

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Química Orgánica I



**INCURSIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE AGENTES  
ANTIANGIOGÉNICOS INNOVADORES :  
APROXIMACIÓN AL DISEÑO Y SÍNTESIS DE  
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE TROMBINA  
PAR1**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**M<sup>a</sup> del Pilar Ventosa Andrés**

Bajo la dirección de la doctora

M<sup>a</sup> del Rosario Herranz Herranz

**Madrid, 2012**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



**INCURSIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE AGENTES  
ANTIANGIOGÉNICOS INNOVADORES:  
APROXIMACIÓN AL DISEÑO Y SÍNTESIS DE  
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE TROMBINA  
PAR1.**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> del PILAR VENTOSA ANDRÉS**

**Directora: Dra. M<sup>a</sup> del Rosario Herranz Herranz**

**Madrid, 2011**



A mis padres, hermanos, Lucia, Alex y "La Bisa Gemi"



### **Agradecimientos**

*El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Instituto de Quimica Medica del CSIC, gracias a la beca FPI asociado a proyecto SAF-2006-01205 y contrato predoctoral del proyecto SAF2009-09323, concedidas por el Ministerio de Ciencia e Innovacion y el CSIC, respectivamente, instituciones a las que quisiera expresar mi agradecimiento.*



## INDICE

NOTA SOBRE NOMENCLATURA.....	11
NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS.....	11
ABREVIATURAS.....	13
ANEXO I: AMINOÁCIDOS.....	17
1. INTRODUCCIÓN .....	21
1.1. ANTECEDENTES.....	21
1.1.1. Trombina: Una enzima esencial en homeostasis.....	21
1.1.2. Receptor de trombina PAR1: Estructura primaria, especificidad, activación, señalización y desensibilización.....	21
1.1.3. PAR1 en cáncer y angiogénesis .....	28
1.1.3.1. Asociación hipercoagulación-cáncer.....	28
1.1.3.2. Sobreexpresión de PAR1 en cáncer.....	28
1.1.3.3. Activación y señalización de PAR1 relacionadas con cáncer .....	29
1.1.3.4. PAR1 y angiogénesis.....	31
1.1.4. Activación de PAR1 por trombina: Estudios estructurales.....	32
1.1.5. Moduladores de PAR1 .....	36
1.2. HIPÓTESIS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS ANTAGONISTAS DE PAR1 .....	43
1.3. OBJETIVOS.....	45
1.4. PLAN DE TRABAJO .....	46
1.4.1. Diseño de estructuras.....	46
1.4.2. Síntesis.....	48
1.4.3. Evaluación Biológica .....	49
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
2.1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE UREAS Y TIOUREAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS.....	53
2.1.1. Síntesis.....	53
2.1.1.1. Síntesis de $\alpha$ -aminonitrilos.....	54
2.1.1.2. Reducción del grupo CN de $\alpha$ -aminonitrilos.....	62
2.1.1.3. Síntesis de ureas.....	65
2.1.1.4. Síntesis de ureas análogas al antagonista PAR1 de referencia RWJ-58259. ....	68
2.1.1.5. Síntesis de tioureas.....	68
2.1.2. Evaluación Biológica .....	69

2.1.2.1. Evaluación de la actividad antagonista sobre receptores PAR1. ....	69
2.1.2.2. Evaluación biológica como agentes antitumorales. ....	71
2.1.3. Conclusiones .....	74
2.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE 2- OXOPIPERAZINA .....	75
2.2.1. Síntesis .....	78
2.2.2. Evaluación Biológica .....	88
2.2.2.1. Evaluación de la actividad antagonista de receptores PAR1 .....	88
2.2.2.2. Evaluación de la actividad citotóxica.....	89
2.2.3. Conclusiones .....	89
2.3. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE IMINOHIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS .....	91
2.3.1. Síntesis .....	96
2.3.1.1. Síntesis de $\alpha$ -ureidonitrilos derivados de $\alpha$ -aminonitrilos. ....	96
2.3.1.2. Síntesis de derivados de 4-iminohidantoína. ....	103
2.3.1.3. Síntesis de hidantoínas. ....	114
2.3.2. Evaluación Biológica .....	119
2.3.3. Conclusiones .....	120
3. CONCLUSIONES GENERALES .....	125
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	129
4.1. PRODUCTOS DE ORIGEN COMERCIAL .....	129
4.2. MÉTODOS GENERALES.....	131
4.3. SÍNTESIS DE UREAS Y TIOUREAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS .....	133
4.3.1. Productos de partida no comerciales.....	127
4.3.2. Síntesis de $\alpha$ -aminonitrilos.....	130
4.3.3. Reduccion del grupo CN de los $\alpha$ -aminonitrilos.....	137
4.3.4. Síntesis de ureas.....	139
4.3.5. Sintesis de ureas análogas al antagonista de referencia RWJ-58259.....	155
4.3.6. Sintesis de tioureas.....	158
4.4. SÍNTESIS DE 2-OXOPIPERAZINAS .....	167
4.4.1. Productos de origen comercial.....	161
4.4.2. Sintesis de 2-oxopiperazinas.....	164

4.5. SÍNTESIS DE $\alpha$ -ureidonitrilos, 4-IMINOHIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS.....	185
4.5.1. Síntesis de $\alpha$ -ureidonitrilos.....	179
4.5.2. Síntesis de iminohidantoínas.....	185
4.5.3. Síntesis de hidantoínas.....	193
4.5.3.1. Síntesis de hidantoínas a partir de iminohidantoínas.....	193
4.5.3.2. Síntesis de hidantoínas a partir de $\alpha$ -ureido- nitrilos.....	194
4.6. EVALUACION BIOLÓGICA .....	204
4.6.1. Ensayos de inhibición de la agregación plaquetaria.....	198
4.6.2. Evaluación de la actividad antitumoral. Ensayo de citotoxicidad.....	198
5. BIBLIOGRAFÍA .....	209



## **NOTA SOBRE NOMENCLATURA**

A lo largo de esta Memoria se han utilizado la nomenclatura y símbolos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides", *Pure & Appl. Chem.* **1994**, 56, 595-674. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/iubmb.html#03>).

Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de símbolos de una o tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones en el grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido, mientras que las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

## **NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS**

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de numeración inglesa, en esta Memoria se utiliza este sistema. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, habiendo sido aceptado este sistema por la Real Academia Española de la Lengua, como se recoge en el Diccionario Panhispánico de Dudas, desde su primera edición en octubre de 2005.

Hay terminología científico-técnica que frecuentemente se utiliza de forma abreviada, pero para la cual en la versión en español no existe o no se utiliza una abreviatura; en estos casos se ha utilizado la abreviatura inglesa.



## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Adenilato Ciclasa
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>Ang</b>	(del inglés: angiopoietin) = Angiopoyetina
<b>APC</b>	(del inglés: Activated Protein C) = Proteína Activada C
<b>Ar</b>	Arilo
<b>BACE-1</b>	Beta-secretasa 1
<b>Bfgf</b>	(del inglés: Basic Fibroblast Growth Factor) = Factor básico de crecimiento de fibroblastos
<b>Bn</b>	Bencilo
<b>Boc</b>	<i>Terc</i> -butoxicarbonilo
<b>CAM</b>	(del inglés: ChorioAllantoic Membrane) = Membranas corioalantoicas
<b>c-AMP</b>	(del inglés: cyclic Adenosine Monophosphate) = Adenosina monofosfato cíclico
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50
<b>COSY</b>	(del inglés: COrrelation SpectroscopY)
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DCC</b>	Diciclohexilcarbodiimida
<b>DIBAL-H</b>	Hidruro de diisobutilaluminio
<b>DIC</b>	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
<b>DIEA</b>	Diisopropiletilamina
<b>DMAP</b>	4-Dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido-d <sub>6</sub>
<b>DOS</b>	(del inglés: Diversity Oriented Synthesis) = Síntesis orientada a la diversidad
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva 50
<b>ECL</b>	(del inglés: Extracellular Loop ) = Bucle extracelular
<b>EGF</b>	(del inglés: Epidermal Growth Factor) = Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>EGFR</b>	(del inglés: Epidermal Growth Factor Receptor) = Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>Egr</b>	(del inglés: Early Growth Respose) = Respuesta temprana de crecimiento
<b>ELISA</b>	(del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) = Ensayo de inmunosorbente unido a enzima
<b>EP</b>	Embolia Pulmonar
<b>EPCR</b>	(del inglés: Endothelial Protein C Receptor) = Receptor de la proteína C endotelial
<b>EPO</b>	Entidad Promotora Observadora
<b>eq.</b>	Equivalentes
<b>ERAs</b>	Elementos de Respuesta a Andrógenos

<b>ERK</b>	(del inglés: Extracellular Regulated Kinase) = Quinasa extracelular regulada
<b>ES-MS</b>	(del inglés: Electrospray ionization mass spectrometry) = Espectrometría de masas por ionización con electrospray
<b>FIX</b>	Factor IX
<b>FIXa</b>	Factor IXa
<b>Fmoc</b>	Fluorenilmetoxicarbonil
<b>FV</b>	Factor V
<b>FVII</b>	Factor VII
<b>FVIIa</b>	Factor VIIa
<b>FVIII</b>	Factor VIII
<b>FX</b>	Factor X
<b>FXa</b>	Factor Xa
<b>FXI</b>	Factor XI
<b>FXIa</b>	Factor XIa
<b>g</b>	Gramo
<b>GDP</b>	Guanosina Difosfato
<b>GEFs</b>	(del inglés: Guanine-nucleotide Exchange Factors) = Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
<b>GPCRs</b>	(del inglés: G-Protein Coupled Receptors) = Receptores acoplados a proteínas G
<b>Grb2</b>	(del inglés: Growth factor receptor-bound protein 2) =
<b>GRK</b>	(del inglés: G protein Receptor Kinase) = Quinasa de receptores acoplados a proteína G
<b>GRO-<math>\alpha</math></b>	(del inglés: Growth Regulated Oncogen- $\alpha$ ) = Oncogén regulador de crecimiento $\alpha$
<b>GTP</b>	Guanosina Trifosfato
<b>h</b>	Hora
<b>HER2</b>	(del inglés: Human Epidermal growth factor Receptor 2) = Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HIV</b>	( del inglés: Human Immunodeficiency Virus) = Virus de inmunodeficiencia humana
<b>HMBC</b>	( del inglés: Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
<b>HOBt</b>	1-Hidroxibenzotriazol
<b>hPAR1</b>	(del inglés: Human Protease-Activated Receptor 1) = Receptor activado por proteasa humano 1
<b>HPLC</b>	(del inglés: High-Performance Liquid Chromatography) = Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>HPLC-MS</b>	(del inglés: High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) = Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometro de masas
<b>Hse</b>	Homoserina
<b>HSQC</b>	(del inglés: Heteronuclear Single Quantum Coherence)
<b>HTS</b>	(del inglés: High Throughput Screening) = Cribado de alto rendimiento
<b>Hz</b>	Hercio
<b>InsP<sub>3</sub></b>	Fosfoinosítido

<b>KDR</b>	Receptor de factor de crecimiento del endotelio vacular 2
<b>Ki</b>	Canal de Potasio
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de disociación
<b>KLK</b>	(del inglés: Kallikrein-Related Peptidases) = Peptidasas relacionadas con las kalikreinas
<b>LBS</b>	(del inglés: Ligand Binding Site) = Sitio de unión del ligando
<b>LMWH</b>	(del inglés: Low-Molecular Weight Heparin) = Heparinas de bajo peso molecular
<b>MAPKs</b>	(del inglés: Mitogen-Activated Protein Kinases) = Proteína quinasas activadas por mitógenos
<b>min</b>	Minutos
<b>MMP-1</b>	(del inglés: Matrix Metalloprotease-1) = Metaloproteasa de matriz 1
<b>MW</b>	(del inglés: MicroWaves) = Microondas
<b>NOE</b>	(del inglés: Nuclear Overhauser Effect) = Efecto nuclear Overhauser
<b>NOESY</b>	(del inglés: Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) = Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser
<b>Orn</b>	Ornitina
<b>PAR1-APs</b>	(del inglés: PAR1-Activating Peptides) = Péptidos activadores de PAR1
<b>PARs</b>	(del inglés: Protease-Activated Receptors) = Receptores activados por Proteasas
<b>Pbf</b>	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobencofurano-5-sulfonilo
<b>PDGF</b>	(del inglés: Platelet-Derived Growth Factor) = Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>Pf</b>	Punto de fusión
<b>Ph</b>	Fenilo
<b>PI<sub>3</sub>K</b>	(del inglés: Phosphatidylinositol-3-Kinase) = Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PKC</b>	Proteína Quinasa C
<b>PLC<math>\beta</math></b>	(del inglés: Phospholipase C $\beta$ ) = Fosfolipasa C $\beta$
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PyK2</b>	(del inglés: Proline rich tyrosin Kinase-2) = Tirosina quinasa rica en prolinas-2
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>ROK</b>	(del inglés: Rho-Kinase) = Rho-quinasa
<b>Rdto.</b>	Rendimiento
<b>SAR</b>	(del inglés: Structure-Activity Relationships) = Relaciones Estructura-Actividad
<b>SER</b>	(del inglés: Serum Response Elements) = Elementos de Respuesta Sérica
<b>Src</b>	Steroid receptor cofactor
<b>T.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>TF</b>	(del inglés: Tissue Factor) = Factor Tisular
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TIE</b>	Receptor de Angiopoyetina

<b>TK</b>	(del inglés: Tyrosin Kinase) = Tirosina quinasa
<b>TLC</b>	(del inglés: Thin Layer Chromatography) = Cromatografía de capa fina
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>TMSCN</b>	Cianuro de trimetilsililo
<b>VEGF</b>	(del inglés: Vascular Endothelial Growth Factor) = Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VEGFR2</b>	(del inglés: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) = Receptor 2 del Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>Xaa</b>	Aminoácido

## ANEXO I: AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código		Fórmula	Aminoácido	Código		Fórmula
Ácido Aspártico	Asp	D		Isoleucina	Ile	I	
Ácido Glutámico	Glu	E		Leucina	Leu	L	
Alanina	Ala	A		Lisina	Lys	K	
Arginina	Arg	R		Metionina	Met	M	
Asparagina	Asn	N		Prolina	Pro	P	
Cisteína	Cys	C		Serina	Ser	S	
Glutamina	Gln	Q		Tirosina	Tyr	Y	
Glicina	Gly	G		Treonina	Thr	T	
Fenilalanina	Phe	F		Triptófano	Trp	W	
Histidina	His	H		Valina	Val	V	



# **1. INTRODUCCIÓN**

---



## 1. INTRODUCCIÓN

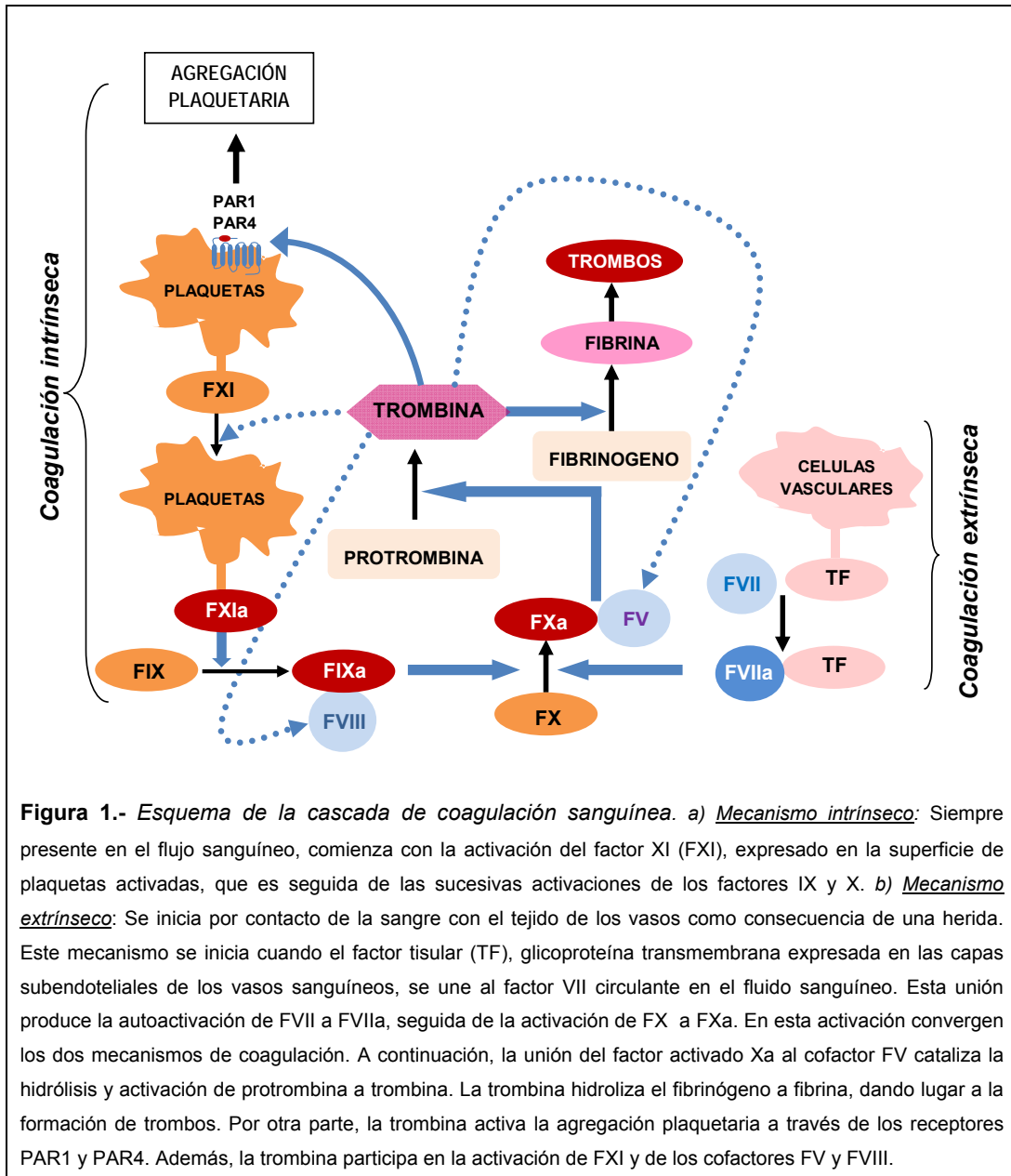
### 1.1. ANTECEDENTES

#### 1.1.1. Trombina: Una enzima esencial en homeostasis

La trombina es una serina proteasa que, tal como se muestra de forma esquemática en la Figura 1, posee un papel central y esencial en la cascada de coagulación sanguínea<sup>1</sup>. Además, esta proteasa induce diversos efectos sobre una amplia variedad de células, tales como: plaquetas<sup>2,3</sup>, células endoteliales y de músculo liso<sup>2,4</sup>, neuronas y astrocitos en el sistema nervioso<sup>2,4-7</sup>, células inmunitarias e inflamatorias<sup>8,9</sup>, osteoblastos<sup>10</sup> y células tumorales<sup>11-14</sup>. Estos efectos celulares de la trombina están mediados por la activación de tres receptores de la familia de receptores activados por proteasas (PARs: PAR1, PAR3 y PAR4)<sup>2,4,15,16</sup>. Éstos son receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que requieren una proteólisis específica en el extremo N-terminal extracelular para desenmascarar en este extremo una secuencia de activación intramolecular. Esta activación se traduce en una compleja cascada de señalización intracelular. Entre estos receptores, PAR1 es el principal receptor activado por trombina en la mayoría de las células humanas<sup>17</sup>.

#### 1.1.2. Receptor de trombina PAR1: Estructura primaria, especificidad, activación, señalización y desensibilización

PAR1 fue el primer receptor activado por proteasas en ser descubierto y clonado (1991), como resultado de la búsqueda de receptores responsables de los efectos celulares de la trombina<sup>18</sup>. La trombina es un agonista extremadamente potente de este receptor ( $EC_{50} = 50$  pM) y la activación se bloquea por los inhibidores de trombina hirudina e hirugen<sup>18</sup>. PAR1 está constituido por 425 aminoácidos y posee 7 dominios transmembrana hidrófobos característicos de los GPCRs. Tal como se indica de forma esquemática en la Figura 2, este receptor contiene en el extremo N-terminal extracelular la secuencia consenso de reconocimiento para la proteólisis por serina proteasas ( $L^{38}DPR^{41}$ ), seguida de la secuencia activadora ( $S^{42}FLLRN^{47}$ ) y de una secuencia similar a la secuencia de reconocimiento de la hirudina por trombina ( $K^{51}YEPF^{55}$ ). Esta secuencia similar a hirudina es esencial para la unión del receptor con alta afinidad a trombina<sup>17</sup>.



**Figura 1.- Esquema de la cascada de coagulación sanguínea.** a) *Mecanismo intrínseco*: Siempre presente en el flujo sanguíneo, comienza con la activación del factor XI (FXI), expresado en la superficie de plaquetas activadas, que es seguida de las sucesivas activaciones de los factores IX y X. b) *Mecanismo extrínseco*: Se inicia por contacto de la sangre con el tejido de los vasos como consecuencia de una herida. Este mecanismo se inicia cuando el factor tisular (TF), glicoproteína transmembrana expresada en las capas subendoteliales de los vasos sanguíneos, se une al factor VII circulante en el fluido sanguíneo. Esta unión produce la autoactivación de FVII a FVIIa, seguida de la activación de FX a FXa. En esta activación convergen los dos mecanismos de coagulación. A continuación, la unión del factor activado Xa al cofactor FV cataliza la hidrólisis y activación de protrombina a trombina. La trombina hidroliza el fibrinógeno a fibrina, dando lugar a la formación de trombos. Por otra parte, la trombina activa la agregación plaquetaria a través de los receptores PAR1 y PAR4. Además, la trombina participa en la activación de FXI y de los cofactores FV y FVIII.



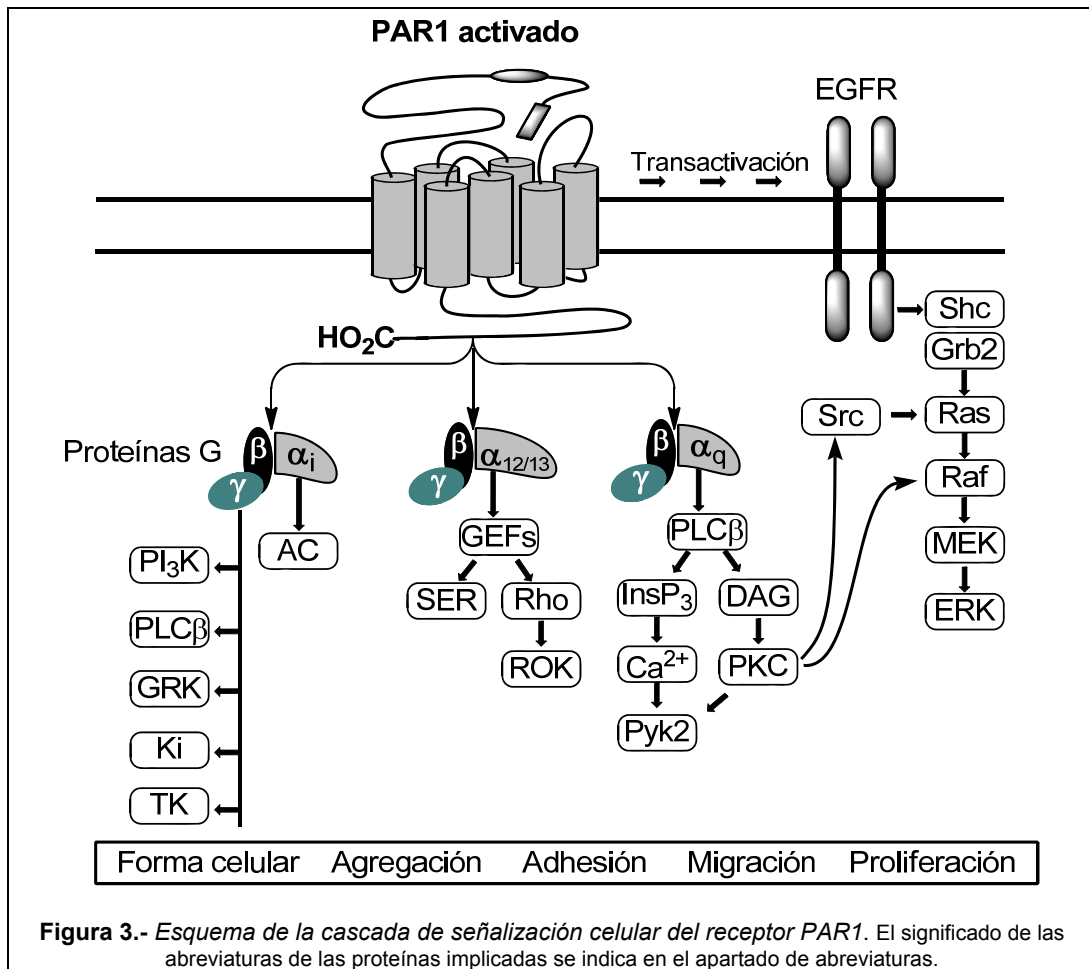
PARs también presentan especificidad, según la especie animal, en su expresión celular y perfiles de señalización<sup>22</sup>. Así por ejemplo, en lo que respecta a las plaquetas, células en las que los PARs han sido más estudiados, las plaquetas humanas expresan PAR1 y PAR4, con señalización independiente, mientras que, las plaquetas de ratón expresan PAR3 y PAR4, y las de cobaya PAR1, PAR3 y PAR4<sup>17,21</sup>. Hay que destacar que las plaquetas de los animales más habituales para la evaluación biológica, ratones, ratas y perros no expresan PAR1<sup>23</sup>. En células endoteliales de ratón PAR1 y PAR4 median la señalización. Sin embargo, en las células endoteliales humanas PAR1 es el único receptor de trombina, pues no expresan PAR4<sup>24</sup>. Las células de músculo liso vascular y los fibroblastos expresan PAR1 y PAR2, pero estos últimos no son activados por trombina<sup>17,21,22</sup>. De forma similar, las neuronas y astrocitos del sistema nervioso central y las neuronas del sistema nervioso periférico, así como diversas células inflamatorias e inmunitarias, expresan PAR1 y PAR2<sup>2,4,8</sup>. La especificidad de especie animal complica el desarrollo farmacológico de moduladores de estos receptores, pues los ensayos *in vivo* hay que hacerlos en primates.

La trombina es el principal regulador fisiológico de PAR1, sin embargo, otras enzimas de la cascada de coagulación sanguínea también pueden contribuir a su activación. Así, durante la coagulación el complejo TF-FVIIa señala, en parte, a través de PAR1<sup>25</sup>. Aunque el factor FVIIa por sí solo, incluso a altas concentraciones, no es capaz de activar PAR1, cuando este receptor es coexpresado junto al TF sí que es activado por FVIIa. El factor FXa también activa PAR1 en células endoteliales y en fibroblastos<sup>26</sup>. La proteína C activada (APC) por trombina, cuando está unida a su receptor en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (EPCR), también ejerce parte de sus acciones a través de la activación de PAR1<sup>27</sup>. Mientras la APC se mantiene unida a través de su receptor a la superficie celular, el complejo EPCR-APC induce la activación de PAR1. Esta activación es responsable en gran medida de los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores de la APC<sup>27,28</sup>. Se ha demostrado que la APC hidroliza PAR1 en el mismo sitio que la trombina<sup>27</sup>. Estudios recientes sugieren que la enzima fibrinolítica plasmina puede actuar como activador endógeno de PAR1 en astrocitos y neuronas<sup>9,29</sup>. Como se comentara más ampliamente en el siguiente apartado, 1.1.3, diversas proteasas derivadas de tumores, fundamentalmente peptidasas relacionadas con las kalikreinas (KLK)<sup>9,30</sup> y la metaloproteasa de matriz 1 (MMP-1)<sup>31</sup>, activan PAR1. Este receptor también es activado por algunas proteasas bacterianas, entre las que destacan las gingipainas-R específicas de arginina (HRgpA y RgpB)

producidas por la principal bacteria responsable de la periodontitis humana *Porphyromonas gingivalis*. Se ha descrito que HRgpA y RgpB inducen la agregación plaquetaria con potencia similar a la trombina y que sus efectos son mediados por PAR1 y PAR4<sup>32</sup>. Este mecanismo podría explicar la relación que hay entre la periodontitis y las enfermedades cardiovasculares<sup>33</sup>. Muy recientemente, también se ha descrito que proteasas de promastigotes de *Leishmania* activan PAR1 en macrófagos y que esta activación puede ser responsable de la infección de estas células por *Leishmania*<sup>34</sup>.

Como en la mayoría de los GPCRs, PAR1 se acopla con multitud de cascadas de señalización celular. La activación de este receptor produce cambios conformacionales que favorecen su interacción con proteínas G triméricas. En estado inactivo una subunidad  $G\alpha$  está unida a guanosina difosfato (GDP) y a las subunidades  $G\beta\gamma$ . La activación de PAR1 induce un cambio conformacional en estas proteínas G que conlleva el intercambio de GDP por guanosina trifosfato (GTP), seguido de la fosforilación del receptor y separación de la subunidad  $G\alpha$  del complejo dimérico  $G\beta\gamma$ , desencadenando la compleja cascada de señalización (Figura 2), específica según el tipo de célula. PAR1 interacciona con distintos subtipos de subunidades  $G\alpha$ <sup>2,4,15,22</sup>, principalmente, con  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{12/13}$  y  $G\alpha_q$  (Figura 3). El acoplamiento con  $G\alpha_i$  inhibe adenilato ciclasa (AC), suprimiendo la formación de c-AMP, acción que provoca las respuestas de las plaquetas<sup>15</sup>.

El acoplamiento de PAR1 con  $G\alpha_{12}$  y  $G\alpha_{13}$  juega un papel fundamental en el control de la forma celular y la migración<sup>4</sup>. Estas subunidades interactúan con factores de intercambio de nucleótidos de guanina Rho (GEFs)<sup>35-37</sup>, que controlan la forma y la migración celular, y con elementos de respuesta sérica (SRE)<sup>38</sup>. En las plaquetas, esta activación de Rho-quinasas mediada por  $G\alpha_{12/13}$  está involucrada en los cambios de forma inducidos por trombina<sup>39</sup>, mientras que, en fibroblastos y células endoteliales parece estar involucrada en la permeabilidad y en la migración<sup>36,37,40</sup>. En células tumorales la activación de Rho quinasas mediada por PAR1 parece estar involucrada en la reorganización del citoesqueleto, la migración celular y la invasión<sup>35,41,42</sup>.



El principal acoplamiento de PAR1 con proteínas G es a través  $G\alpha_q$ <sup>4,36</sup>. Este acoplamiento activa la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ )<sup>43</sup>, generando fosfoinosítido (InsP<sub>3</sub>), que induce movilización de calcio, y diacilglicerol (DAG), que activa la proteína quinasa C (PKC). Este mecanismo abre el camino a quinasas reguladas por calcio y por PKC, tales como las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y fosfoesterasas<sup>44</sup>. Teniendo en cuenta el importante efecto mitógeno de la trombina, ha habido mucho interés en el acoplamiento de PAR1 con la cascada de MAP quinasas<sup>2,4</sup>. En particular, el módulo MAPK-ERK1/2 juega un papel crítico en la proliferación celular y en la diferenciación. Gran parte de la información sobre la regulación de este módulo se ha derivado del estudio de receptores tirosina quinasa, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La activación de este receptor inicia la cascada de

fosforilación desde la proteína Ras a ERK1/2. Esta cascada puede ser activada vía PKC<sup>45</sup> o mediante la transactivación de EGFR inducida por PAR1<sup>4,44,46,47</sup>.

Por último, tal como se muestra en la Figura 3, las subunidades G $\beta$  $\gamma$  acoplan los receptores PAR1 a muchas otras ramas de señalización<sup>4,15,48</sup>, que incluyen fosfatidilinositol-3-quinasa (PI<sub>3</sub>K), enzimas modificadoras de lípidos (PLC $\beta$ ), quinasas de receptores de proteínas G (GRK), canales de potasio (Ki), y tirosina quinasas (TK). Entre estas vías de señalización, destaca el papel importante que juega la PI<sub>3</sub>K en la regulación de la estructura del citoesqueleto, la movilidad y supervivencia celulares y la mitogénesis mediada por PAR1. Además, en algunos tipos de células la PI<sub>3</sub>K funciona como intermediaria en la activación de ERKs<sup>2,15,43,49</sup>.

Debido a la naturaleza irreversible de la activación proteolítica de PAR1, su señalización está estrechamente regulada por su rápida desensibilización y tráfico<sup>50</sup>. La activación irreversible de estos receptores sugiere que poseen un mecanismo de terminación de la señalización diferente al de los clásicos GPCRs<sup>2</sup>. La fosforilación es importante para su desensibilización e internalización. Así, la fosforilación en diversas posiciones del extremo C-terminal intracelular mediante las quinasas de GPCRs 3 y 5 median la rápida inactivación<sup>51</sup>. Además, la unión de  $\beta$ -arrestinas independiente de la fosforilación también contribuye a la desensibilización de PAR1<sup>52</sup>. Estos receptores cuando están activados son fosforilados, desacoplados de las proteínas G y, preferentemente, internalizados en lisosomas, donde son degradados con alta eficacia, sin ser reciclados a la superficie celular<sup>53,54</sup>. La internalización desconecta el receptor de la señalización, mientras que, la degradación en lisosomas impide el retorno a la superficie celular. Los receptores PAR1 no activados son reciclados entre la superficie celular y un compartimento intracelular, generando una reserva protegida de receptores, que renueva la superficie celular tras la exposición a la acción de la proteasa activadora, dando lugar a una rápida resensibilización, independiente de la síntesis de novo del receptor<sup>22</sup>. Además, la desensibilización del receptor puede tener lugar también por proteólisis extracelular a nivel de la secuencia activadora(S<sup>42</sup>FLLRN<sup>47</sup>)<sup>2</sup>.

### 1.1.3. PAR1 en cáncer y angiogénesis

#### 1.1.3.1. Asociación hipercoagulación-cáncer

La relación entre cáncer y trombosis es bien conocida desde 1865<sup>55</sup>. Así, las trombosis venosas, cuyas manifestaciones clínicas varían desde la trombosis de venas profundas a la embolia pulmonar (EP), son frecuentemente observadas en pacientes de cáncer. Se estima que 10-20 % de las muertes por cáncer pueden ser debidas a EP más que al propio cáncer<sup>56</sup>, y que la histología del tumor está relacionada con el riesgo de sufrir EP<sup>57</sup>. Las trombosis venosas son la segunda causa de muerte en pacientes de cáncer<sup>58</sup>. Por otra parte, el cáncer es un reconocido factor de riesgo de tromboembolismo venoso y pacientes de cáncer sometidos a cirugía tienen mayor riesgo de trombosis posquirúrgica<sup>59</sup>. La trombosis puede ser la primera manifestación clínica de un cáncer. De hecho, se ha visto que, aproximadamente el 10% de los pacientes que sufren una trombosis espontánea, desarrollan cáncer unos años más tarde<sup>60</sup>. Además, la prognosis de los pacientes de cáncer es peor en los que desarrollan trombosis<sup>61,62</sup>. Teniendo en cuenta estos hechos, se han realizado diversos estudios clínicos prospectivos sobre el uso de anticoagulantes en pacientes de cáncer, cuyos resultados sugieren un potencial aumento en su supervivencia<sup>55,59,63,64</sup>. En estos estudios se ha comparado la heparina o la warfarina frente a heparinas de bajo peso molecular (LMWH)<sup>65-68</sup>, encontrando mayores aumentos de supervivencia en los pacientes tratados con LMWH<sup>69,70</sup>. Además de aumentar la supervivencia, se ha descrito que estos anticoagulantes en pacientes de cáncer son capaces de aumentar la actividad funcional de las células asesinas naturales<sup>71</sup>.

#### 1.1.3.2. Sobreexpresión de PAR1 en cáncer

La asociación entre expresión de PAR1 y cáncer es bien conocida para un número creciente de tumores<sup>13,72</sup>. Así, se ha observado sobreexpresión de PAR1 en biopsias de tumores de pacientes de melanoma<sup>73</sup>, carcinoma de endometrio<sup>74</sup>, cáncer de mama<sup>75</sup>, próstata<sup>76-79</sup>, páncreas<sup>80</sup>, ovario<sup>81</sup>, colon<sup>82</sup> y de pulmón de células no pequeñas<sup>83,84</sup>, carcinoma de cabeza y cuello con células escamosas<sup>85</sup> y de leucemias<sup>86</sup>. En muchos de estos pacientes, los niveles de expresión de PAR1 correlacionan con el grado de invasividad del tumor. Así, por ejemplo, un estudio sobre un panel de líneas celulares de carcinoma de mama mostró altos niveles de expresión del gen *hPar1* en células altamente agresivas metastásicas (MDA-435 o MCF10AT3B), niveles intermedios de

expresión en células moderadamente metastásicas (MDA-231 o MCF10T) y niveles muy bajos de expresión o nulos en células no metastásicas (MCF-7, ZR-75 o MCF10A)<sup>75</sup>. De forma similar, se ha visto que la expresión de PAR1 está significativamente aumentada en fibroblastos de tejidos de mama malignos con respecto a fibroblastos de tejidos benignos<sup>87</sup>. La expresión de PAR1 es un factor independiente de la prognosis de reducción de supervivencia y se ha demostrado que es un factor de riesgo para la recurrencia en el cáncer de próstata<sup>77</sup>.

Estudios experimentales en modelos animales y líneas celulares de cáncer también apoyan la estrecha relación entre la expresión de PAR1 y cáncer. Así, por ejemplo, PAR1 induce la transformación oncogénica de fibroblastos NIH 3T3<sup>88</sup> y el bloqueo de la expresión de PAR1 en células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231 reduce considerablemente su potencial metastásico, mientras que, la sobreexpresión de PAR1 en células tumorales poco metastásicas MCF-7 induce su crecimiento e invasión en ratones<sup>31</sup>. Resultados similares se han observado en células de melanoma<sup>89,90</sup>.

#### 1.1.3.3. Activación y señalización de PAR1 relacionadas con cáncer

Como se ha comentado en el apartado 1.1.2, la trombina es el principal activador de PAR1, siendo esta activación el principal desencadenante de los efectos mitógenos directos de trombina sobre células tumorales y de los efectos indirectos a través de interacciones tumor-plaquetas<sup>14</sup>. La activación de las plaquetas induce la liberación de factores de crecimiento y angiogénesis de células tumorales, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>91</sup>, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)<sup>92</sup> y la angiopoyetina 1<sup>93</sup>. Por otra parte, además de mediar la adhesión a células endoteliales y el desarrollo de vasos colaterales, los agregados de plaquetas protegen a las células tumorales de las células asesinas naturales<sup>94</sup>. Estos agregados embolizan, dando lugar a isquemia<sup>5</sup>. Los trombos de células tumorales producen la extravasación del tumor en el parénquima y neoangiogénesis<sup>63</sup>.

Además de la trombina, otras proteasas contribuyen a la activación de PAR1 y están involucradas en la supervivencia de células tumorales, motilidad, migración e invasión, al menos, en estudios experimentales *in vitro*. Por ejemplo, recientemente, se ha descrito que la proteína C activada (APC), una serina proteasa implicada fundamentalmente en la regulación de la fisiología vascular, aumenta la invasión y quimiotaxis en células de cáncer de mama, mediante la activación de vías de señalización específicas a través de la activación de PAR1 y de EPCR<sup>95</sup>.

Es bien conocido el importante papel que juegan las metaloproteasas matriciales (MMP) en el crecimiento, invasión y metástasis de tumores malignos<sup>96</sup>. En particular, la expresión de MMP-1 está asociada con una peor prognosis en melanomas, y cánceres de mama, ovario, colorectal, pancreático y gástrico<sup>97</sup>. La expresión de MMP-1 también está asociada con un aumento de angiogénesis en xenoinjertos modelos de melanoma y tumores de mama y de próstata<sup>98</sup>. Un trabajo reciente sugiere que la actividad angiogénica de la MMP-1 de tumores puede ser debida a la activación de PAR1 expresado en células endoteliales, activación que se transmitiría a través de la vía de señalización Raf/MEK/ERK, contribuyendo de esta forma a la capacidad metastásica de las células cancerosas<sup>31,99</sup>. Se ha descrito también que la expresión de PAR1 en células de cáncer de mama induce la expresión del factor angiogénico Cyr61. Este factor induce invasión y actúa como molécula señalizadora induciendo la expresión de MMP-1 en fibroblastos estromales vecinos<sup>100</sup>. En un cribado de fluidos de pacientes, benignos frente a malignos, se ha identificado una cascada de señalización que indica que la MMP-1 activa PAR1<sup>101</sup>. Por otra parte, se ha descrito que la MMP-1 activa la señalización MAPKs en células endoteliales vía PAR-1 y que la acción combinada de MMP-1 y trombina es más angiogénica que la de cada una de estas proteasas por separado<sup>98</sup>. Estos resultados sugieren que la MMP-1 podría complementar la acción de la trombina en la angiogénesis y progresión tumoral. La MMP-1 también activa PAR1 en la superficie de las plaquetas<sup>102</sup>. Sin embargo, efectúa la proteólisis a nivel de los residuos Asp<sup>39</sup>-Pro<sup>40</sup>, distinto sitio que la trombina (Arg<sup>41</sup>-Ser<sup>42</sup>). Esta activación induce la señalización de la vía Rho-GTP implicada en el cambio de forma celular y la motilidad, así como en la señalización de las MAPKs.

Como ya se ha comentado en el apartado 1.1.2, la activación de PAR1 puede transactivar EGFR. Así, se ha descrito que la activación de PAR1 por trombina induce transactivación persistente de EGFR y ErbB2/HER2 en carcinoma de mama invasivo, pero no en células epiteliales mamarias normales<sup>47</sup> y, en células de cáncer de colon HT-29, la transactivación de EGFR induce proliferación celular<sup>103</sup>.

Varios grupos han observado que la sobreexpresión del gen *hPar1* en glándulas mamarias de ratón aumenta los niveles de expresión de *Wnt-4* y *Wnt-7b*, que están unidos a la estabilización de la  $\beta$ -catenina nuclear<sup>72,104,105</sup>. Esta estabilización sólo se ha observado en el embarazo y en células epiteliales estabilizadas de líneas tumorales.

Por último, la expresión de PAR1 también ha sido relacionada con factores de transcripción<sup>72</sup>. Por ejemplo, en biopsias de cáncer de próstata se ha encontrado relación

entre la expresión del gen *hPar1* con elementos de respuesta a andrógenos (ERAs)<sup>106</sup> y con el gen de respuesta temprana-1 (*Egr-1*)<sup>107</sup>, observándose correlación entre el nivel de expresión de estos genes y el tamaño y grado de malignidad del tumor. Por otra parte, el gen supresor de tumores p53 participa en la regulación del nivel de expresión de *hPar1*<sup>72</sup>. Se ha observado que la expresión de *hPar1* es baja en líneas de células cancerosas que expresan p53 normal, mientras que, está sobreexpresado en líneas celulares que no expresan p53 o lo expresan mutado<sup>108</sup>.

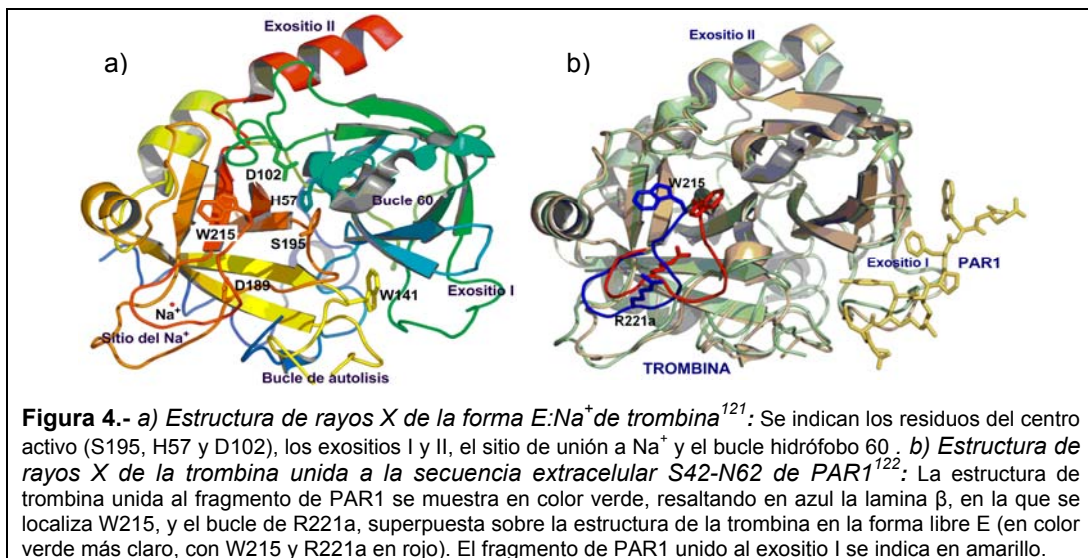
#### 1.1.3.4. PAR1 y angiogénesis

La trombina es un potente factor angiogénico, cuyo efecto es dependiente de la activación de PAR1 e independiente de la formación de fibrina en la coagulación sanguínea<sup>14,109,110</sup>. Tanto la trombina como el péptido activador de PAR1 SFLLRNPNDKYEPF aumentan 2-3 veces la neoangiogénesis en membranas corioalantóicas (CAM) de pollo<sup>111</sup>. Esta neoangiogénesis va acompañada de inducción del mRNA de VEGF y de angiopoyetina-2 (Ang-2) y es inhibida por los inhibidores específicos de angiogénesis KDR-Fc (vs. VEGF) y Tie-2-Fc (vs. Ang-1 y Ang-2), así como por inhibidores de la cascada de señalización de PAR1, tales como inhibidores de PKC, MAPK o PI<sub>3</sub>K. La trombina también estimula la angiogénesis en células tumorales mediante la inducción de la producción de VEGF<sup>14</sup>. En células endoteliales, la trombina induce la expresión del receptor VEGFR2<sup>112</sup> y la producción de Ang-2<sup>113</sup> y, en plaquetas, induce la secreción de VEGF<sup>92</sup> y Ang-1<sup>93</sup>. Además, parece que la inducción de la angiogénesis tumoral por trombina, vía PAR1, requiere la sobreexpresión del oncogén regulador del crecimiento  $\alpha$  (*GRO- $\alpha$* )<sup>114</sup>. Por otra parte, se ha descrito que los antagonistas de PAR1 SCH79797 y RWJ-56110 son potentes agentes antiangiogénicos y que este efecto correlaciona con efectos inhibidores sobre la proliferación de células endoteliales y sobre la síntesis de ADN, efectos solo evidentes cuando las células endoteliales se encuentran en estado de crecimiento rápido<sup>115,116</sup>. Estos antagonistas de PAR1 también inhiben la actividad de ERK1/2 inducida por trombina. Esta inhibición es específica de la activación inducida por trombina, pues los antagonistas de PAR1 no inhiben los efectos sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por bFGF, VEGF o EGF. Por último, recientemente, Zania *et al.* han descrito que la secuencia N-terminal PAR1(1-41), que se libera al medio extracelular tras la activación de PAR1 y al que han denominado "parstatin", muestra potente actividad antiangiogénica *in vitro*<sup>117</sup> y en diversos modelos animales<sup>118-120</sup>.

#### 1.1.4. Activación de PAR1 por trombina: Estudios estructurales

La trombina posee alta capacidad para adoptar diferentes conformaciones o formas alostéricas. En condiciones fisiológicas es capaz de adoptar tres formas: Una forma inactiva  $E^*$ , incapaz de unir  $\text{Na}^+$  o sustratos en su sitio activo, que está en equilibrio con una forma activa  $E$ , capaz de unir  $\text{Na}^+$ , pero no la mayoría de sus sustratos, denominada forma lenta o de baja actividad. Esta forma lenta está, a su vez, en equilibrio con la forma ligada a  $\text{Na}^+$ ,  $E:\text{Na}^+$  (Figura 4a), denominada rápida, altamente activa y necesaria para la unión de la mayoría de sus sustratos fisiológicos, entre los que se encuentra PAR1<sup>121</sup>.

En la estructura de trombina se han identificado cuatro sitios esenciales: a) El sitio activo, localizado en un canal interno, donde se sitúan los residuos S195, H57 y D102 (Figura 4a), cuya entrada está controlada por la unión de  $\text{Na}^+$ , a través del D189; b) El sitio de unión de  $\text{Na}^+$ ; c) El exosítio I, que contiene diversos aminoácidos básicos, que facilitan la orientación óptima de la mayoría de sus sustratos, como el fibrinógeno, la trombomodulina o PAR1, y de sus inhibidores naturales como la hirudina; d) El exosítio II, opuesto al exosítio I, constituido por una hélice  $\alpha$  C-terminal, en el que se unen los ligandos polianiónicos, como la heparina, los glucosaminoglicanos, el receptor de plaquetas GpIb, o los anticuerpos<sup>121</sup>. En general, la unión de sustratos al exosítio I produce un cambio conformacional a nivel del canal del centro activo, situado a  $\approx 30$  Å, que se refleja en un cambio en la orientación de las cadenas de W215 y R221 para permitir la entrada del sustrato en el canal, como se muestra en la Figura 4b para la interacción trombina/PAR1.



Al igual que en otros GPCRs, la naturaleza transmembrana de PAR1 ha dificultado los estudios estructurales de este receptor. A pesar de ello, en los últimos 10 años diversos estudios estructurales han aportado información significativa sobre la estructura del receptor y sus interacciones con trombina<sup>17</sup>. Esta información se ha obtenido a través de estudios de mutagénesis dirigida, tanto sobre PAR1 como sobre trombina<sup>18,19,123-130</sup>, de estudios de rayos X sobre trombina humana cristalizada con diversos fragmentos del exodominio N-terminal de PAR1<sup>122,131,132</sup>, conteniendo todos ellos la secuencia similar a hirudina, y del estudio mediante RMN de la estructura de la secuencia N-terminal de PAR1 (Ala26-Hse103), en comparación con la de la secuencia resultante de proteólisis por trombina (Ser42-Hse103)<sup>20</sup>. En la Tabla 1 se resume la información resultante de estos estudios, agrupada según los distintos dominios estructurales identificados en PAR1.

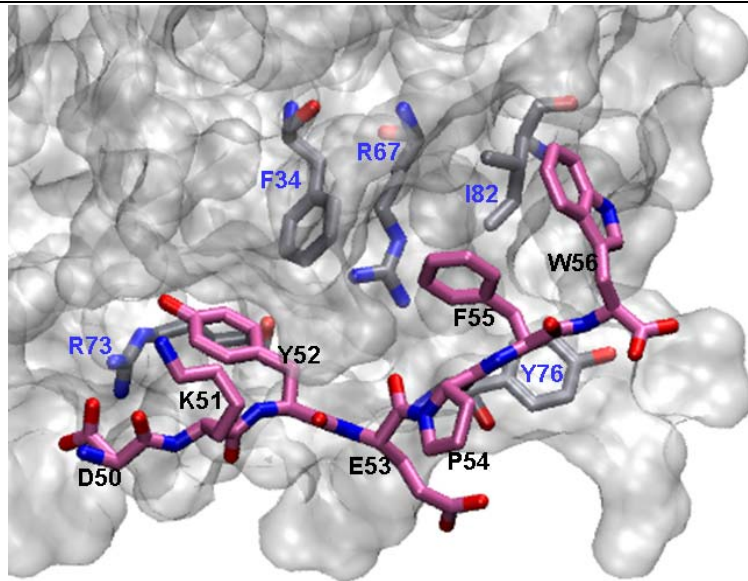
**Tabla 1.-** Aminoácidos relevantes para la interacción trombina/PAR1

Dominio de PAR1	Mutagénesis		Rayos X		RMN
	PAR1	Trombina	PAR1	Trombina	PAR1
Reconocimiento por proteasas (L <sup>38</sup> DPR <sup>41</sup> )	L38	L99, I174, W215	L38	L99, I174, W215	
			D39	H57	
	P40	S195, H57			
	R41				
Ligando activador (S <sup>42</sup> FLLRN <sup>47</sup> )	F43	S195, H57			
	L45	S195, H57			F43, L44, R46
	R46	E39			
Secuencia similar a hirudina (D <sup>50</sup> KYEPF <sup>55</sup> )	D50	R73, K149	D50	R73, K149	
	Y52		Y52	R73, F34	D50, K51
	E53	R67	E53	T74, Y76	
	F55	I82, Y76	F55	R67, F34, I82	
LBS (L <sup>84</sup> PAFIS <sup>89</sup> )	F87, I88, S89				P85, A86, S89, I88
ECL-2 (Q <sup>242</sup> -----G <sup>265</sup> )	D256				
	E260				
ECL-3 (A <sup>335</sup> -----E <sup>350</sup> )	E347				
Referencias	18, 19, 123-130		122, 131, 132		20

En el dominio de reconocimiento de PAR1 por proteasas (L<sup>38</sup>DPR<sup>41</sup>) los estudios de mutagénesis han mostrado que el residuo de R41 es crítico para la activación del receptor<sup>18</sup>. Otros estudios indican que L38 y P40 son también importantes para la proteólisis eficiente por trombina<sup>125</sup>. Un modelo 3D de PAR1 unido a trombina muestra que L38 ocupa el sitio de unión de grupos aromáticos de trombina, formado por L99, I174 y W215<sup>124</sup>. Uno de los estudios de rayos X confirma esta hipótesis y también indica que la interacción dominante de PAR1 en el sitio activo de trombina es el puente iónico entre el D39 de PAR1 y la H57 de trombina<sup>131</sup>.

En lo que respecta al ligando activador (S<sup>42</sup>FLLRN<sup>47</sup>), los estudios de mutagénesis sugieren la existencia de interacción entre la R46 de PAR1 y el E39 de trombina, a través de un par iónico, y de los residuos de PAR1 F43, L45 y P40, éste último en el sitio de proteólisis, con el W60d, situado en el bucle 60 de trombina, y con los residuos del centro activo S195 e H57<sup>124</sup>. Además, el estudio de RMN indica una fuerte interacción intramolecular de la F43 con la S89 (se observan 8 NOEs) y de la L44 con la I88<sup>20</sup>. Tanto la S89 como la I88 se localizan en el denominado sitio de unión del ligando activador (L<sup>84</sup>PAFIS<sup>89</sup>). En los estudios de rayos X la secuencia del ligando activador no se resuelve bien, hecho que se ha relacionado con su alta movilidad<sup>1</sup>.

Estudios de mutagénesis sobre el dominio que contiene la secuencia similar a hirudina (D<sup>50</sup>KYEPF<sup>55</sup>), así como su supresión, indican que la presencia de esta secuencia es esencial para la unión de trombina con alta afinidad<sup>126</sup>. Además, la unión de dicho dominio, como ya se ha comentado, induce efectos alostéricos en la trombina, que conllevan un aumento considerable en la eficiencia de la proteólisis<sup>122-124,126</sup>. Del conjunto de resultados de los estudios de mutagénesis, rayos X y RMN se deduce que los residuos D50, Y52, E53 y F55 establecen interacciones específicas importantes para la unión trombina/PAR1. De ellos, Y52, que interacciona con R73 y F34 de trombina, parece ser especialmente crucial<sup>20,123,131</sup>. Los estudios de mutagénesis<sup>124,127</sup> y uno de los estudios de rayos X<sup>131</sup> también destacan la importancia del E53, que establecería un par iónico con la R67 de la trombina. Sin embargo, según los estudios de rayos X más recientes<sup>122,132</sup>, E53 se orientaría hacia fuera de la superficie de la trombina (Figura 5), interaccionando con T74 y con Y76. Estos estudios muestran también la importancia de la interacción de D50 de PAR1 con R73 y K 149 de trombina, así como la interacción de la F55 de PAR1 con el bolsillo hidrófobo de trombina definido por F34, I82 y L65, y con el residuo básico de R67.



**Figura 5.-** Modelo de la estructura de la unión de la secuencia de PAR-1  $D^{50}KYEPFW^{66}$  (símbolos de los aminoácidos en negro) al exosítio I de trombina<sup>122</sup> (residuos implicados en azul)

Mediante la utilización de un anticuerpo policlonal, anti-PAR1(1-160), que inhibe la activación de PAR1 en varios tipos de células que expresan este receptor, y experimentos ELISA se identificó en este receptor la secuencia (L<sup>84</sup>PAFIS<sup>89</sup>), denominada LBS (Sitio de unión del ligando), a la que se une intramolecularmente el ligando activador<sup>129</sup>. Posteriormente, la importancia de esta secuencia fue confirmada en el estudio de RMN ya comentado<sup>20</sup>. Además de las interacciones ya indicadas, este estudio identificó interacciones del enlace peptídico D50-K51 con P85 y A86, resultado que sugiere que el ligando activador se extiende hacia la secuencia similar a hirudina. El estudio también sugiere la presencia de un giro en la secuencia activadora a nivel de la R46, de forma que su grupo guanidino se proyectaría hacia fuera del LBS. Por otra parte, uno de los estudios de mutagénesis mostró la importancia de I88 y S89 en el LBS, de E347 en el 3º bucle extracelular (ECL-3) y de E256 en el 2º bucle extracelular (ECL-2) para las respuestas funcionales a la activación por agonistas (trombina o PAR1-APs)<sup>19</sup>. Este estudio muestra también que algunas mutaciones capaces de eliminar la respuesta a PAR1-APs sintéticos tienen poco efecto sobre la activación por trombina. Este resultado sugiere que el sitio de unión de los PAR1-APs no coincide con el sitio de unión

intramolecular del ligando activador. En este sentido, hasta el momento, no se ha determinado el sitio de unión de ningún ligando sintético, tanto agonista como antagonista. Sin embargo, se ha observado que agonistas diferentes ejercen diferentes efectos sobre un mismo tipo de célula<sup>13,20,133,134</sup>.

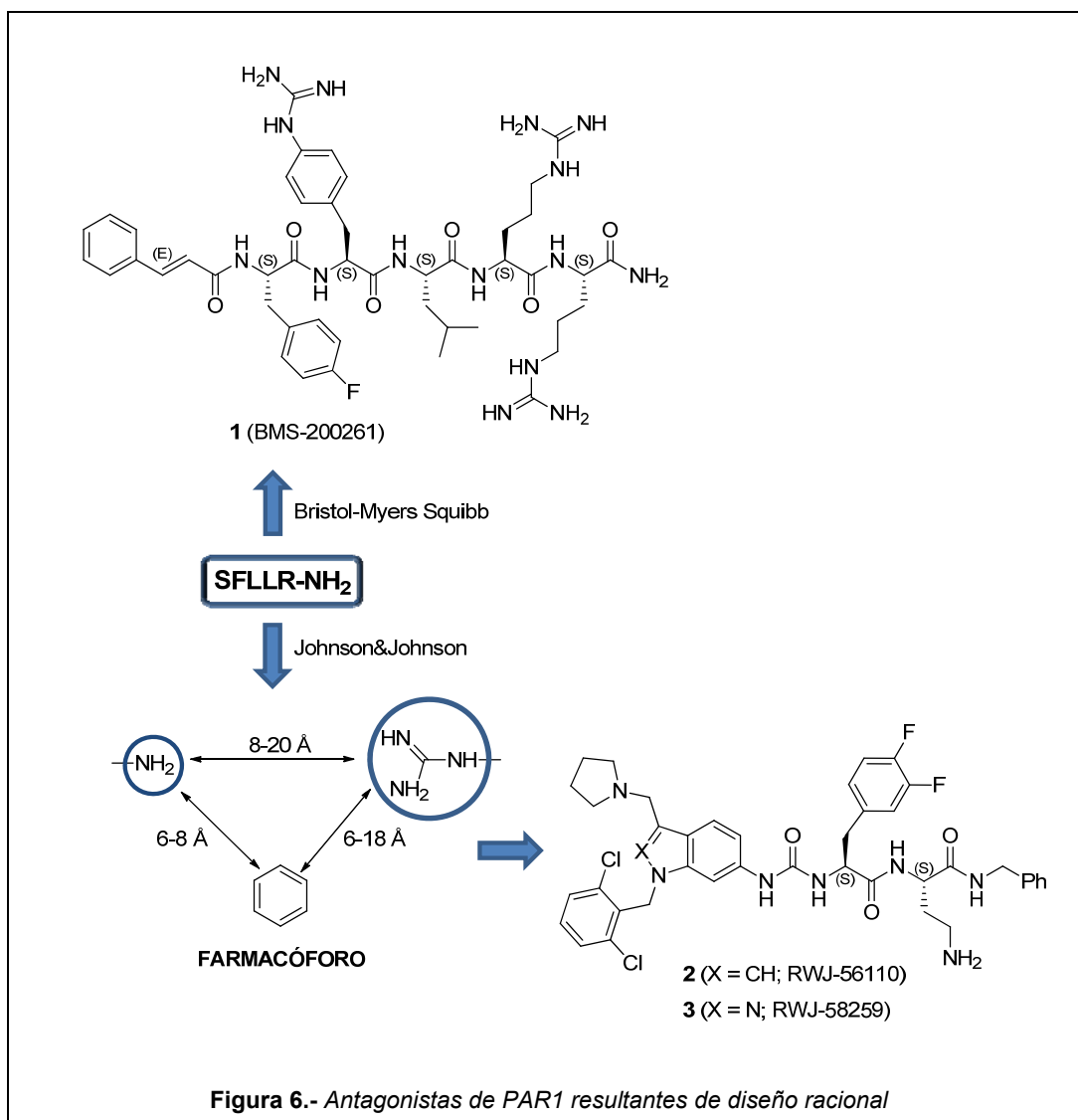
### 1.1.5. Moduladores de PAR1

Los múltiples efectos fisiológicos y patofisiológicos regulados por la activación de PAR1 apoyan la hipótesis de que los compuestos capaces de modular las interacciones trombina/PAR1 podrían tener potencial aplicación terapéutica en diversos estados patológicos. Dada la preferente expresión de este receptor en plaquetas y su relación con la cascada de coagulación sanguínea, la búsqueda de antagonistas se ha orientado preferentemente hacia el campo de las enfermedades cardiovasculares, bajo la hipótesis de que podrían ser buenos antitrombóticos sin los inconvenientes hemorrágicos de los inhibidores de trombina. Por otra parte, teniendo en cuenta la estrecha relación entre PAR1 y los procesos cancerosos (comentada en el apartado 1.1.3), recientemente, se ha empezado a contemplar la utilización de los antagonistas de PAR1 en cáncer, particularmente, como inhibidores de angiogénesis. En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares y los cánceres están consideradas como las dos primeras causas de mortalidad. Además, la disponibilidad de agonistas y antagonistas potentes y específicos de PAR1 tiene interés para uso como herramientas farmacológicas en el estudio de las implicaciones fisiológicas de este receptor. Sin embargo, el descubrimiento de moduladores de PAR1 ha constituido y constituye un reto, al tener que competir con la activación intramolecular endógena, energéticamente más favorecida. En este reto, el estudio de relaciones estructura-actividad (SAR) sobre los péptidos activadores (PAR1-APs) fueron el punto de arranque. En este sentido, destacan los primeros estudios con el péptido de 14 aminoácidos que incluye la secuencia 42-55 de PAR1 (SFLLRNPNDKYEPF-NH<sub>2</sub>)<sup>18</sup>. Estudios posteriores identificaron el hexapéptido SFLLRN-NH<sub>2</sub> como secuencia mínima para la actividad agonista completa y el pentapéptido SFLLR-NH<sub>2</sub> como secuencia mínima con actividad agonista<sup>135,136</sup>. La modificación extensiva de los PAR1-APs ha delimitado los requisitos estructurales de las interacciones trombina/PAR1, proporcionando la base para el diseño racional de antagonistas. Así, el escaneo con Ala de SFLLRN-NH<sub>2</sub> y modificaciones en su amino N-terminal mostraron la importancia de este amino libre y de Phe, Leu y Arg para la

actividad agonista<sup>135-141</sup>. Estas y otras modificaciones, incluyendo la incorporación de heterociclos y macrociclos en el péptido han dado lugar a ligandos de PAR1 con actividad agonista, antagonista y mixta agonista-antagonista, aunque, en general, con baja potencia y selectividad<sup>142,143</sup>. Además, se ha descrito que el péptido TFRRRLSRATR derivado de la secuencia C-terminal del receptor P2Y1 de las plaquetas humanas posee actividad agonista sobre PAR1, siendo TFRRRL la secuencia mínima activa capaz de activar las plaquetas<sup>144</sup>. Por otra parte, se ha descrito que el péptido inhibidor de trombina, RPPGF, resultante de la hidrólisis de bradiquinina por la enzima convertidora de angiotensina, inhibe la activación de las plaquetas a concentraciones inferiores a la  $CI_{50}$  de inhibición de la trombina, mediante la unión a PAR1 en su sitio de proteólisis, a través de la R41, impidiendo la activación del receptor por trombina<sup>145,146</sup>. Es de señalar que, recientemente, se ha descrito que un pentapéptido no natural derivado de la modificación de RPPGF, denominado trombostatina FM19, disminuyó el número de vasos de los tumores así como el crecimiento tumoral en administración oral en ratones modelo de cáncer de próstata a concentraciones inferiores a las requeridas para actividad anticoagulante<sup>147</sup>.

Desde los años 90, la búsqueda de antagonistas de PAR1 potentes y selectivos ha sido liderada por un pequeño grupo de compañías farmacéuticas, orientada hacia el campo cardiovascular, particularmente de los antitrombóticos e inhibidores de la aterosclerosis y la reestenosis. En esta búsqueda se han seguido dos estrategias clásicas en Química Médica: (a) diseño racional de peptidomiméticos, basado en los mencionados estudios de relaciones estructura-actividad sobre los PAR1-APs, y (b) cribados de alto rendimiento (HTS) de quimiotecas de moléculas pequeñas.

Aplicando la estrategia (a), a partir de SF(f)F(Gn)LR-NH<sub>2</sub> (f = *p*-fluoro; Gn = *p*-guanidino), uno de los pentapéptidos agonistas más potentes, mediante la sustitución del residuo de serina por un grupo trans-cinamoilo o fenilpropinoilo, la compañía Bristol-Myers Squibb obtuvo una serie de potentes antagonistas de PAR1. El compuesto BMS-200261 (Figura 6, **1**), el más potente de la serie<sup>148</sup>, es antagonista selectivo de PAR1 frente a PAR2<sup>24</sup> y PAR4<sup>149,150</sup>.



Por otra parte, en Johnson & Johnson, teniendo en cuenta información de estudios SAR y de conformaciones de baja energía sobre SFLLRN, definieron un modelo de farmacóforo de tres puntos (Figura 6), constituido por el grupo amino N-terminal, el anillo de fenilo y el carbono central del grupo guanidino de arginina. Aplicando este modelo de farmacóforo, utilizando esqueletos rígidos como soporte de los grupos farmacofóricos, y optimización estructural obtuvieron varias series de antagonistas<sup>21,143,151</sup>. Así, el esqueleto de 6-aminoindol, inicialmente seleccionado para orientar adecuadamente los tres grupos farmacofóricos de SFLLRN, y la introducción de un grupo urea como anclaje

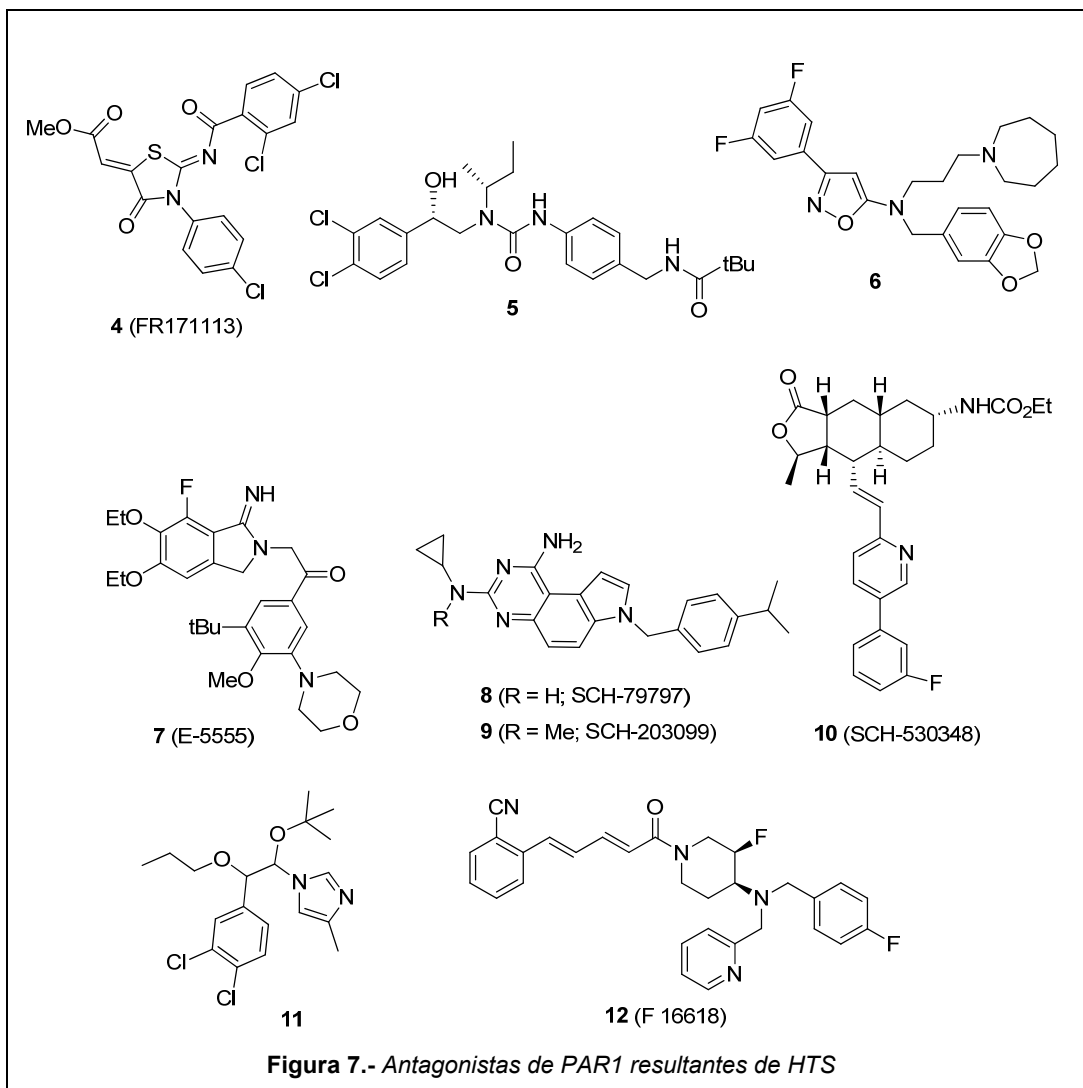
dieron lugar a la primera serie de antagonistas, que posteriormente fue optimizada, sustituyendo el grupo guanidino por amino con el fin de minimizar efectos cardiovasculares indeseados. Entre estos peptidomiméticos basados en el esqueleto de indol, el compuesto RWJ-56110 (Figura 6, **2**) mostró alta potencia antagonista, selectividad por PAR1, y selectividad en la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por trombina o agonistas PAR1 frente a la inducida por colágeno<sup>152,153</sup>. Además, como se ha comentado en el apartado 1.1.3.4, este antagonista bloqueó la angiogénesis, tanto la básica como la estimulada, en los modelos *in vitro* Matrigel e *in vivo* CAM<sup>115,116</sup>. Posteriormente, con el fin de optimizar el perfil de seguridad cardiaca de RWJ-56110, particularmente para minimizar el efecto hipotensor, el anillo de indol fue sustituido por su bioisómero indazol para dar lugar a RWJ-58259 (**3**)<sup>152</sup>. Este antagonista está considerado como un estándar de referencia en estudios farmacológicos. Es de señalar que, a diferencia de lo que sucede con la mayoría de los antagonistas de PAR1 descritos, RWJ-58259 inhibe de forma similar la agregación plaquetaria inducida por el agonista SFLLRN que por la trombina<sup>151</sup>. Este antagonista bloqueó la formación de trombos en primates no humanos, constituyendo la primera prueba de la potencial utilidad clínica de los antagonistas de PAR1 en humanos<sup>154</sup>, aunque su mala biodisponibilidad oral paralizó su desarrollo clínico<sup>143</sup>. Al igual que RWJ-56110, RWJ-58259 también inhibe la invasión celular en modelos de angiogénesis<sup>143</sup>.

En lo que respecta al HTS de quimiotecas de moléculas pequeñas no peptídicas, esta estrategia ha desvelado varias series de antagonistas representados en la Figura 7 por los compuestos más significativos. El derivado de 1,3-tiazolidinona FR171113 (**4**), de Fujisawa Pharmaceuticals, fue el primer antagonista no peptídico de PAR1 descrito. Este antagonista mostró inhibición submicromolar en la agregación de plaquetas humanas inducida por SFLLRN e inhibió la trombosis arterial en cobayas<sup>155,156</sup>.

Investigadores de Merck han descrito una serie de ureas, representadas por **5**, y otra de derivados de isoxazol, representados por **6**, con afinidad submicromolar por plaquetas e inhibición de la secreción de serotonina en plaquetas inducida por PAR1-APs<sup>157,158</sup>. El compuesto más potente de estas series **6** inhibió la agregación plaquetaria inducida por trombina 1 nM a concentración 1  $\mu$ M.

La compañía japonesa Eisai Inc. ha patentado un gran número de 2-iminoimidazoles, 2-iminopirrolidinas y guanidinas y amidinas cíclicas como antagonistas de los receptores de trombina<sup>159-161</sup>. Entre estos compuestos, las amidinas bicíclicas fueron las que mostraron mejores resultados, destacando E-5555 (**7**), activa por vía oral,

que inhibe la agregación plaquetaria inducida por trombina a concentración 64 nM. Este compuesto se encuentra en la actualidad en experimentación clínica fase II en Japón, en pacientes con síndrome coronario agudo y en enfermos con daños en las arterias coronarias<sup>162</sup>, aunque la información sobre los resultados de las fases preclínicas es muy escasa<sup>143</sup>.



Por último, hay que señalar las aportaciones de la compañía Schering-Plough en la búsqueda de antagonistas de PAR1 mediante HTS. Primero, describieron la pirroloquinazolina SCH-79797 (**8**) y su *N*-metil-derivado SCH-203099 (**9**), antagonistas potentes y selectivos de PAR1 en plaquetas humanas y en células de músculo liso

cuando se utilizan PAR1-APs como agonistas, aunque con relativa baja potencia antagonista en la agregación plaquetaria inducida por trombina (3 y 0.7  $\mu$ M, respectivamente)<sup>163,164</sup>. Es de señalar que SCH-79797 es un potente agente antiangiogénico en modelos in vivo<sup>115,116</sup>, bloquea la migración celular, reduce el daño producido en el miocardio por isquemia/reperfusión y muestra efectos antiproliferativos en diversas líneas de células tumorales<sup>165-167</sup>, aunque parece ser que los efectos antiproliferativos no están mediados a través de PAR1<sup>168</sup>. El éxito principal de Schering-Plough en este campo lo constituyó el descubrimiento en 2005 de una familia de antagonistas de PAR1 derivados de producto natural himbacina<sup>169</sup>, descubiertos dentro de una campaña de búsqueda de ligandos para los receptores muscarínicos. Extensivos estudios SAR condujeron a SCH-530348 (Figura 7, **10**), recientemente denominado "Vorapaxar", potente antagonista competitivo de PAR1 ( $K_i$  = 8.1 nM), que inhibe la agregación de plaquetas humanas inducida por trombina a concentración 47 nM y con excelente biodisponibilidad oral<sup>170</sup>. Los buenos resultados de la investigación preclínica de Vorapaxar facilitaron su paso a experimentación clínica, pasando en 2007 a fase III en síndrome coronario agudo y en prevención secundaria de daños cardiovasculares y trombosis en pacientes de alto riesgo<sup>171</sup>.

Por último, recientemente, los laboratorios Pierre Fabre han descrito dos series de antagonistas estructuralmente no relacionadas derivadas de HTS, seguido de optimización, entre los que se encuentran los éteres derivados de imidazol **11**<sup>172</sup> y amidas de piperazinas representadas por **12** (F 16618)<sup>173,174</sup>. Este antagonista, el más avanzado de estas series, ha mostrado potente actividad antitrombótica y reducción de reestenosis en la arteria carótida de ratas, sin afectar al tiempo de coagulación<sup>175,176</sup>.

De la comparación estructural entre las distintas familias de antagonistas no peptídicos descubiertos por HTS y con los peptidomiméticos resultantes del diseño racional no se deducen hechos estructurales comunes más allá de la presencia de grupos aromáticos y básicos, que, como se ha comentado, se incluían en el modelo de farmacóforo.

Como una estrategia diferente en la búsqueda de antagonistas de PAR1, hay que señalar los recientes resultados prometedores de antagonistas basados en pepducinas en la prevención de trombos en modelos animales de cáncer de mama<sup>31</sup>. Estas pepducinas son péptidos lipidados derivados de secuencias de los bucles intracelulares de PAR1, capaces de penetrar en la célula, e interferir con la unión PAR1/proteínas G, bloqueando la transmisión de señales<sup>177,178</sup>. El diseño de pepducinas parte de los

estudios de mutagénesis que indican que el 3º bucle intracelular (i3) de los GPCR media en gran medida el acoplamiento del receptor con sus correspondientes proteínas G<sup>179</sup>. En el caso de PAR1, se ha visto que la secuencia del i3 denominada P1-i3-40, que contiene aminoácidos próximos a la parte intracelular de la hélice  $\alpha$  transmembrana 5 (TM5), induce una rápida entrada de calcio en las plaquetas, indicativa de activación<sup>177,178</sup>. A partir de este resultado, mediante sucesivos truncados y *N*-palmitoilaciones, para favorecer la penetración en la célula, se obtuvo la pepducina denominada P1pal-12 (palmitoil-NH-RCLSSSAVANRS-NH<sub>2</sub>), antagonista total de PAR1, capaz de bloquear la entrada de calcio inducida por trombina en plaquetas, así como su agregación inducida por SFLLN-NH<sub>2</sub><sup>177,178</sup>. P1pal-12, así como el análogo heptapeptídico P1pal-7 inhibieron también el crecimiento tumoral y la angiogénesis en xenoinjertos de cáncer de mama en ratones desnudos<sup>31</sup>.

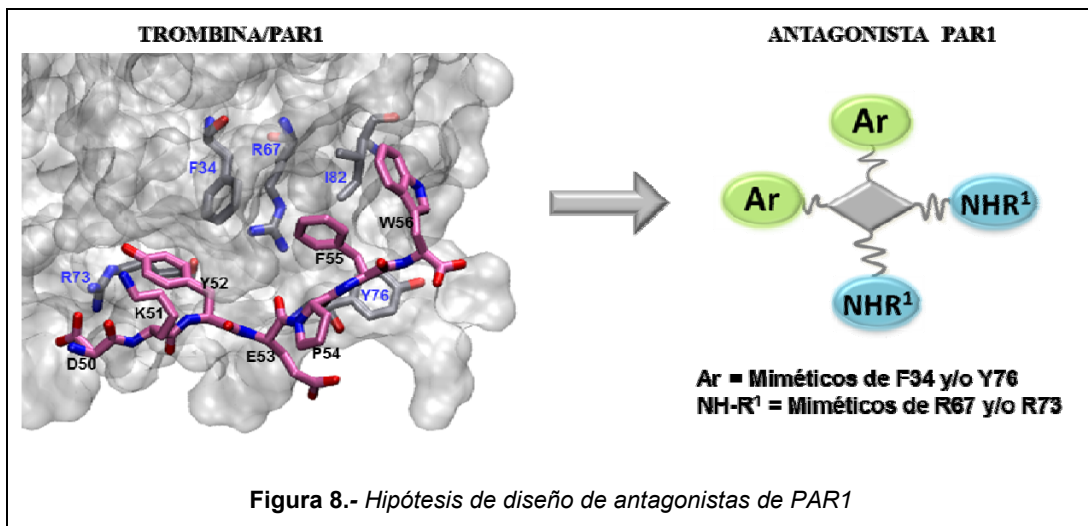
A pesar del avance significativo que constituyen los antagonistas de PAR1 descritos en los últimos 10 años, su número es todavía muy limitado, así como la información disponible sobre ellos. Particularmente, en lo que se refiere a su sitio de unión al receptor y a la actividad *in vivo* en modelos animales apropiados, donde tienen que competir con el principal agonista endógeno, la trombina, y no con los AP1-APs utilizados en la mayoría de las evaluaciones biológicas. Como ya se ha comentado en el punto 1.1.4, no existe información estructural sobre el sitio de unión de ninguno de los antagonistas descritos hasta ahora, información que permitiría un diseño racional basado en la estructura del receptor. Por otra parte, la dificultad de disponer de preparaciones rápidas y estables del receptor y de ligandos radioactivos apropiados, para ensayos masivos de unión de ligandos a PAR1, ha dificultado el desarrollo de proyectos de búsqueda de antagonistas<sup>151</sup>. Estos ensayos se realizan en preparaciones de membranas de plaquetas humanas<sup>180</sup> o de células CHRF-288-11<sup>181</sup>, que no son comerciales. De hecho, actualmente, la mayoría de las evaluaciones de potenciales ligandos de PAR1 todavía se realizan determinando inhibición de la agregación de plaquetas en sueros humanos, con la dificultad que supone la manipulación de muestras de origen humano. A estas dificultades hay que añadir la especificidad de especie animal, comentada en el apartado 1.1.2, que imposibilita el uso de las especies animales más habituales en experimentación animal para los modelos *in vivo*.

## 1.2. HIPÓTESIS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS ANTAGONISTAS DE PAR1

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, a pesar de la fuerte asociación del receptor de trombina PAR1 con el desarrollo, crecimiento e invasión tumoral, hasta ahora no se ha contemplado el estudio de la utilización de los antagonistas de este receptor como una posible terapia en el tratamiento del cáncer. Solo muy recientemente, se ha empezado a explorar la utilización de un reducido número de antagonistas como herramientas farmacológicas en este campo, preferentemente como inhibidores de la angiogénesis<sup>115,116</sup>. Por ello, como una alternativa novedosa, aunque arriesgada, en la búsqueda de agentes antitumorales, en el año 2007 el grupo de PEPTIDOMIMÉTICOS del Instituto de Química Médica del CSIC inició un proyecto orientado al diseño y síntesis de nuevos antagonistas de PAR1 como aproximación innovadora a la búsqueda de nuevos inhibidores de la angiogénesis. Inicialmente, este proyecto se enmarcó dentro del proyecto SAF-2006-01205, "*Peptidomiméticos como herramientas para el desarrollo de moduladores de interacciones proteína-proteína*" y desde enero del 2010 se encuadra en el proyecto SAF2009-09323 "*Diseño racional y diversidad molecular: dos estrategias convergentes para la modulación de interacciones proteína-proteína terapéuticamente relevantes*".

Las conclusiones de los estudios estructurales para la interacción trombina/PAR1, indicaron que la primera interacción entre la trombina y su receptor PAR1 se produce a nivel de la secuencia similar a hirudina (D<sup>50</sup>KYEPF<sup>55</sup>), en el exosito I de trombina, y que esta interacción es esencial y determinante para la proteólisis y activación del receptor. A partir de estas conclusiones, como hipótesis para la obtención de nuevos antagonistas de PAR1, se planteó el diseño de peptidomiméticos del exosito I de trombina, capaces de bloquear esa primera interacción de la trombina con la secuencia similar a hirudina de PAR1. Dado que, como se ha mostrado en la Figura 5, los residuos de trombina críticos para la interacción inicial con PAR1 (Phe<sup>34</sup>, Arg<sup>67</sup>, Arg<sup>73</sup>, Tyr<sup>76</sup>, e Ile<sup>82</sup>, en inglés denominados "hot spots") son discontinuos y no se encuentran localizados formando una estructura peptídica secundaria definida, es difícil plantear un diseño basado en miméticos de estructura secundaria. Por ello, aplicando una estrategia de síntesis orientada a la diversidad (DOS) para explorar el espacio de interacción proteína-proteína, tal como se muestra de forma simplificada en la Figura 8, se planteó un diseño basado en estructuras de flexibilidad variable, portadoras de, al menos, tres puntos de diversidad para el anclaje de agrupamientos que pudieran mimetizar los mencionados

“hot spots” del exosítio I de trombina en su interacción con PAR1. Es decir: uno o dos grupos hidrófobos capaces de mimetizar el bolsillo hidrófobo definido por F34, Y76 y I82, y uno o dos grupos básicos capaces de mimetizar R67 y/o R73.



Con la diversidad de esqueletos se pretendía modular la topografía y la flexibilidad global de la molécula, mientras que, con la diversidad de anclajes y funcionalidades se pretendía modular la distancia entre los grupos farmacofóricos, su flexibilidad y su funcionalidad. Además, este diseño podría ajustarse también al mencionado modelo de farmacóforo triangular.

### 1.3. OBJETIVOS

Como objetivo general de la tesis doctoral que se recoge en esta Memoria, se planteó el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos peptidomiméticos capaces de inhibir la activación de PAR1 por trombina, mediante el bloqueo de la primera interacción entre ambas proteínas en el exosito I de trombina, que es determinante y esencial para dicha activación. Este objetivo general se puede desglosar en tres objetivos más concretos:

- a) De acuerdo con la hipótesis de diseño, mediante una estrategia de diseño orientado a la diversidad estructural, seleccionar estructuras versátiles, de flexibilidad variable, portadoras de, al menos, tres puntos de diversidad para el anclaje de grupos capaces de mimetizar las cadenas laterales de los aminoácidos del exosito I de trombina importantes para su interacción con PAR1 a nivel de la secuencia similar a hirudina.
- b) Aplicando una estrategia de síntesis orientada a la diversidad, sintetizar pequeñas quimiotecas de las estructuras seleccionadas, que permitiesen explorar el espacio químico, en lo que respecta a distancias y flexibilidad, utilizando, a ser posible, herramientas de síntesis generadoras de diversidad desarrolladas en el grupo de investigación.
- c) Evaluación de las nuevas moléculas sintetizadas, en primer lugar, como potenciales antagonistas de PAR1 y, posteriormente, aquellas que en esta primera evaluación mostrasen actividad significativa, como inhibidores de angiogénesis.

## 1.4. PLAN DE TRABAJO

### 1.4.1. Diseño de estructuras

De acuerdo con la hipótesis de diseño, tal como se muestra en la Figura 9, se proyectaron tres tipos de estructuras generales de flexibilidad variable **A**, **B** y **C**, capaces de aportar, al menos, tres puntos de diversidad, en los que unir los denominados grupos farmacofóricos (uno o dos grupos aromáticos y uno o dos grupos de carácter básico) a distancias y con topografías diversas. La síntesis de este tipo de estructuras se planteó a partir de precursores comunes, uno de los principios de fundamentales en la síntesis orientada a la diversidad (DOS)<sup>182-187</sup>. Hay que señalar que las ureas abiertas **A**, además de reunir estas características, son análogos de los antagonistas peptidomiméticos desarrollados por Johnson&Johnson, comentados en el apartado 1.1.5, cuyo prototipo es el antagonista de referencia RWJ-258259, de hecho el agrupamiento indazólico de este antagonista se incluyó entre la diversidad de grupos aromáticos en **R**<sup>2</sup>. La importancia del grupo ureido viene reforzada también por su presencia en la serie de ureas antagonistas de PAR1 **5**, desarrollados por Merck mediante HTS.

El grupo **Ar** de las estructuras **A**, **B** y **C** identifica grupos aromáticos de aminoácidos naturales, preferentemente fenilo e indol (Phe y Trp), respectivamente, aunque, dependiendo de los resultados biológicos iniciales, se plantearía la introducción de fenilos sustituidos, como el de la difluorofenilalanina presente en el antagonista RWJ-258259.

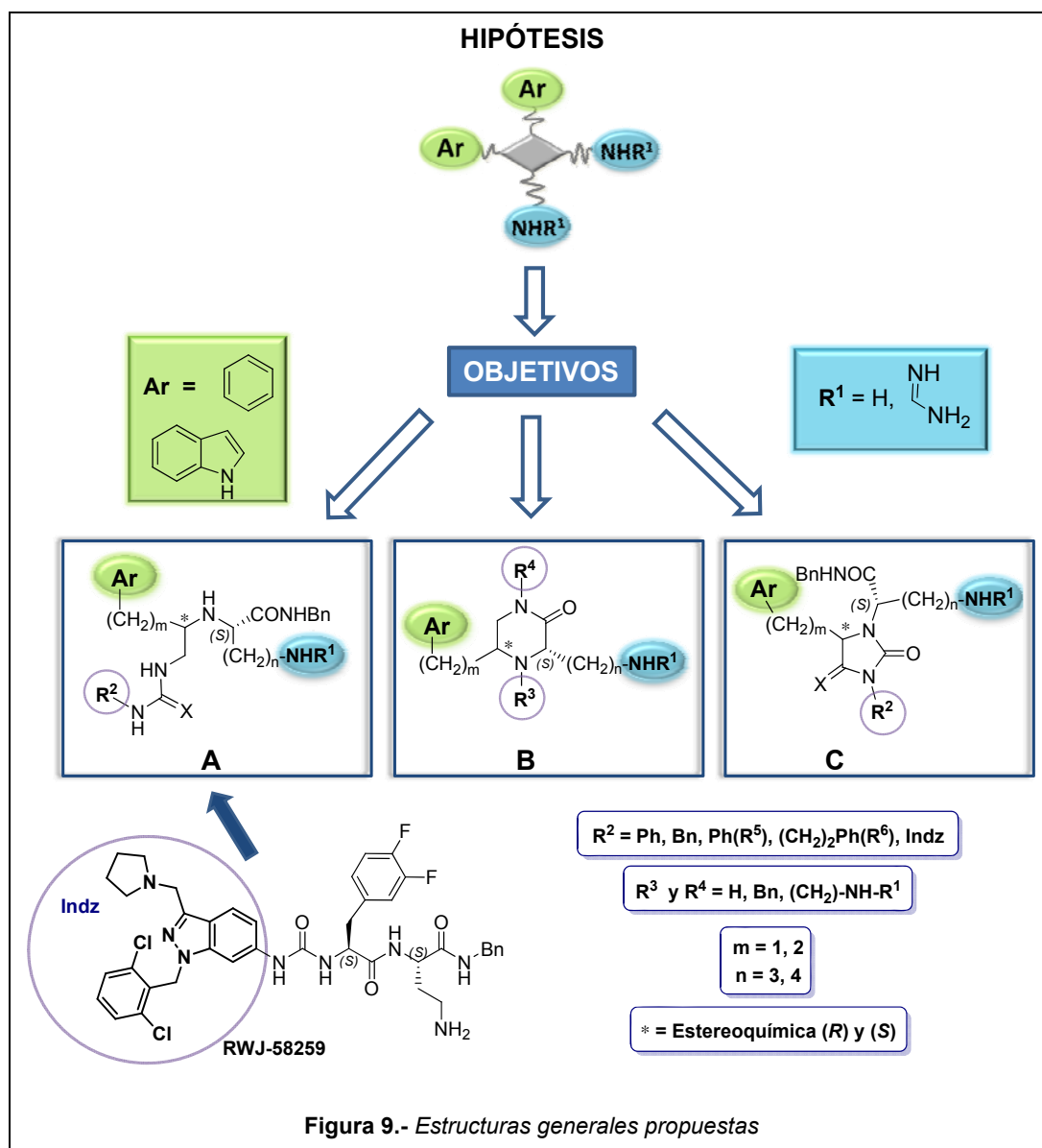
Como grupos básicos se seleccionaron el amino de la cadena lateral de lisina o de ornitina y el guanidino de arginina (**NH-R**<sup>1</sup>).

La distancia entre los grupos farmacofóricos se modularía con el número de metilenos *m* y *n*. El grupo **Ar** se uniría a través de 1 o 2 eslabones (*m*), mientras que, el grupo básico se uniría a través de 3 o 4 eslabones (*n* correspondiente a Orn/Arg y Lys). Dependiendo de los resultados, se podría incluir también la cadena de ácido diaminobutírico, presente en RWJ-258259.

Las estructuras **B**, derivadas de 2-oxopiperazinas, permitirían la introducción de dos agrupamientos adicionales, aromáticos y/o básicos, en **R**<sup>3</sup> y **R**<sup>4</sup>.

En el centro quiral (\*), que se generaría en el proceso de síntesis, se plantearon las dos estereoquímicas (*R*) y (*S*). Sin embargo, en el resto de centros quirales, que procederían de los compuestos de partida para la síntesis, en principio solo se

plantearon con configuración (S), susceptible de modificación en caso de ser necesario para estudios SAR.

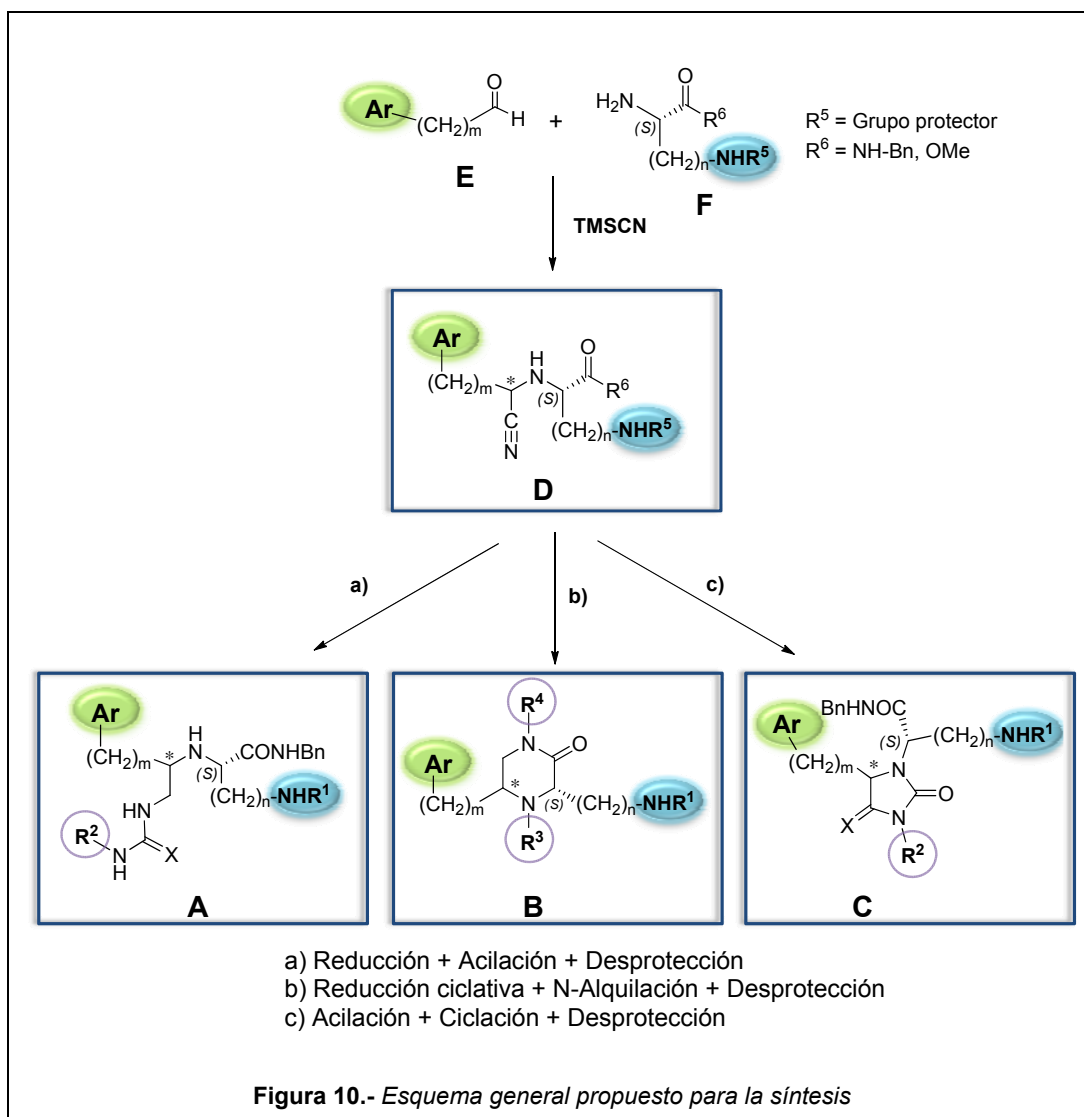


El diseño de las estructuras **A**, **B** y **C** se planteó de forma interactiva, flexible y coordinada con los resultados que se fuesen obteniendo de la evaluación biológica de los compuestos sintetizados.

### 1.4.2. Síntesis

Para la síntesis de las estructuras propuestas **A-C** se propuso un esquema que tiene en cuenta dos de los principios de la síntesis orientada a la diversidad<sup>182</sup>, como son: a) Aprovechamiento de la eficiencia de las reacciones multicomponente; y b) La presencia de grupos reactivos en los productos de reacción permite aplicar esquemas de síntesis con puntos de ramificación, donde un intermedio común es usado en diferentes reacciones para dar lugar a esqueletos diversos, multiplicando la diversidad. Por ello, se planteó un esquema de síntesis versátil y ramificado, aprovechando el alto potencial de los  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de aminoácidos para la generación de diversidad molecular, puesto de manifiesto previamente por nuestro grupo de investigación<sup>188</sup> (Figura 10).

En la síntesis de los tres tipos de estructuras planteadas **A-C** se utilizarían los  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de aminoácidos **D** como intermedios comunes. Estos  $\alpha$ -aminonitrilos **D** se obtendrían mediante una reacción de tres componentes de Strecker, consistente en la adición *in situ* de cianuro de trimetilsililo (TMSCN) a la imina intermedia formada entre los aldehídos **E**, portadores de grupos aromáticos, y los aminoácidos básicos  $N(\alpha)$ -desprotegidos **F**. La adecuada manipulación química de la reactividad del grupo ciano, junto con la de los grupos reactivos del aminoácido, mediante reacciones sencillas de reducción, reacciones con isocianatos, ciclación, alquilaciones y eliminación de grupos protectores permitiría acceder a las estructuras propuestas **A-C**. El esquema de síntesis propuesto tiene la ventaja de que tanto los derivados de los aminoácidos como la mayoría de los otros reactivos necesarios son de fácil acceso comercial. Dado que en la síntesis de los  $\alpha$ -aminonitrilos **D** se genera un nuevo centro estereogénico, habría que prestar especial atención a la estereoselectividad de los procesos o a la resolución de diastereoisómeros. Como se ha comentado en el apartado anterior, en principio, solo se utilizarían aminoácidos de la serie natural L, mientras que, los de la serie D solo serían considerados en el caso de que fuesen necesarios para estudios SAR.



### 1.4.3. Evaluación Biológica

Los compuestos de las series **A-C**, así como todos los intermedios de la síntesis, serían evaluados como antagonistas de los receptores PAR1 e inhibidores de angiogénesis en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Patras en Grecia, bajo la dirección del Dr. Nikos E. Tsopanoglou, con quien se está colaborando para la realización de este proyecto. Este grupo ha estudiado el papel de la trombina en la angiogénesis y la progresión tumoral<sup>109,110,112,189</sup> y, recientemente, ha demostrado el

bloqueo de la angiogénesis por antagonistas de PAR1<sup>115,116</sup>. En primer lugar, los compuestos serían cribados en ensayos de agregación plaquetaria, ya que, como se ha comentado, el PAR1 humano se expresa principalmente en estas células, en las que su activación por trombina induce agregación. Los compuestos que inhibiesen la agregación plaquetaria serían evaluados en células endoteliales en ensayos de movilización de calcio, dado que en estas células la activación de PAR1 induce movilización de calcio. Por último, los compuestos que pasasen estos filtros iniciales serían evaluados en el modelo *in vivo* de angiogénesis de la membrana corioalantoica de pollo.

Además, todos los compuestos sintetizados serían evaluados como potenciales agentes citotóxicos por la compañía PharmaMar, S. A., EPO de los proyectos SAF mencionados, en los que se ha encuadrado esta tesis doctoral.

## **2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



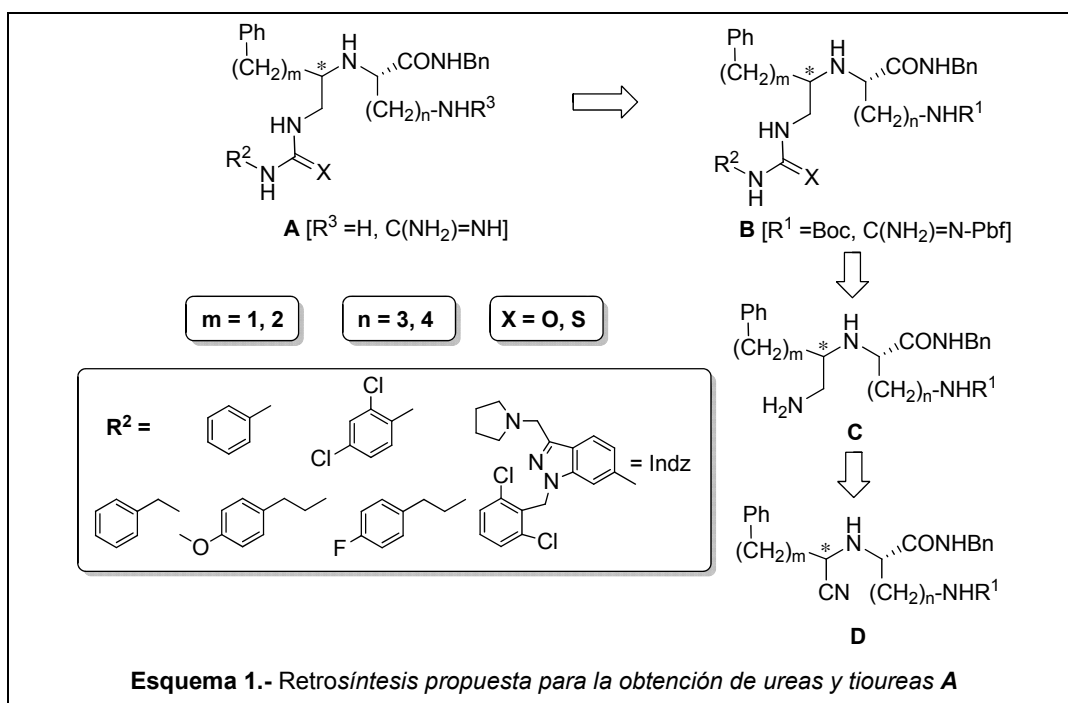
## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE UREAS Y TIOUREAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS

#### 2.1.1. Síntesis

En este capítulo se contempla la síntesis y evaluación biológica de la quimioteca de ureas y tioureas derivadas de aminoácidos básicos de fórmula general **A** indicadas en el apartado 1.4.1. La síntesis de estas estructuras se planteó utilizando como productos de partida  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de aminoácidos básicos (**D**) y aplicando un esquema general de retrosíntesis que, tal como se indica en el Esquema 1, implica tres etapas fundamentales:

- Reducción del grupo ciano a aminometilo (**C**).
- Reacción de las aminas **C** con diferentes isocianatos o isotiocianatos para dar las correspondientes ureas o tioureas de fórmula general **B**.
- Eliminación de los grupos protectores, para obtener las ureas deseadas **A**.



### 2.1.1.1. Síntesis de $\alpha$ -aminonitrilos

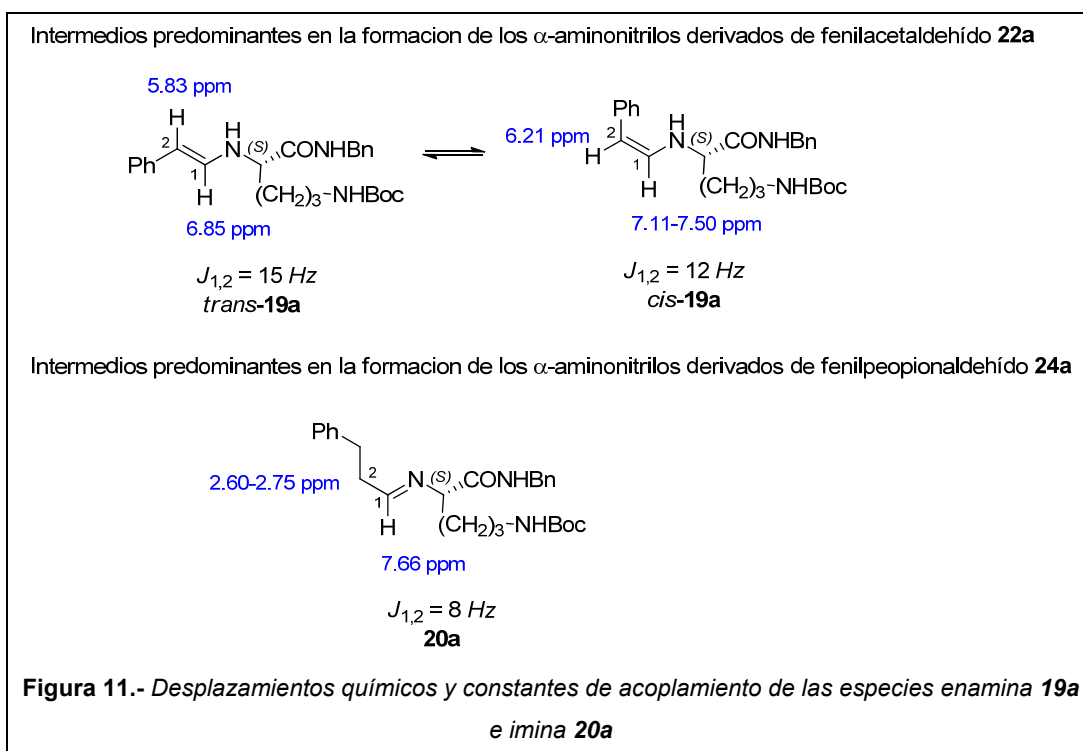
Inicialmente, la síntesis de los  $\alpha$ -aminonitrilos **D** se abordó aplicando las condiciones desarrolladas anteriormente en el grupo de investigación para la preparación de aminonitrilos análogos derivados de  $\alpha$ -aminoaldehídos<sup>190</sup>. Esta metodología implicaba una síntesis modificada de Strecker, consistente en la reacción catalizada por  $ZnCl_2$ , de  $\alpha$ -aminoaldehídos con aminoácidos  $N_\alpha$ -desprotegidos a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , seguida de adición *in situ* de TMSCN sobre la imina intermedia. En el caso que nos ocupa, la aplicación de esta metodología requería la previa preparación de las amidas bencílicas derivadas de ornitina, lisina y arginina convenientemente protegidas en la cadena lateral [**15a** = H-Orn(Boc)-NHBn; **15b** = H-Lys(Boc)-NHBn y **15c** = H-Arg(Pbf)-NHBn]. Tal como se indica en el Esquema 2, estas amidas se obtuvieron por reacción del correspondiente aminoácido  $N_\alpha$ -Fmoc protegido **13a-c** con bencilamina utilizando 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y  $N,N'$ -diciclohexilcarbodiimida (DCC), como agentes de acoplamiento, seguida de la eliminación del grupo protector  $N_\alpha$ -Fmoc por tratamiento con  $Et_2NH$  en  $CH_3CN$ .

Cuando se aplicaron las condiciones de reacción de la síntesis de Strecker, arriba indicadas, a la reacción de la bencilamida derivada de Ornitina **15a** con fenilacetaldehído (**16**), además de los dos posibles epímeros en el nuevo centro estereogénico generado (**R**)- y (**S**)-**22a**, se detectó la formación de subproductos de reacción sobre la amina secundaria (**23**) en el análisis del crudo de reacción por HPLC-MS. Con el fin de evitar la formación de estos subproductos, fue necesario ajustar la relación de equivalentes aldehído/amina (**16/15a**) a 0.8/1. Utilizando esta proporción de reactivos, se obtuvieron los  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de Orn(Boc) y Lys(Boc), y fenilacetaldehído y 3-fenilpropionaldehído, **22a,b** y **24a,b**, respectivamente, como mezclas 1:1 de epímeros y 60-75% de rendimiento. De estas mezclas de epímeros, solo los derivados de fenilacetaldehído **22a,b** pudieron resolverse por cromatografía. Además, **22a** también fue parcialmente resuelta por cristalización lenta de AcOEt/hexano. A la vista de las dificultades para la resolución de las mezclas epiméricas, se estudió la posibilidad de inducir asimetría en su síntesis.



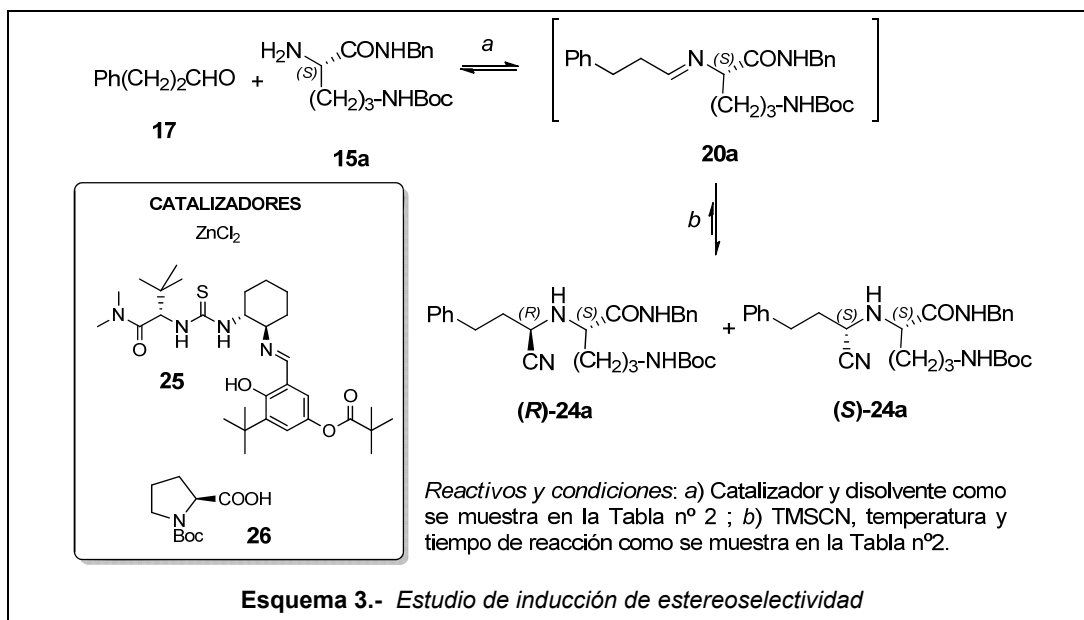
realizó mediante HPLC-MS y  $^1\text{H}$ -RMN sobre la mezcla del correspondiente aldehído **16** o **17** con la bencilamida derivada de ornitina **15a** calentada a 80 °C en  $\text{CDCl}_3$  durante 5 min en microondas. En ambos casos, el análisis de HPLC-MS de la mezcla de reacción mostró la aparición de un pico de masa molecular correspondiente a la imina o enamina. En cuanto al análisis por  $^1\text{H}$ -RMN:

- En el caso de los derivados de fenilacetaldehído, no se observó la presencia de la señal correspondiente al protón imínico, sino la presencia de dos dobletes (5.83 y 6.85 ppm) con constante de acoplamiento de 15 Hz, correspondientes a los protones de la enamina *trans*-**19a** (Figura 11), junto con un doblete a 6.21 ppm, con constante de acoplamiento de 12 Hz, correspondiente a uno de los protones de la enamina *cis*-**19a**. La medida de las integrales de estos dobletes indicó una proporción *trans*:*cis*-**19a** de (1:1).
- En el caso de los derivados de 3-fenilpropionaldehído, se observó la señal correspondiente al protón imínico de **20a** a 7.66 ppm como un triplete acoplado con un multiplete a 2.60-2.75 ppm, correspondiente a los protones 2-H de **20a**, con constante de acoplamiento de 8 Hz.



Por lo tanto, se puede concluir que en el caso de los derivados de fenilacetaldehído, el equilibrio está desplazado hacia los intermedios enamínicos **19a**, estabilizados por conjugación del doble enlace con el anillo aromático, mientras que, en el caso de los derivados de 3-fenilpropionaldehído, el intermedio de reacción predominante es la imina **20a**.

La síntesis de Strecker ha sido uno de los métodos más utilizados para la obtención de precursores de  $\alpha$ -aminoácidos y la necesidad de obtenerlos enantioméricamente puros ha potenciado el desarrollo de diversas metodologías para la inducción de estereoselectividad en esta síntesis<sup>191,192-194</sup>. La inducción de estereoselectividad se ha abordado mediante la utilización de auxiliares quirales<sup>192-194</sup>, fundamentalmente aminas quirales precursoras de un grupo amino primario, y, más recientemente, mediante la utilización de catalizadores quirales<sup>195-198</sup>. En este caso, se han utilizado tanto catalizadores organometálicos quirales como la organocatálisis. En los últimos años, han destacado preferentemente las ureas y tioureas del grupo de E.N. Jacobsen<sup>199-201</sup>, tales como la tiourea **25** (Esquema 3). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudió la posibilidad de inducir estereoselectividad en la síntesis de **24a**, utilizando como catalizador la tiourea **25** en lugar de  $ZnCl_2$  y aplicando las condiciones descritas por Jacobsen. Como se muestra en la Tabla 2 (entrada 2), la utilización de hasta un 5% de catalizador, utilizando tolueno como disolvente, no mejoró la estereoselectividad con respecto a la utilización de  $ZnCl_2$  y el rendimiento fue menor.



A continuación, teniendo en cuenta trabajos recientes de V. Lu *et al.*<sup>202</sup>, en los que muestran la utilidad de Boc-Pro-OH (**26**) como catalizador para la adición enantioselectiva de alquinos a iminas, se estudió su influencia sobre la síntesis de **24a**. La utilización de diferentes cantidades de catalizador (10 -50 %mol) condujo a un 5-10% de exceso en el diastereoisómero (**R**)-**24a** (entradas 3 y 4). Este ligero exceso desapareció bajo condiciones de reacción de control termodinámico (mayor temperatura y tiempo de reacción), mejorando significativamente el rendimiento (entrada 5).

**Tabla 2.-** Influencia de las condiciones de reacción sobre la síntesis de los aminonitrilos (**R**)- y (**S**)-**24a**.

Entrada	Catalizador (mol %)	Disolvente	T (°C)	t (h o min)	24a (%) <sup>a</sup>	(R) : (S) <sup>b</sup>
1	ZnCl <sub>2</sub> (100)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	24 h	72	1 : 1
2	<b>25</b> (5)	Tolueno	0	24 h	42	1 : 1
3	Boc-Pro-OH (10)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	2 h	56	1.1 : 1
4	Boc-Pro-OH (50)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	2 h	61	1.2 : 1
5	Boc-Pro-OH (50)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	48 h	99	1 : 1
6	ZnCl <sub>2</sub> (100)	MeOH	0	2 h	80	1 : 1
7	ZnCl <sub>2</sub> (100)	MeOH	0	24 h	80	1 : 2
8	ZnCl <sub>2</sub> (100)	MeOH	T.a.	2 h	57	1 : 1.5
9	ZnCl <sub>2</sub> (100)	MeOH	T.a.	24 h	48	1 : 2.3
10	Boc-Pro-OH (50))	MeOH	0	2 h	82	1.1 : 1
11	Boc-Pro-OH (50))	MeOH	0	24 h	94	1 : 1
12	Boc-Pro-OH (50)	MeOH	T.a.	2 h	64	1 : 1.2
13	Boc-Pro-OH (50)	MeOH	T.a.	24 h	79	1 : 1.5
14	Boc-Pro-OH (50)	MeOH	T.a.	48 h	80	1 : 1.9
15 <sup>c</sup>	ZnCl <sub>2</sub> (100)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	120	5 min	51	1 : 1.6
16 <sup>c</sup>	ZnCl <sub>2</sub> (100)	MeOH	120	3 min	40	1 : 2
17 <sup>c</sup>	ZnCl <sub>2</sub> (100)	-	120	5 min	24	1 : 1
18 <sup>c</sup>	-	-	120	5 min	63	1 : 1
19	-	H <sub>2</sub> O	0	2 h	2	1 : 1
20	-	H <sub>2</sub> O	0	24 h	2	1 : 1
21	-	NaCl sat.	0	2 h	2	1 : 1
22	-	NaCl sat.	0	24 h	48	1 : 1

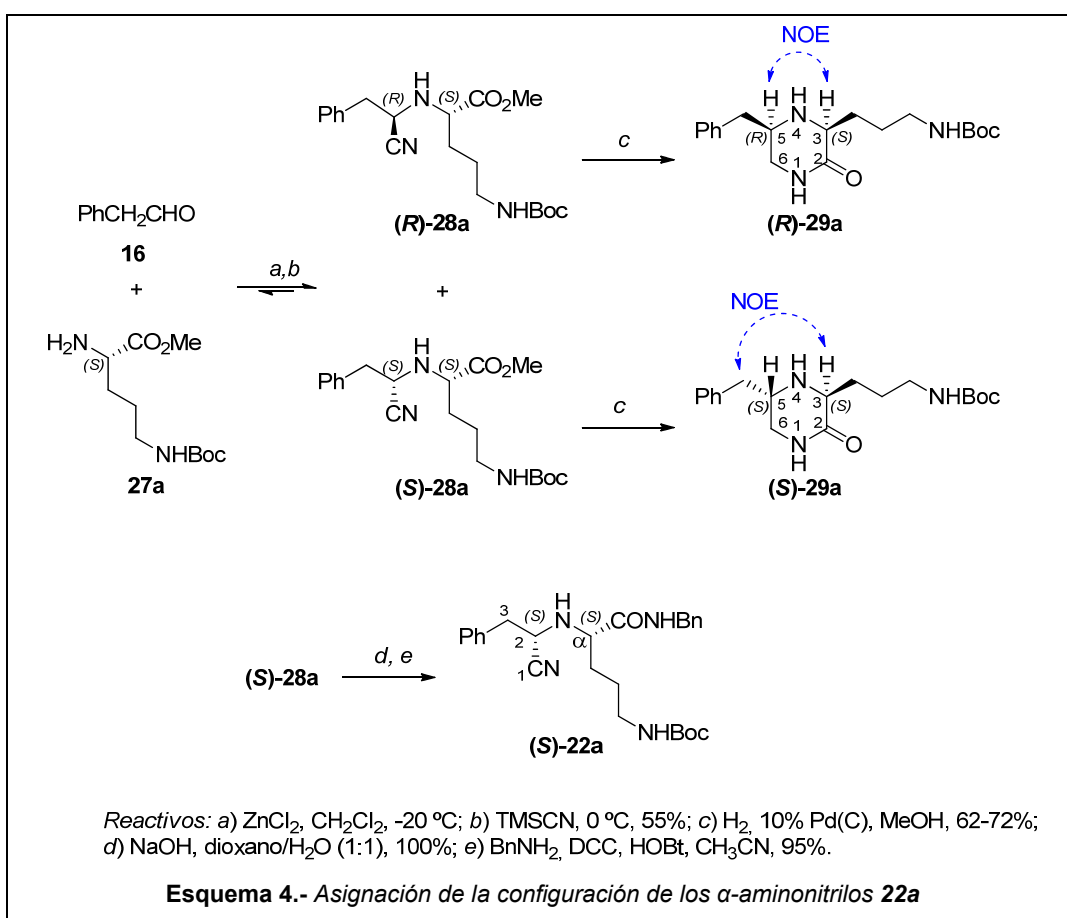
<sup>a</sup>Conversión calculada por HPLC-MS en el crudo de reacción. Columna: Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A (CH<sub>3</sub>CN) en B (disolución al 0,05% de TFA en agua) durante 5 min. <sup>b</sup> Proporción de diastereoisómeros determinada por HPLC-MS en el crudo de reacción. Columna: Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 40-60% de A en B durante 5 min. <sup>c</sup>Calentamiento por irradiación de microondas.

Publicaciones recientes describen la influencia del disolvente, temperatura y tiempo de la reacción sobre la estereoquímica de la síntesis de Strecker<sup>203-207</sup>. Por ello, también se estudió la influencia de estos factores sobre la síntesis de **24a**. Cuando se utilizó MeOH como disolvente, en lugar de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (entradas 6-9), se observó hasta un 40% de exceso del epímero (**S**)-**24a** bajo condiciones de control termodinámico, aunque el

rendimiento disminuyó con el tiempo de reacción, debido a la formación de mezclas complejas de productos de degradación. Estos resultados se confirmaron cuando la reacción se llevó a cabo a 120 °C durante 5 min, mediante irradiación por microondas (entradas 15-18). La sustitución de ZnCl<sub>2</sub> por Boc-Pro-OH como catalizador no supuso ninguna mejora en la estereoselectividad de la reacción, aunque disminuyó significativamente la formación de los productos de degradación, obteniendo mejores rendimientos (entradas 10-14). A la vista de la mejora de la estereoselectividad obtenida al aumentar la polaridad del disolvente y, teniendo en cuenta estudios recientes que describen el efecto acelerador sobre la velocidad de la reacción de la utilización de H<sub>2</sub>O o disolución saturada de NaCl como disolvente en adiciones a iminas<sup>208,209</sup>, se estudió la utilización de ambos en la síntesis de **24a**. En el primer caso (entradas 19 y 20) se detectó por HPLC-MS la formación cuantitativa de la imina **20a** tras 2 h de reacción. Sin embargo, tras 24 h, esta imina había desaparecido, observándose la formación de solo un 2% de aminonitrilo junto con una mezcla compleja de productos de reacción. Cuando ésta se llevó a cabo en disolución saturada de NaCl (entradas 21 y 22) a las 2 h también se detectó la imina y, tras 24 h, un 48% de rendimiento de los α-aminonitrilos **24a**, que no aumentó a mayor tiempo de reacción. Un estudio similar se realizó para la inducción de asimetría en la síntesis de los α-aminonitrilos derivados de fenilacetaldehído **22a**, obteniendo resultados muy similares. El conjunto de resultados de este estudio ponen de manifiesto la dificultad de inducir estereocontrol en la síntesis de estos aminonitrilos bajo condiciones de control cinético y que la única posibilidad de inducción de estereoselectividad es mediante condiciones de control termodinámico lento en MeOH, en las que, debido a una ligera mayor estabilidad, se obtiene preferentemente el epímero de configuración (S) con respecto del (R). Además, los resultados muestran que las estructuras del intermedio de reacción de tipo imina o enamina no influyen sobre la estereoselectividad. A la vista de los resultados de estos estudios, aplicando las condiciones de la entrada 7 de la Tabla 2, los α-aminonitrilos derivados de arginina **22c** (Esquema 2) se obtuvieron con rendimiento del 90% y como mezcla de epímeros (R):(S) = (1:3), que no pudo ser resuelta cromatográficamente.

La configuración del nuevo centro estereogénico generado en los α-aminonitrilos **22** y **24** se asignó por vía química. Para ello, se llevó a cabo la síntesis de los ésteres metílicos análogos, derivados de fenilacetaldehído y de ornitina **28a** (Esquema 4), aplicando las condiciones de reacción de la entrada 1 de la Tabla 2. De esta forma, se obtuvo la mezcla de epímeros (**RS**)-**28a** en proporción 1:1, que fue resuelta

cromatográficamente. A continuación, con el fin de asignar la configuración de C<sub>2</sub> en cada uno de los epímeros **(R)**- y **(S)**-**28a**, ambos se transformaron en las correspondientes 2-oxopiperazinas **(R)**- y **(S)**-**29a**, por hidrogenación catalítica a temperatura ambiente y 1 atmósfera de presión, utilizando Pd(C) al 10% como catalizador<sup>210</sup>. El efecto NOE observado entre los protones 3-H y 5-H en el espectro <sup>1</sup>H-RMN de **(R)**-**29a** indicó una disposición 3,5-diaxial o disposición relativa *cis* para ambos protones y, por lo tanto, configuración (*R*) en el C<sub>5</sub> de la 2-oxopiperazina **(R)**-**29** y en el C<sub>2</sub> del correspondiente aminonitrilo de partida **(R)**-**28a**.



Una vez conocida la configuración de los ésteres metílicos **(R)**- y **(S)**-**28a**, la asignación de la configuración de las respectivas amidas bencílicas **22a** se realizó por correlación química. Para ello, se llevó a cabo la saponificación de **(S)**-**28a** por tratamiento con NaOH en dioxano/agua (1:1). El posterior acoplamiento del ácido

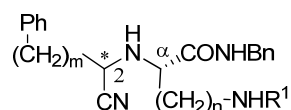
obtenido con  $\text{BnNH}_2$ , utilizando DCC y HOBt como agentes de acoplamiento, condujo a una bencilamida idéntica en todos los aspectos a **(S)-22a**.

La comparación de los datos de HPLC y  $^1\text{H-RMN}$  para los epímeros **(R)-** y **(S)-22a** (Tabla 3), muestra que:

- El tiempo de retención en HPLC del epímero (S) es mayor que el del (R), indicativo de un mayor carácter lipófilo.
- El protón 2-H en el epímero (R) aparece a campo más bajo ( $\approx 0.2$  ppm) que en el (S) y el protón  $\alpha$ -H aparece a campo más alto en el (R) que en el (S).

Estos datos se utilizaron como criterio de asignación tentativa de la configuración en el resto de aminonitrilos **22** y **24** (Tabla 3).

**Tabla 3.-** Comparación de los datos más significativos de HPLC y de  $^1\text{H-RMN}$  para los diferentes  $\alpha$ -aminonitrilos **22** y **24**.



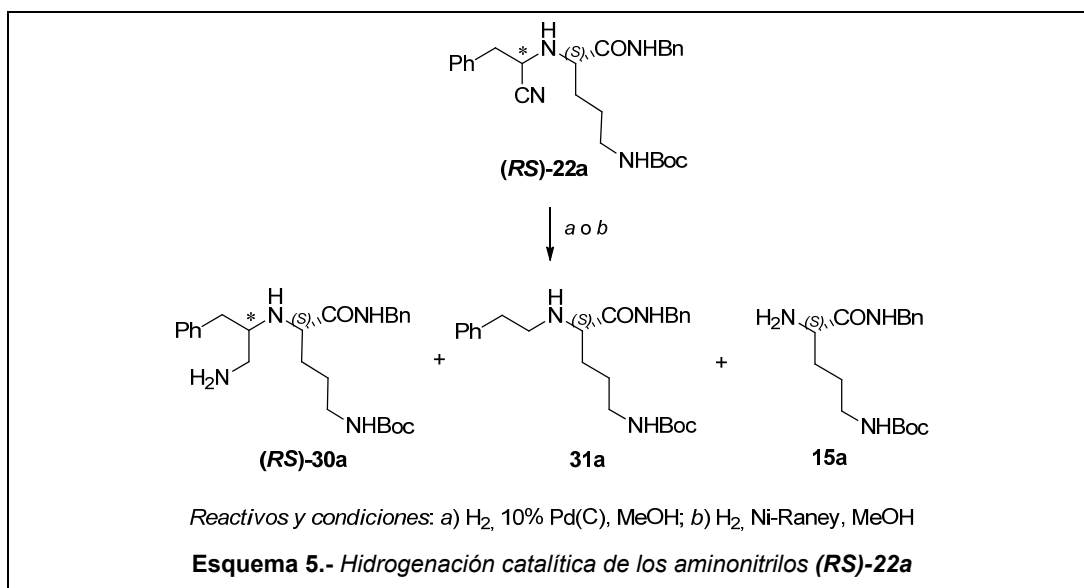
**22, 24**

Comp.	m	n	R <sup>1</sup>	Conf. (*)	HPLC <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H RMN ( $\delta$ , ppm) <sup>b</sup>	
					t <sub>R</sub> (min)	2-H	$\alpha$ -H
<b>(R)-22a</b>	1	3	Boc	(R)	23.30	3.73	3.28
<b>(S)-22a</b>				(S)	23.70	3.49	3.37
<b>(R)-22b</b>	1	4	Boc	(R)	23.70	3.79	3.25
<b>(S)-22b</b>				(S)	24.30	3.48	3.33
<b>(RS)-22c</b>	1	3	C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf	(R)	5.14	3.81	3.34
				(S)	5.48	3.48	3.36
<b>(RS)-24a</b>	2	3	Boc	(R)	24.10	3.51	3.32
				(S)	24.30	3.40	3.33
<b>(RS)-24b</b>	2	4	Boc	(R)	24.50	3.53	3.23
				(S)	24.80	3.29-3.41	3.29-3.41

<sup>a</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min, excepto para **(RS)-22c** que se utilizó Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) gradiente 10-100% de A en B durante 7 min <sup>b</sup>Datos de  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY.

2.1.1.2. Reducción del grupo CN de  $\alpha$ -aminonitrilos

Inicialmente, la reducción del grupo CN se abordó aplicando las condiciones que condujeron directamente a la obtención de las 2-oxopiperazinas **(RS)-29a** comentadas en el apartado anterior, es decir, mediante hidrogenación catalítica a temperatura ambiente y una atmósfera de presión, utilizando Pd(C) al 10% como catalizador<sup>210</sup>. Sin embargo, aplicando estas condiciones sobre la mezcla epimérica de aminonitrilos **(RS)-22a**, se obtuvieron las correspondiente aminas **(RS)-30a** junto con la bencilamida **15a** y **31a**<sup>211</sup>, producto de eliminación de cianhídrico, seguida de reducción de la imina intermedia (Esquema 5, Tabla 4, entrada 1), ambos subproductos resultantes de la reacción retro-Strecker en **(RS)-22a**. La sustitución de Pd(C) por Ni Raney no supuso una mejora significativa, ya que aumentó la formación de **31a** (entrada 2, Tabla 4). A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta la dificultad de separar los productos de reacción, se planteó la utilización de otros métodos alternativos para la reducción del grupo CN. Entre ellos, la transferencia de hidrogeno utilizando hidrato de hidrazina como generador de hidrógeno y Ni Raney como catalizador, metodología que se había puesto a punto anteriormente en nuestro laboratorio para la reducción de aminonitrilos intermedios en la síntesis de benzodiazepinas<sup>212</sup>. Con el fin de minimizar la formación de los subproductos **31a** y **15a**, se llevó a cabo un estudio de condiciones de reacción, recogido en la Tabla 4.



A la vista de los resultados de este estudio, se dedujo que las mejores condiciones para la reducción del grupo CN eran reflujo en MeOH durante 5 min, utilizando 20 equivalentes de hidrato de hidrazina como agente de transferencia de hidrógeno y 100 mg/mmol de Ni Raney como catalizador (entrada 7). De esta forma, se evitaba la formación de **31** y se minimizaba hasta un 5% la formación del producto de retro-Strecker **15a**. La agitación vigorosa y la activación eficaz del catalizador son factores clave para que la reacción sea lo más rápida posible, minimizando la presencia del aminonitrilo en el medio de reacción, que es determinante de la formación del producto de retro-Strecker **15a**.

**Tabla 4.-** Influencia de las condiciones de reacción en la reducción de la mezcla de aminonitrilos (**RS**)-**22a**<sup>a</sup>

Entrada	Condiciones de reacción				Rdto (%) <sup>b</sup>		
	Catalizador	Fuente de H <sub>2</sub>	T (°C)	t (min)	30a	31	15a
1	10 % Pd(C)	H <sub>2</sub>	T.a.	24 h	80	12	8
2	Ni Raney 100 mg/mmol	H <sub>2</sub>	T.a.	24 h	54	40	6
3	Ni Raney 100 mg/mmol	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (20 eq)	85	30	37	-	63
4	Ni Raney 100 mg/mmol	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (40 eq)	T.a.	30	67	-	33
5	Ni Raney 200 mg/mmol	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (20 eq)	T.a.	30	73	-	27
6	Ni Raney 100 mg/mmol	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (20 eq)	T.a.	90	92	-	8
7	Ni Raney 100 mg/mmol	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (20 eq)	65	5	95	-	5

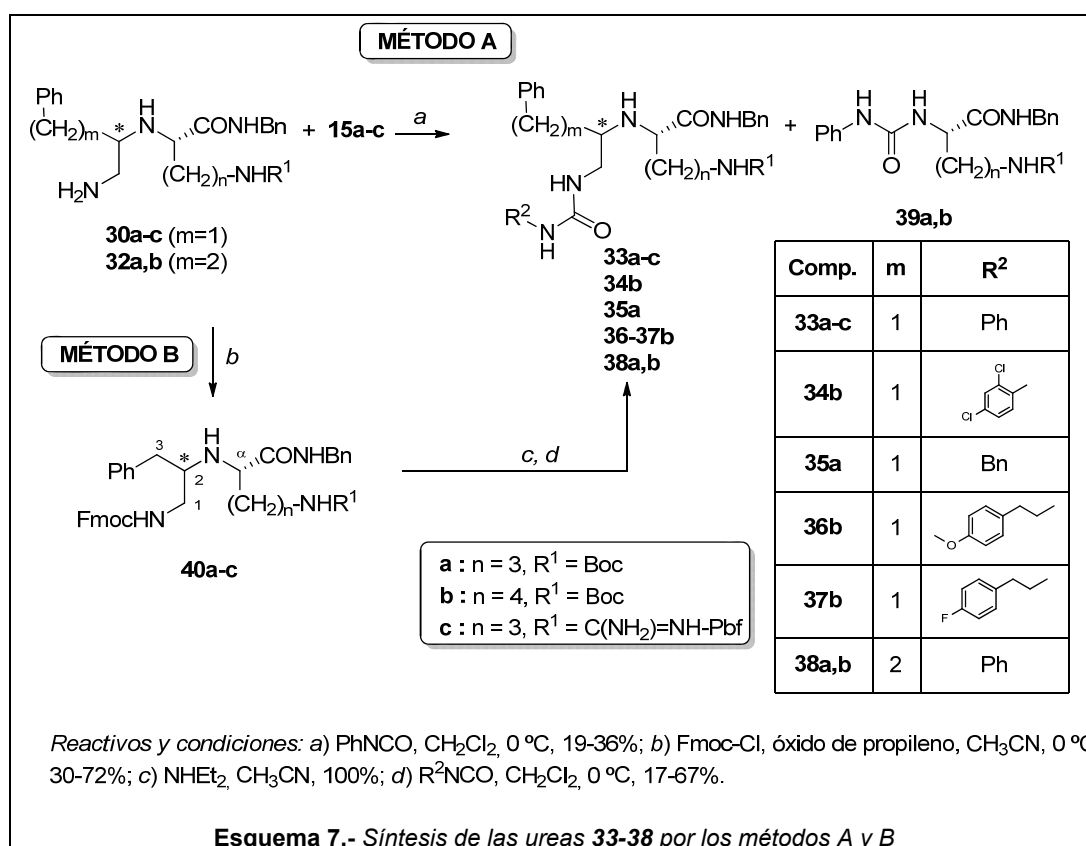
<sup>a</sup>Reacciones en MeOH excepto para la entrada 3 que se realizó en EtOH. <sup>b</sup>Rendimiento determinado por HPLC-MS en el crudo de reacción.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de reducción, se extendió la metodología al resto de los  $\alpha$ -aminonitrilos **22** y **24**, obteniendo los productos deseados **30** y **32** (Esquema 6, Tabla 5) con de aceptables a muy buenos rendimientos (55-92%), junto con los productos de retro-Strecker **15a-c**. Hay que señalar que en los derivados de fenilacetaldehído **22** ( $m = 1$ ) la reducción del epímero (*R*) requirió mayor tiempo de reacción que el (*S*). El mayor tiempo de permanencia en el medio de reacción se tradujo en una significativa disminución del rendimiento de (*R*)-**30** y el consiguiente aumento de los productos de retro-Strecker **15** (ver Tabla 5). En el caso de los derivados de arginina



2.1.1.3. Síntesis de ureas

Debido a la dificultad de aislamiento de las aminas primarias **30** y **32** de los productos de retro-Strecker **15**, se estudió la formación de las ureas **33-38** (Esquema 7) utilizando directamente el crudo de la reacción de reducción sin purificar. En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de los crudos de reducción (**RS**)-**30a,b** y (**RS**)-**32a,b** con isocianato de fenilo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0 °C (Método A, Esquema 7, Tabla 6). De esta forma, se obtuvieron las ureas deseadas (**RS**)-**33a,b** y (**RS**)-**38a,b**, junto con las ureas **39a,b**, derivadas de los subproductos de la reacción retro-Strecker **15a,b**. El similar comportamiento cromatográfico de las ureas presentes en las mezclas de reacción dificultó la purificación de las ureas deseadas **33a,b** y **38a,b**, siendo necesarias varias purificaciones cromatográficas sucesivas, que conllevaron una disminución importante en el rendimiento de producto puro.



Como método alternativo, se planteó la protección de las aminas **30** y **32**, previa a su transformación en ureas (Método B, Esquema 7, Tabla 6). Para ello, inicialmente, los

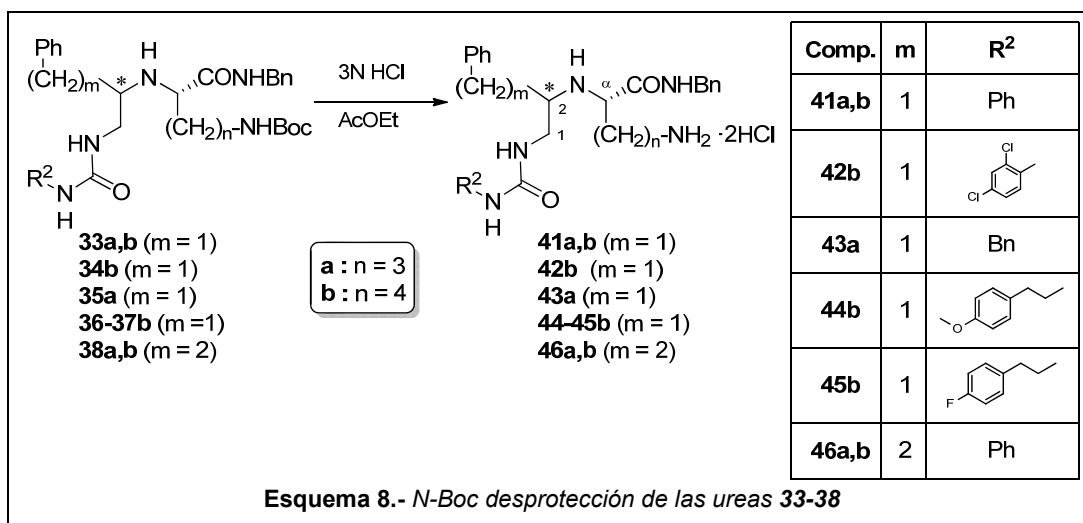
crudos de la reacción de reducción (**R**)- y (**S**)-**30a** se trataron con cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc-Cl) en las condiciones estándar [ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , dioxano/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1)]. En estas condiciones, se obtuvieron los correspondientes Fmoc-derivados (**R**)- y (**S**)-**40a** aunque con completa epimerización en uno de los dos centros quirales. La utilización de óxido de propileno como aceptor de HCl, en lugar de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  evitó esta epimerización. A continuación, la aplicación de esta metodología a todos los derivados de fenilacetaldehído (**R**)- y (**S**)-**30a-c** permitió su aislamiento y la obtención de (**R**)- y (**S**)-**40a-c** con rendimientos del 30-75%. La posterior eliminación del grupo Fmoc por tratamiento con  $\text{Et}_2\text{NH}$ , seguida de reacción con diferentes isocianatos permitió la obtención de las ureas (**R**)- y (**S**)-**33-37**, indicadas en el Esquema 7. En la Tabla 6, se muestran los rendimientos de la aplicación del método A (reducción + reacción con isocianatos) con el método B (reducción + Fmoc-protección + Fmoc-desprotección + reacción con isocianatos) para la obtención de las ureas **33-38**. En los casos en los que se han aplicado ambos métodos [(**RS**)-**33a,b**] se puede observar la mejora significativa del método B con respecto al A (16-23% aumento en el rendimiento), a pesar del mayor número de etapas de reacción.

**Tabla 6.-** Optimización de la síntesis de ureas. Comparación de rendimientos de los métodos A y B.

Urea	m	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	A (%) <sup>a</sup>	B (%) <sup>b</sup>	
	( <b>RS</b> )- <b>33a</b>	1	3	Boc	Ph	36	52
	( <b>R</b> )- <b>33a</b>	1	3			-	17
	( <b>S</b> )- <b>33a</b>	1	3			-	67
	( <b>RS</b> )- <b>33b</b>	1	4			21	44
	( <b>R</b> )- <b>33b</b>	1	4			-	44
	( <b>S</b> )- <b>33b</b>	1	4			-	57
	( <b>S</b> )- <b>33c</b>	1	3	C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf	-	25	
	( <b>R</b> )- <b>34b</b>	1	4	Boc		-	40
	( <b>S</b> )- <b>34b</b>	1	4			-	62
	( <b>R</b> )- <b>35a</b>	1	3		Bn	-	25
	( <b>S</b> )- <b>35a</b>	1	3			-	51
	( <b>R</b> )- <b>36b</b>	1	4			-	40
	( <b>S</b> )- <b>36b</b>	1	4			-	52
	( <b>R</b> )- <b>37b</b>	1	4			-	42
	( <b>S</b> )- <b>37b</b>	1	4			-	61
	( <b>RS</b> )- <b>38a</b>	2	3		Ph	19	-
	( <b>RS</b> )- <b>38b</b>	2	4			29	-

<sup>a</sup>Rendimiento global del Método A (reducción + reacción con isocianatos). <sup>b</sup>Rendimiento global del Método B (reducción + *N*-Fmoc protección + Fmoc-desprotección + reacción con isocianatos).

Como se muestra en el Esquema 8, la eliminación del grupo protector *tert*-butoxicarbonilo (Boc) en las ureas **33-38**, por tratamiento con una disolución 3 N de HCl en AcOEt, proporcionó los derivados *N*-Boc desprotegidos **41-46** con rendimientos cuantitativos. Teniendo en cuenta el bajo rendimiento global de la síntesis de la urea derivada de arginina (**S**)-**33c**, ésta no fue desprotegida.

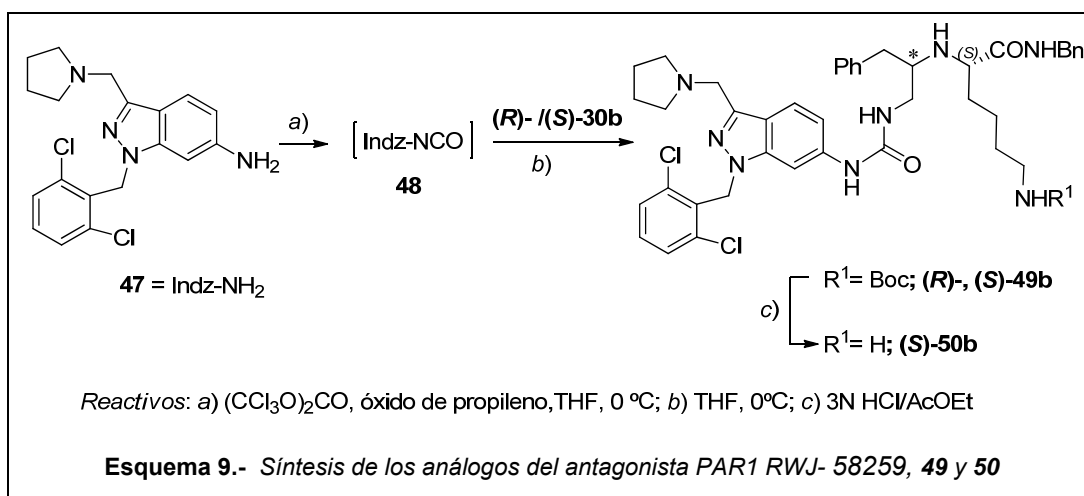


Tanto en las ureas protegidas **33-38** como en las desprotegidas **41-46**, de la comparación de los datos de HPLC, <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN de los epímeros (*R*) con los de los (*S*), se deduce que:

- Al igual que en los respectivos aminonitrilos de partida, el tiempo de retención en HPLC de los epímeros de configuración (*S*) es menor que el de los de configuración (*R*).
- Los protones 2-H y α-H de las ureas de configuración (*S*) aparecen a campo más bajo ( $\approx 0.2$  ppm) que en los de configuración (*R*).
- La diferencia de desplazamiento químico ( $\Delta\delta$ ) entre los protones metilénicos del grupo bencilo es mayor en las ureas de configuración (*S*) ( $\Delta\delta \approx 0.35$  ppm) que en las (*R*) ( $\Delta\delta \approx 0.15$  ppm).
- En general, las señales correspondientes a C<sub>2</sub> y C<sub>α</sub> en las ureas de configuración (*S*) aparecen a mayor campo que en las de configuración (*R*).

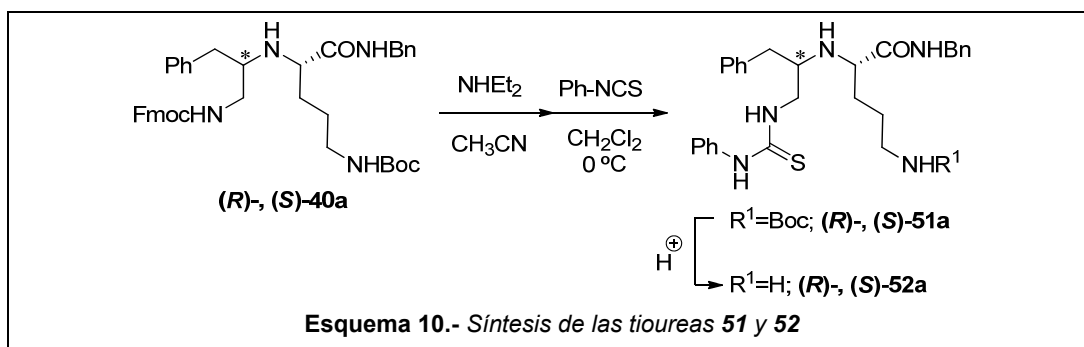
2.1.1.4. Síntesis de ureas análogas al antagonista PAR1 de referencia RWJ-58259

Como se ha comentado en el apartado 1.4., la obtención de análogos del antagonista de receptores PAR1 RWJ-58259 constituía uno de los objetivos dentro de la síntesis de ureas de fórmula general **A** (Figura 6). La síntesis de estos análogos se planteó mediante la aplicación de la metodología recientemente desarrollada en nuestro laboratorio para la optimización de la síntesis de RWJ-58259<sup>173,213,214</sup> Como se indica en el Esquema 9, este procedimiento consistió en la formación *in situ* del isocianato **48**, mediante reacción del 6-aminoindazol **47** con trifosgeno, en presencia de óxido de propileno como aceptor de HCl, seguida de reacción con las aminas derivadas de lisina (**R**)- y (**S**)-**30b**, obteniendo las ureas (**R**)- y (**S**)-**49b**. El rendimiento de (**S**)-**49b** (85%) fue considerablemente más alto que el de (**R**)-**49b** (20%). La eliminación del grupo protector Boc proporcionó el derivado *N*-Boc desprotegido (**S**)-**50b** con rendimiento cuantitativo. Debido al bajo rendimiento obtenido para el epímero (**R**)-**49b**, éste no fue desprotegido.

2.1.1.5. Síntesis de tioureas

Una vez establecidas en el apartado anterior las condiciones de reacción óptimas para la obtención de ureas (Método B), se planteó la obtención de tioureas análogas, aplicando una metodología similar, sustituyendo los isocianatos por isotiocianatos. Como se indica en el Esquema 10, las feniltioureas derivadas de ornitina (**R**)- y (**S**)-**51a** se prepararon, con 68-72% de rendimiento global, a partir de los *N*-Fmoc derivados (**R**)- y

**(S)-40a**. Finalmente, se llevó a cabo la eliminación del grupo Boc por tratamiento con disolución 3 N de HCl en AcOEt, proporcionando los derivados *N*-Boc desprotegidos **(R)-** y **(S)-52a** con rendimientos cuantitativos.



El patrón de señales de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, así como el comportamiento en HPLC, de las tioureas epímeras **(R)-**, **(S)-51a** y **-52a** fue muy similar al de las ureas análogas **33a** y **41a**, respectivamente.

## 2.1.2. Evaluación Biológica

### 2.1.2.1. Evaluación de la actividad antagonista sobre receptores PAR1

Considerando que el PAR1 humano se expresa principalmente en plaquetas y su activación por trombina induce agregación, las ureas **41-46** y tioureas **52**, así como los compuestos intermedios de su síntesis, se evaluaron como inhibidores de la agregación de plaquetas humanas inducida por el agonista de referencia SFLLRN, con el fin de determinar su efecto antagonista de receptores PAR1. Todos los compuestos fueron ensayados a una concentración inicial de 0.1 mg/ml. Ninguna de las ureas y tioureas desprotegidas mostró actividad inhibitoria significativa. Sin embargo, como se muestra en la Figura 12, algunas de las ureas protegidas y, en particular, los Fmoc-derivados **40** mostraron un % de inhibición significativo. Así, los Fmoc-derivados **(S)-40a** y **(S)-40c** inhibieron la agregación plaquetaria un 51% y 36%, respectivamente, y la urea **(R)-33b** un 38%.

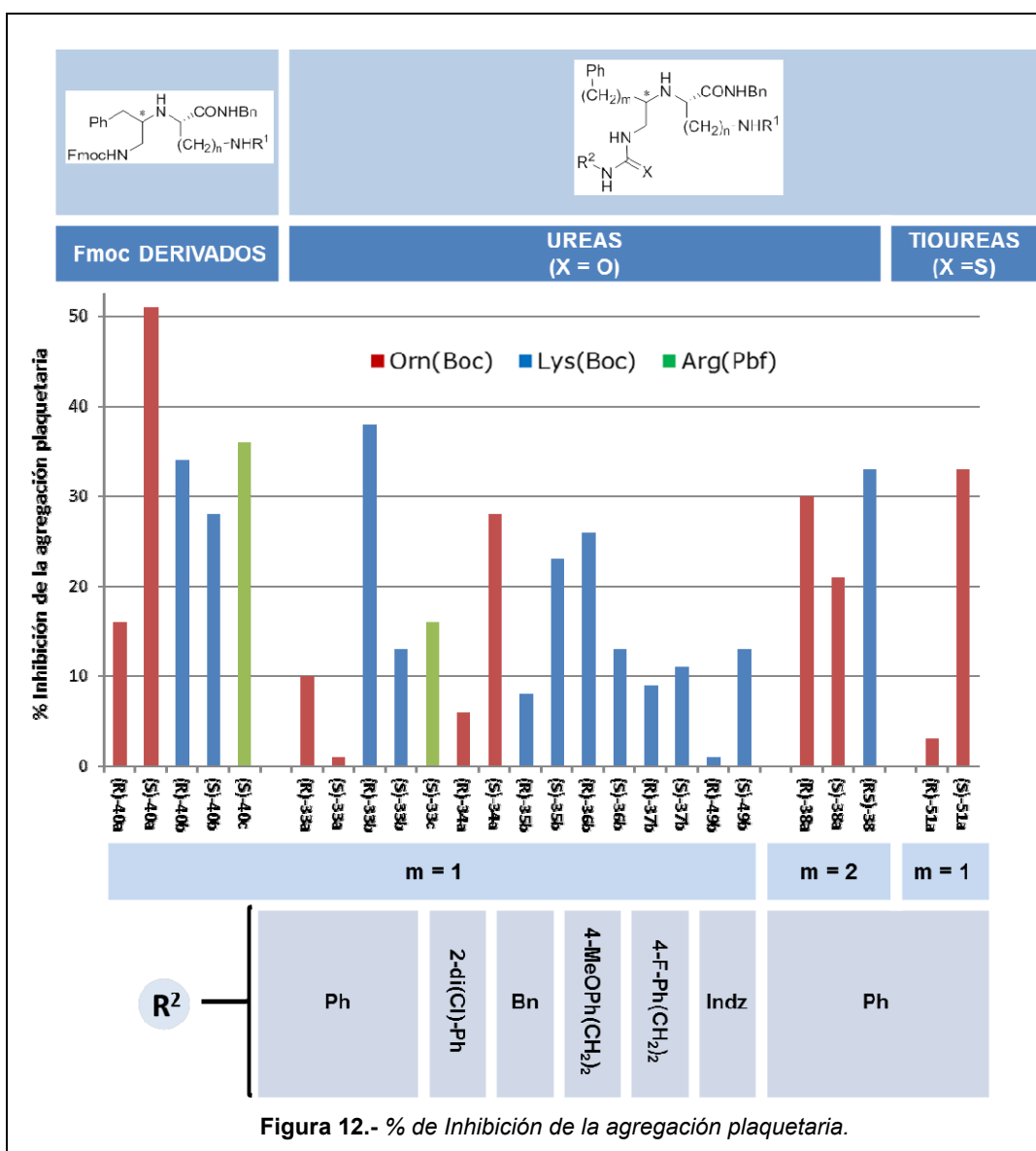


Figura 12.- % de Inhibición de la agregación plaquetaria.

Aunque los resultados no permiten establecer relaciones estructura-actividad claras, éstos indican que:

- Los Fmoc-derivados muestran mayor inhibición que las correspondientes ureas y tioureas. Aunque el limitado número de tioureas preparado no permite establecer conclusiones, los resultados indican un mejor comportamiento de las tioureas **51a** con respecto a las ureas análogas **33a**.

- En lo que respecta a la naturaleza del aminoácido básico, el orden de actividad en los Fmoc-derivados **40** fue Orn(Boc) > Arg(Pbf) > Lys(Boc), mientras que, en las ureas **33-38** el orden fue Lys(Boc) > Arg(Pbf) > Orn(Boc).
- Los resultados no muestran una influencia clara de la estereoquímica (*S*) o (*R*) sobre la actividad.
- En cuanto a la distancia de separación del grupo aromático Ph (*m*), la comparación de los datos de los derivados de 3-fenilpropionaldehído (*m* = 2) y ornitina **38a** con los análogos derivados de fenilacetaldehído (*m* = 1) **33a**, parece indicar una mejor actividad para *m* = 2.
- Por último, en cuanto a la influencia del sustituyente R<sup>2</sup> sobre el agrupamiento urea, los datos parecen indicar Ph > 2,4-di(Cl)-Ph ≈ 4-MeOPh(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> > 4-F-Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> ≈ Indz. Hay que señalar que, el antagonista de referencia RWJ-58259, ensayado en paralelo, a una concentración 10 μM (aproximadamente 15 veces menor que la de los compuestos examinados) inhibió un 98% la agregación plaquetaria. La comparación estructural del derivado indazólico (**S**)-**50b**, con la familia de peptidomiméticos antagonistas de PAR1 a la que pertenece RWJ-58259<sup>151</sup>, muestra la principal diferencia en la ausencia en (**S**)-**50b** del grupo carbonilo del enlace péptido presente en RWJ-58259 entre di(F)-Phe y el residuo del ácido diaminobutírico. Dicho grupo carbonilo podría tener un papel importante en la interacción con PAR1, bien participando en la formación de enlaces de hidrógeno o en la disposición de los grupos farmacofóricos en la orientación apropiada. Por ello, su ausencia podría ser causa importante de la total inactividad de (**S**)-**50b** en el ensayo de agregación plaquetaria.

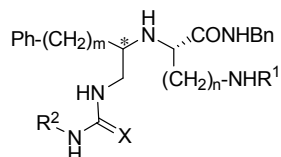
Teniendo en cuenta la baja actividad mostrada por los compuestos en el cribado de agregación plaquetaria, éstos no fueron pasados a las evaluaciones subsiguientes inicialmente planteadas, comentadas en la Introducción (Apartado 1.4.3).

#### 2.1.2.2. Evaluación biológica como agentes antitumorales

Tal como se indica en la Introducción, todos los compuestos descritos en este capítulo, así como RWJ-58259, fueron incluidos en los ensayos de HTS de citotoxicidad de la compañía PharmaMar, S. A. La citotoxicidad fue evaluada en tres líneas celulares de carcinoma humano representativas: mama (MDA-MB-231), pulmón (A549) y colon

(HT29), empleando doxorubicina como control y de acuerdo con los protocolos del Instituto Nacional del Cancer de Estados Unidos (NCI). El análisis de los datos fue realizado automáticamente por el sistema de gestión de información del laboratorio de HTS, determinando tres parámetros representativos del crecimiento celular: GI<sub>50</sub> (concentración que inhibe al 50% el crecimiento celular), TGI (concentración que produce inhibición total del crecimiento celular) y LC<sub>50</sub> (concentración que produce un 50% de muerte celular).

Ninguno de los aminonitrilos de partida **22** y **24**, las aminas intermedias Fmoc-protégidas **38** o las ureas y tioureas desprotégidas **41-46**, **50** y **52** mostraron citotoxicidad a la máxima concentración ensayada 10<sup>-4</sup> M. Tampoco mostró citotoxicidad el antagonista PAR1 de referencia RWJ-58259. Sin embargo, tal como se recoge en la Tabla 7, la mayoría de las ureas y tioureas protegidas **33-38**, **49** y **51** mostraron citotoxicidades moderadas, de orden μM, aunque la comparación de los resultados no permite establecer relaciones estructura-citotoxicidad. Entre los resultados obtenidos, cabe destacar las citotoxicidades de los dos epímeros de las ureas derivadas de indazol (**R**)- y (**S**)- **49b** y sobre todo del epímero (**R**) de la urea derivada de 4-fluorofeniletilo y lisina (**R**)-**37b**.

**Tabla 7.-** Citotoxicidades inducidas por las ureas **33-38** y **49**, y las tioureas **51**.


Compuesto	m	n	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	GI <sub>50</sub> (μM)			
						Mama (MDA-MB-231)	Pulmón (A549)	Colon (HT29)	
<b>Doxorrubicina</b>						10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-2</sup>	
<b>RWJ-58259</b>						>12.1	>12.1	>12.1	
<b>(R)-33a</b>	1	3	O	Boc	Ph	>17.4	10.1	10.1	
<b>(S)-33a</b>	1	3				7.67	8.71	7.67	
<b>(R)-33b</b>	1	4				8.00	5.27	6.81	
<b>(S)-33b</b>	1	4				11.4	8.34	7.15	
<b>(S)-33c</b>	1	3		C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf		>13.0	>13.0	>13.0	
<b>(R)-34b</b>	1	4		Boc		>15.2	13.1	8.53	
<b>(S)-34b</b>	1	4				>15.2	6.09	8.53	
<b>(R)-35a</b>	1	3			Bn	>17.0	>17.0	>17.0	
<b>(S)-35a</b>	1	3				14.3	13.4	15.7	
<b>(R)-36b</b>	1	4				14.9	6.97	9.14	
<b>(S)-36b</b>	1	4				14.9	6.97	9.14	
<b>(R)-37b</b>	1	4				2.94	2.17	2.17	
<b>(S)-37b</b>	1	4				>15.8	15.6	15.8	
<b>(R)-38a</b>	2	3			Ph	14.1	7.32	13.1	
<b>(S)-38a</b>	2	3				11.1	6.98	7.15	
<b>(RS)-38b</b>	2	4				12.1	8.14	9.31	
<b>(R)-49b</b>	1	4				Indz	7.13	6.21	3.22
<b>(S)-49b</b>	1	4			Indz	4.71	2.41	4.71	
<b>(R)-51a</b>	1	3			S	Boc	Ph	>17.0	15.9
<b>(S)-51a</b>	1	3		9.49				6.78	6.78

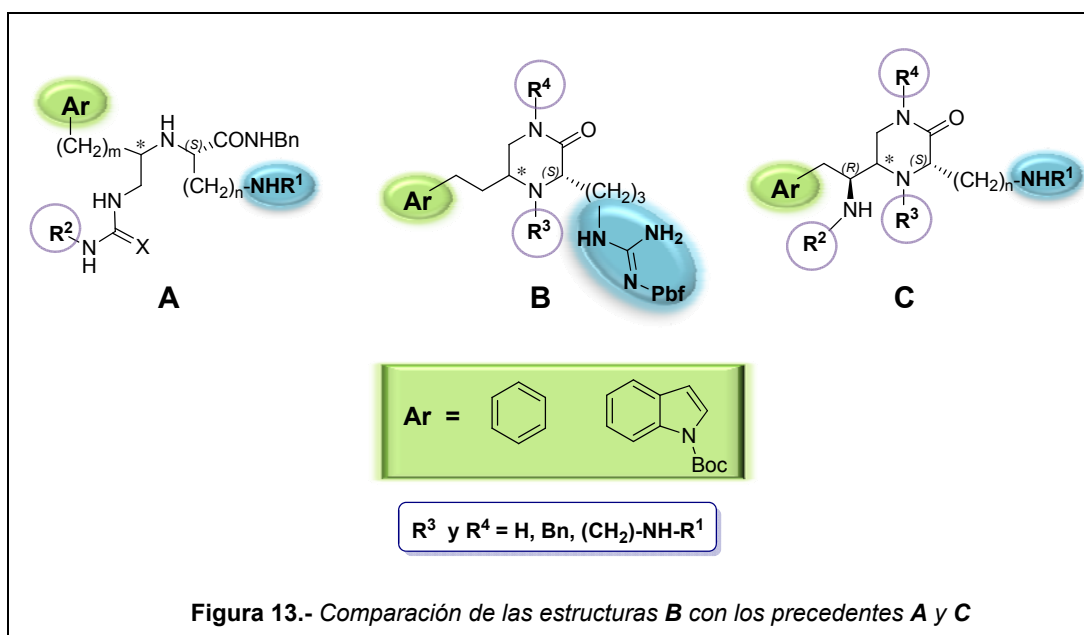
### 2.1.3. Conclusiones

Del conjunto de resultados incluidos en este capítulo, se puede concluir que:

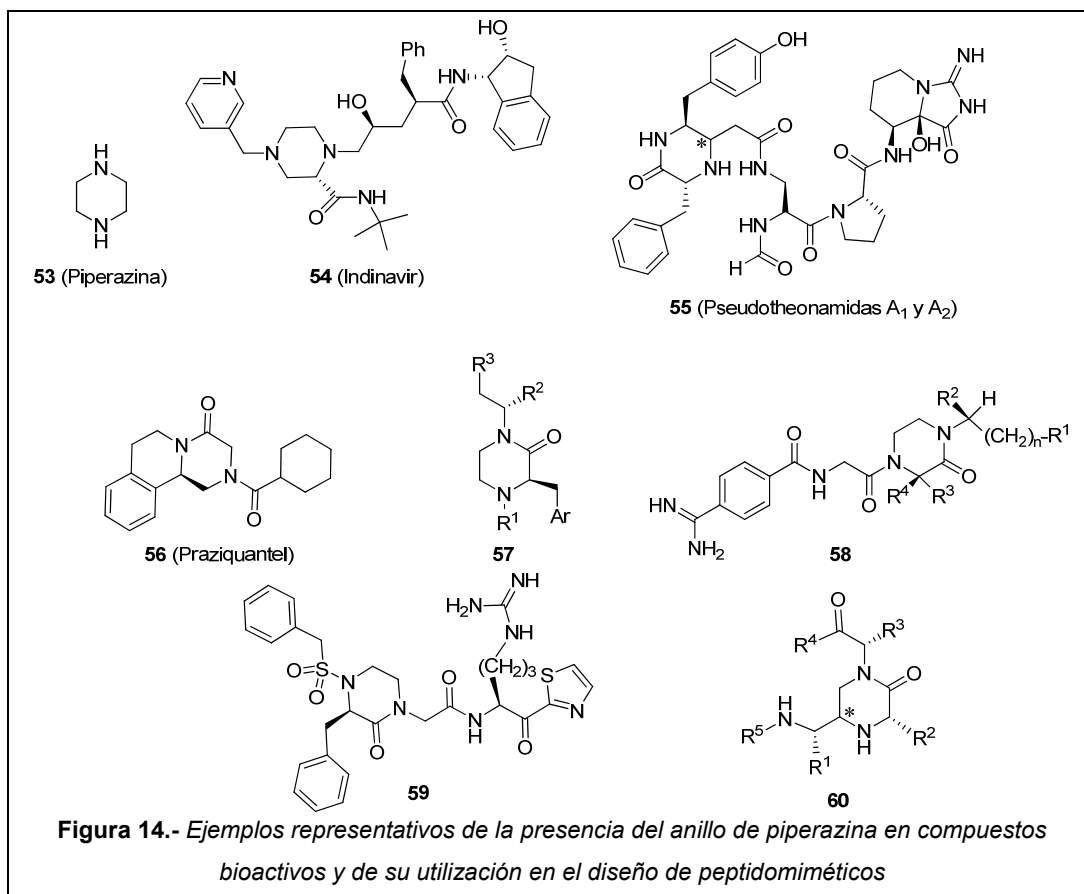
- Se ha desarrollado y optimizado una metodología para la obtención de quimiotecas de ureas y tioureas quirales altamente funcionalizadas derivadas de  $\alpha$ -aminoácidos básicos, utilizando  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de aminoácidos como generadores de diversidad molecular.
- La falta de actividad antagonista sobre los receptores PAR1 mostrada por las ureas comentadas en el punto anterior, no ha permitido confirmar la hipótesis de diseño de nuevos antagonistas, comentada en la introducción. La comparación estructural de estas ureas con ureas análogas descritas como potentes antagonistas de PAR1, sugiere que la falta de actividad de las ureas aquí descritas podría deberse fundamentalmente a la ausencia en su estructura del grupo carbonilo peptídico presente en los antagonistas, que debe ser importante bien para la orientación de los grupos farmacofóricos o por su participación en la formación de enlaces de hidrógeno con el receptor.
- La moderada actividad antiagregante sobre las plaquetas, mostrada por las ureas protegidas en la cadena lateral del aminoácido básico, podría constituir un buen punto de partida para la optimización estructural en la búsqueda de nuevos antagonistas de PAR1

## 2.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE 2-OXOPIPERAZINA

Dentro del proyecto general de búsqueda de nuevos antagonistas para los receptores PAR1, de forma paralela al desarrollo de esta tesis<sup>215</sup>, aunque fuera de ella, se habían preparado los derivados de 2-oxopiperazina de fórmula general **C**. Con el fin de ampliar la serie y estudiar la influencia de la sustitución en la posición 5 del anillo de piperazina en los resultados biológicos, en el marco de esta tesis se incluyó la síntesis y evaluación de las 2-oxopiperazinas análogas de fórmula general **B**. Estas 2-oxopiperazinas podrían considerarse como análogos conformacionalmente restringidos de las ureas abiertas **A**. Teniendo en cuenta los resultados biológicos comentados en el capítulo anterior, así como resultados previos de las 2-oxopiperazinas **C** que indicaban una mejor inhibición de la agregación plaquetaria para derivados de arginina que para los de ornitina o lisina, así como para los que contenían un grupo indol en lugar de fenilo, la diversidad de las estructuras **B** se amplió para incluir también el grupo indol y se limitó a los derivados de arginina y de 3-fenilpropionaldehído. Además, a la vista de la falta de actividad biológica tanto de los compuestos de la serie **A** como de los de la serie **C** desprotegidos en la cadena lateral del aminoácido básico, no se contempló la preparación de los compuestos **B** desprotegidos.



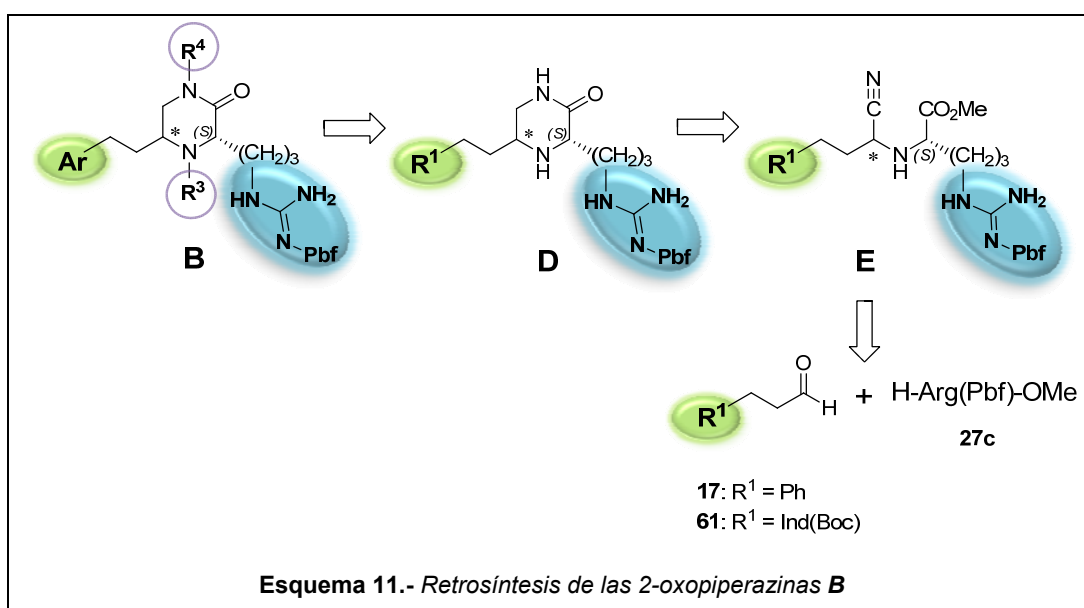
Hay que señalar que la recurrente presencia del anillo de piperazina en compuestos biológicamente activos ha motivado su inclusión entre los llamados “esqueletos privilegiados” en Química Médica<sup>216,217</sup>. En la actualidad hay 112 entradas para fármacos derivados de piperazina en el Drug Bank (<http://www.drugbank.ca>)<sup>218</sup>. El primer fármaco fue la propia piperazina (Figura 8, **53**), introducido en 1953 como antihelmíntico y muy utilizado para el tratamiento de la obstrucción intestinal<sup>219</sup>. Posteriormente, se han introducido otros muchos en diversos campos de actividad farmacológica, como por ejemplo el inhibidor de la proteasa del HIV, Indinavir (**54**)<sup>220</sup>. Entre los derivados de piperazina, el esqueleto de 2-oxopiperazina se encuentra presente en diversos productos naturales, como por ejemplo, entre otros, en las pseudotheonamidas (**55**), inhibidores de serina proteasas<sup>221</sup>. Un ejemplo representativo de la presencia del anillo de 2-oxopiperazina en fármacos lo constituye el antihelmíntico Praziquantel<sup>222</sup> (**56**), en el que se encuentra fusionado con un anillo de tetrahydroisoquinolina.



Además, el anillo de 2-oxopiperazina también ha sido utilizado para la introducción de restricción conformacional en péptidos y en el diseño de peptidomiméticos. Así, por ejemplo, forma parte de la estructura de antagonistas de neuroquininas<sup>223</sup> y colecistoquinina<sup>223,224</sup> de fórmula general **57**, agonistas del receptor de melanocortina-4<sup>225</sup>, antagonistas del neuropéptido S<sup>226</sup>, y antagonistas del fibrinógeno (**58**)<sup>227,228</sup>. También se ha utilizado en el diseño de inhibidores de diversas peptidasas<sup>229</sup>, tales como: el factor Xa (**59**)<sup>230</sup>, elastasa<sup>231</sup>, renina<sup>232,233</sup>, geranilgeraniltransferasa-I<sup>234</sup> y  $\beta$ -secretasa 1 (BACE1)<sup>235</sup>. En el campo de los miméticos de estructura secundaria peptídica, las 2-oxopiperazinas quirales de fórmula general **60** fueron diseñadas por nuestro grupo de investigación como miméticos de giros inversos  $\gamma$ <sup>236</sup>.

### 2.2.1. Síntesis

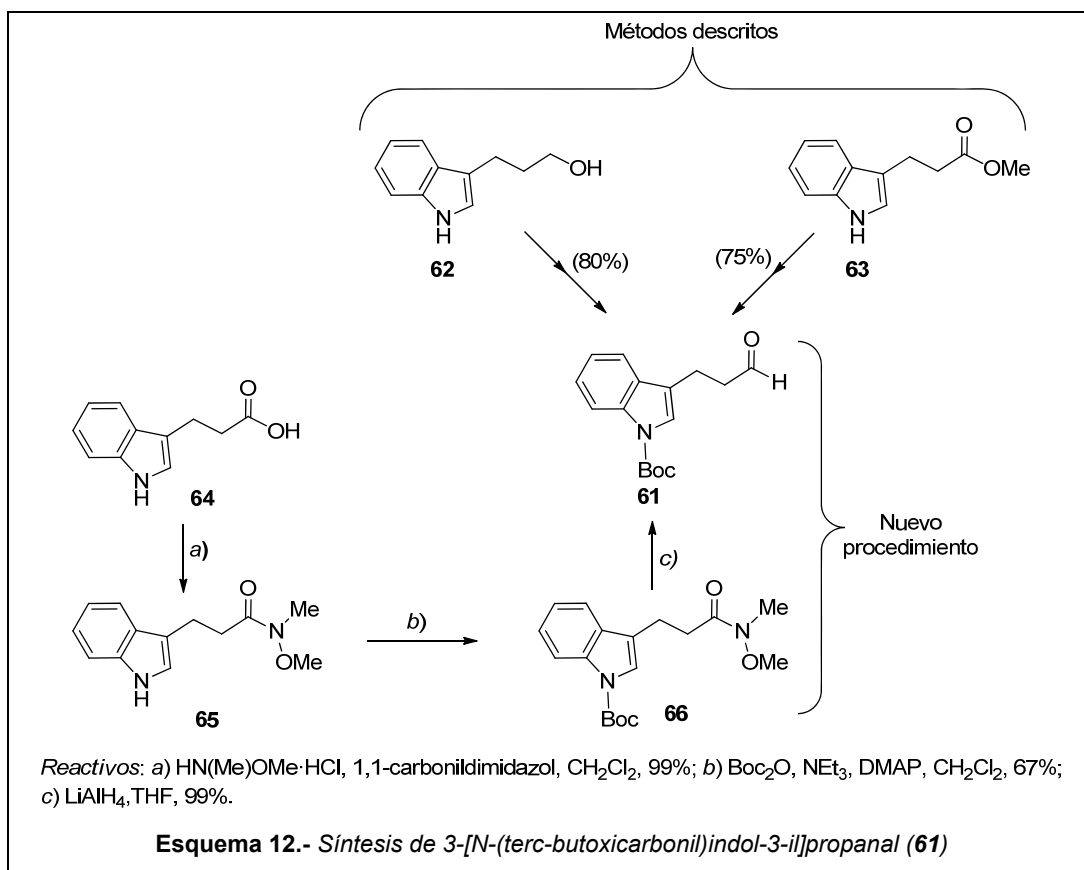
Como se muestra en el esquema retrosíntico 11, la síntesis de las 2-oxopiperazinas **B** se planteó a partir de los correspondientes  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de Arg(Pbf)-OMe (**E**), mediante una reducción ciclativa, seguida de dos alquilaciones sucesivas para la introducción regioselectiva de los grupos  $R^3$  y  $R^4$  en las posiciones 4 y 1, respectivamente.



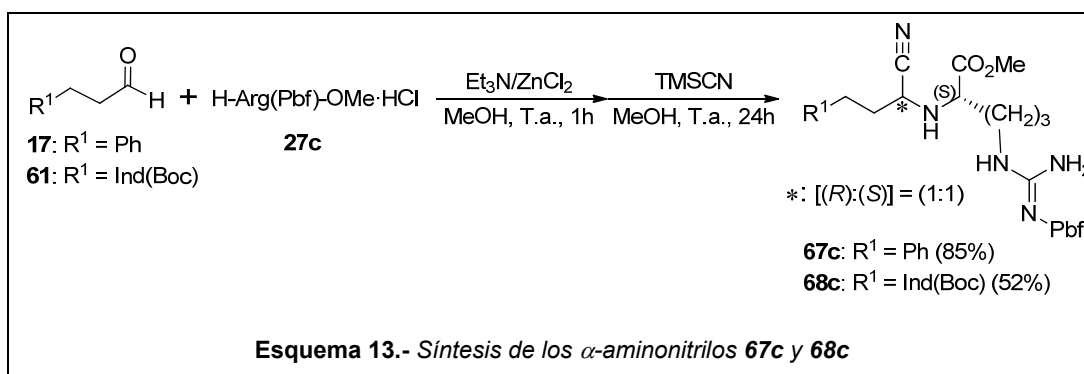
En el caso de los derivados que incorporan indol como grupo aromático, previamente a la aplicación de este esquema, fue necesario sintetizar el correspondiente aldehído **61**, que no es comercial. Además, con el fin de evitar la competencia del NH indólico en las reacciones de alquilación, esta posición debía estar protegida, seleccionando para ello la protección Boc, previamente utilizada en la síntesis de la serie de 2-oxopiperazinas análogas **C**, indicadas en la Figura 13.

En la búsqueda bibliográfica de 3-[*N*-(*tert*-butoxicarbonil)indol-3-il]propanal (**61**) se encontraron dos procedimientos diferentes de síntesis (Esquema 12). El primero, una patente en la que no se dan detalles experimentales, describe la síntesis con un 80% de rendimiento, a partir de 3-(indol-3-il)propanol (**62**), mediante *N*-Boc-protección, seguida de oxidación<sup>237</sup>, mientras que el segundo describe la síntesis, a partir del éster metílico del ácido 3-(indol-3-il)propiónico (**63**), mediante *N*-Boc-protección, seguida de reducción

con DIBAL-H<sup>238,239</sup>. A la vista de estos precedentes y teniendo en cuenta el coste de los posibles productos de partida comerciales, inicialmente, se intentó aplicar el primer procedimiento, partiendo de **62**. Sin embargo, en la *N*-Boc-protección de este alcohol se obtuvo un rendimiento inferior al 20%. Por otra parte, la conocida dificultad de controlar la reducción de ésteres a aldehídos no alentaba la aplicación del segundo. Por ello, decidimos aplicar el procedimiento de síntesis de  $\alpha$ -aminoaldehídos de Fehrentz y Castro<sup>240</sup>, ampliamente utilizado en nuestro laboratorio, consistente en la reducción de las correspondientes amidas de Weinreb. Así, como se indica en el Esquema 12, se llevó a cabo la síntesis de **61** con rendimiento global del 93%, en tres etapas a partir del ácido 3-(indol-3-il)propiónico (**64**): a) Síntesis de la *N*-metil-*N*-metoxiamida **65**; b) Introducción del grupo protector Boc (**66**) y c) Reducción. Hay que señalar que el aldehído **61** es inestable y es conveniente utilizarlo recientemente preparado, ya que descompone incluso en el congelador.

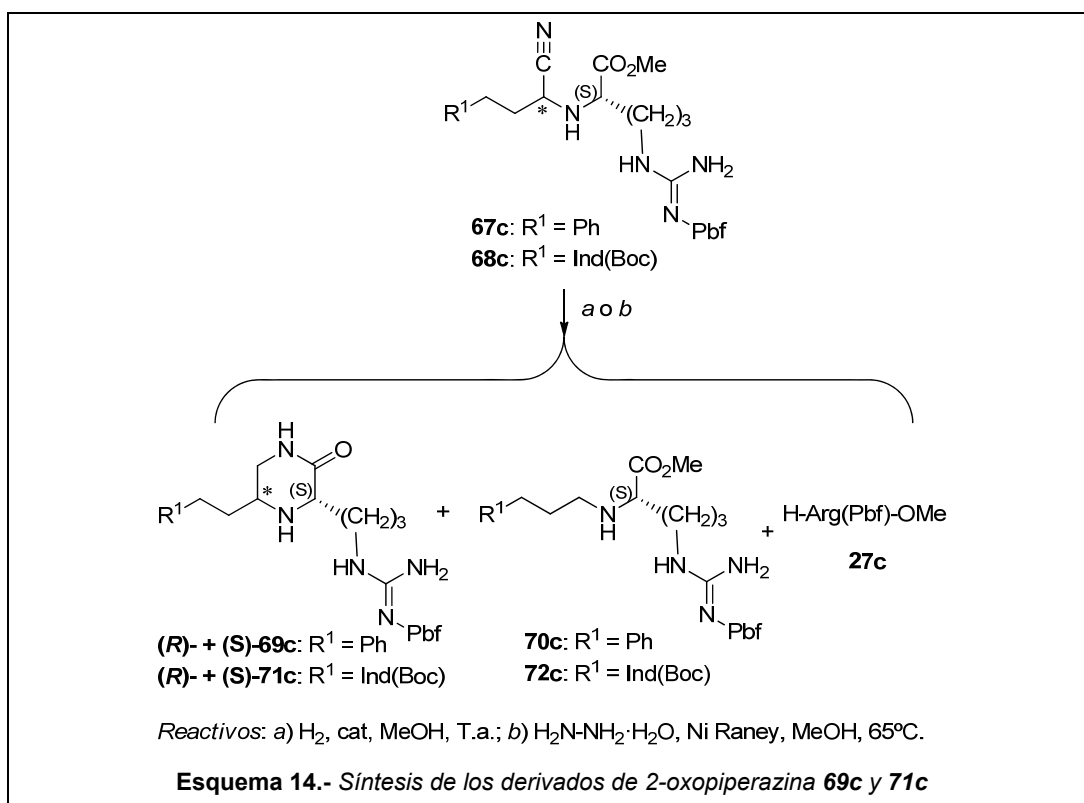


Los  $\alpha$ -aminonitrilos de fórmula general **E** se prepararon aplicando las condiciones de reacción optimizadas para la síntesis de Strecker, indicadas en la entrada 7 de la Tabla 2 del capítulo anterior (2.1.1.1). Es decir, utilización de  $\text{ZnCl}_2$  como catalizador y MeOH como disolvente y llevando a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 24 h. De esta forma, los aminonitrilos **67c** y **68c** (Esquema 13) se obtuvieron con rendimientos del 85 y del 52%, respectivamente. Estos aminonitrilos fueron obtenidos como mezclas epiméricas (1:1) en el centro estereogénico generado, que no pudieron ser resueltas. A diferencia de como se ha comentado para las bencilamidas análogas **22a**, **24b** y **22c**, en la síntesis de los ésteres metílicos **67c** y **68c** no se observó estereoselectividad.



Inicialmente, la reducción ciclativa de los  $\alpha$ -aminonitrilos **67c** y **68c** se intentó mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd(C) al 10%, en condiciones de reacción similares a las que se habían utilizado para la síntesis de las 2-oxopiperazinas **29a** comentadas en el capítulo anterior. Sin embargo, tal como se indica en la Tabla 8 para la reducción de **67c** (entrada 1), en este caso las 2-oxopiperazinas **69c** (Esquema 14) se obtuvieron como productos minoritarios (25%), siendo el producto de retro-Strecker **27c** y **70c**, procedente de la reducción de la correspondiente imina intermedia, los productos mayoritarios. Por ello, fue necesario realizar un estudio de condiciones óptimas de reducción utilizando diferentes catalizadores. Este estudio se llevó a cabo con los derivados de 3-fenilpropionaldehído **67c** y los resultados más significativos se recogen en la Tabla 8. Al igual que como se ha comentado para la reducción de aminonitrilos derivados de bencilamidas, los mejores resultados se obtuvieron cuando la reducción se realizó por transferencia de  $\text{H}_2$  con hidrato de hidrazina en MeOH a 65 °C, utilizando Ni Raney como catalizador (entrada 5). Estas condiciones fueron utilizadas

para la síntesis de las 2-oxopiperazinas portadoras del grupo indol **71c**, obteniendo resultados similares, aunque los rendimientos fueron más bajos (47 %). Hay que señalar que, también en estos casos, la agitación vigorosa y la activación eficaz del catalizador son factores clave para la reproducibilidad de los buenos rendimientos. Las mezclas epiméricas de 2-oxopiperazinas (*R*)- y (*S*)-**69c** y (*R*)- y (*S*)-**71c** fueron resueltas cromatográficamente.



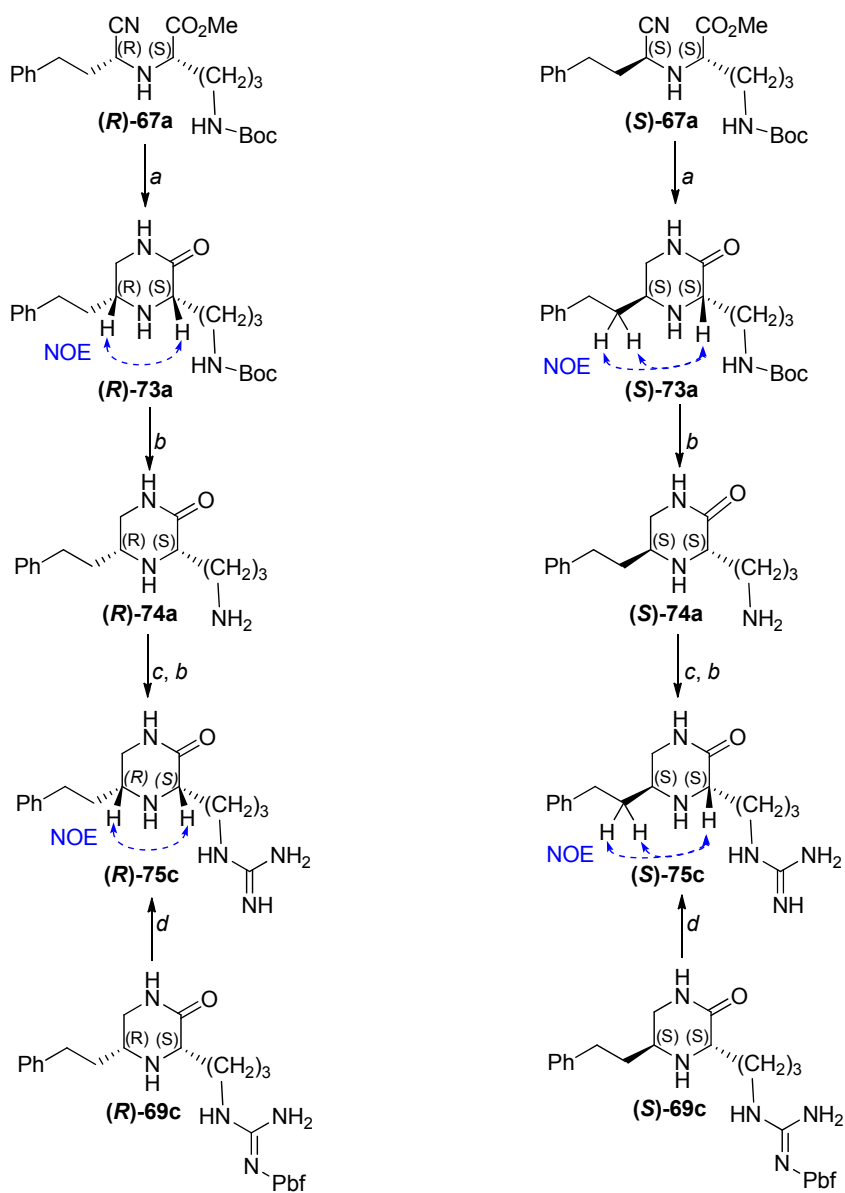
**Tabla 8.-** Puesta a punto de condiciones para la reducción de **67c**.

Entrada	Condiciones de reacción				Rendimientos (%) <sup>a</sup>		
	Reductor	Catalizador	t (h)	T (°C)	(R)-+(S)-69c	70c	27c
1	H <sub>2</sub>	10% Pd(C)	24	T.a.	25	20	50
2	H <sub>2</sub>	10% Pd(C)/AcOH	24	T.a.	10	50	40
3	H <sub>2</sub>	PtO <sub>2</sub>	24	T.a.	25	20	50
4	H <sub>2</sub>	Ni Raney	3	T.a.	40	35	8
5	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	Ni Raney	10 min	65	93	0	7

<sup>a</sup>Rendimientos determinados por HPLC-MS. Columna: Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min.

En los espectros  $^1\text{H}$  RMN NOESY 1D de cada uno de los epímeros (*R*)- y (*S*)- de las 2-oxopiperazinas **69c** y **71c**, realizados en diferentes disolventes [ $\text{CDCl}_3$  y  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] no se observaron efectos NOE que nos permitieran asignar la configuración en  $\text{C}_5$ . Teniendo en cuenta que, como se ha comentado en el capítulo anterior, en las 2-oxopiperazinas derivadas de ornitina **29a** si se habían observado NOEs que permitieron la asignación de dicha configuración, esta asignación se abordó de forma indirecta en **69c** por vía química, aprovechando la conocida posibilidad de convertir derivados de ornitina en derivados de arginina<sup>241-243</sup>, mediante reacciones de guanidinilación<sup>244</sup>.

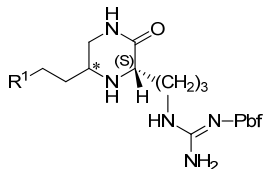
Como se muestra en el Esquema 15, en primer lugar, se preparó la mezcla epimérica de aminonitrilos derivados de ornitina (*R*)- y (*S*)-**67a**, que fue resuelta cromatográficamente. A continuación, cada uno de estos epímeros fue sometido, por separado, a reducción ciclativa, obteniendo, en cada caso, la correspondiente 2-oxopiperazina (*R*)- y (*S*)-**73a**. La eliminación del grupo protector Boc en estas 2-oxopiperazinas derivadas de ornitina, seguida de reacción de guanidinilación, por tratamiento con 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metil-2-isotiourea<sup>244-247</sup>, y eliminación de los grupos Boc, condujo, con bajo rendimiento (12%), a las correspondientes 2-oxopiperazinas derivadas de arginina desprotegida (*R*)- y (*S*)-**75c**, respectivamente. Estas 2-oxopiperazinas fueron idénticas a las obtenidas tras eliminación de la protección Pbf en el grupo guanidino de (*R*)- y (*S*)-**69c**, mediante tratamiento con TFA en presencia de 2.5% de triisopropilsilano. En el espectro  $^1\text{H}$  RMN NOESY 1D de la 2-oxopiperazina derivada de ornitina (*R*)-**73a** se observó NOE entre los protones 3-H y 5-H, mientras que, en el correspondiente espectro de su epímero (*S*)-**73a** se observó NOE entre el protón 3-H y los protones del grupo metileno 5- $\text{CH}_2$ . Efectos NOE similares se observaron en los espectros NOESY 1D de las 2-oxopiperazinas derivadas de arginina desprotegida (*R*)- y (*S*)-**75c**. Estos datos permitieron la asignación de forma inequívoca de la configuración de todos los compuestos indicados en el Esquema 15. En la comparación de los datos de HPLC-MS para la pareja de epímeros de las 2-oxopiperazinas portadoras del grupo feniletilo **69c**, se observó un tiempo de retención ligeramente mayor para el epímero (*S*) que para el (*R*) (Tabla 9), así como mayor  $R_f$  en TLC. Por otra parte, en los respectivos espectros de RMN se observó que el protón 3-H y, sobre todo, los carbonos  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_5$  aparecían a campo más bajo en el epímero (*S*) que en el (*R*). Estas diferencias entre ambos epímeros (Tabla 9) fueron utilizadas para la asignación de la configuración en las 2-oxopiperazinas análogas portadoras del grupo *N*-Boc-indol-3-ilo **71c**.



Reactivos: a)  $N_2H_4$ , Ni Raney, MeOH, 65 °C, 33-43%; b) 20% TFA,  $CH_2Cl_2$ , T.a., 100%; c)  $Et_3N$ ,  $HgCl_2$ ,  $BocHNC(SMe)NBoc$ , DMF, T.a., 10-14%; d) TFA (95%), TIPS (2.5%),  $H_2O$  (2.5%), T.a., 99%.

**Esquema 15.- Asignación de configuración de las 2-oxopiperazina 69c y 71c**

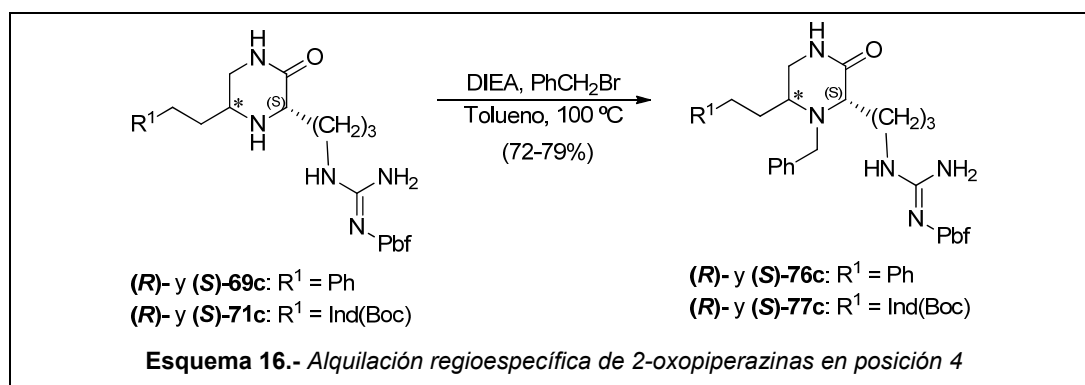
**Tabla 9.-** Comparación de los datos más significativos de HPLC-MS y RMN de las 2-oxopiperazinas **69c** y **71c**.



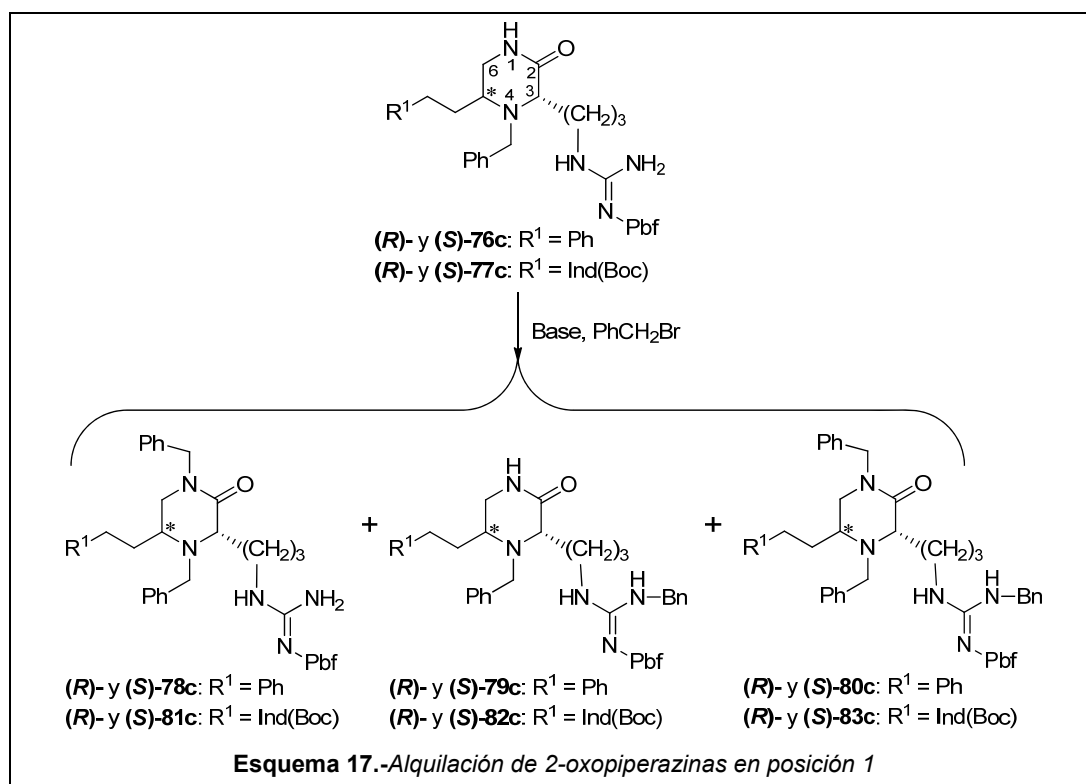
	( <i>R</i> )- <b>69c</b>	( <i>S</i> )- <b>69c</b>	( <i>R</i> )- <b>71c</b>	( <i>S</i> )- <b>71c</b>
R <sup>1</sup>	Ph	Ph	Ind(Boc)	Ind(Boc)
Conf.(*)	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )
HPLC <sup>a</sup> t <sub>R</sub>	3.80	3.83	4.10	4.12
<sup>1</sup> H RMN <sup>b</sup>				
3-H	3.32	3.35	3.37	3.41
5-H	2.89	2.86	2.97	2.97
<sup>13</sup> C RMN <sup>c</sup>				
C <sub>3</sub>	53.3	58.2	55.2	58.1
C <sub>5</sub>	46.3	52.0	46.6	52.2

<sup>a</sup>HPLC-MS. Columna: Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>b</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, asignados con la ayuda de espectros COSY y HSQC. <sup>c</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, asignados con la ayuda de espectros HSQC.

Como se muestra en el Esquema 16, la primera etapa de alquilación de las 2-oxopiperazinas (*R*)- y (*S*)-**69c** y **-71c** fue realizada mediante reacción con bromuro de bencilo (3 equivalentes) en tolueno a 100 °C, utilizando DIEA (5 equivalentes) como base, obteniendo, de forma regioespecífica y con rendimientos superiores al 70%, las correspondientes 2-oxopiperazinas alquiladas en posición 4 **76c** y **77c**. El aumento de la proporción de agente alquilante y base (6 y 8 equivalentes, respectivamente) permitió disminuir el tiempo de reacción de 6 a 3 h, sin afectar a la regioespecificidad. Los rendimientos fueron significativamente menores (10-40 %) cuando se utilizaron CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>CN como disolventes o cuando se utilizaron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base. En estos casos las reacciones transcurrieron con menor rendimiento y con baja regioselectividad.



La alquilación selectiva en la posición 1 del anillo de 2-oxopiperazina de **76c** y **77c** con bromuro de bencilo requirió un estudio de condiciones de reacción, ya que el análisis HPLC-MS de los crudos de reacción de los primeros intentos de alquilación de **(R)**- y **(S)**-**76c** pusieron de manifiesto la alquilación del grupo guanidino, a pesar de estar protegido, obteniendo mezclas de los compuestos 1,4-dialquilados **(R)**- y **(S)**-**78c**, junto con los compuestos alquilados en el grupo guanidino **79c** y **80c**, tal como se muestra en el Esquema 17.



**Tabla 10.-** Estudio de condiciones de alquilación de la posición 1 de la 2-oxopiperazina **(R)**-**76c**.

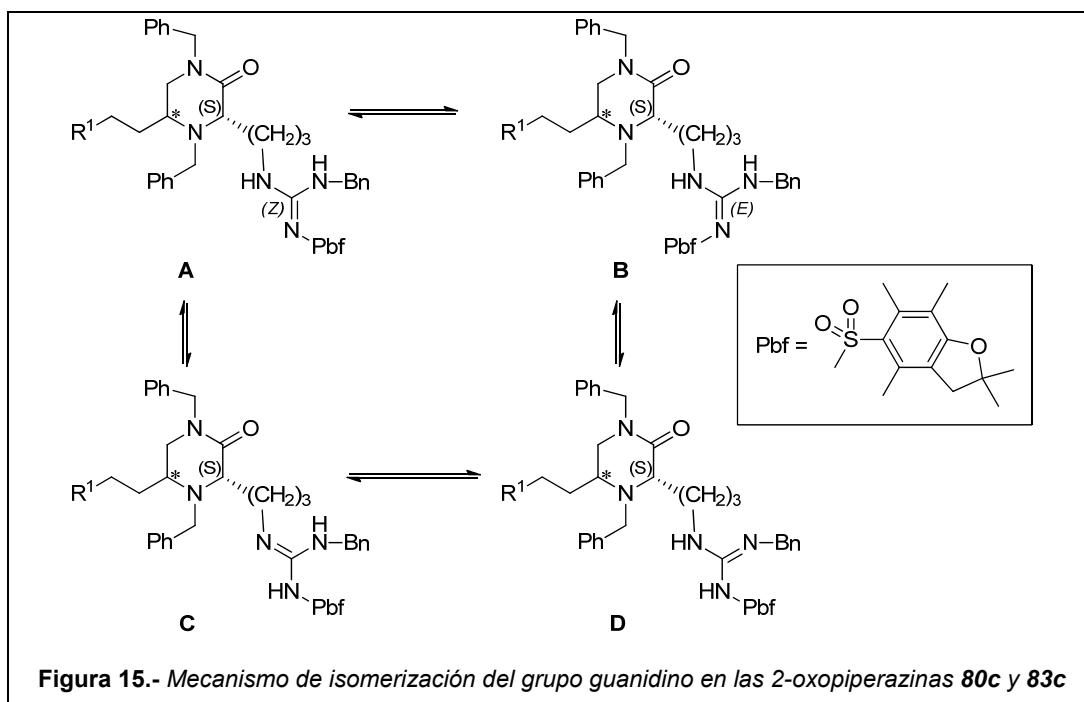
Entrada	Condiciones de reacción				Rendimiento (%) <sup>a</sup>		
	Base (Eq.)	Disolvente	T (°C)	t (h)	<b>(R)</b> - <b>78c</b>	<b>(R)</b> - <b>79c</b>	<b>(R)</b> - <b>80c</b>
1	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.2)	Acetona	56	3	8	40	13
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.2)	Acetona	56	72	5	20	40
3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.2)	DMF	T.a.	72	8	38	17
4	NaH (1.1)	DMF	T.a.	72	25	24	30
5	NaH (2.2)	DMF	90	1	10	35	16
5	NaH (2.2)	THF	T.a.	24	50	21	21
7	NaH (2.2)	THF/DMF (9:1)	T.a.	24	61	5	24

<sup>a</sup>Determinado por HPLC-MS, columna: Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min.

Teniendo en cuenta resultados previos del grupo de investigación en alquilaciones de otros derivados de 2-oxopiperazinas<sup>248,249</sup>, inicialmente, la alquilación en posición 1 se abordó utilizando 2.2 equivalentes de bromuro de bencilo, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base y a reflujo en acetona. Como se recoge en la entrada 1 de la Tabla 10, en estas condiciones el producto mayoritario **79c** fue el de alquilación selectiva en el grupo guanidino. También fue mayoritario la alquilación en el grupo guanidinio utilizando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, aunque se obtuvo con mayor proporción de los productos de dialquilación, tanto en la posición 1 de la 2-oxopiperazina como en el grupo guanidino, **80c** (entrada 2). Esta dialquilación disminuyó al sustituir la acetona por DMF y realizar la reacción a temperatura ambiente. La mejora más significativa en regioselectividad para la monoalquilación en el anillo de 2-oxopiperazina **78c** se obtuvo al utilizar NaH como base tanto en DMF como en THF y, en particular, cuando se utilizó mezcla THF/DMF (9:1) como disolvente (entrada 7 de la Tabla 10). En estas condiciones los productos deseados, 1,4-dibencilados en el anillo de piperazina, **78c** y **81c** fueron aislados con rendimientos del 40-50% y los tribencilados **80c** y **83c** con rendimientos del 8-14%. Hay que señalar que los productos de monoalquilación en el grupo guanidino **79c** y **82c**, si bien los análisis de HPLC-MS de los crudos de reacción indicaban que eran compuestos dibencilados, no pudieron aislarse ni purificarse para la caracterización completa. La asignación de las posiciones benciladas se realizó en base a los datos de RMN. En los espectros <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos 1,4-dibencilados **78c** y **81c** en CDCl<sub>3</sub>, en comparación con los de los 4-monobencilados **76c** y **77c**, se observaba la desaparición del singlete a 7.10-7.35 ppm, correspondiente al 1-H lactámico, y la aparición de las señales correspondientes al metileno del grupo bencilo entrante, como sistemas AB, a 4.40-4.69 ppm. En los espectros de correlación <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HMBC, estas señales correlacionan con la señal correspondiente al C<sub>2</sub>, a 171 ppm.

El análisis HPLC-MS de los compuestos tribencilados **80c** y **83c** indicaba la presencia de dos picos solapados, que no pudieron ser resueltos, correspondientes a dos isómeros en relación variable comprendida entre (2:1) y (4:1). La asignación de los espectros de RMN de estos compuestos fue muy difícil debido a problemas de resolución. En los espectros <sup>1</sup>H RMN en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO se observaba la presencia de dos especies isoméricas en proporción similar a la determinada por HPLC-MS. Estos espectros mostraban la presencia de los tres grupos bencilo claramente diferenciados en las señales correspondientes a los respectivos grupos metileno, cuya asignación fue realizada con la ayuda de espectros de correlación <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H, COSY y <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C, HSQC y

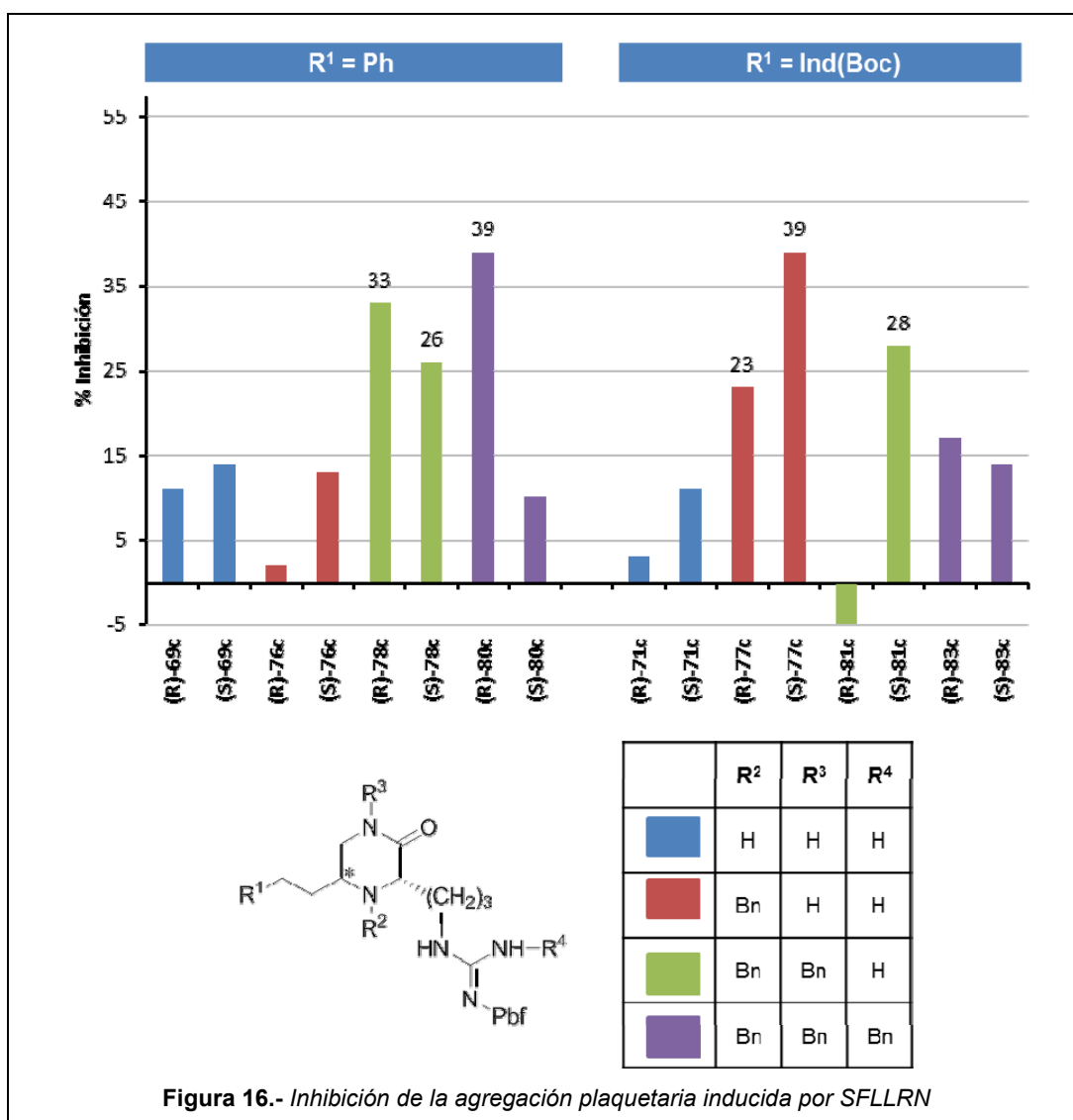
HMBC. Los protones metilénicos de los grupos bencilo en la posición 1 del anillo de piperazina y en el grupo guanidino presentaban desplazamientos químicos muy próximos, solapándose en algunos casos. Su asignación se realizó en base a las correlaciones observadas en HMBC entre las señales correspondientes a estos protones metilénicos y el carbono lactámico, a 170-171 ppm, o el del grupo guanidino, a 155-156 ppm, respectivamente. Los protones metilénicos del bencilo lactámico (1-CH<sub>2</sub>), al igual que en **76c** y **77c**, aparecían como dos dobletes de un sistema AB con constante de acoplamiento geminal de 14 Hz, mientras que, los protones metilénicos del bencilo en el guanidino aparecían como un doblete con constante de acoplamiento de 5-6 Hz, variable con la temperatura, que colapsaban a un singlete al agitar con D<sub>2</sub>O. Estos últimos datos indicaban el acoplamiento de los protones metilénicos con el NH del guanidino y, por tanto, nos ayudaron a asignar la estructura del grupo guanidino, fijando el C=N unido al grupo protector Pbf (Figura 15, **A** o **B**), como se ha descrito para sulfoguanidinas<sup>250-252</sup>. Las dos formas isoméricas que se observan en HPLC y en RMN podrían corresponder a los dos isómeros geométricos en el grupo guanidino **A** (*Z*) y **B** (*E*). La isomerización **A** ⇌ **B** se puede producir por inversión en el N que soporta el grupo Pbf o por prototropía e interconversión en alguna de las formas tautoméricas **C** o **D**<sup>250,253,254</sup>. Esta interconversión podría explicar la baja resolución de los espectros RMN.



## 2.2.2. Evaluación Biológica

### 2.2.2.1. Evaluación de la actividad antagonista de receptores PAR1

Al igual que las ureas comentadas en el capítulo anterior, los derivados de 2-oxopiperazina **69c-83c** fueron evaluados como inhibidores de la agregación de plaquetas humanas, inducida por una concentración 30  $\mu$ M del agonista de referencia de los receptores PAR1 SFLLRN, a una concentración inicial de 0.1 mg/ml. Los resultados en % de inhibición se muestran en el gráfico de la Figura 16.



Las 2-oxopiperazinas monobenciladas en la posición 4 (**R**)-**77c** o dibenciladas en las posiciones 1 y 4 (**R**)- y (**S**)-**78c**, (**R**)-**80c** y (**S**)-**81c** inhibieron más de un 20% la agregación plaquetaria, aunque, al igual que las ureas comentadas en el capítulo anterior, con baja potencia. Estas bajas potencias no nos permitieron establecer relaciones estructura-actividad claras, si bien, los datos parecen indicar que al comparar los derivados que portan fenilo como grupo aromático en R<sup>1</sup> con los que portan Ind(Boc):

- La influencia de la sustitución en el anillo de piperazina es diferente, ya que en los primeros la actividad aumenta al introducir el grupo bencilo en posición 1, mientras que, en los segundos disminuye.
- La influencia de la estereoquímica en la posición 5 del anillo de piperazina es diferente en ambas series, en general, en la primera los epímeros (**R**) **78c** y **80c** fueron más activos que los (**S**), mientras que, en la segunda **77c** y **81c** esta tendencia se invirtió.

Estas diferencias, junto con el bajo rango de variabilidad de los % de inhibición no permiten la comparación de ambas series para establecer conclusiones claras sobre la influencia del grupo aromático en R<sup>1</sup>.

#### 2.2.2.2. Evaluación de la actividad citotóxica

Ninguno de los derivados de 2-oxopiperazina descritos en este capítulo mostró actividad citotóxica significativa a concentraciones inferiores a 10<sup>-5</sup> M en las tres líneas celulares tumorales indicadas en el capítulo anterior.

#### 2.2.3. Conclusiones

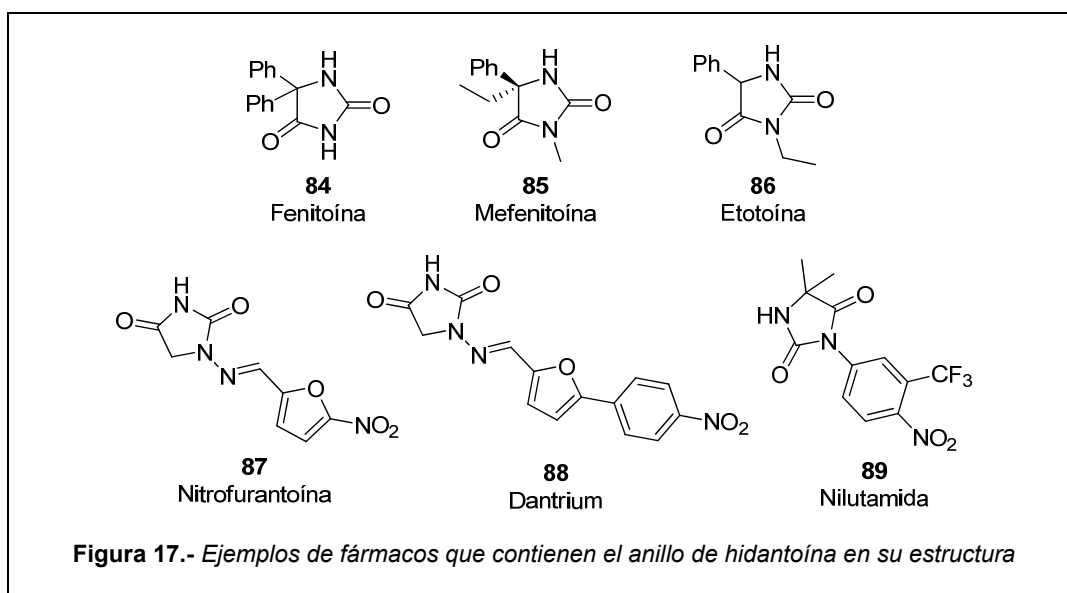
Las conclusiones más significativas de los resultados comentados en este capítulo se pueden resumir en los tres puntos siguientes:

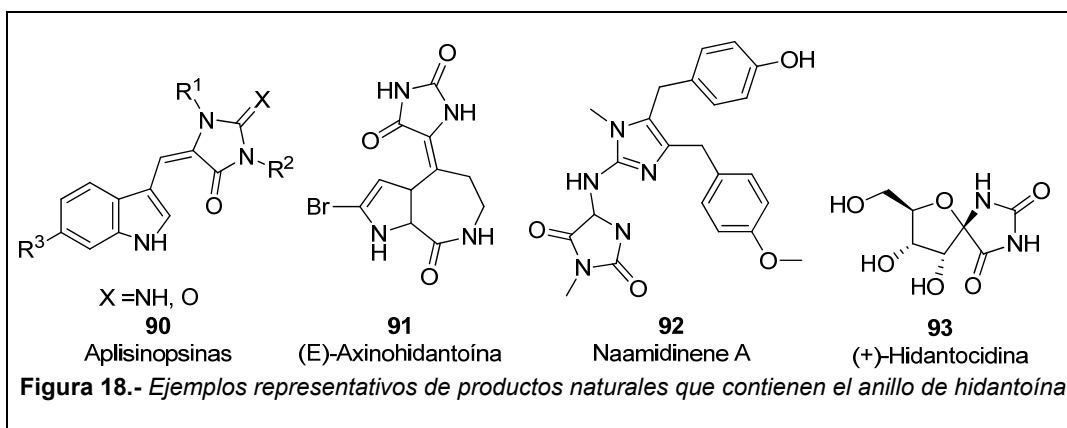
- A partir de  $\alpha$ -aminonitrilos derivados del éster metílico de arginina, con el grupo guanidino adecuadamente protegido, se ha preparado una serie de 2-oxopiperazinas, portadoras de, al menos, un grupo aromático, y con diversos grados de sustitución en el anillo de piperazina, que fueron diseñadas como potenciales antagonistas de los receptores PAR1 humanos.

- Se ha puesto a punto una metodología eficaz para la síntesis de las 2-oxopiperazinas arriba indicadas, que implica una etapa de reducción ciclativa, seguida de dos alquilaciones regioselectivas. La participación del grupo guanidino procedente de la Arg, a pesar de estar protegido con el grupo Pbf, complica la regioselectividad de la alquilación en la posición 1 del anillo de piperazina en las reacciones de alquilación. Tras los estudios de optimización de condiciones de alquilación, se ha conseguido una selectividad (4:1) a favor de la alquilación en la piperazina con respecto al grupo guanidino.
- Los derivados de 4-bencil- y/o 1,4-dibencil-2-oxopiperazina preparados inhiben la agregación en plaquetas humanas, aunque con baja potencia. Estos resultados no han permitido establecer relaciones estructura-actividad claras.

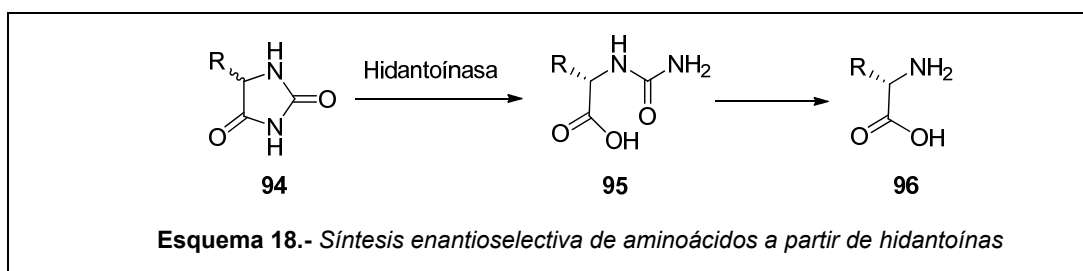
### 2.3. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE IMINOHIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS

Entre los denominados esqueletos privilegiados también se incluye el anillo de hidantoína. En el Drug Bank (<http://www.drugbank.ca>)<sup>218</sup> actualmente hay 21 entradas de fármacos que contienen dicho anillo. Entre los aprobados destaca la Fenitoína<sup>255</sup> (**84**, Figura 17), utilizada desde 1938 para el tratamiento de la epilepsia. Posteriormente, con el fin de minimizar los efectos secundarios adversos, se aprobaron sus análogos Mefenitoína<sup>255,256</sup> (**85**) y Etotoína<sup>255,257</sup> (**86**). Otros ejemplos representativos de fármacos con acción en campos farmacológicos diversos son el antibacteriano nitrofurantoína<sup>258</sup> (**87**), el antagonista de calcio Dantrium o Dantroleno<sup>259</sup> (**88**) o el antiandrógeno Nilutamida (**89**), utilizado en el tratamiento del cáncer de próstata<sup>260,261</sup>. Por otra parte, el esqueleto de hidantoína está presente en numerosos alcaloides extraídos de esponjas y corales marinos, como por ejemplo: las aplisinopsinas (**90**, Figura 18), que muestran actividad citotóxica, antiviral, antidepresiva, inhibidora de monoamino oxidasa o óxido nítrico sintetasa<sup>262,263</sup>, las axinohidantoínas<sup>264,265</sup> (**91**), con actividad citotóxica e inhibidora de proteína quinasa C, el derivado de 2-aminoimidazol naamidinene A<sup>266,267</sup> (**92**) y la hidantocidina<sup>268,269</sup> (**93**), un espironucleósido con actividad herbicida y regulador del crecimiento de las plantas, debida a la inhibición de adenilsuccinato sintetasa<sup>268,269</sup>.

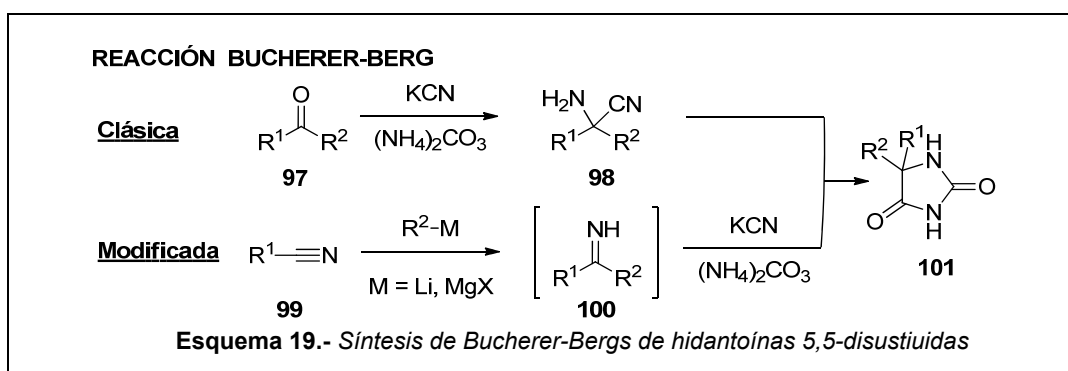




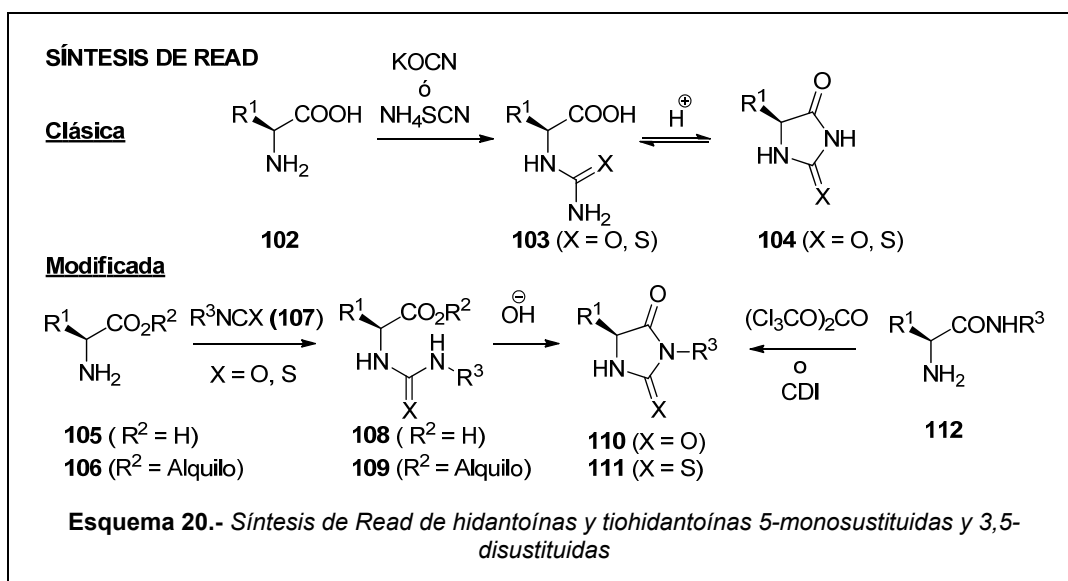
Además, las hidantoínas son consideradas compuestos de alto interés en síntesis orgánica por su utilización industrial como intermedios para la síntesis de aminoácidos enantioméricamente puros<sup>270</sup> (Esquema 18).



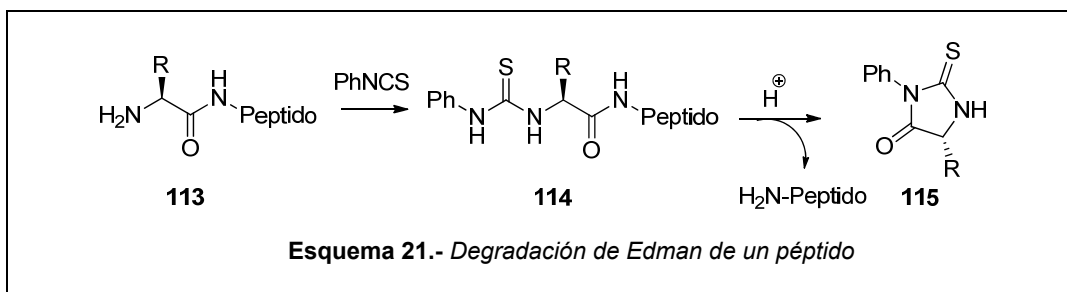
Existen numerosos métodos para la síntesis de hidantoínas en disolución. Estos procedimientos se pueden agrupar en varias categorías, pero las más comúnmente utilizadas son: a) Métodos basados en la síntesis de Bucherer-Bergs<sup>271,272</sup> (Esquema 19) y b) Métodos basados en la síntesis de Read (Esquemas 20 y 21). La metodología de Bucherer-Bergs<sup>271,272</sup> permite la obtención de hidantoínas 5,5-disustituidas de fórmula general **101** (Esquema 19) y consiste en una reacción de tres componentes de los compuestos carbonílicos **97** con cianuro potásico y carbonato amónico. Esta reacción transcurre a través de los  $\alpha$ -aminonitrilos intermedios **98**, que en el medio básico de reacción dan lugar a las hidantoínas **101**<sup>273,274</sup>. Entre las modificaciones de esta metodología, Motagne *et al.*<sup>275</sup> han descrito la adición de reactivos de Grignard (RMgX) y organolitios (R-Li) a los nitrilos **99** que, a través de un intermedio de tipo imina **98**, conducen a las hidantoínas 5,5-disustituidas **101**. Estas modificaciones del método original han permitido aumentar la versatilidad en la síntesis de hidantoínas.



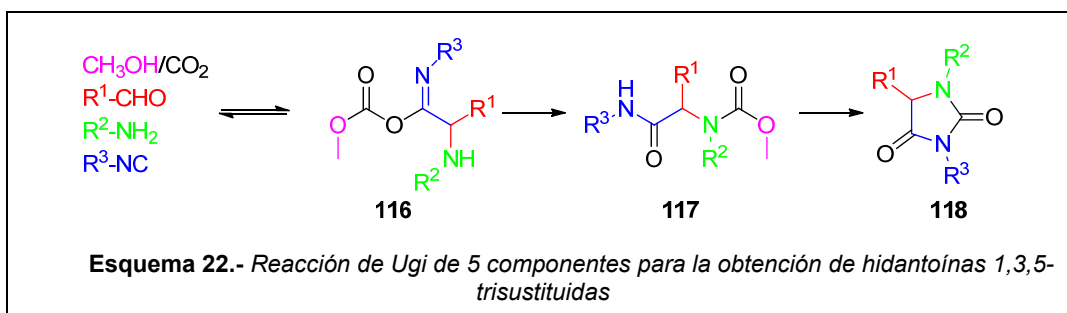
En cuanto a la síntesis de Read<sup>276</sup> (Esquema 20), el método original permite la obtención de las hidantoínas y tiohidantoínas 5-sustituidas enantioméricamente puras **104** a partir de los aminoácidos **102**, que, por reacción con isocianato potásico (KOCN) o isotiocianato amónico (NH<sub>4</sub>SCN), dan lugar a la correspondiente urea o tiourea **103**, las cuales, por tratamiento con medio ácido, conducen a la respectiva hidantoína o tiohidantoína **104**. Aplicando una metodología similar, pero utilizando los isocianatos o isotiocianatos orgánicos **107**, en lugar de isocianato potásico, a partir de los α-aminoácidos **105** o de sus ésteres **106**, se obtienen los correspondientes α-ureidoácidos **108** o α-ureidoésteres **109**, que, en medio básico, conducen a las respectivas hidantoínas **110** o tiohidantoínas **111** 3,5-disustituidas<sup>277,278</sup>. Las hidantoínas **110** se pueden obtener también a partir de α-aminoamidas (**112**) por reacción con *N,N'*-carbonildimidazol (CDI)<sup>279</sup> o trifosgeno<sup>280</sup> (Esquema 20).



La degradación de Edman<sup>281</sup>, método utilizado para la secuenciación de péptidos y proteínas, se puede considerar una variante de la síntesis de hidantoínas de Read. Este método de secuenciación de péptidos (Esquema 21) consiste en el tratamiento del péptido *N*-desprotegido **113** con isotiocianato de fenilo, dando lugar a la correspondiente tiourea en el extremo *N*-terminal **114**. El posterior tratamiento con medio ácido de esta tiourea induce la ciclación a la tiohidantoína derivada del aminoácido *N*-terminal (**115**), con eliminación del resto del péptido. El análisis secuencial por espectrometría de masas de los crudos de reacción permite la identificación de los aminoácidos que integran el péptido.



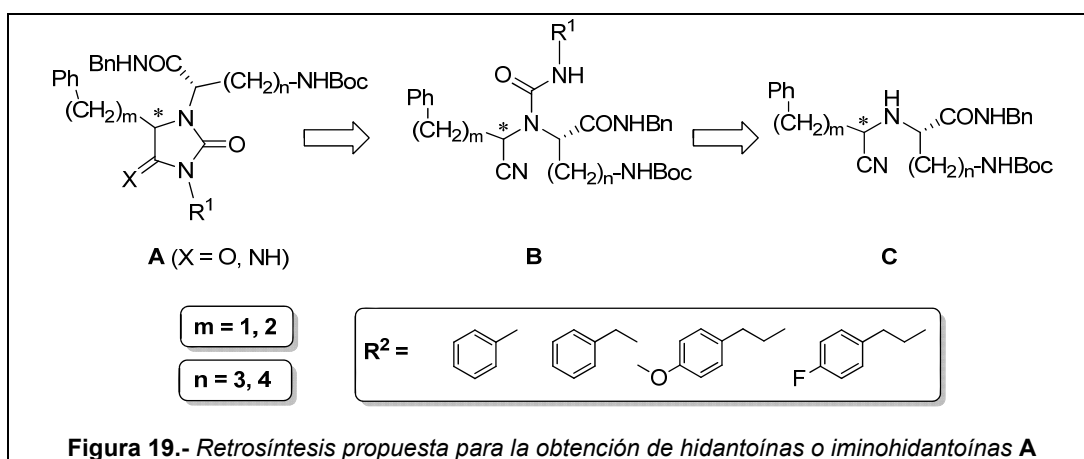
Por último, entre los métodos de síntesis en disolución descritos, mencionar la aplicación de la síntesis de Ugi de cinco componentes<sup>282-284</sup> (compuesto carbonílico + amina + isonitrilo + metanol + dióxido de carbono) para la preparación de hidantoínas 1,3,5-trisustituidas (**118**, Esquema 22).



Algunos de los métodos de síntesis en disolución mencionados se han aplicado también en la síntesis de hidantoínas en fase sólida<sup>271,285,286</sup>. Entre ellos, destacan la adaptación de la síntesis de Read a aminoácidos anclados a una resina a través del grupo carboxílico, con formación del anillo de hidantoína simultáneamente con el desanclaje de la resina. La síntesis de hidantoínas a partir de derivados de  $\alpha$ -

aminoamidas se ha aplicado también a la síntesis de hidantoínas sobre sustratos (fundamentalmente péptidos) unidos a un soporte polimérico, en las que la etapa de formación de la hidantoína es independiente del desanclaje.

Teniendo en cuenta los antecedentes y el interés de los derivados de hidantoína tanto en Química Medica como en Química Orgánica, el tercer y último objetivo de esta tesis doctoral fue la síntesis de las iminohidantoínas e hidantoínas 1,3,5-trisustituidas de fórmula general **A**, indicadas en la Figura 19. Como se muestra en el esquema retrosintético de esta Figura, la síntesis de las estructuras **A** se planteó de forma directa a partir de los  $\alpha$ -aminonitrilos **C**, e implicaba la reacción con isocianatos para dar lugar a los  $\alpha$ -ureidonitrilos **B** y su posterior ciclación. Esta ruta de síntesis permitiría obtener una serie de hidantoínas o iminohidantoínas **A** quirales, con alta diversidad de sustituyentes en las posiciones 1, 3 y 5, con control de la funcionalidad, dependiendo de la naturaleza del  $\alpha$ -aminonitrilo de partida y de los isocianatos utilizados. Entre los  $\alpha$ -aminonitrilos, se contempló la utilización de los  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de ornitina **22a** y **24a** y de lisina **22b** y **24b**, cuya síntesis se ha indicado en el Esquema 2. De entre los isocianatos comerciales, se planteó la utilización de isocianato de fenilo, de bencilo, de 4-metoxifenilo y 4-fluorofenilo, portadores de grupos aromáticos anclados a través de cadenas metilénicas de diverso longitud  $[(CH_2)_{0-2}]$ . Teniendo en cuenta los resultados biológicos comentados en los capítulos anteriores, que indicaban una mejor inhibición de la agregación plaquetaria para derivados *N*-protegidos en la cadena lateral del aminoácido básico, la preparación de las estructuras **A** se planteó manteniendo la cadena lateral del aminoácido *N*-Boc protegida.

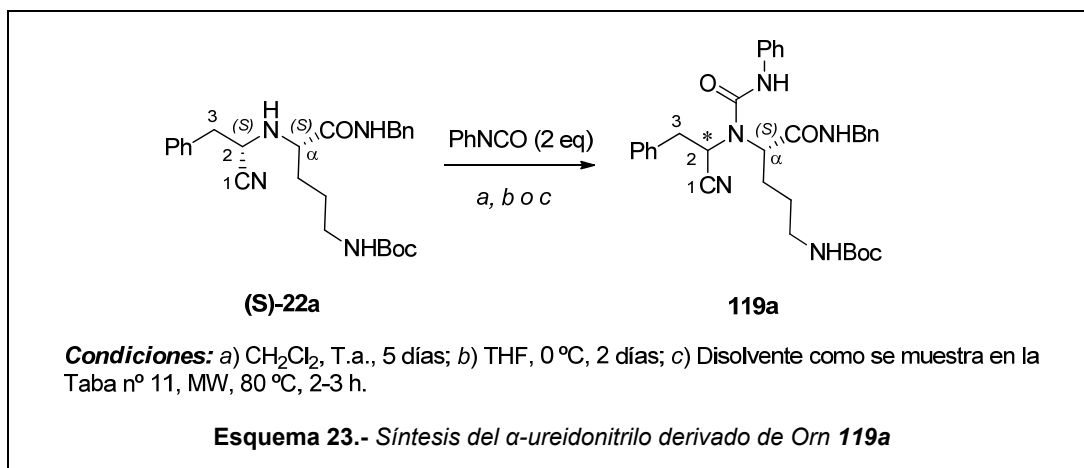


### 2.3.1. Síntesis

#### 2.3.1.1. Síntesis de $\alpha$ -ureidonitrilos derivados de $\alpha$ -aminonitrilos

La puesta a punto de la primera etapa del esquema de síntesis planteado para la obtención del esqueleto de hidantoína, que suponía la obtención de  $\alpha$ -ureidonitrilos de fórmula general **B**, se llevó a cabo con el  $\alpha$ -aminonitrilo derivado de ornitina (**(S)**-**22a** e isocianato de fenilo (Esquema 23). Inicialmente, esta síntesis se abordó aplicando las condiciones descritas en la bibliografía<sup>278,287</sup>, que implicaban la reacción de un  $\alpha$ -aminonitrilo con dos equivalentes de isocianato, y utilizaban diferentes disolventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ <sup>278</sup> y THF<sup>287</sup>). Para ello, se realizó un estudio de ambas condiciones en paralelo. Cuando la reacción se realizó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente, después de 5 días de reacción, el  $\alpha$ -aminonitrilo de partida (**(S)**-**22a** se recuperó inalterado (entrada 1, Tabla 11). Sin embargo, tras tres días más en los que llegó a evaporarse el disolvente, el análisis por TLC y HPLC del crudo de reacción, mostró la aparición de un 60% del producto deseado (**(S)**-**119a**. En cuanto a la aplicación de las condiciones descritas por Bartolomé-Nebreda *et al.*<sup>287</sup>, cuando la reacción se realizó en THF a 0 °C, se observó la formación de (**(S)**-**119a** con buenos rendimientos (86%) después de 72 h de reacción (entrada 2, Tabla 11). La formación de la urea deseada (**(S)**-**119a** tras la evaporación del  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , en el primer caso, junto con el creciente interés de la comunidad científica por las reacciones sin disolvente<sup>288</sup> nos hizo plantearnos estudiar la síntesis sin disolvente (entrada 3). Esto implicaba una operación previa de mezclado y homogeneización de los reactivos con una mínima cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro y su posterior evaporación con corriente de argón. En estas condiciones, tras 48 h de agitación de la mezcla (jarabe espeso) se obtuvo un 98% del producto deseado (**(S)**-**119a**. A continuación, con el fin de disminuir el tiempo de reacción, se llevó a cabo la reacción en microondas<sup>289,290</sup>. Como se muestra en la entrada 4 de la Tabla 11, cuando la reacción se llevó a cabo en microondas utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente, se recuperó el  $\alpha$ -aminonitrilo de partida (**(S)**-**22a** sin reaccionar. Sin embargo, cuando la reacción se realizó sin disolvente, calentando a 80 °C durante 2 h en microondas, se obtuvieron, casi cuantitativamente las ureas (**(RS)**-**119a** (98%) (Entrada 5). El análisis HPLC del crudo de reacción, mostró la aparición de dos picos a 27.55 y 27.75 min, en proporción aproximada (1:1) (Figura 20, b), mientras que, el correspondiente análisis del aminonitrilo de partida (**(S)**-**22a** mostraba solo un pico a 23.04 min (Figura 20, a). Estos datos indicaban que se había producido la

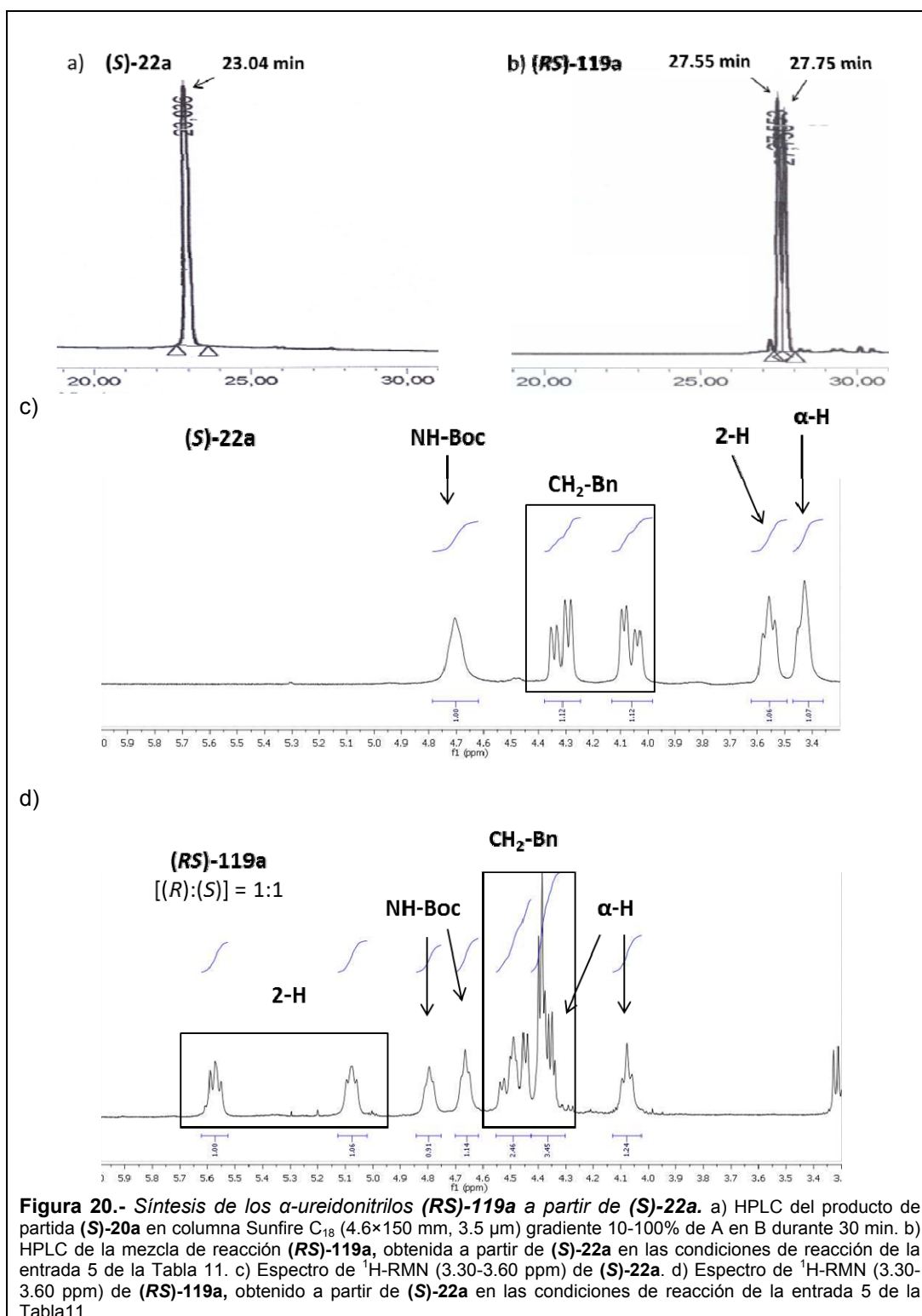
epimerización del centro estereogénico C<sub>2</sub> del α-ureidonitrilo **(RS)-119a**. Este resultado se confirmó al comparar el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del α-aminonitrilo de partida **(S)-22a** con el de los productos de reacción **(RS)-119a** (Figura 20, c y d), que, en este caso, mostraba la aparición de las señales correspondientes a 2-H, α-H y NH-Boc duplicadas en proporción (≈1:1). Este estudio también mostró que en las trazas del α-aminonitrilo **(S)-22a** que quedaban sin reaccionar, no se había producido epimerización en C<sub>2</sub>, ya que no se observaban dos picos en HPLC ni duplicidad de señales en RMN. Como era de esperar, la epimerización también se observó cuando se aplicaron estas condiciones al epímero **(R)-22a** (entrada 6, Tabla 11). Hay que señalar que cuando la reacción se llevó a cabo a 0 °C o a temperatura ambiente (entradas 2 y 3 de la Tabla 11) no se observó epimerización.



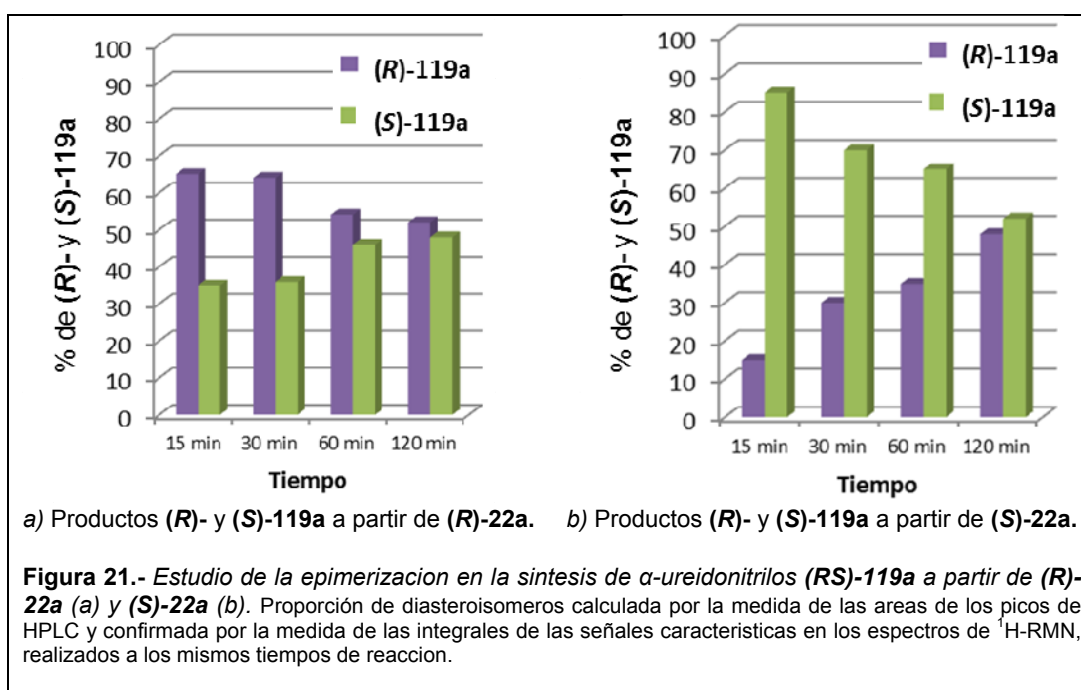
**Tabla 11.-** Influencia de las condiciones de reacción en la formación de los α-ureidonitrilos **119a**.

Entrada	Aminonitrilo	Condiciones de reacción			α-ureidonitrilo	
	Nº	Disolvente	T (°C)	Tiempo	Nº	Rdto <sup>a</sup> (%)
1	<b>(S)-22a</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	T. a.	5 días	<b>(S)-119a</b>	0
2	<b>(S)-22a</b>	THF	0	72 h	<b>(S)-119a</b>	86
3	<b>(S)-22a</b>	-	T. a.	48 h	<b>(S)-119a</b>	98
4 <sup>b</sup>	<b>(S)-22a</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80	2 h	<b>(S)-119a</b>	0
5 <sup>b</sup>	<b>(S)-22a</b>	-	80	2 h	<b>(RS)-119a</b>	98 <sup>c</sup>
6 <sup>b</sup>	<b>(R)-22a</b>	-	80	2 h	<b>(RS)-119a</b>	95 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Rendimiento aislado. <sup>b</sup>Calefacción por irradiación de microondas. <sup>c</sup>Proporción de diastereoisómeros [(R):(S)] = 1:1.

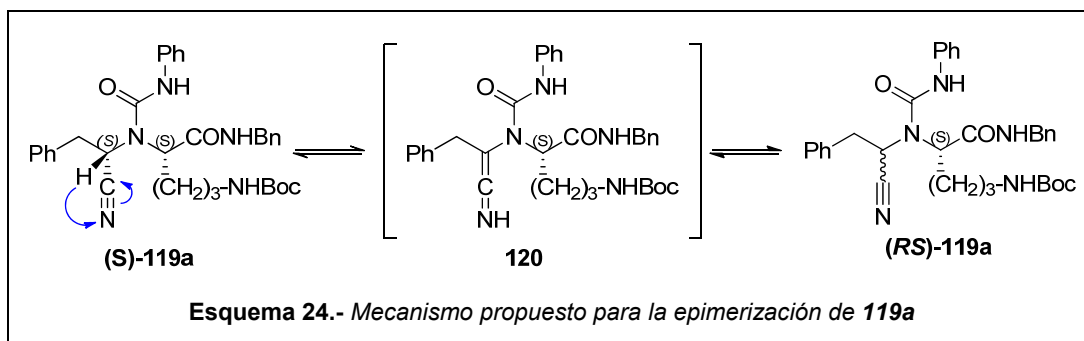


Como se muestra en la Figura 21, en la que se representa el porcentaje de productos (**R**)- y (**S**)-**119a** a partir de (**R**)-**22a** (a) y a partir de (**S**)-**22a** (b) en función del tiempo de reacción en microondas, cuando el producto de partida era (**R**)-**22** a los 60 min de reacción la proporción de epímeros (**RS**)-**119a** era  $\approx 1:1$ , mientras que, a partir de (**S**)-**22a** fueron necesarios 120 min para la epimerización completa. Este hecho nos indicó que la velocidad de epimerización del epímero (**R**) era mayor que la del (**S**). Esta mayor reactividad del epímero (**R**) ya se había observado en la reducción del CN de los  $\alpha$ -aminonitrilos, tal como se ha comentado en el apartado 2.1.2.



Como se indica en el Esquema 24, la mayor tendencia a epimerizar de los  $\alpha$ -ureidonitrilos (**RS**)-**119a** con respecto a los  $\alpha$ -aminonitrilos de partida (**R**)- y (**S**)-**22a** podría explicarse en base a que con la introducción del grupo ureido disminuye la densidad electrónica sobre el carbono  $\text{C}_2$ , aumentando la acidez del protón que soporta, facilitando, de esta forma, la prototropía de dicho protón, para dar lugar a una especie plana de tipo cetimina **120**, que revertiría al  $\alpha$ -ureidonitrilo **119a**, con pérdida de la estereoquímica en  $\text{C}_2$ . Recientemente, O. Ramström y col., en estudios de resolución enzimática de  $\alpha$ -aminonitrilos<sup>291,292</sup>, han observado la total epimerización de  $\alpha$ -

acilaminonitrilos en el medio de la resolución a 40 °C y la nula epimerización de los correspondientes  $\alpha$ -aminonitrilos en las mismas condiciones.



Se dedujo que las mejores condiciones para la obtención de los  $\alpha$ -ureidonitrilos (**R**)- y (**S**)-119a sin epimerización son: reacción del  $\alpha$ -aminonitrilo (**R**)- y (**S**)-22a con dos equivalentes de isocianato de fenilo sin disolvente a temperatura ambiente (entrada 4, Tabla 11). De esta forma, se evita la epimerización y se disminuye el tiempo de reacción en comparación con el método en disolución (entrada 3, Tabla 11). Hay que señalar que, teniendo en cuenta los principios básicos de la Química Sostenible o Verde<sup>293-296</sup>, las reacciones sin disolvente<sup>297</sup> son una técnica no convencional que presenta muchas ventajas con respecto a los métodos convencionales, tales como:

- El ahorro de energía y disolventes, que se traduce en una reducción en la peligrosidad y toxicidad, disminuyendo tanto el impacto ambiental como los riesgos sanitarios.
- En muchos casos las reacciones son más rápidas y dan lugar a elevados rendimientos.
- Elevada eficacia cuando esta metodología se asocia con otras técnicas experimentales (microondas o ultrasonidos).

Cuando el  $\alpha$ -aminonitrilo de partida era una mezcla epimérica 1:1 sin separar, se aplicaron las condiciones de reacción de la entrada 5 de la Tabla 11. Es decir: calefacción a 80 °C en microondas, sin disolvente durante 2-3 h, disminuyendo significativamente los tiempos de reacción.

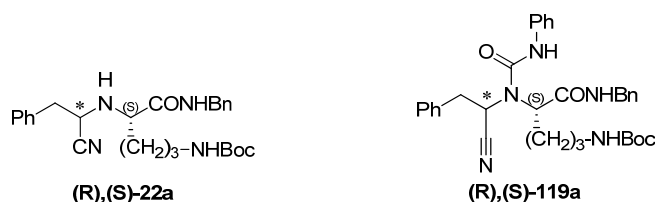
Los espectros de resonancia <sup>1</sup>H-RMN de los  $\alpha$ -ureidonitrilos (**R**)- y (**S**)-119a, en comparación con los de los respectivos  $\alpha$ -aminonitrilos (**R**)- y (**S**)-22a, mostraron un desplazamiento de 1.5-2.0 ppm a campo más bajo para la señal del protón 2-H y de 0.8-1.2 ppm para el  $\alpha$ -H (Tabla 12). En los espectros de resonancia de <sup>13</sup>C-RMN se mantenía la señal característica del grupo CN ( $\approx$  120 ppm) y se observaba la aparición

de un nuevo carbono cuaternario correspondiente al carbonilo de la urea ( $\approx 155$  ppm) (Tabla 12). Todos los datos extraídos de los espectros de RMN indicaban que se había producido un cambio en el entorno de las posiciones  $C_\alpha$  y  $C_2$  del aminonitrilo.

La comparación de los datos de HPLC y de RMN entre los dos epímeros (**R**)- y (**S**)-**119a**, en comparación con los de los correspondientes  $\alpha$ -aminonitrilos (**R**)- y (**S**)-**22a** mostró que:

- A diferencia de los  $\alpha$ -aminonitrilos (**R**)- y (**S**)-**22a**, el tiempo de retención en HPLC del epímero (**R**)-**119a** es mayor que el del (**S**)-**119a**.
- En cuanto a los datos de  $^1\text{H}$ -RMN, en los  $\alpha$ -ureidonitrilos **119a** el protón 2-H, al igual que en los  $\alpha$ -aminonitrilos de partida, aparece más apantallado ( $\approx 0.5$  ppm) en el epímero (**S**) que en el (**R**). El protón  $\alpha$ -H en los  $\alpha$ -ureidonitrilos **119a** también aparece más apantallado ( $\approx 0.4$ ) en (**S**) que en el (**R**), mientras que, en los  $\alpha$ -aminonitrilos **22a** la relación de desplazamientos químicos entre epímeros es inversa.
- En cuanto a los  $^{13}\text{C}$ -RMN, en los  $\alpha$ -ureidonitrilo **119a**, las señales correspondientes a  $C_2$  y  $C_\alpha$  en el epímero (**S**) aparecen apantalladas (2.1-3.4 ppm) con respecto a los (**R**). Sin embargo, en los  $\alpha$ -aminonitrilos **22a** no se observan diferencias significativas.

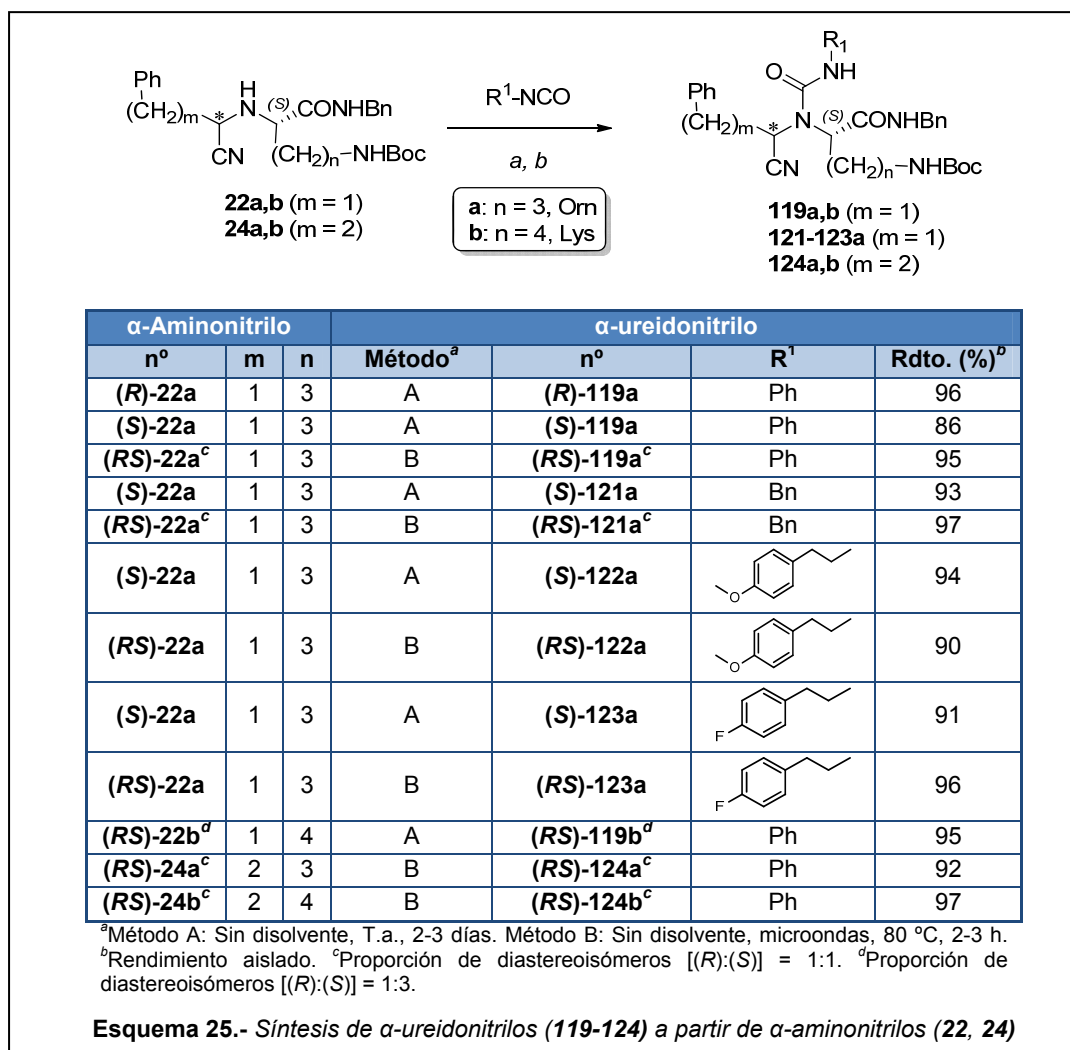
**Tabla 12.-** Comparación de los datos más significativos de HPLC,  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de la  $\alpha$ -ureidonitrilos (**R**)- y (**S**)-**119a** con los  $\alpha$ -aminonitrilos (**R**)- y (**S**)-**22a**.



Compuesto	( <b>R</b> )-22a	( <b>S</b> )-22a	( <b>R</b> )-119a	( <b>S</b> )-119a
HPLC $t_R$ (min) <sup>a</sup>	23.3	23.7	27.7	27.5
$^1\text{H}$ -RMN <sup>b</sup>				
2-H	3.73	3.49	5.58	5.07
$\alpha$ -H	3.28	3.37	4.49	4.08
NH-CON		-		10.33
$^{13}\text{C}$ -RMN <sup>c</sup>				
CN	119.8	119.9	118.7	118.9
$C_2$	51.6	51.1	50.0	53.4
$C_\alpha$	60.4	60.6	59.1	61.5
NHCON	-	-	155.3	154.5

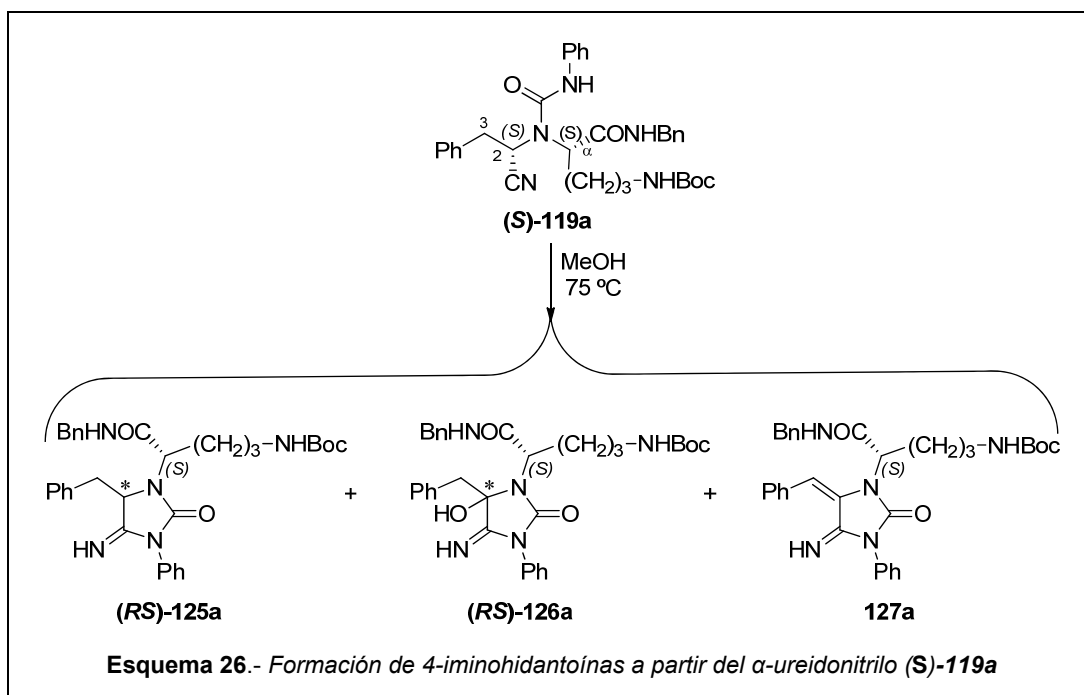
<sup>a</sup>Sunfire  $C_{18}$  (4.6  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>b</sup>Espectros registrados a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$ . Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>c</sup>Espectros registrados a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$ . Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de reacción para la obtención de  $\alpha$ -ureidonitrilos a partir de  $\alpha$ -aminonitrilos, se estudió la versatilidad de la metodología con otros  $\alpha$ -aminonitrilos e isocianatos. Como se muestra en el Esquema 25, el tratamiento de los  $\alpha$ -aminonitrilos (*R*)-, (*S*)-**22a** y (*RS*)-**22b** con el correspondiente isocianato a temperatura ambiente y sin disolvente, dio lugar en todos los casos a los  $\alpha$ -ureidonitrilos (*R*)- y (*S*)-**119a**, (*S*)-**121-123a** y (*RS*)-**119b** en la misma proporción de epímeros que los  $\alpha$ -aminonitrilos de partida y con buenos rendimientos (86-96%) (Método A, Esquema 25). Para el caso de los  $\alpha$ -aminonitrilos (*RS*)-**22a**, **24a** y **24b**, estos se hicieron reaccionar con el correspondiente isocianato sin disolvente calentando a 80 °C durante 2-3 h en microondas para obtener la mezcla 1:1 de epímeros de  $\alpha$ -ureidonitrilos (*RS*)-**121-123a**, **124a,b** con buenos rendimientos (90-97%) (Método B, Esquema 25).



### 2.3.1.2. Síntesis de derivados de 4-iminohidantoína.

La ciclación intramolecular de  $\alpha$ -ureidonitrilos **B** para formar el correspondiente anillo de 4-iminohidantoína **A** (Figura 19, X = NH) se estudió en el epímero (**S**)-**119a**. En primer lugar, de acuerdo con los antecedentes bibliográficos<sup>277</sup>, la ciclación se abordó mediante calefacción a reflujo de MeOH durante 15 min (entrada 1, Tabla 13). En estas condiciones, la mezcla epimérica de 4-iminohidantoínas (**RS**)-**125a** se obtuvo como producto minoritario (9%), junto con los productos de oxidación, las 5-hidroxi-4-iminohidantoínas (**RS**)-**126a**, productos mayoritarios (78%), y la 5-fenilmetilen-4-iminohidantoína **127a** (13%), resultante de la eliminación de H<sub>2</sub>O en (**RS**)-**126a**. Hay que señalar, que recientemente se ha descrito la formación de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas como resultado de la autooxidación de 1,5-dimetil-4-imihohidantoínas en disolución de EtOH<sup>298</sup>. Por ello, con el fin de evitar la oxidación, a continuación, la ciclación de (**S**)-**119a** se estudió mediante calefacción en tolueno a 100 °C en presencia de NEt<sub>3</sub> (entrada 2, Tabla 13). De esta forma, aumentó significativamente el rendimiento de (**RS**)-**125a** (44%) y disminuyó la formación de los productos de oxidación. En vista de este resultado, se estudió la utilización de otros disolventes, como CH<sub>3</sub>CN y otras bases (entradas 3 y 4, Tabla 13), así como la reacción en ausencia de disolvente y bajo irradiación de microondas a 100 °C (entradas 5 y 6, Tabla 13). En estas últimas condiciones, se obtuvieron exclusivamente las 4-iminohidantoínas (**RS**)-**125a**, como mezcla epimérica (1:1), que no pudo ser resulta. De estos estudios se deduce que la utilización de NEt<sub>3</sub> como base, sin disolvente y calefacción a 100 °C durante 5 min por irradiación de microondas conduce cuantitativamente a la obtención de la 4-iminohidantoína (**RS**)-**125a**.



**Tabla 13.-** Influencia de las condiciones de reacción en la formación de 4-iminohidantoínas.

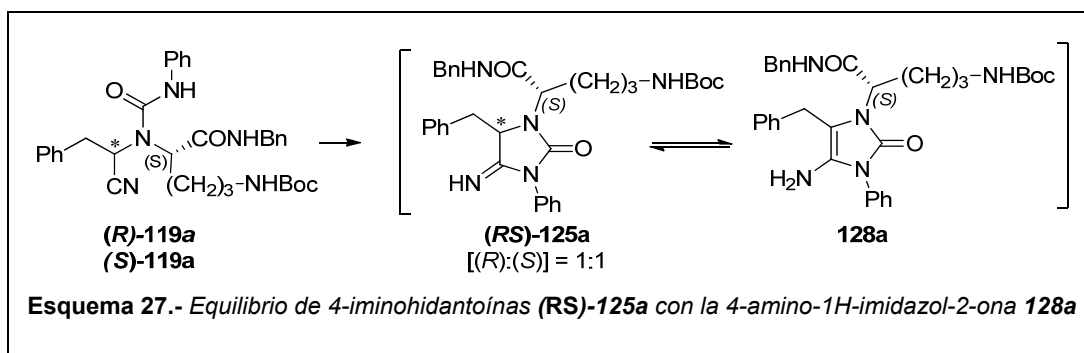
Entrada	Condiciones de reacción				Rendimiento (%) <sup>a</sup>		
	Base	Disolvente	T (°C)	Tiempo	125a	126a	127a
1	-	MeOH	75	15 min	9	78	13
2	NEt <sub>3</sub>	Tolueno	100	30 min	44	30	-
3 <sup>c</sup>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CN	100	15 min	43	-	-
4 <sup>c</sup>	NEt <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CN	100	15 min	88	12	-
5 <sup>c</sup>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	100	5 min	99	-	-
6 <sup>c</sup>	NEt <sub>3</sub>	-	100	5 min	99	-	-

<sup>a</sup>Determinado mediante análisis HPLC del crudo de reacción, utilizando columna Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min, excepto para las entradas 1 y 6 que es rendimiento aislado.

<sup>c</sup>Calefacción mediante irradiación por microondas.

El análisis de los datos HPLC-MS de las 4-iminohidantoínas **(RS)-125a**, mostró la aparición de dos picos a 3.55 y 3.63 min a menor tiempo de retención que el  $\alpha$ -ureidonitrilo de partida **(S)-119a**. El pico del ion molecular  $[M+1]^+$  de cada uno de los picos correspondientes a **(RS)-125a** indicaba una fórmula empírica idéntica a la del  $\alpha$ -ureidonitrilo de partida **(S)-119a**, por lo tanto, ambos compuestos debían ser isómeros. El espectro <sup>1</sup>H-RMN de **(RS)-125a**, en comparación con el del  $\alpha$ -ureidonitrilo **(S)-119a**, mostró la desaparición de las señales características del 2-H y del NH del grupo ureido

de **(S)**-**119a**, la aparición del 5-H a 4.62 ppm y un desplazamiento de  $\approx 0.2$  ppm a campo más bajo para los  $\alpha$ -H. La señal correspondiente al NH del grupo imina no se observó, probablemente debido a su rápido intercambio con el disolvente. En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **(RS)**-**125a** se observó la desaparición de la señal correspondiente al carbono del CN ( $\approx 120$  ppm) y la aparición de dos carbonos terciarios a 57.3 y 58.8 ppm, correspondientes a las señales de los  $\text{C}_5$ , y dos carbonos cuaternarios a 170.2 y 170.3 ppm, respectivamente, correspondientes a los dos C imínicos. Todos estos datos indicaban que la ciclación para dar el anillo de 4-iminohidantoína transcurría con una completa epimerización en el  $\text{C}_5$  del anillo. A la vista de la estructura de este anillo, la epimerización podría explicarse como consecuencia de la existencia de un equilibrio entre la estructura de 4-iminohidantoína **125a** y la de 4-aminoimidazol-2-ona **128a**, en la que se perdería la quiralidad en el  $\text{C}_5$ , tal como se muestra en el Esquema 27.



Se estudió la posibilidad de controlar el equilibrio 4-iminohidantoína $\rightleftharpoons$ 4-aminoimidazol-2-ona con las condiciones de reacción, tales como el disolvente, temperatura y tiempo de reacción. Los resultados de este estudio se analizaron por HPLC. Como se muestra en la Tabla 14, las iminohidantoínas **(RS)**-**125a** se observaron cuantitativamente, como único producto de reacción, cuando la reacción se llevó a cabo sin disolvente, utilizando  $\text{NEt}_3$  como base y calentando a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  en microondas, independientemente del tiempo de reacción y del epímero de partida (entradas 1-4, Tabla 14). Sin embargo, al realizar la reacción sin base y utilizando MeOH como disolvente a temperatura ambiente, después de 1 h de reacción, se observó la formación de la 4-aminoimidazol-2-ona **128a** como único producto de reacción (entradas 5 y 7). Mientras que, después de 24 h, se observó la formación de las especies 4-iminohidantoínas **(RS)**-**125a** (40-47%), junto con los productos de oxidación **(RS)**-**126a**, (entradas 6 y 8). Estos resultados indicaban que la preferencia hacia una especie u otra

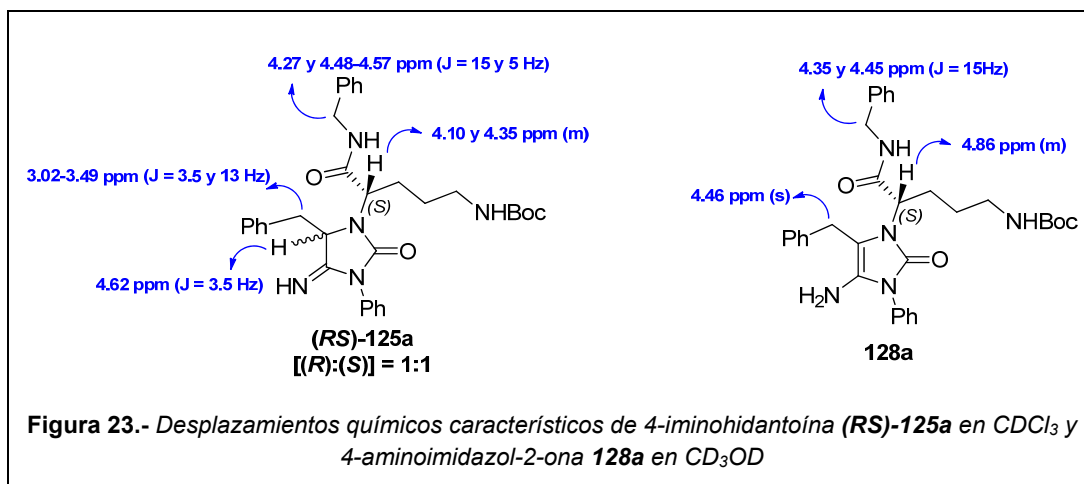
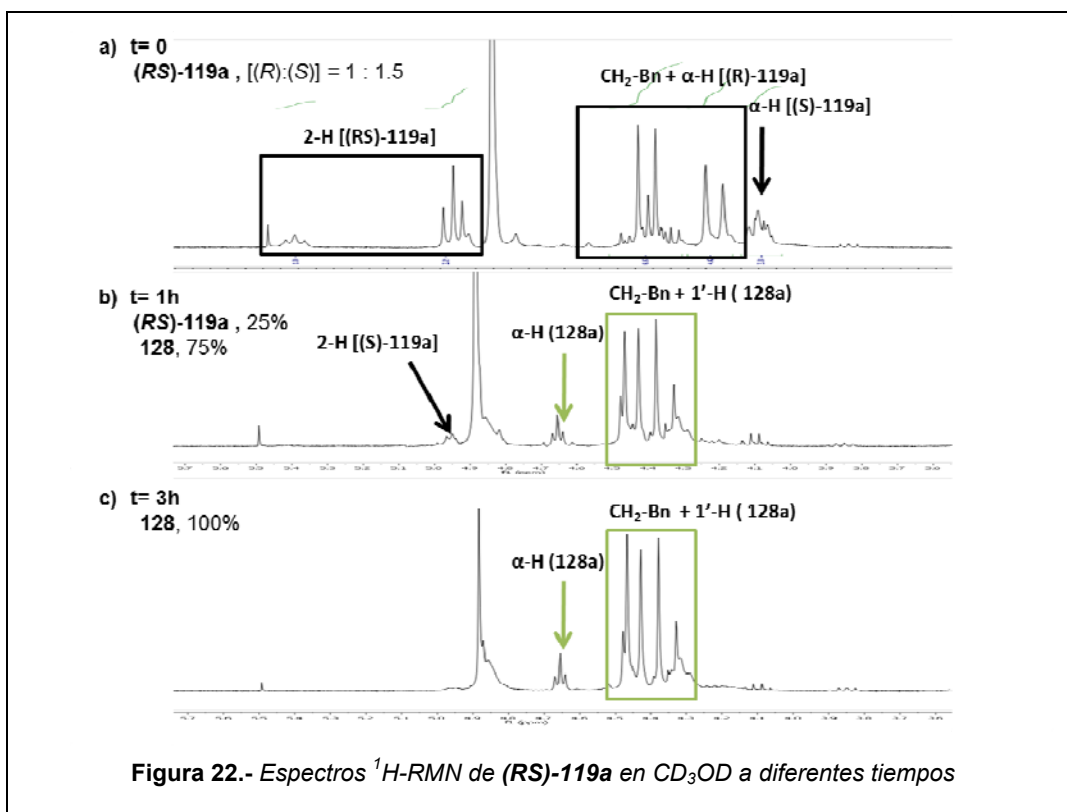
era dependiente del disolvente utilizado, estando el equilibrio desplazado hacia la 4-aminoimidazol-2-ona (**128a**) en disolventes polares, mientras que, sin disolvente o en disolventes apolares (como el  $\text{CDCl}_3$  utilizado para los espectros RMN) estaba desplazado hacia las 4-iminohidantoínas (**(RS)-125a**).

**Tabla 14.-** Influencia de las condiciones de reacción en el equilibrio **(RS)-125a**  $\rightleftharpoons$  **128a** .

Entrada	Aminonitrilo	Condiciones de reacción				Rendimiento (%) <sup>a</sup>	
	Nº	Base	Disolvente	T (°C)	Tiempo	(RS)-125a	128a
1 <sup>b</sup>	(S)-119a	NEt <sub>3</sub>	-	100	5 min	100	0
2 <sup>b</sup>	(S)-119a	NEt <sub>3</sub>	-	100	20 min	100	0
3 <sup>b</sup>	(R)-119a	NEt <sub>3</sub>	-	100	5 min	100	0
4 <sup>b</sup>	(R)-119a	NEt <sub>3</sub>	-	100	20 min	100	0
5	(S)-119a	-	MeOH	T.a.	1 h	0	100
6 <sup>c</sup>	(S)-119a	-	MeOH	T.a.	24 h	47	0
7	(R)-119a	-	MeOH	T.a.	1 h	0	100
8 <sup>c</sup>	(R)-119a	-	MeOH	T.a.	24 h	40	0

<sup>a</sup>Determinado por el HPLC del crudo de reacción. Columna Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>b</sup>Calefacción por irradiación de microondas. <sup>c</sup>Se forma el producto de oxidación **(RS)-126a** en un 53% para la entrada 6 y en un 60% para la entrada 8.

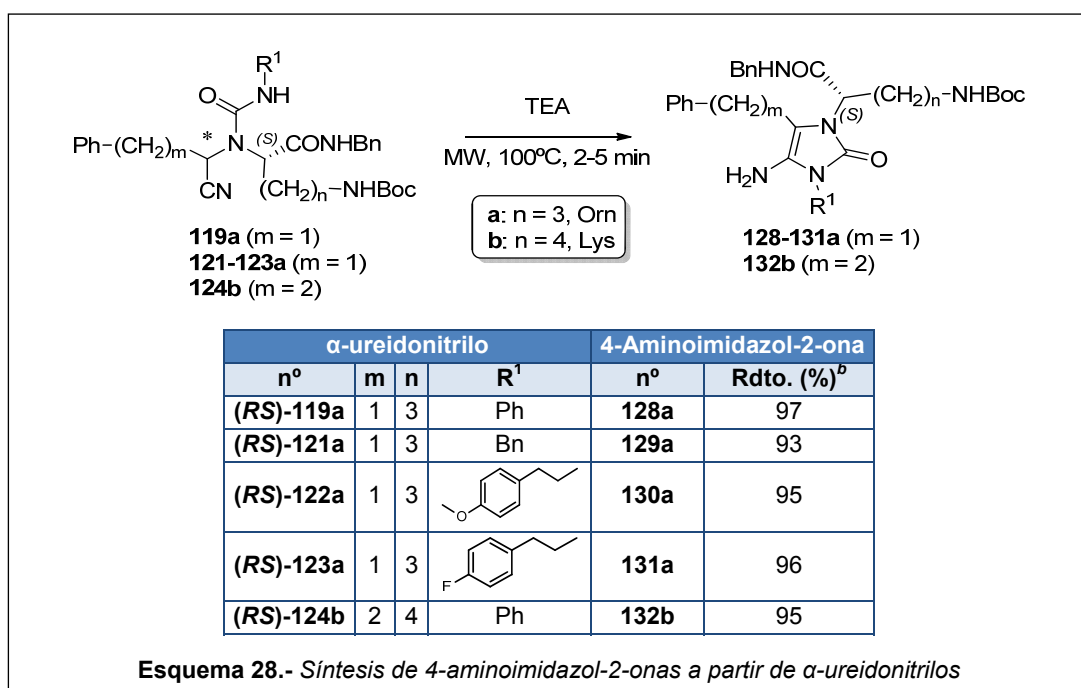
Para confirmar los resultados, se estudió del comportamiento de una mezcla [(R):(S)] = (1:1.5) de los α-ureidonitrilos **(RS)-119a** en CD<sub>3</sub>OD, siguiendo la reacción a diferentes tiempos por <sup>1</sup>H-RMN (Figura 22). A tiempo inicial, se observaron las señales correspondientes a las parejas de protones 2-H, α-H y NHBn características de **(RS)-119a** (Figura 22, a). Al cabo de 3 h de reacción (Figura 22, c), el espectro se había simplificado mostrando la desaparición de las señales de los protones 2-H y α-H de **(RS)-119a**, y la aparición de un multiplete a 4.86, correspondiente al α-H de **128a**, de dos dobletes a 4.35 y 4.45 ppm, correspondientes a los protones metilénicos del NHBn, indicativo de la presencia de un solo isómero. Si comparamos el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la forma 4-aminoimidazol-2-ona **128a** en CD<sub>3</sub>OD con el **(RS)-125a** en CDCl<sub>3</sub>, mostró la desaparición de los 5-H y la simplificación de las señales de 5-CH<sub>2</sub> de **128a** a un singlete a 4.46 ppm, en comparación con el doblete de dobletes de **(RS)-125a** (Figura 23).



Dado que los estudios del equilibrio sugerían su desplazamiento hacia la forma 4-aminoimidazol-2-ona **128a** en disolventes polares, y teniendo en cuenta que los ensayos biológicos se realizan en disolventes polares, para facilitar la discusión de resultados, a

estos compuestos se les asignó la estructura de 4-aminoimidazol-2-ona **128a**, con la que evitábamos el tener que arrastrar la mezcla de epímeros.

Seguidamente, se estudió la versatilidad de la ciclación intramolecular de diferentes  $\alpha$ -ureidonitrilos con el fin de obtener las correspondientes 4-aminoimidazol-2-onas. Para ello, los  $\alpha$ -ureidonitrilos **119a**, **121-123a** y **124b** se calentaron a 100 °C en microondas durante 5 min, utilizando  $\text{NEt}_3$  como base. De esta forma, se obtuvieron las 4-amino-1H-imidazol-2-onas **128-131a** y **132b** con rendimientos superiores al 95%. Aunque en los análisis de HPLC estos compuestos mostraban un alto grado de pureza, debido a su equilibrio en disolución con las correspondientes 4-iminohidantoínas y a la fácil oxidación de estas con el oxígeno atmosférico, sus espectros de RMN presentaron baja resolución, lo que dificultó su asignación. Hay que señalar que en la bibliografía hemos encontrado muy pocos precedentes de compuestos análogos con estructura de 4-iminohidantoína o de 4-aminoimidazol-2-ona<sup>277,299,300</sup>.

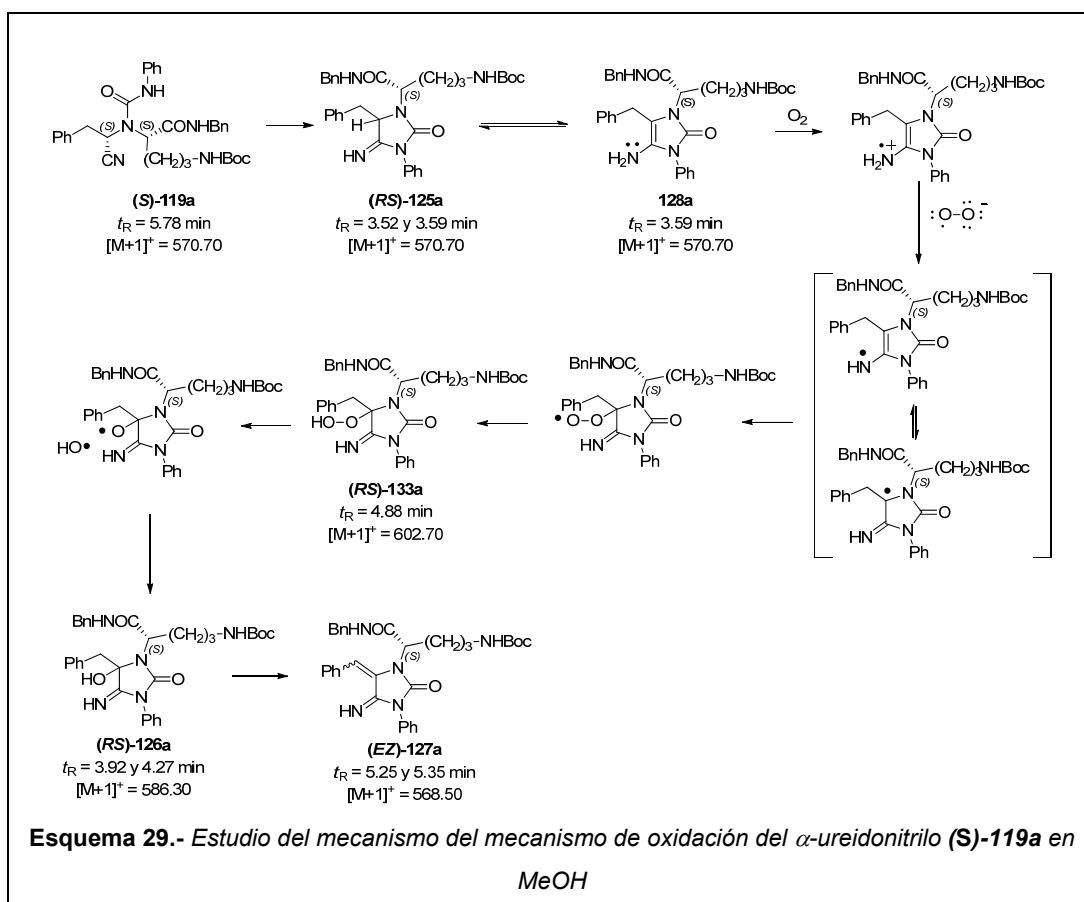


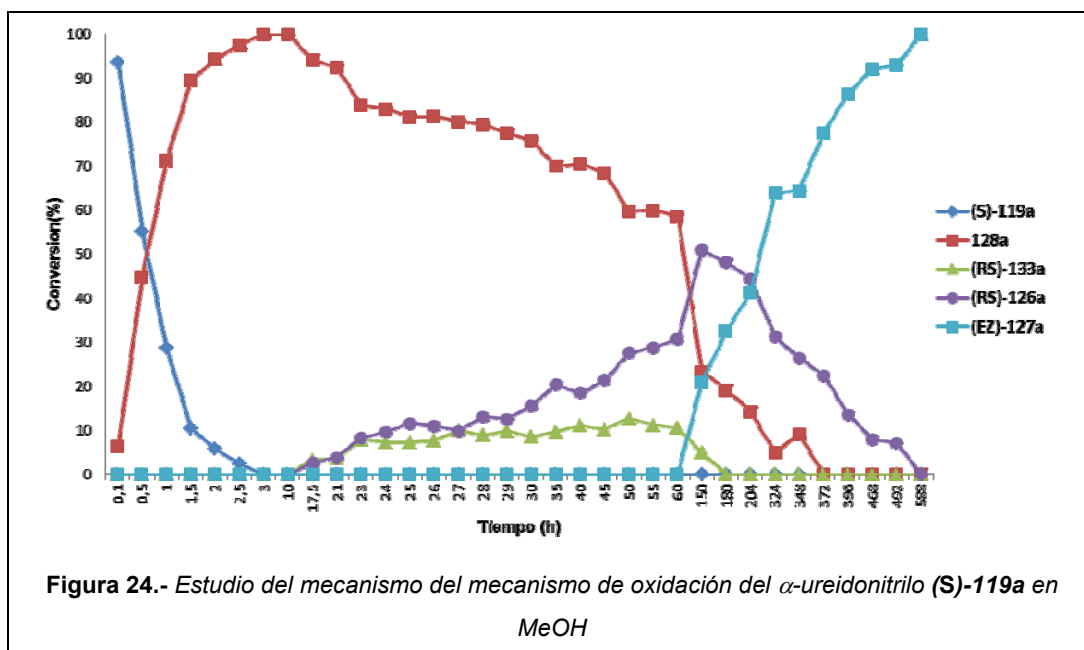
El análisis de HPLC-MS de la mezcla epimérica de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas (**RS**)-**126a** mostró la presencia de 2 picos a 3.92 y 4.27 min, a mayor tiempo de retención que las respectivas 4-iminohidantoínas (**RS**)-**125a** (3.52 y 3.59 min). Por otra parte, el espectro de masas de (**RS**)-**126a**, presentaba un pico para el ion molecular  $[\text{M}+1]^+$  de 586.34  $m/z$ , con 16 unidades de masa más que las 4-iminohidantoínas (**RS**)-**125a**. El

espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **(RS)-126a**, en comparación con el de los respectivos  $\alpha$ -ureidonitrilos **(RS)-119a**, mostró la desaparición de las señales correspondientes al 2-H y al NH del grupo ureido. Mientras que, en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observó la desaparición de las señales correspondientes al CN ( $\approx 119$  ppm) y a los carbonos  $\text{C}_2$  de los ureido-nitrilos ( $\approx 50.0$  y  $53.4$  ppm), así como la aparición de dos nuevos carbonos cuaternarios ( $\approx 172.0$  ppm), correspondientes a los carbonos imínicos de los dos epímeros **(RS)-126a**. Si comparamos el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de las 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **(RS)-126a** con el de las 4-iminohidantoínas **(RS)-125a**, se observa la desaparición de los protones 5-H ( $\approx 4.60$  ppm) y la aparición de dos dobletes a  $2.87$  y  $3.47$  ppm correspondientes a los protones metilénicos del  $5\text{-CH}_2$ , en lugar de los dos dobletes de **(RS)-125a**. El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN mostró la desaparición de los dos carbonos terciarios  $\text{C}_5$  de **(RS)-125a** y la aparición de dos carbonos cuaternarios a  $87.9$  y  $88.9$  ppm, respectivamente, correspondientes a los  $\text{C}_5$  de **(RS)-126a**.

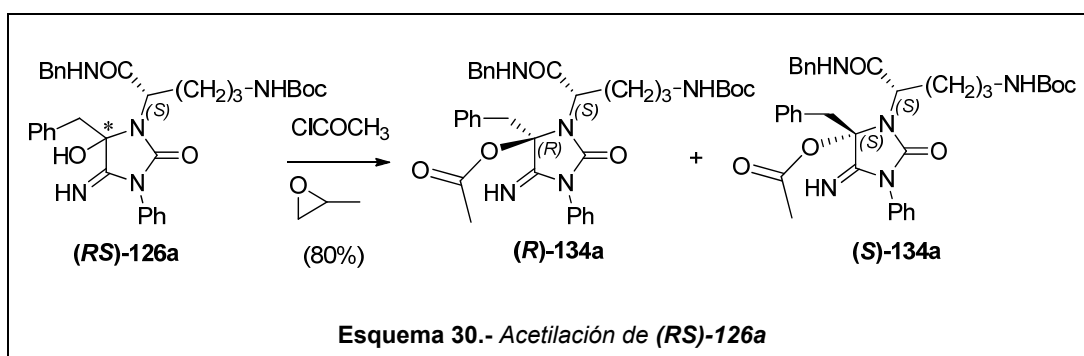
Como ya se ha comentado, publicaciones recientes explican la formación de derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoína a partir de 1,5-dimetil-4-iminohidantoínas<sup>298,301</sup> en EtOH, basándose en un mecanismo de autooxidación de enaminas, en el que estaría implicado el oxígeno atmosférico. Angelova *et al.*<sup>45</sup> realizaron un estudio sencillo por  $^1\text{H}$ -RMN, para justificar la formación del derivado de 5-hidroxi-4-iminohidantoína a partir de la 4-iminohidantoína. Por otra parte, Törnqvist *et al.*<sup>301</sup> utilizaron  $^{18}\text{O}_2$  para marcar el producto final de reacción, y justificar la importancia del oxígeno atmosférico. Con el objetivo de analizar con mayor profundidad el mecanismo de formación de nuestros derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **(RS)-125a**, se estudió el mecanismo de oxidación, siguiendo la reacción mediante HPLC-MS. Para ello, se llevó a cabo la reacción de **(S)-119a** en MeOH en un vial abierto a la atmósfera y a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó por HPLC-MS a diferentes tiempos. Las especies formadas se identificaron a partir de su tiempo de retención y de su espectro de masas. El cálculo de las conversiones se realizó a partir de la medida del área de los picos para, finalmente, representar la conversión en las diferentes especies en función del tiempo de reacción. Como se muestra en el esquema 29 y la Figura 24, al cabo de 3 h de reacción, se ha producido la completa ciclación intramolecular de **(S)-119a** para formar el derivado de 4-aminoimidazol-2-ona (**128a**), que fácilmente puede oxidarse con el oxígeno atmosférico formándose los correspondientes 5-peroxi derivados **(RS)-133a**, que son precursores de **(RS)-126a**. Entre las 5 y las 125 h de reacción, la formación de **(RS)-133** es constante, esto es debido a que, inmediatamente que se forman estos derivados, se

transforman en los 5-hidroxi derivados **(RS)-126a**, incrementándose su conversión linealmente. A partir de las 200 h de reacción, se produce un descenso en la formación de **(RS)-126a**, aumentando la formación de producto de eliminación de H<sub>2</sub>O, **(EZ)-127a**, que después de 500 h llega a ser el único producto de reacción. La velocidad de la reacción ciclación-oxidación de **(S)-119a** aumenta cuando burbujeamos con oxígeno, mientras que, si burbujeamos la reacción con argón, la velocidad de la reacción desciende considerablemente. Por lo tanto, el derivado de 4-aminoimidazol-2-ona (**128a**) en MeOH es rápidamente oxidado en presencia del oxígeno atmosférico, formándose las 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **(RS)-126a**. En los espectros de masas de los análisis HPLC-MS de los crudos de reacción se detectaron especies como los intermedios **(RS)-133a**, que apoyan y justifican experimentalmente el mecanismo propuesto por otros autores<sup>298,301</sup>.



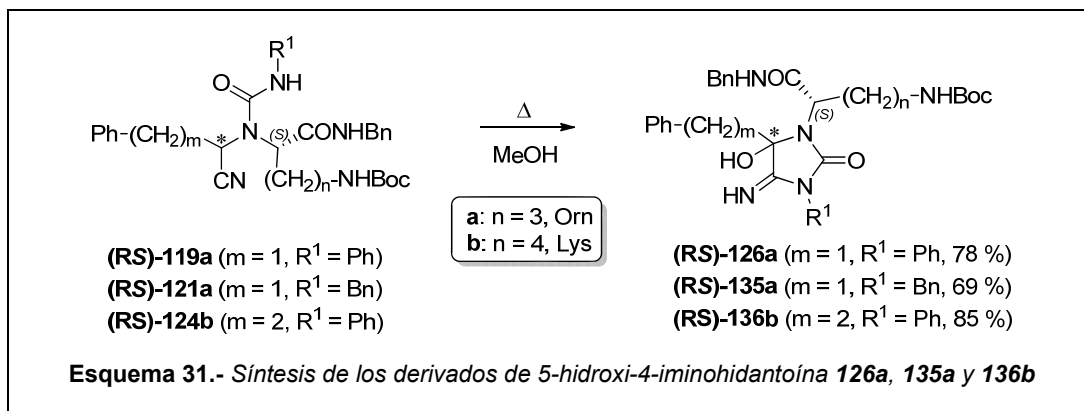


Con el fin de ayudar a la caracterización estructural de **(RS)-126a** y para explorar la reactividad del ciclo de 5-hidroxi-4-iminohidantoína, se estudió su acetilación. Como se muestra en el Esquema 30, la reacción de **(RS)-126a** con cloruro de acetilo, en presencia de óxido de propileno como aceptor de HCl, condujo a los O-acetil derivados **(R)-134a** y **(S)-134a** en un 80% de rendimiento, que fueron separados cromatográficamente, aunque no pudo asignarse la configuración absoluta en el C<sub>5</sub>, portador del grupo acetoxilo.

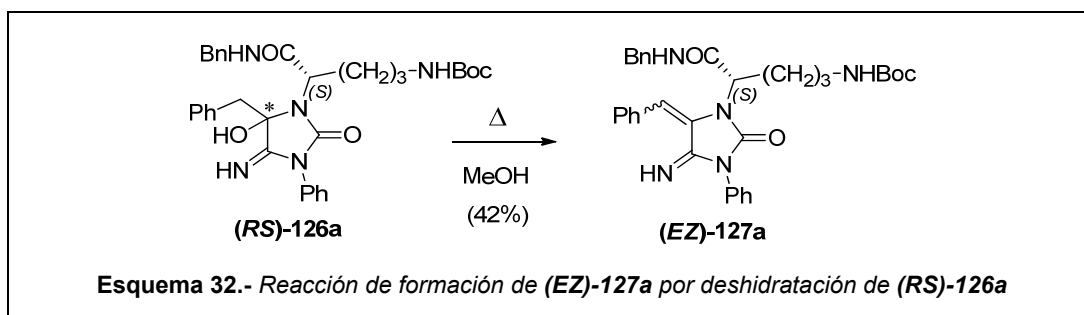


Una vez establecidas las condiciones óptimas para la ciclación oxidativa de los  $\alpha$ -ureidonitrilos **119**, se estudió la versatilidad de dicha reacción para los  $\alpha$ -ureidonitrilos

**(RS)-121a** y **(RS)-124b**. En todos los casos la calefacción en MeOH durante 1-2 h, condujo a las correspondientes 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **(RS)-135a** y **(RS)-136b** con buenos rendimientos (69-85%). Al igual que **(RS)-126a**, estas mezclas epiméricas (1:1) no pudieron ser resueltas (Esquema 31).



Por último, se abordó la reacción de deshidratación mediante calefacción a reflujo de MeOH de las 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **(RS)-126a**, para obtener la mezcla de los correspondientes isómeros **(EZ)-127a** (42%) en proporción (1:1), que tampoco pudieron ser resueltas (Esquema 32). Es de señalar que en estas condiciones, las 5-hidroxi-4-iminohidantoínas análogas **(RS)-136b** no dieron lugar a los productos de deshidratación, sino que condujeron a mezclas complejas de productos de descomposición. Este resultado indicó que la deshidratación solo se da cuando el doble enlace generado está conjugado con el anillo aromático.



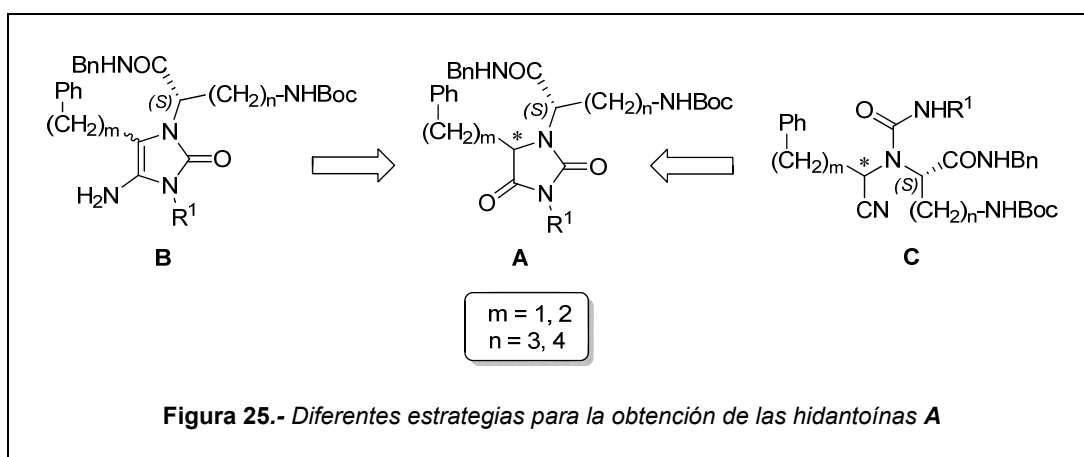
El análisis de los datos de HPLC-MS de **(EZ)-127a** mostró la aparición de dos picos a 5.25 y 5.35 min, a mayor tiempo de retención que **(RS)-126a**; ambos picos

presentaban en el análisis de masas un pico de ion molecular  $[M+1]^+$  de 569.44  $m/z$ , con 18 unidades de masa menor que **(RS)-126a**. El espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **(EZ)-127a**, mostró la desaparición de los protones metilénicos del 5- $\text{CH}_2$  ( $\approx$  2.87-3.47 ppm), así como la aparición de dos singles a 6.26 y 6.30 ppm, correspondientes a los nuevos protones olefínicos 5-CH. En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observó la desaparición de los carbonos metilénicos del 5- $\text{CH}_2$  ( $\approx$  43.8 ppm) y de los  $\text{C}_5$  (87.9 y 88.9 ppm), así como la aparición de dos nuevos carbonos a 113.7 y 114.4 ppm, correspondientes al nuevo carbono olefínico del 5-CH.

2.3.1.3. Síntesis de hidantoínas

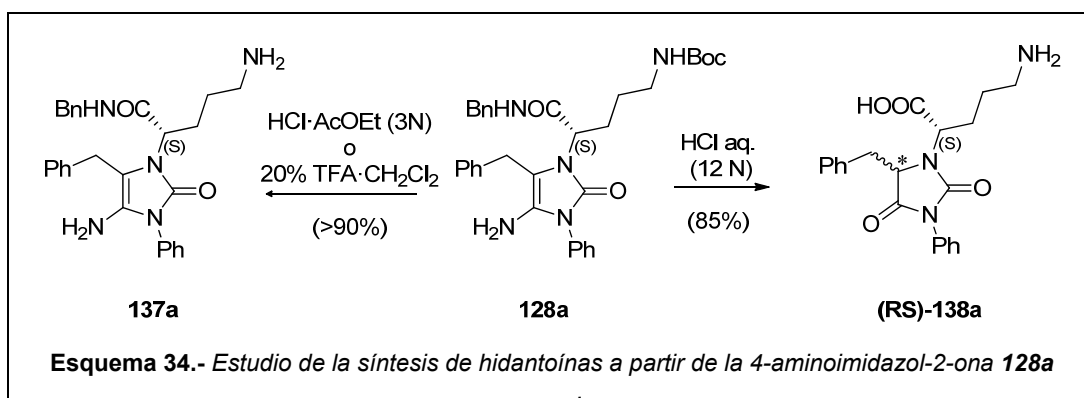
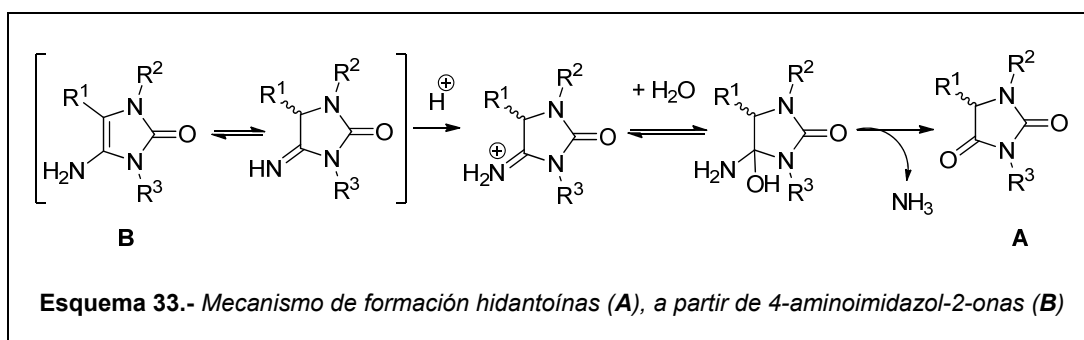
Para la preparación de hidantoínas de fórmula general **A**, indicadas en la Figura 25, se plantearon dos rutas alternativas:

- Síntesis a partir de los derivados de 4-amino-1*H*-imidazol-2-ona **B**.
- Síntesis a partir de los  $\alpha$ -ureidonitrilos **C**.

2.3.1.3.1. Síntesis de hidantoínas a partir de 4-amino-1*H*-imidazol-2-onas.

En el Esquema 33, se indica el mecanismo por el cual la hidrólisis de 4-aminoimidazol-2-onas **B** podría dar lugar a las correspondientes hidantoínas **A**. Las condiciones descritas en bibliografía, implicaban la hidrólisis por tratamiento con ácidos fuertes, tales como HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrados<sup>276</sup>. Estos medios ácidos eran incompatibles con la presencia del grupo protector Boc en la cadena lateral del amino ácido, y por ello, inicialmente, nos planteamos estudiar la utilización de condiciones más suaves, que nos permitiesen mantener dicho grupo. Este estudio se realizó utilizando la 4-aminoimidazol-2-ona derivada de ornitina **128a** como modelo. En primer lugar, **128a** fue tratada con disoluciones diluidas (0.1-1N) de HCl en AcOEt o de AcOH en MeOH, recuperándose en todos los casos el producto de partida inalterado. A continuación, como se muestra en el Esquema 34, se aplicaron las condiciones estándar de eliminación del grupo Boc, es decir tratamiento con disolución de HCl 3 N en AcOEt o disolución de TFA al 20% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Aplicando estas condiciones, se eliminó el grupo protector Boc, pero el anillo de 4-aminoimidazol-2-ona permaneció inalterado,

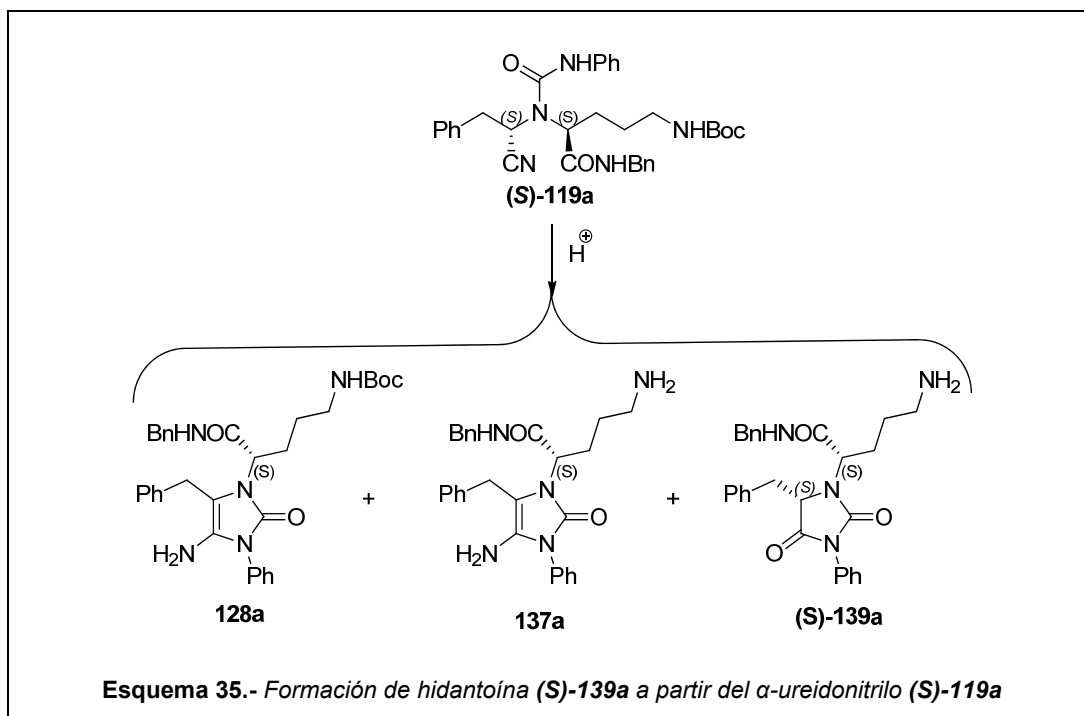
obteniendo la 4-aminoimidazol-2-ona **137a**, con rendimientos superiores al 90%. En vista de la resistencia del anillo de 4-aminoimidazol-2-ona a la hidrólisis, finalmente, se decidió aplicar las condiciones descritas<sup>276</sup>, que suponían el reflujo en HCl concentrado (12N). De esta forma, se consiguió la hidrólisis del anillo de 4-aminoimidazol-2-ona, pero con la simultánea hidrólisis del grupo bencilamida, obteniendo la hidantoína derivada de ornitina **138** con un 85 % de rendimiento.



### 2.3.1.3.2. Síntesis de hidantoínas a partir de $\alpha$ -ureidonitrilos.

Ante la dificultad de obtener los derivados de hidantoína **A** a partir de las 4-aminoimidazolonas **B** sin eliminación del grupo Boc, como alternativa, se planteó la síntesis de estos derivados a partir de los  $\alpha$ -ureidonitrilos **C** por ciclación en medio ácido. Para ello, inicialmente, se estudió el tratamiento del  $\alpha$ -ureidonitrilo (**S**)-**119a** con diferentes concentraciones de HCl en AcOEt (Esquema 35, Tabla 15). El tratamiento con disolución 0.1 N de HCl en AcOEt condujo a la formación de la 4-aminoimidazol-2-ona **128a** como único producto de reacción (entrada 1, Tabla 15). Este resultado nos indicó

que la ciclación de los  $\alpha$ -ureidonitrilos para dar el anillo de 4-aminoimidazol-2-ona podía realizarse tanto en medios básicos como en medios ligeramente ácidos. Al aumentar la concentración de HCl a 0.3 N de HCl (entrada 2, Tabla 15) se empezó a observar la eliminación del grupo protector Boc, junto con la ciclación. Fue necesario aumentar la concentración de HCl hasta 3 N (entrada 3, Tabla 15) para observar la formación del anillo de hidantoína de **(S)**-139a. Esta ciclación, con simultánea eliminación del grupo Boc, fue casi cuantitativa en HCl concentrado (12 N) o en disolución de TFA al 20% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En estos casos, no se produjo la hidrólisis del grupo bencilamida. Además, hay que señalar que no se observó epimerización en el  $\text{C}_5$  de **(S)**-139a.

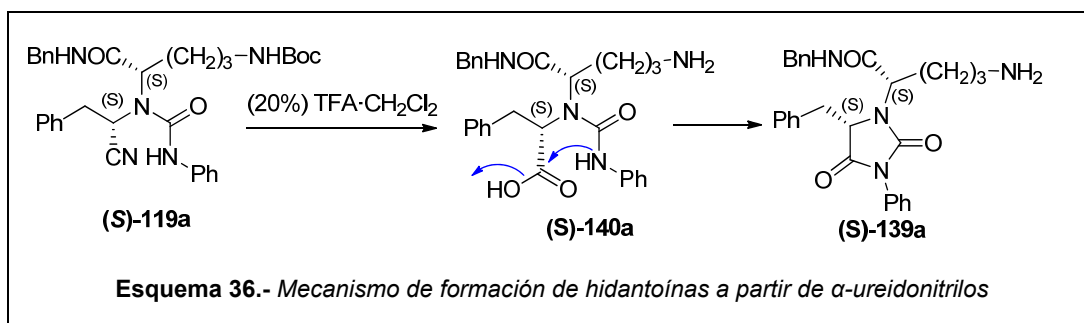


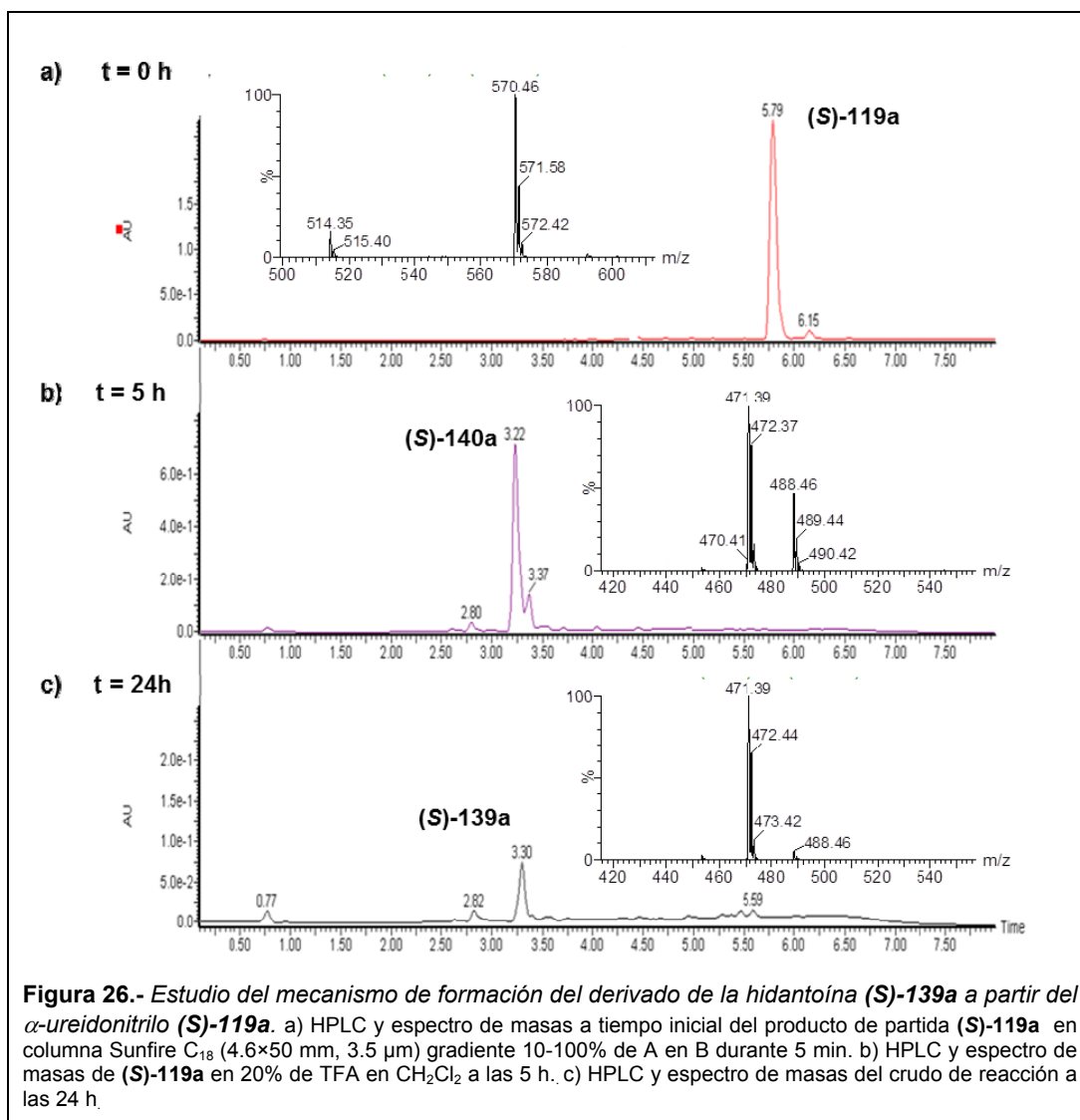
**Tabla 15.-** Influencia de del medio ácido en la ciclación del  $\alpha$ -ureidonitrilo **(S)**-119a.

Entrada	Condiciones de reacción			Rendimiento (%) <sup>a</sup>		
	Medio ácido	T (°C)	Tiempo	128a	137a	(S)-139a
1	HCl/AcOEt (0.1 N)	T.a.	3 días	95	-	-
2	HCl/AcOEt (0.3 N)	T.a.	15 min	62	38	-
3	HCl/AcOEt (3 N)	T.a.	30 min	-	55	45
4 <sup>b</sup>	20% TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	T.a.	24 h	-	-	95
5 <sup>b</sup>	HCl (12 N)	100	30 min	-	-	85

<sup>a</sup>Determinado mediante HPLC del crudo de reacción. Columna Sunfire  $\text{C}_{18}$  (4.6  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>b</sup>Rendimiento aislado.

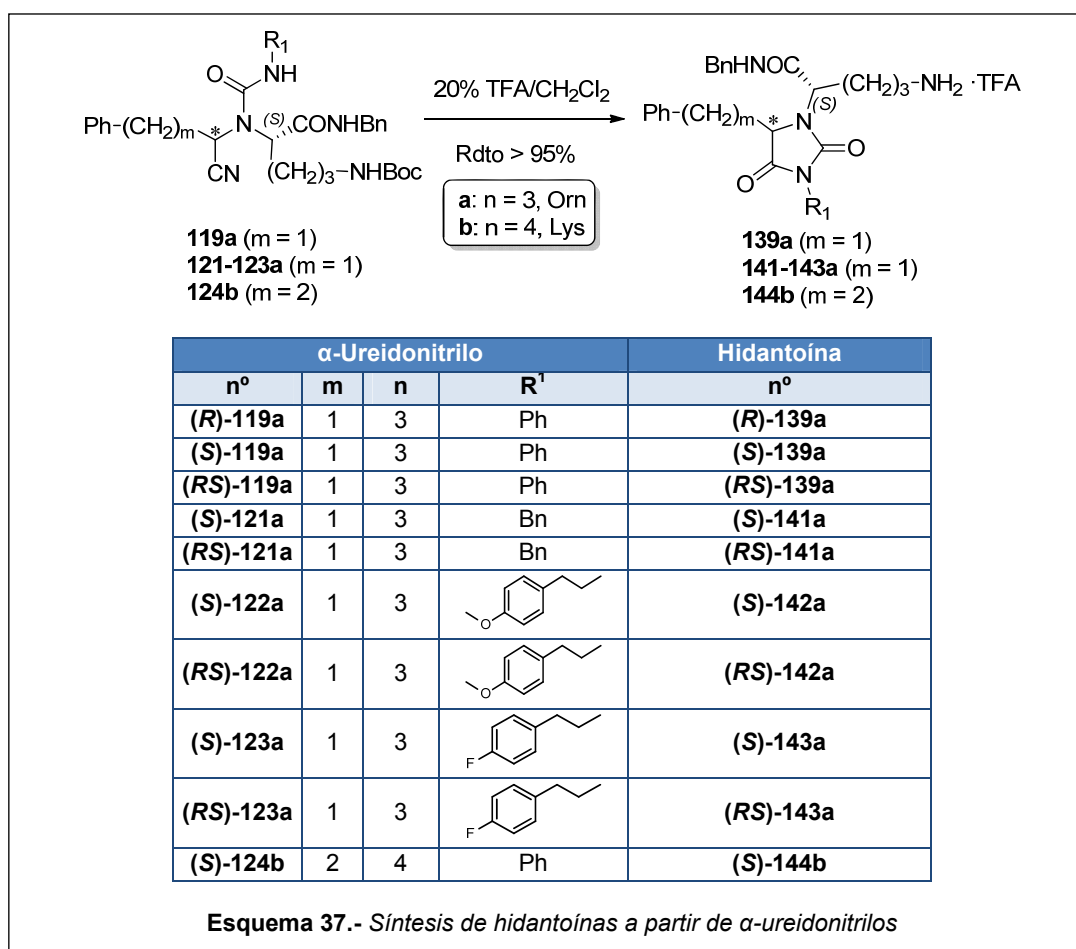
Este diferente comportamiento con respecto a cuando la hidantoína se obtenía a través de la ciclación del mismo  $\alpha$ -ureidonitrilo a las 4-iminohidantoínas/4-aminoimidazolona, seguida de hidrólisis, proceso en el que, como se ha comentado, se producía la epimerización completa, nos indicó que el mecanismo debería ser diferente y que la ciclación del  $\alpha$ -ureidonitrilo en medio ácido fuerte no debería transcurrir a través de las estructuras de 4-iminohidantoínas/4-aminoimidazolona. Por ello, se realizó el estudio detallado del mecanismo de reacción. Para ello, mediante HPLC-MS se monitorizó a diferentes tiempos la transformación de **(S)-119a** en disolución de TFA al 20% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Como se indica en la Figura 26, después de 5 h de reacción, **(S)-119a** ( $t_R = 5.79$  min,  $[\text{M}+1]^+ = 570.46$ ) había desaparecido por completo y aparecía un pico muy mayoritario a menor tiempo de retención ( $t_R = 3.22$  min) con un pico de ion molecular  $[\text{M}+1]^+$  de  $488.46$   $m/z$ , que coincide con la masa del producto de hidrólisis del CN a COOH y eliminación del grupo Boc [**(S)-140a**, Esquema 36]. Al cabo de 24 h, el ácido intermedio **(S)-140a** había desaparecido por completo y se observaba un nuevo pico a 3.30 min con ion molecular  $[\text{M}+1]^+$  de  $471.99$   $m/z$ , que correspondía a la hidantoína **(S)-139a**. En paralelo, la transformación de **(S)-119a** se monitorizó también por  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ , en lugar de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Los resultados confirmaron el mecanismo indicado en el Esquema 35.





**Figura 26.- Estudio del mecanismo de formación del derivado de la hidantoína (S)-139a a partir del  $\alpha$ -ureidonitrilo (S)-119a.** a) HPLC y espectro de masas a tiempo inicial del producto de partida (S)-119a en columna Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×50 mm, 3.5  $\mu$ m) gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. b) HPLC y espectro de masas de (S)-119a en 20% de TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a las 5 h. c) HPLC y espectro de masas del crudo de reacción a las 24 h.

A la vista de los resultados del estudio del mecanismo de ciclación de  $\alpha$ -ureidonitrilos a través de hidrólisis para dar hidantoínas y teniendo en cuenta el estudio de optimización de condiciones de reacción recogido en la Tabla 15, tal como se muestra en el Esquema 37, se prepararon las hidantoínas **139**, **141-144** por tratamiento de los correspondientes  $\alpha$ -ureidonitrilos **119**, **121-124** con disolución de TFA al 20% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 24 h.



### 2.3.2. Evaluación Biológica

Los α-ureidonitrilos, las 4-aminoimidazol-2-onas y las hidantoínas incluidas en este capítulo fueron también evaluadas como inhibidores de la agregación de plaquetas humanas y como citotóxicos en cultivos de células de cáncer humano. Sin embargo, ninguno de estos compuestos mostró actividad significativa en estas evaluaciones.

### 2.3.3. Conclusiones

Del conjunto de resultados comentados en este capítulo, se deduce que los  $\alpha$ -ureidonitrilos son moléculas con una reactividad camaleónica susceptible de ser controlada y dirigida en función las condiciones de reacción, para dar lugar a derivados de 4-iminohidantoínas/4-aminoimidazol-2-onas, 5-hidroxi-4-iminohidantoínas e hidantoínas, que son pentaheterociclos de alto interés en Química Médica. Esta observación se puede concretar en las siguientes conclusiones:

- Se ha puesto a punto la síntesis de  $\alpha$ -ureidonitrilos altamente funcionalizados, derivados de  $\alpha$ -aminoácidos, mediante reacción de los correspondientes  $\alpha$ -aminonitrilos con isocianatos, sin disolvente y a temperatura ambiente. Este proceso transcurre sin epimerización en el carbono que soporta el grupo ciano. El proceso se activa considerablemente cuando se realiza a 80 °C, bajo irradiación de microondas. Sin embargo, en estas condiciones los  $\alpha$ -ureidonitrilos epimerizan completamente. Se ha demostrado que la epimerización tiene lugar en los  $\alpha$ -ureidonitrilos y no en los  $\alpha$ -aminonitrilos de partida.
- La calefacción de los  $\alpha$ -ureidonitrilos a 100 °C, mediante irradiación con microondas, en presencia de una base y ausencia de disolvente produce su ciclación a derivados de 4-iminohidantoínas que están en equilibrio con su forma tautómera de 4-aminoimidazol-2-ona. En disolución, este equilibrio está controlado por el disolvente. En disolventes apolares, como el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , la estructura de 4-iminohidantoína es predominante, mientras que en disolventes polares, como el MeOH, predomina la estructura de 4-aminoimidazol-2-ona. Debido a este equilibrio tautomérico, la ciclación procede con completa epimerización en el carbono 5 del anillo pentaheterocíclico.
- La ciclación de los  $\alpha$ -ureidonitrilos puede realizarse en ausencia de medio básico, en cuyo caso, el proceso es significativamente más lento y va acompañado de oxidación de las 4-aminoimidazol-2-onas formadas a 5-hidroxi-4-iminohidantoínas. Esta oxidación es completa cuando la ciclación se lleva a cabo en disolución de MeOH. Las 5-bencil-5-hidroxi-4-iminohidantoínas, por calefacción, se deshidratan para dar los correspondientes 5-benciliden- derivados.

- 
- Tanto las 4-iminohidantoínas/4-aminoimidazol-2-onas como las 5-hidroxi-4-iminohidantoínas son heterociclos para los cuales se han encontrado pocos precedentes en la bibliografía.
  - La conversión de las 4-iminohidantoínas en las correspondientes hidantoínas, mediante hidrólisis, requiere calefacción en medio ácido fuerte, como HCl 12 N, que es incompatible con la presencia en la molécula de grupos protectores Boc o del grupo bencilamida.
  - La hidrólisis de  $\alpha$ -ureidonitrilos, a temperatura ambiente, por tratamiento con HCl 12 N o disolución de TFA al 20% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, conduce sin epimerización a las correspondientes hidantoínas, objetivo sintético de este capítulo, aunque con simultánea eliminación del grupo protector Boc de la cadena lateral del aminoácido básico que integra la estructura.
  - Aunque los estudios comentados en este capítulo han resultado muy fructíferos desde el punto de vista químico-sintético, los resultados biológicos no nos han permitido acercarnos a los objetivos biológicos planteados: búsqueda de nuevos antagonistas para los receptores de trombina PAR1 y de compuestos antitumorales.



### **3. CONCLUSIONES GENERALES**



---

### 3. CONCLUSIONES GENERALES

- A partir de los recientes estudios estructurales sobre la interacción de trombina con su receptor PAR1, dentro de un amplio programa de búsqueda de agentes antiangiogénicos innovadores, se ha propuesto una hipótesis general para el diseño de potenciales antagonistas de los receptores PAR1. Esta hipótesis se ha definido como una estructura general constituida por un esqueleto central portador de, al menos, tres puntos de diversidad molecular para el anclaje de los grupos definidos como farmacofóricos para la interacción de alta afinidad entre trombina y PAR1, es decir: uno o dos grupos aromáticos y uno o dos grupos de carácter básico, anclados a distancias y con orientación diversa.
- Para explorar la validez de la hipótesis, se han sintetizado 3 colecciones de compuestos quirales, derivados de aminoácidos básicos, en los que el esqueleto central se ha variado entre ureas lineales, derivados de 2-oxopiperazina y diversos sistemas pentaheterocíclicos, tales como 4-aminoimidazol-2-onas, 4-iminohidantoínas e hidantoínas.
- Para la síntesis de las estructuras propuestas, se ha aplicado una estrategia de síntesis orientada a la diversidad, preparando las tres series de compuestos a partir de intermedios de síntesis comunes,  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de  $\alpha$ -aminoácidos básicos, y aplicando esquemas de síntesis con etapas de ramificación de la diversidad.
- Se ha prestado especial atención a la estereoselectividad de los esquemas sintéticos o a la resolución de estereoisómeros. La síntesis de las estructuras propuestas ha requerido el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas, incluyendo la síntesis sin disolvente o la síntesis activada por irradiación de microondas.
- Si bien algunas de las estructuras sintetizadas han mostrado moderada actividad antagonista de receptores PAR1 en plaquetas humanas y citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano, de los resultados biológicos se deduce que no nos hemos acercado lo suficiente al objetivo propuesto de obtener antagonistas potentes de PAR1, mejores que los antagonistas de referencia descritos.



## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

---



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. PRODUCTOS DE ORIGEN COMERCIAL

Ácido 3-(indol-3-il)propiónico	ALDRICH
Ácido trifluoroacético (TFA)	ALDRICH
Bencilamina	ALDRICH
Isocianato de bencilo	ALDRICH
Boc-Pro-OH	BACHEM
Bromuro de bencilo	FLUKA
Carbonato de bis-triclorometilo (Trifosgeno)	FLUKA
1,1'-Carbonildiimidazol (CDI)	ALDRICH
CELITA 545	SDS
Cianuro de trimetilsililo (TMSCN)	ALDRICH
Cloruro de 9-Fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc-Cl)	ALDRICH
Dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo	ALDRICH
Dicicloxilcarbodiimida (DCC)	ALDRICH
Isocianato de 2,4-diclorofenilo	ALDRICH
Dietilamina	ALDRICH
Diisopropilcarbodiimida (DIC)	FLUKA
Diisopropiletilamina (DIEA)	FLUKA
Pivalato de 3-[( <i>E</i> )-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-2-[[[(1 <i>S</i> )-1-[(Dimetilamino)carbonil]-2,2-dimetilpropil] tioureido]ciclohexil]imino]metil]-5-( <i>terc</i> -butil)-4-hidroxifenilo (Catalizador de Jacobsen)	ALDRICH
4-Dimetilaminopiridina (DMAP)	ALDRICH
<i>N,N</i> -Dimetilformamida (DMF)	LABSCAN
Fenilacetaldehído	ALDRICH
Isocianato de fenilo	ALDRICH
3-Fenilpropionaldehído	ALDRICH
Isotiocianato de fenilo	ALDRICH
Isocianato de 4-fluorofenetilo	ALDRICH
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	BACHEM
Fmoc-Lys(Boc)-OH	BACHEM
Fmoc-Orn(Boc)-OH	BACHEM

PARTE EXPERIMENTAL

---

H-Arg(Pbf)-OMe	BACHEM
HgCl <sub>2</sub>	PANREAC
Hidrato de hidrazina (NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O)	SIGMA
Hidrocioruro de <i>N,O</i> -dimetilhidroxilamina	FLUKA
1-Hidroxibenzotriazol (HOBt)	IRIS
Hidruro de litio y aluminio (LiAlH <sub>4</sub> )	FLUKA
H-Lys(Boc)-OMe	BACHEM
H-Orn(Boc)-OMe	BACHEM
Isocianato de 4-metoxifenetilo	ALDRICH
NaCN	ALDRICH
NaH, suspensión al 60% en aceite mineral	ALDRICH
NaHCO <sub>3</sub>	PANREAC
Ni Raney	ALDRICH
<i>N,N'</i> -di- <i>tert</i> -butoxicarboniltiurea	ALDRICH
Óxido de propileno	FLUKA
Pd (C) 10%	FLUKA
Trietilamina (TEA)	SCHARLAU
Triisopropilsilano (TIPS)	ALDRICH
ZnCl <sub>2</sub>	ALDRICH

Todos los disolventes empleados fueron comerciales y se secaron y purificaron utilizando métodos estándar.

## 4.2. MÉTODOS GENERALES

Las cromatografías analíticas en capa fina fueron realizadas sobre cromatofolios de 0.2 mm de espesor, con gel de sílice de tipo 60, Merck F<sub>254</sub>. Los compuestos se detectaron con luz UV a 254 nm y/o a 365 nm y mediante pulverización con disolución al 2% de ninhidrina en EtOH y posterior calefacción.

Las separaciones cromatográficas en columna de media presión (flash) se realizaron con gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh) y empleando cartuchos SNAP de Sílice KP-SIL de 5g (12 x 75 mm), 10g (12 x 150 mm) o 50g (39 x 81 mm) y KP-C18-HS 12g (12 x 150 mm), utilizando un equipo Biotage Horizon. Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen:volumen.

Las purificaciones realizadas mediante cromatografía radial, fueron llevadas a cabo en un cromatotrón Harrison Research modelo 8924, en placas circulares de vidrio, sobre las que se utilizó gel de sílice 60 PF<sub>254</sub> con yeso, en capas de 1 o 2 mm de espesor.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Mettler Toledo M170.

Los análisis elementales se realizaron en un analizador Heareus CHN-O-RAPID y se consideran satisfactorios los valores comprendidos en el rango  $\pm 0.4$  %, respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares.

Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se registraron en espectrómetros Varian-INOVA 300 (300 MHz), Bruker-AVANCE 300 (300 MHz), Varian-INOVA 400 (400 MHz) o Varian Unity 500 (500 MHz). En las muestras disueltas en CDCl<sub>3</sub> se utilizó TMS como referencia interna, y en el resto de los casos se empleó la señal correspondiente al disolvente utilizado (acetona-d<sub>6</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>, D<sub>2</sub>O). En los compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación de las diferentes señales de <sup>1</sup>H-RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY, heteronuclear <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC y HMBC. Los experimentos 1D NOESY se registraron a 400 MHz utilizando 2 s de tiempo de espera y 500 ms de tiempo de mezcla.

Los espectros de <sup>13</sup>C-RMN se registraron en espectrómetros Varian-INOVA 300 (75 MHz), Bruker-AVANCE 300 (75 MHz), Varian-INOVA 400 (100 MHz) o Varian Unity 500 (125 MHz), utilizando las mismas referencias internas que en los espectros de <sup>1</sup>H RMN. Las asignaciones de las diferentes señales de <sup>13</sup>C-RMN se realizaron mediante experimentos de correlación heteronuclear <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C de tipo HSQC y HMBC.

Los análisis HPLC analíticos se llevaron a cabo en un equipo Waters, equipado con una columna de fase reversa Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5 μm). El flujo utilizado fue de

1 ml/min y se empleó un detector de UV de longitud de onda variable, detectando a 214 y 254 nm. Como eluyente, se utilizaron distintas mezclas de CH<sub>3</sub>CN (disolvente A) y disolución al 0,05% de TFA en agua (disolvente B), en modo gradiente.

Los análisis HPLC-MS se llevaron a cabo en un equipo Waters 12695, equipado con columnas de fase reversa, conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ, utilizando diferentes gradientes que serán indicados en cada caso. Las columnas utilizadas fueron Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) y Xbrigde C<sub>18</sub> (4.2 × 100 mm, 3.5 μm). El flujo utilizado fue de 1 ml/min y como eluyentes, se utilizaron diferentes mezclas de disolución al 0.1% de HCOOH en CH<sub>3</sub>CN (disolvente A) y disolución al 0,1% de HCOOH en agua (disolvente B), en modo gradiente.

Las espectrometrías de Masas de Electro spray fueron realizada en un aparato Hewlett Packard 1100 MSD, en modo positivo y/o negativo, utilizando como portador MeOH o bien mezcla MeOH- CH<sub>3</sub>CN - HCOOH (1%). El flujo utilizado fue 0.5 ml/min, presión de nebulizador 40 psi, y la temperatura y flujo de gas de secado fue de 300 °C y 10 l/min. En esta técnica los picos [M+1]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup> y [M-1]<sup>-</sup> suelen ser las señales más abundantes.

Las espectrometrías de masa exacta HRMS (EI+) fueron realizadas en un equipo Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141.

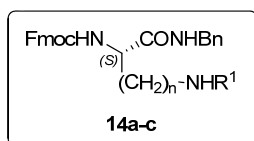
Los experimentos de irradiación de microondas han sido realizados en un reactor de microondas monomodo Emrys<sup>TM</sup> Synthesizer (Biotage AB).

Los productos finales obtenidos fueron liofilizados en un equipo Telstar 6-80.

### 4.3. SÍNTESIS DE UREAS Y TIOUREAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS

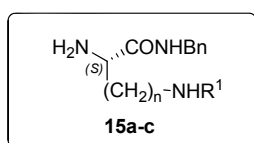
#### 4.3.1. Productos de partida no comerciales

##### 4.3.1.1. Síntesis de las $\alpha$ -aminobencilamidas **14a-c** a partir de los $\alpha$ -aminoácidos $N_\alpha$ -Fmoc protegidos **13a-c**.

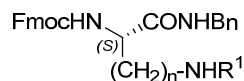


Sobre una disolución de los  $\alpha$ -aminoácidos **13a-c** (10 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (200 ml) bajo atmósfera de Ar, se adicionó sucesivamente HOBt (1.35 g, 10 mmol),  $\text{BnNH}_2$  (1.06 ml, 10 mmol) y DCC (4.13 g, 20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo, el precipitado formado se filtró y se lavó varias veces con  $\text{CH}_3\text{CN}$  frío. El filtrado se lavó sucesivamente con HCl 0.1 N (50 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml) y disolución saturada de NaCl (50 ml). Los extractos orgánicos se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, y el disolvente se evaporó a sequedad. El crudo así obtenido se purificó, mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 10-60% de AcOEt en hexano como eluyente, obteniendo de las  $\alpha$ -aminobencilamidas **14a-c** en forma de sólidos blancos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas  $\alpha$ -aminobencilamidas se recogen en la Tabla 4.1.

##### 4.3.1.2. Procedimiento general de $N_\alpha$ -Fmoc desprotección. Síntesis de las $\alpha$ -aminobencilamidas $N_\alpha$ -desprotegidas **15a-c**.

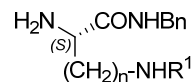


Sobre una disolución de las aminobencilamidas  $N_\alpha$ -Fmoc protegidas **14a-c** (10 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (200 ml), se adicionó  $\text{Et}_2\text{NH}$  (10.40 ml, 100 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo, el precipitado formado se filtró, se lavó varias veces con  $\text{CH}_3\text{CN}$  frío y la disolución resultante se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna flash, utilizando como eluyente un gradiente del 0-20% de MeOH en AcOEt. Así, se obtuvieron cuantitativamente las  $\alpha$ -aminobencilamidas  $N_\alpha$ -desprotegidas **15a-c** en forma de sólidos blancos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas  $\alpha$ -aminobencilamidas  $N_\alpha$ -desprotegidas se recogen en las Tabla 4.2.

**Tabla 4.1.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las  $\alpha$ -aminoamidas **14a-c**.

Compuesto	14a	14b	14c
n	3	4	3
R <sup>1</sup>	Boc	Boc	C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf
F. Molecular <sup>a</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S
Pf (°C)	180-181	155-156	129-130
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	26.00	26.38	27.48
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	-3.1 (c 1, CHCl <sub>3</sub> )	-2.6 (c 1.1, CHCl <sub>3</sub> )	-1.2 (c 0.9, CHCl <sub>3</sub> )
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>			
Calculado	544.27	558.29	738.32
Encontrado	544.36	558.42	738.56
<sup>1</sup> H-RMN <sup>c</sup>			
$\alpha$ -H	4.37	4.38	3.83
$\beta$ -H	1.64-1.75	1.55-1.64	1.48-1.95
$\gamma$ -H	1.05-1.19	1.30-1.38	1.48-1.95
$\delta$ -H	2.97-3.15	1.65-1.98	3.17-3.68
$\epsilon$ -H	-	3.0-3.16	-
NH-R <sup>1</sup>	4.68	4.61	6.32-6.44
R <sup>1</sup>	1.40	1.41	1.14, 1.16, 2.11, 2.50, 2.58, 2.96
NH-Fmoc	5.71	5.54	-
Fmoc	4.20, 4.38, 5.71, 7.30, 7.40, 7.59, 7.75	4.17, 4.37, 5.71, 7.30, 7.39, 7.56, 7.75	4.14, 4.51-4.46, 7.30, 7.39, 7.56, 7.75
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.42	4.43	4.51-4.46
NH-Bn	6.93	6.52	6.52
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5.5	5.5	-
J <sub><math>\alpha, \beta</math></sub>	8.5	-	6.5
<sup>13</sup> C-RMN <sup>d</sup>			
C <sub><math>\alpha</math></sub>	53.3	54.9	54.7
C <sub><math>\beta</math></sub>	30.5	29.6	30.7
C <sub><math>\gamma</math></sub>	26.6	22.5	25.8
C <sub><math>\delta</math></sub>	38.8	32.0	40.6
C <sub><math>\epsilon</math></sub>	-	39.8	-
R <sup>1</sup>	28.3, 79.4, 156.8	28.4, 79.3, 156.3	12.9, 18.3, 19.7, 23.8, 43.6, 43.8, 86.8, 117.9, 125.1, 132.7, 138.5, 138.8, 156.8-157.7 <sup>e</sup>
Fmoc	47.2, 66.9, 120.0, 125.2, 127.1, 128.7, 141.3, 143.8, 156.4	47.2, 67.0, 119.9, 125.1, 127.0, 127.7, 141.2, 143.7, 156.2	47.5, 67.5, 120.3, 125.5, 127.5, 128.1, 141.6, 144.0, 156.9
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.5	43.5	42.6
CONH	171.9	171.5	172.6

<sup>a</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>b</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>c</sup>Espectros registrados a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>d</sup>Espectros registrados a 75 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. <sup>e</sup>Señal correspondiente al C guanidinico de la arginina.

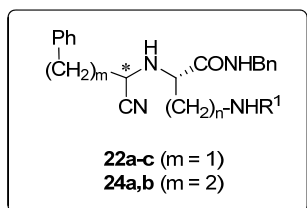
**Tabla 4.2.-** Datos analíticos y espectroscopios más significativos de las  $\alpha$ -aminoamidas **15a-c**.

Compuesto	15a	15b	15c
n	3	4	3
R <sup>1</sup>	Boc	Boc	C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf
F. Molecular <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S
Pf (°C)	96-97	112-113	136-137
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	12.76	12.89	15.37
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+8.9 (c 1.2, MeOH)	+6.8 (c 1.1, MeOH)	+7.4 (c 1, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>			
Calculado	322.21	336.22	516.26
Encontrado	322.40	336.28	516.38
<sup>1</sup> H-RMN <sup>c</sup>			
$\alpha$ -H	3.15	3.13	3.84
$\beta$ -H	1.05-1.79	1.32-1.44	1.55-1.88
$\gamma$ -H	1.05-1.79	1.32-1.44	1.07-1.31
$\delta$ -H	2.89	1.32-1.44	3.06-3.56
$\epsilon$ -H	-	2.87	-
NH-R <sup>1</sup>	6.80	6.73	6.44
R <sup>1</sup>	1.39	1.30	1.12, 1.15, 2.10, 2.50, 2.58, 2.95
NH <sub>2</sub>	1.89	3.31	-
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.25	4.27	4.38
NH-Bn	8.41	8.31	7.93
J <sub>NH,CH<sub>2</sub>(Bn)</sub>	6	6	-
J <sub><math>\alpha</math>,<math>\beta</math></sub>	6.5	6.5, 9	6.5
<sup>13</sup> C-RMN <sup>d</sup>			
C <sub><math>\alpha</math></sub>	54.9	55.1	54.7
C <sub><math>\beta</math></sub>	32.9	29.8	32.4
C <sub><math>\gamma</math></sub>	26.5	23.0	26.0
C <sub><math>\delta</math></sub>	40.7	23.6	40.9
C <sub><math>\epsilon</math></sub>	-	35.2	-
R <sup>1</sup>	28.6, 77.6, 155.9	28.6, 77.6, 155.9	12.9, 18.4, 19.7, 23.9, 43.6, 86.8, 117.9, 125.0, 132.6, 133.4, 138.9, 156.8-157.6 <sup>e</sup>
CH <sub>2</sub> (Bn)	42.2	42.4	42.5
CONH	175.6	175.5	171.6

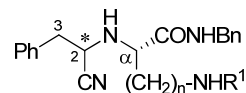
<sup>a</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>b</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>c</sup>Espectros registrados a 300 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>d</sup>Espectros registrados a 75 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. <sup>e</sup>Señal correspondiente al C guanidínico de la arginina.

### 4.3.2. Síntesis de $\alpha$ -aminonitrilos

#### 4.3.2.1. Procedimiento general para la síntesis de los $\alpha$ -aminonitrilos derivados de aminoácidos básicos **22a-c** y **24a,b**.

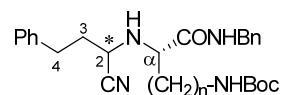


Sobre una disolución de la correspondiente  $\alpha$ -aminobencilamida  $N_{\alpha}$ -desprotegida **15a-c** (10 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro o MeOH (100 ml), enfriada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se adicionó, bajo atmósfera de argón,  $\text{ZnCl}_2$  (1.36 g, 10 mmol) y el aldehído apropiado [fenilacetaldehído (**16**) o 3-fenilpropionaldehído (**17**)] (8 mmol). Tras una hora de agitación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se adicionó TMSCN (2.09 ml, 15 mmol) y la mezcla de reacción se dejó que alcanzara paulatinamente  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de 24 h a esa temperatura, se evaporó el disolvente a vacío. El crudo resultante se disolvió en AcOEt (200 ml), se lavó sucesivamente con  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 25 ml) y disolución saturada de NaCl (25 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, y el disolvente se evaporó a sequedad. El crudo así obtenido se purificó, mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 20-60% de AcOEt en hexano como eluyente. De este modo, se obtuvieron las correspondientes mezclas epiméricas de  $\alpha$ -aminonitrilos (**22a-b**, **24a-b**) en proporción 1:(1-2) (dependiendo del disolvente y tiempo de reacción, como se indica en la Tabla 2 de la Discusión de resultados), excepto para el caso de los derivados de arginina (**RS**)-**22c** que se obtuvieron en una proporción 1:3 (utilizando MeOH como disolvente). Estas mezclas epiméricas fueron resueltas cromatográficamente, excepto en el caso de los derivados de 3-fenilpropionaldehído (**RS**)-**24a** y (**RS**)-**24b** y de arginina (**RS**)-**22c**. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos  $\alpha$ -aminonitrilos se recogen en las siguientes Tablas 4.3 y 4.4.

**Tabla 4.3.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -aminonitrilos **22a-c** ( $m = 1$ ).

Compuesto <sup>a</sup>	(R)-22a	(S)-22a	(R)-22b	(S)-22b	(RS)-22c	
n	3	3	4	4	3	
R <sup>1</sup>	Boc	Boc	Boc	Boc	C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf	
Config.(*)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	
Rdto. (%)	28	35	29	32	85	
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	23.28	23.89	23.73	24.14	5.14	5.48
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+7.5 (c 1, MeOH)	+21.3 (c 0.9, MeOH)	+ 9.2 (c 1.2, MeOH)	+27.1 (c 1, MeOH)	-	
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>						
Calculado	451.26	451.26	465.28	265.28	645.31	
Encontrado	451.48	451.48	465.56	465.56	645.46	
<sup>1</sup> H-RMN <sup>d</sup>						
2-H	3.73	3.49	3.79	3.48	3.81	3.48
3-H	2.96	2.83-3.14	2.91-3.13	2.94, 3.09	2.85-3.05	
J <sub>2,3</sub>	7	7	7	5, 9	7	5, 9
Aminoácido						
$\alpha$ -H	3.28	3.37	3.25	3.33	3.34	3.36
$\beta$ -H	1.56-1.71	1.09-1.89	1.53-1.85	1.73-1.86	1.40-1.85	
$\delta$ -H	1.44-1.57	1.09-1.89	1.53-1.85	1.48-1.63	1.40-1.85	
$\gamma$ -H	2.97-3.15	2.83-3.14	1.14-1.38	1.62-1.74	3.05-3.26	
$\epsilon$ -H			2.91-3.13	2.99-3.16	-	
NH-R <sup>1</sup>	4.55	4.65	4.53	4.62	6.10-6.40	
NH-Bn	6.96	6.74	7.05	6.70	-	7.50
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.35	3.99, 4.25	4.3, 4.48	3.96, 4.28	4.33	4.03, 4.24
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	6	5, 7	6, 5	5, 9	6	
<sup>13</sup> C-RMN <sup>e</sup>						
CN	119.8	119.9	119.2	119.6	120.1	120.4
C <sub>2</sub>	51.6	51.1	51.1	51.2	51.3	51.8
C <sub>3</sub>	39.9	39.8	39.2	39.9	39.9	
Aminoácido						
C <sub><math>\alpha</math></sub>	60.4	60.6	60.9	61.2	60.4	61.1
C <sub><math>\beta</math></sub>	30.9	33.8	29.8	29.8	31.1	
C <sub><math>\gamma</math></sub>	26.5	24.9	22.3	22.7	25.7	26.0
C <sub><math>\delta</math></sub>	39.8	39.5	32.6	32.8	41.0	
C <sub><math>\epsilon</math></sub>	-	-	38.7	39.4	-	
CO	173.1	172.4	172.7	172.5	174.0	173.3
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.8	42.8	43.4	42.7	43.7	43.3
C(NH <sub>2</sub> )=N	-	-	-	-	156.7	

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sirupes, excepto **(S)-22b** que es un sólido cristalino [Pf = 120-121 °C (AcOEt/Hexano)]. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min, excepto para **(RS)-22c** que se utilizó Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m) y gradiente 10-100% de A en B durante 7 min. <sup>d</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>e</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.4.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -aminonitrilos **24a,b** ( $m = 2$ ).

Compuesto <sup>a</sup>	(RS)-24a		(RS)-24b	
n	3		4	
Config.(*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	
Rdto. (%)	72%		70%	
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	24.12	24.34	24.52	24.83
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	465.28		479.29	
Encontrado	465.50		479.50	
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>d</sup></b>				
2-H	3.51	3.40	3.53	3.29-3.41
3-H	2.66-2.91		1.88-2.20	
4-H	2.98-3.13		2.63-2.88	
J <sub>2,3</sub>	7	7	6, 8	6, 8
<i>Aminoácido</i>				
α-H	3.32	3.46	3.23	3.29-3.41
β-H	1.46-1.81		1.68-1.85	
δ-H	3.13-3.24		1.31-1.52	
γ-H	1.94-2.15		1.52-1.67	
ε-H	-		2.98-3.14	
NH-Boc	4.76		4.68	
NH-Bn	7.04		7.08-7.21	
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.35, 4.40		4.36, 4.42	
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	6		3, 6	
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>e</sup></b>				
CN	119.8	119.7	120.0	119.8
C <sub>2</sub>	49.1, 49.3		49.4, 49.6	
C <sub>3</sub>	31.7		32.0	
C <sub>4</sub>	34.7, 35.1		34.9, 35.3	
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	60.2	59.5	61.6	60.8
C <sub>β</sub>	30.8		30.1	
C <sub>γ</sub>	26.2, 26.6		22.6, 22.9	
C <sub>δ</sub>	39.2, 39.4		33.2, 33.2	
C <sub>ε</sub>	-		39.8	
CO	173.3	172.8	173.5	172.9
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.4	43.1	43.6	43.3

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sirupes. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>d</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>e</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

#### 4.3.2.2. Estudios de inducción de estereoselectividad en la reacción de Strecker.

##### MÉTODO A: Reacción de Strecker utilizando la tiourea de Jacobsen como catalizador.

Sobre una disolución de la  $\alpha$ -aminoamida **15a** (50 mg, 0.16 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (5 ml) enfriada a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , se adicionó, lentamente y bajo atmósfera de argón, 3-fenilpropionaldehído (**17**) (153  $\mu\text{l}$ , 0.13 mmol) y el catalizador de Jacobsen **25** (1% o 5% mol). La agitación se mantuvo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 h. En otro matraz, se preparó una disolución de TMSCN (29  $\mu\text{l}$ , 0.24 mmol) en 0.5 ml de tolueno. La mezcla se enfrió a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  y se le añadió MeOH anhidro (9  $\mu\text{l}$ , 0.24 mmol). Tras 2 h de agitación a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , esta disolución se adicionó con una cánula sobre la disolución anterior, que previamente había sido enfriada a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . Después de 24 h a esta temperatura, se evaporó el disolvente a vacío. El crudo de reacción se analizó por HPLC-MS.

##### MÉTODO B: Reacción de Strecker utilizando Boc-Pro-OH como catalizador.

A una disolución de la  $\alpha$ -aminoamida **15a** (50 mg, 0.16 mmol) en el disolvente apropiado ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o MeOH) (5 ml), a la temperatura apropiada ( $0\text{ }^\circ\text{C}$  o temperatura ambiente, indicada en la Tabla 2, apartado 2.1.1.1) se le adicionó el correspondiente aldehído [fenilacetaldehído (**16**) o 3-fenilpropionaldehído (**17**)] (0.13 mmol) y Boc-Pro-OH (% mol indicado en la Tabla 2, apartado 2.1.1.1). Posteriormente, se adicionó TMSCN (31  $\mu\text{l}$ , 0.25 mmol) y se mantuvo la agitación a la temperatura indicada en cada caso. A determinados tiempos (indicados en la Tabla 2, apartado 2.1.1.1), se analizó el crudo de la reacción por HPLC-MS.

##### MÉTODO C: Reacción de Strecker irradiando con microondas.

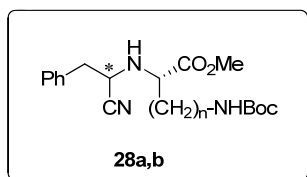
A una disolución de la  $\alpha$ -aminoamida **15a** (50 mg, 0.16 mmol) en el disolvente apropiado ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro, MeOH o sin disolvente, indicado en la Tabla 2, apartado 2.1.1.1) (5 ml) en vial de microondas se le adicionó a temperatura ambiente  $\text{ZnCl}_2$  (22 mg, 0.16 mmol) y el aldehído correspondiente (**16** o **17**) (0.13 mmol). A continuación, se añadió TMSCN (31  $\mu\text{l}$ , 0.25 mmol). Esta mezcla homogeneizada fue irradiada a microondas a  $120\text{ }^\circ\text{C}$  durante 3-5 min. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se disolvió en AcOEt (10 ml) y la disolución así obtenida se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 5 ml), disolución saturada de NaCl (5 ml), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y el disolvente se

evaporó a sequedad. El crudo de reacción se analizó por HPLC-MS. Los resultados obtenidos se han indicado en la Tabla 2 del apartado 2.1.1.1.

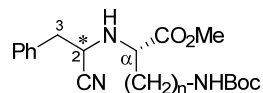
MÉTODO D: Reacción de Strecker en H<sub>2</sub>O y en disolución saturada de NaCl.

A una disolución de  $\alpha$ -aminoamida **15a** (50 mg, 0.16 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (0.5 ml), a temperatura ambiente, se le adicionó 3-fenilpropionaldehído **17** (153  $\mu$ l, 0.13 mmol). Tras 15 min de agitación, se evaporó el disolvente mediante corriente de argón. Sobre el sirupe obtenido, se adicionó H<sub>2</sub>O (2 ml) o una disolución saturada de NaCl (2 ml) a 5 °C. A continuación, se adicionó, gota a gota, la fuente de cianuro (TMSCN o disolución acuosa de NaCN) (0.25 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 5 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 ml). Los extractos orgánicos se evaporan a sequedad y el crudo de reacción se analizó por HPLC-MS.

**4.3.2.3. Síntesis de los  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de ésteres metílicos de aminoácidos (*R*)- y (*S*)-28.**



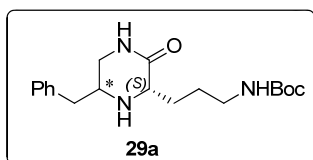
A una disolución del hidrocloreto de H-Orn(Boc)-OMe **27a** (500 mg, 1.8 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) se le añadió TEA (250  $\mu$ l, 1.8 mmol). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, se enfrió a -20 °C y se le añadió fenilacetaldehído (**16**) (330  $\mu$ l, 1.44 mmol) y ZnCl<sub>2</sub> (121 mg, 1.8 mmol), manteniendo la agitación durante 2 h. A continuación, se adicionó TMSCN (332  $\mu$ l, 2.7 mmol) y se mantuvo la agitación a 0 °C durante otras 24 h. Transcurrido este tiempo, se procedió como se ha comentado anteriormente para la síntesis de los  $\alpha$ -aminonitrilos **22a-c** y **24a,b** (apartado 4.3.2.1). La purificación de los productos de reacción se llevó a cabo mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 10-80% de AcOEt en hexano como eluyente, obteniendo por separado los epímeros (*R*)-**28** (182 mg, 27 %) y (*S*)-**28** (190 mg, 28 %). Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos  $\alpha$ -aminonitrilos se recogen en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los α-aminonitrilos **28a,b**.


Compuesto <sup>a</sup>	(R)-28a	(S)-28a	(R)-28b	(S)-28b
n	3	3	4	4
Config. (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Rdto. (%)	27	28	26	30
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	24.73	24.42	23.77	23.46
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+7.5 (c 1, MeOH)	-20.9 (c 1, MeOH)	+10.5 (c 1, MeOH)	-24.1 (c 1, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	376.21	376.21	390.23	390.23
Encontrado	376.50	376.50	390.50	390.50
<sup>1</sup> H-RMN <sup>d</sup>				
2-H	3.72	3.85	3.77	3.83
3-H	2.99-3.1	3.05-3.12	3.01-3.07	3.0-3.11
J <sub>2,3</sub>	-	7	10	7
<i>Aminoácido</i>				
α-H	3.37	3.51	3.34	3.49
β-H	1.60-1.66	1.70-1.75	1.57-1.67	1.64-1.72
δ-H	2.99-3.1	3.05-3.12	1.34-1.22	1.52-1.58
γ-H	1.60-1.66	1.52-1.61	1.41-1.49	1.32-1.39
ε-H	-	-	2.98-3.12	3.0-3.11
NH-Boc	4.50	4.58	4.49	4.57
OMe	3.74	3.70	3.74	3.68
J <sub>α,β</sub>	6	5, 7	6	5, 7
<sup>13</sup> C-RMN <sup>e</sup>				
CN	119.4	119.4	119.1	119.3
C <sub>2</sub>	51.0	50.5	50.8	50.4
C <sub>3</sub>	40.2	40.0	39.9	39.5
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	59.6	58.8	59.7	58.7
C <sub>β</sub>	30.1	30.4	32.2	32.7
C <sub>γ</sub>	26.6	26.4	22.4	22.7
C <sub>δ</sub>	40.1	39.63	29.7	29.5
C <sub>ε</sub>	-	-	39.9	40.0
CO <sub>2</sub>	174.2	174.1	174.0	174.1
OMe	52.5	52.1	52.2	52.0

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sirupes. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>d</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>e</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

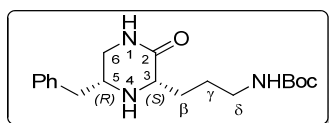
#### 4.3.2.4. Reducción del grupo CN en los $\alpha$ -aminonitrilos (*R*)- y (*S*)-28a. Síntesis de las 2-oxopiperazinas (*R*)- y (*S*)-29a.



Una disolución del correspondiente  $\alpha$ -aminonitrilo (*R*)- y (*S*)-**28a** (190 mg, 0.5 mmol) en MeOH (25 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atmósfera de presión de H<sub>2</sub> durante 24 h en presencia de Pd (C) al 10% (300 mg/mmol).

A continuación, se filtró el catalizador sobre celita y se lavó con MeOH (3 x 50 ml). Los filtrados se evaporaron a vacío. El residuo se disolvió en tolueno (10 ml) y la disolución se calentó a 100 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna flash utilizando gradiente 20-60% de AcOEt en hexano como eluyente, obteniéndose las 2-oxopiperazinas (*R*)-**29a** (86 mg, 62%) y (*S*)-**29a** (98 mg, 72%), respectivamente, cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen a continuación:

##### (3*S*,5*R*)-3-[3-(*tert*-Butoxicarbonil)aminopropil]5-bencil-2-oxopiperazina [(*R*)-**29a**]



Sirupe (86 mg, 62%); Fórmula molecular: C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>; **HPLC-MS** [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min]; t<sub>R</sub> = 3.03 min, [M+1]<sup>+</sup> = 348.22.

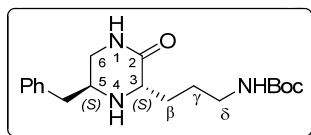
**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.44 (s, 9H, Boc), 1.29-1.96 (m, 4H, β-H y γ-H), 2.73 (t, J = 7 Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>) 3.01-3.26 (m, 5H, 5-H, 6-H y δ-H), 3.43 (m, 1H, 3-H), 4.95 (m, 1H, NH-Boc), 6.28 (s, 1H, 1-H), 7.06-7.40 (m, 5H, aromáticos).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 26.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>γ</sub>), 28.5 (CH<sub>3</sub>, Boc), 29.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>β</sub>), 40.0 (CH<sub>2</sub>, 5-CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>δ</sub>), 47.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 53.9 (CH, C<sub>5</sub>), 58.6 (CH, C<sub>3</sub>), 77.2 (C, Boc), 127.8, 128.9, 129.7 (CH, Ph), 135.2 (C, Ph), 156.3 (C, Boc), 172.6 (C, C<sub>2</sub>).

**ESI-MS** m/z [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 348.22; encontrado 348.42 (100 %).

Análisis calculado para C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (%): C, 63.98; H, 7.79; N, 11.19. Encontrado: C, 64.03; H, 7.92; N 11.31.

##### (3*S*,5*S*)-3-[3-(*tert*-Butoxicarbonil)aminopropil]5-Bencil-2-oxopiperazina [(*S*)-**29a**]



Sirupe (98 mg, 72%); Fórmula molecular: C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>; **HPLC-MS** [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min]; t<sub>R</sub> = 2.88 min, [M+1]<sup>+</sup> = 348.22.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.42 (s, 9H, Boc), 1.30-2.10 (m, 4H, β-H y γ-H), 2.67

(t,  $J = 7$  Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 2.80-3.25 (m, 5H, 5-H, 6-H y  $\delta$ -H), 3.41 (m, 1H, 3-H), 5.12 (m, 1H, *NH*-Boc), 6.65 (s, 1H, 1-H), 7.10-7.43 (m, 5H, aromáticos).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 25.4 (CH<sub>2</sub>, C <sub>$\gamma$</sub> ), 28.4 (CH<sub>3</sub>, Boc), 29.6 (CH<sub>2</sub>, C <sub>$\beta$</sub> ), 40.2 (CH<sub>2</sub>, 5-CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>, C <sub>$\delta$</sub> ), 47.2 (CH, C<sub>5</sub>), 48.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 55.6 (CH, C<sub>3</sub>), 77.2 (C, Boc), 127.7, 128.8, 129.3 (CH, Ph), 134.7 (C, Ph), 155.9 (C, Boc), 172.4 (C, C<sub>2</sub>).

ESI-MS  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 348.22; encontrado 348.42 (100 %).

Análisis calculado para C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (%): C, 63.98; H, 7.79; N, 11.19. Encontrado: C, 64.13; H, 8.01; N 11.42.

#### 4.3.2.5. Determinación de la configuración absoluta de los $\alpha$ -aminonitrilos 22a. Síntesis del (S)-22a a partir de (S)-28a.

A una disolución de (S)-28a (50 mg, 0.13 mmol) en mezcla dioxano:H<sub>2</sub>O (1:1) (2 ml) se le adicionó NaOH 1N (0.4 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a vacío. La mezcla de reacción se disolvió en AcOEt (50 ml), la disolución así obtenida se lavó con H<sub>2</sub>O (3 x 10 ml) y disolución saturada de NaCl (10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se disolvió en CH<sub>3</sub>CN (5 ml), y, bajo atmósfera de argón, se le añadió HOBT (18 mg, 0.13 mmol), DIC (55 mg, 0.27 mmol) y BnNH<sub>2</sub> (15  $\mu$ l, 0.13 mmol), y la mezcla de reacción se procesó y purificó como se ha comentado en el procedimiento general de síntesis de bencilamidas (apartado 4.3.1.1), para dar el correspondiente  $\alpha$ -aminonitrilo (S)-22a, idéntico al obtenido anteriormente (apartado 4.3.2.1).

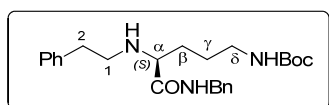
#### 4.3.3. Reducción del grupo CN de los $\alpha$ -aminonitrilos derivados de bencilamidas 22 y 24.

##### 4.3.3.1. Hidrogenación catalítica de los $\alpha$ -aminonitrilos (RS)-22a. Síntesis de la N <sub>$\delta$</sub> -Boc-N <sub>$\alpha$</sub> -(1-amino-3-fenilprop-2-il)ornitina [(RS)-30a] y de N <sub>$\delta$</sub> -Boc-N <sub>$\alpha$</sub> -(2-fenetil)-ornitina (31).

Una disolución de la mezcla epimérica (RS)-22a (300 mg, 0.67 mmol) en MeOH (50 ml), se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atmósfera de presión de H<sub>2</sub>, en presencia de Pd(C) al 10% (400 mg/mmol), durante 1 h. Pasado este tiempo, se filtró el catalizador sobre celita, se lavó con abundante MeOH (3 x 75 ml) y el disolvente se evaporó a

sequedad. A continuación, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente un gradiente de 0-10% de MeOH en AcOEt. De este modo, se aisló la amina secundaria **31** (12%), de mayor  $R_f$ , junto con la mezcla de diaminas primarias (**RS**)-**30a** (80%) y la bencilamida derivada de Orn(Boc) **15a** (8%). Los datos analíticos más significativos de (**RS**)-**30a** están recogidos en la Tabla 4.6 y los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **31** se detallan a continuación:

#### Bencilamida de $N_5$ -Boc- $N_\alpha$ -(2-fenetil)ornitina (**31**)



Sirupe (11 mg, 12 %); Fórmula molecular:  $C_{25}H_{35}N_3O_3$ ; **HPLC** [Sunfire  $C_{18}$  ( $4.6 \times 150$  mm, 3.5  $\mu$ m), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min];  $t_R$  = 16.02 min.

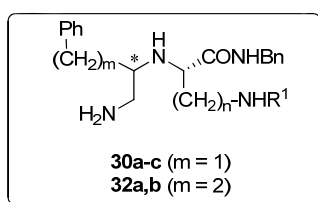
**HPLC-MS** [Xbridge  $C_{18}$  ( $4.2 \times 100$  mm, 3.5  $\mu$ m), gradiente 5-80% de A en B durante 15 min];  $t_R$  = 12.0 min,  $[M+1]^+$  = 426.60.

**$^1H$ -RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.40 (s, 9H, Boc), 1.44-1.58 (m, 2H,  $\gamma$ -H), 1.66-1.75 (m, 2H,  $\beta$ -H), 2.68-2.76 (m, 2H, 2-H), 2.75-2.90 (m, 2H, 1-H), 3.05-3.47 (m, 3H,  $\delta$ -H y  $\alpha$ -H); 4.26 [dd,  $J$  = 6 y 15 Hz, 1H,  $CH_2$  (Bn)], 4.36 [dd,  $J$  = 6 y 15 Hz, 1H,  $CH_2$  (Bn)], 4.59 (m, 1H,  $NH$ -Boc), 7.10-7.34 (m, 10H, aromáticos); 7.38 (m, 1H,  $NH$ -Bn).

**ESI-MS**  $m/z$   $[M+1]^+$  calculado para  $C_{25}H_{36}N_3O_3$ , 426.27; encontrada 426.60 (100 %).

Análisis calculado para  $C_{25}H_{35}N_3O_3$  (%): C, 70.56; H, 8.29; N, 9.87; Encontrado: C, 70.65; H, 8.34; N 9.98.

#### 4.3.3.2. Procedimiento general para la reducción del grupo CN en los $\alpha$ -aminonitrilos **22a-c** y **24a,b**. Síntesis de las aminas primarias **30a-c** y **32a,b**.

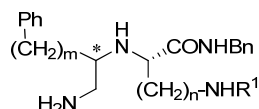


Sobre una disolución del correspondiente  $\alpha$ -aminonitrilo **22a-c** y **24a,b** (3 mmol) en MeOH (20 ml) se añadió Ni Raney (aprox. 100 mg/mmol), previamente lavado con MeOH, e hidrato de hidrazina (0.62 ml, 60 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60-70  $^\circ$ C durante 5 a 15

min. Transcurrido este tiempo, se filtró el catalizador sobre celita, se lavó con abundante MeOH (5 x 30 ml) y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo así obtenido se analizó por HPLC-MS, para determinar la proporción de los productos de reacción **30** y **32** y los **15a-c**, que no pudieron ser separados cromatográficamente. Los crudos de reacción así obtenidos se utilizaron sin purificación adicional para la siguiente etapa de

síntesis. Los datos analíticos más significativos de las aminas **30** y **32** se recogen en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6.-** Datos analíticos más significativos de las aminas **30a-c** y **32a,b**.

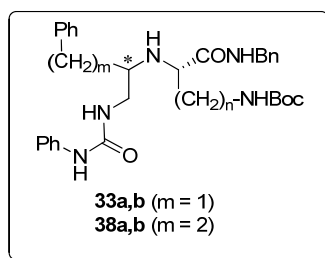


Comp.	m	n	R <sup>1</sup>	[M+1] <sup>+</sup> calc.	[M+1] <sup>+</sup> encontr.	t <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	F. molecular
<b>(R)-30a</b>	1	3	Boc	455.60	455.57	14.52	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>(S)-30a</b>	1	3	Boc	455.60	455.57	15.13	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>(R)-30b</b>	1	4	Boc	469.31	469.23	14.44	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>(S)-30b</b>	1	4	Boc	469.31	469.23	15.12	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>(S)-30c</b>	1	3	C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf	649.86	649.66	3.58	C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S
<b>(RS)-32a</b>	2	3	Boc	469.31	469.23	14.31 y 14.78	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<b>(RS)-32b</b>	2	4	Boc	483.33	483.66	14.18 y 14.69	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min, excepto para **(S)-30c** que se utilizó una columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 50 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 5 min.

#### 4.3.4. Síntesis de ureas.

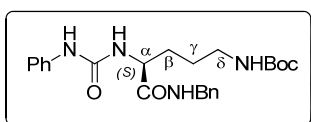
##### 4.3.4.1. Método A: Síntesis de las ureas **33a,b** y **38a,b** junto con las ureas derivadas de aminoácidos **39a,b**.



Sobre una disolución del correspondiente crudo de la reducción de los α-aminonitrilos **(RS)-22a,b** o **(RS)-24a,b** (obtenidos según se describe en el apartado 4.3.3.2) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 ml) enfriada a 0 °C, se añadió isocianato de fenilo (32 μl, 0.3 mmol). Después de 2 h de agitación a dicha temperatura, se evaporó el disolvente a sequedad. El residuo resultante se disolvió en AcOEt (50 ml), se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml) y disolución saturada de NaCl (2 x 10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente un gradiente 20-100% de AcOEt en hexano para dar la correspondiente mezcla epimérica de las ureas deseadas **(RS)-33a,b** o **(RS)-38a,b**, junto con las ureas derivadas de los respectivos aminoácidos **39a** o **39b**. Solo la mezcla epimérica **(RS)-38a** pudo ser resuelta en la separación cromatográfica.

Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las ureas **33a,b** y **38a,b** se recogen en las Tablas 4.8 , 4.9, 4.10 y 4.12. Los datos de las ureas derivadas de aminoácidos **39a** y **39b** se indican a continuación.

**Bencilamida de  $N_\delta$ -Boc- $N_\alpha$ -(fenilcarbamoil)ornitina (39a)**



Sólido blanco; Pf = 195-196 °C; Fórmula molecular:  $C_{24}H_{32}N_4O_4$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -6.3$  (c 1, MeOH); **HPLC** [Sunfire  $C_{18}$  (4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min];  $t_R = 20.61$  min.

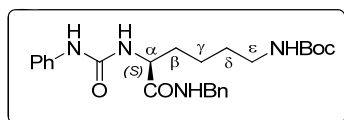
**$^1H$ -RMN** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ (ppm) 1.12-1.30 (m, 2H, γ-H ), 1.37 (s, 9H, Boc), 1.39-1.83 (m, 2H, β-H ), 2.78-3.01 (m, 2H, δ-H), 4.19-4.28 (m, 1H, α-H, ), [d, J = 5.5 Hz, 2H,  $CH_2$  (Bn)], 6.41 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NHCONH), 6.83 (sa, 1H, NH-Boc), 6.86-7.47 (m, 10H, aromáticos), 8.57 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH-Bn), 8.66 (s, 1H, NHCONH).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ (ppm) 26.3 ( $CH_2$ ,  $C_\gamma$ ), 28.6 ( $CH_3$ , Boc), 31.2 ( $CH_2$ ,  $C_\beta$ ), 40.1 ( $CH_2$ ,  $C_\delta$ ), 42.3 [ $CH_2$ ,  $CH_2$  (Bn)], 52.7 (CH,  $C_\alpha$ ), 77.7 (C, Boc), 117.8 -140.7 (10 CH y 2 C, aromáticos), 155.0 (CO), 155.9 (C, Boc) ,172.5 (CONH).

**ESI-MS**  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup> calculado para  $C_{24}H_{33}N_4O_4$ , 441.54; encontrado 441.27 (100 %).

Análisis calculado para  $C_{24}H_{32}N_4O_4$  (%): C, 65.43; H, 7.32; N, 12.72. Encontrado: C, 65.18, H, 7.15; N, 12.62.

**Bencilamida de  $N_\epsilon$ -Boc- $N_\alpha$ -(fenilcarbamoil)lisina (39b)**



Sólido blanco; Pf = 191-192 °C; Fórmula molecular:  $C_{25}H_{34}N_4O_4$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -7.3$  (c 1, MeOH); **HPLC** [Sunfire  $C_{18}$  (4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min];  $t_R = 21.37$  min.

**$^1H$ -RMN** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ (ppm) 1.17-1.30 (m, 2H, γ-H ), 1.17-1.38 (m, 2H, δ-H), 1.35 (s, 9H, Boc), 1.46-1.81 (m, 2H, β-H ), 2.78-2.96 (m, 2H, ε-H), 4.28 (dd, J = 9.5 y 15 Hz, 1H, α-H), 4.29 [d, J = 5.5 Hz, 2H,  $CH_2$  (Bn)], 6.37 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NHCONH), 6.73 (m, 1H, NH-Boc), 6.83-7.46 (m, 10H, aromáticos), 8.57 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH-Bn), 8.61 (s, 1H, NHCONH)

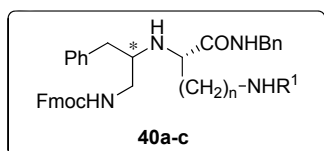
**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ (ppm) 22.8 ( $CH_2$ ,  $C_\gamma$ ), 28.6 ( $CH_3$ , Boc), 29.7 ( $CH_2$ ,  $C_\beta$ ), 33.4 ( $CH_2$ ,  $C_\delta$ ), 39.8 ( $CH_2$ ,  $C_\epsilon$ ), 42.4 [ $CH_2$ ,  $CH_2$  (Bn)], 53.0 (CH,  $C_\alpha$ ), 77.7 (C, Boc), 117.8 -140.7 (10 CH y 2 C, aromáticos),155.0 (CO), 155.9 (C, Boc), 172.6 (CONH).

**ESI-MS**  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup> calculado para  $C_{25}H_{35}N_4O_4$ , 455.26; encontrado 455.27 (100 %).

Análisis calculado para  $C_{25}H_{34}N_4O_4$  (%): C, 66.06; H, 7.54; N, 12.33. Encontrado: C 66.35; H, 7.51; N, 11.99.

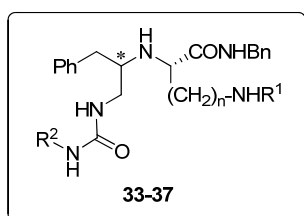
#### 4.3.4.2.- Método B: Síntesis de las ureas (33-37).

##### Procedimiento general para la *N*-Fmoc protección de las aminas 30a-c. Síntesis de las aminas *N*-Fmoc protegidas 40a-c.



Sobre una disolución del correspondiente crudo **30a-c** procedente de la reducción del grupo CN de los  $\alpha$ -aminonitrilos (**22a-c**) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10 ml) enfrida a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , se adicionó lentamente óxido de propileno ( $56\text{ }\mu\text{l}$ , 8 mmol) y Fmoc-Cl (78 mg, 0.3 mmol). Después de 2 h agitando a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , se evaporó el disolvente a vacío y el residuo se disolvió en AcOEt (50 ml). La disolución se lavó sucesivamente con  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 10 ml) y disolución saturada de NaCl (2 x 10 ml), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó a sequedad. El crudo obtenido se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 10-40% de AcOEt en hexano, para obtener las aminas *N*-Fmoc protegidas **40a-c**, cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen en la Tabla 4.7.

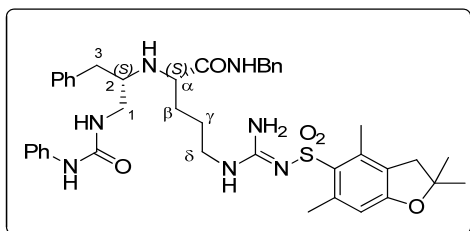
##### Procedimiento general para la *N*-Fmoc desprotección de las aminas *N*-Fmoc protegidas 40a-c y posterior reacción con isocianatos. Síntesis de las ureas 33-37.



A una disolución del correspondiente *N*-Fmoc derivado **40a-c** (0.3 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (20 ml) se añadió  $\text{Et}_2\text{NH}$  ( $320\text{ }\mu\text{l}$ , 3 mmol). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se procesó como se ha indicado en el procedimiento general descrito con anterioridad (apartado 4.3.1.2), para dar las correspondientes aminas *N*-Fmoc desprotegidas (**30a-c**), con rendimiento cuantitativo. Sobre una disolución de estas aminas **30a-c** (0.3 mmol), en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (10 ml) enfrida a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , se añadió el correspondiente isocianato (isocianato de fenilo, isocianato de bencilo, isocianato de 4-metoxifenilo, isocianato de 4-fluorofenilo y isocianato de 2,4-diclorofenilo) (0.3 mmol). Después de un tiempo de agitación a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  comprendido entre 15 min y 2 h de agitación (dependiendo del isocianato utilizado), la mezcla de reacción se procesó como se ha descrito en el apartado 4.3.2.1. De este modo, se aislaron las ureas (**33-37**). Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las ureas **33-37** se recogen en las

Tablas 4.8, 4.9, 4.10 y 4.11, agrupados según el aminoácido que incorporan en su estructura. Para el derivado de arginina (**S**)-**33c** se indican a continuación:

**N-[(2S)-3-Fenil-1-(fenilureido)prop-2-il]-Arg(Pbf)-NHBN [(S)-33c].**



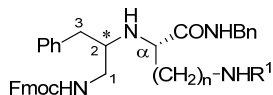
Espuma (30 mg, 25%); Fórmula molecular:  $C_{42}H_{53}N_7O_5S$ ;  $[\alpha]_D^{20} = + 2.5$  (c 1, MeOH); **HPLC-MS** [Sunfire  $C_{18}$  (4.6 × 50 mm, 3.5  $\mu$ m), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min];  $t_R = 4.11$  min,  $[M+1]^+ = 768.81$ .

**$^1H$ -RMN** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.61-1.63 (m, 4H,  $\beta$ -H y  $\gamma$ -H), 1.38, 2.01, 2.39 y 2.45 (4s, 15H, Pbf), 2.74 (m, 1H, 2-H), 2.85 (s, 2H, Pbf), 2.92-3.17 (m, 4H, 3-H y  $\delta$ -H), 3.20-3.42 (m, 2H, 1-H), 3.99 (bs, 1H,  $\alpha$ -H), 4.17 [d, 1H, J = 6 y 14.5 Hz,  $CH_2$  (Bn)], 4.30 [d, 1H, J = 4.5 y 14.5 Hz,  $CH_2$  (Bn)], 6.20 [sa, 3H,  $NHC(NH_2)N$ ], 6.84-7.34 (m, 15H, aromáticos), 7.78 y 8.15 (2bs, 2H,  $NHCONH$ ).

**$^{13}C$ -RMN** (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 12.9, 18.3, 19.7, 28.9 ( $CH_3$ , Pbf), 25.7 ( $CH_2$ ,  $C_\gamma$ ), 30.1 ( $CH_2$ ,  $C_\beta$ ), 31.3 ( $CH_2$ ,  $C_3$ ), 40.3 ( $CH_2$ ,  $C_\delta$ ), 43.6 ( $CH_2$ ,  $C_1$ ), 43.6 ( $CH_2$ , Pbf), 59.2 (CH,  $C_2$ ), 59.5 (CH,  $C_\alpha$ ), 86.77, 117.93, 125.0, 132.6, 133.3 (C, Pbf), 126.9-139.2 (15CH y 5C, aromáticos y Pbf), 156.4 ( $NHCONH$ ), 159.2 [ $NHC(NH_2)N$ ].

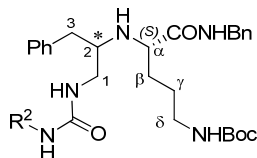
**ESI-MS**  $m/z$   $[M+1]^+$  calculado para  $C_{42}H_{54}N_7O_5S$ , 768.26; encontrado 768.81 (100 %).

Análisis calculado para  $C_{42}H_{53}N_7O_5S$  (%): C, 65.69; H, 6.96; N, 12.77; encontrado: C, 65.35; H, 6.93; N, 12.62.

**Tabla 4.7.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las aminas *N*-Fmoc protegidas **40a-c**.

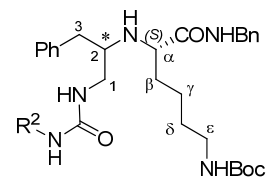
Compuesto <sup>a</sup>	( <i>R</i> )-40a	( <i>S</i> )-40a	( <i>R</i> )-40b	( <i>S</i> )-40b	( <i>S</i> )-40c
n	3	3	4	4	3
R <sup>1</sup>	Boc	Boc	Boc	Boc	C(NH <sub>2</sub> )=N-Pbf
Config. (*)	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>S</i> )
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>41</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>50</sub> H <sub>58</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S
Rdto. (%)	55	80	64	70	85
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	20.56	21.26	20.68	21.21	4.65
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+7.1 (c 1, MeOH)	+15.4 (c 1, MeOH)	+8.2 (c 0.8, MeOH)	+12.3 (c 0.9, MeOH)	+ 6.4 (c 1, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>					
Calculado	677.36	677.36	691.38	691.38	871.41
Encontrado	677.59	677.59	691.59	691.59	871.77
<sup>1</sup> H-RMN <sup>d</sup>					
1-H	3.26-3.55	3.16-3.43	3.06-3.19	2.88-3.44	3.02-3.55
2-H	2.75	2.77	2.75	2.72	2.73
3-H	2.76-2.99	2.41-2.71	2.88-3.02	2.42-2.68	2.64-2.84
NH-Fmoc	5.75	5.32	5.18	5.19	5.60
<i>Aminoácido</i>					
α-H	3.24	3.38	3.06-3.19	3.22	3.38
β-H	1.10-1.98	1.50-1.59	0.91-1.64	1.16-1.86	1.12-1.80
γ-H	1.10-1.98	1.46-1.81	0.91-1.64	1.16-1.86	1.12-1.80
δ-H	2.99-3.14	2.97-3.16	0.1-1.64	1.16-1.86	3.06-3.55
ε-H	-	-	2.48-2.83	2.88-3.44	-
NH-R <sup>1</sup>	4.71	4.75	4.60	4.57	6.28
NH-Bn	6.99	6.91	7.09	7.04	6.97-7.34
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.42	3.83, 4.35	4.28-4.47	3.83, 4.35	3.85, 4.29
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5	5, 7	7.5	7	7.5
<sup>13</sup> C-RMN <sup>e</sup>					
C <sub>1</sub>	44.6	43.1	44.6	43.5	43.6
C <sub>2</sub>	58.6	58.7	59.2	59.3	59.2
C <sub>3</sub>	39.1	39.6	38.9	39.8	31.3
<i>Aminoácido</i>					
C <sub>α</sub>	60.2	59.1	61.1	60.2	59.5
C <sub>β</sub>	30.7	30.9	33.1	33.5	30.1
C <sub>γ</sub>	26.0	26.3	22.4	22.5	25.7
C <sub>δ</sub>	39.5	40.1	29.6	29.8	40.3
C <sub>ε</sub>	-	-	39.9	41.5	-
CO	174.2	174.2	174.4	174.4	174.8
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.1	42.7	42.9	42.7	43.2
C(NH <sub>2</sub> )=N	-	-	-	-	159.2

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos o espumas. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min, excepto para (**S**)-**38c** que se utilizó una columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 50 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>d</sup>Espectros registrados a 300, 400 o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>e</sup>Espectros registrados a 75, 100 o 125 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.8.-** Datos espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de ornitina y fenilacetaldehído **33a** y **35a**.


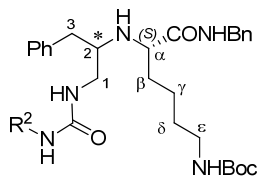
Compuesto <sup>a</sup>	(R)-33a	(S)-33a	(R)-35a	(S)-35a
R <sup>2</sup>	Ph	Ph	Bn	Bn
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>33</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
Rdto (%) <sup>c</sup>	17	67	25	51
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>d</sup>	17.45	18.15	18.47	18.86
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+7.2 (c 1, MeOH)	+ 6.7 (c 1.1, MeOH)	+6.5 (c 1.1, MeOH)	+7 (c 0.9, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	574.33	574.33	588.35	587.35
Encontrado	574.27	574.52	588.48	588.62
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>e</sup></b>				
1-H	3.04-3.32	2.81-3.14	3.06-3.20	3.20-3.34
2-H	2.81	2.93	2.80	2.74
3-H	2.58-2.76	2.40-2.75	2.61-2.65	2.45-2.81
NH-CO-NH	5.77, 7.57	6.04, 8.62	4.73, 5.06	5.81
R <sup>2,f</sup>	-	-	4.27	4.37
<b>Aminoácido</b>				
α-H	3.04-3.32	3.22-3.48	3.21	3.42
β-H	1.38-2.41	1.56-1.74	1.44-1.69	1.60-1.85
γ-H	1.10-1.42	1.00-1.54	1.19-1.45	1.41-1.53
δ-H	2.84-3.02	3.14-3.29	2.87-3.06	2.86-3.20
NH-Boc	4.62	4.94	4.58	4.94
NH-Bn	6.89-7.42	7.75	7.47	6.98
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.29, 4.41	3.70, 4.2	4.32, 4.40	3.78, 4.30
J <sub>NH,CH<sub>2</sub> (Bn)</sub>	6	5, 7	5	4, 7
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>g</sup></b>				
C <sub>1</sub>	43.9	42.9	44.4	44.3
C <sub>2</sub>	60.2	59.5	59.4	58.6
C <sub>3</sub>	39.4	40.6	39.4	40.3
NH-CO-NH	156.2	156.8	158.2	159.2
R <sup>2,f</sup>	-	-	42.6	43.9
<b>Aminoácido</b>				
C <sub>α</sub>	60.4	59.6	59.9	59.2
C <sub>β</sub>	30.7	30.8	30.6	30.5
C <sub>γ</sub>	26.0	26.2	26.1	25.8
C <sub>δ</sub>	39.2	40.2	39.5	39.8
CO	175.0	174.7	174.6	174.4
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.2	42.4	43.2	41.7

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como espumas. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Rendimiento global obtenido por el Método B. <sup>d</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>e</sup>Espectros registrados a 300, 400 o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>f</sup>Datos de protón y carbono aromáticos no incluidos. <sup>g</sup>Espectros registrados a 75, 100 o 125 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.9.-** Datos analíticos más significativos de las ureas derivadas de lisina y fenilacetaldehído **33b**, **34b**, **36b** y **37b**.

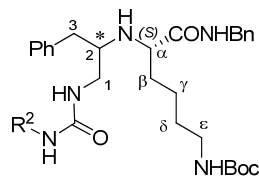
Compuestos <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	Config (*)	Rdto. (%) <sup>b</sup>	t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	[α] <sub>20</sub> <sup>d</sup>	[M+1] <sup>+</sup> calc.	[M+1] <sup>+</sup> encontr.	F. molecular <sup>d</sup>
( <i>R</i> )- <b>33b</b>	Ph	<i>R</i>	98	18.29	+6.5 (c 0.6, MeOH)	588.35	588.62	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
( <i>S</i> )- <b>33b</b>	Ph	<i>S</i>	87	18.49	+4 (c 0.9, MeOH)	588.35	588.55	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
( <i>R</i> )- <b>34b</b>		<i>R</i>	89	20.05	+7.5 (c 1, MeOH)	656.27	656.66	C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
( <i>S</i> )- <b>34b</b>		<i>S</i>	75	20.03	+3 (c 0.8, MeOH)	656.27	656.46	C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
( <i>R</i> )- <b>36b</b>		<i>R</i>	95	18.29	+8.5 (c 1.1, MeOH)	646.39	646.72	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
( <i>S</i> )- <b>36b</b>		<i>S</i>	93	18.43	+5.9 (c 1, MeOH)	646.39	646.52	C <sub>37</sub> H <sub>51</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
( <i>R</i> )- <b>37b</b>		<i>R</i>	90	18.47	+ 7.6 (c 1, MeOH)	634.37	634.68	C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
( <i>S</i> )- <b>37b</b>		<i>S</i>	94	18.57	+3.5 (c 1.1, MeOH)	634.37	634.43	C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>4</sub>

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos o espumas. <sup>b</sup>Rendimiento global obtenido por el Método B. <sup>c</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>d</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N.

**Tabla 4.10.-** Datos espectroscópicos más significativos de ureas derivadas de lisina y fenilacetaldehído **33b** y **34b**.


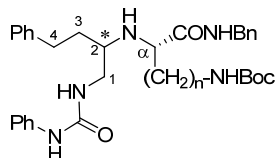
Compuesto	(R)-33b	(S)-33b	(R)-34b	(S)-34b
R <sup>2</sup>	Ph			
Config. (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
<sup>1</sup> H-RMN <sup>a</sup>				
1-H	2.89-3.00	3.18-3.50	2.83-3.14	3.14-3.38
2-H	2.78-2.87	2.73	2.84-2.93	2.66-2.77
3-H	2.53-2.77	2.51-2.68	2.63, 2.72	2.66-2.91
NH-CO-NH	5.51	5.94, 8.09	5.96	6.33
<i>Aminoácido</i>				
α-H	3.01-3.14	3.35	3.32	3.38-3.54
β-H, γ-H, δ-H	0.73-1.65	1.00-1.90	0.73-1.89	0.86-2.19
ε-H	3.01-3.32	2.90-3.18	2.83-2.94, 3.03-3.14	3.00-3.41
NH-Boc	4.59	4.88	4.55	4.86
NH-Bn	7.56	6.90-7.61	7.33	7.70
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.29, 4.38	3.90, 4.35	4.30, 4.40	4.00, 4.37
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	6	4, 7	6	6.5
<sup>13</sup> C-RMN <sup>b</sup>				
C <sub>1</sub>	43.8	39.8	43.9	42.9
C <sub>2</sub>	59.1	58.0	58.9	60.2
C <sub>3</sub>	39.0	30.9	39.2	36.6
NH-CO-NH	156.0	154.8	154.9	157.2
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	61.0	58.4	60.8	60.4
C <sub>β</sub>	33.3	27.9	33.2	29.7
C <sub>γ</sub>	22.6	21.1	22.5	20.8
C <sub>δ</sub>	29.6	27.6	29.6	29.7
C <sub>ε</sub>	39.9	38.1	39.8	39.7
CO	174.9	172.1	175.0	170.2
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.1	40.7	43.2	40.0

<sup>a</sup>Espectros registrados a 300, 400 o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>b</sup>Espectros registrados a 75, 100 o 125 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.11.-** Datos espectroscópicos más significativos de ureas derivadas de lisina y fenilacetaldehído **36b** y **37b**.


Compuesto	(R)-36b	(S)-36b	(R)-37b	(S)-37b
R <sup>2</sup>				
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
<sup>1</sup> H-RMN <sup>a</sup>				
1-H	2.91-3.18	2.99-3.29	2.93-3.28	2.99-3.28
2-H	2.66-2.82	2.65-2.72	2.56-2.89	2.63-2.73
3-H	2.66-2.82	2.60, 2.69	2.56-2.89	2.58, 2.68
NH-CO-NH	4.70	5.15, 5.29	4.80	5.26, 5.41
R <sup>2,b</sup>	2.66 (2'-H), 3.28 (1'-H), 3.76 (OMe)	2.76 (2'-H), 3.40 (1'-H), 3.80 (OMe)	2.77 (2'-H), 3.32 (1'-H)	2.73-2.86 (2'-H), 3.40 (1'-H)
Aminoácido				
α-H	2.91-3.18	3.29-3.50	2.93-3.28	3.28-3.37
β-H, γ-H, δ-H	0.78-1.71	1.02-2.23	0.81-2.11	0.77-2.23
ε-H	2.91-3.18	2.99-3.17	2.93-3.28	2.94-3.18
NH-Boc	4.55	4.85	4.58	4.88
NH-Bn	7.57	7.02-7.44	7.52	7.05-7.60
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.32, 4.41	3.91, 4.35	4.41	3.89, 4.34
J <sub>NH,CH<sub>2</sub> (Bn)</sub>	6	7	7	3, 7
<sup>13</sup> C-RMN <sup>c</sup>				
C <sub>1</sub>	43.9	43.1	43.8	43.1
C <sub>2</sub>	59.5	60.6	59.1	60.6
C <sub>3</sub>	35.4	33.5	35.2	36.2
NH-CO-NH	156.3	159.5	157.9	160.3
R <sup>2,b</sup>	35.5 (C <sub>2</sub> '), 39.9 (C <sub>1</sub> '), 55.2 (OMe)	33.5 (C <sub>2</sub> '), 40.8 (C <sub>1</sub> '), 55.6 (OMe)	32.9 (C <sub>2</sub> '), 41.2 (C <sub>1</sub> ')	33.6 (C <sub>2</sub> '), 40.9 (C <sub>1</sub> ')
Aminoácido				
C <sub>α</sub>	60.9	60.8	60.7	60.8
C <sub>β</sub>	30.9	30.5	30.5	30.5
C <sub>γ</sub>	22.6	23.6	22.3	23.6
C <sub>δ</sub>	29.7	30.1	29.3	30.1
C <sub>ε</sub>	38.9	40.5	38.9	40.5
CO	174.6	174.9	174.4	175.0
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.1	42.2	42.7	42.0

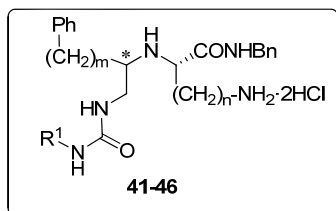
<sup>a</sup>Espectros registrados a 300, 400 o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>b</sup>Datos de protón y carbono aromáticos no incluidos debido al solapamiento de las señales. <sup>c</sup>Espectros registrados a 75, 100 o 125 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.12.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de 3-fenilpropionaldehído **38a,b**.


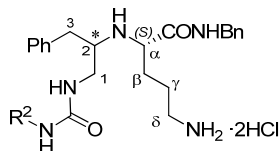
Compuesto <sup>a</sup>	(R)-38a	(S)-38a	(RS)-38b	
n	3	3	4	
Config. (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	
Rdto. (%) <sup>b</sup>	13	14	29	
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+7.5 (c 0.9, MeOH)	+5 (c 1, MeOH)	-	
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	18.54	18.89	18.70	19.06
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	588.35	588.35	602.36	
Encontrado	588.17	588.27	602.27	
<sup>1</sup> H-RMN <sup>d</sup>				
1-H	3.14-3.43	3.25-3.31	3.38, 3.27	
2-H	2.60	2.56	2.61	2.61
3-H	1.60-1.81	1.57-1.68	1.50-1.85	
4-H	2.49-2.78	2.51-2.63	2.45-2.74	
NH-CO-NH	5.86, 7.67	5.84, 7.70	5.80, 7.84, 8.1	
<i>Aminoácido</i>				
α-H	3.21	3.15	3.25	
β-H	1.48-1.60	1.68-1.80	1.50-1.85	
γ-H	1.29-1.81	1.46-1.57	1.50-1.85	
δ-H	2.95-3.28	2.92-3.12	0.94-1.33	
ε-H		-	2.88-3.17	
NH-Boc	4.92	4.73	4.84	4.66
NH-Bn	7.45	7.32	7.46	
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.35	4.39	4.36	
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5	6	6, 9	
<sup>13</sup> C-RMN <sup>e</sup>				
C <sub>1</sub>	43.1	42.5	43.0	42.0
C <sub>2</sub>	57.1	57.4	58.8	56.9
C <sub>3</sub>	35.7	35.6	34.8	
C <sub>4</sub>	32.3	32.4	32.1	
NH-CO-NH	156.2	156.7	156.2	156.7
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	58.3	59.9	60.1	
C <sub>β</sub>	31.6	32.2	33.0	
C <sub>γ</sub>	28.6	28.6	22.9	
C <sub>δ</sub>	39.5	40.3	29.8	
C <sub>ε</sub>	-	-	40.0	
CO	175.1	174.9	174.9	
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.5	43.4	43.3	

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como espumas. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Rendimiento global obtenido por el Método A. <sup>d</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>e</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>f</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

#### 4.3.4.3. Procedimiento general de *N*-Boc desprotección. Síntesis de las ureas *N*-desprotegidas 41-46.



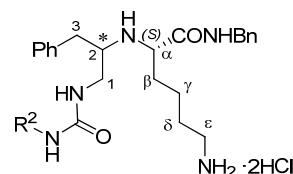
La correspondiente urea **33-38** (0.15 mmol) se disolvió en una disolución 3 N de HCl en AcOEt (5 ml). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a vacío, el residuo obtenido se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}$  (3 ml) y se liofilizó. De este modo, se obtuvieron de forma cuantitativa los hidroclouros de las respectivas aminas *N*-desprotegidos **41-46** que no necesitaron purificación adicional. Los datos analíticos y espectroscópicos de ureas *N*-desprotegidas **41-46** se recogen en las Tablas 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16, agrupados según el aminoácido que incorporan en su estructura.

**Tabla 4.13.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de ornitina y fenilacetaldéhido desprotegidas **41a** y **43a**.


Compuesto <sup>a</sup>	(R)-41a	(S)-41a	(R)-43a	(S)-43a
R <sup>2</sup>	Ph	Ph	Bn	Bn
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	12.87	12.89	12.87	12.95
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+5.5 (c 1.3, MeOH)	+26.6 (c 0.9, MeOH)	+5.2 (c 1, MeOH)	+2.1 (c 1.5, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado <sup>c</sup>	474.61	474.61	488.29	488.29
Encontrado <sup>d</sup>	474.52	474.52	488.52	488.38
<sup>1</sup> H-RMN <sup>e</sup>				
1-H	3.10-3.31	3.11, 3.53	3.09-3.22	2.94-3.46
2-H	3.10-3.31	3.23	3.23	3.18
3-H	2.69-3.31	2.74-2.94, 2.99-3.18	2.74-3.02	2.74-3.10
NH-CO-NH	6.89	6.94, 7.10	6.72, 7.00	6.94, 7.11
2-NH <sup>f</sup>	9.15, 9.79	9.41, 9.50	9.56, 9.81	9.19, 9.88
R <sup>2,g</sup>	-	-	4.30	4.20, 4.41
Aminoácido				
α-H	4.33	4.27-4.44	4.32-4.38	4.32
β-H	1.80-2.07	1.82-2.06	1.90-2.10	1.80-1.99
γ-H	1.56-1.76	1.61-1.78	1.56-1.82	1.58-1.74
δ-H	2.69-2.85	2.74-2.94	2.74-3.02	2.74-2.91
δ-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	8.08	8.12	8.08	8.09
NH-Bn	9.65	9.64	9.56	9.54
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.25, 4.50	4.35	4.35, 4.60	4.28
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5, 6	6.5	5, 6.5	6
<sup>13</sup> C RMN <sup>h</sup>				
C <sub>1</sub>	42.6	42.7	43.1	43.7
C <sub>2</sub>	56.7	57.7	56.7	58.5
C <sub>3</sub>	28.2	34.9	28.9	28.8
NH-CO-NH	156.6	156.4	159.7	160.5
R <sup>2,i</sup>	-	-	42.6	43.4
Aminoácido				
C <sub>α</sub>	59.5	59.0	60.4	60.6
C <sub>β</sub>	27.1	27.3	27.2	27.9
C <sub>γ</sub>	22.8	22.7	22.7	23.3
C <sub>δ</sub>	33.5	37.7	33.5	35.4
CO	167.0	167.2	166.9	167.9
CH <sub>2</sub> (Bn)	28.0	38.0	38.1	38.6

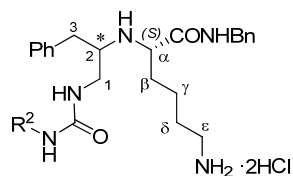
<sup>a</sup>Todos los compuestos se liofilizaron. <sup>b</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>c</sup>Masa calculada para el ion molecular sin considerar HCl. <sup>d</sup>Abundancia relativa entre 15-25%. El pico base del espectro de masas corresponde a la masa de [(M+2)/2]<sup>+</sup>. <sup>e</sup>Espectros registrados a 400 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>f</sup>La suma de las integrales de las dos señales equivale a 2H. Estas señales corresponden al 2-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> y su presencia debe ser debida a la existencia de conformaciones en equilibrio dinámico. <sup>g</sup>Datos de protón y carbono aromáticos no incluidos. <sup>h</sup>Espectros registrados a 100 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.14.-** Datos analíticos más significativos de las ureas derivadas de lisina y de fenilacetaldéido desprotegidas **41b**, **42b**, **44b** y **45b**.



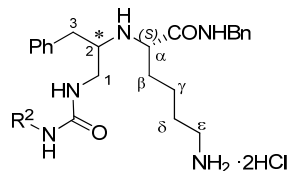
Compuesto <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	Config (*)	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	[α] <sub>20</sub> <sup>d</sup>	[M+1] <sup>+</sup> calc. <sup>c</sup>	[M+1] <sup>+</sup> encontr. <sup>d</sup>	F. Molecular
<b>(R)-41b</b>	Ph	R	12.78	+16.5 (c 1.6, MeOH)	488.64	488.5	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl
<b>(S)-41b</b>		S	13.26	+19.3 (c 1.5, MeOH)	488.64	488.5	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl
<b>(R)-42b</b>		R	14.85	+9.8 (c 0.4, MeOH)	555.22	556.63	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl
<b>(S)-42b</b>		S	14.09	+12.3 (c 1.1, MeOH)	555.22	556.63	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl
<b>(R)-44b</b>		R	13.46	+15.6 (c 0.8, MeOH)	545.34	546.62	C <sub>32</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ·2HCl
<b>(S)-44b</b>		S	13.52	+19.7 (c 0.7, MeOH)	545.34	546.62	C <sub>32</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ·2HCl
<b>(R)-45b</b>		R	13.65	+15.2 (c 0.8, MeOH)	533.32	533.65	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl
<b>(S)-45b</b>		S	13.69	+21.5 (c 1.3, MeOH)	533.32	534.65	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron obtenidos como sólidos amorfos. <sup>b</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>c</sup>Masa calculada para el ion molecular sin considerar HCl. <sup>d</sup>Abundancia relativa entre 15-25%. El pico base del espectro de masas corresponde a la masa de [(M+2)/2].

**Tabla 4.15.-** Datos espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de lisina y fenilacetaldehído desprotegidas **41b** y **42b**.


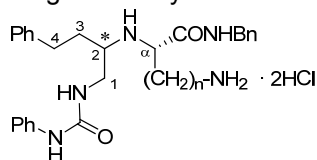
Compuesto	(R)-41b	(S)-41b	(R)-42b	(S)-42b
R <sup>2</sup>	Ph			
Config. (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
<sup>1</sup> H-RMN <sup>a</sup>				
1-H	3.08-3.34	2.99-3.09, 3.51-3.60	3.27-3.40	2.96-3.19
2-H	3.24	3.23	3.23	3.23
3-H	2.77-2.92, 3.08-3.34	2.78-2.94, 3.08-3.18	2.91, 3.27-3.40	2.61-2.95
NH-CO-NH	6.89	6.89, 7.15	7.59	-
2-NH <sup>b</sup>	9.01, 9.77	9.09, 9.51	8.99, 9.67	9.16
<i>Aminoácido</i>				
α-H	4.20	4.23-4.48	4.26	4.31
β-H	1.72-2.08	1.74-2.01	1.82-2.05	1.68-1.98
γ-H	1.25-1.48	1.28-1.49	1.37-1.49	1.17-1.42
δ-H	1.50-1.70	1.51-1.69	1.53-1.71	1.46-1.68
ε-H	2.72	2.69	2.80	2.71
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	8.01	8.08	7.94	7.92
NH-Bn	9.47	9.51	9.43	9.41
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.28, 4.45	4.33	4.38, 4.52	4.36
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5, 6	5	5, 6	5
<sup>13</sup> C-RMN <sup>c</sup>				
C <sub>1</sub>	43.3	43.3	42.6	43.1
C <sub>2</sub>	57.9	58.9	57.2	58.5
C <sub>3</sub>	34.3	35.7	32.0	35.0
NH-CO-NH	157.3	157.0	155.9	156.2
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	60.3	59.8	58.8	59.0
C <sub>β</sub>	30.2	30.4	29.4	29.5
C <sub>γ</sub>	22.0	22.1	21.3	21.9
C <sub>δ</sub>	27.1	27.0	26.5	26.9
C <sub>ε</sub>	38.9	38.5	37.5	38.8
CO	167.8	168.0	167.1	167.9
CH <sub>2</sub> (Bn)	38.9	38.9	38.3	38.9

<sup>a</sup>Espectros registrados a 300, 400 o 500 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>b</sup>La suma de las integrales de las dos señales equivale a 2H. Estas señales corresponden al 2-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> y su presencia debe ser debida a la existencia de conformaciones en equilibrio dinámico. <sup>c</sup>Espectros registrados a 75, 100 o 125 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.16.-** Datos espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de lisina y fenilacetaldehído desprotegidas **44b** y **45b**.

Compuesto	(R)-44b	(S)-44b	(R)-45b	(S)-45b
R <sup>2</sup>				
Config. (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
<sup>1</sup> H-RMN <sup>a</sup>				
1-H	3.03-3.25	2.78, 3.03	3.08-3.26	2.97, 3.18
2-H	3.03-3.25	3.15	3.04	3.15
3-H	2.68-2.79, 3.03-3.25	2.96, 3.03	2.78, 3.08-3.26	2.78, 3.04
NH-CO-NH	6.37, 6.50	6.57, 6.76	6.43, 6.59	6.63, 6.82
2-NH <sup>b</sup>	9.45	9.00, 9.92	9.42, 9.84	9.02, 9.91
R <sup>2,c</sup>	2.63 (2'-H), 3.03-3.25 (1'-H), 3.69 (OCH <sub>3</sub> )	2.71 (2'-H), 3.20 (1'-H), 3.69 (OCH <sub>3</sub> )	2.68 (2'-H), 3.08-3.26 (1'-H),	2.68 (2'-H), 3.22 (1'-H)
<i>Aminoácido</i>				
α-H	4.09	4.21	4.21	4.23
β-H	1.74-1.95	1.83	1.75-1.98	1.84
γ-H	1.27-1.39	1.35	1.30-1.41	1.36
δ-H	1.39-1.64	1.59	1.50-1.67	1.59
ε-H	2.71	2.62	2.71	2.72
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	7.80	8.03	7.95	8.07
NH-Bn	9.25	9.45	9.47	9.48
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.28, 4.47	4.36	4.28, 4.46	4.36
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5, 6	6	5, 6.5	6
<sup>13</sup> C-RMN <sup>a</sup>				
C <sub>1</sub>	41.9	42.6	42.9	43.0
C <sub>2</sub>	55.4	58.4	57.6	58.9
C <sub>3</sub>	34.3	34.9	33.9	35.2
NH-CO-NH	161.5	159.8	162.2	162.2
R <sup>2,c</sup>	35.4 (C <sub>2</sub> '), 38.0 (C <sub>1</sub> '), 55.4 (OCH <sub>3</sub> ),	34.7 (C <sub>2</sub> '), 38.2 (C <sub>1</sub> '), 54.9 (OCH <sub>3</sub> )	35.3 (C <sub>2</sub> '), 38.7 (C <sub>1</sub> ')	35.5 (C <sub>2</sub> '), 38.7 (C <sub>1</sub> ')
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	56.8	60.0	61.2	60.4
C <sub>β</sub>	30.5	29.6	30.0	31.8
C <sub>γ</sub>	21.1	21.3	21.6	20.1
C <sub>δ</sub>	27.2	26.3	26.8	26.7
C <sub>ε</sub>	38.0	38.7	38.7	39.1
CO	-	167.4	167.5	167.9
CH <sub>2</sub> (Bn)	38.8	40.1	41.7	40.6

<sup>a</sup>Espectros registrados a 300, 400 o 500 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>b</sup>La suma de las integrales de las dos señales equivale a 2H. Estas señales corresponden al 2-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> y su presencia debe ser debida a la existencia de conformaciones en equilibrio dinámico. <sup>c</sup>Datos de protón y carbono aromáticos no incluidos. <sup>d</sup>Espectros registrados a 75, 100 o 125 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

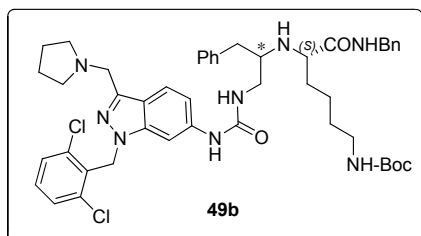
**Tabla 4.17.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de 3-fenilpropionaldehído desprotegidas **46a** y **46b**.


Compuesto <sup>a</sup>	(R)-46a	(S)-46a	(RS)-46b	
n	3	3	4	
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl	
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	-	-	13.26	13.45
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+6.9 (c 0.9, MeOH)	+11.3 (c 1, MeOH)	-	-
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado <sup>c</sup>	488.64	488.64	502.66	
Encontrado <sup>d</sup>	488.50	488.50	502.50	
<sup>1</sup> H RMN <sup>e</sup>				
1-H	3.35-3.71	3.22-3.45	3.38-3.65	
2-H	3.05	3.08	2.91-3.06	
3-H	1.80-2.09	1.70-2.06	1.70-1.96	
4-H	2.55-2.76	2.64-2.94	2.58-2.78	
2-NH <sup>f</sup>	9.11, 9.43	9.10, 9.40	8.93, 9.46	8.77, 9.33
<i>Aminoácido</i>				
α-H	4.25	4.09	4.16	4.03
β-H	1.80-2.09	1.70-2.06	1.43-1.62	
γ-H	1.61-1.80	1.51-1.71	1.23-1.40	
δ-H	2.76-2.96	2.64-2.92	1.70-1.96	
ε-H	-	-	2.58-2.78	
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	7.95	8.07	7.92	
NH-Bn	9.33	9.19	9.32	9.32
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.25, 4.40	4.33	4.26, 4.35	4.30
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	4, 5	5	5, 7	5
<sup>13</sup> C RMN <sup>g</sup>				
C <sub>1</sub>	42.6	42.4	43.0	42.0
C <sub>2</sub>	56.6	57.2	58.8	56.9
C <sub>3</sub>	29.4	30.5	34.8	
C <sub>4</sub>	28.1	27.1	32.1	
NH-CO-NH	156.5	156.0	156.7, 156.2	
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	57.8	57.5	60.1	
C <sub>β</sub>	27.2	27.1	33.0	
C <sub>γ</sub>	22.7	22.4	22.9	
C <sub>δ</sub>	31.0	30.9	29.8	
C <sub>ε</sub>	-	-	40.0	
CO	166.9	166.5	174.9	
CH <sub>2</sub> (Bn)	38.1	37.8	43.3	

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron obtenidos como sólidos amorfos. <sup>b</sup>Columna Sunfire C18 (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>c</sup>Masa calculada para el ion molecular sin considerar HCl. <sup>d</sup>Abundancia relativa entre 15-25%. El pico base del espectro de masas corresponde a la masa de [(M+2)/2]<sup>+</sup>. <sup>e</sup>Espectros registrados a 400 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>f</sup>La suma de las integrales de las dos señales equivale a 2H. Estas señales corresponden al 2-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> y su presencia debe ser debida a la existencia de conformaciones en equilibrio dinámico. <sup>g</sup>Espectros registrados a 100 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC

### 4.3.5. Síntesis de las ureas análogas al antagonista de referencia RWJ-58259.

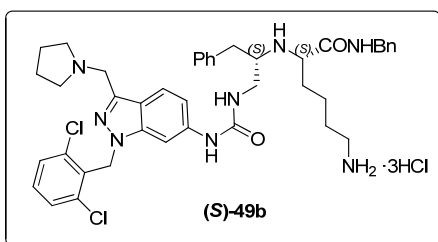
#### 4.3.5.1. Síntesis de las ureas derivadas de 6-aminoindazol (*R*)- y (*S*)- 49b.



A una disolución de la correspondiente amina *N*-Fmoc protegida (*R*)- y (*S*)-40b (205 mg, 0.3 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (20 ml) se le añadió Et<sub>2</sub>NH (320 µl, 3 mmol). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se procesó según se ha descrito en el procedimiento general descrito

de *N*-Fmoc desprotección (apartado 4.3.1.2). De esta forma, se obtuvieron de forma cuantitativa las aminas (*R*)- y (*S*)-30b que, sin posterior purificación, se utilizaron en la síntesis de la correspondiente urea (*R*)- y (*S*)-49b. Para ello, a una disolución del 6-aminoindazol 47 (79 mg, 0.21 mmol) en THF seco (5 ml), previamente enfriada a 0 °C, se le añadió óxido de propileno (118 µl, 1.68 mmol) y una solución de trifosgeno (20 mg, 0.07 mmol) en THF seco (1 ml) gota a gota. Tras 5 min de agitación, se añadió lentamente una disolución de la amina anteriormente obtenida (*R*)- o (*S*)-30b (0.21 mmol) en THF seco (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en AcOEt (50 ml). La disolución resultante se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml) y disolución saturada de NaCl (2 x 10 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía flash en fase reversa KP-C18-HS 12g (12 x 150 mm), utilizando como eluyente un gradiente 10-100% de CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O-0,5%TFA. De este modo, se aislaron las ureas derivadas de 6-aminoindazol (*R*)-49b (20%) y (*S*)-49b (85%), cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos, se recogen en la Tabla 4.18.

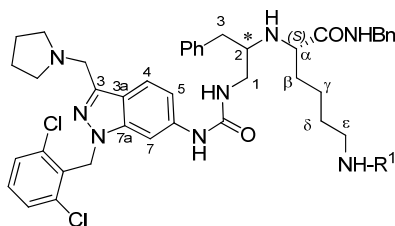
#### 4.3.5.2. *N*-Boc desprotección de la urea derivada de indazol (*S*)-49b. Síntesis de (*S*)-50b.



La urea *N*-Boc protegida (*S*)-49b (130 mg, 0.15 mmol) se disolvió en una disolución 3 N de HCl en AcOEt (5 ml). Después de 1 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a vacío. El residuo obtenido se disolvió en H<sub>2</sub>O (3 ml) y se liofilizó. De este modo, se obtuvo de

forma cuantitativa el hidrocloreto de la urea desprotegida (**S**)-**50b**. Los datos analíticos y espectroscópicos de esta urea se recogen en la Tabla 4.18.

**Tabla 4.18.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de indazol **49b** y **50b**.



Compuesto <sup>a</sup>	( <i>R</i> )- <b>49b</b>	( <i>S</i> )- <b>49b</b>	( <i>S</i> )- <b>50b</b>
R <sup>1</sup>	Boc	Boc	H
Config (*)	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>S</i> )
F. Molecular	C <sub>47</sub> H <sub>58</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>58</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ·3HCl
Rdto (%)	20	85	100
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	16.33	16.51	13.11
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	3.26	3.26	2.73
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+8.4 (c 1, MeOH);	+5.6 (c 1, MeOH)	+1.6 (c 1.2, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>			
Calculado <sup>d</sup>	869.40	869.40	769.34
Encontrado <sup>e</sup>	869.49	869.56	769.37
<sup>1</sup> H-RMN <sup>f</sup>			
1-H	3.21-3.43	3.18-3.31, 3.55	3.16-3.59
2-H	3.27	3.23	3.12
3-H	2.74-3.07	2.74-3.07	2.84
NH-CO-NH	8.72, 11.8	8.92, 11.78	8.01, 9.66
2-NH <sup>g</sup>	-	-	9.43, 10.58
<i>Aminoácido</i>			
α-H	3.93	4.25	4.14
β-H	1.75-1.94	1.76-1.83	1.74
γ-H	1.02-1.46	1.08-1.42	1.32
δ-H	1.02-1.46	1.08-1.42	1.53
ε-H	2.74-2.92	2.72-2.86	2.66
ε-NH-R <sup>1</sup>	4.64	4.70	-
R <sup>1</sup>	1.31	1.29	-
CH <sub>2</sub> -Bn	4.29	4.30	4.32
NH-Bn	8.12	9.18	9.08
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	7	5	7
<i>Indazol</i>			
pirrolidina	1.69, 1.85, 3.02, 3.45	1.70, 1.87, 2.98, 3.45	1.77-1.95, 3.04
CH <sub>2</sub> -pirrolidina	4.36	4.36	4.54
CH <sub>2</sub> -diCIPh	5.52	5.50	5.57
4-H	7.41	7.43	7.02-7.95
5-H	6.94	6.99	7.02-7.95
7-H	7.87	7.80	7.02-7.95

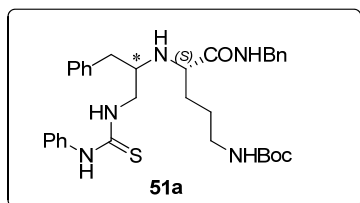
Tabla 4.18.- (Continuación)

<sup>13</sup> C-RMN <sup>h</sup>	(R)-49b	(S)-49b	(S)-50b
C <sub>1</sub>	40.8	40.3	38.3
C <sub>2</sub>	60.2	61.5	58.8
C <sub>3</sub>	34.9	36.6	35.1
NHCONH	157.4	158.5	156.1
<i>Aminoácido</i>			
C <sub>α</sub>	59.3	60.6	58.2
C <sub>β</sub>	29.5	30.7	29.7
C <sub>γ</sub>	21.7	21.9	21.4
C <sub>δ</sub>	29.1	29.3	26.4
C <sub>ε</sub>	39.4	39.7	38.2
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.8	44.2	42.6
CONH	167.2	167.6	167.3
R <sup>1</sup>	28.3, 79.5, 162.2	28.5, 79.4, 162.1	-
<i>Indazol</i>			
pirrolidina	23.4, 52.3	23.6, 52.8	22.6, 52.7
CH <sub>2</sub> -pirrolidina	48.1	48.6	47.7
CH <sub>2</sub> -diCIPh	47.7	48.0	47.2
C <sub>3</sub>	133.7	133.7	138.2
C <sub>3a</sub>	119.5	119.8	120.6
C <sub>4</sub>	119.2	119.3	117.8
C <sub>5</sub>	116.3	116.4	114.6
C <sub>6</sub>	138.8	138.8	139.7
C <sub>7</sub>	98.8	98.8	98.4
C <sub>7a</sub>	141.6	141.7	141.3

<sup>a</sup>Todos los compuestos se aislaron como sólidos amorfos. <sup>b</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>c</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. Masa calculada para el ion molecular sin considerar HCl para **(S)-50b**. <sup>d</sup>Abundancia relativa entre 15-25%. El pico base del espectro de masas corresponde a la masa de [(M+2)/2]<sup>+</sup> para **(S)-50b**. <sup>e</sup>Espectros registrados a 500 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>f</sup>La suma de las integrales de las dos señales equivale a 2H. Estas señales corresponden al 2-NH<sub>2</sub><sup>+</sup> y su presencia debe ser debida a la existencia de conformaciones en equilibrio dinámico. <sup>g</sup>Espectros registrados a 125 MHz en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

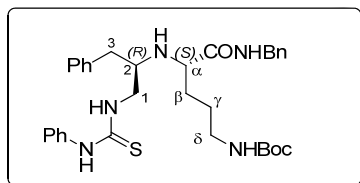
### 4.3.6. Síntesis de tioureas.

#### 4.3.6.1. Procedimiento general para la obtención de tioureas (*R*)- y (*S*)-51a.



A una disolución de la correspondiente amina *N*-Fmoc protegida (*R*)- y (*S*)-40a (203 mg, 0.3 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (20 ml) se le añadió Et<sub>2</sub>NH (320  $\mu$ l, 3 mmol). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se procesó según se ha descrito en el procedimiento general de *N*-Fmoc desprotección (apartado 4.3.1.2). De esta forma, se obtuvieron de forma cuantitativa las aminas (*R*)- y (*S*)-30a que, sin posterior purificación, se utilizaron en la síntesis de la correspondiente tiourea (*R*)- y (*S*)-51a, respectivamente. Para ello, sobre una disolución de la amina anteriormente obtenida (*R*)- y (*S*)-30a (0.3 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 ml) enfriada a 0 °C, se añadió isotiocianato de fenilo (40.5 mg, 0.3 mmol). Después de 2 h agitando a 0 °C, la reacción se procesó según se ha descrito en el procedimiento general B de síntesis de ureas (Método B, apartado 4.3.4.1). De este modo, se aislaron las tioureas (*R*)- y (*S*)-51a, cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos se indican a continuación:

#### *N*-[(2*R*)-3-Fenil-1-(feniltioureido)prop-2-il]-Lys(Boc)-NH-Bn [(*R*)-51a]



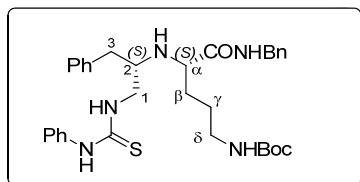
Espuma (121 mg, 68%); Fórmula molecular: C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S;  $[\alpha]_D^{20} = + 3.0$  (c 1, MeOH); HPLC [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu$ m), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min];  $t_R = 18.42$  min.

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1.38 (s, 9H, Boc), 1.10-1.65 (m, 4H,  $\beta$ -H y  $\gamma$ -H), 2.71-2.91 (m, 3H, 3-H y  $\delta$ -H), 2.97 (dd, J = 7.5 y 13 Hz, 1H, 3-H), 3.09-3.30 (m, 2H,  $\alpha$ -H y 2-H), 3.63 (d, 2H, J = 5 Hz, 1-H), 4.21 [dd, J = 6.5 y 15 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> (Bn)], 4.43 [dd, J = 5 y 15 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> (Bn)], 4.53 (m, 1H, NH-Boc), 6.79 y 7.85 (2s, 2H, NHCSNH), 7.04-7.63 (m, 16H, aromáticos y NH-Bn).

<sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 25.9 (CH<sub>2</sub>, C $\gamma$ ), 28.3 (CH<sub>3</sub>, Boc), 30.5 (CH<sub>2</sub>, C $\beta$ ), 39.4 (CH<sub>2</sub>, C $\delta$ ), 43.2 (CH<sub>2</sub>, Bn), 58.1 (CH, C $\alpha$ ), 59.7 (CH, C<sub>2</sub>), 79.3 (C, Boc), 125.0-138.3 (15 CH y 3 C, aromáticos), 156.3 (C, Boc), 174.9 (CONH), 181.2 (CS).

ESI-MS,  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S, 590.31; encontrado 590.58 (100%).

Análisis calculado para C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S (%): C, 67.20; H, 7.35; N, 11.87; Encontrado: C, 67.24; H, 7.55; N, 11.93.

**N-[(2S)-3-Fenil-1-(feniltioureido)prop-2-il]-Lys(Boc)-NHBn [(S)-51a].**

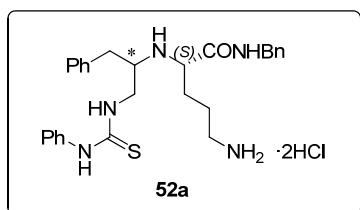
Espuma (125 mg, 72%); Fórmula molecular:  $C_{33}H_{43}N_5O_3S$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +7.5$  (c 1.1, MeOH); **HPLC** [Sunfire  $C_{18}$  (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min];  $t_R = 18.67$  min.

**$^1H$ -RMN** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.38 (s, 9H, Boc), 1.23-1.90 (m, 4H,  $\beta$ -H y  $\gamma$ -H), 2.87-3.17 (m, 6H, 1-H, 3-H y  $\delta$ -H), 3.40 (m, 1H, 2-H), 3.62 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 4.10 [dd, J = 7 y 15 Hz, 1H,  $CH_2$  (Bn)], 4.38 [dd, J = 5 y 15 Hz, 1H,  $CH_2$  (Bn)], 4.71 (m, 1H, *NH*-Boc), 6.69 y 8.05 (2s, 2H, *NHCSNH*), 7.02-7.54 (m, 16H, aromáticos y *NH*-Bn).

**$^{13}C$ -RMN** (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 26.2 ( $CH_2$ ,  $C_\gamma$ ), 28.4 ( $CH_3$ , Boc), 29.3 ( $CH_2$ ,  $C_\beta$ ), 39.5 ( $CH_2$ ,  $C_\delta$ ), 40.5 ( $CH_2$ ,  $C_3$ ), 43.1 ( $CH_2$ , Bn), 58.3 (CH,  $C_\alpha$ ), 59.3 (CH,  $C_2$ ), 79.5 (C, Boc), 124.5-138.4 (15 CH y 3C, aromáticos), 156.4 (C, Boc), 173.4 (CONH), 181.3 (CS).

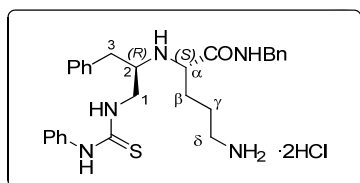
**ESI-MS**,  $m/z$   $[M+1]^+$  calculado para  $C_{33}H_{44}N_5O_3S$ , 590.31; encontrado 590.58 (100%).

Análisis calculado para  $C_{33}H_{43}N_5O_3S$  (%): C, 67.20; H, 7.35; N, 11.87; Encontrado: C, 67.15; H, 7.45; N, 11.86.

**4.3.6.2. N-Boc desprotección de las tioureas (R)- y (S)-51a. Síntesis de (R)- y (S)-52a.**

La correspondiente tiourea *N*-Boc protegida (**(R)-** y (**(S)-51a**) (80 mg, 0.15 mmol) se disolvió en una disolución 3 N de HCl en AcOEt (5 ml), según el protocolo general descrito anteriormente en el apartado 4.3.4.3 para la eliminación del grupo Boc de ureas, obteniendo las

tioureas desprotegidas (**(R)-** y (**(S)-52a**), con rendimientos cuantitativos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas tioureas se detallan a continuación.

**Hidrocloruro de N-[(2R)-3-fenil-1-(feniltioureido)prop-2-il]-Lys(H)-NHBn [(R)-52a]**

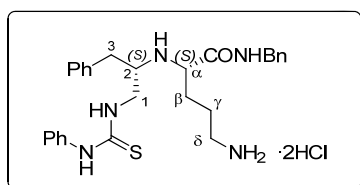
Sólido amorfo (42 mg, 100%); Fórmula molecular:  $C_{28}H_{35}N_5OS \cdot 2HCl$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +10.7$  (c 1, MeOH). **HPLC** [Sunfire  $C_{18}$  (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min];  $t_R = 13.29$  min.

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.50-1.76 (m, 2H, γ-H), 1.78-2.06 (m, 2H, β-H), 2.72-3.27 (m, 4H, 3-H y δ-H), 3.46-3.66 (m, 2H, 1-H), 3.80 (m, 1H, 2-H), 4.25 [dd, 1H, J = 6 y 15 Hz, CH<sub>2</sub>(Bn)], 4.37 (m, 1H, α-H), 4.53 [dd, 1H, J = 5 y 15 Hz, CH<sub>2</sub>(Bn)], 7.10 (s, 1H, NHCSNH), 6.93-7.55 (m, 16H, aromáticos y NHCSNH), 8.05 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.41 (s, 1H, NHBn), 8.75 y 10.22 (2sa, 2H, 2-NH).

**<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 22.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>γ</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>β</sub>), 28.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 34.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>δ</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub>, Bn), 42.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 57.0 (CH, C<sub>2</sub>), 58.3 (CH, C<sub>α</sub>), 117.7-139.9 (15 CH y 3C, aromáticos), 166.9 (C, CONH), 181.0 (C, CS).

**ESI-MS**, *m/z* [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>OS, 490.26; encontrado 246.13 (100%) [(M+2)/2]<sup>+</sup>, 490.48 (15%) [M+1]<sup>+</sup>.

**Hidrocloruro de N-[(2S)-3-fenil-1-(feniltioureido)prop-2-il]-Lys(H)-NHBn [(S)-52a]**



Sólido amorfo (53 mg, 100%); Fórmula molecular: C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>OS·2HCl; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +2.9 (c 0.7, MeOH); **HPLC** [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min]; *t<sub>R</sub>* = 13.40 min.

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.51-2.06 (m, 2H, β-H y γ-H), 2.73-3.22 (m, 5H, 2-H, 3-H y δ-H), 3.52-3.60 (m, 2H, 1-H), 4.29 (m, 1H, α-H), 4.40 [d, 2H, J = 6 Hz, CH<sub>2</sub>(Bn)], 7.10 (s, 1H, NHCSNH), 6.69-7.71 (m, 15H, aromáticos y NHCSNH), 7.94 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.42 (s, 1H, NHBn), 9.19 y 9.54 (2sa, 2H, 2-NH).

**<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 22.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>γ</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>β</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>δ</sub>), 38.9 (CH<sub>2</sub>, Bn), 42.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 57.0 (CH, C<sub>2</sub>), 58.8 (CH, C<sub>α</sub>), 123.4-138.7 (15 CH y 3C, aromáticos), 166.9 (C, CONH), 181.7 (C, CS).

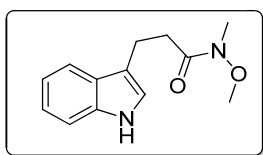
**ESI-MS**, *m/z* [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>OS, 490.26; encontrado 246.13 (100%) [(M+2)/2]<sup>+</sup>, 490.48 (15%) [M+1]<sup>+</sup>.

## 4.4. SÍNTESIS DE 2-OXOPIPERAZINAS

### 4.4.1. Productos de partida no comerciales

#### 4.4.1.1. Síntesis de 3-(indol-3-il)-*N*-metil-*N*-metoxipropanamida <sup>302</sup>(65).

Sobre una disolución del ácido 3-(indol-3-il)propanoico (1.00 g, 5.29 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 ml) se adicionó CDI (1.03 g, 6.34 mmol). Después de 15 min de agitación a temperatura ambiente, se adicionó hidrocloreuro de *N,O*-dimetilhidroxilamina (0.62 g, 6.34 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se añadió H<sub>2</sub>O (5 ml) y la fase acuosa se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 25 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó a sequedad. El crudo de reacción, así obtenido, se utilizó sin purificación adicional para la siguiente etapa de la síntesis. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **65** se detallan a continuación:



Sirupe (1.23 g, 99 %); Fórmula molecular: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **HPLC-MS** [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5µm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min]; *t<sub>R</sub>* = 4.23 min; [M+1]<sup>+</sup> = 233.30.

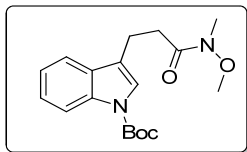
<sup>1</sup>**H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.88 (t, J = 8 Hz, 2H, 2-H), 3.17 (t, J = 8 Hz, 2H, 1-H), 3.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.08 [s, 1H, 2-H (Indol)], 7.16 [dt, J = 1 y 8 Hz, 1H, 6-H (Indol)], 7.24 [dt, J = 1 y 8 Hz, 1H, 5-H (Indol)], 7.40 [dd, J = 1 y 8 Hz, 1H, 7-H (Indol)], 7.68 [d, J = 7.5 Hz, 1H, 4-H (Indol)], 8.15 [sa, 1H, NH (Indol)]

<sup>13</sup>**C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 20.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 32.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 32.9 (CH<sub>3</sub>), 61.3 (OCH<sub>3</sub>), 111.3 [CH, C<sub>7</sub> (Indol)], 115.5 [C, C<sub>3</sub> (Indol)], 118.8 [CH, C<sub>4</sub> (Indol)], 119.3 [CH, C<sub>5</sub> (Indol)], 121.8 [CH, C<sub>6</sub> (Indol)], 122.0 [CH, C<sub>2</sub> (Indol)], 127.4 [C, C<sub>3a</sub> (Indol)], 136.4 [C, C<sub>7a</sub> (Indol)], 174.3 (CONH)

**ESI-MS** *m/z* [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 233.28; encontrado 233.30 (100%) [M+H]<sup>+</sup>, 255.28 (70%) [M+Na]<sup>+</sup>.

#### 4.4.1.2. *N*-Boc protección de 3-(indol-3-il)-*N*-metil-*N*-metoxipropanamida (**65**). Síntesis de 3-[*N*-(*tert*-butoxicarbonil)indol-3-il]-*N*-metil-*N*-metoxipropanamida (**66**).

Sobre una disolución de la *N*-metil-*N*-metoxiamida **65** (1.22 g, 5.25 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (75 ml) se adicionó TEA (769 µl, 5.51 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se le adicionó lentamente dicarbonato de di-*tert*-butilo (1.20 g, 5.51 mmol) y DMAP (38 mg, 0.31 mmol). Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a vacío y el residuo se disolvió en AcOEt (75 ml). La disolución se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (3 x 20 ml) y disolución saturada de NaCl (20 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo así obtenido se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente un gradiente 20-70% de AcOEt en hexano. De este modo, se obtuvo el compuesto del epígrafe **66**, cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos se detallan a continuación:



Sirupe (1.10 g, 67 %) Fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. **HPLC-MS** [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 µm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min]; *t<sub>R</sub>* = 5.69 min, [M+1]<sup>+</sup> = 333.40.

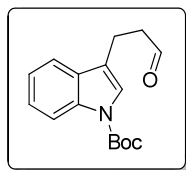
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.66 (s, 9H, Boc), 2.83 (t, J = 8 Hz, 2H, 1-H), 3.04 (t, J = 8 Hz, 2H, 2-H), 3.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.64 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.36-7.19 [m, 2H, 5-H y 6-H (Indol)], 7.41 [s, 1H, 2-H (Indol)], 7.55 [d, J = 8 Hz, 1H, 7-H (Indol)], 8.11 [d, J = 8 Hz, 1H, 4-H (Indol)].

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 19.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 27.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 28.2 (CH<sub>3</sub>, Boc), 31.6 (CH<sub>3</sub>), 61.2 (OCH<sub>3</sub>), 83.4 (C, Boc), 115.2 [C, C<sub>3</sub> (Indol)], 118.9 [CH, C<sub>7</sub> (Indol)], 120.1 [CH, C<sub>4</sub> (Indol)], 122.4 [CH, C<sub>5</sub> (Indol)], 122.5 [CH, C<sub>6</sub> (Indol)], 124.3 [CH, C<sub>2</sub> (Indol)], 130.4 [C, C<sub>3a</sub> (Indol)], 135.5 [C, C<sub>7a</sub> (Indol)], 149.8 (CO, Boc), 173.6 (CONH).

**ESI-MS** *m/z* [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 332.17; encontrado 333.40 (100%) [M+H]<sup>+</sup>, 355.38 (70%) [M+Na]<sup>+</sup>.

**4.4.1.3. Reducción de 3-[*N*-(*tert*-butoxicarbonil)-indol-3-il]-*N*-metil-*N*-metoxipropanamida (66). Síntesis de 3-[*N*-(*tert*-butoxicarbonil)indol-3-il]propanal<sup>238,239</sup> (61).**

Sobre una disolución de la *N*-metil-*N*-metoxiamida **66** (1.10 g, 3.31 mmol) en THF anhidro (50 ml), enfriada a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, bajo atmósfera de argón, se adicionó lentamente una suspensión de hidruro de litio y aluminio (252 mg, 6.62 mmol) en THF (5 ml). La evolución de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, y una vez consumida la carboxamida de partida, se adiciono AcOEt (20 ml) seguido de H<sub>2</sub>O (20 ml). La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se separó la fase orgánica de la acuosa. Seguidamente la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 20 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. De este modo, se obtuvo el aldehído **61**, cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos se detallan a continuación:

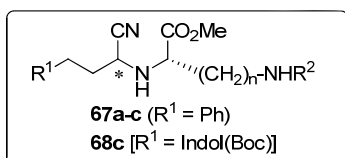


Sirupe (890 mg, 99 %); Fórmula molecular: C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.67 [s, 9H, Boc (Indol)], 2.86 (t, J = 8 Hz, 2H, 1-H), 3.04 (t, J = 8 Hz, 2H, 2-H), 7.45-7.15 [m, 3H, 2-H, 5-H y 6-H (Indol)], 7.52 [d, J = 7.5 Hz, 1H, 7-H (Indol)], 8.13 [d, J = 7.5 Hz, 1H, 4-H (Indol)], 9.86 (t, J = 1.5 Hz, 1H, CHO).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 17.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 27.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>3</sub>, Boc), 84.0 (C, Boc), 115.8 [C, C<sub>3</sub> (Indol)], 119.1 [CH, C<sub>7</sub> (Indol)], 119.6 [CH, C<sub>4</sub> (Indol)], 122.9 [CH, C<sub>5</sub> (Indol)], 123.0 [CH, C<sub>6</sub> (Indol)], 124.9 [CH, C<sub>2</sub> (Indol)], 130.6 [C, C<sub>3a</sub> (Indol)], 136.0 [C, C<sub>7a</sub> (Indol)], 150.1 (CO, Boc), 201.9 (CHO).

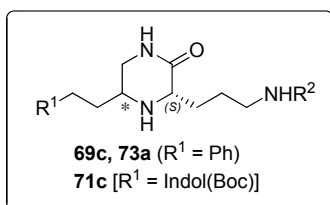
#### 4.4.2. Síntesis de 2-oxopiperazinas.

##### 4.4.2.1. Procedimiento general para síntesis de los $\alpha$ -aminonitrilos **67a-c** y **68c**.

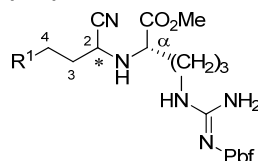


A una suspensión del hidrocloreto del ester metílico del correspondiente  $\alpha$ -aminoácido [H-Orn(Boc)-OMe (**27a**), H-Lys(Boc)-OMe (**27b**) o H-Arg(Pbf)-OMe (**27c**)] (2 mmol) en MeOH (25 ml) se le añadió TEA, (279  $\mu\text{l}$ , 2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, sobre esta disolución se añadió el correspondiente aldehído [3-fenilpropionaldehído (**17**) o indolpropionaldehído (**61**)] (2.2 mmol) y TMSCN (375  $\mu\text{l}$ , 3 mmol). La mezcla de reacción se procesó como se ha indicado en el apartado 4.3.2.3, para el método general de síntesis de  $\alpha$ -aminonitrilos. Así, se obtuvieron los  $\alpha$ -aminonitrilos **67a-c** y **68c**. La purificación de dichos  $\alpha$ -aminonitrilos se llevó a cabo mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 50-100% de AcOEt en hexano. De este modo, se obtuvieron las correspondientes mezclas epiméricas (1:1) de  $\alpha$ -aminonitrilos **67a-c** y **68c**, que no pudieron ser resueltas. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -aminonitrilos se recogen en las Tablas 4.19 y 4.20, agrupados según el aminoácido que incorporan en su estructura.

##### 4.4.2.2. Procedimiento general de reducción/lactamización de los $\alpha$ -aminonitrilos **67a**, **67c** y **68c**. Síntesis de las 2-oxopiperazinas **73a**, **69c** y **71c**.

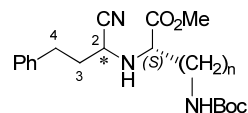


Sobre una disolución del correspondiente  $\alpha$ -aminonitrilo (**R**)-, (**S**)-**67a**, (**RS**)-**67c** y (**RS**)-**68c** (1.3 mmol) en MeOH (20 ml), se añadió Ni Raney ( $\approx 100\text{mg/mmol}$ ) previamente lavado con MeOH, e hidrato de hidrazina (620  $\mu\text{l}$ , 60 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60-70  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Transcurrido este tiempo, el catalizador se filtró sobre celita y se lavó con MeOH (5 x 30 ml). Los filtrados se evaporaron a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente un gradiente 0-10% de MeOH en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . De este modo, se obtuvieron las 2-oxopiperazinas (**R**)- y (**S**)-**73a**, **69c** y **71c**. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas 2-oxopiperazinas se recogen en las tablas 4.21 y 4.22, agrupados según el aminoácido que incorporan en su estructura.

**Tabla 4.19.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los aminonitrilos derivados de arginina (**(RS)**-67c y (**(RS)**-68c.


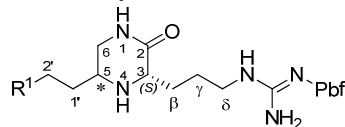
Compuesto <sup>a</sup>	<b>(RS)</b> -67c		<b>(RS)</b> -68c	
R <sup>1</sup>	Ph		Indol(Boc)	
Config.(*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S		C <sub>37</sub> H <sub>50</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	
Rdto. (%)	85		52	
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	5.52		6.29	
ESI-HRMS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	583.2832		722.3462	
Encontrado	583.2828		722.3476	
<sup>1</sup> H-RMN <sup>d</sup>				
2-H	3.46	3.55	3.47	3.64
3-H	1.95-2.14		2.11-2.22	
4-H	2.68-2.89		2.80-3.05	
J <sub>2,3</sub>	7.5	7	7	7
<i>Aminoácido</i>				
α-H	3.32	3.44	3.32	3.48
β-H	1.49-1.85		1.53-1.89	
γ-H	1.49-1.85		1.53-1.89	
δ-H	3.08-3.24		3.07-3.27	
OMe	3.74	3.71	3.74	3.69
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	5.81, 5.99		5.71, 5.96	
J <sub>α,β</sub>	6	7	6	7
<sup>13</sup> C-RMN <sup>e</sup>				
CN	120.3	120.4	119.1	118.9
C <sub>2</sub>	49.0	49.1	48.5	48.9
C <sub>3</sub>	35.8	35.5	33.1	33.2
C <sub>4</sub>	31.9	32.0	20.9	21.1
<i>Aminoácido</i>				
C <sub>α</sub>	60.05	59.2	58.7	59.4
C <sub>β</sub>	30.5	30.8	30.0	30.3
C <sub>γ</sub>	25.7	25.9	25.3	25.5
C <sub>δ</sub>	43.6		41.05	
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	156.6		155.8	
CO <sub>2</sub>	174.7	174.6	174.2	174.2
OMe	52.6	52.6	52.5	52.4

<sup>a</sup>Todos los compuestos se aislaron como sirupes. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>d</sup>Espectros registrados a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>e</sup>Espectros registrados a 75 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.20.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -aminonitrilos derivados de ornitina (n=3) **67a** y de lisina (n=4) **67b**.


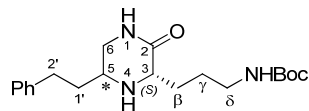
Compuesto <sup>a</sup>	(R)-67a	(S)-67a	(R)-67b	(S)-67b
n	3	3	4	4
Config. (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Rdto. (%)	30	31	28	32
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	24.21	23.87	25.03	24.74
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+ 8.8 (c 1, MeOH)	-20.9 (c 1, MeOH)	+ 5.3 (c 1, MeOH)	-10.6 (c 1, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	390.23	390.23	403.25	403.25
Encontrado	390.50	390.50	403.50	403.50
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>d</sup></b>				
2-H	3.08	3.58	3.40	3.58
3-H	3.30-3.34	2.00-2.12	2.09	1.99-2.16
4-H	2.81	2.74-2.90	2.83	2.72-2.93
<i>Aminoácido</i>				
$\alpha$ -H	3.3	3.49	3.29	3.48
$\beta$ -H	1.57-1.62	1.69-1.80	1.56-1.66	1.54-1.66
$\delta$ -H	3.08	3.13	1.39-1.51	1.67-1.82
$\gamma$ -H	1.45-1.54	1.52-1.61	1.29-1.39	1.33-1.53
$\epsilon$ -H	-	-	3.09	3.01-3.17
NH-Boc	4.57	4.63	4.53	4.54
OMe	3.74	3.71	3.91	3.71
J <sub><math>\alpha,\beta</math></sub>	6	5	6	5, 7
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>e</sup></b>				
CN	119.6	119.6	119.7	118.8
C <sub>2</sub>	48.6	48.5	48.5	47.6
C <sub>3</sub>	35.3	35.0	35.3	34.1
C <sub>4</sub>	31.5	30.5	31.4	30.4
<i>Aminoácido</i>				
C <sub><math>\alpha</math></sub>	59.5	58.6	59.7	57.7
C <sub><math>\beta</math></sub>	30.2	30.5	32.7	28.7
C <sub><math>\gamma</math></sub>	25.9	26.4	22.5	21.5
C <sub><math>\delta</math></sub>	40.0	40.0	29.7	31.9
C <sub><math>\epsilon</math></sub>	-	-	40.2	39.1
CO <sub>2</sub>	174.2	174.3	174.4	173.4
OMe	52.1	52.1	52.1	51.1

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sirupes. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m) gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>d</sup>Espectros registrados a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>e</sup>Espectros registrados a 75 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

**Tabla 4.21.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 2-oxopiperazinas derivadas de arginina **69c** y **71c**.


Compuesto <sup>a</sup>	(R)-69c	(S)-69c	(R)-71c	(S)-71c
R <sup>1</sup>	Ph		Indol(Boc)	
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>36</sub> H <sub>50</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	C <sub>36</sub> H <sub>50</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S
Rdto. (%)	31	35	26	20
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	3.80	3.83	4.10	4.12
Pf (°C) <sup>d</sup>	129-131	128-130	124-126	134-136
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	-0.4 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )	-0.4 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )	-5.8 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )	-4.4 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )
ESI-MS [M+1] <sup>e</sup>				
Calculado	556.73	556.73	695.88	695.88
Encontrado	556.56	556.56	695.72	695.72
<sup>1</sup> H-RMN <sup>e</sup>				
1-H	6.90	6.75	6.93	6.75
3-H	3.32	3.35	3.37	3.41
4-H	2.14	2.14	-	-
5-H	2.89	2.86	2.97	2.97
6-H	2.91, 3.05-3.31	3.04, 3.11-3.24	2.95-3.35	2.96-3.32
β-H	1.53-1.91	1.52-1.89	1.53-1.95	1.54-1.95
γ-H	1.53-1.91	1.52-1.89	1.53-1.95	1.54-1.95
δ-H	3.05-3.31	3.11-3.24	2.95-3.35	2.96-3.32
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	6.51	6.36	6.53	6.33
1'-H	1.53-1.91	1.52-1.89	1.53-1.95	1.54-1.95
2'-H	2.72, 2.63	2.67	2.77	2.76
R <sup>1</sup>	7.12-7.29	7.13-7.31	7.21, 7.30, 7.35, 7.49, 8.09	7.21, 7.30, 7.38, 7.50, 8.10
<sup>13</sup> C-RMN <sup>f</sup>				
C <sub>2</sub>	173.3	173.2	173.2	172.3
C <sub>3</sub>	53.3	58.2	55.2	58.3
C <sub>5</sub>	46.3	52.0	46.6	52.3
C <sub>6</sub>	48.1	48.0	48.0	48.0
C <sub>β</sub>	29.5	29.6	29.6	29.8
C <sub>γ</sub>	26.1	26.1	26.1	25.4
C <sub>δ</sub>	41.0	40.9	40.9	41.1
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	156.6	156.7	156.7	156.5
1'-C	35.0	34.5	32.1	32.9
2'-C	32.3	32.2	21.5	21.4
R <sup>1</sup>	126.3 -141.2	126.2 -141.4	135.6, 130.5, 124.7, 122.6, 120.1, 119.0, 115.4	135.6, 130.5, 124.7, 122.6, 120.2, 119.1, 115.4

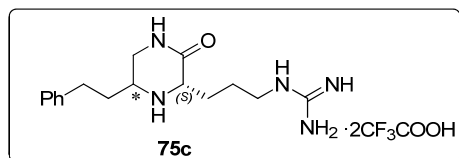
<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>d</sup>Todos los compuestos fueron cristalizados en una mezcla AcOEt/Hexano. <sup>e</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>f</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

**Tabla 4.22.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 2-oxopiperazinas derivadas de ornitina **73a**.


Compuesto <sup>a</sup>	(R)-73a	(S)-73a
Conf (*)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
Rdto. (%)	43	33
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	2.90	2.77
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	- 6.0 (c 1.2, MeOH)	- 9.3 (c 1.2, MeOH)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>		
Calculado	362.24	362.24
Encontrado	362.62	362.62
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>d</sup></b>		
1-H	6.06	7.07-7.38
3-H	3.40	3.45
5-H	2.96	2.58-2.96
6-H	3.03-3.27	3.00-3.19, 3.25
β-H	1.46-1.87	1.48-1.89
γ-H	1.46-1.87	1.48-1.89
δ-H	3.03-3.15	3.00-3.29
NH-Boc	4.90	4.77
1'-H	1.46-1.87	1.48-1.89
2'-H	2.70	2.58-2.96
J <sub>1'-2'</sub>	7.5	-
<b>NOE</b>		
H <sub>3</sub> ,H <sub>5</sub> (%)	3%	0%
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>e</sup></b>		
C <sub>2</sub>	172.1	169.8
C <sub>3</sub>	58.8	57.1
C <sub>5</sub>	52.5	47.8
C <sub>6</sub>	48.6	56.8
C <sub>β</sub>	29.8	29.6
C <sub>γ</sub>	26.4	27.3
C <sub>δ</sub>	35.2	34.6
C <sub>1'</sub>	32.4	32.3
C <sub>2'</sub>	29.5	29.1

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sirupes. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 15-25% de A en B durante 5 min. <sup>d</sup>Espectros registrados a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>e</sup>Espectros registrados a 75 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

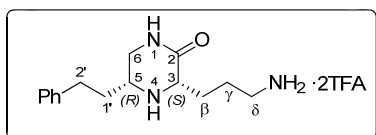
#### 4.4.2.3. Procedimiento general para la eliminación del grupo protector Pbf en (*R*)- y (*S*)-69c. Síntesis de las 2-oxopiperazinas desprotegidas (*R*)- y (*S*)-75c.



La correspondiente 2-oxopiperazina derivada de Arg (*R*)- y (*S*)-69c (93 mg, 0.17 mmol) se disolvió en una mezcla TFA:H<sub>2</sub>O:TIPS (95:2.5:2.5) (1 ml). Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a vacío, el residuo se disolvió en H<sub>2</sub>O (3 ml) y la disolución resultante se liofilizó. De este modo, se obtuvieron de forma cuantitativa los correspondientes trifluoroacetatos de los compuestos del epígrafe (*R*)- y (*S*)-75c que no necesitaron purificación adicional. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas 2-oxopiperazinas se recogen en la Tabla 4.23.

#### 4.4.2.4. *N*-Boc desprotección de las 2-oxopiperazinas (*R*)- y (*S*)-73a. Síntesis de (*R*)- y (*S*)-74a.

La correspondiente 2-oxopiperazina (*R*)- o (*S*)-73a (100 mg, 0.28 mmol) se disolvió en disolución al 20% de TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml). Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a vacío, el residuo se disolvió en 2 ml de H<sub>2</sub>O y se liofilizó. De este modo, se obtuvieron las 2-oxopiperazinas desprotegidas (*R*)- y (*S*)-74a, respectivamente, con rendimiento cuantitativo. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen a continuación:



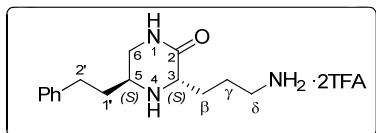
**Trifluoroacetato de (3*S*,5*R*)-3-(3-aminopropil)-5-fenil-2-oxopiperazina [(*R*)-74a].** Sirupe (261 mg, 99%). Fórmula molecular: C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O·2CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H.

**HPLC-MS** [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 2-30% de A en B durante 5 min]; *t<sub>R</sub>* = 0.86 min, [M+1]<sup>+</sup> = 262.37.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 1.60-2.40 (m, 6H, β-H, γ-H y 1'-H), 2.55-2.91 (m, 2H, 2'-H), 3.00 (t, J = 7 Hz, 2H, δ-H), 3.45 (dd, J = 10.5 y 13 Hz, 1H, 6-H), 3.73-3.87 (m, 2H, 6- + 5-H), 3.99-4.26 (m, 1H, 3-H), 7.21-7.45 (m, 5H, aromáticos).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 23.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>γ</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>β</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2'</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1'</sub>), 38.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>δ</sub>), 42.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 52.4 (CH, C<sub>5</sub>), 56.6 (CH, C<sub>3</sub>), 126.8 (CH, Ph), 128.6 (2 CH, Ph), 129.0 (2 CH, Ph), 140.0 (C, Ph), 167.3 (CONH).

**ESI-MS**  $m/z$   $[M+1]^+$  calculado para  $C_{15}H_{24}N_3O_3$ , 261.36 ; encontrado 262.37 (85 %).



**Trifluoroacetato de (3S,5S)-3-(3-aminopropil)-5-feniletil-2-oxopiperazina [(S)-74a]**. Sirupe (130 mg, 99%). Fórmula molecular:  $C_{15}H_{23}N_3O \cdot 2CF_3CO_2H$ .

**HPLC-MS** [Sunfire  $C_{18}$  (4.6 × 150 mm, 3.5  $\mu$ m), gradiente 2-30% de A en B durante 5 min]:  $t_R = 0.72$  min,  $[M+1]^+ = 262.37$ .

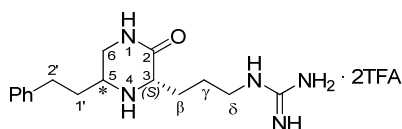
**$^1H$ -RMN** (300 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm) 1.70-2.34 (m, 6H,  $\beta$ -H,  $\gamma$ -H y 1'-H), 2.78 (m, 2H, 2'-H), 3.04 (t,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\delta$ -H), 3.46 (dd,  $J = 10.5$  y 13 Hz, 1H, 6-H), 3.57-3.72 (m, 2H, 6-H y 5-H), 3.99-3.23 (m, 1H, 3-H), 7.21-7.45 (m, 5H, aromáticos).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm) 23.5 ( $CH_2$ ,  $C_\gamma$ ), 26.3 ( $CH_2$ ,  $C_\beta$ ), 30.4 ( $CH_2$ ,  $C_2$ ), 31.5 ( $CH_2$ ,  $C_{1'}$ ), 38.9 ( $CH_2$ ,  $C_\delta$ ), 42.4 ( $CH_2$ ,  $C_6$ ), 52.6 (CH,  $C_5$ ), 56.2 (CH,  $C_3$ ), 126.8 (CH, Ph), 128.6 (2 CH, Ph), 129.1 (2 CH, Ph), 140.2 (C, Ph), 161.5 (CONH).

**ESI-MS**  $m/z$   $[M+1]^+$  calculado para  $C_{15}H_{24}N_3O$ , 262.36; encontrado 262.37(75%).

#### 4.4.2.5. Reacción de guanidilación seguida de *N*-Boc eliminación en (*R*)- y (*S*)-74a. Síntesis de los derivados de arginina (*R*)- y (*S*)-75c.

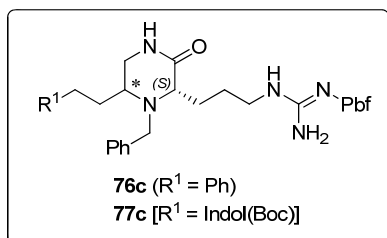
A una disolución de la correspondiente 2-oxopiperazina desprotegida (*R*)- y (*S*)-74a (260 mg, 0.78 mmol) en DMF anhidra (4 ml), se le adicionó TEA (360  $\mu$ l, 2.57 mmol) y *N*-*N'*-di-*tert*-butoxicarbonilurea (226 mg, 0.78 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se le añadió  $HgCl_2$  (232 mg, 0.85 mmol). Después de 3 h de agitación a temperatura ambiente se eliminó el disolvente a vacío. El crudo de reacción se disolvió en AcOEt (25 ml) y se filtró sobre celita para eliminar el sulfuro de mercurio formado en la reacción. Seguidamente, los filtrados se lavaron con  $H_2O$  (3 x 10 ml), disolución de  $Na_2CO_3$  al 5% en  $H_2O$  (1 x 10 ml) y disolución saturada de NaCl (1 x 10 ml). La fase orgánica se secó sobre  $MgSO_4$  anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. De esta forma, se obtuvieron las correspondientes 2-oxopiperazinas derivadas de Arg(Boc)<sub>2</sub> con un rendimiento moderado (10-13%) que, sin purificación adicional, se utilizaron tal cual en la siguiente etapa de síntesis. Este crudo de reacción se disolvió en disolución al 20% de TFA en  $CH_2Cl_2$  (2 ml), según el protocolo general descrito con anterioridad en el apartado 4.4.2.4 para la eliminación del grupo Boc en 2-oxopiperazinas derivadas de ornitina, obteniéndose las 2-oxopiperazinas desprotegidas (*R*)- y (*S*)-75c con rendimiento cuantitativo, idénticas a las obtenidas anteriormente que se han comentado en el apartado 4.4.2.3.

**Tabla 4.23.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 2-oxopiperazinas desprotegidas **75c**.

Compuesto <sup>a</sup>	(R)-75c	(S)-75c
F. Molecular	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O·2CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O·2CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	3.51	6.57
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	-5.4 (c 1, DMSO)	-2.3 (c 1, DMSO)
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>		
Calculado <sup>c</sup>	304.21	304.21
Encontrado <sup>d</sup>	304.44	304.44
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>e</sup></b>		
3-H	3.85	3.84
5-H	3.49	3.42
6-H	3.25, 3.40-3.51	3.28, 3.49
β-H	1.42-2.08	1.50-2.15
γ-H	1.42-2.08	1.50-2.15
δ-H	2.99	3.05
1'-H	1.42-2.08	1.50-2.15
2'-H	2.57	2.50-2.78
<b>NOE</b>		
H <sub>3</sub> ,H <sub>5</sub> (%)	4	0
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>f</sup></b>		
C <sub>2</sub>	167.8	167.9
C <sub>3</sub>	56.4	53.9
C <sub>5</sub>	52.5	49.1
C <sub>6</sub>	42.4	41.7
C <sub>β</sub>	26.4	26.8
C <sub>γ</sub>	24.4	24.7
C <sub>δ</sub>	40.4	40.4
NHC(NH)NH <sub>2</sub>	156.9	156.8
C <sub>1'</sub>	31.3	30.6
C <sub>2'</sub>	30.4	30.1
Ph	140.2, 128.9, 128.5, 126.8	140.128.9, 128.5, 126.8

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sirupes. <sup>b</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×150 mm, 3.5 μm) gradiente 2-30% de A en B durante 5 min. <sup>c</sup>Masa calculada para el ion molecular sin considerar 2TFA. <sup>d</sup>Abundancia relativa entre 15-25%. El pico base del espectro de masas corresponde a la masa de [(M+2)/2]<sup>+</sup>. <sup>e</sup>Espectros registrados a 400 MHz en D<sub>2</sub>O. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>f</sup>Espectros registrados a 100 MHz en D<sub>2</sub>O. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

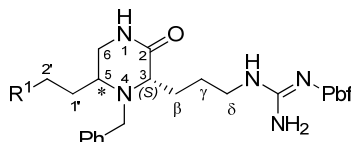
**4.4.2.6. Procedimiento general para la N-bencilación de la posición 4 de las 2-oxopiperazinas 69c y 71c. Síntesis de las 4-bencil-2-oxopiperazinas 76c y 77c.**



A una disolución de la correspondiente 2-oxopiperazina (**R**)-, (**S**)-**69c** y **-71c** (0.55 mmol) en 3 ml de tolueno se añadió sucesivamente DIEA (190  $\mu$ l, 1.1 mmol) y bromuro de bencilo (260  $\mu$ l, 2.2 mmol). La mezcla de reacción, se agitó a 100 °C durante 3 h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente a

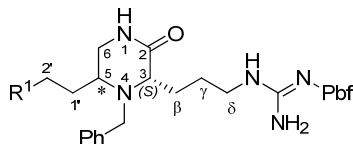
sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente un gradiente 50-100% de AcOEt en acetona. De este modo, se obtuvieron las correspondientes 4-bencil-2-oxopiperazinas (**R**)-, (**S**)-**76c** y **-77c**. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos compuestos se recogen en las Tablas 4.24 y 4.25.

**Tabla 4.24.-** Datos analíticos más significativos de las 4-bencil-2-oxopiperazinas **76c** y **77c**.



Compuesto <sup>a</sup>	( <i>R</i> )-76c	( <i>S</i> )-76c	( <i>R</i> )-77c	( <i>S</i> )-77c
R <sup>1</sup>	Ph	Ph	Indol(Boc)	Indol(Boc)
Config. (*)	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>36</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>43</sub> H <sub>56</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	C <sub>43</sub> H <sub>56</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S
Rdto. (%)	73	72	79	70
HPLC <i>t</i> <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	5.06	4.52	4.85	4.37
Pf (°C) <sup>d</sup>	89-91	73-75	105-107	94-96
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+0 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )	+0 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )	-1.4 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )	+1.2 (c 2, CHCl <sub>3</sub> )
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	646.85	646.85	786.00	786.00
Encontrado	646.58	646.58	785.82	785.82

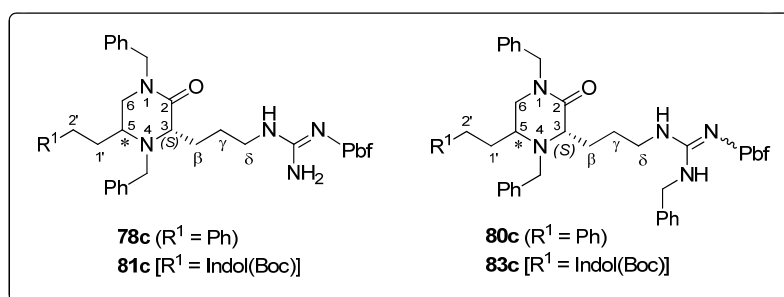
<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5  $\mu$ m) gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>d</sup>Todos los compuestos fueron cristalizados en una mezcla AcOEt/Hexano.

**Tabla 4.25.-** Datos espectroscópicos más significativos de las 4-*N*-bencil-2-oxopiperazinas **76c** y **77c**.

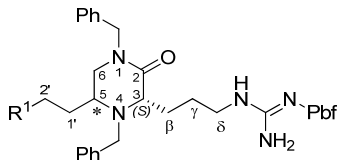
Compuesto	( <i>R</i> )-76c	( <i>S</i> )-76c	( <i>R</i> )-77c	( <i>S</i> )-77c
R <sup>1</sup>	Ph	Ph	Indol(Boc)	Indol(Boc)
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>a</sup></b>				
1-H	7.11-7.35	7.10	7.19-7.35	7.15-7.35
3-H	3.12-3.23	3.05-3.18	3.18-3.08	3.02-3.26
4-CH <sub>2</sub>	3.37, 3.91	3.61, 3.81	3.19-3.63, 3.90	3.59-3.73, 3.83
5-H	3.12-3.23	3.05-3.18	3.19-3.53	3.02-3.26
6-H	3.12-3.33	3.35-3.45, 3.05-3.18	3.19-3.53	3.02-3.26, 3.38-3.50
β-H	1.51-2.01	1.42-1.99	1.70-2.10	1.61-2.10
γ-H	1.51-2.01	1.42-1.99	1.70-2.10	1.61-2.10
δ-H	2.84-2.93	2.73-2.85	2.88-3.01	2.81-2.93
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	6.30	6.61	6.39	6.72
1'-H	1.51-2.01	1.42-1.99	1.70-2.10	1.61-2.10
2'-H	2.62-2.84	2.55-2.70	2.74-2.88	2.60-2.76
R <sup>1</sup>	7.11-7.35-7.11	1.06-7.32	7.19-7.35, 7.49, 8.10	7.15-7.35, 7.42, 8.10
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>b</sup></b>				
C <sub>2</sub>	173.3	173.9	173.3	174.2
C <sub>3</sub>	60.3	61.9	60.3	62.2
4-CH <sub>2</sub>	43.1	42.7	42.4	42.7
C <sub>5</sub>	49.7	57.3	54.2	54.2
C <sub>6</sub>	50.8	59.2	53.9	53.9
C <sub>β</sub>	30.3	29.8	29.4	29.4
C <sub>γ</sub>	25.6	25.7	25.7	25.7
C <sub>δ</sub>	40.6	40.7	40.7	40.6
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	156.5	156.7	156.5	156.8
C <sub>1'</sub>	33.8	35.1	31.9	32.9
C <sub>2'</sub>	32.4	32.4	21.6	21.3
R <sup>1</sup>	126.3-141.4	126.3-141.6	115.4, 119.0, 120.1, 122.6, 124.6, 130.5, 135.6	115.4, 119.0, 120.3, 122.5, 124.7, 130.5, 135.6

<sup>a</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>b</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

**4.4.2.7. Procedimiento general para la *N*-bencilación de la posición 1 de las 4-bencil-2-oxopiperazinas 76c y 77c. Síntesis de las 1,4-dibencil-2-oxopiperazinas, 78c y 81c, y de los derivados bencilados en el grupo guanidino 80c y 83c.**

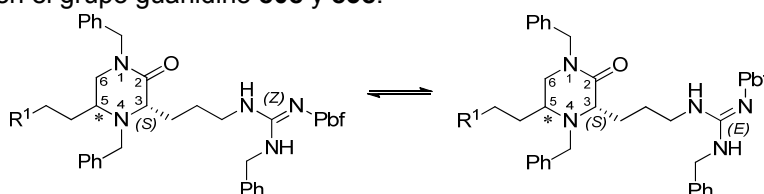


Sobre una disolución de la correspondiente 4-bencil-2-oxopiperazina (*R*)-, (*S*)-**76c** y -**77c** (0.21 mmol), en una mezcla 9:1 de THF/DMF (5 ml), enfriada a 0 °C, se añadió NaH en forma de suspensión al 60% en aceite mineral (0.21 mmol) y se agitó durante 30 min a la misma temperatura bajo atmósfera de argón. A continuación, se le añadió bromuro de bencilo (260  $\mu\text{l}$ , 0.23 mmol) y se agitó a temperatura ambiente 24 h. Transcurrido este tiempo, se añadió H<sub>2</sub>O (2 ml), la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó en columna flash, utilizando como eluyente gradiente 30-100 de AcOEt en hexano. De esta forma, se obtuvieron las 1,4-dibencil-2-oxopiperazinas (*R*)- (*S*)-**78c** y -**81c**, de menor  $R_f$ , cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen en las Tablas 4.26 y 4.28, y los derivados de 2-oxopiperazina tribencilados (*R*)-, (*S*)-**80c** y -**83c**, de mayor  $R_f$ , cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos se detallan en las Tablas 4.27, 4.29 y 4.30.

**Tabla 4.26.-** Datos analíticos más significativos de las 1,4-dibencil-2-oxopiperazinas **78c** y **81c**.


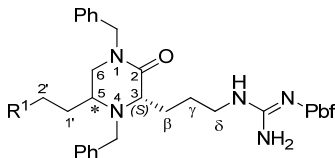
Compuesto <sup>a</sup>	(R)-78c	(S)-78c	(R)-81c	(S)-81c
R <sup>1</sup>	Ph		Indol(Boc)	
Conf. (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>50</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	C <sub>50</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S
Rdto. (%)	42	40	22	42
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	4.16	3.98	5.81	5.16
P.f. (°C) <sup>d</sup>	93-95	70-72	106-108	96-98
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	-3.1 (c 1, CDCl <sub>3</sub> )	+1.7 (c 1, CDCl <sub>3</sub> )	-8.4 (c 1, CDCl <sub>3</sub> )	+7.7 (c 1, CDCl <sub>3</sub> )
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>				
Calculado	736.97	736.97	875.13	875.13
Encontrado	736.34	736.74	875.86	875.86

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>d</sup>Todos los compuestos fueron cristalizados en una mezcla AcOEt/Hexano.

**Tabla 4.27.-** Datos analíticos más significativos de las 1,4-dibencil-2-oxopiperazinas benciladas en el grupo guanidino **80c** y **83c**.


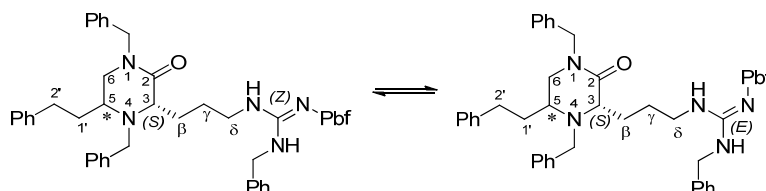
Compuesto <sup>a</sup>	(R)-80c		(S)-80c		(R)-83c		(S)-83c	
R <sup>1</sup>	Ph		Ph		Indol(Boc)		Indol(Boc)	
Config. (*)	(R)		(S)		(R)		(S)	
F. Molecular	C <sub>50</sub> H <sub>59</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S		C <sub>50</sub> H <sub>59</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S		C <sub>57</sub> H <sub>68</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S		C <sub>57</sub> H <sub>68</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	
Rdto. (%)	13		14		10		8	
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	5.66	5.85	5.63	5.84	2.32	2.47	2.32	2.47
ESI-MS [M+1] <sup>+</sup>								
Calculado	827.10		827.10		966.25		966.25	
Encontrado	827.04		827.04		966.10		966.10	
Proporción <sup>c</sup>	8	2	7	3	4	1	5	2

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos. <sup>b</sup>Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>c</sup>Proporción calculada a partir de la medida de las áreas de los picos de HPLC y confirmada por la medida de las integrales de las señales características de <sup>1</sup>H-RMN.

**Tabla 4.28.-** Datos espectroscópicos más significativos de las 1,4-*N*-dibencil-2-oxopiperazinas **78c** y **81c**.


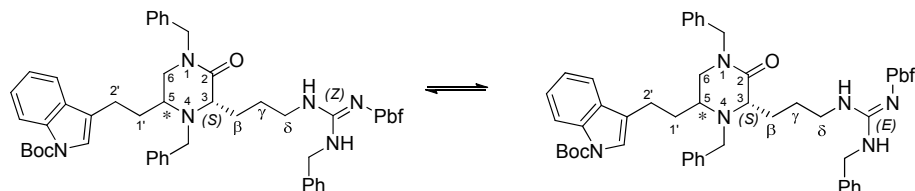
Compuesto	( <i>R</i> )-78c	( <i>S</i> )-78c	( <i>R</i> )-81c	( <i>S</i> )-81c
R <sup>1</sup>	Ph	Ph	Indol(Boc)	Indol(Boc)
<sup>1</sup> H-RMN <sup>a</sup>				
1-CH <sub>2</sub>	4.45, 4.65	4.47, 4.61	4.42, 4.69	4.54, 4.60
3-H	3.05-3.28	3.26-3.35	3.05-3.31	3.30-3.43
4-CH <sub>2</sub>	3.36, 3.86	3.66, 3.74	3.38, 3.81	3.71, 3.78
5-H	3.05-3.28	2.71-2.81	3.05-3.31	2.92-2.97
6-H	3.05-3.28	3.14, 3.26-3.35	3.05-3.31	3.19, 3.30-3.43
J <sub>5,6</sub>	-	8	-	8
β-H	1.52-1.98	1.49-1.93	1.55-2.03	1.53-1.99
γ-H	1.52-1.98	1.49-1.93	1.55-2.03	1.53-1.99
δ-H	2.83-3.00	2.86-3.09	2.85-3.04	2.98-3.13
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	6.01, 6.10	6.10, 6.18	6.04, 6.19	6.14, 6.24
1'-H	1.52-1.98	1.49-1.93	1.55-2.03	1.53-1.99
2'-H	2.45-2.71	2.33-2.53	2.47-2.62, 2.64-2.78	2.47-2.56
R <sup>1</sup>	7.14-7.38	7.13-7.35	7.12-7.39, 8.11	7.17-7.39, 8.11
<sup>13</sup> C-RMN <sup>b</sup>				
1-CH <sub>2</sub>	50.2	50.0	50.2	50.1
C <sub>2</sub>	171.0	171.2	171.0	171.2
C <sub>3</sub>	61.0	63.5	61.1	63.6
4-CH <sub>2</sub>	51.2	58.7	51.3	58.8
C <sub>5</sub>	50.2	56.7	50.4	56.8
C <sub>6</sub>	47.5	47.4	47.5	47.4
C <sub>β</sub>	29.8	29.8	29.8	29.8
C <sub>γ</sub>	25.7	25.8	25.7	25.9
C <sub>δ</sub>	40.5	40.8	40.6	40.8
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	156.2	156.2	156.2	156.2
C <sub>1'</sub>	28.1	30.6	28.1	30.4
C <sub>2'</sub>	32.3	32.1	21.5	21.3
R <sup>1</sup>	126.2-141.1	126.0-141.2	115.4, 118.9, 120.0, 122.5, 124.5, 130.3, 135.5	115.3, 118.8, 120.0, 122.5, 124.4, 130.4, 135.5

<sup>a</sup>Espectros registrados a 400 o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>b</sup>Espectros registrados a 100 o 125 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

**Tabla 4.29.-** Datos espectroscópicos más significativos de las 1,4-dibencil-2-oxopiperazinas benciladas en el grupo guanidino **80c**.


Compuesto	(R)-80c		(S)-80c	
Proporción	8	2	7	3
<sup>1</sup> H-RMN <sup>a</sup>				
1-CH <sub>2</sub>	4.53, 4.63 (2d, J = 14.5)		N.D. <sup>b</sup>	
3-H	3.07		3.18-3.28	
4-CH <sub>2</sub>	3.39, 3.94 (2d, J = 14)		3.72, 3.79 (2d, J = 14)	3.67, 3.72 (2d, J = 14)
5-H	3.26		2.83	
6-H	3.19 (bd), 3.36 (m)		3.18-3.28, 3.51	3.18-3.28, 3.48
J <sub>5,6</sub>	-		4	4
J <sub>6,6</sub>	10		13	13
β-H	1.57-1.78		1.54-1.76	
γ-H	1.57-1.78		1.54-1.76	
δ-H	3.07		3.02-3.16	
C(NH-CH <sub>2</sub> )=N	4.41, 4.44 (2d, J = 14)		4.42, 4.44 (2d, J = 14)	4.42, 4.44 (2d, J = 14)
1'-H	1.71, 1.94		1.57-1.82	
2'-H	2.60, 2.75		2.47	
<sup>13</sup> C-RMN <sup>c</sup>				
1-CH <sub>2</sub>	50.2		50.2	
C <sub>2</sub>	170.5		171.1	
C <sub>3</sub>	61.9		64.2	
4-CH <sub>2</sub>	51.5		59.3	
C <sub>5</sub>	51.0		57.5	57.7
C <sub>5</sub>	48.1		48.0	
C <sub>β</sub>	28.6		31.1	
C <sub>γ</sub>	26.7		26.7	
C <sub>δ</sub>	41.6		41.8	
NHC(NH)=N	155.9		155.9	
C(NH-CH <sub>2</sub> )=N	45.3		45.3	
C <sub>1'</sub>	30.3		35.8	
C <sub>2'</sub>	33.0		32.8	

<sup>a</sup>Espectros registrados a 500 MHz en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>b</sup>N.D. = No determinado por solapamiento con otras señales en el espectro. <sup>c</sup>Espectros registrados a 125 MHz en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

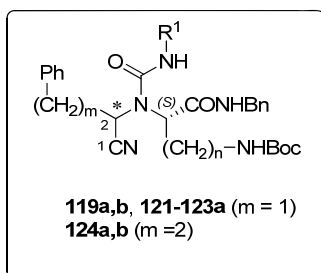
**Tabla 4.30.-** Datos espectroscópicos más significativos de las 1,4-dibencil-2-oxopiperazinas benciladas en el grupo guanidino **83c**.


Compuesto	(R)-83c		(S)-83c	
Proporción	4	1	5	2
<sup>1</sup> H-RMN <sup>a</sup>				
1-CH <sub>2</sub>	4.53, 4.65 (2d, J = 14.5);	4.60 (2d, J = 14.5),	4.51, 4.67 (2d, J = 14.5)	N.D. <sup>b</sup>
3-H	3.13		3.29	
4-CH <sub>2</sub>	3.41 (d, J = 14), 3.91		3.78	
5-H	3.34		2.96	
6-H	3.23, 3.38		3.27, 3.59	
β-H	1.69-1.90		1.67-1.82	
γ-H	1.44, 1.47-1.60		1.60-1.70	
δ-H	3.06		3.12	
C(NH-CH <sub>2</sub> )=N	4.42 (d, J = 5.5)	N.D. <sup>b</sup>	4.42 (d, J = 5.5)	4.56 (d, J = 5.5)
1'-H	1.69-1.90		1.63, 1.91	
2'-H	2.59-2.78		2.58	
Indol(Boc)	7.17-7.39, 8.11		7.12-7.39, 8.11	
<sup>13</sup> C-RMN <sup>c</sup>				
1-CH <sub>2</sub>	50.1		50.3	
C <sub>2</sub>	170.6		171.1	
C <sub>3</sub>	61.8	61.9	64.2	
4-CH <sub>2</sub>	59.5		59.2	
C <sub>5</sub>	51.2		57.6	
C <sub>5</sub>	47.9		48.0	
C <sub>β</sub>	27.6		31.0	
C <sub>γ</sub>	24.7		26.7	
C <sub>δ</sub>	41.4		41.8	
NHC(NH <sub>2</sub> )=N	155.7		155.9	156.5
C(NH-CH <sub>2</sub> )=N	45.7		45.3	
C <sub>1'</sub>	28.4		33.5	
C <sub>2'</sub>	22.0		21.9	
Indol(Boc)	115.3, 118.8, 120.0, 122.5, 124.4, 130.4, 135.5		115.4, 118.9, 120.0, 122.5, 124.5, 130.3, 135.5	

<sup>a</sup>Espectros registrados a 500 MHz en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. <sup>b</sup>N.D. = No determinado por solapamiento con otras señales en el espectro. <sup>c</sup>Espectros registrados a 125 MHz en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HMBC y HSQC.

## 4.5. SÍNTESIS DE $\alpha$ -UREIDONITRILOS, 4-IMINOHIDANTOÍNAS E HIDANTOÍNAS.

### 4.5.1. Síntesis de $\alpha$ -ureidonitrilos.



#### 4.5.1.1. Procedimientos general A. Reacción en THF a 0 °C: Síntesis de los $\alpha$ -ureidonitrilos derivados de ornitina y fenilacetaldehído (*R*)- y (*S*)-119a a partir de los $\alpha$ -aminonitrilos (*R*)- y (*S*)-22a.

Sobre una disolución del correspondiente  $\alpha$ -aminonitrilo (*R*)- y (*S*)-22a (100 mg, 0.22 mmol) en THF anhidro (2 ml) enfriada a 0 °C, se adicionó el correspondiente isocianato de fenilo (48  $\mu$ l, 0.44 mmol). Después de 48 h de agitación a esa temperatura, el residuo resultante se disolvió en AcOEt (10 ml), se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (3 x 3 ml) y disolución saturada de NaCl (3 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo así obtenido se purificó, mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 10-50% de AcOEt en hexano como eluyente. De este modo, se obtienen los  $\alpha$ -ureidonitrilos (*R*)- y (*S*)-119a. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos  $\alpha$ -ureidonitrilos aparecen recogidos en las Tablas 4.31 y 4.32.

#### 4.5.1.2. Procedimiento general B. Reacción sin disolvente: Síntesis de los $\alpha$ -ureidonitrilos derivados de ornitina 119a,b y 121a-123a partir los de $\alpha$ -aminonitrilos 22a,b.

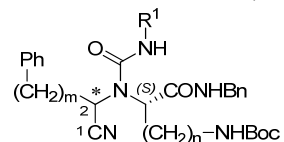
A una disolución del correspondiente  $\alpha$ -aminonitrilo (*R*)-, (*S*)-22a y (*RS*)-22a,b (50 mg, 0.11 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.50 ml) se le adicionó a temperatura ambiente el correspondiente isocianato (isocianato de fenilo, isocianato de bencilo, isocianato de 4-metoxifenetilo y isocianato de 4-fluorofenetilo) (0.22 mmol). Después de 5 min de agitación a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente mediante corriente de argón.

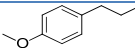
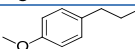
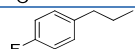
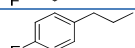
La evolución de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, manteniéndose la agitación a temperatura ambiente hasta que desapareció el  $\alpha$ -aminonitrilo de partida (intervalo de 2-7 días). Transcurrido este tiempo, el residuo resultante se disolvió en AcOEt (10 ml), se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (3 x 3 ml) y disolución saturada de NaCl (3 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El crudo así obtenido se purificó, mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 10-50% de AcOEt en hexano como eluyente. De este modo, se obtuvieron los correspondientes  $\alpha$ -ureidonitrilos **119a,b** y **121a-123a**. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos  $\alpha$ -ureidonitrilos aparecen recogidos en las Tablas 4.31, 4.32 y 4.33, agrupados según el aminoácido que incorporan en su estructura.

**4.5.1.3. Procedimiento general C. Reacción sin disolvente y bajo irradiación de microondas. Síntesis sin disolvente de  $\alpha$ -ureidonitrilos (RS)-119a,b, 121-123a, 124a,b a partir de  $\alpha$ -aminonitrilos (R)-, (S)-22a, (RS)-22a,b y (RS)-24a,b.**

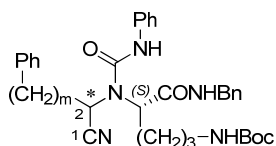
A una disolución del  $\alpha$ -aminonitrilo (R)-, (S)-22a, (RS)-22a,b y (RS)-24a,b (0.11 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 ml) en un vial de microondas se le adicionó a temperatura ambiente el correspondiente isocianato (isocianato de fenilo, isocianato de bencilo, isocianato de 4-metoxifenetilo y isocianato de 4-fluorofenetilo) (0.22 mmol). Después de 5 min de agitación a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente mediante corriente de argón. Esta mezcla homogénea fue irradiada a microondas a 80 °C durante un intervalo de 2-3 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se procesó y purificó como se ha comentado en el apartado 4.5.1.1, para obtener la correspondiente mezcla de epímeros (1:1) (RS)-119a, (RS)-121-123a y (RS)-124a,b. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -ureidonitrilos aparecen recogidos en las Tablas 4.31, 4.32, 4.33 y 4.34, agrupados según el aminoácido que incorporan en su estructura.

**Tabla 4.31.-** Datos analíticos más significativos de los  $\alpha$ -ureidonitrilos **119a,b**, **121a-123a** y **124a,b**.



Compuesto <sup>a</sup>	m	n	R1	Config (*)	F. Molecular <sup>d</sup>	Rdto. (%)	HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	[M+1] <sup>+</sup> Calc.	[M+1] <sup>+</sup> Encontr.
(R)-119a	1	3	Ph	(R)	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	86	27.7	570.30	570.21
(S)-119a	1	3	Ph	(S)	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	96	27.5	570.30	570.39
(RS)-119b	1	4	Ph	(RS)	C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	92	28.2 (R)	584.32	584.38
							28.1 (S)		
(R)-121a	1	3	Bn	(R)	C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	97	27.5	584.32	584.31
(S)-121a	1	3	Bn	(S)	C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	93	27.0	584.32	584.21
(R)-122a	1	3		(R)	C <sub>36</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	90	28.0	628.34	628.52
(S)-122a	1	3		(S)	C <sub>36</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	94	27.6	628.34	628.57
(R)-123a	1	3		(R)	C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	96	27.9	616.74	616.41
(S)-123a	1	3		(S)	C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	91	27.5	616.74	616.27
(RS)-124a	2	3	Ph	(RS)	C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	95	5.97 <sup>d</sup> (R)	583.49	583.32
							5.85 <sup>d</sup> (S)		
(RS)-124b	2	4	Ph	(RS)	C <sub>35</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	97	29.6 (R)	598.33	598.28
							28.9 (S)		

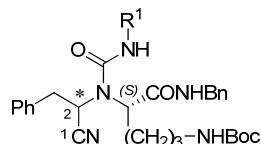
<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos o espumas. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>d</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 50 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 5 min.

**Tabla 4.32.-** Datos espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -fenilureido-nitrilos derivados de ornitina **119a** ( $m = 1$ ) y **124a** ( $m = 2$ ).


Compuesto	(R)-119a	(S)-119a	(RS)-124a	
m	1	1	2	
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>a</sup></b>				
2-H	5.58	5.07	5.33	5.00
3-H	2.96-3.35	2.96-3.35	1.89-2.36	
4-H	-	-	2.70-2.92	2.66
$J_{2,3}$	8	7	7	6
<b>Aminoácido</b>				
$\alpha$ -H	4.49	4.08	4.28	4.06
$\beta$ -H	1.33-2.12	1.33-2.12	1.89-2.36	
$\gamma$ -H	1.33-2.12	1.33-2.12	1.09-1.77	
$\delta$ -H	2.96-3.35	2.96-3.35	3.32-3.53	2.96-3.24
NH-Boc	4.66	4.79	4.67	4.82
NH-Bn	7.63	6.85	7.86	7.86
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.36, 4.49	4.39	4.31, 4.58	4.50
NH-CO-N	10.33	10.33	10.35	10.67
$J_{\text{NH},\text{CH}_2}$ (Bn)	5, 6	5	5, 6	5
$J_{\alpha,\beta}$	7.5	7.5	7	7
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>b</sup></b>				
C <sub>1</sub>	118.9	118.7	119.5	119.4
C <sub>2</sub>	53.4	50.0	50.3	48.2
C <sub>3</sub>	38.8	38.2	33.7	34.7
C <sub>4</sub>	-	-	31.8	32.2
<b>Aminoácido</b>				
C <sub><math>\alpha</math></sub>	61.5	59.1	61.1	58.9
C <sub><math>\beta</math></sub>	28.1	27.5	27.2	28.1
C <sub><math>\gamma</math></sub>	26.7	26.3	26.6	27.0
C <sub><math>\delta</math></sub>	39.2	38.8	38.9	39.2
CONH	171.6	173.0	172.2	174.2
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.9	43.7	44.3	43.9
NHCON	154.5	155.3	154.8	155.8

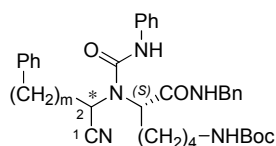
<sup>a</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY.

<sup>b</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.33.-** Datos espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -ureidonitrilos derivados de ornitina **121-123a**.


Compuesto	(R)-121a	(S)-121a	(R)-122a	(S)-122a	(R)-123a	(S)-123a
R <sup>1</sup>	Bn					
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>a</sup></b>						
2-H	5.44	5.13	5.26	5.16	5.34	5.10
3-H	3.18, 3.30	3.24, 2.95-3.16	2.94-3.08	3.18, 2.94-3.08	2.96-3.12	3.20, 2.96-3.12
J <sub>2,3</sub>	6, 9	6	-	7	7	6.5
<i>Aminoácido</i>						
$\alpha$ -H	4.33	4.04	4.35	3.96	4.34	3.99
$\beta$ -H	1.91-2.15	1.91-2.15	1.47-1.61	1.47-1.61	1.79-2.01	1.79-2.01
$\gamma$ -H	1.60-1.82	1.60-1.82	1.77-2.04	1.77-2.04	1.47-1.67	1.47-1.67
$\delta$ -H	2.95-3.16	2.95-3.16	2.94-3.08	2.94-3.08	2.96-3.12	2.96-3.12
NH-Boc	4.73	4.63	4.58	4.64	4.59	4.77
NH-Bn	7.49	6.84	7.14	6.51	-	6.81
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.30, 4.35	4.35	4.35	4.32, 4.43	4.34	4.29, 4.41
NH-CO-N	7.68	7.86	-	-	8.79	7.45
R <sup>1,b</sup>	4.44	4.35	2.66-3.59 3.76 (OMe)	2.71, 3.35, 3.77 (OMe)	2.66-2.95, 3.26-3.39	2.71, 3.26-3.39
J <sub>NH,CH<sub>2</sub> (Bn)</sub>	4.5, 5	6	6	5.5, 6	5	5, 6
J <sub><math>\alpha,\beta</math></sub>	-	7	-	7	7	6
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>c</sup></b>						
C <sub>1</sub>	119.8	119.2	119.4	118.6	119.6	118.9
C <sub>2</sub>	49.6	52.2	51.8	49.1	52.2	49.6
C <sub>3</sub>	38.8	38.7	39.2	38.8	39.0	38.8
<i>Aminoácido</i>						
C <sub><math>\alpha</math></sub>	60.5	58.5	59.9	58.0	60.4	58.5
C <sub><math>\beta</math></sub>	26.4	26.4	26.7	26.7	26.9	27.1
C <sub><math>\gamma</math></sub>	26.8	26.1	25.5	26.4	26.7	26.6
C <sub><math>\delta</math></sub>	38.8	39.1	38.9	39.2	39.0	39.3
CONH	170.8	172.4	170.7	172.2	170.9	172.5
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.6	43.9	43.6	44.0	43.9	44.2
R <sup>1,b</sup>	44.9	44.8	42.5, 34.7, 55.2 (OMe)	42.4, 34.7, 55.2 (OMe)	35.2, 42.5	35.2, 42.4
NHCON	157.5	156.8	158.2	158.1	157.6	157.2

<sup>a</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>b</sup>Datos de protón y carbono aromáticos solapados en la zona de protones aromáticos. <sup>c</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

**Tabla 4.34.-** Datos espectroscópicos más significativos de los  $\alpha$ -fenilureido-nitrilos derivados de lisina **119b** (m=1) y **124b** (m=2).


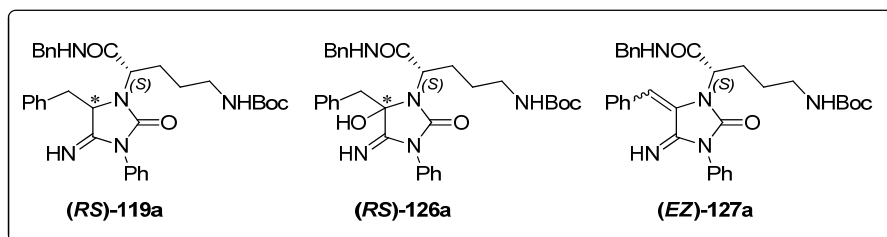
Compuesto <sup>a</sup>	(RS)-119b		(RS)-124b	
m	1		2	
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>a</sup></b>				
2-H	5.66	5.34	5.39	5.29
3-H	2.94-3.18	3.27, 3.05	2.00-2.23	
4-H	-	-	2.64	2.78, 2.84
J <sub>2,3</sub>	7, 8.5	6, 11	8	6, 8
<b>Aminoácido</b>				
$\alpha$ -H	4.11	3.90	3.99	3.82
$\beta$ -H	2.11-2.42		2.00-2.41	
$\gamma$ -H	1.71-1.94		1.62-1.83	
$\delta$ -H	1.34-1.55		1.21-1.56	
$\epsilon$ -H	3.03-3.18		2.97-3.03	
NH-Boc	4.67	4.58	4.65	
NH-Bn	7.50	6.84	7.44	6.84
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.42	4.54, 4.40	4.50	4.31, 4.58
NH urea	10.22		10.3	10.56
J <sub>NH,CH<sub>2</sub> (Bn)</sub>	6	5.5	5	5, 6
J <sub><math>\alpha,\beta</math></sub>	7.5	6, 8.5	8	6, 10
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>b</sup></b>				
C <sub>1</sub>	119.4	118.6	119.0	119.4
C <sub>2</sub>	52.3	49.8	49.3	47.7
C <sub>3</sub>	38.5	39.0	33.6	34.6
C <sub>4</sub>	-	-	32.0	31.6
<b>Aminoácido</b>				
C <sub><math>\alpha</math></sub>	61.4	60.5	60.3	60.9
C <sub><math>\beta</math></sub>	30.5	29.9	30.7	29.9
C <sub><math>\gamma</math></sub>	23.5	22.9	23.6	22.7
C <sub><math>\delta</math></sub>	29.6	29.2	29.6	29.0
C <sub><math>\epsilon</math></sub>	39.7	39.0	39.6	39.8
CONH	171.3	172.5	171.3	173.2
CH <sub>2</sub> (Bn)	44.2	43.9	43.9	44.3
NHCON	154.3	155.0	154.2	155.3

<sup>a</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY.

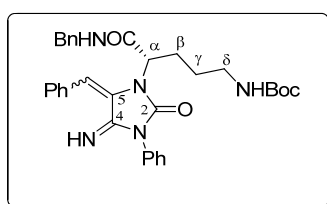
<sup>b</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

#### 4.5.2. Síntesis de 4-iminohidantoínas.

##### 4.5.2.1. Ciclación intramolecular del $\alpha$ -fenilureido-nitrilo (**S**)-119a. Síntesis de las 4-iminohidantoínas (**RS**)-125a, de los derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas (**RS**)-126a y de las 5-benciliden-4-iminohidantoínas (**EZ**)-127a.



Una disolución de (**S**)-119a (50 mg, mmol) en MeOH (5 ml) se calentó a reflujo. Al cabo de 15 min, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash, utilizando gradiente de 10-100% de AcOEt en hexano como eluyente. De esta forma, se obtuvieron la correspondiente mezcla de epímeros 1:1 de 4-iminohidantoína (**RS**)-125a (9%), de menor  $R_f$ , junto con la mezcla epimérica 1:1 de los derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoína (**RS**)-126a (78%), de mayor  $R_f$ , y trazas de (**EZ**)-127a (13%), producto de eliminación de (**RS**)-126a. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de (**RS**)-125a se recogen en las Tablas 4.35 y 4.36, mientras que los de (**RS**)-126a se recogen en la Tabla 4.38 y 4.39, y los de (**EZ**)-127a se recogen a continuación:



**[(ZE)-127a]**. (14 mg, 13 %). Fórmula Molecular:  $C_{33}H_{37}N_5O_4$ ; **HPLC-MS** [Sunfire  $C_{18}$  (4.6 x 50 mm, 3.5 $\mu$ m), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min];  $t_R$  = 5.25 min (40%) y 5.35 min (60%),  $[M+1]^+$  = 569.44.

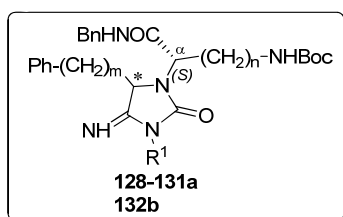
**$^1H$ -RMN** (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): Mayoritario (60%): 1.39 (s, 9H, Boc), 1.50-1.73 (m, 2H,  $\gamma$ -H), 1.96-2.46 (m, 2H,  $\beta$ -H), 2.88-3.33 (m, 2H,  $\delta$ -H), 4.16 [dd,  $J$  = 5, 15 Hz, 1H,  $CH_2$  (Bn)], 4.46 (t, 1H,  $J$  = 7 Hz,  $\alpha$ -H), 4.70 [dd, 1H,  $J$  = 5, 15 Hz, 1H,  $CH_2$  (Bn)], 4.89 (t,  $J$  = 6Hz, 1H,  $NH$ -Boc), 6.26 (s, 1H, 5-CH), 6.79-7.52 (m, 15H, aromáticos), 7.89 (t,  $J$  = 5 Hz, 1H,  $NH$ -Bn). Minoritario (40%): 1.40 (s, 9H, Boc), 1.50-1.73 (m, 2H,  $\gamma$ -H), 1.96-2.46 (m, 2H,  $\beta$ -H), 2.88-3.33 (m, 2H,  $\delta$ -H), 4.04 (t,  $J$  = 7 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 4.43 [d,  $J$  = 6 Hz, 1H,

CH<sub>2</sub> (Bn)], 4.47 [d, J = 6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> (Bn)], 4.70 (t, J = 6 Hz, NH-Boc), 6.30 (s, 1H, 5-CH), 6.79-7.52 (m, 15H, aromáticos), 7.10 (m, 1H, NH-Bn).

<sup>13</sup>C-RMN (750 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): Mayoritario (60%): 26.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>γ</sub>), 28.3 (CH<sub>3</sub>, Boc), 29.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>β</sub>), 39.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>δ</sub>), 43.4 [(CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>(Bn))], 57.2 (CH, C<sub>α</sub>), 80.1 (C, Boc), 114.4 (CH, 5-CH), 127.2-138.0 (15CH y 4 C, aromáticos y C<sub>5</sub>), 156.6 (CO, Boc), 156.9 (C<sub>2</sub>), 171.5 (CONH), 174.4 (C<sub>4</sub>). Minoritario (40%): 26.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>γ</sub>), 28.4 (CH<sub>3</sub>, Boc), 29.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>β</sub>), 39.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>δ</sub>), 44.0 [(CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>(Bn))], 56.0 (CH, C<sub>α</sub>), 79.4 (C, Boc), 113.7 (CH, 5-CH), 127.2-138.0 (15CH y 4 C, aromáticos y C<sub>5</sub>), 155.4 (C<sub>2</sub>), 157.0 (CO, Boc), 171.2 (CONH), 171.8 (C<sub>4</sub>).

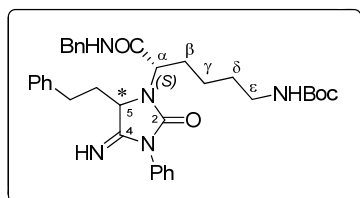
**ESI-MS** m/z [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, 568.68; encontrado 569.44 (100 %).

#### 4.5.2.2. Procedimiento general para la síntesis de 4-iminohidantoínas (128a-131a y 132b) a partir de los α-ureidonitrilos 119a, 121a-123a y 124b.



A una disolución del correspondiente α-ureidonitrilo (**RS**)-**119a**, (**RS**)-**121a-123a** y (**RS**)-**124b** (0.088 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 ml) en un vial de microondas se le adicionó a temperatura ambiente TEA (60.8 μl, 0.439 mmol). Después de 5 min de agitación a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente mediante corriente de argón. Esta mezcla homogénea fue irradiada a microondas a 100 °C durante un intervalo de 5 min. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción resultante se disolvió en AcOEt (10 ml), se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (3 x 3 ml) y disolución saturada de NaCl (3 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El crudo así obtenido se purificó, mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 0-15% de MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. De este modo, se obtuvieron las correspondientes mezclas epiméricas de las correspondientes 4-iminohidantoínas (**RS**)-**128a-131a** y (**RS**)-**132b**, que no pudieron resolverse cromatográficamente. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas 4-iminohidantoínas se recogen en la tabla 4.35 y 4.36, excepto para el derivado de lisina **132b** que se detallan a continuación:

**(2S)-N-Bencil-6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-[(5RS)-5-fenil-3-fenil-4-imino-2-oxoimidazolidin-1-il]hexanoamida [(RS)-132b]**



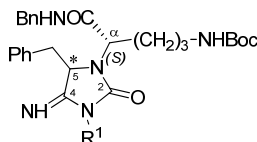
(24 mg, 95 %). Fórmula molecular:  $C_{30}H_{34}N_4O_3$ ; **HPLC** [Sunfire  $C_{18}$  ( $4.6 \times 150$  mm,  $3.5\mu\text{m}$ ), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min];  $t_R = 18.85$  min; **HPLC-MS** [Sunfire  $C_{18}$  ( $4.6 \times 50$  mm,  $3.5\mu\text{m}$ ), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min];  $t_R = 3.26$  min,  $[M+1]^+ = 499.44$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.18-1.70 (m, 4H,  $\gamma$ -H y  $\delta$ -H), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.83-2.19 (m, 2H,  $\beta$ -H), 2.19-2.46 (m, 2H, 5- $\text{CH}_2$ ), 2.47-2.88 (m, 2H, 5- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.85-3.37 (m, 2H,  $\epsilon$ -H), 4.38 (m, 0.5 H,  $\alpha$ -H), 4.41 (m, 0.5 H,  $\alpha$ -H), 4.23-4.52 [m, 2H,  $\text{CH}_2$  (Bn)], 4.56 (t,  $J = 4.5$  Hz, 0.5 H, 5-H), 4.61 (t,  $J = 4.5$  Hz, 0.5 H, 5-H), 5.98 (m, 1H,  $\text{NH-Boc}$ ), 6.98-7.75 (m, 15 H, aromáticos), 7.84 (t,  $J = 6$  Hz, 0.5 H,  $\text{NH-Bn}$ ); 8.13 (t,  $J = 6$  Hz, 0.5H,  $\text{NH-Bn}$ )

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 22.5 y 22.9 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\gamma$ ), 23.9 ( $\text{CH}_3$ , Boc), 30.3 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\beta$ ), 31.5 y 31.9 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\delta$ ), 32.7 y 34.2 ( $\text{CH}_2$ , 5- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 35.0 y 35.3 ( $\text{CH}_2$ , 5- $\text{CH}_2$ ), 40.35 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\epsilon$ ), 43.0 y 43.2 [ $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$  (Bn)], 56.9 y 57.8 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_5$ ), 59.6 y 57.8 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_\alpha$ ), 77.8 (C, Boc), 118.6-14.7 (30 CH y 6 C, aromáticos), 155.8 y 156.0 ( $\text{C}_2$ ), 157.0 y 157.2 ( $\text{CO}_2$ ), 170.2 y 170.4 ( $\text{C}_4$ ), 171.6 y 172.1 (CONH).

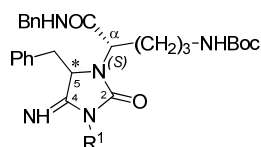
**ESI-MS**  $m/z$   $[M+1]^+$  calculado para  $C_{30}H_{35}N_4O_3$ , 499.62; encontrado 499.44 (100 %).

**Tabla 4.35.-** Datos analíticos más significativos de 4-iminohidantoínas derivadas de ornitina **128a-131a**.



Compuesto <sup>a</sup>	(RS)-128a	(RS)-129a	(RS)-130a	(RS)-131a
R <sup>1</sup>	Ph	Bn		
Config (*)	(RS)	(RS)	(RS)	(RS)
Proporción (R:S)	(1:1)	(1:1)	(1:1)	(1:1)
F. Molecular <sup>b</sup>	$C_{33}H_{39}N_5O_4$	$C_{34}H_{41}N_5O_4$	$C_{36}H_{45}N_5O_5$	$C_{35}H_{42}FN_5O_4$
Rdto (%)	97%	93%	95%	96%
HPLC $t_R$ (min) <sup>c</sup>	17.1 y 17.3	19.5	19.1	19.4
HPLC $t_R$ (min) <sup>d</sup>	3.52 y 3.59	3.64 y 3.74	3.63	3.71
MS $[M+1]^+$				
Calculado	570.69	584.72	628.77	616.74
Encontrado	570.30	584.31	628.60	616.57

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos o espumas. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Columna Sunfire  $C_{18}$  ( $3.9 \times 150$  mm,  $3.5\mu\text{m}$ ) y gradiente 10-100% de A en B durante 30 min. <sup>d</sup>Columna Sunfire  $C_{18}$  ( $3.9 \times 50$  mm,  $3.5\mu\text{m}$ ) y gradiente 15-95% de A en B durante 5 min.

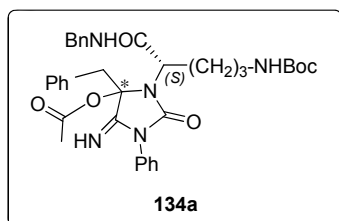
**Tabla 4.36.-** Datos espectroscópicos más significativos de los derivados de 4-iminohidantoínas **128-131a**.


Compuesto	( <i>RS</i> )-128a	( <i>RS</i> )-129a	( <i>RS</i> )-130a	( <i>RS</i> )-131a
R <sup>1</sup>	Ph	Bn		
<b><sup>1</sup>H-NMR<sup>a</sup></b>				
5-H	4.62	4.63	4.60	4.76
5-CH <sub>2</sub>	3.02-3.49	3.01-3.34	2.82-3.19	3.22-3.57
3-R <sup>1,b</sup>	-	4.20-4.47	2.45-2.77 (2'-H), 3.32-3.67 (1'-H), 3.72, 2.75 (OMe)	3.63, 3.90 (1'-H), 2.72-2.97 (2'-H)
J <sub>5,5CH<sub>2</sub></sub>	3.5	5, 8	4.5, 6	4.5
<b>Aminoácido</b>				
α-H	4.10, 4.35	4.12, 4.28	4.19, 4.32	4.08, 4.36
β-H	1.79-2.33	1.76-2.30	1.90-2.20	1.81-2.36
γ-H	1.52-1.67	1.31-1.55	1.11-1.61	1.13-1.68
δ-H	3.17	3.15	2.95	2.96-3.16
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.27, 4.48-4.57	4.20-4.47	4.25-4.55	4.28, 4.58 4.35-4.43, 4.47
NH-Bn	6.78, 7.83	7.06, 7.61	7.83-7.97	7.81, 7.99
NH-Boc	4.67	4.91	6.06	5.91, 6.10
Boc	1.42	1.41	1.40	1.37
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	5, 6.5
<b><sup>13</sup>C-NMR<sup>c</sup></b>				
C <sub>2</sub>	156.2, 156.3	156.0, 156.1	157.6, 157.8	162.1, 162.2
C <sub>4</sub>	170.2, 170.3	170.2, 170.4	170.1, 170.2	169.2
C <sub>5</sub>	57.3, 58.8	59.0, 57.2	58.7, 58.8	55.9, 57.2
5-CH <sub>2</sub>	39.8, 39.9	37.1, 37.5	32.4, 32.6	33.7, 33.8
3-R <sup>1,b</sup>	-	41.9, 43.7	39.8, 37.9 (C <sub>2'</sub> ), 44.7, 77.9 (C <sub>1'</sub> ), 54.2, 54.3 (OMe)	41.1, 41.4 (C <sub>2'</sub> ), 44.3, 44.4 (C <sub>1'</sub> )
<b>Aminoácido</b>				
C <sub>α</sub>	59.3, 61.2	61.4, 59.9	60.2, 61.3	59.8, 61.2
C <sub>β</sub>	31.7	27.3, 27.8	27.2	31.3
C <sub>γ</sub>	27.1, 27.4	26.3, 27.2	25.6, 26.0	28.3, 28.8
C <sub>δ</sub>	38.2	39.7, 39.8	37.5, 37.9	39.7, 39.8
CH <sub>2</sub> (Bn)	42.9, 43.1	42.9, 43.1	43.1, 43.2	44.0, 44.3
CONH	170.2, 170.3	170.2, 170.4	172.0, 172.2	173.4, 173.5

<sup>a</sup>Espectros registrados a 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY.

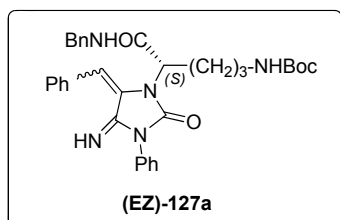
<sup>b</sup>Datos de protón y carbono aparecen solapadas en la zona de los protones y carbonos aromáticos. <sup>c</sup>Espectros registrados a 125 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

#### 4.5.2.3. Síntesis de los O-acetil derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoína (*R*)- y (*S*)-134a, a partir de (*RS*)-126a.

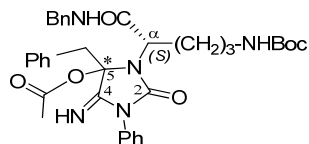


A una disolución de la mezcla epimérica de 5-hidroxi-4-iminohidantoína (*RS*)-126a (50 mg, 0.085 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (3 ml), enfriada a 0 °C, se le adicionó sucesivamente óxido de propileno (40 µl, 0.683 mmol) y cloruro de acetilo (6.7 µl, 0.085 mmol). La mezcla se dejó alcanzar temperatura ambiente, y, tras 24 h de agitación, se evaporó el disolvente a vacío. El crudo así obtenido se purificó por cromatografía circular radial, utilizando como eluyente gradiente 20-50% de AcOEt en hexano. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los O-acetil derivados (*R*)- y (*S*)-134a aparecen recogidos en la Tabla 4.37.

#### 4.5.2.4. Procedimiento de deshidratación de los derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas (*RS*)-126a. Síntesis del derivado de 5-benciliden-4-iminohidantoína (*ZE*)-127a.



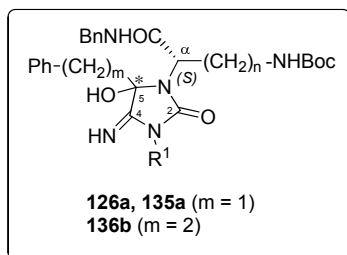
Una disolución del derivado de 5-hidroxi-4-iminohidantoína (*RS*)-126a (35 mg, 0.060 mmol) en MeOH (5 ml) se calentó a 90-100 °C, durante 48 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se evaporó a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía circular radial, utilizando un gradiente 20-50% de AcOEt en Hexano. De este modo, se aisló únicamente el compuesto del epígrafe (*ZE*)-127a (42%), idéntico al obtenido anteriormente (apartado 4.5.2.1).

**Tabla 4.37.-** Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los derivados O-acetilados de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **132a**.


Compuesto <sup>a</sup>	<i>(R)</i> - y <i>(S)</i> -132a <sup>d</sup>	
F. Molecular <sup>c</sup>	C <sub>35</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Rdto (%)	43	37
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>d</sup>	5.60	5.40
MS [M+1] <sup>+</sup>		
Calculado	628.73	628.73
Encontrado	628.53	628.53
<sup>1</sup> H-RMN <sup>e</sup>		
5-OCOCH <sub>3</sub>	2.18	2.27
5-CH <sub>2</sub>	3.24, 3.42	3.15, 3.48
Aminoácido		
α-H	4.02	4.30
β-H	1.99-2.47	1.96-2.36
γ-H	1.14-1.49	1.09-1.69
δ-H	3.02-3.21	2.75-2.95, 3.23-3.36
NH-Boc	4.65	4.84
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.45, 4.52	4.03, 4.72
NH-Bn	7.25	-
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	5, 6	4.5, 7
J <sub>α,β</sub>	6.5	6, 10
J <sub>5CH<sub>2</sub></sub>	14.5	14
<sup>13</sup> C-RMN <sup>f</sup>		
C <sub>2</sub>	155.6	155.0
C <sub>4</sub>	171.6	No se ve
C <sub>5</sub>	87.5	89.7
5-CH <sub>2</sub>	41.5	44.0
5-OCOCH <sub>3</sub>	28.3, 183.2	26.9, 183.0
Aminoácido		
C <sub>α</sub>	56.2	56.7
C <sub>β</sub>	29.7	26.5
C <sub>γ</sub>	27.7	26.1
C <sub>δ</sub>	39.5	38.8
CH <sub>2</sub> (Bn)	44.3	43.3
CONH	172.2	172.1

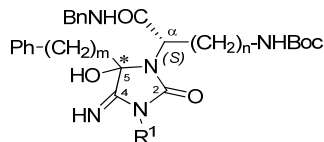
<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos o espumas. <sup>b</sup>No ha sido posible asignar la configuración en C<sub>5</sub>. <sup>c</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>d</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 50 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>e</sup>Espectros registrados a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY. <sup>f</sup>Espectros registrados a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

#### 4.5.2.5. Procedimiento general de ciclación/oxidación de los $\alpha$ -ureidonitrilos **119a**, **121a** y **124b**. Síntesis de los derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoína **126a**, **135a** y **136b**.



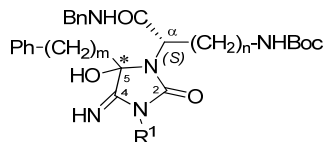
Una disolución del correspondiente  $\alpha$ -ureidonitrilo (**RS**)-**119a**, **121a** y **124b** (125 mg, 0.219 mmol) en MeOH (5 ml) se agitó a temperatura ambiente y al aire durante un intervalo de 4 días. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se evaporó a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash, utilizando un gradiente 10-50% de AcOEt en hexano. De este modo, se obtuvieron los correspondientes derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoína (**RS**)-**126a**, **135a** y **136b**, cuyos datos analíticos y espectroscópicos más significativos aparecen recogidos en las Tablas 4.38 y 4.39.

**Tabla 4.38.-** Datos analíticos más significativos de los derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **126a**, **135a** y **136b**.



Compuesto <sup>a</sup>	( <i>RS</i> )-126a	( <i>RS</i> )-135a	( <i>RS</i> )-136b
m	1	1	2
n	3	3	4
R <sup>1</sup>	Ph	Bn	Ph
Config (*)	( <i>RS</i> )	( <i>RS</i> )	( <i>RS</i> )
Proporción (R:S)	(1:1)	(1:1)	(1:1)
F. Molecular <sup>b</sup>	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
Rdto (%)	78	69	85
HPLC t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	3.92 y 4.27	4.05 y 4.47	4.12 y 4.29
MS [M+1] <sup>+</sup>			
Calculado	586.30	600.31	614.74
Encontrado	586.34	600.68	614.54

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos o espumas. <sup>b</sup>Análisis elemental satisfactorio para C, H, N. <sup>c</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 50 mm, 3.5  $\mu$ m) y gradiente 10-100% de A en B durante 5 min

**Tabla 4.39.-** Datos espectroscópicos más significativos de los derivados de 5-hidroxi-4-iminohidantoínas **126a**, **135a** y **136b**.


Compuesto <sup>a</sup>	(RS)-126a		(RS)-135a		(RS)-136b	
m	1		1		2	
n	3		3		4	
R <sup>1</sup>	Ph		Bn		Ph	
Config (*)	(R):(S)		(R):(S)		(R):(S)	
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>a</sup></b>						
5-CH <sub>2</sub>	2.87-3.47		3.19	2.84 y 2.91	2.00-2.46	
5-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	-	-	-	-	2.49-2.63	
3-R <sup>1,b</sup>	-		4.63	4.60	-	
<b>Aminoácido</b>						
α-H	3.98	4.25-4.36	4.23	3.91	3.88	4.08
β-H	1.87-2.37		2.09	1.84-1.92, 2.04-2.16	1.67-1.24	
γ-H	1.38-1.61		1.22-1.56		1.67-1.24	
δ-H	2.87-3.47		2.70-3.14		2.00-2.46	
ε-H	-		-		3.17-2.85	
NH-Boc	4.78	4.66	4.76	4.60	4.53	4.59
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.12, 4.59	4.29, 4.42	4.23, 4.42	4.33, 4.39	4.34, 4.42	4.31, 4.44
NH-Bn	7.99	6.77	7.88	-	8.02	-
J <sub>NH,CH<sub>2</sub>(Bn)</sub>	5, 7	6	5.5	5, 7	5, 7	5
J <sub>α,β</sub>	6	-	7	5, 10	7.5	7.5
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>c</sup></b>						
C <sub>2</sub>	156.9	155.4	156.5	156.4	155.5	155.6
C <sub>4</sub>	172.4	171.8	172.7	172.4	171.7	171.7
C <sub>5</sub>	88.9	87.9	88.3	86.9	88.3	87.7
5-CH <sub>2</sub>	43.8		43.6	42.9	30.1	29.9
5-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	-	-	-	-	37.9	39.4
3-R <sup>1,b</sup>	-		43.4	43.9	-	
<b>Aminoácido</b>						
C <sub>α</sub>	57.2	56.0	55.7	56.7	58.2	56.2
C <sub>β</sub>	29.6	29.0	27.2	27.6	29.1	29.4
C <sub>γ</sub>	26.2	28.6	26.2	26.1	24.5	23.0
C <sub>δ</sub>	39.3	39.8	39.5	38.8	29.8	29.9
C <sub>ε</sub>	-		-	-	39.7	39.9
CH <sub>2</sub> (Bn)	43.3		42.1	42.3	43.4	43.9
CONH	171.5	171.2	172.7	172.2	171.9	171.8

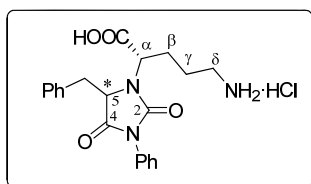
<sup>a</sup>Espectros registrados a 400 o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY.

<sup>b</sup>Datos de protón y carbono aromáticos no incluidos, solapados en la zona de los aromáticos. <sup>c</sup>Espectros registrados a 100 o 125 MHz en CDCl<sub>3</sub>. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

### 4.5.3. Síntesis de hidantoínas.

#### 4.5.3.1. Síntesis de hidantoínas a partir de 4-iminohidantoínas. Síntesis del hidrocloreto del ácido (2S)-5-amino-2-[(5RS)-5-bencil-3-fenil-2,4-dioxoimidazolidin-1-il]pentanoico [(RS)-138a] a partir de 4-aminoimidazol-2-ona derivada de Orn 128a.

A una disolución de la 4-aminoimidazol-2-ona **128a** (20 mg, 0.035 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (1 ml), se le adicionó lentamente HCl concentrado (2 ml), se calentó en un tubo cerrado a 100 °C durante 4 días. Al cabo de ese tiempo, el disolvente se evaporó a sequedad y el residuo resultante se disolvió en H<sub>2</sub>O (3 ml) y se liofilizó. De este modo se obtuvo sin purificación adicional y con buen rendimiento (85%) el compuesto del epígrafe. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-138a** se detallan a continuación:



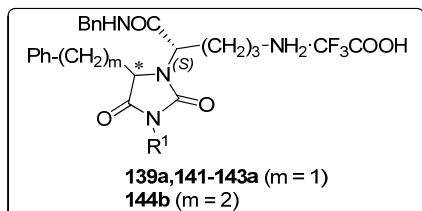
(12 mg, 85 %). Fórmula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·HCl; **HPLC-MS** [Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min]; t<sub>R</sub> = 2.82 min; [M+1]<sup>+</sup> = 382.27.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1.35-2.33 (m, 4H, γ-H y β-H), 2.17-2.28 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 2.84-3.03 (m, 2H, δ-H), 3.98 y 4.09 (2m, 2H, α-H), 4.26 y 4.32 (2t, 2H, J = 8Hz, 5-H), 7.01-7.46 (m, 10H, aromáticos).

**<sup>13</sup>C-RMN** (750 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 23.4 y 25.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>β</sub>), 35.2 (CH<sub>2</sub>, 5-CH<sub>2</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>γ</sub>), 58.9 y 57.4 (CH, C<sub>5</sub>), 69.8 y 71.2 (CH, C<sub>α</sub>), 119.0-138.2 (10CH y 2C, aromáticos), 153.9 (C<sub>2</sub>), 170.1 (C<sub>4</sub>), 176.0 (COOH).

**ESI-MS** *m/z* [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, 382,17; encontrado 382.27 (100 %).

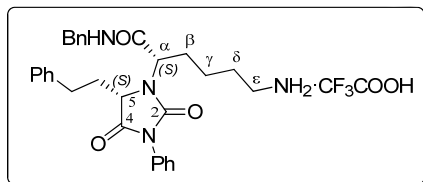
#### 4.5.3.2. Síntesis de hidantoínas a partir de $\alpha$ -ureidonitrilos. Procedimiento general de la síntesis de las hidantoínas desprotegidas en la cadena lateral básica 139a, 141-143a y 144b.



El correspondiente  $\alpha$ -ureidonitrilo (**R**)-, (**S**)-**119a**, (**S**)-, (**RS**)-**121-123a** y (**S**)-**124b** (0.125 mmol) se disolvió en una disolución al 20% de TFA en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml) y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Al cabo de

este tiempo, el disolvente se evaporó a sequedad, y se coevaporó varias veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 2 ml). El residuo resultante se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}$  (3 ml) y se liofilizó. De este modo se obtuvieron sin purificación adicional los hidantoínas (**R**)-, (**S**)-**139a**, (**S**)-, (**RS**)-**141a**, (**S**)-, (**RS**)-**142a**, (**S**)-, (**RS**)-**143a** y (**S**)-**144b** con rendimientos superiores al 95%. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos compuestos se recogen en las Tablas 4.40 y 4.41, excepto para el derivado de lisina (**S**)-**144b** que se detallan a continuación:

#### Trifluoroacetato de (2S)-6-amino-N-Bencil-2-[(5S)-3-fenil-5-fenetil-2,4-dioxoimidazolin-1-il]hexanamida [(S)-144b].



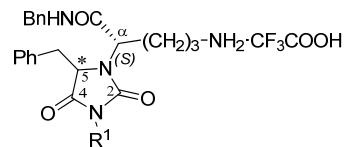
Sólido amorfo. (17 mg, 95 %). Fórmula molecular:  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ . HPLC [Sunfire  $\text{C}_{18}$  (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), gradiente 10-100% de A en B durante 30 min];  $t_R = 18.85$  min.

HPLC-MS [Sunfire  $\text{C}_{18}$  (4.6 x 50 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), gradiente 10-100% de A en B durante 5 min];  $t_R = 3.26$  min;  $[M+1]^+ = 499.44$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 1.31-1.44 (m, 2H,  $\gamma$ -H), 1.52-1.66 (m, 2H,  $\delta$ -H), 2.06-2.16 (m, 1H,  $\beta$ -H), 2.17-2.28 (m, 2H, 5- $\text{CH}_2$ ), 2.45-2.55 (m, 1H, 5- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.68-2.76 (m, 1H,  $\epsilon$ -H), 4.26 [d, 2H, J = 15 Hz,  $\text{CH}_2$  (Bn)], 4.27 (d, 1H, J = 8Hz, 5-H), 4.32 (t, 1H, J = 8Hz,  $\alpha$ -H), 7.01-7.46 (m, 15H, aromáticos).

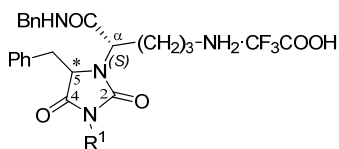
$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 22.3 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\gamma$ ), 25.9 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\delta$ ), 28.4 ( $\text{CH}_2$ , 5- $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\beta$ ), 31.1 ( $\text{CH}_2$ , 5- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 39.2 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_\epsilon$ ), 42.1 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ -Bn), 57.1 (CH,  $\text{C}_\alpha$ ), 59.6 (CH,  $\text{C}_5$ ), 118.3-139.6 (15CH y 3C, aromáticos), 155.5 ( $\text{C}_2$ ), 171.2 ( $\text{C}_4$ ), 169.2 (CONH).

ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$  calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_3$ , 499.62; encontrado 499.44(100 %).

**Tabla 4.40.-** Datos analíticos más significativos de las hidantoínas derivadas de ornitina **139a** y **141a-143a**.

Compuesto <sup>a</sup>	R <sup>1</sup>	Config (*)	F. Molecular	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	[M+1] <sup>+</sup> calc. <sup>c</sup>	[M+1] <sup>+</sup> encontr. <sup>d</sup>
<b>(R)-139a</b>	Ph	(R)	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	3.10	471.56	471.32
<b>(S)-139a</b>	Ph	(S)	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	3.10	471.56	471.43
<b>(R)-141a</b>	Bn	(R)	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	3.22	485.25	485.38
<b>(S)-141a</b>	Bn	(S)	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	3.22	485.25	485.23
<b>(R)-142a</b>		(R)	C <sub>31</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O·CF <sub>3</sub> COOH	3.23	528.64	529.39
<b>(S)-142a</b>		(S)	C <sub>31</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O·CF <sub>3</sub> COOH	3.23	528.64	529.53
<b>(R)-143a</b>		(R)	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·CF <sub>3</sub> COOH	3.29	485.25	485.38
<b>(S)-143a</b>		(S)	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·CF <sub>3</sub> COOH	3.29	485.25	485.21

<sup>a</sup>Todos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos o espumas. <sup>b</sup>Columna Sunfire C<sub>18</sub> (3.9 × 50 mm, 3.5 μm) y gradiente 10-100% de A en B durante 5 min. <sup>c</sup>Masa calculada para el ion molecular sin considerar CF<sub>3</sub>COOH. <sup>d</sup>Abundancia relativa entre 95-100%.

**Tabla 4.41.-** Datos espectroscópicos más significativos de las hidantoínas derivadas de ornitina **139a** y **141a**.


Compuesto	(R)-139a	(S)-139a	(R)-141a	(S)-141a
R <sup>1</sup>	Ph		Bn	
Config (*)	(R)	(S)	(R)	(S)
<b><sup>1</sup>H-RMN<sup>a</sup></b>				
5-H	4.56	4.66	4.40	4.51
5-CH <sub>2</sub>	3.46	3.30, 3.36	3.16, 3.21	3.23
3-R <sup>1,b</sup>	-	-	4.32	4.07
J <sub>5,5CH<sub>2</sub></sub>	8	5	5	5
J <sub>5-CH<sub>2</sub></sub>	8	15	15	15
Aminoácido				
α-H	4.27	4.27	4.40	4.19
β-H	2.07-2.27	2.07-2.27	1.92-2.25	1.92-2.25
γ-H	1.67-1.80	1.67-1.80	1.52-1.72	1.52-1.72
δ-H	2.97	2.97	2.88	2.88
CH <sub>2</sub> (Bn)	4.12	4.38, 4.46	4.28, 4.39	4.47, 4.58
J <sub>NH,CH<sub>2</sub></sub> (Bn)	-	15	15	15
J <sub>α,β</sub>	7.5	7.5	7.5	7.5
<b><sup>13</sup>C-RMN<sup>c</sup></b>				
C <sub>2</sub>	157.2	157.8	158.7	158.7
C <sub>4</sub>	173.7	172.9	174.2	173.7
C <sub>5</sub>	61.7	63.1	61.9	63.2
5-CH <sub>2</sub>	36.3	37.5	37.3	36.6
3-R <sup>1,g</sup>	-	-	44.3	44.3
Aminoácido				
C <sub>α</sub>	59.4	59.4	55.5	59.3
C <sub>β</sub>	28.3	28.3	27.3	28.2
C <sub>γ</sub>	25.7	25.7	25.5	25.5
C <sub>δ</sub>	40.2	40.2	40.2	40.2
CH <sub>2</sub> (Bn)	44.4	44.5	43.0	43.2
CONH	171.1	171.2	170.8	171.2

<sup>a</sup>Espectros registrados a 400 o 500 MHz en CD<sub>3</sub>OD. Asignación realizada con la ayuda de experimentos COSY.

<sup>b</sup>Datos de protón y carbono aromáticos no incluidos debido al solapamiento de las señales. <sup>c</sup>Espectros registrados a 100 o 125 MHz en CD<sub>3</sub>OD. Asignación realizada con la ayuda de experimentos HSQC y HentiMBC.



## 4.6. EVALUACION BIOLOGICA

### 4.6.1. Ensayos de inhibición de agregación plaquetaria.

La sangre necesaria para el ensayo fue obtenida de personas voluntarias (30 mL por persona), las cuales no habían tomado ningún fármaco que alterara las plaquetas durante las dos semanas previas a la donación. La sangre se extrae por punción venosa y se recoge en tubos Vacutainer de 2.7 ml que contienen una solución tampón al 3.2% de citrato de sodio. La sangre extraída fue centrifugada a 250×g durante 7 minutos para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP). Después de separar el PRP, el resto de la sangre fue re-centrifugada a 900×g durante 10 min para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). El PPP fue usado como referencia óptica en la agregación y como diluyente para obtener un PRP de una concentración final de 200.000 plaquetas/μL. La agregación plaquetaria se midió en un agregómetro óptico (Chrono-Log modelo 440 de cuatro canales). Se preparon por duplicado las siguientes muestras en cubetas de vidrio:

- Muestra control: 0.5 ml de PRP con 30 μM de SFLLRN.
- Muestra a ensayar: 0.5 ml de PRP con 30 μM de SFLLRN y 0.1 mg/ml del compuesto a evaluar. (Todas las disoluciones se realizaron en DMSO)

Las muestras fueron incubadas 5 min a 37 °C. Se realizó la medida de la agregación plaquetaria al comienzo y al final del ensayo, siendo el valor máximo de agregación plaquetaria para la muestra control al final del ensayo. Por comparación de este valor máximo con el valor obtenido en las muestras a ensayar se determinó el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria. El resultado obtenido es la media de los dos ensayos realizados.

### 4.6.2. Evaluación de la actividad antitumoral. Ensayo de citotoxicidad.

El ensayo de citotoxicidad se realizó en multiplaca de 96 pocillos, utilizando el método del NCI (National Cancer Institute)<sup>303</sup>. El crecimiento celular se evaluó tras 48 h de incubación en presencia o ausencia de los compuestos a ensayar. El resultado expresa el porcentaje de crecimiento con respecto al control sin tratar. Puesto que se toma como referencia el tiempo cero, momento en que empieza el tratamiento, se puede observar crecimiento (igual a control (100%)= “no efecto” o inferior al control (100 a 0%)= “citostaticidad”) o muerte celular parcial (0 a 99%) o total (100%)= “citotoxicidad”. En el

ensayo se determinan tres valores críticos, a saber: GI<sub>50</sub>, concentración que produce una inhibición del crecimiento del 50%; TGI, concentración que produce una inhibición total del crecimiento; LC<sub>50</sub>, concentración que produce un 50% de muerte celular. El ensayo de citotoxicidad se realizó en las líneas celulares de carcinoma humano A-549 (pulmón), HT-29 (colon) y MDA-MB-231 (mama). La cuantificación del ensayo se realizó por colorimetría mediante tinción con sulforodamina B (SRB) y medición de la densidad óptica en el lector de multicapa tipo ELISA. Estos ensayos fueron realizados por la empresa farmacéutica PharmaMar.



## **5. BIBLIOGRAFÍA**

---



---

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Di Cera, E. Thrombin. *Mol. Aspects Med.*, **2008**, *29*, 203-254.
2. Macfarlane, S. R.; Seatter, M. J.; Kanke, T.; Hunter, G. D.; Plevin, R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.*, **2001**, *53*, 245-282.
3. Martorell, L.; Martínez-González, J.; Rodríguez, C.; Gentile, M.; Calvayrac, O.; Badimon, L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb. Haemostasis*, **2008**, *99*, 305-315.
4. Ossovskaya, V. S.; Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.*, **2004**, *84*, 579-621.
5. Sokolova, E.; Reiser, G. Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: localization, expression and participation in neurodegenerative diseases. *Thromb. Haemostasis*, **2008**, *100*, 576-581.
6. Luo, W.; Wang, Y.; Reiser, G. The role of thrombin and thrombin receptors in the brain. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 133-159.
7. Luo, W.; Wang, Y.; Reiser, G. Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res. Rev.*, **2007**, *56*, 331-345.
8. Steinhoff, M.; Buddenkotte, J.; Shpacovitch, V.; Rattenholl, A.; Moormann, C.; Vergnolle, N.; Luger, T. A.; Hollenberg, M. D. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.*, **2005**, *26*, 1-43.
9. Ramachandran, R.; El-Daly, M.; Saifeddine, M.; Hollenberg, M. D. Thrombin: To PAR or not to PAR, and the regulation of inflammation. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 19-46.
10. Pagel, C. N.; Song, S. J.; Loh, L. H.; Tudor, E. M.; Murray-Rust, T. A.; Pike, R. N.; Mackie, E. J. Thrombin-stimulated growth factor and cytokine expression in osteoblasts is mediated by protease-activated receptor-1 and prostanoids. *Bone*, **2009**, *44*, 813-821.
11. Arora, P.; Ricks, T. K.; Trejo, J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *J. Cell Sci.*, **2007**, *120*, 921-928.
12. Camerer, E. Protease signaling in tumor progression. *Thromb. Res.*, **2007**, *120 Suppl 2*, S75-S81.
13. Borensztajn, K. S.; Spek, C. A. Protease-activated receptors, apoptosis and tumor growth. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, **2008**, *36*, 137-147.
14. Kobrinsky, B.; Karpatkin, S. The role of thrombin in tumor biology. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 161-172.

15. Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, **2000**, *407*, 258-264.
16. Proteinase-activated receptors. In *The Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction*. 5th ed. Watling, K. J., Ed.; SigmaAldrich Research Biotechnology: Natick, **2006**, pp. 210-211.
17. García-López, M. T.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Herranz, R. Thrombin-activated receptors: Promising targets for cancer therapy? *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 109-128.
18. Vu, T. K.; Hung, D. T.; Wheaton, V. I.; Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, **1991**, *64*, 1057-1068.
19. Blackhart, B. D.; Ruslim-Litrus, L.; Lu, C. C.; Alves, V. L.; Teng, W.; Scarborough, R. M.; Reynolds, E. E.; Oksenberg, D. Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide. *Mol. Pharm.*, **2000**, *58*, 1178-1187.
20. Seeley, S.; Covic, L.; Jacques, S. L.; Sudmeier, J.; Baleja, J. D.; Kuliopulos, A. Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor: inhibition of intramolecular liganding. *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 1033-1041.
21. Derian, C. K.; Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Andrade-Gordon, P. Therapeutic potential of protease-activated receptor-1 antagonists. *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2003**, *12*, 209-221.
22. Trejo, J. Regulation of thrombin receptor signaling. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 47-61.
23. Kahn, M. L.; Zheng, Y. W.; Huang, W.; Bigornia, V.; Zeng, D.; Moff, S.; Farese, R. V., Jr.; Tam, C.; Coughlin, S. R. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, **1998**, *394*, 690-694.
24. O'Brien, P. J.; Prevost, N.; Molino, M.; Hollinger, M. K.; Woolkalis, M. J.; Woulfe, D. S.; Brass, L. F. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 13502-13509.
25. Schaffner, F.; Ruf, W. Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2008**, *34*, 147-153.
26. Camerer, E.; Kataoka, H.; Kahn, M.; Lease, K.; Coughlin, S. R. Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 16081-16087.
27. Riewald, M. Thrombin and activated protein C: Integrated to regulate vascular physiology. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 63-80.

- 
28. Cheng, T.; Liu, D.; Griffin, J. H.; Fernández, J. A.; Castellino, F.; Rosen, E. D.; Fukudome, K.; Zlokovic, B. V. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat. Med.*, **2003**, *9*, 338-342.
  29. Mannaioni, G.; Orr, A. G.; Hamill, C. E.; Yuan, H.; Pedone, K. H.; McCoy, K. L.; Berlinguer Palmini, R.; Junge, C. E.; Lee, C. J.; Yepes, M.; Hepler, J. R.; Traynelis, S. F. Plasmin potentiates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in hippocampal neurons through activation of protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 20600-20611.
  30. Hollenberg, M. D.; Oikonomopoulou, K.; Hansen, K. K.; Saifeddine, M.; Ramachandran, R.; Diamandis, E. P. Kallikreins and proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of inflammatory diseases and cancer. *Biol. Chem.*, **2008**, *389*, 643-651.
  31. Boire, A.; Covic, L.; Agarwal, A.; Jacques, S.; Sherifi, S.; Kuliopulos, A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, **2005**, *120*, 303-313.
  32. Loubakos, A.; Potempa, J.; Travis, J.; D'Andrea, M. R.; Andrade-Gordon, P.; Santulli, R.; Mackie, E. J.; Pike, R. N. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect. Immun.*, **2001**, *69*, 5121-5130.
  33. Loubakos, A.; Yuan, Y. P.; Jenkins, A. L.; Travis, J.; Andrade-Gordon, P.; Santulli, R.; Potempa, J.; Pike, R. N. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood*, **2001**, *97*, 3790-3797.
  34. Rana, T.; Misra, S.; Mittal, M. K.; Farrow, A. L.; Wilson, K. T.; Linton, M. F.; Fazio, S.; Willis, I. M.; Chaudhuri, G. Mechanism of down-regulation of RNA polymerase III-transcribed non-coding RNA genes in macrophages by *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 6614-6626.
  35. Nguyen, Q. D.; Faivre, S.; Bruyneel, E.; Rivat, C.; Seto, M.; Endo, T.; Mareel, M.; Emami, S.; Gespach, C. RhoA- and RhoD-dependent regulatory switch of G $\alpha$  subunit signaling by PAR-1 receptors in cellular invasion. *FASEB J.*, **2002**, *16*, 565-576.
  36. McLaughlin, J. N.; Shen, L.; Holinstat, M.; Brooks, J. D.; Dibenedetto, E.; Hamm, H. E. Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 25048-25059.
  37. Gavard, J.; Gutkind, J. S. Protein kinase C-related kinase and ROCK are required for thrombin-induced endothelial cell permeability downstream from Galpha12/13 and Galpha11/q. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 29888-29896.
  38. De Vries, L.; Palmier, C.; Finana, F.; Le Grand, B.; Perez, M.; Cussac, D. Pharmacological characterization of protease activated receptor-1 by a serum responsive element-dependent reporter gene assay: major role of calmodulin. *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, *71*, 1449-1458.

39. Huang, J. S.; Dong, L.; Kozasa, T.; Le Breton, G. C. Signaling through G(alpha)13 switch region I is essential for protease-activated receptor 1-mediated human platelet shape change, aggregation, and secretion. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 10210-10222.
40. Vouret-Craviari, V.; Boquet, P.; Pouyssegur, J.; Van Obberghen-Schilling, E. Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol. Biol. Cell*, **1998**, *9*, 2639-2653.
41. Nguyen, Q. D.; De Wever, O.; Bruyneel, E.; Hendrix, A.; Xie, W. Z.; Lombet, A.; Leibl, M.; Mareel, M.; Gieseler, F.; Bracke, M.; Gespach, C. Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment. *Oncogene*, **2005**, *24*, 8240-8251.
42. Hatziapostolou, M.; Polytarchou, C.; Panutsopoulos, D.; Covic, L.; Tsihchlis, P. N. Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 1851-1861.
43. Furuhashi, I.; Abe, K.; Sato, T.; Inoue, H. Thrombin-stimulated proliferation of cultured human synovial fibroblasts through proteolytic activation of proteinase-activated receptor-1. *J. Pharmacol. Sci.*, **2008**, *108*, 104-111.
44. Palma-Nicolas, J. P.; López, E.; López-Colomé, A. M. PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci. Rep.*, **2008**, *28*, 307-317.
45. Chiu, Y. C.; Fong, Y. C.; Lai, C. H.; Hung, C. H.; Hsu, H. C.; Lee, T. S.; Yang, R. S.; Fu, W. M.; Tang, C. H. Thrombin-induced IL-6 production in human synovial fibroblasts is mediated by PAR1, phospholipase C, protein kinase C $\alpha$ , c-Src, NF-kappa B and p300 pathway. *Mol. Immunol.*, **2008**, *45*, 1587-1599.
46. Huang, Y. L.; Shi, G. Y.; Lee, H.; Jiang, M. J.; Huang, B. M.; Wu, H. L.; Yang, H. Y. Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, **2009**, *21*, 954-968.
47. Arora, P.; Cuevas, B. D.; Russo, A.; Johnson, G. L.; Trejo, J. Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene*, **2008**, *27*, 4434-4445.
48. Faivre, S.; Regnaud, K.; Bruyneel, E.; Nguyen, Q. D.; Mareel, M.; Emami, S.; Gespach, C. Suppression of cellular invasion by activated G-protein subunits G $\alpha$ o, G $\alpha$ i1, G $\alpha$ i2, and G $\alpha$ i3 and sequestration of G $\beta$  $\gamma$ . *Mol. Pharm.*, **2001**, *60*, 363-372.
49. Wang, H.; Ubl, J. J.; Stricker, R.; Reiser, G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2002**, *283*, C1351-C1364.
50. Wolfe, B. L.; Marchese, A.; Trejo, J. Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *J. Cell Biol.*, **2007**, *177*, 905-916.

- 
51. Ishii, K.; Chen, J.; Ishii, M.; Koch, W. J.; Freedman, N. J.; Lefkowitz, R. J.; Coughlin, S. R. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 1125-1130.
  52. Paing, M. M.; Stutts, A. B.; Kohout, T. A.; Lefkowitz, R. J.; Trejo, J. beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 1292-1300.
  53. Sambrano, G. R.; Coughlin, S. R. The carboxyl tail of protease-activated receptor-1 is required for chemotaxis. Correlation of signal termination and directional migration. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 20178-20184.
  54. Trejo, J.; Hammes, S. R.; Coughlin, S. R. Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, *95*, 13698-13702.
  55. Lyman, G. H.; Khorana, A. A.; Kuderer, N. M.; Lee, A. Y. Cancer and thrombosis: back to the future renewed interest in an old problem. *Cancer Investig.*, **2009**, *27*, 472-473.
  56. Shen, V. S.; Pollak, E. W. Fatal pulmonary embolism in cancer patients: is heparin prophylaxis justified? *South. Med. J.*, **1980**, *73*, 841-843.
  57. Svendsen, E.; Karwinski, B. Prevalence of pulmonary embolism at necropsy in patients with cancer. *J. Clin. Pathol.*, **1989**, *42*, 805-809.
  58. Rickles, F. R.; Edwards, R. L. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood*, **1983**, *62*, 14-31.
  59. Petralia, G. A.; Kakkar, A. K. Anti-thrombotic therapy in cancer patients. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 189-203.
  60. Prandoni, P.; Lensing, A. W.; Buller, H. R.; Cogo, A.; Prins, M. H.; Cattelan, A. M.; Cuppini, S.; Noventa, F.; ten Cate, J. W. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, **1992**, *327*, 1128-1133.
  61. Sørensen, H. T.; Mellekjaer, L.; Olsen, J. H.; Baron, J. A. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.*, **2000**, *343*, 1846-1850.
  62. Kakkar, A. K. An expanding role for antithrombotic therapy in cancer patients. *Cancer Treat. Rev.*, **2003**, *29 Suppl 2*, 23-26.
  63. Nierodzik, M. L.; Karpatkin, S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, **2006**, *10*, 355-362.
  64. Zacharski, L. R.; Henderson, W. G.; Rickles, F. R.; Forman, W. B.; Cornell, C. J., Jr.; Forcier, R. J.; Edwards, R. L.; Headley, E.; Kim, S. H.; O'Donnell, J. F.; et al. Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer*, **1984**, *53*, 2046-2052.

65. Lebeau, B.; Chastang, C.; Brechot, J. M.; Capron, F.; Dautzenberg, B.; Delaisements, C.; Mornet, M.; Brun, J.; Hurdebourcq, J. P.; Lemarie, E. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules" Group. *Cancer*, **1994**, *74*, 38-45.
66. Altinbas, M.; Coskun, H. S.; Er, O.; Ozkan, M.; Eser, B.; Unal, A.; Cetin, M.; Soyuer, S. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J. Thromb. Haemost.*, **2004**, *2*, 1266-1271.
67. Kakkar, A. K.; Levine, M. N.; Kadziola, Z.; Lemoine, N. R.; Low, V.; Patel, H. K.; Rustin, G.; Thomas, M.; Quigley, M.; Williamson, R. C. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*, 1944-1948.
68. Klerk, C. P.; Smorenburg, S. M.; Otten, H. M.; Lensing, A. W.; Prins, M. H.; Piovella, F.; Prandoni, P.; Bos, M. M.; Richel, D. J.; van Tienhoven, G.; Buller, H. R. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 2130-2135.
69. Lee, A. Y.; Rickles, F. R.; Julian, J. A.; Gent, M.; Baker, R. I.; Bowden, C.; Kakkar, A. K.; Prins, M.; Levine, M. N. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 2123-2129.
70. Leshchenko Iu, M.; Miasoiedov, D. V.; Oliinichenko, H. P.; Koshel, K. V.; Iatsenko, S. M. The effect of low-molecular-weight heparin on the late follow-up results of the combined and complex treatment of patients with rectal cancer. *Klin. Khir.*, **2007**, 21-24.
71. Bobek, V.; Boubelik, M.; Fiserova, A.; L'Uptovcova, M.; Vannucci, L.; Kacprzak, G.; Kolodziej, J.; Majewski, A. M.; Hoffman, R. M. Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. *Lung Cancer*, **2005**, *47*, 215-223.
72. Salah, Z.; Grisaru-Granovsky, S.; Maoz, M.; Uziely, B.; Cohen, I.; Turn, H.; Perez, T.; Bar-Shavit, R. The role of thrombin and its receptors in epithelial malignancies: Lessons from a transgenic mouse model and transcriptional regulation. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 173-188.
73. Tellez, C.; Bar-Eli, M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene*, **2003**, *22*, 3130-3137.
74. Granovsky-Grisaru, S.; Zaidoun, S.; Grisaru, D.; Yekel, Y.; Prus, D.; Beller, U.; Bar-Shavit, R. The pattern of protease activated receptor 1 (PAR1) expression in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, **2006**, *103*, 802-806.
75. Even-Ram, S.; Uziely, B.; Cohen, P.; Grisaru-Granovsky, S.; Maoz, M.; Ginzburg, Y.; Reich, R.; Vlodaysky, I.; Bar-Shavit, R. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.*, **1998**, *4*, 909-914.

- 
76. Cooper, C. R.; Chay, C. H.; Gendernalik, J. D.; Lee, H. L.; Bhatia, J.; Taichman, R. S.; McCauley, L. K.; Keller, E. T.; Pienta, K. J. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer*, **2003**, *97*, 739-747.
  77. Yuan, T. C.; Lin, M. F. Protease-activated receptor 1: a role in prostate cancer metastasis. *Clin. Prostate Cancer*, **2004**, *3*, 189-191.
  78. Black, P. C.; Mize, G. J.; Karlin, P.; Greenberg, D. L.; Hawley, S. J.; True, L. D.; Vessella, R. L.; Takayama, T. K. Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate*, **2007**, *67*, 743-756.
  79. Zhang, X.; Wang, W.; True, L. D.; Vessella, R. L.; Takayama, T. K. Protease-activated receptor-1 is upregulated in reactive stroma of primary prostate cancer and bone metastasis. *Prostate*, **2009**, *69*, 727-736.
  80. Rudroff, C.; Seibold, S.; Kaufmann, R.; Zetina, C. C.; Reise, K.; Schafer, U.; Schneider, A.; Brockmann, M.; Scheele, J.; Neugebauer, E. A. Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumour cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro. *Clin. Exp. Metastasis*, **2002**, *19*, 181-189.
  81. Grisarú-Granovsky, S.; Salah, Z.; Maoz, M.; Pruss, D.; Beller, U.; Bar-Shavit, R. Differential expression of protease activated receptor 1 (PAR1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int. J. Cancer*, **2005**, *113*, 372-378.
  82. Darmoul, D.; Gratio, V.; Devaud, H.; Lehy, T.; Laburthe, M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am. J. Pathol.*, **2003**, *162*, 1503-1513.
  83. Jin, E.; Fujiwara, M.; Pan, X.; Ghazizadeh, M.; Arai, S.; Ohaki, Y.; Kajiwara, K.; Takemura, T.; Kawanami, O. Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 participate in the cell growth of alveolar capillary endothelium in primary lung adenocarcinomas. *Cancer*, **2003**, *97*, 703-713.
  84. Ghio, P.; Cappia, S.; Selvaggi, G.; Novello, S.; Lausi, P.; Zecchina, G.; Papotti, M.; Borasio, P.; Scagliotti, G. V. Prognostic role of protease-activated receptors 1 and 4 in resected stage IB non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer*, **2006**, *7*, 395-400.
  85. Zhang, X.; Hunt, J. L.; Landsittel, D. P.; Muller, S.; Adler-Storthz, K.; Ferris, R. L.; Shin, D. M.; Chen, Z. G. Correlation of protease-activated receptor-1 with differentiation markers in squamous cell carcinoma of the head and neck and its implication in lymph node metastasis. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 8451-8459.
  86. Veiga, C. D.; Carneiro-Lobo, T. C.; Coelho, C. J.; Carvalho, S. M.; Maia, R. C.; Vasconcelos, F. C.; Abdelhay, E.; Mencialha, A. L.; Ferreira, A. F.; Castro, F. A.; Monteiro, R. Q. Increased expression of protease-activated receptor 1 (PAR-1) in human leukemias. *Blood Cells Mol. Dis.*, **2011**, *46*, 230-234.

87. D'Andrea, M. R.; Derian, C. K.; Santulli, R. J.; Andrade-Gordon, P. Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am. J. Pathol.*, **2001**, *158*, 2031-2041.
88. Martin, C. B.; Mahon, G. M.; Klinger, M. B.; Kay, R. J.; Symons, M.; Der, C. J.; Whitehead, I. P. The thrombin receptor, PAR-1, causes transformation by activation of Rho-mediated signaling pathways. *Oncogene*, **2001**, *20*, 1953-1963.
89. Salah, Z.; Maoz, M.; Pokroy, E.; Lotem, M.; Bar-Shavit, R.; Uziely, B. Protease-activated receptor-1 (hPar1), a survival factor eliciting tumor progression. *Mol. Cancer Res.*, **2007**, *5*, 229-240.
90. Villares, G. J.; Zigler, M.; Wang, H.; Melnikova, V. O.; Wu, H.; Friedman, R.; Leslie, M. C.; Vivas-Mejia, P. E.; López-Berestein, G.; Sood, A. K.; Bar-Eli, M. Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome-incorporated protease-activated receptor-1 small interfering RNA. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 9078-9086.
91. Kepner, N.; Lipton, A. A mitogenic factor for transformed fibroblasts from human platelets. *Cancer Res.*, **1981**, *41*, 430-432.
92. Möhle, R.; Green, D.; Moore, M. A.; Nachman, R. L.; Rafii, S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**, *94*, 663-668.
93. Li, J. J.; Huang, Y. Q.; Basch, R.; Karparkin, S. Thrombin induces the release of angiotensin-1 from platelets. *Thromb. Haemostasis*, **2001**, *85*, 204-206.
94. Nieswandt, B.; Hafner, M.; Echtenacher, B.; Mannel, D. N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 1295-1300.
95. Beaulieu, L. M.; Church, F. C. Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1. *Exp. Cell Res.*, **2007**, *313*, 677-687.
96. Page-McCaw, A.; Ewald, A. J.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*, 221-233.
97. Ala-aho, R.; Kahari, V. M. Collagenases in cancer. *Biochimie*, **2005**, *87*, 273-286.
98. Blackburn, J. S.; Brinckerhoff, C. E. Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **2008**, *173*, 1736-1746.
99. Blackburn, J. S.; Rhodes, C. H.; Coon, C. I.; Brinckerhoff, C. E. RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 10849-10858.
100. Nguyen, N.; Kuliopulos, A.; Graham, R. A.; Covic, L. Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 2658-2665.

- 
101. Agarwal, A.; Covic, L.; Sevigny, L. M.; Kaneider, N. C.; Lazarides, K.; Azabdaftari, G.; Sharifi, S.; Kuliopulos, A. Targeting a metalloprotease-PAR1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, *7*, 2746-2757.
  102. Trivedi, V.; Boire, A.; Tchernychev, B.; Kaneider, N. C.; Leger, A. J.; O'Callaghan, K.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*, **2009**, *137*, 332-343.
  103. Darmoul, D.; Gratio, V.; Devaud, H.; Peiretti, F.; Laburthe, M. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cancer Res.*, **2004**, *2*, 514-522.
  104. Yin, Y. J.; Katz, V.; Salah, Z.; Maoz, M.; Cohen, I.; Uziely, B.; Turm, H.; Grisaru-Granovsky, S.; Suzuki, H.; Bar-Shavit, R. Mammary gland tissue targeted overexpression of human protease-activated receptor 1 reveals a novel link to  $\beta$ -catenin stabilization. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 5224-5233.
  105. Grisaru-Granovsky, S.; Maoz, M.; Barzilay, O.; Yin, Y. J.; Prus, D.; Bar-Shavit, R. Protease activated receptor-1, PAR1, promotes placenta trophoblast invasion and  $\beta$ -catenin stabilization. *J. Cell. Physiol.*, **2009**, *218*, 512-521.
  106. Salah, Z.; Maoz, M.; Cohen, I.; Pizov, G.; Pode, D.; Runge, M. S.; Bar-Shavit, R. Identification of a novel functional androgen response element within hPar1 promoter: implications to prostate cancer progression. *FASEB J.*, **2005**, *19*, 62-72.
  107. Salah, Z.; Maoz, M.; Pizov, G.; Bar-Shavit, R. Transcriptional regulation of human protease-activated receptor 1: a role for the early growth response-1 protein in prostate cancer. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 9835-9843.
  108. Salah, Z.; Haupt, S.; Maoz, M.; Baraz, L.; Rotter, V.; Peretz, T.; Haupt, Y.; Bar-Shavit, R. p53 controls hPar1 function and expression. *Oncogene*, **2008**, *27*, 6866-6874.
  109. Tsopanoglou, N. E.; Pipili-Synetos, E.; Maragoudakis, M. E. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am. J. Pathol.*, **1993**, *264*, C1302-C1307.
  110. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. The role of thrombin in angiogenesis. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 93-113.
  111. Caunt, M.; Huang, Y. Q.; Brooks, P. C.; Karpatkin, S. Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J. Thromb. Haemost.*, **2003**, *1*, 2097-2102.
  112. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 23969-23976.

113. Huang, Y. Q.; Li, J. J.; Hu, L.; Lee, M.; Karparkin, S. Thrombin induces increased expression and secretion of angiotensin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood*, **2002**, *99*, 1646-1650.
114. Caunt, M.; Hu, L.; Tang, T.; Brooks, P. C.; Ibrahim, S.; Karparkin, S. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 4125-4132.
115. Zania, P.; Kritikou, S.; Flordellis, C. S.; Maragoudakis, M. E.; Tsopanoglou, N. E. Blockade of angiogenesis by small molecule antagonists to protease-activated receptor-1: association with endothelial cell growth suppression and induction of apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, *318*, 246-254.
116. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. Inhibition of angiogenesis by small-molecule antagonists of protease-activated receptor-1. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2007**, *33*, 680-687.
117. Zania, P.; Gourni, D.; Aplin, A. C.; Nicosia, R. F.; Flordellis, C. S.; Maragoudakis, M. E.; Tsopanoglou, N. E. Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**, *328*, 378-389.
118. Strande, J. L.; Widlansky, M. E.; Tsopanoglou, N. E.; Su, J.; Wang, J.; Hsu, A.; Routhu, K. V.; Baker, J. E. Parstatin: a cryptic peptide involved in cardioprotection after ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **2009**, *83*, 325-334.
119. Huang, H.; Vasilakis, P.; Zhong, X.; Shen, J. K.; Geronatsiou, K.; Papadaki, H.; Maragoudakis, M. E.; Gartaganis, S. P.; Viores, S. A.; Tsopanoglou, N. E. Parstatin suppresses ocular neovascularization and inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2010**, *51*, 5825-5832.
120. Routhu, K. V.; Tsopanoglou, N. E.; Strande, J. L. Parstatin(1-26): the putative signal peptide of protease-activated receptor 1 confers potent protection from myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2010**, *332*, 898-905.
121. Di Cera, E. Thrombin as an anticoagulant. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **2011**, *99*, 145-184.
122. Gandhi, P. S.; Chen, Z.; Mathews, F. S.; Di Cera, E. Structural identification of the pathway of long-range communication in an allosteric enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 1832-1837.
123. Vu, T. K.; Wheaton, V. I.; Hung, D. T.; Charo, I.; Coughlin, S. R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, **1991**, *353*, 674-677.
124. Ayala, Y. M.; Cantwell, A. M.; Rose, T.; Bush, L. A.; Arosio, D.; Di Cera, E. Molecular mapping of thrombin-receptor interactions. *Proteins*, **2001**, *45*, 107-116.
125. Nieman, M. T.; Schmaier, A. H. Interaction of thrombin with PAR1 and PAR4 at the thrombin cleavage site. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 8603-8610.
126. Jacques, S. L.; LeMasurier, M.; Sheridan, P. J.; Seeley, S. K.; Kuliopulos, A. Substrate-assisted catalysis of the PAR1 thrombin receptor. Enhancement of macromolecular association and cleavage. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 40671-44068.

- 
127. Myles, T.; Le Bonniec, B. F.; Stone, S. R. The dual role of thrombin's anion-binding exosite-I in the recognition and cleavage of the protease-activated receptor 1. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, *268*, 70-77.
128. Covic, L.; Gresser, A. L.; Kuliopulos, A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 5458-5467.
129. Bahou, W. F.; Kutok, J. L.; Wong, A.; Potter, C. L.; Collier, B. S. Identification of a novel thrombin receptor sequence required for activation-dependent responses. *Blood*, **1994**, *84*, 4195-4202.
130. Nanevycz, T.; Ishii, M.; Wang, L.; Chen, M.; Chen, J.; Turck, C. W.; Cohen, F. E.; Coughlin, S. R. Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 21619-21625.
131. Mathews, II; Padmanabhan, K. P.; Ganesh, V.; Tulinsky, A.; Ishii, M.; Chen, J.; Turck, C. W.; Coughlin, S. R.; Fenton, J. W., 2<sup>nd</sup> Crystallographic structures of thrombin complexed with thrombin receptor peptides: existence of expected and novel binding modes. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 3266-3279.
132. Gandhi, P. S.; Chen, Z.; Di Cera, E. Crystal structure of thrombin bound to the uncleaved extracellular fragment of PAR1. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 15393-15398.
133. Vouret-Craviari, V.; Van Obberghen-Schilling, E.; Rasmussen, U. B.; Pavirani, A.; Lecocq, J. P.; Pouyssegur, J. Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **1992**, *3*, 95-102.
134. Vouret-Craviari, V.; Van Obberghen-Schilling, E.; Scimeca, J. C.; Van Obberghen, E.; Pouyssegur, J. Differential activation of p44mapk (ERK1) by alpha-thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem. J.*, **1993**, *289 ( Pt 1)*, 209-214.
135. Feng, D. M.; Veber, D. F.; Connolly, T. M.; Condra, C.; Tang, M. J.; Nutt, R. F. Development of a potent thrombin receptor ligand. *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4125-4130.
136. Ceruso, M. A.; McComsey, D. F.; Leo, G. C.; Andrade-Gordon, P.; Addo, M. F.; Scarborough, R. M.; Oksenberg, D.; Maryanoff, B. E. Thrombin receptor-activating peptides (TRAPs): Investigation of bioactive conformations via structure-activity, spectroscopic, and computational studies. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 2353-2371.
137. Scarborough, R. M.; Naughton, M. A.; Teng, W.; Hung, D. T.; Rose, J.; Vu, T. K.; Wheaton, V. I.; Turck, C. W.; Coughlin, S. R. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 13146-13149.
138. Chao, B. H.; Kalkunte, S.; Maraganore, J. M.; Stone, S. R. Essential groups in synthetic agonist peptides for activation of the platelet thrombin receptor. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 6175-6178.
-

139. Vassallo, R. R., Jr.; Kieber-Emmons, T.; Cichowski, K.; Brass, L. F. Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 6081-6085.
140. Sabo, T.; Gurwitz, D.; Motola, L.; Brodt, P.; Barak, R.; Elhanaty, E. Structure-activity studies of the thrombin receptor activating peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, *188*, 604-610.
141. Natarajan, S.; Riexinger, D.; Peluso, M.; Seiler, S. M. 'Tethered ligand' derived pentapeptide agonists of thrombin receptor: a study of side chain requirements for human platelet activation and GTPase stimulation. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1995**, *45*, 145-151.
142. Barry, G. D.; Le, G. T.; Fairlie, D. P. Agonists and antagonists of protease activated receptors (PARs). *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 243-265.
143. Chen, C.; Maryanoff, B. E.; Andrade-Gordon, P. Thrombin receptor modulators: Medicinal chemistry, biological evaluation, and clinical applications. In *Thrombin: Physiology and Disease*. Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, pp. 205-236.
144. Mao, Y.; Jin, J.; Kunapuli, S. P. Characterization of a new peptide agonist of the protease-activated receptor-1. *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, *75*, 438-447.
145. Hasan, A. A.; Warnock, M.; Nieman, M.; Srikanth, S.; Mahdi, F.; Krishnan, R.; Tulinsky, A.; Schmaier, A. H. Mechanisms of Arg-Pro-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2003**, *285*, H183-H193.
146. Nieman, M. T.; Warnock, M.; Hasan, A. A.; Mahdi, F.; Lucchesi, B. R.; Brown, N. J.; Murphey, L. J.; Schmaier, A. H. The preparation and characterization of novel peptide antagonists to thrombin and factor VIIa and activation of protease-activated receptor 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *311*, 492-501.
147. Nieman, M. T.; LaRusch, G.; Fang, C.; Zhou, Y.; Schmaier, A. H. Oral thrombostatin FM19 inhibits prostate cancer. *Thromb. Haemostasis*, **2010**, *104*, 1044-1048.
148. Bernatowicz, M. S.; Klimas, C. E.; Hartl, K. S.; Peluso, M.; Allegretto, N. J.; Seiler, S. M. Development of potent thrombin receptor antagonist peptides. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4879-4887.
149. Kahn, M. L.; Nakanishi-Matsui, M.; Shapiro, M. J.; Ishihara, H.; Coughlin, S. R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Investig.*, **1999**, *103*, 879-887.
150. Quinton, T. M.; Kim, S.; Derian, C. K.; Jin, J.; Kunapuli, S. P. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 18434-18439.

- 
151. Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Andrade-Gordon, P.; Derian, C. K. Discovery of potent peptide-mimetic antagonists for the human thrombin receptor, protease-activated receptor-1 (PAR-1). *Curr. Med. Chem. - Cardiovasc. Hematol. Agents*, **2003**, *1*, 13-36.
152. Zhang, H. C.; Derian, C. K.; Andrade-Gordon, P.; Hoekstra, W. J.; McComsey, D. F.; White, K. B.; Poulter, B. L.; Addo, M. F.; Cheung, W. M.; Damiano, B. P.; Oksenberg, D.; Reynolds, E. E.; Pandey, A.; Scarborough, R. M.; Maryanoff, B. E. Discovery and optimization of a novel series of thrombin receptor (PAR-1) antagonists: potent, selective peptide mimetics based on indole and indazole templates. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1021-1024.
153. Derian, C. K.; Maryanoff, B. E.; Andrade-Gordon, P.; Zhang, H. C. Design and evaluation of potent peptide-mimetic PAR-1 antagonists. *Drug Dev. Res.*, **2003**, *59*, 355-366.
154. Damiano, B. P.; Derian, C. K.; Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Gordon, P. A. RWJ-58259: a selective antagonist of protease activated receptor-1. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **2003**, *21*, 313-326.
155. Kato, Y.; Kita, Y.; Nishio, M.; Hirasawa, Y.; Ito, K.; Yamanaka, T.; Motoyama, Y.; Seki, J. In vitro antiplatelet profile of FR171113, a novel non-peptide thrombin receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **1999**, *384*, 197-202.
156. Kato, Y.; Kita, Y.; Hirasawa-Taniyama, Y.; Nishio, M.; Mihara, K.; Ito, K.; Yamanaka, T.; Seki, J.; Miyata, S.; Mutoh, S. Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, FR171113, in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *473*, 163-169.
157. Barrow, J. C.; Nantermet, P. G.; Selnick, H. G.; Glass, K. L.; Ngo, P. L.; Young, M. B.; Pellicore, J. M.; Breslin, M. J.; Hutchinson, J. H.; Freidinger, R. M.; Condra, C.; Karczewski, J.; Bednar, R. A.; Gaul, S. L.; Stern, A.; Gould, R.; Connolly, T. M. Discovery and initial structure-activity relationships of trisubstituted ureas as thrombin receptor (PAR-1) antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2691-2696.
158. Nantermet, P. G.; Barrow, J. C.; Lundell, G. F.; Pellicore, J. M.; Rittle, K. E.; Young, M.; Freidinger, R. M.; Connolly, T. M.; Condra, C.; Karczewski, J.; Bednar, R. A.; Gaul, S. L.; Gould, R. J.; Prendergast, K.; Selnick, H. G. Discovery of a nonpeptidic small molecule antagonist of the human platelet thrombin receptor (PAR-1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 319-323.
159. Suzuki, S.; Kotake, M.; Miyamoto, M.; Kawahara, T.; Kajiwara, A.; Hishinuma, I.; Okano, K.; Miyazawa, S.; Clark, R.; Ozaki, F.; Sato, N.; Shinoda, M.; Kamada, A.; Tsukada, I.; Matsuura, F.; Naoe, Y.; Terauchi, T.; Oohashi, Y.; Ito, O.; Tanaka, H.; Musya, T.; Kogushi, M.; Kawada, T.; Matsuoka, T.; Kobayashi, H.; Chiba, K.; Kimura, A.; Ono, N. Preparation of 2-iminoimidazole derivatives as thrombin receptor antagonists PCT Int. Appl. WO 2002088092, 2002.
-

160. Suzuki, S.; Kotake, M.; Miyamoto, M.; Kawahara, T.; Kajiwara, A.; Hishinuma, I.; Okano, K.; Miyazawa, S.; Clark, R.; Ozaki, F. Preparation of 2-iminopyrrolidine derivatives as thrombin receptor antagonists. PCT Int. Appl. WO 2002085855, 2002.
161. Suzuki, S.; Kotake, M.; Miyamoto, M.; Kawahara, T.; Kajiwara, A.; Hishinuma, I.; Okano, K.; Miyazawa, S.; Clark, R.; Ozaki, F. Preparation of cyclic amidine derivatives as thrombin receptor antagonists. PCT Int. Appl. WO 2002085850, 2002.
162. Safety and tolerability of E5555 and its effects on markers of intravascular inflammation in subjects with coronary artery disease. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00312052> (February 21, 2011).
163. Ahn, H. S.; Arik, L.; Boykow, G.; Burnett, D. A.; Caplen, M. A.; Czarniecki, M.; Domalski, M. S.; Foster, C.; Manna, M.; Stamford, A. W.; Wu, Y. Structure-activity relationships of pyrroloquinazolines as thrombin receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2073-2078.
164. Ahn, H. S.; Foster, C.; Boykow, G.; Stamford, A.; Manna, M.; Graziano, M. Inhibition of cellular action of thrombin by *N*<sub>3</sub>-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7*H*-pyrrolo[3,2-*f*]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *60*, 1425-1434.
165. Ma, L.; Perini, R.; McKnight, W.; Dickey, M.; Klein, A.; Hollenberg, M. D.; Wallace, J. L. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, *102*, 216-220.
166. Kaufmann, R.; Rahn, S.; Pollrich, K.; Hertel, J.; Dittmar, Y.; Hommann, M.; Henklein, P.; Biskup, C.; Westermann, M.; Hollenberg, M. D.; Settmacher, U. Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J. Cell. Physiol.*, **2007**, *211*, 699-707.
167. Strande, J. L.; Hsu, A.; Su, J.; Fu, X.; Gross, G. J.; Baker, J. E. SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res. Cardiol.*, **2007**, *102*, 350-358.
168. Di Serio, C.; Pellerito, S.; Duarte, M.; Massi, D.; Naldini, A.; Cirino, G.; Prudovsky, I.; Santucci, M.; Geppetti, P.; Marchionni, N.; Masotti, G.; Tarantini, F. Protease-activated receptor 1-selective antagonist SCH79797 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by a protease-activated receptor 1-independent mechanism. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.*, **2007**, *101*, 63-69.
169. Chackalamannil, S.; Xia, Y.; Greenlee, W. J.; Clasby, M.; Doller, D.; Tsai, H.; Asberom, T.; Czarniecki, M.; Ahn, H. S.; Boykow, G.; Foster, C.; Agans-Fantuzzi, J.; Bryant, M.; Lau, J.; Chintala, M. Discovery of potent orally active thrombin receptor (protease activated receptor 1) antagonists as novel anti-thrombotic agents. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5884-5887.
170. Chackalamannil, S.; Wang, Y.; Greenlee, W. J.; Hu, Z.; Xia, Y.; Ahn, H. S.; Boykow, G.; Hsieh, Y.; Palamanda, J.; Agans-Fantuzzi, J.; Kurowski, S.; Graziano, M.; Chintala, M.

- Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 3061-3064.
171. Shinohara, Y.; Goto, S.; Doi, M.; Jensen, P. Safety of the novel protease-activated receptor-1 antagonist Vorapaxar in Japanese patients with a history of ischemic stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **2010**, *19*.
172. Rilatt, I.; Mirabel, E.; Grand, B. L.; Perez, M. Discovery and SAR of small molecule PAR1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 903-906.
173. Perez, M.; Lamothe, M.; Maraval, C.; Mirabel, E.; Loubat, C.; Planty, B.; Horn, C.; Michaux, J.; Marrot, S.; Letienne, R.; Pignier, C.; Bocquet, A.; Nadal-Wollbold, F.; Cussac, D.; de Vries, L.; Le Grand, B. Discovery of novel protease activated receptors 1 antagonists with potent antithrombotic activity in vivo. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 5826-5836.
174. Planty, B.; Pujol, C.; Lamothe, M.; Maraval, C.; Horn, C.; Grand, B. L.; Perez, M. Exploration of a new series of PAR1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 1735-1739.
175. Létiénne, R.; Leparq-Panissié, A.; Calmettes, Y.; Nadal-Wollbold, F.; Perez, M.; Le Grand, B. Antithrombotic activity of F 16618, a new PAR1 antagonist evaluated in extracorporeal arteriovenous shunt in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, *79*, 1616-1621.
176. Chieng-Yane, P.; Bocquet, A.; Létiénne, R.; Bourbon, T.; Sablayrolles, S.; Perez, M.; Hatem, S. N.; Lompré, A.-M.; Le Grand, B.; David-Duflho, M. Protease-activated receptor-1 antagonist F-16618 reduces arterial restenosis by down-regulation of tumor necrosis Factor  $\alpha$  and Matrix metalloproteinase 7 expression, migration, and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2011**, *336*, 643-651.
177. Covic, L.; Gresser, A. L.; Talavera, J.; Swift, S.; Kuliopulos, A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2002**, *99*, 643-648.
178. Covic, L.; Misra, M.; Badar, J.; Singh, C.; Kuliopulos, A. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat. Med.*, **2002**, *8*, 1161-1165.
179. Kostenis, E.; Conklin, B. R.; Wess, J. Molecular basis of receptor/G protein coupling selectivity studied by coexpression of wild type and mutant m2 muscarinic receptors with mutant G $\alpha$ (q) subunits. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1487-1495.
180. Ahn, H. S.; Foster, C.; Boykow, G.; Arik, L.; Smith-Torhan, A.; Hesk, D.; Chatterjee, M. Binding of a thrombin receptor tethered ligand analogue to human platelet thrombin receptor. *Mol. Pharm.*, **1997**, *51*, 350-356.
181. Andrade-Gordon, P.; Maryanoff, B. E.; Derian, C. K.; Zhang, H. C.; Addo, M. F.; Darrow, A. L.; Eckardt, A. J.; Hoekstra, W. J.; McComsey, D. F.; Oksenberg, D.; Reynolds, E. E.; Santulli, R. J.; Scarborough, R. M.; Smith, C. E.; White, K. B. Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, 12257-12262.

182. Tan, D. S. Diversity-oriented synthesis: exploring the intersections between chemistry and biology. *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 74-84.
183. Schreiber, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*, **2000**, *287*, 1964-1969.
184. Spandl, R. J.; Bender, A.; Spring, D. R. Diversity-oriented synthesis; a spectrum of approaches and results. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1149-1158.
185. Nielsen, T. E.; Schreiber, S. L. Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, *47*, 48-56.
186. Schreiber, S. L. Organic chemistry: Molecular diversity by design. *Nature*, **2009**, *457*, 153-154.
187. Hajduk, P. J.; Galloway, W. R.; Spring, D. R. Drug discovery: A question of library design. *Nature*, **2011**, *470*, 42-43.
188. González-Vera, J. A.; García-López, M. T.; Herranz, R. Potential of amino acid-derived  $\alpha$ -amino nitriles for generating molecular diversity. *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2008**, *5*, 209-221.
189. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2004**, *30*, 63-69.
190. Herranz, R.; Suárez-Gea, M. L.; Vinuesa, S.; García-López, M. T. Studies on the synthesis of cyanomethyleneamino pseudopeptides. *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 5186-5191.
191. Wang, J.; Liu, X.; Feng, X. Asymmetric Strecker reactions. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 6947-6983.
192. Williams, R. M. Asymmetric Strecker synthesis. In *Synthesis of optically active  $\alpha$ -amino acids.*; Pergamon Press: Oxford, **1989**, pp. 208-229.
193. Duthaler, R. O. Recent developments in the stereoselective synthesis of  $\alpha$ -amino acids. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 1539-1650.
194. Enders, D.; Shilvock, J. P. Some recent applications of  $\alpha$ -amino nitrile chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, *29*, 359-373.
195. Yet, L. Recent developments in catalytic Strecker-type reactions. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2001**, *40*, 875-877.
196. Gröger, H. Catalytic enantioselective Strecker reactions and analogous syntheses. *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 2795-2828.
197. Kobayashi, S.; Ishitani, H. Catalytic enantioselective addition to imines. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 1069-1094.
198. Merino, P.; Marqués-López, E.; Tejero, T.; Herrera, R. P. Organocatalyzed Strecker reactions. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 1219-1234.
199. Zuend, S. J.; Coughlin, M. P.; Lalonde, M. P.; Jacobsen, E. N. Scaleable catalytic asymmetric Strecker syntheses of unnatural  $\alpha$ -amino acids. *Nature*, **2009**, *461*, 968-970.

- 
200. Zuend, S. J.; Jacobsen, E. N. Mechanism of amido-thiourea catalyzed enantioselective imine hydrocyanation: transition state stabilization via multiple non-covalent interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15358-15374.
201. Vachal, P.; Jacobsen, E. N. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the Strecker reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 10012-10014.
202. Lu, Y.; Johnstone, T. C.; Arndtsen, B. A. Hydrogen-bonding asymmetric metal catalysis with  $\alpha$ -amino acids: a simple and tunable approach to high enantioinduction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11284-11285.
203. Majhi, A.; Kim, S. S.; Kadam, S. T. Solvent-free synthesis of  $\alpha$ -aminonitriles from aldehydes, amines and trimethylsilyl cyanide catalyzed by thallium(III) chloride tetrahydrate. *Appl. Organomet. Chem.*, **2008**, *22*, 705-711.
204. Walsh, P. J.; Li, H.; de Parrodi, C. A. A green chemistry approach to asymmetric catalysis: solvent-free and highly concentrated reactions. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 2503-2545.
205. Khan, N. H.; Agrawal, S.; Kureshy, R. I.; Abdi, S. H. R.; Singh, S.; Suresh, E.; Jasra, R. V.  $\text{Fe}(\text{Cp})_2\text{PF}_6$  catalyzed efficient Strecker reactions of ketones and aldehydes under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 640-644.
206. Gising, J.; Ortvist, P.; Sandstrom, A.; Larhed, M. A straightforward microwave method for rapid synthesis of N-1, C-6 functionalized 3,5-dichloro-2(1H)-pyrazinones. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 2809-2815.
207. Baeza, A.; Nájera, C.; Sansano, J. M. Solvent-free synthesis of racemic  $\alpha$ -aminonitriles. *Synthesis*, **2007**, *8*, 1230,1234.
208. Narayan, S.; Muldoon, J.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. "On Water": Unique Reactivity of Organic Compounds in Aqueous Suspension. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**, *44*, 3275-3279.
209. Cruz-Acosta, F.; Santos-Exposito, A.; de Armas, P.; Garcia-Tellado, F. Lewis base-catalyzed three-component Strecker reaction on water. An efficient manifold for the direct  $\alpha$ -cyanoamination of ketones and aldehydes. *Chem. Commun.*, **2009**, 6839-6841.
210. Suárez-Gea, M. L.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Herrero, S.; Herranz, R. Branched peptides and conformationally constrained analogues from cyanomethyleneamino pseudopeptides. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 2083-2084.
211. Freifelder, M. Nitriles. In *Catalytic hydrogenation in organic synthesis. Procedures and commentary.*; Wiley-interscience: Nueva York, **1979**; Cap. 8, pp. 138-152.
212. Herrero, S.; García-López, M. T.; Herranz, R. Expedient one-pot synthesis of novel chiral 2-substituted 5-phenyl-1,4-benzodiazepine scaffolds from amino acid-derived amino nitriles. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 4582-4585.
-

213. Bartolomé-Nebreda, J. M.; Patino-Molina, R.; Martín-Martínez, M.; Gomez-Monterrey, I.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Latorre, M.; Del Río, J.; Herranz, R. 5-(Tryptophyl)amino-1,3-dioxoperhydroprido[1,2-c]pyrimidine-based potent and selective CCK1 receptor antagonists: Structure-activity relationship studies on the substituent at N2-position. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2219-2228.
214. Valdivielso, A. M.; García-López, M. T.; Herranz, R. Improved synthesis of the PAR-1 thrombin receptor antagonist RWJ-58259. *Arkivoc*, **2008**, S1-S4.
215. Valdivielso, A. M.; García-López, M. T.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Herranz, R. Resultados no descritos.
216. Klabunde, T.; Hessler, G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 928-944.
217. Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 893-930.
218. Knox, C.; Law, V.; Jewison, T.; Liu, P.; Ly, S.; Frolkis, A.; Pon, A.; Banco, K.; Mak, C.; Neveu, V.; Djoumbou, Y.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Wishart, D. S. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for "omics" research on drugs. *Nucleic Acids Res.*, **2011**, *39*, D1035-D1041.
219. Borio, P. The anthelmintic action of papain and of piperazine diphenylacetate (DPP). *Minerva Farm* **1953**, *2*, 141-142.
220. Vacca, J. P.; Dorsey, B. D.; Schleif, W. A.; Levin, R. B.; McDaniel, S. L.; Darke, P. L.; Zugay, J.; Quintero, J. C.; Blahy, O. M.; Roth, E. L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1994**, *91*, 4096-4100.
221. Nakao, Y.; Masuda, A.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. Pseudotheonamides, serine protease inhibitors from the marine sponge *Theonella Swinhoei*. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 2425-2431.
222. Kusel, J.; Hagan, P. Praziquantel - Its use, cost and possible development of resistance. *Parasitol. Today*, **1999** *15*, 352-354.
223. Horwell, D. C.; Lewthwaite, R. A.; Pritchard, M. C.; Ratcliffe, G. S.; Ronald Rubin, J. The use of heterocycles for the conformational restriction of biologically active peptoids. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 4591-4606.
224. Batt, A. R.; Kendrick, D. A.; Mathews, E.; Rooker, D. P.; Ryder, H.; Semple, G.; Szelke, M. Novel cholecystokinin receptor ligands: Oxopiperazines derived from Boc-CCK-4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 867-872.
225. Tian, X.; Mishra, R. K.; Switzer, A. G.; Hu, X. E.; Kim, N.; Mazur, A. W.; Ebetino, F. H.; Wos, J. A.; Crossdoersen, D.; Pinney, B. B.; Farmer, J. A.; Sheldon, R. J. Design and synthesis of potent and selective 1,3,4-trisubstituted-2-oxopiperazine based melanocortin-4 receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 4668-4673.

- 
226. Zhang, Y.; Gilmour, B. P.; Navarro, H. A.; Runyon, S. P. Identifying structural features on 1,1-diphenylhexahydrooxazolo[3,4-a]pyrazin-3-ones critical for Neuropeptide S antagonist activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 4064-4067.
227. Sugihara, H.; Fukushi, H.; Miyawaki, T.; Imai, Y.; Terashita, Z.-i.; Kawamura, M.; Fujisawa, Y.; Kita, S. Novel non-peptide Fibrinogen receptor antagonists. 1. Synthesis and glycoprotein IIb/IIIa antagonistic activities of 1,3,4-trisubstituted 2-oxopiperazine derivatives incorporating side-chain functions of the RGDF peptide. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 489-502.
228. Kitamura, S.; Fukushi, H.; Miyawaki, T.; Kawamura, M.; Konishi, N.; Terashita, Z.-i.; Naka, T. Potent dibasic GPIIb/IIIa antagonists with reduced prolongation of bleeding time: Synthesis and pharmacological evaluation of 2-oxopiperazine derivatives. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2438-2450.
229. Maryanoff, B. E.; Costanzo, M. J. Inhibitors of proteases and amide hydrolases that employ an  $\alpha$ -ketoheterocycle as a key enabling functionality. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 1562-1595.
230. Su, T.; Yang, H.; Volkots, D.; Woolfrey, J.; Dam, S.; Wong, P.; Sinha, U.; Scarborough, R. M.; Zhu, B.-Y. Design, synthesis, and structure-activity relationships of substituted piperazinone-based transition state factor Xa inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 729-732.
231. Seibel, J.; Brown, D.; Amour, A.; Macdonald, S. J.; Oldham, N. J.; Schofield, C. J. Synthesis and evaluation of  $\delta$ -lactams (piperazones) as elastase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 387-389.
232. Powell, N. A.; Clay, E. H.; Holsworth, D. D.; Bryant, J. W.; Ryan, M. J.; Jalaie, M.; Zhang, E.; Edmunds, J. J. Equipotent activity in both enantiomers of a series of ketopiperazine-based renin inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 2371-2374.
233. Holsworth, D. D.; Cai, C.; Cheng, X.-M.; Cody, W. L.; Downing, D. M.; Erasga, N.; Lee, C.; Powell, N. A.; Edmunds, J. J.; Stier, M.; Jalaie, M.; Zhang, E.; McConnell, P.; Ryan, M. J.; Bryant, J.; Li, T.; Kasani, A.; Hall, E.; Subedi, R.; Rahim, M.; Maiti, S. Ketopiperazine-based renin inhibitors: Optimization of the "C" ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 2500-2504.
234. Peng, H.; Carrico, D.; Thai, V.; Blaskovich, M.; Bucher, C.; Pusateri, E. E.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Synthesis and evaluation of potent, highly-selective, 3-aryl-piperazinone inhibitors of protein geranylgeranyltransferase-I. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 1768-1784.
235. Cumming, J. N.; Le, T. X.; Babu, S.; Carroll, C.; Chen, X.; Favreau, L.; Gaspari, P.; Guo, T.; Hobbs, D. W.; Huang, Y.; Iserloh, U.; Kennedy, M. E.; Kuvelkar, R.; Li, G.; Lowrie, J.; McHugh, N. A.; Ozgur, L.; Pan, J.; Parker, E. M.; Saionz, K.; Stamford, A. W.; Strickland, C.; Tadesse, D.; Voigt, J.; Wang, L.; Wu, Y.; Zhang, L.; Zhang, Q. Rational design of novel, potent piperazinone and imidazolidinone BACE1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 3236-3241.
-

236. Herrero, S.; García-López, M. T.; Latorre, M.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río, J.; Herranz, R. 2-oxopiperazine-based gamma-turn conformationally constrained peptides: Synthesis of CCK-4 analogues. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3866-3873.
237. Chi, Y.; Gellman, S. H.; Pomerantz, W. C.; Horn, W. S.; Guo, L. English, E. P. Concise  $\beta_2$ -amino acid synthesis via organo catalytic aminomethylation of aldehydes. *PCT Int. Appl.* (**2007**), WO 2007112358 A1 20071004.
238. Amatore, M.; Beeson, T. D.; Brown, S. P.; MacMillan, D. W. C. Enantioselective Linchpin catalysis by SOMO catalysis: an approach to the asymmetric  $\alpha$ -chlorination of aldehydes and terminal epoxide formation. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 5121-5124.
239. Rendler, S.; MacMillan, D. W. C. Enantioselective polyene cyclization via organo-SOMO catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5027-5029.
240. Fehrentz, J.-A.; Castro, B. An efficient synthesis of optically active  $\alpha$ -(<sup>t</sup>butoxycarbonylamino)-aldehydes from  $\alpha$ -amino Acids. *Synthesis*, **1983**, *1983*, 676,678.
241. Fruton, J. S.; Anson, M. L.; John, T. E. The synthesis of peptides. *Adv. Protein Chem.*, **1949**, *Volume 5*, 1-82.
242. Barany, G.; Merrifield, R. B. The peptides: analysis, synthesis, biology. In *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. Gross, E., Meienhofer, J., Eds.; Academic Press: New York, **1980**; Cap. 2, pp. 3-284.
243. Greenstein, J. P.; Winitz, M. In *Chemistry of the Amino Acids*. John Wiley and Sons: New York, **1961**; Cap. 3, pp. 1841-1855
244. Katritzky, A. R.; Rogovoy, B. V. Recent developments in guanylatin agents. *ARKIVOK*, **2005**, 49-87.
245. Verdini, A. S.; Lucietto, P.; Fossati, G.; Giordani, C. A facile preparation of Fmoc-Arg<sup>ω</sup>(Boc)<sub>2</sub>-OH and Z-Arg<sup>ω</sup>(Boc)<sub>2</sub>-OH, new arginine derivatives for peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 6541-6542.
246. Izdebski, J.; Gers, T.; Kuncce, D.; Markowski, P. New tris-alkoxycarbonyl arginine derivatives for peptide synthesis. *J. Pept. Sci.*, **2005**, *11*, 60-64.
247. Guo, Z.-X.; Cammidge, A. N.; Horwell, D. C. A convenient and versatile method for the synthesis of protected guanidines. *Synth. Commun.*, **2000**, *30*, 2933-2943.
248. Herrero, S.; Salgado, A.; García-Lopez, M. T.; Herranz, R. Synthesis of chiral 1,6,8-trioxoperhydropyrazino[1,2-c]pyrimidines as novel highly functionalized scaffolds for peptidomimetics. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 4899-4902.
249. González-Vera, J. A.; García-López, M. T.; Herranz, R. Molecular diversity via amino acid derived  $\alpha$ -amino nitriles: Synthesis of spirocyclic 2,6-dioxopiperazine derivatives. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 3660-3666.

- 
250. Yamamoto, Y.; Kojima, S. Synthesis and chemistry of guanidine derivatives In *The chemistry of amidines and imidates*. Patai S.; Rappoport, Z., Ed.; John Wiley & Sons: Chichester, **1991**; Cap. 2, pp. 485-526.
251. Aláaume, M.; Gulko, A.; Herbstein, F. H.; Kapon, M.; Marsh, R. E. Comparison of the dimensions and conformation of the sulfaguanidine moiety in sulfaguanidine monohydrate and trans-dichlorobis(sulfaguanidine)palladium(II) *Acta Crystallogr. Sect. B* **1976**, *32*, 669-682. .
252. Sullivan, G. R.; Roberts, J. D. Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance. Structure of sulfaguanidine. *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 1095-1096.
253. Kanamori, K.; Roberts, J. D. A nitrogen-15 NMR study of the barriers to isomerization about guanidinium and guanidino carbon-nitrogen bonds in L-arginine. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 4698-4701.
254. Zhang, W.-X.; Nishiura, M.; Hou, Z. Catalytic addition of amine N-H Bonds to carbodiimides by half-sandwich rare-earth metal complexes: efficient synthesis of substituted guanidines through amine protonolysis of rare-earth metal guanidates. *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 4037-4051.
255. McNamara, J. O. Drugs effective in the therapy of the epilepsy. In *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. . 9<sup>th</sup> ed. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G., Eds.; McGraw-Hill: New York, **1996**, pp. 461-486.
256. Lenkowski, P. W.; Ko, S.-H.; Anderson, J. D.; Brown, M. L.; Patel, M. K. Block of human Na<sub>v</sub>1.5 sodium channels by novel  $\alpha$ -hydroxyphenylamide analogues of phenytoin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2004**, *21*, 635-644.
257. Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2006**, *5*, 993-996.
258. Mandell, G. L.; Petri, W. A. In *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9<sup>th</sup> ed. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G., Eds.; McGraw-Hill: New York, **1996**, pp. 1057-1072.
259. Krause, T.; Gerbershagen, M. U.; Fiege, M.; Weißhorn, R.; Wappler, F. Dantrolene – A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*, **2004**, *59*, 364-373.
260. Kassouf, W.; Tanguay, S.; Aprikian, A. G. Nilutamide as second line hormone therapy for prostate cancer after androgen ablation fails. *J. Urol.*, **2003**, *169*, 1742-1744.
261. Lukka, H.; Waldron, T.; Klotz, L.; Winkquist, E.; Trachtenberg, J. Maximal androgen blockade for the treatment of metastatic prostate cancer - A systematic review. *Curr. Oncol.*, **2006**, *13*, 81-93.
262. Kondo, K.; Nishi, J.; Ishibashi, M.; Kobayashi, J. i. Two new tryptophan-derived alkaloids from the okinawan marine sponge *Aplysina Sp.* *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1008-1011.
263. Segraves, N. L.; Crews, P. Investigation of brominated tryptophan alkaloids from two Thorectidae sponges: Thorectandra and Smenospongia. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 1484-1488.
-

264. Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Leet, J. E.; Gupta, R.; Schaufelberger, D. E.; Bates, R. B.; Clewlow, P. J.; Doubek, D. L.; Manfredi, K. P.; Rützler, K.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P.; Ward, F. B.; Bruck, M.; Camou, F. Antineoplastic agents. 168. Isolation and structure of axinohydantoin. *Can. J. Chem.*, **1990**, *68*, 1621-1624.
265. Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Killmer, L.; Hofmann, G.; Johnson, R. K. Z-axinohydantoin and debromo-Z-axinohydantoin from the sponge *Stylotella aurantium*: inhibitors of protein kinase C. *Nat. Pro. Lett.*, **1997**, *9*, 201-207.
266. Crews, P.; Clark, D. P.; Tenney, K. Variation in the alkaloids among indo-pacific *Leucetta* sponges. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *66*, 177-182.
267. Carmelya, S.; Ilanb, M.; Kashmana, Y. 2-amino imidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta chagosensis*. *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 2193-2200.
268. Renard, A.; Lhomme, J.; Kotera, M. Synthesis and properties of spiro nucleosides containing the barbituric acid moiety. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 1302-1307.
269. Walter, M. W. Structure-based design of agrochemicals. *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, *19*, 278-291.
270. Burton, S. G.; Dorrington, R. A. Hydantoin-hydrolysing enzymes for the enantioselective production of amino acids: new insights and applications. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 2737-2741.
271. Meusel, M.; Gütschow, M. Recent developments in hydantoin chemistry. A review. *Org. Prep. Proced. Int.*, **2004**, *36*, 391-443.
272. López, C. A.; Trigo, G. G.; Alan R. Katritzky, F. R. S. The chemistry of hydantoins. In *Adv. Heterocycl. Chem.*; Academic Press: **1985**; Cap. Volume 38, pp. 177-228.
273. Uhrich, K.; Olson, E.; Worman, J. Aqueous, room temperature synthesis of a 3(N) substituted hydantoin. *Synth. Commun.*, **1986**, *16*, 1387-1392.
274. O'Brien, R. A.; Worman, J. J.; Olson, E. S. Carbon dioxide in organic synthesis: preparation and mechanism of formation of N-(3)-substituted hydantoins. *Synth. Commun.*, **1992**, *22*, 823-828.
275. Montagne, C.; Shipman, M. Modified Bucherer-Bergs reaction for the one-pot synthesis of 5,5'-disubstituted hydantoins from nitriles and organometallic reagents. *Synlett*, **2006**, *2006*, 2203-2206.
276. Sarges, R.; Howard, H. R.; Kelbaugh, P. R. Synthesis of optically active spirohydantoins by asymmetric induction. Hydantoin formation from amino nitriles and chlorosulfonyl isocyanates. *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 4081-4085.
277. Parcher, B. W.; Erion, D. M.; Dang, Q. An efficient synthesis of 5-aminoimidazol-2-ones via cyclization reactions of 2-aminoacetonitriles and isocyanates. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 2677-2679.
278. Rowbottom, M. W.; Vickers, T. D.; Tamiya, J.; Zhang, M.; Dyck, B.; Grey, J.; Schwarz, D.; Heise, C. E.; Hedrick, M.; Wen, J.; Tang, H.; Wang, H.; Fisher, A.; Aparicio, A.; Saunders, J.;

- Goodfellow, V. S. Synthesis and structure-activity relationships of spirohydantoin-derived small-molecule antagonists of the melanin-concentrating hormone receptor-1 (MCH-R1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 2171-2178.
279. Kurz, T.; Geffken, D.; Widyan, K. Synthesis and reactivity of 3-alkoxy-4-imino-imidazolidin-2-ones: a novel class of 4-iminohydantoins. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2409-2416.
280. Zhang, D.; Xing, X.; Cuny, G. D. Synthesis of hydantoins from enantiomerically pure  $\alpha$ -amino amides without epimerization. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 1750-1753.
281. Evindar, G.; Batey, R. A. Peptide heterocycle conjugates: a diverted Edman degradation protocol for the synthesis of N-terminal 2-iminohydantoins. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 1201-1204.
282. Gunawan, S.; Nichol, G. S.; Chappeta, S.; Dietrich, J.; Hulme, C. Concise preparation of novel tricyclic chemotypes: fused hydantoin-benzodiazepines. *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 4689-4692.
283. Ignacio, J. M.; Macho, S.; Marcaccini, S.; Pepino, R.; Torroba, T. A facile synthesis of 1,3,5-trisubstituted hydantoins via Ugi four-component condensation. *Synlett*, **2005**, *2005*, 3051,3054.
284. Olimpieri, F.; Bellucci, M. C.; Volonterio, A.; Zanda, M. A mild, efficient approach for the synthesis of 1,5-disubstituted hydantoins. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, *2009*, 6179-6188.
285. Blanco-Ania, D.; Hermkens, P. H. H.; Slidregt, L. A. J. M.; Scheeren, H. W.; Rutjes, F. P. J. T. Synthesis of hydantoins and thiohydantoins spiro-fused to pyrrolidines: Druglike molecules based on the 2-arylethyl amine scaffold. *J. Com. Chem.*, **2009**, *11*, 527-538.
286. Gerona-Navarro, G.; González-Muñiz, R.; Fernández-Carvajal, A.; González-Ros, J. M.; Ferrer-Montiel, A.; Carreño, C.; Albericio, F.; Royo, M. Solid-phase synthesis of a library of amphipatic hydantoins. Discovery of new hits for TRPV1 blockade. *ACS Combinatorial Science*, **2011**, *13*, 458-465.
287. Bartolomé-Nebreda, J. M.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Latorre, M.; Del Río, J.; Herranz, R. 5-(Tryptophyl)amino-1,3-dioxoperhydropyrido[1,2-c]pyrimidine-based potent and selective CCK1 receptor antagonists: Structure-activity relationship studies on the central 1,3-dioxoperhydropyrido[1,2-c]pyrimidine scaffold. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 4196-4206.
288. Hashmi, I. A.; Aslam, A.; Ali, S. K.; Ahmed, V.-u.; Ali, F. I. Synthesis of hydantoins, thiohydantoins, and glycocyamidines under solvent-free conditions. *Synth. Commun.*, **2010**, *40*, 2869-2874.
289. Lamiri, M.; Bougrin, K.; Daou, B.; Soufiaoui, M.; Nicolas, E.; Giralt, E. Microwave-assisted solvent-free regiospecific synthesis of 5-alkylidene and 5-arylidenehydantoins. *Synth. Commun.*, **2006**, *36*, 1575-1584.

290. Brouillette, Y.; Lisowski, V.; Guillon, J.; Massip, S. p.; Martinez, J. Efficient one-pot microwave-assisted synthesis of 3-(thien-3-yl)imidazolidine-2,4-dione analogs. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 7538-7544.
291. Vongvilai, P.; Linder, M.; Sakulsombat, M.; Svedendahl Humble, M.; Berglund, P.; Brinck, T.; Ramström, O. Racemase activity of *B. cepacia* lipase leads to dual-function asymmetric dynamic kinetic resolution of  $\alpha$ -aminonitriles. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, *50*, 6592-6595.
292. Vongvilai, P.; Ramström, O. Dynamic asymmetric multicomponent resolution: Lipase-mediated amidation of a double dynamic covalent system. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14419-14425.
293. Anastas, P. T. Introduction: Green Chemistry. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 2167-2168.
294. Linthorst, J. An overview: origins and development of green chemistry. *Foundations of Chemistry*, *12*, 55-68.
295. Green Chemistry. <http://www.epa.gov/greenchemistry/> (September 2, 2011).
296. Pietro Tundo; Paul Anastas; David StC. Black; Joseph Breen; Terrence Collins; Sofia Memoli; Junshi Miyamoto; Polyakoff, M.; Tumas, W. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. *Pure Appl. Chem.*, **2000**, *72*, 1207-1228.
297. Tanaka, K.; Toda, F. Solvent-Free Organic Synthesis. *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 1025-1074.
298. Angelova, V. T.; Vassilev, N. G.; Chauvin, A.-S.; Koedjikov, A. H.; Ivanov, P. M.; Pojarlieff, I. G. Autoxidation of a 4-iminoimidazolidin-2-one with a tertiary 5-hydrogen to its 5-hydroxy derivative. *Arkivoc*, **2008**, (xi), 11-23.
299. Tsakladidis, C.; Bosies, E.; Schultz, M.; Haag, R.; Herrmann, D.; Pahlke, W. Preparation of 4-imino-5-alkylideneimidazolidin-2-ones as immunosuppressants. DE 3841879, 1990.
300. Zaki, M. E. A.; Proença, M. F. Synthesis of 6-cyano and 6-unsubstituted 2-aryl-8-oxopurine from a common 2-oxoimidazole precursor. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 755-762.
301. Rydberg, P.; Luning, B.; Wachtmeister, C. A.; Eriksson, L.; Törnqvist, M. Applicability of a modified Edman procedure for measurement of protein adducts: Mechanisms of formation and degradation of phenylthiohydantoins. *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**, *15*, 570-581.
302. Chung, J. Y. L.; Tufano, M. D.; May, P. D.; Shiosaki, K.; Nadzan, A. M.; Garvey, D. S.; Shue, Y. K.; Brodie, M. S.; Holladay, M. W. Preparation of tetrapeptide type-B CCK receptor ligands. EP405506A1, 1991.
303. Boyd, M. R.; Paull, K. D. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.*, **1995**, *34*, 91-109.