

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA



PDE7, NUEVA DIANA TERAPÉUTICA EN ENFERMEDADES  
NEUROLÓGICAS.  
VALIDACIÓN Y DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES

TESIS DOCTORAL DE:

**MIRIAM REDONDO SANCHO**

DIRIGIDA POR:

**CARMEN GIL  
NURIA CAMPILLO**

Madrid, 2013

## **PRÓLOGO**



## Enfermedades Neurológicas

Las enfermedades neurológicas son un conjunto de trastornos que afectan al sistema nervioso. Dentro de éstas, se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, relacionadas con la edad avanzada y que se caracterizan por la muerte de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC) y el consiguiente deterioro funcional de las partes afectadas. En países desarrollados son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad debido al aumento de la esperanza de vida como consecuencia de la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias. Según informes del Eurostat<sup>1</sup> (Centro de documentación de Estadísticas Europeas), en los próximos años se estima una subida espectacular de la esperanza de vida, con una proporción ligeramente superior en mujeres que en hombres (Tabla 1).

**Tabla 1.** Esperanza de vida al nacer (UE-27) en años.

	1960	2009	Prev.2050 <sup>1</sup>
<b>Mujeres</b>	73	82.4	88.6
<b>Hombres</b>	67	76.4	83.7

Según el mismo informe, no sólo se estima un aumento de la esperanza de vida, sino que además, el porcentaje estimado de población de 80 años o más será considerablemente mayor. A la vista de los datos de dicho informe, se estima que en el plazo de unos 40 años la población de la Unión Europea de más de 80 años pasará del 4.6% a un 12.0%, es decir, que la cifra se va a multiplicar por tres veces. Cabe destacar que en países como Alemania o España sus valores se encuentran por encima de la media europea (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentaje de población mayor de 80 años.

	España	Alemania	UE-27 <sup>1</sup>
<b>2010</b>	4.9	5.0	4.6
<b>2060</b>	14.2	13.5	12.0

Debido al incremento de la población anciana, las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en un tema de salud fundamental en los países desarrollados ya que actualmente sólo existen tratamientos sintomáticos para este tipo de enfermedades. Por tanto, encontrar tratamientos eficaces para estas enfermedades es muy importante. De hecho, a principios del año 2012 se ha puesto en marcha una estrategia europea para el

estudio e investigación de enfermedades neurodegenerativas por iniciativa de JPND (*Joint Programming on Neurodegenerative Diseases*)<sup>2</sup>. Aunque en el campo científico se están haciendo grandes avances, todavía se necesita un mayor conocimiento de las causas de estas enfermedades.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una muerte progresiva de las neuronas funcionales en el cerebro, generalmente iniciada por una inflamación, estrés oxidativo y/o excitotoxicidad inicial y una degeneración posterior. Según el tipo de célula afectada y la manifestación clínica que presentan, podemos hablar de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Además de generar una gran discapacidad en los pacientes, suponen un gran gasto debido a la atención social y sanitaria que requieren, los tratamientos farmacológicos, la incapacidad laboral y la carga física y psicológica de los cuidadores. Actualmente se desconoce la etiología, sin embargo, muchos estudios sugieren que algunos factores genéticos, procesos inflamatorios y agentes oxidantes podrían ser causas posibles de su origen<sup>3, 4</sup> (Tabla 3). Enfermedades de este tipo son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple, entre otras.

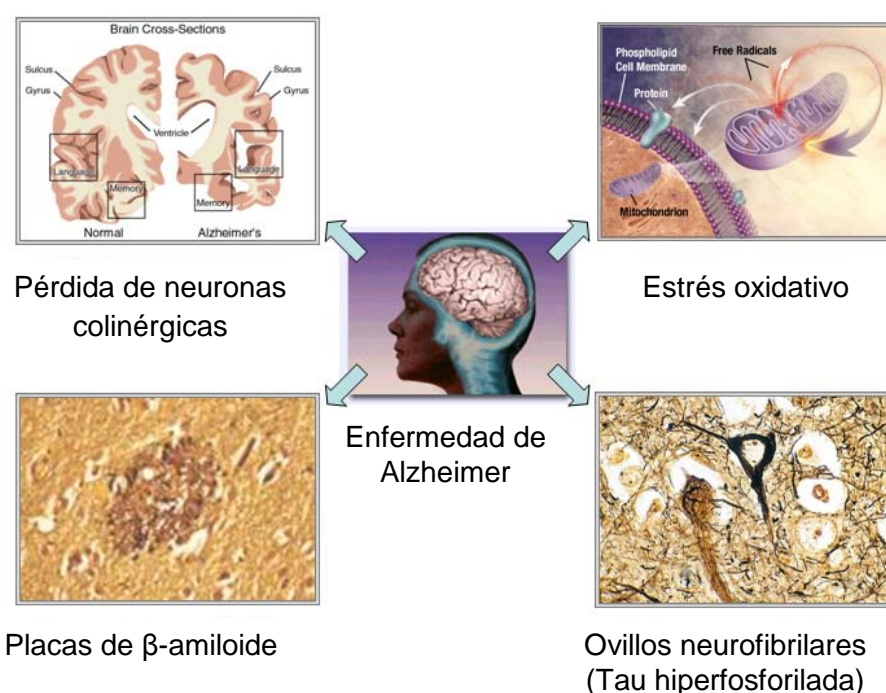
**Tabla 3.** Características de las enfermedades neurodegenerativas más habituales.

	Apoptosis	Excitotoxicidad	Estrés oxidativo	Proteínas tóxicas	Inflamación
Enf. de Alzheimer	+	+	+	+	+
Enf. de Parkinson	+	+	+	+	+
Enf. de Huntington	+	+	+	+	
Esclerosis lat. amiotrófica	+	+	+	+	
Esclerosis múltiple	+	+	+		+

En la actualidad no se conocen biomarcadores sanguíneos que permitan un diagnóstico fácil y rápido de los procesos neurodegenerativos, por lo que se diagnostican en estadios bastante avanzados. Por lo tanto, la posibilidad de disponer de biomarcadores permitiría aplicar un tratamiento farmacológico precoz, reduciendo considerablemente la sintomatología y mejorando la vida del paciente. En resumen, estos procesos constituyen un conjunto de patologías de origen desconocido, afectando generalmente en mayor proporción a la población de avanzada edad. Debido a que se desconocen las causas, su tratamiento es de tipo sintomático y tardío por lo que una vez instaurado, los síntomas se atenúan pero la enfermedad neurodegenerativa progresa. Aunque se considera como tratamiento profiláctico, existen numerosos estudios estadísticos que demuestran que la ingesta de ciertos alimentos o aditivos alimentarios

con propiedades antioxidantes podrían reducir el estrés oxidativo, reduciendo el riesgo de padecer dichas enfermedades neurodegenerativas<sup>5</sup>.

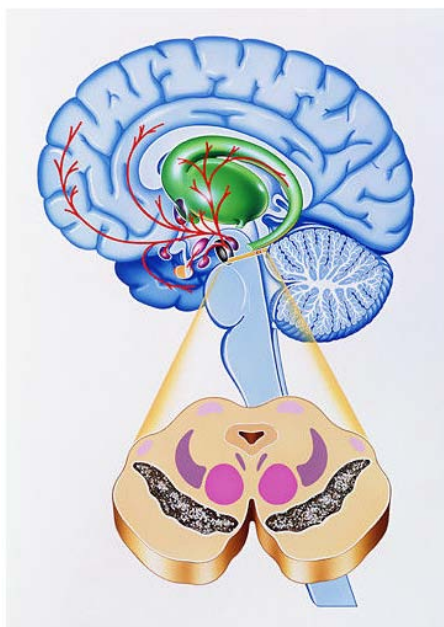
**Enfermedad de Alzheimer.** Es un proceso neurodegenerativo que suele aparecer generalmente a partir de los 65 años, caracterizada por un daño progresivo en las neuronas colinérgicas en ciertas regiones del cerebro como la corteza e hipocampo, observándose un enorme deterioro de las facultades mentales relacionadas con el aprendizaje, memoria y pensamiento (Figura 1).



**Figura 1.** Características generales de la enfermedad de Alzheimer.

Aunque se desconoce la causa exacta, se cree que la existencia de factores de tipo ambiental (estrés oxidativo) o genético<sup>6-8</sup> así como el estilo de vida pueden aumentar el riesgo a padecer dicha enfermedad. Actualmente sólo se puede diagnosticar de forma certera *post mortem* (visualizándose la formación de agregados de β-amiloide y ovillos neurofibrilares<sup>9</sup> en el cerebro de pacientes fallecidos), lo que dificulta enormemente su tratamiento. Existen un gran número de compuestos que se encuentran en estudio, aunque a día de hoy sólo están comercializados cinco fármacos para su tratamiento, cuatro son inhibidores de la acetilcolinesterasa (tacrina<sup>10</sup>, donepezilo<sup>11</sup>, galantamina<sup>12</sup> y rivastigmina<sup>13</sup>) y otro es un antagonista de la recaptación de glutamato (memantina<sup>14</sup>).

**Enfermedad de Parkinson.** Esta enfermedad neurodegenerativa que suele manifestarse generalmente a partir de los 60 años, se caracteriza por un daño en las neuronas dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia negra, formándose agregados moleculares de  $\alpha$ -sinucleína (Figura 2)<sup>15</sup>.



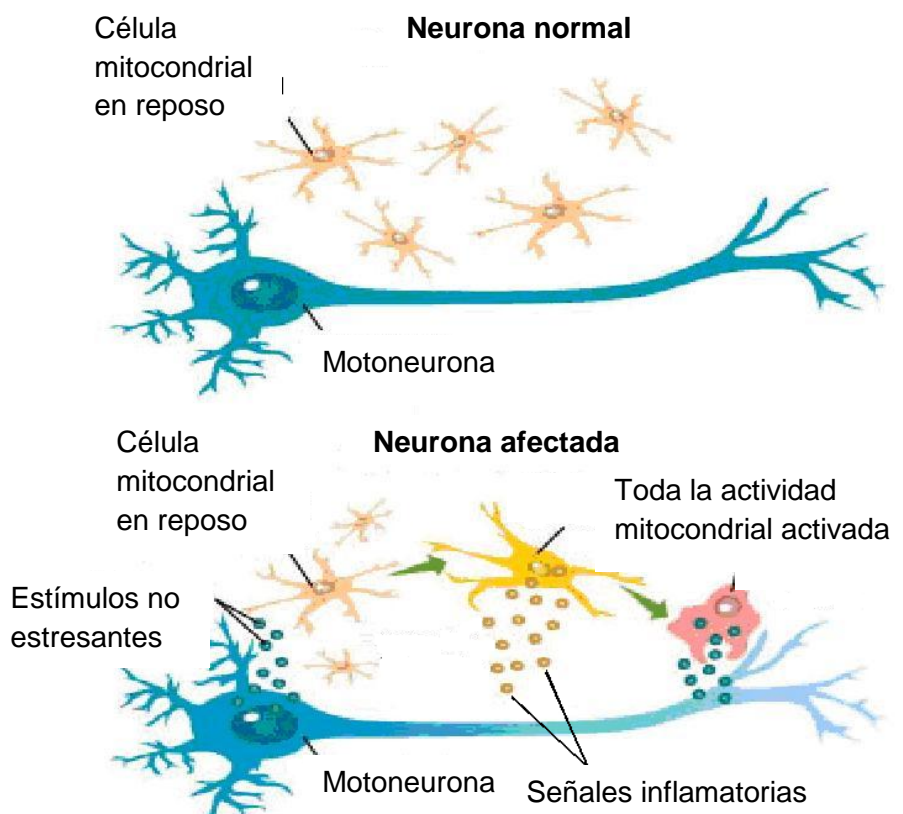
**Figura 2.** Áreas afectadas en la enfermedad de Parkinson.

Los pacientes con Parkinson presentan temblor en extremidades inferiores y superiores, rigidez, lentitud y descoordinación de los movimientos motores. A medida que la enfermedad progresa, los síntomas se acentúan impidiendo realizar actividades tan cotidianas como caminar, entre otras. Aunque la etiología se desconoce, algunos estudios apuntan a que determinados virus y pesticidas podrían influir en el desarrollo de la misma<sup>16, 17</sup>. Actualmente el diagnóstico se determina en función de las manifestaciones clínicas descartando otras patologías similares. En la actualidad, existen comercializados diferentes fármacos para paliar los síntomas que reemplazan la pérdida de dopamina: el precursor de dopamina (*L*-dopa), inhibidores de la monoaminoxidasa-B (MAO-B), inhibidores de la catecol O-metiltransferasa (COMT), amantadina y anticolinérgicos<sup>18</sup>. Todos estos fármacos mejoran síntomas clínicos como la acinesia (dificultad para iniciar un movimiento) y los trastornos posturales pero presentan a menudo efectos adversos incapacitantes como la discinesia (movimientos anormales e involuntarios).

**Enfermedad de Huntington.** Esta enfermedad de causa hereditaria (afectación del cromosoma 4) afecta tanto a personas jóvenes (incluso antes de los 20 años) como a personas de edad más avanzada y se caracteriza por diversos trastornos del movimiento, los más habituales son la corea y el parkinsonismo, además de trastornos cognitivos y de la conducta (psicosis, agresividad) debido a la afectación celular del núcleo caudado<sup>19</sup>. Actualmente algunos estudios sugieren que el mecanismo de la neurodegeneración podría estar relacionado con la acumulación de la proteína huntingtina mutada en la zona perinuclear de las neuronas<sup>19</sup>, ya que la localización habitual de la huntingtina natural es el citoplasma de las neuronas del estriado y de la corteza cerebral. Los trastornos de la conducta son tratados con neurolépticos atípicos mientras que los trastornos del movimiento son tratados con agonistas dopaminérgicos. En 1995, un estudio demostró que el riluzol había sido utilizado con éxito en modelos de lesión estriatal por ácido quinolínico<sup>20</sup>. Sin embargo, estudios clínicos posteriores indicaron que el riluzol no mostraba eficacia neuroprotectora en comparación con el placebo<sup>21</sup>.

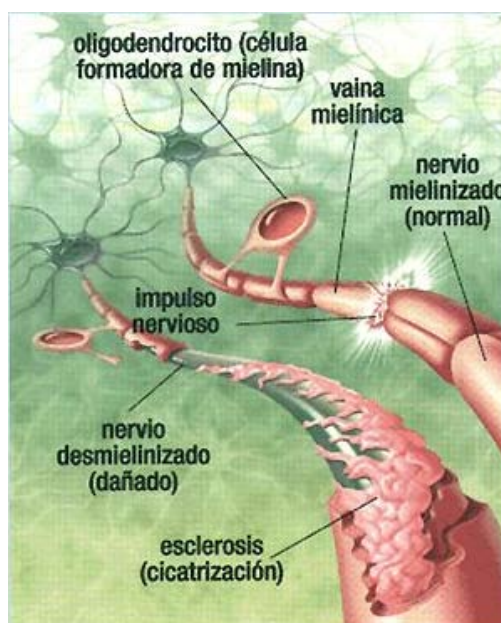
**Esclerosis lateral amiotrófica.** Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a las motoneuronas sin afectar a las funciones cerebrales hasta que se produce la muerte del individuo por parálisis de los músculos respiratorios. Sólo un 10% de los pacientes presenta la enfermedad por una alteración genética (FUS/TLS y TDP-43)<sup>22</sup>, el resto de los casos son de causa desconocida. Recientemente, se ha publicado un estudio donde se propone que un fallo en el proceso metabólico de la proteína ubiquitina 2 (presente en todos los casos) podría ser el desencadenante de la enfermedad<sup>23</sup> (Figura 3).

Aunque suele aparecer a partir de los 50 años, también puede manifestarse durante la juventud. Dentro de los síntomas clínicos se encuentran espasmos, debilitamiento y atrofia muscular, dificultades para la deglución o respiración e incapacidad de mover los miembros inferiores y superiores<sup>24</sup>. En la actualidad, se emplea el riluzol, cuyo modo de acción parece estar relacionado con la inhibición de la liberación de glutamato<sup>25</sup> y el dexamipexol actualmente en Fase III que basa su mecanismo de acción en mejorar la función mitocondrial y evitar por tanto, el estrés oxidativo neuronal<sup>26</sup>.



**Figura 3.** Afectación neuronal en la esclerosis lateral amiotrófica.

**Esclerosis múltiple.** Existe una gran controversia sobre como clasificar esta enfermedad. Actualmente, la esclerosis múltiple se considera una enfermedad autoinmune con características neurodegenerativas que se manifiesta en personas de mediana edad (entre 20 y 40 años). Esta enfermedad se caracteriza por una desmielinización de las neuronas del cerebro, tronco del encéfalo y médula espinal (Figura 4). En las primeras etapas de la enfermedad aparecen las primeras alteraciones de la visión. Posteriormente, se manifiestan algunos trastornos como debilidad y rigidez muscular, falta de coordinación motora e incluso ausencia de control de la vejiga, dolor o fatiga<sup>27</sup>. Durante años se empleó el interferón- $\beta$  como inmunomodulador para reducir la duración de los brotes, pero presenta como desventaja principal su elevado coste y la necesidad de administración vía intramuscular<sup>28</sup> además de potenciales efectos adversos que deben ser controlados por un neurólogo. Recientemente, se ha aprobado para su uso clínico el fingolimod (FTY720), un inhibidor de la esfingosina-1-fosfatasa de administración oral<sup>29, 30</sup>, que sin embargo tampoco está exento de efectos adversos.



**Figura 4.** Pérdida de la vaina de mielina en la esclerosis múltiple.

### **Perspectivas**

Como se ha comentado anteriormente, cualquier aproximación farmacológica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas que se plantee presenta dos inconvenientes principales: a) las causas primarias de este tipo de enfermedades no están totalmente definidas y b) la ausencia de un diagnóstico precoz en las fases asintomáticas, ya que el tratamiento será mucho más eficaz cuanto más tempranamente se aplique. Por ello, con el fin de desarrollar un tratamiento eficaz es necesario ampliar el conocimiento de las causas desencadenantes de los daños celulares que se producen en cada una de ellas. Dado que una de las características comunes de estas enfermedades es la presencia de un daño celular producido por una inflamación inicial, el tratamiento podría basarse en la actuación frente a la neuroinflamación existente o bien, en su prevención (tratamiento neuroprotector)<sup>31, 32</sup>.





## **INTRODUCCIÓN**

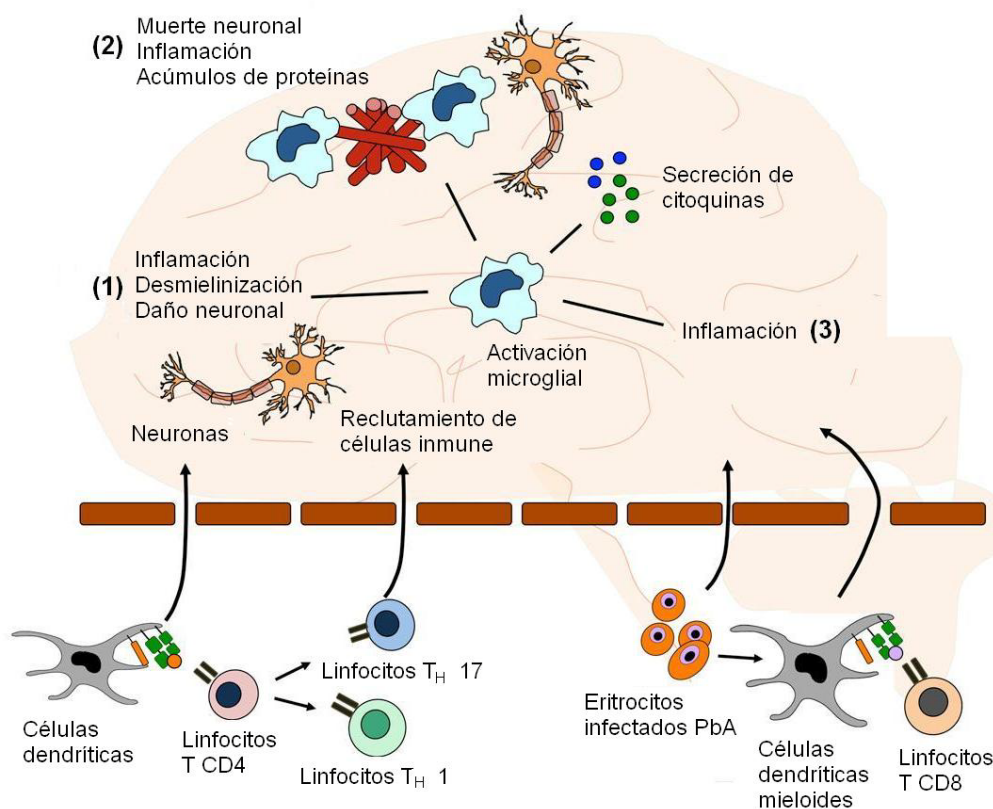




## 1. NEUROINFLAMACIÓN Y FOSFODIESTERASAS

### 1.1. NEUROINFLAMACIÓN

La neuroinflamación representa una respuesta celular coordinada a un daño tisular, considerándose como uno de los principales factores implicados en la patología de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer<sup>33</sup>, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis múltiple<sup>34</sup>. El proceso de neuroinflamación se puede desglosar en dos componentes, uno celular y otro humoral (Figura 5). Los principales elementos celulares que intervienen en la neuroinflamación son i) astroglia, ii) barrera hematoencefálica (BHE), iii) microglia y iv) linfocitos T. Respecto al componente humoral, los principales elementos son: i) citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ), ii) quimiocinas, iii) óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species* o ROS).



**Figura 5.** Neuroinflamación en el sistema nervioso central (SNC).

Una de las células más abundantes de la corteza cerebral, en torno al 50%, son los astrocitos. Éstas células juegan un papel muy importante en el funcionamiento del SNC ya que entre sus numerosas funciones, se encuentran la aportación de nutrientes al

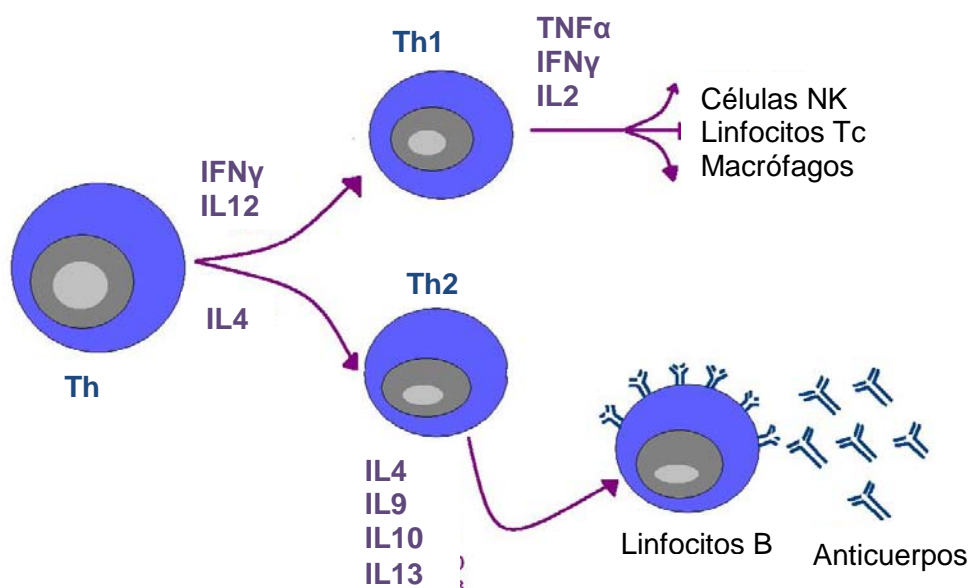
entorno extracelular así como la prevención de la entrada de sustancias tóxicas a través de la BHE<sup>35</sup>. Además, los astrocitos regulan las actividades sinápticas, manteniendo una concentración adecuada de potasio en el espacio extracelular neuronal así como recaptando los neurotransmisores después de su liberación<sup>36</sup>.

Por otro lado, se encuentran las células de microglía que se consideran como los macrófagos del SNC, modulando la inflamación mediante su influencia sobre astrocitos y neuronas. Cuando la microglía no se encuentra activada, se producen factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (*Nerve growth factor* o NGF), factor de crecimiento derivado de glía (*Glial cell line-derived neurotrophic factor* o GDNF), factor de crecimiento derivado de cerebro (*Brain derived neurotrophic factor* o BDNF) y la neurotrofina-4 (NT-4) así como agentes antiinflamatorios como la IL-10<sup>37</sup>.

Ante un estímulo inflamatorio la microglía, que se encuentra altamente distribuida por el cerebro, responde rápidamente liberando citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  que inducen la liberación de ROS y NOS (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, respectivamente) conduciendo a la muerte neuronal. A su vez, debido a la neurodegeneración producida se generan activadores microgliales que continúan activando el estímulo pro-inflamatorio. Con el fin de evitar una respuesta inflamatoria excesiva, neuronas y astrocitos modulan la actividad microglial, liberando citocinas anti-inflamatorias<sup>37</sup> tales como IL-4, IL-11 e IL-13. El sistema inmune de nuestro organismo está formado por diferentes células, entre ellas, se encuentran los linfocitos que se clasifican según su función. Los linfocitos B son aquellos que se encargan fundamentalmente de producir anticuerpos específicos frente a un determinado estímulo antigénico. Los linfocitos T son los encargados de modular la respuesta inmune (linfocitos *T helper* o Th) y de destruir los elementos reconocidos por los anticuerpos específicos (linfocitos *T citotóxico* o Tc). Durante el proceso inflamatorio, se produce un infiltrado celular de linfocitos T y B, células dentríticas y monocitos<sup>38</sup>.

A su vez, los linfocitos Th infiltrados en presencia del estímulo antigénico se diferenciarán a los subtipos celulares Th1 o Th2 segregando diferentes tipos de citocinas<sup>39</sup>. Los linfocitos Th1 segregan citocinas pro-inflamatorias como IL-2, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  provocando la activación de los macrófagos, linfocitos T citotóxicos y células NK (*Natural Killer*) con el fin de fagocitar las células dañadas (respuesta inmune celular). Por otra parte, los linfocitos Th2 segregan las citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-9, IL-10 o IL-13) favoreciendo la proliferación y diferenciación de los linfocitos B (respuesta inmune humoral). Es decir, la respuesta inmune debida a un estímulo está regulada mediante el equilibrio entre las citocinas liberadas por los linfocitos Th1 y Th2 (Figura 6). Generalmente, estas vías son contrapuestas, de modo que una de las vías resulta

protectora frente al daño, mientras que la otra ruta favorece la progresión de la inflamación.



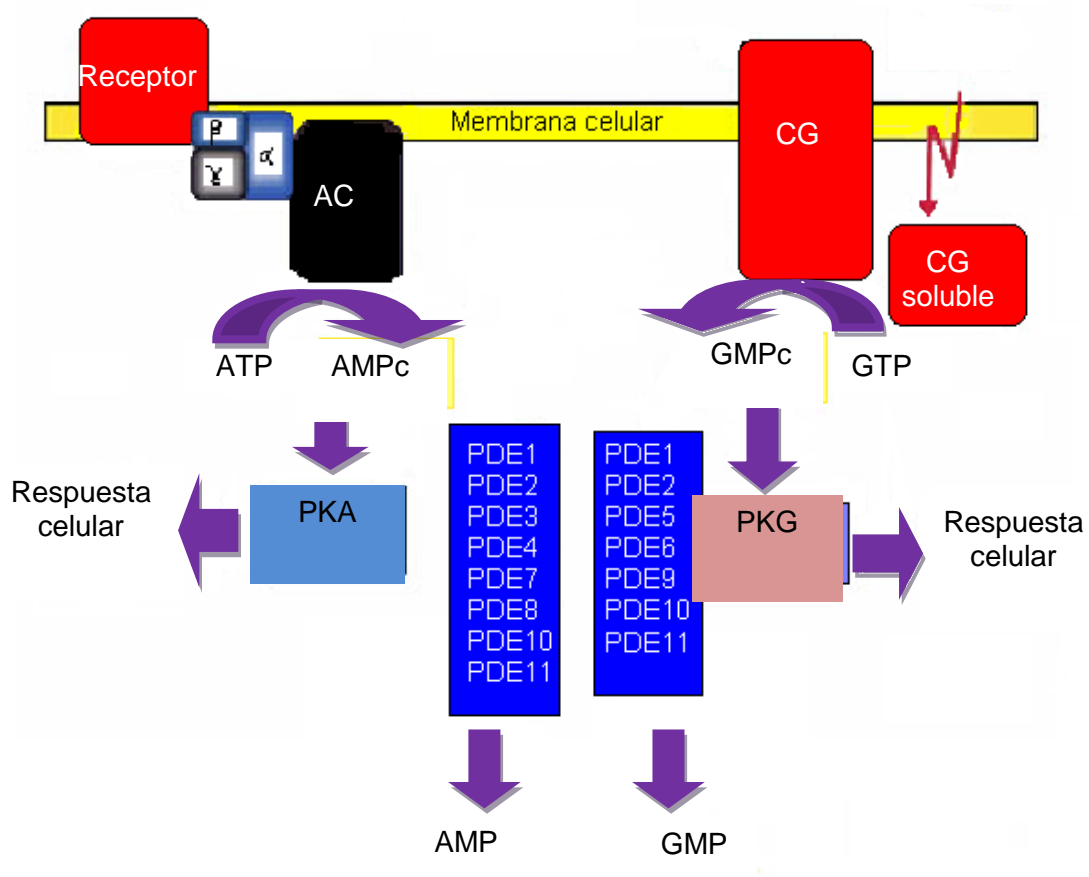
**Figura 6.** Diferenciación de células Th1 y Th2.

En casos patológicos como el caso de las enfermedades neurodegenerativas se ha observado que existe un desequilibrio favorecido hacia los linfocitos Th1, estimulando de forma excesiva la respuesta inmune. Es decir, se produce una neuroinflamación descontrolada de manera que los mecanismos de reparación no son suficientes para reparar el daño producido. Además, se ha observado que la actividad moduladora de las neuronas y astrocitos disminuye. De manera que la respuesta pro-inflamatoria de la microglía no se suprime, causando alteraciones en la homeostasis de los procesos de señalización celular<sup>37</sup>. Es conocido que en tales caso patológicos, los linfocitos Th1 tienen un papel importante en la alteración de la permeabilidad de la BHE mediante la liberación de mediadores celulares<sup>38</sup>. Como consecuencia del daño de la barrera, se produce una inflamación local que causa las manifestaciones clínicas típicas de las enfermedades inflamatorias como la desmielinización de los axones neuronales en la esclerosis múltiple o destrucción del cartílago en el caso de la artritis reumatoide. Es decir, una adecuada activación de los linfocitos T es fundamental para defender nuestro organismo frente a la presencia de agentes patógenos, mientras que una respuesta exagerada conduce a desequilibrios responsables de diversas patologías<sup>40</sup>.

La activación de los linfocitos T viene dada por un aumento de la concentración citosólica de los nucleótidos cíclicos correspondientes: 3',5'-monofosfato de adenosina

cíclico (AMPc) y 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), segundos mensajeros implicados en la transducción de señales intracelulares, controlando la acción de hormonas, neurotransmisores y otros mecanismos<sup>41</sup>.

El AMPc es un segundo mensajero implicado en numerosos procesos biológicos de transducción de señales. Su acción se debe a su capacidad de unión a proteínas reguladoras como la proteína quinasa A (PKA), regulando la fosforilación de otras proteínas. Se sabe que la PKA se activa en presencia de cuatro unidades de AMPc en sus unidades reguladoras, lo que causa que las unidades catalíticas se liberen y ejerzan su acción<sup>42</sup>. Entre sus numerosas acciones, se encuentra su capacidad para regular la expresión de proteínas antiinflamatorias. Es por ello que los niveles citosólicos de AMPc están relacionados con la regulación del sistema inmune e inflamatorio, entre otros procesos biológicos (Figura 7).



**Figura 7.** Señalización celular vía AMPc/GMPc.

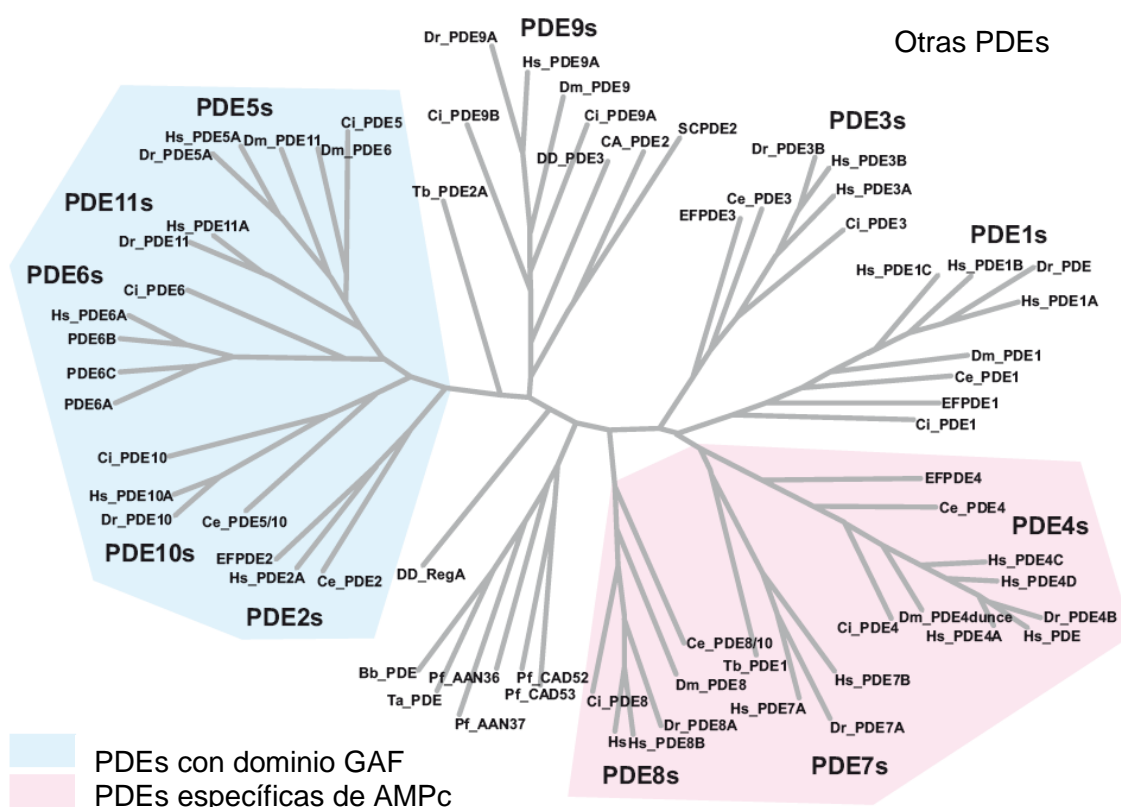
La concentración citosólica de los nucleótidos cíclicos está regulada por un equilibrio entre su síntesis a partir de trifosfato de adenosina (ATP) o de guanosina (GTP) por las enzimas adenilato (AC) o guanilato (GC) ciclasas y su degradación mediada por las fosfodiesterasas (PDEs). Por lo tanto, existirían dos vías diferentes de aumentar los niveles de los nucleótidos, una de ellas es mediante la activación de su correspondiente ciclasa. Sin embargo, se ha observado que no presenta un efecto significativo en la respuesta inmune<sup>43</sup>. Otra vía sería la inactivación de su degradación mediante la inhibición de la familia de las fosfodiesterasas (PDEs) (Figura 7). Teniendo en cuenta que varios estudios han demostrado que el aumento en concreto de los niveles citosólicos del AMPc suprime la liberación de citocinas pro-inflamatorias por parte de los linfocitos Th1<sup>44</sup>, un aumento de AMPc podría suponer una alternativa en el tratamiento de las enfermedades que presentan alteraciones del sistema inmune tales como el asma o la esclerosis múltiple<sup>45</sup> y también en enfermedades donde se produce neuroinflamación. Por ello, la inhibición de las diferentes PDEs traería consigo un aumento de los niveles de nucleótidos cíclicos siendo de gran utilidad terapéutica<sup>46</sup> como agentes antiinflamatorios, antiasmáticos, vasodilatadores, relajantes del músculo liso, cardiotónicos, antidepresivos, antitrombóticos y así como agentes para la mejora de la cognición y la memoria<sup>47</sup>.

## 1.2. FOSFODIESTERASAS

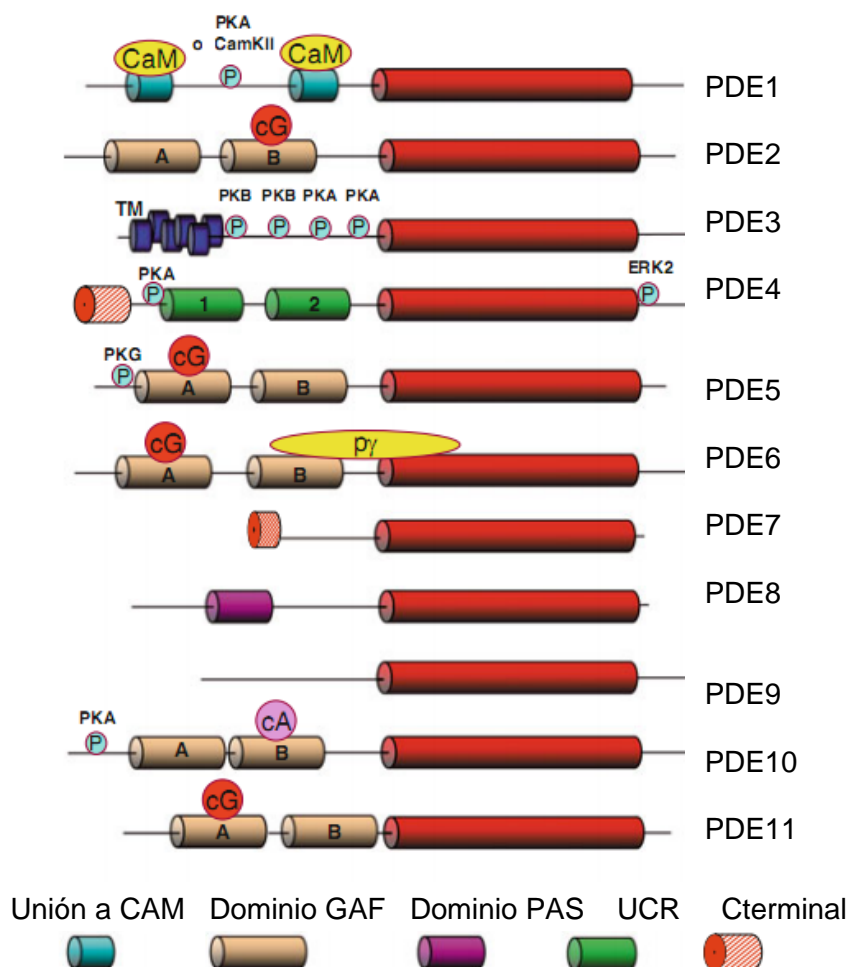
Las fosfodiesterasas (PDEs) son una superfamilia de metaloproteínas que hidrolizan el AMPc y GMPc transformándolas en sus formas inactivas 5'-monofosfato de adenosina (5'-AMP) y 5'-monofosfato de guanosina (5'-GMP) respectivamente. En la actualidad, existen 11 subfamilias descritas de PDEs que a su vez, presentan diferentes isoenzimas. Además, muestran diferente especificidad frente a AMPc y GMPc así como diferente distribución tisular (Tabla 4)<sup>48</sup>.

Las PDEs de mamífero presentan una organización estructural muy conservada y están formadas por el dominio catalítico, el dominio PAS próximo al extremo C-terminal, la región espaciadora y los dominios reguladores próximos al extremo N-terminal (Figura 8). Dentro de cada subfamilia, existen residuos muy conservados en la zona catalítica que guardan relación con la especificidad por el sustrato (AMPc o GMPc) permitiendo el diseño de inhibidores selectivos<sup>47, 49</sup>.

**Tabla 4.** Especificidad y distribución tisular de la superfamilia de PDEs<sup>48, 50</sup>.



	Sustrato	Inhibidor	Distribución tisular
<b>PDE1</b>	AMPc,GMPc	Vinpocetina, IC224, IC295, IC86340	Corazón, cerebro, pulmón, páncreas y músculo liso
<b>PDE2</b>	AMPc,GMPc	BAY-607550, IC933, oxindol, PDP, ND7001	Glándulas suprarrenales, cerebro, corazón, pulmón e hígado
<b>PDE3</b>	AMPc,GMPc	Cilostazol, cilostamida,milrinona, CI930, siguazodan	Corazón, páncreas, pulmón, hígado y tejido adiposo
<b>PDE4</b>	AMPc	Rolipram	Riñón, cerebro, hígado y pulmón
<b>PDE5</b>	GMPc	Sildenafil, tadalafil, vardenafilo	Cerebro, pulmón y músculo liso
<b>PDE6</b>	GMPc	-	Fotorreceptores y glándula pineal
<b>PDE7</b>	AMPc	BRL-50481, ASB16165	Músculo esquelético, corazón, riñón, linfocitos T, cerebro y páncreas
<b>PDE8</b>	AMPc	PF049573225	Ojos, hígado, músculo esquelético, corazón, riñón, ovario y cerebro
<b>PDE9</b>	GMPc	BAY-736691	Riñón, hígado, pulmón y cerebro
<b>PDE10</b>	AMPc,GMPc	MP10, TP10, papaverina	Cerebro, tiroides y páncreas
<b>PDE11</b>	AMPc,GMPc	Tadalafilo	Músculo esquelético, próstata, riñón, hígado, corazón, glándulas pituitaria y salivares



**Figura 8.** Dominios de las 11 familias de PDEs<sup>51</sup> en mamíferos.

**PDE1** presenta tres isoenzimas diferentes: PDE1A, PDE1B y PDE1C. Su característica fundamental es la posibilidad de unión al complejo  $Ca^{2+}$ / calmodulina modulando vías de señalización entre los nucleótidos AMPc, GMPc y el  $Ca^{2+}$ . Únicamente PDE1B se encuentra en el SNC. En concreto, se expresa principalmente en el estriado y en menor proporción en la corteza cerebral e hipocampo<sup>52</sup> (presenta un patrón de distribución similar a PDE10A<sup>53</sup>).

**PDE2** se expresa principalmente en corteza, hipocampo y estriado<sup>52, 53</sup>. La inhibición de PDE2 es especialmente relevante para incrementar los niveles de ambos nucleótidos pero sobretodo, los niveles de GMPc<sup>54</sup>. El inhibidor selectivo BAY-607550 muestra un incremento de los niveles de AMPc como de GMPc, aumentando la capacidad de aprendizaje y la memoria *in vivo*<sup>55</sup>.

**PDE3** es una fosfodiesterasa inespecífica frente a AMPc y GMPc, cuyos inhibidores presentan diferentes aplicaciones terapéuticas como el tratamiento de la claudicación intermitente<sup>56</sup> o su uso como antiplaquetario<sup>57</sup> o anticonceptivo<sup>58</sup>, entre otros. Así, el

cilostazol se ha visto que reduce la muerte celular tras un infarto cerebral y que además promueve la supervivencia de las células ganglionares de la retina axotomizadas<sup>59</sup>. Recientemente, se ha observado que un inhibidor dual PDE3/PDE4 (KCA-1490) muestra un efecto antiinflamatorio en procesos de broncoconstricción inducidos por histamina<sup>60</sup>. Sin embargo, el uso de inhibidores de PDE3 presenta como limitación principal posibles efectos cardiotóxicos<sup>61, 62</sup>.

**PDE4** es una de las fosfodiesterasas más estudiadas en la literatura. Presenta cuatro isoenzimas, de las cuales tres de ellas (PDE4A, PDE4B, PDE4D) se expresan en el SNC<sup>63</sup>. Se sabe que PDE4 es una de las familias más implicada en los procesos de regulación del AMPc interviniendo en los procesos de aprendizaje, consolidación y retención de memoria a largo plazo<sup>64, 65</sup>. Inhibidores como MK-0952 representan una buena aproximación para el tratamiento de trastornos en la memoria<sup>66, 67</sup>, mientras que otros inhibidores de PDE4 pueden ser una buena aproximación para el tratamiento de psicosis debidas al síndrome de abstinencia por anfetaminas<sup>68</sup>. Rolipram<sup>65</sup> es un inhibidor selectivo de PDE4 con eficacia en enfermedades antiinflamatorias<sup>69, 70</sup> así como en diversas enfermedades del SNC<sup>71, 72</sup>. Este inhibidor se emplea habitualmente como patrón en estudios experimentales y teóricos con el objetivo de conocer en mayor profundidad las cascadas de señalización. Aunque existen numerosos estudios que indican que los inhibidores de PDE4 poseen un gran potencial para el tratamiento de diversas enfermedades en el SNC, presentan como importante limitación la aparición de náuseas y vómitos dosis dependiente. Algunos estudios sugieren que la conformación catalíticamente activa de la isoenzima PDE4D<sup>73</sup> con gran afinidad por rolipram es la responsable de los efectos eméticos<sup>74</sup> mientras que la inhibición de PDE4B permite obtener únicamente el efecto terapéutico sin efectos secundarios. Recientemente, se ha aprobado el uso de un inhibidor de PDE4, roflumilast, para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>75</sup>.

**PDE5** se expresa en pulmón, músculo liso y cerebro (células de Purkinje, hipocampo y corteza<sup>52</sup>). Sus inhibidores, sildenafil, vardenafil y tadalafilo, inicialmente fueron comercializados para el tratamiento de la disfunción eréctil y de la hipertensión arterial pulmonar. Recientemente, algunos estudios han mostrado que dichos inhibidores presentan mejoras en la función cognitiva así como mejoras en la consolidación de la memoria<sup>76</sup>.

**PDE6** está expresada fundamentalmente en la retina (fotoreceptores tipo cono y bastones). Su activación provoca la hidrólisis de GMPc, cerrando los canales de Na<sup>+</sup> generándose la hiperpolarización de dichos receptores. Como consecuencia, los estímulos visuales se transmiten a la neurona postsináptica<sup>77</sup>. Por el contrario, su inhibición puede provocar anomalías en los procesos visuales<sup>78</sup>.

**PDE7** es una fosfodiesterasa específica para AMPc e insensible a Rolipram que se expresa en distintas zonas del cerebro, además de en linfocitos<sup>79</sup>. El dominio catalítico de PDE7 (residuos 130-482) fue cristalizado en presencia del inhibidor no selectivo IBMX<sup>80</sup> así como en presencia de un inhibidor derivado de tioxoquinazolina<sup>81</sup>. Cabe destacar que el dominio catalítico de PDE7A posee una estructura tridimensional muy similar a PDE4D cuando se superpone el esqueleto proteico de PDE7 (residuos 139-455) sobre los residuos equivalentes en PDE4. Sin embargo, existe un desplazamiento de la  $\alpha$ -hélice 11 de PDE7, lo que le otorga una ligera diferencia en la conformación espacial al comparar con PDE4<sup>82</sup>. El desarrollo de inhibidores de PDE7 ha permitido el inicio del estudio de su fisiología y patología<sup>83, 84</sup>. La subfamilia PDE7 presenta dos isoenzimas: PDE7A que se encuentra mayoritariamente en el sistema inmune, pulmón, corazón, riñón y músculo esquelético<sup>85-87</sup> y PDE7B que se encuentra mayoritariamente en cerebro aunque también puede aparecer en otras zonas como páncreas, corazón y músculo esquelético<sup>88-90</sup>. Ambas isoformas presentan una identidad entorno al 70% por lo que el diseño de inhibidores selectivos frente a una u otra isoforma es difícil<sup>89</sup>. Se ha podido observar que el inhibidor selectivo de PDE7, BRL-50481<sup>91</sup>, presenta un efecto sinérgico con rolipram (inhibidor de PDE4) sobre la elevación de los niveles de AMPc<sup>92</sup>.

**PDE8** es una fosfodiesterasa de las descritas más recientemente, por lo que el conocimiento de su distribución y expresión en el SNC no está todavía claro<sup>93</sup>. Recientemente, se han descrito los primeros inhibidores de esta enzima obtenidos por cribado de alto rendimiento (*HTS-high throughput screening*)<sup>94</sup>. Se ha visto que pacientes con la enfermedad de Alzheimer en estadios avanzados presentan un aumento de la expresión de PDE8 en el hipocampo, además sus inhibidores han mostrado ser útiles en el tratamiento de la esquizofrenia<sup>95</sup>.

**PDE9** es específica de GMPc y se expresa fundamentalmente en el hipocampo. Recientemente, Merk&Co ha descrito que el inhibidor PF-04447943 muestra efectos beneficiosos similares al donepezilo para el tratamiento del Alzheimer<sup>96</sup>. Además, otro inhibidor selectivo de PDE9, BAY-73-6691<sup>97</sup> muestra mejores efectos en cuanto al aprendizaje y memoria que el tratamiento convencional con donepezilo.

**PDE10** se expresa en una gran variedad de zonas en el SNC tales como el estriado, el hipocampo o la corteza cerebral<sup>98</sup>. El inhibidor MP10 se encuentra en fase clínica para el tratamiento de esquizofrenia<sup>95, 99</sup> y carece de los efectos no deseados de los antipsicóticos clásicos debido a que mimetiza el antagonismo dopaminérgico D2 y glutamatérgico<sup>100</sup>. Además, otros inhibidores de PDE10 han mostrado eficacia como antiinflamatorio en el tratamiento de la hipertensión pulmonar<sup>101</sup>. Recientemente, se ha visto que la inhibición prolongada en el tiempo de PDE10A produce cambios en la expresión génica en diversas proteínas implicadas en la excitabilidad del estriado<sup>102</sup>.

**PDE11** es una de las últimas fosfodiesterasas descritas<sup>103</sup>. Actualmente, se sabe que el dominio regulatorio GAF<sup>104</sup> es fundamental para su actividad biológica. Inhibidores selectivos de esta enzima ponen de manifiesto su importancia en la regulación de la producción de cortisol por parte de las células adrenales, fundamental en enfermedades endocrinas como la enfermedad de Cushing<sup>105</sup>.

### 1.3. INHIBIDORES DE PDE7

Dado que varias PDEs se expresan en el SNC<sup>106</sup> y en algunas patologías existe un aumento de su función, los inhibidores de PDEs podrían considerarse como fármacos prometedores para el tratamiento de enfermedades psíquicas y neurodegenerativas<sup>59, 107, 108</sup>. En concreto, se encuentran PDE4, PDE7 y PDE8 (específicas de AMPc), PDE9 (específica de GMPc) y PDE1, PDE2 y PDE10 con afinidad por ambos sustratos.

En esta memoria se ha seleccionado PDE7 como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas debido a su expresión en el SNC así como en los linfocitos T<sup>79</sup>, por lo tanto, su inhibición podría ser fundamental para modular el proceso de neuroinflamación que tiene lugar en este tipo de enfermedades, regulando los niveles de AMPc.

Los primeros inhibidores de PDE7 descritos en la bibliografía pertenecen a la familia de las benzotiadiazinas<sup>109</sup>, y fueron desarrollados en nuestro grupo de investigación. Posteriormente, surgieron nuevos compuestos pertenecientes a familias químicamente diversas (Figura 9).

#### Derivados de benzotiadiazina

A esta familia pertenecen los primeros compuestos heterocíclicos descritos con actividad inhibitoria frente a PDE7, y por tanto, con aplicación en enfermedades inflamatorias y autoinmunes<sup>109</sup>. Su actividad se encuentra en el rango micromolar (8-25  $\mu$ M). Con el fin de estudiar aquellos requisitos estructurales capaces de mejorar tanto la actividad biológica como su selectividad, se llevó a cabo un modelo CoMFA (*comparative molecular field analysis*) en el que se analizaron las interacciones estéricas y electrostáticas de estos derivados que eran importantes para la actividad<sup>110</sup>.

**Figura 9.** Familias de inhibidores de PDE7.

### **Derivados de guanina**

Estos derivados, desarrollados por Celltech R&D, presentan una actividad frente a PDE7 en el rango micromolar y una ausencia de actividad frente a PDE3 y PDE4. Su diseño está basado en la sustitución bioisómera del anillo de guanina por uno de adenosina con el objetivo de emular la unión del sustrato AMPc a la enzima<sup>111</sup>.

### **Derivados de sulfonamida**

Son inhibidores muy selectivos y con actividades por debajo del rango micromolar descritos por Celltech<sup>112, 113</sup> y SmithKline Beecham<sup>114</sup>. A esta familia pertenece el compuesto BRL-50481, descrito en 2004<sup>91</sup> que se caracteriza por presentar una actividad en el rango nanomolar y buena selectividad en ensayos *in vitro* (Figura 10).

Por otra parte, BRL-50481 es capaz de reducir la producción de TNF $\alpha$  por parte de los monocitos y macrófagos sanguíneos, presentando un efecto sinérgico con rolipram. Además, la administración de dicho inhibidor a ratones mejora la mineralización ósea comparándose con otros tratamientos. Estos resultados ponen de manifiesto que los inhibidores de PDE7 son útiles en la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos<sup>115</sup>. BRL-50481 actualmente se emplea como herramienta farmacológica en el estudio de PDE7.

**Figura 10.** Estructura del inhibidor de PDE7 BRL-50481.

#### **Derivados de 1,3,4-tiadiazol**

Estos derivados heterocíclicos son capaces de inhibir PDE7 de manera selectiva en el rango micromolar. Fueron descubiertos por Warner-Lambert mediante técnicas de cribado de alto rendimiento (*High throughput screening* o HTS). Posteriormente, estos inhibidores fueron modificados con el objetivo de mejorar su farmacocinética (biodisponibilidad oral y aclaramiento renal) así como su estabilidad metabólica<sup>116, 117</sup>. Los compuestos presentaban dos posibles sitios susceptibles de ser metabolizados como la oxidación del anillo ciclohexilo (aclaramiento renal) y la hidrólisis del grupo amida (aclaramiento extrahepático). Tras diversas modificaciones, se obtuvo el derivado PF0332040, como un inhibidor selectivo de PDE7 con propiedades antiinflamatorias *in vitro* (Figura 11).

**Figura 11.** Estructura del inhibidor de PDE7 PF0332040.

### **Derivados de espiroquinazolina**

Son compuestos desarrollados por Warner-Lambert y Pfizer con valores de inhibición entre 0.004 y 19  $\mu\text{M}$ , obteniéndose mayores valores cuando en la posición 6 se encuentra un grupo arilo o heteroarilo<sup>118-122</sup>. Además, estudios relación estructura-actividad muestran que un átomo de cloro en posición 8 tiene gran relevancia para mantener la actividad biológica. Los derivados optimizados presentaron además cierta selectividad frente a PDE7A, PDE3A, PDE4D y PDE5, así como mejores propiedades tipo fármaco. Estos derivados fueron reivindicados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes así como en el tratamiento del dolor neuropático<sup>123, 124</sup>.

### **Derivados de tieno [2,3-c]pirazol**

Dentro de esta familia se encuentra el inhibidor ASB16165 con un anillo de pirazol en su estructura. Presenta una actividad en el rango nanomolar, demostrando su potencial uso en el tratamiento de desórdenes inmunes, ya que suprime la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los linfocitos T dependiente de AMPc/ PKA (Figura 12)<sup>125</sup>. Por otra parte, en estudios recientes se ha demostrado el papel que juegan los inhibidores de PDE7 en la proliferación de los keratinocitos epidérmicos, fundamental en enfermedades crónicas de la piel como la psoriasis<sup>126</sup>.

**Figura 12.** Estructura del inhibidor de PDE7 ASB16165<sup>127</sup>.

### **Derivados de pirimidina**

Estos derivados presentan una actividad en el rango nanomolar así como propiedades biofarmacéuticas adecuadas. Mediante estudios QSAR, se han realizado modificaciones con el objetivo de reducir la interacción con otras PDEs. Además, aquellos derivados con mayor actividad mostraron una inhibición en la proliferación de los linfocitos T, aunque no se sabe si está relacionado con la inhibición enzimática, ya

que las diferencias en la proliferación son mínimas en los animales *wild type* y los animales *PDE7 knockout*<sup>128</sup>. Los derivados de 4-aminotieno[2,3-*d*]pirimidina-6-carbonitrilo fueron reivindicados por Almirall Prodesfarma<sup>129</sup> como potentes inhibidores de PDE7, útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Todos los ejemplos presentan valores de concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) entre 1 y 10  $\mu\text{M}$ <sup>128</sup>.

### **Derivados de tioxoquinazolina**

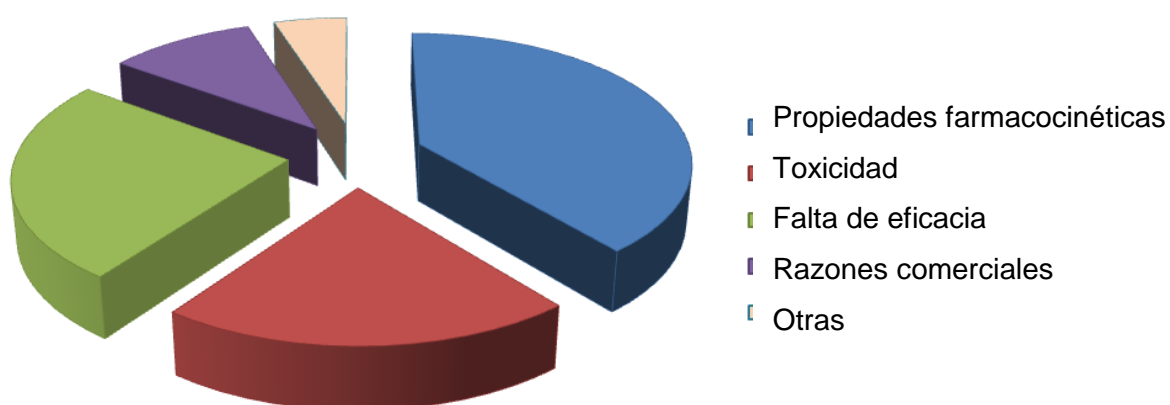
Empleando técnicas de cribado virtual de ligandos por semejanza y tomando como punto de partida un inhibidor de PDE7 perteneciente a la familia de las benzotiadiazinas, se sintetizaron y evaluaron distintas series de compuestos. Este procedimiento condujo a los derivados de tioxoquinazolina, que presentaron una inhibición de PDE7 en el rango micromolar<sup>130</sup>. Diversas modificaciones estructurales llevaron a la obtención de nuevos inhibidores que fueron ensayados frente al dominio catalítico de PDE7A1 y PDE4D2, obteniéndose valores de CI<sub>50</sub> en el rango micromolar (0.1-1.8  $\mu\text{M}$ ). Además, los ensayos de viabilidad celular basados en la utilización de yoduro de propidio, mostraron que los nuevos derivados sintetizados presentaban una ventana terapéutica adecuada<sup>81</sup>.

### **Derivados de dihidronaftiridindiona**

Estos derivados presentan actividad en el rango nanomolar, algunos de ellos incluso dualidad PDE4/PDE7. Con el objetivo de reducir los efectos secundarios debido a una baja selectividad de estos compuestos, se llevaron a cabo estudios de modelado molecular que permitieron el desarrollo de nuevas moléculas con un mayor actividad y selectividad debido principalmente a la presencia de dos moléculas de agua en el sitio de unión<sup>131</sup>.

## 2. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS MEDIANTE APROXIMACIONES COMPUTACIONALES

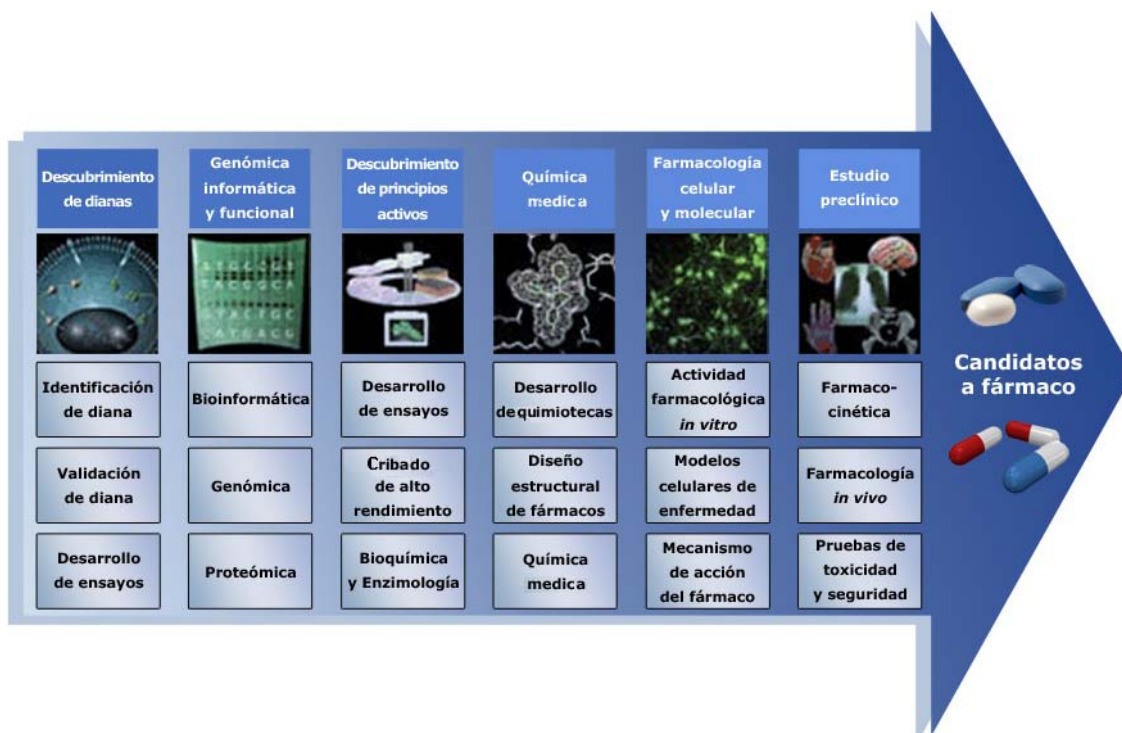
El proceso de desarrollo de una nueva molécula con aplicaciones terapéuticas supone unos 7-12 años dependiendo del tipo de fármaco y de la patología a la que esté destinada y un coste muy elevado para las compañías farmacéuticas. Dentro del coste, se estima que el 80% del presupuesto se destina a las diferentes fases clínicas<sup>132</sup>. Dicho proceso presenta un número variable de causas por las que un candidato finalmente no llega a ser comercializado. En la Figura 13 se recogen las principales causas de fracaso en el desarrollo de un nuevo fármaco analizadas en un estudio realizado en los años noventa<sup>133</sup>, demostrándose que entre ellas se encontraban: las propiedades farmacocinéticas (absorción, metabolismo, distribución y excreción) y la toxicidad.



**Figura 13.** Principales causas de fallo en el desarrollo de un nuevo fármaco.

La primera dificultad del proceso se encontraba en la búsqueda de un cabeza de serie o *hit* es decir, aquella sustancia que presenta una demostrada actividad biológica frente a la diana terapéutica en estudio y sirve como referencia en la síntesis de otras estructuras con el objetivo de mejorar su eficacia<sup>134</sup>. Se estima que las empresas farmacéuticas destinan en torno a un 10% de su inversión en programas de modelización y simulación, y que dicha cifra se encuentra en aumento<sup>132</sup>, por lo que actualmente, esta etapa no resulta limitante. De hecho, se ha visto que existe una gran diversidad de compuestos diseñados pero que pocos de ellos llegan a ser desarrollados posteriormente, debido a que las fases clínicas en algunas ocasiones son inviables económicamente. Posteriormente, se encuentra la optimización del cabeza de serie y

sus ensayos preclínicos, que conlleva un gasto económico para obtener un candidato a fármaco o *lead* (Figura 14).



**Figura 14.** Proceso de obtención de un candidato a fármaco: *hit to lead*.

Así, se estima que sólo 5 de cada 40.000 compuestos ensayados en animales llega a fases clínicas, y sólo 1 de cada 5 compuestos que superan las fases clínicas llegan a ser finalmente aprobados para su comercialización, es decir, existen varias etapas limitantes<sup>132</sup>. Todos estos datos reflejan la dificultad del desarrollo, y que por tanto, es necesario recabar la suficiente información farmacológica y toxicológica de un grupo de moléculas antes de entrar en la etapa clínica.

En este contexto, el objetivo de la química computacional reside en incrementar la tasa de éxito reduciendo el gasto y el tiempo necesario para la producción de nuevas moléculas. Además, actualmente todos los compuestos candidato a fármaco son filtrados de acuerdo a las propiedades tipo fármaco o ADMETox (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) con el objetivo de seleccionar sólo aquellos compuestos que presentan un perfil adecuado para ser desarrollado en etapas futuras.

Por otra parte, las aproximaciones computacionales que se pueden emplear para estos fines se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de donde se obtenga la información necesaria para obtener los modelos: las aproximaciones indirectas o basadas en la estructura del ligando y las aproximaciones directas o basadas en la estructura de la diana (Tabla 5).

**Tabla 5.** Técnicas computaciones aplicadas al diseño de fármacos.

		Diana conocida	Diana desconocida
Búsqueda del	Estructuras nuevas	Cribado virtual basado en la diana Diseño <i>de novo</i>	Cribado virtual basado en el ligando
cabeza de serie	Por analogía estructural	Modificación estructural Estudios de <i>docking</i>	Farmacóforo 2D, 3D-QSAR, RNAs
Optimización del cabeza de serie		Estudios de <i>docking</i>	2D, 3D-QSAR, RNAs

Dentro de cada aproximación, existen diferentes técnicas. Así, dentro de la aproximación basada en la estructura de la diana encontramos:

-Diseño *de novo*. Es una técnica que permite la búsqueda de nuevos cabezas de serie, identificando los sitios de unión a la proteína y realizando una búsqueda de ligandos que se ajuste a los requisitos del sitio de unión modelizado<sup>135</sup>.

-Estudios de *docking*. Técnica que permite la obtención de un modelo de acoplamiento entre una proteína y los ligandos previamente seleccionados desde el punto de vista estructural y energético. Para ello, es necesario poseer información acerca de la estructura tridimensional de la proteína a partir de cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o mediante la construcción de modelos teóricos<sup>135</sup>.

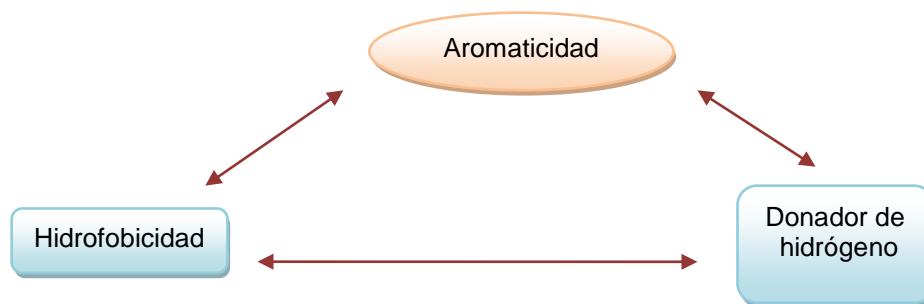
-Cribado virtual basado en la diana (*Structure-based* o *Receptor-Based Virtual screening*)<sup>136, 137</sup>. Permite la selección de aquellas moléculas biológicamente activas frente a dianas particulares empleando aproximaciones basadas en la diana como los estudios de *docking*.

Por otro lado, dentro de la aproximación basada en el ligando encontramos:

-Búsqueda por similitud con compuestos activos conocidos<sup>138</sup>. Dado que la actividad biológica viene determinada por la complementariedad entre el ligando y la diana, uno de los pilares fundamentales en el diseño racional de fármacos es el principio de semejanza, que establece que compuestos estructuralmente similares tienen propiedades fisicoquímicas y biológicas parecidas, y que por tanto podrían tener efectos *in vivo* similares. De esta forma, partiendo de una molécula biológicamente activa, la identificación de nuevas moléculas está basada en la búsqueda de estructuras similares en bases de datos.

-Modelo teórico de farmacóforo (Esquema 1). Permite establecer los rasgos estéricos y electrónicos reconocidos por el sitio de unión de una diana determinada a partir de moléculas químicamente diversas con actividad biológica conocida. Con la información

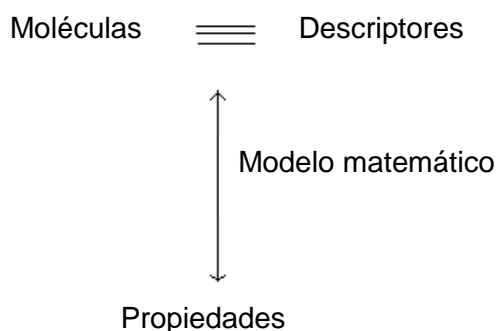
obtenida, el modelo genera vectores que relacionan las interacciones obtenidas entre el farmacóforo y las moléculas disponibles en las librerías virtuales o reales<sup>137</sup>.



**Esquema 1.** Representación típica de un modelo teórico de farmacóforo.

-Cribado virtual basado en el ligando (*Ligand-Based virtual Screening*)<sup>136, 137</sup>. Permite la selección de aquellas moléculas biológicamente activas frente a dianas particulares empleando aproximaciones basadas en el ligando como modelos farmacofóricos, o similitud con otras moléculas activas.

-Relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSAR) y relaciones estructura-propiedad cuantitativa (QSPR)<sup>137</sup> en dos y tres dimensiones (2D o 3D). Estas técnicas permiten la construcción de un modelo teórico capaz de relacionar la estructura química de las moléculas con una propiedad mediante el empleo de aproximaciones computacionales. El objetivo de un estudio tipo QSAR es encontrar un modelo que a partir de una serie de descriptores para un conjunto de moléculas de actividad conocida, permita obtener la actividad de una molécula dada (Figura 15). El modelo generado permite proponer nuevos compuestos con un mejor perfil de actividad y selectividad. Por lo tanto, la aproximación QSAR es una herramienta de gran utilidad en los procesos tales como el cribado virtual<sup>139</sup>.



**Figura 15.** Modelo matemático como puente entre las moléculas y sus propiedades.

En resumen, la incorporación de las aproximaciones computacionales a los procesos de descubrimiento, diseño y desarrollo de nuevos fármacos han supuesto una gran mejora en la búsqueda de nuevas cabezas de serie con gran diversidad estructural, y con conocimiento previo tanto de su farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) como de su farmacodinamia (unión a moléculas biológicas) permitiendo la orientación de su síntesis y optimización.



## **OBJETIVOS**



Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de enfermedades caracterizadas por una muerte celular progresiva de las neuronas de determinadas áreas del cerebro. Dado que una de las características comunes de estas enfermedades es la presencia de un daño celular producido por una inflamación inicial, un posible tratamiento de este tipo de enfermedades sería aquel que actuase frenando la neuroinflamación producida.

Fosfodiesterasa 7 (PDE7) es una enzima que se expresa en cerebro y que además es capaz de regular los niveles de AMPc en nuestro organismo. Como se ha comentado, el AMPc es un segundo mensajero capaz de regular los procesos inflamatorios. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis doctoral nos proponemos por una parte, la validación de PDE7 como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurológicas debido a su implicación en los procesos de neuroinflamación via AMPc y por otra, el desarrollo de nuevos inhibidores más selectivos de PDE7. Para ello, se emplearán diferentes aproximaciones habituales en Química Médica.

Los objetivos serán:

1. Validación de PDE7 como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas empleando inhibidores de la misma.
  - 1.1. Optimización de la síntesis de los derivados de tioquinazolininas empleando síntesis orgánica asistida por microondas.
  - 1.2. Estudios biológicos de los inhibidores de PDE7 en diferentes modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. Desarrollo de dos nuevas familias de inhibidores a partir de un modelo de farmacóforo.
3. Identificación de nuevos inhibidores empleando un modelo de redes neuronales artificiales.
  - 3.1. Desarrollo de los modelos neuronales
  - 3.2. Identificación y síntesis de nuevos inhibidores
4. Estudio computacional para identificar las claves estructurales necesarias para la interacción del ligando con el sitio de unión a la enzima PDE7.







## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **CAPÍTULO 1**



## 1. VALIDACIÓN DE PDE7 COMO DIANA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

### 1.1. ANTECEDENTES

Dentro del proceso de diseño y búsqueda de inhibidores selectivos de PDEs llevado a cabo en nuestro grupo de trabajo, se describieron los derivados de benzotienotiadiazina y benzotiadiazina como los primeros inhibidores de PDE7<sup>109</sup>. Además, empleando técnicas de cribado virtual de ligandos por semejanza a partir de la 2,2-dióxido de 1-[(3,4-diclorofenil)metil]-2,1,3-benzotiadiazin-4(3*H*)-ona<sup>109</sup> (**1**), se sintetizaron y evaluaron biológicamente diferentes derivados de tioxoquinazolina que presentaban una actividad similar a la molécula de partida pero con una menor complejidad química<sup>130</sup> (Figura 16).

Comp.	CI <sub>50</sub> PDE7A (μM)	CI <sub>50</sub> PDE4B (μM)
<b>1</b>	8.0	19.0
<b>2</b>	5.5	37.0
<b>3</b>	5.4	10-13%
<b>4</b>	48.5	56.0
<b>5</b>	1.9	10-10%

**Figura 16.** Valores de actividad inhibitoria frente a PDE7A y PDE4B.

A continuación, diferentes modificaciones estructurales de los derivados de tioxoquinazolina **2-5** proporcionaron los derivados **6-32** que fueron ensayados frente al dominio catalítico de PDE7A1 y PDE4D2 (Tabla 6). Estas modificaciones se realizaron sobre las posiciones 2 y 4 del heterociclo, y sobre la naturaleza del anillo fusionado manteniendo siempre el grupo aromático unido al nitrógeno en posición 3. Entre todos los compuestos sintetizados, cabe destacar que algunos de los derivados mostraron actividad inhibitoria en el orden submicromolar, así como una ventana terapéutica adecuada tras llevarse a cabo ensayos de viabilidad celular. La capacidad que presentaron estos compuestos de disminuir la respuesta inflamatoria modulando los

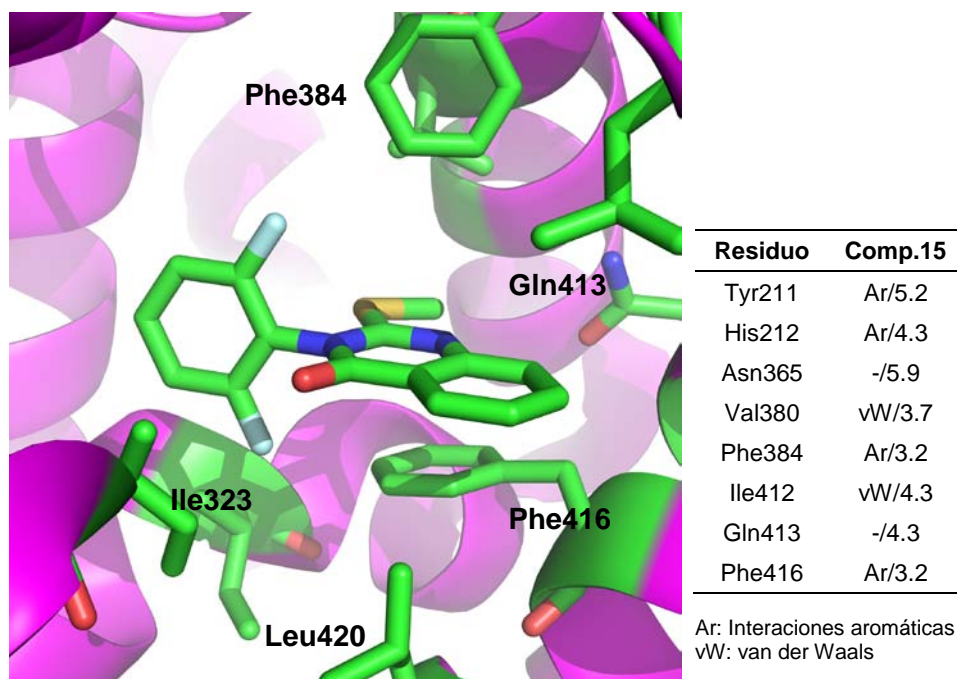
niveles de AMPc, los convierte en candidatos interesantes a desarrollar para el tratamiento de enfermedades neurológicas<sup>81</sup>.

**Tabla 6.** Valores de actividad inhibitoria frente a PDE7A y PDE4D.

Comp.	X	R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	CI <sub>50</sub> PDE7A1 (μM)	CI <sub>50</sub> PDE4D2 (μM)
IBMX	-	-	-	8.10 ± 0.40	31
Rolipram	-	-	-	129 ± 10	0.55 ± 0.05
6	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =H	-	> 10	-
7	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =2,6-diF	-	>10	-
8	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =2,3,4-triF	-	>10	-
9	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =2-Br	-	~10	-
11	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =2,6-diF	-	> 1	-
12	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =2,3,4-triF	-	> 10	-
13	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =2-Br	-	1.70 ± 0.10	34 ± 5
15	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =2-Br	R <sup>3</sup> =Me	0.51 ± 0.02	3.50 ± 0.30
16	O	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =2,3,4-triF	R <sup>3</sup> =Me	~10	-
18	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =Ph	R <sup>3</sup> =Me	> 1	-
19	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =2,6-diF	R <sup>3</sup> =Me	0.24 ± 0.03	4.50 ± 0.10
20	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =2,3,4-triF	R <sup>3</sup> =Me	2.10 ± 0.10	-
21	O	R <sup>1</sup> =6-Br,R <sup>2</sup> =2-Br	R <sup>3</sup> =Me	1.86 ± 0.18	-
22	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =Ph	R <sup>3</sup> =Me	~ 1	-
23	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =2,6-diF	R <sup>3</sup> =Me	0.13 ± 0.02	1.40 ± 0.20
24	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =2,3,4-triF	R <sup>3</sup> =Me	> 1	-
25	O	R <sup>1</sup> =8-Me,R <sup>2</sup> =2-Br	R <sup>3</sup> =Me	0.27 ± 0.02	1.10 ± 0.20
26	S	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =H	-	1.04 ± 0.08	5.70 ± 0.03
27	S	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =2,6-diF	-	~ 1	-
28	S	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =2,3,4-triF	-	> 1	-
29	S	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =Me	0.84 ± 0.01	8.00 ± 1.20
30	S	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =2,6-diF	R <sup>3</sup> =Me	0.10-1	-
31	S	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =2,3,4-triF	R <sup>3</sup> =Me	> 1	-
32	S	R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =2-Br	R <sup>3</sup> =Me	0.10-1	-

En el grupo del Prof. Ke de la Universidad de Carolina del Norte, se llevó a cabo la obtención de la estructura cristalográfica resuelta por difracción de rayos X correspondiente al dominio catalítico de PDE7A en presencia del derivado de

tioxoquinazolina **15** (código PDB: 3G3N)<sup>81</sup> observándose que el modo de unión de éste es diferente al modo de unión del inhibidor no selectivo IBMX<sup>80</sup>. En el modo de unión del derivado **15**, la presencia del anillo aromático fusionado permite una interacción  $\pi$ - $\pi$  con el anillo aromático del residuo Phe416 (Figura 17). Por otra parte, el anillo aromático no fusionado puede formar interacciones  $\pi$ - $\pi$  con Phe384, por lo que su presencia podría ser fundamental para la actividad.



**Figura 17.** Estructura cristalográfica del complejo PDE7-**15** (código PDB: 3G3N).

Dadas las propiedades terapéuticas interesantes mostradas por los inhibidores de PDE7 pertenecientes a la familia de las tioxoquinazolin<sup>81</sup>, nos propusimos llevar a cabo la optimización de su procedimiento sintético con el fin de obtener este tipo de derivados de una forma rápida y sencilla que nos permitiera su empleo para la validación PDE7 como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

## 1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DE TIOXOQUINAZOLINA ASISTIDA POR MICROONDAS

La síntesis convencional de los derivados de tioxoquinazolina había sido descrita previamente por nuestro grupo<sup>81, 130</sup>. Así, la obtención de los compuestos **2-13** se llevaba a cabo por condensación y posterior ciclación entre el antranilato de metilo o

derivados del ácido antranílico, según el caso, con los correspondientes isotiocianatos en tolueno a reflujo o bien en etanol. En éste último caso, la reacción se llevaba a cabo a 4 °C para evitar, en la medida de lo posible, la formación del tiocarbamato correspondiente a la reacción entre el isotiocianato y el etanol. Sin embargo, la mayor desventaja de este procedimiento residía en los largos tiempos de reacción así como en los bajos rendimientos (Esquema 2).

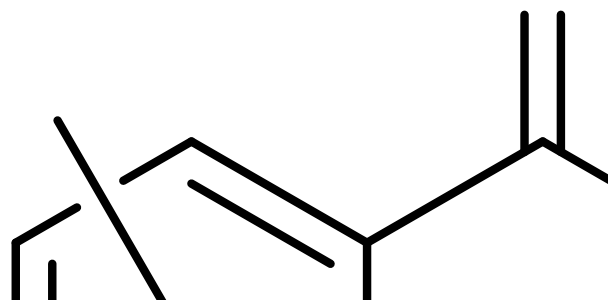


**Esquema 2.** Ruta sintética de los derivados de quinazolina **2-13**.

En una segunda etapa, la preparación de los derivados de tioquinazolina S-metilados **14-25** se realizaba mediante la metilación de los derivados previamente sintetizados **2-13** en dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente usando yoduro de metilo y carbonato potásico como base. Finalmente, la reacción de tiónación del grupo carbonilo en posición 4 se llevaba a cabo empleando el reactivo de Lawesson en tolueno a reflujo obteniéndose únicamente los derivados **26-32** (Esquema 3)<sup>81</sup>.

Debido a la actividad antiinflamatoria que presentaron los inhibidores de PDE7 tipo quinazolina<sup>81</sup>, nos planteamos el desarrollo de una ruta sintética más eficiente. Con el fin de acortar los elevados tiempos de reacción, así como aumentar los rendimientos necesarios para la obtención de los derivados de tioquinazolina y evitar los problemas derivados de la formación de productos secundarios no deseados en la reacción<sup>81</sup>, decidimos utilizar síntesis orgánica asistida por microondas (MAOS) empleada en la literatura con éxito en la síntesis de otros derivados de

tioxoquinazolin<sup>140</sup>. En concreto, seleccionamos los derivados **2**, **3**, **5**, **7**, **13**, **26** y **29** para optimizar la síntesis de esta familia de compuestos.



**Esquema 3.** Ruta sintética de los derivados de quinazolina **14-32**.

La síntesis orgánica asistida por microondas (MAOS)<sup>141-143</sup>, no sólo ofrece mejoras en cuanto a los rendimientos y a los tiempos de reacción con respecto a métodos convencionales, sino que también permite trabajar con menos cantidad de disolvente e incluso evitarlo, en algunos casos, lo que es importante a la hora de desarrollar una química sostenible o también llamada química verde. La utilización de microondas permite además un calentamiento rápido y homogéneo, reduciéndose así la formación de subproductos y otros productos de descomposición. Como se ha indicado anteriormente, la limitación fundamental que presenta el método convencional de obtención de tioxoquinazolin<sup>140</sup> son los elevados tiempos de reacción necesarios. En concreto, para obtener los derivados de tioxoquinazolin<sup>140</sup> **2**, **3** y **5** en tolueno a reflujo se necesitan 6, 3 y 12 días respectivamente, mientras que los derivados **7** y **13** en etanol a 4 °C necesitan 17 y 5 días respectivamente. Por ello, para llevar a cabo la optimización de su proceso sintético, se realizó un estudio experimental sobre las condiciones óptimas de ciclación bajo irradiación microondas. Se determinó el tiempo, temperatura y disolvente más adecuado para obtener las tioxoquinazolin<sup>140</sup> buscadas (Tabla 7).

**Tabla 7.** Reacciones de condensación mediante MAOS vs síntesis convencional.

Comp.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	MAOS			Síntesis convencional		
				Disolvente	Condiciones	Rto	Disolvente	Condiciones	Rto
<b>2</b>	H	Me	H	Tolueno	120 °C, 40 min	70%	Tolueno	reflujo, 6 días	60%
<b>5</b>	H	Me	2-Br	Tolueno	120 °C, 40 min	10%	Tolueno	reflujo, 12 días	10%
<b>5</b>	H	Me	2-Br	DMSO/H <sub>2</sub> O	120 °C, 40 min	60%	Tolueno	reflujo, 12 días	10%
<b>3</b>	H	Me	2,6-diF	DMSO/H <sub>2</sub> O	120 °C, 40 min	60%	Tolueno	reflujo, 3 días	40%
<b>7</b>	6-Br	H	2,6-diF	DMSO/H <sub>2</sub> O	120 °C, 40 min	50%	Etanol	4 °C, 17 días	2%
<b>13</b>	8-Me	H	2-Br	Tolueno	120 °C, 40 min	30%	Etanol	4 °C, 5 días	40%

Empleando MAOS se logró una reducción considerable del tiempo de reacción en todos los casos, de varios días a 40 min. En lo que se refiere al rendimiento, se observó que al emplear el mismo disolvente que se había utilizado en la síntesis convencional, no se producía una mejora significativa en el caso de la síntesis de los compuestos **2** y **5**. Sin embargo, el empleo de una mezcla de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1)<sup>140</sup> en algunos casos permitió la obtención de las tioquinazolinas **3**, **5** y **7** con mejores rendimientos, excepto en el caso del compuesto **13** con el que fue necesario emplear tolueno como disolvente ya que el empleo de la mezcla de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1) no conducía a la formación del producto deseado.

En el caso de las reacciones de tiónación, para obtener los derivados de tioquinazolina **26** y **29** en tolueno a reflujo se necesitan 48 y 24 h respectivamente. Por ello, continuando con la estrategia anterior, se prepararon estos compuestos empleando el reactivo de Lawesson en tolueno a 120 °C bajo irradiación microondas durante 2 y 1 h respectivamente. Cabe destacar además, que en este caso, no fue necesario el cambio de disolvente, ya que el uso del disolvente habitual permitía la precipitación del producto buscado en el medio de reacción, facilitando así el proceso de aislamiento y purificación.

Por tanto, empleando la síntesis asistida por microondas, se pudieron obtener las tioquinazolinas seleccionadas en unos tiempos de reacción significativamente más bajos. Asimismo, se observó una mejora en cuanto a los rendimientos obtenidos.

### 1.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS DERIVADOS DE TIOXOQUINAZOLINA

Aplicando la síntesis asistida por microondas, nos propusimos la síntesis de nuevos derivados con el objetivo de aumentar la solubilidad de estos compuestos y además, se realizaron otras modificaciones con el objetivo de aumentar el número de posibles interacciones con el dominio catalítico de PDE7 basándonos en los datos cristalográficos obtenidos<sup>81</sup>. De esta forma, se añadieron distintos sustituyentes con el objetivo de enriquecer electrónicamente el anillo aromático fusionado y favorecer la interacción con el residuo de Phe416 del dominio catalítico de PDE7<sup>81</sup>, fundamental para la unión de los derivados de tioxoquinazolina en el centro activo. De acuerdo a este objetivo, se prepararon los derivados **33** y **34** que presentaban un átomo de cloro en posición 8 y que no habían podido obtenerse por el método convencional. Aplicando la metodología puesta a punto, se pudieron obtener tras 40 min de reacción a 120 °C bajo irradiación microondas empleando DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1) como disolvente con un rendimiento de bajo a moderado. Otra modificación planteada fue sustituir el benceno fusionado por piridina (derivados **35** y **36**) para aumentar la solubilidad acuosa de estos derivados<sup>144</sup>. Sin embargo, el empleo de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1) a 120 °C conducía a la formación de un producto secundario correspondiente a la descarboxilación del derivado del ácido antranílico de partida. Así pues, fue necesario sustituir el disolvente por acetonitrilo. Aunque el aumento de la temperatura de 120 °C a 150 °C aceleró la formación de los derivados de tioxoquinazolina **35** y **36**, los rendimientos obtenidos fueron bajos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Reacción de ciclación empleando microondas de los derivados **33-36**.

Comp.	X	Y	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Temp	Tiempo	Disolvente	Rto
<b>33</b>	CH	CH	8-Cl	2,6-diF	H	120 °C	40 min	DMSO/H <sub>2</sub> O (1:1)	63%
<b>34</b>	CH	CH	8-Cl	2-Br	H	120 °C	40 min	DMSO/H <sub>2</sub> O (1:1)	18%
<b>35</b>	CH	N	H	H	Me	150 °C	30 min	Acetonitrilo	5%
<b>36</b>	N	CH	H	H	H	150 °C	30 min	Acetonitrilo	35%

Teniendo en cuenta la estructura cristalográfica de PDE7A-**15** (código PDB: 3G3N)<sup>81</sup> y con el objetivo de explorar posibles interacciones en el centro activo de la enzima, se planteó la introducción de sustituyentes voluminosos en el átomo de azufre del anillo de

algunas tioquinazolinas sintetizadas. Los grupos introducidos fueron metilo, etilo, butilo, neopentilo, isobutilo, ciclohexilmetilo, bencilo y ciclopropilmetilo (Tabla 9).

**Tabla 9.** Reacciones de S-alkilación empleando microondas para la obtención de los derivados **37-50**.

Comp.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	A.alkilante	Condiciones	Rto
<b>37</b>	8-Cl	2,6-diF	Me	IMe	150 °C 1 h	30%
<b>38</b>	H	H	Et	SDE	150 °C 1 h	43%
<b>39</b>	H	2,6-diF	Et	SDE	150 °C 1 h	58%
<b>40</b>	8-Cl	2,6-diF	Et	SDE	150 °C 1 h	33%
<b>41</b>	H	4-F	Et	SDE	150 °C 1 h	61%
<b>42</b>	H	H			150 °C 1 h	8%
<b>43</b>	H	H			150 °C 1 h	30%
<b>44</b>	H	H			150 °C 1 h	75%
<b>45</b>	H	H			150 °C 1 h	44%
<b>46</b>	H	3-OMe			150 °C 1 h	36%
<b>47</b>	H	4-OMe			150 °C 1 h	62%
<b>48</b>	H	H			150 °C 1 h	47%
<b>49</b>	H	4-OMe			150 °C 1 h	99%
<b>50</b>	H	3-OMe			150 °C 1 h	84%

SDE: Sulfato de dietilo

Empleando la síntesis asistida por microondas, se obtuvieron los derivados S-alkilados **37-50** con rendimientos moderados. Cabe destacar que durante la preparación de algunos derivados, se observó que cuando se partía de un derivado con un halógeno en posición 2 del anillo aromático del nitrógeno en posición 3, no se obtenían los productos alkilados deseados sino los productos **51** y **52** correspondientes a la pérdida de dicho halógeno y posterior ciclación intramolecular del compuesto de partida (Esquema 4).

#### Esquema 4. Formación de productos ciclados **51** y **52**.

A fin de preparar los derivados *S*-alquilados con halógenos en posición 2 del anillo aromático y evitar la formación de los productos ciclados, fue necesario llevar a cabo las reacciones a temperatura ambiente, obteniéndose de esta manera los compuestos **53-56** con buenos rendimientos (Tabla 10).

**Tabla 10.** Reacciones de *S*-alquilación para la obtención de los derivados **53-56**.

Comp.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	A.alquilante	Temp.	Tiempo	Rto
<b>53</b>	8-Me	2,6-diF			t.a.	12 h	42%
<b>54</b>	H	2-Br			t.a.	12 h	77%
<b>55</b>	H	2-Br			t.a.	12 h	98%
<b>56</b>	8-Me	2,6-diF			t.a.	12 h	99%

El empleo de MAOS ha permitido por tanto, la obtención de nuevos derivados de tioquinazolina con una mayor funcionalidad presentando, en general, rendimientos moderados y tiempos de reacción cortos así como una fácil purificación. La asignación estructural de los nuevos derivados de tioquinazolina sintetizados así como de los productos secundarios obtenidos fue establecida en base a los datos analíticos y espectroscópicos de resonancia magnética nuclear tanto de <sup>1</sup>H como de <sup>13</sup>C, que se encuentran recogidos en la parte experimental.

#### 1.4. EVALUACIÓN ENZIMÁTICA

Los nuevos derivados de tioquinazolina sintetizados fueron evaluados por el grupo de las Prof. M<sup>a</sup> Isabel Cadavid y M<sup>a</sup> Isabel Loza en la Universidad de Santiago de Compostela frente a la enzima PDE7A1 empleando un ensayo radiométrico a partir de la co-incubación de la enzima recombinante humana con el 3H-AMPC. Los porcentajes de inhibición obtenidos se muestran en la Tabla 11. A continuación, se calculó la CI<sub>50</sub> de los compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición mayor del 60%. Asimismo, con el objetivo de evitar posibles efectos secundarios en los compuestos más activos, se procedió a su evaluación frente a PDE3A y a PDE4D ya que la inhibición de PDE3A está asociada a efectos cardiotóxicos<sup>61</sup>, mientras que PDE4D es la isoenzima responsable de los efectos eméticos característicos de los inhibidores de PDE4<sup>145</sup>. Además, en los experimentos enzimáticos se han incluido como controles BRL-50481<sup>91</sup>,

conocido inhibidor de PDE7, el inhibidor de PDE4 rolipram<sup>71</sup> y tres de las quinazolininas previamente descritas pero cuya síntesis se ha optimizado en este trabajo (**2**, **13** y **26**) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Actividades de los derivados de tioxoquinazolina frente a PDE7A, PDE3A y PDE4D.

Comp.	% PDE7A@10 $\mu$ M	CI <sub>50</sub> PDE7A ( $\mu$ M)	% PDE3A@10 $\mu$ M	% PDE4D@10 $\mu$ M
<b>BRL50481</b>	99.5	0.09	0.4	-
<b>Rolipram</b>	3.1	14.8	9.4	107.8
<b>2</b>	76.0	4.6	5.1	-
<b>13</b>	90.5	2.0	20.7	25.5
<b>26</b>	95.1	0.5	19.3	40
<b>33</b>	74.9	6.1	12.1	-
<b>34</b>	63.4	1.8	16.1	-
<b>35</b>	-3.1	-	-	-
<b>36</b>	9.3	-	-	-
<b>37</b>	67.2	15.2	0.6	-
<b>38</b>	80.3	6.9	-	-
<b>39</b>	88.9	6.9	-	-
<b>40</b>	94.6	2.4	-	-
<b>41</b>	52.5	-	-	-
<b>42</b>	45.6	-	-	-
<b>43</b>	86.2	0.6	54.0	38
<b>44</b>	50.4	-	-	-
<b>45</b>	87.0	0.1	50.0	37.0
<b>46</b>	27.4	-	-	-
<b>47</b>	-9.1	-	-	-
<b>48</b>	81.0	0.2	35.0	49.0
<b>49</b>	-1.5	-	-	-
<b>50</b>	35.6	-	-	-
<b>51</b>	22.1	-	-	-
<b>52</b>	19.0	-	-	-
<b>53</b>	65.5	8.6	-	-
<b>54</b>	80.0	2.1	36.1	-
<b>55</b>	95.1	9.4	-	-
<b>56</b>	89.5	4.5	47.9	-

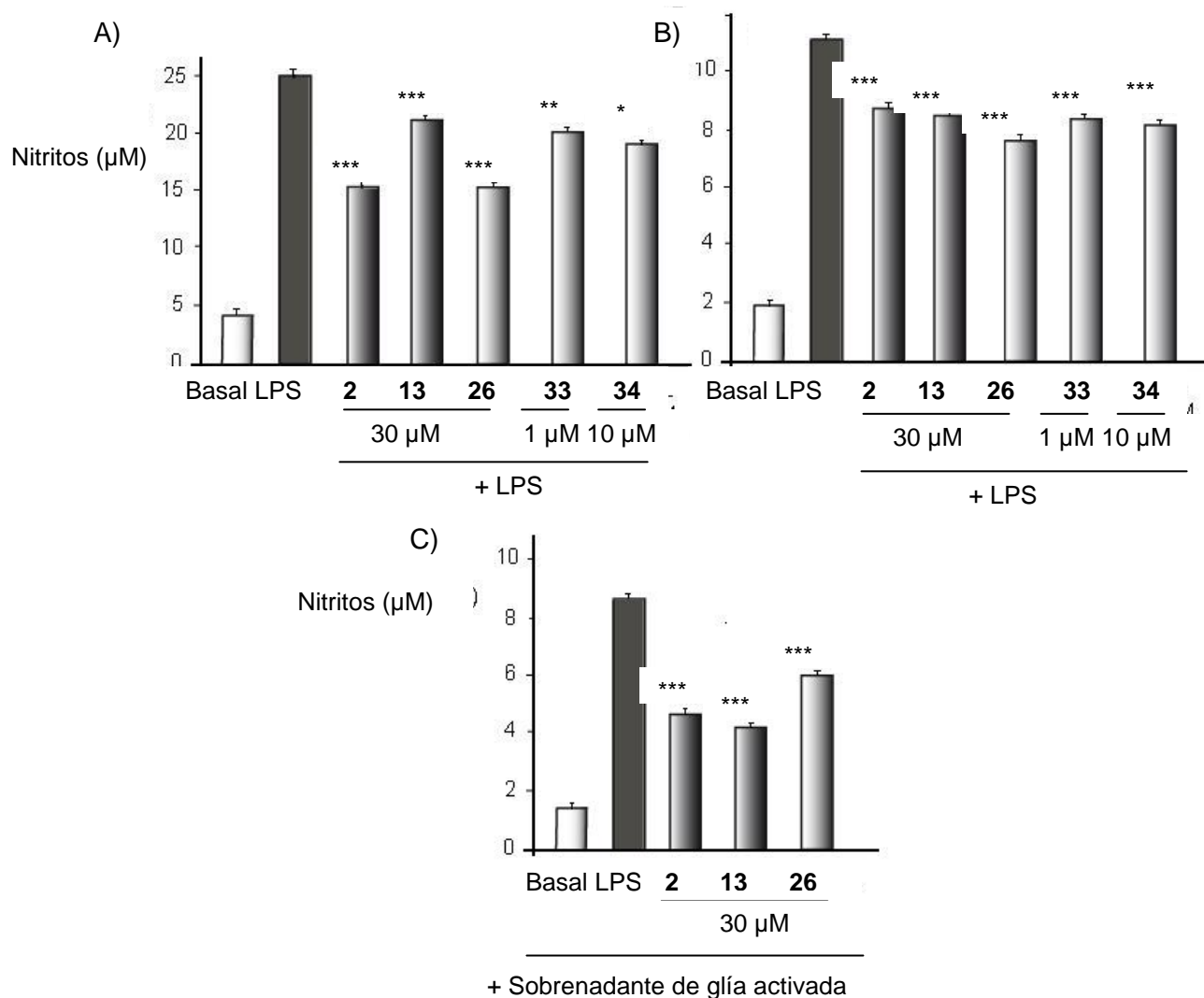
Considerando los datos obtenidos, los derivados de tioxoquinazolina sintetizados presentaron actividad frente a PDE7A en el rango micromolar, mientras que los derivados *S*-alquilados **43**, **45** y **48** mostraron valores de CI<sub>50</sub> en el rango submicromolar. Por otra parte, dado que los derivados de tioxoquinazolina ensayados no inhiben PDE3A ni PDE4D a la misma concentración a la que inhibían PDE7A, se

podría decir *a priori* que estos derivados carecerían tanto de efectos cardiotóxicos como de efectos eméticos.

### **1.5. ESTUDIOS DE NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL DAÑO INFLAMATORIO *IN VITRO***

Con el objetivo de demostrar la eficacia terapéutica de los inhibidores de PDE7 en enfermedades del SNC, llevamos a cabo el estudio de sus propiedades antiinflamatorias en diferentes células del SNC, seleccionándose los derivados **2**, **13**, **26**, **33** y **34**. En concreto, se determinó el efecto de los inhibidores de PDE7 sobre el daño inflamatorio producido por LPS (lipopolisacárido de la pared bacteriana que induce inflamación) en cultivos primarios de neuronas, astrocitos y microglía. Un cultivo primario es un cultivo celular que proviene de un tejido en el que tras un cierto número de divisiones las células entran en proceso de senescencia y dejan de dividirse, generalmente manteniendo la viabilidad. Así, después de 1 h de incubación con el inhibidor a las concentraciones indicadas, los cultivos primarios de microglía y astrocitos fueron incubados otras 24 h en presencia de 10 µg/ mL de LPS. El efecto de los compuestos ensayados sobre los cultivos primarios de astrocitos y microglía dañados por LPS se mide a través de la producción de NO (óxido nítrico) mediante la reacción de Griess<sup>146</sup> (Figura 18). Estos experimentos se llevaron a cabo en el grupo de la Prof. Ana Pérez-Castillo del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIB-CSIC).

Se pudo observar como los inhibidores de PDE7 ensayados **2**, **13**, **26**, **33** y **34** protegen frente al daño causado por la inflamación inducida por LPS en los cultivos primarios de astrocitos y microglía ya que como se puede apreciar en las gráficas, el tratamiento con estos inhibidores trae consigo una disminución significativa en la producción de nitritos respecto al control (Figura 18A y 18B). Continuando con la evaluación de la capacidad neuroprotectora de los inhibidores de PDE7, para emular mejor el entorno patológico en el que se ven rodeadas las neuronas del SNC por la microglía activada, el daño inflamatorio en dichas células fue causado con el sobrenadante de los cultivos de glía activada por LPS. Del mismo modo que ocurría en los cultivos primarios de astrocitos y microglía dañados por LPS, el tratamiento del cultivo primario de neuronas con sobrenadante de glía activada, con los inhibidores de PDE7 muestra una reducción significativa de la producción de nitritos (Figura 18C), poniendo de manifiesto un efecto neuroprotector *in vitro* frente al daño inflamatorio.

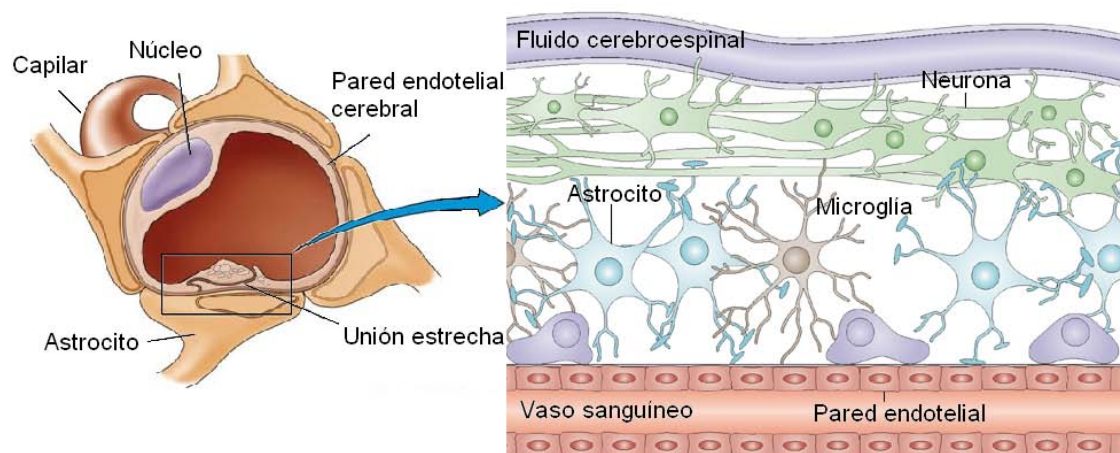


**Figura 18.** Efecto de los inhibidores de PDE7 tipo quinazolina en cultivos primarios de microglía (A), astrocitos (B) dañados por LPS y neuronas estimuladas con sobrenadante de glía activada (C). \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01 y \*P<0.05.

## 1.6. DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE ATRAVESAR LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Dentro del proceso de desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, el paso de la BHE<sup>147</sup> es una característica limitante. Esta barrera que se encuentra entre el tejido cerebral y los vasos sanguíneos que lo rodean, está formada por un endotelio cuyas células están estrechamente unidas (Figura 19). Su función fundamental es proteger al SNC frente a agentes externos potencialmente tóxicos. Sin embargo, la BHE puede suponer un obstáculo para el tratamiento de

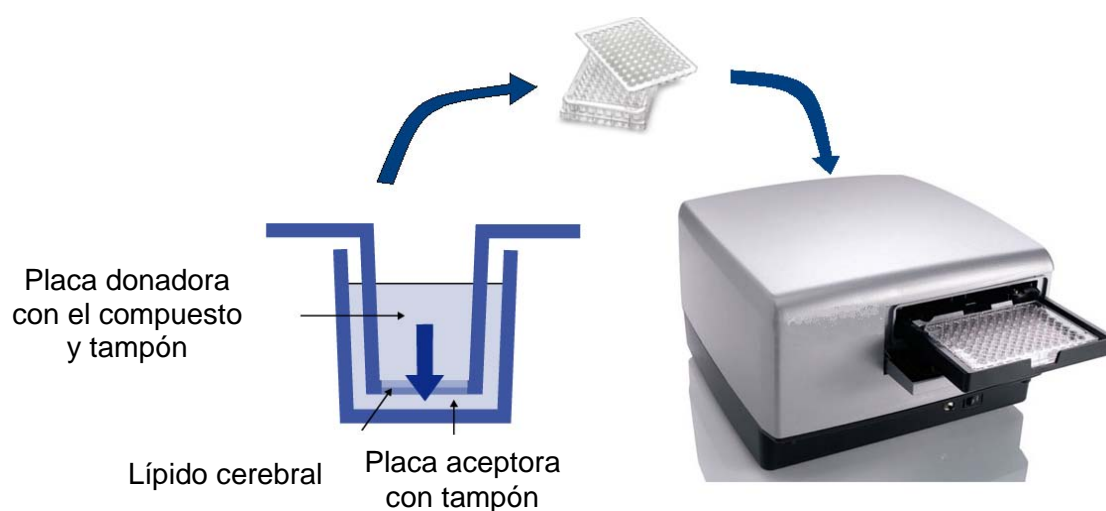
enfermedades del SNC, ya que el fármaco necesariamente debe atravesar dicha membrana para ejercer su efecto terapéutico.



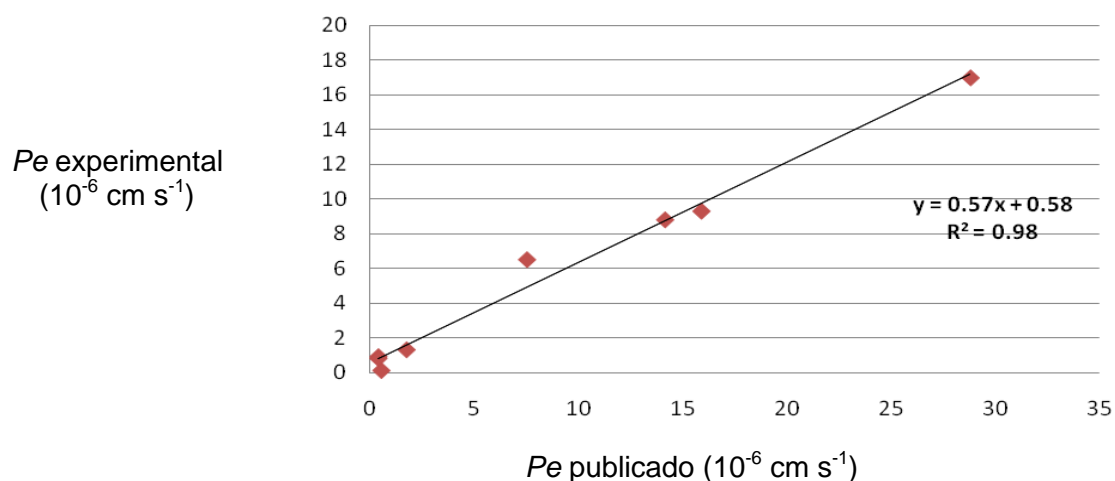
**Figura 19.** Organización y distribución celular de la barrera hematoencefálica.

Generalmente, la mayoría de las moléculas que pueden atravesar la BHE, lo hacen mediante difusión pasiva. El resto penetran mediante transporte activo mediado por transportadores específicos para otras moléculas bioorgánicas. Actualmente, existen tanto métodos computacionales<sup>148</sup> capaces de predecir la permeabilidad de la BHE como métodos experimentales. En nuestro caso, para medir la capacidad de penetración por difusión pasiva de los derivados de tioquinazolina se empleó un método *in vitro* basado en el empleo de membranas artificiales, PAMPA-BBB (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay for Blood-Brain Barrier*) descrito por Di y colaboradores<sup>149</sup> y puesto a punto en nuestro grupo de trabajo<sup>150</sup> para moléculas con limitada solubilidad acuosa. Esta metodología está basada en la capacidad de un compuesto para atravesar una membrana artificial impregnada de un lípido de cerebro porcino desde la placa donadora que contiene el tampón a un determinado pH y el fármaco a evaluar hasta la placa receptora que únicamente contiene el medio tampón. La permeabilidad de un compuesto se determina a partir de la diferencia entre los valores de absorbancia obtenidos en la placa donadora y receptora (Figura 20).

Las quinazolininas seleccionadas fueron ensayadas disueltas en una mezcla de tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 y etanol en proporción 70:30. El método utilizado se validó ensayando en las mismas condiciones productos comerciales de los cuales se conocía su capacidad de penetración en el SNC, obteniéndose una buena correlación lineal entre la permeabilidad experimental y la descrita ( $r^2 = 0.98$ ) (Figura 21).



**Figura 20.** Representación del ensayo de PAMPA.



**Figura 21.** Correlación lineal entre los valores reales y los experimentales de los compuestos comerciales.

Los experimentos se realizaron por triplicado de acuerdo con el procedimiento descrito en la parte experimental. Los resultados se expresan como el valor medio de tres ensayos independientes conteniendo cada uno de ellos tres repeticiones de cada compuesto. A partir de esta correlación se pudieron establecer los límites para predecir el paso de BHE. Se considera que una molécula la atraviesa (SNC+) cuando su permeabilidad ( $Pe$ ) está por encima del valor  $4 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$  y por tanto, serían capaces de llegar a sus dianas terapéuticas situadas en el SNC. Por otra parte, se considera que una molécula no atraviesa la barrera hematoencefálica (SNC-) cuando su  $Pe$  está por

debajo del valor  $2 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ . Valores de  $Pe$  entre  $2$  y  $4 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ , se encuentran en la zona de incertidumbre y por tanto se considera permeabilidad incierta (SNC+/-).

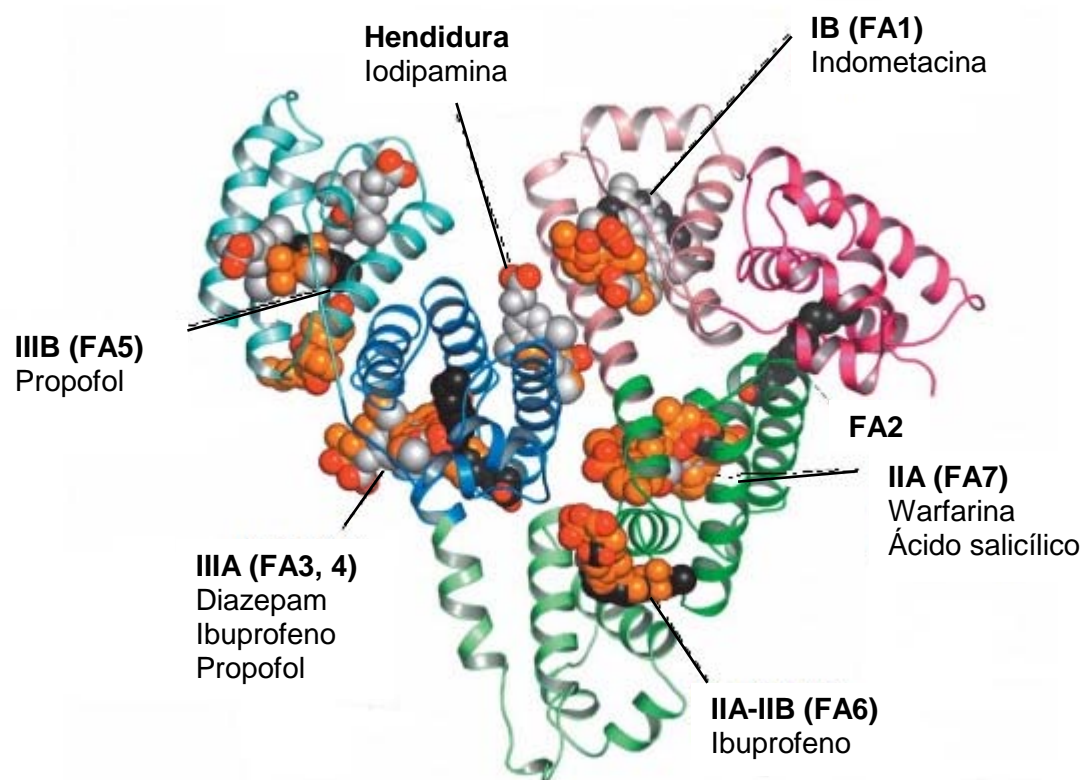
**Tabla 12.** Resultados del ensayo PAMPA-BBB de los derivados de tioquinazolina.

Compuesto	Media $Pe$	SNC	$Pe$ Biblio. <sup>149</sup>
Norfloxacino	0.55	-	0.1
Enoxacino	0.41	-	0.9
Cafeina	1.76	-	1.3
Promazina	14.16	+	8.8
Ofloxacino	0.41	-	0.8
Testosterona	28.81	+	17
Progesterona	15.90	+	9.3
Clorpromazina	7.54	+	6.5
Rolipram	4.25	+	
BRL-50481	12.35	+	
2	19.16	+	
3	10.77	+	
4	21.36	+	
5	14.18	+	
7	16.91	+	
9	16.93	+	
13	22.64	+	
14	11.06	+	
16	13.39	+	
17	2.69	+/-	
26	34.02	+	
28	34.04	+	
29	25.16	+	
39	4.80	+	
33	11.06	+	
55	1.90	+/-	
56	1.30	-	

A la vista de los resultados obtenidos (Tabla 12), los derivados de tioquinazolina estudiados penetrarían la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva y por tanto, este tipo de derivados serían capaces de alcanzar sus dianas terapéuticas en el SNC, condición necesaria que deben cumplir los fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

## 1.7. ESTUDIO DE LA UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Durante el desarrollo farmacéutico, la capacidad de unión a proteínas plasmáticas permite conocer la fracción libre de un fármaco en la circulación sistémica y su perfil de distribución, posibilitando el establecimiento de una posología adecuada para lograr el efecto terapéutico deseado. Dentro de las proteínas plasmáticas, se encuentra la albúmina<sup>151</sup> que es la más abundante en el torrente sanguíneo. Esta proteína (66 kDa) tiene un papel fundamental en el transporte y distribución de diferentes moléculas necesarias para el organismo. De esta forma, cuando un fármaco alcanza la circulación sistémica, será transportado también por la albúmina. Dado el papel transportador de esta proteína, se han encontrado diversos sitios de unión para alojar diferentes ligandos (Figura 22).



**Figura 22.** Sitios de unión de la albúmina con sus ligandos correspondientes.

Los estudios para determinar la capacidad de unión a la albúmina de los inhibidores de PDE7 tipo quinazolina, se llevó a cabo en el grupo del Prof. Carlo Bertucci de la Universidad de Bolonia. Esta medida se puede realizar empleando diversas técnicas como la resonancia de plasmón de superficie<sup>152</sup>, la cromatografía líquida de afinidad de

alta presión (HPLAC)<sup>153</sup> o el dicroísmo celular<sup>154</sup>. En nuestro caso, se emplearon las dos últimas técnicas tanto para medir el porcentaje como su sitio de unión. En el caso de HPLAC, la albúmina se encuentra inmovilizada en la fase estacionaria mientras que los derivados se disponen en la fase móvil. Además, se emplearon diferentes compuestos como controles a fin de determinar los diferentes tiempos de retención y porcentajes de afinidad (A%). Las medidas se llevaron a cabo con los inhibidores **2**, **13** y **26**, mostrando en la Tabla 13 los resultados obtenidos.

**Tabla 13.** Porcentaje de unión a la albúmina (A%) en el ensayo HPLAC para tres compuestos comerciales y los diferentes inhibidores de PDE7 ensayados.

Comp.	A%	A% Biblio.
<b>Clonazepam</b>	85.7 ± 0.5	86.0 <sup>155</sup>
<b>Diazepam</b>	94.5 ± 0.3	93.5 <sup>156</sup>
<b>Warfarina</b>	97.8 ± 0.06	98.5 <sup>156</sup>
<b>2</b>	94.4 ± 0.06	-
<b>13</b>	98.0 ± 0.07	-
<b>26</b>	99.7 ± 0.01	-

Como se puede ver en la Tabla 13, se obtuvo una buena correlación entre los valores experimentales y los descritos en la literatura de los compuestos de referencia. Así, extrapolando estos resultados, se puede concluir que los inhibidores **2**, **13** y **26** mostraron una alta afinidad por la albúmina, siendo ésta mayor del 94%.

Tras medir la capacidad de unión a esta proteína plasmática, a continuación se llevó a cabo la determinación del sitio de unión a la misma, ya que conocer la posible afinidad por el sitio de unión a la bilirrubina, entre otros, es de suma importancia. En este último caso, el desplazamiento de esta molécula impediría su correcto transporte y eliminación, trayendo consigo serios problemas para el organismo. Para medir esta propiedad, se emplearon compuestos cuyo sitio de unión es conocido, calculando el desplazamiento de dichos compuestos tras la administración de los inhibidores en estudio (Tabla 14).

Como resultado de estos experimentos, se observó que las quinazolininas ensayadas (**2**, **13** y **26**) compiten con el ácido salicílico e ibuprofeno en su unión a la albúmina a partir de su interacción con el sitio IIA y IIIA, mientras que no presentan competición alguna por el ácido valproico, marcador selectivo del sitio de unión a la bilirrubina. Por tanto, estos compuestos no presentarían *a priori* problemas de toxicidad relacionados con la bilirrubina. Estos estudios se confirmaron mediante el empleo del dicroísmo circular, con el que se calcula la posible variación de la estructura de la albúmina en presencia de los compuestos a estudiar<sup>157</sup>.

**Tabla 14.** Valores de  $K_i$  obtenidos en el análisis cromatográfico por desplazamiento para tres compuestos comerciales y los diferentes inhibidores de PDE7 ensayados.

Comp.	Ácido salicílico	Ibuprofeno	Ácido valproico
Clonazepam	N.D.	-	N.D.
Diazepam	-	$8.71 \times 10^3$	-
Warfarina	$1.01 \times 10^4$	-	$1.16 \times 10^4$
<b>2</b>	$7.29 \times 10^3$	$1.34 \times 10^4$	N.D.
<b>13</b>	$7.78 \times 10^3$	$2.76 \times 10^4$	N.D.
<b>26</b>	$1.16 \times 10^4$	$2.58 \times 10^4$	N.D.

N.D.: valores estadísticamente no significativos.

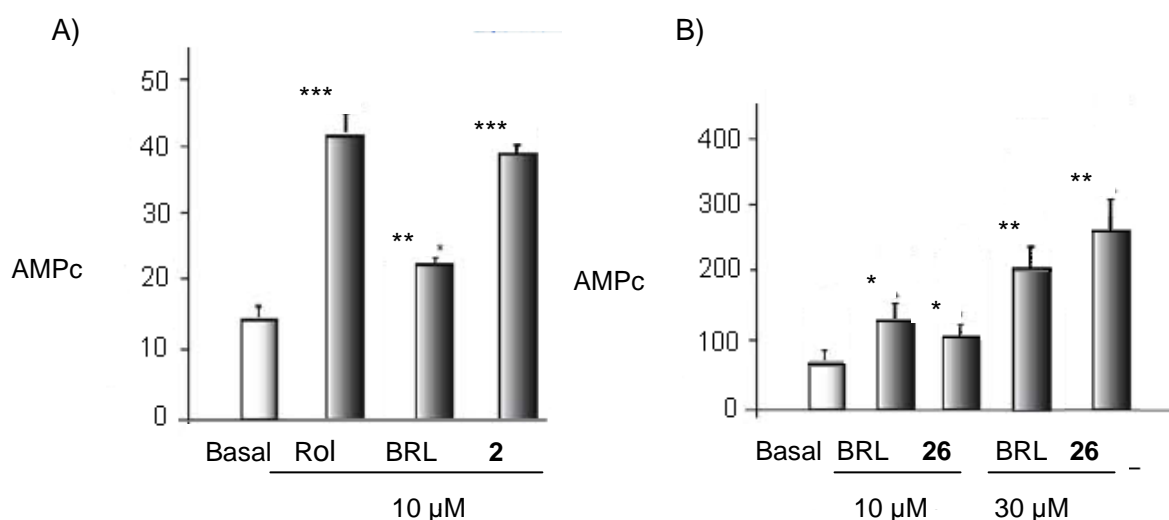
### 1.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MUTAGÉNESIS

De cara a un futuro desarrollo de estos inhibidores de PDE7, se llevaron a cabo estudios *in vitro* para determinar su seguridad farmacológica. Así, se seleccionó la evaluación de la mutagénesis o genotoxicidad mediante el test de Ames<sup>158</sup> que permite conocer la capacidad de un fármaco para causar mutaciones en el ADN por diferentes mecanismos de acción. Este experimento que fue llevado a cabo por el grupo del Prof. Hugo Cerecetto de la Universidad de la República de Uruguay. Se realiza con cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium*. Éstas presentan mutaciones en los genes implicados en la síntesis de la histidina, por lo que las bacterias necesitan un suministro extra de este aminoácido para su crecimiento. El ensayo se basa en la capacidad de los compuestos de provocar una alteración genética que permita a estas bacterias crecer sin el aporte extra de histidina. Dado que se pueden emplear simultáneamente enzimas hepáticas, de esta manera se simula el efecto del metabolismo pudiendo evaluar no sólo los compuestos en sí, sino también sus metabolitos. Como resultado de este experimento, se determinó que los derivados de tioquinazolina ensayados **2** y **26** resultaron no ser mutagénicos ni tampoco sus metabolitos.

### 1.9. MEDIDA DE AMPc IN VITRO

Puesto que la inhibición de las PDEs está correlacionada directamente con un aumento de los niveles de AMPc debido a que inhibe su degradación<sup>47</sup>, se llevaron a cabo ensayos celulares en el IIB-CSIC para medir la variación de los niveles de AMPc en diferentes líneas celulares en presencia de los inhibidores de PDE7 **2** y **26**. Además, también se emplearon rolipram<sup>71</sup> y BRL-50481<sup>91</sup> como inhibidores estándares de PDE4

y de PDE7, respectivamente. En la Figura 23, se observa como la presencia del inhibidor **2** causó un aumento del segundo mensajero en la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) mayor que el causado por el inhibidor de PDE7 BRL-50481. En el caso del inhibidor **26**, tanto el BRL-50481 como el compuesto fueron capaces de aumentar los niveles de este segundo mensajero en células de microglía.



**Figura 23.** Medida de los niveles de AMPc en la línea celular SH-SY5Y (A) y microglía (B). \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  y \* $P < 0.05$ .

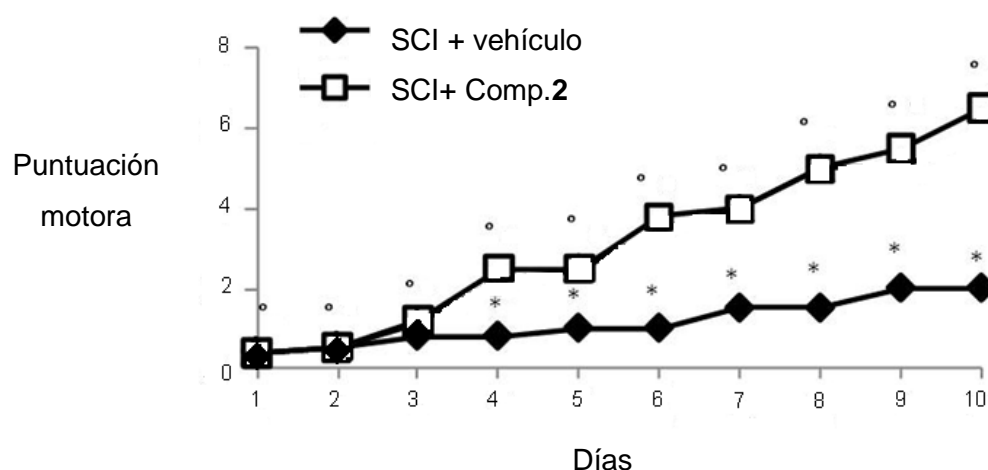
### 1.10. VALIDACIÓN DE PDE7 COMO DIANA EN MODELOS *IN VIVO*

Los inhibidores de PDE7 pertenecientes a la familia de las tioquinazolinonas han presentado un perfil terapéutico adecuado *in vitro*, demostrando su potencial uso como agentes antiinflamatorios y neuroprotectores en cultivos primarios de células del SNC debido a su capacidad para aumentar los niveles de AMPc. Asimismo, su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica los convierte en candidatos prometedores para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Con el objetivo de demostrar su eficacia en este sentido, se seleccionaron dos inhibidores de PDE7 de esta familia, los derivados **2** y **26** para estudiar sus efectos *in vivo* en distintos modelos animales de este tipo de enfermedades, debido a que ninguno de los dos resultó ser mutagénico.

#### 1.10.1. Modelo de daño medular

En primer lugar, se estudió el efecto del inhibidor **2** en un modelo de daño medular (SCI, *spinal cord injury*). Este experimento se llevó a cabo en el grupo del Prof.

Salvatore Cuzzocrea en la Universidad de Messina, provocando el daño por lesión traumática entre las vértebras torácicas T5-T8. Como se puede apreciar en la Figura 24, la administración del inhibidor de PDE7 provocó una mejora significativa de los síntomas motores respecto a los animales dañados que no recibieron tratamiento.

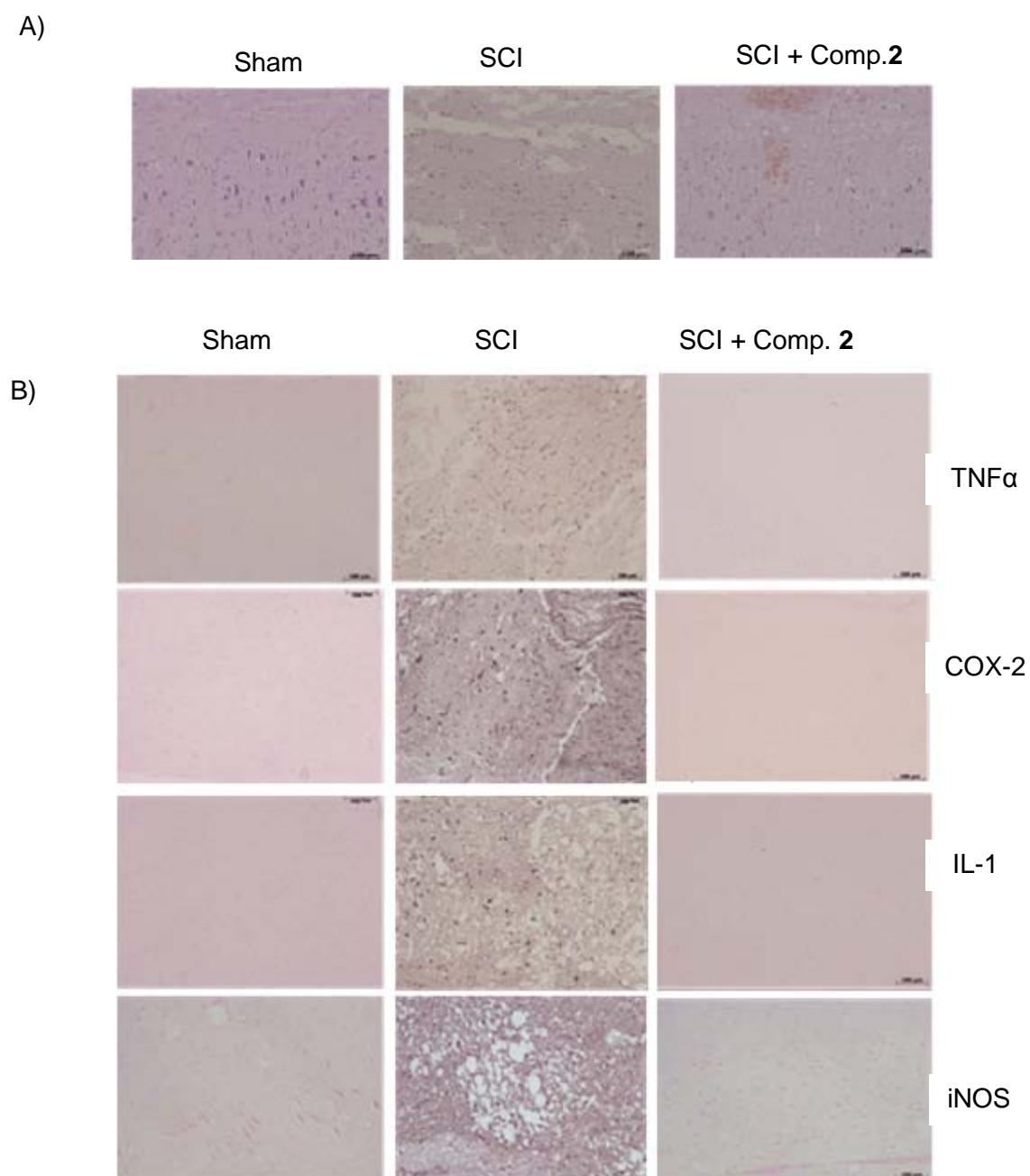


**Figura 24.** Efecto del inhibidor 2 en la función motora de los animales con daño medular.

Asimismo, no sólo es clara la mejora de las alteraciones histológicas observadas en los cortes de médula espinal de los animales tratados con respecto al grupo no tratado sino que también se ha podido comprobar que el tratamiento de los animales con este derivado trae consigo una disminución de distintos marcadores de neuroinflamación como  $\text{TNF}\alpha$ , COX-2, IL-1 e iNOS (Figura 25).

Por lo tanto, se ha demostrado capacidad de los inhibidores de PDE7 tipo quinazolina para reducir la inflamación y el daño tisular producido en un modelo de daño medular<sup>159</sup>.

160



**Figura 25.** Alteraciones histológicas de la médula espinal de los animales con daño medular (A). Efecto de los inhibidores de PDE7 en la expresión de marcadores inflamatorios (B).

### 1.10.2. Modelo de la enfermedad de Parkinson

Con el objetivo de estudiar la eficacia terapéutica de los inhibidores de PDE7 en enfermedades neurodegenerativas, se estudiaron los efectos biológicos del inhibidor **2** en un modelo animal de Parkinson en el IIB-CSIC. En este modelo, se inyecta LPS (10 µg/ mL), directamente en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) de roedores,

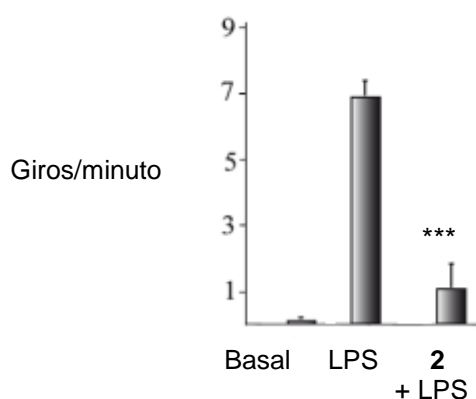
induciendo la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas y la activación de la microglía cercana<sup>161</sup>. De acuerdo al protocolo establecido, se inyectó de forma intracerebral en un único hemisferio LPS o el derivado **2** + LPS en la SNpc. Además, también se incluyó en el experimento un grupo de animales tratados con el inhibidor de PDE7 BRL-50481. Los animales fueron sacrificados 72 h después de la inyección. Debido al daño causado por la administración de LPS, se observa una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas que sin embargo, se reduce en el caso de los animales a los que se les administró el inhibidor de PDE7 en la SNpc (Figura 26 y 27).



**Figura 26.** Efecto neuroprotector del derivado **2** en un modelo de Parkinson. Tinción inmunohistoquímica que muestra la expresión de TH en la SNpc (n = 12 animales).

Teniendo en cuenta que los inhibidores de PDE7 mostraron un efecto neuroprotector en neuronas dopaminérgicas, se llevó a cabo un estudio con el fin de determinar su efecto sobre el comportamiento locomotor de los animales. De esta manera, se inyectó unilateralmente vehículo o LPS (10µg) sólo o combinado con el inhibidor **2** (20nmol) en la SNpc de ratas adultas. Tres semanas después de la inyección a los animales, se les indujo un comportamiento rotatorio mediante una inyección con apomorfina. Los valores

representan la media  $\pm$  ds de tres experimentos diferentes, con 12 animales/grupo experimental. \*\*\* $P < 0.001$  en comparación con los animales inyectados con LPS. En la Figura 27, se observó un descenso en el número de giros por minuto en aquellos animales tratados con el inhibidor **2** en presencia de LPS.



**Figura 27.** Análisis del comportamiento provocado tras la administración del derivado **2** en un modelo de Parkinson. \*\*\* $P < 0.001$ .

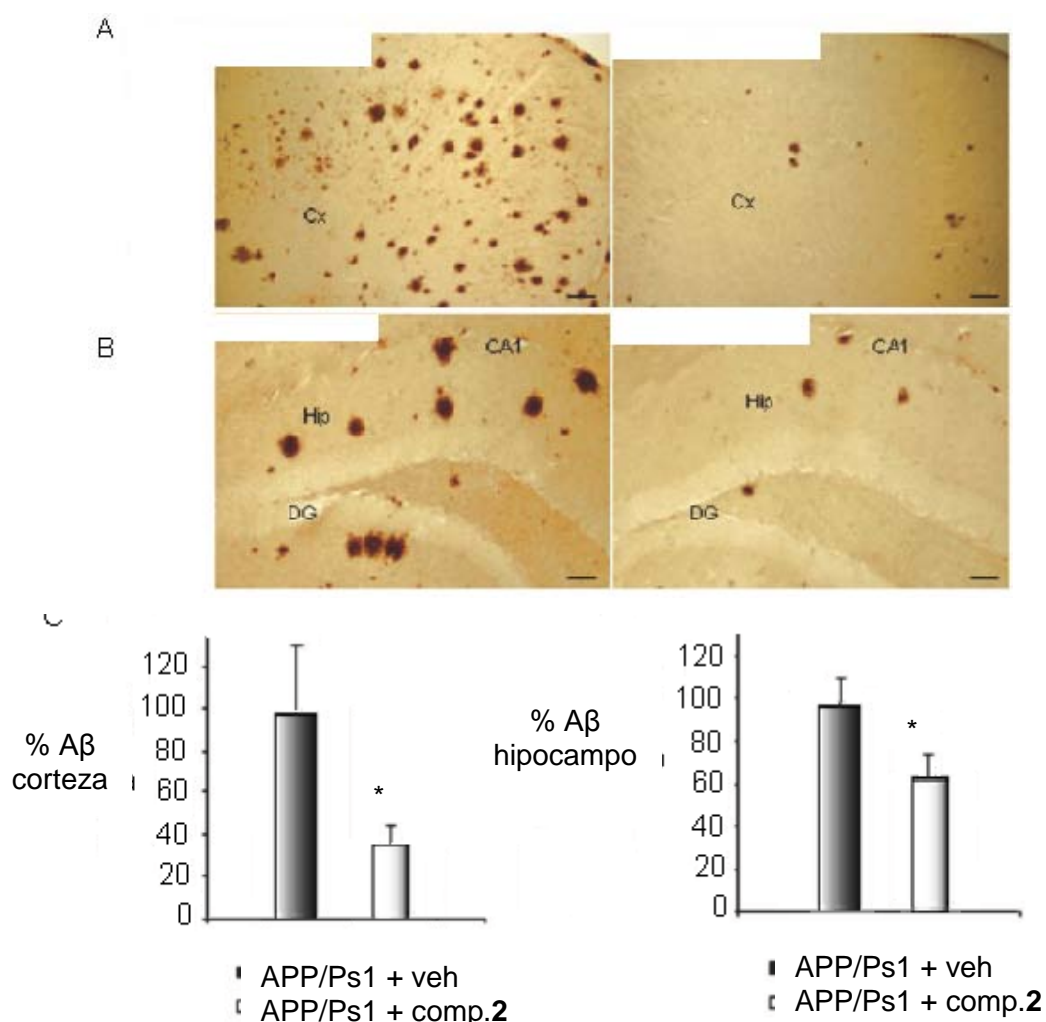
Por lo tanto, estos experimentos *in vivo* mostraron que los inhibidores de PDE7 y en concreto, el compuesto **2**, presenta un efecto neuroprotector frente al daño producido por LPS en neuronas dopaminérgicas, lo que le convierte en un agente prometedor para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson<sup>162</sup>.

### 1.10.3. Modelo de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por los elevados niveles del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en el cerebro de los pacientes. Otra característica fundamental de esta enfermedad es la inflamación y acumulación de astrocitos en los depósitos del péptido  $\beta$ -amiloide. Dado el potencial antiinflamatorio de los inhibidores de PDE7 demostrado anteriormente, se seleccionó el derivado de tioxoquinazolina **2** para evaluar la eficacia de estos agentes para el tratamiento de dicha enfermedad en el grupo de la Dra. Eva Carro del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

En primer lugar, se administró el compuesto **2** y el inhibidor de PDE7 BRL-50481 a cultivos celulares de tejido cortical e hipocampal expuestos al péptido  $A\beta_{1-42}$ , observándose en ambos casos una disminución de la muerte celular por apoptosis en comparación con aquellos cultivos celulares no tratados expuestos al péptido. A continuación se evaluó el efecto de la inhibición de PDE7 sobre los depósitos cerebrales de  $A\beta$  en ratones APP/Ps1 doble transgénicos tras la administración intraperitoneal a

una dosis de 5 mg/Kg del derivado **2** durante cuatro semanas (Figura 28). Estos animales transgénicos se caracterizan por presentar una formación acelerada de los depósitos de péptido A $\beta$ , desarrollando una neuropatología similar a la enfermedad de Alzheimer.



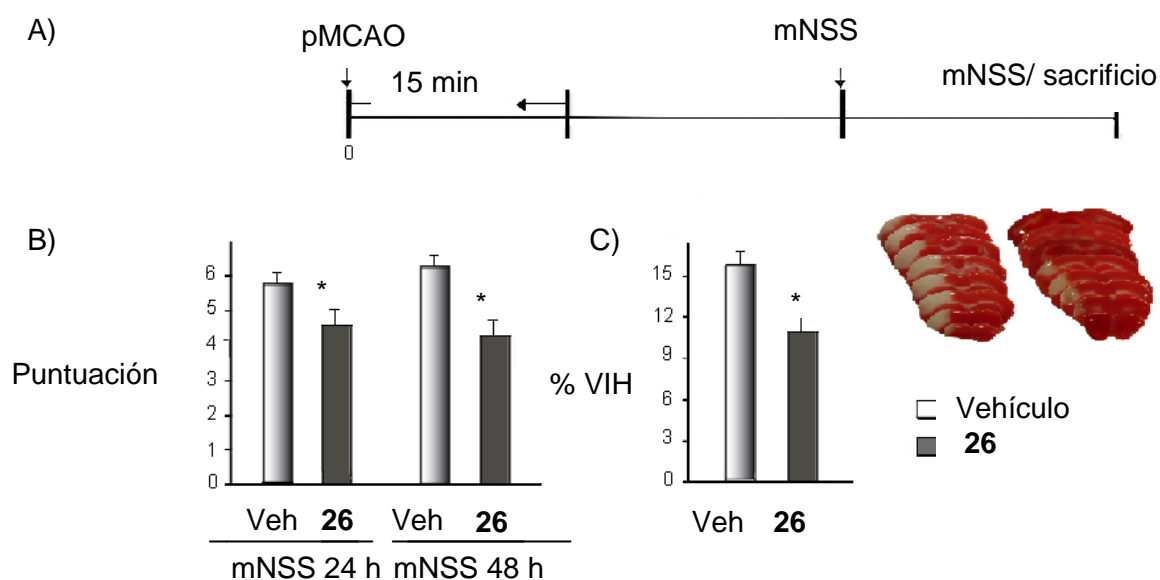
**Figura 28.** Comparación de los depósitos de A $\beta$  en animales APP/Ps1 sin tratar (control) y tras la administración del compuesto **2** en corteza (A) e hipocampo (B). Cuantificación de los resultados (C). 8 animales por grupo. \*P<0.05.

Tal y como se muestra en la figura, se observa un descenso significativo de los depósitos del péptido A $\beta$  en aquellos animales tratados con el inhibidor de PDE7. Todos estos resultados demuestran que los inhibidores de PDE7, y en concreto el derivado de tioxoquinazolina **2**, son agentes terapéuticos eficaces en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer<sup>163</sup>.

#### 1.10.4. Modelo de Isquemia cerebral

Una vez demostrado el potencial neuroprotector del compuesto **26** en cultivos primarios, se estudio este efecto *in vivo*. Para ello, se evaluó la eficacia del inhibidor en un modelo de isquemia<sup>164</sup> en el grupo de la Prof. M<sup>a</sup> Ángeles Moro de la Universidad Complutense de Madrid.

La inducción de isquemia focalizada en los animales se realizó por oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO)<sup>165, 166</sup> mediante ligadura de la misma. El inhibidor se administró por inyección intraperitoneal en una única dosis (5 mg/ Kg) quince minutos después de provocar la lesión arterial. Transcurridas 24 h y 48 h se realizó una evaluación neurológica (mNSS) y a las 48 h se sacrificaron los ratones, se extrajeron sus cerebros y se dividieron en rodajas de 2 mm de espesor que se tiñeron con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) para poder visualizar el área infartada.



**Figura 29.** Protocolo del tratamiento farmacológico (A). Evaluación neurológica 24 h y 48 h después de la pMCAO (B). Volumen hemisférico infartado (VIH) 48 h después de la pMCAO (C). \*P<0.05.

En todos los casos tratados se observó una reducción considerable del área infartada respecto a los controles así como una mejoría en los síntomas neurológicos que presentaban los animales (Figura 29). Cabe destacar también que tanto en el grupo control como en el tratado no se produjeron diferencias de peso significativas respecto al peso que presentaba los animales al principio del experimento. A la vista de estos resultados, queda por tanto demostrado el efecto neuroprotector *in vivo* de los

inhibidores de PDE7, tras la administración del derivado de quinazolina **26** en un modelo de isquemia en ratón<sup>167</sup>.

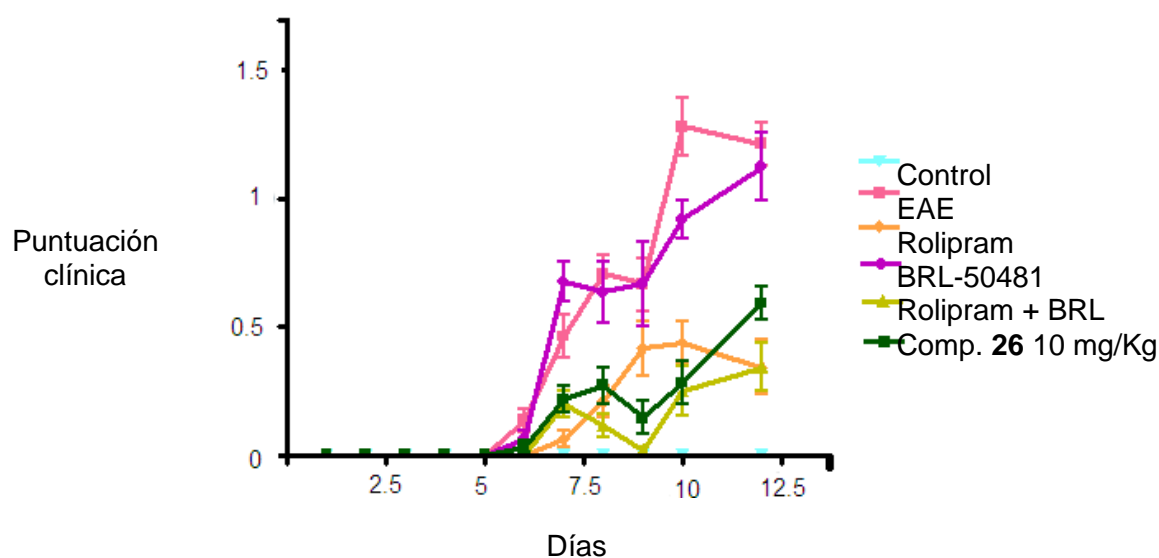
### **1.10.5. Modelos de Esclerosis Múltiple**

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica producida por la lesión de la vaina de mielina presente en las neuronas del SNC. Debido a la afectación de dichas neuronas, el paciente presenta una movilidad muy reducida y en casos severos, invalidez. Dado que actualmente se desconoce la etiología, resulta complicado validar modelos animales de esta enfermedad. En estos casos, se utilizan modelos animales que simulan la sintomatología de la enfermedad, y en ocasiones, es fundamental emplear varios modelos con el fin de demostrar la eficacia de las nuevas terapias de forma certera<sup>168</sup>. En nuestro caso, con el objetivo de demostrar el potencial uso de los inhibidores de PDE7 en el tratamiento de este tipo de enfermedades, se ha empleado tanto un modelo autoinmune como un modelo inducido por virus.

#### **1.10.5.1. Modelo de Encefalomiелitis alérgica experimental**

Este modelo está basado en la inflamación mediada por los linfocitos T específicos frente a mielina, siendo uno de los más utilizados actualmente debido a su similitud clínica e histopatológica con la esclerosis múltiple. La encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) fue inducida en ratones tipo SJL mediante la inmunización con MOG<sub>35-55</sub> junto con el adyuvante completo de Freund desde el día 0. Como consecuencia, se obtiene un modelo crónico moderado, permitiendo tanto el estudio de la patogénesis mediada por linfocitos T CD4+ Th1/ Th17, el daño axonal mediado por los linfocitos T CD8+ como la validación preclínica de los compuestos con potencial terapéutico. Este experimento se llevó a cabo en el grupo de la Dra. Sara Ballester en el Instituto de Salud Carlos III.

Tras la inmunización con MOG<sub>35-55</sub>, los animales comienzan a presentar deterioro neurológico a partir del día 8, alcanzando su máximo en el día 17. El inhibidor **26** se administró por vía intraperitoneal de forma diaria (10 mg/Kg) a partir del día 5. Asimismo, se administró también el inhibidor estándar de PDE4, rolipram y el inhibidor de PDE7, BRL-50481, con el objetivo de comparar resultados. Los signos clínicos y la puntuación se siguieron hasta el día 20 (Figura 30).



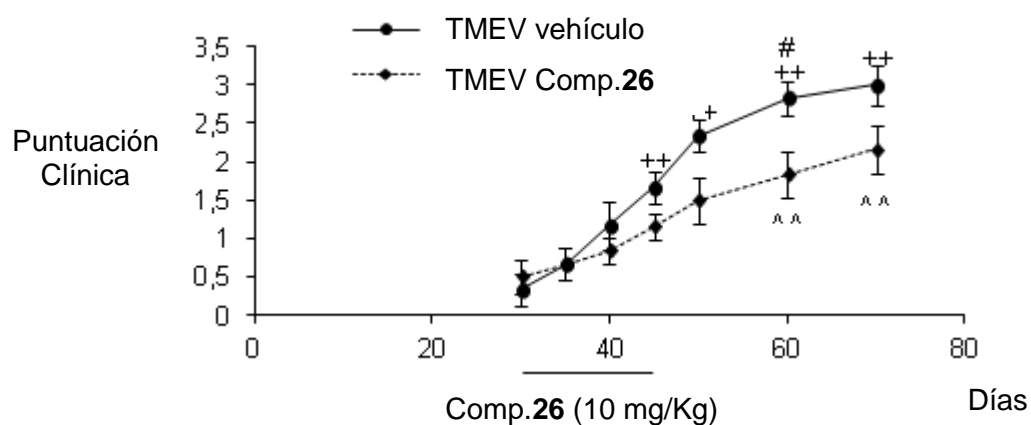
**Figura 30.** Efecto del derivado **26**, BRL-50481 y Rolipram en el modelo de EAE.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede observar que los animales enfermos sin tratar presentaron una mayor puntuación clínica debido a una mayor afectación neurológica. Por otra parte, el tratamiento de los ratones con el inhibidor BRL-50481 no mostró una modificación significativa del curso de la enfermedad, mientras que su administración conjunta con rolipram en el grupo de animales tratados supuso una mejora de la función motora debido a un efecto sinérgico. Por último, los animales tratados con el inhibidor de PDE7 tipo quinazolina **26** mostró una menor afectación neurológica, con resultados comparables al grupo tratado con BRL-50481 y rolipram.

#### 1.10.5.2. Modelo de Theiler

Tal y como se ha comentado anteriormente, actualmente se desconoce la causa de la esclerosis múltiple. Una de las hipótesis propuestas está basada en la existencia de un agente viral como posible causa de esta enfermedad. Basándose en esta hipótesis, se ha desarrollado un modelo mediante la inoculación intracerebral del virus de Theiler, se genera una desmielinización en los ratones SJL/J afectados, simulando la enfermedad en su variante primaria progresiva (Encefalomiélitis murina por infección del virus de Theiler o TMEV-IDD)<sup>169</sup>. Cabe destacar que la inoculación del virus debe realizarse entre las cuatro y seis semanas de edad con el objetivo de simular la aparición temprana (infancia o adolescencia) de la enfermedad. Este estudio se llevó a cabo en el grupo de la Prof. Carmen Guaza del Instituto Cajal (ICajal-CSIC). Tras la inoculación del virus, los animales comenzaron a presentar un deterioro neurológico a partir del día 30. El inhibidor **26** se administró por vía intraperitoneal en una dosis diaria

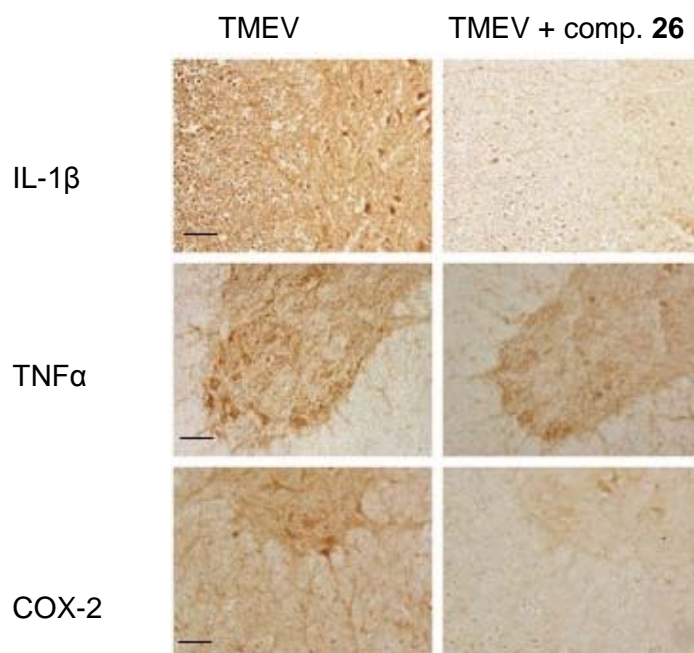
de 10 mg/Kg durante la fase asintomática. Posteriormente, una vez establecida la enfermedad, la dosis diaria del tratamiento se redujo a 5 mg/Kg. Los signos clínicos fueron seguidos hasta el día 75 postinfección (Figura 31).



**Figura 31.** Efecto del derivado **26** en el modelo de Theiler (n = 6 animales, en tres experimentos diferentes).

Observando los datos obtenidos, en el caso de los animales enfermos tratados con el compuesto **26** se observa una disminución significativa del deterioro neurológico. Mientras que en el caso de los animales enfermos no tratados, se observa una puntuación clínica significativamente mayor que el grupo tratado con el compuesto. En la Figura 32, se puede observar la reducción significativa de las citoquinas proinflamatorias en cortes histológicos correspondientes a los animales tratados con el inhibidor **26**.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en los modelos de esclerosis múltiple de EAE y TMEV-IDD, los inhibidores de PDE7 tipo tioxoquinazolina presentaron efectos neuroprotectores y antiinflamatorios que pueden ser de gran utilidad para el tratamiento de esta enfermedad<sup>170</sup>.

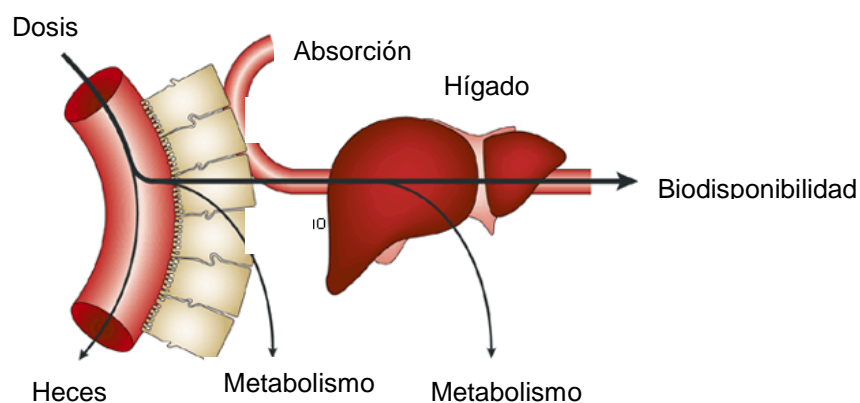


**Figura 32.** Análisis inmunohistoquímico de la médula espinal de los ratones en el modelo de Theiler.

### 1.11. FARMACOCINÉTICA *IN VIVO*

En el proceso tradicional de investigación farmacológica, las causas principales que pueden hacer fracasar el desarrollo de un fármaco son tanto sus malas propiedades farmacocinéticas, es decir, absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) como problemas relacionados con su toxicidad. Por ello, es fundamental un estudio de estas propiedades durante la identificación de posibles candidatos.

Una de las propiedades más exigidas a una molécula durante su desarrollo es la biodisponibilidad oral (Figura 33). Esta propiedad refleja la fracción de la dosis administrada que alcanza de forma inalterada la circulación sistémica y la velocidad a la que se produce dicho proceso. A partir de esta propiedad se puede establecer la vía de administración y la posología necesaria para alcanzar los niveles circulatorios deseados. La distribución por la circulación sistémica está limitada por diferentes factores como la absorción, el metabolismo de primer paso en el hígado, la unión a proteínas plasmáticas.



**Figura 33.** Proceso ADME de un fármaco.

En este sentido, dado el potencial de los derivados de las tioquinazolina **2** y **26** para el tratamiento de enfermedades como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis múltiple y con el fin de conocer su biodisponibilidad oral y penetración en cerebro, se llevó a cabo un estudio farmacocinético determinando la fracción del fármaco distribuida en plasma y cerebro tras su administración. Para ello, se utilizaron machos de ratones albinos suizos (3 animales por cada punto). La formulación empleada y volúmenes totales fueron: 100% de DMSO y 1mL/Kg para la administración intraperitoneal y 0.5% p/v de carboximetilcelulosa sódica y 0.1% v/v Tween80 en agua y 10 mL/Kg para el caso de la administración oral. La dosis administrada en ambos casos fue de 10 mg/Kg. Los niveles plasmáticos y cerebrales fueron determinados por HPLC-MS (Tabla 15).

**Tabla 15.** Parámetros farmacocinéticos en plasma y cerebro tras la administración del derivado **2** (10 mg/Kg).

Vía	Medio	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	Ratio Cerebro/Plasma
i.p.	Plasma	0.50	1697.06	0.35
	Cerebro	0.50	805.48	
p.o.	Plasma	0.25	1173.70	0.21
	Cerebro	0.25	300.66	

Los datos obtenidos reflejan que el derivados de tioquinazolina **2** es capaz de alcanzar el SNC tras su administración tanto por vía intraperitoneal como oral, poniendo de manifiesto que este inhibidor además de ser capaz de pasar la BHE, presenta una buena biodisponibilidad oral, lo que unido a los resultados obtenidos en los correspondientes modelos animales, le convierte en un candidato prometedor para ser desarrollado como fármaco para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o

Alzheimer<sup>171</sup>. Asimismo, el derivado **26** también presenta unas propiedades farmacocinéticas similares, lo que unido a la eficacia demostrada, los convierte en candidatos prometedores para el tratamiento de enfermedades de carácter neurológico e inflamatorio<sup>172</sup>.



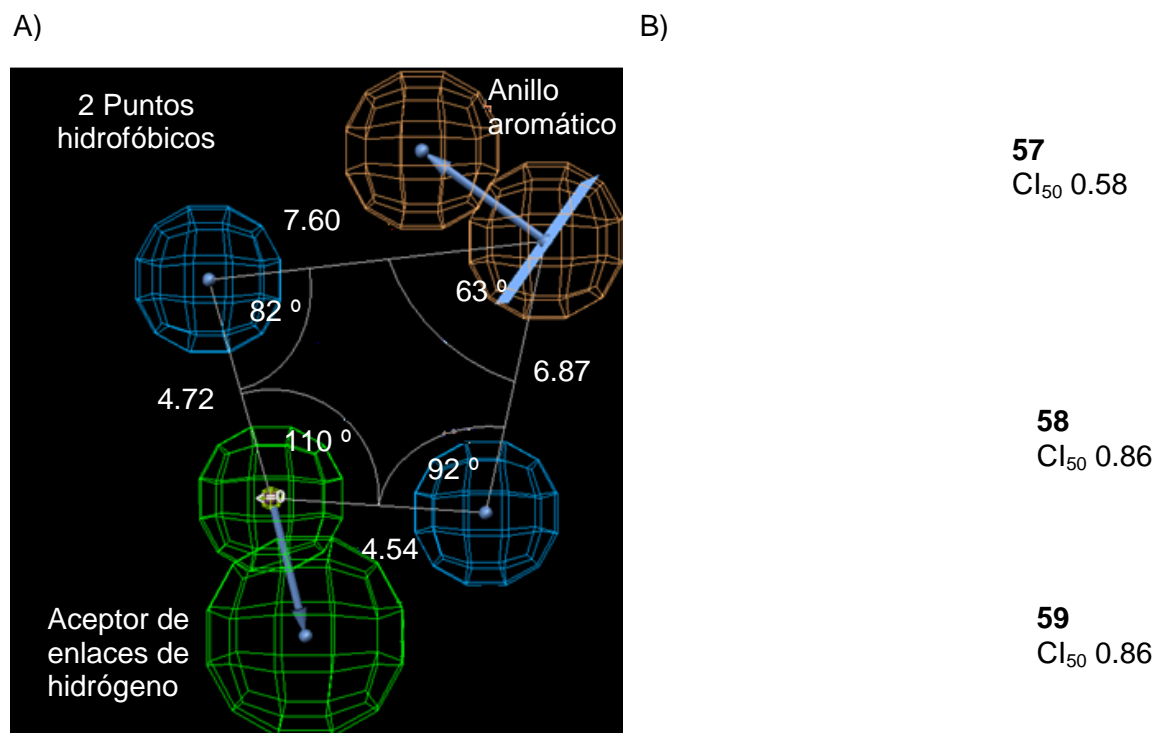
## **CAPÍTULO 2**



## 2. DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DE PDE7

### 2.1. ANTECEDENTES

En el proceso de búsqueda de nuevos inhibidores de PDE7, en nuestro grupo de trabajo se había desarrollado un modelo teórico de farmacóforo, basado en las familias de inhibidores de PDE7 disponibles en aquel momento<sup>173</sup> (Figura 34).



**Figura 34.** Farmacóforo de cuatro puntos definido por *HypoGen* ( $T = 1.6 \text{ \AA}$ ) (A). Actividades experimentales en PDE7 de los prototipos **57-59** (B).

A continuación, se llevó a cabo una búsqueda virtual de nuevos cabeza de serie en quimiotecas comerciales como *Maybridge*, *ChemDiv* o *Specs*, permitiendo la identificación de nuevos prototipos tras considerar no sólo los ángulos y distancias definidos en el farmacóforo sino también las reglas de Lipinski. Este cribado virtual permitió la identificación de 12 compuestos con una Cl<sub>50</sub> teórica en el rango nanomolar que tras ser adquiridas a la casa comercial correspondiente, fueron evaluados experimentalmente frente a PDE7A1 encontrándose que tres de ellos inhibían la enzima en rango submicromolar (Tabla 16)<sup>174</sup>. De estos tres prototipos, se han seleccionado tanto el derivado del anillo de furano (**57**) como el derivado del anillo de tiazol (**58**) como

cabezas de serie para llevar a cabo su optimización y síntesis con el objetivo de encontrar nuevas familias de inhibidores de PDE7.

## 2.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DEL ANILLO DE FURANO

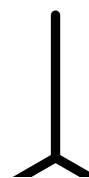
### 2.2.1. Síntesis de los derivados del anillo de furano

El derivado 3,4,5-trietoxibenzoato de 5-(2-metil-4-nitrofenil)-2-furilmetilo (**57**) presenta dos anillos aromáticos diferentemente sustituidos unidos mediante un conector formado por el anillo de furano y un enlace éster. Con el objetivo de explorar las relaciones estructura-actividad de esta familia, se llevaron a cabo modificaciones tanto en el número como en la naturaleza de los sustituyentes de ambos anillos aromáticos. En cuanto a la estructura del conector, se estudió la importancia de la presencia tanto del grupo éster como del anillo de furano (Figura 35).

**Figura 35.** Posibles puntos a modificar en los derivados del anillo de furano.

La ruta sintética para obtener los derivados de benzoato de 5-fenil-2-furilmetilo consiste en una reacción de acoplamiento entre el ácido 3,4,5-trietoxibenzoico o 3,4,5-trimetoxibenzoico y los derivados de 5-fenil-2-furilmetanol correspondientes en presencia de hexafluorofosfato del agente acoplante y trietilamina (TEA) como base en diclorometano. Tras probar distintos agentes acoplantes, se seleccionó el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) como el más adecuado en estos casos por su fácil manejo así como por la menor toxicidad del derivado de fosforamida resultante. Empleando este procedimiento, se obtuvieron los derivados **60-65** en los cuales por una parte se introdujeron distintos sustituyentes en el anillo aromático unido al furano y por otro, se obtuvieron también derivados en los cuales, el grupo etoxilo se sustituyó por metoxilo. Todos los derivados de 5-fenil-2-furilmetanol empleados son comerciales, excepto el 5-(2,4-diclorofenil)-2-furilmetanol

(66) que fue necesario sintetizarlo previamente mediante la reducción del ácido 5-(2,4-diclorofenil)-2-furoico con hidruro de litio y aluminio ( $\text{LiAlH}_4$ ) de acuerdo con el procedimiento descrito en la parte experimental. En general, estos derivados se obtuvieron con rendimientos de moderados a bajos, debido probablemente a la inestabilidad de los derivados de 5-fenil-2-furilmetanol (Esquema 5).



**Esquema 5.** Ruta sintética para la obtención de los derivados **60-65**.

A continuación, se propuso la modificación del enlace éster de manera que el grupo carbonilo del mismo estuviese unido directamente al anillo de furano. Para ello, siguiendo el procedimiento anterior se obtuvieron los derivados de 5-fenil-2-furoato de bencilo (**67-85**) mediante una reacción de acoplamiento entre los derivados del ácido 5-fenil-2-furoico y el alcohol 3,4,5-trietoxibencílico o 3,4,5-trimetoxibencílico en presencia de PyBOP y TEA en diclorometano. Dentro de las modificaciones de la estructura de estos compuestos, se propuso la introducción de sustituyentes electroattractores ( $\text{CF}_3$ ,  $\text{NO}_2$  y  $\text{Cl}$ ) y electrodonadores (Me y OMe) sobre las posiciones 2, 3 y 4 de dicho anillo aromático así como la eliminación del anillo aromático unido al furano, con el objetivo de estudiar su influencia sobre la actividad biológica. Además, se modificaron tanto el número como la naturaleza de los grupos alquilo presentes en el alcohol bencílico de partida (Esquema 6). La mayoría de estos nuevos derivados se obtuvieron con rendimientos moderados. Sin embargo, en el caso de los derivados con sustituyentes electroattractores ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{Cl}$  y  $\text{CF}_3$ ) en posiciones 2 y 4 del anillo aromático, se observó un descenso en los rendimientos (derivados **70-74**, **77** y **85**).

**Esquema 6.** Ruta sintética para la obtención de los derivados **67-85**.

Teniendo en cuenta un futuro desarrollo farmacológico de estos compuestos y de acuerdo a los principios de bioisosterismo<sup>175</sup>, se propuso la sustitución del enlace éster por un enlace amida, a fin de aportar mayor estabilidad a estos derivados frente a la hidrólisis intentando mantener la actividad biológica. Así, se llevó a cabo la síntesis de los derivados de 5-fenil-2-furamida de bencilo haciendo reaccionar los derivados del ácido furoico correspondientes con la 3,4,5-trimetoxibencilamina en presencia de PyBOP y TEA a temperatura ambiente. De igual modo que en los derivados de 5-fenil-2-furoato de bencilo preparados previamente (**67-85**), los derivados de furamida **87** y **88** que presentaban sustituyentes electroattractores como NO<sub>2</sub> en posición 2 del anillo aromático unido al furano presentaron rendimientos menores (Esquema 7).

**Esquema 7.** Ruta sintética para la obtención de los derivados **86-88**.

Otra de las modificaciones propuestas fue la referente al anillo de furano. Siguiendo de nuevo los principios de bioisoterismo<sup>175</sup>, se sustituyó el anillo de furano por un anillo de tiofeno. Dado que en el momento de realizar la síntesis, no se disponía comercialmente del ácido 5-fenil-2-tiofencarboxílico, fue necesario diseñar una ruta sintética alternativa. Para ello, se realizó una reacción de acoplamiento entre el alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico con el ácido 5-bromo-2-tiofenocarboxílico en presencia de PyBOP y TEA en diclorometano. Posteriormente, se llevó a cabo la formación de un enlace carbono-carbono mediante una reacción de Suzuki en presencia de Pd (0) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 90 °C bajo irradiación microondas entre el derivado **89** sintetizado y el ácido fenil borónico. El catalizador empleado fue tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (Esquema 8).

**Esquema 8.** Ruta sintética para la obtención de los derivados **89** y **90**.

La asignación estructural de los nuevos derivados del anillo de furano y tiofeno sintetizados fue establecida en base a los datos analíticos y espectroscópicos de resonancia magnética nuclear tanto de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$ , que se encuentran recogidos en la parte experimental.

## 2.2.2. Evaluación biológica

### 2.2.2.1. Evaluación enzimática

**Tabla 17.** Valores de inhibición en PDE7A1 de los derivados **60-90**.

Comp.	% inh @10 $\mu\text{M}$	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
60	24.4	-
61	49.5	33.37 $\pm$ 8.1
62	48.8	12.34 $\pm$ 3.2
63	3.7	-
64	39.9	-
65	16.4	-
67	10.0	-
68	-9.9	-
69	57.9	5.17 $\pm$ 1.1
70	54.9	2.63 $\pm$ 0.9
71	34.6	-
72	38.3	-
73	8.0	-
74	28.8	-
75	49.1	7.31 $\pm$ 3.5
76	14.0	-
77	48.0	14.07 $\pm$ 2.9
78	14.0	-
79	30.7	-
80	30.8	-
81	31.1	-
82	29.2	-
83	28.0	-
84	44.8	-
85	41.6	-
86	23.5	-
87	70.5	3.20 $\pm$ 1.2
88	-10.3	-
89	-1.5	-
90	30.1	-

BRL-50481 (% inh @10 $\mu\text{M}$ ): 99.5

Una vez sintetizadas las moléculas deseadas, se llevó a cabo la medida de la inhibición de PDE7A1 en la Universidad de Santiago de Compostela empleando un ensayo radiométrico a partir de la co-incubación de la enzima recombinante humana con el  $^3\text{H}$ -AMPc. En la Tabla 17 se recogen los porcentajes de inhibición medidos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Asimismo, se calculó la  $\text{CI}_{50}$  de los derivados que presentaron un porcentaje de inhibición de PDE7A1 a 10  $\mu\text{M}$  alrededor de 50% (Tabla 17).

En primer lugar, se observa que tanto la sustitución del anillo aromático unido al furano en el caso del compuesto **69** por hidrógeno (derivado **67**) o por un grupo metilo (derivado **68**) como la sustitución del anillo de furano por el de tiofeno (derivado **90**) conllevan una pérdida de la actividad biológica. Es decir, la presencia del anillo de furano y el anillo aromático adyacente parece ser fundamental para la actividad. Por otra parte, tanto el compuesto **69** sin sustituyentes en el anillo aromático unido al furano como los compuestos **70** y **87** con sustituyentes electroattractores en posición 2 del anillo aromático unido al furano presentaron las mejores actividades.

En lo que se refiere a las  $\text{CI}_{50}$  calculadas podemos observar que todos los compuestos presentaron valores menores que en el caso del prototipo **57**. Dado que las condiciones del ensayo enzimático difieren del empleado para identificar los cabezas de serie, se llevó a cabo de nuevo la evaluación del derivado de furano **57** en las nuevas condiciones, encontrándose un valor de inhibición de PDE7A1 de 29% a 10  $\mu\text{M}$ , corroborándose así, la mejora de la actividad. A continuación, se seleccionaron aquellos derivados de furano que presentaron mejores  $\text{CI}_{50}$ , y se evaluó su capacidad de inhibición de PDE3A con el objetivo de evitar posibles efectos secundarios en los futuros candidatos a desarrollo, dado que la inhibición de PDE3A está asociada a efectos cardiotoxicos<sup>61</sup> (Tabla 18).

**Tabla 18.** Valores de inhibición en PDE3A de los derivados más activos.

Comp.	%inh PDE3A @ 10 $\mu\text{M}$	$\text{CI}_{50}$ PDE3A ( $\mu\text{M}$ )	Ratio PDE7/PDE3
<b>62</b>	3.0 $\pm$ 12.7	104.2 $\pm$ 36.6	0.12
<b>69</b>	46.1 $\pm$ 3.0	54.6 $\pm$ 12.1	0.09
<b>70</b>	74.9 $\pm$ 5.4	1.8 $\pm$ 0.8	1.44
<b>75</b>	11.0 $\pm$ 4.0	-	-
<b>77</b>	57.1 $\pm$ 12	3.4 $\pm$ 1.3	4.15
<b>87</b>	49.6 $\pm$ 1.2	3.9 $\pm$ 0.7	0.82

Considerando los nuevos datos obtenidos, se seleccionó el derivado **69** para su evaluación frente a PDE4D y PDE4B, ya que PDE4D es la isoenzima responsable de los efectos eméticos característicos de los inhibidores de PDE4<sup>145</sup> (Tabla 19). Además,

los compuestos fueron evaluados frente a PDE7B a fin de conocer el perfil de selectividad frente a las isoformas de PDE7.

**Tabla 19.**  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) en diferentes PDEs del inhibidor **69**.

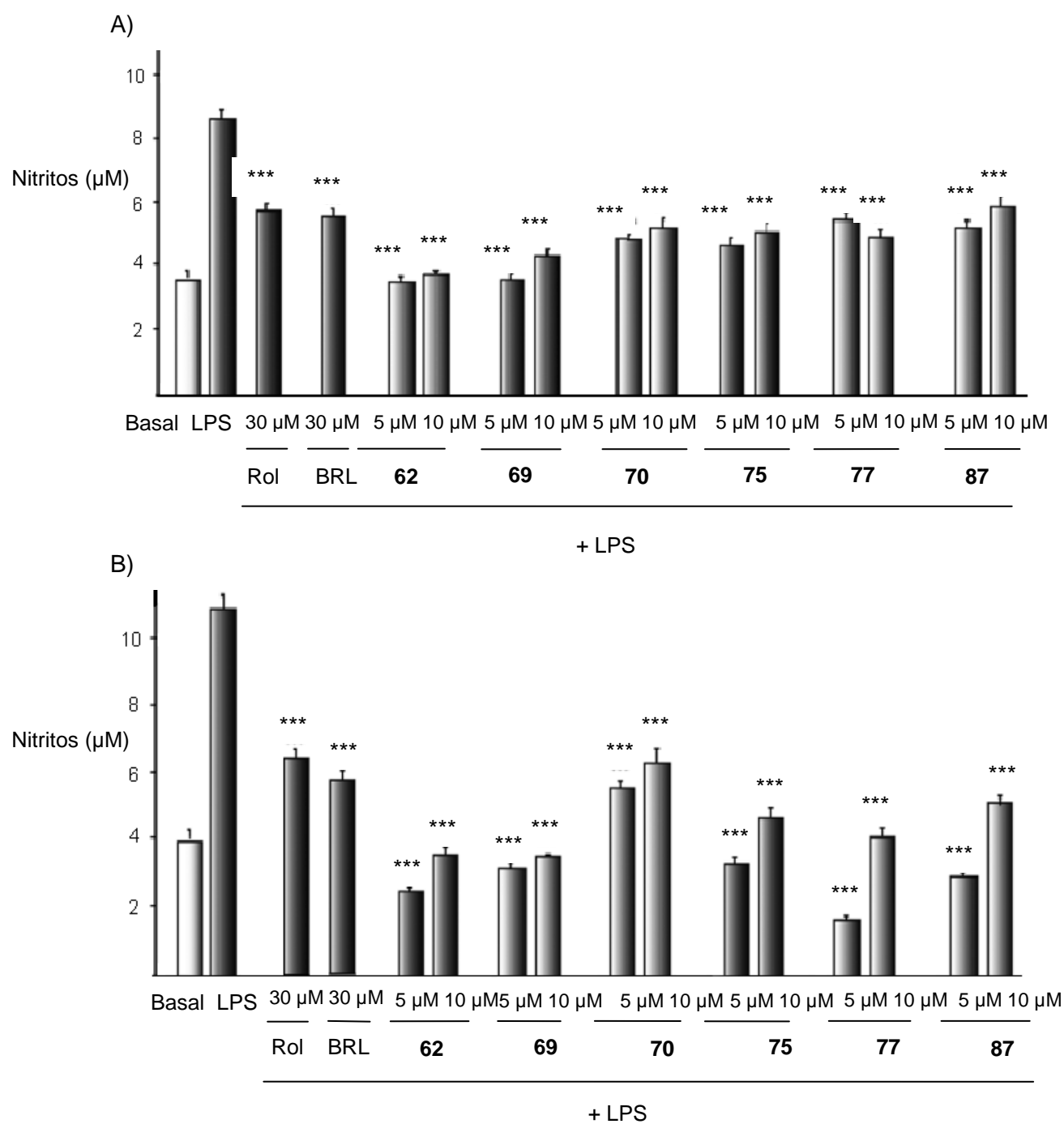
	<b>Actividad</b>
<b>%inh PDE7B @10<math>\mu M</math></b>	23.2 $\pm$ 4.4
<b><math>CI_{50}</math> PDE7A</b>	5.1 $\pm$ 1.1
<b><math>CI_{50}</math> PDE3A</b>	54.6 $\pm$ 8.1
<b><math>CI_{50}</math> PDE4B</b>	12.4 $\pm$ 4.2
<b><math>CI_{50}</math> PDE4D</b>	66.3 $\pm$ 13.9

Dado que el derivado **69** no inhibe PDE3A ni PDE4D a la misma concentración en la que inhibía a PDE7A, se podría decir que este compuesto *a priori* carecería de efectos cardiotóxicos y eméticos, lo cual permite su selección para futuros estudios farmacológicos. Por otra parte, destacar además la selectividad del derivado de furano **69** frente a PDE7A respecto a PDE7B, siendo el primer inhibidor selectivo de PDE7A descrito en la literatura.

#### **2.2.2.2. Ensayos de neuroprotección frente al daño inflamatorio in vitro**

A fin de conocer la toxicidad potencial de los derivados de furano sintetizados, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular con aquellos que presentaron una menor  $CI_{50}$  (**62**, **69**, **70**, **75**, **77** y **87**). Para ello, se empleó el ensayo basado en la reducción del MTT<sup>176</sup> (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) por las células vivas dando lugar al derivado reducido correspondiente (formazan). Éste último puede ser cuantificado por métodos colorimétricos. Este ensayo permite conocer la fucionabilidad mitocondrial de las células tratadas y por lo tanto, la viabilidad celular en presencia de los compuestos. Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de la Prof. Ana Pérez-Castillo en el IIB-CSIC. Para ello, se emplearon los derivados seleccionados así como BRL-50481 (inhibidor de PDE7) y rolipram (inhibidor de PDE4) como controles. Así, los resultados obtenidos mostraron que tanto los derivados ensayados como rolipram y BRL-50481 a las concentraciones de 5  $\mu M$  y 10  $\mu M$  mantienen una alta viabilidad de los cultivos celulares de astrocitos y microglía. Posteriormente, con el objetivo de demostrar la eficacia terapéutica de los inhibidores de PDE7 en enfermedades neurodegenerativas, se realizó el estudio de las propiedades antiinflamatorias de los compuestos seleccionados en diferentes células del SNC dañadas con LPS. El efecto antiinflamatorio de los compuestos ensayados se mide tras

24 h de incubación con el inhibidor a través de la producción de NO (óxido nítrico, producto de oxidación) (Figura 36).

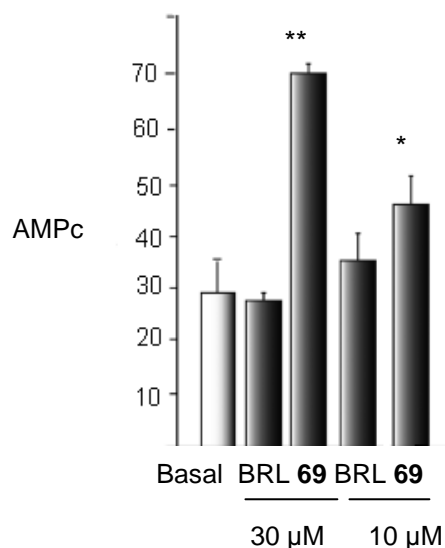


**Figura 36.** Medida de la producción de nitritos en cultivos primarios de microglía (A) y astrocitos (B) estimulados por LPS en presencia de los inhibidores de PDE7 derivados de furano. \*\*\* $P < 0.001$ .

Así, podemos observar en todos los casos, como los inhibidores de PDE7 derivados de furano ensayados protegen frente al daño causado por la inflamación inducida por LPS en cultivos primarios de astrocitos y microglía. Cabe destacar además que en algunos casos, su efecto es superior al producido por los estándares rolipram y BRL 50481.

### 2.2.2.3. Medida de niveles de AMPc

Con el objetivo de comprobar los efectos biológicos de estos derivados, se propuso correlacionar la inhibición de PDE7 con los niveles totales de AMPc en células de macrófagos murinos (Raw 264.7). De entre los derivados de furano que presentaban mejor  $CI_{50}$ , se seleccionó el derivado **69**. Además, se empleó el inhibidor de PDE7, BRL-50481<sup>91</sup> como referencia (Figura 37).



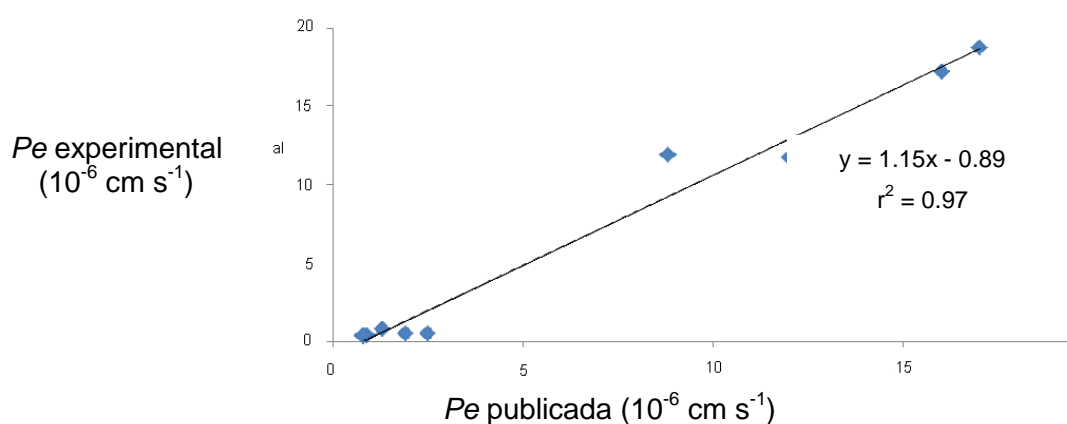
**Figura 37.** Medida de los niveles de AMPc en células Raw 264.7 en presencia de los inhibidores de PDE7 derivados de furano. \*\* $P < 0.01$  y \* $P < 0.05$ .

La inhibición de las fosfodiesterasas está correlacionada directamente con un aumento de los niveles de AMPc citosólico, puesto que se inhibe su degradación. Como se puede observar en la Figura 39, el inhibidor de PDE7 tipo furano **69** provocó un aumento del segundo mensajero en la línea celular estudiada en mayor medida que el inhibidor de PDE7 BRL-50481.

### 2.2.2.4. Paso de barrera hematoencefálica

Como se ha comentado anteriormente, dentro del proceso de desarrollo de un fármaco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, el paso de la BHE es una característica fundamental. En este caso, para medir la capacidad de penetración por difusión pasiva de los derivados de anillo del furano se empleó el método *in vitro* PAMPA-BBB del mismo modo que en el caso de los derivados de tioquinazolina descritos en esta memoria. Así, los compuestos fueron ensayados disueltos en una mezcla de tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 y etanol en proporción 70:30. El método utilizado se validó ensayando en las mismas condiciones productos comerciales de los cuales se conocía su capacidad de penetración en el SNC, obteniéndose una buena correlación lineal ( $r^2 = 0.97$ ) entre la permeabilidad experimental y la descrita. En la Tabla 20 se detalla el resultado obtenido en el experimento con el derivado **69**.

**Tabla 20.** Resultados del ensayo PAMPA-BBB del derivado **69**.



Comp.	Media Pe	SNC	Pe Biblio. <sup>149</sup>
Atenolol	0.3	-	0.8
Enoxacino	0.4	-	0.9
Cafeina	0.8	-	1.3
Promazina	11.9	+	8.8
Ofloxacino	0.4	-	0.8
Testosterona	18.7	+	17
Hidrocortisona	0.5	-	1.9
Piroxicam	0.5	+	2.5
Verapamilo	17.2	+	16
Desipramina	11.7	+	12
<b>69</b>	8.1	+	

Teniendo en cuenta estos resultados, el inhibidor **69** penetraría *a priori* la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva, por tanto, este tipo de compuestos serían capaces de alcanzar sus dianas terapéuticas en el sistema nervioso central.

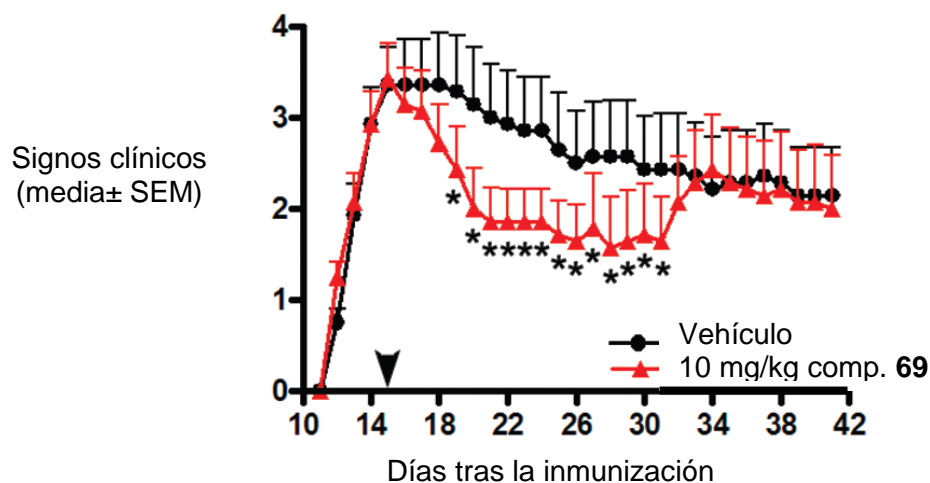
#### **2.2.2.5. Eficacia en un modelo in vivo de esclerosis múltiple**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes modelos de esclerosis múltiple para los inhibidores de PDE7 tipo tioxoquinazolina, se ha seleccionado, en este caso, el modelo de Encefalomiелitis experimental alérgica (EAE) con el objetivo de demostrar la eficacia de los derivados de anillo de furano para el tratamiento de esta enfermedad. Este experimento se llevó a cabo por el grupo de la Prof. Guadalupe Mengod en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC). Como se ha comentado anteriormente, este modelo está basado la inflamación mediada por los linfocitos T específicos frente a la inmunización con MOG<sub>35-55</sub> junto con el adyuvante completo de Freund desde el día 0 en ratones tipo C57BL/6J. El inicio de la sintomatología se produce en los días 12-14 días posteriores a la inoculación, provocando una parálisis que se inicia desde la cola a las patas delanteras, mostrando las lesiones observadas en los pacientes de esta enfermedad. En el caso de los derivados del anillo de furano, el tratamiento farmacológico se administra antes de aparecer la sintomatología clínica en los ratones, por lo tanto constituye un tratamiento neuroprotector.

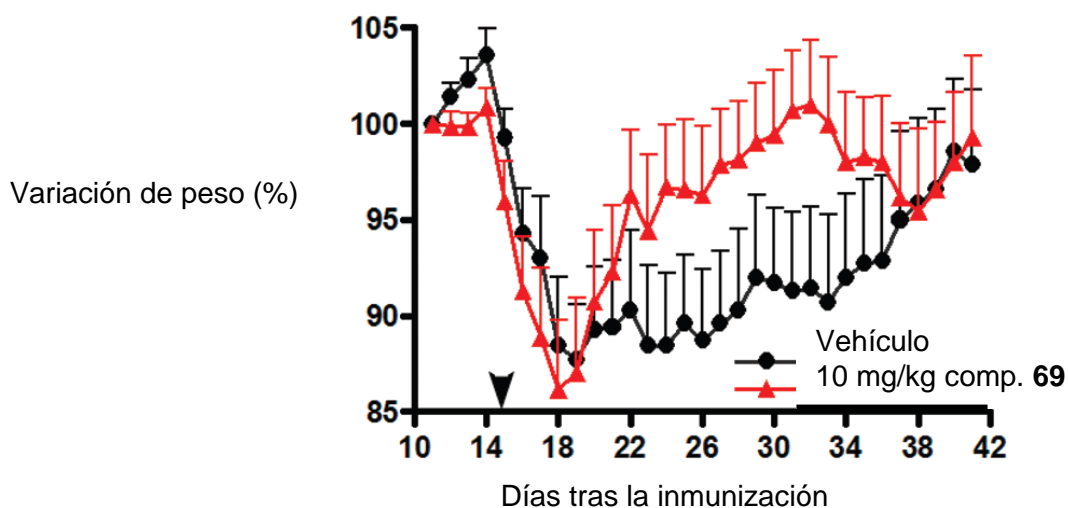
El inhibidor de PDE7 **69** se administró por vía intraperitoneal a partir del día 5 postinmunización a una dosis diaria de 10 mg/Kg, es decir, antes del comienzo de la enfermedad. Los animales comenzaron a presentar deterioro neurológico a partir del día 12, alcanzando su máximo en el día 16. Los signos clínicos y la puntuación han sido seguidos hasta el día 41 (Figura 38).

A la vista de los resultados obtenidos, se observa una mejora significativa de la sintomatología durante los primeros 15 días de tratamiento así como una recuperación en el peso del animal en el grupo tratado por el inhibidor. Sin embargo, los animales sin tratamiento presentan una puntuación clínica sin apenas variación, así como una mayor pérdida de peso. Por tanto, la eficacia mostrada por el inhibidor de PDE7 perteneciente a la familia de los furanos (**69**) en el modelo de EAE, demuestra de nuevo el potencial de los inhibidores de esta enzima como futuros fármacos para el tratamiento de la esclerosis múltiple.<sup>177</sup>

A)



B)



**Figura 38.** Efecto terapéutico del derivado **69** en el modelo de EAE. Sintomatología Clínica (A). Variación del peso de los animales (B). La cuantificación de los resultados pertenece a dos grupos distintos: control y tratamiento con 7 animales cada uno.

### 2.3. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DEL ANILLO DE 1,3-TIAZOL

#### 2.3.1. Síntesis orgánica de los derivados del anillo de 1,3-tiazol

El derivado 2-[2-(2-benzamido-4-metilpentanoiloxi)butanamido]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (**58**) se caracteriza por presentar un anillo de 1,3-tiazol sustituido unido a un grupo fenilo mediante una sucesión de enlaces amida, éster y amida.

Partiendo de este cabeza de serie, se propusieron distintas modificaciones con el fin de explorar la actividad de esta familia como posibles inhibidores de PDE7. Así, se propusieron modificaciones tanto en los sustituyentes de los anillos presentes en los extremos de la molécula como en el conector. En lo que se refiere al conector que une ambos extremos, se propuso en primer lugar, la eliminación de las cadenas laterales para simplificar la molécula y evitar la presencia de carbonos asimétricos. Y, por otra parte, dado que en la molécula de partida, el conector está formado por la secuencia de enlaces amida-éster-amida, se propuso variar tanto la secuencia como el número de estos enlaces (Figura 39).

### **Figura 39.** Modificaciones propuestas del derivado **58**

En primer lugar, se abordó la síntesis de diferentes derivados del anillo de 1,3-tiazol que presentaban en su estructura un conector formado por un único enlace tipo amida (Figura 40).

### **Figura 40.** Moléculas con un conector de un único enlace tipo amida.

Así, las moléculas propuestas se prepararon a partir de la reacción de acoplamiento entre los 2-amino-1,3-tiazoles correspondientes y los ácidos orgánicos diferentemente sustituidos en presencia de PyBOP y TEA como base en diclorometano a temperatura ambiente (Esquema 9). De este modo, se obtuvieron los derivados **91-96** con rendimientos moderados.



**Esquema 9.** Ruta sintética para la obtención de los derivados **91-96**.

Posteriormente y continuando con los objetivos propuestos, se llevó a cabo la síntesis de derivados con el conector formado por dos enlaces. Dentro de esta estrategia, se propusieron dos modificaciones en cuanto a la secuencia. Por un lado, tal y como se observa en la Figura 41, la primera estaría formada por dos enlaces amida y la segunda, por un enlace amida unido al tiazol y a continuación un enlace éster unido al otro extremo de la molécula.

**Figura 41.** Moléculas con un conector de dos enlaces tipo amida/éster.

La preparación de estos derivados se realizó empleando las condiciones de reacción puestas a punto anteriormente. Se obtuvieron los derivados **103-117** a partir de la reacción de acoplamiento entre los diferentes 2-amino-1,3-tiazoles y los ácidos orgánicos correspondientes en presencia de PyBOP y TEA en diclorometano. En aquellos casos en los que los ácidos necesarios no estaban disponibles comercialmente, fue necesaria su obtención previa como es el caso de los ácidos 2-(2,2-difenilacetamido)acético (**100**), 2-[3,3-difenilpropionamido]acético (**101**) y 2-(2,2-difenilacetoxi)acético (**102**). Estos ácidos se obtuvieron partiendo según cada caso, del 2-hidroxiacetato de bencilo o 2-aminoacetato de bencilo, y posterior desprotección en presencia de H<sub>2</sub> y Pd/C en una mezcla de tetrahidrofurano y metanol 1:2 (Esquema 10). Cabe destacar que las moléculas con un conector formado por dos enlaces amidas

presentaron un rendimiento significativamente mayor que aquellos derivados cuyo conector estaba formado por un enlace tipo amida y éster.

**Esquema 10.** Ruta sintética para la obtención de los derivados **103-117**.

Finalmente, dado que en el cabeza de serie, los dos extremos de la molécula estaban unidos por una secuencia de tres enlaces (amida, éster y amida), se propuso la síntesis de derivados en los que manteniendo esta misma secuencia, se modificaron los extremos y también análogos que presentasen un conector formado por tres enlaces amida (Figura 42).

**Figura 42.** Moléculas con un conector de tres enlaces tipo amida/éster.

La preparación de estos derivados se realizó a partir de la reacción de acoplamiento entre los diferentes 2-amino-1,3-tiazoles y los ácidos correspondientes. Todos los intermedios de reacción necesarios eran comerciales excepto los ácidos 2-(2-benzamidoacetoxi)acético (**120**) y 2-[2-(2-fenilacetamido)acetoxi]acético (**121**) que tuvieron que ser sintetizados previamente. Para ello, se hicieron reaccionar los ácidos diferentemente sustituidos con el 2-hidroxiacetato de bencilo o 2-aminoacetato de bencilo según cada caso, en presencia de PyBOP y TEA como base en diclorometano. Posteriormente, fue necesario la desprotección de los grupos protectores en presencia de H<sub>2</sub> y Pd/C en una mezcla de tetrahidrofurano y metanol (1:2) a temperatura ambiente (Esquema 11).

**Esquema 11.** Ruta sintética para la obtención de los derivados **122-130**.

La asignación estructural de todos los derivados del anillo de tiazol sintetizados, así como los intermedios de reacción obtenidos fue establecida en base a los datos analíticos y espectroscópicos de resonancia magnética nuclear tanto de <sup>1</sup>H como de <sup>13</sup>C, que se encuentran recogidos en la parte experimental.

## 2.3.2. Evaluación biológica

### 2.3.2.1. Evaluación enzimática

**Tabla 21.** Valores de inhibición en PDE7A1 de los derivados **91-96**, **103-117**, y **122-130**.

Comp.	% inh @10 $\mu$ M	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>91</b>	52.9	
<b>92</b>	38.4	
<b>93</b>	18.5	
<b>94</b>	20.0	
<b>95</b>	3.3	
<b>96</b>	16.2	
<b>103</b>	20.7	
<b>104</b>	33.6	
<b>105</b>	64.2	4.0
<b>106</b>	53.1	
<b>107</b>	13.5	
<b>108</b>	8.8	
<b>109</b>	25.0	
<b>110</b>	10.3	
<b>111</b>	21.3	
<b>112</b>	6.7	
<b>113</b>	9.3	
<b>114</b>	14.7	
<b>115</b>	82.7	5.5
<b>116</b>	44.5	
<b>117</b>	6.3	
<b>122</b>	38.7	
<b>123</b>	26.0	
<b>124</b>	11.4	
<b>125</b>	10.6	
<b>126</b>	16.0	
<b>127</b>	16.8	
<b>128</b>	25.2	
<b>129</b>	5.6	
<b>130</b>	3.8	

BRL-50481: 99.5% inh PDE7

Una vez sintetizadas las moléculas deseadas, se llevó a cabo la medida de la inhibición de PDE7A1 en la Universidad de Santiago de Compostela empleando un ensayo radiométrico a partir de la co-incubación de la enzima recombinante humana PDE7A con el <sup>3</sup>H-AMPC. En la Tabla 21 se recogen los porcentajes de inhibición de

PDE7A1 a 10  $\mu\text{M}$  de los derivados sintetizados. Asimismo se han calculado las  $\text{CI}_{50}$  de los compuestos con un porcentaje de inhibición más alto

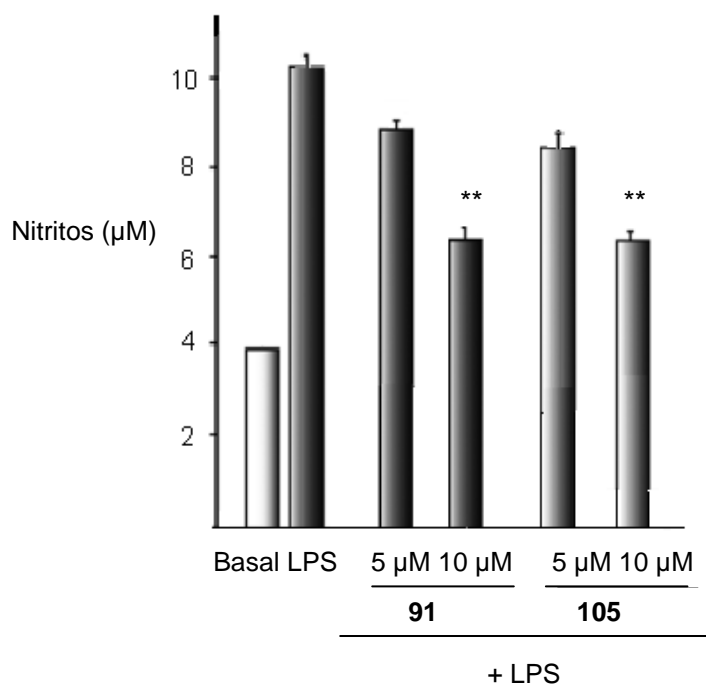
Como puede apreciarse en la Tabla 21, aquellos compuestos que mostraron un porcentaje de inhibición mayor del 50%, se caracterizan por presentar el grupo 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (A1) en un extremo de la molécula y residuos aromáticos correspondientes a los ácidos 2,2-difenilacético (B5) o 3,3-difenilpropiónico (B6) en el otro, separados por uno o dos enlaces. En concreto, los dos derivados más activos presentan los grupos mencionados anteriormente, separados por un conector con dos enlaces amida (**105**) o con un enlace amida y otro éster (**115**).

### 2.3.2.2. *Ensayos de protección frente al daño inflamatorio in vitro*

A fin de determinar las concentraciones permitidas de utilización de los derivados de tiazol sintetizados en cultivos celulares, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular con aquellos que presentaron una menor  $\text{CI}_{50}$  (**91**, **105**, **106** y **115**). Para ello, se empleó el ensayo del MTT<sup>176</sup> que permite conocer la viabilidad de las células en presencia de los compuestos ensayados. Como resultado del experimento, se observó que los derivados de tiazol ensayados no presentaron efectos citotóxicos.

Con el objetivo de demostrar la eficacia terapéutica de estos inhibidores de PDE7, derivados del anillo de tiazol, se realizó el estudio de las propiedades anti-inflamatorias de los cuatro compuestos que presentaban un porcentaje de inhibición de PDE7A1 mayor del 50% a 10  $\mu\text{M}$ . Así, se dañaron células de macrófagos murinos (Raw 264.7) con LPS y posteriormente, se midió el efecto anti-inflamatorio de los derivados ensayados tras 24 horas de incubación a través de la producción de nitritos mediante la reacción de Griess (Figura 43).

Se puede observar como dos de los inhibidores de PDE7 derivados de tiazol (**91** y **105**) son capaces de disminuir de manera significativa la producción de nitritos, por lo que puede decirse que son capaces de proteger a las células Raw 264.7 frente al daño inflamatorio producido por el LPS. La falta de actividad encontrada en los derivados **106** y **115** puede deberse a problemas para atravesar la membrana celular ya que el derivado **106** es más voluminoso que los derivados **91** y **105**. Además, por otra parte, el derivado **115** se diferencia del compuesto **105** por la presencia de un grupo éster en lugar de amida.



**Figura 43.** Medida de la producción de nitritos en células Raw 264.7 estimuladas por LPS en presencia de los inhibidores de PDE7 derivados de tiazol. \*\* $P < 0.01$ .

En resumen, diferentes modificaciones estructurales llevadas a cabo sobre los prototipos seleccionados (**57** y **58**) han conducido al descubrimiento de dos nuevas familias de inhibidores de PDE7: los derivados del anillo de furano y los derivados del anillo de tiazol. En primer lugar, los inhibidores de PDE7 tipo furano han demostrado su eficacia en un modelo *in vivo* de esclerosis múltiple y por tanto, pueden considerarse como candidatos para el tratamiento de esta enfermedad<sup>178</sup>. Por otra parte, los derivados del anillo de tiazol también han mostrado actividad inhibitoria frente a PDE7 en el rango micromolar aunque su eficacia terapéutica actualmente se encuentra en estudio.

#### 2.4. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE PDE7 MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN COMPUTACIONAL BASADA EN REDES NEURONALES ARTIFICIALES

Uno de los principales retos en el diseño de fármacos es la identificación de nuevos compuestos activos, previamente a su síntesis. Como se ha comentado en la introducción hay diferentes métodos computacionales que se pueden aplicar al diseño de fármacos, como los métodos basados en la diana terapéutica (estudios de *docking*, diseño *de novo*), o los métodos basados en el ligando (QSAR, 3D-QSAR).

Básicamente, un estudio QSAR (*quantitative structure-actividad relationship*), debería funcionar como un diccionario entre el conjunto de estructuras y la propiedad a estudiar. El objetivo de un estudio QSAR es encontrar un modelo matemático capaz de describir la actividad biológica de un conjunto de moléculas en función de un número de variables o descriptores que definen la estructura química, de forma que se pueda predecir dicha propiedad biológica de una familia de compuestos no evaluados. El modelo matemático se puede clasificar en (i) lineal como los métodos de Regresión Lineal, Regresión Lineal Múltiple y los métodos de Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados y (ii) no lineales, aproximaciones basadas en técnicas más actuales, como son los algoritmos genéticos o las Redes Neuronales Artificiales (RNAs)<sup>179, 180</sup>.

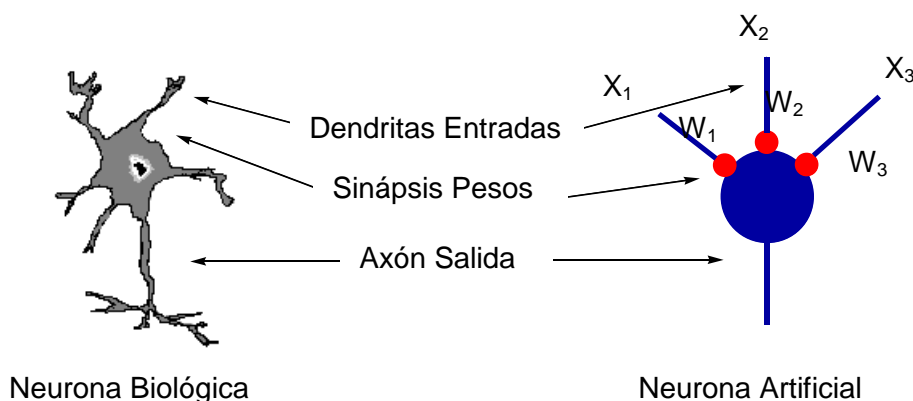
En las últimas décadas se ha incrementado el uso de aproximaciones matemáticas no lineales mediante las RNAs o los métodos basados en algoritmos genéticos para la predicción de propiedades biológicas<sup>181-190</sup>.

Estos métodos forman parte de lo que se conoce como Inteligencia Artificial y a diferencia de los modelos lineales, éstos se presentan como sistemas o métodos expertos que consiguen simular procesos biológicos, ya sean cambios evolutivos o mutaciones en el caso de los algoritmos genéticos o el comportamiento de las redes neuronales biológicas en el caso de las RNAs. Estas cualidades son aprovechadas en la clasificación de los compuestos, de modo que nos permiten un reconocimiento de patrones estructurales y por tanto del valor de la propiedad asociada a ellos.

Dentro de este contexto, en la presente memoria la identificación de nuevos inhibidores de PDE7 se ha abordado mediante Redes Neuronales Artificiales (RNAs).

#### **2.4.1. Redes neuronales artificiales**

Las Redes Neuronales Artificiales (RNAs) son un modelo donde se procesa información de forma simplificada emulando al cerebro humano. Este modelo contiene gran número de unidades de procesamiento (neuronas) análogas a las neuronas biológicas que están conectadas entre sí para procesar la información que reciben<sup>191, 192</sup> (Figura 44).



**Figura 44.** Representación esquemática del sistema biológico y artificial.

De la observación detallada del proceso biológico se podrían establecer las siguientes analogías con el sistema artificial:

- Las entradas  $X_i$  son valores reales que representan las señales que provienen de otras neuronas y son capturadas por las dendritas.
- Los pesos  $W_i$  son valores reales que corresponden a la intensidad de la sinápsis que conecta dos neuronas.

De esta forma, el proceso que se da en el interior de la neurona se puede explicar en tres operaciones. La primera es la ponderación de cada señal de entrada ( $X_i$ ) a una neurona determinada mediante el peso ( $W_i$ ) sináptico. La segunda operación es el sumatorio de todas las señales ponderadas además de la entrada neta a cada neurona que puede escribirse de la siguiente forma:

$$neta_i = \sum_{i=1}^n W_i X_i = \vec{X} \vec{W}$$

Y por último, este sumatorio pasa a la salida a través de una función umbral o función de transferencia, que la neurona debe superar para activarse y que depende de las características específicas de cada red.

$$X_i = f_i (neta_i)$$

Las redes neuronales presentan ciertas ventajas respecto a otros modelos matemáticos, como son:

- **Aprendizaje adaptativo:** tras someterse a un entrenamiento inicial las unidades de procesamiento son capaces de aprender a realizar tareas.

- **Auto-organización:** las RNAs son capaces de organizar o representar la información recibida tras la etapa de aprendizaje.
- **Tolerancia a fallos:** la información recibida está distribuida por toda la red, de esta forma no se pierde la información de salida en el caso de destrucción parcial de la red.
- **Operación en tiempo real:** debido a que las unidades están conectadas entre sí de forma sencilla.

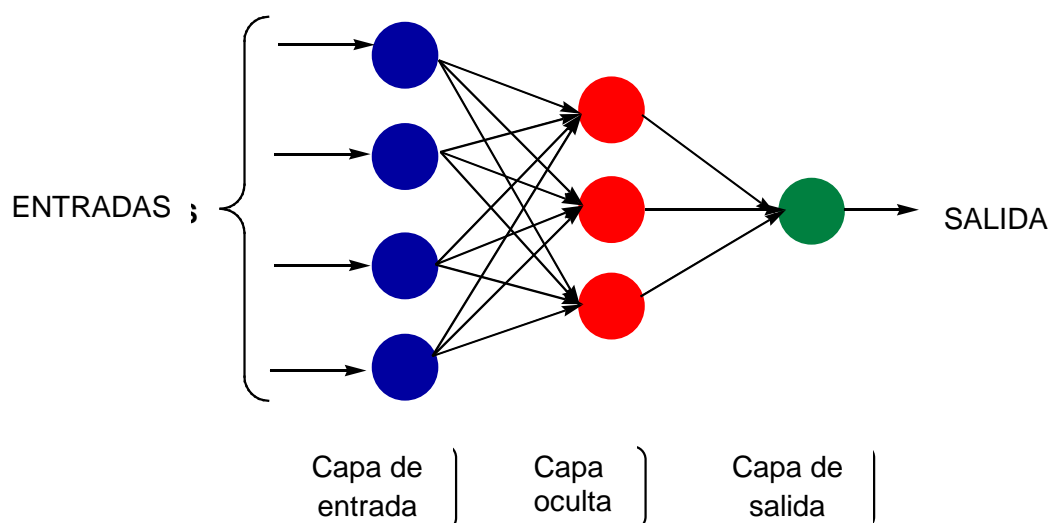
Los puntos clave que hay que estudiar al desarrollar un modelo neuronal son tanto la topología como el tipo de aprendizaje.

#### 2.4.1.1. Topología de las redes neuronales artificiales

Consiste en la organización de las neuronas o unidades de procesamiento en capas. De esta forma, las RNAs se clasifican en monocapa en las que establecen conexiones laterales entre las neuronas de la única capa que posee la red; y multicapa en las que las neuronas se encuentran agrupadas en varias capas.

Las neuronas se clasifican en función de la capa donde se encuentren (Figura 45):

- *Neuronas de entrada:* reciben información de un estímulo exterior.
- *Neuronas ocultas:* procesan la información recibida.
- *Neuronas de salida:* tras el procesado de información, ésta llega a las “unidades” de salida para dar respuesta al sistema.



**Figura 45.** Arquitectura general de una red neuronal artificial.

Para un correcto procesamiento de la información se requiere una adecuada arquitectura de red, número de capas y número de neuronas que constituyen cada capa, es decir en función de la información procesada tanto el número de capas como el número de neuronas en cada capa variará con el fin de optimizar el proceso de aprendizaje.

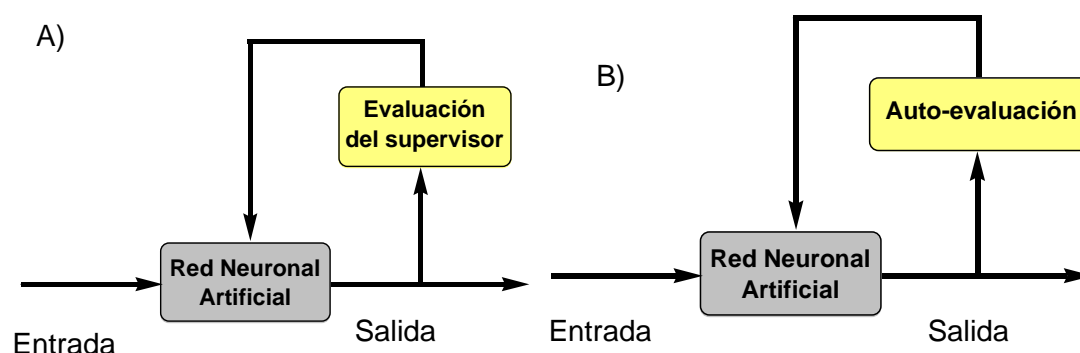
#### 2.4.1.2. Aprendizaje de una red neuronal

El aprendizaje es el proceso por el cual una RNA modifica sus pesos como respuesta a la información de entrada. Los cambios que se producen durante el proceso de aprendizaje son los de destrucción, modificación y creación de nuevas conexiones entre neuronas. El proceso de aprendizaje termina cuando los valores de los pesos permanecen estables con el tiempo ( $dW_i/dt = 0$ ).

Los criterios por los que se modifican los valores de los pesos determinan la regla de aprendizaje. Se consideran dos tipos de reglas: aprendizaje supervisado y no supervisado, cuya diferencia fundamental es la existencia o no de un agente externo (supervisor) que controle dicho proceso.

**Aprendizaje supervisado.** El proceso se realiza mediante un entrenamiento controlado por un agente externo que comprueba la respuesta que debería producir la red a partir de una entrada determinada. Cuando la respuesta no es la deseada, se procederá a modificar los pesos de las conexiones hasta obtener una salida más aproximada a la real. La aproximación más utilizada consiste en corrección de error, es decir, ajustar los pesos de las conexiones de la red en función de la diferencia entre los valores reales y los obtenidos en la salida de la red.

**Aprendizaje no supervisado.** El proceso no requiere un supervisor para ajustar los pesos de las conexiones. Por lo que la red no recibe información del exterior (Figura 46).

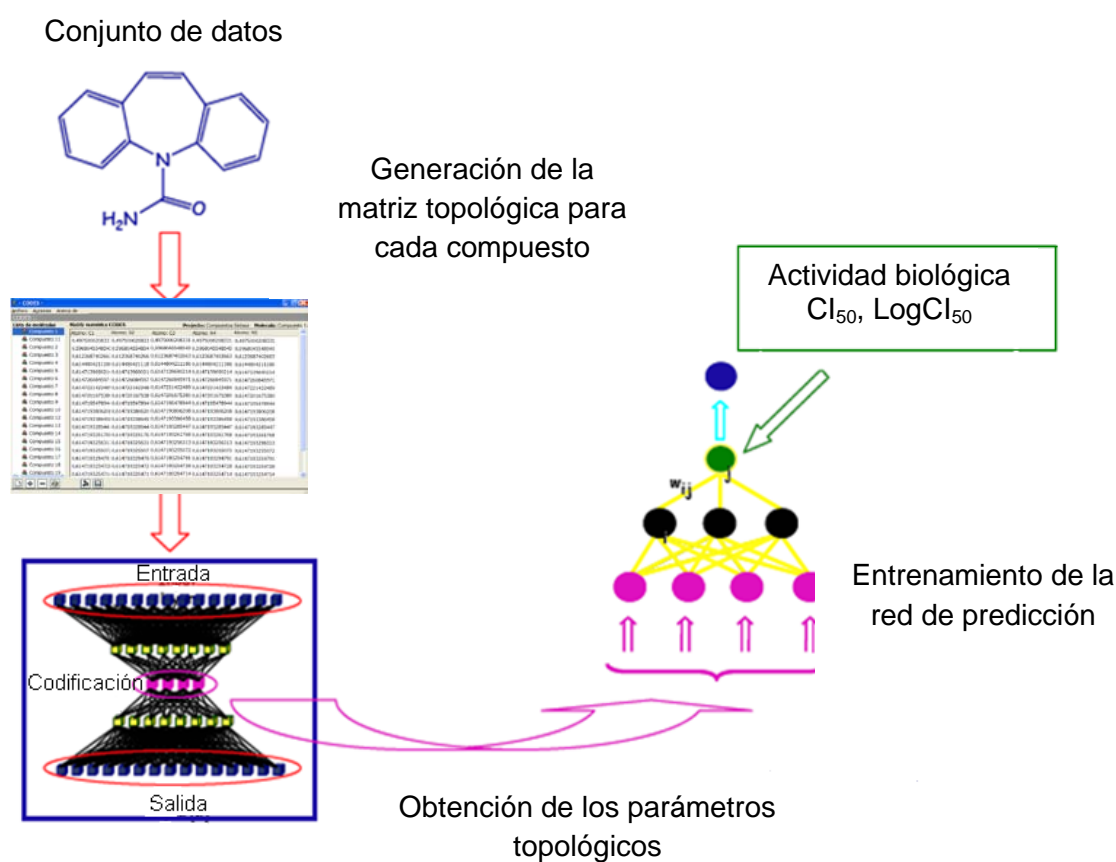


**Figura 46.** Diferencias entre aprendizaje supervisado (A) y no supervisado (B).

### 2.4.2. Protocolo del desarrollo de un modelo basado en RNAs

El protocolo empleado en el desarrollo de un modelo de RNAs consta principalmente de cuatro pasos claves: a) recopilación de los datos tanto de entrada como de salida; b) codificación de los datos a un código numérico; c) desarrollo del modelo de red neuronal y d) validación del modelo.

En el caso concreto del modelo de red neuronal desarrollado para predecir la actividad inhibitoria frente a PDE7, la metodología llevada a cabo para la obtención del mismo, se encuentra recogida en la Figura 47.



**Figura 47.** Esquema general del desarrollo de un modelo de red neuronal artificial.

- *Conjunto de datos.* Tras llevar a cabo una búsqueda bibliográfica, se escogieron 92 compuestos inhibidores de PDE7 cuya actividad biológica se expresaba como  $CI_{50}$ . Así, los inhibidores **I-1** a **I-92** pertenecen a un grupo variado de familias como tiadiazoles<sup>116, 117</sup>, bencenosulfonamidas<sup>91</sup>, quinazolininas<sup>81</sup>, tiazoles<sup>193</sup> y derivados espirotríclicos<sup>118, 120, 121, 124</sup>, entre otros (Figura 48 y Anexo 1).



**Figura 48.** Inhibidores de PDE7 seleccionados.

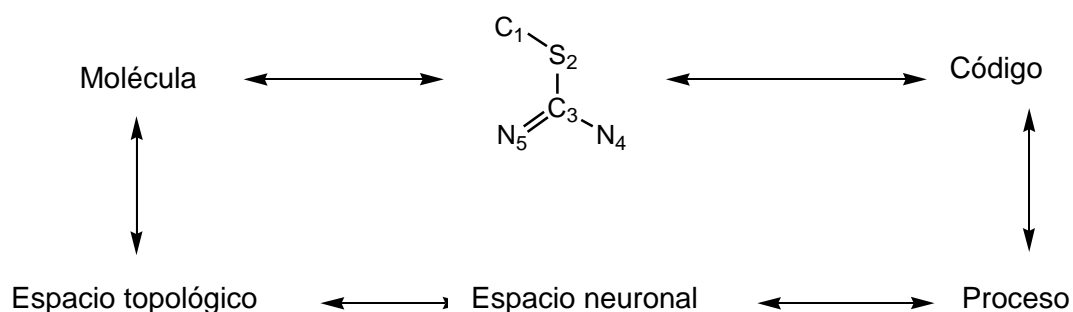
Los valores de actividad se emplearon en los modelos teóricos de forma cuantitativa y cualitativa:

- Como *valores cuantitativos* se utilizó la actividad frente a PDE7 expresada como el logaritmo de la concentración inhibitoria 50 ( $\text{LogCI}_{50}$ ).

- Como *valores cualitativos* se asignó el valor (1) al rango de actividad que abarca los valores menores que 0.1  $\mu\text{M}$ , (0) comprende los valores de actividad entre 0.1 y 1  $\mu\text{M}$  y (-1) incluye los valores mayores de 1.1  $\mu\text{M}$ .

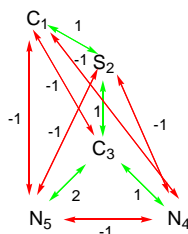
Por otra parte, sobre el conjunto de datos inicial se formaron grupos diferentes al azar con el objeto de obtener un conjunto de entrenamiento (*training*) para el proceso de aprendizaje y un conjunto de predicción (*test*) con compuestos externos o independientes del conjunto de entrenamiento, para comprobar la capacidad predictiva de los modelos.

- *Codificación de las estructuras.* Como se ha comentado anteriormente, la codificación de las estructuras químicas a un código numérico es necesaria para el establecimiento de un modelo QSAR con el fin de establecer una relación matemática con la propiedad a estudiar (en nuestro caso, la actividad biológica). La codificación del conjunto de inhibidores de PDE7 seleccionados (**I-1** a **I-92**) se ha llevado a cabo empleando el programa CODES<sup>®194</sup>, creado en el Instituto de Química Médica por el Prof. Manfred Stud. El objetivo del programa es codificar las moléculas a valores numéricos para poder predecir las propiedades que poseen. La codificación tiene en cuenta tanto la naturaleza de los átomos, el tipo de enlace, la conectividad como los centros quirales. CODES<sup>®</sup> define la estructura química a dos niveles: el primero lo forma el espacio topológico donde queda definida la estructura química de la molécula y el segundo nivel está constituido por un espacio neuronal, que no es más que la definición formal de RNA (Figura 49). Ambos niveles quedan definidos matemáticamente, de manera que se crea una relación entre cada punto (átomo) del espacio topológico y una unidad (neurona) del espacio neuronal, y cada relación binaria (enlace) se corresponde con una conexión activadora o inhibidora de dicho espacio neuronal.



**Figura 49.** Relación entre los distintos elementos que configuran CODES<sup>®</sup>.

Las relaciones binarias o enlaces se traducen en el espacio neuronal como conexiones entre sus neuronas cuyos pesos se cuantifican como (1) para enlaces simples, (2) para enlaces dobles, (3) para enlaces triples,  $(1 + 1/2)$  para enlaces aromáticos y (-1) para los átomos no enlazados (Figura 50).

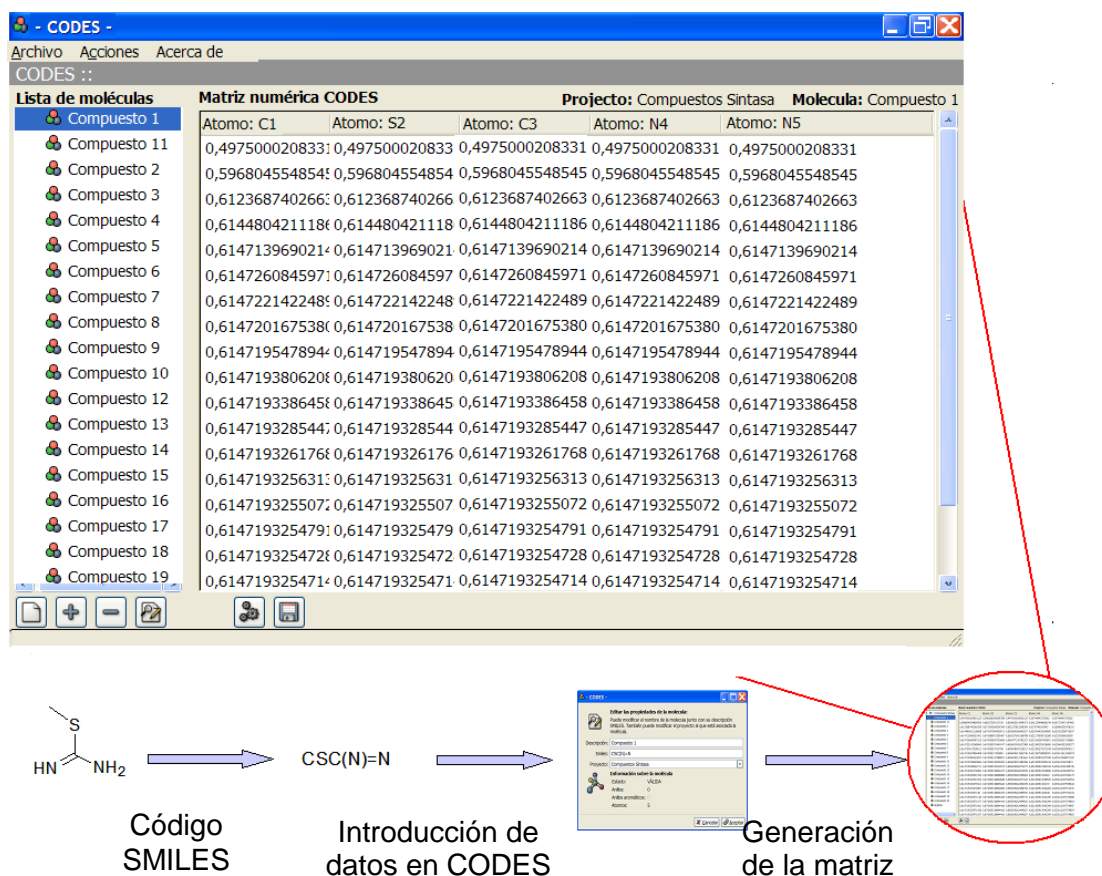


**Figura 50.** Valor numérico de las conexiones entre las neuronas de CODES<sup>®</sup> de la S-metilisotiourea.

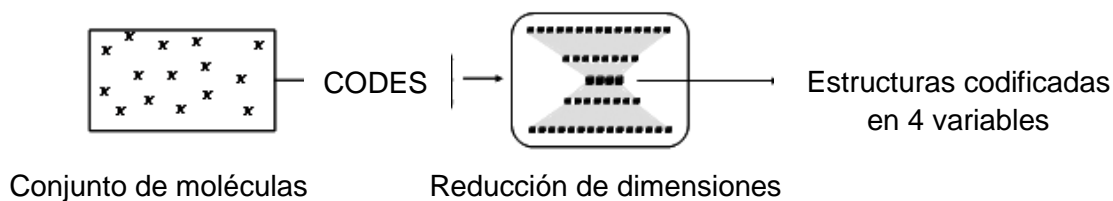
En base a la Teoría de Gestalt<sup>195</sup>, teoría en la que se basa el programa CODES<sup>®</sup>, las neuronas interaccionan entre sí hasta alcanzar un estado de equilibrio, donde los valores de actividad de sus neuronas ya no varían. Cuando se alcanza el estado de equilibrio, CODES<sup>®</sup> recoge los valores de activación de cada neurona del espacio neuronal que corresponden con cada átomo de la molécula. Puesto que es un proceso secuencial y discontinuo, para cada iteración obtenemos un vector de actividades. El conjunto de vectores obtenido desde el inicio hasta el estado de equilibrio se agrupa para obtener la matriz dinámica, donde cada vector representa una iteración. El último vector recoge el estado del equilibrio de la red.

El proceso de codificación comienza a partir del código SMILES (*simplified molecular input line entry specification*)<sup>196, 197</sup> de cada estructura (Anexo 1) que se introduce en el programa CODES<sup>®</sup> generándose la matriz dinámica. Las dimensiones de las matrices vienen dadas por el número de átomos de cada estructura y por el número de iteraciones necesarias para alcanzar el estado de equilibrio del proceso de codificación (Figura 53).

Así, dado que la matriz de cada inhibidor de PDE7 presenta dimensiones distintas puesto que presentan distintos número de átomos, es necesario transformar esta matriz en un mismo número de variables para poder homogeneizar las dimensiones del conjunto de datos (Figura 52). Para ello, se empleó la estrategia de comprimir la matriz dinámica de CODES<sup>®</sup> en un menor número de variables (reducción de dimensiones mediante RNAs). La reducción de dimensiones radica en disminuir la complejidad de un sistema sin alterar sus características intrínsecas ni su naturaleza.



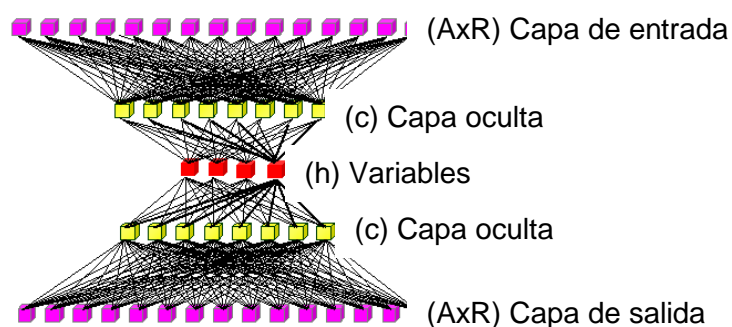
**Figura 51.** Generación de la matriz dinámica de la S-metilisotiourea desde su código SMILES.



**Figura 52.** Metodología de obtención de las variables codificantes para cada estructura.

Durante el proceso de la reducción de dimensiones, se utilizó una red neuronal artificial de retropropagación de error mediante aprendizaje supervisado, tipo ReNDeR<sup>198</sup> (*reversible nonlinear dimensionality reduction*) en el que se consigue reducir un conjunto de datos de cualquier dimensión a un pequeño número de variables previamente seleccionado. Esta red se compone de una capa de entrada, una de salida y de tres capas ocultas, siendo su arquitectura simétrica del tipo (AxR)-c-h-c-(AxR). Así,

(AxR) es la capa de entrada y de salida que representa a la matriz de CODES<sup>®</sup>, conteniendo tantas neuronas como columnas tiene la matriz o lo que es lo mismo, número de átomos que contiene la estructura. Por otra parte,  $c$  son dos capas ocultas que poseen un número de neuronas equivalentes a un tercio del número de neuronas de la capa de salida o entrada. Y  $h$  es la tercera capa oculta que representa el número elegido de variables en las que se quiere reducir la matriz (Figura 53).



**Figura 53.** Estructura de una red neuronal artificial tipo ReNDeR.

Basándose en estudios previos con redes neuronales artificiales<sup>130, 199</sup>, se decidió reducir la matriz de CODES<sup>®</sup> a 4 variables o nodos (Anexo 2).

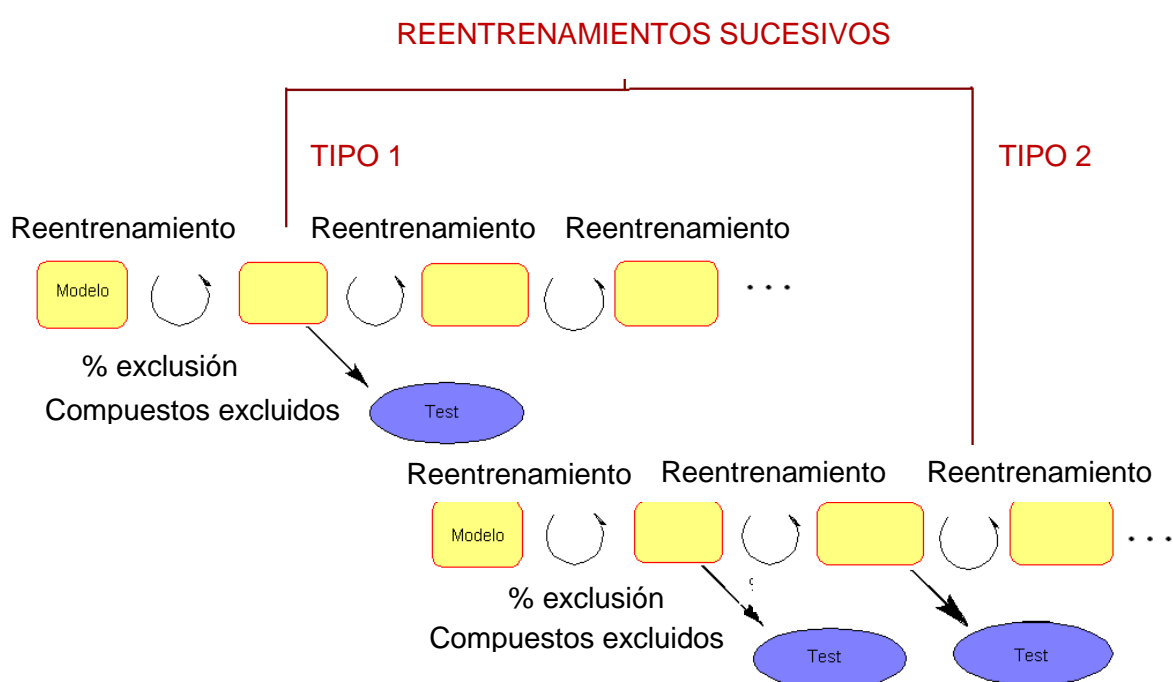
- *Desarrollo y validación de los modelos neuronales.* Tras haber obtenido los descriptores moleculares, el siguiente paso consistió en el establecimiento de los modelos teóricos de manera que se pudieran relacionar los descriptores de los compuestos con su actividad biológica con el objeto de encontrar un modelo capaz de predecir la actividad biológica de nuevos inhibidores de PDE7. Las etapas de desarrollo y validación de los modelos no son procesos independientes sino que son procesos iterativos que tienen como objetivo ir optimizando los modelos desarrollados. Por ello, para una clara descripción y comprensión del proceso, los pasos desarrollo y validación se detallarán conjuntamente.

Para el desarrollo de estos modelos neuronales se empleó una red neuronal FFNN (*feed forward neural net*) cuyas conexiones son hacia delante con retropropagación de error y mediante aprendizaje supervisado. Se siguieron dos estrategias distintas: modelo individuales y conjuntos de redes neuronales (NNE o *neural network emsembles*<sup>200</sup>).

- Modelos individuales. Por un lado se llevaron a cabo reentrenamientos individuales (tipo 1) en donde el modelo seleccionado se reentrena

independientemente varias veces y por otro lado se llevaron a cabo reentrenamientos consecutivos (tipo 2) donde el modelo seleccionado se reentrena una vez, el modelo obtenido vuelve a reentrenarse y así sucesivamente hasta cinco reentrenamientos consecutivos (Figura 54).

- Conjunto de redes<sup>200</sup>, en este caso, el dato de salida se obtiene del valor promedio de los datos de las redes que componen el modelo. Se llevaron a cabo variaciones en el número de redes que componen cada modelo así como variaciones en los parámetros de entrenamiento de las redes. Por otro lado, en la obtención del conjunto de redes se siguieron dos estrategias: variando la velocidad de entrenamiento (vía B) y sin variar (vía A).



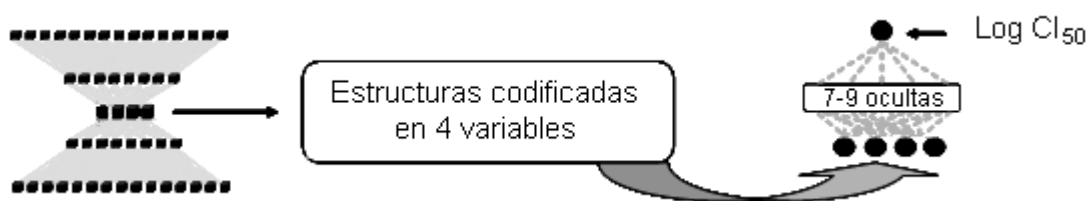
**Figura 54.** Método de obtención de los modelos de redes neuronales artificiales individuales.

La validación de los modelos se realizó mediante validación interna y externa. Mediante la validación interna, la red elimina aleatoriamente del conjunto de entrenamiento un número reducido de compuestos. Éstos van a ser predichos por la red a medida que transcurre el entrenamiento e irá informando de la capacidad predictiva de la red. Mediante la validación externa, el modelo es evaluado con nuevas estructuras desconocidas por la red. La evaluación de cualquier modelo teórico es un paso clave y necesario para posteriormente poder utilizar el modelo desarrollado.

Todos los modelos teóricos desarrollados en este trabajo se evaluaron de la siguiente forma:

- (i) Calidad estadística del modelo, mediante el coeficiente de correlación ( $r$ ), la desviación estándar ( $s$ ), y el coeficiente de validación cruzada ( $r^2_{cv}$ ).
- (ii) Validación interna para evaluar la robustez del modelo.
- (iii) Validación externa o predicción de un conjunto externo e independiente al de entrenamiento para validar la capacidad predictiva del modelo en base a los siguientes parámetros: compuestos inactivos mal clasificados (FAR, índice de falsa alarma), compuestos bien clasificados (FC, fracción correcta) y compuestos activos bien clasificados (POD, probabilidad de detección).

Así, para obtener las condiciones y arquitecturas óptimas, se llevó a cabo en primer lugar un barrido variando el número de neuronas ocultas apropiado para el número de compuestos que formaban la red, las condiciones de entrenamiento (parámetros como número de ciclos, porcentaje de exclusión así como velocidad de entrenamiento) (Figura 55).



**Figura 55.** Arquitectura de los modelos predictivos.

Todos los modelos desarrollados se llevaron a cabo teniendo en cuenta el factor  $\rho$ <sup>189, 201, 202</sup> para diseñar la arquitectura de la red. Este factor se define con la siguiente fórmula:

$$\rho = \frac{n}{(E + 1) \times O + (O + 1) \times S}$$

Donde  $n$  es el número de compuestos que forman la red,  $E$  es el número de descriptores o neuronas que forman la capa de entrada,  $O$  es el número de neuronas de la capa oculta y  $S$  es el número de neuronas de salida.

Los valores entre los que debe oscilar el factor  $\rho$  para desarrollar un modelo de calidad son entre 1.8 y 2.2<sup>203</sup>. Este factor permite orientar el desarrollo de un modelo predictivo con el fin de evitar situaciones de sobreentrenamiento (valores por debajo de

1) en donde la red ha memorizado los datos o por el contrario de falta de capacidad de generalizar (valores por encima de 3).

### 2.4.3. Resultados de los modelos de RNAs obtenidos

Durante el desarrollo de los modelos para predecir la actividad frente a PDE7, para que éstos respondieran a un valor adecuado del factor  $\rho$ , se modificaron las neuronas de la capa oculta, mientras que la capa de salida presentó siempre una única salida correspondiente a la actividad biológica.

Para cada conjunto de entrenamiento se realizó un estudio sistemático del proceso de aprendizaje. En el primer paso de dicho aprendizaje se llevó a cabo un barrido de arquitecturas atendiendo al número de neuronas ocultas y al número de compuestos que forman la red. Una vez elegida la mejor arquitectura (4:x:1, donde x varía de 7 a 9), los modelos siguieron dos metodologías diferentes.

En la Tabla 23 se recopilan los modelos obtenidos mediante la estrategia de modelos individuales (estrategia 1). Se muestran los parámetros estadísticos y de validación. Los modelos obtenidos empleando la primera estrategia muestran parámetros estadísticos correctos en el proceso de entrenamiento ( $r^2$  entre 0.99-0.74). Sin embargo, cuando nos trasladamos a los resultados obtenidos para el conjunto de validación externa o test, los resultados empeoran significativamente ( $r^2$  entre 0.25-0.68).

Analizamos el modelo 1, el cual presenta los mejores parámetros estadísticos en términos cualitativos (inactivos -1, activos +1 y moderados 0). Los porcentajes de clasificación correcta del modelo para las tres categorías en el conjunto de entrenamiento y de predicción (validación externa) se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 23.** Parámetros de validación de los modelos individuales de PDE7.

Modelo	Estrategia	Arquitectura	R <sup>2</sup> /SD entrenamiento	n	V.I. <sup>a</sup>	R <sup>2</sup> /SD test
1	Modelo inicial	4:7:1	0.74/ 0.38	70/22	70%	0.68/ 0.34
2	Tr1/ tipo 1	4:7:1	0.78/ 0.37	49/43	ND	0.62/ 0.33
3	Tr1/ tipo 2	4:7:1	0.99/ 0.01	59/33	100%	0.50/ 0.34
4	Modelo inicial	4:7:1	0.80/ 0.33	70/22	70%	0.38/ 0.46
5	Tr4/ tipo 1	4:7:1	0.74/ 0.38	67/25	ND	0.51/ 0.50
6	Tr4/ tipo 2	4:7:1	0.99/ 0.01	75/17	100%	0.45/ 0.56
7	Modelo inicial	4:8:1	0.78/ 0.38	70/22	80%	0.25/ 0.81
8	Tr7/ tipo 2	4:8:1	0.99/ 0.01	49/23	100%	0.45/ 0.56

N: número de compuestos entrenamiento/test

V.I.<sup>a</sup>: predicción correcta de la validación interna.

ND: no determinada porque el modelo final carece de validación interna.

Tr: reentrenamiento del modelo seleccionado.

**Tabla 24.** Análisis de la clasificación por categorías en el conjunto de entrenamiento y en el conjunto de predicción del modelo 1.

Predicho	Conjunto de entrenamiento			Conjunto de predicción		
	Experimental					
	Inactivo	Moderado	Activo	Inactivo	Moderado	Activo
Activo	9%	8%	75%	5%	27%	60%
Moderado	31%	55%	-	55%	46%	-
Inactivo	60%	37%	-	40%	26%	-

De acuerdo a los índices estadísticos obtenidos, el modelo 1 muestra valores bajos de activos bien clasificados (**FC**) tanto en el conjunto de entrenamiento como en el conjunto de predicción, así mismo, el modelo 1 muestra un porcentaje importante de compuestos inactivos mal clasificados (**FAR**). Por lo tanto, este modelo no posee buena capacidad predictiva (Tabla 25).

Teniendo en cuenta estos resultados, nos propusimos mejorar la predicción empleando la estrategia de conjunto de redes (estrategia 2). Para ello, elegimos el conjunto de datos de la mejor red obtenida con la primera estrategia (modelo 1). Se hicieron diferentes conjuntos de redes. Cada conjunto de redes fue obtenido variando parámetros como porcentaje de exclusión, número de neuronas ocultas, velocidad de entrenamiento, etc. Los resultados obtenidos con esta segunda estrategia se presentan en la Tabla 26.

**Tabla 25.** Índices estadísticos del conjunto de entrenamiento y del conjunto de predicción del modelo 1.

	Conjunto de entrenamiento	Conjunto de predicción
<b>Fracción correcta (FC)</b>	100%	45%
<b>Índice de falsa alarma (FAR)</b>	0%	27%
<b>Probabilidad de detección (POD)</b>	98%	96%

**Tabla 26.** Parámetros de validación de los modelos NNE de PDE7.

Modelo	Estrategia	Nº redes	% exclusión	R <sup>2</sup> /SD entrenamiento	R <sup>2</sup> /SD test
<b>NNE 1</b>	NNE A	5	50%	0.78/ 0.30	0.60/ 0.28
<b>NNE 2</b>	NNE A	10	50-30%	0.77/ 0.38	0.53/ 0.35
<b>NNE 3</b>	NNE A	20	50-30%	<b>0.85/ 0.25</b>	<b>0.70/ 0.23</b>
<b>NNE 4</b>	NNE B	5	30%	0.80/ 0.28	0.65/ 0.28
<b>NNE 5</b>	NNE B	10	30%	0.80/ 0.26	0.34/ 0.29
<b>NNE 6</b>	NNE B	20	30%	0.87/ 0.22	0.44/ 0.34

El modelo **NNE 3** presenta buenos resultados estadísticos en la predicción tanto en el conjunto de entrenamiento como en el test. A continuación, se detallan en las Tablas 27 y 28 los resultados del proceso de entrenamiento y de predicción (validación externa) del modelo **NNE 3**, respectivamente.

**Tabla 27.** Conjunto de entrenamiento del modelo **NNE 3**.

Comp.	Análisis cuantitativo		Análisis cualitativo	
	Log CI <sub>50</sub>	Teórico	Experimental	Teórico
<b>I-92</b>	-1.200	-0.696	1	0
<b>I-91</b>	-1.522	-1.801	1	1
<b>I-90</b>	-1.657	-1.378	1	1
<b>I-89</b>	-1.161	-1.267	1	1
<b>I-88</b>	-0.327	-0.279	0	0
<b>I-87</b>	-0.031	-0.172	0	0
<b>I-86</b>	-0.251	0.169	0	-1
<b>I-85</b>	-0.259	-0.377	0	0
<b>I-83</b>	-0.638	-0.378	0	0
<b>I-81</b>	-0.060	-0.154	0	0
<b>I-80</b>	-1.045	-0.665	1	0
<b>I-79</b>	-0.699	-0.479	0	0
<b>I-78</b>	-0.154	-0.169	0	0

Comp.	Análisis cuantitativo		Análisis cualitativo	
	Log CI <sub>50</sub>	Teórico	Experimental	Teórico
I-75	-1.568	-1.132	1	1
I-74	-0.795	-0.541	0	0
I-73	-0.585	-1.148	0	1
I-72	0.117	-0.320	-1	0
I-71	0.342	0.119	-1	-1
I-70	0.230	0.132	-1	-1
I-69	0.212	0.344	-1	-1
I-68	-1.096	-1.385	1	1
I-67	0.255	-0.085	-1	0
I-66	0.469	-0.062	-1	0
I-65	0.278	-0.195	-1	0
I-64	0.021	0.219	-1	-1
I-63	-1.055	-1.417	1	1
I-62	-0.721	-0.974	0	0
I-61	0.217	-0.259	-1	0
I-60	-0.721	-0.345	0	0
I-59	-0.214	-0.045	0	0
I-58	-0.508	-0.249	0	0
I-57	-1.070	-0.802	1	0
I-56	-0.420	-0.752	0	0
I-54	-0.721	-0.561	0	0
I-52	-1.356	-1.399	1	1
I-51	-1.853	-1.456	1	1
I-50	-1.721	-1.777	1	1
I-49	-1.619	-1.266	1	1
I-47	-1.677	-1.345	1	1
I-46	-1.699	-1.488	1	1
I-45	-1.602	-1.066	1	1
I-44	-1.886	-1.532	1	1
I-40	-0.920	-0.723	0	0
I-39	-0.221	-0.570	0	0
I-38	-0.075	-0.116	0	0
I-36	-0.102	-0.016	0	0
I-34	-0.408	-0.635	0	0
I-33	-1.853	-1.611	1	1
I-32	-1	-0.456	1	0
I-31	-1.376	-0.940	1	0
I-30	-0.397	-0.402	0	0
I-29	-0.671	-0.549	0	0
I-28	0.209	-0.125	-1	0
I-27	-0.804	-0.608	0	0
I-26	-0.014	-0.257	0	0
I-25	-1.420	-1.724	1	1
I-23	-1.795	-1.333	1	1

Comp.	Análisis cuantitativo		Análisis cualitativo	
	Log CI <sub>50</sub>	Teórico	Experimental	Teórico
I-22	-2.455	-2.068	1	1
I-21	-2.397	-2.065	1	1
I-19	-1.259	-0.764	1	0
I-18	0	-0.383	0	0
I-17	-1.102	-0.858	1	0
I-16	-1.221	-1.487	1	1
I-15	-1.522	-1.228	1	1
I-12	-1.055	-0.891	1	0
I-10	-0.853	-0.554	0	0
I-9	0.176	-0.065	-1	0
I-8	-1.920	-1.904	1	1
I-3	-2	-1.783	1	1
I-2	-1.585	-1.527	1	1

**Tabla 28.** Conjunto de predicción del modelo **NNE 3**.

Comp.	Análisis cuantitativo		Análisis cualitativo	
	Log CI <sub>50</sub>	Teórico	Experimental	Teórico
I-84	0.176	-0.149	-1	0
I-82	-0.619	-0.958	0	0
I-77	-0.537	-0.393	0	0
I-76	0.113	-0.283	-1	0
I-55	-0.376	-0.894	0	0
I-53	-0.920	-1.220	0	1
I-48	-1.585	-1.211	1	1
I-43	-0.677	-0.745	0	0
I-42	-0.795	-0.751	0	0
I-41	-0.795	-0.320	0	0
I-37	-0.008	-0.562	0	0
I-35	-1.180	-0.713	1	0
I-24	-1.823	-1.343	1	1
I-20	-1.958	-1.298	1	1
I-14	-1.853	-1.364	1	1
I-13	-1.284	-1.107	1	1
I-11	-1.522	-1.129	1	1
I-7	-1.795	-1.205	1	1
I-6	-0.769	-0.597	0	0
I-5	-1.494	-1.154	1	1
I-4	-0.920	-1.231	0	1
I-1	-0.823	-1.173	0	1

El porcentaje de aciertos en el conjunto de entrenamiento y el porcentaje de aciertos en el conjunto de validación externa, tienen un valor por encima del 75%. Los porcentajes de clasificación correcta del modelo **NNE 3** para las tres categorías (activos 1, moderados 0 e inactivos -1) en el conjunto de entrenamiento y de predicción (validación externa) se muestra en continuación (Tabla 29).

**Tabla 29.** Análisis de la clasificación por categorías en el conjunto de entrenamiento y en el conjunto de predicción del modelo **NNE 3**.

Predicho	Conjunto de entrenamiento			Conjunto de predicción		
	Experimental					
	Inactivo	Moderado	Activo	Inactivo	Moderado	Activo
Activo	10%	3%	71%	-	24%	88%
Moderado	54%	93%	-	100%	75%	-
Inactivo	36%	4%	-	-	1%	-

De acuerdo a los índices estadísticos, el modelo **NNE3** muestra valores más altos de aciertos (**FC**) en el conjunto de entrenamiento y en el conjunto de predicción, así como valores menores de falsos negativos (**FAR**) que el modelo **1** previamente descrito (Tabla 30).

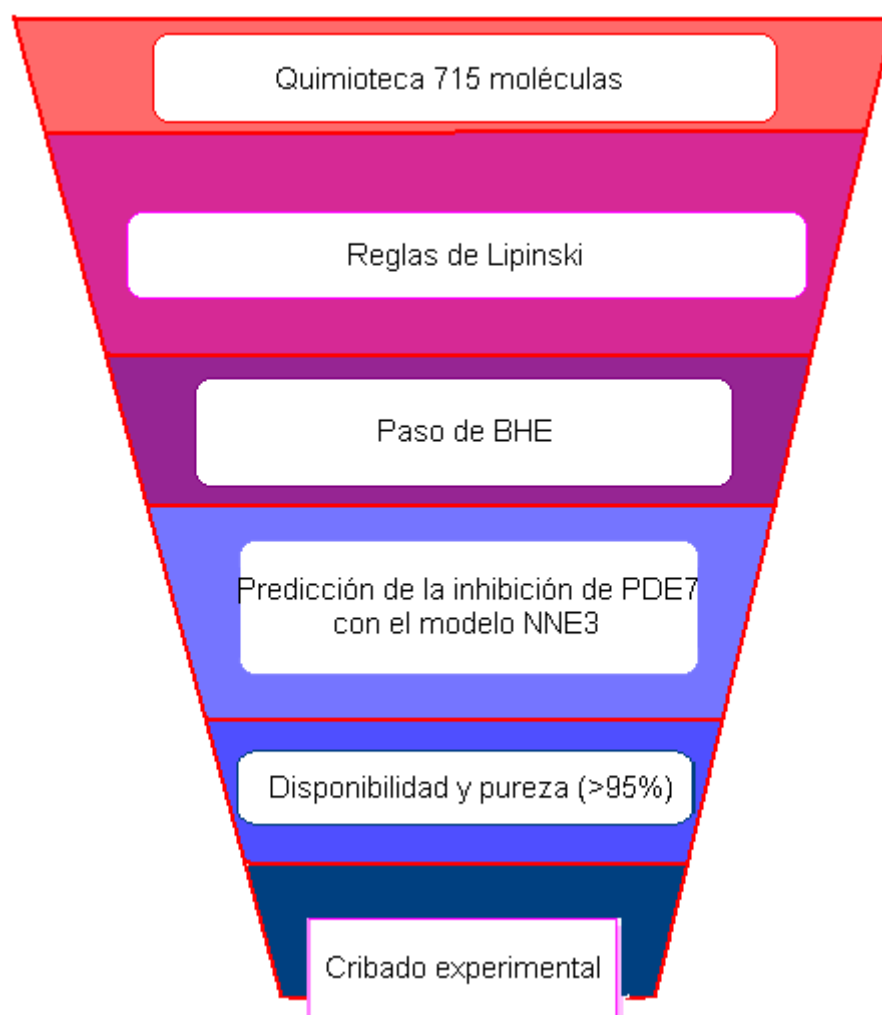
**Tabla 30.** Índices estadísticos del conjunto de entrenamiento y del conjunto de predicción del modelo **NNE3**.

	Conjunto de entrenamiento	Conjunto de predicción
<b>Fracción correcta (FC)</b>	76%	72%
<b>Índice de falsa alarma (FAR)</b>	2%	18%
<b>Probabilidad de detección (POD)</b>	98%	100%

Viendo los resultados obtenidos de los distintos modelos de redes neuronales, se puede concluir que el modelo **NNE3** desarrollado mediante la estrategia NNEA y teniendo en cuenta los valores de actividad cualitativos es el mejor modelo ya que constituye una mejora considerable sobre el modelo anterior con una capacidad predictiva del 82% y el 74% en los conjuntos de entrenamiento y predicción respectivamente. Por otra parte, la utilidad de este modelo de red neuronal reside en su utilización para identificar nuevas moléculas con actividad inhibitoria frente PDE7, diana terapéutica novedosa para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

#### 2.4.4. Cribado virtual

Continuando con nuestros esfuerzos en desarrollar nuevos inhibidores de PDE7 como fármacos innovadores para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, nos planteamos el uso del modelo de red neuronal **NNE3** para identificar nuevos inhibidores de esta enzima, mediante cribado virtual de la quimioteca de compuestos de nuestro grupo de investigación. Con el fin de seleccionar candidatos orientados a convertirse en fármacos para el tratamiento de enfermedades del SNC, se emplearon diversos filtros basados en propiedades fisicoquímicas encaminadas a considerar las propiedades farmacocinéticas de los componentes de la quimioteca (Figura 56).



**Figura 56.** Proceso de identificación de nuevos inhibidores de PDE7 basado en el modelo de red neuronal **NNE3**.

Las estructuras empleadas para llevar a cabo el cribado virtual provinieron de la quimioteca de nuestro grupo, formada por 715 compuestos pertenecientes a un grupo variado de familias.

Como se ha comentado en la introducción, en el proceso tradicional de investigación farmacéutica, la causa principal de que un candidato a fármaco fracase durante su desarrollo son unas malas propiedades farmacocinéticas (absorción, metabolismo, distribución y excreción). Por ello, es fundamental una predicción temprana de estas propiedades durante el desarrollo. Actualmente, con el fin de minimizar la utilización de los animales de experimentación y agilizar el tiempo de desarrollo de un fármaco, se han diseñado diversos métodos predictivos que permiten un cálculo teórico de este tipo de propiedades. Entre ellos, destacan los métodos computacionales que se utilizan habitualmente con gran éxito para predecir propiedades tipo fármaco. Dentro de los métodos computacionales, destacan aquellos que emplean filtros basados en las propiedades fisicoquímicas. Uno de estos filtros se corresponde con las reglas de Lipinski<sup>204</sup>. De acuerdo con estas reglas, para que un candidato a desarrollo se pueda administrar por vía oral debe presentar las siguientes características:

- LogP <5
- Peso molecular <500 g/mol
- Aceptores de puentes de hidrógeno <10
- Donadores de puentes de hidrógeno <5

Se considera que un compuesto que no satisfaga dos o más de estos criterios, tiene una baja probabilidad de convertirse en un buen fármaco. Además, normalmente esta regla se extiende con la condición de que el número de enlaces rotables sea inferior a 10.

Así, en este primer filtro, se eliminaron aquellas estructuras que no tuvieran propiedades tipo fármaco. De las 715 moléculas de la quimioteca, 648 (90.6%) cumplieron las reglas de Lipinski y por tanto, *a priori* serían biodisponibles.

Otro de los filtros generales empleados fue la predicción del paso de barrera hematoencefálica, fundamental para aquellas moléculas que deben ejercer su acción en el SNC. La gran mayoría de los compuestos capaces de atravesar la BHE emplean la difusión pasiva<sup>205</sup>. Dado que algunas propiedades fisicoquímicas como el peso molecular, el coeficiente de partición (LogP) así como el número de donadores o aceptores de puentes de hidrógeno, están involucradas en la penetración de los fármacos al SNC por difusión pasiva<sup>206, 207</sup>, se emplearon métodos computacionales de predicción de paso de BHE, como el cálculo de LogBB, basado en dichas propiedades fisicoquímicas (Anexo 3).

Así, si  $\text{LogP} - (\text{N}+\text{O}) > 0$  o bien si  $(\text{N}+\text{O}) < 5$ , entonces el valor de LogBB sería positivo. Siendo (N+O) el número de átomos de nitrógeno y oxígeno.

Si LogBB tiene un valor positivo, entonces se considera una alta probabilidad de atravesar dicha barrera por difusión pasiva.

De acuerdo a esta fórmula, se calculó el LogBB para las 648 moléculas que cumplían las reglas de Lipinski, de éstas sólo 220 (37.9%) presentaron unas propiedades fisicoquímicas adecuadas para atravesar la barrera hematoencefálica. Finalmente, empleando el modelo de redes neuronales **NNE3**, se predijo la actividad inhibitoria frente a PDE7 de las 220 moléculas seleccionadas (Anexo 4). El protocolo seguido en este paso fue el mismo que el descrito para el desarrollo del modelo. Los resultados de actividad biológica fueron clasificados en términos cualitativos. Así, aquellas moléculas cuyo valor de  $\text{LogCl}_{50}$  predicho era mayor que -0.3 se consideran inactivas, aquellas con valores entre -0.3 y -1 se consideran moderadas y por último, las moléculas con  $\text{LogCl}_{50}$  menor de -1 se considerarían activas frente a PDE7. De estas 220 moléculas, 42 fueron predichas como activas. Tras esta predicción y comprobar tanto la disponibilidad física como la pureza por HPLC (> 95%), se identificaron 21 moléculas correspondientes a diferentes familias para su evaluación enzimática.

Tras llevar a cabo las distintas fases del cribado, las 21 moléculas seleccionadas fueron evaluadas en la Universidad de Santiago de Compostela. Los porcentajes de inhibición frente a PDE7 se encuentran recogidos en la Tabla 31.

A la vista de estos resultados, los compuestos VP1.16 y VP0.1, que presentaban un porcentaje de inhibición a 10  $\mu\text{M}$  mayor del 65%, fueron identificados como inhibidores de PDE7 mediante una aproximación computacional basada en RNAs. Tras el cálculo de su  $\text{Cl}_{50}$ , el derivado de tiofeno VP0.1 no ha sido considerado para un futuro desarrollo, dada la reciente publicación de derivados de esta naturaleza como inhibidores de PDE4<sup>208</sup>. Sin embargo, el derivado de iminotiadiazol VP1.16 recientemente publicado por nuestro grupo como inhibidor de GSK-3 $\beta$ <sup>209</sup>, no sólo ha demostrado su capacidad de inhibir PDE7 *in vitro* sino que ha permitido el descubrimiento de la familia de los 5-imino-1,2,4-tiadiazoles como inhibidores de esta enzima (Figura 57).

**Tabla 31.** Valores de actividad de los compuestos seleccionados frente a PDE7A.

Comp.	PDE7A
	% inh@10 $\mu$ M
AC105	18.43
SC083	8.30
SC005	18.42
SC007	3.73
SC008	10.09
AM047	60.00
SC119	51.07
CG015	24.83
CG060	7.36
SC126cp	7.06
CG062	2.89
CG067	12.51
CG069	17.96
CG074	10.12
VP1.16	82.00
SC034	7.22
SC055	1.68
CG093	22.52
EF017	23.82
S033	11.10
VP0.1	72.40

**Figura 57.** Estructuras identificadas mediante el empleo del modelo **NNE3** como inhibidores de PDE7.

Los ensayos enzimáticos de un gran número de compuestos de la familia de los iminotiadiazoles pusieron de manifiesto valores de  $CI_{50}$  en el orden micromolar, existiendo una buena correlación entre los valores predicho por la red y los experimentales (Tabla 32).

**Tabla 32.** Valores predichos y experimentales de  $CI_{50}$  de la nueva familia de inhibidores de PDE7.

Comp.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	X	Predicho cualitativo	Experimental $CI_{50}$ PDE7A $\mu$ M	Experimental cualitativo
VP1.16	Ph	Ph	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Et	Br	1	1.13 ± 0.21	1
VP1.21	Ph	Ph	H	Br	0	1.02 ± 0.13	1
VP1.22	Ph	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	Br	0	1.44 ± 0.15	0
VP1.32	Ph	Ph	ciclohex	Br	1	1.64 ± 0.22	0
VP1.14	Ph	Ph	CH <sub>2</sub> -3Py	2Br	0	0.38 ± 0.06	1
VP1.15	Ph	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	Br	0	1.11 ± 0.17	1
VP1.43	4-OMePh	Ph	CH <sub>2</sub> -3Py	2Br	1	0.86 ± 0.10	1
VP1.40	4-OMePh	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	Br	1	1.50 ± 0.14	0
VP1.41	4-OMePh	Ph	Ph	Br	1	4.36 ± 0.31	0
VP1.65	4-OMePh	Ph	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Et	Br	0	0.89 ± 0.09	1
VP1.60	Ph	4-OMePh	CH <sub>2</sub> -3Py	2Br	1	0.85 ± 0.07	1
VP1.61	Ph	4-OMePh	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	Br	1	1.18 ± 0.15	1
VP1.62	Ph	4-OMePh	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Et	Br	1	0.78 ± 0.11	1
VP3.15	Ph	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Morf	2Br	0	1.59 ± 0.16	0
VP1.23	Ph	Ph	Ph	-	0	3.52 ± 0.42	0
VP2.3	Ph	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	Cl	0	1.97 ± 0.29	0
VP2.12	Ph	4-NO <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> -3Py	2Br	1	0.84 ± 0.19	1
VP2.15	Ph	1-naftil	CH <sub>2</sub> -3Py	2Br	1	0.87 ± 0.09	1
VP2.32	1-naftil	Ph	CH <sub>2</sub> -3Py	2Br	1	1.08 ± 0.15	1
VP2.33	1-naftil	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	Br	0	1.24 ± 0.12	1
VP2.64	Pent	Ph	CH <sub>2</sub> -3Py	2Br	0	2.80 ± 0.17	0

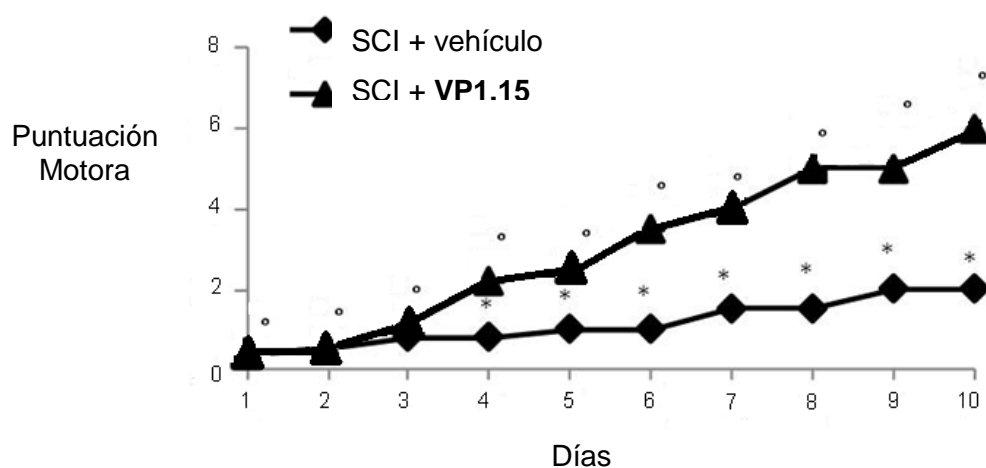
(1) fue asignado al rango de actividad que incluye valores menores de 0.1  $\mu$ M, (0) incluye actividades entre 0.1 y 1  $\mu$ M and (-1) incluye valores por encima de 1.1  $\mu$ M.

A continuación, en la Tabla 33 se muestran los porcentajes de clasificación del modelo **NNE 3** en el conjunto de los compuestos identificados en el cribado virtual.

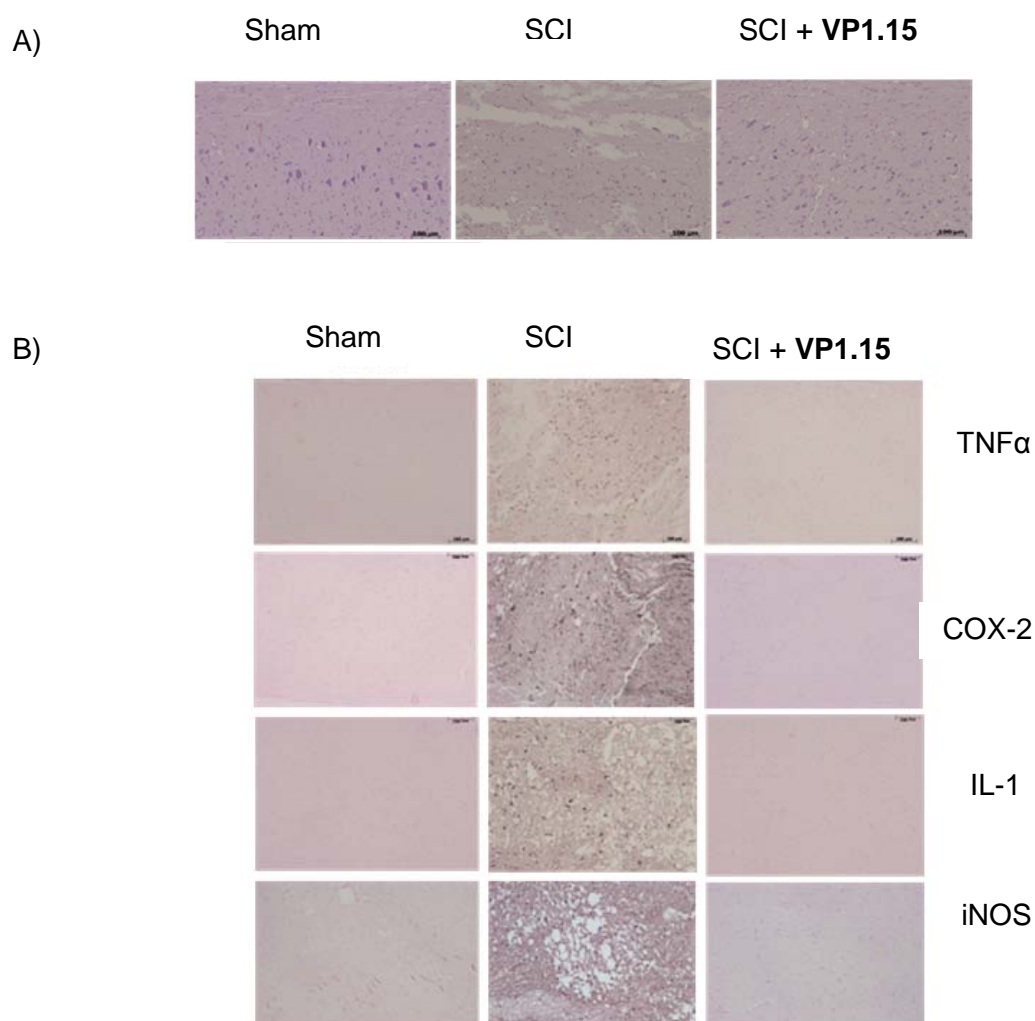
**Tabla 33.** Análisis de la clasificación por categorías en el conjunto de compuestos seleccionados.

		Experimental	
		Activo	Moderado
Predicho	Activo	8/13 62%	1/8 12%
	Moderado	5/13 35%	5/8 62%

Tras el análisis de los datos obtenidos, se aprecia un buen porcentaje de predicción de los valores experimentales (62%), por lo que el modelo de red neuronal **NE3** constituye una herramienta muy útil en la identificación de nuevos inhibidores de PDE7. Además, uno de los miembros de esta nueva familia de inhibidores de PDE7, el derivado VP1.15 ha mostrado al igual que el derivado de quinazolina **2** previamente descrito en esta memoria, eficacia en un modelo de daño medular (SCI, *spinal cord injury*). Este estudio se llevó a cabo en el grupo del Prof. Salvatore Cuzzocrea en la Universidad de Messina, provocando el daño por lesión traumática entre las vértebras torácicas T5-T8. Como se puede apreciar en la Figura 58, la administración del nuevo inhibidor de PDE7 provocó una mejora significativa de los síntomas motores respecto a los animales dañados que no recibieron tratamiento.

**Figura 58.** Efecto del inhibidor de PDE7 VP1.15 en la función motora.

De igual manera que la quinazolina **2**, la administración de VP1.15 mejora las alteraciones histológicas observadas en los cortes de médula espinal de los animales tratados con respecto al grupo no tratado y también, se ha podido comprobar que el tratamiento de los animales con este inhibidor de PDE7 trae consigo una disminución de distintos marcadores de neuroinflamación como TNF $\alpha$ , COX-2, IL-1 e iNOS (Figura 59).



**Figura 59.** Alteraciones histológicas de la médula espinal en los animales (A). Efecto de los inhibidores de PDE7 en la expresión de marcadores inflamatorios (B).

Por lo tanto, se ha desarrollado un modelo de red neuronal que predice la inhibición de PDE7 de cualquier identidad química con una capacidad de predicción del 74%. Este modelo se estableció empleando el programa CODES® que define cada molécula a partir de su representación en 2D, de forma eficiente y fácil. Por otra parte, gracias al uso de este modelo de red neuronal durante un cribado virtual de la quimioteca de nuestro grupo de investigación, se han podido identificar una nueva familia de inhibidores de PDE7 y demostrar su efecto antiinflamatorio en un modelo de daño medular<sup>159, 160</sup>.



## **CAPÍTULO 3**



### 3. ESTUDIO COMPUTACIONAL DE PDE7

#### 3.1. ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LAS ISOFORMAS DE PDE7

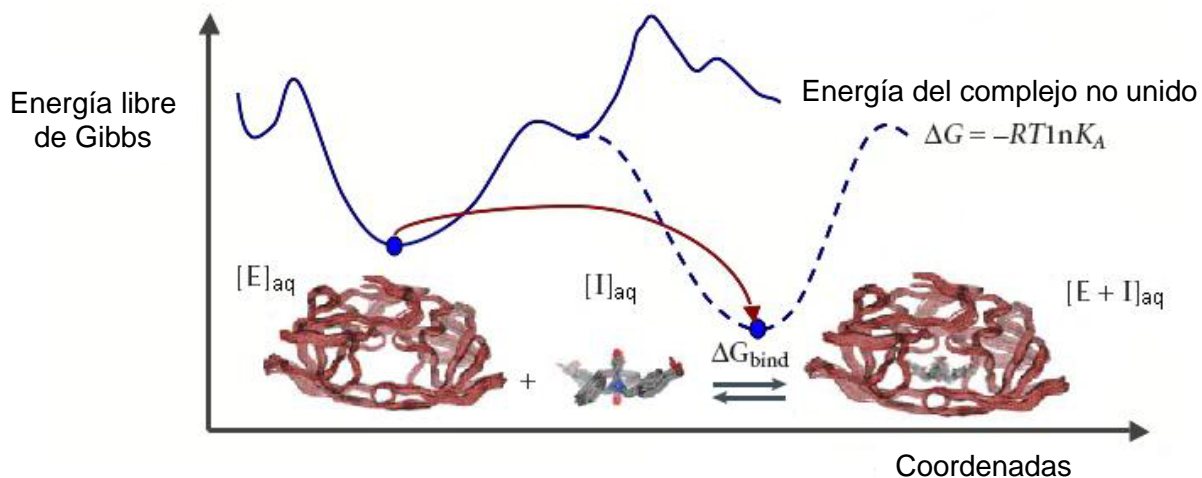
Con el doble objetivo de conocer por un lado con mayor profundidad el modo de unión y las interacciones claves de los inhibidores preparados y por otro, de ser capaces de diseñar inhibidores selectivos de PDE7 frente a otras PDEs, se propuso un estudio computacional tanto de PDE7 como de los complejos con los ligandos preparados. El desarrollo de inhibidores alostéricos permitiría la interacción de una molécula con un sitio de unión diferente al dominio catalítico, provocando un cambio conformacional y evitando así, la unión del sustrato biológico en otra ubicación diferente de la enzima. *A priori*, este fenómeno otorgaría selectividad frente a otras proteínas similares.

Desde el punto de vista biológico, la interacción entre diferentes biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o lípidos juega un papel muy importante en procesos tales como la transducción de señales. Por tanto, para obtener una interacción favorable y selectiva que se traduzca en una respuesta efectiva, la orientación de las moléculas implicadas es crucial. Dentro del campo farmacéutico, el conocimiento de la naturaleza de dicha interacción así como de su importancia biológica es fundamental para predecir la afinidad y la actividad de un candidato a fármaco con el fin de modular e incluso, potenciar su acción terapéutica<sup>136</sup>. De esta forma, el acoplamiento molecular o *docking* es una aproximación computacional que nos aporta información biológica importante en el diseño racional de fármacos.

El *docking* es una técnica que permite modelizar el modo de unión de fármacos a proteínas y se comenzó a utilizar a principios de la década de los 80<sup>210</sup>. El proceso de *docking* (Figura 60) predice tanto la localización como la conformación del inhibidor dentro del sitio de unión deseado. Así, podemos identificar aquellas características moleculares responsables del reconocimiento molecular y predecir las modificaciones estructurales que podrían mejorar la afinidad por la proteína.

Actualmente existen numerosos algoritmos y programas para llevar a cabo dicho proceso. En los últimos años, con el objetivo de mejorar los programas de *docking*, tales como Autodock<sup>®211</sup>, DOCK<sup>®212</sup> o Gold<sup>®213</sup> se han desarrollado nuevos algoritmos como EUDOC<sup>214</sup>, SEED<sup>215</sup>, SEEDS<sup>216</sup> y MM<sup>217</sup>. Independientemente del algoritmo o programa empleado, uno de los puntos clave en el proceso de *docking* es el tratamiento de la conformación de los ligandos. De igual modo, se debe tratar la flexibilidad del receptor, aunque no siempre se lleva a cabo debido a que en algunos casos puede llegar a

empeorar el resultado de los cálculos de *docking*<sup>218</sup>, además de incrementar considerablemente el tiempo de cálculo.

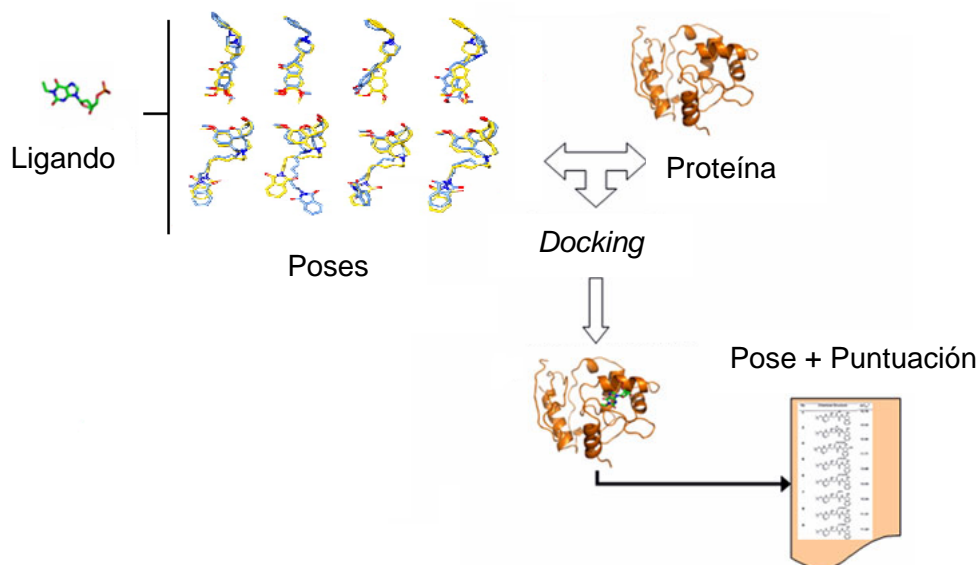


**Figura 60.** Aspectos teóricos del proceso de *docking*<sup>136</sup>. Estudio del complejo [E+I] bajo condiciones de equilibrio.

El proceso de *docking* se puede resumir en las siguientes etapas<sup>136</sup>:

- Determinación de las poses

Cada molécula contiene un número variable de grados de libertad, por ello, hay que identificar aquellas conformaciones (poses) que sean las más adecuadas para adaptarse a la estructura de la proteína (Figura 61). Este proceso debe ser lo más rápido posible para poder evaluar una gran cantidad de compuestos en un único estudio de *docking*.



**Figura 61.** Análisis de las diferentes poses para una molécula en un proceso de *docking*.

#### - Funciones de puntuación o *scoring*

Se encargan de establecer una jerarquía entre los modos de unión predichos a través de la evaluación de las interacciones entre los compuestos y la proteína, basadas en cálculos que tienen en cuenta el volumen de las moléculas, las interacciones electroestáticas y de van der Waals. Adicionalmente, se tienen en cuenta efectos entálpicos, entrópicos y de solvatación.

A su vez, las funciones de puntuación se pueden clasificar en tres categorías<sup>219</sup>:

- Basadas en campos de fuerza. Emplea potenciales similares a los empleados en mecánica molecular.
- Basadas en el conocimiento. Sus funciones derivan de los datos experimentales, así se obtiene información de los contactos entre átomos observados en las estructuras para posteriormente, calcular energías de unión.
- Basadas en regresiones empíricas. Útil en la eliminación de resultados falsos positivos, mientras que mantiene un gran número de compuestos activos (por ejemplo, el módulo Surflex-Dock<sup>220</sup> de Sybyl®).
- Establecimiento de una jerarquía. En este caso, se estima la energía libre de unión del complejo formado por la proteína y el ligando (cada una de las poses de una misma molécula), otorgando una puntuación que viene dada por las interacciones más o menos favorables presentes en dicho complejo.

#### **3.1.1. Descripción secuencial y estructural de PDE7**

Debido a la existencia de diferentes tipos de PDEs en nuestro organismo, el diseño de moduladores alostéricos podría suponer la obtención de inhibidores selectivos frente a PDE7 y por tanto, dicha aproximación supondría una reducción de efectos adversos no deseados como resultado de la ausencia de interacción con el resto de PDEs.

PDE7 muestra alrededor de un 50% de identidad en el dominio catalítico con el resto de los miembros de la familia de fosfodiesterasas. En la Tabla 34 se muestra el alineamiento de aquellos residuos más conservados entre la familia de PDEs dentro del dominio catalítico. Cabe destacar que el centro activo de todas las PDEs está delimitado por cuatro sitios bien definidos: el sitio Q que es donde se encuentra la glutamina invariable, la región H o hidrofóbica, la región L y el sitio M donde se encuentran los metales de la enzima.

**Tabla 34.** Alineamiento de secuencias en el sitio de unión del sustrato<sup>82</sup>.

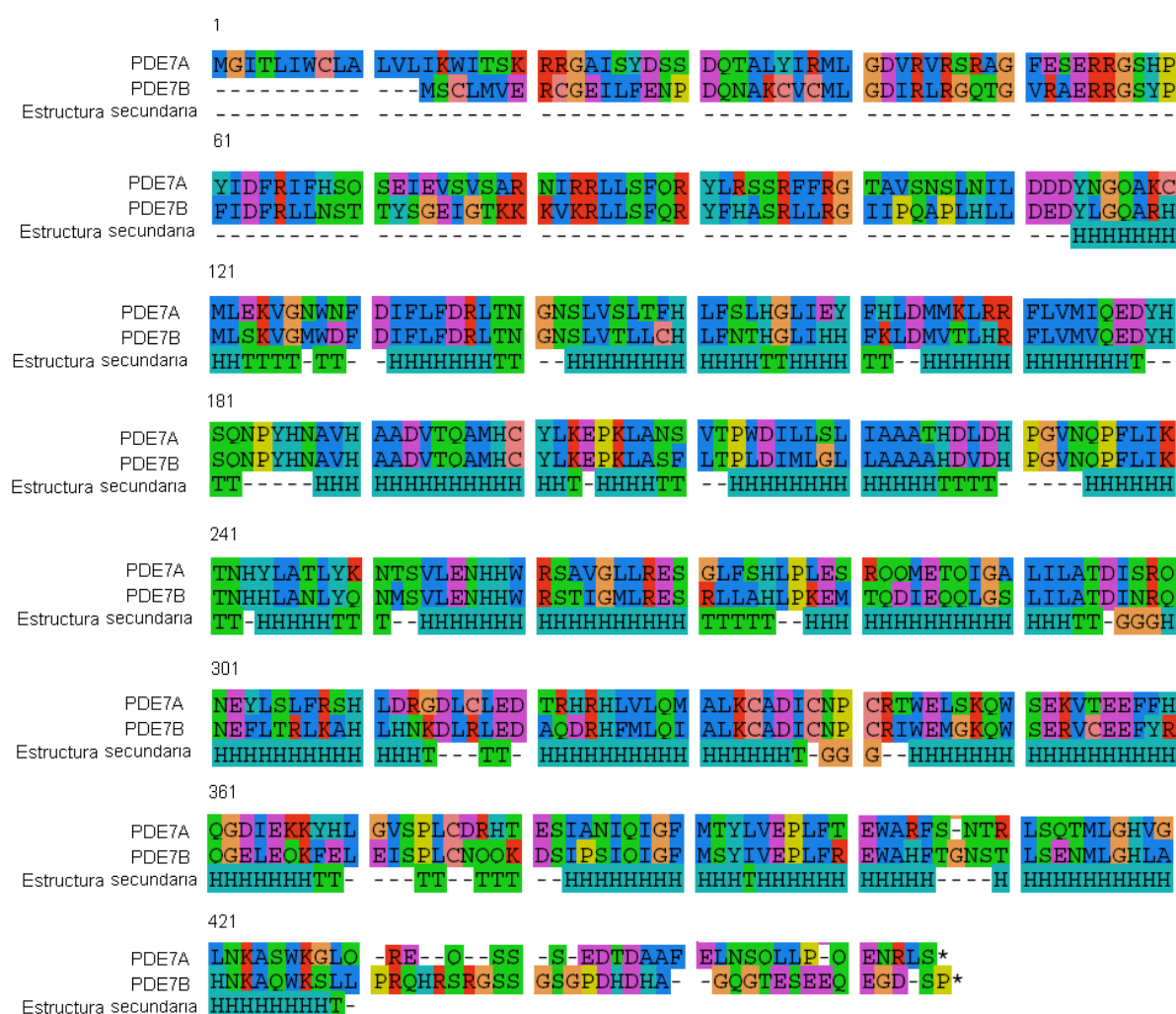
	*159	160	164	200	201	204	273	318	319	321	333	336	340	369	372
<b>PDE1</b>	Y	H	H	H	D	H	M	D	I	H	T	L	F	Q	F
<b>PDE2</b>	Y	H	H	H	D	H	L	D	L	D	A	I	F	Q	F
<b>PDE3</b>	Y	H	H	H	D	H	L	D	I	G	T	I	F	Q	F
<b>PDE4</b>	Y	H	H	H	D	H	M	D	L	N	T	I	F	Q	F
<b>PDE5</b>	Y	H	H	H	D	H	L	D	L	A	A	V	F	Q	F
<b>PDE6</b>	Y	H	H	H	D	H	L	D	L	A	A	V	F	Q	F
<b>PDE7</b>	Y	H	H	H	D	H	I	D	I	N	S	V	F	Q	F
<b>PDE8</b>	Y	H	H	H	D	H	M	D	V	N	A	I	Y	Q	F
<b>PDE9</b>	F	H	H	H	D	H	M	D	I	N	V	L	F	Q	Y
<b>PDE10</b>	Y	H	H	H	D	H	L	D	L	S	A	I	F	Q	F
<b>PDE11</b>	Y	H	H	H	D	H	L	D	L	A	A	V	F	Q	W

\*Los números se refieren a la secuencia de aminoácidos de PDE4D.

### 3.1.2. Análisis secuencial de las isoformas de PDE7

El alineamiento secuencial es una herramienta útil en la comparación de proteínas basada en su secuencia que permite establecer equivalencias entre diferentes secuencias aunque no presenten un alto grado de identidad, pudiéndose emplear programas como *ClustalW*<sup>®</sup>, *Seaview*<sup>®</sup> o *T-coffee*<sup>®</sup>, entre otros. La subfamilia PDE7 está codificada por 2 genes (PDE7A y PDE7B) que dan lugar a las distintas isoformas. Así, PDE7A da lugar a la isoforma A1 que se distribuye mayoritariamente en el sistema inmune y también en el pulmón, la isoforma A2 que se encuentra principalmente en el corazón, riñón y músculo esquelético y la isoforma A3 que aparece en los linfocitos T después de su activación<sup>221-223</sup>, <sup>222</sup>, <sup>224</sup>. En cuanto a PDE7B, existe únicamente en humanos y se expresa mayoritariamente en cerebro<sup>225</sup>, <sup>226</sup> por lo que se le asocia un papel importante en el proceso de memoria, aprendizaje y plasticidad sináptica<sup>227</sup>. También puede encontrarse en otros tejidos como páncreas, corazón y músculo esquelético<sup>225-227</sup>.

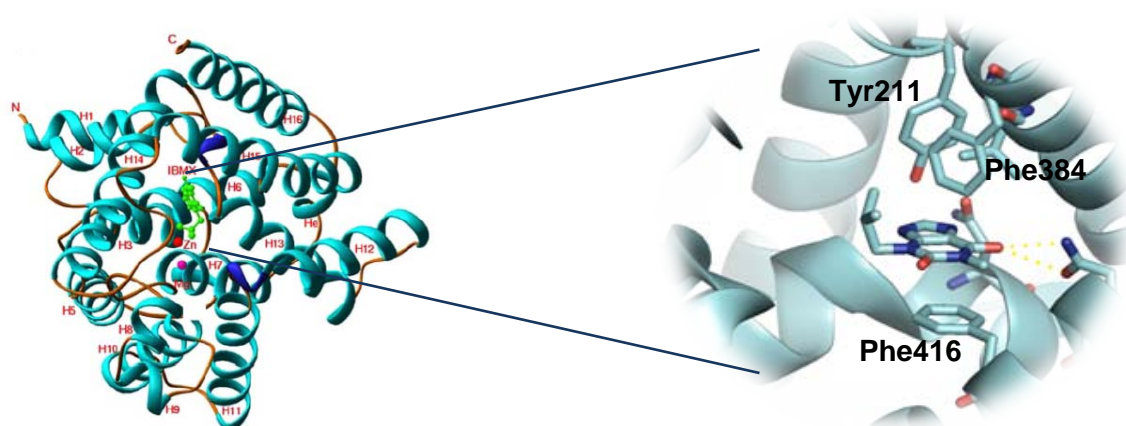
En la Figura 62 se muestra el alineamiento secuencial del dominio catalítico de las isoformas 7A y 7B, junto con la estructura secundaria presentando un elevado grado de identidad, alrededor del 70%<sup>222</sup>, <sup>226</sup>, conservándose los residuos claves tal y como se puede observar.



**Figura 62.** Alineamiento secuencial PDE7A y PDE7B en *Clustalw*<sup>®</sup> (H:  $\alpha$ -hélices, T: loops).

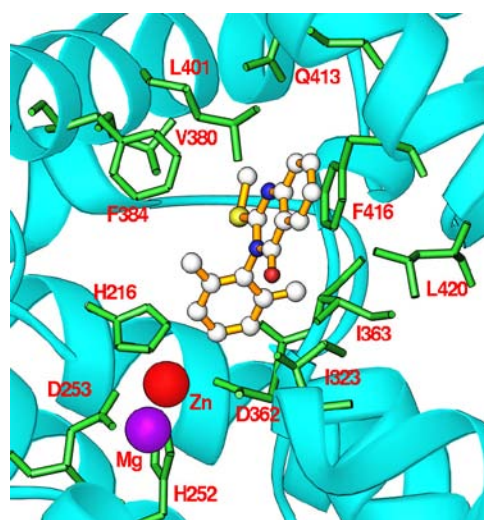
### 3.1.3. Evaluación estructural de las isoformas de PDE7

El alineamiento o superposición estructural de proteínas permite establecer similitudes entre diferentes estructuras tridimensionales, empleándose plataformas como *DALI*<sup>®</sup>, *Mammoth*<sup>®</sup> o *Pymol*<sup>®</sup>, entre otros. Como resultado del alineamiento estructural se obtiene tanto una superposición de coordenadas atómicas como una desviación de las medidas (RMSD) entre las estructuras de las proteínas superpuestas. En la actualidad, en el *Protein Data Bank* (PDB) se encuentra la estructura cristalográfica de la isoforma PDE7A1 en presencia de dos inhibidores, IBMX<sup>80</sup> (1ZKL) y el derivado de tioxquinazolina 15<sup>81</sup> (3G3N) resuelta mediante difracción de rayos X (Figura 63).



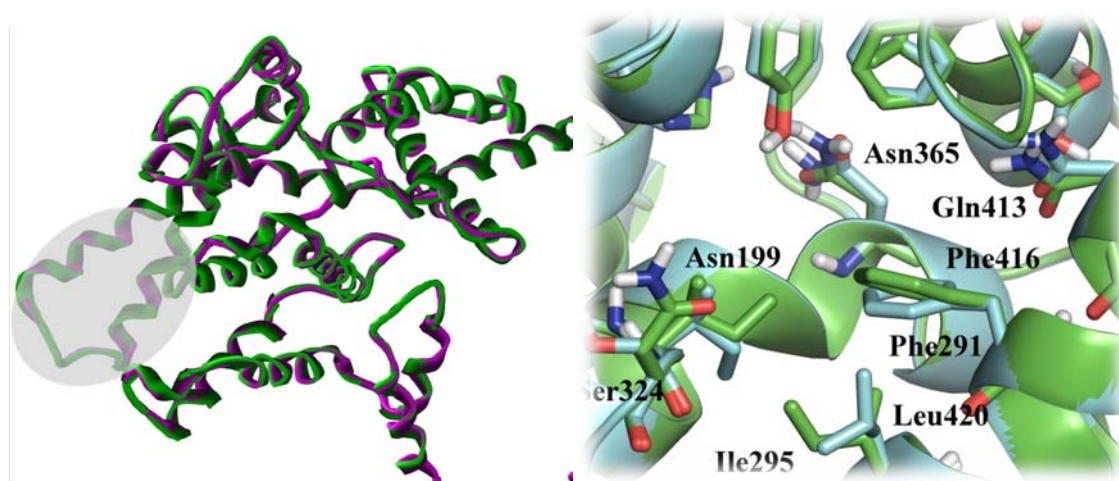
**Figura 63.** Dominio catalítico de PDE7A1 con el inhibidor no selectivo IBMX (1ZKL)<sup>80</sup>.

La estructura cristalográfica del dominio catalítico de PDE7A y la quinazolina **15**<sup>81</sup> resuelta por el Prof. Ke de la Universidad de Carolina del Norte puso de manifiesto el modo de unión de este inhibidor de PDE7 que difiere del modelo de unión de IBMX<sup>80</sup>, ya que a pesar de que el sitio de unión de esta quinazolina está rodeado por los mismos residuos que en el caso del IBMX, no forma el enlace de hidrógeno con el residuo Gln413 (Figura 64). Esto parece indicar que aunque la existencia del puente de hidrógeno con este residuo es importante para la actividad, no es indispensable, ya que el derivado **15** presenta una  $CI_{50}$  de 0.5  $\mu$ M en comparación con la presentada por el inhibidor no selectivo IBMX ( $CI_{50}$  de 8.1  $\mu$ M frente a PDE7).



**Figura 64.** Complejo cristalográfico del inhibidor **15**-PDE7A<sup>81</sup> (distancias en Å).

A diferencia de PDE7A, la estructura cristalográfica de la isoforma PDE7B no ha sido todavía resuelta. Actualmente, únicamente se dispone de un modelo de homología para PDE7B (1LXW)<sup>228</sup>. De acuerdo al alineamiento estructural entre la estructura cristalográfica de PDE7A (1ZKL) y el modelo de homología de PDE7B llevado a cabo en Sybyl® (Figura 65), se observa que la conformación y posición del dominio catalítico permanece prácticamente invariable (sustitución de Leu420 en PDE7A por Ile295 en PDE7B). Por otra parte, las diferencias más significativas se encuentran en los residuos que forman parte de los *loops* (giros que unen  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -láminas). De manera que debido a la gran similitud entre ambas, el diseño de inhibidores selectivos frente a PDE7B sería complicado. De acuerdo a estos resultados, en todos los estudios computacionales posteriores se empleó únicamente PDE7A.



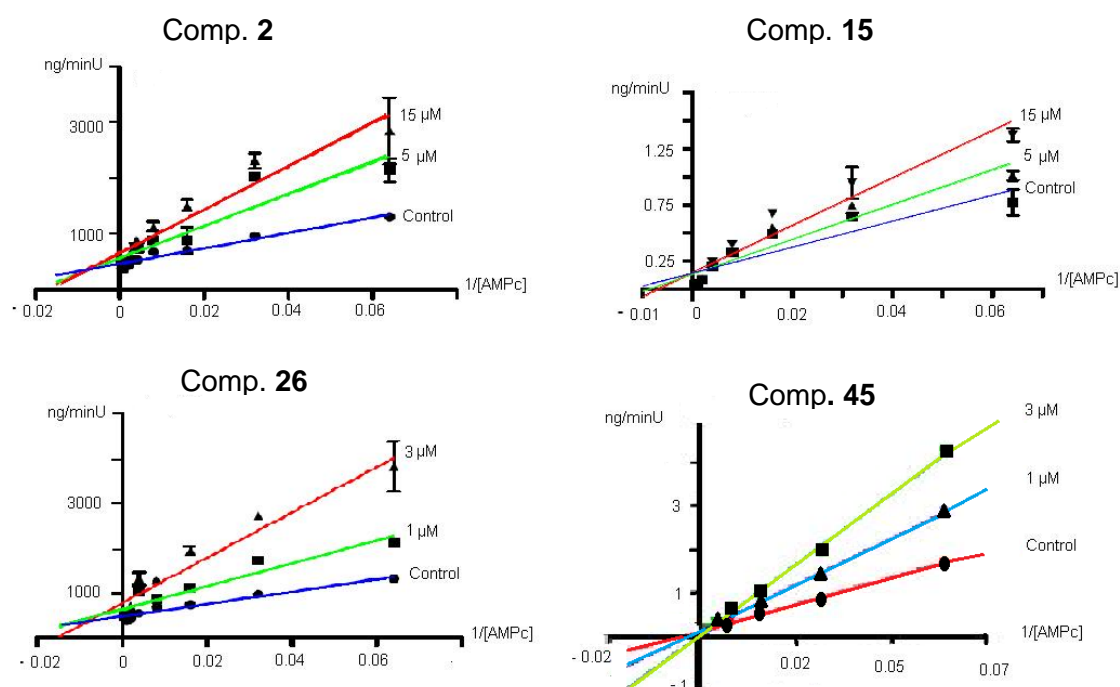
**Figura 65.** Alineamiento estructural PDE7A y PDE7B en Sybyl®. Estructura secundaria completa (A). Ampliación del centro activo de PDE7A (azul) y PDE7B (verde) (B).

## 3.2. MODELO DE UNIÓN TEÓRICO DE LOS INHIBIDORES DE PDE7

### 3.2.1. Estudios cinéticos de unión a PDE7

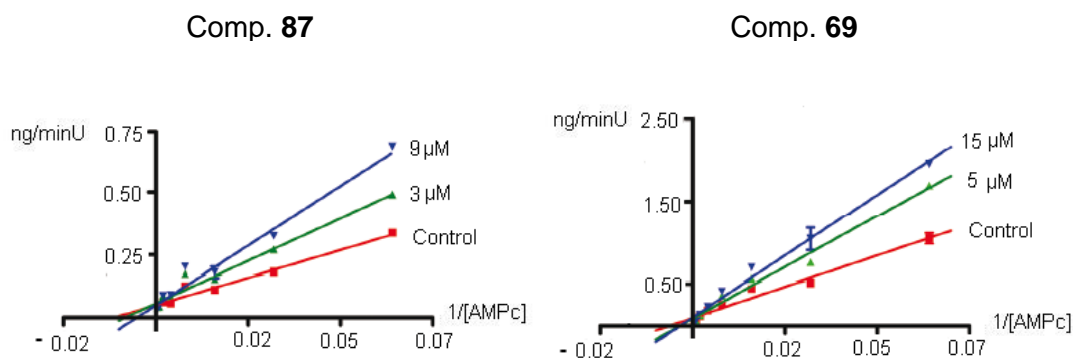
Con el objetivo de conocer el modo de unión a PDE7 de los compuestos obtenidos en esta memoria, se seleccionaron tanto los derivados del anillo de furano como los derivados de tioquinazolina que presentaron una mayor actividad biológica frente a PDE7 para llevar a cabo el estudio de su mecanismo de acción. Así, se realizaron estudios cinéticos en la Universidad de Santiago de Compostela. Para ello, se midió la inhibición enzimática empleando concentraciones variables de los inhibidores a una concentración determinada de AMPc. En el eje de abscisas de las gráficas se representa

la inversa de la concentración de AMPc empleado, mientras que en el eje de las ordenadas, se representa la inversa de la velocidad de formación del complejo inhibidor-enzima. Una vez realizados los estudios de inhibición, se puede apreciar que en los derivados **15** y **45** se obtuvieron un conjunto de rectas cuyo origen común se encontraba en el eje de ordenadas, es decir, la velocidad de formación del complejo compuesto-PDE7 permanece constante a concentraciones variables del inhibidor y por tanto, presentaría un tipo de inhibición competitiva. Es decir, el derivado compite con el AMPc en la unión al centro activo. Por otro lado, las quinazolininas **2** y **26** mostraron un tipo de inhibición mixta, ya que en este caso el origen común no se encuentra ni en el eje de ordenadas ni en el eje de abcisas. Este experimento muestra que existen otros sitios de unión a la enzima además del centro activo (Figura 66).



**Figura 66.** Gráfica de los estudios cinéticos realizados a concentraciones variables de los derivados de tioquinazolina (**2**, **15**, **26** y **45**).

Paralelamente, también se llevaron a cabo estudios cinéticos con los derivados de furano **87** y **69** que condujeron a la obtención de un conjunto de rectas cuyo origen común se encontraba en el eje de ordenadas (Figura 67). Así pues, estos inhibidores inhiben la enzima de manera competitiva, uniéndose por tanto, al centro activo.



**Figura 67.** Gráfica de los estudios cinéticos realizados a concentraciones variables de los derivados del anillo de furano (**87** y **69**).

Dado que los resultados experimentales mostraron una inhibición mixta en el caso de las quinazolininas **2** y **26**, los inhibidores debían unirse tanto al sitio del AMPc como a un sitio alostérico. Ello llevó a plantear la búsqueda de otros posibles sitios de unión no descritos hasta el momento a fin de racionalizar los resultados obtenidos. Por otra parte, el diseño de inhibidores de PDE7 alostéricos permitiría la obtención de moléculas selectivas frente a dicha diana.

### 3.2.2. Análisis de la superficie de las PDEs

Con el fin de identificar cavidades que puedan considerarse como posibles sitios de unión de moléculas pequeñas en PDE7A, se analizó computacionalmente la superficie tanto de PDE7 como de otras PDEs

#### 3.2.2.1. Identificación y análisis de las diferentes cavidades

Existen diferentes programas diseñados para la identificación y el análisis de cavidades en superficies de proteínas que difieren en el tipo de algoritmo empleado. Principalmente existen dos tipos de algoritmos: los basados en las relaciones de estructura-actividad<sup>229</sup> y los evolutivos. Los primeros a su vez se dividen en energéticos y geométricos<sup>230</sup>. Los algoritmos basados en relaciones estructura-actividad tienen en cuenta la geometría de la superficie de la proteína, identificando posibles cavidades. Los del tipo evolutivo buscan proteínas con secuencia similar, con el objetivo de encontrar cavidades conservadas que puedan ser empleadas como diana para el desarrollo de nuevos fármacos. En nuestro caso, se han empleado algoritmos del tipo geométrico

para poder determinar posibles cavidades alostéricas que permitan establecer un modo teórico de unión de los derivados activos frente a la diana descritos en esta memoria.

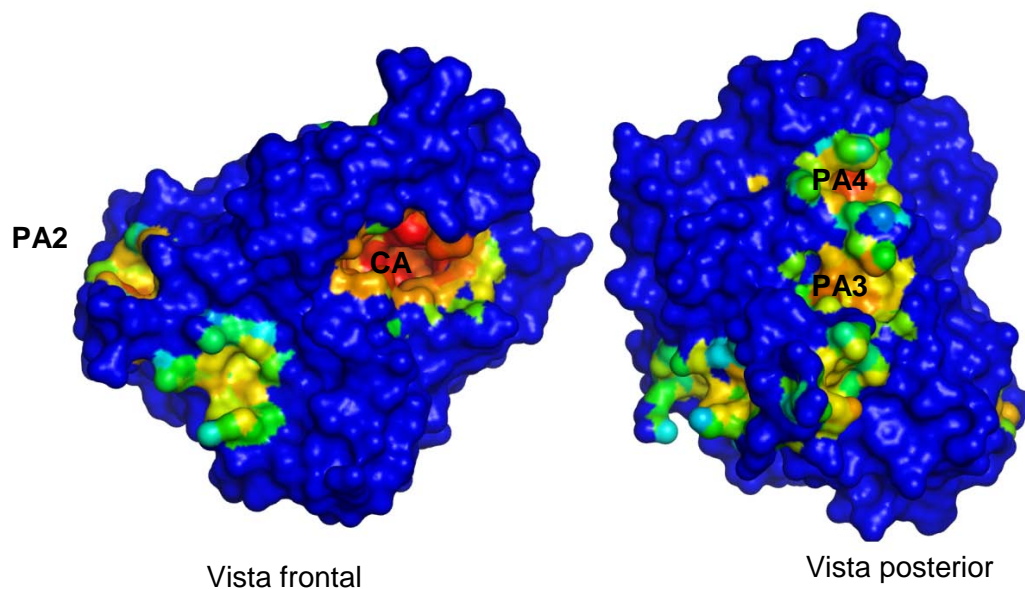
Para la identificación de cavidades en PDE7, se han empleado dos aproximaciones diferentes. La primera se llevó a cabo con los programas *Fpocket*<sup>231</sup> y *Hpocket*<sup>®</sup> basados en algoritmos geométricos. Y en la segunda aproximación, se empleó el servidor *MetaPocket*<sup>®</sup> v.2.0 que utiliza diferentes algoritmos tanto energéticos como geométricos.

A grandes rasgos, en el programa *Fpocket*<sup>®</sup> se genera una malla de puntos alrededor de la proteína y se hace crecer esferas en cada punto de la malla hasta que se encuentran contactos estéricos. A continuación, se buscan vías de salida a la superficie. Posteriormente, se identifican las cavidades y se puntúan en función de diferentes propiedades (volumen, hidrofobia, superficie accesible al disolvente). Con esta información se analizan los bolsillos, desechando aquellos que no presentan propiedades adecuadas.

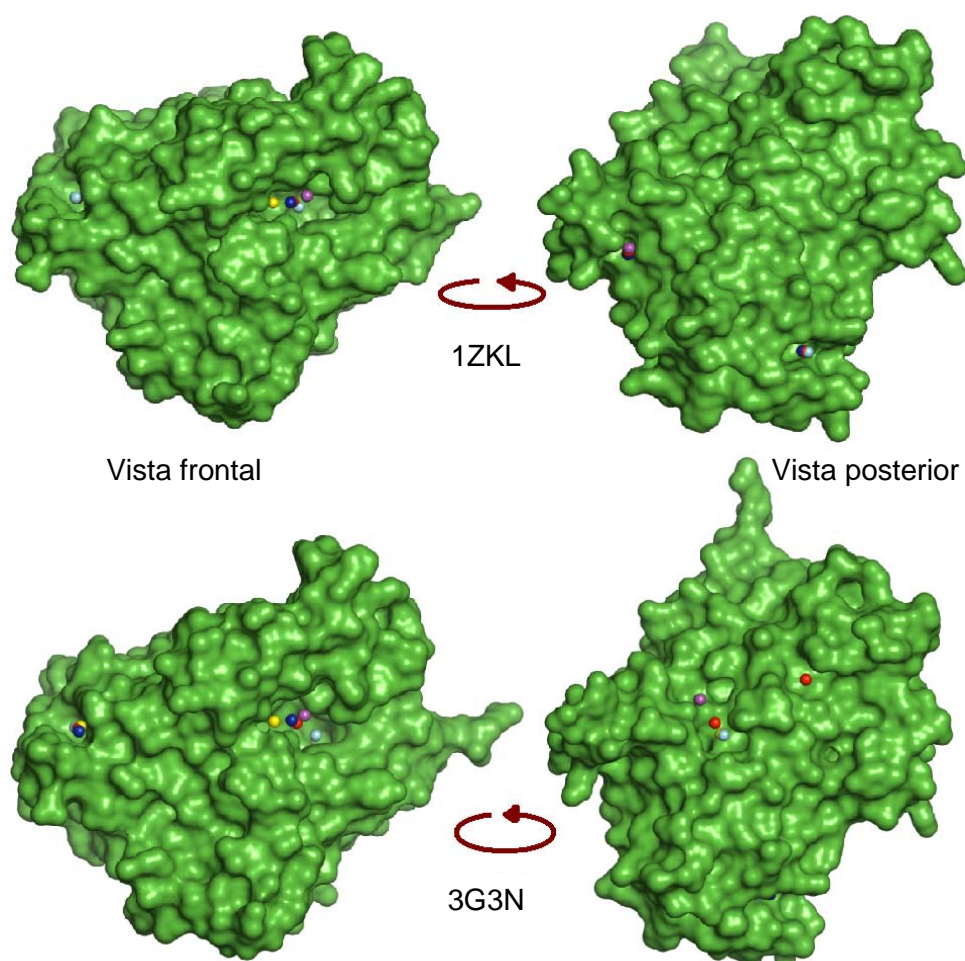
En nuestro caso, se identificaron cuatro cavidades en PDE7A. En primer lugar, según el estudio realizado en las dos estructuras cristalizadas (1ZKL y 3G3N) con *Fpocket*<sup>®</sup> y *Hpocket*<sup>®</sup> se encontraron tres bolsillos conservados y con mejor puntuación a lo largo de la familia de PDE7A: centro activo (CA) y los bolsillos PA2 y PA3. Por otra parte, a pesar de que el bolsillo PA4 únicamente fue detectado en la estructura 3G3N por el programa *Fpocket*<sup>®</sup>, se encuentra muy conservado de acuerdo a los resultados del programa *Hpocket*<sup>®</sup>.

El programa *HPocket*<sup>®</sup> lleva a cabo una búsqueda de proteínas similares mediante BLAST obteniendo una gráfica con las cavidades más conservadas coloreadas en rojo, así como las menos conservadas que se presentan en azul. Es importante resaltar que el área azul no representa una ausencia de cavidad, sino una baja probabilidad de encontrar una cavidad. Por el contrario, el área roja representa altas probabilidades de encontrarla (Figura 68).

A continuación, se empleó el programa *MetaPocket*<sup>®</sup> para estudiar los complejos PDE7A-IBMX (código PDB: 1ZKL) y PDE7A-inhibidor **15** (código PDB: 3G3N) y así, comprobar si las predicciones realizadas con *Fpocket*<sup>®</sup> eran correctas. Para ello, el programa *MetaPocket*<sup>®</sup> se sirve de diferentes algoritmos (LIGSITE<sup>224</sup>, PASS<sup>225</sup>, Q-SiteFinder<sup>226</sup> y SURFNET<sup>227</sup>) para poder identificar posibles bolsillos. Posteriormente, las cavidades encontradas se clasifican empleando una función de puntuación (Figura 69).

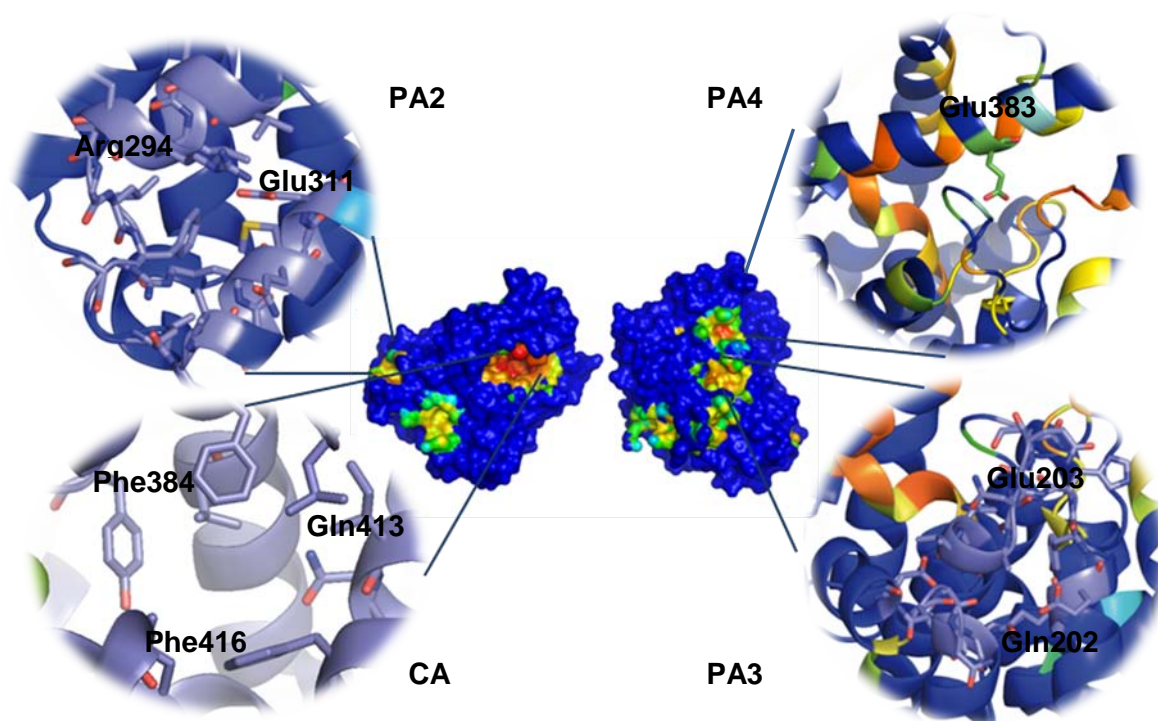


**Figura 68.** Exploración y consenso de las cavidades encontradas en PDE7A (1ZKL) en HPocket®.



**Figura 69.** Representación de las cavidades encontradas por *Metapocket*® en 1ZKL y 3G3N.

Analizando los resultados obtenidos con los programas *Fpocket*® y *Hpocket*®, y tras contrastarlos con *Metapocket*®, se encontraron e identificaron las mismas cuatro cavidades presentes en PDE7A, además del centro activo, mostradas en la Figura 70.



**Figura 70.** Exploración y consenso de las cavidades encontradas en PDE7A.

Una vez identificados los posibles sitios de unión en PDE7, se realizó el mismo estudio con las enzimas PDE3 y PDE4 para comprobar si los bolsillos identificados en PDE7 también se encontraban en otras PDEs. Para ello, se emplearon todas las estructuras cristalizadas tanto de PDE3 como de PDE4. Tras el estudio mediante *Fpocket*® de los diversos sitios de unión a PDE7 (PA2, PA3, PA4), podemos establecer diferencias en cuanto a los sitios de unión a la enzima encontrados en las diferentes estructuras cristalográficas (Tabla 36).

El bolsillo PA2 también se encuentra conservado en PDE4D aunque con un tamaño ligeramente menor que en PDE7A y está ausente en PDE3B. La cavidad PA3 que se encuentra en PDE7A, PDE3B y PDE4B, está muy expuesta al exterior. Cabe mencionar que PA3 presenta un menor volumen y una menor accesibilidad en PDE3B que en el resto de PDEs. Por otra parte, PDE4D carece de este sitio de unión. El bolsillo PA4 se localiza en PDE4D y PDE3B, aunque su reducido volumen dificulta la unión de ligandos en dicha zona. PDE4B carece de este bolsillo.

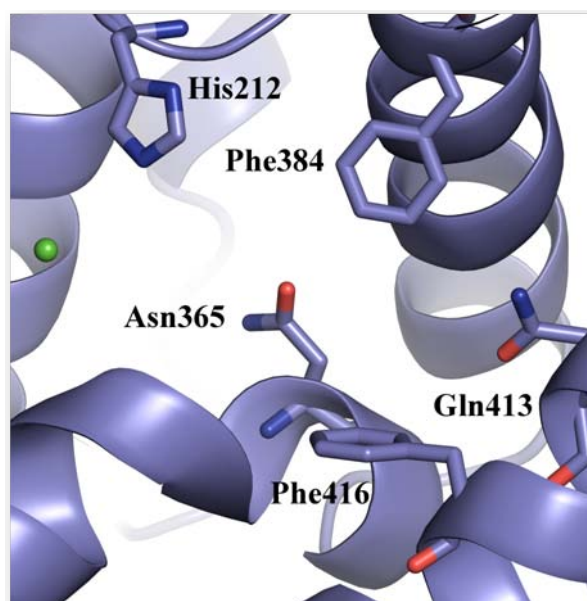
**Tabla 36.** Identificación de los posibles sitios de unión en PDEs.

Enzima	PDB	CA	PA2	PA3	PA4	Enzima	PDB	CA	PA2	PA3	PA4
PDE7A	1ZKL	x	x	x	x	PDE7B	1LXW	x	x	x	x
	3G3N	x	x	x	x		1F0J	x	x	x	-
	1MKD	x	x	-	x		1R06	x	x	x	-
	1OYN	x	x	-	-		1RO9	x	x	x	-
	1PTW	x	x	-	x		1ROR	x	-	x	x
	1Q9M	x	x	-	x		1TB5	x	x	x	x
	1TB7	x	x	x	x		1XLX	x	-	x	x
	1TBB	x	x	-	x		1XLZ	x	x	x	x
	1XOM	x	x	-	x		1XM4	x	x	x	-
	1XON	x	x	x	x		1XM6	x	x	x	-
	1XOQ	x	x	x	x		1XMU	x	x	x	x
	1XOR	x	x	x	x		1XMY	x	x	x	-
	1Y2B	x	-	x	x		1XN0	x	x	x	x
	1Y2C	x	x	-	x		1XOS	x	x	x	-
	1Y2D	x	x	-	x		1XOT	x	x	x	-
	1Y2E	x	-	-	x		1Y2H	x	x	x	x
	1Y2K	x	x	-	x		1Y2J	x	x	x	x
1ZKN	x	x	-	x	2CHM	x	x	x	-		
PDE4D	2FM0	x	x	-	x	2QYL	x	-	x	-	
	2FM5	x	x	-	x	3D3P	x	x	x	x	
	2PW3	x	x	-	x	3FRG	x	-	x	-	
	2QYN	x	x	x	x	3G45	x	-	x	x	
	3G4G	x	-	x	x	3GWT	x	-	x	-	
	3G4I	x	x	-	x	3HC8	x	x	x	-	
	3G4K	x	x	-	x	3HDZ	x	x	x	-	
	3G4L	x	x	-	x	3HMV	x	-	x	x	
	3G58	x	x	-	x	3KKT	x	x	x	-	
	3IAD	x	x	-	-	3LY2	x	x	x	-	
	3IAK	x	-	-	-	3O0J	x	-	x	-	
	3K4S	x	-	-	x	3O56	x	x	x	-	
	3SL3	x	x	-	x	3O57	x	-	x	x	
	3SL4	x	x	-	-	PDE3B	1SO2	x	-	x	-
	3SL5	x	x	-	-		1SOJ	x	-	x	x
	3SL6	x	x	x	x						
	3SL8	x	x	-	x						
3V9B	x	x	-	x							

### 3.2.2.2. Análisis de los posibles sitios de unión

La inspección conjunta de los resultados llevó a seleccionar aquellas cavidades (CA, PA2, PA3 y PA4) predichas por todos los programas utilizados para su examen posterior, recogiendo dichas cavidades así como sus residuos más característicos en función de la PDE en estudio. Como cabría esperar, la primera cavidad encontrada por *FPocket*<sup>®</sup> fue el centro activo tanto en el complejo PDE7-IBMX como en el complejo PDE7-15 (Figura 71).

A)



B)

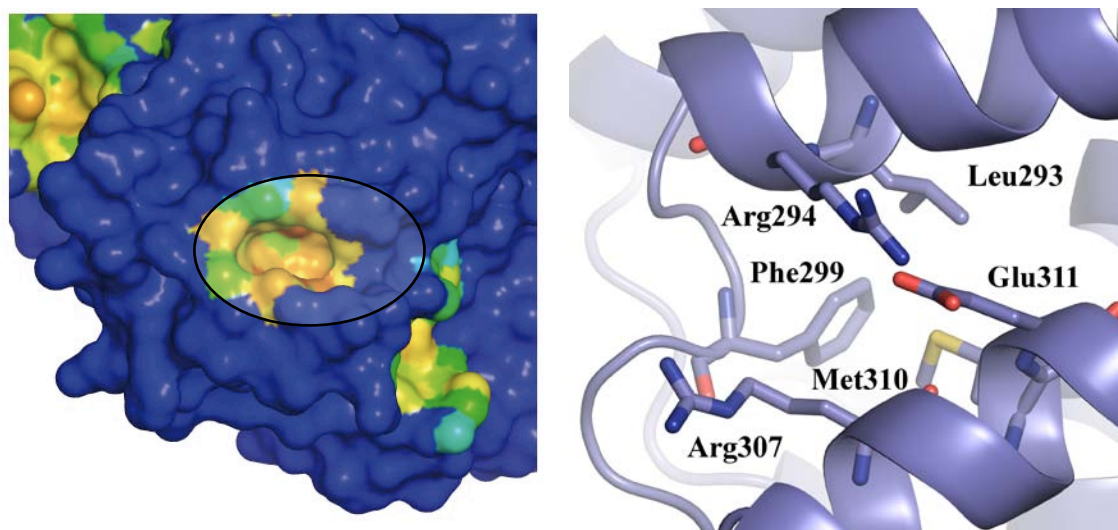
CA	<b>PDE7A</b>	His212	Asn365	Glu413	Phe384	Phe416
	<b>PDE3B</b>	His737	Gly940	Glu988	Phe959	Phe991
	<b>PDE4D</b>	His160	Asn321	Glu369	Phe340	Phe372
	<b>PDE4B</b>	His234	Asn395	Glu443	Phe414	Phe446

**Figura 71.** Sitio de unión CA de 1ZKL (A). Secuencia de aminoácidos del centro activo en PDE7A, PDE3B, PDE4D y PDE4B.

La segunda cavidad (PA2) encontrada por *FPocket*<sup>®</sup> se encuentra entre las  $\alpha$ -hélices 9 y 11 de PDE7A (1ZKL) con una puntuación inferior a la obtenida para el sitio activo. Sin embargo, la hidrofobia y el volumen son muy similares (Figura 72). El sitio de unión PA2 posee una geometría alargada y estrecha así como la coexistencia de los aminoácidos cargados, arginina y ácido glutámico, formando un puente salino. De esta forma, se encuentran favorecidas aquellas moléculas que puedan presentar interacciones del tipo catión- $\pi$  o puentes de hidrógeno con los aminoácidos cargados

presentes en este sitio de unión. Además, el reducido volumen de este sitio de unión favorece la interacción selectiva de moléculas pequeñas.

A)



B)

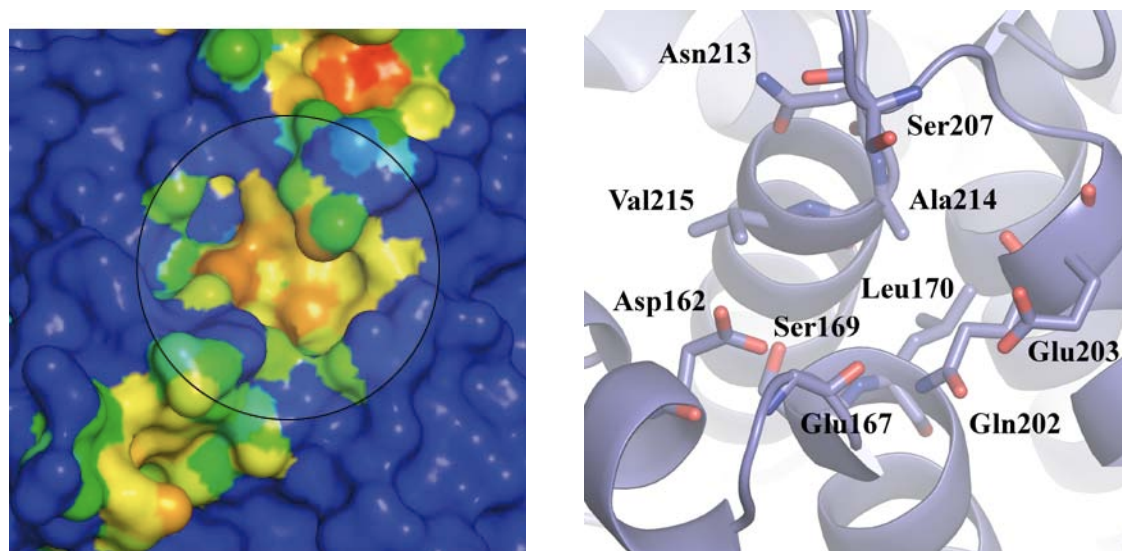
PA2	<b>PDE7A</b>	Leu293	Arg294	Phe299	Arg307	Met310	Glu311
	<b>PDE4D</b>	Leu241	Gln242	Phe249	Arg257	Leu260	Arg261
	<b>PDE4B</b>	Leu487	Gln488	Phe495	Arg503	Leu506	Arg507

**Figura 72.** Sitio de unión PA2 de 1ZKL (A). Secuencia de aminoácidos del centro activo en PDE7A, PDE3B, PDE4D y PDE4B.

El sitio de unión PA3 presenta un volumen mayor que el sitio de unión PA2 (Figura 73). Además, este bolsillo se encuentra de forma adyacente al sitio de unión PA4 separados por un *loop* que soporta al residuo de His212 en 1ZKL. Éste transfiere su protón al residuo conservado de ácido glutámico durante el proceso catalítico<sup>232</sup>. Su hidrofobia es similar a la presentada por PA2. Sin embargo, dado que PA3 es una cavidad más expuesta al exterior, podría ser menos favorable para alojar ligandos.

Por otra parte, el sitio de unión PA4 se encuentra muy conservado en las diferentes PDEs aunque presenta un tamaño más reducido (Figura 74). Además, cabe destacar que dicho sitio en 1ZKL se encuentra espacialmente detrás del residuo del Glu383 que recibe el protón del residuo de His212 durante el proceso catalítico. Por lo tanto, cuando un modulador alostérico interactuase con este sitio de unión, cabría esperar que afectase al mecanismo catalítico de la enzima, disminuyendo por tanto, su actividad.

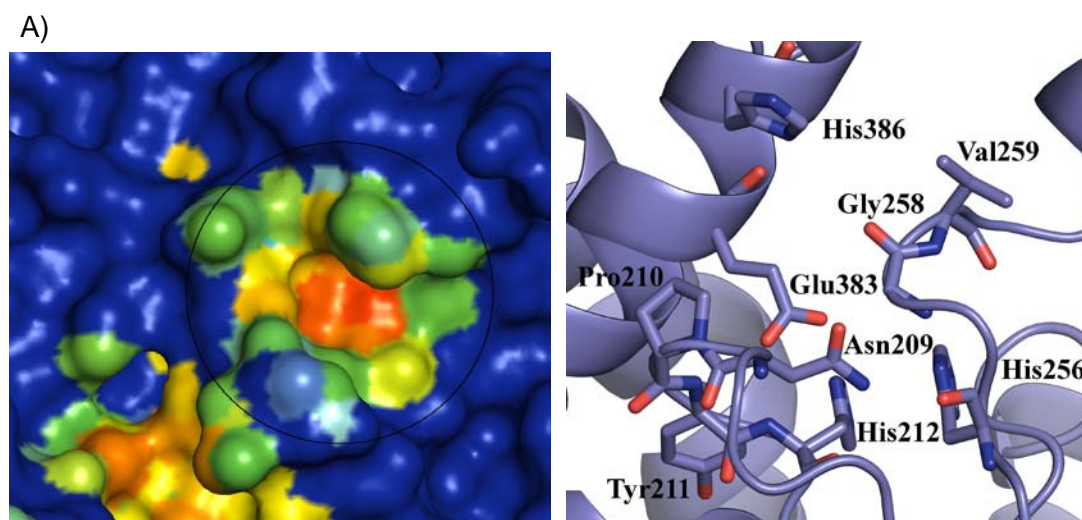
A)



B)

PA3	PDE7A	Asp162	Gly167	Ser169	Leu170	Gln202	Glu203	Ser207	Asn213	Ala214	Val215
	PDE3B	Val685	Ser692	Ile695	Leu696	Glu728	Asn729	Asp733	Asn738	Arg739	Ile740
	PDE4B	Ala184	Asn189	Pro191	Leu192	Glu224	Asp225	Ser229	Asn235	Ser236	Leu237

**Figura 73.** Sitio de unión PA3 de 1ZKL (A). Secuencia de aminoácidos del centro activo en PDE7A, PDE3B, PDE4D y PDE4B.



B)

PA4	PDE7A	Glu383	Asn209	Pro210	Tyr211	His212	His256	Gly258	Val259	His386
	PDE3B	Glu958	Ile734	Pro735	Tyr736	His737	His825	Gly827	Arg828	Glu961
	PDE4D	Glu339	Val157	Ala158	Tyr159	His160	His204	Gly206	Val207	Arg342

**Figura 74.** Sitio de unión PA4 de 1ZKL (A). Secuencia de aminoácidos del centro activo en PDE7A, PDE3B, PDE4D y PDE4B.

Simultáneamente a la identificación de los diferentes sitios de unión es necesaria una inspección visual de dichas cavidades. Éstas deben tener un tamaño y forma adecuados para alojar a los diferentes inhibidores así como presentar un entorno capaz de establecer interacciones electrostáticas e hidrofóbicas favorables (complementariedad).

En resumen, se puede decir que tras el análisis de la superficie de PDE7 con el programa *FPocket*<sup>®</sup>, se han encontrado tres sitios de unión además del centro activo, que podrían ser útiles en el diseño de inhibidores alostéricos de PDE7.

### 3.2.2.3. Validación de los sitios de unión: estudios de docking

Una vez identificados y analizados los posibles sitios alostéricos de PDE7A, se propuso estudiar el modo de unión de dos de las familias de compuestos desarrolladas a lo largo de esta memoria. En el caso de los derivados de tioxquinazolina los sitios de unión PA3 y PA4 no fueron tenidos en cuenta en el estudio de *docking* debido a la mayor exposición al exterior del primero y al menor volumen del segundo. Mientras que en el caso de los derivados del anillo de furano, se tuvo en cuenta únicamente el centro activo ya que experimentalmente se había demostrado que compiten con el AMPc.

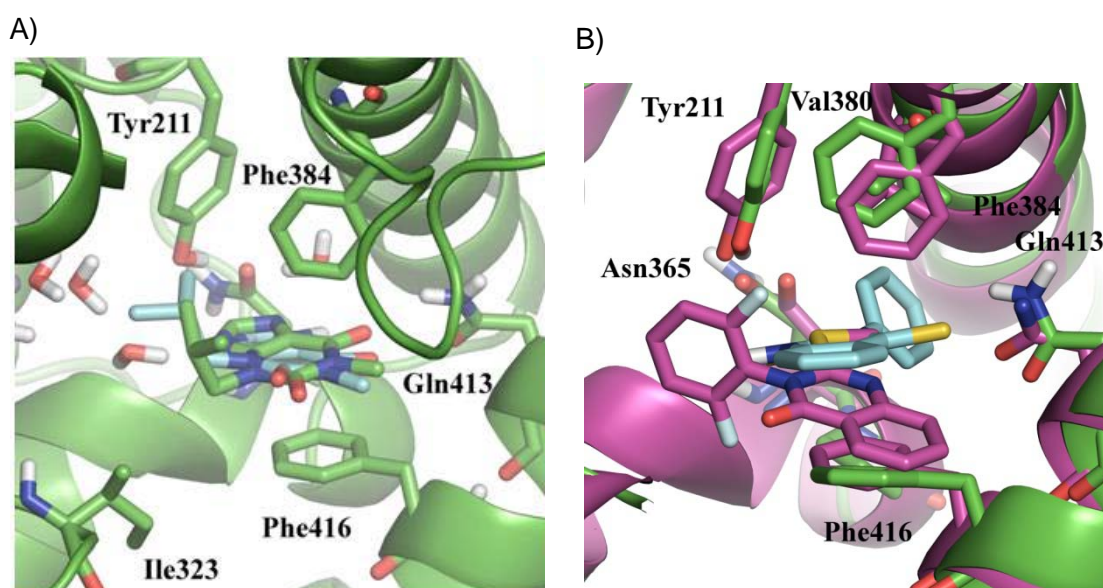
**Tabla 41.** Resultados del estudio de *docking* preliminar para los inhibidores de PDE7A seleccionados.

Comp.	1ª Solución			2ª Solución			CI <sub>50</sub> (µM)	Tipo inh.
	Energía de unión	Población	bolsillo	Energía de unión	Población	bolsillo		
<b>IBMX</b>	-6.36	18%	CA	-6.36	18%	CA	8.1	competitivo
<b>2</b>	-6.91	1%	PA2	-6.17	25%	CA	4.6	mixto
<b>15</b>	-6.96	21%	CA	-6.96	21%	CA	4.6	competitivo
<b>26</b>	-6.79	17%	PA2	-6.45	23%	CA	0.5	mixto
<b>45</b>	-6.93	3%	CA	-6.88	10%	CA	0.1	competitivo
<b>69</b>	-8.29	14%	CA	-7.81	17%	CA	5.1	competitivo
<b>87</b>	-8.14	1%	CA	-7.54	1%	CA	3.2	competitivo

Con el fin de establecer y validar un protocolo de *docking* correcto para poder estudiar el modo de unión de los inhibidores de PDE7A, se llevaron a cabo estudios preliminares de *docking* tanto con la estructura de referencia 1ZKL como con un conjunto representativo de inhibidores (aquellos derivados cuyos datos experimentales del estudio cinético eran conocidos) para poder racionalizar las preferencias de unión a las diferentes cavidades y su competitividad con el AMPc considerando como superficie a estudiar (*grid* o malla) la proteína completa. Para ello, se empleó el programa

Autodock®. Se analizaron todas las soluciones, recogiendo en la Tabla 41 las dos soluciones con mejor energía de unión y mayor porcentaje de población.

En la Figura 75 se muestra la superposición tridimensional de las estructuras experimentales 1ZKL y 3G3N con las soluciones encontradas. En ambos casos, las dos mejores soluciones encontradas para los inhibidores IBMX y el compuesto **15** se localizan en el centro activo. En el caso de IBMX, la distancia media cuadrática mínima (RMSD) entre la estructura experimental y teórica, es de 0.1 Å lo que muestra una gran similitud entre el modo de unión experimental del inhibidor y el modo de unión teórico establecido por el estudio. En el caso del complejo 3G3N en ambas soluciones el inhibidor **15** se ubican en el centro activo, sin embargo, el RMSD presenta un valor de 3.0 Å, ya que los estudios teóricos proponen un modo de unión análogo al del inhibidor IBMX y, experimentalmente se ha comprobado que el modo de unión del compuesto **15** es diferente<sup>81</sup>. De igual modo, estudios teóricos realizados en el grupo del Prof. Luque de la Universidad de Barcelona también pusieron de manifiesto que el modo de unión de los derivados de tioquinazolina era similar al presentado por IBMX en la estructura cristalográfica 1ZKL<sup>81</sup>.

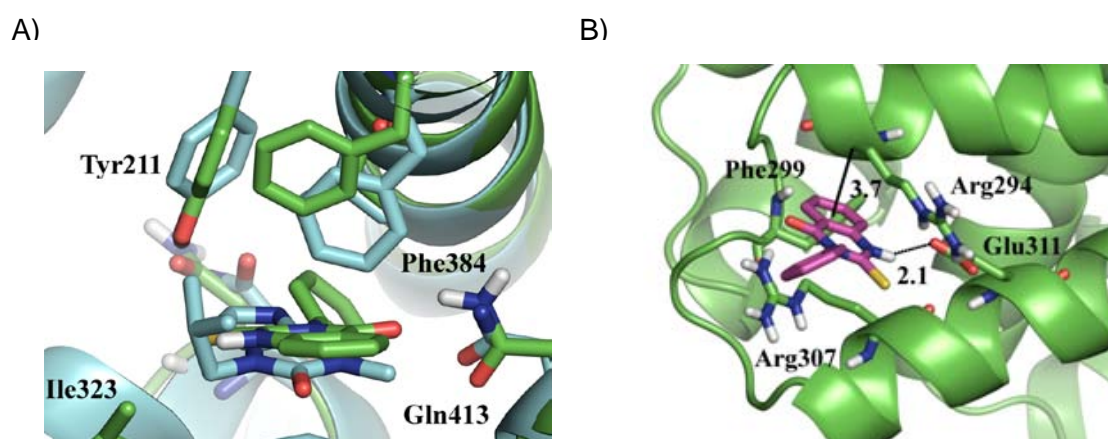


**Figura 75.** Modo de unión teórico (azul) en comparación con el modo experimental (verde) del estándar IBMX en 1ZKL (A). Comparación del modo de unión experimental (rosa) y propuesto (azul) del inhibidor **15** en 3G3N (B).

En base a los resultados obtenidos con ambos inhibidores de referencia y teniendo en cuenta que estos resultados fueron obtenidos mediante un *docking* ciego, se podría

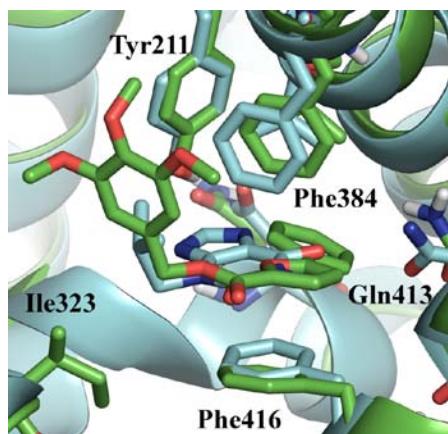
concluir que empleando esta metodología sería posible estudiar la preferencia de unión de los inhibidores desarrollados en esta memoria.

Respecto a los resultados del *docking* de los inhibidores estudiados (Tabla 41) se observa concordancia entre los datos experimentales y teóricos. Así, los derivados de tioquinazolina **2** y **26** con inhibición tipo mixta, mostraron dos soluciones posibles. La primera se correspondía a la cavidad PA2 mientras que la segunda al sitio de unión al sustrato AMPc o centro activo. En la Figura 76 se muestra la orientación del inhibidor **2** dentro del centro activo, en comparación con el inhibidor no específico IBMX y del sitio de unión PA2.



**Figura 76.** Modo de unión teórico del derivado **2** (verde) en comparación con el modo de unión experimental de IBMX (azul) en 1ZKL (A). Modo de unión propuesto para el compuesto **2** (B) en el sitio de unión PA2 mostrándose las interacciones más relevantes (distancias en angstroms).

A la vista de estos resultados, se observa que el compuesto **2** presenta el anillo de quinazolina orientado de forma prácticamente idéntica al anillo de purina del inhibidor no selectivo IBMX. Así, el inhibidor **2** establece interacciones similares al IBMX con los residuos adyacentes. Por otra parte, el resto de compuestos con inhibición competitiva mostraron únicamente preferencia por el centro activo. En concreto, en la Figura 77 se muestra la orientación del modo de unión teórico del derivado de anillo de furano **69** que presenta en este caso, una inhibición competitiva de PDE7.



**Figura 77.** Modo de unión teórico del derivado **69** (verde) en comparación con el modo de unión experimental de IBMX (azul) en PDE7A 1ZKL.

Tal y como se observa en la Figura 77, el derivado de furano **69** presenta tanto el anillo de fenilo unido al furano como éste último orientados de forma paralela aunque no idéntica al anillo de purina del inhibidor no selectivo IBMX. Esta orientación permite que el otro anillo aromático del inhibidor **69** establezca interacciones con los residuos hidrofóbicos Phe384 e Ile323 de igual manera que la cadena lateral del IBMX.

Por lo tanto, como conclusión se podría decir que los estudios de *docking* preliminares mostraron una concordancia entre los resultados experimentales (estudios cinéticos) y los predichos. Así, dado que los estudios computacionales permitieron explicar el modo de unión experimental de estos derivados, se procedió a estudiar el modo de unión del resto de inhibidores de PDE7 de los que se desconocía si competían o no con el AMPc, empleando los parámetros validados anteriormente.

### 3.2.3. Estudios de *docking* de los inhibidores de PDE7

#### 3.2.3.1. Docking global: estructura proteica completa

Una vez establecido el protocolo del estudio de *docking* con el conjunto representativo de estructuras, se llevó a cabo el estudio con el resto de inhibidores cuyo comportamiento de competitividad frente al AMPc era desconocido. Para ello, el estudio de *docking* se realizó sobre la superficie completa de la enzima con el fin de determinar las preferencias por las diferentes cavidades empleando Autodock®.

## a) Familia de los derivados de tioxoquinazolina

Del mismo modo, se analizaron los resultados para los derivados de tioxoquinazolina. En este caso, los compuestos estudiados presentaron preferencia por el centro activo. Sin embargo, algunos de ellos presentaron además, interacciones favorables en el sitio de unión PA2 (Tabla 42).

**Tabla 42.** Resultados del estudio de *docking* para los derivados de tioxoquinazolina.

Comp.	1º Solución			2º Solución			CI <sub>50</sub> (µM)
	E. de unión	Población	Bolsillo	E. de unión	Población	Bolsillo	
4	-6.23	52%	CA	-6.23	52%	PA2	7.0
7	-6.64	35%	CA	-6.79	10%	CA	11.0
11	-6.28	23%	CA	-6.29	8%	PA2	9.3
13	-7.09	18%	CA	-7.09	18%	CA	2.0
16	-6.07	17%	CA	-6.12	12%	PA2	87
20	-6.61	35%	CA	-6.61	35%	CA	5.1
23	-6.66	17%	CA	-6.68	11%	PA2	29.2
25	-7.23	18%	CA	-7.24	16%	CA	1.6
27	-5.60	24%	CA	-6.18	18%	PA2	0.4
30	-6.50	22%	CA	-6.50	22%	CA	3.2
32	-7.10	25%	CA	-7.10	25%	CA	5.3
33	-6.30	28%	PA2	-6.43	13%	PA2	6.1
34	-7.02	25%	CA	-7.02	25%	CA	1.8
37	-5.36	57%	CA	-5.52	16%	CA	15.2

A la vista de los resultados presentados en la tabla anterior, podemos establecer las siguientes conclusiones:

Aquellos derivados de tioxoquinazolina con grupos S-metilo en su estructura (**16**, **20**, **23**, **25**, **30** y **32**), sufren un ligero aumento de tamaño en comparación con los derivados de tioxoquinazolina sin sustituyentes en el azufre que les impide alojarse correctamente en PA2. Por ello, estas moléculas únicamente podrían unirse al centro activo, actuando como inhibidores competitivos. Por el contrario, aquellos derivados con el átomo de azufre sin alquilar y con sustituyentes poco voluminosos en los anillos aromáticos presentan interacciones favorables en PA2. Además, éstos últimos mantienen su capacidad de unión al centro activo, comportándose como inhibidores no competitivos mixtos.

En el centro activo (sitio Q), generalmente se establecen interacciones hidrofóbicas entre el anillo de tioxoquinazolina y los residuos Phe416, Leu401 y Val380 debido

fundamentalmente a la introducción de sustituyentes en el anillo condensado que provoca una reorientación de la molécula (Figura 78A).

El sitio de unión PA2, permite interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático condensado y la cadena alifática del residuo Arg294. Por otra parte, los anillos de benceno se encuentran rodeados por los residuos Arg294 y Arg307 lo que facilita interacciones de tipo catión- $\pi$  (Figura 78B).

La puntuación para el resto de bolsillos encontrados en PDE7A es menor, por lo que en general, se unirían en menor proporción debido posiblemente a su mayor exposición al disolvente.

A)

B)

**Figura 78.** Interacciones más relevantes para los derivados de tioxoquinazolina en el centro activo (A) y sitio de unión PA2 (B).

b) Familia de los derivados de anillo del furano

Observando los resultados obtenidos, los derivados del anillo de furano mostraron preferencia por el centro activo de la enzima, debido a que las grandes dimensiones de estos inhibidores impiden su unión a otros bolsillos de menor tamaño. En la Tabla 43 se encuentran recogidas tanto las energías de las poses más pobladas como aquella pose con menor energía.

Dentro de las diferentes cavidades del centro activo (bolsillo Q, bolsillo M y bolsillo hidrofóbico), los derivados del anillo de furano se localizan principalmente en el sitio Q, donde se encuentra el residuo de glutamina invariable. Sin embargo, estos compuestos se disponen muy próximos al bolsillo hidrofóbico del centro activo. En la Figura 79 se encuentran recogidas las interacciones más relevantes de estos derivados en el sitio Q del centro activo de PDE7.

**Tabla 43.** Resultados del estudio de *docking* para los derivados del anillo de furano.

Comp.	1º Solución		2º Solución		Cl <sub>50</sub> (µM)	bolsillo
	E. de unión	Población	E. de unión	Población		
<b>65</b>	-7.86	16%	-7.86	16%	12.3	CA
<b>70</b>	-7.45	12%	-7.93	7%	2.6	CA
<b>75</b>	-8.63	7%	-8.63	7%	7.3	CA
<b>77</b>	-7.95	12%	-8.63	4%	14.1	CA
<b>78</b>	-7.99	16%	-7.99	16%	90.9	CA

Tras el análisis de las interacciones presentes en los complejos inhibidor-PDE7, se observa que el anillo de furano presenta interacciones  $\pi$ - $\pi$  muy favorables con el residuo Phe416. Por otra parte, los grupos alquilo en el anillo de fenilo también reorientan la molécula para evitar un posible impedimento estérico y establecer así, interacciones hidrofóbicas favorables en este caso con los residuos Ile323 y Phe384.

**Figura 79.** Interacciones más relevantes para los derivados del anillo de furano en el centro activo.

c) Familia de los derivados de anillo del tiazol

A la vista de los resultados obtenidos, los derivados del anillo de tiazol mostraron preferencia por el centro activo de PDE7 debido al mayor volumen que le proporcionan los sustituyentes aromáticos. En la Tabla 44 se encuentran recogidas tanto las energías de las poses más pobladas como aquella pose con menor energía.

**Tabla 44.** Resultados del estudio de *docking* preliminar para los inhibidores de PDE7A seleccionados.

Comp.	1ª Solución		2ª Solución			CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
	Energía de unión	Población	Energía de unión	Población	bolsillo	
<b>91</b>	-6.45	5%	-6.45	5%	CA	-
<b>105</b>	-6.55	1%	-5.63	3%	CA	4.0
<b>106</b>	-6.46	1%	-6.46	1%	CA	-
<b>115</b>	-6.51	2%	-4.96	3%	CA	5.5

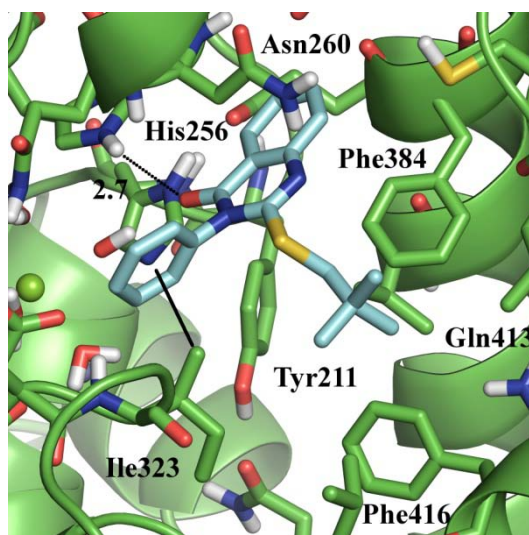
Dentro del centro activo, los derivados del anillo de tiazol orientan los grupos aromáticos dentro del bolsillo Q y muy próximos al bolsillo hidrofóbico, de igual forma que sucedía en los derivados del anillo de furano.

### 3.2.3.2. *Docking* focalizado en los sitios de unión CA y PA2

Como se ha comentado anteriormente, teniendo en cuenta los resultados de los estudios de *docking* preliminar y con el objetivo de conocer en profundidad el modo de unión así como racionalizar las interacciones características entre cada derivado y la enzima, los estudios de *docking* se focalizaron en el bolsillo específico para aquellos compuestos más relevantes empleando el módulo de Surflex-dock de Sybyl® vs 8.0.

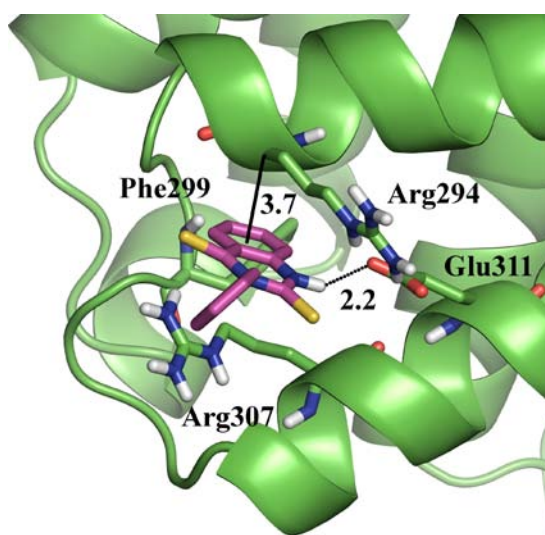
#### a) Derivados de tioquinazolina

Como ejemplo representativo de un derivado de tioquinazolina con unión preferente al centro activo se seleccionó el inhibidor **45**. En comparación con la estructura cristalizada del complejo 3G3N, se puede observar que la cadena alifática dificulta el alojamiento correcto en el sitio Q de la enzima. Por ello, el inhibidor **45** se podría situar en el sitio N (con un mayor volumen), forzando la reorientación de su cadena lateral hacia el bolsillo hidrofóbico formado por los residuos Leu401, Leu420 e Ile323. Tanto estas interacciones como su disposición que ocupa la mayor parte del sitio de unión, explican el aumento de actividad biológica comparando con sus análogos con el átomo de azufre sin sustituir (Figura 80).



**Figura 80.** Modo de unión teórico del compuesto **45** en el centro activo de PDE7A (distancias en angstroms).

Por otra parte, dado que algunos derivados también presentaron preferencia por el sitio de unión PA2, se seleccionó el inhibidor **26** como ejemplo de una inhibición no competitiva mixta. A continuación, se recogen los resultados obtenidos de los estudios de *docking* focalizados en dicho bolsillo (Figura 81).



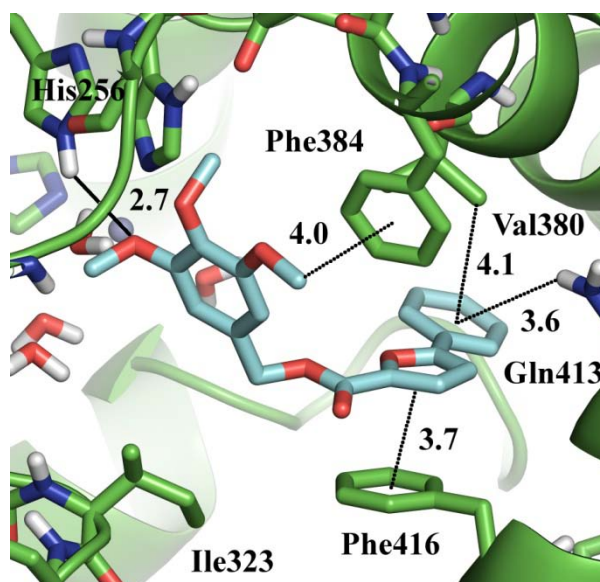
**Figura 81.** Modo de unión propuesto para el compuesto **26** en el sitio de unión PA2, mostrándose las interacciones más relevantes (distancias en angstroms).

En concreto, este compuesto presenta interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático condensado y la cadena lateral del residuo Arg294; e interacciones tipo

catión- $\pi$  entre el anillo de benceno y los residuos Arg294 y Arg307. La actividad inhibitoria frente a PDE7 podría explicarse por la distorsión del puente salino entre los residuos Arg294 y Glu311 ocasionado por puente de hidrógeno entre el grupo NH del inhibidor y el residuo Glu311, causando la desestabilización de la estructura secundaria de la enzima.

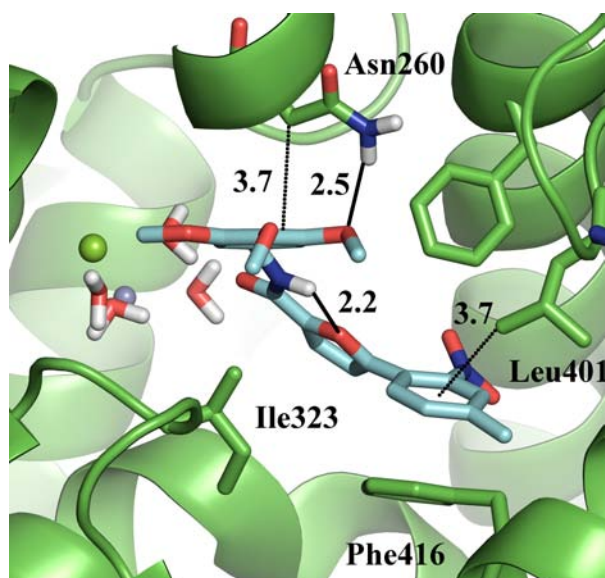
b) Derivados del anillo de furano

Considerando el modo de inhibición competitivo de los derivados de furano **87** y **69**, los estudios de *docking* se focalizaron en el centro activo. Cabe destacar que se obtuvieron dos modos de unión diferentes. Por un lado, el primer modo de unión (A) se caracterizaba por una interacción hidrofóbica entre el anillo de fenilo y el residuo Val380 así como interacciones NH- $\pi$  con la Gln413. Por otro lado, el segundo modo de unión (B) se caracterizaba por una reorientación de la molécula, lo que le permite establecer interacciones hidrofóbicas con el residuo Ile323. En concreto, el inhibidor **69** se une al centro activo de acuerdo al modo de unión A donde el anillo de furano contribuye a la inhibición mediante una interacción  $\pi$ - $\pi$  con el residuo Phe416. Además, el fragmento 3,4,5-trimetoxifenilo se encuentra favorecido por un puente de hidrógeno entre uno de los grupos metoxilo y el H $\epsilon$  de la His256 así como por una interacción hidrofóbica con el residuo Phe384 (Figura 82).



**Figura 82.** Modo de unión propuesto para el compuesto **69** en PDE7A, mostrándose las interacciones más relevantes (distancias en angstroms).

Finalmente, cuando el grupo éster se sustituye por un grupo amida como es el caso del inhibidor **87**, se favorece el modo de unión B. Esto es debido a una reorientación de la molécula que permite la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo NH y el oxígeno del anillo de furano. De esta forma, se favorecen interacciones hidrofóbicas entre el anillo de fenilo y el residuo Leu401 (Figura 83).



**Figura 83.** Modo de unión propuesto para el compuesto **87** en PDE7A, mostrándose las interacciones más relevantes (distancias en angstroms).

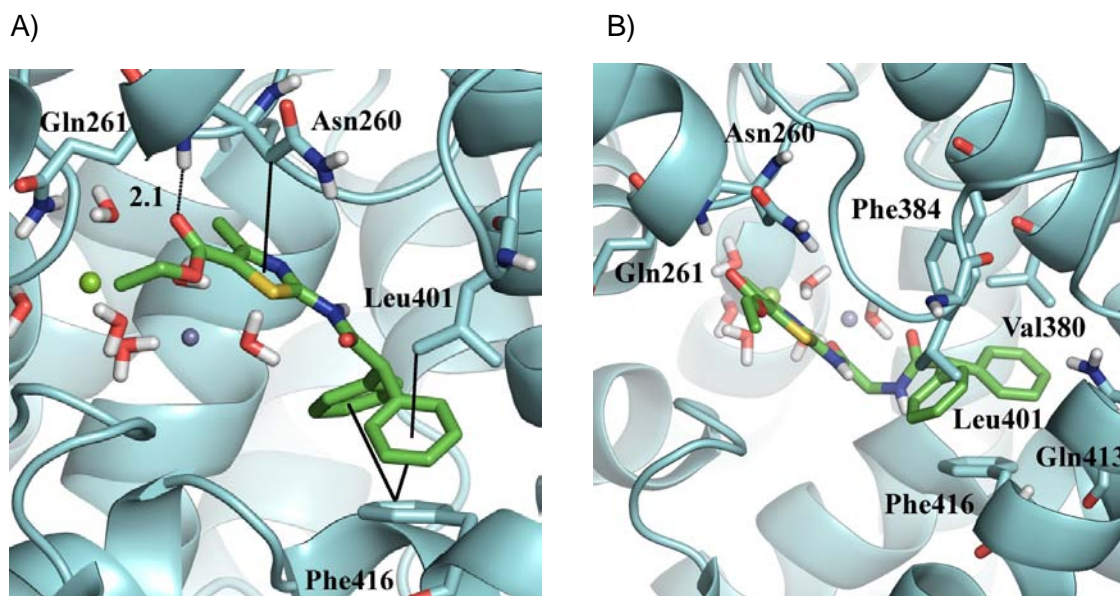
En definitiva, el modo de unión teórico obtenido en los estudios de *docking* para los derivados **87** y **69** se encuentra en concordancia con los datos experimentales de competición con el AMPc. Además, los resultados obtenidos ponen de manifiesto las características estructurales fundamentales que pueden conducir a la optimización biológica de esta familia de derivados<sup>177</sup>.

### c) Derivados del anillo de tiazol

A fin de determinar las interacciones más relevantes de los inhibidores de PDE7 tipo tiazol, tomamos como ejemplo los derivados **91** y **105**. Los resultados obtenidos mostraron que el sustituyente bifénilo se encontraría situado en el bolsillo Q (Phe416, Val380 y Leu401).

Así, en el modo de unión del derivado **91** se observa que el grupo bifénilo se dispone entre los residuos Phe416 y Phe384, estableciéndose interacciones hidrofóbicas mientras que el anillo de tiazol se encuentra más próximo del sitio M. Además, se

establecería un puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del grupo éster y el grupo NH del residuo Gln261 ( $d = 2.1 \text{ \AA}$ ). Resultados similares se observaron para el derivado **105** (Figura 84). Así, la actividad frente a PDE7 podría explicarse por la presencia de interacciones hidrofóbicas entre los anillos aromáticos y la cadena lateral del residuo Val380.



**Figura 84.** Modo de unión propuesto para el compuesto **91** en PDE7A (A). Modo de unión propuesto para el compuesto **105** en PDE7A (B).

Los modos de unión propuestos ponen de manifiesto que la presencia del grupo bifenilo parece ser fundamental, ya que su sustitución por un grupo bencilo (derivados **92** y **104**) conduce a la pérdida de la actividad frente a PDE7A.

Por lo tanto, tomando como ejemplo aquellos derivados de tioquinazolina que mostraron inhibición mixta (**2** y **26**), se ha podido explicar mediante estudios de *docking* el modo de unión experimental a PDE7A. Esto permitiría el estudio de las relaciones estructura-actividad de esta familia, a fin de diseñar inhibidores alostéricos tipo tioquinazolina. Asimismo, estos estudios permitirían el diseño de nuevas moléculas con inhibición no competitiva de PDE7, puesto que se han identificado nuevos sitios de unión a la enzima.





**CONCLUSIONES**



En esta memoria, se han obtenido diferentes inhibidores de PDE7A como agentes farmacológicos prometedores para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Para ello, se han desarrollado diferentes familias químicamente diversas que han mostrado actividad inhibitoria frente a PDE7A en el rango micromolar, estudiando en cada caso su modo de unión a la enzima con estudios tanto teóricos como experimentales. Además, de forma complementaria se han llevado a cabo estudios farmacocinéticos, habiéndose obtenido candidatos a fármaco, que por su capacidad inhibitoria de PDE7 y su buena biodisponibilidad oral, pueden proteger frente al daño celular producido por una neuroinflamación. Por ello, los inhibidores de PDE7 y en concreto, los derivados presentados en esta memoria, han mostrado su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Los temas más relevantes de este trabajo se recogen a continuación:

Se ha validado la enzima PDE7 como diana farmacológica, cuya inhibición ha mostrado un efecto terapéutico en procesos inflamatorios vía AMPc, clave en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Así, inhibidores de PDE7 tipo quinazolina descritos anteriormente, han mostrado eficacia como agentes farmacológicos en modelos animales de Alzheimer, Parkinson, daño medular y Esclerosis múltiple.

Se ha llevado a cabo una optimización de la síntesis de los derivados de tioquinazolina mediante el empleo de MAOS, y que a su vez, ha permitido el diseño, síntesis y evaluación de nuevos derivados de tioquinazolina S-sustituidos, cuya actividad frente a PDE7 se encuentra en el rango nanomolar.

A partir de un modelo de farmacóforo, se ha llevado a cabo el diseño, síntesis y evaluación de la familia de los derivados del anillo de furano, que han demostrado su potencial terapéutico en un modelo animal de Esclerosis múltiple. Asimismo, se ha realizado el diseño, síntesis de la familia de los derivados del anillo de tiazol, cuyo potencial terapéutico actualmente se encuentra en estudio.

Se ha desarrollado un modelo de Redes Neuronales Artificiales, capaz de predecir la actividad inhibitoria frente a esta enzima de estructuras químicas diversas. A partir de este modelo, se han identificado nuevos cabezas de serie, cuyo desarrollo permitiría la obtención de nuevas familias de inhibidores de PDE7.

Por otra parte, el análisis computacional de la superficie de PDE7 ha permitido elucidar diversos sitios de unión alostéricos a la enzima que pueden ser modulados farmacológicamente, lo cual permitiría el diseño de inhibidores selectivos de PDE7.

**DIFUSIÓN DE RESULTADOS**



Los resultados obtenidos en las distintas fases del desarrollo de la presente Tesis Doctoral, han dado lugar hasta la fecha, a las siguientes publicaciones y patentes.

*Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:*

Paterniti, M.I.; Mazzon, E.; Gil, C.; Implizzari, D.; Palomo, V.; **Redondo, M.**; Perez, D.I.; Esposito, E.; Martinez, A.; Cuzzocrea, S. PDE7 inhibitors: new potential drugs for the therapy of spinal cord injury. *Plos One*, **2011**, 6, e15937

Morales-García, J.A.; **Redondo, M.**; Gil, C.; Alonso-Gil, S.; Martinez, A.; Santos, A.; Pérez-Castillo, A. Phosphodiesterase 7 inhibition dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease. *Plos One*, **2011**, 6, e17240.

**Redondo, M.**; G. Zarruk, J.; Ceballos, P.; Perez, D.I.; Perez, C.; Perez-Castillo, A.; Moro, M.A.; Brea, J.; Val, C.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Campillo, N.; Martinez, A.; Gil, C. Neuroprotective efficacy of quinazoline type phosphodiesterase 7 inhibitors in celular cultures and experimental stroke model. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 47, 175-185.

**Redondo, M.**; Brea, J.; Perez, D.I.; Soteras, I.; Val, C.; Perez, C.; Morales-García, J.A.; Alonso-Gil, S.; Paul-Fernandez, N.; Martin-Alvarez, R.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Pérez-Castillo, A.; Mengod, G.; Campillo, N.; Martinez, A.; Gil, C. Effect of phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Discovery of a new chemically diverse family of compounds. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 3274-3284.

Pérez, D.I.; Pistolozzi, M.; Palomo, V.; **Redondo, M.**; Fortugno, C.; Gil, C.; Felix, G.; Martinez, A.; Bertucci, C. 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) and Phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors: Determination of blood brain barrier penetration and binding to human serum albumin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2012**, 45, 677-684.

**Redondo, M.**; Palomo, V.; Brea, J.; Pérez, D.I.; Martín-Álvarez, R.; Pérez, C.; Paúl-Fernández, N.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Mengod, G.; Martínez, A.; Gil, C.; Campillo, N. Identification *in silico* and experimental validation of novel phosphodiesterase 7 inhibitors with effect in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *ACS Chem. Neurosci.*, **2012**, 3, 793-803.

Perez, R.; Antequera, D.; Bolos, M.; Pascual, C.; Krzyzanowska, A.; Pérez-Grijalba, V.; **Redondo, M.**; Sarasa, M.; Gil, C.; Ferrer, I.; Martinez, A.; Carro, E. Phosphodiesterase 7 Inhibitor S14 regulates astrocytes-induced degradation of brain amyloid- $\beta$ . *Nature Neuropharmacology*, **2012** (enviado)

Mestre, L.; Morales-García, J.A.; **Redondo, M.**; Pérez, C.; Alonso-Gil, S.; Pérez-Castillo, A.; Gil, C.; Martinez, A.; Guaza, C. Inhibitors of phosphodiesterase-7 as novel drugs for treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, **2012** (enviado)

Medina-Rodriguez, E.M.; Arenzana, F.J.; Pastor, J.; **Redondo, M.**; Palomo, V.; García de Sola, R.; Gil, C.; Martínez, A.; Bribián, A.; de Castro, F. Inhibition of endogenous phosphodiesterase 7 promotes oligodendrocyte precursor differentiation and survival. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2012** (enviado).

*Patentes derivadas de la Tesis Doctoral:*

Martínez, A.; Gil, C.; Pérez, C.; Pérez-Castillo, A.; Morales, J.; **Redondo, M.**; Sanz, M. "Uso de derivados de quinazolina y sus composiciones farmacéuticas en enfermedades neurodegenerativas". ES 200930189. Fecha de prioridad: 20 de Mayo de 2009. WO2010133742 (extensión Europa, USA, Japón, Australia). Licenciada a Araclon Biotech.

Gil, C.; Martínez, A.; **Redondo, M.**; Campillo, N.; Perez, D.I.; Perez-Castillo, A.; Loza, M.I.; Brea, J.; Cadavid, M. "Derivados heterocíclicos de nuevos inhibidores de fosfodiesterasa 7" P201130712. Fecha de prioridad: 4 de Mayo de 2011. PCT/ES2012/070293.

Gil, C.; Martínez, A.; **Redondo, M.**; Garcia Fernandez, A.; Campillo, N.; Perez, D.I.; Loza, M.I.; Brea, J.; Cadavid, M.; L. Ametzurra, A.; Hormaetxe, I.; Buela, S. "Quinazolininas S-sustituidas y sus aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades mediadas por PDE7". P201231413. Fecha de prioridad: 13 de Septiembre de 2012. Licenciada a BrainCo Biopharma.

**PARTE EXPERIMENTAL**



## 1. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS

### 1.1. Técnicas y aparatos

Los productos de partida comerciales fueron obtenidos de los proveedores correspondientes Sigma-Aldrich, Alfa Aesar y Acros Organics. El dispositivo de microondas utilizado en la optimización fue un equipo Initiator™ de Biotage®. Las reacciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina, utilizando placas de cromatografía compuestas por gel de sílice Merck tipo 60 F254 de un espesor de capa 0.2 mm. Los cromatofolios fueron revelados con luz ultravioleta de 254/365 nm y con mezclas de ácido fosfomoblídico en etanol. Los brutos de reacción, en su mayoría, han sido purificados mediante cromatografía en columna en gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh ASTM) o automática en el dispositivo Isolera One™ de Biotage® en columnas SF10-4g si 50 AX1368-8 de la casa comercial Agilent Technologies. El eluyente empleado se especifica en cada caso y las proporciones de mezcla van siempre indicadas en volumen. El aparato de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) utilizado para cuantificar la pureza de los productos fue un Alliance Waters 2690 con un detector de UV Photodiodo Array modelo Waters 2996 acoplado a un detector de MS modelo MicromassZQ de Waters, cuyos valores se expresan en unidades de masa ( $m/z$ ). Se utilizó una columna SunFire™ C18, 3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 nm x 50 nm y como eluyente mezclas de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  en gradiente 10:100 en 5 minutos. Los puntos de fusión (P.f) fueron medidos en un aparato Mettler Toledo MP70 y en un microscopio Reicher-Jung Thermovar. Por otra parte, los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) han sido realizados con los disolventes deuterados correspondientes. Los aparatos utilizados para los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron: Bruker AVANCE-300, Varian INNOVA-300, Varian INNOVA-400, Varian MERCURY-400 y Varian-500. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm ( $\delta$ ), y son calculados con respecto el disolvente empleado en cada caso. La multiplicidad de las señales (*s*: singlete, *d*: doblete, *dd*: doble doblete, *t*: triplete, *td*: triplete de dobletes, *c*: cuadruplete, *m*: multiplete). Los análisis elementales de los compuestos se llevaron a cabo en un analizador Heraeus CHN – O – rapid y Leco CHNS – 932 y están en el rango de  $\pm 0.4$  respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares. Todos los análisis y técnicas instrumentales han sido realizados en el Centro de Química Orgánica “Manuel Lora Tamayo” (CENQUIOR-CSIC).

## 1.2. Síntesis de los derivados de tioquinazolina

### *Método general*

Sobre una disolución del derivado del ácido antranílico correspondiente (1 equivalente) en 4 mL del disolvente indicado se añade el derivado del fenilisotiocianato correspondiente (1.5 equivalentes). La mezcla de reacción se agita a la temperatura y durante el tiempo que se indica y finalmente, se enfría el bruto de reacción. El sólido obtenido se filtra y se purifica como se indica en cada caso.

**3-Fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (2):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: antranilato de metilo (0.25 mL, 1.98 mmol), fenilisotiocianato (0.30 mL, 2.97 mmol). Disolvente: tolueno. Condiciones de reacción: 40 min bajo irradiación microondas a 120 °C. Aislamiento por filtración a vacío. Purificación: lavados con dietiléter. Rendimiento: sólido blanco (343 mg, 70%). P.f.: = 300-302 °C (Biblio.<sup>233</sup> 305-306 °C). Pureza HPLC: 99%.

**3-(2,6-Difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (3):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: antranilato de metilo (0.30 mL, 2.27 mmol), 2,6-difluorofenilisotiocianato (0.45 mL, 3.40 mmol). Disolvente: DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1). Condiciones de reacción: 40 min bajo irradiación microondas a 120 °C. Aislamiento por filtración a vacío. Purificación: lavados con dietiléter. Rendimiento: sólido blanco (367 mg, 60%). P.f.: = 283-284 °C (Biblio.<sup>81</sup> 262-263 °C). Pureza HPLC: >99%.

**3-(2-Bromofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (5):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: antranilato de metilo (0.25 mL, 1.98 mmol), 2-bromofenilisotiocianato (0.36 mL, 2.97 mmol). Disolvente: DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1). Condiciones de reacción: 40 min bajo irradiación microondas a 120 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (9:1). Rendimiento: sólido blanco (410 mg, 60%) P.f.: = 252-254 °C (Biblio.<sup>234</sup> 256-258 °C). Pureza HPLC: 98%.

**6-Bromo-3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (7):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-amino-5-bromobenzoico (52 mg, 0.25 mmol), 2,6-difluorofenilisotiocianato (0.041 mL, 0.37 mmol). Disolvente: DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1). Condiciones de reacción: 40 min bajo irradiación

microondas a 120 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (9:1). Rendimiento: sólido blanco (46 mg, 50%). P.f.: = 252-253 °C (Biblio.<sup>81</sup> 274-276 °C). Pureza HPLC: 98%.

**3-(2-Bromofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (13):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-amino-3-metilbenzoico (0.100 g, 0.66 mmol), 2-bromofenilisotiocianato (0.12 mL, 0.99 mmol). Disolvente: tolueno. Condiciones de reacción: 40 min bajo irradiación microondas a 120 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (9:1). Rendimiento: sólido blanco (68 mg, 30%). P.f.: = 209-210 °C (Biblio.<sup>81</sup> 209-211 °C). Pureza HPLC: >99%.

**8-Cloro-3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (33):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-amino-3-clorobenzoico (140 mg, 0.81 mmol), 2,6-difluorofenilisotiocianato (0.156 mL, 1.21 mmol). Disolvente: DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1). Condiciones de reacción: 40 min bajo irradiación microondas a 120 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (9:1). Rendimiento: sólido blanco (166 mg, 63%). P.f.: 206.2-208.8 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (m/z): 325 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	51.78	2.17	8.63	9.87
<b>Hallado</b>	51.54	2.16	8.23	9.61

**3-(2-Bromofenil)-8-cloro-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (34):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-amino-3-clorobenzoico (300 mg, 1.66 mmol), 2-bromofenilisotiocianato (0.345 mL, 2.49 mmol). Disolvente: DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1). Condiciones de reacción: 40 min bajo irradiación microondas a 120 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (9:1). Rendimiento: sólido blanco (104 mg, 18%). P.f.: 192.3-193.5 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 369 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	45.74	2.19	7.62	8.72
<b>Hallado</b>	45.82	2.18	7.74	8.88

**3-Fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidina (35):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 2-aminonicotinato de metilo (200 mg, 1.27 mmol), fenilisotiocianato (0.28 mL, 1.90 mmol). Disolvente: acetonitrilo. Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: lavados con acetonitrilo. Rendimiento: sólido blanco (18 mg, 5%). P.f.: 301.5-302.7 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 256 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>13</sub> N <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	61.16	3.55	16.46	12.56
<b>Hallado</b>	60.93	3.64	16.65	12.39

**3-Fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirido[3,4-d]pirimidina (36):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3-aminonicotínico (150 mg, 1.03 mmol), fenilisotiocianato (0.18 mL, 1.54 mmol). Disolvente: acetonitrilo. Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: lavados con acetonitrilo. Rendimiento: sólido blanco (91 mg, 35%). P.f.: 280.6-281.5 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (m/z): 256 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>13</sub> N <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	61.16	3.55	16.46	12.56
<b>Hallado</b>	60.92	3.61	16.73	12.42

### 1.3. Síntesis de los derivados de tioxoquinazolina S-alkilados

#### *Método general*

Sobre una disolución de la 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina correspondiente (1 equivalente) en 5 mL de acetonitrilo se añade el agente alquilante (1.2 equivalentes) en presencia de una disolución de carbonato (0.5 M). La mezcla de

reacción se agita a la temperatura y durante el tiempo que se indica y finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica como se indica en cada caso.

**8-Cloro-3-(2,6-difluorofenil)-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (37):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 8-cloro-3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**33**) (50 mg, 0.15 mmol), yoduro de metilo (0.010 mL, 0.18 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (9:1). Rendimiento: sólido amarillo (15 mg, 30%). P.f.: 200.1-201.2 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (m/z): 339 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	53.18	2.68	8.27	9.47
<b>Hallado</b>	52.98	2.71	8.16	9.31

**2-Eiltio-3-fenil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (38):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**2**) (200 mg, 0.78 mmol), sulfato de dietilo (0.122 mL, 0.94 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (94 mg, 43%). Pureza HPLC: >99%. P.f.: 117.5-119.6 °C. (Biblio.<sup>235</sup> 112-114 °C). EM (m/z): 283 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	68.06	5.00	9.92	11.36
<b>Hallado</b>	68.33	4.98	10.05	11.21

**2-Eiltio-3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (39):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**3**) (88 mg, 0.28 mmol), sulfato de dietilo (0.04 mL, 0.33 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como

eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (53 mg, 58%). P.f.: 154.1-155.2 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES, m/z): 319 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	60.37	3.80	8.80	10.07
<b>Hallado</b>	60.42	3.93	8.84	9.98

**8-Cloro-2-etiltio-3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (40):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 8-cloro-3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**33**) (160 mg, 0.45 mmol), sulfato de dietilo (0.07 mL, 0.54 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (52 mg, 33%). P.f.: 165.4-166.7 °C. Pureza HPLC: 97%. MS (ES) m/z: 353 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	54.47	3.14	7.94	9.09
<b>Hallado</b>	54.19	2.89	8.06	8.79

**2-Etiltio-3-(4-fluorofenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (41):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(4-fluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina<sup>236</sup> (104 mg, 0.38 mmol), sulfato de dietilo (0.06 mL, 0.45 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (70 mg, 61%). P.f.: 130.7-131.8 °C. HPLC pureza: >99%. MS (ES) m/z: 301 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	63.98	4.36	9.33	10.68
<b>Hallado</b>	63.75	4.26	9.29	10.47

**3-Fenil-2-isobutiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (42):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**2**) (200 mg, 0.78 mmol), bromuro de isobutilo (0.101 mL, 0.94 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (20 mg, 8%). P.f.: 139.4-140.6 °C. Pureza HPLC: 96%. MS (ES) m/z: 311 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	68.89	5.44	9.45	10.82
<b>Hallado</b>	68.73	5.41	9.36	10.73

**2-Benciltio-3-fenil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (43):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**2**) (150 mg, 0.59 mmol), bromuro de bencilo (0.084 mL, 0.71 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (61 mg, 30%). P.f.: 175.0-176.0 °C. (Biblio.<sup>237</sup> 176.5-177 °C). Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 345 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	72.70	4.27	8.48	9.70
<b>Hallado</b>	73.00	4.27	8.26	9.58

**2-Butiltio-3-fenil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (44):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**2**) (150 mg, 0.59 mmol), bromuro de butilo (0.077 mL, 0.71 mmol), NaH (22 mg, 0.88 mmol). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. El sólido obtenido se aísla por filtración. Purificación: lavados con acetonitrilo. Rendimiento: sólido blanco (137 mg, 75%). P.f.: 128.3-129.4 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 311 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla A. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla B.

C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	69.65	5.84	9.02	10.33
<b>Hallado</b>	69.24	5.71	9.45	10.31

**3-Fenil-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (45):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**2**) (150 mg, 0.59 mmol), bromuro de neopentilo (0.092 mL, 0.70 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (84 mg, 44%). P.f.: 161.0-162.1 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 325 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	70.34	6.21	8.63	9.88
<b>Hallado</b>	70.12	6.50	8.66	9.69

**3-(3-Metoxifenil)-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (46):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(3-metoxifenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina<sup>236</sup> (100 mg, 0.35 mmol), bromuro de neopentilo (0.05 mL, 0.42 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (45 mg, 36%). P.f.: 128.4-129.3 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 378 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	67.77	6.26	7.90	9.05
<b>Hallado</b>	67.39	6.15	7.88	8.94

**3-(4-Metoxifenil)-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (47):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(4-metoxifenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina<sup>236</sup> (150 mg, 0.53 mmol), bromuro de neopentilo (0.08 mL, 0.63 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando

como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (115 mg, 62%). P.f.: 139.7-140.2 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 378 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	67.77	6.26	7.90	9.05
<b>Hallado</b>	67.56	6.35	7.71	9.20

**2-Ciclohexilmetiltio-3-fenil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (48):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**2**) (150 mg, 0.59 mmol), bromuro de ciclohexilmetilo (0.099 mL, 0.70 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (96 mg, 47%). P.f.: 148.1-149.8 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 352 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	71.97	6.33	7.99	9.15
<b>Hallado</b>	71.88	6.28	8.03	8.99

**2-Ciclohexilmetiltio-3-(4-metoxifenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (49):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(4-metoxifenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina<sup>236</sup> (100 mg, 0.35 mmol), bromuro de ciclohexilmetilo (0.06 mL, 0.42 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (168 mg, 99%). P.f.: 165.4-166.9 °C. Pureza HPLC: 96%. EM (m/z): 381 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	69.44	6.36	7.36	8.43
<b>Hallado</b>	69.19	6.61	7.27	8.72

**2-Ciclopropilmetiltio-3-(3-metoxifenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (50):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(3-metoxifenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina<sup>236</sup> (15 mg, 0.03 mmol), bromuro de ciclopropilmetilo (0.003 mL, 0.04 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 1 hora bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (10 mg, 84%). P.f.: 116.2-118.4 °C. Pureza HPLC: 95%. EM (m/z): 339 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	67.43	5.36	8.28	9.47
<b>Hallado</b>	67.28	5.31	8.04	9.19

**3-(2,6-Difluorofenil)-8-metil-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (53):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(2,6-difluorofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (11) (97 mg, 0.32 mmol), bromuro de neopentilo (0.048 mL, 0.38 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 12 horas a temperatura ambiente. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (51 mg, 42%). P.f.: 151.4-152.3 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 375 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	64.15	5.38	7.48	8.56
<b>Hallado</b>	64.35	5.29	7.50	8.45

**3-(2-Bromofenil)-2-ciclohexilmetiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (54):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(2-bromofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (6) (100 mg, 0.30 mmol), bromuro de ciclohexilmetilo (0.05 mL, 0.36 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 12 horas a temperatura ambiente. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (100 mg, 77%). P.f. 129.5-132.0 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (m/z): 429, 431 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> BrN <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	58.74	4.93	6.52	7.47
<b>Hallado</b>	59.01	5.18	6.43	7.70

**3-(2-Bromofenil)-2-ciclopropilmetiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (55):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(2-bromofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**6**) (150 mg, 0.42 mmol), bromuro de ciclopropilmetilo (0.050 mL, 0.50 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 12 horas a temperatura ambiente. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (161 mg, 98%). P.f.: 110.8-113.5 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (m/z): 389 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> BrOS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	56.86	4.27	6.98	7.99
<b>Hallado</b>	56.48	3.89	7.21	8.05

**2-Ciclopropilmetiltio-3-(2,6-difluorofenil)-8-metil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (56):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(2,6-difluorofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**11**) (97 mg, 0.32 mmol), bromuro de ciclopropilmetilo (0.038 mL, 0.38 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 12 horas a temperatura ambiente. Purificación: cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (145 mg, 99%). P.f.: 143.6-146.3 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 359 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla C. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla D.

C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	63.67	4.50	7.82	8.95
<b>Hallado</b>	63.58	4.60	7.83	8.92

#### 1.4. Síntesis de los derivados de 12-oxo-quinazolin[2,3-*b*]benzotiazol

##### *Método general*

Sobre una disolución de la 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina correspondiente (1 equivalente) en 5 mL de acetonitrilo se añade una disolución

carbonato potásico (0.5 M). La mezcla de reacción se agita a la temperatura y durante el tiempo que se indica y finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando los eluyentes indicados en cada caso.

**10-Fluoro-4-metil-12-oxo-quinazolin[2,3-*b*]benzotiazol (51):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: (2,6-difluorofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**11**) (140 mg, 0.49 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 150 °C durante 1 hora bajo irradiación microondas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (20 mg, 15%). P.f.: 213.8-216.6 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (m/z): 285 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.24 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-1), 7.62 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H-3), 7.43-7.33 (m, 3H, H-6, H-ar), 7.27-7.22 (m, 1H, H-ar), 2.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 159.1 (CO), 154.9 (CS);, 151.4 (d, *J* = 261.1 Hz, C-ar), 145.7 (C-4a), 135.5 (C-3), 134.1 (C-ar), 128.0 (C-4), 127.9 (C-ar), 125.6 (C-1), 125.2 (C-2), 118.8 (C-1a), 117.6 (C-ar), 116.0 (C-ar), 115.8 (C-ar), 53.8 (CH<sub>3</sub>).

C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> FN <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	63.37	3.19	9.85	11.28
<b>Hallado</b>	63.18	2.85	10.01	11.44

**4-Metil-12-oxo-quinazolin[2,3-*b*]benzotiazol (52):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3-(2-bromofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**13**) (56 mg, 0.16 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.5 mg). Condiciones de reacción: 150 °C durante 1 hora bajo irradiación microondas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (20 mg, 46%). P.f.: 205.8-206.6 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (m/z): 206 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.90 (dd, 1H, *J* = 8.3 Hz, H-1), 8.16 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-ar), 8.00 (dd, 1H, *J* = 7.4, 1.1 Hz, H-ar), 7.76 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H-2), 7.60-7.56 (m, 2H, H-7, H-ar), 7.44 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, H-ar), 2.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 160.4 (CO), 156.1 (CS), 145.4 (C-1a), 135.8 (C-ar), 135.3 (C-3), 133.7 (C-ar), 126.7 (C-4, C-ar), 125.3 (C-2), 124.3 (C-ar), 123.5 (C-2), 122.8 (C-ar), 118.28 (C-ar), 118.2 (C-4a), 17.2 (CH<sub>3</sub>).

C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	67.65	3.78	10.52	12.04
<b>Hallado</b>	67.91	3.60	10.73	11.89

## 1.5. Síntesis de los derivados del anillo de furano

### 1.5.1. Síntesis de productos de partida

**5-(2,4-Diclorofenil)-2-furilmetanol (66):** Sobre una suspensión de LiAlH<sub>4</sub> (66 mg, 1.75 mmol) en THF anhidro (10 mL) se le añade el ácido 5-(2,4-diclorofenil)-2-furoico (300 mg, 1.16 mmol), disuelto en THF (5 mL) a 0 °C. Tras agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos, a la mezcla de reacción se le añade agua (2 ml) lentamente a 0 °C y se filtra sobre celita. La mezcla de reacción se extrae con acetato/agua (30 mL). Rendimiento: sólido amarillo (72 mg, 61%). P.f.: 83.2 °C. Pureza HPLC: 98%. MS (ES) m/z: 225, 227 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.81 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-ar), 7.45 (s, H-ar), 7.30 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-ar), 7.07 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, H-furil), 6.43 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H-furil), 4.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 153.8 (C-furil), 149.3 (C-furil), 133.1 (C-ar), 130.6 (C-ar), 130.4 (C-ar), 128.5 (C-ar), 128.3 (C-ar), 127.2 (C-ar), 112.0 (C-furil), 110.0 (C-furil), 57.6 (CH<sub>2</sub>).

### 1.5.2. Síntesis de los derivados de benzoato-5-fenil-2-furilmetilo

#### *Método general*

Sobre una disolución del ácido 3,4,5-trietoxibenzoico o 3,4,5-trimetoxibenzoico (1.2 equivalentes) en 10 mL de diclorometano se añade el agente acoplante (1.2 equivalentes) junto con TEA (2 equivalentes) como base y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añade el derivado de 5-fenil-2-furilmetanol correspondiente (1 equivalente) y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando los eluyentes que se indican en cada caso.

**3,4,5-Trimetoxibenzoato de 5-(2,4-diclorofenil)-2-furilmetilo (60):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (99 mg, 0.46 mmol), PyBOP (241 mg, 0.46 mmol), derivado **66** (100 mg, 0.39 mmol), TEA (0.536

mL, 3.88 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (23 mg, 14%). P. f.: 120.4 °C. Pureza HPLC: 96%. MS (ES) m/z: 438 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla E. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla F.

C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	57.68	4.15
<b>Hallado</b>	57.72	4.18

**3,4,5-Trimetoxibenzoato de 5-(4-nitrofenil)-2-furilmetilo (61):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (500 mg, 2.33 mmol), PyBOP (1213 mg, 2.33 mmol), 5-(4-nitrofenil)-2-furilmetanol (438 mg, 1.94 mmol), TEA (0.536 mL, 3.88 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (57 mg, 7%). P.f.: 137.1 °C. Pureza HPLC: 93%. MS (ES) m/z: 371 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla E. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla F.

C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>8</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	61.02	4.63	3.39
<b>Hallado</b>	60.78	4.54	3.29

**3,4,5-Trietoxibenzoato de 5-(2,4-diclorofenil)-2-furilmetilo (62):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3,4,5-trietoxibenzoico (250 mg, 0.98 mmol), PyBOP (509 mg, 0.98 mmol), derivado **66** (200 mg, 0.82 mmol), TEA (0.226 mL, 1.64 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (157 mg, 48%). P.f.: 83.3 °C. Pureza HPLC: 93%. MS (ES) m/z: 394 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla E. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla F.

C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	60.13	5.05
<b>Hallado</b>	59.90	5.27

**3,4,5-Trietoxibenzoato de 5-(4-nitrofenil)-2-furilmetilo (63):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3,4,5-trietoxibenzoico (100 mg, 0.39 mmol), DCC (132 mg, 0.43 mmol), 5-(4-nitrofenil)-2-furilmetanol (94 mg, 0.43

mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido amarillo (60 mg, 16%). P.f.: 118.8 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 456 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H- RMN (300 MHz CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla E. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla F.

C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>8</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	63.29	5.53	3.08
<b>Hallado</b>	63.10	5.34	3.28

**3,4,5-Trietoxibenzoato de 5-(4-metilfenil)-2-furilmetilo (64):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3,4,5-trietoxibenzoico (170 mg, 0.67 mmol), PyBOP (331 mg, 0.64 mmol), 5-(4-metilfenil)-2-furilmetanol (100 mg, 0.53 mmol), TEA (0.147 mL, 1.06 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido amarillo (162 mg, 57%). P.f.: 75.6 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 181. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: Tabla E. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla F.

C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	70.74	6.65
<b>Hallado</b>	70.45	6.38

**3,4,5-Trietoxibenzoato de 5-fenil-2-furilmetilo (65):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3,4,5-trietoxibenzoico (175 mg, 0.68 mmol), PyBOP (358 mg, 0.68 mmol), 5-fenil-2-furilmetanol (100 mg, 0.57 mmol), TEA (0.158 mL, 1.15 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido amarillo (246 mg, 87%). P. f.: 71.1 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 449 [M+K]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla E. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla F.

C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	70.23	6.38
<b>Hallado</b>	70.51	6.19

### 1.5.3. Síntesis de los derivados de 5-fenil-2-furoato de bencilo

#### *Método general*

Sobre una disolución del derivado del ácido 5-fenil-2-furoico correspondiente (1.2 equivalentes) en 10 mL de diclorometano se añade el agente acoplante PyBOP (1.2

equivalentes) junto con TEA (2 equivalentes) como base y se agita a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añade el alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico o 3,4,5-trietoxibencílico (1 equivalente) y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando los eluyentes que se indican en cada caso.

**2-Furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (67):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-furoico (300 mg, 2.62 mmol), PyBOP (1360 mg, 2.62 mmol), alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.373 mL, 2.25 mmol) y TEA (0.622 mL, 4.50 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (173 mg, 27%). P.f.: 88.1 °C. Pureza HPLC: 97%. MS (ES) m/z: 181. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.56 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H-furil), 7.19 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H-furil), 6.65 (s, 2H, H-ar), 6.48 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H-furil), 5.24 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-ar), 3.84 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 158.9 (CO), 153.7 (C-ar, 2C), 146.9 (C-furil), 144.91 (C-furil), 138.5 (C-ar), 131.9 (C-ar), 118.7 (C-furil), 112.3 (C-furil), 106.2 (C-ar, 2C), 67.2 (O-CH<sub>2</sub>-ar), 61.21 (OCH<sub>3</sub>), 56.4 (OCH<sub>3</sub>).

C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	61.64	5.52
<b>Hallado</b>	61.50	5.30

**5-Metil-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (68):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 5-metil-2-furoico (300 mg, 2.30 mmol), PyBOP (1200 mg, 2.30 mmol), alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.318 mL, 1.92 mmol) y TEA (0.533 mL, 3.84 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (117 mg, 20%). P.f.: 90.6 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 181. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.11 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H-furil), 6.66 (s, 2H, H-ar), 6.11 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, H-furil), 5.24 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>-ar), 3.86 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 158.8 (CO), 157.7 (C-ar, 2C), 153.5 (C-furil), 143.1 (C-furil), 138.2 (C-ar), 131.6 (C-ar), 120.0 (C-ar), 108.7 (C-furil), 105.9 (C-furil), 66.0 (OCH<sub>2</sub>-ar), 61.1 (OCH<sub>3</sub>), 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	62.74	5.92
<b>Hallado</b>	62.62	5.84

**5-Fenil-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (69):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.210 mL, 1.27 mmol), ácido 5-fenil-2-furoico (200 mg, 1.03 mmol), PyBOP (639 mg, 1.23 mmol), TEA (0.284 mL, 2.06 mmol). Tiempo de reacción: 23 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (90 mg, 24%). P.f.: 98.4 °C. Pureza HPLC: 97%. MS (ES) m/z: 391 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	69.10	5.80
<b>Hallado</b>	68.89	9.18

**5-(2-Trifluorometilfenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (70):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.129 mL, 0.65 mmol), ácido 5-(2-trifluorometilfenil)-2-furoico (200 mg, 0.76 mmol), PyBOP (393 mg, 0.76 mmol), TEA (0.174 mL, 1.26 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (123 mg, 36%). P.f.: 89.8 °C. Pureza HPLC: 94%. MS (ES) m/z: 459 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C- RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	60.55	4.39
<b>Hallado</b>	60.37	4.31

**5-(2-Clorofenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (71):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.154 mL, 0.90 mmol), ácido 5-(2-clorofenil)-2-furoico (239 mg, 1.08 mmol), PyBOP (561 mg, 1.08 mmol), TEA (0.249 mL, 1.80 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (118 mg, 33%). P.f.: 124.6 °C. Pureza HPLC: 94%. MS (ES) m/z: 403 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> ClO <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	62.61	4.75
<b>Hallado</b>	62.54	4.55

**5-(2,4-Diclorofenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (72):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.159 mL, 0.93 mmol), ácido 5-(2,4-diclorofenil)-2-furoico (200 mg, 0.78 mmol), PyBOP (485 mg, 0.93 mmol), TEA (0.215 mL, 1.55 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido amarillo (225 mg, 55%). P.f.: 125.4 °C. Pureza HPLC: 96%. MS (ES) m/z: 459 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	57.68	4.15
<b>Hallado</b>	57.39	4.31

**5-(2-Cloro-5-trifluorometilfenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (73):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.141 mL, 0.83 mmol), ácido 5-(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-2-furoico (200 mg, 0.99 mmol), PyBOP (516 mg, 0.99 mmol), TEA (0.228 mL, 1.65 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (100 mg, 26%). P.f.: 129.1 °C. Pureza HPLC: 94%. MS (ES) m/z: 181. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	56.12	3.85
<b>Hallado</b>	55.92	3.87

**5-(2-Nitro-4-metilfenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (74):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.112 mL, 0.66 mmol), ácido 5-(2-nitro-4-metilfenil)-2-furoico (200 mg, 0.79 mmol), PyBOP (412 mg, 0.79 mmol), TEA (0.182 mL, 1.32 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (27 mg, 10%). P.f.: 148.3 °C. Pureza HPLC: 90%. MS (ES) m/z: 450 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN

(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C- RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	61.82	4.95	3.28
<b>Hallado</b>	61.81	4.82	3.44

**5-(2-Nitro-4-clorofenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (75):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.101 mL, 0.61 mmol), ácido 5-(2-nitro-4-clorofenil)-2-furoico (200 mg, 0.71 mmol), PyBOP (369 mg, 0.71 mmol), TEA (0.164 mL, 1.19 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (130 mg, 38%). P.f.: 147.3 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 470 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	56.32	4.05	3.18
<b>Hallado</b>	56.07	4.02	2.99

**5-(3-Trifluorometilfenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (76):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.105 mL, 0.62 mmol), ácido 5-(3-trifluorometilfenil)-2-furoico (200 mg, 0.74 mmol), PyBOP (405 mg, 0.78 mmol), TEA (0.171 mL, 1.24 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (235 mg, 87%). P.f.: 107.7 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 181. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C- RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	60.55	4.39
<b>Hallado</b>	60.34	4.31

**5-(4-Nitrofenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (77):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.168 mL, 0.98 mmol), ácido 5-(4-nitrofenil)-2-furoico (200 mg, 0.82 mmol), PyBOP (509 mg, 0.98 mmol), TEA (0.227 mL, 1.64 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación:

eluyente hexano/acetato de etilo (4:1). Rendimiento: sólido blanco (34 mg, 10%). P.f.: 161.2 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 436 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>8</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	61.02	4.63	3.39
<b>Hallado</b>	60.97	4.75	3.65

**5-(4-Metoxifenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (78):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.126 mL, 0.74 mmol), ácido 5-(4-metoxifenil)-2-furoico (200 mg, 0.89 mmol), PyBOP (462 mg, 0.89 mmol), TEA (0.205 mL, 1.48 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (205 mg, 70%). P.f.: 137.0 °C. Pureza HPLC: 97%. MS (ES) m/z: 421 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	66.32	5.57
<b>Hallado</b>	66.03	5.57

**5-(4-Metilfenil)-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (79):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico (0.196 mL, 1.15 mmol), ácido 5-(4-metilfenil)-2-furoico (200 mg, 0.96 mmol), PyBOP (599 mg, 1.15 mmol), TEA (0.265 mL, 1.92 mmol). Tiempo de reacción: 22 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (121 mg, 33%). P.f.: 144.6 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 405 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	69.10	5.80
<b>Hallado</b>	69.30	5.65

**5-Fenil-2-furoato de 3,4,5-trietoxibencilo (80):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trietoxibencílico (0.314 mL, 1.28 mmol),

ácido 5-fenil-2-furoico (300 mg, 1.55 mmol), PyBOP (998 mg, 1.92 mmol), TEA (0.354 mL, 2.56 mmol). Tiempo de reacción: 18 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (196 mg, 38%). P.f.: 88.8 °C. Pureza HPLC: 98%. MS (ES) m/z: 433 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	70.23	6.38
<b>Hallado</b>	70.15	6.09

**5-(2,4-Diclorofenil)-2-furoato de 3,4,5-trietoxibencilo (81):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trietoxibencílico (0.162 mL, 0.65 mmol), ácido 5-(2,4-diclorofenil)-2-furoico (200 mg, 0.78 mmol), PyBOP (505 mg, 0.97 mmol), TEA (0.179 mL, 1.30 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (200 mg, 64%). P.f.: 92.4 °C. Pureza HPLC: 93%. MS (ES) m/z: 501 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	60.13	5.05
<b>Hallado</b>	60.25	4.98

**5-(4-Nitrofenil)-2-furoato de 3,4,5-trietoxibencilo (82):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trietoxibencílico (0.171 mL, 0.69 mmol), ácido 5-(4-nitrofenil)-2-furoico (200 mg, 0.82 mmol), PyBOP (530 mg, 1.02 mmol), TEA (0.189 mL, 1.37 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido amarillo pálido (110 mg, 35%). P.f.: 107.8 °C. Pureza HPLC: 97%. MS (ES) m/z: 223. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>8</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	63.29	5.53	3.08
<b>Hallado</b>	63.01	5.60	3.38

**5-(4-Metilfenil)-2-furoato de 3,4,5-trietoxibencilo (83):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: alcohol 3,4,5-trietoxibencílico (0.197 mL, 0.79 mmol), ácido 5-(4-metilfenil)-2-furoico (200 mg, 0.96 mmol), PyBOP (623 mg, 1.20 mmol), TEA (0.221 mL, 1.60 mmol). Tiempo de reacción: 18 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (77 mg, 10%). P.f.: 99.7 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 447 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	70.44	6.65
<b>Hallado</b>	70.25	6.58

**5-Fenil-2-furoato de 4-metoxibencilo (84):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 5-fenil-2-furoico (495 mg, 2.63 mmol), alcohol 4-metoxibencílico (0.270 mL, 2.13 mmol), PyBOP (1360 mg, 2.63 mmol), TEA (0.589 mL, 4.26 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (589 mg, 90%). P.f.: 81.6 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 309 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.78 (d, 2H, J = 7.1 Hz, H-ar), 7.43-7.39 (m, 4H, H-ar), 7.37-7.32 (m, 1H, H-ar), 7.26 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-furil), 6.92 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H-ar), 6.72 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-furil), 5.30 (s, 2H, H-ar), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 159.9 (CO), 158.9 (C-ar), 157.8 (C-furil), 143.8 (C-furil), 130.5 (C-ar), 129.7 (C-ar), 129.0 (C-ar), 128.1 (C-ar), 125.4 (C-ar), 120.4 (C-furil), 114.2 (C-ar), 107.1 (C-furil), 66.5 (C-ar), 55.5 (OCH<sub>3</sub>).

C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	74.01	5.23
<b>Hallado</b>	74.12	5.20

**5-(4-Cloro-2-nitrofenil)-2-furoato de 4-metoxibencilo (85):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 5-(4-cloro-2-nitrofenil)-2-furoico (399 mg, 1.42 mmol), alcohol 4-metoxibencílico (0.147 mL, 1.18 mmol), PyBOP (738 mg, 1.42 mmol), TEA (0.326 mL, 2.36 mmol). Tiempo de reacción:

24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido amarillo (112 mg, 25%). P.f.: 138.7 °C. Pureza HPLC: 96%. MS (ES) m/z: 410 (M+Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.78 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H-ar), 7.76 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-ar), 7.60 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-ar), 7.38 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Har), 7.23 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-furil), 6.91 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H-ar), 6.68 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-furil), 5.29 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-ar), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 160.0 (CO), 158.3 (C-ar), 150.6 (C-ar), 148.1 (C-furil), 145.5 (C-furil), 135.7 (C-ar), 132.6 (C-ar), 131.0 (C-ar), 130.5 (C-ar), 127.7 (C-ar), 124.5 (C-ar), 121.8 (C-ar), 119.8 (C-furil), 114.2 (C-ar), 112.0 (C-furil), 66.9 (CH<sub>2</sub>-ar), 55.5 (OCH<sub>3</sub>).

C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>6</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	58.85	3.64	3.61
<b>Hallado</b>	58.57	3.59	3.60

#### 1.5.4. Síntesis de derivados de *N*-(3,4,5-trimetoxibencil)-5-fenil-2-furamida

##### *Método general*

Sobre una disolución del derivado del ácido 5-fenil-2-furoico correspondiente (1.2 equivalentes) en 10 mL de diclorometano se añade el agente acoplante PyBOP (1.2 equivalentes) junto con TEA (2 equivalentes) como base y se agita a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añade la 3,4,5-trimetoxibencilamina (1 equivalente) y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando los eluyentes indicados en cada caso.

***N*-(3,4,5-trimetoxibencil)-5-(2-trifluorometilfenil)-2-furamida (86)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3,4,5-trimetoxibencilamina (0.166 mL, 0.97 mmol), ácido 5-(2-trifluorometilfenil)-2-furoico (300 mg, 1.14 mmol), PyBOP (590 mg, 1.14 mmol), TEA (0.314 mL, 2.27 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (400 mg, 94%). P.f.: 123.7 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 458 [M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	60.69	4.63	3.22
<b>Hallado</b>	60.48	4.57	3.24

**N-(3,4,5-trimetoxibencil)-5-(2-nitro-4-metilfenil)-2-furamida (87):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3,4,5-trimetoxibencilamina (0.173 mL, 0.99 mmol), ácido 5-(2-nitro-4-metilfenil)-2-furoico (300 mg, 1.19 mmol), PyBOP (618 mg, 1.19 mmol), TEA (0.274 mL, 1.98 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido amarillo pálido (56 mg, 14%). P.f.: 114.2 °C. Pureza HPLC: 93%. MS (ES) m/z: 427 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	61.97	5.20	6.57
<b>Hallado</b>	61.68	5.28	6.84

**N-(3,4,5-trimetoxibencil)-5-(2-nitro-4-clorofenil)-2-furamida (88):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: 3,4,5-trimetoxibencilamina (0.104 mL, 0.59 mmol), ácido 5-(2-nitro-4-clorofenil)-2-furoico (200 mg, 0.71 mmol), PyBOP (369 mg, 0.71 mmol), TEA (0.164 mL, 1.18 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido amarillo (299 mg, 94%). P.f.: 142.4 °C. Pureza HPLC: 96%. MS (ES) m/z: 447, 449 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla G. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla H.

C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	%C	%H	%N
<b>Teórico</b>	56.45	4.29	6.27
<b>Hallado</b>	56.56	4.04	8.28

### 1.5.5. Síntesis de los derivados del anillo de tiofeno

**5-Bromo-2-tiofenocarboxilato de 3,4,5-trimetoxibencilo (89):** Sobre una disolución del ácido 5-bromo-2-tiofenocarboxílico (300 mg, 1.40 mmol) en 10 mL de diclorometano se añade el agente acoplante PyBOP (730 mg, 1.40 mmol) junto con TEA (0.332 mL, 2.40 mmol) como base y se agita a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añade el alcohol 3,4,5-

trimetoxibencílico (0.239 mL, 1.20 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (378 mg, 81%). P.f.: 113.5 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 388 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.57 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-tienilo), 7.06 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-tienilo), 6.63 (s, 2H, H-ar), 5.23 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>-ar), 3.87 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 161.3 (CO), 153.7 (2C, C-ar), 138.5 (C-ar), 134.3 (C-tienilo), 133.7 (C-tienilo), 131.5 (C-tienilo), 131.4 (C-ar), 120.9 (C-tienilo), 105.9 (2C, C-ar), 67.6 (OCH<sub>2</sub>-ar), 61.3 (OCH<sub>3</sub>), 56.6 (2C, OCH<sub>3</sub>).

C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> BrSO <sub>5</sub>	%C	%H
<b>Teórico</b>	46.52	3.90
<b>Hallado</b>	46.27	3.81

**5-Fenil-2-tiofenocarboxilato de 3,4,5-trimetoxibencilo (90):** en un vial de microondas se añaden el derivado **89** (100 mg, 0.26 mmol), ácido fenilborónico (32 mg, 0.26 mmol), tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) (11 mg, 0.01 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (17 mg, 0.05 mmol) como base. A continuación se añade 2 ml de una disolución Dioxano/H<sub>2</sub>O (6:1) y se agita a 90 °C bajo irradiación microondas durante dos horas. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (45 mg, 45%). P.f.: 109.4 °C. Pureza HPLC: >99%. MS (ES) m/z: 181. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.80 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-tienilo), 7.64 (dd, 2H, *J* = 8.3, 1.6 Hz, H-ar), 7.41-7.35 (m, 3H, H-ar), 7.30 (d, 1H, *J* = 3.94 Hz, H-tienilo), 6.68 (s, 2H, H-ar), 5.28 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>-ar), 3.89 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 162.4 (CO), 153.8 (2C, C-ar), 152.0 (C-tienilo), 131.8 (C-ar), 129.5 (2C, C-ar), 129.3 (C-tienilo), 126.6 (2C, C-ar), 124.1 (C-tienilo), 105.9 (2C, C-ar), 67.4 (OCH<sub>2</sub>-ar), 61.3 (OCH<sub>3</sub>), 56.6 (2C, OCH<sub>3</sub>).

C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> S	%C	%H
<b>Teórico</b>	65.61	5.24
<b>Hallado</b>	65.33	5.14

## 1.6. Síntesis de los derivados del anillo de tiazol

### 1.6.1. Síntesis de los productos de partida

#### 1.6.1.1. *Derivados del acetato de bencilo*

##### *Método general*

Sobre una disolución del ácido carboxílico correspondiente (1.2 equivalentes) en 10 ml de diclorometano se añade PyBOP (1.2 equivalentes) junto con TEA (2 equivalentes) como base y se agita durante 1 hora. A continuación, se añade el derivado del aminoacetato o hidroxacetato de bencilo (1 equivalente) y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® con los eluyentes que se indican en cada caso.

**2-(2,2-Difenilacetamido)acetato de bencilo (97):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2,2-difenilacético (500 mg, 2.33 mmol), PyBOP (1210 mg, 2.33 mmol), 2-aminoacetato de bencilo (391 mg, 1.94 mmol) y TEA (0.536 mL, 3.88 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (188 mg, 28%). P.f.: 111.4-113.5 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 360 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

**2-(3,3-Difenilpropionamido)acetato de bencilo (98):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 3,3-difenilpropiónico (407 mg, 1.78 mmol), PyBOP (925 mg, 1.78 mmol), 2-aminoacetato de bencilo (300 mg, 1.49 mmol) y TEA (0.412 mL, 2.98 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (272 mg, 49%). P.f.: 103.0-105.9 °C Pureza HPLC: 95%. EM (*m/z*): 374 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

**2-(2,2-Difenilacetoxi)acetato de bencilo (99):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2,2-difenilacético (597 mg, 2.79 mmol), PyBOP

(1450 mg, 2.79 mmol), 2-hidroxiacetato de bencilo (0.341 mL, 2.33 mmol) y TEA (0.646 mL, 4.67 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (543 mg, 65%). P.f.: 51.5-52.7 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 213. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

**2-(2-Benzamidoacetoxi)acetato de bencilo (118):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-benzamidoacético (216 mg, 1.20 mmol), PyBOP (626 mg, 1.20 mmol), 2-hidroxiacetato de bencilo (0.141 mL, 1 mmol), TEA (0.33 mL, 2.40 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (209 mg, 64%). P.f.: 98.8-101.3 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 350 (M+Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

**2-[2-(2-Fenilacetamido)acetoxi]acetato de bencilo (119):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-(2-fenilacetamido)acético (1170 mg, 6.08 mmol), PyBOP (3160 mg, 6.08 mmol), 2-hidroxiacetato de bencilo (0.742 mL, 5.07 mmol), TEA (1.40 mL, 10.14 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (580 mg, 28%). P.f.: 80.9-82.2 °C. Pureza HPLC: 95%. EM (*m/z*): 213. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

#### 1.6.1.2. Derivados del ácido acético

##### *Método general*

Sobre una disolución del derivado de acetato de bencilo correspondiente (1 equivalente) en 15 mL de THF/MeOH (1:2) a 0 °C, añadimos lentamente el catalizador Pd/C (10% p/p). A continuación, pasamos una corriente de H<sub>2</sub> y mantenemos la reacción a la presión y durante el tiempo indicado en cada caso. Finalmente, se eliminan los restos del catalizador empleando un filtro de 0.45 µm. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® con los eluyentes que se indican en cada caso.

**Ácido 2-(2,2,-difetilacetamido)acético (100):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **97** (123 mg, 0.34 mmol), Pd/C (12 mg, 10%

p/p). Condiciones de reacción: 17 psi durante 3 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (78 mg, 84%). P.f.: 133.7-136.0 °C. Pureza HPLC: 96%. EM (*m/z*): 270 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

**Ácido 2-(3,3-difenilpropionamido)acético (101):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **98** (200 mg, 0.50 mmol), Pd/C (20 mg, 10% p/p). Condiciones de reacción 20 psi durante 3 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo. (8:1). Rendimiento: sólido blanco (144 mg, 99%). P.f.: 126.5-128.7 °C. Pureza HPLC: 95%. EM (*m/z*): 282 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

**Ácido 2-(2,2-difenilacetoxi)acético (102):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **99** (543 mg, 1.31 mmol), Pd/C (54 mg, 10% p/p). Condiciones de reacción: 17 psi durante 5 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo. (8:1). Rendimiento: sólido blanco (327 mg, 93%). P.f.: 113.0-114.4 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 213. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla O.

**Ácido 2-(2-benzamidoacetoxi)acético (120):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **118** (152 mg, 0.46 mmol), Pd/C (15 mg, 10% p/p). Condiciones de reacción: 20 psi durante 3 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (82 mg, 75%). P.f.: 160.1-163.8 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 238 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CH<sub>3</sub>OD), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CH<sub>3</sub>OD), los datos se recogen en la Tabla O.

**Ácido 2-[2-(2-fenilacetamido)acetoxi]acético (121):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **119** (546 mg, 1.12 mmol), Pd/C (52 mg, 10% p/p). Condiciones de reacción: 17 psi durante 5 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (8:1). Rendimiento: sólido blanco (205 mg, 73%). P.f.: 95.6-97.0 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 251 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CH<sub>3</sub>OD), los datos se recogen en la Tabla Ñ. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CH<sub>3</sub>OD), los datos se recogen en la Tabla O.

### 1.6.2. Síntesis de los derivados de anillo de tiazol con un conector de un enlace

#### Método general

Sobre una disolución del ácido carboxílico correspondiente (1.2 equivalentes) en 10 ml de diclorometano se añade PyBOP (1.2 equivalentes) junto con TEA (2 equivalentes) como base y se agita durante 1 hora. A continuación, se añade el derivado del 2-aminotiazol correspondiente (1 equivalente) y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® con los eluyentes que se indican en cada caso.

**2-(2,2-Difenilacetamido)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (91):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2,2-difenilacético (238 mg, 1.12 mmol), PyBOP (586 mg, 1.12 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (200 mg, 0.94 mmol), TEA (0.217 mL, 1.57 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (1:1). Rendimiento: sólido blanco (214 mg, 60%). P.f.: 161.5-163.7 °C. Pureza HPLC: 97%. EM (*m/z*): 380 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla I. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla J.

C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	66.29	5.30	7.36	8.43
<b>Hallado</b>	66.07	5.53	7.33	8.78

**2-[2-(3-Clorofenilacetamido)]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (92):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido (3-clorofenil)acético (100 mg, 0.57 mmol), PyBOP (296 mg, 0.57 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (91 mg, 0.47 mmol), TEA (0.131 mL, 0.91 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (1:1). Rendimiento: sólido blanco (63 mg, 33%). P.f.: 149.7-150.6 °C. Pureza HPLC: 97%. EM (*m/z*): 339 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla I. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla J.

C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	53.17	4.46	8.27	9.46
<b>Hallado</b>	52.89	4.71	8.16	9.25

**2-(2-Metoxibenzamido)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (93):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-metoxibenzoico (200 mg, 1.30 mmol), PyBOP (683 mg, 1.30 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (197 mg, 1.06 mmol), TEA (0.303 mL, 2.18 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: eluyente hexano/ acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (114 mg, 33%). P.f.: 151.6-153.2 °C. Pureza HPLC: 95%. EM (*m/z*): 321 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla I. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla J.

C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	56.24	5.03	8.74	10.01
<b>Hallado</b>	56.60	5.59	8.47	9.98

**N-(benzotiazol-2-il)-2,2-difenilacetamida (94):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2,2-difenilacético (238 mg, 1.12 mmol), PyBOP (586 mg, 1.12 mmol), 2-aminobenzotiazol (141 mg, 0.94 mmol), TEA (0.260 mL, 1.88 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: extracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Rendimiento: sólido blanco (161 mg, 50%). P.f.: 142.4-146.1 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 345 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla I. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla J.

C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	73.23	4.68	8.13	9.31
<b>Hallado</b>	73.20	4.65	8.20	9.40

**N-(benzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (95):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido (3-clorofenil)acético (272 mg, 1.55 mmol), PyBOP (807 mg, 1.55 mmol), 2-aminobenzotiazol (200 mg, 1.29 mmol), TEA (0.357 mL, 2.58 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (256 mg, 66%). P.f.: 175-6-177.5 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 303 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla I. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla J.

C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	59.50	3.66	9.25	10.59
<b>Hallado</b>	59.36	3.78	8.98	10.33

**N-(benzotiazol-2-il)-2-metoxibenzamida (96):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-metoxibenzoico (239 mg, 1.57 mmol), PyBOP (817 mg, 1.57 mmol), 2-aminobenzotiazol (196 mg, 1.31 mmol), TEA (0.364 mL, 2.63 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (204 mg, 55%). P.f.: 159.0-160.2 °C. Pureza HPLC: 95%. EM (*m/z*): 285 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla I. <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla J.

C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	63.36	4.25	9.85	11.28
<b>Hallado</b>	63.60	4.42	9.93	11.27

### 1.6.3. Síntesis de derivados de anillo de tiazol con un conector de dos enlaces

#### *Método general*

Sobre una disolución del ácido carboxílico correspondiente (1.2 equivalentes) en 10 ml de diclorometano se añade el agente acoplante (1.2 equivalentes) junto con TEA (2 equivalentes) como base y se agita durante 1 hora. A continuación, se añade el derivado del 2-aminotiazol correspondiente (1 equivalente) y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante el método indicado en cada caso.

**2-(2-Benzamidoacetamido)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (103):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-benzamidoacético (100 mg, 0.56 mmol), PyBOP (290 mg, 0.56 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (86 mg, 0.46 mmol), TEA (0.128 mL, 0.93 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (2:1). Rendimiento: sólido blanco (70 mg, 36%). P.f.: 217.8-218.4 °C. Pureza HPLC: 93%. EM (*m/z*): 348 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	55.32	4.93	12.10	9.23
<b>Hallado</b>	55.27	4.55	11.82	8.81

**2-[2-(2-Fenilacetamido)acetamido]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (104):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-(2-fenilacetamido)acético (39 mg, 0.332 mmol), EDC (246 mg, 1.29 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (207 mg, 1.07 mmol), DMAP (39 mg, 0.332 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Aislamiento: filtración del sólido en suspensión y lavados con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rendimiento: sólido blanco (73 mg, 20%). P.f.: 158.8-159.0 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (*m/z*): 362 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	56.50	5.30	11.63	8.87
<b>Hallado</b>	56.54	5.26	11.27	8.78

**2-[2-(2,2-Difenilacetamido)acetamido]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (105):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **100** (60 mg, 0.22 mmol), PyBOP (115 mg, 0.22 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (36 mg, 0.18 mmol), TEA (0.052 mL, 0.37 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (53 mg, 65%). P.f.: 161.2-162.5 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 439 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	56.50	5.30	11.63	8.87
<b>Hallado</b>	56.34	5.09	11.50	8.77

**2-[2-(3,3-Difenilpropionamido)acetamido]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (106):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **101** (119 mg, 0.43 mmol), PyBOP (187 mg, 0.36 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (68 mg, 0.36 mmol), TEA (0.098 mL, 0.71 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (78 mg, 47%). P.f.: 199.1-201.2 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 452 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	63.84	5.58	9.31	7.10
<b>Hallado</b>	63.71	5.68	9.41	7.32

***N*-(benzotiazol-2-il)-2-(benzamido)acetamida (107)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-benzamidoacético (200 mg, 1.09 mmol), PyBOP (568 mg, 1.09 mmol), 2-aminobenzotiazol (140 mg, 0.91 mmol), TEA (252 mL, 1.82 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (260 mg, 91%). P.f.: 267.6-268.4 °C (Biblio.<sup>238</sup> 262-264 °C). Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 312 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	61.72	4.21	13.50	10.30
<b>Hallado</b>	61.45	4.04	13.70	10.28

***N*-(benzotiazol-2-il)-2-(2-fenilacetamido)acetamida (108)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-(2-fenilacetamido)acético (305 mg, 1.55 mmol), EDC (296 mg, 1.55 mmol), 2-aminobenzotiazol (200 mg, 1.29 mmol), DMAP (58 mg, 0.46 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Aislamiento: filtración del sólido en suspensión y lavados con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rendimiento: sólido blanco (327 mg, 78%). P.f.: 247.2-249.9 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 326 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	62.75	4.65	12.91	9.85
<b>Hallado</b>	62.47	4.58	12.67	9.57

***N*-(benzotiazol-2-il)-2-(2,2-difenilacetamido)acetamida (109)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **100** (150 mg, 0.55 mmol), PyBOP (288 mg, 0.55 mmol), 2-aminobenzotiazol (72 mg, 0.46 mmol), TEA (0.153 mL, 1.11 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (18 mg, 10%). P.f.: 208.2-209.0 °C. Pureza HPLC: 98%. EM

(*m/z*): 402 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	68.81	4.77	10.47	7.99
<b>Hallado</b>	68.53	4.48	10.71	7.86

**N-(benzotiazol-2-il)-2-(3,3-difenilpropionamido)acetamida (110)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **101** (59 mg, 0.20 mmol), PyBOP (104 mg, 0.20 mmol), 2-aminobenzotiazol (26 mg, 0.17 mmol), TEA (0.047 mL, 0.34 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Aislamiento: filtración del sólido en suspensión, y lavados con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rendimiento: sólido blanco (33 mg, 46%). P.f.: 216.9-217.7 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (*m/z*): 416 (M+Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	69.37	5.09	10.11	7.72
<b>Hallado</b>	69.13	4.96	10.40	7.83

**N-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-(benzamido)acetamida (111)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-benzamidoacético (200 mg, 1.09 mmol), PyBOP (568 mg, 1.09 mmol), 2-amino-4-fenil-5-metiltiazol (168 mg, 0.88 mmol), TEA (0.244 mL, 1.76 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (117 mg, 43%). P.f.: 225.8-227.0 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 352 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	64.94	4.88	11.96	9.12
<b>Hallado</b>	64.80	4.90	11.95	9.24

**N-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-(2-fenilacetamido)acetamida (112)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-(2-fenilacetamido)acético (241 mg, 1.22 mmol), EDC (233 mg, 1.22 mmol), 2-amino-5-metil-4-feniltiazol (200 mg,

1.02 mmol), DMAP (38 mg, 0.306 mmol). Tiempo de reacción: 20 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato (6:1). Rendimiento: sólido blanco (128 mg, 35%). P.f.: 199.5-201.8 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 366 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	65.73	5.24	11.50	8.77
<b>Hallado</b>	65.88	5.07	11.38	8.59

***N*-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-(2,2-difenilacetamido)acetamida (113)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **100** (92 mg, 0.34 mmol), PyBOP (176 mg, 0.34 mmol), 2-amino-4-fenil-5-metiltiazol (54 mg, 0.28 mmol), TEA (0.078 mL, 0.56 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (20 mg, 20%). P.f.: 197.6-198.3 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (*m/z*): 442 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	70.72	5.25	9.52	7.26
<b>Hallado</b>	71.02	5.42	9.67	7.40

***N*-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-(3,3-difenilpropionamido)acetamida (114)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **101** (30 mg, 0.11 mmol), PyBOP (55 mg, 0.11 mmol), 2-amino-4-fenil-5-metiltiazol (17 mg, 0.088 mmol), TEA (0.030 mL, 0.212 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (3:1). Rendimiento: sólido blanco (28 mg, 70%). P.f.: 226.3-228.4 °C. Pureza HPLC: 98%. EM (*m/z*): 456 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	71.18	5.53	9.22	7.04
<b>Hallado</b>	70.94	5.47	8.99	7.22

**2-[2-(2,2-Difenilacetoxi)acetamido]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (115):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **102** (200 mg, 0.74 mmol), PyBOP (384 mg, 0.74 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (114 mg, 0.61 mmol), TEA (0.170 mL, 1.23 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (228 mg, 84%). P.f.: 68.4-70.0 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 439 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	63.00	5.06	6.39	7.31
<b>Hallado</b>	63.01	5.22	6.41	7.09

**N-(benzotiazol-2-il)-2-(2,2-difenilacetoxi)acetamida (116):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **102** (180 mg, 0.66 mmol), PyBOP (343 mg, 0.66 mmol), 2-aminobenzotiazol (85 mg, 0.55 mmol), TEA (0.152 mL, 1.10 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (161 mg, 73%). P.f.: 109.6-110.7 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 403 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>23</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	68.64	4.51	6.96	7.97
<b>Hallado</b>	68.61	4.48	7.02	7.69

**N-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-(2,2-difenilacetoxi)acetamida (117):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **102** (200 mg, 0.74 mmol), PyBOP (385 mg, 0.74 mmol), 2-amino-4-fenil-5-metiltiazol (117 mg, 0.61 mmol), TEA (0.170 mL, 1.23 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (200 mg, 73%). P.f.: 72.4-74.8 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 443 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla K. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla L.

C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	70.57	5.01	6.33	7.25
<b>Hallado</b>	70.44	5.22	6.43	7.00

#### 1.6.4. Síntesis de derivados del anillo de tiazol con un conector de tres enlaces

##### *Método general*

Sobre una disolución del ácido carboxílico correspondiente (1.2 equivalentes) en 10 ml de diclorometano se añade PyBOP (1 equivalente) junto con TEA (2 equivalentes) como base y se agita durante 1 hora. A continuación, se añade el derivado del 2-aminotiazol correspondiente (1 equivalente) y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante el empleo de la técnica indicada en cada caso.

**2-[2-(2-Benzamidoacetoxi)acetamido]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (122):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **120** (94 mg, 0.39 mmol), PyBOP (205 mg, 0.39 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (61 mg, 0.33 mmol), TEA (0.092 mL, 0.66 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: recristalización del sólido obtenido de MeOH/H<sub>2</sub>O. Rendimiento: sólido blanco (38 mg, 28%). P.f.: 190.6-192.5 °C. EM (*m/z*): 406 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla M. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla N.

C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	53.32	4.72	10.36	7.91
<b>Hallado</b>	52.98	4.81	10.28	8.02

**2-[2-(2-(2-fenilacetamido)acetoxi)acetamido]-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (123):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **121** (125 mg, 0.49 mmol), PyBOP (259 mg, 0.49 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (77 mg, 0.41 mmol), TEA (0.115 mL, 0.83 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (131 mg, 75%). P.f.: 189.6-191.2 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 420 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-

RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ), los datos se recogen en la Tabla M.  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ), los datos se recogen en la Tabla N.

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	54.41	5.05	10.02	7.64
<b>Hallado</b>	54.01	4.89	9.78	7.78

***N*-(benzotiazol-2-il)-2-(2-benzamidoacetoxi)acetamida (124)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **120** (92 mg, 0.39 mmol), PyBOP (203 mg, 0.39 mmol), 2-aminobenzotiazol (49 mg, 0.32 mmol), TEA (0.090 mL, 0.65 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: recristalización del sólido obtenido de MeOH/H<sub>2</sub>O. Rendimiento: sólido blanco (34 mg, 28%). P.f.: 216.7-217.7 °C. EM (*m/z*): 369 (M+H)<sup>+</sup>.  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, Acetona- $d_6$ ), los datos se recogen en la Tabla M.  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, Acetona- $d_6$ ), los datos se recogen en la Tabla N.

$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	58.53	4.09	11.38	8.68
<b>Hallado</b>	58.28	3.99	11.21	8.50

***N*-(benzotiazol-2-il)-2-[2-(2-fenilacetamido)acetoxi]acetamida (125)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **121** (59 mg, 0.22 mmol), PyBOP (114 mg, 0.22 mmol), 2-aminobenzotiazol (30 mg, 0.19 mmol), TEA (0.055 mL, 0.39 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (30 mg, 40%). P.f.: 175.0-176.3 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 385 (M+H)<sup>+</sup>.  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, Acetona- $d_6$ ), los datos se recogen en la Tabla M.  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, Acetona- $d_6$ ), los datos se recogen en la Tabla N.

$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	59.52	4.47	10.96	8.36
<b>Hallado</b>	59.28	4.25	10.77	8.09

***N*-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-(2-benzamidoacetoxi)acetamida (126)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **120** (96 mg, 0.40 mmol), PyBOP (212 mg, 0.40 mmol), 2-amino-4-fenil-5-metiltiazol (64 mg, 0.34 mmol), TEA (0.94 mL, 0.68 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo

(6:1). Rendimiento: sólido blanco (22 mg, 16%). P.f.: 174.7-176.4 °C. Pureza HPLC: 95%. EM ( $m/z$ ): 410 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla M. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla N.

C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	61.60	4.68	10.26	7.83
<b>Hallado</b>	61.22	4.24	10.24	7.44

***N*-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-[2-(2-fenilacetamido)acetoxi]acetamida (127):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: derivado **121** (158 mg, 0.63 mmol), PyBOP (328 mg, 0.63 mmol), 2-amino-4-fenil-5-metiltiazol (100 mg, 0.53 mmol), TEA (0.145 mL, 1.05 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (74 mg, 3%). P.f.: 168.5-169.9 °C. Pureza HPLC: 92%. EM ( $m/z$ ): 425 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla M. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), los datos se recogen en la Tabla N.

C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	62.40	5.00	9.92	7.57
<b>Hallado</b>	62.24	4.96	10.01	7.48

**2-[2-(2-Benzamidoacetamido)acetamido]-4-metiltiazole-5-carboxilato de etilo (128):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-(2-benzamidoacetamido)acético (304 mg, 1.29 mmol), PyBOP (559 mg, 1.07 mmol), 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (200 mg, 1.07 mmol), TEA (0.297 mL, 2.15 mmol). Tiempo de reacción: 24 horas. Purificación: recristalización de MeOH del sólido obtenido. Rendimiento: sólido blanco (169 mg, 38%). P.f.: 248.6-249.6 °C. Pureza HPLC: >99%. EM ( $m/z$ ): 405 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla M. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla N.

C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	53.45	4.98	13.85	7.93
<b>Hallado</b>	53.41	4.90	13.55	7.50

***N*-(benzotiazol-2-il)-2-(2-benzamidoacetamido)acetamida (129):** Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-(2-

benzamidoacetamido)acético (304 mg, 1.29 mmol), PyBOP (670 mg, 1.29 mmol), 2-aminobenzotiazol (166 mg, 1.07 mmol), TEA (0.296 mL, 2.14 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Purificación: cromatografía en columna utilizando el equipo Isolera® empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6:1). Rendimiento: sólido blanco (38 mg, 10%). P.f.: 249.8-250.6 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 369 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla M. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla N.

C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	58.68	4.38	15.21	8.70
<b>Hallado</b>	58.92	4.62	15.00	8.56

***N*-(4-fenil-5-metiltiazol-2-il)-2-(2-benzamidoacetamido)acetamida (130)**: Se obtiene según el método general descrito anteriormente. Reactivos: ácido 2-(2-benzamidoacetamido)acético (293 mg, 1.22 mmol), PyBOP (634 mg, 1.22 mmol), 2-amino-5-metil-4-feniltiazol (200 mg, 1.02 mmol), TEA (0.282 mL, 2.04 mmol). Tiempo de reacción: 12 horas. Aislamiento: filtración del sólido en suspensión y posterior extracción en acetato de etilo/ NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado. Rendimiento: sólido blanco (89 mg, 21%). P.f.: 199.1-201.9 °C. Pureza HPLC: >99%. EM (*m/z*): 409 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla M. <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), los datos se recogen en la Tabla N.

C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	%C	%H	%N	%S
<b>Teórico</b>	61.75	4.94	13.72	7.85
<b>Hallado</b>	62.00	4.85	13.65	7.75

## 2. PROCEDIMIENTOS BIOLÓGICOS

### 2.1. Capacidad de penetración en el Sistema Nervioso Central (SNC)

En el método PAMPA-BBB<sup>149</sup> se utilizaron como patrones compuestos comerciales con permeabilidad en cerebro conocida.

- *Materiales:*

Compuestos comerciales de Sigma Aldrich y Fluka. Lípido de cerebro porcino (PBL) de Avanti Polar Lipids, Inc (nº catalogo 141101) disuelto en dodecano (20 mg/ mL). Solución tampón: EtOH 30% v/v en tampón fosfato salino (PBS) a pH = 7.4. Placa aceptora: placa de 96 pocillos (Multiscreen®, nº catalogo MAIPN4550, membrana PVDF, tamaño de poro: 0.45 µM) de Millipore. Placa donadora: placa de 96 pocillos de "lágrima" de pION. Placa de 96 pocillos para UV (COSTAR®) de pION.

- *Instrumentación:*

Espectrofotómetro de UV de placas de 96 pocillos (Multiskan spectrum de ThermoScientific).

- *Procedimiento*

Se determinaron las longitudes de ondas del espectro de absorción de cada derivado, cuyos niveles de absorbancia estaban situados entre 1-0.8 para posteriormente medir cada permeabilidad, utilizando una disolución de cada compuesto (1 mg en 5 mL de PBS/EtOH 70:30). Con estas disoluciones madre se miden los niveles de absorbancia inicial a las longitudes de onda determinadas anteriormente. Estos valores serán comparados con los niveles obtenidos en la placa aceptora al final del ensayo. A las longitudes de onda seleccionadas se miden los niveles de absorbancia al final del ensayo. Para ello, se añade 180 µL de cada disolución (1 mg de compuesto en 5 mL de PBS/EtOH 70:30) a cada pocillo de la placa donadora. La membrana artificial se cubre con 4 µL de una solución de PBL en dodecano 20 mg/mL. A la placa aceptora se le añade 180 µL de la solución tampón. A continuación formamos un sistema tipo *sándwich* de manera que la placa donadora queda encima de la placa aceptora a través de la membrana artificial. Este sistema se incuba durante 4 h sin agitación a temperatura ambiente. Los niveles de absorbancia de la placa aceptora se miden utilizando un espectrofotómetro de UV en una placa de 96 pocillos con 130 µL en cada uno. Los resultados se expresan como el valor medio de tres ensayos independientes conteniendo cada uno tres repeticiones de cada compuesto.

## 2.2. Medida del efecto antiinflamatorio por producción de nitritos

- Cultivo primario de *neuronas de cortex cerebral* de embriones de ratas de 18 días.

Los cultivos primarios de neuronas se obtuvieron a partir del mesencéfalo ventral de embriones de rata de 18 días de edad. Tras el sacrificio de las madres gestantes, se extrajeron los sacos embrionarios, aislándose el mesencéfalo ventral. Las células obtenidas se sembraron en medio MEM suplementado con 10% FBS, 10% HS, 1g/l de glucosa, glutamina 2mM, piruvato sódico 1mM, aminoácidos no esenciales 100 µM, penicilina 50U/mL y estreptomycin 50 µg/mL y se mantuvieron en condiciones estándar durante una semana (95% humedad, 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>).

- Cultivo primario de *microglía y astrocitos*: partimos de cortex cerebral de ratas de dos días de edad postnatal (P2).

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el cerebro y se aisló la corteza cerebral. Las células obtenidas fueron sembradas en DMEM con 10% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo y 1% de penicilina/estreptomycin y se mantuvieron en condiciones estándar durante una semana (95% de humedad, 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>). A continuación, los cultivos se mantuvieron en agitación durante 4 h, permitiendo así separar la microglía no adherente del resto de tipos celulares (astrocitos y oligodendrocitos). Con el fin de separarlos, los cultivos celulares se mantuvieron en agitación durante toda la noche a 260 rpm a 37°C.

### *Determinación de la producción de nitritos*

Las células se tratan con LPS (10 µg/ml) en ausencia y presencia de los diferentes inhibidores de PDE7 en la producción de NO (óxido nítrico) por la iNOS como indicador de inflamación. Los inhibidores de PDE7 se añaden 1h antes que el estímulo inflamatorio. Para ello, después de 24 h de incubación se determina la cantidad de nitritos, uno de los productos de oxidación del NO. Para ello, se utiliza el método basado en la reacción de Griess: 100 µl de sobrenadante de los cultivos se mezclan con 100 µl de reactivo de Griess en una placa de 96 pocillos incubándose durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se mide la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas. La cantidad de nitritos producido se determina utilizando una curva patrón de nitrito sódico.

### 3. PROCEDIMIENTOS COMPUTACIONALES

#### 3.1. Desarrollo de los modelos de Redes Neuronales Artificiales

Las estructuras seleccionadas para los modelos teóricos se obtuvieron de la bibliografía mediante la búsqueda en bases de datos como *PubMed* o *ISI web of Knowledge*. Sólo se eligieron aquellas estructuras en las que la actividad biológica se expresaba en concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ). La representación de las estructuras se ha llevado a cabo con el programa ChemDraw<sup>®</sup> vs. 8.0. Las moléculas se han representado sin tener en cuenta sus hidrógenos de acuerdo con la filosofía de CODES<sup>®</sup> y se han especificado los enlaces aromáticos en los anillos de benceno. En la representación de los compuestos **I-12**, **I-13** se ha tenido en cuenta la disposición espacial de los centros esteroisómeros.

Una vez dibujadas las estructuras, el código SMILES se obtiene con el programa ChemDraw<sup>®</sup> vs. 8.0. La obtención de la matriz dinámica de cada molécula se llevó a cabo con el programa CODES<sup>®</sup> vs. 1.0.

Cada matriz dinámica obtenida se redujo a 4 parámetros mediante una red de retropropagación de error con conexiones hacia delante tipo ReNDeR con el programa TSAR<sup>®</sup> v3.3. Los valores de los parámetros que ofrece el programa por defecto han sido respetados excepto los señalados a continuación:

Error de convergencia (RMS): 0.005

Número de ciclos: 500

Número de iteraciones por ciclo: 6000

Porcentaje de datos excluidos para la validación interna: 0%

Se considera que el proceso de reducción finaliza cuando el valor del error de convergencia para los valores utilizados en el proceso de aprendizaje (Best RMS) presenta un valor constante. El error de convergencia es la diferencia entre los valores de entrada y de salida de la red considerándose una reducción aceptable aquella cuyo error es inferior a 0.02 unidades.

Se siguieron dos estrategias:

- *Modelos individuales de Redes Neuronales*. Cada modelo individual fue sometido a entrenamientos sucesivos de dos tipos para estudiar la capacidad predictiva.

*Reentrenamiento sucesivo tipo 1 o sin porcentaje de exclusión*: con el modelo inicial se aplicó un porcentaje de exclusión y seguidamente se reentrenó. Posteriormente, los compuestos excluidos pasaron al conjunto de test y seguidamente, se volvió a reentrenar sin excluir compuestos. Este proceso se repitió cinco veces.

*Reentrenamiento sucesivo tipo 2 o con porcentaje de exclusión:* con el modelo inicial, se aplicó un porcentaje de exclusión y seguidamente se reentrenó. Posteriormente, los compuestos excluidos pasaron al conjunto de test y seguidamente, se volvió a reentrenar excluyendo compuestos. Este proceso se repitió cinco veces.

- *Conjunto de Redes Neuronales* o **NNE** (*Neural Network Emsembled*)<sup>200</sup> que permite capturar complejas relaciones no lineales entre las estructuras y la propiedad a estudiar aproximándose a una regresión multilínea.

El objetivo de la estrategia de Conjunto de Redes Neuronales es construir múltiples modelos que sean capaces de hacer una buena predicción cambiando el conjunto de entrenamiento o el método de construcción de la red y posteriormente, unir todos los modelos en uno único mediante promedio (regresión). Se estudió la capacidad predictiva en función del número de redes de cada modelo NNE. Dentro de esta estrategia se obtuvieron dos tipos de NNE, donde se variaron sólo parámetros (**NNEA**) y en otros casos se variaron tanto parámetros como velocidad de aprendizaje (**NNEB**).

El entrenamiento de las redes predictivas se ha realizado con el programa *TSAR*® v3.3 y el tipo de red empleado es una red de retropropagación del error con conexiones hacia delante. Se han respetado los valores de los parámetros establecidos por defecto, excepto los siguientes:

Error de convergencia (RMS): 0.01

Número de ciclos: 200-300

Número de iteraciones por ciclo: 1000-2000

Porcentaje de datos excluidos para la validación interna: 30-50%

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de los datos de regresión  $s$ ,  $r$  y  $r^2_{cv}$ . Así  $s$  y  $r$  son la desviación estándar y el coeficiente de correlación del proceso respectivamente. El coeficiente  $r^2_{cv}$  es el coeficiente de validación cruzada y sirve para validar la capacidad predictiva del modelo.

La técnica empleada es conocida como “deja un grupo fuera” (*leave group out*) y es una variante del “deja uno fuera” (*leave one out*). En el caso del primer método (*leave group out*), el conjunto de compuestos empleado en la construcción del modelo es dividido en diferentes grupos de manera que a lo largo del entrenamiento se van excluyendo uno a uno. La ecuación de regresión obtenida se emplea para predecir el valor experimental de los grupos que se hayan ido excluyendo en el proceso obteniéndose así el valor de  $r^2_{cv}$ .

### Validación interna

La validación interna también se utilizó para evaluar la robustez del modelo. Mediante este procedimiento, la red elimina de forma aleatoria un número reducido de compuestos, los cuales no van a ser tenidos en cuenta en el proceso de aprendizaje sino que la red va a predecir su valor de salida a medida que transcurre dicho entrenamiento.

### Validación externa

Es el paso clave para evaluar la capacidad predictiva del modelo. Consistió en utilizar un conjunto con nuevas estructuras (conjunto de validación o predicción) desconocidas por la red a fin de predecir sus actividades biológicas.

### Índices estadísticos

Se utilizó el índice FC (Fracción correcta) que representa el porcentaje de casos correctamente clasificados, el índice FAR (Índice de Falsa alarma) que constituye el porcentaje de compuestos inactivos mal clasificados y el índice POD (Probabilidad de detección) que representa la fracción de casos activos bien clasificados. Para obtener estos índices se aplican las siguientes fórmulas:

$$FC = \frac{(TA + TM + TI)}{N^{\circ} \text{ total}} \times 100$$

$$FAR = \frac{FA}{(TA + TM + TI)} \times 100$$

$$POD = \frac{(TA + TM)}{(TA + TM + FI)} \times 100$$

Donde TA (*true actives*) es el número de compuestos activos correctamente clasificados, TM (*true moderates*) es el número de compuestos moderados correctamente clasificados, TI (*true inactives*) es el número de compuestos inactivos correctamente clasificados, FA (*false actives*) es el número de compuestos activos mal clasificados y FI (*false inactives*) es el número de compuestos inactivos mal clasificados<sup>190</sup>.

### 3.2. Cribado virtual. Identificación de nuevos inhibidores de PDE7

Las estructuras químicas fueron seleccionadas de la quimioteca de nuestro grupo de investigación. La representación de las estructuras se ha llevado a cabo con el programa *ChemDraw*® vs. 12.0. Una vez dibujadas las estructuras, se obtiene el código SMILES.

Con el fin de conocer la biodisponibilidad de un posible fármaco de forma teórica, se calcularon los descriptores definidos en las reglas de Lipinski (PM, logP y átomos dadores y aceptores de hidrogeno) para cada uno de los compuestos de la quimioteca. Para la obtención de los distintos parámetros fisicoquímicos, se empleó la plataforma bioinformática online Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/>). Aquellos compuestos químicos que no cumplieron la “regla de los cinco”, se descartaron para la siguiente etapa. Así, fueron seleccionados 648 compuestos. De éstos, solo 220 derivados atravesarían a priori la BHE tras el cálculo teórico del parámetro LogBB (Anexo 3). A partir del código SMILES, se obtuvieron las matrices numéricas mediante el programa *CODES*® v1.0. Las matrices numéricas obtenidas fueron reducidas a 4 parámetros, empleando los mismos valores utilizados para la reducción de dimensiones del training de la red neuronal **NNE3**.

Aquellos derivados que mostraron actividad predicha de carácter activo (Anexo 4), fueron seleccionados para su evaluación biológica.

### 3.3. Determinación de cavidades en la superficie de PDE7

El programa *Fpocket*® se encuentra disponible en <http://fpocket.sourceforge.net> con el fin de encontrar los posibles sitios de unión en PDE7A. Los resultados obtenidos fueron contrastados con otros programas de búsqueda de cavidades (*Metapocket*® vs. 2.0, *Hpocket*®), observándose similares resultados. Las estructuras cristalográficas utilizadas para el estudio teórico se obtuvieron de *Protein Data Bank* ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)). Así, se emplearon únicamente aquellas estructuras cristalizadas existentes en el momento del estudio:

PDE7: PDE7A (1ZKL y 3G3N) y PDE7B (modelo de homología).

PDE4: PDE4B (1F0J,1R06, 1R09, 1ROR, 1TB5,1XLX, 1XLZ, 1XM4, 1XM6, 1XMU, 1XMY, 1XN0, 1XOS, 1XOT, 1Y2H, 1Y2J, 2CHM, 2QYL, 3D3P, 3FRG, 3G45, 3GWT, 3HC8, 3HDZ, 3HMV, 3KKT, 3LY2, 3O0J, 3O56 y 3O57), PDE4D (1MKD, 1OYN, 1PTW, 1Q9M, 1TB7, 1TBB, 1XOM, 1XON, 1XOQ, 1XOR, 1Y2B, 1Y2B, 1Y2C, 1Y2D, 1Y2E, 1Y2K, 1ZKN, 2FM0, 2FM5, 2PW3, 2QYN, 3G4G, 3G4I, 3G4K, 3G4L, 3G58, 3IAD, 3IAK, 3K4S, 3SL3, 3SL4, 3SL5, 3SL6,3SL8 Y 3V9B).

PDE3B: 1SO2 y 1SOJ.

Tanto los ligandos presentes en la estructura cristalizada de la enzima como las moléculas de agua fueron eliminados utilizando el programa *Pymol*®, mientras que se mantuvieron las aguas de coordinación y los metales (Zn y Mg) presentes en la estructura. Como datos de entrada se emplearon los ficheros de PDB modificados. Tras el análisis con *Fpocket*®, éste devuelve un conjunto de esferas encontradas para cada estructura. Todas las estructuras fueron analizadas visualmente con el objetivo de determinar aquellas cavidades comunes en todas las estructuras de PDEs. Estos resultados se confirmaron al usar la aplicación *Metapocket*® y *Hpocket*®. Posteriormente, las estructuras cristalinas se superpusieron con los resultados obtenidos en *Fpocket*.

### **3.4. Estudios de docking**

En el modelo de unión a PDE7A se empleó únicamente la cadena A de la proteína que fue minimizada mediante el programa *Sybyl*® vs 8.0. La estructura proteica empleada fue modificada mediante la adición de hidrógenos (minimizados mediante campos de fuerza MMFF94 hasta alcanzar el gradiente 0.01 Kcal/mol) y posterior adición de residuos neutros en el dominio terminal. Así mismo, los ligandos fueron también minimizados utilizando el campo de fuerza MMFF94 hasta alcanzar el gradiente 0.01 Kcal/mol. El estudio de *docking* global fue llevado a cabo empleando *Autodock*® vs. 4.2, usando los parámetros que vienen por defecto, excepto en los señalados a continuación:

Tamaño de población: 100

Número máximo de evaluaciones: 3.000.000

Número de *GA runs*: 100

La malla con un tamaño de 126 x 126 x 126 y con un espaciado de 0.475 Å se estableció en el centro de la proteína. Por otra parte, el estudio de *docking* focalizado fue llevado a cabo mediante el módulo *Surflex-Dock* de *Sybyl*® vs 8.0, generándose un protomol automático y empleándose hasta 20 conformaciones distintas de los ligandos para generar mayor flexibilidad. Sólo se seleccionaron aquellas soluciones que mediante examinación visual, guardaran una buena relación estructura-actividad.

### **3.5. Análisis secuencial y estructural de PDE7**

Las diferentes secuencias de PDEs utilizadas fueron obtenidas de la plataforma *Swiss Prot* (web [www.expasy.org](http://www.expasy.org)). El alineamiento secuencial fue llevado a cabo

mediante el empleo del programa *Clustalx*® (formato Fasta), y los ajustes manuales de los alineamientos se realizaron mediante el programa *Seaview*. El alineamiento estructural fue realizado en *Sybyl*® en la plataforma Silicon Graphics. Las diferentes estructuras cristalográficas (1ZKL, 2OUP, 1ZKN, 1Y2H) utilizadas en el alineamiento se obtuvieron del PDB y fueron estudiadas mediante visualización empleando el programa *PyMol*.

**TABLAS**



**Tabla A.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados de quinazolina **33-36**.

Compuesto				H-5	H-6	H-7	H-8	H-ar
<b>33</b>	X=CH	Y=CH	R <sup>1</sup> =8-Cl R <sup>2</sup> =2,6-diF	7.99 (t, J = 1.4 Hz)	7.66-7.56 (m)	7.97 (t, J = 1.3 Hz)	-	7.33 (t, J = 8.2 Hz), 7.40 (t, J = 7.8 Hz),
<b>34</b>	X=CH	Y=CH	R <sup>1</sup> =8-Cl R <sup>2</sup> =2-Br	8.06 (d, J = 7.9 Hz)	7.30-7.28 (m)	7.74 (d, J = 1.4 Hz)	-	7.71 (d, J = 1.4 Hz), 7.46 (t, J = 7.6 Hz), 7.35 (d, J = 7.6 Hz), 7.31 (d, J = 1.6 Hz)
<b>35</b>	X=CH	Y=N	R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =H	8.34 (d, J = 7.7 Hz)		8.76 (d, J = 4.6 Hz)	-	7.50-7.29 (m)
<b>36</b>	X=N	Y=CH	R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =H	7.81 (d, J = 5.1 Hz)	8.82 (s)	-	8.52 (d, J = 5.1 Hz)	7.42-7.40 (m)

**Tabla B.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>13</sup>C-RMN de los derivados de quinazolina **33-36**.

Compuesto				C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-ar
<b>33</b>	X=CH	Y=CH	R <sup>1</sup> =8-Cl R <sup>2</sup> =2,6-diF	176.0	158.7	126.4	120.0	137.6	127.8	160.2 (d, J = 250.5 Hz), 137.4 (8a), 132.5 (t, J = 10.0 Hz), 117.6 (4a), 113.3 (d, J = 22.8 Hz)
<b>34</b>	X=CH	Y=CH	R <sup>1</sup> =8-Cl R <sup>2</sup> =2-Br	175.9	158.8	128.2	125.4	135.8	119.2	138.0, 136.1 (8a), 134.1, 131.1, 130.6, 129.2, 123.0, 117.7 (4a)
<b>35</b>	X=CH	Y=N	R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =H	177.8	160.4	112.3	155.6	154.3	-	151.0, 139.5, 137.3, 129.3, 128.5, 120.7
<b>36</b>	X=N	Y=CH	R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =H	177.2	159.4	119.7	144.5	-	139.3	135.2, 129.3, 129.2, 128.6, 122.1

**Tabla C.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados de quinazolina **38-56**.

Compuesto	R <sup>3</sup>	R <sup>3</sup>	H-5	H-6	H-7	H-8	H-ar
<b>37</b> R <sup>1</sup> =8-Cl R <sup>2</sup> =2,6-diF	Me	2.66 (s, CH <sub>3</sub> )	8.18 (d, J = 8.1 Hz)		7.83 (d, J = 7.8 Hz)	-	7.13 (d, J=8.5 Hz), 7.34 (d, J = 8.1 Hz), 7.56-7.55 (m)
<b>38</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	Et	3.21 (d, J = 7.2 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.39 (d, J = 7.4 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	8.28 (d, J = 7.9 Hz)				7.80-7.34 (m)
<b>39</b> R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =2,6-diF	Et	3.18 (d, J = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.29 (d, J = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	8.10 (d, J = 7.9 Hz)		7.89 (t, J = 7.2 Hz)	7.65 (d, J = 7.1 Hz)	7.79-7.72 (m), 7.53-7.44 (m)
<b>40</b> R <sup>1</sup> =8-Cl R <sup>2</sup> =2,6-diF	Et	3.23 (d, J = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.34 (d, J = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	8.07 (d, J = 7.8 Hz)		8.05 (d, J = 7.5 Hz)	-	7.76-7.43 (m)
<b>41</b> R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =4-F	Et	3.10 (d, J = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.36 (d, J = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	8.04 (d, J = 7.9 Hz)				7.60-7.36 (m), 7.75-7.85 (m)
<b>42</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	iBu	3.05 (d, J = 6.7 Hz, SCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) 1.93-1.97 (m, SCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 0.92 (d, J = 6.1 Hz, SCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	8.05 (d, J = 7.9 Hz)		7.81 (t, J = 8.4 Hz)		7.60-7.52 (m), 7.47-7.42 (m)
<b>43</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	Bn	4.42 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	8.28 (d, J = 7.9 Hz)		7.80 (t, J = 8.2 Hz)	7.72 (d, J = 8.2 Hz)	7.57-7.33 (m)
<b>44</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	Bu	3.12 (t, J = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.63-1.31 (m, SCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, SCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	8.06 (d, J = 7.9 Hz)		7.81 (t, J = 8.4 Hz)		7.59-7.52 (m), 7.47-7.41 (m)
<b>45</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.24 (s, SCH <sub>2</sub> ), 1.06 (s, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	8.23 (d, J = 7.9 Hz)				7.75-7.30 (m)
<b>46<sup>a</sup></b> R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =3-OMe	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.22 (s, SCH <sub>2</sub> ), 0.94 (s, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	8.06 (d, J = 7.9 Hz)		7.61 (t, J = 8.1 Hz)	7.82 (t, J = 8.7 Hz)	7.50-7.44 (m), 7.14-6.99 (m)
<b>47<sup>b</sup></b> R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =4-OMe	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.20 (s, SCH <sub>2</sub> ), 0.94 (s, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	8.06 (d, J = 7.9 Hz)	7.45 (t, J = 9.8 Hz)	7.81 (t, J = 9.8 Hz)	7.60 (t, J = 7.6 Hz)	7.36-7.33 (m), 7.11-7.07 (m)
<b>48</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	CH <sub>2</sub> - ciclohexilo	3.08 (d, J = 6.7 Hz, SCH <sub>2</sub> ), 1.24-0.93 (m, chexilo), 1.85-1.60 (m, chexilo)	8.23 (d, J = 7.9 Hz)		7.73 (t, J = 8.2 Hz)	7.61 (d, J = 8.2 Hz)	7.52-7.50 (m), 7.36 (t, J = 8.0 Hz), 7.32-7.28 (m)
<b>49<sup>c</sup></b> R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =4-OMe	CH <sub>2</sub> - ciclohexilo	3.05 (d, J = 6.7 Hz, SCH <sub>2</sub> ), 1.76-1.56 (m, chexilo), 1.18-0.93 (m, chexilo)	8.06 (d, J = 7.9 Hz)	7.45 (t, J = 8.1 Hz)	7.81 (t, J = 7.2 Hz)	7.59 (d, J = 7.9 Hz)	7.35-7.33 (m), 7.09-7.07 (m)
<b>50<sup>d</sup></b> R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =3-OMe	CH <sub>2</sub> - ciclopropilo	3.12 (d, J = 7.2 Hz, SCH <sub>2</sub> ), 1.14-1.08 (m, cpropilo), 0.52-0.28 (m, cpropilo)	8.07 (d, J = 7.8 Hz)		7.83 (t, J = 7.1 Hz)	7.61 (d, J = 8.1 Hz)	7.51-7.44 (m), 7.14-7.00 (m)
<b>53<sup>e</sup></b> R <sup>1</sup> =8-Me R <sup>2</sup> =2,6-diF	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.34 (s, SCH <sub>2</sub> ), 0.95 (s, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	7.94 (d, J = 7.9 Hz)				7.49-7.40 (m), 7.81-7.73 (m)

<sup>a</sup>OCH<sub>3</sub>: 3.79 (s), <sup>b</sup>OCH<sub>3</sub>: 3.85 (s), <sup>c</sup>OCH<sub>3</sub>: 3.84 (s), <sup>d</sup>OCH<sub>3</sub>: 3.80 (s), <sup>e</sup>CH<sub>3</sub>: 2.60 (s)

**Tabla C cont.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados de quinazolina **38-56**.

Compuesto	R <sup>3</sup>	R <sup>3</sup>	H-5	H-6	H-7	H-8	H-ar
<b>54</b> R <sup>1</sup> = H R <sup>2</sup> =2-Br	CH <sub>2</sub> - ciclohexilo	3.16 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, SCH <sub>2</sub> ), 1.74-1.52 (m, chexilo), 1.14-0.89 (m, chexilo)	8.05 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz)				7.85-7.79 (m), 7.64-7.54 (m), 7.50-7.43 (m)
<b>55</b> R <sup>1</sup> = H R <sup>2</sup> =2-Br	CH <sub>2</sub> - ciclopropilo	3.10 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, SCH <sub>2</sub> ), 1.13-1.05 (m, cpropilo), 0.48-0.25 (m, cpropilo)	8.06 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz)				7.86-7.80 (m), 7.65-7.56 (m), 7.51-7.43 (m)
<b>56<sup>f</sup></b> R <sup>1</sup> = 8-Me R <sup>2</sup> =2,6-diF	CH <sub>2</sub> - ciclopropilo	3.21 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> ), 1.29-1.19 (m, cpropilo), 0.56-0.29 (m, cpropilo)	7.94 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz)			-	7.80-7.73 (m), 7.48-7.40 (m)

<sup>f</sup>CH<sub>3</sub>: 2.58 (s).

**Tabla D.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>13</sup>C-RMN de los derivados de quinazolina **38-56**.

Compuesto	R <sup>3</sup>	R <sup>3</sup>	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	C-4a	C-ar
<b>37</b> R <sup>1</sup> =8-Cl R <sup>2</sup> =2,6-diF	Me	14.1 (CH <sub>3</sub> )	159.1	158.5	125.9	135.8	129.8	143.3	147.5	127.0	159.7 (dd, J = 2.52.7, 3.8Hz), 133.7 (t, J = 10.1 Hz), 119.8, 113.0 (dd, J = 19.5, 3.3 Hz)
<b>38</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	Et	27.4 (SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 14.2 (SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	157.8	162.3	127.6	126.6	134.9	126.6	148.4	115.5	136.5, 130.3, 130.0, 129.6
<b>39</b> R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =2,6-diF	Et	26.6(SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 14.6 (SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	157.5	160.1	127.4	127.1	136.6	134.1	147.8	113.6	160.4 (d, J = 246.8 Hz), 118.9, 113.4
<b>40</b> R <sup>1</sup> =8-Cl, R <sup>2</sup> =2,6-diF	Et	26.9 (SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 14.3 (SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	158.0	161.5	127.2	126.5	135.5	125.7	148.0	117.1	163.1 (d, J = 246.8 Hz), 132.5, 120.2, 116.9
<b>41</b> R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =4-F	Et	26.9 (SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 14.5 (SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	158.0	161.5	133.0	127.2	135.5	126.5	148.0	116.9	163.1 (d, J = 246.8 Hz), 132.5, 125.7, 120.2, 117.1
<b>42</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	iBu	130.1 (SCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 28.2 (SCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 22.5 (SCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	157.8	161.1	126.9	126.4	135.2	126.2	147.6	119.9	136.4, 129.7
<b>43</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	Bn	37.5 (SCH <sub>2</sub> -Ph)	157.5	162.2	127.9	126.6	135.0	126.3	148.2	120.4	136.8, 136.2, 130.3, 130.1, 129.8, 129.6, 128.9, 127.7,
<b>44</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	Bu	31.0 (SCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 30.3 (SCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 21.4 (SCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 13.5 (SCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ).	157.4	160.8	126.0	129.7	134.9	125.8	147.3	119.5	136.1, 129.4, 126.5
<b>45</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	46.2 (SCH <sub>2</sub> ), 32.3 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 29.3	158.3	162.4	127.2	126.1	134.9	125.6	148.1	116.2	136.6, 129.7, 129.6, 129.2,
<b>46<sup>a</sup></b> R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =3-OMe	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	45.3 (SCH <sub>2</sub> ), 32.3 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 29.3 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	160.6	161.4	127.2	126.6	135.5	126.5	147.7	115.9	158.1, 137.8, 130.8, 122.1, 120.2, 115.8
<b>47<sup>b</sup></b> R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =4-OMe	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	45.4 (SCH <sub>2</sub> ), 32.1 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 29.2 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	160.6	161.7	127.2	126.6	135.4	126.4	147.6	120.1	158.8, 131.2, 129.2, 115.4
<b>48</b> R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H	CH <sub>2</sub> -ciclohexilo	39.5 (SCH <sub>2</sub> ), 37.2 (chexilo), 32.7 (chexilo), 25.9 (chexilo), 26.3 (chexilo)	157.9	161.9	127.2	126.2	134.5	125.6	147.8	119.6	136.1, 129.8, 129.6, 129.2 ,
<b>49<sup>c</sup></b> R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =4-OMe	CH <sub>2</sub> -ciclohexilo	39.2 (SCH <sub>2</sub> ), 37.3 (chexilo), 32.7 (chexilo), 26.1 (chexilo), 26.3 (chexilo)	160.5	161.5	127.2	126.6	135.4	126.3	147.9	115.2	158.8, 131.2, 129.1, 120.2
<b>50<sup>d</sup></b> R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =3-OMe	CH <sub>2</sub> -ciclopropilo	38.3 (SCH <sub>2</sub> ), 9.8 (cpropilo), 6.2 (cpropilo)	160.4	160.9	126.8	126.3	135.3	126.2	147.7	115.6	137.6, 130.5, 126.8, 121.8, 119.8

<sup>a</sup>OCH<sub>3</sub>: 56.1, <sup>b</sup>OCH<sub>3</sub>: 56.1, <sup>c</sup>OCH<sub>3</sub>: 38.8, <sup>d</sup>OCH<sub>3</sub>: 55.9

**Tabla D cont.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados de quinazolina **38-56**.

<b>53<sup>e</sup></b> $\text{R}^1 = 8\text{-Me}$ , $\text{R}^2 = 2,6\text{-diF}$	$\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$	44.9 (SCH <sub>2</sub> ), 32.6 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 28.9 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	156.0	160.7	126.9	135.1	136.9	125.1	145.9	113.6	158.8 (d, $J = 252.2$ Hz), 134.1, 118.8, 113.4
<b>54</b> $\text{R}^1 = \text{H}$ , $\text{R}^2 = 2\text{-Br}$	$\text{CH}_2\text{-ciclohexilo}$	37.5 (SCH <sub>2</sub> ), 32.7 (chexilo), 32.6 (chexilo), 26.1 (chexilo), 26.4 (chexilo)	157.5	160.6	129.7	127.3	135.7	126.7	147.9	119.8	135.9, 134.0, 132.6, 123.8
<b>55</b> $\text{R}^1 = \text{H}$ , $\text{R}^2 = 2\text{-Br}$	$\text{CH}_2\text{-ciclopropilo}$	38.1 (SCH <sub>2</sub> ), 10.5 (cpropilo), 6.3 (cpropilo)	157.6	160.2	127.3	126.7	135.9	123.8	147.9	117.3	136.9, 135.7, 134.0, 132.3, 129.7, 119.8,
<b>56<sup>f</sup></b> $\text{R}^1 = 8\text{-Me}$ $\text{R}^2 = 2,6\text{-diF}$	$\text{CH}_2\text{-ciclopropilo}$	38.3 (SCH <sub>2</sub> ), 10.5 (cpropilo), 6.4 (cpropilo)	156.2	160.3	126.5	135.2	136.8	125.6	146.2	133.6	158.8 (d, $J = 252.5$ Hz), 134.5, 118.8, 113.5

<sup>e</sup>CH<sub>3</sub>: 17.6, <sup>f</sup>CH<sub>3</sub>: 17.6.

**Tabla E.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$ -RMN de los derivados del anillo de furano **60-65**.

Compuesto	$\text{R}^1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$	$\text{R}^1 = \text{OCH}_3$	$\text{CH}_2$	H-furil	H-ar
<b>60</b> $\text{R}^2=2,4\text{-diCl}$	-	3.90 (s)	5.36 (s)	7.11 (d, $J = 3.4$ Hz), 6.62 (d, $J = 3.4$ Hz)	7.82 (d, $J = 8.6$ Hz), 7.46 (d, $J = 2.1$ Hz), 7.31-7.29 (m), 7.28 (d, $J = 2.1$ Hz)
<b>61</b> $\text{R}^2=4\text{-NO}_2$	-	3.83 (s)	5.31 (s)	6.80 (d, $J = 3.4$ Hz), 6.58 (d, $J = 3.4$ Hz)	8.18 (d, $J = 8.8$ Hz), 7.75 (d, $J = 9.0$ Hz), 7.20-7.18 (m)
<b>62</b> $\text{R}^2=2,4\text{-diCl}$	4.24-4.15 (m, $\text{CH}_2$ ), 1.48-1.40 (m, $\text{CH}_3$ )	-	5.49 (s)	6.87 (d, $J = 3.4$ Hz), 6.60 (d, $J = 3.4$ Hz)	8.10 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.58-7.41 (m)
<b>63</b> $\text{R}^2=4\text{-NO}_2$	4.13-4.04 (m, $\text{CH}_2$ ), 1.36 (t, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3$ ), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_3$ )	-	5.33 (s)	6.84 (d, $J = 3.4$ Hz), 6.61 (d, $J = 3.4$ Hz)	8.23 (d, $J = 9.0$ Hz), 7.78 (d, $J = 9.0$ Hz), 7.25-7.22 (m)
<b>64<sup>a</sup></b> $\text{R}^2=4\text{-CH}_3$	4.16-4.09 (m, $\text{CH}_2$ ), 1.43 (t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_3$ ), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3$ )	-	5.32 (s)	6.56 (d, $J = 3.3$ Hz), 6.54 (d, $J = 3.3$ Hz)	7.58 (d, $J = 8.3$ Hz), 7.28, 7.19 (d, $J = 8.5$ Hz)
<b>65</b> $\text{R}^2=\text{H}$	4.15-4.10 (m, $\text{CH}_2$ ), 1.43 (t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_3$ ), 1.35 (t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_3$ )	-	5.33 (s)	6.64 (d, $J = 3.3$ Hz), 6.56 (d, $J = 3.3$ Hz)	7.70-7.29 (m)

<sup>a</sup>:  $\text{CH}_3$ : 2.36 (s)

**Tabla F.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados del anillo de furano **60-65**.

Compuesto	$\text{R}^1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$	$\text{R}^1 = \text{OCH}_3$	$\text{CH}_2$	CO	C-furil	C-ar
<b>60</b> $\text{R}^2=2,4\text{-diCl}$	-	61.3	59.0	166.3	150.3, 142.8, 113.5, 112.5	153.4, 149.8, 133.8, 131.1, 130.9, 129.1, 127.9, 127.7, 125.1, 107.4
<b>61</b> $\text{R}^2=4\text{-NO}_2$	-	61.3, 56.7	58.9	166.2	152.6, 151.7, 113.9, 110.2	153.4, 147.0, 142.9, 136.4, 125.0, 124.7, 124.5, 107.4
<b>62</b> $\text{R}^2=2,4\text{-diCl}$	69.7, 65.1 ( $\text{CH}_2$ ), 16.1, 15.2 ( $\text{CH}_3$ )	-	60.4	165.9	153.1, 144.8, 109.6, 109.0	153.6, 143.9, 129.3, 129.2, 125.2, 120.9, 119.2, 108.8
<b>63</b> $\text{R}^2=4\text{-NO}_2$	69.4, 65.3 ( $\text{CH}_2$ ), 15.9, 15.2 ( $\text{CH}_3$ )	-	58.8	166.3	152.5, 151.9, 113.8, 110.2	153.1, 147.1, 136.5, 130.2, 124.7, 109.1
<b>64<sup>a</sup></b> $\text{R}^2=4\text{-CH}_3$	69.4, 65.2 ( $\text{CH}_2$ ), 15.9, 15.3 ( $\text{CH}_3$ )	-	59.2	166.5	155.2, 149.1, 109.1, 105.6	153.0, 137.9, 130.1, 129.7, 125.0, 113.6
<b>65</b> $\text{R}^2=\text{H}$	69.4, 65.2 ( $\text{CH}_2$ ), 16.0, 15.2 ( $\text{CH}_3$ )	-	59.2	166.5	153.0, 149.1, 108.8, 106.3	149.5, 129.2, 125.7, 124.3, 124.4, 113.7

<sup>a</sup>:  $\text{CH}_3$ : 31.3

**Tabla G.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$ -RMN de los derivados del anillo de furano **69-88**.

Compuesto	$\text{R}^1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$	$\text{R}^1 = \text{OCH}_3$	$\text{CH}_2$	H-furil	H-ar
<b>69</b> $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.93 (s), 3.85 (s)	5.29 (s)	7.28 (d, $J = 4.0$ Hz), 6.74 (d, $J = 3.5$ Hz)	7.79 (d, $J = 6.9$ Hz), 7.45-7.35 (m)
<b>70</b> $\text{R}^2 = 2\text{-CF}_3$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.89 (s), 3.86 (s)	5.30 (s)	7.30 (d, $J = 4.0$ Hz), 6.79 (d, $J = 3.5$ Hz)	7.80 (d, $J = 8.0$ Hz), 7.68 (t, $J = 7.4$ Hz), 7.53 (t, $J = 7.8$ Hz), 6.69 (s)
<b>71</b> $\text{R}^2 = 2\text{-Cl}$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.86 (s), 3.83 (s)	5.27 (s)	7.28 (d, $J = 3.6$ Hz), 7.18 (d, $J = 3.6$ Hz)	7.96 (d, $J = 7.9$ Hz), 7.43 (d, $J = 7.4$ Hz), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz), 7.28-7.25 (m), 6.67
<b>72</b> $\text{R}^2 = 2,4\text{-diCl}$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.87 (s), 3.62 (s)	5.57 (s)	7.28 (d, $J = 3.7$ Hz), 7.18 (d, $J = 3.7$ Hz)	7.91 (d, $J = 8.6$ Hz), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz), 7.31 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz), 6.66 (s)
<b>73</b> $\text{R}^2 = 2\text{-Cl}, 5\text{-CF}_3$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.89 (s), 3.85 (s)	5.32 (s)	7.32 (d, $J = 3.7$ Hz), 7.28 (d, $J = 3.7$ Hz)	8.23 (s), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.52 (d, $J = 10.5$ Hz), 6.70 (s)
<b>74<sup>a</sup></b> $\text{R}^2 = 2\text{-NO}_2, 4\text{-CH}_3$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.89 (s), 3.85 (s)	5.27 (s)	6.66 (d, $J = 3.6$ Hz)	7.67 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.60 (s), 7.43 (d, $J = 7.9$ Hz), 7.27-7.25 (m),
<b>75</b> $\text{R}^2 = 2\text{-NO}_2, 4\text{-Cl}$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.88 (s), 3.84 (s)	5.27 (s)	6.70 (d, $J = 3.6$ Hz), 6.66 (d, $J = 3.6$ Hz)	7.78-7.25 (m)
<b>76</b> $\text{R}^2 = 3\text{-CF}_3$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.90 (s), 3.86 (s)	5.31 (s)	7.30 (d, $J = 3.6$ Hz), 6.85 (d, $J = 3.6$ Hz)	8.02, 7.96 (d, $J = 6.8$ Hz), 7.62-7.53 (m), 6.71 (s)
<b>77</b> $\text{R}^2 = 4\text{-NO}_2$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.93 (s), 3.86 (s)	5.30 (s)	7.31 (d, $J = 3.6$ Hz), 6.95 (d, $J = 3.6$ Hz)	7.52 (d, $J = 9.0$ Hz), 7.93 (d, $J = 9.0$ Hz), 6.69 (s)
<b>78<sup>b</sup></b> $\text{R}^2 = 4\text{-OCH}_3$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.89 (s), 3.85 (s)	5.85 (s)	7.18 (d, $J = 3.5$ Hz), 6.89 (d, $J = 3.5$ Hz)	8.29 (d, $J = 8.6$ Hz), 7.83 (s), 7.52 (d, $J = 8.7$ Hz)
<b>79<sup>c</sup></b> $\text{R}^2 = 4\text{-CH}_3$ $\text{X} = \text{O}$	-	3.92 (s), 3.85 (s)	5.50 (s)		7.67 (d, $J = 8.2$ Hz), 7.29-7.21 (m), 6.69 (s)
<b>80</b> $\text{R}^2 = \text{H}$ $\text{X} = \text{O}$	4.05-3.96 (m, $\text{CH}_2$ ), 1.45 (t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_3$ ), 1.33 (t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_3$ )	-	5.26 (s)	7.27 (d, $J = 3.6$ Hz) 6.72 (d, $J = 3.6$ Hz)	7.76 (d, $J = 7.0$ Hz), 7.44-7.35 (m), 6.64 (s)

<sup>a</sup>:  $\text{CH}_3$ : 2.47 (s), <sup>b</sup>:  $\text{OCH}_3$ : 3.85 (s), <sup>c</sup>:  $\text{CH}_3$ : 2.35 (s)

**Tabla G cont.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados del anillo de furano **69-88**.

Compuesto	R <sup>1</sup> = OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	H-furil	H-ar
<b>81</b> R <sup>2</sup> =2,4-diCl X=O	4.07-3.98 (m, CH <sub>2</sub> ), 1.43 (t, J = 7.0 Hz, CH <sub>3</sub> ), 1.35 (t, J = 7.0 Hz, CH <sub>3</sub> )	-	5.26 (s)	7.28 (d, J = 3.7 Hz), 7.20 (d, J = 3.7 Hz)	7.93 (d, J = 8.6 Hz), 7.48 (d, J = 2.0 Hz), 7.33 (d, J = 8.6, 2.1 Hz), 6.65 (s)
<b>82</b> R <sup>2</sup> =4-NO <sub>2</sub> X=O	4.45-4.38 (m, CH <sub>2</sub> ), 1.44 (t, J = 7.1 Hz, CH <sub>3</sub> ), 1.39 (t, J = 7.0 Hz, CH <sub>3</sub> )	-	5.42 (s)	7.32 (d, J = 3.6 Hz), 6.95 (d, J = 3.5 Hz)	8.30 (d, J = 8.9 Hz), 7.94 (d, J = 9.0 Hz), 6.67 (s)
<b>83<sup>d</sup></b> R <sup>2</sup> =4-CH <sub>3</sub> X=O	4.16-4.03 (m, CH <sub>2</sub> ), 1.46 (t, J = 7.0 Hz, CH <sub>3</sub> ), 1.33 (t, J = 7.0 Hz, CH <sub>3</sub> )	-	5.25 (s)	7.22 (d, J = 3.6 Hz), 6.69 (d, J = 3.6 Hz)	7.67 (d, J = 8.2 Hz), 7.25-7.21 (m), 6.66 (s)
<b>86</b> R <sup>2</sup> =3-CF <sub>3</sub> X=NH	-	3.87 (s), 3.89 (s)	4.60 (s)	7.29 (d, J = 3.5 Hz), 6.80 (d, J = 3.5 Hz)	7.83 (d, J = 7.8 Hz), 7.73 (d, J = 7.8 Hz), 7.64 (t, J = 7.8 Hz), 7.53 (t, J = 7.4 Hz), 6.61 (s)
<b>87<sup>e</sup></b> R <sup>2</sup> =2-NO <sub>2</sub> ,4-CH <sub>3</sub> X=NH	-	3.81 (s), 3.75 (s)	4.48 (s)	7.15 (d, J = 3.6 Hz), 6.65 (d, J = 3.6 Hz)	7.49 (d, J = 8.9 Hz), 7.34 (d, J = 8.4 Hz), 6.51 (s)
<b>88</b> R <sup>2</sup> =2-NO <sub>2</sub> ,4-Cl X=NH	-	3.87 (s), 3.83 (s)	4.55 (s)	7.23 (d, J = 3.6 Hz), 6.77 (d, J = 3.6 Hz)	7.73 (d, J = 8.1 Hz), 7.71-7.60 (m), 6.57 (s)

<sup>d</sup>: CH<sub>3</sub>: 2.38 (s), <sup>e</sup>: CH<sub>3</sub>: 2.39 (s)

**Tabla H.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados del anillo de furano **69-88**.

Compuesto	R <sup>1</sup> = OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CO	C-furil	C-ar
<b>69</b> R <sup>2</sup> =H X=O	-	61.2, 56.6	67.1	159.0	158.2, 143.9, 120.7, 107.3	153.7, 143.5, 138.5, 131.7, 129.8, 129.4, 129.2, 125.3, 106.1
<b>70<sup>a</sup></b> R <sup>2</sup> =2-CF <sub>3</sub> X=O	-	61.3, 56.5	67.2	158.8	154.5, 144.8, 120.2, 112.4	153.7, 138.5, 132.3, 131.6, 131.1, 129.5, 128.8, 127.3 (c, J = 17.3, 5.7 Hz), 106.1
<b>71</b> R <sup>2</sup> =2-Cl X=O	-	61.0, 56.4	66.9	158.7	154.1, 138.3, 120.1, 112.7	153.5, 143.5, 131.4, 131.3, 131.0, 129.8, 129.1, 128.2, 127.5, 105.8
<b>72</b> R <sup>2</sup> =2,4-diCl X=O	-	61.6, 56.6	67.3	158.8	153.8, 143.9, 120.3, 113.1	153.3, 132.0, 135.2, 131.0, 130.0, 127.9, 106.2
<b>73<sup>b</sup></b> R <sup>2</sup> =2-Cl,5-CF <sub>3</sub> X=O	-	61.3, 56.6	67.4	158.7	153.8, 138.5, 120.3, 114.1	152.6, 144.5, 134.9, 131.9, 131.5, 126.2 (c, J = 13.5 Hz), 122.0, 106.0
<b>74<sup>c</sup></b> R <sup>2</sup> =2-NO <sub>2</sub> ,4-CH <sub>3</sub> X=O	-	61.2, 56.6	67.2	158.6	153.8, 145.0, 120.2, 111.3	152.6, 148.3, 141.2, 138.5, 133.3, 131.5, 130.1, 124.9, 120.9, 106.0
<b>75</b> R <sup>2</sup> =2-NO <sub>2</sub> ,4-Cl X=O	-	61.3, 56.6	67.4	158.5	151.1, 145.6, 120.2, 112.2	153.8, 148.4, 138.5, 136.1, 132.8, 131.4, 131.2, 124.9, 122.0, 124.8, 106.0
<b>76<sup>d</sup></b> R <sup>2</sup> =3-CF <sub>3</sub> X=O	-	61.2, 56.6	67.3	158.8	156.4, 144.6, 120.6, 108.5	153.9, 138.5, 132.2, 131.5 (c, J = 32.7 Hz), 130.6, 130.0, 125.8, 122.0 (c, J = 2.9 Hz), 106.1
<b>77</b> R <sup>2</sup> =4-NO <sub>2</sub> X=O	-	61.3, 56.6	67.5	158.6	155.4, 147.9, 120.6, 110.5	153.8, 145.6, 143.2, 135.4, 131.4, 125.7, 124.8, 106.3
<b>78<sup>e</sup></b> R <sup>2</sup> =4-OCH <sub>3</sub> X=O	-	61.3, 56.6	66.9	160.7	158.4, 143.3, 122.0, 105.8	159.1, 153.7, 131.9, 126.9, 122.8, 114.7, 106.0
<b>79<sup>f</sup></b> R <sup>2</sup> =4-CH <sub>3</sub> X=O	-	61.2, 56.5	67.0	159.0	158.5, 143.5, 120.8, 106.6	153.7, 139.6, 139.0, 131.8, 129.9, 127.2, 125.5, 106.0
<b>80</b> R <sup>2</sup> =H X=O	69.3, 67.1 (CH <sub>2</sub> ), 16.0, 15.3 (CH <sub>3</sub> )	-	69.3	159.0	158.1, 143.9, 120.7, 107.7	153.4, 138.5, 131.3, 129.9, 129.4, 129.2, 125.3, 107.3

<sup>a</sup>: CF<sub>3</sub>: 124.1 (d, J = 273.4 Hz), <sup>b</sup>: CF<sub>3</sub>: 125.7 (d, J = 272.5 Hz), <sup>c</sup>: CH<sub>3</sub>: 21.5, <sup>d</sup>: CF<sub>3</sub>: 123.9 (d, J = 272.5 Hz), <sup>e</sup>: OCH<sub>3</sub>: 55.8, <sup>f</sup>: CH<sub>3</sub>: 21.8

**Tabla H cont.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados del anillo de furano **69-88**.

Compuesto	$\text{R}^1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$	$\text{R}^1 = \text{OCH}_3$	$\text{CH}_2$	$\text{CO}$	<b>C-furil</b>	<b>C-ar</b>
<b>81</b> $\text{R}^2=2,4\text{-diCl}$ $\text{X}=\text{O}$	67.4, 65.1 ( $\text{CH}_2$ ), 15.6, 14.9 ( $\text{CH}_3$ )	-	69.3	158.8	153.4, 144.0, 120.2, 113.1	153.2, 138.5, 135.2, 132.0, 131.0, 130.0, 127.9, 127.0, 107.7
<b>82</b> $\text{R}^2=4\text{-NO}_2$ $\text{X}=\text{O}$	67.6, 65.2 ( $\text{CH}_2$ ), 16.0, 15.4 ( $\text{CH}_3$ )	-	69.2	158.7	155.3, 145.7, 125.7, 110.6	153.5, 147.9, 138.7, 135.4, 130.8, 124.7, 107.9, 102.0
<b>83<sup>g</sup></b> $\text{R}^2=4\text{-CH}_3$ $\text{X}=\text{O}$	67.0, 65.1 ( $\text{CH}_2$ ), 16.0, 15.3 ( $\text{CH}_3$ )	-	69.2	159.1	152.5, 143.6, 120.8, 107.6	153.4, 139.5, 138.4, 131.3, 129.9, 125.0, 106.6
<b>86<sup>h</sup></b> $\text{R}^2=3\text{-CF}_3$ $\text{X}=\text{NH}$	-	61.3, 56.5	43.9	158.5	152.7, 148.2, 116.4, 112.2	153.9, 137.0, 134.0, 132.4, 130.8, 129.4, 128.9 (c, $J = 17.5$ Hz), 105.7
<b>87<sup>i</sup></b> $\text{R}^2=2\text{-NO}_2, 4\text{-CH}_3$ $\text{X}=\text{NH}$	-	61.3, 56.6	43.8	158.2	153.9, 148.2, 120.7, 111.5	150.6, 148.4, 141.1, 137.3, 133.9, 133.2, 125.2, 124.8, 116.6, 105.1
<b>88</b> $\text{R}^2=2\text{-NO}_2, 4\text{-Cl}$ $\text{X}=\text{NH}$	-	61.3, 56.6	43.9	158.0	154.0, 148.8, 121.8, 112.4	149.3, 148.2, 137.8, 135.8, 133.8, 132.7, 130.7, 124.6, 116.6, 105.1

<sup>g</sup>:  $\text{CH}_3$ : 21.8, <sup>h</sup>:  $\text{CF}_3$ : 127.2 (d,  $J = 273.5$  Hz), <sup>i</sup>:  $\text{CH}_3$ : 21.5

**Tabla I.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$ -RMN de los derivados de tiazol **91-96**.

Compuesto	A	B	H-ar
<b>91</b> (A1, B5)	4.23-4.16 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.50 (s, $\text{CH}_3$ ), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )	5.32 (s, CH-ar)	7.37-7.23 (m)
<b>92</b> (A1, B2)	4.19 (c, $J = 14.2, 7.1$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.51 (s, $\text{CH}_3$ ), 1.23 (t, $J = 7.0$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )	3.80 (s, $\text{CH}_2$ )	7.37-7.25 (m)
<b>93</b> (A1, B3)	4.32 (c, $J = 14.4, 7.2$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.69 (s, $\text{CH}_3$ ), 2.52-2.50 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )	7.17 (t, $J = 6.9$ Hz), 4.11 (s, $\text{OCH}_3$ )	8.31 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.59 (t, $J = 6.6$ Hz), 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz)
<b>94</b> (A2, B5)		5.41 (s)	7.98 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.74 (d, $J = 7.9$ Hz), 7.46-7.27 (m)
<b>95</b> (A2, B2)		3.79 (s, $\text{CH}_2$ )	7.84 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.74 (d, $J = 8.1$ Hz), 7.45 (t, $J = 7.9$ Hz), 7.37-7.31 (m), 7.29-7.08 (m)
<b>96</b> (A2, B3)		3.94 (s, $\text{OCH}_3$ )	8.00 (d, $J = 7.9$ Hz), 7.77-7.75 (m), 7.58 (t, $J = 8.4$ Hz), 7.44 (t, $J = 8.3$ Hz), 7.22 (t, $J = 8.5$ Hz), 7.10 (t, $J = 8.4$ Hz)

**Tabla J.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados de tiazol **91-96**.

Compuesto	A	CO	B
<b>91</b> (A1, B5)	170.9, 156.6 ( $\text{CO}_2$ ), 60.5 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 16.5 ( $\text{CH}_3$ ), 13.8 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )	162.5	139.1, 128.9, 128.7, 127.4, 57.5 (CH-ar)
<b>92</b> (A1, B2)	162.0, 159.6 ( $\text{CO}_2$ ), 114.6, 60.6 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 17.2 ( $\text{CH}_3$ ), 14.2 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )	169.7	156.3, 136.9, 132.9, 130.6, 129.5, 128.2, 126.9, 41.3 ( $\text{CH}_2$ -ar)
<b>93</b> (A1, B3)	162.5, 158.3 ( $\text{CO}_2$ ), 60.6 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 16.6 ( $\text{CH}_3$ ), 13.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )	162.5	156.7, 135.2, 132.1, 121.6, 119.2, 115.7, 112.6, 56.3 ( $\text{OCH}_3$ )
<b>94</b> (A2, B5)	158.1, 148.8, 131.8, 126.5, 122.1, 120.9	171.3	139.1, 128.9, 127.5, 56.7 (CH-ar)
<b>95</b> (A2, B2)	159.3, 148.1, 135.1, 126.9, 124.7, 122.1, 120.9	169.1	135.5, 132.4, 130.7, 129.9, 128.5, 127.8, 43.3 ( $\text{CH}_2$ -ar)
<b>96</b> (A2, B3)	157.8, 148.9, 134.3, 131.9, 130.8, 126.5, 122.3, 121.9, 121.0	165.3	158.4, 134.3, 130.8, 124.5, 121.4, 112.4, 56.7 ( $\text{OCH}_3$ )

**Tabla K.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados de tiazol **103-117**.

Compuesto	A	CH <sub>2</sub> -X	B	H-ar
<b>103</b> (A1, B1) X=NH	4.23-4.16 (m, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.53 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.25 (t, J = 7.0 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )			7.88-7.86 (m), 7.55-7.46 (m)
<b>104</b> (A1, B4) X=NH	4.31-4.28 (m, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.59 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	4.18 (d, J = 5.7 Hz)	3.69 (s, CH <sub>2</sub> )	7.35-7.31 (m)
<b>105</b> (A1, B5) X=NH	4.36-4.27 (m, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.50 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	4.22 (d, J = 5.5 Hz)		7.40-7.33 (m)
<b>106</b> (A1, B6) X=NH	4.28 (c, J = 14.5, 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.55 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.32 (t, J = 7.0 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	4.10 (d, J = 5.6 Hz)	4.64 (t, J = 7.8 Hz, CH-Ph), 3.11 (d, J = 7.8 Hz, CH <sub>2</sub> )	7.32-7.13 (m)
<b>107</b> (A2, B1) X=NH		4.23 (d, J = 5.6 Hz)		7.99-7.90 (m), 7.75 (d, J = 7.9 Hz), 7.59-7.42 (m), 7.30 (t, J = 8.0 Hz)
<b>108</b> (A2, B4) X=NH		4.05 (d, J = 5.7 Hz)	3.51 (s, CH <sub>2</sub> )	8.56 (t, J = 5.7 Hz), 7.96 (d, J = 8.0 Hz), 7.72 (d, J = 8.1 Hz), 7.41 (t, J = 8.4 Hz), 7.30-7.19 (m)
<b>109</b> (A2, B5) X=NH		4.19 (d, J = 5.6 Hz)	2.12 (s, CH <sub>2</sub> )	7.87 (d, J = 7.4 Hz), 7.76 (d, J = 8.6 Hz), 7.50-7.30 (m)
<b>110</b> (A2, B6) X=NH		3.94 (d, J = 5.5 Hz)	4.48 (t, J = 7.9 Hz, CH), 2.95 (d, J = 7.9 Hz, CH <sub>2</sub> )	8.38 (t, J = 5.4 Hz), 7.96 (d, J = 7.8 Hz), 7.72 (d, J = 8.0 Hz), 7.41 (t, J = 7.4 Hz), 7.30-7.12 (m)
<b>111</b> (A3, B1) X=NH	2.48 (s, CH <sub>3</sub> )	4.16 (d, J = 5.8 Hz)		7.91 (d, J = 7.3 Hz), 7.64 (d, J = 7.2 Hz), 7.55-7.34 (m)
<b>112</b> (A3, B4) X=NH	2.45 (s, CH <sub>3</sub> )	4.00 (d, J = 5.7 Hz)	3.52 (s, CH <sub>2</sub> )	8.47 (t, J = 5.7 Hz), 7.64 (d, J = 8.0 Hz), 7.43 (t, J = 7.4 Hz), 7.35-7.19 (m)
<b>113</b> (A3, B5) X=NH	2.51 (s, CH <sub>3</sub> )	4.26 (d, J = 5.5 Hz)	5.18 (s, CH-Ph)	7.66 (d, J = 7.6 Hz), 7.43-7.22 (m)
<b>114</b> (A3, B6) X=NH	2.46 (s, CH <sub>3</sub> )	3.90 (d, J = 5.8 Hz)	4.50 (t, J = 7.9 Hz, CH), 2.97 (d, J = 7.8 Hz, CH <sub>2</sub> )	8.33 (t, J = 5.6 Hz), 7.63 (d, J = 7.1 Hz), 7.44 (t, J = 7.2 Hz), 7.36-7.23 (m), 7.19-7.12 (m)
<b>115</b> (A1, B5) X=O	4.20 (c, J = 14.0, 7.2 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.54 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	4.88 (s)	5.37 (s, CH <sub>2</sub> )	7.37-7.23 (m)
<b>116</b> (A2, B5) X=O		4.92 (s)	5.38 (s, CH <sub>2</sub> )	7.97 (d, J = 8.4 Hz), 7.75 (d, J = 8.0 Hz), 7.46-7.26 (m)
<b>117</b> (A3, B5) X=O	2.46 (s, CH <sub>3</sub> )	4.86 (s)	5.37 (s, CH <sub>2</sub> )	7.63 (d, J = 7.6 Hz), 7.46-7.25 (m)

**Tabla L.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados de tiazol **103-117**.

Compuesto	A	Ca	CH <sub>2</sub> -X	Cb	B
<b>103</b> (A1, B1) X=NH	162.6, 160.2 (CO <sub>2</sub> ), 156.6, 114.9, 61.4 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 12.6 (CH <sub>3</sub> ), 14.8 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	169.7	43.5	167.3	134.2, 132.1, 128.9, 128.0
<b>104</b> (A1, B4) X=NH	162.7, 158.9 (CO <sub>2</sub> ), 156.5, 116.3, 61.0 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 14.4 (CH <sub>3</sub> ), 17.3 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	172.8	43.4	167.7	134.0, 129.6, 129.3, 127.7, 43.6 (CH <sub>2</sub> )
<b>105</b> (A1, B5) X=NH	169.4 (CO <sub>2</sub> ), 159.3, 117.3, 61.0 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 14.7 (CH <sub>3</sub> ), 17.6 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	173.9	41.3	163.0	138.9, 129.4, 129.3, 128.0, 59.2 (CH)
<b>106</b> (A1, B6) X=NH	168.3, 161.9 (CO <sub>2</sub> ), 156.2, 115.1, 60.2 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 16.3 (CH <sub>3</sub> ), 13.6 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	171.2	42.6	171.5	144.4, 128.2, 127.6, 126.0, 47.0 (CH-Ph), 41.6 (CH <sub>2</sub> )
<b>107</b> (A2, B1) X=NH	158.3, 149.2, 132.2, 126.6, 124.2, 122.4, 121.1	169.8	43.3	167.7	134.3, 132.1, 129.0, 128.0
<b>108</b> (A2, B4) X=NH	158.9, 158.4, 136.7, 127.1, 124.2, 122.3	171.5	42.6	169.8	149.1, 129.8, 128.8, 126.7, 42.9
<b>109</b> (A2, B5) X=NH	148.5, 137.9, 132.6, 126.8, 124.6, 121.9, 121.2	170.8	40.1	158.4	147.5, 129.5, 129.3, 128.4, 59.4 (CH)
<b>110</b> (A2, B6) X=NH	158.1, 149.0, 131.8, 126.7, 124.0, 122.2, 121.2	171.5	42.8	169.3	144.8, 129.0, 128.2, 126.6, 56.8 (CH <sub>2</sub> ), 41.4 (CH)
<b>111</b> (A3, B1) X=NH	153.7, 144.1, 133.7, 128.3, 127.3, 127.2, 121.0, 11.9 (CH <sub>3</sub> )	168.1	42.5	166.6	134.8, 131.4, 127.9, 127.9
<b>112</b> (A3, B4) X=NH	154.4, 144.7, 135.5, 128.8, 128.6, 127.0, 121.7, 12.5 (CH <sub>3</sub> )	171.4	42.6	168.7	136.8, 129.7, 129.0, 127.9, 40.2 (CH <sub>2</sub> )
<b>113</b> (A3, B5) X=NH	153.7, 144.6, 135.5, 128.4, 128.3, 127.3, 121.7, 11.5 (CH <sub>3</sub> )	167.9	42.4	172.2	140.4, 129.1, 128.5, 127.4, 57.4 (CH-ar)
<b>114</b> (A3, B6) X=NH	152.3, 128.7, 127.5, 126.4, 121.8, 12.2 (CH <sub>3</sub> )	171.1	42.3	168.3	144.9, 128.7, 128.3, 127.6, 46.8 (CH), 42.2 (CH <sub>2</sub> )
<b>115</b> (A1, B5) X=O	162.3 (CO <sub>2</sub> ), 159.1, 156.6, 114.6, 62.8 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 17.3 (CH <sub>3</sub> ), 14.3 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	166.8	60.8	171.9	139.0, 128.9, 128.8, 127.5, 55.7 (CH-Ph)
<b>116</b> (A2, B5) X=O	157.6, 148.8, 131.5, 126.5, 123.8, 122.0, 120.7	166.2	63.7	171.9	138.5, 128.9, 128.8, 127.8, 55.6 (CH-Ph)
<b>117</b> (A3, B5) X=O	153.6, 144.6, 128.7, 127.6, 127.5, 12.1 (CH <sub>3</sub> )	165.8	62.4	172.9	139.2, 128.9, 128.8, 128.3, 55.7 (CH-Ph)

**Tabla M.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados de tiazol **122-130**.

Compuesto	A	CH <sub>2</sub> -X	CH <sub>2</sub> -NH	B	H-ar
<b>122</b> (A1, B1) X=O	4.33-4.25 (m, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.58 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.33 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	4.98 (s)			8.03-7.99 (m), 7.59-7.46 (m)
<b>123</b> (A1, B4) X=O	4.20 (c, <i>J</i> = 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.51 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.24 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	4.81 (s)	3.98 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz)	3.47 (CH <sub>2</sub> -Ph)	7.26-7.15 (m)
<b>124</b> (A2, B1) X=O		5.01 (s)	4.34 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz)		8.04-7.94 (m), 7.77 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.58-7.43 (m), 7.33 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz)
<b>125</b> (A2, B4) X=O		4.96 (s)	4.16 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz)		7.96 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz), 7.76 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz), 7.46 (t, <i>J</i> = 8.3 Hz), 7.39-7.20
<b>126</b> (A3, B1) X=O	2.53 (s, CH <sub>3</sub> )	4.96 (s)	4.31 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz)		8.03 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.70 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz), 7.55-7.31 (m)
<b>127</b> (A3, B4) X=O	2.53 (s, CH <sub>3</sub> )	4.74 (s)	4.12 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz)	3.68 (CH <sub>2</sub> -Ph)	7.61-7.26 (m)
<b>128</b> (A1, B1) X=NH	4.23 (c, <i>J</i> = 14.2, 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.53 (s, CH <sub>3</sub> ), 1.25 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	3.94 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz)	4.02 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz)		7.89 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz), 7.55-7.46 (m)
<b>129</b> (A2, B1) X=NH		4.09 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz)	3.97 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz)		8.83 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 8.40 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz), 8.00-7.75 (m), 7.42-7.34 (m), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz)
<b>130</b> (A3, B1) X=NH	2.40 (s, CH <sub>3</sub> )	3.88 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz)	3.94 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz)		7.90 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz), 7.61 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz), 7.52-7.25 (m)

**Tabla N.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados de tiazol **122-130**.

Compuesto	A	Ca	CH <sub>2</sub> -X	Cb	CH <sub>2</sub> -NH	Cc	B
<b>122</b> (A1, B1) X=O	161.4, 158.3 (CO), 155.8, 59.9 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 15.8 (CH <sub>3</sub> ), 13.1 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	168.8	61.5	167.0	40.9	165.5	133.0, 131.1, 127.8, 126.8
<b>123</b> (A1, B4) X=O	162.5 (CO <sub>2</sub> ), 156.8, 115.2, 61.3 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 17.7 (CH <sub>3</sub> ), 14.8 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	171.4	62.6	170.4	41.1	159.5	136.6, 129.7, 128.7, 42.5 (CH <sub>2</sub> -Ph)
<b>124</b> (A2, B1) X=O	152.4, 151.5, 128.9, 125.1, 122.6, 122.3	171.8	63.6	170.6	42.7	167.5	132.8, 129.7, 128.6, 127.4
<b>125</b> (A2, B4) X=O	157.3, 136.4, 126.3, 124.1, 121.6, 121.2	171.2	62.8	169.6	40.6	166.1	132.2, 129.4, 128.4, 126.7, 42.6 (CH <sub>2</sub> -Ph)
<b>126</b> (A3, B1) X=O	155.5, 144.3, 133.3, 128.9, 128.7, 128.6, 12.8	170.9	63.8	166.9	43.0	160.0	134.8, 133.2, 129.9, 129.7
<b>127</b> A3, B4 X=O	143.6, 143.5, 132.1, 129.1, 128.7, 127.8, 122.9, 12.7	172.8	62.8	168.8	41.7	166.9	134.7, 129.9, 129.4, 128.8, 43.8 (CH <sub>2</sub> -Ph)
<b>128</b> A1, B1 X=NH	162.1 (CO <sub>2</sub> ), 159.5, 156.2, 113.9, 60.5 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 17.0 (CH <sub>3</sub> ), 14.2 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	169.7	42.1	169.0	42.5	166.5	133.9, 131.2, 128.3, 127.4
<b>129</b> A2, B1 X=NH	157.9, 148.8, 131.7, 126.5, 123.9, 12.0, 120.7	169.9	42.5	169.3	42.9	166.8	134.2, 131.7, 128.5, 127.6
<b>130</b> A3, B1 X=NH	144.3, 136.5, 131.8, 128.8, 128.0, 120.1, 12.8 (CH <sub>3</sub> )	169.6	43.5	167.4	43.8	158.8	134.8, 131.9, 128.9, 128.6

**Tabla Ñ.** Desplazamientos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados intermedios **97-102** y **118-121**.

Compuesto		R	CH <sub>2</sub> -X	B	H-ar
<b>97</b>	(B5) R=Bn X=NH	5.12 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	3.94 (d, J = 5.7 Hz)	5.05 (d, J = 6.2 Hz, CH <sub>2</sub> )	7.34-7.28 (m)
<b>98</b>	(B6) R=Bn X=NH	5.06 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	3.80 (d, J = 5.8 Hz)	4.48 (t, J = 7.9 Hz, CH <sub>2</sub> -Ph), 2.91 (d, J = 7.8 Hz, CH <sub>2</sub> )	7.35-7.11 (m)
<b>99</b>	(B5) R=Bn X=O	5.19 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	4.77 (s)	5.25 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	7.37-7.21 (m)
<b>100</b>	(B5) R=H X=NH		3.88 (d, J = 5.6 Hz)	5.00 (s, CH-Ph)	7.30-7.10 (m)
<b>101</b>	(B6) R=H X=NH		3.84 (d, J = 5.6 Hz)	4.60 (t, J = 7.8 Hz, CH-Ph), 3.04 (d, J = 7.8 Hz, CH <sub>2</sub> )	7.35-7.13 (m)
<b>102</b>	(B5) R=H X=O		4.62 (s)	5.11 (s, CH-Ph)	7.31-7.14 (m)
<b>118</b>	(B1) R=Bn X=O	5.21 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	4.79 (s)	4.27 (d, J = 5.9 Hz, CH <sub>2</sub> -NH)	7.50-7.47 (m), 7.42-7.32, (m) 7.94 (d, J = 8.4 Hz), 7.56 (t, J = 7.2 Hz)
<b>119</b>	(B4) R=Bn X=O	5.20 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	4.73 (s)	4.06 (s, CH <sub>2</sub> -NH), 3.58 (s, CH <sub>2</sub> -Ph)	7.41-7.22 (m)
<b>120</b>	(B1) R=H X=O		4.70 (s)	4.25 (d, J = 5.8 Hz, CH <sub>2</sub> -NH)	7.87-7.85 (m), 7.57 (t, J = 7.4 Hz), 7.49-7.46 (m)
<b>121</b>	(B4) R=H X=O		4.65 (s)	4.06 (CH <sub>2</sub> -NH), 3.58 (CH <sub>2</sub> -Ph)	7.33-7.28 (m), 7.25-7.22 (m)

**Tabla O.** Desplazamientos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados intermedios **97-102** y **118-121**.

Compuesto		R	CH <sub>2</sub> -X	Ca	Cb	B
<b>97</b>	(B5) R=Bn X =NH	139.9, 128.8, 128.6, 128.3, 66.3 (CH <sub>2</sub> -Ph)	41.4	171.6	173.8	140.5, 128.9, 128.7, 127.2, 127.0, 56.62 (C <sub>H</sub> -Ph)
<b>98</b>	(B6) R=Bn X =NH	135.9, 128.4, 127.9, 127.5, 65.7 (CH <sub>2</sub> -Ph)	40.6	169.7	170.7	128.3, 128.0, 126.1, 46.4 (CH <sub>2</sub> ), 40.1 (C <sub>H</sub> -Ph)
<b>99</b>	(B5) R=Bn X =O	138.8, 128.7, 128.4, 127.1, 56.2 (CH-Ph)	61.2	167.4	171.1	135.6, 128.5, 128.2, 128.1, 66.5 (C <sub>H</sub> -Ph)
<b>100</b>	(B5) R=X X =NH		41.5	171.3	173.5	141.3, (140.2, 129.6, 129.4, 129.1, 128.9, 127.6, 127.4, 57.2 (C <sub>H</sub> -Ph)
<b>101</b>	(B6) R=H X =NH		41.6	171.4	171.5	145.7, 129.4, 128.6, 127.1, 47.9 (C <sub>H</sub> -Ph), 42.5 (CH <sub>2</sub> )
<b>102</b>	(B5) R=H X =O		60.7	168.1	171.4	138.7, 128.7, 128.4, 127.2, 56.0 (C <sub>H</sub> -Ph)
<b>118</b>	(B1) R=Bn X =O	133.8, 131.2, 128.4, 128.3, 40.7 (CH <sub>2</sub> -NH)	60.8	166.7	169.3	167.3 (CO), 135.6, 128.2, 128.2, 127.1, 66.0 (C <sub>H</sub> -Ph)
<b>119</b>	(B4) R=Bn X =O	135.6, 128.2, 128.1, 128.0, 42.1 (CH <sub>2</sub> -ar), 40.4 (CH <sub>2</sub> -NH)	60.6	167.1	169.4	170.2 (CO), 135.7, 129.2, 128.4, 126.5, 66.1 (C <sub>H</sub> -Ph)
<b>120</b>	(B1) R=H X =O		61.9	170.9	171.1	170.5 (CO), 134.9, 132.9, 129.6, 128.4, 41.9 (C <sub>H</sub> -NH)
<b>121</b>	(B4) R=H X =O		60.5	169.9	178.1	169.4 (CO), 135.2, 128.6, 127.9, 126.5, 42.1 (C <sub>H</sub> -Ph), 40.4 (C <sub>H</sub> -NH)



**ANEXOS**





**Anexo 1.** Inhibidores de PDE7 seleccionados para el desarrollo del modelo de RNAs.

Comp.	R	Código SMILES
I-1 <sup>193</sup>	-	<chem>CC1=C(C(OCC)=O)SC(NC2=NC(NC3ccc(OC)c(OC)c3)=C4C(N=CN4CC)=N2)=N1</chem>
I-2 <sup>91</sup>	-	<chem>Cc1ccc([N+](=O)[O-])cc1S(N(C)C)=O</chem>
I-3 <sup>193</sup>	-	<chem>CC1=C(C(OCC)=O)SC(NC2=NC(NC3ccc(S(N)=O)cc3)=C4C(N=CN4CC)=N2)=N1</chem>
I-4 <sup>239, 240</sup>	Me	<chem>Clc1cc(C(c2cc(c3ccc(OC)cc3)c(NS(c4ccc(C)cc4)=O)=O)cc2)=NCC5)c5cc1</chem>
I-5 <sup>239, 240</sup>	OCF <sub>3</sub>	<chem>Clc1cc(C(c2cc(c3ccc(OC)cc3)c(NS(c4ccc(OC(F)(F)F)cc4)=O)=O)cc2)=NCC5)c5cc1</chem>
I-6 <sup>124</sup>	4-H	<chem>Clc1c(NC(NC23CCCC3)=O)c2ccc1</chem>
I-7 <sup>118</sup>	3-Fenil	<chem>Clc1c(NC(NC23CCCC3)=O)c2cc(c4ccccc4)c1</chem>
I-8 <sup>118</sup>	1 <i>H</i> -Benzo[d]imidazol	<chem>O=C(NC12CCCC2)Nc3c1cc(c4cc5c(NC=N5)cc4)cc3Cl</chem>
I-9 <sup>116</sup>	R <sup>1</sup> =4-Cl; R <sup>2</sup> =H	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N/C3CCCC3)cc1</chem>
I-10 <sup>116</sup>	R <sup>2</sup> =4-Cl; R <sup>6</sup> =3-COOH	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N/c3cccc(C(O)=O)c3)cc1</chem>
I-11 <sup>116</sup>	R <sup>1</sup> =N-(Morfolinmetil)acetil R <sup>2</sup> =H	<chem>O=C(NCN1CCOCC1)c2ccc(C(S/3)=NN(C)C3=N/C4CCCC4)cc2</chem>
I-12 <sup>241</sup>	R <sup>6</sup> =3-OH (R,R); R <sup>2</sup> =4-CONH <sub>2</sub>	<chem>O=C(N)c1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N/[C@@H]3C[C@H](O)CCC3)cc1</chem>
I-13 <sup>241</sup>	R <sup>2</sup> =3-OH(R,R); R <sup>1</sup> =4-SO <sub>2</sub> Me	<chem>O[C@@H]1C[C@@H](/N=C2SC(c3ccc(S(=O)(C)=O)cc3)=NN/2C)CCC1</chem>
I-14 <sup>242</sup>	-	<chem>O=S(c1ccc(N(C(c2cc(C)c(OC)cc2)=C3)C4=C3CC(N5CCN(C)CC5)CC4)cc1)(NC6=NC(C)=CC(C)=N6)=O</chem>
I-15 <sup>243</sup>	-	<chem>O=C(OCC)C(S1)=C(C)N=C1NC2=NC(NC3ccc(OC)c(OC)c(OC)c3)=CC(C4CCC(N(C)C)CC4)=N2</chem>
I-16 <sup>243</sup>	-	<chem>O=C(OCC)C(S1)=C(C)N=C1NC2=NC(C3CCC(O)CC3)=CC(C4CCC(O)CC4)=N2</chem>
I-17 <sup>243</sup>	-	<chem>O=C1N(C2=NC(C3=CC=CS3)=NS2)N=C(c4cc(Cl)c(OC)cc4)C5CC=CCC51</chem>
I-18 <sup>81</sup>	-	<chem>S=C(c1cccc(C)c1N2)N(c3ccccc3)C2=S</chem>
I-19 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	<chem>Clc1c(NC(NC23CCCC3)=O)c2c(OCCO)cc1</chem>
I-20 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> -5-CO <sub>2</sub> -Et-furan-2-il	<chem>Clc1c(NC(NC23CCCC3)=O)c2c(OCC4=C(C(OCC)=O)C=CO4)cc1</chem>
I-21 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> -1 <i>H</i> -tetrazol-5-il	<chem>O=C1NC2=C(Cl)C=CC(OCC3=NN=NN3)=C2C4(CCCCC4)N1</chem>
I-22 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> -5-OH-[1.2.4]oxadiazol-3-il	<chem>O=C1NC2=C(Cl)C=CC(OCC3=NOC(O)=N3)=C2C4(CCCCC4)N1</chem>
I-23 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> -5-CO <sub>2</sub> H-furan-2-il	<chem>Clc1c(NC(NC23CCCC3)=O)c2c(OCC4=C(C(O)=O)C=CO4)cc1</chem>
I-24 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H	<chem>Clc1c(NC(NC23CCCC3)=O)c2c(OCCCS(=O)(O)=O)cc1</chem>
I-25 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -4-morfolina	<chem>O=C1NC2=C(Cl)C=CC(OCCN3CCOCC3)=C2C4(CCCCC4)N1</chem>
I-26 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHMe	<chem>Clc1c(NC(NC23CCCC3)=O)c2c(OCCNC)cc1</chem>

Comp.	R	Código SMILES
I-27 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	Clc1c(NC(NC23CCCCC3)=O)c2c(OCCN(C)C)cc1
I-28 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Clc1c(NC(NC23CCCCC3)=O)c2c(OCCOCCN)cc1
I-29 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CHOH CH <sub>2</sub> NHMe	Clc1c(NC(NC23CCCCC3)=O)c2c(OCC(CNC)O)cc1
I-30 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	Clc1c(NC(NC23CCCCC3)=O)c2c(OCC(CN(C)C)O)cc1
I-31 <sup>118</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Clc1c(NC(NC23CCCCC3)=O)c2c(OCCNCC(O)=O)cc1
I-32 <sup>118</sup>	4-Me	Clc1c(NC(NC23CCCCC3)=O)c2c(C)cc1
I-33 <sup>118</sup>	4-OMe	Clc1c(NC(NC23CCCCC3)=O)c2c(OC)cc1
I-34 <sup>118, 120, 121, 124</sup>	8-F	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cccc3F
I-35 <sup>120, 121, 124</sup>	8-Br	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cccc3Br
I-36 <sup>120, 121, 124</sup>	8-CH <sub>3</sub>	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cccc3C
I-37 <sup>120, 121, 124</sup>	6-Ph	O=C(NC12CCCCC1)Nc3c2cc(C4=CC=CC=C4)cc3
I-38 <sup>120, 121, 124</sup>	5-Cl	O=C(NC12CCCCC1)Nc3c2c(Cl)ccc3
I-39 <sup>120, 121, 124</sup>	5.6-diCl	O=C(NC12CCCCC1)Nc3c2c(Cl)c(Cl)cc3
I-40 <sup>120, 121, 124</sup>	6.8-diCl	O=C(NC12CCCCC1)Nc3c2cc(Cl)cc3Cl
I-41 <sup>120, 121, 124</sup>	6-Me-8-Cl	O=C(NC12CCCCC1)Nc3c2cc(C)cc3Cl
I-42 <sup>120, 121, 124</sup>	6-OMe-8-Cl	O=C(NC12CCCCC1)Nc3c2cc(OC)cc3Cl
I-43 <sup>120, 121, 124</sup>	4-Metilespirociclohexil	O=C(NC12CCC(C)CC2)Nc3c1cccc3Br
I-44 <sup>120, 121, 124</sup>	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> H	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4ccc(C(O)=O)cc4)cc3Cl
I-45 <sup>120, 121, 124</sup>	m-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> H	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4ccc(C(O)=O)c4)cc3Cl
I-46 <sup>120, 121, 124</sup>	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4ccc(C(N)=O)cc4)cc3Cl
I-47 <sup>120, 121, 124</sup>	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CONH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NMe <sub>2</sub>	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4ccc(C(NCCN(C)C)=O)cc4)cc3Cl
I-48 <sup>120, 121, 124</sup>	m-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CONH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NMe <sub>2</sub>	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4ccc(C(NCCN(C)C)=O)c4)cc3Cl
I-49 <sup>120, 121, 124</sup>	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CONH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NMe <sub>2</sub>	O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4ccc(C(NCCCN(C)C)=O)cc4)cc3Cl

Comp.	R	Código SMILES
I-50 <sup>120, 121, 124</sup>	m-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CONH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NMe <sub>2</sub>	<chem>O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4cccc(C(NCCCN(C)C)=O)c4)cc3Cl</chem>
I-51 <sup>120, 121, 124</sup>	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CO-N-Metilpiperazina	<chem>O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4ccc(C(N5CCN(C)CC5)=O)cc4)cc3Cl</chem>
I-52 <sup>120, 121, 124</sup>	m-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CO-N-Metilpiperazina	<chem>O=C(NC12CCCCC2)Nc3c1cc(c4cccc(C(N5CCN(C)CC5)=O)c4)cc3Cl</chem>
I-53 <sup>117</sup>	R <sup>1</sup> =4-SO <sub>2</sub> Me; R <sup>2</sup> =H	<chem>CN(N=C(c1cccc1)S/2)C2=N\c3cc(C(O)=O)c(S(=O)(C)=O)cc3</chem>
I-54 <sup>117</sup>	R <sup>1</sup> =3-CN; R <sup>2</sup> = H	<chem>CN(N=C(c1cccc1)S/2)C2=N\c3cc(C(O)=O)cc(C#N)c3</chem>
I-55 <sup>117</sup>	R <sup>2</sup> =H; R <sup>1</sup> =4-CO(4-metil-piperazin-1-il)	<chem>CN1N=C(c2ccc(C(N3CCN(C)CC3)=O)cc2)S/C1=N/C4CCCCC4</chem>
I-56 <sup>117</sup>	R <sup>2</sup> =3-OH trans	<chem>CN1N=C(c2ccc(C(NC(C)(C)CO)=O)cc2)S/C1=N/[C@H]3CCCC(O)C3</chem>
I-57 <sup>117</sup>	R <sup>1</sup> =4-CONH(2-hdroxi-1,1-dimetiletil) R <sup>2</sup> =3-OH trans R <sup>1</sup> =4-NHCOMe	<chem>CN1N=C(c2ccc(NC(C)=O)cc2)S/C1=N/[C@H]3CCCC(O)C3</chem>
I-58 <sup>117</sup>	R <sup>2</sup> =3-OH trans R <sup>1</sup> =4-SO <sub>2</sub> Me	<chem>CN1N=C(c2ccc(S(C)(=O)=O)cc2)S/C1=N/[C@H]3CCCC(O)C3</chem>
I-59 <sup>117</sup>	2- OH cis	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(N)=O)cc2)=N1)=N/[C@H]3CCCC3O</chem>
I-60 <sup>117</sup>	4-OH trans	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(N)=O)cc2)=N1)=N\c3CCC(O)CC3</chem>
I-61 <sup>117</sup>	3-OH cis	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(N)=O)cc2)=N1)=N/[C@H]3CCCC(O)C3</chem>
I-62 <sup>117</sup>	3-OH trans	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(N)=O)cc2)=N1)=N\c3CC(O)CCC3</chem>
I-63 <sup>117</sup>	3-OH (R,R)	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(N)=O)cc2)=N1)=N/[C@H]3CCC[C@@H](O)C3</chem>
I-64 <sup>116</sup>	Biciclo[2,2,1] hept-2-il	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N/C3C(C4)CCC4C3)cc1</chem>
I-65 <sup>116</sup>	2-Hidroxi-1,1-dimetiletil	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3cc(C)C(O)cc1</chem>
I-66 <sup>116</sup>	Fenil	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3=CC=CC=C3)cc1</chem>
I-67 <sup>116</sup>	3-OH	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3cc(O)ccc3)cc1</chem>
I-68 <sup>116</sup>	3-(2H-tetrazol-5-il)	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3cc(C4=NNN=N4)ccc3)cc1</chem>
I-69 <sup>116</sup>	3-CONH <sub>2</sub>	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3cc(C(N)=O)ccc3)cc1</chem>
I-70 <sup>116</sup>	4-OH	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3ccc(O)cc3)cc1</chem>
I-71 <sup>116</sup>	4-F	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3ccc(F)cc3)cc1</chem>
I-72 <sup>116</sup>	2-OH, 5-COOH	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3c(O)ccc(C(O)=O)c3)cc1</chem>
I-73 <sup>116</sup>	2-OH, 3-COOH	<chem>Clc1ccc(C(S/2)=NN(C)C2=N\c3c(O)c(C(O)=O)ccc3)cc1</chem>

Comp.	R	Código SMILES
I-74 <sup>116</sup>	3-COOH, 4-F	<chem>Clc1ccc(C(S(=O)(=O)N)C(=O)Nc3cc(C(=O)O)c(F)cc3)cc1</chem>
I-75 <sup>116</sup>	4,7-Dimetil quinazolina	<chem>CN(N=C(C1=CC=C(C(C)=NC=N2)C2=C1)S(=O)(=O)N)C3=NC4CCCCC4</chem>
I-76 <sup>116</sup>	2-Cl	<chem>CN1/C(SC(c2c(Cl)ccc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-77 <sup>116</sup>	3-OH	<chem>CN1/C(SC(c2cc(O)ccc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-78 <sup>116</sup>	3-Cl	<chem>CN1/C(SC(c2cc(Cl)ccc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-79 <sup>116</sup>	3-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	<chem>CN1/C(SC(c2cc(S(=O)(=O)N)ccc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-80 <sup>116</sup>	3-CONH <sub>2</sub>	<chem>CN1/C(SC(c2cc(C(N)=O)ccc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-81 <sup>116</sup>	3-COOH	<chem>CN1/C(SC(c2cc(C(=O)O)ccc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-82 <sup>116</sup>	4-OH	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(O)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-83 <sup>116</sup>	4-COOMe	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(OC)=O)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-84 <sup>116</sup>	4-Cl	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(Cl)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-85 <sup>116</sup>	4-COOH	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(=O)O)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-86 <sup>116</sup>	4-NH <sub>2</sub>	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(N)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-87 <sup>116</sup>	3-Me, 4-CONH <sub>2</sub>	<chem>CN1/C(SC(c2cc(C)C(C(N)=O)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-88 <sup>116</sup>	3-OMe, 4-CONH <sub>2</sub>	<chem>CN1/C(SC(c2cc(OC)C(C(N)=O)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-89 <sup>116</sup>	3-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> , 4-Cl	<chem>CN1/C(SC(c2cc(S(N)(=O)=O)C(Cl)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-90 <sup>116</sup>	3-SO <sub>2</sub> NHEt, 4-Cl	<chem>CN1/C(SC(c2cc(S(NCC)(=O)=O)C(Cl)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>
I-91 <sup>116</sup>	4-CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -N-morfolinil	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(NCCN3CCOCC3)=O)cc2)=N1)=N/C4CCCCC4</chem>
I-92 <sup>116</sup>	4-CONHCH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<chem>CN1/C(SC(c2ccc(C(NCCN(C)C)=O)cc2)=N1)=N/C3CCCCC3</chem>

**Anexo 2.** Variables de entrada para la red neuronal, obtenidas tras la reducción de dimensiones.

<b>Comp.</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
I-1	0.824805	0.02059	0.027546	0.020005
I-2	0.987969	0.040606	0.031817	0.992433
I-3	0.025064	0.018587	0.871014	0.025251
I-4	0.907033	0.026002	0.009621	0.023997
I-5	0.883312	0.031732	0.028993	0.033764
I-6	0.915279	0.99687	0.986983	0.960851
I-7	0.697131	0.750226	0.995709	0.997673
I-8	0.076401	0.937887	0.000907	0.007127
I-9	0.412103	0.895437	0.903391	0.255357
I-10	0.093917	0.997256	0.89745	0.961969
I-11	0.904289	0.046262	0.027739	0.050401
I-12	0.084001	0.690593	0.116325	0.049928
I-13	0.785893	0.003162	0.064435	0.008843
I-14	0.777262	0.004367	0.006458	0.021562
I-15	0.010845	0.00676	0.006454	0.809156
I-16	0.026129	0.921301	0.023752	0.022828
I-17	0.314084	0.071012	0.068357	0.262474
I-18	0.994101	0.980303	0.990388	0.98975
I-19	0.358922	0.962927	0.889166	0.104338
I-20	0.869406	0.027862	0.010168	0.030562
I-21	0.415963	0.569516	0.98084	0.741146
I-22	0.415963	0.569516	0.98084	0.741146
I-23	0.929689	0.005872	0.017627	0.038603
I-24	0.674565	0.000232	0.00257	0.039804
I-25	0.001904	0.004098	0.895127	0.041666
I-26	0.97251	0.965634	0.339512	0.996595
I-27	0.922049	0.884639	0.244723	0.59938
I-28	0.205381	0.884517	0.624457	0.510516
I-29	0.977827	0.937339	0.317506	0.619464
I-30	0.014395	0.337643	0.134946	0.483521
I-31	0.002671	0.751227	0.203597	0.003908
I-32	0.036175	0.500084	0.277307	0.675212
I-33	0.11241	0.26918	0.738229	0.577431
I-34	0.205862	0.904151	0.244813	0.892184
I-35	0.863481	0.952994	0.96858	0.956333
I-36	0.324064	0.328639	0.309182	0.766063
I-37	0.576614	0.825674	0.725045	0.943223
I-38	0.977764	0.983828	0.970171	0.182014
I-39	0.942604	0.878549	0.998111	0.995413
I-40	0.947401	0.999983	0.858211	0.062039
I-41	0.813252	0.945594	0.096404	0.934502
I-42	0.741634	0.066536	0.130777	0.795944
I-43	0.741634	0.066536	0.130777	0.795944
I-44	0.069645	0.000483	0.000462	0.931533
I-45	0.935083	0.111989	9.2e-005	0.027029
I-46	0.931749	0.000223	0.000394	0.04961
I-47	0.02554	0.017693	0.021401	0.924596
I-48	0.872382	0.028165	0.022261	0.032033
I-49	0.917655	0.021888	0.015164	0.018502
I-50	0.03575	0.030505	0.793042	0.008289
I-51	0.04695	0.828941	0.014169	0.01704
I-52	0.018492	0.020606	0.015912	0.928709
I-53	0.903026	0.032933	0.001079	0.001201
I-54	0.990421	0.710036	0.114675	0.869108
I-55	0.841383	0.048273	0.064642	0.005665
I-56	0.035568	0.0494	0.035207	0.797716
I-57	0.004051	0.083507	0.002876	0.735232

<b>Comp.</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
I-58	0.014364	0.008668	0.15499	0.687601
I-59	0.989786	0.447801	0.992606	0.982077
I-60	0.923775	0.997781	0.916581	0.996271
I-61	0.156536	0.991634	0.982831	0.848269
I-62	0.003846	0.790941	0.101716	0.01472
I-63	0.927896	0.000554	0.009228	0.189424
I-64	0.966081	0.973558	0.941785	0.396351
I-65	0.972448	0.905577	0.803425	0.99066
I-66	0.958872	0.994647	0.99674	0.680187
I-67	0.996775	0.59624	0.996873	0.625385
I-68	0.005805	0.002796	0.836009	0.191127
I-69	0.967967	0.062628	0.99622	0.899858
I-70	0.980339	0.805035	0.998617	0.539458
I-71	0.972624	0.380912	0.994297	0.859654
I-72	0.02755	0.105842	0.065059	0.738752
I-73	0.002131	0.039907	0.708103	0.200532
I-74	0.01536	0.162492	0.006681	0.54921
I-75	0.052292	0.749734	0.9909	0.918103
I-76	0.667457	0.539127	0.536442	0.356475
I-77	0.762825	0.179308	0.144207	0.940531
I-78	0.334175	0.264264	0.5376	0.830523
I-79	0.92284	0.723142	0.738779	0.093847
I-80	0.940884	0.20657	0.159968	0.95938
I-81	0.935618	0.156566	0.318913	0.927962
I-82	0.490779	0.31032	0.969575	0.317776
I-83	0.999557	0.996463	0.981316	0.930724
I-84	0.892315	0.161231	0.777029	0.259727
I-85	0.476255	0.600632	0.846401	0.358308
I-86	0.978523	0.992109	0.987195	0.585795
I-87	0.988915	0.553073	0.963968	0.989638
I-88	0.992063	0.942551	0.989754	0.772288
I-89	0.316334	0.013032	0.112718	0.002728
I-90	0.009368	0.920609	0.004644	0.028857
I-91	0.023512	0.00926	0.913369	0.01728
I-92	0.074753	0.405584	0.050186	0.066867

**Anexo 3.** 220 Estructuras químicas seleccionadas que cumplen las reglas de Lipinski y que *a priori* atraviesan la BHE.

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
AM003	<chem>C1CCc2c(C1)c(c(s2)N)C#N</chem>	2.06	178.26	2	2	0	0	0.06
AM019	<chem>N1=C(C=C(N(CCc2ccccc2)S1(=O)=O)c1ccccc1)c1ccccc1</chem>	4.73	388.49	4	0	0	5	0.73
AM032	<chem>n1cnc2c(c1SC(=O)Cc1ccccc1)ncn2C(=O)Cc1ccccc1</chem>	3.98	388.45	6	0	0	6	-0.02
CG056	<chem>c1(cc(c(c1)C(=O)OC)N)Cl</chem>	2.98	220.06	3	2	0	2	-0.02
AM047	<chem>C1CCc2c(C1)c(nn2c1sc2c(n1)cccc2)C</chem>	4.04	269.37	3	0	0	1	1.04
AM048	<chem>C1CCC2=C(C1)[C@H](N(N2)c1sc2c(n1)cccc2)C</chem>	4.53	271.39	3	1	0	1	1.53
AM048	<chem>C1CCC2=C(C1)[C@@H](N(N2)c1sc2c(n1)cccc2)C</chem>	4.53	271.39	3	1	0	1	1.53
AM049	<chem>[C@H]1(C=CN1c1sc2c(n1)cccc2)C</chem>	2.73	217.30	3	1	0	1	-0.27
AM052	<chem>N1=NC2=C([C@H]1C)CCC2</chem>	1.61	122.17	2	0	0	0	-0.39
AM053	<chem>C1(=NN=C(C1O)c1ccccc1)c1ccccc1</chem>	2.57	236.27	3	1	0	2	-0.43
AM054	<chem>N1=NC2=C([C@H]1C)CCC2</chem>	1.61	122.17	2	0	0	0	-0.39
AM054	<chem>N1=NC2=C([C@@H]1C)CCC2</chem>	1.61	122.17	2	0	0	0	-0.39
AM056	<chem>N1=NC2=C([C@H]1C)CCC2</chem>	1.61	122.17	2	0	0	0	-0.39
AM056	<chem>N1=NC2=C([C@@H]1C)CCC2</chem>	1.61	122.17	2	0	0	0	-0.39
AM057	<chem>N1=NC2=C([C@H]1C)CCC2</chem>	1.61	122.17	2	0	0	0	-0.39
AM080	<chem>c1ccc(c(c1)O)/C=N/c1ccccc1</chem>	3.41	197.24	2	1	0	2	1.41
AC004	<chem>c1cnc(cc1)NC(=S)NCc1ccccc1</chem>	2.49	243.34	3	2	0	5	-0.52
AC010	<chem>c1ccc(cc1)NC(=S)NCC</chem>	1.73	180.28	2	2	0	4	-0.28
AC012	<chem>c1ccc2c(c1)oc(=N\CC)[nH]2</chem>	2.26	162.19	3	1	0	1	0.26
AC014	<chem>c1cnc(cc1)/N=c1\scn1C)C</chem>	2.86	205.29	3	0	0	1	-0.14
AC016	<chem>c1cnc(cc1)/N=c1\n(c(ns1)c1ccccc1)C</chem>	4.22	268.35	4	0	0	2	0.22
AC023	<chem>c1ccc2c(c1)sc(n2)NCC</chem>	2.73	178.26	2	1	0	2	0.73
AC027	<chem>c1(ccc(cn1)Cl)NC(=O)NCc1ccccc1</chem>	2.79	225.42	4	2	0	3	-0.21
CG106	<chem>C1CCc2c(C1)c(c(s2)N)C(=O)OCC</chem>	2.52	225.31	3	2	0	3	-0.48

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
CG108	<chem>c1ccc2c(c1)c(c(s2)C(=O)OC)N</chem>	2.39	207.25	3	2	0	2	-0.61
AC033	<chem>c1cnc2c(c1)[nH]/c(=NCC)s2</chem>	2.76	179.25	3	1	0	1	-0.24
AC044	<chem>c1nc(ccc1)NC(=S)SC</chem>	1.83	184.29	2	1	0	3	-0.17
AC052	<chem>c1ccc2c(c1)N[C@@H](S2)[NH3]</chem>	1.54	153.23	2	4	0	0	-0.46
AC061	<chem>c1ccc2c(c1)sc(n2)N</chem>	1.98	150.21	2	2	0	0	-0.02
AC068	<chem>C1CC(CCC1)/N=c1/n(c(=O)n(s1)C(C)C)CC</chem>	4.04	269.41	4	0	0	3	0.04
AC092	<chem>c1cnc(cc1)/N=c1/n(c(ns1)c1cccc1)CC</chem>	4.60	282.37					0.60
AC093	<chem>c1cnc(cc1)/N=c1/n(c(ns1)CC)Cc1cccc1</chem>	4.36	296.40	4	0	0	4	0.36
AC098	<chem>c1ccc(nc1)/N=c1/n(c(=O)n(s1)C1CCCC1)CC</chem>	4.10	304.42	5	0	0	3	0.10
AC105	<chem>c1ccc(cc1)/N=c1/n(c(=O)n(s1)C(C)C)CC</chem>	3.83	263.37	4	0	0	3	-0.17
CG008	<chem>N1=C(c2c(N(Cc3cccc3)S1(=O)=O)cccc2)OCc1ccc(cc1)Cl</chem>	4.75	412.90	5	0	0	5	-0.25
CG013	<chem>c12c(cccc1)N(Cc1ccc(cc1)Cl)S(=O)(=O)N(C2=O)Cc1ccc(cc1)Cl</chem>	4.79	447.34	5	0	0	4	-0.21
CG015	<chem>c12c(cccc1)N(Cc1cccc1Cl)S(=O)(=O)N(C2=O)Cc1c(cccc1)Cl</chem>	4.70	447.34	5	0	0	4	-0.30
CG019	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3cccc3Cl)S1(=O)=O)cccc2)Cc1cccc1</chem>	4.07	412.90	5	0	0	4	0.07
CG026	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3cc(ccc3)Cl)S1(=O)=O)cccc2)Cc1cc(ccc1)Cl</chem>	4.75	447.34	5	0	0	4	0.75
CG035	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3ccc(cc3)OC)S1(=O)=O)cccc2)Cc1ccc(cc1)OC</chem>	3.55	438.51	7	0	0	6	-0.45
CG036	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3ccc(cc3)C(F)F)S1(=O)=O)cccc2)Cc1cccc1</chem>	4.33	446.45	5	0	0	5	0.33
CG059	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3cc(c(cc3)Cl)Cl)S1(=O)=O)ccs2)Cc1cccc1</chem>	4.60	453.37	5	0	0	4	-0.40
CG060	<chem>n1(c(=S)n(c2c(c1=O)cccc2)Cc1ccc(cc1)Cl)Cc1cccc1</chem>	4.97	392.91	3	0	0	4	1.97
CG062	<chem>n1(c(=S)n(c2c(c1=O)cccc2)Cc1ccc(cc1)C(F)F)Cc1cccc1</chem>	5.19	426.46	3	0	1	5	2.19
CG067	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3cccc4c3cccc4)S1(=O)=O)cccc2)Cc1cccc1</chem>	4.60	428.51	5	0	0	4	-0.40
CG069	<chem>n1(c(=O)n(c2c(c1=O)cccc2)Cc1ccc(cc1)Cl)Cc1cccc1</chem>	4.63	376.84	4	0	0	4	0.63
CG072	<chem>n1(c(=S)[nH]c2c(c1=O)cccc2)Cc1cccc1</chem>	2.63	268.34	3	1	0	2	-0.37
CG073	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3ccc(c(c3)Cl)Cl)S1(=O)=O)cccc2)CC(C)C</chem>	4.45	413.33	5	0	0	4	-0.55
CG074	<chem>N1=C(c2c(N(Cc3ccc(c(c3)Cl)Cl)S1(=O)=O)cccc2)OCC(C)C</chem>	4.89	413.33	5	0	0	5	-0.12
CG086	<chem>N1(C(=O)c2c(N(CC(=O)c3ccc(cc3)Cl)S1(=O)=O)cccc2)Cc1cccc1</chem>	3.87	440.91	6	0	0	5	-0.14
CG088	<chem>N1=C(c2c(N(Cc3ccc(cc3)Cl)S1(=O)=O)cccc2)OCC</chem>	3.53	350.83	5	0	0	4	-0.47

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
CG090	<chem>N1=C(c2c(N(Cc3ccc(c(c3)Cl)Cl)S1(=O)=O)cccc2)OCC</chem>	4.14	385.27	5	0	0	4	0.14
CG093	<chem>N1(C(=O)c2c(N(Cc3ccc(cc3)Cl)S1(=O)=O)cccc2)CCC</chem>	3.60	364.85	5	0	0	4	-0.40
CG099	<chem>c1(ccc(cc1)CCOCCI)OC</chem>	2.75	200.67	2	0	0	5	0.75
CG101	<chem>c1ccc(cc1)CCOCCI</chem>	2.69	170.64	1	0	0	4	1.69
AE009	<chem>c1(sc(cc1C(=O)OCC)c1cccc1)N</chem>	3.26	247.32	3	2	0	4	0.26
AE010	<chem>C1CCCc2c(C1)cn[nH]2</chem>	2.00	136.20	2	1	0	0	0.00
AE084	<chem>c1(sc(c(c1)N)C(=O)OC)c1cccc1</chem>	3.00	233.29	3	2	0	3	0.00
EF016	<chem>c1ccc(cc1)NC(=S)NC1CC[NH](CC1)Cc1cccc1</chem>	3.01	326.49	3	3	0	6	0.00
EF017	<chem>C1C(CC[NH](C1)Cc1cccc1)CCNC(=S)Nc1cccc1</chem>	3.84	354.54	3	3	0	8	0.84
EF019	<chem>c1ccc2c(c1)sc(n2)NC1CC[NH](CC1)Cc1cccc1</chem>	4.01	324.47	3	2	0	4	1.01
AM094	<chem>C1CCC2=C(C1)C(=NON2)C</chem>	2.13	152.20	3	1	0	0	-0.88
AM096	<chem>c1(c(cc2c(c1)ncn2C)C)C</chem>	2.30	160.22	2	0	0	0	0.30
AM0101	<chem>c1(c(c(c(o1)c1cccc1)c1cccc1)C#N)N</chem>	3.89	260.30	3	2	0	2	1.89
AM106	<chem>N1=C(C=C(NO1)c1cccc1)c1cccc1</chem>	4.07	236.27	3	1	0	2	1.07
TC2.30	<chem>c1(ccc2c(c1)c(=O)n(c(=S)[nH]2)c1cccc1)Br</chem>	3.10	333.21	3	1	0	1	0.10
TC2.41	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(c(c(cc1)F)F)F</chem>	3.80	322.31	3	0	0	2	0.80
TC2.42	<chem>c1c2c(sc1)c(=O)n(c(n2)SC)c1cccc1</chem>	3.00	274.37	3	0	0	2	0.00
TC2.43	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(cccc1F)F</chem>	3.90	304.32	3	0	0	2	0.90
TC2.44	<chem>c1ccc2c(c1)sc1c2nc(n(c1=O)c1c(cccc1F)F)SC</chem>	4.97	360.41	3	0	0	2	1.97
TC2.45	<chem>c1ccc2c(c1)c(=S)n(c(=S)[nH]2)c1c(c(c(cc1)F)F)F</chem>	3.21	324.35	2	1	0	1	1.21
TC2.47	<chem>c1cc2c(s1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(cccc1F)F</chem>	3.66	310.35	3	0	0	2	0.66
TC2.51	<chem>c1ccc2c(c1)c(=S)n(c(n2)SC)c1c(c(c(cc1)F)F)F</chem>	4.15	338.38	2	0	0	2	2.15
TC3.1	<chem>c1ccc2c(c1)c(=S)n(c(n2)SC)c1c(cccc1F)F</chem>	4.24	320.39	2	0	0	2	2.24
TC3.9	<chem>c1ccc2c(c1)c(=S)n(c(n2)SC)c1cccc1</chem>	3.59	284.41	2	0	0	2	1.59
TC3.13	<chem>c1ccc2c(c1)c(=S)n(c(n2)SC)c1c(cccc1)Br</chem>	4.56	363.31	2	0	0	2	2.56
TC3.14	<chem>c1cc(c2c(c1)c(=O)n(c(=S)[nH]2)c1c(cccc1)Br)C</chem>	3.69	347.24	3	1	0	1	0.69
TC3.16	<chem>c1cc(c2c(c1)c(=O)n(c(=S)[nH]2)c1c(cccc1F)F)C</chem>	3.37	304.32	3	1	0	1	0.37

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
TC3.17	<chem>c1cc(c2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(c(cc1)F)F)C</chem>	3.27	322.31	3	1	0	1	0.27
TC3.22	<chem>c1cc(c2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(cccc1)Br)C</chem>	4.62	361.26	3	0	0	2	1.62
TC3.23	<chem>c1cc(c2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(cccc1F)F)C</chem>	4.30	318.35	3	0	0	2	1.30
TC3.24	<chem>c1cc(c2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(c(cc1)F)F)C</chem>	4.20	336.34	3	0	0	2	1.20
TC3.28	<chem>c1(ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(cccc1)Br)Br</chem>	4.07	412.11	3	1	0	1	1.07
TC3.29	<chem>c1(ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(cccc1F)F)Br</chem>	3.75	369.19	3	1	0	1	0.75
TC3.30	<chem>c1(ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(c(cc1)F)F)F)Br</chem>	3.66	387.18	3	1	0	1	0.66
TC3.32	<chem>c1(ccc2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(c(cc1)F)F)F)Br</chem>	4.59	401.21	3	0	0	2	1.59
TC3.36	<chem>c1(ccc2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(cccc1F)F)Br</chem>	4.68	383.22	3	0	0	2	1.68
TC3.47	<chem>c1(ccc2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1cccc1)Br</chem>	4.03	347.24	3	0	0	2	1.03
S016	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1ccc(cc1)C(F)F)F</chem>	3.21	322.31	3	1	0	2	0.21
S015	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1ccc(cc1)C</chem>	2.76	268.34	3	1	0	1	-0.24
S022	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1ccc(cc1)Cl</chem>	2.99	288.76	3	1	0	1	-0.01
S023	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1ccc(cc1)F</chem>	2.48	272.30	3	1	0	1	-0.52
S025	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1cc(c(c1)F)F)F</chem>	3.08	308.28	3	1	0	1	0.08
S026	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1ccc(cc1)Br</chem>	3.12	333.21	3	1	0	1	0.12
S027	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1cc(ccc1)Br</chem>	3.31	333.21	3	1	0	1	0.31
S028	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(cccc1)Br</chem>	3.29	333.21	3	1	0	1	0.29
S029	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(cc(cc1)Br)F</chem>	3.43	351.20	3	1	0	1	0.43
S033	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1cccc2c1cccc2</chem>	3.68	304.37	3	1	0	1	0.68
S035	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c=S)[nH]2)CCc1cccc1</chem>	2.84	282.37	3	1	0	3	-0.16
S037	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1cccc1</chem>	3.25	268.34	3	0	0	2	0.25
S038	<chem>c1ccc2c(c1)c(=O)n(c(n2)SC)c1c(cccc1)Br</chem>	4.22	347.24	3	0	0	2	2.22
S041	<chem>c1cc2c(s1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(cc(cc1)Br)F</chem>	3.19	357.23	3	1	0	1	0.19
S043	<chem>c1cc2c(s1)c(=O)n(c=S)[nH]2)c1c(c(cc1)F)F)F</chem>	2.63	314.31	3	1	0	1	-0.37
S045	<chem>c12c(c3c(s1)c(=O)n(c=S)[nH]3)c1cccc1)cccc2</chem>	3.38	310.40	3	1	0	1	0.38
S047	<chem>c12c(c3c(s1)c(=O)n(c=S)[nH]3)c1c(cc(cc1)Br)F)cccc2</chem>	4.49	407.29	3	1	0	1	1.49

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
S048	<chem>c12c(c3c(s1)c(=O)n(c(=S)[nH]3)c1c(cccc1F)F)cccc2</chem>	4.03	346.38	3	1	0	1	1.03
S049	<chem>c12c(c3c(s1)c(=O)n(c(=S)[nH]3)c1c(c(cc1)F)F)cccc2</chem>	3.94	364.37	3	1	0	1	0.94
VP0.1	<chem>C1[C@H](Cc2c(C1)c(c(s2)NC(=O)CCCCI)C(=O)OCCC)C</chem>	4.34	357.90	4	1	0	8	0.34
SC003	<chem>C1CCc2c(C1)c(cs2)OC[C@H](CNC(C)C)O</chem>	2.57	269.41	3	2	0	6	-0.43
SC004a	<chem>c1(c(c(cs1)Cl)Cl)[C@@H]([C@@H](C)N)Cl</chem>	2.82	244.57	1	2	0	2	1.82
SC004b	<chem>c1(c(c(cs1)Cl)Cl)[C@@H]([C@H](C)N)Cl</chem>	2.82	244.57	1	2	0	2	1.82
SC004c	<chem>c1(c(c(cs1)Cl)Cl)[C@H]([C@@H](C)N)Cl</chem>	2.82	244.57	1	2	0	2	1.82
SC004d	<chem>c1(c(c(cs1)Cl)Cl)[C@H]([C@H](C)N)Cl</chem>	2.82	244.57	1	2	0	2	1.82
SC005	<chem>c1(nn(c(n1)CCCl)c1cccc1)c1cccc1</chem>	3.74	283.76	3	0	0	4	0.74
SC006	<chem>c1(ccc2c(c1)c1c(n2NC(=O)c2cccc2)cccc1)Cl</chem>	4.98	320.78	3	1	0	2	1.98
SC007a	<chem>c1c(sc(c1Cl)[C@@H]([C@H](C)CN)Cl)Cl</chem>	3.36	258.60	1	2	0	3	1.36
SC007b	<chem>c1c(sc(c1Cl)[C@@H]([C@@H](C)CN)Cl)Cl</chem>	3.36	258.60	1	2	0	3	2.36
SC007c	<chem>c1c(sc(c1Cl)[C@H]([C@H](C)CN)Cl)Cl</chem>	3.36	258.60	1	2	0	3	2.36
SC007d	<chem>c1c(sc(c1Cl)[C@H]([C@@H](C)CN)Cl)Cl</chem>	3.36	258.60	1	2	0	3	2.36
SC008	<chem>c1cccc(c1)N(C(=O)C)NC(=O)c1cccc1</chem>	2.19	254.29	4	1	0	3	-0.81
SC009	<chem>c1cccc(c1)N(NC(=O)c1cccc1)C</chem>	2.83	226.28	3	1	0	3	-0.17
SC013	<chem>c1ccc2c(c1)n([nH]c(nc2=O)c1cccc1)c1cccc1</chem>	4.24	313.36	4	1	0	2	0.24
SC013	<chem>c1ccc2c(c1)n(nc([nH]c2=O)c1cccc1)c1cccc1</chem>	4.24	313.36	4	1	0	2	0.24
SC015a	<chem>c1(c(ccs1)Br)[C@@H](CNC(C)(C)C)O</chem>	2.73	278.22	2	2	0	4	0.73
SC015b	<chem>c1(c(ccs1)Br)[C@H](CNC(C)(C)C)O</chem>	2.73	278.22	2	2	0	4	0.73
SC016	<chem>c12c(ccc(c1)Cl)Sc1c(N2CCNN2CCN(CC2)C)cccc1</chem>	4.41	374.94	4	1	0	4	0.41
SC018	<chem>c1ccc2c(c1)c1c(n2N=O)cccc1</chem>	3.33	196.21	3	0	0	1	0.33
SC019	<chem>c1ccc2c(c1)c1c(n2N)c(ccc1)Cl</chem>	3.55	216.67	2	2	0	0	1.55
SC109a	<chem>Cl[C@@H]1CCCN1CC(=O)O</chem>	3.55	216.67	2	2	0	0	0.55
SC109b	<chem>Cl[C@H]1CCCN1CC(=O)O</chem>	3.55	216.67	2	2	0	0	0.55
SC023	<chem>n1(c(nc(n1)c1cccc1)SC)c1cccc1</chem>	3.77	267.36	3	0	0	3	0.77
SC024	<chem>c1(NNC(=O)c2cccc2)cccc1</chem>	2.59	212.25	3	2	0	3	-0.41

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
SC025	<chem>c1(N(NC(=O)c2ccccc2)c2ccccc2)ccccc1</chem>	4.53	288.35	3	1	0	4	1.53
SC027a	<chem>c1csc(c1Cl)C[C@H](CC)CN</chem>	2.40	224.16	1	2	0	4	1.40
SC027b	<chem>c1csc(c1Cl)C[C@H](CC)CN</chem>	2.40	224.16	1	2	0	4	1.40
SC030	<chem>c12c(cccc1)Sc1c(N2CCNN2CCN(CC2)C)cccc1</chem>	3.76	340.50	4	1	0	4	-0.24
SC031	<chem>c12c(cccc1)Sc1c(N2CCNN(C)C)cccc1</chem>	3.87	285.42	3	1	0	4	0.87
SC034	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)ccc(c2)Cl</chem>	4.75	373.91	4	1	0	3	0.75
SC035	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)cc(cc2)Cl</chem>	4.25	359.88	4	1	0	3	0.25
SC036	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CCN(C)C)ccc(c2)Cl</chem>	4.11	347.87	4	1	0	4	0.11
SC037	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN(CC)CC)cc(cc2)Cl</chem>	4.60	361.90	4	1	0	5	0.60
SC038	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)C)cccc2</chem>	3.20	256.33	3	1	0	1	0.20
SC039	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)cccc2</chem>	3.59	325.44	4	1	0	3	0.59
SC040	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)C)cc(cc2)Cl</chem>	3.85	290.78	3	1	0	1	0.85
SC041	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN(C)C)cc(cc2)Cl</chem>	3.84	333.84	4	1	0	3	-0.16
SC042	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)CC=O)cc(cc2)Cl</chem>	4.55	275.76	2	0	0	2	2.55
SC043	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)cc(cc2)Cl</chem>	4.75	373.91	4	1	0	3	0.75
SC044	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)cccc2</chem>	4.10	339.46	4	1	0	3	0.10
SC045	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN(C)C)ccc(c2)Cl</chem>	3.84	333.84	4	1	0	3	-0.16
VP116	<chem>O=C(OCC)C/N=C1SN(C2=CC=CC=C2)C(C3=CC=CC=C3)=N\1.Br</chem>	4.94	339.42	5	0	0	6	-0.06
SC046	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)ccc(c2)Cl</chem>	4.25	359.88	4	1	0	3	0.25
SC047	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)CCNN1CCCC1)cccc2</chem>	4.78	325.48	3	1	0	4	1.78
SC048	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)c(ccc2)Cl</chem>	4.73	373.91	4	1	0	3	0.73
SC049	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)cc(cc2)Cl</chem>	4.25	359.88	4	1	0	3	0.25
SC050	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)c(ccc2)Cl</chem>	4.73	373.91	4	1	0	3	0.73
SC051	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)ccc(c2)Cl</chem>	4.25	359.88	4	1	0	3	0.25
SC052	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)N)cccc2</chem>	3.46	214.29	2	2	0	0	1.46
SC054	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)ccc(c2)Cl</chem>	4.75	373.91	4	1	0	3	0.75
SC055	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN1CCCC1)cc(cc2)Cl</chem>	4.75	373.91	4	1	0	3	0.75

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
SC056	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)CN(C)C)ccc(c2)Cl</chem>	3.84	333.84	4	1	0	3	-0.16
SC057	<chem>c12c(N(c3c(S1)cccc3)NC(=O)C)ccc(c2)Cl</chem>	3.85	290.78	3	1	0	1	0.85
SC059	<chem>S1c2c(N=Nc3c1cccc3)ccc(c2)Cl</chem>	4.43	246.72	2	0	0	0	2.43
SC070	<chem>c1(ccc(c(c1)Sc1c(cccc1)[N](=O)O)N)Cl</chem>	3.90	280.74	4	2	0	3	-0.10
SC074	<chem>c1cc(cc(c1)Sc1c(cccc1)NNC(=O)CN1CCCC1)Cl</chem>	4.39	375.93	4	2	0	6	0.39
SC083a	<chem>c1(c(cc(s1)Cl)C[C@H](N)C)Cl</chem>	2.51	210.13	1	2	0	2	1.51
SC083b	<chem>c1(c(cc(s1)Cl)C[C@@H](N)C)Cl</chem>	2.51	210.13	1	2	0	2	1.51
SC084	<chem>c1(cc(c(s1)Br)Br)I</chem>	4.47	367.83	0	0	0	0	4.47
SC086	<chem>c1(c(c(c(s1)Br)Br)Cl)Br</chem>	4.81	355.28	0	0	0	0	4.81
SC089a	<chem>c1(cccs1)C[C@@H](C)N</chem>	1.22	141.24	1	2	0	2	0.22
SC089b	<chem>c1(cccs1)C[C@H](C)N</chem>	1.22	141.24	1	2	0	2	0.22
SC090a	<chem>c1(c(cc(s1)Cl)Cl)C[C@@H](C)N</chem>	2.63	210.13	1	2	0	2	1.63
SC090b	<chem>c1(c(cc(s1)Cl)Cl)C[C@H](C)N</chem>	2.63	210.13	1	2	0	2	1.63
SC091a	<chem>c1(cc(cs1)Cl)C[C@@H](C)N</chem>	1.83	175.68	1	2	0	2	0.83
SC091b	<chem>c1(cc(cs1)Cl)C[C@H](C)N</chem>	1.83	175.68	1	2	0	2	0.83
SC093a	<chem>c1(c(ccs1)Cl)C[C@H](CCl)N</chem>	2.09	210.13	1	2	0	3	1.09
SC093b	<chem>c1(c(ccs1)Cl)C[C@@H](CCl)N</chem>	2.09	210.13	1	2	0	3	1.09
SC094a	<chem>c1(cc(c(s1)Cl)Cl)C[C@H](CCl)N</chem>	2.89	244.57	1	2	0	3	1.89
SC094b	<chem>c1(cc(c(s1)Cl)Cl)C[C@@H](CCl)N</chem>	2.89	244.57	1	2	0	3	1.89
SC096	<chem>c1(c(c(cs1)Cl)Cl)C[C@H](CCl)N</chem>	2.70	244.57	1	2	0	3	1.70
SC103	<chem>c1(ccc(cc1)Cl)/C(=C/[N](=O)O)C</chem>	2.66	197.62	3	0	0	2	-0.34
SC113	<chem>c1c(cc(c(c1)Sc1c(cccc1)[N](=O)O)N)Cl</chem>	3.90	280.74	4	2	0	3	-0.10
SC114	<chem>c1ccc(c(c1)Sc1c(cccc1)[N](=O)O)Br</chem>	4.58	310.17	3	0	0	3	1.58
SC115	<chem>c1(c(c(c(s1)Cl)Cl)O)C(=O)OC</chem>	2.79	227.07	3	1	0	2	-0.22
SC116	<chem>c1cccc(c1)Nc1cccc1</chem>	3.93	169.23	1	1	0	2	2.93
SC118	<chem>c1ccc(c(c1)Sc1c(cccc1)NNC(=O)C)Br</chem>	3.60	337.24	3	2	0	4	0.60
SC119	<chem>s1c2c([n]([n](c3c1cccc3)C(=O)C)C(=O)C)cccc2</chem>	4.45	298.37	4	0	0	0	0.45

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
SC120	<chem>c1c(sc(c1O)C(=O)OC)c1cccc1</chem>	3.30	234.28	3	1	0	3	0.30
CO1101	<chem>c12c(cccc1)nc(n2Cc1sccc1)c1sccc1</chem>	4.89	296.42	8	5	0	0	2.89
CO1102	<chem>c12c(cccc1)[nH]c([nH]2)c1cccs1</chem>	3.34	201.27	9	4	0	2	1.34
CO1103	<chem>c12c(cccc1)nc([nH]2)c1ccc(s1)C</chem>	3.55	214.29	2	1	0	1	1.55
CO1104	<chem>c12c(cccc1)[nH]c(n2)c1cccc1</chem>	3.55	194.24	7	4	0	0	1.55
CO1105	<chem>c12c(cccc1)[nH]c(n2)c1sccc1</chem>	3.31	200.27	7	4	0	1	1.31
CO1106	<chem>c12c(cccc1)nc(n2Cc1sccc1)c1sccc1</chem>	4.38	296.42	7	4	0	1	2.38
CO2103	<chem>c12c(cccc1)nc(c(n2)c1sccc1)c1sccc1</chem>	4.65	294.40	2	0	0	2	2.65
CO2106	<chem>c12c(cccc1)nc(c(n2)c1occc1)c1occc1</chem>	3.36	262.27	4	0	0	2	1.36
CO2107	<chem>[C@H]12[C@@H](CCCC1)N=C(C(=N2)c1cccc1)c1cccc1</chem>	4.62	288.39	2	0	0	2	2.62
CO2109	<chem>c12c(CCCC1)nc(c(n2)c1cccc1)c1cccc1</chem>	4.82	286.38	2	0	0	2	2.82
CO2110	<chem>[C@@H]12[C@H](CCCC1)N=C(C(=N2)c1cccc1)c1cccc1</chem>	4.62	288.39	2	0	0	2	2.62
CO2301	<chem>n1c(c(nc2c1nccc2)c1cccc1)c1cccc1</chem>	4.18	283.33	3	0	0	2	1.18
CO2302	<chem>n1c(c(nc2c1cncc2)c1cccc1)c1cccc1</chem>	3.98	283.33	3	0	0	2	0.98
CO4002	<chem>c1(ccn([n]1C)Cl)C</chem>	1.69	237.06	2	0	0	1	0.69
SC122	<chem>c12c(sc(c1O)C(=O)OCC)CCC2</chem>	2.41	212.27	3	1	0	3	-0.59
SC126	<chem>c1(csc(c1O)C(=O)OC)c1cccc1</chem>	3.10	234.28	3	1	0	3	0.10
SC132	<chem>c1c(sc(c1O)C(=O)OCC)c1cccc1</chem>	3.67	248.30	3	1	0	4	0.67
SC130	<chem>c1c(sc(c1O)C(=O)OC)c1cccc1</chem>	3.30	234.28	3	1	0	3	0.30
SC127	<chem>c1(csc(c1O)C(=O)OC)c1cccc1</chem>	3.10	234.28	3	1	0	3	0.10
SC133	<chem>c1(c(scc1OC[C@@H](CNC(C)(C)O)Cl)C</chem>	3.09	277.82	3	2	0	6	0.09
SC134	<chem>s1ccc2c1c(c(s2)C(=O)OC)OC[C@H]1CO1</chem>	2.55	270.33	4	0	0	5	-0.45
SC138	<chem>c1(cc(sc1C(=O)OC)c1cccc1)O</chem>	3.30	234.28	3	1	0	3	0.30
SC139	<chem>c1(csc(c1O)C(=O)OC)Sc1cccc1</chem>	3.27	266.34	3	1	0	4	0.27
SC140	<chem>c1csc2c1sc(c2O)C(=O)OC</chem>	2.44	214.27	3	1	0	2	-0.56
SC141	<chem>c1(c(sc(c1O)C(=O)OC)Sc1cccc1)C</chem>	4.58	278.40	2	1	0	4	2.58
SC142	<chem>c1(c(sc(c1O)C(=O)OC)Cl)Cl</chem>	2.79	227.07	3	1	0	2	-0.22

Comp.	SMILE	LogP	MW	nON	nOHNH	nviol	nrotb	LogBB
SC143	<chem>c1(c(sc(c1O)C(=O)OC)Cl)c1cccc1</chem>	3.90	268.72	3	1	0	3	0.90
SC145	<chem>c1(c(sc(c1OC)C(=O)OC)OC)c1cccc1</chem>	3.56	278.33	4	0	0	5	-0.44
SC154	<chem>c1(c(sc(c1OC)C(=O)OC)C)Cl</chem>	2.48	220.68	3	0	0	3	-0.52
SC155	<chem>c1(c(scc1OC[C@@H])(CNC(C)(C)C)O)Cl)C</chem>	3.09	277.82	3	2	0	6	0.09
SC156	<chem>s1cc(OC[C@@H])(CNC(C)(C)C)O)c2c1ccs2</chem>	2.98	285.43	3	2	0	6	-0.02
SC159	<chem>c1(c(sc(c1O)C(=O)OC)Cl)C</chem>	2.56	206.65	3	1	0	2	-0.44
SV047	<chem>C1CN=C(NC1)SCl</chem>	1.66	256.11	2	1	0	2	-0.34





**Anexo 4.** Predicción de la actividad inhibitoria frente a PDE7 de las 220 estructuras químicas seleccionadas.

CODE	CODES INPUT				OUTPUT
	P1	P2	P3	P4	NNE3A
AM003	0.646981	0.50407	0.993123	0.433044	Moderado
AM019	0.075575	0.030073	0.056933	0.579541	Moderado
AM032	0.039968	0.02834	0.080709	0.646056	Moderado
CG056	0.360127	0.761412	0.786028	0.277918	Inactivo
AM047	0.954122	0.231238	0.096872	0.722267	Activo
AM048	0.069716	0.449017	0.477391	0.889873	Moderado
AM048	0.069716	0.449017	0.477391	0.889873	Moderado
AM049	0.992739	0.901818	0.968266	0.187912	Inactivo
AM052	0.973953	0.951481	0.840147	0.990882	Inactivo
AM053	0.181515	0.201039	0.220135	0.687929	Inactivo
AM054	0.973953	0.951481	0.840147	0.990882	Inactivo
AM054	0.973953	0.951481	0.840147	0.990882	Inactivo
AM056	0.973953	0.951481	0.840147	0.990882	Inactivo
AM056	0.973953	0.951481	0.840147	0.990882	Inactivo
AM056	0.973953	0.951481	0.840147	0.990882	Inactivo
AM057	0.973953	0.951481	0.840147	0.990882	Inactivo
AM080	0.29542	0.312935	0.357	0.962855	Inactivo
AC004	0.98703	0.855442	0.994864	0.879907	Moderado
AC010	0.957765	0.954347	0.92282	0.955923	Moderado
AC012	0.968477	0.972872	0.960112	0.800413	Moderado
AC014	0.864613	0.988576	0.948761	0.969593	Moderado
AC016	0.015888	0.495793	0.602327	0.564297	Moderado
AC023	0.959196	0.923104	0.784099	0.968428	Inactivo
AC027	0.987427	0.941515	0.860259	0.982507	Inactivo
CG106	0.22051	0.482973	0.265691	0.963187	Inactivo
CG108	0.850859	0.796238	0.949868	0.956023	Moderado
AC033	0.976578	0.979627	0.974184	0.767305	Inactivo
AC044	0.795491	0.618753	0.528143	0.930132	Inactivo
AC052	0.812415	0.970408	0.975954	0.959967	Moderado
AC061	0.384145	0.317166	0.996089	0.618574	Activo
AC068	0.720327	0.061557	0.613571	0.47946	Inactivo
AC092	0.625804	0.830321	0.17809	0.32794	Moderado
AC093	0.071158	0.685921	0.939931	0.434535	Moderado
AC098	0.129303	0.051769	0.90818	0.982267	Moderado
AC105	0.154034	0.448104	0.845114	0.574054	Activo
CG008	0.042355	0.046759	0.733485	0.036279	Activo
CG013	0.018732	0.034463	0.896256	0.014484	Activo
CG015	0.028916	0.887116	0.036391	0.028687	Activo
CG019	0.019219	0.015416	0.044378	0.823456	Moderado
CG026	0.931867	0.020498	0.009128	0.031542	Activo
CG035	0.020549	0.020641	0.772693	0.031912	Activo
CG036	0.034542	0.042274	0.676817	0.020171	Activo
CG059	0.92735	0.027111	0.04786	0.013748	Activo

<b>CODE</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>NNE3A</b>
CG060	0.740186	0.008658	0.004119	0.080253	Activo
CG062	0.01724	0.027607	0.83982	0.0232	Activo
CG067	0.081005	0.846374	0.013299	0.022367	Activo
CG069	0.018708	0.779637	0.037718	0.026537	Activo
CG072	0.11462	0.740787	0.069565	0.752178	Moderado
CG073	0.017942	0.804116	0.008505	0.058193	Moderado
CG074	0.036371	0.004972	0.827688	0.08324	Activo
CG086	0.856686	0.029058	0.027358	0.021996	Activo
CG088	0.999013	0.907471	0.994804	0.815858	Moderado
CG090	0.874682	0.228732	0.002806	0.001513	Moderado
CG093	0.054696	0.052219	0.597347	0.053933	Activo
CG099	0.92136	0.929339	0.228564	0.026661	Activo
CG101	0.776965	0.951308	0.956743	0.932058	Moderado
AE009	0.948169	0.786233	0.985223	0.012486	Moderado
AE010	0.951684	0.523389	0.484239	0.873251	Inactivo
AE084	0.979397	0.96467	0.854025	0.016546	Moderado
EF016	0.647869	0.976075	0.985607	0.735824	Moderado
EF017	0.252488	0.016913	0.0174	0.036694	Activo
EF019	0.993096	0.831279	0.949672	0.551415	Inactivo
AM094	0.698238	0.783135	0.587045	0.982615	Moderado
AM096	0.994103	0.968392	0.987458	0.756826	Inactivo
AM0101	0.387532	0.2381	0.466592	0.514519	Moderado
AM106	0.983981	0.055363	0.982152	0.011205	Moderado
TC2.30	0.252344	0.784158	0.162189	0.638304	Moderado
TC2.41	0.940325	0.732683	0.98625	0.986903	Moderado
TC2.42	0.994182	0.976292	0.967515	0.121537	Moderado
TC2.43	0.94305	0.976532	0.667627	0.972141	Moderado
TC2.44	0.97079	0.084121	0.824111	0.772783	Moderado
TC2.45	0.943329	0.992825	0.805749	0.95616	Moderado
TC2.47	0.958718	0.989111	0.757928	0.99801	Moderado
TC2.51	0.988615	0.918291	0.826508	0.849174	Inactivo
TC3.1	0.632092	0.899358	0.742268	0.995395	Moderado
TC3.9	0.945494	0.955056	0.9949	0.999908	Moderado
TC3.13	0.998352	0.993675	0.9649	0.998837	Moderado
TC3.14	0.899312	0.955049	0.999132	0.144836	Moderado
TC3.16	0.815661	0.989187	0.99608	0.725864	Moderado
TC3.17	0.96266	0.640989	0.973966	0.996762	Moderado
TC3.22	0.933247	0.990717	0.655515	0.694386	Moderado
TC3.23	0.958243	0.724496	0.824042	0.700614	Inactivo
TC3.24	0.999257	0.927163	0.989845	0.930332	Moderado
TC3.28	0.912148	0.860432	0.872921	0.956881	Moderado
TC3.29	0.892964	0.993092	0.920857	0.960428	Moderado
TC3.30	0.997316	0.584151	0.616186	0.991131	Inactivo
TC3.32	0.957181	0.847148	0.576076	0.996173	Moderado
TC3.36	0.718472	0.489575	0.998227	0.988654	Moderado

<b>CODE</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>NNE3A</b>
TC3.47	0.792155	0.86635	0.965556	0.977626	Moderado
S016	0.995007	0.995483	0.983526	0.819976	Moderado
S015	0.091647	0.141366	0.670239	0.935058	Inactivo
S022	0.82943	0.401508	0.34919	0.20511	Moderado
S023	0.81734	0.849885	0.891995	0.906192	Moderado
S025	0.9934	0.966413	0.981011	0.64557	Inactivo
S026	0.920309	0.226057	0.815886	0.304833	Inactivo
S027	0.895419	0.961495	0.956591	0.966145	Moderado
S028	0.131616	0.818974	0.06542	0.668761	Moderado
S029	0.50798	0.988891	0.99259	0.77189	Moderado
S033	0.942765	0.915024	0.26918	0.126082	Activo
S035	0.812543	0.54843	0.937858	0.418083	Inactivo
S037	0.131658	0.841031	0.352617	0.385105	Moderado
S038	0.7339	0.962824	0.636369	0.994711	Moderado
S041	0.996458	0.992694	0.769943	0.863159	Moderado
S043	0.487171	0.884561	0.98331	0.964499	Activo
S045	0.916335	0.970672	0.989132	0.96047	Moderado
S047	0.983357	0.838205	0.994765	0.782272	Moderado
S048	0.990416	0.922879	0.997135	0.960594	Moderado
S049	0.926405	0.774995	0.798642	0.129012	Inactivo
VP01	0.703623	0.027812	0.004	0.107048	Activo
SC003	0.994097	0.968727	0.90412	0.775071	Inactivo
SC004a	0.983341	0.820646	0.736874	0.910604	Inactivo
SC004b	0.983341	0.820646	0.736874	0.910604	Moderado
SC004c	0.983341	0.820646	0.736874	0.910604	Moderado
SC004d	0.983341	0.820646	0.736874	0.910604	Moderado
SC005	0.865749	0.185696	0.097944	0.779632	Activo
SC006	0.750098	0.567481	0.831145	0.154949	Inactivo
SC007a	0.385744	0.992295	0.038351	0.011149	Activo
SC007b	0.923743	0.983726	0.882052	0.965654	Moderado
SC007c	0.018269	0.000221	0.517114	0.007859	Activo
SC007d	0.018269	0.000221	0.517114	0.007859	Activo
SC008	0.865749	0.185696	0.097944	0.779632	Activo
SC009	0.750098	0.567481	0.831145	0.154949	Inactivo
SC013	0.385744	0.992295	0.038351	0.011149	Activo
SC013	0.385744	0.992295	0.038351	0.011149	Moderado
SC015a	0.923743	0.983726	0.882052	0.965654	Moderado
SC015b	0.923743	0.983726	0.882052	0.965654	Moderado
SC016	0.018269	0.000221	0.517114	0.007859	Activo
SC018	0.942095	0.968073	0.944532	0.859359	Moderado
SC019	0.843217	0.914222	0.987228	0.945192	Moderado
SC109a	0.975144	0.959479	0.960841	0.980686	Moderado
SC109b	0.975144	0.959479	0.960841	0.980686	Moderado
SC023	0.621918	0.697046	0.972368	0.737418	Activo
SC024	0.98822	0.852607	0.135973	0.062941	Activo

<b>CODE</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>NNE3A</b>
SC025	0.629357	0.964304	0.874849	0.187881	Inactivo
SC027a	0.916217	0.432778	0.131367	0.473901	Moderado
SC027b	0.916217	0.432778	0.131367	0.473901	Moderado
SC030	0.053888	0.02107	0.455218	0.009373	Activo
SC031	0.902784	0.891084	0.736955	0.532509	Inactivo
SC034	0.475867	0.005765	0.003716	0.019339	Activo
SC035	0.602799	0.035635	0.051793	0.129587	Moderado
SC036	0.995584	0.984071	0.988153	0.993025	Moderado
SC037	0.136507	0.101676	0.749694	0.021657	Activo
SC038	0.996162	0.984482	0.964425	0.96959	Moderado
SC039	0.967461	0.951828	0.911369	0.760654	Inactivo
SC040	0.648571	0.833029	0.09525	0.903295	Moderado
SC041	0.826721	0.86411	0.992027	0.865264	Moderado
SC042	0.994695	0.920104	0.959523	0.982524	Moderado
SC043	0.152471	0.00729	0.546227	0.000841	Activo
SC044	0.839709	0.649083	0.354361	0.933078	Inactivo
SC045	0.960413	0.521084	0.898102	0.998129	Inactivo
VP116	0.009814	0.798164	0.145732	0.003521	Activo
SC046	0.11147	0.056888	0.058049	0.659519	Moderado
SC047	0.778927	0.892843	0.881091	0.99175	Moderado
SC048	0.05953	0.60935	0.029967	0.032362	Moderado
SC049	0.602799	0.035635	0.051793	0.129587	Moderado
SC050	0.05953	0.60935	0.029967	0.032362	Moderado
SC051	0.11147	0.056888	0.058049	0.659519	Moderado
SC052	0.386625	0.953441	0.288397	0.947091	Moderado
SC054	0.475867	0.005765	0.003716	0.019339	Activo
SC055	0.152471	0.00729	0.546227	0.000841	Activo
SC056	0.960413	0.521084	0.898102	0.998129	Inactivo
SC057	0.562126	0.349673	0.087205	0.820645	Inactivo
SC059	0.897659	0.409392	0.994277	0.984534	Inactivo
SC070	0.993678	0.998652	0.99696	0.983607	Moderado
SC074	0.705914	0.004215	0.17499	0.003067	Moderado
SC083a	0.163234	0.791742	0.128304	0.946791	Moderado
SC083b	0.589843	0.63512	0.977338	0.931913	Activo
SC084	0.475595	0.994351	0.600943	0.73035	Moderado
SC086	0.475595	0.994351	0.600943	0.73035	Moderado
SC089a	0.976649	0.969413	0.966917	0.867704	Moderado
SC089b	0.976649	0.969413	0.966917	0.867704	Moderado
SC090a	0.103711	0.93235	0.235906	0.596884	Moderado
SC090b	0.103711	0.93235	0.235906	0.596884	Moderado
SC091a	0.993096	0.939206	0.986876	0.879903	Moderado
SC091b	0.993096	0.939206	0.986876	0.879903	Moderado
SC093a	0.892427	0.442443	0.756128	0.18351	Inactivo
SC093b	0.892427	0.442443	0.756128	0.18351	Inactivo
SC094a	0.207088	0.638318	0.07177	0.939913	Moderado

<b>CODE</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>NNE3A</b>
SC094b	0.207088	0.638318	0.07177	0.939913	Moderado
SC096	0.565474	0.437244	0.072731	0.94398	Moderado
SC103	0.462694	0.701835	0.135976	0.931421	Inactivo
SC113	0.201281	0.764014	0.737779	0.49553	Moderado
SC114	0.988207	0.971045	0.945724	0.159186	Inactivo
SC115	0.953313	0.909668	0.956284	0.942964	Moderado
SC116	0.901485	0.588961	0.701257	0.553794	Inactivo
SC118	0.809545	0.130194	0.243296	0.455275	Moderado
SC119	0.006865	0.21455	0.570236	0.03064	Activo
SC120	0.194914	0.481644	0.925033	0.270904	Moderado
CO1101	0.960446	0.879399	0.907751	0.978067	Moderado
CO1102	0.989246	0.983634	0.93894	0.811026	Inactivo
CO1103	0.990117	0.936669	0.854229	0.989988	Inactivo
CO1104	0.837912	0.945261	0.972918	0.959639	Moderado
CO1105	0.953594	0.939595	0.871896	0.964808	Moderado
CO1106	0.992762	0.964211	0.942656	0.996925	Moderado
CO2103	0.110622	0.258619	0.698966	0.824974	Moderado
CO2106	0.148093	0.732172	0.224327	0.741617	Moderado
CO2107	0.052539	0.984946	0.001294	0.003892	Activo
CO2109	0.234712	0.181612	0.116858	0.872373	Inactivo
CO2110	0.950512	0.061935	0.001056	0.000506	Activo
CO2301	0.020459	0.892987	0.039398	0.824574	Moderado
CO2302	0.965779	0.932472	0.976835	0.953736	Moderado
CO4002	0.965779	0.932472	0.976835	0.953736	Moderado
SC122	0.941895	0.887017	0.925845	0.952871	Moderado
SC126	0.270483	0.951403	0.895671	0.07501	Activo
SC132	0.712161	0.082149	0.432934	0.946884	Inactivo
SC130	0.194914	0.481644	0.925033	0.270904	Moderado
SC127	0.270483	0.951403	0.895671	0.07501	Moderado
SC133	0.111566	0.882579	0.630823	0.230165	Inactivo
SC134	0.999757	0.654171	0.841588	0.998497	Inactivo
SC138	0.859402	0.175321	0.278504	0.959012	Inactivo
SC139	0.988597	0.179453	0.120231	0.828116	Activo
SC140	0.912975	0.980572	0.97316	0.850134	Moderado
SC141	0.131606	0.082863	0.656117	0.718082	Moderado
SC142	0.110833	0.820911	0.415595	0.980798	Moderado
SC143	0.160825	0.074056	0.95419	0.888182	Moderado
SC145	0.036413	0.039982	0.672389	0.901072	Inactivo
SC154	0.45842	0.972553	0.143912	0.89637	Moderado
SC155	0.111566	0.882579	0.630823	0.230165	Inactivo
SC156	0.788695	0.990721	0.997533	0.804252	Moderado
SC159	0.955765	0.972385	0.804334	0.987875	Inactivo
SV047	0.989768	0.848763	0.941183	0.964177	Moderado

## **BIBLIOGRAFÍA**







1. Population grows in twenty EU Member States. *Eurostat* **2011**.
2. [www.neurodegenerationresearch.eu](http://www.neurodegenerationresearch.eu).
3. Andersen, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence. *Nat. Med.* **2004**, *10*, Suppl, S18-25.
4. Doyle, K. M.; Kennedy, D.; Gorman, A. M.; Gupta, S.; Healy, S. J.; Samali, A. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 2025-2039.
5. Butterfield, D.; Castegna, A.; Pocernich, C.; Drake, J.; Scapagnini, G.; Calabrese, V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 444-461.
6. D'Onofrio, G.; Panza, F.; Seripa, D.; Sancarlo, D.; Paris, F.; Cascavilla, L. The APOE polymorphism in Alzheimer's disease patients with neuropsychiatric symptoms and syndromes. *Int. J. Geriatr. Psychiat.* **2011**, *26*, 1062-1070.
7. Bralten, J.; Arias-Vasquez, A.; Makkinje, R.; Veltman, J.; Brunner, H.; Fernández, G.; Rijpkema, M.; Franke, B. Association of the Alzheimer's gene SORL1 with hippocampal volume in young, healthy adults. *Am. J. Psychiat.* **2011**, *168*, 1083-1089.
8. Morgan, K. The three new pathways leading to Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2011**, *37*, 353-357.
9. Rodgers, A. B. Alzheimer's disease: unraveling the mystery *National Institute of Aging (NIH)* **2003**, *2*.
10. Malaguarnera, M.; Pistone, G.; Vinci, M.; Motta, M.; di Fazio, I.; Rampello, L. Tacrine treatment of Alzheimer's disease: many expectations, few certainties. *Neurobiol.* **1998**, *38*, 226-231.
11. Doody, R. S. clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontology* **1999**, *45*, 23-32.
12. Pearson, V. E. Galantamine: a new Alzheimer drug with a past life. *Ann. Pharmacother.* **2001**, *35*, 1406-1413.
13. Grossberg, G.; Irwin, P.; Satlin, A.; Mesenbrink, P.; Spiegel, R. Rivastigmine in Alzheimer disease: efficacy over two years. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2004**, *12*, 420-431.
14. Rogawski, M. A.; Wenk, G. L. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs Rev.* **2003**, *9*, 275-308.
15. Usenovic, M.; Tresse, E.; Mazzulli, J. R.; Taylor, J. P.; Krainc, D. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction,  $\alpha$ -synuclein accumulation and neurotoxicity. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 4240-4246.

16. Vyas, K. J.; Weiss, J. H. BMMA-an unusual cyanobacterial neurotoxin. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2009**, *10*, 50-55.
17. Rohn, T. T.; Catlin, L. W. Immunolocalization of influenza A virus and markers of inflammation in the human Parkinson's disease brain. *Plos One* **2011**, *6*, e20495.
18. Kalinderi, K.; Fidani, L.; Katsarou, Z.; Bostantjopoulou, S. Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease. *Int. J. Clin. Pract.* **2011**, *65*, 1289-1294.
19. Scherzinger, E.; Lurz, R.; Turmaine, M. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **1997**, *90*, 549-558.
20. Mary, V.; Wahl, F.; Stuzman, J. M. Effect of riluzole on quinolinate-induced neuronal damage in rats: comparison with blockers of glutamatergic neurotransmission. *Neurosci. Lett.* **1995**, *201*, 92-96.
21. Landwehrmeyer, G. B.; Dubois, B.; de Yébenes, J. G.; Kremer, B.; Gaus, W.; Kraus, P. H.; Przuntek, H.; Dib, M.; Doble, A.; Fischer, W.; Ludolph, A. C.; group, E. H. s. d. i. s. Riluzole in Huntington's disease: a 3-year, randomized controlled study. *Ann. Neurol.* **2007**, *62*, 262-272.
22. Ji-Wu, W.; Jonathan, R. B.; Andrew, T.; Neil, A. S.; Brian, D. M. The ALS-associated protein FUS and TDP-43 function together to affect Drosophila locomotion and life span. *J. Clin. Inves.* **2011**, *121*, 4118-4126.
23. Faisal, F.; Jianhua, Y.; Pavan, V.; Erdong, L.; Yi, Y.; Wenjie, C. SQSTM1 Mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* **2011**, *68*, 1440-1446.
24. Feldman, E. L.; Goldman, L.; Ausiello, D. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases*. 23<sup>rd</sup> ed.; 2007.
25. Borrás-Blasco, J.; Plaza-Macías, I.; Navarro-Ruiz, A.; Perís-Martí, J.; Antón-Cano, A. Riluzole as a treatment for amyotrophic lateral sclerosis. *Rev. Neurol.* **1998**, *27*, 1021-1027.
26. Merit, C.; Michael, E. B.; Evan, W. I.; Robert, M.; Hiroshi, M.; Jeremy, S.; Dan, H. M.; David, S.; James, L. M.; Donald, A.; Mary, S.; Craig, A.; Juliet, M.; Valentin, K. G. The effects of dexamipexole (KNS-760704) in individuals with amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1652-1656.
27. Stüve, O.; Oksenberg, J. Multiple Sclerosis overview. *Gene Reviews* **2010**.

28. Dayal, A. S.; Jensen, M. A.; Lledo, A.; Arnason, B. G. Interferon Beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* **1995**, *45*, 1277-1285.
29. Havia, J. B.; Pellkofer, H. L.; Meinl, I.; Gerdes, L. A.; Honnhfeld, R.; Kümpfel, T. Rebound of disease activity after withdrawal of fingolimod (FTY720) treatment. *Arch. Neurol.* **2012**, *69*, 262-264.
30. Lindsey, J.; Haden-Pinneri, K.; Memon, N.; Buja, L. Sudden unexpected death on fingolimod. *Mult. Scler.* **2012**, doi 10.1177/1352458512438456.
31. Lauterbach, E. C.; Mendez, M. F. Psychopharmacological neuroprotection in neurodegenerative diseases, part III: criteria-based assessment: a report of the ANPA. *J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci.* **2011**, *23*, 242-260.
32. Lauterbach, E. C.; Schillcutt, S. D.; Victoroff, J.; Coburn, K. L.; Mendez, M. F. Psychopharmacological neuroprotection in neurodegenerative disease: heuristic clinical applications. *J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci.* **2010**, *22*, 130-154.
33. Akiyama, H. Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku. J. Exp. Med.* **1994**, *174*, 295-303.
34. McGeer, E. G.; McGeer, P. L. The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease. *CNS Drugs* **2007**, *21*, 789-797.
35. Abbott, N. J.; Ronnback, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 41-53.
36. Binder, D. K.; Steinhäuser, C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* **2006**, *54*, 358-368.
37. Kraft, A. D.; Harry, G. J. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, *8*, 2980-3018.
38. Olsson, T. Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* **1995**, *144*, 245-268.
39. Adams, J.; Keith, K. P. *Extracellular and Intracellular Signaling*. 10<sup>th</sup> ed.; 2011.
40. Aandahl, E. M.; Moretto, W. J.; Haslett, P. A.; Vang, T.; Bryn, T.; Tasken, K.; Nixon, D. F. Inhibition of antigen-specific T cell proliferation and cytokine production by protein kinase A type I. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 802-808.
41. Vig, M.; George, A.; Sen, R.; Durdik, J.; Rath, S.; Bal, V. Commitment of activated T cells to secondary responsiveness is enhanced by signals mediated by cAMP-dependent protein kinase A-I. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1471-1481.

42. Biorgo, E.; Moltu, K.; Tasken, K. Phosphodiesterases as targets for modulating T-cell responses. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *204*, 345-363.
43. Braun, C. M.; Huang, S. K.; Kagey-Sobotka, A.; Lichtenstein, L. M.; Essayan, D. M. Co-regulation of antigen-specific T lymphocyte responses by type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinases (cAK). *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 871-879.
44. Ozegbe, P.; Foey, A. D.; Ahmed, S.; Williams, R. O. Impact of cAMP on the T-cell response to type II collagen. *Immunology* **2004**, *111*, 35-40.
45. Romagnani, S. Lymphokine production by human T-cells in disease states. *Ann. Rev. Immunol.* **1994**, *12*, 227-257.
46. Francis, S. H.; Conti, M.; Houslay, M. D. *Phosphodiesterases as drug targets*. Springer-Verlag: Germany, 2011.
47. Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *109*, 366-398.
48. Lugnier, C. PDE inhibitors: a new approach to treat metabolic syndrome? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 698-706.
49. Jeon, Y. H.; Heo, Y. S.; Kim, C. M.; Hyun, Y. L.; Lee, T. S.; Ro, S.; Cho, J. M. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2005**, *62*, 1198-1220.
50. Conti, M.; Beavo, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 481-511.
51. Francis, S. H.; Houslay, M. D.; Conti, M. Phosphodiesterase inhibitors: factors that influence potency, selectivity and action. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *204*, 47-84.
52. Schmidt, C. J. Phosphodiesterase inhibitors as potential cognition enhancing agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 222-230.
53. Repaske, D. R.; Corbin, J. G.; Conti, M.; Goy, M. F. A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience* **1993**, *56*, 673-686.
54. Sonnenburg, W. K.; Mullaney, P. J.; Beavo, J. A. Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17655-17661.

55. Boess, F. G. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacol.* **2004**, *47*, 1081-1092.
56. Liu, Y.; Shakur, Y.; Kambayashi, J. Phosphodiesterases as targets for intermittent claudication. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *204*, 211-236.
57. Yoshida, H.; Itoh, S.; Hara, T.; Sasaki, Y.; Kondo, S.; Nakagawa, T.; Asanuma, A.; Tanabe, S. A phosphodiesterase 3 inhibitor, K-134, improves hindlimb skeletal muscle circulation in rat models of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* **2012**, *221*, 84-90.
58. Li, M.; Yu, Y.; Yan, J.; Yan, L. Y.; Zhao, Y.; Li, R.; Liu, P.; Hsueh, A. J.; Qiao, J. The role of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, on oocyte maturation and subsequent pregnancy in mice. *Plos One* **2012**, *7*, e30649.
59. Rose, G. M.; Hopper, A.; De Vivo, M.; Tehim, A. Phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 3329-3334.
60. Ochiais, K.; Takita, S.; Eiraku, T.; Kojima, A.; Iwase, K.; Kishi, T.; Fukuchi, K.; Yasue, T.; Adams, D. R.; Allcock, R. W.; Jiang, Z.; Kohno, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 3: design, synthesis and structure-activity relationships of dual PDE3/4- inhibitory fused bicyclic heteroaromatic-dihydropyridazinones with anti-inflammatory and bronchodilatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1644-1658.
61. Movsesian, M. A.; Kukreja, R. C. Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *204*, 237-249.
62. Movsesian, M.; Wever-Pinzon, O.; Vandeput, F. PDE3 inhibition in dilated cardiomyopathy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 707-713.
63. Cherry, J. A.; Davis, R. L. Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J. Comp. Neurol.* **1999**, *407*, 287-301.
64. Rose, G. M.; Hopper, A.; De Vivo, M.; Tehim, A. A phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement. *Curr. Pharma. Des.* **2005**, *11*, 3329-3334.
65. Barad, M.; Bourtchouladze, R.; Winder, D.; Golan, D.; Kandel, E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A* **1998**, *95*, 15020-15025.
66. Ghavami, A.; Hirst, W. D.; Novak, T. J. Selective phosphodiesterase (PDE)-4 inhibitors: a novel approach to treating memory deficit? *Drugs R. D.* **2006**, *7*, 63-71.

67. Michel, G.; Renee, A.; Stephen, D.; Rebecca, D.; Daniel, D.; Laurence, D.; Richard, F. Discovery of MK-0952, a selective PDE4 inhibitor for the treatment of long-term memory loss and mild cognitive impairment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6387-6393.
68. Maxwell, C. R.; Kanes, S. J.; Abel, T.; Siegel, S. J. Phosphodiesterase inhibitors: a novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications. *Neuroscience* **2004**, *129*, 101-107.
69. Greten, T. F.; Eigler, A.; Sinha, B.; Moeller, J.; Endres, S. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram differentially regulates the proinflammatory mediators TNF-alpha and nitric oxide. *Int. J. Immunopharmacol.* **1995**, *17*, 605-610.
70. Harada, D.; Ikeda, Y.; Nosaka, Y.; Kobayashi, K.; Manabe, H. Curative effects of phosphodiesterase 4 inhibitors cilomilast, rolumilast, and rolipram in dermatitis mouse model. *J. Dermatol. Sci.* **2008**, *51*, 215-219.
71. Kanes, S. J.; Tokarczyk, J.; Siegel, S. J.; Bilker, W.; Abel, T.; Kelly, M. P. Rolipram: a specific phosphodiesterase 4 inhibitor with potential antipsychotic activity. *Neuroscience* **2007**, *144*, 239-246.
72. DeMarch, Z.; Giampá, C.; Patassini, S.; Bernardi, G.; Fusco, F. Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **2008**, *30*, 375-387.
73. Kalgutkar, A. S.; Choo, E.; Taylor, T. J.; Marfart, A. Disposition of CP-671,305 a selective phosphodiesterase 4 inhibitor in preclinical species. *Xenobiotica* **2004**, *34*, 755-770.
74. Hirose, R.; Manabe, H.; Nonaka, H.; Yanagawa, K.; Akuta, K.; Sato, S.; Ohshima, E.; Ichimura, M. Correlation between emetic effect of phosphodiesterase 4 inhibitors and their occupation of the high-affinity rolipram binding site in *Suncus murinus* brain. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *573*, 93-99.
75. Baye, J. Roflumilast (daliresp): a novel phosphodiesterase-4 inhibitor for the treatment of severe chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *37*, 149-161.
76. Reneerkens, O. A.; Rutten, K.; Akkerman, S.; Blokland, A.; Shaffer, C. L.; Menniti, F. S.; Steinbusch, H. W.; Prickaerts, J. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition improves object recognition memory: indications for central and peripheral mechanisms. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2012**, [doi.org/10.1016/j.nlm.2012.02.008](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.02.008)
77. Birch, D. G.; Toler, S. M.; Swanson, W. H.; Fish, G. E.; Laties, A. M. A double-blind placebo-controlled evaluation of the acute effects of sildenafil citrate

(Viagra) on visual function in subjects with early-stage age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* **2002**, *133*, 665-672.

78. Kerr, N. M.; Danesh-Meyer, H. V. Phosphodiesterase inhibitors and the eye. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **2009**, *37*, 514-523.

79. Li, L.; Yee, C.; Beavo, J. A. CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science* **1999**, *283*, 848-851.

80. Wang, H.; Liu, Y.; Chen, Y.; Robinson, H.; Ke, H. Multiple elements jointly determine inhibitor selectivity of cyclic nucleotide phosphodiesterases 4 and 7. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30949-30955.

81. Castaño, T.; Wang, H.; Campillo, N.; Ballester, S.; Gonzalez-Garcia, C.; Hernandez, J.; Perez, C.; Cuenca, J.; Perez-Castillo, A.; Martinez, A.; Huertas, O.; Gelpi, J.; Luque, F.; Ke, H.; Gil, C. Synthesis, structural analysis, and biological evaluation of thioxoquinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 866-876.

82. Ke, H.; Wang, H. Crystal structures of phosphodiesterases and implications on substrate specificity and inhibitor selectivity. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 391-403.

83. Castro, A.; Jerez, M. J.; Gil, C.; Martinez, A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 229-244.

84. Gil, C.; Campillo, N.; Perez, D. I.; Martinez, A. Phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors as new drugs for neurological and anti-inflammatory disorders. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2008**, *18*, 1127-1139.

85. Wang, P.; Wu, P.; Egan, R. W.; Billah, M. M. Cloning, characterization, and tissue distribution of mouse phosphodiesterase 7A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 1271-1277.

86. Smith, S. J.; Brookes-Fazakerley, S.; Donnelly, L. E.; Barnes, P. J.; Barnette, M. S.; Giembycz, M. A. Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2003**, *284*, L279-L289.

87. Han, P.; Zhu, X. Y.; Michaeli, T. Alternative splicing of the high affinity cAMP-specific phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16152-16157.

88. Gardner, C.; Robas, N.; Cawkill, D.; Fidock, M. Cloning and characterization of the human and mouse PDE7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*, 186-192.

89. Hetman, J. M.; Soderling, S. H.; Glavas, N. A.; Beavo, J. A. Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2000**, *97*, 472-476.
90. Giembycz, M. A.; Smith, S. J. Phosphodiesterase 7 (PDE7) as a therapeutic target. *Drugs Fut.* **2006**, *31*, 207-229.
91. Smith, S. J.; Cieslinski, L. B.; Newton, R.; Donnelly, L. E.; Fenwick, P. S.; Nicholson, A. G.; Barnes, P. J.; Barnette, M. S.; Giembycz, M. A. Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1679-1689.
92. Yang, G.; McIntyre, K. W.; Townsend, R. M.; Shen, H. H.; Pitts, W. J.; Dodd, J. H.; Nadler, S. G.; McKinnon, M.; Watson, A. Phosphodiesterase 7A-deficient mice have functional T cells. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 6414-6420.
93. Brown, K. M.; Lee, L. C.; Findlay, J. E.; Day, J. P.; Braille, G. S. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase, PDE8A1, is activated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 1631-1637.
94. Deninno, M. P.; Wright, S. W.; Visser, M. S.; Etienne, J. B.; Moore, D. E.; Olson, T. V.; Rocke, B. N.; Andrews, M. P.; Zarbo, C.; Millham, M. L.; Boscoe, B. P.; Boyer, D. D.; Doran, S. D.; Houseknecht, K. L. 1,5-substituted nipecotic amides: selective PDE8 inhibitors displaying diastereomer-dependent microsomal stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3095-3098.
95. Zhang, H. T. Phosphodiesterase targets for cognitive dysfunction and schizophrenia-a New York academy of Sciences meeting. *IDrugs* **2010**, *13*, 166-168.
96. Vardigan, J. D.; Converso, A.; Hutson, P. H.; Uslaner, J. M. The selective phosphodiesterase 9 (PDE9) inhibitor PF-04447943 attenuates a scopolamine-induced deficit in a novel rodent attention task. *J. Neurogenet.* **2011**, *25*, 120-126.
97. Kroker, K. S.; Rast, G.; Giovannini, R.; Marti, A.; Dorner-Ciossek, C.; Rosenbrock, H. Inhibition of acetylcholinesterase and phosphodiesterase-9A has differential effects on hippocampal early and late LTP. *Neuropharmacol.* **2012**, *62*, 1964-1974.
98. Seeger, T. F. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res.* **2003**, *985*, 113-126.
99. Siuciak, J. A. The role of phosphodiesterases in schizophrenia: therapeutic implications. *CNS Drugs* **2008**, *22*, 983-993.
100. Grauer, S. M.; Pulito, V. L.; Navarra, R. L.; Kelly, M. P.; Kelly, C.; Graf, R.; Langen, B.; Loque, S.; Brennan, J.; Jiang, L.; Charych, E.; Egerland, U.; Liu, F.;

Marquis, K. L.; Malamas, M.; Hage, T.; Comery, T. A.; Brandon, N. J. Phosphodiesterase 10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive and negative symptoms of schizophrenia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *331*, 574-590.

101. Tian, X.; Vroom, C.; Ghofrani, H. A.; Weissmann, N.; Bieniek, E.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Schermuly, R. T.; Pullamsetti, S. S. Phosphodiesterase 10A upregulation contributes to pulmonary vascular remodeling. *Plos One* **2011**, *6*, e18136.

102. Kleiman, R. J.; Kimmel, L. H.; Bove, S. E.; Lanz, T. A.; Harms, J. F.; Romegialli, A.; Miller, K. S.; Willis, A.; Des Etages, S.; Kuhn, M.; Schmidt, C. J. Chronic suppression of phosphodiesterase 10A alters striatal expression of genes responsible for neurotransmitter synthesis, neurotransmission, and signaling pathways implicated in Huntington's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 64-76.

103. Makhlof, A.; Kshirsagar, A.; Niederberger, C. Phosphodiesterase 11: a brief review of structure, expression and function. *Int. J. Impot. Res.* **2006**, *18*, 501-509.

104. Jäger, R.; Russwurm, C.; Schwede, F.; Genieser, H.; Koesling, D.; Russwurm, M. Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1210-1219.

105. Ceyhan, O.; Birsoy, K.; Hoffman, C. Identification of biologically active PDE11-selective inhibitors using a yeast-based high-throughput screen. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 155-163.

106. Menniti, F. S.; Faraci, W. S.; Schmidt, C. J. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 660-670.

107. Brandon, N. J.; Rotella, D. P. Potential CNS applications for PDEs inhibitors. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2007**, *42*, 3-12.

108. Halene, T. B.; Siegel, S. J. PDE inhibitors in psychiatry-future options for dementia, depression and schizophrenia? *Drug. Discov. Today* **2007**, *12*, 870-878.

109. Martinez, A.; Castro, A.; Gil, C.; Miralpeix, M.; Segarra, V.; Domenech, T.; Beleta, J.; Palacios, J. M.; Ryder, H.; Miro, X.; Bonet, C.; Casacuberta, J. M.; Azorin, F.; Piña, B.; Puigdomenech, P. Benzyl derivatives of 2,1,3-benzo- and benzothieno[3,2-a]thiadiazine 2,2-dioxides: first phosphodiesterase 7 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 683-689.

110. Castro, A.; Abasolo, M.; Gil, C.; Segarra, V.; Martinez, A. CoMFA of benzyl derivatives of 2,1,3-benzo and benzothieno [3,2- $\alpha$ ]thiadiazine 2,2-dioxides: clues for the design of phosphodiesterase 7 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *36*, 333-338.

111. Barnes, M. J.; Cooper, N.; Davenport, R. J.; Dyke, H. J.; Galleway, F. P.; Galvin, F. C.; Gowers, L.; Haughan, A. F.; Lowe, C.; Meissner, J. W.; Montana, J. G.; Morgan, T.; Picken, C. L.; Watson, R. J. Synthesis and structure-activity relationships of guanine analogues as phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1081-1083.
112. Lowe, C.; Dyke, H. J.; Haughan, A. F.; Findlay, J. E.; Galvin, F. C.; Morgan, T.; Picken, C. L. Heterobiarylsulphonamides and their use as PDE7 inhibitors. WO0174786. **2001**.
113. Haughan, A. F.; Findlay, J. E.; Lowe, C.; Buckley, G. M.; Dyke, H. J.; Galvin, F. C.; Mack, S. R.; Meissner, J. W.; Morgan, T.; Watson, R. J.; Picken, C. L.; Runcie, K. A. Sulphonamide derivatives. WO0198274. **2001**.
114. Aubart, K. M.; S.B., C.; Leber, J. D. Compounds and their use as PDE inhibitors. US2002/0156064. **2002**.
115. Pekkinen, M.; Ahlström, M. E.; Riehle, U.; Huttunen, M. M.; Lamberg-Allardt, C. J. Effects of phosphodiesterase 7 inhibition by RNA interference on the gene expression and differentiation of human mesenchymal stem cell-derived osteoblasts. *Bone* **2008**, *73*, 84-91.
116. Vergne, F.; Bernardelli, P.; Lorthois, E.; Pham, N.; Proust, E.; Oliveira, C.; Mafroud, A. K.; Royer, F.; Wrigglesworth, R.; Schellhaas, J.; Barvian, M.; Moreau, F.; Idrissi, M.; Tertre, A.; Bertin, B.; Coupe, M.; Berna, P.; Soulard, P. Discovery of thiadiazoles as a novel structural class of potent and selective PDE7 inhibitors. Part 1: design, synthesis and structure-activity relationship studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4607-4613.
117. Vergne, F.; Bernardelli, P.; Lorthois, E.; Pham, N.; Proust, E.; Oliveira, C.; Mafroud, A. K.; Ducrot, P.; Wrigglesworth, R.; Berlioz-Seux, F.; Coleon, F.; Chevalier, E.; Moreau, F.; Idrissi, M.; Tertre, A.; Descours, A.; Berna, P.; Li, M. Discovery of thiadiazoles as a novel structural class of potent and selective PDE7 inhibitors. Part 2: metabolism-directed optimization studies towards orally bioavailable derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4615-4621.
118. Bernadelli, P.; Ducrot, P.; Lorthois, E.; Vergne, F. Spirotricyclic derivatives and their use as phosphodiesterase-7 inhibitors. US2002/0198198. **2002**.
119. Warner-Lambert. New spirocondensed quinazolinones and their use as phosphodiesterase inhibitors. WO2004/026818 **2004**.
120. Bernadelli, P.; Ducrot, P.; Lorthois, E.; Vergne, F. New spirotricyclic derivatives and their use as phosphodiesterase-7 inhibitors. WO02/076953. **2002**.
121. Bernadelli, P.; Ducrot, P.; Lorthois, E.; Vergne, F. New spirotricyclic derivatives and their use as phosphodiesterase-7 inhibitors. WO02074754. **2002**.

122. Rawson, D. J.; Swain, N. A. Spirocyclic derivatives. WO2007063391. **2007**.
123. Bernardelli, P.; Vergne, F.; Mendes, C.; Ducrot, P. New Spirocondensed quinazolinones and their use as phosphodiesterase inhibitors. WO2004/026818. **2004**.
124. Lorthiois, E.; Bernardelli, P.; Vergne, F.; Oliveira, C.; Mafroud, A. K.; Proust, E.; Heuze, L.; Moreau, F.; Idrissi, M.; Tertre, A.; Bertin, B.; Coupe, M.; Wrigglesworth, R.; Descours, A.; Soulard, P.; Berna, P. Spiroquinazolinones as novel, potent, and selective PDE7 inhibitors. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4623-4626.
125. Kadoshima-Yamaoka, K.; Murakawa, M.; Goto, M.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Nagahira, A.; Hayashi, Y.; Nagahira, K.; Miura, K.; Nakatsuka, T.; Chamoto, K.; Fukuda, Y.; Nishimura, T. ASB16165, a novel inhibitor of phosphodiesterase 7A (PDE7A) suppresses IL-12-induced IFN-gamma production by mouse activated T lymphocytes. *Immunol. Lett.* **2009**, *22*, 193-197.
126. Goto, M.; Kadoshima-Yamaoka, K.; Murakawa, M.; Yoshioka, R.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Kanki, S.; Hayashi, Y.; Nagahira, K.; Ogata, A.; Nakatsuka, T.; Fukuda, Y. Phosphodiesterase 7A inhibitor ASB16165 impairs proliferation of keratinocytes in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *633*, 93-97.
127. Bergmann, J. E.; Cutshall, N. S.; Demopoulos, G. A.; Florio, V. A.; Gray, P.; Hohmann, J.; Zeng, H. Use of PDE7 inhibitors for the treatment of movement disorders. US20100113486. **2010**.
128. Guo, J.; Watson, A.; Kempson, J.; Carlsen, M.; Barbosa, J.; Stebbins, K.; Lee, D.; Dood, J.; Nadler, S.; McKinnon, M.; Barrish, J.; Pitts, W. Identification of potent pyrimidine inhibitors of phosphodiesterase 7 (PDE7) and their ability to inhibit T cell proliferation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1935-1938.
129. Terricabras, B. E.; Segarra, M. V.; Alvarez-Builla, G. J.; Vaquero, L. J.; Minguez, O. J. 4-Aminothieno[2,3-d]pyrimidine-6-carbonitrilo derivatives as PDE7 inhibitors. WO2004065391. **2004**.
130. Castro, A.; Jerez, M. J.; Gil, C.; Calderon, F.; Domenech, T.; Nueda, A.; Martinez, A. CODES, a novel procedure for ligand-based virtual screening: PDE7 inhibitors as an application example. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1349-1359.
131. Gewald, R.; Rueger, C.; Grunwald, C.; Egerland, U.; Hoefgen, N. Synthesis and structure-activity relationship studies of dihydronaphthyridinediones as a novel structural class of potent and selective PDE7 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6652-6656.

132. Kapetanovic, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *171*, 165-176.
133. Kennedy, T. Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 436-444.
134. Bleicher, K.; Böhm, H.; Müller, K.; Alanine, A. A guide to drug discovery: hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 192-204.
135. Schneider, G.; Fechner, U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 649-663.
136. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 935-949.
137. Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug. Discovery* **2002**, *1*, 882-894.
138. Barbosa, F.; Dragos, H. Molecular similarity and property similarity. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 589-600.
139. Duch, W.; Swaminathan, K.; Meller, J. Artificial intelligence approaches for rational drug design and discovery. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 1497-14508.
140. Li, Z.; Huang, H.; Sun, H.; Jiang, H.; Liu, H. Microwave-assisted efficient and convenient synthesis of 2,4(1H,3H)-quinazolinediones and 2-thioxoquinazolines. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 484-486.
141. Mavandadi, F.; Pilotti, A. The impact of microwave-assisted organic synthesis in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 165-174.
142. Kappe, C. O.; Dallinger, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 51-63.
143. Kappe, C. O.; Stadler, A.; Dallinger, D. *Microwaves in organic and medicinal chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed.; Willey-VCH Verlag GmbH & Co: Germany, 2012.
144. Meanwell, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529-2591.
145. Robichaud, A.; Stamatiou, P. B.; Jin, S. L.; Lachance, N.; MacDonald, D.; Laliberte, F.; Liu, S.; Huang, Z.; Conti, M.; Chan, C. C. Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha (2)-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 1045-1052.
146. Stone, W. L.; Yang, H.; Qui, M. Assays for nitric oxide expression. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *315*, 245-256.

147. Pardridge, W. M. Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimer's Dementia* **2009**, *5*, 427-432.
148. Guerra, A.; Páez, J. A.; Campillo, N. E. Artificial neural networks in admet modeling: prediction of blood-brain barrier permeation. *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 586-594.
149. Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223-232.
150. Arce, M. P.; Rodriguez-Franco, M.; Gonzalez-Muñoz, G.; Perez, C.; Lopez, B.; Villarroya, M.; Lopez, M.; Garcia, A.; Conde, S. Neuroprotective and cholinergic properties of multifunctional glutamic acid derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7249-7257.
151. Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 38-52.
152. Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Roos, H.; Andersson, K.; Borg, P.; Hamalainen, M.; Karlsson, R. Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1986-1992.
153. Pistolozzi, M.; Franchini, C.; Corbo, F.; Muraglia, M.; De Giorgi, M.; Felix, G.; Bertucci, C. Tocainide analogues binding to human serum albumin: a HPLAC and circular dichroism study. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2010**, *53*, 179-185.
154. Cimitan, S.; Lindgren, M. T.; Bertucci, C.; Danielson, U. H. Early absorption and distribution analysis of antitumor and anti-AIDS drugs: lipid membrane and plasma protein interactions. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3536-3546.
155. Goodman, A.; Gilman, A. G. *The pharmacological basis of therapeutics*. Milan, 2003.
156. Zhong, L. M.; Zong, Y.; Sun, L.; Guo, J. Z.; Zhang, W.; He, Y.; Song, R.; Wang, W. M.; Xiao, C. J.; Lu, D. Resveratrol inhibits inflammatory responses via the mammalian target of rapamycin signaling pathway in cultured LPS-stimulated microglial cells. *Plos One* **2012**, *7*, e32195.
157. Pérez, D. I.; Pistolozzi, M.; Palomo, V.; Redondo, M.; Fortugno, C.; Gil, C.; Felix, G.; Martinez, A.; Bertucci, C. 5-imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) and phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors. Determination of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin. *Eur. J. Pharma. Sci.* **2012**, *45*, 677-684.

158. Kim, B. S.; Margolin, B. H. Prediction of rodent carcinogenicity utilizing a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. *Environ. Mol. Mutagen.* **1999**, *34*, 297-304.
159. Redondo, M.; Palomo, V.; Brea, J.; Perez, D. I.; Martín-Álvarez, R.; Perez, C.; Paúl-Fernandez, N.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Mengod, G.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. Identification in silico and validation in vitro of novel phosphodiesterase 7 inhibitors with effect in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 793-803.
160. Paterniti, I.; Mazzon, E.; Gil, C.; Implicazzari, D.; Palomo, V.; Redondo, M.; Perez, D. I.; Esposito, E.; Martinez, A.; Cuzzocrea, S. PDE7 inhibitors: new potential drugs for the therapy of spinal cord injury. *Plos One* **2011**, *6*, e15937.
161. McCoy, M. K.; Martinez, T. N.; Ruhn, K. A.; Szymkowski, D. E.; Smith, C. G.; Botterman, B. R.; Tansey, K. E.; Tansey, M. G. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 9365-9375.
162. Morales-Garcia, J.; Redondo, M.; Gil, C.; Alonso-Gil, S.; Martinez, A.; Santos, A.; Perez-Castillo, A. Phosphodiesterase 7 inhibition preserves dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease. *Plos One* **2011**, *6*, e17240.
163. Pérez-Gonzalez, R.; Antequera, D.; Bolos, M.; Pérez, V.; Redondo, M.; Sarasa, M.; Gil, C.; Martinez, A.; Carro, E. Phosphodiesterase 7 inhibitor S14 regulates astrocytes-induced degradation of brain amyloid- $\beta$ . *The Journal of the Alzheimer's association* **2011**, *7*, S452.
164. Caso, J. R.; Pradillo, J. M.; Hurtado, O.; Lorenzo, P.; Moro, M. A.; Lizasoain, I. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* **2007**, *115*, 1599-1608.
165. Chen, S. T.; Hsu, C. Y.; Hogan, E. L.; Maricq, H.; Balentine, J. D. A model of focal ischemic stroke in rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* **1986**, *17*, 738-743.
166. Liu, T. H.; Beckman, J. S.; Freeman, B. A.; Hogan, E. L.; Hsu, C. Y. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am. J. Physiol.* **1989**, *256*, H589-H593.
167. Redondo, M.; Zarruk, J. G.; Ceballos, P.; Perez, D. I.; Perez, C.; Perez-Castillo, A.; Moro, M. A.; Brea, J.; Val, C.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Campillo, N. E.; Martinez, A.; Gil, C. Neuroprotective efficacy of quinazoline type phosphodiesterase 7

inhibitors in cellular cultures and experimental stroke model. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 175-185.

168. Moreno, B.; Espejo, C.; Mestre, L.; Suardiaz, M.; Clemente, D.; De Castro, F. Guía de uso adecuado de modelos animales para el desarrollo de terapias en esclerosis múltiple. *Rev. Neurol.* **2012**, *54*, 114-124.

169. Lipton, H. L. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infect. Immun.* **1975**, *11*, 1147-1155.

170. Gil, C.; Redondo, M.; Pérez, C.; Martínez, A.; Susín, C.; Pérez-Castillo, A.; Mestre, L.; Guaza, C. Potential of phosphodiesterase-7 (PDE7) inhibitors for the treatment of multiple sclerosis. *French-Spain meeting on multiple sclerosis 2010*, Book of Abstracts.

171. Martínez, A.; Gil, C.; Pérez, C.; Pérez-Castillo, A.; Morales, J.; Redondo, M.; Sanz, M. Uso de derivados de quinazolina y sus composiciones farmacéuticas en enfermedades neurodegenerativas. WO2010133742 (extensión Europa, USA, Japón, Australia)

#### **2009.**

172. Gil, C.; Martínez, A.; Redondo, M.; Garcia Fernandez, A.; Campillo, N.; Perez, D. I.; Brea, J.; Ametzazurra, A.; Hormaetxe, I.; Loza, M. I.; Cadavid, M.; Simon Buela, L. Quinazolininas S-sustituidas y sus aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades mediadas por PDE7. P201231413. **2012**.

173. Jerez, M. J.; Castro, A.; Gil, C.; Martínez, A. Development of a pharmacophoric model for specific PDE7 inhibitors. *Drugs Fut.* **2004**, *29*, P129.

174. Gil, C.; Castro, A.; Jerez, M. J.; Ke, H.; Wang, H.; Ballester, S.; González-García, C.; Martínez, A. A new PDE7 inhibitors leads for neurodegenerative diseases discovered by using a pharmacophoric model. *Drugs Fut.* **2008**, *33*, P228.

175. Lima, L. M.; Barreriro, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23-49.

176. Iselt, M.; Holtei, W.; Hilgard, P. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. *Arzneimittelforschung* **1989**, *39*, 747-749.

177. Redondo, M.; Brea, J.; Perez, D. I.; Soteras, I.; Val, C.; Perez, C.; Morales-garcia, J.; Alonso-Gil, S.; Paul-Fernandez, N.; Martin-Alvarez, R.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Perez-Castillo, A.; Mengod, G.; Campillo, N. E.; Martínez, A.; Gil, C. Effect of phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Discovery of a new chemically diverse family of compounds. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3274-3284.

178. Gil, C.; Martinez, A.; Redondo, M.; Campillo, N.; Pérez, D. I.; Pérez-Castillo, A.; Loza, M. I.; Cadavid, M.; Brea, J. Derivados heterocíclicos de nuevos inhibidores de fosfodiesterasa 7. P201130712. **2011**.
179. Erb, R. J. Introduction to Backpropagation Neural Network Computation. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 165-170.
180. Agatonovic-Kustrin, S.; Beresford, R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 717-727.
181. Garg, P.; Verma, J. In silico prediction of blood brain barrier permeability: an artificial neural network model. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 289-297.
182. Liu, R.; Sun, H.; So, S. S. Development of quantitative structure-property relationship models for early ADME evaluation in drug discovery. 2. Blood-brain barrier penetration. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1623-1632.
183. Li, H.; Yap, C. W.; Ung, C. Y.; Xue, Y.; Cao, Z. W.; Chen, Y. Z. Effect of selection of molecular descriptors on the prediction of blood-brain barrier penetrating and nonpenetrating agents by statistical learning methods. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 1376-1384.
184. Winkler, D. A. Neural networks as robust tools in drug lead discovery and development. *Mol. Biotechnol.* **2004**, *27*, 139-168.
185. Durisova, M.; Dedik, L. New mathematical methods in pharmacokinetic modeling. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *96*, 335-342.
186. Iyer, M.; Mishru, R.; Han, Y.; Hopfinger, A. J. Predicting blood-brain barrier partitioning of organic molecules using membrane-interaction QSAR analysis. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1611-1621.
187. Vilar, S.; Santana, L.; Uriarte, E. Probabilistic Neural Network Model for the In Silico Evaluation of Anti-HIV Activity and Mechanism of Action. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1118-1124.
188. López-Rodríguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernández, E.; Rosado, M. L.; Pardo, L.; Schaper, K.-J. Synthesis and Structure-Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. 6. Study of the 5-HT  $1_{A/\alpha 1}$ -Adrenergic Receptor Affinity by Classical Hansch Analysis, Artificial Neural Networks, and Computational Simulation of Ligand Recognition. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 198-207.
189. Kovesdi, I.; Dominguez-Rodríguez, M. F.; Orfi, L.; Naray-Szabo, G.; Varro, A.; Papp, J. G.; Matyus, P. Application of neural networks in structure-activity relationships. *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 249-269.

190. Sadat Hayatshahi, S. H.; Abdolmaleki, P.; Safarian, S.; Khajeh, K. Non-linear quantitative structure-activity relationship for adenine derivatives as competitive inhibitors of adenosine deaminase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338, 1137-1142.
191. Devillers, J. *Neural networks in QSAR and Drug Design* 1<sup>st</sup> ed.; Lyon, 1996.
192. Zupan, J. *Neural Networks in chemistry and drug design* 2<sup>nd</sup> ed ed.; Wiley-vch: Weinheim, 1999.
193. Pitts, W. J.; Vaccaro, W.; Huynh, T.; Leftheris, K.; Roberge, J. Y.; Barbosa, J.; Guo, J.; Brown, B.; Watson, A.; Donaldson, K.; Starling, G. C.; Kiener, P. A.; Poss, M. A.; Dodd, J. H.; Barrish, J. C. Identification of purine inhibitors of phosphodiesterase 7 (PDE7). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2955-2958.
194. CODES v1.0. Idea original Prof. Manfred Stud.
195. Kohler, W. *The task of Gestalt psychology*. New Jersey, 1969; p 66-92.
196. Weinenger, D. SMILES: A chemical language for information systems.1. introduction to methodology and encoding rules. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1988**, 28, 31-36.
197. Weinenger, D. SMILES: 2. Algorithm ofr generation of unique SMILES notation. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1989**, 29, 97-101.
198. Livingstone, D. J.; Hesketh, G.; Clayworth, D. Novel method for the display of multivariate data using neural networks. *J. Mol. Graph.* **1991**, 9, 115-118.
199. Dorronsoro, I.; Chana, A.; Abasolo, I.; Castro, A.; Gil, C.; Stud, M.; Martinez, A. CODES/neural network model: a usedful tool for in silico prediction of oral absortion and blood-brain barrier permeability of structurally diverse drugs. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, 23, 89-98.
200. Akhand, M. A.; Islam, M. M.; Murase, K. A comparative study of data sampling techniques for constructing neural network ensembles. *Int. J. Neural. Syst.* **2009**, 19, 67-89.
201. Andrea, T. A.; Kalayeh, H. Applications of neural networks in quantitative structure-activity relationships of dihydrofolate reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2824-2836.
202. So, S. S.; Richards, W. G. Application of neural networks: quantitative structure-activity relationships of the derivatives of 2,4-diamino-5-(substituted-benzyl)pyrimidines as DHFR inhibitors. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3201-3207.
203. TSAR v3.3. Oxford Molecular Ltd. [<http://www.oxomol.com>].

204. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
205. Tamai, I.; Tsuji, A. Drug delivery through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *19*, 401-424.
206. Norinder, U.; Haeblerlein, M. Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 291-313.
207. Crivori, P.; Cruciani, G.; Carrupt, P. A.; Testa, B. Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2204-2216.
208. Nankervis, J.; Ho, P.; Morton, C.; Ng, H. L.; Hancock, N.; Parker, M.; Martin, T. J.; Manallack, D.; Thompson, P. Synthesis of novel thiophene compounds as PDE4 inhibitors. *Drugs Fut.* **2010**, *35*, 522.
209. Palomo, V.; Perez, D. I.; Perez, C.; Morales-Garcia, J.; Soteras, I.; Alonso-Gil, S.; Encinas, A.; Castro, A.; Campillo, N. E.; Perez-Castillo, A.; Gil, C.; Martinez, A. 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles: first small molecules as substrate competitive inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1645-1661.
210. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferring, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 269-288.
211. Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of Autodock. *J. Mol. Recognition* **1996**, *9*, 1-5.
212. [dock.compbio.ucsf.edu](http://dock.compbio.ucsf.edu).
213. Cole, J. C.; Nissink, J. W. M.; Taylor, R. *Protein-ligand docking and virtual screening with Gold*. Florida (USA), 2005.
214. Pang, Y. P.; Perola, E.; Xu, K.; Prendergast, F. G. EUDOC: a computer program for identification of drug interaction sites in macromolecules and drug leads from chemical databases. *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 1750-1771.
215. Majeux, N.; Scarsi, M.; Caflisch. Efficient electrostatic solvation model for protein-fragment docking. *Proteins* **2001**, *42*, 256-268.
216. Honma, T.; Hayashi, K.; Aoyama, T.; Hashimoto, N.; Machida, T.; Fukasawa, K.; Iwama, T.; Ikeura, C.; Ikuta, M.; Suzuki-Takahashi, I. Structure-based generation of a new class of potent CDK4 inhibitors: new *de novo* design strategy and library design. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4615-4627.
217. David, L.; Luo, R.; Gilson, M. K. Ligand-receptor docking with the Mining Minima Optimizer. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 157-171.

218. Abagyan, R.; Totrov, M. High-throughput docking for lead generation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 375-382.
219. Shoichet, B. K.; McGovern, S. L.; Wein, B.; Irwin, J. J. Lead discovery using molecular docking. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 439-446.
220. Jain, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 499-511.
221. Wang, P.; Wu, P.; Egan, R. W.; Billah, M. M. Cloning, characterization, and tissue distribution of mouse phosphodiesterase 7A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 1271-1277.
222. Smith, S. J.; Brookes-Fazakerley, S.; Donnelly, L. E.; Barnes, P. J.; Barnette, M. S.; Giembycz, M. A. Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2003**, *284*, L279-L289.
223. Han, P.; Zhu, X. Y.; Michaeli, T. Alternative splicing of the high affinity cAMP-specific phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16152-16157.
224. Glavas, N. A.; Ostenson, C.; Schaefer, J. B.; Vasta, V.; Beavo, J. A. T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6319-6324.
225. Gardner, C.; Robas, N.; Cawkill, D.; Fidock, M. Cloning and characterization of the human and mouse PDE7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*, 186-192.
226. Hetman, J. M.; Soderling, S. H.; Glavas, N. A.; Beavo, J. A. Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 472-476.
227. Giembycz, M. A.; Smith, S. J. Phosphodiesterase 7 (PDE7) as a therapeutic target. *Drugs Fut.* **2006**, *31*, 207-229.
228. Ramadevi, S.; Sunitatajne, S. Theoretical model of the catalytic domain of cAMP specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 7B. *to be published* **2012**.
229. Winkler, D. A. The role of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in biomolecular discovery. *Brief. Bioinform.* **2002**, *3*, 73-86.
230. Schmidtke, P.; Souaille, C.; Estienne, F.; Bauring, N.; Kroemer, R. T. Large-scale comparison of four binding site detection algorithms. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 2191-2200.
231. <http://fpocket.sourceforge.net>.
232. Ke, H.; Wang, H.; Ye, M. Structural insight into the substrate specificity of phosphodiesterases. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *204*, 121-134.

233. Alagarsamy, V.; Giridhar, R.; Yadav, M. Synthesis and pharmacological investigation of novel 1-substituted-4-phenyl-1,2,4-triazolo[4,3-a]quinazolin-5(4H)-ones as a new class of H1-antihistaminic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1877-1880.
234. Muthusamy, S.; Ramakrishnan, V. T. A facile photochemical-synthesis of 12*H*-benzothiazolo[2,3-*b*]quinazolin-12-ones. *Synthetic Commun.* **1992**, *22*, 519-533.
235. Kottke, K.; Kühmstedt, H. The preparation of 2-hydrazino-3-arylquinazolones-(4)-synthesis of compounds with and aminoguanidine structure. *Pharmazie* **1978**, *33*, 19-23.
236. Jerez, M. J. Técnicas computacionales para el desarrollo de nuevos fármacos inhibidores selectivos de fosfodiesterasa 7 como estrategia para el tratamiento de patologías inflamatorias. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. **2005**.
237. McCarthy, J. E.; Haines, E. L.; VanderWerf, C. A. Synthesis of some thioquinazolones of interest as potential ataractic agents. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 964-966.
238. Glennon, R. A.; Von Strandtmann, M. Cyclodehydration of N-[2-(Heteroarylcarbamoyl)methyl]benzamides. Preparation of 5-(heteroarylamino)oxazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12*, 135-138.
239. Grundler, G.; Gutterer, B.; Hatzelmann, A.; Stadlwieser, J.; Sterk, G.; Weinbrenner, S. (Dihydro)isoquinoline derivatives as phosphodiesterase inhibitors. BYK Gulden Lomberg Chemische Fabrik. BMBH WO0240450. **2002**.
240. Grundler, G.; Gutterer, B.; Hatzelmann, A.; Stadlwieser, J.; Sterk, G.; Weinbrenner, S. Dihydroisoquinolines as novel phosphodiesterase inhibitors. BKY Gulden Lomberg Chemische Fabrik. GMBH WO0240449. **2002**.
241. Jones, N. A.; Leport, M.; Holand, T.; Vos, T.; Morgan, M.; Fink, M.; Pruniaux, M. P.; Berthelie, C.; O'Connor, B. J.; Bertrand, C.; Page, C. P. Phosphodiesterase (PDE) 7 in inflammatory cells from patients with asthma and COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2007**, *20*, 60-68.
242. Yamamoto, S.; Sugahara, S.; Ikeda, K.; Shimizu, Y. Pharmacological profile of a novel phosphodiesterase 7A and -4 dual inhibitor, YM-393059, on acute and chronic inflammation models. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *550*, 166-172.
243. Pitts, W. J.; Watson, A. J.; Dodd, J. H. Dual inhibitors of PDE7 and PDE4. Bristol-Myers Squibb Company. WO02088080. **2002**.

