

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**Síntesis y estudio de nuevos agentes antiprotozoarios derivados de
compuestos dicatiónicos para el tratamiento de la tripanosomiasis
africana humana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Hernán Ríos Martínez

Director

Christophe Dardonville

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I

TESIS DOCTORAL

**Síntesis y estudio de nuevos agentes antiprotozoarios
derivados de compuestos dicatiónicos para el
tratamiento de la tripanosomiasis africana humana**

Carlos Hernán Ríos Martínez



Director: Dr. Christophe Dardonville
Instituto de Química Médica

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas

Marie Curie

Dedicada a mi Madre Maya, por todo el sacrificio que ha hecho por mí durante toda su vida, a mi padre Nollo por todo su apoyo, a mi hermana Yoly por que estar siempre conmigo y a mi sobrina Ashley por ser tan linda

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Dr. Christophe Dardonville, a quien por su paciencia y optimismo le estoy muy agradecido.

Esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de la beca para Investigadores (BIDP-2008-030) de la Secretaría Nacional de Ciencias y Tecnología (SENACYT) en conjunto con el Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU) de la República de Panamá.

También me gustaría agradecer al Dr. Harry de Koning del Instituto de Infección, Inmunidad e Inflamación de la Universidad de Glasgow, por recibirme en su laboratorio y permitirme aprender sobre los ensayos biológicos y a miembros de su grupo de investigación: Ibrahim Teka, Abdusalan Alkhaldi y Antoius Eze.

A las Prof. Pilar Goya y María Jesús Pérez Pérez, directoras del IQM, por la ayuda mostrada en todo momento y al resto del personal de la gerencia y administración del Instituto.

Agradecer también a la Dra. Silvia Ortega de la Universidad Complutense de Madrid por la tutela durante la realización de esta tesis.

Al personal del laboratorio de instrumental del IQM: por su ayuda y la paciencia que han mostrado conmigo a lo largo de estos años; también, a Javier Renau por su colaboración incondicional en mis numerosas dudas informáticas.

Al personal especializado del Centro de Química Orgánica Lora Tamayo, a los servicios de espectrometría de masas, microanálisis y especialmente al servicio de RMN: a la Dra M^a Luisa Jimeno, a Araceli, Maite, Sergio, Elisa y Pablo, por su servicio impecable y su buen hacer.

A la Dra. Nadine Jagerovic, por el apoyo brindado para la realización de esta tesis. Al Dr. Vicente Arán por haberme recibido en su laboratorio durante los primeros años de esta tesis.

A la Dra. Laura Lagartera y Silvia Soto Álvarez por la realización de los experimentos SPR y al Dr. Tomás Herraiz por los experimentos de metabolismo.

A nuestros colaboradores, la Dra. Florence Miller de la Universidad de Paris Descartes por la realización de los ensayos de traspaso de Barrera Hematoencefálica y al Prof. R. Brun y M. Kaiser del Instituto Tropical Suizo en Basilea por la realización de los ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

A mis antiguos compañeros del master: Zulay, Arturo, Esther y David, también quisiera agradecer a mis compañeros doctorandos y estudiantes de máster del IQM y IQOG; Sandra, María, Fran, Nieves, Bea, Pili, Gloria, Eva, Irene, Ana, Mario, Martín, Diego, Nerea, Oskía, Ana Gamó y Ana García, Marta, Lole, a mis compañeros doctores del IQM; Paco, Andrés, Aida, Felipe, Roberto, Laura, Mariana, Plácido, María Ángeles, Nono, José, Susana y a los antiguos compañeros del IQM; Pili, Ángel, Pedro, Valle, Mirian, Natalia, Mirian, Diego, Mónica, Carmen, Silvan, por su puesto a mi compañero de labo, Paco, que siempre tiene alguna idea a probar. A mis antiguos compañero de labo, Eddysson, Alan y Sandra. A Albita por estar siempre alegre conmigo. Mi estancia en España ha sido grata debido a todos ustedes.

Y finalmente un muy especial agradecimiento;

- ❖ A Ana, nunca olvidaré las vacaciones en Almería, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Alejandra por aceptar a este panameño como tu amigo, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Guadalupe por soportar mi charla sobre “espiderman”, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Andrea, porque cuando lo necesité estuviste allí, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Silvia, por escucharme cuando más lo necesité, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Javier, por ser un buen amigo, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Vanessa, porque siempre me diste mucho ánimo, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Sergio, porque a pesar de todo, fuimos buenos amigos, ¡*muchas gracias!*
- ❖ A Paula, porque sin tu apoyo, esta estancia en España hubiese sido muy difícil, *gracias amiga*, y a Diego por supuesto, porque sé que también tuve su apoyo.

- ❖ *“Mucha gente entra y sale de tu vida a lo largo de los años. Pero solo los verdaderos amigos dejan huellas en tu corazón”.*

A todos gracias, “*porque es mi última Navidad*”

INDICE

Agradecimientos	i
Índice General	iii
Abreviaturas	ix
Resumen	xiii
Abstract	xvi
1. Introducción	
1.1 Enfermedad tropicales desatendidas	3
1.2 Enfermedad del sueño	4
1.2.1 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i> .	5
1.2.2 Manifestación clínica de la enfermedad del sueño.	7
1.2.3 Tratamientos quimioterápico actual de la TAH.	8
1.2.3.1 Fase hemolinfática	8
1.2.3.2 Fase encefálica	9
1.2.4 Nuevos candidatos a fármacos investigados para el tratamiento de la TAH.	10
1.3 Referencias bibliográficas	12
2. Antecedentes y Objetivos	
2.1 Antecedentes	17
2.1.1 Descubrimiento de moléculas dicatiónicas con actividad tripanocida.	17
2.1.2 Barrera hematoencefálica y fase tardía de la enfermedad del sueño.	18
2.1.3 Estrategias profármacos para mejorar la biodisponibilidad de amidinas y guanidinas.	19
2.1.4 Estrategia para mejorar la permeabilidad en BHE de derivados 2-iminoimidazolidínicos y guanidínicos.	21
2.1.5 Unión a ADN y mecanismos de acción de los compuestos bisguanidinos y bis(2-iminoimidazolidinios).	22
2.2 Objetivos	23
2.3 Referencias bibliográficas	25
3. Síntesis y estudios de actividad tripanocida de derivados N-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos (33a, 33b, 34b-d, 35a, 36a, y 36f).	
3.1 Antecedentes sobre la síntesis de N-alcoxi-2-iminoimidazolidinas.	30
3.2 Síntesis "one pot" de las bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas) (33a, 33b, 34b-d, 35a, 36a, y 38f)	32
3.2.1 Síntesis de las N-alcoxi-N-(aminoetil)-2-nitrobencensulfonamidas (19c - 22c).	32

3.2.2 Síntesis de los isotiocianatos (29 – 32).	36
3.2.3 Síntesis de las (1-alcoxiimidazolidin-2-iliden)aminas (33a-b, 34b-d, 35a 36a).	37
3.3 Preparación de las bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas) 33c, 33e, 34a, 34e, 34c, 34e, 38a,b, 35c, 35e, 36b, 36c, y 36e	39
3.4 Determinación por RMN de ¹³ C de la forma tautomérica predominante en los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos).	41
3.5 Ensayos biológicos	44
3.5.1 Ensayos <i>in vitro</i> con cepas silvestres y resistentes de <i>T. brucei</i> de las bis(<i>N</i> -alcoxi-2-iminoimidazolidinas)	44
3.5.1.1 Actividad <i>in vitro</i> contra <i>T. b. rhodesiense</i>	44
3.5.1.2 Actividad <i>in vitro</i> sobre cepas resistentes de <i>T. brucei</i>	46
3.5.2 Ensayos <i>in vivo</i> en modelos murino de enfermedad del sueño	47
3.5.2.1 Actividad <i>in vivo</i> en la fase temprana (fase hemolinfática) de la TAH	47
3.5.2.2 Actividad <i>in vivo</i> en la fase tardía (fase neurológica) de la TAH	50
3.5.3 Actividad <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i> , <i>L. donovani</i> y <i>P. falciparum</i>	52
3.6 Determinación del pK _a y del porcentaje de ionización a pH fisiológico de los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos)	53
3.7 Estudios de permeabilidad en la BHE, unión a proteínas plasmáticas y metabolismo hepático del derivado <i>N</i> -hidroxilado 33e	55
3.7.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los compuestos para cruzar la barrera hematoencefálica	55
3.7.2 Ensayo <i>in vitro</i> de metabolismo hepático del derivado <i>N</i> -hidroxilado 33e	59
3.8 Discusión de los resultados	60
3.9 Conclusiones	63
3.10 Referencias bibliográficas	64
4. Síntesis y estudios de actividad tripanocida de derivados <i>N</i>-alcoxidos y <i>N</i>-alquilguanidinas.	
4.1 Antecedentes sobre la síntesis de <i>N</i> -alcoxi y <i>N</i> -alquilguanidinas	72
4.2 Síntesis de las <i>N</i> -alquil y <i>N</i> -alcoxi guanidinas (57 – 66)	73
4.2.1 Síntesis de las bis-etoxicarbonilguanidinas (45 – 46).	74
4.2.2 Síntesis de las 2-alcoxi-3-etoxicarbonilguanidinas y 2-alquil-3-etoxicarbonilguanidinas (47 – 56).	74

4.2.3 Optimización de las condiciones de desprotección del grupo etoxicarbonilo para generar las <i>N</i> -alquil y <i>N</i> -alcoxi guanidinas (57 – 66) y sus hidroclozuros	75
4.3 Ensayos biológicos	80
4.3.1 Actividad <i>in vitro</i> de las bis-guanidinas contra <i>T. b. rhodesiense</i> y <i>P. falciparum</i>	80
4.3.2 Actividad <i>in vivo</i> en la fase temprana (fase hemolinfática) de la TAH de las <i>N</i> -alquil y <i>N</i> -alcoxiguanidinas	81
4.4 Discusión de los resultados y conclusiones	82
4.5 Referencias bibliográficas	83
5. Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorado del compuesto cabeza de serie 2.	
5.1 Antecedentes	88
5.1.1 Síntesis de las 4-nitro- <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzamidas (70 – 72 , 76 – 77)	89
5.1.2 Síntesis de las <i>N</i> -(4-aminofenil)-4-aminobenzamidas (78 – 82)	90
5.1.3 Síntesis de las 4-(imidazolidin-2-ilidene)amino- <i>N</i> -(4-(imidazolidin-2-ilideneamino)fenil)benzamidas (83 – 87) protegidas con grupos <i>terc</i> -butoxicarbonilo (Boc)	92
5.1.4 Eliminación de los grupos protectores Boc para obtener los derivados fluorados (83a – 86a) y clorado (87a) de la fenilbenzamida 2 .	92
5.2 Ensayos biológicos	94
5.2.1 Actividad <i>in vitro</i> de los derivados 83a - 86a contra <i>T. b. brucei</i>	94
5.3 Medición del p <i>K</i> _a de las moléculas 83a – 87a y discusión de los resultados	94
5.4 Conclusiones	96
5.5 Referencias bibliográficas	96
6. Determinación de la constante de ionización (p<i>K</i>_a) por Espectroscopia de UV utilizando placas de 96 pocillos.	
6.1 Introducción	100
6.2 Medición del p <i>K</i> _a mediante espectroscopia UV en placas de 96 pocillos	102
6.2.1 Metodología del ensayo	102
6.2.2 Procedimiento general para el análisis de los espectros UV	103
6.2.3 Validación de la técnica con compuestos de p <i>K</i> _a conocido	106

6.3	Determinación del pK_a de los compuestos bis(2-iminoimidazolídnicos)	111
6.3.1	Resultados y discusión	111
6.4	Conclusiones	114
6.6	Referencias bibliográficas	116
7.	<i>Estudios biofísicos por Resonancia de Superficie de Plasmón (SPR).</i>	
7.1	Estudios de unión a ADN.	119
7.1.1	Introducción sobre la técnica de SPR.	120
7.1.2	Resultados de unión de los compuestos a 3 oligonucleótidos "hairpin" de secuencia AATT, (AT) ₄ y (CG) ₄	121
7.2	Estudios de unión a proteínas plasmáticas	127
7.3	Conclusión	128
7.4	Referencias bibliográficas	129
8.	<i>Parte Experimental</i>	
8.1	Síntesis de la diaminas 27 y 28	134
8.2	Procedimiento general para la síntesis de los isotiocianatos 29 – 32	134
8.3	Procedimiento general para síntesis de las <i>N</i> -(2-aminoetil)- <i>N</i> -alcoxibenzensulfonamidas 19c – 21c , 24c	136
8.4	Procedimiento general para la síntesis "one-pot" de las 1-alcoxi-2-arilaminoimidazolinas 33a-b , 34b-d , 35a , 36a	136
8.5	Procedimiento general para la síntesis de 1-(2-(alcoxi-amino)etil)-3-ariltioureas 37 - 43	140
8.6	Procedimiento general para la síntesis de las 1-alcoxi-2-arilaminoimidazolinas 33c , 34a , 34c , 35b , 35c , y 36c a partir de sus correspondientes tioureas	145
8.7	Procedimiento general para la desprotección del grupo OTHP	149
8.8	Caracterización de las tiadiazepinas	151
8.9	Procedimiento general para la síntesis de las bis-etoxycarboniltioureas (45 - 46)	151
8.10	Procedimiento general para la síntesis de las <i>N</i> -alquiloxi y <i>N</i> -alquilguanidinas 47 – 56	152

8.11 Procedimiento general para la obtención de las <i>N</i> -alquiloxi y <i>N</i> -alquil guanidinas finales 57 - 66 en forma de base libre	158
8.12 Procedimiento general para la formación de las sales hidrocioradas de guanidinio	158
8.13 Procedimiento general para la formación de las benzamidas halogenadas 70 - 72	164
8.14 Procedimiento general para la síntesis asistida por microondas de las benzamidas halogenadas 76 y 77	164
8.15 Procedimiento general para la reducción de las nitrobenzamidas (70 - 72, 76 -77).	167
8.15.1 Hidrogenación catalítica con Pd-C	167
8.15.2 Reducción con cloruro de estaño (II)	167
8.16 Procedimiento general para la síntesis de los derivados fluorados y clorados de 4-((imidazolidin-2-iliden)amino- <i>N</i> -((4-(imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamidas protegidas con el grupo <i>terc</i> -butoxicarbonil (Boc) 83- 87 .	169
8.17 Procedimiento general para la formación de la sales de 2-aminoimidazolinio 83a - 87a	172
8.18 Procedimiento General para la medida de pK_a mediante espectroscopia de Ultravioleta (UV) en placas de 96 pocillos	174
8.18.1 Procedimiento general para la preparación de las disoluciones tampón utilizadas para la medida de pK_a	174
8.18.1.1 Preparación de disoluciones tampón AcOH/AcONa (pH 3.0 - 5.0).	174
8.18.1.2 Preparación de disoluciones tampón KH_2PO_4/K_2HPO_4 para pH 5.8 hasta 8.0	175
8.18.1.3 Preparación de disoluciones tampón $Na_2B_4O_7/H_3BO_3$ para pH 8.0 hasta 10.8	175
8.18.1.4 Preparación de disoluciones tampón Na_2HPO_4/Na_3PO_4 para pH 10.9 hasta 12.0	175
8.18.2 Procedimiento general para la preparación de la placa de 96 pocillos para las medidas de los espectros de UV	178
8.18.3 Análisis de los datos para calcular el pK_a	179
8.18.4 Espectros y determinación de pK_a para los compuestos bis(2-iminoimidazolidinicos).	180
8.19 Ensayos Biológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	189
8.19.1 Actividad antiparasitaria	189
8.19.1.1 Actividad <i>in vitro</i> contra <i>T. b. rhodesiense</i>	189
8.19.1.2 Actividad <i>in vitro</i> contra <i>T. b. brucei</i>	190
8.19.1.3 Actividad <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i> , <i>L. donovani</i> y <i>P. falciparum</i>	190
8.19.2 Actividad tripanocida <i>in vivo</i>	191

8.19.2.1	Modelo murino STIB900 de enfermedad del sueño aguda	191
8.19.2.2	Modelo murino GVR35de enfermedad del sueño crónica	191
8.20	Ensayo de Permeabilidad con células endoteliales microvasculares de cerebro humano (hCMEC/D3)	192
8.20.1	Análisis de los resultados por HPLC	193
8.21	Ensayo <i>in vitro</i> de metabolismo hepático del derivado <i>N</i> -hidroxilado 33e	193
8.21.1	Procedimiento general para el ensayo de reducción de <i>N</i> -hidroxilaminas	194
8.21.2	Procedimiento general para el análisis por HPLC	194
8.21.3	Procedimiento general para el análisis de la incubación enzimática por HPLC-MS	195
8.22	Estudios biofísicos por SPR	195
8.22.1	Estudios de unión a albumina de suero humano (HSA)	195
8.22.1.1	Inmovilización de la HSA	195
8.22.1.2	Experimento de unión a HSA	195
8.22.2	Estudios de unión a ADN	196
8.22.2.1	Inmovilización de los oligonucleótidos	196
8.22.2.2	Experimentos de unión con los compuestos sintetizados en esta tesis	197
8.23	Referencias bibliográficas	198
9.	<i>Conclusiones generales</i>	202

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADME	Administración, distribución, metabolismo y excreción
ADN	Ácido desoxiribonucleico
APTS	Ácido p-toluenosulfónico
AT	adenina-timina
Bn	Bencilo
BHE	Barrera hematoencefálica
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
C	concentración
CI ₅₀	Concentración molar necesaria para producir 50% de inhibición
CCF	Cromatografía de capa fina
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMSO	dimetilsulfóxido
EDAC	1-Etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminotileter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
ETD	Enfermedades tropicales desatendidas
Et ₃ N	Trietilamina
Et	Etilo
EtOH	Etanol
ES ⁺	Electrospray positivo
ES ⁻	Electrospray negativo
Gp	Grupo protector
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSA	Albúmina de suero humano
I	Fuerza iónica
ip	intraperitoneal
IS	Índice de selectividad
K _A	Constante de asociación
K _D	Constante de disociación
L	Ligando
LY	Lucifer yellow
mARC	Complejo mitocondrial de reducción de amidoximas
Me	metilo
MeCN	Acetonitrilo
MGB	Ligando del surco estrecho (Minor Groove binder)
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolin)etanosulfónico
MO	microondas
MS	Espectrometría de masas
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NECT	Terapia combinada nifurtimox-eflornitina
2-NsCl	Cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo
4-NsCl	Cloruro de 4-nitrobenzenosulfonilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTHP	Tetrahidropiraniloxi
PhSH	Tiofenol
Pht	Ftalimida
PM	Peso molecular

iPr	Isopropilo
PBS	Solución buffer de sales de fosfatos(Phosphate buffer solution)
SNC	Sistema Nervioso Central
SPR	Resonancia de Superficie de Plasmón
TAH	Tripanosomiasis africana humana
T _s	Tiempo medio de supervivencia libre de parásitos
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
THP	Tetrahidropirano
TWEEN 20	Polyoxietilen (20)

RESUMEN

Síntesis y estudio de nuevos agentes antiprotozoarios derivados de compuestos dicatiónicos para el tratamiento de la Tripanosomiasis africana humana

Resumen de la tesis

La tripanosomiasis africana humana (TAH, o enfermedad del sueño) es una enfermedad provocada por dos subespecies del parásito protozoario *Tripanosoma brucei* (*T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*) cuyo vector es la mosca tsetsé (género *Glossina*). La TAH, que se encuentra presente en 36 países del continente africano, puede manifestarse en una forma crónica (infección por la subespecie *T. b. gambiense*) o una forma aguda (subespecie *T. b. rhodesiense*). En la fase temprana, o estado hemolinfático, el parásito se desarrolla dentro del sistema circulatorio mientras que en el estado tardío, o encefálico, los parásitos han cruzado la barrera hematoencefálica (BHE) y se encuentran en el sistema nervioso central (SNC) resultando difícil su erradicación. Los cuatro fármacos actualmente registrados para tratar la TAH son tóxicos, poco eficaces y requieren una administración parenteral. Por tal motivo, la búsqueda de nuevos agentes tripanocidas se hace necesaria para combatir la TAH.

Objetivos: En esta tesis nos planteamos seguir optimizando la actividad tripanocida de los compuestos cabezas de serie de derivados bis(2-iminoimidazolidínio) (2 - 5) y bisguanidinio (7 - 8) para conseguir compuestos activos en la fase tardía (cerebral) de la TAH.

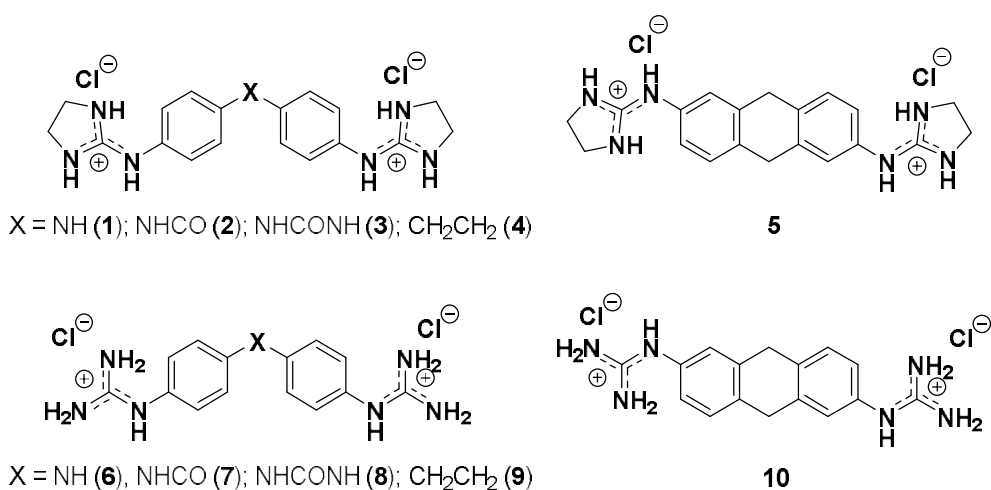


Figura 1: Compuestos cabeza de serie.

Nuestra hipótesis de partida fue que dichos compuestos no llegaban a pasar la BHE por difusión pasiva por estar cargados a pH fisiológico, es decir, demasiado polares. Para modular la polaridad de estos compuestos, se probaron dos aproximaciones basadas en:

1) La disminución de la basicidad de la molécula mediante la introducción de sustituyentes *N*-alcoxilo sobre los nitrógenos N1 de los anillos de imidazolina y de las guanidinas, o la introducción de átomos electronegativos (F, Cl) en los anillos aromáticos del espaciador.

2) La introducción de sustituyentes alquilo sobre los nitrógenos de las guanidinas para aumentar su lipofilia

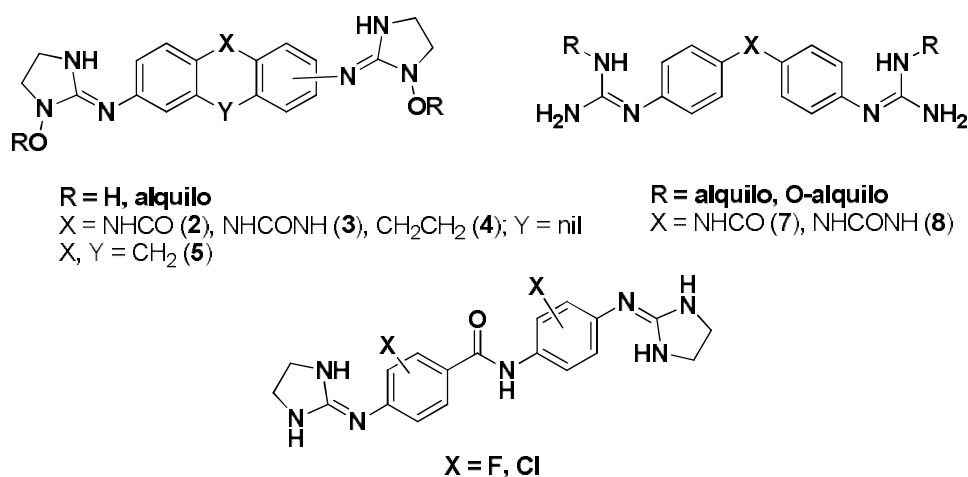


Figura 2: Series de derivados sintetizados para modular la basicidad y lipofilia de los compuestos cabeza de serie.

Resultados: Se sintetizaron 18 derivados *N*-hidroxilos y *N*-alcoxilados (OMe, OEt, OBn, OTHP, OH) de los compuestos cabezas de serie bis(2-aminoimidazolinio) 2 – 5 y 4 derivados de los compuestos cabezas de serie de derivados bisguanidinio 7 – 8. También fueron sintetizados 5 derivados halogenados del compuesto cabeza de serie 2 introduciendo un átomo de flúor o de cloro sobre los anillos aromáticos del esqueleto de fenilbenzamida presente en esta molécula. Además, fueron sintetizados seis *N*-alquil derivados (Me, Et, iPr) de los compuestos cabezas de serie 7 y 8.

Todos los compuestos se ensayaron *in vitro* e *in vivo* contra *T. b. rhodesiense*, encontrándose actividades en el rango submicromolar para el derivado imidazolínico *N*-hidroxilado 33e y nanomolar para los derivados de *N*-alquil (Et, iPr) guanidina 57a, 58a, 65a, y 66a. En los ensayos *in vivo* en modelos murinos de TAH, 33e fue el único compuesto que mostró actividad curativa en ambas fases de la enfermedad, siendo 100% curativo en la fase temprana a la dosis de 20 mg/Kg (ip) y moderadamente activo en la fase tardía a la dosis de 100 mg/Kg (ip). Por otra parte, los derivados de *N*-alquilguanidina 57a y 58a fueron 100% curativos en la fase temprana de la TAH a la dosis de 20 mg/Kg (ip).

Se puso a punto una novedosa metodología para medir el pK_a de serie de compuestos por espectroscopia UV mediante el uso de placas de 96 pocillos. Con ella se midieron los pK_a de todos los compuestos derivados bis(2-iminoimidazolidinas) sintetizados durante esta tesis. Se comprobó que la introducción de grupos alcoxilos sobre el nitrógeno N1 del anillo de imidazolina disminuía la basicidad de estas moléculas en 2 unidades de pK_a . Asimismo, la introducción de un átomo de fluor o cloro sobre uno de los anillos aromáticos del espaciador disminuye el pK_a de estos compuestos aunque de manera menos pronunciada.

Se llevaron a cabo ensayos complementarios con el compuesto más prometedor **33e** para determinar su permeabilidad a través de la BHE humana, su unión a proteínas plasmáticas y su posible metabolismo hepático.

Por último, se midió por SPR la afinidad por ADNs de secuencia "AT" de todos los derivados sintetizados porque estos compuestos podrían actuar como ligandos del surco estrecho del ADN. Los compuestos con esqueleto de fenilbenzamida, **33e** en particular, mostraron la mayor afinidad de unión por las secuencias AATT y (AT)₄. Esta afinidad demostró ser superior a la de su compuesto cabeza de serie **2**. Puesto que el genoma mitocondrial de *T. brucei* es muy rico en secuencias de bases A-T, existe la posibilidad de que **33e** esté actuando sobre *T. brucei* como ligando del surco estrecho del ADN.

Synthesis and study of new dicationic compound derivatives as antiprotozoal agents for the treatment of human African trypanosomiasis

Abstract

Human African trypanosomiasis (HAT or sleeping sickness) is a disease caused by two subspecies of the parasite *Trypanosoma brucei* (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*) that is transmitted to mammalian hosts by the bite of infected tsetse flies (genus *Glossina*). HAT is found in 36 countries of the African continent. Two forms of the disease exist: the chronic form (*T. b. gambiense* spp.) and the acute form (*T. b. rhodesiense* spp.). In the early stage (hemolymphatic stage), the parasite is found in the circulatory system while in the late stage (encephalitic stage), the parasite has crossed the blood-brain barrier (BBB) and is found in the central nervous system (CNS). In this case, the parasite is hard to eradicate. The four existing drugs to treat HAT are toxic, show little efficacy and require parenteral administration. Hence, the search for new antitrypanosomal agents to fight HAT is highly needed.

Aims: The objective of this doctoral thesis was to further optimize the activity of series of bis(2-iminoimidazolidine) (2 - 5) and bisguanidine lead compounds (7 - 8) to get compounds active in the late (cerebral) stage of HAT.

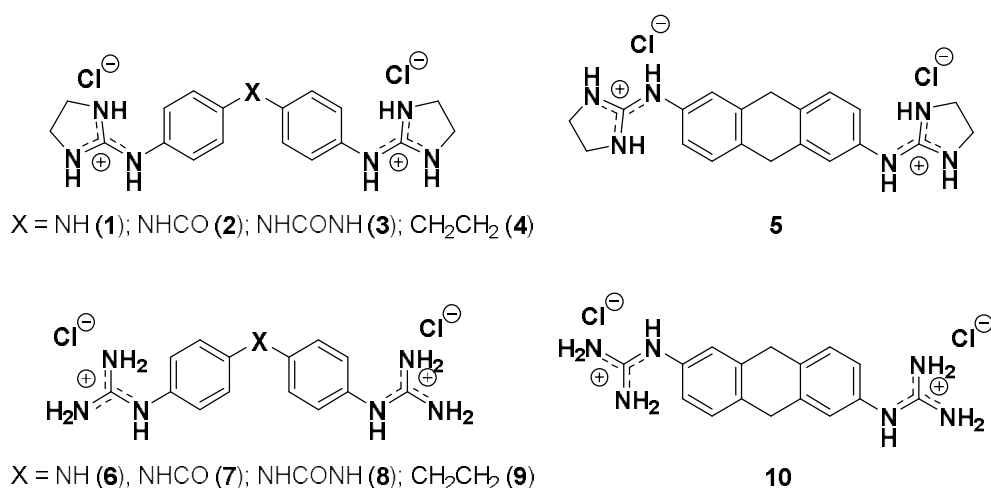


Figure 1: Lead compounds taken as starting point for this PhD project.

Our working hypothesis was that these compounds are not able to cross the BBB by passive diffusion because they are positively charged at physiological pH (ie, these compounds are very polar). We envisaged two different ways to modulate the polarity of these compounds by:

1) Decreasing the basicity of the molecules by introducing different *N*-alkoxy groups on the N1 nitrogen of the imidazoline ring, and on the guanidine group, or the introduction of electronegative atoms (F, Cl) on the aromatic rings of the diphenyl linker.

2) The introduction of different alkyl substituents over the nitrogen's of the guanidine's group to increase the lipophilicity in these molecules.

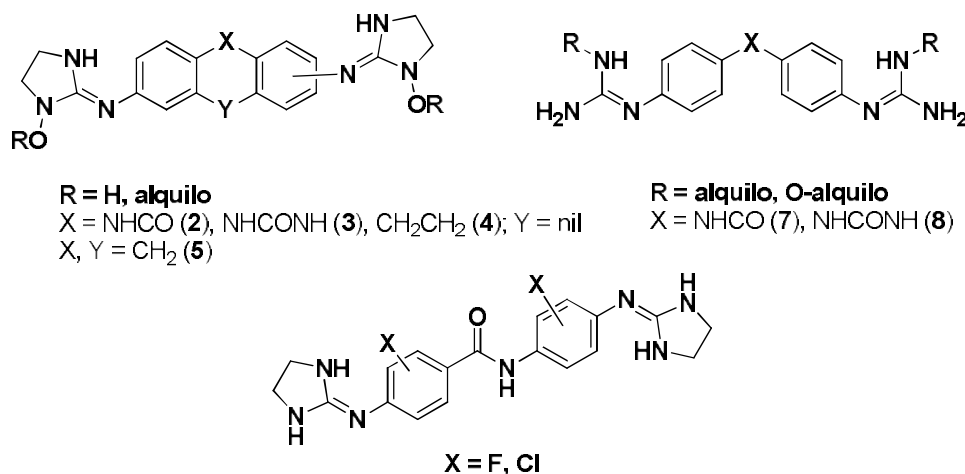


Figure 2: Series of derivatives synthesized to modulate the basicity and lipophilicity of the lead compounds.

Results: We synthesized 18 *N*-alkoxy (OMe, OEt, OBn, OTHP, OH) derivatives of the bis(2-iminoimidazolidine) leads 2 – 5 and 4 derivative of the bisguanidine lead compounds 7 – 8. In addition, we synthesized 5 halogenated derivatives of the lead compound 2 introducing fluorine atoms and chlorine atoms in the aromatic rings of the phenylbenzamide scaffold present in these molecules. Moreover, 6 *N*-alkylguanidine derivatives of the lead compounds 7 – 8 were prepared.

All the compounds were tested *in vitro* and *in vivo* against *T. b. rhodesiense*. We found activities in the submicromolar range for the *N*-hydroxylated imidazoline derivative 33e and nanomolar activities for the *N*-alkyl (Et, iPr) guanidines derivatives 57a, 58a, 65a and 66a. In the *in vivo* assays in murine models of HAT, 33e was the only curative compound of the series in the early stage with doses of 20 mg/Kg by ip administration. This compound presented moderate activity in the late stage disease at doses of 100 mg/Kg (ip). On the other hand, *N*-alkylguanidines derivatives 57a and 58a were curative in the early stage of HAT at doses of 20 mg/Kg ip.

We have developed a new methodology that enables for the rapid measurement of ionization constants (pK_a) of series of compounds by UV spectroscopy using 96 well microtiter plates. We were able to measure the pK_a of all the bis(2-iminoimidazoline)

compounds synthesized during this thesis. We checked that the introduction of an alkoxy group on the nitrogen *N*1 in the imidazoline ring decreased the basicity of the entire molecules by 2 pK_a units. Alike, the introduction of fluorine or chlorine atoms in one of the aromatic ring of the diphenyl scaffold decreased the pK_a of these compounds by 0-2 to 0-7 pK_a units.

Complementary assays were carried out with the best compound **33e** to determine its *in vitro* permeability in the human BBB, its binding to plasma proteins and its possible hepatic metabolism.

Finally, we measured by SPR the DNA affinity of all the derivatives to "AT" sequences as they could act as DNA minor groove binders. The compounds with a phenylbenzamide core, **33e** in particular, showed the higher affinity for the AATT and (AT₄) sequences. This affinity proved to be higher than that of the lead compound **2**. Since the mitochondrial genome of *T. brucei* is rich in A-T sequences, we conclude that **33e** may be acting over *T. brucei* as kDNA minor groove ligand.

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Introducción

1.1 Enfermedades Tropicales Desatendidas

Por definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) son un grupo de enfermedades que afectan principalmente a las regiones más pobres del mundo. Estas se localizan en la zona tropical del planeta y despiertan muy poco interés por parte de las empresas farmacéuticas, ya que muchas de estas enfermedades prácticamente no existen en las regiones más ricas del mundo. Hoy en día cerca de un billón de personas, es decir, una sexta parte de la población mundial, están afectadas por algunas de estas enfermedades, concentrándose la mayor parte en África y Latinoamérica¹. La OMS llama desatendidas a estas enfermedades por las siguientes razones: la primera son las consecuencias en la salud que producen sobre los millones de personas que hoy en día sufren alguna de estas enfermedades, consecuencias que pueden causar grandes defectos físicos y problemas sociales que conllevan un gran sufrimiento humano e incluso discriminación. La segunda razón es su geolocalización; afectan las áreas tropicales en las zonas más pobres del mundo, al no ser enfermedades contagiosas, no llaman la atención de los medios de comunicación. El hecho también de que no afecten a los países ricos no contribuye a una mayor divulgación sobre estas enfermedades; son causantes de gran cantidad de muertes al nivel mundial y debido a la falta de recursos de muchos de los países afectados la población posee poco acceso a la atención sanitaria. Muchas de estas enfermedades también están asociadas con la falta de higiene en la población, factor que a su vez está asociado con la falta de educación, algo muy común en las regiones más pobres del mundo¹. Actualmente están consideradas como ETD unas 17 enfermedades de las cuales muchas son muy poco conocidas. Se caracterizan por ser endémicas y no son capaces de expandirse fuera de las regiones tropicales (Figura 1.1). Dentro de estas enfermedades, las más conocidas son:

- la enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Dicha enfermedad afecta exclusivamente a la región tropical latinoamericana.
- la Leishmaniasis, causada por diferentes especies parásitas del género *Leishmania*.
- la enfermedad del sueño, también conocida como tripanosomiasis africana humana (TAH), causada por el parásito *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). Esta enfermedad es endémica del continente africano.

En esta tesis nos enfocaremos en la búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios, en especial contra la enfermedad del sueño.

Introducción

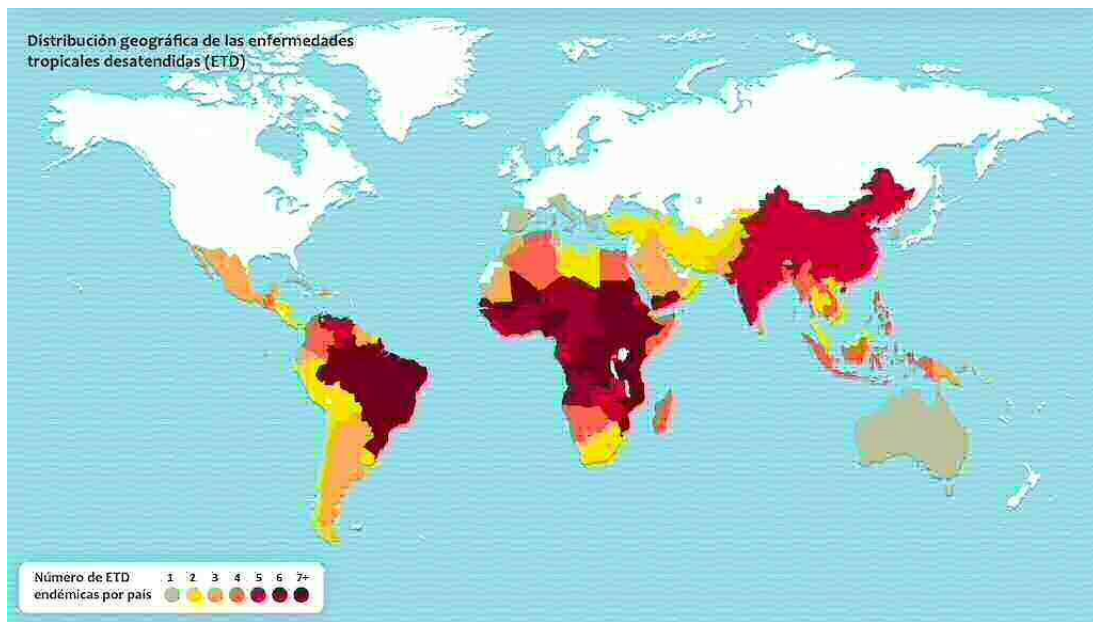


Figura 1.1: Distribución de las enfermedades tropicales desatendidas.

1.2 Enfermedad del sueño

La tripanosomiasis africana humana (TAH) es una enfermedad provocada por el parásito protozoario *Trypanosoma brucei* (*T. b.*), específicamente por dos subespecies de este género; *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*. Otra especie y subespecies de tripanosoma (Ej. *T. congolensis*, *T. b. brucei*) son patógenas para los animales y causan la tripanosomiasis en especies silvestres y en el ganado (Ej. se conoce como *nagana* en África)^{2,3}. La región de infección por estos parásitos está restringida a la zona en donde vive la mosca tsetse (mosca del género *Glossina*), la cual es el vector responsable de la transmisión de estos parásitos a los seres humanos y animales. Los animales pueden hospedar los parásitos *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* por lo que representan un reservorio importante de dichos parásitos humanos.

Actualmente, la TAH se encuentra presente en 36 países del continente Africano. Por un lado, la subespecie *T. b. gambiense* que está presente en la parte Oeste y Central de África representa más del 95% de los casos informados y da lugar a una forma crónica de la enfermedad. Por otro lado, la subespecie *T. b. rhodesiense* está presente en el Este y el Sur de este continente y provoca una forma aguda de la enfermedad (**Figura 1.2**). Según datos de la OMS para el año 2005, se estimó unos 17.000 nuevos casos que sumados a los reportados en años anteriores sumaban entre 50.000 a 70.000 personas infectadas, aunque para el año 2009, el número de nuevos casos detectados disminuyó a menos de 10,000, siendo el número de casos reales estimado en 30.000².

Introducción

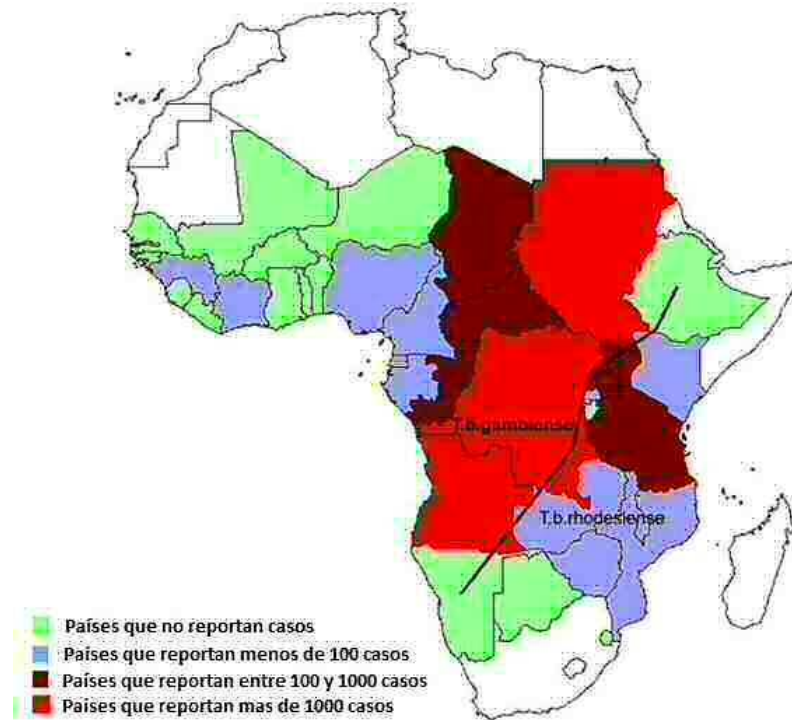


Figura 1.2: Distribución de casos de la TAH⁴.

Es importante mencionar que el continente africano ha sufrido tres epidemias severas de la enfermedad del sueño en el siglo XX. La primera que se reporta se remonta al año 1896 finalizando esta epidemia en 1906, afectando principalmente a Uganda y Congo⁵. Según datos reportados se estima que entre 300.000 y 500.000 personas murieron durante esta epidemia⁶. Una segunda epidemia sucedió en 1920 afectando a varios países más y terminando para finales de la década de los años 40^{2,5}. Finalmente una tercera epidemia se dio para mitad de la década de los años 60 cuando muchos países africanos declararon su independencia y entraron en una inestabilidad política que resultó en la ruina económica de estos países y por lo tanto, los programas para combatir la enfermedad de sueño fueron abandonados⁵. Esta fue la más reciente de las epidemias que afectó a países como Angola, Congo, Sudán del Sur y partes de Uganda^{5,7}.

1.2.1 Ciclo de vida de *T. brucei*

El ciclo de vida de *T. brucei* consta de dos etapas; una primera dentro de la mosca tsetse y una segunda dentro del huésped mamífero (humanos o animales). El ciclo inicia cuando la mosca tsetse es infectada al alimentarse de sangre de animales o humanos que ya son reservorios del parásito. Después de 21 días de haberse infectado, esta mosca se convierte en vector de *T. brucei*.

Introducción

El ciclo de vida del parásito dentro de la mosca sigue las siguientes etapas (**Figura 1.3**): Cuando la mosca produce una herida y, a través de su saliva infectada traspasa los tripomastigotes metacíclicos de *T. brucei* al mamífero, se desarrolla una lesión en el lugar de la picadura después de 5 a 15 días.

- 1- Los parásitos sufren otra transformación a su forma tripanomastigote sanguínea y se multiplican en el sistema hemolinfático.
- 2- Es justo en esta etapa del ciclo cuando diagnosticarse la infección por *T. brucei*.⁸ Este se multiplica por fusión binaria. Dentro del sistema circulatorio, el parásito es llevado a diferentes sitios con fluidos corporales además de la sangre tales como el fluido linfático y espinal y después determinado tiempo cruza la barrera hematoencefálica (BHE) alojándose así en el cerebro, donde causa daños en el sistema nerviosos central (SNC) ocasionando los síntomas clásicos de la enfermedad del sueño.
- 3- En este punto, el parásito se encuentra en el sistema circulatorio del infectado.
- 4- De este manera, la moscas tsetse se alimentarse de la sangre infectada con tripanosomas.
- 5- El parásito se aloja en el intestino de la mosca en donde sufre cambios tanto morfológicos como bioquímicos, teniendo un aspecto delgado y alargado; esta forma es conocida como tripomastigote procíclico.
- 6- Aquí sufre otro cambio morfológico a su forma epimastigoste, y se multiplica.
- 7- Sufre otra transformación a la forma tripomastigote metacíclica, la cual es ya infecciosa para seres humanos y animales, completándose así la primera etapa del ciclo.

Introducción

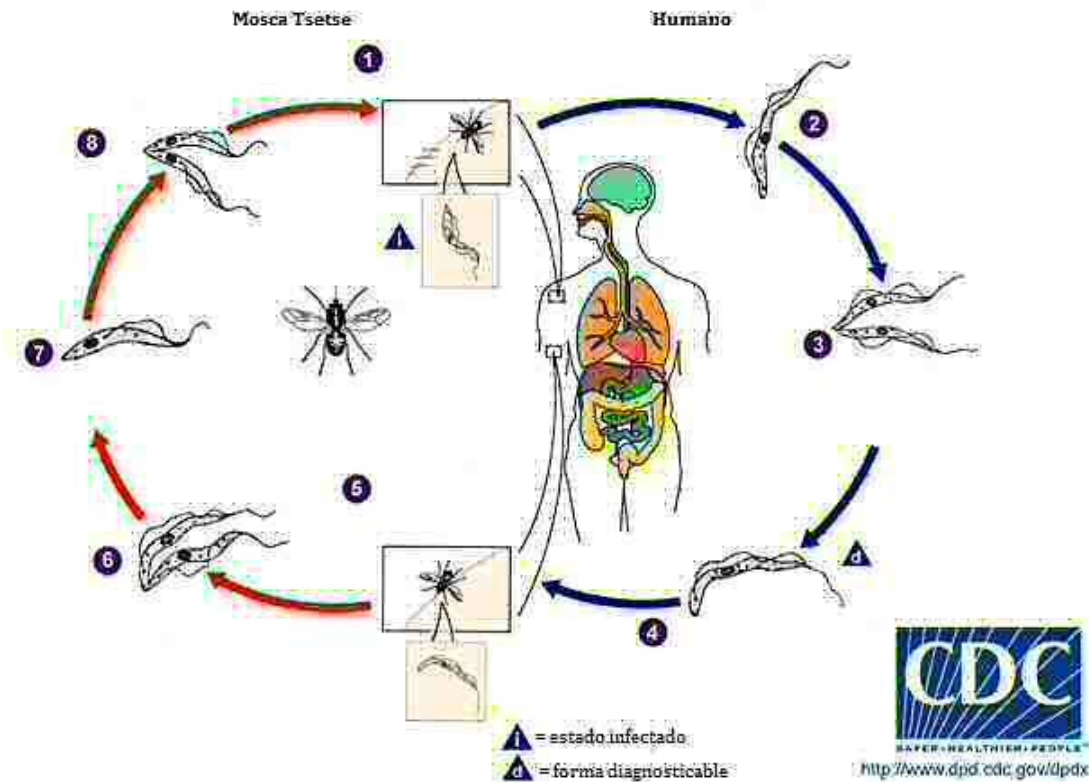


Figura 1.3: Ciclo de vida de *T. brucei*

1.2.2 Manifestación clínica de la enfermedad del sueño

Esta enfermedad se desarrolla en dos etapas distintas. La fase temprana, o estado hemolinfático, se manifiesta a las semanas de la picadura; la persona presenta fiebre prolongada con duración de hasta 7 días, dolores de cabeza, dolor en las articulaciones, debilidad y pérdida de peso. Además de estos síntomas, el parásito puede llegar a invadir diferentes órganos tales como el bazo, el hígado, la piel, los ojos, el sistema cardiovascular y el sistema endocrino. El estado tardío, o encefálico, se caracteriza porque *T. brucei* ha cruzado la BHE. En el caso de la subespecie *T. b. rhodesiense*, esta etapa de la enfermedad puede presentarse en semanas o meses. Si la infección es causada por la subespecie *T. b. gambiense*, esta etapa de la enfermedad es más lenta, pudiendo llegar a presentarse después de meses e incluso años de haber sufrido la picadura de la mosca infectada⁸. Los síntomas neurológicos causados por el daño al SNC pueden agruparse en daños motores, psiquiátricos, anomalías sensoriales y trastornos del sueño. Además, pueden ir acompañados por otros síntomas más sutiles tales como irritabilidad, agotamiento y dolores de cabeza. Dentro de los trastornos psiquiátricos, los infectados pueden sufrir cambios de personalidad, alucinaciones, pueden tornarse violentos y llegar a tener tendencias suicidas. En cuanto a los síntomas motores, pueden sufrir temblores en

Introducción

extremidades así como contracciones involuntarias e incontrolables de las extremidades y la lengua, hipertonia de las extremidades, además de cansancio, distracción, y una inversión del ciclo circadiano (es decir, somnolencia durante el día e insomnio por las noches). En los pacientes no tratados, los síntomas suelen progresar a convulsiones, somnolencia severa, coma y muerte.

1.2.3 Tratamiento quimioterápico actual de la TAH

El arsenal terapéutico para combatir esta enfermedad cuenta actualmente con cuatro fármacos: la suramina, la pentamidina, el melarsoprol y la eflornitina. Algunos de estos fármacos datan de la primera mitad del siglo XX y es bien conocido que, debido a sus efectos secundarios no deseados, no podrían tener la categoría de medicamento con los estándares actuales⁹. La utilización y eficacia de estos fármacos depende tanto de la subespecie que este infectando como del lugar en donde se localice el parásito; es decir, diferentes fármacos serán utilizados según se esté en la fase temprana (hemolinfática) o la fase tardía (encefálica) de la TAH.

1.2.3.1 Fase Hemolinfática

En el caso de la fase temprana, el tratamiento depende incluso de cuál sea la especie que cause la infección. La suramina, una naftilamida sulfonada usada por primera vez en 1922 (**Figura 1.4**)¹⁰, es efectiva cuando la enfermedad es causada por *T. b. rhodesiense*. Este compuesto no es capaz de cruzar la BHE, razón por cual es sólo útil en la fase hemolinfática de la TAH. Es administrada por vía intravenosa y provoca efectos adversos tales como: fallo renal, choque anafiláctico y neurotoxicidad¹¹. Para evitar estos efectos secundarios sobre los pacientes, el tratamiento con este fármaco es complejo y largo alcanzando los 30 días.

El segundo fármaco efectivo en esta etapa de la enfermedad es la pentamidina, sólo efectiva si la infección es causada por *T. b. gambiense*. Esta diamidina aromática es usada desde los años 1930 (**Figura 1.4**)¹² y es administrada por inyecciones intramusculares. Tampoco es capaz de cruzar la BHE (al menos en cantidades terapéuticas) y presenta varios efectos adversos tales como hipo e hiperglicemia así como hipotensión, además de su toxicidad.

Introducción

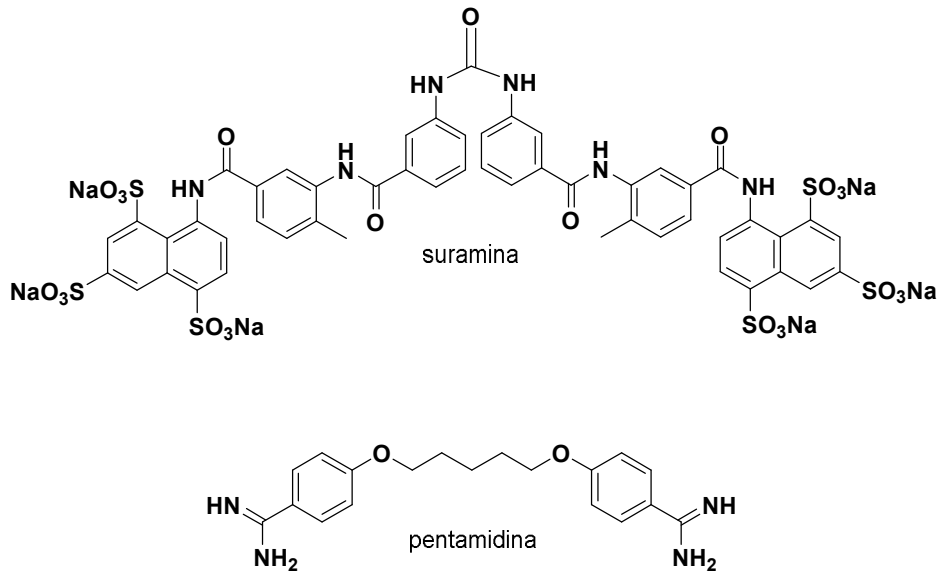


Figura 1.4: Estructura de los fármacos utilizados para tratar la fase hemolinfática de la TAH gambiense (pentamidina) y rodesiense (suramina).

1.2.3.2 Fase Encefálica

En la fase encefálica o tardía de la TAH, es necesario administrar otros fármacos cuyas características es su permeabilidad en la BHE. El melarsoprol (**Figura 1.5**), unos de los fármacos más utilizados en esta etapa de la enfermedad ya que es efectivo independientemente del parásito que cause la infección, es un compuesto derivado de arsénico trivalente desarrollado en los años 1940¹³. Fue el único tratamiento disponible para la fase tardía hasta el año 1990. Al ser un compuesto insoluble en agua, es necesario administrarlo por vía intravenosa en mezcla con propilenglicol; esto hace que el tratamiento sea extremadamente doloroso debido a la destrucción de las venas del paciente. Dicho fármaco posee una serie de efectos secundarios que pueden ser fatales en los pacientes tratados (5% de los casos); produce fiebre, taquicardia, dolor retroesternal, y también causa encefalopatía reactiva postratamiento (PTRE, por sus siglas en inglés), siendo los efectos más comunes las convulsiones y edemas cerebrales⁸.

El otro fármaco utilizado en la segunda fase de TAH, la eflornitina, es muy efectiva aunque exclusivamente contra la subespecie *T. b. gambiense*. Posee menos efectos secundarios que el melarsoprol pero debido a su poca biodisponibilidad, se debe administrar por vía intravenosa en tratamientos de 14 días. Estas condiciones hacen muy complicado el uso de dicho medicamento en las zonas rurales afectadas.

Introducción

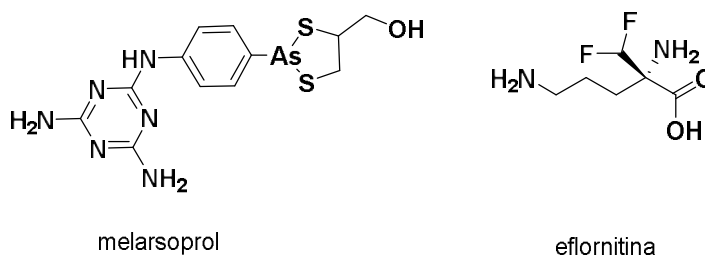


Figura 1.5: Estructura del melarsoprol y la eflornitina, fármacos usados en la fase tardía de la TAH.

Recientemente, se ha aprobado el uso combinado de la eflornitina intravenosa con nifurtimox por vía oral para el tratamiento de la infección causada por *T. brucei gambiense*. Dicha combinación (nifurtimox-eflornithine combination therapy, NECT) representa la primera mejora de tratamiento para la fase encefálica de la TAH *gambiense* en 25 años, tanto por su coste y su seguridad como por su facilidad de administración¹⁴.

1.2.4 Nuevos candidatos a fármacos investigados para el tratamiento de la TAH

A pesar del avance que representa el tratamiento NECT, la búsqueda de nuevos fármacos efectivos contra *T. brucei* sigue siendo una prioridad. Son necesarios nuevos medicamentos que ayuden a paliar los efectos secundarios adversos a la salud de los pacientes y la dificultad en su administración que presentan los tratamientos existentes. En particular, sigue sin haber fármacos efectivos y seguros contra la TAH rodesiense. En los últimos años, varios candidatos a fármacos para el tratamiento de la TAH han sido estudiados en fases clínicas. Unos de estos compuestos es el maleato de pafuramidina (DB289) que funciona como un profármaco de la furamidina (**Figura 1.6**)¹⁵. La pafuramidina es mucho menos activa *in vitro* que la furamidina¹⁶ pero resulta activa por administración oral¹⁷. Debido a los buenos resultados obtenidos, DB289 llegó a fase clínica III pero fue abandonado por que presentó toxicidad en hígado y algunos pacientes presentaron insuficiencia renal¹⁸. Otro tipo de compuestos que han demostrado tener actividad cuando fueron administrados por vía oral fueron los compuestos derivados de oxaborol 6-carboxamida (SCYX-6759 y SCYX-7158, **Figura 1.6**). Estos compuestos han demostrado ser curativos tanto en la fase hemolinfática como en la fase encefálica de la TAH. En 2012, el compuesto SCYX-7158 pasó a ser investigado en fase clínica I en humanos¹⁹. Otro nuevo fármaco que se encuentra en estudios clínicos es el fexinidazol (**Figura 1.6**). Este compuesto resultó curativo contra la forma aguda y crónica de la TAH cuando fue administrado por vía oral²⁰. Se conoce que los metabolitos derivados de este compuesto son los mayores responsables de la actividad pero resultaron ser mutagénicos,

Introducción

aunque por su buena biodisponibilidad oral este compuesto fue candidato para la fase clínica II en el año 2012²¹.

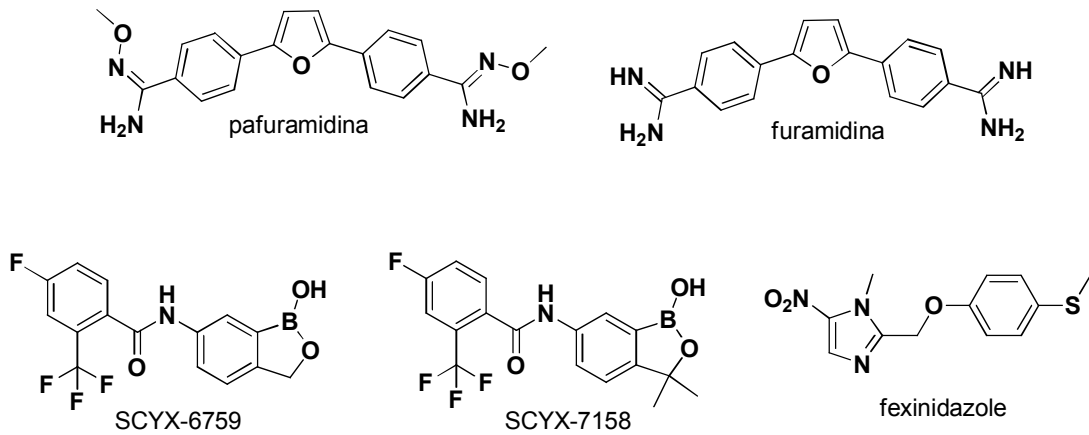


Figura 1.6: Candidatos fármaco estudiado en fases clínicas en humanos.

Sin duda, estos compuestos son candidatos a fármaco muy prometedores para el tratamiento de ambas fases de la TAH. Sin embargo, cabe recordar que las posibilidades de éxito de los fármacos que entran en fase clínica son bastante pequeñas. El reciente ejemplo de la pafuramidina, cuyo desarrollo como fármaco oral para la enfermedad del sueño se detuvo después de llegar a la fase III^{18a}, sirve para demostrar que la búsqueda de nuevas moléculas tripanocidas sigue siendo de actualidad.

Por tal motivo, nos planteamos en esta tesis la búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios que no posean estos efectos secundarios adversos a la salud y que sean efectivos tanto en la primera como en la segunda fase de la TAH.

Introducción

1.3 Referencias bibliográficas

1. W.H.O. Neglected tropical diseases. http://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq/es/index.html.
2. W.H.O. Trypanosomiasis, Human African (sleeping sickness). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/index.html>.
3. Steverding, D., The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasites & Vectors* **2010**, *3*, 1756-3305.
4. WHO/TDR *Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis*; n° 975; World Health Organization: 2012.
5. Steverding, D., The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors* **2008**, *1*, 3.
6. G., H., The History of Sleeping sickness in East Africa. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12* (1), 112-125.
7. De Raadt, P.; (W.H.O.) The history of the sleeping sickness. http://www.who.int/trypanosomiasis_african/country/history/en/.
8. Kennedy, P., Human African trypanosomiasis; neurological aspects. *J. Neurol.* **2006**, *253* (4), 411-416.
9. Karlberg, J. P.; Speers, M. A., *Revisión de Ensayo Clínicos; una guía para el Comité de Ética*. Centros de Ensayos Clínicos, Universidad de Hong Kong ; Asociación de Acreditación de los Programas de Protección para la Investigación en Seres Humanos, Washington D. C.: p 149.
10. Wang, C. C., Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. *Annual. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1995**, *35*, 93-127.
11. (a) Brun, R.; Blum, J.; Chappuis, F.; Burri, C., Human African trypanosomiasis. *Lancet* **2010**, *375*, 148-159; (b) Kennedy, P. G. E., Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113* (4), 496-504.

Introducción

12. (a) Steverding, D., The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors* **2008**, *1* (1), 3; (b) Bray, P. G.; Barrett, M. P.; Ward, S. A.; de Koning, H. P., Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends. Parasitol.* **2003**, *19* (5), 232-239.
13. Friedheim, E., Mel B in the treatment of human trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1949**, *29*, 173-192.
14. Yun, O.; Priotto, G.; Tong, J.; Flevaud, L.; Chappuis, F., NECT is next: Implementing the new drug combination therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e720.
15. Boykin, D. W.; Kumar, A.; Hall, J. E.; Bender, B. C.; Tidwell, R. R., Anti-pneumocystis activity of bis-amidoximes and bis-*O*-alkylamidoximes prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 3017-3020.
16. Ansele, J. H.; Anbazhagan, M.; Brun, R.; Easterbrook, J. D.; Hall, J. E.; Boykin, D. W., *O*-Alkoxyamidine prodrugs of furamidine: In vitro transport and microsomal metabolism as indicators of in vivo efficacy in a mouse Model of *trypanosoma brucei rhodesiense* infection. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4335-4338.
17. Sturk, L. M.; Brock, J. L.; Bagnell, C. R.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R., Distribution and quantitation of the anti-trypanosomal diamidine 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan (DB75) and its *N*-methoxy prodrug DB289 in murine brain tissue. *Act. Trop.* **2004**, *91*, 131-143.
18. (a) Paine, M. F.; Wang, M. Z.; Generaux, C. N.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D.; De Koning, H. P.; Olson, C. A.; Pohlig, G.; Burri, C.; Brun, R.; Murilla, G. A.; Thuita, J. K.; Barrett, M. P.; Tidwell, R. R., Diamidines for human African trypanosomiasis. *Current Opin. Invest. Drugs* **2010**, *11* (8), 876-883; (b) Development of a novel, orally applicable drug for treatment of first stage sleeping sickness (Pafuramidine maleate-DB289). Swiss Tropical and Public Health Institute. <http://www.swisstph.ch/about-us/departments/medicines-research/pharmaceutical-medicine/experience/pafuramidine-maleate-db289.html>.
19. Nare, B.; Wring, S.; Bacchi, C.; Beaudet, B.; Bowling, T.; Brun, R.; Chen, D.; Ding, C.; Freund, Y.; Gaukel, E.; Hussain, A.; Jarnagin, K.; Jenks, M.; Kaiser, M.; Mercer, L.; Mejia, E.; Noe, A.; Orr, M.; Parham, R.; Plattner, J.; Randolph, R.; Rattendi, D.; Rewerts, C.; Sligar, J.; Yarlett, N.; Don, R.; Jacobs, R., Discovery of novel orally bioavailable oxaborole 6-

Introducción

carboxamides that demonstrate cure in a murine model of late-stage central nervous system african trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4379-88.

20. Torreele, E.; Bourdin Trunz, B.; Tweats, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Mazué, G.; Bray, M. A.; Pécoul, B., Fexinidazole – A new oralnitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e923.

21. Tweats, D.; Bourdin Trunz, B.; Torreele, E., Genotoxicity profile of fexinidazole--a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). *Mutagenesis* **2012**, *27*, 523-532.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antecedentes y Objetivos

2. Antecedentes

2.1.1 Descubrimiento de moléculas dicatiónicas con actividad tripanocida

Hace unos años, el cribado por parte del Instituto Tropical Suizo de una quimioteca de compuestos sintetizados en nuestro grupo permitió encontrar una serie de moléculas dicatiónicas derivados de bisguanidinio y bisimidazolinio (**Figura 2.1**) muy interesantes por su actividad sobre *T. brucei rhodesiense*¹.

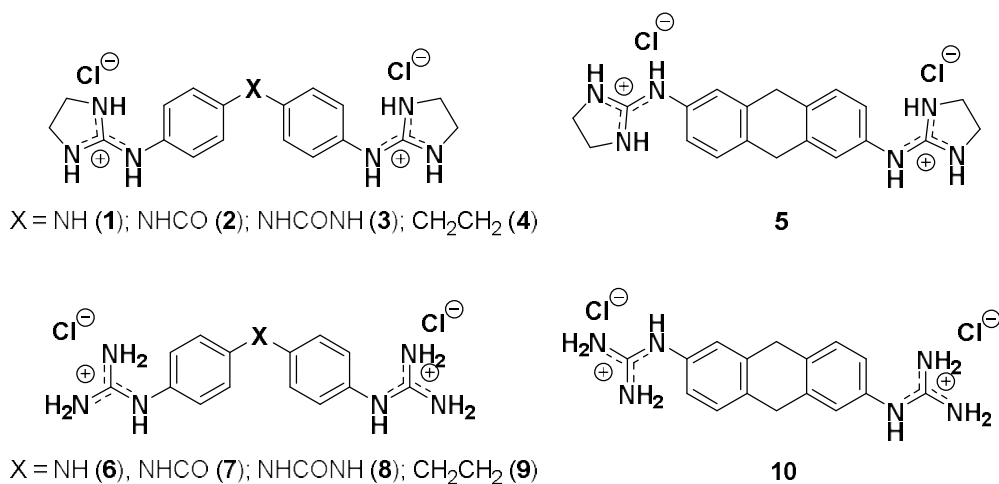


Figura 2.1: Estructura de los compuestos cabeza de serie derivados de bis-(2-iminoimidazolidinio) y bisguanidinio.

Los compuestos cabeza de serie **1** – **10** destacaron por su actividad tanto *in vitro* como *in vivo* frente al parásito *T. b. rhodesiense* causante de una forma aguda de TAH². Los primeros compuestos sintetizados, **1** y **6** (**Figura 2.1**), destacaron por su concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) en el rango nanomolar (69 y 22 nM, respectivamente) y su baja citotoxicidad (índice de selectividad = 3072 para **1**)¹. Estudios posteriores en dos modelos murinos de infección por *T. b. brucei* (cepa STIB795) y *T. b. rhodesiense* (cepa STIB900) mostraron que dichos compuestos eran capaces, con un tratamiento estándar de 4 días por vía intraperitoneal (ip), de curar el 100% de los ratones infectados a la dosis de 20 mg/kg/día³. Dado los buenos resultados obtenidos, nuevas series con diferentes espaciadores fueron sintetizadas y ensayadas contra *T. brucei* destacando especialmente la actividad nanomolar *in vitro* de los compuestos **2** – **5** y **7** – **10** (**Figura 2.1**)². Además, se comprobó que estos nuevos compuestos podían curar los ratones infectados con *T. b. rhodesiense* a dosis bajas (5 – 10 mg/kg ip). Algunos fueron también curativos por administración oral a la dosis de 50 mg/kg (**2**, **7**)². Sin embargo, ningún compuesto fue capaz de curar la fase tardía de la enfermedad en el modelo murino de infección crónica por *T. b. brucei* (cepa GVR35), posiblemente debido a su baja penetración de la barrera hematoencefálica (BHE). Tomando en cuenta que tanto los anillos de imidazolinio como los

Antecedentes y Objetivo

grupos guanidinio estarán cargados positivamente a pH fisiológico debido a su alto pK_a (Ej. $pK_a = 9.9$ para **1**)⁴, estos compuestos estarán mayoritariamente en su forma dicatiónica *in vivo*. Debido a esto es probable que dichos compuestos no sean capaces de cruzar la BHE por difusión pasiva, explicando su falta de actividad en la fase neurológica de la TAH. El mismo inconveniente se ha observado con las diamidinas pentamidina y el diminaceno (**Figura 2.2**), fármacos usados desde hace décadas como primer tratamiento en la fase temprana de la tripanosomiasis *gambiense* y en la Nagana, respectivamente⁵.

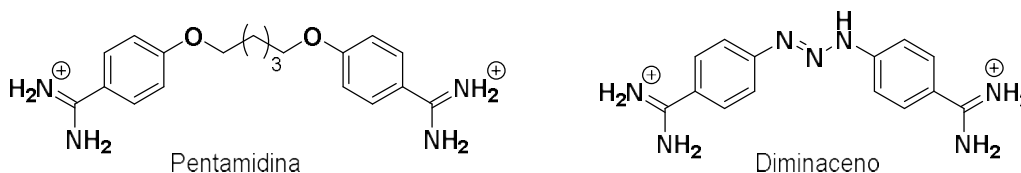


Figura 2.2: Estructura de diamidinas usadas clínicamente para el tratamiento de la fase temprana de la tripanosomiasis gambiense y para la tripanosomiasis animal provocada por *T. b. brucei* (nagana).

2.1.2 Barrera hematoencefálica y fase tardía de la enfermedad del sueño

La barrera hematoencefálica es una barrera entre los vasos sanguíneos y el fluido extracelular cerebral en el sistema nervioso central (SNC). Está formada por una red de células endoteliales de los capilares cerebrales que se caracteriza por que cada célula está estrechamente unida a la siguiente, lo que le confiere una impermeabilidad a la pared interna del capilar, formando una barrera entre los vasos sanguíneos y el SNC. Su función es la de impedir la entrada de toxinas de la sangre en el cerebro y mantener la homeostasis. Sin embargo, esta barrera es también un obstáculo para la administración efectiva de fármacos en el SNC.

La fase tardía de la enfermedad del sueño se caracteriza por la invasión del SNC por los parásitos. Los tripanosomas se multiplican en el cerebro lo que hace muy difícil su eliminación con fármacos quimioterápicos convencionales que no suelen pasar la BHE. Este es el caso, en particular, de la mayoría de los compuestos dicatiónicos como las diamidinas o las bis(2-iminoimidazolidinas). Se sabe que la mayoría de las moléculas activas sobre el SNC atraviesan las membranas lipídicas de la BHE bien por difusión pasiva (Ej. moléculas pequeñas y lipófilas), bien con ayuda de transportadores específicos (Ej. glucosa, aminoácidos). Por otra parte, las macromoléculas (Ej. péptidos, proteínas) traspasan la BHE por endocitosis, mediada por receptores o por interacciones electrostáticas. Además, otros transportadores como la glicoproteína P (P-gp) promueven la excreción de sus sustratos del cerebro y de las células endoteliales de la BHE hacia la sangre (**Figura 2.3**)⁶.

Antecedentes y Objetivos

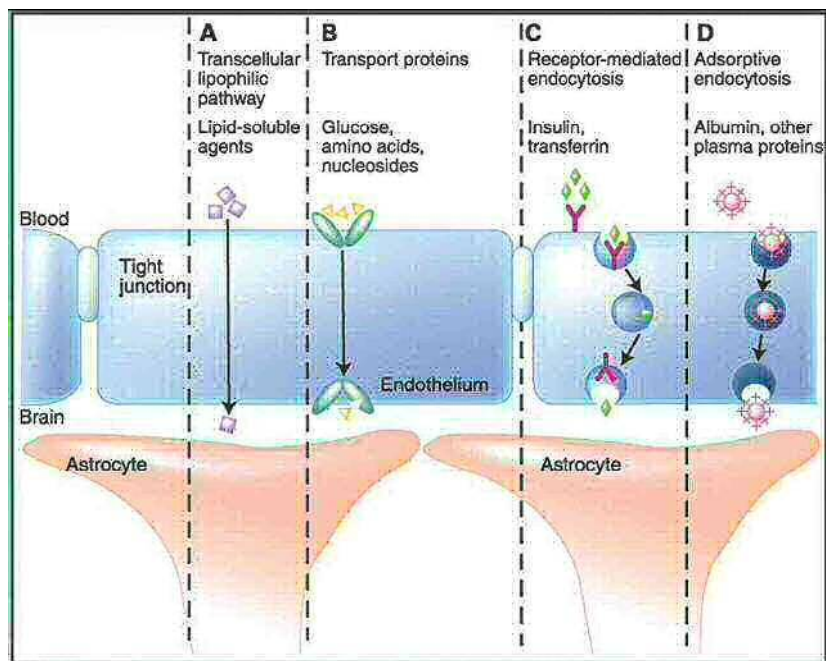


Figura 2.3: Representación esquemática de los mecanismos de transporte de moléculas endógenas a través de la BHE. A) Las moléculas pequeñas y liposolubles atraviesan la BHE por difusión. Sin embargo, son sujetas a la excreción por transportadores como la P-gp. B) Las moléculas pequeñas endógenas, incluyendo los aminoácidos, nucleósidos y la glucosa, son transportadas por transportadores específicos. C) Las moléculas más grandes, incluyendo la insulina y la transferrina, son reconocidas por receptores en la cara luminal del endotelio y son transportadas a través de la célula para ser liberadas en el parénquima cerebral. D) Las grandes proteínas plasmáticas endógenas, incluyendo la albúmina, son transportadas a través de la BHE por endocitosis (adaptado a partir de *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 2011, 50, 7998-8014)⁶.

2.1.3 Estrategias profármaco para mejorar la biodisponibilidad de amidinas y guanidinas

Según se ha descrito en la literatura, la derivatización del grupo amidina como una amidoxima ha sido útil para mejorar la biodisponibilidad oral de este tipo de fármacos. Las amidoximas son profármacos que tienen un pK_a más bajo y no están cargadas a pH fisiológico lo que facilita su absorción por las membranas biológicas. Las amidoximas son metabolizadas a las amidinas activas a través de una secuencia de *O*-desmetilaciones oxidativas llevadas a cabo por las isoformas 1A1, 1A2 y 1B1 del citocromo P450 y *N*-deshidroxilaciones reductivas catalizadas por el citocromo *b5*^{7,8}. Midgley *et al.* demostraron que el compuesto (2,5-bis[4-(*N*-metoxiamidino)fenil]furano (**Figura 2.4**) funciona como un profármaco que mejora la eficacia oral y reduce la toxicidad de este tipo de compuesto en modelos animales⁹. Este compuesto sufre entonces, una vez dentro del organismo, una biotransformación al compuesto activo.

Antecedentes y Objetivo

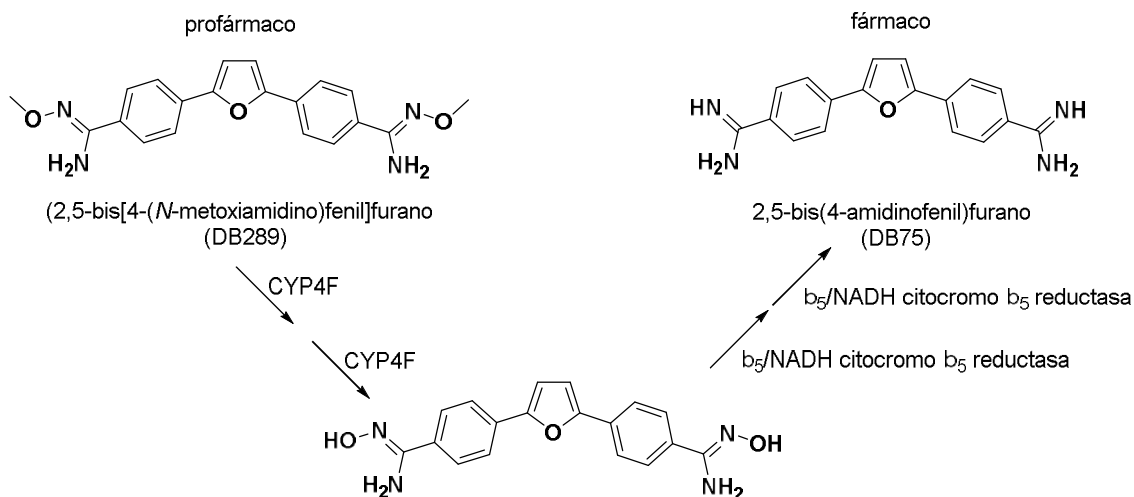


Figura 2.4: Vía metabólica de la biotransformación del profármaco pafuramidina (DB289) al fármaco antiprotozoario furamidina (DB75).

Otras estrategias de profármacos similares para mejorar la actividad oral de amidinas y guanidinas se han reportado en la literatura (Ej., C,C'-bis(oxadiazolonas)alquilen *N*-substituidas¹⁰, *N,N'*-dihidroxiamidinas¹¹). Degardin *et al.*⁹ utilizan la metodología de C,C'-bis(oxadiazolonas)alquilen para mejorar la actividad oral de una diamidina dicatiónica antimalárica y proponen que mediante este método, se enmascara la carga positiva que poseen este tipo de moléculas y mejoran su biodisponibilidad oral. Una vez pasen las membranas biológicas pertinentes, estos compuestos sufren una biotransformación formando nuevamente la bisamidina activa. (**Figura 2.5**).

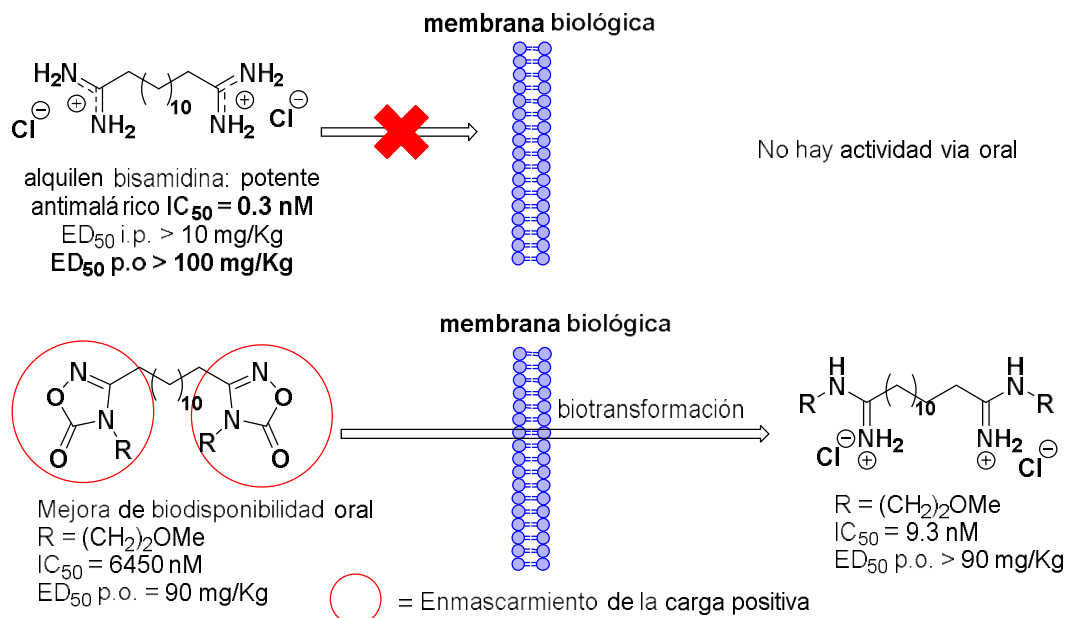


Figura 2.5: Ejemplo de estrategia de enmascaramiento de la carga positiva de una bisamidina⁹.

Tomando en cuenta estos hallazgos, decidimos seguir una estrategia similar para modificar las propiedades fisicoquímicas de nuestros derivados imidazolínicos y

Antecedentes y Objetivos

guanidinio (ie, disminuir su pK_a) a manera de intentar mejorar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos cabezas de serie, más específicamente su permeabilidad de la BHE.

2.1.4 Estrategias para mejorar la permeabilidad de la BHE de derivados de 2-iminoimidazolidinio y guanidinio.

Nuestra idea para mejorar la permeabilidad de los cabezas de serie **1 – 10** está basada en la siguiente hipótesis: dichos prototipos son moléculas pequeñas que no llegan a pasar la BHE por difusión pasiva por ser compuestos demasiado básicos, es decir, cargados a pH fisiológico. Mediante la alcoxilación del nitrógeno de los grupos guanidina e imidazolina, se debería conseguir disminuir el pK_a de las moléculas facilitando su paso de la BHE por difusión. Dichos derivados *N*-alcoxilados podrían actuar bien como profármacos que son metabolizados *in vivo* en el cerebro para generar las especies activas, o bien tener actividad tripanocida intrínseca (**Figura 2.6**).

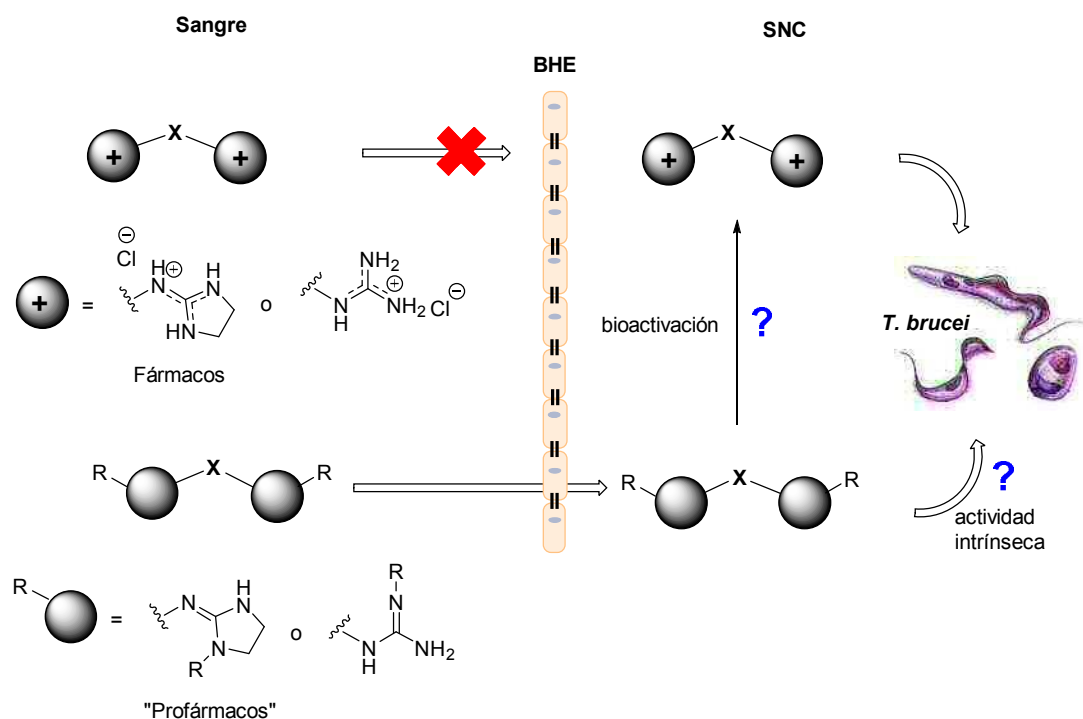


Figura 2.6. Hipótesis de partida sobre la mejora de permeabilidad en la BHE mediante la preparación de derivados *N*-alcoxilados de guanidina e imidazolina.

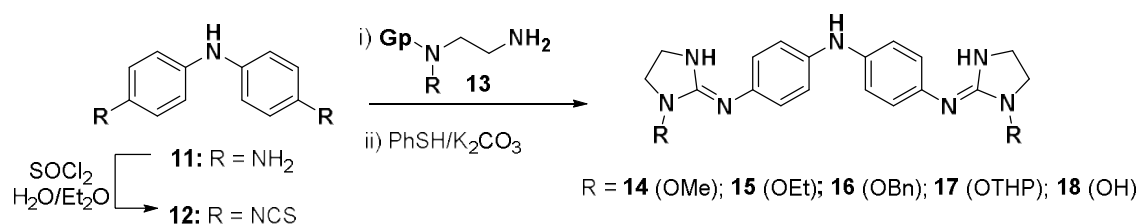
Aunque no se ha descrito el metabolismo *in vivo* de 1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas, si existen antecedentes sobre el metabolismo de *N*-hidroxiguanidinas a guanidinas¹². Debido a la gran similitud tanto geométrica como electrónica de los grupos guanidina y 2-iminoimidazolina (ie, se pueden considerar guanidinas cíclicas)¹³, anticipamos que

Antecedentes y Objetivo

derivados de 1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas podrían reducirse a las 2-iminoimidazolidinas de partida mediante una ruta metabólica parecida.

Para probar nuestra hipótesis, se preparó una primera serie *N*-alcoxi derivados del compuesto cabeza de serie **1**. Para ello, se puso a punto una estrategia sintética “one pot” basada en la reacción de la bis(4-isotiocianatofenil)amina (obtenida a partir de la 4,4'-diaminodifenilamina comercial) con *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)-2-nitrobenzenosulfonamidas (Esquema 2.1)¹⁴.

Esquema 2.1



Se comprobó la capacidad de estos compuestos para atravesar la BHE mediante un ensayo *in vitro* de permeabilidad a través de la línea celular de endotelio microvascular cerebral humano hCMEC/D3¹⁵. En este modelo de BHE, el *N*-hidroxi derivado **18** demostró tener una permeabilidad 3 veces mayor en comparación con el producto sin sustituir **1**¹⁶ demostrándose el potencial de dicha estrategia. Aunque el *N*-hidroxi compuesto **18** demostró ser activo *in vitro* contra *T. b. rhodesiense* con una CI₅₀ de 0.37 μM, resultó poco activo *in vivo* en el modelo de fase aguda de la enfermedad del sueño (Ej. aumentando ligeramente el tiempo medio de recaída de la parasitemia sin llegar a curar los ratones)¹⁶. En conjunto, estos estudios previos mostraron que la estrategia que consiste en funcionalizar los nitrógenos *N*-1 de los anillos de imidazolina con grupos hidroxilos permite mejorar la permeabilidad de los compuestos bis-2-iminoimidazolidinicos.

2.1.5 Unión a ADN y mecanismo de acción de los compuestos derivados de bisguanidinio y bis-(2-iminoimidazolidinio).

Se ha estudiado en colaboración con investigadores de la Universidad de Georgia (EEUU), el posible mecanismo de acción de los compuestos bis-(2-iminoimidazolidinio) y bisguanidinio, observándose, a semejanza de lo que ocurre con la pentamidina y otras diamidinas, la interacción de algunos de nuestros prototipos con modelos de ADN¹⁷. Muchas diamidinas,¹¹ bis(2-iminoimidazolidinas) y bisguanidinas aromáticas^{2, 17} que poseen actividad antiprotozoaria presentan una gran afinidad por el surco estrecho del ADN rico en secuencias adenina-timina (AT)¹⁸. El cinetoplasto de los tripanosomas (ie,

Antecedentes y Objetivos

masa de ADN circular extranuclear que contiene múltiples copias del genoma mitocondrial y se encuentra ubicada en una gran mitocondria) es rico en secuencias de bases AT por lo que podría ser una diana de dichos compuestos. Las moléculas dicatiónicas podrían inhibir la transcripción y la actividad de otras enzimas ADN-dependientes¹⁹. De hecho, hemos observado cierta correlación entre la actividad antitripanosoma *in vitro* de nuestros compuestos derivados de bis(2-iminoimidazolidinio) y su afinidad por secuencias AT de ADN. Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de dichos compuestos podría deberse (al menos en parte) a la formación de un complejo con el ADN³.

2.2 Objetivos

En esta tesis, nos planteamos seguir optimizando las propiedades farmacocinéticas de los compuestos cabezas de serie bis(2-iminoimidazolidínicos) (**2 – 5**) y bisguanidinio (**7 – 8**), más específicamente su permeabilidad en la BHE, con el fin de conseguir moléculas activas en la fase tardía (cerebral) de la TAH. Como hemos mencionado en el apartado 2.1.4, nuestra hipótesis es que dichos compuestos no llegan a pasar la BHE por difusión pasiva por estar cargados a pH fisiológico, es decir, demasiado polares. Para modular la polaridad de estos compuestos, decidimos probar dos aproximaciones basadas en:

1) la disminución de la basicidad de la molécula mediante:

(a) la introducción de sustituyentes *N*-alcoxilo sobre los nitrógenos N1 de los anillos de imidazolina o de las guanidinas.

(b) la introducción de átomos electronegativos (F, Cl) en los anillos aromáticos del espaciador difenílicos.

2) la introducción de sustituyentes alquilo sobre los nitrógenos de las guanidinas para aumentar su lipofilia (**Figura 2.7**).

Antecedentes y Objetivo

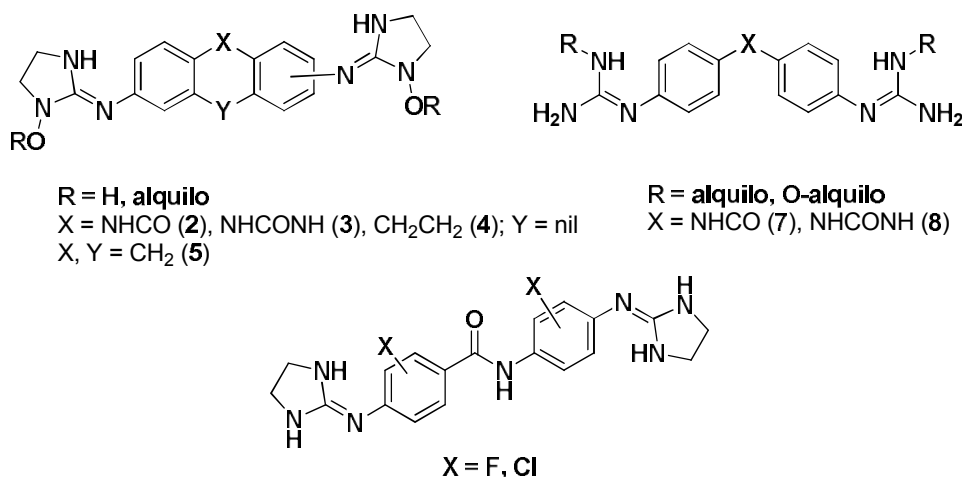


Figura 2.7: Series de derivados sintetizados para modular la basicidad y lipofilia de los compuestos cabeza de serie.

Las aproximaciones propuestas (1a) y (2) se llevaron a cabo con diferentes moléculas cabezas de serie, tanto imidazolininas (2, 3, 4, y 5) como guanidinas (7 y 8), mientras que la aproximación (1b) se llevó a cabo utilizando el esqueleto *N*-fenilbenzamida de la molécula (2), cuya molécula con este espaciador resultó ser el más activo en los ensayos *in vivo*.

Un objetivo importante de este trabajo fue medir el pK_a de las moléculas sintetizadas con el fin de determinar el porcentaje de ionización a pH fisiológico de dichos compuestos. Para ello, nos planteamos desarrollar un nuevo método rápido de medición de pK_a por espectroscopia de UV mediante el uso de placas de 96 pocillos.

Otro objetivo de este trabajo fue comprobar la actividad tripanocida de las nuevas moléculas sintetizadas tanto *in vitro* contra *T. brucei* como *in vivo* en modelos murinos de fase temprana y, para los más efectivos, de fase neurológica de la TAH. Además, se planteó comprobar la bioactividad *in vitro* de estos compuestos contra otros protozoos parásitos tales como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum*.

Otro objetivo fue estudiar las propiedades farmacocinéticas de los mejores compuestos utilizando ensayos *in vitro* de permeabilidad de la BHE humana, ensayo de unión a proteínas plasmáticas, y ensayos de metabolismo con fracciones hepáticas humanas.

Finalmente, se planteó la necesidad de medir la afinidad de unión a ADN de los nuevos compuestos sintetizados. La interacción de los compuestos cabeza de serie (de los que derivan los compuestos sintetizados en esta tesis) o compuestos análogos con el surco estrecho del ADN está bien establecida^{2-3, 18b, c}. Por lo tanto, resultaba interesante estudiar la interacción de los nuevos análogos con ADN puesto que su actividad antiparasitaria

Antecedentes y Objetivos

podría deberse en parte a dicha interacción. Los estudios de interacción con el ADN fueron realizados mediante la técnica de resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés).

2.3 Referencias bibliográficas

1. Dardonville, C.; Brun, R., Bisguanidine, bis(2-aminoimidazoline), and polyamine derivatives as potent and selective chemotherapeutic agents against *trypanosoma brucei rhodesiense*. Synthesis and in vitro evaluation. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2296-2307.
2. Rodríguez, F.; Rozas, I.; Kaiser, M.; Brun, R.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; García, R. N.; Dardonville, C., New bis(2-aminoimidazoline) and bisguanidine DNA minor groove binders with potent in Vivo Antitrypanosomal and Antiplasmodial Activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 909-923.
3. Dardonville, C.; Barrett, M. P.; Brun, R.; Kaiser, M.; Tanius, F.; Wilson, W. D., DNA bindingaffinity ofbisguanidine and bis(2-aminoimidazoline) Derivatives with in Vivo Antitrypanosomal Activity. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (12), 3748-3752.
4. Kinsella, G. K.; Rodriguez, F.; Watson, G. W.; Rozas, I., Computational approach to the basicity of a series of [alpha]1-adrenoceptor ligands in aqueous solution. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2850-2855.
5. Brun, R.; Blum, J.; Chappuis, F.; Burri, C., Human African trypanosomiasis. *Lancet* **2010**, *375*, 148-159.
6. Malakoutikhah, M.; Teixido, M.; Giralt, E., Shuttle-mediated drug delivery to the brain. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 7998-8014.
7. Wang, M. Z.; Saulter, J. Y.; Usuki, E.; Cheung, Y.-L.; Hall, M.; Bridges, A. S.; Loewen, G.; Parkinson, O. T.; Stephens, C. E.; Allen, J. L.; Zeldin, D. C.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Parkinson, A.; Paine, M. F.; Hall, J. E., CYP4F enzymes are the major enzymes in human liver microsomes that catalyze the O-demethylation of the antiparasitic prodrug DB 289 [2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxime]. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1985-1994.

Antecedentes y Objetivo

8. Saulter, J. Y.; Kurian, J. R.; Trepanier, L. A.; Tidwell, R. R.; Bridges, A. S.; Boykin, D. W.; Stephens, C. E.; Anbazhagan, M.; Hall, J. E., Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1886-1893.
9. Midgley, I.; Fitzpatrick, K.; Taylor, L. M.; Houchen, T. L.; Henderson, S. J.; Wright, S. J.; Cybulski, Z. R.; John, B. A.; McBurney, A.; Boykin, D. W.; Trendler, K. L., Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2,5-bis[4-(N-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride). *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 955-967.
10. Degardin, M.; Wein, S.; Durand, T.; Escale, R.; Vial, H.; Vo-Hoang, Y., N-substituted bis-C-alkyloxadiazolones as dual effectors: Efficient intermediates to amidoximes or amidines and prodrug candidates of potent antimalarials. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5233-5236.
11. Reeh, C.; Wundt, J.; Clement, B., N,N'-Dihydroxyamidines: a new prodrug principle to Improve the Oral Bioavailability of Amidines. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (26), 6730-6734.
12. (a) Clement, B.; Demesmaeker, M.; Linne, S., Microsomal catalyzed N-hydroxylation of guanabenz and reduction of the N-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 682-688; (b) Froehlich, A. K.; Girreser, U.; Clement, B., Metabolism of N-hydroxyguanidines (N-hydroxydebrisoquine) in human and porcine hepatocytes: reduction and formation of glucuronides. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1532-1537.
13. Dardonville, C.; Rozas, I.; Alkorta, I., Similarity studies on guanidinium, imidazolinium, and imidazolium cations: toward new bradykinin antagonists. *J. Mol. Graph. Model.* **1998**, *16*, 150-156.
14. Mascaraque, A.; Nieto, L.; Dardonville, C., Efficient one-pot synthesis of 1-alkoxy-2-arylaminoimidazolines from N-alkoxy-N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzenesulfonamides and arylisothiocyanates. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4571-4574.
15. Poller, B.; Gutmann, H.; Krahenbuhl, S.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P. O.; Tuffin, G.; Drewe, J.; Huwyler, J., The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a

Antecedentes y Objetivos

human blood-brain barrier model for drug transport studies. *J Neurochem* **2008**, *107*, 1358-1368.

16. Nieto, L.; Mascaraque, A.; Miller, F.; Glacial, F.; Rios Martinez, C.; Kaiser, M.; Brun, R.; Dardonville, C., Synthesis and antiprotozoal activity of *N*-alkoxy analogues of the trypanocidal lead compound 4,4-Bis(imidazolinylamino)diphenylamine with Improved Human Blood Brain Barrier Permeability. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 485-494.

17. Glass, L. S.; Nguyen, B.; Goodwin, K. D.; Dardonville, C.; Wilson, W. D.; Long, E. C.; Georgiadis, M. M., Crystal structure of a trypanocidal 4,4'-bis(imidazolinylamino)diphenylamine bound to DNA. *Biochemistry* **2009**, *48*, 5943-5952.

18. (a) Baraldi, P. G.; Bovero, A.; Fruttarolo, F.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Pavani, M. G.; Romagnoli, R., DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 475-528; (b) Nagle, P. S.; Quinn, S. J.; Kelly, J. M.; O'Donovan, D. H.; Khan, A. R.; Rodriguez, F.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; Rozas, I., Understanding the DNA binding of novel non-symmetrical guanidinium/2-aminoimidazolium derivatives. *Org. Biomol Chem.* **2010**, *8*, 5558-5567; (c) Nagle, P. S.; Rodriguez, F.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; Rozas, I., High DNA affinity of a series of peptide linked diaromatic guanidinium-like derivatives. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4397-4406.

19. Tidwell, R.; Boykin, D., Minor groove binders as antimicrobial agents. In *Small molecule DNA and RNA binder: synthesis to nucleic acid complexes*, Wiley-VCH: New York, USA, 2003; pp 416-460.

*3. SÍNTESIS Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD
TRIPANOCIDA DE DERIVADOS 1-ALCOXI-2-
IMINOIMIDAZOLIDÍNICOS*

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

3. Síntesis y estudio de la actividad tripanocida de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

3.1 Antecedentes sobre la síntesis de 1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas

El anillo de 2-iminoimidazolidina se encuentra presente en muchos fármacos. La clonidina, un medicamento utilizado para tratar la presión arterial alta y como antidepresivo, es un ejemplo clásico de fármaco que posee este heterociclo (**Figura 3.1**)¹. En el caso de la clonidina, el anillo imidazolidínico no se encuentra sustituido. La sustitución del nitrógeno N1 del anillo de imidazolidina plantea un problema sintético a la hora de preparar *N*-alcoxi derivados de este heterociclo.

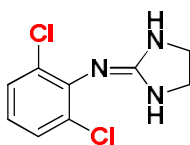
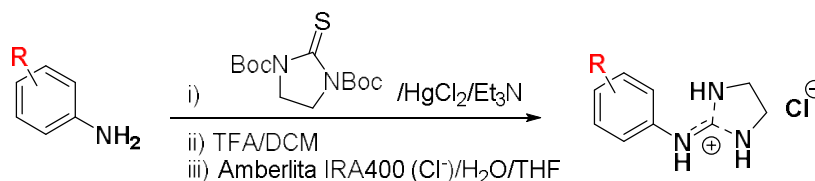


Figura 3.1: Estructura de la clonidina.

En la literatura se encuentran descritas muchas rutas sintéticas para construir este heterociclo². En particular, una metodología que consiste en hacer reaccionar una diamina aromática con *N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonil)imidazolidin-2-tiona en presencia de HgCl_2 y un exceso de Et_3N para dar lugar a la 2-iminoimidazolidina totalmente protegida con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), fue reportada anteriormente por nuestro grupo (Esquema 3.1)³. Posteriormente, los grupos Boc se eliminan por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) aislándose los compuestos imidazolidínicos y guanidínicos como trifluoroacetatos. El tratamiento con resina básica de intercambio iónico (Amberlita IRA400, forma Cl^-) permite regenerar las sales hidrocioradas de 2-iminoimidazolidinio (Esquema 3.1).

Esquema 3.1

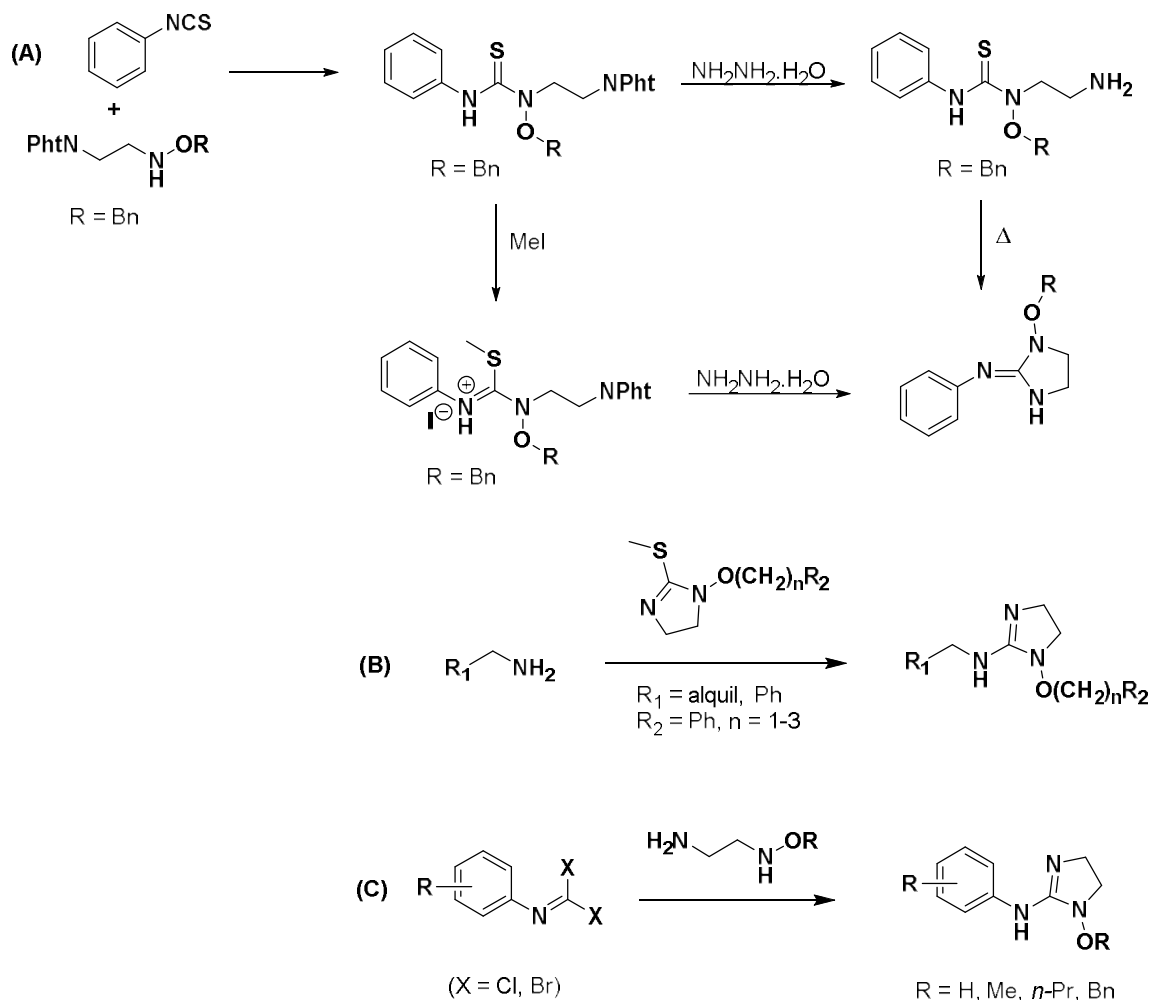


En cambio, están descritas muy pocas rutas para obtener 1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas. La primera ruta (Esquema 3.2, A) se basa en la ciclación intramolecular de una tiourea intermedia (o su derivado de isotiouronio) obtenido por condensación entre un isotiocianato y una *N*-benciloietilendiamina protegida con el grupo ftalimido. En este

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

caso, la desprotección del grupo bencilo (R = Bn) seguida por la alquilación del grupo 1-hidroxilo (R = OH) genera las 1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas (R = Me, Et)⁴.

Esquema 3.2



La estrategia de Alanine *et al.* consiste en hacer reaccionar sales de isotiuronio cíclicas, previamente sintetizadas en 6 etapas, con un exceso de amina (Esquema 3.2, B)¹⁴. Dicha estrategia funciona bien para aminas alifáticas y bencílicas. Sin embargo, según nuestra experiencia, las aminas aromáticas desactivadas suelen reaccionar mucho peor con las sales de isotiuronio.

En la tercera aproximación (Esquema 3.2, C), se hace reaccionar una dihalometilendiamina, obtenido por halogenación a baja temperatura del isonitrilo precursor⁵ o formanilida⁶, con derivados de *N*-hidroxi-etilendiamina sintetizados previamente (R = H⁷, Me⁶, Et⁶, Bn^{4b, 6}) o sintetizados *in situ* (R = Me)^{4b}.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

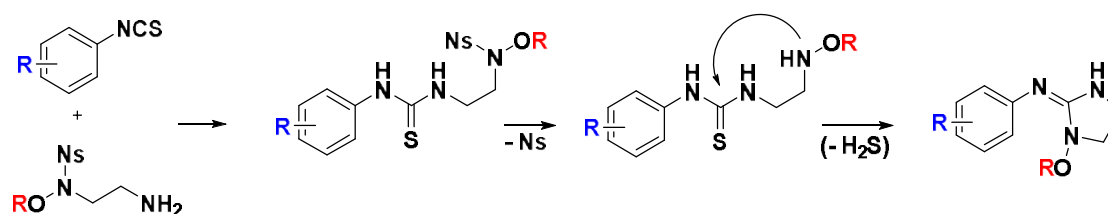
Con las rutas sintéticas A y C, las *N*-alcoxi-2-iminoimidazolidinas de partida deben ser sintetizadas previamente por métodos que no son siempre aplicables a diferentes grupos R (Ej, funciona bien para R = Bn pero da bajos rendimientos para R = Me, Et).

Debido a las limitaciones de las diferentes rutas sintéticas antes descritas, nuestro grupo puso a punto una nueva metodología convergente inspirada en la ruta A y basada en la reacción de isotiocianatos con *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)-2-nitrobenzenosulfonamidas⁸. Así pues, la preparación de nuestros derivados se realizó mediante esta metodología usando un procedimiento “one pot” en el que no se aislaron los productos intermedios. En algunos casos, fue necesario aislar estos productos intermedios para mejorar el rendimiento de (o simplemente para obtener) los productos finales⁸.

3.2 Síntesis “one pot” de las bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas) (35a, 35b, 36b-d, 37a, 38a, y 38f)

El esquema 3.3 muestra la secuencia sintética general para la síntesis convergente de estos derivados. En primer lugar, se prepararon las *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)-2-nitrobenzenosulfonamidas de partida (R = OMe, OEt, OBn, OTHP) que se hacen reaccionar con los isotiocianatos para obtener las 1-[(2-(alcoxi-amino)etil)]-3-ariltioureas protegidas. A continuación se desprotege la amina secundaria y mediante una adición nucleófila sobre el tiocarbonilo, se da la ciclación y formación de las 2-iminoimidazolidinas finales sustituidas con diferentes grupos alcoxilos⁸ (Esquema 3.3).

Esquema 3.3

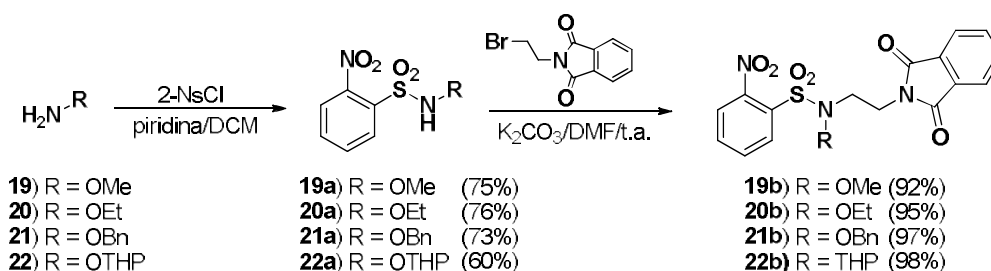


3.2.1 Síntesis de las *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)-2-nitrobenzenosulfonamidas (19c-22c)

La síntesis de estas etilendiaminas protegidas se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito por nuestro grupo de investigación⁸. Se inicia con la protección de las alcoxi-aminas comerciales **19** – **21** con el cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo (cloruro de nosilo: 2-NsCl) en presencia de piridina y DCM anhidro como disolvente. De esta manera se obtuvieron las diferentes *N*-alcoxi-aminas protegidas **19a** – **21a** con buenos rendimientos⁹ (Esquema 3.4).

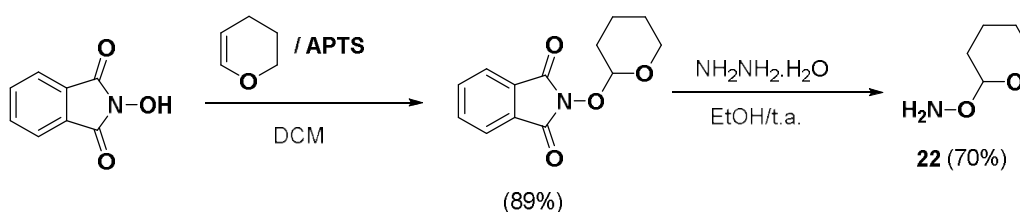
Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Esquema 3.4



Para la obtención de la *O*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)hidroxilamina **22**, se siguió un protocolo descrito por Martin *et al.*¹⁰. La reacción de la *N*-hidroxifalimida comercial con 3,4-dihidro-2*H*-pirano en presencia del ácido *p*-toluenosulfónico y utilizando una mezcla de DCM/dioxano como disolvente generó la *N*-hidroxifalimida protegida con THP con excelente rendimiento. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante una noche. Se comprobó la formación del producto por cromatografía de capa fina (CCF). El producto se purificó por precipitación en metanol y simple filtración (Esquema 3.5).

Esquema 3.5

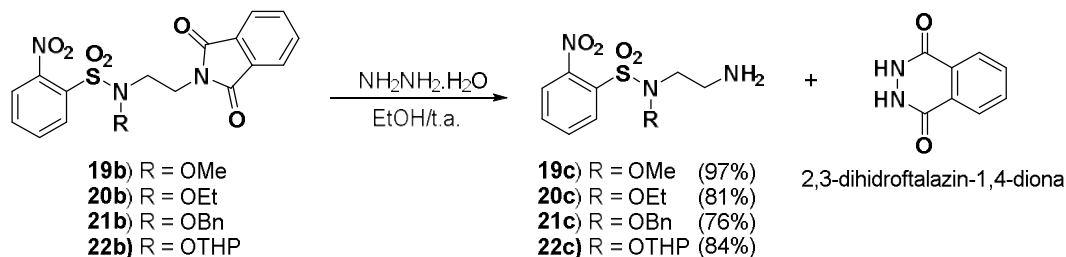


La desprotección del grupo ftalamido se realizó utilizando $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ en etanol y a temperatura ambiente. Se comprobó por CCF la culminación de la reacción y la alcoxiamina **22** fue purificada por destilación a presión reducida (20 mm Hg). Se recolectó el destilado a 80 °C obteniéndose así la *O*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)hidroxilamina **22** con buenos rendimientos (Esquema 3.5). El compuesto **22** fue protegido con el cloruro de 2-nitrobenzenosulfonylo en las mismas condiciones que las alcoxiaminas **19** - **21** para obtener así el compuesto **22a** con 60% de rendimiento. Luego, las alcoxiaminas **19a** - **22a** se hicieron reaccionar con la 2-bromoetilftalimida en medio básico a temperatura ambiente utilizando DMF como disolvente. Terminada la reacción, se purificaron por precipitación en agua y simple filtración. De esta manera se obtuvieron las etilendiaminas **19b** - **22b** convenientemente protegidas con buenos rendimientos^{11,12}. Nuevamente la desprotección de la ftalimida se realizó utilizando la $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ en etanol y a temperatura ambiente obteniéndose las etilendiamina **19c** - **22c** (Esquema 3.6) con

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

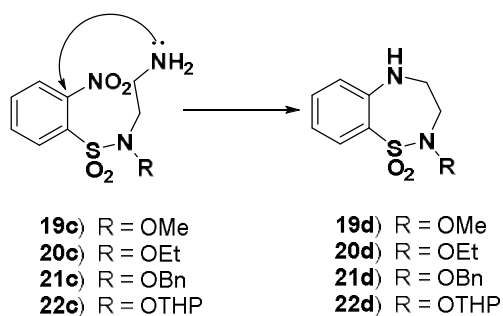
buenos rendimientos. El producto secundario de esta reacción, la 2,3-dihidroftalamida-1,4-diona, es un sólido blanco que se elimina por simple filtración.

Esquema 3.6



Debido a la presencia del grupo nitro en posición 2 del fenilo en la sulfonamidas **19c** – **22c**, la amina primaria recién desprotegida puede atacar sobre esta posición para dar una reacción de ciclación intramolecular¹³ (Esquema 3.7). Observamos que esta reacción ocurre inmediatamente después de la desprotección de la amina primaria y a temperatura ambiente. Debido a esta reacción espontánea se obtuvieron los dióxidos de 2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,2,5]tiadiazepina **19d** y **22d** que fueron aislados y caracterizados (Esquema 3.7). Es de mencionar que la formación de dichas benzotiadiazepinas con los sustituyentes etoxi y benciloxi (R = OEt, OBn) se observó por HPLC-MS [m/z = 243.07 (M+H) y 305.21 (M+H), respectivamente], pero estos subproductos no fueron purificados ni caracterizados.

Esquema 3.7

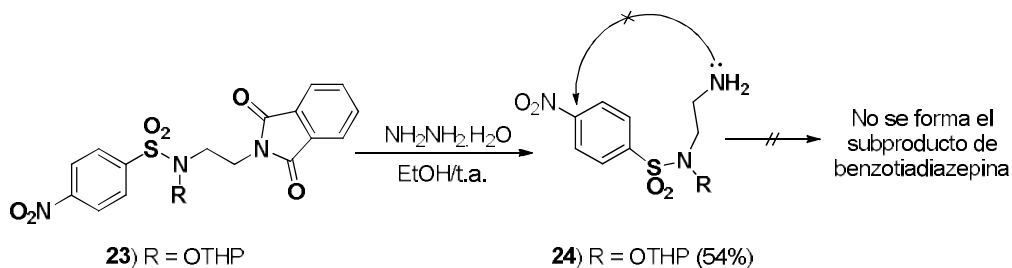


Para evitar que las *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)-2-nitrobenzenosulfonamidas sintetizadas (**19c** – **22c**) se degraden mediante este mecanismo de ciclación intramolecular probamos reemplazar el grupo protector 2-nitrobenzenosulfonilo por el 4-nitrobenzenosulfonilo (4-Ns) obteniéndose así el compuesto **23**. En este caso, el grupo nitro queda lo suficientemente alejado de la amina primaria para evitar la reacción intramolecular que da lugar a las benzotiadiazepinas. De esta manera, después de la desprotección del grupo nosilo se obtuvo la *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)-4-nitrobenzenosulfonamida **24** con buen

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

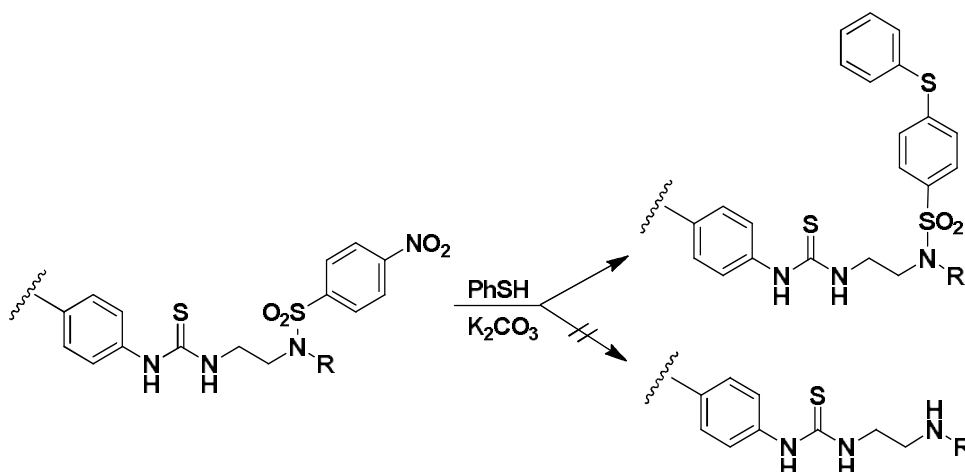
rendimiento sin observarse la formación del subproducto benzotiadiazepina (Esquema 3.8).

Esquema 3.8



Dicho reactivo reaccionó sin problemas con el 1,2-bis(4-isotiocianatofenil)etano para formar la tiourea correspondiente con buen rendimiento (Esquema 3.9). Sin embargo, no se consiguió en la etapa siguiente eliminar el grupo protector 4-Ns utilizando la metodología clásica probada para el grupo 2-Ns (PhSH/K₂CO₃)⁹. En esta reacción, no se observó en ningún momento el producto de la desprotección (la reacción fue monitorizada por HPLC-MS) sino el producto de la sustitución del grupo nitro por el tiofenolato (Esquema 3.9).

Esquema 3.9



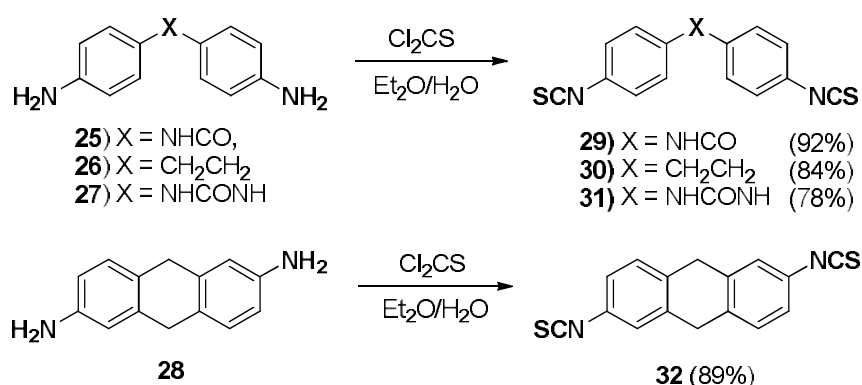
Por tal motivo se decidió seguir utilizando como grupo protector el 2-Ns a pesar de la reacción secundaria de formación de las benzotiadiazepinas **19d** - **22d**. Para minimizar la formación de estos subproductos no deseados, se procedió a la utilización de las etilendiaminas desprotegidas (**19c** - **22c**) en el siguiente paso de reacción, sin previa purificación. Procediendo de esta manera, solo se observó la formación de **19d** - **22d** en un 4 - 5%. Afortunadamente, dichos subproductos no interfieren en la síntesis y se pueden separar por cromatografía una vez conseguidas las imidazolidinas finales.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

3.2.2 Síntesis de los isotiocianatos (29 - 32)

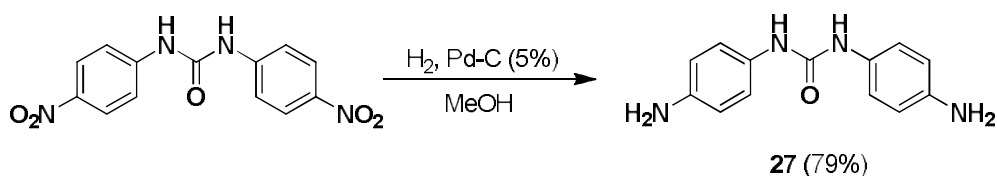
La síntesis de los isotiocianatos **29** - **32** se realizó según el procedimiento antes reportado por nuestro grupo de investigación¹⁴. Se hicieron reaccionar las diaminas **25** - **28** con un ligero exceso de tiofosgeno (Esquema 3.10). Se utilizó una mezcla de Et₂O/H₂O en una proporción 3:1 como disolvente. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante una noche. Los productos de la reacción fueron purificados por precipitación y simple filtración y lavados con agua y hexano, obteniéndose los isotiocianatos **29** - **32** con buenos rendimientos (Esquema 3.10).

Esquema 3.10



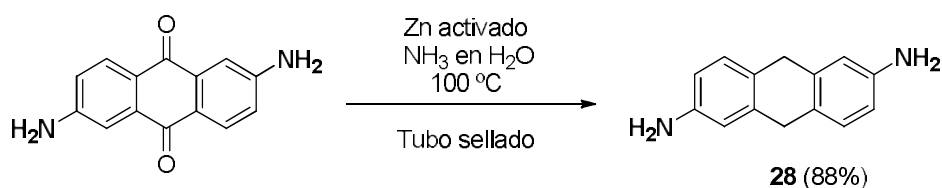
Las diaminas **27** y **28** no son comerciales y se obtuvieron mediante la reducción de la 1,3-bis(4-nitrofenil)urea y la 2,6-diamino-9,10-antraquinona, respectivamente. La diamina **27** se obtuvo por hidrogenación catalítica de la 1,3-bis(4-nitrofenil)urea comercial utilizando paladio sobre carbono (Pd-C 5%) como catalizador. La diamina se purificó por precipitación en metanol obteniéndose buenos rendimientos (Esquema 3.11).

Esquema 3.11



La diamina **28** (Esquema 3.12) se obtuvo por reducción de la 2,6-diamino-9,10-antraquinona comercial utilizando amoníaco (30% en agua) y Zn activado¹⁵. La reacción se calentó a 100 °C en un tubo sellado y **28** se obtuvo por extracción con acetona con buen rendimiento.

Esquema 3.12

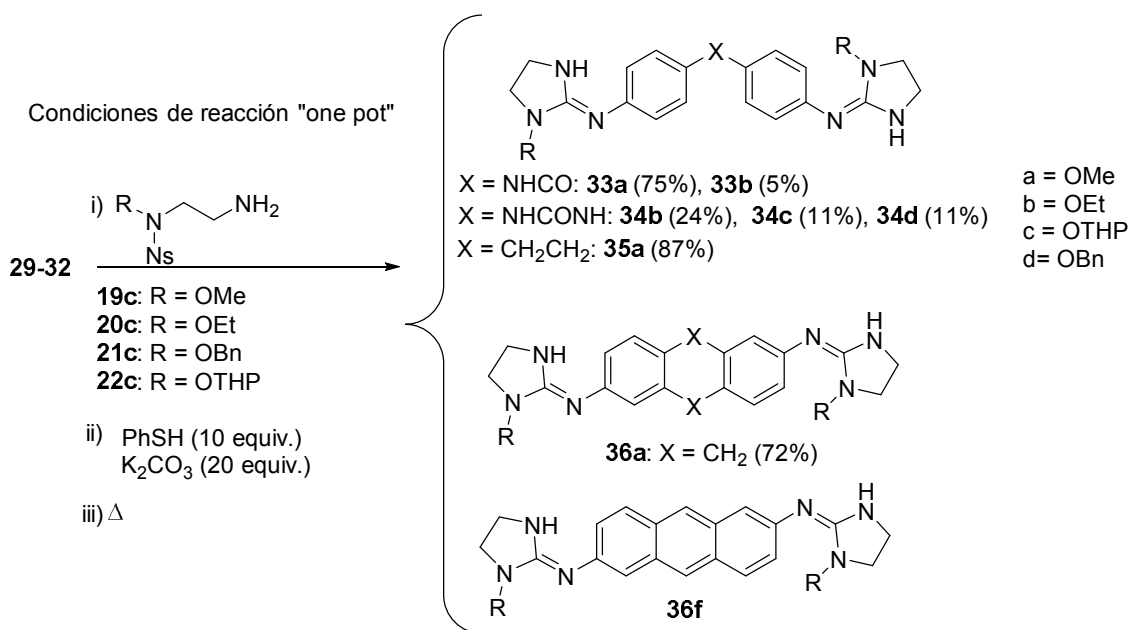


3.2.3 Síntesis de las bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas) **33a**, **33b**, **34b**, **34d**, **36a**, y **36a** por el método “one pot”

Una vez obtenidas las etilendiaminas **19c** – **22c** convenientemente desprotegidas, 2.5 equivalentes de estas se hicieron reaccionar con los isotiocyanatos **29** – **32** (1 equivalente)¹⁴. Estos fueron añadidos gota a gota a la disolución en DMF de las etilendiaminas en aproximadamente 15 minutos siguiendo un procedimiento previamente descrito¹⁵. La mezcla de reacción cambió de un color naranja a un color marrón oscuro al ir añadiendo los isotiocyanatos, indicando la formación de las 1-(2-(alcoxi-amino)etil)-3-ariltioureas intermedias correspondientes. La formación de estos compuestos intermedios fue comprobada mediante HPLC-MS. A continuación, se procedió a la eliminación de los grupos nosilo en el mismo matraz. Para ello, se añadió un exceso de 10 equivalentes de tiofenol y 20 equivalentes de K₂CO₃ (Esquema 3.13) a la mezcla de reacción. Las reacciones se dejaron en agitación a temperatura ambiente. Se comprobó por HPLC-MS la completa desprotección de la amina secundaria. A continuación, la mezcla de reacción se diluye añadiendo más DMF se calentó a 60°C para favorecer la reacción de ciclación mediante una adición nucleofílica al tiocarbonilo de la tiourea y eliminación de “SH”, dándose la formación del anillo 2-iminoimidazolidínico como se muestra en el Esquema 3.13. Las reacciones se dejaron en agitación entre 10 y 22 días. Se comprobó por HPLC-MS la completa formación del producto. De esta manera, mediante la metodología “one pot” se obtuvieron los compuestos **33a-b**, **34b-d**, **35a** y **36a** (Esquema 3.13).

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Esquema 3.13



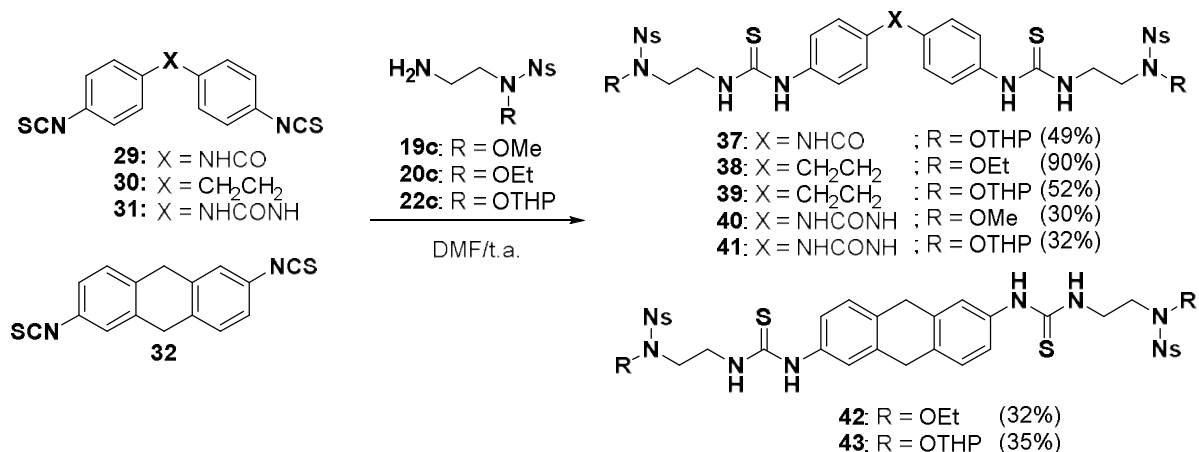
Los crudos de reacción fueron purificados por cromatografía sobre sílice con DCM/MeOH + 0.1% de Et₃N (100:0 – 90:10) obteniéndose los productos con rendimientos entre bajos a moderados. Es de mencionar que el el compuesto **36a** se obtuvo como una mezcla con el compuesto **36f** (~ 20%). Este compuesto se identificó por HPLC-MS ($t_r = 3.37$ min, $m/z = 407.32$ para **36a** y $t_r = 3.50$ min, $m/z = 405.36$ para **36f**) y RMN. En RMN de ¹H, es característica la señal a 3.82 ppm (s, 4H, CH₂) para los protones del metileno en posición 9,10 del dihidroantraceno mientras que el resto de señales solapa con las del compuesto insaturado **36a**. Dicho subproducto proviene posiblemente de la reacción competitiva de oxidación del dihidroantraceno a antraceno durante las etapas de desprotección-ciclación en presencia de derivados de azufre¹⁶. La mezcla de estos dos compuestos no se logró separar. También es de mencionar que estos crudos de reacción presentaron un perfil cromatográfico complicado haciendo difícil su purificación. Debido a esto, por medio de este procedimiento no fue posible la obtención de los productos con sustituyentes OTHP y OBn, que además presentaron problemas en la etapa de ciclación intramolecular. En este caso, se observó mediante HPLC-MS la formación de las 1-(2-(alcoxi-amino)etil)-3-ariltioureas intermedias, pero después de calentar las reacciones a 60°C para favorecer la ciclación, ya no fue posible observar los productos finales. En resumen, utilizando este procedimiento "one pot" se obtuvieron crudos de reacciones muy complejos y difíciles de purificar por cromatografía. Algunos de los productos finales resultaron ser inestables en la columna cromatográfica. Debido a esto, se procedió a repetir las reacciones, en este caso, aislando y purificando las tioureas intermedias.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

3.3 Preparación de las bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas) 33c, 33e, 34a, 34e, 34c, 34e, 38a,b, 35c, 35e, 36b, 36c, y 36e.

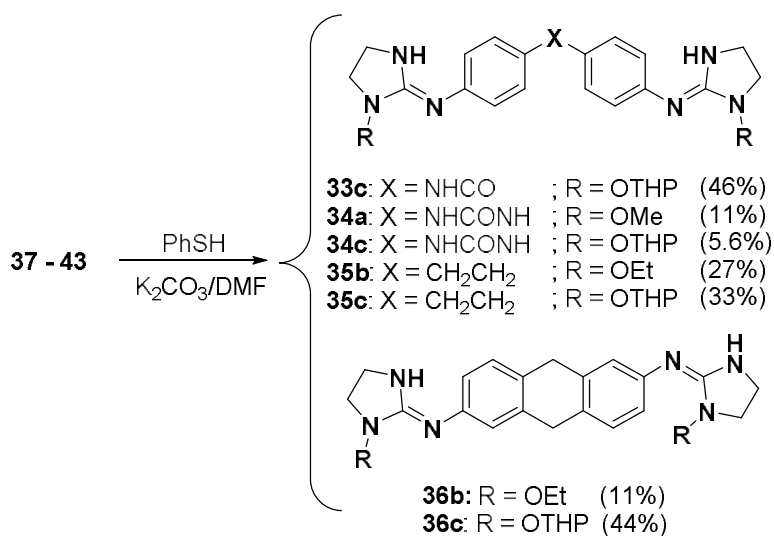
La reacción de los isotiocyanatos **29** – **32** con las etilendiaminas **19c**, **20c** y **22c** permitió obtener las 1-[(2-(alcoxi-amino)etil)]-3-ariltioureas **37** - **43** con rendimientos moderados (Esquema 3.14).

Esquema 3.14



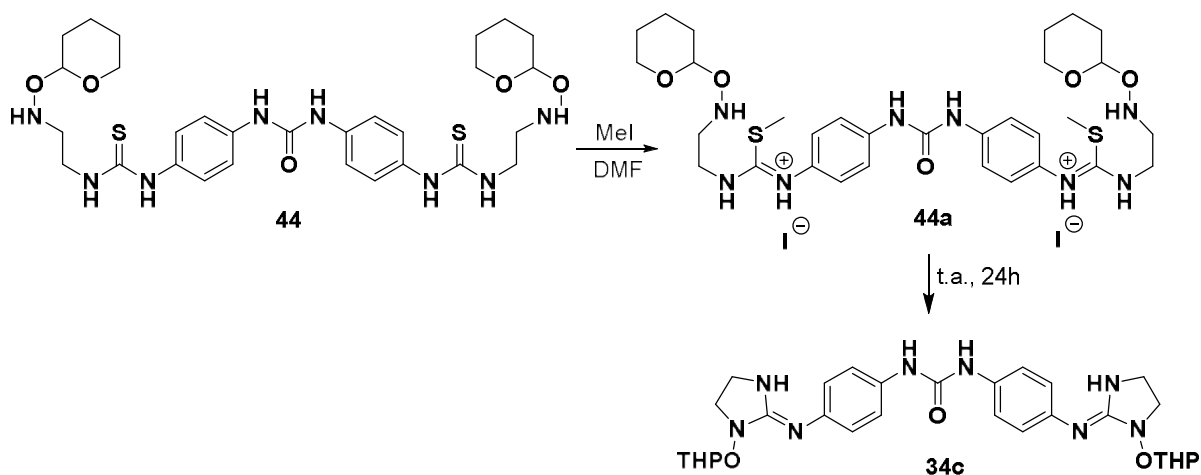
La purificación de los compuestos **37**, **41** - **43** se realizó por cromatografía flash sobre sílice con un gradiente de hexano/AcOEt (80:20 → 0:100). Se observó durante la purificación, que los productos precipitaban en la columna debido a su poca solubilidad en el eluyente utilizado. Por este motivo, la purificación del compuesto **38** se realizó por precipitación en metanol, mientras que los compuestos **39** - **40** fueron purificados por precipitación en DCM frío. Siguiendo el mismo procedimiento de desprotección del grupo nosilo usado en la síntesis "one pot" (PhSH/K₂CO₃), las 1-(2-(alcoxi-amino)etil)-3-ariltioureas **37** - **43** fueron redisueltas en DMF anhidra. Una vez añadidos los reactivos de desprotección y para evitar la descomposición de estos compuestos, las reacciones se dejaron a temperatura ambiente y en agitación entre 7 y 14 días. El cambio en la metodología de la síntesis de estos compuestos, nos permitió obtener las 1-alcoxi-2-arilimidazolidinas **33c**, **34a**, **34c**, **35b**, **35c**, **36b** y **36c** (Esquema 3.15) con rendimientos moderados y bajos.

Esquema 3.15



En el caso del compuesto **34c**, se observó por HPLC-MS que después de la desprotección del grupo nosilo, no se daba la reacción de ciclación intramolecular. La reacción se calentó entonces a 40°C. Después de un día de reacción a esta temperatura, solo se siguió observando el compuesto intermedio **44** (Esquema 3.16). Para aumentar la electrofilia del carbono tiocarbónico y así favorecer la reacción de ciclación, se decidió metilar la tiourea intermedia **44** para generar la sal de isotiuronio tal como se muestra en el esquema 3.16¹¹. El compuesto intermedio **44a** se detectó por HPLC-MS. La reacción se dejó entonces en agitación a temperatura ambiente durante una noche, observándose la formación del compuesto **34c** (Esquema 3.16).

Esquema 3.16

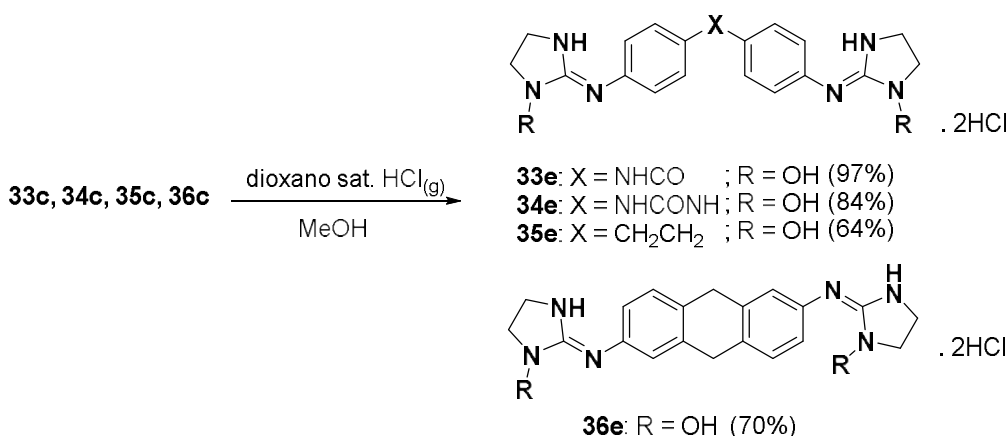


La metodología usada para la purificación de estos compuestos fue la cromatografía en columna. En el caso de los compuestos **33c**, **34a**, **35c** y **36c** se utilizó una columna flash

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

sobre sílice y como eluyente un gradiente de DCM/MeOH (100:0 → 90:10). Para el compuesto **34c** se utilizó alúmina neutra para evitar la posible degradación del mismo. La desprotección del grupo THP de los compuestos **33c**, **34c**, **35c** y **36c** se realizó utilizando una disolución de dioxano saturado con HCl_(g). Terminada la desprotección, el disolvente fue eliminado a presión reducida. Estos compuestos fueron purificados por precipitación en MeOH obteniendo los diclorhidratos de los compuestos **33e** – **36e** (Esquema 3.17) con buenos rendimientos.

Esquema 3.17



3.4 Determinación por RMN de ¹³C de la forma tautomérica predominante en los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos).

Debido a la presencia del nitrógeno unido a la posición 2 del anillo de imidazolidina, este tipo de heterociclo presenta un equilibrio tautomérico (**Figura 3.2**). Distinguir cual es el tautómero predominante en disolución resulta posible utilizando la RMN de ¹³C puesto que el carbono cuaternario C2 de la imidazolina tendrá un desplazamiento químico distinto si se encuentra como tautómero imino (~ 160 ppm) o amino (~ 130 ppm)

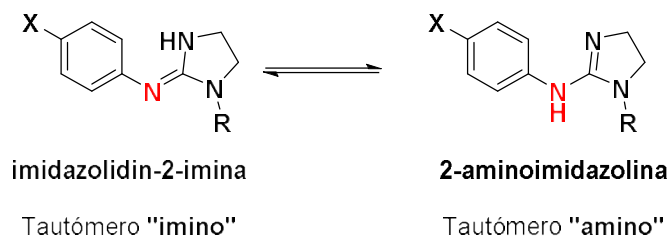


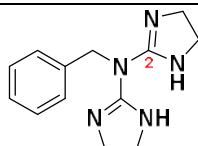
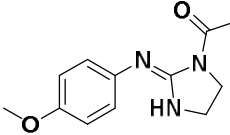
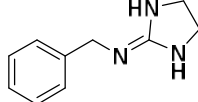

Figura 3.2: Equilibrio tautomérico del grupo 2-iminoimidazolidina.

Gómez-San Juan *et al.* determinaron que para el compuesto *N*-bencil-*N*-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-amina (**A**) cuyo tautómero obligado es el amino, la señal del carbono C2 aparece a 127.7 ppm (Tabla 3.1)^{2a}. En cambio, para los

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

compuestos 1-[(2-(4-metoxifenilimino)imidazolidin-1-il]etan-1-ona (**B**) y *N*-benzilimidazolidin-2-imina (**C**) cuya forma tautomérica predominante es el “imino”, la señal del carbono C2 del anillo de imidazolina se encuentra entre 160.0 ppm y 162.0 ppm^{2a}. En otro estudio, Isobe *et al.* prepararon varias 2-iminoimidazolidinas 1,3-disustituidas (**D**) en las que el único tautómero posible es el “imino”, observándose señales para el carbono C2 del anillo de imidazolina en el rango 157.0 –162.0 ppm (Tabla 3.1)¹⁷. Jackman *et al.* hicieron un estudio por RMN de ¹H y ¹³C para identificar la forma tautomérica predominante en amidinas cíclicas, guanidinas e imidazolininas¹⁸. Compararon los espectros de RMN de la *N*-(2,6-diclorofenil)-1,3-dimetilimidazolidin-2-imina (**E**), en donde el anillo de imidazolina está disustituido permitiendo solo la forma “imino”, con una serie de análogos en donde el anillo de imidazolina se encuentra sin sustituir o mono sustituido permitiendo el equilibrio tautomérico¹⁸ (Tabla 3.1). Los compuestos en donde si puede existir el equilibrio tautomérico amino/imino, la señal de C2 se encuentra entre 156.2 – 158.4 ppm, lo cual es más consistente con la forma tautomérica “imina” como lo mencionan Jackman *et al.*¹⁸.

Tabla 3.1: Desplazamiento químico de la señal del carbono C2 de diferentes derivados de 2-iminoimidazolidínicos^{2a} por RMN de ¹³C en CDCl₃

Cmpto	Estructura	Desplazamiento químico del carbono C2 del anillo de imidazolina δ (ppm)	Ref.
A		127.7	2a
B		160.0	2a
C		162.0	2a
D		157.0 - 162.0	26

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Continuación: Tabla 3.1:

E		155.1	18
F		155.9	18
G		157.8	18
H		156.2	18
I		158.4	18

En el caso de nuestros compuestos, las señales del carbono C2 se encuentran en el rango 158.0 – 160.0 ppm. A continuación, se comparan los valores de desplazamiento químico de RMN de ^{13}C de dos tipos de compuestos bis-(2-iminoimidazolidínicos) sintetizados en esta tesis: 1) la serie con el espaciador amida ($\text{X} = \text{NHCO}$), moléculas no simétricas en donde se observan dos señales para el carbono C2 del anillo de imidazolina; 2) la serie con espaciador etilénico ($\text{X} = \text{CH}_2\text{CH}_2$), moléculas simétricas en donde se observa una sola señal para este mismo carbono. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Desplazamientos químicos de las señales del carbono C2 de los derivados 2-iminoimidazolidínicos **33a** – **33e** y **35a** – **35e** por RMN de ^{13}C en disolución en CDCl_3^a y DMSO^b .

Compuesto	X	R	Desplazamiento químico del carbono C2 δ (ppm)
33a^a	NHCO	OMe	158.7 y 158.0
33b^a		OEt	159.0 y 158.4
33c^a		OTHP	159.6 y 159.1
33e^b		OH	160.1 y 159.5
35a^a	CH ₂ CH ₂	OMe	158.8
35b^a		OEt	159.1
35c^a		OTHP	159.6
35e^b		OH	159.9

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

En el caso de estos compuestos, el carbono C2 muestra una señal de RMN de ^{13}C en el rango 158.0 – 160.1 ppm, lo que concuerda con lo reportado en la literatura para el tautómero imino (ie, $\delta > 150.0$ ppm). Por lo tanto, en el caso de los compuestos imidazolidínicos sintetizados en esta tesis, podemos concluir que el tautómero predominante en disolución tanto en CDCl_3 (**33a -c**, **35a - c**) como en DMSO (**33e**, **35e**) es el “imino”.

3.5 Ensayos biológicos

3.5.1 Ensayos *in vitro* con cepas silvestres y resistentes de *T. brucei* de las bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas)

3.5.1.1 Actividad *in vitro* contra *T. b. rhodesiense*

Los compuestos **33a-e**, **34a-e**, **35a-e** y **36a-e** se ensayaron *in vitro* contra *T. brucei* utilizando un ensayo de viabilidad con un indicador metabólico de la función celular: la sal sódica de resazurina también conocida como “Alamar Blue”. En este ensayo, el colorante se añade al medio de cultivo de los parásitos que contiene el compuesto a ensayar para determinar la sensibilidad de los tripanosomas a dicho compuesto¹⁹. Si el compuesto ensayado no tiene efecto, los parásitos vivos metabolizan la resazurina (azul) a resorufina (rojo) lo que permite medir el efecto del compuesto ensayado bien por fluorimetría bien por colorimetría (**Figura 3.3**). La intensidad de la señal es proporcional al número de parásitos vivos en el medio de cultivo por lo que se puede cuantificar el efecto inhibitorio del compuesto ensayado.

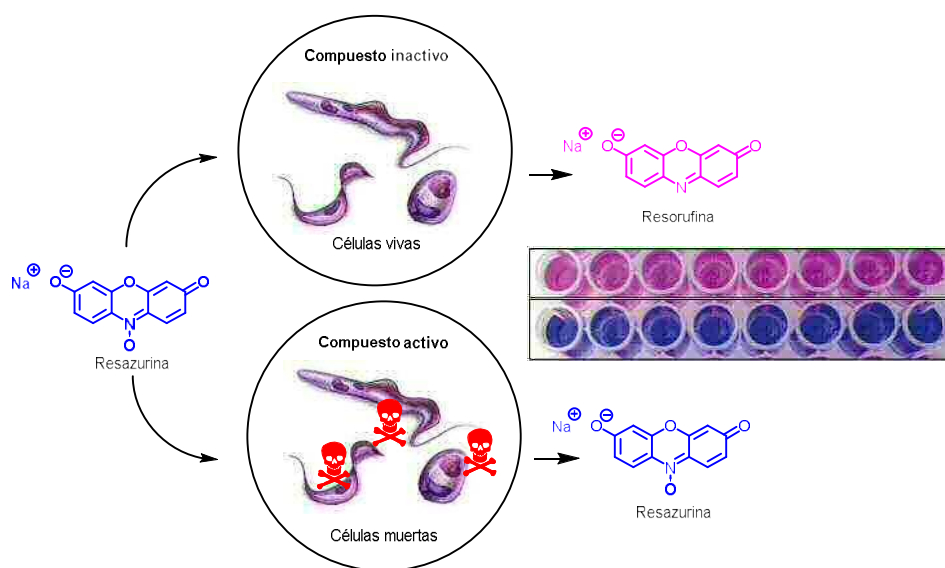
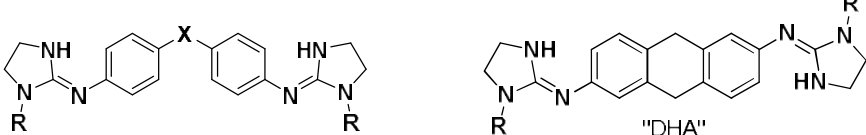


Figura 3.3: Ejemplo de cambio de color de la resazurina (azul) a resorufina (rojo) en un ensayo *in vitro* de viabilidad celular

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Con el mismo ensayo, se evaluó también la citotoxicidad de los compuestos sobre células de mamífero (células-L6 de rata) para poder determinar el índice de selectividad hacia el parásito: $IS = (CI_{50} \text{ células L6}) / (CI_{50} \text{ parásito})^{19}$. Los resultados de estos ensayos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.3: Actividad *in vitro* de los cabezas de serie 2–5 y de sus derivados bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos) contra *T. b. rhodesiense* y citotoxicidad sobre células L6



Compuesto	X	R	<i>T. b. rhodesiense</i> ^a	Citotoxicidad L6 ^b	IS ^c
CI ₅₀ (μM) ^d					
2	NHCO	H	0.025 ^e	193 ^e	7720
33a	NHCO	OMe	18.5	75.6	4
33b	NHCO	OEt	11.6	101.9	8.8
33c	NHCO	OTHP	16.7	26.1	1.5
33e	NHCO	OH	0.888	>213	>240
3	NHCONH	H	0.122 ^e	104 ^e	852
34a	NHCONH	OMe	149.6	112.7	0.7
34b	NHCONH	OEt	45.9	>192	>4
34c	NHCONH	OTHP	19.5	23.2	1.2
34d	NHCONH	OBn	2.4	30.9	12.8
34e	NHCONH	OH	7.9	>206	>26
4	CH ₂ CH ₂	H	0.054 ^e	34.9 ^e	646
35a	CH ₂ CH ₂	OMe	10.9	77.7	7
35b	CH ₂ CH ₂	OEt	3.55	35.9	10
35c	CH ₂ CH ₂	OTHP	2.72	7.6	2.8
35e	CH ₂ CH ₂	OH	5.36	88.4	16.5
5	DHA	H	0.060 ^e	37.2 ^e	620
36c	DHA	OTHP	3.49	19.1	5.4

^a *T. brucei rhodesiense* STIB900 tripomastigotes. Control: melarsoprol, IC₅₀ = 0.005 μM. ^b Células L-6 de mioblastos esqueléticos de rata. Control: podofilotoxina, IC₅₀ = 0.012 μM; ^c Índice de Selectividad = $[CI_{50} \text{ (células L6)} / CI_{50} \text{ (T. b. r.)}]$. ^d Concentración inhibitoria 50 = concentración necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de los parásitos. ^e Datos publicados previamente²⁰.

Los resultados de este ensayo muestran que la mayoría de los nuevos compuestos presentan una actividad moderada contra *T. b. rhodesiense* en el rango micromolar bajo ($CI_{50} < 50 \mu\text{M}$). Tan solo el compuesto **34a** es totalmente inactivo con una CI_{50} por encima de este valor. Se observa cierta influencia de la naturaleza del sustituyente *N*-OR sobre la

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

actividad tripanocida. Así pues, el orden de actividad decreciente dependiendo del sustituyente es: OH \geq OTHP \sim OBn > OEt > OMe.

En comparación con los compuestos cabeza de serie **2** – **5**, todos los *N*-alcoxi derivados presentaron actividad del orden de 20 a 160 veces menor contra *T. brucei*. Esta pérdida de actividad era esperada ya que dichos compuestos fueron preparados como posibles profármacos que necesitarían una bioactivación *in vivo* para generar los compuestos activos²¹. Sin embargo, cabe destacar la actividad tripanocida del compuesto **33e** (CI₅₀ < 1 μ M) que a su vez presentó el menor valor de citotoxicidad teniendo un índice de selectividad mayor a 200 frente a células de mioblastos esqueléticos de rata. Es de destacar también que los compuestos que poseen sustituyentes *N*-hidroxilos (**33e** – **36e**) son menos citotóxicos que los compuestos sin sustituir (i.e. cabezas de serie **2**–**5**). Esto se traduce en unos índices de selectividad más altos para dichos compuestos.

3.5.1.2 Actividad *in vitro* sobre cepas resistentes de *T. brucei*

El fenómeno de resistencia cruzada es un problema que se observa a menudo entre los fármacos tripanocidas existentes (pentamidina, melarsoprol) y los compuestos dicatiónicos de tipo diamidina. Las diamidinas son sustratos del transportador de aminopurinas TbAT1/P2²² y de los transportadores de pentamidina de alta y baja afinidad (HAPT y LAPT, respectivamente) del parásito *T. brucei*²³. La ausencia de uno o más de estos transportadores en el parásito es responsable de la resistencia cruzada entre los fármacos arsenicales y las diamidinas²⁴. Puesto que la estructura de nuestros compuestos se parece a la de las diamidinas, y que poseen el farmacóforo reconocido por el transportador P2, decidimos ensayar la actividad de nuestras moléculas con diferentes cepas resistentes de tripanosomas (TbAT1-KO y B48). Así pues, para establecer su perfil de resistencia, el derivado más activo (**33e**) y el compuesto cabeza de serie correspondiente (**2**) se ensayaron sobre la cepa silvestre (WT) de *T. b. brucei* y las cepas resistentes a fármacos (TbAT1-KO y B48). El compuesto **2** fue aproximadamente 5 veces más activo contra la cepa silvestre de *T. b. brucei* en comparación con cualquiera de las dos cepas resistentes con factores de resistencia de 4.5 y 5.2 para las cepas TbAT1-KO y B48, respectivamente (Tabla 2). Estos resultados indican que la captación celular del compuesto cabeza de serie **2** (sin sustituir) depende en parte del transportador TbAT1 (comparar WT vs TbAT1-KO), mientras que la expresión de HAPT1 no parece influir en la sensibilidad de este compuesto (comparar TbAT1-KO vs B48). En contraste, el derivado **33e** mostró actividades similares sobre las tres cepas de *T. brucei* indicando que estos transportadores no son esenciales para la absorción de esta molécula en el parásito.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Tabla 3.4: Actividad *in vitro* del compuesto cabeza de serie **2** y su *N*-hidroxi derivado **33e** sobre cepas silvestres y resistentes a fármacos de *T. brucei*.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)							
	WT ^a	n	TbAT1-KO ^b	n	FR ^c	B48 ^d	n	FR
2	5.70±0.96	3	25.5±3.5	3	4.5	29.6±3.6	3	5.2
33e	15.5±2.0	3	17.1±1.9	3	1.1	18.6±2.1	3	1.2

^a Cepa silvestre: tripomastigotes de *T. b. brucei* s427; ^b *T. b. brucei* knockout: cepa que no posee un transportador P2 funcional y es resistente a diminaceno; ^c Factor de resistencia en comparación con la cepa silvestre; ^d La cepa B48 es un mutante derivado de la cepa TbAT1-KO que no posee un transportador HAPT funcional. Dicha cepa es resistente al diminaceno, la pentamidina y los melaminofenil arsenicales.

3.5.2 Ensayos *in vivo* en modelos murino de enfermedad del sueño

Después de los ensayos *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en modelos murinos de la enfermedad del sueño con todos los derivados *N*-alcoxilados sintetizados, independientemente de su actividad intrínseca *in vitro*. En efecto, dichos compuestos fueron diseñados como potenciales profármacos que requieren metabolizarse *in vivo* para generar las especies activas por lo que dichos ensayos eran necesarios para comprobar nuestra hipótesis.

3.5.2.1 Actividad *in vivo* en la fase temprana (fase hemolinfática) de la TAH.

Los compuestos cabeza de serie **2 – 5** y los compuestos **33a-b, 33e, 34a-b, 34d-e, 35a-b, 35d, 36a, y 36e** fueron ensayados *in vivo* en la primera fase de la enfermedad de sueño utilizando el modelo murino STIB900²⁵. En este ensayo, los ratones son infectados con el parásito *T. b. rhodesiense* por lo que desarrollan una infección hemolinfática aguda (ie, sin infección del SNC). Este modelo de infección por *T. b. rhodesiense* tiene la característica de ser difícil de curar. De hecho, los fármacos de referencia como la pentamidina y el diminaceno no son capaces de curar este modelo de TAH. Para este ensayo, grupos de 4 ratones infectados por *T. b. rhodesiense* fueron tratados con los diferentes compuestos durante 4 días consecutivos (día 1, 2, 3, y 4 post-infección), bien por administración intraperitoneal (ip) o bien por vía oral (po). Se calculó para cada grupo el tiempo medio de recaída en la parasitemia (i.e. reaparición de parásitos en la sangre) y el número de ratones curados, en este caso, los ratones supervivientes y libres de parásitos después de 60 días. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 3.5.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Tabla 3.5: Actividad in vivo de los compuestos cabeza de series **2 – 5** y de sus derivados bis-(1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos) en modelos murino de la infección por *T. b. rhodesiense*. El modelo STIB900 de infección aguda reproduce la fase temprana (hemolinfática) de la TAH.

Cmpto	X	R	Via de administración ^a	dosis (mg/Kg)	Curado ^b / Infectado	Tiempo medio de recaída (días) ^c	
Control			-	-	0/4	7 ^d	
2	NHCO	H	ip	4 × 20	4/4^e	> 60	
			ip	4 × 10	4/4	> 60	
			ip	4 × 5	4/4	> 60	
			po	4 × 50	4/4	> 60	
33a		OMe	ip	4 × 50	0/4	8	
			po	4 × 100	0/4	10.5	
33b		OEt	ip	4 × 10	0/4	7	
			po	4 × 50	0/4	7	
33e		OH	ip	4 × 50	4/4	> 60	
			ip	4 × 20	4/4	> 60	
			ip	4 × 10	1/4	> 31	
			ip	4 × 5	0/4	20.5	
	po		4 × 50	0/4	10.5		
3	NHCONH	H	ip	4 × 20	4/4^e	> 60	
			ip	4 × 10	2/4	60	
			ip	4 × 5	3/4	60	
			po	4 × 50	0/4	9.5	
34a		OMe	ip	4 × 10	T ^f	T	
			po	4 × 40	0/4	7	
34b		OEt	ip	4 × 50	T	T	
			po	4 × 100	0/4	7	
34d		OBn	ip	4 × 50	0/4	7	
			po	4 × 100	0/4	7	
34e		OH	ip	4 × 40	0/4	12.75	
4		CH ₂ CH ₂	H	ip	4 × 20	4/4	> 60
				ip	4 × 10	1/4	46.75
				ip	4 × 5	0/4	15.75
				po	4 × 50	0/4	7
35a			OMe	ip	4 × 50	0/4	T ^g
	po			4 × 100	0/4	7	
35b	OEt		ip	4 × 30	0/4	7	
			po	4 × 50	0/4	7.75	
35e	OH		ip	4 × 50	0/4	14	

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Continuación Tabla 3.5

5	DHA	H	ip	4 × 20	4/4 ^e	> 60
			ip	4 × 10	3/4	> 60
			ip	4 × 5	0/4	25.5
			po	4 × 50	0/4	13
			po	4 × 20	0/4	8
			po	4 × 10	0/4	9.25
36a	OMe		ip	4 × 50	0/4	7
			po	4 × 50	0/4	7
36e	OH		ip	4 × 20	0/4	18.25
			po	4 × 50	0/4	7

^a ip = intraperitoneal, po = vía oral. ^b Número de ratones que sobrevivieron y fueron libres de parásitos durante 60 días. ^c Promedio de días de recaída en la parasitemia. ^d Los ratones controles son siempre positivos (ie, con parasitemia) y son sacrificados el séptimo día del experimento. ^e Datos previamente reportados en la referencia [20]. ^f Tóxico después de la primera administración. ^g Subtóxico: 2 ratones murieron (día 5) durante el tratamiento.

Los compuestos cabeza de serie **2–5** fueron muy efectivos en este modelo de fase temprana de la TAH, siendo capaces de curar los ratones a dosis bajas (5 mg/Kg para **2 y 3** y 10 mg/Kg para **4 y 5**) cuando fueron administrados por vía intraperitoneal. Además, hay que destacar que el compuesto cabeza de serie **2** fue también curativo por administración oral a la dosis de 50 mg/Kg. Sin embargo, ninguno de los nuevos *N*-alcoxi derivados ensayados mostró actividad destacable cuando fue administrado por vía oral. De hecho, los compuestos con sustituyentes 1-metoxi (**33a–36a**), 1-etoxi (**33b–35b**), y 1-benciloxi (**34d**) resultaron inactivos tanto por vía oral como por vía intraperitoneal. Además, los derivados 1-metoxi (**34a, 35a**) y 1-etoxi (**34b**) mostraron toxicidad por vía ip a la dosis ensayada. Dicha toxicidad no se observó cuando fueron administrados por vía oral.

En cambio, los compuestos con sustituyentes *N*-hidroxilo (**33e, 35e, 34e y 36e**) fueron capaces de aumentar el tiempo medio de recaída en la parasitemia a la dosis de 5, 40, 50, y 20 mg/Kg/día (ip), respectivamente. El resultado más destacado proviene del derivado **33e** (X = NHCO, R = OH) que llegó a ser curativo en 4/4 ratones por vía intraperitoneal a la dosis de 20 mg/Kg (Tabla 3.5). Sin embargo, dicho compuesto resultó escasamente efectivo cuando fue administrado por vía oral a la dosis de 50 mg/Kg.

En resumen, en estas series la introducción de sustituyentes alcoxi sobre el nitrógeno N1 de los anillos de imidazolidina resulta en una disminución de la actividad *in vitro* y una total pérdida de la actividad *in vivo*. Es de mencionar que los compuestos **33a** y **33e** presentaron actividad débil por administración oral. Por el contrario, la introducción de sustituyentes hidroxilo sobre el nitrógeno N1 de los anillos de imidazolidina genera compuestos que conservan cierta actividad *in vivo* en este ensayo de fase temprana de la TAH. En particular, el *N*-hidroxi derivado **33e** (X = NHCO, R = OH) resultó muy activo (100% curativo) sobre la fase temprana de la enfermedad del sueño en el modelo murino

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

STIB900. Por lo tanto, se decidió probar su actividad en el modelo murino GVR35 de fase tardía (neurológica) de la TAH.

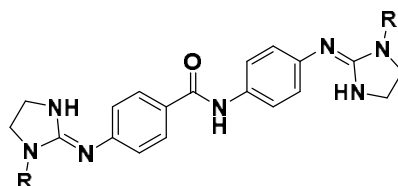
3.5.2.2 Actividad *in vivo* en la fase tardía (fase neurológica) de la TAH

La fase neurológica de la TAH se caracteriza por que *T. brucei* ha cruzado la BHE y se localiza en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo. Por tal motivo, los fármacos útiles en esta fase tienen que ser capaces de cruzar la BHE. Debido a los buenos resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* en la fase hemolinfática, se decidió probar el compuesto **33e** en el modelo murino de infección crónica GVR35. Dicho modelo reproduce la fase tardía de la enfermedad del sueño. En este ensayo, los ratones fueron infectados por *T. b. brucei* (cepa GVR35) hasta observar el desarrollo de la fase neurológica de la TAH. Esta ocurre aproximadamente 14 días post-infección. El aceturato de diminaceno se usó como fármaco control. Cuando se administra pronto después de la infección (ie, antes de la infección del SNC), el diminaceno elimina los parásitos de la sangre y previene la aparición de la forma neurológica de la enfermedad en ratones²⁶. Cuando se administra 21 días post-infección, el diminaceno solo elimina los parásitos del sistema sanguíneo periférico. Puesto que los ratones ya han desarrollado la fase neurológica de la enfermedad, se observa la reaparición de la parasitemia en la sangre después de algunos días (ie, los parásitos migran desde el SNC hacia el sistema sanguíneo y linfático).

Así pues, tres grupos de ratones fueron tratados diariamente durante 5 días (días 14 – 18 post-infección) con los compuestos **2**, **33e**, y aceturato de diminaceno, respectivamente. Luego, los ratones fueron monitorizados durante 180 días mediante detección del parásito en sangre. Para cada compuesto se calculó el “tiempo medio de supervivencia libre de parásitos” (T_s). Pasados 180 días sin detectar en parásito en la sangre, el ratón es considerado curado. Los resultados del ensayo se presentan en la tabla 3.6.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Tabla 3.6: Actividad *in vivo* del compuesto cabeza de serie **2** y de su derivado bis(1-hidroxi-2-iminoimidazolidínico) **33e** en el modelo murino de infección crónica por *T. b. brucei*. El modelo GVR35 de infección crónica reproduce la fase tardía (neurológica) de la TAH.



Compuesto	R	Vía admin. ^a	Dosis (mg/kg)	Curado ^b / Infectado	Tiempo medio tiempo de recaída (días) ^c	T _s (% del control) ^d
aceturato de diminaceno		ip	1 × 40	0/5	47	100%
2	H	ip	5 × 50	T ^e	T ^e	
		ip	5 × 20	0/5	51	108%
33e	O	ip	4 × 40	1/4	78.7^f	171%
		ip	5 × 100 ^g	0/4	52.3^h	143%

^a ip = intraperitoneal. ^b Número de ratones que sobreviven y están libres de parásitos durante 180 días. ^c Tiempo medio de recaída de la parasitemia (en días). ^d T_s, Tiempo de supervivencia libre de parásitos; calculado como 100 × (tiempo medio de recaída para los ratones tratados con el compuesto / tiempo medio de recaída para los ratones control tratados con aceturato de diminaceno). ^e Todos los ratones murieron después del cuarto tratamiento. ^f 3 ratones recayeron en los días 39, 46 y 50, un ratón sobrevivió sin parásitos detectados por 180 días. ^g En este experimento, el tiempo medio de recaída para el ratón control es 46 días (n = 4). ^h Compuesto administrado b.i.d. ^h Ratones control de este experimento = 36 días (n = 6 ratones).

El compuesto cabeza de serie **2** no presentó actividad en la fase neurológica de TAH a las dosis probadas como anteriormente se había comprobado. En cambio, el compuesto **33e** resultó parcialmente curativo en este modelo de fase neurológica de la TAH aumentando el tiempo de supervivencia libre de parásitos, T_s, en 171% en comparación con el control (Tabla 3.6). Cuando se administró a una dosis de 100 mg/Kg b.i.d., **33e** aumentó el T_s en un 143% del control. Estos datos indican que el derivado *N*-hidroxilo **33e** es más activo sobre la infección cerebral por tripanosomas que el compuesto sin sustituir **2**. Además, hay que destacar que **33e** resulta más seguro que el compuesto cabeza de serie **2** pues se pudo administrar a una dosis bastante alta (100 mg/Kg) sin que se observasen signos de toxicidad mientras que **2** resultó tóxico a la dosis de 50 mg/Kg ip.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

3.5.3 Actividad *in vitro* contra *T. cruzi*, *L. donovani* y *P. falciparum*

Es sabido que los compuestos dicatiónicos suelen tener actividad antiprotozoaria no solo sobre *T. brucei* sino también sobre otros parásitos relacionados además de *P. falciparum*. Por lo tanto, todos los compuestos 1-alcoxi también fueron cribados *in vitro* contra los parásitos causante de la tripanosomiasis americana (*T. cruzi*), la leishmaniasis (*L. donovani*) y la malaria (*P. falciparum*). Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Actividad *in vitro* de los compuestos cabezas de serie 2–4 y de sus derivados bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidina) contra *T. cruzi*, *L. donovani*, y *P. falciparum*.

Cmpto	X	R	<i>T. cruzi</i> ^a	<i>L. donovani</i> ^b	<i>P. falciparum</i> K1 ^c	Citotoxicidad L6 ^d
2	NHCO	H	nd ^e	nd	0.028 ^f	193 ^f
33a	NHCO	OMe	152.3	41.7	1.0	75.6
33b	NHCO	OEt	130.6	45.9	1.3	101.9
33c	NHCO	OTHP	37.7	92.0	2.2	26.1
33e	NHCO	OH	161.0	>213	1.73	>213
3	NHCONH	H	nd	nd	0.028 ^f	104 ^f
34a	NHCONH	OMe	>228	170.6	5.131	112.7
34b	NHCONH	OEt	>192	96.3	6.3	>192
34c	NHCONH	OTHP	130.8	88.3	1.9	23.2
34d	NHCONH	OBn	13.7	1.0	4.6	30.9
34e	NHCONH	OH	107.8	>206	2.8	>206
4	CH ₂ CH ₂	H	nd	nd	0.016 ^f	34.9 ^f
35a	CH ₂ CH ₂	OMe	31.9	137.6	1.1	77.7
35b	CH ₂ CH ₂	OEt	42.4	> 176	0.778	35.9
35c	CH ₂ CH ₂	OTHP	8.5	87.5	0.935	7.6
35e	CH ₂ CH ₂	OH	111.4	178.7	0.642	88.4
5	DHA	H	nd	nd	0.0186 ^f	37.2 ^f
36c	DHA	OTHP	26.0	45.6	0.60	19.1

^a Amastigotes de la cepa Tulahuén C2C4; control: benznidazol, CI₅₀ = 1.35 μM. ^b Amastigotes axénicos de la cepa MHOM/ET/67/L82; control: miltefosina, CI₅₀ = 0.528 μM. ^c Estadio eritrocitario de la cepa K1 resistente a cloroquina y pirimetamina; control: cloroquina, CI₅₀ = 0.132 μM. ^d Células L6: mioblastos esqueléticos de rata; control: podofilotoxina, CI₅₀ = 0.012 μM. nd: ^eno determinado.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

En el caso de *T. cruzi*, los compuesto no presentaron actividad significativa, salvo en el caso del compuesto **35c** cuya CI_{50} está por debajo de 10 μM . Sin embargo, dicho compuesto no es selectivo por el parásito. Frente a *L. donovani* tan solo el compuesto **34d** presentó una actividad interesante ($CI_{50} = 1 \mu M$) con una selectividad frente a células de mamífero destacable ($IS = 30$). Los mejores resultados se obtuvieron frente al parásito *P. falciparum*. Todos los compuestos presentaron actividad moderada contra este parásito con CI_{50} en el rango 0.642 – 6.3 μM . Estos datos corresponden a una pérdida de actividad *in vitro* > 30 veces para los 1-alcoxi derivados **35–36a-e** en comparación con los compuestos cabeza de serie sin sustituir **2–5**. Sin embargo, estos resultados sugieren que las bis(1-alcoxiimidazolidinas) podrían ser buenos candidatos en la búsqueda de nuevos fármacos contra la malaria.

3.6 Determinación del pK_a y del porcentaje de ionización a pH fisiológico de los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos)

Utilizando la metodología puesta a punto en esta tesis (Véase capítulo 6) hemos medido el pK_a de los compuestos cabeza de serie **2 – 5** y de los derivados **33a-b,e, 34a-b, 35a-b,e y 36a** (Tabla 3.8). Para cada molécula, se calculó también el porcentaje de ionización a pH fisiológico (pH 7.4) con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ ionización} = \frac{100}{1 + 10^{(pH - pK_a)}}$$

Para los compuestos cabeza de serie **2 – 5** se midieron pK_a s superiores a 9.3 confirmándose la alta basicidad que presentan estos compuestos. Así pues, estos compuestos se encontrarán protonados a pH fisiológico (pH = 7.4) en una proporción > 98%, confiriéndoles un carácter muy polar. Esto concuerda con la falta de actividad de dichos compuestos cabeza de serie en la fase neurológica de la enfermedad del sueño ya que al estar completamente ionizados no podrán cruzar la BHE por difusión pasiva.

La introducción de un grupo hidroxilo o alcoxilo sobre el nitrógeno N1 del anillo de 2-iminoimidazolidina tiene por efecto la disminución de la basicidad de dichos derivados en aproximadamente 2 unidades de pK_a (**33a-e, 34a-b, 35a-e, 36a**). No se observaron apenas diferencias en el pK_a de las moléculas al cambiar un hidroxilo por un metoxilo o etoxilo (comparar **33e** con **33a-b**, y **35e** con **35a-b**). En estas series, destacan los derivados **33a,b,e** con valores de pK_a próximos a 7.4. Dichos compuestos solo estarán ionizados al 50% en el medio fisiológico lo que debería mejorar su permeabilidad a través de las

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

membranas biológicas. En el caso del compuesto **33e**, estos resultados concuerdan con la actividad observada *in vivo* en el modelo murino de infección cerebral.

Tabla 3.8: Medidas experimentales de pK_a y porcentaje de ionización a pH fisiológico de las bis(2-iminoimidazolidinas) y sus *N*-alcóxi derivados.

Cmpto ^a	X	R	λ (nm) ^b	$pK_a \pm SD$ ^c	% Ionización a pH 7.4
2		H	258/308	9.29 \pm 0.07^d	98.7
33a	NHCO	OMe	258/312	7.27 \pm 0.09	42.6
33b		OEt	258/308	7.34 \pm 0.03	46.6
33e		OH	258/298	7.43 \pm 0.10	51.7
3		H	260/292	10.34 \pm 0.04	99.9
34a	NHCONH	OMe	240/270	7.95 \pm 0.05	78.0
34b		OEt	258/296	8.27 \pm 0.07	88.1
4		H	260/310	10.71 \pm 0.10	99.9
35a	CH ₂ CH ₂	OMe	236/262	8.01 \pm 0.12	82.3
35b		OEt	238/262	8.01 \pm 0.21	82.3
35e		OH	238/264	7.97 \pm 0.13	78.8
5		H	272/288	9.82 \pm 0.26	99.6
36a		OMe	272/290	7.53 \pm 0.14	87.4

^a El compuesto fue redissuelto en DMSO (solución madre) y diluido con el correspondiente buffer para alcanzar una concentración de 0.2 mM en cada pocillo (2% DMSO v/v). ^b Longitud de onda analítica. ^c pK_a de los grupos iminoimidazolidínicos; solamente pudo ser calculado un valor de pK_a para ambos grupos iminoimidazolidínicos. ^d El valor del pK_a fue calculado del promedio de al menos 3 medidas.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

3.7 Estudios de permeabilidad en la BHE, unión a proteínas plasmáticas y metabolismo hepático del derivado *N*-hidroxilado 33e.

3.7.1 Evaluación *in vitro* de la capacidad de los compuestos para cruzar la barrera hematoencefálica

Con el fin de corroborar los buenos resultados obtenidos con el compuesto **33e** en el modelo murino de fase tardía de la TAH, nos propusimos medir *in vitro* la capacidad de dicho compuesto (y del correspondiente cabeza de serie **2**) para atravesar la BHE. Sabemos que para obtener actividad en la segunda fase de esta enfermedad es necesario que los compuestos crucen esta barrera fisiológica. Para simular la misma, se han utilizado células endoteliales microvasculares inmortalizadas de cerebro humano (hCMEC/D3) cuya utilidad como modelo *in vitro* de BHE está bien establecida²⁷. A manera de referencia, fue utilizado como fármaco control la pentamidina cuya permeabilidad en la BHE es baja, resultando incapaz de curar la infección cerebral por *T. brucei*²⁸. Como referencia de transporte pasivo paracelular a través de las uniones celulares fue utilizado el compuesto fluorescente hidrofílico "Lucifer yellow" (LY); la difusión paracelular del LY a través de la BHE está fuertemente restringida por la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales. Por lo tanto, una baja permeabilidad del LY en este ensayo nos indica que las células endoteliales están sumamente unidas simulando de muy buena manera la BHE.

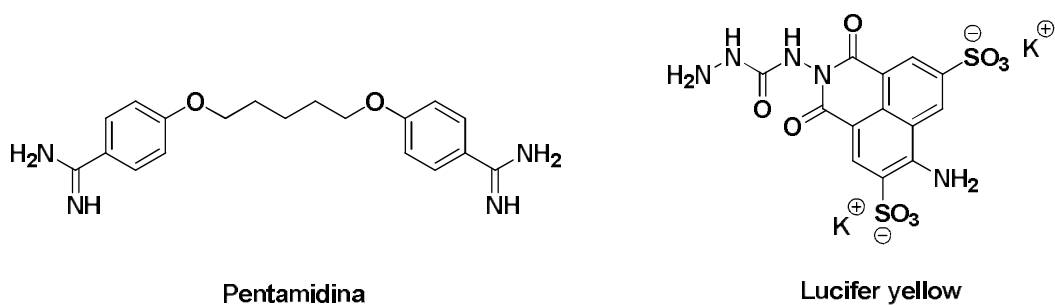


Figura 3.4: Estructura de la Pentamidina y del Lucifer Yellow (LY).

Este tipo de ensayo tiene la capacidad de discriminar compuestos con baja, mediana y alta permeabilidad. En este ensayo, las células endoteliales cerebrales fueron cultivadas en placas tipo Boyden delimitándose dos compartimentos: los compartimentos luminal (arriba) y abluminal (abajo) que representan los compartimentos sanguíneo y cerebral, respectivamente (**Figura 3.5**). Para iniciar el ensayo, los compuestos fueron colocados en el compartimento luminal. A diferentes tiempos (10, 25 y 45 min), cada inserto de cultivo (con y sin células) se transfirió a un nuevo compartimento inferior conteniendo tampón de transporte fresco.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

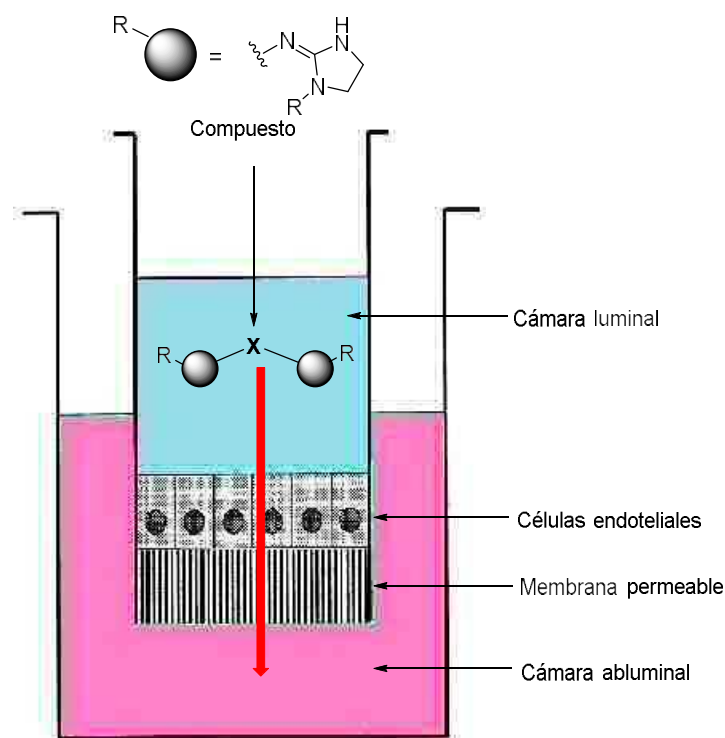
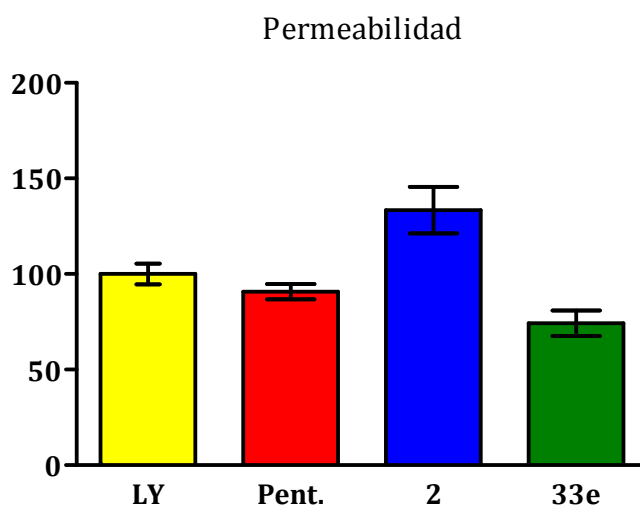


Figura 3.5: Esquema de una cámara de Boyden con inserto utilizada en el ensayo *in vitro* de paso de BHE. La superficie del inserto (ie, filtro con membrana permeable) está precubierto con colágeno y una monocapa de células endoteliales hCMEC/D3.

Al final del ensayo, la cantidad de cada compuesto en los compartimentos inferiores a diferentes tiempos, en el compartimento superior al final del experimento, y en la disolución de trabajo se cuantificó por HPLC. Los coeficientes de permeabilidad se calcularon mediante el “principio de aclaramiento”, es decir a partir de la pendiente del volumen de fármaco aclarado desde el compartimento luminal al abluminal en función del tiempo (véase los detalles en la parte experimental). Ante de iniciar el ensayo, se evaluó la calidad del modelo de BHE midiendo la permeabilidad del LY. El valor de permeabilidad del LY ($P_e = 1.63 \pm 0.09 \times 10^{-3}$ cm/min), que corresponde a una baja permeabilidad, se normalizó a un valor de 100%. A continuación, se determinó la concentración de trabajo a la cual los compuestos ensayados no afectaban la monocapa de células endoteliales. Esto se consiguió midiendo la permeabilidad del LY en presencia de dichos compuestos. En el caso de los compuestos **2** y **33e**, la concentración de trabajo fue de 100 μ M. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica.

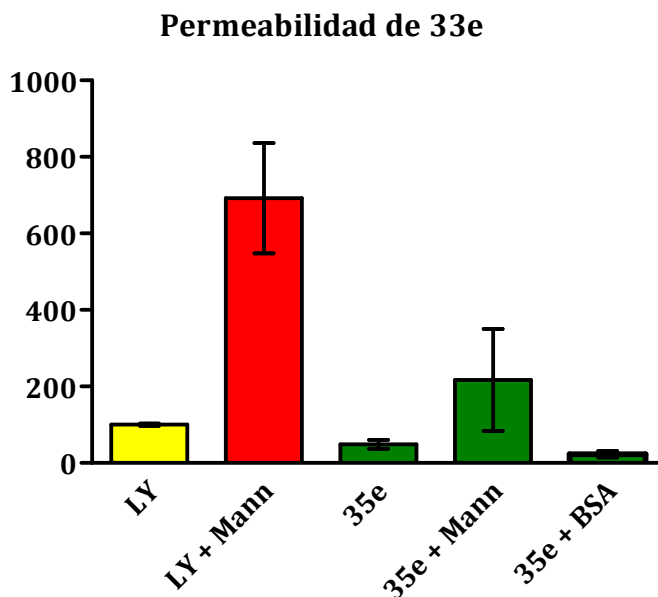
Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Grafica 3.1: Valores de permeabilidad *in vitro* sobre la línea celular endotelial de cerebro humano (hCMEC/D3) de la pentamidina, **2**, y **33e** comparados con el LY.



La pentamidina mostró un valor de permeabilidad similar al LY (Gráfica 3.1, 91% vs 100%), lo que corresponde a una baja permeabilidad en este modelo *in vitro*. El compuesto cabeza de serie **2** mostró un valor de permeabilidad ligeramente superior al LY (133%), aunque sigue siendo una permeabilidad baja en este ensayo si se compara con otros compuestos como la fenitoina y el diazepam que poseen una permeabilidad intermedia y alta en la BHE^{27a}. De modo sorprendente, el compuesto **33e** mostró un valor de permeabilidad aún más bajo (74%) que el compuesto cabeza de serie **2**. Se descartó que el compuesto pudiera ser metabolizado por las células endoteliales ya que el balance de masa de los compuestos fue alrededor del 100% en todos los experimentos. Debido a que el compuesto **33e** fue el compuesto más activo *in vivo* en el modelo de fase neurológica de la TAH (Tabla 3.6), es posible que penetre en el cerebro utilizando otra vía diferente a la de la difusión pasiva a través de la BHE. Para comprobar si nuestro ensayo era capaz de detectar el paso del compuesto **33e** a pesar de su baja permeabilidad, se realizó un experimento adicional aplicando un choque osmótico a las células endoteliales. Dicho tratamiento induce una destrucción temporal de las uniones estrechas de las células endoteliales permitiendo la libre difusión paracelular de los compuestos ensayados. Así pues, se midió la permeabilidad de **33e** y del LY después de someter las células a un choque hiperosmótico con una disolución 1.4 M de manitol. Como se observa en la gráfica 3.2, las permeabilidades del LY y de **33e** aumentaron ampliamente: 692% vs 100% para LY solo, y 217% vs 49% para **33e** solo.

Gráfica 3.2: Valores de permeabilidad *in vitro* sobre la línea celular hCMEC/D3 de **33e** en ausencia y presencia de manitol y albúmina de suero humano (BSA), respectivamente.



Este ensayo confirmó que era posible aumentar la permeabilidad de **33e** cuando las uniones estrechas de las células endoteliales están alteradas. Por lo tanto, es posible que **33e** pueda alcanzar el cerebro de los ratones por rutas distintas a la vía paracelular o la difusión libre a través de ambas membranas plasmáticas endoteliales. Así, **33e** podría pasar por transcitosis o ser transportado activamente hacia el cerebro a través de las células endoteliales cerebrales. Durante los estudios de permeabilidad, se añadió albúmina de suero bovino (BSA) en el buffer del ensayo con la finalidad de facilitar la transcitosis. Sin embargo, la presencia del BSA no aumentó la permeabilidad del compuesto **33e** (Figura 3.2, 28% vs 49% para **33e** solo) indicando bien una baja afinidad por esta proteína, o bien que la transcitosis no es la ruta principal de entrada en el cerebro. Para confirmar estos datos, se estudió la unión a albúmina de suero humano (HSA) de estos compuestos utilizando la técnica de resonancia de plasmón de superficie. Los detalles de este ensayo se recogen en el capítulo 7 de esta tesis. Cabe destacar que en estos ensayos, el compuesto cabeza de serie **2** mostró una unión intermedia a la HSA mientras que **33e** mostró poca unión a dicha proteína, confirmando los resultados observados en los ensayos de permeabilidad. Es importante resaltar que ese bajo nivel de unión a la proteína plasmática HSA debería influir positivamente sobre la actividad de este compuesto mediante el aumento de su concentración libre en la sangre.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

3.7.2 Ensayo *in vitro* de metabolismo hepático del derivado *N*-hidroxilado **33e**

Nuestra hipótesis de trabajo al sintetizar derivados *N*-alcoxilados de los cabezas de serie fue que dichos compuestos podrían actuar como profármacos de las especies activas sin sustituir (**2** – **5**). Esta hipótesis se basaba en trabajos descritos en la literatura con derivados de amidina y guanidina parecidos aunque no iguales²⁹. El metabolismo hepático de *N*-hidroxiamidinas (Ej. benzamidoxima) y *N*-hidroxiguanidinas (Ej. *N*-hidroxi-debrisoquina) con microsomas, fracciones mitocondriales y hepatocitos ha sido estudiado ampliamente (**Figura 3.6**). Clement *et al.* caracterizaron el “complejo mitocondrial de reducción de amidoximas” (mARC, por sus siglas en inglés)^{29c, 30} como el responsable de la reducción de las amidoximas y *N*-hidroxiguanidinas a amidina y guanidina, respectivamente^{29b}.

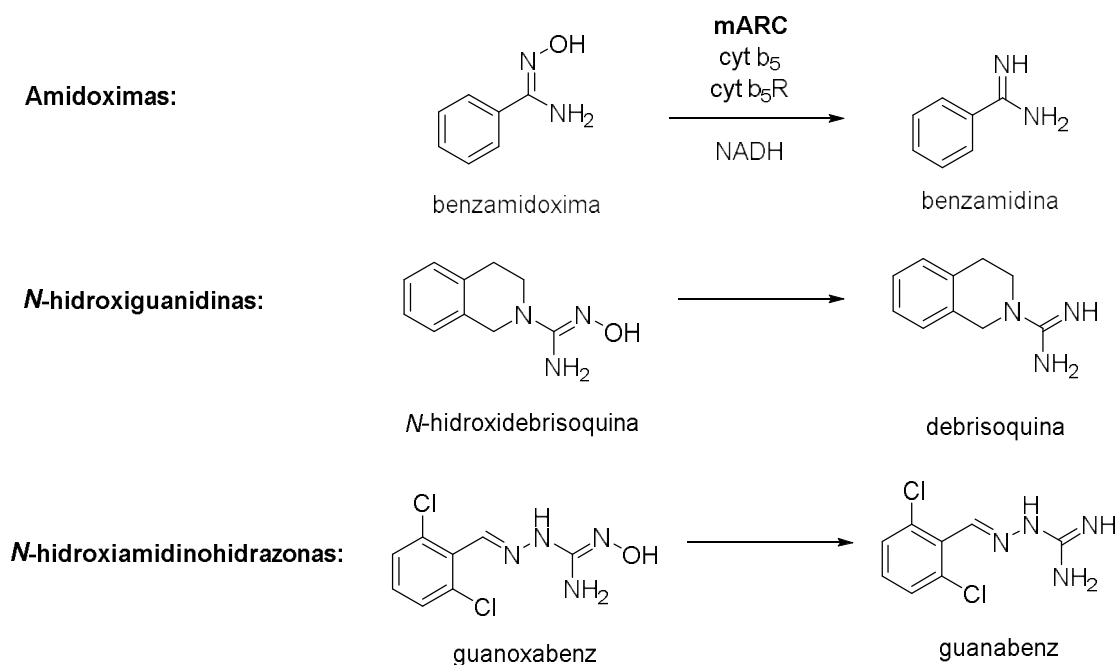


Figura 3.6: Metabolismo de *N*-hidroxiamidinas y *N*-hidroxiguanidinas por el complejo mARC^{29b}

Para comprobar si el compuesto *N*-hidroxilado **33e** podría metabolizarse con el complejo mARC, se llevaron a cabo estudios *in vitro* de metabolismo de **33e** con microsomas y fracciones mitocondriales humanas siguiendo el protocolo descrito por Clement *et al.*^{29h} Dichos estudios fueron realizados por el Dr. Tomás Herraiz del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del CSIC. En estos ensayos, los metabolitos se analizaron y cuantificaron por HPLC usando los compuestos de partida y metabolitos esperados como patrones internos.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

En primer lugar, se puso a punto el ensayo y se validó estudiando la reducción de la benzamidoxima a benzamidina (ambos productos comerciales, **Figura 3.6**), obteniéndose resultados similares a los descritos en la literatura³¹. Una vez validado el ensayo, se llevó a cabo el ensayo con el compuesto **33e** tomando el compuesto **2** como metabolito final esperado en dicha reacción (**Figura 3.7**). Después de 50 minutos de incubación con microsomas humanos en presencia de NADH en una concentración de 1.2 mM no se detectó ningún metabolito y solo se detectó el producto de partida **33e**. Estos resultados indican que el complejo mARC no metaboliza la 1-hidroxi-2-iminoimidazolidina **33e** *in vitro*, por lo que dicho compuesto posiblemente no se active por esa vía metabólica (o por ninguna) *in vivo*, aunque otras vías metabólicas no se puedan descartar.

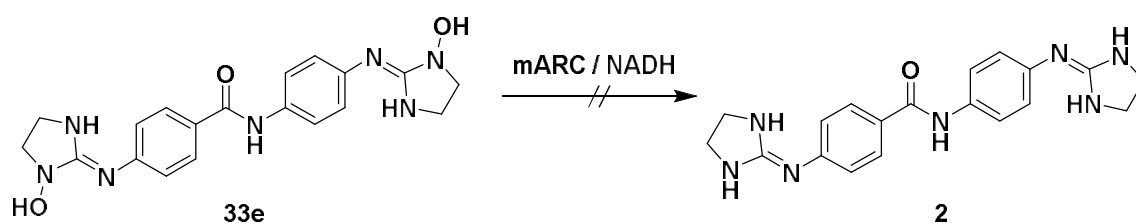


Figura 37: Hipótesis de partida sobre el metabolismo de **33e** por el complejo mARC.

En conclusión, parece que el derivado **33e** no se metaboliza (al menos por el mecanismo propuesto como hipótesis en esta tesis) al compuesto cabeza de serie **2**, sugiriendo que su actividad *in vivo* en los modelos murinos de TAH se debe a su actividad antiparasitaria intrínseca nada desdeñable (i.e., $CI_{50} = 0.888 \mu\text{M}$ contra *T. b. rhodesiense*). Para corroborar estos datos, el compuesto **33e** fue enviado al Instituto Tropical Suizo para realizar un ensayo de farmacocinética en ratones con el fin de determinar su metabolismo *in vivo*. Dicho ensayo no había concluido en el momento de escribir esta memoria por lo que seguimos pendientes de analizar estos resultados.

3.8 Discusión de los resultados

Se han sintetizado una nuevas series de derivados 1-alcoxilados de las bis(2-iminoimidazolidinas) cabezas de serie **2** – **5** fueron sintetizadas con el fin de mejorar su actividad *in vivo* en la segunda fase de la enfermedad del sueño. Para combatir esta fase de la enfermedad, que se caracteriza por la presencia de parásitos en el cerebro y en el fluido cerebroespinal, se hacen necesarios fármacos capaces de cruzar la BHE. Sabemos que las bisimidazolidinas son compuestos dicatiónicos que estarán protonados a pH fisiológico; por consiguiente, su permeabilidad en la BHE se ve comprometida. En esta tesis, hemos demostrado que los derivados *N*-alcoxilados poseen un valor de pK_a hasta 2 unidades menor en comparación con los compuestos cabezas de serie sin sustituir. Por lo tanto,

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

estos nuevos derivados estarán menos ionizados a pH fisiológico, lo cual puede traducirse en una mayor biodisponibilidad en el SNC en los ensayos *in vivo*. Hemos observado cierta correlación entre el pK_a de nuestros compuestos y su actividad *in vivo* en el modelo murino de fase tardía de la enfermedad del sueño, lo que era lo esperado según la hipótesis planteada en esta tesis. Así, el compuesto **33e**, el cual tiene solo un 50% de ionización a pH 7.4, fue el compuesto más activo de la serie en dicho ensayo. Aunque los compuestos **33a-c** poseen valores de pK_a similares al compuesto **33e** resultaron inactivos *in vivo* probablemente debido al conjunto de dos factores: una ausencia de bioactivación metabólica y una baja actividad intrínseca ($CI_{50} > 10 \mu M$).

Es interesante resaltar que los compuestos más activos sobre *T. brucei*, tanto *in vitro* como *in vivo*, fueron los derivados *N*-hidroxilados **33e** – **36e**. Dichos derivados consiguieron aumentar el tiempo de recaída en la parasitemia en el modelo STIB900 de TAH mientras que el compuesto **33e** fue curativo en dicho ensayo. Por este buen resultado, este compuesto fue ensayado *in vivo* en el modelo murino de la fase tardía de la enfermedad. En este modelo el compuesto **33e** aumentó el tiempo de recaída de la parasitemia en 143 - 171%, a diferencia del compuesto cabeza de serie **2** que no presentó actividad en esta fase de la enfermedad.

Dado los resultados del compuesto **33e** en los ensayos *in vivo* y los resultados de la medida de pK_a que indican un menor porcentaje de ionización a pH fisiológico, se decidió medir la permeabilidad de este compuesto, del cabeza de serie **2** y de la pentamidina (como fármaco de referencia) en un modelo *in vitro* de BHE humana: el modelo hCMEC/D3^{27b}. El valor de permeabilidad medido para la pentamidina ($P_e = 1.48 \times 10^{-3}$ cm/min) resultó consistente con los datos *in vivo* descritos en la literatura; Sanderson et al. mostraron que la pentamidina es capaz de atravesar la BHE hasta cierto punto aunque parte del fármaco queda atrapado en el interior de las células endoteliales capilares. Además, dicho fármaco es también sustrato de las P-gp y la proteína asociada a resistencia múltiple de fármacos (MRP)²⁸. La permeabilidad medida para el compuesto cabeza de serie **2** ($P_e = 2.17 \times 10^{-3}$ cm/min) fue ligeramente superior a la de la pentamidina; sin embargo, esta permeabilidad sigue siendo baja lo que se traduce por una ausencia de actividad *in vivo* a nivel del SNC (i.e., en el modelo murino GVR35). Estos datos confirman que los compuestos cabeza de serie dicatiónicos (tanto **2** como la pentamidina) tienen escasa permeabilidad en la BHE y que no se alcanza la dosis curativa en el cerebro de los animales infectados, explicando la recaída en la parasitemia de los animales tratados con estos fármacos. Al igual que la pentamidina, la participación de transportadores de entrada (Ej. “human organic cation transporter”, hOCT1)²⁸ o excreción (P-gp; MRP) podría ser responsable de la distribución

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

de estos compuestos en el SNC. En el presente caso, el uso de una dosis más elevada *in vivo* para superar la baja biodistribución en el SNC no fue posible debido a problemas de toxicidad que podrían estar relacionados con la interacción de los compuestos con los hOCTs, como ya se observó con diamidinas relacionadas³².

Sorprendentemente, el compuesto **33e**, que posee actividad en la fase neurológica de la enfermedad del sueño, posee un valor de permeabilidad *in vitro* más bajo que el compuesto cabeza de serie **2** en el modelo hCMEC/D3 de BHE humana. En dicho modelo, los valores más altos de permeabilidad se midieron con los compuestos más básicos que están > 98% ionizados a pH fisiológico. En cambio, el compuesto **33e** (ionizado al 50% a pH 7.4) mostró una permeabilidad menor con dicho modelo de BHE. Estos datos aparentemente contradictorios podrían explicarse por la expresión diferenciada de transportadores y enzimas metabólicas de la BHE en ratones (i.e. modelos murinos de TAH) y humanos (modelo hCMEC/D3 de BHE humana). Por lo tanto, las diferencias entre especies podrían ser responsables de las diferencias observadas entre los resultados *in vitro* e *in vivo*. Podría ocurrir que **33e** penetre en el cerebro por un transportador específico que se expresa en ratones pero no en la línea celular hCMEC/D3 utilizada en el ensayo de permeabilidad³³. De hecho, se han observado leves diferencias con respecto a la expresión de transportadores ABC (“ATP-binding cassette”) entre dicha línea celular y microcapilares aislados de cerebro humano³⁴. Por otra parte, el hecho de que **33e** apenas se una a la HSA (<10%, por SPR), y posiblemente a las proteínas de tejido (Ej. cerebro humano), debería dar lugar a una “concentración plasmática libre” del compuesto más alta, lo que a su vez daría lugar a una mayor actividad *in vivo* en el modelo CNS de la enfermedad del sueño.

Por último, los ensayos *in vitro* sobre cepas resistentes de *T. brucei* que no expresan los transportadores TbAT1/P2 y HAPT (cepas TbAT1-KO y B48, respectivamente) mostraron que el derivado **33e** no depende de transportadores específicos para penetrar en el parásito mientras que la captación celular del cabeza de serie **2** depende en parte del transportador de aminopurinas TbAT1/P2. Estos datos implican que **2** es propenso a la resistencia cruzada con otros fármacos tripanocidas que utilizan este transportador (Ej. melarsoprol, diminaceno) a diferencia del derivado *N*-hidroxilado **33e** que no presenta esta limitación.

3.9 Conclusiones

El objetivo de este capítulo era optimizar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos cabeza de serie bis(2-iminimidazolidínicos) (**2 – 5**), más específicamente su permeabilidad en la BHE, con el fin de conseguir moléculas activas en la fase tardía (cerebral) de la TAH. Nuestra hipótesis de partida fue que dichos compuestos no llegaban a pasar la BHE por difusión pasiva por estar cargados a pH fisiológico. Para modular la polaridad de estos compuestos, probamos disminuir la basicidad de las moléculas mediante la introducción de sustituyentes *N*-alcoxi sobre el nitrógeno N1 de los anillos de imidazolidina. Por lo tanto, se sintetizaron 18 derivados *N*-alcoxilados de las bis(2-iminoimidazolidinas) cabeza de serie **2 – 5**. Siete de estos compuestos fueron sintetizados mediante un método “one pot” (**33a-b, 34b,d, 35^a y 36a,f**) y los restantes 11 compuestos fueron sintetizados siguiendo la misma ruta pero aislando las tioureas intermedias (**37 – 43**) para luego realizar la ciclación intramolecular. De esta manera se obtuvieron los compuestos **33c, 34a,c, 35b-c y 36b-c**; Los compuestos **33e-36e** fueron obtenidos por hidrólisis ácida del grupo THP presente en los compuestos **33c – 36c**.

Se midieron los pK_a s de los compuestos cabezas de serie y sus derivados *N*-hidroxilo y *N*-alcoxilos (**33a-b, 34a-b y 35a-b,e**) comprobándose que la introducción de sustituyentes alcóxilos (-OR, R = H, Me, Et) sobre el nitrógeno N1 de los anillos de imidazolidina reducía la basicidad de estas moléculas en aproximadamente 2 unidades de pK_a . Los compuestos cabeza de series poseen un pK_a en el rango 9.3 – 10.7 lo que supone un porcentaje de ionización a pH fisiológico superior al 99%. Nuestros derivados *N*-alcoxilados poseen un pK_a en el rango 7.3 – 8.3 lo que supone un menor porcentaje de ionización a pH fisiológico (en el rango 42 – 88%).

Entre todos estos compuestos, únicamente los 1-hidroxi derivados **33e – 36e** mostraron eficacia *in vivo* en la fase temprana de la enfermedad en ratones, logrando aumentar el tiempo de recaída en la parasitemia cuando fueron administrados intraperitonealmente. El derivado **33e** es el único que fue curativo para los ratones infectados cuando fue administrado a una dosis de 20 mg/Kg (ip). Debido este buen resultado, dicho compuesto fue ensayado en un modelo murino de la fase neurológica de la enfermedad del sueño. En este caso el compuesto **33e** fue capaz de aumentar el tiempo de recaída en la parasitemia aunque no llegó a ser curativo. En comparación, el compuesto cabeza de serie **2** no presentó actividad en esta fase de la enfermedad. Por lo tanto, podemos concluir que la sustitución del nitrógeno N1 del anillo de imidazolidina con grupos hidroxilo reduce la

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

basicidad de estas moléculas y a su vez mejora la actividad *in vivo* (i.e., la biodisponibilidad cerebral) en la fase neurológica de la enfermedad del sueño.

Otra propiedad interesante de estos compuestos *N*-hidroxilados es su baja citotoxicidad en comparación con los compuestos cabeza de serie, que se traduce por un mayor índice terapéutico y menos toxicidad *in vivo*.

Por último, hemos comprobado que el derivado más activo sintetizado en este capítulo (**33e**) no se metabolizaba *in vitro* por el complejo mARC tal como lo habíamos supuesto. Por lo tanto, parece que dicho compuesto no actúa como profármaco sino como fármaco gracias a su actividad intrínseca sobre *T. brucei* (CI₅₀ = 0.888 μM). Aunque todavía están pendientes los resultados del estudio *in vivo* de farmacocinética de **33e**, estos datos preliminares sugieren que los derivados *N*-hidroxilados de imidazolidina son una nueva clase de moléculas tripanocidas con un interesante potencial para la fase neurológica de la TAH.

3.10 Referencias bibliográficas

1. Nikolic, K.; Agbaba, D., Imidazoline antihypertensive drugs: selective i(1) -imidazoline receptors activation. *Cardiovasc. Ther.* **2012**, *30*, 209-216.
2. (a) Gómez-San Juan, A.; Botija, J. M.; Méndez, A.; Sotomayor, N.; Lete, E., C-N Bond forming reactions in the synthesis of substituted 2-aminoimidazole derivatives. *ARKIVOC* **2014**, *ii*, 44-56; (b) Mohanazadeh, F.; Nami, N.; Hosseini, S. S., Efficient synthesis of 2-arylamino-2-imidazolines and 2-aminobenzimidazoles with aminoiminomethanesulfonic acid derivatives. *Chinese J. Chem.* **2011**, *29* (5), 1055-1058; (c) Genc, M.; Servi, S., Microwave-induced synthesis of 2-aminoimidazolines under neat conditions. *Synth. Commun.* **2009**, *39* (18), 3263-3277; (d) David Crouch, R., Synthetic routes toward 2-substituted 2-imidazolines. *Tetrahedron* **2009**, *65* (12), 2387-2397; (e) Servi, S.; Genc, M., One-Pot Synthesis of iminoimidazolines under microwave irradiation solvent-free conditions. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 3173 - 3179.
3. Dardonville, C.; Goya, P.; Rozas, I.; Alasua, A.; Martín, M. I.; Borrego, M. J., New aromatic iminoimidazolidine derivatives as α1-adrenoceptor antagonists: a novel synthetic approach and pharmacological activity. *Bioorg. & Med. Chem.* **2000**, *8* (7), 1567-1577.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

4. (a) Ramuz, H. Pyridine derivatives. 1981; (b) Ramuz, H. 2-imino-imidazolidine derivatives. U.S. Patent 4,244,957, 1978.
5. Jung, F.; Delvare, C.; Boucherot, D.; Hamon, A., Cephalosporins with C-7-isocyanide dihalides : useful synthons for the introduction of amino heterocycles at C-7 - new routes to the synthesis of amino imidazoles. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2375-2378.
6. Cohnen, E. *N*-substituirte 2-Arylamino-imidazoline-(2). Verfahren zu deren Herstellung und neue Hydroxylamine als Zwischenprodukte. 2709720, 1978.
7. Jonnalagadda, S. B.; Choudary, V.; Bhattacharya, A. K., Kinetics and mechanism of the oxidation of aliphatic diamines by peroxodisulphate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 849 - 853.
8. Mascaraque, A.; Nieto, L.; Dardonville, C., Efficient one-pot synthesis of 1-alkoxy-2-arylaminoimidazolines from *N*-alkoxy-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzenesulfonamides and aryl isothiocyanates. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4571-4574.
9. Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M., 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373-6374.
10. Martin, N. I.; Woodward, J. J.; Marletta, M. A., NG-hydroxyguanidines from primary amines. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4035-4038.
11. Alanine, A.; Bourson, A.; Buttelmann, B.; Gill, R.; Heitz, M. P.; Mutel, V.; Pinard, E.; Trube, G.; Wyler, R., 1-Benzyloxy-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl-amines, a novel class of NR1/2B subtype selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3155-3159.
12. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective groups in organic synthesis*. 3rd ed.; Wiley Intersciences: 1999.
13. (a) Burnett, J. F.; Zahler, R. E., Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions. *Chem. Rev.* **1951**, *49*, 273-412; (b) Ma, C.; Zhang, Q.; Ding, K.; Xin, L.; Zhang, D., A novel DBU-promoted S-N-type Smiles rearrangement reaction under controlled microwave heating. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7476-7479.

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

14. Nieto, L.; Mascaraque, A.; Miller, F.; Glacial, F.; Rios Martinez, C.; Kaiser, M.; Brun, R.; Dardonville, C., Synthesis and antiprotozoal activity of *N*-alkoxy analogues of the trypanocidal lead compound 4,4-Bis(imidazolinylamino)diphenylamine with Improved Human Blood Brain Barrier Permeability. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 485-494.
15. Takimiya, K.; Yanagimoto, T.; Yamashiro, T.; Ogura, F.; Otsubo, T., Syntheses and properties of 11,11,12,12-tetracyano-2,6-anthraquinodimethane (TANT) and Its 9,10-dichloro Derivative as Novel Extensive Electron Acceptors. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1998**, *71*, 1431-1435.
16. Peter P. Fu, R. G. H., Dehydrogenation of polycyclic hydroaromatic compounds. *Chem. Rev.* **1978**, *78*, 317-359.
17. (a) Isobe, T.; Fukuda, K.; Ishikawa, T., Modified Guanidines as Potential Chiral Superbases. 1. Preparation of 1,3-disubstituted 2-iminoimidazolidines and the related guanidines through Chloroamidine Derivatives. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7770-7773; (b) Isobe, T.; Fukuda, K.; Ishikawa, T., Simple preparation of chiral 1,3-dimethyl-2-iminoimidazolidines (monocyclic guanidines) and applications to asymmetric alkylative esterification. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1729-1735.
18. Jackman, L. M.; Jen, T., Nuclear magnetic resonance spectroscopy. XIII. Amidines. VII. Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies on the tautomerism, geometrical isomerism, and conformation of some cyclic amidines, guanidines, and related systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2811-2818.
19. Ráz, B.; Iten, M.; Grether-Bühler, Y.; Kaminsky, R.; Brun, R., The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Trop.* **1997**, *68*, 139-147.
20. Rodríguez, F.; Rozas, I.; Kaiser, M.; Brun, R.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; García, R. N.; Dardonville, C., New bis(2-aminoimidazoline) and bisguanidine DNA minor groove binders with potent *in Vivo* antitrypanosomal and antiplasmodial activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 909-923.
21. (a) Wang, M. Z.; Saulter, J. Y.; Usuki, E.; Cheung, Y.-L.; Hall, M.; Bridges, A. S.; Loewen, G.; Parkinson, O. T.; Stephens, C. E.; Allen, J. L.; Zeldin, D. C.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Parkinson, A.; Paine, M. F.; Hall, J. E., CYP4F enzymes are the major enzymes in

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

human liver microsomes that catalyze the *O*-demethylation of the antiparasitic prodrug DB 289 [2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-*O*-methylamidoxime]. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1985-1994; (b) Degardin, M.; Wein, S.; Durand, T.; Escale, R.; Vial, H.; Vo-Hoang, Y., *N*-substituted bis-*C*-alkyloxadiazolones as dual effectors: Efficient intermediates to amidoximes or amidines and prodrug candidates of potent antimalarials. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5233-5236.

22. de Koning, H. P.; Jarvis, S. M., Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Act. Trop.* **2001**, *80*, 245-50.

23. De Koning, H. P., Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 586-592.

24. De Koning, H. P., Ever-increasing complexities of diamidine and arsenical crossresistance in African trypanosomes. *Trends Parasitol.* **2008**, *24*, 345-9.

25. Thuita, J. K.; Karanja, S. M.; Wenzler, T.; Mdachi, R. E.; Ngotho, J. M.; Kagira, J. M.; Tidwell, R.; Brun, R., Efficacy of the diamidine DB75 and its prodrug DB289, against murine models of human African trypanosomiasis. *Acta Trop.* **2008**, *108*, 6-10.

26. Jennings, F. W.; Gray, G. D., Relapsed parasitaemia following chemotherapy of chronic *T. brucei* infections in mice and its relation to cerebral trypanosomes. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **1983**, *7*, 147-154.

27. (a) Cucullo, L.; Couraud, P. O.; Weksler, B.; Romero, I. A.; Hossain, M.; Rapp, E.; Janigro, D., Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2008**, *28*, 312-328; (b) Poller, B.; Gutmann, H.; Krahenbuhl, S.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P. O.; Tuffin, G.; Drewe, J.; Huwyler, J., The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 1358-1368; (c) Weksler, B. B.; Subileau, E. A.; Perriere, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M.; Tricoire-Leignel, H.; Nicotra, A.; Bourdoulous, S.; Turowski, P.; Male, D. K.; Roux, F.; Greenwood, J.; Romero, I. A.; Couraud, P. O., Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* **2005**

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Nov;19:1872-1874. Epub 2005 Sep 1. **2005**, 19, 1872-1784; (d) Weksler, B. B.; Subileau, E. A.; Perriere, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M.; Tricoire-Leignel, H.; Nicotra, A.; Bourdoulous, S.; Turowski, P.; Male, D. K.; Roux, F.; Greenwood, J.; Romero, I. A.; Couraud, P. O., Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005 Nov;19:1872-4. Epub 2005 Sep 1. **2005**, 19 (13), 1872-4.

28. Sanderson, L.; Dogruel, M.; Rodgers, J.; De Koning, H. P.; Thomas, S. A., Pentamidine movement across the murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein, and multidrug resistance-associated protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 329, 967-977.

29. (a) Reeh, C.; Wundt, J.; Clement, B., *N,N'*-dihydroxyamidines: a new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6730-6734; (b) Havemeyer, A.; Lang, J.; Clement, B., The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab. Rev.* **2011**, 43, 524-539; (c) Gruenewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Schwering, U.; Mendel, R. R.; Clement, B., The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 8173-8177; (d) Midgley, I.; Fitzpatrick, K.; Taylor, L. M.; Houchen, T. L.; Henderson, S. J.; Wright, S. J.; Cybulski, Z. R.; John, B. A.; McBurney, A.; Boykin, D. W.; Trendler, K. L., Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2,5-bis[4-(*N*-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride). *Drug Metab. Dispos.* **2007**, 35, 955-967; (e) Saulter, J. Y.; Kurian, J. R.; Trepanier, L. A.; Tidwell, R. R.; Bridges, A. S.; Boykin, D. W.; Stephens, C. E.; Anbazhagan, M.; Hall, J. E., Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, 33, 1886-1893; (f) Frohlich, A. K.; Girreser, U.; Clement, B., Metabolism of benzamidoxime (*N*-hydroxyamidine) in human hepatocytes and role of UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* **2005**, 35, 17-25; (g) Clement, B.; Mau, S.; Deters, S.; Havemeyer, A., Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab. Dispos.* **2005**, 33, 1740-1747; (h) Clement, B., Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab. Rev.* **2002**, 34, 565-579; (i) Boykin, D. W.; Kumar, A.;

Síntesis y estudio de derivados 1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos

Hall, J. E.; Bender, B. C.; Tidwell, R. R., Anti-pneumocystis activity of bis-amidoximes and bis-O-alkylamidoximes prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 3017-3020.

30. Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B., Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34796-34802.

31. (a) Neve, E. P.; Nordling, A.; Andersson, T. B.; Hellman, U.; Diczfalusy, U.; Johansson, I.; Ingelman-Sundberg, M., Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6307-6317; (b) Kurian, J. R.; Bajad, S. U.; Miller, J. L.; Chin, N. A.; Trepanier, L. A., NADH cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 1171-1178.

32. Ming, X.; Ju, W.; Wu, H.; Tidwell, R. R.; Hall, J. E.; Thakker, D. R., Transport of cationic drugs pentamidine and furamidine by human organic cation transporters. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 424-430.

33. Ohtsuki, S.; Ikeda, C.; Uchida, Y.; Sakamoto, Y.; Miller, F.; Glacial, F.; Decleves, X.; Scherrmann, J.-M.; Couraud, P.-O.; Kubo, Y.; Tachikawa, M.; Terasaki, T., Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction Proteins for Validation of Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood-Brain Barrier Model. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 289-296.

34. Dauchy, S.; Miller, F.; Couraud, P. O.; Weaver, R. J.; Weksler, B.; Romero, I. A.; Scherrmann, J. M.; De Waziers, I.; Decleves, X., Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 897-909.

*4. SÍNTESIS Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD
TRIPANOCIDA DE DERIVADOS DE N-ALCOXI Y N-
ALQUILGUANIDINAS.*

4. Síntesis y estudio de la actividad tripanocida de derivados de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

4.1 Antecedentes sobre la síntesis de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

El potencial antiparasitario de los derivados de guanidina ha sido descrito en numerosas ocasiones desde hace más de 60 años¹. Dichos compuestos, al igual que los derivados 2-aminoimidazolínicos descritos en la capítulo 3 de esta tesis, son compuestos muy básicos que estarán protonados a pH fisiológico². De la misma manera, la *N*-alquilación o *N*-alcoxilación del grupo guanidina debería modular la basicidad de estos compuestos así como su lipofilia. Según nuestra hipótesis, estas modificaciones deberían tener un efecto positivo sobre la actividad tripanocida de estos derivados en la fase cerebral de la TAH. Por lo tanto, decidimos preparar dos series de derivados *N*-alcoxi y *N*-alquilo de los compuestos cabeza de serie **7** y **8** para probar esta hipótesis.

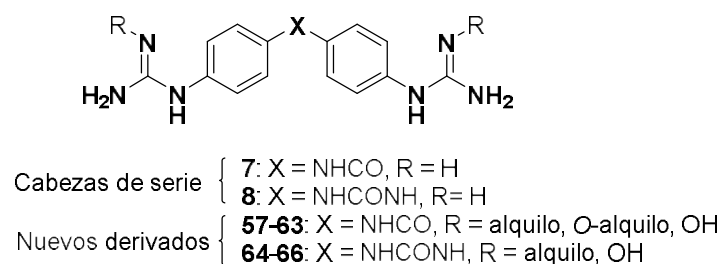


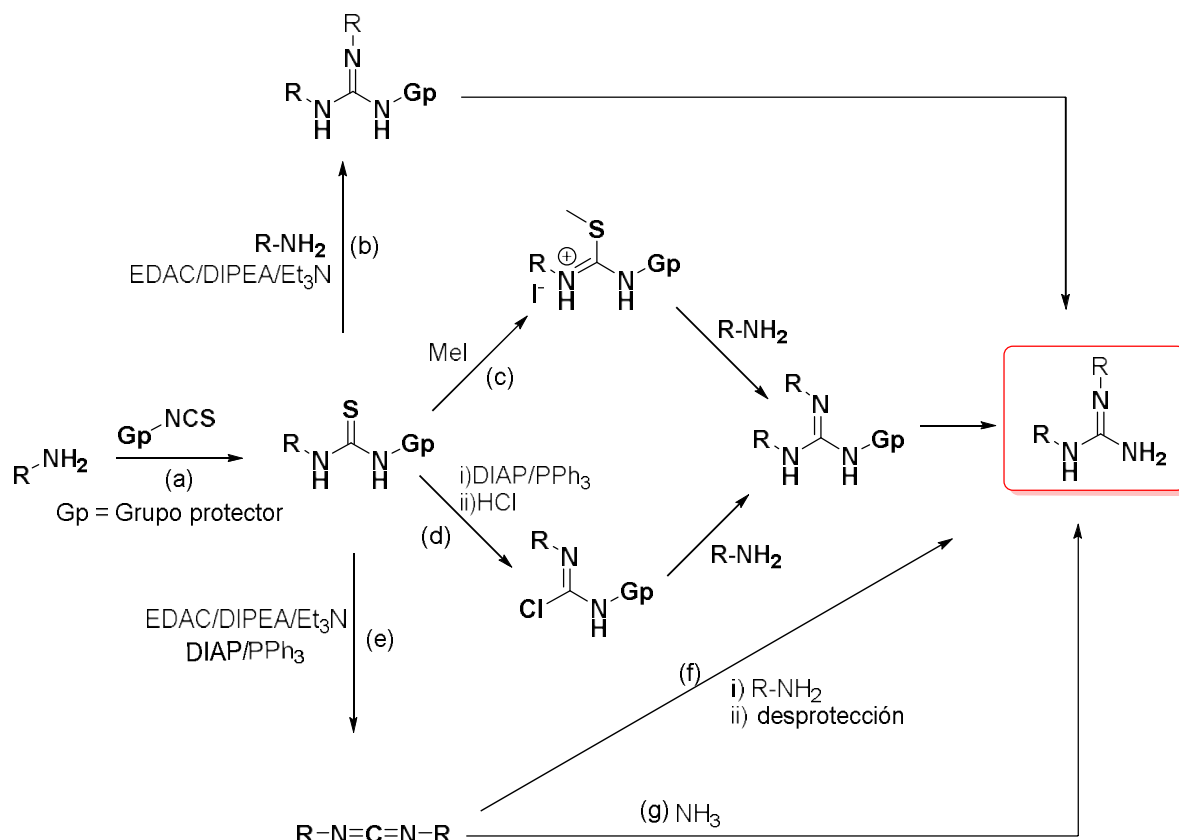
Figura 4.1: Estructuras de los compuestos cabeza de serie **7-8** y sus nuevos derivados.

En la literatura se han descrito diferentes rutas para la síntesis de guanidinas *N*-sustituidas. En su mayoría, las rutas sintéticas empiezan con la formación de una tiourea 1,3-disustituida obtenida a partir de la reacción de una amina primaria con un isotiocianato (Esquema 4.1, a). A continuación, la tiourea se puede activar de diferentes maneras (b-e) para reaccionar con aminas primarias dando lugar a las guanidina di- o trisustituidas. Linton *et al.* preparan la tiourea protegida como carbamato (a, b), para luego hacerla reaccionar con diferentes tipos de aminas, formando así la guanidina protegida que tras una desprotección conduce a la guanidina disustituida³. Sambrok *et al.* activan la tiourea como sal de isotiuronio (c) la cual reacciona luego con una amina primaria (alifática o aromática) o una alcoxiamina, obteniéndose las *N*-alquil y *N*-alcoxi guanidinas trisustituidas (Esquema 4.1)⁴. Otras alternativas consisten en formar una carbodiimida mediante desulfuración de la tiourea (e), o preparar derivados de 1-cloroformamidina (d) que luego se hacen reaccionar con una amina primaria para obtener la guanidina correspondiente⁵. Es de mencionar que estas rutas conllevan a la formación de guanidinas trisustituidas. Barvian *et al.* preparan en su síntesis guanidinas

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

trisustituidas a partir de la carbodiimida en donde uno de los grupos R es un grupo protector y una amina (f). En este caso, el último paso de la síntesis es una reacción de desprotección que da lugar a la guanidina disustituida⁶. Por el contrario Dangate *et al.* hacen reaccionar la carbodiimida obtenida a partir de la tiourea con amoníaco para obtener así la guanidina disustituida (g)⁷.

Esquema 4.1

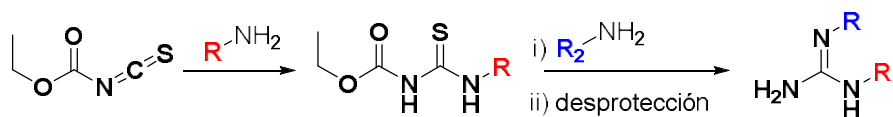


4.2 Síntesis de las *N*-alquil y *N*-alcoxiguanidinas (52 - 61).

La síntesis de las *N*-alquil y *N*-alcoxiguanidinas disustituidas se llevó a cabo siguiendo la metodología de Linton *et al.*³ (Esquema 4.2). El primer paso consiste en la formación de una etoxycarboniltiourea por reacción entre una amina primaria y etoxycarbonilisotiocianato. Luego, la tiourea puede reaccionar con diferentes alquil- y alquiloaminas en presencia de clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDAC) dando lugar a las guanidinas correspondientes. A continuación, la desprotección de la guanidina se puede llevar a cabo en medio básico (KOH) o ácido (i.e., ácido de Lewis)^{1d}.

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

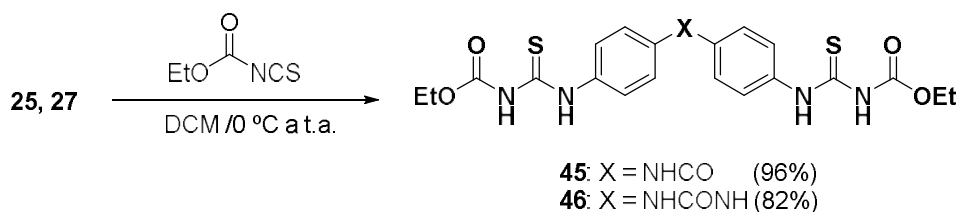
Esquema 4.2



4.2.1 Síntesis de las bis-(etoxicarboniltiureas) (45 - 46)

Las diaminas **25** y **27** se hicieron reaccionar con un exceso (2.2 equiv.) de isotiocianato de etoxicarbonilo comprobándose la formación de los productos por HPLC-MS. Las etoxicarboniltiureas son insolubles en el disolvente de reacción por lo que se purificaron por simple filtración, obteniéndose **45** y **46** con buenos rendimientos (Esquema 4.3)^{1d}.

Esquema 4.3

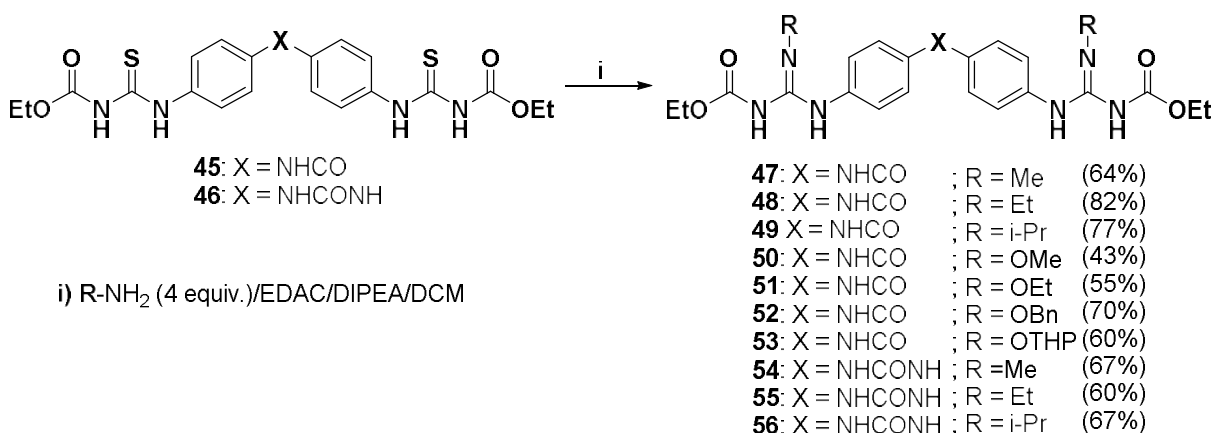


4.2.2 Síntesis de las 2-alcoxi-3-etoxicarbonilguanidinas y 2-alquil-3-etoxicarbonilguanidinas (47 - 56).

Las *N*-alquilguanidinas **47 - 49** y **54 - 56** y las *N*-alcoxi guanidinas **50 - 53**, (Esquema 4.4) se obtuvieron por reacción de las etoxicarboniltiureas **45** y **46** con un exceso (4 equiv.) de las alquil o alcoxi aminas correspondientes en presencia de EDAC y DIPEA. La purificación de las guanidinas con espaciador de tipo benzamida (compuestos **47 - 53**) se realizó por cromatografía flash sobre sílice con DCM/AcOEt (100/0 \rightarrow 90/10). Para las guanidinas con espaciador de tipo fenilurea (**54 - 56**), se utilizó un eluyente más polar: DCM/MeOH (100/0 \rightarrow 90/10), obteniéndose los productos finales con buen rendimiento (Esquema 4.4).

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

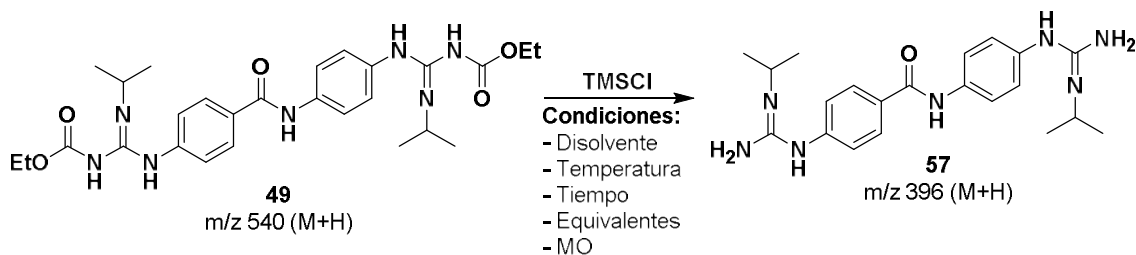
Esquema 4.4



4.2.3 Optimización de las condiciones de desprotección del grupo etoxicarbonilo para generar las *N*-alquil y *N*-alcoxiguanidinas (57 – 66) y sus hidroccloruros.

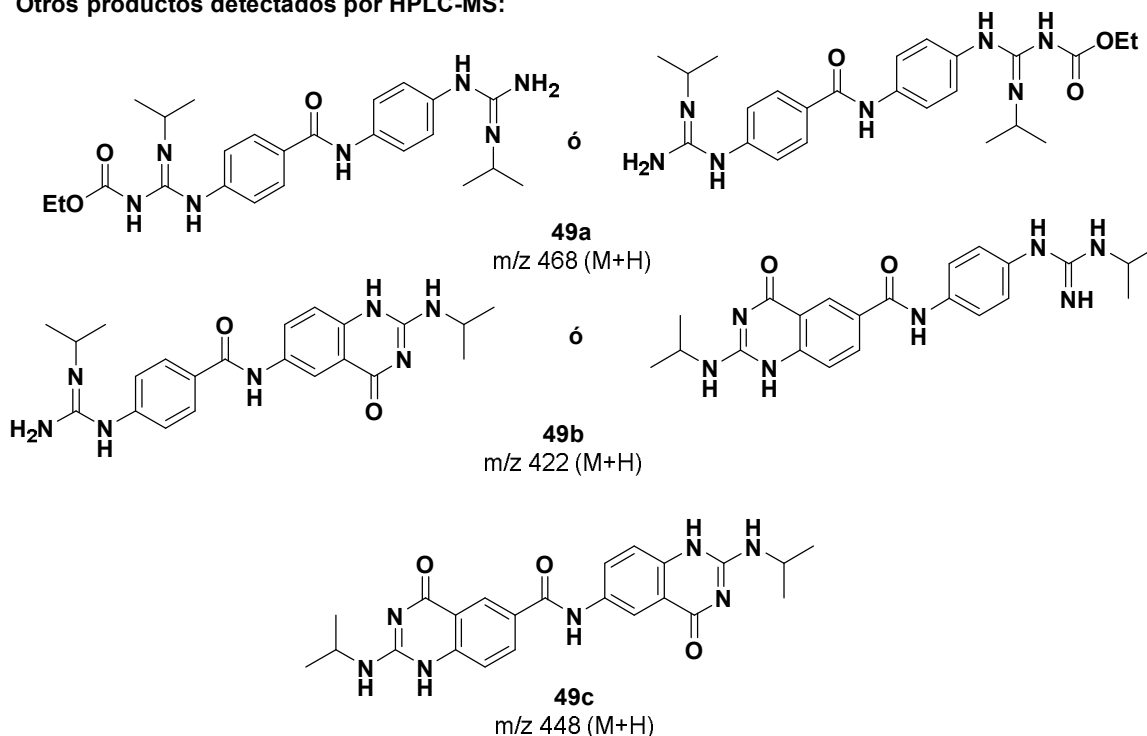
El procedimiento empleado para la síntesis de las 3-etoxicarbonilguanidinas ha demostrado ser útil para cualquiera de las hidroxilaminas o alquilaminas mencionadas. Sin embargo, fue necesario optimizar las condiciones para la hidrólisis de los restos etoxicarbonilo para dar lugar a las *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas finales. Se probaron dos estrategias de desprotección del grupo etoxicarbonilo. La primera metodología descrita por Zeghida *et al.* utiliza ácidos de Lewis como el cloruro o el bromuro de trimetilsililo (TMSCl y TMSBr, respectivamente)⁸. Se decidió probar con TMSCl ya que directamente obtendríamos nuestros compuestos en forma de hidroccloruros. Se utilizó el compuesto **49** para la búsqueda de estas condiciones. Para obtener la total desprotección del grupo etoxicarbonilo, se utilizaron diferentes condiciones de reacciones obteniéndose mezclas los compuestos **49a** – **49c** y **57** (Esquema 4.5) que se detallan en la Tabla 4.1. En esta tabla se muestra un resumen de la condiciones que se probaron (estequiometría, disolvente, temperatura, tiempo de reacción, microondas) y el porcentaje de los productos de reacción que se observaron por HPLC-MS según el esquema 4.5.

Esquema 4.5



Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

Otros productos detectados por HPLC-MS:



La masa observada m/z 396 (M+H) corresponde a la estructura del producto deseado totalmente desprotegido **57**. También se observaron los iones moleculares m/z 422 (M+H) y 448 (M+H). El ion molecular m/z 422 concuerda con una de las estructuras **49b** propuestas para la desprotección del grupo etoxicarbonilo en un lado de la molécula, mientras que en el otro extremo se ha formado un anillo de 2-isopropilaminoquinazolinona. Esto se debe probablemente a una reacción competitiva de Friedel-Craft intramolecular que se puede dar entre el anillo aromático y el resto etoxicarbonilo⁹. El ion molecular m/z 448 concuerda con la estructura **49c** en donde este heterociclo se ha formado en ambos lados de la molécula. En la tabla 4.1 se presentan las condiciones que se probaron para la desprotección de los restos etoxicarbonilo. Se observó que cuando la reacción se llevó a cabo en DMF durante 60 minutos a 130 °C utilizando microondas (MO) como fuente de energía, se obtenían mezclas de producto proveniente de la reacción de desprotección y de la reacción de ciclación intramolecular. En el cromatograma se observó que los picos con $t_r = 1.47$ min y $t_r = 1.92$ min poseían la misma $m/z = 422$ (M+H). Esto puede deberse a que el compuesto **49** no es simétrico y por lo tanto la ciclación se puede dar de un lado u otro de la molécula generándose dos posibles isómeros **49b** con tiempos de retenciones diferentes. También se observó que a esta temperatura de reacción el producto mayoritario era **49c**, proveniente de la doble reacción de ciclación.

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

Tabla 4.1: Condiciones de reacción y productos detectados durante la optimización de la desprotección del resto etoxicarbonilo utilizando TMSCl.

Condiciones de reacción					Compuestos observados por HPLC-MS		
Disolv.	T (°C)	MO	tiempo (min)	TMSCl (equiv.)	Compuesto	m/z (M+H)	% (UV)
DMF	130	si	60	8	57	396	22
					49b (t.r. = 1.47 min)	422	10
					49b (t.r. = 1.92 min)	422	17
					49c	448	51
DMF	80	si	20	10	57	396	74
					49a	468	21
					49	540	4
DMF	80	si	40	10	57	396	89
					49a	468	11
					49	540	0
DMF	80	si	60	10	57	396	96
DMF	80	si	60	10	49a	468	4
MeCN	100	si	10	10	49	540	74
MeCN	100	si	20	10	49a	468	44
					49	540	56
MeCN	100	si	30	10	49a	468	55
					49	540	45

Por tal motivo, se decidió disminuir la temperatura y probar la reacción en otros disolventes. Cuando se utilizó MeCN como disolvente y 10 equivalentes de TMSCl a 100 °C durante 30 minutos, se observó la desprotección de un solo grupo etoxicarbonilo, obteniéndose **49a** (55%) y el producto de partida **49**. Cuando se realizó el experimento con DMF a 80 °C, se observó que a los 40 min de reacción, ya se obtenía 89% del compuesto deseado **57** y no se observaba ningún producto de ciclación. Dejando la reacción durante 60 min se obtuvo el producto desprotegido **57** en un 95%. Por tal motivo, se decidió utilizar estas condiciones para la desprotección de los compuestos **47** – **56**. Sin embargo, nuestros intentos para reproducir aquellos resultados con bisguanidinas que llevan sustituyentes (ie, R = Et, OEt, OBn) distintos a los descritos por Zeghida *et al.* no fueron exitosos⁹. Utilizando estas mismas condiciones, se volvieron a tener mezclas de productos de desprotección y quinazolinonas. Aparentemente, el método de

Síntesis y estudio de N-alcoxi y N-alquilguanidinas

desprotección del grupo etoxicarbonilo con TMSCl es muy dependiente del sustituyente presente sobre el amino N' de la guanidina. Debido al poco éxito obtenido en la desprotección de los grupos etoxicarbonilos con TMSCl, pasamos a estudiar otro método que consiste en la hidrólisis básica del grupo etoxicarbonilo con una mezcla de KOH (0.1 M o 1 M) en EtOH o MeOH^{1d}. Dicho método genera los compuestos en forma de base libre. De la misma forma que en el caso anterior, la búsqueda de condiciones se llevó a cabo con el compuesto **49** como se muestra en la Tabla 4.2.

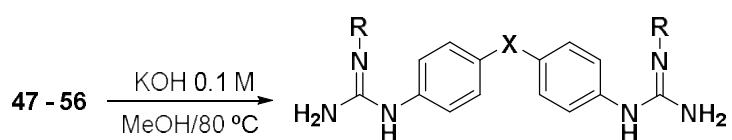
Tabla 4.2: Condiciones de reacción y productos detectados durante la optimización de la desprotección del resto etoxicarbonilo utilizando KOH.

Condiciones de reacción						Compuestos observados por HPLC-MS		
Disolv.	T (°C)	MO	tiempo (min)	KOH (Equiv.)	KOH Conc. (M)	Cmpto	m/z (M+H)	% UV
EtOH	80	si	25	10	1	49a	468	56
						49	540	44
EtOH	80	si	45	10	1	49a	468	76
						49	540	24
EtOH	80	si	60	10	1	49a	468	80
						49	540	20
MeOH	80	no	720	10	0.1	57	396	100

El análisis de los productos de reacción por HPLC-MS mostró que en una hora de reacción en estas condiciones (KOH 1M/EtOH/80 °C/MO), mayoritariamente se formaba la estructura **49a** proveniente de la desprotección de uno de los grupos etoxicarbonilo (m/z 468). Al cambiar el etanol por el metanol utilizando una concentración más baja de KOH (0.1M) y calentando a 80 °C (sin MO) durante 12 horas se logró la total desprotección del compuesto **49**, obteniéndose por recristalización el compuesto **57** con buen rendimiento y pureza satisfactoria. Dichas condiciones de desprotección se usaron con éxito para la desprotección de las etoxicarbonilguanidinas **47** – **56**, obteniéndose las bisguanidinas **57** – **66** con buenos rendimientos (Esquema 4.6).

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

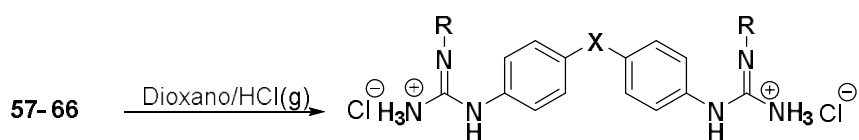
Esquema 4.6



57:	X = NHCO	; R = i-Pr	(77%)
58:	X = NHCO	; R = Et	(64%)
59:	X = NHCO	; R = Me	(77%)
60:	X = NHCO	; R = OMe	(43%)
61:	X = NHCO	; R = OEt	(55%)
62:	X = NHCO	; R = OBn	(70%)
63:	X = NHCO	; R = OTHP	(60%)
64:	X = NHCONH	; R = Me	(90%)
65:	X = NHCONH	; R = Et	(67%)
66:	X = NHCONH	; R = i-Pr	(60%)

Mediante la metodología de desprotección en medio básico, se obtuvo la forma neutra de estas moléculas. Para conferir mayor estabilidad a los compuestos y facilitar su disolución en agua para los ensayos biológicos, fueron preparadas los hidroccloruros de todas las bisguanidinas desprotegidas usando una disolución de dioxano saturado con HCl(g) (Esquema 4.7).

Esquema 4.7



57a:	X = NHCO	; R = i-Pr
58a:	X = NHCO	; R = Et
59a:	X = NHCO	; R = Me
60a:	X = NHCO	; R = OMe
61a:	X = NHCO	; R = OEt
62a:	X = NHCO	; R = OBn
63a:	X = NHCO	; R = OH
64a:	X = NHCONH	; R = Me
65a:	X = NHCONH	; R = Et
66a:	X = NHCONH	; R = i-Pr

De esta manera se obtuvieron los hidroccloruros 57a - 66a que fueron recristalizadas de DCM. Es de mencionar que el compuesto 63a proviene de la desprotección del grupo tetrahidropiranóxido de 63 dando a lugar al derivado con el *N*-hidroxilo libre.

4.3 Ensayos biológicos

4.3.1 Actividad *in vitro* de las bisguanidinas contra *T. b. rhodesiense* y *P. falciparum*

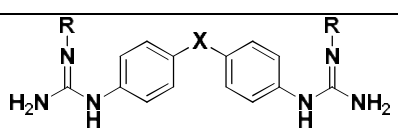
Los compuestos **57** – **66** fueron ensayados sobre el parásito *T. b. rhodesiense* utilizando el ensayo del “Alamar blue” detallado en el capítulo 3.5.1.1. La citotoxicidad de los compuestos se midió sobre células L6 de rata lo que permitió calcular el índice de selectividad hacia el parásito (Tabla 4.3). Estos compuestos fueron ensayados tanto en su forma de base libre como en forma de hidrocloreuro. No se apreció ninguna diferencia significativa entre las dos formulaciones de estos compuestos. Además, se decidió evaluar también la actividad antimalárica de estas bisguanidinas puesto que, en estudios anteriores, los compuestos cabeza de serie precursores **7** y **8** mostraron actividades en el rango nanomolar sobre el parásito plasmodio. Así pues, se midió la actividad antimalárica usando la cepa NF54 de *P. falciparum* (ie, cepa sensible a la cloroquina) con el ensayo de incorporación de [³H]hipoxantina¹⁰. Los resultados se presentan en la Tabla 4.3.

Todas las bisguanidinas con sustituyentes *N*-alquilo presentaron actividad contra *T. b. rhodesiense* en el rango submicromolar (Tabla 4.3). En particular, los compuestos con sustituyentes etilo (**58a**, **65a**) e isopropilo (**57a**, **66a**) resultaron altamente eficaces con CI_{50} en el rango nanomolar y altos índices de selectividad ($IS > 1000$). Estos resultados suponen unas actividades entre 2 y 3 veces superiores a las de los compuestos cabezas de serie sin sustituir (**7**, **8**). En cambio, las bisguanidinas con sustituyentes *N*-hidroxi y *N*-alcoxilo ($R = OH, OMe, OTHP, OBn$) resultaron poco activas contra el parásito a excepción del compuesto **62** que presentó una actividad (CI_{50}) por debajo de $1 \mu M$ (Tabla 4.3). Cabe destacar que un espaciador de tipo amida entre los grupos 4-guanidinofenil (compuestos **7** y **57** – **63**) da actividades sobre *T. brucei* entre 5 y 10 veces mayores que un espaciador de tipo urea (compuestos **8** y **64** – **66**). Es de mencionar que todos los compuestos (salvo **63a**) presentaron baja citotoxicidad frente a células de mamífero.

En cuanto a la actividad contra *P. falciparum*, 9 compuestos presentaron actividad submicromolar contra este parásito, siendo los derivados sustituidos con etilo (**58**) e isopropilo (**57**) los más activos de la serie de la *N*-fenilbenzamida. En cambio, los derivados *N*-metilo (**64**) y *N*-etilo (**65**) fueron los más activos de los derivados de la urea **8**. De la misma manera que para la actividad sobre *T. brucei*, las bisguanidinas con sustituyentes *N*-hidroxilado y *N*-alcoxilo ($R = OH, OMe, OTHP, OBn$) resultaron menos activas contra *P. falciparum* con $CI_{50} > 1 \mu M$.

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

Tabla 4.3: Actividades *in vitro* de las bisguanidinas y sus hidrocloruros contra *T. b. rhodesiense* y *P. falciparum*.



Cmpto	X	R	<i>T. b. rhod.</i> ^a	<i>P. falc.</i> NF54 ^b	Citotox. L6 ^c	IS _{<i>T. brucei</i>} ^d
CI ₅₀ (µM)						
7 ^e	NHCO	H (2 HCl)	0,036 ^e	nd ^f	11,5 ^e	319
57a	NHCO	<i>i</i> Pr (2 HCl)	0,011	0,446	102,6	9327
58	NHCO	Et	0,011	0,318	135,7	12336
58a	NHCO	Et (2 HCl)	0,009	0,232	118,0	13111
59	NHCO	Me	0,563	2,01	165,7	294
59a	NHCO	Me (2 HCl)	0,177	1,02	172,8	976
60	NHCO	OMe	120,1	10,5	206,2	1,7
60a	NHCO	OMe (2 HCl)	56,0	7,5	141,0	2,5
61	NHCO	OBn	0,052	0,405	110,8	2130
62a	NCHO	OBn(2 HCl)	3,13	2,83	6,6	2,1
63	NHCO	OTHP	51,4	42,6	160,0	3,1
63a	NHCO	OH (2 HCl)	4,88	3,58	99,6	20,4
8^e	NHCONH	H (2 HCl)	0,187 ^e	nd ^g	> 235 ^e	> 1256
64	NHCONH	Me	0,381	0,322	223,7	587
64a	NHCONH	Me (2 HCl)	0,264	0,192	177,3	671
65	NHCONH	Et	0,146	0,301	157,8	1081
65a	NHCONH	Et (2 HCl)	0,090	0,397	116,4	1293
66a	NHCONH	<i>i</i> Pr (2 HCl)	0,049	0,437	125,6	2563

^a *T. brucei rhodesiense* STIB900 tripomastigotes. Control: melarsoprol, IC₅₀ = 0.008 µM; ^b *P. falciparum* cepa NF54 sensible a cloroquina, estado eritrocítico. Control: cloroquina, IC₅₀ = 0.006 µM; ^c Células de mioblastos esqueléticas de ratas. Control: podofilotoxina, IC₅₀ = 0.014 µM; ^d Índice de selectividad = [IC₅₀ (células L6) / IC₅₀ (*T. b. r.*)]; ^e Datos publicados previamente^{11,f} No determinado con esta cepa de plasmodio. CI₅₀ con *P. falciparum* K1 = 0.055 µM; ^g No determinado con esta cepa de plasmodio. CI₅₀ con *P. falciparum* K1 = 0.096 µM.

4.3.2 Actividad *in vivo* en la fase temprana (fase hemolinfática) de la TAH de las *N*-alquil y *N*-alcoxiguanidinas

Dados los buenos resultados en los ensayos *in vitro* contra *T. b. rhodesiense* de los compuestos **57a**, **58a**, **65a** y **66a**, se procedió a ensayar su eficacia *in vivo* en la primera fase de la enfermedad de sueño utilizando el modelo murino STIB900¹². El ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo anteriormente detallado (3.5.2.1). Los resultados de los ensayos se muestran en la siguiente Tabla.

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

Tabla 4.4: Actividad *in vivo* de los compuestos cabezas de serie **7–8** y de sus derivados *N*-sustituidos en el modelo murino de infección por *T. b. rhodesiense*.

Compuesto	X	R	Via de administración ^a	dosis (mg/kg)	Curado ^b /Infectado	Prom. de días de recaída ^c
Control	-	-	-	-	0/4	7 ^d
7^e	NHCO	H	ip	4 × 20	4/4 ^e	>60 ^e
8	NHCONH	H	ip	nd ^f	nd	nd
57a	NHCO	<i>i</i> Pr	ip	4 × 20	4/4	>60
58a	NHCO	Et	ip	4 × 20	4/4	>60
65a	NHCONH	Et	ip	4 × 20	0/3 ^g	18.3
66a	NHCONH	<i>i</i> Pr	ip	4 × 20	0/2 ^h	10

^a ip = intraperitoneal, po = per os. ^b Número de ratones que sobrevivieron y fueron libres de parásitos durante 60 días. ^c Promedio de días de recaída en la parasitemia. ^d Los ratones controles son siempre positivos (ie, con parasitemia) y son sacrificados el séptimo día del experimento. ^e Datos previamente reportados en la referencia [1]. ^f No determinado. ^g Un ratón murió después de la primera inyección. ^h Dos ratones murieron después de la cuarta inyección.

Los derivados de benzamida **57a** y **58a** fueron capaces de curar el 100% de los ratones infectados. En cambio, los derivados de difenilurea **65a** y **66a**, aunque presentaron actividad débil en esta fase, no fueron capaces de curar los ratones infectados y mostraron cierta toxicidad (véase Tabla 4.4). Estos resultados demuestran el potencial tripanocida de las *N*-alquilguanidinas derivadas de la benzamida **7**.

4.4 Discusión de los resultados y conclusiones

Una nueva serie de derivados *N*-alquilados y *N*-alcoxilados de las bisguanidinas **7** y **8** fueron sintetizados como posibles nuevos fármacos contra la enfermedad del sueño. Al igual que los *N*-alcoxi derivados de la bis(2-iminoimidazolidinas), la *N*-alquilación o *N*-alcoxilación del grupo guanidinio tiene la finalidad de disminuir la polaridad de estas moléculas (aumentando su lipofilia o bajando su pK_a , respectivamente) para facilitar su paso a través de la BHE.

Todos los compuestos fueron obtenidos con el nitrógeno N1 de la guanidina protegido con el resto etoxicarbonilo. Se comprobó que las mejores condiciones de desprotección de este resto eran una hidrólisis básica utilizando KOH y calentando la reacción a 80 °C. La utilización de TMSCl para la desprotección del resto etoxicarbonilo condujo a una mezcla

Síntesis y estudio de *N*-alcoxi y *N*-alquilguanidinas

del producto de desprotección y de una 2-(alquilamino)quinazolinona producto de una reacción competitiva de Friedel-Craft intramolecular que se puede dar entre el anillo aromático y el resto etoxicarbonilo. Los resultados de los ensayos *in vitro* contra *T. b. rhodesiense* mostraron que los derivados de guanidina con restos *N*-alcoxi eran inactivos mientras que los análogos con restos alquílicos, etilo (**58a**, **65a**) e isopropilo (**57a**, **66a**), eran los más eficaces contra este parásito, dando actividades en el rango nanomolar y una selectividad > 1000 hacía el parásito. Estos compuestos resultaron tener mejor actividad incluso que sus cabezas de serie **7** – **8**. Por tal motivo, estos compuestos fueron elegidos para probar su actividad en ensayos *in vivo* en un modelo murino de la fase hemolinfática de la enfermedad del sueño. Dos de los nuevos *N*-alquil derivados (**57a**, **58a**) del cabeza de serie **7** resultaron curativos *in vivo* en dicho modelo murino cuando fueron administrados por vía intraperitoneal a una dosis de 20 mg/Kg. Así pues, se comprobó nuevamente que los mejores candidatos tripanocidas poseían el espaciador de tipo benzamida.

Como se espera que los sustituyentes alquílicos mejoren la lipofilia de este tipo de compuestos, calculamos el coeficiente de partición octanol/agua (clogP) de dichos compuestos utilizando el programa ChemBioDraw. Se comprobó que **57a** y **58a** tenían una lipofilia más alta (clogP = 3.14 y 2.51, respectivamente) que el cabeza de serie **7** (clogP = 0.79), por lo que dichos compuestos son buenos candidatos para el ensayo *in vivo* en el modelo murino de fase tardía de la enfermedad del sueño.

4.5 Referencias bibliográficas

- (a) Hewitt, R. I.; Gumble, A., Experimental chemotherapy of trypanosomiasis; effect of *p*-phenylene diguanidine and related compounds against experimental infections with *Trypanosoma equiperdum*. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1949**, *96*, 305-314; (b) Safir, S. R.; Kushner, S.; Brancone, L. M.; Subbarow, Y., Experimental chemotherapy of trypanosomiasis. II. The preparation of compounds related to *p*-phenylenediguanidine. *J. Org. Chem.* **1948**, *13*, 924-932; (c) Stephens, C. E.; Brun, R.; Salem, M. M.; Werbovetz, K. A.; Taniou, F.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W., The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2065-2069; (d) Arafa, R. K.; Brun, R.; Wenzler, T.; Taniou, F. A.; Wilson, W. D.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W., Synthesis, DNA affinity, and antiprotozoal activity of fusedring dicationic compounds and their prodrugs. *J. Med.Chem.* **2005**, *48*, 5480-5488; (e) Arafa, R. K.; Wenzler, T.; Brun, R.; Chai, Y.; Wilson, W. D., Molecular modeling study and synthesis of novel dicationic flexible triaryl guanidines and imidamides as antiprotozoal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5852-5860; (f) Bi, X.; Lopez, C.; Bacchi, C. J.; Rattendi, D.; Woster, P.

Síntesis y estudio de N-alcoxi y N-alquilguanidinas

M., Novel alkylpolyaminoguanidines and alkylpolyaminobiguanides with potent antitrypanosomal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3229-3232.

2. Katritzky, A. R.; Rogovoy, B. V., Recent developments in guanylating agents. *ARKIVOC.* **2005**, *iv*, 49-87.

3. Linton, B. R.; Carr, A. J.; Orner, B. P.; Hamilton, A. D., A Versatile one-pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1566-1568.

4. Sambrook, M. R.; Beer, P. D.; Wisner, J. A.; Paul, R. L.; Cowley, A. R.; Szemes, F.; Drew, M. G. B., Anion-templated assembly of pseudorotaxanes: Importance of Anion Template, Strength of Ion-Pair Thread Association, and Macrocyclic Ring Size. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2292-2302.

5. Rauws, T. R.; Maes, B. U., Transition metal-catalyzed *N*-arylations of amidines and guanidines. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2463-2497.

6. Barvian, M. R.; Showalter, H. D. H.; Doherty, A. M., Preparation of *N,N'*-bis(aryl)guanidines from electron deficient amines via masked carbodiimides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6799-6802.

7. Dangate, P. S.; Akamanchi, K. G., *o*-Iodoxybenzoic acid mediated oxidative condensation: synthesis of guanidines using 1,3-disubstituted thiourea precursors. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6765-6767.

8. Zeghida, W.; Debray, J.; Michel, C.; Milet, A.; Dumy, P.; Demeunynck, M., Synthesis of *N*-acridinyl-*N'*-alkylguanidines: Dramatic influence of amine to guanidine replacement on the physicochemical properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4779-4782.

9. Zeghida, W.; Debray, J.; Chierici, S.; Dumy, P.; Demeunynck, M., Concise Synthesis of 2-Amino-4(3H)-quinazolinones from Simple (Hetero)aromatic Amines. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2473-2475.

Síntesis y estudio de N-alcoxi y N-alquilguanidinas

10. Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D., Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710-718.
11. Rodríguez, F.; Rozas, I.; Kaiser, M.; Brun, R.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; García, R. N.; Dardonville, C., New bis(2-aminoimidazoline) and bisguanidine DNA minor groove binders with potent *in vivo* antitrypanosomal and antiplasmodial activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 909-923.
12. Thuita, J. K.; Karanja, S. M.; Wenzler, T.; Mdachi, R. E.; Ngotho, J. M.; Kagira, J. M.; Tidwell, R.; Brun, R., Efficacy of the diamidine DB75 and its prodrug DB289, against murine models of human African trypanosomiasis. *Acta Trop.* **2008**, *108*, 6-10.

*5. SÍNTESIS Y ESTUDIO DE DERIVADOS FLUORADOS Y
CLORADOS DEL COMPUESTO CABEZA DE SERIE 2*

Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

5 Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados del compuesto cabeza de serie (2)

5.1 Antecedentes

Los ensayos *in vivo* en modelos murinos de enfermedad del sueño de los análogos *N*-sustituidos de bis(2-iminoimidazolidina) y bis-guanidina confirmaron el gran potencial tripanocida de los compuestos derivados de la *N*-fenilbenzamida (ie, cabezas de serie **2** y **7**). En particular, la estrategia que consiste en reducir el pK_a de la molécula **2** introduciendo sustituyentes *N*-hidroxilo sobre los anillos de imidazolidina permitió aumentar moderadamente la permeabilidad de la BHE en el análogo **33e** (véase capítulo 3). A pesar de ser positivos, estos datos no resultaron del todo satisfactorios puesto que dicho compuesto no llegó a ser 100% curativo en el modelo de fase tardía de la enfermedad. Tal vez se deba a la modesta actividad intrínseca del análogo **33e** ($CI_{50} = 0.888 \mu M$) en comparación con **2** ($CI_{50} = 0.025 \mu M$).

Por lo tanto, decidimos probar otra estrategia para intentar disminuir el pK_a de la molécula cabeza de serie **2** y mejorar su permeabilidad de la BHE sin afectar, en la medida de lo posible, su actividad tripanocida. Para ello nos planteamos la introducción de átomos de flúor o cloro sobre los anillos aromáticos del esqueleto de *N*-fenilbenzamida (Figura 5.1). Estos átomos de halógeno tienen una electronegatividad alta (3.98 y 3.17, respectivamente) y funcionan como grupos electroattractores que, al ser introducidos sobre el anillo aromático, deberían disminuir la densidad electrónica sobre los grupos imidazolidina, rebajando así el pK_a de la molécula. El uso de grupos electroattractores para modular la basicidad de grupos adyacentes es una herramienta bien establecida en Química Médica¹. Además, los átomos de halógeno (F, Cl) se pueden usar para conferir estabilidad metabólica, modular la lipofilia², o aumentar la permeabilidad en membranas de las moléculas mediante la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares³.

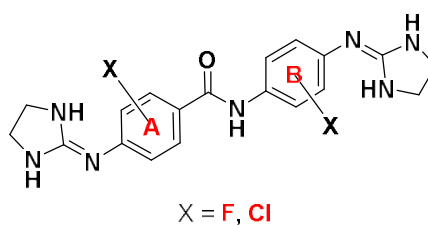


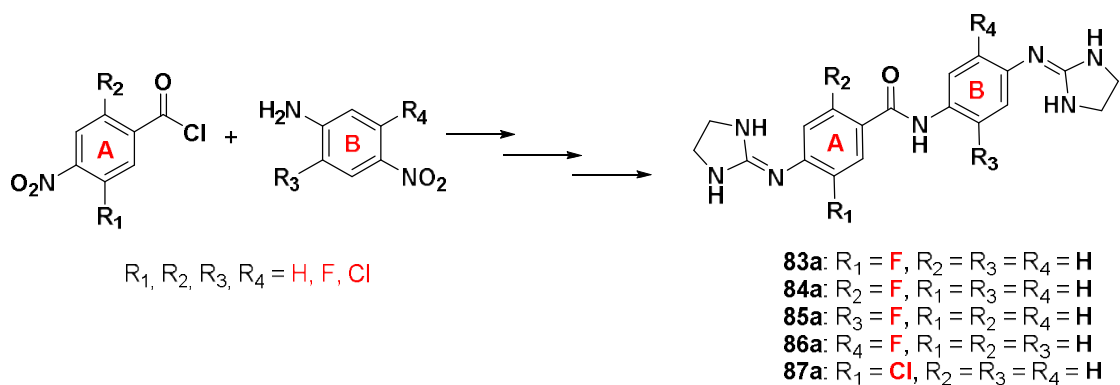
Figura 5.1: Estructura general de los derivados fluorados y clorados del compuesto cabeza de serie **2**.

Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

Así pues, se decidió preparar derivados de compuesto **2** sustituyendo uno de los protones aromáticos (anillos **A** y **B**, Figura 5.1) por un átomo de flúor o cloro.

La estrategia sintética elegida se resume en el esquema 5.1. Consiste en la reacción de los cloruro de 4-nitrobenzoilo sustituidos con derivados de 4-nitroanilina para obtener las 4-nitro-*N*-(4-nitrofenil)benzamidas correspondientes. Luego, por reducción de los grupos nitro se obtienen las diaminas que se hacen reaccionar con la *N,N'*-di(*tert*-butoxicarbonil)imidazolin-2-tiona, generándose los compuestos bis(2-aminoimidazólicos) deseados totalmente protegidos con Boc. Los grupos Boc se eliminan por hidrólisis ácida en el último paso de la síntesis obteniéndose los productos finales **79a** – **83a** (Esquema 5.1).

Esquema 5.1

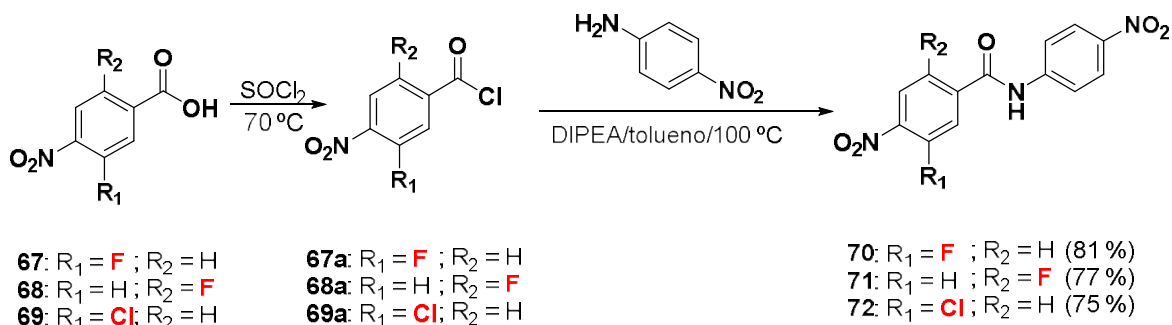


5.1.1 Síntesis de las 4-nitro-*N*-(4-nitrofenil)benzamidas (**70** – **72**, **76** – **77**)

La síntesis de los derivados con el flúor y el cloro en el anillo **A** de la benzamida se inició con la formación de los cloruros de ácidos **67a** – **69a** (Esquema 5.2). Esta se llevó a cabo por reacción de los ácidos carboxílicos comerciales **67** – **69** con cloruro de tionilo. Después de evaporar el exceso de cloruro de tionilo, los cloruros de ácido **67a** – **69a**, se hicieron reaccionar directamente con la 4-nitroanilina disuelta en tolueno y en presencia de DIPEA. Los productos fueron purificados por precipitación en tolueno frío y sucesivos lavados con HCl 0.1 M, agua y metanol. De esta manera los compuestos **70** – **72** se obtuvieron con buenos rendimientos (Esquema 5.2).

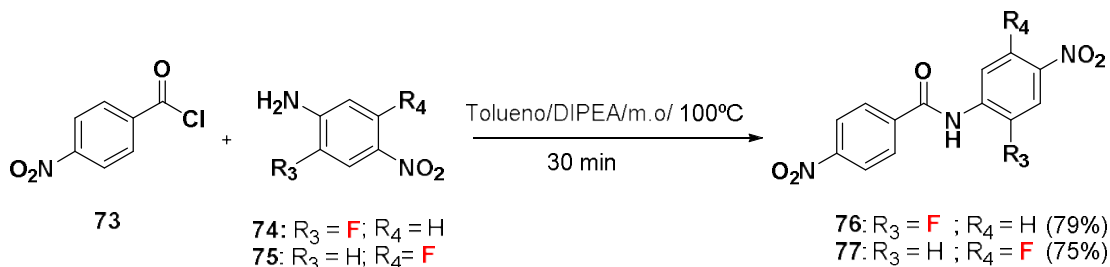
Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

Esquema 5.2



En el caso de las benzamidas sustituidas en el anillo **B** (**76**, **77**), la reacción se llevó a cabo por reacción del cloruro de 4-nitrobenzoilo (**73**) con la 2-fluoro-4-nitroanilina (**74**) y la 3-fluoro-4-nitroanilina (**75**), respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tolueno en presencia de un exceso de DIPEA a 100 °C durante 30 minutos usando microondas como fuente de energía (Esquema 5.3). Las benzamidas precipitan en tolueno, por lo que se pudieron aislar por filtración, lavar sucesivamente con HCl 0.1 M, agua y MeOH, obteniéndose los compuestos **76** y **77** con buenos rendimientos y con alta pureza (Esquema 5.3).

Esquema 5.3

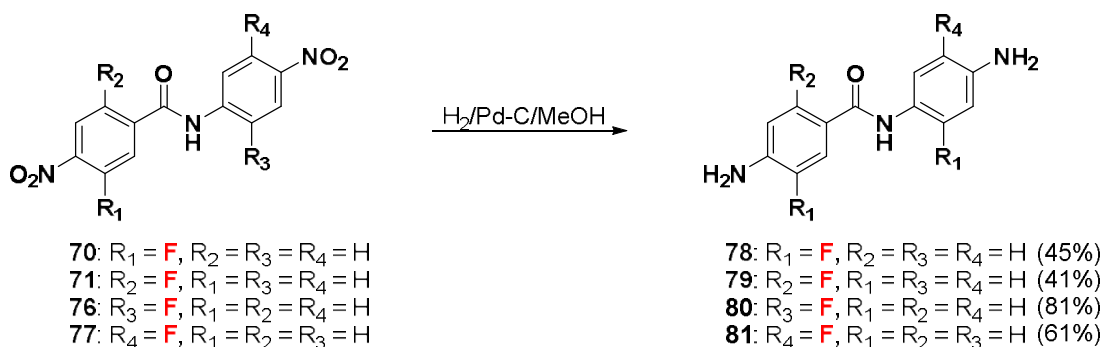


5.1.2 Síntesis de las 4-amino-*N*-(4-aminofenil)benzamidas (**78** – **81**)

La reducción de los grupos nitro de los compuestos **70**, **71**, **76** y **77** se llevó a cabo por hidrogenación catalítica utilizando Pd-C (5%) como catalizador bajo una atmósfera de H₂ y metanol como disolvente (Esquema 5.4), obteniéndose los compuestos **78** – **81** con buenos rendimientos por recrystalización de metanol.

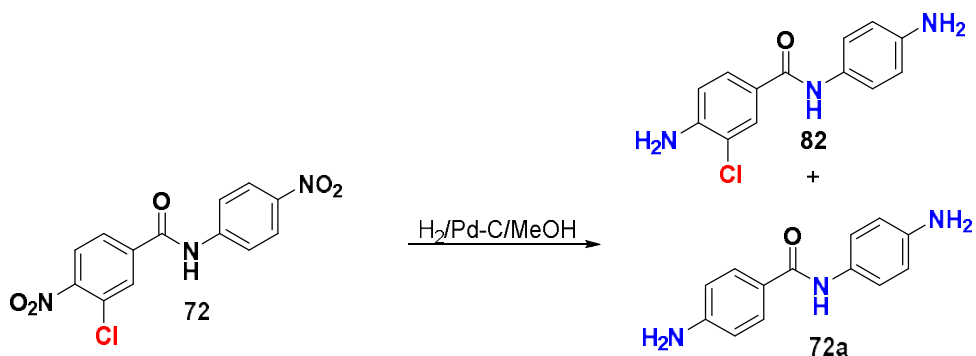
Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

Esquema 5.4



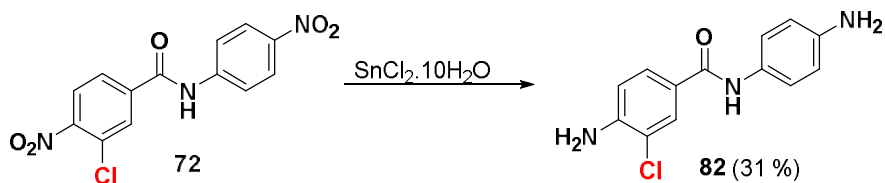
La reducción de los grupos nitro del compuesto **72** por ese mismo método dio como resultado una mezcla de la diamina deseada **82** y del producto deshalogenado **72a** en una proporción (8:2). Dicho subproducto proviene de la deshalogenación reductiva bien de **72** o de **82** (Esquema 5.5).

Esquema 5.5



Para evitar la formación de este subproducto, se procedió a realizar la reducción de los grupos nitro utilizando cloruro de estaño II (SnCl₂·10H₂O). De esta manera se obtuvo la diamina **82** con buena pureza (Esquema 5.6).

Esquema 5.6

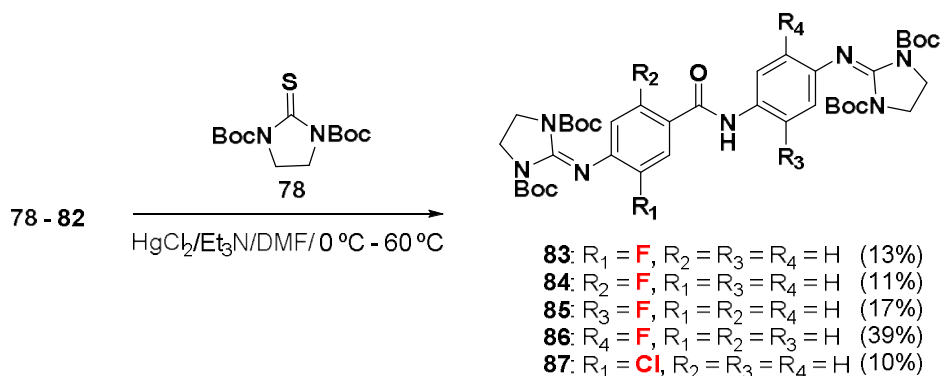


Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

5.1.3 Síntesis de las 4-(imidazolidin-2-iliden)amino-*N*-[(4-(imidazolidin-2-ilideneamino)fenil)]benzamidas (83 – 87) protegidas con grupos *tert*-butoxicarbonilo (Boc)

La introducción de las imidazolidinas protegidas con Boc se llevó a cabo a partir de las diaminas aromáticas **78** – **82** siguiendo el protocolo previamente puesto a punto en el grupo con *N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonil)imidazolin-2-tiona (**78**)/HgCl₂/Et₃N en DMF anhidra⁴. Los productos fueron purificados por cromatografía flash sobre sílice con una mezcla de hexano/AcOEt (1:1) y posteriormente recristalizados de acetato de etilo frío, obteniéndose los compuestos **83** – **87** con bajos rendimientos (Esquema 5.7). Estos bajos rendimientos se deben a la poca reactividad (nucleofilia) que han mostrado este tipo de benzamidas sustituidas con átomos de halógeno

Esquema 5.7



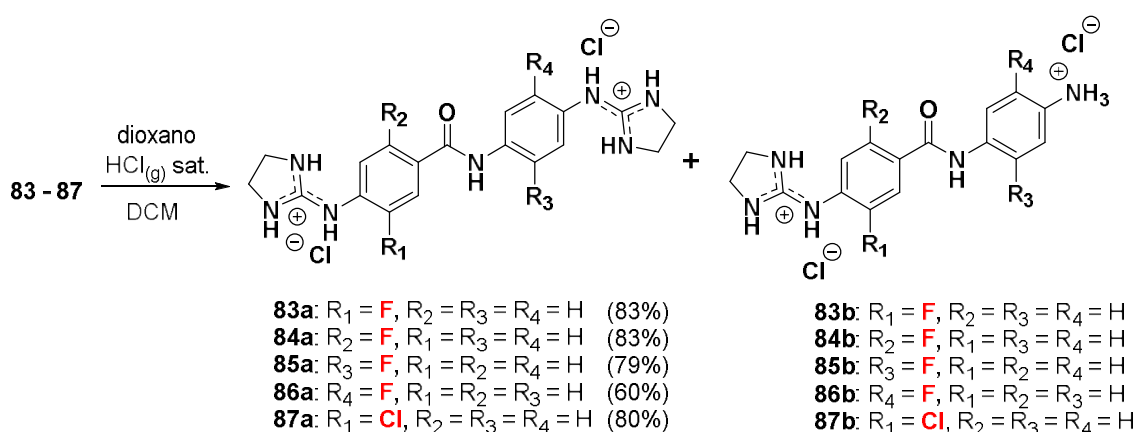
5.1.4 Eliminación de los grupos protectores Boc para obtener los derivados fluorados (83a – 86a) y clorado (87a) de la *N*-fenilbenzamida 2

La desprotección de los grupos Boc de los compuestos **82** – **87** se llevó a cabo añadiendo una disolución de dioxano saturada de ácido clorhídrico (HCl_(g)) sobre los derivados protegidos disueltos en DCM, obteniéndose los compuestos **82a** – **87a** como sales dihidrocloruros (Esquema 5.8). El análisis por HPLC-MS del crudo de reacción mostró la presencia de un subproducto cuyo ion molecular *m/z* 314 (M + H) y *m/z* 330 (M + H), en una proporción de 90:10 en comparación con los productos deseados. Estas masas concuerdan con las estructuras **82b** – **87b**, posiblemente de la pérdida de uno de los anillos de imidazolidina en la molécula (Esquema 5.8). También se realizó una prueba de desprotección del grupo Boc utilizando ácido trifluoroacético, obteniéndose prácticamente el mismo resultado. Los compuestos **86** y **87** se purificaron por cromatografía sobre sílice obteniéndose los productos

Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

deseados mezclados con subproductos provenientes de la desprotección parcial de los grupos protectores Boc. Por lo tanto, los compuestos **86** y **87** no se aislaron como sustancias puras por lo que no se da su caracterización por RMN. Se identificaron por HPLC-MS las mezclas de **86** y **87** con sus subproductos parcialmente desprotegidos. Comprobamos a continuación que el tratamiento ácido de estas mezclas daba lugar, como esperábamos, a los productos finales deseados totalmente desprotegidos.

Esquema 5.8



La utilización de dioxano saturado con HCl_(g) tiene como ventaja la obtención directa de los hidrocloruros. Esto facilita su purificación ya que estas sales son insolubles en dioxano lo que nos permitiría purificarlas por recristalización. Para minimizar la formación de los subproductos **83b** - **87b**, la reacción de desprotección se llevó a cabo a 0 °C. Para esto, los compuestos fueron enfriados antes de añadir el dioxano saturado con HCl_(g). Después de comprobar por HPLC-MS la total desprotección de los grupos Boc, se filtraron y se lavaron con Et₂O, obteniéndose los compuestos **83a** - **87a** con buena pureza (Esquema 5.8).

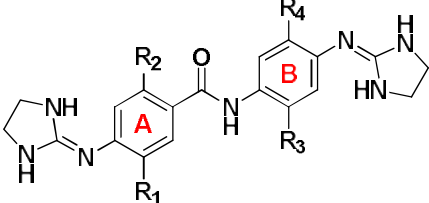
Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

5.2 Ensayos biológicos

5.2.1 Actividad *in vitro* de los derivados 83a - 86a contra *T. b. brucei*

Los compuestos fluorados derivados del compuesto cabeza de serie **2** fueron ensayados sobre el parásito *T. b. brucei* utilizando el ensayo del "Alamar blue" detallado en el capítulo 3.0. Los compuestos **83a** y **86a** mostraron actividad baja contra este parásito. El compuesto **85a** mostró una actividad moderada mientras que el compuesto **84a** ha sido el mejor con una $CI_{50} = 1 \mu\text{M}$ en este ensayo (Tabla 5.1). Cabe destacar que en estos dos últimos compuestos, que son los más activos, el átomo de fluor se encuentra en *orto* del grupo amida del espaciador. En los compuestos menos activos (**83a** y **86a**), el átomo de fluor se encuentra en *orto* del anillo de imidazolidina.

Tabla 5.1: Actividad *in vitro* de los compuestos fluorados **83a** – **86a** contra *T. b. brucei*.



	CI_{50} (μM)	
compuesto ^a	R	<i>T. b. brucei</i> ^a
83a	$R_1 = \text{F}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$	52.5
84a	$R_2 = \text{F}; R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$	1.02
85a	$R_3 = \text{F}; R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$	11.9
86a	$R_4 = \text{F}; R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$	31.9

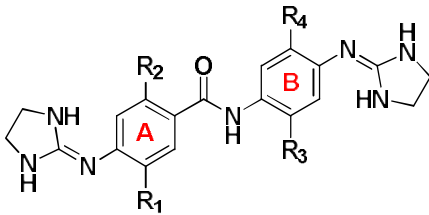
^a Cepa silvestre: tripomastigotes de *T. b. brucei* s427. Control: pentamidina, $CI_{50} = 0.005 \mu\text{M}$.

5.3 Medición del pK_a de las moléculas 83a – 87a y discusión de los resultados

Nuestro objetivo, al sintetizar derivados fluorados y clorados de **2**, era disminuir la densidad electrónica sobre los anillos de imidazolina (es decir, reducir la basicidad de dichos grupos) introduciendo átomos electronegativos sobre los anillos aromáticos al los que están unidos. Para comprobar el efecto de dicha sustitución sobre la basicidad de la molécula, se midieron los pK_a s de los derivados **83a** – **87a** utilizando la técnica puesta a punto durante esta tesis (véase capítulo 6). Los resultados se muestran en la Tabla 5.2.

Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

Tabla 5.2: Medidas experimentales de pK_a de los compuestos **83a** – **87a**.



compuesto ^a	R	λ (nm) ^b	$pK_a \pm SD$ ^c
2	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$	258/308	9.29 ± 0.07
83a	$R_1 = F; R_2 = R_3 = R_4 = H$	314/380	9.09 ± 0.10
84a	$R_2 = F; R_1 = R_3 = R_4 = H$	260/314	8.55 ± 0.01
85a	$R_3 = F; R_1 = R_2 = R_4 = H$	243/309	9.40 ± 0.11
86a	$R_4 = F; R_1 = R_2 = R_3 = H$	263/313	9.43 ± 0.02
87a	$R_1 = Cl; R_2 = R_3 = R_4 = H$	260/312	8.57 ± 0.05

^aEl compuesto fue disuelto en DMSO (solución madre) y diluido con el correspondiente buffer para alcanzar una concentración de 0.2 mM en cada pocillo (2% DMSO v/v.). ^b Longitud de onda analítica. ^c pK_a de los grupos iminoimidazolidínicos; solamente pudo ser calculado un valor de pK_a para ambos grupos imidazolidínicos. El valor del pK_a fue calculado del promedio de al menos 3 medidas independientes.

La introducción de un átomo de fluor o cloro sobre los anillos aromáticos A y B de la fenilbenzamida no resultó en un cambio drástico del pK_a de los compuestos **83a** – **87a**. Sin embargo, se observó una clara diferencia en el efecto sobre el pK_a dependiendo de qué anillo (A o B) estuviera sustituido. Así pues, los compuestos con un átomo de flúor (**83a**, **84a**) o cloro (**83a**) sobre el anillo A tienen un pK_a más bajo (0.2 a 0.8 unidades de pK_a) que el compuesto cabeza de serie **2** sin sustituir. Por el contrario, los compuestos **85a** y **86a** con el átomo de fluor en el anillo B tienen un pK_a parecido o ligeramente superior (0.11 a 0.14 unidades de pK_a , respectivamente) al compuesto cabeza de serie **2**. En este caso, la posición del flúor sobre el anillo (en *orto*, R_4 , o en *meta*, R_3 , respecto al anillo de imidazolidina) no parece tener mucha influencia sobre el pK_a de la molécula. En cambio, el efecto del átomo de flúor sobre el pK_a está más marcado cuando esté se encuentra en el anillo A en posición *meta* de la imidazolidina (**84a**, $pK_a = 8.55$). Curiosamente, la misma reducción de pK_a se observa cuando el átomo de cloro se encuentra en el anillo A en *orto* de la imidazolina (**87a**, $pK_a = 8.57$). Olsen *et al.* han medido efectos del mismo orden (ie, disminución de 0.3 y 0.44 unidades de pK_a para un átomo de flúor en *meta* y *orto* de la fenilamidina, respectivamente) sobre el pK_a del grupo amidina de inhibidores de trombina. Por lo tanto, la influencia del átomo de halógeno sobre la basicidad de estas moléculas es más marcada cuando el halógeno se encuentra en el anillo A de la *N*-fenilbenzamida. Sin embargo, cabe destacar que la amplitud de dicho efecto depende del átomo considerado y de su posición (*orto* o *para*) con respecto al

Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

anillo de imidazolina. Esto puede deberse a que en el anillo A, además de poseer el átomo de flúor o cloro, tiene otro grupo desactivante como lo es el carbonilo de la amida.

5.4 Conclusiones

Se han sintetizado 4 derivados fluorados y un derivado clorado del compuesto **2** para intentar reducir la basicidad de dicho cabeza de serie. El objetivo se logró para 3 compuestos sustituidos en el anillo A (**83a**, **84a**, **87a**) aunque solo se observó una reducción notable del pK_a para los compuestos **84a** y **87a**, con fluor en meta y cloro en orto del grupo imidazolidina, respectivamente. Estos compuestos fueron ensayados *in vitro* sobre *T. b. brucei*. Se observó una actividad entra baja y moderada contra este parásito. Solo el compuesto **84a** presentó buena actividad contra *T. b. brucei* ($CI_{50} = 1.02 \mu M$). Cabe destacar que este compuesto presentó el pK_a mas bajo de los compuestos ensayados ($pK_a = 8.55$). Por lo tanto, se hace necesario medir la actividad contra *T. b. rhodesiense* para corroborar el potencial tripanocida de estos compuestos.

5.5 Referencias bibliográficas

1. (a) Olsen, J.; Seiler, P.; Wagner, B.; Fischer, H.; Tschopp, T.; Obst-Sander, U.; Banner, D. W.; Kansy, M.; Muller, K.; Diederich, F., A fluorine scan of the phenylamidinium needle of tricyclic thrombin inhibitors: effects of fluorine substitution on pK_a and binding affinity and evidence for intermolecular C-FCN interactions. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1339-1352; (b) Morgenthaler, M.; Schweizer, E.; Hoffmann-Roder, A.; Benini, F.; Martin, R. E.; Jaeschke, G.; Wagner, B.; Fischer, H.; Bendels, S.; Zimmerli, D.; Schneider, J.; Diederich, F.; Kansy, M.; Muller, K., Predicting and tuning physicochemical properties in lead optimization: amine basicities. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1100-1115.
2. Fontenelle, C. Q.; Wang, Z.; Fossey, C.; Cailly, T.; Linciau, B.; Fabis, F., Design of fluorinated 5-HT4R antagonists: Influence of the basicity and lipophilicity toward the 5-HT4R binding affinities. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7529-7538.
3. Alex, A.; Millan, D. S.; Perez, M.; Wakenhut, F.; Whitlock, G. A., Intramolecular hydrogen bonding to improve membrane permeability and absorption in beyond rule of five chemical space. *MedChemComm* **2011**, *2*, 669-674.

Síntesis y estudio de derivados fluorados y clorados

4. Dardonville, C.; Goya, P.; Rozas, I.; Alasua, A.; Martín, M. I.; Borrego, M. J., New aromatic iminoimidazolidine derivatives as α 1-adrenoceptor antagonists: a novel synthetic approach and pharmacological activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1567-1577.

*6. DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE IONIZACIÓN
(pK_a) POR ESPECTROSCOPIA UV EN PLACAS DE 96
POCILLOS*

Determinación de constantes de ionización por UV

6. Determinación de constantes de ionización por espectroscopía UV

6.1 Introducción

La constante de ionización de un fármaco (pK_a) es un parámetro fisicoquímico necesario para conocer el estado de ionización de dicho fármaco dentro del cuerpo. Las propiedades farmacocinéticas ADME (Administración, distribución, metabolismo y excreción) de los fármacos y la manera en que estos interactúan con sus dianas, así como la liposolubilidad ($\log P$), solubilidad y permeabilidad están muy relacionadas con su estado de ionización, es decir, su constante de disociación ácida también conocida como constante de acidez (K_a)¹. En la práctica, la constante de acidez se expresa mediante una medida logarítmica de K_a ²:

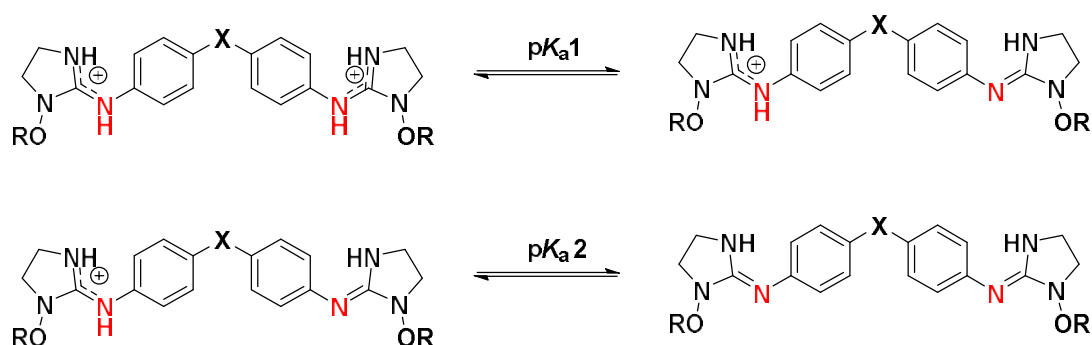
$$pK_a = -\log_{10} K_a$$

La hipótesis de partida de este trabajo de tesis fue que las bis(2-iminoimidazolidinas) y las bisguanidinas cabezas de serie **1** – **10** no mostraron actividad *in vivo* en la fase tardía (neurológica) de la TAH por no penetrar el SNC debido a su baja permeabilidad en la BHE. Por su carácter básico, estos compuestos estarán protonados a pH fisiológico lo cual influirá en su permeabilidad en la BHE. Se sintetizaron varias series de derivados (Ej. derivados *N*-alcoxilados, derivados fluorados) con el fin de modular la basicidad de dichos compuestos prototipo. Por lo tanto, un objetivo importante de este trabajo fue medir los pK_a s de los compuestos sintetizados para poder evaluar su porcentaje de ionización a pH fisiológico.

Cabe destacar que los compuestos estudiados poseen dos grupos imidazolidínicos básicos por lo que debería observarse dos valores de pK_a (pK_{a1} y pK_{a2}) tal como se muestra en el Esquema 6.1. Sin embargo, a nivel experimental no fue posible calcular un valor de pK_a para cada grupo imidazolidínico sino que se observó un valor de pK_a “promedio” para cada molécula. Estos resultados se discuten más adelante en este capítulo.

Determinación de constantes de ionización por UV

Esquema 6.1



Entre los métodos más utilizados para medir pK_a s están: (a) La valoración potenciométrica, en la que el pK_a se determina mediante una curva de valoración; (b) la espectroscopía ultravioleta (UV), donde el espectro ultravioleta del compuesto se mide en cada punto de la valoración y se representa gráficamente el cambio en la absorbancia UV en función del pH³; (c) La electroforesis capilar en diferentes disoluciones tampón, donde el pK_a se calcula a partir de la movilidad relativa de los iones a diferentes pH⁴. Además, existen aparatos comerciales diseñados para medir pK_a s de manera automática usando un “sistema lineal de gradiente de pH” (“mixed-buffer linear pH gradient system”)⁵. Sin embargo, en ausencia de tal equipamiento, la determinación de pK_a de series de compuestos por los métodos tradicionales requiere mucho tiempo y resulta bastante tediosa pues no pueden realizarse medidas simultáneas de varios compuestos. Tomando en cuenta estas limitaciones de los métodos existentes, decidimos desarrollar una nueva metodología que permita medir el pK_a de varios compuestos de manera simultánea y rápida usando placas de 96 pocillos. Para ello, decidimos aprovechar las ventajas de la espectroscopia UV tales como su sensibilidad (Ej. solo se necesita una pequeña cantidad del compuesto; válido para compuestos poco solubles) y su versatilidad (Ej. funciona a pH altos y bajos; se pueden medir varios compuestos a la vez usando placas de 96 pocillos)^{3a}.

Se describen a continuación la puesta a punto del experimento de medición de pK_a mediante la espectroscopia UV en placas de 96 pocillos así como los resultados de medidas de pK_a de los compuestos imidazolidínicos sintetizados en esta tesis. Parte de estos resultados se recoge en el artículo siguiente: Rios Martínez, C. H.; Dardonville, C. “Rapid determination of ionization constants (pK_a) by UV spectroscopy using 96-Well Microtiter Plates” *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 142-145.

Determinación de constantes de ionización por UV

6.2 Medición del pK_a mediante espectroscopia UV en placas de 96 pocillos

6.2.1 Metodología del ensayo

Para poder medir el pK_a de una molécula por espectroscopia UV, ésta debe tener un cromóforo cercano al grupo ionizable y su absorbancia en el espectro UV debe cambiar en función del estado de ionización de la molécula. Para averiguar esto, se midió el espectro UV de los compuestos en dos disoluciones tampón de pH ácido y básico (pH 3 y 12, respectivamente), observándose una clara diferencia de absorbancia entre la molécula neutra y la molécula protonada (Figura 6.1). De esta manera, comprobamos que se podía medir el pK_a de nuestras series de compuestos utilizando la espectroscopia UV.

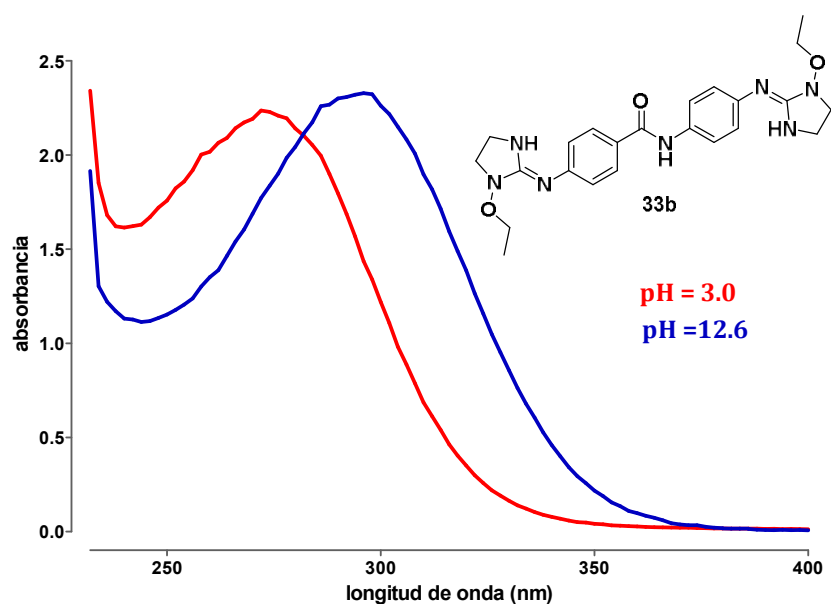


Figura 6.1: Espectros de UV del compuestos **33b** a pH 3.0 y pH 12.6

Antes de empezar el experimento se prepararon disoluciones tampón de pH variable y fuerza iónica constante ($I = 0.1$ M) para cubrir una gama de pH entre 3 y 12 (Ej. 2-3 puntos por unidad de pK_a). Además, se preparó una disolución madre ("stock") a una concentración 10 mM en DMSO de cada compuesto a ensayar. El experimento de medida de los pK_a se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se añaden las diferentes disoluciones tampón (Ej. 196 μ L) en cada uno de los pocillos de la placa a utilizar (Figura 6.2).
- 2) Se preparan en primer lugar las disoluciones "blanco" (factores de corrección) añadiendo 2% (v/v) de DMSO en la disolución tampón al pH deseado.

Determinación de constantes de ionización por UV

3) Se sigue rellenando la placa añadiendo una cantidad fija de disolución stock de cada compuesto en cada uno de los pocillos (Ej. 4 µL) procurando agitar con la micropipeta para obtener una disolución homogénea. La concentración final de los compuestos en cada uno de los pocillos es 0.2 mM.

4) Se miden los espectros UV en el rango 200-500 nm.

5) Los datos de los espectros UV a cada longitud de onda en función del pH se tratan utilizando el programa Excel obteniéndose los espectros corregidos respecto al blanco.

6) Los datos de absorbancia obtenidos se analizan con el programa GraphPad⁶. Con este programa representamos la gráfica del cambio de la absorbancia de nuestros compuestos en función del pH, lo que nos permite calcular el pK_a para cada uno de los compuestos siguiendo el método descrito por Tomsho *et al.* (Véase apartado 6.2.2)⁷. Se realiza un mínimo de tres medidas de pK_a para cada compuesto. Luego el pK_a promedio se calcula a partir del promedio de las constantes de ionización (K_a) obtenidas en cada medida^{3b}.

Cabe destacar que el número y rango de disoluciones tampón necesarios para determinar el pK_a depende del compuesto que se está estudiando. En general, un primer ensayo con 12 disoluciones que van desde pH 3 hasta 12 permite obtener un valor aproximado de pK_a que se puede refinar repitiendo el experimento usando más puntos de pH alrededor (± 2 unidades de pH) de dicho valor.

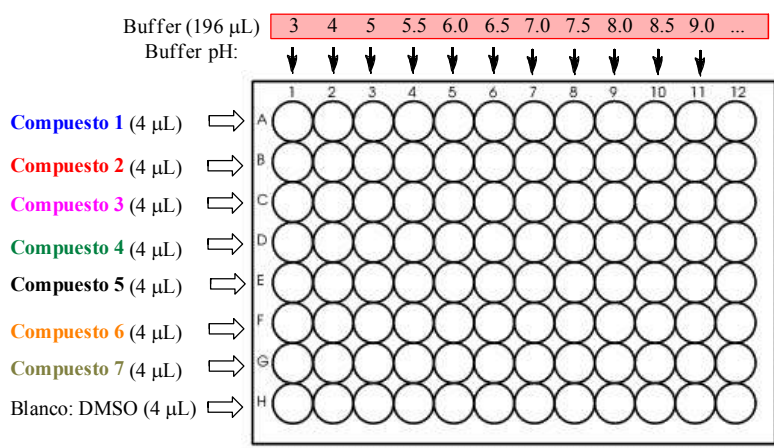


Figura 6.2: Ejemplo de relleno de una placa de 96 pocillos para la determinación simultánea de los pK_as de 7 compuestos.

6.2.2 Procedimiento general para el análisis de los espectros UV

El análisis de los datos que hemos utilizado para realizar estos estudios ha sido descrito previamente por Tomsho *et al.*^{7a} A continuación se presenta un ejemplo de dicho análisis llevado a cabo con el 4-nitrofenol (**Figura 6.3**). Los datos de UV obtenidos fueron importados

Determinación de constantes de ionización por UV

al programa Excel y procesados de la siguiente manera; en primer lugar, el espectro UV fue corregido mediante la sustracción del espectro UV de los blancos para cada pH y longitud de onda. Obtenidos los espectros UV de nuestros compuestos sin la absorbancia aportada por el DMSO, se procedió a normalizarlos sustrayendo a los espectros de UV la absorbancia a la cual los compuestos no absorben (Ej. $\lambda = 400$ o 500 nm en la mayoría de los casos, **Figura 6.3a**). Obtenido el espectro normalizado, realizamos el espectro diferencial, el cual se obtiene sustrayendo el espectro UV del compuesto al pH más ácido a los espectros UV obtenidos a todos los otros pHs. Las longitudes de onda analíticas se determinaron gráficamente a partir de la longitud de onda del máximo y el mínimo que se observan en la gráfica del espectro diferencial (**Figura 6.3b**). La absorbancia total para cada una de los pH analizados, se calcula como la suma del valor absoluto de las absorbancias a las longitudes de onda analíticas para cada uno de los pH utilizados (Figura 6.3c). Luego estos valores se representan en función del pH, y el pK_a de la molécula se determina mediante regresión no lineal utilizando la ecuación 1.

$$Absorbancia\ total = \frac{\epsilon_{HA} - \epsilon_{A^-} * [10^{(pH - pK_a)}]}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} * [S_t] \quad (1)$$

En donde ϵ_{HA} y ϵ_{A^-} son los coeficientes de extinción de la forma ácida y básica del compuesto, respectivamente, y S_t es la concentración del compuesto.

Determinación de constantes de ionización por UV

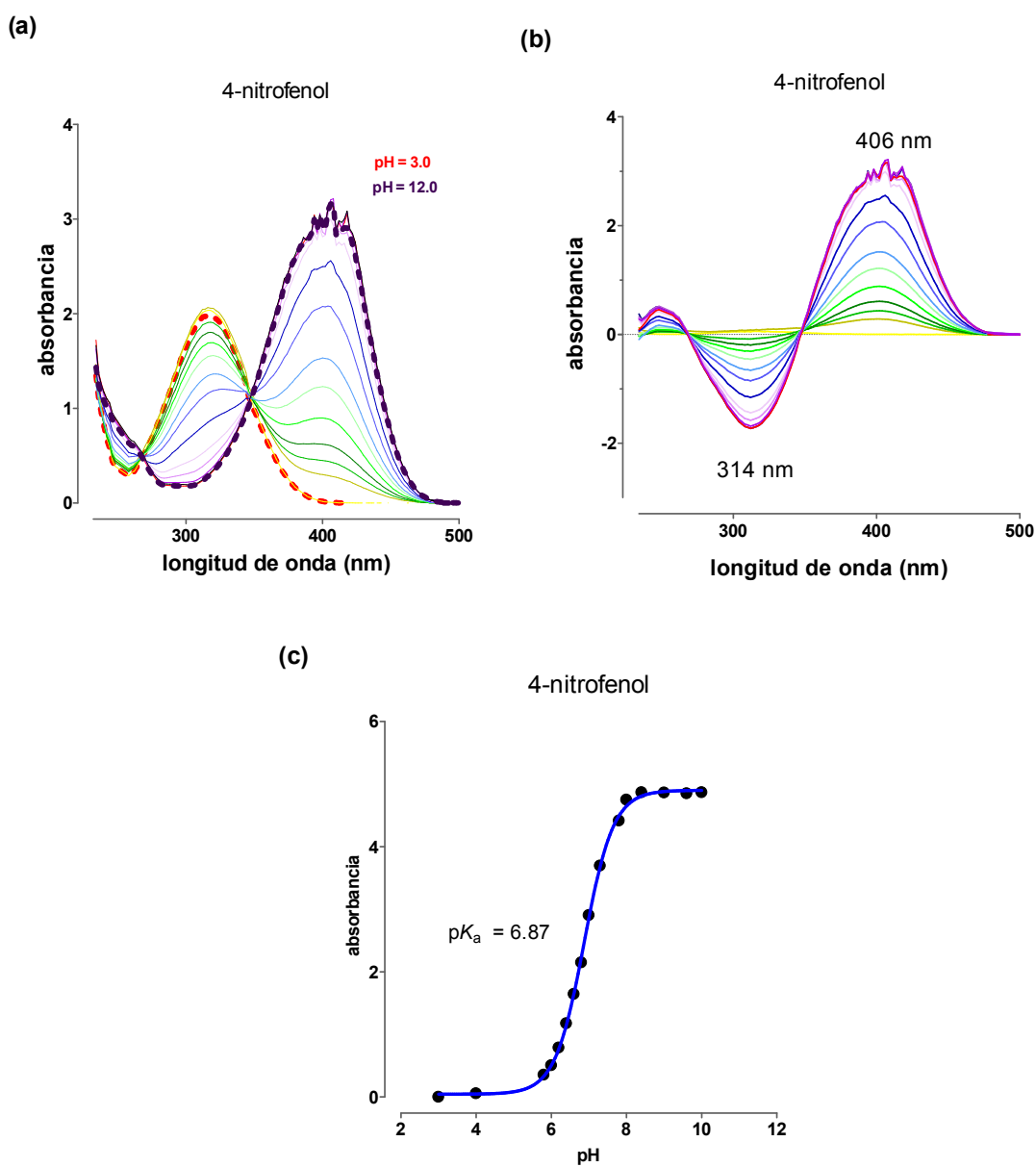


Figura 6.3: Análisis de espectros y determinación del pK_a del 4-nitrofenol. (a) espectro UV ($\lambda = 250-500$ nm) del 4-nitrofenol en diferentes disoluciones tampón desde pH 3 hasta pH 12. Las absorbancias están normalizadas a cero para $\lambda = 500$ nm. (b) Espectro diferencial entre el espectro de UV del compuesto a pH 3 y los espectros de UV de todos los otros pHs. La desviación máxima ocurre a 406 nm mientras que el mínimo ocurre a 314 nm. (c) Gráfico de la absorbancia total vs pH. El valor de pK_a se determina mediante regresión no lineal utilizando la ecuación 1.

Determinación de constantes de ionización por UV

6.2.3 Validación de la técnica con compuestos de pK_a conocido

Para validar nuestra técnica, se decidió realizar la medición sobre compuestos cuyos pK_a están descritos en la literatura. Se tomaron como ejemplos compuestos monoácidos, monobásicos y dibásicos: 2-metil-1*H*-benzimidazol, 5-nitro-1*H*-imidazol, clonidina y dicarbamimidato de oxibis(4,1-fenileno) (**88**) (Figura 6.4)

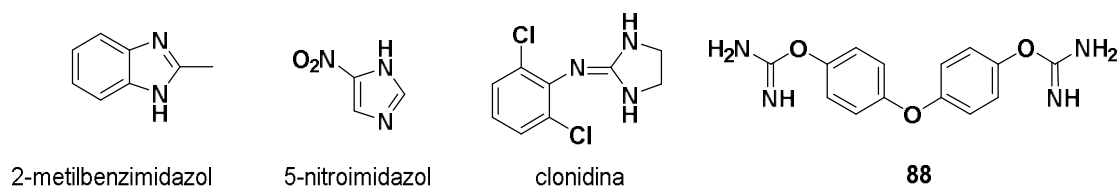


Figura 6.4. Estructura de los compuestos de referencia utilizados para validar el método.

La cantidad de puntos de pH utilizados depende de cada compuesto. Luego fueron añadidos 4 μL de cada uno de los compuestos a los 196 μL de las disoluciones buffer. De esta manera los compuestos se encuentran en una concentración de 0.2 mM. Los espectros UV fueron medidos y corregidos y luego estos espectros fueron normalizados obteniéndose los siguientes espectros UV (Figura 6.5).

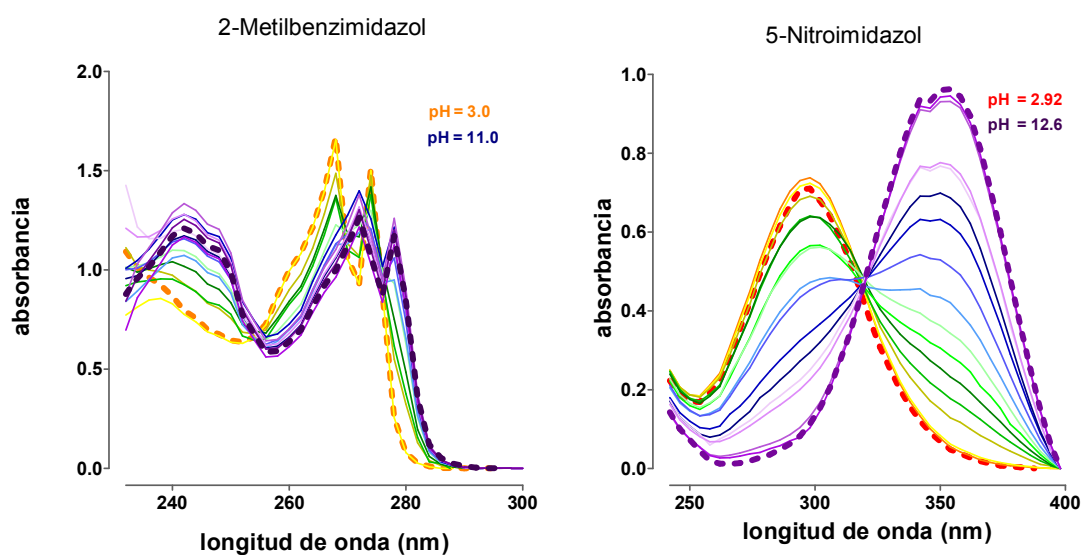


Figura 6.5: Espectros UV normalizados del 2-metilbenzimidazol y 5-nitroimidazol.

Determinación de constantes de ionización por UV

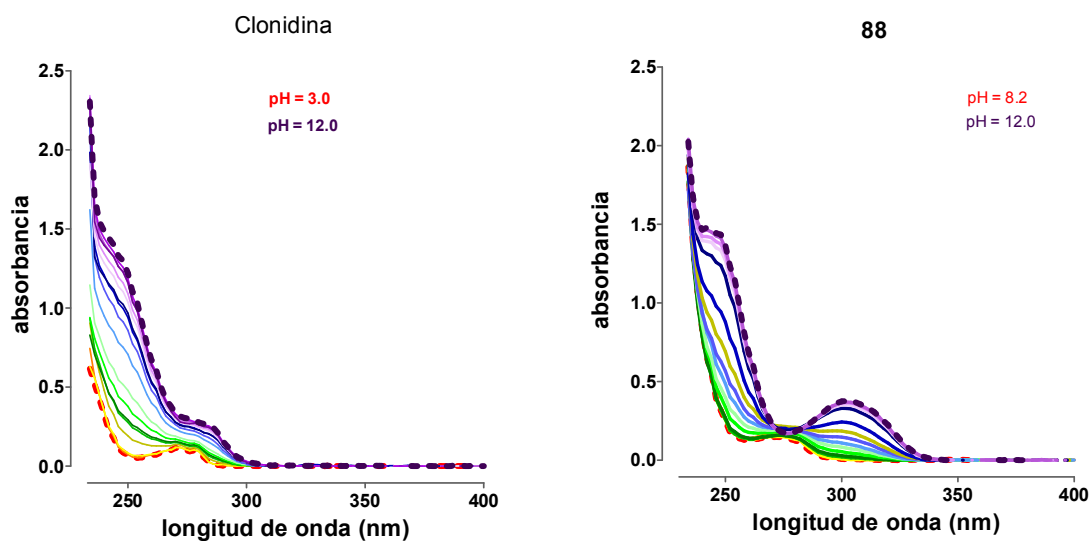


Figura 6.6. Espectros de UV normalizados de la clonidina y el compuesto 88.

Una vez obtenidos los espectros normalizados, se calculó el diagrama diferencial tal como se indica en el procedimiento general para el análisis de los datos de espectroscopia UV. De esta manera obtuvimos las siguientes gráficas.

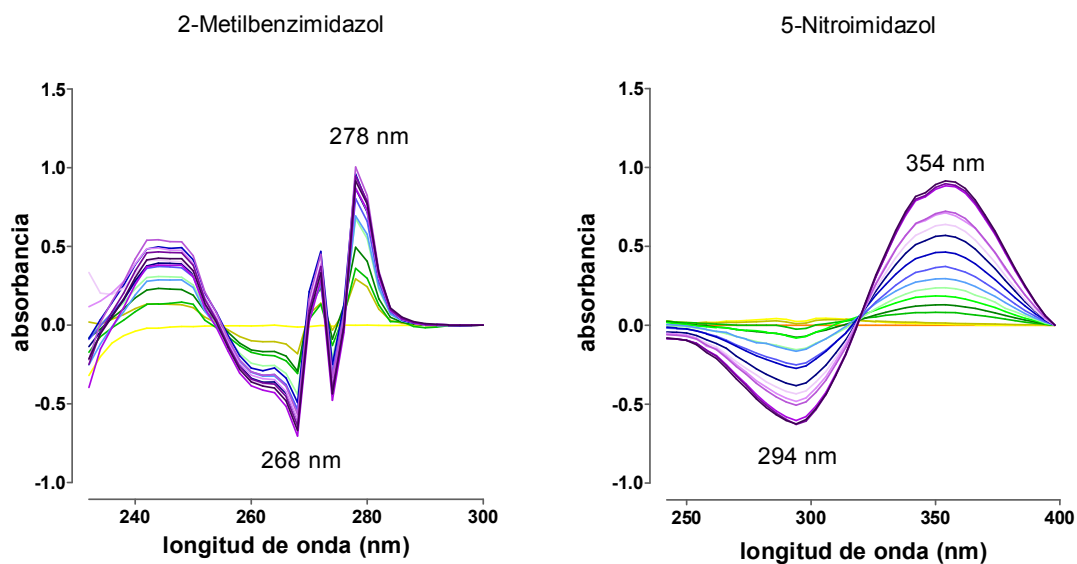


Figura 6.7: Gráfica diferencial de los compuestos 2-metilbenzimidazol y 5-nitroimidazol.

Determinación de constantes de ionización por UV

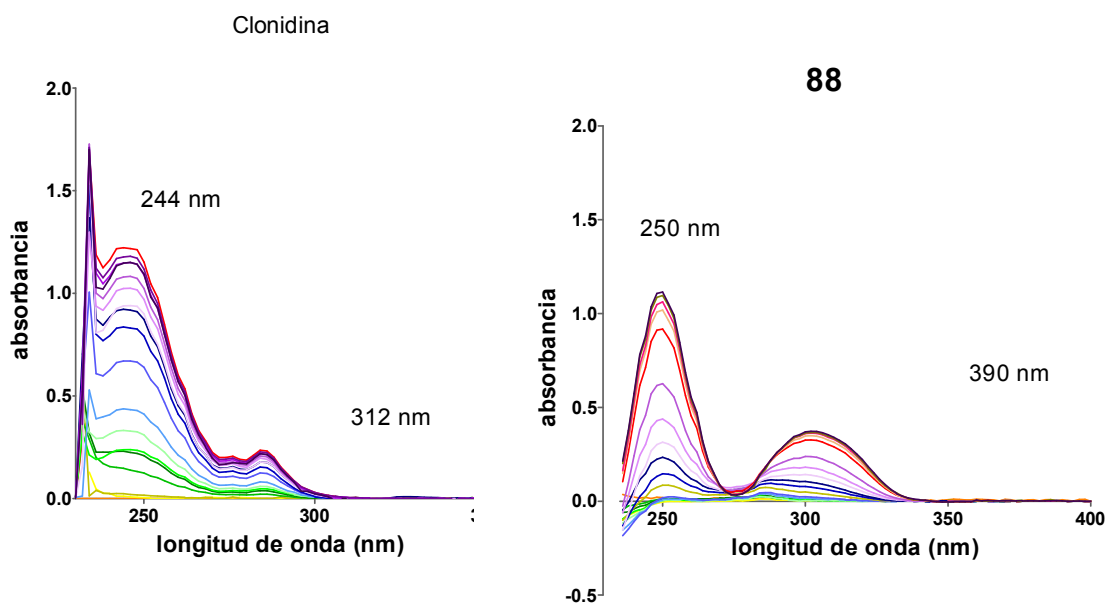


Figura 6.8: Gráfica diferencial de la clonidina y compuesto 88.

Tomando los máximos y los mínimos de absorbancia que se obtuvieron gráficamente de los diagramas de absorbancia diferencial, se obtienen las longitudes de onda analíticas. La suma de los valores absolutos de las absorbancias a estas longitudes de onda se representa en función del pH obteniéndose las curvas de absorbancia total vs pH. El valor de pK_a se determina mediante regresión no lineal utilizando la ecuación 1.

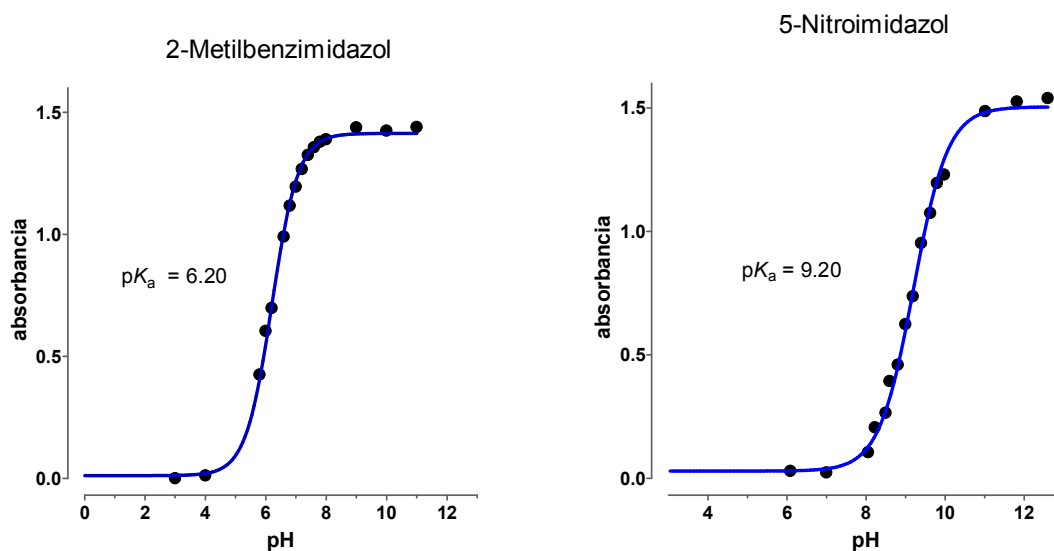


Figura 6.9: Curva de absorbancia vs pH: determinación del pK_a del 2-metilbenzimidazol y del 5-nitroimidazol.

Determinación de constantes de ionización por UV

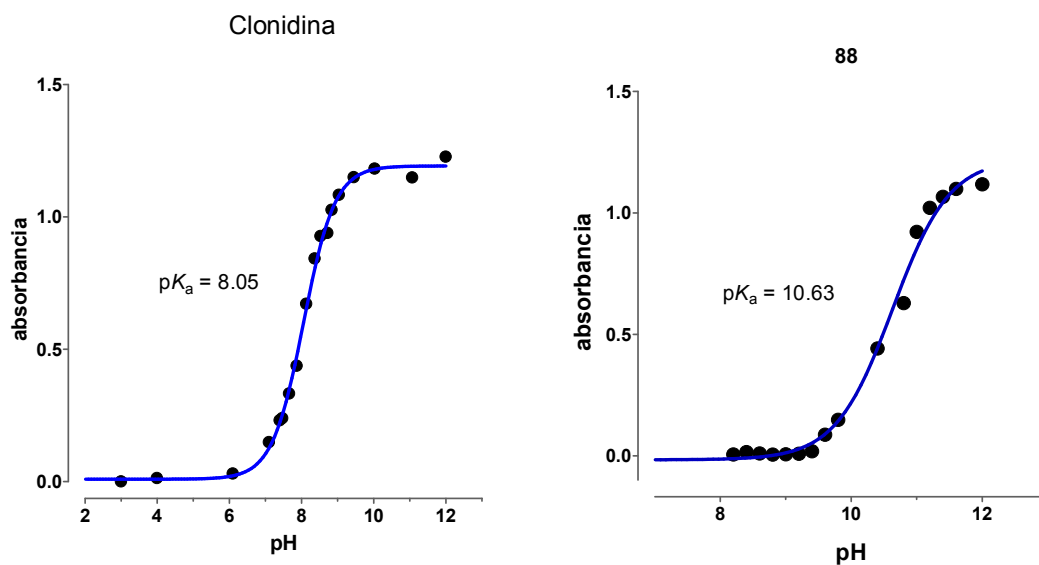
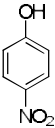
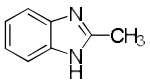

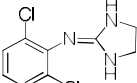
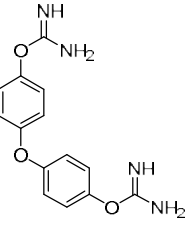


Figura 6.10: Curva de absorbancia vs pH: determinación del pK_a de la clonidina y de 88.

Se realizaron un mínimo de tres medidas para cada uno de los compuestos. A partir de ellas se calcularon los promedios de los pK_a experimentales. Los pK_a s medidos experimentalmente con nuestro método fueron muy similares a los datos descritos en la literatura (Tabla 6.1) demostrando la aplicabilidad de esta técnica. También se demostró que la presencia de 2% de DMSO como codisolvente no alteraba significativamente el pK_a observado ya que los valores determinados experimentalmente mediante nuestra metodología fueron muy similares a los reportados en la literatura en 100% de agua. Esto representa una ventaja para la determinación del pK_a de compuestos pocos solubles en agua.

Determinación de constantes de ionización por UV

Tabla 6.1: pK_a experimentales y valores encontrados en la literatura.

Estructura compuesto	Disolv. ^a	λ (nm) ^b	pK _a medido	Promedio ± error ^c	Valor Lit. ^d	Ref.
	H ₂ O	318/400	7.01 7.02 7.02	7.02 ± 0.01	7.15	8
4-nitrofenol	H ₂ O+2% DMSO	318/400	6.84 6.88 6.90	6.87 ± 0.03	6.91	9
	H ₂ O+2% DMSO	268/280	6.20 6.27 6.21 6.20	6.22 ± 0.03	6.23	10
2-metil-1H-benzimidazol						
	H ₂ O+2% DMSO	297/354	9.22 9.17 9.20	9.20 ± 0.03	9.3	10
5-nitro-1H-imidazol						
	H ₂ O+2% DMSO	244/312	8.15 8.24 8.05	8.14 ± 0.09	8.12 8.04	11
clonidina						
	H ₂ O+2% DMSO	250/390	10.63 10.72 10.75	10.70 ± 0.06	10.4	12
88						

^a Temperatura de los experimentos 30 °C. Todos los pK_a fueron medidos a un fuerza iónica constante (I = 0.1 M) y a un concentración de C = 0.2 mM. Hemos observado que el uso de un 2% v/v DMSO como codisolvente no altera significativamente el valor del pK_a de los compuestos ensayados. ^b Las longitudes de onda analíticas han sido determinadas a través del máximo y mínimo de absorbancia en los diagramas de absorbancia diferencial. ^c Desviación estándar. ^d Valores experimentales medidos a 25 °C en agua.

Determinación de constantes de ionización por UV

Puesto que el tiempo medio necesario para rellenar una microplaca de 96 pocillos (Ej. blancos y siete compuestos en 12 tampones diferentes o 5 compuestos en 16 tampones diferentes) es de unos 45 minutos, y que la lectura de la placa tarda unos 40 minutos (Ej. $\lambda = 230 - 400$ nm con una resolución de 2 nm), decidimos comprobar la estabilidad de los compuestos en las disoluciones tampón a través del tiempo. Para ello, se realizaron varias medidas de la misma placa a diferentes tiempos (40, 90 y 150 minutos) y se calculó el pK_a de los compuestos para cada tiempo. Dicha prueba se llevó a cabo con el 5-nitro-1*H*-imidazol y un derivado bis(2-aminoimidazolinico) sustituido con *N*-metoxilo (**35a**). Los resultados de este experimento (Figura 6.11) muestran que el pK_a medido para cada compuesto no varía significativamente a lo largo del experimento por lo que deducimos que los compuestos ensayados son estables en las disoluciones tampón a través del tiempo.

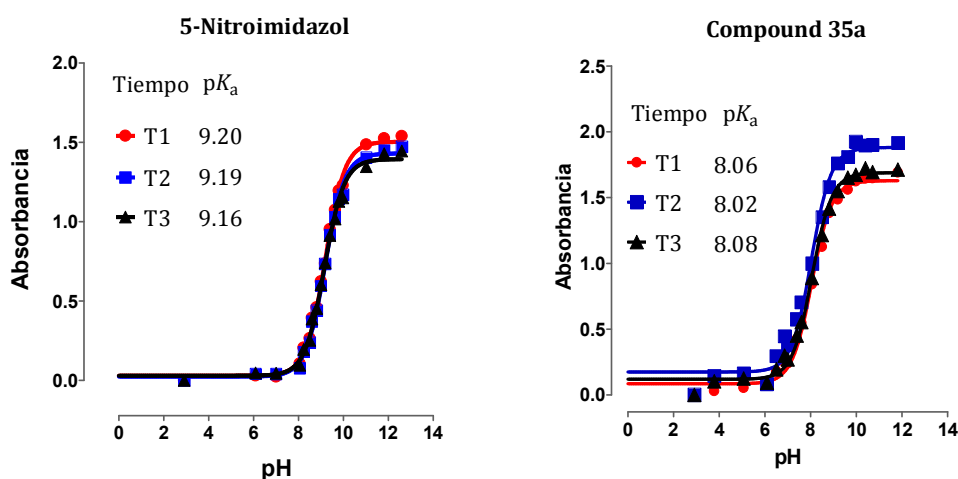


Figura 6.11: Estudio de estabilidad del 5-nitroimidazol y **35a** en las disoluciones tampón a lo largo del experimento. La placa con los compuestos disueltos en los tampones fue leída 3 veces a lo largo de 3 h (T1 = 40 min, T2 = 90 min, T3 = 150 min). El pK_a fue calculado para cada tiempo.

6.3 Determinación del pK_a de los compuestos bis(2-iminoimidazolinicos)

6.3.1 Resultados y discusión

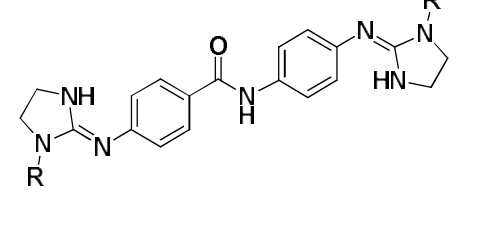
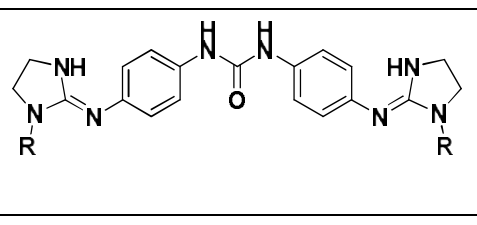
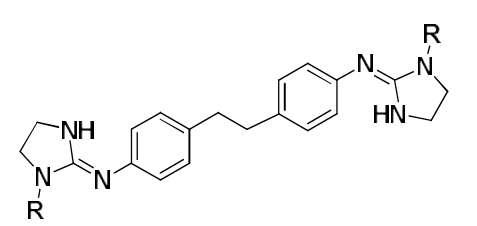
Habiendo comprobado la validez de esta nueva metodología, procedimos a medir el pK_a de los derivados imidazolidínicos sintetizados durante esta tesis. Siguiendo el procedimiento general antes detallado se llevó a cabo la medida simultánea del pK_a de los compuestos cabeza de serie (**2 - 4**), los *N*-alcoxil análogos (**33 - 38**), y los derivados halogenados (**83a - 87a**). Se utilizó una media de 4 compuestos por placa con 16 disoluciones tampón (pH) diferentes.

Determinación de constantes de ionización por UV

Esto nos permitió tener todos los espectros UV en todo el rango de pH en aproximadamente 30 – 40 minutos. En comparación con otras técnicas, esta se puede considerar una técnica rápida para la obtención del pK_a .

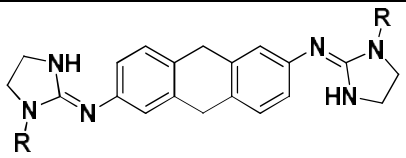
Los valores experimentales de pK_a se recogen en la Tabla 6.2. Los espectros UV, el análisis de datos, y las curvas de absorbancia vs pH para la determinación de los pK_a s aparecen en la parte experimental. Hay que destacar que solo fue posible medir un solo valor de pK_a para nuestros compuestos a pesar de poseer dos grupos ionizables. Esto se debe probablemente al solapamiento de ambos pK_a s. Es decir, la segunda desprotonación posiblemente tiene lugar en un rango muy pequeño de pH, por lo que no se distinguen experimentalmente los cambios en los espectros de UV. Estos resultados son consistentes con aquellos publicados en la literatura con moléculas dicationicas simétricas similares [ie, bis(2-iminoimidazolidinas), bisguanidinas y dicarbamimidatos]¹³.

Tabla 6.2: Medidas experimentales de pK_a de las bis-(2-iminoimidazolidinas) y sus derivados *N*-alcoxilados.^a

	Estructura	R	λ (nm) ^b	$pK_a \pm DS$ ^c
2		H	258/308	9.29 \pm 0.07^d
33a		OMe	258/312	7.27 \pm 0.09
33b		OEt	258/308	7.34 \pm 0.03
33e		OH	258/298	7.43 \pm 0.10
3		H	260/292	10.34 \pm 0.04
34a		OMe	240/270	7.95 \pm 0.05
34b		OEt	258/296	8.27 \pm 0.07
4		H	260/310	10.71 \pm 0.10
35a		OMe	236/262	8.01 \pm 0.12
35b		OEt	238/262	8.01 \pm 0.21
35e		OH	238/264	7.97 \pm 0.13

Determinación de constantes de ionización por UV

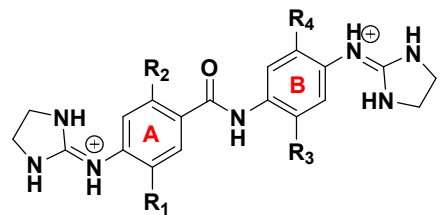
Continuación Tabla 6.2

5		H	272/288	9.82 ± 0.26
36a		OMe	272/290	7.53 ± 0.14

^a El compuesto fue disuelto en DMSO (solución madre) y diluido con el correspondiente buffer para alcanzar una concentración de 0.2 mM en cada pocillo (2% DMSO v/v). ^b Longitud de onda analítica. ^c pK_a de los grupos iminoimidazolidínicos; solamente un valor de pK_a pudo ser calculado para ambos grupos iminoidazolínicos. ^d El valor del pK_a fue calculado del promedio de al menos 3 medidas independientes.

De igual manera, solo fue posible medir un único valor de pK_a (que también es resultado del promedio de las dos constantes de ionización presentes en estas moléculas) para los compuestos halogenados **83a** – **88a**. Los pK_a obtenidos fueron ligeramente superiores al compuesto cabeza de serie **2** en el caso de los compuestos sustituidos en el anillo B (**85a** – **86a**) y disminuyó ligeramente en el caso de los compuestos sustituidos en el anillo A (**83a** – **84a** y **87a**) (Tabla 6.3). Dichos resultados se comentan más detalladamente en el capítulo 5 de esta tesis.

Tabla 6.3: Medidas experimentales de pK_a de los compuestos **83a** – **87a**.



Compuesto ^a	R	λ (nm) ^b	$pK_a \pm SD^c$
2	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$	258/308	9.29 ± 0.07^d
83a	$R_1 = F; R_2 = R_3 = R_4 = H$	314/380	9.09 ± 0.10
84a	$R_2 = F; R_1 = R_3 = R_4 = H$	260/314	8.55 ± 0.01
85a	$R_3 = F; R_1 = R_2 = R_4 = H$	243/309	9.40 ± 0.11
86a	$R_4 = F; R_1 = R_2 = R_3 = H$	263/313	9.43 ± 0.02
87a	$R_1 = Cl; R_2 = R_3 = R_4 = H$	260/312	8.57 ± 0.05

^aEl compuesto fue disuelto en DMSO (solución madre) y diluido con el correspondiente buffer para alcanzar una concentración de 0.2 mM en cada pocillo (2% DMSO v/v). ^b Longitud de onda analítica. ^c pK_a de los grupos iminoimidazolidínicos; solamente pudo ser calculado un valor de pK_a para ambos grupos imidazolidínicos. ^d El valor del pK_a fue calculado del promedio de al menos 3 medidas independientes.

Determinación de constantes de ionización por UV

6.4 Conclusiones

Hemos desarrollado una metodología que permite una rápida medición de la constante de ionización (pK_a) de series de compuestos orgánicos por espectroscopía UV. Esta metodología aprovecha unas ventajas de la espectroscopía UV como su sensibilidad y su rendimiento mediante la utilización de placas de 96 pocillos. Esto hace posible la utilización de una pequeña cantidad de compuesto (1 - 2 mg) y la determinación simultánea del pK_a (en H_2O) de varios compuestos. Además, hemos comprobado que la presencia de 2% de DMSO en las disoluciones acuosas apenas afecta los valores experimentales de pK_a . Esto presenta una ventaja ya que permite medir las constantes de ionización en agua de compuestos poco solubles en medio acuoso.

Esta metodología resultó ser muy útil para medir este parámetro físico-químico muy importante a la hora del diseño de nuevos fármacos. El hecho de utilizar cantidades pequeñas de compuestos y aparatos habituales en laboratorios de investigación (pH-metro, espectrometro UV-Vis) hace factible este método como herramienta de uso común por grupos de investigación en Química Médica. El tiempo que consume la realización de la medida es relativamente corto en comparación con otros métodos de medición de pK_a y el análisis de datos resulta sencillo, por lo que esta metodología presenta muchas ventajas para la determinación de las constantes de ionización de compuestos orgánicos.

En el caso particular de nuestros compuestos bis(2-iminoimidazolidínicos) que poseen dos grupos ionizables, no fue posible medir el pK_a para cada uno de estos grupos. Solamente un valor de pK_a (promedio) fue determinado para cada compuesto. Esto puede deberse a que la segunda desprotonación tiene lugar en un rango muy corto de pH por lo que el cambio en los espectros no pudo detectarse.

Determinación de constantes de ionización por UV

6.5 Referencias bibliográficas

1. Manallack, D. T.; Prankerd, R. J.; Nassta, G. C.; Ursu, O.; Oprea, T. I.; Chalmers, D. K., A chemogenomic analysis of ionization constants--implications for drug discovery. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 242-255.
2. Wikipedia, c. d. Constante de disociación ácida [http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Constante de disociaci%C3%B3n %C3%A1cida&oldid=68238970](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Constante_de_disociaci%C3%B3n_%C3%A1cida&oldid=68238970) (accessed 25 de septiembre del 2013, 07:49 UTC).
3. (a) Allen, R. I.; Box, K. J.; Comer, J. E.; Peake, C.; Tam, K. Y., Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 699-712; (b) Albert, A.; Serjeant, E. P., *The determination of ionization constants: a laboratory manual*. Chapman and Hall: 1971; p 115.
4. (a) Cabot, J. M.; Fuguet, E.; Rafols, C.; Roses, M., Fast high-throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis. II. Acidic internal standards. *J. Chromatogr. A* **2010**, *24*, 8340-8345; (b) Fuguet, E.; Rafols, C.; Bosch, E.; Roses, M., Fast high-throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis: I. Monoprotic weak acids and bases. *J. Chromatogr. A* **2009**, *24*, 3646-3651; (c) Fuguet, E.; Rafols, C.; Roses, M., A fast high throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis. 3. Basic internal standards. *J. Chromatogr. A* **2011**, *24*, 3928-3934.
5. (a) Box, K.; Bevan, C.; Comer, J.; Hill, A.; Allen, R.; Reynolds, D., High-Throughput Measurement of pKa Values in a Mixed-Buffer Linear pH Gradient System. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 883-892; (b) Comer, J.; Box, K., High-Throughput Measurement of Drug pKa Values for ADME Screening. *J. Assoc. Lab. Autom.* **2003**, *8*, 55-59.
6. Lead, A. M.; Tarkany, O.; Novikov, A.; Moskalenko, E.; Vysotsky, A.; Volokh, V. *Prism 5 for Windows*, 5.01; GraphPad Software Inc.: 1992-2007.
7. (a) Tomsho, J. W.; Pal, A.; Hall, D. G.; Benkovic, S. J., Ring structure and aromatic substituent effects on the pK_a of the benzoxaborole pharmacophore. *ACS Med. Chem. Lett.*

Determinación de constantes de ionización por UV

2011, 3, 48-52; (b) Ríos Martínez, C. H.; Dardonville, C., Rapid determination of ionization constants (pK_a) by UV spectroscopy using 96-Well microtiter plates. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 4, 142-145.

8. Liptak, M. D.; Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C., Absolute pK_a determinations for substituted phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6421-6427.

9. Volgyi, G.; Ruiz, R.; Box, K.; Comer, J.; Bosch, E.; Takacs-Novak, K., Potentiometric and spectrophotometric pK_a determination of water-insoluble compounds: validation study in a new cosolvent system. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 418-428.

10. Schofield, K.; Grimmett, M. R.; Keene, B. R. T., *Heteroaromatic nitrogen compounds : the Azoles*. Cambridge University Press: 1976.

11. Tam, K. Y.; Takács-Novák, K., Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 434, 157-167.

12. Nagle, P.; Kahvedžić, A.; McCabe, T.; Rozas, I., On the protonated state of amidinium-like diaromatic derivatives: X-ray and UV studies. *Struct. Chem.* **2012**, 23, 315-323.

13. Kinsella, G. K.; Rodriguez, F.; Watson, G. W.; Rozas, I., Computational approach to the basicity of a series of $[\alpha]1$ -adrenoceptor ligands in aqueous solution. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 2850-2855.

*7. ESTUDIOS BIOFÍSICOS POR RESONANCIA DE
PLASMÓN DE SUPERFICIE (SPR)*

7. Estudios biofísicos por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)

7.1 Estudios de unión a ADN

Es conocida la capacidad de los compuestos dicatiónicos para interactuar con el ADN¹. Compuestos de la familia de las diamidinas², diguanidinas³ o bisimidazolininas⁴ activos contra *T. brucei* demostraron ser buenos ligandos del ADN⁵. Existen dos modos de interacción fármaco-ADN que se basan en una unión bien covalente o no-covalente entre el ligando y la doble hebra del ADN. Además, los ligandos de ADN se pueden dividir en dos subclases: ligandos del surco y agentes intercalantes⁶. Los ligandos del surco estrecho (“minor groove binders”, MGB por sus siglas en inglés) son compuestos particularmente interesantes para el diseño de agentes antimicrobianos porque son “secuencia-selectivos” (a diferencia de los agentes intercalantes que no lo son), uniéndose principalmente a los ADN de doble hebra ricos en bases A/T. La selectividad es especialmente relevante en el caso de parásitos patógenos como los tripanosomas cuyo genoma mitocondrial contiene una alta proporción de secuencias de ADN ricas en bases A/T⁵. Se han descrito en la literatura series de compuestos MGB que se unen específicamente al surco estrecho del ADN siendo a su vez muy efectivos contra el parásito *T. brucei*^{5, 7}. La mayoría de dichos MGB comparte características estructurales: carga(s) positiva(s), anillos aromáticos o heteroaromáticos preferentemente no fusionados, y una estructura en forma de media-luna (“isohelicity”) que se adapta a la curvatura del surco⁸ (**Figura 7.1**).

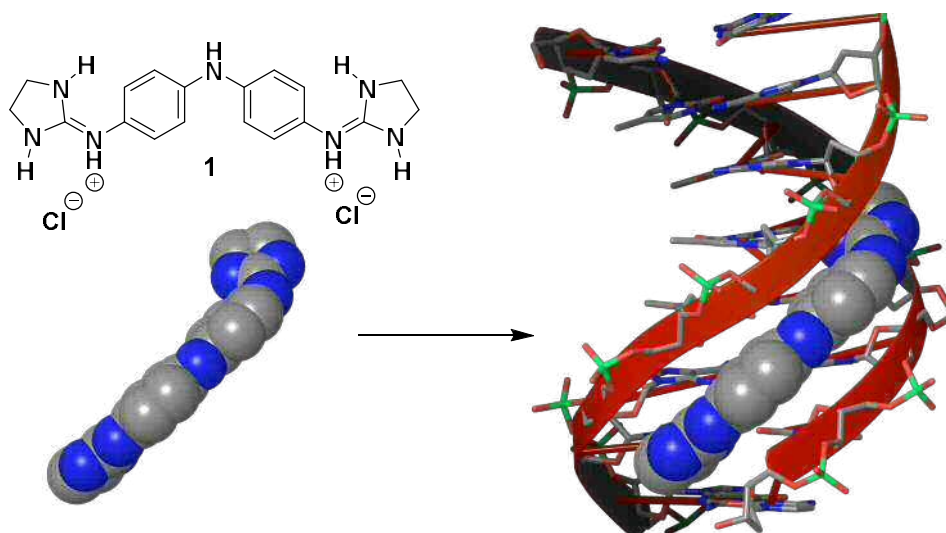


Figura 7.1: Estructura cristalina de la 4,4'-bis(imidazolidinilamino)difenilamina unida al surco estrecho de una cadena de ADN de secuencia AATT⁸.

Dichas características permiten una coincidencia ideal entre el ligando y el surco mediante interacciones de tipo van der Waals y enlaces de hidrógeno. En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, se demostró la capacidad de los derivados de bis-iminoimidazolidinio para interactuar con el surco estrecho del ADN, factor posiblemente relacionado con la bioactividad de estos compuestos contra *T. brucei* ^{4a, b}. Puesto que los compuestos sintetizados en esta tesis son derivados estructuralmente relacionados con los cabezas de serie **2 – 9**, nos planteamos medir experimentalmente su afinidad por el ADN con el objetivo de determinar: 1) la influencia que tienen los sustituyentes -OR de los anillos de imidazolidina sobre la fuerza y el modo de unión al ADN de este tipo de compuestos, y 2) si existe una correlación entre la unión al ADN y la actividad biológica sobre *T. brucei*. Estos experimentos se llevaron a cabo mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR, por sus siglas en inglés), una técnica bien establecida para el análisis cuantitativo de las interacciones fármaco-ácido nucléico.⁹

7.1.1 Introducción sobre la técnica de SPR

Esta técnica consiste en la medición, mediante un biosensor óptico de onda evanescente, del cambio en el ángulo de la luz reflejada que se produce por la interacción de un ligando con su receptor (o viceversa) inmovilizado sobre una superficie de oro ('chip') (**Figura 7.2**). En la figura 7.2a se muestra un receptor que ha sido inmovilizado sobre la superficie del chip. Sobre esta lámina de metal se coloca un prisma. Un haz de luz polarizada se hace incidir sobre el chip de oro a través del prisma con un cierto valor crítico para provocar la reflexión del haz de luz. Sobre el punto de incidencia del haz se produce una interacción con la nube electrónica del metal y una pequeña parte del haz es absorbida por éste, fenómeno que es conocido como onda evanescente o plasmón de superficie (**Figura 7.2b**).

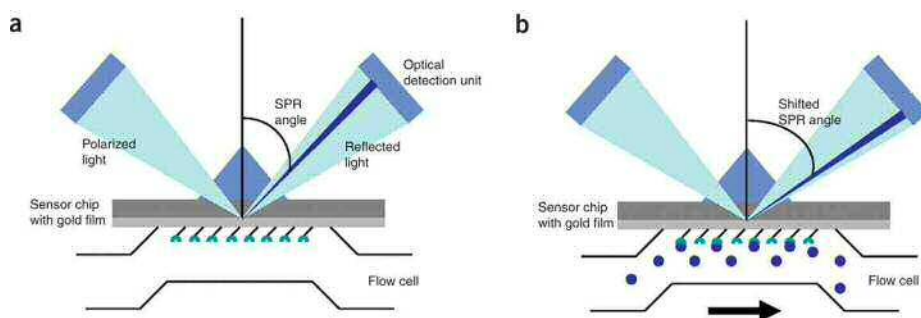


Figura 7.2: Esquema del funcionamiento del SPR. (a) Chip de oro con un receptor inmovilizado. El ángulo SPR del haz de luz reflejada se mantiene constante en ausencia de ligando. (b) Al fluir el ligando sobre la superficie del chip, se une al receptor provocando un cambio en el ángulo SPR proporcional a la cantidad de ligando que se une.

Estudios biofísicos por SPR

El ángulo de SPR es aquel en el que se produce la mayor pérdida de luz reflejada y depende de las características ópticas del sistema. El equipo monitorizará estos cambios de modo que cuando nuestro ligando interacciona con el receptor inmovilizado (**Figura 7.2b**) se producirá un cambio en el ángulo SPR, que será dependiente del cambio de masa producido sobre la superficie del chip. Se representa como señal de resonancia en función del tiempo (sensograma). En la figura 7.3 se muestra gráficamente la cuantificación del cambio en el ángulo de SPR a lo largo de un experimento en el que un ligando fluye sobre la superficie del chip donde está inmovilizado el receptor. La técnica de SPR permite medir la afinidad de la interacción ligando-receptor, así como la cinética de la misma. A continuación se muestran las constantes de asociación (K_A) y disociación (K_D) de un sistema de interacción 1:1 entre el ligando (L) y el receptor (R):

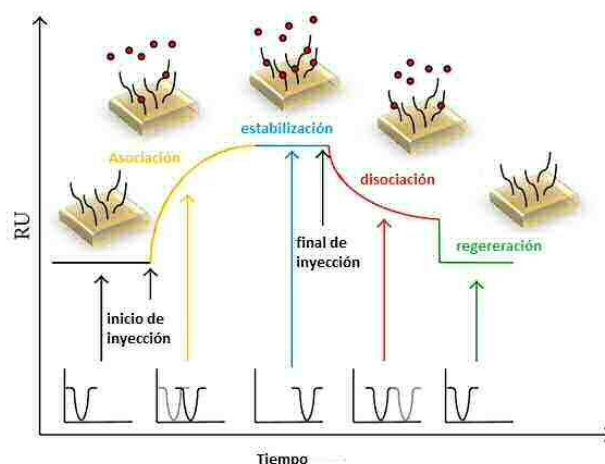
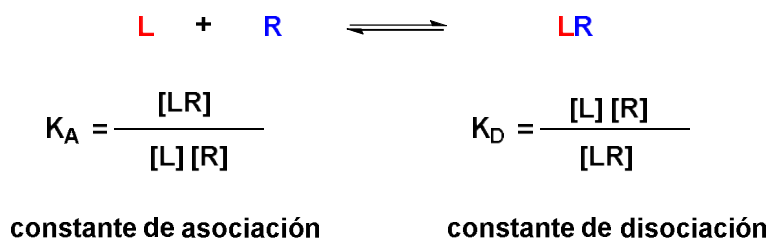


Figura 7.3: Sensograma. Representación continua y en tiempo real que refleja los procesos de asociación y disociación del complejo ligando-receptor.

7.1.2 Resultados de unión de los compuestos a 3 oligonucleótidos “hairpin” de secuencia AATT, (AT)₄ y (CG)₄

Con la finalidad de conocer la afinidad por el surco estrecho del ADN de los compuestos sintetizados, nos planteamos medir mediante la técnica de SPR dicha interacción. Para esto, tres tipos de oligonucleótidos con secuencia **AATT**, **(AT)₄** y **(CG)₄**, respectivamente

Estudios biofísicos por SPR

(Figura 7.4), fueron inmovilizados en un microchip de oro utilizando la técnica de streptavidina como se describe en la parte experimental (sección 8.22).



Figura 7.4: Estructura de las secuencias de ADN 5'-biotinilado ("hairpin duplexes") usados en estos ensayos.

Fueron utilizadas las secuencias AATT y (AT)₄ ya que es conocida la afinidad de compuestos dicatiónicos por estas secuencias y su alta presencia en el genoma mitocondrial de *T. brucei*. La secuencia (GC)₄ ha sido utilizada como control negativo. Como primer paso, se procedió al cribado (a la concentración de 25 μM) de todos los compuestos sintetizados con los tres ADNs con el fin de determinar cuales se unían al ADN de manera significativa. De esta manera se pudieron distinguir los compuestos con buena afinidad y aquellos que no se unían a dichos ADNs (Figura 7.5).

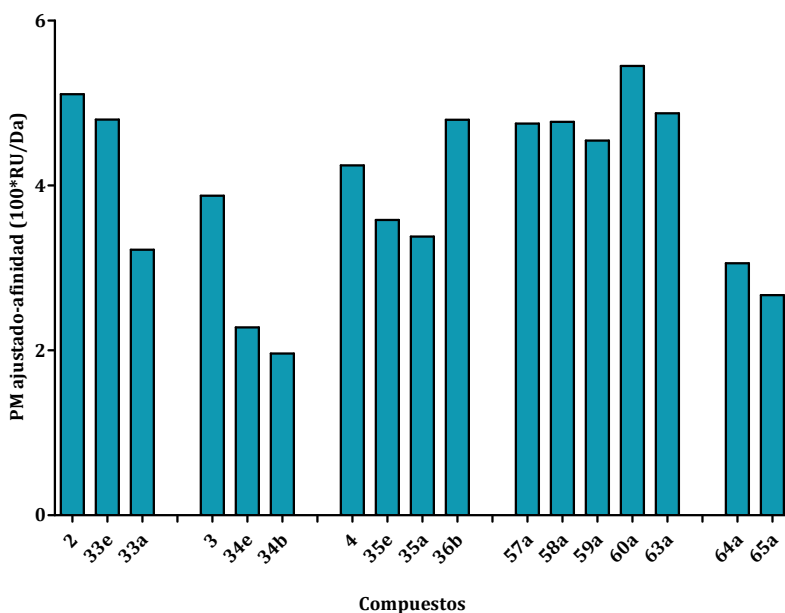


Figura 7.5: Diagrama de la afinidad (respuesta SPR relativa ajustada al peso molecular) de los diferentes compuestos a la concentración de 25 μM con el ADN AATT.

Se procedió entonces a medir las constantes de asociación de los compuestos con mejor afinidad aparente: los cabezas de serie imidazolidínicos **2** – **4**, el compuesto cabeza de serie guanidínico **7**, los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos) **33a,e** y **35b,e**, y los derivados bisguanidínicos **57a** - **58a** y **65a**. El experimento para la medición de las constantes de afinidad se llevó a cabo de la siguiente manera: diferentes diluciones de los compuestos, en el rango 0.05 – 60 μM, fueron inyectadas sobre el microchip donde habían

sido inmovilizadas las diferentes secuencias de ADN obteniéndose un sensograma para cada una de las concentraciones (Figura 7.6).

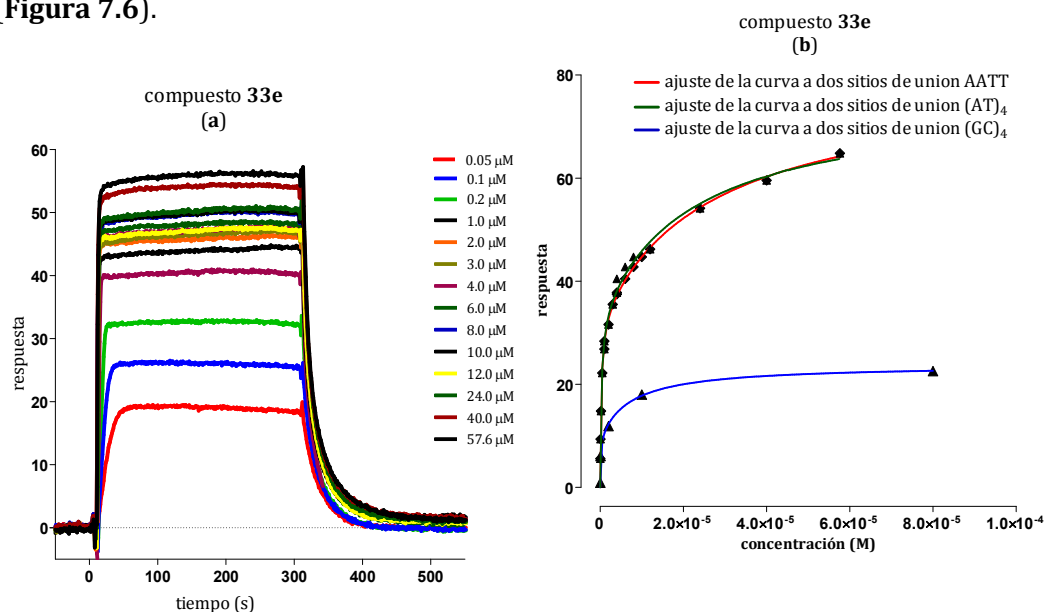


Figura 7.6: Determinación de la constante de afinidad. (a) Sensogramas a diferentes concentraciones de la unión del compuesto **33e** con el oligonucleótido AATT. (b) La respuesta SPR (RU) en la región de equilibrio de los sensogramas fue convertida a r (moles de compuesto unido por mol de ADN; $r = RU/RU_{max}$) y fue representada frente a la concentración del compuesto no unido para los oligonucleótidos AATT, $(AT)_4$ y $(GC)_4$.

Una vez obtenidos los sensogramas para cada una de las concentraciones, la respuesta SPR (RU) en la región de equilibrio de los sensogramas (zona de estabilización en la figura 7.3) fue convertida a r (moles de compuesto unido por mol de ADN; $r = RU/RU_{max}$) y fue representada frente a la concentración del compuesto no unido ($C_f =$ disolución que fluye sobre la superficie del chip). Las diferentes curvas fueron ajustadas a modelos de un sitio o dos sitios de unión según cada caso (véase los detalles en la parte experimental (8.22.2.2)). Los resultados se muestran en la Tabla 7.1.

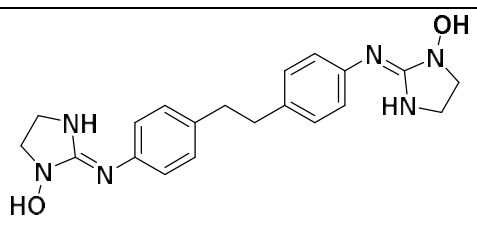
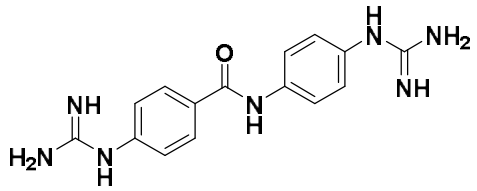
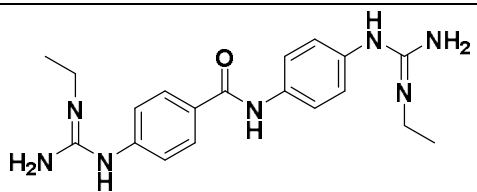
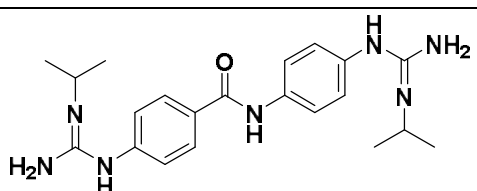
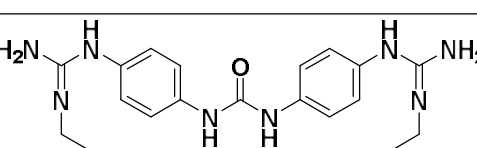
Estudios biofísicos por SPR

Tabla 7.1: Constantes de afinidad K_A ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$) de los compuestos por los oligonucleótidos AATT, (AT)₄ y (GC)₄.

	Estructura	AATT ^a (r) ^b	(AT) ₄ ^a (r) ^b	(GC) ₄ ^a (r) ^b
2		60.2 (1.7)	32.6 (1.3)	<1 ^{c,d}
33a		39.1 (1.5)	28.5 (2)	<1 ^c
33e		130 (1)	36.6 (1.2)	0.54 (1.5)
3		0.86 (1.8)	1.27 (1.4)	0.02 -0.06 ^f (4.7)
4		3.6 (3.3)	2.3 (4)	0.51 (2)
35b		0.19-0.70 (2)	(0.10- 0.14) ^d (8.9) ^d	0.12 ^e (2)

^a Constante de unión primaria para un ajuste a un modelo de dos sitios de unión. ^b $r = RU/RU_{max}$. ^c No hay suficiente señal para obtener una constante de unión para ese oligonucleótido. ^d Unión no específica. ^e Constante de unión para un ajuste a un sitio de unión. ^f Tomado de Nagle P. *et al.*^{4c}

Estudios biofísicos por SPR

Continuación Tabla 7.1			
Estructura	AATT ^a (r) ^b	(AT) ₄ ^a (r) ^b	(GC) ₄ ^a (r) ^b
<p>35e</p> 	11.5 (1.1)	2.5 (1.2)	0.13 ^e (1)
<p>7</p> 	71.0 ^f	18.0 ^d	<1 ^c
<p>57a</p> 	8.1 (1.5)	3.5 (1.6)	-
<p>58a</p> 	5.5 ^e (2)	3.3 (2)	-
<p>65a</p> 	0.18 ^e (2.8)	0.14 (3.5)	^d

^a Constante de unión primaria para un ajuste a un modelo de dos sitios de unión. ^b r = RU/RU_{max}. ^c No hay suficiente señal para obtener una constante de unión para ese oligonucleótido. ^d Unión no específica. ^e Constante de unión para un ajuste a un sitio de unión. ^f Tomado de Nagle P. *et al.*^{4c}

Los compuestos cabeza de series **2** y **7** cuyo espaciador es la benzamida, mostraron una alta afinidad por los oligonucleótidos AATT y (AT)₄ con una preferencia (del orden de 2 veces) para el primero. Por el contrario, estos compuestos mostraron una afinidad baja por la secuencia (CG)₄ confirmando que son ligandos específicos del surco estrecho del ADN. En cambio, los cabezas de serie con espaciador urea (**3**) o etileno (**4**) mostraron una afinidad reducida (entre 20 y 40 veces menor) para ambas secuencias AT y escasa especificidad.

Estudios biofísicos por SPR

Los derivados bis(1-alcoxi-2-iminoimidazolidínicos) mostraron resultados diversos. El compuesto **35b** (R = OEt) mostró valores bajos de afinidad, similares para las tres secuencias, siendo bastante inespecífica su afinidad por estos ADN. En cambio, el *N*-metoxi derivado **33a** mostró una unión selectiva a ambas secuencias AT aunque su constante de afinidad para estas secuencias fue algo menor que la del compuesto **2** sin sustituir. Por el contrario, la introducción de grupos OH sobre los nitrógenos imidazolidínicos (**33e**, **35e**) resultó en una mejora sustancial de la afinidad de estos compuestos por la secuencia AATT (entre 2 y 3 veces) en comparación con los compuestos cabeza de serie **2** y **4**, respectivamente. Así pues, el derivado *N*-hidroxilado **33e** fue el que mejor afinidad mostró por los oligonucleótidos AATT y (AT)₄, siendo más específico por la secuencia AATT (3.5 veces) frente a la secuencia (AT)₄. En conjunto, estos datos muestran el efecto positivo de los grupos hidroxilo sobre la fuerza y la selectividad de unión de estos derivados.

En cuanto a los derivados de guanidina, la introducción de restos etilo (**57a**) e isopropilo (**58a**) resultó en una pérdida de afinidad (> 5 veces) por ambas secuencias AT con $K_A < 10 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. De igual manera, el derivado de guanidina **65a** (R = Et) con espaciador de tipo urea resultó ser un ligando débil e inespecífico de estas secuencias ($K_A < 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). En general, todos los compuestos mostraron escasa afinidad por la secuencia (CG)₄ ($K_A < 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) indicando que estos derivados son ligandos específicos del surco estrecho de ADN ricos en bases AT.

En resumen, estos resultados muestran que la unión de estos compuestos dicatiónicos al surco estrecho del ADN es muy sensible a pequeñas modificaciones estructurales sobre los grupos catiónicos (Ej. sustituyentes alquilo y alcoxilo), tanto en los anillos de imidazolidina como en las guanidinas. Cabe destacar que la introducción de grupos hidroxilo sobre el N1 de las imidazolidinas mejora de manera importante la afinidad y la selectividad de estas moléculas por la secuencia AATT. Este resultado es muy interesante porque según estudios anteriores con moléculas parecidas, la introducción de grupos hidroxilo sobre los restos de guanidina reducían drásticamente la afinidad de unión a ADN de dichos compuestos¹⁰. Por lo tanto, nuestros resultados establecen una base para el diseño de nuevos ligandos del surco estrecho más potentes y específicos.

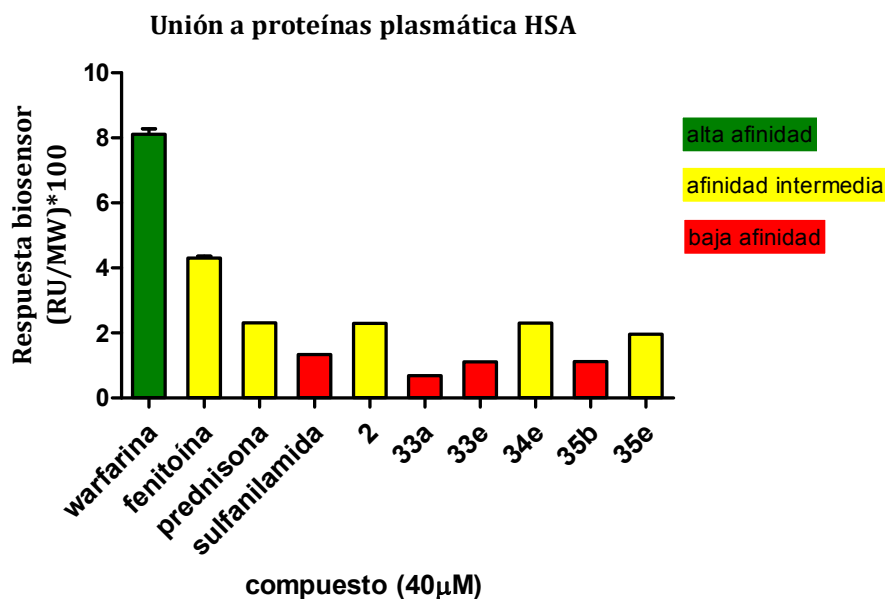
Por último, hay que recalcar que la naturaleza del espaciador entre los dos fenilos juega también un papel fundamental para el reconocimiento de estas estructuras por el ADN. Nuestros datos confirman que la *N*-fenilbenzamida (Ej. **2**, **7**, **33a**, **33e**) es un esqueleto privilegiado para obtener excelentes ligandos del ADN. De hecho, el compuesto **33e** que

resultó ser el mejor ligando de ADN de la serie, es también el compuesto que mostró la mejor actividad *in vivo* en la fase neurológica de la TAH. Aunque no se observa una clara correlación entre los resultados de unión a ADN y la actividad tripanocida de estos compuestos, los resultados de unión de **35e** sugieren que dicho compuesto podría actuar sobre *T. brucei* mediante un mecanismo que implica la formación de un complejo con el ADN.

7.2 Estudios de unión a proteínas plasmáticas

Las proteínas plasmáticas son proteínas que se encuentran en el plasma sanguíneo, llegando estar presentes en sangre en cantidades de 70 g/L. El plasma sanguíneo contiene mayoritariamente albúmina (30 a 50 g/L), inmunoglobulina (10 – 15 g/L), fibrinógenos (2 – 4.5 g/L) y otros tipos de proteínas. Es de mencionar que en el plasma, la albúmina de suero humano (HSA) juega un papel importante en el transporte de agentes, tanto endógenos como exógenos a través del torrente sanguíneo y, por consiguiente, suele utilizarse como modelo para investigar su interacción con moléculas pequeñas ya que puede proporcionar información relevante sobre la farmacocinética y farmacodinamia de posibles nuevos fármacos¹¹. Así, la estimación de la capacidad de unión que tendrán nuestros compuestos por la HSA ejercerá un efecto en su concentración libre en el torrente sanguíneo. Por tal motivo, nos propusimos medir la unión a HSA de los compuestos **2**, **33a**, **33e**, **34d**, **35b** y **35d** mediante SPR. El experimento consiste en inmovilizar HSA en un chip a través de grupos amino. A continuación, se lleva a cabo el experimento de unión, donde se utilizaron como controles positivos diferentes compuestos (warfarina, fenitoína, prednisona) y sulfanilamida como control negativo. La concentración óptima para llevar a cabo el experimento fue determinada en 40 μM siguiendo los protocolos previamente descritos¹² obteniéndose los resultados que se muestran en la gráfica 7.1.

Gráfica 7.1: Afinidad por HSA del compuesto cabeza de serie 2 y algunos de sus análogos.



Realizado el experimento, se observó que todos los compuestos poseen una unión reversible a HSA. El compuesto cabeza de serie 2 mostró un nivel intermedio al igual que el compuesto 36e. Por el contrario los compuestos 33a, 33e, 35b y 35e apenas se unen como se muestra en la gráfica 7.1. Los resultados de baja unión a HSA eran los esperados, en especial los del compuesto 35e que fue capaz de curar los ratones en el ensayo *in vivo* de la primera fase de la THA. Al no presentar apenas unión a HSA, el compuesto 35e tiene una alta disponibilidad en sangre para actuar contra el parásito, lo cual explica su actividad *in vivo* en la primera fase de la TAH.

7.3 Conclusiones

Hemos medido mediante la técnica de SPR la constante de afinidad de los compuestos cabeza de serie 2 – 4 y 7 y los derivados 33a,e, 35b,e; 57a, 58a y 65a por los oligonucleótidos AATT, (AT)₄ y (GC)₄. También hemos medido mediante esta técnica la afinidad del compuestos cabeza de serie 2 y los derivados 33a,e; 34e y 35b,e por la HSA.

Ninguno de los compuestos imidazolidínicos ensayados mostró alta afinidad por la HSA indicando que estos compuestos deberían poseer una alta disponibilidad en sangre permitiéndoles actuar sobre los parásitos de manera más efectiva.

En los ensayos de unión a ADN, hemos comprobado que los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos) 33a, 33e, 35b y 35e y los derivados de bisguanidina 57a, 58a y 65a poseen mayor afinidad por los oligonucleótidos AATT y (AT)₄ vs (GC)₄ confirmándose que son ligandos del surco estrecho específicos de secuencias AT. Los compuestos

derivados de la *N*-fenilbenzamida (**33a** y **33e**) mostraron poseer la mayor afinidad por los oligonucleótidos AATT y (AT)₄ entre todos los compuestos probados, recalcando el potencial de dicho esqueleto para el diseño de ligandos específicos del surco estrecho. El compuesto **33e** que posee actividad *in vivo* en la fase neurológica de la TAH mostró mayor afinidad que el compuesto cabeza de serie **2**, en particular por el oligonucleótido de secuencia AATT ($K_A = 130 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Como ya es conocido que el genoma mitocondrial de *T. brucei* posee una alta cantidad de estas secuencias, estos resultados podrían indicar que el compuesto **33e** actúa sobre el parásito como un MGB, uniéndose al ADN mitocondrial e inhibiendo de alguna manera la transcripción del ADN.

7.4 Referencias bibliográficas

1. Wilson, W. D.; Nguyen, B.; Tanious, F. A.; Mathis, A.; Hall, J. E.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W., Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 389-408.
2. Soeiro, M. N.; De Souza, E. M.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W., Aromatic diamidines as antiparasitic agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14*, 957-972.
3. Nagle, P. S.; Quinn, S. J.; Kelly, J. M.; O'Donovan, D. H.; Khan, A. R.; Rodriguez, F.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; Rozas, I., Understanding the DNA binding of novel non-symmetrical guanidinium/2-aminoimidazolium derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5558-5567.
4. (a) Dardonville, C.; Barrett, M. P.; Brun, R.; Kaiser, M.; Tanious, F.; Wilson, W. D., DNA binding affinity of bisguanidine and bis(2-aminoimidazoline) Derivatives with *in Vivo* Antitrypanosomal Activity. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3748-3752; (b) Rodríguez, F.; Rozas, I.; Kaiser, M.; Brun, R.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; García, R. N.; Dardonville, C., New bis(2-aminoimidazoline) and bisguanidine DNA minor groove binders with potent *in Vivo* antitrypanosomal and antiplasmodial activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 909-923; (c) Nagle, P. S.; Rodriguez, F.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; Rozas, I., High DNA affinity of a series of peptide linked diaromatic guanidinium-like derivatives. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4397-4406.
5. Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Mathis, A.; Tevis, D.; Hall, J. E.; Boykin, D. W., Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie* **2008**, *90*, 999-1014.

6. Neidle, S., *Principles of nucleic acid structure*. Elsevier Inc.: 2008.
7. Tidwell, R.; Boykin, D., Minor groove binders as antimicrobial agents. In *Small molecule DNA and RNA binder: synthesis to nucleic acid complexes*, Wiley-VCH: New York, USA, 2003; pp 416-460.
8. Glass, L. S.; Nguyen, B.; Goodwin, K. D.; Dardonville, C.; Wilson, W. D.; Long, E. C.; Georgiadis, M. M., Crystal structure of a trypanocidal 4,4'-bis(imidazolinylamino)diphenyl amine bound to DNA. *Biochemistry* **2009**, *48*, 5943-5952.
9. (a) Wilson, W. D., Analyzing Biomolecular Interactions. *Science* **2002**, *295*, 2103-2105; (b) Nguyen, B.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D., Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions. *Methods* **2007**, *42*, 150-61.
10. Kahvedzic, A.; Nathwani, S. M.; Zisterer, D. M.; Rozas, I., Aromatic bis-*N*-hydroxyguanidinium derivatives: synthesis, biophysical, and biochemical evaluations. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 451-459.
11. (a) Xiao, J.; Zhao, Y.; Wang, H.; Yuan, Y.; Yang, F.; Zhang, C.; Yamamoto, K., Noncovalent interaction of dietary polyphenols with common human plasma proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10747-10754; (b) Scherrmann; Jean-Michel, Transporters in Absorption, Distribution, and Elimination. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1933-1942.
12. (a) Frostell-Karlsson, Å.; Remaeus, A.; Roos, H.; Andersson, K.; Borg, P.; Hämäläinen, M.; Karlsson, R., Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1986-1992; (b) Rich, R. L.; Day, Y. S.; Morton, T. A.; Myszka, D. G., High-resolution and high-throughput protocols for measuring drug/human serum albumin interactions using BIACORE. *Anal Biochem.* **2001**, *296*, 197-207.

8. PARTE EXPERIMENTAL

Parte Experimental

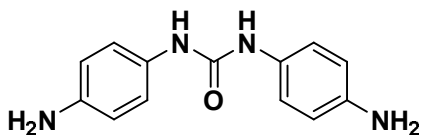
8. Parte Experimental

Los espectros de masas se registraron en modo positivo mediante la técnica de ionización por electrospray (ES⁺) con un aparato MSD-Serie 1100 Hewlett Packard o en un HPLC-MS WATERS integrado por un módulo de separación 2695, un detector PDA (Photodiode Array) 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ. La cromatografía líquida analítica (HPLC) se realizó en fase reversa utilizando una columna SunFire C18-3.5 µm de dimensiones 4.6 mm × 50 mm. Las muestras se analizaron utilizando como fase móvil A: CH₃CN + 0.08% ácido fórmico y B: H₂O + 0.05% ácido fórmico. El gradiente utilizado fue de 15% a 95% de CH₃CN, salvo que se indique lo contrario, en 5 min a un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó entre 190 y 440 nm. La detección de masas se realizó mediante el equipo Micromass ZQ acoplado al módulo de HPLC utilizando tres voltajes de cono diferentes (20, 40 y 60 eV) y detección en modo positivo (ES⁺). Las cromatografías de capa fina (CCF) fueron realizadas en cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ de 20 x 20 cm, marca Merck. Las separaciones cromatográficas fueron realizadas por cromatografía de media presión con el sistema FlashMaster Personal usando columnas precompactadas FlashPack SI de 2 g, 10 g, 20 g o 50 g de sílica gel, columnas compactadas manualmente con alúmina neutra (Sigma-Aldrich, Al₂O₃, Brockmann I, pH = 7.0) o por cromatografía de capa fina preparativa, placas (20 x 20) cm y 2 mm de ancho, marca UNIPLATE. Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se registraron en espectrómetros Bruker 300 Unity, Varian 400 Unity, Mercury 400 y Mercury 500. Los experimentos de correlación heteronuclear, HMBC y HSQC, fueron realizados en un espectrómetro Bruker 300, Varian 400 Unity Mercury 400 Unity con sonda de detección inversa. La multiplicidad de las señales de RMN de protón están definidas de la siguiente manera: singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuádruplete (c), múltiplete (m), s.a. (señal ancha). Las constantes de acoplamiento *J* se dan en hertzios (Hz). Los disolventes secos usados son de marca Aldrich/Fluka envasados en botellas SureSeal™. Las reacciones en microondas fueron realizadas en un reactor de microondas Biotage (frecuencia: 2045 GHz). Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato de medida de punto de fusión marca Mettler Toledo MP270.

Parte Experimental

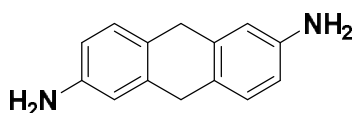
8.1 Síntesis de la diaminas 27 y 28

8.1.1 Síntesis de la 1,3-bis(4-aminofenil)urea (27)



En un matraz de tres bocas se disolvió 5 g (17.4 mmol) de 1,3-bis(4-nitrofenil)urea en 120 mL de MeOH. Se añadió 250 mg de Pd-C 10% como catalizador. Después de purgar el aire del matraz mediante un ciclo de vacío/argón/vacío, la reacción se dejó en agitación durante 23 horas bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm). Terminada la reacción, se eliminó el catalizador por filtración sobre celite, se evaporó el disolvente y el producto se recrystalizó de una mezcla de MeOH/DMF (2%). De esta manera se obtuvieron 4.14 g (98%) de **27** como un sólido marrón con buena pureza.

8.1.2. Síntesis de la 9,10-dihidroantracen-2,6-diamina (28)



La diamina **28** fue sintetizada utilizando el procedimiento descrito por Takimiya *et al.* con alguna modificación¹. En un tubo de vidrio KIMAX sellado con tapón de rosca se hizo reaccionar 1.08 g (4.5 mmol) de 2,6-diamino-9,10-antraquinona con 4.5 g (68 mmol) de cinc (Zn) activado* en 10 mL de una disolución de NH₃ (30% en agua). La reacción fue calentada a 100 °C durante 23 horas. El precipitado fue filtrado sobre celita. Luego fue lavado sucesivamente con acetona para separar el producto de las sales de zinc. El filtrado fue secado con Na₂SO₄ y el disolvente evaporado obteniéndose 830 mg (88%) del compuesto **15** como un sólido amarillo. Los datos de ¹H-RMN del producto fueron consistentes con aquellos descritos por Takimiya *et al.*¹

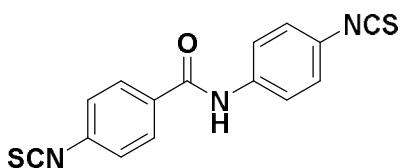
* Activación del cinc: una suspensión de cinc en polvo se agita con una disolución acuosa al 10% de HCl durante 2 minutos. El zinc se recoge por filtración con una placa filtrante y se lava sucesivamente con agua y acetona. A continuación, el polvo de zinc se agita vigorosamente con éter durante 10 min. El cinc se recoge por filtración, se lava con éter y se usa directamente en la reacción.

8.2 Procedimiento general para la síntesis de los isotiocianatos 29 - 32

Tiofosgeno (2.5 equiv.) [Precaución: ¡Muy tóxico! Manejar con protección adecuada en una vitrina de gases bien ventilada] fue añadido con una jeringa a una suspensión en agitación de las diaminas **25 - 28** (1 equiv.) en Et₂O/H₂O (3:1, v/v). La reacción fue agitada a temperatura ambiente toda la noche. El precipitado fue filtrado, lavado con agua y secado al vacío para dar los isotiocianatos **29 - 32** con excelentes rendimientos y alta pureza.

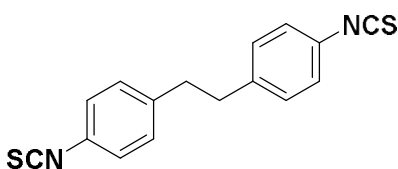
Parte Experimental

8.2.1 Síntesis del 4-isotiocianato-N-(4-isotiocianatofenil)benzamida (**29**).



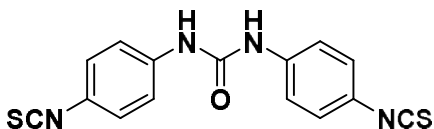
De acuerdo con el procedimiento general 8.2, 3.42 g (15 mmol) de la diamina **25** se hizo reaccionar con 2.51 mL (33 mmol) de tiofosgeno para obtener **29** como un sólido color gris (92%). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.88 (s, 1H, NH), 7.85 (d, $J = 8.7$, 2H, ArH), 7.63 (d, $J = 8.8$, 2H, ArH), 7.31 (d, $J = 8.7$, 2H, ArH), 7.22 (d, $J = 8.8$, 2H, ArH). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 164.7(C=O), 138.6, 137.1, 135.9, 135.5, 133.2, 129.0, 127.8, 127.0, 126.5, 121.5. P.f. 199-200 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) $m/z = 312.27$ (M+H).

8.2.2 Síntesis del 1,2-bis(4-isotiocianatofenil)etano (**30**).



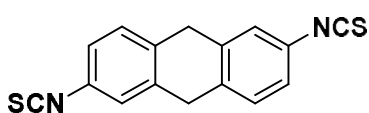
De acuerdo con el procedimiento general 8.2, 3.23 g (15.2 mmol) de 4,4'-(etano-1,2-diil)dianilina **26** se hizo reaccionar con 2.55 mL (33.5 mmol) de tiofosgeno para obtener **30** como un sólido color blanco (84%). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.13 (m, 4H, ArH), 7.06 (m, 4H, ArH), 2.89 (s, 4H, CH_2CH_2). P.f. 128-129 °C. HPLC (UV): 95%.

8.2.3 Síntesis de la 1,3-bis(4-isotiocianatofenil)urea (**31**).



De acuerdo con el procedimiento general 8.2, 2.02 g (8.84 mmol) de la diamina **27** se hizo reaccionar con 1.69 mL (22.1 mmol) de tiofosgeno para obtener **31** como un sólido color gris (78%). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (s, 2H, NH), 7.40 (d, $J = 8.8$, 4H, ArH), 7.12 (d, $J = 8.8$, 4H, ArH). P.f. > 235 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) $m/z = 327.19$ (M+H).

8.2.4 Síntesis del 2,6-diisotiocianato-9,10-dihidroantraceno (**32**).



De acuerdo con el procedimiento general 8.2, 2.46 g (11.7 mmol) de la diamina **28** se hizo reaccionar con 1.96 mL (26 mmol) de tiofosgeno para obtener **32** como un sólido color beige (89%). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7.42 (d, $J = 1.9$, 2H, ArH), 7.40 (d, $J = 8.0$, 2H, ArH), 7.27 (dd, $J = 1.9$, 8.0, 2H, ArH), 3.94 (s, 4H, CH_2). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 137.9, 136.0, 132.9, 128.5, 127.7, 124.5, 123.6, 34.4. P.f. > 300 °C. HPLC (UV) > 90%.

Parte Experimental

8.3 Procedimiento general para síntesis de las *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)benzenosulfonamidas **19c - 22c**

Se utilizó el procedimiento publicado por nuestro grupo de investigación tal como se describe a continuación². A una disolución en agitación de las alcoxiaminas **19 - 22** (1 equiv.), piridina (0.5 equiv.) en 30 mL de DCM se añadió gota a gota 100 mL de una disolución de NsCl (1 equiv.) y piridina (1.5 equiv.). A continuación, la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Se comprobó por CCF que la reacción había terminado. Luego, por lavado con una disolución de HCl 0.1M y posterior recrystalización de una mezcla de acetona/hexano (1:1, v/v) se obtuvieron las 2-nitrobenzenosulfonamidas **19a - 22a** con buenos rendimientos. La alquilación de **19a - 22a** usando la 2-bromoetilftalimida (1.1 equiv.) en presencia de K_2CO_3 (2 equiv.) en 30 mL de DMF como disolvente, se realizó a temperatura ambiente durante una noche, generando los compuestos **19b - 22b**. Terminada las reacciones, los crudos de reacción se añadieron lentamente sobre 150 mL de agua destilada para hacer precipitar el producto. Los precipitados fueron filtrados sobre una placa filtrante de poro N°3 y secados, obteniéndose las ftalimidas **19b - 22b** con buenos rendimientos. Las ftalamidas **19b - 22b** disueltas en EtOH absoluto (300 mL) se pusieron en agitación con un exceso de monohidrato de hidracina (10 equiv.) a temperatura ambiente por tres o cuatro horas. Terminada la reacción, el precipitado blanco (2,3-dihidroftalazin-1,4-diona) que se forma como subproducto de la desprotección se separó por simple filtración y se lavó con EtOH (2×100 mL). El filtrado se evaporó a presión reducida y el residuo crudo fue redisoluto en DCM y secado con MgSO_4 . Se filtró nuevamente y se evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose así los crudos de las etilendiaminas **19c - 22c**. La pureza de los productos obtenidos (80-90%) se comprobó por HPLC-MS. Las *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil)benzenosulfonamidas así obtenidas son poco estables por lo que se dejaron secando en alto vacío durante una hora y se usaron directamente sin más purificación en el siguiente paso de reacción.

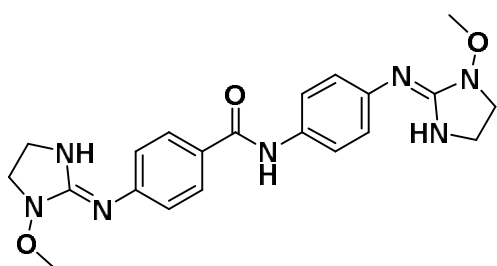
8.4 Procedimiento general para la síntesis “one-pot” de las 1-alcoxi-2-ariliminoimidazolidinas **33a-b, 34b-d, 35a, 36a**

Sobre una disolución agitada de la correspondiente 1,2-etilendiamina (**19c - 22c**) (2.5 equiv.) en DMF anhidra (5 mL) bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota una disolución del isotiocianato (**28 - 32**, 1 equiv.) en DMF anhidra (5 mL). Las reacciones fueron calentadas a 65 °C o agitadas a temperatura ambiente tal como se indica en cada caso. Después de confirmar la formación de las tioureas intermedias por HPLC-MS, se

Parte Experimental

añadió tiofenol (10 equiv.) seguido por K_2CO_3 (20 equiv.). La mezcla de reacción de diluyó con 30 mL DMF anhidra para así favorecer el proceso de ciclación intramolecular después de producirse la desprotección de la amina secundaria. Las reacciones fueron agitadas durante el tiempo indicado hasta completarse la ciclación, obteniéndose las 1-alcoxi-2-arilimidazolidinas **33a-b**, **34b-d**, **35a**, **36a**. Los pasos de reacción fueron monitorizados por HPLC-MS. Los crudos de reacción fueron filtrados sobre celita y el precipitado lavado con DCM. Las fases orgánicas fueron lavadas con $NaHCO_3$ 5% (30 mL), salmuera (30 mL) y secadas con $MgSO_4$. Los disolventes fueron evaporados a presión reducida y el crudo resultante purificado por cromatografía flash sobre sílice

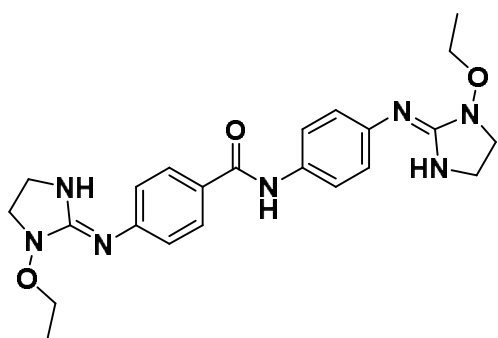
8.4.1 Síntesis de la 4-((1-metoxiimidazolidin-2-iliden)amino)-N-(4-((1-metoxiimidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (**33a**)



De acuerdo con el procedimiento general 8.4, 0.42 g (1.32 mmol) del isotiocianato **29** se hizo reaccionar con 0.90 g (3.3 mmol) de la amina **19c**. La mezcla de reacción se agitó durante 24 días. Terminada la reacción, el producto fue purificado por cromatografía

flash sobre sílice (cartucho SI de 10 g) usando DCM/MeOH y 0.1% de Et_3N como eluyente, obteniéndose 420 mg (75%) de **33a** como un sólido marrón. 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.41 (s, 1H, CO-NH), 7.68 (d, $J = 8.5$, 2H, ArH), 7.41 (d, $J = 8.5$, 2H, ArH), 7.27 (d, $J = 8.5$, 2H, ArH), 7.16 (d, $J = 8.5$, 2H, ArH), 6.13 – 5.25 (s.a, 2H, Imd-NH), 3.70 (s, 6H, O-CH₃) 3.42 (m, 4H, Imd-CH₂), 3.33 (m, 4H, Imd-CH₂). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.8 (C=O), 158.5 (C=N), 158.0 (C=N), 138.9 (Ar-C), 133.3 (Ar, C), 128.6 (Ar, 2 \times CH), 128.4 (Ar, C), 121.8 (Ar, 2 \times CH), 120.4 (Ar, 2 \times CH), 119.5 (Ar, 2 \times CH), 115.5, 63.1 (2 \times O-CH₃), 51.8 (2 \times Imd-CH₂), 45.8 (2 \times Imd-CH₂). P.f. 165-170 °C. HPLC (UV) > 91%. LRMS (ES⁺) $m/z = 424.23$ (M+H). HRMS (ES⁺): requerido para $C_{21}H_{25}N_7O_3$: 423.2019 (encontrado: 423.2023).

8.4.2 Síntesis de la 4-((1-etoxiimidazolidin-2-iliden)amino)-N-(4-((1-etoxiimidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (**33b**)

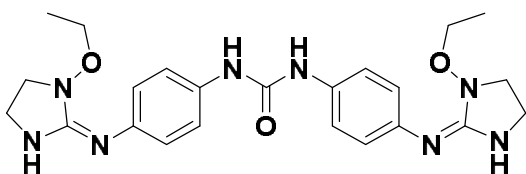


De acuerdo con el procedimiento general 8.4, 0.68 g (2.26 mmol) del isotiocianato **29** se hizo reaccionar con 1.63 g (5.6 mmol) de la amina **20c**. La mezcla de reacción se agitó durante 24 días a 65 °C. Una vez terminada la reacción, el

Parte Experimental

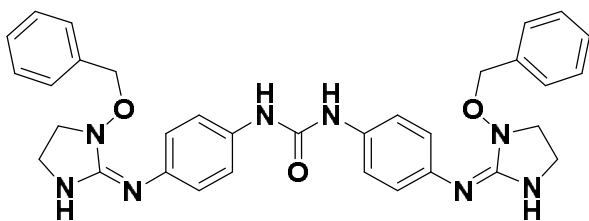
producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 20 g) usando un gradiente de DCM/MeOH (100:0→90:10) como eluyente, obteniéndose 50 mg (5%) de **33b** como un sólido marrón. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.85 (s, 1H, CO-NH), 7.75 (d, J = 8.5, 2H, ArH), 7.49 (d, J = 8.2, 2H, ArH), 7.30 (d, J = 8.2, 2H, ArH), 7.17 (d, J = 8.5, 2H, ArH), 5.88 (s, 2H, Imd-NH), 3.93 (c, J = 7.0, 4H, O-CH₂), 3.53 – 3.28 (m, 8H, Imd-CH₂), 1.24 (t, J = 7.0, 6H, CH₃). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 165.9 (C=O), 159.0 (C=N), 158.4 (C=N), 146.0 (Ar, C), 138.0 (Ar, C), 133.7 (Ar, C), 128.6 (Ar, 2 × CH), 128.3 (Ar, C), 121.8 (Ar, 2 × CH), 120.4 (Ar, 2 × CH), 119.3 (Ar, 2 × CH), 70.90 (O-CH₂), 70.88 (O-CH₂), 52.6 (2 × Imd-CH₂), 45.7 (2 × Imd-CH₂), 14.3 (2 × CH₃). P.f. 135-136 °C. HPLC (UV) > 90%. LRMS (ES⁺) m/z = 452.12 (M+H). HRMS (ES⁺): requerido para C₂₃H₂₉N₇O₃: 451.2332 (encontrado: 451.2335).

8.4.3 Síntesis de la 1,3-bis(4-((1-metoxiimidazolidin-2-iliden)amino)fenil)urea (**34b**)



De acuerdo con el procedimiento general 8.4, 0.737 g (2.26 mmol) del isotiocianato **31** se hizo reaccionar con 1.63 g (5.6 mmol) de la amina **20c**. La mezcla de reacción se agitó durante 7 días a temperatura ambiente. El producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 20 g) usando un gradiente de DCM/MeOH (100:0→90:10) como eluyente, obteniéndose 253 mg (24%) de **34b** como un sólido marrón. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.53 (s, 2H, NH-CO-NH), 7.21 (d, J = 8.0, 4H, ArH), 7.04 (d, J = 8.0, 4H, ArH), 4.40 (s, 2H, Imd-NH) 3.96 (c, J = 7.0, 4H, O-CH₂), 3.40 (m, 8H, Imd-CH₂), 1.26 (t, J = 7.0, 6H, CH₃). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 159.5 (2 × C=N), 154.4 (C=O), 136.7 (Ar, C), 135.2 (Ar, C), 128.8 (Ar, C), 124.4 (Ar, C), 121.4 (Ar, 4 × CH), 120.4 (Ar, 4 × CH), 71.1 (2 × O-CH₂), 52.6 (2 × Imd-CH₂), 44.8 (2 × Imd-CH₂), 14.3 (2 × CH₃). P.f. 144-146 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 467.14 (M+H).

8.4.4 Síntesis de 1,3-bis(4-((1-benziloxiimidazolidin-2-iliden)amino)fenil)urea (**34d**)

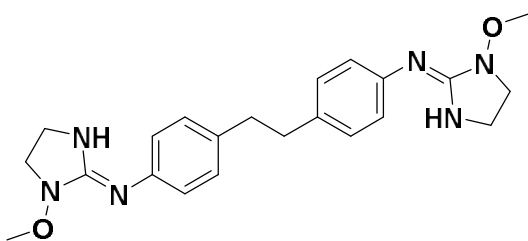


De acuerdo con el procedimiento general 8.4, 0.30 g (0.92 mmol) del isotiocianato **31** se hizo reaccionar con 0.418 g (1.19 mmol) de la amina **21c**. La mezcla de reacción se agitó durante 22 días a 65 °C. El producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice

Parte Experimental

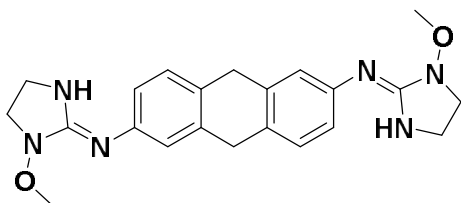
(cartucho SI de 10 g) usando un gradiente de DCM/MeOH (100:0→90:10) como eluyente, obteniéndose 60 mg (11%) de **34d** como un sólido marrón. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (s, 2H, NH-CO-NH), 7.44 – 7.25 (m, 10H, ArH-OBn), 7.15 (d, $J = 8.6$, 4H, ArH), 6.88 (d, $J = 8.6$, 4H, ArH), 4.90 – 4.73 (s, 4H, O-CH_2), 4.56 (s.a, 2H, Imd-NH), 3.29 (m, 4H, Imd-CH_2), 3.17 (m, 4H, Imd-CH_2). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 159.5 ($2 \times \text{C=N}$), 153.9 (C=O), 136.2 (Ar-OBn , $2 \times \text{C}$), 135.2 (Ar , C), 134.9 (Ar , C), 129.3 (Ar-OBn , $4 \times \text{CH}$), 128.7 (Ar-OBn , $2 \times \text{CH}$), 128.6 (Ar-OBn , $4 \times \text{CH}$), 128.4 (Ar , C), 123.9 (Ar , C), 121.3 (Ar , $4 \times \text{CH}$), 120.2 (Ar , $4 \times \text{CH}$), 77.8 ($2 \times \text{O-CH}_2$), 52.4 ($2 \times \text{Imd-CH}_2$), 44.4 ($2 \times \text{Imd-CH}_2$). P.f. 60-65 °C. HPLC (UV): 91%. LRMS (ES^+) $m/z = 591.49$ (M+H).

8.4.5 Síntesis de la *N,N'*-(etano-1,2-diilbis(4,1-fenileno))bis(1-metoxiidimidazolidin-2-imina) (35a)



De acuerdo con el procedimiento general 8.4, 0.42 g (1.32 mmol) del isotiocianato **30** se hizo reaccionar con 0.9 g (3.3 mmol) de la amina **19c**. La mezcla de reacción se agitó durante 14 días a 65 °C. Una vez terminada la reacción, el producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 10 g) usando un gradiente de DCM/MeOH (90:10) and 0.1% of Et_3N como eluyente, obteniéndose 470 mg (87%) de **35a** como un sólido marrón. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.05 (s.a, 2H, Imd-NH), 7.32 (d, $J = 8.2$, 4H, ArH), 7.10 (d, $J = 8.2$, 4H, ArH), 3.82 (s, 6H, O-CH_3), 3.62 (t, $J = 6.8$, 4H, Imd-CH_2), 3.46 (t, $J = 6.8$, 4H, Imd-CH_2), 3.10 – 2.77 (m, 4H, CH_2CH_2). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 158.8 ($2 \times \text{C=N}$), 136.3 (Ar , $2 \times \text{C}$), 129.3 (Ar , $4 \times \text{CH}$), 127.2 (Ar , $2 \times \text{C}$), 119.7 (Ar , $4 \times \text{CH}$), 63.2 ($2 \times \text{O-CH}_3$), 52.0 ($2 \times \text{Imd-CH}_2$), 46.8 ($2 \times \text{Imd-CH}_2$), 37.5 ($2 \times \text{CH}_2$). P.f. 106-108 °C. HPLC (UV) > 90%. LRMS (ES^+) $m/z = 409.20$ (M+H). HRMS (ES^+): requerido para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2$: 408.2274 (encontrado: 408.2278).

8.4.6 Síntesis de la *N,N'*-(9,10-dihidroantracen-2,6-diil)bis(1-metoxiidimidazolidin-2-imina) (36a)



De acuerdo con el procedimiento general 8.4, 0.392 g (1.32 mmol) del isotiocianato **32** se hizo reaccionar con 0.9 g (3.3 mmol) de la amina **19c**. La mezcla de reacción se agitó durante 10 días a 65°C. El producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 10 g) usando un gradiente de DCM/MeOH (90:10) and 0.1% of Et_3N como eluyente, obteniéndose 389 mg (72%) de **36a** como un sólido marrón. $^1\text{H RMN}$

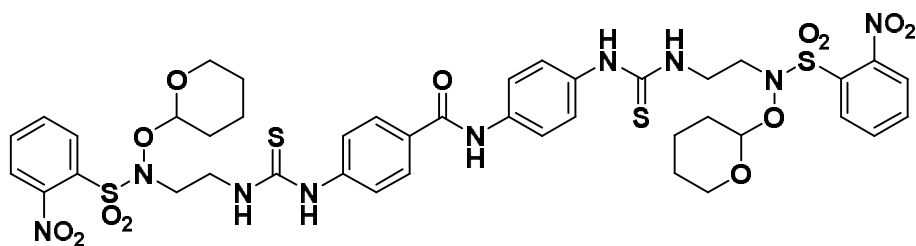
Parte Experimental

(300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (m, 2H, ArH), 7.12 (m, 4H, ArH), 3.82 (s, 4H, CH₂), 3.78 (s, 6H, O-CH₃), 3.63 – 3.51 (m, 4H, Imd-CH₂), 3.50 – 3.34 (m, 4H, Imd-CH₂). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 158.6 (2 × C=N), 137.6 (Ar, 2 × C), 131.3 (Ar, 2 × C), 127.8 (Ar, 2 × CH), 124.9 (Ar, 2 × C), 118.8 (Ar, 2 × CH), 117.7 (Ar, 2 × CH), 63.0 (2 × O-CH₃), 51.5 (2 × Imd-CH₂), 46.0 (2 × Imd-CH₂), 35.5 (2 × CH₂). P.f. 110-112 °C. HPLC (UV) > 90%. LRMS (ES⁺) m/z = 407.11 (M+H).

8.5 Procedimiento general para la síntesis de 1-(2-(alcoxi-amino)etil)-3-ariltioureas 37 – 43

Una suspensión del isotiocianato (**29** - **32**) (1 equiv.) en DMF anhidra (5 mL) fue añadida gota a gota con una jeringa a una solución de *N*-alcoxi-*N*-(2-aminoetil) benzenosulfonamida (**19c** - **22c**) (2.5 equiv.) en DMF anhidra (30 mL) en agitación bajo atmósfera de argón. Más DMF anhidra (15 mL) se usa para arrastrar el resto de isotiocianato (no es soluble del todo en DMF) y es añadido a la reacción para alcanzar un volumen de 50 mL. La formación de las tioureas fue monitorizada por HPLC-MS. Después de evaporar el disolvente a vacío, el crudo de la reacción fue tratado con metanol y triturado con una espátula. El sólido formado fue filtrado y lavado con más MeOH. Los compuestos **30b** y **31a** fueron recristalizados de DCM frío, filtrados y lavados con Et₂O.

8.5.1 Síntesis de la 4-(3-(2-((2-nitro-*N*-((tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)fenil)sulfonamido)etil)tioureido)-*N*-(4-(3-(2-((2-nitro-*N*-((tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)fenil)sulfonamido)etil)tioureido)fenil)benzamida (**37**)

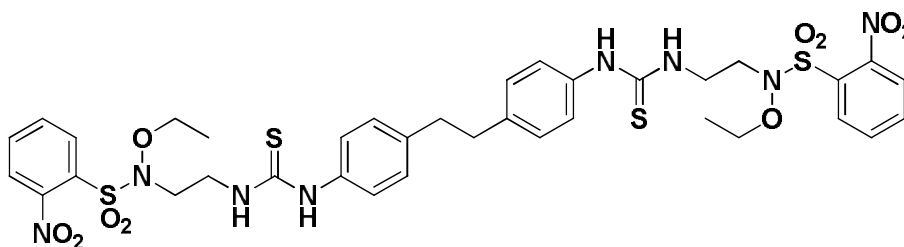


De acuerdo con el procedimiento general 8.5, 2.07 g (6.0 mmol) de la amina **22c** se hizo reaccionar con 0.75 g (2.4 mmol) del isotiocianato **29**. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto fue purificado por precipitación en MeOH obteniéndose 1.18 g (41%) de **37** como un sólido de color amarillo pálido. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.74-8.46 (m, 2H, NH), 8.19-8.04 (m, 1H, NH), 8.00-7.89 (m, 4H, 2 × ArH_{Ns}, 2 × ArH), 7.86-7.80 (m, 2H, ArH_{Ns}), 7.78-7.70 (m, 4H, 2 × ArH_{Ns}, 2 × ArH), 7.62 (m, 2H, ArH_{Ns}), 7.35 (d, J = 8.2, 2H, ArH), 7.35-7.29 (m, 1H, NH), 7.21 (d, J = 8.2, 2H, ArH), 4.96 (d, J = 6.8, 1H, O-CH-O), 4.88 (d, J = 7.2, 1H, O-CH-O), 4.35 – 4.23 (m, 2H, N-CH₂), 4.00 – 3.82 (m, 2H, N-CH₂), 3.75 – 3.56 (m, 2H, N-CH₂), 3.54 – 3.31 (m, 2H, O-CH₂), 3.21 – 3.01 (m, 2H, O-

Parte Experimental

CH_2), 2.89 – 2.65 (m, 2H, N- CH_2), 1.88 – 1.80 (m, 2H, CH_2), 1.77 – 1.63 (m, 2H, CH_2), 1.55 – 1.28 (m, 8H, CH_2). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 180.3 (C=S), 179.9 (C=S), 165.2 (C=O), 149.8 (Ar_{Ns} , C), 149.7 (Ar_{Ns} , C), 140.3 (Ar, C), 137.2 (Ar, C), 135.8 (Ar_{Ns} , CH), 135.6 (Ar_{Ns} , CH), 132.54 (Ar_{Ns} , CH), 132.51 (Ar_{Ns} , CH), 132.4 (Ar, CH), 132.0 (Ar_{Ns} , 2 \times CH), 131.5 (Ar_{Ns} , CH), 131.4 (Ar_{Ns} , CH), 129.2 (Ar, 2 \times CH), 126.2 (Ar, 2 \times CH), 125.4 2 (Ar, C), 124.24 (Ar_{Ns} , CH), 124.21 (Ar_{Ns} , CH), 123.7 (Ar, 2 \times CH), 122.0 (Ar, 2 \times CH), 105.9 (O-CH-O), 105.8 (O-CH-O), 65.8 (O- CH_2), 65.6 (O- CH_2), 52.8 (N- CH_2), 52.6 (N- CH_2), 41.6 (N- CH_2), 41.5 (N- CH_2), 28.9 (2 \times CH_2), 24.6 (2 \times CH_2), 21.2 (2 \times CH_2). P.f. 132-133 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 1002.45 (M+H).

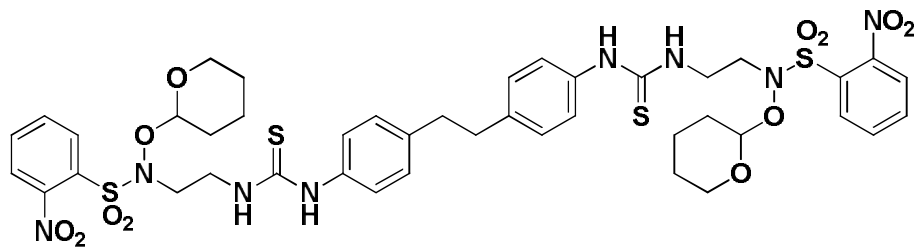
8.5.2 Síntesis de la 1,1'-(etan-1,2-diilbis(4,1-fenilen))bis(3-(2-((2-nitro-N-(etoxi)fenil)sulfonamido)etil)tiourea (38)



De acuerdo con el procedimiento 8.5, 1.81 g (6.23 mmol) de la amina **20c** se hizo reaccionar con 0.74 g (2.5 mmol) del isotiocianato **30**. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto fue purificado por precipitación con MeOH obteniéndose 1.98 g (91%) de **38** como un sólido amarillo pálido. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.66 (s.a, 2H, NH), 8.05 (m, 6H, Ar-H), 7.97 – 7.89 (m, 2H, Ar-H), 7.80 (s, 2H, NH), 7.29 (d, J = 8.5, 4H, Ar-H), 7.22 (d, J = 8.5, 4H, Ar-H), 4.09 (c, J = 7.0, 4H, O- CH_2), 3.79-3.69 (m, 4H, N- CH_2), 3.25 (m, 4H, N- CH_2), 2.84 (s, 4H, CH_2), 1.18 (t, J = 7.0, 6H, CH_3). ^{13}C RMN (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 180.5 (2 \times C=S), 149.2 (Ar_{Ns} , 2 \times C), 137.8 (Ar, 2 \times C), 136.7 (Ar, 2 \times C), 136.4 (Ar_{Ns} , 2 \times CH), 132.03 (Ar_{Ns} , 2 \times CH), 131.98 (Ar_{Ns} , 2 \times CH), 128.6 (Ar, 4 \times CH), 124.1 (Ar_{Ns} , 2 \times CH), 123.7 (Ar, 2 \times C), 123.3 (Ar, 4 \times CH), 73.4 (2 \times O- CH_2), 51.8 (2 \times N- CH_2), 41.0 (2 \times N- CH_2), 36.5 (2 \times CH_2), 13.3 (2 \times CH_3). P.f. 198-200 °C. HPLC (UV) = 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 875.69 (M+H).

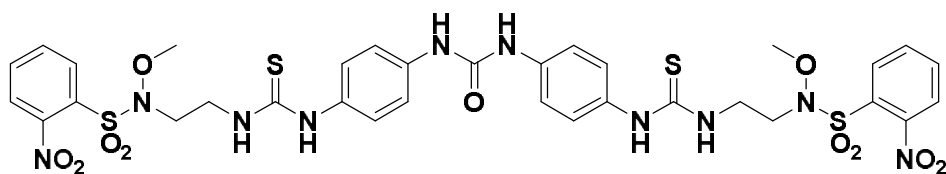
Parte Experimental

8.5.3 Síntesis de la 1,1'-(etano-1,2-diilbis(4,1-fenilen))bis(3-(2-((2-nitro-N-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)sulfonamido)etil)tiourea (39)



De acuerdo con el procedimiento general 8.5, 2.10 g (6.26 mmol) de la amina **22c** se hizo reaccionar con 0.72 g (2.44 mmol) del isotiocianato **30**. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto fue purificado por precipitación en DCM frío obteniéndose 1.25 g (52%) de **39** como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.76 (s.a, 2H, NH), 8.13 – 8.00 (m, 6H, ArH_{Ns}), 7.98 – 7.90 (m, 2H, ArH_{Ns}), 7.39 (s.a, 2H, NH), 7.25 (s, 8H, ArH), 5.01 – 4.97 (m, 2H, O-CH-O), 4.08 – 3.98 (m, 2H, N-CH₂), 3.76 – 3.65 (m, 4H, N-CH₂), 3.58 – 3.49 (m, 2H, O-CH₂), 3.34 – 3.30 (m, 2H, O-CH₂), 2.84 (s, 4H, CH₂), 2.83 – 2.76 (m, 2H, CH₂), 1.67 (s, 2H), 1.88 – 1.77 (m, 2H, CH₂), 1.56 – 1.34 (m, 8H, CH₂). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 180.2 (2 \times C=S), 149.0 (Ar_{Ns} , 2 \times C), 138.3 (Ar_{Ns} , 2 \times CH), 136.6 (Ar , 2 \times C), 136.3 (Ar_{Ns} , 2 \times C), 132.2 (Ar_{Ns} , 4 \times CH), 128.9 (Ar , 4 \times CH), 124.3 (Ar_{Ns} , 2 \times CH), 123.9 (Ar , 2 \times C), 123.8 (Ar , 4 \times CH), 104.9 (2 \times O-CH-O), 64.0 (2 \times O-CH₂), 52.0 (2 \times N-CH₂), 40.6 (2 \times N-CH₂), 36.6 (2 \times CH₂), 28.3 (2 \times CH₂), 24.3 (2 \times CH₂), 19.7 (2 \times CH₂). P.f. 104-105 °C. HPLC (UV): 92 %. LRMS (ES⁺) m/z = 988 (M+H).

8.5.4 Síntesis de la 1,3-bis(4-(3-(2-((2-nitro-N-(metoxi)fenil)sulfonamido)etil)tiouredio)fenil)urea (40)

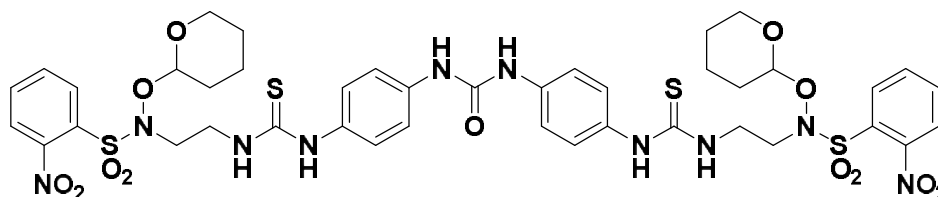


De acuerdo con el procedimiento general 8.5, 2.07 g (6.0 mmol) de la amina **19c** se hizo reaccionar con 0.75 g (2.4 mmol) del isotiocianato **31**. La reacción se agitó a temperatura ambiente por 12 horas. El producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 10 g) eluyendo con hexano/AcOEt (100/0 \rightarrow 0/100), obteniéndose 0.774 g (91%) de **40** como un sólido verde pálido. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.60 (s, 2H, NH), 8.69 (s, 2H, NH), 8.14 – 7.98 (m, 6H, ArH_{Ns}), 7.97 – 7.87 (m, 2H, ArH_{Ns}), 7.73 (s.a, 2H, NH), 7.42 (d, J = 8.6, 4H, ArH), 7.24 (d, J = 8.6, 4H, ArH), 3.83 (s, 6H, O-CH₃), 3.75 (m, 4H, N-

Parte Experimental

CH_2), 3.29 – 3.17 (m, 4H, N- CH_2). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 180.6 ($2 \times C=S$), 152.5 ($C=O$), 149.3 (Ar_{Ns} , $2 \times C$), 136.8 (Ar , $2 \times C$), 136.5 (Ar_{Ns} , $2 \times CH$), 132.6 (Ar_{Ns} , CH), 132.0, 131.9 (Ar_{Ns} , CH), 124.7 (Ar , $4 \times CH$), 124.1 (Ar_{Ns} , $2 \times CH$), 123.7 (Ar_{Ns} , $2 \times CH$), 118.5 (Ar , $4 \times CH$), 65.4 ($2 \times O-CH_3$), 51.8 ($2 \times N-CH_2$), 41.1 ($2 \times N-CH_2$). P.f. > 182 °C (desc.). HPLC (UV) = 97%. LRMS (ES $^+$) m/z = 877.65 (M+H).

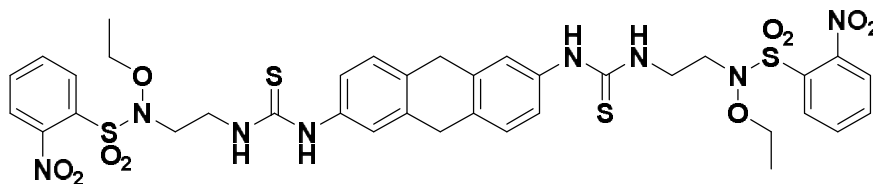
8.5.5 Síntesis de la 1,3-bis(4-(3-(2-((2-nitro-N-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)sulfonamido)etil)tiouredio)fenil)urea (41)



De acuerdo con el procedimiento general 8.5, 2.1 g (6.26 mmol) de la amina **22c** se hizo reaccionar con 0.722 g (2.44 mmol) del isotiocianato **32**. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 10 g) eluyendo con hexano/AcOEt(100/0 \rightarrow 0/100), obteniéndose 0.806 g (32%) de **41** como un sólido amarillo pálido. 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.68 (s.a, 2H, NH), 8.70 (s.a, 2H, NH), 8.12 – 8.00 (m, 6H, ArH_{Ns}), 7.97 – 7.89 (m, 2H, ArH_{Ns}), 7.43 (d, $J = 8.8$, 4H, ArH), 7.31 (s.a, 2H, NH), 7.21 (d, $J = 8.8$, 4H, ArH), 5.11 – 4.75 (m, 2H, O- $CH-O$), 4.13 – 3.93 (m, 2H, N- CH_2), 3.79 – 3.62 (m, 4H, N- CH_2), 3.59 – 3.46 (m, 2H, O- CH_2), 3.42 – 3.35 (m, 2H, O- CH_2), 2.91 – 2.75 (m, 2H, N- CH_2), 1.85 – 1.76 (m, 2H, CH_2), 1.73-1.62 (m, 2H, CH_2), 1.58 – 1.24 (m, 8H, CH_2). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 180.3 ($2 \times C=S$), 152.5 ($C=O$), 148.9 (Ar_{Ns} , $2 \times C$), 137.0 (Ar , $2 \times C$), 136.6 (Ar_{Ns} , $4 \times CH$), 132.2 (Ar , $4 \times CH$), 125.0 (Ar , $2 \times C$), 124.2 (Ar_{Ns} , $4 \times CH$), 123.9 (Ar_{Ns} , $2 \times C$), 118.7 (Ar , $4 \times CH$), 104.9 ($2 \times O-CH-O$), 64.0 ($2 \times O-CH_2$), 52.0 ($2 \times N-CH_2$), 40.6 ($2 \times N-CH_2$), 28.3 ($2 \times CH_2$), 24.3 ($2 \times CH_2$), 19.7 ($2 \times CH_2$). P.f. 164-166 °C. HPLC (UV) $> 95\%$. LRMS (ES $^+$) m/z = 1017.91 (M+H).

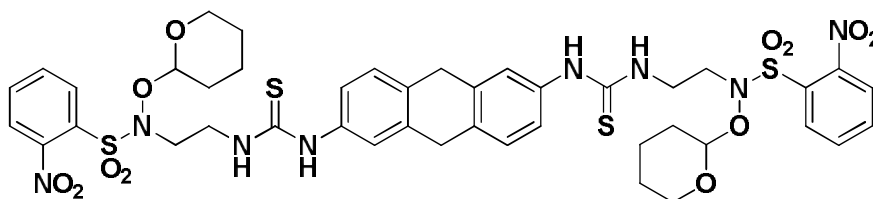
Parte Experimental

8.5.6 Síntesis de la 1,1'-(9,10-dihidroantracen-2,6-diil)bis(3-(2-(2-nitro-*N*-(etoxi)fenil)sulfonamido)etil)tiourea (42)



De acuerdo con el procedimiento general 8.5, 1.49 g (5.2 mmol) de la amina **20c** se hizo reaccionar con 0.61 g (2.08 mmol) del isotiocianato **32**. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 10 g) eluyendo con hexano/AcOEt (100/0 → 0/100), obteniéndose 0.562 g (32%) de **42** como un sólido marrón. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.67 (s.a, 2H, NH), 8.16 – 7.98 (m, 6H, Ar_{Ns}), 7.98 – 7.90 (m, 2H, Ar_{Ns}), 7.77 (s.a, 2H, NH), 7.33 (m, 2H, ArH), 7.27 (d, $J = 8.0$, 2H, ArH), 7.14 (d, $J = 8.0$, 2H, ArH), 4.11 (c, $J = 7.1$, 4H, O- CH_2), 3.87 (s, 4H, CH_2), 3.79 – 3.67 (m, 4H, N- CH_2), 3.30 – 3.17 (m, 4H, N- CH_2), 1.18 (t, $J = 7.1$, 6H, CH_3). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 180.2 ($2 \times C=S$), 149.8 (Ar_{Ns} , $2 \times C$), 137.5 (Ar , C), 136.6 (Ar , C), 136.2 (Ar_{Ns} , $2 \times CH$), 133.6 (Ar , C), 132.25 (Ar_{Ns} , C), 132.19 (Ar_{Ns} , C), 127.7 (Ar , $2 \times CH$), 124.2 (Ar_{Ns} , $2 \times CH$), 123.8 (Ar_{Ns} , $2 \times CH$), 122.9 (Ar , $2 \times CH$), 122.0 (Ar , $2 \times CH$), 104.9 ($2 \times O-CH-O$), 64.0 ($2 \times O-CH_2$), 52.0 ($2 \times N-CH_2$), 40.5 ($2 \times N-CH_2$), 35.0 ($2 \times CH_2$), 28.3 ($2 \times CH_2$), 24.2 ($2 \times CH_2$), 19.7 ($2 \times CH_2$). P.f. 126-127 °C. HPLC (UV): 95%. LRMS (ES $^+$) $m/z = 873.73$ (M+H).

8.5.7 Síntesis de la 1,1'-(9,10-dihidroantracen-2,6-diil)bis(3-(2-(2-nitro-*N*-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)sulfonamido)etil)tiourea (43)



De acuerdo con el procedimiento general 8.5, 2.1 g (6.26 mmol) de la amina **22c** se hizo reaccionar con 0.72 g (2.44 mmol) del isotiocianato **32**. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto fue purificado por cromatografía flash sobre sílice (cartucho 10 g) eluyendo con hexano/AcOEt (100/0 → 0/100), obteniéndose 0.846 g (35 %) of **43** como un sólido marrón. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.79 (s.a, 2H, NH), 8.14 – 8.01 (m, 6H, ArH), 7.99 – 7.91 (m, 2H, ArH), 7.37 – 7.25 (m, 4H, ArH), 7.17 – 7.05 (m, 2H, ArH), 4.92 – 4.88 (m, 2H, O- $CH-O$), 4.14 – 4.06 (m, 2H), 3.89 (s, 4H), 3.80 – 3.64 (m, 2H),

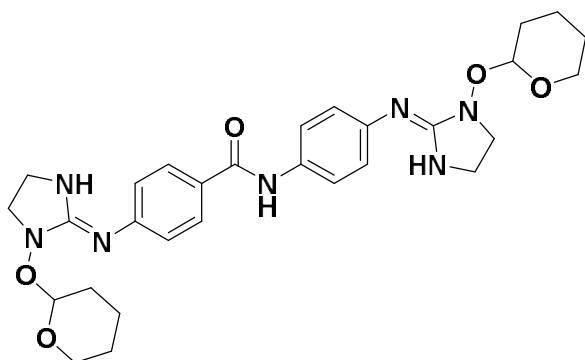
Parte Experimental

3.61 – 3.44 (m, 4H), 3.14 – 3.06 (m, 2H), 2.81 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.32 (m, 8H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 180.6 (2 × C=S), 149.2 (Ar_{Ns}, 2 × C), 137.2 (Ar, C), 136.7 (Ar, C), 136.4 (Ar_{Ns}, 2 × CH), 132.9 (Ar, C), 132.25 (Ar_{Ns}, C), 132.19 (Ar_{Ns}, C), 127.5 (Ar, 2 × CH), 124.1 (Ar_{Ns}, 2 × CH), 123.8 (Ar_{Ns}, 2 × CH), 122.5 (Ar, 2 × CH), 121.5 (Ar, 2 × CH), 73.4 (2 × O-CH₂), 51.8 (2 × N-CH₂), 41.0 (2 × N-CH₂), 35.0 (2 × CH₂), 13.3 (2 × CH₃). P.f. 116-118 °C. HPLC (UV) > 90%. LRMS (ES⁺) m/z = 985.75 (M+H).

8.6 Procedimiento general para la síntesis de las 1-alcoxi-2-ariliminoimidazolidinas 33c, 34a, 34c, 35b, 35c, y 36c a partir de sus correspondientes tioureas.

A una disolución de la tiourea en DMF anhidra (100 mL) se añadió tiofenol (6 equiv.) y K₂CO₃ (12 equiv.). Una vez verificado (por HPLC-MS) la eliminación de los grupos protectores nosilo, se diluyó la reacción con 100 mL de DMF anhidra. La reacción se dejó en agitación varios días (el tiempo se indica para cada compuesto) hasta la formación del producto deseado. La reacción fue monitorizada por HPLC-MS. El disolvente de la reacción se evaporó a vacío y el crudo fue redisoluto en DCM. Se lavó con una disolución de NaHCO₃ al 5% (1 × 50 mL) y luego con salmuera (1 × 50 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. La purificación de los compuestos se llevó a cabo por cromatografía flash sobre sílice (cartuchos SI de 10 g) utilizando un gradiente de DCM/MeOH: 100/0 → 90/10 (**33c**, **34c**, **35c** and **36c**) o DCM/MeOH (saturado con NH₃) 100/0 → 90/10 (**34d**). Los compuestos **34a** y **35b** fueron purificados utilizando alúmina neutra y un gradiente de DCM/MeOH (saturado con NH₃) 100/0 → 90/10 como eluyente.

8.6.1 Síntesis de la 4-((1-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)imidazolidin-2-ilidene)amino)-N-(4-((1-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)imidazolidin-2-ilidene)amino)fenil)benzamida (33c)



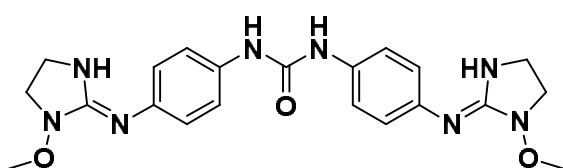
De acuerdo con el procedimiento general 8.6, 0.570 g (0.57 mmol) de **37** se hizo reaccionar con 0.349 mL (3.41 mmol) de tiofenol y 0.943 g (6.38 mmol) de K₂CO₃. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Se obtuvo 0.147 g (46%) de **33c** como un sólido marrón.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (br s, 1H, CONH), 7.80 (d, J = 8.7, 2H, ArH), 7.57 (dd, J = 2.4, 8.7, 4H, ArH), 7.42 (d, J = 8.7, 2H, ArH), 4.95 – 4.80 (m, 2H, OCH), 4.21 – 4.07 (m, 2H, OCH₂), 3.71 –

Parte Experimental

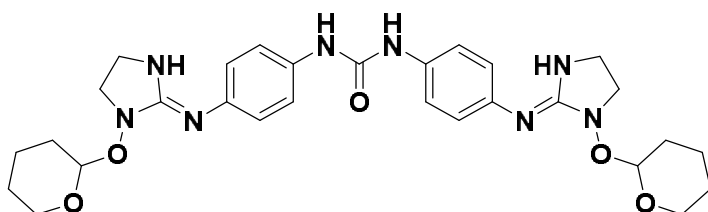
3.54 (m, 8H, NCH₂), 3.39 – 3.25 (m, 2H, OCH₂), 2.01 – 1.73 (m, 4H, CH₂), 1.69 – 1.64 (m, 8H, CH₂). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 165.4 (C=O), 159.6 (C=N), 159.1 (C=N), 143.8 (Ar-C), 136.5 (Ar-C), 133.1 (Ar-C), 128.3 (Ar, 2 × CH), 127.9 (Ar-C), 121.3 (Ar, 2 × CH), 119.2 (Ar, 2 × CH), 117.7 (2 × Ar-C), 105.1 (O-CH-O), 104.9 (O-CH-O), 66.4 (O-CH₂), 66.0 (O-CH₂), 53.8 (2 × Imd-CH₂), 49.8 (Imd-CH₂), 48.9 (Imd-CH₂), 29.44 (CH₂), 29.36 (CH₂), 25.0 (2 × CH₂), 21.7 (CH₂), 21.5 (CH₂). P.f. 121-123 °C. HPLC (UV): 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 564.47 (M+H).

8.6.2 Síntesis de la 1,3-bis(4-((1-metoximidazolidin-2-iliden)amino)fenil)urea (34b)



De acuerdo con el procedimiento general 8.6, 1.59 g (1.8 mmol) de **40** se hizo reaccionar con 0.49 mL (4.8 mmol) de tiofenol y 1.32 g (9.6 mmol) de K₂CO₃. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Se obtuvo 0.083 g (10%) de **34b** como un sólido marrón. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.54 (s.a, 2H, NH), 7.45 (d, J = 8.8, 4H, ArH), 7.37 (d, J = 8.8, 4H, ArH), 3.77 (s, 6H, O-CH₃), 3.58 (t, J = 7.1, 4H, Imd-CH₂), 3.48 (t, J = 7.1, 4H, Imd-CH₂). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) 159.0 (2 × C=N), 152.8 (C=O), 136.7 (Ar, 2 × C), 132.1 (Ar, 2 × C), 122.6 (Ar, 4 × CH), 118.5 (Ar, 4 × CH), 63.1 (2 × O-CH₃), 50.7 (2 × Imd-CH₂), 43.5 (2 × Imd-CH₂). P.f. > 135 °C (desc.). HPLC (UV) = 97%. LRMS (ES⁺) m/z = 439.45 (M+H).

8.6.3 Síntesis de la 1,3-bis(4-((1-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)urea (34c)

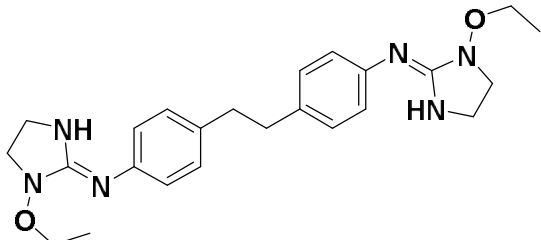


De acuerdo con el procedimiento general 8.6, 0.570 g (0.8 mmol) de **41** se hizo reaccionar con 0.348 mL (3.41 mmol) de tiofenol y 0.943 g (6.83 mmol) de K₂CO₃. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Se obtuvo 0.053 g (11%) de **34c** como un sólido marrón. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.87 (s, 2H, NH), 7.26 – 7.14 (m, 8H, ArH), 5.02 4.75 (m, 2H, O-CH-O), 4.19 – 3.98 (m, 2H, O-CH₂), 3.66 – 3.46 (m, 8H, CH₂), 3.45 – 3.19 (m, 2H, Imd-CH₂), 2.07 – 1.71 (m, 4H, CH₂), 1.70 – 1.38 (m, 8H, CH₂). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 159.8 (2 × C=N), 153.9 (C=O), 135.9 (Ar, 2 × C), 134.0 (Ar, 2 × C), 120.7 (Ar, 4 × CH), 120.0 (Ar, 2 × CH), 104.5 (2 × O-CH-O), 65.5 (2 × O-

Parte Experimental

CH_2), 53.7 (2 × *Imd-CH*₂), 48.23 (2 × *Imd-CH*₂), 29.1 (2 × CH_2), 24.9 (2 × CH_2), 21.8 (2 × CH_2). P.f. 108-110 °C. HPLC (UV) > 90%. LRMS (ES⁺) m/z = 579.52 (M+H).

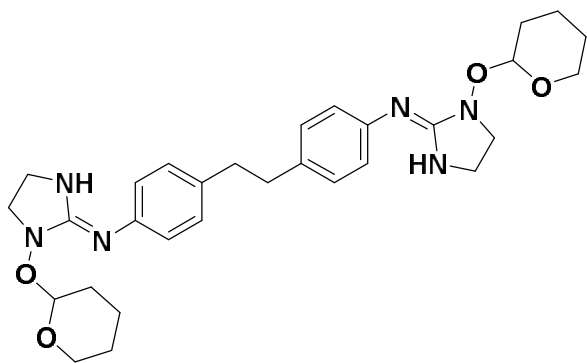
8.6.4 Síntesis de la *N,N'*-(etan-1,2-diilbis(4,1-fenilen))bis(1-etoxiimidazolidin-2-imina) (35b)



De acuerdo con el procedimiento general 8.6, 0.9 g (1.1 mmol) de **38** se hizo reaccionar con 0.68 mL (6.6 mmol) de tiofenol y 1.82 g (13.2 mmol) de K₂CO₃. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Se obtuvieron 0.045 g (5.6%)

de **35b** como un sólido marrón. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (d, J = 8.4, 4H, *ArH*), 7.05 (d, J = 8.4, 4H, *ArH*), 5.28 (s, 2H, *NH*), 3.98 (c, J = 7.0, 4H, *O-CH*₂), 3.57 (t, J = 7.2, 4H, *Imd-CH*₂), 3.39 (t, J = 7.2, 4H, *Imd-CH*₂), 2.81 (s, 4H, CH_2), 1.31 (t, J = 7.0, 6H, CH_3). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 159.1 (2 × C=N), 138.4 (*Ar*, 2 × C), 136.1 (*Ar*, 2 × C ×), 129.1 (*Ar*, 4 × CH ×), 119.4 (*Ar*, 4 × CH ×), 70.9 (2 × *O-CH*₂), 53.0 (2 × *Imd-CH*₂), 47.2 (2 × *Imd-CH*₂), 37.5 (2 × CH_2), 14.4 (2 × CH_3). P.f. 65-70 °C. HPLC (UV): 97%. LRMS (ES⁺) m/z = 437.49 (M+H).

8.6.5 Síntesis de la *N,N'*-(etan-1,2-diilbis(4,1-fenilen))bis(1-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)imidazolidin-2-imina) (35c)

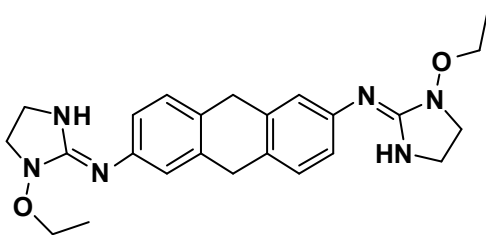


De acuerdo con el procedimiento 8.6, 0.448 g (0.45 mmol) de **39** se hizo reaccionar con 0.275 mL (2.7 mmol) de tiofenol y 0.745 g (5.4 mmol) de K₂CO₃. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 13 días. Se obtuvo 0.086 g (33%) de **35c** como un sólido marrón. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ

7.36 (d, J = 8.2, 4H, *ArH*), 7.05 (d, J = 8.2, 4H, *ArH*), 4.96-4.76 (m, 2H, *O-CH-O*), 4.20-4.05 (m, 2H, *O-CH*₂), 3.86 – 3.71 (m, 2H, *Imd-CH*₂), 3.70 – 3.55 (m, 4H, *Imd-CH*₂), 3.37-3.24 (m, 2H, *O-CH*₂), 3.37 – 3.24 (m, 2H, *Imd-CH*₂), 2.80 (s, 4H, CH_2), 1.98 – 1.73 (m, 4H, CH_2), 1.68 – 1.46 (m, 8H, CH_2). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 159.6 (2 × C=N), 135.5 (*Ar*, 4 × C), 129.0 (*Ar*, 4 × CH), 118.3 (*Ar*, 4 × CH), 104.9 (2 × *O-CH-O*), 66.1 (2 × *O-CH*₂), 54.0 (2 × *Imd-CH*₂), 49.7 (2 × *Imd-CH*₂), 37.6 (2 × CH_2), 29.5 (2 × CH_2), 25.1 (2 × CH_2), 21.6 (2 × CH_2). P.f. 200-201 °C. HPLC (UV) > 99%. LRMS (ES⁺) m/z = 549.56 (M+H).

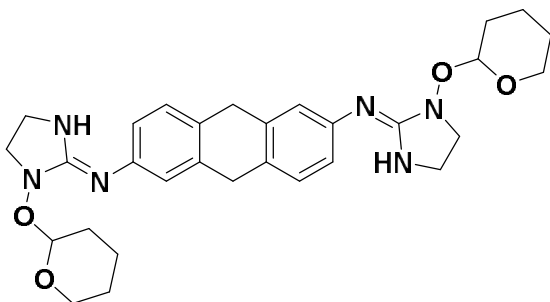
Parte Experimental

8.6.6 Síntesis de la *N,N'*-(9,10-dihidroantracen-2,6-diil)bis(1-etoxiimidazolidin-2-imina) (**36b**)



De acuerdo con el procedimiento 8.6, 0.665 g (0.64 mmol) de **42** se hizo reaccionar con 0.39 mL (3.85 mmol) de tiofenol y 1.06 g (7.72 mmol) de K_2CO_3 . La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Se obtuvo 0.006 g (11%) de **36b** como un sólido marrón. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 (s, 2H, ArH), 7.13 (s, 4H, ArH), 5.72 (m, 2H, NH), 3.96 (q, $J = 7.0$, 4H, OCH_2), 3.83 (s, 4H, CH_2), 3.57 (m, 4H, CH_2), 3.39 (m, 4H, CH_2), 1.27 (d, $J = 7.0$, 6H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 159.2 (2 \times C=N), 138.7 (2 \times Ar-C), 137.7 (2 \times Ar-C), 130.9 (2 \times Ar-C), 127.9 (2 \times Ar-CH) 118.5 (2 \times Ar-CH), 117.4 (2 \times Ar-CH), 70.8 (2 \times O- CH_2), 52.9 (2 \times CH_2), 47.0 (2 \times CH_2), 35.7 (2 \times CH_2), 14.3 (2 \times CH_3). HPLC (%UV) = 92%. P.f. 125-127 °C. LRMS (ES⁺): 435.32 (M + H).

8.6.7 Síntesis de la *N,N'*-(9,10-dihidroantracen-2,6-diil)bis(1-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)imidazolidin-2-imina) (**36c**)

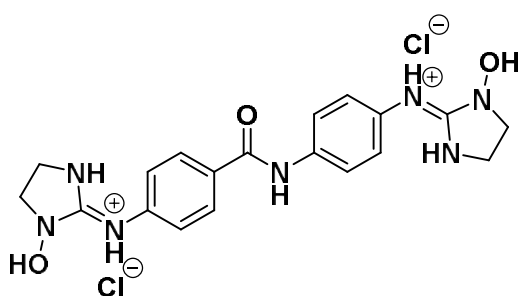


De acuerdo con el procedimiento general 8.6, 0.8 g (0.81 mmol) de **43** se hizo reaccionar con 0.5 mL (4.87 mmol) de tiofenol y 1.34 g (9.74 mmol) de K_2CO_3 . La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 11 días. Se obtuvo 0.189 g (44%) de **36c** como un sólido marrón. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.7 (s, 2H), 7.34 (s, 4H, ArH), 7.11 (s, 2H, ArH), 5.1 (m, 2H, OCH), 4.0 (m, 2H, OCH_2), 3.70 (s, 4H, CH_2), 1.8 (m, 4H) 1.6 (m, 8H, CH_2). ^{13}C RMN (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 160.0 (2 \times C=N), 155.0 (Ar, -2 \times C), 137.9 (Ar-C), 135.1 (Ar-C), 132.4 (Ar, 2 \times CH), 128.8 (Ar-C), 128.4 (Ar, 2 \times CH), 127.7 (Ar-C), 127.2 (Ar-CH), 124.0 (Ar-CH), 103.4 (2 \times CH), 62.2 (2 \times CH_2), 52.8 (2 \times CH_2), 41.1 (2 \times CH_2), 34.8 (2 \times CH_2), 27.3 (2 \times CH_2), 24.5 (2 \times CH_2), 18.5 (2 \times CH_2). P.f. 130-132 °C. HPLC (UV) = 90 %. LRMS (ES⁺) m/z = 547.41 (M+H).

Parte Experimental

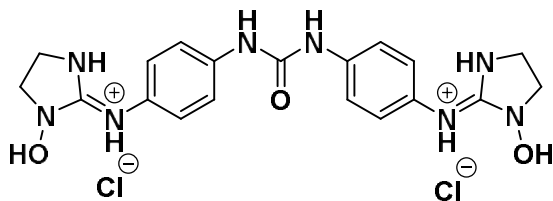
8.7 Procedimiento general para la desprotección del grupo OTHP. Sobre una disolución de las 1-alcoxi-2-iminoimidazolidinas **33c** - **36c** en MeOH (1 mL) se añadió 3 mL de una disolución de dioxano saturada con cloruro de hidrógeno (HCl_{gas}). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche y el disolvente se evaporó a vacío. Los compuestos se recristalizaron de MeOH/acetona (**33e**, **34d**, y **36e**) o iPrOH (**35e**) y se lavaron con Et₂O.

8.7.1 Síntesis del dihidrocloruro de 4-((1-hidroxiimidazolidin-2-iliden)amino)-N-(4-((1-hidroxiimidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (**33e**)



130 mg (0.238 mmol) del compuesto **33c** fueron desprotegidos de acuerdo con el procedimiento general 8.7 obteniéndose 91.6 mg (97%) de **33e** como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.15 (s, 1H, NH), 11.09 (s, 1H, OH), 11.01 (s, 1H, NH), 10.77 (s, 1H, NH), 10.72 (s, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, OH), 9.02 (s, 1H, NH), 8.16 (d, J = 8.7, 2H, ArH), 7.96 (d, J = 8.9, 2H, ArH), 7.51 (d, J = 8.7, 2H, ArH), 7.32 (d, J = 8.9, 2H, ArH), 3.82 – 3.70 (m, 4H, Imd-CH₂), 3.65 – 3.52 (m, 4H, Imd-CH₂). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 164.6 (C=O), 160.1 (C=N), 159.5 (C=N), 138.22 (Ar-C), 132.19 (Ar-C), 132.2 (Ar-C), 130.2 (Ar-C), 129.3 (Ar, 2 × CH), 124.8 (Ar, 2 × CH), 123.2 (Ar, 2 × CH), 121.3 (Ar, 2 × CH), 52.0 (Imd-CH₂), 51.8 (Imd-CH₂), 40.6 (Imd-CH₂), 40.4 (Imd-CH₂). P.f. 164-165 °C. HPLC (UV) > 99%. LRMS (ES⁺) m/z = 396.33 (M+H). HRMS (ES⁺) requerido para C₁₉H₂₃Cl₂N₇O₃: 395.1706 (encontrado: 395.1720).

8.7.2 Síntesis del dihidrocloruro de 1,3-bis(4-((1-hidroxiimidazolin-2-iliden)amino)fenil)urea (**34e**)

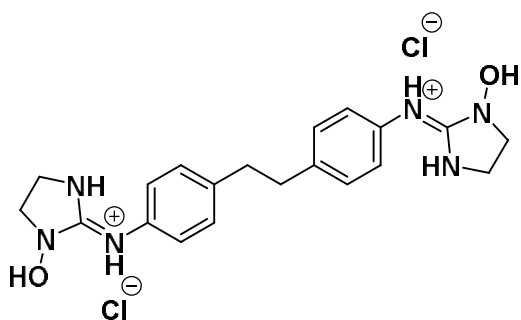


10 mg (0.017 mmol) del compuesto **34c** fueron desprotegidos de acuerdo con el procedimiento general 8.7 obteniéndose 6 mg (84%) de **34e** como un sólido marrón. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.79 (s.a, 2H, NH), 10.64 (s.a, 2H, NH), 9.65 (s.a, 2H, OH), 8.89 (s, 2H, NH), 7.55 (d, J = 8.6, 4H, ArH), 7.25 (d, J = 8.6, 4H, ArH), 3.78 – 3.62 (m, 4H, Imd-CH₂), 3.60 – 3.45 (m, 4H, Imd-CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 160.3 (C=O), 152.7 (2 × C=N), 139.0 (2 × Ar-C), 128.2 (2 × Ar-C), 125.5 (Ar, 2 × CH), 118.4 (Ar, 2 × CH), 52.1 (2 × CH₂), 48.6 (2 × CH₂). P.f. 170-175 °C.

Parte Experimental

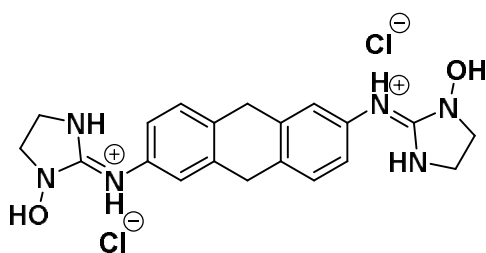
HPLC (UV) = 96 %. **LRMS (ES⁺)** m/z = 411.31 (M + H). **HRMS (ES⁺)** requerido para C₁₉H₂₄Cl₂N₈O₃: 410.1815 (encontrado: 410.1807).

8.7.3 Síntesis del dihidrocloruro de *N,N'*-(etan-1,2-diilbis(4,1-fenilen))bis(1-hidroxiimidazolidin-2-imina) (35d)



50 mg (0.091 mmol) del compuesto **35c** fueron desprotegidos de acuerdo con el procedimiento general 8.7 obteniéndose 23.7 mg (68%) de **35d** como un sólido marrón. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.04 (s, 2H, OH), 10.77 (s, 2H, NH), 9.00 (s, 2H, NH), 7.35 (d, J = 7.8, 4H, ArH), 7.26 (d, J = 7.8, 4H, ArH), 3.73 (t, J = 7.7, 4H, Imd-CH₂), 3.54 (t, J = 7.7, 4H, Imd-CH₂), 2.91 (s, 4H, CH₂). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 159.9 (2 × C=N), 140.3 (2 × Ar-C), 132.9 (2 × Ar-C), 129.5 (Ar, 4 × CH), 124.1 (Ar, 4 × CH), 51.9 (2 × Imd-CH₂), 40.2 (2 × Imd-CH₂), 36.2 (2 × CH₂). P.f. > 224 °C (desc.). **HPLC (UV)** = 95 %. **LRMS (ES⁺)** m/z = 381.43 (M + H). **HRMS (ES⁺)** requerido para C₂₀H₂₆Cl₂N₆O₂: 381.1961 (encontrado: 381.1585).

8.7.4 Síntesis del dihidrocloruro de *N,N'*-(9,10-dihidroantracén-2,6-diil)bis(1-hidroxiimidazolidin-2-imina) (36e).

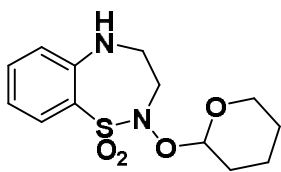


96 mg (0.18 mmol) del compuesto **36c** fueron desprotegidos de acuerdo con el procedimiento general 8.7 obteniéndose 45.9 mg (69%) de **36e** como un sólido marrón. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.84 (s.a, 2H, NH), 10.77 (s, 2H, NH), 8.92 (s.a, 2H, OH), 7.43 (d, J = 8.0, 2H, ArH), 7.33 (d, J = 2.0, 2H, ArH), 7.17 (dd, J = 8.0, 2.0, 2H, ArH), 3.96 (s, 4H, CH₂), 3.77 – 3.67 (m, 4H, NCH₂), 3.60 – 3.51 (m, 4H, NCH₂). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 159.6 (2 × C=N), 148.7 (2 × Ar-C), 138.6 (Ar-C), 136.1 (Ar-C), 132.7 (2 × Ar-CH), 129.2 (Ar-C), 128.1 (2 × Ar-CH), 125.4 (Ar-C), 123.5 (Ar-CH), 122.7 (Ar-CH), 50.3 (2 × CH₂), 44.0 (2 × CH₂), 36.2 (2 × CH₂). LRMS (ESI⁺) m/z = 379.33 (M + H). P.f. > 130 °C (desc.). **HPLC (%UV)** = 97 %. **LRMS (ES⁺)** m/z = 379.33 (M + H). **HRMS (ES⁺)**: requerido para C₂₀H₂₄Cl₂N₆O₂: 378.1804 (encontrado: 378.1792).

Parte Experimental

8.8 Caracterización de las tiadiazepinas.

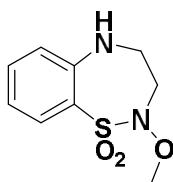
8.8.1 1,1-dióxido de 2-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,2,5]tiadiazepina (22d).



$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (dd, $J = 8.0, 1.6$, 1H, *ArH*), 7.37 (td, $J = 7.6, 7.6, 1.6$, 1H, *ArH*), 7.03 (td, $J = 7.6, 7.6, 1.6$, 1H, *ArH*), 6.93 (d, $J = 8.0$, 1H, *ArH*), 5.27 (m, 1H, *CH*), 4.02 (m, 1H), 3.82 (m, 1H, *CH}_2*), 3.64 (m, 2H, *CH}_2*), 3.29 (m, 2H, *CH}_2*), 1.56 (m, 6H, *CH}_2*).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 147.0 (*Ar-C*), 134.3 (*Ar-CH*), 131.6 (*Ar-CH*), 126.9 (*Ar-C*), 121.7 (*Ar-CH*), 121.3 (*Ar-CH*), 104.4 (*O-CH-O*), 63.4 (*O-CH}_2*), 55.0 (*CH}_2*), 42.0 (*CH}_2*), 28.7 (*CH}_2*), 25.1 (*CH}_2*), 19.5 (*CH}_2*). **HPLC (%UV) = 96 %**. **LRMS (ES $^+$) m/z = 299.26 (M + H)**.

8.8.2 1,1-dióxido de 2-metoxi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,2,5]tiadiazepina (19d).

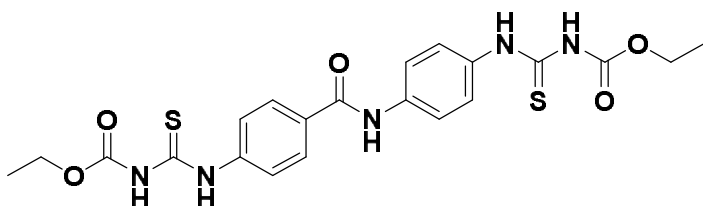


$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (d, $J = 8.0$, 1H, *ArH*), 7.39 (t, $J = 7.6, 7.6$, 1H, *ArH*), 7.07 (t, $J = 7.6, 7.6$, 1H, *ArH*), 6.92 (d, $J = 8.0$, 1H, *ArH*), 3.95 (m, 1H, *NH*), 3.81 (s, 3H, *O-CH}_3*), 3.74 (m, 2H, *-CH}_2-*), 3.25 (m, 2H, *-CH}_2-*). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 146.8 (*Ar-C*), 134.4 (*Ar-CH*), 131.8 (*Ar-CH*), 127.1 (*Ar-C*), 121.7 (*Ar*, 2 \times *CH*), 63.9 (*O-CH}_3*), 52.9 (*-CH}_2-*), 42.0 (*-CH}_2-*). **HPLC (%UV) = 95 %**. **LRMS (ES $^+$) m/z = 229.12 (M + H)**.

8.9 Procedimiento general para la síntesis de las bis(etoxicarboniltiureas) (45 - 46)

A una disolución de diamina **25 - 27** (1 equiv.) en 15 mL DCM anhidro enfriada a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se le adiciona lentamente un exceso de isotiocianato de etoxicarbonilo (2.2 equiv.). Una vez terminada la adición, la reacción se agita una noche a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los productos precipitan en el medio de reacción. El precipitado se filtra y se lava con hexano, obteniéndose las etoxicarboniltiureas **45 - 46** con buenos rendimientos.

8.9.1 Síntesis de la 4-(3-etoxicarboniltiurea)-N-(4-(3-etoxicarboniltiurea)fenil)benzamida (45)

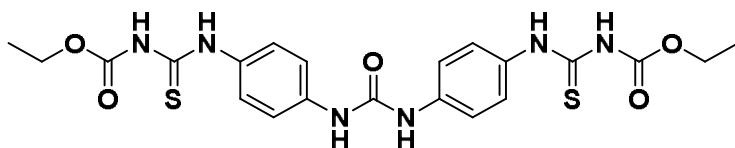


Siguiendo el procedimiento general 8.9, se hizo reaccionar 1.0 g (4.4 mmol) de 4-amino-N-(4-aminofenil)benzamida (**25**) con 1.1 mL (9.7 mmol) de

Parte Experimental

isotiocianato de etoxicarbonilo. La reacción se dejó en agitación por 12 horas. El producto se hizo precipitar según el procedimiento antes detallado obteniéndose 2.1 g (96%) de **45** como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.72 (s, 1H, NH), 11.49 (s, 1H, NH), 11.36 (s, 1H, NH), 11.22 (s, 1H, NH), 10.33 (s, 1H, NH), 7.97 (d, J = 9.0, 2H, ArH), 7.80 (m, 4H, ArH), 7.54 (d, J = 9.0, 2H, ArH), 4.22 (c, J = 7.1, 2H, O-CH₂-), 4.21 (c, J = 7.1, 2H, O-CH₂-), 1.26 (t, J = 7.1, 3H, CH₃), 1.25 (t, J = 7.1, 3H, CH₃). ¹³C RMN (75 MHz DMSO-d₆) δ 175.9 (C=O), 165.1 (2 x C=O), 154.0 (C=N), 153.9(C=N), 141.3, 137.5, 133.9, 132.4, 128.5, 125.3, 124.1, 120.6, 62.5 (O-CH₂-), 62.4 (O-CH₂-), 14.5 (2 x CH₃). P.f. > 300 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 490.11 (M+H).

8.9.2 Síntesis de la 1,3-bis(4-(3-etoxicarboniltiouredio)fenil)urea (**46**).



Siguiendo el procedimiento general 8.9, se hizo reaccionar 1.17 g (5.76 mmol) de 1,3-bis(4-

aminofenil)urea **27** con 1.20 mL (10.63 mmol) de etoxicarbonilisotiocianato. La reacción se dejó en agitación por 12 horas. El producto se hizo precipitar según el procedimiento antes detallado obteniéndose 2.0 g (82%) de **46**. ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 11.44 (s, 2H, NH), 11.20 (s, 2H, NH), 8.78 (s, 2H, NH), 7.47 (s, 8H, ArH), 4.21 (c, J = 7.1, 4H, O-CH₂), 1.26 (t, J = 7.1, 6H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 178.5 (C=O), 153.6 (C=S), 152.5 (C=S), 137.7 (2 x Ar-C), 132.0 (2 x Ar-C), 125.3 (Ar, 4 x CH), 118.1 (Ar, 4 x CH), 62.0 (2 x O-CH₂-), 14.2 (2 x CH₃). P.f. > 300 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 505.39 (M+H)

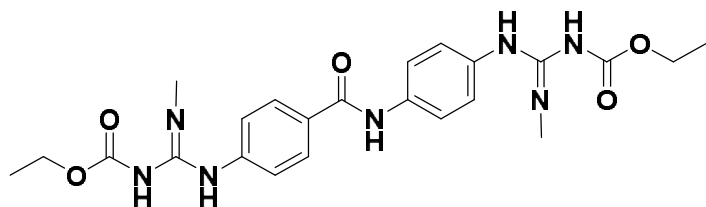
8.10 Procedimiento general para la síntesis de las *N*-alquiloxi y *N*-alquilguanidinas **47 - 56**

A una disolución de 4 equivalentes de hidroxilamina (i.e., hidrocloreto de *O*-metilhidroxilamina, *O*-etilhidroxilamina, y *O*-bencilhidroxilamina), o alquilamina (i.e., etilamina, isopropilamina) en 5 mL de DCM anhidro y bajo atmósfera de argón, se añade diisopropiletilamina (DIPEA, 6 equiv.). La reacción se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se enfría con un baño de hielo y se añade sucesivamente la bis(etoxicarboniltiourea) **45 - 46** (1 equiv.) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 4 equiv.). Se observa que la mezcla de reacción cambia de un color blanco turbio a un marrón claro. La reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, la mezcla de reacción se diluye con 10 mL de CH₂Cl₂, se lava con agua destilada (3 x 10 mL), salmuera (10 mL) y se seca con

Parte Experimental

MgSO₄. El disolvente se evapora a vacío y el producto se purifica tal como se especifica en cada caso obteniéndose los derivados de guanidinas **47** – **56**.

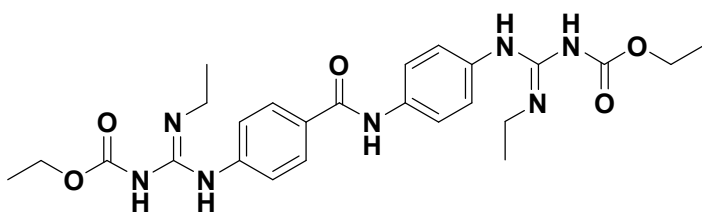
8.10.1 Síntesis de la 4-(3-etoxicarbonil-2-metilguanidino)-N-(4-(3-etoxicarbonil-2-metilguanidino)fenil)benzamida (**47**).



Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 800 mg (1.64 mmol) de la bis(etoxicarboniltiurea) **45** con 1.71 mL (9.84 mmol) de

DIPEA, 1.26 g (6.56 mmol) de EDAC y 3.28 mL (6.56 mmol) de metilamina (disolución 2M en THF). La purificación se llevó a cabo por precipitación en AcOEt y lavado con Et₂O, obteniéndose 495.4 mg de **47** (64%) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10.55 (s.a, 1H, NH), 8.67 (s.a, 1H, NH), 7.86 (d, J = 8.6, 2H, ArH), 7.69 (d, J = 8.3, 2H, ArH), 7.18 (m, 2H, ArH), 7.13 (d, J = 8.6, 2H, ArH), 5.03 (m, 2H, NH), 4.14 (c, J = 7.1, 4H, O-CH₂-), 2.94 (s, 3H, N-CH₃), 2.89 (s, 3H, N-CH₃), 1.29 (m, 6H, -CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 164.8 (C=O), 163.4 (C=O), 163.2 (C=O), 159.1 (C=N), 158.6 (C=N), 141.4 (Ar-C), 136.3 (Ar-C), 132.8 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 128.2 (Ar-CH), 124.9 (Ar-CH), 122.4 (Ar-CH), 120.6 (Ar-CH), 59.7 (-OCH₂-), 59.6 (-OCH₂-), 28.4 (-NCH₃), 28.1 (-NCH₃), 14.7 (CH₃), 14.6 (CH₃). P.f. 127-130 °C. HPLC (UV) = 96 %. LRMS (ES⁺) = 484.46 (M+H).

8.10.2 Síntesis de la 4-(2-etil-3-etoxicarbonilguanidino)-N-(4-(2-etil-3-etoxicarbonilguanidino)fenil)benzamida (**48**)



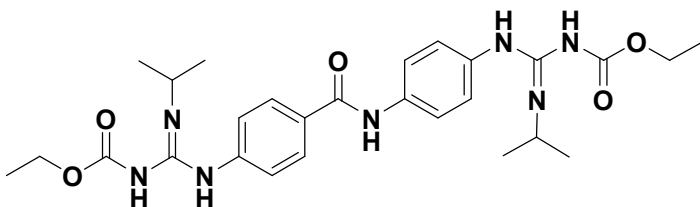
Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 500 mg (1.02 mmol) de la bis(etoxicarboniltiurea) **45** con 1.1 mL (6.13 mmol) de

DIPEA, 784 mg (4.09 mmol) de EDAC y 331.3 mg (4.09 mmol) de clorhidrato de etilamina. El producto se purificó por cromatografía sobre sílice (cartucho SI de 10 g) con DCM/AcOEt (9:1) obteniéndose 418.6mg de **48** (81%) como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 10.66 (s.a, 1H, NH), 8.49 (s.a, 1H, NH), 7.86 (d, J = 7.5, 2H, ArH), 7.68 (d, J = 8.5, 2H, ArH), 7.17 (s, 1H, NH), 7.13 (d, J = 8.5, 4H, ArH), 4.76 (s.a, 1H, NH), 4.14 (c, J = 7.1, 4H, -OCH₂-), 3.39 (m, 4H, -OCH₂-), 1.28 (t, J = 7.1, 6H, CH₃), 1.20 (t, J = 6.9, 3H, CH₃), 1.11 (t, J = 7.1, 3H, CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 165.5 (C=O), 136.9 (2 × Ar-C), 129.1 (Ar, 2 × CH), 126.6 (Ar, 2 × CH), 124.0 (Ar, 2 × CH), 122.1 (Ar, 2 × CH), 61.6 (-OCH₂-), 61.2 (-OCH₂-)

Parte Experimental

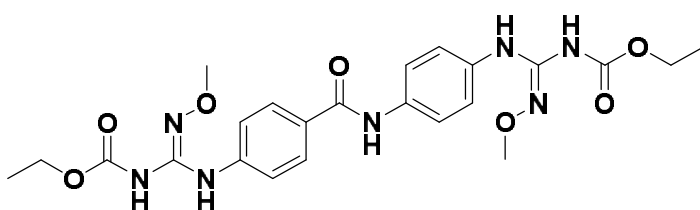
), 36.4 ($2 \times -NCH_2$), 15.0 (CH_3), 14.8 ($2 \times CH_3$), 14.6 ($2 \times CH_3$). P.f. 170-171 °C. HPLC (UV) > 90%. HRMS (ES⁺) requerido para $C_{25}H_{33}N_7O_5$: 511.2541 (encontrado: 511.2543).

8.10.3 Síntesis de la 4-(3-etoxicarbonil-2-isopropilguanidino)-N-(4-(3-etoxicarbonil-2-isopropilguanidino)fenil)benzamida (49)



Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 800 mg (1.64 mmol) de la bis(etoxicarboniltiurea) **45** con 1.71 mL (9.84 mmol) de DIPEA, 1.26g (6.56 mmol) de EDAC y 0.57 mL (6.56 mmol) de isopropilamina. La purificación se llevó a cabo por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 10 g) con DCM/AcOEt (100/0→90/10) obteniéndose 690 mg de **49** (77%) como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 10.57 (s, 1H, NH), 8.48 (s, 1H, NH), 7.89 (d, J = 7.9, 2H, ArH), 7.70 (d, J = 8.3, 2H, ArH), 7.14 – 6.94 (m, 4H, ArH), 4.59 (s, 1H, NH), 4.27 (m, 2H, -CH₂-), 4.15 (c, J = 7.1, 4H, -OCH₂-), 1.30 (m, 6H, CH₃), 1.20 (d, J = 6.4, 6H, CH₃), 1.11 (d, J = 6.4, 6H, CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 165.5 (C=O), 164.7 (2 × C=O), 158.2 (2 × C=N), 137.0 (2 × Ar-C), 132.2 (2 × Ar-C), 129.2 (Ar, 2 × CH), 126.6 (Ar, 2 × CH), 124.1 (Ar, 2 × CH), 122.2 (Ar-CH), 61.6 (-OCH₂-), 61.1 (-OCH₂-), 43.0 (-CH-), 23.1 (2 × CH₃), 23.0 (2 × CH₃), 14.8 (CH₃), 14.6 (CH₃). P.f. 136-138 °C. HPLC (UV) > 95%. HRMS (ES⁺) requerido para $C_{27}H_{37}N_7O_5$: 539.2856 (encontrado: 539.2849).

8.10.4 Síntesis de la 4-(3-etoxicarbonil-2-metoxiguanidino)-N-(4-(3-etoxicarbonil-2-metoxiguanidino)fenil)benzamida (50)

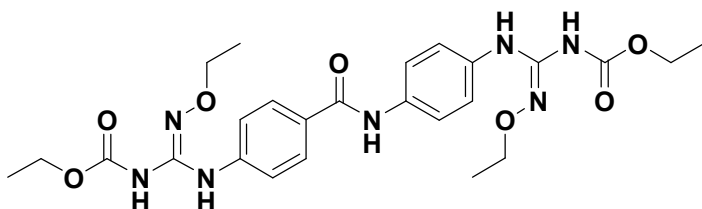


Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 500 mg (1.02 mmol) de la bis-etoxicarboniltiurea **45** con 1.1 mL (6.13 mmol) de DIPEA, 784 mg (4.09 mmol) de EDAC y 341 mg (4.09 mmol) de clorhidrato de metoxiamina. El producto se purificó por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 5g) con DCM/AcOEt (9:1) obteniéndose 226mg del compuesto **50** (43%) como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H, NH), 8.84 (s, 1H, NH), 8.02 (s, 2H, NH), 7.80 (d, J = 8.7, 2H, ArH), 7.76 (s, 1H, NH), 7.53 (d, J = 8.7, 4H, ArH), 7.43 (d, J = 8.7, 2H, ArH), 4.23 (c, J = 7.0, 2H, O-CH₂-), 4.20 (c, J = 7.0, 2H, O-CH₂-), 3.83 (s, 3H, O-CH₃), 3.77 (s, 3H, O-CH₃), 1.39 (m, 6H, O-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 165.1 (C=O), 153.5 (2 × C=O), 145.2 (Ar-C),

Parte Experimental

144.2 (C=N), 142.2 (C=N), 135.4 (Ar-C), 132.6 (Ar-C), 127.8 (Ar-C) 128.2 (Ar, 2 × CH), 121.0 (Ar, 2 × CH), 119.7 (Ar, 2 × CH), 118.4 (Ar, 2 × CH), 62.7 (O-CH₃), 62.1 (O-CH₃), 14.4 (2 × CH₃). **P.f.** 190-191 °C. **HPLC (UV):** 97%. **HRMS (ES⁺)** requerido para C₂₃H₂₉N₇O: 515.2128 (encontrado: 515.2134).

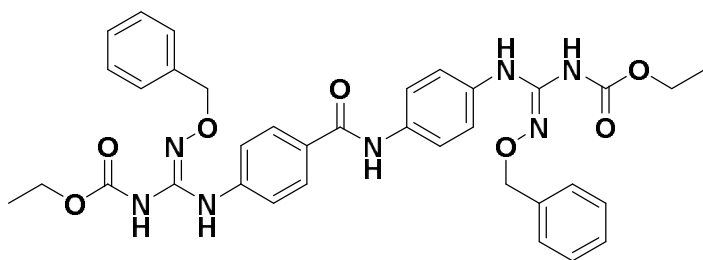
8.10.5 Síntesis de la 4-(2-etoxi-3-etoxicarbonilguanidino)-N-(4-(2-etoxi-3-etoxicarbonilguanidino)fenil)benzamida (51)



Siguiendo el procedimiento general 3.16, se hizo reaccionar 500 mg (1.02 mmol) de la bis(etoxicarboniltiourea) **45** con 1.1 mL (6.13 mmol) de

DIPEA, 784 mg (4.09 mmol) de EDAC y 397 mg (4.09 mmol) de clorhidrato de etoxiamina. El producto se purificó por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 5g) con DCM/AcOEt (9:1) obteniéndose 299 mg de **51** (55%) como un sólido blanco. **¹H RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ 9.17 (s, 1H, NH), 8.84 (s, 1H, NH), 8.04 (s, 2H, NH), 7.79 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.78 (s, 1H, NH), 7.53 (d, J = 8.8, 4H, ArH), 7.44 (d, J = 8.6, 2H, ArH), 4.24 (m, 4H, O-CH₂-), 4.05 (m, 4H, O-CH₂-), 1.32 (m, 12H, CH₃). **¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ 165.2 (C=O), 153.5 (2 × C=N), 144.6 (Ar-C), 143.9 (C=O), 142.3 (C=O), 135.6 (Ar-C), 132.4 (Ar-C), 128.2 (Ar, 2 × CH), 127.7 (Ar-C), 121.0 (Ar, 2 × CH), 119.4 (Ar-CH), 118.2 (Ar-CH), 69.7 (-OCH₂-), 69.5 (-OCH₂-), 62.6 (-OCH₂-), 62.4 (-OCH₂-), 14.7 (CH₃), 14.4 (CH₃). **P.f.** 181-183 °C. **HPLC (UV):** 95%. **LRMS (ES⁺) m/z** = 544.17 (M+H).

8.10.6 Síntesis de la 4-(2-benciloxi-3-etoxicarbonilguanidino)-N-(4-(2-benciloxi-3-etoxicarbonilguanidino)fenil)benzamida (52)



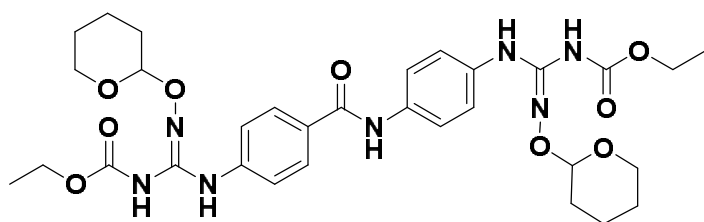
Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 800 mg (1.64 mmol) de la bis(etoxicarboniltiourea) **45** con 1.71 mL (9.84 mmol) de DIPEA, 1.26g (6.56 mmol) de

EDAC y 0.57 mL (6.56 mmol) de benciloxiamina. La purificación se llevó a cabo por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 5g) con AcOEt/MeOH (100/0→90/10), obteniéndose 875 mg de **52** (80%) como un sólido blanco. **¹H RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ 9.18 (s, 1H, NH), 8.84 (s, 1H, NH), 8.00 (m, 2H, NH), 7.78 (d, J = 8.7, 2H, ArH), 7.67 (s, 1H, NH), 7.52 (m, 4H, ArH), 7.40 (m, 12H, ArH), 5.03 (s, 2H, -OCH₂-), 5.00 (s, 2H, -OCH₂-), 4.23 (c, J = 7.1, 4H, -OCH₂-), 1.32 (t, J = 7.1, 6H, CH₃). **¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ 164.9 (C=O),

Parte Experimental

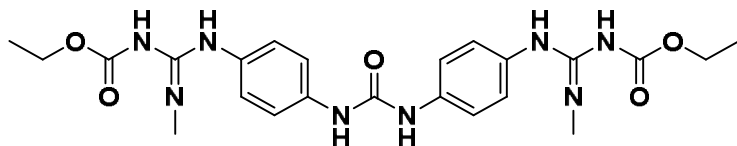
153.3 ($2 \times C=O$), 144.8 ($C=N$), 144.0 ($C=N$), 143.9 ($Ar-C$), 142.1 ($Ar-C$), 137.5 ($Ar-C$), 137.3 ($Ar-C$), 135.4 ($Ar-C$), 132.3 ($Ar-C$), 128.8 ($Ar, 2 \times CH$), 128.8 ($Ar, 2 \times CH$), 128.43 ($Ar, 2 \times CH$), 128.37 ($Ar, 2 \times CH$), 128.2 ($Ar, 2 \times CH$), 127.6 ($Ar-CH$), 120.8 ($Ar, 2 \times CH$), 119.5 ($Ar-CH$), 118.2 ($Ar-CH$), 76.3 ($O-CH_2-$), 76.2 ($O-CH_2-$), 62.5 ($O-CH_2-$), 62.3 ($O-CH_2-$), 14.2 (CH_3). **P.f.** 156-158 °C. **HPLC (UV)** = 95%. **LRMS (ES⁺) m/z** = 668.68 (M+H).

8.10.7 Síntesis de la 4-(3-etoxicarbonil-2-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)guanidino)-N-(4-(3-etoxicarbonil-2-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)guanidino)fenil)benzamida (53)



Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 650 mg (1.32 mmol) de la bis(etoxicarboniltiourea) **45** con 1.49 mL (8.6 mmol) de DIPEA, 1.1 g (5.72 mmol) de EDAC y 670 mg (5.72 mmol) de *O*-(tetrahidro-2H-piran-2-il)hidroxilamina. La purificación se llevó a cabo por precipitación en AcOEt, obteniéndose el compuesto **53** (560 mg, 60%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 9.21 (s, 1H, NH), 8.88 (s, 1H, NH), 7.97 (s, 2H, NH), 7.88 (s, 1H, NH), 7.79 (d, *J* = 8.8, 2H, *ArH*), 7.54 (m, 4H, *ArH*), 7.44 (d, *J* = 9.0, 2H, *ArH*), 5.14 (dd, *J* = 5.8, 2.2, 1H, *O-CH-O*), 5.10 (dd, *J* = 6.0, 2.1, 1H, *O-CH-O*), 4.24 (m, 4H, *O-CH₂-*), 3.94 (m, 2H, *-CH₂-*), 3.63 (m, 2H, *-CH₂-*), 2.48 (m, 2H, *-CH₂-*), 1.86 (m, 4H, *-CH₂-*), 1.61 (m, 6H, *-CH₂-*), 1.34 (m, 6H, *CH₃*). **¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃)** δ 165.3 ($C=O$), 153.5 ($2 \times C=O$), 146.0 ($C=N$), 145.3 ($C=N$), 142.1 ($Ar-C$), 135.5 ($Ar-C$), 132.7 ($Ar-C$), 128.3 ($Ar, 2 \times CH$), 128.0 ($Ar-C$), 121.1 ($Ar, 2 \times CH$), 119.8 ($Ar, 2 \times CH$), 118.6 ($Ar, 2 \times CH$), 101.8 (*O-CH-O*), 101.7 (*O-CH-O*), 64.3 (*O-CH₂-*), 64.2 (*O-CH₂-*), 62.9 (*O-CH₂-*), 62.7 (*O-CH₂-*), 29.6 (*-CH₂-*), 29.5 (*-CH₂-*), 25.4 (*-CH₂-*), 21.0 (*-CH₂-*), 20.9 (*-CH₂-*), 14.5 ($2 \times CH_3$). **P.f.** 116-118 °C. **HPLC (UV)**: 95%. **LRMS (ES⁺) m/z** = 656.59 (M+H).

8.10.8 Síntesis de la 1,3-bis(4-(3-etoxicarbonil-2-metilguanidino)fenil)urea (54)

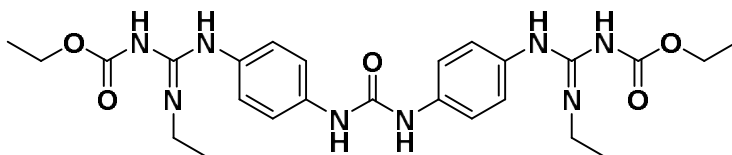


Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 800 mg (1.59 mmol) de la bis(etoxicarboniltiourea) **46** con 1.66 mL (9.52 mmol) de DIPEA, 1.21 g (6.36 mmol) de EDAC y 3.18 mL (6.36 mmol) de metilamina (disolución 2M en THF). La purificación se llevó a cabo por trituración del crudo con Et₂O obteniéndose 707 mg de **54** (73%) como un sólido de color blanco. **¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆)** δ 11.9 (s, 2H, NH), 9.7 (d, *J* = 8.4, 4H, *ArH*), 9.5 (d, *J* = 8.3, 4H, *ArH*), 6.2 (c, *J* = 7.1, 4H, *O-CH₂-*), 5.7 (s, 6H, *N-CH₃*), 3.4 (t, *J* = 7.1,

Parte Experimental

6H, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.7 (C=O), 159.6 (2 \times C=O), 153.1 (2 \times C=N), 137.9 (2 \times Ar-C), 131.2 (2 \times Ar-C), 126.0 (Ar, 4 \times CH), 118.5 (Ar, 4 \times CH), 59.9 (2 \times O- CH_2 -), 28.4 (2 \times N- CH_3), 15.0 (2 \times CH_3). P.f. > 280 $^\circ C$ (desc.). HPLC (UV): 98%. LRMS (ES $^+$) m/z = 499.44 (M + H).

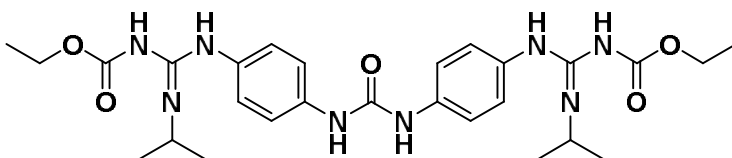
8.10.9 Síntesis de la 1,3-bis(4-(2-etil-3-etoxicarbonilguanidino)fenil)urea (55)



Siguiendo el procedimiento general 8.10, se hizo reaccionar 800 mg (1.59 mmol) de la

bis(etoxicarboniltiurea) **46** con 1.6 mL (9.5 mmol) de DIPEA, 1.23 g (6.4 mmol) de EDAC y 0.518 g (6.4 mmol) de hidrocloreto de etilamina. La purificación se llevó a cabo por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 5g) con DCM/MeOH (100/0 \rightarrow 95/5), obteniéndose 418 mg de **55** (60%) como un sólido blanco. 1H RMN (300 MHz, DMSO) δ 8.69 (s, 2H, NH), 7.44 (d, J = 8.2, 4H, ArH), 7.20 (d, J = 8.2, 4H, ArH), 3.94 (c, J = 6.9, 4H, -O CH_2 -), 3.29 (m, 4H, -N CH_2 -), 1.12 (m, 12H, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO) δ 163.5 (C=O), 158.4 (2 \times C=O), 152.5 (2 \times C=N), 137.0 (2 \times Ar-C), 131.2 (2 \times Ar-C), 125.5 (Ar, 4 \times CH), 118.6 (Ar, 4 \times CH), 59.6 (2 \times -O CH_2 -), 35.6 (2 \times -N CH_2 -), 14.8 (2 \times CH_3), 14.7 (2 \times CH_3). P.f. 190-191 $^\circ C$. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES $^+$) m/z = 527.58 (M+H).

8.10.10 Síntesis de la 1,3-bis(4-(3-etoxicarbonil-2-isopropilguanidinio)fenil)urea (56)



Siguiendo el procedimiento general 8.10 se hizo reaccionar 300 mg (0.62 mmol) de la

bis(etoxicarboniltiurea) **46** con 0.642 mL (3.69 mmol) de DIPEA, 0.472 g (2.46 mmol) de EDAC y 0.21 mL (2.46 mmol) de isopropilamina. La purificación se llevó a cabo por cromatografía flash sobre sílice (cartucho SI de 5g) con DCM/MeOH (100/0 \rightarrow 95/5), obteniéndose 228 mg de **56** (67%). 1H RMN (300 MHz, CDCl $_3$) δ 10.89 - 10.12 (s.a, 1H, NH), 8.70 - 8.11 (s.a, 2H, NH), 7.49 - 7.37 (m, 4H, ArH), 7.05 (d, J = 8.0, 4H, ArH), 4.95 - 4.38 (s.a, 2H, NH), 4.25 - 4.22 (m, 2H, -CH-), 4.18 (c, J = 7.0, 4H, O- CH_2), 1.28 (t, J = 7.0, 6H, CH_3), 1.11 (m, 12H, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl $_3$) δ 164.6 (C=O), 158.6 (2 \times C=O), 153.2 (2 \times C=N), 138.6 (2 \times Ar-C), 129.9 (2 \times Ar-C), 126.9 (Ar, 4 \times CH), 120.2 (Ar, 4 \times CH), 61.5 (2 \times O- CH_2 -), 43.2 (2 \times -CH-), 23.1 (4 \times CH_3), 14.8 (2 \times CH_3). P.f. > 130 $^\circ C$ (desc.). HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES $^+$) m/z = 555.58 (M+H).

Parte Experimental

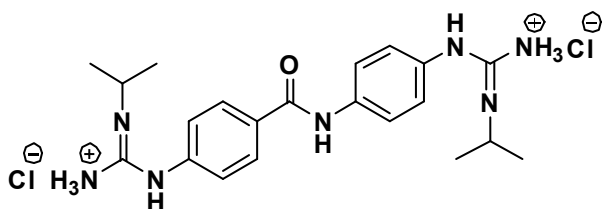
8.11. Procedimiento general para la obtención de las *N*-alcoxi y *N*-alquil guanidinas finales 57 – 66 en forma de base libre

La reacción se lleva a cabo en un tubo de vidrio KIMAX con tapón de rosca. A una disolución de las bis(etoxicarbonilguanidina) en 1 mL de EtOH absoluto se añade 2 mL de KOH 0.1 M. El tubo se cierra (“sella”) y la reacción se deja en agitación a 80 °C durante 3 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se enfría, se trasvasa a un matraz y disolvente se evapora a presión reducida. El producto luego precipita en H₂O. Se raspa con una espátula para formar un precipitado. La guanidina en forma de base libre se aísla mediante filtración con una placa filtrante N° 3.

8.12 Procedimiento general para la formación de los dilhidrocloruros de guanidinio

A una disolución de la guanidina en 1 mL de MeOH se añaden 3 mL de dioxano saturado con HCl_(g). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Los disolventes se evaporan a vacío y la sal de guanidinio se tritura en Et₂O para obtener las sales hidrocioradas con buenos rendimientos y alta pureza.

8.12.1 Síntesis del dihidrocloruro de 4-(2-isopropilguanidinio)-*N*-(4-(2-isopropilguanidinio)fenil)benzamida (57a)

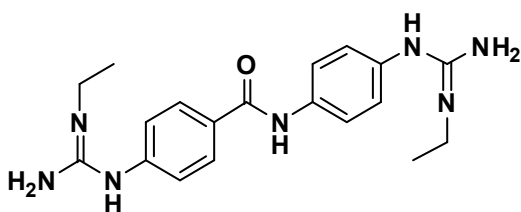


Siguiendo el procedimiento general 8.11, se desprotegeron 300 mg (0.56 mmol) de **49**, obteniéndose 157 mg de **57** (71%) como un sólido blanco. Siguiendo el procedimiento general 3.12, se

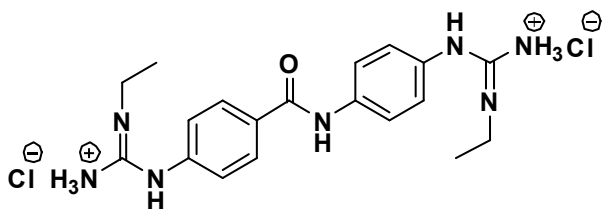
obtuvieron 106 mg del dihidrocloruro **57a** como un sólido blanco. **HPLC (UV)** = 97%. **¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆)** δ 10.51 (s, 1H, NH), 10.28 (s, 1H, NH), 9.80 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, NH), 8.10 (d, J = 8.5, 2H, ArH), 8.03 (s.a. 3H, NH), 7.91 (d, J = 8.5, 2H, ArH), 7.64 (s, 2H, NH), 7.34 (d, J = 8.0, 2H, ArH), 7.20 (d, J = 8.0, 2H, ArH), 3.94 (m, 2H, -CH-), 1.19 (t, J = 6.2, 12H, CH₃). **¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆)** δ 164.5 (C=O), 154.2 (C=N), 153.5 (C=N), 139.6 (Ar-C), 137.5 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 129.3 (Ar, 2 × CH), 125.1 (Ar-CH), 122.2 (Ar-CH), 121.3 (Ar-CH), 43.8 (-CH-), 43.4 (-CH-), 22.3 (2 × CH₃), 22.2 (2 × CH₃). **P.f.** 206-208 °C. **HPLC (UV)** = 96%. **LRMS (ES⁺) m/z** = 396.47 (M + H).

Parte Experimental

8.12.2 Síntesis del dihidrocloruro de 4-(2-etilguanidinio)-N-(4-(2-etilguanidinio)fenil)benzamida (58a)

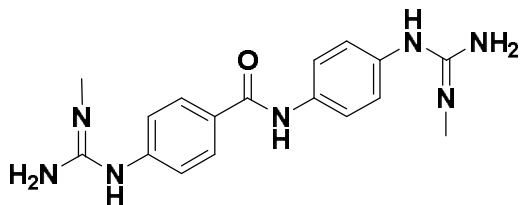


Siguiendo el procedimiento general 8.11, se desprotegeron 350 mg (0.68 mmol) de **48**, obteniéndose 205.5 mg de **58** (81%) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 9.9 (s, 1H, NH), 7.8 (d, J = 8.2, 2H, ArH), 7.7 (d, J = 8.4, 2H, ArH), 6.9 (m, 4H, ArH), 3.2 (m, 4H, N-CH₂-), 1.1 (m, 6H, CH₃). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 165.1 (C=O), 152.9 (C=N), 152.0 (C=N), 134.7 (2 \times Ar-C), 128.7 (Ar, 2 \times CH), 125.8 (2 \times Ar-C), 123.6 (Ar, 2 \times CH), 122.4 (Ar, 2 \times CH), 121.3 (Ar, 2 \times CH), 35.6 (N-CH₂-), 35.4 (N-CH₂-), 15.0 (CH₃), 14.7 (CH₃). P.f. 134-135 °C. HPLC (UV)= 92%. LRMS (ES⁺) m/z = 368.49



(M+H). Siguiendo el procedimiento general 8.12, se obtuvieron 182.4 mg del dihidrocloruro **58a** como un sólido blanco. HPLC (UV)= 92%. ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.51 (s, 1H, NH), 10.31 (s, 1H, NH), 9.83 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, NH), 8.10 (d, J = 8.4, 2H, ArH), 8.00 (s.a, 3H, NH), 7.92 (d, J = 8.1, 2H, ArH), 7.68 (s.a, 2H, NH), 7.35 (d, J = 8.1, 2H, ArH), 7.21 (d, J = 8.4, 2H, ArH), 3.30 (m, 4H, N-CH₂-), 1.14 (c, J = 7.3, 6H, CH₃). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 164.5 (C=O), 154.9 (C=N), 154.3 (C=N), 139.5 (Ar-C), 137.7 (Ar-C), 130.9 (Ar-C), 130.6 (Ar-C), 129.3 (2 \times ArH), 125.3 (2 \times ArH), 122.4 (2 \times ArH), 121.4 (2 \times ArH), 36.5 (N-CH₂), 36.2 (N-CH₂), 14.2 (-CH₃), 14.1 (-CH₃).

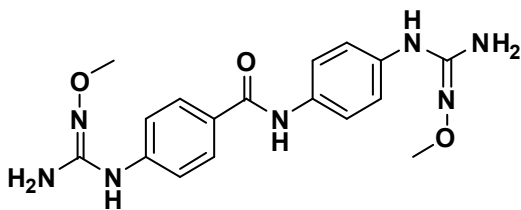
8.11.1 Síntesis de la 4-(2-metilguanidino)-N-(4-(2-metilguanidino)fenil)benzamida (59)



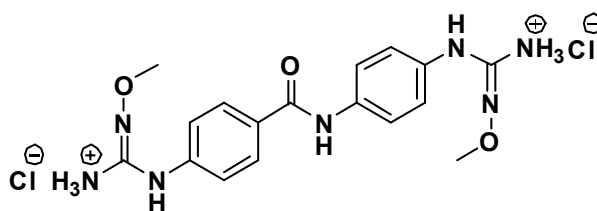
Siguiendo el procedimiento general 8.11, se desprotegeron 136 mg (0.28 mmol) de **47**, obteniéndose 90 mg (94%) de la base libre **59** como un sólido blanco. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.91 (s, 1H, NH), 7.84 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.13 (s.a., 2H, NH), 6.89 (m, 4H, Ar-H), 5.96 (s.a, 4H, NH₂), 2.70 (s, 3H, -CH₃), 2.68 (s, 3H, -CH₃). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 165.3 (C=O), 154.2 (C=N), 153.1 (C=N), 134.9 (2 \times Ar-C), 129.0 (Ar, 2 \times CH), 126.2 (2 \times Ar-C), 123.9 (2 \times Ar-CH), 122.6 (2 \times Ar-CH), 121.6 (Ar-CH), 28.2 (N-CH₃), 28.1 (N-CH₃). Pf > 300 °C. HPLC (UV) = 93%. LRMS (ES⁺) m/z = 340.45

Parte Experimental

8.12.3 Síntesis del dihidrocloruro de la 4-(2-metoxiguanidinio)-N-(4-(2-metoxiguanidinio)fenil)benzamida (60a).

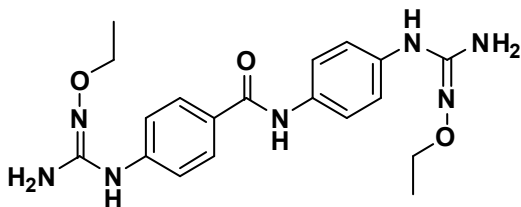


Seguando el procedimiento general 8.11, se desprotegeron 200 mg (0.39 mmol) de **50**, obteniéndose 100 mg de **60** (69%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.78 (s.a, 1H, NH), 7.81 (d, J = 7.1, 2H, ArH), 7.73 – 7.56 (s.a, 1H, NH), 7.53 (d, J = 7.2, 2H, ArH), 7.40 (d, J = 7.2, 2H, ArH), 7.28 (d, J = 7.1, 2H, ArH), 5.40 (s, 2H, NH $_2$), 5.21 (s, 2H, NH $_2$), 3.62 (s, 3H, O-CH $_3$), 3.59 (s, 3H, O-CH $_3$). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.6 (C=O), 151.5 (C=N), 150.7 (C=N), 144.6 (Ar-C), 137.4 (Ar-C), 131.8 (Ar-C), 128.4 (Ar, 2 \times CH), 125.5 (Ar-C), 121.0 (Ar, 2 \times CH), 117.2 (Ar-CH), 115.9 (Ar-CH), 60.6 (O-CH $_3$), 60.5 (O-CH $_3$). P.f. 205 $^\circ\text{C}$. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES $^+$) m/z



= 372.48 (M+H). Seguando el procedimiento general 8.12, se obtuvieron 79.1 mg del dihidrocloruro **60a** como un sólido blanco. HPLC (UV) > 95%. ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.61 (s.a, 1H), 10.63 (s, 1H), 10.58 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 8.40 (s, 2H), 8.14 (s, 2H), 8.11 (d, J = 8.4, 2H, ArH), 7.93 (d, J = 8.3, 2H, ArH), 7.40 (d, J = 8.1, 2H, ArH), 7.25 (d, J = 8.1, 2H, ArH), 3.74 (s, 3H, O-CH $_3$), 3.71 (s, 3H, O-CH $_3$). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.6 (C=O), 156.3 (C=N), 155.5 (C=N), 138.7 (Ar-C), 138.0 (Ar-C), 131.3 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 129.3 (Ar, 2 \times CH), 125.4 (Ar, 2 \times CH), 122.6 (Ar, 2 \times CH), 121.3 (Ar, 2 \times CH), 64.5 (O-CH $_3$), 64.4 (O-CH $_3$).

8.11.2 Síntesis de la 4-(2-etoxiguanidino)-N-(4-(2-etoxiguanidino)fenil)benzamida (61)

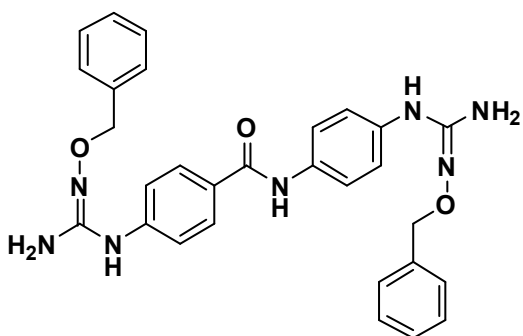


Seguando el procedimiento general 3.17, se desprotegeron 30 mg (0.055 mmol) de **51**, obteniéndose 18.6 mg de **61** (85%) como sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.75 (s, 1H, NH), 8.09 (s, 1H, NH), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.58 (s, 1H, NH), 7.52 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.39 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.27 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ArH), 5.31 (s, 2H, NH $_2$), 5.14 (s, 2H, NH $_2$), 3.83 (m, 4H, O-CH $_2$), 1.20 (m, 6H, CH $_3$). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.5 (C=O), 151.3 (C=N),

Parte Experimental

150.5 (C=N), 144.7 (Ar-C), 137.5 (Ar-C), 131.7 (Ar-C), 128.4 (2 x Ar-CH), 125.4 (Ar-C), 121.0 (2 x Ar-CH), 117.1 (2 x Ar-CH), 115.8 (2 x Ar-CH), 67.6 (O-CH₂), 67.4 (O-CH₂), 14.7 (2 x CH₃). P.f. 184-186 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 400.39 (M + H).

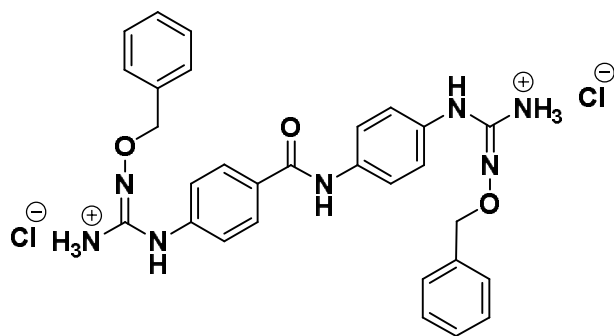
8.12.4 Síntesis del dihidrocloruro de 4-(2-(benciloxi)guanidinio)-N-(4-(2-(benciloxi)guanidinio)fenil)benzamida (62a)



Siguiendo el procedimiento general 8.11, se desprotegeron 200 mg (0.30 mmol) de **52**, obteniéndose 140 mg de **62** (95%) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.75 (s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, NH), 7.78 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.60 (s, 1H, NH), 7.50 (d, J = 9.0 Hz, 2H, ArH), 7.45 - 7.40 (m, 4H, ArH), 7.39 -

7.31 (m, 6H, ArH), 7.32 - 7.25 (m, 2H, ArH), 7.22 (d, J = 9.0 Hz, 2H, ArH), 5.43 (s, 2H, -NH₂), 5.26 (s, 2H, -NH₂), 4.88 (s, 2H, O-CH₂-), 4.84 (s, 2H, O-CH₂-). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 164.5 (C=O), 151.5 (C=N), 150.7 (C=N), 144.6 (Ar-C), 139.25 (Ar-C), 139.16 (Ar-C), 137.4 (Ar-C), 131.7 (Ar-C), 128.4 (2 x ArH), 128.1 (2 x ArH), 128.0 (2 x ArH), 127.95 (2 x ArH), 127.91 (ArH), 127.3 (ArH), 127.2 (Ar-C), 125.4 (2 x ArH), 121.0 (2 x ArH), 117.1 (2 x ArH), 115.9 (2 x ArH), 74.32 (O-CH₂), 74.25 (O-CH₂-). P.f. 110-113 °C. HPLC (UV) = 95%. LRMS

(ES⁺) m/z = 524.56 (M + H).

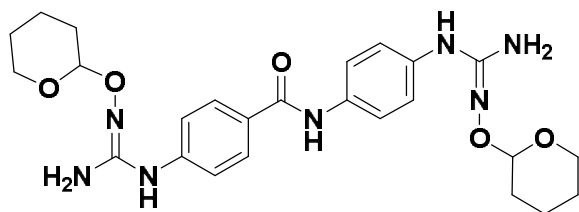


Siguiendo el procedimiento general 8.12, se obtuvieron 95 mg del dihidrocloruro **62a** como un sólido blanco. HPLC (UV) = 98%. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.54 (s, 2H), 10.55 (s, 1H), 10.53 (s, 2H), 10.20 (s,

1H), 8.26 (s, 2H), 8.08 (d, J = 8.6, 2H, ArH), 7.91 (d, J = 8.8, 2H, ArH), 7.52 (m, 4H, ArH), 7.41 (m, 6H, ArH), 7.29 (d, J = 8.6, 2H, ArH), 7.15 (d, J = 8.8, 2H, ArH), 4.96 (s, 2H, O-CH₂), 4.92 (s, 2H, O-CH₂). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 164.6 (C=O), 156.6 (C=N), 155.6 (C=N), 139.1 (Ar-C), 137.9 (Ar-C), 135.2 (Ar-C), 135.0 (Ar-C), 129.8 (Ar-C), 129.53 (Ar, 4 x CH), 129.48 (Ar, 4 x CH), 129.2 (Ar, 2 x CH), 128.7 (Ar, 2 x CH), 128.4 (Ar, 2 x CH), 125.1 (Ar, 2 x CH), 122.0 (Ar-C), 121.3 (Ar, 2 x CH), 78.1 (O-CH₂-), 77.8 (OCH₂).

Parte Experimental

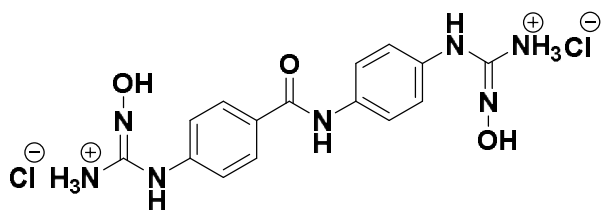
8.11.3 Síntesis de la 4-(2-(tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)guanidino-N-(4-(2-(tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)guanidino)fenil)benzamida (63)



Siguiendo el procedimiento general 3.17, se desprotegeron 200 mg (0.39 mmol) de **53**, obteniéndose 170 mg de **63** (85%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.78 (s, 1H, NH), 8.31

(s, 1H, NH), 7.79 (d, $J = 8.8$, 2H, ArH), 7.73 (s, 1H, NH), 7.52 (d, $J = 9.0$, 2H, ArH), 7.38 (d, $J = 8.8$, 2H, ArH), 7.26 (d, $J = 9.0$, 2H, ArH), 5.48 (s, 2H, NH_2), 5.27 (s, 2H, NH_2), 4.96 (t, $J = 3.7$, 1H, O-CH-O), 4.92 (t, $J = 3.8$, 1H, O-CH-O), 3.81 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.43 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.86 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.65 (m, 4H, $-\text{CH}_2-$), 1.49 (m, 6H, $-\text{CH}_2-$). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165.2 (C=O), 152.8 (C=N), 152.1 (C=N), 145.4 (Ar-C), 138.1 (Ar-C), 132.4 (Ar-C), 129.1 (Ar, 2 \times CH), 126.1 (Ar-C), 121.7 (Ar, 2 \times CH), 117.9 (Ar, 2 \times CH), 116.6 (Ar, 2 \times CH), 99.9 (2 \times O-CH-O), 62.0 (2 \times O-CH $_2$), 29.9 ($-\text{CH}_2-$), 29.8 ($-\text{CH}_2-$), 25.9 (2 \times $-\text{CH}_2-$), 20.1 ($-\text{CH}_2-$), 20.0 ($-\text{CH}_2-$). P.f. > 300 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES $^+$) m/z = 512.67 (M + H).

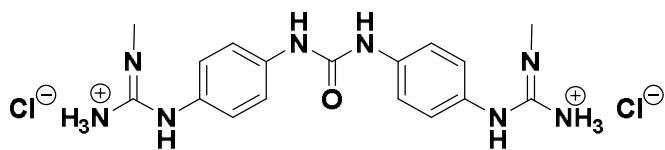
8.12.5 Síntesis del dihidrocloruro de 4-(2-hidroxi)guanidinio)-N-(4-(2-hidroxi)guanidinio)fenil)benzamida (63a)



Siguiendo el procedimiento general 3.18, se desprotegeron 100 mg (0.20 mmol) de **63**, obteniéndose 69 mg de **63a** (69%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.25 (s,

1H), 10.83 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 10.36 (s, 2H), 10.12 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.20 (s, 2H), 8.08 (d, $J = 8.3$, 2H, ArH), 7.89 (d, $J = 8.4$, 2H, ArH), 7.34 (d, $J = 8.2$, 2H, ArH), 7.20 (d, $J = 8.4$, 2H, ArH). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.9 (C=O), 157.4 (C=N), 156.4 (C=N), 139.6 (Ar-C), 137.9 (Ar-C), 130.6 (Ar-C), 129.6 (Ar, 4 \times CH), 125.3 (Ar-C), 121.7 (Ar, 4 \times CH). P.f. > 300 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES $^+$) m/z = 344.57 (M + H).

8.12.6 Síntesis del dihidrocloruro de 1,3-bis(4-(2-metil)guanidinio)fenil)urea (64a)



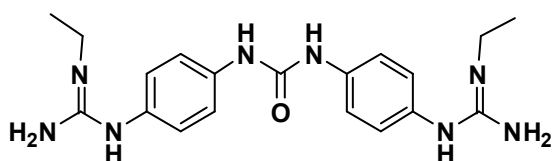
Siguiendo el procedimiento general 8.11, 132 mg, (0.40 mmol) de **54** fueron desprotegidos obteniéndose 107 mg de **59** (81%)

como un sólido blanco. Siguiendo el procedimiento general 8.12, se obtuvieron 95 mg del

Parte Experimental

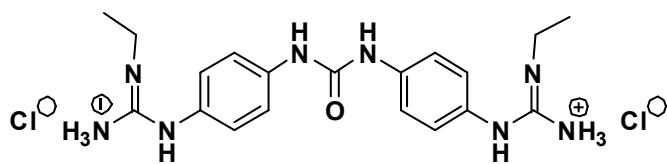
dihidrocloruro **64a**. $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.8 (s, 2H, NH), 9.6 (s.a., 2H, NH), 7.7 (m, 6H, NH_3), 7.5 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, ArH), 7.1 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, ArH), 2.8 (d, $J = 4.9$ Hz, 6H, NCH_3). $^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 155.9 (2 x C=O), 152.7 (2 x C=N), 138.7 (2 x Ar-C), 128.5 (4 x Ar-CH), 126.3 (2 x Ar-C), 118.6 (4 x Ar-CH), 28.2 (NCH_3). P.f. 277-278 °C. HPLC (UV) = 95%. LRMS (ES^+) $m/z = 383.60$ (M + H).

8.12.7 Síntesis del dihidrocloruro de 1,3-bis(4-(2-etilguanidinio)fenil)urea (**65a**)



Seguendo el procedimiento general 8.11, se desprotegeron 200 mg (0.38 mmol) de **55**, obteniéndose 131.9 mg (91%) de la base libre **65** como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$

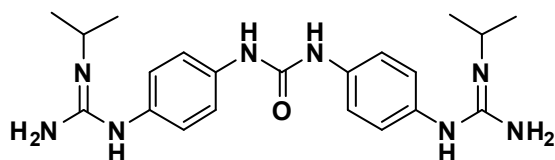
(400 MHz, DMSO) δ 8.25 (s.a., 2H, NH), 7.23 (d, $J = 8.7$, 4H, ArH), 6.65 (d, $J = 8.7$, 4H, ArH), 5.25 (s.a., 2H), 4.76 (s.a., 4H), 3.12 (d, $J = 7.2$, 4H, O-CH_2 -), 1.06 (t, $J = 7.2$, 6H, CH_3). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, DMSO) δ 152.9 (C=O), 151.3 (2 x C=N), 145.5 (2 x Ar-C), 132.7 (2 x Ar-C), 123.0 (Ar , 4 x CH), 119.3 (Ar , 4 x CH), 35.2 (2 x N-CH_2 -), 15.1 (2x CH_3). P.f. 211-212 °C. HPLC (UV)



> 98%. LRMS (ES^+) $m/z = 383.53$ (M+H). Seguendo el procedimiento general 8.12, se obtuvieron 79.1 mg del dihidrocloruro de **65a**

como un sólido blanco. HPLC (UV) = 98%. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.81 (s, 2H, NH), 9.57 (s, 2H, NH) 7.83 (s, 2H, NH), 7.60 (s.a., 4H) 7.53 (d, $J = 8.7$, 4H, ArH), 7.14 (d, $J = 8.7$, 4H, ArH), 3.25 (m, 4H, N-CH_2 -), 1.12 (t, $J = 7.1$, 6H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 155.0 (2 x C=N), 152.7 (C=O), 138.7 (2 x Ar-C), 128.6 (Ar , 4 x CH), 126.3 (2 x Ar-C), 118.7 (Ar , 4 x CH), 36.3 (2 x N-CH_2), 14.3 (2 x CH_3).

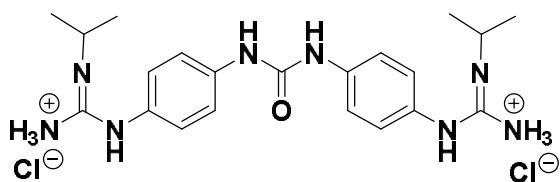
8.12.8 Síntesis del dihidrocloruro del 1,3-bis(4-(2-isopropilguanidinio)fenil)urea (**66a**)



Seguendo el procedimiento general 8.11, se desprotegeron 300 mg (0.56 mmol) de **56**, obteniéndose 157 mg (71%) de **66** como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.30 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H, ArH), 6.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, ArH), 4.98 (s.a., 6H), 3.83 (h, $J = 6.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}-$), 1.09 (d, $J = 6.4$ Hz, 12H, $-\text{CH}_3$). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 152.9 (C=O), 150.7 (2 x C=N), 145.2 (2 x Ar-C), 132.8 (Ar-C), 123.0 (4 x ArH), 119.3 (4 x ArH), 41.4 (N-CH-), 23.0. P.f. 206 °C. HPLC (UV) = 96 %. LRMS (ES^+) $m/z = 396.47$ (M +

Parte Experimental

H). Siguiendo el procedimiento general 8.12, se obtuvieron 105 mg del dihidrocloruro de



66a. HPLC (UV) = 97%. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.72 (s, 2H), 9.44 (s, 2H), 7.82 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.5, 4H, *ArH*), 7.48 (s.a., 4H) 7.14 (d, *J* = 8.5, 4H, *ArH*), 3.87 (m,

2H), 1.17 (d, *J* = 6.2, 12H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 154.6 (C=O), 153.0 (2 × C=N), 139.0 (2 × *Ar-C*), 129.0 (2 × *Ar-C*), 126.4 (*Ar*, 4 × *CH*) 119.0 (*Ar*, 4 × *CH*), 43.8 (2 × *N-CH*), 22.7 (4 × *CH*₃).

8.13 Procedimiento general para la formación de las *N*-fenilbenzamidias halogenadas **70 - 72**

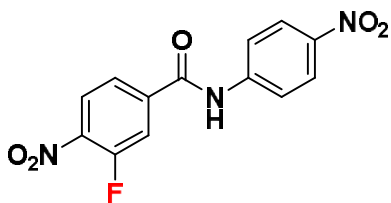
La reacción se lleva a cabo en un tubo de vidrio KIMAX cerrado con tapón de rosca. Una disolución del ácido carboxílico (2-fluoro-4-nitrobenzoico, 3-fluoro-4-nitrobenzoico y 2-cloro-4-nitrobenzoico, 1.5 equiv.) en 1 mL de SOCl₂ se calienta a 70 °C durante aproximadamente 5 horas. Al enfriar, se abre el tubo [Precaución: tener cuidado con la presión interna de SO₂ y HCl] y se trasvasa la mezcla de reacción a un matraz. Se evapora el SOCl₂, obteniéndose el cloruro de ácido como un aceite. A continuación, el cloruro de ácido se añade gota a gota a una disolución de 4-nitroanilina (1.0 equiv.) y DIPEA (2.0 equiv.) en 5 mL de tolueno anhidro. La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. Las benzamidias se aíslan por precipitation añadiendo gotas de MeOH a la mezcla de reacción. El precipitado se filtra y se lava sucesivamente con HCl 0.1M y MeOH, obteniéndose las benzamidias **70 - 72** con buen grado de pureza (> 95% por HPLC).

8.14 Procedimiento general para la síntesis asistida por microondas de las benzamidias halogenadas **76 y 77**

En un tubo de reacción para microondas, se disuelve la anilina comercial (2-fluoro-4-nitroanilina, 3-fluoro-4-nitroanilina y 2-cloro-4-nitroanilina, 1.0 equiv.), cloruro de 4-nitrobenzoilo (1.5 equiv.), y DIPEA (5.0 equiv.) en 8 mL de tolueno anhidro. La reacción se calienta en microondas a 100 °C durante 30 min. Terminada la reacción, se enfría el crudo y el producto precipita de la mezcla de reacción. El sólido se filtra y se lava sucesivamente con una solución de HCl 0.1 M y MeOH, obteniéndose las benzamidias **76 y 77** con buen grado de pureza (> 95% por HPLC).

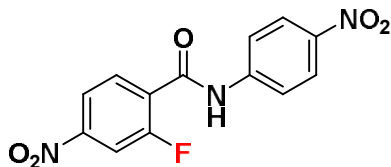
Parte Experimental

8.13.1 Síntesis de la 3-fluoro-4-nitro-*N*-(4-nitrofenil) benzamida (**70**)



Siguiendo el procedimiento general 8.13, se hizo reaccionar 700 mg (3.78 mmol) del ácido 3-fluoro-4-nitrobenzicoico en 3 mL de SOCl₂. Una vez formado el cloruro de ácido, este se hizo reaccionar con 435 mg (3.15 mmol) de la 4-nitroanilina y 1.1 mL (6.3 mmol) de DIPEA obteniéndose 785 mg (81%) de **70** como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.10 (s, 1H, NH), 8.36 – 8.31 (m, 1H, ArH), 8.29 (d, J = 9.2, 2H, ArH), 8.15 (dd, J = 1.8, 11.8, 1H, ArH), 8.05 (d, J = 9.2, 2H, ArH), 8.01 – 7.97 (m, 1H, ArH). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 163.4 (d, J = 1.7, C=O), 154.3 (d, J = 262.3, Ar-CF), 144.7 (Ar-C), 143.0 (Ar-C), 140.9 (d, J = 7.5, Ar-C), 138.8 (d, J = 7.8, Ar-C), 126.7 (d, J = 2.6, Ar-CH), 124.9 (Ar, 2 × CH), 124.8 (d, J = 4.3, Ar-CH), 120.2 (2 × Ar-CH), 118.1 (d, J = 22.6, Ar-CH). P.f. 178-180 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 306.15 (M + H). Microanálisis: requerido para C₁₃H₈FN₃O₅ (C: 51.16 %, H: 2.64 %, N: 13.77 %), encontrado (C: 50.10 %, H: 2.38 %, N: 13.53 %).

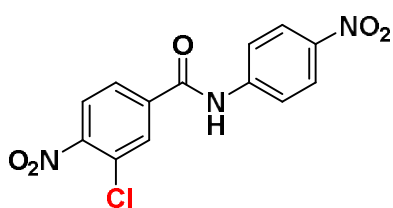
8.13.2 Síntesis de la 2-fluoro-4-nitro-*N*-(4-nitrofenil) benzamida (**71**)



Siguiendo el procedimiento general 8.13, se hizo reaccionar 700 mg (3.78 mmol) del ácido 2-fluoro-4-nitrobenzoico en 3 mL de SOCl₂. Una vez formado el cloruro de ácido, este se hizo reaccionar con 435 mg (3.15 mmol) de la 4-nitroanilina y 1.1 mL (6.3 mmol) de DIPEA, obteniéndose 736 mg (77%) de **71** como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.18 (s, 1H, NH), 8.37 – 8.13 (m, 4H, ArH), 7.98 (m, 3H, ArH). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 161.6 (C=O), 158.3 (d, J = 253.9, Ar-CF), 149.4 (d, J = 8.8, Ar-C), 144.1 (Ar-C), 143.0 (Ar-C), 131.0 (d, J = 3.3, ArH), 129.8 (d, J = 16.1, Ar-C), 124.5 (Ar, 2 × CH), 119.6 (Ar, 2 × CH), 119.4 (d, J = 3.6, Ar-CH), 111.8 (d, J = 27.3, Ar-CH). P.f. 180-181 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES⁺) m/z = 306.08 (M + H). Microanálisis: requerido para C₁₃H₈FN₃O₅ (C: 51.16 %, H: 2.64 %, N: 13.77 %), encontrado (C: 50.65 %, H: 2.84 %, N: 13.36 %).

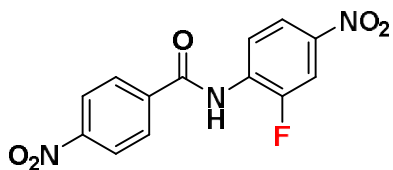
Parte Experimental

8.13.3 Síntesis de la 2-cloro-4-nitro-*N*-(4-nitrofenil) benzamida (72)



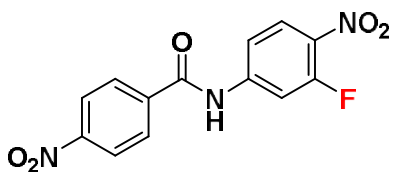
Seguendo el procedimiento general 8.13, se hizo reaccionar 300 mg (1.5 mmol) del ácido 3-cloro-4-nitrobenzoico en 3 mL de SOCl_2 . Una vez formado el cloruro de ácido, este se hizo reaccionar con 138.1 mg (1.0 mmol) de 4-nitroanilina y 0.4 mL (2.0 mmol) de DIPEA, obteniéndose 245.2 mg (76 %) de **72** como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.2 (s, 1H, *NH*), 8.4 (m, 1H, *ArH*), 8.3 (m, 3H, *ArH*), 8.2 (m, 1H, *ArH*), 8.1 (d, $J = 8.8$, 2H, *ArH*). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 163.4, ($\text{C}=\text{O}$) 149.3 (*Ar-C*), 144.8 (*Ar-C*), 142.9 (*Ar-C*), 138.7 (*Ar-C*), 131.0 (*Ar-CH*), 128.4 (*Ar-CH*), 125.8 (*Ar-CH*), 125.0 (*Ar-C-Cl*), 124.8 (*Ar*, $-2 \times \text{CH}$), 120.2 (*Ar*, $2 \times \text{CH}$). P.f. 178-180 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES^+) $m/z = 322.09$ ($\text{M} + \text{H}$). Microanálisis: requerido para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_5$, (C: 48.54 %, H: 2.51 %, N: 13.06 %), encontrado (C: 48.98 %, H: 3.02 %, N: 12.54 %).

8.14.1 Síntesis de la *N*-(2-fluoro-4-nitrofenil)-4-nitrobenzamida (76)



Seguendo el procedimiento general 8.14, se hizo reaccionar 300 mg (1.9 mmol) de 2-fluoro-4-nitroanilina con 536 mg (2.9 mmol) del cloruro de 4-nitrobenzoilo en presencia de 1.6 mL (9.5 mmol) de DIPEA, obteniéndose 1.84 g de **76** (79%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.91 (s, 1H, *NH*), 8.39 (d, $J = 8.8$, 2H, *ArH*), 8.26 (dd, $J = 10.5$, 2.5, 1H, *ArH*), 8.20 (d, $J = 8.8$, 2H), 8.18 – 8.07 (m, 2H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 164.5 ($\text{C}=\text{O}$), 153.5 (d, $J = 251.9$, *Ar-CF*), 149.6 (*Ar-C*), 144.3 (d, $J = 8.2$, *Ar-C*), 139.1 (*Ar-C*), 132.4 (d, $J = 12.0$, *Ar-C*), 129.7 (*Ar*, $2 \times \text{CH}$), 125.3 (d, $J = 2.3$, *Ar-CH*), 123.7 (*Ar-C*), 120.3 (d, $J = 3.4$, *Ar-CH*), 112.0 (d, $J = 25.1$, *Ar-CH*). P.f. 212-214 °C. HPLC (UV) = 98%. LRMS (ES^-) $m/z = 304.60$ ($\text{M} - \text{H}$). Microanálisis: requerido para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{FN}_3\text{O}_5$, (C: 51.16 %, H: 2.64 %, N: 13.77 %), encontrado (C: 51.31 %, H: 2.49 %, N: 13.96 %).

8.14.2 Síntesis de la *N*-(3-fluoro-4-nitrofenil)-4-nitrobenzamida (77)



Seguendo el procedimiento general 8.14, se hizo reaccionar 50 mg (0.32 mmol) de la 2-fluoro-4-nitroanilina con 89 mg (0.48 mmol) del cloruro de 4-nitrobenzoilo en presencia de 0.3 mL (1.6 mmol) de DIPEA. El producto se purificó por precipitación en DCM obteniéndose 73.6 mg de **77** (75%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.20 (s, 1H, *NH*), 8.39 (d, $J = 8.3$, 2H, *ArH*), 8.24 (d, $J = 8.8$, 1H, *ArH*), 8.19 (d, $J = 8.3$, 2H,

Parte Experimental

ArH), 8.03 (d, $J = 14.1$, 1H, *ArH*), 7.75 (d, $J = 9.4$, 1H, *ArH*). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 164.8 (C=O), 155.5 (d, $J = 259.7$, *Ar-CF*), 149.6 (*Ar-C*), 145.9 (d, $J = 11.4$, *Ar-C*), 139.4 (*Ar-C*), 131.8 (d, $J = 7.2$, *Ar-C*), 129.5 (*Ar*, 2 \times *CH*), 127.5 (*Ar-CH*), 123.7 (*Ar*, 2 \times *CH*), 115.8 (d, $J = 3.1$, *Ar-CH*), 108.2 (d, $J = 26.1$, *Ar-CH*). P.f. 226-228 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES $^-$) m/z = 304.57 (M - H). HRMS (ES $^-$) requerido para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{FN}_3\text{O}_5$: 305.0448, (encontrando: 305.0443).

8.15 Procedimiento general para la reducción de las nitrobenzamidias (70 - 72, 76 - 77)

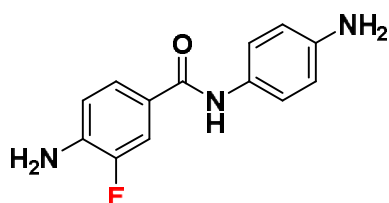
8.15.1 Hidrogenación catalítica con Pd-C

En un matraz de 100 mL de tres bocas se disuelve la benzamida (**70**, **71**, **75**, **77**) en 3 mL de MeOH. A continuación, el matraz se enfría con un baño de hielo y se añade el catalizador Pd-C (5%). Después de purgar el aire del matraz mediante un ciclo de vacío/argón/vacío, la reacción se deja en agitación durante una noche bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm). La formación de las diaminas se sigue por TLC utilizando ninhidrina como revelador. Terminada la reacción, se elimina el catalizador por filtración sobre celita, se evapora el disolvente y el producto se recristaliza de MeOH o DCM como se indica en cada caso, obteniéndose las anilinas **78** - **81**.

8.15.2 Reducción con cloruro de estaño (II)

A una disolución de la nitrobenzamida **72** en 100 mL de EtOH se añaden 10 equivalentes de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. La reacción se deja en agitación vigorosa durante toda la noche. A continuación, la reacción se basicifica con una solución de NaOH 0.5 M hasta un pH = 8 y se extrae con AcOEt hasta comprobar por TLC (revelada con ninhidrina) la completa extracción del producto. La fase orgánica se lava con salmuera y se seca con MgSO_4 . El disolvente se evapora a presión reducida. El producto se purifica por precipitación en AcOEt frío y simple filtración., obteniéndose el compuestos **82** con buena pureza.

8.15.1.1 Síntesis de la 4-amino-*N*-(4-aminofenil)-3-fluorobenzamida (**78**)



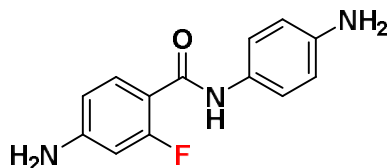
Siguiendo el procedimiento general 8.15.1, se puso a reaccionar 594 mg (1.95 mmol) de **70** con 30 mg de Pd-C (5%) como catalizador. El producto se purificó por recristalización de MeOH obteniéndose 393 mg de **78** (82%) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.52 (s, 1H, *NH*), 7.59 (m, 2H, *ArH*), 7.32 (d, $J = 8.5$, 2H, *ArH*), 6.78 (t, $J = 8.7$, 1H, *ArH*), 6.52 (d, $J = 8.5$, 2H, *ArH*), 5.75 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 4.90 (s, 2H, $-\text{NH}_2$).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-

Parte Experimental

d₆) δ 163.5 (d, $J = 2.3$, C=O), 149.4 (d, $J = 236.7$, Ar-CF), 144.9 (Ar-C), 139.7 (d, $J = 13.1$, Ar-C), 128.4 (Ar-C), 124.6 (d, $J = 2.4$, Ar-CH), 122.2 (Ar, $2 \times$ CH), 122.0 (d, $J = 5.0$, Ar-CH), 114.7 (d, $J = 4.9$, Ar-C), 114.2 (d, $J = 19.4$, Ar-CH), 113.7 (Ar, $2 \times$ CH). **P.f.** 168-170 °C. **HPLC (%UV)** > 95%. **LRMS (ES⁺) m/z** = 246.18 (M + H). **Microanálisis:** requerido para C₁₃H₁₂FN₃O (C: 63.66%, H: 4.93%, N: 17.13%), encontrando (C: 63.68%, H: 4.89%, N: 16.98%).

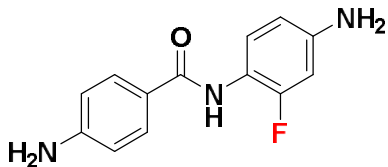
8.15.1.2 Síntesis de la 4-amino-N-(4-aminofenil)-2-fluorobenzamida (79)



Seguendo el procedimiento general 8.15.1, se puso a reaccionar 780 mg (2.5 mmol) de **71** con 39 mg de Pd-C (5%). El producto se purificó por recristalización de DCM obteniéndose 259 mg de **79** (41%) como un sólido blanco.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.19 (s, 1H, NH), 7.67 (d, $J = 8.5$, 2H, ArH), 7.02 (t, $J = 8.6$, 1H, ArH), 6.56 (d, $J = 8.5$, 2H, ArH), 6.42 – 6.31 (m, 2H, ArH), 5.68 (s, 2H, -NH₂), 5.29 (s, 2H, -NH₂). **¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆)** δ 165.4 (C=O), 157.5 (d, $J = 242.7$, Ar-CF), 151.9 (Ar-C), 148.3 (d, $J = 10.9$, Ar-C), 129.2 (Ar, $2 \times$ CH), 128.9 (d, $J = 3.6$, Ar-CH), 120.8 (Ar-C), 113.8 (d, $J = 13.2$ Hz, Ar-C), 112.6 (Ar, $2 \times$ CH), 109.3 (d, $J = 2.5$, Ar-CH), 100.4 (d, $J = 23.0$, Ar-CH). **P.f.** 174-175 °C. **HPLC (%UV)** > 95%. **LRMS (ES⁺) m/z** = 246.25 (M + H).

8.15.1.3 Síntesis de la 4-amino-N-(4-amino-2-fluorofenil)benzamida (80)

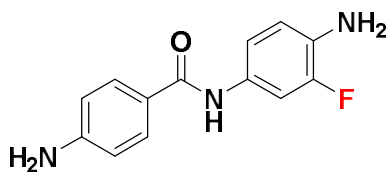


Seguendo el procedimiento general 8.15.1, se puso a reaccionar 500 mg (1.64 mmol) de **76** con 25 mg de Pd-C (5%). El producto se purificó por recristalización de DCM obteniéndose 351 mg de **80** (81%) como un sólido blanco.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.19 (s, 1H, NH), 7.67 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.02 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar-H), 6.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar-H), 6.42 – 6.31 (m, 2H, Ar-H), 5.68 (s, 2H, -NH₂), 5.29 (s, 2H, -NH₂). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)** δ 165.4 (C=O), 157.5 (d, $J = 242.7$ Hz, Ar-CF), 151.9 (Ar-C), 148.3 (d, $J = 10.9$ Hz, Ar-C), 129.2 (2 x Ar-CH), 128.9 (d, $J = 3.6$ Hz, Ar-CH), 120.8 (Ar-C), 113.8 (d, $J = 13.2$ Hz, Ar-CH), 112.6 (2 x Ar-CH), 109.3 (d, $J = 2.5$ Hz, Ar-C), 100.4 (d, $J = 23.0$ Hz, Ar-CH). **P.f.** 197-200 °C. **HPLC (UV)** > 95%. **LRMS (ES⁺) m/z** = 246.25 (M + H).

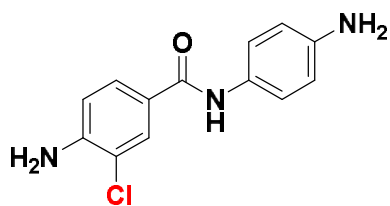
Parte Experimental

8.15.1.4 Síntesis de la 4-amino-*N*-(4-amino-3-fluorofenil)benzamida (**81**)



Seguendo el procedimiento general 3.12.1, se puso a reaccionar 500 mg (1.64 mmol) de **77** con 25 mg Pd-C (5%). El producto se purificó por recristalización en DCM obteniéndose 247 mg de **81** (61%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.58 (s, 1H, NH), 7.67 (d, $J = 8.9$, 2H, ArH), 7.54 – 7.49 (m, 1H, ArH), 7.25 – 7.11 (m, 1H, ArH), 6.79 – 6.66 (m, 1H, ArH), 6.58 (d, $J = 8.9$, 2H, ArH), 5.71 (s, 2H, $-NH_2$), 4.88 (s, 2H, $-NH_2$). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.8 (C=O), 151.9 (Ar-C), 149.8 (d, $J = 234.8$, Ar-CF), 131.9 (d, $J = 13.1$, Ar-C), 129.3 (d, $J = 9.4$, Ar-C), 129.1 (Ar, 2 \times CH), 121.3 (Ar-C), 116.8 (d, $J = 2.9$, Ar-CH), 115.8 (d, $J = 5.5$, ArH), 112.6 (Ar, 2 \times CH), 108.2 (d, $J = 22.9$, Ar-CH). P.f. 188-189 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES+) $m/z = 246.25$ (M + H). Microanálisis: requerido para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}$ (C: 63.66%, H: 4.93%, N: 17.13%), encontrando (C: 63.71%, H: 8.02%, N: 17.10%).

8.15.2.1 Síntesis de la 4-amino-2-cloro-*N*-(4-aminofenil)benzamida (**82**)



Seguendo el procedimiento general 8.15.2, se hizo reaccionar 1.0 g (3.1 mmol) de **72** con 7.0 g (31 mmol) de exceso de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. El producto se purificó por precipitación en AcOEt obteniéndose 254 mg de **82** (31%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.55 (s, 1H, NH), 7.85 (d, $J = 2.1$, 1H, ArH), 7.66 (dd, $J = 8.5, 2.1$, 1H, ArH), 7.32 (d, $J = 8.7$, 2H, ArH), 6.81 (d, $J = 8.5$, 1H, ArH), 6.52 (d, $J = 8.7$, 2H, ArH), 5.92 (s, 2H, $-NH_2$), 4.90 (s, 2H, $-NH_2$). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.0 (C=O), 148.1 (Ar-C), 145.5 (Ar-C), 129.3 (Ar-C), 129.0 (Ar-C), 128.2 (Ar-CH), 123.6 (Ar-CCl), 122.8 (Ar, 2 \times CH), 116.7 (Ar-CH), 114.8 (Ar-CH), 114.3 (Ar, 2 \times CH). P.f. 148-150 °C. HPLC (UV) > 95%. LRMS (ES+) $m/z = 262.18$ (M + H).

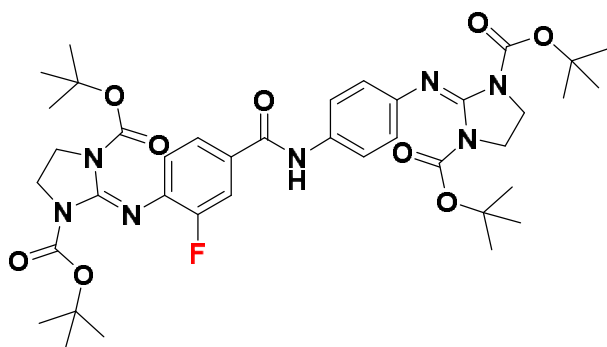
8.16 Procedimiento general para la síntesis de los derivados fluorados y clorados de 4-((imidazolidin-2-iliden)amino-*N*-((4-((imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamidas protegidas con el grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc) **83** – **87**

A una mezcla de las diaminas (**78** - **82**, 1 equiv.) y *N,N'*-di(*tert*-butoxicarbonil)imidazolin-2-tiona³ (3 equiv.) en 5 mL de DMF anhidra a 0 °C se añade Et_3N (7 equiv.) y HgCl_2 (3 equiv.). La reacción se agita a 0 °C por una hora y luego se lleva a temperatura ambiente. La reacción se agita durante 12 horas. La reacción es monitorizada por HPLC-MS. Si la reacción no termina, esta se calienta a la temperatura y tiempo indicado en cada caso. Terminada la reacción, el precipitado color negro (HgS) se elimina por filtración sobre

Parte Experimental

Celita. El precipitado se lava con 100 mL de DMF y el filtrado se evapora a presión reducida. La purificación se lleva a cabo por cromatografía sobre sílice utilizando un gradiente Hexano/AcOEt (50:50 → 0:100). El producto se recrystaliza de AcOEt frío, obteniéndose los compuestos **83** - **87** con buen grado de pureza.

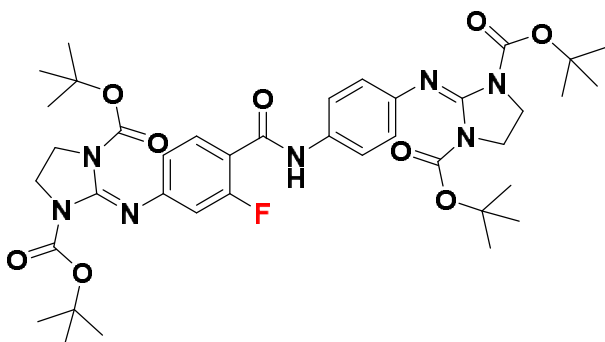
8.16.1 Síntesis de la 3-fluoro-4-((1,3-di(*tert*-butoxicarbonil))imidazolidin-2-ilinen)amino-*N*-(4-(((di(*tert*-butoxicarbonil)-2-imidazolidin-2-ilinen)amino)fenil)benzamida) (**83**)



Siguiendo el procedimiento general 8.16, 800 mg (3.3 mmol) de **78**, se hicieron reaccionar con 3.0 g (9.9 mmol) de *N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonil)imidazolin-2-tiona, 2.6 g de HgCl₂ (9.9 mmol) y Et₃N (3.2 mL, 23.1 mmol). El producto se purificó por cromatografía flash (cartucho SI

de 20 g) tal como se indica en el procedimiento general para obtener 145 mg (6%) de **83**. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.8 (s, 1H, *NH*), 7.6 (m, 1H, *ArH*), 7.5 (d, *J* = 9.0, 3H, *ArH*), 7.1 (m, 1H, *ArH*), 7.0 (d, *J* = 9.0, 2H), 3.8 (m, 4H, *Imd-CH*₂), 3.8 (m, 4H, *Imd-CH*₂), 1.4 (s, 18H, *CH*₃), 1.3 (s, 18H, *CH*₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 164.0 (*C=O*), 153.5 (d, *J* = 246.4, *Ar-CF*), 150.4 (*C=O*), 149.9 (*C=O*), 144.9 (*Ar-C*), 140.9 (*C=N*), 139.9 (d, *J* = 12.7, *Ar-C*), 139.3 (*C=N*), 133.2 (*Ar-C*), 129.4 (d, *J* = 6.3, *Ar-C*), 123.8 (d, *J* = 3.2, *Ar-CH*), 122.6 (d, *J* = 2.9 Hz, *Ar-CH*), 122.0 (*Ar*, 2 × *CH*), 120.7 (*Ar*, 2 × *CH*), 114.8 (d, *J* = 22.4, *Ar-CH*), 83.3 (*O-CH*), 83.0 (*O-CH*), 43.3 (2 × *Imd-CH*₂), 43.1 (2 × *Imd-CH*₂), 28.0 (12 × *CH*₃). P.f. 183-184 °C. HPLC (UV) > 96%. LRMS (ES⁺) *m/z* = 782.63 (M + H).

8.16.2 Síntesis de la 2-fluoro-4-((1,3-di(*tert*-butoxicarbonil))iminoimidazolidin-2-iliden)amino-*N*-(4-(((di(*tert*-butoxicarbonil)iminoimidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida) (**84**)

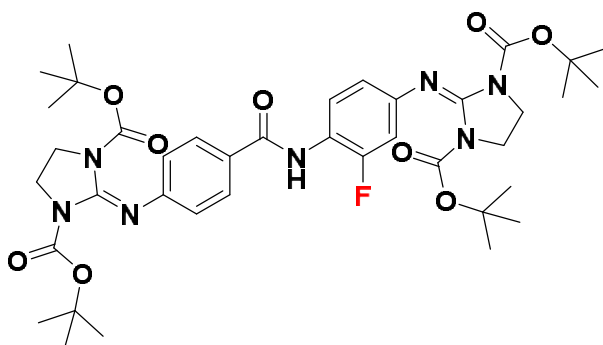


Siguiendo el procedimiento general 8.16, 750 mg de **79** se hicieron reaccionar con 3.0 g (9.9 mmol) de *N,N'*-di(*tert*-butoxicarbonil)imidazolin-2-tiona, 2.6 g de HgCl₂ (9.9 mmol) y Et₃N (3.2 mL, 23.1 mmol). El producto se purificó por cromatografía flash

Parte Experimental

(cartucho SI de 20 g) tal como se indica en el procedimiento general para obtener 90 mg (12%) de **84**. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ 9.88 (s, 1H, NH), 7.58 (d, $J = 8.8$, 2H, ArH), 7.53 (d, $J = 8.8$, 1H, ArH), 6.80 (d, $J = 8.8$, 2H, ArH), 6.71 (m, 2H, ArH), 3.78 (m, 4H, Imd-CH₂), 3.75 (m, 4H, Imd-CH₂), 1.32 (m, 20H, CH₃), 1.29 (m, 16H, CH₃). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, DMSO-d₆) δ 162.0 (C=O), 159.9 (d, $J = 247.9$, Ar-CF), 153.2 (d, $J = 10.7$, Ar-C), 149.7 (C=O), 149.3 (C=O), 144.4 (Ar-C), 140.9 (C=N), 138.9 (C=N), 133.6 (Ar-C), 130.3 (d, $J = 3.7$), 120.8 (Ar, 2 \times CH), 120.3 (Ar, 2 \times CH), 117.0 (d, $J = 14.1$, Ar-C), 116.8 (Ar-CH), 107.7 (d, $J = 22.9$, Ar-CH), 81.8 (O-CH), 81.4 (O-CH), 43.1 (2 \times Imd-CH₂), 42.9 (2 \times Imd-CH₂), 27.5 (12 \times CH₃). P.f. 175-177 °C. HPLC (UV) > 96%. LRMS (ES⁺) m/z = 782.67 (M + H).

8.16.3 Síntesis de la 4-((1,3-di(terc-butoxicarbonil)iminoimidazolidin-2-iliden)amino-N-(3-fluoro-4-((di(terc-butoxicarbonil)iminoimidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida) (85)



Siguiendo el procedimiento general 8.16, 500 mg (2.0 mmol) de **75**, se hicieron reaccionar con 1.8 g (6.0 mmol) de *N,N'*-bis(terc-butoxicarbonil)imidazolin-2-ona, 1.6 g de HgCl₂ (6.0 mmol) y Et₃N 2.0 mL (14.0 mmol). La reacción se dejó a

temperatura ambiente 12 h. y luego a 40 °C durante 5 días y luego a 60 °C durante 48 horas más. El producto se purificó por cromatografía flash (cartucho SI de 20 g) tal como se indica en el procedimiento general para obtener 145 mg (17%) de **85**. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.39 – 11.25 (s.a, 1H, NH), 11.10 (s.a, 1H, NH), 10.33 (s.a, 1H, NH), 8.60 (s, 2H, NH), 8.53 (s, 2H, NH), 8.08 (d, $J = 8.25$ Hz, 2H, Ar-H), 7.61 (t, $J = 8.61$ Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (d, $J = 8.27$ Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (dd, $J = 2.33, 11.43$ Hz, 1H, Ar-H), 7.13 (dd, $J = 2.36, 8.59$ Hz, 1H, Ar-H), 3.69 (d, $J = 6.88$ Hz, 8H, Imd-CH₂). P.f. 183-185 °C. HPLC (UV) = 96%. LRMS (ES⁺) m/z = 782.63 (M + H). HRMS (ES⁺): requerido para C₃₉H₅₂FN₇O₉: 781.3811 (encontrado: 781.3881).

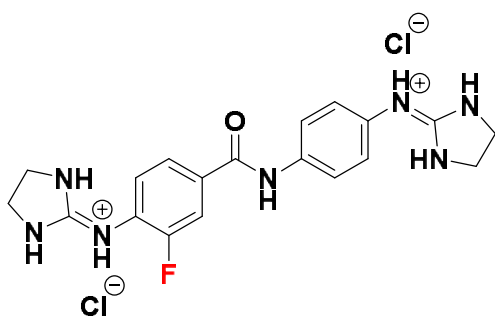
Parte Experimental

8.17 Procedimiento general para la formación de las sales de 2-iminoimidazolidinio **83a** – **87a**.

A una disolución del compuesto **83** – **87** en 1 mL de DCM enfriada con un baño de hielo a 0 °C, se añade 1 mL de una solución de dioxano saturada con cloruro de hidrógeno (HCl_g) lentamente. La reacción se deja en agitación a 0 °C durante una hora. Pasado este tiempo, la reacción se deja calentar hasta temperatura ambiente y en agitación durante una noche. Terminada la reacción, las paredes del tubo se raspan con una espátula para ayudar a la precipitación. El precipitado se aísla por filtración y se lava con Et₂O, obteniéndose los compuestos **83a** – **87a** con buena pureza.

Nota: para los compuestos **86a** y **87a**, se hizo reaccionar la mezcla de productos + subproductos parcialmente desprotegidos obtenidos en el paso previo de síntesis.

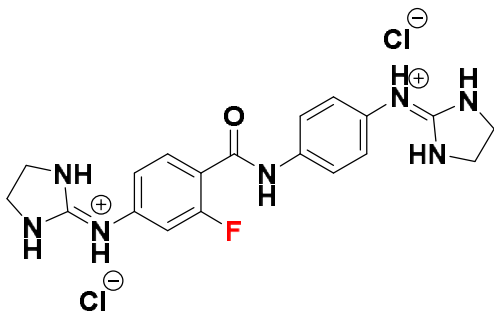
8.17.1 Síntesis del dihidrocloruro de 3-fluoro-4-(imidazolidin-2-iliden)amino-*N*-(4-((2-imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (**83a**)



Siguiendo el procedimiento general 8.17, se desprotegeron 100 mg (0.19 mmol) de **83** obteniéndose 41 mg de **83a** (83 %). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.02 (s, 1H, NH), 10.79 (s, 1H, NH), 10.69 (s, 1H, NH), 8.61 (s, 2H, NH), 8.31 (s, 2H, NH), 8.16 – 8.03 (m, 1H, ArH), 7.96 (d, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.90 (d, J = 8.1 Hz, 2H, ArH), 7.56 (t, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.24 (d, J = 8.1 Hz, 2H, ArH), 3.70 – 3.64 (m, 4H), 3.64 – 3.58 (m, 4H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-d₆) δ 163.7 (C=O), 158.4 (C=N), 158.3 (C=N), 155.4 (d, J = 247.9 Hz, Ar-CF), 137.6 (Ar-C), 134.8 (d, J = 6.3 Hz), 131.8 (Ar-C), 127.1 (Ar-CH), 126.8 (d, J = 12.2 Hz, Ar-C), 125.3 (d, J = 2.7 Hz, Ar-CH), 124.2 (2 x Ar-CH), 122.0 (2 x Ar-CH), 116.6 (d, J = 21.3 Hz, Ar-CH), 66.8 (2 x NCH₂), 43.3 (NCH₂), 43.1 (NCH₂). P.f. > 180 °C (desc.). HPLC (UV) > 95 %. LRMS (ES⁺) = 382.41 (M + H). HRMS (ES⁺) requerida para C₁₉H₂₂FN₇O: 381.1719 (encontrada: 381.1723).

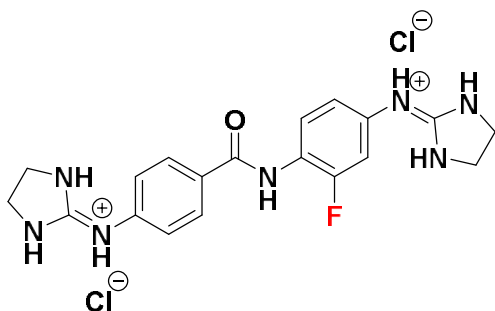
Parte Experimental

8.17.2 Síntesis del dihidrocloruro de 2-fluoro-4-(imidazolidin-2-iliden)amino-*N*-(4-((2-imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (84a)



Siguiendo el procedimiento general 8.17, se desprotegeron 100 mg (0.13 mmol) de **84** obteniéndose 40 mg de **84a** (83 %). ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.43 (s, 1H, NH), 10.69 (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, NH), 8.69 (s, 2H, NH), 8.29 (s, 2H, NH), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.73 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, ArH), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.22 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H, ArH), 3.73 – 3.68 (m, 4H, NCH_2), 3.67 – 3.60 (m, 4H, NCH_2). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162.5 (C=O), 159.7 (d, $J = 250.0$ Hz, Ar-CF), 158.4 (C=N), 157.6 (C=N), 140.3 (d, $J = 10.9$ Hz, Ar-C), 137.6 (Ar-C), 131.7 (Ar-C), 131.6 (d, $J = 3.9$ Hz, Ar-CH), 124.7 (2 x Ar-CH), 121.7 (d, $J = 14.7$ Hz, Ar-C), 121.2 (2 x Ar-CH), 118.2 (Ar-CH), 110.1 (d, $J = 26.3$ Hz, Ar-CH). 66.8 (2 x NCH_2), 43.13 (NCH_2), 43.11 (NCH_2). P.f. > 180 °C (desc.). HPLC (UV) > 95 %. LRMS (ES $^+$) = 382.34 (M + H). HRMS (ES $^+$) requerida para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_7\text{O}$: 381.1713 (encontrada: 381.1715).

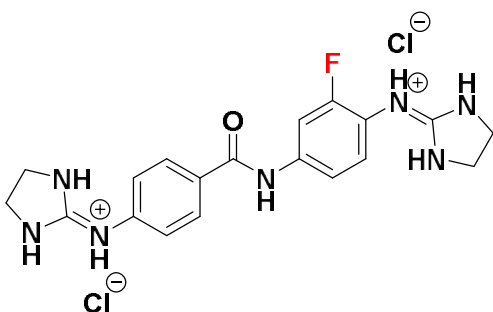
8.17.3 Síntesis del dihidrocloruro de 4-(imidazolidin-2-iliden)amino-*N*-(2-fluoro-4-((imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (85a)



Siguiendo el procedimiento general 8.17, se desprotegeron 150 mg (0.19 mmol) de **85** obteniéndose 54.9 mg de **85a** (79 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.04 (s.a, 1H, NH), 10.60 (s.a, 1H, NH), 10.40 (s.a, 1H, NH), 8.70 (s.a, 2H, NH), 8.46 (s.a, 2H, NH), 8.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH), 7.93 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, ArH), 7.64 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, ArH), 7.40 (m, 3H, ArH), 3.71 (s, 4H, $Imd-CH_2$), 3.67 (s, 4H, $Imd-CH_2$). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.8 (C=O), 158.6 (C=N), 158.4 (C=N), 156.4 ($J = 245.46$ Hz, C-F), 140.0 ($J = 10.3$ Hz, Ar-C), 139.4 (Ar-C), 131.1 (Ar-C), 129.3 (2 x Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 122.0 (2 x Ar-CH), 117.9 ($J = 13.2$ Hz, Ar-CH), 116.5 (Ar-C), 108.0 ($J = 24.7$ Hz, Ar-CH), 42.8 (2 x $Imd-CH_2$), 42.7 (2 x $Imd-CH_2$). P.f. > 180 °C (desc.). HPLC (UV) = 95 %. LRMS (ES $^+$) = 382.41 (M + H). HRMS (ES $^+$) requerida para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_7\text{O}$: 381.1713 (encontrada: 381.1723).

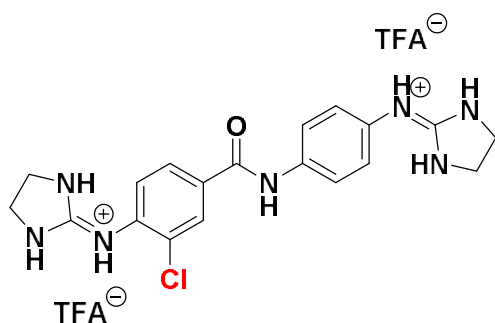
Parte Experimental

8.17.4 Síntesis del dihidrocloruro de 4-(imidazolidin-2-iliden)amino-N-(3-fluoro-4-((imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (86a)



Siguiendo el procedimiento general 8.17, se desprotegeron 150 mg (0.19 mmol) de **86** obteniéndose 37.9 mg de **86a** (60 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.07 (s.a., 1H, NH), 10.86 (s.a., 1H, NH), 10.23 (s.a., 1H, NH), 8.71 (s.a., 2H, NH), 8.63 (s.a., 2H, NH), 8.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, ArH), 7.63 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, ArH), 7.27 (m, 1H, ArH), 7.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, ArH), 3.71 (m, 4H, Imd- CH_2), 3.69 (m, 4H, Imd- CH_2). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.5 (C=O), 157.8 (C=N), 157.6 (C=N), 155.70 (d, $J = 248.2$ Hz), 139.3 (Ar-C), 134.3 (d, $J = 10.0$ Hz), 130.6 (Ar-C), 129.4 (2 x Ar-CH), 127.9 (d, $J = 2.5$ Hz, Ar-CH), 123.6 (d, $J = 12.4$ Hz, Ar-C), 122.0 (2 x Ar-CH), 119.1 (d, $J = 3.3$ Hz, Ar-CH), 111.2 (d, $J = 23.1$ Hz, Ar-CH), 42.73 (Imd- CH_2), 42.71 (Imd- CH_2). P.f. > 180 °C (desc.). HPLC (%UV) = 95 %. LRMS (ES $^+$) = 382.41 (M + H). HRMS (ES $^+$) requerida para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_7\text{O}$: 381.1713 (encontrada: 381.1712).

8.17.5 Síntesis del ditrifluoroacetato de 3-cloro-4-(imidazolidin-2-iliden)amino-N-((2-imidazolidin-2-iliden)amino)fenil)benzamida (87a)



Siguiendo el procedimiento general 8.17, se desprotegeron 32.6 mg de la mezcla de **87** obteniéndose 26 mg de **87a** (80 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.80 (s.a., 1H, NH), 10.60 (s, 1H, NH), 10.55 (s.a., 1H), 8.61 (s.a., 2H, NH), 8.41 (s.a., 2H, NH), 8.22 (s, 1H, ArH), 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 3.70 (m, 4H, Imd- CH_2), 3.66 (m, 4H, Imd- CH_2). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.3 (C=O), 158.1 (C=N), 158.0 (C=N), 137.1 (Ar-C), 135.7 (Ar-C), 134.7 (Ar-C), 131.4 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 129.3 (Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 124.2 (2 x Ar-CH), 121.5 (25 x Ar-CH), 42.8 (Imd- CH_2), 42.7 (Imd- CH_2). P.f. 172-174 °C HPLC (%UV) = 95 %. LRMS (ES $^+$) = 398.26 (M + H). HRMS (ES $^+$) requerida para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_7\text{O}$: 397.1418 (encontrada: 397.1412).

Parte Experimental

8.18 Procedimiento general para la medida de pK_a mediante espectroscopia ultravioleta (UV) en placas de 96 pocillos.

8.18.1 Procedimiento general para la preparación de las disoluciones tampón utilizadas para la medida de pK_a

Las disoluciones fueron preparadas en agua destilada. Los pH fueron medidos con un pH-metro marca HANNA (HI-2210) a una temperatura de 30 °C. La disolución estandar de HCl 0.1 M fue valorada utilizando K_2CO_3 como patrón primario, midiéndose una concentración $C = 0.108$ M. La disolución estandar de NaOH 0.1 M fue sonicada durante 10 minutos y valorada utilizando ftalato ácido de potasio como patrón primario, midiéndose una concentración $C = 0.102$ M. Todas las disoluciones tampón fueron preparadas con una fuerza iónica constante ($I = 0.1$ M). La fuerza iónica de las disoluciones tampón fue calculada y ajustada añadiendo KCl como se indica para cada disolución. Se prepararon 32 disoluciones entre pH = 3.0 hasta pH = 13.58 con una diferencia de 0.2 unidades de pH entre cada disolución. Los espectros UV fueron medidos a una temperatura de 30 °C con un espectrómetro UV-Vis THERMO Multiskan.

8.18.1.1 Preparación de disoluciones tampón AcOH/AcONa (pH 3.0 - 5.0)

100 mL de una solución de acetato sódico (AcONa) a una concentración de 0.1 M fue preparada disolviendo 820.3 mg de AcONa (10 mmol) en 100 mL de agua destilada. 50 mL de cada disolución tampón fueron preparados de la siguiente manera: 25 mL de una disolución de AcONa 0.1 M se puso en agitación en un matraz a 30 °C. Luego el pH deseado (pH 3.0, 4.0 y 5.0) fue ajustado añadiendo con una bureta una disolución de HCl 0.1 M previamente valorada utilizando K_2CO_3 como patrón primario. El volumen final fue ajustado a 50 mL añadiendo agua destilada. Finalmente, se calculó la fuerza iónica de la disolución ($I = 0.05$ M) y se ajustó a 0.1 M añadiendo 186.3 mg (2.5 mmol) de KCl. La concentración requerida de KCl fue calculada restando 0.1 (I requerida) de la fuerza iónica calculada para cada uno de las disoluciones tampón (Tabla 1).

8.18.1.2 Preparación de disoluciones tampón KH_2PO_4/K_2HPO_4 para pH 5.8 hasta 8.0

1L de una disolución de fosfato de potasio se preparó disolviendo 6.8 g (50 mmol) de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) en 1 L de agua destilada. Luego, 50 mL de cada disolución tampón fueron preparados de la siguiente manera: 25 mL de esta disolución se puso en agitación a 30 °C y su pH fue ajustado al valor requerido añadiendo HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M (previamente cuantificados, véase 3.2.1.1) con una bureta. El volumen final fue ajustado

Parte Experimental

a 50 mL añadiendo agua destilada. La fuerza iónica de las diferentes disoluciones tampón se calculó ($I = 0.027$ a 0.068 M) y se ajustó a 0.1 M añadiendo la cantidad de KCl necesaria (Tabla 1).

8.18.1.3 Preparación de disoluciones tampón $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{H}_3\text{BO}_3$ para pH 8.0 hasta 10.8

1L de una disolución de borax 0.025 M fue preparada disolviendo 9.54 g (25 mmol) de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 1L de agua destilada. Luego, 50 mL de cada disolución tampón (pH 8.0 hasta pH 9.0) fueron preparados de la siguiente manera: 25 mL de esta disolución de borax se pusieron en agitación a 30 °C. El pH fue ajustado al valor requerido añadiendo una solución de HCl 0.1 M (pH 8.0 hasta pH 9.0). El volumen fue ajustado hasta 50 mL añadiendo agua destilada. La fuerza iónica de las diferentes disoluciones tampón se calculó ($I = 0.053$ a 0.061 M) y se ajustó a 0.1 M añadiendo la cantidad de KCl necesaria (Tabla 1).

50 mL de cada disolución tampón (pH 9.2 hasta pH 10.8) fueron preparados a partir de 25 mL de la disolución de borax 0.025 M en agitación a 30 °C. El pH fue ajustado al valor requerido añadiendo una solución de NaOH 0.1 M. El volumen fue ajustado hasta 50 mL añadiendo agua destilada. La fuerza iónica de las diferentes disoluciones tampón se calculó y se ajustó a 0.1 M añadiendo 186.3 mg (2.5 mmol) de KCl (Tabla 1).

8.18.1.4 Preparación de disoluciones tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ para pH 10.9 hasta 12.0

Se preparó 1 L de una disolución de Na_2HPO_4 0.05 M disolviendo 7.098 g (50 mmol) de Na_2HPO_4 en 1 L de agua destilada. Luego, 50 mL de cada disolución tampón (pH 10.9 hasta pH 12.0) fueron preparados de la siguiente manera: 25 mL de esta disolución se pusieron en agitación a 30 °C. El pH fue ajustado al valor deseado añadiendo una disolución de NaOH 0.1 M. El volumen fue ajustado a 50 mL añadiendo agua destilada. La fuerza iónica para estas disoluciones fue calculada entre 0.066 a 0.088 M. La fuerza iónica de las diferentes disoluciones tampón se calculó ($I = 0.077$ a 0.088 M) y se ajustó a 0.1 M añadiendo la cantidad de KCl necesaria (Tabla 1).

La disolución tampón de glicina/NaOH (pH = 12.6) es de marca Fluka (referencia: 33552).

Parte Experimental

Tabla 8.1. Preparación de disoluciones tampón con fuerza iónica constante ($I = 0.1 \text{ M}$)

buffer	pH	V de sal (mL)	V de HCl (mL)	Vol. de NaOH (mL)	Vol. de agua	Fuerza iónica calculada (M)	Conc. de KCl requerida (M)	Masa de KCl (mg)
AcONa/ AcOH	3,00	25	22,8	X	2,2	0,05	0,05	186,38
	4,00		19,9		5,1	0,05	0,05	186,38
	5,00		8,8		16,2	0,05	0,05	186,38
KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄	6,00	25	X	0,73	24,27	0,028	0,072	0,00
	6,20			1,12	23,88	0,030	0,07	0,00
	6,40			1,68	48,32	0,032	0,068	0,00
	6,60			2,47	47,53	0,035	0,065	0,00
	6,80			3,50	46,5	0,039	0,061	0,00
	7,00			4,75	45,25	0,044	0,056	0,00
	7,20			6,14	43,86	0,05	0,05	0,00
	7,40			7,53	42,47	0,056	0,044	0,00
	7,60			8,78	41,22	0,061	0,039	0,00
	7,80			9,80	40,2	0,065	0,035	0,00
8,00	10,59	39,41	0,068	0,032	0,00			
Borax	8,20	25	5,73	X	19,27	0,06	0,040	0,00
	8,40		5,46		44,54	0,059	0,041	0,00
	8,60		5,09		44,91	0,058	0,042	0,00
	8,80		4,89		45,11	0,056	0,044	0,00
	9,00		3,97		46,03	0,053	0,047	0,00
	9,20		2,98		47,02	0,05	0,050	0,00
	9,40	3,69	46,31	0,05	0,050	0,00		
	9,60	4,35	45,65	0,05	0,050	0,00		
	9,80	4,9	45,1	0,05	0,050	0,00		
	10,00	5,33	44,67	0,05	0,050	0,00		
	10,20	5,63	44,37	0,05	0,050	0,00		
	10,40	5,85	44,15	0,05	0,050	0,00		
	10,60	5,99	44,01	0,05	0,050	0,00		
	10,80	6,08	43,92	0,05	0,050	0,00		
Na ₂ HPO ₄ / Na ₃ PO ₄	11,00	25	X	2,2	22,8	0,077	0,023	0,00
	11,20			3,1	46,9	0,077	0,023	0,00
	11,40			4,1	45,9	0,079	0,021	0,00
	11,60			6,4	43,6	0,081	0,019	0,00
	11,80			9,1	40,9	0,084	0,016	0,00
	12,00			12,9	37,1	0,088	0,012	0,00

Parte Experimental

8.18.2 Procedimiento general para la preparación de la placa de 96 pocillos para las medidas de los espectros de UV

Se pesó entre 1 y 2 mg de cada compuesto en un eppendorf utilizando una balanza analítica de alta precisión. El compuesto fue disuelto en el DMSO necesario para obtener una concentración inicial de 10 mM (disolución madre). La placa de 96 pocillos (placa UV-transparente de marca Thermo Scientific Nunc) se rellenó como se muestra en la Figura 1. Cada una de las líneas fue rellenada con 196 μL de cada una de las disoluciones tampón, desde el pH más ácido hasta el pH más básico. Luego, 4 μL de la disolución madre fueron añadidos a cada uno de los pocillos cargados con las disoluciones tampón procurando agitar las disoluciones con la micropipeta. La concentración final del compuesto obtenida en cada uno de los pocillos es de 200 μM . También se preparó una disolución "blanco" (sin compuesto analito) por cada disolución tampón utilizada en el ensayo. Para esto se tomó 196 μL de las disoluciones tampón y luego se les añadió 4 μL de DMSO. El DMSO representa un 2 % del volumen total de las disoluciones. Luego, la placa de 96 pocillos fue colocada en el espectrometro (THERMO Multiskan Spectrum Apparatus) y agitada por 10 minutos a 30 °C antes de medir los espectros de UV. Los espectros de UV fueron registrados entre 200 nm y 400 nm, midiendo absorbancia cada 2 nm.

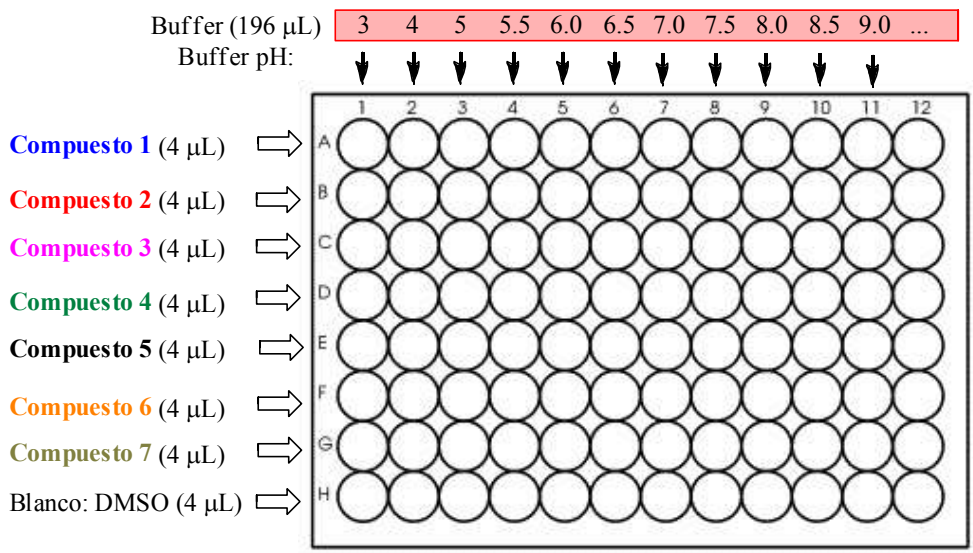


Figura 8.1. Ejemplo de relleno de una placa de 96 pocillos para la determinación simultánea de los pK_{as} de 7 compuestos.

Parte Experimental

8.18.3 Análisis de los datos para calcular el pK_a

Para el análisis espectral y la determinación de pK_a s, seguimos el método descrito previamente por Tomsho *et al*⁴. Los detalles de dicho análisis se encuentran recogidos en el capítulo 2.4. Se usó el programa Excel para tratar los datos (pasos a-e) y el programa Prism 5.0 para la representación gráfica de los datos y cálculo del pK_a (paso f). En resumen, el análisis consiste en los siguientes pasos:

- (a) Corrección de los espectros UV ($\lambda = 250-400$ nm) mediante la sustracción del espectro de UV de los blancos para cada pH y longitud de onda.
- (b) Normalización de los espectros (las absorbancias están normalizadas a cero para $\lambda = 400$ nm).
- (c) Cálculo del espectro diferencial entre el espectro de UV del compuesto a pH ácido (pH 3) y los espectros de UV a todos los restantes pHs.
- (d) Determinación de las longitudes de onda de absorbancia (positiva y negativa) máxima correspondientes a las longitudes de onda analíticas.
- (e) Cálculo de la absorbancia total a las longitudes de onda analíticas para cada uno de los pH analizados.
- (f) Representación gráfica de la absorbancia total vs pH. El valor de pK_a se determina mediante regresión no lineal utilizando la ecuación 1:

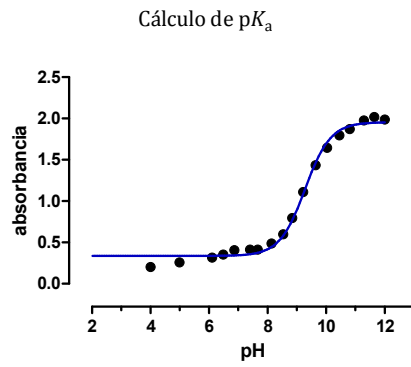
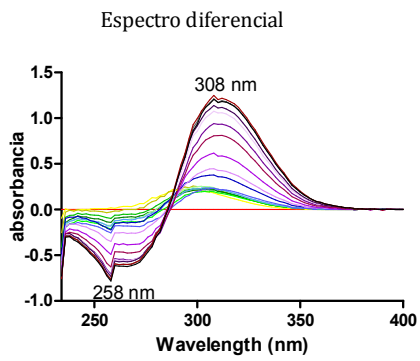
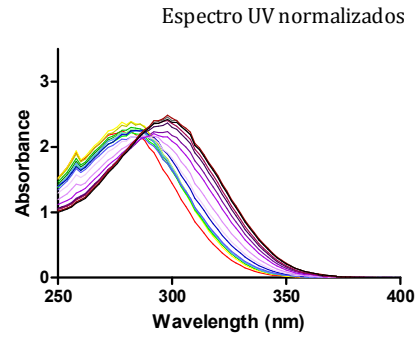
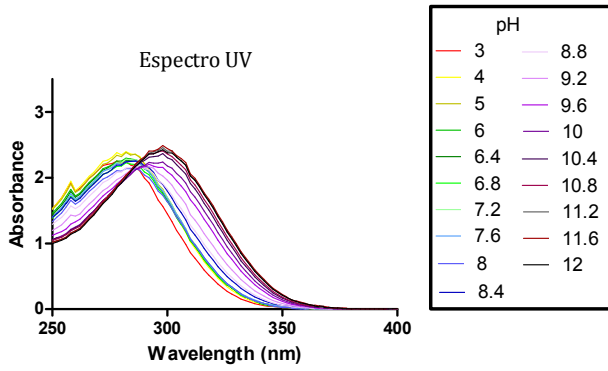
$$Absorbancia\ total = \frac{\epsilon_{HA} - \epsilon_{A^-} * [10^{(pH - pKa)}]}{1 + 10^{(pH - pKa)}} * [S_t] \quad (1)$$

donde ϵ_{HA} y ϵ_{A^-} son los coeficientes de extinción de la forma ácida y básica del compuesto, respectivamente, y S_t es la concentración del compuesto.

Parte Experimental

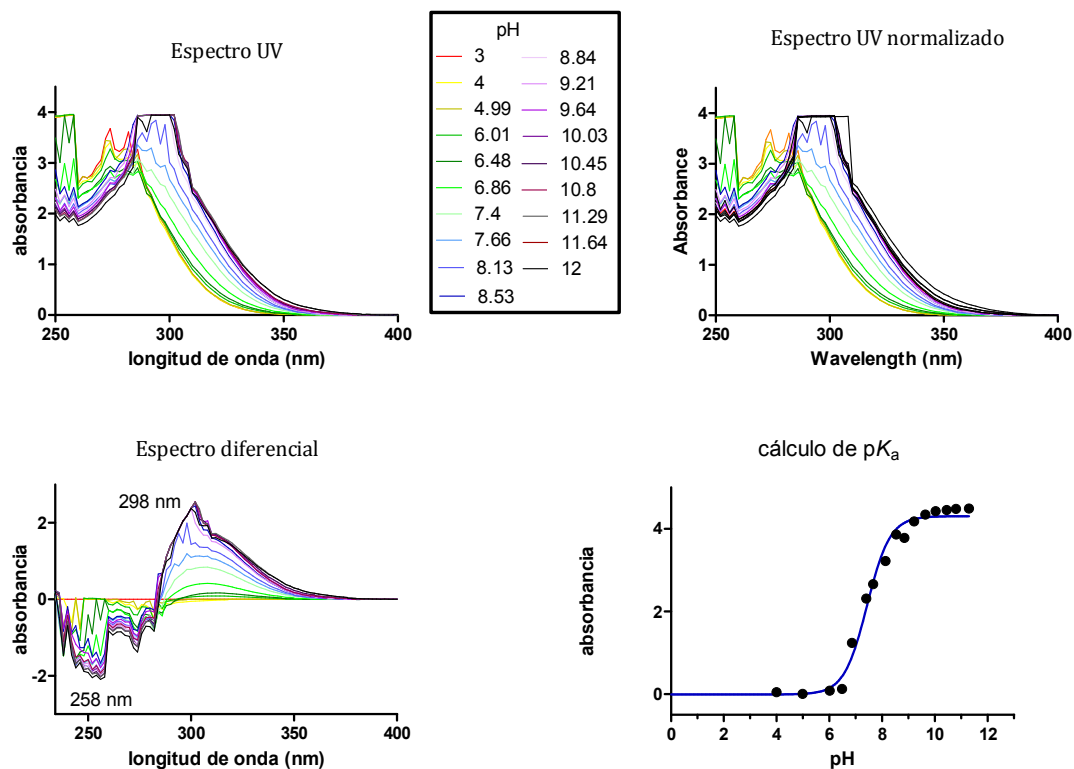
8.18.4 Espectros y determinación de pK_a para los compuestos bis(2-iminoimidazolidinicos).

- Compuesto 2

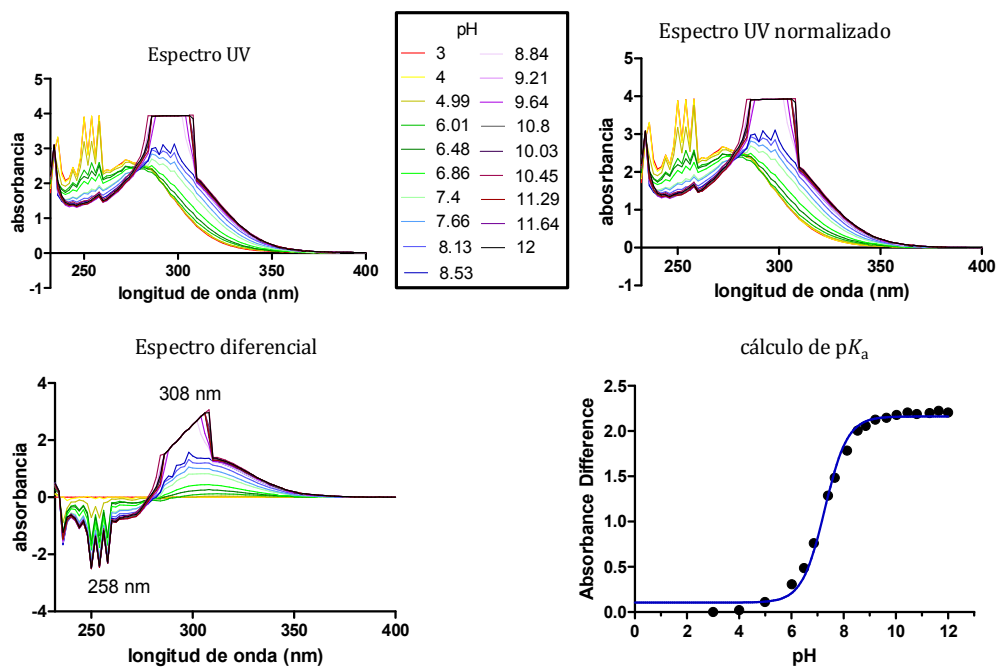


Parte Experimental

• Compuesto 33e

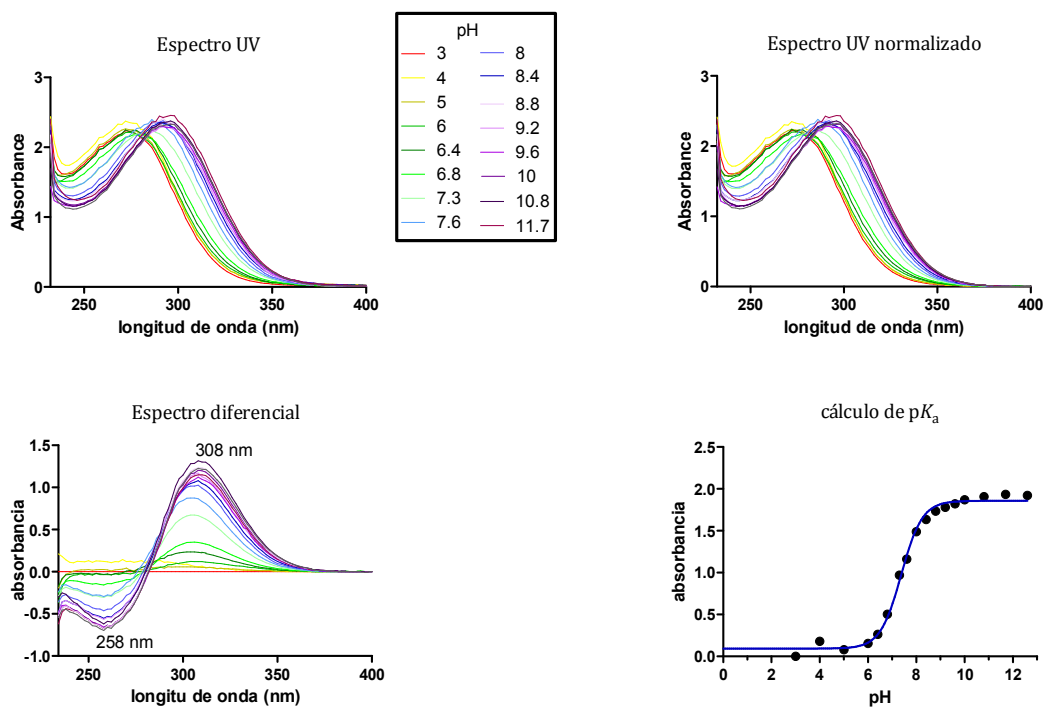


• Compuesto 33a

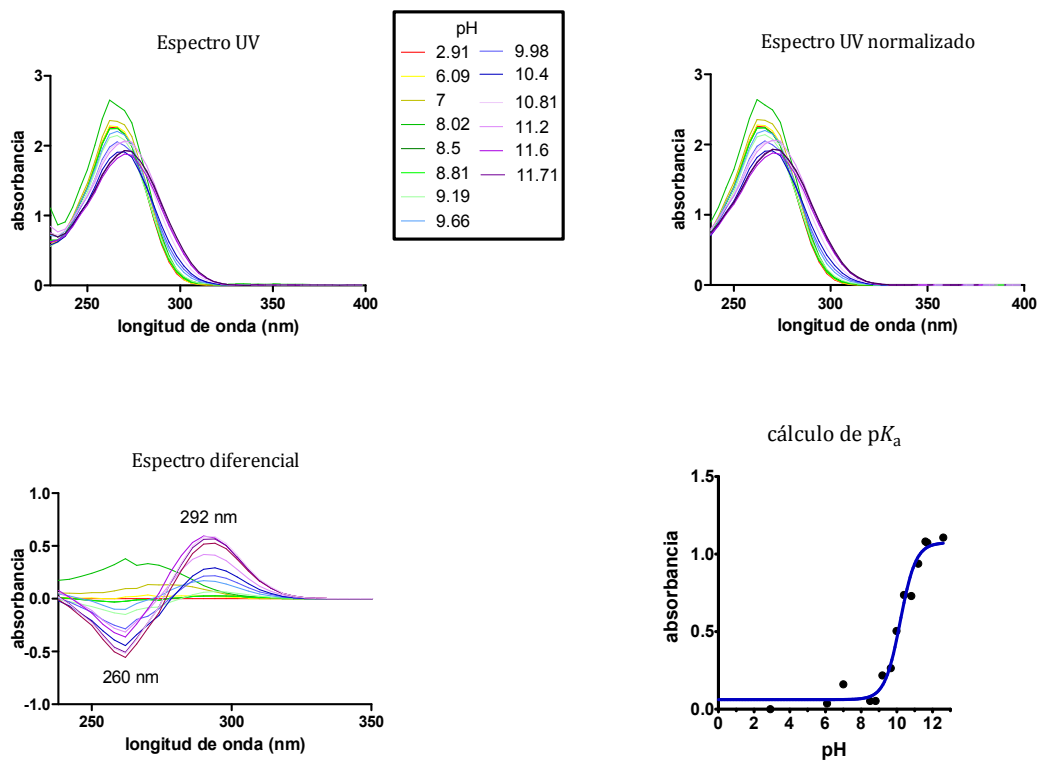


Parte Experimental

• Compuesto 33b

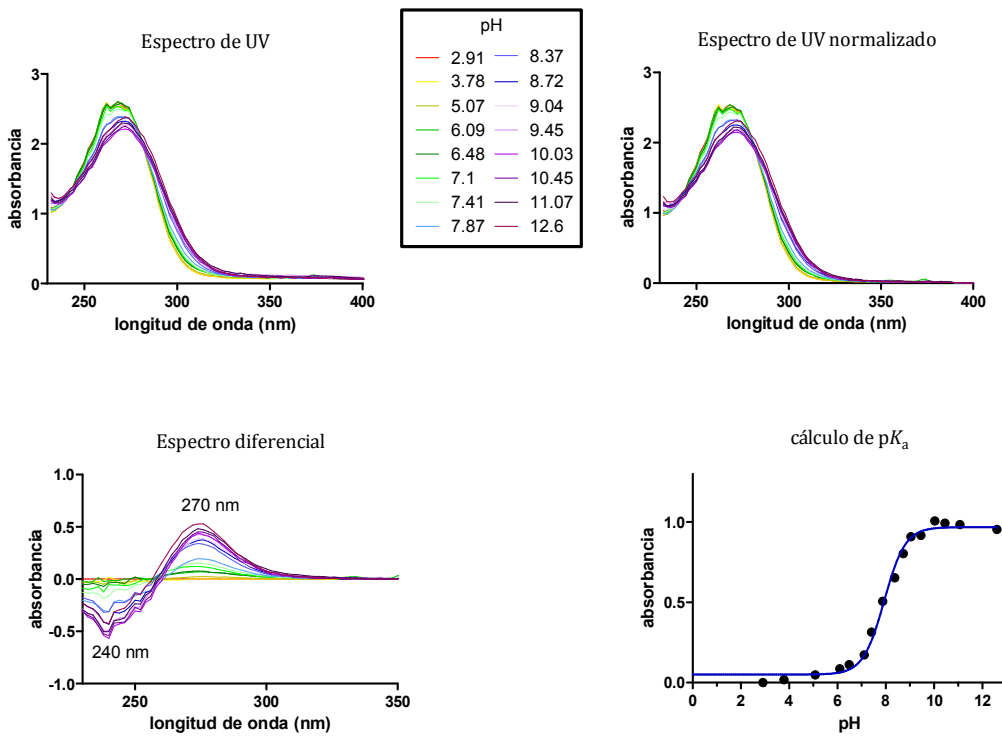


• Compuesto 3

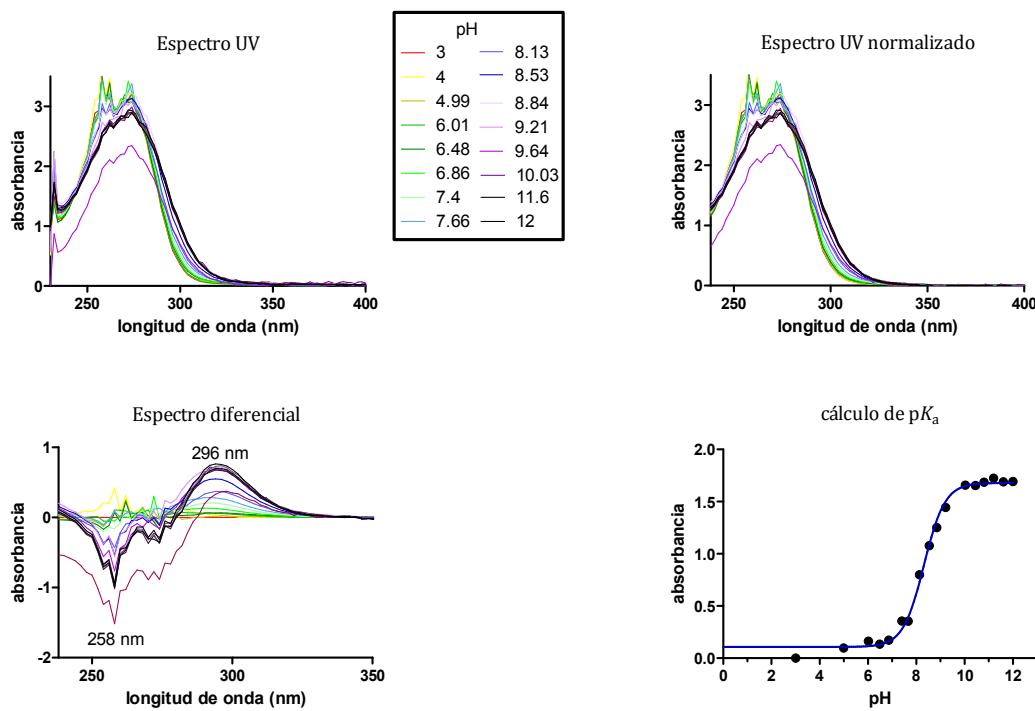


Parte Experimental

- **Compuesto 34a**

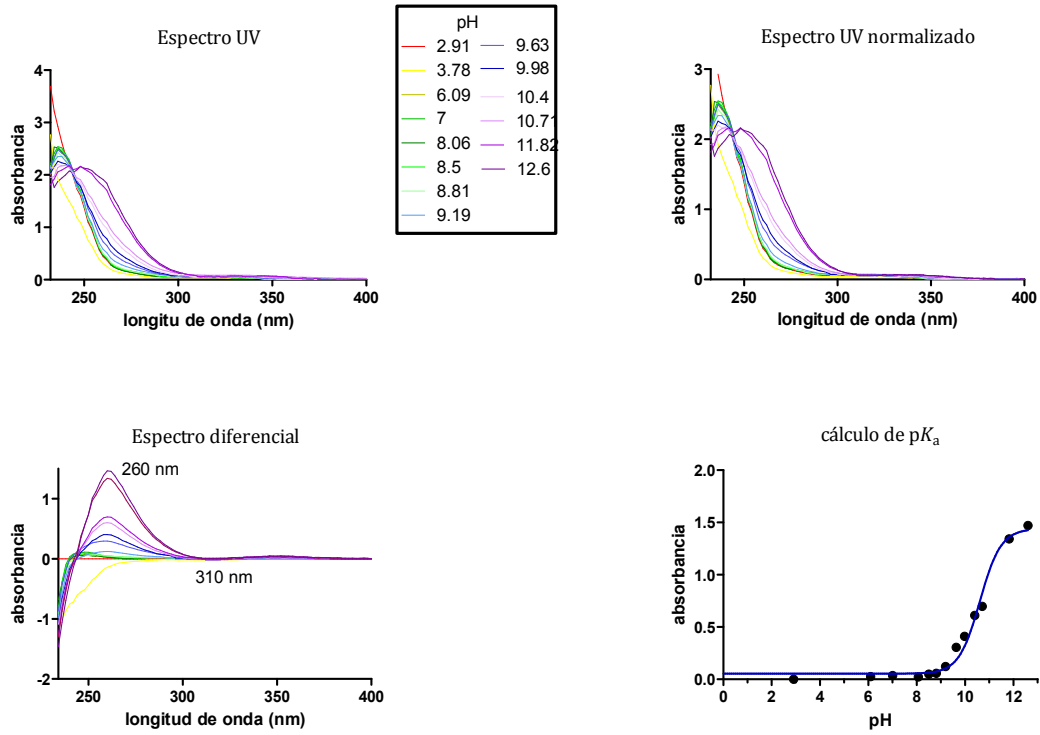


- **Compuesto 34b**

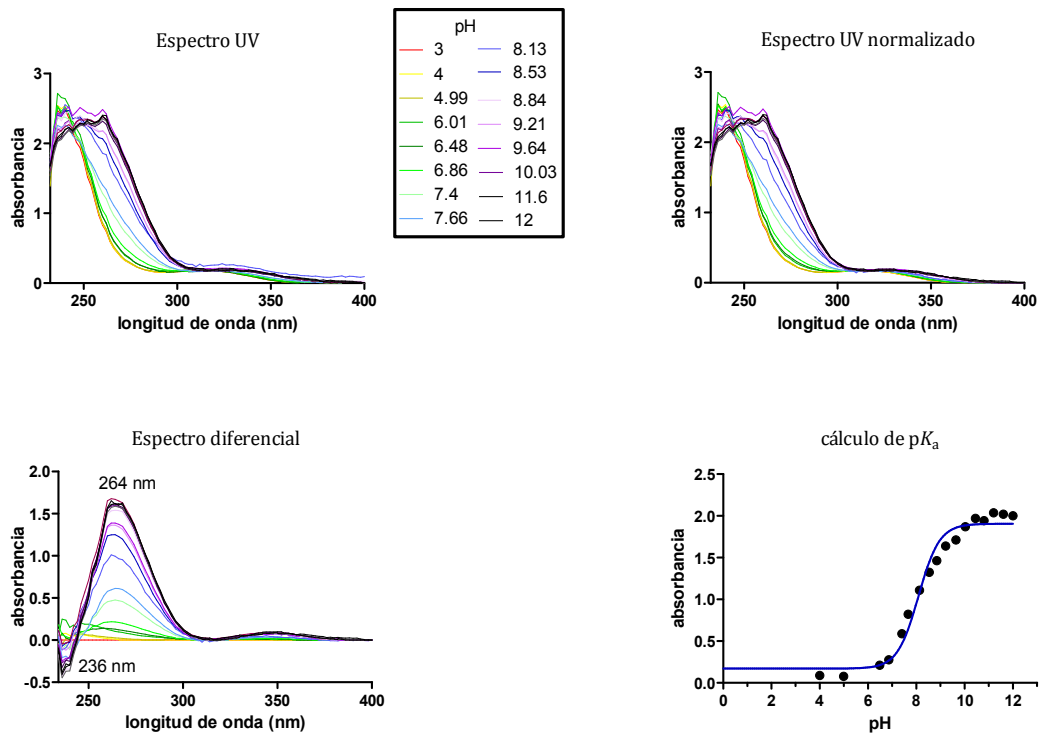


Parte Experimental

• Compuesto 4

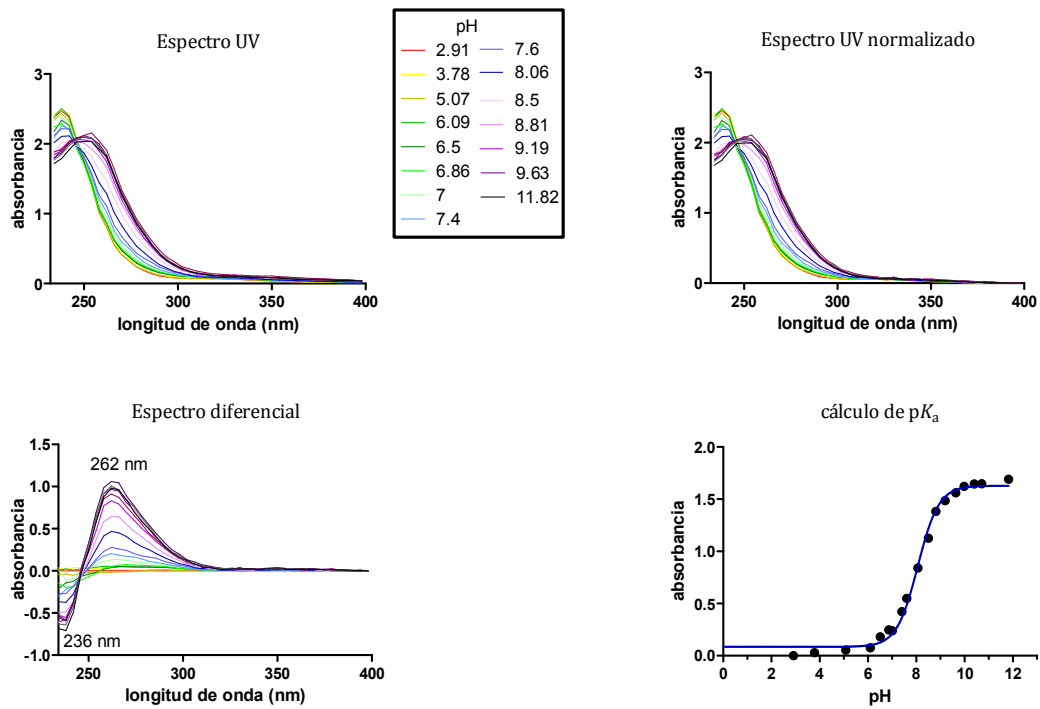


• Compuesto 35e

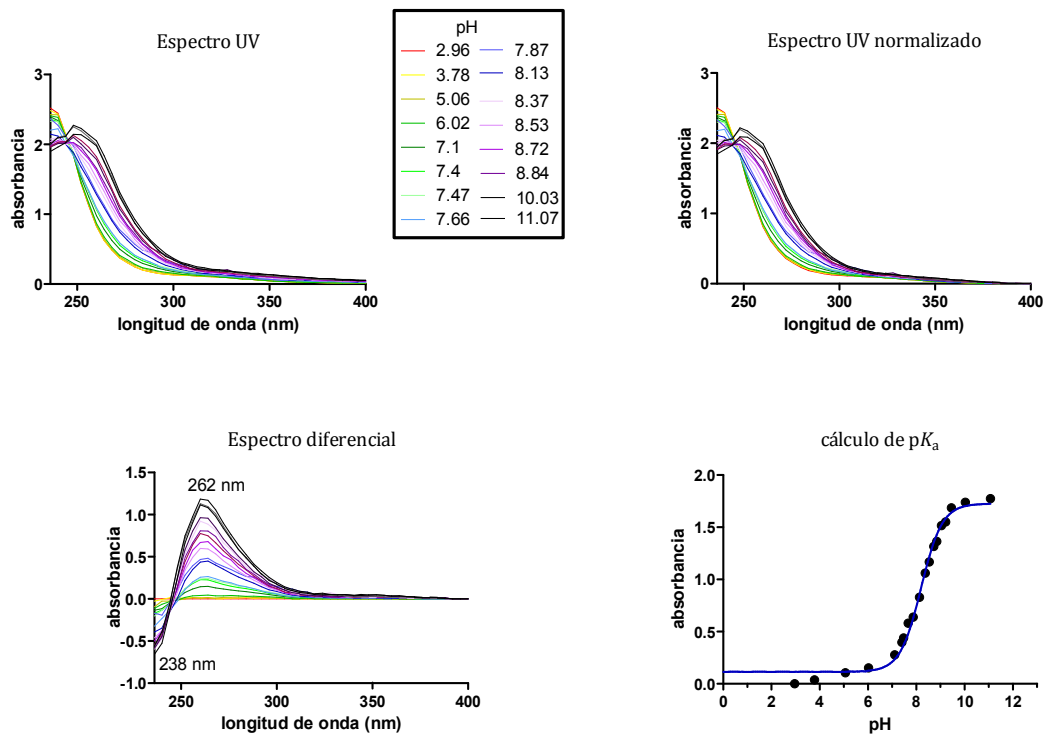


Parte Experimental

• Compuesto 35a

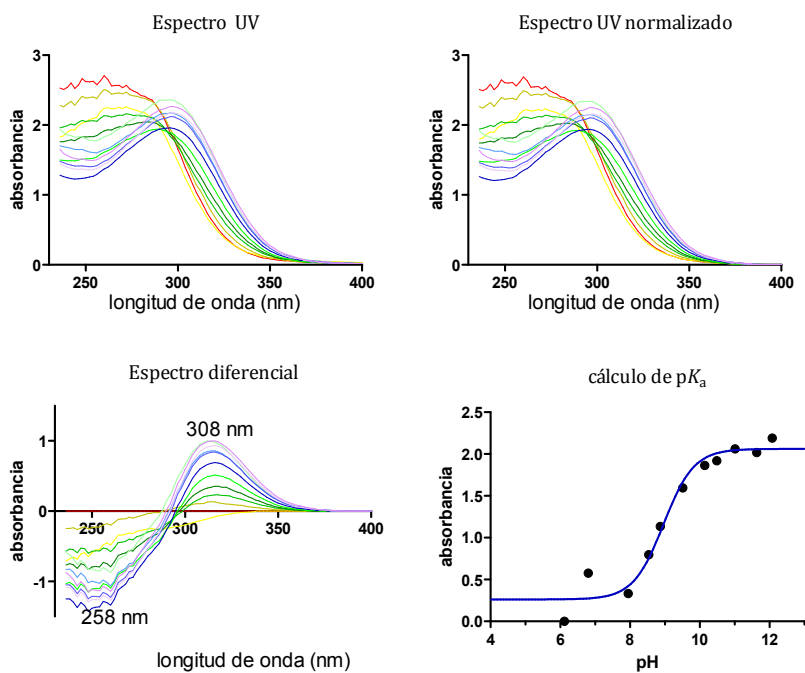


• Compuesto 35b

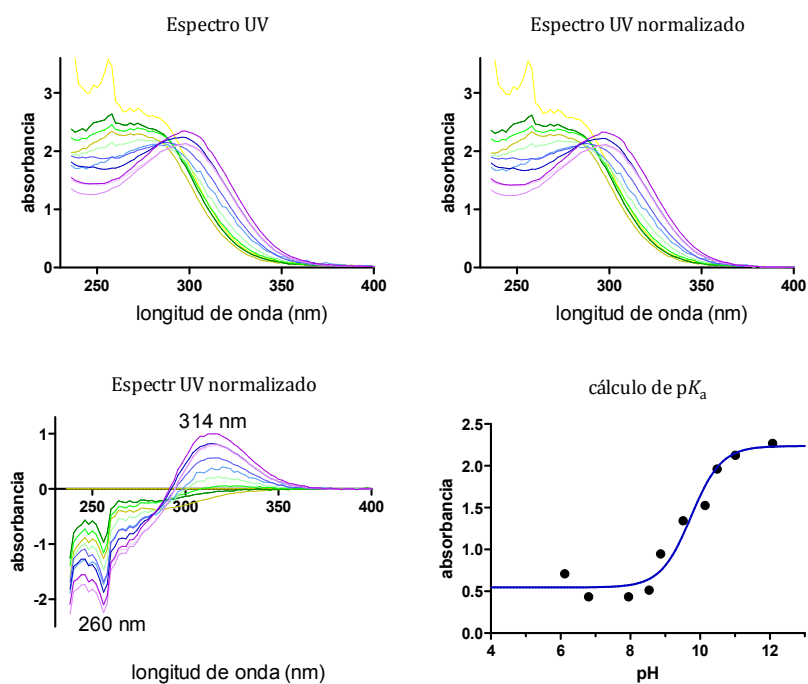


Parte Experimental

- Compuesto **83a**

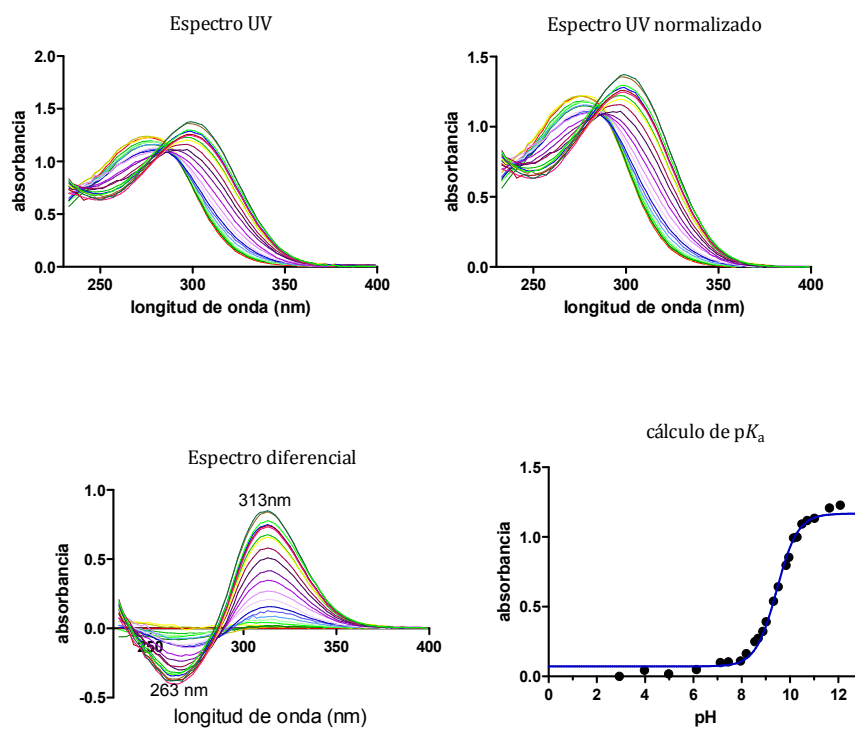


- Compuesto **84a**

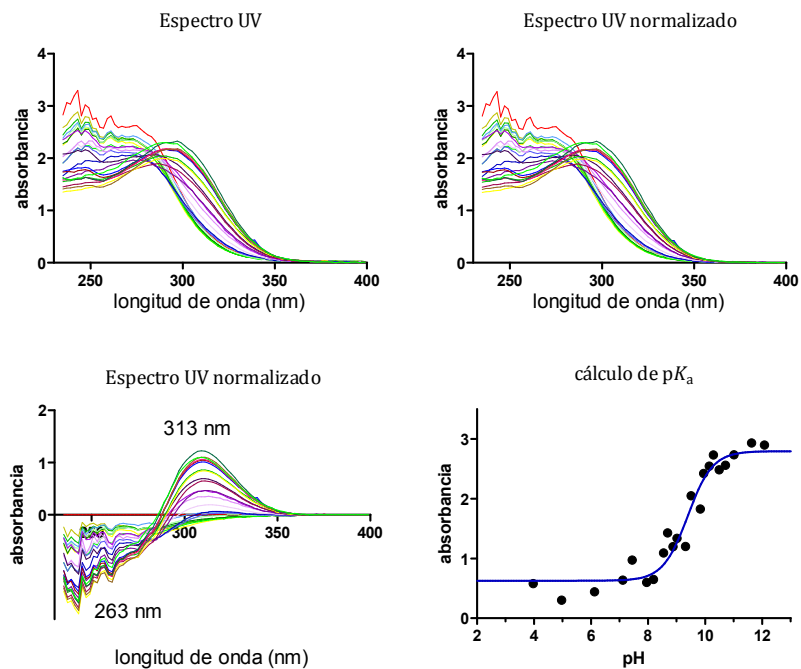


Parte Experimental

- Compuestos **85a**

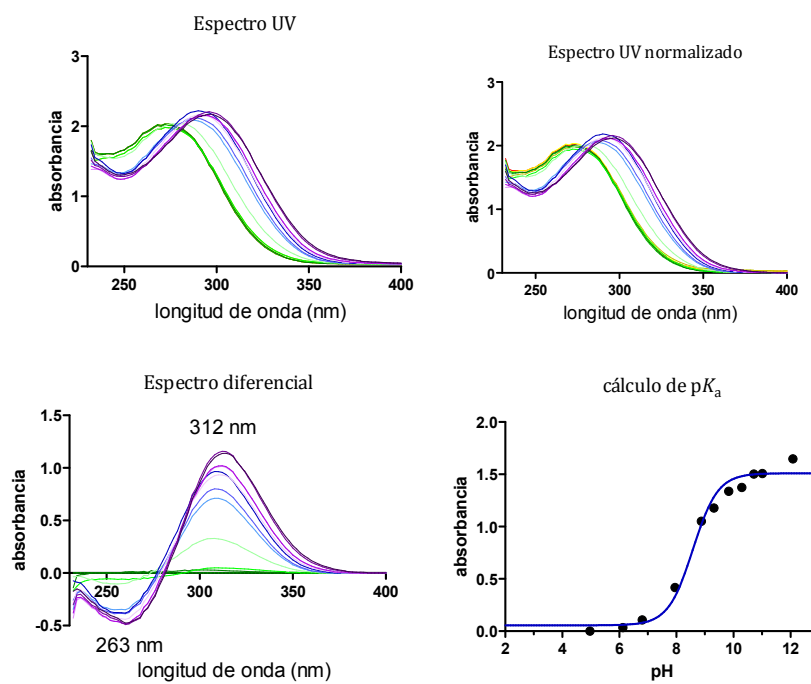


- Compuesto **86a**



Parte Experimental

- Compuesto **87a**



Parte Experimental

8.19 Ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo*

8.19.1 Actividad antiparasitaria

Los siguientes ensayos se llevaron a cabo en el Departamento de Quimioterapia Antiparasitaria del Instituto Tropical Suizo en Basilea (Prof. R. Brun y M. Kaiser):

- actividad *in vitro* sobre los parásitos *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi*, *P. falciparum*, *L. donovani*, y citotoxicidad de los compuestos sobre células L6 de rata.

- actividad *in vivo* en modelos murinos de enfermedad del sueño: modelo STIB900 de infección aguda (fase temprana) y modelo GVR35 de infección crónica (fase tardía).

Todos los estudios de eficacia *in vivo* en ratones (modelos STIB900 y GVR35) se llevaron a cabo de acuerdo con las normas y reglamentos para la protección de los derechos de los animales ("Tierschutzverordnung") del "Bundesamt für Veterinärwesen " suizo. Fueron aprobados por la oficina veterinaria del Cantón de Basilea, Suiza.

Por otro lado, los ensayos *in vitro* con cepas silvestres y resistentes de *T. b. brucei* se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. de Koning en el Instituto de Infección, Inmunidad & Inflamación de la Universidad de Glasgow durante 2 estancias de 15 días en dicho laboratorio.

Cabe destacar que la diferencia de actividad que se puede observar entre las cepas STIB900 de *T. b. rhodesiense* y s427 de *T. b. brucei* se debe probablemente a las pequeñas diferencias existentes en los protocolos de ambos laboratorios aunque no se puede descartar que se deba a las diferencias bioquímicas entre ambas cepas de tripanosomas.

8.19.1.1 Actividad *in vitro* contra *T. b. rhodesiense*.

La actividad tripanocida de los compuestos fue determinada utilizando el ensayo "Alamar blue"⁵. Para este ensayo, cada pocillo de la placa se rellenó con 50 µL de medio esencial mínimo (MEM) suplementado con HEPES (25 mM), glucosa (1g/L), 1% MEM amino ácidos no-esenciales (100x), 2-mercaptoetanol (0.2 mM), piruvato sódico (1mM) y suero de caballo inactivado por calor (15%). A continuación, se añadieron en los pocillos siete diluciones triples de los compuestos a ensayar (concentraciones en el rango 90 a 0.123 µg/mL). Luego, fueron añadidos en cada pocillo 10⁴ células de parásitos (formas sanguíneas del parásito *T. b. rhodesiense* STIB900) en 50 µL y la placa fue incubada a 37 °C bajo atmosfera de CO₂ (5%) durante 72 h. A continuación, se añadió 10 µL de solución de resazurin (Alamar blue, 12.5 mg en 100 mL de agua destilada) en cada pocillo y la placa fue incubada durante 2 – 4 h más. Finalmente, se hizo una lectura fluorimétrica de la placa de 96 pocillos (Fluorímetro de microplacas Spectramax Gemini XS, Molecular Devices Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) a longitudes de onda de 530 nm y 590 nm. Los datos obtenidos fueron tratados y analizados en el programa GraphPad. La disminución de la

Parte Experimental

fluorescencia se expresó en porcentaje de la fluorescencia de los cultivos control y se representó frente a las concentraciones de los compuestos. A partir de las curvas de inhibición sigmoideal, se calculó la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) de los compuestos ensayados⁶.

8.19.1.2 Actividad *in vitro* contra *T. b. brucei*

Una leve modificación del protocolo usado para *T. b. rhodesiense* fue usada para el ensayo de las cepas salvajes y resistentes de *T. b. brucei*⁷. La cepa TbAT1-KO fue obtenida de la modificación de la cepa salvaje de *T. b. brucei* Lister 427 (s427) por supresión del gen *TbAT1*⁸. La cepa B48 es un mutante derivado de TbAT1-KO por selección *in vitro* a altos niveles de pentamidina, y no expresa el transportador de alta afinidad de pentamidina (HAPT1)⁹.

El compuesto a ensayar es incubado en una placa de 96 pocillos con las células de parásito que se encuentran a una concentración de 1×10^5 células/mL. Se preparan 24 concentraciones de los compuestos (100 mM hasta 1.19×10^{-5} mM), luego las células se incuban en presencia de los compuestos (37 °C y 5% CO₂) por unas 48 horas. Pasado este tiempo, el reactivo “Alamar Blue” se añade a cada pocillo de la placa con el cultivo de las células y estas se incuban durante 24 horas más.

8.19.1.3 Actividad *in vitro* contra *T. cruzi*, *L. donovani* y *P. falciparum*

Los valores de CI₅₀ contra las cepas de amastigotes de *L. donovani* MHOM/ET/67/L82 fueron determinados utilizando el ensayo de “Alamar blue”¹⁰. Los valores de CI₅₀ contra *P. falciparum* (estadio eritrocítico) fueron determinados por en el ensayo de incorporación de [³H]hipoxantina utilizando la cepa K1 resistente a cloroquina y pirimetamina¹¹. Los valores de CI₅₀ contra tripomastigotes de la cepa Tulahuen C2C4 de *T. cruzi* conteniendo el gen β-D-galactosidasa (LacZ) fueron determinados utilizando un ensayo colorimétrico con el sustrato “rojo de clorofenilo β-D-galactopiranosido (CPRG)-Nonidet”¹². Los detalles del protocolo para todos estos ensayos han sido publicadas anteriormente por nuestro grupo¹³.

Parte Experimental

8.19.2 Actividad tripanocida *in vivo*

8.19.2.1 Modelo murino STIB900 de enfermedad del sueño aguda

Este modelo murino mimetiza la primera fase de la enfermedad. Cuatro ratones hembra NMR1 fueron utilizados para cada grupo en este experimento. Cada ratón fue inoculado vía intraperitoneal con 10^4 tripomastigotes de la forma sanguínea del parásito *T. b. rhodesiense* de la cepa STIB900. Sangre heparinizada proveniente de un ratón donador con una parasitemia de aproximadamente 5×10^6 /mL fue suspendida en PSG para obtener una suspensión de tripanosomas de 1×10^5 /mL. Cada ratón fue inyectado con 0.25 mL de esta suspensión. Los compuestos fueron disueltos en 100% de DMSO, luego diluido 10 veces en agua destilada o como lo especifica el proveedor. El tratamiento con los compuestos se inició 3 días después de la infección durante 4 días consecutivos para todas las vías de administración (i.p., p.o.) en un volumen de 0.1 mL/10g. Tres ratones infectados y sin tratamiento fueron usados como control. No se realizó una inyección control con el vehículo solo (ie, DMSO-agua) porque se estableció anteriormente que este vehículo no afecta a la parasitemia ni tampoco a los ratones. La parasitemia fue monitoreada en la sangre obtenida por un corte realizado en la cola del ratón; primero, dos veces por semana durante 15 días después del tratamiento, seguido de una vez a la semana durante los 60 días restantes del experimento. Los ratones fueron considerados curados cuando no hubo recaída en la parasitemia detectada en la sangre de la cola durante los 60 días del periodo de observación. Se calculó el tiempo medio (en días) de recaída en la parasitemia para cada grupo de ratones.

8.19.2.2 Modelo murino GVR35 de enfermedad del sueño crónica

La cepa GVR35 de *T. b. brucei* fue aislada de un ñu en el Serengeti en 1966 (aislado primario S10)¹⁴. El modelo murino GVR35 mimetiza la segunda fase (fase neurológica) de la enfermedad del sueño. Se utilizaron cinco ratones hembra NMR1 por experimento. Cada ratón fue inyectado con 2×10^4 tripomastigotes de la forma sanguínea del parásito *T. b. brucei* de la cepa GVR35. El tratamiento fue por vía intraperitoneal en un volumen de 10 mL/Kg durante 5 días consecutivos desde el día 14 hasta el día 18 después de la infección. Un grupo control fue tratado el día 14 post-infección con una sola dosis de aceturato de diminaceno (40 mg/Kg del peso corporal, vía i.p.). Dicha dosis es subcurativa pues solo elimina los parásitos del sistema hemolinfático aunque no del SNC, lo que trae como consecuencia la reaparición de tripanosomas en la sangre¹⁴. La parasitemia fue monitorizada dos veces en la primera semana después del tratamiento, seguido por una vez por semana hasta el día 180 post-infección. Los ratones se consideraron curados

Parte Experimental

cuando no se detectó recaída en la parasitemia en sangre extraída de la cola del ratón durante los 180 días de observación. Los ratones supervivientes fueron sacrificados el día 180, y el día de la muerte de los animales fue anotado (los ratones curados como > 180 días).

8.20. Ensayo de permeabilidad con células endoteliales microvasculares de cerebro humano (hCMEC/D3)

Los compuestos fueron disueltos en agua destilada a una concentración 10 mM (Solución madre). El ensayo de permeabilidad se realizó utilizando la monocapa de células hCMEC/D3 siguiendo el protocolo descrito antes por nuestro grupo². Antes de realizar el ensayo de permeabilidad, la concentración óptima de trabajo (i.e., concentración que no perturba el complejo celular entre las células endoteliales) fue determinada utilizando el tinte fluorescente “Lucifer yellow” (LY) como marcador de la integridad de las uniones estrechas entre las células endoteliales. La concentración óptima usada para la pentamidina, **2**, **4**, y **33e** fue de 100 μ M. El experimento se realizó de la siguiente manera: después de 6 días de cultivo, los insertos precubiertos, con y sin células endoteliales, fueron transferidos a una placa de 6 pocillos conteniendo 2.6 mL de la disolución tampón usada (“tampón transportador” = solución salina tampón de Hanks, CaCl_2 y MgCl_2 , 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio y, cuando se requería, 0.1% de BSA) en el compartimiento abluminal. Al tiempo 0, el tampón transportador conteniendo el compuesto a ensayar, con o sin LY (50 μ M disuelto en el cultivo celular), fue colocado en cada uno de los compartimientos luminales. Las incubaciones se realizaron a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO_2 . A diferentes tiempos, 10, 25 y 45 min, cada inserto de cultivo (con y sin células) fue transferido a un nuevo compartimiento conteniendo tampón transportador nuevo (**Figura 8.2**). La cantidad de cada compuesto en el compartimiento abluminal a los diferentes tiempos (T = 0, 10, 25, y 45 min) así como en el compartimiento luminal al final del experimento fue cuantificada por fluorimetría (para el LY) o por HPLC-MS (para la pentamidina, **2**, **4**, y **33e**). La permeabilidad endotelial fue calculada a partir de la velocidad de aclaramiento (“clearance rate”) y de la superficie del inserto de cultivo, como se describió previamente².

Para destruir temporalmente las uniones estrechas entre las células endoteliales, se aplicó una disolución hiperosmótica de D-manitol (1.4 mM en EBM-2) a las células endoteliales 30 min antes de los estudios de permeabilidad.

Parte Experimental

8.20.1 Análisis de los resultados por HPLC

Muestras de 1 mL fueron recogidas a los diferentes tiempos directamente del compartimiento basal y transferidas a viales de HPLC (Waters) de 1.5 mL. Dichas muestras se almacenaron en el congelador para su posterior análisis. Las muestras fueron descongeladas y guardadas a 4 °C un día antes de su análisis. Las muestras fueron agitadas utilizando un agitador orbital durante 40 minutos y luego analizadas por HPLC. Se utilizó un instrumento marca Waters (“Waters 2690 separation module with Waters 996 photodiode array detector”) con una columna Waters Sunfire C18-3.5 µm (4.6 x 50 mm). Las condiciones de inyección fueron las siguientes: temperatura de la columna = 30 °C, flujo = 1 mL/min, volumen de inyección = 10 µL. La fase móvil utilizada fue una mezcla de H₂O (+0.05 % TFA):CH₃CN (+0.05 % TFA) y en las siguientes condiciones: pentamidina (isocrático 20:80, tiempo de gradiente = 10 min), **2** (isocrático 10:90, tiempo de gradiente = 5 min), **4** (isocrático 15:85, tiempo de gradiente = 5 min), y **33e** (isocrático 7:93, tiempo de gradiente = 5 min). Las longitudes de onda analíticas fueron las siguientes: pentamidina (262 nm), **2** (275 nm), **4** (234 nm), y **33e** (275 nm). Cada una de las muestras fue inyectada 3 veces y el promedio del valor del área del pico de UV fue usado para determinar la concentración de la muestra de acuerdo a la curva de calibración preparada. La curva de calibración fue obtenida para cada compuesto utilizando 6 diferentes concentraciones que se obtuvieron por doble dilución serial de una disolución madre de cada compuesto en la disolución tampón del ensayo, y empezando a una concentración de 150 µM (pentamidina, **2**, y **4**) o 120 µM (**33e**). Cada concentración fue analizada por triplicado y se representó gráficamente el valor medio del área de pico del compuesto en función de la concentración. La ecuación de la curva de calibración fue obtenida por el análisis de regresión lineal utilizando el programa Microsoft Excel.

8.21 Ensayo *in vitro* de metabolismo hepático del derivado *N*-hidroxilado 35e

Se utilizaron los compuestos comerciales benzamidina (Alfa Aesar), benzamidoxima (Thermo Fisher Scientific), y NADH (Sigma Aldrich). Las fracciones enzimáticas utilizadas provienen de microsomas hepáticos humanos y mitocondrias hepáticas humanas. Los ensayos fueron realizados por el Dr. Tomás Herraiz del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del CSIC.

Parte Experimental

8.21.1 Procedimiento general para el ensayo de reducción de derivados de hidroxilaminas

La actividad amidoxima reductasa fue determinada siguiendo la reducción de la benzamidoxima a benzamidina, y la reducción de **33e** a **2**, por HPLC. Para tal finalidad, se incubó el compuesto *N*-hidroxilado (**33e** o benzamidoxima) en un volumen final de 0.2 mL de una disolución tampón de fosfato (40 mM) a pH = 6.0 a una concentración de 0.5 mM. El tiempo de preincubación fue de 3 minutos y la reacción fue iniciada por la adición de NADH (1.2 mM) seguida de una incubación a 37 °C en agitación durante 60 min. La reacción se detuvo por la adición de MeOH frío (150 µL), y a continuación centrifugada a 10000 rpm durante 10 min. Se tomaron alícuotas de 20 µL del medio de reacción y fueron estudiadas por HPLC para determinar los posibles productos de reducción.

8.21.2 Procedimiento general para el análisis por HPLC

La formación del producto reducido (i.e., benzamidina o compuesto **2**) en el medio de reacción fue monitorizada por HPLC. Se utilizó una columna de fase reversa (Novapak C18; 150 mm × 3.9 mm, 4 µm). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: eluyente A: 50 mM de una solución tampón de fosfato (pH = 6.0) conteniendo acetato de sodio 20 mM; eluyente B: 50% de A en acetonitrilo. La benzamidoxima fue inyectada en condiciones isocráticas utilizando una mezcla de 98% de A y 8% de B. La benzamidina fue detectada por UV a una longitud de onda de 335 nm (tiempo de retención: $t_R = 2.5$ min). La temperatura de la columna fue de 40 °C. El flujo de inyección fue de 1 mL/min. Se realizó una curva de calibración de la absorbancia de la benzamidina en función de la concentración y se usó para determinar la concentración de este compuesto en el medio de reacción. Para el compuesto cabeza de serie **2** y el derivado **33e** las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: eluyente A: una solución buffer de fosfato de amonio ajustada a pH = 3.0 a una concentración de 50 mM, eluyente B: 20% de A en MeCN. Se utilizó un gradiente lineal de 0% de B hasta 14.2% de B en 20 minutos. La temperatura de la columna fue de 40 °C. El flujo de inyección fue de 1 mL/min. El compuesto **33e** fue detectado por UV a una longitud de onda de 280 nm. El tiempo de retención de los compuestos fue: $t_R = 15.3$ min para **2** y $t_R = 14.9$ min para el compuesto **33e**.

Parte Experimental

8.21.3 Procedimiento general para el análisis de la incubación enzimática por HPLC-MS

El análisis por HPLC-MS fue realizado en un aparato marca Agilent 1200 HPLC equipado con un detector de diodos (DAD 1200) acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo 6110 MSD (Agilent Technologies). La separación cromatográfica fue realizada en una columna Zorbax SB-C18 (2.1 × 150 mm, 5 μm). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: eluyente A: H₂O con 0.1% de ácido fórmico; eluyente B: MeCN con 0.1% de ácido fórmico. Los alícuotas del ensayo con el compuesto **33e** fueron inyectados en un gradiente lineal de 0% →12% de B con un tiempo de inyección de 20 min. Para el ensayo con la benzamidoxima, se usaron condiciones isocráticas (100% A). El flujo de inyección utilizado fue de 0.3 mL/min. La temperatura de la columna fue 40 °C y el volumen de inyección de 20 μL. El análisis por espectrometría de masas se realizó mediante ionización electrospray en modo positivo (ES⁺). Las condiciones de detección fueron: fragmentador: 90 V (compuesto **33e**) y 60 V (benzamidoxima) en un rango de 50-600 unidades de masa.

8.22 Estudios biofísicos por SPR

Los experimentos de SPR fueron realizados a 25 °C con un aparato Biacore X-100 (GE Healthcare, Biacore AB, Uppsala Sweden) en la Unidad de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) del Instituto de Química Médica del CSIC (Dra. L. Lagartera).

8.22.1 Estudios de unión a albumina de suero humano (HSA)

8.22.1.1 Inmovilización de la HSA

La HSA utilizada para el experimento (Sigma-Aldrich) está libre de ácidos grasos y de globulina. Fue usada sin previa purificación. Se preparó una disolución madre en una disolución tampón fosfatos (PBS, pH = 7.4) y se guardó a -20 °C. Justo antes de su utilización, esta disolución fue diluida a una concentración de 100 μg/mL en una disolución de acetato de sodio 10 mM (pH = 5.0). La HSA fue inmovilizada sobre un sensor chip CM5 (Biacore) utilizando química de acoplamiento de aminas. La superficie fue bloqueada con la inyección durante 7 min de una disolución 1 M de etanolamina, pH = 8.0. El nivel de inmovilización varió entre 8000 y 9000 RU.

Parte Experimental

8.22.1.2. Experimento de unión a HSA

Los fármacos control (warfarina, fenitoína, prednisona y sulfanilamida) y los compuestos **2**, **33a**, **33e**, **34d**, **35b** y **35e** se prepararon en una disolución madre a una concentración de 10 mM en DMSO. Las disoluciones madres fueron diluidas en PBS conteniendo DMSO (3%) para alcanzar una concentración final de 40 μ M en PBS. Los estudios de afinidad se realizaron a un flujo de 90 μ L/min con tiempos de asociación y de disociación de 40 s y 60 s, respectivamente. La regeneración entre cada una de los ciclos de inyecciones no fue necesaria. Para limpiar el sistema de flujo, se realizó un lavado extra después de cada inyección con 50% de DMSO. Las respuestas de unión de los compuestos a la HSA fueron corregidas restando la respuesta producida por el DMSO mediante el programa de corrección de disolvente de Biacore X-100. Se realizaron varias medidas de afinidad con la warfarina durante el ensayo para controlar la eficiencia de unión de la HSA a lo largo del experimento. Las curvas de dosis-respuesta se obtuvieron por el trazado de la $RU / Da * 100$ frente a las concentraciones del compuesto estudiado. A la concentración de 40 μ M todos los compuestos dieron respuestas medibles. El gráfico de nivel de unión a HSA se dividió en regiones de baja, intermedia y alta respuesta de unión usando el nivel de respuesta de la warfarina, fenitoína y prednisona como controles, respectivamente. La sulfanilamida se utilizó como control negativo.

8.22.2 Estudios de unión a ADN

Los oligonucleótidos (Sigma Aldrich) utilizados en estos ensayos fueron;

Oligo 1: [Biotina]CGAATTCGTCTCCGAATTCG (AATT)

Oligo 2: [Biotina]CATATATATCCCATATATATG (AT₄)

Oligo 3: [Biotina]CGCGCGGTTTTTCGCGCGG (CG₄)

8.22.2.1 Inmovilización de los oligonucleótidos

Para la inmovilización de los oligonucleótidos se escogieron chips que llevaran incorporados la molécula de estreptavidina. El oligonucleótido biotinilado se une a la estreptavidina con una alta afinidad permitiendo mayor accesibilidad del ligando hacia el analito. Además permite tener el oligonucleótido en una misma orientación. Los oligonucleótidos biotinilados en 5', se prepararon a una concentración inicial de 100 μ M para posteriormente diluirlos a la concentración de 25 nM en una disolución buffer: MES 10 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, y TWEEN 20 0.005% a pH = 6.25.

Parte Experimental

El chip fue lavado previamente a la inmovilización con inyecciones sucesivas de NaOH 50 mM y NaCl 1M. Cuando la línea base se mantuvo estable se llevó a cabo la inmovilización a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. La disolución buffer empleada fue la misma que la utilizada para la dilución de los oligonucleótidos. La cantidad de oligonucleótidos inmovilizada fue en el rango 300 – 400 RU. El canal 1 se empleó como referencia (sin inmovilizar).

8.22.2.2 Experimentos de unión con los compuestos sintetizados en esta tesis

Las medidas de afinidad se realizaron tras el equilibrado de cada oligonucleótido en la disolución buffer descrita anteriormente a 18 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 5 minutos seguido del periodo de disociación de otros 5 minutos. Una vez estabilizada la señal se procedió a realizar experimentos de unión para llevar a cabo una selección de los mejores compuestos. Las medidas se realizaron a una concentración de 25 μM de cada compuesto en el tampón descrito anteriormente. El periodo de disociación fue de otros 5 minutos. Después de la disociación, se regeneró la superficie con una disolución de NaCl 200mM y NaOH 10mM a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las medidas de afinidad para cada oligonucleótido se realizaron a concentraciones para cada compuesto entre de 0.05 a 60 μM . Después de la disociación se regeneró la superficie con una disolución de NaCl 200 mM y NaOH 10 mM.

Las constantes de unión (K_A en M^{-1}) se calcularon a partir del ajuste de los datos obtenidos en el estado estacionario. Las respuestas que se observaron en el estado de equilibrio (RU_{obs}) fueron divididas por la respuesta máxima previsible para el ligando (RU_{max}), representadas gráficamente frente a las concentraciones de los ligandos empleados ($L =$ concentración en la disolución que fluye sobre las superficie del chip), y ajustadas a un modelo de 1 tipo de sitio ($K_2 = 0$) o bien de 2 tipos de sitio de unión: $r = (\text{RU}_{\text{obs}} / \text{RU}_{\text{max}}) = (K_1L + 2K_1K_2L^2) / (1 + K_1L + K_1K_2L^2)$

RU_{obs} es la respuesta en el estado estacionario

RU_{max} es la respuesta máxima

K_1 es la constante de disociación del primer sitio

K_2 es la constante de disociación del segundo sitio

L es la concentración del analito en disolución

Parte Experimental

8.23 Referencias bibliográficas

1. Takimiya, K.; Yanagimoto, T.; Yamashiro, T.; Ogura, F.; Otsubo, T., Syntheses and properties of 11,11,12,12-tetracyano-2,6-anthraquinodimethane (TANT) and Its 9,10-dichloro Derivative as Novel Extensive Electron Acceptors. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1998**, *71*, 1431-1435.
2. Nieto, L.; Mascaraque, A.; Miller, F.; Glacial, F.; Rios Martinez, C.; Kaiser, M.; Brun, R.; Dardonville, C., Synthesis and antiprotozoal activity of *N*-alkoxy analogues of the trypanocidal lead compound 4,4-Bis(imidazolinylamino)diphenylamine with Improved Human Blood Brain Barrier Permeability. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 485-494.
3. Dardonville, C.; Goya, P.; Rozas, I.; Alsasua, A.; Martín, M. I.; Borrego, M. J., New aromatic iminoimidazolidine derivatives as α 1-adrenoceptor antagonists: a novel synthetic approach and pharmacological activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1567-1577.
4. Tomsho, J. W.; Pal, A.; Hall, D. G.; Benkovic, S. J., Ring structure and aromatic substituent effects on the pK_a of the benzoxaborole pharmacophore. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *3*, 48-52.
5. Ráz, B.; Iten, M.; Grether-Bühler, Y.; Kaminsky, R.; Brun, R., The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Trop.* **1997**, *68*, 139-147.
6. Dardonville, C.; Fernandez-Fernandez, C.; Gibbons, S.-L.; Jagerovic, N.; Nieto, L.; Ryan, G.; Kaiser, M.; Brun, R., Antiprotozoal activity of 1-phenethyl-4-aminopiperidine derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3815-3821.
7. Rodenko, B.; van der Burg, A. M.; Wanner, M. J.; Kaiser, M.; Brun, R.; Gould, M.; de Koning, H. P.; Koomen, G. J., 2,*N*6-disubstituted adenosine analogs with antitrypanosomal and antimalarial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3796-3802.
8. Matovu, E.; Stewart, M. L.; Geiser, F.; Brun, R.; Maser, P.; Wallace, L. J.; Burchmore, R. J.; Enyaru, J. C.; Barrett, M. P.; Kaminsky, R.; Seebeck, T.; de Koning, H. P., Mechanisms of arsenical and diamidine uptake and resistance in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 1003-1008.

Parte Experimental

9. Bridges, D. J.; Gould, M. K.; Nerima, B.; Maser, P.; Burchmore, R. J.; de Koning, H. P., Loss of the high-affinity pentamidine transporter is responsible for high levels of cross-resistance between arsenical and diamidine drugs in African trypanosomes. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 1098-1108.
10. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
11. Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D., Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710-718.
12. Buckner, F. S.; Verlinde, C. L.; La Flamme, A. C.; Van Voorhis, W. C., Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2592-2597.
13. Dardonville, C.; Fernandez-Fernandez, C.; Gibbons, S. L.; Jagerovic, N.; Nieto, L.; Ryan, G.; Kaiser, M.; Brun, R., Antiprotozoal activity of 1-phenethyl-4-aminopiperidine derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (9), 3815-3821.
14. Jennings, F. W.; Gray, G. D., Relapsed parasitaemia following chemotherapy of chronic *T. brucei* infections in mice and its relation to cerebral trypanosomes. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **1983**, *7*, 147-154.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

9. Conclusiones generales

Con el objetivo de optimizar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos dicatiónicos cabeza de serie de derivados bis(2-iminoimidazolidinio) (**2 - 5**) y bisguanidinio (**7 - 8**), más específicamente su permeabilidad en la BHE, para poder conseguir moléculas activas en la fase tardía de la enfermedad del sueño, se sintetizaron tres series de derivados de polaridad reducida. Para modular la polaridad de estos compuestos, se probaron dos aproximaciones basadas en (1) la disminución de la basicidad de la molécula mediante la introducción de sustituyentes *N*-alcoxilo sobre los nitrógenos N1 de los anillos de imidazolina o de las guanidinas, y la introducción de átomos electronegativos (F, Cl) en los anillos aromáticos del espaciador difenílico; (2) la introducción de sustituyentes alquilo sobre los nitrógenos de las guanidinas para aumentar su lipofilia.

Se sintetizó una serie de 18 derivados de los compuestos cabeza de serie bis(2-iminoimidazolidina) **2 - 5** introduciendo grupos alcoxilos e hidroxilos (OMe, OEt, OBn, OTHP, OH) sobre el N1 de los anillos de imidazolina. Siete de estos compuestos (**33a-b**, **34b,d**, **35a** y **36a,f**) fueron sintetizados mediante una metodología "one pot" puesta a punto en nuestro grupo de investigación. Once de los compuestos fueron sintetizados mediante la purificación y caracterización de las tioureas intermedias correspondientes y posterior reacción de ciclación para obtener los productos finales **33c**; **34a,c**; **35b-c**; **36b-c**. Los compuestos con R = OH fueron obtenidos mediante la desprotección del grupo THP presente en los compuestos **33c - 36c**.

Además, fueron sintetizadas una serie de 10 derivados de los compuestos cabeza de serie bisguanidínicos **7 - 8** durante la realización de esta tesis. En cuatro de estos compuestos se introdujeron grupos alcoxilos e hidroxilo (OH, OMe, OEt, OBn, OTHP) sobre un nitrógeno del grupo guanidinio y en seis compuestos fueron introducidos grupos alquílicos (Me, Et, *i*Pr). Todas las series de alcoxi y alquilguanidinas fueron obtenidas protegidas por el grupo etoxicarbonilo. En esta tesis se puso a punto la desprotección de este grupo mediante una hidrólisis básica.

Finalmente, se sintetizaron una serie de 5 compuestos derivados de los compuestos cabeza de serie **2** introduciendo un átomo de fluor (**83a - 86a**) o uno de cloro (**87a**) sobre los anillos aromáticos del esqueleto *N*-fenilbenzamida presente en esta molécula.

Conclusiones generales

Con la finalidad de comprobar si nuestras aproximaciones para bajar la basicidad de los compuestos cabeza de serie funcionaban, se puso a punto una novedosa metodología para medir el pK_a de serie de compuestos por espectroscopia UV mediante el uso de placas de 96 pocillos. Hemos medido el pK_a de 19 de los compuestos sintetizados en esta tesis. Así, hemos comprobado que la introducción de grupos alcoxilos sobre el nitrógeno N1 del anillo de imidazolidina disminuye significativamente la basicidad de estos compuestos en aproximadamente 2 unidades de pK_a . También hemos observado que la introducción de un átomo de fluor o cloro sobre uno de los anillos aromáticos de la *N*-fenilbenzamida tiene un efecto menos pronunciado sobre la basicidad de estas moléculas (0.2 – 0.7 unidades de pK_a). Además, la magnitud del efecto del átomo de halógeno sobre el pK_a de la molécula depende de qué anillo sustituye, siendo más marcado cuando ocurre en el anillo A y mucho más débil en el anillo B.

Con la finalidad de conocer la capacidad tripanocida de las nuevas moléculas sintetizadas, hemos probado su actividad tanto *in vitro* contra *T. brucei* como *in vivo* en modelos murinos de fase temprana y, para los más efectivos, de fase neurológica de la TAH. Además, se comprobó la bioactividad *in vitro* de estos compuestos contra otros protozoos parásitos tales como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum*.

En comparación con los compuestos cabeza de serie todos los nuevos derivados de bis(2-iminoimidazolidina), salvo **33e**, resultaron tener una actividad inferior, tanto en los ensayos *in vitro* como en los ensayos *in vivo* en el modelo STIB900 de infección aguda que reproduce la fase temprana (hemolinfática) de la TAH. En estas series, los derivados *N*-hidroxilados fueron los más activos aunque solo el derivado **33e** resultó 100% curativo por administración intraperitoneal a la dosis de 20 mg/Kg. Debido a los buenos resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* en la fase hemolinfática, se comprobó la actividad del compuesto **33e** en el modelo murino de infección crónica GVR35. El compuesto **33e** resultó moderadamente activo en este modelo de fase neurológica de la TAH aumentando el tiempo de supervivencia libre de parásitos sin llegar a curar el 100% de los ratones. Así pues, el derivado *N*-hidroxilado **33e** con un esqueleto *N*-fenilbenzamida se perfiló como el compuesto más interesante de estas series.

Los resultados de los ensayos *in vitro* contra *T. b. rhodesiense* mostraron que los derivados de guanidina con restos *N*-alcoxilo eran inactivos mientras que los análogos con restos alquílicos Et (**58a**, **65a**) e ⁱPr (**57a**, **66a**) eran los más eficaces contra este parásito, dando actividades en el rango nanomolar bajo, superando a sus respectivos cabezas de serie sin sustituir **7** y **8**. Dos de los nuevos derivados *N*-alquilados (**57a**, **58a**) del cabeza de serie **7**

Conclusiones generales

resultaron 100% curativos *in vivo* en el modelo murino STIB900 de infección aguda cuando fueron administrados por vía intraperitoneal a una dosis de 20mg/Kg. Así pues, se comprobó nuevamente que los mejores candidatos tripanocidas poseían el esqueleto *N*-fenilbenzamida. Además, se comprobó que la adición de sustituyentes alquilos sobre los restos de guanidina aumentaba la lipofilia y mejoraba la actividad *in vitro* e *in vivo* de dichos compuestos.

En el caso de los compuestos fluorados (**83a**, **85a** y **86a**) y clorado (**87a**) se observó una actividad entre baja y moderada en el ensayo *in vitro* contra la cepa *T. b. brucei*. Solo el compuesto **84a** presentó actividad interesante contra este parásito ($CI_{50} = 1.02 \mu M$). Cabe destacar que estos últimos resultados se obtuvieron con una cepa diferente, la cepa *T. b. brucei* (ensayos en la Universidad de Glasgow), usando un protocolo ligeramente diferente a aquel usado para la cepa *T. b. rhodesiense* (ensayos en el Instituto Tropical Suizo) lo que podría explicar las diferencias de actividad encontradas entre ambos laboratorios. Solo los resultados con la cepa *T. b. rhodesiense* nos permitirá comparar estas actividades con las de otras series. En cuanto a la actividad *in vitro* contra los parásitos causantes de la enfermedad de Chagas (*T. cruzi*) y la leishmaniasis (*L. donovani*), los compuestos no presentaron actividad significativa, salvo en el caso del compuesto **34d** que presentó una actividad interesante frente a *L. donovani* ($CI_{50} = 1 \mu M$) con una selectividad frente a células de mamíferos destacable ($IS = 30$). En cambio, todos los compuestos presentaron actividad moderada contra *P. falciparum* con CI_{50} en el rango 0.642 – 6.3 μM .

Con el objetivo de estudiar las propiedades farmacocinéticas de los mejores compuestos tripanocidas sintetizados en esta tesis, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de permeabilidad de la BHE humana (modelo hCMEC/D3), ensayo de unión a proteínas plasmáticas por SPR, y ensayos *in vitro* de metabolismo con fracciones hepáticas humanas con el compuesto **35e**. Se comprobó que ninguno de los compuestos **2**, **33a**, **33e**, **34d**, **35b** y **35d** tenían alta afinidad por la HSA, lo cual supone una alta disponibilidad en sangre para actuar contra el parásito. De manera sorprendente, el compuesto **33e** que posee actividad en la fase neurológica de la enfermedad del sueño en ratones mostró una baja permeabilidad *in vitro* en la línea celular microvascular de cerebro humano. Las diferencias entre especies podrían ser responsables de las diferencias observadas entre los resultados *in vitro* e *in vivo*. Por último, hemos comprobado que el derivado más activo (**33e**) no se metabolizaba *in vitro* por el complejo mARC tal como lo habíamos supuesto. Por lo tanto, parece que dicho compuesto no actúa como profármaco sino como fármaco gracias a su actividad intrínseca sobre *T. brucei* ($CI_{50} = 0.888 \mu M$).

Conclusiones generales

Finalmente, hemos medido experimentalmente por SPR la constante de afinidad de los compuestos cabeza de serie (**2** - **4** y **7**), de los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos) (**33a**, **33e**; **35b**, **35e**), y de los derivados bisguanidínicos (**57a**, **58a** y **65a**) por tres tipos de oligonucleótidos con secuencias AATT, (AT)₄ y (CG)₄. Se comprobó que los derivados bis(2-iminoimidazolidínicos) **33a**, **33e**, **35b**, **35e** y los derivados bisguanidínicos **57a**, **58a** y **65a** poseen mayor afinidad por los oligonucleótidos AATT y (AT)₄ vs (GC)₄ confirmándose que son ligandos del surco estrecho específicos de secuencias AT. Los compuestos derivados de la *N*-fenilbenzamida (**33a** y **33e**) mostraron poseer la mayor afinidad por los oligonucleótidos AATT y (AT)₄ entre todos los compuestos probados, recalcando el potencial de dicho esqueleto de *N*-fenilbenzamida para el diseño de ligandos específicos del surco estrecho. El compuesto **33e** que posee actividad *in vivo* en la fase neurológica de la TAH mostró mayor afinidad que el compuesto cabeza de serie **2**, en particular por el oligonucleótido de secuencia AATT ($K_A = 130 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Puesto que el genoma mitocondrial de *T. brucei* posee una alta cantidad de estas secuencias, estos resultados podrían indicar que el mecanismo de acción de **33e** está relacionado con su unión al ADN mitocondrial e inhibición de la transcripción del ADN.

