

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Química Orgánica I



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevos inhibidores de proteínas quinasas como tratamiento innovador  
para enfermedades neurodegenerativas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Irene García Salado**

**Madrid, 2014**

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



**TESIS DOCTORAL**

**NUEVOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS  
COMO TRATAMIENTO INNOVADOR PARA  
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

**M<sup>a</sup> Irene García Salado**

**Madrid 2014**



Neurodegenerative diseases are defined as hereditary and sporadic conditions which are characterized by progressive nervous system dysfunction. These disorders are often associated with atrophy of the affected central or peripheral structures of the nervous system. They include diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis among others. Because neurodegenerative diseases strike primarily in mid- to late-life, the incidence is expected to soar as the population ages. For that reason, finding treatments and cures for neurodegenerative diseases is a goal of increasing urgency.

Protein Kinases are key regulators of cell function that constitute one of the largest and most functionally diverse gene families. By adding phosphate groups to substrate proteins, they direct the activity, localization and overall function of many proteins, and serve to orchestrate the activity of almost all cellular processes.

Nowadays protein kinases have emerged as one of the promising therapeutic areas because of the crucial role kinases play in several diseases.

In this work we describe the design, synthesis, biological evaluation and cellular assays of different protein kinase inhibitors (CK1 and LRRK2) as an innovative treatment for different neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases and Amyotrophic lateral sclerosis.

During recent years, several studies have highlighted the importance of protein kinase CK1 in neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder involving specific neurons of the hippocampus, neocortex, and other regions of the brain. Co-localization of protein kinase CK1 and its substrates, proteins tau and TDP-43, in Alzheimer's disease brains suggests a clear function for protein kinase CK1 in the abnormal processing of these proteins.

Parkinson's disease is characterized by progressive degeneration not only of the dopaminergic nigrostriatal system, responsible for the core motor symptoms, but also by involvement of many other neuronal systems and organs. CK1 phosphorylates the protein  $\alpha$ -synuclein giving rise to the Lewy bodies, the main hallmark of this pathology.

Amyotrophic lateral sclerosis is a neurodegenerative disease that primarily targets motor neurons resulting in progressive paralysis and death within a few years from onset. The low prevalence of ALS detracts efforts for basic research. However, recently hyperphosphorylated cytoplasmic and intranuclear inclusions of TDP-43 have been found in brains of patients with Amyotrophic lateral sclerosis. Moreover, it was reported that different sites on the recombinant TDP-43 are phosphorylated by CK1.

Regarding the discovery and design of innovative CK1 inhibitors, three different strategies have been developed. In the first one, based on the substrate, several modifications of described CK1 inhibitors (imidazoles, PF-670462) have been designed and synthesized. From all these chemical modifications one hit compound has showed good properties as pharmacological tool. For the second strategy, a chemical genetic approach has been followed arising a new family of selective CK1 inhibitors in the nanomolar range, able to reduce TDP-43 phosphorylation, predicted as blood brain barrier penetration and presenting excellent pharmacokinetic properties. The third strategy consists in finding new leads following a virtual screening of our in-house chemical library and a commercial library. From this strategy a new compound has emerged as a promising lead that could be modified in the future.

Protein kinase LRRK2 is involved in Parkinson's disease. LRRK2 is a protein kinase located in the cytoplasm of the cell that interacts with parkin, but not

with  $\alpha$ -synuclein; parkin is a ligase associated with sinfilin, a protein that interacts with  $\alpha$ -synuclein. Therefore, mutation G2019S in this protein kinase is the main cause of the genetic cases of this pathology. For this reason, the search of selective and permeable inhibitors to pass the blood brain barrier is a promising challenge for the treatment of this disease.

Regarding the search of LRRK2 inhibitors, a biology oriented synthesis (*BIOS*) has been developed. Starting from the oxoindol core, different modifications have been performed in order to improve the inhibitory potency and obtain permeable compounds to blood brain barrier. Innovative and selective kinase inhibitors have been discovered in the nanomolar range, able to cross the blood brain barrier and showing anti-inflammatory properties resulting promising candidates to be further explored for Parkinson disease treatment.



***AGRADECIMIENTOS***

---



A mi familia, y en especial a mis padres, por vuestro apoyo incondicional, cariño y ayuda en todo momento. Mamá, eres la mejor! Papá, gracias por tu apoyo siempre! Vic, gracias por todos los buenos momentos! Abuelo, gracias porque a pesar de una guerra y una posguerra elegirías vivir otra vez tu propia vida sin cambiar nada, un gran ejemplo de fortaleza! A Ángel, Rosa y Lucía, porque nunca hemos sido cuatro sino siete.

Fernando, gracias por acogerme tan bien en aquellas prácticas y enseñarme todo lo que se sobre RMN, muchas gracias! Aurelio, por ese año de máster que pasé en tu laboratorio, aprendí muchísimo y lo pasé muy bien. Por tu ayuda y disposición en todo momento!!

Dani, que te voy a contar...gracias por tu ayuda en todo momento, por tu apoyo en mis momentos bajos, por las risas, los aperitivos...si hasta te has ganado un diploma al amigo listillo!!

Carmen, mi 'no oficial' directora de tesis, que me has ayudado y enseñado como si lo hubieras sido! He heredado casi casi tu ojo de halcón! muchas gracias por tu cercanía, por pensar siempre en nosotros y por esas terapias en los momentos de estrés. Nunca olvidaré nuestro gran hermano en el sillón rojo de Florencia!

Ana, sabes que soy mujer de pocas palabras... así que muchísimas gracias, gracias por darme esta oportunidad, por confiar en mí, por tu cariño y desvivirte por los tuyos, eres una jefa estupenda y mejor persona. Siempre has sabido expresar una palabra de fortaleza en los momentos flojos, tu entusiasmo y optimismo es contagioso. Me siento realmente orgullosa de poder decir que he pertenecido a tu grupo de trabajo y que además de jefa has sido una excelente persona humana, de las que ya pocas quedan. Eres todo un ejemplo de mujer trabajadora y madre de familia! Una superwoman!

Inés, de no ser por ti nada de esto hubiera ocurrido, te estaré agradecida toda la vida. A mis amigos de la uni: Alberto, Laura, María, Vincent e Inés, por esas risas que siempre nos echamos y esas tortitas que siempre tendremos pendientes!!

Yessi, Sole y Tamara por ser mis tres soles y alegrarme siempre la vida. Mariano, gracias por estar ahí, en lo bueno y en lo malo!

Jose, Ana, Josefa, Mario, Martín, Dani (porque además de mi jefe eres mi compi, aunque no quieras), Valle, Ignacio, Miriam, Placi, Silvi, Larissa, Mônica, Victor y Leti me lo he pasado muy muy bien con vosotros!!! dicen que es más fácil trabajar si el ambiente es bueno, pues con vosotros lo es!!! Mis comienzos en el 310, que fueron divertidísimos!!! nunca me he arrepentido más de tener hipo!

Miri, lo que nos hemos podido reír, tus frases célebres, tu vómito de extraterrestre de postre, ese 'viva cojla', que me dio el salto a un viernes tarde libre...eres una crack! nunca pierdas esa sonrisa!! Valle, muchísimas gracias por tu ayuda en todo momento, me lo he pasado muy bien contigo!!! seguro que te irá genial hagas lo que hagas en la vida! Silvi!!!! gracias por todas las risas, los concursos de música, esa comida tan maravillosa de los aperitivos! siempre estará tu recuerdo en este centro...jajajaja!! Anita y Josefa, por estar ahí en los momentos difíciles, que en los buenos estamos todos! Josephine eres todo un descubrimiento! Cremita top top... Anita...eres the next one!!!! Mucha mucha suerte y mucha muchísima paciencia contigo misma!!! Mario, gracias por todo chato! Los comienzos con vosotros en tu laboratorio fueron grandiosos!!! la que liaste por querer dejar de decir palabras del madriz profundo...Bea, que te voy a decir? Disfrutemos de la vida! me encantan nuestros trayectos de una parada en metro! Eres un encanto de chica! Y dentro de nada estarás en esta vorágine! Mônica, gracias por esas conversaciones

camino de nuevos ministerios, mi brasileira favorita! Y por todo el brigadeiro! Feli!!! Mi Mariñas favorito! Qué bien que me lo he pasado contigo! aunque hasta las narices de las anillas de plástico, que lo sepas!!! Luismi, eres una gran persona!! Gracias por esas conversaciones científico-políticas en el jardín, siempre tan interesantes! Jose, gracias por los divertidos momentos vividos! Nuria, Ruth, Paco, Nieves, Aida, Oskía, Lole, Marta, Pili y Guada, muchas gracias!

Conny and Chris, thank you very much for your help during my stay in Darmstadt!!!!

Lola, Sole y Ángel, gracias por vuestra ayuda con la RMN a diferentes temperaturas. Araceli, Maite, Elisa, May, Sergio y Pablo, muchas gracias por estar siempre dispuestos a echarme una mano y hacerme los experimentos a toda prisa! Tico, sé que he sido muy pesada con los microanálisis, pero muchas gracias!

Concha, gracias por tu eficiencia y rapidez con los ensayos biológicos!!! Maribel y Santiago, gracias por acogerme en vuestros laboratorios!

Prof. Elguero, aunque usted no lo sepa he aprendido mucho con sus publicaciones y apuntes sobre RMN y equilibrio químico, mil gracias!

A todos los que han ayudado a que este trabajo haya salido adelante, el grupo de la Dra. Ana Pérez de Biomédicas, el grupo de la Dra. Rosa M. Arahuetes, la Dra. Maite Solas de biología y la Dra. Begoña G. Miguel, el grupo de la Dra. Francisca Vicente, Dr. Brian Kramer y Dra. Magalie Lecourtois; muchísimas, muchísimas gracias!

Antonio, gracias por estar a mi lado en todo momento, por tu apoyo, cariño, paciencia y alegría en todo momento, has aguantado como un campeón mis cambios de humor, mis agobios! Pero por fin esto ha terminado y en gran parte ha sido gracias a ti!



## ***ÍNDICE***

---



<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
1. Bases moleculares comunes de las enfermedades neurodegenerativas ..	14
1.1. Neuroinflamación.....	14
1.2. Agregación proteica .....	15
1.3. Excitotoxicidad.....	16
1.4. Estrés oxidativo.....	17
2. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas .....	19
2.1. Proteínas quinasas .....	20
2.2. Enfermedades neurodegenerativas y proteínas quinasas .....	25
2.2.1. Enfermedad de Alzheimer .....	25
2.2.2. Enfermedad de Parkinson .....	32
2.2.3. Esclerosis lateral amiotrófica .....	37
2.3. Caseína quinasa 1 (CK1) .....	41
2.4. Quinasa con repeticiones ricas en leucina 2 ( <i>LRRK2</i> ) .....	44
<b>OBJETIVOS</b> .....	49
<b>DISCUSIÓN Y RESULTADOS</b> .....	53
1. Búsqueda de nuevos inhibidores de CK1 .....	55
1.1. Diseño de nuevos inhibidores de CK1 basada en sustrato.....	56
1.1.1. Síntesis de imidazoles.....	58
1.1.2. Ensayos de la actividad enzimática en CK1 .....	70
1.1.3. Estudio de la disminución de la fosforilación de la proteína TDP-43 inducida por <i>L</i> -BMAA.....	71

## Índice

---

1.1.4. Estudio de la supervivencia de motoneuronas en ausencia de factores tróficos.....	73
1.1.5. Estudio de las propiedades farmacocinéticas y seguridad farmacológica.....	74
1.1.5.1. Determinación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica .....	76
1.1.5.2. Estudios de inhibición de citocromos.....	79
1.1.5.3. Estudio de las propiedades de seguridad.....	80
1.2. Búsqueda de nuevos inhibidores mediante cribado biológico de quimiotecas.....	85
1.2.1. Optimización de los cabezas de serie .....	90
1.2.1.1. Optimización de <b>MR-2.4</b> .....	90
1.2.1.2. Optimización de <b>MR-3.15</b> .....	96
1.2.2. Estudio del modo de unión a la enzima.....	105
1.2.3. Estudio de la selectividad frente a otras proteínas quinasas ..	109
1.2.4. Estudios en modelos celulares de los inhibidores de CK1δ ....	110
1.2.4.1. Modelos de neuroprotección .....	110
1.2.4.2. Estudios de neurogénesis.....	113
1.2.5. Modelos <i>in vitro</i> de enfermedades neurodegenerativas .....	115
1.2.5.1. Modelo celular de esclerosis lateral amiotrófica .....	115
1.2.5.2. Modelo celular de la enfermedad de Parkinson .....	118
1.2.6. Estudio de las propiedades farmacocinéticas y seguridad farmacológica.....	119
1.2.6.1. Determinación del paso de la barrera hematoencefálica .....	120
1.2.6.2. Estudio de la farmacocinética <i>in vivo</i> del Benzotiazol 83.....	122

1.2.6.3.	Evaluación de la seguridad .....	123
1.2.7.	Estudios de eficacia en modelos animales .....	128
1.2.7.1.	Protección de los inhibidores de CK1 $\delta$ frente a la toxicidad de TDP-43 en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	128
1.2.7.2.	Protección frente al daño causado por LPS en ensayos <i>in vivo</i> .....	131
1.3.	Búsqueda de inhibidores de CK1 $\delta$ basada en la estructura de la proteína quinasa .....	134
1.3.1.	Búsqueda de sitios de modulación alostérica.....	140
2.	<b>Búsqueda de nuevos inhibidores de LRRK2</b> .....	145
2.1.	Búsqueda de nuevos inhibidores de LRRK2 basados en sustrato.....	145
2.1.1.	Ensayos de la actividad enzimática en LRRK2 .....	170
2.1.2.	Estudio de la selectividad frente a otras proteínas quinasas ..	173
2.1.3.	Estudios en modelos celulares de los inhibidores de LRRK2 .	174
2.1.3.1.	Modelos de neuroprotección .....	174
2.1.4.	Modelos <i>in vitro</i> de enfermedades neurodegenerativas .....	176
2.1.4.1.	Modelo celular de la Enfermedad de Parkinson.....	176
2.1.5.	Estudio de las propiedades farmacocinéticas .....	177
2.1.5.1.	Determinación del paso de la barrera hematoencefálica .....	177
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	181
	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	185
1.	<b>Síntesis de imidazoles</b> .....	189
2.	<b>Síntesis de tiazoles y benzotiazoles</b> .....	227

## Índice

---

3. Síntesis de isatinas.....	277
4. Medida de la inhibición de CK1 por el método Kinase Glo <sup>®</sup> .....	317
5. Medida del paso de la barrera hematoencefálica por el método PAMPA.....	318
6. Evaluación de la toxicidad de los inhibidores de CK1 $\delta$ en un model de pez cebra.....	319
7. Determinación de cavidades en la superficie de CK1 $\delta$ .....	320

***ABREVIATURAS***

---



**3-OMD:** 3-*O*-metildopa

**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina

**$\Delta G$ :** incremento de la energía libre de Gibbs

**$\Delta v$ :** incremento de desplazamiento químico

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADP:** adenosín difosfato

**Ac.:** ácido

**AcOEt:** acetato de etilo

**AcOH:** ácido acético

**ADME-tox:** absorción, distribución, metabolismo y excreción-toxicidad

**ALK:** del inglés: *anaplastic lymphoma kinase*

**AMP:** adenosín monofosfato

**AMPA:** del inglés: *amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

**Anh.:** anhidro

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**Asp:** aspártico

**Asn:** asparagina

**ATP:** adenosin trifosfato

**$B_0$ :** campo magnético

**BHE:** barrera hematoencefálica

**BIOS:** del inglés: *biology-oriented synthesis*

**BRaf:** del inglés: *serine/threonine-protein kinase B-raf*

**c:** cuadruplete

**°C:** grados centígrados

**C9ORF72:** del inglés: *chromosome 9 open reading frame 72*

**CDK5:** quinasa dependiente de ciclina 5

**CI<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria 50

## Abreviaturas

---

**CK1:** caseín quinasa 1

**C<sub>max</sub>:** concentración máxima

**COR:** del inglés: *C-terminal of Roc*

**CYP:** citocromo P

**d:** doblete

**Da:** dalton

**DAPI:** 4,6-diamino-2-fenilindol

**dd:** doblete de dobletes

**DDC:** dopa descarboxilasa

**DMAP:** 4-dimetilaminopiridina

**DMF:** *N, N*-dimetilformamida

**DMSO:** dimetisulfóxido

**dt:** doblete de tripletes

**DYRK1A:** del inglés: *dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*

**EDC:** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

**EGFR:** del inglés: *epidermal growth factor receptor*

**ELA:** esclerosis lateral amiotrófica

**eq.:** equivalente

**ESI (MS):** del inglés: *electrospray ionization mass spectrometry*

**EtOH:** etanol

**FLT3:** del inglés: *Fms-like tyrosine kinase 3*

**FRET:** del inglés: *fluorescence resonance energy transfer*

**GAL4/UAS:** del inglés: *GAL4/upstream activating sequence*

**GDNF:** del inglés: *glial cell-derived neurotrophic factor*

**GFAP:** del inglés: *glial fibrillary acidic protein*

**Glu:** glutamato

**grad.:** gradiente

- GSK3 $\beta$** : glucógeno sintasa quinasa 3  $\beta$
- GTPasa**: guanosina trifosfatasa
- Her2**: del inglés: *cell surface receptor tyrosine kinases*
- hERG**: del inglés: *human ether-à-go-go-related gene*
- HMBC**: del inglés: *heteronuclear multiple bond correlation*
- $^1\text{H}$ -RMN**: resonancia magnética de protón
- HSQC**: del inglés: *heteronuclear single quantum coherence*
- hTDP-43**: TDP-43 humana
- Hz**: hertzios
- Ile**: isoleucina
- hpf**: horas *post* fertilización
- HPLC**: cromatografía líquida de alto rendimiento
- IGF1R**: del inglés: *insulin-like growth factor 1 receptor*
- IL-1 $\beta$** : interleuquina 1 $\beta$
- i.p.**: inyección intraperitoneal
- J**: constante de acoplamiento
- JAKs**: del inglés: *Janus kinase*
- JNK**: del inglés: *c-Jun N-terminal kinase*
- K**: grados kelvin
- Kcal**: kilocalorías
- KDa**: kilodalton
- L-BMAA**: del inglés:  $\beta$ -*N*-methylamino-L-alanine
- LCK**: del inglés: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*
- LC/MSD**: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
- Leu**: leucina
- LPS**: lipopolisacárido

## Abreviaturas

---

**LRRK2:** del inglés: *leucine rich repeat kinase 2*

**Lys:** lisina

**m:** múltiple

**MAO-B:** monoamino oxidasa B

**MAOs:** monoamino oxidasas

**MAP-2:** del inglés: *microtubule-associated protein 2*

**MAPKAPK2:** del inglés: *MAP kinase-activated protein kinase 2*

**MAP3K1:** del inglés: *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*

**MARK:** del inglés: *microtubule affinity-regulating kinase*

**MEK1/2:** del inglés: *activador mitogen-activated protein kinase kinase*

**MeOH:** metanol

**MHz:** megahertzios

**MMT-K10:** montmorillonita potásica 10

**mTOR:** del inglés: *mammalian target of rapamycin*

**MW:** microondas

**NMDA:** *N*-metil-D-aspartato

**NOE:** del inglés: *nuclear Overhauser effect*

**NOESY-2D:** del inglés: *nuclear Overhauser effect spectroscopy-2D*

**PAK:** del inglés: *p21-activated kinases*

**PAMPA:** del inglés: *parallel artificial membrane permeability assay*

**PDB:** del inglés: *Protein data bank*

**PDGFRA:** del inglés: *platelet-derived growth factor receptor alpha*

**PDGFRB:** del inglés: *platelet derived growth factor receptor beta*

**PDK1:** del inglés: *phosphoinositide-dependent kinase-1*

**Pe(exp.):** permeabilidad efectiva experimental

**Pe(bibl.):** permeabilidad efectiva bibliográfica

**P.f.:** punto de fusión

**Ph:** fenilo

**PIK3C2A:** del inglés: *phosphoinositide-3-kinase class-2-alpha polypeptide*

**PKC:** proteína quinasa C

**PM:** peso molecular

**p.o.:** administración oral

**PPA:** proteína precursora de amiloide

**PPi:** pirofosfato

**ppm:** partes por millón

**PRKACA:** del inglés: *cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha*

**P-(TDP-43):** fosfo-TDP-43

**ROC:** del inglés: *ras of complex proteins*

**ROCK:** del inglés: *rho-associated protein kinase*

**ROCO:** del inglés: *roco protein family*

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno

**s:** singlete

**S:** score/puntuación

**sept:** septeto

**Ser:** serina

**SGK2:** del inglés: *serine/threonine-protein kinase Sgk2*

**SNC:** sistema nervioso central

**SOD1:** superóxido dismutasa 1

**t:** triplete

**t.a.:** temperatura ambiente

**TARDBP:** del inglés: *TAR DNA-binding protein*

**Tc:** temperatura de coalescencia

**td:** triplete de dobletes

## Abreviaturas

---

**TDP-43:** del inglés: *TAR DNA-binding protein 43 kDa*

**TH:** tirosina hidroxilasa

**THF:** tetrahidrofurano

**Thr:** treonina

**T<sub>max</sub>:** tiempo máximo

**TNF- $\alpha$ :** del inglés: *tumor necrosis factor  $\alpha$*

**t.r.:** temperatura de reflujo

**Tyr:** tirosina

**VEGFRs:** del inglés: *expression of vascular endothelial growth factor receptors*

**VGFRs:** del inglés: *vascular endothelial growth factor*

## ***INTRODUCCIÓN***

---



El descubrimiento de la penicilina a principios del siglo XX por Alexander Fleming, supuso un gran avance en la medicina moderna y la sociedad actual aumentando la esperanza de vida de los seres humanos. Este hecho ha supuesto también, un incremento en la prevalencia de muchas enfermedades asociadas a la edad, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas. El coste a nivel humano y económico derivado de estas patologías, hace que la búsqueda de nuevos fármacos que puedan frenar o curar este tipo de patologías, sea de vital importancia.

Hoy en día se conocen más de un centenar de enfermedades neurodegenerativas; siendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y la esclerosis lateral amiotrófica las más importantes por su incidencia y/o gravedad<sup>1</sup>.

Estas patologías se caracterizan por una pérdida crónica y progresiva de las neuronas en diferentes zonas del sistema nervioso, provocando diversas sintomatologías, como la disminución de la cognición, trastornos del movimiento o espasticidad muscular entre otras<sup>2</sup>. La mayoría de este tipo de enfermedades son esporádicas y la aportación del componente hereditario es mínimo, siendo menor del 10%, aunque algunas enfermedades neurodegenerativas tienen una base genética, como por ejemplo, la paraplesia espástica familiar o el corea de Huntington.

Todos los trastornos neurodegenerativos tienen en común, además de la ya comentada muerte neuronal progresiva, procesos de neuroinflamación, déficit

---

<sup>1</sup> Palop, J. J.; Chin, J.; Mucke, L., A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* **2006**, *443*, 768-773.

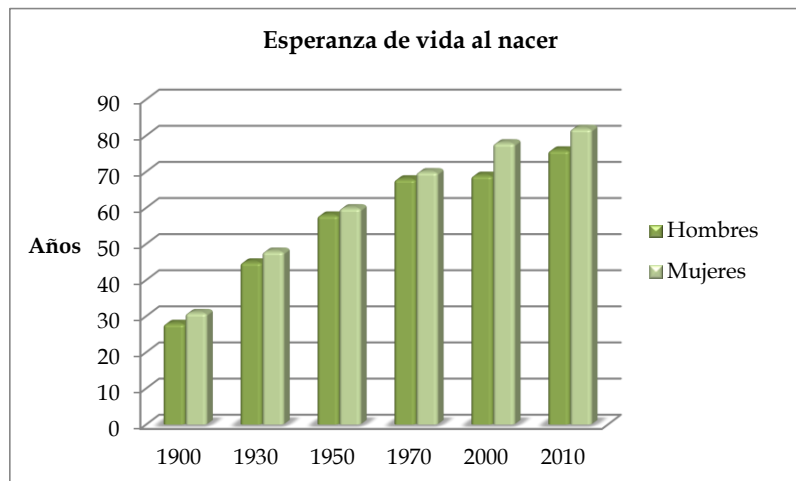
<sup>2</sup> Forman, M. S.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M., Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 1055-1063.

## Introducción

---

en diversos sistemas de neurotransmisores, y modificaciones postraslacionales en diferentes proteínas que conlleva su plegamiento anómalo y/o agregación. Además son de etiología idiopática, es decir, se desconoce la causa que las produce.

El principal factor de riesgo para padecer la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson es la edad, por tanto, debido al aumento de la esperanza de vida (Figura 1), se prevé que el número de enfermos aumente de una manera exponencial en un futuro próximo.



**Figura 1.-** Tendencia de la esperanza de vida hasta el año 2010. Fuente: [http://www.madrimasd.org/blogs/salud\\_publica/2012/03/11/133156](http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2012/03/11/133156)

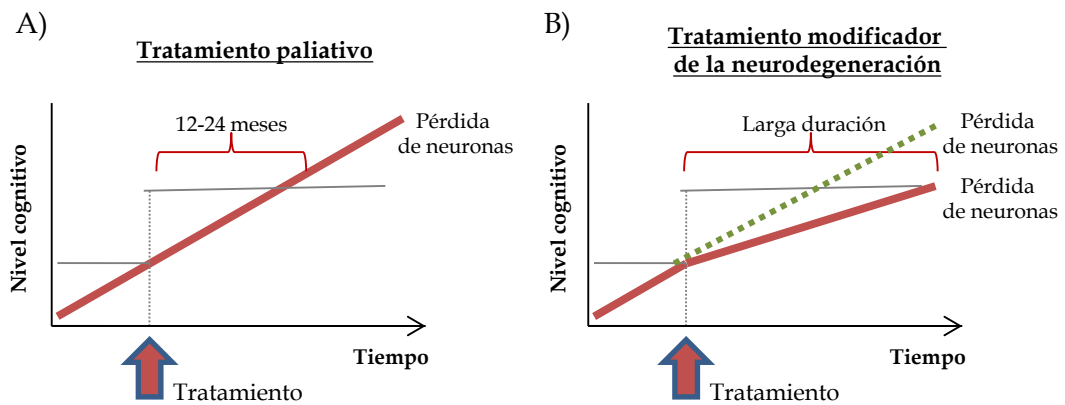
Actualmente no existe un tratamiento eficaz para las enfermedades neurodegenerativas, siendo todos los fármacos aprobados para su tratamiento de tipo paliativo<sup>3</sup>.

Un tratamiento paliativo, mejora temporalmente la sintomatología clínica del paciente, y puede mejorar su calidad de vida un determinado periodo de

---

<sup>3</sup> Lindenberger, E.; Lugassy, M.; Clark, E.; Bixby, K.; Sutcliffe, N.; Shah, R., Neurodegenerative Diseases: Palliative Care From Day One. *J. Pain Symptom Manage.* **2013**, *45*, 318-319.

tiempo, sin embargo, la pérdida neuronal sigue su curso (Figura 2A). Un tratamiento eficaz sería aquel que fuese capaz de modificar la neurodegeneración; es decir, parar totalmente la muerte neuronal o retrasarla notablemente por lo que la pérdida de neuronas disminuiría y se frenaría el curso de la enfermedad aliviando los síntomas clínicos de forma permanente o en periodos mucho más largos (Figura 2B).



**Figura 2.-** A) Tratamiento paliativo para la enfermedad de Alzheimer y cómo evoluciona la pérdida neuronal; B) tratamiento modificador de la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer.

Por todo esto, es urgente y de vital importancia la búsqueda de fármacos eficaces que sean capaces de retrasar, frenar y/o revertir el daño neuronal y así poder curar las enfermedades neurodegenerativas. Este es el objetivo básico del presente trabajo.

## **Introducción**

---

### **1. BASES MOLECULARES COMUNES DE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

Entre los procesos patológicos que pueden causar una pérdida progresiva de neuronas, se encuentran el daño causado por la inflamación, el estrés oxidativo, agentes neurotóxicos, modificaciones postraslacionales anómalas en diferentes proteínas y el déficit de neurotransmisores, como son la acetilcolina y la dopamina.

#### **1.1. Neuroinflamación**

La neuroinflamación es el mecanismo por el cual el sistema nervioso central (SNC) se protege frente a agentes infecciosos, disfunciones fisiológicas y daño celular. La respuesta inflamatoria está mediada por dos sistemas celulares: la glía del sistema nervioso central y los linfocitos, monocitos y macrófagos del sistema hematopoyético<sup>4</sup>.

Las células gliales son las células inmunes del sistema nervioso central y actúan de forma similar a los macrófagos periféricos. Al ser células del sistema inmune, sus funciones principales son la defensa frente a los patógenos, la reparación del tejido dañado y la homeostasis del sistema nervioso.

En la mayoría de los casos, la neuroinflamación es un proceso beneficioso que cesa en el momento en que el daño ha terminado y la homeostasis ha sido restablecida. A pesar de ello, este proceso de neuroinflamación mediante la inflamación de la glía puede contribuir a la cascada inflamatoria que da lugar al daño neuronal progresivo que se observa en las enfermedades neurodegenerativas. La activación de la glía, da lugar a la producción en exceso de varios factores que contribuyen al daño neuronal, como son el óxido

---

<sup>4</sup> Hurley, L. L.; Tizabi, Y., Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotoxic. Res.* **2013**, *23*, 131-144.

nítrico, las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), las especies reactivas de oxígeno y el glutamato<sup>5</sup>.

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas tienen en común la activación de manera crónica del sistema inmune. No se ha determinado todavía qué lleva a ese estado de inflamación crónica aunque posiblemente, puede ser provocado por la agregación de proteínas o al mal plegamiento de éstas, a proteínas de choque térmico y a patrones moleculares asociados a daño<sup>6</sup>. Así, la neuroprotección frente a la inflamación crónica está siendo cada vez más estudiada como freno de la pérdida neuronal progresiva que se observa en estas patologías neurológicas.

### 1.2. Agregación proteica

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se han encontrado agregados de proteínas o proteínas mal plegadas. El tipo de proteína es dependiente de la enfermedad neurodegenerativa en cuestión. Así, en la enfermedad de Alzheimer encontramos agregados de proteína tau formando los ovillos neurofibrilares fuera de la célula y agregados de  $\beta$ -amiloide formando las placas seniles en el interior de la misma<sup>7</sup>. En la enfermedad de Parkinson existen los cuerpos de Lewy, formados por una acumulación de  $\alpha$ -sinucleína<sup>8</sup>, mientras que en la esclerosis lateral amiotrófica, la proteína mutada de superóxido dismutasa (SOD1) forma inclusiones en la forma

---

<sup>5</sup> Spencer, J. P.; Vafeiadou, K.; Williams, R. J.; Vauzour, D., Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol. Aspects Med.* **2012**, *33*, 83-97.

<sup>6</sup> Amor, S.; Puentes, F.; Baker, D.; van der Valk, P., Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* **2010**, *129*, 154-169.

<sup>7</sup> Lee, V. M.; Goedert, M.; Trojanowski, J. Q., Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 1121-1159.

<sup>8</sup> Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M.,  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6469-6473.

## **Introducción**

---

familiar de la enfermedad y la proteína unida a ADN denominada TAR de 43 KDa (TDP-43) migra desde el núcleo al citosol, formando agregados de proteína hiperfosforilada<sup>9</sup>.

Diversas estrategias terapéuticas encaminadas a la reducción de esta agregación proteica son las que actualmente están en estudio para muchas de estas patologías.

### **1.3. Excitotoxicidad**

La excitotoxicidad es el proceso patológico por el cual las neuronas son dañadas y destruidas por la sobreactivación de receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato, como los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Las excitotoxinas como el NMDA y el ácido kaínico que se unen a estos receptores, así como altos niveles patológicos de glutamato, pueden provocar la excitotoxicidad al permitir que niveles elevados de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) entren en la célula<sup>10</sup>. Esta entrada de calcio activa una serie de enzimas, incluyendo las fosfolipasas, las endonucleasas, y proteasas tales como la calpaína, las cuales continúan dañando estructuras celulares como las que componen el citoesqueleto, la membrana y el ADN.

La excitotoxicidad del glutamato es una de las causas por las que se piensa que puede producirse la disfunción neuronal y la degeneración. Además, se ha relacionado con enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica, la

---

<sup>9</sup> Neuman, M.; Sampathu, D. M.; Kwong, L. K.; Truax, A. C.; Micsenyi, M. C.; Chou, T. T.; Bruce, J.; Schunck, T.; Grossman, M.; Clarck, C. M.; McCluskey, L. F.; Miller, B. L.; Masliah, E.; Mackenzie, I. R.; Feldman, H.; Feiden, W.; Kretschmar, H. A.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M., Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **2006**, *314*, 130-133.

<sup>10</sup> Arundine, M.; Tymianski, M., Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **2003**, *34*, 325-337.

esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.

Las primeras observaciones de los efectos tóxicos del glutamato fueron llevadas a cabo por Lucas y Newhouse<sup>11</sup>, describiendo la degeneración de la retina al inyectar glutamato en ratones. Se ha demostrado que la afluencia de calcio es esencial para la excitotoxicidad del glutamato; esto es, en presencia de calcio la toxicidad del glutamato se ve aumentada y viceversa.

Por otro lado, una de las características de la neurodegeneración excitotóxica es la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico es capaz de reaccionar con radicales libres de superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peroxinitrito, que produce la nitración y la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y daño en el ADN produciendo la muerte celular<sup>12</sup>.

### 1.4. Estrés oxidativo

La mitocondria, es el orgánulo de la célula encargada de llevar a cabo la respiración, y también de producir las especies reactivas de oxígeno (ROS). En condiciones fisiológicas, entre el 1-2% de la cantidad de oxígeno que entra en la mitocondria es convertido en ROS y neutralizado por los antioxidantes endógenos. Cuando se produce una entrada masiva de calcio en la neurona<sup>13</sup> se aumenta la actividad mitocondrial aumentando el número de ROS, que aumenta a su vez, la producción de óxido nítrico o especies reactivas de nitrógeno (RNS). Como se ha comentado anteriormente, el óxido nítrico

---

<sup>11</sup> Lucas, D. R.; Newhouse, J. P., The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch. Ophthalmol.* **1957**, *58*, 193-201.

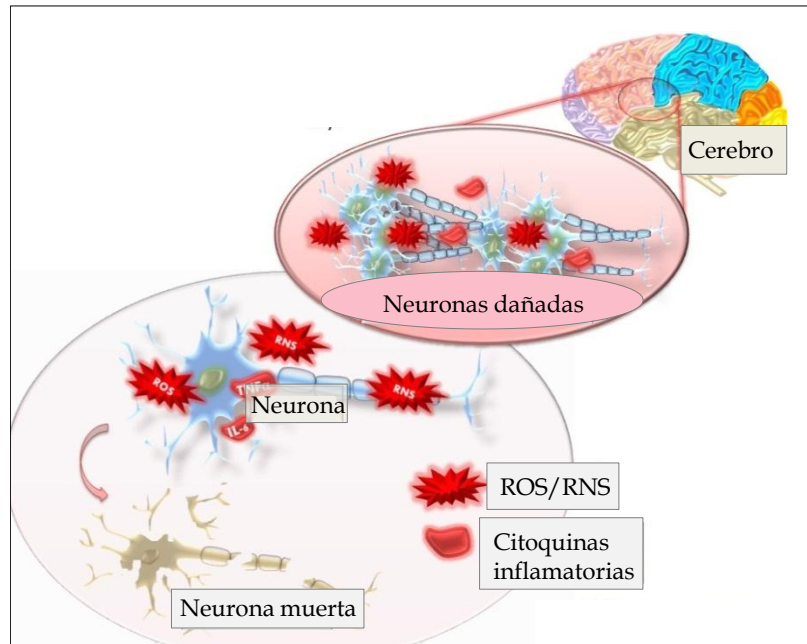
<sup>12</sup> Lau, A.; Tymianski, M., Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pfluegers Arch.* **2010**, *460*, 525-542.

<sup>13</sup> Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I., Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 205-214.

## Introducción

---

reacciona rápidamente con aniones superóxido dando lugar a peroxinitrito, que es la especie de nitrógeno más reactiva.

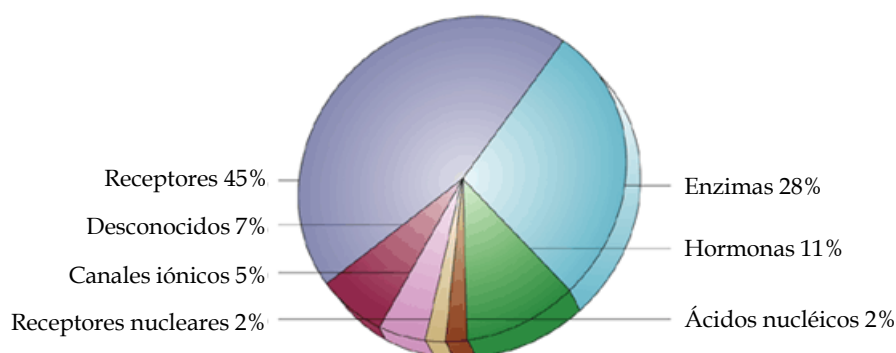


**Figura 3.-** Daño causado por el estrés oxidativo en las neuronas.

El desequilibrio entre la formación y la eliminación de las especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno da lugar al estrés oxidativo (Figura 3).

## 2. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las estrategias que suelen seguirse como aproximación terapéutica para el descubrimiento de fármacos eficaces en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, se basan en localizar dianas terapéuticas implicadas en las patologías moleculares descritas anteriormente<sup>14</sup>. Una diana terapéutica es una macromolécula biológica que desempeña una función esencial en una enfermedad. Los científicos calculan que, hoy en día, existen unas 8.000 dianas terapéuticas conocidas. Estas dianas pueden ser factores secretados, receptores de la superficie celular o vías de señalización intracelular (Figura 4)<sup>15</sup>.



**Figura 4.-** Tipos de dianas terapéuticas.

Recientemente, se ha demostrado que ciertas proteínas quinasas están sobreactivadas e implicadas en la fosforilación y posterior agregación proteica presentes en varios desórdenes, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y la esclerosis lateral amiotrófica. Dado que muchos de los últimos

<sup>14</sup> Trippier, P. C.; Labby, K. J.; Hawker, D. D.; Mataka, J. J.; Silverman, R. B. Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: Strength in numbers. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3121–3147.

<sup>15</sup> Bleicher, K. H.; Böhm, H. J.; Müller, K.; Alanine, A. I., Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 369-378.

## **Introducción**

---

fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer son inhibidores de proteínas quinasas, esta tesis plantea la validación de ciertas proteínas quinasas como dianas farmacológicas útiles en enfermedades neurodegenerativas y el descubrimiento, síntesis y optimización de sus inhibidores selectivos como candidatos a fármacos eficaces.

### **2.1. Proteínas Quinasas**

El genoma humano está formado por 518 genes que codifican más de 2000 proteínas quinasas diferentes. Estas proteínas son específicas de Ser, Thr o Tyr; es decir, fosforilan estos aminoácidos en las proteínas sustrato<sup>16</sup>. Las proteínas quinasas son enzimas responsables de la regulación de mecanismos celulares como su muerte y división, el transporte y secreción de moléculas, la función cerebral, regulación de la presión sanguínea, el metabolismo, o la síntesis de proteínas<sup>17</sup>. La desregulación de la actividad de las proteínas quinasas es la responsable de muchas enfermedades, como son, el cáncer, la inflamación o los desórdenes neuronales entre otras<sup>18</sup>.

Las proteínas quinasas conservan su dominio catalítico en secuencia y estructura, sin embargo difieren en cómo se regula su función catalítica.

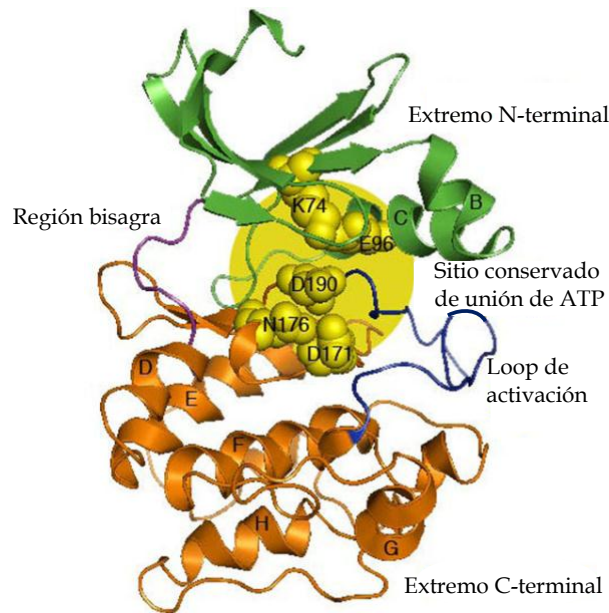
En la Figura 5, se muestra la estructura general de las proteínas quinasas en las que se diferencian las zonas N-terminal y C-terminal (zonas verde y naranja, respectivamente), unidos por una región bisagra (color violeta) donde se sitúa el sitio catalítico.

---

<sup>16</sup> Hanks, S. K.; Hunter, T., Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, *9*, 576-596.

<sup>17</sup> Cohen, P.; Alessi, D. R., Kinase drug discovery-what's next in the field? *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 96-104.

<sup>18</sup> Cheng, H. C.; Qi, R. Z.; Paudel, H.; Zhu, H. J., Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*, 794089-794092.



**Figura 5.-** Modelo de la estructura de la familia de las proteínas quinasas humanas. Este modelo está basado en la estructura de la proteína quinasa MAP3K1.

El reconocimiento del sustrato se produce mediante interacción con ciertos residuos conocido como *loop* de activación (zona azul), del extremo C-terminal. El sitio de unión del sustrato se localiza entre el centro catalítico, el *loop* de activación y las hélices D, F, G y H. La molécula de ATP se une en la región bisagra (zona amarilla) donde encontramos cinco aminoácidos conservados: Lys 74 (K74), que interacciona con los fosfatos en posiciones  $\alpha$  y  $\beta$  del ATP, estabilizándolo; Glu 96 (E96) que forma un puente salino con Lys 74 (K74) incrementando la estabilidad del sistema; Asp 171 (D171) que es la base catalítica para iniciar la transferencia de fosfato mediante la desprotonación de Ser, Thr o Tyr; Asn 176 (N176) que interacciona con un catión divalente posicionando así el fosfato en posición  $\gamma$  de la molécula de

## Introducción

---

ATP, y finalmente el Asp 190 (D190) que se une al catión divalente posicionando también a la molécula de ATP<sup>19</sup>.

Debido a la conservación del sitio catalítico, es importante la búsqueda de compuestos selectivos para evitar efectos secundarios no deseados<sup>20</sup>.

Existen poco más de 20 inhibidores de proteínas quinasas aprobados para el tratamiento de diversas enfermedades humanas<sup>21</sup>. Los primeros inhibidores de proteínas quinasas fueron descubiertos para el tratamiento del cáncer. El primer inhibidor de quinasa comercializado fue imatinib (Glivec®) en el año 2001, por la compañía Gleevec-Novartis, para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y el tumor gastrointestinal del estroma. Sin embargo, está surgiendo un gran interés en el desarrollo de terapias basadas en moduladores de proteínas quinasas para enfermedades inflamatorias crónicas<sup>22</sup> y del sistema nervioso central<sup>23</sup>.

En la Tabla 1, se muestran las estructuras químicas de los inhibidores de proteínas quinasas aprobados recientemente para su uso clínico o que están en fases avanzadas de desarrollo.

---

<sup>19</sup> Matthews, D. J.; Gerritsen, M. E., Protein Kinase Structure, Function, and Regulation en *'Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy'* John Wiley & Sons, Inc. **2010**, 75-117.

<sup>20</sup> Noble, M. E.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N., Protein kinase inhibitors: insights into design from structure. *Science* **2004**, *303*, 1800-1805.

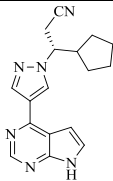
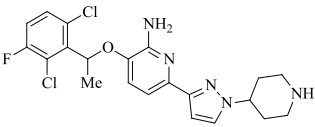
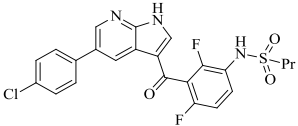
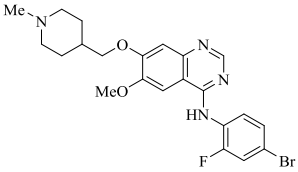
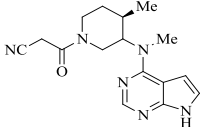
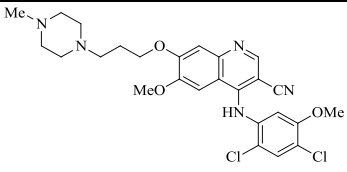
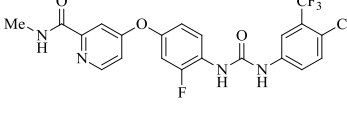
<sup>21</sup> Sawyer, T. K.; Wu, J. C.; Sawyer, J. R.; English, J. M., Protein kinase inhibitors: breakthrough medicines and the next generation. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2013**, *22*, 675-678.

<sup>22</sup> Cohen, P., Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 317-324.

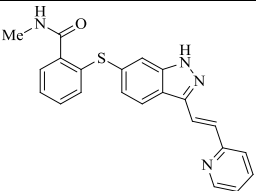
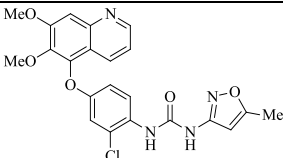
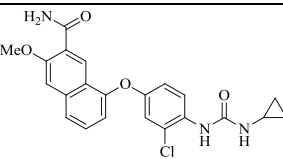
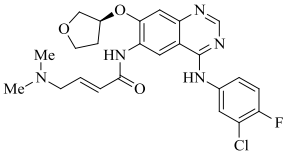
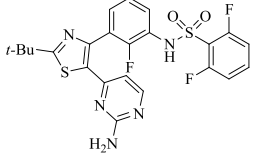
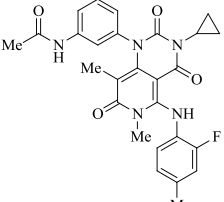
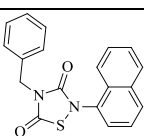
<sup>23</sup> Chico, L. K.; Van Eldick, L. J.; Watterson, D. M., Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 892-909.

## Introducción

**Tabla 1.-** Inhibidores de proteínas quinasas aprobados para su comercialización o en desarrollo clínico desde el año 2011 al 2013.

Nombre	Estructura	Diana farmacológica	Compañía	Año e indicación terapéutica
Ruxolitinib		JAKs	Incyte	2011, mielofibrosis
Crizotinib		ALK/Met	Pfizer	2011, carcinoma de pulmón
Vemurafenib		BRaf	Roche	2011, melanoma
Vadetinib		Varias tirosina quinasas	Caprelsa IPR Pharms	2012, cáncer de tiroides
Tofacitinib		JAKs	Pfizer	2012, artritis reumatoide
Bosutinib		BcrAbl SRC	Pfizer	2012, leucemia
Regorafenib		Varias tirosina quinasas	Stivarga Bayer	2012, cáncer de tiroides

## Introducción

Nombre	Estructura	Diana farmacológica	Compañía	Año e indicación terapéutica
Axitinib		VEGFRs, PDGFRB, c-KIT	Pfizer	2012, carcinoma de riñón
Tivozanib		VGFRs	AVEO Pharms	2012, cáncer de riñón
Lenvatinib		VEGFR2	Eisai	2012, cáncer de tiroides (Japón)
Afatinib		Her2 EGFR	Boehringer Ingelheim	2013, carcinoma de pulmón
Dabrafenib		BRaf	GSK	2013, melanoma metastásico
Trametinib		MEK1/2	GSK	2013, melanoma metastásico
Tideglusib		GSK3β	Noscira	Fase IIb, enfermedad de Alzheimer

Como puede observarse, la indicación terapéutica de la mayoría de estos fármacos son las enfermedades oncológicas; siendo sólo dos, Tofanicitinib y Ruxolitinib, inhibidores de la proteína quinasa JNK, dirigidos a enfermedades inflamatorias y únicamente uno, Tideglusib, para enfermedades neurodegenerativas.

Como se recoge en la Tabla 1, los inhibidores de proteínas quinasas aprobados por las agencias regulatorias son moléculas pequeñas, de bajo peso molecular y generalmente de naturaleza heterocíclica. El desarrollo clínico de estos fármacos para el sistema nervioso central todavía es muy incipiente, ofreciendo un gran campo abierto para la investigación.

## **2.2. Enfermedades neurodegenerativas y proteínas quinasas**

### **2.2.1. Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer es la demencia más común entre las personas mayores y también la patología neurodegenerativa más prevalente, afectando al 66% de los enfermos neurológicos. Es una enfermedad cuya carga en la sociedad, y en especial en los cuidadores y enfermos, está creciendo en los últimos años debido al aumento de la esperanza de vida. En el año 2012 se estimó a nivel mundial en 36 millones de personas las afectadas por esta enfermedad<sup>24</sup> y dado que el principal factor de riesgo es la edad, se calcula que en el año 2050 esta cifra casi se duplicará. En concreto, las predicciones cifran en casi 14 millones de enfermos de Alzheimer en Estados Unidos para el año 2050, mientras que en el 2010 eran sólo 5 millones de enfermos los

---

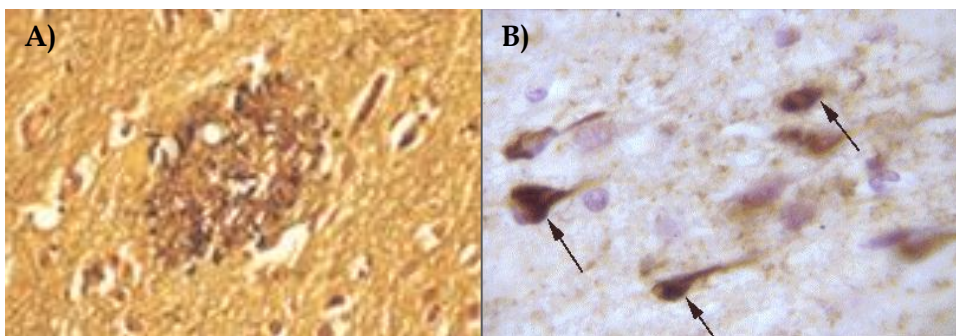
<sup>24</sup> Ikram, M. A.; DeCarli, C., Next frontiers in the genetic epidemiology of Alzheimer's disease. *Eur. J. Epidemiol.* **2012**, *27*, 831-836.

## Introducción

---

censados en este país. A día de hoy, en España 800.000 personas padecen esta patología neurodegenerativa<sup>25</sup>.

Las dos lesiones histopatológicas características de la enfermedad de Alzheimer son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Las placas seniles están relacionadas con la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide, como producto de la ruptura anómala proteolítica de la proteína precursora de amiloide (PPA) en tejidos cerebrales (Figura 6A); mientras que los ovillos neurofibrilares están relacionados con los cambios provenientes de la hiperfosforilación de la proteína tau asociada a los microtúbulos del citoesqueleto de las neuronas<sup>26</sup> (Figura 6B). Estos agregados se encuentran en las zonas del cerebro responsables de la memoria y de la cognición (hipocampo y corteza).



**Figura 6.-** Lesiones histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer; A) placas seniles, B) ovillos neurofibrilares.

La proteína precursora de amiloide (PPA) es una proteína transmembrana que experimenta un proceso no amiloidogénico por acción de la  $\alpha$ -secretasa. Esta enzima realiza un corte en la parte extracelular de la PPA liberando lo que se

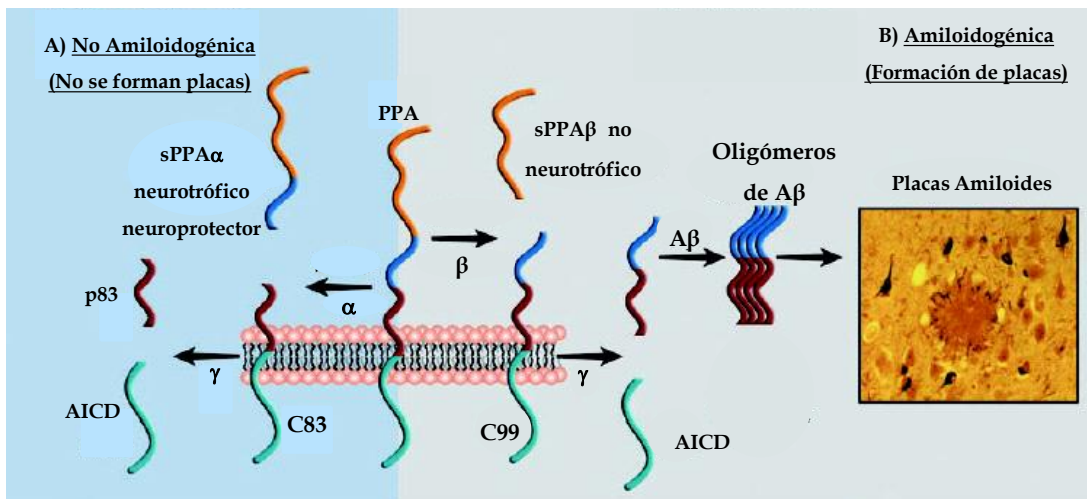
---

<sup>25</sup> Estado del arte de la enfermedad de Alzheimer en España. [http://static.correofarmaceutico.com/docs/2013/06/18/in\\_al.pdf](http://static.correofarmaceutico.com/docs/2013/06/18/in_al.pdf)

<sup>26</sup> De-Paula, V. J.; Radanovic, M.; Diniz, B. S.; Forlenza, O. V., Alzheimer's disease. *Subcell. Biochem.* **2012**, 65, 329-352.

denomina sPPA $\alpha$ , el cual es soluble (Figura 7A) y parece tener un importante papel en la supervivencia y plasticidad neuronal, además de proteger a las neuronas de la excitotoxicidad. También, parece ser fundamental en el desarrollo temprano del sistema nervioso central y en la regulación de la proliferación de las células madre neuronales.

Sin embargo, en la vía amiloidogénica la  $\beta$ -secretasa realiza el corte en la PPA de tal manera que se libera la llamada sPPA $\beta$  (Figura 7B)<sup>27</sup>.



**Figura 7.-** Formación del péptido  $\beta$ -amiloide a partir de la proteína precursora de amiloide (PPA). A) Vía no amiloidogénica que ocurre en condiciones normales. B) Formación del péptido  $\beta$ -amiloide, vía amiloidogénica, y posterior acumulación y formación de las placas seniles.

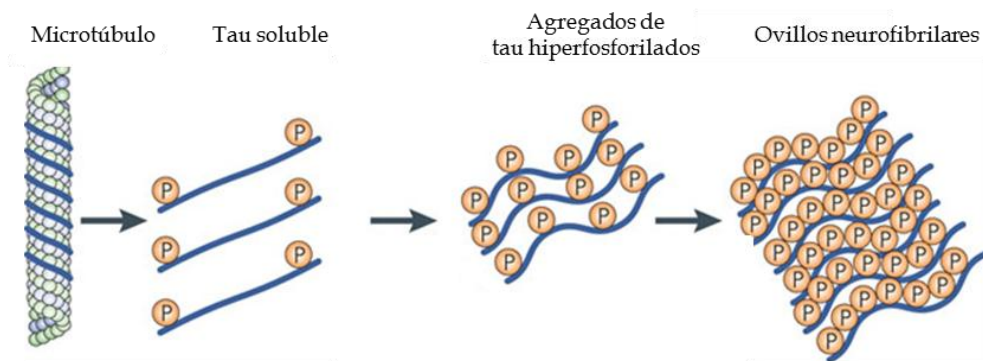
La  $\gamma$ -secretasa actúa en ambas vías procesando el fragmento que queda anclado a la membrana. En el caso de la vía no amiloidogénica, se libera el péptido p83, el cual es soluble y no parece tener una función importante. Pero en la vía amiloidogénica, el péptido liberado es la proteína  $\beta$ -amiloide, que

<sup>27</sup> Sorrentino, P.; Iuliano, A.; Polverino, A.; Jacini, F.; Sorrentino, G., The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 641-652.

## Introducción

puede hacerse insoluble al cambiar de conformación y formar agregados, siendo el componente mayoritario de las placas amiloides.

La otra característica de la enfermedad de Alzheimer es la formación de los ovillos neurofibrilares. La proteína implicada en la formación de estos agregados es la proteína asociada a microtúbulos denominada tau<sup>28</sup>. Esta proteína tiene una gran importancia a nivel neuronal, ya que es un componente de su citoesqueleto. La proteína tau interacciona con  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, y su fosforilación juega un papel muy importante estabilizando los polímeros de tubulina. Estos microtúbulos son esenciales para el mantenimiento de la estructura neuronal, el transporte axonal y la plasticidad neuronal. El desajuste en la fosforilación de tau, afecta a la habilidad de unión de tau con la tubulina, perturbando la estructura de los microtúbulos (Figura 8). Esto produce la reducción de la viabilidad celular y por último el colapso del citoesqueleto del microtúbulo dando lugar a la muerte neuronal.



**Figura 8.-** Formación de los ovillos neurofibrilares.

Además, hay otras características en la enfermedad de Alzheimer, como son los acúmulos de proteína nuclear TDP-43 en la zona hipocámpal. Estas

---

<sup>28</sup> Kosik, K. S., The molecular and cellular biology of tau. *Brain Pathol.* **1993**, 3, 39-43.

inclusiones están presentes en el 25-30% de los casos de Alzheimer esporádico y en el 14% de los casos hereditarios<sup>29</sup>.

Existen diferentes dianas farmacológicas implicadas en la enfermedad de Alzheimer que han sido ampliamente estudiadas sin obtener hasta el momento resultados positivos para la erradicación de esta enfermedad<sup>30</sup>.

Actualmente los tratamientos paliativos aprobados para esta patología nacen de la hipótesis colinérgica y están enfocados a aumentar el nivel de acetilcolina en cerebro. La acetilcolina es el neurotransmisor específico de las sinapsis participando en la regulación de los niveles de vigilancia y en el funcionamiento de grandes áreas de asociación. Variaciones en sus niveles conllevan a alteraciones de la conducta, con síndromes característicos, como son la pérdida de memoria y atención, el habla confusa y la ataxia, la confusión y la desorientación. En la enfermedad de Alzheimer se ha observado que el nivel de acetilcolina se encuentra por debajo de lo normal. Por tanto la mayoría de los fármacos aprobados para esta patología son los que actúan sobre el sistema colinérgico, aumentando los niveles de este neurotransmisor en la sinapsis, por inhibición de su catabolismo.

En la Figura 9, se muestran los inhibidores de acetilcolinesterasa aprobados para su comercialización: donepezilo (Aricept®, Pfizer, 1998), galantamina (Reminyl®, Janssen-Cilag, 2005) y rivastigmina (Exelon®, Novartis Europharm, 1998). El cuarto compuesto, la memantina (Ebixa®, Lundbeck, 2002) es un antagonista no competitivo del receptor de glutamato NMDA, que protege la

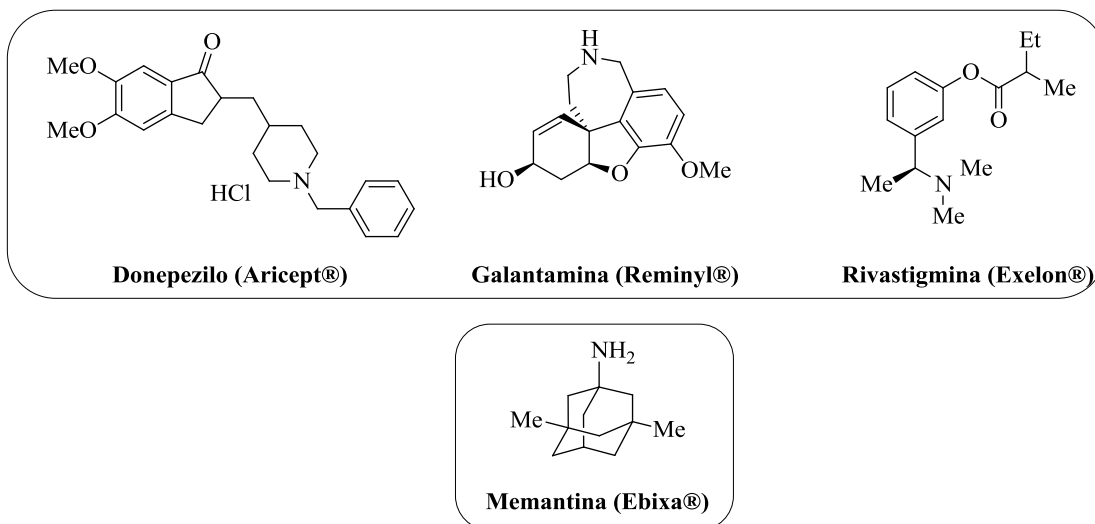
---

<sup>29</sup> Wilson, A. C.; Dugger, B. N.; Dickson, D. W.; Wang, D. S., TDP-43 in aging and Alzheimer's disease, a review. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2011**, *4*, 147-155.

<sup>30</sup> Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C. X., Alzheimer disease therapeutics: Focus on the disease and not just plaques and tangles. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.002

## Introducción

neurona frente a la entrada masiva de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), presentando una actividad neuroprotectora<sup>31</sup>.



**Figura 9.-** Inhibidores de acetilcolinesterasa (arriba) y de NMDA (abajo) aprobados para el tratamiento paliativo de la Enfermedad de Alzheimer.

Desde hace pocos años se han empezado a estudiar las proteínas quinasas y su relación con la enfermedad de Alzheimer. Estas enzimas están implicadas en el proceso de la formación del péptido  $\beta$ -amiloide, la fosforilación de la proteína tau, la neuroinflamación y la neurotoxicidad. Entre las proteínas quinasas relacionadas con esta patología están las enzimas GSK3 y CDK5, capaces de fosforilar a la proteína tau; JNK y p38, implicadas en la formación del péptido  $\beta$ -amiloide a partir de la proteína precursora de amiloide (PPA); ROCK y PAK, relacionadas con el crecimiento neurítico vinculado al proceso

<sup>31</sup> Singh, S.; Kushwah, A. S.; Singh, R.; Farswan, M.; Kaur, M., Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2012**, *16*, 1651-1664.

de la PPA y la toxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide; y CK1 que fosforila a la proteína tau y a TDP-43<sup>32</sup>.

GSK3 es una Serina/Treonina quinasa, que está involucrada en numerosos procesos celulares, y por tanto está relacionada con muchas enfermedades, como son la diabetes, hipertrofia muscular, cáncer y la enfermedad de Alzheimer<sup>33</sup>. Esta quinasa juega un papel crucial en la hiperfosforilación de la proteína tau así como en la formación de ovillos neurofibrilares, dos de las patologías más importantes de la enfermedad de Alzheimer, estando alguno de sus inhibidores en desarrollo clínico.

Dada la novedad y el poco conocimiento que existe sobre la enzima caseína quinasa 1 (CK1) y su relación con la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, resulta de gran interés el desarrollo de nuevos compuestos capaces de modular a esta proteína y por consiguiente, a la enfermedad. La isoforma CK1 $\delta$  es capaz de generar fosfoepítomos de tau; además, el péptido  $\beta$ -amiloide estimula la actividad de CK1, contribuyendo a la fosforilación de manera anómala de proteínas en la enfermedad de Alzheimer<sup>34</sup>.

CK1 fosforila a la proteína tau de manera específica en los residuos Ser202/Thr205 y Ser396/Ser404. Estos residuos son los implicados en la unión de tau a tubulina, indicando el papel relevante de CK1 en la agregación de tau. Las enzimas GSK3 y CK1 $\delta$ , fosforilan al menos 15 sitios que también se

---

<sup>32</sup> Savage, M. J.; Gingrich, D. E., Advances in the development of kinase inhibitor therapeutics for Alzheimer's Disease. *Drug Dev. Res.* **2009**, *70*, 125-144.

<sup>33</sup> Martinez, A.; Castro, A.; Dorronsoro, I.; Alonso, M., Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 373-384.

<sup>34</sup> Schwab, C.; DeMaggio, A. J.; Ghoshal, N.; Binder, L. I.; Kuret, J.; McGeer, P. L., Casein Kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **2000**, *21*, 503-510.

## Introducción

---

encuentran fosforilados en los pares de filamentos helicoidales, que dan lugar a los ovillos neurofibrilares de tau en cerebros de enfermos de Alzheimer.

Una combinación de actividades de estas dos proteínas parece ser la responsable de las tres cuartas partes de Ser/Thr fosforiladas en los pares de filamentos helicoidales, indicando la importancia de CK1 $\delta$  y GSK3 en esta patología<sup>35</sup>.

La enfermedad de Alzheimer también está asociada a la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide, que como se ha explicado anteriormente se produce a partir de la PPA mediante las actividades de  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, que contienen en sus regiones intracelulares numerosos sitios de fosforilación de CK1. Estos sitios están conservados en las especies de rata, ratón y humano. Una sobreexpresión de CK1 $\epsilon$ , una de las isoformas de esta quinasa expresadas en cerebro da lugar a un incremento en la producción del péptido  $\beta$ -amiloide<sup>36</sup>.

### 2.2.2. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la presencia de temblores, rigidez, bradiquinesia e inestabilidad postural. La forma esporádica de la enfermedad de Parkinson es mayoritaria, frente al 5% de casos de tipo familiar o hereditaria<sup>37</sup>. Al igual que en la enfermedad de Alzheimer, la incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, afectando a uno de cada 1000 adultos

---

<sup>35</sup> Hanger D. P.; Byers H. L.; Wray S.; Leung K. Y.; Saxton M. J.; Seereeram A.; Reynolds C. H.; Ward M. A.; Anderton B. H., Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23645–23654.

<sup>36</sup> Flajolet, M.; He, G.; Heiman, M.; Lin, A.; Nairn, A. C.; Greengard, P., Regulation of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  formation by casein kinase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **2007**, *104*, 4159-4164.

<sup>37</sup> Warner, T. T., Schapira, A. H. V., Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **2003**, *53*, S16–S25.

mayores de 65 años<sup>38</sup>. Tanto los factores genéticos como los ambientales contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, aunque los mecanismos moleculares que intervienen en la enfermedad de Parkinson son desconocidos. En esta enfermedad se produce una pérdida de las neuronas dopaminérgicas que están localizadas en la sustancia negra y producen la inervación del estriado, observándose la presencia de agregados proteicos en inclusiones denominados cuerpos de Lewy en las neuronas del bulbo raquídeo<sup>39</sup> (Figura 10).

La formación de los cuerpos de Lewy, se debe al fallo del sistema de degradación de la célula y están formados por agregados de proteínas, principalmente de  $\alpha$ -sinucleína<sup>40</sup>. Esta proteína, se expresa en el cerebro y aunque su función aún no está clara, aparentemente puede estar implicada en funciones de neurotransmisión, y procesos de plasticidad.

---

<sup>38</sup> de Rijk, M. C.; Launer, L. J.; Berger, K.; Breteler, M. M.; Dartigues, J. F.; Baldereschi, M.; Fratiglioni, L.; Lobo, A.; Martínez-Lage, J.; Trenkwalder, C.; Hofman, A., Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology* **2000**, *54*, S21-23.

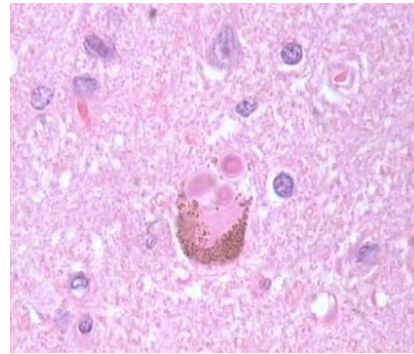
<sup>39</sup> Fahn, S., Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *991*, 1-14.

<sup>40</sup> Jesse, S.; Steinacker, P.; Lehnert, S.; Gillardon, F.; Hengerer, B.; Otto, M., Neurochemical approaches in the laboratory diagnosis of Parkinson and Parkinson dementia syndromes: a review. *CNS Neurosci. Ther.* **2009**, *15*, 157-182.

## Introducción

---

En los cuerpos de Lewy, la proteína  $\alpha$ -sinucleína sufre diversos cambios postraslacionales, entre ellos la fosforilación y el cambio conformacional. Entre las proteínas quinasas que fosforilan  $\alpha$ -sinucleína está CK1<sup>41</sup>.



**Figura 10.-** Cuerpos de Lewy presentes en la enfermedad de Parkinson.

Recientemente, se ha relacionado esta enfermedad con mutaciones en

diversos genes; entre los que se encuentra LRRK2, de sus siglas en inglés *leucine rich repeat kinase 2*. Estas mutaciones generan un tipo de parkinsonismo muy similar a la enfermedad de Parkinson de tipo esporádico.

LRRK2 es una proteína quinasa que se encuentra mayoritariamente en el citoplasma que interacciona con parkina, pero no con  $\alpha$ -sinucleína. La parkina es una ligasa, cuyos sustratos y formas de interacción son relevantes para la enfermedad de Parkinson. La parkina está asociada a su vez con sinfilina-1, una proteína que interacciona con  $\alpha$ -sinucleína y está presente en los cuerpos de Lewy<sup>13</sup>.

Además, se han relacionado las mutaciones en LRRK2 con el balance autofágico, que podría dar lugar a la muerte celular en presencia de otro componente más, aún sin determinar<sup>42</sup>.

---

<sup>41</sup> Okochi, M.; Walter, J.; Koyama, A.; Nakajo, S.; Baba, M.; Iwatsubo, T.; Meijer, L.; Kahle, P. J.; Haass, C., Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated  $\alpha$ -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 390-397.

<sup>42</sup> Gomez-Suaga, P.; Luzon-Toro, B.; Churamani, D.; Zhang, L.; Bloor-Young, D.; Patel, S.; Woodman, P. G.; Churchill, G. C.; Hilfiker, S., Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 511-525.

Hoy en día, la enfermedad de Parkinson no tiene cura, pero sí se puede controlar eficazmente durante un amplio espacio temporal mediante la administración de agentes dopaminérgicos. Las terapias se dirigen únicamente a mejorar los síntomas derivados de la patología causados por el déficit dopaminérgico, en particular: temblor, rigidez y bradiquinesia. La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante y con mayor repercusión comportamental; sin embargo, aunque lo más evidente y sencillo sería la administración directa de dopamina, este compuesto es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Este problema se ha solucionado con la administración de levodopa, que es una molécula capaz de atravesar la BHE, y una vez en el SNC es transformada en dopamina por acción de la enzima dopa descarboxilasa (DDC) (Figura 11).

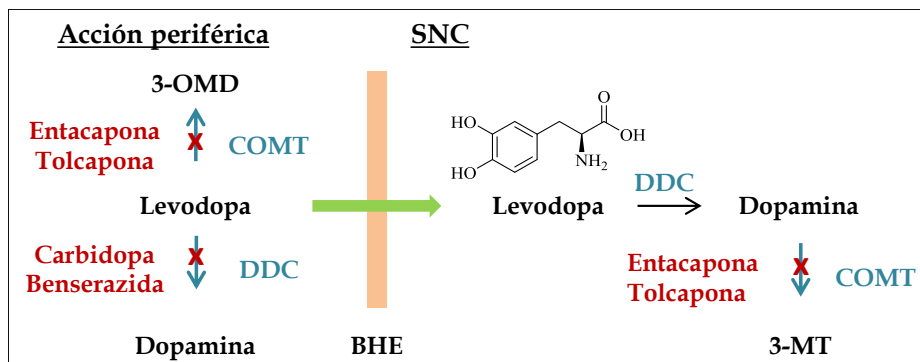


Figura 11.- Metabolismo de la Levodopa.

Actualmente, la terapia farmacológica mantiene como único objetivo la recuperación de los niveles de dopamina. Para ello, se usan: precursores de la síntesis de dopamina, como la levodopa; potenciadores de su liberación en los espacios sinápticos, como la amantadina (Amantadine®, Laboratorios Ern, 1967); agonistas de receptores dopaminérgicos, como la bromocriptina (Parlodel®, Meda Pharma, 1979), la apomorfina (Apo-go PEN®, Britannia

## Introducción

Pharmaceuticals Limited, 2001) y la lisurida (Dopergin<sup>®</sup>, Bayer, 1990); e inhibidores de las enzimas encargadas de su catabolismo periférico y en el sistema nervioso central. Así, para aumentar la concentración de levodopa en plasma se utiliza en combinación con inhibidores de la dopa descarboxilasa como carbidopa o benserazida y más recientemente con inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMT) como entacapona (Comtan<sup>®</sup>, Novartis, 1999) y la tolcapona (Tasmar<sup>®</sup>, Meda AB, 1999). Por otra parte, para evitar la degradación de la dopamina en la neurona se utilizan los inhibidores de monoamino oxidasa B (MAO-B), destacando la selegilina (Plurimen<sup>®</sup>, Orion Corporation, 1989) (Figura 12).

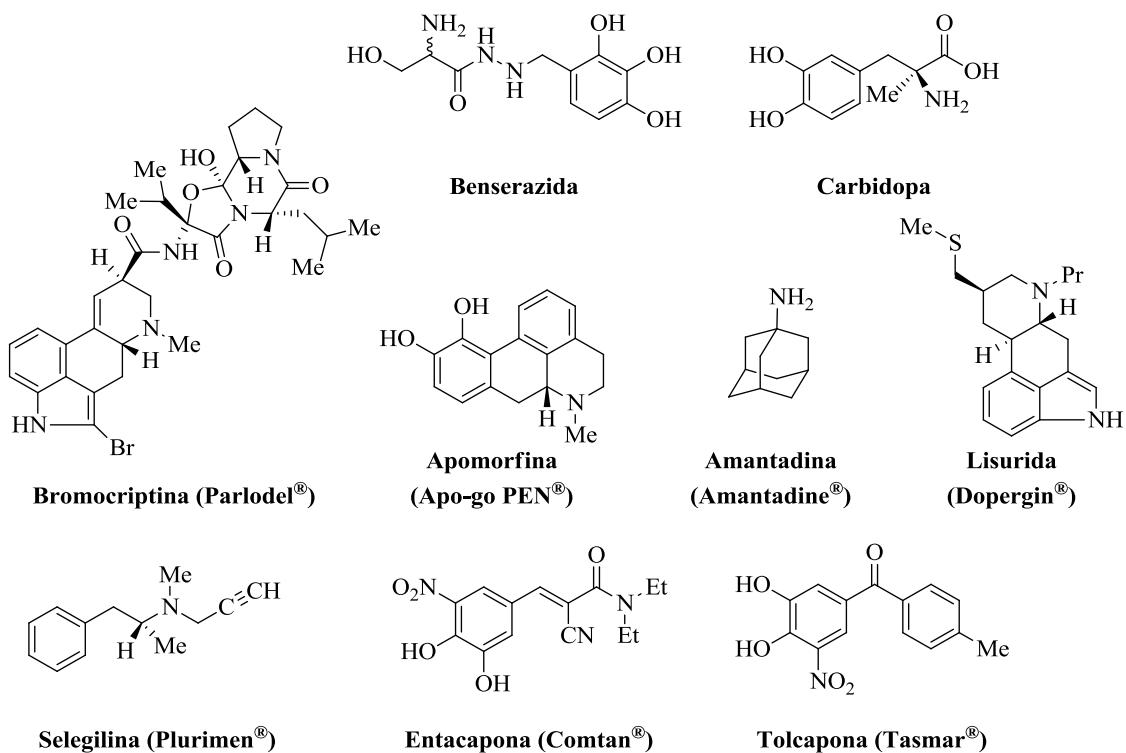
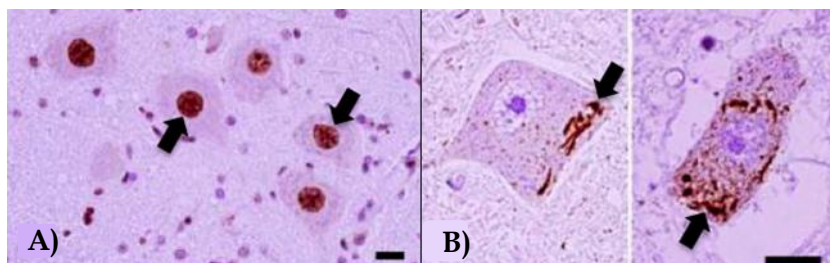


Figura 12.- Fármacos aprobados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

### 2.2.3. Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa mortal que afecta tanto a las motoneuronas de la médula espinal y del bulbo raquídeo como a las que se encuentran en la corteza motora. La pérdida de neuronas conduce a la atrofia muscular y a la debilidad, fasciculaciones y espasticidad. Esta patología se clasifica en familiar (10% de los casos) y esporádica, siendo clínicamente muy parecidas. La edad a la que aparece esta enfermedad es muy variable, aunque normalmente se sufre pasados los cuarenta años de edad. La mayoría de los pacientes mueren entre 3 y 5 años después de haber aparecido los primeros síntomas, si bien la duración de esta enfermedad puede abarcar desde los pocos meses hasta los veinte años de supervivencia<sup>43</sup>. Las motoneuronas dañadas presentan inclusiones de agregados de proteínas. En pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, se han encontrado inclusiones de la proteína TDP-43 fosforilada y ubiquitinada<sup>9</sup> (Figura 13).



**Figura 13.-** A) Proteína TDP-43, en el núcleo de una motoneurona sana. B) Proteína TDP-43 agregada en el núcleo de la motoneurona enferma.

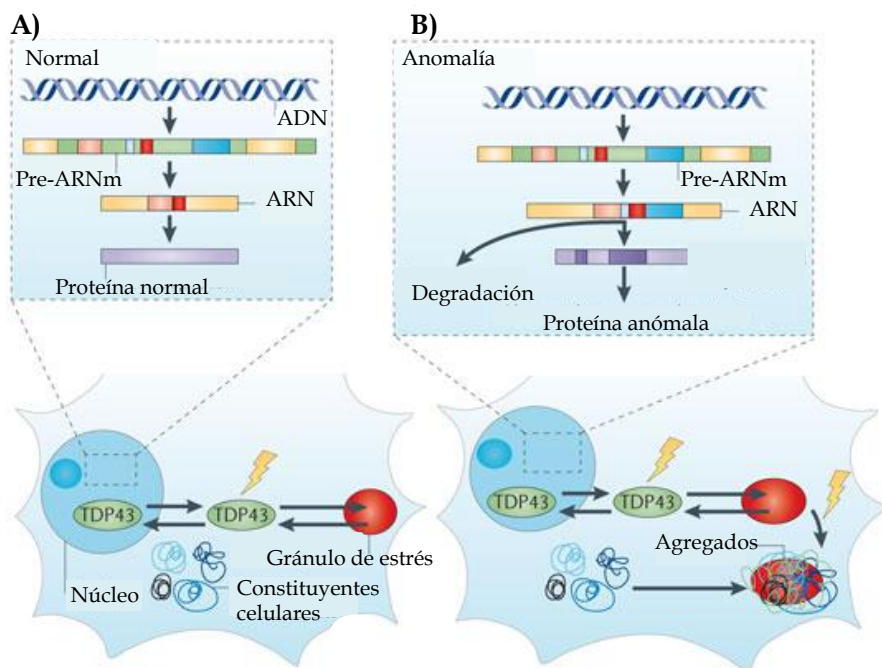
Esta proteína lleva a cabo procesos de regulación de expresión genética y estabilización del ARNm<sup>44</sup>. En condiciones fisiológicas, esta proteína se

<sup>43</sup> Robberecht, W.; Philips, T., The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 248-264.

<sup>44</sup> Chen-Plotkin, A. S.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q., TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6*, 211-220.

## Introducción

encuentra en equilibrio entre el núcleo y el citoplasma. Si la célula es sometida a estrés, la proteína TDP-43 migra desde el núcleo hasta el citoplasma y se acumula en los gránulos de estrés; cuando esta situación se resuelve, la proteína vuelve hasta el núcleo (Figura 14A). Sin embargo, en una situación anómala TDP-43 migra desde el núcleo y se acumula de forma irreversible en los gránulos de estrés en el citoplasma<sup>43</sup> (Figura 14B). La acumulación irreversible se debe entre otros factores al aumento del grado de fosforilación. En el año 2009, se describió que la proteína quinasa CK1 fosforila TDP-43 *in vivo* y que sus niveles de actividad se encuentran aumentados en pacientes de esclerosis lateral amiotrófica<sup>45</sup>.



**Figura 14.-** Posible mecanismo patológico de TDP-43.

<sup>45</sup> Kametani, F.; Nonaka, T.; Suzuki, T.; Arai, T.; Dohmae, N.; Akiyama, H.; Hasegawa, M., Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 382, 405-409.

Es importante señalar que las mutaciones en algunos genes relacionados con esta enfermedad, como el de la superóxido dismutasa 1 (SOD1), y el de TARDBP que codifica TDP-43 pueden explicar el 20% de los casos de ELA familiar. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que la mutación en el gen C9ORF72, de sus siglas en inglés *chromosome 9 open reading frame 72*, abarca entre el 40-50% de los casos de ELA familiar<sup>46</sup>, abriendo nuevos horizontes para el tratamiento de esta enfermedad.

Para la esclerosis lateral amiotrófica sólo existe un fármaco aprobado, llamado riluzol (Rilutek®, Sanofi-Aventis, 1995). Este fármaco es de carácter paliativo; es decir, no es capaz de curar la enfermedad y aumenta la vida de los pacientes entre 2-3 meses, aunque muchos de los pacientes abandonan el tratamiento debido a los efectos secundarios.

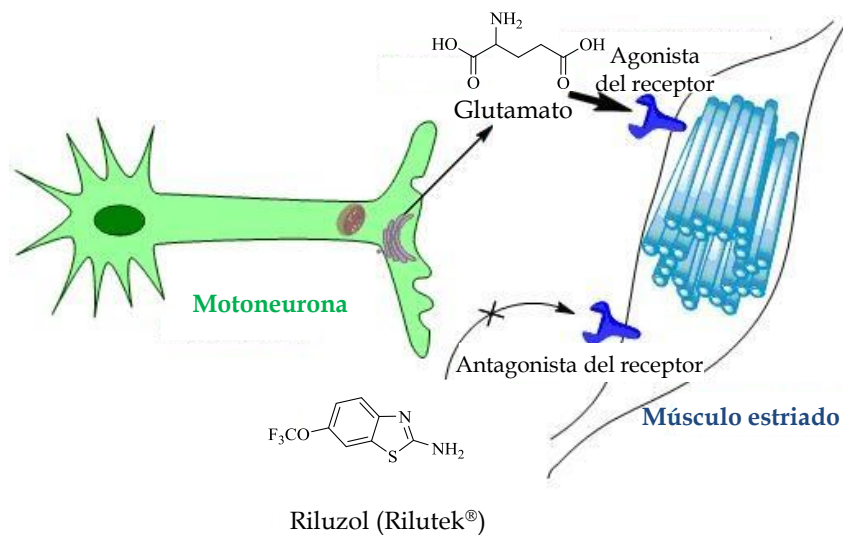
El mecanismo de acción de este fármaco es poco conocido y se cree que actúa como antagonista del receptor NMDA, bloqueando el efecto del glutamato (Figura 15)<sup>47</sup>. Los pacientes de esclerosis lateral amiotrófica, presentan niveles más altos del neurotransmisor glutamato en el suero y en el líquido cefalorraquídeo. Debido al carácter excitotóxico que posee este neurotransmisor a concentraciones elevadas, las neuronas comienzan a morir cuando están expuestas por largos períodos a cantidades excesivas de glutamato.

---

<sup>46</sup> Turner, M. R.; Hardiman, O.; Benatar, M.; Brooks, B. R.; Chio, A.; de Carvalho, M.; Ince, P. G.; Lin, C.; Miller, R. G.; Mitsumoto, H.; Nicholson, G.; Ravits, J.; Shaw, P. J.; Swash, M.; Talbot, K.; Traynor, B. J.; Van den Berg, L. H.; Veldink, J. H.; Vucic, S.; Kiernan, M. C., Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 310-322.

<sup>47</sup> Bellingham, M. C., A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS Neurosci. Ther.* **2011**, *17*, 4-31.

## Introducción

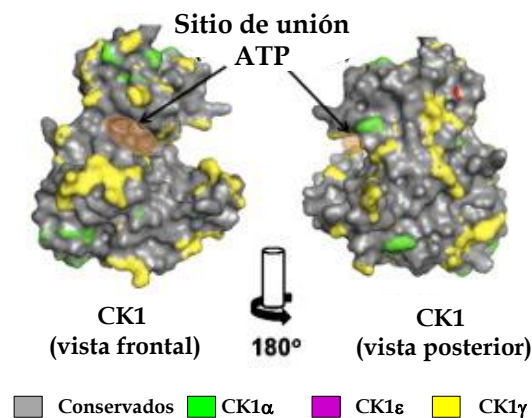


**Figura 15.-** Estructura del Riluzol, fármaco paliativo comercializado para la esclerosis lateral amiotrófica y su mecanismo de acción como antagonista de los receptores de glutamato.

En resumen, estas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por procesos anómalos donde se produce la modificación postraslacional de diversas proteínas que se encuentran anormalmente fosforiladas por la acción de diferentes proteínas quinasas. Dentro de las diferentes proteínas quinasas implicadas en estos procesos patológicos, resulta de especial interés el estudio de CK1 y LRRK2 como nuevas dianas farmacológicas para enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica.

### 2.3. Caseína Quinasa 1 (CK1)

La proteína quinasa CK1, es una Ser/Thr quinasa que fue caracterizada por primera vez en la década de los 70<sup>48</sup>. La familia de CK1 está formada por siete isoformas, CK1 $\alpha$ , CK1 $\beta$ , CK1 $\gamma$ -CK1 $\gamma$ 3, CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$ <sup>49</sup>. Todas ellas conservan su dominio catalítico (53%-98%) y difieren en la región C-terminal (Figura 16).



**Figura 16.-** Estructura cristalográfica de CK1 $\delta$  (código PDB: 1CKJ). Se muestran los aminoácidos específicos de cada isoforma, así como el sitio de unión del ATP.

CK1 se encuentra en diferentes compartimentos celulares, como por ejemplo, la membrana plasmática, el citosol y el núcleo. Al ser una quinasa ampliamente distribuida, se cree que tiene un papel esencial en procesos regulatorios, estando involucrada en diferentes funciones biológicas, como la reparación de ADN, morfología celular, modulación de la ruta metabólica de Wnt/ $\beta$ -catenina, vía Hedgehog y los ritmos circadianos<sup>49</sup>. Recientemente, se ha descubierto que la proteína quinasa CK1 está implicada en diversas

<sup>48</sup> Gross, S. D.; Anderson, R. A., Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell. Signalling* **1998**, *10*, 699-711.

<sup>49</sup> Cheong, J. K.; Virshup, D. M., Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 465-469.

## Introducción

---

enfermedades neurodegenerativas, trastornos del sueño, cáncer y patologías inflamatorias, siendo una buena diana terapéutica<sup>50</sup>.

Su relación con las enfermedades neurodegenerativas estudiadas en el presente trabajo deriva de su participación en las modificaciones postraslacionales de las proteínas implicadas en dichas patologías como se ha comentado anteriormente (Tabla 2).

**Tabla 2.-** Implicación de CK1 en patologías neurodegenerativas.

Sustratos fosforilados por CK1	Patología
tau	Enfermedad de Alzheimer
TDP-43	Esclerosis lateral amiotrófica Enfermedad de Alzheimer Demencia frontotemporal
$\alpha$ -sinucleína	Enfermedad de Parkinson Demencia de cuerpos de Lewy

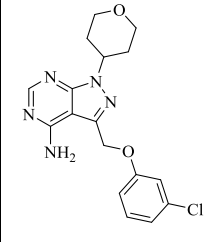
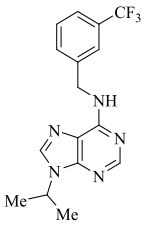
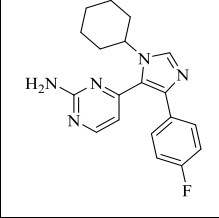
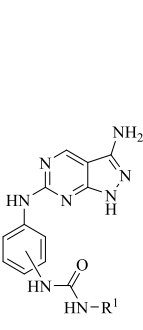
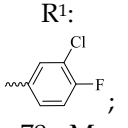
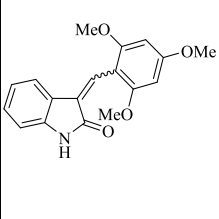
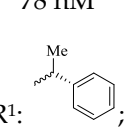
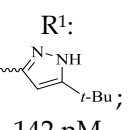
Su implicación en la fosforilación de tau en la enfermedad de Alzheimer, de  $\alpha$ -sinucleína en la enfermedad de Parkinson y de TDP-43 en la esclerosis lateral amiotrófica, así como la falta de un tratamiento efectivo para todas ellas, hace que sea de especial interés la búsqueda de nuevos inhibidores de CK1 eficaces como nueva aproximación terapéutica.

En la bibliografía se encuentran descritos diversos inhibidores de esta enzima, sin embargo, ninguno de ellos se encuentra todavía en desarrollo clínico (Tabla 3).

---

<sup>50</sup> Perez, D. I.; Gil, C.; Martínez, A., Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 924-954.

Tabla 3.- Inhibidores de CK1.

Inhibidor	Estructura	CI <sub>50</sub>	Inhibidor	Estructura	CI <sub>50</sub>
PF-4800567		32-710 nM	Longdaysin		5.6-8.8 μM
PF-670462		7-14 nM	Familia fenil- pirazolo- pirimidinas		R <sup>1</sup> :  78 nM
IC261		1 μM			R <sup>1</sup> :  2.47 μM
					R <sup>1</sup> :  142 nM

Estos derivados presentan como características comunes que son compuestos heterocíclicos y de bajo peso molecular. Algunos de estos inhibidores han sido estudiados en diversos procesos en los que CK1 está implicada. Por ejemplo, ensayos realizados con **PF-4800567** y **PF-670462**, potentes inhibidores de las isoformas CK1ε y CK1δ/ε, respectivamente; han demostrado la importancia de CK1δ en los ritmos circadianos<sup>51</sup>. Además, estudios llevados a cabo con

<sup>51</sup> Walton, K. M.; Fisher, K.; Rubitski, D.; Marconi, M.; Meng, Q. J.; Sladek, M.; Adams, J.; Bass, M.; Chandrasekaran, R.; Butler, T.; Griffor, M.; Rajamohan, F.; Serpa, M.; Chen, Y.; Claffey, M.; Hastings, M.; Loudon, A.; Maywood, E.; Ohren, J.; Doran, A.; Wager, T. T., Selective inhibition of casein kinase 1ε minimally alters circadian clock period. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 330, 430-439.

## Introducción

---

**longdaysin**, han mostrado la relación de diversas isoformas de CK1 con la ruta metabólica de Wnt/ $\beta$ -catenina y la vía Hedgehog<sup>52</sup>, implicada en cáncer.

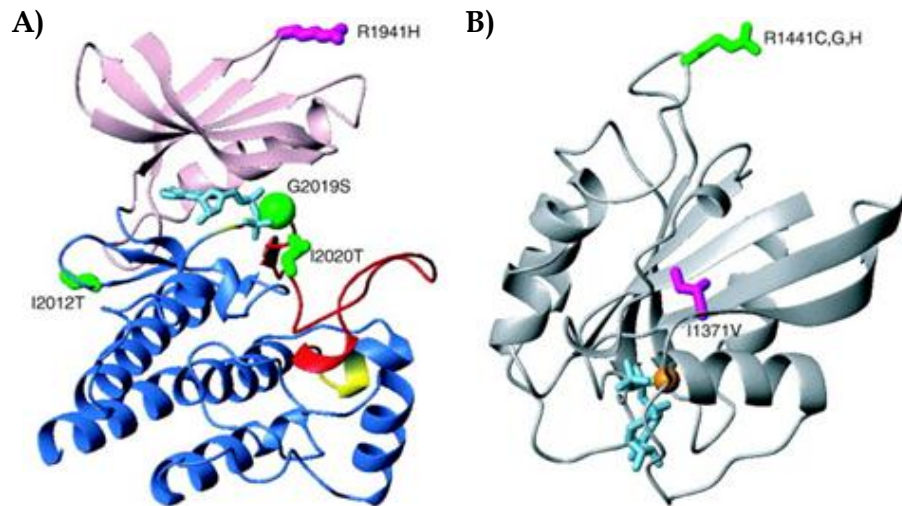
### 2.4. Quinasa con repeticiones ricas en leucina 2 (LRRK2)

Esta proteína de 280 KDa, pertenece a la familia de proteínas denominadas ROCO, caracterizada por la presencia de diferentes dominios como ROC, de sus siglas en inglés *Ras of complex proteins*, un dominio GTPasa y otro dominio denominado COR (*C-terminal of ROC*) del cual se desconoce su función<sup>53</sup>. Posee dos sitios catalíticos, donde se producen las mutaciones relacionadas con esta enfermedad y que serán descritas más adelante. Uno de los sitios catalíticos es el dominio de quinasa y el otro es el formado por ROC y GTPasa, que actúa como interruptor molecular para una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares. Flanqueando los dos dominios catalíticos nos encontramos con varios dominios de interacción proteína-proteína, el dominio N-terminal rico en Leu y el dominio C-terminal (dominio WD40) (Figura 17). Algunas de las funciones de LRRK2 son el tráfico vesicular, dinámica de microtúbulos y funciones celulares. La dinámica de microtúbulos es crucial para el transporte de membrana a diferentes sitios de la célula en procesos de autofagia y tráfico vesicular sináptico.

---

<sup>52</sup> Cohen, M. M., The Hedgehog Signaling Network. *Am. J. Med. Genet., Part A* **2003**, 123A, 5-28.

<sup>53</sup> Lewis, P. A., The function of ROCO proteins in health and disease. *Biol. Cell* **2009**, 101, 183-191.



**Figura 17.-** Modelos de homología de los dominios de quinasa y ROC de LRRK2. Se muestran los aminoácidos mutados que se sabe que derivan en la enfermedad y las mutaciones que supuestamente son patogénicas. A) Dominio de quinasa LRRK2 (basado en la estructura con código PDB: 1QPC, cadena A. B) El dominio ROC de LRRK2 (basado en la estructura con código PDB: 1VG8, cadena A.

El descubrimiento de LRRK2 comenzó con la identificación de varias familias de pacientes que sufrían la enfermedad de Parkinson con un claro componente genético, pero que sin embargo no encajaba con ninguna de las mutaciones conocidas hasta ese momento<sup>54</sup>. Las mutaciones en LRRK2 son la causa genética más común para la enfermedad de Parkinson, siendo el 4% de los casos familiares y el 1% de los casos esporádicos<sup>55</sup>. Además, en ciertas poblaciones como son la población árabe del norte de África y los judíos

<sup>54</sup> Kett, L. R.; Dauer, W. T., Leucine-rich repeat kinase 2 for beginners: six key questions. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2012**, *2*, a009407.

<sup>55</sup> Healy, D. G.; Falchi, M.; O'Sullivan, S. S.; Bonifati, V.; Durr, A.; Bressman, S.; Brice, A.; Aasly, J.; Zabetian, C. P.; Goldwurm, S.; Ferreira, J. J.; Tolosa, E.; Kay, D. M.; Klein, C.; Williams, D. R.; Marras, C.; Lang, A. E.; Wszolek, Z. K.; Berciano, J.; Schapira, A. H.; Lynch, T.; Bhatia, K. P.; Gasser, T.; Lees, A. J.; Wood, N. W.; International, L. C., Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 583-590.

## Introducción

---

askenazíes, esta mutación alcanza el 40% de los casos de Parkinson<sup>56,57</sup>. La mutación G2019S es claramente la que mayor prevalencia presenta en las poblaciones norteamericanas y europeas. Existen otras cuatro mutaciones en LRRK2 (R1441C, R1441G, Y1699C y I2020T), pero son mucho menos comunes<sup>54</sup>. Por otro lado, algunas variaciones en el gen LRRK2 también han sido relacionadas con la enfermedad de Parkinson de tipo esporádico<sup>58</sup>. La gran mayoría de los pacientes de Parkinson con mutación G2019S en LRRK2, presentan características clínicas y neuropatológicas prácticamente indistinguibles de las observadas en el tipo esporádico<sup>59</sup>.

Al ser una quinasa poco explorada y de gran interés terapéutico para la enfermedad de Parkinson, la búsqueda de inhibidores selectivos se convierte en un área muy atractiva en la terapéutica de esta patología. Hasta el momento están descritos diferentes inhibidores de LRRK2 (Tabla 4) pero que

---

<sup>56</sup> Lesage, S.; Durr, A.; Tazir, M.; Lohmann, E.; Leutenegger, A. L.; Janin, S.; Pollak, P.; Brice, A.; French Parkinson's Disease Genetics Study, G., LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 422-423.

<sup>57</sup> Ozelius, L. J.; Senthil, G.; Saunders-Pullman, R.; Ohmann, E.; Deligtisch, A.; Tagliati, M.; Hunt, A. L.; Klein, C.; Henick, B.; Hailpern, S. M.; Lipton, R. B.; Soto-Valencia, J.; Risch, N.; Bressman, S. B., LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 424-425.

<sup>58</sup> Satake, W.; Nakabayashi, Y.; Mizuta, I.; Hirota, Y.; Ito, C.; Kubo, M.; Kawaguchi, T.; Tsunoda, T.; Watanabe, M.; Takeda, A.; Tomiyama, H.; Nakashima, K.; Hasegawa, K.; Obata, F.; Yoshikawa, T.; Kawakami, H.; Sakoda, S.; Yamamoto, M.; Hattori, N.; Murata, M.; Nakamura, Y.; Toda, T., Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1303-1307.

<sup>59</sup> Simón-Sánchez, J.; Schulte, C.; Bras, J. M.; Sharma, M.; Gibbs, J. R.; Berg, D.; Paisan-Ruiz, C.; Lichtner, P.; Scholz, S. W.; Hernández, D. G.; Kruger, R.; Federoff, M.; Klein, C.; Goate, A.; Perlmutter, J.; Bonin, M.; Nalls, M. A.; Illig, T.; Gieger, C.; Houlden, H.; Steffens, M.; Okun, M. S.; Racette, B. A.; Cookson, M. R.; Foote, K. D.; Fernández, H. H.; Traynor, B. J.; Schreiber, S.; Arepalli, S.; Zonozi, R.; Gwinn, K.; van der Brug, M.; López, G.; Chanock, S. J.; Schatzkin, A.; Park, Y.; Hollenbeck, A.; Gao, J.; Huang, X.; Wood, N. W.; Lorenz, D.; Deuschl, G.; Chen, H.; Riess, O.; Hardy, J. A.; Singleton, A. B.; Gasser, T., Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1308-1312.

presentan la dificultad de no atravesar la barrera hematoencefálica o ser poco selectivos frente a otras proteínas quinasas; por lo que no pueden ser moléculas candidatas a fármaco<sup>60</sup>.

Estos compuestos son ATP-competitivos, es decir, se unen a la enzima en el sitio catalítico. Por esto es de vital importancia el diseño y síntesis de moléculas que sean selectivas de la proteína LRRK2 y con buenas propiedades tipo fármaco.

Tabla 4.- Inhibidores de LRRK2.

Inhibidor	Estructura	CI <sub>50</sub> (nM)
CZC-25146		5
LRRK2-IN-1		13
Indolininona (GW5074)		500
Sunitinib		79

<sup>60</sup> Kramer, T.; Lo Monte, F.; Goring, S.; Okala Amombo, G. M.; Schmidt, B., Small molecule kinase inhibitors for LRRK2 and their application to Parkinson's disease models. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3, 151-160.

## **Introducción**

---

Las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades que no tienen un tratamiento farmacológico efectivo en la actualidad. El número de personas que las sufren cada vez es mayor dado el aumento de la esperanza de vida lo que supone un alto coste personal, familiar y social. Por todo esto es de especial importancia la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser candidatos a fármaco. Las proteínas quinasas están implicadas en numerosos procesos biológicos esenciales para la vida, estando la sobreexpresión de estas enzimas relacionada con diversas patologías y más concretamente con enfermedades neurodegenerativas.

Entre ellas, las proteínas quinasas CK1 y LRRK2 surgen como nuevas dianas farmacológicas para enfermedades tan importantes como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La búsqueda de inhibidores efectivos de estas quinasas y su desarrollo como candidatos a fármacos para estas enfermedades complejas es el marco del trabajo recogido en la presente memoria.

## ***OBJETIVOS***

---



El objetivo de esta memoria es el descubrimiento de nuevos fármacos potenciales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y en concreto el diseño de inhibidores de CK1 y LRRK2 capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y ser desarrollados como fármacos innovadores para la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson.

Se proponen tres aproximaciones diferentes para la búsqueda de inhibidores de CK1.

- A partir de inhibidores conocidos, el desarrollo de programas de química médica que simplifiquen la molécula y al mismo tiempo la hagan permeable a la barrera hematoencefálica.
- Utilizar una aproximación de genética química inversa mediante el cribado de quimiotecas de compuestos químicos en ensayos *in vitro* de CK1.
- Teniendo en cuenta la estructura cristalográfica de la proteína, identificar nuevos ligandos por cribado virtual.

Todos los inhibidores identificados se caracterizarán en base a sus propiedades tipo fármaco y se evaluarán en diversos modelos celulares y animales de esclerosis lateral amiotrófica y Parkinson.

La búsqueda de inhibidores de LRRK2 se llevará a cabo por técnicas de química médica clásica a partir de inhibidores existentes en la literatura intentando mantener la potencia inhibitoria y aumentando la permeabilidad en la barrera hematoencefálica.

Los inhibidores que puedan obtenerse se evaluarán en modelos celulares y animales de la enfermedad de Parkinson.



## ***DISCUSIÓN Y RESULTADOS***

---



### 1. BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE CK1

De las siete isoformas que posee CK1, las que actualmente se conoce que están más implicadas en modificaciones postraslacionales de proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas son CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$ . En la enfermedad de Alzheimer, la isoforma CK1 $\delta$  se asocia a la fosforilación de la proteína tau y podría desempeñar un papel fundamental en esta patología, estando su actividad aumentada en los cerebros de los pacientes<sup>61</sup>. La sobreexpresión de la isoforma CK1 $\epsilon$  además promueve el incremento de la producción de la proteína  $\beta$ -amiloide<sup>36</sup>. En la enfermedad de Parkinson se sabe que CK1 fosforila  $\alpha$ -sinucleína aunque no se conoce con exactitud que isoforma está más implicada. Por último, en la esclerosis lateral amiotrófica la fosforilación de la proteína TDP-43 se lleva a cabo por las isoformas CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$ <sup>45</sup>.

Por tanto, a lo largo de este trabajo se han elegido estas dos isoformas para ser moduladas farmacológicamente y poder proporcionar candidatos a fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica.

La química médica, cuyo fin es encontrar nuevos fármacos, engloba diferentes aspectos de la biología molecular, la bioinformática, la farmacología, la química orgánica y la bioquímica. Para poder descubrir y/o diseñar un nuevo fármaco se pueden seguir diferentes metodologías en función de que se conozca o no, la estructura tridimensional de la diana farmacológica de interés. Una diana farmacológica es una macromolécula, generalmente de naturaleza proteica, ubicada en la célula, en un área fisiológica concreta, como la membrana celular, el citoplasma o el núcleo, capaz de reconocer un sustrato

---

<sup>61</sup> Yasojima, K.; Kuret, J.; DeMaggio, A. J.; McGeer, E.; McGeer, P. L., Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res.* **2000**, *865*, 116-120.

## **Discusión y Resultados**

---

produciendo una respuesta celular, y que está implicada en la patología molecular de distintas enfermedades.

Si la estructura tridimensional de la diana no se conoce, el descubrimiento de moléculas que interaccionan con ella puede llevarse a cabo por técnicas de cribado de alto rendimiento, diseñando un ensayo biológico adecuado, o bien si se conocen diferentes sustratos que interaccionan con ella, se pueden emplear métodos de relación estructura-actividad o de definición de farmacóforos y búsqueda en bases de datos tridimensionales.

Por otra parte, si la estructura tridimensional de la diana es conocida se pueden llevar a cabo tareas de cribado virtual sobre la proteína o en diferentes bolsillos de su superficie así como estudios de *docking* molecular para definir las interacciones claves sustrato-receptor.

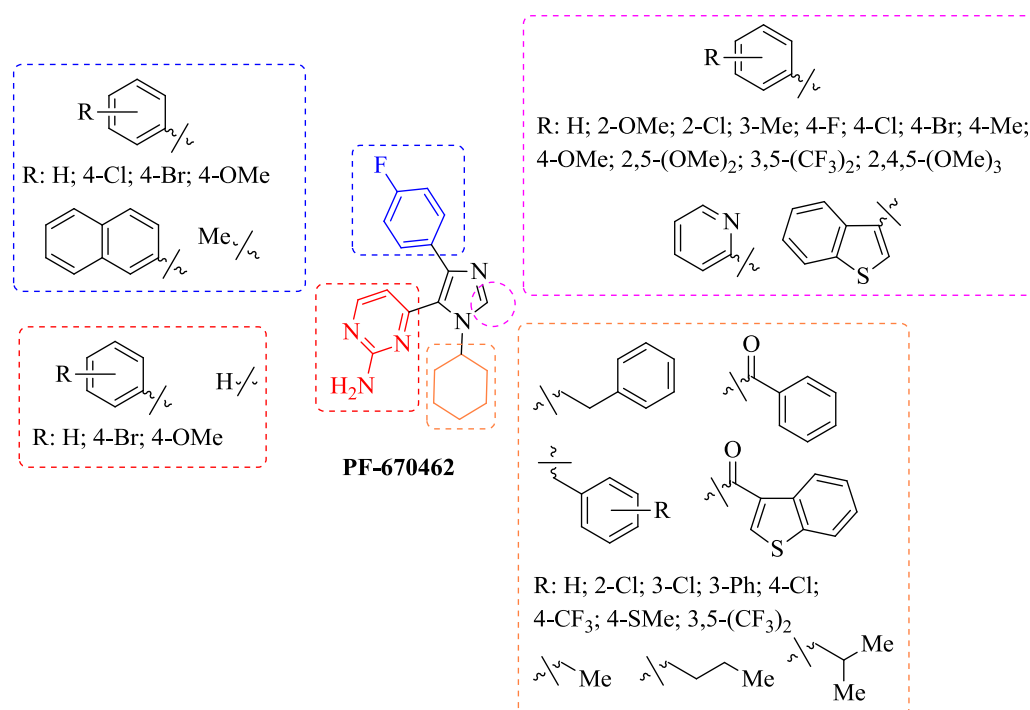
Para la búsqueda de nuevos inhibidores de CK1 realizada en esta memoria se han llevado a cabo diferentes aproximaciones en función de los datos estructurales disponibles en cada momento.

### **1.1. Diseño de nuevos inhibidores de CK1 basada en sustrato**

Son diversas las familias descritas como inhibidores de CK1 recogidas en la Tabla 3, sin embargo y aunque su actividad enzimática va desde el rango nanomolar hasta el micromolar, no presentan propiedades farmacocinéticas aptas para ser candidatos a fármacos de patologías del sistema nervioso central por no atravesar la barrera hematoencefálica o tener una baja permeabilidad. De todos los inhibidores descritos en la bibliografía actualmente no hay ningún inhibidor de CK1 en fases clínicas o preclínicas.

## Discusión y Resultados

Dado que el compuesto **PF-670462** ha sido el más ampliamente estudiado como modulador de los procesos biológicos en los que está implicada CK1<sup>62</sup>, como los ritmos circadianos o la ruta metabólica de Wnt/ $\beta$ -catenina, se ha elegido esta molécula (**PF-670462**) como prototipo inicial para llevar a cabo diversas modificaciones estructurales y así poder obtener un candidato tipo fármaco con buenas propiedades biológicas y farmacocinéticas.



**Figura 18.-** PF-670462, prototipo para la síntesis de la familia de imidazoles, con las modificaciones estructurales propuestas.

<sup>62</sup> Badura, L.; Swanson, T.; Adamowicz, W.; Adams, J.; Cianfrogna, J.; Fisher, K.; Holland, J.; Kleiman, R.; Nelson, F.; Reynolds, L.; St. Germain, K.; Schaeffer, R.; Tate, B.; Sprouse, J., An inhibitor of casein kinase 1 $\epsilon$  induces phase delays in circadian rhythms under free running and entrained conditions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, 322, 730-738.

## Discusión y Resultados

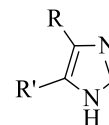
---

Este compuesto posee en su estructura química un anillo de imidazol diferentemente sustituido, por lo que se propuso un estudio de la variación de la potencia inhibitoria frente a CK1 en función de los posibles sustituyentes del heterociclo manteniendo fijo el anillo de imidazol. Por tanto, se propuso la síntesis y evaluación biológica frente a CK1 de diferentes imidazoles monosustituídos, disustituídos en posiciones 2,4-, 2,5- y 4,5- y trisustituídos en las posiciones 2,4,5-. Además, se propuso el estudio de los correspondientes compuestos *N*-alquilados de cada una de las familias de compuestos (Figura 18). Tanto las sustituciones en los carbonos del anillo de imidazol como las *N*-alquilaciones serán de naturaleza alquílica y/o aromática.

### 1.1.1. Síntesis de imidazoles

Existen diversas metodologías sintéticas para formar el anillo de imidazol diferentemente sustituido siendo dependientes del tipo de sustitución que se quiera obtener.

Con el fin de introducir diferentes sustituyentes en las posiciones 4 y 5 (Figura 19), se siguió una estrategia sintética multicomponente en la que el anillo de

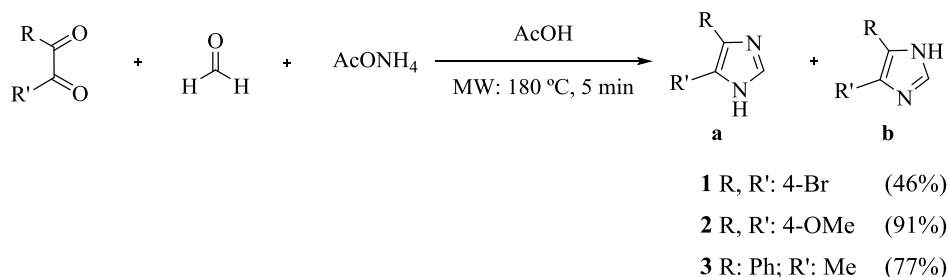


**Figura 19.-** Imidazoles 4,5-disustituídos.

imidazol se forma a partir de la condensación de dicetonas, formaldehído y acetato de amonio. En concreto, se ha seguido una metodología descrita en la bibliografía<sup>63</sup>, basada en el empleo de la síntesis orgánica asistida por microondas (MAOs), logrando bajos tiempos de reacción (5 min) y rendimientos elevados a una temperatura de 180 °C (Esquema 1).

---

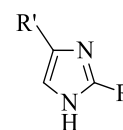
<sup>63</sup> Wolkenberg, S. E.; Wisnoski, D. D.; Leister, W. H.; Wang, Y.; Zhao, Z.; Lindsley, C. W., Efficient synthesis of imidazoles from aldehydes and 1,2-diketones using microwave irradiation. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1453-1456.



**Esquema 1.-** Síntesis de imidazoles 4,5-disustituídos (Compuestos **1-3**).

La asignación estructural de los compuestos finales se llevó a cabo a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. Cabe señalar que cuando los sustituyentes R y R' del anillo de imidazol no son iguales (compuesto **3**), debido a la prototropía entre los dos átomos de nitrógeno, puede presentarse un equilibrio entre dos formas tautoméricas. La determinación del tautómero mayoritario, se ha realizado por resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), y experimentos de efecto nuclear Overhauser (NOE)<sup>64</sup> que permite determinar el acoplamiento dipolar, es decir la interacción magnética a través del espacio entre dos núcleos.

De esta manera, la irradiación de los protones *orto*- del anillo de fenilo unido al imidazol ( $\text{H}_7$  y  $\text{H}_{11}$ , 7.60 ppm) produce efecto NOE con los protones correspondientes al metilo heterocíclico ( $\text{H}_{12}$ , 2.36 ppm), mientras que si se irradian los protones del metilo ( $\text{H}_{12}$ ) se produce efecto NOE con el protón del NH ( $\text{H}_1$ ) además de los protones *orto*- del fenilo. Por ello, el tautómero mayoritario para el compuesto **3** fue la forma **a** (Figura 21).



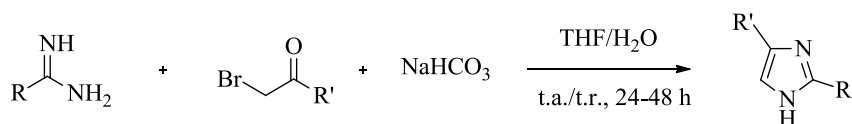
**Figura 20.-** Imidazoles 2,4-disustituídos.

<sup>64</sup> Neuhaus, D.; Williamson, M., The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis, Wiley-VCH, New York, 2000.

## Discusión y Resultados

Para la obtención de los derivados de imidazol 2,4-disustituídos (Figura 20), se han empleado dos rutas sintéticas diferentes. La primera, consiste en una ciclación intermolecular entre un derivado de amidina y un derivado de  $\alpha$ -halometilcetona<sup>65</sup> en medio ligeramente básico (Esquema 2).

En primer lugar, las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (compuestos **4**, **5** y **6**) pero dado que los tiempos de reacción eran muy altos (16-48 h), se realizaron los derivados **7-14**, a temperatura de reflujo, aumentando en general el rendimiento de la reacción.



<b>4</b>	R: 2-Py	R': 4-BrPh	(34%)
<b>5</b>	R: 4-OMePh	R': 3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	(43%)
<b>6</b>	R: Ph	R': 4-OMePh	(44%)
<b>7</b>	R: 4-ClPh	R': 4-OMePh	(66%)
<b>8</b>	R, R': 4-ClPh		(62%)
<b>9</b>	R: Ph	R': 4-ClPh	(43%)
<b>10</b>	R: Ph	R': 4-BrPh	(37%)
<b>11</b>	R: Ph	R': 2-Naftilo	(39%)
<b>12</b>	R, R': Ph		(30%)
<b>13</b>	R: 3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	R': 4-BrPh	(46%)
<b>14</b>	R: 3-Benzotiofeno	R': 4-BrPh	(17%)

**Esquema 2.-** Síntesis de imidazoles 2,4-disustituídos (compuestos **4-14**).

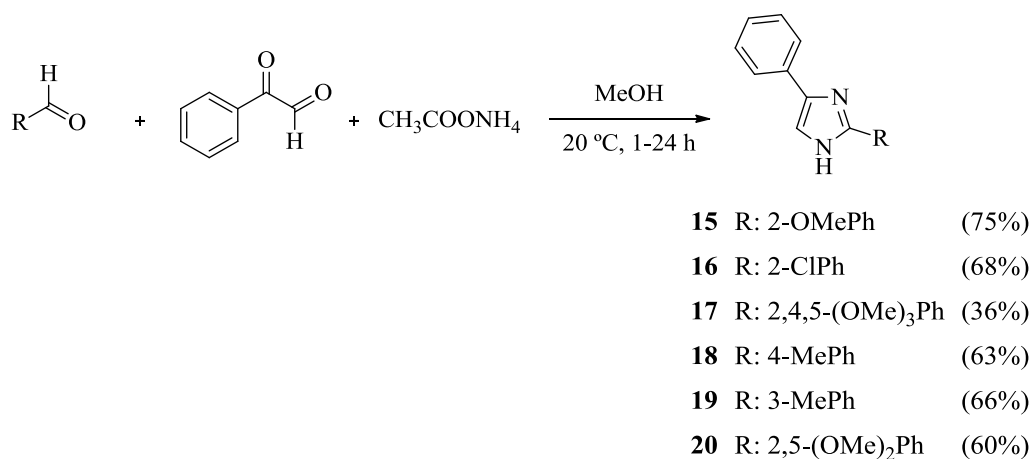
La segunda ruta sintética emplea la ciclación intermolecular entre el derivado de fenilglioxal y un aldehído en presencia de un exceso de sal de amonio. Esta

<sup>65</sup> Li, B.; Chiu, C. K. F.; Hank, R. F.; Murry, J.; Roth, J.; Tobiassen, H., An optimized process for formation of 2,4-disubstituted imidazoles from condensation of amidines and  $\alpha$ -haloketones. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 682-683.

## Discusión y Resultados

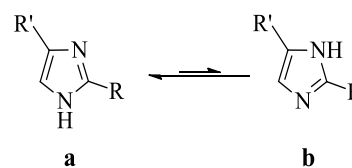
especie es la encargada de transferir los átomos de nitrógeno para la formación del anillo de imidazol<sup>66</sup> (Esquema 3).

El empleo de una u otra ruta (Esquema 2 o Esquema 3), se realizó en función de la asequibilidad sintética de los reactivos de partida.



**Esquema 3.-** Síntesis de imidazoles 2,4-disustituídos (compuestos **14-20**).

Al emplear cualquiera de las dos rutas sintéticas, se obtuvieron los dos tautómeros posibles (Figura 21), siendo el tautómero mayoritario el producto final representado en el esquema de síntesis (tautómero a), debido a que se produce un menor impedimento estérico entre el protón unido al nitrógeno y los sustituyentes del anillo de imidazol. La identificación

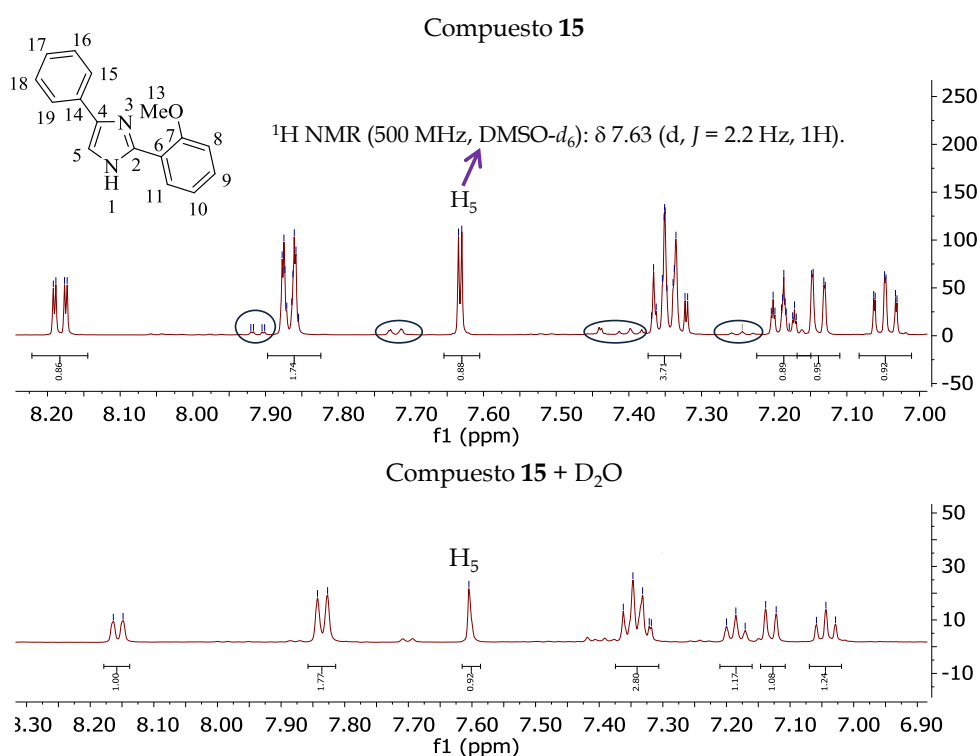


**Figura 21.-** Representación del equilibrio tautomérico entre las formas posibles.

<sup>66</sup> Zuliani, V.; Cocconcelli, G.; Fantini, M.; Ghiron, C.; Rivara, M., A practical synthesis of 2,4(5)-diarylimidazoles from simple building blocks. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4551-4553.

## Discusión y Resultados

inequívoca de la posición del protón unido al nitrógeno, se llevó a cabo mediante estudios monodimensionales y bidimensionales de resonancia magnética nuclear (RMN).



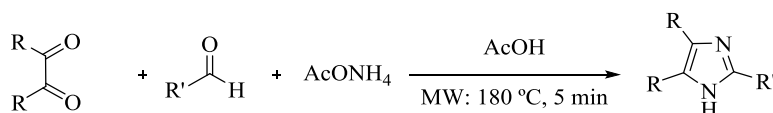
**Figura 22.-** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN realizados en DMSO y DMSO con  $\text{D}_2\text{O}$  ampliados en la zona aromática (compuesto **15**). Las zonas rodeadas con un círculo indican las señales correspondientes al tautómero minoritario.

Mediante el estudio del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **15**, se observa como la señal correspondiente al  $\text{H}_5$  del imidazol resuena a 7.63 ppm y aparece como un doblete con constante de acoplamiento ( $J$ ) de 2.2 Hz, debido al acoplamiento escalar con el NH de la posición adyacente. Al añadir agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) se produce el intercambio rápido con el protón unido directamente a un heteroátomo, en este caso con el NH, lo que se traduce en

una señal de singlete para el H<sub>5</sub> al desaparecer el acoplamiento escalar (Figura 22).

Además de estos estudios, las estructuras químicas de todos los derivados sintetizados se han asignado inequívocamente mediante estudios bidimensionales de correlación heteronuclear, entre protón y carbono, de corta distancia como de larga distancia (<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC y <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC), concluyendo en todos los casos que el tautómero mayoritario es la forma **a**.

La síntesis de los imidazoles 2,4,5-trisustituídos se llevó a cabo empleando la misma metodología utilizada para los derivados 4,5-disustituídos reemplazando el formaldehído por un aldehído sustituido<sup>63</sup> (Esquema 4). El uso del microondas favorece que los tiempos de reacción sean muy cortos con rendimientos de buenos a muy buenos. Estas moléculas, al tener un plano de simetría, no presentan diferentes formas tautoméricas.



**21** R: 2-OMePh R': 4-OMePh (59%)

**22** R: 2-ClPh R': 4-OMePh (82%)

**23** R: 2-OMePh R': 4-BrPh (84%)

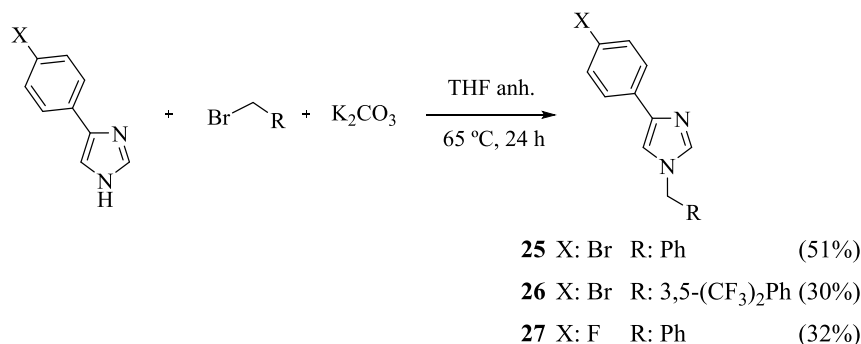
**24** R: 2-ClPh R': 4-BrPh (92%)

**Esquema 4.-** Síntesis de imidazoles, 2,4,5-trisustituídos (compuestos **21-24**).

Por último, y dado que el prototipo **PF-670462**, tiene el átomo de nitrógeno del anillo de imidazol alquilado, se ha procedido a la síntesis de los correspondientes derivados alquilados de los compuestos previamente sintetizados. Los agentes alquilantes que se han utilizado han sido tanto de naturaleza aromática, como de naturaleza alifática.

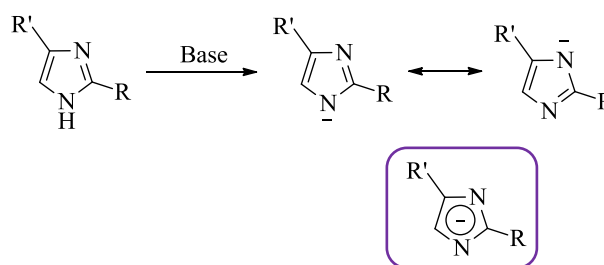
## Discusión y Resultados

La *N*-bencilación se realizó según métodos clásicos de alquilación, utilizando un disolvente anhidro en presencia de base (Esquema 5).



**Esquema 5.-** Síntesis de imidazoles *N*-alquilados (compuestos **25-27**).

Dado que el producto de partida está en equilibrio tautomérico, y que en medio básico la entidad que reacciona es la base conjugada (Figura 23), la reactividad no tiene relación directa con la



**Figura 23.-** Equilibrio entre las bases conjugadas del imidazol 2,4-disustituido.

tautomería<sup>67</sup>, es decir, no se puede pensar que el producto obtenido sea el que proviene del tautómero mayoritario y no el del minoritario, siendo necesario un estudio de <sup>1</sup>H-RMN para determinar inequívocamente la posición de alquilación. El estudio de los espectros NOE al irradiar los protones del metileno (H<sub>12</sub>) unido directamente al átomo de nitrógeno del imidazol ha permitido establecer que la alquilación se ha producido sobre el nitrógeno N<sub>1</sub>

<sup>67</sup> Claramunt, R. M.; Elguero, J., Una aproximación a la tautomería de los heterociclos aromáticos. *An. Quím.* **2006**, *102*, 30-39.

del imidazol. A modo de ejemplo, la Figura 24 muestra los espectros del imidazol **25** y el espectro NOE observado entre los protones H<sub>12</sub> y H<sub>2</sub>/H<sub>5</sub> del imidazol.

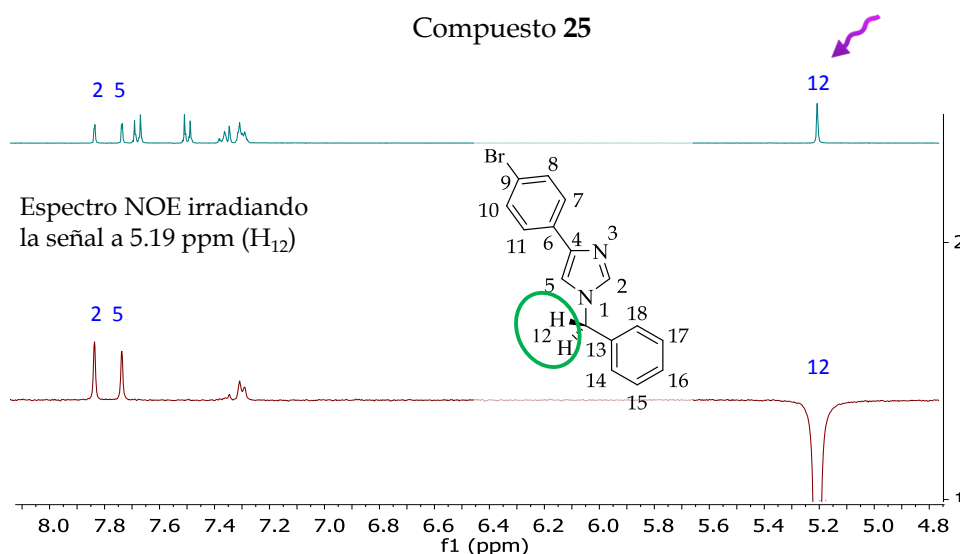
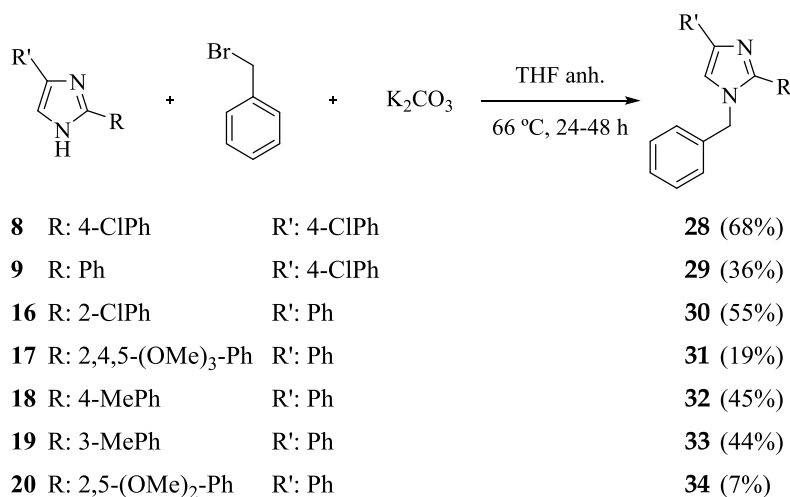


Figura 24.- Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (arriba) y espectro NOE (abajo), derivado **25**.

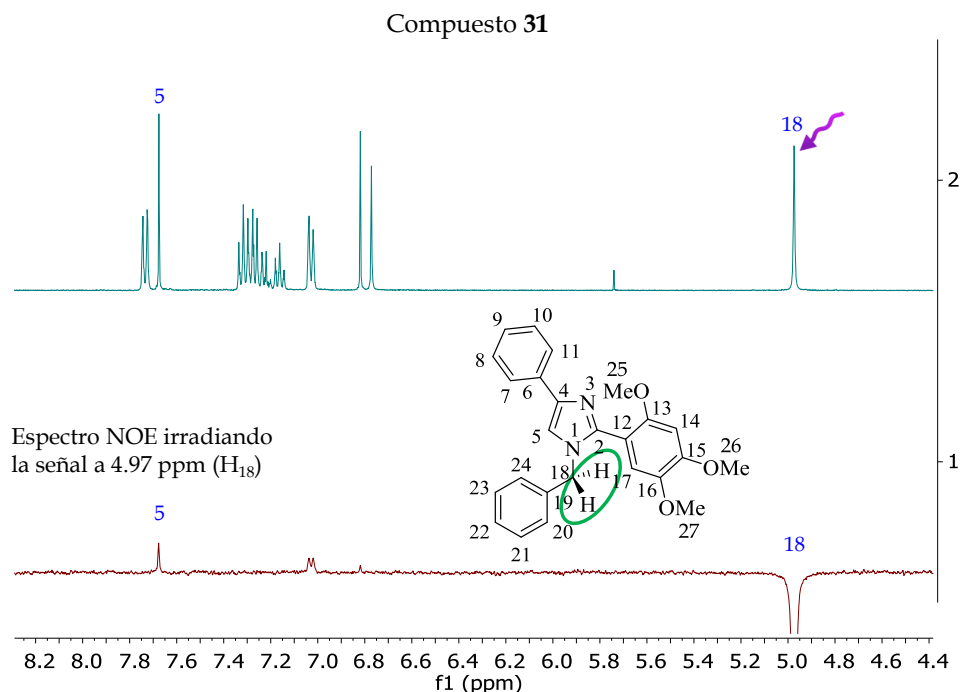
La alquilación se realizó según la metodología descrita anteriormente para los derivados monosustituidos. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente hasta la desaparición del producto final (Esquema 6). Los rendimientos fueron desde el 7% (derivado **34**) hasta el 68% (imidazol **28**). Observando los valores de los rendimientos de reacción se deduce que los más bajos se obtuvieron en los casos en los que el grupo R contenía diversos grupos metoxilo en su estructura, lo que disminuye la nucleofilia del nitrógeno del imidazol desfavoreciendo el ataque sobre el derivado halogenado.

## Discusión y Resultados



**Esquema 6.-** Síntesis de imidazoles disustituídos *N*-alquilados (imidazoles **28-34**).

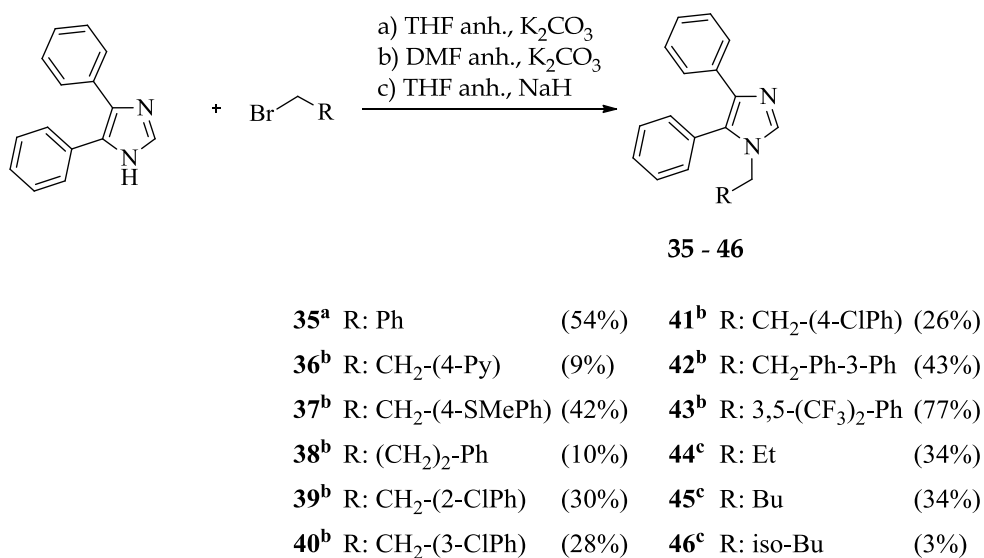
Al igual que en el caso anterior, la posición de alquilación se determinó de manera inequívoca a partir de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y el estudio de los espectros NOE. A modo de ejemplo en la Figura 25, se recogen los espectros de <sup>1</sup>H-RMN y NOE del imidazol trisustituído **31** que muestra la posición de alquilación en N<sub>1</sub>. Esta posición es la única encontrada en todos los casos y representa la de menor impedimento estérico al ataque electrófilo del agente alquilante.



**Figura 25.-** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (arriba) y espectro NOE (abajo) del compuesto 31.

Utilizando el derivado comercial, 4,5-difenilimidazol, como producto de partida, se ha llevado a cabo una gran variedad de *N*-alquilaciones empleando diferentes condiciones básicas así como tiempos y temperaturas de reacción (Esquema 7). Se llevaron a cabo tres metodologías diferentes variando tanto el disolvente como la base empleada. Como disolventes se emplearon THF o DMF, obteniéndose rendimientos más altos en los casos en los que se empleó THF. En cuanto a la base se empleó  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en el caso de tener agentes alquilantes de naturaleza aromática y  $\text{NaH}$  en el caso de ser de naturaleza alquílica. Esto es debido a que la naturaleza electrófila de estos agentes alquilantes es muy baja, y por tanto es necesario el uso de una base más fuerte con el fin de aumentar la nucleofilia del derivado de imidazol.

## Discusión y Resultados

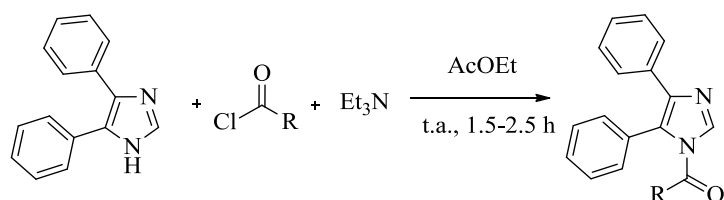


**Esquema 7.-** Síntesis de 4,5-difenilimidazoles *N*-alquilados (compuestos **35-46**).

Por último, se han preparado dos derivados con enlace amida en el nitrógeno del imidazol y así poder estudiar esta nueva modificación estructural al incluir un agrupamiento tipo carbonilo (Esquema 8). La reacción se llevó a cabo con el cloruro de ácido correspondiente en presencia de trietilamina como base<sup>68</sup>. El bajo rendimiento observado en el compuesto **47** pudo ser debido a un impedimento estérico entre el derivado de benzotiofeno y el imidazol.

<sup>68</sup> Lee, J. P.; Bembi, R.; Fife, T. H., Steric effects in the hydrolysis reactions of *N*-acylimidazoles. Effect of aryl substitution in the leaving group. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2872-2876.

## Discusión y Resultados

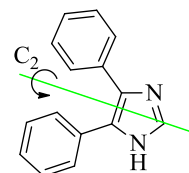


**47** R: 2-Benzotiofeno (5%)

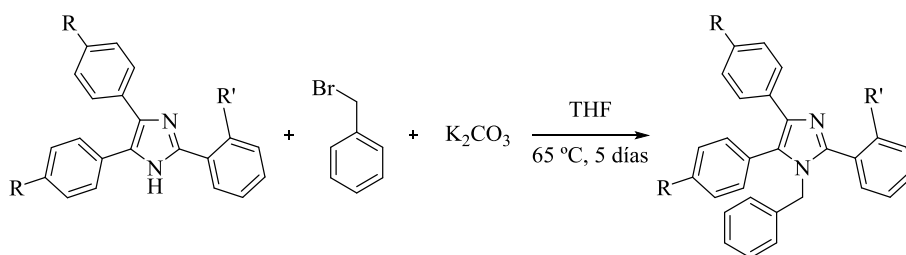
**48** R: Ph (41%)

**Esquema 8.-** Síntesis de 4,5-difenilimidazoles *N*-alquilados (derivados **47** y **48**).

Todos los productos sintetizados derivados del 4,5-difenilimidazol (**35-48**) poseen un eje de simetría  $C_2$  (Figura 26), resultando por tanto las dos posibles posiciones de alquilación equivalentes. Como última modificación, se sintetizaron algunos derivados *N*-alquilados de imidazoles trisustituidos, empleando la metodología anteriormente descrita (Esquema 9), obteniendo los derivados de imidazol tetrasustituidos con rendimientos moderados.



**Figura 26.-** Eje de simetría de los derivados **35-48**.



**49** R: OMe R': Cl (50%)

**50** R: Br R': OMe (35%)

**51** R: Br R': Cl (12%)

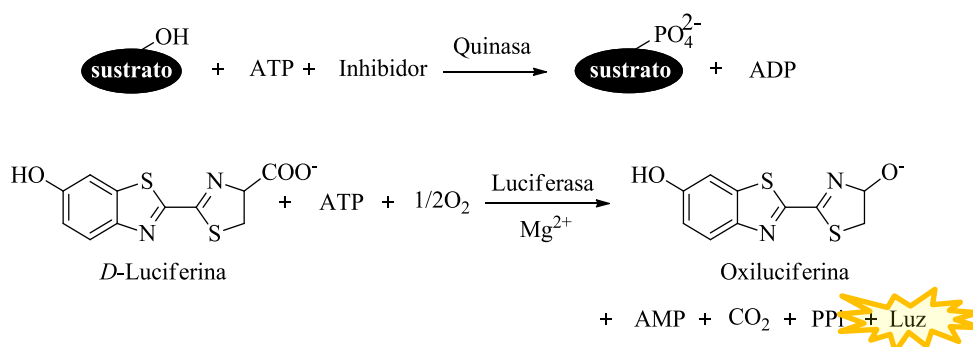
**Esquema 9.-** *N*-alquilación de imidazoles 2,4,5-trisustituidos (compuestos **49-51**).

## Discusión y Resultados

### 1.1.2. Ensayos de la actividad enzimática en CK1

A continuación, todos los derivados de imidazol diferentemente sustituidos fueron evaluados como potenciales inhibidores de CK1.

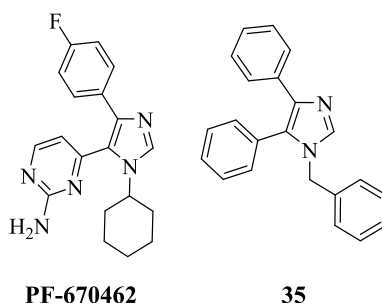
Para ello, se implementó un método apropiado en nuestro laboratorio. Se eligió una metodología *in vitro*, en formato de placas de 96 pocillos que utiliza enzima recombinante humana CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$ . Como técnica de lectura se utilizó la luminiscencia comercializada con el nombre de Kinase-Glo<sup>®</sup> (Figura 27). Este método evita el uso de radioactividad aumentando así su seguridad para los investigadores. Los ensayos se realizan en presencia y ausencia de compuesto. La cantidad de luz medida va a depender de la concentración de ATP que haya en el medio. Y a su vez la concentración de ATP va a depender de la inhibición de quinasa, ya que cuanto más inhibida esté la quinasa menos cantidad de ATP se va a consumir y por tanto más señal luminimétrica observaremos.



**Figura 27.-** Método de evaluación biológica mediante luminiscencia, Kinase-Glo<sup>®</sup>.

Utilizando esta metodología se han evaluado todos los compuestos sintetizados (1-51) a una concentración fija de 10  $\mu\text{M}$  determinándose el % de inhibición de CK1 a esta concentración. Se ha procedido a calcular la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) sólo en aquellos casos donde la inhibición

de la enzima a 10  $\mu\text{M}$  ha sido  $\geq 50\%$ . La  $\text{CI}_{50}$  es la concentración de compuesto necesaria para disminuir la actividad enzimática en un 50%. De todos los derivados de imidazol evaluados sólo el derivado **35** presenta un 51% de inhibición frente a la isoforma de CK1 $\delta$ , siendo su  $\text{CI}_{50} = 11.12 \mu\text{M}$ . La actividad encontrada es menor que la del prototipo (**PF-670462**), pero la estructura química es mucho más sencilla (Figura 28).



**Figura 28.-** Compuesto prototipo, **PF-670462**, imidazol diseñado y sintetizado, compuesto **35**.

Dado que la selección de la diana CK1 se hizo en base a su capacidad de fosforilar la proteína TDP-43, se ha evaluado si el imidazol **35** presenta esta capacidad, con el fin de confirmar nuestra hipótesis de trabajo.

### 1.1.3. Estudio de la disminución de la fosforilación de la proteína TDP-43 inducida por *L*-BMAA

Recientemente se ha descrito que la neurotoxina  $\beta$ -metilamino-*L*-alanina (*L*-BMAA) asociada con la etiología de la esclerosis lateral amiotrófica, aumenta las formas fosforiladas de la proteína TDP-43<sup>69</sup>. Utilizando esta metodología experimental que puede considerarse un modelo celular de esclerosis lateral

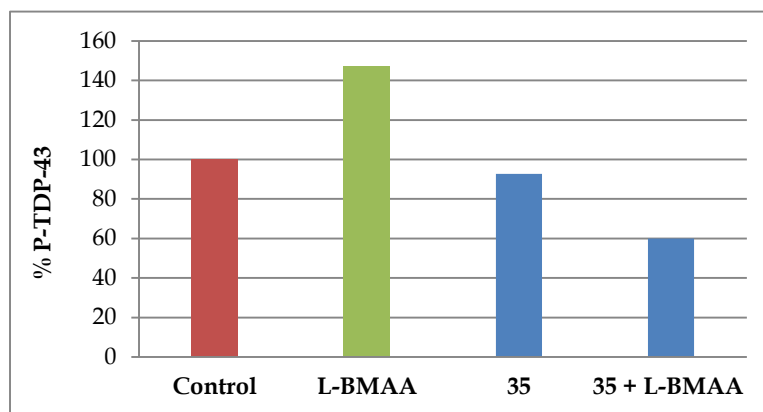
<sup>69</sup> Muñoz-Sáez, E.; de Munk, E.; Arahuetes, R. M.; Solas, M. T.; Martínez, A. M.; Miguel, B. G.,  $\beta$ -*N*-methylamino-*L*-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma. *J. Toxicol. Sci.* **2013**, *38*, 425-430.

## Discusión y Resultados

---

amiotrófica, se ha evaluado el derivado **35** para estudiar su capacidad para disminuir la fosforilación de TDP-43.

El experimento se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Begoña G. Miguel de la Universidad Complutense de Madrid. Se incubaron las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con *L*-BMAA en presencia y ausencia de inhibidor y se cuantificó la fosforilación de TDP-43 utilizando un anticuerpo específico. En la Figura 29, se muestran los resultados de la densitometría realizada sobre el *Western-blot*.

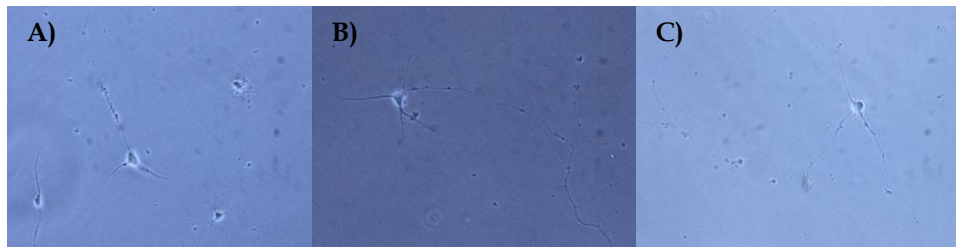


**Figura 29.-** Densitometría del *Western-blot*, se representó el % de TDP-43 fosforilada en presencia del derivado **35**, en presencia y ausencia de *L*-BMAA respecto al control.

El inhibidor de CK1 **35**, es capaz de penetrar en la célula y disminuye las formas fosforiladas de la proteína TDP-43 inducida por la neurotoxina *L*-BMAA, validando CK1 como diana farmacológica frente al daño producido por la fosforilación de TDP-43.

### 1.1.4. Estudio de la supervivencia de motoneuronas en ausencia de factores tróficos

Dado que en la esclerosis lateral amiotrófica se produce la muerte progresiva de las motoneuronas, se ha evaluado el potencial neuroprotector del imidazol **35** en motoneuronas aisladas de embriones de rata en ausencia de factores tróficos<sup>70</sup>. De esta manera se ha estudiado si el derivado **35**, es capaz de aumentar la supervivencia de las motoneuronas en ausencia de factores tróficos. Este ensayo se ha realizado en colaboración con la Dra. Patricia Casina de la Universidad de la República de Uruguay. Se cultivaron las motoneuronas en presencia y ausencia de factores tróficos, midiendo la capacidad de las mismas a crecer en presencia o no de compuesto. Se emplearon dos controles, uno en ausencia de factores tróficos, y otro en presencia de factores tróficos.



**Figura 30.-** A) motoneuronas de embriones de rata en ausencia de factores tróficos; B) motoneuronas de embriones de rata en presencia de factores tróficos y C) motoneuronas de embriones de rata en ausencia de factores tróficos y en presencia del imidazol **35**.

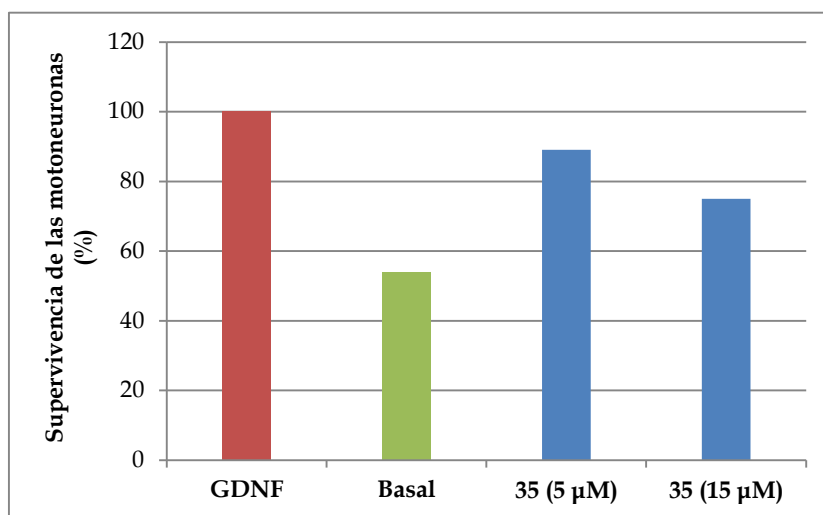
En la Figura 30, se observa que en ausencia de factores tróficos (A) empiezan a morir las motoneuronas, sin embargo en presencia de factores tróficos (B) las

---

<sup>70</sup> Angka, H. F.; Geddes, A. J.; Kablar, B., Differential survival response of neurons to exogenous GDNF depends on the presence of skeletal muscle. *Dev. Dyn.* **2008**, *237*, 3169–3178.

## Discusión y Resultados

motoneuronas van creciendo de la misma manera que lo hacen en presencia del compuesto **35** (C) a una concentración de 5 y 15  $\mu\text{M}$ .



**Figura 31.-** Cuantificación de la supervivencia de las motoneuronas en presencia del compuesto **35**. GDNF (*Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*), en presencia de factores tróficos; basal en ausencia de factores tróficos.

En la Figura 31 se muestran los datos de este experimento cuantificados en % de supervivencia de las motoneuronas.

El imidazol **35** aumenta la supervivencia de las motoneuronas aún en ausencia de factores tróficos a las concentraciones de 5 y 15  $\mu\text{M}$ , sugiriendo que la inhibición de CK1 puede tener un papel neuroprotector.

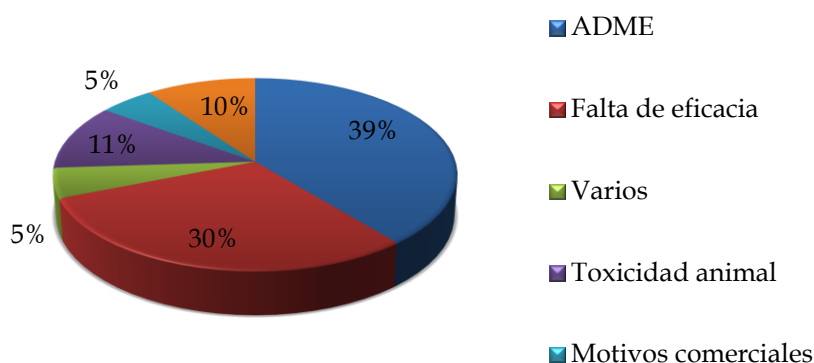
### 1.1.5. Estudio de las propiedades farmacocinéticas y seguridad farmacológica

Dado que el imidazol **35** inhibe a la enzima CK1, disminuyendo la fosforilación de TDP-43, y además aumenta la supervivencia de las motoneuronas en ausencia de factores tróficos; se han estudiado sus

propiedades tipo fármaco con el fin de programar estudios biológicos más avanzados.

Un compuesto candidato a fármaco además de poseer la capacidad de modular la diana de interés, debe tener unas buenas propiedades tipo fármaco tales como, absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME-tox). En concreto, en nuestro caso, para patologías del sistema nervioso central es fundamental el paso de la barrera hematoencefálica.

Casi el 40% de los compuestos que llegan a fases clínicas fracasan debido a que no presentan unas buenas propiedades farmacocinéticas, ADME-tox (Figura 32)<sup>71</sup>. Por lo que es de vital importancia el estudio *a priori* de estas propiedades.



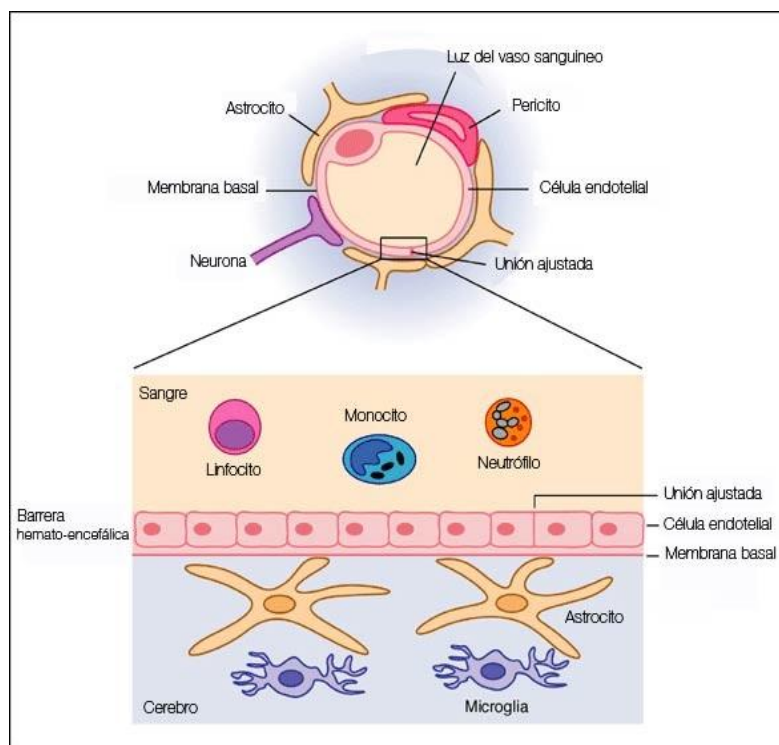
**Figura 32.-** Causas del fracaso en el desarrollo de fármacos.

<sup>71</sup> Kennedy, T., Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discov. Today* **1997**, 2, 436-444.

## Discusión y Resultados

### 1.1.5.1. Determinación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) que actúa de barrera física entre el sistema vascular y el cerebro; se encuentra constituida por células endoteliales especializadas que recubren el sistema vascular cerebral. Esta barrera tiene una importancia capital en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas y las células gliales, así como en el bloqueo del acceso de sustancias tóxicas endógenas o exógenas<sup>72</sup>. En la Figura 33, se representa un esquema de la estructura de la barrera hematoencefálica.



**Figura 33.-** Estructura de la barrera hematoencefálica.

<sup>72</sup> Jeffrey, P.; Summerfield, S., Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 33-37.

Las moléculas que atraviesan la barrera hematoencefálica, lo hacen mediante difusión pasiva, difusión facilitada por transportadores o bien mediante transporte activo; siendo la difusión pasiva el mecanismo más habitual. Los compuestos lipofílicos con un bajo peso molecular ( $PM < 500$  Da) pueden atravesarla directamente mediante difusión pasiva entre las paredes de capilares mientras que existen transportadores específicos para vitaminas y aminoácidos, entre otros.

Con el fin de poder predecir la capacidad de nuestros compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica, se ha puesto a punto en nuestro grupo de investigación un método experimental basado en la metodología PAMPA, de sus siglas en inglés *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*. Con este método se puede estudiar la permeabilidad por difusión pasiva de los compuestos orgánicos usando un lípido de cerebro porcino, que emula a la barrera hematoencefálica humana<sup>73</sup>. Es un método adaptado a placas de 96 pocillos que utiliza la espectroscopía de UV para la cuantificación del compuesto.

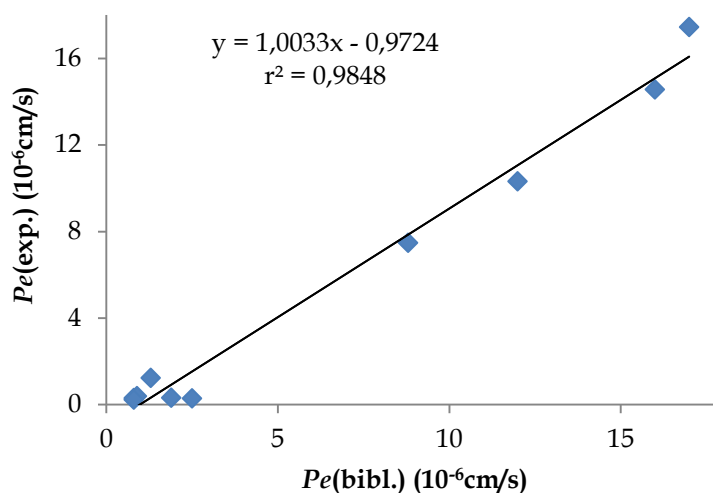
Para ello se realiza siempre una validación experimental con diez fármacos comerciales cuya capacidad de atravesar o no la BHE es conocida (Figura 34), obteniéndose una correlación lineal entre la permeabilidad experimental y la descrita en la bibliografía, que se utiliza para determinar la permeabilidad de los compuestos problema.

---

<sup>73</sup> Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T., High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223-232.

## Discusión y Resultados

---



**Figura 34.-** Correlación lineal entre los valores de permeabilidad descritos en la bibliografía y los obtenidos experimentalmente de los compuestos comerciales utilizando la metodología PAMPA.

De esta forma, y de acuerdo con los valores descritos en la bibliografía para la permeabilidad efectiva en humanos donde se considera el valor de  $4 \times 10^{-6}$  cm/s como límite para establecer los compuestos que pueden pasar al cerebro, y  $2 \times 10^{-6}$  cm/s como límite para establecer los derivados que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica; se calcula en cada experimento a partir de la ecuación de la recta de calibración el valor "y" de permeabilidad efectiva experimental [ $Pe(\text{exp.})$ ] a partir del cual el compuesto problema atravesará la barrera hematoencefálica<sup>74</sup>. Así, se espera que un compuesto pase la barrera hematoencefálica (SNC+) si tiene un valor de  $Pe(\text{exp.}) > 3.04 \times 10^{-6}$  cm/s, y por el contrario si tiene un valor de  $Pe(\text{exp.}) < 1.03 \times 10^{-6}$  cm/s, no pasará la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva.

---

<sup>74</sup> Crivori, P.; Cruciani, G; Carrupt, P. A.; Testa, B., Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecule structure. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2204-2216.

**Tabla 5.-** Comparativa entre la permeabilidad efectiva experimental y descrita en la bibliografía de diez compuestos comerciales, usados para la validación del método. El valor de la permeabilidad experimental [ $Pe(\text{exp.})$ ] corresponde a la media de los valores obtenidos en dos experimentos independientes.

Compuesto	$Pe(\text{exp.})$ ( $10^{-6}\text{cm/s}$ )	$Pe(\text{bibl.})$ ( $10^{-6}\text{cm/s}$ ) <sup>73</sup>
Atenolol	$0.3 \pm 0.4$	0.8
Cafeína	$1.2 \pm 0.7$	1.3
Desipramina	$10.3 \pm 0.3$	12
Enoxacino	$0.4 \pm 0.2$	0.9
Hidrocortisona	$0.3 \pm 0.1$	1.9
Ofloxacino	$0.2 \pm 0.1$	0.8
Piroxicam	$0.3 \pm 0.1$	2.5
Promazina	$7.5 \pm 0.1$	8.8
Testosterona	$17.4 \pm 0.2$	17
Verapamilo	$14.6 \pm 0.1$	16

En la Tabla 5, se recogen los resultados del experimento llevado a cabo para determinar el paso de la barrera hematoencefálica. Así para el derivado **35** se determinó que tiene una  $Pe(\text{exp.}) = 12.80 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  y por tanto es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (SNC+).

### 1.1.5.2. Estudios de inhibición de citocromos

La metabolización hepática de los fármacos y sus metabolitos se realiza principalmente en el hígado, y es llevado a cabo mayoritariamente por los citocromos de la familia P450 (CYP450). El CYP450 juega un papel muy importante en la biotransformación de un gran número de fármacos estructuralmente diversos. Algunas isoenzimas de esta familia, como son, CYP3A4, 2D6 y 2C9, están implicadas en el metabolismo de la mayoría de los fármacos. Para minimizar posteriores problemas en fases clínicas,

## Discusión y Resultados

---

normalmente se incorporan, en las fases tempranas del desarrollo de fármacos, estudios de metabolización por parte de estos citocromos<sup>75</sup>.

Este experimento se ha realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Francisca Vicente de la Fundación Medina en Granada. En el ensayo se mide la  $CI_{50}$  del compuesto, clasificándose en inhibidores fuertes ( $CI_{50} > 1 \mu M$ ), moderados ( $1 \mu M < CI_{50} < 10 \mu M$ ) y débiles ( $CI_{50} > 10 \mu M$ ) de los citocromos. Los compuestos candidatos a fármaco, no deben presentar una inhibición muy fuerte del citocromo para evitar problemas de interacción medicamentosa. Los resultados obtenidos para el imidazol **35** se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.-** Resultados de la inhibición de los citocromos para el compuesto **35**.

Compuesto	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
<b>35</b>	Inhibidor débil	Inhibidor débil	Inhibidor débil/moderado

El derivado **35** presenta baja inhibición de los citocromos estudiados, por lo que cumple los requisitos para poder ser desarrollado como fármaco.

### 1.1.5.3. Estudio de las propiedades de seguridad

Últimamente se han aplicado diversos experimentos *in vitro* para estudiar las propiedades de seguridad de los compuestos candidatos a fármaco. Estos estudios se realizan en las fases tempranas de desarrollo incrementando así las probabilidades de éxito en fases más tardías<sup>76</sup>.

---

<sup>75</sup> Pérez, J.; Díaz, C.; Salado, I. G.; Pérez, D. I.; Peláez, F.; Genilloud, O.; Vicente, F., Evaluation of the effect of compound aqueous solubility in cytochrome P450 inhibition assays. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2013**, *4*, 628-639.

<sup>76</sup> Yu, H.; Adedoyin, A., ADME-Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 852-861.

Por tanto dado que el compuesto **35** tiene la actividad buscada, inhibe CK1, y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, se ha evaluado su seguridad *in vitro*.

### -Seguridad genética: Ensayos de mutagénesis

La identificación de sustancias capaces de inducir mutaciones genéticas en el ADN es un procedimiento esencial para determinar la seguridad del compuesto candidato a fármaco. Los compuestos capaces de inducir mutaciones son perjudiciales para la salud humana ya que pueden producir efectos en la fertilidad así como en las generaciones posteriores, o incluso pueden inducir cáncer. Una molécula, para poder ser desarrollada como fármaco no debe ser genotóxica. El test de Ames (Figura 35), es el método *in vitro* empleado para estos estudios y está aceptado para la identificación de compuestos que pueden producir modificaciones genéticas<sup>77</sup>.

El ensayo se realiza con cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98) que están modificadas genéticamente y no son capaces de sintetizar el aminoácido histidina, por lo que no pueden desarrollarse. Si el compuesto en ensayo produce nuevas mutaciones, se revierte el daño, produciendo el crecimiento de la cepa. Los resultados obtenidos con este test tienen una reproducibilidad alta en modelos murinos (77-90%)<sup>78</sup> por lo que es un ensayo que se lleva a cabo en etapas muy tempranas de desarrollo de fármacos.

---

<sup>77</sup> Mortelmans, K.; Zeiger, E., The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **2000**, *455*, 29-60.

<sup>78</sup> Zeiger, E.; Haseman, J. K.; Shelby, M. D.; Margolin, B. H.; Tennant, R. W., Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **1990**, *16*, 1-14.

## Discusión y Resultados

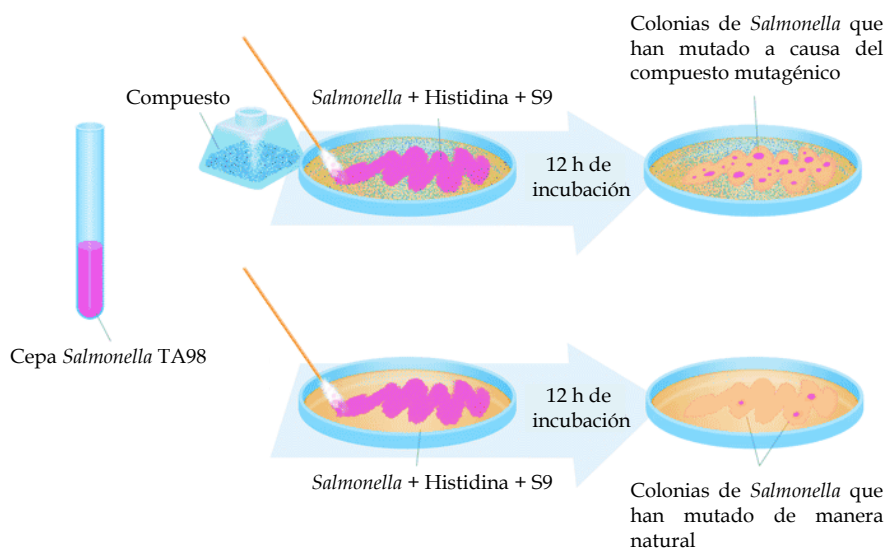


Figura 35.- Representación del Test de Ames.

Además, dado que las bacterias son incapaces de metabolizar compuestos químicos vía citocromos, como ocurre en mamíferos y otros vertebrados, se adiciona un sistema de activación metabólico externo (fracción S9) para poder estudiar la toxicidad, ya no del compuesto *per se*, sino también de los metabolitos generados<sup>79</sup>.

Estos ensayos, que se realizaron en colaboración con el Prof. Hugo Cerecetto de la Universidad de la República de Uruguay, mostraron que ni el imidazol 35 ni sus metabolitos son mutagénicos, pudiéndose continuar el estudio del resto de sus propiedades como candidato a fármaco.

<sup>79</sup> Ames, B. N.; Lee, F. D.; Durston, W. E., An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 782-786.

*-Seguridad cardiaca: Determinación de la actividad sobre los canales iónicos voltaje-dependientes*

La cardioseguridad es otra de las propiedades que deben estudiarse en fases tempranas. Los canales iónicos dependientes de voltaje están relacionados con la actividad cardiovascular dado que la actividad eléctrica responsable de los latidos del corazón se produce por el paso de iones a través de la membrana de las células cardiacas. Cuando la actividad eléctrica del corazón se modifica, se producen las conocidas arritmias. Debido a estos efectos secundarios, un gran número de fármacos ya comercializados han sido retirados del mercado y otros que estaban en desarrollo han tenido que ser interrumpidos. Normalmente, los fármacos que producen arritmias lo hacen inhibiendo los canales de potasio, hERG<sup>80</sup>. Además de este canal, los canales de sodio, Nav1.5 y calcio, Cav1.2 están relacionados con la actividad eléctrica del corazón que coordina el pulso.

Los estudios de inhibición de estos canales se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Francisca Vicente de la Fundación Medina de Granada. Se determinó la CI<sub>50</sub> del imidazol **35** frente a los tres canales iónicos, y en función del valor de la CI<sub>50</sub> se pueden clasificar en inhibidores fuertes (CI<sub>50</sub> < 5 µM), moderados (5 µM < CI<sub>50</sub> < 50 µM), débiles (50 µM < CI<sub>50</sub> < 100 µM) y sin actividad (CI<sub>50</sub> > 100 µM). En la Tabla 7, se observa que el inhibidor de CK1, compuesto **35**, es un inhibidor fuerte del canal de sodio, y moderado de los canales hERG y Cav1.2 por lo que tiene una alta probabilidad de presentar efectos cardiotóxicos en humanos.

---

<sup>80</sup> Anyukhovskiy, E. P., Early prediction of proarrhythmic cardiotoxicity in the drug development process. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *91*, 7-8.

## Discusión y Resultados

---

**Tabla 7.-** Inhibición de los canales iónicos dependientes de voltaje.

Compuesto	hERG	Nav1.5	Cav1.2
35	Inhibidor moderado	Inhibidor fuerte	Inhibidor moderado

Todos estos estudios han permitido identificar al imidazol **35**, como un inhibidor de CK1 $\delta$  que penetra en el sistema nervioso central, es capaz de disminuir la fosforilación de TDP-43 en cultivos celulares, y de aumentar la supervivencia de las motoneuronas en ausencia de factores tróficos. Por todo ello, es un compuesto con muy buenas propiedades para poder ser utilizado como herramienta farmacológica para estudiar los procesos fisiológicos y patológicos en los que está involucrada CK1, tanto en modelos celulares como animales. Ahora bien, la inhibición de los canales iónicos que presenta este compuesto no lo hace recomendable para su desarrollo como fármaco en uso humano.

### **1.2. Búsqueda de nuevos inhibidores de CK1 mediante cribado biológico de quimiotecas**

El cribado biológico de quimiotecas ha demostrado ser una metodología eficaz en el descubrimiento de cabezas de serie químicamente diversos para una diana específica estando esta metodología incluida en lo que hoy se denomina genética química<sup>81</sup>. La genética química utiliza moléculas pequeñas como herramientas farmacológicas en el estudio de la función de una proteína determinada. El término nace en comparación con la genética clásica que se caracteriza por la modulación del genoma mediante siRNAs, mutagénesis dirigida, oligonucleótidos, etc. Para estudiar también la función de una proteína determinada suele distinguirse entre genética química prospectiva y genética química inversa (Figura 35)<sup>82</sup>.

En el primer caso, aproximación prospectiva, se parte de una evaluación fenotípica de una quimioteca para seleccionar estas pequeñas moléculas siendo el paso clave la determinación de la diana molecular sobre la que actúa la molécula elegida para producir el cambio fenotípico. En el segundo, aproximación inversa, el punto de partida es el cribado de quimiotecas en una proteína de interés siendo la etapa clave el hecho de que estas moléculas identificadas sean capaces de penetrar en la célula y promover el cambio fenotípico deseado.

En esta memoria se ha realizado una aproximación de genética química inversa para la identificación de nuevos inhibidores de CK1. Esta metodología presenta como ventaja, la obtención de prototipos que tras su optimización farmacológica pueden llegar a ser candidatos a fármacos. En nuestro grupo de

---

<sup>81</sup> Walsh, D. P.; Chang, Y. T., Chemical genetics. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2476-2530.

<sup>82</sup> Fisher, M.; Nelson, A., The chemical genetic approach: The interrogation of biological mechanisms with small molecule probes in 'New frontiers in chemical biology: Enabling drug discovery', *RSC Drug Discovery, Cambridge UK.* **2010**, 1-32.

## Discusión y Resultados

investigación existe una quimioteca de unas 800 moléculas diversas, formada por compuestos heterocíclicos, de PM < 500 Da que han sido sintetizados en diversos proyectos de búsqueda de nuevos fármacos eficaces en el sistema nervioso central. Para iniciar este estudio se optó inicialmente por la diversidad estructural eligiendo 25 moléculas de naturaleza heterocíclica variada para su evaluación biológica en CK1δ.

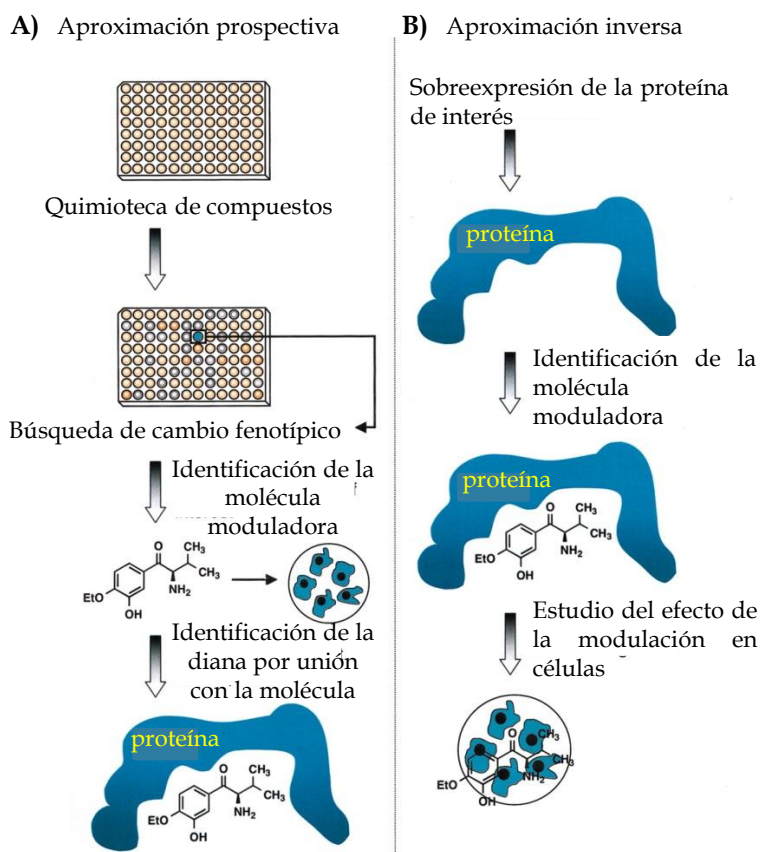
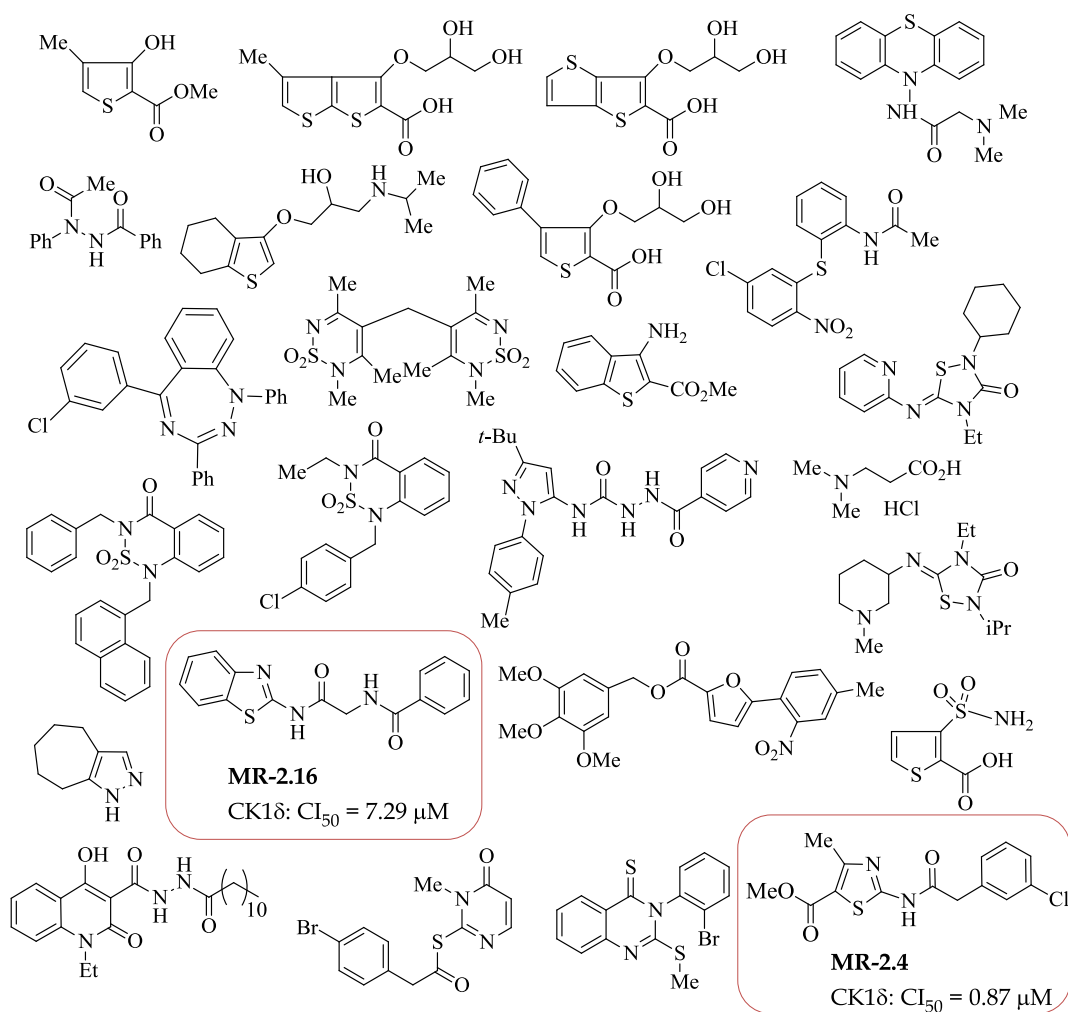


Figura 35.- Genética química prospectiva e inversa.

La evaluación frente a CK1δ se llevó a cabo empleando la metodología Kinase Glo®, anteriormente mencionado. Tras llevar a cabo el ensayo de los

## Discusión y Resultados

compuestos seleccionados a la misma concentración (10  $\mu\text{M}$ ) únicamente dos compuestos, **MR-2.4** y **MR-2.16**, mostraron una inhibición de la enzima  $\geq 50\%$ . Posteriormente, se calculó su  $\text{CI}_{50}$  presentando valores de 0.87 y 7.29  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 36).



**Figura 36.-** Compuestos heterocíclicos químicamente diversos seleccionados de nuestra propia quimioteca para un primer cribado frente a CK1 $\delta$ .

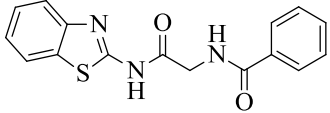
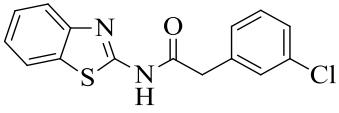
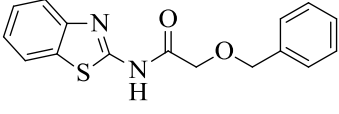
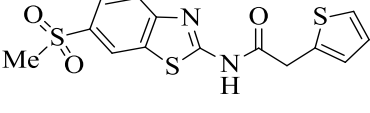
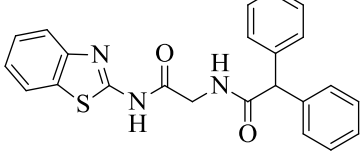
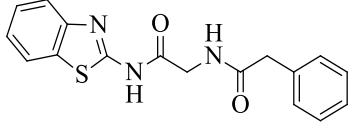
## Discusión y Resultados

Teniendo en cuenta la estructura química de estos dos nuevos compuestos (MR-2.4 y MR-2.16) se seleccionaron, en un segundo paso, un grupo de moléculas focalizadas en estas estructuras de nuestra quimioteca para su posterior evaluación.

**Tabla 8.-** Evaluación biológica de los compuestos con estructura química focalizada en tiazoles.

	Compuesto	Estructura	CK1δ CI <sub>50</sub> (μM)
Tiazoles	MR-2.4		0.87 ± 0.03
	MR-2.2		7.45 ± 0.40
	MR-3.4		9.31 ± 0.26
	MR-3.27		3.79 ± 0.77
	MR-2.19		7.38 ± 0.12
	MR-3.55		10.11 ± 0.09

**Tabla 9.-** Evaluación biológica de los compuestos con estructura química focalizada en benzotiazoles.

	Compuesto	Estructura	CK1δ CI <sub>50</sub> (µM)
Benzotiazoles	MR-2.16		7.29 ± 0.16
	MR-3.15		0.85 ± 0.10
	MR-2.58		4.37 ± 0.17
	IGS-0.2		2.69 ± 0.42
	MR-3.14		1.93 ± 0.02
	MR-3.60		6.33 ± 0.27

Fueron seleccionados compuestos que tuvieran en su estructura la entidad de tiazol o benzotiazol, variando la naturaleza y longitud del espaciador entre el heterociclo y el anillo aromático. La mayoría de los compuestos seleccionados para este segundo cribado (Tablas 8 y 9) presentaron inhibición frente a CK1δ en el rango micromolar, siendo el compuesto **MR-3.15** el inhibidor más potente de la familia de benzotiazoles evaluados, con un valor de CI<sub>50</sub> = 0.85 µM. Para el caso de la familia de tiazoles, no se mejoró la potencia inhibitoria

## Discusión y Resultados

---

del prototipo **MR-2.4**, tomándose este compuesto como cabeza de serie de la familia de este tipo de compuestos.

### 1.2.1. Optimización de los cabezas de serie

Los derivados **MR-2.4** (2-(2-(3-clorofenil)acetamida)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo) y **MR-3.15** (N-(2-(benzotiazol-2-ilamino)-2-oxoetil)benzamida) resultaron ser los inhibidores más potentes de CK1 $\delta$  y se seleccionaron como cabezas de serie para su posterior optimización. Las estructuras de ambos prototipos tienen en común un anillo de naturaleza heterocíclica (tiazol o benzotiazol) seguido de un espaciador de tipo amida y un grupo metileno; y a continuación, un anillo de fenilo sustituido.

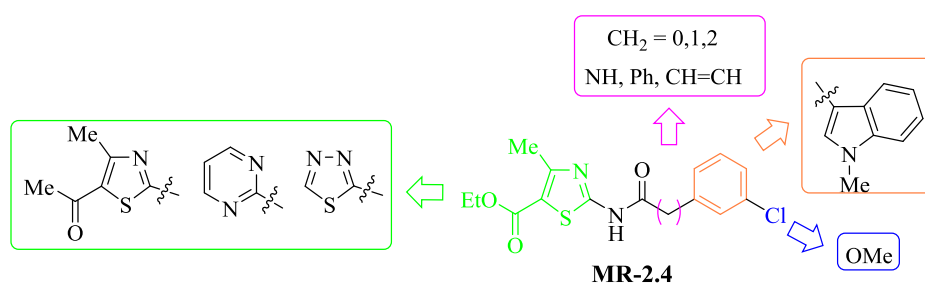
Considerando los dos prototipos de manera independiente, se diseñaron diferentes estructuras químicas con el fin de determinar la relación existente entre la estructura química y la actividad biológica frente a la enzima CK1.

#### 1.2.1.1. Optimización de **MR-2.4**

Para la optimización del compuesto **MR-2.4** se propuso el cambio del anillo de tiazol por distintos heterociclos como pirimidina y tiadiazol o bien modificando la sustitución del anillo de tiazol cambiando el grupo éster por un grupo acetilo. También, se evaluó la influencia en la actividad biológica de la naturaleza y longitud del espaciador y además, se introdujeron diferentes sustituyentes en las distintas posiciones del anillo de fenilo; y se substituyó por otros anillos de naturaleza heterocíclica, como es el anillo fusionado tipo indol. A continuación, se indican los cambios estructurales propuestos para el prototipo **MR-2.4** (Figura 37).

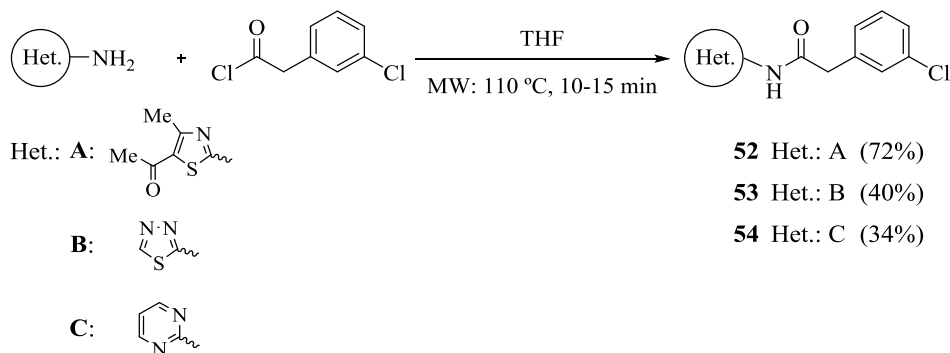
## Discusión y Resultados

La preparación de todos los derivados propuestos, se ha realizado mediante síntesis convergente, usando como material de partida el correspondiente amino-heterociclo.



**Figura 37.-** Modificaciones estructurales propuestas para el compuesto **MR-2.4**.

En primer lugar se modificó el anillo de tiazol, sustituyéndolo por 4-metiltiazol con un grupo acetilo en posición 5, tiadiazol o pirimidina.



**Esquema 10.-** Síntesis de los derivados **52-54**.

La formación del enlace amida se realizó según la metodología descrita en la bibliografía<sup>83</sup>, mediante la reacción de la amina con el cloruro de ácido

<sup>83</sup> Li, Y.; Wang, Y.; Wang, J., Microwave-assisted synthesis of amides from various amines and benzoyl chloride under solvent-free conditions: A rapid and efficient method for selective protection of diverse amines. *Russ. J. Org. Chem.* **2008**, *44*, 358-361.

## Discusión y Resultados

---

correspondiente empleando la síntesis orgánica asistida por microondas (Esquema 10).

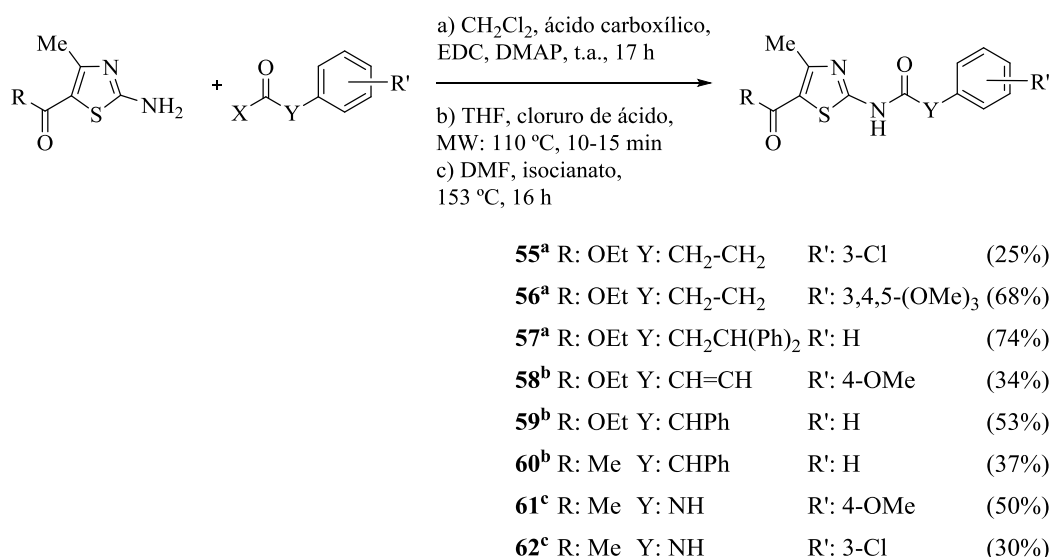
Estos compuestos se evaluaron frente a CK1δ siguiendo el método implementado en el grupo. Los valores del % de inhibición a 10 μM se recogen en la Tabla 10 observándose que la sustitución del anillo de tiazol por los anillos de tiadiazol y pirimidina (derivados **53** y **54**, respectivamente) produce la pérdida de actividad. Por otro lado, la variación en la sustitución del anillo de tiazol por un grupo acetilo no produce una variación significativa en la potencia inhibitoria frente a CK1δ. Por lo que, dado que el anillo de tiazol es importante para la acción biológica, se decidió mantener en la estructura química de los siguientes compuestos.

**Tabla 10.-** Derivados de *N*-heteroaril-fenilacetamidas sintetizados y evaluados frente a CK1δ.

Compuesto	CK1δ % inh. /CI <sub>50</sub>
MR-2.4	0.87 ± 0.03
52	1.12 ± 0.06
53	20% @ 20 μM
54	20% @ 10 μM

A continuación, se realizaron diversas modificaciones tanto en la naturaleza como en la longitud del espaciador entre el heterociclo y el anillo de fenilo (Esquema 11).

## Discusión y Resultados



Esquema 11.- Síntesis de los derivados 55-62.

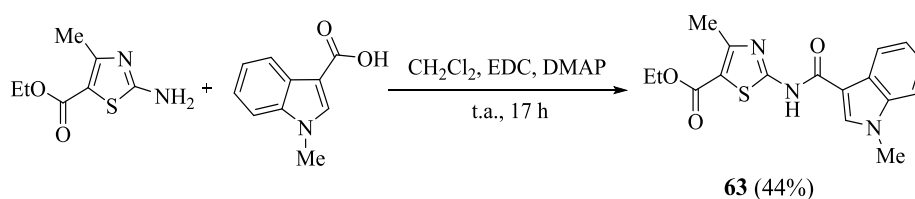
En primer lugar se llevó a cabo un acoplamiento clásico entre una amina y un ácido carboxílico en presencia de EDC y DMAP<sup>84</sup> como agentes acoplantes (tiazoles **55**, **56** y **57**). Dado los largos tiempos de reacción (17 h), se empleó la síntesis orgánica asistida por microondas<sup>83</sup>, realizando el acoplamiento entre el derivado de amina y el cloruro de ácido, reduciendo notablemente los tiempos de reacción (10-15 min) (compuestos **58** y **59**), sin embargo, el rendimiento no mejoró. Para el caso de la obtención de derivados de urea en el espaciador (**61** y **62**), la reacción se realizó por un método clásico de síntesis de ureas, empleando el derivado de isocianato y el derivado de amina correspondientes en presencia de trietilamina y DMAP<sup>85</sup>.

<sup>84</sup> El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602

<sup>85</sup> Song, E. Y.; Kaur, N.; Park, M. Y.; Jin, Y.; Lee, K.; Kim, G.; Lee, K. Y.; Yang, J. S.; Shin, J. H.; No, K. K. T.; Han, G., Synthesis of amide and urea derivatives of benzothiazole as Raf-1 inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1519-1524.

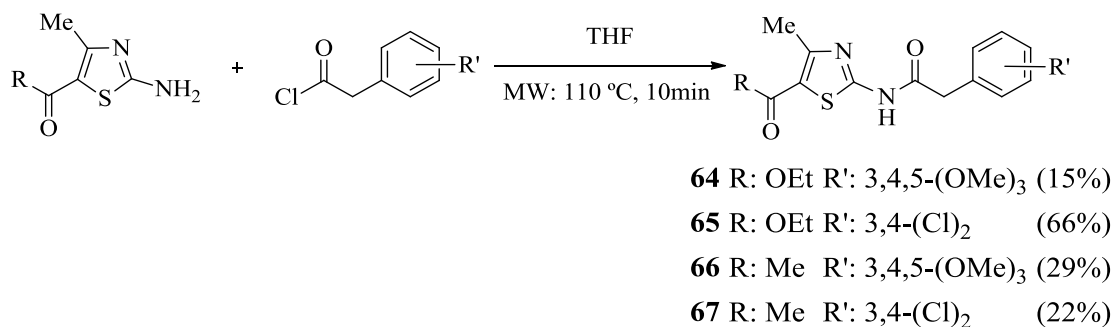
## Discusión y Resultados

Además, también se sustituyó el anillo de fenilo por el anillo fusionado de indol. La reacción de obtención del derivado **63** se llevó a cabo por acoplamiento clásico de formación de enlace amida (Esquema 12).



**Esquema 12.-** Síntesis del compuesto **63**.

Por último, se modificó la posición y naturaleza de los sustituyentes en el anillo de fenilo, empleando la síntesis orgánica asistida por microondas para llevar a cabo la reacción entre el aminotiazol y el cloruro de ácido correspondiente (Esquema 13).



**Esquema 13.-** Síntesis de los tiazoles **64-67**.

Para la evaluación enzimática frente a CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$  de los compuestos **53** - **65**, se empleó la misma metodología que la descrita anteriormente, los compuestos que presentaron un % de inhibición a 10  $\mu$ M mayor que 50% se calculó su CI<sub>50</sub>. Los valores del % de inhibición o bien el valor de la IC<sub>50</sub> se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11.- Evaluación enzimática frente a CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$  de los derivados de tiazol.

Comp.	CK1 $\delta$ % inh./CI <sub>50</sub>	CK1 $\epsilon$ % inh./CI <sub>50</sub>	Comp.	CK1 $\delta$ % inh./CI <sub>50</sub>	CK1 $\epsilon$ % inh./CI <sub>50</sub>
MR-2.4	0.87 ± 0.03 $\mu$ M	12.61 ± 0.70 $\mu$ M	61	7.22 ± 0.24 $\mu$ M	< 20% @ 20 $\mu$ M
55	< 20% @ 20 $\mu$ M	< 20% @ 10 $\mu$ M	62	15.28 ± 1.15 $\mu$ M	< 20% @ 20 $\mu$ M
56	4.92 ± 0.12 $\mu$ M	31% @ 20 $\mu$ M	63	17.42 ± 0.71 $\mu$ M	< 20% @ 20 $\mu$ M
57	6.18 ± 0.26 $\mu$ M	< 20% @ 20 $\mu$ M	64	0.98 ± 0.13 $\mu$ M	11.13 ± 0.63 $\mu$ M
58	< 20% @ 10 $\mu$ M	< 20% @ 10 $\mu$ M	65	2.85 ± 0.36 $\mu$ M	18.00 ± 0.61 $\mu$ M
59	2.30 ± 0.13 $\mu$ M	8.03 ± 0.39 $\mu$ M	66	3.29 ± 0.55 $\mu$ M	17.00 ± 0.76 $\mu$ M
60	9.14 ± 0.23 $\mu$ M	23% @ 20 $\mu$ M	67	3.46 ± 0.40 $\mu$ M	18.35 ± 0.88 $\mu$ M

Observando los datos de actividad frente a CK1 $\delta$  recogidos en las Tablas 10 y 11, se puede concluir que es necesario mantener el anillo de tiazol, mejorando la potencia inhibitoria si la sustitución es de tipo éster en la posición 5 (compuestos 59, 64, 65) respecto a si es de tipo acetilo (compuestos 60, 66 y 67). En cuanto al espaciador, la potencia inhibitoria aumenta cuando es de naturaleza amida seguido de un metileno y un anillo de tipo fenilo, siendo la actividad independiente del tipo de sustitución que posea este anillo.

Además todos los compuestos sintetizados de esta serie (55-67) han sido evaluados frente a la isoforma CK1 $\epsilon$  (Tabla 11), siendo su potencia inhibitoria inferior a la presentada en CK1 $\delta$ , en general suele encontrarse un orden de magnitud inferior a la obtenida para CK1 $\delta$ .

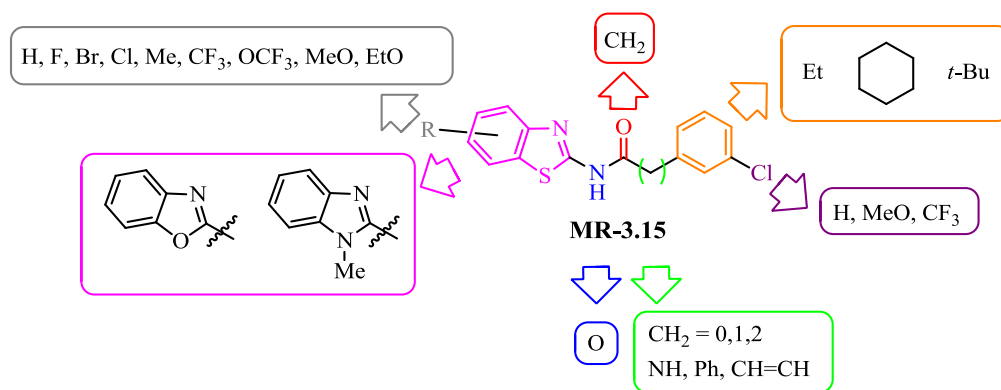
#### 1.2.1.2. Optimización de MR-3.15

Con el fin de proceder a la optimización y estudio de la relación estructura-actividad del prototipo seleccionado MR-3.15, se definieron las entidades químicas representativas. Éstas son el grupo 2-aminobenzotiazol separado por

## Discusión y Resultados

un espaciador de un anillo de fenilo, siendo el espaciador un grupo amida y un grupo metileno. A partir de esta estructura, se diseñaron diferentes compuestos (Figura 38) para determinar la relación existente entre la estructura química y la actividad biológica frente a la enzima CK1 $\delta$ .

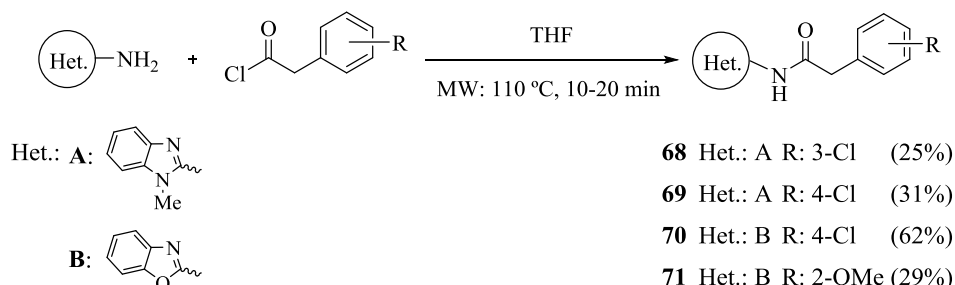
Para ello se propuso la introducción de diferentes sustituyentes en el anillo de benzotiazol, como halógenos, grupos alquilo, o trifluorometilo. Además, se llevó a cabo el estudio de la influencia de la naturaleza del heterociclo fusionado en la actividad frente a la enzima CK1 $\delta$ . Además, se modificó el anillo de benzotiazol por otros heterociclos fusionados de tipo 6+5 tales como bencimidazol y benzoxazol. Por último, se evaluó la influencia de la longitud y de la naturaleza del espaciador entre el heterociclo y el anillo de fenilo.



**Figura 38.-** Modificaciones estructurales propuestas del compuesto **MR-3.15**.

La preparación de todos los derivados propuestos se ha llevado a cabo mediante síntesis convergente, usando como material de partida el correspondiente amino-heterociclo.

## Discusión y Resultados



**Esquema 14.-** Síntesis de los derivados **68-71**.

En primer lugar se modificó la naturaleza del heterociclo, sustituyéndolo por bencimidazol y benzoxazol dando lugar a los compuestos **68-71** según se muestra en el Esquema 14.

**Tabla 12.-** Derivados de *N*-heteroaril-fenil-acetamidas sintetizados y evaluados frente a CK-1δ.

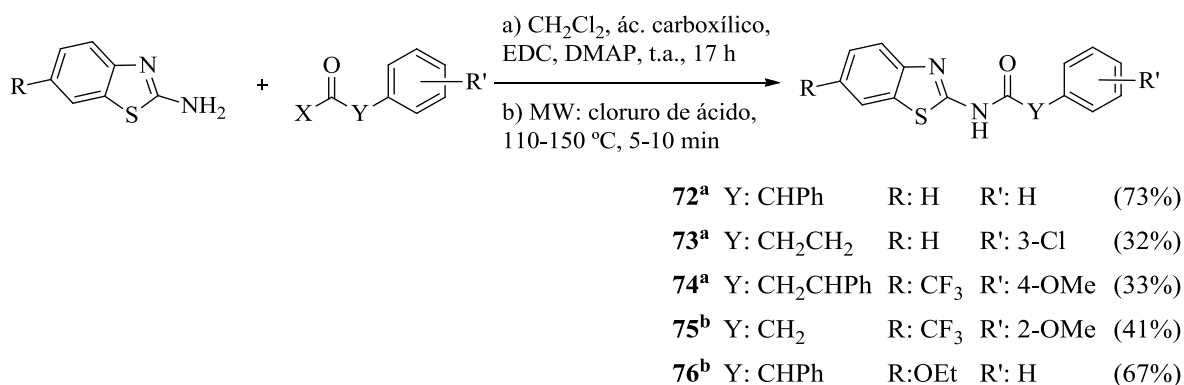
Compuesto	%inh @ 10 μM	CK1δ CI <sub>50</sub> (μM)
<b>MR-3.15</b>	> 60%	<b>0.85 ± 0.10</b>
<b>68</b>	27%	-
<b>69</b>	31%	-
<b>70</b>	> 60%	4.11 ± 0.68
<b>71</b>	24%	-

Estos compuestos se evaluaron frente a CK1δ siguiendo la metodología de Kinase Glo<sup>®</sup>. Los valores se recogen en la Tabla 12 y se observa en todos los casos que la sustitución del benzotiazol por *N*-metil-bencimidazol o benzoxazol produce una pérdida o disminución de la potencia inhibitoria. Por lo que se decidió mantener el anillo de benzotiazol en la estructura química de los siguientes compuestos.

A continuación, se realizaron diversas variaciones tanto en la naturaleza, como en la longitud del espaciador entre el heterociclo y el anillo de fenilo,

## Discusión y Resultados

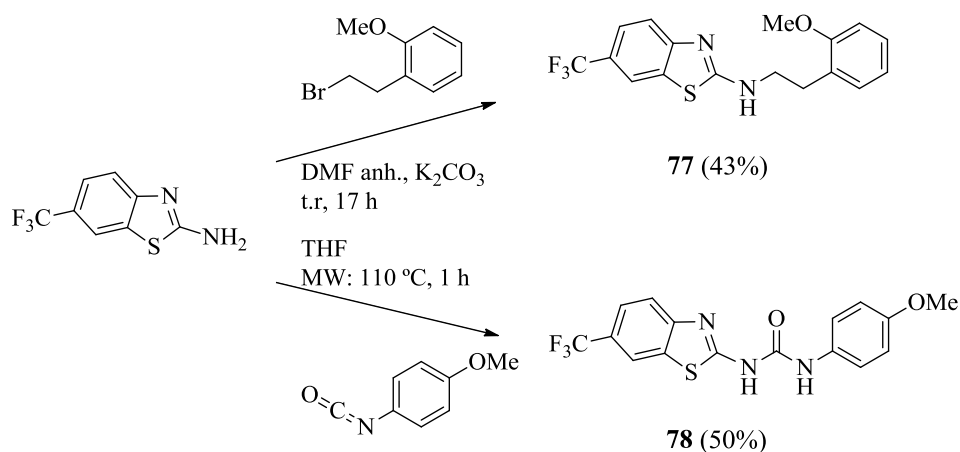
siguiendo una síntesis convergente entre el derivado de 2-aminobenzotiazol, con diferentes sustituyentes en posición 6, y el ácido o cloruro de ácido correspondiente (Esquema 15).



**Esquema 15.-** Síntesis de los compuestos **72-76**.

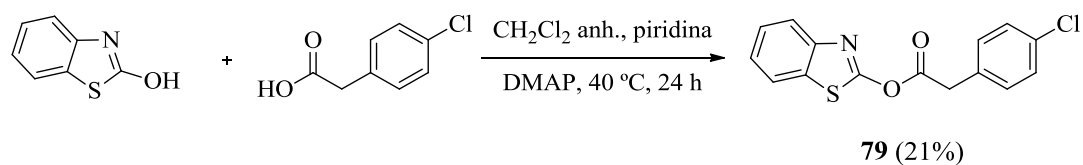
También, se modificó la naturaleza del espaciador, bien eliminando el carbonilo, introduciendo un motivo urea, o bien un enlace tipo éster. Los procedimientos sintéticos se encuentran en los Esquemas 16 y 17. En el caso del benzotiazol **77** se siguió la metodología clásica de alquilación de derivados de amina empleando un derivado halogenado como agente alquilante. Para el caso de la formación de ureas se siguió la síntesis convergente entre el derivado de amina y el correspondiente isocianato empleando la síntesis orgánica asistida por microondas (Esquema 16).

## Discusión y Resultados



Esquema 16.- Síntesis de los derivados **77** y **78**.

En el caso de la formación del enlace de tipo éster en el espaciador, se empleó un acoplamiento clásico entre un alcohol y un derivado carboxílico en presencia de DMAP como catalizador y una base (Esquema 17).



Esquema 17.- Síntesis del compuesto **79**.

Todos estos derivados **72-79** también fueron evaluados frente a la enzima CK1δ y sus valores de inhibición se encuentran en la Tabla 13.

## Discusión y Resultados

Tabla 13.- Evaluación de la potencia inhibitoria frente a CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$  de los benzotiazoles 72-79.

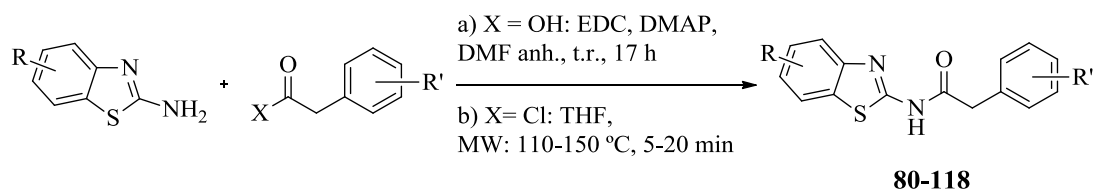
Comp.	CK1 $\delta$ %inh./CI <sub>50</sub>	CK1 $\epsilon$ %inh./CI <sub>50</sub>	Comp.	CK1 $\delta$ %inh./CI <sub>50</sub>	CK1 $\epsilon$ %inh./CI <sub>50</sub>
MR3.15	0.85 ± 0.10 $\mu$ M	2.86 ± 0.51 $\mu$ M	76	2.82 ± 0.43 $\mu$ M	7.86 ± 0.25 $\mu$ M
72	1.96 ± 0.83 $\mu$ M	7.31 ± 0.20 $\mu$ M	77	26% @ 10 $\mu$ M	22% @ 10 $\mu$ M
73	3.58 ± 0.21 $\mu$ M	31% @ 20 $\mu$ M	78	5.50 ± 0.11 $\mu$ M	29% @ 20 $\mu$ M
74	2.50 ± 0.33 $\mu$ M	9.73 ± 0.20 $\mu$ M	79	< 20% @ 10 $\mu$ M	< 20% @ 10 $\mu$ M
75	25% @ 10 $\mu$ M	< 20% @ 10 $\mu$ M			

Además los compuestos 72-79 fueron evaluados frente a la isoforma CK1 $\epsilon$ , disminuyendo, en general, unas diez veces la potencia inhibitoria.

Como puede observarse, los cambios estructurales realizados hasta el momento no producen un compuesto más potente frente a la inhibición de CK1 $\delta$  que el prototipo MR-3.15, ni una inhibición mejorada en CK1 $\epsilon$ , por lo que a continuación, manteniendo como espaciador un enlace amida más un metileno entre el benzotiazol y el anillo de fenilo; se realizaron diferentes modificaciones en este último fragmento. Estos cambios se basaron en introducir diferentes sustituyentes de distinta naturaleza en el anillo aromático y variar el sustituyente en posición 6 del anillo de benzotiazol.

La metodología sintética empleada para la variación de la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo de benzotiazol (Esquema 18) es la misma que la descrita en el Esquema 9.

## Discusión y Resultados



**Esquema 18.-** Síntesis de los compuestos 80-118.

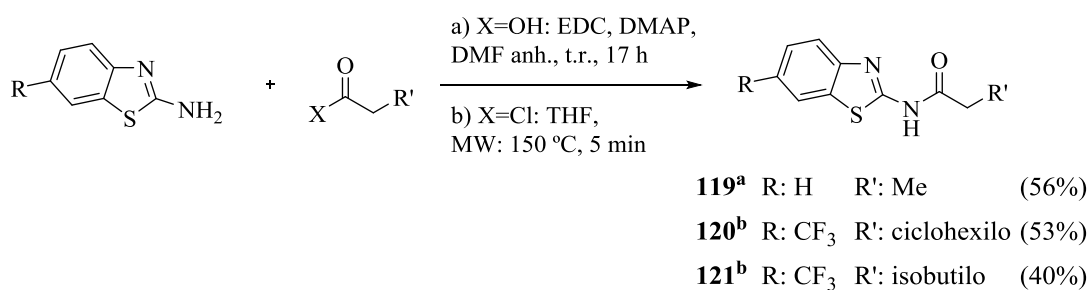
**Tabla 14.-** Derivados 80-118.

Comp.	R	R'	Rdto.	Comp.	R	R'	Rdto.
80	H	H	34%	100	6-OEt	2-Cl	53%
81	6-CF <sub>3</sub>	H	61%	101	6-OEt	3-Cl	70%
82	6-CF <sub>3</sub>	2-Cl	75%	102	6-OEt	4-Cl	37%
83	6-CF <sub>3</sub>	3-Cl	40%	103	6-OEt	2-OMe	51%
84	6-CF <sub>3</sub>	4-Cl	95%	104	6-OEt	3-OMe	44%
85	6-CF <sub>3</sub>	2-OMe	54%	105	6-OEt	4-OMe	67%
86	6-CF <sub>3</sub>	3-OMe	26%	106	6-OEt	3,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	29%
87	6-CF <sub>3</sub>	4-OMe	44%	107	6-OEt	3,4-(Cl) <sub>2</sub>	22%
88	6-CF <sub>3</sub>	3,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	18%	108	6-OCF <sub>3</sub>	3-Cl	48%
89	6-CF <sub>3</sub>	3,4-(Cl) <sub>2</sub>	65%	109	6-OCF <sub>3</sub>	2-OMe	46%
90	6-CF <sub>3</sub>	2,5-(OMe) <sub>2</sub>	31%	110	6-OCF <sub>3</sub>	3,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	19%
91	6-CF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	42%	111	6-OCF <sub>3</sub>	3,4-(Cl) <sub>2</sub>	45%
92	6-OMe	2-Cl	47%	112	6-Me	3-Cl	41%
93	6-OMe	3-Cl	76%	113	6-Me	2-OMe	20%
94	6-OMe	4-Cl	8%	114	6-F	2-OMe	33%
95	6-OMe	2-OMe	37%	115	6-Cl	2-OMe	59%
96	6-OMe	3-OMe	62%	116	6-Br	2-OMe	42%
97	6-OMe	4-OMe	42%	117	4-Cl	3-Cl	32%
98	6-OMe	3,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	8%	118	4-Me	3-Cl	43%
99	6-OMe	3,4-(Cl) <sub>2</sub>	20%				

## Discusión y Resultados

En la Tabla 14, se recogen todos los compuestos sintetizados, en los que se ha introducido un sustituyente en el benzotiazol, tanto en la posición 4 como en la posición 6. Además se ha mantenido el anillo de fenilo introduciendo diferentes sustituyentes de distinta naturaleza a lo largo del anillo.

Por otro lado, se ha modificado la naturaleza química del anillo de fenilo, sustituyéndolo por un anillo de ciclohexilo, isobutilo o simplemente eliminando el anillo aromático (Esquema 19).



**Esquema 19.-** Síntesis de los benzotiazoles **119-121**.

Todos estos compuestos (**80-121**) se evaluaron frente a CK1 $\delta$ , presentando valores de CI<sub>50</sub> en el rango submicromolar y nanomolar (Tabla 15) mejorando en muchos casos la actividad biológica del prototipo de partida.

Además, todos estos derivados de benzotiazol (**80-121**) han sido evaluados frente a la isoforma CK1 $\epsilon$  (Tabla 15), obteniendo inhibidores potentes frente a este isoenzima pero siempre mostrando una potencia inhibitoria inferior y generalmente en un orden de magnitud a la obtenida frente a CK1 $\delta$ .

## Discusión y Resultados

**Tabla 15.-** Evaluación de la potencia inhibitoria frente a CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$  de los compuestos **80-121**.

Comp.	CK1 $\delta$ %inh./CI <sub>50</sub>	CK1 $\epsilon$ %inh./CI <sub>50</sub>	Comp.	CK1 $\delta$ %inh./CI <sub>50</sub>	CK1 $\epsilon$ %inh./CI <sub>50</sub>
<b>MR3.15</b>	<b>0.85 ± 0.10 <math>\mu</math>M</b>	<b>2.86 ± 0.51 <math>\mu</math>M</b>	<b>101</b>	1.21 ± 0.09 $\mu$ M	3.73 ± 0.12 $\mu$ M
<b>80</b>	0.33 ± 0.03 $\mu$ M	2.31 ± 0.12 $\mu$ M	<b>102</b>	1.11 ± 0.29 $\mu$ M	7.49 ± 0.41 $\mu$ M
<b>81</b>	47 ± 5 nM	0.76 ± 0.03 $\mu$ M	<b>103</b>	5.76 ± 0.61 $\mu$ M	46% @ 20 $\mu$ M
<b>82</b>	68 ± 7 nM	7.73 ± 0.13 $\mu$ M	<b>104</b>	0.99 ± 0.07 $\mu$ M	8.97 ± 0.40 $\mu$ M
<b>83</b>	23 ± 2 nM	0.84 ± 0.06 $\mu$ M	<b>105</b>	1.09 ± 0.12 $\mu$ M	9.49 ± 0.38 $\mu$ M
<b>84</b>	65 ± 3 nM	0.55 ± 0.04 $\mu$ M	<b>106</b>	1.43 ± 0.35 $\mu$ M	9.83 ± 0.75 $\mu$ M
<b>85</b>	10 ± 1 nM	0.80 ± 0.14 $\mu$ M	<b>107</b>	3.43 ± 0.69 $\mu$ M	14.20 ± 0.75 $\mu$ M
<b>86</b>	42 ± 5 nM	0.69 ± 0.02 $\mu$ M	<b>108</b>	0.54 ± 0.02 $\mu$ M	1.02 ± 0.03 $\mu$ M
<b>87</b>	33 ± 2 nM	0.70 ± 0.02 $\mu$ M	<b>109</b>	0.62 ± 0.06 $\mu$ M	7.39 ± 1.13 $\mu$ M
<b>88</b>	15 ± 7 nM	0.37 ± 0.20 $\mu$ M	<b>110</b>	79 ± 7 nM	0.94 ± 0.01 $\mu$ M
<b>89</b>	56 ± 2 nM	0.87 ± 0.21 $\mu$ M	<b>111</b>	0.59 ± 0.04 $\mu$ M	0.93 ± 0.03 $\mu$ M
<b>90</b>	84 ± 9 nM	0.98 ± 0.09 $\mu$ M	<b>112</b>	83 ± 3 nM	0.88 ± 0.03 $\mu$ M
<b>91</b>	87 ± 3.3 nM	0.72 ± 0.19 $\mu$ M	<b>113</b>	0.29 ± 0.03 $\mu$ M	4.93 ± 0.15 $\mu$ M
<b>92</b>	9.71 ± 0.99 $\mu$ M	30% @ 20 $\mu$ M	<b>114</b>	1.17 ± 0.51 $\mu$ M	4.51 ± 0.26 $\mu$ M
<b>93</b>	0.53 ± 0.07 $\mu$ M	3.73 ± 0.12 $\mu$ M	<b>115</b>	0.32 ± 0.03 $\mu$ M	1.15 ± 0.10 $\mu$ M
<b>94</b>	0.75 ± 0.09 $\mu$ M	8.75 ± 0.52 $\mu$ M	<b>116</b>	0.26 ± 0.02 $\mu$ M	1.03 ± 0.09 $\mu$ M
<b>95</b>	2.22 ± 0.30 $\mu$ M	33% @ 20 $\mu$ M	<b>117</b>	6.43 ± 0.32 $\mu$ M	20% @ 10 $\mu$ M
<b>96</b>	0.42 ± 0.06 $\mu$ M	2.43 ± 0.20 $\mu$ M	<b>118</b>	20% @ 10 $\mu$ M	20% @ 10 $\mu$ M
<b>97</b>	0.57 ± 0.08 $\mu$ M	2.41 ± 0.19 $\mu$ M	<b>119</b>	13.62 ± 0.31 $\mu$ M	22% @ 20 $\mu$ M
<b>98</b>	1.12 ± 0.41 $\mu$ M	27% @ 10 $\mu$ M	<b>120</b>	0.43 ± 0.02 $\mu$ M	2.87 ± 0.25 $\mu$ M
<b>99</b>	1.24 ± 0.17 $\mu$ M	16.49 ± 0.59 $\mu$ M	<b>121</b>	0.46 ± 0.02 $\mu$ M	4.10 ± 0.60 $\mu$ M
<b>100</b>	27% @ 10 $\mu$ M	<20% @ 10 $\mu$ M			

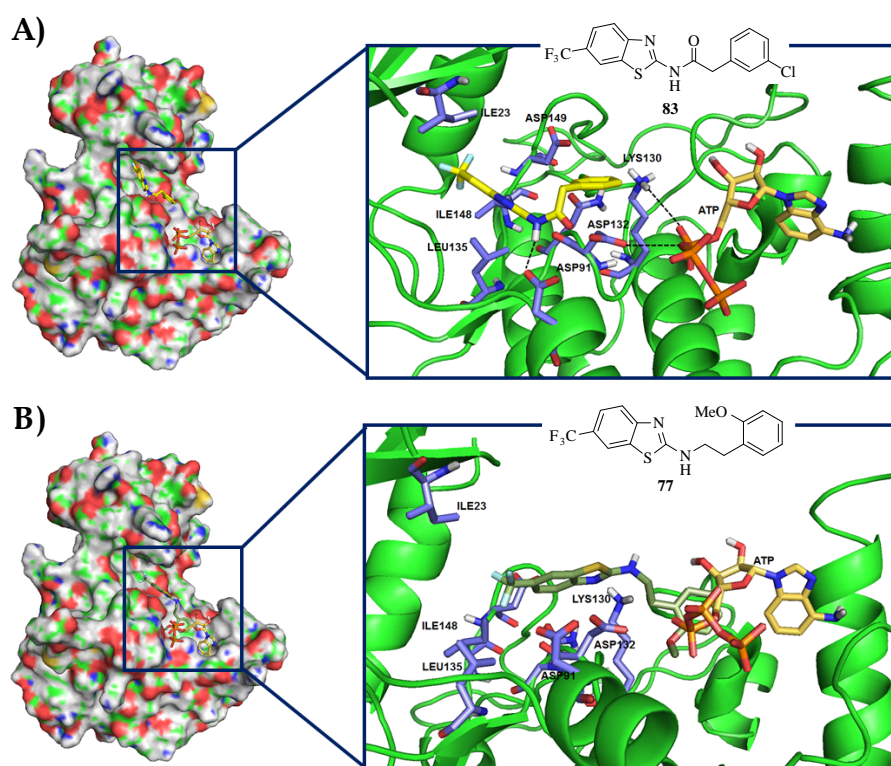
## Discusión y Resultados

---

Observando los datos recogidos en las Tablas 12, 13 y 15, se puede observar que existe una gran influencia en la introducción de un sustituyente en la posición 6, respecto a la posición 4, del anillo de benzotiazol en la potencia inhibitoria frente a CK1 $\delta$ , mientras que el grupo metilo o trifluorometilo aumenta la  $CI_{50}$  en un orden de magnitud (compuestos **81-91** y **112**), los grupos metoxilo o trifluorometoxilo mantienen la actividad enzimática respecto al prototipo (compuestos **93, 94, 96, 97, 108, 109** y **111**), y los grupos voluminosos como es el etoxilo, disminuye la actividad enzimática (derivados **100-107**). Probablemente esto se deba a que esta parte de la molécula se sitúe en un bolsillo hidrofóbico de la enzima, y cuando la posición 4 del heterociclo se sustituye por grupos más voluminosos como metilo o cloro, se pierde la actividad debido a un posible impedimento estérico. Por otro lado, los sustituyentes en el anillo de fenilo no parecen tener influencia en la potencia inhibitoria, manteniendo los valores de  $CI_{50}$  en el mismo rango. Esto podría sugerir que las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas del anillo de fenilo con la enzima podrían tener un papel relevante en esa zona de la molécula. Los benzotiazoles **120** y **121** se sintetizaron para validar esta hipótesis. Así, al presentar valores de inhibición de CK1 $\delta$  en el rango submicromolar, sugieren que una interacción hidrofóbica de los grupos ciclohexilo e isopropilo con la enzima es similar a la producida por el anillo de fenilo en esa misma posición. A la vista de todos estos resultados, se puede concluir que la familia de derivados de benzotiazoles es más potente frente a la inhibición de CK1 $\delta$  que la familia de los tiazoles. El sustituyente del benzotiazol más favorecido es el grupo trifluorometilo en posición 6, obteniendo valores de inhibición frente a CK1 $\delta$  en el rango nanomolar.

### 1.2.2. Estudio del modo de unión a la enzima

Una vez que se ha establecido que la familia de *N*-(benzotiazol-2-il)-2-fenilacetamidas son inhibidores potentes de CK1 $\delta$ , se estudió su posible modo de unión a la enzima. Para ello, se realizó un estudio de *docking* sobre toda la estructura de la enzima CK1 $\delta$ .

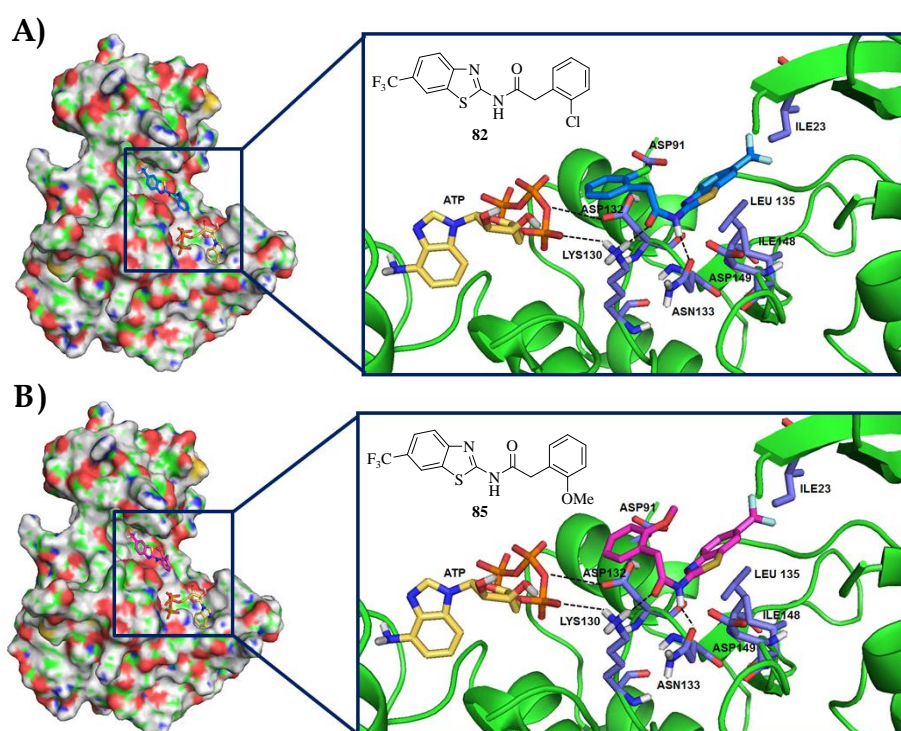


**Figura 39.-** Resultados del *docking* ciego realizado sobre CK1 $\delta$  (PDB: 3UYS), A) con el compuesto 83 [ $CI_{50}$  (CK1 $\delta$ ) = 23 nM], B) con el compuesto inactivo 77 (25% @ 10  $\mu$ M).

En la base de datos de proteínas (*Protein data bank*: PDB), existen sólo tres estructuras cristalizadas de la proteína CK1 $\delta$ , cuyos códigos PDB son: 3UYS, 3UYT, 3UZP. El cartografiado ciego realizado sobre toda la superficie de la proteína se llevó a cabo con el inhibidor 83 ( $CI_{50}$  = 23 nM) y con el compuesto

## Discusión y Resultados

inactivo, derivado **77** (25% de inhibición @ 10  $\mu$ M) empleando la estructura cristalina de CK1 $\delta$  (Código PDB: 3UYS). El análisis de las mejores soluciones de este estudio para el compuesto **83**, mostraron como grupo más poblado y de menor energía, el sitio del ATP, sugiriéndonos así cual sería el sitio preferido de unión a la enzima por esta familia de compuestos (Figura 39).



**Figura 40.-** Resultados del docking ciego realizado sobre CK1 $\delta$  (PDB: 3UYS), A) con el compuesto **82** [ $CI_{50}$  (CK1 $\delta$ ) = 68 nM], B) con el compuesto **85** [ $CI_{50}$  (CK1 $\delta$ ) = 10 nM].

El mismo estudio de cartografiado (*docking*) para los derivados **82** y **85**, confirmó que el centro activo de la enzima es el sitio de unión de la familia de compuestos *N*-(benzotiazol-2-il)-2-fenilacetamidas (Figura 40).

Un estudio detallado del sitio de unión del ATP muestra que los residuos Ile 23 y 148, Asp 91, 132 y 149, Leu 135, Lys 130 y Asn 133 son los más

importantes para la interacción de los inhibidores con la enzima (Figura 39). El grupo amida es esencial para la interacción con el Asp 132 y 91 (derivado **83**), y Asp 149, Asn 133 y Lys 130 (benzotiazoles **82** y **85**). Este hecho se corroboró mediante el análisis de la solución de menor energía encontrada para el compuesto **77**. Este compuesto también se sitúa en el centro catalítico (Figura 39B) pero en este caso, la ausencia del grupo carbonilo en el espaciador no permite fijar ninguna conformación del compuesto que dé lugar a un complejo enzima-ligando estable y por tanto que inhiba a la enzima. El heterociclo de benzotiazol con el grupo trifluorometilo facilita las interacciones hidrofóbicas entre el compuesto **83** y la región hidrofóbica formada por los residuos Leu 135, Ile 23 y 148. Los benzotiazoles **82** y **85** también presentan afinidad por la región hidrofóbica pero de forma diferente al derivado **83**, ya que mostraron puentes de hidrógeno con Asn 133 y Lys 130.

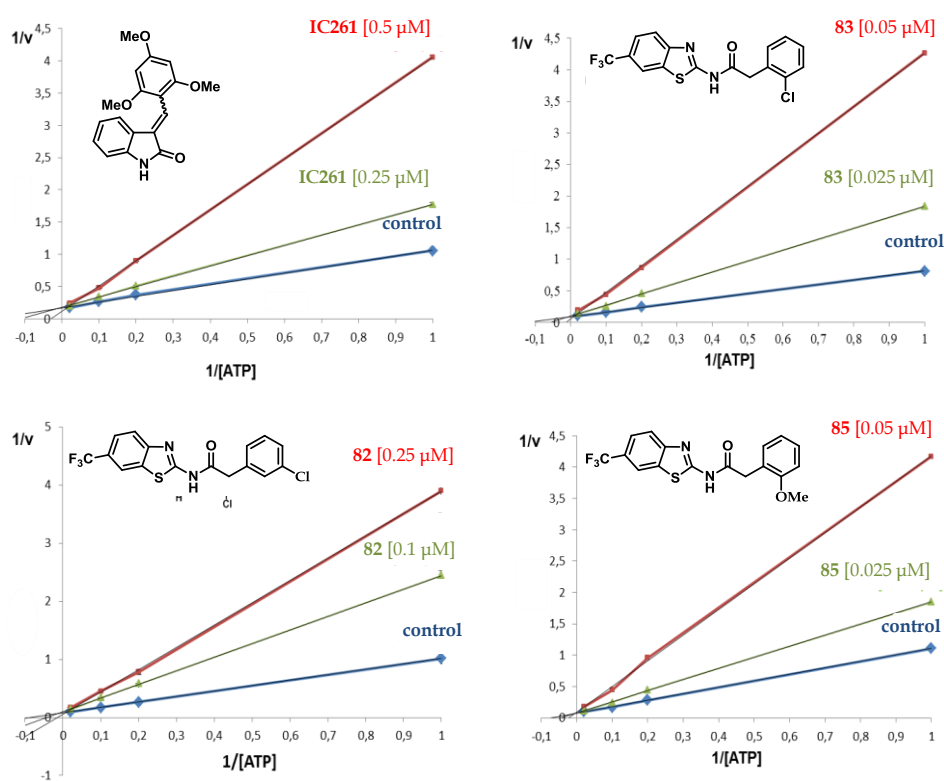
Para confirmar los resultados obtenidos en el estudio de modelización molecular, se realizaron estudios de competitividad con el ATP de los compuestos **82**, **83** y **85** utilizándose como compuesto de referencia, el compuesto **IC261**, conocido inhibidor de CK1 $\delta$  que compite con el ATP ( $CI_{50} = 1.0 \mu\text{M}$ ). Los experimentos se realizaron variando la concentración de ATP (de 1 a 50  $\mu\text{M}$ ) y de compuesto. La representación gráfica de Lineweaver-Burk o representación de doble recíproco se muestra en la Figura 41. El punto de corte con el eje de ordenadas ( $1/V$ ) no varía al aumentar la concentración de **IC261** (de 0.25 a 0.5  $\mu\text{M}$ ), lo que significa que este compuesto actúa como un inhibidor que compite con el ATP, como ya estaba descrito en la bibliografía<sup>86</sup>.

---

<sup>86</sup> Mashhoon, N.; DeMaggio, A. J.; Tereshko, V.; Bergmeier, S. C.; Egli, M.; Hoekstra, M. F.; Kuret, J., Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20052-20060.

## Discusión y Resultados

Los mismos experimentos fueron realizados para los benzotiazoles **82**, **83** y **85**, en todos los casos los inhibidores presentaron el mismo comportamiento que el compuesto **IC261**, mostrando una inhibición competitiva con el ATP, y confirmando así, los resultados de los estudios de *docking* efectuados *in silico* para estos compuestos.



**Figura 41.-** Datos cinéticos determinados para **IC261** y los *N*-(benzotiazol-2-il)-fenilamidas **82**, **83** y **85**. La concentración del sustrato caseína, se mantuvo constante a 12.5  $\mu$ M. Cada punto es la media de dos experimentos diferentes y cada uno de ellos analizado por duplicado.

### 1.2.3. Estudio de la selectividad frente a otras proteínas quinasas

El quinoma humano describe las proteínas quinasas que se encuentran en el genoma humano, siendo más de quinientos los genes que codifican a estas proteínas<sup>87</sup>. La gran homología que existe entre los bolsillos de ATP a lo largo del quinoma constituye un gran reto para el descubrimiento de fármacos que actúen sobre estas dianas. Considerando que los inhibidores obtenidos son competitivos con el ATP, es muy importante determinar su selectividad frente a un amplio panel de quinasas que nos permita eliminar posibles efectos secundarios no deseados, por acción frente a otras proteínas quinasas, en un futuro.

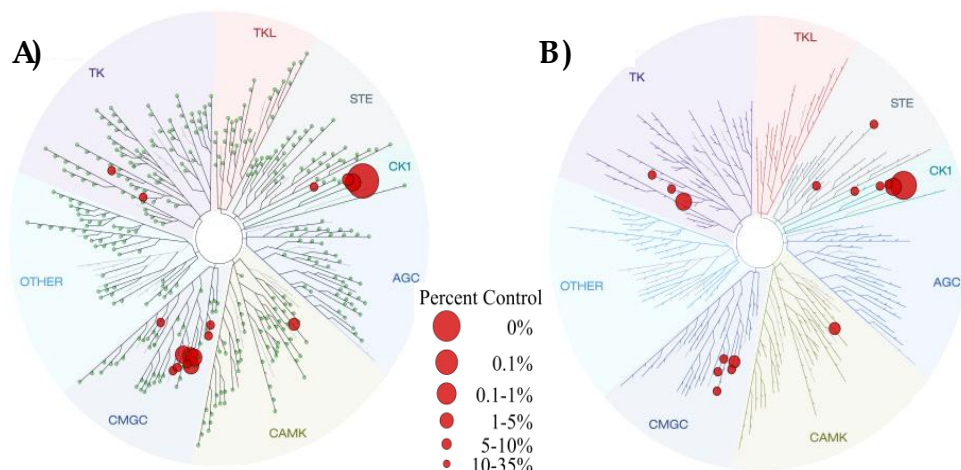
Los benzotiazoles **82** y **83**, fueron evaluados a la concentración de 10  $\mu$ M, frente a 456 quinasas, empleando la aproximación de KinomeScan<sup>®</sup>. Los resultados muestran una alta selectividad por CK1 $\delta$  (Figura 42), obteniendo una puntuación de selectividad (S) de 0.04 para ambos compuestos. La puntuación S se obtiene al dividir el número de quinasas a las que el compuesto inhibe entre el número total de quinasas evaluadas en el experimento. Otros inhibidores de quinasas que están comercializados, como Sunitinib y Lapatinib presentan un valor de S de 0.57 y 0.010, respectivamente en un panel de 290 quinasas<sup>88</sup>; lo que muestra una excelente selectividad para los dos compuestos evaluados.

---

<sup>87</sup> Drewry, D. H.; Bamborough, P.; Schneider, K.; Smith, G. K., The kinome and its impact on medicinal chemistry en 'Kinase drug discovery' *Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK*, **2012**; 1-53.

<sup>88</sup> Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P., A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127-132.

## Discusión y Resultados



**Figura 42.-** Árbol del quinoma humano para los compuestos **82** y **83** (Figura 42A y 42B, respectivamente). Las figuras fueron realizadas mediante DiscoverRx TREEspot® Versión 4. Los resultados originales fueron proporcionados en forma de porcentaje y las dianas que mantenían una actividad menor al 1% se seleccionaron para realizar la figura. El tamaño de los círculos rojos es proporcional a la afinidad por la diana.

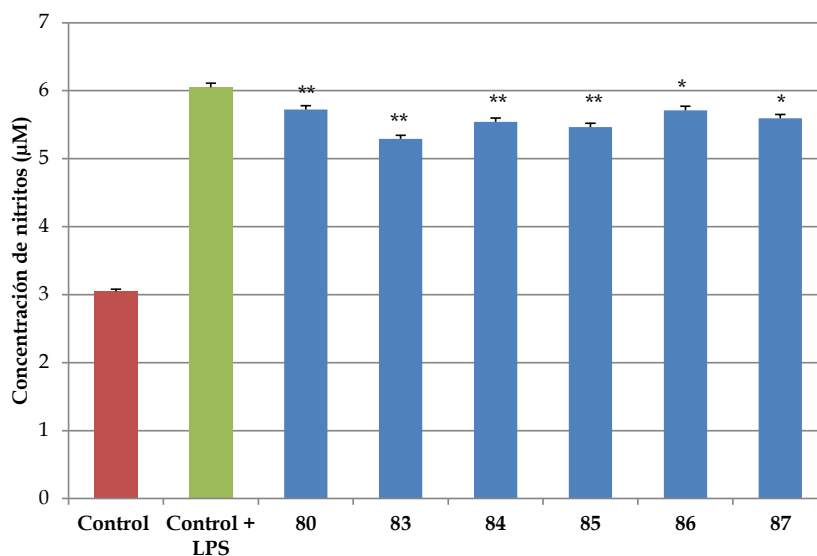
### 1.2.4. Estudios en modelos celulares de los inhibidores de CK1 $\delta$

#### 1.2.4.1. Modelos de neuroprotección

Dada la falta de información sobre la posible actividad biológica de los inhibidores de CK1, se decidió evaluar su potencial sobre un modelo de neuroprotección general para diversas patologías neurodegenerativas. Para ello, se han seleccionado varios inhibidores de CK1 $\delta$  con valores de  $CI_{50}$  en el rango submicromolar y nanomolar, y se han evaluado en diferentes modelos celulares tanto en cultivos primarios de astrocitos y microglía como en líneas celulares establecidas. Se ha elegido el modelo general de activación inflamatoria producida por lipopolisacárido (LPS). Este lipopolisacárido producido por las bacterias Gram negativas, es un potente activador de la

respuesta autoinmune e inflamatoria<sup>89</sup>. La reacción inflamatoria se mide mediante la producción de nitritos, que son a su vez productos de la oxidación del óxido nítrico (NO). Los experimentos se realizaron en presencia y ausencia de compuesto y después de 24 h de incubación se determinó la cantidad de nitritos mediante la reacción de Griess. Una mayor producción de nitritos implica una activación inflamatoria mayor.

El primer estudio se ha llevado a cabo en una línea celular de macrófagos murinos (células Raw) evaluando la acción de los inhibidores de CK1δ a una concentración fija de 10 μM y 60 min de pre-incubación antes del estímulo con LPS (Figura 43).



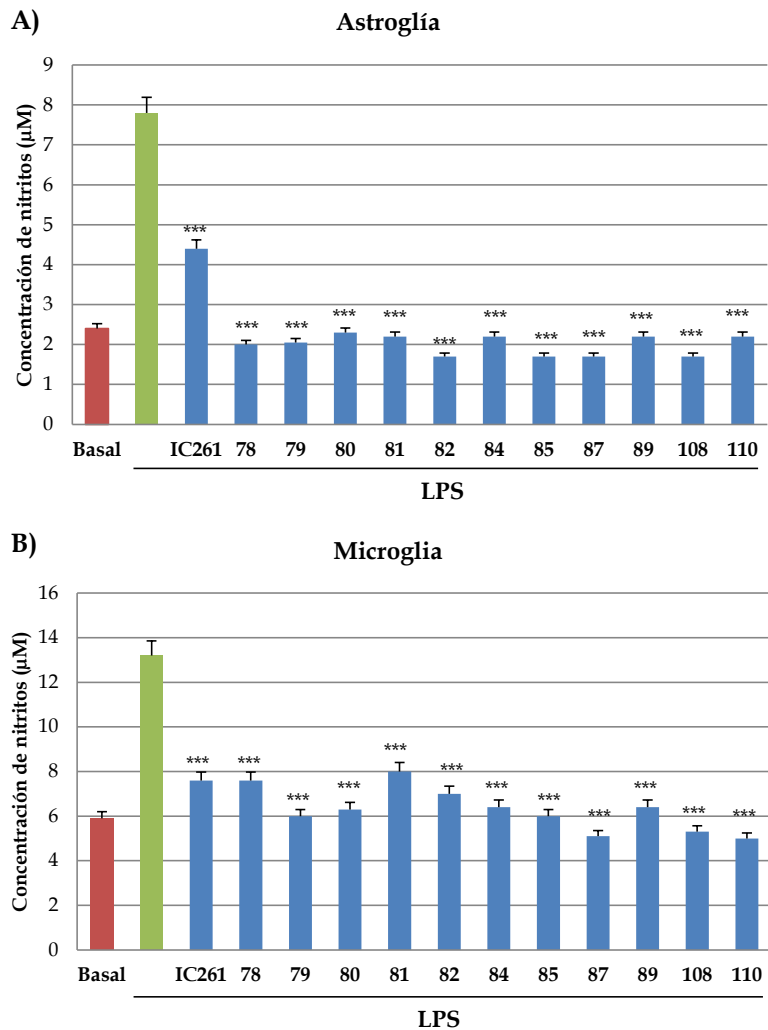
**Figura 43.-** Concentración de nitritos producida en presencia de LPS. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Los inhibidores de CK1 evaluados mostraron una disminución significativa de los niveles de nitritos, indicando una protección frente al daño inflamatorio

<sup>89</sup> Bryant, C. E.; Spring, D. R.; Gangloff, M.; Gay, N. J., The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 8-14.

## Discusión y Resultados

provocado por el LPS siguiendo una metodología similar a la anterior (Figura 44).



**Figura 44.-** Los cultivos celulares de Astroglía (A) y microglía (B), se trataron con LPS (10 µg/mL) en ausencia o presencia de los compuestos (10 µM). Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de seis replicas en tres experimentos diferentes. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , diferencias estadísticamente significativas entre los compuestos y los cultivos tratados con LPS).

Con el fin de evaluar la capacidad antiinflamatoria en células del sistema nervioso central, se han realizado estudios de neuroprotección en cultivos primarios de astrocitos y microglía. Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de la Prof. Ana María Pérez Castillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas-CSIC.

Se utilizó como control de referencia el inhibidor de CK1 comercial **IC261** encontrando que todos los inhibidores de CK1 evaluados mostraron una disminución de la reactividad inflamatoria, por lo que presentan carácter neuroprotector frente al daño producido por LPS.

Así, es la primera vez que se describe esta actividad biológica importante para esta familia de compuestos.

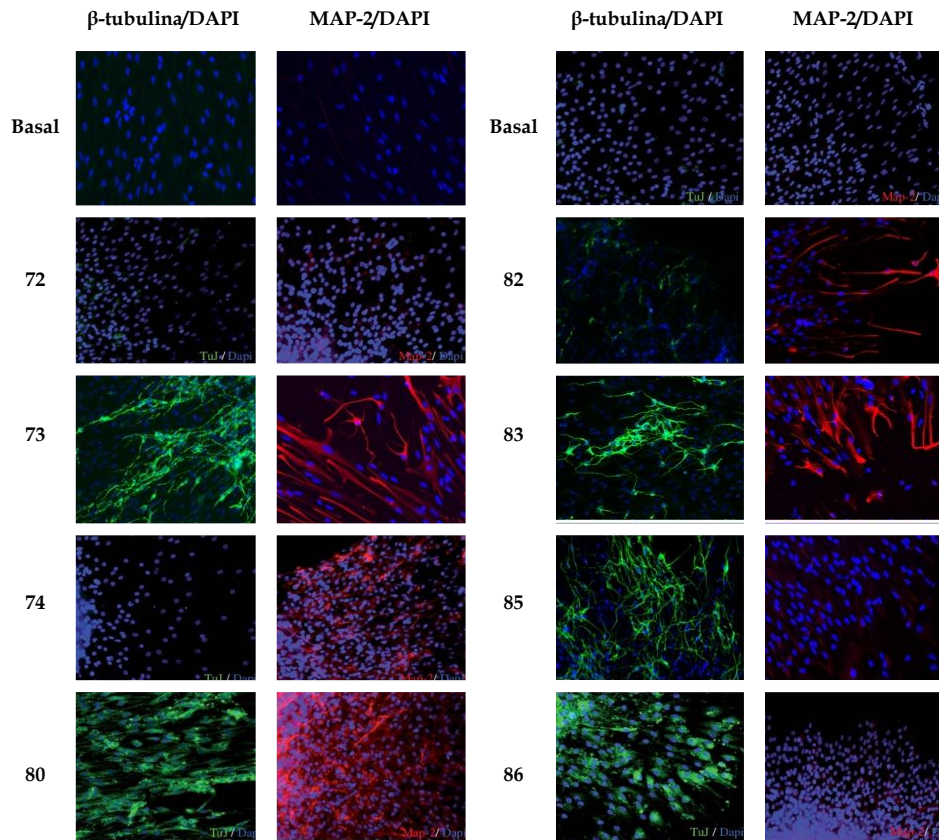
### 1.2.4.2. *Estudios de neurogénesis*

Recientemente, se ha descrito en el cerebro de los mamíferos adultos un proceso de neurogénesis endógeno como un mecanismo de reparación para determinados daños cerebrales. A veces este mecanismo resulta insuficiente y el aumento de la formación de neuronas nuevas de manera endógena en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas puede marcar un cambio en la terapia de estas patologías<sup>90</sup>.

---

<sup>90</sup> Brinton, R. D.; Wang J. M., Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Curr. Alzheimer Res.* **2006**, 3, 185-190.

## Discusión y Resultados



**Figura 45.-** Efecto de los inhibidores de CK1 en la diferenciación celular en neuroesferas, con doble tinción  $\beta$ -tubulina (rojo) y DAPI (azul), y con doble tinción MAP-2 (verde) y DAPI (azul).

En la enfermedad de Alzheimer y en la esclerosis lateral amiotrófica, el potencial neurogénico se encuentra disminuido, así como el nivel de los factores que ayudan a la regeneración<sup>91</sup>.

Por ello, y como una estrategia terapéutica general para varios procesos patológicos, se ha utilizado un modelo de neuroesferas aisladas del

---

<sup>91</sup> Liu, Z.; Martin, L. J., The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **2006**, 497, 468-488.

hipocampo de cerebro de rata adulta, para evaluar la capacidad de diferenciación selectiva de las mismas en presencia de los inhibidores de CK1 $\delta$ . Se utilizaron diferentes anticuerpos selectivos como  $\beta$ -tubulina, GFAP-2 y DAPI. Estos anticuerpos están ampliamente reconocidos para marcar núcleos celulares (DAPI), astrocitos (GFAP) y neuronas maduras ( $\beta$ -tubulina). Aunque este estudio está actualmente en curso, algunos resultados de la inmunohistoquímica se muestran en la Figura 45, donde puede observarse que varios benzotiazoles inhibidores de CK1 aumentan la diferenciación de las células neurales hacia neuronas. Este potencial neurogénico es la primera vez que se describe para esta familia de nuevos compuestos.

### **1.2.5. Modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas**

Con el fin de valorar el potencial terapéutico de los inhibidores de CK1 en patologías concretas se han utilizado diferentes modelos celulares y animales de enfermedades neurodegenerativas previamente establecidos.

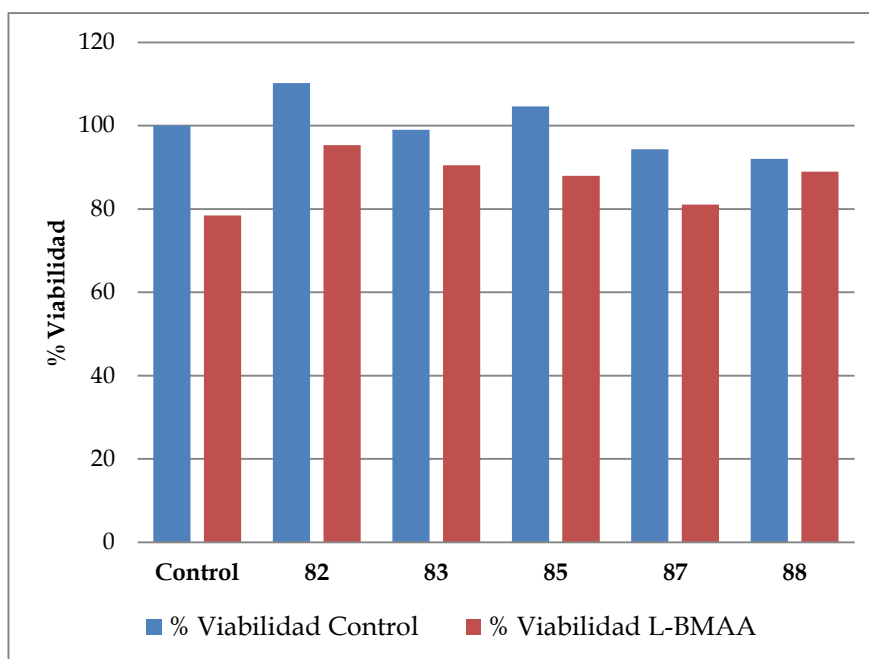
#### **1.2.5.1. Modelo celular de esclerosis lateral amiotrófica**

Este modelo utiliza *L*-BMAA, neurotoxina asociada a la etiología de la esclerosis lateral amiotrófica<sup>92</sup> como agente neurotóxico en un cultivo de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

---

<sup>92</sup> Holtcamp, W., The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease? *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, A110-116.

## Discusión y Resultados



**Figura 46.-** Resultados del aumento de la viabilidad celular frente al daño producido por *L*-BMAA en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y de los compuestos **82, 83, 85, 87 y 88**.

Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Begoña G. Miguel de la Universidad Complutense de Madrid. En este experimento, el compuesto se añade inmediatamente antes que el *L*-BMAA, y se observa el aumento o disminución de la viabilidad celular; es decir, el potencial neuroprotector de los compuestos frente al tóxico. En la Figura 46, las barras azules representan la viabilidad celular de los controles (células SH-SY5Y) en presencia y ausencia de compuesto para evaluar la posible toxicidad del compuesto, y las barras rojas, la viabilidad celular en presencia de la neurotoxina y en presencia o ausencia del compuesto, lo que indica el potencial neuroprotector de los inhibidores de CK1 en este modelo celular de esclerosis lateral amiotrófica. La concentración de los compuestos se fijó a partir del valor de su  $CI_{50}$  *in vitro*.

Como se observa en la Figura 46, los compuestos **82-85** y **88** no presentan toxicidad celular a las concentraciones utilizadas y además son capaces de aumentar la supervivencia celular respecto al daño producido por la toxina *L*-BMAA, presentando un buen perfil farmacológico como candidatos a fármaco para posteriores estudios del tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

### *-Estudio de la disminución de la fosforilación de TDP-43*

Para determinar si la inhibición de CK1 $\delta$  podría prevenir la fosforilación de TDP-43 *in vitro*, se ha utilizado en colaboración con el Dr. Brian C. Kramer de la Universidad de Washington un modelo puesto a punto en su grupo de trabajo<sup>93</sup>. La línea celular utilizada fue la HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) y la fosforilación de TDP-43 se indujo de manera endógena por exposición al ácido etacrínico<sup>94</sup>. Las células fueron tratadas con los inhibidores de CK1 a diferentes concentraciones durante 1.5 h *post*-adición del agente causante de la fosforilación de TDP-43. A continuación las células se extrajeron y lisaron con el fin de determinar los cambios producidos en la fosforilación de TDP-43 mediante *Western blott* utilizando anticuerpos específicos (Figura 47).

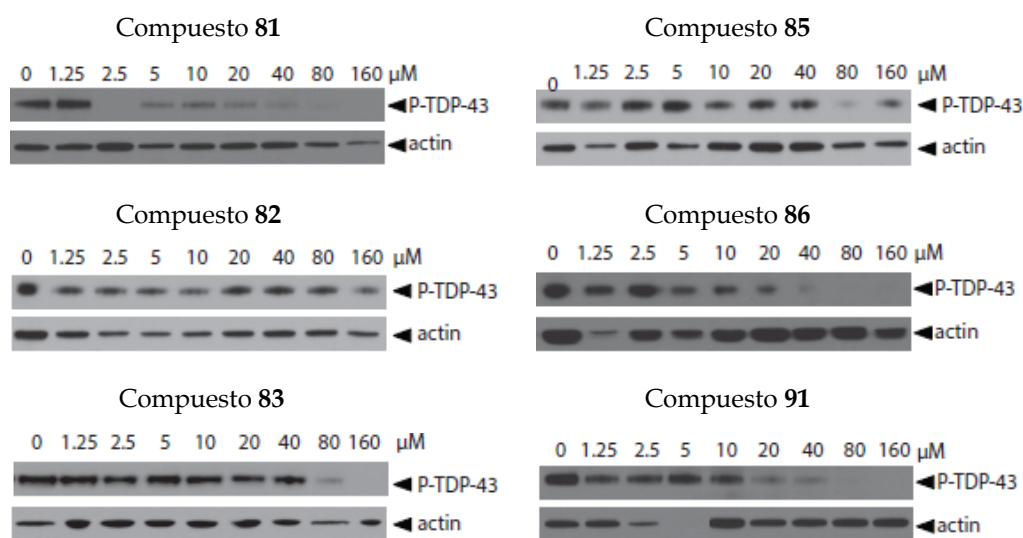
Como se observa en la Figura 47, la gran mayoría de los inhibidores de CK1 $\delta$  evaluados son capaces de disminuir la fosforilación de TDP-43 con un perfil dosis dependiente.

---

<sup>93</sup> Liachko, N. F.; McMillan, P. J.; Guthrie, C. R.; Bird, T. D.; Leverenz, J. B.; Kraemer, B. C., CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* **2013**, *74*, 39-52.

<sup>94</sup> Iguchi, Y.; Katsuno, M.; Takagi, S.; Ishigaki, S.; Niwa, J.; Hasegawa, M.; Tanaka, F.; Sobue, G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *45*, 862-870.

## Discusión y Resultados



**Figura 47.-** Medida de la disminución de la fosforilación de TDP-43 por los compuestos 81, 82, 83, 85, 86 y 91 por *Western Blott*.

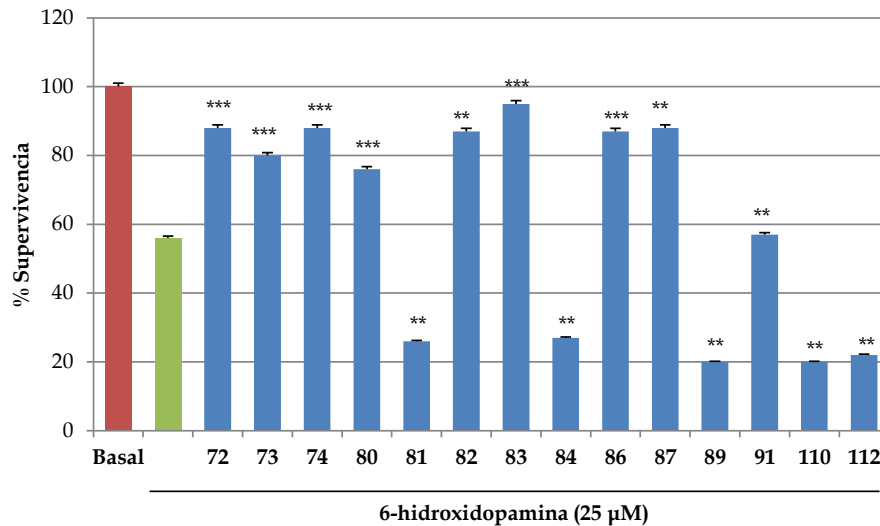
### 1.2.5.2. Modelo celular de la enfermedad de Parkinson

La proteína quinasa CK1, está relacionada con diferentes patologías neurológicas y por ello, se evaluaron algunos de los compuestos de la familia de los benzotiazoles en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson.

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es la neurotoxina más ampliamente utilizada en estos modelos. Se cree que la muerte celular inducida por 6-OHDA es causada por especies reactivas de oxígeno derivadas de la autooxidación de 6-OHDA y por un posible efecto en la cadena respiratoria de la mitocondria.

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de la Prof. Ana María Pérez del Castillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas-CSIC. Se utilizó la línea celular SH-SY5Y y una concentración fija de los compuestos (10  $\mu\text{M}$ ).

Tras 16 h de co-incubación, se evaluó el número de células vivas mediante la técnica de MTT<sup>95</sup> (Figura 48).



**Figura 48.-** Evaluación de los inhibidores de CK1δ en células SH-SY5Y frente al daño producido por 6-OHDA. Cada punto representa el valor medio  $\pm$  desviación estándar de cuatro réplicas en tres experimentos diferentes (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Como se observa en la Figura 48, la gran mayoría de los inhibidores de CK1 son capaces de aumentar la supervivencia celular frente al daño producido por la neurotoxina 6-OHDA.

### 1.2.6. Estudio de las propiedades farmacocinéticas y seguridad farmacológica

Dado que los inhibidores de CK1 pertenecientes a la familia de los benzotiazoles han mostrado un buen perfil terapéutico en diferentes modelos

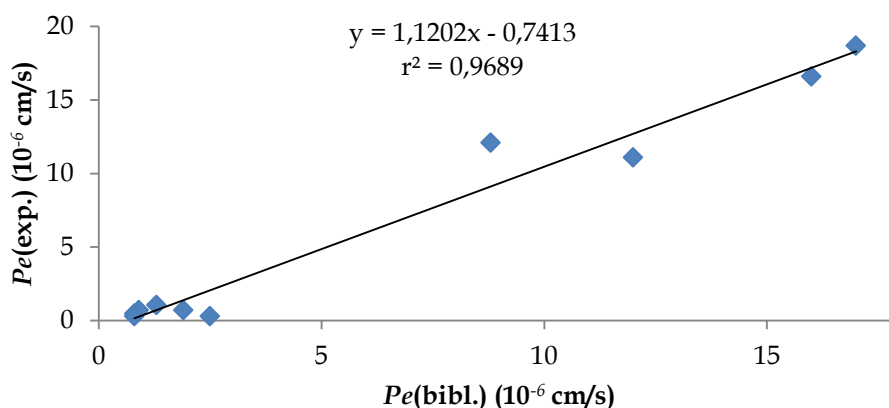
<sup>95</sup>Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.

## Discusión y Resultados

celulares se evaluaron sus propiedades ADME con el fin de diseñar estudios *in vivo*.

### 1.2.6.1. Determinación del paso de la barrera hematoencefálica

Para estudiar la capacidad de la familia de *N*-(benzotiazol-2-il)-2-fenilamida, de penetrar en el cerebro, se ha empleado la metodología PAMPA; siguiéndose el mismo procedimiento que el descrito en el capítulo anterior, pág. 78. Primero, se validó el método (Figura 49) obteniéndose una buena correlación entre el valor experimental y el descrito en la literatura [ $Pe(\text{exp.}) = 1.1202 Pe(\text{bibl.}) - 0.7413$  ( $r^2 = 0.9689$ )] determinándose que los compuestos serán SNC+ cuando tengan un valor de  $Pe(\text{exp.}) > 3.74 \times 10^{-6}$  cm/s, y SNC- cuando tengan un valor de  $Pe(\text{exp.}) < 1.66 \times 10^{-6}$  cm/s.



**Figura 49.-** Correlación lineal entre los valores de permeabilidad efectiva descritos en la bibliografía y los obtenidos experimentalmente de los compuestos comerciales utilizando la metodología PAMPA.

Para todos los compuestos que tenían una  $CI_{50} < 90$  nM se determinó su permeabilidad a la BHE (Tabla 16), salvo para los derivados **82** y **90** que precipitaron en las condiciones en las que se realiza el experimento.

**Tabla 16.-** Comparativa entre la permeabilidad efectiva experimental y descrita en la bibliografía de diez compuestos comerciales, usados para la validación del método, y diferentes *N*-(benzotiazol-2-il)-2-fenilacetamidas. El valor de la permeabilidad experimental [ $Pe(\text{exp.})$ ] corresponde a la media de los valores obtenidos en dos experimentos independientes.

Compuesto	$Pe(\text{bibl.})$ ( $10^{-6}$ cm/s)	$Pe(\text{exp})$ ( $10^{-6}$ cm.s <sup>-1</sup> )	Predicción BHE
Atenolol	0.8	$0.2 \pm 0.1$	
Caféina	1.3	$0.9 \pm 0.1$	
Desipramina	12	$14.6 \pm 0.6$	
Enoxacino	0.9	$0.2 \pm 0.1$	
Hidrocortisona	1.9	$1.1 \pm 0.8$	
Ofloxacino	0.8	$0.4 \pm 0.3$	
Piroxicam	2.5	$0.5 \pm 0.1$	
Promazina	8.8	$12.7 \pm 1.3$	
Testosterona	17	$21.8 \pm 4.0$	
Verapamilo	16	$24.6 \pm 1.5$	
<b>81</b>		$4.4 \pm 2.9$	SNC+
<b>83</b>		$11.2 \pm 2.0$	SNC+
<b>84</b>		$9.6 \pm 0.1$	SNC+
<b>85</b>		$11.2 \pm 2.0$	SNC+
<b>86</b>		$11.2 \pm 2.0$	SNC+
<b>87</b>		$14.6 \pm 0.1$	SNC+
<b>88</b>		$7.2 \pm 2.5$	SNC+
<b>89</b>		$1.4 \pm 1.5$	SNC-
<b>91</b>		$6.4 \pm 3.0$	SNC+
<b>110</b>		$2.6 \pm 0.8$	SNC+/SNC-
<b>112</b>		$5.6 \pm 0.8$	SNC+

## Discusión y Resultados

---

Todos los compuestos estudiados, menos el benzotiazol **89**, que tampoco mostró permeabilidad celular, son capaces de atravesar la BHE y por tanto pueden ser utilizados en modelos experimentales de animal completo al poder penetrar el cerebro.

### 1.2.6.2. Estudio de la farmacocinética *in vivo* del Benzotiazol **83**

Para asegurarnos del paso de la barrera hematoencefálica *in vivo* tras la administración intraperitoneal (i.p.) y oral (p.o.) de los benzotiazoles, se ha realizado un estudio de farmacocinética en ratones BALB/c con el derivado **83**. En concreto, se ha medido la concentración en plasma y cerebro de este derivado a diferentes tiempos *post*-administración, con el fin de determinar su concentración máxima así como la proporción plasma/cerebro.

En dos grupos de 24 ratones cada uno, se administró el compuesto **83** de manera intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 2 mg/kg; y de forma oral (p.o.) a dosis de 10 mg/kg. A continuación, se evaluó la concentración de dicho compuesto a 0.08, 0.25, 1, 2, 4, 8 y 24 h en el grupo i.p.; y a 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h en el grupo p.o. tanto en plasma como en cerebro. En los dos casos, se ha observado que los ratones estaban sanos después de haber administrado el compuesto.

**Tabla 17.-** Parámetros farmacocinéticos del compuesto **83** en plasma y cerebro.

Administración	Matriz	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	Proporción
i.p. (2 mg/Kg)	Plasma	0.50	224.51	2.99
	Cerebro <sup>a</sup>	1.00	670.56	
p.o. (10 mg/Kg)	Plasma	0.50	1120.42	3.52
	Cerebro <sup>a</sup>	2.00	3940.51	

<sup>a</sup>: concentración en cerebro expresada en ng/g.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 17, el compuesto **83** tiene muy buen perfil farmacocinético para llegar a ser un neurofármaco, ya que se distribuye preferentemente en cerebro obteniendo una buena proporción entre la concentración en plasma y la concentración en cerebro, y puede ser administrado por vía oral.

### 1.2.6.3. Evaluación de la seguridad

A continuación se llevaron a cabo diversos estudios de seguridad farmacológica. Estos estudios consistieron en la evaluación de la toxicidad en un modelo de pez cebra, la determinación de la actividad sobre los canales iónicos dependientes de voltaje y la determinación de la seguridad genética.

#### *-Modelo de toxicidad en pez cebra*

En la década de los 70, el investigador George Streisinger, reconoció el potencial que presentaba el pez cebra en el desarrollo biológico y genético<sup>96</sup>.

La principal ventaja que presenta este modelo animal, es la facilidad de manejo y observación de los embriones. Dada su transparencia durante las primeras etapas de su desarrollo, ofrece la posibilidad de observar el crecimiento y formación de los órganos sin necesidad de usar técnicas invasivas. Además, es un animal muy fértil pudiendo producir cientos de huevos al mes.

Comparando al pez cebra con la especie humana, el 70% de los genes humanos tienen su correspondiente gen en el pez cebra<sup>97</sup> por lo que este modelo cada vez está más aceptado para el estudio de seguridad de

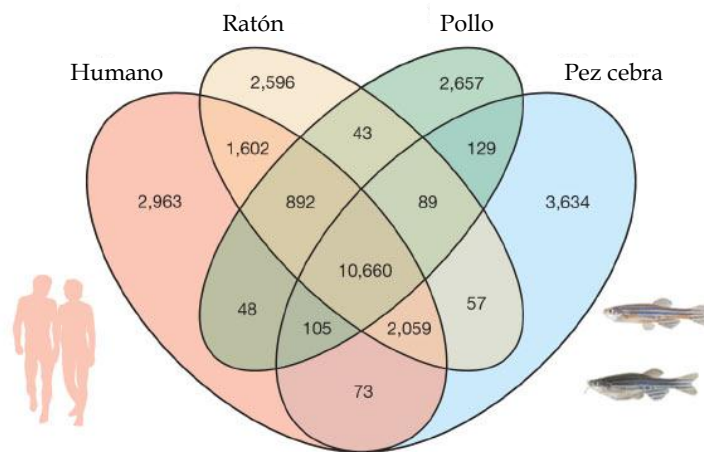
---

<sup>96</sup> Streisinger, G.; Walker, C.; Dower, N.; Knauber, D.; Singer, F., Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **1981**, 291, 293-296.

<sup>97</sup> Howe, K.; Clark, M. D.; Torroja, C. F. et al., The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013**, 496, 498-503.

## Discusión y Resultados

compuestos candidatos a fármaco dada su alta reproducibilidad en humanos (Figura 50). Además para los estudios de seguridad empleando este modelo, son necesarios sólo microgramos o miligramos de compuesto, mientras que los estudios en mamíferos necesitan unos pocos gramos de compuesto<sup>98</sup>. Por otro lado el 84% de los genes implicados en enfermedades humanas se encuentran también en el pez cebra.



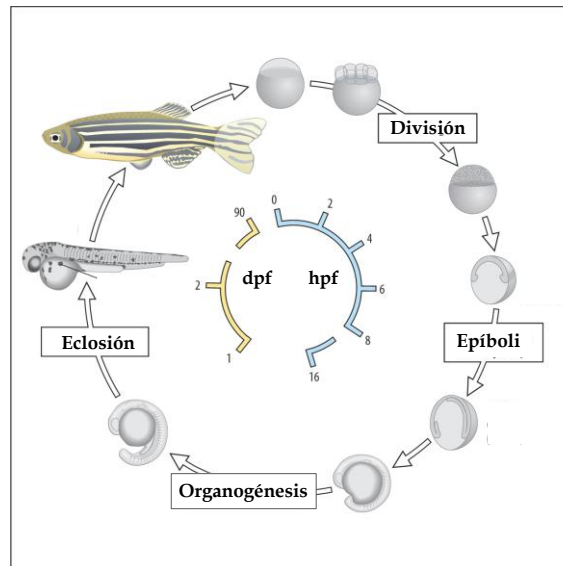
**Figura 50.-** Homología entre el genoma humano y los modelos animales más comunes.

Por todo lo expuesto, en este trabajo se ha elegido el pez cebra como herramienta para evaluar la seguridad de los inhibidores de CK1. Estos experimentos se realizaron durante una estancia predoctoral en el grupo del Prof. Boris Schmidt, en la Universidad Técnica de Darmstadt en Alemania.

Dado que la proteína quinasa CK1, está involucrada en procesos tempranos del desarrollo como puede ser la ruta metabólica de Wnt/ $\beta$ -catenina, es necesario que los huevos del pez cebra hayan alcanzado el 30% del desarrollo

<sup>98</sup> Zon, L. I.; Peterson, R. T., *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 35-44.

embrionario antes de la eclosión (epíboli) (Figura 51) para ser tratados con los inhibidores de CK1.



**Figura 51.-** Etapas del desarrollo embrionario del pez cebra.

Con el fin de determinar el rango de concentraciones en las que el compuesto es seguro para el tratamiento de organismos vivos, se estudiaron los diferentes signos de toxicidad en los embriones tras la adición de los compuestos. Uno de los signos más fácilmente reconocibles es la cola (Figura 52A), presentando malformaciones cuando existe toxicidad (Figura 52B y C).



**Figura 52.-** A) Embrión control, B) y C) embriones tratados con efectos tóxicos.

## Discusión y Resultados

La evaluación se realiza en placas de 24 pocillos estudiando cada concentración de compuesto por triplicado y un total de 10 embriones por pocillo.

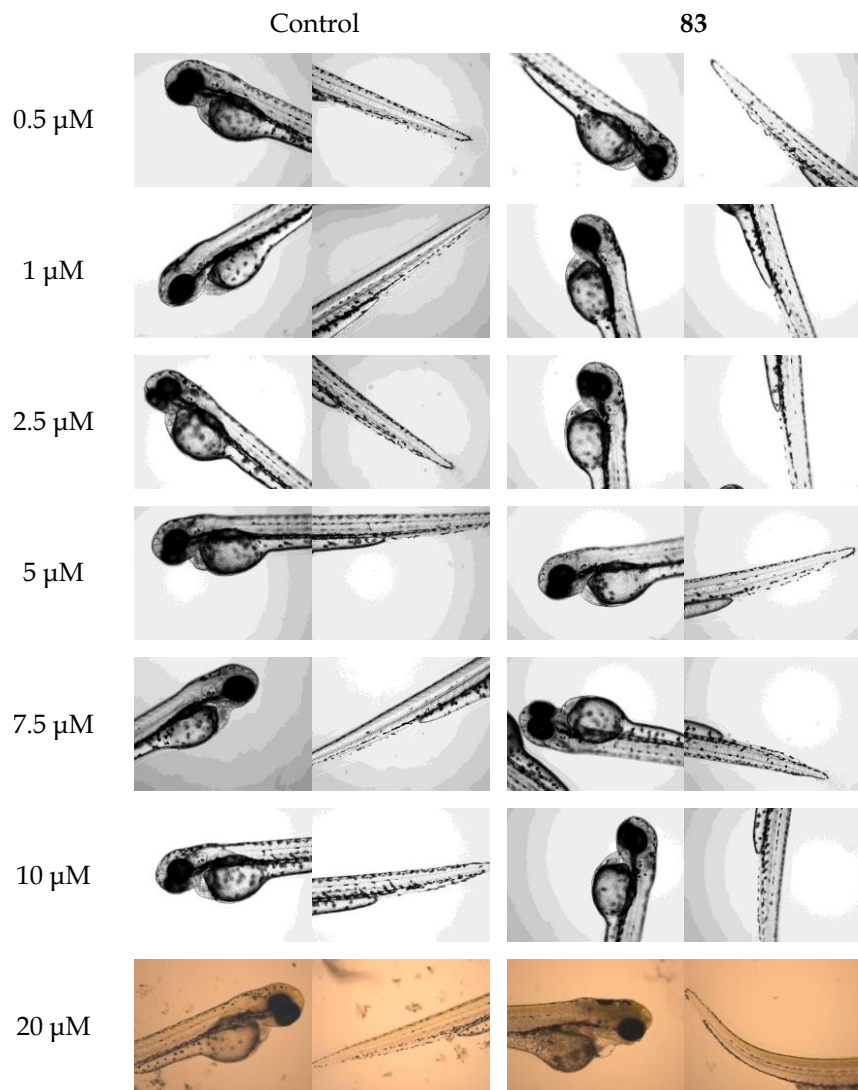


Figura 53.- Embriones control e incubados con el compuesto 83.

En la Figura 53, se muestran a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para un embrión tratado a diferentes concentraciones del benzotiazol **83**.

Este estudio se llevó a cabo para los derivados **83** y **85** encontrando un rango de concentraciones seguro entre 0.5 y 10  $\mu\text{M}$ , siendo la concentración de 20  $\mu\text{M}$  tóxica para el pez cebra apareciendo malformaciones en la cola.

*-Seguridad cardiaca: Determinación de la actividad sobre los canales iónicos voltaje-dependientes*

En colaboración con la Fundación Medina, Granada y de manera análoga a la descrita en el capítulo anterior (pág. 83) se evaluó la cardiosseguridad del benzotiazol **83**. En la Tabla 18, se observa que este compuesto presenta una inhibición débil y moderada para los canales hERG y Nav1.5/Cav1.2, respectivamente, por lo que podría ser desarrollado como fármaco potencial para patologías humanas.

**Tabla 18.-** Resultados de inhibición del derivado **83** sobre los canales iónicos.

Compuesto	hERG	Nav1.5	Cav1.2
<b>83</b>	Inhibidor débil	Inhibidor moderado	Inhibidor moderado

*-Seguridad genética: Ensayos de mutagénesis*

Este ensayo se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Francisca Vicente de la Fundación Medina de Granada, el estudio se realizó con cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100), encontrándose que el derivado **83** no es mutagénico

## Discusión y Resultados

---

### 1.2.7. Estudios de eficacia en modelos animales

#### 1.2.7.1. Protección de los inhibidores de CK1 $\delta$ frente a la toxicidad de TDP-43 en *Drosophila melanogaster*

A pesar de la falta actual de modelos animales validados al día de hoy para el estudio de TDP-43, se han iniciado algunas evaluaciones de la eficacia de los inhibidores de CK1 en un modelo animal de *Drosophila melanogaster* actualmente disponible.

La mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) fue llevada por primera vez a un laboratorio en 1901 por el investigador William Castle. Los experimentos realizados con *Drosophila* presentan como ventaja que la cría de esta especie es fácil y económica<sup>99</sup>. La secuencia del ADN de la *Drosophila* se publicó en el año 2000, sólo contiene 4 cromosomas, frente a los 23 que contiene el genoma humano; y su genoma es 1/26 el tamaño del genoma humano, simplificando mucho su análisis. Además, el 75% de los genes implicados en patologías humanas tienen su correspondiente gen en *Drosophila*.

Dado que la familia de *N*-benzotiazol-fenilamidas son potentes inhibidores de CK1 $\delta$  y que además, atraviesan la barrera hematoencefálica, se evaluaron algunos de estos compuestos en la determinación de su potencial terapéutico *in vivo* usando un modelo transgénico de *Drosophila* de TDP-43<sup>100</sup>. Muchos de los modelos de *Drosophila* de proteinopatías, basados en la expresión de la proteína humana TDP-43 (hTDP-43) por el sistema de expresión binario

---

<sup>99</sup> Venken, K. J. T.; Bellen, H. J., Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 167-178.

<sup>100</sup> Romano, M.; Feiguin, F.; Buratti, E., *Drosophila* answers to TDP-43 proteinopathies. *J. Amino Acids* **2012**, *2012*, 356081.

GAL4/UAS, se han caracterizado recientemente<sup>101</sup>. Estos modelos presentaron, en su mayoría, que la expresión de hTDP-43 mantenía una similitud con las proteinopatías asociadas a TDP-43 humanas, incluyendo la neurodegeneración, déficit cognitivo y disminución de la vida media de los animales.

Además, los datos bioquímicos mostraron que en *Drosophila* la proteína hTDP-43 mantiene la fosforilación de manera anormal en los sitios específicos de la patología. En este estudio, se utilizó la vida media de *Drosophila* como indicador fenotípico para evaluar el papel neuroprotector de estos compuestos frente al daño producido por hTDP-43, ya que estos compuestos son capaces de inhibir la fosforilación de esta proteína mediante la inhibición de CK1δ.

La disminución de la vida media en las moscas, es un fenotipo que está estrechamente relacionado con el proceso neurodegenerativo que da lugar a la alteración en el funcionamiento de la neurona o en la viabilidad celular y se había demostrado que la expresión específica de hTDP-43 en neuronas diferenciadas adultas, utilizando el sistema elav-Gal4GS reducía drásticamente la vida media<sup>102</sup>.

Se han seleccionado cuatro compuestos (**79**, **82**, **83** y **95**) el derivado **79** que es inactivo y otros compuestos con diferentes valores de CI<sub>50</sub> sobre CK1δ (68 nM, 23 nM y 2.22 μM, respectivamente). Este derivado **79**, que comparte las mismas características estructurales que el resto de los benzotiazoles evaluados, se incluye como control negativo del experimento. La inducción de

---

<sup>101</sup> Osterwalder, T.; Yoon, K. S.; White, B. H.; Keshishian, H., A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 12596-12601.

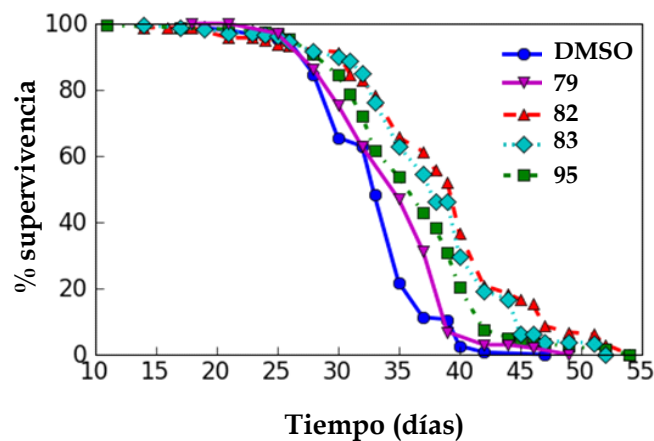
<sup>102</sup> Miguel, L.; Frebourg, T.; Campion, D.; Lecourtois, M., Both cytoplasmic and nuclear accumulations of the protein are neurotoxic in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *41*, 398-406.

## Discusión y Resultados

la hTDP-43 en moscas adultas comenzó nueve días después del nacimiento, por activación del gen que la produce añadiendo RU486 (Mifeprestone®) en la alimentación. Desde ese momento, en el que se inicia la producción de hTDP-43, se empiezan a observar sus efectos tóxicos de muerte neuronal y reducción de la vida media. Como se muestra en la Figura 54 y la Tabla 19, la adición al alimento de los compuestos **82**, **83** y **95** a 100 nM, aumenta significativamente la vida media de las moscas comparado con el grupo control (DMSO: 33.17 días, N = 151).

**Tabla 19:** Vida media de las moscas tratadas con los inhibidores de CK1 y con el derivado inactivo **79**.

Compuesto	Vida media (días)	Nº de moscas estudiadas
Control (DMSO)	33.14	151
<b>79</b>	35.20	102
<b>82</b>	38.63	163
<b>83</b>	37.84	178
<b>95</b>	36.17	173



**Figura 54.-** Supervivencia de moscas transgénicas *elav-Gal4GS>UAS-hTDP-43* que expresan la proteína hTDP-43 específicamente en neuronas adultas. Las moscas se trataron con los compuestos **79**, **82**, **83** y **95**.

Es un hecho interesante la correlación directa que existe entre la potencia inhibitoria sobre CK1δ y la disminución de la toxicidad de hTDP-43 (Tabla 19). Así, los benzotiazoles **82** y **83** aumentaron la vida media de los animales con mayor eficacia que el compuesto **95** que es un inhibidor 100 veces menos potente. Por otro lado, el derivado inactivo **79** no modificó de manera significativa la vida de las moscas.

Con estos experimentos, se puede concluir que los inhibidores de CK1δ, tienen un efecto neuroprotector frente a la neurotoxicidad de hTDP-43 en experimentos *in vivo*, mostrando su potencial terapéutico para el tratamiento farmacológico de las proteinopatías asociadas a TDP-43 como es la esclerosis lateral amiotrófica<sup>103</sup>.

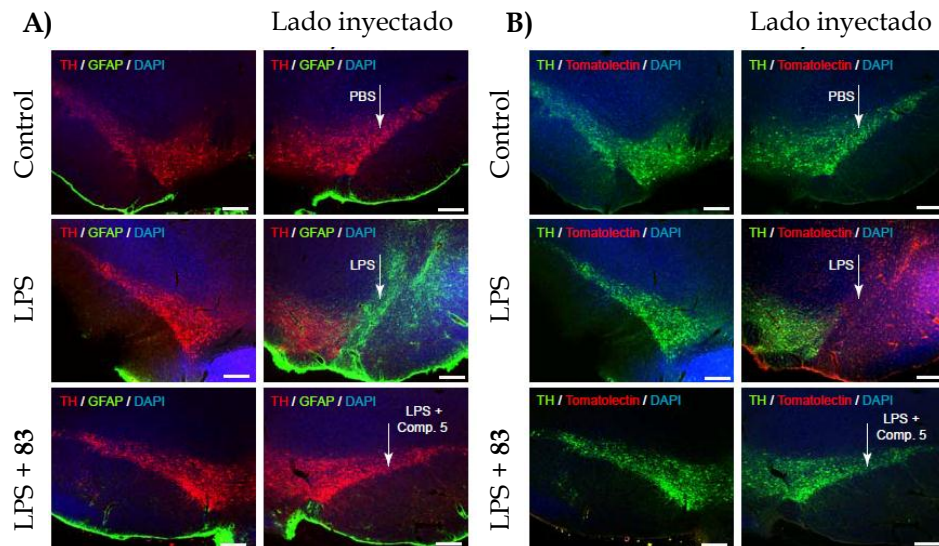
### 1.2.7.2. Protección frente al daño causado por LPS en ensayos *in vivo*

Se estudió la capacidad del compuesto **83** para disminuir el daño producido por LPS en un modelo *in vivo* de rata adulta. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de la Prof. Ana María Pérez Castillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas-CSIC.

---

<sup>103</sup> Salado, I. G.; Redondo, M.; Bello, M.; Perez, C.; Liachko, N.; Kraemer, B.; Lecourtois, M.; Gil, C.; Martínez, A.; Pérez, D. I., Protein kinase CK-1 inhibitors as new potential drugs for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Med. Chem.* **2014**, doi: 10.1021/jm500065f.

## Discusión y Resultados



**Figura 55.-** Efectos del compuesto **83**, en ensayos *in vivo* frente a la neuroinflamación producida por LPS. Los animales control fueron inyectados con buffer de PBS. Después de 72 h los cerebros fueron tratados mediante inmunodetección de marcadores de la inflamación. A) La doble inmunotinción con GFAP en verde (marcador de astrogliosis) junto con tirosina hidroxilasa (TH, en rojo). B) Tinción con lectina en rojo como marcador de microglia, las neuronas dopaminérgicas se tiñeron con TH, en verde.

Se inyectó el compuesto **83** junto con LPS, en la parte compacta de la sustancia negra de cerebros de rata adulta.

Como se observa en la Figura 55, el compuesto **83** es capaz de neuroproteger frente al daño causado por LPS en la sustancia negra, presentando un buen perfil como candidato a fármaco para la enfermedad de Parkinson.

Como resumen de este capítulo cabe señalar que se ha diseñado y sintetizado un nuevo inhibidor de CK1 $\delta$  (benzotiazol **83**) capaz de inhibir a esta enzima en el rango nanomolar, con un buen perfil de selectividad frente a 456 proteínas quinasas. Presenta varias propiedades biológicas interesantes para el

potencial tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, especialmente, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer en modelos celulares, y un perfil farmacocinético apto para continuar su desarrollo en fases clínicas. Los buenos datos iniciales obtenidos en modelos *in vivo* de esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson, han permitido que en la actualidad se continúe su estudio tanto a nivel farmacológico en modelos transgénicos murinos de TDP-43 como su transferencia tecnológica para llegar a fases clínicas<sup>104</sup>.

---

<sup>104</sup> Martínez, A.; Pérez, D. I.; Gil, C.; Salado, I. G.; Redondo, M.; Pérez, C.; Patente No. PCT/ES2013/070874

## Discusión y Resultados

---

### 1.3. Búsqueda de inhibidores de CK1 $\delta$ basada en la estructura de la proteína quinasa

El hecho de disponer de la estructura cristalográfica de la diana biológica en estudio, representa una oportunidad única para la búsqueda de nuevos fármacos. La estructura cristalina de CK1 $\delta$  humana ha sido publicada durante la realización de esta memoria, lo que ha permitido varios estudios sobre ella con el fin tanto de encontrar nuevos inhibidores con diversidad estructural, como posibles inhibidores alostéricos.

En el año 2012, la proteína quinasa CK1 $\delta$  humana fue cristalizada por primera vez con el inhibidor **PF670462**. A día de hoy sólo existen tres estructuras cristalizadas, con códigos PDB, 3UYS, 3UYT y 3UZP<sup>105</sup>. La primera estructura, 3UYS, corresponde a una estructura *apo* (sin inhibidor) mientras que 3UYT y 3UZP corresponden a estructuras *holo*, es decir, han sido cristalizadas ambas, con el inhibidor de CK1, **PF670462**.

A partir de la estructura cristalográfica de CK1 $\delta$  (PDB: 3UYS) y utilizando el programa AutoDock-Vina<sup>106</sup> se ha llevado a cabo el cribado virtual completo de nuestra quimioteca interna que consta de 802 compuestos, con el fin de identificar nuevos inhibidores de CK1 $\delta$  estructuralmente diversos a los existentes y aumentar el número de herramientas farmacológicas que nos permitan el estudio de CK1 $\delta$  como diana farmacológica.

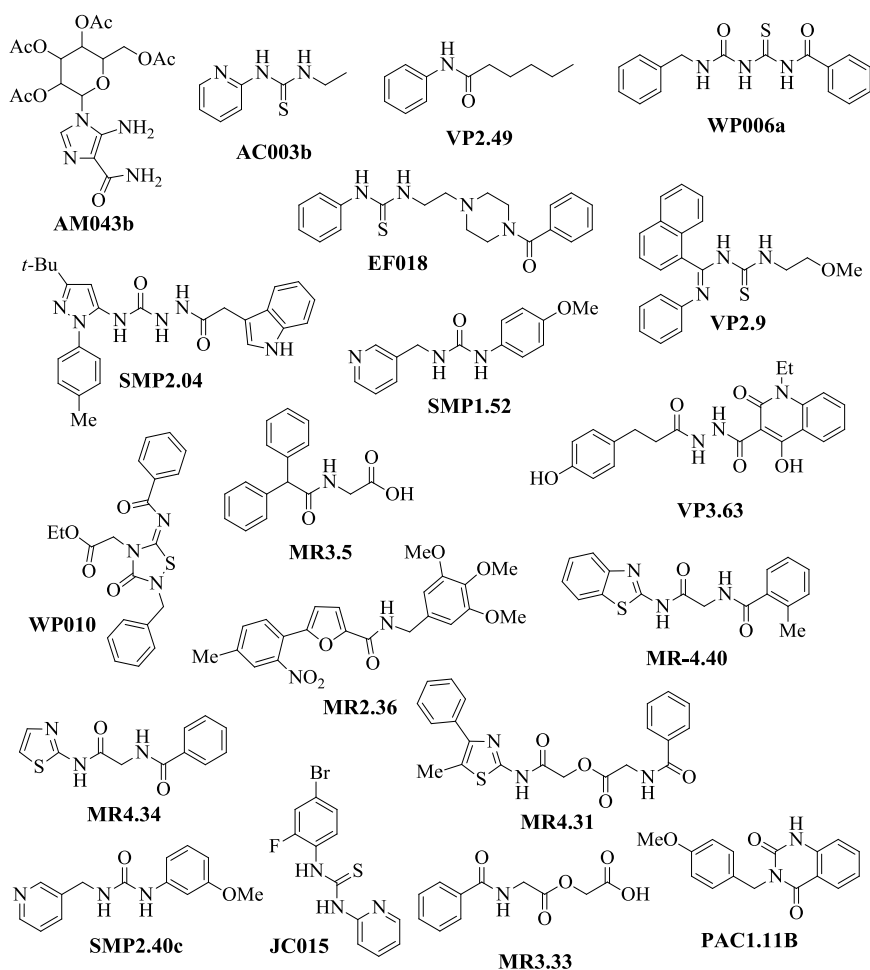
---

<sup>105</sup> Long, A.; Zhao, H.; Huang, X., Structural basis for the interaction between casein kinase 1 delta and a potent and selective inhibitor. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 956–960.

<sup>106</sup> Sandeep, G.; Nagasree, K. P.; Hanisha, M.; Kumar, M. M. K., AUdOcker LE: A GUI for virtual screening with AUTODOCK Vina. *BMC Res. Notes.* **2011**, *4*, 445-449.

## Discusión y Resultados

La técnica de cribado virtual permite, a través de algoritmos de evaluación de energías de interacción, identificar moléculas de una quimioteca que pueden interactuar con la diana farmacológica en cuestión<sup>107</sup>.



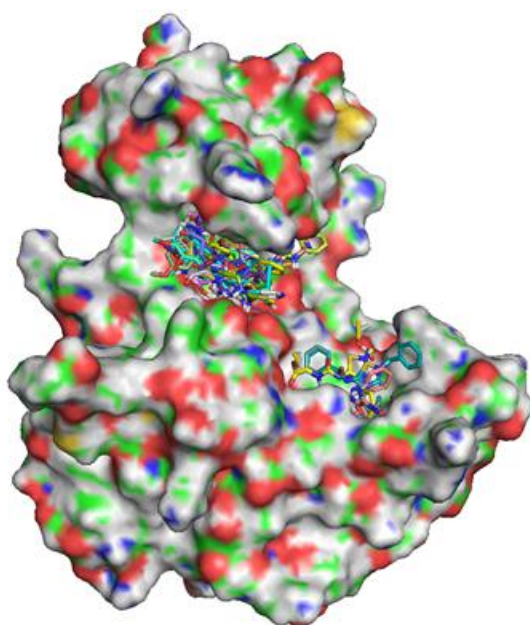
**Figura 56.-** Compuestos de nuestra quimioteca que sido identificados como posibles ligandos de CK1 $\delta$  por cribado virtual.

<sup>107</sup> Zhu, T.; Cao, S.; Su, P. C.; Patel, R.; Shah, D.; Chokshi, H.B.; Szukala, R.; Johnson, M. E.; Hevener, K. E., Hit identification and optimization in virtual screening: Practical recommendations based on a critical literature analysis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6560–6572.

## Discusión y Resultados

---

A partir del cribado de nuestra quimioteca de compuestos, sólo 19 moléculas, recogidas en la Figura 56, presentaron una posible unión a CK1 $\delta$ . En todos los casos se observó que la zona de mayor probabilidad de unión a ligandos es el bolsillo del ATP, encontrándose en él, el mayor grupo de moléculas (Figura 57).



**Figura 57.-** Superposición de todas las moléculas que resultaron tener interacciones con CK1 $\delta$  en el cribado.

Una vez realizado el cribado virtual, se llevó a cabo la evaluación biológica de las 19 moléculas seleccionadas frente a CK1 $\delta$ , con el fin de confirmar los resultados obtenidos en ese estudio. El cálculo de la CI<sub>50</sub> sólo se llevó a cabo cuando los compuestos presentaron más de un 50% de inhibición a 10  $\mu$ M. En la Tabla 20 se recogen los valores obtenidos.

## Discusión y Resultados

**Tabla 20.-** Evaluación de la  $CI_{50}$  de los compuestos que han interactuado con CK1 $\delta$  en el cribado virtual.

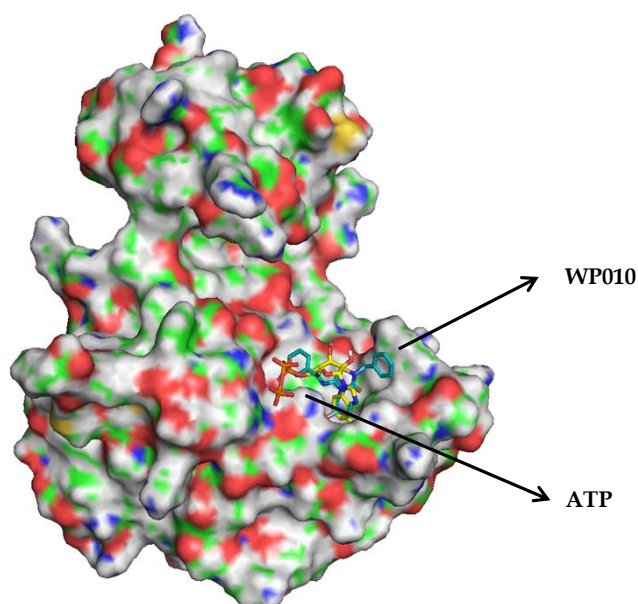
Compuesto	CK1 $\delta$ ( $CI_{50}$ )
<b>WP010</b>	$0.78 \pm 0.03 \mu\text{M}$
<b>VP2.9</b>	$39.32 \pm 2.39 \mu\text{M}$
<b>MR-4.40</b>	$3.95 \pm 0.26 \mu\text{M}$

La falta de actividad en la gran mayoría de los compuestos puede deberse a distintos factores asociados tanto a la reproducibilidad experimental de los métodos teóricos como a la baja solubilidad de algunas de las estructuras. Es importante sin embargo, mencionar que el derivado **MR4.40** ( $CI_{50} = 3.95 \pm 0.26 \mu\text{M}$ ) comparte un gran parecido estructural con la familia de benzotiazoles y tiazoles previamente desarrolladas en el capítulo anterior, lo que valida la hipótesis de búsqueda.

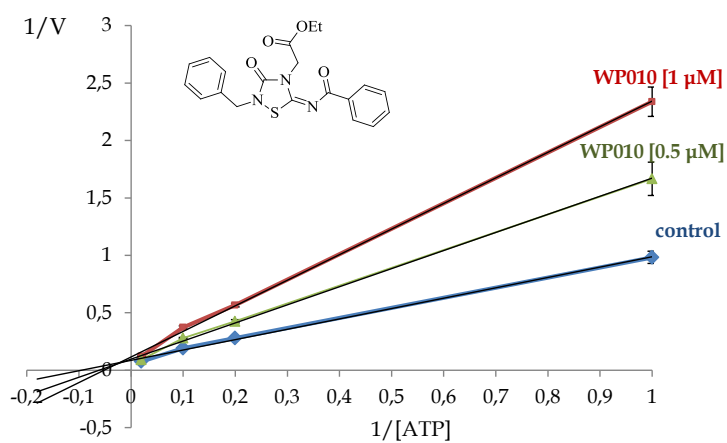
Además los compuestos **VP2.9** y **WP010**, derivados de urea y tiadiazol con valores de  $CI_{50}$  de 39.32 y 0.78  $\mu\text{M}$  respectivamente, pueden ser considerados como nuevas cabezas de serie para el desarrollo de diferentes familias de inhibidores de CK1 $\delta$ .

Finalmente y para validar el modo de unión obtenido por el programa de *docking* (Figura 58) se ha llevado a cabo estudios experimentales de unión a CK1 $\delta$  utilizando diferentes concentraciones de ATP. Los resultados muestran una cinética ATP-competitiva para WP010, corroborando el modo de unión teórico (Figura 59).

## Discusión y Resultados



**Figura 58.-** Docking del compuesto WP010 y la molécula de ATP en la estructura de CK1δ (PDB: 3UYS).



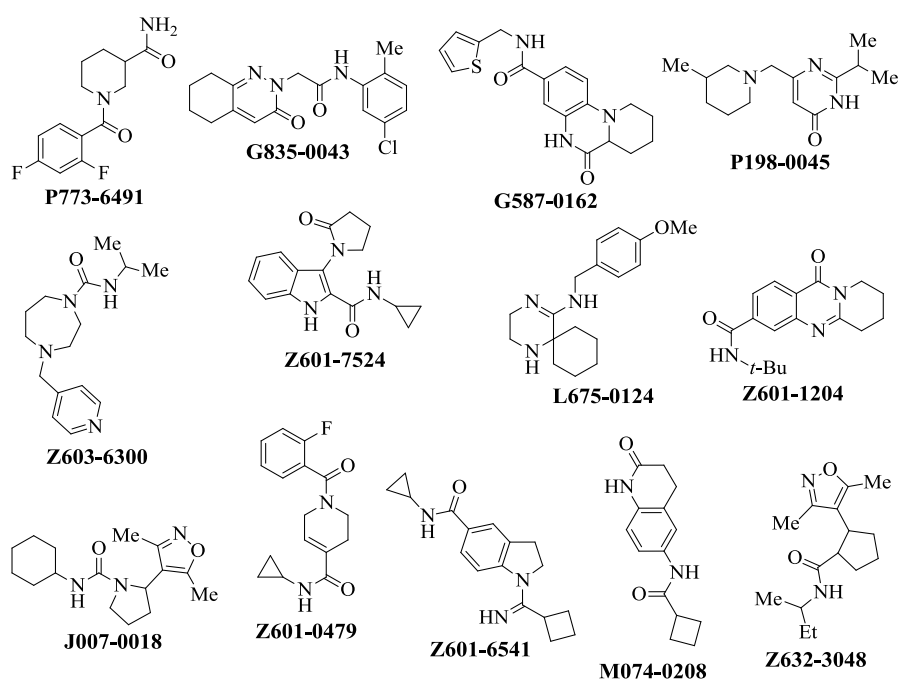
**Figura 59.-** Estudio cinético de competitividad con el ATP [1-50 μM] para el compuesto WP010.

Además de este estudio, se ha realizado el cribado virtual de una librería comercial de compuestos formada por 21490 moléculas (ChemDiv).

## Discusión y Resultados

Inicialmente se pasó un filtro empleando las reglas de Lipinski<sup>108</sup> seleccionando 914 compuestos para realizar el cribado virtual.

Las reglas de Lipinski consideran que las moléculas candidatas a fármacos deben poseer una serie de propiedades entre las que se encuentran que su peso molecular debe ser menor que 500, la lipofilia del compuesto, expresada como log P (coeficiente entre agua y octanol) debe ser menor que 5, el número de grupos donadores de puentes de hidrógeno debe ser menor que 5 y el número de grupos aceptores de puentes de hidrógeno debe ser menor que 10. Además existen otras variantes respecto a la superficie polar de la molécula o número de enlaces rotables.



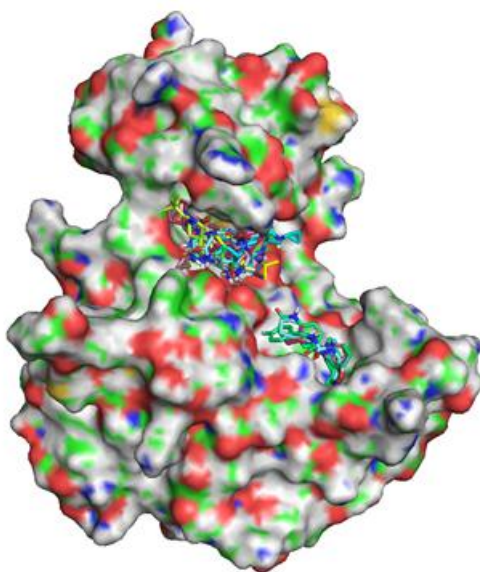
**Figura 60.-** Estructuras químicas de los 13 compuestos que interactúan con CK1 $\delta$  en la zona de unión del ATP.

<sup>108</sup> Lipinski, C. A., Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today: Technol.* **2004**, 1, 337-341.

## Discusión y Resultados

---

Así, se seleccionaron 13 compuestos (Figura 60) que podrían interactuar con la proteína quinasa CK1 $\delta$ , en la misma zona de interacción que los benzotiazoles previamente descritos sugiriendo que podrían ser competitivos con el ATP (Figura 61), estando el estudio de la actividad biológica actualmente en curso.



**Figura 61.-** Superposición de todas las moléculas que resultaron tener interacciones con CK1 $\delta$  en el cribado.

### 1.3.1. Búsqueda de sitios de modulación alostérica

La mayoría de los inhibidores de proteínas quinasas conocidos son ATP competitivos, es decir, se unen a la enzima en el centro catalítico, el cual está altamente conservado a lo largo de todo el quinoma humano. Todas ellas utilizan la molécula de ATP como cofactor catalizando la transferencia de un grupo fosfato al sustrato. Aunque la secuencia primaria de aminoácidos en el sitio catalítico presenta algunas diferencias, la estructura tridimensional de las proteínas quinasas a lo largo del quinoma humano está muy conservada.

## Discusión y Resultados

---

Por ello, la identificación de sitios alostéricos, es decir, nuevas cavidades en la superficie de la proteína que puedan alojar moléculas pequeñas o sustratos y modificar la conformación de las quinasas para impedir o desestabilizar la unión del ATP; se considera una línea de investigación interesante en la búsqueda de inhibidores selectivos de quinasas. Durante las últimas décadas, se han desarrollado numerosos métodos computacionales para determinar estas posibles cavidades<sup>109</sup>.

Dado que CK1 es una quinasa poco estudiada y explorada hasta el momento, la estructura cristalina de la enzima humana es conocida y por otra parte parece que su inhibición tiene unas actividades terapéuticas interesantes tal y como se ha visto a lo largo de esta memoria, se decidió iniciar el estudio de la superficie molecular de CK1 $\delta$  con el fin de poder determinar posibles sitios alostéricos de modulación e identificar posibles moduladores alostéricos. Para este trabajo, se ha empleado el programa fpocket, que es un método basado en la energía de interacción, y que por medio de sondas de forma esférica obtiene las diferentes cavidades donde podría unirse una molécula<sup>110</sup>. Para una proteína determinada se obtendrán  $n$  bolsillos, siendo el bolsillo número 1 el de menor energía, que normalmente coincide con el centro catalítico.

---

<sup>109</sup> Zheng, X.; Gan, L.; Wang, E.; Wang, J., Pocket-based drug design: Exploring pocket space. *AAPS J.* **2013**, *15*, 228-241.

<sup>110</sup> Vincent Le Guilloux, V.; Schmidtke, P.; Tuffery, P., Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinf.* **2009**, *10*, 168.

## Discusión y Resultados

---

Esta metodología ya había sido empleada con éxito en nuestro grupo de trabajo para la determinación de bolsillos alostéricos en otras quinasas como GSK3<sup>111</sup> y la fosfodiesterasa 7<sup>112</sup>.

Las tres estructuras cristalizadas de CK1 $\delta$  humana (PDB: 3UYS, 3UYT y 3UZP) han sido incluidas en el estudio de la superficie de esta proteína quinasas. Las estructuras se prepararon eliminando las moléculas de agua, ligandos e iones con los que puede estar cocrystalizada. De esta forma, se mantuvo únicamente la forma monomérica de cada una de las estructuras. A continuación, las tres estructuras fueron analizadas independientemente con el programa fpocket, obteniéndose un número de bolsillos diferente en cada estructura (Tabla 21).

**Tabla 21.-** Número de bolsillos encontrado en CK1 $\delta$ .

Estructura PDB	3UYS	3UYT	3UZP
Número de bolsillos	14	19	21

A continuación, realizando un análisis visual de cada uno de los bolsillos de las tres estructuras cristalizadas, se determinaron las cavidades conservadas en ellas, eligiendo los siete bolsillos encontrados en la superficie de las tres estructuras (Tabla 22). En esta tabla se recogen los bolsillos comunes a las tres estructuras cristalográficas junto con la puntuación que reciben en el programa y que indica la mayor posibilidad de interacción de moléculas pequeñas.

---

<sup>111</sup> Palomo, V.; Soteras, I.; Pérez, D. I.; Pérez, C.; Gil, C.; Campillo, N. E.; Martínez, A., Exploring the binding sites of glycogen synthase kinase 3. Identification and characterization of allosteric modulation cavities. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8461–8470.

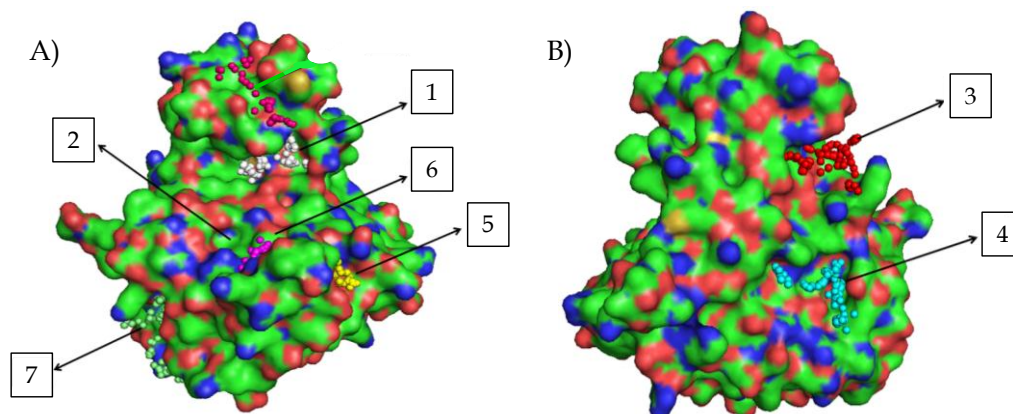
<sup>112</sup> Redondo, M.; Soteras, I.; Brea, J.; González-García, A.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Martínez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E., Unraveling phosphodiesterase surfaces. Identification of phosphodiesterase 7 allosteric modulation cavities. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 781-788.

## Discusión y Resultados

**Tabla 22.-** Bolsillos principales encontrados (1-7) en las estructuras de CK1 $\delta$ , y su puntuación en cada una de ellas.

Bolsillos principales encontrados en CK1 $\delta$	Estructura PDB		
	3UYS	3UYT	3UZP
1	1	1	2
2	2	3	3
3	4	5	9
4	5	16	1
5	7	7	6
6	8	14	10
7	10	2	16

En la Figura 62, se muestran los bolsillos conservados (1-7) de CK1 $\delta$  a lo largo de las tres estructuras cristalizadas.



**Figura 62.-** Bolsillos conservados en CK1 $\delta$  A) vista anterior y B) vista posterior.

Superponiendo los bolsillos encontrados con los complejos cristalinos se ha podido comprobar que el bolsillo 1 es el que aloja el ATP y el inhibidor

## **Discusión y Resultados**

---

**PF670462**, coincidiendo con el sitio catalítico. Las otras cavidades representan posibles sitios de interacción alostérica ofreciendo nuevas posibilidades para el diseño y descubrimiento de nuevos moduladores de CK1 $\delta$ .

## 2. BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE LRRK2

### 2.1. Búsqueda de nuevos inhibidores de LRRK2 basados en sustrato

La proteína quinasa LRRK2, es una proteína poco conocida, con una gran complejidad estructural y cuyo aumento de función se ha relacionado directamente con la etiología de la enfermedad de Parkinson. Aunque son diversos los inhibidores descritos de esta enzima, estas moléculas presentan el inconveniente de no atravesar la barrera hematoencefálica, o presentar una baja selectividad respecto a otras quinasas. Es necesario por tanto, el descubrimiento de nuevas moléculas candidatas a fármacos que actúen a nivel del sistema nervioso central, y por tanto capaces de llegar a cerebro.

Con este fin, se propuso el descubrimiento de nuevos inhibidores de LRRK2 permeables a cerebro y para ello, se decidió hacer uso de la síntesis orientada a la biología (BIOS)<sup>113</sup>. Esta metodología se caracteriza por emplear la biología y las estructuras químicas privilegiadas como criterio para el desarrollo de quimiotecas focalizadas<sup>114</sup>. En este marco, los productos naturales cobran especial importancia, definiendo el espacio químico explorado por la naturaleza en su evolución<sup>115</sup>. En realidad los productos naturales terrestres o marinos definen fragmentos moleculares privilegiados y biológicamente relevantes producidos por biomoléculas para interactuar directamente con ellas. En consecuencia, se espera que las quimiotecas de compuestos formadas por productos naturales sean ricas en bioactividad y sean eficaces como

---

<sup>113</sup> Wetzel, S.; Bon, R. S.; Kumar, K.; Waldmann, H., Biology-oriented synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10800–10826.

<sup>114</sup> Wilk, W.; Zimmermann, T. J.; Kaiser, M.; Waldmann, H., Principles, implementation and application of biology-oriented synthesis (BIOS). *Biol. Chem.* **2010**, *391*, 491-497.

<sup>115</sup> Bon, R. S.; Waldmann, H., Bioactivity-guided navigation of chemical space. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1103-1114.

## Discusión y Resultados

---

productos moduladores de múltiples procesos biológicos. Además la síntesis de compuestos inspirada en quimiotecas de productos naturales es una estrategia prometedora para la identificación de tipos de compuestos relevantes biológicamente, así como moléculas prototipo que den lugar a programas de descubrimiento de fármacos. En realidad, la gran mayoría de los fármacos aprobados durante los últimos años son productos naturales o bien han tenido en ellos su inspiración<sup>116</sup>.

Con el fin de encontrar inhibidores de LRRK2 nuevos con propiedades biológicas y farmacéuticas adecuadas, elegimos un diseño racional basado en sustrato haciendo uso de esqueletos químicos privilegiados para la actividad biológica<sup>117</sup>, utilizando síntesis orientada a la biología (*BIOS*). En concreto nos fijamos en el oxoindol, este heterociclo, derivado de productos naturales como es la familia del índigo, está presente en numerosos compuestos con potencial acción terapéutica en epilepsia, migrañas, demencia senil, y quimioterapia, entre otras<sup>118</sup>. Además, la estructura de oxoindol también está presente en compuestos con potencial antioxidante y anticonvulsionante<sup>119</sup>.

Por otra parte, diversos inhibidores de proteínas quinasas descritos también llevan un núcleo de oxoindol o isatina en su estructura química. Este es el caso de semaxanib y sunitinib, aprobados para el tratamiento de diversas

---

<sup>116</sup> Newman D. J.; Cragg G. M., Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.

<sup>117</sup> Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R., Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 347-361.

<sup>118</sup> Pandeya, S. N.; Smitha, S.; Jyoti, M.; Sridhar, S. K., Biological activities of isatin and its derivatives. *Acta Pharm.* **2005**, *55*, 27-46.

<sup>119</sup> Bhrigu, B.; Pathak, D.; Siddiqui, N.; Alam, M. S.; Ahsan, W., Search for biological active isatins: A short review. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* **2010**, *2*, 229-235.

patologías oncológicas<sup>120</sup>, el **IC261** que inhibe CK1<sup>121</sup>, la indolinona **GW5074** inhibidor LRRK2<sup>122</sup>, las indirubinas que son productos naturales inhibidoras de CDK1 y GSK3 $\beta$ <sup>123</sup>, algunas aminopirimidiniminoisatina que inhiben la replicación del virus VIH en linfocitos<sup>124</sup>, mientras que la isatina es inhibidor de acetilcolinesterasa y MAO-B entre otras<sup>125</sup>. En la Figura 63 se muestran las estructuras de las moléculas derivadas de oxoindol con propiedades biológicas.

---

<sup>120</sup> Zámečníkova A., Novel approaches to the development of tyrosine kinase inhibitors and their role in the fight against cancer. *Expert Opin. Drug Discovery*. **2014**, 9, 77-92.

<sup>121</sup> Mashhoon N.; DeMaggio A. J.; Tereshko V.; Bergmeier S. C.; Egli M.; Hoekstra M. F.; Kuret J., Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 20052-20060.

<sup>122</sup> Liu Z.; Hamamichi S.; Lee B. D.; Yang D.; Ray A.; Caldwell G. A.; Caldwell K. A.; Dawson T. M.; Smith W. W.; Dawson V. L., Inhibitors of LRRK2 kinase attenuate neurodegeneration and Parkinson-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* Parkinson's disease models. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, 20, 3933-3942.

<sup>123</sup> Polychronopoulos P.; Magiatis P.; Skaltsounis A. L.; Myrianthopoulos V.; Mikros E.; Tarricone A.; Musacchio A.; Roe S. M.; Pearl L.; Leost M.; Greengard P.; Meijer L., Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 935-946.

<sup>124</sup> Medvedev, A.; Buneeva, O.; Glover, V., Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biol. Targets Ther.* **2007**, 1, 151-162.

<sup>125</sup> Raj, V., Review on CNS activity of isatin derivatives. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **2012**, 4, 1-9.

## Discusión y Resultados

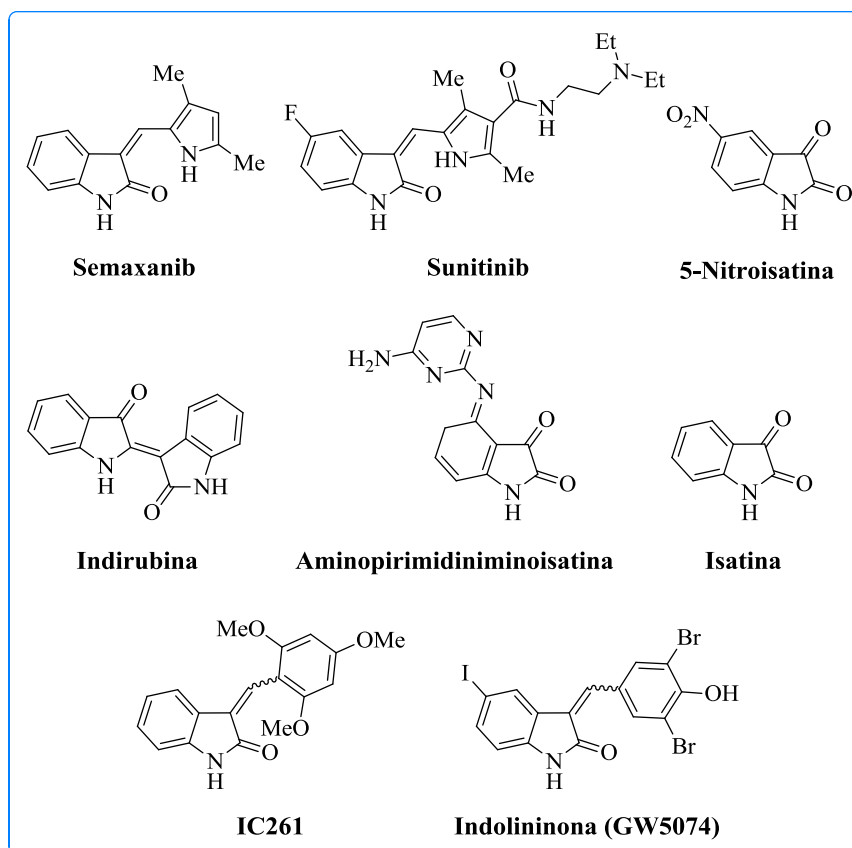
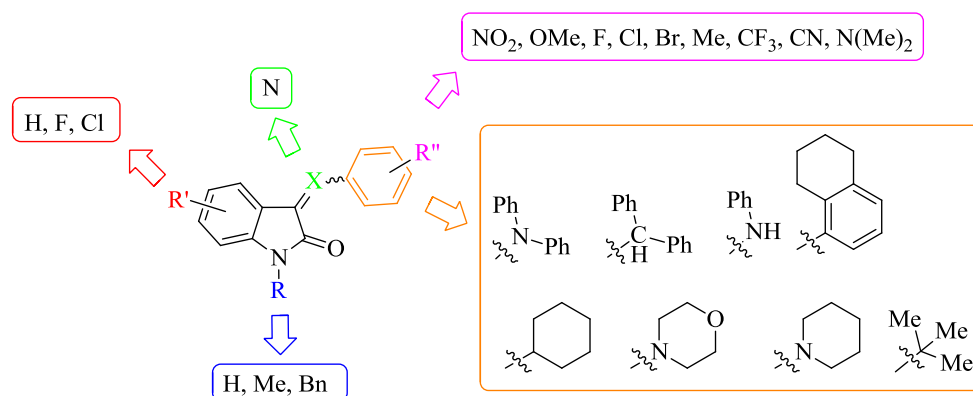


Figura 63.- Estructura química de los derivados de oxindol.

Dado que **IC261** y **GW5074** son inhibidores de las proteínas quinasas objeto de nuestro estudio y comparten una gran semejanza estructural, elegimos estos derivados para iniciar un programa de modificación estructural que nos permitiera la obtención de los inhibidores de LRRK2 buscados con propiedades mejoradas (Figura 64).



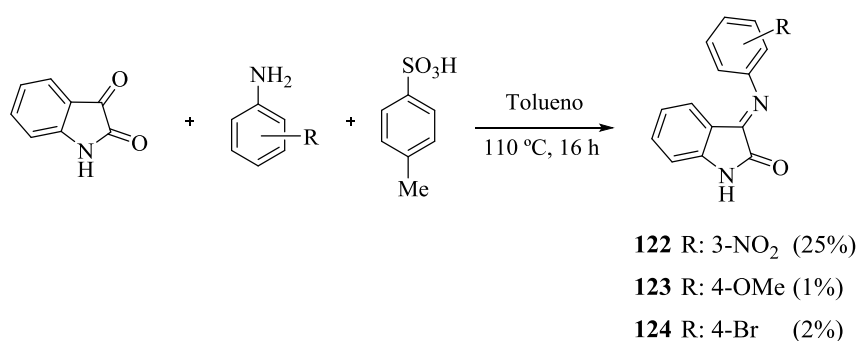
**Figura 64.-** Modificaciones estructurales propuestas manteniendo el anillo de oxoindol.

En todos los casos se ha introducido como elemento de novedad en la estructura química un enlace imino unido directamente al oxoindol. Además se varió la naturaleza del grupo unido directamente al enlace imino, siendo tanto de naturaleza aromática como alifática. Por otra parte, se estudió la influencia de los sustituyentes en posiciones 5 y 7 del anillo de oxoindol de naturaleza halogenada, así como en el átomo de nitrógeno de la isatina.

Para la síntesis de los diferentes derivados se utilizó una metodología descrita en la bibliografía, en la que se produce la formación del enlace imino entre la isatina y diferentes anillos aromáticos en un disolvente aprótico<sup>126</sup>. En el acoplamiento se emplea el ácido *p*-toluensulfónico como catalizador de la reacción eliminando el agua producida en el medio (Esquema 20).

<sup>126</sup> Ikotun, A. A.; Egharevba, G. O.; Obafemi, C. A.; Owoseni, A. O., Ring deactivating effect on antimicrobial activities of metal complexes of the schiff base of *p*-nitroaniline and isatin. *J. Chem. Pharm. Res.* **2012**, *4*, 416-422.

## Discusión y Resultados



**Esquema 20.-** Síntesis de los derivados **122-124**.

De esta manera se sintetizaron los derivados **122-124**, tras largos tiempo de reacción y rendimientos muy bajos. Con el fin de optimizar el proceso se utilizó la síntesis orgánica asistida por microondas<sup>127</sup>, empleando la montmorillonita-K10 como catalizador y soporte donde se produce la reacción<sup>128</sup>. La montmorillonita (MMT-K10) es una mezcla de silicatos en disposición laminar que se utiliza recientemente como soporte inorgánico en síntesis orgánica. Las reacciones catalizadas por MMT-K10 se realizan, normalmente, en condiciones suaves de reacción obteniendo alto rendimiento y selectividad; pudiendo actuar como superficie donde la reacción tiene lugar. Para la formación de iminas, es esencial eliminar el agua del medio de reacción; para esto, normalmente, se ha utilizado el ácido *p*-toluensulfónico, cloruro de titanio (IV) o MMT-K10; sin embargo, el uso de microondas acelera la deshidratación de la reacción al utilizar un soporte arcilloso como MMT-

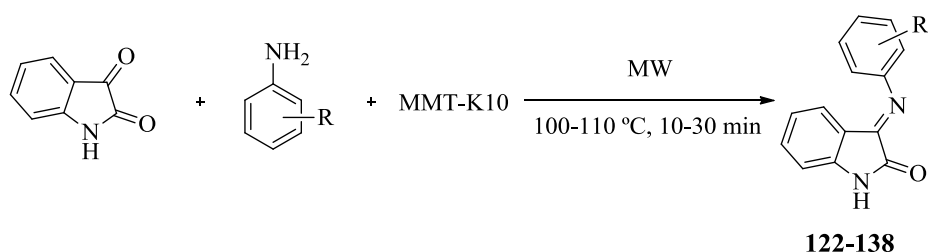
<sup>127</sup> Pandey, M.; Raghuvanshi, D. S.; Singh, K. N., Microwave-assisted, solvent-free synthesis of 3'-(aryl/heteroaryl)-1-morpholinomethyl/piperidinomethylspiro[3H-indole-3,2'-thiazolidine]-2,4'(1H)-diones via 3-isatinimines. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *46*, 49-53.

<sup>128</sup> Kaur, N.; Kishore, D., Montmorillonite: An efficient, heterogeneous and green catalyst for organic synthesis. *J. Chem. Pharm. Res.* **2012**, *4*, 991-1015

## Discusión y Resultados

K10. Así, se lograron tiempos de reacción bajos (10 min) y un aumento, en general, del rendimiento (Esquema 21).

Estas nuevas condiciones de reacción se aplicaron a la síntesis de los derivados **122-124** previamente obtenidos observándose un aumento considerable del rendimiento (50%, 75% y 84% para **122**, **123** y **124**, respectivamente). Los bajos rendimiento de los derivados **128** y **130** pueden deberse a la utilización de la amina como hidrocloreuro.



<b>122</b> R: 3-NO <sub>2</sub>	(50%)	<b>131</b> R: 4-F	(71%)
<b>123</b> R: 4-OMe	(75%)	<b>132</b> R: 4-CF <sub>3</sub>	(41%)
<b>124</b> R: 4-Br	(84%)	<b>133</b> R: 4-Me	(81%)
<b>125</b> R: H	(86%)	<b>134</b> R: 4-CN	(56%)
<b>126</b> R: 2-OMe	(27%)	<b>135</b> R: 4-NO <sub>2</sub>	(24%)
<b>127</b> R: 2-CF <sub>3</sub>	(53%)	<b>136</b> R: 4-N(Me) <sub>2</sub>	(84%)
<b>128</b> R: 2-Cl	(4%)	<b>137</b> R: 2,4-(OMe) <sub>2</sub>	(47%)
<b>129</b> R: 2-F	(60%)	<b>138</b> R: 3,4-(OMe) <sub>2</sub>	(65%)
<b>130</b> R: 3-Cl	(10%)		

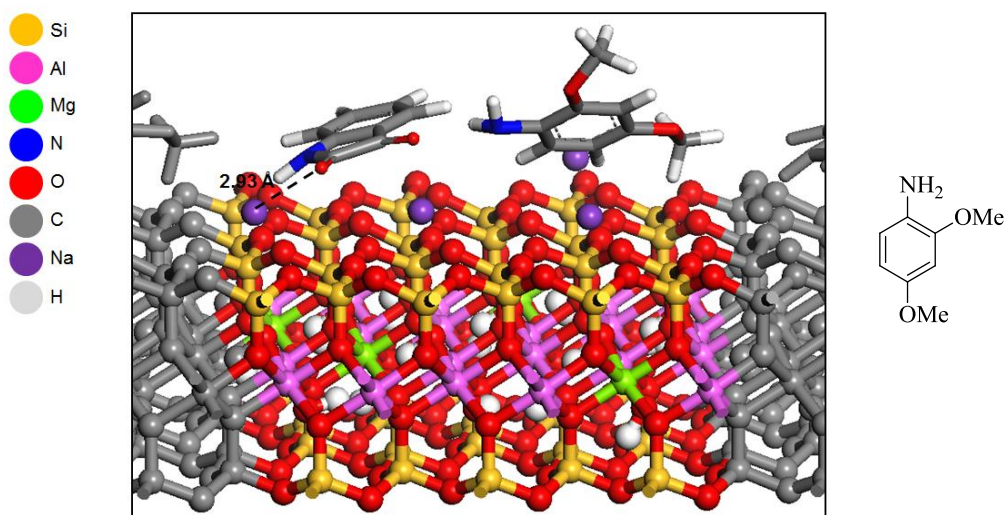
**Esquema 21.-** Síntesis de los compuestos **122-138**.

Con el fin de tratar de explicar el papel de MMT-K10 en este tipo de reacciones, se han realizado en colaboración con Murilo Bello de la Universidade Federal do Rio de Janeiro, la modelización molecular de los reactivos de partida utilizando el programa Spartan'10. Una vez optimizados

## Discusión y Resultados

los reactivos, se usaron en la construcción del sistema molecular reactivo-MMT-K10 utilizando el programa *Materials Studio* (Figura 65).

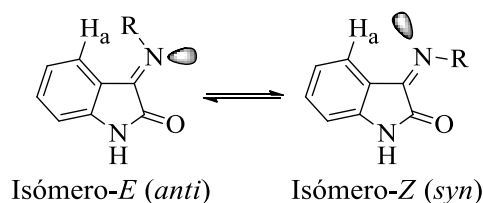
Como se observa en la Figura 65, la molécula de oxoindol se sitúa en la superficie de la MMT-K10, dejando el carbono carbonílico expuesto pudiéndose producir el ataque nucleófilo por parte del derivado de amina y facilitando por tanto la reacción química.



**Figura 65.-** Imagen de la simulación de la dinámica molecular durante 1 ns del sistema reactivo-(MMT-K10) en la síntesis del derivado **137**.

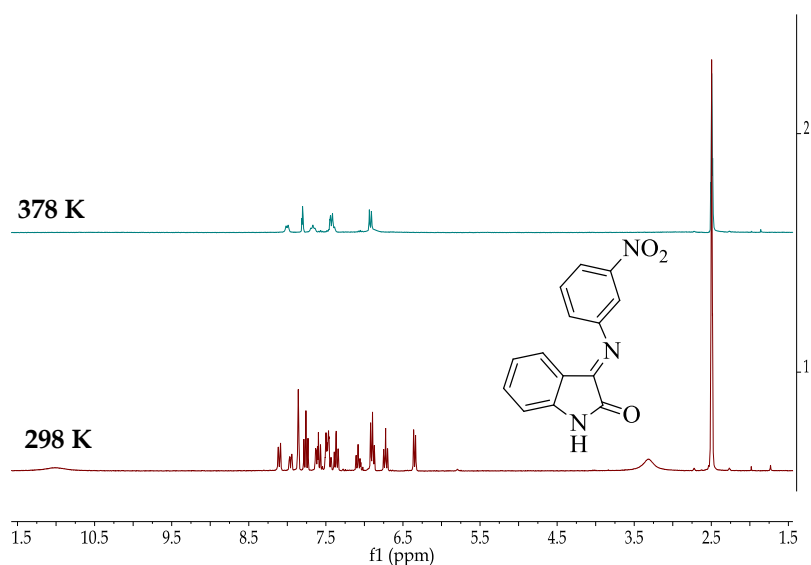
Los derivados de oxoindol formados contienen en su estructura un enlace tipo imino, por lo que pueden existir dos isómeros, *Z* y *E*, alrededor de este doble enlace (Figura 66)<sup>129</sup>.

<sup>129</sup> Layer, R. W., The chemistry of imines. *Chem. Rev.* **1963**, 63, 489-510.



**Figura 66.-** Equilibrio entre los dos isómeros *E* y *Z* del enlace imino.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN muestran las señales para ambos isómeros en todos los casos a temperatura ambiente. Para confirmar que la multiplicidad de estas señales se debía a la existencia de isómeros *E/Z*, se registraron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN a 25 °C (298 K) y a 105 °C (378 K), observándose un cambio en la multiplicidad y número de señales al aumentar la temperatura. Esto indica la existencia de un equilibrio dinámico en disolución entre las formas *E/Z* (Figura 67) pudiéndose llegar a la coalescencia.



**Figura 67.-** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para el compuesto **122** adquirido a 25 °C (298 K), abajo, y a 105 °C (378 K), arriba.

## Discusión y Resultados

---

Con el fin de determinar el valor del incremento de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de la rotación alrededor de este enlace imino, se llevó a cabo un estudio por resonancia magnética nuclear a diferentes temperaturas, desde  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , variando la temperatura de 10 en  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La apariencia del espectro de RMN de un sistema en equilibrio dinámico es función de las velocidades de interconversión y por tanto de la temperatura. Analizando las variaciones del espectro con la temperatura pueden determinarse parámetros cinéticos de los equilibrios dinámicos presentes, como es la energía libre de Gibbs ( $G$ ). Al disminuir la temperatura, los procesos dinámicos internos se ralentizan, registrando el espectro las señales de los dos isómeros como si se tratara de una mezcla de dos compuestos diferentes. Sin embargo, la rotación alrededor del enlace se acelera cuando se eleva la temperatura, observándose un proceso de ensanchamiento de las señales, hasta finalmente colapsar en una señal única promediada, inicialmente muy ancha, que va ganando resolución con el aumento de la velocidad de giro proporcional al valor de la temperatura. La temperatura de coalescencia  $T_c$ , es aquella a la cual las señales individuales colapsan en una señal única muy ancha, en muchos casos oculta en la línea base del espectro. A partir de este valor puede determinarse la constante de velocidad del proceso de interconversión (Ec. 1.1):

$$K_{T_c} = \frac{\pi}{\sqrt{2}} (\nu_A - \nu_B) \sim 2.2\Delta\nu \dots \text{(Ec. 1.1)}$$

La velocidad de interconversión a la temperatura de coalescencia depende sólo de la diferencia de desplazamientos químicos. Dado que esta diferencia varía con el campo magnético ( $B_0$ ) la temperatura de coalescencia depende también de la intensidad del campo magnético. Esto es, cuanto menor sea la frecuencia del espectrómetro utilizado, más fácilmente se alcanzará la

temperatura de coalescencia. Sustituyendo  $K_{Tc}$  en la ecuación de Eyring se llega a una expresión que permite evaluar de forma aproximada la energía libre de activación a la temperatura de coalescencia (Ec. 1.2):

$$\Delta G^\ddagger = RT_C \ln \frac{RT_C \sqrt{2}}{\pi N h (\nu_A - \nu_B)} \dots \text{(Ec. 1.2)}$$

$$\Delta G^\ddagger = 4.57 * 10^{-3} T_C (9.97 + \log \frac{T_C}{\Delta \nu}) \text{ kcal/mol} \dots \text{(Ec. 1.3)}$$

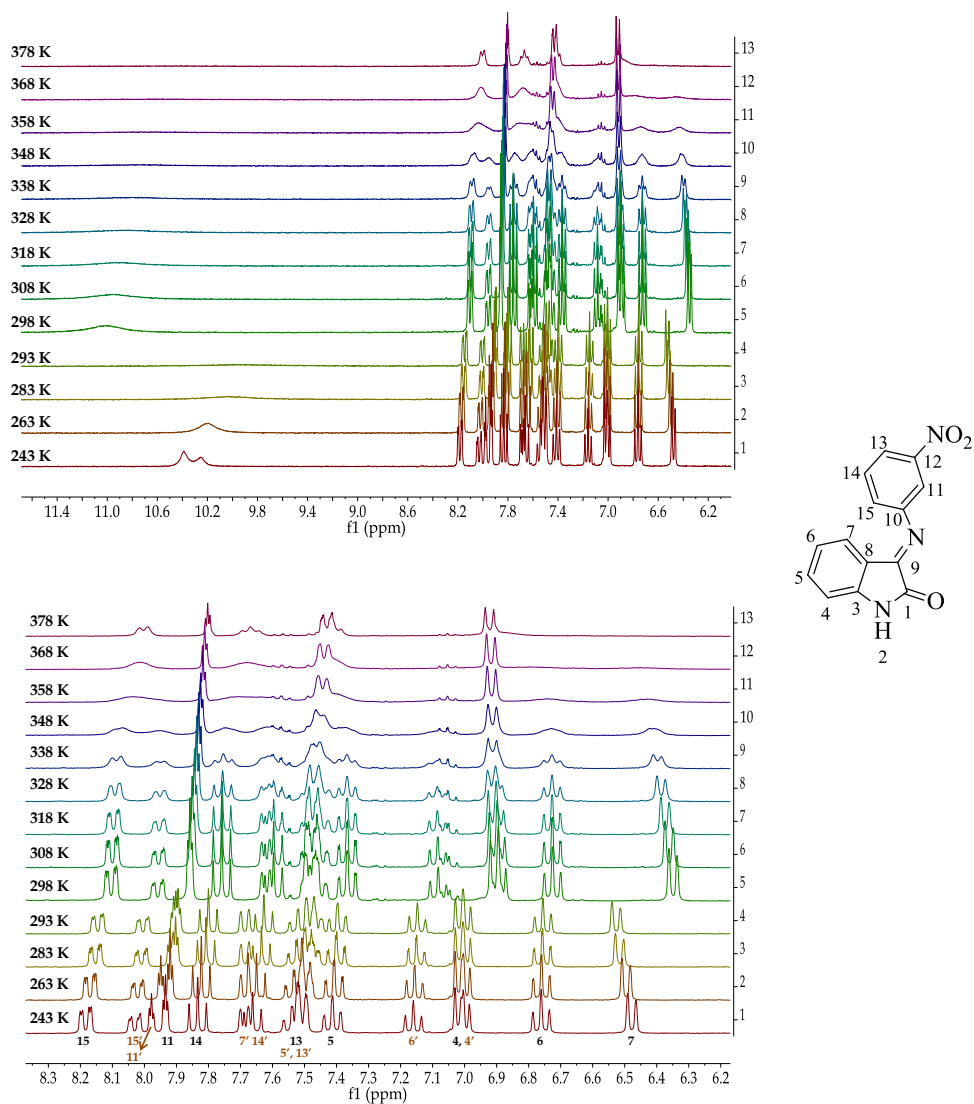
Siendo  $T_C$ , la temperatura de coalescencia y  $\Delta \nu$ , la diferencia del desplazamiento químico en Hertzios de las señales en ausencia de intercambio, que en este caso se medirá a  $-30^\circ\text{C}$  (243 K).

Los espectros adquiridos a las temperaturas desde  $-30^\circ\text{C}$  (243 K) hasta  $20^\circ\text{C}$  (293 K), se realizaron en acetona deuterada, mientras que para los espectros adquiridos desde  $25^\circ\text{C}$  (298 K) hasta  $105^\circ\text{C}$  (378 K) el disolvente deuterado empleado fue DMSO (Figura 68). Al haber varias señales que alcanzan la  $T_C$  en este rango de temperaturas, se ha calculado la barrera energética a partir del análisis de diferentes pares señales<sup>130</sup>.

---

<sup>130</sup> Jennings, W. B.; Boyd, D. R., The mechanism of interconversion of (Z)- and (E)-Ketimines. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7187.

## Discusión y Resultados



**Figura 68.-** Ampliaciones de los espectros adquiridos a diferentes temperaturas del compuesto **122**.

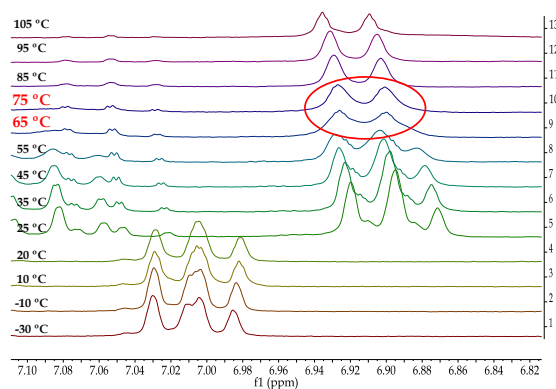
Así, se ha calculado para la pareja de protones H<sub>4</sub>/H<sub>4'</sub>, H<sub>14</sub>/H<sub>14'</sub>, y H<sub>15</sub>/H<sub>15'</sub> la energía libre de Gibbs:

## Discusión y Resultados

$H_4/H_4'$ :  $T_C \sim 70^\circ\text{C}$  (343 K);  $\Delta\nu = 6$  Hz.

Sustituyendo estos valores en la Ec. 1.3 se obtiene un valor de  $\Delta G$ :

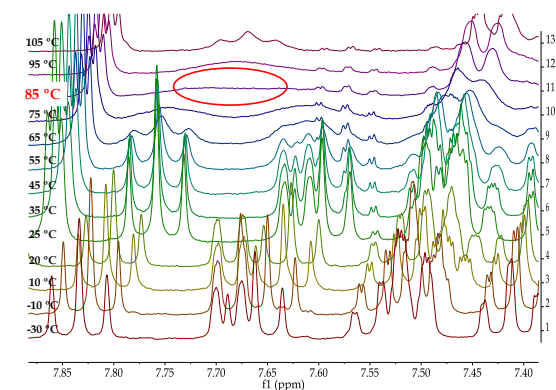
$$\Delta G^\ddagger = 18.38 \text{ kcal/mol}; 76.83 \text{ kJ/mol}$$



$H_{14}/H_{14}'$ :  $T_C \sim 85^\circ\text{C}$  (358 K);  $\Delta\nu = 51$  Hz.

Sustituyendo estos valores en la Ec. 1.3: el valor de  $\Delta G$  obtenido es:

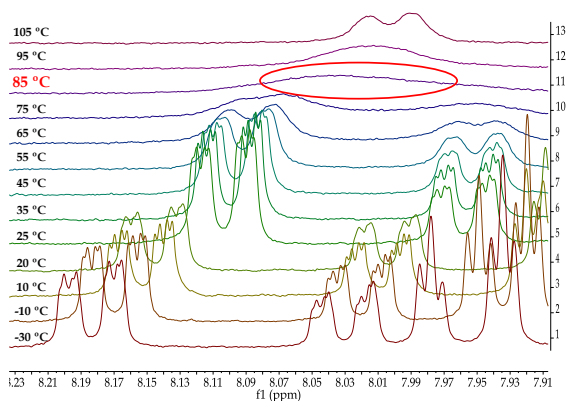
$$\Delta G^\ddagger = 17.69 \text{ kcal/mol}; 73.94 \text{ kJ/mol}$$



$H_{15}/H_{15}'$ :  $T_C \sim 80^\circ\text{C}$  (353 K);  $\Delta\nu = 45$  Hz.

Sustituyendo estos valores en la Ec. 1.3: se obtiene un valor de  $\Delta G$ :

$$\Delta G^\ddagger = 17.52 \text{ kcal/mol}; 73.23 \text{ kJ/mol}$$



Calculando el valor medio de los tres valores obtenidos para la energía libre de Gibbs de rotación alrededor del enlace imino entre la isatina y el anillo aromático, se obtuvo:

## Discusión y Resultados

---

$$\Delta G^\ddagger = 17.86 \pm 0.46 \text{ kcal/mol}; 74.61 \pm 1.91 \text{ kJ/mol}$$

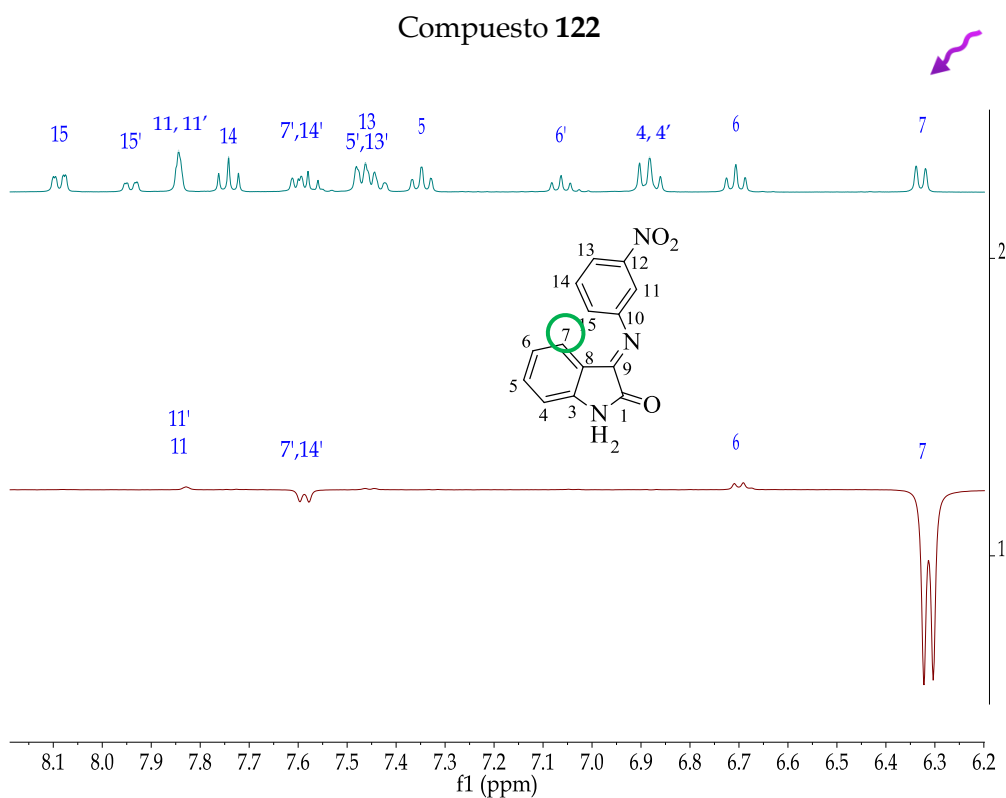
Para este tipo de compuestos, no existe en la bibliografía ningún dato de energía libre de Gibbs. Sin embargo, sí existen datos de energía libre de Gibbs de isomerización de iminas de naturaleza alquímica<sup>131</sup>, siendo estos valores entre 18.9-27.0 Kcal/mol. Miller y colaboradores<sup>132</sup> estimaron la barrera de activación  $\Delta G^\ddagger$  para derivados de tipo aromático, obteniendo valores de 16.8 kcal/mol. También existen algunos valores teóricos de derivados de pirimidina, piridina, y purina donde se observaron valores de energía libre de activación entre 19.7-21.6 kcal/mol<sup>133</sup>. El valor de  $\Delta G^\ddagger$  obtenido para el derivado **122**, está comprendido en el mismo orden de magnitud que los encontrados para estos otros compuestos y puede explicar el hecho de que a temperatura ambiente se observen los dos isómeros en solución que no pueden separarse, ya que al eluirse cada uno de los isómeros de la placa preparativa y estar en solución vuelve a originarse la mezcla de las formas E/Z.

---

<sup>131</sup> Blanco, F.; Alkorta, I.; Elguero, J., Barriers about double carbon-nitrogen bond in imine derivatives (Aldimines, oximes, hydrazones, azines). *Croat. Chem. Acta.* **2009**, *82*, 173-183.

<sup>132</sup> Miller, S.; Reich, B.; Greenwald, E.; Justice, A.; Beckstead, B.; Reibenspies, J.; North, S. Phenyl-(2-phenylimino-1,2-diphenylethyl)-amine: Ene-diamine versus imine-amine isomeric preferences. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8409-8416.

<sup>133</sup> Glaser, R.; Yin, J.; Miller, S., Asymmetry in the N-inversion of heteroarene imines: pyrimidin-4(3H)-imine, pyridin-2(1H)-imine, and 1H-purine-6(9H)-imine. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1132-1142.



**Figura 69.-** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (arriba) y espectro de NOE (abajo) del compuesto **122**. La numeración con el símbolo prima corresponde al isómero mayoritario.

A continuación, se estudió mediante resonancia magnética nuclear cuál de los dos isómeros *E/Z* era la forma mayoritaria.

En primer lugar, mediante el estudio por  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC y  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC se han identificado todos los protones de los correspondientes isómeros y una vez identificado el protón  $\text{H}_7$  del isómero mayoritario, se irradió, observándose que el isómero obtenido mayoritariamente es el isómero *E*, dado que el protón  $\text{H}_7$  presentó efecto NOE con los protones aromáticos del fenilo. A modo de ejemplo, en la Figura 69 se representa el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN y el espectro de NOE del compuesto **122**. De esta forma al irradiar el protón del oxindol  $\text{H}_7$

## Discusión y Resultados

(6.32 ppm) se observa efecto NOE con el protón del anillo de fenilo H<sub>11</sub> (7.83 ppm), confirmando que el isómero mayoritario es la forma *E*.

Para todos los compuestos sintetizados se observa como isómero mayoritario la forma *E*, esto puede ser debido a la estabilidad de la forma *E* dado que presenta una interacción denominada *T-shaped edge-to-face* entre el CH aromático del oxindol y el plano del anillo de fenilo<sup>134,135</sup> que debe ser más estable que la interacción carbonilo- $\pi$ <sup>136</sup> que estabilizaría la forma *Z*; como se muestra en la Figura 70.

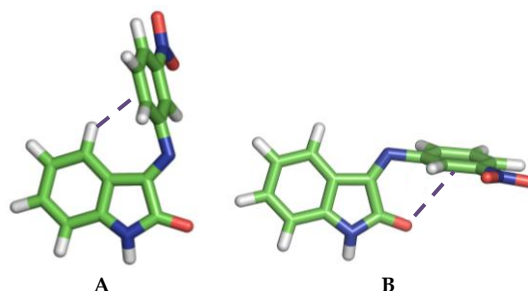


Figura 70.- Interacción “*T-shaped edge-to-face*” (A) y CO- $\pi$  (B).

Las diferencias observadas en la proporción entre ambos isómeros se puede deber a la naturaleza electroceptora o electrodonadora de los sustituyentes del anillo de fenilo<sup>137</sup> (Tabla 23). Es decir, la interacción se produce debido al carácter electropositivo del hidrógeno del oxindol y al carácter

<sup>134</sup> Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F., Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210-1250.

<sup>135</sup> Salonen, L. M.; Ellermann, M.; Diederich, F., Aromatic rings in chemical and biological recognition: Energetics and structures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4808-4842.

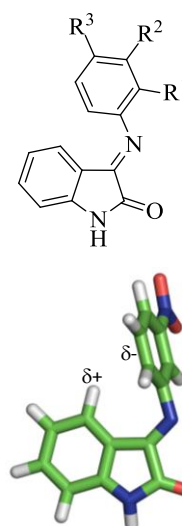
<sup>136</sup> Wan, C. Q.; Chenab, X. D.; Mak, T. C. W., Supramolecular frameworks assembled via intermolecular lone pair-aromatic interaction between carbonyl and pyridyl groups. *CrystEngComm*, **2008**, *10*, 475-478.

<sup>137</sup> Karthikeyan, S.; Ramanathan, V.; Mishra, B. K., Influence of the substituents on the CH... $\pi$  interaction: Benzene-methane complex. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 6687-6694.

electronegativo del anillo de fenilo; cuando el anillo de fenilo se sustituye por un grupo electroaceptor, la densidad electrónica en el anillo se ve disminuida y por tanto, la interacción CH-fenilo (*T-shaped edge-to-face*) es más débil, traduciéndose en una menor proporción del isómero *E* (compuestos **122**, **127**, **132**, **134** y **135**).

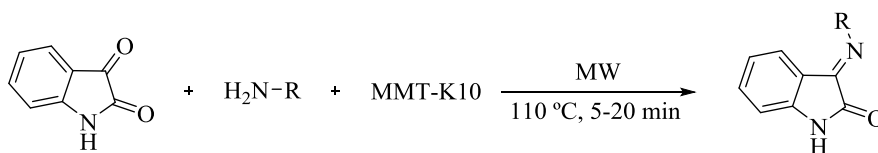
Tabla 23.- Proporciones *E/Z* de los compuestos **122-138**.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Ratio <i>E:Z</i>
<b>122</b>	H	NO <sub>2</sub>	H	63:37
<b>123</b>	H	H	OMe	83:17
<b>124</b>	H	H	Br	77:23
<b>125</b>	H	H	H	83:17
<b>126</b>	OMe	H	H	83:17
<b>127</b>	CF <sub>3</sub>	H	H	62:38
<b>128</b>	Cl	H	H	77:23
<b>129</b>	F	H	H	67:33
<b>130</b>	H	Cl	H	63:37
<b>131</b>	H	H	F	67:33
<b>132</b>	H	H	CF <sub>3</sub>	71:29
<b>133</b>	H	H	Me	77:23
<b>134</b>	H	H	CN	64:36
<b>135</b>	H	H	NO <sub>2</sub>	64:36
<b>136</b>	H	H	N(Me) <sub>2</sub>	76:24
<b>137</b>	OMe	H	OMe	83:17
<b>138</b>	H	OMe	OMe	83:17



Sin embargo, si el sustituyente tiene carácter electrodonador, la densidad electrónica del anillo de fenilo aumentará, obteniéndose mayor proporción del isómero *E* (derivados **126**, **133**, **136**, **137** y **138**).

## Discusión y Resultados

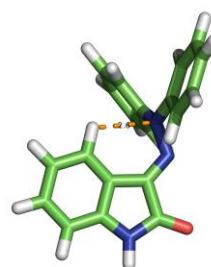


<b>139</b> R: 5-(1,2,3,4-tetrahidronaftaleno)	(70%)
<b>140</b> R: N(Ph) <sub>2</sub>	(74%)
<b>141</b> R: CH(Ph) <sub>2</sub>	(48%)
<b>142</b> R: NHPPh	(24%)
<b>143</b> R: ciclohexilo	(71%)
<b>144</b> R: piperidina	(86%)
<b>145</b> R: morfolina	(59%)

**Esquema 22.-** Síntesis de los compuestos **139-145**.

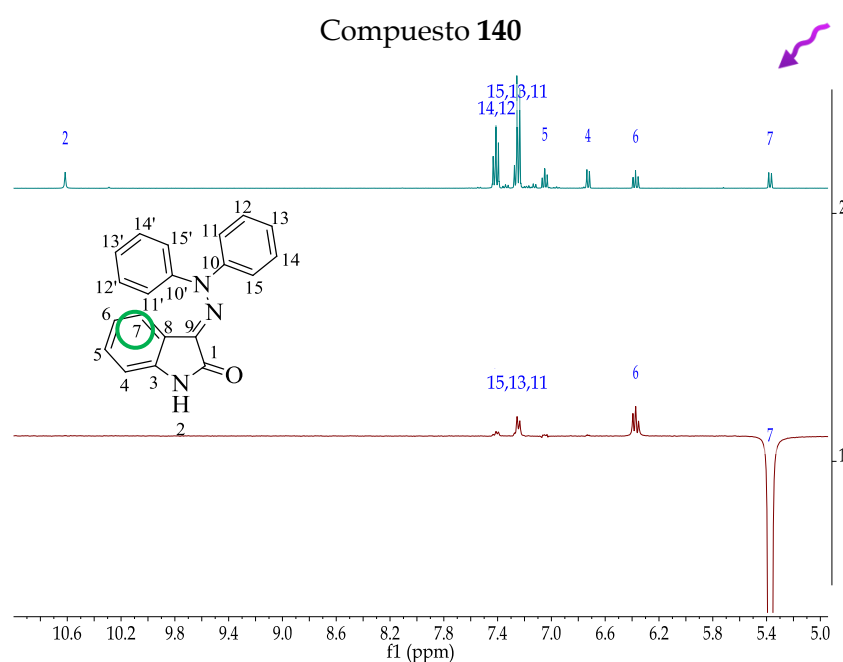
Con el fin de seguir aumentando la diversidad estructural en esta familia química, se modificó el anillo de fenilo unido al grupo imino por otros sustituyentes tanto de naturaleza alquílica como de naturaleza aromática. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando la metodología descrita con montmorillonita bajo irradiación de microondas (Esquema 22).

La elucidación estructural de estos derivados (**139-145**) se ha llevado a cabo por resonancia magnética nuclear, determinando la proporción *E/Z* en cada uno de los casos. A modo de ejemplo, se muestra el espectro de <sup>1</sup>H-RMN y el espectro de NOE del compuesto **140**. Como se observa en la Figura 71 el producto mayoritario y casi único es el isómero *E*, debido a que se produce un enlace de hidrógeno débil entre el hidrógeno H<sub>7</sub> del oxindol y el nitrógeno de la hidrazona



**Figura 71.-** Interacciones CH- $\pi$  en el compuesto **140**.

(Figura 72) estando más favorecida la forma *E* que la forma *Z*. La distancia entre el hidrógeno y el nitrógeno es de 2.6 Å, estando en concordancia con los datos encontrados en la bibliografía para este tipo de enlace de hidrógeno<sup>138,139</sup>.



**Figura 72.-** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (arriba) y espectro de NOE (abajo) del derivado 140.

Las proporciones de isómeros *E/Z* obtenidas para los compuestos 139-145 se recogen en la Tabla 24 existiendo casos en que es mayoritario el isómero *E* y en otros el *Z*.

<sup>138</sup> Alekseyeva, E. A.; Batsanov, A. S.; Boyd, L. A.; Fox, M. A.; Hibbert, T. G.; Howard, J. A. K.; Hugh MacBride, J. A.; Mackinnon, A.; Wade, K., Intra- and inter-molecular carboranyl C-H...N hydrogen bonds in pyridyl-containing *ortho*-carboranes. *Dalton Trans.* **2003**, 475-482.

<sup>139</sup> Cappelli, A.; Giorgi, G.; Anzini, M.; Vomero, S.; Ristori, S.; Rossi, C.; Donati, A., Characterization of persistent intramolecular C-H...X(N,O) bonds in solid state and solution. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3177-3183.

## Discusión y Resultados

Tabla 24.- Proporción de los isómeros E/Z para los derivados 139-145.

Compuesto	R	E/Z
139	5-(1,2,3,4-tetrahidronaftaleno)	11:89
140	N(Ph) <sub>2</sub>	95:5
141	CH(Ph) <sub>2</sub>	35:65
142	NHPh	14:86
143	Ciclohexilo	45:55
144	Piperidina	46:54
145	Morfolina	88:12

En estos casos, el isómero mayoritario varía en función de las fuerzas intramoleculares que se pueden dar en cada caso (Tabla 24). Los compuestos

141 y 142 presentan como isómero mayoritario la forma Z, ya que se puede formar un enlace de

hidrógeno entre el grupo carbonilo del

oxoindol y el CH (compuesto 141) o NH de la hidrazona (compuesto 142) (Figura 73). Se han minimizado estas dos estructuras utilizando el programa de cálculo molecular (Sybyl<sup>140</sup>) y se han medido las distancias de los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Así, en el caso del enlace CH...O, la distancia H...O es de 2.3 Å; mientras que para el caso NH...O, se encontró una distancia

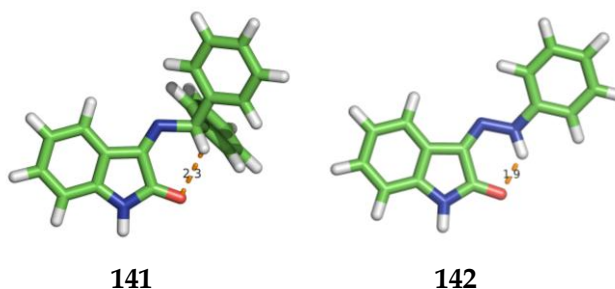
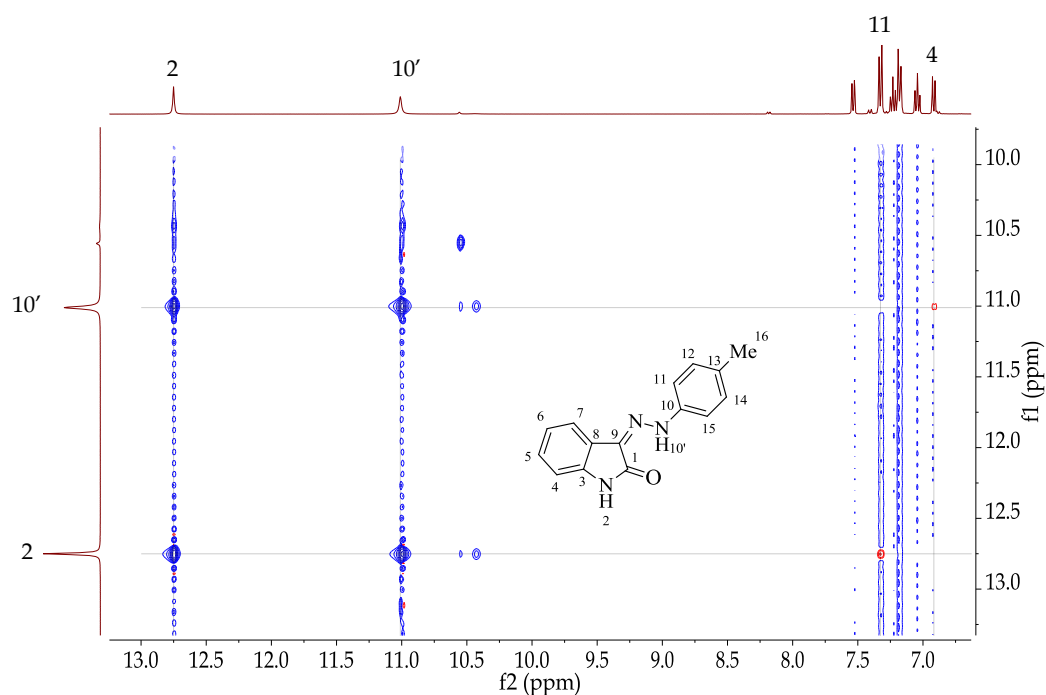


Figura 73.- Distancias H...O para los oxoindoles 141 (2.3 Å) y 142 (1.9 Å) en su forma mayoritaria.

<sup>140</sup> Ghose, A. K.; Jaeger, E. P.; Kowalczyk, P. J.; Peterson, M. L.; Treasurywala, A. M., Conformational searching methods for small molecules. I. Study of the sybyl search method. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1050-1065.

de 1.9 Å; traduciéndose en una mayor proporción del isómero *Z* en el compuesto **142** que en el compuesto **141**. Los productos **143** y **144** presentan como isómero mayoritario el *Z*, aunque la proporción entre un isómero y otro es prácticamente la misma; mientras que para el derivado **145** se observa el isómero *E* como producto mayoritario.

A modo de ejemplo, se muestra el espectro de NOE bidimensional del compuesto **142** donde se puede ver que el protón del NH ( $H_{10'}$ ) no presenta interacción con el protón de la isatina ( $H_7$ ) sugiriendo que se encuentra como isómero *Z* (Figura 74).

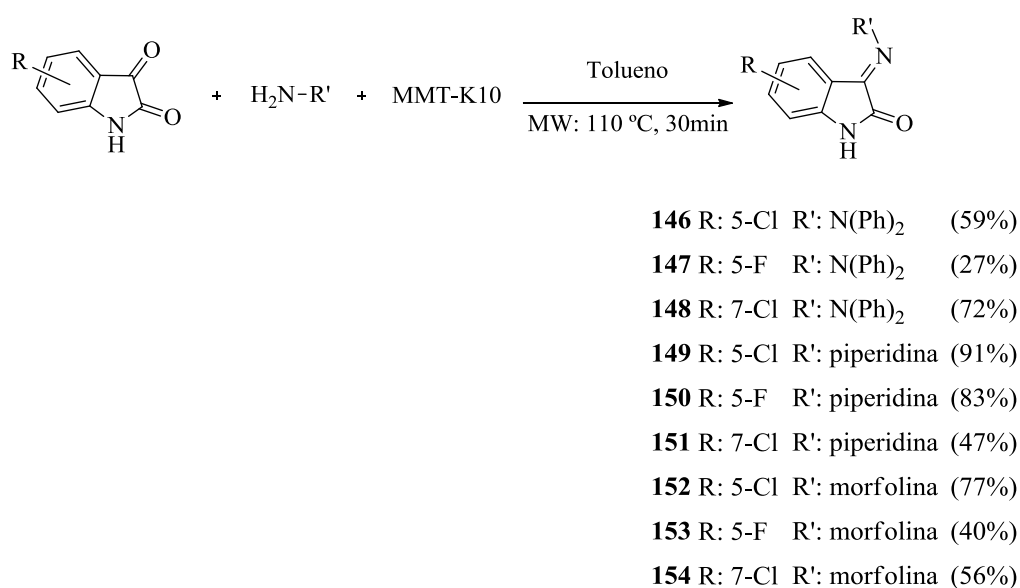


**Figura 74.-** Espectro NOESY-2D del compuesto **142**. El protón del  $NH_{10'}$  no presenta efecto NOE con el protón del oxindol  $H_7$ , que en caso de estar en la forma *E* sería el más cercano.

## Discusión y Resultados

Además de estas modificaciones, se han introducido diferentes sustituyentes en varias posiciones del anillo de oxoindol. La metodología sintética ha sido la descrita anteriormente (Esquema 23).

Al igual que en los casos anteriores se ha determinado cuál de los dos isómeros es el mayoritario y en qué proporción se encuentran (Tabla 25).



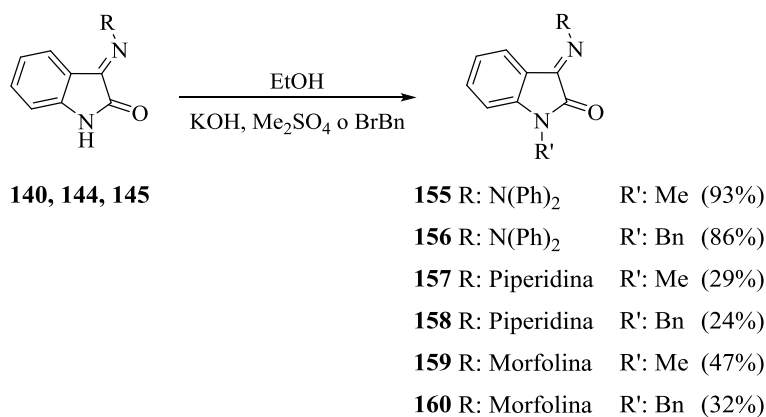
**Esquema 23.-** Síntesis de los compuestos **146-154**.

Como se observa en la Tabla 25, en el caso de tener dos fenilos como sustituyentes del enlace hidrazona, se mantiene que el isómero mayoritario es el *E* aumentando, aunque en poca medida, la proporción del isómero *Z*, esto puede ser debido a un impedimento estérico entre el átomo halogenado en posición 5 y los dos grupos fenilo. En el caso de la piperidina y de la morfolina, la proporción se invierte, siendo el isómero mayoritario el *Z*.

Tabla 25.- Proporción de los isómeros E/Z para los compuestos 146-154.

Compuesto	R	R'	E/Z
146	5-Cl	N-(Ph) <sub>2</sub>	85:15
147	5-F	N-(Ph) <sub>2</sub>	96:4
148	7-Cl	N-(Ph) <sub>2</sub>	92:8
149	5-Cl	piperidina	18:82
150	5-F	piperidina	30:70
151	7-Cl	piperidina	25:75
152	5-Cl	morfolina	26:74
153	5-F	morfolina	30:70
154	7-Cl	morfolina	26:74

Por último se llevaron a cabo modificaciones en el NH del oxoindol, introduciendo sustituyentes de naturaleza alquílica (metilo), y bencílica. La metodología sintética fue la habitual<sup>141</sup>, utilizando un agente alquilante en un disolvente polar con una base que neutralice el ácido formado (Esquema 24).



Esquema 24.- Síntesis de los derivados de hidrazona 155-160.

<sup>141</sup> Ottoni, O.; Cruz, R.; Alves, R., Efficient and simple methods for the introduction of the sulfonyl, acyl and alkyl protecting groups on the nitrogen of indole and its derivatives. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13915-13928.

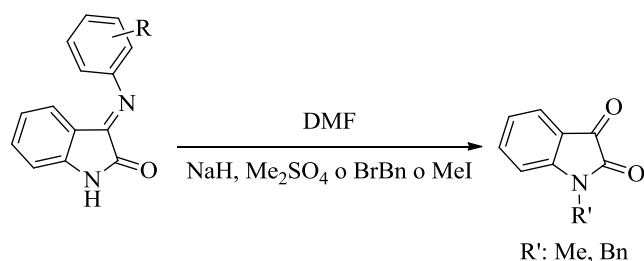
## Discusión y Resultados

Tabla 26.- Proporciones E/Z de los compuestos 155-160.

Compuesto	R	R'	E/Z
155	N-(Ph) <sub>2</sub>	Me	91:9
156	N-(Ph) <sub>2</sub>	Bn	80:20
157	piperidina	Me	49:61
158	piperidina	Bn	33:67
159	morfolina	Me	59:41
160	morfolina	Bn	45:55

Las proporciones de los dos isómeros se muestran en la Tabla 26.

Sin embargo, al llevar a cabo la síntesis bajo estas mismas condiciones de los derivados de oxoindol con enlace tipo imino la reacción no evolucionaba hacia el producto deseado sino que se formaba la isatina alquilada con la pérdida del grupo aromático (Esquema 25).



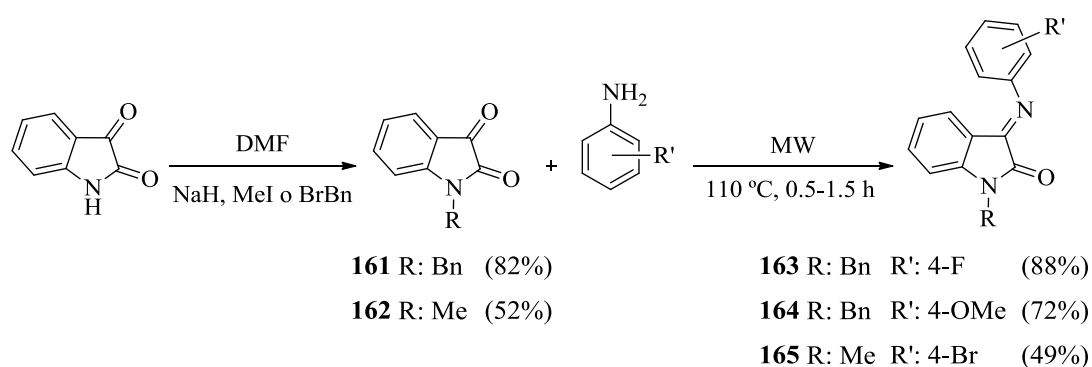
Esquema 25.- Eliminación del grupo iminofenilo en presencia de un exceso de agente alquilante.

Esto puede deberse a que el exceso de agente alquilante empleado, produzca la alquilación en el NH del oxoindol y además en el nitrógeno del enlace imino, formándose una sal cuaternaria fácilmente hidrolizable en el medio de reacción o en el procesado. Sin embargo, en el caso de tener un enlace de tipo

## Discusión y Resultados

hidrazona (compuestos **140**, **141**, **142**, **144** y **145**) no se produce la hidrólisis al ser un enlace mucho más estable que el de tipo imino<sup>142,143</sup>.

Por tanto, para poder obtener este tipo de derivados, en primer lugar se sintetizaron los derivados *N*-alquilados de oxoindol, y a continuación se introdujo el anillo aromático con la formación del enlace imino (Esquema 26).



**Esquema 26.-** Síntesis de los derivados *N*-alquilados y la posterior formación del enlace imino.

Las proporciones de los isómeros *E/Z* para los compuestos **163-165** se recogen en la Tabla 27. Como se observa se mantiene el isómero *E* como mayoritario, al igual que en los derivados correspondientes sin *N*-alquilar.

**Tabla 27.-** Proporciones *E/Z* para los compuestos **163-166**.

Compuesto	R	R'	<i>E/Z</i>
<b>163</b>	Bn	2-Cl	77:23
<b>164</b>	Bn	4-OMe	80:20
<b>165</b>	Me	4-Br	76:24

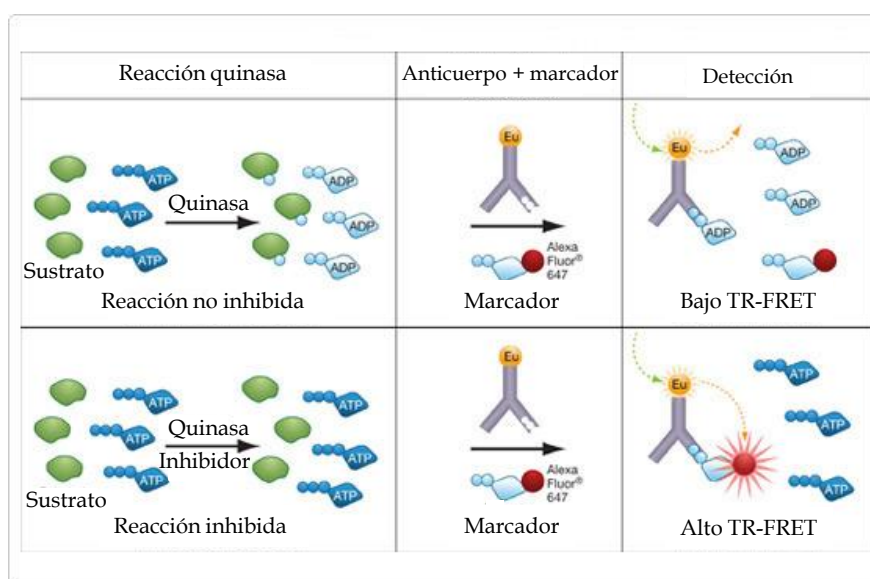
<sup>142</sup> Johnson, J. E.; Morales, N. M.; Gorczyca, A. M.; Dolliver, D. D.; McAllister, M. A., Mechanisms of Acid-Catalyzed *Z/E* Isomerization of Imines. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7979-7985.

<sup>143</sup> Smith, M. B.; March, J., *March's advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms, and structure.* 6<sup>th</sup> Edition, 1264-1267.

## Discusión y Resultados

### 2.1.1. Ensayos de la actividad enzimática en LRRK2

La evaluación enzimática frente a la enzima LRRK2 de los compuestos sintetizados, fue realizada de manera externa empleando la metodología Adapta<sup>®</sup>, que se basa en un procedimiento homogéneo y fluorescente para la detección de ADP<sup>144</sup> (Figura 75).



**Figura 75.-** Representación del método empleado en la evaluación biológica de los compuestos **122-166**.

Todos los compuestos han sido evaluados a una concentración fija de 10  $\mu$ M, y solo en los casos en los que se ha encontrado una inhibición de la enzima > 50%, se ha calculado su  $CI_{50}$  (Tabla 28).

<sup>144</sup> Ma, H.; Deacon, S.; Horiuchi, K., The challenge of selecting protein kinase assays for lead discovery optimization. *Expert Opin. Drug Discov.* **2008**; 3, 607–621.

Tabla 28.- Evaluación de la potencia inhibitoria frente a LRRK2.

Comp.	%inh. @ 10 $\mu$ M	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Comp.	%inh. @10 $\mu$ M	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
122	19%	-	144	79%	1.34
123	63%	2.17	145	74%	1.70
124	11%	-	146	96%	0.012
125	71%	3.65	147	97%	0.023
126	15%	-	148	17%	-
127	12%	-	149	91%	0.28
128	30%	-	150	77%	1.5
129	60%	2.34	151	11%	-
130	39%	-	152	78%	1.2
131	71%	3.18	153	66%	3.65
132	14%	-	154	7%	-
133	54%	4.72	155	49%	5.76
134	45%	15.40	156	40%	6.98
135	66%	7.27	157	-3%	-
136	76%	3.79	158	1%	-
137	15%	-	159	6%	-
138	3%	-	160	2%	-
139	14%	-	161	-1%	-
140	96%	0.11	162	-15%	-
141	-1%	-	163	1%	-
142	23%	-	164	13%	-
143	36%	-	165	9%	-

Como se recoge en la Tabla 28, el enlace hidrazona (C=N-N) dio lugar a compuestos muy potentes, con valores de CI<sub>50</sub> en el rango nanomolar (derivados **140**, **144** y **145**), y más activos que aquellos obtenidos con el enlace

## Discusión y Resultados

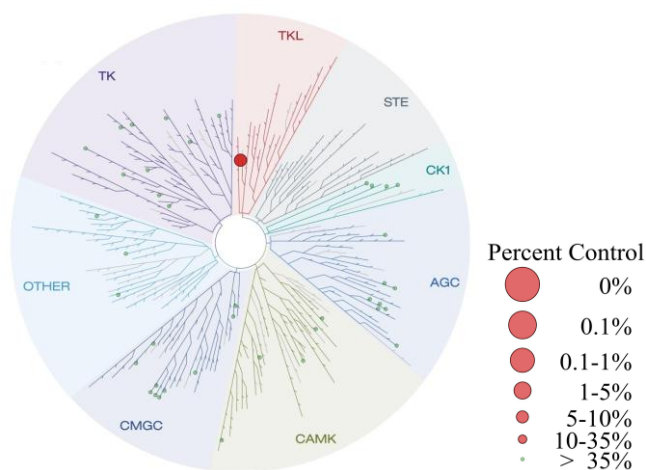
---

tipo imino (C=N-C). Estos imino derivados mostraron unas  $CI_{50}$  en el rango micromolar (compuestos **136**, **123** y **131**) o incluso resultaron inactivos (derivados **139**, **143** y **122**). En el caso del enlace tipo hidrazona, los derivados más potentes fueron los que poseían en su estructura dos anillos de fenilo (compuesto **140**), probablemente por existir en el enzima una zona de interacción tipo hidrofóbica mejor ocupada por este sustituyente voluminoso. Además, la potencia inhibitoria se favoreció cuando se introdujo un sustituyente con mayor volumen estérico en la posición 5 del oxoindol como es un átomo de cloro (compuesto **146**). En este caso, se obtuvo un valor de  $CI_{50}$  = 11.5 nM. Para los casos en los que había un átomo de flúor o de hidrógeno en dicha posición la potencia inhibitoria fue de 23 (compuesto **147**) y 110 nM (derivado **140**), respectivamente.

Analizando las primeras relaciones estructura química-actividad biológica en esta familia de compuestos, puede observarse que la naturaleza y/o posición de los sustituyentes del anillo aromático tiene importancia en el modo de unión. Así la sustitución en posición *meta*- tanto de naturaleza electroceptora (compuesto **122**) como de naturaleza electrodonadora (derivado **138**) dio lugar a compuestos inactivos, cuando la sustitución está en posición *orto*- se observa que, a excepción de que el sustituyente sea muy poco voluminoso (compuesto **129**), se produce una pérdida de actividad (derivados **128**, **126** y **127**); y por último, cuando la sustitución es en posición *para*- los compuestos son más potentes cuando el grupo es electrodonador (compuesto **123**) que en el caso de que sea electroceptor (derivados **132** y **135**). La sustitución del NH del oxoindol con diferentes agentes alquilantes, produjo una pérdida total o disminución drástica de la actividad sobre LRRK2.

2.1.2. Estudio de la selectividad frente a otras proteínas quinasas

Con el fin de determinar el perfil de selectividad frente a otras quinasas de esta familia de compuestos, se evaluó el oxoindol **140** a una concentración de 10  $\mu$ M frente a 49 proteínas quinasas, obteniéndose una muy buena selectividad con una puntuación de selectividad (S) de 0.02 (Figura 76).



**Figura 76.-** Árbol del quinoma humano para el compuesto **140**. La figura se realizó mediante DiscovereRx TREEspot<sup>®</sup> Versión 4. Los resultados originales fueron proporcionados en forma de porcentaje y las dianas que mantenían una actividad menor al 1% se seleccionaron para realizar la figura. El tamaño de los círculos es proporcional a la afinidad por la diana.

**Tabla 29.-** Proteínas quinasas frente a las que el derivado **140** ha sido evaluado.

Proteína Quinasa	% actividad	Proteína Quinasa	% actividad	Proteína Quinasa	% actividad
ABL1	100	DYRK1A	100	p38 $\gamma$	100
AKT1	100	EGFR	100	p38 $\delta$	100
AKT2	100	FGFR3	100	p38 $\alpha$	100
AKT3	100	VEGFR1	100	JNK1	94

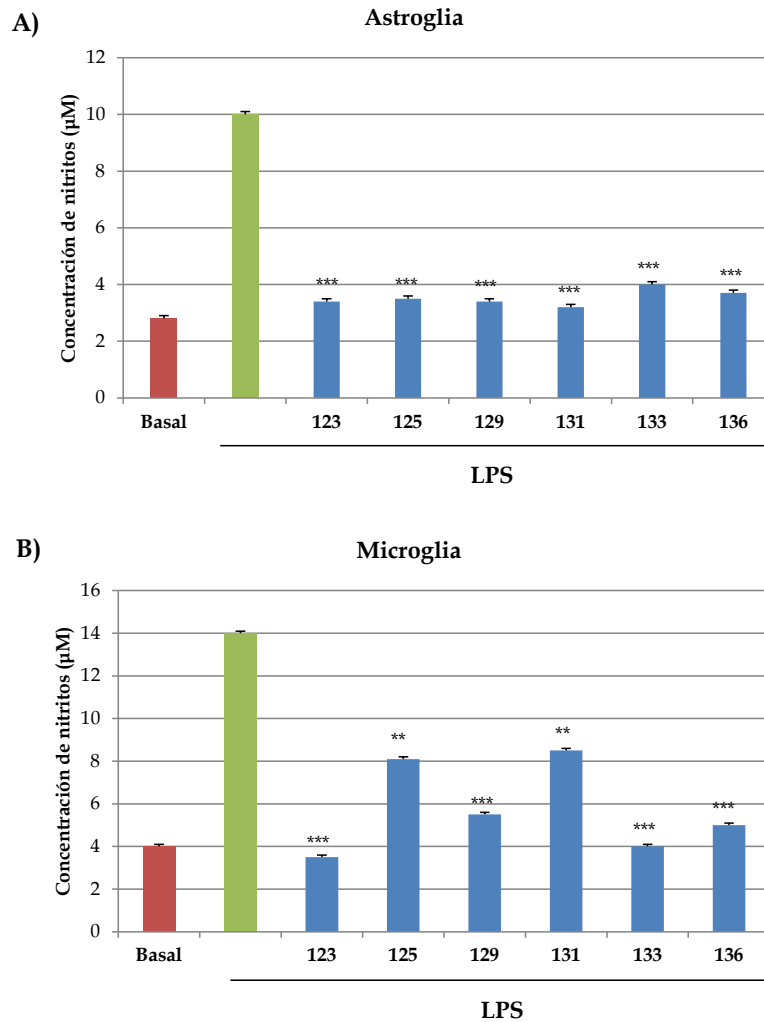
## Discusión y Resultados

Proteína Quinasa	% actividad	Proteína Quinasa	% actividad	Proteína Quinasa	% actividad
Aurora A	74	FLT3	45	MAPKAPK2	97
CAMK2D	100	mTOR	100	MARK	100
CDK1	100	FYN	100	PDGFRA	97
CDK2	100	GSG2	94	PDK1	100
CDK5/p25	100	GSK3 $\alpha$	100	PIK3C2A	100
CDK5/p35	100	GSK3 $\beta$	79	PRKACA	97
CHEK1	99	IGF1R	83	PKC $\alpha$	85
CK1 $\alpha$	100	JAK1	99	PKC $\beta$	100
CK1 $\delta$	100	LCK	98	PKC $\delta$	100
CK1 $\epsilon$	94	LRRK2	9	PKC $\epsilon$	97
CK1 $\gamma$	100	JNK3	93	ROCK1	100
CK2 $\alpha$	100	p38 $\beta$	100	SGK2	96
DAPK1	86				

### 2.1.3. Estudios en modelos celulares de los inhibidores de LRRK2

#### 2.1.3.1. Modelos de neuroprotección

De momento no son muchos los datos que se conocen en relación a la fisiología y patología de LRRK2. Por ello, algunos de estos derivados de isatina se seleccionaron para ser evaluados en un modelo de activación de la respuesta inflamatoria general para muchas patologías neurodegenerativas. Se emplearon cultivos primarios de astrocitos y microglía y la metodología fue la misma que la empleada en el caso de los benzotiazoles (pág. 113). Como se observa en la Figura 77, los inhibidores de LRRK2 evaluados en cultivos de astrocitos y microglía son neuroprotectores, disminuyendo la producción de nitritos por disminución de la reactividad inflamatoria.



**Figura 77.-** Los cultivos celulares de astrogliía (A) y microglía (B), se trataron con LPS (10 µg/mL) en ausencia o presencia de los compuestos (10 µM). Cada punto representa la media ± desviación estándar de seis replicas en tres experimentos diferentes. (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , diferencias estadísticamente significativas entre los compuestos y los cultivos tratados con LPS).

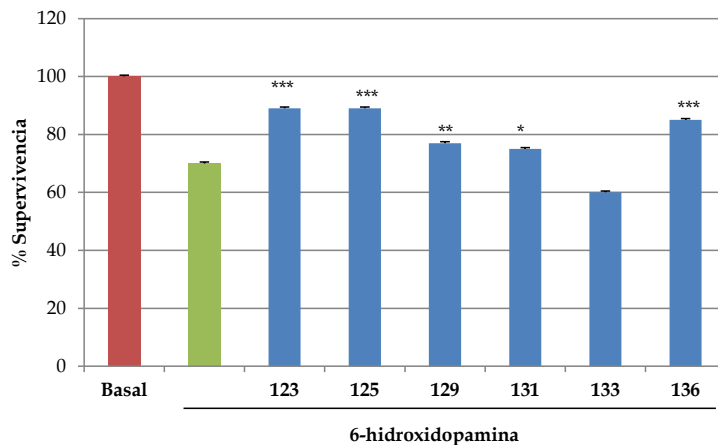
## Discusión y Resultados

### 2.1.4. Modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas

#### 2.1.4.1. Modelo celular de la enfermedad de Parkinson

Dado que si es conocido el aumento de función de LRRK2 como un marcador patológico de la enfermedad de Parkinson<sup>145</sup>, se evaluaron los inhibidores de LRRK2 aquí preparados en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson, empleando 6-OHDA. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de la Prof. Ana María Pérez Castillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas-CSIC.

Como se observa en la Figura 78, la mayoría de los inhibidores de LRRK2 son capaces de aumentar la supervivencia celular frente al daño producido por la neurotoxina 6-OHDA y por tanto potenciales agentes neuroprotectores para la enfermedad de Parkinson.



**Figura 78.-** Evaluación de los inhibidores de LRRK2 en células SH-SY5Y frente al daño producido por 6-OHDA. Cada punto representa el valor medio  $\pm$  desviación estándar de cuatro réplicas en tres experimentos diferentes (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

<sup>145</sup> Ray S.; Liu M., Current understanding of LRRK2 in Parkinson's disease: biochemical and structural features and inhibitor design. *Future Med. Chem.* **2012**, *13*, 1701-1713.

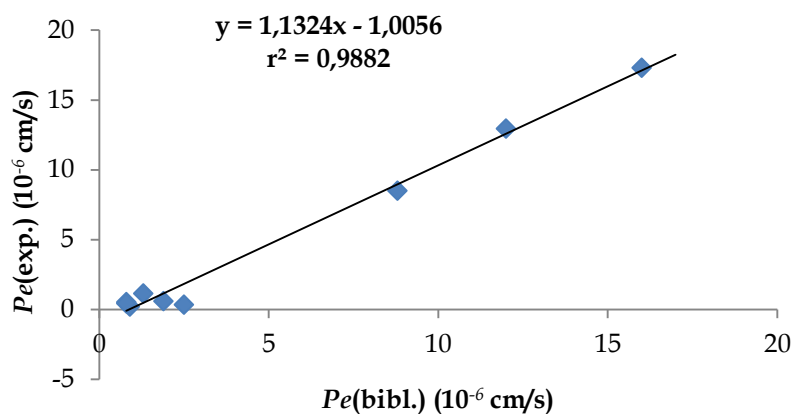
### 2.1.5. Estudio de las propiedades farmacocinéticas

Con el fin de diseñar estudios *in vivo* y dado el buen perfil terapéutico de los inhibidores de LRRK2, se evaluaron algunas de sus propiedades ADME.

#### 2.1.5.1. Determinación del paso de la barrera hematoencefálica

El primer paso fue la evaluación de la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica de los inhibidores de LRRK2 siguiendo la misma metodología descrita en capítulos anteriores de esta memoria (Pág. 78).

En primer lugar se validó el método (Figura 79) obteniéndose una buena correlación entre la permeabilidad efectiva experimental y el descrito en la literatura [ $Pe(\text{exp.}) = 1.1324 Pe(\text{bibl.}) - 1.0056$  ( $r^2 = 0.9689$ )] determinándose que los compuestos serán SNC+ cuando tengan un valor de  $Pe(\text{exp.}) > 3.54 \times 10^{-6}$  cm/s, y SNC- si tienen un valor de  $Pe(\text{exp.}) < 1.26 \times 10^{-6}$  cm/s.



**Figura 79.-** Correlación lineal entre los valores de permeabilidad efectiva descritos en la bibliografía y los obtenidos experimentalmente de los compuestos comerciales utilizando la metodología PAMPA.

## Discusión y Resultados

**Tabla 30.-** Comparativa entre la permeabilidad efectiva experimental y descrita en la bibliografía de diez compuestos comerciales, usados para la validación del método, y diferentes isatinas. El valor de la permeabilidad experimental [ $Pe(\text{exp.})$ ] corresponde a la media de los valores obtenidos en dos experimentos independientes.

Compuesto	$Pe(\text{bibl.})$ ( $10^{-6}$ cm/s)	$Pe(\text{exp.})$ ( $10^{-6}$ cm/s) <sup>73</sup>	Predicción BHE
Atenolol	0.8	$0.5 \pm 0.4$	
Cafeína	1.3	$1.1 \pm 0.5$	
Desipramina	12	$12.9 \pm 1.2$	
Enoxacino	0.9	$0.2 \pm 0.1$	
Hidrocortisona	1.9	$0.6 \pm 0.3$	
Ofloxacino	0.8	$0.4 \pm 0.1$	
Piroxicam	2.5	$0.3 \pm 0.1$	
Promazina	8.8	$8.5 \pm 1.5$	
Testosterona	17	$16.4 \pm 0.2$	
Verapamilo	16	$17.3 \pm 2.2$	
<b>123</b>		$5.9 \pm 0.8$	SNC+
<b>125</b>		$10.7 \pm 0.5$	SNC+
<b>129</b>		$10.6 \pm 2.1$	SNC+
<b>131</b>		$8.8 \pm 1.4$	SNC+
<b>133</b>		$14.7 \pm 0.5$	SNC+
<b>134</b>		$3.4 \pm 1.3$	SNC+/SNC-
<b>135</b>		$10.3 \pm 1.6$	SNC+
<b>136</b>		$8.3 \pm 0.7$	SNC+
<b>140</b>		$9.8 \pm 1.0$	SNC+
<b>144</b>		$15.3 \pm 0.9$	SNC+
<b>145</b>		$5.7 \pm 1.4$	SNC+
<b>149</b>		$29.4 \pm 1.6$	SNC+

## Discusión y Resultados

Compuesto	$P_e(\text{bibl.})$ ( $10^{-6}$ cm/s)	$P_e(\text{exp.})$ ( $10^{-6}$ cm/s) <sup>c</sup>	Predicción BHE
150		$16.5 \pm 1.2$	SNC+
152		$12.3 \pm 0.3$	SNC+
153		$8.4 \pm 0.3$	SNC+
155		$14.4 \pm 0.6$	SNC+

Para todos los compuestos que presentaron potencia inhibitoria frente a LRRK2 se determinó su permeabilidad efectiva a la BHE (Tabla 30). La predicción de la permeabilidad de los compuestos **146**, **147** y **156** no pudo ser determinada ya que los compuestos precipitaban en las condiciones en las que se realiza el experimento. A excepción del compuesto **134**, todos los compuestos estudiados son capaces de atravesar la BHE mediante transporte pasivo.

En este trabajo se ha desarrollado una nueva familia de inhibidores selectivos de la proteína quinasa LRRK2 presentando valores de  $CI_{50}$  en el rango nanomolar. Estos compuestos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y son capaces de disminuir la activación inflamatoria producida por LPS en cultivos primarios de astrocitos y microglía. Por otro lado, en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson, presentan propiedades neuroprotectoras disminuyendo la muerte neuronal producida por la neurotoxina 6-OHDA.

Aunque estos estudios siguen actualmente en proceso, los inhibidores de LRRK2 presentan buenas propiedades biológicas y ADME para su desarrollo como candidatos a fármaco frente a la enfermedad de Parkinson.



## ***CONCLUSIONES***

---



En esta memoria se han sintetizado inhibidores potentes y selectivos de CK1 $\delta$  y LRRK2, químicamente diversos, como agentes farmacológicos prometedores para el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Los puntos más relevantes de este trabajo se recogen a continuación:

- Se han sintetizado dos familias químicas estructuralmente diversas y novedosas de inhibidores de CK1 $\delta$  capaces de penetrar en la célula.
- Se ha probado que los inhibidores de CK1 $\delta$  son capaces de disminuir la fosforilación de TDP-43 en diversos modelos celulares.
- Se ha probado que el derivado de imidazol **35**, inhibidor de CK1 $\delta$  a concentración micromolar, protege la supervivencia de las motoneuronas murinas en ausencia de factores tróficos.
- Se ha demostrado que las *N*-(benzotiazol-2-il)-2-fenilacetamidas son inhibidores de CK1 $\delta$  ATP competitivos con valores de CI<sub>50</sub> en el rango nanomolar, selectivos frente a un panel de más de 450 proteínas quinasas y permeables al sistema nervioso central.
- Se ha probado el efecto antiinflamatorio de los inhibidores de CK1 $\delta$  tanto en líneas celulares de macrófagos como en cultivos primarios de neuronas, astrocitos y microglía.
- Se ha demostrado el efecto neurogénico *in vitro* de los inhibidores de CK1 $\delta$  en concreto de las *N*-(benzotiazol-2-il)-2-fenilacetamidas.
- Se ha probado el efecto neuroprotector de los inhibidores de CK1 $\delta$  en un modelo transgénico de h-TDP-43 en *Drosophila melanogaster*.
- Se ha demostrado la eficacia de la neuroprotección de neuronas dopaminérgicas del inhibidor de CK1 $\delta$  **83**, en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson.

## Conclusiones

---

- Se ha elegido el derivado **83** como candidato a desarrollo preclínico para esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer por sus buenas propiedades ADME *in vitro* e *in vivo*, siendo seguro, biodisponible por vía oral y muy penetrante en cerebro.
- Se han identificado dos prototipos heterocíclicos nuevos para futuros desarrollos como inhibidores de CK1δ ATP competitivos mediante cribado virtual.
- Se han determinado varias cavidades de potencial modulación alostérica en la superficie de CK1δ.
- Se ha validado CK1δ como una diana farmacológica válida para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.
- Se ha diseñado y sintetizado una nueva familia de inhibidores de LRRK2, selectivos de esta proteína quinasa, que presentaron actividades inhibitorias en el rango micro-nanomolar, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, de proteger frente al daño producido por 6-OHDA en modelos celulares y de disminuir la neuroinflamación causada por LPS.

***PARTE EXPERIMENTAL***

---



Los productos de partida comerciales fueron obtenidos de las casas comerciales Sigma Aldrich, Acros, Alfa Aesar y TCI-Europe. El dispositivo de microondas utilizado en la optimización fue un equipo Initiator™ de Biotage®. Los aparatos utilizados para la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear fueron: Bruker AVANCE-300 (300 MHz), Varian INNOVA-300 (300 MHz), Varian INNOVA-400 (400 MHz), Varian MERCURY-400 (400 MHz) y Varian Unity-500 (500 MHz). Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y son obtenidos tomando como referencia el disolvente deuterado utilizado en cada caso. La multiplicidad de las señales (s: singlete, d: doblete, dd: doblete de dobletes, dt: doblete de tripletes, t: triplete, td: triplete de dobletes, c: cuadruplete, sept: septeto, m: multiplete), las constantes de acoplamiento ( $J = \text{Hz}$ ) y la asignación estructural se indican en cada caso como referencia. La cromatografía en capa fina se realizó en cromatofolios de gel de sílice Merck tipo 60 F254 de espesor de capa 0.2 mm. Los cromatofolios son revelados con luz ultravioleta a 254/365 nm. Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron en gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh ASTM). Las separaciones cromatográficas automáticas se realizaron en el aparato IsoleraOne de Biotage, utilizando columnas SF10-4g Si 50 AX1368-8 de la casa comercial Agilent Technologies y KP-Sil 10 g de Biotage®. Los eluyentes y tipo de cromatografía empleados se indican en cada caso, y las proporciones empleadas siempre se indican en volumen. El cromatógrafo de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), utilizado para cuantificar la pureza de los productos, fue un Alliance Waters 2690 con un detector de UV Photodiodo Array modelo Waters 2996 acoplado a un detector de MS modelo Micromass ZQ de Waters. Se utilizó una columna SunFire™ C18, 3.5  $\mu\text{m}$ , (4.6 x 50 mm) y como eluyentes una mezcla de Acetonitrilo/agua 15:95 en 5 min, o el gradiente especificado en cada caso

## Parte Experimental

---

concreto. La espectrometría de masas (EM) se realizó en un espectrómetro LC/MSD serie 100 Hewlett Packard para técnicas de Electrospray positivo (ESI). Los valores se expresan en unidades de masa ( $m/z$ ). Los puntos de fusión se midieron en un aparato MP70 de Mettler Toledo. El análisis elemental de los compuestos está en el rango de  $\pm 0.4$  respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas empíricas y se han realizado en el departamento de Análisis y Técnicas Instrumentales del Centro Nacional de Química Orgánica "Lora Tamayo" (CENQUIOR-CSIC), con un analizador Heraeus CHN-O-rapid.

## 1. SÍNTESIS DE IMIDAZOLES

### Procedimiento general de síntesis de imidazoles diferentemente sustituidos

**Método general A<sup>63</sup>:** En un vial de microondas se adicionan el derivado de dicetona o glioxal (1 eq.), derivado de aldehído (1 eq.), acetato de amonio (10 eq.) y ácido acético (mL indicados en cada caso, para 0.2 mmol de aldehído se adiciona 1 mL de ácido acético); y se somete a irradiación microondas durante 5 min a 180 °C. A continuación, el crudo de reacción se adiciona sobre amoniaco a 0 °C y el precipitado formado se filtra y se lava con agua a 0 °C. El sólido se purifica mediante columna cromatográfica empleando una mezcla diclorometano/metanol (10:1), obteniéndose un sólido del color indicado en cada caso.

**Método general B<sup>65</sup>:** Una mezcla de la amidina correspondiente (1 eq.) con hidrógeno carbonato sódico (4 eq.) en THF/Agua (10:6) se calienta a reflujo durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se adiciona durante 30 min el derivado de  $\alpha$ -halometilcetona correspondiente (1 eq.) disuelto en THF (10 mL). La reacción se mantiene a una temperatura y durante un tiempo indicado para cada caso. A continuación, se adiciona acetato de etilo (50 mL) y se extrae con agua (50 mL), la fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo se purifica mediante la técnica indicada en cada caso.

**Método general C<sup>66</sup>:** Se prepara una disolución de fenilglioxal (1 eq.) en metanol (9 mL) y se adiciona gota a gota una disolución formada por el derivado de aldehído (1 eq.) y acetato de amonio (4.9 eq.) en metanol (20 mL). La disolución resultante se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado ese tiempo el disolvente se elimina a presión reducida, disolviéndose el crudo en diclorometano (50 mL) y extrayéndose con una disolución saturada de

## Parte Experimental

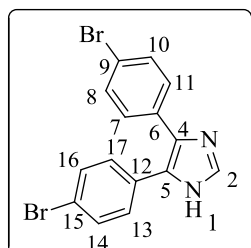
---

NaHCO<sub>3</sub> (3 x 50 mL). El crudo se purifica mediante la técnica cromatográfica indicada en cada caso empleándose una mezcla de hexano/acetato de etilo como eluyentes en las proporciones indicadas en cada caso.

**Método general D:** Se prepara una disolución de 1 eq. de derivado de imidazol 2,4-disustituido (1 eq.) y carbonato potásico (1.2 eq.) o hidruro sódico (1 eq.) en THF anhidro (7 mL). Esta disolución se agita a reflujo durante 1 h. A continuación, se adiciona el derivado alquilante (1 eq.) y se deja reaccionar durante un tiempo y temperatura determinado en cada caso.

**Método general E:** Se prepara una disolución del derivado de imidazol (1 eq.) y trietilamina (1 eq.) en acetato de etilo (15 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 30 min, pasado ese tiempo se adiciona el cloruro de ácido correspondiente (1.2 eq.) y se agita durante un tiempo determinado en cada caso. El precipitado se filtra, se lava con agua fría, y en el caso de ser necesario se purifica mediante la técnica cromatográfica indicada en cada caso; empleando hexano/acetato de etilo en la proporción que se indica.

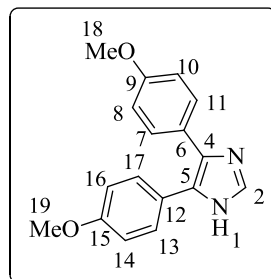
**4,5-bis-(4-Bromofenil)-1H-imidazol (1):** Método A: Reactivos: 1,2-bis(4-



bromofenil)etano-1,2-diona (300 mg, 0.8 mmol), formaldehído (24.5 mg, 0.8 mmol), acetato de amonio (571.2 mg, 8.15 mmol) y ácido acético (4 mL). Rendimiento: 142.8 mg, 46%, sólido blanco. P.f. 262 °C (lit.<sup>146</sup> 261 °C). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.60 (s,

1H, H-1), 7.81 (s, 1H, H-2), 7.61 - 7.46 (m, 4H, H-8, H-10, H-14, H-16), 7.44 - 7.29 (m, 4H, H-7, H-11, H-13, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 146.4 (C), 143.7 (C), 138.9 (C), 136.7 (C-2), 133.2 (C), 132.0 (C-8, C-10, C-14, C-16), 129.9 (C-7, C-11, C-13, C-17), 120.6 (C-9, C-15). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.48 min. MS (ESI+): m/z 381 [M + 3], 379 [M + 1], 377 [M - 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 47.65%, H 2.67%, N 7.41%. Hallado: C 47.52%, H 2.80%, N 7.28%.

**4,5-bis-(4-Metoxifenil)-1H-imidazol (2):** Método A: Reactivos: 1,2-bis(4-



metoxifenil)etano-1,2-diona (300 mg, 1.1 mmol), formaldehído (33.3 mg, 1.1 mmol), acetato de amonio (777.9 mg, 11.0 mmol) y ácido acético (6 mL). Rendimiento: 202.3 mg, 91%, sólido blanco. P.f. 184 °C (lit.<sup>146</sup> 184 °C). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.27

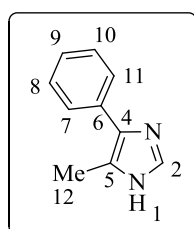
(s, 1H, H-1), 7.67 (s, 1H, H-2), 7.39 - 7.29 (m, 4H, H-7, H-11, H-13, H-17), 6.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H-8, H-10, H-14, H-16), 3.74 (s, 6H, H-18, H-19). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 158.8 (C-9, C-15), 144.9 (C-4, C-5), 135.5 (C-2), 129.3 (C-6, C-7, C-11, C-12, C-13, C-17), 114.5 (C-8, C-10, C-14, C-16), 55.7 (C-18, C-19). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.63 min. MS (ESI+): m/z

<sup>146</sup> Hellmut, H.; Rudolf, G.; Dieter, H., Formamide reactions. XIII. Imidazoles from α-diketones. *Chem. Ber.* **1959**, 92, 338-343.

## Parte Experimental

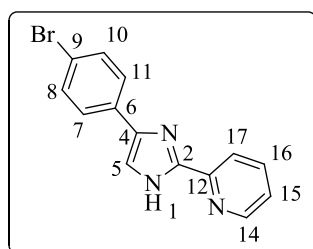
281 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 72.84%, H 5.75%, N 9.99%. Hallado: C 72.77%, H 5.74%, N 9.82%.

**5-Metil-4-fenil-1H-imidazol (3):** Método A: Reactivos: 1-fenilpropano-1,2-



diona (500 mg, 3.37 mmol), formaldehído (101.3 mg, 3.37 mmol), acetato de amonio (2.62 g, 33.7 mmol) y ácido acético (8 mL). Rendimiento: 410.3 mg, 77%, sólido blanco-marrón. P.f. 186 - 187 °C (lit.<sup>147</sup> 184 - 187 °C). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.03 (s, 1H, H-1), 7.60 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.56 (s, 1H, H-2), 7.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-8, H-10), 7.19 (ddt, *J* = 8.8, 7.1, 1.3 Hz, 1H, H-9), 2.36 (s, 3H, H-12). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 134.8 (C-6), 133.9 (C-2), 132.5 (C-4 o C-5), 128.6 (C-8, C-10), 126.0 (C-7, C-11), 125.7 (C-9), 125.0 (C-4 o C-5), 12.2 (C-12). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 0.58 min. MS (ESI+): *m/z* 159 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 75.92%, H 6.37%, N 17.71%. Hallado: C 76.15%, H 6.60%, N 17.69%.

**2-(4-(4-Bromofenil)-1H-imidazol-2-il)piridina (4):** Método B: Reactivos:

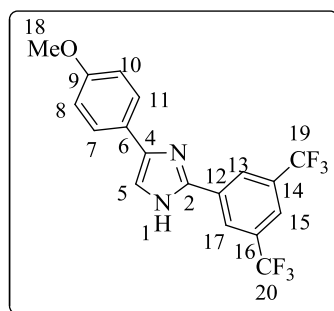


picolinamida (0.7 g, 4.4 mmol), hidrógeno carbonato sódico (1.5 g, 17.7 mmol), 2-bromo-1-(4-bromofenil)etanona (1.2 g, 4.4 mmol) y THF/agua (16 mL). Condiciones de reacción: 16 h a temperatura ambiente. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) y a continuación se recristalizó en metanol/agua dando lugar a un sólido blanco. Rendimiento: 446.7 mg, 34%. P.f. 197 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.00 (s, 1H, H-1), 8.62 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-14), 8.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-17), 7.91 (td, *J* = 7.7, 1.8

<sup>147</sup> Yasuo, K.; Louis A. C., Synthesis of *N*-alkylimidazoles from *N*-alkyloxazolium salts. *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 3205-3207.

Hz, 1H, H-16), 7.87 - 7.80 (m, 3H, H-5, H-8, H-10), 7.56 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-7, H-9), 7.39 (ddd,  $J = 7.5, 4.8, 1.2$  Hz, 1H, H-15).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  149.4 (C-14), 148.9 (C-12), 146.3 (C-2), 140.8 (C-6), 137.6 (C-16), 134.1 (C-4), 131.7 (C-7, C-11), 126.8 (C-8, C-10), 123.6 (C-15), 120.0 (C-17), 119.4 (C-9), 116.3 (C-5). HPLC: Pureza = 95%, t.r. = 3.58 min. MS (ESI+):  $m/z$  300 [M + 1], 302 [M + 3]. Análisis elemental ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_3$ ) Calculado: C 56.02%, H 3.36%, N 14.00%. Hallado: C 55.74%, H 3.33%, N 13.71%.

**2-(3,5-bis-(Trifluorometil)fenil)-4-(4-metoxifenil)-1H-imidazol (5):** Método B:



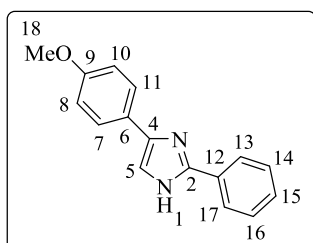
Reactivos: 3,5-bistrifluorometilbenzamidina (250 mg, 0.98 mmol), hidrógeno carbonato sódico (327.6 mg, 3.9 mmol), 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etanona (271.1 mg, 0.98 mmol) y THF/agua (6 mL). Condiciones de reacción: 48 h a temperatura ambiente. Purificación: columna

cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 163.8 mg, 43%. P.f. 217 °C. Proporción **a/b** (70:30):  
 Forma **a**:  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  13.06 (s, 1H, H-1), 8.60 (s, 2H, H-13, H-17), 8.05 (s, 1H, H-15), 7.83 - 7.76 (m, 3H, H-5, H-7, H-11), 6.98 - 6.91 (m, 2H, H-8, H-10), 3.76 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  158.7 (C-9), 143.1 (C-12), 142.4 (C-2), 133.3 (C-4), 131.4 (c,  $J = 33.0$  Hz, C-14, C-16), 127.2 (C-6), 126.3 (C-7, C-11), 125.2 (c,  $J = 2.5$  Hz, C-13, C-17), 123.8 (c,  $J = 273.4$  Hz, C-19, C-20), 121.3 (c,  $J = 3.78$  Hz, C-15), 115.2 (C-5), 114.4 (C-8, C-10), 55.5 (C-18).  
 Forma **b**:  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.87 (s, 0.3H, H-1), 8.66 (s, 0.6H, H-13, H-17), 8.03 (s, 0.3H, H-15), 7.72 (d,  $J = 8.8$  Hz, 0.6H, H-7, H-11), 7.47 (d,  $J = 1.4$  Hz, 0.3H, H-5), 7.03 (d,  $J = 8.8$  Hz, 0.6H, H-8, H-10), 3.79 (s, 0.9H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  159.2 (C-9), 143.7 (C-12), 134.3

## Parte Experimental

(C-2 o C-4), 131.3 (c,  $J = 33.0$  Hz, C-14, C-16), 127.0 (C-6), 126.8 (C-2 o C-4), 126.6 (C-7, C-11), 125.9 (c,  $J = 268.0$  Hz, C-19, C-20), 124.8 (c,  $J = 2.52$  Hz, C-13, C-17), 121.3 (c,  $J = 3.78$  Hz, C-15), 114.8 (C-8, C-10), 55.7 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 5.38 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 388 [M + 2]. Análisis elemental (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>F<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 55.97%, H 3.13%, N 7.25%. Hallado: C 56.13%, H 3.40%, N 7.28%.

**4-(4-Metoxifenil)-2-fenil-1H-imidazol (6):** Método B: Reactivos: benzamidina

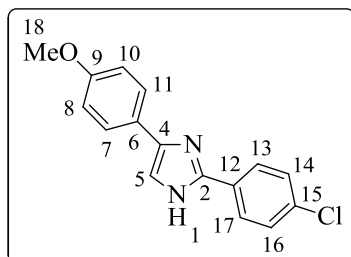


(250 mg, 1.8 mmol), hidrógeno carbonato sódico (607.3 mg, 7.2 mmol), 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etanona (500.0 mg, 1.8 mmol) y THF/agua (6 mL). Condiciones de reacción: 48 h a temperatura ambiente. Purificación: columna

cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido beige. Rendimiento: 175.8 mg, 44%. P.f. 180 - 181 °C (lit.<sup>148</sup> 170 - 174 °C). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.53 (s, 1H, H-1), 7.96 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-13, H-17), 7.77 - 7.70 (m, 2H, H-7, H-11), 7.60 (s, 1H, H-5), 7.42 (dd,  $J = 8.4, 7.0$  Hz, 2H, H-14, H-16), 7.34 - 7.28 (m, 1H, H-14), 6.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-8, H-10), 3.74 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 158.6 (C-9), 146.2 (C-2), 141.6 (C-3), 131.4 (C-4), 129.4 (C-14, C-16), 128.6 (C-15), 128.2 (C-6), 126.3 (C-7, C-11), 125.5 (C-13, C-17), 125.4 (C-12), 114.6 (C-8, C-10), 55.7 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.22 min. MS (ESI+): m/z 251 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 76.78%, H 5.64%, N 11.19%. Hallado: C 76.55%, H 5.70%, N 11.28%.

<sup>148</sup> Bellina, F.; Cauteruccio, S.; Di Fiore, A.; Marchetti, C.; Rossi, R., Highly selective synthesis of 4(5)-aryl-, 2,4(5)-diaryl-, and 4,5-diaryl-1H-imidazoles via Pd-catalyzed direct C-5 arylation of 1-benzyl-1H-imidazole. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6060-6072.

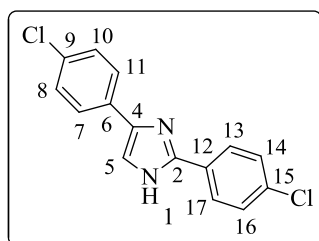
**2-(4-Clorofenil)-4-(4-metoxifenil)-1H-imidazol (7):** Método B: Reactivos: 4-



clorobenzamidina (250 mg, 1.3 mmol), hidrógeno carbonato sódico (439.5 mg, 5.2 mmol), 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etanona (363.4 mg, 1.3 mmol) y THF/agua (6 mL). Condiciones de reacción: 16 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica

empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 244.4 mg, 66%. P.f. 234 °C (lit.<sup>149</sup> 233 - 235 °C). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.62 (s, 1H, H-1), 8.05 - 7.94 (m, 2H, H-13, H-17), 7.80 - 7.69 (m, 2H, H-7, H-11), 7.59 (s, 1H, H-5), 7.57 - 7.46 (m, 2H, H-14, H-16), 7.00 - 6.89 (m, 2H, H-8, H-10), 3.77 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 158.0 (C-9), 144.6 (C-2), 141.1 (C-4), 132.4 (C-15), 129.5 (C-12), 128.7 (C-5, C-14, C-16), 127.2 (C-6), 126.5 (C-13, C-17), 125.7 (C-7, C-11), 113.9 (C-8, C-10), 55.0 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.81 min. MS (ESI+): m/z 288 [M + 4], 286 [M + 2]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O) Calculado: C 67.49%, H 4.60%, N 9.84%. Hallado: C 67.19%, H 4.73%, N 10.02%.

**2,4-bis-(4-Clorofenil)-1H-imidazol (8):** Método B: Reactivos: 4-



clorobenzamidina (250 mg, 1.3 mmol), hidrógeno carbonato sódico (439.5 mg, 5.2 mmol), 2-bromo-1-(4-clorofenil)etanona (305.5 mg, 1.3 mmol) y THF/agua (6 mL). Condiciones de reacción: 4 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica

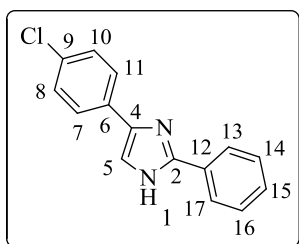
empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 235.5 mg, 62%. P.f. 190 °C (lit.<sup>149</sup> 190 - 191 °C). <sup>1</sup>H-RMN (300

<sup>149</sup> Kumar, D.; Kumar, N. M.; Patel, G.; Gupta, S.; Varma, R. S., A facile and eco-friendly synthesis of diarylthiazoles and diarylimidazoles in water. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1983-1986.

## Parte Experimental

MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.79 (s, 1H, H-1), 8.00 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H-13, H-17), 7.94 - 7.78 (m, 3H, H-5, H-7, H-11), 7.59 - 7.48 (m, 2H, H-14, H-16), 7.42 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H-8, H-10).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  145.0 (C-2), 140.1 (C-4), 133.4 (C-Ph), 132.7 (C-Ph), 130.5 (C-Ph), 129.3 (C-Ph), 128.8 (C-14, C-16), 128.5 (C-8, C-10), 126.6 (C-13, C-17), 126.0 (C-7, C-11), 115.2 (C-5). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.07 min. MS (ESI+):  $m/z$  294 [M + 5], 292 [M + 3], 290 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2$ ) Calculado: C 62.30%, H 3.49%, N 9.69%. Hallado: C 62.58%, H 3.60%, N 9.75%.

**4-(4-Clorofenil)-2-fenil-1H-imidazol (9)**: Método B: Reactivos: benzamidina



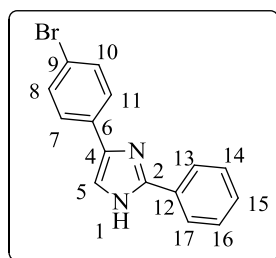
(250 mg, 1.6 mmol), hidrógeno carbonato sódico (536.4 mg, 6.4 mmol), 2-bromo-1-(4-clorofenil)etanol (371.3 mg, 1.6 mmol) y THF/agua (6 mL). Condiciones de reacción: 4 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando

acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 174.7 mg, 43%. P.f. 162 °C (lit.<sup>150</sup> 162 °C).  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.71 (s, 1H, H-1), 8.00 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, H-13, H-17), 7.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.83 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.60 - 7.31 (m, 5H, H-8, H-10, H-Ph).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  146.4 (C-2), 140.3 (C-4), 134.0 (C-6), 130.8 (C-9), 129.1 (C-14, C-16), 128.8 (C-8, C-10), 128.6 (C-15), 126.4 (C-7, C-11), 125.6 (C-12), 125.3 (C-13, C-17), 115.2 (C-5). HPLC: Pureza = 98%, t.r. = 2.95 min. MS (ESI+):  $m/z$  257 [M + 3], 255 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2$ )

<sup>150</sup> Ueno, M.; Togo, H., Environmentally benign preparation of heteroaromatics from ketones or alcohols, with macroporous polystyrenesulfonic acid and (diacetoxyiodo)benzene, followed by thioamide, amidine, and 2-aminopyridine. *Synthesis* **2004**, 16, 2673-2677.

Calculado: C 70.73%, H 4.35%, N 11.00%. Hallado: C 70.90%, H 4.39%, N 11.01%.

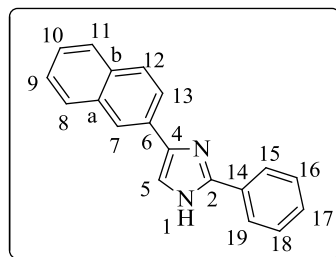
**4-(4-Bromofenil)-2-fenil-1H-imidazol (10)**<sup>151</sup>: Método B: Reactivos:



benzamidina (700 mg, 4.5 mmol), hidrógeno carbonato  
sódico (1.5 g, 17.8 mmol), 2-bromo-1-(4-  
bromofenil)etanona (1.24 g, 4.5 mmol) y THF/agua (23  
mL). Condiciones de reacción: 3 h a reflujo.  
Purificación: columna cromatográfica empleando

acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 495.6 mg, 37%. P.f. 178 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.72 (s, 1H, H-1), 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-13, H-17), 7.88 - 7.76 (m, 3H, H-5, H-7, H-11), 7.53 (d, *J*=8.6 Hz, 2H, H-8, H-10), 7.45 (m, 2H, H-14, H-16), 7.35 (m, 1H, H-15). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 146.5 (C-2), 131.7 (C-8, C-10), 130.7 (C-4 o C-6 o C-12), 130.4 (C-4 o C-6 o C-12), 129.1 (C-4 o C-6 o C-12), 128.6 (C-14, C-16), 128.4 (C-15), 126.7 (C-7, C-11), 125.3 (C-13, C-17), 119.3 (C-9), 115.3 (C-5). HPLC: Pureza = 96%, t.r. = 3.32 min. MS (ESI+): *m/z* 301 [M + 3], 299 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>) Calculado: C 60.22%, H 3.71%, N 9.36%, Br 26.71%. Hallado: C 59.90%, H 3.91%, N 9.05%, Br 26.47%.

**5-(Naftalen-2-il)-2-fenil-1H-imidazol (11)**: Método B: Reactivos: benzamidina



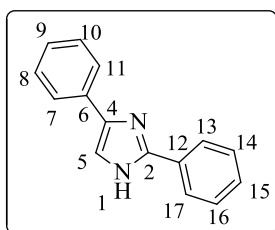
(700 mg, 4.5 mmol), hidrógeno carbonato sódico  
(1.5 g, 17.8 mmol), 2-bromo-2'-acetonaftona (1.1 g,  
4.5 mmol) y THF/agua (23 mL). Condiciones de  
reacción: 2 h a reflujo. Purificación: columna

<sup>151</sup> Kempter, G.; Spindler, J.; Fiebig, H. J.; Sarodnick, G., Preparation of heterocyclic substituted imidazoles and imidazol[2,1-b]thiazoles. *J. Prakt. Chem. (Leipzig)*, **1971**, 313, 977-985.

## Parte Experimental

cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 472.6 mg, 39%. P.f. 229 - 230 °C (lit.<sup>152</sup> 230 - 232 °C). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.73 (s, 1H, H-1), 8.39 (s, 1H, H-7), 8.05 - 8.03 (m, 3H, H-13, H-15, H-19), 7.95 - 7.83 (m, 4H, H-5, H-8, H-11, H-12), 7.50- 7.42 (m, 4H, H-9, H-10, H-16, H-18), 7.39-7.35 (m, 1H, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 146.2 (C-2), 141.1 (C-4), 133.4 (C-14), 132.3 (C-a o C-b), 131.9 (C-a o C-b), 130.5 (C-14), 128.9 (C-16, C-18), 128.2 (C-17), 128.1 (C-6 o C-9 o C-10 o C-11), 127.9 (C-6 o C-9 o C-10 o C-11), 127.7 (C-8), 126.2 (C-6 o C-9 o C-10 o C-11), 125.2 (C-15, C-19), 123.9 (C-13), 121.9 (C-7), 115.1(C-5). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.28 min. MS (ESI+): m/z 271 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 84.42%, H 5.22%, N 10.36%. Hallado: C 84.28%, H 5.36%, N 10.37%.

**2,4-Difenil-1H-imidazol (12):** Método B: Reactivos: benzamidina (700 mg, 4.5



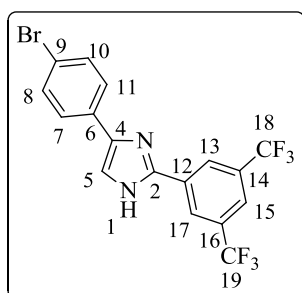
mmol), hidrógeno carbonato sódico (1.5 g, 17.8 mmol), bromoacetonaftona (800 mg, 4.5 mmol) y THF/agua (23 mL). Condiciones de reacción: 3 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido

blanco. Rendimiento: 288 mg, 30%. P.f. 171 - 172 °C (lit.<sup>150</sup> 164 °C). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.62 (s, 1H, H-1), 8.01 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-13, H-17), 7.87 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.71 (s, 1H, H-5), 7.56 - 7.30 (m, 5H, H-Ph), 7.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-9 o H-15). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 146.1 (C-2), 141.4 (C-4), 135.0 (C-12), 130.9 (C-6), 129.0 (C-8, C-10), 128.7 (C-14, C-16), 128.4 (C-15), 126.5 (C-9), 125.2 (C-13, C-17), 124.7 (C-7, C-11), 114.6 (C-5).

<sup>152</sup> Murai, T.; Kikugawa, Y.; Hirao, H., Preparation of 2-phenyl-4-naphthylimidazoles. Patente No: JP-4194856.

HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.70 min. MS (ESI+): m/z 221 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 81.79%, H 5.49%, N 12.72%. Hallado: C 81.55%, H 5.61%, N 12.63%.

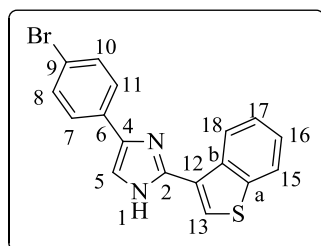
**2-(3,5-bis-(Trifluorometil)fenil)-4-fenil-1H-imidazol (13):** Método B:



Reactivos: 3,5 bis(trifluorometil)benzamidina (650 mg, 2.2 mmol), hidrógeno carbonato sódico (740 mg, 8.9 mmol), 2-bromo-1-(4-bromofenil)etanona (610 mg, 2.2 mmol) y THF/agua (23 mL). Condiciones de reacción: 3 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano

(1:3) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 438.6 mg, 46%. P.f. 202 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.23 (s, 1H, H-1), 8.62 (s, 2H, H-13, H-17), 8.08 (s, 1H, H-15), 8.01 (s, 1H, H-5), 7.85 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-8, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 143.3(C-2), 140.8 (C-4, C-12), 133.4 (C-6), 131.6 (C-8, C-10), 131.1 (c, *J* = 32.9 Hz, C-14, C-16), 126.6 (C-7, C-11), 125.1 (C-13, C-17), 123.4 (c, *J* = 272.9 Hz, C-18, C-19), 121.3 (c, *J* = 3.6 Hz, C-15), 119.5 (C-9), 116.7 (C-5). HPLC: Pureza = 96%, t.r. = 6.07 min (20-80 en 10 min). MS (ESI+): m/z 438 [M + 3], 436 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>9</sub>BrF<sub>6</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 46.92%, H 2.08%, N 6.44%. Hallado: C 46.99%, H 1.80%, N 6.20%.

**2-(Benzotiofen-3-il)-4-(4-bromofenil)-1H-imidazol (14):** Método B: Reactivos:

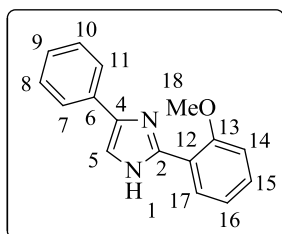


benzotiofen-3-carboximidamida (780 mg, 2.8 mmol), hidrógeno carbonato sódico (940 mg, 11.2 mmol), 2-bromo-1-(4-bromofenil)etanona (600 mg, 2.8 mmol) y THF/agua (23 mL). Condiciones de

## Parte Experimental

reacción: 4 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 167 mg, 17%. P.f. 175 - 176 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.80 (s, 1H, H-1), 9.09 (ddd,  $J = 8.2, 1.3, 0.7$  Hz, 1H, H-18), 8.19 (s, 1H, H-13), 8.05 (ddd,  $J = 8.1, 1.1, 0.6$  Hz, 1H, H-15), 7.92 - 7.83 (m, 3H, H-5, H-7, H-11), 7.58 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-8, H-10), 7.53 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H, H-17), 7.45 (ddd,  $J = 8.1, 7.0, 1.3$  Hz, 1H, H-16).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  143.6 (C-2), 140.4 (C-a), 140.0 (C-4), 137.1 (C-b), 134.7 (C-6), 132.1 (C-8, C-10), 127.0 (C-7, C-11), 126.9 (C-12), 125.9 (C-16), 125.6 (C-18), 125.5 (C-17), 125.0 (C-13), 123.4 (C-15), 119.5 (C-9), 114.9 (C-5). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 8.42 min (grad.: 15-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  358 [M + 3], 356 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{S}$ ) Calculado: C 57.48%, H 3.12%, N 7.89%, S 9.03%. Hallado: C 57.60%, H 3.20%, N 8.01%, S 9.10%.

**2-(2-Metoxifenil)-4-fenil-1H-imidazol (15):** Método C: Reactivos: fenilglioxal



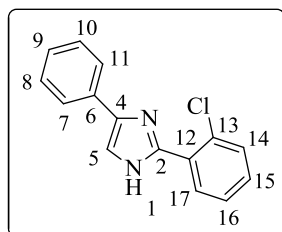
monohidrato (250 mg, 1.9 mmol), 2-metoxibenzaldehído (252.9 mg, 1.9 mmol), acetato de amonio (698.4 mg, 9.07 mmol) y metanol (20 mL). Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido amarillo.

Rendimiento: 349 mg, 75%. P.f. 141 °C (lit.<sup>153</sup> 116 - 118 °C).  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.90 (s, 1H, H-1), 8.18 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H, H-17), 7.93 - 7.82 (m, 2H, H-7, H-11), 7.64 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-5), 7.40 - 7.30 (m, 3H, H-8, H-10, H-15), 7.17 (m, 2H, H-9, H-14), 7.05 (td,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 1H, H-16), 3.95 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  156.1 (C-13), 143.6 (C-2), 140.4 (C-4),

<sup>153</sup> Fantini, M.; Zuliani, V.; Spotti, M. A.; Rivara, M., Microwave assisted efficient synthesis of imidazole-based privileged structures *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 181-185.

135.2 (C-6), 129.8 (C-15), 128.8 (C-8, C-10), 128.5 (C-17), 126.6 (C-9), 124.9 (C-7, C-11), 121.2 (C-16), 119.1 (C-12), 114.3 (C-5), 112.2 (C-14), 56.0 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.37 min. MS (ESI+): m/z 251 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 76.78%, H 5.64%, N 11.19%. Hallado: C 76.78%, H 5.55%, N 10.94%.

**2-(2-Clorofenil)-4-fenil-1H-imidazol (16)**<sup>154</sup>: Método C: Reactivos: fenilglioxal



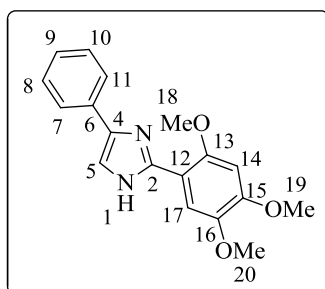
monohidrato (250 mg, 1.9 mmol), 2-clorobenzaldehído (261.3 mg, 1.9 mmol), acetato de amonio (698.4 mg, 9.1 mmol) y metanol (20 mL). Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 282.4 mg, 68%. P.f.

131 - 132 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.41 (s, 1H, H-1), 7.88 - 7.81 (m, 3H, H-7, H-11, H-Ph), 7.76 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-5), 7.60 - 7.55 (m, 1H, H-Ph), 7.50 - 7.38 (m, 2H, H-Ph), 7.38 - 7.32 (m, 2H, H-8, H-10), 7.30 - 7.16 (m, 1H, H-9). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 144.0 (C-2), 141.5 (C-4), 135.2 (C-6), 131.9 (CH-Ph), 131.5 (C-13), 130.9 (CH-Ph), 130.7 (CH-Ph), 130.6 (C-12), 129.1 (C-8, C-10), 128.0 (CH-Ph), 127.0 (C-9), 125.1 (C-7, C-11), 115.2 (C-5). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.53 min. MS (ESI+): m/z 257 [M + 3], 255 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>) Calculado: C 70.73%, H 4.35%, N 11.00%. Hallado: C 70.48%, H 4.50%, N 10.98%.

<sup>154</sup> Hirao, H.; Kikugawa, Y.; Murai, T., Surface treatment agent used during Pb-free soldering. Patente No: JP-2005349439.

## Parte Experimental

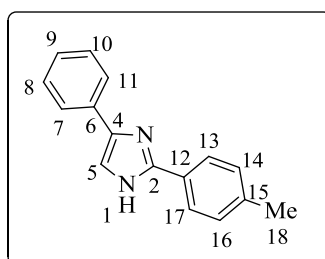
**4-Fenil-2-(2,4,5-trimetoxifenil)-1H-imidazol (17):** Método C: Reactivos:



fenilglioxal monohidrato (250 mg, 1.9 mmol), 2,4,5-trimetoxibenzaldehído (364.9 mg, 1.9 mmol), acetato de amonio (698.4 mg, 9.1 mmol) y metanol (20 mL). Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 207 mg, 36%. P.f. 143 °C.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.70 (s, 1H, H-1), 7.86 (dd,  $J = 8.2, 1.3$  Hz, 2H, H-7, H-11), 7.73 (s, 1H, H-17), 7.57 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-5), 7.34 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-8, H-10), 7.27 - 7.14 (m, 1H, H-9), 6.78 (s, 1H, H-14), 3.94 (s, 3H, H-OMe), 3.84 (s, 3H, H-OMe), 3.78 (s, 3H, H-OMe).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  150.9 (C-Ph), 150.3 (C-Ph), 143.9 (C-2), 143.2 (C-Ph), 140.0 (C-4), 135.3 (C-6), 128.8 (C-8, C-10), 126.4 (C-9), 124.8 (C-7, C-11), 113.8 (C-5), 111.8 (C-17), 110.6 (C-12), 98.4 (C-14), 56.6 ( $\text{CH}_3\text{-OMe}$ ), 56.6 ( $\text{CH}_3\text{-OMe}$ ), 56.3 ( $\text{CH}_3\text{-OMe}$ ). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.54 min. MS (ESI+): m/z 311 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ ) Calculado: C 69.66%, H 5.85%, N 9.03%. Hallado: C 69.53%, H 5.74%, N 8.96%.

**4-Fenil-2-(4-tolil)-1H-imidazol (18)<sup>155</sup>:** Método C: Reactivos:

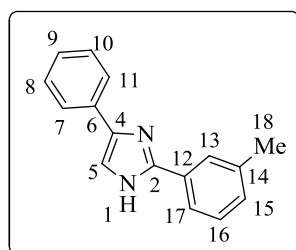


monohidrato (250 mg, 1.9 mmol), 4-metilbenzaldehído (223.5 mg, 1.9 mmol), acetato de amonio (698.4 mg, 9.1 mmol) y metanol (20 mL). Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 275.7 mg, 63%. P.f. 180 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}$

<sup>155</sup> Yartseva, S. V.; Levin, P. I.; Lebedeva, L. P.; Shishkin, V. N.; Tanaseichuk, B. S. Inhibition of the oxidative thermal degradation of polypropylene by thienyl- and furyldiarylimidazoles. *Vysokomol. Soedin., Ser. A.* **1971**, *13*, 2260-2264.

$d_6$ ):  $\delta$  12.43 (s, 1H, H-1), 7.86 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-13, H-17), 7.82 (dd,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 2H, H-7, H-11), 7.70 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-5), 7.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H-8, H-10), 7.24 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-14, H-16), 7.16 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-9), 2.31 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  146.6 (C-2), 141.5 (C-4), 138.2 (C-15), 135.4 (C-6), 130.0 (C-14, C-16), 129.1 (C-8, C-10), 128.6 (C-12), 126.8 (C-9), 125.5 (C-13, C-17), 125.0 (C-7, C-11), 114.6 (C-5), 21.5 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.44 min. MS (ESI+): m/z 235 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 82.02%, H 6.02%, N 11.96%. Hallado: C 82.31%, H 6.30%, N 11.71%.

**4-Fenil-2-(3-tolil)-1H-imidazol (19)**<sup>156</sup>: Método C: Reactivos: fenilglioxal



monohidrato (250 mg, 1.9 mmol), 3-metilbenzaldehído (223.5 mg, 1.9 mmol), acetato de amonio (698.4 mg, 9.1 mmol) y metanol (20 mL). Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido amarillo.

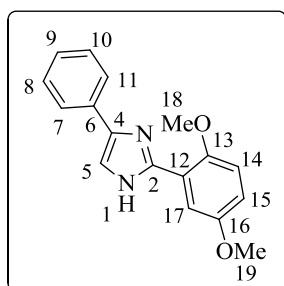
Rendimiento: 288.1 mg, 66%. P.f. 172 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.60 (s, 1H, H-1), 7.89 - 7.83 (m, 3H, H-7, H-11, H-13), 7.78 (dt,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 1H, H-17), 7.75 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-5), 7.39 - 7.33 (m, 3H, H-8, H-10, H-16), 7.24 - 7.15 (m, 2H, H-9, H-15), 2.38 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  146.6 (C-2), 141.6 (C-4), 138.5 (C-14), 135.4 (C-6), 131.2 (C-12), 129.4 (C-15 o C-16), 129.3 (C-15 o C-16), 129.1 (C-8, C-10), 126.8 (C-9), 126.1 (C-13), 125.0 (C-7, C-11), 122.7 (C-17), 114.9 (C-5), 21.8 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.47 min. MS (ESI+): m/z 235 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>)

<sup>156</sup> Nakanishi, S.; Nantaku, J.; Otsuji, Y., Synthesis of imidazole derivatives from  $\alpha$ -halooximes and amidines by use of iron carbonyls. *Chem. Lett.* **1983**, 3, 341-342.

## Parte Experimental

Calculado: C 82.02%, H 6.02%, N 11.96%. Hallado: C 82.31%, H 6.25%, N 12.12%.

**2-(2,5-Dimetoxifenil)-4-fenil-1H-imidazol (20):** Método C: Reactivos:



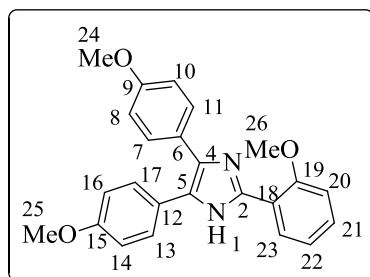
fenilglioxal monohidrato (250 mg, 1.9 mmol), 2,5-dimetoxibenzaldehído (308.8 mg, 1.9 mmol), acetato de amonio (698.4 mg, 9.1 mmol) y metanol (20 mL).

Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido amarillo.

Rendimiento: 312.6 mg, 60%. P.f. 135 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.89 (s, 1H, H-1), 7.85 (dt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.72 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-17), 7.62 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.33 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-8, H-10), 7.17 (ddt, *J* = 7.4, 5.6, 1.2 Hz, 1H, H-9), 7.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-14), 6.89 (dd, *J* = 9.0, 3.2 Hz, 1H, H-15), 3.87 (s, 3H, H-18 o H-19), 3.75 (s, 3H, H-18 o H-19). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 153.8 (C-16), 150.6 (C-13), 143.7 (C-2), 140.6 (C-4), 135.3 (C-6), 129.1 (C-8, C-10), 126.8 (C-9), 125.1 (C-7, C-11), 119.8 (C-12), 115.3 (C-15), 113.6 (C-14), 113.2 (C-17), 114.8 (C-5), 56.4 (C-18 o C-19), 56.1 (C-18 o C-19). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.63 min. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 281 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 72.84%, H 5.75%, N 9.99%. Hallado: C 73.02%, H 5.91%, N 10.11%.

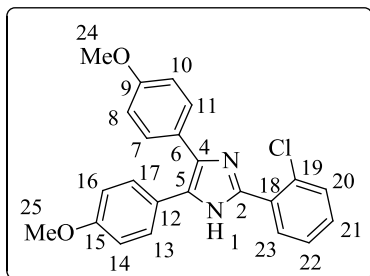
**2-(2-Metoxifenil)-4,5-bis(4-metoxifenil)-1H-imidazol (21)<sup>157</sup>:** Método A:



Reactivos: 1,2-bis(4-metoxifenil)etano-1,2-diona (250 mg, 0.9 mmol), 2-metoxibenzaldehído (125.9 mg, 0.9 mmol), acetato de amonio (712.9 mg, 9.2 mmol) y ácido acético (5 mL). Rendimiento: 209.7 mg, 59%, sólido blanco. P.f. 218 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.67

(s, 1H, H-1), 8.02 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H-23), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H7, H-11), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-13, H-17), 7.36 - 7.32 (m, 1H, H-21), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-20), 7.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-22), 6.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-14, H-16), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-8, H-10), 3.90 (s, 3H, H-26), 3.78 (s, 3H, H-25), 3.73 (s, 3H, H-24). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 158.7 (C-15), 157.8 (C-9), 155.9 (C-19), 142.4 (C-2), 135.7 (C-4), 129.9 (C-13, C-17), 129.5 (C-21), 128.7 (C-23), 128.1 (C-7, C-11), 127.9 (C-6), 126.4 (C-5), 123.7 (C-12), 120.5 (C-22), 119.0 (C-18), 114.0 (C-14, C-16), 113.6 (C-8, C-10), 111.5 (C-20), 55.5 (C-26), 55.2 (C-25), 55.0 (C-24). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.91 min (grad.: 15-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 388 [M + 2]. Análisis elemental (C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Calculado: C 74.59%, H 5.74%, N 7.25%. Hallado: C 74.70%, H 5.81%, N 7.28%.

**2-(2-Clorofenil)-4,5-bis(4-metoxifenil)-1H-imidazol (22)<sup>158</sup>:** Método A:



Reactivos: 1,2-bis(4-metoxifenil)etano-1,2-diona (250 mg, 0.9 mmol), 2-clorobenzaldehído (129.8 mg, 0.9 mmol), acetato de amonio (712.9 mg, 9.2 mmol) y ácido acético (5 mL). Rendimiento: 297

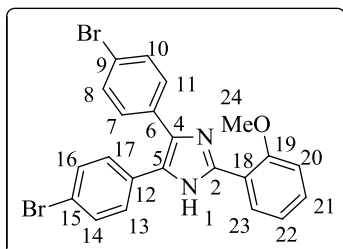
<sup>157</sup> Lombardino, J. G., Pharmaceutical imidazoles. Patente No: DE-2155558A19720629.

<sup>158</sup> Cohen, R., Substituent effects on the reactivity of triarylimidazolyl free radicals toward tris(2-methyl-4-diethylaminophenyl)methane *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2280-2284.

## Parte Experimental

mg, 82%, sólido blanco. P.f. 79 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.43 (s, 1H, H-1), 7.84 - 7.73 (m, 1H, H-23), 7.62 - 7.56 (m, 1H, H-20), 7.51 - 7.44 (m, 4H, H-13, H-17, H-21, H-22), 7.41 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-7, H-11), 7.00 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-8, H-10), 6.88 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-14, H-16), 3.80 (s, 3H, H-24), 3.75 (s, 3H, H-25).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  159.1 (C-9), 158.3 (C-15), 143.0 (C-2), 136.5 (C-4), 131.8 (C-23), 130.5 (C-20), 130.3 (C-19, C-21), 129.8 (C-7, C-11), 128.6 (C-13, C-17), 128.1 (C-12), 127.5 (C-18, C-22), 127.4 (C-22), 123.7 (C-6), 114.5 (C-8, C-10), 114.0 (C-14, C-16), 55.5 (C-24), 55.4 (C-25). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.95 min (grad.: 15-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 395 [M + 3], 393 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$ ) Calculado: C 70.68%, H 4.90%, N 7.17%. Hallado: C 70.62%, H 4.92%, N 6.88%.

### 4,5-Bis(4-bromofenil)-2-(2-metoxifenil)-1H-imidazol (23): Método A:

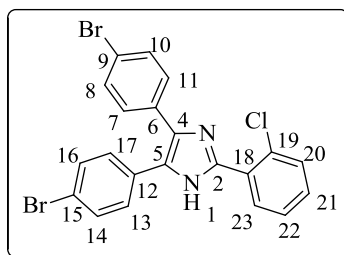


Reactivos: 1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (250 mg, 0.7 mmol), 2-metoxibenzaldehído (91.2 mg, 0.7 mmol), acetato de amonio (516.4 mg, 6.7 mmol) y ácido acético (5 mL). Rendimiento: 273 mg, 84%, sólido blanco. P.f. 242 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300

MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.03 (s, 1H, H-1), 8.02 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H, H-23), 7.64 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-14, H-16), 7.53 - 7.37 (m, 7H, H-7, H-8, H-10, H-11, H-13, H-17, H-21), 7.17 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-20), 7.07 (td,  $J = 7.5, 1.1$  Hz, 1H, H-22), 3.92 (s, 3H, H-24).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  156.4 (C-19), 144.1 (C-2), 136.0 (C-4), 134.6 (C-6), 132.0 (C-14, C-16), 131.6 (2 CH-Ph), 131.1 (2 CH-Ph), 130.4 (C-21), 129.4 (2 CH-Ph), 129.3 (C-23), 128.9 (C-12), 127.1 (C-5), 121.3 (C-9 o C-15), 121.0 (C-22), 120.0 (C-9 o C-15), 119.0 (C-18), 112.0 (C-20), 55.9 (C-24). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 9.32 (grad.: 10-95 en 10 min) min. MS (ESI+): m/z

487 [M + 3], 485 [M + 1], 483 [M - 1]. Análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 54.57%, H 3.33%, N 5.79%. Hallado: C 54.73%, H 3.08%, N 5.68%.

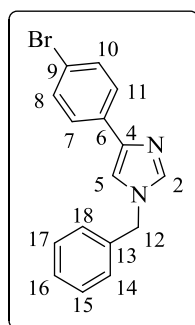
**4,5-bis-(4-Bromofenil)-2-(2-clorofenil)-1H-imidazol (24)** Método A: Reactivos:



1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (250 mg, 0.7 mmol), 2-clorobenzaldehído (94.1 mg, 0.7 mmol), acetato de amonio (516.4 mg, 6.7 mmol) y ácido acético (5 mL). Rendimiento: 301.2 mg, 92%, sólido blanco. P.f. 216 - 217 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.78 (s, 1H, H-1), 7.79 (dd, *J* = 6.0, 3.4 Hz, 2H, H-Ph), 7.67 - 7.57 (m, 3H, H-Ph), 7.50 - 7.46 (m, 7H, H-Ph). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 144.3 (C-2), 136.5 (C-4), 134.4 (C-6 o C-19), 132.1 (C-6 o C-19), 132.0 (C-13, C-17), 131.9 (C-14, C-16), 131.8 (C-23), 130.8 (C-21), 130.7 (C-12 o C.18), 130.6 (C-8, C-10), 130.5 (C-12 o C-18), 130.1 (C-20), 129.6 (C-19, C-22), 127.6 (C-7, C-11), 121.4 (C-15), 120.2 (C-9). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 10.56 min (grad.: 10-95 en 10 min). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 493 [M + 5], 491 [M + 3], 489 [M + 1], 487 [M - 1]. Análisis elemental (C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>ClN<sub>2</sub>) Calculado: C 51.62%, H 2.68%, N 5.73%. Hallado: C 51.88%, H 2.48%, N 5.51%.

**1-Bencil-4-(4-bromofenil)-1H-imidazol (25):** Método D: Reactivos:

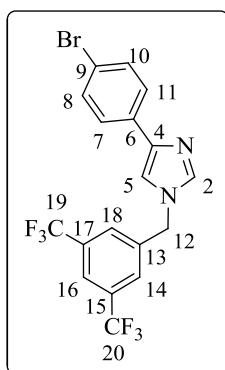


4-(4-bromofenil)-1H-imidazol (1 g, 4.5 mmol), carbonato potásico (746.3 mg, 5.4 mmol), bromuro de bencilo (769.6 mg, 4.5 mmol). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 725 mg, 51%. P.f. 106 - 107 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.82 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-2), 7.72 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-5), 7.69 - 7.64 (m, 2H, H-7, H-11), 7.50 - 7.45 (m, 2H, H-8, H-10), 7.37 - 7.25 (m, 5H, H-14, 18), 5.19 (s,

## Parte Experimental

2H, H-12).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  140.4 (C-4), 138.9 (C-2), 138.2 (C-13), 134.4 (C-6), 132.0 (C-8, C-10), 129.4 (2 CH-Ph), 128.5 (C-16), 128.2 (2 CH-Ph), 126.8 (C-7, C-11), 119.6 (C-9), 117.1 (C-5), 50.5 (C-12). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.53 min. MS (ESI+): m/z 315 [M + 3], 313 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrN}_2$ ) Calculado: C 61.36%, H 4.18%, N 8.94%. Hallado: C 61.21%, H 4.47%, N 8.99%.

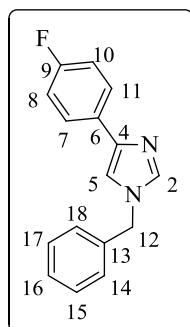
### 1-(3,5-bis-(Trifluorometil)bencil)-4-(4-bromofenil)-1H-imidazol (26): Método



D: Reactivos: 4-(4-bromofenil)-1H-imidazol (400 mg, 1.8 mmol), carbonato potásico (298.6 mg, 2.2 mmol), bromuro de 3,5-bis(trifluorometil)bencilo (550 mg, 1.8 mmol). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 230 mg, 30%.

P.f. 126 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.08 (s, 3H, H-14, H-16, H-18), 7.96 (s, 1H, H-2), 7.84 (s, 1H, H-5), 7.74 - 7.63 (m, 2H, H-7, H-11), 7.60 - 7.44 (m, 2H, H-8, H-10), 5.44 (s, 2H, H-12).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  141.2 (C-13), 140.5 (C-4), 138.8 (C-2), 133.9 (C-6), 131.7 (C-8, C-10), 130.9 (c,  $J = 32.9$  Hz, C-15, C-17), 129.1 (c,  $J = 3.2$  Hz, C-14, C-18), 126.6 (C-7, C-11), 123.0 (c,  $J = 272.9$  Hz, C-19, C-20), 122.1 (m, C-16), 119.9 (C-9), 116.6 (C-5), 49.0 (C-12). HPLC: Pureza = 96%, t.r. = 4.73 min. MS (ESI+): m/z 453 [M + 3], 450 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{BrF}_6\text{N}_2$ ) Calculado: C 48.13%, H 2.47%, Br 17.19%, N 6.24%. Hallado: C 47.98%, H 2.54%, Br 18.11%, N 6.30%.

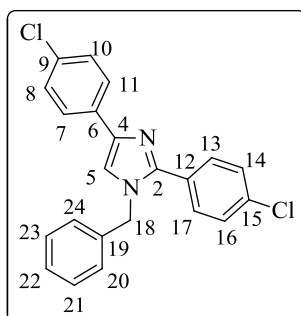
**1-Bencil-4-(4-fluorofenil)-1H-imidazol (27):** Método D: Reactivos: 4-(4-



fluorofenil)-1H-imidazol (250 mg, 1.5 mmol), carbonato potásico (244.6 mg, 1.8 mmol), bromuro de bencilo (263.2 mg, 1.5 mmol). Condiciones de reacción: 48 h a reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:1) obteniendo un sólido beige. Rendimiento: 125 mg, 32%. P.f. 75 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.80 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H-2), 7.76 - 7.69 (m, 2H, H-7, H-11), 7.64 (d,  $J = 1.3$  Hz,

1H, H-5), 7.37 - 7.25 (m, 5H, H-14, 18), 7.16 - 7.09 (m, 2H, H-8, H-10), 5.18 (s, 2H, H-12).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  161.5 (d,  $J = 242.3$  Hz, C-9), 140.7 (C-4), 138.7 (C-2), 138.3 (C-13), 131.7 (d,  $J = 3.0$  Hz, C-6), 129.4 (2 CH-Ph), 128.5 (C-16), 128.2 (2 CH-Ph), 126.6 (d,  $J = 7.8$  Hz, C-7, C-11), 116.4 (C-5), 115.9 (d,  $J = 21.3$  Hz, C-8, C-10), 50.4 (C-12). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.78 min. MS (ESI+):  $m/z$  253 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FN}_2$ ) Calculado: C 76.17%, H 5.19%, N 11.10%. Hallado: C 76.12%, H 5.36%, N 11.21%.

**1-Bencil-2,4-bis(4-clorofenil)-1H-imidazol (28):** Método D: Reactivos: 2,4-



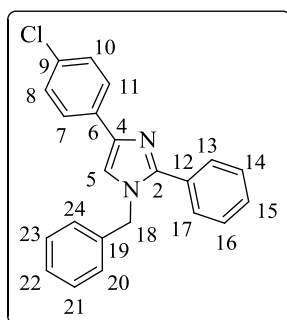
bis(4-clorofenil)-1H-imidazol (200 mg, 0.7 mmol), carbonato potásico (114.7 mg, 0.8 mmol), bromuro de bencilo (117.9 mg, 0.7 mmol). Condiciones de reacción: 4 días a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento:

177.1 mg, 68%. P.f. 134 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.90 (s, 1H, H-5), 7.87 - 7.76 (m, 2H, H-7, H-11), 7.67 - 7.60 (m, 2H, H-13, H-17), 7.54 - 7.46 (m, 2H, H-14, H-16), 7.45 - 7.38 (m, 5H, H-8, H-10, H-Ph), 7.08 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H-20, H-24), 5.35 (s, 2H, H-18).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  146.1 (C-2),

## Parte Experimental

138.9 (C-4), 137.1 (C-19), 133.5 (C-Ph), 132.9 (C-Ph), 130.8 (C-Ph), 130.0 (C-13, C-17), 129.1 (C-Ph), 128.8 (C-21, C-23), 128.6 (C-14, C-16), 128.5 (C-8, C-10), 127.6 (C-22), 126.5 (C-20, C-24), 125.9 (C-7, C-11), 119.7 (C-5), 50.0 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 10.02 min. MS (ESI+): m/z 382 [M + 3], 380 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 69.67%, H 4.25%, N 7.39%. Hallado: C 69.88%, H 4.27%, N 7.55%.

**1-Bencil-4-(4-clorofenil)-2-fenil-1H-imidazol (29)**<sup>159</sup>: Método D: Reactivos: 4-

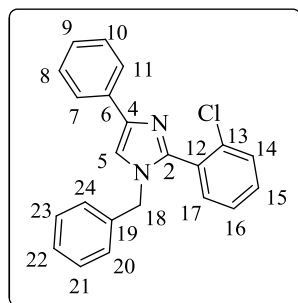


(4-clorofenil)-2-fenil-1H-imidazol (150 mg, 0.6 mmol), carbonato potásico (97.7 mg, 0.7 mmol), bromuro de bencilo (99.1 mg, 0.6 mmol). Condiciones de reacción: 4 días a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 71.6 mg, 36%. P.f. 97 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.88 (s, 1H, H-5),

7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.66 - 7.54 (m, 2H, H-13, H-17), 7.50 - 7.20 (m, 8H, H-8, H-10, H-14, H-15, H-16, H-21, H-22, H-23), 7.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-20, H-24), 5.34 (s, 2H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 147.4 (C-2), 138.7 (C-4), 137.3 (C-19), 133.1 (C-6), 128.6 (2 CH-Ph), 128.4 (2 CH-Ph), 130.6 (C-9 o C-12), 130.6 (C-9 o C-12), 128.8 (C-14, C-16), 128.5 (C-13, C-17), 127.6 (C-15, C-22), 126.5 (C-20, C-24), 125.9 (C-7, C-11), 119.2 (C-5), 49.9 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.53 min. MS (ESI+): m/z 348 [M + 3], 346 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>) Calculado: C 76.63%, H 4.97%, N 8.12%. Hallado: C 76.90%, H 4.89%, N 7.98%.

<sup>159</sup> Zhang, B.; Wan, C.; Wang, Q.; Zhang, S.; Zha, Z.; Wang, Z., A Rapid and efficient access to polysubstituted imidazoles via iodine-catalyzed tandem oxidative cyclization. *Huaxue Xuebao* **2012**, *70*, 2408-2411.

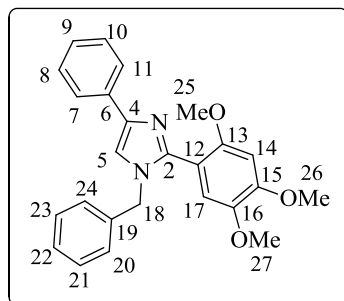
**1-Bencil-2-(2-clorofenil)-4-fenil-1H-imidazol (30):** Método D: Reactivos: 2-(2-



clorofenil)-4-fenil-1H-imidazol (250 mg, 1.1 mmol), carbonato potásico (189.3 mg, 1.4 mmol), bromuro de bencilo (194.8 mg, 1.1 mmol). Condiciones de reacción: 48 h a reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:4) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 195.1 mg, 55%. P.f.

127 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.84 (s, 1H, H-5), 7.82 – 7.74 (m, 2H, H-7, H-11), 7.61 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H, H-14), 7.57 – 7.48 (m, 1H, H-15), 7.47 – 7.39 (m, 3H, H-16, H-17, H-22), 7.34 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-8, H-10), 7.30 – 7.15 (m, 3H, H-9, H-21, H-23), 7.00 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 2H, H-20, H-24), 5.03 (s, 2H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 144.6 (C-2), 139.9 (C-4), 136.8 (C-19), 134.1 (C-6), 133.5 (C-13), 132.7 (C-17), 131.3 (C-15), 129.9 (C-12), 129.5 (C-14), 128.6 (2 CH-Ph), 128.5 (2 CH-Ph), 127.6 (C-22), 127.2 (C-16), 127.0 (C-20, C-24), 126.4 (C-9), 124.2 (C-7, C-11), 117.2 (C-5), 49.6 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.44 min. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 348 [M + 3], 346 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>) Calculado: C 76.63%, H 4.97%, N 8.12%. Hallado: C 76.90%, H 4.99%, N 8.17%.

**1-Bencil-4-fenil-2-(2,4,5-trimetoxifenil)-1H-imidazol (31):** Método D:



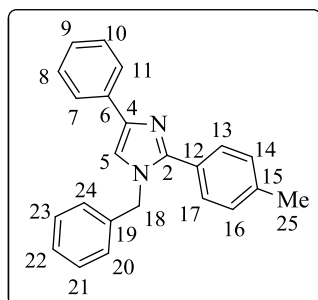
Reactivos: 4-fenil-2-(2,4,5-trimetoxifenil)-1H-imidazol (250 mg, 0.8 mmol), carbonato potásico (133.8 mg, 1.0 mmol), bromuro de bencilo (138.4 mg, 0.8 mmol). Condiciones de reacción: 48 h a reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:4) obteniendo un

sólido amarillo. Rendimiento: 63.4 mg, 19%. P.f. 139 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz,

## Parte Experimental

DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.80 – 7.71 (m, 2H, H-7, H-11), 7.68 (s, 1H, H-5), 7.33 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, H-8, H-10), 7.29 – 7.26 (m, 2H, H-21, H-23), 7.25 – 7.12 (m, 2H, H-9, H-22), 7.09 – 6.99 (m, 2H, H-20, H-24), 6.83 (s, 1H, H-17), 6.78 (s, 1H, H-14), 4.98 (s, 2H, H-18), 3.85 (s, 3H, H-26), 3.69 (s, 3H, H-25), 3.64 (s, 3H, H-27).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  151.6 (C-13), 150.7 (C-15), 145.2 (C-2), 142.4 (C-16), 139.8 (C-4), 137.5 (C-19), 134.5 (C-6), 128.4 (4 CH-Ph), 127.3 (C-22), 127.1 (C-20, C-24), 126.1 (C-9), 124.1 (C-7, C-11), 116.8 (C-5), 115.5 (C-17), 110.3 (C-12), 97.8 (C-14), 56.1 (C-27), 55.9 (C-25), 55.8 (C-26), 49.5 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.12 min. MS (ESI+):  $m/z$  402 [M + 2]. Análisis elemental (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Calculado: C 74.98%, H 6.04%, N 7.00%. Hallado: C 74.77%, H 6.08%, N 6.93%.

**1-Bencil-4-fenil-2-(4-tolil)-1H-imidazol (32)**<sup>160</sup>: Método D: Reactivos: 4-fenil-2-



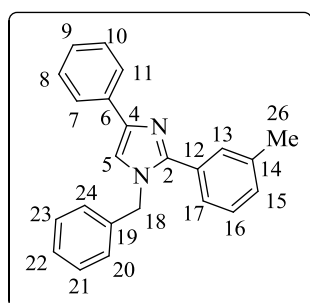
(4-tolil)-1H-imidazol (250 mg, 1.1 mmol), carbonato potásico (177 mg, 1.3 mmol), bromuro de bencilo (181.2 mg, 1.1 mmol). Condiciones de reacción: 48 h a reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:4) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 156.1 mg, 45%. P.f. 147 - 148

°C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.89 – 7.74 (m, 3H, H-5, H-7, H-11), 7.58 – 7.45 (m, 2H, H-13, H-17), 7.44 – 7.15 (m, 8H, H-Ph), 7.14 – 7.03 (m, 2H, H-20, H-24), 5.33 (s, 2H, H-18), 2.34 (s, 3H, H-25).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  147.3 (C-2), 139.8 (C-4), 138.2 (C-15), 137.5 (C-19), 134.2 (C-6), 129.1 (C-21, C-23), 128.7 (C-8, C-10), 128.5 (C-13, C-17), 128.3 (C-14, C-16), 127.6 (C-12 o C-22), 127.5 (C-12 o C-22), 126.4 (C-20, C-24), 126.3 (C-9), 124.2 (C-7, C-11), 118.6 (C-5), 49.8 (C-18), 20.8 (C-25). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.09 min (grad.: 10-95 en

<sup>160</sup> Mehdi; A.; Samira; A.; Shahzad; F.; Asgarian, D. J.; Peiman, M., A one-pot, four-component synthesis of *N*-substituted 2,4-diarylimidazoles *Synlett*. **2009**, *20*, 3263-3266.

10 min). MS (ESI+):  $m/z$  325 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 85.15%, H 6.21%, N 8.63%. Hallado: C 84.98%, H 6.45%, N 8.44%.

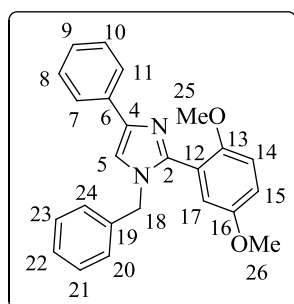
**1-Bencil-4-fenil-2-(3-tolil)-1H-imidazol (33):** Método D: Reactivos: 4-fenil-2-



(3-tolil)-1H-imidazol (276 mg, 1.2 mmol), carbonato potásico (197.1 mg, 1.4 mmol), bromuro de bencilo (201.2 mg, 1.2 mmol). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 167.2 mg, 44%. P.f.

94 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.83 - 7.80 (m, 3H, H-5, H-7, H-11), 7.44 (s, 1H, H-13), 7.44 - 7.19 (m, 9H, H-8, 10, H-15, H-16, H-17, H-21, H-22, H-23), 7.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-20, H-24), 5.34 (s, 2H, H-18), 2.33 (s, 3H, H-26). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 144.7 (C-2), 140.2 (C-4), 138.2 (C-14 o C-19), 137.9 (C-14 o C-19), 134.6 (C-6 o C-12), 130.7 (C-6 o C-12), 129.5 (C-13), 129.7 (C-15), 129.2 (2 CH-Ph), 128.9 (2 CH-Ph), 128.8 (C-16 o C-17), 127.9 (C-16 o C-17), 126.9 (C-20, C-24), 126.8 (C-9), 125.7 (C-22), 124.6 (C-7, C-11), 119.1 (C-5), 50.3 (C-18), 21.3 (C-26). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.72 min. MS (ESI+):  $m/z$  326 [M + 2]. Análisis elemental (C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 85.15%, H 6.21%, N 8.63%. Hallado: C 85.24%, H 6.45%, N 8.88%.

**1-Bencil-2-(2,5-dimetoxifenil)-4-fenil-1H-imidazol (34):** Método D: Reactivos:

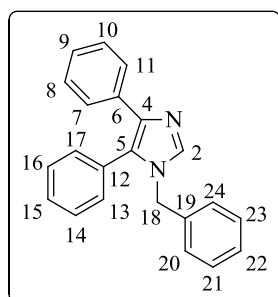


4-fenil-2-(2,5-dimetoxifenil)-1H-imidazol (292.6 mg, 1.0 mmol), carbonato potásico (173.2 mg, 1.3 mmol), bromuro de bencilo (178.4 mg, 1.0 mmol). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de

## Parte Experimental

etilo/hexano (1:2) obteniendo un aceite amarillo. Rendimiento: 28.8 mg, 7%.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.78 - 7.72 (m, 2H, H-7, H-11), 7.71 (s, 1H, H-5), 7.35 - 7.30 (m, 2H, H-8, H-10), 7.29 - 7.19 (m, 3H, H-21, 23), 7.19 - 7.14 (m, 1H, H-9), 7.10 - 6.98 (m, 4H, H-Ph), 6.85 (dd,  $J = 2.9, 0.6$  Hz, 1H, H-17), 4.99 (s, 2H, H-18), 3.68 (s, 3H, H-OMe), 3.65 (s, 3H, H-OMe).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  153.6 (C-13 o C-16), 151.7 (C-13 o C-16), 145.7 (C-2), 140.6 (C-4), 138.1 (C-19), 135.1 (C-6), 129.2 (4 CH-Ph), 128.1 (C-Ph), 127.8 (C-20, C-24), 126.9 (C-Ph), 124.8 (C-11), 121.0 (C-12), 120.9 (C-Ph), 117.8 (C-17), 117.1 (C-5), 116.7 (C-14 o C-15), 113.3 (C-14 o C-15), 56.4 (C-25 o C-26), 56.2 (C-25 o C-26), 50.3 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.42 min. MS (ESI+): m/z 372 [M + 2]. Análisis elemental ( $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ ) Calculado: C 77.81%, H 5.99%, N 7.56%. Hallado: C 77.65%, H 5.81%, N 7.32%.

**1-Bencil-4,5-difenil-1H-imidazol (35):** Método D: Reactivos: 4,5-difenil-1H-



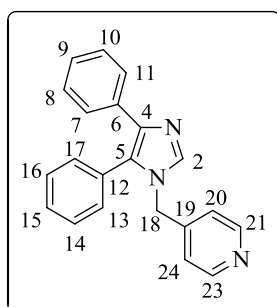
imidazol (1 g, 4.5 mmol), carbonato potásico (746.3 mg, 5.4 mmol), bromuro de bencilo (769.5 mg, 4.5 mmol). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 746 mg, 54%. P.f. 116 - 117 °C (lit.<sup>161</sup> 116 -

118 °C).  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.95 (s, 1H, H-2), 7.55 - 7.3 (m, 5H, H-Ph), 7.24 - 7.05 (m, 8H, H-Ph), 6.91 - 6.75 (m, 2H, H-20, H-24), 5.05 (s, 2H, H-18).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  137.8 (C-2), 137.2 (C), 137.1 (C), 134.7 (C), 130.6 (2 CH-Ph), 130.3 (CH-Ph), 128.8 (2 CH-Ph), 128.6 (CH-Ph), 128.4 (2 CH-Ph), 128.2 (C), 128.0 (2 CH-Ph), 127.4 (C-22), 126.7 (C-20, C-24), 126.0 (C),

<sup>161</sup> Saikat, D. S.; Parasa, H.; Dilip, K., An efficient and one-pot synthesis of 2,4,5-trisubstituted and 1,2,4,5-tetrasubstituted imidazoles catalyzed by  $\text{InCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 2216-2220.

125.8 (2 CH-Ph), 48.2 (C-18). HPLC: Pureza = 97%, t.r. = 3.58 min. MS (ESI+): m/z 311 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 85.13%, H 5.85%, N 9.03%. Hallado: C 84.97%, H 6.12%, N 9.10%.

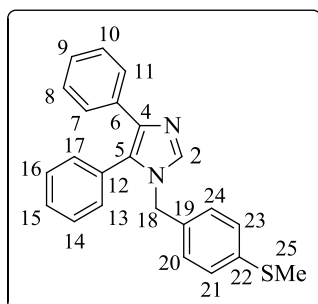
**4-((4,5-Difenil-1H-imidazol-1-il)metil)piridina (36):** Método D: Reactivos: 4,5-



difenil-1H-imidazol (700 mg, 3.1 mmol), carbonato potásico (513 mg, 3.8 mmol), 4-(bromometil)piridina (784 mg, 3.1 mmol), DMF anhidra (32 mL). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido beige. Rendimiento: 88.7 mg,

9%. P.f. 122 - 123 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.42 - 8.35 (m, 2H, H-21, H-23), 7.98 (s, 1H, H-2), 7.41 - 7.32 (m, 5H, H-7, H-11, H-13, H-17, H-9 o H-15), 7.18 - 7.13 (m, 4H, H-14, H-16, H-8, H-10), 7.11 - 7.04 (m, 1H, H-9 o H-15), 6.86 - 6.79 (m, 2H, H-20, H-24), 5.11 (s, 2H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 150.4 (C-21, C-23), 147.0 (C-19), 138.9 (C-2), 137.9 (C-4 o C-5), 135.3 (C-6 o C-12), 131.3 (2 CH-Ph), 130.7 (C-9 o C-15), 129.7 (2 CH-Ph), 129.5 (C-6 o C-12), 128.9 (C-4 o C-5), 128.8 (2 CH-Ph), 126.8 (C-9 o C-15), 126.5 (2 CH-Ph), 122.1 (C-20, C-24), 47.5 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.72 min. MS (ESI+): m/z 312 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>) Calculado: C 81.00%, H 5.50%, N 13.49%. Hallado: C 80.78%, H 5.36%, N 13.19%.

**1-(4-(Metiltio)bencil)-4,5-difenil-1H-imidazol (37):** Método D: Reactivos: 4,5-

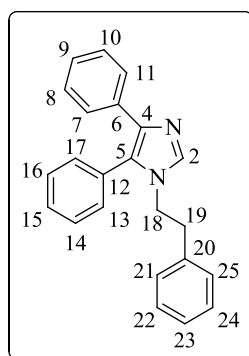


difenil-1H-imidazol (500 mg, 2.3 mmol), carbonato potásico (372.6 mg, 2.7 mmol), bromuro de 4-(metiltio)-bencilo (492.6 mg, 2.3 mmol), DMF anhidra (15 mL). Condiciones de reacción: 24 h a

## Parte Experimental

reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:5) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 339.2 mg, 42%. P.f. 194 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.85 (s, 1H, H-2), 7.56 – 7.25 (m, 10H, H-Ph), 7.17 – 7.08 (m, 2H, H-20, H-24), 6.93 – 6.83 (m, 2H, H-21, H-23), 5.14 (s, 2H, H-18), 2.41 (s, 3H, H-25). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 138.0 (C-22), 136.6 (C-2), 133.0 (C-4), 132.0 (C-19), 130.8 (C-14, C-16 o C-8, C-10), 130.3 (C-6 o C-12), 129.6 (C-9 o C-15), 129.1 (C-13, C-17), 128.8 (C-9 o C-15), 128.4 (C-14, C-16 o C-8, C-10), 127.9 (C-21, C-23), 127.8 (C-5 o C-6 o C-12), 127.7 (C-5 o C-6 o C-12), 126.6 (C-7, C-11), 125.8 (C-20, C-24), 48.6 (C-18), 14.5 (C-25). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.67 min. MS (ESI+): m/z 357 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>S) Calculado: C 77.49%, H 5.65%, N 7.86%. Hallado: C 77.31%, H 5.48%, N 7.77%

**1-Fenetil-4,5-difenil-1H-imidazol (38):** Método D: Reactivos: 4,5-difenil-1H-

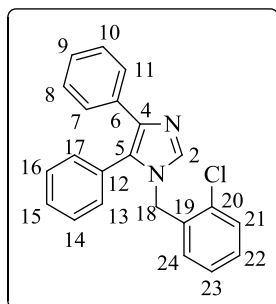


imidazol (500 mg, 2.3 mmol), carbonato potásico (372.6 mg, 2.7 mmol), bromoetil benceno (318.9 mg, 2.3 mmol), DMF anhidra (20 mL). Condiciones de reacción: 48 h a temperatura ambiente. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 70 mg, 10%. P.f. 157 °C (lit.<sup>162</sup> 156 – 157 °C). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.50 – 7.43 (m, 6H, H-2, H-Ph), 7.30 – 7.17 (m, 7H, H-Ph), 7.16 – 7.10 (m, 1H, H-Ph), 6.96 – 6.89 (m, 2H, H-Ph), 4.06 – 3.97 (m, 2H, H-18), 2.82 (dd, J = 8.0, 6.8 Hz, 2H, H-19). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 138.1 (C-4), 137.3 (C-20), 136.7 (C-2), 134.5 (C-5), 130.9 (2 CH-Ph), 130.8 (C), 129.1 (2 CH-Ph), 128.7 (C-

<sup>162</sup> Romuald, B.; Witold, E. H.; Grzegorz, M., Isonitroso ketones. Part V. Syntheses of 2-unsubstituted imidazole 3-oxides from isonitroso ketones and anhydroformaldehydoamines. *Rocz. Chem.* **1977**, *51*, 49-57.

22, C-24), 128.6 (C-21, C-25), 128.3 (CH-Ph), 128.1 (2 CH-Ph), 127.0 (C-Ph), 126.9 (CH-Ph), 126.5 (2 CH-Ph), 126.3 (CH-Ph), 46.6 (C-18), 37.5 (C-19). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 0.99 min. MS (ESI+): m/z 325 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 85.15%, H 6.21%, N 8.63%. Hallado: C 85.20%, H 6.28%, N 8.54%.

**1-(2-Clorobencil)-4,5-difenil-1H-imidazol (39):** Método D: Reactivos: 4,5-

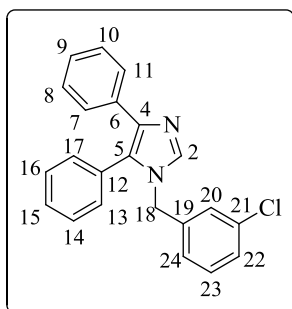


difenil-1H-imidazol (500 mg, 2.3 mmol), carbonato potásico (372.6 mg, 2.7 mmol), 1-(bromometil)-2-clorobenceno (466.4 mg, 2.3 mmol), DMF anhidra (20 mL). Condiciones de reacción: 6 días a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido

blanco. Rendimiento: 230.1 mg, 30%. P.f. 137 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.93 (s, 1H, H-2), 7.48 -7.06 (m, 13H, H-Ph), 6.78 - 6.67 (m, 1H, H-21 o H-24), 5.16 (s, 2H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 138.5 (C-2), 137.5 (C-4), 135.0 (C-5 o C-20), 134.9 (C-5 o C-20), 131.7 (C-19), 130.9 (2 CH-Ph), 130.5 (C-6), 129.7 (CH-Ph), 129.6 (CH-Ph), 129.3 (2 CH-Ph), 129.2 (CH-Ph), 129.2 (CH-Ph), 128.7 (CH-Ph), 128.4 (2 CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 126.5 (CH-Ph), 126.2 (2 CH-Ph), 46.1 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.76 min. MS (ESI+): m/z 347 [M + 3], 345 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 76.63%, H 4.97%, N 8.12%. Hallado: C 76.44%, H 4.69%, N 7.84%.

## Parte Experimental

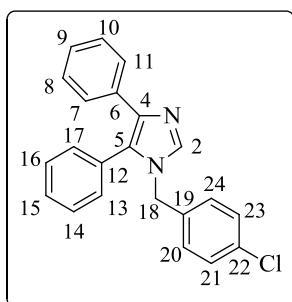
**1-(3-Clorobencil)-4,5-difenil-1H-imidazol (40):** Método D: Reactivos: 4,5-



difenil-1H-imidazol (500 mg, 2.3 mmol), carbonato potásico (372.6 mg, 2.7 mmol), 1-(bromometil)-3-clorobenceno (466.4 mg, 2.3 mmol), DMF anhidra (20 mL). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido

beige. Rendimiento: 217.5 mg, 28%. P.f. 132 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.01 (s, 1H, H-2), 7.79 – 7.08 (m, 12H, H-Ph), 6.91 (s, 1H, H-20), 6.86 – 6.81 (m, 1H, H-24), 5.09 (s, 2H, H-18).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  140.0 (C-4), 138.4 (C-2), 137.5 (C-19), 135.0 (C-5), 133.4 (C-6), 131.0 (C-8, C-10 o C-14, C-16), 130.7 (C-23 o C-9 o C-15), 130.6 (C-21), 129.3 (C-7, C-11 o C-13, C-17), 129.1 (C-22), 128.5 (C-12), 128.4 (2 CH-Ph), 127.8 (C-23 o C-9 o C-15), 127.2 (C-20), 126.5 (C-9 o C-15), 126.2 (2 CH-Ph), 125.9 (C-24), 47.7 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.76 min. MS (ESI+): m/z 347 [M + 3], 345 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2$ ) Calculado: C 76.63%, H 4.97%, N 8.12%. Hallado: C 76.92%, H 4.69%, N 7.90%.

**1-(4-Clorobencil)-4,5-difenil-1H-imidazol (41):** Método D: Reactivos: 4,5-

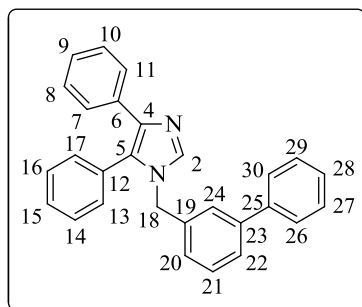


difenil-1H-imidazol (500 mg, 2.3 mmol), carbonato potásico (372.6 mg, 2.7 mmol), 1-(bromometil)-4-clorobenceno (466.4 mg, 2.3 mmol), DMF anhidra (20 mL). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido

blanco. Rendimiento: 206.2 mg, 26%. P.f. 124 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.88 (s, 1H, H-2), 7.61 – 7.36 (m, 5H, H-7, H-11, H-13, H-17, H-9 o H-15),

7.32 – 7.28 (m, 2H, H-21, H-23), 7.24 – 7.07 (m, 5H, H-Ph), 6.92 – 6.87 (m, 2H, H-20, H-24), 5.07 (s, 2H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  138.3 (C-2), 137.5 (C-4 o C-5), 136.7 (C-19), 135.1 (C-6), 132.4 (C-22), 131.0 (2 CH-Ph), 130.7 (C-12), 129.3 (2 CH-Ph), 129.1 (C-9 o C-15), 129.0 (C-20, C-24), 128.8 (C-21, C-23), 128.6 (C-4 o C-5), 128.4 (2 CH-Ph), 126.5 (C-9 o C-15), 126.2 (2 CH-Ph), 47.6 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.82 min. MS (ESI+): m/z 347 [M + 3], 345 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2$ ) Calculado: C 76.63%, H 4.97%, N 8.12%. Hallado: C 76.86%, H 4.95%, N 7.89%.

**1-([1,1'-Bifenil]-3-il-metil)-4,5-difenil-1H-imidazol (42):** Método D: Reactivos:

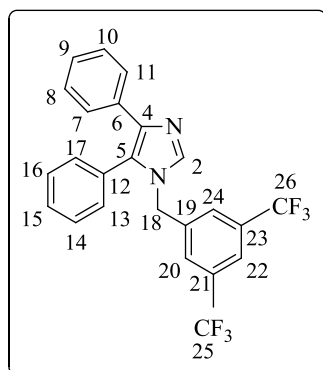


4,5-difenil-1H-imidazol (500 mg, 2.3 mmol), carbonato potásico (372.6 mg, 2.7 mmol), 3-(bromometil)-1,1'-bifenilo (560.5 mg, 2.3 mmol), DMF anhidra (20 mL). Condiciones de reacción: 1.5 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de

etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido beige. Rendimiento: 381.3 mg, 43%. P.f. 114 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.04 (s, 1H, H-2), 7.57 – 7.04 (m, 18H, H-Ph), 6.91 (dt,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 1H, H-Ph), 5.14 (s, 2H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}$ ):  $\delta$  140.4 (C), 139.8 (C), 138.1 (C-2), 138.0 (C), 137.2 (C), 134.8 (C), 130.8 (2 CH-Ph), 130.6 (C), 129.3 (CH-Ph), 129.1 (CH-Ph), 129.0 (2 CH-Ph), 128.8 (2 CH-Ph), 128.3 (C), 128.1 (2 CH-Ph), 127.7 (CH-Ph), 126.7 (2 CH-Ph), 126.1 (CH-Ph), 126.1 (CH-Ph), 126.0 (2 CH-Ph), 125.6 (2 CH-Ph), 48.0 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.10 min. MS (ESI+): m/z 387 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_2$ ) Calculado: C 87.01%, H 5.74%, N 7.24%. Hallado: C 87.15%, H 5.83%, N 7.29%.

## Parte Experimental

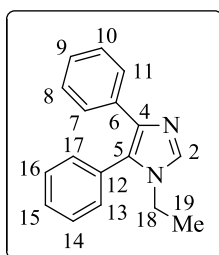
**1-(3,5-Dimetilbencil)-4,5-difenil-1H-imidazol (43):** Método D: Reactivos: 4,5-



difenil-1H-imidazol (150 mg, 0.7 mmol), carbonato potásico (113.2 mg, 0.8 mmol), 1-(bromometil)-3,5-bis(trifluorometil)benceno (208.8 mg, 0.7 mmol), DMF anhidra (6 mL). Condiciones de reacción: 2.5 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando diclorometano/metanol (10:1) obteniendo un aceite marrón. Rendimiento: 446.4

mg, 77%.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.09 (s, 1H, H-2), 7.94 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-22), 7.47 - 7.42 (m, 2H, H-20, H-24), 7.41 - 7.34 (m, 5H, H-Ph), 7.20 - 7.06 (m, 5H, H-Ph), 5.30 (s, 2H, H-18).  $^{13}\text{C-NMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  140.9 (C-2), 138.9 (C), 138.0 (C), 135.1 (C), 131.2 (2 CH-Ph), 130.9 (C), 130.8 (c,  $J = 33.1$  Hz, C-21, C-23), 129.7 (2 CH-Ph), 129.5 (CH-Ph), 129.0 (C), 129.0 (c,  $J = 3.0$  Hz, C-20, C-24), 128.8 (2 CH-Ph), 126.9 (CH-Ph), 126.5 (2 CH-Ph), 123.7 (c,  $J = 273.7$  Hz, C-25, C-26), 122.1 (c,  $J = 3.0$  Hz, C-22), 47.9 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.57 min. MS (ESI+):  $m/z$  447 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{N}_2$ ) Calculado: C 64.58%, H 3.61%, N 6.28%. Hallado: C 64.81%, H 3.70%, N 6.27%.

**1-Butil-4,5-difenil-1H-imidazol (44)**<sup>163</sup>: Método D: Reactivos: 4,5-difenil-1H-



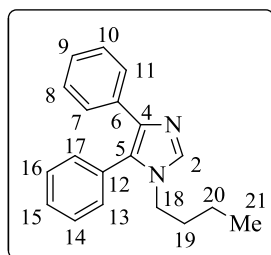
imidazol (500 mg, 2.3 mmol), hidruro sódico (54.5 mg, 2.3 mmol), 1-bromoetano (247.2 mg, 2.3 mmol), THF anhidro (20 mL). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 190.6

mg, 34%. P.f. 94 - 95 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.84 (s, 1H, H-2), 7.55

<sup>163</sup> Simonov, A. M.; Garnovskii, A. D., Amination of heterocyclic compounds containing the imidazole ring. *Zh. Obshch. Khim.* **1961**, 31, 114-17.

- 7.45 (m, 3H, H-Ph), 7.38 - 7.33 (m, 4H, H-Ph), 7.21 - 7.12 (m, 2H, H-Ph), 7.12 - 7.02 (m, 1H, H-Ph), 3.80 (c,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-18), 1.13 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, H-19).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  136.8 (C-2, C-6 o C-12), 134.9 (C-4), 130.7 (C-6 o C-12), 130.6 (2 CH-Ph), 129.1 (2 CH-Ph), 128.6 (CH-Ph), 128.0 (2 CH-Ph), 127.9 (C-5), 125.8 (3 CH-Ph), 39.4 (C-18), 16.1 (C-19). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.97 min. MS (ESI+):  $m/z$  250 [M + 2]. Análisis elemental ( $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2$ ) Calculado: C 82.22%, H 6.49%, N 11.28%. Hallado: C 82.50%, H 6.85%, N 11.54%.

**1-Butil-4,5-difenil-1H-imidazol (45):** Método D: Reactivos: 4,5-difenil-1H-

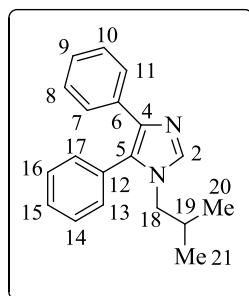


imidazol (500 mg, 2.3 mmol), hidruro sódico (54.5 mg, 2.3 mmol), 1-bromobutano (311.0 mg, 2.3 mmol), THF anhidro (20 mL). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un

sólido blanco. Rendimiento: 215.9 mg, 34%. P.f. 95 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.81 (s, 1H, H-2), 7.63 - 7.29 (m, 7H, H-Ph), 7.22 - 6.98 (m, 3H, H-8, H-10 o H-14, H-16), 3.78 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-18), 1.42 (tt,  $J = 7.8, 6.6$  Hz, 2H, H-19), 1.21 - 1.00 (m, 2H, H-20), 0.71 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, H-21).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  137.4 (C-2), 136.7 (C-4), 134.9 (C-5 o C-6 o C-12), 130.8 (C-5 o C-6 o C-12), 130.6 (2 CH-Ph), 129.1 (2 CH-Ph), 128.7 (CH-Ph), 128.1 (C5 o C-6 o C-12), 128.0 (2 CH-Ph), 125.9 (CH-Ph), 125.8 (2 CH-Ph), 44.0 (C-18), 32.0 (C-19), 19.0 (C-20), 13.2 (C-21). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.38 min. MS (ESI+):  $m/z$  278 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2$ ) Calculado: C 82.57%, H 7.29%, N 10.14%. Hallado: C 82.78%, H 7.12%, N 10.43%.

## Parte Experimental

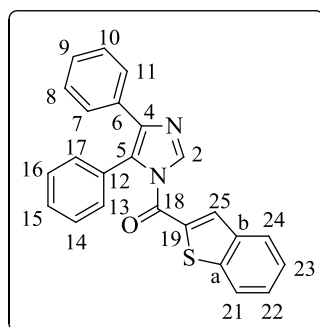
**1-Isobutil-4,5-difenil-1H-imidazol (46):** Método D: Reactivos: 4,5-difenil-1H-



imidazol (500 mg, 2.3 mmol), hidruro sódico (54.5 mg, 2.3 mmol), 1-bromo-2-metilpropano (311.0 mg, 2.3 mmol), THF anhidro (20 mL). Condiciones de reacción: 24 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 18.7 mg, 3%. P.f. 139 °C. <sup>1</sup>H-RMN

(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.79 (s, 1H, H-2), 7.54 – 7.43 (m, 3H, H-Ph), 7.37 – 7.31 (m, 4H, H-Ph), 7.20 – 7.12 (m, 2H, H-Ph), 7.10 – 7.03 (m, 1H, H-Ph), 3.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-18), 1.69 – 1.53 (m, 1H, H-19), 0.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, H-20, H-20'). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 138.5 (C-2), 137.3 (C-4), 135.5 (C-Ph), 131.5 (C-Ph), 131.3 (2 CH-Ph), 129.7 (2 CH-Ph), 129.3 (C-Ph), 128.8 (C-5), 128.6 (2 CH-Ph), 126.5 (CH-Ph), 126.5 (2 CH-Ph), 52.2 (C-18), 29.2 (C-19), 20.1 (C-20, C-20'). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.34 min. MS (ESI+): *m/z* 278 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>) Calculado: C 82.57%, H 7.29%, N 10.14%. Hallado: C 82.61%, H 7.43%, N 9.89%.

**Benzotiofen-2-il(4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)metanona (47):** Método D:

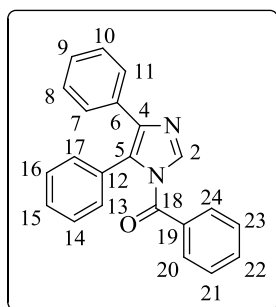


Reactivos: 4,5-difenil-1H-imidazol (500 mg, 2.3 mmol), trietilamina (229.3 mg, 2.3 mmol), cloruro de 2-carbonilo-benzotiofeno (669.1 mg, 3.4 mmol), acetato de etilo (15 mL). Condiciones de reacción: 2.5 h a temperatura ambiente. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido beige.

Rendimiento: 46.5 mg, 5%. P.f. 172 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.10 (s, 1H, H-2), 7.89 (s, 1H, H-25), 7.80 (ddd, *J* = 8.2, 3.2, 1.3 Hz, 2H, H-21, H-24), 7.49

- 7.10 (m, 12H, H-Ph, H-22, H-23).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  160.6 (C-18), 143.1 (C-a), 140.6 (C-4), 138.3 (C-2), 138.1 (C), 135.8 (C), 133.3 (C-25), 133.0 (C), 130.2 (2 CH-Ph), 129.9 (C), 128.6 (2 CH-Ph), 128.4 (C), 128.3 (CH-Ph), 128.2 (2 CH-Ph), 127.6 (C-22 o C-23), 127.5 (CH-Ph), 126.3 (C-24), 125.6 (C-22 o C-23), 122.8 (C-21). MS (ESI+): m/z 381 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ ) Calculado: C 81.46%, H 4.97%, N 8.64%. Hallado: C 75.61%, H 4.33%, N 7.48%.

**(4,5-Difenil-1H-imidazol-1-il)(fenil)metanona (48):** Método D: Reactivos: 4,5-



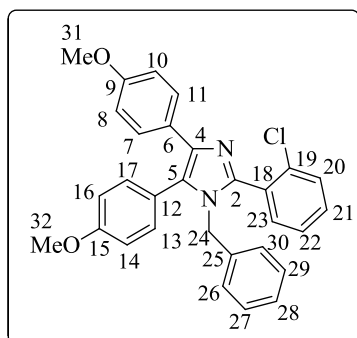
difenil-1H-imidazol (500 mg, 2.3 mmol), trietilamina (229.3 mg, 2.3 mmol), cloruro de benzoilo (382.7 mg, 2.7 mmol), acetato de etilo (15 mL). Condiciones de reacción: 1.5 h a temperatura ambiente. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido blanco.

Rendimiento: 303.9 mg, 41%. P.f. 183 °C (P.f. 186 - 187 °C<sup>164</sup>).  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.97 (s, 1H, H-2), 7.82 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-20, H-24), 7.65 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-Ph), 7.51 (m, 6H, H-Ph), 7.30 - 7.23 (m, 6H, H-Ph).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  166.9 (C-18), 139.8 (C-2), 134.4 (C), 133.6 (C), 133.2 (C), 132.4 (C), 130.8 (2 CH-Ph), 130.5 (2 CH-Ph), 129.6 (CH-Ph), 129.2 (2 CH-Ph), 128.9 (CH-Ph), 128.8 (2 CH-Ph), 128.7 (CH-Ph), 128.6 (2 CH-Ph), 127.7 (CH-Ph), 127.2 (2 CH-Ph). MS (ESI+): m/z 325 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ ) Calculado: C 81.46%, H 4.97%, N 8.64%. Hallado: C 81.20%, H 5.00%, N 8.72%.

<sup>164</sup> Pal, L. J.; Taek, L. G.; Hee, L. Y.; Sik, L. S.; Sun, K. I.; Ha, R. Z., Kinetics studies on the hydrolysis of *N*-benzoyl-4,5-diphenylimidazole derivatives. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*, 1357-1360.

## Parte Experimental

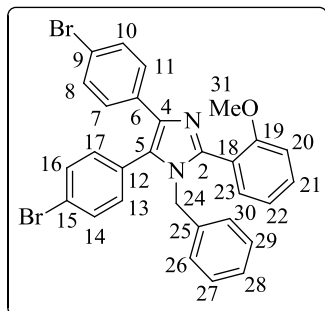
### 1-Bencil-2-(2-clorofenil)-4,5-bis(4-metoxifenil)-1H-imidazol (49): Método D:



Reactivos: 2-(2-clorofenil)-4,5-bis(4-metoxifenil)-1H-imidazol (150 mg, 0.4 mmol), carbonato potásico (62.9 mg, 0.5 mmol), bromuro de bencilo (65.6 mg, 0.4 mmol), THF anhidro (3 mL). Condiciones de reacción: 8 días a reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco.

Rendimiento: 92 mg, 50%. P.f. 130 - 131 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.60 - 7.54 (m, 1H, H-20), 7.50 - 7.43 (m, 2H, H-21, H-23), 7.40 - 7.32 (m, 3H, H-7, H-11, H-22), 7.21 - 7.15 (m, 2H, H-13, H-17), 7.14 - 7.08 (m, 3H, H-27, 29), 7.00 - 6.94 (m, 2H, H-8, H-10), 6.81 - 6.75 (m, 2H, H-8, H-10), 6.66 - 6.60 (m, 2H, H-26, H-30), 4.86 (s, 2H, H-24), 3.77 (s, 3H, H-32), 3.68 (s, 3H, H-31).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  159.9 (C-15), 158.2 (C-9), 144.5 (C-2), 137.3 (C-25), 136.9 (C-4), 133.9 (C-18 o C-19), 133.1 (C-21 o C-23), 132.6 (C-13, C-17), 131.6 (C-21 o C-23), 130.7 (C-18 o C-19), 130.1 (C-20), 128.7 (C-27, C-29), 128.5 (C-5), 127.7 (C-28), 127.6 (C-6), 127.5 (C-7, C-11), 126.4 (C-26, C-30), 124.9 (C-22), 122.9 (C-12), 114.9 (C-14, C-16), 114.0 (C-8, C-10), 55.6 (C-32), 55.4 (C-31), 47.7 (C-24). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.47 min. MS (ESI+): m/z 484 [M + 3], 482 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_2$ ) Calculado: C 74.91%, H 5.24%, N 5.82%. Hallado: C 74.69%, H 5.06%, N 5.79%.

**1-Bencil-4,5-bis(4-bromofenil)-2-(2-metoxifenil)-1H-imidazol (50):** Método D:



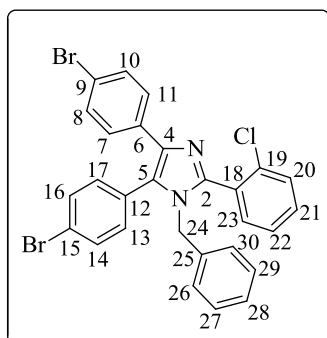
Reactivos: 2-(2-metoxifenil)-4,5-bis(4-bromofenil)-1H-imidazol (150 mg, 0.3 mmol), carbonato potásico (51.1 mg, 0.4 mmol), bromuro de bencilo (53.0 mg, 0.3 mmol), THF anhidro (3 mL).  
 Condiciones de reacción: 8 días a reflujo.  
 Purificación: IsoleraOne empleando acetato de

etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 61.6 mg, 35%.

P.f. 192 °C. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.59 – 7.55 (m, 2H, H-14, H-16), 7.47 – 7.42 (m, 1H, H-21), 7.42 – 7.39 (m, 2H, H-8, H-10), 7.38 (dd, *J* = 7.5, 1.8 Hz, 1H, H-23), 7.34 – 7.30 (m, 2H, H-7, H-11), 7.20 – 7.16 (m, 2H, H-13, H-17), 7.12 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H, H-20), 7.10 – 7.06 (m, 3H, H-27, 29), 7.00 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, H-22), 6.63 – 6.60 (m, 2H, H-26, H-30), 4.90 (s, 2H, H-24), 3.75 (s, 3H, H-31). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 157.5 (C-19), 146.2 (C-2), 137.3 (C-25), 136.4 (C-4), 134.1 (C-6), 133.1 (C-13, C-17), 132.6 (C-23), 132.5 (C-14, C-16), 131.7 (C-21), 131.6 (C-8, C-10), 130.1 (C-12), 128.8 (C-5), 128.6 (C-7, C-11), 128.5 (C-27, C-29), 127.5 (C-28), 126.5 (C-26, C-30), 122.8 (C-15), 121.0 (C-22), 120.0 (C-9 o C-18), 119.8 (C-9 o C-18), 112.0 (C-20), 55.9 (C-31), 48.0 (C-24).  
 HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 10.23 min (grad.: 10-95 en 10 min). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 577 [M + 3], 575 [M + 1], 573 [M - 1]. Análisis elemental (C<sub>29</sub>H<sub>22</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O)  
 Calculado: C 60.65%, H 3.86%, N 4.88%. Hallado: C 60.44%, H 3.91%, N 4.76%.

## Parte Experimental

### 1-Bencil-4,5-bis(4-bromofenil)-2-(2-clorofenil)-1H-imidazol (51): Método D:



Reactivos: 2-(2-clorofenil)-4,5-bis(4-bromofenil)-1H-imidazol (150 mg, 0.3 mmol), carbonato potásico (51.1 mg, 0.4 mmol), bromuro de bencilo (51.3 mg, 0.3 mmol), THF anhidro (3 mL). Condiciones de reacción: 8 días a reflujo. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:2) obteniendo un sólido blanco.

Rendimiento: 20 mg, 12%. P.f. 180 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.58 – 7.52 (m, 3H, H-14, H-16, H-20), 7.48 (dd,  $J = 7.6, 1.7$  Hz, 1H, H-23), 7.45 (td,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H, H-21), 7.40 – 7.33 (m, 3H, H-8, H-10, H-22), 7.30 – 7.26 (m, 2H, H-7, H-11), 7.19 – 7.16 (m, 2H, H-13, H-17), 7.07 – 7.03 (m, 3H, H-27, 29), 6.57 (ddd,  $J = 4.6, 2.5, 1.3$  Hz, 2H, H-26, H-30), 4.86 (s, 2H, H-24).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  145.6 (C-2), 136.8 (C-25), 136.4 (C-4), 133.9 (C-6 o C-19), 133.8 (C-6 o C-19), 133.2 (C-13, C-17, C-23), 133.1 (C-12), 132.6 (C-14, C-16), 131.9 (C-21), 131.7 (C-8, C-10), 130.2 (C-20), 129.7 (C-5), 128.9 (C-18), 128.8 (C-7, C-11), 128.5 (C-27, C-29), 127.8 (C-22, C-28), 126.4 (C-26, C-30), 123.0 (C-15), 120.0 (C-9), 48.1 (C-24). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 9.97 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 581 [M + 3], 579 [M + 1], 577 [M - 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{28}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{ClN}_2$ ) Calculado: C 58.11%, H 3.31%, N 4.84%. Hallado: C 58.23%, H 3.42%, N 4.90%.

## 2. SÍNTESIS DE TIAZOLES Y BENZOTIAZOLES

### Procedimiento general de síntesis de los derivados de tiazol y benzotiazol.

#### Método general A:

*Procedimiento general de síntesis de cloruros de ácido*<sup>165</sup>.

En un matraz provisto de refrigerante y bajo atmósfera inerte, se adiciona el ácido correspondiente (1 eq.) y SOCl<sub>2</sub> (1.5 eq.). La mezcla de reacción se calienta a 80 °C durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se elimina el exceso de SOCl<sub>2</sub> evaporando a presión reducida, y el cloruro de ácido obtenido se utiliza directamente en la reacción de formación de la amida.

*Procedimiento general de síntesis de amidas mediante síntesis orgánica asistida por microondas*<sup>83</sup>.

En un vial de microondas, se adiciona el cloruro de ácido formado (1 eq.) sobre el derivado de amina (1 eq.). El vial se introduce en el reactor de microondas y se calienta a la temperatura y el tiempo indicado en cada caso. Transcurrido este tiempo, se adiciona diclorometano (50 mL) y la fase orgánica se extrae con una disolución 0.1M de HCl (3 x 50 mL). A continuación, la fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 50 mL) y después con una disolución saturada de NaCl (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando el equipo IsoleraOne o de forma no automática, según se determina en cada caso. Todos los cloruros de ácido necesarios para la síntesis de los derivados amida, se sintetizaron *in situ* excepto: Cloruro de 2-(4-

---

<sup>165</sup> Raparti, V.; Chitre, T.; Bothara, K.; Kumar, V.; Dangre, S.; Khachane, C.; Gore, S.; Deshmane, B., Novel 4-(morpholin-4-yl)-N-(arylidene)benzohydrazides: Synthesis, antimycobacterial activity and QSAR investigations. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3954–3960.

## Parte Experimental

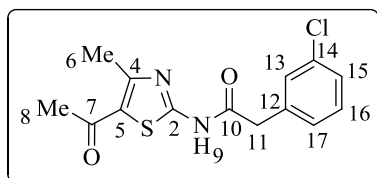
---

clorofenil)acetilo, Cloruro de 2-(2,5-dimetoxi)acetilo y Cloruro de 2-fenilbutanoilo que se adquirieron de la casa comercial Sigma Aldrich.

**Método general B<sup>84</sup>:** Se prepara una disolución del ácido carboxílico correspondiente (1 eq.), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (1.3 eq.) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0.2 eq.) en diclorometano. La mezcla se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adiciona el derivado de amina (1 eq.) manteniendo la mezcla a temperatura ambiente hasta desaparición del producto de partida. La fase orgánica se extrae con una disolución de HCl 0.1 M (3 x 50 mL) y después, se realizan lavados de la fase orgánica con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 50 mL), y con una disolución saturada de NaCl (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica por la técnica cromatográfica indicada en cada caso.

**Método general C<sup>85</sup>:** 1 eq. del derivado de 1-(2-amino-4-metiltiazol-5-il)etanona, 1,6 eq. de trietilamina y 5mol% de DMAP se disuelven en 10 mL de DMF, a continuación se adicionan 1.6 eq. del derivado de isocianato correspondiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se adiciona agua (50 mL) y se extrae con acetato de etilo (3 x 50 mL). El crudo se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyentes hexano y acetato de etilo en la proporción que se indica en cada caso.

**N-(5-Acetil-4-metiltiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (52):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (302.9 mg, 1.6 mmol), 1-(2-amino-4-metiltiazol-5-il)etanona (250 mg, 1.6 mmol) y THF (1 mL).

Condiciones de reacción: 10 min bajo

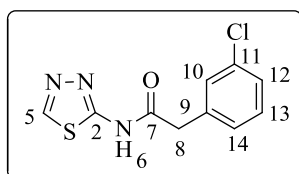
irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna flash utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco.

Rendimiento: 352.8 mg, 72%. P.f. 195 - 196 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 12.71 (s, 1H, H-9), 7.40 (s, 1H, H-13), 7.38 - 7.29 (m, 2H, H-16, H-17), 7.27 (dt, *J* = 7.0, 1.6 Hz, 1H, H-15), 3.82 (s, 2H, H-11), 2.55 (s, 3H, H-6), 2.45 (s, 3H, H-8).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 190.6 (C-7), 169.5 (C-10), 159.3 (C-2), 154.3 (C-4), 136.8 (C-12), 132.9 (C-14), 130.2 (C-16), 129.2 (C-13), 128.1 (C-15), 126.9 (C-17), 125.5 (C-5), 41.1 (C-11), 30.0 (C-8), 18.0 (C-6). HPLC : Pureza > 99%, t.r. = 4.64 min. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 311 [M + 3], 309 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 54.46%, H 4.24%, N 9.07%, S 10.38%. Hallado: C 54.47%, H 4.21%, N 9.06%, S 10.29%.

**2-(3-Clorofenil)-N-(1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida (53):** Método A: Reactivos:



Cloruro de 2-(2-clorofenil)acetilo (466.8 mg, 2.5 mmol), 2-amino-1,3,4-tiadiazol (250 mg, 2.5 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo

irradiación microondas a 110 °C. Purificación:

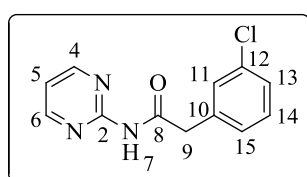
IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener

un sólido blanco. Rendimiento: 253.4 mg, 40%. P.f. 241 - 242 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.80 (s, 1H, H-6), 9.13 (s, 1H, H-5), 7.42 - 7.36 (m, 1H, H-10), 7.36 - 7.25 (m, 3H, H-12, 14), 3.83 (s, 2H, H-8). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.8 (C-7), 159.2 (C-2), 149.5 (C-5), 137.9 (C-9), 133.6 (C-11), 130.9 (CH-

## Parte Experimental

Ph), 130.0 (CH-Ph), 128.8 (CH-Ph), 127.6 (CH-Ph), 41.6 (C-8). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 1.87 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 256 [M + 3], 254 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>OS) Calculado: C 47.34%, H 3.18%, N 15.56%, S 12.64%. Hallado: C 47.98%, H 3.39%, N 16.80%, S, 12.51%.

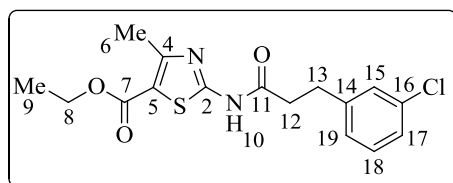
**2-(3-Clorofenil)-N-(pirimidin-2-il)acetamida (54):** Método A: Reactivos:



Cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (492.5 mg, 2.6 mmol), 2-amino-pirimidina (250 mg, 2.6 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación:

IsoleraOne utilizando una mezcla diclorometano/metanol (9:1) para obtener un sólido marrón. Rendimiento: 217.8 mg, 34%. P.f. 174 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.81 (s, 1H, H-7), 8.64 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, H-4, H-6), 7.43 - 7.23 (m, 4H, H-11, H-13, 15), 7.17 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-5), 3.82 (s, 2H, H-9). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.4 (C-8), 159.0 (C-4, C-6), 158.2 (C-2), 138.7 (C-10), 133.4 (C-12), 130.7 (CH-Ph), 129.9 (CH-Ph), 128.8 (CH-Ph), 127.2 (CH-Ph), 117.5 (C-5), 43.3 (C-9). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.14 min. MS (ESI+): m/z 250 [M + 3], 248 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 58.19%, H 4.07%, N 16.97%. Hallado: C 58.20%, H 4.09%, N 16.72%.

**2-(3-(3-Clorofenil)propanamida)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (55):**

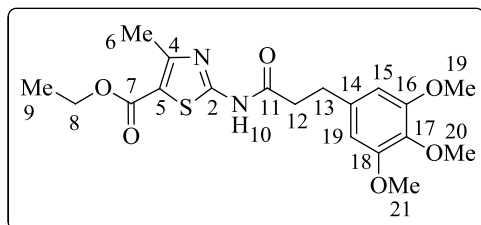


Método B: Se obtuvo según la metodología general descrita anteriormente. Reactivos: ácido 3-(3-clorofenil)propanóico (247.2 mg, 1.3

mmol), EDC (333.2 mg, 1.7 mmol), DMAP (32.7 mg, 0.3 mmol), 2-aminotiazol-5-carboxilato de etilo (250 mg, 1.3 mmol) y diclorometano (40 mL). Condiciones de reacción: 17 h a temperatura ambiente. Purificación:

IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 98 mg, 25%. P.f. 201 - 202 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.48 (s, 1H, H-10), 7.38 - 7.14 (m, 4H, H-15, H-17, 19), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-8), 2.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-13), 2.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-12), 2.53 (s, 3H, H-6), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-9). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.5 (C-11), 162.5 (C-7), 159.7 (C-2), 156.5 (C-4), 143.5 (C-14), 133.3 (C-16), 130.6 (C-12 o C-13), 128.6 (C-15), 127.4 (C-19), 126.5 (C-12 o C-13), 114.2 (C-5), 60.8 (C-8), 36.6 (C-12), 30.1 (C-13), 17.4 (C-6), 14.6 (C-9). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 5.89 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 355 [M + 3], 353 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 54.46%; H 4.86%; N 7.94%; S 9.09%. Hallado: C 54.35%; H 4.72%; N 7.89%; S 8.98%.

**4-Metil-2-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)propanamida)tiazol-5-carboxilato de etilo**



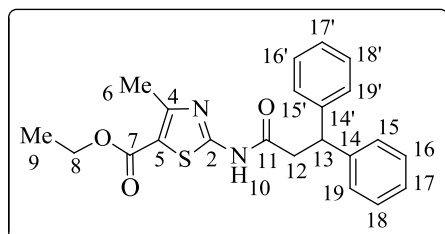
(56): Método B: Se obtuvo según la metodología general descrita anteriormente. Reactivos: ácido 3-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoico (321.6 mg, 1.3 mmol), EDC (333.6 mg, 1.7

mmol), DMAP (32.7 mg, 0.3 mmol), 2-aminotiazol-5-carboxilato de etilo (250 mg, 1.3 mmol) y diclorometano (40 mL). Condiciones de reacción: 17 h a temperatura ambiente. Purificación: Columna flash utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (2:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 381.1 mg, 68%. P.f. 157 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.43 (s, 1H, H-10), 6.50 (s, 2H, H-15, H-19), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-8), 3.69 (s, 6H, H-19, H-21), 3.57 (s, 3H, H-20), 2.99 - 2.77 (m, 2H, H-13), 2.78 - 2.66 (m, 2H, H-12), 2.49 (s, 3H, H-6), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-9). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.4 (C-11), 162.1 (C-7), 159.4 (C-2), 156.1 (C-4), 152.7 (C-16, C-18), 136.2 (C-14 o C-

## Parte Experimental

17), 135.8 (C-14 o C-17), 113.9 (C-5), 105.5 (C-15, C-19), 60.5 (C-8), 59.9 (C-20), 55.7 (C-19, C-21), 36.8 (C-12), 30.7 (C-13), 17.0 (C-6), 14.2 (C-9). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.68 min. MS (ESI+): m/z 409 [M+1]. Análisis elemental (C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S) Calculado: C 55.8%; H 5.92%; N 6.86%; S 7.87%. Hallado: C 55.71%; H 5.82%; N 7.11%; S 7.66%.

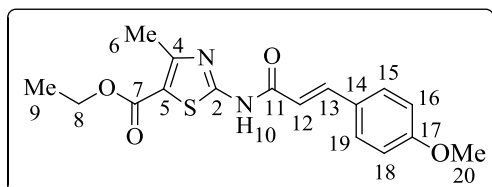
### 2-(3,3-Difenilpropanamida)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (57): Método



B: Se obtuvo según la metodología general descrita anteriormente. Reactivos: ácido 3,3-difenilpropanoico (138.5 mg, 0.6 mmol), EDC (151.8 mg, 0.8 mmol), DMAP (14.9 mg, 0.12 mmol), 2-

aminotiazol-5-carboxilato de etilo (114 mg, 0.6 mmol) y diclorometano (40 mL). Condiciones de reacción: 17 h a temperatura ambiente. Purificación: Columna flash utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 177.4 mg, 74%. P.f. 202 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.52 (s, 1H, H-10), 7.74 - 6.89 (m, 10H, H-15, 19; H-15', 19'), 4.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-13), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-8), 3.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-12), 2.46 (s, 3H, H-6), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-9). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.2 (C-11), 162.0 (C-7), 159.2 (C-2), 156.1 (C-4), 143.6 (C-14, C-14'), 128.4 (4 CH-Ph), 127.4 (4 CH-Ph), 126.3 (C-17, C-17'), 113.8 (C-5), 60.4 (C-8), 46.3 (C-13), 40.7 (C-12), 16.9 (C-6), 14.1 (C-9). HPLC: Pureza: > 99%, t.r. = 6.41 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 395 [M+1]. Análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 66.98%; H 5.62%; N 7.10%; S 8.13%. Hallado: C 66.74%; H 5.51%; N 7.33%; S 8.10%.

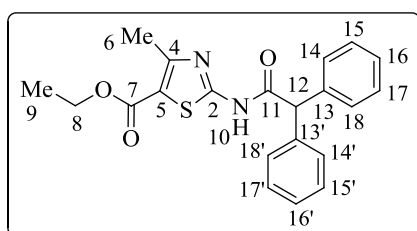
**4-Metiltiazol-(E)-2-(3-(4-metoxifenil)acrilamida)-5-carboxilato de etilo (58):**



Método A: Reactivos: cloruro de (E)-3-(4-metoxifenil)acrilato (264.0 mg, 1.3 mmol), 2-aminotiazol-5-carboxilato de etilo (250 mg, 1.3 mmol) y THF (2

mL). Condiciones de reacción: 15 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 153.3 mg, 34%. P.f. 259 °C. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.85 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H-13), 7.57 – 7.53 (m, 2H, H-15, H-19), 7.00 – 6.85 (m, 2H, H-16, H-18), 6.51 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H-12), 4.33 (c, J = 7.2 Hz, 2H, H-8), 3.86 (s, 3H, H-20), 2.65 (s, 3H, H-6), 1.37 (td, J = 7.1 Hz, 3H, H-9). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.9 (C-11), 164.1 (C-7), 161.8 (C-17), 161.1 (C-2), 155.1 (C-4), 145.0 (C-13), 130.2 (C-15, C-19), 126.8 (C-14), 115.6 (C-12), 114.4 (C-5), 114.3 (C-16, C-18), 60.9 (C-8), 55.4 (C-20), 16.5 (C-6), 14.3 (C-9). HPLC: Pureza = 95%, t.r. = 5.24 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 347 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S) Calculado: C 58.94%, H 5.24%, N 8.09%, S 9.26%. Hallado: C 59.12%, H 5.38%, N 7.83%, S 8.99%.

**4-Metiltiazol-2-(2,2-difenilacetamido)-5-carboxilato de etilo (59):** Método A:



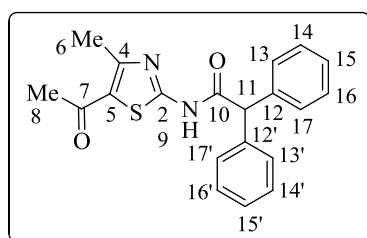
Reactivos: cloruro de 2,2-difenilacetilo (309.1 mg, 1.3 mmol), 2-aminotiazol-5-carboxilato de etilo (250 mg, 1.3 mmol) y THF (2 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C.

Purificación: IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 270.2 mg, 53%. P.f. 163 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.97 (s, 1H, H-10), 7.71 – 6.97 (m, 10H, H-14, 18,

## Parte Experimental

H-14', 18'), 5.32 (s, 1H, H-12), 4.22 (c,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-8), 2.52 (s, 3H, H-6), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, H-9).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  170.8 (C-11), 162.0 (C-7), 159.3 (C-2), 156.2 (C-4), 138.6 (C-13, C-13'), 128.6 (4 CH-Ph), 128.5 (4 CH-Ph), 127.2 (C-16, C-16'), 114.3 (C-5), 60.5 (C-8), 56.0 (C-12), 16.9 (C-6), 14.1 (C-9). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 11.51 min (grad.: 15-95 en 15 min). MS (ESI+): m/z 381 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) Calculado: C 66.29%, H 5.30%, N 7.36%, S 8.43%. Hallado: C 66.44%, H 5.29%, N 7.31%, S 8.19%.

**N-(5-Acetil-4-metiltiazol-2-il)-2,2-difenilacetamida (60):** Método A:

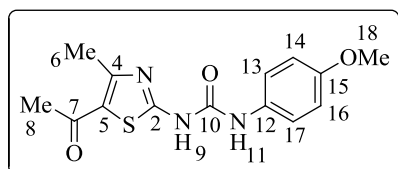


Reactivos: cloruro de 2,2-difenilacetilo (369.7 mg, 1.6 mmol), 1-(2-amino-4-metiltiazol-5-il)etanona (250 mg, 1.6 mmol) y THF (2 mL).

Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación:

IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 206.7 mg, 37%. P.f. 216 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.95 (s, 1H, H-9), 7.62 - 7.00 (m, 10H, H-Ph), 5.33 (s, 1H, H-11), 2.54 (s, 3H, H-6), 2.46 (s, 3H, H-8).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  190.6 (C-7), 170.8 (C-10), 159.2 (C-2), 154.3 (C-4), 138.6 (C-12, C-12'), 128.6 (4 CH-Ph), 128.5 (4 CH-Ph), 127.2 (C-15, C-15'), 125.5 (C-5), 56.0 (C-11), 30.0 (C-8), 18.0 (C-6). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 5.11 min. MS (ESI+): m/z 351 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) Calculado: C 68.55%, H 5.18%, N 7.99%, S 9.15%. Hallado: C 68.34%, H 5.24%, N 8.02%, S 9.31%.

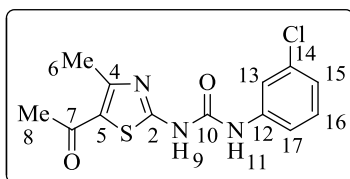
**1-(5-Acetil-4-metiltiazol-2-il)-3-(4-metoxifenil)urea (61):** Método C: Reactivos:



1-(2-amino-4-metiltiazol-5-il)etanona (250.0 mg, 1.6 mmol) y 1-isocianato-4-metoxibenceno (238.6 mg, 2.6 mmol), trietilamina (258.8 mg, 2.6 mmol), DMAP (9.8

mg, 0.1 mmol) y DMF (10 mL). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 243.7 mg, 50%. P.f. 255 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.84 (s, 1H, H-9), 8.85 (s, 1H, H-11), 7.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-13, H-17), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-14, H-16), 3.72 (s, 3H, H-18), 2.52 (s, 3H, H-6), 2.43 (s, 3H, H-8). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 190.17 (C-7), 161.24 (C-10), 155.26 (C-15), 154.2 (C-4), 151.3 (C-2), 131.1 (C-12), 124.7 (C-5), 120.6 (C-13, C-17), 114.1 (C-14, C-16), 55.16 (C-18), 29.86 (C-8), 17.92 (C-6). HPLC: Pureza = 97%, t.r. = 4.08 min. MS (ESI+): *m/z* 306 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 55.07%, H 4.95%, N 13.76%, S 10.50%. Hallado: C 54.94%, H 4.86%, N 13.77%, S 10.48%.

**1-(5-Acetil-4-metiltiazol-2-il)-3-(3-clorofenil)urea (62):** Método C: Reactivos:



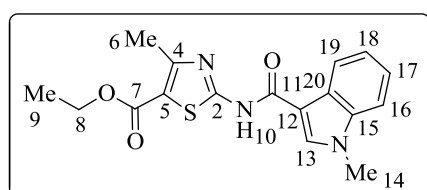
1-(2-amino-4-metiltiazol-5-il)etanona (250.0 mg, 1.6 mmol) y 1-isocianato-3-clorobenceno (245.6 mg, 2.6 mmol), trietilamina (258.8 mg, 2.6 mmol), DMAP (9.8 mg, 0.1 mmol) y DMF (10 mL).

Purificación: acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 148.2 mg, 30%. P.f. 255 °C. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.01 (s, 1H, H-9), 9.24 (s, 1H, H-11), 7.70 (s, 1H, H-13), 7.43 - 7.25 (m, 2H, H-Ph), 7.16 - 6.96 (m, 1H, H-Ph), 2.52 (s, 3H, H-6), 2.43 (s, 3H, H-8). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 190.7 (C-7), 170.2 (C-2), 154.6 (C-4), 150.7 (C-10), 139.9 (C-12), 133.7 (C-14), 130.9 (CH-Ph), 123.1 (CH-Ph), 121.6 (C-5), 118.6 (C-13),

## Parte Experimental

117.7 (CH-Ph), 40.2 (C-6), 30.3 (C-8). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.68 min. MS (ESI+): m/z 312 [M + 3], 310 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 50.40%, H 3.90%, N 13.56%, S 10.35%. Hallado: C 50.18%, H 3.99%, N 13.64%, S 10.08%.

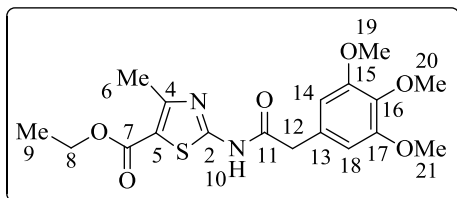
### 4-Metil-2-(1-metil-1H-indol-3-carboxamida)tiazol-5-carboxilato de etilo (63):



Método B: Reactivos: ácido 1-metil-1H-indol-3-carboxílico (235.2 mg, 1.3 mmol), EDC (333.6 mg, 1.7 mmol), DMAP (32.7 mg, 0.3 mmol), 2-aminotiazol-5-carboxilato

de etilo (250 mg, 1.3 mmol) y diclorometano (40 mL). Condiciones de reacción: 17 h a temperatura ambiente. Purificación: Columna flash utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (2:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 201 mg, 44%. P.f. 232 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.50 (s, 1H, H-10), 8.54 (s, 1H, H-13), 8.22 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-19), 7.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-16), 7.37 - 7.03 (m, 2H, H-17, H-18), 4.24 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-8), 3.86 (s, 3H, H-14), 2.57 (s, 3H, H-6), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-9). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 162.7 (C-7, C-11), 160.9 (C-2), 156.6 (C-4), 137.4 (C-15), 135.0 (C-13), 127.1 (C-20), 123.2 (C-17), 122.2 (C-18), 121.4 (C-19), 113.7 (C-5), 111.2 (C-16), 107.0 (C-12), 60.7 (C-8), 33.9 (C-14), 17.4 (C-6), 14.6 (C-9). HPLC: Pureza >99%, t.r. = 5.14 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 344 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 58.34%, H 4.59%, N 12.76%, S 9.74%. Hallado: C 58.63%, H 4.80%, N 12.48%, S 9.51%.

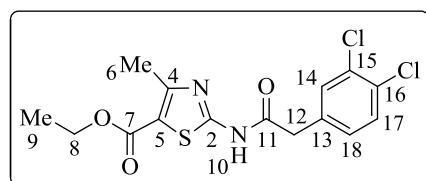
**4-Metil-2-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetamida)tiazol-5-carboxilato de etilo (64):**



Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetilo (327.8 mg, 1.3 mmol), 2-aminotiazol-5-carboxilato de etilo (250 mg, 1.3 mmol) y THF (2 mL).

Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 79.1 mg, 15%. P.f. 156 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.65 (s, 1H, H-10), 6.63 (s, 2H, H-14, H-18), 4.21 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-8), 3.74 (s, 6H, H-19, H-21), 3.70 (s, 2H, 12), 3.62 (s, 3H, H-20), 2.53 (s, 3H, H-6), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-9). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.9 (C-11), 162.0 (C-7), 159.5 (C-2), 156.1 (C-4), 152.7 (C-15, C-17), 136.4 (C-16), 129.9 (C-13), 114.0 (C-5), 106.6 (C-14, C-18), 60.4 (C-8), 59.9 (C-20), 55.8 (C-19, C-21), 41.8 (C-12), 16.9 (C-6), 14.1 (C-9). HPLC: Pureza = 97%, t.r. = 9.35 min (grad.: 15-95 en 10 min). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 395 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S) Calculado: C 54.81%, H 5.62%, N 7.10%, S 8.13%. Hallado: C 55.00%, H 5.69%, N 7.03%, S 8.28%.

**2-(2-(3,4-Diclorofenil)acetamida)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (65):**



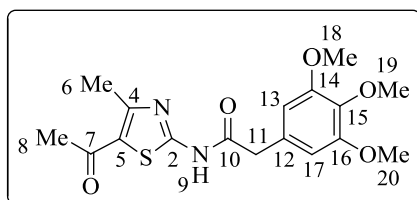
Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4-dicloro)acetilo (300.7 mg, 1.3 mmol), 2-aminotiazol-5-carboxilato de etilo (250 mg, 1.3 mmol) y THF (2 mL). Condiciones de

reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 332.8 mg, 66%. P.f. 204 - 205 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.72 (s, 1H, H-10), 7.61 (s, 1H, H-14), 7.59 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-

## Parte Experimental

17), 7.30 (dd,  $J = 8.3, 1.9$  Hz, 1H, H-18), 4.22 (c,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-8), 3.84 (s, 2H, H-12), 2.53 (s, 3H, H-6), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, H-9).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.3 (C-11), 162.0 (C-7), 159.4 (C-2), 156.1 (C-4), 135.5 (C-13), 131.5 (C-14), 130.8 (C-15 o C-16), 130.4 (C-17), 129.9 (C-18), 129.7 (C-15 o C-16), 114.2 (C-5), 60.5 (C-8), 40.3 (C-12), 17.0 (C-6), 14.1 (C-9). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.13 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  375 [M + 3], 373 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) Calculado: C 48.27%, H 3.78%, N 7.51%, S 8.59%. Hallado: C 48.50%, H 3.81%, N 7.64%, S 8.41%.

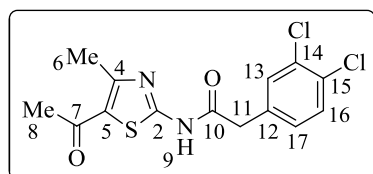
**N-(5-Acetil-4-metiltiazol-2-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetamida (66):** Método



A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetilo (391.5 mg, 1.6 mmol), 1-(2-amino-4-metiltiazol-5-il)etanona (250 mg, 1.6 mmol) y THF (2 mL). Condiciones

de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: Columna cromatográfica utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 169.7 mg, 29%. P.f. 199 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.65 (s, 1H, H-9), 6.65 (s, 2H, H-13, H-17), 3.76 (s, 6H, H-18, H-20), 3.71 (s, 2H, H-11), 3.63 (s, 3H, H-19), 2.57 (s, 3H, H-6), 2.46 (s, 3H, H-8).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  191.0 (C-7), 170.3 (C-10), 159.8 (C-2), 154.7 (C-4), 153.1 (C-14, C-16), 136.9 (C-19), 130.3 (C-12), 125.8 (C-5), 107.1 (C-13, C-17), 60.3 (C-19), 56.2 (C-18, C-20), 42.3 (C-11), 30.4 (C-8), 18.4 (C-6). HPLC: Pureza = 95%, t.r. = 4.57 min. MS (ESI+):  $m/z$  365 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ) Calculado: C 56.03%, H 5.53%, N 7.69%, S 8.80%. Hallado: C 55.87%, H 5.61%, N 7.66%, S 8.59%.

**N-(5-Acetil-4-metiltiazol-2-il)-2-(3,4-diclorofenil)acetamida (67):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(3,4-dicloro)acetilo (300.7 mg, 1.3 mmol), 1-(2-amino-4-metiltiazol-5-il)etanona (250 mg, 1.6 mmol) y THF (1 mL).

Condiciones de reacción: 10 min bajo

irradiación microondas a 110 °C. Purificación: IsoleraOne utilizando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco.

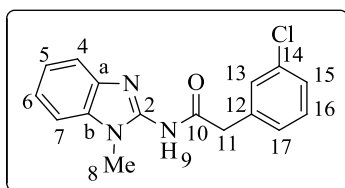
Rendimiento: 122.9 mg, 22%. P.f. 263 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.72 (s, 1H, H-9), 7.62 (s, 1H, H-13), 7.60 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-16), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H-17), 3.85 (s, 2H, H-11), 2.57 (s, 3H, H-6), 2.46 (s, 3H, H-8).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 191.0 (C-7), 169.7 (C-10), 159.2 (C-2), 154.6 (C-4), 135.9 (C-12), 131.9 (C-13), 131.2 (C-14 o C-15), 130.8 (C-16), 130.3 (C-17), 130.1 (C-14 o C-15), 125.9 (C-5), 40.2 (C-11), 30.4 (C-8), 18.4 (C-6).

HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 5.00 min. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 345 [M + 3], 343 [M + 1].

Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 48.99%, H 3.52%, N 8.16%, S 9.34%. Hallado: C 49.75%, H 3.70%, N 8.09%, S 9.19%.

**2-(3-Clorofenil)-N-(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)acetamida (68):** Método A:



Reactivos: Cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (385.7 mg, 2.0 mmol), 2-amino-1-metil-1H-benzimidazol

(250 mg, 1.7 mmol) y THF (0.3 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a

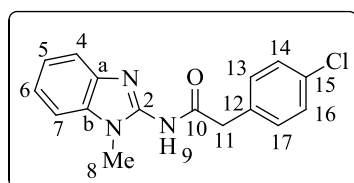
110 °C. Purificación: IsoleraOne empleando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 127.3 mg, 25%.

P.f.: 156 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.44 (s, 1H, H-13), 7.37 - 7.11 (m, 8H, H-benzimidazol, H-Ph), 3.80 (s, 2H, H-11), 3.66 (s, 3H, H-8). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 182.3 (C-10), 153.3 (C-2), 139.2 (C-12), 133.9 (C-14), 130.0 (C-b),

## Parte Experimental

129.6 (C-13), 129.4 (CH), 128.1 (C-a), 127.7 (CH), 126.4 (CH), 123.2 (2 CH), 111.2 (CH), 109.1 (CH), 46.9 (C-11), 28.3 (C-8). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.44 min. MS (ESI+): m/z 302 [M + 3], 300 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 64.11%, H 4.71%, N 14.02%. Hallado: C 63.70%, H 4.35%, N 13.51%.

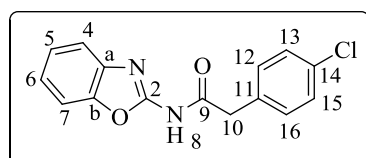
**2-(4-Clorofenil)-N-(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)acetamida (69):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(4-clorofenil)acetilo (317.7 mg, 1.7 mmol), 1-metil-1H-benzimidazol-2-amino (250 mg, 1.7 mmol) y THF (0.5 mL). Condiciones de reacción: 20 min bajo irradiación

microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 158 mg, 31%. P.f.: 196 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.35 – 7.24 (m, 4H, H-Ph), 7.23 – 7.19 (m, 4H, H-benzimidazol), 3.79 (s, 2H, H-11), 3.66 (s, 3H, H-8). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 182.8 (C-10), 153.6 (C-2), 136.0 (C-12), 132.6 (C-15), 132.3 (C-a), 131.1 (C-13, C-17), 130.2 (C-b), 128.5 (C-14, C-16), 128.4 (CH-benzimidazol), 123.4 (CH-benzimidazol), 111.5 (CH-benzimidazol), 109.3 (CH-benzimidazol), 46.8 (C-10), 28.5 (C-8). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 3.28 min. MS (ESI+): m/z 302 [M + 3], 300 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 64.11%, H 4.71%, N 14.02%. Hallado: C 64.02%, H 4.80%, N 13.95%.

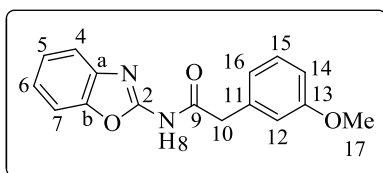
**N-(Benzoxazol-2-il)-2-(4-clorofenil)acetamida (70):** Método A: Reactivos:



cloruro de 2-(4-clorofenil)acetilo (352.5 mg, 1.9 mmol), 2-amino benzoxazol (250 mg, 1.9 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción:

15 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 331.9 mg, 62%. P.f: 193 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.88 (s, 1H, H-8), 7.58 (m, 2H, H-4, H-7), 7.45 - 7.31 (m, 4H, H-12, H-13, H-15, H-16), 7.28 (td, *J* = 7.0, 1.6 Hz, 1H, H-5 o H-6), 7.25 (td, *J* = 7.0, 1.8 Hz, 1H, H-5 o H-6), 3.86 (s, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 168.5 (C-9), 155.0 (C-2), 147.6 (C-a o C-b), 140.6 (C-a o C-b), 133.7 (C-11), 131.5 (C-14), 131.3 (C-12, C-16), 128.2 (C-13, C-15), 124.5 (C-5 o C-6), 123.6 (C-5 o C-6), 118.2 (C-4 o C-7), 110.0 (C-4 o C-7), 41.7 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r = 3.43 min. MS (ESI+): m/z 289 [M + 3], 287 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 62.84%, H 3.87%, N 9.77%. Hallado: C 62.78%, H 3.59%, N 9.64%.

**N-(Benzoxazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (71):** Método A: Reactivos:



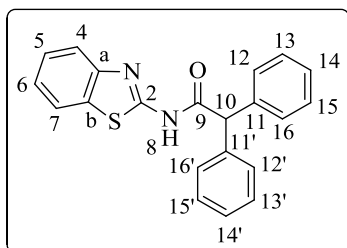
cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (343.5 mg, 1.9 mmol) sobre el 2-amino-benzoxazol (250 mg, 1.9 mmol) y THF (0.5 mL). Condiciones de reacción: 15 min bajo irradiación microondas a

110 °C. Purificación: IsoleraOne empleando una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido marrón. Rendimiento: 154.3 mg, 29%. P.f: 135 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.75 (s, 1H, H-8), 7.64 - 7.51 (m, 2H, H-benzoxazol), 7.35 - 7.17 (m, 4H, H-benzoxazol, H-fenilo), 6.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-14), 6.90 (dd, *J* = 7.9, 6.9 Hz, 1H, H-12), 3.82 (s, 2H, H-10), 3.74 (s, 3H, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 168.8 (C-9), 157.2 (C-15), 155.1 (C-2), 147.6 (C-b), 140.7 (C-a), 131.1 (C-13), 128.3 (CH-benzoxazol), 124.4 (CH-benzoxazol), 123.4 (CH-benzoxazol), 123.1 (C-11), 120.1 (C-12), 118.1 (CH-benzoxazol), 110.6 (C-14), 109.9 (C-16), 55.4 (C-17), 37.4 (C-10). HPLC:

## Parte Experimental

Pureza > 99%, t.r. = 4.15 min. MS (ESI+): m/z 283 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Calculado: C 68.07%, H 5.00%, N 9.92%. Hallado: C 67.87%, H 4.69%, N 9.74%.

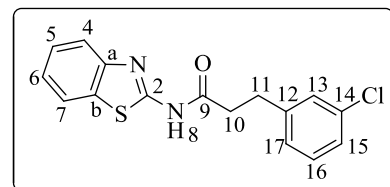
**N-(Benzotiazol-2-il)-2,2'-difenilacetamida (72)**<sup>166</sup>: Método B: Reactivos: ácido



2,2-difenilacético (351.9 mg, 1.7 mmol), EDC (413.6 mg, 2.2 mmol), DMAP (40.3 mg, 0.3 mmol), 2-amino-benzotiazol (250 mg, 1.7 mmol) y diclorometano (40 mL). Condiciones de reacción: 48 h a temperatura ambiente obteniéndose un

sólido blanco sin necesidad de purificación. Rendimiento: 417.9 mg, 73%. P.f: 213 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.83 (s, 1H, H-8), 7.98 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-7), 7.75 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4), 7.50 - 7.22 (m, 12H, H-5, H-6, H-12, 16, H-12', 16'), 5.42 (s, 1H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 171.4 (C-9), 158.2 (C-2), 148.8 (C-a), 139.2 (C-11, C-11'), 131.8 (C-b), 128.9 (8 CH-Ph), 127.6 (C-14, C-14'), 126.6 (C-5), 124.1 (C-6), 122.1 (C-7), 121.0 (C-4), 56.6 (C-10). HPLC: Pureza = 97.17%, t.r. = 7.55 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 345 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 73.23%, H 4.68%, N 8.13%, S 9.31%. Hallado: C 73.50%, H 4.72%, N 8.33%, S 9.26%.

**N-(Benzotiazol-2-il)-3-(3-clorofenil)propanamida (73)**: Método B: Reactivos:

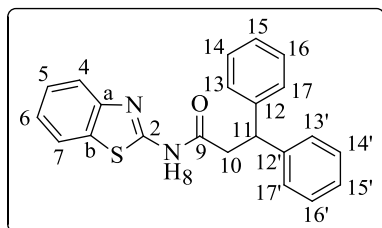


ácido 3-(3-clorofenil)propanoico (306.3 mg, 1.7 mmol), EDC (413.6 mg, 2.2 mmol), DMAP (40.3 mg, 0.3 mmol), 2-amino-benzotiazol (250

<sup>166</sup> Blaettermann, S.; Peters, L.; Ottersbach, P. A.; Bock, A.; Konya, V.; Weaver, C. D.; Gonzalez, A.; Schroeder, R.; Tyagi, R.; Luschnig, P.; et al A biased ligand for OXE-R uncouples G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  signaling within a heterotrimer. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 631-638.

mg, 1.7 mmol) y diclorometano (40 mL). Condiciones de reacción: 17 h a reflujo; a continuación se adiciona DMF (40 mL) manteniéndose a reflujo durante 5 h. Purificación: columna cromatográfica empleando como eluyentes una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 166.2 mg, 32%. P.f. 160 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 12.37 (s, 1H, H-8), 7.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4), 7.48 - 7.39 (m, 1H, H-5), 7.36 (s, 1H, H-13), 7.32 - 7.30 (m, 1H, H-16), 7.30 - 7.28 (m, 1H, H-6), 7.27 - 7.25 (m, 2H, H-15, H-17), 3.02 - 2.90 (m, 2H, H-11), 2.88 - 2.77 (m, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 171.6 (C-9), 158.1 (C-2), 148.9 (C-b), 143.7 (C-12), 133.3 (C-14), 131.8 (C-a), 130.6 (C-16), 128.6 (C-13), 127.4 (C-17), 126.5 (C-5 o C-15), 126.4 (C-5 o C-15), 123.8 (C-6), 122.0 (C-7), 120.8 (C-4), 36.8 (C-10), 30.1 (C-11). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.01 (grad.: 30-95 en 10min). MS (ESI+): *m/z* 319 [M + 3], 317 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS) Calculado: C 60.66%, H 4.14%, N 8.84%, S 10.12%. Hallado: C 60.62%, H 4.09%, N 9.01%, S 9.99%.

***N*-(Benzotiazol-2-il)-3,3'-difenil-propanamida (74):** Método B: Reactivos:



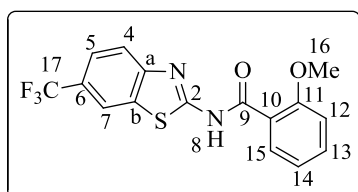
ácido 3,3-difenilpropanoico (375.2 mg, 1.7 mmol), EDC (413.6 mg, 2.2 mmol), DMAP (40.3 mg, 0.3 mmol), 2-amino-benzotiazol (250 mg, 1.7 mmol) y diclorometano (40 mL).

Condiciones de reacción: 17 h a reflujo; se adiciona DMF (40 mL) manteniéndose a reflujo durante 30 h. Purificación: IsoleraOne usando como eluyentes, acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 195.7 mg, 33%. P.f: 198 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 12.43 (s, 1H, H-8), 7.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-4), 7.42 (dd, *J* = 10.7, 4.6 Hz, 1H, H-5), 7.37 - 7.22 (m, 9H, H-6, H-13, 17,

## Parte Experimental

H-13', 17'), 7.22 - 7.11 (m, 2H, H-15, H15'), 4.65 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-11), 3.31 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-10).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO-  $d_6$ ):  $\delta$  170.7 (C-9), 158.0 (C-2), 148.8 (C-a), 144.1 (C-12, C-12'), 131.7 (C-b), 127.9 (8 CH-Ph), 126.7 (C-15, C-15'), 126.4 (C-5), 123.9 (C-6), 122.0 (C-7), 120.8 (C-4), 46.7 (C-11), 41.3 (C-10). HPLC: Pureza = 97%, t.r. = 7.47 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  359 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ ) Calculado: C 73.71%, H 5.06%, N 7.82%, S 8.95%. Hallado: C 74.00%, H 5.08%, N 7.54%, S 8.76%.

**2-Metoxi-N-(6-(trifluorometil)benzotiazol-2-il)benzamida (75):** Método A:

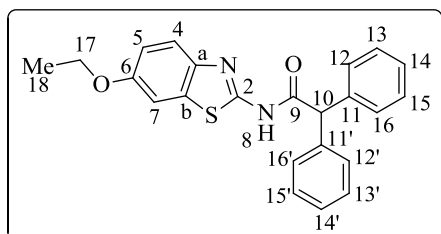


Reactivos: cloruro de 2-metoxibenzoilo (195.5 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.1 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación

microondas a 150 °C. Purificación: columna flash empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 164.1 mg, 41%. P.f: 215 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.29 (s, 1H, H-8), 8.53 (s, 1H, H-7), 7.93 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-4), 7.75 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 2H, H-5, H-16), 7.66 - 7.53 (m, 1H, H-14), 7.24 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-13), 7.11 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-15), 3.94 (s, 3H, H-16).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.3 (C-9), 160.9 (C-2), 157.3 (C-12), 151.3 (C-a), 133.8 (C-14), 132.1 (C-b), 130.3 (C-16), 124.6 (c,  $J = 272.1$  Hz, C-17), 123.8 (c,  $J = 31.8$  Hz, C-6), 123.0 (c,  $J = 3.6$  Hz, C-5), 121.3 (C-11), 121.0 (C-4), 120.7 (C-15), 119.9 (c,  $J = 4.2$  Hz, C-7), 112.3 (C-13), 56.1 (C-16). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.34 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  353 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) Calculado: C 54.54%, H 3.15%, N 7.95%. Hallado: C 54.21%, H 2.99%, N 7.86%.

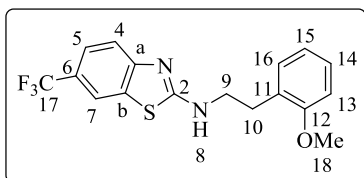
**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2,2-difenilacetamida (76):** Método A: Reactivos:



cloruro de 2,2-difenilacetilo (296.9 mg, 1.3 mmol), 2-amino-6-etoxibenzotiazol (250 mg, 1.3 mmol) y THF (0.5 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C.

Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (3:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 333.2 mg, 67%. P.f: 224 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.70 (s, 1H, H-8), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.44-7.31 (m, 10H, H-12, 16, H-12', 16'), 7.00 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-5), 5.36 (s, 1H, H-10), 4.05 (c, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-17), 1.33 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.6 (C-9), 155.6 (C-2 o C-6), 155.4 (C-2 o C-6), 142.5 (C-a), 138.8 (C-11, C-11'), 132.7 (C-b), 128.5 (8 CH-Ph), 127.2 (C-14, C-14'), 121.2 (C-4), 115.4 (C-5), 105.3 (C-7), 63.6 (C-17), 56.1 (C-10), 14.7 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 8.04 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 389 [M+1]. Análisis elemental (C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 71.11%, H 5.19%, N 7.21%, S 8.25%. Hallado: C 71.12%, H 5.31%, N 7.20%, S 8.43%.

**N-(2-Metoxifenetil)-6-(trifluorometil)benzotiazol-2-amina (77):** En un



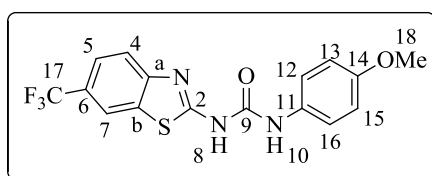
matraz, provisto de refrigerante y bajo atmosfera inerte se adicionó 6-2-amino-(trifluorometil)benzotiazol (250 mg, 1.1 mmol), carbonato potásico (138 mg, 1.4 mmol) y DMF

(20 mL). La mezcla se agita a reflujo durante 30 min tomando un color amarillo claro. A continuación, se adiciona 1-(2-bromoetil)-2-metoxibenceno (246.3 mg, 1.3 mmol) cambiando instantáneamente a color azul y volviendo a

## Parte Experimental

amarillo al cabo de unos pocos minutos. La reacción se deja a reflujo durante toda la noche. Después, se evapora el disolvente a presión reducida, y se adiciona acetato de etilo (50 mL) y HCl 0.1M (50 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo se purifica mediante IsoleraOne utilizando como eluyentes, acetato de etilo/hexano (1:2). Obteniéndose el producto final como un sólido beige. Rendimiento: 169.0 mg, 43%. P.f: 160 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.45 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-8), 8.10 (s, 1H, H-7), 7.53 - 7.45 (m, 2H, H-4, H-5), 7.26 - 7.11 (m, 2H, H-14, H-16), 6.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-13), 6.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-15), 3.79 (s, 3H, H-18, 3.55 (c, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-9), 2.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.1 (C-2), 157.7 (C-12), 156.0 (C-a), 131.2 (C-b), 130.5 (CH-Ph), 128.2 (CH-Ph), 127.0 (C-11), 125.2 (c, *J* = 271.3 Hz, C-17), 123.0 (c, *J* = 3.7 Hz, C-5), 121.3 (c, *J* = 31.8 Hz, C-6), 120.7 (C-15), 118.9 (c, *J* = 4.1 Hz, C-7), 118.1 (C-4), 111.1 (C-13), 55.7 (C-18), 44.3 (C-9), 29.8 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.05 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 343 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 57.94%, H 4.29%, N 7.95%. Hallado: C 57.85%, H 4.12%, N 7.70%.

**1-(4-Metoxifenil)-3-(6-(trifluorometil)benzotiazol-2-il)urea (78):** En un vial de

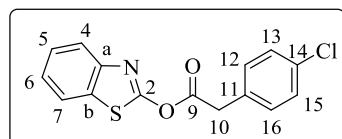


microondas, se adicionó 1-isocianato-4-metoxibenceno (170.9 mg, 1.1 mmol) sobre el 2-amino-6-(trifluorometil)benzotiazol (250 mg, 1.1 mmol) y THF (0.4 mL). La

mezcla se calienta bajo irradiación microonadas a 110 °C durante 2 h, formándose un precipitado de color blanquecino. A continuación, se adiciona acetato de etilo (50 mL) y agua (50 mL). El crudo se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyentes acetato de etilo/hexano

obteniéndose un sólido blanco Rendimiento: 202.3 mg, 50%. P.f: 200 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.97 (s, 1H, H-8), 8.99 (s, 1H, H-10), 8.39 (s, 1H, H-7), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4), 7.72 - 7.62 (m, 1H, H-5), 7.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-12, H-16), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13, H-15), 3.72 (s, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 162.6 (C-9), 160.8 (C-2), 155.4 (C-14), 151.8 (C-a), 132.3 (C-b), 131.1 (C-11), 125.3 (d, *J* = 39.6 Hz, C-6), 124.8 (d, *J* = 242.6 Hz, C-17), 122.8 (d, *J* = 2.7 Hz, C-5), 120.9 (C-12, C-16), 119.9 (C-4), 119.5 (d, *J* = 4.2 Hz, C-7), 114.1 (C-13, C-15), 55.2 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.15 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 368 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 52.31%, H 3.29%, N 11.44%. Hallado: C 50.27%, H 4.08%, N 11.54%.

**Acetato de benzotiazol-2-il 2-(4-clorofenil) (79):** Sobre una disolución de 2-



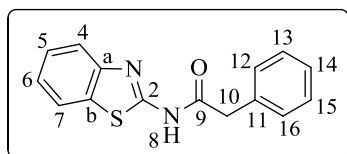
hidroxi-benzotiazol (250 mg, 1.7 mmol) y piridina (360.2 mg, 4.6 mmoles) y diclorometano anhidro (17 mL) se adiciona lentamente cloruro de 2-(4-

clorofenil)acetilo (258.7 mg, 1.4 mmol). La reacción se mantiene a reflujo durante 6 h, después se adiciona una cantidad catalítica de DMAP y se deja a reflujo durante toda la noche. A continuación, se adiciona HCl 0.1 M (50 mL), y la fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL). El extracto orgánico se seca sobre sulfato de magnesio y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica utilizando como eluyentes acetato de etilo/hexano (2:1), obteniéndose el producto final como un sólido blanco Rendimiento: 74.1 mg, 21%. P.f: 138 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.15 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, H-benzooxazol), 7.72 (dd, *J* = 7.1, 2.1 Hz, 1H, H-benzooxazol), 7.49 - 7.19 (m, 6H, H-Ph, H-benzooxazol), 4.42 (s, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 172.3 (C-2),

## Parte Experimental

169.9 (C-9), 144.2 (C-a), 136.3 (C-14), 134.1 (C-11), 131.3 (C-12, C-16), 128.1 (C-13, C-15), 126.4 (CH), 123.2 (C-b), 122.7 (CH), 122.6 (CH), 111.4 (CH), 39.8 (C-10). MS (ESI+):  $m/z$  307 [M + 3], 305 [M + 1]. Análisis elemental ( $C_{15}H_{10}ClNO_2S$ ) Calculado: C 59.31%, H 3.32%, N 4.61%. Hallado: C 59.56%, H 3.33%, N 4.36%.

**N-(Benzotiazol-2-il)-2-fenilacetamida (80)**: Método B: Reactivos: ácido 2-

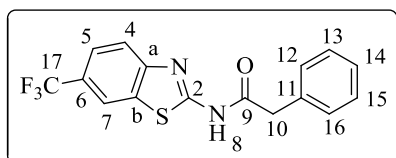


fenilacético (247.6 mg, 1.7 mmol), EDC (413.6 mg, 2.2 mmol), DMAP (40.3 mg, 0.3 mmol), 2-amino-benzotiazol (250 mg, 1.7 mmol) y DMF (40 mL).

Condiciones de reacción: 17 h a reflujo. Purificación: columna cromatográfica utilizando como eluyentes una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:1), obteniéndose un sólido amarillo. Rendimiento: 159.1 mg, 34%. P.f: 165 - 166 °C (lit.<sup>167</sup> 180 °C).  $^1H$ -RMN (300 MHz, DMSO-  $d_6$ ):  $\delta$  12.58 (s, 1H, H-8), 7.95 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.73 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H-4), 7.42 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.38 - 7.18 (m, 6H, H-6, H-12, 16), 3.82 (s, 2H, H-10).  $^{13}C$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  170.2 (C-9), 157.9 (C-2), 148.5 (C-a), 134.6 (C-11), 131.4 (C-b), 129.3 (C-12, C-16), 128.4 (C-13, C-15), 126.9 (C-14), 126.1 (C-5), 123.5 (C-6), 121.7 (C-7), 120.5 (C-4), 41.8 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.86 min (grad.: 10-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  269 [M + 1]. Análisis elemental ( $C_{15}H_{12}N_2OS$ ) Calculado: C 67.14%, H 4.51%, N 10.44%, S 11.95%. Hallado: C 67.02%, H 4.63%, N 10.31%, S 11.74%.

<sup>167</sup> Uher, M.; Berkes, D.; Lesko, J.; Floch, L., Reactions of carbonyl isothiocyanates with nucleophilic bifunctional reagents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, *48*, 1651-1658.

***N*-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-fenilacetamida (81):** Método A:

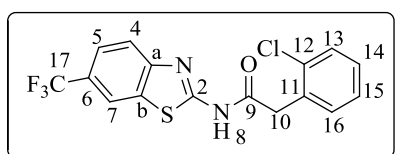


Reactivos: cloruro de 2-fenilacetilo (176.2 mg, 1.2 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo

irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco-amarillo. Rendimiento: 234.3 mg, 61%. P.f: 216 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.85 (s, 1H, H-8), 8.49 (s, 1H, H-7), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-4), 7.74 (dd, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.41 - 7.22 (m, 5H, H-12, 16), 3.87 (s, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.1 (C-9), 161.5 (C-2), 151.6 (C-a), 134.8 (C-11), 132.4 (C-b), 129.7 (C-12, C-16), 128.8 (C-13, C-15), 127.3 (C-14), 125.8 (c, *J* = 36.1 Hz, C-6), 124.9 (c, *J* = 267.0 Hz, C-17), 123.3 (c, *J* = 3.3 Hz, C-5), 121.3 (C-4), 120.3 (c, *J* = 3.8 Hz, C-7), 42.2 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.24 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 336 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 57.14%, H 3.30%, N 8.33%, S 9.53%. Hallado: C 57.30%, H 3.28%, N 8.09%, S 9.80%.

***N*-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(2-clorofenil)acetamida (82):** Método



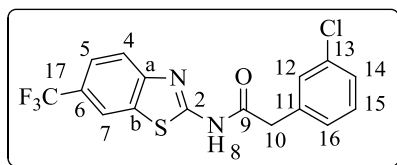
A: Reactivos: cloruro de 2-(2-clorofenil)acetilo (216.6 mg, 1.2 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 318.3 mg, 75%. P.f: 228 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.92 (s, 1H, H-8), 8.49 (s, 1H, H-7), 7.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-4), 7.74 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.50 - 7.42 (m, 2H, H-Ph),

## Parte Experimental

7.38 - 7.22 (m, 2H, H-Ph), 4.06 (s, 2H, H-10).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  169.7 (C-9), 161.1 (C-2), 151.3 (C-a), 133.7 (CH-Ph), 132.6 (C-11, CH-Ph), 132.5 (C-12), 132.0 (C-b), 129.1 (C-16), 127.3 (CH-Ph), 124.6 (c,  $J = 271.9$  Hz, C-17), 123.8 (c,  $J = 31.8$  Hz, C-6), 123.0 (c,  $J = 3.5$  Hz, C-5), 121.0 (C-4), 119.9 (c,  $J = 4.0$  Hz, C-7), 40.4 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 8.33 min (grad.: 20-95 en 10 min). MS (ESI+) m/z: 373 [M + 3], 371 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{OS}$ ) Calculado: C 51.83%, H 2.72%, N 7.56%. Hallado: C 51.68%, H 2.54%, N 7.50%.

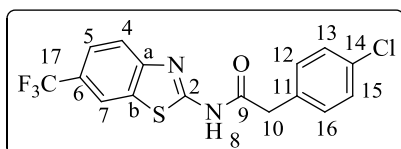
**N-(6-(Trifluorometil)benzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (83):** Método



A: Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (432.8 mg, 2.3 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (500 mg, 2.3 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10

min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 340 mg, 40%. P.f: 191 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.85 (s, 1H, H-8), 8.48 (s, 1H, H-7), 7.91 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-4), 7.73 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-5), 7.44 (s, 1H, H-12), 7.35 - 7.32 (m, 3H, H-Ph), 3.90 (s, 2H, H-10).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  170.2 (C-9), 161.1 (C-2), 151.3 (C-a), 136.8 (C-11), 132.9 (C-13), 132.0 (C-b), 130.2 (C-15 o C-16), 129.4 (C-12), 128.3 (C-14), 127.0 (C-15 o C-16), 124.7 (c,  $J = 277.6$  Hz, C-17), 123.8 (c,  $J = 31.8$  Hz, C-6), 122.9 (c,  $J = 3.2$  Hz, C-5), 121.0 (C-4), 119.9 (c,  $J = 4.5$  Hz, C-7), 41.2 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.96 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 373 [M + 3], 371 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{OS}$ ) Calculado: C 51.83%, H 2.72%, N 7.56%, S 8.75%. Hallado: C 51.72%, H 2.83%, N 7.27%, S 8.56%.

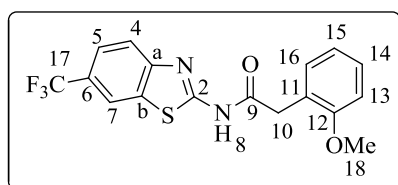
***N*-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(4-clorofenil)acetamida (84):** Método



A: Reactivos: cloruro de 2-(4-clorofenil)acetilo (216.7 mg, 1.1 mmol) y 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg,

1.14 mmol). Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 404.1 mg, 95%. P.f.: 183 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.84 (s, 1H, H-8), 8.48 (s, 1H, H-7), 7.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-4), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.45 - 7.31 (m, 4H, H-12, 16), 3.87 (s, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.4 (C-9), 161.1 (C-2), 151.2 (C-a), 134.0 (C-14), 132.0 (C-11), 131.7 (C-b), 131.3 (C-12, C-16), 128.1 (C-13, C-15), 124.5 (c, *J* = 272.0 Hz, C-17), 123.7 (c, *J* = 31.8 Hz, C-6), 122.9 (c, *J* = 3.9 Hz, C-5), 120.9 (C-4), 119.9 (c, *J* = 4.3 Hz, C-7), 41.0 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 8.01 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 373 [M + 3], 371 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 51.83%, H 2.72%, N 7.56%, S 8.64%. Hallado: C 52.00%, H 2.71%, N 7.55%, S 8.49%.

***N*-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (85):**



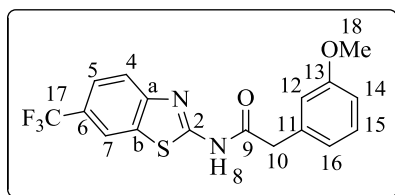
Método A: Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (211.6 mg, 1.2 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol). Condiciones de reacción: 5 min

bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 366.06 mg, 54%. P.f: 179 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.72 (s, 1H, H-8), 8.47 (s, 1H, H-7), 7.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-4), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5), 7.37 - 7.11 (m, 2H, H-14, H-16), 6.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-13),

## Parte Experimental

6.92 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-15), 3.84 (s, 2H, H-10), 3.74 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  170.8 (C-9), 161.2 (C-2), 157.3 (C-12), 151.4 (C-a), 132.0 (C-b), 131.2 (C-16), 128.5 (C-14), 124.6 (c,  $J = 271.8$  Hz, C-17), 123.6 (c,  $J = 31.8$  Hz, C-6), 122.9 (c,  $J = 5.2$  Hz, C-5), 122.8 (C-11), 120.8 (C-4), 120.2 (C-15), 119.9 (c,  $J = 4.2$  Hz, C-7), 110.8 (C-13), 55.5 (C-18), 36.7 (C-10). HPLC: Pureza = 97%, t.r. = 7.37 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  367 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) Calculado: C 55.73%, H 3.58%, N 7.65%, S 8.75%. Hallado: C 56.02%, H 3.61%, N 7.37%, S 8.75%.

### ***N*-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(3-metoxifenil)acetamida (86):**

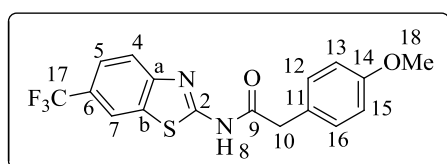


Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3-metoxifenil)acetilo (211.7 mg, 1.2 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de

reacción: 15 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 108.1 mg, 26%. P.f: 156 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.83 (s, 1H, H-8), 8.48 (s, 1H, H-7), 7.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-4), 7.73 (dd,  $J = 8.5, 1.5$  Hz, 1H, H-5), 7.25 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-15), 6.93 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-12), 6.91 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-16), 6.84 (dd,  $J = 7.9, 2.2$  Hz, 1H, H-14), 3.82 (s, 2H, H-10), 3.74 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  171.2 (C-9), 161.8 (C-2), 160.0 (C-13), 152.0 (C-a), 136.5 (C-11), 132.7 (C-b), 130.2 (C-15), 125.2 (c,  $J = 271.8$  Hz, C-17), 124.4 (c,  $J = 31.9$  Hz, C-6), 123.6 (c,  $J = 3.6$  Hz, C-5), 122.2 (C-16), 121.6 (C-4), 120.6 (c,  $J = 4.1$  Hz, C-7), 115.9 (C-12), 113.0 (C-14), 55.7 (C-18), 42.6 (C-10). HPLC: Pureza = 98%, t.r. = 7.21 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  367 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ )

Calculado: C 55.73%, H 3.58%, N 7.65%, S 8.75%. Hallado: C 55.80%, H 3.41%, N 7.66%, S 9.02%.

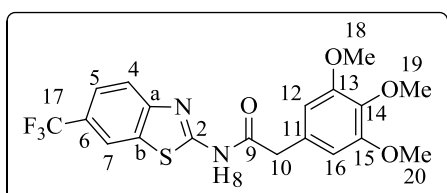
***N*-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(4-metoxifenil)acetamida (87):**



Método A: Reactivos: cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo (211.7 mg, 1.2 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol) y THF (1 mL).

Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 184.8 mg, 44%. P.f: 136 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.79 (s, 1H, H-8), 8.47 (s, 1H, H-7), 7.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-4), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5), 7.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-12, H-16), 6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-13, H-15), 3.77 (s, 2H, H-10), 3.72 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.0 (C-9), 161.1 (C-2), 158.3 (C-14), 151.3 (C-a), 132.0 (C-b), 130.4 (C-12, C-16), 126.3 (C-11), 124.5 (c, *J* = 272.2 Hz, C-17), 123.7 (c, *J* = 31.9 Hz, C-6), 122.9 (c, *J* = 3.7 Hz, C-5), 120.9 (C-4), 119.8 (c, *J* = 4.3 Hz, C-7), 113.9 (C-13, C-15), 55.0 (C-18), 40.9 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.68 min. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 367 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 55.73%, H 3.58%, N 7.65%, S 8.75%. Hallado: C 55.48%, H 3.31%, N 7.44%, S 8,97%.

***N*-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetamida (88):**



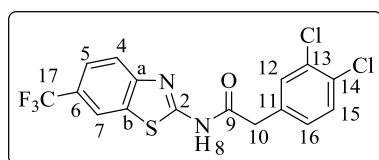
Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetilo (280.1 mg, 1.2 mmoles), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2

mmoles) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación

## Parte Experimental

microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido beige. Rendimiento: 89.5 mg, 18%. P.f: 225 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.80 (s, 1H, H-8), 8.49 (s, 1H, H-7), 7.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-4), 7.74 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-5), 6.69 (s, 2H, H-12, H-16), 3.79 (s, 2H, H-10), 3.77 (s, 6H, H-18, H-20), 3.64 (s, 3H, H-19). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.0 (C-9), 161.5 (C-2), 153.1 (C-13, C-15), 151.7 (C-a), 136.9 (C-14), 132.4 (C-b), 130.2 (C-11), 124.9 (c, *J* = 272.0 Hz, C-17), 124.1 (c, *J* = 31.8 Hz, C-6), 123.3 (c, *J* = 3.5 Hz, C-5), 121.3 (C-4), 120.3 (c, *J* = 4.2 Hz, C-7), 107.2 (C-12, C-16), 60.3 (C-19), 56.2 (C-18, C-20), 42.5 (C-10). HPLC: Pureza 98%, t.r. = 6.56 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 427 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S) Calculado: C 53.52%, H 4.02%, N 6.57%, S 7.52%. Hallado: C 53.60%, H 4.04%, N 6.62%, S 7.71%.

### N-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(3,4-diclorofenil)acetamida (89):

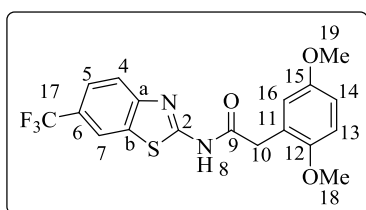


Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4-diclorofenil)acetilo (256 mg, 1.2 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción:

10 min bajo irradiación de microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 405.18 mg, 65%. P.f: 164 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.85 (s, 1H, H-8), 8.49 (s, 1H, H-7), 7.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-4), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5), 7.64 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-12), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-15), 7.34 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, H-16), 3.92 (s, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.0 (C-9), 161.0 (C-2), 151.3 (C-a), 135.4 (C-11), 132.0 (C-b), 131.7 (C-12), 130.8 (C-13 o C-14), 130.4 (C-15), 130.1 (C-16), 129.7 (C-13 o C-14), 124.5 (c, *J* = 272.0 Hz, C-17), 123.8 (c, *J* = 31.8 Hz, C-6), 122.9 (c, *J* = 3.4 Hz,

C-5), 121.0 (C-4), 119.9 (c,  $J = 4.1$  Hz, C-7), 40.5 (C-10). HPLC: Pureza = 97%, t.r. = 8.66 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 410 [M + 5], 408 [M + 3], 406 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 47.42%, H 2.24%, N 14.07%, S 7.91%. Hallado: C 47.28%, H 2.30%, N 7.04%, S 7.38%.

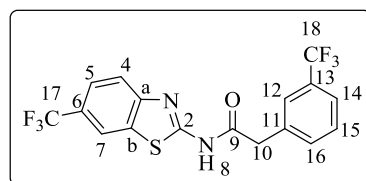
**N-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-(2,5-dimetoxifenil)acetamida (90):**



Método A: Reactivos: cloruro de 2-(2,5-dimetoxifenil)acetilo (246 mg, 1.2 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol). Condiciones de reacción: 7 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido beige.

Rendimiento: 141.7 mg, 31%. P.f: 148 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.78 (s, 1H), 8.22 (s, 1H, H-7), 7.68 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H-4), 7.57 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 6.99 - 6.60 (m, 2H, H-13, H-14), 6.85 (s, 1H, H-16), 3.68 (s, 8H, H-10, H-18, H-19). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 174.0 (C-9), 166.0 (C-2), 152.9 (C-a o C-12), 152.6 (C-a o C-12), 151.5 (C-15), 132.5 (C-b), 128.6 (c,  $J = 272.1$  Hz, C-17), 125.9 (C-11), 121.9 (c,  $J = 2.25$  Hz, C-5), 121.6 (c,  $J = 37.2$  Hz, C-6), 119.2 (C-4), 118.8 (c,  $J = 3.6$  Hz, C-7), 117.4 (C-16), 111.7 (C-13, C-14), 56.0 (C-18 o C-19), 55.3 (C-18 o C-19), 38.4 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.03 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 397 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 54.54%, H 3.81%, N 7.07%, S 8.09%. Hallado: C 54.82%, H 3.93%, N 7.38%, S 8.25%.

**N-(6-(Trifluorometil)benzotiazol-2-il)-2-(3-(trifluorometil)fenil)acetamida**

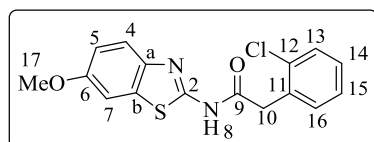


(91): Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3-(trifluorometil)-fenil)acetilo (253.8 mg, 1.2

## Parte Experimental

mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.2 mmol) y THF (0.5 mL). Condiciones de reacción: 20 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación por columna flash acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 194.4 mg, 42%. P.f: 141 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.87 (s, 1H, H-8), 8.46 (s, 1H, H-7), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-4), 7.73 - 7.67 (m, 1H, H-5, H-12), 7.66 - 7.60 (m, 2H, H-14, H-16), 7.59 - 7.52 (m, 1H, H-15), 3.99 (s, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.9 (C-9), 161.7 (C-2), 151.9 (C-a), 136.4 (C-11), 134.5 (C-16), 132.7 (C-b), 130.1 (C-15), 129.7 (c, *J* = 31.5 Hz, C-13), 126.9 (c, *J* = 3.9 Hz, C-12), 125.2 (c, *J* = 271.8 Hz, C-17 o C-18), 124.9 (c, *J* = 272.1 Hz, C-17 o C-18), 124.4 (c, *J* = 3.8 Hz, C-14), 124.4 (c, *J* = 31.8 Hz, C-6), 123.6 (c, *J* = 4.0 Hz, C-5), 121.7 (C-4), 120.6 (c, *J* = 4.4 Hz, C-7), 41.9 (C-10). HPLC: Pureza = 96%, t.r. = 7.04 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 405 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>10</sub>F<sub>6</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 50.50%, H 2.49%, N 6.93%, S 7.93%. Hallado: C 50.63%, H 2.71%, N 7.08%, S 8.16%.

***N*-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(2-clorofenil)acetamida (92):** Método A:



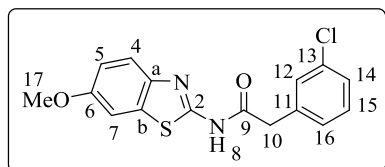
Reactivos: cloruro de 2-(2-clorofenil)acetilo (262.2 mg, 1.4 mmol), 2-amino-6-metoxibenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido blanco-marrón. Rendimiento: 216.3 mg, 47%. P.f: 218 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.52 (s, 1H, H-8), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.56 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-7), 7.52 - 7.32 (m, 4H, H-13, 16), 7.03 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-5), 4.02 (s, 2H, H-10), 3.80 (s, 3H, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.2 (C-9), 156.5 (C-2), 156.2 (C-6), 143.0 (C-a), 134.1 (C-b o C-

## Parte Experimental

Ph), 133.3 (C-b o C-Ph), 133.1 (C-b o C-Ph), 132.8 (CH-Ph), 129.4 (CH-Ph), 129.3 (CH-Ph), 127.6 (CH-Ph), 121.5 (C-4), 115.3 (C-4), 105.1 (C-7), 56.0 (C-17), 40.2 (C-10). HPLC: Pureza 99%, t.r. = 3.85 min. MS (ESI+): m/z 335 [M + 3], 333 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 57.74%, H 3.94%, N 8.42%, S 9.63%. Hallado: C 57.68%, H 3.97%, N 8.42%, S 9.69%.

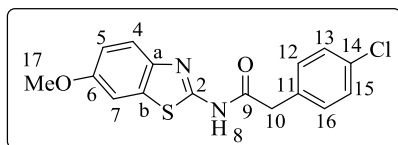
**N-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (93):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (314.6 mg, 1.7 mmol), 2-amino-6-metoxibenzotiazol (300 mg, 1.7 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 15 min bajo

irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 418 mg, 76%. P.f: 180 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.47 (s, 1H, H-8), 7.63 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-4), 7.52 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H-7), 7.41 (m, 1H, H-12) 7.38-7.2 (m, 3H, H-14, 16), 7.00 (dd, 1H, *J* = 8.9 Hz, 2.6 Hz, H-5), 3.82 (s, 2H, H-10), 3.77 (s, 3H, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.7 (C-9), 156.4 (C-2 o C-6), 156.0 (C-2 o C-6), 142.7 (C-a), 137.3 (C-11), 133.1 (C-b), 132.9 (C-13), 130.5 (C-15 o C-16), 129.5 (C-12), 128.4 (C-14), 127.1 (C-15 o C-16), 121.4 (C-4), 115.2 (C-5), 104.9 (C-7), 55.8 (C-17), 41.4 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.32 min (grad.: 20-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 335 [M + 3], 333 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 57.74%, H 3.94%, N 8.42%, S 9.63%. Hallado: C 57.46%, H 3.90%, N 8.27%, S 9.44%.

**N-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(4-clorofenil)acetamida (94):** Método A:

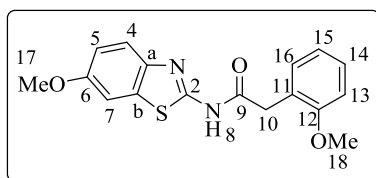


Reactivos: cloruro de 2-(4-clorofenil)acetilo (262.2 mg, 1.4 mmol), 2-amino-6-

## Parte Experimental

metoxibenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol). Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 36.6 mg, 8%. P.f: 246 - 247 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.47 (s, 1H, H-8), 7.64 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-4), 7.56 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-7), 7.43 - 7.35 (m, 4H, H-12, H-13, H-15, H-16), 7.03 (dd,  $J = 8.8, 2.6$  Hz, 1H, H-5), 3.83 (s, 2H, H-10), 3.80 (s, 3H, H-17).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  169.9 (C-9), 156.5 (C-2 o C-6), 156.2 (C-2 o C-6), 142.9 (C-a), 134.1 (C-b), 133.1 (C-11 o C-14), 132.0 (C-11 o C-14), 131.7 (C-12, C-16), 128.7 (C-13, C-15), 121.5 (C-4), 115.3 (C-5), 105.1 (C-7), 56.0 (C-17), 41.3 (C-10). MS (ESI+):  $m/z$  335 [M + 3], 333 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ ) Calculado: C 57.74%, H 3.94%, N 8.42%, S 9.63%. Hallado: C 57.74%, H 3.83%, N 8.20%, S 9.37%.

**N-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (95):** Método A:



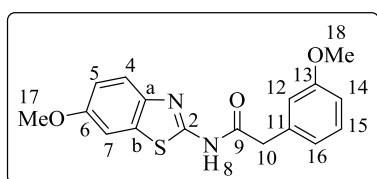
Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (256.1 mg, 1.4 mmol), 2-amino-6-metoxibenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol). Condiciones de reacción: 5 min bajo

irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 166.8 mg, 37%. P.f: 160 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.34 (s, 1H, H-8), 7.64 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-4), 7.55 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-7), 7.33 - 7.18 (m, 2H, H-14, H-16), 7.07 - 6.85 (m, 3H, H-5, H-13, H-15), 3.80 (s, 5H, H-10, H-17), 3.75 (s, 3H, H-18).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  170.4 (C-9), 157.7 (C-12), 156.4 (C-2 o C-6), 156.3 (C-2 o C-6), 143.0 (C-a), 133.1 (C-b), 131.5 (C-16), 128.8 (C-14), 123.5 (C-11), 121.4 (C-4), 120.6 (C-15), 115.2 (C-5), 111.2 (C-13), 105.1 (C-7), 56.0 (C-17 o C-18), 55.8 (C-17 o C-18), 36.9 (C-10).

## Parte Experimental

HPLC: Pureza = 98%, t.r. = 4.85 min. MS (ESI+): m/z 329 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 62.18%, H 4.91%, N 8.53%, S 9.76%. Hallado: C 62.05%, H 4.79%, N 8.52%, S 10.39%.

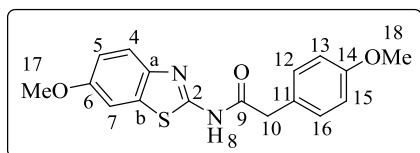
**N-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(3-metoxifenil)acetamida (96):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(3-metoxifenil)acetilo (256.1 mg, 1.4 mmol), 2-amino-6-metoxibenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol) y THF (0.7 mL). Condiciones de reacción: 15 min bajo

irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido amarillo. Rendimiento: 284.4 mg, 62%. P.f: 149 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.43 (s, 1H, H-8), 7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.54 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-7), 7.24 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-15), 7.01 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H-5), 6.91-6.89 (m, 2H, H-12, H-16), 6.83 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H-14), 3.78 (s, 3H, H-17), 3.76 (s, 2H, H-10), 3.73 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.4 (C-9), 159.9 (C-13), 156.8 (C-2 o C-6), 156.5 (C-2 o C-6), 143.3 (C-a), 136.8 (C-11), 133.4 (C-b), 130.1 (C-15), 122.2 (C-16), 121.8 (C-4), 115.8 (C-12), 115.6 (C-5), 112.9 (C-14), 105.4 (C-7), 56.3 (C-17 o C-18), 55.7 (C-17 o C-18), 42.5 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.78 min. MS (ESI+): m/z 329 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 62.8%, H 4.91%, N 8.53%, S 9.76%. Hallado: C 62.53%, H 4.68%, N 8.41%, S 10.00%.

**N-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(4-metoxifenil)acetamida (97):** Método A:

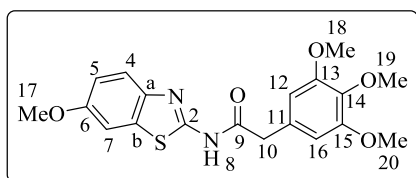


Reactivos: cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo (256.1 mg, 1.4 mmol), 2-amino-6-metoxibenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación

## Parte Experimental

microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido beige. Rendimiento: 328.35 mg, 42%. P.f: 183 - 184 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.40 (s, 1H, H-8), 7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-12, H-16), 7.01 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H-5), 6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-13, H-15), 3.78 (s, 3H, H-17), 3.72 (s, 5H, H-10, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.2 (C-9), 158.2 (C-14), 156.1 (C-2 o C-6), 155.9 (C-2 o C-6), 142.5 (C-a), 132.7 (C-b), 130.3 (C-12, C-16), 126.6 (C-11), 121.1 (C-4), 114.8 (C-5), 113.8 (C-13, C-15), 104.7 (C-7), 55.6 (C-17), 55.0 (C-18), 40.9 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 1.93 min (grad.: 60-95 en 5 min). MS (ESI+): *m/z* 329 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 62.18%, H 4.91%, N 8.53%, S 9.76%. Hallado: C 62.38%, H 5.10%, N 8.32%, S 9.66%.

**N-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetamida (98):** Método



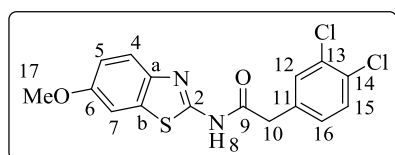
A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetilo (339.4 mg, 1.4 mmol), 6-metoxibenzotiazol-2-amino (250 mg, 1.4 mmoles) y THF (0.5 mL). Condiciones de

reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 44.2 mg, 8%. P.f: 251 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.39 (s, 1H, H-8), 7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.01 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H-5), 6.66 (s, 2H, H-12, H-16), 3.79 (s, 3H, H-17), 3.76 (s, 6H, H-18, H-20), 3.72 (s, 2H, H-10), 3.63 (s, 3H, H-19). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.7 (C-9), 156.1 (C-2 o C-6), 155.8 (C-2 o C-6), 152.7 (C-13, C-15), 142.5 (C-a), 136.4 (C-14), 132.7 (C-b), 130.1 (C-11), 121.0 (C-4), 114.8 (C-5), 106.7 (C-12, C-16), 104.6 (C-7), 59.9 (C-19), 55.8 (C-18, C-20), 55.5 (C-17), 42.0 (C-10).

## Parte Experimental

HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.89 min. MS (ESI+): m/z 389 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S) Calculado: C 58.75%, H 5.19%, N 7.21%, S 8.25%. Hallado: C 58.95%, H 5.33%, N 7.38%, S 8.40%.

**N-(6-Metoxibenzotiazol-2-il)-2-(3,4-diclorofenil)acetamida (99):** Método A:

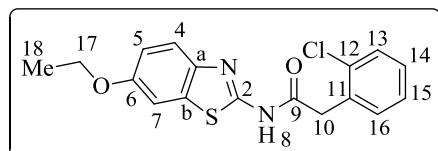


Reactivos: cloruro de 2-(3,4-diclorofenil)acetilo (310 mg, 1.4 mmol), 2-amino-6-metoxibenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol) y THF (0.4 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación

microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido beige. Rendimiento: 100 mg, 20%.

P.f: 200 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.47 (s, 1H, H-8), 7.64-7.50 (m, 4H, H-4, H-7, H-12, H-15), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-16), 7.01 (dd, *J* = 8.8, 2.7 Hz, 1H, H-5), 3.85 (s, 2H, H-10), 3.78 (s, 3H, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.8 (C-9), 156.9 (C-6), 156.4 (C-2), 143.3 (C-a), 136.5 (C-11), 133.4 (C-b), 132.3 (CH-Ph), 131.5 (C-14), 131.1 (CH-Ph), 130.7 (C-16), 130.3 (C-13), 121.9 (C-4), 115.7 (C-5), 105.4 (C-7), 56.3 (C-17), 41.2 (C-10). HPLC: pureza > 99%, t.r.: 7.18 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 370 [M + 3], 368 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 52.33%, H 3.29%, N 7.63%, S 8.73%. Hallado: C 52.05%, H 3.09%, N 7.38%, S 8.53%.

**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)- 2-(2-clorofenil)acetamida (100):** Método A:



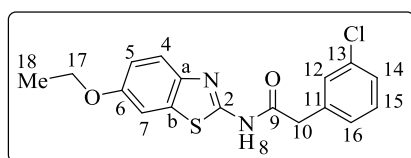
Reactivos: cloruro de 2-(2-clorofenil)acetilo (243.2 mg, 1.3 mmol), 2-amino-6-etoxibenzotiazol (250 mg, 1.3 mmol). Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C.

Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3)

## Parte Experimental

obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 234.6 mg, 53%. P.f: 206 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.51 (s, 1H, H-8), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.54 (s, 1H, H-7), 7.50-7.40 (m, 2H, H-Ph), 7.38 - 7.27 (m, 2H, H-Ph), 7.02 (dm, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5), 4.05 (c, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-17), 4.01 (s, 2H, H-10), 1.34 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.2 (C-9), 156.2 (C-1 o C-7), 155.7 (C-1 o C-7), 142.9 (C-4), 134.1 (C-5 o C-11 o C-12), 133.3 (C-5 o C-11 o C-12), 133.1 (C-5 o C-11 o C-12), 132.8 (C-16), 129.4 (CH-Ph), 129.3 (CH-Ph), 127.6 (CH-Ph), 121.5 (C-3), 115.7 (C-2), 105.7 (C-6), 63.9 (C-17), 39.6 (C-10), 15.1 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.03 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 349 [M + 3], 347 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 58.87%, H 4.36%, N 8.08%, S 9.25%. Hallado: C 58.75%, H 4.31%, N 8.21%, S 9.16%.

**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (101):** Método A:

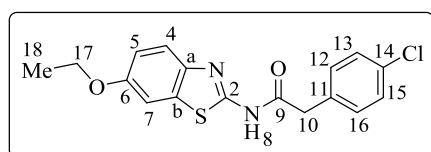


Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (291.9 mg, 1.54 mmol), 2-amino-6-etoxibenzotiazol (300 mg, 1.54 mmol) y THF

(1 mL). Condiciones de reacción: 15 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 373.5 mg, 70%. P.f: 164 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.7 (s, 1H, H-8), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.52 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.42 (s, 1H, H-12), 7.40 - 7.31 (m, 2H, H-14, H-16), 7.29 (dt, *J* = 7.1, 1.5 Hz, 1H, H-15), 7.00 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H, H-5), 4.04 (c, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-17), 3.83 (s, 2H, H-10), 1.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.1 (C-9), 156.4 (C-2 o C-6), 156.1 (C-2 o C-6), 143.2 (C-a), 137.8 (C-11), 133.6 (C-b o C-13), 133.4 (C-b o C-13), 130.9 (C-14 o C-15), 130.0 (C-12), 128.9 (C-16), 127.6 (C-14 o C-15), 121.8 (C-4), 116.0 (C-5), 106.0

(C-7), 64.3 (C-17), 41.9 (C-10), 15.4 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.90 min (grad.: 20-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 349 [M + 3], 347 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 58.87%, H 4.36%, N 8.08%, S 9.25%. Hallado: C 59.02%, H 4.18%, N 8.13%, S 8.96%.

**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2-(4-clorofenil)acetamida (102)**<sup>168</sup>: Método A:



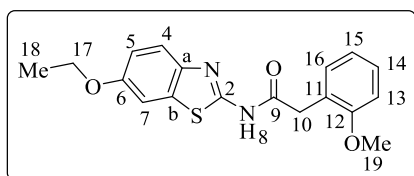
Reactivos: cloruro de 2-(4-clorofenil)acetilo (243.2 mg, 1.3 mmol), 2-amino-6-etoxibenzotiazol (250 mg, 1.3 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido blanco. Rendimiento: 165.39 mg, 37%. P.f: 193 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.46 (s, 1H, H-8), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.53 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.46 - 7.31 (m, 4H, H-12, 16), 7.01 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-5), 4.05 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-17), 3.83 (s, 2H, H-10), 1.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.9 (C-9), 156.1 (C-2 o C-6), 155.7 (C-2 o C-6), 142.9 (C-a), 134.1 (C-14), 133.1 (C-b o C-11), 132.0 (C-b o C-11), 131.6 (C-12, C-16), 128.7 (C-13, C-15), 121.5 (C-4), 115.6 (C-5), 105.7 (C-7), 63.9 (C-17), 41.3 (C-10), 15.1 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.52 min (grad.: 40-95 en 5 min). MS (ESI+): m/z 349 [M + 3], 347 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 58.87%, H 4.36%, N 8.08%, S 9.25%. Hallado: C 58.69%, H 4.22%, N 7.94%, S 9.02%.

<sup>168</sup> Crawford, B. E.; Brown, J. R.; Glass, C. A.; Bai, X.; N-linked glycan biosynthesis modulators. Patente No: WO-2010111713 A2-20100930.

## Parte Experimental

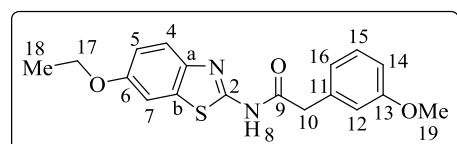
**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (103):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (237.6 mg, 1.3 mmol), 2-Amino-6-metoxibenzotiazol (250 mg, 1.3 mmol). Condiciones de reacción: 5 min bajo

irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 222.7 mg, 51%. P.f: 149 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.33 (s, 1H, H-8), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.53 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.32 - 7.19 (m, 2H, H-14, H-16), 7.05 - 6.96 (m, 2H, H-5, H-15), 6.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-13), 4.06 (c, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-17), 3.79 (s, 2H, H-10), 3.75 (s, 3H, H-19), 1.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.4 (C-9), 157.7 (C-12), 156.3 (C-7), 155.7 (C-1), 143.0 (C-4), 133.1 (C-5), 131.5 (C-16), 128.8 (C-14), 123.5 (C-11), 121.4 (C-3), 120.6 (C-15), 115.6 (C-2), 111.2 (C-13), 105.7 (C-6), 63.9 (C-17), 55.8 (C-19), 36.9 (C-10), 15.1 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.37 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 343 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 63.14%, H 5.30%, N 8.18%, S 9.36%. Hallado: C 63.19%, H 5.25%, N 8.23%, S 9.35%.

**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2-(3-metoxifenil)acetamida (104):** Método A:

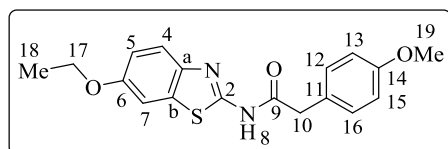


Reactivos: cloruro de 2-(3-metoxifenil)acetilo (237.6 mg, 1.3 mmol), 2-amino-6-etoxibenzotiazol (250 mg, 1.3

mmol) y THF (0.7 mL). Condiciones de reacción: 15 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 194.1 mg, 44%. P.f: 164 °C. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.42 (s, 1H, H-8), 7.61 (d, *J*

= 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.52 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-7), 7.24 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-15), 7.00 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H, H-5), 6.96 - 6.77 (m, 1H, H-16), 6.92 (s, 1H, H-12), 6.83 (ddd,  $J = 8.3, 2.5, 1.2$  Hz, 1H, H-14), 4.04 (c,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-17), 3.76 (s, 2H, H-10), 3.74 (s, 3H, H-19), 1.33 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.7 (C-9), 159.2 (C-13), 155.8 (C-2), 155.3 (C-6), 142.5 (C-a), 136.1 (C-11), 132.7 (C-b), 129.4 (C-15), 121.5 (C-16), 121.1 (C-4), 115.3 (C-5), 115.1 (C-12), 112.2 (C-14), 105.3 (C-7), 63.6 (C-17), 55.0 (C-19), 41.8 (C-10), 14.7 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 2.04 min (grad.: 60-95 en 5 min). MS (ESI+):  $m/z$  342 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) Calculado: C 63.14%, H 5.30%, N 8.18%, S 9.36%. Hallado: C 63.09%, H 5.32%, N 8.19%, S 9.64%.

**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2-(4-metoxifenil)acetamida (105):** Método A:



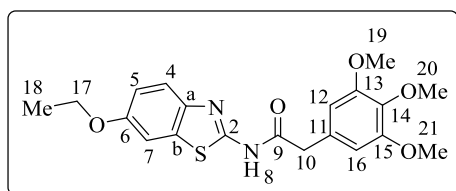
Reactivos: cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo (237.6 mg, 1.3 mmole, 2-amino-6-etoxibenzotiazol (250 mg,

1.287 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 342.37 mg, 67%. P.f: 179 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.39 (s, 1H, H-8), 7.60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-4), 7.51 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-7), 7.25 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-12, H-16), 6.99 (dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz, 1H, H-5), 6.89 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-13, H-15), 4.04 (c,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-17), 3.72 (s, 5H, H-10, H-19), 1.33 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H-18).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  170.2 (C-9), 158.2 (C-14), 155.9 (C-2), 155.3 (C-6), 142.5 (C-a), 132.7 (C-b), 130.3 (C-12, C-16), 126.6 (C-11), 121.1 (C-4), 115.2 (C-5), 113.9 (C-13, C-15), 105.3 (C-7), 63.6 (C-17), 55.0 (C-19), 40.9 (C-10), 14.7 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 1.98 min (grad.: 60-95 en 5 min). MS (ESI+):

## Parte Experimental

m/z 343 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 63.14%, H 5.30%, N 8.18%, S 9.36%. Hallado: C 62.95%, H 5.43%, N 8.22%, S 9.61%.

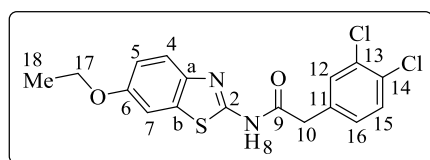
**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetamida (106):** Método



A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetilo (314.9 mg, 1.3 mmol), 2-amino-etoxibenzotiazol (250 mg, 1.3 mmol) y THF (0.5 mL).

Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido gris. Rendimiento: 149 mg, 29%. P.f: 217 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.38 (s, 1H, H-8), 7.61 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.52 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.00 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-5), 6.66 (s, 2H, H-12, H-16), 4.04 (c, J = 6.9 Hz, 2H, H-17), 3.76 (s, 6H, H-19, H-21), 3.72 (s, 2H, H-10), 3.62 (s, 3H, H-20), 1.33 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 169.7 (C-9), 155.8 (C-2 o C-6), 155.3 (C-2 o C-6), 152.7 (C-13, C-15), 142.5 (C-a), 136.5 (C-14), 132.7 (C-b), 130.2 (C-11), 121.1 (C-4), 115.2 (C-5), 106.6 (C-12, C-16), 105.3 (C-7), 63.6 (C-17), 59.9 (C-20), 55.8 (C-19, C-21), 42.1 (C-10), 14.7 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 5.57 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 403 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S) Calculado: C 59.69%, H 5.51%, N 6.96%, S 7.97%. Hallado: C 59.46%, H 5.48%, N 7.05%, S 8.00%.

**N-(6-Etoxibenzotiazol-2-il)-2-(3,4-diclorofenil)acetamida (107):** Método A:

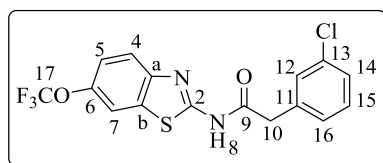


Reactivos: cloruro de 2-(3,4-diclorofenil)acetilo (287.6 mg, 1.3 mmol), 6-etoxibenzotiazol-2-amino (250 mg, 1.3 mmol) y THF (0.5 mL). Condiciones de

reacción: 10 min bajo irradiación de microondas a 110 °C. Purificación:

columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido beige. Rendimiento: 109.6 mg, 22%. P.f: 148 - 149 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.46 (s, 1H, H-8), 7.65 - 7.57 (m, 2H, H-4, H-Ph), 7.52 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-7), 7.32 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H-Ph), 7.00 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H-5), 4.04 (c, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-17), 3.85 (s, 2H, H-10), 1.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.1 (C-9), 155.6 (C-2 o C-6), 155.3 (C-2 o C-6), 142.4 (C-a), 135.7 (C-11), 132.7 (C-b), 131.5 (C-12), 130.7 (C-13 o C-14), 130.4 (C-15), 129.9 (C-16), 129.6 (C-13 o C-14), 121.1 (C-4), 115.2 (C-5), 105.3 (C-7), 63.5 (C-17), 40.4 (C-10), 14.6 (C-18). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.82 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 385 [M + 3], 383 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 53.55%, H 3.70%, N 7.35%, S 8.41%. Hallado: C 55.36%, H 3.68%, N 7.09%, S 8.12%.

***N*-(6-Trifluorometoxibenzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (108):**



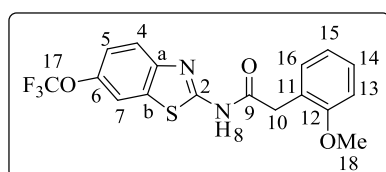
Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (201.7 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol (250 mg, 1.1 mmol). Condiciones de reacción: 5 min

bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 386.7 mg, 48%. P.f: 150 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.74 (s, 1H, H-8), 8.11 (dd, *J* = 2.5, 1.1 Hz, 1H, H-7), 7.82 (dd, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 1H, H-4), 7.41 (td, *J* = 1.7, 0.7 Hz, 1H, H-12), 7.38 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H-5), 7.35 - 7.29 (m, 2H, H-14, H-15), 7.28 (dt, *J* = 7.0, 1.8 Hz, 1H, H-16), 3.88 (s, 2H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.7 (C-9), 160.0 (C-2), 148.2 (C-a), 144.7 (c, *J* = 1.5 Hz, C-6), 137.5 (C-11), 133.6 (C-b o C-13), 133.3 (C-b o C-13), 130.9 (C-15 o C-16), 130.1 (C-15 o C-16), 128.9 (C-14), 127.6 (C-15 o C-16), 122.2

## Parte Experimental

(C-4), 120.9 (c,  $J = 256.1$  Hz, C-17), 119.6 (C-5), 115.7 (C-7), 41.8 (C-10). HPLC: Pureza = 98%, t.r. = 8.08 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 389 [M + 3], 387 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 49.68%, H 2.61%, N 7.24%, S 8.29%. Hallado: C 49.81%, H 2.45%, N 7.32%, S 7.99%.

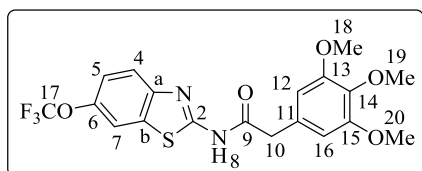
### **N-(6-Trifluorometoxibenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (109):**



Método A: Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (196.9 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol (250 mg, 1.1 mmol) y THF (0.6 mL). Condiciones de

reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:3) para obtener un sólido amarillo. Rendimiento: 187 mg, 46%. P.f: 143 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.60 (s, 1H, H-8), 8.09 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H-7), 7.81 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-4), 7.40 (dd,  $J = 8.8, 1.6$  Hz, 1H, H-5), 7.31 - 7.19 (m, 2H, H-14, H-16), 6.98 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-13), 6.91 (tm,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-15), 3.82 (s, 2H, H-10), 3.73 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.6 (C-9), 159.5 (C-2), 157.3 (C-12), 147.6 (C-a), 144.0 (C-6), 132.6 (C-b), 131.2 (C-16), 128.5 (C-14), 122.9 (C-11), 121.4 (C-4), 120.2 (C-15), 120.1 (c,  $J = 255.6$  Hz, C-17), 119.8 (C-4), 115.0 (C-7), 110.8 (C-13), 55.4 (C-18), 36.6 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.48 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 383 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) Calculado: C 53.40%, H 3.43%, N 7.33%, S 8.39%. Hallado: C 53.22%, H 3.28%, N 7.21%, S 8.09%.

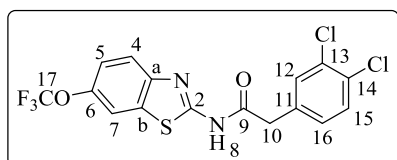
***N*-(6-Trifluorometoxibenzotiazol-2-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetamida**



**(110):** Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetilo (261.1 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol (250 mg, 1.1

mmol) y THF (1.5 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido marrón. Rendimiento: 89.3 mg, 19%. P.f: 227 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.66 (s, 1H, H-8), 8.10 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-7), 7.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.41 (dd, *J* = 8.8, 0.9 Hz, 1H, H-5), 6.67 (s, 2H, H-12, H-16), 3.76 (s, 8H, H-10, H-18, H-20), 3.62 (s, 3H, H-19). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.4 (C-9), 159.5 (C-2), 152.8 (C-13, C-15), 147.5 (C-a), 144.1 (C-6), 136.5 (C-14), 132.6 (C-b), 129.9 (C-11), 121.8 (C-4), 120.2 (c, *J* = 255.8 Hz, C-17), 118.5 (C-5), 115.0 (C-7), 106.8 (C-12, C-16), 59.9 (C-19), 55.8 (C-18, C-20), 42.1 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.72 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 443 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S) Calculado: C 51.58%, H 3.87%, N 6.33%, S 7.25%. Hallado: C 51.66%, H 3.90%, N 6.45%, S 7.47%.

***N*-(6-Trifluorometoxibenzotiazol-2-il)-2-(3,4-diclorofenil)acetamida (111):**



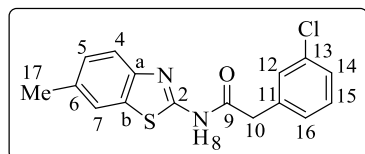
Método A: Reactivos: cloruro de 2-(3,4-diclorofenil)acetilo (238.5 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol (250 mg, 1.1 mmol) y THF (0.3 mL). Condiciones de

reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 203.1 mg, 45%. P.f: 171 - 172 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300

## Parte Experimental

MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.72 (s, 1H, H-8), 7.99 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H, H-7), 7.72 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.61 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, H-12), 7.57 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H-15), 7.38 – 7.22 (m, 2H, H-5, H-16), 3.82 (s, 2H, H-10).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  171.4 (C-9), 162.0 (C-2), 148.1 (C-a), 143.5 (C-6), 136.7 (C-11), 132.9 (C-b), 131.5 (C-12), 130.6 (C-13), 130.3 (C-15), 130.0 (C-14), 129.3 (C-16), 121.9 (C-4), 120.2 (c,  $J$  = 255.9 Hz, C-17), 118.5 (C-5), 114.6 (C-7), 41.7 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 8.76 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  426 [M + 5], 424 [M + 3], 422 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) Calculado: C 45.62%, H 2.15%, N 6.65%, S 7.62%. Hallado: C 45.38%, H 1.97%, N 6.48%, S 7.47%.

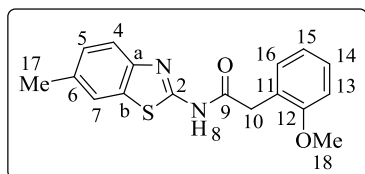
**N-(6-Metilbenzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (112):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (345.2 mg, 1.5 mmol), 6-metilbenzotiazol-2-amino (250 mg, 1.5 mmol) y THF (0.3 mL).

Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación de microondas a 110 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 195.6 mg, 41%. P.f: 208 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.53 (s, 1H, H-8), 7.74 (s, 1H, H-7), 7.62 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H-4), 7.43 (s, 1H, H-12), 7.39 – 7.27 (m, 3H, H-14, 16), 7.23 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-5), 3.84 (s, 2H, H-10), 2.39 (s, 3H, H-17).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.4 (C-9), 156.8 (C-2), 146.4 (C-a), 136.9 (C-11), 132.9 (C-13), 132.8 (C-6), 131.4 (C-b), 130.1 (C-15 o C-16), 129.2 (C-12), 128.1 (C-14), 127.3 (C-5), 126.8 (C-15 o C-16), 121.2 (C-7), 120.1 (C-4), 41.1 (C-10), 20.8 (C-17). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.13 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  319 [M + 3], 317 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}$ ) Calculado: C 60.66%, H 4.14%, N 8.84%, S 10.12%. Hallado: C 60.90%, H 4.15%, N 8.83%, S 9.87%.

**N-(6-Metilbenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (113):** Método A:

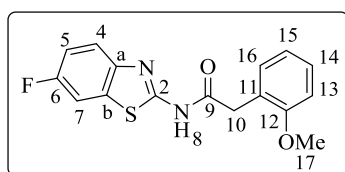


Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (280.8 mg, 1.5 mmol), 2-amino-6-metilbenzotiazol (250 mg, 1.5 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación

microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido naranja-marrón. Rendimiento: 93.45 mg, 20%. P.f: 167 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.38 (s, 1H, H-8), 7.73 (s, 1H, H-7), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-4), 7.32 - 7.16 (m, 3H, H-5, H-14, H-16), 6.98 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-13), 6.91 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H, H-15), 3.79 (s, 2H, H-10), 3.74 (s, 3H, H-18), 2.39 (s, 3H, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.1 (C-9), 157.2 (C-2 o C-12), 157.1 (C-2 o C-12), 146.5 (C-a), 132.8 (C-6), 131.5 (C-b), 131.1 (C-16), 128.4 (C-14), 127.3 (C-5), 123.0 (C-11), 121.2 (C-7), 120.2 (C-15), 120.1 (C-4), 110.8 (C-13), 55.4 (C-18), 36.6 (C-10), 20.9 (C-17). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.30 min (grad.: 20-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 312 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 65.36%, H 5.16%, N 8.97%, S 10.26%. Hallado: C 65.37%, H 5.40%, N 8.79%, S 10.36%.

**N-(6-Fluorobenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (114):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (273.8 mg, 1.5 mmol), 2-amino-6-fluorobenzotiazol (250 mg, 1.5 mmol).

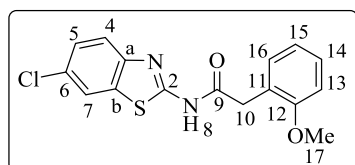
Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación

microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido naranja-marrón. Rendimiento: 153.17 mg, 33%. P.f: 156 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.51 (s, 1H, H-8), 7.88 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H-5), 7.75 (dd, *J* = 8.9, 4.8 Hz, 1H, H-4), 7.33 -

## Parte Experimental

7.20 (m, 3H, H-7, H-14, H-16), 6.99 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-13), 6.92 (td,  $J = 7.4, 0.9$  Hz, 1H, H-15), 3.81 (s, 2H, H-10), 3.75 (s, 3H, H-17).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  170.8 (C-9), 159.0 (d,  $J = 239.6$  Hz, C-6), 158.4 (C-2), 157.6 (C-12), 145.7 (C-a), 133.0 (d,  $J = 11.0$  Hz, C-b), 131.5 (C-16), 128.8 (C-14), 123.4 (C-11), 121.9 (d,  $J = 9.3$  Hz, C-4), 120.6 (C-15), 114.5 (d,  $J = 24.3$  Hz, C-7), 111.2 (C-13), 108.5 (d,  $J = 26.9$  Hz, C-5), 55.8 (C-17), 37.0 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.97 min. MS (ESI+):  $m/z$  316 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ ) Calculado: C 60.75%, H 4.14%, N 8.86%, S 10.14%. Hallado: C 60.54%, H 3.99%, N 8.74%, S 9.88%.

**N-(6-Clorobenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (115):** Método A:

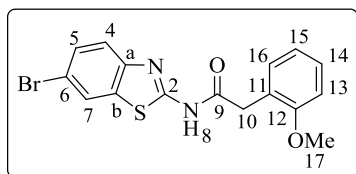


Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (250.6 mg, 1.4 mmol), 2-amino-6-clorobenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación

microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido amarillo. Rendimiento: 265.1 mg, 59%. P.f: 169 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.57 (s, 1H, H-8), 8.09 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-7), 7.73 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-4), 7.44 (dd,  $J = 8.6, 2.2$  Hz, 1H, H-5), 7.32 - 7.19 (m, 2H, H-14, H-16), 6.98 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-13), 6.91 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-15), 3.81 (s, 2H, H-10), 3.73 (s, 3H, H-17).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  170.5 (C-9), 158.9 (C-2), 157.3 (C-12), 147.5 (C-a), 133.1 (C-b o C-6), 131.2 (C-16), 128.5 (C-14), 127.5 (C-b o C-6), 126.4 (C-5), 122.9 (C-11), 121.7 (C-4), 121.4 (C-7), 120.2 (C-15), 110.8 (C-13), 55.5 (C-17), 36.6 (C-10). HPLC: Pureza = 96%, t.r. = 6.93 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+):  $m/z$  334 [M + 3], 332 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ ) Calculado: C 57.74%, H 3.94%, N 10.65%, S 9.63%. Hallado: C 57.69%, H 4.02%, N 8.25%, S 9.48%.

**N-(6-Bromobenzotiazol-2-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida (116):** Método A:

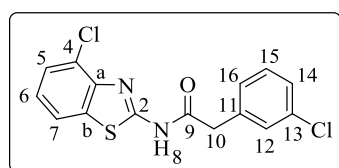


Reactivos: cloruro de 2-(2-metoxifenil)acetilo (201.9 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-bromobenzotiazol (250 mg, 1.1 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación

microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido amarillo-naranja. Rendimiento: 172.5 mg, 42%. P.f: 170 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.58 (s, 1H, H-8), 8.24 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-7), 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-4), 7.57 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H-5), 7.34 - 7.19 (m, 2H, H-14, H-16), 6.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-13), 6.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-15), 3.82 (s, 2H, H-10), 3.75 (s, 3H, H-17). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.9 (C-9), 159.2 (C-2), 157.6 (C-12), 148.1 (C-a), 134.0 (C-b), 131.5 (C-16), 129.5 (C-5), 128.9 (C-14), 124.6 (C-7), 123.3 (C-11), 122.4 (C-4), 120.6 (C-15), 115.7 (C-6), 111.2 (C-13), 55.8 (C-17), 37.0 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.18 min (grad.: 30-95 en 10 min). MS (ESI+): *m/z* 378 [M + 3], 376 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) Calculado: C 50.94%, H 3.47%, N 7.43%, S 8.50%. Hallado: C 51.08%, H 3.60%, N 7.31%, S 8.29%.

**N-(4-Clorobenzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (117):** Método A:



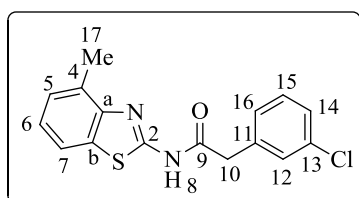
Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (255.9 mg, 1.4 mmol), 2-amino-4-clorobenzotiazol (250 mg, 1.4 mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a

110 °C. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:8) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 144.9 mg, 32%. P.f: 161 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.00 (s, 1H, H-8), 7.94 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H, H-7), 7.51 (dd, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H, H-5), 7.44 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-12), 7.40 - 7.30 (m,

## Parte Experimental

3H, H-Ph), 7.27 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-6), 3.87 (s, 2H, H-10).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  170.0 (C-9), 158.9 (C-2), 145.4 (C-a), 136.8 (C-11), 133.0 (C-Cl), 132.9 (C-Cl), 130.2 (CH-Ph), 129.3 (CH-Ph), 128.2 (CH-Ph), 127.0 (CH-Ph), 126.2 (C-5), 124.4 (C-6), 124.4 (C-b), 120.9 (C-7), 41.2 (C-10). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.21 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 342 [M + 5], 340 [M + 3], 338 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}$ ) Calculado: C 53.4%, H 2.99%, N 8.31%, S 9.51%. Hallado: C 53.74%, H 3.10%, N 8.55%, S 9.41%.

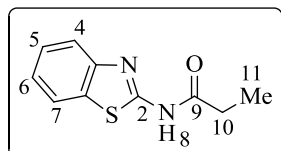
**N-(4-Metilbenzotiazol-2-il)-2-(3-clorofenil)acetamida (118):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-(3-clorofenil)acetilo (287.3 mg, 1.5 mmol), 2-amino-4-metilbenzotiazol (250 mg, 1.5mmol) y THF (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo

irradiación microondas a 110 °C. Purificación: IsoleraOne empleando acetato de etilo/hexano (1:7) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 206.2 mg, 43%. P.f: 166 °C.  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.68 (s, 1H, H-8), 7.75 (dd,  $J = 7.6, 1.5$  Hz, 1H, H-7), 7.43 (s, 1H, H-12), 7.40 - 7.12 (m, 5H, H-5, H-6, H-Ph), 3.84 (s, 2H, H-10), 2.56 (s, 3H, H-17).  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.6 (C-9), 156.9 (C-2), 147.5 (C-a), 137.0 (C-11), 132.9 (C-4), 131.0 (C-b), 130.2 (C-16), 129.8 (C-13), 129.3 (C-12), 128.1 (CH-Ph), 126.9 (C-5), 126.6 (CH-Ph), 123.5 (C-6), 119.1 (C-7), 41.2 (C-10), 17.9 (C-17). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.21 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 319 [M + 3], 317 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}$ ) Calculado: C 60.66%, H 4.14%, N 8.84%, S 10.12%. Hallado: C 60.90%, H 4.31%, N 8.92%, S 10.12%.

**N-(benzotiazol-2-il)propionamida (119):** Método B: Reactivos: ácido



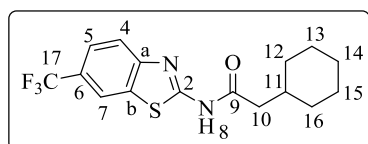
propiónico (122.8 mg, 1.7 mmol), EDC (413.6 mg, 2.2 mmol), DMAP (40.3 mg, 0.3 mmol), 2-amino-benzotiazol (250 mg, 1.7 mmol) y DMF (40 mL).

Condiciones de reacción: 17 h a reflujo obteniéndose

un sólido blanco sin necesidad de purificación. Rendimiento: 193.1 mg, 56%.

P.f: 195 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.28 (s, 1H, H-8), 7.95 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-7), 7.71 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-4), 7.41 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-5), 7.28 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-6), 2.49-2.47 (m, 2H, H-10), 1.10 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, H-11).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  172.9 (C-9), 157.9 (C-2), 148.5 (C-a), 131.3 (C-b), 125.9 (C-5), 123.3 (C-6), 121.6 (C-7), 120.3 (C-4), 28.4 (C-10), 8.9 (C-11). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 4.04 min (grad.: 10-95 en 10min) MS (ESI+): m/z 207 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$ ) Calculado: C 58.23%, H 4.89%, N 13.58%, S 15.55%. Hallado: C 58.18%, H 4.65%, N 13.42%, S 15.80%.

**N-(6-Trifluorometilbenzotiazol-2-il)-2-ciclohexilacetamida (120):** Método A:



Reactivos: cloruro de 2-ciclohexilacetilo (182.8 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.1 mmol).

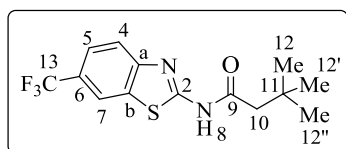
Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C.

Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 208.3 mg, 53%. P.f: 188 °C.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.57 (s, 1H, H-8), 8.47 (s, 1H, H-7), 7.88 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-4), 7.72 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-5), 2.39 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-10), 1.91 - 1.52 (m, 6H, H-ciclohexilo), 1.39 - 0.87 (m, 5H, H-ciclohexilo).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  172.7 (C-9), 161.7 (C-2), 151.9 (C-a), 132.6 (C-b), 125.3 (c,  $J = 271.8$  Hz, C-17), 124.3 (c,  $J = 31.8$  Hz, C-6), 123.6 (c,  $J = 3.5$  Hz, C-5), 121.5

## Parte Experimental

(C-4), 120.5 (c,  $J = 4.4$  Hz, C-7), 43.5 (C-10), 35.2 (C-11), 33.1 (2 CH<sub>2</sub>-ciclohexilo), 26.4(CH<sub>2</sub>-ciclohexilo), 26.2 (2 CH<sub>2</sub>-ciclohexilo). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 7.81 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 342 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 56.13%, H 5.00%, N 8.18%, S 9.37%. Hallado: C 56.01%, H 4.97%, N 8.30%, S 9.19%.

**N-(6-(Trifluorometil)benzotiazol-2-il)-3,3-dimetilbutanamida (121):** Método



A: Reactivos: cloruro de 3,3-dimetilbutanoilo (154.3 mg, 1.1 mmol), 2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (250 mg, 1.1 mmol).

Condiciones de reacción: 5 min bajo irradiación microondas a 150 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando acetato de etilo/hexano (1:1) para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 146.4 mg, 40%. P.f: 192 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.50 (s, 1H, H-8), 8.47 (s, 1H, H-7), 7.88 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-4), 7.72 (dd,  $J = 8.6, 1.6$  Hz, 1H, H-5), 2.40 (s, 2H, H-10), 1.02 (s, 9H, H-12, H-12', H-12''). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.4 (C-9), 160.9 (C-2), 151.2 (C-a), 131.9 (C-b), 124.6 (c,  $J = 271.7$  Hz, C-13) 123.6 (c,  $J = 31.9$  Hz, C-6), 122.8 (c,  $J = 3.0$  Hz, C-5), 120.8 (C-4), 119.8 (c,  $J = 4.1$  Hz, C-7), 48.0 (C-10), 31.0 (C-11), 29.41 (C-12, C-12', C-12''). HPLC: Pureza > 99%, t.r. = 6.81 min (grad.: 40-95 en 10 min). MS (ESI+): m/z 317 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS) Calculado: C 53.15%, H 4.78%, N 8.86%. Hallado: C 53.36%, H 4.91%, N 9.02%.

### 3. SÍNTESIS DE ISATINAS

#### Procedimiento general de síntesis de isatinas.

**Método A**<sup>127</sup>: En un vial de microondas se adicionan el derivado de isatina correspondiente (1 eq.), el derivado de amina correspondiente (1 eq.) y MMT-K10 (para 1 mmol de isatina 20 mg de MMT-K10), en presencia o no de disolvente. La irradiación por microondas se realiza durante un tiempo y temperatura especificados en cada caso. A continuación, se adiciona acetato de etilo (50 mL) y se extrae con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 50 mL). El crudo se purifica mediante técnicas cromatográficas especificadas para cada caso. En el caso de que la amina se encuentre en forma de hidrocioruro, se agita la amina (1 eq.), trietilamina (1 eq.) y tolueno (3 mL) durante una 1 h a temperatura ambiente. Y se adiciona al crudo de reacción como en el caso de encontrarse la amina libre.

**Método B**<sup>141</sup>: Se prepara una disolución del derivado de isatina (2.4 eq.) en etanol (20 mL) a temperatura ambiente y se adiciona KOH (3 eq.) manteniendo la mezcla agitando hasta la total disolución de los reactivos. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y se adiciona acetona (20 mL) y el agente alquilante correspondiente (3 eq.), manteniendo la reacción a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación se adiciona acetato de etilo (50 mL) y la fase orgánica se extrae con una disolución saturada de NaCl (50 mL). El crudo se purifica mediante columna cromatográfica empleando cloroformo como eluyente.

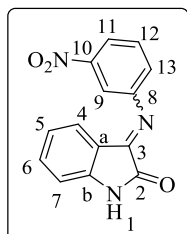
**Método C**: Se prepara una disolución de isatina (1eq.) y NaH (1eq.) en DMF anhidra bajo atmósfera inerte, y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se adiciona el bromuro de bencilo (1 eq.), y se mantiene la mezcla agitando hasta desaparición de la isatina. El disolvente se elimina a

## **Parte Experimental**

---

presión reducida y se adiciona acetato de etilo (50 mL) y la fase orgánica se extrae con una disolución saturada de NaCl (2 x 50 mL), se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente orgánico se elimina a presión reducida. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica empleando cloroformo como eluyente.

**(E,Z)-3-((4-Nitrofenil)imino)indolin-2-ona (122):** Método A: Reactivos: isatina

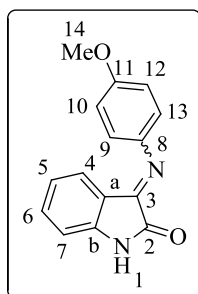


(250 mg, 1.7 mmol), 3-nitroanilina (234.7 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 226.1 mg, 50%, ratio *E/Z*:

63:37. P.f: 217 °C. Isómero E:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.98 (s, 1.59H, H-1), 8.10 (ddd,  $J = 8.1, 2.2, 0.9$  Hz, 1H, H-13), 7.85 (t,  $J = 2.1$  Hz, 2.1H, H-9), 7.75 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-12), 7.51 - 7.41 (m, 2.3H, H-11), 7.36 (td,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H, H-6), 6.90 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-7), 6.72 (td,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 1H, H-5), 6.34 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-4).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  163.9 (C-2), 157.1 (C-3), 152.1 (C-10), 149.4 (C-8), 148.2 (C-b), 135.7 (C-6), 131.9 (C-12), 126.4 (C-4), 125.2 (C-11), 122.6 (C-5), 120.2 (C-13), 116.3 (C-a), 113.0 (C-9), 112.4 (C-7). Isómero Z:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.98 (s, 1.59H, H-1), 7.95 (ddd,  $J = 8.2, 2.4, 1.0$  Hz, 0.5H, H-13), 7.85 (t,  $J = 2.1$  Hz, 2.1H, H-9), 7.61 (d,  $J = 7.5$  Hz, 0.5H, H-4), 7.59 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-12), 7.51 - 7.41 (m, 2.3H, H-6, H-11), 7.07 (td,  $J = 7.5, 0.6$  Hz, 0.6H, H-5), 6.87 (d,  $J = 6.8$  Hz, 0.7H, H-7).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  159.2 (C-2), 155.5 (C-3), 151.3 (C-10), 148.6 (C-8), 147.2 (C-b), 135.5 (C-6), 130.5 (C-12), 126.4 (C-11), 124.0 (C-4), 123.1 (C-5), 121.6 (C-a), 119.3 (C-13), 114.2 (C-9), 111.7 (C-7). MS (ESI+):  $m/z$  268 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ ) Calculado: C 62.92%, H 3.39%, N 15.72%. Hallado: C 62.87%, H 3.45%, N 15.66%.

## Parte Experimental

**(E,Z)-3-((4-Metoxifenil)imino)indolin-2-ona (123):** Método A: Reactivos:

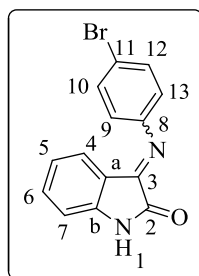


isatina (600 mg, 4.1 mmol), 4-metoxianilina (502.3 mg, 4.1 mmol), MMT-K10 (81.6 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando cloroformo/metanol (10:1) para obtener un sólido naranja-amarillo. Rendimiento: 769.2 mg, 75%, ratio E/Z: 83:17. P.f:

237 °C (lit.<sup>169</sup> 238 °C). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.92 (s, 1H, H-1), 7.33 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.08 - 6.92 (m, 4.2H, H-Ph), 6.92 - 6.85 (m, 1.4H, H-7), 6.75 (td, *J* = 7.6, 1.0Hz, 1H, H-5), 6.64 (d, *J* = 7.5Hz, 1H, H-4), 3.79 (s, 3H, H-14). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.3 (C-2), 157.8 (C-11), 155.2 (C-3), 147.5 (C-b), 143.8 (C-8), 134.9 (C-6), 125.6 (C-4), 122.4 (C-5), 120.2 (C-9, C-13), 116.5 (C-a), 115.4 (C-10, C-12), 112.1 (C-7), 56.0 (C-14). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.81 (s, 0.2H, H-1), 7.54 (d, *J* = 7.3 Hz, 0.2H), 7.40 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0.2H, H-6), 7.20 - 7.12 (m, 0.4H, H-9, H-13), 7.08 - 6.92 (m, 4.2H, H-5), 6.92 - 6.85 (m, 1.4H, H-10, H-12), 6.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.2H, H-7), 3.76 (s, 0.6H, H-14). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.4 (C-2), 158.2 (C-11), 152.3 (C-3), 145.7 (C-b), 141.7 (C-8), 134.2 (C-6), 123.5 (C-9, C-13), 123.0 (C-a), 122.9 (C-4, C-6), 114.1 (C-10, C-12), 111.2 (C-7), 55.9 (C-14). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 253 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 71.42%, H 4.79%, N 11.10%. Hallado: C 71.60%, H 4.76%, N 10.96%.

<sup>169</sup> Kriza, A.; Ignat, I.; Stanica, N.; Draghici, C., Synthesis and characterization of Cu(II), Co(II) and Ni(II) complexes with Schiff bases derived from isatin. *Rev. Chim.* **2011**, *62*, 696-701.

**(E,Z)-3-((4-Bromofenil)imino)indolin-2-ona (124):** Método A: Reactivos:

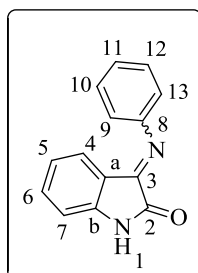


isatina (250 mg, 1.7 mmol), 4-bromoanilina (292.3 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: obtención del producto final puro sin necesidad de purificación, sólido naranja. Rendimiento: 433.5 mg, 85%, ratio *E/Z*: 77:23. P.f: 241 °C (lit.<sup>127</sup> 242 °C).

**Isómero E:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.96 (s, 1.3H, H-1), 7.64 - 7.59 (m, 2H, H-10, H-12), 7.33 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H-6), 6.87 (dt, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H, H-7), 6.74 (td, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.40 (ddd, *J* = 7.7, 1.3, 0.6 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.0 (C-2), 156.0 (C-3), 150.3 (C-8), 147.8 (C-b), 135.4 (C-6), 133.2 (C-10, C-12), 126.1 (C-4), 122.6 (C-5), 120.4 (C-9, C-13), 117.8 (C-11), 116.3 (C-a), 112.3 (C-7). **Isómero Z:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.96 (s, 1.3H, H-1), 7.56 (ddd, *J* = 7.4, 1.3, 0.6 Hz, 0.3H, H-4), 7.50 - 7.39 (m, 1H, H-6, H-10, H-12), 7.03 (tdd, *J* = 7.5, 2.2, 0.9 Hz, 0.3H, H-5), 6.99 - 6.92 (m, 2.4H, H-9, H-13), 6.83 (dt, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 0.3H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.2 (C-2), 154.2 (C-3), 149.1 (C-8), 146.5 (C-b), 135.1 (C-a), 131.8 (C-10, C-12), 123.6 (C-9, C-13), 123.0 (C-5), 121.9 (C-4), 121.9 (C-A), 117.3 (C-11), 111.5 (C-7). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 304 [M + 3], 302 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>O) Calculado: C 55.84%, H 3.01%, N 9.30%. Hallado: C 55.93%, H 2.84%, N 9.50%.

## Parte Experimental

**(E,Z)-3-(Fenilimino)indolin-2-ona (125):** Método A: Reactivos: isatina (250

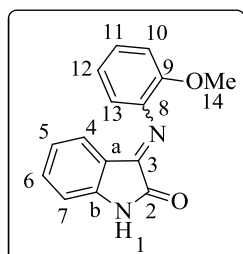


mg, 1.7 mmol), 4-bromoanilina (158.2 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido amarillo. Rendimiento: 323.7 mg, 86%, ratio E/Z: 83:17. P.f: 231 °C (lit.<sup>170</sup> 232 - 234 °C). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN

(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.97 (s, 1.25H, H-1), 7.52 - 7.38 (m, 2.25H, H-9, H-13), 7.37 - 7.20 (m, 2.50H, H-6, H-11), 7.03 - 6.82 (m, 3.75H, H-7, H-10, H-12), 6.71 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-5), 6.33 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.6 (C-2), 156.1 (C-3), 151.6 (C-8), 148.1 (C-b), 135.5 (C-6), 130.7 (C-9, C-13), 126.5 (C-4), 126.0 (C-11), 122.8 (C-5), 118.3 (C-10, C-12), 116.8 (C-a), 112.6 (C-7). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.97 (s, 1.25H, H-1), 7.58 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 0.25H, H-4), 7.52 - 7.38 (m, 2.25H, H-6), 7.37 - 7.20 (m, 2.5H, H-10, H-12), 7.15 - 7.03 (m, 0.5H, H-5, H-11), 7.03 - 6.82 (m, 3.75H, H-7, H-9, H-13). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.5 (C-2), 153.9 (C-3), 150.1 (C-8), 146.8 (C-b), 135.3 (C-6), 129.4 (C-10, C-12), 125.5 (C-11), 123.9 (C-4), 123.4 (C-5), 122.5 (C-a), 120.1 (C-9, C-13), 111.8 (C-7). MS (ESI+): *m/z* 223 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 75.66%, H 4.54%, N 12.60%. Hallado: C 75.74%, H 4.51%, N 12.83%.

<sup>170</sup> Vine, K. L.; Locke, J. M.; Ranson, M.; Pyne, S. G.; Bremner, J. B., In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 931-938.

**(E,Z)-3-((2-Metoxifenil)imino)indolin-2-ona (126):** Método A: Reactivos:



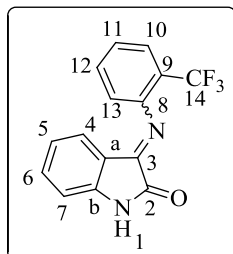
isatina (250 mg, 1.7 mmol), 2-metoxianilina (209.2 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 116.3

mg, 27%, ratio *E/Z*: 83:17. P.f: 179 - 180 °C (lit.<sup>171</sup> 177 - 179 °C). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.95 (s, 1.2H, H-1), 7.31 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.26 - 7.16 (m, 1H, H-11), 7.12 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H-10), 7.08 - 6.92 (m, 1.7H, H-12), 6.92 - 6.80 (m, 2.6H, H-7, H-13), 6.71 (td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H, H-5), 6.39 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.1 (C-2), 156.3 (C-3), 148.2 (C-9), 147.1 (C-b), 139.6 (C-8), 135.1 (C-6), 126.8 (C-11), 125.6 (C-4), 122.6 (C-5), 121.8 (C-12), 119.1 (C-13), 117.0 (C-a), 112.9 (C-10), 112.1 (C-7), 56.1 (C-14). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.95 (s, 1.2H, H-1), 7.58 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 0.2H, H-4), 7.42 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0.2H, H-6), 7.08 - 6.92 (m, 1.7H, H-5), 6.92 - 6.80 (m, 2.6H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.1 (C-2), 156.3 (C-3), 148.7 (C-9), 146.3 (C-b), 139.6 (C-8), 134.9 (C-6), 125.9 (C-Ph), 123.5 (C-4), 123.0 (C-Ph), 121.8 (C-Ph), 120.9 (C-a), 120.2 (C-Ph), 112.0 (C-5), 111.5 (C-7), 56.0 (C-14). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 253 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 71.42%, H 4.79%, N 11.10%. Hallado: C 71.15%, H 4.55%, N 11.02%.

<sup>171</sup> Kouznetsov, V. V.; Bello, J. S.; Amado, D. F., A simple entry to novel spiro dihydroquinoline-oxindoles using Povarov reaction between 3-*N*-aryliminoisatins and isoeugenol. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5855-5857.

## Parte Experimental

**(E,Z)-3-((2-(Trifluorometil)fenil)imino)indolin-2-ona (127)<sup>172</sup>:** Método A:

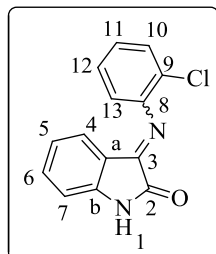


Reactivos: isatina (250 mg, 1.7 mmol), 2-trifluorometilanilina (273.7 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 20 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para

obtener un sólido naranja. Rendimiento: 262.3 mg, 53%, ratio E/Z: 62:38. P.f: 177 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.06 (s, 1.8H, H-1), 7.85 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-10), 7.73 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-12), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-11), 7.38 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.14 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-13), 6.94 - 6.90 (m, 1.4H, H-7), 6.74 (td, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.0 (C-2), 156.5 (C-3), 148.8 (C-8), 147.4 (C-b), 135.2 (C-6), 134.1 (C-12), 126.8 (c, *J* = 4.9 Hz, C-10), 125.5 (C-4), 125.1 (C-11), 123.7 (c, *J* = 273.2 Hz, C-14), 122.1 (C-5), 118.5 (C-13), 117.1 (c, *J* = 30.4 Hz, C-9), 115.6 (C-a), 111.8 (C-7). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.06 (s, 1.8H, H-1), 7.69 - 7.60 (m, 0.8H, H-4, H-10), 7.59 - 7.48 (m, 0.8H, H-6, H-12), 7.26 (t, 7.7 Hz, 0.8H, H-11), 7.11 - 7.03 (m, 0.9H, H-5, H-13), 6.94 - 6.90 (m, 1.4H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 158.4 (C-2), 154.4 (C-3), 148.6 (C-8), 146.4 (C-b), 135.2 (C-6), 132.7 (C-12), 125.8 (c, *J* = 5.3 Hz, C-10), 123.8 (C-11), 123.7 (c, *J* = 273.2 Hz, C-14), 123.4 (C-4), 122.7 (C-5), 120.5 (C-a), 119.3 (C-13), 117.0 (c, *J* = 29.7 Hz, C-9), 111.2 (C-7). MS (ESI+): *m/z* 291 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 62.07%, H 3.13%, N 9.65%. Hallado: C 62.21%, H 2.98%, N 9.60%.

<sup>172</sup> Piscopo, E.; Diurno, M. V.; Antonucci, M.; Imperatrice, F.; Caliendo, V.; Cataldi, M. T., Studies on heterocyclic compounds: Indol-2,3-dione derivatives. I. Biological activity of fluorinated 3-phenyliminoindol-2(3H)-ones. *Boll. - Soc. Ital. Biol. Sper.* **1985**, *61*, 1327-33.

**(E,Z)-3-((2-Clorofenil)imino)indolin-2-ona (128)**<sup>173</sup>: Método A: Reactivos:



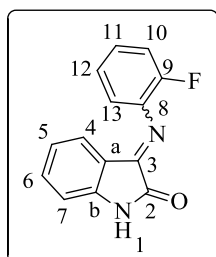
isatina (250 mg, 1.7 mmol), hidrocloreuro de 2-cloroanilina (278.6 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 12 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetoneitrilo (7:3) para obtener un sólido amarillo.

Rendimiento: 16.6 mg, 4%. P.f: 175 °C, ratio E/Z: 77:23. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.05 (s, 1H, H-1), 7.56 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, H-10), 7.39 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, H-12), 7.35 (td, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.24 (td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H-11), 7.03 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H-13), 6.93 – 6.86 (m, 1H, H-7), 6.72 (td, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 1H, H-5), 6.22 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.9 (C-2), 157.2 (C-3), 147.8 (C-b o C-8), 147.5 (C-b o C-8), 136.0 (C-6), 130.8 (C-10), 129.2 (C-12), 127.1 (C-11), 125.8 (C-4), 123.0 (C-5), 121.7 (C-9), 119.6 (C-13), 116.5 (C-a), 112.5 (C-7). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.90 (s, 0.3H, H-2), 7.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.3H, H-4), 7.46 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0.3H, H-6), 7.41 – 7.38 (m, 0.3H, H-10 o H-13), 7.25 – 7.20 (m, 0.3H, H-11 o H-12), 7.09 – 7.05 (m, 0.6H, H-5, H-11 o H-12), 6.96 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 0.3H, H-10 o H-13), 6.89 – 6.85 (m, 0.3H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.0 (C-2), 155.6 (C-3), 147.4 (C-b o C-8), 146.8 (C-b o C-8), 135.8 (C-6), 129.8 (C-10 o c-13), 128.0 (C-11 o C-12), 125.9 (C-11 o C-12), 124.0 (C-4), 123.4 (C-5), 122.3 (C-a), 121.1 (C-9), 120.4 (C-10 o C-13), 111.8 (C-7). MS (ESI+): *m/z* 259 [M + 3], 257 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O) Calculado: C 65.51%, H 3.53%, N 10.91%. Hallado: C 65.67%, H 3.81%, N 11.02%.

<sup>173</sup> Khan, K. M.; Mughal, U. R.I.; Samreen; Perveen, S.; Choudhary, M. I., Schiff bases of isatin: potential anti-leishmanial agents. *Lett. Drug Des. Discov.* **2008**, *5*, 243-249.

## Parte Experimental

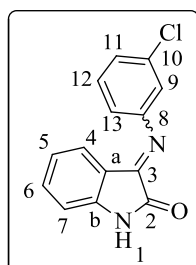
**(E,Z)-3-((2-Fluorofenil)imino)indolin-2-ona (129)**<sup>172</sup>: Método A: Reactivos:



isatina (250 mg, 1.7 mmol), 2-fluoroanilina (188.8 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg). Condiciones de reacción: 6 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 246.5 mg, 60%, ratio E/Z:

67:33. P.f: 199 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.01 (s, 1.5H, H-1), 7.42 - 7.30 (m, 2.5H, H-6, H-10), 7.30 - 7.12 (m, 4.5H, H-11, 13), 6.90 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-7), 6.76 (td, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.45 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.8 (C-2), 157.6 (C-3), 150.9 (d, *J* = 244.1 Hz, C-9), 147.8 (C-b), 138.2 (d, *J* = 12.8 Hz, C-8), 135.9 (C-6), 127.3 (d, *J* = 7.1 Hz, C-11 o C-13), 126.1 (d, *J* = 3.6 Hz, C-11 o C-13), 125.6 (C-4), 122.8 (C-5), 121.1 (d, *J* = 1.5 Hz, C-12), 117.1 (d, *J* = 19.1 Hz, C-10), 116.6 (C-a), 112.4 (C-7). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.01 (s, 1.5H, H-1), 7.63 (ddd, *J* = 7.5, 1.1, 0.5 Hz, 0.5H, H-4), 7.42 - 7.30 (m, 2.5H, H-6, H-Ph), 7.30 - 7.12 (m, 4.5H, H-Ph), 7.07 (td, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.5H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.1 (C-2), 156.0 (C-3), 151.5 (d, *J* = 243.7 Hz, C-9), 146.7 (C-b), 137.5 (d, *J* = 12.9 Hz, C-8), 135.6 (C-6), 126.3 (d, *J* = 7.4 Hz, C-11 o C-13), 125.0 (d, *J* = 3.5 Hz, C-11 o C-13), 123.9 (C-4), 123.2 (C-5), 122.3 (d, *J* = 1.9 Hz, C-12), 121.3 (C-a), 115.9 (d, *J* = 19.9 Hz, C-10), 111.7 (C-7). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 243 [M + 1], 241 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O) Calculado: C 69.99%, H 3.78%, N 11.66%. Hallado: C 70.05%, H 3.93%, N 11.54%.

**(E,Z)-3-((3-Clorofenil)imino)indolin-2-ona (130)**<sup>172</sup>: Método A: Reactivos:



isatina (250 mg, 1.7 mmol), hidrocloreuro de 3-cloroanilina (278.6 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL).

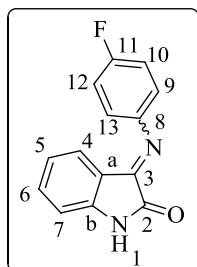
Condiciones de reacción: 6 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetronitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja.

Rendimiento: 45.1 mg, 10%, ratio *E/Z*: 63:37. P.f: 215 °C.

**Isómero E:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.99 (s, 1H, H-1), 7.51 – 7.39 (m, 1.3H, H-12), 7.38 – 7.29 (m, 1H, H-6), 7.30 – 7.25 (m, 1.3H, H-11), 7.09 (ddd, *J* = 2.4, 1.8, 0.4 Hz, 1H, H-9), 6.96 – 6.92 (m, 1H, H-13), 6.87 (ddt, *J* = 7.9, 1.1, 0.6 Hz, 1H, H-7), 6.74 (tdd, *J* = 7.7, 1.0, 0.5 Hz, 1H, H-5), 6.32 (ddd, *J* = 7.8, 1.4, 0.7 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.0 (C-2), 156.3 (C-3), 152.7 (C-10), 147.8 (C-b), 135.5 (C-6), 134.7 (C-8), 132.1 (C-12), 126.1 (C-4), 125.3 (C-11), 122.6 (C-5), 117.9 (C-9), 116.8 (C-13), 116.3 (C-a), 112.3 (C-7). **Isómero Z:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.87 (s, 0.3H, H-1), 7.56 (ddd, *J* = 7.4, 1.3, 0.7 Hz, 0.3H, H-4), 7.51 – 7.39 (m, 1.3H, H-6), 7.30 – 7.25 (m, 1.3H, H-12), 7.11 (dddd, *J* = 8.0, 2.1, 1.0, 0.5 Hz, 0.3H, H-11), 7.07 – 7.01 (m, 0.6H, H-5, H-9), 6.92 – 6.89 (m, 0.3H, H-13), 6.84 (dc, *J* = 7.8, 0.8 Hz, 0.3H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.1 (C-2), 154.5 (C-3), 151.5 (C-10), 146.7 (C-b), 135.3 (C-6), 133.4 (C-8), 130.7 (C-12), 124.5 (C-11), 123.8 (C-4), 123.0 (C-13), 121.7 (C-a), 119.0 (C-5), 118.3 (C-9), 111.6 (C-7). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 259 [M + 3], 257 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O) Calculado: C 65.51%, H 3.53%, N 10.91%. Hallado: C 65.48%, H 3.71%, N 10.80%.

## Parte Experimental

**(E,Z)-3-((4-Fluorofenil)imino)indolin-2-ona (131):** Método A: Reactivos:

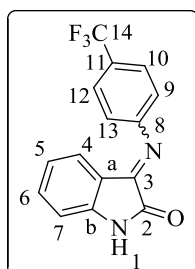


isatina (250 mg, 1.7 mmol), 4-fluoroanilina (188.8 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 6 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido amarillo. Rendimiento: 289.5 mg, 71%, ratio E/Z: 67:33. P.f: 217 - 218 °C (lit.<sup>174</sup> 210 - 216 °C).

**Isómero E:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.94 (s, 1.3H, H-1), 7.36 - 7.23 (m, 3H, H-6, H-10, H-12), 7.14 - 6.98 (m, 3.6H, H-9, H-13), 6.86 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H, H-7), 6.72 (td, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 1H, H-5), 6.40 (ddd, *J* = 7.8, 1.2, 0.6 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.1 (C-2), 160.3 (d, *J* = 240.9 Hz, C-11), 156.2 (C-3), 147.7 (C-b), 147.4 (d, *J* = 2.7 Hz, C-8), 135.2 (C-6), 126.0 (C-4), 122.1 (C-5), 117.1 (d, *J* = 22.6 Hz, C-10, C-12), 120.0 (d, *J* = 8.2 Hz, C-9, C-13), 116.3 (C-a), 112.2 (C-7). **Isómero Z:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.94 (s, 1.3H, H-1), 7.58 - 7.51 (m, 0.3H, H-4), 7.41 (td, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 0.3H, H-6), 7.41 - 6.98 (m, 3.6H, H-5, H-Ph), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.3H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 160.3 (d, *J* = 240.9 Hz, C-11), 159.8 (C-2), 154.1 (C-3), 146.3 (C-b), 145.7 (d, *J* = 2.7 Hz, C-8), 134.9 (C-6), 123.4 (C-4), 123.0 (C-a), 122.5 (C-5), 122.0 (d, *J* = 8.3 Hz, C-9, C-13), 115.6 (d, *J* = 22.5 Hz, C-10, C-12), 111.4 (C-7). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 241 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O) Calculado: C 69.99%, H 3.78%, N 11.66%. Hallado: C 70.12%, H 3.92%, N 11.48%.

<sup>174</sup> Bari, S. B.; Agrawal, A. O.; Patil, U. K., Synthesis and pharmacological evaluation of some novel isatin derivatives for antimicrobial activity. *J. Sci., Islamic Repub. Iran.* **2008**, *19*, 217-221.

**(*E,Z*)-3-((4-(Trifluorometil)fenil)imino)indolin-2-ona (132)<sup>172</sup>:** Método A:



Reactivos: isatina (250 mg, 1.7 mmol), 4-trifluorometilanilina (273.7 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (0.5 mL).

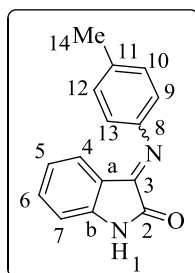
Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja.

Rendimiento: 203.1 mg, 41%, ratio *E/Z*: 71:29. P.f: 265 °C.

**Isómero *E*:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.00 (s, 1.4H, H-1), 7.86 - 7.77 (m, 2H, H-10, H-12), 7.35 (td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.22 - 7.16 (m, 2H, H-9, H-13), 6.89 (dt, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 1H, H-7), 6.74 (td, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.28 (ddd, *J* = 7.7, 1.3, 0.6 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.2 (C-2), 158.6 (C-3), 154.0 (C-8), 147.3 (C-b), 135.0 (C-6), 127.0 (c, *J* = 4.1 Hz, C-10, C-12), 125.5 (C-4), 125.2 (c, *J* = 32.1 Hz, C-11), 122.6 (c, *J* = 232.3 Hz, C-14), 122.0 (C-5), 118.0 (C-9, C-13), 115.6 (C-a), 111.7 (C-7). **Isómero *Z*:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.00 (s, 1.4H, H-1), 7.67 - 7.60 (m, 0.8H, H-10, H-12), 7.60 (ddd, *J* = 7.3, 1.0, 0.5 Hz, 0.4H, H-4), 7.47 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0.4H, H-6), 7.15 - 7.10 (m, 0.8H, H-9, H-13), 7.07 (td, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 0.4H, H-5), 6.87 (dt, *J* = 7.8, 0.8 Hz, 0.4H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.2 (C-2), 158.6 (C-3), 155.4 (C-8), 146.3 (C-b), 134.8 (C-6), 125.7 (c, *J* = 3.9 Hz, C-10, C-12), 124.2 (c, *J* = 36.4 Hz, C-11), 123.3 (C-4), 122.6 (c, *J* = 232.3 Hz, C-14), 122.5 (C-5), 120.8 (C-a), 119.0 (C-9, C-13), 111.0 (C-7). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 291 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 62.07%, H 3.13%, N 9.65%. Hallado: C 62.36%, H 3.12%, N 9.40%.

## Parte Experimental

**(E,Z)-3-((4-Metilfenil)imino)indolin-2-ona (133)**<sup>172</sup>: Método A: Reactivos:

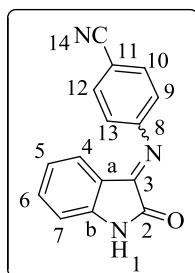


isatina (250 mg, 1.7 mmol), 4-metilanilina (182.1 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 20 min bajo irradiación microondas a 100 °C.

Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 324.4 mg, 81%, ratio *E/Z*: 77:23. P.f: 226 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.93 (s, 1.15H, H-1), 7.32 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-10, H-12), 6.92 – 6.83 (m, 3.15H, H-7, H-9, H-13), 6.72 (td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H, H-5), 6.47 (dt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-4), 2.34 (s, 3H, H-14). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.5 (C-2), 154.8 (C-3), 147.8 (C-8), 146.9 (C-b), 134.3 (C-6, C-11), 134.2 (C-6, C-11), 130.0 (C-10, C-12), 125.2 (C-4), 121.7 (C-5), 117.4 (C-9, C-13), 115.7 (C-a), 111.5 (C-7), 20.4 (C-14). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.93 (s, 1.15H, H-1), 7.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.15H, H-4), 7.42 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 0.15H, H-6), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 0.3H, H-10, H-12), 7.04 (t, *J* = 7.8 Hz, 0.15H, H-5), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 0.3H, H-9, H-13), 6.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 0.15H, H-7), 2.29 (s, 0.45H, H-14). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 158.5 (C-2 o C-3), 152.4 (C-2 o C-3), 146.2 (C-8), 145.4 (C-b), 134.3 (C-6, C-11), 134.0 (C-6, C-11), 128.8 (C-10, C-12), 122.6 (C-4), 122.3 (C-5), 119.7 (C-9, C-13), 111.5 (C-7), 110.7 (C-a), 20.4 (C-14). MS (ESI+): *m/z* 237 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 76.25%, H 5.12%, N 11.86%. Hallado: C 76.19%, H 4.98%, N 11.62%.

**(E,Z)-4-((2-Oxoindolin-3-iliden)amino)benzonitrilo (134):** Método A:



Reactivos: isatina (250 mg, 1.7 mmol), 4-aminobenzonitrilo (200.7 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL).

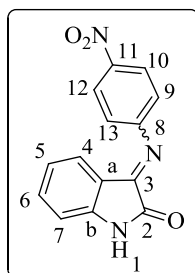
Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (1:1) para obtener un sólido naranja.

Rendimiento: 236.9 mg, 56%, ratio E/Z: 64:36. P.f: 277 °C.

**Isómero E:**  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.99 (s, 1.5H, H-1), 7.92 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-10, H-12), 7.36 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-6), 7.18 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-8), 6.89 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-7), 6.75 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-5), 6.30 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-4).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  163.1 (C-2), 155.3 (C-3), 154.6 (C-8), 147.3 (C-b), 135.0 (C-6), 134.0 (C-10, C-12), 125.7 (C-4), 122.0 (C-5), 119.0 (C-14), 118.3 (C-9, C-13), 115.5 (C-a), 111.7 (C-7), 107.2 (C-11). **Isómero Z:**  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.99 (s, 1.5H, H-1), 7.75 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-10, H-12), 7.60 (d,  $J = 7.5$  Hz, 0.5H, H-4), 7.47 (t,  $J = 7.6$  Hz, 0.5H, H-6), 7.11 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-9, H-13), 7.06 (t,  $J = 7.4$  Hz, 0.5H, H-5), 6.86 (d,  $J = 7.6$  Hz, 0.5H, H-7).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  158.5 (C-2), 154.2 (C-3 o C-8), 153.7 (C-3 o C-8), 146.3 (C-b), 134.9 (C-6), 132.7 (C-10, C-12), 123.3 (C-4), 122.4 (C-5), 120.6 (C-a), 119.3 (C-9, C-13), 119.0 (C-14), 111.0 (C-7), 106.0 (C-11). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  248 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$ ) Calculado: C 71.87%, H 3.67%, N 16.99%. Hallado: C 73.12%, H 3.71%, N 17.02%.

## Parte Experimental

**(E,Z)-3-((4-Nitrofenil)imino)indolin-2-ona (135):** Método A: Reactivos: isatina



(250 mg, 1.7 mmol), 4-nitroanilina (234.7 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de

reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C.

Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3)

para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 110.5 mg, 24%,

ratio *E/Z*: 64:36. P.f: 267 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.99 (s, 1.3H, H-1), 8.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-10, H-12), 7.37 (t, *J* =

7.8 Hz, 1H, H-6), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-9, H-13), 6.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1.6H,

H-7), 6.73 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 6.35 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.0 (C-2), 156.5 (C-3), 155.4 (C-11), 147.4 (C-b), 144.3 (C-

8), 135.2 (C-6), 126.0 (C-4), 125.7 (C-10, C-12), 122.1 (C-5), 118.2 (C-9, C-13),

115.5 (C-a), 111.7 (C-7). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.99 (s,

1.3H, H-1), 8.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 0.5H, H-10, H-12), 7.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.5H, H-4),

7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 0.5H, H-6), 7.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 0.5H, H-9, H-13), 7.09 (d, *J* =

7.7 Hz, 0.5H, H-5), 6.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1.6H, H-7). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-

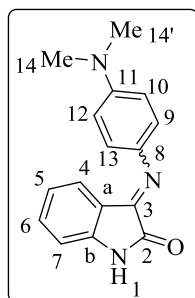
*d*<sub>6</sub>): δ 158.6 (C-2), 156.5 (C-3), 153.8 (C-11), 146.6 (C-b), 143.5 (C-8), 135.2 (C-6),

124.4 (C-10, C-12), 123.5 (C-4), 122.5 (C-5), 120.5 (C-a), 119.0 (C-9, C-13), 111.1

(C-7). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 268 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) Calculado:

C 62.92%, H 3.39%, N 15.72%. Hallado: C 63.00%, H 3.60%, N 15.81%.

**(E,Z)-3-((4-Isopropilfenil)imino)indolin-2-ona (136)**<sup>175</sup>: Método A: Reactivos:



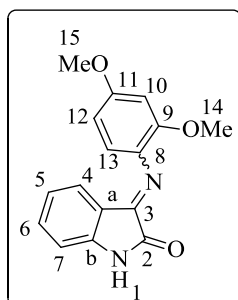
isatina (250 mg, 1.7 mmol), *N,N'*-dimetilbenceno-1,4-diamina (231.4 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetónitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 380.1 mg, 84%, ratio *E/Z*: 76:24. P.f: 264 °C.

**Isómero E:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.84 (s, 1.25H, H-1), 7.38 - 7.27 (m, 1.25H, H-6), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4), 7.06 - 6.99 (m, 2H, H-9, H-13), 6.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-7), 6.85 - 6.73 (m, 3H, H-5, H-10, H-12), 2.96 (s, 6H, H-14, H-14'). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.2 (C-2), 152.8 (C-3), 150.1 (C-11), 147.4 (C-b), 139.4 (C-8), 134.6 (C-6), 125.2 (C-4), 122.6 (C-5), 122.3 (C-9, C-13), 117.2 (C-a), 113.4 (C-10, C-12), 112.4 (C-7), 41.2 (C-14, C-14'). **Isómero Z:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.84 (s, 1.25H, H-1), 7.57 - 7.46 (m, 0.75H, H-5, H-9, H-13), 7.38 - 7.27 (m, 1.25H, H-6), 6.69 (d, *J* = 9.1 Hz, H-10, H-12), 2.98 (s, 1.5H, H-14, H-14'). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 160.5 (C-1), 151.0 (C-11), 148.0 (C-3), 144.7 (C-7), 137.2 (C-8), 133.0 (C-6), 127.6 (C-9, C-13), 124.6 (C-a), 123.0 (C-4 o C-5), 122.5 (C-4 o C-5), 112.1 (C-10, C-12), 111.2 (C-7), 41.1 (C-14, C-14'). MS (ESI+): *m/z* 266 [M + 2]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O) Calculado: C 72.43%, H 5.70%, N 15.84%. Hallado: C 72.16%, H 5.51%, N 16.03%.

<sup>175</sup> Kalavska, D.; Kalavsky, S.; Kosturiak, A.; Szalo, A., Study of acid hydrolysis of some substituted derivatives of 3-phenyliminooxindole. *Chem. Zvesti.* **1978**, 32, 650-657.

## Parte Experimental

**(E,Z)-3-((2,4-Dimetoxifenil)imino)indolin-2-ona (137)<sup>176</sup>:** Método A:

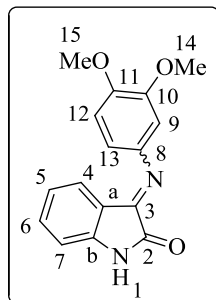


Reactivos: isatina (250 mg, 1.7 mmol), 2,4-dimetoxianilina (260.3 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 6 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (3:2) para obtener un sólido rojo-naranja. Rendimiento: 223.2 mg, 47%, ratio E/Z: 83:17.

P.f: 216 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.89 (s, 1H, H-1), 7.31 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H-6), 6.88 - 6.93 (m, 2H, H-7, H-13), 6.76 (td, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H, H-4), 6.69 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-10), 6.64 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-4), 6.57 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H, H-12), 3.78 (s, 3H, H-15), 3.66 (s, 3H, H-14). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.4 (C-2), 159.1 (C-11), 155.7 (C-3), 149.9 (C-9), 146.9 (C-b), 134.7 (C-6), 132.6 (C-8), 125.4 (C-4), 122.6 (C-5), 120.4 (C-13), 117.1 (C-a), 111.9 (C-7), 105.7 (C-12), 100.2 (C-10), 56.2 (CH<sub>3</sub>-OMe), 56.1 (CH<sub>3</sub>-OMe). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.74 (s, 0.2H, H-1), 7.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 0.2H, H-4), 7.38 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0.2H, H-6), 7.01 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 0.2H, H-5), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 0.2H, H-12), 6.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.2H, H-7), 6.55 (d, *J* = 2.5 Hz, 0.2H, H-10), 6.44 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 0.2H, H-13), 3.74 (s, 0.6H, H-OMe), 3.67 (s, 0.6H, H-OMe). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 283 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Calculado: C 68.07%, H 5.00%, N 9.92%. Hallado: C 67.83%, H 5.11%, N 9.88%.

<sup>176</sup> Azizian, J.; Morady, A. V.; Soozangarzadeh, S.; Asadi, A., Synthesis of novel spiro-[3H-indole-3,3'-[1,2,4]triazolidine]-2-ones via azomethine imines. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9721-9723.

**(E,Z)-3-((3,4-Dimetoxifenil)imino)indolin-2-ona (138):** Método A: Reactivos:



isatina (250 mg, 1.7 mmol), 3,4-dimetoxianilina (260.3 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL).

Condiciones de reacción: 6 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (4:1) para obtener un sólido rojo-naranja.

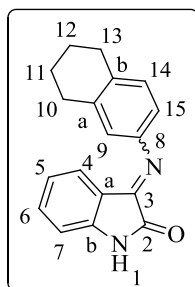
Rendimiento: 312.7 mg, 65%, ratio E/Z: 83:17. P.f: 265 °C.

**Isómero E:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.91 (s, 1H, H-1), 7.31 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, H-6), 7.03 - 6.99 (m, 1.2H, H-12), 6.86 (dt, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 1.2H, H-7), 6.74 (d, *J* = 1.9 Hz, 1.2H, H-5), 6.70 - 6.64 (m, 2H, H-4, H-9), 6.51 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H-13), 3.76 (s, 3H, H-OMe), 3.68 (s, 3H, H-OMe). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.4 (C-2), 155.2 (C-3), 150.2 (C-10), 147.4 (C-b), 147.1 (C-11), 144.1 (C-8), 134.9 (C-6), 125.8 (C-4), 122.4 (C-5), 116.4 (C-a), 113.1 (C-12), 112.1 (C-7), 109.9 (C-13), 103.8 (C-9), 56.4 (CH<sub>3</sub>-OMe), 56.1 (CH<sub>3</sub>-OMe).

**Isómero Z:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.80 (s, 0.2H, H-1), 7.54 - 7.49 (m, 0.2H, H-4), 7.38 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 0.2H, H-6), 7.03 - 6.99 (m, 1.2H, H-5), 6.93 - 6.88 (m, 0.2H, H-9), 6.86 (dt, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 1.2H, H-12), 6.81 (dt, *J* = 7.7, 0.8 Hz, 0.2H, H-7), 6.74 (d, *J* = 1.9 Hz, 1.2H, H-13), 3.74 (s, 0.6H, H-OMe), 3.69 (s, 0.6H, H-OMe). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 283 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Calculado: C 68.07%, H 5.00%, N 9.92%. Hallado: C 67.89%, H 4.94%, N 9.81%.

## Parte Experimental

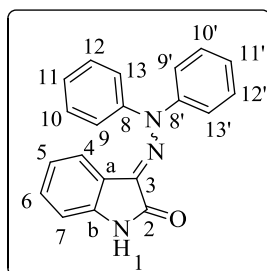
### (*E,Z*)-3-((5,6,7,8-Tetrahidronaftalen-2-il)imino)indolin-2-ona (139): Método



A: Reactivos: isatina (250 mg, 1.7 mmol), 5,6,7,8-2-amino-tetrahidronaftaleno (250.1 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 20 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (4:1) para obtener un sólido naranja-amarillo. Rendimiento: 329.7 mg, 70%, ratio *E/Z*:

11:89. P.f: 211 °C. Isómero *E/Z*: <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.64 (s, 1H), 9.40 (s, 0.3H), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 0.3H), 7.53 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 0.3H), 7.35 - 7.24 (m, 1H), 7.18 - 6.84 (m, 5H), 6.75 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.80 (dt, *J* = 26.4, 6.2 Hz, 3H), 2.62 - 2.36 (m, 2H), 1.93 - 1.60 (m, 6H). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.3, 159.8, 154.4, 149.6, 148.7, 145.3, 139.0, 138.6, 134.1, 126.1, 126.1, 126.0, 125.9, 125.7, 125.6, 123.8, 122.9, 118.0, 117.8, 116.5, 113.3, 112.6, 111.7, 29.8, 29.6, 25.0, 24.3, 22.8, 22.6, 22.3. MS (ESI+): *m/z* 277 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 78.24%, H 5.84%, N 10.14%. Hallado: C 77.99%, H 5.70%, N 9.96%.

### (*E,Z*)-3-(2,2-Difenilhidrazona)indolin-2-ona (140)<sup>177</sup>: Método A: Reactivos:

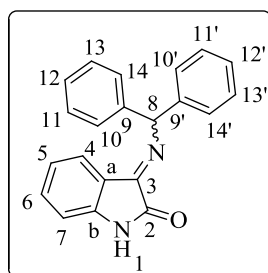


isatina (250 mg, 1.7 mmol), hidrocloreuro de 2,2-difenilhidrazona (220.7 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg), trietilamina (171.9 mg, 1.7 mmol) y tolueno (3 mL). Condiciones de reacción: 6 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido verde-amarillo. Rendimiento: 394.8 mg, 74%, ratio *E/Z*: 95:5. P.f: 246 -

<sup>177</sup> Popp, F. D., Potential anticonvulsants. IX. Some isatin hydrazones and related compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **1984**, *21*, 1641-1645.

248 °C. Isómero E:  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.64 (s, 1H, H-1), 7.47 – 7.41 (m, 4H, H-Ph), 7.31 – 7.26 (m, 6H, H-Ph), 7.07 (td,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1H, H-6), 6.75 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-7), 6.40 (td,  $J = 7.8, 1.1$  Hz, 1H, H-5), 5.39 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-7).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  166.5 (C-2), 157.5 (C-3), 146.3 (C-8, C-8'), 143.9 (C-b), 131.0 (C-6), 130.2 (4 CH-Ph), 126.7 (2 CH-Ph), 125.8 (C-4), 123.6 (4 CH-Ph), 121.3 (C-5), 116.4 (C-a), 110.6 (C-7). MS (ESI+):  $m/z$  314 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ ) Calculado: C 76.66%, H 4.82%, N 13.41%. Hallado: C 76.84%, H 5.09%, N 13.17%.

**(E,Z)-3-(Bencidrilimino)indolin-2-ona (141)**<sup>178</sup>: Método A: Reactivos: isatina



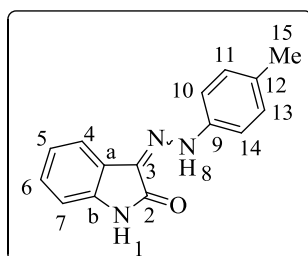
(250 mg, 1.7 mmol), difenilmetanamina (311.3 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg). Condiciones de reacción: 20 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja-amarillo. Rendimiento: 255.1 mg, 48%, ratio *E/Z*: 35:65. P.f: 173 °C. Isómero Z:  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.01 (s, 1H, H-1), 7.73 (s, 1H, H-8), 7.64 – 7.61 (m, 1H, H-4), 7.47 – 7.43 (m, 4H, H-Ph), 7.42 – 7.37 (m, 1.5H, H-6), 7.37 – 7.29 (m, 6H, H-Ph), 7.26 – 7.20 (m, 3H, H-Ph), 7.05 (td,  $J = 7.5, 0.9$  Hz, 1H, H-5), 6.85 (dt,  $J = 7.8, 0.8$  Hz, 1H, H-7).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  163.6 (C-2), 153.0 (C-3), 144.4 (C-b), 144.1 (C-9, C-9'), 133.4 (C-6), 128.4 (4 CH-Ph), 127.4 (4 CH-Ph), 126.9 (2 CH-Ph), 122.3 (C-5), 122.0 (C-4), 121.6 (C-a), 110.6 (C-7), 64.1 (C-8). Isómero E:  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.89 (s, 0.5H, H-1), 7.90 (d,  $J = 7.6$  Hz, 0.5H, H-4), 7.52 (dd,  $J = 8.3, 1.1$  Hz, 2H, H-Ph), 7.42 – 7.37 (m, 1.5H, H-6), 7.37 – 7.29 (m, 6H, H-Ph), 7.26 – 7.20 (m, 3H, H-Ph), 7.00 (td,  $J = 7.7, 1.1$

<sup>178</sup> Al-Kahraman, Y. M. S. A.; Singh, G. S.; Yasinzai, M., Evaluation of *N*-(2-thienylidene)amines, *N*-(2-hydroxybenzylidene)amines and 3-iminoindolin-2-ones as antileishmanial agents. *Lett. Drug Des. Discov.* **2011**, *8*, 491-495.

## Parte Experimental

Hz, 0.5H, H-5), 6.89 (dt,  $J = 7.8, 0.8$  Hz, 0.5H, H-7), 6.62 (s, 0.5H, H-8).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  160.0 (C-2), 154.3 (C-3), 146.5 (C-b), 143.8 (C-9, C-9'), 133.8 (C-6), 128.5 (4 CH-Ph), 127.3 (C-4), 127.2 (4 CH-Ph), 127.0 (2 CH-Ph), 122.1 (C-5), 116.1 (C-a), 111.2 (C-7), 68.1 (C-8). MS (ESI+):  $m/z$  313[M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ ) Calculado: C 80.75%, H 5.16%, N 8.97%. Hallado: C 80.57%, H 5.02%, N 8.75%.

**(E,Z)-3-(2-(4-Tolil)hidrazono)indolin-2-ona (142)**<sup>179</sup>: Método A: Reactivos:

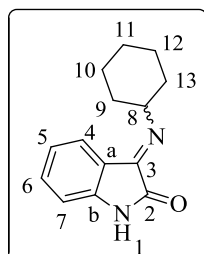


isatina (250 mg, 1.7 mmol), hidrocloreuro de 4-tolilhidrazina (269.5 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg), trietilamina (171.9 mg, 1.7 mmol) y tolueno (3 mL). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación:

IsoleraOne empleando agua/acetronitrilo (7:3) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 104.1 mg, 24%, ratio *E/Z*: 14:86. P.f: 224 °C. Isómero Z:  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.71 (s, 1H, H-8), 10.97 (s, 1H, H-1), 7.50 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-4), 7.33 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-10, H-14), 7.23 (td,  $J = 7.7, 1.3$  Hz, 1H, H-6), 7.18 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-11, H-13), 7.04 (tdd,  $J = 7.6, 1.6, 0.9$  Hz, 1H, H-5), 6.95 – 6.88 (m, 1H, H-7), 2.24 (s, 3H, H-15).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  163.9 (C-2), 140.9 (C), 140.2 (C), 132.7 (C), 130.6 (C-11, C-13), 128.9 (C-6), 127.6 (C), 122.5 (C-5), 121.9 (C-a), 119.1 (C-4), 114.7 (C-10, C-14), 111.1 (C-7), 21.1 (C-15). MS (ESI+):  $m/z$  252 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ ) Calculado: C 71.70%, H 5.21%, N 16.72%. Hallado: C 72.00%, H 5.48%, N 16.45%.

<sup>179</sup> Seferoglu, Z.; Aktan, E.; Ertan, N., Spectral characterization and computational studies of some novel phenylazoindol-2-one dyes. *Color. Technol.* **2009**, 125, 342-351.

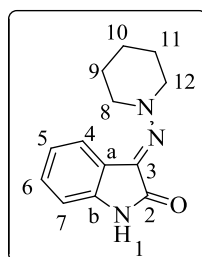
**(E,Z)-3-(Ciclohexilimino)indolin-2-ona (143)**<sup>178</sup>: Método A: Reactivos: isatina



(250 mg, 1.7 mmol), ciclohexilamina (168.6 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (4:1) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 274.7 mg, 71%, ratio E/Z: 45:55. P.f:

213 °C. Isómero E/Z: <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.87 (s, 1H), 10.79 (s, 1H), 7.65 - 7.29 (m, 4H), 7.12 - 6.93 (m, 2H), 6.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.12 - 5.00 (m, 1H), 4.21 - 4.07 (m, 1H), 1.89 - 1.12 (m, 20H). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.5 (C), 159.3 (C), 152.5 (C), 151.8 (C), 145.9 (C), 144.1 (C), 138.3 (CH), 133.2 (CH), 132.7 (CH), 126.5 (CH), 124.6 (CH), 122.7 (CH), 122.2 (CH), 122.1 (CH), 121.5 (CH), 117.8 (C), 115.9 (C), 112.2 (CH), 110.4 (CH), 60.4 (CH), 57.8 (CH), 33.7 (2 CH<sub>2</sub>), 32.8 (2 CH<sub>2</sub>), 25.2 (2 CH<sub>2</sub>), 24.1 (2 CH<sub>2</sub>), 23.9 (2 CH<sub>2</sub>). MS (ESI+): *m/z* 229 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O) Calculado: C 73.66%, H 7.06%, N 12.27%. Hallado: C 73.38%, H 6.92%, N 12.40%.

**(E,Z)-3-(Piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (144)**: Método A: Reactivos: isatina



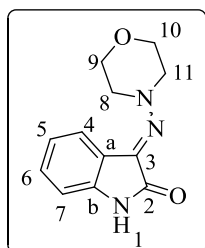
(250 mg, 1.7 mmol), 1-aminopiperidina (170.2 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (4:1) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 335.0 mg, 86%, ratio E/Z:

46:54. P.f: 142 °C (lit.<sup>177</sup> 141 - 142 °C). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.55 (s, 1H, H-1), 7.28 - 7.24 (m, 1H, H-4), 7.11 - 7.02 (m, 1.8H, H-6), 6.94 - 6.85 (m, 1.8H, H-5), 6.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 3.97 - 3.93 (m, 4H, H-8, H-12), 1.90 - 1.47 (m, 12H, H-9, H-10, H-11). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ

## Parte Experimental

158.4 (C-2), 143.3 (C-b), 140.2 (C-3), 126.5 (C-6), 126.7 (C-a), 120.9 (C-5), 117.8 (C-4), 109.0 (C-7), 57.5 (C-8, C-12), 25.8 (C-9, C-11), 23.2 (C-10). Isómero E:  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.64 (s, 0.8H, H-1), 7.32 – 7.24 (m, 1.8H, H-4, H-6), 7.11 – 7.02 (m, 1.8H, H-5), 6.94 – 6.85 (m, 1.8H, H-7), 3.22 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 4H, H-8, H-12), 1.90 – 1.47 (m, 12H, H-9, H-10, H-11).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.1 (C-2, C-3), 138.5 (C-b), 130.9 (C-6), 125.4 (C-4), 121.8 (C-5), 115.6 (C-a), 110.3 (C-7), 55.9 (C-8, C-12), 24.9 (C-9, C-11), 23.3 (C-10). MS (ESI+):  $m/z$  230 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ ) Calculado: C 68.10%, H 6.59%, N 18.33%. Hallado: C 68.12%, H 6.61%, N 18.20%.

**(E,Z)-3-(Morfolinoimino)indolin-2-ona (145)**: Método A: Reactivos: isatina

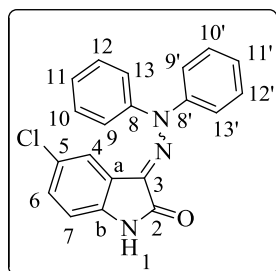


(250 mg, 1.7 mmol), 1-aminomorfolina (173.6 mg, 1.7 mmol), MMT-K10 (34 mg). Condiciones de reacción: 10 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (4:1) para obtener un sólido naranja. Rendimiento: 354.5 mg, 59%, ratio E/Z: 88:12. P.f:

184 - 186 °C (lit.<sup>177</sup> 186 - 188 °C). Isómero Z:  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.71 (s, 1.5H, H-1), 7.37 (m, 2H, H-4, H-6), 7.06 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H-5), 6.90 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H-7), 3.83 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 4H, H-9, H-10), 3.20 (m, 4H, H-8, H-11).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  164.8 (C-3), 143.9 (C-b), 140.3 (C-3), 131.8 (C-6), 126.3 (C-4), 122.0 (C-5), 115.1 (C-a), 110.5 (C-7), 65.4 (C-9, C-10), 55.0 (C-8, C-11). Isómero E:  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.71 (s, 1.5H, H-1), 7.41 – 7.36 (m, 0.5H, H-4), 7.17 – 7.12 (m, 0.5H, H-6), 6.94 – 6.90 (m, 0.5H, H-5), 6.80 – 6.77 (m, 0.5H, H-7), 3.9 – 3.75 (m, 4H, H-morfolina).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  158.4 (C-2), 143.3 (C-3), 139.4 (C-b), 127.7 (C-6), 124.3 (C-a), 121.2 (C-5), 118.5 (C-4), 109.4 (C-7), 65.8 (C-14, C-16), 56.6 (C-13, C-17). MS (ESI+):

m/z 232 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 62.30%, H 5.67%, N 18.17%. Hallado: C 62.11%, H 5.83%, N 18.05%.

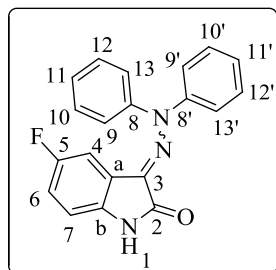
**(E,Z)-5-Cloro-3-(2,2-difenilhidrazono)indolin-2-one (146):** Método A:



Reactivos: 5-cloroisatina (250 mg, 1.4 mmol), hidrocloreuro de 2,2-difenilhidrazina (254.0 mg, 1.4 mmol), MMT-K10 (27 mg), trietilamina (139.0 mg, 1.4 mmol) y tolueno (6 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación:

IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (7:3) para obtener un sólido amarillo. Rendimiento: 284.1 mg, 59%, ratio E/Z: 85:15. P.f: 305 °C (lit.<sup>177</sup> 305 – 306 °C). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.75 (s, 1H, H-1), 7.49 (m, 4H, H-Ph), 7.35 (m, 6H, H-Ph), 7.12 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 4.98 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 166.3 (C-2), 145.8 (C-3), 142.2 (C-b), 130.3 (4 CH-Ph), 129.8 (C-6), 129.6 (2 C-Ph), 127.3 (2 CH-Ph), 125.3 (C-a), 125.3 (C-4), 124.0 (4 CH-Ph), 117.7 (C-5), 111.7 (C-7). MS (ESI+): m/z 350 [M + 3], 348 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 69.07%, H 4.06%, N 12.08%. Hallado: C 68.78%, H 3.95%, N 11.88%.

**(E,Z)-5-Fluoro-3-(2,2-difenilhidrazono)indolin-2-one (147):** Método A:



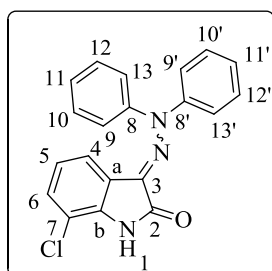
Reactivos: 5-fluoroisatina (250 mg, 1.5 mmol), hidrocloreuro de 2,2-difenilhidrazina (279.0 mg, 1.5 mmol), MMT-K10 (30 mg), trietilamina (153.0 mg, 1.5 mmol) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 1 h bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación:

columna cromatográfica empleando diclorometano como eluyente obteniendo un sólido marrón. Rendimiento: 138 mg, 27%, ratio

## Parte Experimental

*E/Z*: 96:4. P.f: 228 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.65 (s, 1H, H-1), 7.49 (m, 4H, H-Ph), 7.34 (m, 6H, H-Ph), 6.94 (ddd, *J* = 9.1, 8.5, 2.6 Hz, 1H, H-6), 6.73 (dd, *J* = 8.5, 4.7 Hz, 1H, H-7), 4.86 (dd, *J* = 10.5, 2.6 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 166.6 (C-2), 157.37 (d, *J* = 234.0 Hz, C-5), 146.0 (C-8, C-8'), 139.9 (d, *J* = 1.5 Hz, C-b), 131.3 (C-3), 130.3 (4 CH-Ph), 127.2 (2 CH-Ph), 123.9 (4 CH-Ph), 117.1 (d, *J* = 8.8 Hz, C-a), 116.8 (d, *J* = 23.7 Hz, C-6), 112.7 (d, *J* = 27.8 Hz, C-4), 111.1 (d, *J* = 8.1 Hz, C-7). MS (ESI+): *m/z* 332 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O) Calculado: C 72.50%, H 4.26%, N 12.68%. Hallado: C 72.79%, H 4.31%, N 12.85%.

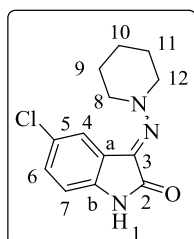
**(*E,Z*)-7-Cloro-3-(2,2-difenilhidrazono)indolin-2-ona (148)**: Método A:



Reactivos: 7-cloroisatina (250 mg, 1.4 mmol), hidrocloreuro de 2,2-difenilhidrazina (254.0 mg, 1.4 mmol), MMT-K10 (27 mg), trietilamina (139.0 mg, 1.4 mmol) y tolueno (2 mL). Condiciones de reacción: 1 h bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación:

IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (4:1) como eluyentes obteniendo un sólido amarillo. Rendimiento: 344 mg, 72%, ratio *E/Z*: 92:8. P.f: 208 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.05 (s, 1H, H-1), 7.46 (m, 4H, 4H-Ph), 7.32 (m, 6H, 6H-Ph), 7.15 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H, H-6), 6.41 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5), 5.23 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 166.5 (C-2), 145.9 (C-8, C-8'), 141.0 (C-b), 131.9 (C-3), 130.3 (4 CH-Ph), 129.8 (C-6), 127.1 (2 CH-Ph), 124.0 (C-4), 123.8 (4 CH-Ph), 122.8 (C-a), 122.2 (C-5), 118.3 (C-7). MS (ESI+): *m/z* 348 [M + 1], 350 [M + 3]. Análisis elemental (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 69.07%, H 4.06%, N 12.08%. Hallado: C 69.23%, H 4.15%, N 12.05%.

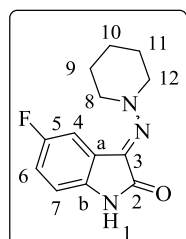
**(E,Z)-5-Cloro-3-(piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (149):** Método A:



Reactivos: 5-cloroisatina (250 mg, 1.4 mmol), 1-aminopiperidina (137.0 mg, 1.4 mmol), MMT-K10 (27 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: El producto final se obtuvo sin necesidad de purificación como un sólido

amarillo. Rendimiento: 327 mg, 91%, ratio *E/Z*: 18:82. P.f: 193 °C. Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.63 (s, 1H, H-1), 7.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.04 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H, H-6), 6.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7), 4.08 - 3.95 (m, 4H, H-8, H-12), 1.73 - 1.54 (m, 7.2H, H-piperidina). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.1 (C-2), 137.5 (C-b), 130.4 (C-3), 126.0 (C-6), 125.8 (C-a), 121.4 (C-5), 117.6 (C-4), 111.0 (C-7), 58.6 (C-8, C-12), 26.7 (2 CH<sub>2</sub>-piperidina), 23.8 (CH<sub>2</sub>-piperidina). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.72 (s, 0.2H, H-1), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 0.2H, H-6), 7.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 0.2H, H-4), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 0.2H, H-7), 3.30 - 3.25 (m, 0.8H, H-8, H-12), 1.73 - 1.54 (m, 7.2H, H-piperidina). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.7 (C-2), 142.2 (C-b), 137.3 (C-3), 128.2 (C-6), 126.1 (C-a), 124.9 (C-5), 117.5 (C-4), 112.4 (C-7), 56.8 (C-8, C-12), 25.7 (2 CH<sub>2</sub>-piperidina), 23.8 (CH<sub>2</sub>-piperidina). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 264 [M + 1], 266 [M + 3]. Análisis elemental (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 59.21%, H 5.35%, N 15.93%. Hallado: C 59.15%, H 5.48%, N 15.69%.

**(E,Z)-5-Fluoro-3-(piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (150):** Método A:

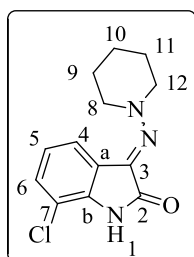


Reactivos: 5-fluoroisatina (250 mg, 1.5 mmol), 1-aminopiperidina (152.0 mg, 1.5 mmol), MMT-K10 (30 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: Columna cromatográfica empleando diclorometano/metanol (150:1)

## Parte Experimental

como eluyentes, obteniéndose un sólido amarillo. Rendimiento: 311.6 mg, 83%, ratio *E/Z*: 30:70. P.f: 169 °C. Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.55 (s, 1H, H-1), 7.01 (ddd, *J* = 8.9, 6.7, 2.7 Hz, 1.5H, H-4), 6.87 (m, 1.5H, H-6), 6.73 (dd, *J* = 8.4, 4.4 Hz, 1H, H-7), 4.04 (m, 4H, H-8, H-12), 1.77 - 1.48 (m, 9H, H-piperidina). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.4 (C-2), 158.6 (d, *J* = 234.4 Hz, C-5), 135.0 (d, *J* = 1.3 Hz, C-b), 127.8 (d, *J* = 8.8 Hz, C-a), 122.4 (C-3), 112.8 (d, *J* = 24.0 Hz, C-6), 110.3 (d, *J* = 8.2 Hz, C-7), 105.0 (d, *J* = 25.4 Hz, C-4), 58.5 (C-8, C-12), 26.6 (C-9, C-11), 23.8 (C-10). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.64 (s, 0.5H, H-1), 7.15 (ddd, *J* = 9.4, 8.5, 2.6 Hz, 0.5H, H-7), 7.01 (ddd, *J* = 8.9, 6.7, 2.7 Hz, 1.5H, H-4), 6.87 (m, 1.5H, H-6), 3.30 (m, 2H, H-8, H-12), 1.77 - 1.48 (m, 9H, H-piperidina). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 166.0 (C-2), 158.2 (d, *J* = 235.8 Hz, C-5), 139.9 (C-b), 138.2 (C-3), 117.2 (d, *J* = 23.5 Hz, C-6), 116.8 (d, *J* = 8.3 Hz, C-7), 112.4 (d, *J* = 26.1 Hz, C-4), 111.7 (C-a), 56.8 (C-8, C-12), 25.7 (C-9, C-11), 23.9 (C-10). MS (ESI+): *m/z* 248 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O) Calculado: C 63.15%, H 5.71%, N 16.99%. Hallado: C 63.08%, H 5.74%, N 17.04%.

**(*E,Z*)-7-Cloro-3-(piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (151):** Método A:

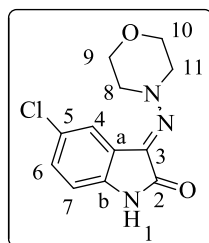


Reactivos: 7-cloroisatina (250 mg, 1.4 mmol), 1-aminopiperidina (137 mg, 1.4 mmol), MMT-K10 (27 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: Columna cromatográfica empleando diclorometano/metanol (100:1)

como eluyentes, obteniéndose un sólido amarillo. Rendimiento: 171.6 mg, 47%, ratio *E/Z*: 25:75. P.f: 151 °C. Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.93 (s, 1H, H-1), 7.19 (ddd, *J* = 7.6, 4.5, 1.0 Hz, 1.3H, H-4), 7.09 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H, H-6), 6.88 (ddd, *J* = 8.1, 7.5, 0.5 Hz, 1H, H-5), 4.82 - 3.77 (m, 4H, H-8,

H-12), 1.75 - 1.53 (m, 7.8H, H-piperidina). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.0 (C-2), 135.9 (C-b), 130.5 (C-3), 128.1 (C-a), 126.2 (C-6), 122.6 (C-5), 116.7 (C-4), 114.0 (C-7), 58.6 (C-8, C-12), 26.7 (C-9, C-11), 23.7 (C-10). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.02 (s, 0.3H, H-1), 7.33 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 0.3H, H-6), 7.19 (ddd, *J* = 7.6, 4.5, 1.0 Hz, 1.3H, H-4), 7.09 - 7.00 (m, 0.3H, H-5), 3.31 - 3.25 (m, 1.2H, H-8, H-12), 1.75 - 1.53 (m, 7.8H, H-piperidina). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.9 (C-2), 140.8 (C-b), 137.3 (C-3), 124.1 (C-4), 123.5 (C-5), 122.1 (C-6), 118.1 (C-a), 115.2 (C-7), 56.8 (C-8, C-12), 25.7 (C-9, C-11), 23.9 (C-10). MS (ESI+): *m/z* 266 [M + 3], 264 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 59.21%, H 5.35%, N 15.93%. Hallado: C 59.31%, H 5.60%, N 16.02%.

**(*E,Z*)-5-Cloro-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (152)**: Método A: Reactivos: 5-



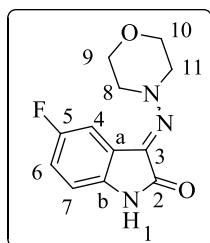
cloroisatina (250 mg, 1.4 mmol), 4-aminomorfolina (141 mg, 1.4 mmol), MMT-K10 (27 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 1 h bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: Columna cromatográfica empleando diclorometano/metanol (100:1) como eluyentes,

obteniéndose un sólido amarillo. Rendimiento: 280.8 mg, 77%, ratio *E/Z*: 26:74. P.f: 192 °C. Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.79 (s, 1H, H-1), 7.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.14 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H, H-6), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7), 4.04 (dd, *J* = 6.2, 3.6 Hz, 4H, H-9, H-10), 3.80 (m, 5.6H, H-8, H-11). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.1 (C-2), 138.1 (C-b), 127.3 (C-3), 127.0 (C-6), 126.0 (C-5), 124.5 (C-a), 118.3 (C-4), 111.3 (C-7), 66.6 (C-8, C-11), 57.7 (C-9, C-10). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.84 (s, 0.4H, H-1), 7.39 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 0.4H, H-6), 7.29 (d, *J* = 2.1 Hz, 0.4H, H-4), 6.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 0.4H, H-7), 3.80 (m, 5.6H, H-9, H-10), 3.29 (m, 1.6H, H-8, H-11). <sup>13</sup>C-

## Parte Experimental

RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.3 (C-2), 143.0 (C-3), 141.1 (C-b), 131.5 (C-6), 126.3 (C-5), 125.8 (C-4), 117.1 (C-a), 112.6 (C-7), 66.1 (C-8, C-11), 56.0 (C-9, C-10). MS (ESI+):  $m/z$  268 [M + 3], 266 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O) Calculado: C 54.25%, H 4.55%, N 15.82%. Hallado: C 54.27%, H 4.60%, N 15.79%.

**(E,Z)-5-Fluor-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (153)**: Método A: Reactivos: 5-

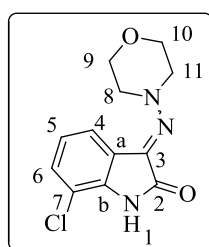


fluoroisatina (250 mg, 1.5 mmol), 4-aminomorfolina (155 mg, 1.5 mmol), MMT-K10 (30 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: Columna cromatográfica empleando diclorometano/metanol (100:1) como eluyentes,

obteniéndose un sólido amarillo. Rendimiento: 149.2 mg, 40%, ratio *E/Z*: 30:70. P.f: 191 °C. Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.66 (s, 1H, H-1), 7.01 (dd,  $J$  = 8.7, 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.90 (ddd,  $J$  = 9.8, 8.4, 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.76 - 6.70 (m, 1H, H-7), 4.03 - 3.96 (m, 4H, H-8, H-11), 3.77 - 3.71 (m, 4H, H-9, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  159.4 (C-2), 158.7 (d,  $J$  = 235.1 Hz, C-5), 135.8 (d,  $J$  = 1.1 Hz, C-b), 126.9 (d,  $J$  = 9.0 Hz, C-a), 125.7 (d,  $J$  = 3.3 Hz, C-3), 113.9 (d,  $J$  = 24.0 Hz, C-6), 110.7 (d,  $J$  = 8.4 Hz, C-7), 105.7 (d,  $J$  = 25.2 Hz, C-4), 66.6 (C-9, C-10), 57.6 (C-8, C-11). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.70 (s, 0.4H, H-1), 7.17 (ddd,  $J$  = 9.5, 8.5, 2.6 Hz, 0.4H, H-6), 7.10 (dd,  $J$  = 8.8, 2.6 Hz, 0.4H, H-4), 6.85 (dd,  $J$  = 8.6, 4.5 Hz, 0.4H, H-7), 3.82 - 3.77 (m, 1.6H, H-8, H-11), 3.27 - 3.21 (m, 1.6H, H-9, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.6 (C-2), 158.2 (d,  $J$  = 236.8 Hz, C-5), 141.9 (d,  $J$  = 2.5 Hz, C-3), 140.6 (d,  $J$  = 1.6 Hz, C-b), 118.4 (d,  $J$  = 23.6 Hz, C-6), 116.3 (d,  $J$  = 8.6 Hz, C-a), 113.5 (d,  $J$  = 25.8 Hz, C-4), 112.0 (d,  $J$  = 8.1 Hz, C-7), 66.1 (C-9, C-10), 56.0 (C-8, C-11). MS

(ESI+): m/z 250 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 57.83%, H 4.85%, N 16.86%. Hallado: C 57.58%, H 4.90%, N 16.91%.

**(E,Z)-7-Cloro-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (154):** Método A: Reactivos: 7-

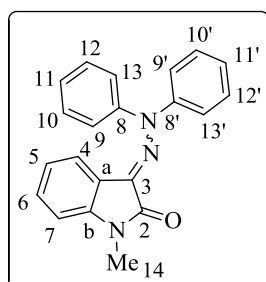


cloroisatina (250 mg, 1.4 mmol), 4-aminomorfolina (141 mg, 1.4 mmol), MMT-K10 (27 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 1 h bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: Columna cromatográfica empleando diclorometano/metanol (100:1) como eluyentes,

obteniéndose un sólido amarillo. Rendimiento: 204.6 mg, 56%, ratio *E/Z*: 26:74. P.f: 177 °C (lit.<sup>177</sup> 180 - 181 °C). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.06 (s, 1H, H-1), 7.23 (dd, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H-4), 7.15 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H, H-6), 6.97 - 6.84 (m, 1H, H-5), 4.00 - 3.98 (m, 4H, H-9, H-10), 3.84 - 3.71 (m, 5.2H, H-9, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 159.1 (C-2), 136.8 (C-b), 127.3 (C-6, C-7), 125.3 (C-3), 122.9 (C-5), 117.4 (C-a), 114.3 (C-7), 66.6 (C-9, C-10), 55.9 (C-8, C-11). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.11 (s, 0.3H, H-1), 7.38 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 0.3H, H-4), 7.30 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 0.3H, H-6), 7.05 (t, *J* = 7.9 Hz, 0.3H, H-5), 3.84 - 3.71 (m, 5.2H, H-9, H-10), 3.28 - 3.21 (m, 1.2H, H-8, H-11). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.5 (C-2), 141.6 (C-b), 141.3 (C-3), 131.6 (C-4), 125.2 (C-6), 123.8 (C-5), 117.6 (C-a), 115.4 (C-7), 66.2 (C-9, C-10), 57.7 (C-8, C-11). MS (ESI+): m/z 268 [M + 3], 266 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 54.25%, H 4.55%, N 15.82%. Hallado: C 54.30%, H 4.37%, N 16.02%.

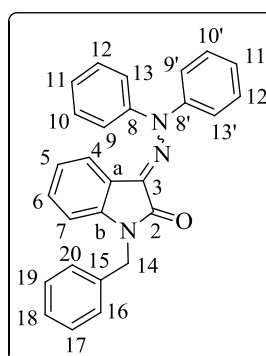
## Parte Experimental

### **(*E,Z*)-3-(2,2-Difenilhidrazono)-1-metilindolin-2-ona (155)**<sup>180</sup>: Método B:



Reactivos: (*E,Z*)-3-(2,2-difenilhidrazono)indolin-2-ona (100 mg, 0.3 mmol), sulfato de dimetilo (50.2 mg, 0.4 mmol), KOH (22.3 mg, 0.4 mmol), etanol (3 mL) y acetona (3 mL). Rendimiento: sólido naranja, 273.9 mg, 86%, ratio *E/Z*: 91:9. P.f: 190 °C. Isómero *E*: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.51 - 7.40 (m, 4H, H-Ph), 7.35 - 7.24 (m, 6H, H-Ph), 7.17 (td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-6), 6.93 (dt, *J* = 7.7, 0.8 Hz, 1H, H-7), 6.47 (td, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, H-5), 5.45 (ddd, *J* = 7.8, 1.2, 0.5 Hz, 1H, H-4), 3.17 (s, 3H, H-14). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.2 (C-2), 146.4 (C-3), 146.3 (C-8, C-8'), 144.9 (C-b), 131.0 (C-6), 130.2 (4 CH-Ph), 126.8 (2 CH-Ph), 125.5 (C-4), 123.7 (4 CH-Ph), 121.8 (C-5), 115.8 (C-a), 109.3 (C-7), 26.6 (C-14). MS (ESI+): *m/z* 328 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 77.04%, H 5.23%, N 12.84%. Hallado: C 77.31%, H 5.40%, N 12.58%.

### **(*E,Z*)-1-Bencil-3-(2,2-difenilhidrazono)indolin-2-ona (156)**: Método B:

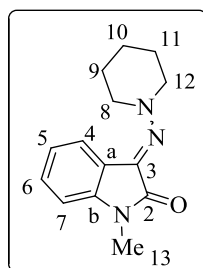


Reactivos: (*E,Z*)-3-(2,2-difenilhidrazono)indolin-2-ona (100 mg, 0.3 mmol), bromuro de bencilo (68.2 mg, 0.4 mmol), KOH (22.3 mg, 0.4 mmol), etanol (3 mL) y acetona (3 mL). Rendimiento: sólido naranja, 110.5 mg, 96%, ratio *E/Z*: 80:20. P.f: 177 - 178 °C. Isómero *E*: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.52 - 7.40 (m, 4H, H-Ph), 7.35 - 7.26 (m, 9H, H-Ph), 7.26 - 7.16 (m, 2H, H-Ph), 7.06 (td, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, H-6), 6.91 - 6.81 (m, 1H, H-7), 6.42 (td, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, H-5), 5.34 (ddd, *J* = 7.9, 1.2, 0.5 Hz, 1H, H-4), 4.94 (s, 2H, H-14). <sup>13</sup>C-

<sup>180</sup> Alcaide, B.; Almendros, P.; Aragoncillo, C., Indium-promoted allylation reaction of imino-isatins in aqueous media: Synthesis of quaternary 3-aminooxindoles. *Eur. J.Org. Chem.* **2010**, *15*, 2845-2848.

RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.4 (C-2), 146.6 (C-3), 146.2 (2 C-Ph), 143.7 (C-b), 137.1 (C-15), 132.3 (C-6), 130.7 (4 CH-Ph), 129.8 (C-17, C-19), 129.2 (C-18), 128.0 (C-16, C-20), 127.8 (C-11, C-11'), 126.9 (C-4), 125.6 (4 CH-Ph), 122.8 (C-5) 121.9 (C-a), 109.8 (C-7), 43.3 (C-14). MS (ESI+):  $m/z$  404 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>27</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 80.37%, H 5.25%, N 10.41%. Hallado: C 80.61%, H 5.43%, N 10.67%.

**(*E,Z*)-1-Metil-3-(piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (157):** Método B:



Reactivos: (*E,Z*)-3-(piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (250 mg, 1.1 mmol), sulfato de dimetilo (137 mg, 1.1 mmol), KOH (76 mg, 1.4 mmol), etanol (10 mL) y acetona (10 mL).

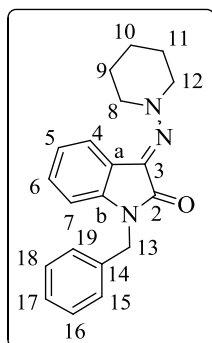
Rendimiento: aceite naranja, 78 mg, 29%, ratio *E/Z*: 49:61.

Isómero *Z*: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.31 (ddd,  $J$  = 7.5, 1.2, 0.6 Hz, 1H, H-4), 7.17 (td,  $J$  = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-6),

6.96 (m, 2H, H-5, H-7), 4.00 (t, 4H, H-8, H-12), 3.18 (s, 3H, H-13), 1.72 (m, 8H, H-9, H-11), 1.61 (m, 4H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  157.4 (C-2), 140.3 (C-b), 139.7 (C-3), 127.1 (C-6), 124.9 (C-a), 122.1 (C-5), 118.1 (C-4), 108.6 (C-7), 58.3 (C-8, C-12), 26.6 (C-13), 25.6 (C-9, C-11), 23.9 (C-10). Isómero *E*: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.39 (td,  $J$  = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.35 (ddd,  $J$  = 7.7, 1.3, 0.6 Hz, 1H, H-7), 7.13 (td,  $J$  = 7.6, 1.0 Hz, 1H, H-5), 7.07 (m, 1H, H-7), 3.25 (m, 3H, H-8, H-12), 3.17 (s, 2H, H-13), 1.72 (m, 8H, H-9, H-11), 1.61 (m, 4H, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  164.5 (C-2), 145.0 (C-b), 139.7 (C-3), 131.5 (C-6), 125.7 (C-7), 123.0 (C-5), 122.9 (C-a), 109.7 (C-4), 56.7 (C-8, C-12), 26.6 (C-13), 26.5 (C-9, C-11), 23.9 (C-10). MS (ESI+):  $m/z$  244 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 69.11%, H 7.04%, N 17.27%. Hallado: C 69.40%, H 7.32%, N 17.51%.

## Parte Experimental

### (*E,Z*)-1-Bencil-3-(piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (158): Método B:



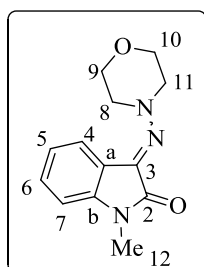
Reactivos: (*E,Z*)-3-(piperidin-1-ilimino)indolin-2-ona (250 mg, 1.1 mmol), bromuro de bencilo (186 mg, 1.1 mmol), KOH (76 mg, 1.1 mmol), etanol (10 mL) y acetona (10 mL).

Rendimiento: sólido amarillo, 85 mg, 24%, ratio *E/Z*: 33:67.

P.f: 127 °C. Isómero Z:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.31 (m, 9H, H-4, H-Ph), 7.09 (td,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H, H-6), 6,97 (m, 1H, H-5), 6.88 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-7), 4.95 (s, 2H,

H-13), 4.06 - 4.03 (m, 4H, H-8, H-12), 1.78 - 1.70 (m, 6H, H-9, H-11), 1.62 - 1.58 (m, 3H, H-10).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  157.3 (C-2), 139.2 (C-b), 138.4 (C-3), 131.1 (C-14), 128.1 (2 CH-Ph), 127.9 (3 CH-Ph), 126.9 (C-6), 125.1 (C-a), 123.1 (C-5), 118.2 (C-4), 109.2 (C-7), 58.4 (C-8, C-12), 43.3 (C-13), 26.6 (C-9, C-11), 23.9 (C-10). Isómero E:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.31 (m, 9H, H-6, H-4, H-Ph), 7.09 (cd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H, H-5), 6,97 (m, 1H, H-7), 4.95 (s, 1H, H-13), 3.31 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H-8, H-12), 1.78 - 1.70 (m, 6H, H-9, H-11), 1.62 - 1.58 (m, 3H, H-10).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  164.6 (C-2), 143.7 (C-b), 137.2 (C-3), 129.8 (2 CH-Ph), 129.6 (3 CH-Ph), 129.3 (C-14), 125.7 (C-a), 125.5 (C-6), 122.2 (C-5), 115.8 (C-4), 110.2 (C-7), 56.7 (C-8, C-12), 43.2 (C-13), 25.7 (C-9, C-11), 23.8 (C-10). MS (ESI<sup>+</sup>): 320 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ ) Calculado: C 75.21%, H 6.63%, N 13.16%. Hallado: C 75.43%, H 6.71%, N 13.30%.

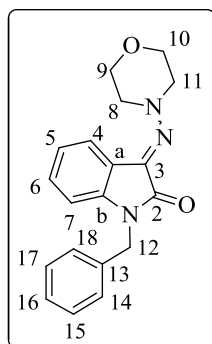
### (*E,Z*)-1-Metil-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (159): Método B: Reactivos:



(*E,Z*)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (168 mg, 0.7 mmol), sulfato de dimetilo (92 mg, 0.7 mmol), KOH (51 mg, 0.7 mmol), etanol (10 mL) y acetona (10 mL). Rendimiento: sólido amarillo, 84.3 mg, 47%, ratio *E/Z*: 59:41. P.f: 117 °C

(lit.<sup>177</sup> 116 - 118 °C). Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.43 (m, 2H, H-4, H-6), 7.13 (tt, *J* = 7.7, 0.8 Hz, 1H, H-5), 7.08 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H, H-7), 3.83 (m, 4H, H-9, H-10), 3.22 (m, 4H, H-8, H-11), 3.17 (s, 3H, H-12). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.1 (C-2), 145.6 (C-b), 143.0 (C-3), 132.4 (C-4 o C-6), 126.7 (C-4 o C-6), 123.2 (C-5), 115.2 (C-a), 109.9 (C-7), 66.1 (C-9, C-10), 55.8 (C-8, C-11), 26.6 (C-12). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.35 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4), 7.23 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-6), 7.00 (m, 2H, H-5, H-7), 3.95 (m, 4H, H-8, H-11), 3.78 (m, 4H, H-9, H-10), 3.18 (s, 3H, H-12). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 157.4 (C-2), 141.2 (C-b), 128.2 (C-6), 126.6 (C-3), 124.0 (C-a), 122.4 (C-5 o C-7), 118.7 (C-4), 109.0 (C-5 o C-7), 66.6 (C-9, C-10), 57.4 (C-8, C-11), 26.7 (C-12). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 246 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) Calculado: C 63.66%, H 6.16%, N 17.13%. Hallado: C 63.60%, H 6.14%, N 17.15%.

**(E/Z)-1-Bencil-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (160):** Método B: Reactivos:



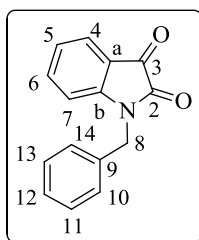
(*E,Z*)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (200 mg, 0.9 mmol), bromuro de bencilo (148 mg, 0.9 mmol), KOH (61 mg, 0.9 mmol), etanol (10 mL) y acetona (10 mL). Rendimiento: sólido aceitoso naranja, 90 mg, 32%, ratio *E/Z*: 45:55.

Isómero Z: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.37 (m, 1H, H-4), 7.35 - 7.32 (m, 6H, H-Ph), 7.13 (td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 2H, H-6), 6.99 (m, 2H, H-5), 6.92 (dt, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 1H, H-7), 4.95 (s, 4H, H-12), 4.01 (m, 4H, H-8, H-11), 3.82 (m, 8H, H-9, H-10). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 156.7 (C-2), 141.1 (C-3), 139.5 (C-b), 136.9 (C-13), 128.7 (2 CH-Ph), 127.5 (C-6), 127.4 (2 CH-Ph), 127.3 (CH-Ph), 123.7 (C-7), 122.8 (C-5), 118.3 (C-4), 108.9 (C-a), 66.0 (C-9, C-10), 56.9 (C-8, C-11), 42.8 (C-12). Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.44 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H-4), 7.37 (m, 1H,

## Parte Experimental

H-6), 7.32 (m, 6H, H-Ph), 7.13 (dt,  $J = 7.6, 1.1$  Hz, 2H, H-5), 6.99 (m, 2H, H-7), 4.95 (s, 4H, H-12), 3.82 (m, 8H, H-9, H-10), 3.28 (m, 4H, H-8, H-11).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  163.7 (C-2), 143.9 (C-b), 141.4 (C-3), 136.4 (C-13), 131.5 (C-6), 128.8 (2 CH-Ph), 127.4 (2 CH-Ph), 126.2 (C-4), 125.2 (CH-Ph), 122.0 (C-5), 114.8 (C-a), 109.8 (C-7), 65.6 (C-9, C-10), 55.3 (C-8, C-11), 42.6 (C-12). MS (ESI+):  $m/z$  322 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ ) Calculado: C 71.01%, H 5.96%, N 13.08%. Hallado: C 71.28%, H 6.02%, N 12.95%.

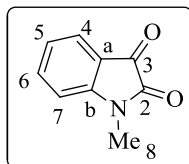
**1-Bencilindolin-2,3-diona (161):** Método C: Reactivos: isatina (1 g, 6.8 mmol),



bromuro de bencilo (1.4 mg, 8.2 mmol), NaH (196 mg, 8.2 mmol) y DMF (20 mL). Condiciones de reacción: 1 h a temperatura ambiente. Rendimiento: sólido naranja, 1.32 g, 82%. P.f: 133 °C (P.f. 131 - 133 °C<sup>181</sup>).  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.57 - 7.49 (m, 1H, H-4, H-6), 7.48 - 7.23 (m, 5H, H-Ph), 7.11 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H-5), 6.97 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-7), 4.91 (s, 2H, H-8).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  183.0 (C-3), 158.3 (C-2), 150.3 (C-b), 137.9 (C-4 o C-6), 135.5 (C-9), 128.6 (2 CH-Ph), 127.5 (C-12), 127.3 (2 CH-Ph), 124.4 (C-4 o C-6), 123.3 (C-5), 117.7 (C-a), 111.0 (C-7), 42.9 (C-8). MS (ESI+):  $m/z$  238 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ) Calculado: C 75.94%, H 4.67%, N 5.90%. Hallado: C 76.05%, H 4.70%, N 6.20%.

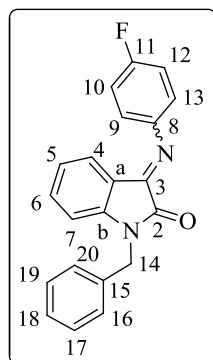
<sup>181</sup> Sarel, S.; Klug, J. T., Synthesis and properties of 2,2-diphenylindoxyl. *Isr. J. Chem.* **1964**, 2, 143-150.

**1-Metilindoline-2,3-diona (162)**<sup>182</sup>: Método C: Reactivos: isatina (1 g, 6.8



mmol), yoduro de metilo (1.2 mg, 8.2 mmol), NaH (196 mg, 8.2 mmol) y DMF (20 mL). Condiciones de reacción: 16 h a temperatura ambiente. Rendimiento: sólido naranja, 571.1 g, 52%. P.f: 129 °C. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.68 (m, 1H, H-6), 7.54 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, H-4), 7.13 (m, 2H, H-5, H-7), 3.14 (s, 3H, H-8). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 184.1 (C-3), 158.8 (C-2), 152.0 (C-b), 138.8 (CH), 124.9 (CH), 123.9 (CH), 118.1 (C-a), 111.2 (CH), 26.7 (C-8). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 162 [M + 1]. Análisis elemental (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>) Calculado: C 67.07%, H 4.38%, N 8.69%. Hallado: C 64.22%, H 4.51%, N 8.55%.

**(E/Z)-1-Bencil-3-((4-fluorofenil)imino)indolin-2-ona (163)**<sup>183</sup>: Método A:



Reactivos: 1-bencilindolin-2,3-diona (200 mg, 0.8 mmol), 4-fluoroanilina (93.7 mg, 0.8 mmol), MMT-K10 (27 mg) y tolueno (1 mL). Condiciones de reacción: 30 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: IsoleraOne empleando agua/acetonitrilo (10:1) como eluyentes obteniéndose un sólido naranja. Rendimiento: 243.6 mg, 88%, ratio *E/Z*: 77:23. P.f. 200 °C. Isómero E: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.48 - 7.22 (m, 10H, H-6, H-Ph), 7.14 (dd, *J* = 7.0, 1.2 Hz, 1H, H-Ph), 7.12 - 7.03 (m, 2H, H-Ph), 7.03 - 6.96 (m, 1H, H-7), 6.79 (td, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.47 (dd, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H-4), 4.96 (s, 2H, H-14). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.0 (C-2), 162.7 (d, *J* = 224.9 Hz, C-11), 155.2 (C-3),

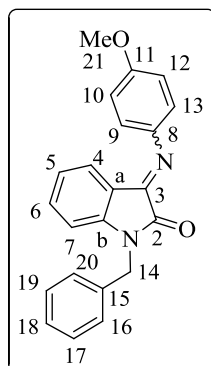
<sup>182</sup> Gassman, P. G.; Cue, B. W.; Luh, T. Y., A general method for the synthesis of isatins. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1344-1348.

<sup>183</sup> Zhang, B.; Feng, P.; Sun, L. H.; Cui, Y.; Ye, S.; Jiao, N., *N*-Heterocyclic carbene-catalyzed homoenolate additions with *N*-aryl ketimines as electrophiles: Efficient synthesis of spirocyclic  $\gamma$ -lactam oxindoles. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 9198-9203.

## Parte Experimental

147.6 (C-b), 147.2 (d,  $J = 2.6$  Hz, C-8), 136.5 (C-15), 135.0 (C-6), 130.3, 129.4 (C-17, C-19), 128.3 (C-18), 128.0 (C-16, C-20), 125.8 (C-4), 123.2 (C-5), 120.1 (d,  $J = 8.2$  Hz, C-9, C-13), 117.1 (d,  $J = 22.5$  Hz, C-10, C-12), 116.0 (C-7), 111.4 (C-a), 43.5 (C-14). Isómero Z:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.65 – 7.59 (m, 0.2H, H-4), 7.48 – 7.22 (m, 10H, H-Ph, H-6), 6.94 (d,  $J = 7.9$  Hz, 0.4H, H-Ph, H-isatina), 4.82 (s, 1H, H-14).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  159.2 (C-2), 156.5 (d,  $J = 247.8$  Hz, C-11), 153.1 (C-3), 146.4 (C-b), 134.7 (C-6), 129.3 (C-17, C-19), 128.2 (C-18), 128.1 (C-16, C-20), 123.9 (C-4), 123.7 (C-5), 123.3 (C-7), 122.4 (d,  $J = 8.3$  Hz, C-9, C-13), 115.7 (d,  $J = 22.4$  Hz, C-10, C-12), 110.7 (C-a), 43.3 (C-14). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  331 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}$ ) Calculado: C 76.35%, H 4.58%, N 8.48%. Hallado: C 76.19%, H 4.64%, N 8.51%.

**(E/Z)-3-((4-Metoxifenil)imino)-1-fenilindolin-2-ona (164)**<sup>184</sup>: Método A:



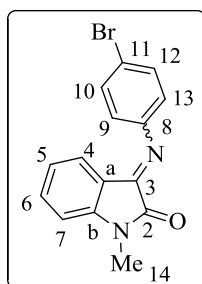
Reactivos: 1-bencilindolin-2,3-diona (100 mg, 0.4 mmol), 4-metoxianilina (527 mg, 0.4 mmol), MMT-K10 (8.4 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 1 h bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando diclorometano como eluyente obteniéndose un sólido naranja. Rendimiento: 103 mg, 72%, ratio *E/Z*: 80:20. P.f: 153 °C. Isómero E:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,

$\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.42 – 7.20 (m, 9.4H, H-Ph, H-6, H-10, H-12), 7.05 (d,  $J = 0.8$  Hz, 2H, H-9, H-13), 7.02 (m, 1H, H-7), 6.82 (td,  $J = 7.6, 1.0$  Hz, 1H, H-5), 6.73 (ddd,  $J = 7.7, 1.3, 0.6$  Hz, 1H, H-4), 4.99 (s, 2H, H-14), 3.81 (s, 3H, H-21).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  163.2 (C-2), 157.9 (C-11), 154.2 (C-3), 147.4 (C-b), 143.6 (C-8), 134.7 (C-6), 133.9 (C-15), 129.4 (C-17, C-19), 128.2 (C-18), 128.0 (C-16, C-20),

<sup>184</sup> Arsanious, M. H. N.; Maigali, S. S., Isatin imines in the reaction with iminophosphine: X-Ray structure of phospholane derivatives. *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 202-214.

125.4 (C-4), 123.1 (C-5), 120.3 (C-9, C-13), 116.2 (C-a), 115.4 (C-10, C-12), 111.3 (C-7), 56.0 (C-21), 43.5 (C-14). Isómero Z:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.63 (dd,  $J = 7.5, 0.7$  Hz, 0.2H, H-6), 7.42 - 7.20 (m, 9.4H, H-Ph, H-10, H-12) 7.11 (dd,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 0.2H, H-5), 7.05 (d,  $J = 0.8$  Hz, 4H, H-9, H-13), 6.97 (dd,  $J = 7.9, 0.8$  Hz, 0.2H, H-7), 6.93 (d,  $J = 8.9$  Hz, 0.2H, H-4), 4.87 (s, 0.4H, H-14), 3.79 (s, 0.6H, H-21). MS (ESI+):  $m/z$  343 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ ) Calculado: C 77.17%, H 5.30%, N 8.18%. Hallado: C 76.89%, H 5.41%, N 8.02%.

**(E/Z)-3-((4-Bromofenil)imino)-1-metilindolin-2-ona (165)**<sup>185</sup>: Método A:



Reactivos: 1-metilindoline-2,3-diona (205 mg, 1.3 mmol), 4-bromoanilina (218 mg, 1.3 mmol), MMT-K10 (26 mg) y tolueno (5 mL). Condiciones de reacción: 90 min bajo irradiación microondas a 100 °C. Purificación: columna cromatográfica empleando cloroformo como eluyente obteniéndose un sólido naranja. Rendimiento: 196 mg, 49%,

ratio *E/Z*: 76:24. P.f: 208 °C. Isómero E:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.65 - 7.62 (m, 2H, H-10, H-12), 7.46 - 7.42 (m, 2H, H-6), 7.10 - 6.99 (m, 1.3H, H-7), 6.97 - 6.95 (m, 3H, H-9, H-13), 6.85 (td,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 1H, H-5), 6.47 (ddd,  $J = 7.6, 1.2, 0.6$  Hz, 1H, H-4), 3.20 (s, 3H, H-14).  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  162.7 (C-2), 155.3 (C-3), 150.1 (C-8), 148.7 (C-b), 135.3 (C-6), 133.2 (C-10, C-12), 125.8 (C-4), 123.1 (C-5), 120.4 (C-9, C-13), 117.9 (C-11), 115.7 (C-a), 110.9 (C-7), 26.8 (C-14). Isómero Z:  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.55 (td,  $J = 7.8, 1.3$  Hz, 0.3H, H-6), 7.46 (m, 2H, H-10, H-12), 7.15 (dd,  $J = 7.5, 0.9$  Hz, 0.3H, H-5), 7.10 - 6.99 (m, 1.3H, H-7), 6.97 - 6.95 (m, 3H, H-4, H-9, H-13), 3.08 (s, 0.9H, H-

<sup>185</sup> Rajasekaran, T.; Karthik, G.; Sridhar, B.; Subba Reddy, B. V., Dual behavior of isatin-based cyclic ketimines with dicarbomethoxy carbene: Expedient synthesis of highly functionalized spirooxindolyl oxazolidines and pyrrolines. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1512-1515.

## Parte Experimental

---

14).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  157.7 (C-2), 153.3 (C-3), 149.0 (C-8), 147.6 (C-b), 135.1 (C-6), 131.8 (C-10, C-12), 123.6 (C-4), 123.2 (C-5), 122.0 (C-9, C-13), 121.1 (C-a), 117.5 (C-11), 110.3 (C-7), 26.5 (C-14). MS (ESI+):  $m/z$  317 [M + 3], 315 [M + 1]. Análisis elemental ( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}$ ) Calculado: C 57.16%, H 3.52%, N 8.89%. Hallado: C 57.24%, H 3.60%, N 9.02%.

#### 4. MEDIDA DE LA INHIBICIÓN DE CK1 POR EL MÉTODO KINASE-GLO<sup>®</sup>

La proteína quinasa, caseína quinasa 1 (CK1) recombinante humana fue adquirida de Millipore (Millipore Iberica S.A.U.). El kit Kinase-Glo<sup>®</sup> se obtuvo de Promega (Promega Biotech Ibérica, SL), mientras que el ATP, el sustrato caseína y los diferentes reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se preparó una disolución buffer de 50 mM de HEPES (pH 7.5), 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, y 15 mM de acetato de magnesio. Para llevar a cabo el experimento de Kinase Glo, se utilizaron placas de 96 pocillos. Se preparó una disolución 10  $\mu$ M de los inhibidores en Dimetilsulfóxido (DMSO). A continuación, se llevó a cabo la reacción enzimática empleando 10  $\mu$ L de la disolución de los inhibidores, 10  $\mu$ L (20 ng) de enzima y 20  $\mu$ L de la disolución tampón que contiene 25  $\mu$ M de caseína and 1  $\mu$ M de ATP. La concentración final de DMSO no puede exceder de 1%. Después de 30 min de incubación a 30 °C, la reacción se paró con 40  $\mu$ L de reactivo de Kinase-Glo. Se midió la luminiscencia después de 10 min usando el lector POLARstar Optima multimode reader (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Germany). La actividad enzimática es proporcional a la diferencia entre el ATP total y el consumido. La actividad inhibitoria se calculó en base a las actividades máximas medidas en ausencia de inhibidor.

##### Ensayos de competición con ATP

Los ensayos de cinética a diferentes concentraciones de ATP y los distintos inhibidores de CK1 $\delta$  se realizaron utilizando el Kit de ADP-Glo kinase<sup>186</sup>.

---

<sup>186</sup> ADP-Glo Kinase Assay Technical Manual: [www.promega.com/tbs/](http://www.promega.com/tbs/).

### 5. MEDIDA DEL PASO DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA POR EL MÉTODO PAMPA

El paseo de la BHE se evaluó empleando un ensayo de permeabilidad a través de una membrana artificial PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), siguiendo el procedimiento optimizado previamente en nuestro grupo<sup>187</sup>. Se emplearon microplacas de 96 pocillos (Millipore); la microplaca donadora contiene un filtro de PVDF con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{M}$  y diámetro de 25 mm, mientras que la microplaca aceptora tiene forma de lágrima. La microplaca receptora se rellenó con 180  $\mu\text{L}$  por pocillo de una mezcla de buffer fosfato salino de pH = 7.4 (PBS) y EtOH en proporción 70:30. El filtro de la placa donadora se cubrió con 4  $\mu\text{L}$  de una disolución del extracto lipídico de cerebro de cerdo (*Avanti Polar Lipids*) en dodecano (20 mg/mL). A continuación, se añadieron 180  $\mu\text{L}$  de una disolución de los compuestos a evaluar en la mezcla de PBS/EtOH sobre la microplaca donadora, que se colocó cuidadosamente sobre la placa receptora. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente (25 °C) la placa donadora se separó cuidadosamente y se determinó la concentración de los compuestos en la placa receptora mediante espectroscopía UV en un espectrofotómetro lector de placas de 96 pocillos (*Thermoscientific, Multiskan spectrum*) analizando cada compuesto a 3 longitudes de onda. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes conteniendo cada uno de ellos tres recipientes de cada compuesto a analizar. En cada experimento se incluyeron 10 compuestos estándar de control de permeabilidad conocida.

---

<sup>187</sup> Pérez, D. I.; Pistozzi, M.; Palomo, V.; Redondo, M.; Fortugno, C.; Gil, C.; Felix, G.; Martinez, A.; Bertucci, C., 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) and phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors: Determination of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45*, 677–684.

## **6. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE CK1 EN UN MODELO DE PEZ CEBRA**

Los peces cebra se mantienen en un tanque de cría de 2 L según los métodos descritos por Christiane Nüsslein-Volhard y Ralf Dahm. Los peces cebra se crían en un ciclo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad a una temperatura de  $26.0 \pm 0.5$  °C. Los embriones se obtienen de manera natural y se traspasan a placas de 24 pocillos, teniendo 10 embriones por pocillo. Cuando se alcanzan las 6 hpf (50% epíboli) se tratan con 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20  $\mu$ M de inhibidor de CK1 en una solución de E2. Los fenotipos se observaron y las imágenes se tomaron usando el microscopio Axio Scope A1 de Carl Zeiss al cabo de 1, 2, 3 y 4 días. Todos los experimentos realizados para este estudio se llevaron a cabo acorde con los principios éticos y de bien hacer de la legislación alemana para la investigación con animales.

### 7. DETERMINACIÓN DE CAVIDADES EN LA SUPERFICIE DE CK1 $\delta$

Para detectar las cavidades sobre la superficie de CK1 $\delta$ , se utilizó el programa fPocket, que se puede descargar gratuitamente del servidor <http://www.sourceforge.net/projects/fpocket>. Los ficheros de las coordenadas cristalográficas se obtuvieron del PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)). Las estructuras fueron 3UYS, 3UYT y 3UZP. Las moléculas de agua, los ligandos y los átomos metálicos se eliminaron de la estructura utilizando el programa Pymol. Como entrada al programa se le proporcionaron los ficheros PDB modificados. Cuando el programa fPocket termina el análisis, devuelve cada estructura con el conjunto de esferas encontradas. Todas las estructuras fueron analizadas visualmente con el objetivo de encontrar las cavidades comunes en las tres estructuras de CK1 $\delta$ .