

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Péptidos helicoidales y derivados de chalcona en la búsqueda de
moduladores de canales iónicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Balsera Paredes

Directores

M^a Jesús Pérez de Vega
Rosario González Muñiz

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Tesis Doctoral

**PÉPTIDOS HELICOIDALES Y DERIVADOS DE
CHALCONA EN LA BÚSQUEDA DE MODULADORES DE
CANALES IÓNICOS**

Beatriz Balsera Paredes

Instituto de Química Médica (CSIC)

Madrid, 2015



Dña. M^a JESÚS PÉREZ DE VEGA, Científico titular y Dña. ROSARIO GONZÁLEZ MUÑIZ, Investigador científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICAN:

Que el trabajo reflejado en la presente memoria titulada “Péptidos helicoidales y derivados de chalcona en la búsqueda de moduladores de canales iónicos” ha sido realizada en el Departamento de Química Médica III del Instituto de Química Médica (CSIC) por Dña. BEATRIZ BALSERA PAREDES y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, Mayo de 2015

Fdo. M^a Jesús Pérez de Vega

Fdo. Rosario González Muñiz

AGRADECIMIENTOS

El trabajo recogido en la presente Memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Médica, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), institución a la que quisiera expresar mi agradecimiento y ha sido posible gracias a una beca JAE predoctoral, concedida por dicha institución.

En primer lugar, me gustaría agradecer el apoyo y ayuda recibida por mis directoras de Tesis, las Dras. M^a Jesús Pérez de Vega y Rosario González Muñiz. Gracias por haberme permitido unirme al grupo, por todo lo que he aprendido de vosotras y por vuestra dedicación e incansable trabajo que han hecho posible la realización de esta Tesis. Vuestros consejos y cariño me han permitido crecer en el ámbito científico y han hecho que la experiencia vivida haya sido muy grata.

A la Dra. M^a Teresa García López, jefa del grupo de investigación, mi gratitud por el apoyo brindado durante estos años de trabajo en la elaboración de esta Tesis.

Mi agradecimiento también a la Dra. Mercedes Martín por los consejos prestados durante estos años y por explicarme con mucha paciencia los conceptos básicos de la modelización molecular. A la Dra. Marta Gutiérrez por su cariño y comprensión y por esas conversaciones que me han hecho crecer mucho tanto profesional como personalmente. Y finalmente, a la Dra. Rosario Herranz por su inestimable ayuda.

A todo el personal de los servicios técnicos del Centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo: RMN, espectrometría de masas y microanálisis.

A la Prof. Pilar Goya, directora del Instituto de Química Médica cuando entré, y a la Prof. M^a Jesús Pérez Pérez, actual directora, por las facilidades dadas desde el IQM.

A la Sociedad Española de Química Terapéutica por la concesión de diferentes becas que han permitido presentar parte de este trabajo en congresos.

A mis compañeros del grupo, tengo tanto que decir y tanto que agradecer; A Maribel, Paula, Mayte y Tato, gracias por vuestros consejos. A M^a Ángeles, gracias por lo bien que me acogiste, por escucharme, por lo que me ayudaste en mis comienzos y por acompañarme en estos casi 5 años. Felipe, lo que me he reído contigo, gracias por hacer nuestras tardes menos solitarias en la planta alta. A Pili Ventosa y Ángel porque sin vosotros esto no hubiese sido lo mismo, por las risas y los ánimos cuando más se necesitaban. A Nono y Paco por estar siempre de buen humor. A Tamara por llenar el 346 y por su apoyo incondicional. A Dani, que con su acento andaluz me transportaba a casa cada día. A Marta y Pedro, por traer la juventud y las ganas de nuevo. Muy especialmente a Diego y a Pili, mis almas gemelas. Diego, gracias no solo por estos años de tesis, sino por todos los que nos quedan juntos, porque he aprendido tanto de ti que no tengo papel suficiente para agradecértelo, por hacer que mi vida en el IQM empezase a ser bonita y porque a pesar de lo lejos que estás, te tengo muy cerca. Ay mi Pi!!! Que hubiese hecho yo sin ti? Pili, gracias por ser mi compañera de laboratorio, mi mejor amiga, mi hermana, la persona que me conoce más que casi yo misma, gracias por querer y cuidar tanto a Valeria y porque sin duda, el mejor regalo que me ha dado esta Tesis es haberte conocido.

Agradecer también al resto de mis compañeros del IQM su ayuda y amistad durante estos años. Gracias Carlos, Miriam, Valle, Anita, Dani, Ruth, Josefa, Felipe Reviriego, José Cumella, Pedro González, Sonia, Lole, Alba,

Susana, Belén, Ana Gamo, Martín, Mario, Paula Morales, Laura, Sergio, Ignacio Colomer. Martita que gran escuela de verano, lo que nos reímos y lo que me ayudaste. Andrés, nos quedan muchos partidos que ver en el As. Oskia, mi gran compañera de viajes, aún nos quedan muchos por hacer. Asier, eres un crack, gracias por hacerme reír tanto. Aída, gracias por ser como eres. Guada, siempre recordaré nuestras aventuras por la calle Monte Igueldo. Y especialmente, a Irene, como te echo de menos, gracias por esas conversaciones en el metro y por hacerme ver el lado bueno de las cosas. Nieves, mi Indie preferida, gracias porque "tienes guardados abrazos que abarcan ciudades", por nuestras charlas de las 19:30 y por estar siempre ahí. Peter! He compartido junto a ti toda mi tesis pero vivir esta última etapa contigo ha sido todo un placer, no tengo palabras para agradecerte todo, si que puedo decirte que la familia Sesmilo-Balsera te quiere un montón. A Javier Renau, gracias por todo lo que me has enseñado de informática.

A mis niñas, las mejores farmacéuticas, gracias por estos 12 años juntas, por acompañarme en tantas etapas, algunas muy buenas y otras menos, pero siempre estáis ahí. Me habéis enseñado muchas cosas desde que vine a Madrid, pero lo más importante, lo que es la verdadera amistad. Os quiero mucho.

A mis amigos, a todos aquellos que habéis hecho posible esto con vuestro cariño y apoyo. Mery y Javi habéis compartido conmigo toda mi vida de estudio (cuantas horas sin salir, eh?), nuestras bodas y ahora descubrimos esto de ser padres a la vez. Gracias por estar ahí, Samu y yo no podíamos tener mejores compañeros para recorrer nuestra vida. Rupi, eres una pieza indispensable en mi vida. Gracias por tantos momentos juntos. Y finalmente, a ti, Manuela, quien nos iba a decir que nos volveríamos a juntar en Madrid? Estos 30 años juntas se me han hecho cortos, así que pido al menos otros 30 más.

A mi familia, especialmente a mi hermana, mis suegros, mis cuñados, mis sobrinos y mis tíos por su amor, cariño y comprensión. Me habéis dado la fuerza necesaria para seguir siempre hacia delante.

A mi madre, gracias por todo lo que me has dado, por tu apoyo y tu confianza siempre. Espero que estés orgullosa de mí, porque todo lo que soy en esta vida es gracias a ti.

A ti, Samuel, gracias por acompañarme en otra etapa más de mi vida, por tu comprensión y por tu ánimo en los últimos momentos cuando cada vez era más difícil. Sin duda, no podría haber elegido mejor compañero en este viaje de mi vida.

A mi princesa, Valeria, eres toda una campeona por haber soportado la escritura de la tesis dentro de la barriga de mamá. Compartir contigo esta etapa ha sido lo más bonito de todo. Gracias por hacer que siempre me haya sentido acompañada. Te quiero mi bebe.

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides", Pure & Appl. Chem., 1984, 56, 595).

Mientras no se indique lo contrario, los aminoácidos se nombran mediante el sistema de símbolos de una o tres letras y pertenecen a la serie natural L. Los sustituyentes de los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo de una o tres letras del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o acetilado, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre o en forma de amida se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso del sistema inglés de puntuación en la numeración, se ha utilizado este sistema en la Memoria de esta Tesis. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el diccionario panhispánico de dudas, desde su primera edición en Octubre de 2005.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en Guidelines for Authors (*J. Org. Chem.* **2008**, 73). Algunas abreviaturas menos frecuentes se indican a continuación:

ACh: Acetilcolina
ATP: Trifosfato de adenosina
 α -Bgt: α -Bungarotoxina
Bak: BCL2-antagonist/killer
Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large
Boc: *tert*-Butoxicarbonilo
Bzl: Bencilo
CFA: Complejo adjuvante de Freund's
 α -CTx: α -Conotoxinas
CYP: Citocromo
DAPI: 4'-6-Diamidino-2-fenilindol
DC: Dicroísmo circular
DCM: Diclorometano
DIEA: N,N-Diisopropiletilamina
DMAP: 4-Dimetilaminopiridina
DMF: N,N-Dimetilformamida
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
DPP-IV: Dipeptidil Peptidasa
EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
EM: Espectro de masas
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva
HBS: Hydrogen bond surrogate
HMBC: Correlación Heteronuclear a larga distancia
HSQC: Correlación Heteronuclear Single-Quantum
HCTU: Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HOBT: *N*-Hidroxibenzotriazol

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia
5-HT: Receptor serotoninérgico
HTS: Cribado de alto rendimiento
IPPs: Interacciones proteína proteína
LDH: Lactato deshidrogenasa
LPS: Lipopolisacárido
MBHA: 4-Metilbencihidrilamina
MLA: Metillicaconitina
MOM: Metoximetilo
MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina
NADA: N-araquidonoidopamina
NAMs: Moduladores alostéricos negativos
NMDA: Receptores ionotrópicos de glutamato (N-metil-D-aspartato)
NOE: Efecto Nuclear Overhauser
PAMs: Moduladores alostéricos positivos
PBS: Tampón fosfato salino
ppm: Partes por millón
PyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxotripirrolidinofosfonio
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
RTX: Resiniferotoxina
ROS: Radicales libres de oxígeno
STD: Diferencia de transferencia de saturación
TIPS: Triisopropilsilano
TE: Equivalentes de Trolox
TEM: Microscopía electrónica de transmisión
TFA: Ácido trifluoroacético
TFE: Trifluoroetanol
THF: Tetrahidrofurano
THC: Tetrahidrocannabinoides
TOSMIC: Isocianuro de p-tolueno sulfonilmetilo
tr: Tiempo de retención
TRP: Receptores de potencial transitorio

ÍNDICE

Introducción general	1
Canales iónicos “Receptores de Potencial Transitorio (TRP)”	4
Aspectos Generales	4
Patologías asociadas a canales TRP	6
Moduladores de canales TRP	8
Moduladores de TRPV1	8
Moduladores de TRPA1	11
Moduladores de TRPM8	13
Receptores Nicotínicos (nAChR)	15
Aspectos Generales	15
Receptor nicotínico $\alpha 7$	18
Moduladores de receptores nicotínicos $\alpha 7$	20
Agonistas	21
Antagonistas	25
Moduladores alostéricos	26
Objetivos Generales	27
1. Capítulo 1: Diseño, síntesis y validación de una quimioteca de péptidos helicoidales: Una aproximación novedosa a la modulación de canales iónicos TRP	31
1.1 Introducción	33
1.1.1 Modulación de interacciones proteína-proteína	35
1.1.2 Motivos helicoidales como elementos de reconocimiento de proteínas	37
1.1.2.1 Estabilización de hélices α mediante interacciones no covalentes	39
1.1.2.2 Estabilización de hélices α mediante el uso de plantillas de iniciación	40
1.1.2.3 Miméticos de hélices α	43
1.1.3 Antecedentes	44
1.2 Objetivos	47

1.3 Resultados y Discusión	51
1.3.1 Diseño	53
1.3.2 Síntesis	55
1.3.3 Estudios Conformacionales	61
1.3.3.1 Estudios de Dicroísmo Circular	61
1.3.3.2 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	66
1.3.3.2.1 Desviación del desplazamiento químico ($\Delta\delta$)	66
1.3.3.2.2 Efecto nuclear Overhauser (NOE)	68
1.3.3.2.3 Cálculo de la estructura	70
1.3.4 Validación de la colección de péptidos como moduladores de IPPs	71
1.3.4.1 Interacción de la proteína p53 con la proteína MDM2	72
1.3.4.2 Interacción del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) con su receptor Flt-1	74
1.3.5 Evaluación de la colección de péptidos en canales iónicos TRP	82
1.4 Conclusiones	85
1.5 Parte experimental	89
1.5.1 Instrumentación general	91
1.5.2 Reactivos y Disolventes	91
1.5.3 Síntesis de péptidos en fase sólida	91

1.5.4	Métodos cromatográficos	95
1.5.5	Caracterización de los péptidos	96
1.5.6	Métodos para la determinación conformacional	108
1.5.7	Ensayos biológicos	109
2.	Capítulo 2: Moduladores alostéricos selectivos del receptor nicotínico $\alpha 7$: Chalconas y compuestos relacionados	111
2.1	Introducción	113
2.1.1	Modulación alostérica de canales nicotínicos $\alpha 7$	115
2.2	Antecedentes	119
2.2.1	Evaluación de una colección heterogénea de productos naturales como moduladores de canales nicotínicos	121
2.2.2	Chalcona: Una estructura privilegiada	123
2.2.2.1	Síntesis de chalconas	123
2.2.2.2	Actividad farmacológica	123
2.3	Objetivos	127
2.4	Resultados y discusión	131
2.4.1	Síntesis de chalconas polihidroxiladas	133
2.4.2	Modificaciones en el anillo aromático B	139
2.4.2.1	Introducción de un grupo acetamido	139
2.4.2.2	Sustitución del anillo B por Indol	141
2.4.3	Modificaciones en el espaciador	142

2.4.3.1	Reducción del doble enlace	143
2.4.3.2	Reducción del carbonilo y derivados de Oxima	147
2.4.3.3	Derivados de pirrol	148
2.4.3.4	Otras modificaciones: Derivados de tetrahidroisoquinolina y tetrahidro- β -carbolina	150
2.4.4	Evaluación biológica	153
2.4.4.1	Estudios electrofisiológicos en ovocitos	153
2.4.4.1.1	Evaluación de una colección comercial de chalconas	153
2.4.4.1.2	Estudios de los nuevos derivados de chalcona preparados	154
2.4.4.2	Ensayos de toxicidad	164
2.4.4.2.1	Ensayos de citotoxicidad	164
2.4.4.2.2	Ensayos en órganos aislados	166
2.4.4.3	Ensayos de neuroprotección	167
2.4.4.4	Capacidad antioxidante	169
2.4.4.5	Capacidad de aprendizaje <i>In vivo</i>	170
2.4.4.6	Ensayos de analgesia <i>In vivo</i>	171
2.4.5	Estudios de farmacocinética	174
2.4.6	Síntesis y estudios de profármacos	179
2.4.6.1	Derivados de Valina	180

2.4.6.2	Derivados del dipéptido Val-Val	182
2.4.6.3	Derivados del tripéptido Val-Pro-Val	185
2.4.6.4	Estudios de estabilidad química y enzimática	188
2.4.6.4.1	Estabilidad de los profármacos en disolución acuosa	188
2.4.6.4.2	Estabilidad de los profármacos tripeptídicos frente a la enzima dipeptidil-peptidasa IV (CD26)	194
2.4.6.5	Estudios electrofisiológicos en ovocitos	200
2.5	Conclusiones	203
2.6	Parte Experimental	209
2.6.1	Generalidades	211
2.6.2	Síntesis de polimetoxi y polihidroxi chalconas	213
2.6.2.1	Procedimiento general para la síntesis de chalconas polimetoxiladas	213
2.6.2.2	Procedimiento general para la síntesis de chalconas polihidroxiladas	219
2.6.3	Síntesis de las (Z)-Chalconas 2.35 y 2.36	225
2.6.4	Síntesis de Chalconas E-2.35 , E-2.36 y E-2.38	227
2.6.5	Síntesis de Acetamido chalconas	229
2.6.6	Síntesis de Indolil chalconas	232
2.6.7	Síntesis de 1,3-difenil-1-propanonas	234
2.6.8	Síntesis de Derivados de Pirrol	245

2.6.9	Síntesis de Derivados de Tetrahydroisoquinolina y tetrahydro- β -carbolina	247
2.6.10	Síntesis de Profármacos	250
2.6.10.1	Derivados de Valina	250
2.6.10.2	Derivados de Valina-Valina	252
2.6.10.3	Derivados de Valina-Prolina-Valina	258
2.6.11	Ensayos biológicos	263
3.	Capítulo 3: Chalconas con actividad antitumoral y antileishmania	265
3.1	Introducción	267
3.1.1	Chalconas con actividad antitumoral	269
3.1.2	Chalconas con actividad antileishmania	273
3.2	Objetivos	277
3.3	Resultados y discusión	281
3.3.1	Actividad biológica como antitumorales	283
3.3.2	Actividad biológica frente a Leishmania	288
3.4	Conclusiones	301
4.	Bibliografía	305
5.	Resumen en inglés	333
6.	Anexos	339

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los canales iónicos median de forma selectiva el paso de iones a través de la membrana plasmática que separa dos medios acuosos de distinta composición, el extracelular y el intracelular, siendo este transporte extremadamente rápido. Son complejos homo o heteromultiméricos, formados por el ensamblaje de varias proteínas que se encuentran embebidas total o parcialmente en la membrana celular, a las que se denomina subunidades. Estas subunidades forman el poro hidrófilo, que comunica los espacios intra y extracelular y permiten el paso rápido de determinados iones a favor del gradiente electroquímico, generando una corriente iónica. En condiciones fisiológicas, los iones Na^+ y Ca^{2+} se mueven hacia el interior de la célula, generando una corriente de entrada que despolariza la membrana; la salida de iones K^+ hacia el medio extracelular y la entrada de iones Cl^- , facilita la repolarización celular, alcanzándose los niveles de reposo¹.

El funcionamiento anómalo de los canales iónicos puede dar lugar a distintas enfermedades conocidas con el nombre de canalopatías. La búsqueda de compuestos capaces de modular y/o corregir el mal funcionamiento de los canales iónicos puede abordarse desde diferentes estrategias. Así, se pueden buscar compuestos que actúen a nivel del poro o bien compuestos que interaccionen con proteínas que participan regulando su función.

En la presente memoria nos vamos a centrar en el estudio de dos tipos de canales iónicos: los Receptores de Potencial Transitorio (TRP) y el Receptor nicotínico $\alpha 7$ (nAChR).

Canales iónicos “Receptores de Potencial Transitorio (TRP)”

Aspectos Generales

Los Receptores de Potencial Transitorio (TRP) están constituidos por proteínas transmembrana que forman canales catiónicos y permiten el flujo de Na^+ y Ca^{2+} , aunque según la isoforma, la permeabilidad y la selectividad para cationes mono o divalentes varía sustancialmente. Su patrón de distribución tisular es muy amplio, apareciendo expresados en prácticamente todos los tejidos, especialmente en el sistema nervioso central y periférico, donde juegan un papel crucial en la transducción sensorial, convirtiendo los estímulos ambientales en cambios de excitabilidad de la membrana neuronal². Además, su permeabilidad al catión Ca^{2+} implica la activación de señales de transducción celular que también contribuyen a la transmisión sensorial.

Estructuralmente, los canales TRP son homo o hetero-oligómeros formados por la asociación de cuatro subunidades alrededor de un eje de simetría central que coincide con el poro iónico. Cada subunidad está formada por 6 segmentos transmembrana (S1-S6), un lazo hidrófilo entre el quinto y sexto segmento transmembrana, que estructura el poro iónico, y dos dominios intracelulares en los extremos *N*- y *C*-terminales² (Figura 1). La región *N*-terminal puede contener dominios de unión a anquirina, que juegan un papel clave en la interacción de estos receptores con proteínas citosólicas, constituyendo complejos proteicos esenciales para la función del canal²⁻⁴. El dominio *C*-terminal contiene una región importante para la asociación de las subunidades y zonas de interacción con fosfoinosítidos y proteínas reguladoras^{2,3}.

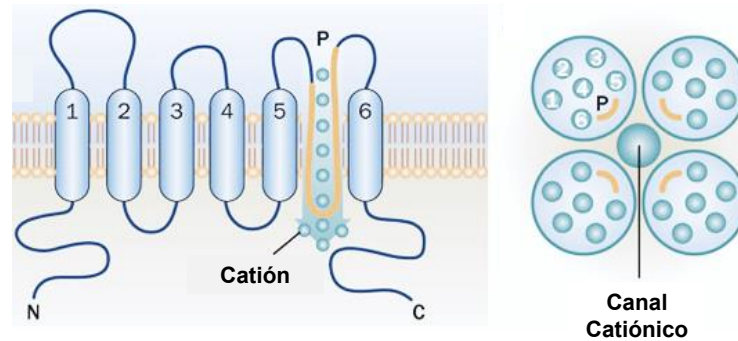


Figura 1. Subunidad del receptor TRP con 6 dominios transmembrana. Estructura de tetrámero constituida por cuatro subunidades que forman el poro.

Los canales TRP se expresan en una gran variedad de organismos multicelulares que comprende desde las levaduras a los mamíferos, pasando por los gusanos, la mosca de la fruta, y el pez cebra. Atendiendo a su homología estructural pueden ser clasificados en 7 subfamilias: TRPC (Clásicos o Canónicos), TRPV (Vainilloides), TRPM (Melastatina), TRPA (Homólogos de la proteína ANKTM), TRPP (Policistina), TRPLM (Mucolipina), TRPN (Homólogos de la proteína NOMP-C)⁵. Dentro de ellas, cabe destacar los TRPV, TRPM y TRPA por ser receptores ionotrópicos que responden a estímulos térmicos que comprenden desde temperaturas nocivas frías a calientes⁶. Estas subfamilias, a su vez, se dividen en distintos subtipos, siendo los más relevantes en relación a esta memoria, TRPV1, TRPA1 y TRPM8, que están implicados en dolor inflamatorio y neuropático. Además, en los últimos años, TRPM8 ha adquirido una mayor importancia por su implicación en el cáncer de próstata.

El receptor TRPV1 destaca por ser un sensor molecular del umbral de temperaturas altas nocivas para el organismo⁷. Fue clonado en el año 1997⁸ y se le llamó receptor de capsaicina o receptor vainilloide. La capsaicina, un derivado de la vainillina, es conocida por producir una sensación de quemazón debida a la excitación de terminales sensoriales polimodales. Está

presente en determinadas especies vegetales del género *Capsicum* sp., como por ejemplo el chile, y se caracteriza por activar de forma selectiva al receptor TRPV1^{8,9}. Este receptor se activa por calor intenso, concretamente por temperaturas que sobrepasen los 42°C, convirtiéndolo en una especie de termómetro molecular. Además, se activa a pH < 6, y también se ha descrito su respuesta a alicina, componente activo del ajo^{2,10}.

Al contrario de lo que sucedía en TRPV1, TRPA1 es un termosensor de temperaturas bajas. Una característica peculiar de la estructura de TRPA1 es una larga región N-terminal que presenta 14 repeticiones de anquirina, que podrían servir para la interacción con otras proteínas¹¹. Este receptor se activa a temperaturas inferiores a 17°C. También es importante destacar que puede ser activado por compuestos psicoactivos de la marihuana, así como por sustancias irritantes y agentes pungentes, incluyendo la acroleína, aceites de mostaza, la canela y la alicina^{2,10}.

TRPM8 pertenece a la familia de los receptores de potencial transitorio tipo melastatina. En consonancia con otros TRP, presenta una estructura funcional tetramérica y es un canal catiónico que se activa por temperaturas bajas, entre 8 y < 25°C, y también por mentol e icilina¹².

Patologías asociadas a canales TRP

Los receptores TRP juegan un papel fundamental en la transducción de las distintas modalidades somatosensoriales en mamíferos, incluyendo la sensación térmica, la recepción de feromonas, la regulación del tono vascular, la nocicepción y el dolor². La contribución de los canales TRP a la etiología o progresión de enfermedades no pasa necesariamente por defectos en los genes que los codifican, ya que modificaciones en la expresión, o en la sensibilización o desensibilización de su actividad, aumentan potencialmente su relevancia e implicación en alteraciones de las funciones fisiológicas. Existen numerosas evidencias experimentales que relacionan a diversos

miembros de la superfamilia de canales iónicos TRP con la detección de estímulos intensos de origen térmico y mecánico, así como de estímulos químicos. Por lo tanto, estos canales iónicos representan un papel relevante en patologías que cursan con dolor. En este sentido, la nocicepción es la respuesta a la detección de estímulos nocivos¹³; y los responsables de registrar dichos estímulos son conocidos como nociceptores.

El receptor TRPV1 juega un papel crucial para la transducción de señales dolorosas, especialmente en el dolor inflamatorio^{3,4,14}. Su extensa distribución tisular y celular, junto a la potenciación de su actividad por mediadores pro-inflamatorios liberados durante un daño tisular, ha convertido a este receptor en un mediador crítico de la sensibilización inflamatoria de los nociceptores, que resulta en la manifestación de hipersensibilidad en la zona dañada^{3,15}. La mayor actividad y expresión del receptor TRPV1 en tejidos inflamados es una de las causas principales de la hiperexcitabilidad de los nociceptores que conduce a la manifestación de los dos síntomas característicos de la inflamación: la hiperalgesia y la alodinia. Consecuentemente, el control farmacológico de la actividad y/o expresión superficial de TRPV1 emergen como dos estrategias terapéuticas para el control de la inflamación y del dolor que la acompaña.

Por otra parte, el receptor TRPA1, se ha relacionado con el dolor inflamatorio, el estrés oxidativo y el prurito no dependiente de histamina¹⁶. Atendiendo a la inflamación de las vías respiratorias, juega un papel importante en el asma y el EPOC (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica), por lo que los antagonistas de TRPA1 pueden tener aplicación en el tratamiento de dichas enfermedades¹⁷.

En cuanto a TRPM8, además de estar también relacionado con el dolor inflamatorio, se ha descrito que juega un papel importante en el control de la progresión del ciclo celular. Se ha observado la sobreexpresión de TRPM8 en

tumores malignos de próstata, mama, colon, pulmón y piel. Concretamente, en una línea de células tumorales de próstata, LNCaP, el canal TRPM8 se expresa en el retículo endoplasmático y en la membrana plasmática, donde funciona como un canal iónico permeable a Na^+ y Ca^{2+} , y su expresión se ve incrementada por andrógenos. Es importante destacar que TRPM8 es considerada una diana potencial para la búsqueda de fármacos antitumorales eficaces contra el desarrollo del cáncer de próstata¹⁸.

Moduladores de canales TRP

Moduladores de TRPV1

Como se ha comentado, la modulación del receptor TRPV1 puede resultar útil para el tratamiento de la hiperalgesia, la mitigación de dolor neuropático, y la inhibición de la inflamación neurogénica, entre otros^{19,20}. Este receptor es activado por ligandos endógenos como anandamida y N-araquidonoildopamina (NADA), por compuestos naturales como la capsaicina y la resiniferatoxina y por otros vanilloides, como por ejemplo el escutigeral (Figura 2).

Existen dos tipos de antagonistas, competitivos y no competitivos. Los competitivos se unen al sitio de unión del agonista. Los no competitivos, pueden interactuar con el receptor en un lugar diferente al del agonista. En ambos casos la unión puede ser reversible o irreversible²¹.

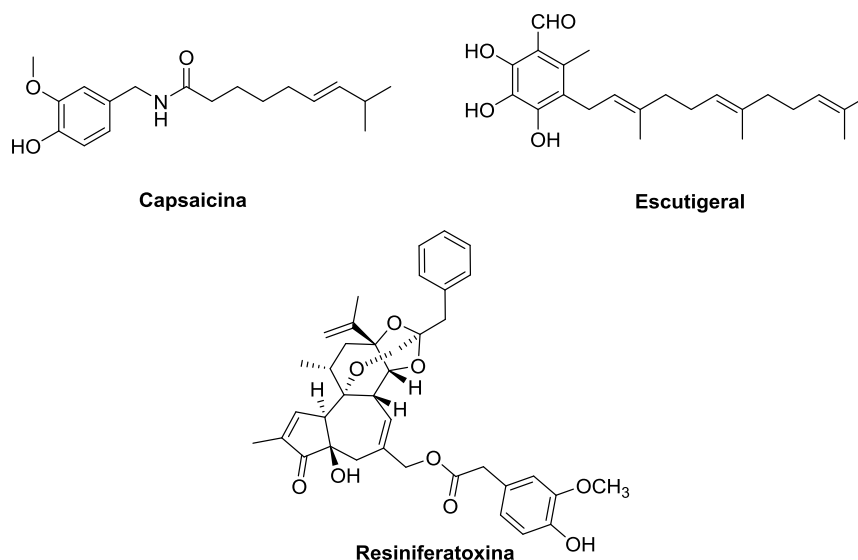


Figura 2. Ejemplos representativos de agonistas de TRPV1.

El primer antagonista competitivo de TRPV1 descrito fue la capsazepina. Este compuesto es un análogo conformacionalmente restringido de capsaicina con un agrupamiento tiourea²². Esta restricción estérica resultó ser fundamental para la actividad antagonista en dicho receptor. Por otro lado, la introducción de un átomo de yodo en el resto vanilloide del agonista resiniferatoxina (RTX), permitió identificar al 5-iodo-RTX (**1.1**), como un antagonista potente de TRPV1^{23,24}. Con el fin de mejorar los inconvenientes de la capsazepina, como por ejemplo su baja solubilidad o la moderada estabilidad metabólica, se desarrollaron una serie de análogos que combinaban los grupos farmacóforos de la capsazepina y de los análogos de RTX, destacando el compuesto **1.2** como el antagonista más potente de este tipo²⁵. Se han identificado algunos antagonistas competitivos de TRPV1 que no presentan una estructura derivada de los vanilloides naturales gracias al cribado masivo de alto rendimiento. En la Figura 3 se muestran algunos ejemplos representativos de las distintas familias. Cabe destacar, los ureído

compuestos **1.3** y **1.4**, que se encuentran en ensayos clínicos en fase I, y el derivado de piridopirimidina **1.5**.

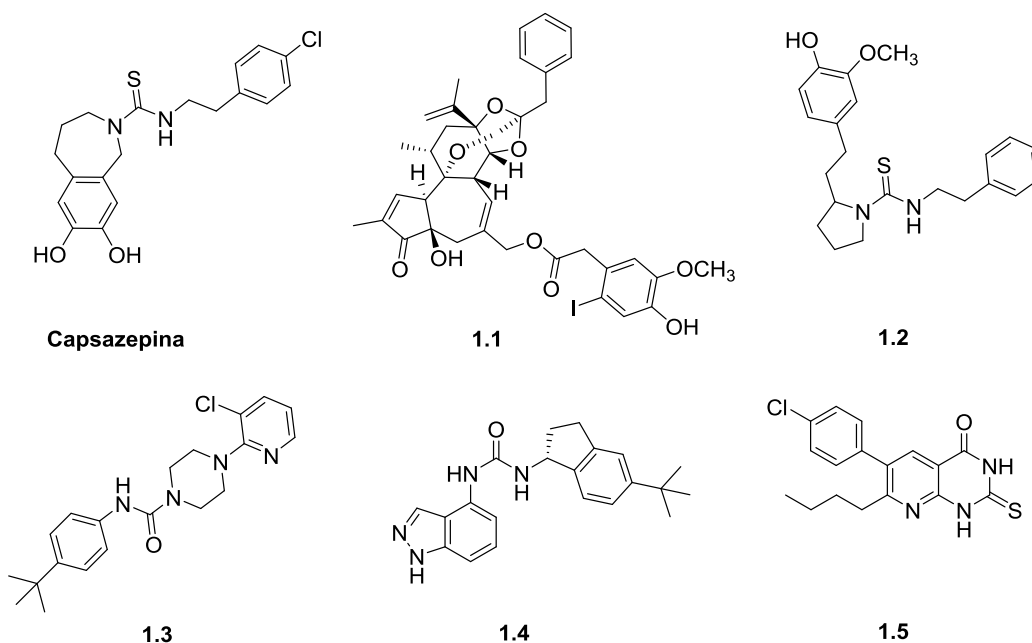


Figura 3. Ejemplos representativos de antagonistas competitivos de TRPV1.

Entre los antagonistas no competitivos, el rutenio rojo es el más clásico. El rutenio rojo, $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_5]^{6+} 6\text{Cl}^-$, es un polición inorgánico capaz de bloquear el influjo de Ca^{2+} a través del canal iónico del receptor, así como de impedir la unión de otros ligandos endógenos como la anandamida, los eicosanoides y N-araquidonildopamina (NADA)^{26,27}. El bloqueo casi irreversible del receptor TRPV1 por los antagonistas no competitivos podría ser el responsable de los efectos adversos observados hasta el momento para este tipo de compuestos. Recientemente, Messeguer y *col.* han identificado una serie de antagonistas no competitivos, cuyo esqueleto central es un anillo de triazina (Figura 4), que se unen al complejo agonista-receptor o al canal abierto. Estos antagonistas no competitivos surgieron a partir de trímeros de N-alkilglicina (peptoides), identificados

previamente por el mismo grupo, que bloqueaban el canal TRPV1 con eficacia micromolar pero presentaban efectos secundarios que parecían deberse a su accesibilidad al canal cerrado. El compuesto **1.6** bloquea el canal abierto con afinidad nanomolar²⁸.

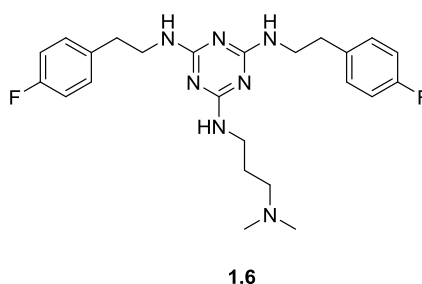


Figura 4. Ejemplo representativo de antagonista no competitivo de TRPV1.

También se han descubierto algunos péptidos que modulan el receptor TRPV1 interfiriendo directa o indirectamente en interacciones proteína-proteína relacionadas con este canal, como se describirá con más detalle en el apartado de antecedentes del capítulo 1.

Moduladores de TRPA1

La modulación del receptor TRPA1 tiene implicación en dolor inflamatorio, estrés oxidativo, afecciones respiratorias y prurito, entre otros^{16,17}. Este receptor se activa por compuestos tales como el isotiocianato de alilo y el cinamaldehído²⁹ (Figura 5).

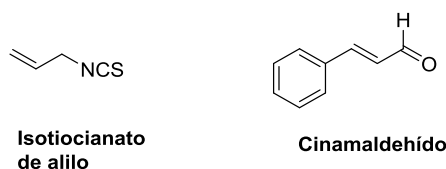


Figura 5. Ejemplos representativos de agonistas de TRPA1.

En 2009, la empresa Glenmark Pharmaceuticals registró una serie de compuestos con anillos de pirimidindiona fusionados como antagonistas de TRPA1. Dentro de esta familia de compuestos, se ensayaron varios derivados del tipo tetrahidroquinazolindionas, para demostrar la eficacia *in vivo* en modelos de dolor/hiperalgesia, destacando el compuesto **1.7** como un potente antagonista³⁰ (Figura 6). A su vez, la modificación estructural de estos compuestos permitió identificar una nueva familia de xantinas, donde cabe destacar el derivado **1.8**, que presenta mayor potencia, solubilidad y biodisponibilidad. Por otra parte, Abbott Laboratories llevó a cabo un estudio de derivados de oximas como antagonistas de TRPA1 que dio lugar a la identificación de varios moduladores, siendo el compuesto **1.9** el antagonista más potente, mostrando además buena biodisponibilidad oral³¹. También el derivado de octahidronaftaleno **1.10** presentó actividad antagonista TRPA1. Los compuestos **1.7** y **1.9** se encuentran actualmente en fases de desarrollo clínico. Por otra parte, existen compuestos con acción dual TRPV3/TRPA1 como el derivado de difosfoxano **1.11** y el compuesto poli-insaturado **1.12**³² (Figura 6).

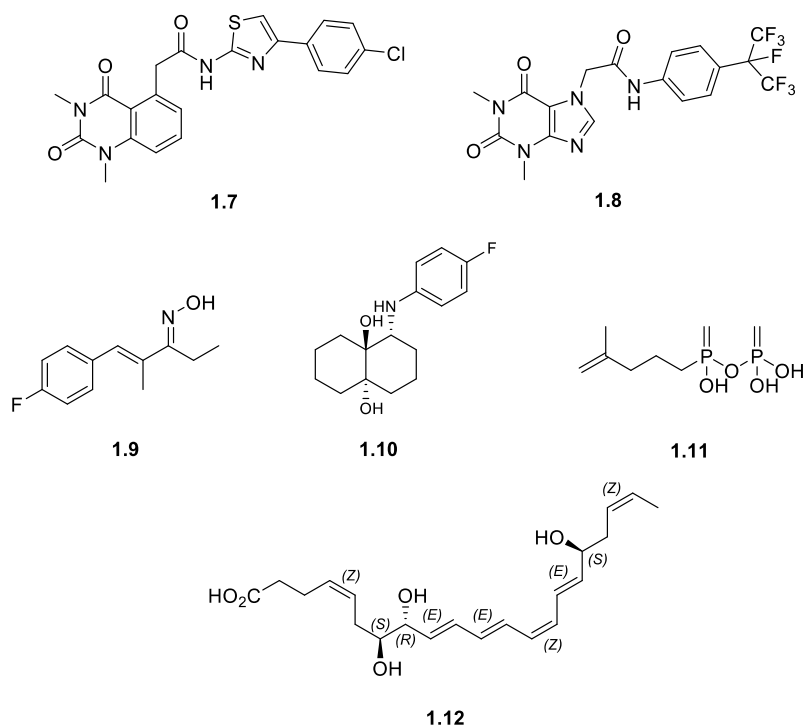


Figura 6. Ejemplos representativos de antagonistas de TRPA1.

Moduladores de TRPM8

Los receptores TRPM8 están implicadas fundamentalmente en dolor inflamatorio y neuropático³³, así como en cáncer de próstata. Este receptor es activado por productos naturales como el mentol y la icilina, entre otros³⁴ (Figura 7).

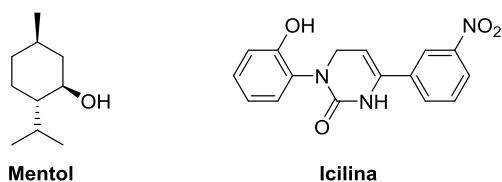


Figura 7. Ejemplos representativos de agonistas de TRPM8.

Los primeros antagonistas de TRPM8 estudiados fueron los derivados de benzotiofeno (**1.13-1.14**) (Figura 8)³⁵. Los compuestos **1.13** y **1.14** fueron eficaces en un modelo de dolor neuropático *in vivo*, produciendo un alto porcentaje de alivio del dolor. Otros compuestos con un resto de benzimidazol como estructura central (**1.15-1.16**)³⁶ fueron capaces de reducir la respuesta a icilina, revertir la hipersensibilidad al calor inducida por carragenina, así como la hiperalgesia térmica y mecánica inducida por CFA (Complete Freund's adjuvant). Finalmente, se estudió el bloqueo del receptor TRPM8 por estructuras cannabinoides, como el THC y el THCA, entre otros, resultando ser antagonistas no selectivos de varios receptores TRP³⁷.

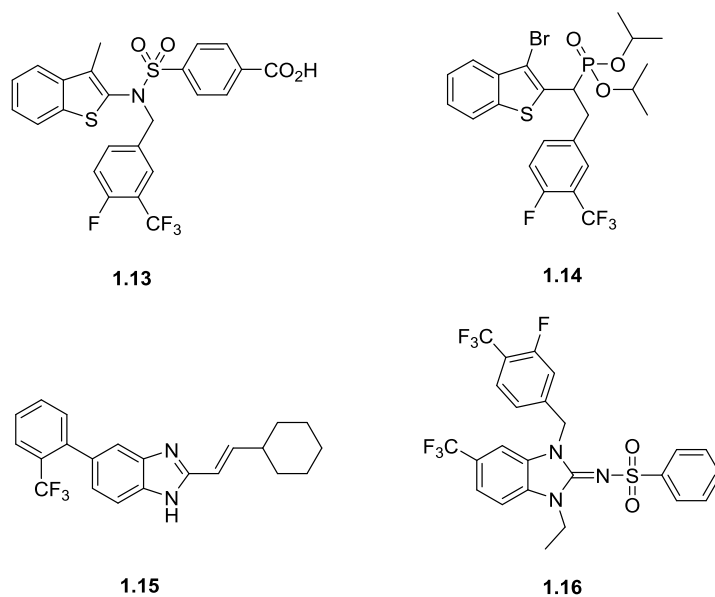


Figura 8. Ejemplos representativos de antagonistas de TRPM8.

Receptores Nicotínicos (nAChR)

Aspectos Generales

Los receptores de Acetilcolina (ACh) o receptores colinérgicos son proteínas de membrana que responden a la unión de su agonista endógeno, el neurotransmisor acetilcolina. Se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso y en el sistema muscular. Estos receptores pueden dividirse en dos clases, nicotínicos y muscarínicos, dependiendo de su especificidad de unión a nicotina o muscarina, respectivamente. Los receptores muscarínicos están acoplados a proteínas G, mientras que los receptores nicotínicos funcionan como canales iónicos mediados por ligando. En la presente memoria nos centraremos exclusivamente en estos últimos, que están implicados en multitud de trastornos cognitivos, neurológicos y dolor inflamatorio, además de ser los receptores para la nicotina.

La estructura cuaternaria del receptor nicotínico viene dictada por el ensamblaje de 5 subunidades proteicas dispuestas alrededor de un poro central, que es permeable a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Existen varios subtipos que se diferencian fundamentalmente en las posibles combinaciones de subunidades³⁸. Estos receptores comparten una estructura básica común pero presentan propiedades funcionales y farmacológicas específicas dependiendo de las diferentes subunidades que componen los diferentes subtipos.

Las distintas subunidades que pueden formar los receptores nicotínicos musculares se denominan α , β , γ , δ y ϵ . En el receptor neuronal existen dos subunidades, denominadas α y β por homología con las subunidades α y β del receptor muscular, y de cada una de ellas se ha identificado la existencia de varios subtipos. En concreto, se han caracterizado nueve tipos de subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$)³⁹. Las subunidades están compuestas por un dominio N-terminal hidrófilo orientado hacia el

exterior celular, constituido por unos 200 aminoácidos y que contiene los elementos más importantes del sitio de unión de agonistas. Cuatro segmentos hidrófobos (M1-M4) que atraviesan la membrana como estructuras α -helicoidales. Uniendo los segmentos hidrófobos, existen varios dominios hidrófilos que son poco extensos a excepción del que une los fragmentos M3 y M4, que puede tener entre 50 y 250 aminoácidos y se encuentra orientado hacia el interior de la célula, siendo la única zona de las subunidades que no presenta homología. Finalmente, un segmento corto C-terminal extracelular⁵⁰.

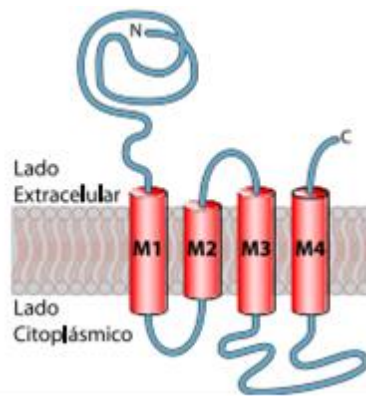


Figura 9. Representación esquemática de una subunidad del receptor nicotínico: Un segmento extracelular N-terminal (N), cuatro dominios transmembrana (M1-M4), y los correspondientes segmentos que los conectan.

La α -bungarotoxina es uno de los componentes del veneno de serpiente rayada taiwanesa que se une irreversible y competitivamente a los receptores de ACh. Además, es un antagonista selectivo del receptor nicotínico $\alpha 7$. En base a los estudios de unión de la α -bungarotoxina, los nAChR neuronales pueden dividirse en dos grupos⁴⁰:

- Receptores sensibles a α -bungarotoxina, que a su vez pueden ser homoméricos, compuestos por 5 subunidades α iguales ($\alpha 7$ - $\alpha 9$), o heteroméricos, compuestos por diferentes subunidades α ($\alpha 7$ y $\alpha 8$ o $\alpha 9$ y $\alpha 10$).

- Receptores insensibles a α -bungarotoxina, compuestos por diferentes combinaciones de subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 6$) y subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Normalmente se encuentran como $(\alpha)_2(\beta)_3$.

La diferente combinación de subunidades α y α/β da lugar a receptores que difieren en términos de permeabilidad, cinéticas de activación y desensibilización y farmacología del ligando³⁹.

La mayoría de los nAChR en el sistema nervioso central contienen bien las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$, o bien solo subunidades $\alpha 7$ (Figura 10). Sin embargo, en el sistema nervioso periférico los subtipos más abundantes son $\alpha 3$ y $\beta 4$. Los subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ son los mejor caracterizados en términos de selectividad de ligando⁴¹.

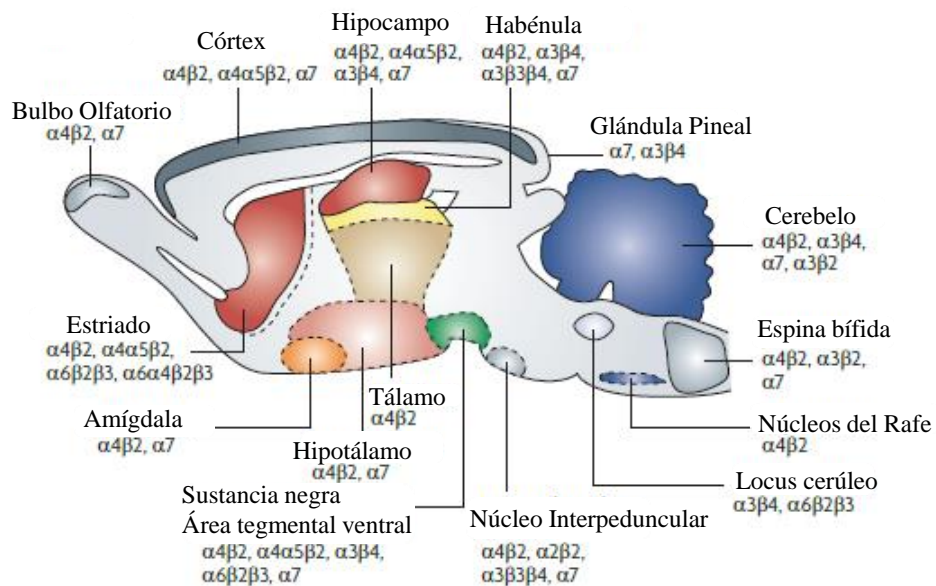


Figura 10. Distribución en el cerebro de los subtipos del receptor nicotínico de acetilcolina.

Receptor nicotínico $\alpha 7$

El nAChR $\alpha 7$ es un homopentámero constituido por 5 subunidades $\alpha 7$, cada una, de aproximadamente 56 kDa y 502 aminoácidos⁴². Se encuentra distribuido fundamentalmente en el sistema nervioso y autonómico de los vertebrados⁴³.

Los nAChR $\alpha 7$, dada su distribución, la cinética del canal y la permeabilidad al Ca^{2+} , parece que juegan un papel relevante en otras funciones fisiológicas, además de la mediación de la neurotransmisión clásica. Por ejemplo, los nAChR $\alpha 7$ se encuentran implicados en procesos como el control de la liberación de diferentes neurotransmisores, el desarrollo y mantenimiento de neuritas⁴⁴, la aparición de convulsiones⁴⁵ y en la viabilidad y muerte neuronales⁴⁶.

La unión de la ACh, que es el ligando endógeno, ocurre en el dominio extracelular de la subunidad α , justo en la interfaz entre dos subunidades adyacentes (Figura 11).

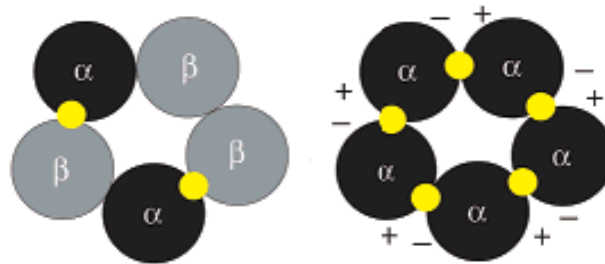


Figura 11. Estructura de un receptor heteromérico $(\alpha)_2(\beta)_3$ y de un receptor homomérico $(\alpha)_5$. En amarillo se representan los sitios de unión de ACh.

La activación del receptor se produce cuando se unen dos moléculas de acetilcolina. Una vez activado, el canal se estabiliza en una conformación abierta que permite la difusión de los cationes al interior de la célula (Figura 12). Se sabe que su desensibilización por acetilcolina y nicotina es rápida y profunda, sin embargo, todavía no se conoce cómo se activa y se

desensibiliza por la acción de agonistas, dado que los sitios de unión y número de éstos aún no se han identificado de forma inequívoca⁴⁷.

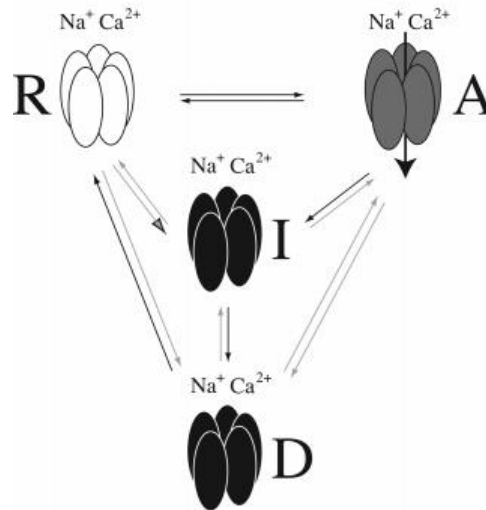


Figura 12. Representación de la transición entre el estado de reposo (R), el estado activo (A), el estado inactivo (I) y el estado desensibilizado (D).

Debido a que $\alpha 7$ nAChR parece estar involucrado en patologías centrales y periféricas que implican, entre otros, trastornos cognitivos, esquizofrenia, inflamación y dolor, se ha generado gran interés en el desarrollo de agentes terapéuticos capaces de actuar sobre este subtipo concreto de receptor nicotínico.

El papel de los canales $\alpha 7$ en funciones cognitivas, como atención, aprendizaje y memoria está siendo bastante estudiado en la actualidad, más aun teniendo en cuenta su distribución en regiones implicadas en dichas funciones, tales como, hipocampo, corteza y varias regiones límbicas subcorticales. Una de las observaciones más consistentes en relación con el envejecimiento normal del cerebro humano es el descenso de los receptores nicotínicos. Es razonable pensar que esta reducción sea una de las causas del deterioro cognitivo leve y facilite la aparición de trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer⁴⁸, y ciertos trastornos

psiquiátricos. Entre los diferentes subtipos de canales nicotínicos presentes en el cerebro, $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ parecen particularmente involucrados en procesos cognitivos. Estudios *in vitro* en cultivos neuronales han puesto de manifiesto que la estimulación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ protege a las neuronas de la degeneración y de la muerte neuronal inducida por la proteína amiloide $A\beta_{42}$, que tiene una alta afinidad por este subtipo de receptor nicotínico⁴⁹. Esta protección es proporcional al número de receptores nicotínicos $\alpha 7$ expresados en las neuronas. Centrándonos en la esquizofrenia, diferentes estudios post-mortem recogidos en la bibliografía muestran que los receptores nicotínicos, en concreto los $\alpha 7$, aparecen reducidos en número en los cerebros de pacientes esquizofrénicos⁵⁰. Por otra parte, diversos estudios indican que los antagonistas de los receptores nicotínicos podrían ser capaces de reducir los síntomas de la depresión y los cambios en el estado de ánimo⁵¹.

Adicionalmente, el receptor nicotínico $\alpha 7$ está relacionado con los procesos dolorosos, ya que la inyección intratecal de colina (agonista selectivo de $\alpha 7$) en ratones produce antinocicepción^{52,53}.

Por otra parte, estos receptores también parecen desempeñar un papel importante en relación a enfermedades que tienen un componente inflamatorio, tales como diabetes⁵⁴, asma⁵⁵ y artritis⁵⁶, pudiendo constituir una posible diana terapéutica para el tratamiento de la inflamación.

Moduladores de receptores nicotínicos $\alpha 7$

La modulación del receptor nicotínico puede ser mediada por agonistas, antagonistas o por moduladores alostéricos. La mayoría de los compuestos descritos hasta el momento presentan actividad agonista, habiéndose estudiado en menor medida los compuestos con actividad antagonista y los moduladores alostéricos.

Agonistas

- Análogos de Nicotina: El prototipo de agonista de estos receptores es la nicotina (Figura 13). Sin embargo, la nicotina no presenta selectividad frente a $\alpha 7$ y su uso está limitado debido a sus efectos adversos. Partiendo de la estructura de la nicotina se han llevado a cabo diferentes modificaciones en los sustituyentes y en la flexibilidad conformacional dando lugar a compuestos con alta afinidad y selectividad por el subtipo $\alpha 4\beta 2$, pero ninguno selectivo para $\alpha 7$ ⁵⁷.

- Análogos de Epibatidina: La epibatidina es un alcaloide aislado de la piel de la rana "*Epipedobates tricolor*". Este compuesto presenta alta potencia, pero también alta toxicidad debido a la baja selectividad por los diferentes subtipos del receptor. Por ello, se han diseñado y ensayado análogos de epibatidina con alta afinidad y una mejora de la selectividad frente a $\alpha 3\beta 4$, como por ejemplo el compuesto **1.18**⁵⁸ (Figura 13).

- Análogos de Citisina: La citisina es un alcaloide aislado de las semillas de *Cytisus* que muestra una alta afinidad como agonista parcial de $\alpha 4\beta 2$ y baja afinidad por $\alpha 7$, frente al que se comporta como agonista total. Unos años después del descubrimiento de la citisina, se ha demostrado que la introducción de sustituyentes en el anillo de piridona, como por ejemplo un halógeno en posición 9 (**1.19**), permite incrementar la afinidad y eficacia por los subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ ⁵⁹ (Figura 13).

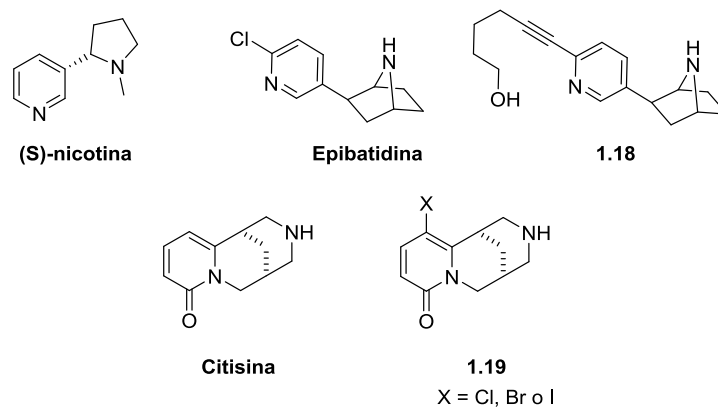


Figura 13. Agonistas derivados de nicotina, epibatidina y citisina no selectivos de $\alpha 7$.

- Ligandos selectivos de $\alpha 7$: Los compuestos que muestran selectividad por el receptor $\alpha 7$ se pueden dividir en dos grupos diferentes.

- El primer grupo está constituido por compuestos que contienen un esqueleto de piridilpiperidina, típico de la toxina anabaseina, procedente de un gusano marino (Figura 14). Un ejemplo lo constituye el compuesto **1.20a** que presenta actividad agonista $\alpha 7$ y no muestra actividad como antagonista de $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$. Sin embargo, análogos relacionados, en los que el grupo 4-OH se sustituye por 4-SMe (**1.20b**) y 4-CF₃ (**1.20c**), no presentaron actividad como agonistas $\alpha 7$ y, por el contrario, mostraron actividad antagonista frente a los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ ⁶⁰ (Figura 14).

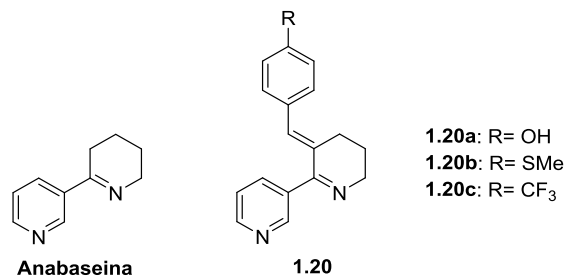


Figura 14. Ejemplos representativos de agonistas selectivos de $\alpha 7$.

- Al segundo grupo pertenecen los compuestos que contienen en su estructura un resto azabíclico, como el antagonista de 5-HT₃ tropisetron⁶¹. Los compuestos de esta familia han presentado actividad dual, como antagonista de 5-HT₃ y agonista parcial de $\alpha 7$. Entre los derivados de quinuclidinas cabe destacar:
 - Espiroquinuclidinas: El carbamato conformacionalmente restringido **1.21** (AR-R17779) fue el primer compuesto descrito en la bibliografía con afinidad selectiva frente a $\alpha 7$. Su análogo **1.22**, más activo, se ha evaluado en ensayos *in vivo* y presenta mejor perfil farmacocinético (no inhibe el citocromo 2D6) y muestra afinidad selectiva por $\alpha 7$ ⁶² (Figura 15).
 - Azabíciclos Arilamidas: Este tipo de compuestos fueron identificados como agonistas débiles de $\alpha 7$ a través de un cribado masivo de alto rendimiento. A partir del compuesto prototipo **1.23** (PNU-282987) se realizaron distintas modificaciones que condujeron a compuestos que llegaron a ensayos clínicos. Estos estudios clínicos fueron interrumpidos en fase I debido a que producían taquicardia ventricular. La introducción de un sistema azabíclico de siete eslabones y diversas sustituciones en el anillo aromático permitieron la identificación del análogo **1.24** (PHA-543613), que mejoraba diez veces los datos de eficacia y seguridad de **1.23**. El compuesto **1.25a** (TC-5619), un análogo del prototipo **1.23**, se encuentra en la actualidad en ensayos clínicos (fase II), presentándose como un buen candidato con actividad agonista selectiva $\alpha 7$ ⁶³. Recientemente Targacept Inc. ha desarrollado un nuevo agonista altamente selectivo para $\alpha 7$, **1.25b** (TC-7020) (Figura 15).

- Carbamatos Azabicíclicos: En este tipo de compuestos, representados por **1.26**, el átomo de oxígeno del carbamato parece ser un elemento farmacofórico esencial en la interacción con el receptor $\alpha 7$, a través de su participación en un enlace de hidrógeno⁶⁴ (Figura 15).
- Arilazabiciclos: El compuesto **1.27** se engloba dentro de la tercera generación de agonistas selectivos $\alpha 7$ para el tratamiento de déficits cognitivos asociados a esquizofrenia. Diferentes modificaciones en su estructura dieron lugar al compuesto diazabicíclico **1.28** (A-582941), que es el agonista más potente dentro de esta familia de compuestos⁶⁵ (Figura 15).

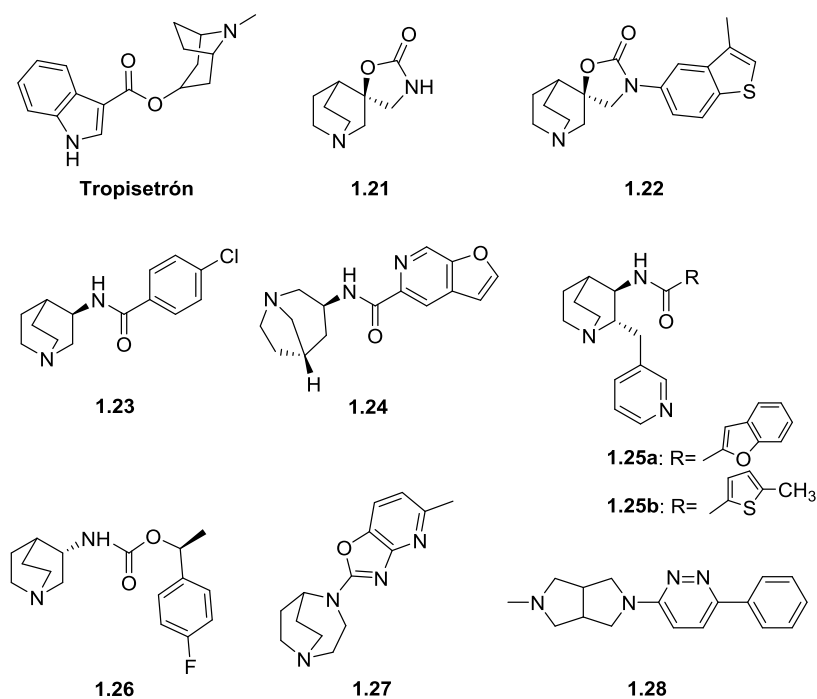


Figura 15. Ejemplos representativos de agonistas selectivos $\alpha 7$.

Antagonistas

La búsqueda de antagonistas del receptor nicotínico ha atraído menos atención ya que, hasta el momento, la mayoría de los esfuerzos se han dirigido hacia la búsqueda de agonistas, que presentan un potencial terapéutico más amplio. No obstante, los antagonistas $\alpha 7$ han sido estudiados como terapia para el cáncer de pulmón de célula no pequeña⁶⁶ y, por otra parte, se ha descrito su utilidad en las intoxicaciones producidas por organofosforados⁶⁷.

Un antagonista por excelencia del receptor nicotínico $\alpha 7$ es la metillicaconitina (MLA), un alcaloide diterpénico aislado de varias especies de *Delphinium* (Figura 16). Presenta alta toxicidad en animales, pero se utiliza como una herramienta importante para el estudio de la farmacología del receptor nicotínico⁶⁸.

Otro ejemplo de antagonista $\alpha 7$ lo constituye el biciclo **1.29**, aislado de los extractos de la piel de ciertas ranas venenosas. El compuesto **1.29** bloquea selectivamente al receptor nicotínico $\alpha 7$, comportándose como un inhibidor no competitivo con acetilcolina⁶⁹. Otros compuestos con estructura de triazol y pirazol carboxamida también presentaron actividad antagonista selectiva frente a $\alpha 7$, destacando los compuestos **1.30** y **1.31**⁷⁰ (Figura 16).

También se ha estudiado que ciertas caracolas marinas (Género *Conus*) producen una amplia gama de toxinas que tienen efecto sobre diferentes canales iónicos, incluidos los nAChR. Estas toxinas son péptidos de pequeño-mediano tamaño con un alto contenido en puentes disulfuro. La optimización de una de estas α -conotoxinas (α -CTX) dio lugar al derivado peptídico **1.32**, un antagonista muy potente y selectivo del receptor $\alpha 7$ ^{71,72} (Figura 16).

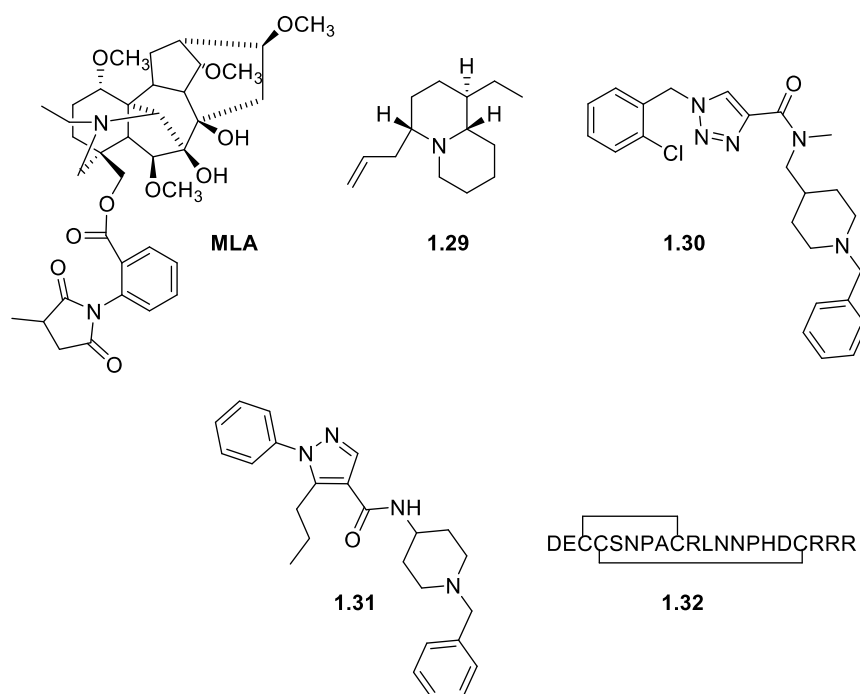


Figura 16. Ejemplos representativos de antagonistas selectivos de $\alpha 7$.

Moduladores alostéricos

Los moduladores alostéricos son compuestos que se unen al receptor nicotínico en un sitio diferente al del agonista y que son capaces de regular el canal incrementando o disminuyendo indirectamente el efecto del ligando endógeno o de un agonista exógeno. Se denominan moduladores alostéricos positivos (PAMs) a aquellos que incrementan la actividad del receptor y por el contrario, aquellos que disminuyen dicha actividad son los moduladores alostéricos negativos (NAMs). Dado que el segundo capítulo de esta memoria se centra en el desarrollo de una nueva serie de PAMs del receptor nicotínico $\alpha 7$, los aspectos relacionados con este tipo de modulación se comentarán en la introducción de dicho capítulo.

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo de esta memoria es la modulación de canales iónicos usando aproximaciones novedosas y/o poco estudiadas hasta el momento. Concretamente, se pretende abordar la modulación de interacciones proteína-proteína (IPPs) relacionadas con canales iónicos TRP (Capítulo 1) y profundizar en la modulación alostérica del receptor nicotínico $\alpha 7$ (Capítulo 2). Adicionalmente, y basados en precedentes bibliográficos, los intermedios de síntesis de capítulo 2 fueron ensayados como antitumorales y agentes leishmanicidas (Capítulo 3).

Los objetivos específicos se detallarán en el apartado correspondiente de los mencionados capítulos.

**CAPÍTULO 1: Diseño, síntesis y validación de una
quimioteca de péptidos helicoidales: una aproximación
novedosa a la modulación de canales TRP**

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Modulación de Interacciones proteína-proteína (IPPs)

Hoy en día, se sabe que muchas proteínas no ejercen su acción de forma aislada, sino formando parte de complejos proteicos cuya función viene determinada por la especificidad de esta unión. Recientemente, se ha demostrado que las IPPs son mucho más accesibles de lo que se pensaba en un primer momento. Hasta hace una década, los sistemas proteína-proteína se consideraban dianas difíciles de abordar con péptidos convencionales, peptidomiméticos o moléculas pequeñas, debido a que estas interacciones normalmente ocurren entre superficies relativamente extensas y a menudo planas de la estructura proteica, que consisten frecuentemente en fragmentos discontinuos de la secuencia primaria de las proteínas⁷³. Sin embargo, estudios estructurales de RMN y cristalografía de rayos X, combinados con mutagénesis dirigida, han mostrado que, en muchos casos, sólo pequeños segmentos de la interfaz de interacción (*hot-spots*) son responsables de la mayoría de la energía libre de unión⁷⁴. Estos *hot-spots* o zonas esenciales para la interacción son generalmente zonas de accesibilidad elevada, relativamente hidrófobas, muy empaquetadas y con una secuencia bastante conservada⁷⁵. En este sentido, el trabajo de Clackson y Wells, que definieron los "*hot-spots*" como regiones de alta afinidad de interacción entre las proteínas implicadas, ha constituido un avance importante. Según estos autores, para interferir en la interacción es suficiente con mimetizar aquellos fragmentos que constituyen los "*hot-spot*," en lugar de toda la interfaz de interacción, por lo que los moduladores de la IPPs pueden ser péptidos, peptidomiméticos o moléculas pequeñas.

Durante los últimos años, se ha dedicado un gran esfuerzo a la caracterización de los aminoácidos importantes en las interacciones proteína-proteína, a la identificación de los motivos estructurales comunes en la interfaz de interacción de diferentes proteínas y al mapeo de las superficies de contacto, lo que, en conjunto, posibilitaría abordar la búsqueda de

moduladores externos⁷⁶. El conocimiento de la estructura tridimensional de los complejos péptido-proteína o proteína-proteína permite utilizar aproximaciones de diseño racional en la búsqueda de moléculas sintéticas capaces de mimetizar, estructural y funcionalmente, la región de interacción de la proteína diana⁷⁷. Así, a partir de los datos estructurales de proteínas aisladas, se pueden predecir sitios potenciales de unión mediante el cribado virtual de bases de datos de moléculas pequeñas. Alternativamente, los estudios de modelización molecular pueden guiar la búsqueda de esqueletos moleculares restringidos donde anclar los residuos esenciales implicados en la unión, proporcionándoles la orientación apropiada (diseño *de novo*).

Otra posible estrategia sería la búsqueda de compuestos capaces de imitar la conformación y propiedades electrónicas de los fragmentos identificados como clave, mimetizando elementos de la estructura secundaria proteica⁷⁸. Existen trabajos previos que describen la utilización de colecciones definidas de péptidos para la identificación de moduladores de IPPs, constituyendo el paso previo hacia la identificación de miméticos no peptídicos de la estructura secundaria. Cabe destacar el éxito obtenido utilizando este tipo de estrategias en la modulación de algunas interacciones proteína-proteína de relevancia terapéutica. Así, se han descrito diversas estrategias químicas orientadas a la búsqueda de moduladores de estas IPPs tales como péptidos conformacionalmente restringidos con estructura de hélice α (a través de la formación de puentes disulfuro, lactama, grapados C-C)⁷⁹⁻⁸¹, foldámeros (β -péptidos, α/β -péptidos mixtos)⁸² y proteomiméticos (miméticos de hélices α de tipo terpenilo y sistemas heterocíclicos relacionados)⁸³. Todas estas estrategias han sido aplicadas con éxito para la modulación de IPPs de interfaz conocida.

1.1.2 Motivos helicoidales como elementos de reconocimiento entre proteínas

Las hélices α son el elemento de estructura secundaria más abundante en la naturaleza y también el más frecuentemente implicado en la interacción entre proteínas⁸⁴. En muchos de estos complejos proteicos solo una de las caras de la hélice α está implicada en la interacción, siendo los residuos importantes para la afinidad los situados en disposición relativa i , $i+3$ ($i+4$) e $i+7$ ⁸⁵. A menudo, la interacción entre estos motivos helicoidales y los sitios de unión complementarios está mediada por residuos hidrófobos situados en las posiciones indicadas.

Una hélice α se define como cualquier secuencia de al menos 5 aminoácidos consecutivos con ángulos ϕ y ψ de -57° y -47° , respectivamente. La adopción de estos ángulos permite que se establezca un patrón de enlaces de hidrógeno consecutivos entre el grupo carbonilo de residuos en posición i y el grupo NH de residuos en posición $i+4$. En cada vuelta de la hélice participan 3.6 aminoácidos, que avanzan 5.4 \AA a lo largo del eje. De forma general, las hélices α contienen un promedio de 12 residuos, aunque las hélices transmembrana pueden ser más largas.

Aproximadamente un 30% de los residuos presentes en las proteínas adoptan esta conformación y por ello ha sido ampliamente estudiada. Existen múltiples factores que determinan la estabilidad de una hélice α . Así, se consideran muy importantes los aminoácidos que la forman, así como la posición que los mismos ocupan dentro de la secuencia, las interacciones entre cadenas laterales, la disposición de las cadenas laterales de sus extremos N-cap y C-cap, etc⁸⁶. Todos éstos son factores a tener en cuenta a la hora de diseñar péptidos helicoidales en disolución acuosa. En este sentido, diferentes estudios de los residuos que componen las proteínas naturales han permitido establecer una preferencia por determinados residuos

en según qué posiciones de la hélice. Así, es común encontrar residuos de Ala y Leu en el interior de la secuencia, mientras que es poco probable encontrar Gly o Pro ya que dificultan la adopción de los ángulos diedros característicos de esta estructura^{87,88}. También es común el uso de aminoácidos α,α -disustituídos, como el Aib, en la zona central de la hélice para aumentar el contenido helicoidal de ésta⁸⁹.

Por otra parte, dada la orientación de los NH, hacia el extremo N-terminal y la orientación de los oxígenos hacia el C-terminal, a la hélice α , se le atribuye un cierto carácter dipolar. Por esto, lo más común es encontrar residuos cargados negativamente en el extremo N-terminal y residuos positivos en el extremo C-terminal. No existe una tendencia clara sobre los residuos que tienden a colocarse en el extremo C-terminal, mientras que en el extremo N-terminal es común encontrar residuos como Asn, Asp, Ser y Thr. De forma general, estos aminoácidos pueden aceptar enlaces de hidrógeno de los grupos NH de residuos cercanos en la secuencia⁹⁰. Una forma sencilla pero efectiva de estabilizar estructuras de hélice α es la acetilación del extremo N-terminal⁹¹. De este modo se elimina la carga positiva del extremo de la hélice y además, el grupo carbonilo extra proporcionado por el acetilo puede generar enlaces de hidrógeno estabilizantes con grupos NH de los residuos próximos. Lo mismo ocurre cuando el extremo C-terminal se encuentra en forma de amida, produciéndose un efecto similar al de la acetilación del extremo N-terminal.

Se han generado distintos modelos matemáticos que permiten calcular de forma teórica el carácter helicoidal de una secuencia peptídica. Entre ellos se encuentra AGADIR, un algoritmo matemático desarrollado por Serrano, Muñoz y colaboradores, que tras varias mejoras es capaz de predecir con bastante fiabilidad la helicidad de cualquier péptido lineal. Para ello, tiene en cuenta diversos factores como el tipo y la posición de los aminoácidos,

posibles enlaces de hidrógeno, interacciones entre cadenas laterales en posiciones adecuadas, el carácter dipolar de la hélice, la dependencia del pH, etc⁹².

El espaciado entre las cadenas laterales de los residuos implicados en una hélice α se visualiza fácilmente con el uso de la rueda helicoidal (Figura 17). Esta representación esquemática de las hélices permite apreciar cómo quedan distribuidas en la superficie las cadenas laterales de sus residuos, teniendo en cuenta que el ángulo que forman dos residuos consecutivos en una hélice α es de 100° .

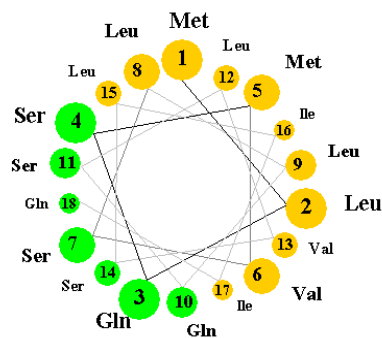


Figura 17. Rueda helicoidal utilizada para el diseño de hélices α . En el ejemplo presentado se puede observar una cara hidrófoba en naranja y una cara hidrófila en verde.

1.1.2.1. Estabilización de hélices α mediante interacciones no covalentes

Numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de la estabilización de la estructura de hélice α a través de interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia. Estos estudios han identificado diferentes tipos de interacciones como puentes salinos⁹³, enlaces de hidrógeno⁹⁴, interacciones hidrófobas⁹⁵ e interacciones aromático-básico⁹⁶. Las interacciones más comunes se producen entre cadenas laterales de

aminoácidos que se encuentran en posiciones $(i, i+3)$ o $(i, i+4)$, siendo estas últimas las más estabilizantes.

La estabilización aportada por los puentes salinos se ha estudiado en sistemas que contienen residuos de Lys y Glu en las posiciones adecuadas para la interacción. Así, se ha comprobado que los puentes salinos $\text{Lys}^i\text{-Glu}^{i+4}$ en posiciones centrales de la secuencia son más estabilizantes que si se encuentran en los extremos⁹⁷. Los pares His-Asp son más estabilizantes que Asp-His⁹⁸, especialmente cuando se encuentran en posiciones $(i, i+4)$. Del mismo modo, existen estudios de triadas de aminoácidos que estabilizan interacciones de este tipo, como Arg-Glu-Arg⁹⁹. En cuanto a enlaces de hidrógeno entre grupos funcionales de cadenas laterales de aminoácidos implicados en una hélice α , lo más común es encontrarlos entre Gln y Asn situados en posiciones $(i, i+4)$ ⁹⁴. Residuos de cadena corta, como Thr, Ser, Asn o Asp, tienden también a favorecer este tipo de estabilización cuando se encuentran en el extremo N-terminal de la secuencia¹⁰⁰. Del resto de interacciones estudiadas cabe destacar que las observadas entre residuos de Phe o Tyr y residuos de Lys o Arg, que en principio se consideraron de tipo aromático-básico (π -catión), son en realidad de tipo hidrófobo entre los anillos aromáticos y los metilenos de las cadenas laterales de los residuos básicos⁹⁶.

1.1.2.2 Estabilización de hélices α mediante el uso de plantillas de iniciación

La mayor penalización a la hora de formar una hélice α viene dada por la pérdida de entropía que conlleva el proceso de iniciación de la hélice, es decir, la colocación de los tres primeros aminoácidos en la disposición adecuada para formar el primer enlace de hidrógeno. Una vez traspasada esta barrera energética, la propagación está más favorecida. Una manera de eliminar esta barrera es sintetizar una molécula plantilla que facilite la formación del primer enlace de hidrógeno. Esta plantilla podría iniciar la hélice

si se coloca en el extremo N-terminal, C-terminal o en el centro del péptido, aunque los requisitos necesarios en cada caso serían diferentes. La nucleación en el centro del péptido se consigue más fácilmente usando restricciones de las cadenas laterales de los aminoácidos. La nucleación en el extremo C-terminal no es fácil de conseguir, pero en el extremo N-terminal se pueden introducir restricciones conformacionales capaces de establecer una geometría adecuada, que disponga los átomos de forma adecuada para iniciar la hélice.

En la bibliografía aparecen numerosos ejemplos de derivados peptídicos que utilizan este tipo de estrategia para inducir estructura de hélice, recurriendo a plantillas de diversa naturaleza (Figura 18)¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

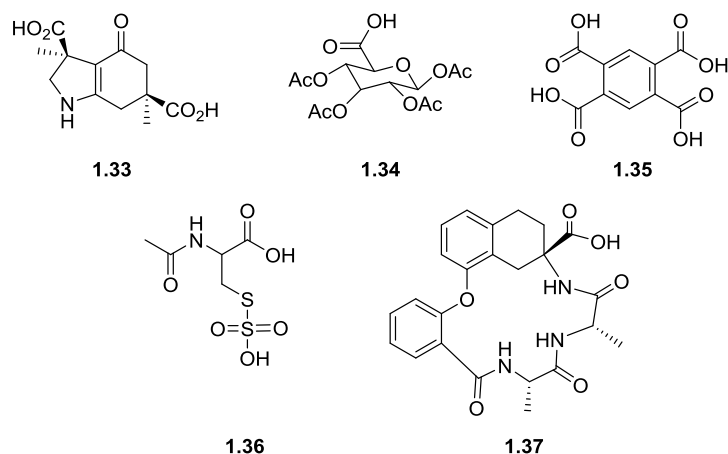


Figura 18. Diferentes plantillas utilizadas para iniciar la estructura de hélice α al introducirlas en el extremo N-terminal de un péptido.

Un ejemplo interesante, dentro de la introducción de plantillas en el extremo N-terminal que permitan superar la barrera energética para producir la iniciación de la hélice, es lo que Arora y *col.* denominan HBS (“hydrogen bond surrogate”)¹⁰⁴. Como ya se ha comentado anteriormente, las hélices α se caracterizan por presentar un enlace de hidrógeno entre las posiciones (i, i+4). Esta estrategia se basa en la sustitución del primer enlace de hidrógeno

por un enlace covalente, que en este caso es un enlace hidrocarbonado, aprovechando la versatilidad y la tolerancia de diferentes grupos funcionales a la reacción de metátesis (Figura 19). La ventaja de esta estrategia es que permite conservar las cadenas laterales de todos los residuos, lo cual es importante a la hora de sintetizar hélices que participen en interacciones proteína-proteína.

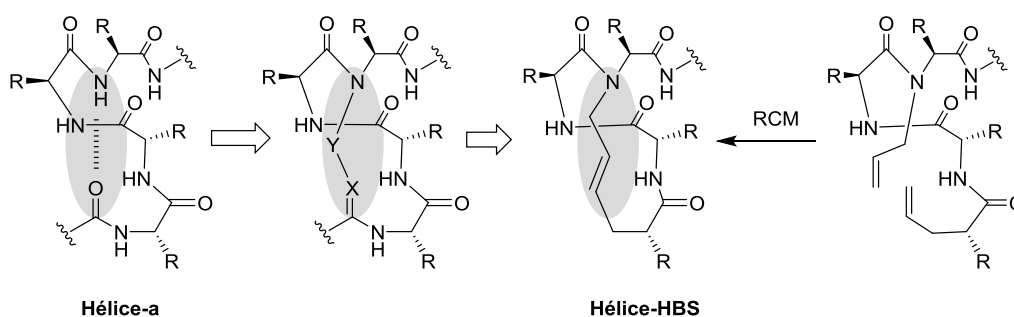


Figura 19. Estrategia HBS.

Basados en el trabajo de Satterthwait, que estudió el uso de hidrazonas para la fijación de hélices α ¹⁰⁵, Arora y *col.* describieron en 2004 el primer estudio de estabilización de hélice α usando esta estrategia^{106,107} y continuaron realizando diferentes estudios con el fin de validarla^{108,109}. Para demostrar la eficacia del HBS en la estabilización de conformaciones de hélice α biológicamente relevantes, aplicaron con éxito la estrategia a un péptido de 16 aminoácidos procedente del dominio BH3 de Bak, **1.38** (Figura 20), que adopta conformación helicoidal cuando se une a Bcl-xL¹¹⁰. Tras varias modificaciones llegaron a los compuestos HBS **1.39** y **1.40**, que presentaron una helicidad del 46 y del 65%, respectivamente, frente al 20% mostrado por **1.38**. Los ensayos de afinidad de estos compuestos demostraron que el derivado con más helicidad **1.40** ($K_D = 69 \pm 16$ nM) era dos veces más potente que su análogo lineal **1.38** ($K_D = 154 \pm 23$ nM).

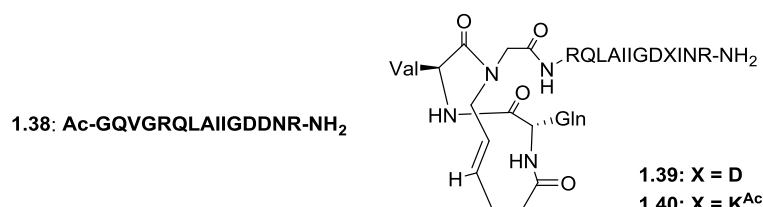


Figura 20. Secuencia patrón y análogos HBS del dominio BH3 de Bak.

1.1.2.3. Miméticos de hélices α

Una alternativa a los métodos de estabilización de hélices α es el uso de esqueletos no peptídicos capaces de imitar la disposición tridimensional de las cadenas laterales de una cara de la hélice¹¹¹. Es el caso de los compuestos diseñados por el grupo de Hamilton, basados en esqueletos de bi- o tri-fenilos¹¹² (Figura 21: **1.41-1.43**), y los diseñados por Rebek y colaboradores, que utilizan esqueletos de piperazina o piridazina como armazón para disponer adecuadamente los residuos i , $i+3$ o $i+4$, e $i+7$ de las hélices α ^{113,114} (Figura 21: **1.44-1.45**).

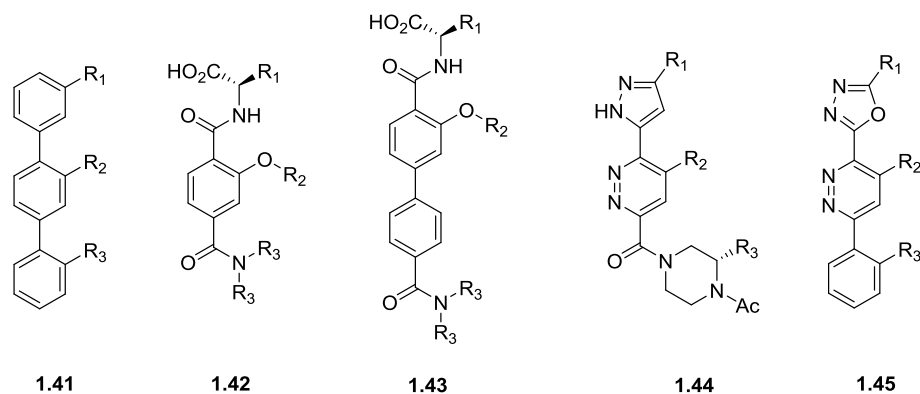


Figura 21. Esqueletos no peptídicos utilizados por Hamilton (**1.41-1.43**) y Rebek (**1.44-1.45**) para mimetizar hélices α .

1.1.3 ANTECEDENTES

Durante los últimos años, nuestro grupo viene trabajando en la búsqueda de nuevos moduladores de canales TRP, principalmente TRPV1¹¹⁵. Teniendo en cuenta que los ensayos clínicos con antagonistas de canales TRPV1 han sido poco fructíferos hasta el momento, debido a efectos adversos imprevistos, surge la necesidad de buscar nuevos enfoques para modular estos canales, a través de mecanismos de acción alternativos.

El análisis de la estructura y función del receptor TRPV1 permitió demostrar que el dominio C-terminal intracelular se encuentra altamente conservado en muchos canales TRP y que es esencial para la tetramerización de las subunidades. Estos estudios sugirieron además que hay diferentes IPPs involucradas en la detección del estímulo y en la apertura de estos canales.

Una estrategia novedosa para interferir en IPPs de receptores acoplados a proteínas G es el uso de péptidos que imitan la secuencia de los fragmentos del propio receptor identificados como *hot spot*. En este sentido, Covic y col. han descrito una serie de péptidos potentes y selectivos, denominados “pepducins”, que se anclan en la membrana celular y modulan la actividad de estos receptores¹¹⁶.

Inspirados en este trabajo, Ferrer-Montiel y col. diseñaron una serie de péptidos cortos denominados “TRPducins” que imitan la secuencia de la región TRP del extremo N-terminal del receptor TRPV1 y poseen un resto de palmitoilo que facilita el anclaje en la membrana. Estos péptidos bloquean selectivamente el canal, probablemente interrumpiendo o interfiriendo en las interacciones proteína-proteína que tienen lugar en el citosol. El péptido palmitoilado **1.46** presentó actividad como antagonista no competitivo de TRPV1 y mostró actividad *in vivo* como antinociceptivo y antiprurito en un modelo de insuficiencia hepática crónica (Figura 20)¹¹⁷. Recientemente hemos

demostrado que este péptido posee estructura helicoidal en disolución acuosa (resultados no publicados).

Por otra parte, existe también la posibilidad de modular proteínas relacionadas con el canal iónico TRPV1, como por ejemplo la modulación del complejo SNARE. En este contexto, Ferrer-Montiel *y col.* han descrito una serie de péptidos palmitoilados, entre los que destaca el compuesto **1.47**¹¹⁸, diseñado a partir del extremo N-terminal de la proteína sinaptosomal de 25 KDa (SNAP-25). Esta proteína del complejo SNARE actúa como inhibidor de la exocitosis neuronal, bloqueando de este modo la sensibilización inflamatoria de TRPV1 por agentes proinflamatorios liberados a través de la exocitosis neuronal¹¹⁹. Este compuesto presentó actividad como antiinflamatorio y antinociceptivo *in vivo* en modelos de dolor neuropático e inflamatorio crónico³⁰ (Figura 22). Por otra parte, el compuesto **1.47**, administrado por vía subcutánea o intramuscular, redujo la hiperalgesia térmica y mecánica, así como la alodinia mecánica en estos modelos de dolor. Por lo tanto, este péptido palmitoilado representa una nueva clase de compuestos que pueden ser terapéuticamente relevantes para el tratamiento del dolor crónico. Además, estos resultados corroboran también el papel fundamental de la exocitosis neuronal en la patogénesis del dolor.



1.46



1.47

Figura 22. Ejemplos representativos de antagonistas no competitivos de TRPV1.

Los compuestos **1.46** y **1.47** constituyen los primeros ejemplos de moduladores directos e indirectos de canales TRP que actúan interfiriendo en interacciones proteína-proteína. Estos antecedentes abren el camino a la utilización de péptidos lineales para la búsqueda de prototipos iniciales para estos receptores ionotrópicos.

El uso de colecciones de péptidos lineales, fácilmente asequibles, ha sido menos explorado en la búsqueda de moduladores de IPP, ya que normalmente estos péptidos adoptan conformaciones al azar, lo que podría limitar su unión a la proteína deseada¹²⁰⁻¹²². Sin embargo, la interacción con la proteína diana podría verse potenciada si los péptidos lineales poseyeran cierto carácter intrínseco para adoptar estructuras secundarias como las hélices α . Péptidos lineales con un cierto carácter helicoidal, combinado con un grado inherente de flexibilidad, serían muy apropiados para el descubrimiento de moduladores de IPPs no conocidas, como punto de partida para luego ser transformados en moléculas no peptídicas.

1.2 OBJETIVOS

Como objetivo general de este capítulo se planteó intentar modular interacciones proteína-proteína relacionadas con canales iónicos TRP, utilizando péptidos lineales helicoidales.

Los objetivos concretos del presente trabajo son:

1. Diseñar una quimioteca de péptidos lineales con capacidad para adoptar conformaciones de hélice α .
2. Sintetizar en fase sólida los péptidos diseñados.
3. Realizar análisis conformacionales de los péptidos preparados para determinar su estructura tridimensional en disolución.
4. Validar la quimioteca en IPP conocidas, como p53-MDM2 y VEGF-FIt1.
5. Evaluar biológicamente la quimioteca como posibles moduladores de canales iónicos TRP.

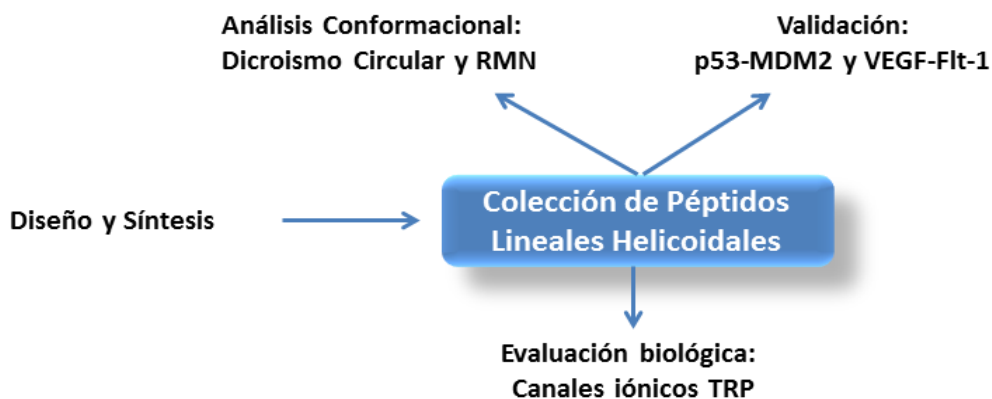


Figura 23. Representación gráfica de los objetivos

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Diseño

Aunque el conocimiento estructural sobre interacciones proteína-proteína (IPP) relacionadas con canales iónicos es escaso, se sabe que en la estabilización de las subunidades que forman el poro está implicado el reconocimiento entre hélices α , que también son importantes en la comunicación de los complejos proteicos del canal con otras proteínas reguladoras^{123,124}. La alta presencia de residuos hidrofóbicos en las superficies de interacción de las hélices sugiere el uso de péptidos helicoidales con residuos aromáticos y alifáticos, situados en las posiciones apropiadas como fuente para el descubrimiento de nuevos moduladores de interacciones proteína-proteína¹²⁵. Para garantizar al menos tres puntos de interacción se han diseñado péptidos con tres aminoácidos aromáticos y con dos residuos aromáticos y un residuo alifático situados convenientemente en la misma cara de la hélice regular (disposición relativa, i , $i+4$, $i+7$). Usando el algoritmo AGADIR^{92,126} se predijo la helicidad del péptido Ac-AAAF⁴AAAF⁸AAF¹¹-NH₂, y de cuatro análogos que contienen glutámico (E) y arginina (R) situados convenientemente en posiciones opuestas a la cara de interacción, que permiten estabilizar la hélice a través de puentes salinos (posiciones 2 y 6). Utilizando el péptido Ac-AEAF⁴ARAF⁸AAF¹¹-NH₂, el de más alta helicidad (25%), como punto de partida para seleccionar los residuos más adecuados para las posiciones ocupadas por Ala se consideraron los 20 aminoácidos proteinogénicos en cada posición. Se generaron colecciones de péptidos virtuales y posteriormente se seleccionaron aquellos con estructura helicoidal. La helicidad de cada péptido virtual se predijo con el programa AGADIR, seleccionando péptidos con helicidad en un rango de 30-65%. Uno de los aspectos que no contemplan los algoritmos matemáticos como AGADIR es la solubilidad acuosa, que resulta un factor determinante a la hora de estudiar los péptidos diseñados. De forma general, el contenido elevado de aminoácidos alifáticos y aromáticos aumenta la helicidad de los péptidos,

pero el carácter hidrófobo de estos residuos provoca que los péptidos resultantes sean poco solubles en agua. Para mejorarla es necesaria la introducción de residuos polares o cargados en las posiciones (i , $i+5$) para evitar la interacción entre ellos¹²⁷. Para tener en cuenta la solubilidad en agua se calcularon también los valores del logS (Tabla 1) mediante el programa ALOGPS¹²⁸, de libre acceso en la web. Esto nos permitió discriminar entre aminoácidos que proporcionando similar carácter helicoidal podrían ayudar en la solubilidad de los péptidos diseñados.

Tabla 1. Equivalencia aproximada entre datos teóricos de logS y solubilidad en agua¹²⁹

Solubilidad	logS
Óptima	$-2 < \log S < 0$
Buena	$-4 < \log S < -2$
Aceptable	$-6 < \log S < -4$
Baja	$-8 < \log S < -6$
Nula	$\log S < -8$

Finalmente, para equilibrar el balance helicidad-solubilidad se consideró la adición de un residuo más a la secuencia, ya sea en el extremo N o C terminal. La combinación de los residuos que proporcionaban las mejores helicidad en cada posición y que mostraban solubilidades teóricas más adecuadas permitió el diseño de las cuatro series de péptidos lineales de 13 aminoácidos indicadas seguidamente (81 péptidos en total).

Tabla 2. Quimioteca constituida por 81 péptidos. Datos teóricos de helicidad y logS

Serie	Secuencia	Helicidad (%)	log S
L1 (27 Compuestos)	Ac-SSEE ^{Ar} ⁵ ARN ^{Ar} ⁹ AA ^{Ar} ¹² N-NH ₂	35-65	-4.6 a -5.0
L2 (18 Compuestos)	Ac-SSEE ^{AI} ⁵ ARN ^{Ar} ⁹ AA ^{Ar} ¹² N-NH ₂	27-55	-4.5 a -4.9
L3 (18 Compuestos)	Ac-SSEE ^{Ar} ⁵ ARN ^{AI} ⁹ AA ^{Ar} ¹² N-NH ₂	32-46	-4.5 a -4.9
L4 (18 Compuestos)	Ac-SSEE ^{Ar} ⁵ ARN ^{Ar} ⁹ AA ^{AI} ¹² N-NH ₂	33-58	-4.5 a -4.9

Ar = Phe, Trp, Tyr. **AI** = Leu, Ile

En esta memoria se recogen los datos referentes al estudio conformacional, validación y evaluación biológica de las cuatro series que componen la quimioteca. En cuanto a la síntesis, en esta memoria se describe la preparación de los péptidos de la serie L1 (27 péptidos), que he realizado íntegramente.

1.3.2 Síntesis

La síntesis de los péptidos se realizó en fase sólida siguiendo la estrategia Fmoc/t-Bu¹³⁰. Los Fmoc-AA-OH utilizados se eligieron convenientemente protegidos en la cadena lateral: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH y Fmoc-Asn(Trt)-OH.

La resina seleccionada para la síntesis fue una matriz de poliestireno-1% DVB (MBHA), funcionalizada como Rink amida, y de baja carga (0.34 mmol/g), para minimizar posibles problemas derivados de la agregación de los péptidos. La utilización de esta resina permite la obtención directa de los productos deseados con el extremo C-terminal en forma de amida durante el proceso de separación del péptido de la resina.

Como agente de acoplamiento se empleó el hexafluorofosfato de (2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio (HCTU) con diisopropiletilendiamina (DIEA) como base. El uso de HCTU reduce los

tiempos de acoplamiento en fase sólida en comparación con otros agentes de acoplamiento más clásicos, como DIC/HOBt.

La síntesis manual de los péptidos **1.48-1.56** y **1.62** comenzó con el hinchado de la resina y la posterior eliminación del grupo Fmoc en medio básico, usando una disolución al 20% (v/v) de piperidina en DMF (Ver un ejemplo representativo en el Esquema 1). Tras lavados posteriores para eliminar los restos de piperidina, se llevó a cabo el acoplamiento del primer aminoácido, Fmoc-Asn(Trt)-OH, utilizando como agente acoplante HCTU en DMF anhidra. Los acoplamientos de los restantes aminoácidos se realizaron del mismo modo, siguiendo la secuencia apropiada en cada caso (Esquema 1). Para comprobar que los acoplamientos se habían completado, una alícuota de resina se monitorizó en un ensayo colorimétrico cualitativo de ninhidrina (Test de Kaiser, detección de aminas primarias)¹³¹.

Una vez completada la elongación de los péptidos y tras la eliminación del grupo Fmoc en condiciones estándar, se procedió a la protección del extremo N-terminal en forma de N-acetilo por tratamiento con Ac₂O y DIEA en DMF a temperatura ambiente.

El siguiente paso fue la escisión de los productos finales de la resina. Para ello se utilizó un cóctel de escisión compuesto por TFA:H₂O:TIPS¹³⁰ en proporciones volumétricas 95:2.5:2.5. El H₂O y el TIPS se utilizaron para atrapar los cationes que se forman en la desprotección de los grupos protectores Trt y ^tBu, que si no se desactivan pueden dar lugar a productos secundarios de alquilación de grupos aromáticos (especialmente Trp y Tyr).

Tras precipitación y liofilización de los crudos de reacción, éstos se purificaron por cromatografía flash en cartuchos de fase reversa, utilizando un equipo BIOTAGE, lo que permitió aislar los péptidos **1.48-1.56** y **1.62** con buenos rendimientos y con purezas superiores al 85% (Tabla 3 y ejemplo representativo en la Figura 23). Alternativamente, la purificación del péptido

1.52 se realizó mediante HPLC semipreparativo, permitiendo la obtención del producto deseado en un grado de pureza del 88%.

Un segundo grupo de péptidos **1.57-1.61** y **1.63-1.74** se preparó también en fase sólida, pero de forma automatizada, en un sintetizador automático de péptidos acoplado a microondas, lo que permitió acortar considerablemente los tiempos de reacción. En este caso los acoplamientos se realizaron con HCTU y HOBt y la purificación, al igual que en los compuestos sintetizados manualmente, se llevó a cabo por cromatografía flash en fase reversa (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento y pureza de los péptidos 1.48-1.74

Compuesto	Secuencia	Método de Síntesis	Pureza (%)	Rendimiento (%)
1.48 (FFF)	SSEEFARNFAAFN	Manual	99	16
1.49 (WFF)	SSEEWARNFAAFN	Manual	89	7
1.50 (YFF)	SSEFYARNFAAFN	Manual	86	74
1.51 (FWF)	SSEEFARNWAAFN	Manual	98	18
1.52 (WWF)	SSEEWARNWAAFN	Manual	88	9
1.53 (YWF)	SSEFYARNWAAFN	Manual	91	21
1.54 (FYF)	SSEEFARNYAAFN	Manual	85	74
1.55 (WYF)	SSEEWARNYAAFN	Manual	96	20
1.56 (YYF)	SSEFYARNYAAFN	Manual	86	65
1.57 (FFW)	SSEEFARNFAAWN	Automatizada	88	11
1.58 (WFW)	SSEEWARNFAAWN	Automatizada	92	27
1.59 (YFW)	SSEFYARNFAAWN	Automatizada	88	16
1.60 (FWW)	SSEEFARNWAAWN	Automatizada	85	11
1.61 (WWW)	SSEEWARNWAAWN	Automatizada	85	11
1.62 (YWW)	SSEFYARNWAAWN	Manual	95	14
1.63 (FYW)	SSEEFARNYAAWN	Automatizada	98	26
1.64 (WYW)	SSEEWARNYAAWN	Automatizada	88	19
1.65 (YYW)	SSEFYARNYAAWN	Automatizada	88	16
1.66 (FFY)	SSEEFARNFAAYN	Automatizada	97	29
1.67 (WFY)	SSEEWARNFAAYN	Automatizada	92	21
1.68 (YFY)	SSEFYARNFAAYN	Automatizada	94	38
1.69 (FWY)	SSEEFARNWAAYN	Automatizada	90	15
1.70 (WWY)	SSEEWARNWAAYN	Automatizada	86	64
1.71 (YWY)	SSEFYARNWAAYN	Automatizada	93	15
1.72 (FYY)	SSEEFARNYAAYN	Automatizada	96	31
1.73 (WYY)	SSEEWARNYAAYN	Automatizada	98	30
1.74 (YYY)	SSEFYARNYAAYN	Automatizada	90	22

En la Figura 24 se muestran a modo de ejemplo, los cromatogramas correspondientes al péptido FWF (1.51) antes y después de la purificación.

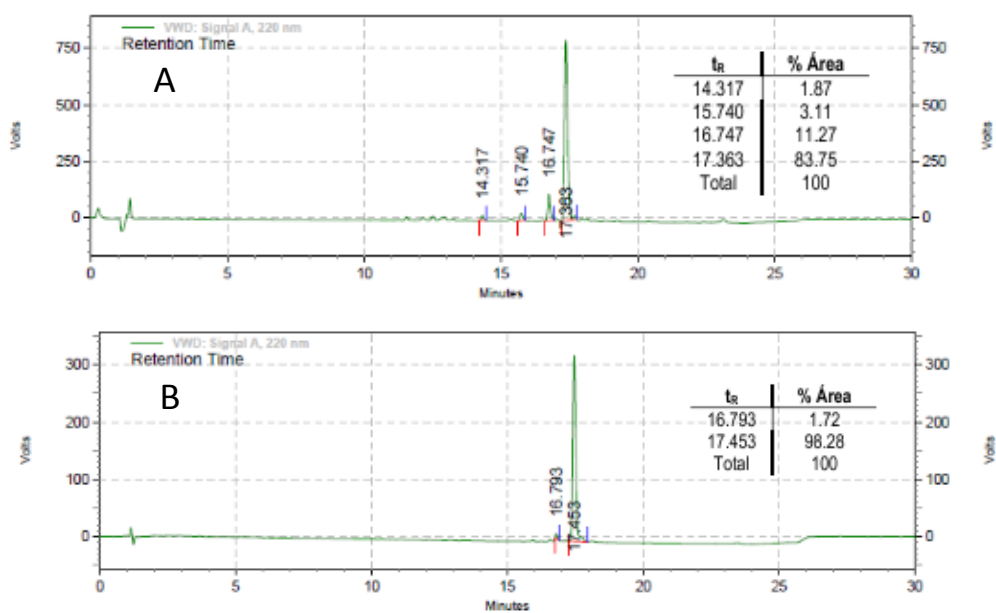
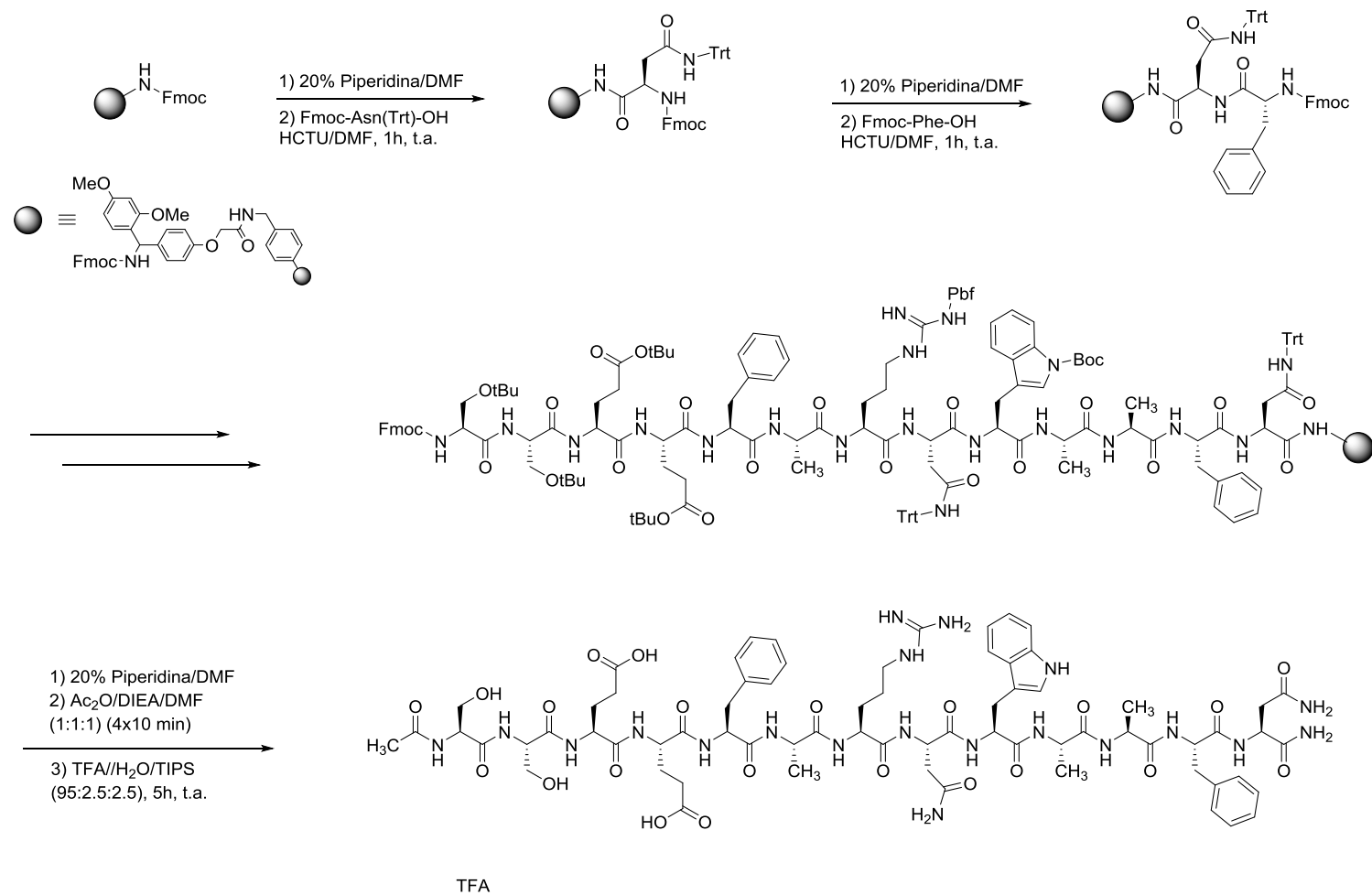


Figura 24. Cromatogramas de HPLC del péptido FWF (1.51). A. Crudo. B. Péptido purificado.



Esquema 1. Síntesis del péptido FWF

1.3.3 Estudios Conformacionales

Con objeto de determinar si los péptidos sintetizados se estructuran en disolución adoptando una conformación de hélice α , como era de esperar en base al diseño, se llevó a cabo el análisis conformacional de algunos péptidos de la quimioteca seleccionados al azar. Primeramente, se realizaron experimentos de dicroísmo circular (DC) a 5°C en H₂O y en mezclas de TFE/H₂O al 30%. Por otra parte se realizaron también experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) y se analizaron las desviaciones de desplazamiento químico y los NOEs. Adicionalmente, mediante dinámica molecular restringida se determinó la estructura tridimensional de aquellos péptidos que presentaron numerosas señales de NOE no secuenciales utilizando el programa CYANA.

1.3.3.1 Estudios de Dicroísmo Circular

La actividad óptica de las proteínas es un parámetro de gran utilidad a la hora de determinar su estructura espacial. Así, aunque el enlace peptídico “*per se*” no es una estructura quiral, la interacción entre grupos amida adyacentes dispuestos en determinadas orientaciones lleva a que las proteínas presenten actividad óptica en la región del ultravioleta lejano donde absorbe el enlace peptídico (180-240 nm). Así, cada elemento de estructura secundaria de las proteínas presenta un perfil de dicroísmo circular característico (Figura 25)¹³².

Los datos de dicroísmo circular se representan en términos de elipticidad en grados (θ) o en diferencia de absorbancia (ΔA), pero este dato debe normalizarse teniendo en cuenta la concentración de la proteína o el péptido que se está estudiando y el número de unidades repetidas que generan dicha señal, que en el caso de las proteínas es el enlace peptídico y

por extensión el número de residuos que lo conforman. Así se define la elipticidad molar por residuo que se calcula con la siguiente fórmula:

$$[\theta] = \theta / (10 \cdot l \cdot c \cdot N),$$

donde $[\theta]$ ($\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}$), θ (mdeg), $l = 0.1$ cm, c (M) y N es el número de residuos.

Por tanto, para poder determinar la elipticidad molar por residuo es necesario conocer la concentración exacta del péptido en estudio. Para ello, existen varios métodos, siendo el más común la medida de absorbancia a 280 nm, siempre y cuando el péptido contenga residuos de Tyr o Trp. Con el valor obtenido se aplica la ley de Lambert-Beer en función del número de cromóforos presentes y se determina la concentración exacta¹³³.

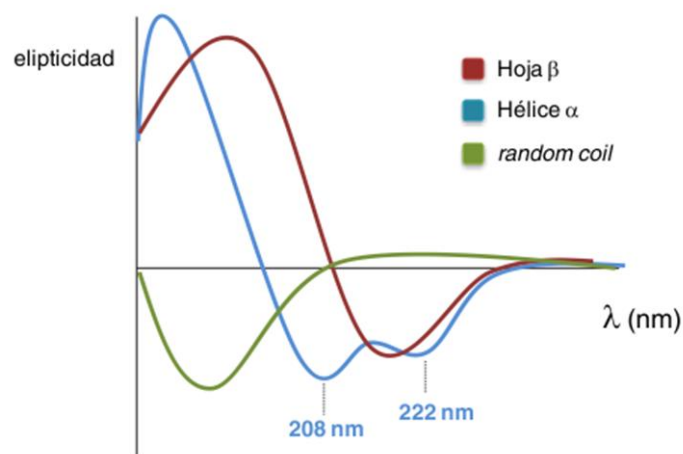
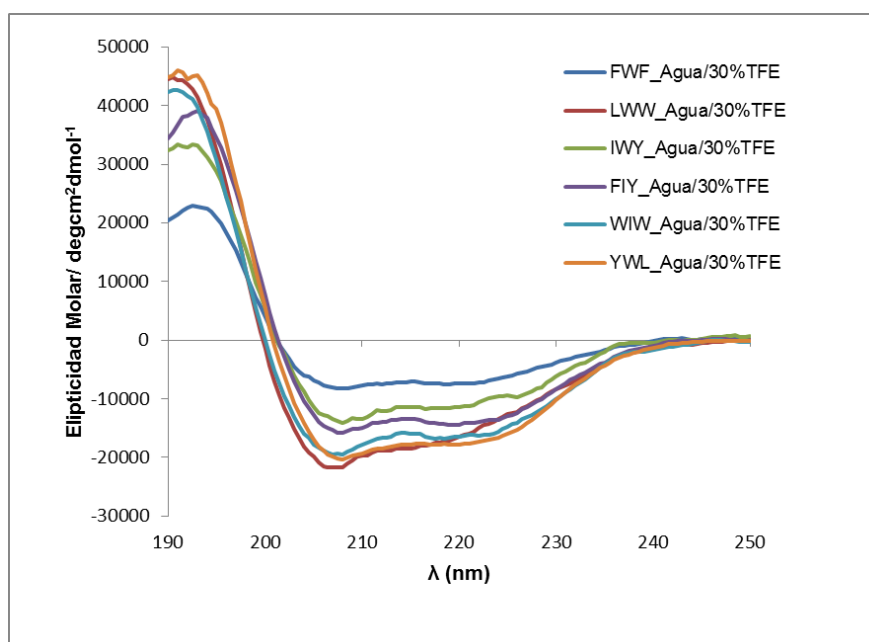


Figura 25. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano para tres estructuras ideales de una proteína: hoja β , hélice α , y *random coil*.

El perfil de dicroísmo circular de una hélice α viene caracterizado por la presencia de un doble mínimo a 208 y 222 nm y un máximo a 190 nm. El porcentaje relativo de helicidad de un péptido puede ser estimado a través del valor de la elipticidad molar por residuo a 222 nm, aunque este valor es orientativo en el caso de péptidos pequeños¹³⁴. Para hacer estos cálculos se

ha utilizado la ecuación descrita por Baldwin¹³⁵ y modificada por Fairlie¹³⁴ para calcular el porcentaje de helicidad en péptidos pequeños a partir de la relación $[\theta]_{222}/[\theta]_{\max}$, donde $[\theta]_{\max} = (-44000 + 250T)(1 - k/n)$, T es la temperatura en grados Celsius y $k = 4$ (factor de corrección lineal finita) que es una constante que adopta un valor de 4 y en nuestro caso ha sido tomado de los estudios de Arora y colaboradores¹⁰⁷, ya que este valor es difícil de definir cuando se trata de péptidos pequeños. El valor calculado de $[\theta]_{\max} = -29595$ grado-dmol⁻¹·cm²·residuo⁻¹.

Como ejemplo, en la Figura 26 se recogen los experimentos de dicroísmo circular para varios péptidos de la colección, tanto en disolución acuosa como utilizando una mezcla al 30% de TFE en agua. Los péptidos estudiados, que se eligieron al azar, presentaron una ligera estructura de hélice α en H₂O, que aumentó de forma considerable cuando los experimentos se realizaron utilizando un 30% de TFE.



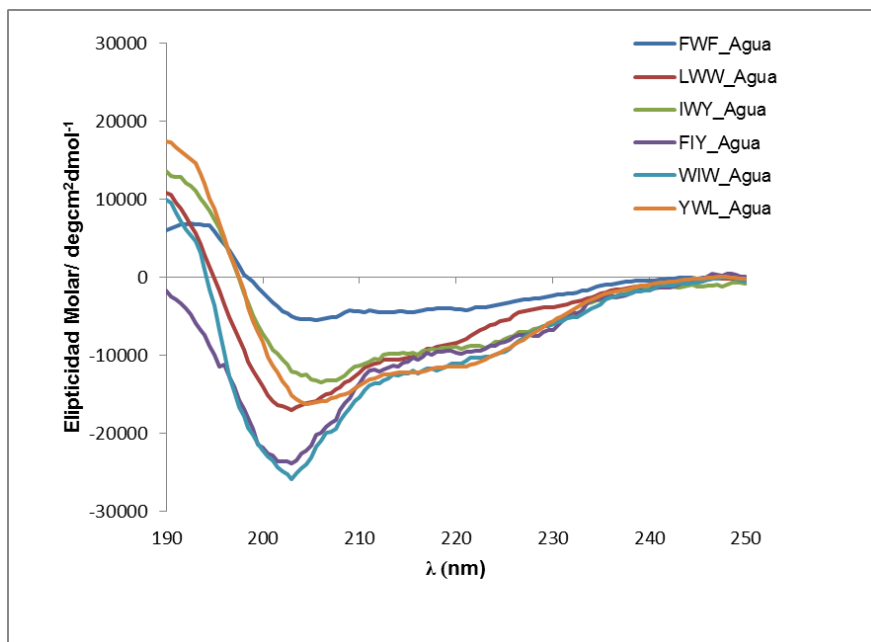


Figura 26. Espectros de Dicroísmo Circular para los péptidos FWF (1.51), LWW, IWY, FIY, WIW y YWL en 30% TFE/H₂O y en H₂O a pH 5.5 y 5° C.

Con los datos de elipticidad molar obtenidos a 222 nm, aplicando la ecuación correspondiente, se estimaron los porcentajes de helicidad para cada uno de los péptidos (Tabla 4). Los perfiles observados apuntan a que los productos presentan un grado aceptable de estructura espacial de hélice α en disolución acuosa ($\geq 20\%$), que mejora considerablemente cuando los experimentos se realizan en presencia de TFE (hasta un 47%), observándose porcentajes de helicidad mas altos gracias a la capacidad de este disolvente para favorecer estructuras de este tipo. Sin embargo, no se observa una total correlación entre los valores predichos y los calculados experimentalmente, siendo éstos últimos un poco más bajos que los que previamente se había estimado.

Tabla 4. Datos de helicidad teóricos calculados con AGADIR y experimentales calculados a partir de elipticidad molar por residuo $[\theta]_{222}$ (deg cm dmol⁻¹residuo) obtenida de los espectros de DC.

Comp. ^a	Secuencia	% Helicidad		
		H ₂ O	30% TFE	Teórica ^b
FWF (1.51)	Ac-SSEEFARNWAAFN-NH₂	22	40	57
LWW	Ac-SSEELARNWAAWN-NH₂	19	41	56
IWY	Ac-SSEEIARNWAAYN-NH₂	23	28	31
FIY	Ac-SSEEFARNIAAYN-NH₂	26	38	38
YWL	Ac-SSEELYARNWAAIN-NH₂	30	47	56

^aLa notación indica los residuos en posiciones 5, 9 y 12 de la secuencia peptídica.

^bCalculado con Agadir.

De forma complementaria, y como un segundo criterio de helicidad se señala también la relación entre los valores de elipticidad molar a 208 y a 222 nm¹⁰⁷. Valores inferiores a 0.65, indicarían que el péptido no se encuentra estructurado como hélice α , mientras que valores comprendidos entre 1.25-1.75 son los esperables para hélices α ideales. En nuestro caso los péptidos estudiados presentan valores cercanos a 1.0, lo que indica que estarían en cierta medida estructurados como hélices α (Tabla 5).

Tabla 5. Elipticidad molar por residuo $[\theta]$ (deg cm dmol⁻¹residuo) a 222 y 208 nm, relación de helicidad a 222 y 208 nm en H₂O/TFE

Péptidos	$[\theta]_{222}$	$[\theta]_{208}$	$[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$
FWF (1.51)	-7190	-8265	0.87
LWW	-15038	-21618	0.70
IWY	-10580	-14188	0.75
FIY	-14023	-15875	0.88
YWL	-17331	-20308	0.85

En conclusión, los estudios de dicroísmo circular confirman que los péptidos estudiados tienden a estructurarse como hélices α .

1.3.3.2 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La actividad biológica de las distintas macromoléculas, los ácidos nucleicos o las proteínas, en medios biológicos está estrechamente ligada a su estructura tridimensional. Con objeto de ratificar la estructura helicoidal de los péptidos preparados, algunos se estudiaron también mediante RMN.

Estos estudios se realizan en disolución acuosa, tanto en H₂O/D₂O (proporciones volumétricas 9:1) como en una mezcla de H₂O/D₂O/TFE. Los parámetros utilizados para la elucidación de la estructura fueron la desviación del desplazamiento químico ($\Delta\delta$) y los NOEs no secuenciales.

1.3.3.2.1 Desviación de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$)

La desviación del desplazamiento químico, $\Delta\delta$, de un determinado núcleo con respecto a los mismos valores en péptidos desestructurados es un parámetro que da idea de la estructura secundaria de un fragmento peptídico. En los últimos años, a partir del análisis estadístico de los valores de δ del gran número de proteínas cuya estructura se ha descrito por RMN, se ha encontrado que existe una correlación entre los ángulos ϕ y ψ del esqueleto de la proteína y las desviaciones de los δ observados para H α , C α o C β . Puesto que los elementos de estructura secundaria vienen definidos por unos ángulos ϕ y ψ característicos, dependiendo del valor de $\Delta\delta$ obtenido se puede determinar si un residuo se encuentra en una lámina β , en una hélice α o en estructura desordenada. El valor se calcula con las siguientes fórmulas, dependiendo de si nos fijamos en los $\Delta\delta$ de H α , C α o C β .

$$- \Delta\delta_{H\alpha} = \delta_{H\alpha}^{\text{observado}} - \delta_{H\alpha}^{\text{random coil}}, \text{ ppm}$$

$$- \Delta\delta_{C\alpha} = \delta_{C\alpha}^{\text{observado}} - \delta_{C\alpha}^{\text{random coil}}, \text{ ppm}$$

$$- \Delta\delta_{C\beta} = \delta_{C\beta}^{\text{observado}} - \delta_{C\beta}^{\text{random coil}}, \text{ ppm}$$

random coil = estructuras al azar

Los valores de $\delta^{random\ coil}$ para 1H y ^{13}C han sido tomados de Wishart et al.¹³⁶.

Para considerar que un péptido presenta estructura de hélice α , los valores de desviación de desplazamiento químico de los protones $H\alpha$ deben ser < -0.1 ppm y los de $C\alpha > 0.5$ ppm¹³². De acuerdo con esto, todos los péptidos seleccionados mostraron el perfil esperado para los protones $H\alpha$, con valores negativos para casi todos los residuos de la secuencia a excepción del primer residuo de Ser (Figura 27).

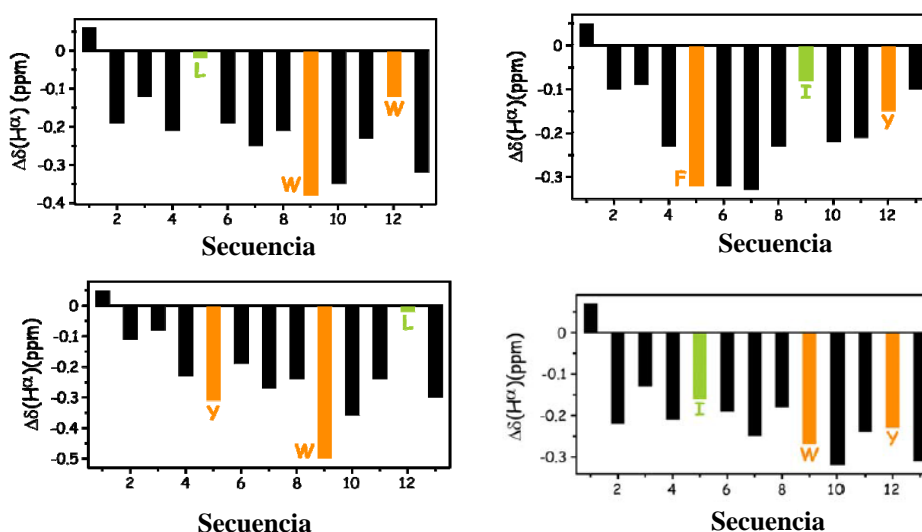


Figura 27. Histogramas que muestran los valores de $\Delta\delta_{H\alpha} = (\delta_{H\alpha}^{observado} - \delta_{H\alpha}^{random\ coil})$ ppm para los péptidos LWL, FIY, YWL, IWY. Los extremos N- y C- terminales se encuentran en forma de acetilo y amida respectivamente.

Frecuentemente, en péptidos helicoidales lineales, los valores absolutos de los residuos centrales son mayores que los que están en posiciones N- y C- terminales, lo que indica que la hélice está menos enroscada en los extremos.

El estudio de la variación de los $C\alpha$ en el espectro de ^{13}C -RMN del péptido IWY también corroboró la conformación de hélice α , obteniéndose valores positivos para los desplazamientos químicos de todos los $C\alpha$ (Figura 28).

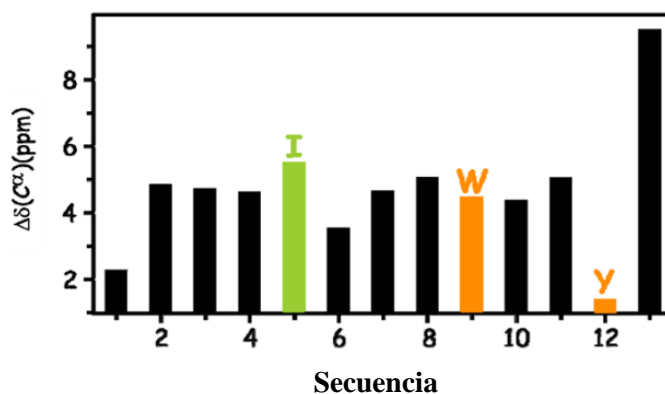


Figura 28. Histograma que muestra los valores de $\Delta\delta_{C\alpha} = \delta_{C\alpha}^{\text{observado}} - \delta_{C\alpha}^{\text{random coil}}$, ppm para el péptido IWY.

1.3.3.2.2 Efecto Nuclear Overhauser (NOE)

Cuando dos núcleos se encuentran próximos en el espacio (a una distancia inferior a 4.5-5.0 Å) en RMN se puede dar un proceso de transferencia de magnetización de uno a otro. Este fenómeno se conoce como efecto nuclear Overhauser (NOE). Entre otros factores, el efecto NOE depende de la distancia a la que se encuentren los núcleos, siendo más intenso cuanto más próximos estén espacialmente. En este sentido, las señales de NOE son una herramienta básica para el análisis estructural mediante RMN ya que permiten cuantificar cómo de próximos o alejados se encuentran dispuestos los átomos espacialmente¹³². En un péptido las señales NOE observadas se pueden dividir en dos grupos, atendiendo a la distancia que separa a los dos núcleos entre los cuales ocurre la transferencia de magnetización: (i) señales de corto alcance y (ii) de medio-largo alcance. Al primer grupo pertenecen las señales de NOE intraresiduales, entre núcleos

presentes en el mismo aminoácido. En el segundo grupo, estarían incluidos los NOEs secuenciales y los NOEs no secuenciales, que se diferencian según se da la transferencia con un núcleo presente en un aminoácido inmediatamente adyacente en la secuencia peptídica (secuenciales), o con un núcleo presente en un aminoácido más alejado (no secuenciales). Estos últimos son clave, desde el punto de vista de cálculo de estructura, ya que restringen el espacio conformacional del péptido.

Las señales de NOEs secuenciales permiten asignar los aminoácidos consecutivos en la secuencia, siendo característico de las hélices α una mayor intensidad en las señales de tipo $d_{NN(i,i+1)}$ que en las de tipo $d_{\alpha N(i,i+1)}$ donde $d_{NN(i,i+1)}$ es la distancia que separa los protones NH de residuos situados en posiciones i e $i+1$. Por otra parte, los NOEs no secuenciales dan una idea de la disposición de los residuos en el espacio. En el caso de hélices α los NOEs más comunes son $d_{\alpha N(i,i+3)}$, $d_{\alpha N(i,i+4)}$, $d_{\alpha\beta(i,i+3)}$.

En la Figura 29 se muestra el resumen de NOEs para el péptido IWY. Se observan los NOEs no secuenciales característicos de hélices α ($d_{\alpha N(i,i+3)}$, $d_{\alpha N(i,i+4)}$, $d_{\alpha\beta(i,i+3)}$), por lo que se puede extraer la conclusión de que el péptido IWY presenta estructura de hélice α a lo largo de toda la secuencia tal y como indicaban los datos de desviación de desplazamiento químico.



Figura 29. Resúmenes de NOE para el péptido IWY (30% HFA, 25°C). El grosor de las líneas indica la intensidad de los NOEs secuenciales, fuerte, medio y débil.

1.3.3.2.3 Cálculo de la estructura

Los cálculos de la estructura del péptido IWY se llevaron a cabo usando el programa CYANA¹³⁷, que utiliza datos experimentales derivados de los espectros de RMN, introducidos en forma de restricciones geométricas (distancias, ángulos y enlaces) para obtener un conjunto de estructuras que satisfagan estas restricciones. En la práctica, los parámetros de restricción utilizados son generalmente las cotas superiores de las distancias interatómicas, derivadas de la intensidad de los NOEs observados. Así, los cálculos realizados con este programa para el péptido IWY sugieren que éste adopta una conformación 3D bien definida de hélice α , con los residuos 5, 9 y 12 alineados a lo largo de una sola cara de la hélice (Figura 30).

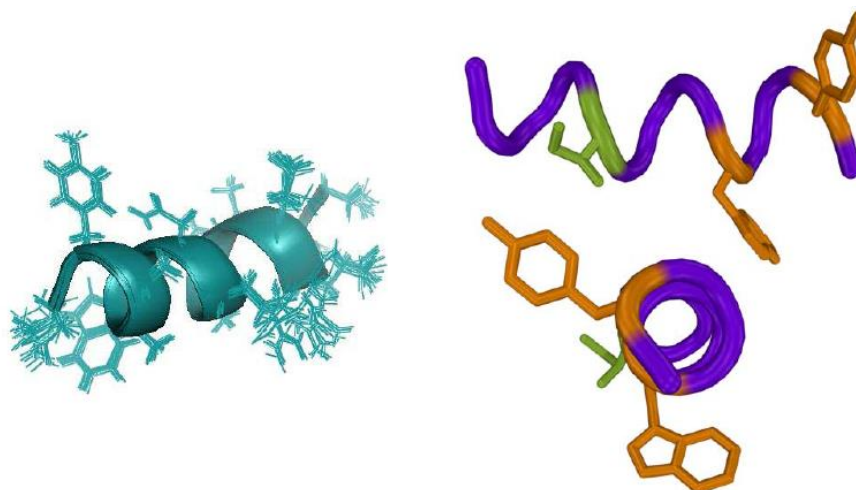


Figura 30. Estructura de RMN en solución para el péptido IWY. Izquierda: superposición de los 20 conformeros de menor energía. Derecha: mínimo absoluto en vista lateral (arriba) y visto desde arriba (abajo). Los residuos de las posiciones 5, 9 y 12 están representados de color naranja. No se muestran los átomos de hidrogeno, ni las otras cadenas laterales.

1.3.4 Validación de la colección de péptidos como moduladores de IPPs.

Una vez preparada y caracterizada la colección de péptidos, y confirmada su estructura helicoidal, se llevó a cabo la validación de la quimioteca en dos IPP conocidas, en las que los *hot-spots* implicados en la interacción poseen estructura helicoidal y presentan bien 3 residuos aromáticos o bien 2 aromáticos y uno alifático que son clave para la interacción. Un resultado positivo en estos sistemas modelo, nos permitiría corroborar que nuestra colección de péptidos helicoidales puede resultar útil en la búsqueda de moduladores de otras IPP en las que estén implicados fragmentos helicoidales con una cara hidrófoba. Las dos dianas seleccionadas para la validación son la interacción de la proteína p53 con la proteína MDM2 y la interacción del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) con su receptor 1 (Flt-1).

1.3.4.1 Modulación de la interacción de la proteína p53 con la proteína MDM2

P53 es una proteína proapoptótica que desempeña un papel central en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, mientras que MDM2 es una proteína adaptadora con actividad ubiquitinasa que inhibe p53 mediante el reconocimiento y la ubiquitinación del dominio N-terminal de trans-activación de p53. En los últimos años, la interfaz p53-MDM2 ha sido estudiada con detalle, identificándose el fragmento helicoidal 17-29 de p53 (ET_{F19}SDL_{W23}KLL_{L26}PEN), y en concreto las cadenas laterales de los residuos, F₁₉, W₂₃ y L₂₆, como *hot-spot* para la interacción con el bolsillo de unión de MDM2¹³⁸.

Así, durante los últimos años se han descrito varias moléculas capaces de inhibir la interacción p53-MDM2, provocando la interrupción del ciclo celular o apoptosis en modelos de cáncer. Debido al carácter hidrófobo de la interacción entre p53-MDM2, se ha seleccionado este sistema para validar nuestra quimioteca.

Con este fin, algunos de los péptidos sintetizados fueron sometidos a experimentos de RMN usando la técnica de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD)¹³⁹, para evaluar su capacidad de interacción con MDM2, y por tanto para interferir en la formación del complejo con p53. Estos experimentos fueron realizados por el grupo del Dr. Carotenuto de la Universidad de Nápoles (Italia).

Los experimentos de STD consisten en aplicar a algunos protones de la proteína una radiofrecuencia selectiva de baja potencia, en una región en la que no haya señales de los protones del ligando. Los efectos de la radiofrecuencia aplicada se expanden a lo largo de la proteína, alcanzando también el sitio de reconocimiento de los ligandos. En estas condiciones, cualquier ligando que interaccione con la proteína se verá afectado por los

efectos de la radiofrecuencia, con la consiguiente perturbación de las intensidades de sus señales de RMN. Así, en una mezcla de ligandos, solamente verán afectada la intensidad de sus señales aquellos que interaccionen con el receptor.

Para nuestros estudios, en primer lugar se seleccionó el péptido FWL que contiene alineados los residuos clave para la interacción de p53 con MDM2 en una misma cara de la estructura helicoidal. También se estudiaron otros péptidos hidrófobos, en concreto FLW, WLF y WFL, que presentan los residuos clave para la interacción con MDM2 pero en posiciones relativas diferentes.

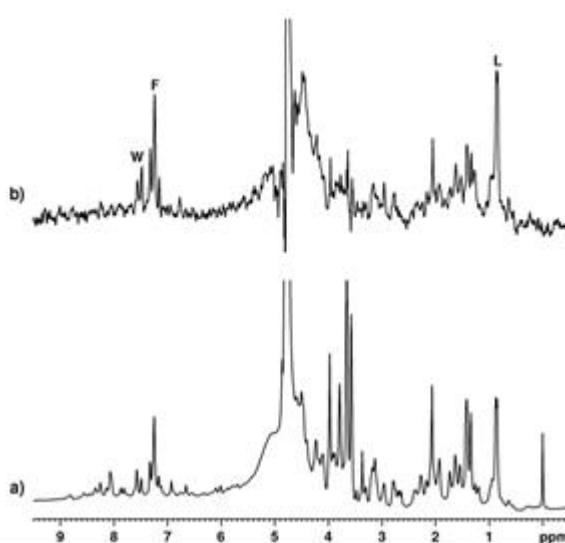


Figura 31. (a) Espectro 1D de protón del péptido FWL (0.5 mM) y la proteína MDM2 (0.025 mM). (b) Espectro STD adquirido tras saturación a -1 ppm. Las señales de los residuos Phe, Trp y Leu están indicadas con el símbolo de una letra.

Como se muestra en la Figura 31 el espectro de STD del complejo FWL-MDM2 permite evidenciar la capacidad de interacción de FWL con MDM2, así como la identificación de los protones que interaccionan en la interfaz de MDM2. En concreto, se observan diferencias significativas en la región de los protones aromáticos (región 7.0-7.5 ppm) y en los protones de

los grupos metilo de la leucina (< 1ppm). Este resultado sugiere la implicación directa de los residuos de Phe, Trp y Leu del péptido FWL en la interacción con MDM2, mostrando un efecto STD relativo η_{sat} del 8%. Estos datos sugieren que el péptido FWL ocupa el mismo bolsillo de MDM2 que p53, mimetizando la hélice 17-29 identificada como *hot-spot*. El péptido WFL también interaccionó con MDM2 aunque con un efecto η_{sat} del 5.1%, menor que el de FWL, indicando la importancia de la disposición del residuo de Leu hacia C-terminal. Los análogos FLW Y WLF mostraron efectos aún menores sobre la saturación de la proteína ($\eta_{\text{sat}} < 5\%$).

1.3.4.2 Interacción del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) con su receptor Flt-1

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) ejerce su acción biológica a través de su unión a diferentes receptores específicos (VEGFRs), VEGF-1 (Flt-1) y VEGF-2 (KDR)¹⁴⁰, que se expresan selectivamente en las células del endotelio vascular. Estos receptores poseen un dominio intracelular tirosina-quinasa y una región extracelular formada por 7 dominios de tipo inmunoglobulina (Ig). El VEGF juega un papel relevante en la angiogénesis fisiológica y patológica. De hecho, en todos los tipos de angiogénesis patológica descritos hasta el momento, incluyendo el cáncer, se han detectado niveles de sobreexpresión de VEGF. Como ejemplo, en los procesos tumorales se ha comprobado que la neutralización de la interacción del VEGF con sus receptores, Flt-1 y KDR, inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis¹⁴¹.

El fragmento 17-25 de VEGF (EVVK_{F17}MDV_{Y21}QRS_{Y25}), situado en el extremo N-terminal, que presenta estructura de hélice α constituye un *hot-spot* importante para la interacción VEGF-VEGFRs, cuyos residuos clave son F₁₇, Y₂₁ e Y₂₅. Mientras que la F₁₇ es crucial para el reconocimiento molecular entre las dos proteínas, los residuos Y₂₁ e Y₂₅ intervienen en la estabilización

del complejo proteico. Recientemente, se ha descrito que péptidos lineales de 13 residuos así como péptidos cíclicos derivados del fragmento 17-25 de VEGF y estructurados como hélices α en disolución son capaces de unirse al receptor Flt-1 con afinidad micromolar¹⁴². También se han descrito péptidos helicoidales más largos diseñados por D'Andrea y *col.*¹⁴³, en los que el residuo clave de Phe se sustituye por Trp, que han mostrado propiedades bien proangiogénicas o antiangiogénicas.

El péptido FYY (**1.72**) de nuestra quimioteca (serie L1) posee en una misma cara de la hélice los residuos aromáticos clave de VEGF₁₇₋₂₅, por lo que su interacción con el receptor Flt-1 podría representar una validación adicional de nuestra colección de péptidos. Cabe destacar, que el tercer residuo aromático de nuestro péptido FYY (**1.72**) no está exactamente en la misma posición relativa que en el VEGF, ocupando posiciones *i*, *i*+4 e *i*+7 mientras que en VEGF las posiciones de los residuos clave son *i*, *i*+4 e *i*+8. Sin embargo, el hecho de que los tres residuos aromáticos se dispongan hacia la misma cara de la hélice hace pensar que los péptidos de nuestra quimioteca podrían establecer una interacción con Flt-1 similar a la de su ligando endógeno. De hecho, resultados previos descritos por Inguibert y *col.* indicaron que péptidos cíclicos con solo dos residuos aromáticos Y/Y o Y/residuo aromático, sin ningún aminoácido entre ellos, son capaces de inhibir la interacción VEGF-Flt-1¹⁴⁴.

La afinidad del péptido FYY (**1.72**), y de algunos análogos que contenían únicamente un punto de mutación en posiciones 5, 9 o 12, por el dominio extracelular del receptor Flt-1 se determinó mediante ensayos de competición con un ligando biotinilado (bt-VEGF₁₆₅)¹⁴⁵. Estos experimentos fueron realizados por el grupo del Prof. Michel Vidal en la Universidad Paris-Descartes (Francia).

En este ensayo todos los péptidos con tres residuos aromáticos en las posiciones indicadas (100 μ M) fueron capaces de competir con el bt-VEGF₁₆₅. Mientras que el péptido modelo FYY (**1.72**) mostró un porcentaje de inhibición del 30%, la introducción de residuos de Trp en las diferentes posiciones clave supuso un incremento en el porcentaje de inhibición de bt-VEGF₁₆₅ (45-50% a 100 μ M), especialmente cuando se sustituyeron los residuos de Tyr (Tabla 6, Figura 32). Del mismo modo, el cambio del residuo de Tyr₉ por Phe mejora ligeramente la capacidad inhibitoria respecto al péptido modelo, mientras que la sustitución del residuo de Tyr₁₂ por Ile (aminoácido alifático), condujo a un péptido inactivo. Este resultado se podría atribuir bien a la necesidad de un residuo aromático en posición 12 o bien a una desestabilización de la estructura de hélice α .

Con todos aquellos péptidos que mostraron un porcentaje de inhibición superior al 35%, se realizaron curvas dosis-respuesta, observando porcentajes máximos de inhibición comprendidos entre el 60 y el 70%. Los valores relativos de IC₅₀ corroboraron los resultados iniciales y confirmaron los efectos beneficiosos de la sustitución de los residuos de Tyr del péptido FYY (**1.72**) por residuos de Trp (Tabla 6), siendo el péptido FWY (**1.69**) el compuesto más potente.

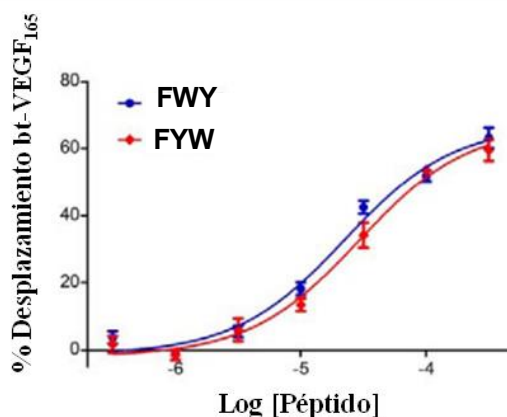


Figura 32. Curvas dosis-respuesta para los péptidos FWY (1.69) y FYW (1.63) tras los ensayos de desplazamiento sobre Flt-1.

Tabla 6. Inhibición de la interacción VEGF-Flt-1. Ensayos de desplazamiento de bt-VEGF₁₆₅.

Compuesto		Inhibición (%) ^a	IC ₅₀ ^b (μM)
Número	Código		
1.72	FYY	29	ND
1.63	FYW	48	28.9
1.69	FWY	50	22.4
1.73	WYY	45	74
1.66	FFY	38.6	194
1.74	YYY	33	ND
	FYI	0	ND
	QK ^c	69	ND

^aPorcentaje de bt-VEGF₁₆₅ desplazado del dominio extracelular de Flt-1 por el péptido estudiado a una concentración de 100 μM. ^bConcentración capaz de desplazar el 50% de bt-VEGF₁₆₅. ND = No determinado. ^cCompuesto de referencia, QK (Ac-KLTWQELYQLKYKGI-NH₂)¹⁴³.

Teniendo en cuenta estos resultados iniciales de inhibición de la interacción VEGF-Flt-1, se decidió evaluar el resto de los péptidos de la serie L1, así como algunos péptidos de las otras tres series que presentaban residuos alifáticos en diferentes posiciones. Para ello, se determinó el

porcentaje de inhibición de bt-VEGF₁₆₅, con los 26 péptidos seleccionados, a una concentración de 30 µM. Como se observa en la Tabla 7, 12 de estos péptidos mostraron una inhibición de la interacción VEGF-Flt-1 superior al 50%, 9 dieron lugar a porcentajes entre el 30% y el 50% y 5 mostraron inhibición inferior al 30% (Tabla 7).

Tabla 7. Inhibición de la interacción VEGF-Flt-1 a una concentración 30 µM

Compuesto		Inhibición (%) ^a (30 µM)	Compuesto		Inhibición (%) ^a (30 µM)
Número	Código		Número	Código	
1.48	FFF	47	1.61	WWW	62
1.49	WFF	60	1.62	YWW	59
1.50	YFF	5	1.65	YYW	41
1.51	FWF	61	1.64	WYW	28
1.52	WWF	52	1.67	WFY	22
1.53	YWF	61	1.68	YFY	12
1.54	FYF	4	1.70	WWY	56
1.55	WYF	62	1.71	YWY	44
1.56	YYF	-		FWI	63
1.57	FFW	63		FIW	29
1.58	WFW	54		FYL	-
1.59	YFW	37		FIY	57
1.60	FWW	41		FLY	4

^aPorcentaje de inhibición de la interacción de bt-VEGF₁₆₅ con el dominio extracelular de Flt-1 mediado por el péptido a una concentración de 30 µM. En color morado se señalan los péptidos seleccionados en este ensayo, que presentan un porcentaje de inhibición superior al 50%, con excepción del péptido YYW. No presenta efecto.

En la Tabla 7 podemos observar que los péptidos que mostraron una inhibición mayor contienen en su secuencia al menos un residuo de Trp combinado con residuos de Phe y Tyr. Todos los péptidos que presentan el residuo de Phe más próximo al C-terminal y combinado con al menos un residuo de Trp presentaron una inhibición superior al 50%, en contraposición

a los combinados con residuos de Tyr, en ausencia de Trp, que mostraron una inhibición inferior al 12%. En cuanto a los péptidos que presentan residuos alifáticos proporcionaron mayor inhibición aquellos que poseen residuos de Ile frente a Leu.

Puesto que en este tipo de ensayos se pueden observar falsos positivos como consecuencia de la contaminación con trazas de metales, para confirmar los resultados obtenidos se repitieron los ensayos en presencia de ácido etilendiaminotetracético, conocido por su alta capacidad para quelar metales (EDTA)¹⁴⁶.

Para este estudio, se seleccionaron 10 de los 12 péptidos que mostraron un porcentaje de inhibición superior al 50% en el primer ensayo. En la Tabla 8 se comparan los resultados de la evaluación de estos péptidos añadidos a 30 μ M, tanto en ausencia como en presencia de EDTA (Tabla 8).

Tabla 8. Inhibición de la interacción VEGF-Ftl-1^a una concentración 30 μ M en presencia o ausencia de EDTA

Compuesto		Inhibición (%) ^a (30 μ M -EDTA ^b)	Inhibición (%) ^a (30 μ M +EDTA ^b)
Número	Código		
1.49	WFF	60	55
1.51	FWF	61	53
1.52	WWF	52	34
1.53	YWF	61	56
1.55	WYF	62	44
1.58	WFW	54	34
1.62	YWW	59	40
1.57	FFW	63	19
1.70	WWY	56	32
	FWI	63	71
	FIY	57	55

^aPorcentaje de inhibición de la interacción de bt-VEGF₁₆₅ con Flt-1 mediado por el péptido a una concentración de 30 μ M. ^bEDTA: Ácido etilendiaminetetracético, utilizado como agente quelante que puede formar complejos con metales. En color morado se señalan los péptidos seleccionados, que presentan un porcentaje de inhibición superior al 40% en presencia de EDTA.

Los nuevos datos obtenidos en presencia de EDTA corroboran la importancia de la presencia de un residuo de Trp junto con un residuo de Phe, mientras que la presencia de dos residuos de Trp combinados con Phe proporciona porcentajes de inhibición inferiores al 40%. Además, aquellos péptidos que en su secuencia tienen el residuo de Phe más próximo al C-terminal muestran mejores valores. Por otra parte, es de destacar que el mejor valor corresponde al péptido FWI, con un residuo alifático, que muestra un porcentaje de inhibición del 71%.

Para los péptidos con un porcentaje de inhibición superior al 40% en presencia de EDTA, se realizaron las curvas dosis-respuesta y se determinó su IC_{50} (Figura 33, Tabla 9).

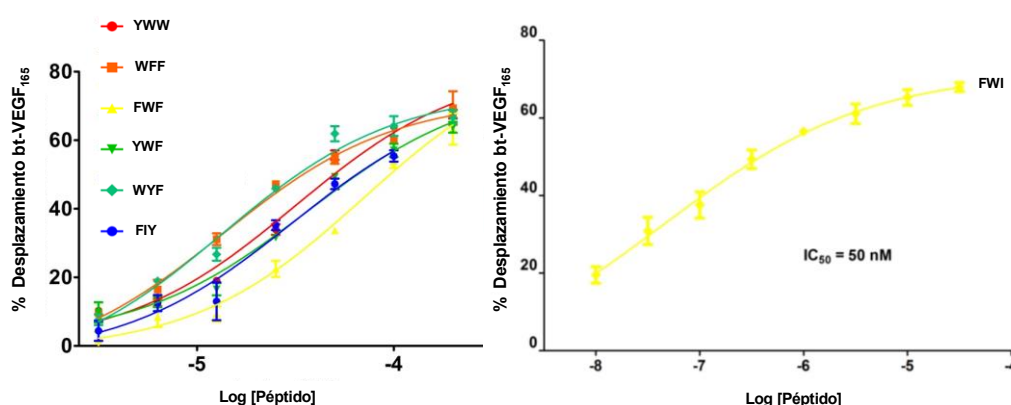


Figura 33. Representación de las curvas dosis-respuesta para los péptidos YWW (1.62), WFF(1.49), FWF (1.51), YWF (1.53), WYF (1.55), FWI, FIY.

Tabla 9. Determinación de la IC_{50} en la interacción péptido-FIt1

Compuesto		IC_{50} (μM) ^a
Número	Código	
1.49	WFF	28.2
1.51	FWF	12.7
1.53	YWF	13.5
1.55	WYF	36.3
1.62	YWW	31.6
	FWI	0.05
	FIY	30.6

^aConcentración capaz de inhibir el 50% de la unión de bt-VEGF₁₆₅

Seis de estos péptidos mostraron valores de IC_{50} del orden micromolar, con una cierta preferencia por el residuo de Trp en la parte central de la hélice (posición 9). Cabe destacar que el péptido FWI presentó un valor de IC_{50} del orden nanomolar, que contrasta con la inactividad del péptido FYI (Tabla 6).

Aunque todos los péptidos ensayados presentan una cara hidrófoba, no todos fueron capaces de interactuar con Flt-1 y no todos fueron reconocidos de igual forma, lo que apunta a una cierta selectividad en función de los residuos en posiciones 5, 9 y 12.

En resumen la colección de péptidos helicoidales ha servido para descubrir nuevas secuencias de alta afinidad por los receptores de VEGF Flt-1. La combinación FWI resultó ser la óptima entre todos los péptidos evaluados y podría ser el punto de partida para el diseño de miméticos no peptídicos.

1.3.5 Evaluación de la colección de péptidos en canales iónicos TRP.

Una vez validada la colección de péptidos se podía ya pensar en su utilización como herramienta para intentar modular IPPs poco conocidas, como las que podrían estar implicadas en el funcionamiento y regulación de canales iónicos. Estos receptores son muy complejos, requieren de la oligomerización de monómeros proteicos, que intervienen en la formación del poro del canal, y de la intercomunicación con otras proteínas asociadas que contribuyen a regular su función^{123,124}. Muchas de estas interacciones tienen lugar a través de motivos helicoidales, por lo que cabe la posibilidad de intentar modularla con péptidos que se estructuren en forma de hélice.

En base a esos antecedentes, la colección completa de péptidos (series L1-L4) ha sido evaluada por el equipo del Dr. Ferrer Montiel (Universidad Miguel Hernández, Elche) frente a canales iónicos que pertenecen a la familia de los TRP (Receptores de potencial transitorio), concretamente TRPV1, TRPM8 y TRPA1.

Así, los componentes de las cuatro series de esta quimioteca se evaluaron en las líneas celulares SH-SY5Y, HEK-CR1 y IMR90, transfectadas

con plásmidos de TRPV1, TRPM8 y TRPA1, respectivamente. Tras activación del canal por el correspondiente agonista, se midieron los niveles de Ca^{2+} intracelular mediante microfluorografía. Los resultados mostraron que algunos péptidos de la serie L3 (FLF, YLF, YIY, YLY) y de la serie L4 (WYI, YFL, YYI), que en su mayor parte contienen residuos de Tyr, presentaban actividad significativa como bloqueantes de TRPV1 y TRPA1 ($> 20\%$) cuando se evaluaron a una concentración de $5 \mu\text{M}$ (Tabla 10). El resto de los compuestos de la quimioteca no mostró actividad de bloqueo ($< 15\%$) frente a ninguno de estos dos canales. Por otra parte, ningún compuesto resultó activo frente a TRPM8. En cuanto a la secuencia y disposición de los residuos clave, es de destacar que todos los péptidos con un residuo alifático en posición 5 y los que incorporaban en 5, 9 y 12 residuos aromáticos fueron totalmente inactivos. Los péptidos FLF, YLF, YIY y YLY, que presentan el aminoácido alifático en posición central, mostraron actividades modestas y no selectivas en TRPV1 y TRPA1. Sin embargo los compuestos WYI, YFL y YYI, con el residuo alifático próximo al extremo C-terminal (posición 12) fueron capaces de bloquear el receptor TRPA1 con valores superiores al 50% , a una concentración de $5 \mu\text{M}$. Además, se podría hablar de una cierta selectividad en dicho canal frente al receptor TRPV1. En nuestro conocimiento, estos tres compuestos constituyen los primeros ejemplos descritos de péptidos capaces de bloquear la actividad de los canales TRPA1.

Tabla 10. Péptidos con actividad bloqueante en canales TRPV1 y TRPA1

Comp.	Secuencia	Bloqueo (%)	
		TRPV1 ^{a,c}	TRPA1 ^{b,c}
FLF	Ac-SSEEFARNLAAFN-NH ₂	23.93 ± 3.86	26.05 ± 5.96
YLF	Ac-SSEFYARNLAAFN-NH ₂	25.61 ± 5.6	24.03 ± 10.9
YIY	Ac-SSEFYARNIAAYN-NH ₂	24.09 ± 3.56	17.95 ± 3.06
YLY	Ac-SSEFYARNLAAYN-NH ₂	38.03 ± 4.39	37.34 ± 5.71
WYI	Ac-SSEEWARNYAAIN-NH ₂	28.18 ± 4.23	55.51 ± 11.2
YFL	Ac-SSEFYARNFAALN-NH ₂	19.77 ± 3.71	51.18 ± 10.2
YYI	Ac-SSEFYARNYAAIN-NH ₂	18.63 ± 3.33	51.38 ± 9.80

^aBloqueo de la entrada de Ca²⁺ inducida por capsaicina en canales TRPV1. ^bBloqueo de la entrada de Ca²⁺ inducida por allil isotiocianato en canales TRPA1. En ambos ensayos, los péptidos se añadieron a una concentración de 5µM.

A la vista de los resultados obtenidos se podría concluir que estos péptidos podrían servir como modelo para el desarrollo de peptidomiméticos capaces de reproducir la disposición 3D de los dos residuos aromáticos y las cadenas laterales alifáticas dentro de la estructura helicoidal. Dado que estos péptidos no comparten ninguno de los requisitos estructurales que se encuentran en los bloqueadores conocidos de los poros de los canales TRP, normalmente compuestos cargados positivamente, ni similitud con la estructura química de las moléculas pequeñas que actúan como antagonistas competitivos, es posible que intervengan en IPPs relacionadas con la formación del poro del canal o con la modulación del mismo por otras proteínas. Aunque el mecanismo exacto de acción de estos péptidos está por determinar, los bloqueadores del canal TRPA1, descritos aquí, podrían constituir un primer paso hacia el desarrollo de antagonistas innovadores para este canal.

1.4 CONCLUSIONES

En este capítulo de Tesis se ha abordado el diseño, la síntesis, el estudio conformacional, la validación y la evaluación biológica de una colección de péptidos lineales, diseñados para interactuar e interferir con IPPs en las que los motivos helicoidales sean clave para la interacción.

Las conclusiones extraídas de los resultados de este capítulo se resumen en los siguientes puntos:

- El programa AGADIR, que predice de forma teórica la capacidad helicoidal de péptidos lineales, ha sido una herramienta fundamental en el diseño *de novo* de una colección de péptidos de estructura general Ac-SSEEX⁵ARNX⁹AAX¹²N-NH₂. En esta estructura los residuos X corresponden a residuos aromáticos y alifáticos que se dispondrían en una cara de la hélice.
- La síntesis en paralelo utilizando metodología de fase sólida (estrategia Fmoc/tBu), permitió la preparación de los 81 péptidos componentes de la quimioteca de manera individual.
- Los estudios conformacionales realizados en una selección aleatoria de péptidos mediante dicroísmo circular y RMN han demostrado que los péptidos diseñados adoptan estructura de hélice α en disolución acuosa.
- Se ha verificado la utilidad de algunos péptidos de la quimioteca para interferir en dos IPPs para las que se conoce la relevancia de hélices α interfaciales (p53-MDM2, VEGF-VEGFRs). En el segundo caso, tras unos primeros resultados positivos, se ha ampliado el número de compuestos evaluados, lo que ha permitido identificar nuevos inhibidores potentes de la interacción VEGF-Flt-1.
- La quimioteca completa se ha evaluado en canales termosensoriales TRPV1, TRPM8 y TRPA1. Se han encontrado algunos péptidos con actividad significativa como bloqueantes de TRPV1 y especialmente TRPA1, que

pueden constituir el punto de partida para el desarrollo de nuevos antagonistas de estos canales iónicos.

Todos estos resultados se resumen gráficamente en la Figura 34.

Además, este tipo de quimiotecas podría ser de interés para estudiar IPPs en las que no se conozcan los residuos clave para la interacción, pudiendo proporcionar pistas valiosas sobre la estructura y composición de las interfaces de estas IPPs.

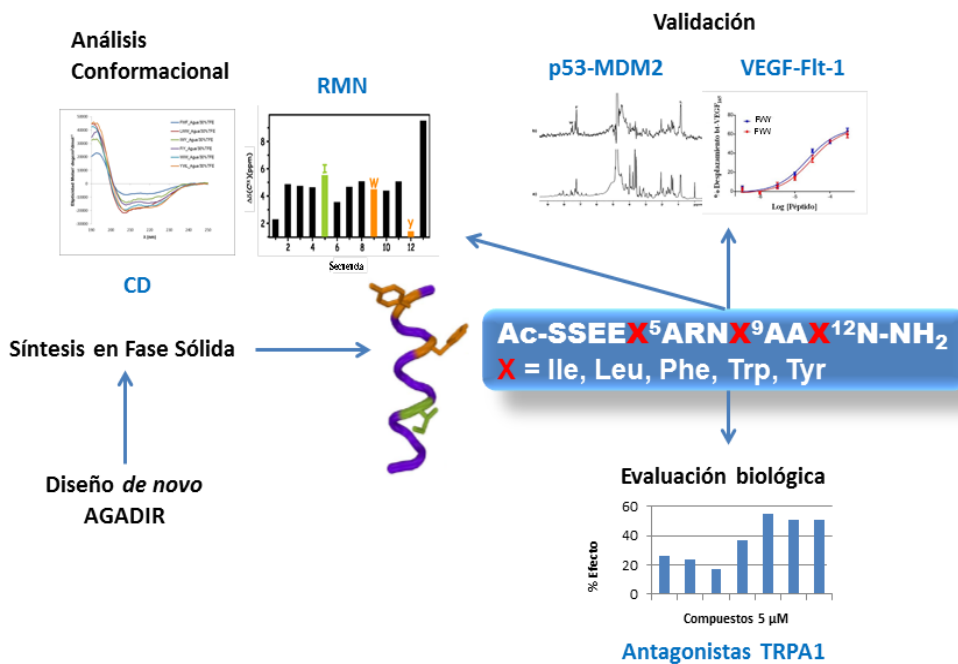


Figura 34. Resumen de resultados y conclusiones.

1.5 PARTE EXPERIMENTAL

1.5.1 Instrumentación General

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-810 equipado con una unidad de control de temperatura Peltier. Los espectros de masas (Electrospray, modo positivo) se registraron en un equipo HPLC-MS WATERS integrado por un módulo de separación 2695, un detector Photodiodo Array 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ 2000. Los experimentos de HPLC analíticos se realizaron en un aparato Agilent Technologies 1120 Compact LC, con una columna Eclipse Plus C18. Los experimentos de HPLC semipreparativo se realizaron en un equipo WATERS integrado por una bomba Waters 2545 y un detector de Photodiodo Array 2998. Los experimentos de masa exacta se realizaron en un equipo Agilent 6520 Q-TOF LC/MS. Las purificaciones en fase reversa se llevaron a cabo utilizando un equipo Biotage ISOLERA ONE. Las reacciones se sometieron a agitación orbital en un equipo GERHARDT. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga termostatazada Universal 320R de Hettich utilizando tubos falcon. La liofilización de las disoluciones acuosas se llevó a cabo en un aparato Telstar Lioalfa-6.

1.5.2 Reactivos y Disolventes

Los disolventes anhidros utilizados se adquirieron de casas comerciales o bien se prepararon por destilación según métodos estándar. Los aminoácidos comerciales se compraron a Novabiochem e IrisBiotech. El resto de reactivos fueron adquiridos de las casas comerciales habituales.

1.5.3 Síntesis de Péptidos en fase sólida

La síntesis de estos péptidos se llevó a cabo en fase sólida siguiendo la estrategia Fmoc/t-Bu¹³⁰, a partir de 200 mg (síntesis manual) y 280 mg (síntesis automatizada) de resina Rink amida, en cada caso utilizando como aminoácido de partida Fmoc-Asn(Trt)-OH.

1.5.3.1 Soporte polimérico

En el presente trabajo se utilizó una única resina del tipo MBHA-PS (1% DVB) de carga 0.34 mmol/g, común para todos los productos sintetizados, funcionalizada con el espaciador Rink Amida.

1.5.3.2 Síntesis Manual

La síntesis se realizó empleando jeringas de polipropileno, de volumen 10 mL, equipadas con una placa filtrante de polietileno poroso. De forma general, la resina se mantuvo en la jeringa añadiendo los reactivos y disolventes adecuados en cada caso de modo que se mantuviera cubierta y solvatada. La agitación del soporte polimérico se realizó con varillas de teflón y/o con un agitador orbital. Los excesos de reactivos, disolventes y posibles subproductos se eliminaron por filtración. El protocolo general de acoplamiento se describe en la Tabla 11. Todos los derivados se obtuvieron con el extremo N-terminal acetilado como se indicará más adelante.

La escisión del compuesto de la resina se realizó como se indicará en el apartado 1.5.3.5. A continuación el crudo de reacción se purificó por cromatografía de media presión, en cartuchos de fase reversa, utilizando un gradiente adecuado para cada producto.

Tabla 11. Protocolo general de acoplamiento de aminoácidos en la síntesis manual

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo
1	DCM/DMF/DCM/DMF	Hinchado	4 x 0.5 min
2	20% Piperidina/DMF ^a	Desprotección Fmoc	1 x 1 min, 3 x 10 min
3	DMF/DCM/DMF/DCM/DMF	Lavado	4 x 0.5 min
4	Fmoc-AA-OH(2 eq) /HCTU(2 eq) /DIEA (2 eq) /DMF	Acoplamiento	1 h
5	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	5 x 0.5 min
6	Ensayo ninhidrina	Control	-

^a Las proporciones entre reactivos y disolventes son volumétricas.

1.5.3.3 Síntesis automatizada

La síntesis de forma automatizada, se realizó utilizando un sintetizador de péptidos, acoplado a microondas, modelo Cem Liberty1.

Para la síntesis de cada producto se parte de 279 mg de resina Rink amida. En este caso, la desprotección del grupo Fmoc se lleva a cabo con piperidina-DMF al 20%, utilizando un protocolo ligeramente diferente, una primera desprotección a 40°C durante 30 segundos, seguida de otra desprotección a 75°C durante 5 minutos. El acoplamiento se realiza utilizando HBTU/HOBt como agente acoplante, a 75°C durante 5 minutos. En este proceso de síntesis, tanto la acetilación como el paso de separación del péptido de la resina se realizaron de la misma forma que se describe en los apartados 1.5.3.4 y 1.5.3.5.

La incorporación de cada aminoácido se llevó a cabo mediante el protocolo descrito en la Tabla 12.

Tabla 12. Protocolo general de acoplamiento en la síntesis automatizada

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo
1	DMF	Hinchado	7 ml x 1 Ciclo
2	20% Piperidina/DMF ^a	Desprotección Fmoc	30 seg/ 40°C, 5 min/ 75°C
3	DMF	Lavado	7 ml x 4 Ciclos
4	Fmoc-AA-OH(2 eq) /HBTU(2 eq) HOBT /DIEA (2 eq) /DMF	Acoplamiento	5 min/ 75°C
5	DMF	Lavado	7 ml x 4 Ciclos
6	Ensayo ninhidrina	Control	-

^aLas proporciones entre reactivos y disolventes son volumétricas.

1.5.3.4 Acetilación de aminas

El protocolo a seguir para la acetilación del extremo N-terminal se describe a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13. Protocolo general de acetilación de aminas

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo
1	DCM/DMF/DCM/DMF	Hinchado	4 x 0.5 min
2	20% Piperidina/DMF ^a	Desprotección Fmoc	1 x 1 min, 3 x 10 min
3	DMF/DCM/DMF/DCM/DMF	Lavado	4 x 0.5 min
4	Ac ₂ O:DMF:DIEA (1:1:1)	Acetilación	1 x 1 min, 4 x 10 min
5	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	4 x 0.5 min
6	Ensayo ninhidrina	Control	-

^aLas proporciones entre reactivos y disolventes son volumétricas

1.5.3.5 Escisión de los productos de la resina

Sobre la resina, dispuesta en la jeringa, se añadió la mezcla acidolítica formada por (TFA:H₂O:TIPS) en proporciones (95:2.5:2.5), aproximadamente 1 ml de disolución por 100 mg de resina. Tras la adición de la disolución, se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 horas. Posteriormente, se recogieron los filtrados en un tubo falcon y se le añadió Et₂O, previamente enfriado, para provocar la precipitación del péptido.

La mezcla se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm y a -15 °C. Se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado con Et₂O dos veces más.

El precipitado seco obtenido se disolvió en agua o en mezclas de agua/acetoneitrilo y se liofilizó para obtener el crudo final.

1.5.4 Métodos cromatográficos

1.5.4.1 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

- HPLC analítico: Se realizó en fase reversa utilizando una columna Eclipse Plus C18 de dimensiones 4.6 mm x 150 mm (µm). Las muestras se analizaron utilizando un gradiente de 10-30% de A en B durante 20 min, usando como fase móvil A: CH₃CN y fase móvil B: H₂O + 0.05% TFA, a un flujo de 1.5 ml/min y con una detección en continuo a una longitud de onda de 220 nm.

- HPLC-MS: Se realizó en fase reversa utilizando una columna SUNFIRE™ C18 (3.5 µm) de dimensiones 4.6 mm x 50 mm. Las muestras se analizaron utilizando un gradiente de 2-40% de A en B durante 15 min, utilizando como fase móvil A: CH₃CN + 0.1% ácido fórmico y B: H₂O + 0.1% ácido fórmico, a un flujo de 1 ml/min y con una detección en continuo entre 230-400 nm.

● HPLC-MS semipreparativo: Se realizó en fase reversa utilizando una columna SUNFIRE™ C18 (5 μm) de dimensiones 10 mm x 150 mm. Las muestras se purificaron utilizando un gradiente de 2-40% de A en B en 15 min, utilizando como fase móvil A: CH₃CN + 0.08% ácido fórmico y B: H₂O + 0.1% ácido fórmico, a un flujo de 8 ml/min y con una detección en continuo a longitudes de onda de 190-400 nm. Para la inyección, el crudo de reacción se disolvió en la mínima cantidad posible de H₂O o mezclas de CH₃CN/H₂O.

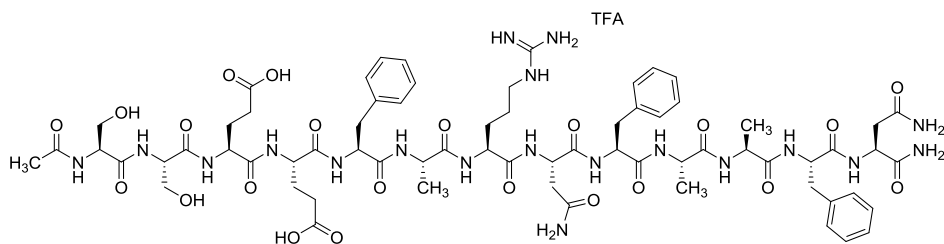
1.5.4.2 Cromatografía flash

Se llevó a cabo en un sistema Isolera One (Biotage) empleando cartuchos KP-C18-HS de 12 g, utilizando mezclas de H₂O/CH₃CN. Para el sembrado del cartucho, los crudos de reacción se disolvieron en la mínima cantidad de H₂O.

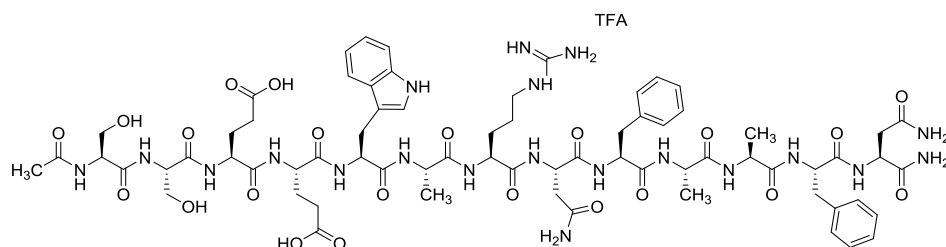
1.5.5 Caracterización de los Péptidos

Las muestras se analizaron utilizando un gradiente 10-30% de A en B durante 20 min (HPLC-analítico, columna Eclipse Plus).

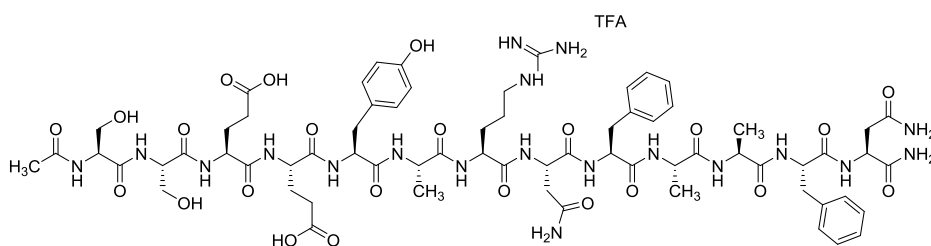
Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.48)



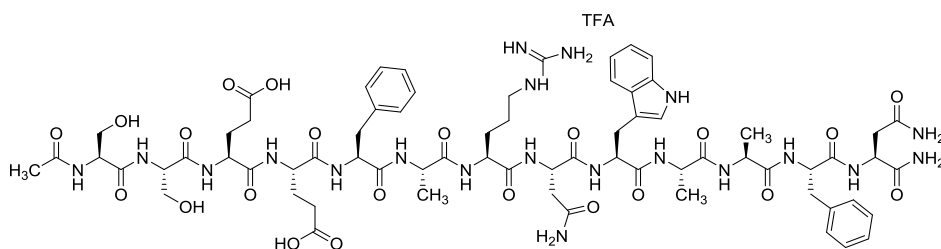
Síntesis Manual. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 18 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 16%, Pureza: 99%, HPLC: $t_R = 17.48$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 766.0$. HRMS: Masa exacta calculada para C₆₈H₉₅N₁₉O₂₂: 1529.6899. Encontrada: 1529.6894.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.49)

Síntesis Manual. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 9 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 7% Pureza: 89% HPLC: $t_R = 18.11$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 785.0$.

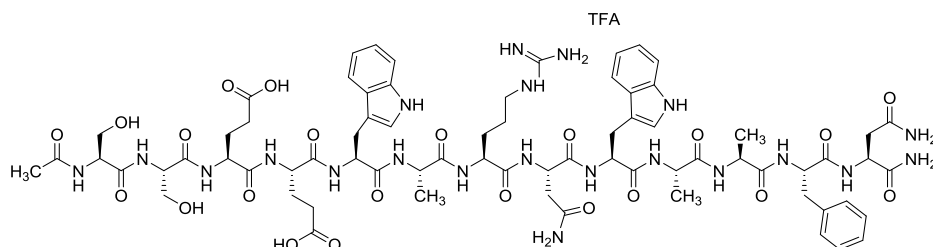
Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.50)

Síntesis Manual. 78 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 74% Pureza: 86%, HPLC: $t_R = 14.38$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 774.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.51)

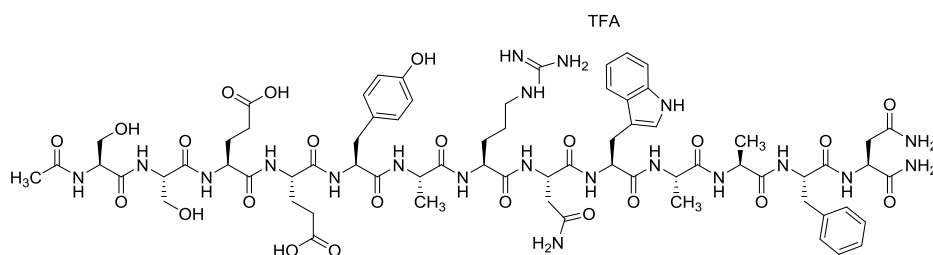
Síntesis Manual. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 20 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 18% Pureza: 98%, HPLC: $t_R = 17.36$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 785.0$. HRMS: Masa exacta calculada para $C_{70}H_{96}N_{20}O_{22}$: 1568.7008. Encontrada: 1568.6979.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.52)

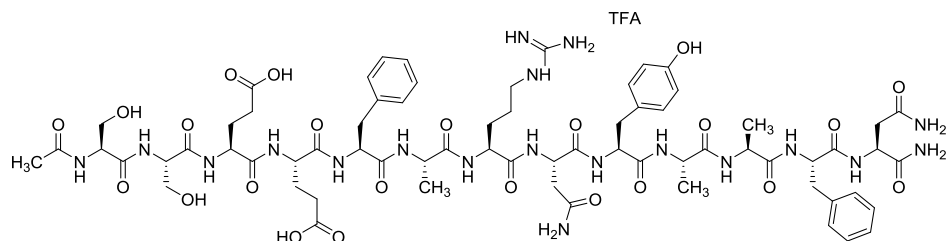


Síntesis Manual. Purificación: HPLC-Semipreparativo (2% de acetonitrilo a 40% en 15 min) obteniéndose 10 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 9% Pureza: 88%, HPLC: $t_R = 18.25$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 805.0$.

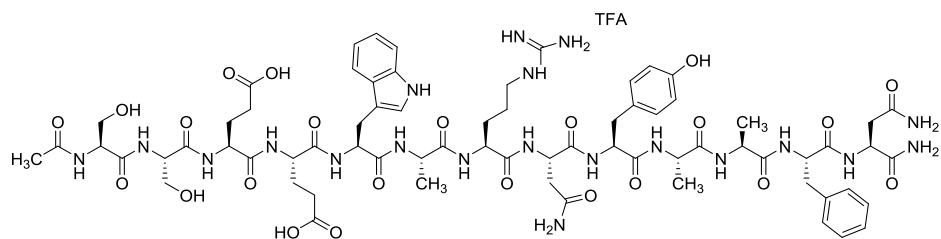
Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.53)



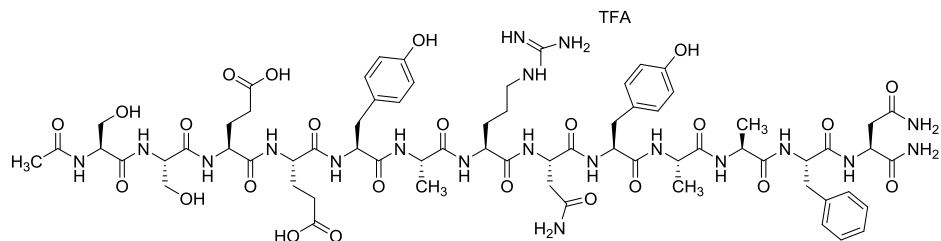
Síntesis Manual. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 23 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 21%, Pureza: 91%, HPLC: $t_R = 14.72$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 793.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.54)

Síntesis Manual. 93 mg de un sólido blanco, tras liofilización.
Rendimiento: 74%, Pureza: 85%, HPLC: $t_R = 13.58$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 774.0$.

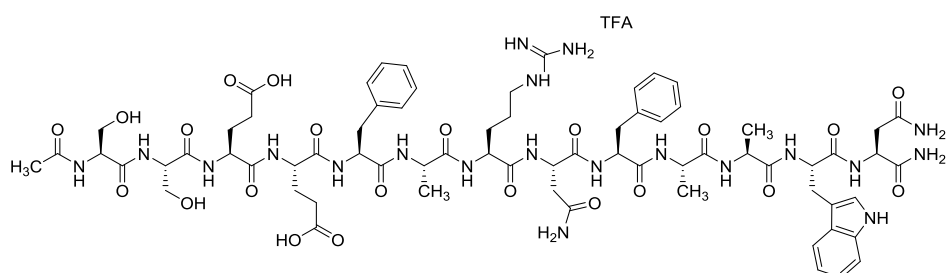
Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.55)

Síntesis Manual. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 22 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 20%. Pureza: 96%, HPLC: $t_R = 14.92$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 793.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Phe-Asn-NH₂ (1.56)

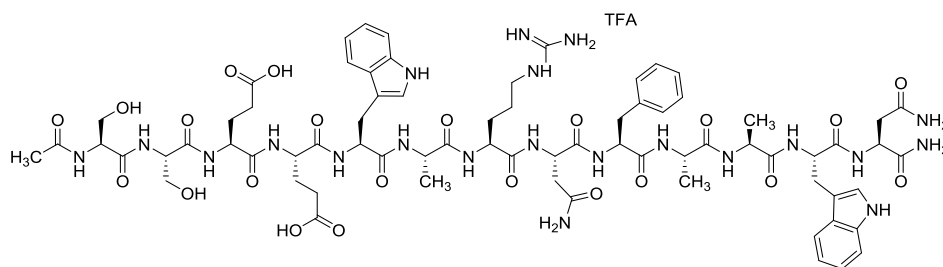
Síntesis Manual. 66 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 65%. Pureza: 86%, HPLC: $t_R=11.06$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+}=782.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.57)

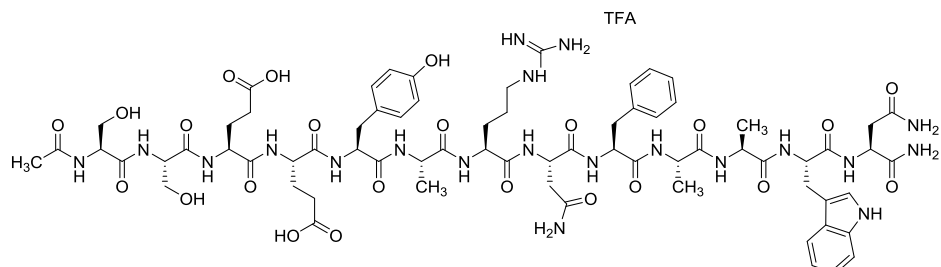


Síntesis automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min). Se obtienen 29 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 11%. Pureza: 88%. HPLC: $t_R= 18.45$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+}=805.0$.

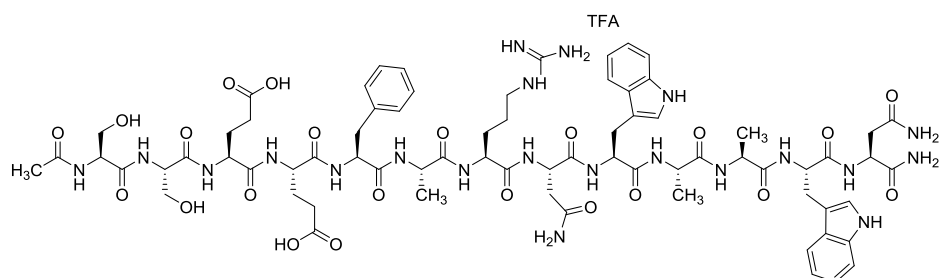
Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.58)



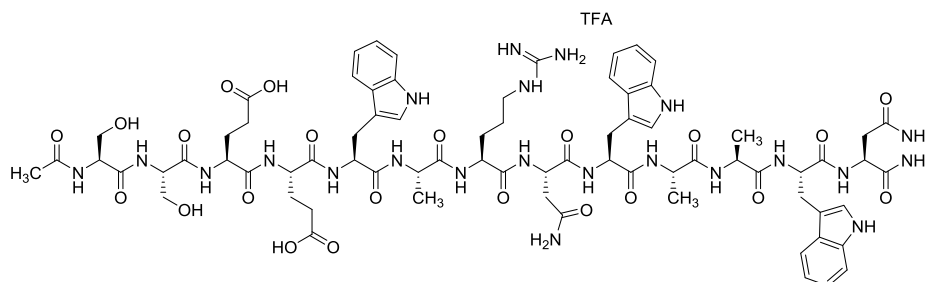
Síntesis automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min). Se obtienen 29 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 27%. Pureza: 92%. HPLC: $t_R= 17.80$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+}=786.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.59)

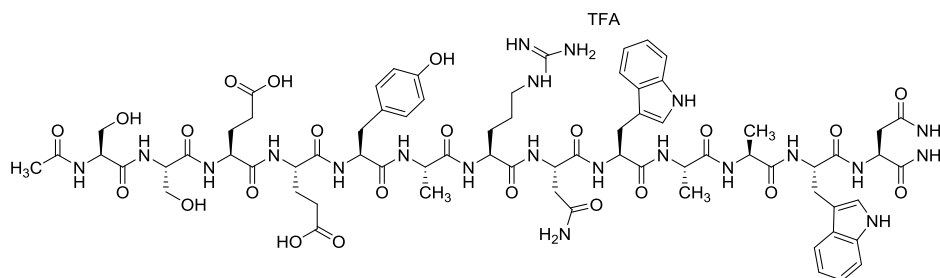
Síntesis automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min). Se obtienen 17 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 16%. Pureza: 88%. HPLC: $t_R = 14.46$ min EM-ES: $[M+2]^{2+} = 793.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.60)

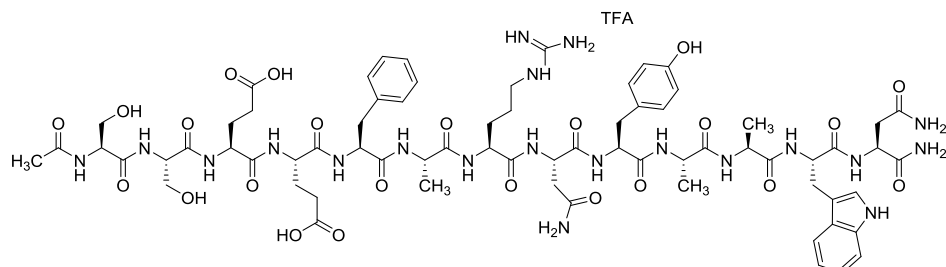
Síntesis automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min). Se obtienen 11 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 11%. Pureza: 85%. HPLC: $t_R = 17.50$ min EM-ES: $[M+2]^{2+} = 805.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.61)

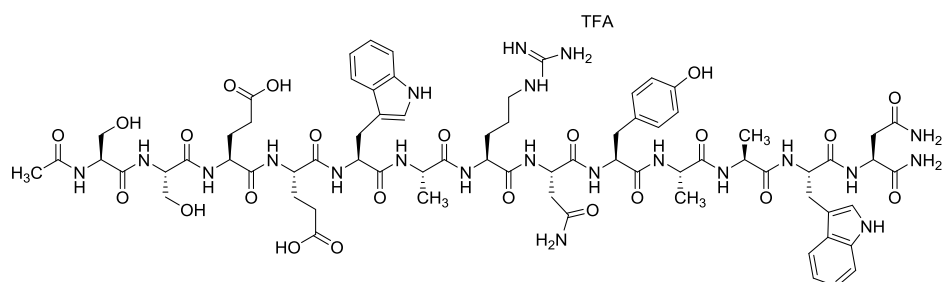
Síntesis automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min). Se obtienen 11 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 11%. Pureza: 85% HPLC: $t_R = 18.51$ min EM-ES: $[M+2]^{2+} = 824.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.62)

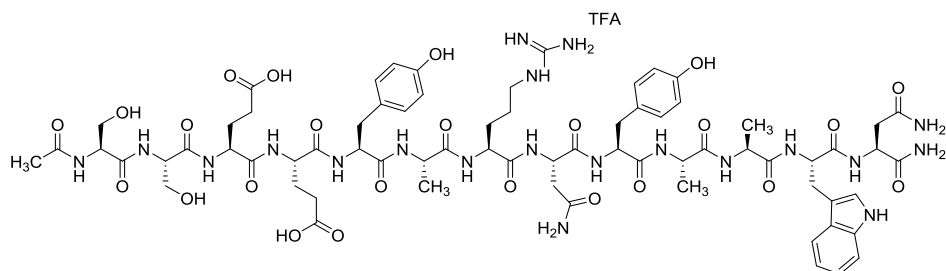
Síntesis Manual. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 15 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 14%, Pureza: 95%, HPLC: $t_R = 15.91$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 813.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.63)

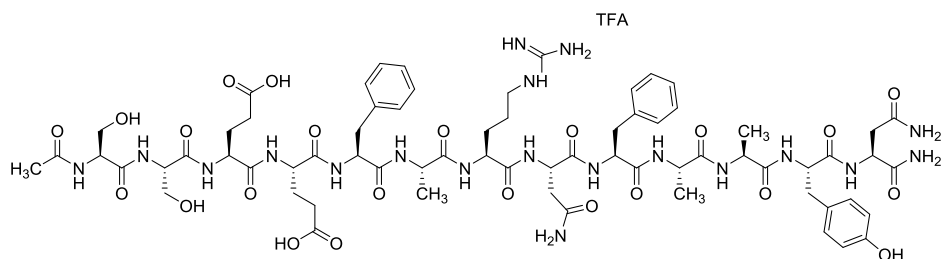
Síntesis automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 41 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 26%, Pureza: 98%, HPLC: $t_R = 14.23$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 793.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.64)

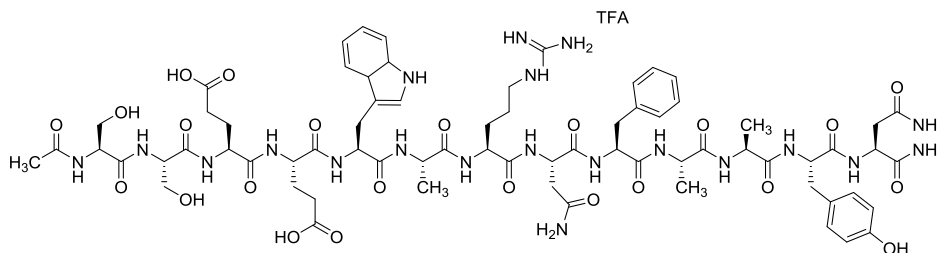
Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 31 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 19%, Pureza: 88%, HPLC: $t_R = 15.45$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 813.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Trp-Asn-NH₂ (1.65)

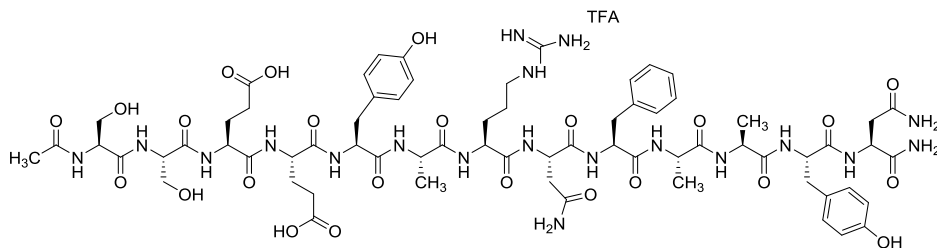
Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 26 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 16%, Pureza: 88%, HPLC: $t_R = 11.92$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 813.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.66)

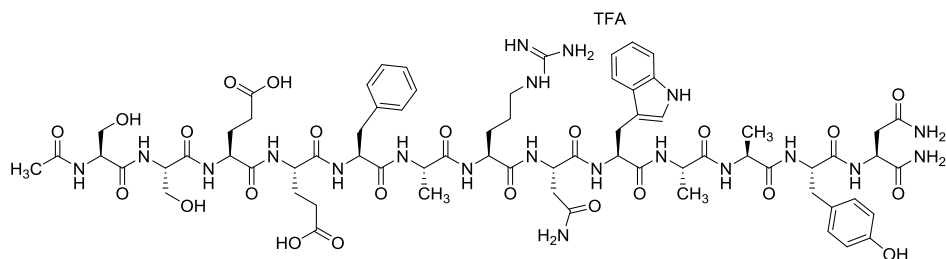
Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 45 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 29%, Pureza: 97%, HPLC: $t_R = 14.38$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 774.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.67)

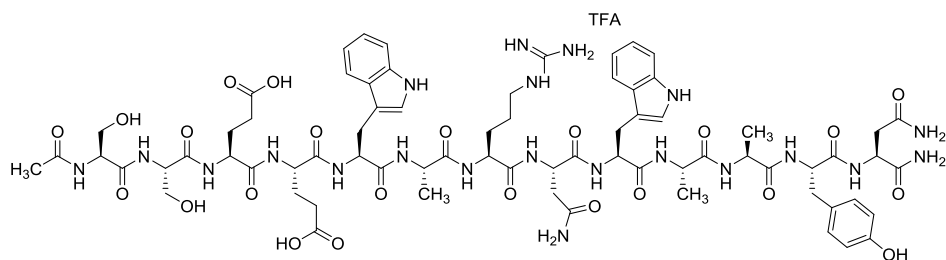
Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 33 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 21%, Pureza: 92%, HPLC: $t_R = 15.42$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 794.0$. HRMS: Masa exacta calculada para $C_{70}H_{98}N_{20}O_{23}$: 1584.6957. Encontrada: 1584.7008.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Phe-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.68)

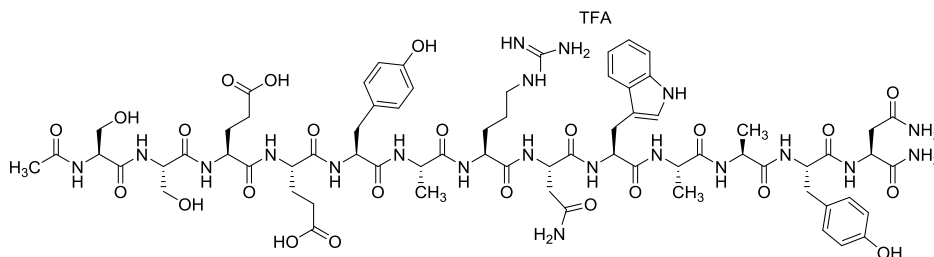
Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 60 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 38%, Pureza: 94%, HPLC: $t_R = 11.51$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 782.0$. HRMS: Masa exacta calculada para $C_{68}H_{95}N_{19}O_{24}$: 1561.6797. Encontrada: 1561.6801.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.69)

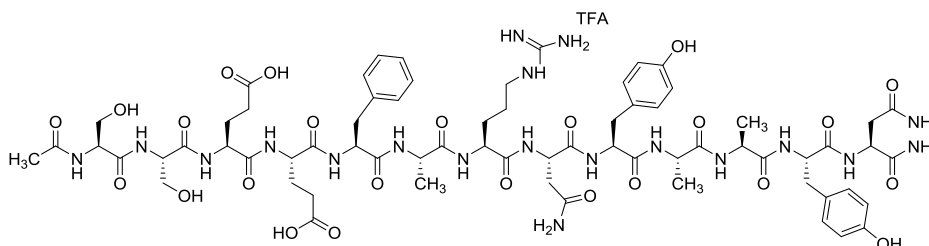
Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 24 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 15%, Pureza: 90%, HPLC: $t_R = 14.69$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 793.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.70)

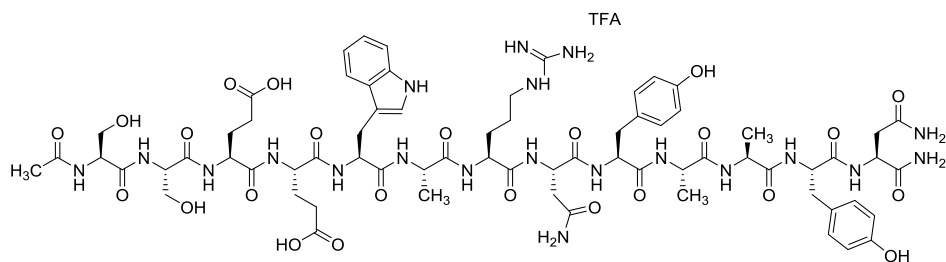
Síntesis Automatizada. 106 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 65%, Pureza: 86%, HPLC: $t_R = 16.40$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 813.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Tyr-Ala-Arg-Asn-Trp-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.71)

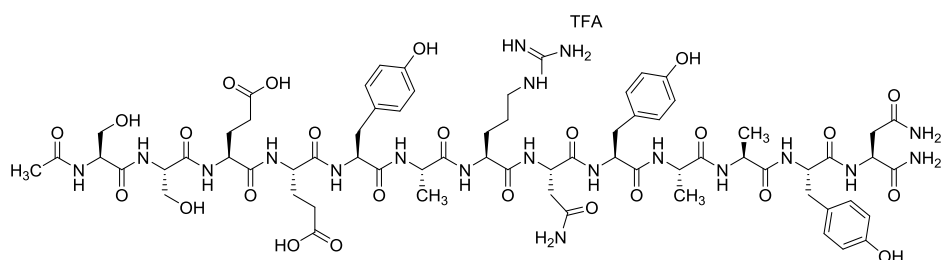
Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 24 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 15%, Pureza: 93%, HPLC: $t_R = 12.40$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 801.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Phe-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.72)

Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 49 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 31%, Pureza: 96%, HPLC: $t_R = 11.27$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 782.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.73)

Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 48 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 30%, Pureza: 98%, HPLC: $t_R = 12.78$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 801.0$.

Ac-Ser-Ser-Glu-Glu-Trp-Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Ala-Tyr-Asn-NH₂ (1.74)

Síntesis Automatizada. Purificación: Cromatografía Flash (Biotage) (0-15% de acetonitrilo en 4 min, 15%-40% en 35 min, 40%-100% en 10 min), obteniéndose 35 mg de un sólido blanco, tras liofilización. Rendimiento: 22%, Pureza: 90%, HPLC: $t_R = 8.69$ min. EM-ES: $[M+2]^{2+} = 790.0$.

1.5.6 Métodos para la determinación conformacional**1.5.6.1 Dicroísmo Circular**

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en H₂O y en disolución de trifluoroetanol (TFE) al 30% en agua. Las concentraciones

utilizadas fueron de 50-100 mM. Se hicieron medidas entre 190-250 nm usando una celda de 0.1 cm de paso óptico. Los experimentos se llevaron a cabo a una velocidad de barrido de 50 nm/min, un tiempo de respuesta de 2 s y 1 nm de anchura de banda. Los espectros obtenidos son el promedio de 4 barridos a los que se les corrigió la línea base.

1.5.6.2 Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN para todos los heteronúcleos observables se registraron en una sola muestra 1mM disueltos en 50% de TFE, 43% de H₂O y 7% D₂O (v/v). Los espectros monodimensionales de ¹H se adquirieron utilizando 298 K en un espectrómetro Bruker Avance 800 MHz. Las asignaciones de los desplazamientos químicos de ¹H se obtuvieron mediante el uso de una combinación de experimentos de resonancia homonuclear estándar (TOCSY y NOESY).

1.5.7 Ensayos Biológicos

1.5.7.1 Ensayos de Afinidad por el receptor Flt-1

Sobre una microplaca de 96 pocillos se añadieron 100 µl de tampón fosfato (PBS, pH 7.4) que contiene VEGFR-1 ECD/Fc Chimera (20 ng/pocillo) o VEGFR-1 D1-D3/Fc chimera (15 ng/pocillo) y se incubaron a 4°C durante una noche. Tras lavar tres veces con 250 µl de PBS 0.1 %, (v/v) Tween 20 (buffer A), la placa se bloqueó con 200 µl de PBS con 3 % (w/v) de BSA y se agitó durante 2h a 37°C. La placa se lavó de nuevo con buffer A.

A continuación, se añadieron en cada pocillo 100 µl de una disolución que contiene 131 pM de bt-VEGF₁₆₅ y los péptidos a ensayar a varias concentraciones diluidos en PBS con 1%DMSO. Tras 3h de agitación a 37°C, la placa se lavó de nuevo con buffer A y se adicionaron sobre cada pocillo 100 µl del complejo streptavidina-HRP diluido 1:8000 en PBS con 0.1 % (v/v) de Tween 20 y 0.3% (w/v) BSA. Después de 1h de incubación a 37°C en

oscuridad la placa se lavó con 250 μ l de buffer A y se añadieron 100 μ l de sustrato quimioluminiscente. El bt-VEGF₁₆₅ anclado se cuantificó por medidas de quimioluminiscencia.

1.5.7.2 Ensayos frente a los canales iónicos TRP

En estos ensayos se utilizaron líneas celulares SH-SY5Y, HEK-CR1 y IMR90, transfectadas con plásmidos de TRPV1, TRPM8 y TRPA1, respectivamente. La cuantificación de la capacidad bloqueante de los canales iónicos por los compuestos a ensayar se determinó mediante el cálculo de la concentración intracelular de Ca²⁺ a través de medidas de fluorescencia, empleando la sonda molecular Fluo-4-AM. Los ensayos se realizaron en una multiplaca de 96 pocillos.

Las células se trataron con 100 μ l de una disolución de Fluo-4 NW y probenecid 2.5 mM. A continuación se añadieron los compuestos a la concentración deseada (5 μ M) y se incubaron a 37°C durante 30 min. y a temperatura ambiente durante otros 30 min. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un equipo POLARstar Omega BMG LAB tech a las longitudes de onda 485 nm (excitación) y 520 nm (emisión). Para la activación de los canales se añadió capsaicina 5 μ M, en el caso de TRPV1, mentol 50 μ M para TRPM8 y alilisotiocianato, 10 μ M para TRPA1. Como control de bloqueo de los canales se añadió el compuesto Arg 15-15 a 50 μ M¹⁴⁷ o rojo de rutenio¹⁴⁸.

**CAPÍTULO 2: Moduladores alostéricos selectivos del
receptor nicotínico $\alpha 7$: Chalconas y compuestos
relacionados**

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Modulación alostérica de canales nicotínicos $\alpha 7$

Los moduladores alostéricos se definen como moléculas que no poseen actividad frente al receptor en ausencia del agonista. Desde el punto de vista terapéutico, se ha especulado que la modulación alostérica podría ser más conveniente que la búsqueda de compuestos con actividad agonista directa, ya que se modulan los efectos de los ligandos endógenos, en lugar de activar o desactivar el receptor *per se*¹⁴⁹. Los moduladores alostéricos se pueden clasificar como positivos (PAMs) o negativos (NAMs), según que incrementen o disminuyan la respuesta del agonista. Un inconveniente de este tipo de moduladores podría ser su efecto limitado en pacientes que presenten disminuidos los niveles de activación endógena¹⁵⁰.

En términos generales, la interacción de un agonista con un canal iónico conduce a una transición conformacional desde el estado de reposo (canal cerrado) al estado activado (canal abierto). Dicha activación puede ser seguida de un retorno al estado de reposo, con la consiguiente disociación del agonista, o de una transición al estado desensibilizado (canal cerrado), en caso de que el agonista permanezca unido. Así, concentraciones altas de agonista pueden producir desensibilización en menos de 1 segundo. Sin embargo, algunos moduladores pueden reactivar el canal y no está del todo claro que esta reactivación requiera de la disociación del agonista.

Los moduladores alostéricos positivos (PAMs) de $\alpha 7$ pueden clasificarse como de tipo I o II¹⁵¹. Los primeros facilitan la transición del estado de reposo del receptor (canal cerrado) al estado activado (canal abierto), aumentando la respuesta del agonista. Por otra parte, los de tipo II estabilizan el estado activado (canal abierto) mejorando la respuesta del agonista y además disminuyendo drásticamente la desensibilización del receptor¹⁵¹.

Los primeros moduladores alostéricos descritos para los canales $\alpha 7$ fueron la ivermectina, un agente antiparasitario, el 5-hidroxiindol, la

galantamina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, y la genisteína, un inhibidor de tirosina quinasa (Figura 35). Esta primera generación de PAMs, de tipo I carece de la selectividad, potencia y eficacia adecuadas, aunque estudios posteriores llevaron al descubrimiento de una segunda generación que presentaba mejores propiedades en relación a estos aspectos¹⁵⁰. Así, el compuesto **2.1**, PAM de tipo I, fue capaz de revertir la disminución en el aprendizaje inducida por escopolamina en un modelo de memoria a largo plazo en ratas¹⁵². Otros PAM de tipo I son los compuestos **2.2** y **2.3** (Figura 35), aunque el primero también presentó actividad antagonista en receptores 5-HT_{2B/C} de serotonina¹⁵³. Además de su interés en modelos animales de esquizofrenia, estudios de comportamiento con **2.3** han permitido determinar la capacidad de los receptores $\alpha 7$ para influir directamente en la función cognitiva¹⁵⁴.

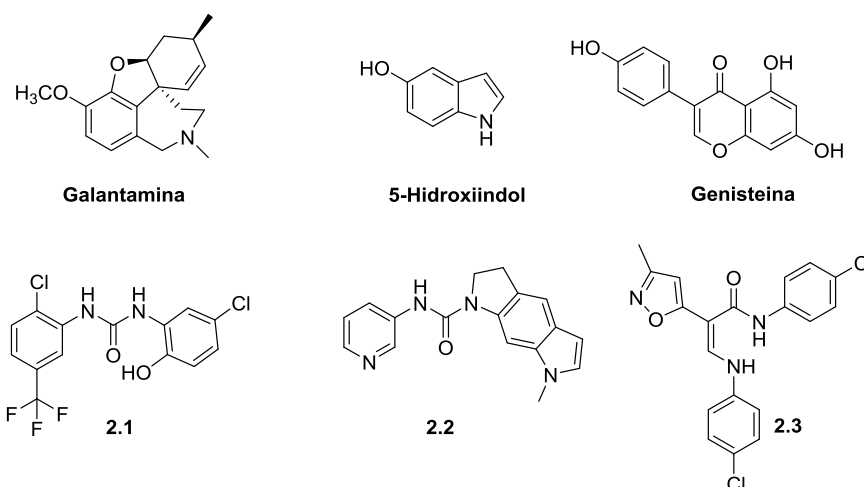


Figura 35. Ejemplos representativos de moduladores alostéricos positivos de tipo I, selectivos del receptor nicotínico $\alpha 7$.

En cuanto a los moduladores alostéricos positivos de tipo II, el compuesto **PNU-120596**¹⁵⁵, descrito por Pfizer (Figura 36), fue el primero en ser ensayado en animales, mostrando selectividad frente a los receptores $\alpha 7$.

Otros ejemplos representativos de este tipo de moduladores son los compuestos **2.4**¹⁵⁶, **2.5**¹⁵⁷ y **TQS**¹⁵⁸ también selectivos de $\alpha 7$ frente a $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$.

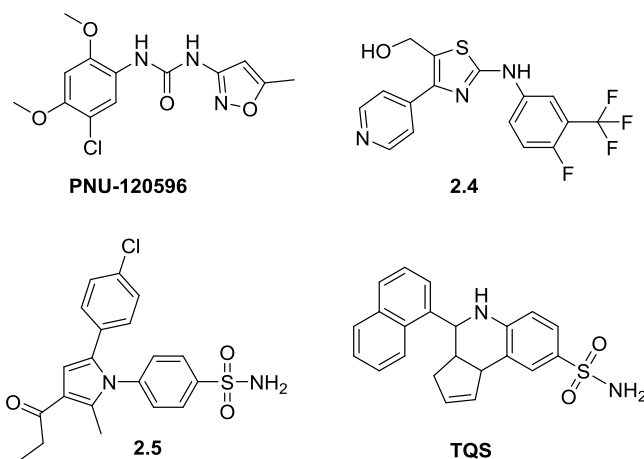


Figura 36. Ejemplos representativos de moduladores alostéricos positivos de tipo II, selectivos del receptor nicotínico $\alpha 7$.

Otro tipo de modulación de este sistema de canales es la modulación endógena mediada por proteínas pertenecientes a la familia de la Ly-6/urokinasa, activadora del receptor de plasminógeno (uPAR). Estas proteínas participan en distintos procesos biológicos como la transducción de señales, la adhesión celular y la activación de células inmunes. Dentro de esta superfamilia Ly6/uPAR destacan SLURP1 y SLURP2, encontradas en la circulación plasmática, y Lynx1 y Lynx2, que portan un resto de glicosilfosfatidilinositol¹⁵⁹. Estas proteínas presentan una gran homología con la α -bungarotoxina (antagonista selectivo para $\alpha 7$).

Entre los moduladores alostéricos negativos (NAMs) no se ha encontrado ninguno selectivo de $\alpha 7$. Sin embargo, sí están recogidos en la bibliografía algunos análogos de sulfonilpiperazina¹⁶⁰ y de benzamida¹⁶¹ que se comportan como NAMs selectivos de los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$.

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 Evaluación de una colección heterogénea de productos naturales como moduladores de canales nicotínicos

Con objeto de identificar nuevos quimiotipos capaces de interactuar con los receptores nicotínicos de ACh, el equipo del Prof. Manuel Criado de la Universidad Miguel Hernández (Alicante) llevó a cabo la evaluación frente a receptores nicotínicos de una quimioteca heterogénea de 240 compuestos naturales de bajo peso molecular (Greenpharma Natural compounds library). Los ensayos se realizaron en ovocitos que expresaban bien el receptor homomérico $\alpha 7$ o bien los receptores $\alpha 4\beta 2$ o $\alpha 3\beta 4$. A continuación, se midieron las respuestas generadas por la administración conjunta de ACh y los compuestos, en mezclas de 3 o 4 compuestos, y se compararon con la respuesta observada cuando se administraba solo acetilcolina. Los compuestos de las mezclas que mostraron resultados positivos se analizaron individualmente administrándose junto a acetilcolina. Uno de estos compuestos, isoliquiritigenina (**1**, Figura 37), se identificó como un modulador alostérico positivo selectivo de $\alpha 7$. Se trata de una chalcona polihidroxi sustituida que aumentaba aproximadamente seis veces la respuesta evocada por ACh.

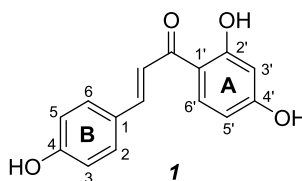


Figura 37. Estructura del compuesto Isoliquiritigenina.

A raíz de este resultado, se decidió realizar un estudio con una colección comercial de derivados de chalcona (**2-101**, Anexo I), de estructura análoga a la de isoliquiritigenina. En este caso, los compuestos se ensayaron individualmente, administrándose conjuntamente con acetilcolina. De esta

nueva colección, seis compuestos (**64**, **87**, **97**, **98**, **99**, **101**, Figura 38) mostraron actividad significativa como PAMs del receptor nicotínico $\alpha 7$, como se describirá con más detalle en el apartado 4.5. Estas chalconas presentan en su estructura al menos un grupo hidroxilo en el anillo A, con preferencia por dos grupos hidroxilo en posiciones 2',4' ó 2',5'. De entre todos ellos cabe destacar el compuesto **97** (4-OH, 2',5'-OH) (Figura 38) que fue aproximadamente 5 veces más potente que isoliquiritigenina.

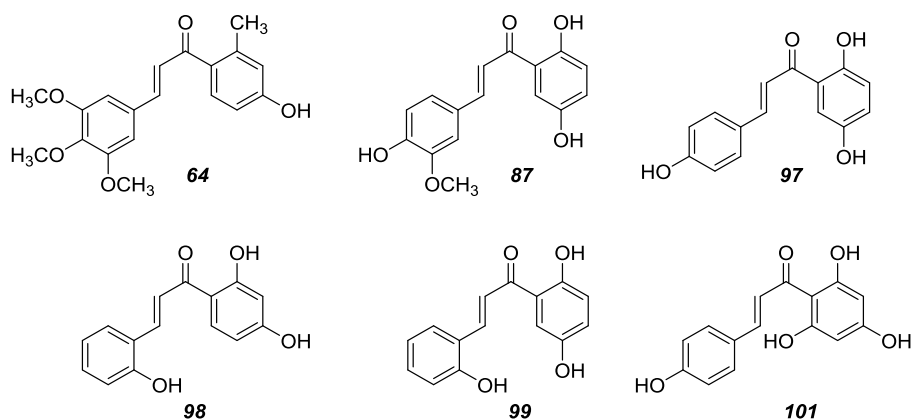


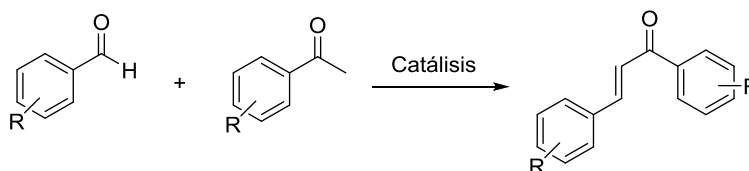
Figura 38. Estructura de los compuestos activos **64**, **87**, **97**, **98**, **99** y **101**

En base a los resultados de este estudio nos propusimos explorar en mayor profundidad las posibilidades de esta serie de PAMs de $\alpha 7$. Teniendo en cuenta el patrón de sustitución de los compuestos que mostraron mejores valores de actividad, parecía conveniente sintetizar nuevas chalconas, modificando tanto el número como la posición y naturaleza de los sustituyentes de los anillos aromáticos, con el fin de identificar nuevos moduladores alostéricos positivos más potentes y selectivos del receptor $\alpha 7$, así como mejorar su perfil farmacocinético.

2.2.2 Chalcona: Una Estructura privilegiada

2.2.2.1 Síntesis de chalconas

Las chalconas son compuestos aromáticos que poseen dos anillos de fenilo unidos por un espaciador que consiste en un grupo carbonilo α,β -insaturado. Comúnmente se sintetizan por condensación de Claisen-Schmidt¹⁶² entre acetofenonas y benzaldehídos, bajo condiciones de catálisis homogénea, generalmente básica (NaOH, KOH, Ba(OH)₂·8H₂O), o mediante el uso de ácidos de Lewis (Yb(OTf)₃, AlCl₃, F₃B·Et₂O) en disolventes orgánicos próticos (MeOH, EtOH) o 1,4-dioxano (Esquema 2).



Esquema 2. Condensación de Claisen-Schmidt

Existen otros métodos menos convencionales para la síntesis de chalconas como la acilación de Friedel-Crafts¹⁶³ a partir de acetofenona y benzaldehído en presencia de Al(Cl)₃, la reacción de Wittig¹⁶⁴, entre un hiluro estabilizado de trifenilbenzoilmetileno con diferentes aldehídos de tipo aromático, o la arilación oxidativa de alquenos terminales con aroil hidrazidas en presencia de Pd¹⁶⁵, entre otras. Estas técnicas menos convencionales pueden emplear catalizadores y reactivos como óxido de zinc, PEG-400, ZrCl₄, líquidos iónicos, etc¹⁶³.

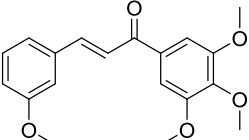
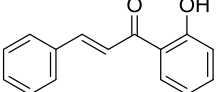
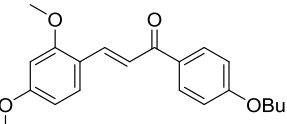
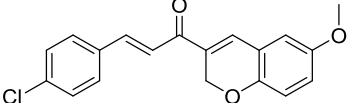
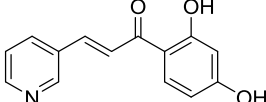
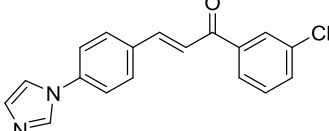
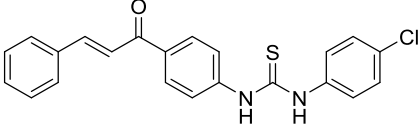
2.2.2.2 Actividad farmacológica

Las chalconas son precursoras de los flavonoides e isoflavonoides, moléculas que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo, lo cual les confiere una gran capacidad antioxidante y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. La notable diversidad estructural y funcional de los flavonoides ha

proporcionado las bases para la investigación en áreas que van desde la genética y la bioquímica a la salud humana. Además tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Las chalconas, a su vez, pueden ser consideradas como estructuras privilegiadas ya que se ha descrito que poseen múltiples aplicaciones terapéuticas. Presentan un amplio espectro de actividad biológica como por ejemplo actividad antitumoral^{166,169-172}, antiinflamatoria¹⁷³⁻¹⁷⁵, antibacteriana^{167,176,177}, antifúngica¹⁷⁸, analgésica¹⁷⁹ y antioxidante^{168,180}. Algunos ejemplos representativos de chalconas bioactivas quedan reflejados en la Tabla 14.

Tabla 14. Ejemplos representativos de chalconas con diferentes actividades farmacológicas

Estructura	Actividad Farmacológica
	Antiproliferativo ¹⁸¹
	Antiproliferativo ¹⁸²
	Antiinflamatorio ¹⁸³
	Antileishmania ¹⁸⁴
	Antimicrobiano ¹⁸⁵
	Antifúngico ¹⁸⁶
	Antinociceptivo ¹⁸⁷

Además, las chalconas pueden actuar como moduladores de canales iónicos. Existen algunos ejemplos descritos en la bibliografía de chalconas que actúan como bloqueantes de canales de K^+ voltaje-dependientes, como la sulfonato-chalcona **2.6**¹⁸⁸, que inhibe la corriente de K^+ alcanzando el máximo de inhibición después de 5 min. Este compuesto presentó interés para el

tratamiento de la desmielinización post-traumática de los axones de la medula espinal, contribuyendo a mejorar el impulso en neuronas desmielinizadas. También se describió la activación por sulfonato chalconas de canales TREK2, un canal de dos poros que presenta cuatro dominios transmembrana y que constituye una de las cuatro familias de los canales de K^+ . La activación de dichos canales presenta interés en dolor neuropático, neuroprotección y secreción de insulina¹⁸⁹.

Por otra parte, existen chalconas descritas como bloqueantes de canales de Ca^{2+} , destacando el compuesto **2.7**, que inhibe la contracción tónica producida por norepinefrina y fenilefrina¹⁹⁰. Este efecto indica que dicho compuesto se comporta como bloqueante de los canales de Ca^{2+} .

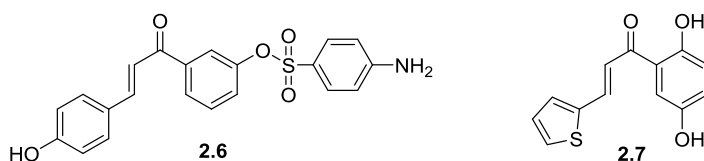


Figura 39. Derivados de chalcona con actividad moduladora de canales iónicos.

En nuestro conocimiento, hasta el momento no se han descrito en la bibliografía chalconas capaces de actuar como moduladores de canales nicotínicos.

2.3 OBJETIVOS

En base a los antecedentes comentados, el objetivo de este capítulo se centra en la búsqueda de nuevas chalconas o compuestos análogos, que tengan actividad como moduladores alostéricos del canal nicotínico $\alpha 7$. Se pretende mejorar la potencia y selectividad del prototipo referido previamente, **97**, e identificar nuevos análogos con mejor perfil farmacológico. Para ello, se propone la preparación de una colección de derivados de dicho compuesto **97**, llevando a cabo diferentes modificaciones:

- Variar el número y posición de los grupos OH, tanto en el anillo aromático A como en el anillo aromático B.
- Introducir en el anillo aromático B sustituyentes diferentes al grupo hidroxilo, así como sustituir este anillo por un sistema de indol.
- Modificar el sistema carbonílico α, β insaturado del espaciador.
- Realizar modificaciones que conlleven una mayor restricción conformacional.

Los compuestos de esta colección serán evaluados para medir su capacidad de modulación de la actividad inducida por acetilcolina en canales nicotínicos $\alpha 7$, lo que nos debería permitir establecer relaciones estructura-actividad. Los mejores compuestos serán sometidos a caracterización farmacológica adicional.

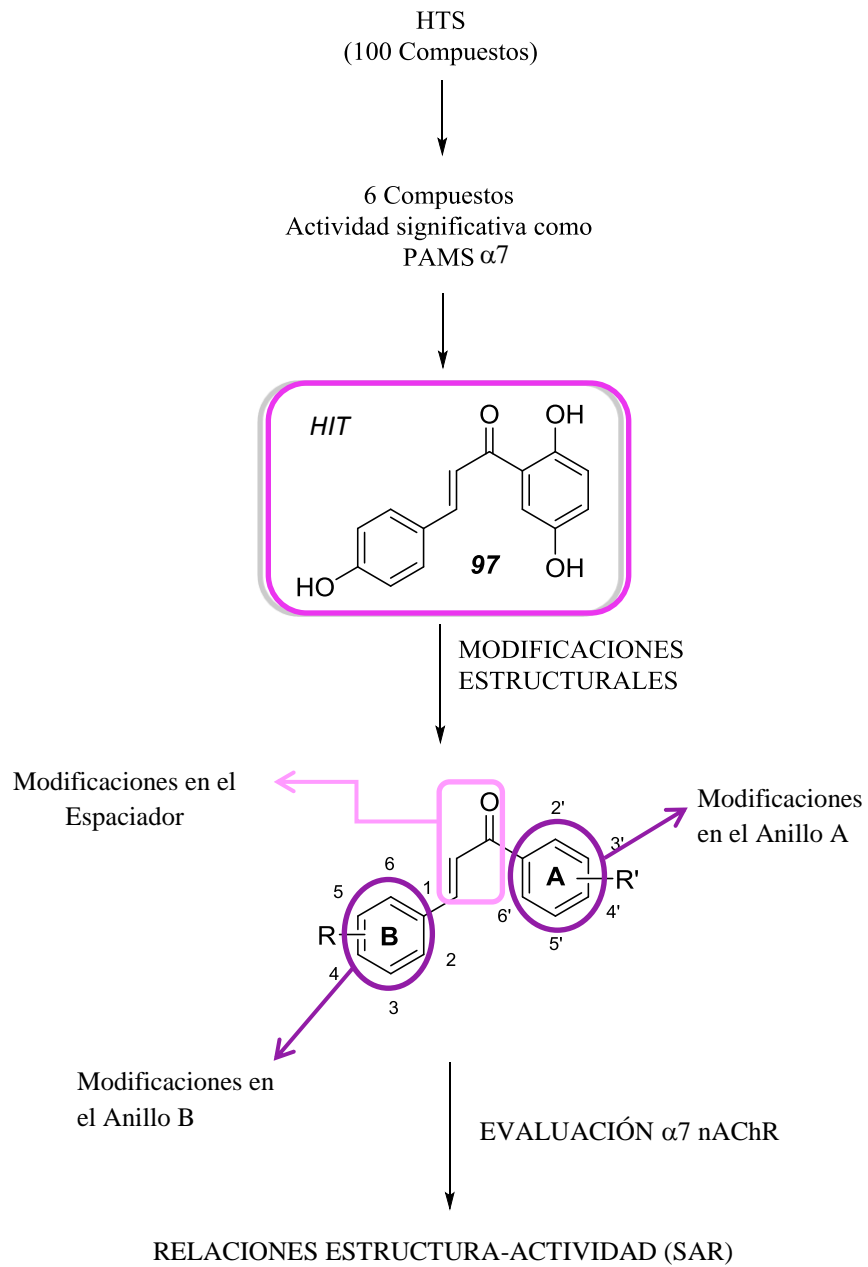
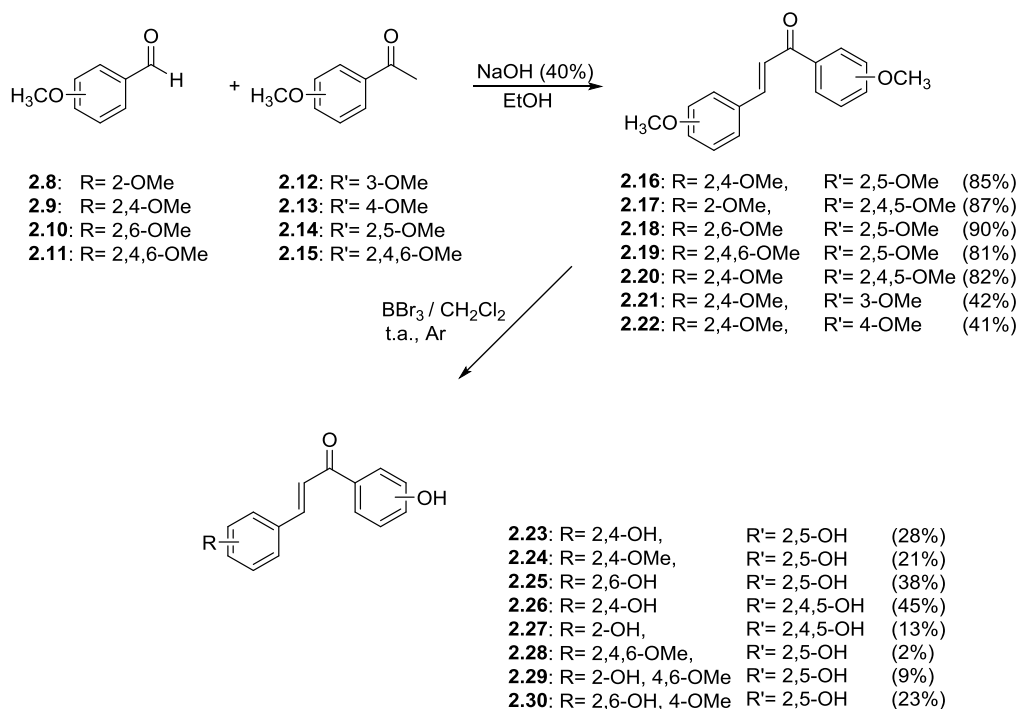


Figura 40. Representación gráfica de los objetivos

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Síntesis de Chalconas polihidroxiadas

De acuerdo con los objetivos propuestos, en primer lugar, nos planteamos la preparación de una serie de chalconas polihidroxiadas con el fin de determinar el número de grupos hidroxilo que dan lugar a los mejores resultados de actividad biológica, así como las posiciones óptimas de sustitución en los anillos aromáticos. En general, se ha mantenido la sustitución en posiciones 2' y 5' del anillo A, dado que los mejores resultados del cribado de la colección de chalconas comerciales se obtuvieron con los grupos OH situados en estas posiciones. La síntesis de las chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas) objeto de estudio, se realizó en dos etapas (Esquema 3). En primer lugar se sintetizaron los derivados metoxilados **2.16-2.22** siguiendo la reacción de condensación de Claisen-Schmidt, a partir del correspondiente benzaldehído con la acetofenona apropiada, bajo condiciones de catálisis básica (NaOH, 40%) en EtOH. Una vez aisladas las metoxi chalconas, en una segunda etapa se llevó a cabo la desprotección de los grupos metoxilo utilizando BBr_3 (1M) en DCM bajo atmósfera inerte¹⁹¹, dando lugar a las chalconas polihidroxiadas **2.23-2.30** (Esquema 3).



Esquema 3

Los derivados metoxilados **2.16-2.22** se purificaron mediante cristalización de MeOH, obteniéndose con alta pureza y buenos rendimientos en general. Estos compuestos han sido caracterizados mediante técnicas de HPLC, EM, y RMN. En los espectros de $^1\text{H-RMN}$ se observan las señales correspondientes a los protones del doble enlace del sistema carbonílico α , β -insaturado en el entorno de 7.5-8.0 ppm con una constante de acoplamiento de 15.6-16.0 Hz, lo que indica que el doble enlace generado presenta configuración E (*trans*).

Una vez preparados los derivados metoxilados se procedió a la desprotección de los grupos metoxilo por tratamiento con BBr_3 . Según describen McOmie y col.¹⁹¹, la cantidad de equivalentes de BBr_3 necesaria para completar la reacción de desprotección depende del número de grupos metoxilo a desproteger, utilizándose un equivalente por cada grupo metoxilo.

Además los autores recomiendan el uso de un equivalente adicional por cada nitrógeno potencialmente básico y por cada oxígeno presente en la molécula. Sin embargo, en nuestro caso al utilizar la cantidad recomendada de BBr_3 , se aislaron productos parcialmente desprotegidos. Así, la desprotección del compuesto **2.16** con 5 equivalentes de BBr_3 dio lugar tanto al compuesto esperado **2.23**, como al producto **2.24**, en el que únicamente había tenido lugar la desprotección de los grupos metoxilo del anillo A. La posición de los grupos metoxilo en este último compuesto se determinó mediante experimentos de RMN heteronucleares de correlación C-H a dos o tres enlaces (HMBC). Así, se observó correlación entre los protones del OMe en posición 2 del anillo B con el C_α (δ : 109.58 ppm) y del OMe en posición 4, también del anillo B, con el carbono de la posición 6 (δ : 130.66 ppm), que confirmaron que ambos grupos metoxilo se encontraban en el anillo aromático B.

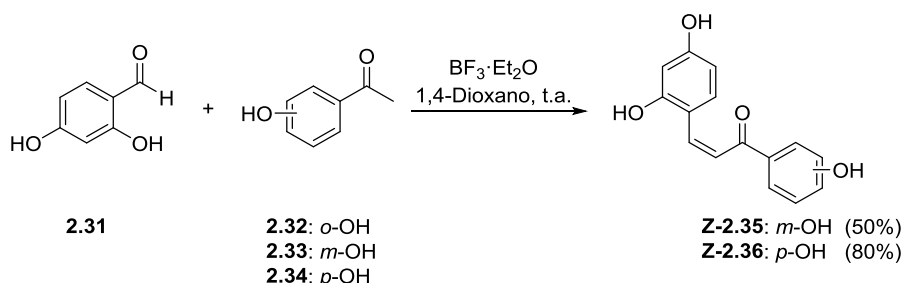
En el caso de la desmetilación de **2.19** se aislaron los compuestos **2.28-2.30**, todos ellos parcialmente desprotegidos en el anillo B de la chalcona, mientras que el compuesto totalmente hidroxilado no se consiguió aislar. En base a estos resultados, para obviar la formación de compuestos parcialmente desprotegidos, se decidió utilizar 2 equivalentes de BBr_3 por cada grupo metoxilo a desproteger y otros 2 equivalentes por cada nitrógeno y oxígeno presentes en la molécula, obteniéndose los compuestos **2.25-2.27** satisfactoriamente, aunque con rendimientos de moderados a bajos.

Los productos hidroxilados finales se purificaron por cromatografía flash en fase reversa usando mezclas de acetonitrilo y agua como eluyente. El bajo rendimiento con el que se obtienen los productos se podría explicar por la baja solubilidad de estos compuestos en el proceso de siembra, lo que dificultó su purificación. Además, los intentos de purificación mediante

cristalización fueron infructuosos debido a la inestabilidad de estos compuestos polihidroxiados al calentar.

La confirmación de la estructura y posición de los grupos metoxilo en los compuestos **2.28-2.30** se realizó de nuevo mediante experimentos de RMN heteronucleares de correlación C-H a dos o tres enlaces (HMBC).

La obtención de los derivados hidroxiados mono sustituidos en el anillo A, a partir del 2,4-dimetoxibenzaldehído **2.9** y las acetofenonas **2.12** y **2.13** respectivamente, siguiendo el procedimiento habitual, dio lugar a los compuestos **2.21** y **2.22**, siendo imposible la desprotección de éstos por tratamiento con BBr_3 , por lo que se recurrió a una ruta alternativa. En primer lugar, se intentó la condensación de los productos desprotegidos 2,4-dihidroxibenzaldehído y la correspondiente monohidroxiacetofenona, bajo las condiciones habituales con NaOH (40%) en EtOH. Sin embargo, no se llegaron a formar los compuestos deseados, por lo que se llevó a cabo un estudio de diferentes condiciones de reacción. En primer lugar se empleó $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ como base¹⁹², sin embargo, tampoco se obtuvieron los derivados polihidroxiados buscados. Por otra parte, también se realizó sin éxito la condensación usando como alternativa catálisis ácida, con ácidos de Lewis como por ejemplo $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ y AlCl_3 ¹⁹³. Finalmente el uso de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en las condiciones descritas por Narender y *col.*¹⁹⁴ permitió la obtención de los derivados *m*- y *p*-hidroxiados **2.35** y **2.36**. Sin embargo, el derivado *o*-hidroxiado tampoco pudo obtenerse por este procedimiento, recuperándose en este caso los productos de partida inalterados, **2.31** y **2.32** (Esquema 4).

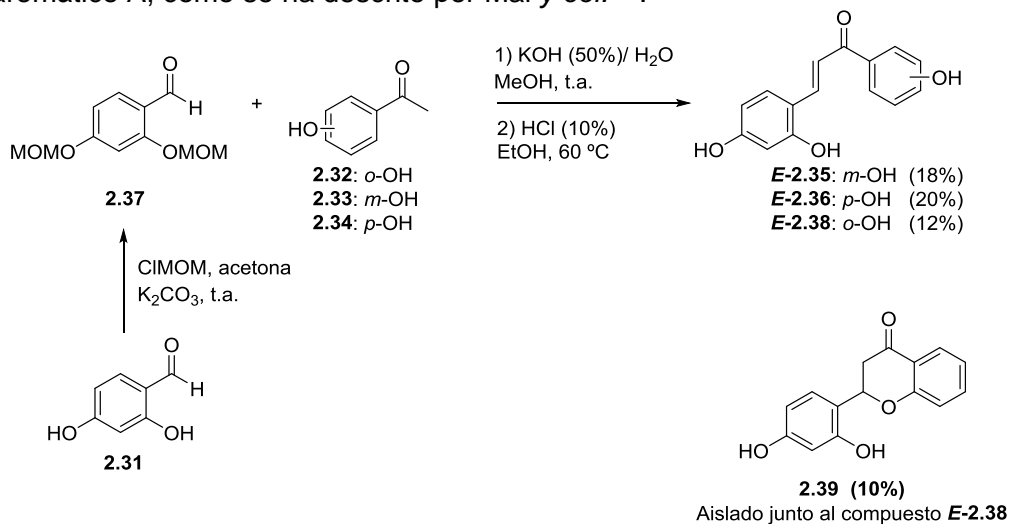


Esquema 4

Estos compuestos fueron caracterizados mediante las técnicas habituales. Es de destacar que en estas condiciones de reacción se obtuvieron los isómeros *Z*, un resultado diferente al obtenido bajo condiciones de catálisis básica, en las que siempre se había observado la formación de los isómeros *E*. Así, en los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de **Z-2.35** y **Z-2.36** aparecen las señales correspondientes a los protones del doble enlace en el entorno de 7.5-8.0 ppm con una constante de acoplamiento de 8.8 Hz.

A la vista de estos resultados, y con el fin de obtener el isómero *E* de estos compuestos, se siguió el método descrito por Kim y *col*¹⁹⁵, que consistía en llevar a cabo la protección de los grupos hidroxilo con metil clorometil éter (MOMCl) antes de proceder a la condensación (dada la baja reactividad de los aldehídos con hidroxilos libres en la condensación aldólica en medio básico). Así, en primer lugar, se preparó el aldehído MOM protegido **2.37** y a continuación se realizó su condensación con la correspondiente acetofenona monohidroxilada en las condiciones habituales, seguido de una segunda etapa de desprotección del grupo MOM por tratamiento con HCl (10%). Este procedimiento permitió la obtención de los compuestos deseados **E-2.35**, **E-2.36** y **E-2.38**, aunque el rendimiento global de las dos etapas fue bajo. En el caso del *o*-hidroxi derivado **E-2.38**, se formó además el subproducto **2.39**, aislado también del medio de reacción. La formación de flavanonas en medio

ácido es muy común a partir de chalconas *orto*-hidroxi sustituidas en el anillo aromático A, como se ha descrito por Mai y *col.*¹⁹⁶.



Esquema 5

En los espectros de ¹H-RMN de los derivados **E-2.35**, **E-2.36** y **E-2.38** se observan las señales correspondientes a los protones del doble enlace del sistema carbonílico α,β-insaturado, en el entorno de 7.5-8.0 ppm con una constante de acoplamiento de 15.4-15.9 Hz, lo que demuestra que los compuestos formados por este método se corresponden a los isómeros *E*. En el espectro de ¹H-RMN del compuesto **2.39** se pudo observar la aparición de un sistema ABX, correspondiente a los protones alifáticos del nuevo anillo formado y la desaparición de los protones correspondientes al doble enlace.

Durante un estudio de solubilidad en tampón PBS a pH 7.4 con el compuesto **E-2.23** se constató que con el tiempo este compuesto se transformaba parcialmente en su correspondiente isómero Cis **Z-2.23** (proporción aproximada del 40% en 7 días). Esta conversión puede deberse a la fotoisomerización de la chalcona *E* por la luz, tal y como se ha descrito en la bibliografía, donde se indica que la isomerización *E/Z* puede ser reversible, dependiente del pH y de la luz UV¹⁹⁷. Este tipo de transformación también ha

podido correlacionarse con los sustituyentes existentes en los anillos A y B de la molécula¹⁹⁸ (Esquema 6). La isomerización se repitió a escala preparativa para disponer de cantidad de **Z-2.23** y poder evaluar la influencia de la estereoquímica del doble enlace en la actividad moduladora de $\alpha 7$.

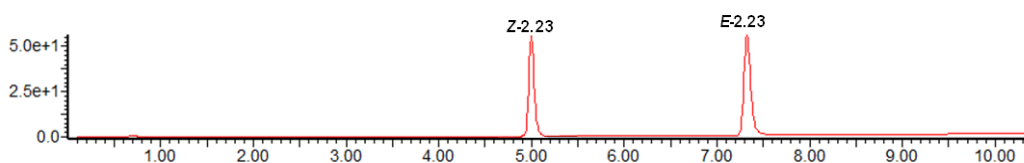
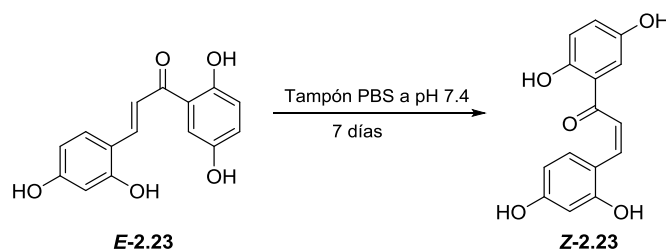


Figura 41. A) Cromatograma de la mezcla de isómeros **E-2.23** y **Z-2.23** (25 °C, 7 días).

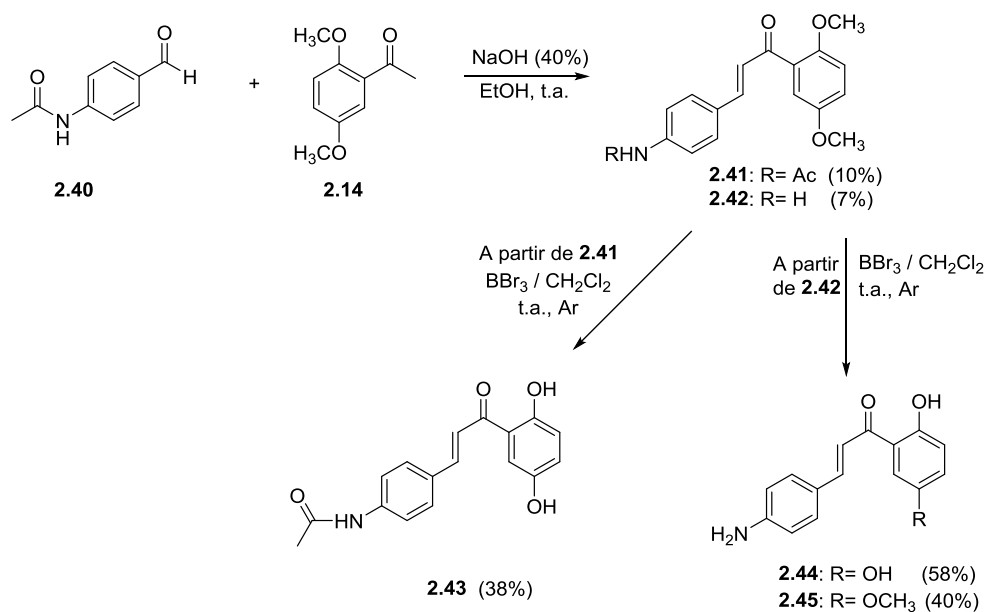
2.4.2 Modificaciones en el anillo aromático B

2.4.2.1 Introducción de un grupo acetamido

Con el fin de determinar la importancia de los grupos hidroxilo en la actividad, se pensó en la sustitución del hidroxilo de la posición 4 por un grupo acetamido en el anillo B de la chalcona prototipo **97**. Un grupo NH situado en la misma posición podría jugar un papel similar al del grupo OH, pudiendo establecer, en su caso, el mismo tipo de interacciones con el receptor.

Siguiendo las mismas condiciones de condensación aldólica y posterior desmetilación descritas en el apartado 2.4.1, se llevó a cabo la reacción de la 2,5-dimetoxiacetofenona (**2.14**) con 4-acetamidobenzaldehído (**2.40**) para dar

lugar a la formación de la 4-acetamidochalcona buscada **2.41**. También se obtuvo la 4-aminochalcona **2.42**, resultante de la desacetilación del grupo amino durante la reacción de condensación (Esquema 7). El posterior tratamiento con BBr_3 de **2.41** condujo a la acetamidochalcona deseada **2.43**, mientras que un tratamiento similar de **2.42** permitió el aislamiento de la aminochalcona hidroxilada **2.44**, junto con el derivado parcialmente desprotegido **2.45**.



Esquema 7

Los derivados acetamidochalcona y aminochalcona metoxilados **2.41** y **2.42** se purificaron por cromatografía en gel de sílice obteniéndose con un alto grado de pureza, aunque en rendimientos bajos. La purificación de los derivados hidroxilados **2.43**, **2.44** y **2.45** se realizó en fase reversa, obteniéndose con rendimientos moderados. Los espectros de MS y RMN confirmaron en todos los casos la formación de los compuestos indicados.

En cuanto a la elucidación estructural de **2.45**, está descrito que el desplazamiento químico de los grupos hidroxilo en posición *orto* al CO en chalconas (~12 ppm) es mayor que en posición *meta* (~9 ppm)¹⁹⁹. La posición del grupo OH libre en **2.45** se asignó en base a esta regla, ya que en el espectro de ¹H-RMN se observó solo una señal a 12.71 ppm, mientras que en el espectro del análogo **2.44**, totalmente desprotegido, se observaron dos señales a 12.37 y a 9.11 ppms. Además, experimentos heteronucleares de RMN de correlación C-H a dos o tres enlaces (HMBC) permitieron determinar de forma inequívoca la posición ocupada por el grupo OH en el anillo A. Así, se observaron correlaciones entre el protón del OH a δ : 12.35 ppm y los carbonos de las posiciones 1' (δ : 120.2 ppm) y 3' (δ : 118.5 ppm) que confirmaron que el grupo OH se encuentra en la posición 2'.

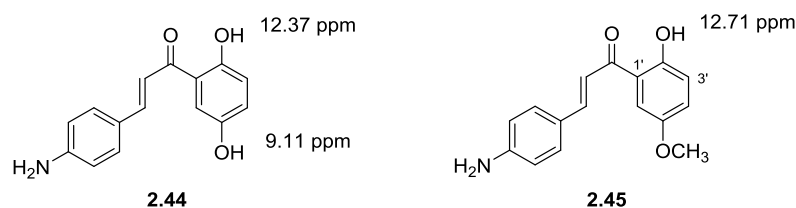


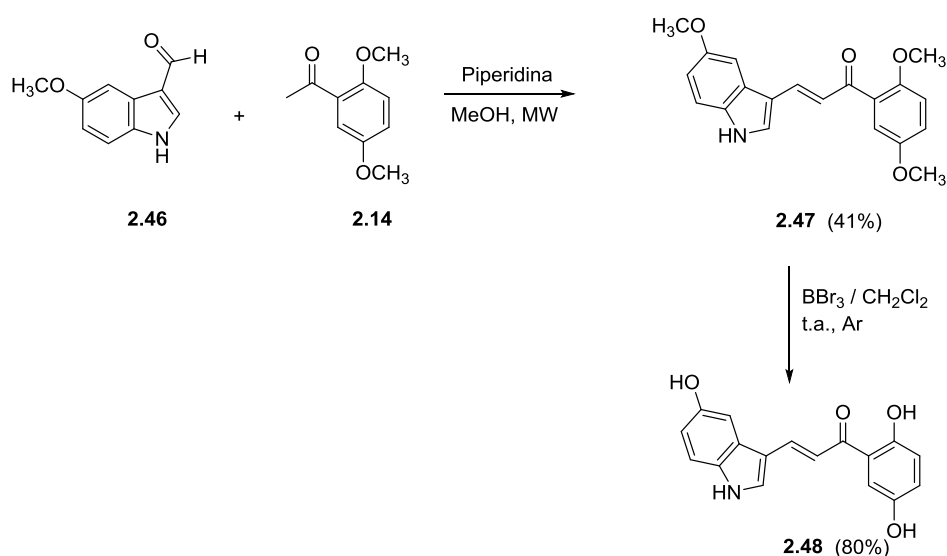
Figura 42. Desplazamientos químicos de los grupos fenol en los compuestos **2.44** y **2.45**.

2.4.2.2 Sustitución del anillo B por Indol

Teniendo en cuenta la actividad mostrada por el 5-hidroxiindol como PAM de tipo I del receptor nicotínico $\alpha 7^{200}$, otra de las modificaciones que se llevaron a cabo fue la sustitución del anillo aromático B por 5-hidroxi-indol.

La síntesis de este derivado se intentó en primer lugar por condensación de 2,5-dimetoxiacetofenona (**2.14**) con 5-metoxindol-3-carboxaldehído (**2.46**) bajo las condiciones habituales de catálisis básica (NaOH (40%) en EtOH). Sin embargo, la condensación no se producía ni a temperatura ambiente, ni calentando a 80 °C, observándose por HPLC la presencia exclusiva de los productos de partida. Se planteó después como

método alternativo de síntesis el descrito por Michael y *col.*²⁰¹, usando piperidina como base en MeOH a reflujo. Sin embargo, esta nueva ruta tampoco nos llevó al compuesto deseado **2.47**. Finalmente, el empleo de piperidina en MeOH bajo radiación microondas condujo al compuesto **2.47** con rendimiento moderado. El posterior tratamiento con BBr_3 dio lugar al derivado trihidroxilado **2.48** con un 80% de rendimiento (Esquema 8).



Esquema 8

Estas chalconas derivadas de indol **2.47** y **2.48** se identificaron en base a sus datos analíticos y espectroscópicos. De nuevo en este caso el producto formado fue el isómero de configuración *E*, como se dedujo de los valores de las constantes de acoplamiento para los protones del sistema α,β -insaturado.

2.4.3 Modificaciones en el espaciador

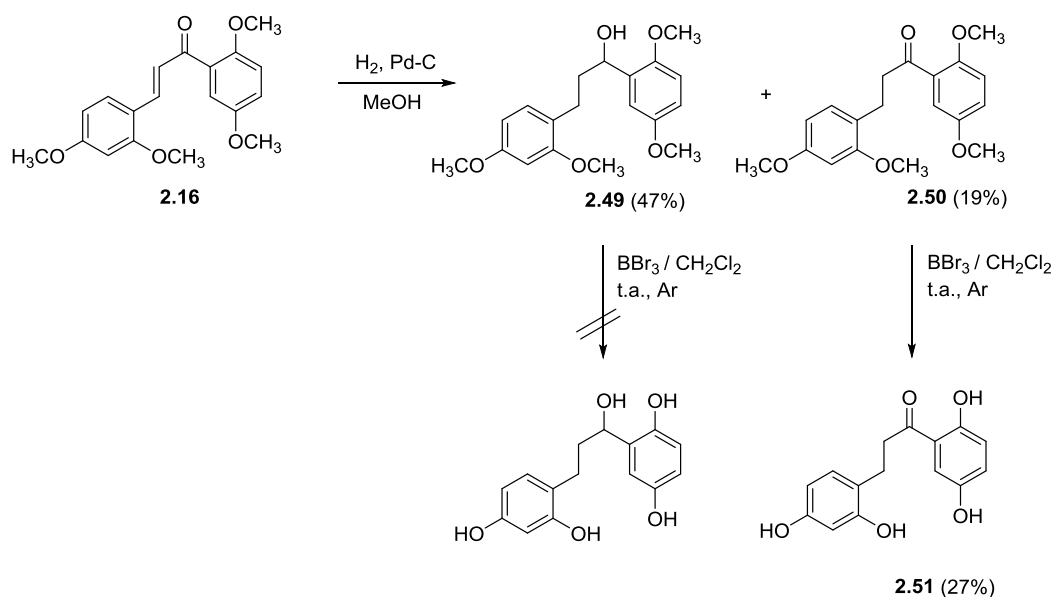
Otra región a explorar en el sistema chalcona, con miras a establecer relaciones estructura-actividad, es el espaciador que une los dos anillos aromáticos. Estas modificaciones permitirán determinar la importancia de la cadena de cetona α,β -insaturada para la interacción con el receptor nicotínico

$\alpha 7$. Con este fin nos planteamos en primer lugar la reducción del doble enlace, así como la del grupo carbonilo y, adicionalmente, se ha preparado un compuesto en el que se ha introducido en el espaciador un anillo de pirrol.

Como prototipo de estas modificaciones se eligió el compuesto **2.23** que, como se verá más adelante en el apartado 4.5, era el que había dado mejores resultados como PAM de los receptores $\alpha 7$.

2.4.3.1 Reducción del doble enlace

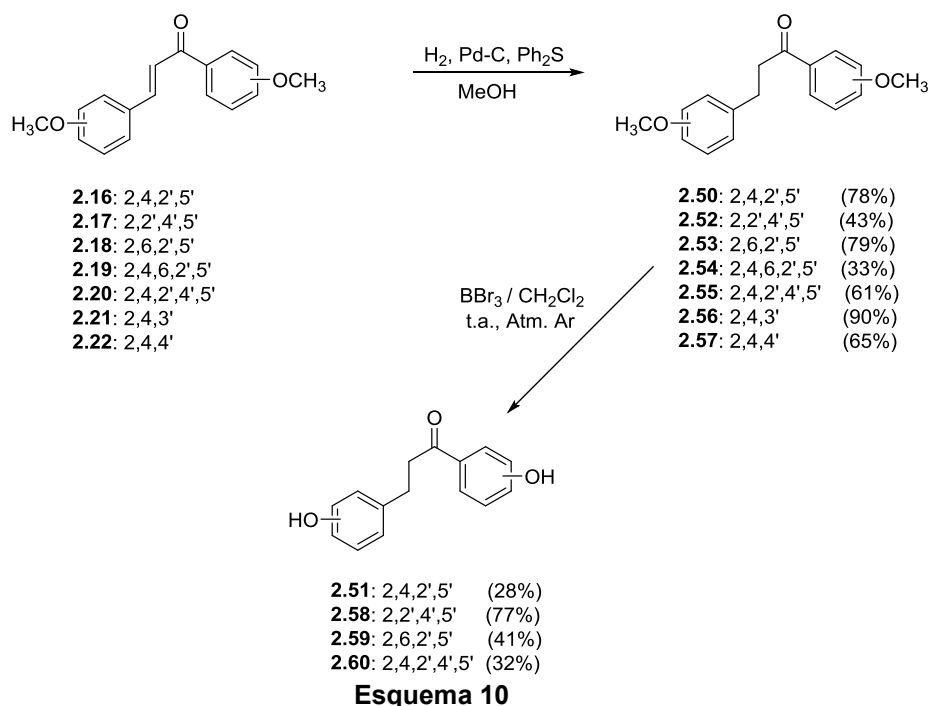
En primer lugar se tanteó la reducción del doble enlace de la cadena del sistema α, β -insaturado intentando mantener intacto el grupo carbonilo. Un primer experimento se realizó mediante hidrogenación catalítica usando Pd-C en MeOH. Esta reacción condujo mayoritariamente al producto **2.49** fruto de la reducción del doble enlace y del grupo carbonilo, además del compuesto deseado **2.50**, obteniéndose en una proporción 2:1, respectivamente. Ambos productos fueron aislados y, una vez separados, tratados con BBr_3 para dar lugar a los correspondientes derivados hidroxilados. Se obtuvo así el compuesto **2.51** a partir de **2.50**, pero no fue posible aislar el derivado hidroxilado del compuesto **2.49**, debido a la descomposición observada.



Esquema 9

Dada la baja proporción en la que se obtuvo el derivado deseado **2.51**, se procedió a la búsqueda de un método alternativo de síntesis que permitiera su obtención con mejor rendimiento. Según Mori y *col.*²⁰², el uso de difenilsulfuro (Ph_2S) durante la hidrogenación con Pd-C permite la reducción selectiva del doble enlace, evitando la reducción adicional del grupo carbonilo. Por lo tanto, se procedió a la hidrogenación de **2.16** en dichas condiciones, llegándose a la obtención de **2.50** como único producto de reacción, con buen rendimiento.

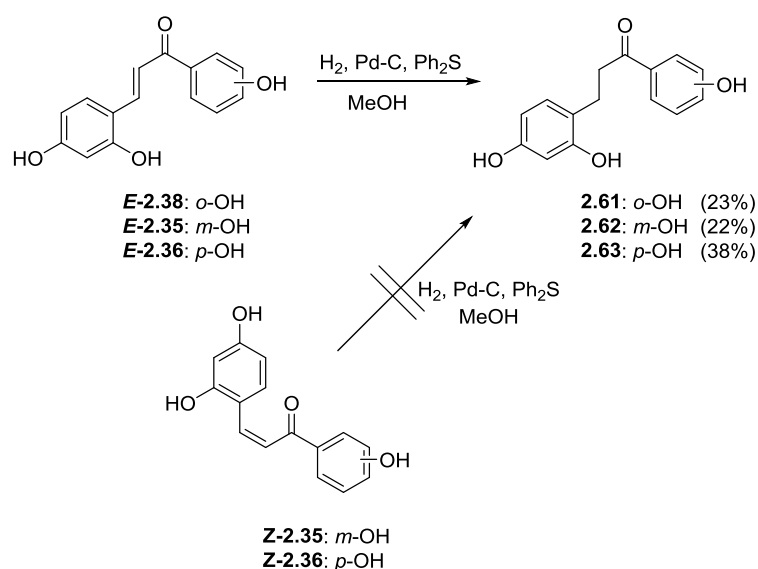
Teniendo en cuenta que, como se verá más adelante, el compuesto **2.51** resultó ser activo frente al receptor nicotínico $\alpha 7$, se planteó la preparación de los análogos saturados correspondientes a todos los derivados hidroxilados sintetizados hasta el momento (Esquema 10).



Los derivados metoxilados intermedios **2.50**, **2.52-2.57** se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice, obteniéndose con alta pureza y rendimientos de moderados a excelentes. En los espectros de ¹H-RMN de los derivados **2.50**, **2.52-2.57** cabe destacar la desaparición de los protones del doble enlace y la aparición de dos nuevas señales correspondientes a los grupos CH₂, en el entorno de 2.7-3.2 ppm.

La desprotección posterior de los grupos metoxilo bajo las mismas condiciones empleadas anteriormente, con BBr₃ en DCM, condujo a los derivados hidroxilados **2.51**, **2.58-2.60**, que fueron obtenidos con rendimientos variables tras ser purificados mediante cromatografía flash en fase reversa. Todos ellos fueron caracterizados mediante las técnicas habituales. Desafortunadamente, los hidroxilados correspondientes a los compuestos **2.54**, **2.56** y **2.57** no pudieron aislarse en forma pura tras el tratamiento habitual con BBr₃, obteniéndose mezclas imposibles de separar.

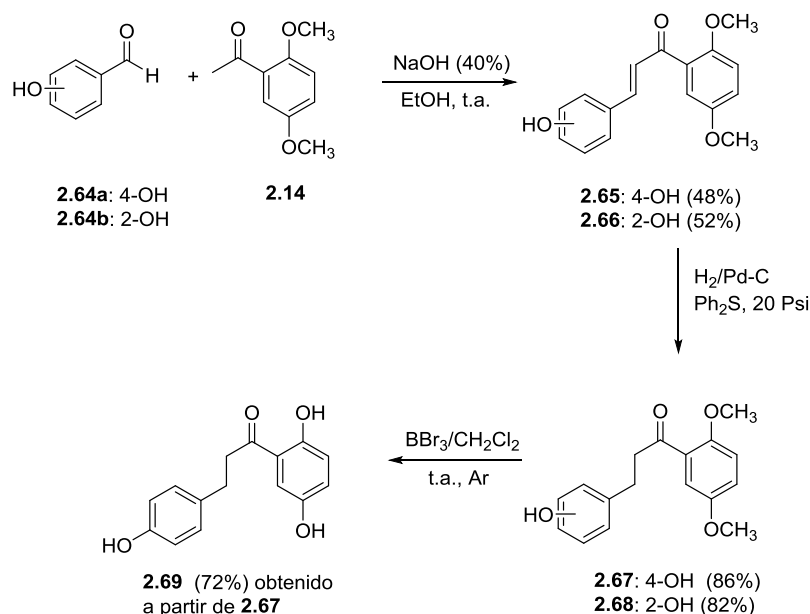
Por otra parte, los compuestos **2.61-2.63**, monohidroxilados en el anillo A, se obtuvieron por hidrogenación de los correspondientes precursores polihidroxilados **E-2.35**, **E-2.36** y **E-2.38** utilizando el mismo método comentado anteriormente (Pd-C/H₂, Ph₂S) (Esquema 11). Estos compuestos se intentaron preparar también por hidrogenación de los correspondientes isómeros **Z-2.35** y **Z-2.36**. Sin embargo, en ambos casos se recuperaron los compuestos de partida inalterados.



Esquema 11

Adicionalmente, y con el fin de completar las relaciones estructura-actividad, se decidió preparar los derivados saturados del compuesto prototipo **97** y de **94**, monosustituídos en el anillo B (Esquema 12). Para ello, primeramente se condensaron los intermedios **2.64** y **2.14** para dar lugar a las chalconas **2.65** y **2.66**. La hidrogenación selectiva del doble enlace, en las condiciones ya comentadas condujo a los derivados reducidos **2.67** y **2.68**. Finalmente, ambos compuestos fueron sometidos a la reacción de desmetilación. Mientras el compuesto **2.69**, análogo reducido de **97**, se

obtuvo con buen rendimiento, el análogo reducido de **94** no pudo obtenerse tras el tratamiento de **2.68** con BBr_3 , recuperándose el producto de partida inalterado.



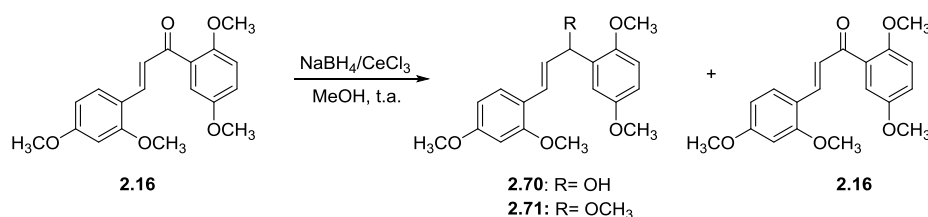
Esquema 12

2.4.3.2 Reducción del grupo carbonilo y derivados de oxima

Otra de las modificaciones que nos planteamos fue la reducción del grupo carbonilo, o la formación de un derivado del mismo, para determinar su importancia en la actividad biológica.

En primer lugar se intentó la reducción del grupo carbonilo del compuesto **2.16** mediante tratamiento con NaBH_4 en THF a temperatura ambiente, aunque no se observó reacción y se recuperó el producto de partida inalterado. También se intentó la reacción descrita por Luche²⁰³ para la reducción selectiva del grupo carbonilo en derivados α,β -insaturados, que implica el uso de NaBH_4 y CeCl_3 en MeOH a temperatura ambiente. Tras varias tentativas, modificando el tiempo y la temperatura de la reacción, el

compuesto deseado **2.70** se obtuvo en una mezcla con el derivado metoxilado **2.71** y producto de partida inalterado. Sin embargo, dicha mezcla no pudo ser separada por los métodos cromatográficos habituales (Esquema 13), por lo que, finalmente, el compuesto **2.70** no pudo ser aislado en forma pura.



Por otra parte, también se intentó modificar el grupo carbonilo por formación de la correspondiente oxima. La reacción del compuesto **2.20** con hidroxilamina en piridina a 60 °C, siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía para la preparación de oximas derivadas de chalcona²⁰⁴, no permitió aislar el compuesto deseado, sino que se obtuvo una mezcla de compuestos (HPLC-MS) que no se consiguió separar, ni tampoco identificar mediante ¹H-RMN.

2.4.3.3 Derivados de Pirrol

Eligiendo como modelo el compuesto **2.23**, 2,4,2',5'-tetrahidroxisustituído, en base a los datos de actividad biológica de que ya disponíamos, y aprovechando la reactividad del doble enlace del conector α,β -insaturado se decidió abordar la preparación de análogos en los que se introdujera un anillo heterocíclico en el espaciador, concretamente un anillo de pirrol. Esta modificación llevaría a derivados pirrólicos que presentarían cierta analogía con algunos productos descritos como PAM del receptor nicotínico $\alpha 7$ ^{157,205}.

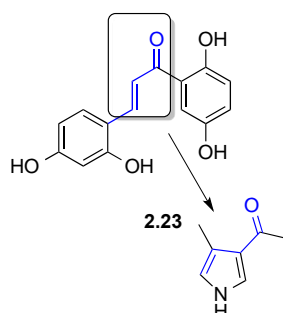
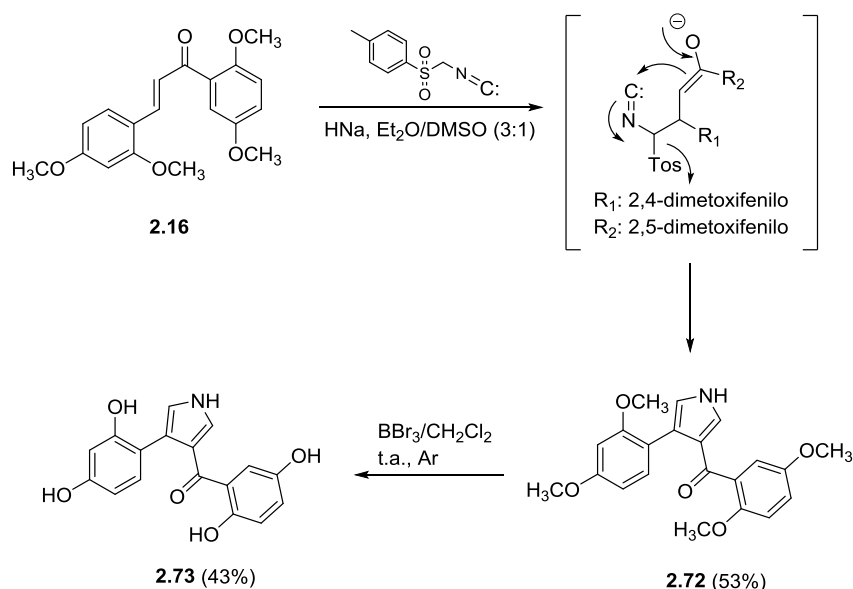


Figura 43. Estructura del compuesto elegido como patrón y modificaciones propuestas para la cadena de unión de los anillos aromáticos.

El reactivo TosMIC (isocianuro de *p*-toluenosulfonilmetilo) es de uso común en química de heterociclos para la síntesis de pirroles, oxazoles, imidazoles y tiazoles, siguiendo un mecanismo de reacción que se basa en la acidez de los protones en alfa a la sulfona y en el carácter de buen grupo saliente del tosilo. Así, se hizo reaccionar la chalcona **2.16** con TOSMIC en presencia de NaH, usando como disolvente una mezcla de Et₂O/DMSO (3:1), lo que llevó al compuesto **2.72** (Esquema 14)²⁰⁶. La reacción utilizada, conocida como de Van Leusen, podría tener lugar mediante adición Michael del carbanión de Tosmic, generado por tratamiento con base (NaH en nuestro caso), al carbono beta de la chalcona, posterior ataque del enolato sobre el carbono del isocianuro, eliminación de tosilo y por último transposición 1,3 de hidruro para dar el 1H-pirrol, aunque también se ha postulado que podría ocurrir a través de una cicloadición 3+2^{207,208}. El tratamiento del compuesto **2.72** con BBr₃ condujo a su derivado hidroxilado **2.73**.

El compuesto **2.72** se purificó por cromatografía en gel de sílice, mientras que la purificación del derivado hidroxilado **2.73** se realizó por cromatografía flash en fase reversa.



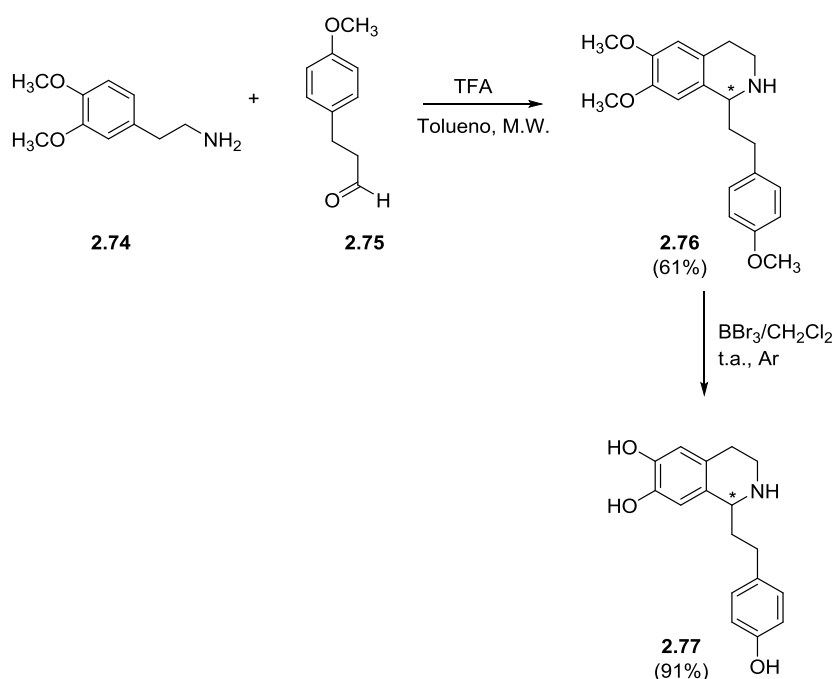
Esquema 14

Por otra parte, también se intentó, aunque sin éxito, la preparación del compuesto en que el espaciador fuese un anillo de pirazol. Sin embargo, en la reacción de **2.16** con trimetil silil diazometano²⁰⁹ se obtuvo una mezcla compleja de compuestos que no pudieron ser identificados por HPLC-MS.

2.4.3.4 Otras modificaciones: Derivados de tetrahydroisoquinolina y tetrahydro- β -carbolina

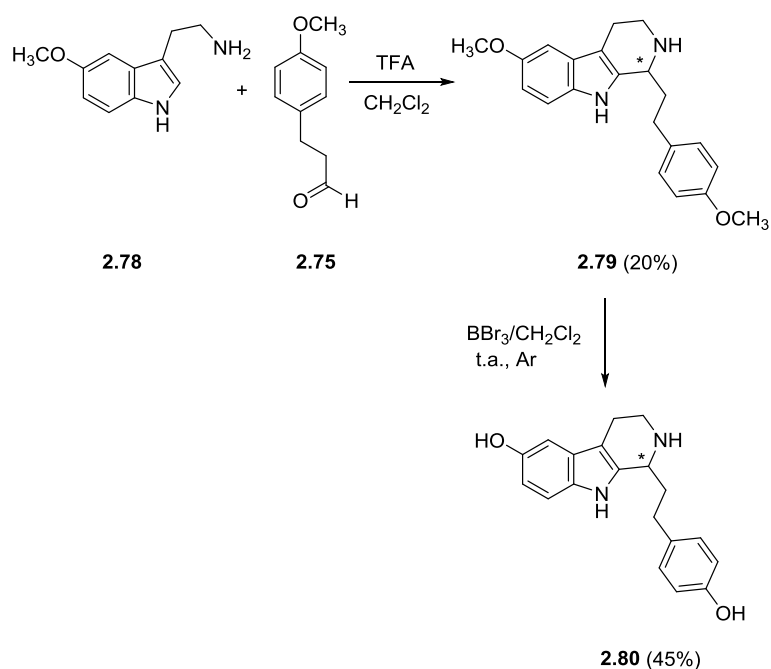
Por último, para intentar encontrar nuevos quimiotipos capaces de modular al receptor nicotínico $\alpha 7$, se diseñaron análogos de hidroxitetrahydroisoquinolina e hidroxitetrahydro- β -carbolinas. Algunos derivados de estos heterociclos se encuentran recogidos en la bibliografía como antagonistas no competitivos de $\alpha 7$, aunque no son selectivos²¹⁰. Los compuestos diseñados mantienen 3 átomos de carbono como espaciador entre los anillos aromáticos que portan los hidroxilos y pueden considerarse como análogos conformacionalmente restringidos en la parte equivalente al anillo A de los derivados de chalcona.

La síntesis del derivado de tetrahydroisoquinolina **2.76**, objeto de estudio, se ha llevado a cabo por reacción de condensación de Pictet Spengler²¹¹ entre la 3,4-dimetoxifenetilamina (**2.74**) y el derivado de fenilpropionaldehído **2.75** en presencia de TFA, bajo radiación microondas. El tratamiento posterior de **2.76** con BBr_3 proporcionó el derivado hidroxilado **2.77** por desprotección de los grupos metoxilo (Esquema 15).



Esquema 15

La síntesis del derivado de tetrahydro- β -carbolina **2.79** se realizó también por reacción de condensación de Pictet Spengler entre la 5-metoxitriptamina (**2.78**) y el derivado de fenilpropionaldehído **2.75** bajo condiciones de catálisis ácida en CH_2Cl_2 . El compuesto obtenido, **2.79**, tras purificación cromatográfica se trató con BBr_3 para dar lugar a su derivado hidroxilado **2.80**, que fue purificado por cromatografía flash en fase reversa (Esquema 16).

**Esquema 16**

Todos los compuestos de este apartado, que se obtuvieron como mezclas racémicas, han sido caracterizados mediante las técnicas habituales, de MS y ^1H y ^{13}C -RMN. Cabe destacar que la señal del H en posición 1 de estos compuestos se observa en torno a 4.00-4.50 ppm.

2.4.4 Evaluación biológica

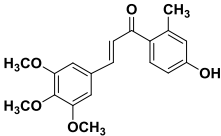
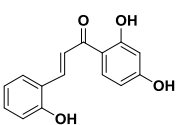
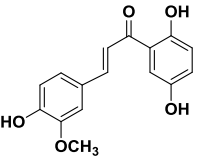
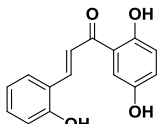
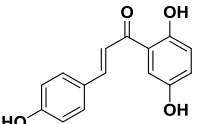
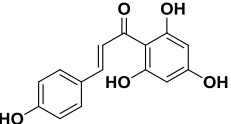
2.4.4.1 Estudios electrofisiológicos en ovocitos

2.4.4.1.1 Evaluación de una colección comercial de chalconas

Como ya se comentó en la introducción de este capítulo, se realizó un estudio de modulación de canales nicotínicos con una colección comercial de un centenar de derivados de chalcona (Anexo I). Los ensayos se realizaron en ovocitos que expresaban bien el receptor homomérico $\alpha 7$ o bien los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$. A continuación, se midieron las respuestas generadas por la administración conjunta de ACh y cada uno de los compuestos individuales, y se compararon con la respuesta observada cuando se administraba solo acetilcolina. A partir de esta colección se encontraron seis compuestos que mostraban actividad significativa como moduladores alostéricos positivos (PAMs) del receptor nicotínico $\alpha 7$. En la Tabla 16 se recogen los datos de I_{max} y EC_{50} para estos compuestos. Estos ensayos se realizaron en la Universidad Miguel Hernández de Alicante por el grupo del Prof. Manuel Criado.

Según se puede observar en la Tabla 16, los compuestos que presentaron mejor actividad como PAMs de $\alpha 7$, **87** y **97**, poseen dos grupos OH en el anillo A, en posiciones 2' y 5', y un OH en posición 4 del anillo B. También resultó ser activo el análogo de **97** en el que el 4-OH se cambió a la posición 2 (**99**). Otras posiciones o disposiciones de los grupos hidroxilo del anillo A que condujeron a compuestos activos fueron 2', 4' (**98**) y 2', 4', 6' (**101**).

Tabla 16. Resultados de actividad de los compuestos **64**, **87**, **97**, **98**, **99**, **101** de la colección comercial frente al receptor nicotínico $\alpha 7$.

Comp	Estructura	Actividad I_{max}^a $EC_{50} (\mu M)^a$	Comp	Estructura	Actividad I_{max}^a $EC_{50} (\mu M)^a$
64		2.1 ± 0.32 7.3 ± 1.4	98		2.6 ± 0.18 4 ± 0.9
87		6.5 ± 0.4 17.2 ± 1.9	99		3.4 ± 0.24 1.9 ± 0.4
97		33 ± 9.6^b 25 ± 2.8^b	101		2.8 ± 0.15 4 ± 1.3

^aValores derivados de las curvas de respuesta a las dosis correspondientes. Las respuestas se registraron a -80 mV y se normalizaron con respecto a la mostrada por solo ACh (0.2 mM). Los datos son la media \pm la desviación estándar, con $n \geq 6$. ^bValores extrapolados por no haber alcanzado la saturación máxima.

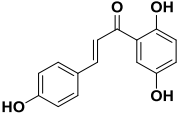
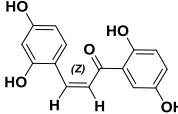
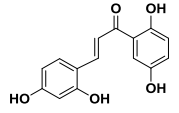
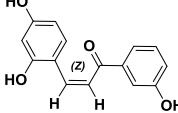
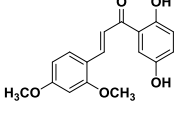
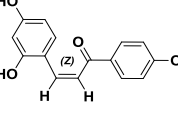
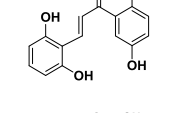
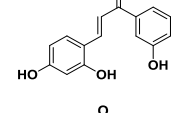
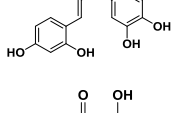
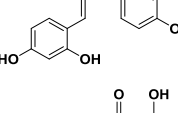
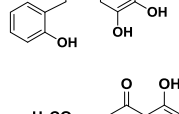
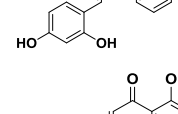
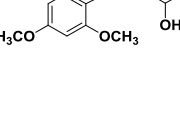
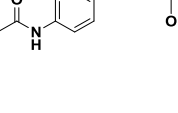
2.4.4.1.2 Estudio de los nuevos derivados de chalcona preparados

Con el fin de determinar si las nuevas chalconas preparadas presentaban actividad frente al receptor nicotínico $\alpha 7$ se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus* que únicamente expresaban dicho receptor.

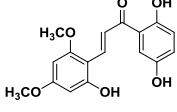
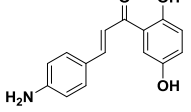
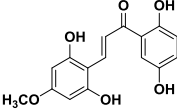
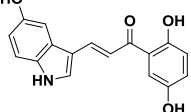
La actividad en el receptor nicotínico $\alpha 7$ se determinó mediante la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje (Patch Clamp)²¹², que consiste en mantener un potencial fijo de membrana determinado en una célula, mediante un sistema de retroalimentación. Se realizó un primer ensayo a una dosis de 10 μM de compuesto y 200 μM de ACh, determinándose el porcentaje de corriente del receptor nicotínico $\alpha 7$, con respecto al ensayo en ausencia de compuesto, con ACh solo. Cuando este ensayo se realizó con

las mismas dosis de los compuestos en ausencia del ligando endógeno (ACh) no se observó ninguna actividad, lo que nos permitió deducir que no actuaban como agonistas por sí mismos. Se ensayaron todos los compuestos de la colección, observándose que los derivados metoxilados, precursores de los compuestos finales hidroxilados, presentaban porcentajes de corriente inferiores a 100 (valor asignado al control, solo con 200 μ M de ACh) (ver anexo II, Tabla AII.1). Los compuestos cuyo porcentaje de corriente fue superior a 100 se comportaban como moduladores alostéricos positivos (PAMs), siendo capaces de potenciar la respuesta provocada por la ACh. Para aquellos compuestos que presentaron un porcentaje de corriente superior a 250 se determinaron los valores de I_{max} y las EC_{50} . En la Tabla 17 se recogen los resultados referentes a la actividad en receptores nicotínicos $\alpha 7$ de las chalconas hidroxiladas que se describen en la presente memoria. Como se ha comentado en la introducción, los PAMs del receptor nicotínico $\alpha 7$ pueden clasificarse como de tipo I o tipo II dependiendo de su acción sobre el canal. Los compuestos **2.23-2.29** potenciaron la corriente iónica evocada por ACh, observándose que esta corriente disminuía muy lentamente, mostrando una cinética más similar a los PAMs tipo II. Atendiendo a los valores de I_{max} (en relación a la eficacia) y EC_{50} (en relación a la potencia) podemos destacar el compuesto **2.23**, que presenta los mejores valores en cuanto a eficacia y potencia.

Tabla 17. Resultados de actividad de los compuestos 97, 2.23-2.30, 2.35, 2.36, 2.38, 2.48, 2.51, 2.69 en el receptor nicotínico $\alpha 7$.¹

Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a Imax ^b EC ₅₀ (μM) ^b	Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a Imax ^b EC ₅₀ (μM) ^b
97		1258 33±9.6 ^c 25±2.8 ^c	Z-2.23		170 2.3±0.2 10.7±1.6
E-2.23		2760 34±5.5 3.3±1.6	Z-2.35		950 11.9±2.1 5.4±1.5
2.24		789 8.6±1.6 3.9±1.4	Z-2.36		110 -
2.25		130 -	E-2.35		580 9±0.9 6.1±1.3
2.26		627 14.5±0.3 67±7.1	E-2.36		199 8.1 ^c 38 ^c
2.27		251 3.2±0.24 ^c 8.9 ^c	2.38		475 19.7±6 34.5±6
2.28		-*	2.43		116 -

¹ ^a Respuesta del compuesto a 10 μM en ovocitos de $\alpha 7$. ^b Valores derivados de las curvas de respuesta a las dosis correspondientes. Las respuestas se registraron a -80 mV y se normalizaron con respecto a la mostrada por solo ACh (0.2 mM). Los datos son la media \pm la desviación estándar, con $n \geq 6$. ^c Valores extrapolados por no haber alcanzado la saturación máxima. *No testado. Imax: Respuesta máxima con respecto al control sin compuesto (Valor =1). EC₅₀: Concentración del compuesto (μM) a la que se obtiene la mitad de la respuesta máxima.

2.29		<p>828 7.8±0.5 2.6±1.2</p>	2.44		<p>124 -</p>
2.30		<p>100 -</p>	2.48		<p>260 3±0.2 1.9±1.3</p>

El compuesto **E-2.23**, que posee dos grupos OH en el anillo A, en posiciones 2' y 5', y dos OH en posiciones 2 y 4 del anillo B, mejoró considerablemente la potencia respecto al compuesto **97** con la misma sustitución en el anillo A, pero con un solo hidroxilo en 4 en el anillo B. El análogo de **E-2.23** en el que el 4-OH se cambió a la posición 6 (**2.25**) resultó ser inactivo. La presencia de dos grupos metoxilo en 2 y 4 del anillo B (**2.24**) disminuyó la actividad respecto a su análogo **E-2.23** con dos grupos hidroxilo. Cuando se mantienen dos grupos OH en posiciones 2 y 4 del anillo B, la presencia de un OH adicional en 4' del anillo A (**2.26**) reduce la actividad. La sustitución 2-OH en B combinada con 2', 4', 5' OH en A (**2.27**) disminuye mucho la eficacia pero mantiene una potencia micromolar. Por otra parte, la combinación de 2 y 4-OH en el anillo B con un solo grupo OH en el anillo A (**E-2.35**, **E-2.36** y **2.38**) conduce a resultados más modestos de actividad, siendo la sustitución en 2' (**2.38**) preferida sobre 3' (**E-2.35**) y 4' (**E-2.36**), en cuanto a la eficacia, pero el compuesto **E-2.35** fue el más potente de los tres. El análogo de **2.38** en el que se ha eliminado el grupo 4-OH del anillo B (**22**, Anexo I) resultó ser un compuesto totalmente inactivo, lo que nos sugiere de nuevo la importancia del grupo OH en posición 4 del anillo B. El compuesto **2.29** con grupos OH en 2' y 5' del anillo A y en posición 2 del anillo B y metoxilado en las posiciones 4 y 6 presentó una actividad similar a su análogo **2.24** e inferior a **E-2.23**, sugiriendo que la presencia de estos grupos metoxilo interfiere en la actividad, aunque no la elimina totalmente. Sin embargo, la

sustitución del grupo metoxilo en 6 por un grupo OH (**2.30**) proporcionó un compuesto totalmente inactivo, confirmando que la presencia de grupos OH en las posiciones 2 y 6 del anillo B no permite la modulación de la actividad de ACh en los canales $\alpha 7$.

El compuesto **E-2.23** se estudió también en cultivos primarios de células cromafines bovinas. Las células cromafines se encuentran invadidas por neuronas colinérgicas preganglionares que liberan acetilcolina, estímulo que induce la secreción de catecolaminas. Usando como modelo de estudio cultivos primarios de células cromafines bovinas, se ha evaluado el efecto de **E-2.23** sobre la exocitosis inducida por colina²¹³. Se realizaron registros siguiendo un protocolo de estimulación repetida con colina 100 μ M previo y tras la exposición de las células a **E-2.23** (1 μ M). Como era de esperar, la aplicación del compuesto produjo un aumento del contenido de catecolaminas liberadas por exocitosis.

Los isómeros *Z* de los compuestos **2.23** y **2.36** mostraron menor actividad como PAMs que sus respectivos isómeros **E-2.23** y **E-2.36** (Tabla 17). Sin embargo, sorprendentemente, la actividad de *Z*- y **E-2.35** fue muy similar entre sí. Eso se podría explicar por el hecho de que el isómero **Z-2.35** se transforma en disolución en su correspondiente isómero **E-2.35** (Figura 44), por lo que la actividad observada frente al receptor nicotínico $\alpha 7$ en ambos casos puede ser atribuida a la contribución del isómero **E-2.35**.

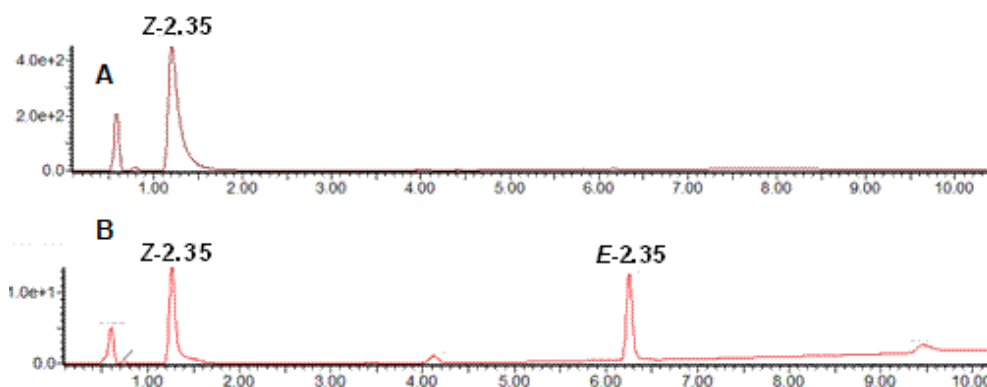


Figura 44. Cromatogramas que muestra la transformación del compuesto **Z-2.35** a **E-2.35**. A) Cromatograma de **Z-2.35** a tiempo 0 minutos. B) Cromatograma de **Z-2.35** a tiempo 150 minutos.

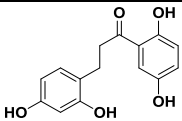
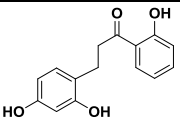
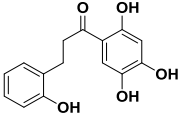
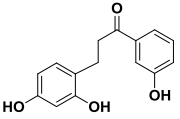
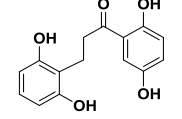
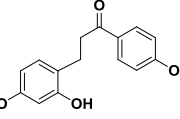
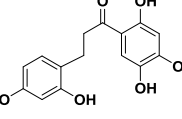
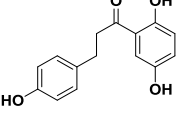
En referencia a los datos de actividad biológica de los derivados en los que se ha modificado el anillo B, se observa que la sustitución del fenol por una anilina (**2.44**) o acetanilida (**2.43**) conduce a la pérdida drástica de la actividad (Tabla 17). Sin embargo, el análogo **2.48** en el que el anillo aromático B se ha sustituido por un sistema indol, fue capaz de potenciar la acción de la Ach en el receptor nicotínico $\alpha 7$, con menos eficacia que **E-2.23** pero con una EC_{50} muy similar (Tabla 17), comparable también a la del 5-hidroxiindol²⁰⁰. Curiosamente, la cinética de las corrientes observadas para el compuesto **2.48** fue característica de un PAM de tipo I, que facilita la transición del canal cerrado al canal abierto pero sin estabilizar el canal abierto. Este resultado es similar al del 5-hidroxiindol²⁰⁰ y diferente del resto de los compuestos más activos (**E-2.23**, **2.51** y **2.69**), que tienen un comportamiento de moduladores positivos de tipo II.

Con respecto a los derivados resultantes de la modificación de la cadena de cetona α, β -insaturada, nos centraremos inicialmente en los derivados de chalcona con el doble enlace reducido. Solo los compuestos **2.51** y **2.69** mostraron una actividad superior a 250, a 10 μM (Tabla 18). Si se comparan los datos de I_{max} y EC_{50} con los obtenidos para el compuesto **E-**

2.23 se puede concluir que existe una ligera disminución de la potencia y de la eficacia. Sin embargo, al carecer del doble enlace α,β -insaturado, esta estructura presenta la ventaja de ser menos reactiva, no pudiendo comportarse como aceptor de Michael, lo que podría contribuir a disminuir la toxicidad con respecto a **E-2.23**. Para el resto de derivados saturados preparados, **2.60-2.65**, no se calcularon los valores de I_{max} y EC_{50} , ya que la actividad era inferior a 250.

Como en el caso de las chalconas, los metoxilo derivados **2.50**, **2.52-2.57** inhibieron la activación inducida por ACh en canales $\alpha 7$ (Tabla AII.2, Anexo II). El porcentaje de inhibición fluctuó entre un 55 y un 85% y, en general, fue más alto que para las correspondientes chalconas. El compuesto más potente resultó ser el derivado reducido **2.50**, análogo metoxilado de **2.51**.

Tabla 18. Resultados de actividad a 10 μM en el receptor nicotínico $\alpha 7$ de los compuestos **2.60-2.65**

Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a <i>I</i> _{max} ^b <i>EC</i> ₅₀ (μM) ^b	Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a <i>I</i> _{max} ^b <i>EC</i> ₅₀ (μM) ^b
2.51		989 15.46±1.2 6.85±0.9	2.63		155 -
2.60		93 -	2.64		201 -
2.61		100 -	2.65		100 -
2.62		70 -	2.69		666 15±1.88 12.8±1.4

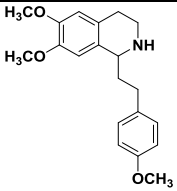
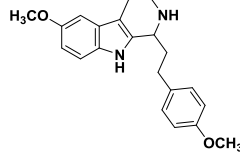
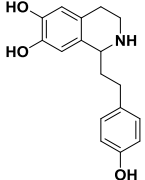
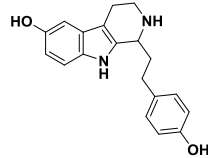
^aRespuesta del compuesto a 10 μM en ovocitos de $\alpha 7$. ^bValores derivados de las curvas de respuesta a las dosis correspondientes. Las respuestas se registraron a -80 mV y se normalizaron con respecto a la mostrada por solo ACh (0.2 mM). Los datos son la media \pm la desviación estándar, con $n \geq 6$. ^cValores extrapolados por no haber alcanzado la saturación máxima. *No testado. *I*_{max}: Respuesta máxima con respecto al control sin compuesto (Valor =1). *EC*₅₀: Concentración del compuesto (μM) a la que se obtiene la mitad de la respuesta máxima.

El derivado hidoxilado de pirrol fue incapaz de modificar la activación del receptor por ACh (**2.73**), mientras que su derivado metoxilado inhibía modestamente la mencionada activación (**2.72**).

Mención aparte merecen los derivados de tetrahydroisoquinolina y tetrahydro- β -carbolina, ya que todos ellos, metoxi- e hidroxil- derivados inhibieron la actividad de la ACh en el receptor que nos ocupa (Tabla 19). En el caso de las tetrahydroisoquinolinas, el trihidroxiderivado **2.77** mostró una inhibición inferior a su análogo con OMe, **2.76**, en línea con lo comentado

anteriormente. Sin embargo, curiosamente, la tetrahydro- β -carbolina dihidroxilada **2.80** fue mejor inhibidor que su análogo metoxilado **2.79**. Queda por demostrar si estos compuestos se comportan como NAMs o como antagonistas competitivos de canales $\alpha 7$. Se encuentra recogido en la bibliografía que los derivados de tetrahydroisoquinolina presentan actividad en los receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA), que desempeñan un papel destacado en procesos tales como aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica y neuronal. La disfunción de estos receptores contribuye en una amplia gama de trastornos neuronales, tales como esquizofrenia, Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington y epilepsia²¹⁴. También podemos destacar que las tetrahydroisoquinolinas hidroxiladas son de especial interés debido a sus acciones farmacológicas sobre la inflamación y trastornos relacionados. Por ejemplo el bromhidrato de **2.77** reduce la liberación de HMGB1 en células activadas por LPS, en modelos de infarto e isquemia en animales²¹⁵.

Tabla 19. Resultados de actividad a 10 μM en el receptor nicotínico $\alpha 7$ de los compuestos **2.76**, **2.77**, **2.79** y **2.80**

Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a	Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a
2.76		55	2.79		40
2.77		70	2.80		20

^aRespuesta del compuesto a 10 μM en ovocitos de $\alpha 7$.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en este apartado, se puede concluir que la chalcona polihidroxilada (2,4,2',5'-OH) **2.23** y su correspondiente derivado saturado **2.51**, así como el derivado **2.69**, análogo saturado del compuesto **97**, presentan el mejor perfil de actividad como PAMs del receptor nicotínico $\alpha 7$, siendo seleccionadas, por tanto, para estudios farmacológicos más extensos y detallados.

Con el fin de determinar si este tipo de compuestos eran selectivos frente al receptor nicotínico $\alpha 7$, se llevó a cabo un ensayo con dos de ellos, **97** y **2.23**, en ovocitos que expresaban únicamente los receptores $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$ ó $\alpha 4\beta 2$. Los resultados recogidos en la Tabla 20 muestran claramente que los compuestos actúan selectivamente como PAMs en el receptor nicotínico $\alpha 7$.

Tabla 20. Resultado de selectividad de los compuestos **97** y **E-2.23** frente al receptor nicotínico

Receptor	Compuesto	
	97	E-2.23
$\alpha 3\beta 4$	$87 \pm 2.6 (5)^{***}$	$93 \pm 1.2 (3)^{**}$
$\alpha 4\beta 2$	$83 \pm 4.9 (3)^*$	$98 \pm 1.8 (3)$
$\alpha 7$	$1258 \pm 95 (7)^{***}$	$2760 \pm 220 (5)^{***}$

Las respuestas en presencia de 10 μM del compuesto indicado y 50 μM de ACh. Se registraron a -80 mv y se normalizaron respecto a la respuesta mostrada solo por ACh (100 μM).

2.4.4.2. Ensayos de toxicidad

Dado que la presencia de la cetona α,β -insaturada en la estructura de las chalconas proporciona una cierta reactividad química, pudiéndose comportar como aceptores de Michael frente a agentes nucleófilos, se han llevado a cabo estudios preliminares de toxicidad con el mejor compuesto de la serie, **E-2.23**.

• 2.4.4.2.1 Ensayos de Citotoxicidad

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de la chalcona hidroxilada **E-2.23** mediante la realización del ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) en células HEK293. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con concentraciones crecientes (0.01-10 μM) de **E-2.23**, en un intervalo de 24 horas (Figura 45). El resultado de este experimento mostró que este compuesto no presenta citotoxicidad a concentraciones de hasta 10 μM .

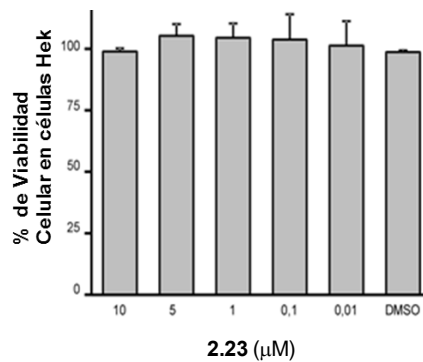


Figura 45. Efecto del compuesto **E-2.23** sobre la citotoxicidad en células HEK293. Cada valor se expresa como la media de 6 experimentos realizados por duplicado

Además, el compuesto **E-2.23** se evaluó en un modelo de células alternativo, un cultivo primario de células postmitóticas de hipocampo. En la Figura 46 se representan dos diagramas: en el de la izquierda la actividad lactato deshidrogenasa liberada al medio (que cuantifica la muerte de la célula) a diferentes concentraciones del compuesto (1-50 μM), y en la derecha el porcentaje de viabilidad celular. Este último valor alcanza un 125% a 10 μM, confirmando que el compuesto no presenta toxicidad a esa concentración. Podría resultar citotóxico a concentraciones superiores, como se demuestra en la actividad LDH a 50 μM.

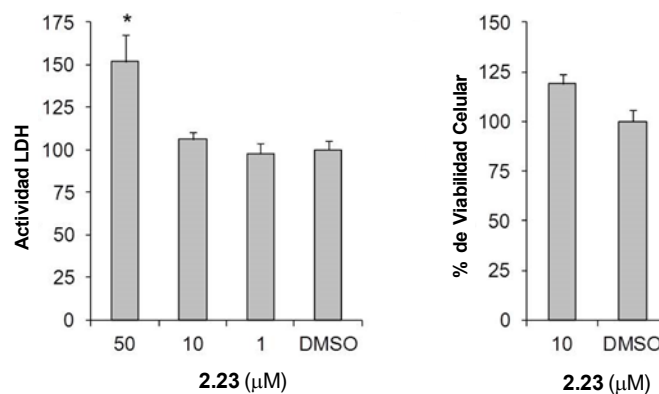


Figura 46. Efecto del compuesto **E-2.23** en la toxicidad celular (panel izquierdo) y viabilidad (panel derecho) de las neuronas de hipocampo. Datos expresados como media \pm S.E.M. *, P -valor < 0.05 (prueba t de Student) en comparación con DMSO.

- **2.4.4.2.2 Ensayos en Órganos aislados**

Teniendo en cuenta los posibles efectos adversos que podrían ocurrir por la interacción de los compuestos recogidos en esta memoria con otras dianas biológicas o por la presencia de canales $\alpha 7$ en diferentes tejidos, el mejor compuesto de la serie, **E-2.23**, fue seleccionado para realizar estudios en órganos aislados y sobre la presión arterial. Estos estudios fueron realizados por el grupo del Dr. Ricardo Borges en la Universidad de La Laguna. Los principales resultados obtenidos se resumen seguidamente:

- Efecto sobre la actividad α -adrenérgica y purinérgica en conducto deferente de rata: Los resultados de este estudio mostraron que **E-2.23** no cambió la contracción basal ni la respuesta contráctil inducida en el conducto deferente, por lo que se descartan acciones “*per se*” o sobre receptores $\alpha 1$ adrenérgicos y purinérgicos.
- Efecto sobre la actividad β -adrenérgica en aurícula de rata: No se observaron diferencias significativas con el control a ninguna de las dosis ensayadas, no viéndose efectos ni en la frecuencia auricular ni en la fuerza del latido. Se descartan efectos directos sobre receptores β -adrenérgicos y sobre canales de sodio y calcio.
- Efecto sobre íleon de rata: No se observaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con **E-2.23** y las no tratadas, ni en la fuerza de la contracción, ni en su frecuencia. Como esta preparación es muy sensible a fármacos con actividad colinérgica, adrenérgica, 5-HT y opioide, se descarta actividad directa sobre los correspondientes receptores.
- Efecto sobre la placa motora: El compuesto **E-2.23** no causó efecto sobre el tono basal ni sobre la contracción producida por estimulación eléctrica, por lo que se descartan acciones tanto pre- como post-sinápticas,

mediadas por receptores nicotínicos musculares ($\alpha 4\beta 2$). Los receptores nicotínicos $\alpha 7$ no son relevantes en la función de la placa motora, lo cual hace esperable la falta de efecto observado.

- Efecto sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca: El compuesto **E-2.23** promovió una reducción de la frecuencia cardiaca, dependiente de dosis, que se hizo evidente después de infusión intravenosa a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. También produjo una caída en la presión sanguínea, significativa a la dosis más alta probada (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Teniendo en cuenta la falta de efecto observado en aurícula aislada, se puede pensar que este efecto se debe a una acción a nivel central o a una estimulación de los ganglios parasimpáticos. Además, conociéndose las propiedades antioxidantes que presentan las hidroxichalconas, la disminución de la presión arterial podría estar relacionada con una disminución en el estrés oxidativo²¹⁶.

Todos estos resultados muestran que el compuesto **E-2.23** presenta un bajo perfil de toxicidad, lo que nos animó a continuar con más estudios farmacológicos.

2.4.4.3 Ensayos de Neuroprotección

Es conocido que la Rotenona, una sustancia de origen vegetal y la Oligomicina A, un macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces*, inducen deterioro oxidativo en la célula a través del bloqueo de los complejos mitocondriales I y V, respectivamente²¹⁷. La Rotenona bloquea la cadena de transporte electrónico entre la NADH deshidrogenasa (Complejo I) y la Coenzima Q. Por otra parte, la Oligomicina A inhibe la síntesis de ATP por ATP sintasa (Complejo V). Así, el bloqueo de la cadena respiratoria genera una acumulación de radicales libres con la consiguiente muerte celular, liberación de sustancias tóxicas y destrucción de otras células. El efecto neuroprotector del compuesto **E-2.23** fue evaluado en la línea celular HT22²¹⁸, una línea de células neuronales colinérgicas de hipocampo derivada

de células HT4. Las células fueron incubadas previamente durante 24 horas con R/O, mostrando una reducción de la viabilidad celular de un 66% frente a las células control (100% de viabilidad celular), medida como la reducción de MTT. Para llevar a cabo el ensayo, el compuesto **E-2.23** se preincubó durante 24 horas con células HT22 y posteriormente se coincubó con Rotenona y Oligomicina A otras 24 horas adicionales. Se observó que en presencia de **E-2.23** la viabilidad de las células aumentaba hasta un 77% a 1 μM y un 83% a 10 μM . Este efecto está mediado por canales $\alpha 7$ nAChR, ya que la incubación previa con α -Bgt 0.1 M, un antagonista casi irreversible del receptor nicotínico $\alpha 7$, disminuyó el porcentaje de viabilidad celular, impidiendo la acción del compuesto **E-2.23**. Por otra parte, el agonista específico del receptor nicotínico $\alpha 7$, PNU-282987, añadido a la misma concentración de **E-2.23** (10 μM) mostró un efecto neuroprotector similar (84% de viabilidad), también revertido por α -Bgt. Estos estudios fueron realizados por el equipo de la Dra. Manuela García en el Instituto Teófilo Hernando de la UAM.

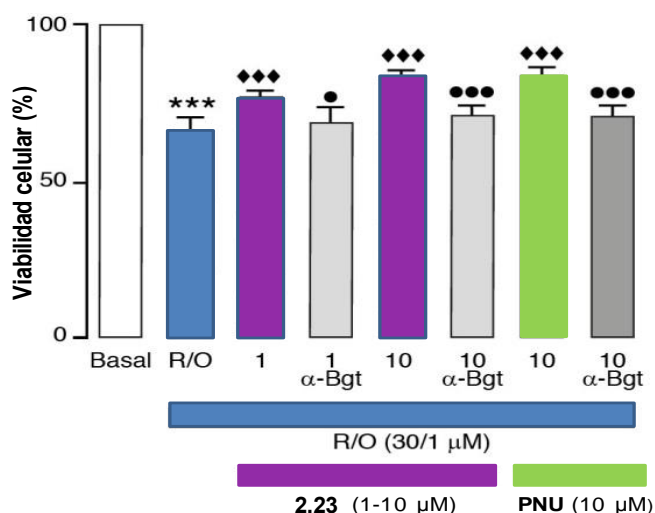


Figura 47. Citoprotección frente a la muerte celular inducida por Rotenona (30 μM) y Oligomicina A (1 μM) en células HT22. Cada columna representa la media + S.E.M. de cinco lotes diferentes de células. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba de Newman-Keuls. *** $P < 0,001$ en comparación con el grupo basal; ◆ $P < 0,05$, ◆◆◆ $P < 0,001$ en comparación con el grupo R/O; ● $P < 0,05$, ●●● $P < 0,001$ en comparación con el correspondiente grupo sin preincubación con α -Bgt.

Estos resultados confirmaron que el compuesto **E-2.23** muestra propiedades neuroprotectoras significativas asociadas a su interacción con el receptor $\alpha 7$, y posiblemente también debidas a su potencial antioxidante.

2.4.4.4 Capacidad antioxidante

La habilidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) es un método de medición de la capacidad antioxidante *in vitro*. El ensayo determina la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, habitualmente fluoresceína, tras tratamiento con generadores de radicales libres tales como azoderivados. Los antioxidantes protegen a la molécula fluorescente de la degradación oxidativa. Existen chalconas metoxi- e hidroxiladas y algunas flavonas descritas que presentan capacidad antioxidante, determinada mediante este mismo ensayo²¹⁹ ó a partir de la actividad captadora de radicales libres (DPPH)²²⁰. Dado el elevado número de

sustituyentes hidroxilo de algunas de las chalconas preparadas, se decidió estudiar la capacidad antioxidante de las que habían mostrado mejor actividad como PAMs de $\alpha 7$ (en colaboración con la Dra. Marta Miguel, ICTAN-CSIC). El grado de protección se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox (análogo de la vitamina E)²²¹ como estándar, con un valor de 1 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ (TE= equivalentes de Trolox)²²². Los compuestos **E-2.23** y **2.51** presentaron valores de 4.5 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ y 7.0 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$, respectivamente, lo que supone 4.5 y 7 veces más capacidad antioxidante que el Trolox. Por lo tanto, la gran capacidad antioxidante de **E-2.23** podría contribuir, al menos parcialmente, a su efecto neuroprotector en el ensayo descrito en el punto anterior.

2.4.4.5 Capacidad de aprendizaje In vivo

Teniendo en cuenta los efectos cognitivos observados tras estimulación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ ²²³, se decidió evaluar el efecto del compuesto **E-2.23** en la memoria espacial de roedores empleando el Test de Morris²²⁴. El ensayo se realizó durante 5 días consecutivos, utilizando ratones de 14 meses, divididos en dos grupos (ratones control y ratones tratados). Dos horas antes de comenzar el experimento, se les administró, vía intraperitoneal, el vehículo (3,57% DMSO) al grupo control y el compuesto **E-2.23** a dosis de 1, 10 o 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ al grupo tratado. Una hora después del tratamiento se les colocó en una piscina que tenía una plataforma no visible situada bajo la superficie, y se determinó los segundos que tardaban los animales en encontrarla. Este ensayo ha sido realizado por el equipo del Dr. Ricardo Borges (ULL).

Como se muestra en la Figura 48, mientras que los animales tratados con el vehículo tardaron el mismo tiempo en encontrar la plataforma a lo largo de los días del experimento, una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del compuesto **E-2.23** redujo a la mitad el tiempo requerido para alcanzarla, lo que sugiere un efecto

positivo en las funciones cognitivas. El ensayo se realizó también a una dosis más alta de 100 µg/kg, sin embargo el resultado no significativo encontrado no es del todo fiable, debido a la dificultad para disolver el compuesto a esta dosis.

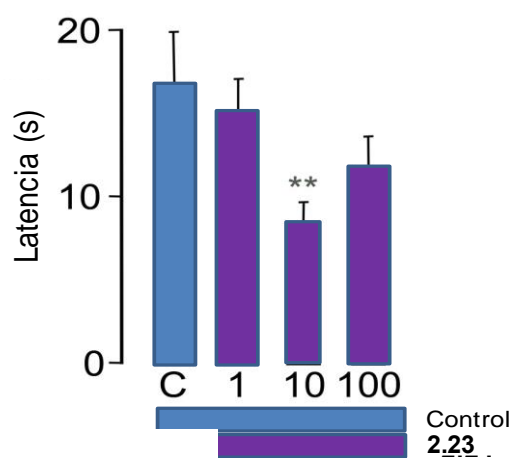


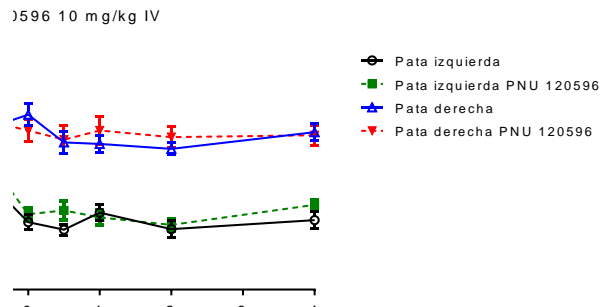
Figura 48. Efecto del compuesto **E-2.23** en la memoria espacial (test de Morris). La prueba se repitió diariamente durante los 5 días de tratamiento. N= 5-16 ratones. ** p < 0,01, test de Dunnet.

2.4.4.6 Ensayos de analgesia In vivo

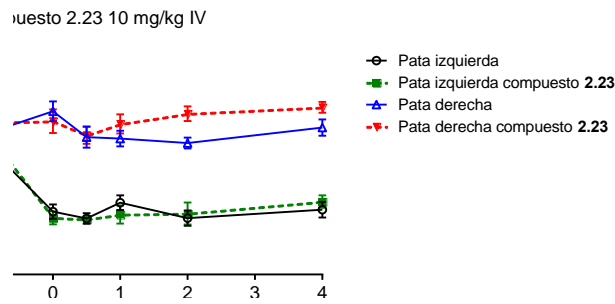
Teniendo en cuenta los efectos antinociceptivos de los PAMs del receptor nicotínico $\alpha 7$, especialmente los descritos para el compuesto PNU-120596 (PAM tipo II)^{225,226} se decidió estudiar también el efecto analgésico de **E-2.23**. En concreto, se estudiaron la posible reducción de la hiperalgesia térmica y mecánica que resulta de la inflamación generada por inyección intraplantar del complejo adyuvante de Freund (CFA)²²⁷. Estos estudios se realizaron en la UMH (Dra. Asia Fernández Carvajal, Dr. Antonio Ferrer-Montiel).

Como se muestra en la Figura 49, se comparó la actividad antinociceptiva en los test de hiperalgesia térmica y mecánica entre los compuestos PNU-120596 y **E-2.23**, administrados por vía intravenosa.

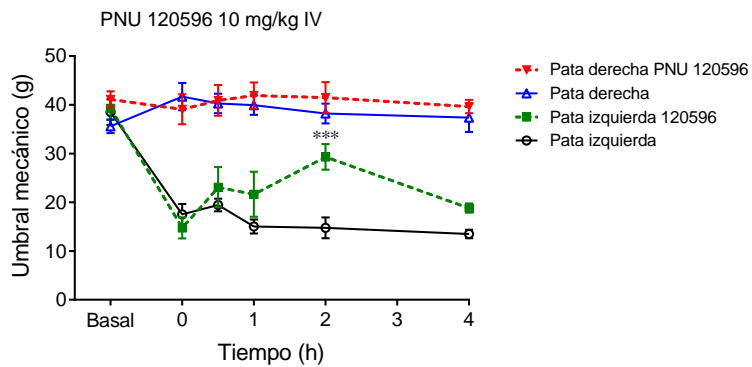
1



2



3



4

puesto 2.23 10 mg/kg IV

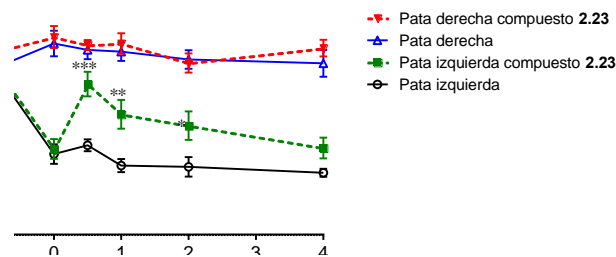


Figura 49. Efecto del PNU-120596 (Gráficos 1 y 3) y del compuesto **E-2.23** (Gráficos 2 y 4) en el modelo de inflamación de la pata inducida por CFA (0.5 mg/mL) en ratas. Tiempo de hiperalgesia térmica (Gráficos 1 y 2) en la pata trasera izquierda, con y sin la administración del compuesto (10 mg/kg IV). Tiempo de hiperalgesia mecánica (Gráficos 3 y 4) en la pata trasera derecha con y sin la administración del compuesto (10 mg/kg IV). Los diagramas muestran el tiempo de retirada de la pata en respuesta a la estimulación térmica o mecánica ($n \geq 6$ ratas/grupo). Los datos se expresan como media \pm SEM $n = 6$. Test de Bonferroni * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En el test de hiperalgesia térmica, los compuestos no presentaron actividad antinociceptiva significativa a lo largo del tiempo (hasta cuatro horas desde su administración). Sin embargo, a dosis de 10 mg/kg ambos compuestos disminuyeron significativamente la hiperalgesia mecánica. En el caso de **E-2.23**, este efecto analgésico fue transitorio y desapareció casi totalmente 2 horas después de su administración, probablemente debido a la eliminación rápida del compuesto.

Los resultados indican que el nivel máximo de analgesia mostrada por el compuesto **E-2.23** es comparable a la ejercida por PNU-120596, aunque la acción fue más rápida y menos duradera.

Dado los buenos resultados obtenidos con el compuesto **E-2.23** en el test de hiperalgesia mecánica, se decidió evaluar también el compuesto **2.69** a la misma dosis (10 mg/kg). El efecto analgésico máximo se produjo a las 2 horas de su administración, a partir de las cuales comienza a descender, desapareciendo prácticamente transcurridas 4 horas. El compuesto **2.69**

presentó un efecto analgésico muy similar al del PNU-120596, y algo más duradero en el tiempo que **E-2.23**.

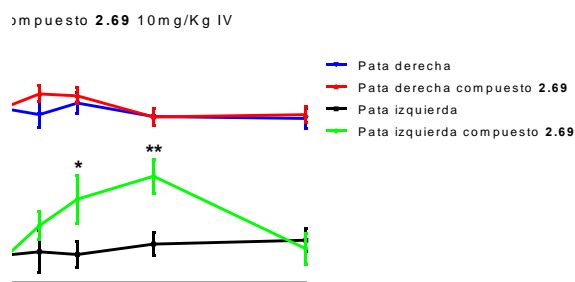


Figura 50. Efecto del compuesto **2.69** en el modelo de inflamación de la pata inducida por CFA (0.5 mg/mL) en ratas. Tiempo de hiperalgesia mecánica en la pata trasera derecha con y sin la administración del compuesto (10 mg/kg IV). Los diagramas muestran el tiempo de retirada de la pata en respuesta a la estimulación mecánica ($n \geq 6$ ratas/grupo). Los datos se expresan como media \pm SEM $n = 6$. Test de Bonferroni * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.4.5 Estudios de Farmacocinética

Con el fin de obtener una información más completa acerca de la biodisponibilidad de los mejores compuestos de la serie se decidió realizar un estudio preliminar de farmacocinética de **E-2.23**, **2.51** y **2.69** (CEREP). Un buen candidato a fármaco además de poseer la capacidad de modular la diana de interés, debe tener unas buenas propiedades, de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME-tox).

El estudio consistió en determinar los siguientes parámetros: 1) la solubilidad a pH intestinal, pH=7.4 (similar al de la sangre) y pH gástrico; 2) la permeabilidad; 3) la unión a proteínas plasmáticas; y 4) el tiempo de vida media y el aclaramiento intrínseco, relacionados con el metabolismo.

Los datos del estudio de solubilidad a los distintos pHs se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Valores de solubilidad para los compuestos **E-2.23**, **2.51** y **2.69**.

Compuestos	Solubilidad a pH Intestinal (μM)	Solubilidad a pH=7.4 (μM)	Solubilidad a pH Gástrico (μM)
E-2.23	11.6	6.4	38.8
2.51	184.2	176.4	185.0
2.69	188.4	159.9	200.0
Haloperidol		156.9	
Simvastatina		29.3	

Teniendo en cuenta que la determinación de la solubilidad se realizó a una concentración máxima de compuesto de 200 μM , se pudo determinar que la chalcona **E-2.23** presentó baja solubilidad, viéndose reducida drásticamente a pH plasmático, lo que dificultaría su absorción y distribución en el organismo. Los compuestos **2.51** y **2.69** presentaron mejores valores de solubilidad a los distintos pHs, posiblemente debido a la ruptura de la planaridad de la molécula si se compara con **E-2.23**. Estos valores de solubilidad fueron similares a los de los fármacos de referencia, como el haloperidol (156.9 μM) que se absorbe fácilmente por vía oral, y superiores a los de simvastatina, un fármaco aprobado para uso oral.

Los ensayos de permeabilidad se realizaron en la línea celular Caco-2, células de carcinoma de colon humano utilizadas como modelo de absorción oral²²⁸. Los compuestos **E-2.23** y **2.51** añadidos a una concentración de 100 μM , mostraron una baja permeabilidad en la dirección apical-basolateral (A-B), unido a una importante salida activa (dirección basolateral-apical, B-A) de

ambos compuestos. Los niveles de salida activa por la acción de proteínas de expulsión se pueden identificar mediante el cálculo de la relación B-A/A-B, de forma que cuando los compuestos presentan una relación superior a 2 están normalmente sujetos a este tipo de expulsión. Los valores calculados en el caso de **E-2.23** (3.75) y **2.51** (12.4) sugieren que la expulsión activa de estos compuestos es importante, especialmente en **2.51**. Sin embargo, el compuesto **2.69** presenta mucho mejores valores de permeabilidad A-B y una relación B-A/A-B de 0.35, mostrando por tanto un mejor perfil de permeabilidad. El porcentaje de recuperación de producto puede también ser muy útil en la interpretación de los datos de permeabilidad. Cuando la recuperación es baja, como en nuestro caso, puede indicar problemas de solubilidad, unión del compuesto a la placa, metabolismo por las células Caco-2 o acumulación del compuesto en la monocapa celular.

Tabla 22. Valores en el experimento de Caco-2 para los compuestos **E-2.23**, **2.51** y **2.69**.

Comp.	Permeabilidad A-B (10^{-6} cm/s)	Permeabilidad B-A (10^{-6} cm/s)	Recuperación media A-B (%)	Recuperación media B-A (%)
E-2.23	5.3	19.9	54	25
2.51	3.1	38.5	49	76
2.69	33.5	12.0	45	73
Propranolol	61.7	22.3	78	54

La unión a proteínas plasmáticas dificulta la distribución de los fármacos en el organismo, por lo que es importante determinar este parámetro para nuestros compuestos²²⁹. Todos ellos presentan un alto porcentaje de unión a

proteínas plasmáticas, en torno al 96-97%, por lo que su volumen de distribución será bajo, dificultando su llegada a los tejidos.

Tabla 23. Porcentaje de unión a proteínas plasmáticas para los compuestos **E-2.23**, **2.51** y **2.69**.

Compuestos	Unión a Proteínas Plasmáticas (%)
E-2.23	96
2.51	97
2.69	97
Warfarina	97
Acebutolol	19

El metabolismo de un fármaco se puede definir como las transformaciones que sufre en el organismo para ser excretado finalmente. Uno de los parámetros que se suele determinar es la vida media del compuesto, que se define como el tiempo que tarda en metabolizarse al 50%. El ensayo se ha realizado en microsomas hepáticos humanos ya que el hígado es el órgano más importante para el metabolismo de fármacos. Se puede distinguir entre el metabolismo de fase I, mediado principalmente por los subtipos de CYP450, y el metabolismo de tipo II, que involucra la conjugación con otros compuestos mediante la acción de distintas transferasas. Los compuestos **E-2.23** y **2.69** presentaron una vida media de 23 y 18 min, respectivamente, indicativa de un metabolismo rápido. Por otro lado, el compuesto **2.51** posee una vida media mayor, en este caso, de 42 min. Por tanto, la reducción del doble enlace, susceptible de oxidación por CYPs aumenta la vida media de este tipo de compuestos. De la comparación

de los valores de $t_{1/2}$ de **2.51** (2,4,2',5'-OH) y **2.69** (4,2',5'-OH) se deduce que la eliminación del grupo 2-OH disminuye la vida media, indicando que la posición 2 seguramente es susceptible de oxidación. Estos valores se han comparado con los de fármacos de referencia como el propranolol, que tiene una vida media > 60 minutos, o con la terfenadina que, por el contrario, tiene una vida media corta de 10 minutos en este ensayo.

El ensayo en microsomas también permite determinar el aclaramiento del fármaco, que nos informa sobre la eliminación de éste. En humanos, un aclaramiento < 8.6 se considera bajo y > 47.0 alto, por lo que lo más adecuado sería encontrarse dentro de este rango. Los tres compuestos ensayados superan el valor de 47.0, lo que nos indica que presentan una eliminación rápida en todos los casos.

Tabla 24. Valores de tiempo de vida media y aclaramiento intrínseco para los compuestos **E-2.23**, **2.51** y **2.69**.

Compuestos	Tiempo de vida media (min)	Aclaramiento intrínseco ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
E-2.23	23	299.5
2.51	42	165.7
2.69	18	387.1
Propranolol	> 60	< 115.5
Terfenadina	10	723.1

En base a los resultados de este estudio, se puede indicar que las propiedades farmacocinéticas de estos compuestos no son óptimas, por lo que se planteó el diseño y síntesis de profármacos que pudieran mejorarlas.

2.4.6 Síntesis y estudios de Profármacos

Una de las estrategias empleadas para mejorar la solubilidad y/o la permeabilidad de compuestos activos es la preparación de profármacos. En general un profármaco se genera mediante la unión covalente del principio activo a un agrupamiento a través de una unión lo suficientemente lábil como para permitir la liberación del fármaco en el organismo, por vía química o enzimática. En este sentido, los profármacos de aminoácidos han sido ampliamente estudiados, ya que el grupo que se añade al fármaco cumple los requisitos de ser inerte biológicamente, no presentando toxicidad, además de ser fácilmente metabolizable y excretable²³⁰. Teniendo en cuenta la experiencia de nuestro grupo de investigación en síntesis de péptidos, nos planteamos también la preparación de profármacos peptídicos, mediante la derivatización del grupo OH de la posición 4 del anillo B a través de la formación de ésteres. Una vez en el organismo, éste enlace éster debería ser susceptible de romperse por la acción de las esterasas, liberando el compuesto activo. Además de mejorar la solubilidad, los profármacos de aminoácidos y péptidos pueden atravesar membranas a través del reconocimiento por proteínas transportadoras específicas²³¹.

Para la preparación de los profármacos, se eligieron los compuestos **E-2.23**, **2.51** y **2.69** ya que, como se ha comentado en repetidas ocasiones, son los que presentaban mejores valores de actividad frente al receptor nicotínico $\alpha 7$. Nos planteamos la síntesis de tres tipos diferentes de profármacos, los derivados de valina, dipéptidos y tripéptidos.

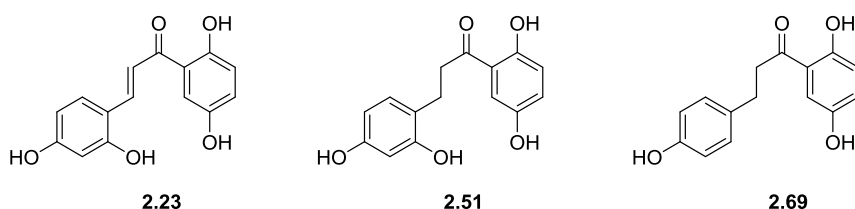
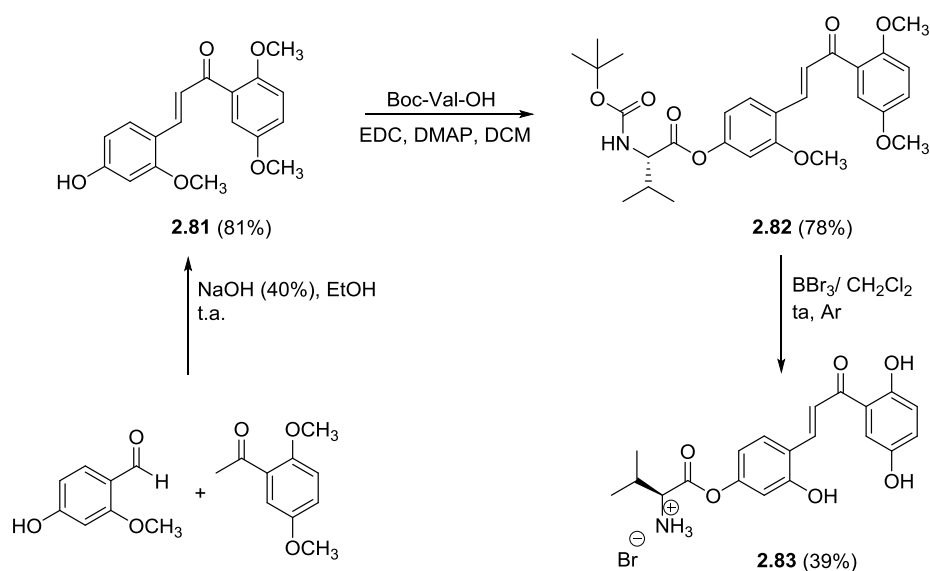


Figura 51. Compuestos prototipo elegidos para la síntesis de profármacos

2.4.6.1 Derivados de Valina

Existen diferentes ejemplos de profármacos derivados de aminoácidos unido al fármaco, como es el caso del Valaciclovir²³², un antiherpético comercializado y que está basado en la labilidad de un enlace éster con valina (Val) para liberar el principio activo aciclovir. Así, teniendo en cuenta esta estrategia nos planteamos, en primer lugar, la preparación del profármaco de **E-2.23** derivado de valina.

La síntesis se realizó por reacción del compuesto **2.81** con Boc-Val-OH en DCM, usando como agente de acoplamiento clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y como base 4-dimetilaminopiridina (DMAP), para dar lugar al compuesto **2.82** con buen rendimiento tras purificación por cromatografía flash en gel de sílice. La desprotección de los grupos metoxilo en presencia de BBr₃ dio lugar al compuesto **2.83**, en el que también se eliminaba el grupo Boc. Este producto fue purificado por cromatografía en fase reversa (Esquema 17).



Esquema 17

Estos derivados de Val han sido caracterizados mediante técnicas de HPLC, EM, y RMN. En los espectros de ¹H-RMN, además de las señales características de la chalcona de configuración *E* se pudieron observar las señales correspondientes al residuo de Val, con el doblete de los grupos metilo de la cadena lateral en torno a 1.0-1.1 ppm, el protón α en el entorno de 4.0-4.2 ppm, y el hidrógeno β a 2.1-2.4 ppm.

Una vez completada la síntesis, se realizó un estudio de estabilidad química del derivado hidroxilado **2.83** en PBS (pH=7.4) y 5% de DMSO a temperatura ambiente. Este estudio reveló la gran inestabilidad química del compuesto en disolución acuosa, que se transformaba en el derivado **E-2.23** en tan solo 30 min.

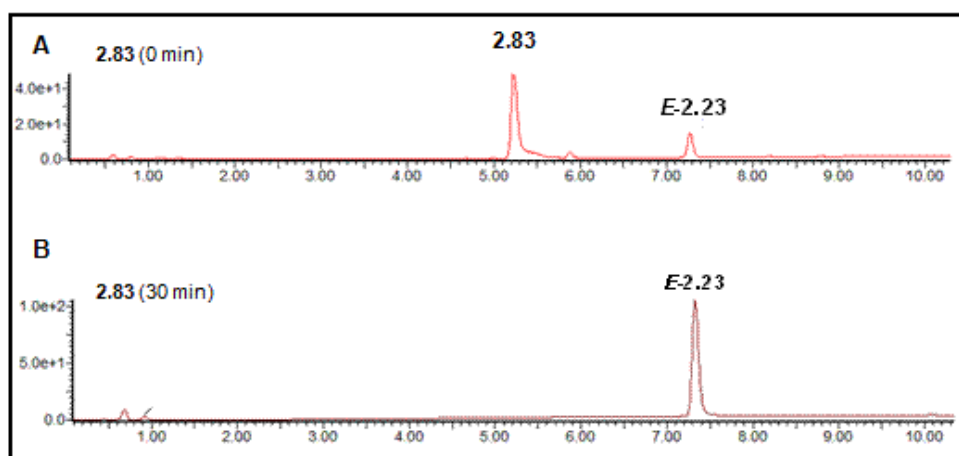


Figura 52. Estudio de estabilidad química del compuesto **2.83** en PBS y 5% DMSO en tiempo 0 (A) y 30 (B) minutos (HPLC).

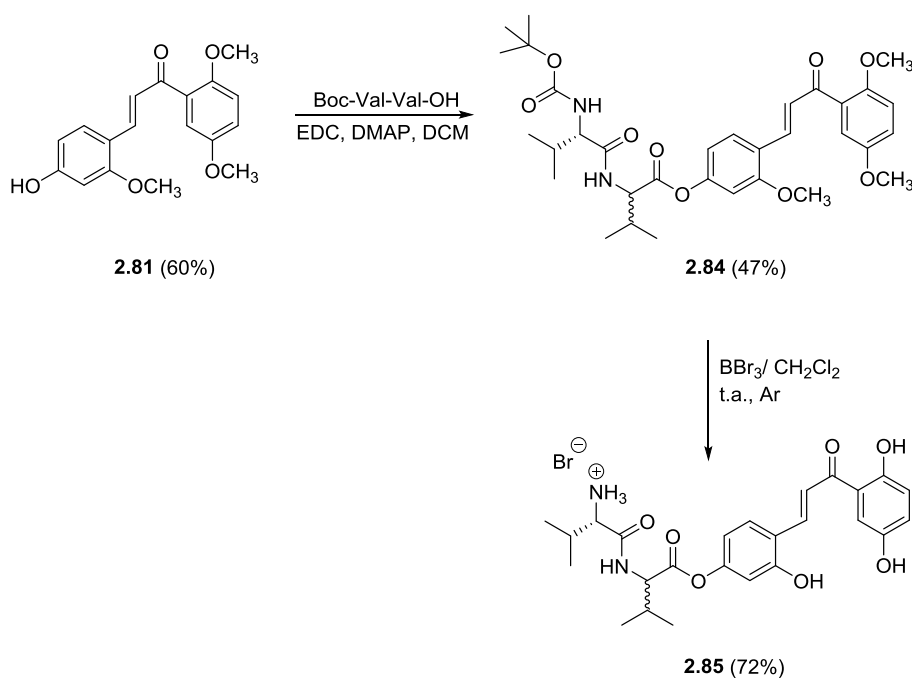
En base a este resultado se decidió no preparar los derivados de valina previstos para el resto de compuestos y pasar a la preparación de derivados de dipéptidos y tripéptidos.

2.4.6.2 Derivados del dipéptido Val-Val

Esta estrategia, descrita por el grupo de P. Gomes, consiste en la síntesis de derivados dipeptídicos del principio activo, que se recupera tras ciclación intramolecular del fragmento dipeptídico para formar la correspondiente dicetopiperazina²³³. La velocidad de liberación de los compuestos activos depende del tamaño de las cadenas laterales del péptido, con una velocidad de degradación significativamente más reducida cuando se incorporan aminoácidos estéricamente impedidos. Este efecto es más pronunciado cuando se trata de aminoácidos β ramificados, como por ejemplo Valina. En la bibliografía se recogen algunos ejemplos representativos de profármacos siguiendo esta estrategia, destacando entre ellos los de paracetamol²³³ y algunas ciclosporinas²³⁴. El principal inconveniente de la

utilización de este tipo de profármacos es su susceptibilidad frente a peptidasas no específicas.

La síntesis del derivado dipeptídico **2.84** se llevó a cabo por reacción de la chalcona α,β -insaturada **2.81** con Boc-Val-Val-OH (comercial) en DCM, en presencia de clorhidrato 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP), como agente de acoplamiento y base, respectivamente. El compuesto **2.84**, previamente purificado por cromatografía flash en gel de sílice, se trató con BBr_3 para dar lugar al compuesto totalmente desprotegido **2.85**, que se purificó por cromatografía en fase reversa (Esquema 18).



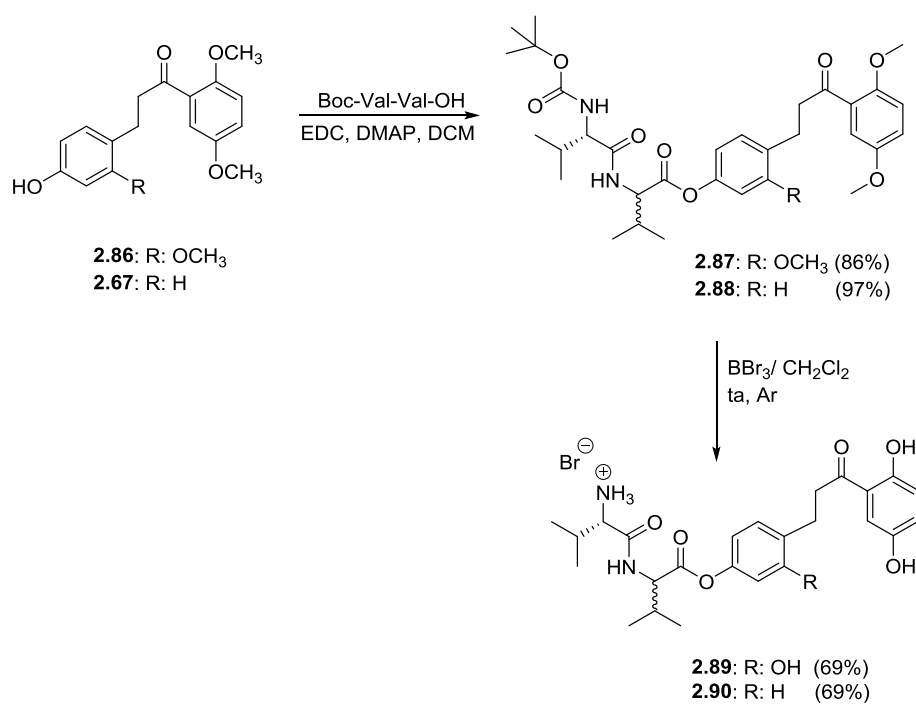
Esquema 18

El análisis por HPLC de **2.85** indicó la presencia de dos diastereoisómeros y una cierta proporción de isómero *Cis* en el doble enlace. Por este motivo se decidió continuar la síntesis de este tipo profármacos únicamente con los derivados saturados, ya que la presencia de mezclas

complejas de isómeros y su difícil separación iba a dificultar los estudios a realizar posteriormente con este compuesto.

La reacción de los derivados saturados **2.69** y **2.86** con Boc-Val-Val-OH, en las condiciones ya comentadas, dio lugar a los compuestos **2.87** y **2.88** con buenos rendimientos. El tratamiento posterior con BBr₃ para llevar a cabo la desprotección de los grupos metoxilo condujo a los compuestos desprotegidos **2.89** y **2.90**, también con buenos rendimientos (Esquema 19).

Estos compuestos fueron purificados mediante cromatografía en gel de sílice, en el caso de los derivados metoxilados y en fase reversa los derivados hidroxilados, obteniéndose todos ellos con alta pureza. Su caracterización se ha realizado de manera habitual mediante HPLC, EM, y RMN. En los cromatogramas de HPLC-MS se observó la presencia de dos picos con la misma masa molecular, en una proporción 56:44 para el derivado **2.89** y 50:50 para el derivado **2.90**, lo que apuntaba a una mezcla de diastereoisómeros, que se corroboró en los espectros de ¹H-RMN. La formación de los dos diastereoisómeros se achacó a la epimerización del C α del residuo de valina C-terminal durante el acoplamiento con el grupo hidroxilo de la chalcona.



Esquema 19

2.4.6.3 Derivados del tripeptido Val-Pro-Val

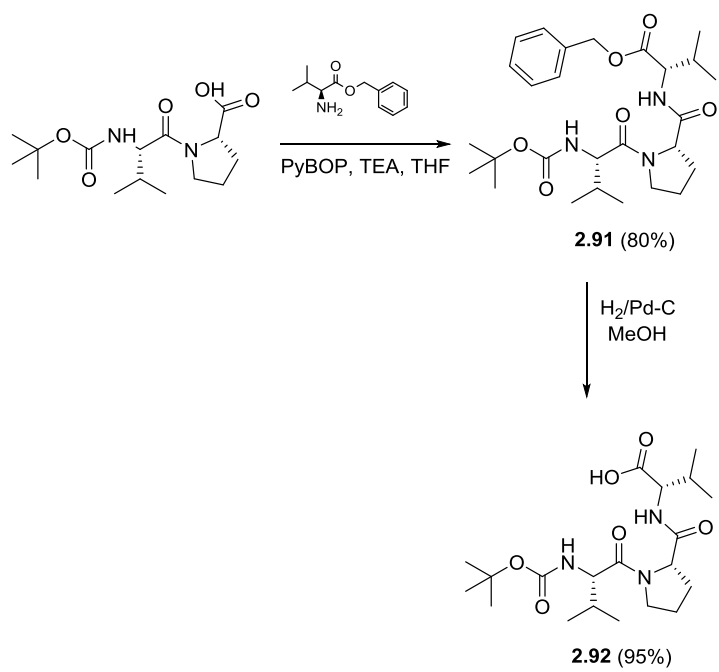
Esta estrategia, descrita por S. Velázquez y colaboradores, consiste en la unión al principio activo de secuencias oligopeptídicas que son reconocidas específicamente por la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV/CD26)²³⁵. Este tipo de enzima es capaz de hidrolizar secuencias dipeptídicas de péptidos naturales que contienen un residuo de Pro, o en menor medida uno de Ala, en la penúltima posición de su extremo N-terminal.

En nuestro caso, para evitar la formación rápida de dicetopiperazinas favorecidas por la presencia de prolina, se decidió incorporar directamente un fragmento tripeptídico, Val-Pro-Val, en el hidroxilo de la posición 4 del anillo B. La liberación del compuesto se llevaría a cabo por la actuación de la enzima CD26, seguida de una posterior hidrólisis química del residuo de Valina, que habíamos determinado que ocurría muy fácilmente en disolución acuosa.

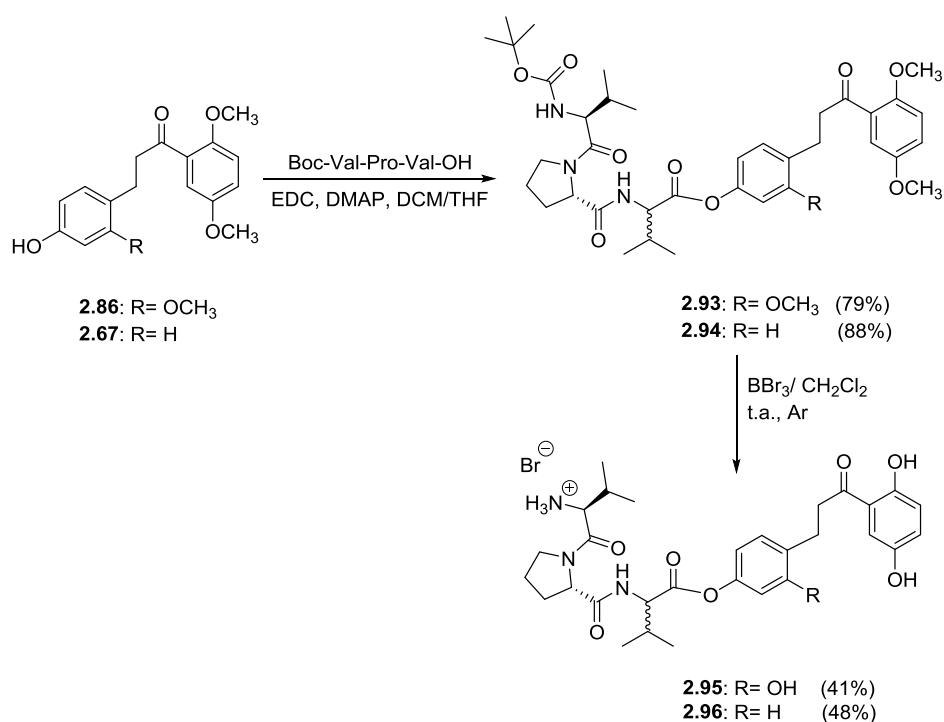
Cabe resaltar que los enlaces peptídicos en los que están involucrados residuos de Pro, y especialmente las secuencias con Pro en la penúltima posición del extremo N-terminal, no son reconocidos por exopeptidasas no especializadas por lo que dicha secuencia protege a los péptidos frente a la degradación proteolítica no específica, un aspecto importante en la estabilidad de un profármaco portador de secuencias peptídicas²³⁶.

La síntesis de los derivados tripeptídicos se llevó a cabo solamente con los compuestos saturados, dado los problemas de isomerización E-Z de las chalconas. Concretamente, partiendo de los derivados de 1-propanona **2.67** y **2.86**, la reacción de acoplamiento con Boc-Val-Pro-Val-OH²³⁷ **2.92** en DCM/THF (1:1), permitió la obtención de los compuestos **2.93** y **2.94** con rendimientos moderados. El tratamiento de los derivados tripeptídicos **2.93** y **2.94** con BBr₃ condujo a los análogos desprotegidos **2.95** y **2.96**, que se purificaron por cromatografía en fase reversa (Esquema 21). El tripéptido **2.91** se sintetizó previamente por reacción del dipéptido Boc-Val-Pro-OH (comercial) con el aminoácido H-Val-OBzl·Tos en THF, utilizando benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP) como agente de acoplamiento en presencia de trietilamina (TEA). El producto **2.91** se obtuvo como un único diastereoisómero, indicando que la reacción de acoplamiento transcurrió sin epimerización del residuo de prolina C-terminal. La hidrogenación catalítica del tripéptido Boc-Val-Pro-Val-OBzl (**2.91**) en presencia de Pd sobre carbono dio lugar al correspondiente tripéptido desprotegido en el extremo C-terminal Boc-Val-Pro-Val-OH²³⁷ (**2.92**), también como un único diastereoisómero (Esquema 20).

Todos estos compuestos han sido caracterizados de la manera habitual, mediante HPLC, EM, y RMN.



Esquema 20



Esquema 21

En los espectros de ¹H-RMN se puede observar que, también en este caso, los compuestos **2.95** y **2.96** se obtuvieron como mezclas de diastereoisómeros. La proporción fue de 49:51 (HPLC) para el derivado **2.95** y 62:38 (HPLC) para el análogo **2.96**. De nuevo, la formación de diastereoisómeros es debida a la epimerización del residuo C-terminal durante el proceso de acoplamiento del tripéptido.

2.4.6.4 Estudios de Estabilidad química y enzimática

• 2.4.6.4.1 Estabilidad de los profármacos en disolución acuosa

Con objeto de poder estimar la estabilidad de los profármacos preparados en medios fisiológicos, se llevó a cabo un estudio en PBS (pH=

7.4), conteniendo un 5% de DMSO a 25° C. La evolución de los compuestos a diferentes tiempos se siguió por HPLC -analítico.

Como ya se comentó anteriormente, el derivado de Valina **2.83** resultó ser muy inestable en disolución acuosa, liberando el compuesto **2.23** en un breve espacio de tiempo, (100% de transformación 30 minutos) (Figura 52, Figura 55).

Los derivados dipeptídicos **2.89** y **2.90**, según la aproximación en la que se basó su diseño, deberían transformarse vía formación de dicetopiperazinas en los correspondientes precursores **2.51** y **2.69**, respectivamente. En ambos casos, aproximadamente el 60% del fármaco había sido liberado tras 5 horas en disolución, dando lugar al correspondiente compuesto activo (Figura 53, Figura 55, Esquema 22).

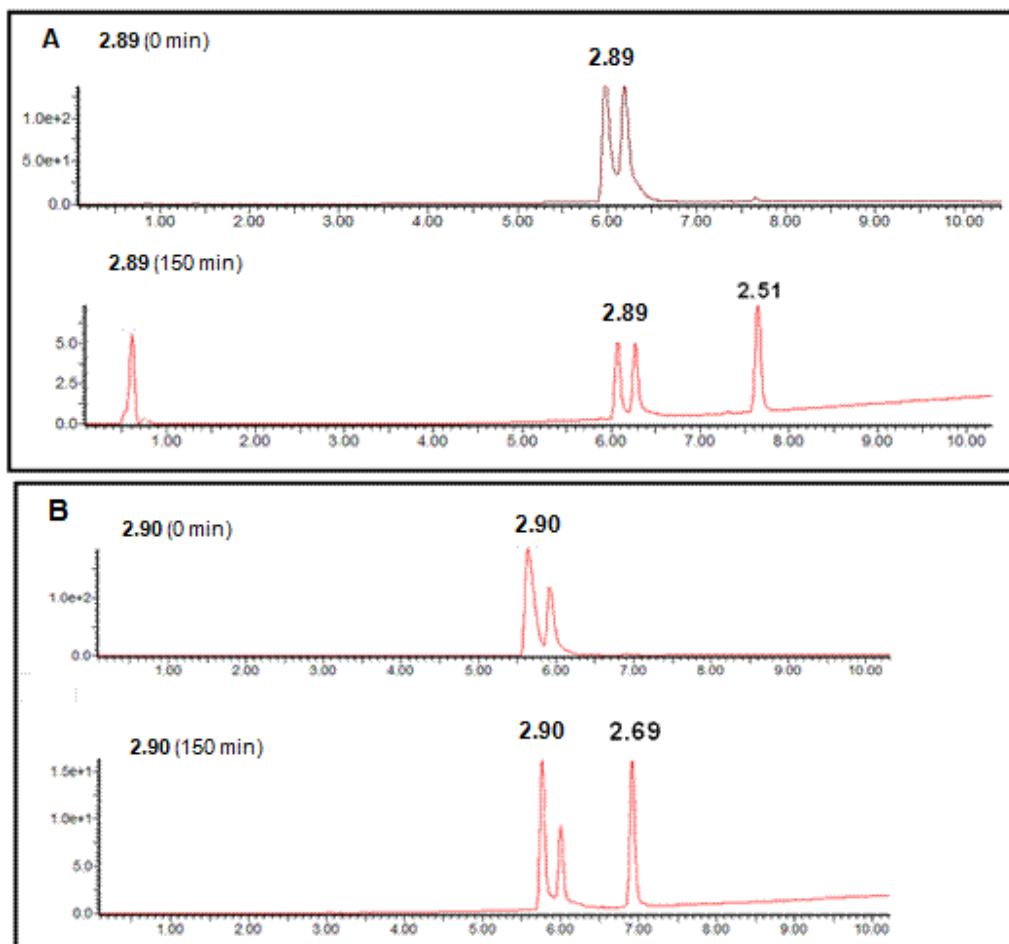
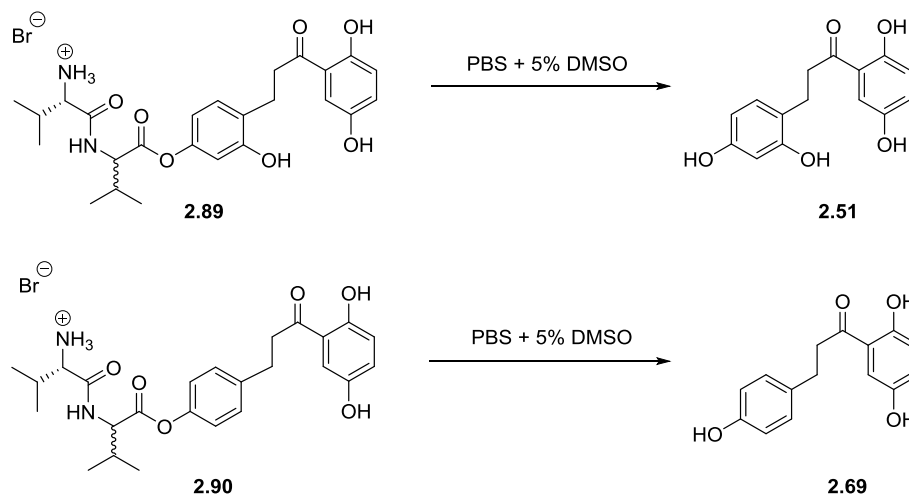
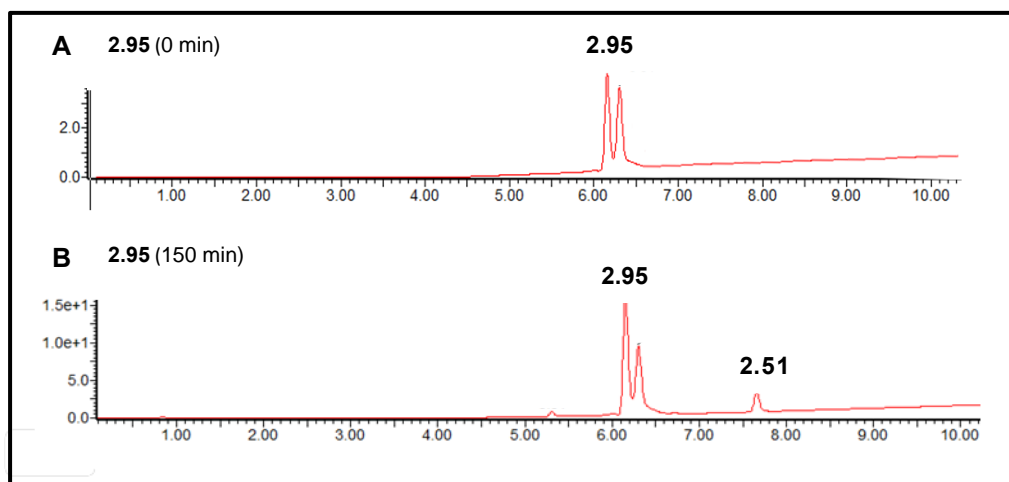


Figura 53. Cromatogramas de estabilidad del compuesto **2.89** a tiempo 0 (A) y 150 minutos (B) y del compuesto **2.90** a tiempo 0 (C) y a 150 minutos (D).



Esquema 22

En cuanto a los derivados tripeptídicos **2.95** y **2.96** se observa que en disolución de PBS/5% de DMSO, presentan una mínima degradación al cabo de 5 horas. Este resultado pone de manifiesto por tanto la necesidad de la presencia de la enzima para ser transformados en el compuesto activo, lo que se corresponde con la estrategia en la que se basó su diseño (Figura 54, Figura 55, Esquema 23).



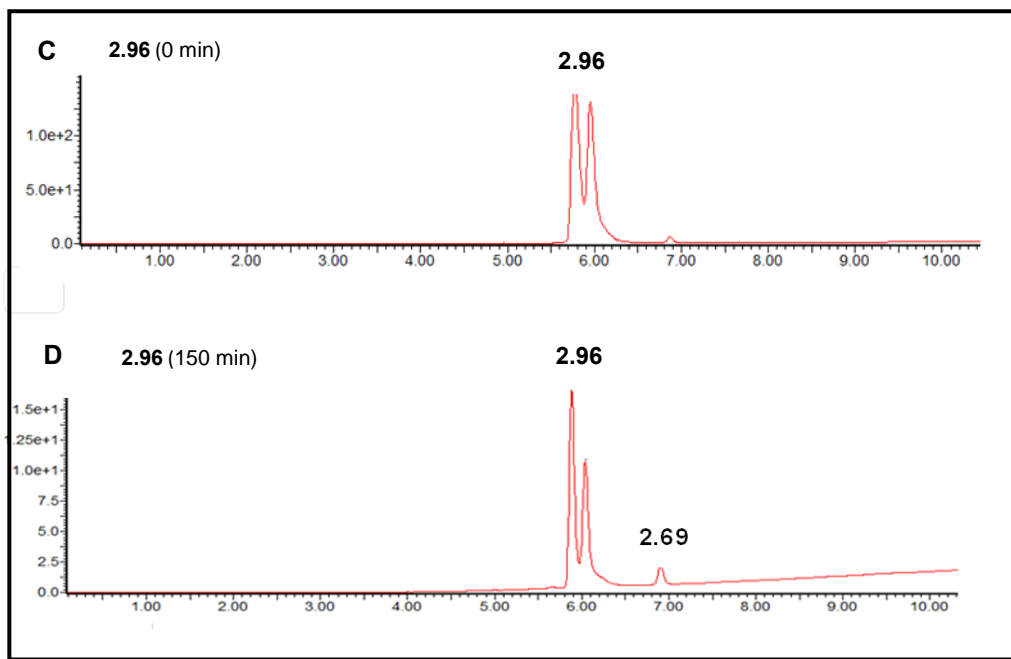
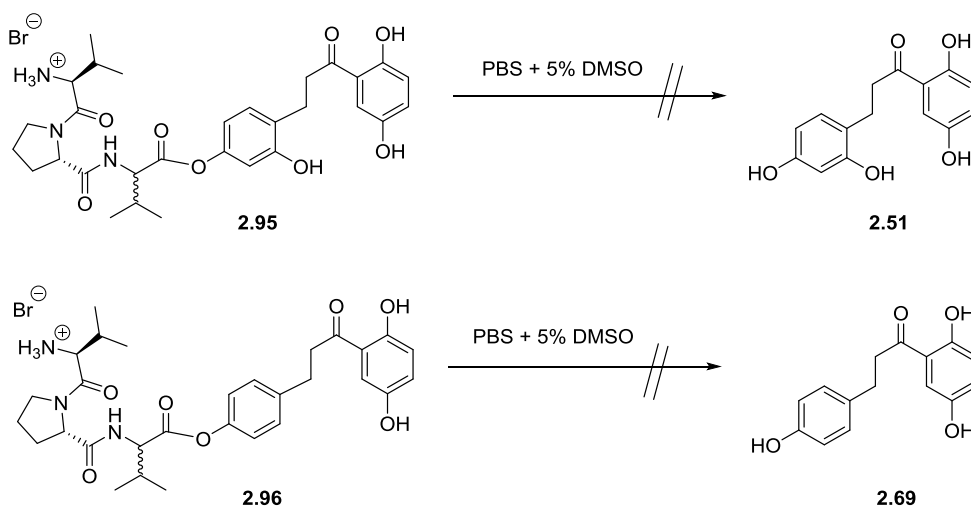


Figura 54. Cromatogramas de estabilidad del compuesto **2.95** a tiempo 0 (A) y 150 minutos (B) y del compuesto **2.96** a tiempo 0 (C) y a 150 minutos (D).



Esquema 23

En la Figura 55 se recogen los porcentajes de degradación a los tiempos indicados para los diferentes profármacos entre 15 y 300 minutos. Como se puede observar en el caso de los derivados dipeptídicos la degradación a las 5 horas fue significativamente mayor que en el caso de los derivados tripeptídicos, como era de esperar teniendo en cuenta los mecanismos de liberación del fármaco en los que se ha basado el diseño de cada uno de ellos. En la Figura 56 se recoge el porcentaje de degradación a los tiempos indicados de los derivados de Val, Val-Val y Val-Pro-Val.

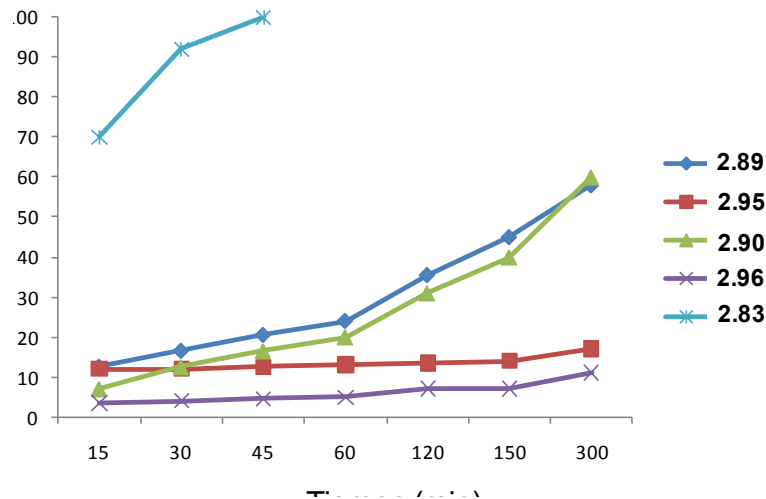


Figura 55. Degradación de los profármacos al compuesto precursor activo mostrado en un diagrama de líneas. (PBS + 5% DMSO, 25° C).

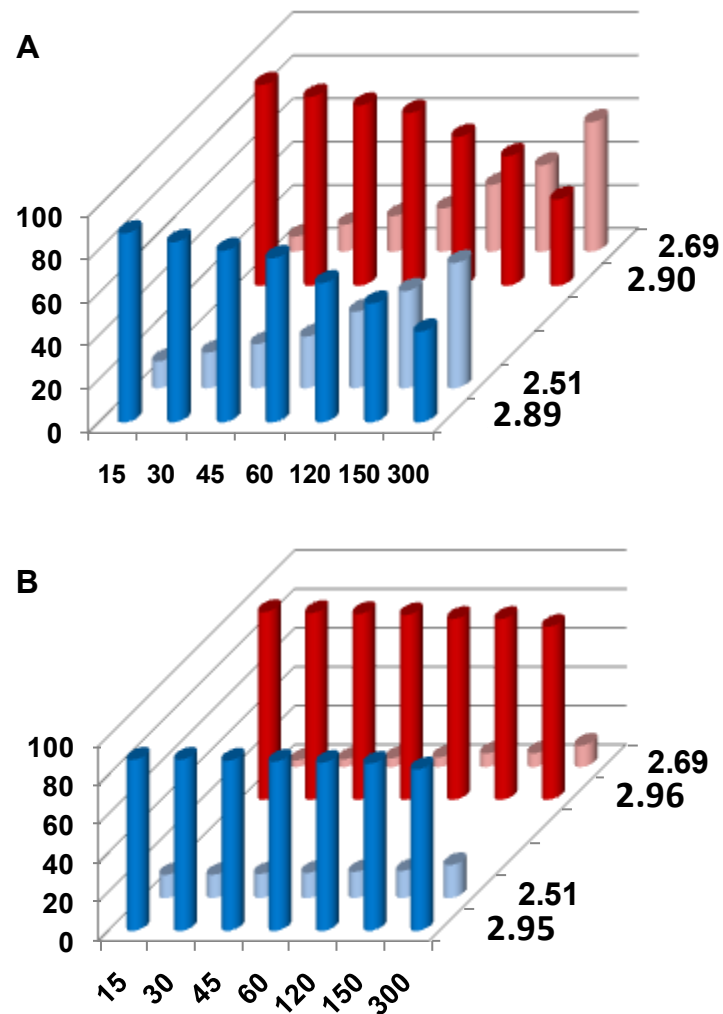


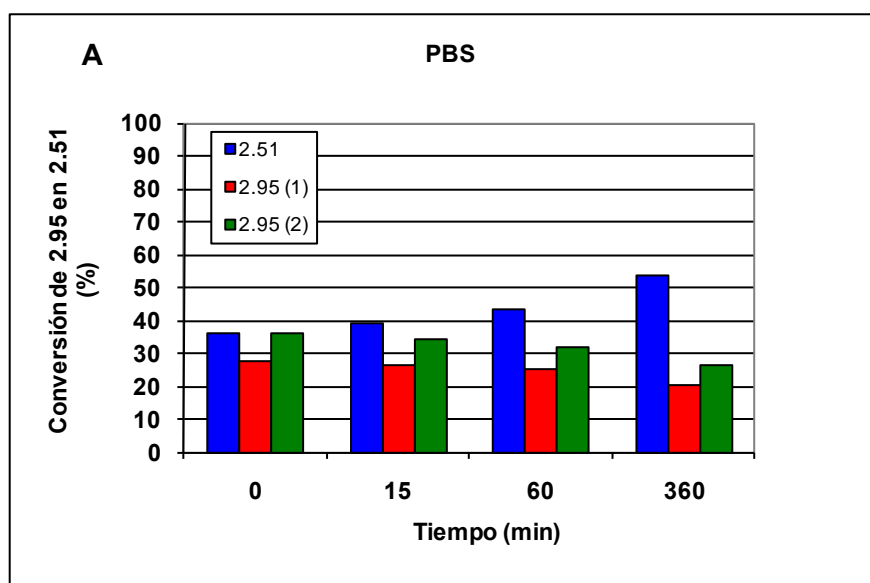
Figura 56. A) Degradación de los profármacos dipeptídicos. B) Degradación de los profármacos tripeptídicos (PBS + 5% DMSO, 25° C).

2.4.6.4.2 Estabilidad de los profármacos tripeptídicos frente a la enzima dipeptidil-peptidasa IV (CD26)

Para confirmar que el fragmento Val-Pro en los profármacos tripeptídicos se metabolizaba por la enzima dipeptidil-peptidasa IV (CD26), como era de esperar dada la estrategia utilizada, se llevó a cabo un estudio

de estabilidad con los compuestos **2.95** y **2.96** en presencia de la enzima, tanto recombinante como natural (suero sanguíneo). Estos estudios fueron realizados por el grupo de la Dra. Lieve Naesen en el Instituto Rega (Lovaina, Bélgica).

Los compuestos fueron incubados a 37 °C de cuatro formas diferentes: con PBS sólo, con la enzima dipeptidil-peptidasa IV en PBS, con un 20% de suero humano en PBS y por último con un 20% de suero bovino en PBS. Después de 0, 15, 60 y 360 minutos de incubación, las disoluciones se trataron con MeOH frío, se centrifugaron y finalmente se analizaron por HPLC.



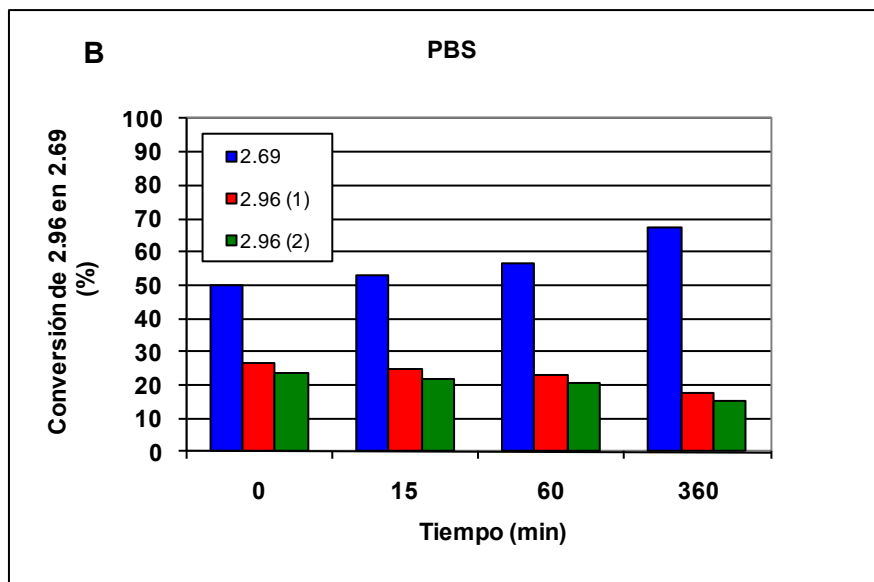


Figura 57. A) Conversión del profármaco **2.95** en el compuesto **2.51** en PBS. B) Conversión del profármaco **2.96** en el compuesto **2.69** en PBS. Las barras rojas y verdes se corresponden con cada uno de los isómeros del respectivo profármaco.

Tras la incubación de **2.95** y **2.96** a 37 °C en PBS, a tiempo 0, existe ya un porcentaje importante tanto del compuesto **2.51** (36%) como del **2.69** (50%). Puesto que en los estudios de estabilidad realizados previamente en PBS a temperatura ambiente no se observaron porcentajes tan elevados de compuesto liberado, estos resultados podrían explicarse por la mayor temperatura de incubación (Figura 57). A tiempo 360 minutos los porcentajes de producto liberados llegaron a 54 y 68%, respectivamente, indicando una estabilidad química moderada de los profármacos tripeptídicos en estas condiciones.

Una vez incubados en presencia de la enzima CD26 en PBS, se puede observar que la conversión del profármaco en el producto activo fue prácticamente del 100% después de 60 minutos (98% en el caso del compuesto **2.95** y del 95% en el caso de **2.96**) (Figura 58). Estos resultados

indican que, en presencia de la enzima recombinante, la mayor parte de la hidrólisis observada se produce vía enzimática.

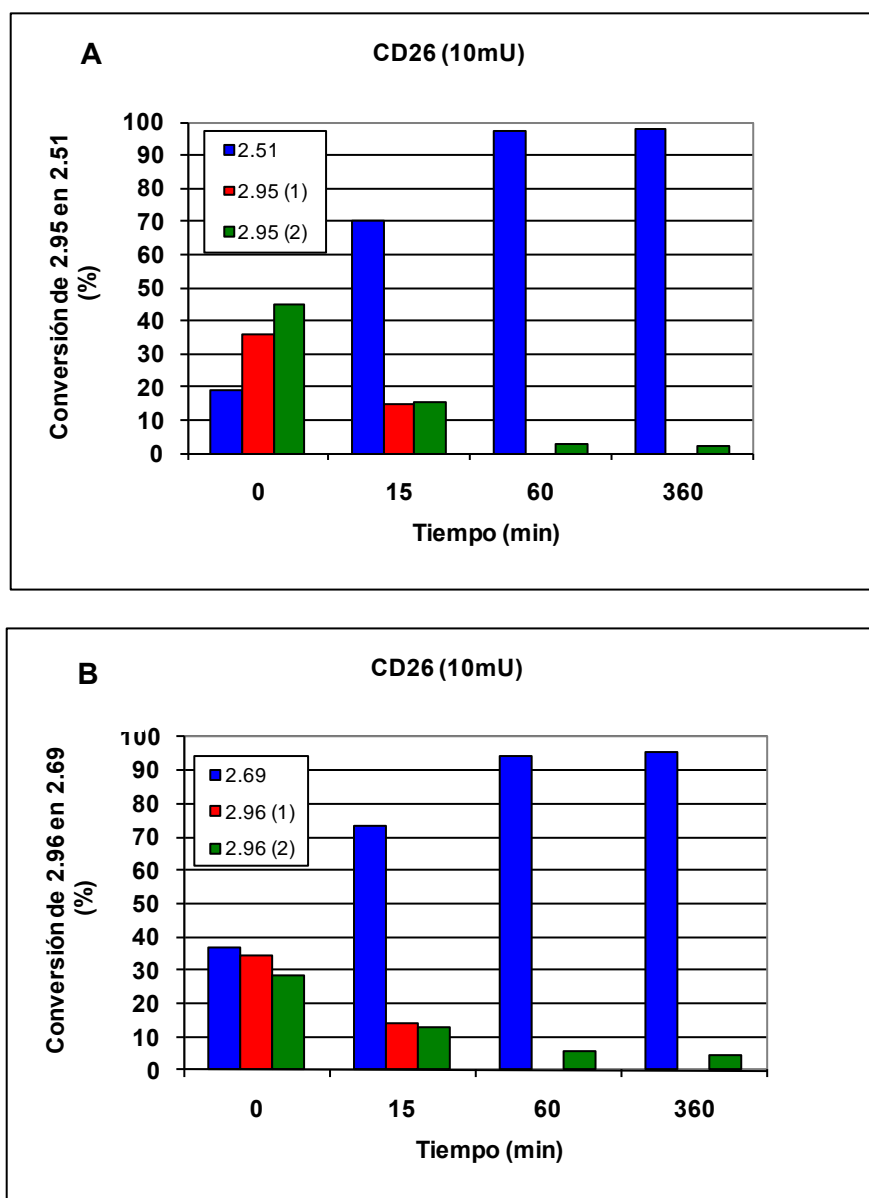
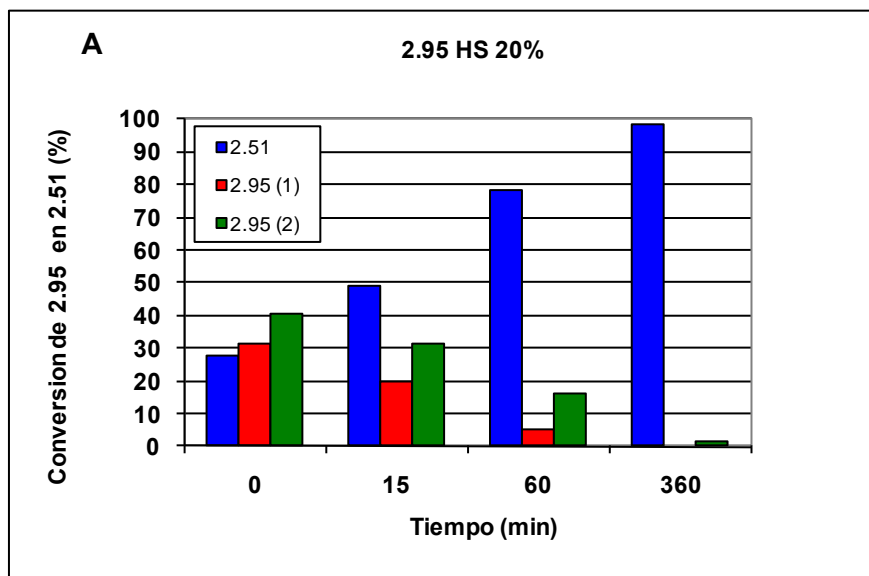


Figura 58. A) Conversión del profármaco **2.95** en presencia de CD26 recombinante en el compuesto **2.51** en 360 minutos. B) Conversión del profármaco **2.96** en presencia de CD26 recombinante en el compuesto **2.69** en 360 minutos.

También se determinó la estabilidad de estos profármacos en suero humano y en suero bovino, como fuente natural de la enzima CD26. Cuando se incubó en suero humano con un 20% de PBS (Figura 59) se puede observar que la conversión fue prácticamente del 100% a los 360 minutos. Algo muy similar sucede cuando la incubación es en suero bovino (Figura 60). Se puede observar que la degradación a tiempo 0 disminuyó ligeramente cuando los profármacos se incubaron con la enzima recombinante y con sueros humano y bovino en comparación con la conversión a tiempo 0 en PBS solo.



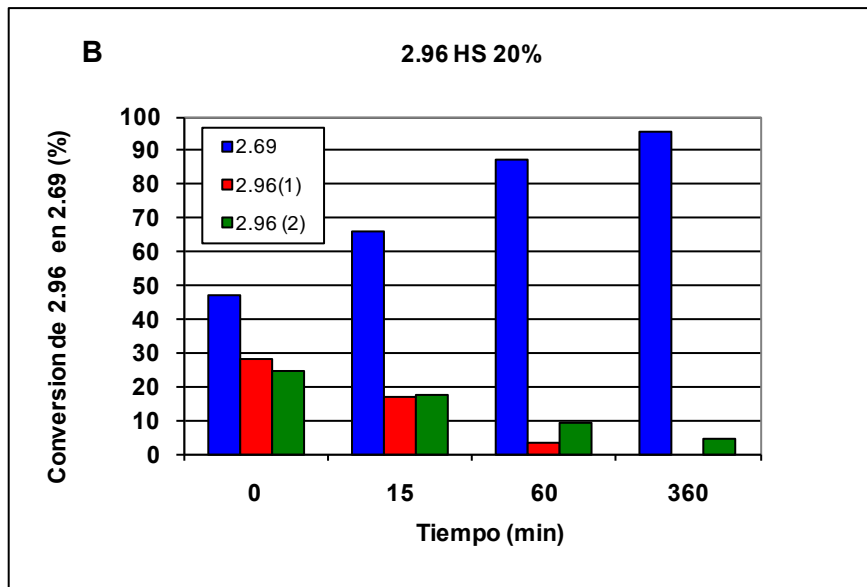
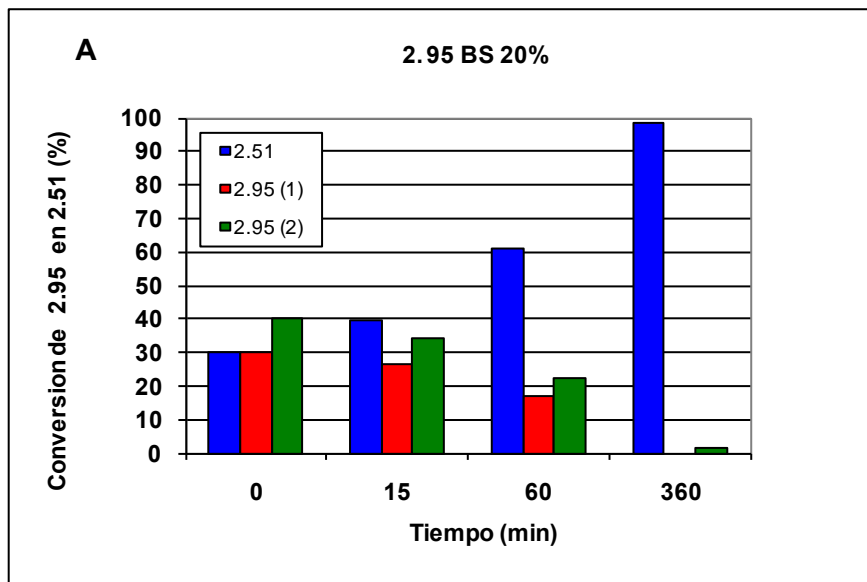


Figura 59. A) Conversión del profármaco **2.95** en suero humano con un 20% de PBS en el compuesto **2.51** en 360 minutos. B) Conversión del profármaco **2.96** en suero humano con un 20% de PBS en el compuesto **2.69** en 360 minutos.



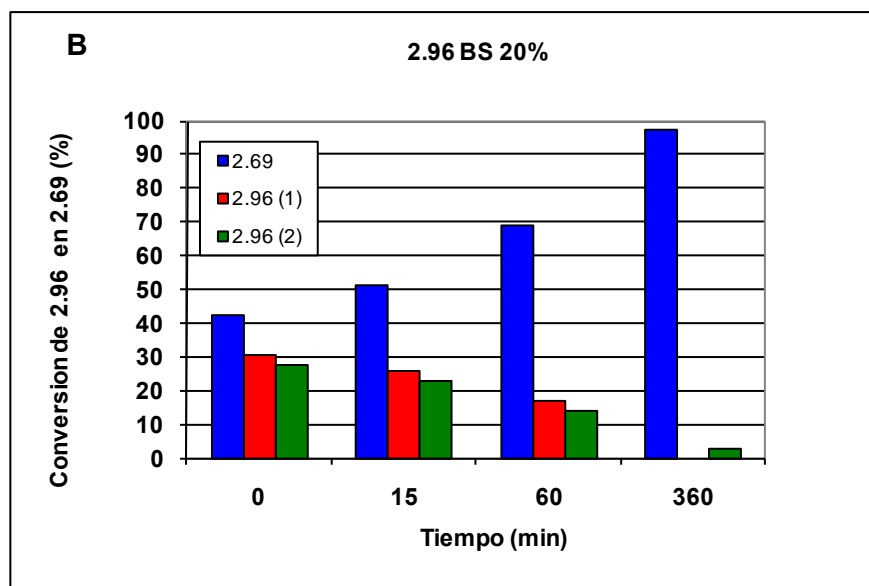


Figura 60. A) Conversión del profármaco **2.95** en suero bovino con un 20% de PBS en el compuesto **2.51** en 360 minutos. B) Conversión del profármaco **2.96** en suero bovino con un 20% de PBS en el compuesto **2.69** en 360 minutos.

Teniendo en cuenta todos estos resultados se puede concluir que aunque un porcentaje de hidrólisis ocurre de manera espontánea en disolución acuosa a 37° C, la liberación del principio activo aumenta considerablemente en presencia de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (CD26), validando la estrategia utilizada.

2.4.6.5 Estudios electrofisiológicos en Ovocitos

Todos los profármacos sintetizados, derivados de Val, dipeptídicos y tripeptídicos han sido evaluados en ovocitos que expresaban el receptor nicotínico $\alpha 7$. Ninguno de estos compuestos fue capaz de potenciar la actividad mediada por ACh en el mencionado receptor. Más bien al contrario, todos ellos disminuyeron la actividad con respecto a la inducida por ACh sola. Se requerirán estudios adicionales para poder interpretar estos resultados.

Tabla 25. Resultados de actividad a 10 μM en el receptor nicotínico $\alpha 7$ de los compuestos **2.85**, **2.89**, **2.90**, **2.95** y **2.96**

Comp	Estructura	Actividad a 10 μM	Comp	Estructura	Actividad a 10 μM
2.85		25	2.95		25
2.89		27	2.96		25
2.90		15			

^aRespuesta a 10 μM en ovocitos de $\alpha 7$.

2.5 CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes del trabajo que se recoge en el capítulo 2 de esta memoria, cuyo objetivo principal era la modulación alostérica del receptor nicotínico $\alpha 7$, se resumen en las siguientes conclusiones:

- Se han preparado diferentes series de compuestos, nuevas chalconas y derivados de chalcona, mediante modificaciones en el número y posición de los grupos OH fenólicos, sustitución de los grupos hidroxilo por otros grupos funcionales o sustitución del anillo aromático B por otros sistemas aromáticos, así como modificaciones en la naturaleza del espaciador e incorporación de mayor restricción conformacional.

- Se han descubierto nuevos moduladores alostéricos positivos (tipo II) del receptor nicotínico $\alpha 7$ mediante ensayos *in vitro* de los compuestos anteriores en ovocitos de *Xenopus*. Dentro de las chalconas se ha identificado a **2.23** (2,4,2',5'-OH) como el compuesto más potente y eficaz, mejorando el perfil farmacológico del prototipo **97**. Entre los derivados no chalconoides destacan los compuestos **2.51** (2,4,2',5'-OH) y **2.69** (4,2',5'-OH), con el doble enlace reducido.

- Los ensayos de citotoxicidad en líneas celulares y toxicidad en órganos aislados confirmaron que estos compuestos muestran un perfil de seguridad aceptable.

- Los estudios realizados en cultivos neuronales tratados con Rotenona y Oligomicina A han permitido determinar la actividad neuroprotectora de **2.23**, que mostró actividad igual o mayor a la del compuesto de referencia PNU-282987 (agonista selectivo $\alpha 7$).

- Los ensayos de analgesia *In vivo* han demostrado que los compuestos **2.23** y **2.69** presentan actividad antinociceptiva comparable a la del modelo de referencia PNU-120596 (también PAM tipo II). Estos compuestos podrían ser candidatos para seguir realizando estudios farmacológicos más amplios.

- El Test de Morris mostró la acción positiva del compuesto **2.23** sobre la capacidad de aprendizaje en roedores, sugiriendo un efecto en funciones cognitivas y, por tanto, su potencial interés en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer.

- La evaluación preliminar de las propiedades farmacocinéticas de **2.23**, **2.51** y **2.69**, sugirió que los dos últimos compuestos poseen en general un mejor perfil, aunque la permeabilidad y la inestabilidad metabólica necesitan mejorarse.

- Se han preparado profármacos aminoacídicos y peptídicos de los compuestos que han mostrado una mayor actividad farmacológica en el receptor nicotínico $\alpha 7$. A falta de estudios adicionales, entre estos profármacos los derivados dipeptídicos parecen los más prometedores.

Todas estas conclusiones se representan de manera gráfica en la Figura 61.

DE MOLECULA PROTOTIPO A COMPUESTO OPTIMIZADO

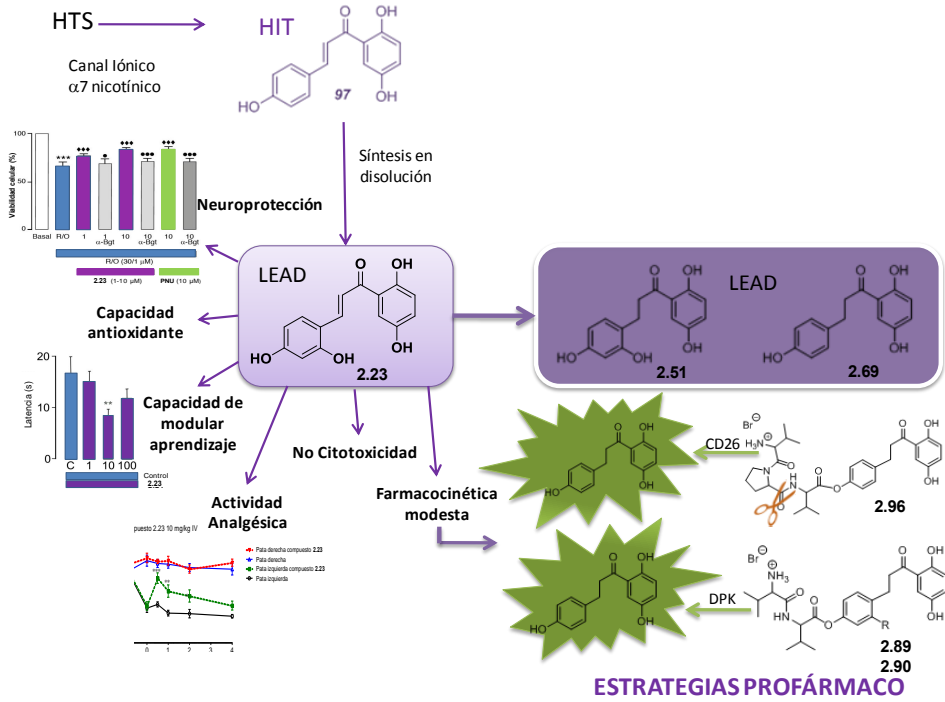


Figura 61. Resumen de resultados y conclusiones del capítulo 2.

2.6 PARTE EXPERIMENTAL

2.6.1 Generalidades

Las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina y HPLC-MS. Los disolventes utilizados como eluyente en cromatografía fueron de calidad HPLC y las placas de gel de sílice de cromatografía en capa fina Merk 60 F254. Los compuestos se detectaron con luz UV a 254 nm y/o a 365 nm.

Los disolventes anhidros empleados en las reacciones se prepararon mediante técnicas habituales (D. D. Perrin, D. R. Perrin, Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press: Oxford. 2ªEd., 1989).

Los espectros de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN se registraron en espectrómetros Varian-INOVA 300, Bruker-AVANCE 300, Varian-MERCURY 400 o Varian-INOVA 400, Varian UNITY 500 usando TMS como referencia interna en el caso de las muestras disueltas en CDCl_3 y la señal correspondiente al disolvente en el resto de casos (DMSO-d_6 o D_2O). Los desplazamientos químicos se indican en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hercios (Hz). Las asignaciones de las diferentes señales de ^{13}C -RMN se realizaron mediante experimentos HSQC de correlación heteronuclear ^1H , ^{13}C .

Los HPLC analíticos se realizaron en un equipo Waters, equipado con una columna de fase reversa Novapak C18 (3.9 × 150 mm, 4 μm) y con un flujo de 1 mL/min, o Agilent, equipado con una columna de fase reversa Eclipse Plus C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm) y con un flujo de 1.5 mL/min. En ambos casos, la fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas de CH_3CN (A) y disolución al 0.05% de TFA en H_2O (B) y la detección de picos se realizó por UV a 220 y 254 nm. Los análisis de HPLC-MS se llevaron a cabo en un equipo Waters 2695, con una columna de fase reversa Sunfire C18 (4.6 × 50 mm, 3.5 μm) y conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y como eluyentes se

utilizaron mezclas de disolución al 0.1% de HCOOH en CH₃CN (A) y disolución al 0.1% de HCOOH en H₂O (B).

Las masas exactas se realizaron en un Sistema 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS de Agilent Technologies. La fase móvil empleada es una mezcla de Acetonitrilo:agua (75:25). Se empleó un caudal de 200 µL/min con una inyección directa de 5 µL. La ionización puede ser electrospray (+/-), con un voltaje de 4500 V, un fragmentador de 150 V y un Skimmer de 85 V.

Las separaciones cromatográficas se realizaron en columna de media presión (flash) con gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh) y en el caso de la fase reversa empleando cartuchos SNAP KP-C₁₈-HS 12 g (12 x 150 mm), 25 g, en un equipo Biotage Isolera One. Los eluyentes empleados y la relación v:v se indican en cada caso.

Las purificaciones realizadas mediante cromatografía circular centrífuga, fueron llevadas a cabo en un cromatotrón Harrison Research modelo 8924, en platos circulares de vidrio sobre los que se utilizó gel de sílice 60 PF254 con yeso, a 1 ó 2 mm de espesor.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Mettler Toledo MP70 y están sin corregir.

El dispositivo de microondas utilizado es un equipo Initiator™ de Biotage®

Los productos finales obtenidos fueron cristalizados (el disolvente de cristalización se indica en cada caso) o liofilizados en un equipo Telstar 6-80.

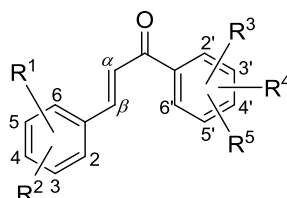


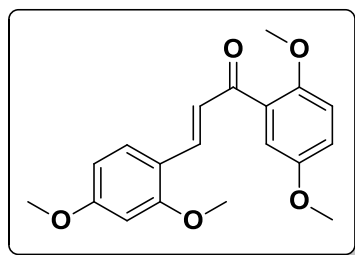
Figura 62. Numeración del sistema de chalcona utilizado para la asignación de las señales de RMN

2.6.2 Síntesis de Polimetoxi y Polihidroxi Chalconas

2.6.2.1 Procedimiento General para la síntesis de chalconas polimetoxiladas:

A una disolución del correspondiente benzaldehído (1.91 mmol) en EtOH (15 mL), se añade la acetofenona deseada (0.263 mL, 1.66 mmol). La disolución se enfría a 0°C y se añade, lentamente, NaOH 40% (1.87 mL). Tras 15 horas de agitación a temperatura ambiente se añade agua y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida. La fase acuosa se extrae con AcOEt y la fase orgánica resultante se lava con agua y disolución saturada de NaCl, se seca sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se cristaliza de MeOH.

(*E*)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2,4-dimetoxifenil)-2-propenoona (2.16)



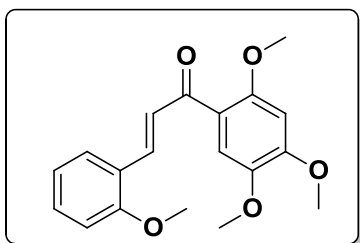
Sólido cristalino amarillo (465 mg). Rdto. 85%. (P.f.:85-87°C, MeOH, p.f.Lit²³⁸, 112°C, EtOH).

HPLC (Sunfire): $t_R = 9.75$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.74 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.83 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe),

6.60 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 5-H), 6.63 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 7.00 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, 6'-H), 7.09 (dd, 1H, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 4'-H), 7.12 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 3'-H) 7.30 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H_a), 7.66 (d, 1H, $J = 8.6$, 6-H), 7.70 (d,

1H, $J = 16.0$ Hz, H_{β}) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 55.53 (OMe), 55.55 (OMe), 55.80 (OMe), 56.33 (OMe), 98.40 (C-3), 106.38 (C-5), 113.90 (C-3', C-6'), 115.79 (C-1), 118.00 (C-4'), 124.49 (C_{α}), 129.87 (C-1'), 130.23 (C-6), 138.10 (C_{β}), 151.67 (C), 153.02 (C), 159.84 (C), 162.93 (C), 191.90 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 329.5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 351.5 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

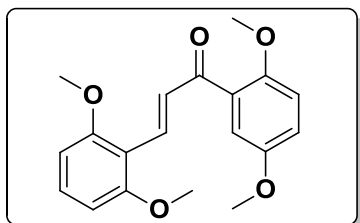
(E)-3-(2-Metoxifenil)-1-(2',4',5'-trimetoxifenil)-2-propenona (2.17)



Sólido cristalino amarillo (475 mg). Rdto. 87%. (P.f.:128-130°C, MeOH). **HPLC** (Sunfire): t_R = 7.50 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.74 (s, 3H, OMe), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe), 3.93 (s, 3H, OMe), 6.80 (s, 1H, 6'-H),

7.01 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, 5-H), 7.10 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 3-H), 7.21 (s, 1H, 3'-H), 7.42 (td, 1H, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 4-H), 7.66 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_{α}), 7.70 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 6-H), 7.83 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_{β}) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 55.66 (OMe), 55.91 (OMe), 55.98 (OMe), 56.68 (OMe), 98.06 (C-3'), 111.79 (C-3), 112.76 (C-6'), 119.48 (C-1), 120.83 (C-1'), 123.31 (C_{α}), 127.43 (C-4), 128.50 (C-5), 131.72 (C-6), 136.00 (C_{β}), 142.82 (C), 153.64 (C), 154.60 (C), 158.15 (C), 188.93 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 329.5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 351.5 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2,6-dimetoxifenil)-2-propenona (2.18)

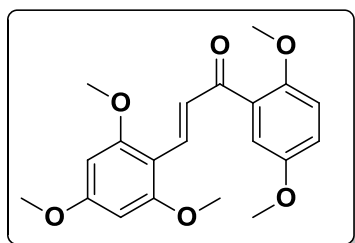


Sólido cristalino amarillo (494 mg). Rdto. 90%. (P.f.:123-125°C, MeOH). **HPLC** (Sunfire): t_R = 6.72 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.74 (s, 3H, OMe), 3.82 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 6H, 2-

OMe), 6.73 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 3-H y 5-H), 7.02 (m, 1H, 4'-H), 7.09 (d, 1H, $J =$

9 Hz, 3'-H), 7.12 (d, 1H, 6'-H), 7.37 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz, 4-H), 7.72 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H_α), 7.91 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H_β) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 55.56 (OMe), 56.03 (OMe), 56.03 (OMe), 56.32 (OMe), 104.23 (C-3 y C-5), 111.48 (C-3'), 113.96 (C-6'), 114.05 (C-4'), 118.35 (C_α), 128.81 (C-4), 129.83 (C-1), 132.22 (C-1'), 133.61 (C_β), 151.91 (C), 153.08 (C), 159.86 (C), 159.86 (C), 192.45 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 329.5 ($\text{M}+\text{H}^+$), 351.5 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

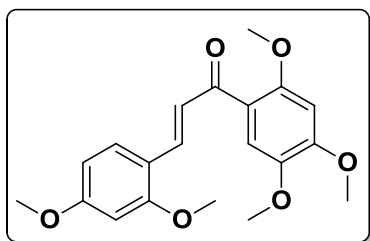
(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2,4,6-trimetoxifenil)-2-propenona (2.19)



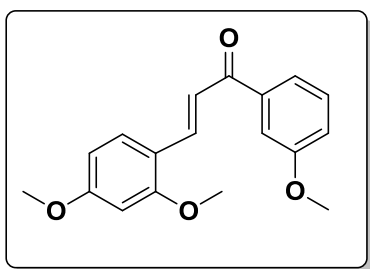
Sólido cristalino amarillo (483 mg). Rdto. 81%. (P.f.: 117-119°C, MeOH, p.f.Lit²³⁹, 114-116°C).

HPLC (Sunfire): $t_R = 7.52$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.73 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 6H, 2-OMe), 6.30 (s, 2H, 3-H y 5-H), 6.98 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 7.07 (dd, 1H, $J = 9.0, 2.9$ Hz, 4'-H), 7.11 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 3'-H), 7.57 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H_α), 7.87 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H_β).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 56.19 (OMe), 56.24 (OMe), 56.69 (OMe), 56.94 (2-OMe), 91.7 (C-3 y C-5), 105.67 (C-1), 114.60 (C-3'), 114.63 (C-6'), 118.49 (C-4'), 126.54 (C_α), 130.94 (C-1'), 134.80 (C_β), 152.36 (C), 153.71 (C), 161.87 (C), 161.87 (C), 163.84 (C), 193.25 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 359.5 ($\text{M}+\text{H}^+$), 381.5 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

(E)-3-(2,4-Dimetoxifenil)-1-(2',4',5'-trimetoxifenil)-2-propenona (2.20)

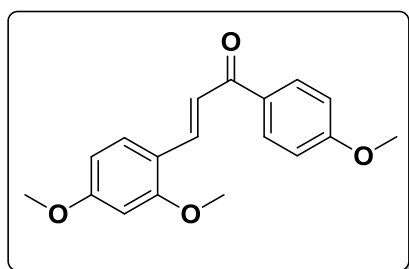
Sólido cristalino amarillo (488 mg). Rdto. 82%. (P.f.:130-132°C, MeOH). **HPLC** (Sunfire): t_R = 4.92 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.73 (s, 3H, OMe), 3.82 (s, 3H, OMe), 3.88 (s, 3H, OMe), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.91 (s, 3H, OMe), 6.59-6.64 (m, 2H, 3-H y 5-H), 6.79 (s, 1H, 6'-H), 7.19 (s, 1H, 3'-H), 7.55 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_α), 7.63 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 6-H), 7.76 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_β) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 56.15 (OMe), 56.41 (OMe), 56.56 (OMe), 56.59 (OMe), 57.29 (OMe), 98.75 (C-3), 99.07 (C-3'), 106.93 (C-5), 113.45 (C-6'), 116.87 (C-1), 120.47 (C-1'), 125.52 (C_α), 130.75 (C-6), 137.06 (C_β), 148.40 (C), 153.96 (C), 154.96 (C), 160.40 (C), 163.23 (C), 189.61 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 359.4 (M+H) $^+$, 381.5 (M+Na) $^+$.

(E)-3-(2,4-Dimetoxifenil)-1-(3'-metoxifenil)-2-propenona (2.21)

Sólido cristalino amarillo (205 mg). Rdto: 42%. (P.f.:70-73°C, MeOH, p.f.Lit²⁴⁰, 76-79°C). **HPLC** (Sunfire): t_R = 9.82 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.83 (s, 6H, OMe), 3.89 (s, 3H, OMe), 6.59-6.64 (m, 2H, 3-H y 5-H), 7.20 (ddt, 1H, $J = 8.1, 2.7, 0.8$ Hz, 4'-H), 7.46 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, 3'-H), 7.54 (dd, 1H, $J = 2.7, 1.5$ Hz, 6'-H), 7.69 (dt, 1H, $J = 8.1, 0.8$ Hz, 2'-H), 7.72 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, H_α), 7.93 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 6-H), 7.99 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, H_β) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 55.32 (OMe), 55.52 (OMe), 55.83 (OMe), 98.26 (C-3), 106.36 (C-5), 112.81 (C-6'), 115.90 (C-1), 118.77 (C-4'), 119.11 (C-2'), 120.78 (C_α), 129.84 (C-3'), 130.15 (C-6), 138.87 (C_β), 139.55 (C-1'), 159.51

(C), 159.99 (C), 163.16 (C), 188.93 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 299.3 (M+H)⁺, 321.3 (M+Na)⁺.

(E)-3-(2,4-Dimetoxifenil)-1-(4'-metoxifenil)-2-propenona (2.22)

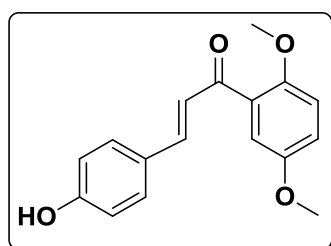


Sólido cristalino amarillo (203 mg). Rdto: 41%. (P.f.:81-84°C, MeOH, p.f.Lit²⁴¹, 82°C).

HPLC (Sunfire): t_R = 9.85 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.84 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe) 6.61-

6.64 (m, 2H, 3-H y 5-H), 7.07 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2'-H y 6'-H), 7.76 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H_α), 7.92 (d, 1H, J = 8.2 Hz, 6-H), 7.97 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H_β), 8.11 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 3'-H y 5'-H) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 55.51 (OMe), 55.51 (OMe), 55.81 (OMe), 98.28 (C-3), 106.28 (C-5), 113.93 (C-3', C-5'), 116.04 (C-1), 119.01 (C_α), 129.96 (C-6), 130.62 (C-2', C-6'), 130.86 (C-1'), 137.88 (C_β), 159.83 (C), 162.92 (C), 162.92 (C), 187.41 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 299.3 (M+H)⁺, 321.3 (M+Na)⁺.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenona (2.65)



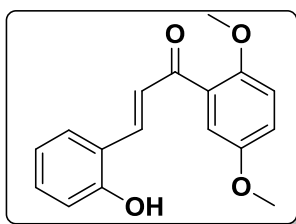
Sólido cristalino amarillo (223 mg). Rdto: 48%. (P.f.:126-129°C, MeOH, P.f.Lit²⁴², 127-128°C).

HPLC (Sunfire): t_R = 8.40 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.74 (s, 3H, OMe), 3.79 (s, 3H, OMe), 6.81 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 3-H y 5-H), 7.00

(m, 1H, 4'-H), 7.09 (m, 2H, 3'-H y 6'-H), 7.18 (d, 1H, J = 15.9 Hz, H_α), 7.42 (d, 1H, J = 15.9 Hz, H_β), 7.56 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 2-H y 6-H), 10.08 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (75MHz, DMSO- d_6) δ : 55.56 (OMe), 56.36 (OMe), 113.84 (C-

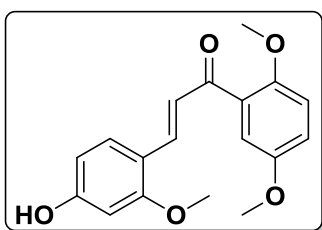
6'), 113.90 (C-3'), 115.94 (C-3, C-5), 117.96 (C-4'), 123.56 (C-1), 125.56 (C_α), 129.80 (C-1'), 130.65 (C-2, C-6), 143.62 (C_β), 151.64 (C), 153.03 (C), 160.08 (C), 191.79 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 285.5 (M+H)⁺, 307.5 (M+Na)⁺.

(E)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-3-(2-hidroxifenil)-2-propenona (2.66)



Sólido cristalino anaranjado 332 mg. Rdto: 70%. (P.f.: 114-119°C, MeOH). **HPLC** (Sunfire): *t_R* = 8.75 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.74 (s, 3H, OMe), 3.79 (s, 3H, OMe), 6.85 (td, 1H, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 5-H), 6.91 (dd, 1H, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 3-H), 7.01 (dd, 1H, *J* = 2.8, 0.8 Hz, 4'-H), 7.10 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, 3'-H), 7.11 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz, 6'-H), 7.25 (ddd, 1H, *J* = 8.2, 7.5, 1.6 Hz, 4-H), 7.39 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz, H_α), 7.63 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 6-H), 7.76 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz, H_β), 10.23 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55.56 (OMe), 56.35 (OMe), 113.92 (C-3', C-6'), 116.21 (C-3), 118.04 (C-4'), 119.50 (C-1), 121.28 (C-1'), 126.14 (C_α), 128.59 (C-4), 129.75 (C-6), 131.56 (C-5), 138.80 (C_β), 151.68 (C), 153.04 (C), 157.06 (C), 192.30 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): 285.5 (M+H)⁺, 267.5 (M+H-H₂O)⁺.

(E)-1-(Dimetoxifenil)-3-(2-metoxi-4-hidroxifenil)-2-propenona (2.81)



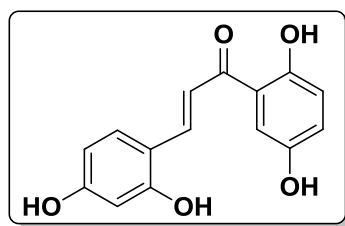
Sólido amarillo (310 mg). Rdto: 60%. (P.f.: 172-175°C, MeOH). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 50% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): *t_R* = 8.51 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.73 (s, 3H, OMe), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 6.43 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 5-H), 6.46 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, 3-H), 6.98 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, 6'-H), 7.07 (dd, 1H, *J* = 9.0, 3.0

Hz, 4'-H), 7.11 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 3'-H), 7.22 (d, 1H, $J = 16$ Hz, H_α), 7.54 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, 6-H), 7.67 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H_β) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 55.56 (OMe), 56.35 (OMe), 56.37 (OMe), 99.16 (C-3), 108.39 (C-5), 113.90 (C-6'), 113.93 (C-3'), 114.25 (C-1), 117.83 (C-4'), 123.47 (C_α), 130.07 (C-1'), 130.40 (C-6), 138.71 (C_β), 151.61 (C), 153.04 (C), 160.12 (C), 161.81 (C), 191.98 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 315.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 337.3 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

2.6.2.2 Procedimiento General para la síntesis de chalconas polihidroxiladas:

A una disolución de la correspondiente metoxi chalcona (1 equivalente) en CH_2Cl_2 seco, previamente enfriada a 0 °C, en atmósfera de argón, se adiciona lentamente una disolución 1M de BBr_3 en CH_2Cl_2 (2 equivalentes por heteroátomo). Después de 24-48 h de agitación a temperatura ambiente, se añade H_2O y CH_2Cl_2 . A continuación se filtra y el precipitado se lava con H_2O y CH_2Cl_2 . Este precipitado se purifica según se indica en cada caso.

(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-(2,4-dihidroxifenil)-2-propenona (E-2.23)

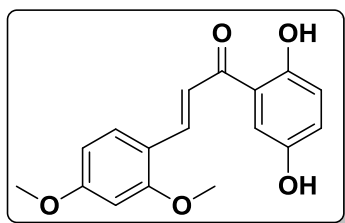


Preparado a partir de **2.16** (200 mg) y obtenido junto a **2.24** usando 10 equivalentes de BBr_3 . Sólido rojizo (48 mg). Rdto. 28%. (P.f.:180-182°C). Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 2 a 25% de

ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 3.69$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.33 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 5-H), 6.40 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, 3-H), 6.81 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 3'-H), 7.00 (dd, 1H, $J = 8.8, 2.9$ Hz, 4'-H), 7.41 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 7.67 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H_α), 7.67 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, 6-H), 8.04 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H_β), 9.14 (s, 1H, OH), 10.07 (s, 1H, OH), 10.33 (s, 1H, OH), 12.25 (s, 1H, OH)

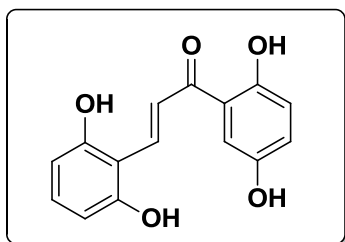
ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 102.48 (C-3), 108.20 (C-5), 113.26 (C-6'), 114.44 (C-1), 116.27 (C_α), 118.28 (C-3'), 120.58 (C-1'), 123.96 (C-4'), 131.29 (C-6), 141.37 (C_β), 149.28 (C), 154.96 (C), 159.63 (C), 161.94 (C), 193.31 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 273.5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 272.0689 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ calculada 272.0685).

(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-(2,4-dimetoxifenil)-2-propenona (2.24)



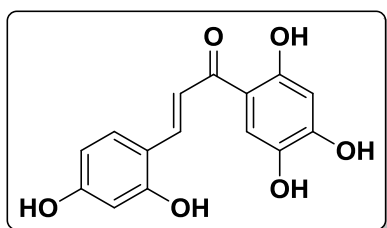
Preparado a partir de **2.16** (200 mg) y obtenido junto a **2.23** usando 10 equivalentes de BBr_3 . Sólido amorfo (24 mg). Rdto. 13%. Purificación por cromatografía en columna. **Eluyente**: gradiente de 1:40 a 1:30 de MeOH en CH_2Cl_2 .

HPLC (Sunfire): t_R = 9.23 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3.85 (s, 3H, OMe), 3.92 (s, 3H, OMe), 6.64 (d, 2H, J = 8.7 Hz, 3-H y 5-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 3'-H), 7.01 (dd, 1H, J = 8.9, 2.8 Hz, 4'-H), 7.44 (d, 1H, J = 2.8 Hz, 6'-H), 7.76 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H_α), 7.91 (d, 1H, J = 8.4 Hz, 6-H), 8.04 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H_β), 9.16 (s, 1H, OH), 12.08 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 46.62 (OMe), 46.92 (OMe), 89.34 (C-3), 97.53 (C-5), 105.68 (C-6'), 106.75 (C-3'), 109.11 (C-1), 109.58 (C_α), 111.69 (C-1'), 115.18 (C-4'), 121.85 (C_β), 130.66 (C-6), 140.39 (C), 145.88 (C), 151.28 (C), 154.48 (C), 184.22 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 301.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 301.1081 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$ calculada 301.1071).

(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-(2,6-dihidroxifenil)-2-propenona (2.25)

Preparado a partir de **2.18** (300 mg) usando 10 equivalentes de BBr_3 . Sólido amorfo rojizo (94 mg). Rdto. 38%. (P.f.:> $250^\circ\text{C}^{(\text{dec})}$) Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 10 a 30% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 5.04$ min

(gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.41 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, 3-H y 5-H), 6.83 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 7.00 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.9$ Hz, 4'-H), 7.06 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, 4-H), 7.22 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 8.10 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_α), 8.26 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_β), 9.26 (s, 1H, OH), 10.36 (s, 1H, OH), 12.14 (s, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 106.65 (C-3, C-5), 109.73 (C-1), 113.80 (C-6'), 118.63 (C-3'), 120.60 (C-4'), 120.99 (C_α), 124.23 (C-1'), 132.52 (C-4), 137.58 (C_β), 149.36 (C), 154.99 (C), 159.37 (C), 159.37 (C), 194.25 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 273.3 ($\text{M}+\text{H}^+$). **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 273.0759 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ calculada 273.0757).

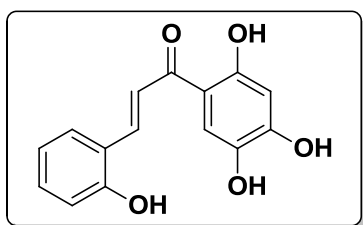
(E)-3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(2',4',5'-trihidroxifenil)-2-propenona (2.26)

Preparado a partir de **2.20** (200 mg) usando 12 equivalentes de BBr_3 . Sólido amorfo rojizo (72 mg). Rdto. 45%. (P.f.:> $250^\circ\text{C}^{(\text{dec})}$) Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 10 a 30% de

ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.42$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.29 (s, 1H, 6'-H), 6.32 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 5-H), 6.39 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, 3-H), 7.42 (s, 1H, 3'-H), 7.58 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H_α), 7.63 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, 6-H), 7.97 (d,

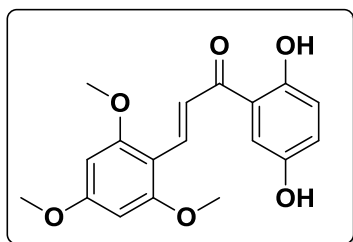
1H, $J = 15.5$ Hz, H_β), 8.71 (sa, 1H, OH), 10.00 (s, 1H, OH), 10.26 (s, 1H, OH), 10.41 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 102.51 (C-3'), 103.1 (C-3), 108.06 (C-5), 111.69 (C-1), 113.39 (C-6'), 114.86 (C-1'), 116.16 (C_α), 131.08 (C-6), 138.19 (C_β), 139.89 (C), 154.48 (C), 159.16 (C), 159.27 (C), 161.48 (C), 191.36 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 289.5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 289.0704 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ calculada 289.0707).

(E)-3-(2-Hidroxifenil)-1-(2',4',5'-trihidroxifenil)-2-propenona (2.27)



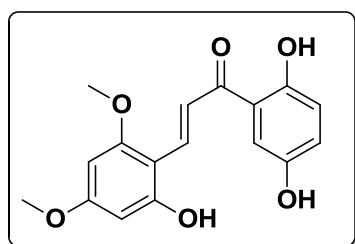
Preparado a partir de **2.17** (200 mg) usando 10 equivalentes de BBr_3 . Sólido amorfo rojizo (38 mg). Rdto. 23%. (P.f.: > 212°C $^{(\text{dec})}$) Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 10 a 30% de

ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 5.36$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.32 (s, 1H, 6'-H), 6.87 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, 5-H), 6.94 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, 3-H), 7.27 (ddd, 1H, $J = 8.2, 7.4, 1.5$ Hz, 4-H), 7.45 (s, 1H, 3'-H), 7.80 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, H_α), 7.80 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, 6-H), 8.06 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_β), 8.76 (s, 1H, OH), 10.31 (s, 1H, OH), 10.52 (s, 1H, OH), 13.13 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 103.11 (C-3'), 111.72 (C-1), 115.07 (C-6'), 116.26 (C-3), 119.48 (C-5), 120.36 (C-1'), 121.41 (C_α), 129.30 (C-4), 132.00 (C-6), 138.40 (C_β), 139.02 (C), 154.99 (C), 157.30 (C), 159.34 (C), 191.36 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 273.4 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 273.0752 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ calculada 273.0757).

(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-(2,4,6-trimetoxifenil)-2-propenona (2.28)

Preparado a partir de **2.19** (200 mg) y obtenido junto a **2.29** y **2.30** usando 12 equivalentes de BBr_3 . Aceite (3 mg). Rdto. 2%. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 10 a 40% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.70$ min (gradiente

de 15 a 95% de A en B en 5 min). **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.87 (s, 3H, OMe), 3.94 (s, 6H, 2-OMe), 6.34 (s, 2H, 3-H y 5-H), 6.82 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 6.99 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.9$ Hz, 4'-H), 7.26 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 7.91 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_α), 8.20 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_β), 9.27 (s, 1H, OH), 12.24 (s, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 55.73 (OMe), 56.26 (OMe), 91.18 (C-3 y C-5), 105.09 (C-1), 113.72 (C-6'), 118.62 (C-3'), 119.06 (C-1'), 120.49 (C_α), 124.14 (C-4'), 136.09 (C_β), 149.34 (C), 155.06 (C), 156.33 (C), 161.75 (C), 163.94 (C), 194.04 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 331.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)⁺.

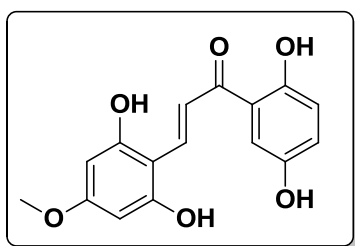
(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-2-propenona (2.29)

Preparado a partir de **2.19** (200 mg) y obtenido junto a **2.28** y **2.30** usando 12 equivalentes de BBr_3 . Aceite (33 mg). Rdto. 18%. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 10 a 40% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.41$

min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.79 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe), 6.17 (s, 1H, 3-H), 6.18 (s, 1H, 5-H), 6.81 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 6.99 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.9$ Hz, 4'-H), 7.23 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 7.93 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_α), 8.22 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz,

H_β), 9.24 (s, 1H, OH), 9.35 (s, 1H, OH), 12.34 (s, 1H, OH) ppm. ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55.35 (OMe), 56.03 (OMe), 90.43 (C-3), 93.77 (C-5), 104.47 (C-1), 113.65 (C-6'), 118.19 (C_α), 118.57 (C-3'), 120.43 (C-1'), 124.04 (C-4'), 137.08 (C_β), 149.27 (C), 155.11 (C), 160.87 (C), 161.74 (C), 163.47 (C), 193.93 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 317.4 (M+H)⁺. **HRMS** (ES+) *m/z* encontrada 317.1005 ([M+H]⁺ C₁₇H₁₆O₆ calculada 317.1020).

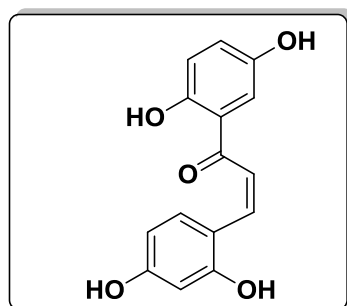
(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-(2,6-dihidroxi-4-metoxifenil)-2-propenona
(2.30)



Preparado a partir de **2.19** (200 mg) y obtenido junto a **2.28** y **2.29** usando 12 equivalentes de BBr₃. Aceite (89 mg). Rdto. 47%. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 10 a 40% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): t_R = 3.83 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.71 (s, 3H, OMe), 6.03 (s, 2H, 3-H y 5-H), 6.81 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, 3'-H), 6.98 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 4'-H), 7.21 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, 6'-H), 7.95 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz, H_α), 8.24 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz, H_β), 12.43 (s, 1H, OH), 13.30 (s, 1H, OH), 13.42 (s, 1H, OH), 13.69 (s, 1H, OH) ppm. ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55.05 (OMe), 93.01 (C-3, C-5), 104.08 (C-1), 113.61 (C-6'), 117.49 (C_α), 118.53 (C-3'), 120.41 (C-1'), 123.98 (C-4'), 138.11 (C_β), 140.12 (C), 149.23 (C), 155.16 (C), 160.78 (C), 163.13 (C), 194.01 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 303.4 (M+H)⁺. **HRMS** (ES+) *m/z* encontrada 303.0868 ([M+H]⁺ C₁₆H₁₄O₆ calculada 303.0863).

Preparación de (Z)-1-(2',5'-dihidroxifenil)-3-(2,4-dihidroxifenil)-2-propenona (Z-2.23)

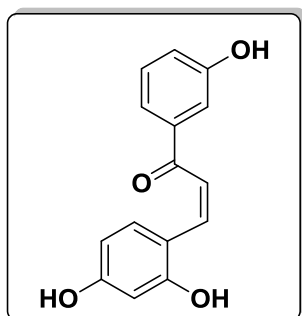
Se prepara una disolución de **2.23** (30 mg) en PBS (cloruro sódico, cloruro de potasio, fosfato sódico y fosfato de potasio) y se mantiene durante 15 días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se liofiliza para eliminar el agua. Al liofilizado se le añade MeOH y se filtra. La disolución de MeOH, que conserva aún parte de las sales, se purifica por cromatografía flash (Biotage) en fase reversa con un gradiente de 2 a 25% de ACN en H₂O (0.05% TFA).



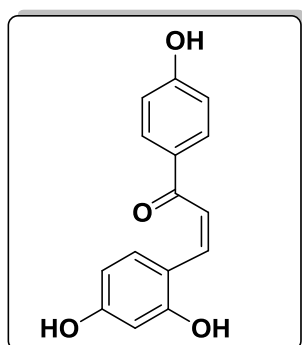
Sólido amorfo (5 mg). Rdto. 16%. (P.f.:> 235 °C^(dec)). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 3.13$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.26 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 5-H), 6.33 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 6.80 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H _{α}), 6.90 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H _{β}), 6.99 (dd, 1H, $J = 8.4, 3.2$ Hz, 4'-H), 7.11 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 7.18 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, 6'-H), 7.22 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, 6-H), 9.23 (s, 1H, OH), 9.41 (s, 1H, OH), 9.64 (s, 1H, OH), 11.33 (s, 1H, OH) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 273.5 (M+H)⁺.

2.6.3 Síntesis de las (Z)-Chalconas 2.35 y 2.36

Procedimiento General: A una disolución de 2,4-dihidroxibenzaldehído (0.4 g, 2.93 mmol) y la correspondiente hidroxiacetofenona (0.2 g, 1.468 mmol) en 1,4-dioxano (12 mL), se añade BF₃Et₂O (0.91 mL, 7.34 mmol). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo el sólido formado se separa por filtración, se lava con CH₂Cl₂ y H₂O, y se seca a vacío.

(Z)-3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(3'-hidroxifenil)-2-propenona (Z-2.35)

Sólido rojizo (188 mg). Precipitado con CH_2Cl_2 . Rdto: 50%. (P.f.:> $202^\circ\text{C}^{(\text{dec})}$). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 2.09$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.26 (ddd, 1H, $J = 8.1, 2.2, 0.9$ Hz, 4'-H), 7.49 (dd, 1H, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 5-H) 7.52-7.59 (m, 2H, 3-H, 5'-H), 7.82 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz, 2'-H), 7.96 (m, 1H, 6'-H), 8.29 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 6-H), 8.57 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_α), 9.37 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_β), 9.92 (s, 1H, OH), 10.28 (sa, 2H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 102.60 (C-3), 112.70 (C-1), 113.32 (C_α), 115.00 (C-2'), 119.06 (C-1'), 120.16 (C-5), 120.33 (C-5'), 122.70 (C-4'), 123.01 (C-6'), 133.30 (C-6), 154.90 (C_β), 158.49 (C), 159.49 (C), 161.49 (C), 188.3 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 239.3 ($\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$)⁺. **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 239.0698 ($[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ calculada 239.0703).

(Z)-3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(4'-hidroxifenil)-2-propenona (Z-2.36)

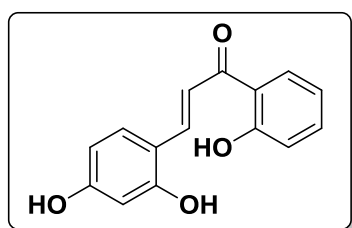
Sólido rojizo (300 mg). Precipitado con CH_2Cl_2 . Rdto: 80%. (P.f.:> $214^\circ\text{C}^{(\text{dec})}$). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 1.20$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.10 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, 2'-H y 6'-H), 7.40 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 5-H), 7.52 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, 3-H), 8.18 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 6-H), 8.47 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, 3'-H, 5'-H), 8.47 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_α), 9.19 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_β) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 102.93 (C-3), 112.68 (C-1), 113.93 (C_α), 117.70 (C-3', C-5'), 120.01 (C-1'), 121.38 (C-5), 130.84 (C-6), 133.02 (C-2'), 133.19 (C-6'), 153.59 (C_β), 159.10 (C), 161.84 (C), 166.38 (C), 187.83 (CO) ppm. **EM** (ES^+):

m/z 239.3 ($M+H-H_2O$)⁺. **HRMS** (ES+) m/z encontrada 239.0705 ($[M+H-H_2O]$)⁺ $C_{15}H_{12}O_4$ calculada 239.0703).

2.6.4 Síntesis de Chalconas *E*-2.35, *E*-2.36 y *E*-2.38

Procedimiento General: A una disolución de 2,4-MOM-benzaldehído (0.55 g, 2.1 mmol) en EtOH (10 mL), se añade la correspondiente acetofenona (0.3 g, 1.8 mmol). La disolución se enfría a 0°C y se le añade, lentamente, KOH 50% (1.95 mL). Tras 15 horas de agitación a temperatura ambiente, se le añade HCl 10% (5 mL) y se calienta a 60°C durante 6 horas. A continuación, se evapora el EtOH y se neutraliza el medio ácido con una disolución de NaHCO₃ 10%. La fase acuosa se extrae con AcOEt y la fase orgánica resultante se lava con agua y disolución saturada de NaCl. Se seca sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash en fase reversa utilizando el eluyente indicado en cada caso.

(*E*)-3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(2'-hidroxifenil)-2-propenona (*E*-2.38)

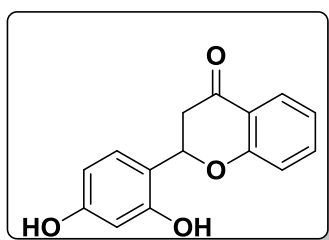


Obtenido junto al compuesto **2.39**. Sólido amorfo rojizo (45 mg). Rdto. 12%. (P.f.: > 92°C^(d)). **Eluyente:** gradiente de 2 a 50% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): t_R = 8.47 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en

10 min). **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.30 (dd, 1H, J = 8.3, 2.3 Hz, 5-H), 6.36 (d, 1H, J = 2.3 Hz, 3-H), 6.98 (m, 2H, 4'-H y 6'-H), 7.50 (td, 1H, J = 8.3, 7.8, 1.6 Hz, 5'-H), 7.73 (d, 1H, J = 8.3 Hz, 6-H), 7.77 (d, 1H, J = 15.4 Hz, H_α), 8.13 (d, 1H, J = 15.4 Hz, H_β), 8.14 (dd, 1H, J = 7.3, 1.2 Hz, 3'-H), 10.07 (s, 1H, OH), 10.31 (s, 1H, OH), 12.98 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 102.44 (C-3), 108.28 (C-5), 113.23 (C-3'), 115.69 (C-6'), 117.77 (C-4'),

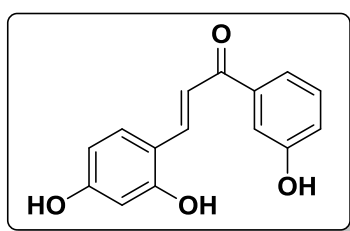
119.03 (C-5'), 120.56 (C_α), 130.29 (C-6), 130.81 (C-1), 135.89 (C_β), 141.39 (C-1'), 159.71 (C), 162.20 (C), 162.20 (C), 193.66 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 257.3 (M+H)⁺, 239.3 (M+H-H₂O). **HRMS** (ES⁺) *m/z* encontrada 239.0705 ([M+H-H₂O]⁺ C₁₅H₁₂O₄ calculada 239.0703).

2-(2,4-dihidroxifenil)-4-cromanona (2.39)



Obtenido junto al compuesto **2.38**. Aceite (15 mg). Rdto: 10%. **Eluyente**: gradiente de 2 a 30% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): *t_R* = 7.55 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.65 (dd, 1H, *J* = 16.8, 2.8 Hz, β-H), 3.27 (dd, 1H, *J* = 16.8, 13.7 Hz, β-H), 5.66 (dd, 1H, *J* = 13.5, 2.7 Hz, α-H), 6.27 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 5-H), 6.34 (d, 1H, 2.3 Hz, 3-H), 7.08 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, 3'-H), 7.08 (m, 1H, 2'-H), 7.23 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, 6-H), 7.56 (m, 1H, 4'H), 7.78 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 5'-H), 9.41 (s, 1H, OH), 9.65 (s, 1H, OH) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 257.2 (M+H)⁺.

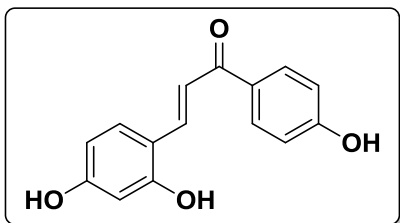
(*E*)-3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(3'-hidroxifenil)-2-propenona (*E*-2.35)



Sólido amorfo rojizo (65 mg). Rdto. 18%. (P.f.: > 75°C^(d)). **Eluyente**: gradiente de 2 a 50% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): *t_R* = 6.62 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.31 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 5-H), 6.38 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, 3-H), 6.97 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 4'-H), 7.30 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, 5'-H), 7.34 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, 2'-H), 7.45 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 6'-H), 7.56 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H_α), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 6-H), 7.92 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H_β), 9.77 (s, 1H, OH), 9.99 (s, 1H, OH), 10.23 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 102.50 (C-3),

108.03 (C-5), 113.34 (C-1), 114.41 (C-2'), 117.37 (C_α), 119.11 (C-6'), 119.64 (C-4'), 120.94 (C-5'), 129.76 (C-6), 130.61 (C-1'), 140.21 (C_β), 157.65 (C), 159.20 (C), 161.44 (C), 189.23 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 257.3 (M+H)⁺, 239.3 (M+H-H₂O). **HRMS** (ES⁺) *m/z* encontrada 257.0801 ([M+H]⁺ C₁₅H₁₂O₄ calculada 257.0808).

(E)-3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(4'-hidroxifenil)-2-propenona (E-2.36)



Sólido amorfo rojizo (25 mg). Rdto. 20%.

(P.f.: > 185°C^(d), P.f.Lit²⁴³, 187-188°C).

Eluyente: gradiente de 2 a 50% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): t_R= 1.00 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10

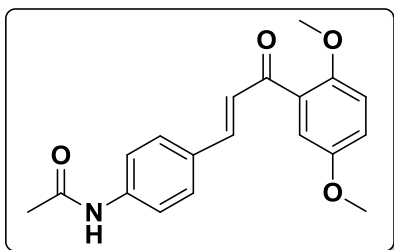
min). **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.30 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 5-H), 6.37 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, 3-H), 6.87 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2'-H, 6'-H), 7.61 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz, H_α), 7.91 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz, H_β), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, 6-H), 7.96 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 3'-H, 5'-H), 9.93 (s, 1H, OH) 10.15 (s, 1H, OH), 10.33 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 102.52 (C-3), 107.94 (C-5), 113.53 (C-1), 115.32 (C-5', C-3'), 117.12 (C_α), 129.84 (C-6), 130.18 (C-1'), 130.76 (C-2', C-6'), 138.93 (C_β), 158.93 (C), 161.15 (C), 161.69 (C), 187.39 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 239.3 (M+H-H₂O). **HRMS** (ES⁺) *m/z* encontrada 239.0701 ([M+H-H₂O]⁺ C₁₅H₁₂O₄ calculada 239.0703).

2.6.5 Síntesis de Acetamido Chalconas

A una disolución de 4-acetamidobenzaldehído (0.31 g, 1.91 mmol) en EtOH (25 mL), se añade 2,5-dimetoxiacetofenona (0.3 g, 1.66 mmol). La disolución se enfría a 0°C y le se añade, lentamente, NaOH 40% (1.87 mL). Tras 15 horas de agitación a temperatura ambiente se añade agua y se evapora el etanol. La fase acuosa se extrae con AcOEt y, tras separación, la

fase orgánica resultante se lava con agua y disolución saturada de NaCl. Se seca sobre MgSO_4 y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash (Biotage) empleando como eluyente un gradiente de 10 a 100% de AcOEt en hexano. Se aislaron los productos **2.41** y **2.42** que se describen a continuación.

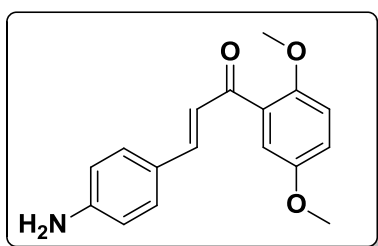
(E)-3-(4-Acetamidofenil)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-2-propenona (2.41)



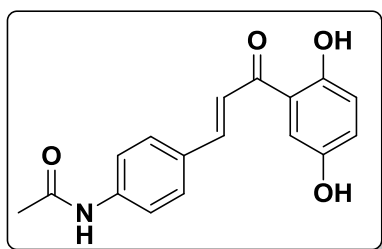
Sólido amarillo (54 mg). Rdto. 10%. P.f.: (153-156°C, MeOH, p.f.Lit²⁴⁴, 154-155°C)

HPLC (Sunfire): $t_R = 4.42$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **¹H-RMN** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.07 (s, 3H, CH_3), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.81 (s, 3H, OMe), 7.02 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 6'-H), 7.08 – 7.15 (m, 2H, 3'-H y 4'-H), 7.29 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_α), 7.44 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_β), 7.66 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H), 10.16 (s, 1H, NH) ppm. **EM** (ES^+): m/z 325.3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

(E)-3-(4-Aminofenil)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-2-propenona (2.42)

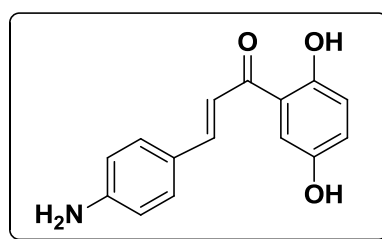


Sólido amarillo (33 mg). Rdto. 7%. P.f.: (110-112 °C, MeOH, p.f.Lit²⁴⁵, semisólido). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.45$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.80 (s, 3H, OMe), 3.83 (s, 3H, OMe), 6.65 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, 3-H y 5-H), 6.92 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 3'-H), 7.00 (dd, 1H, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 4'-H), 7.13 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, 6'-H), 7.18 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H_α), 7.41 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, 2-H y 6-H), 7.55 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H_β) ppm. **EM** (ES^+): m/z 283.3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

(E)-3-(4-Acetamidofenil)-1-(2',5'-dihidroxifenil)-2-propenona (2.43)

Obtenido a partir del compuesto **2.41** (40 mg) usando 10 equivalentes de BBr_3 , siguiendo el procedimiento general descrito en la página 83. Sólido rojizo (14 mg) que no necesita purificación ulterior. Rdto. 38%. (P.f. >237 $^{\circ}\text{C}^{(d)}$) **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.18$ min

(gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.08 (s, 3H, COCH_3), 6.84 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 3'-H), 7.04 (dd, 1H, $J = 8.8, 2.9$ Hz, 4'-H), 7.50 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 7.68 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, 2-H y 6-H), 7.74 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_α), 7.80 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H_β), 7.83 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, 3-H y 5-H), 10.20 (s, 1H, NH), 11.87 (s, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 24.16 (C- CH_3), 115.01 (C-6'), 118.27 (C-3'), 118.83 (C-2 y C-6), 120.07 (C $_\alpha$), 120.89 (C-1), 124.27 (C-4'), 129.08 (C-1'), 130.10 (C-3 y C-5), 141.84 (C), 144.35 (C $_\beta$), 149.45 (C), 154.66 (C), 168.70 (C-CO amida), 193.11 (C-CO cetona) ppm. **EM** (ES^+): m/z 298.5 (M+H) $^+$.

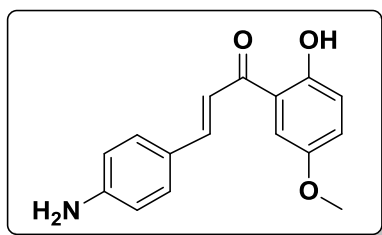
(E)-3-(4-Aminofenil)-1-(2',5'-dihidroxifenil)-2-propen-1-ona (2.44)

Obtenido junto con **2.45** a partir del compuesto **2.42** (30 mg), usando 8 equivalentes de BBr_3 , siguiendo el procedimiento general descrito en la página 83. Sólido rojizo (15.8 mg). Rdto. 58%. (P.f. $>252^{\circ}\text{C}^{(d)}$). Purificación por cromatografía

circular centrífuga. **Eluyente:** $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2(1:60)$. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.22$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, DMSO) δ : 6.03 (s.a, 2H, NH_2), 6.60 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, 3-H y 5-H), 6.79 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 7.00 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.7$ Hz, 4'-H), 7.50 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, 6'-H),

7.56 - 7.60 (m, 3H, 2-H, 6-H y H_α), 7.72 (d, 1H, $J = 14.8$ Hz, H_β), 9.11 (s, 1H, OH), 12.37 (s, 1H, OH) ppm. **EM** (ES^+): m/z 256.4 ($M+H$)⁺.

(E)-3-(4-Aminofenil)-1-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-2-propenona (2.45)



Obtenido junto con **2.44** a partir del compuesto **2.42** (30 mg), usando 8 equivalentes de BBr_3 , siguiendo el procedimiento general descrito en la página 83. Sólido rojizo (12 mg). Rdto. 40%.

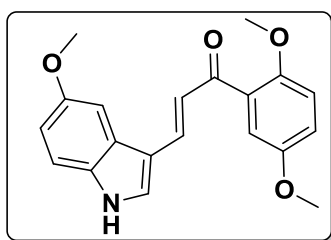
(P.f.:207-209°C). Purificación por cromatografía circular centrífuga. **Eluyente:** MeOH:CH₂Cl₂ (1:100). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 5.00$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 5 min). **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.82 (s, 3H, OMe), 6.03 (s, 2H, NH₂), 6.61 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, 2-H y 6-H), 6.90 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 3'-H), 7.17 (dd, 1H, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 4'-H), 7.64 – 7.69 (m, 4H, 3-H, 5-H, 6'-H y H_α), 7.77 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H_β), 12.71 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 55.92 (OMe), 112.93 (C-3, C-5), 113.54 (C-2, C-6), 114.07 (C _{α}), 118.55 (C-3'), 120.24 (C-1), 121.71 (C-1'), 123.42 (C-4'), 131.96 (C-6'), 147.12 (C _{β}), 151.53 (C), 152.66 (C), 156.45 (C), 192.78 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 270.4 ($M+H$)⁺.

2.6.6 Síntesis de Indolil chalconas

A una disolución de 5-metoxi-1H-indol-3-carboxaldehído (0.241 g, 1.38 mmol) en MeOH (4 mL), bajo atmósfera de Argón se le añade 2,5-dimetoxiacetofenona (0.250 g, 1.38 mmol). Lentamente se adiciona piperidina y la mezcla de reacción se somete a 5 ciclos de 40 minutos a 115° C en un reactor microondas. Tras los ciclos se neutraliza el exceso de piperidina con ácido acético. El disolvente se evapora bajo presión reducida. El residuo resultante se trata con ACOEt y la fase orgánica se lava con agua y disolución

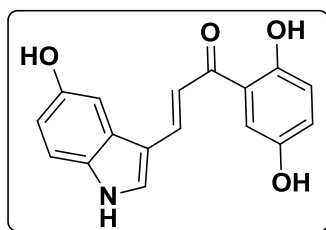
saturada de NaCl. Se seca sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se cristaliza en MeOH.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(5-metoxi-1H-indol-3-il)-2-propenona (2.47)



Sólido cristalino amarillo (468 mg). Rdto: 41%. (P.f.: 145-147 °C, MeOH). **HPLC** (Sunfire): t_R = 8.91 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN**: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.77 (dd, 1H, J = 8.7, 2.5 Hz, 6-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 7-H), 7.00 (dd, 1H, J = 8.7, 2.9 Hz, 4'-H), 7.31 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 3'-H), 7.31, (d, 1H, J = 2.5 Hz, 4'-H), 7.41 (d, 1H, J = 2.9 Hz, 6'-H), 7.45 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H_α), 8.06 (d, 1H, J = 3.0 Hz, 2-H), 8.10 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H_β), 11.35 (d, 1H, J = 3.0 Hz, NH) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 337.4 (M+H)⁺.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(5-metoxi-1H-indol-3-il)-2-propenona (2.48)



Preparado a partir de **2.47** (250 mg) por tratamiento con 10 equivalentes de BBr₃ siguiendo el procedimiento general que se describe en la página 83. Sólido rojizo (180 mg) que no necesitó de purificación ulterior. Rdto: 80%. (P.f.: >240 °C^(d), MeOH). **HPLC** (Sunfire): t_R = 5.45 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN**: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.77 (dd, 1H, J = 8.7, 2.5 Hz, 6-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 7-H), 7.00 (dd, 1H, J = 8.7, 2.9 Hz, 4'-H), 7.31 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 3'-H), 7.31, (d, 1H, J = 2.5 Hz, 4-H), 7.41 (d, 1H, J = 2.9 Hz, 6'-H), 7.45 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H_α), 8.06 (d, 1H, J = 3.0 Hz, 2-H), 8.10 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H_β), 11.35 (d, 1H, J = 3.0 Hz, NH) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 104.74 (C-4), 112.45 (C-3), 112.73 (C-3'), 112.84 (C-6'), 113.18 (C-6), 113.97 (C _{α}), 118.38 (C-7), 120.55 (C-1'), 123.66 (C-4'), 126.06 (C), 131.80

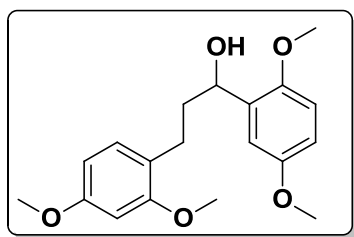
(C), 134.85 (C-2), 140.70 (C_β), 149.26 (C), 152.88 (C), 154.98 (C), 192.48 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 296.4 (M+H)⁺.

2.6.7 Síntesis de 1,3-difenil-1-propanonas

Método A: A una disolución de la correspondiente chalcona (0.304 mmol) en MeOH (30 mL), se le añade Pd/C al 10% (10% en peso). La suspensión se hidrogena a temperatura ambiente y a 15 psi durante 4 horas. Tras la filtración del catalizador, se evapora el disolvente y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

Método B: A una disolución de la correspondiente chalcona (0.304 mmol) en MeOH (30 mL), se le añade Pd/C al 10% (10% en peso) y Ph₂S (0.003 mmol). La suspensión se hidrogena a temperatura ambiente y a 20 psi durante 24 horas. Tras la filtración del catalizador, se evapora el disolvente y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash (Biotage) empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2,4-dimetoxifenil)-1-propanol (2.49)



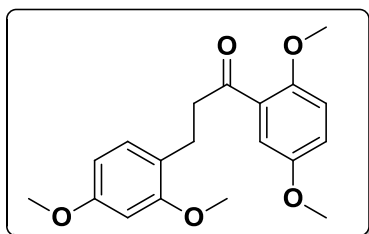
Obtenido junto con **2.50** a partir de **2.14** (100 mg). Sólido amorfo blanco (47 mg). Rdto. 47% (Método A). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 25% de AcOEt en hexano.

HPLC (Sunfire): *t_R* = 9.49 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.70 (m, 1H, H₂ Pr), 1.83 (m, 1H, H₂ Pr), 2.49 (m, 1H, H₃ Pr), 2.60 (m, 1H, H₃ Pr), 4.84 (dd, 1H, *J* = 8.1, 3.9 Hz, H₁ Pr), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.74 (s, 3H, OMe), 6.42 (dd, 1H, *J* = 8.2, 2.5 Hz, 5-H), 6.49 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, 3-H), 6.73 (dd, 1H, *J* =

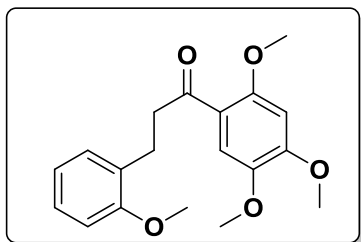
8.8, 3.2 Hz, 4'-H), 6.85 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 3'-H), 6.98 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, 6-H), 7.02 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, 6'-H) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$: (100 Hz, DMSO- d_6) δ : 25.59 (C_3 Pr), 37.93 (C_2 Pr), 55.07 (OMe), 55.24 (OMe), 55.79 (OMe), 65.96 (C_1 Pr), 98.26 (C-6'), 104.15 (C-4'), 111.46 (C-5), 111.51 (C-6), 112.28 (C-3'), 122.46 (C-1), 129.42 (C-3), 135.83 (C-1'), 149.60 (C), 153.21 (C), 157.91 (C), 158.67 (C) ppm. **EM** (ES+): m/z 355.6 (M+Na) $^+$.

1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2,4-dimetoxifenil)-1-propanona (2.50)



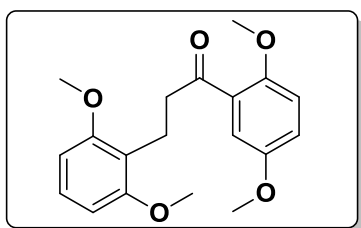
Sólido amorfo blanco Método A: 20 mg; Rdto. 19%. Obtenido junto con **2.49** a partir de 100 mg de **2.14**, Método B: 79 mg; Rdto. 78%. Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**:

gradiente de 0 a 25% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 9.87$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.75 (t, 2H, H_β), 3.11 (t, 2H, H_α), 3.72 (s, 6H, OMe), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 6.42 (dd, 1H, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 5-H), 6.50 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 7.01 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, 6-H), 7.03 (m, 1H, 4'-H), 7.10 (m, 2H, 3'-H y 6'-H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.15 (C_β), 43.31 (C_α), 55.07 (OMe), 55.26 (OMe), 55.50 (OMe), 56.22 (OMe), 98.26 (C-3), 104.28 (C-5), 113.48 (C-6'), 113.91 (C-3'), 119.02 (C-4'), 121.02 (C-1), 128.46 (C-1'), 129.80 (C), 129.80 (C-6), 152.23 (C), 157.89 (C), 158.97 (C), 201.12 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 331.4 (M+H) $^+$, 353.5 (M+Na) $^+$.

3-(2-Metoxifenil)-1-(2',4',5'-trimetoxifenil)-1-propanona (2.52)

Sólido blanco (43 mg). Rdto: 43%. (Método B) (P.f.:111-113°C). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 9.66$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500

MHz, DMSO- d_6) δ : 2.82 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_β), 3.13 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_α), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.87 (s, 6H, OMe), 6.74 (s, 1H, 6'-H), 6.85 (td, 1H, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 5-H), 6.94 (dd, 1H, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 3-H), 7.13 (dd, 1H, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 6-H), 7.17 (ddd, 1H, $J = 8.2, 7.4, 1.7$ Hz, 4-H), 7.21 (s, 1H, 3'-H) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 25.05 (C_β), 43.27 (C_α), 55.29 (OMe), 55.89 (OMe), 55.99 (OMe), 56.51 (OMe), 97.78 (C-3'), 110.64 (C-3), 112.27 (C-6'), 120.33 (C), 120.33 (C), 127.33 (C-4), 129.32 (C-5), 129.66 (C-6), 142.62 (C), 153.83 (C), 155.04 (C), 157.17 (C), 198.28 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 331.4 (M+H) $^+$.

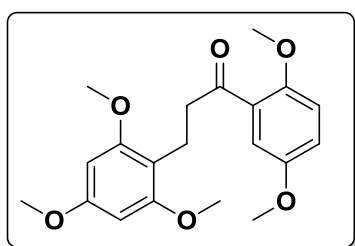
1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2,6-dimetoxifenil)-1-propanona (2.53)

Sólido blanco (79 mg). Rdto: 79%. (Método B) (P.f.: 100-103°C). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 10.00$

min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.83 (m, 2H, H_β), 2.98 (t, 2H, H_α), 3.73 (s, 9H, OMe), 3.77 (s, 3H, OMe), 6.61 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, 3-H y 5-H), 7.06 (dd, 1H, $J = 2.7, 1.0$ Hz, 4'-H), 7.09 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz, 6'-H), 7.09 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, 3'-H), 7.14 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, 4-H) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 17.94 (C_β), 42.53 (C_α), 55.64 (2C,

OMe), 55.67 (OMe), 56.22 (OMe), 103.89 (C-3, C-5), 113.65 (C-6'), 113.84 (C-3'), 116.34 (C-1), 119.12 (C-4'), 127.30 (C-4), 128.35 (C-1'), 152.34 (C), 152.90 (C), 157.78 (2C), 201.48 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 331.4 (M+H)⁺, 353.4 (M+Na)⁺.

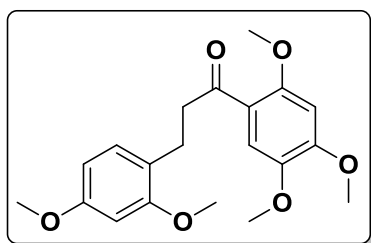
1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2,4,6-trimetoxifenil)-1-propanona (2.54)



Sólido blanco (37 mg). Rdto: 33%. (Método B) (P.f.: 134-137°C). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): t_R = 9.98 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500

MHz, DMSO- d_6) δ : 2.74 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H_β), 2.94 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H_α), 3.72 (s, 6H, 2-OMe), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 6.19 (s, 2H, 3-H y 5-H), 7.05 (dd, 1H, J = 2.7, 1.1 Hz, 4'-H), 7.09 (d, 1H, J = 1.1 Hz, 6'-H), 7.09 (d, 1H, J = 2.7 Hz, 3'-H) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 17.64 (C_β), 42.93 (C_α), 55.17 (OMe), 55.53 (OMe), 55.61 (OMe), 55.61 (OMe), 56.20 (OMe), 90.70 (C-3, C-5), 108.46 (C-1), 113.61 (C-6'), 113.80 (C-3'), 119.06 (C-4'), 128.37 (C-1'), 152.31 (C), 152.87 (C), 158.28 (2C), 159.26 (C), 201.61 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 361.4 (M+H)⁺, 383.4 (M+Na)⁺.

3-(2,4-Dimetoxifenil)-1-(2',4',5'-trimetoxifenil)-1-propanona (2.55)

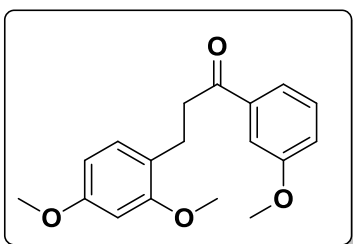


Sólido blanco (66.5 mg). Rdto: 61%. (Método B) (P.f.:103-106°C). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): t_R = 9.51 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10

min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.74 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H_β), 3.08 (t, 2H,

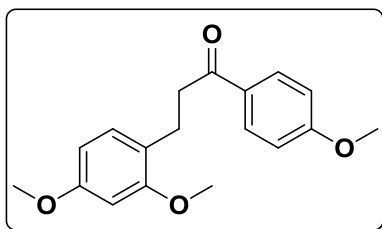
$J = 7.7$ Hz, H_α), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.87 (s, 3H, OMe), 6.42 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.4$ Hz, 5-H), 6.50 (d, 1H, $J = 3$ -H), 6.74 (s, 1H, 6'-H), 7.02 (d, 1H, $J = 6$ -H), 7.20 (s, 1H, 3'-H) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** : (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 24.52 (C_β), 43.67 (C_α), 55.20 (OMe), 55.39 (OMe), 55.89 (OMe), 56.02 (OMe), 56.53 (OMe), 97.76 (C-3'), 98.38 (C-3), 104.42 (C-5), 112.23 (C-6'), 121.44 (C-1), 124.59 (C-1'), 130.01 (C-6), 142.61 (C), 153.82 (C), 155.04 (C), 158.01 (C), 159.01 (C), 198.46 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 361.4 (M+H)⁺, 383.4 (M+Na)⁺.

3-(2,4-Dimetoxifenil)-1-(3'-metoxifenil)-1-propanona (2.56)



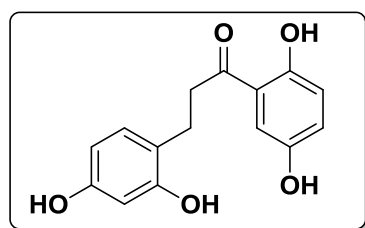
Aceite (79 mg). Rdto: 90%. (Método B). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 8.95$ (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

δ : 2.80 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_β), 3.20 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_α), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.82 (s, 3H, OMe), 6.43 (dd, 1H, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 5-H), 6.52 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 7.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, 6-H), 7.20 (ddd, 1H, $J = 8.2, 2.7, 0.8$ Hz, 4'-H), 7.40-7.46 (m, 2H, 2'-H y 5'-H), 7.56 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 6'-H) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 24.25 (C_β), 38.37 (C_α), 55.12 (OMe), 55.30 (2C, OMe), 98.30 (C-3), 104.36 (C-5), 112.35 (C-6'), 119.12 (C-4'), 120.43 (C-1), 120.86 (C-5'), 129.95 (C-6, C-2'), 138.03 (C-1'), 157.92 (C), 159.08 (C), 159.41 (C), 199.40 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 301.4 (M+H)⁺, 323.4 (M+Na)⁺.

3-(2,4-Dimetoxifenil)-1-(4'-metoxifenil)-1-propanona (2.57)

Aceite (59.6 mg). (Lit²⁴⁶). Rdto: 65%. (Método B). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): $t_{R=}$ 9.94 min (gradiente de 15 a 95% de A en

B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.79 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H _{β}), 3.13 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H _{α}), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.83 (s, 3H, OMe), 6.42 (dd, 1H, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 5-H), 6.52 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 7.03 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H y 5'-H), 7.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, 6-H), 7.94 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 2'-H y 6'-H) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 24.41 (C _{β}), 38.11 (C _{α}), 55.16 (OMe), 55.35 (OMe), 55.55 (OMe), 98.30 (C-3), 104.33 (C-5), 113.89 (C-5', C-3'), 121.03 (C-1), 129.55 (C-1'), 129.93 (C-6', C-2'), 130.22 (C-6), 157.93 (C), 159.06 (C), 163.02 (C), 197.96 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 301.4 (M+H)⁺, 323.4 (M+Na)⁺.

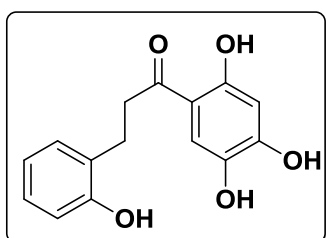
1-(2,5-Dihidroxifenil)-3-(2,4-dihidroxifenil)-1-propanona (2.51)

Obtenido a partir de **2.50** (230 mg) usando 10 equivalentes de BBr₃. Sólido rojizo (50 mg). Rdto: 27%. (P.f.: 150-152°C). Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 2 a 30% de ACN en H₂O (0.05%

TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_{R=}$ 6.90 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.72 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H _{β}), 3.16 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H _{α}), 6.12 (dd, 1H, $J = 8.1, 2.4$ Hz, 5-H), 6.27 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 6.80 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 3'-H), 6.84 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 6-H), 6.97 (dd, 1H, J

= 8.8, 2.9 Hz, 4'-H), 7.20 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 9.02 (s, 1H, OH), 9.42 (s, 2H, OH), 11.41 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.19 (C_β), 43.36 (C_α), 102.13 (C-3), 106.69 (C-5), 114.43 (C-6'), 117.07 (C-1), 118.19 (C-3'), 119.73 (C-1'), 123.96 (C-4'), 129.88 (C-6), 149.12 (C), 153.44 (C), 155.60 (C), 156.32 (C), 206.31 (CO) ppm. **EM** (ES $^+$): m/z 275.6 (M+H) $^+$. **HRMS** (ES $^+$) m/z encontrada 275.0917 ([M+H] $^+$ C $_{15}$ H $_{14}$ O $_5$ calculada 275.0914).

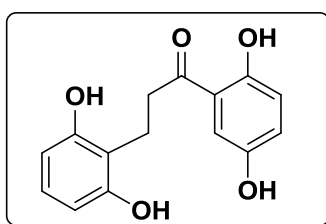
3-(2-Hidroxifenil)-1-(2',4',5'-trihidroxifenil)-1-propanona (2.58)



Obtenido a partir de **2.53** (55 mg) usando 10 equivalentes de BBr $_3$. Sólido anaranjado (36 mg). Rdto: 77%. Precipitado con CH $_2$ Cl $_2$. (P.f.: >250°C $^{(d)}$). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 7.47$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-}$

RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.82 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, H $_\beta$), 3.11 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, H $_\alpha$), 6.27 (s, 1H, 6'-H), 6.70 (td, 1H, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 5-H), 6.78 (dd, 1H, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 3-H), 7.01 (td, 1H, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 4-H), 7.09 (dd, 1H, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 6-H), 8.82 (s, 1H, OH), 9.43 (s, 1H, OH), 10.41 (s, 1H, OH), 12.25 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 25.59 (C_β), 37.76 (C_α), 103.09 (C-3'), 111.03 (C-6'), 114.92 (C-3), 115.13 (C-1), 119.02 (C-5), 127.08 (C-1'), 127.23 (C-4), 129.92 (C-6), 138.36 (C), 154.55 (C), 155.24 (C), 157.65 (C), 203.54 (CO) ppm. **EM** (ES $^+$): m/z 275.2 (M+H) $^+$, 257.3 (M-H $_2$ O) $^+$. **HRMS** (ES $^+$) m/z encontrada 275.0922 ([M+H] $^+$ C $_{15}$ H $_{14}$ O $_5$ calculada 275.0914).

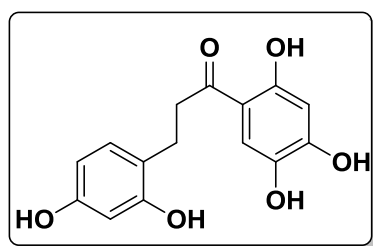
3-(2,6-Dihidroxifenil)-1-(2',5'-dihidroxifenil)-1-propanona (2.59)



Obtenido a partir de **2.54** (55 mg) usando 10 equivalentes de BBr $_3$. Sólido rojizo (19 mg). Rdto: 41%. Precipitado con CH $_2$ Cl $_2$. (P.f.: >150°C $^{(d)}$). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 6.73$ min (gradiente de 15 a

95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.83 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, H_β), 3.06 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, H_α), 6.28 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, 3-H y 5-H), 6.78-6.80 (m, 2H, 3'-H, 4-H), 6.99 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.9 Hz, 4'-H), 7.24 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, 6'-H), 9.18 (s, 1H, OH), 11.38 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 18.59 (C_β), 38.56 (C_α), 106.20 (C-3, C-5), 113.31 (C), 114.83 (C), 118.35 (C-3'), 119.79 (C-4'), 124.22 (C-6'), 126.57 (C-4), 149.35 (C), 153.83 (C), 156.21 (2C), 205.95 (CO) ppm. **EM** (ES+): *m/z* 275.2 (M+H)⁺, 257.3 (M-H₂O)⁺. **HRMS** (ES+) *m/z* encontrada 275.0916 ([M+H]⁺ C₁₅H₁₂O₄ calculada 275.0914).

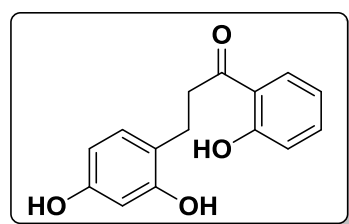
3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(2',4',5'-trihidroxifenil)-1-propanona (2.60)



Obtenido a partir de **2.56** (60 mg) usando 12 equivalentes de BBr₃. Sólido rojizo (16 mg). Precipitado con CH₂Cl₂. Rdto: 32%. (P.f.: >235°C^(d)). **HPLC** (Sunfire): t_R = 6.05 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min).

¹H-RMN: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.74 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, H_β), 3.08 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, H_α), 6.11 (dd, 1H, *J* = 8.1, 2.2 Hz, 5-H), 6.26 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, 3-H), 6.26 (s, 1H, 6'-H), 6.84 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, 6-H), 7.19 (s, 1H, 3'-H), 9.22 (s, 1H, OH), 10.35 (s, 1H, OH), 10.90 (s, 1H, OH) ppm. **EM** (ES+): *m/z* 291.4 (M+H)⁺. **HRMS** (ES+) *m/z* encontrada 291.1720 ([M+H]⁺ C₁₅H₁₄O₆ calculada 291.1784).

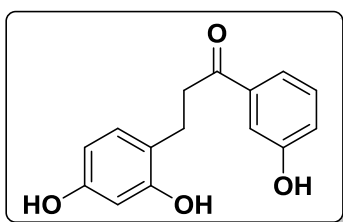
3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(2'-hidroxifenil)-1-propanona (2.61)



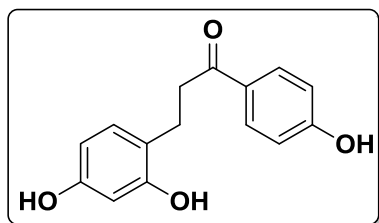
Obtenido por hidrogenación de **2.36** (150 mg). Sólido amorfo rojizo (35 mg). Rdto: 23%. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 2 a 35% de

ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 8.17$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.75 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H _{β}), 3.24 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H _{α}), 6.12 (dd, 1H, $J = 8.1, 2.3$ Hz, 5-H), 6.27 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, 3-H), 6.85 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 6-H), 6.92-6.95 (m, 2H, 5'-H, 3'-H), 7.51 (ddd, 1H, $J = 8.4, 7.1, 1.7$ Hz, 4'-H), 7.91 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.7$ Hz, 6'-H), 8.99 (s, 1H, OH), 9.23 (s, 1H, OH), 11.99 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 24.50 (C _{β}), 39.50 (C _{α} junto con la señal de DMSO), 102.38 (C-3), 105.92 (C-5), 117.21 (C-3'), 117.66 (C), 119.18 (C-5'), 120.11 (C), 130.10 (C-6'), 130.72 (C-6), 136.01 (C-4'), 155.84 (C), 156.59 (C), 160.75 (C), 206.26 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 259.2 (M+H)⁺. **HRMS** (ES⁺) m/z encontrada 259.09682 ([M+H]⁺ C₁₅H₁₄O₄ calculada 259.09649).

3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(3'-hidroxifenil)-1-propanona (2.62)

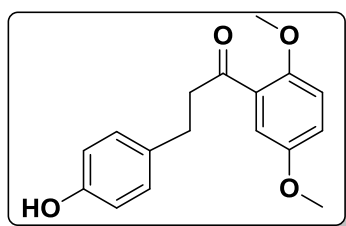


Obtenido por hidrogenación de **2.37** (150 mg) Sólido amorfo rojizo (33 mg). Rdto: 22%. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 2 a 20% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 6.51$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.71 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H _{β}), 3.12 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H _{α}), 6.11 (dd, 1H, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 5-H), 6.27 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, 3-H), 6.83 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 6-H), 7.00 (dd, 1H, $J = 8.0, 2.8$ Hz, 4'-H), 7.30-7.32 (m, 2H, 3'-H, 6'-H), 7.40 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, 2'-H), 8.97 (s, 1H, OH), 9.19 (s, 1H, OH), 9.75 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 24.51 (C _{β}), 38.71 (C _{α}), 102.46 (C-3), 105.97 (C-5), 114.10 (C), 117.60 (C), 118.93 (C), 120.16 (C), 129.85 (C), 130.15 (C-6), 138.12 (C), 155.87 (C), 156.86 (C), 157.64 (C), 100.77 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 259.2 (M+H)⁺. **HRMS** (ES⁺) m/z encontrada 259.09541 ([M+H]⁺ C₁₅H₁₄O₄ calculada 259.09649).

3-(2,4-Dihidroxifenil)-1-(4'-hidroxifenil)-1-propanona (2.63)

Obtenido por hidrogenación de **2.38** (40 mg). Sólido amorfo rojizo (15 mg). Lit²⁴⁷. Rdto: 38%. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 2 a 30% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire):

$t_R = 5.04$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.70 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H _{β}), 3.07 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H _{α}), 6.11 (dd, 1H, $J = 8.1, 2.8$ Hz, 5-H), 6.27 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, 3-H), 6.92-6.84 (m, 3H, 6-H, 2'-H, 6'-H), 7.84 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, 3'-H, 5'-H), 8.96 (s, 1H, OH), 9.18 (s, 1H, OH), 10.32 (s, 1H, OH) ppm. **EM** (ES+): m/z 259.2 (M+H)⁺. **HRMS** (ES+) m/z encontrada 259.0948 ([M+H]⁺ C₁₅H₁₄O₄ calculada 259.09649).

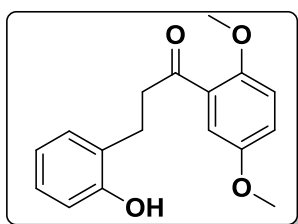
1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-1-propanona (2.67)

Sólido blanco (75 mg). Rdto: 86%. (Método B) (P.f.: 118-121°C). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 8.68$ min (gradiente de 15

a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.76 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, H _{β}), 3.15 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, H _{α}), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 6.65 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, 3-H y 5-H), 7.00 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, 2-H y 6-H), 7.03 (m, 1H, 4'-H), 7.10 (m, 2H, 3'-H y 6'-H), 9.18 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR**: (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 29.15 (C _{β}), 45.26 (C _{α}), 55.37 (OMe), 56.30 (OMe), 113.58

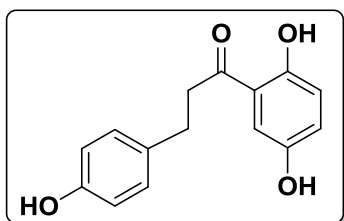
(C-6'), 113.98 (C-3'), 115.12 (C-3, C-5), 119.26 (C-4'), 128.33 (C-1), 129.24 (C-2, C-6), 131.37 (C-1'), 152.39 (C), 152.93 (C), 155.45 (C), 200.93 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 287.4 (M+H)⁺, 309.4 (M+Na)⁺.

1-(2',5'-dimetoxifenil)-3-(2-hidroxifenil)-1-propanona (2.68)



Sólido blanco 78 mg. Rdto: 89%. (Método B) (P.f.: 85-90°C). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): t_R = 9.09 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.80 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H_β), 3.16 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H_α), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 6.69 (td, 1H, J = 7.4, 1.2 Hz, 4-H), 6.76 (dd, 1H, J = 8.1, 1.2 Hz, 6-H), 6.99 (ddd, 1H, J = 8.1, 7.4, 1.7 Hz, 5-H), 7.04 (d, 1H, J = 7.4 Hz, 3-H), 7.05 (dd, 1H, J = 2.2, 1.5 Hz, 4'-H), 7.10 (d, 1H, J = 1.5 Hz, 6'-H), 7.10 (d, 1H, J = 2.2 Hz, 3'-H), 9.33 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.95 (C_β), 43.11 (C_α), 55.54 (OMe), 56.26 (OMe), 113.54 (C-6'), 113.93 (C-3'), 114.84 (C-3), 118.91 (C-5), 119.18 (C-4'), 127.01 (C-4), 127.29 (C), 128.37 (C), 129.85 (C-6), 152.36 (C), 152.90 (C), 155.19 (C), 201.18 (CO) ppm. **EM** (ES+): 309.4 (M+Na)⁺, 269.3 (M-H₂O)⁺.

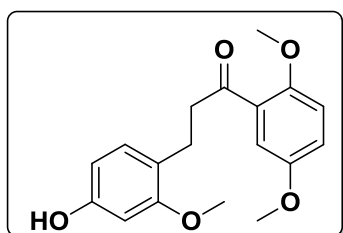
3-(4-hidroxifenil)-1-(2',5'-dihidroxifenil)-1-propanona (2.69)



Obtenido a partir de **2.67** (150 mg) usando 8 equivalentes de BBr₃. Sólido rojizo (98 mg). Rdto: 72%. Precipitado con CH₂Cl₂. (P.f.: 105-108°C). **HPLC** (Sunfire): t_R = 7.71 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.80 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H_β), 3.26 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H_α), 6.66 (d, 2H, J = 8.4 Hz, 3-H y 5-H), 6.80 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 3'-H), 6.97 (dd, 1H, J = 8.9, 3.0 Hz, 4'-H), 7.05 (d, 2H, J = 8.4 Hz, 2-H y 6-H), 7.19 (d, 1H, J =

3.0 Hz, 6'-H), 9.17 (s, 1H, OH), 11.25 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 28.76 (C_β), 41.02 (C_α), 114.71 (C-6'), 115.08 (C-3, C-5), 118.42 (C-3'), 120.19 (C-4'), 124.15 (C-1'), 129.25 (C-2, C-6), 131.04 (C-1), 149.42 (C), 153.54 (C), 155.50 (C), 204.82 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 259.2 (M+H) $^+$. **HRMS** (ES+) m/z encontrada 259.09611 ([M+H] $^+$ C₁₅H₁₄O₄ calculada 259.09649).

1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-(2-metoxi-4-hidroxifenil)-1-propanona (2.86)



Sólido blanco (78 mg). Rdto: 81% (Método B). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 45% de AcOEt en hexano). **HPLC** (Sunfire): t_R = 6.77 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10

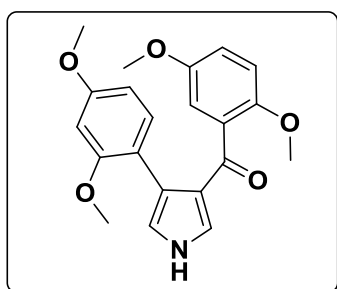
min). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.71 (t, 2H, J = 7.6 Hz, H_β), 3.08 (t, 2H, J = 7.6 Hz, H_α), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 6.25 (dd, 1H, J = 8.2, 2.2 Hz, 5-H), 6.35 (d, 1H, J = 2.2 Hz, 3-H), 6.87 (d, 1H, J = 8.2 Hz, 6-H), 7.02 (m, 1H, 4'-H), 7.07-7.11 (m, 2H, 3'-H, 6'-H) 9.20 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.29 (C_β), 43.60 (C_α), 55.12 (OMe), 5.57 (OMe), 56.30 (OMe), 98.92 (C-3), 106.59 (C-5), 113.59 (C-6'), 113.96 (C-4'), 119.07 (C-1), 119.12 (C-3'), 128.51 (C-1'), 129.93 (C-6), 152.31 (C), 152.94 (C), 156.98 (C), 157.93 (C), 201.41 (CO) ppm. **EM** (ES+): m/z 317.4 (M+H) $^+$.

2.6.8 Síntesis de Derivados de Pirrol

A una disolución de la chalcona **2.16** (0.1 g, 0.304 mmol), en Et₂O/DMSO (3:1), se le añade TOSMIC (isocianuro de toluenosulfonilmetil) (0.077 g, 0.395 mmol) y NaH (0.0075 g, 0.316 mmol). La reacción se mantiene en agitación y a temperatura ambiente durante 6 horas. A continuación, se evapora el disolvente a sequedad y se purifica por

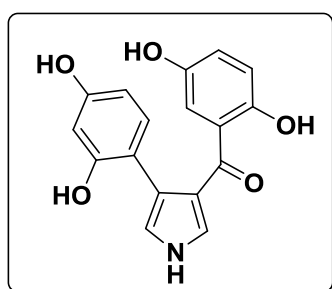
cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice, utilizando un gradiente de 0 a 50% de AcOEt en hexano.

3-(2',5'-dimetoxibenzoil)-4-(2,4-Dimetoxifenil)-1H-pirrol (2.72)



Sólido blanco (60 mg). Rdto 53%. (P.f.: 178-182°C). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 8.11$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.55 (s, 6H, 2-OMe), 3.72 (s, 6H, 2-OMe), 6.35 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 6.41 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.4$ Hz, 5-H), 6.65 (dd, 1H, $J = 2.1, 1.4$ Hz, 4'-H), 6.71 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz, 5-H-pirrol), 6.85 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, 6'-H), 6.86 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, 3'-H), 7.00 (dd, 1H, $J = 3.2, 2.2$ Hz, 2-H-pirrol), 7.04 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, 6-H), 11.34 (sa, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 55.22 (OMe), 55.43 (OMe), 55.69 (OMe), 56.15 (OMe), 98.09 (C-3), 104.12 (C-5), 112.87 (C-6'), 114.03 (C-4'), 115.25 (C-3'), 117.26 (C), 119.80 (C-5-pirrol), 120.85 (C), 123.69 (C), 127.37 (C-2-Pirrol), 131.39 (C-6), 132.08 (C), 150.34 (C), 152.54 (C), 157.78 (C), 159.90 (C), 189.44 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 368.3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

3-(2',5'-Dihidroxibenzoil)-4-(2,4-dihidroxifenil)-1H-pirrol (2.73)



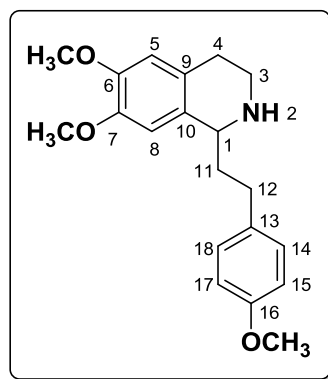
Obtenido a partir de **2.84** (100 mg) usando 12 equivalentes de BBr_3 , siguiendo el procedimiento general descrito en la página 83. Aceite rojizo (18 mg). Rdto 43%. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 2 a 40% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.69$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.16 (dd, 1H, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 5-H), 6.20 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 6.74 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 3'-H), 6.82 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz, 5-H-Pirrol),

6.87 (dd, 1H, $J = 8.8, 2.9$ Hz, 4'-H), 6.94 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, 6-H), 7.16 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz, 2-H-Pirrol), 7.20 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, 6'-H), 8.93 (sa, 1H, OH), 11.43 (sa, 1H, NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 102.57 (C-3), 106.01 (C-5), 113.65 (C-6'), 117.53 (C-4'), 117.61 (C-3'), 118.61 (C-5-pyrrol), 121.23 (C), 121.32 (C), 121.71 (C), 122.24 (C), 124.51 (C-2-pyrrol), 130.51 (C-6), 148.82 (C), 153.85 (C), 154.75 (C), 156.71 (C), 195.52 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 312.2 ($\text{M}+\text{H}^+$). **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 312.08724 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ calculada 312.08665).

2.6.9 Síntesis de Derivados de Tetrahydroisoquinolina y tetrahydro- β -carbolina.

A una disolución de 3,4-dimetoxifenetilamina (0.4 g, 2.20 mmol) en tolueno (1.5 mL), se le añade 3-(4-metoxifenil)-propionaldehído (0.435 g, 2.648 mmol), y TFA (1.35 mL, 17.65 mmol). La reacción se calienta a 140 °C durante 30 minutos utilizando la técnica de irradiación microondas. A continuación, se evapora el disolvente a sequedad y se adiciona NaOH 2N hasta pH= 8-9. Seguidamente, se extrae con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl y se seca sobre MgSO_4 . Finalmente, se evapora el disolvente a sequedad y se lleva a cabo su purificación.

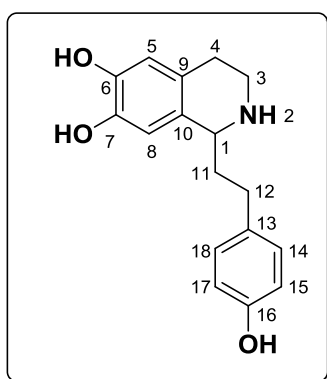
6,7-Dimetoxi-1-(4-metoxifenil)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina (2.76)²⁴⁸



Cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. (**Eluyente**: gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano), obteniéndose un aceite (440 mg). Rdto: 61%. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 4.12$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.00-2.11 (m, 4H, 11-H, 12-H), 2.61-2.92 (m, 2H, 4-H), 2.99-3.12 (m, 1H, 3-Ha),

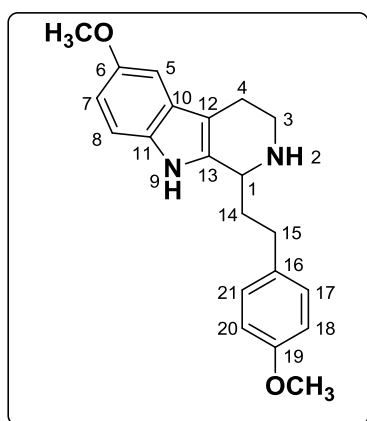
3.31 (dt, 1H, $J = 12.6, 5.6$ Hz, 3-Hb), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.82 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe), 4.07 (dd, 1H, $J = 8.2, 4.2$ Hz, 1-H), 6.56 (s, 1H, 5-H), 6.58 (s, 1H, 8-H), 6.83 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, 15-H, 17-H), 7.14 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, 14-H, 18-H) ppm. **EM** (ES^+): m/z 327.3 ($M+H$)⁺.

1-(4-Hidroxifenetil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-6,7-diol²¹⁵



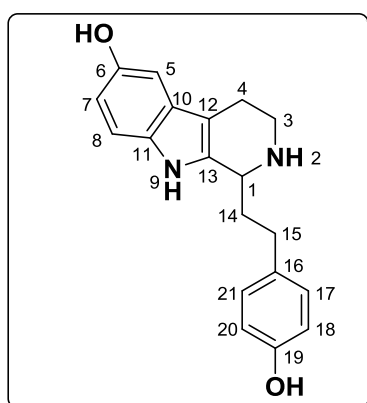
Obtenido a partir de **2.96** (125 mg) usando 8 equivalentes de BBr_3 . Sólido rojizo (99.5 mg) que no necesita de purificación ulterior. Rdto: 91%. (P.f.: >200 °C^(d)). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 5.14$ min (gradiente de 2 a 30% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 1.99-2.09 (m, 2H, 11-H), 2.59-2.65 (m, 2H, 12-H), 2.77-2.85 (m, 2H, 4-H), 3.20-3.26 (m, 1H, 3a-H), 3.37-3.45 (m, 1H, 3b-H), 4.21-4.30 (m, 1H, 1-H), 6.54 (s, 1H, 5-H), 6.59 (s, 1H, 8-H), 6.70 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, 15-H, 17H), 7.05 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, 14-H, 18-H), 8.62 (sa, 1H, OH), 9.09 (sa, 2H, OH) ppm. **EM** (ES^+): m/z 286.3 ($M+H$)⁺. **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 286.14296 ($[M+H]^+$) $C_{17}H_{19}NO_3$ calculada 286.14377).

A una disolución de 5-metoxitriptamina (0.25 g, 1.314 mmol) en CH_2Cl_2 (6 mL), se le añade 3-(4-metoxifenil)-propionaldehído (0.248 g, 1.511 mmol). Tras una hora y media, la reacción se enfría a -20 °C y se le añade TFA (0.1 mL, 1.514 mmol). Después de 2 horas, se adiciona $NaHCO_3$ saturado hasta $pH = 8$. La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 12 horas. Seguidamente, se extrae con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl y se seca sobre $MgSO_4$. Finalmente, se evapora el disolvente a sequedad y se lleva a cabo su purificación.

6-Metoxi-1-(4-metoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina (2.79)

Aceite (90 mg). Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. (**Eluyente:** gradiente de 0 a 70% de AcOEt en hexano). Rdto: 20%. **HPLC** (Sunfire): $t_R = 5.05$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.93-2.01 (m, 1H, 14a-H), 2.09-2.16 (m, 1H, 14b-H), 2.69-2.72 (m, 2H, 15-H), 2.86-2.95 (m, 2H, 4-H), 3.02-3.07 (m, 1H, 3a-H), 3.34-3.39 (m, 1H, 3b-

H), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.85 (s, 3H, OMe), 4.09 (dd, 1H, $J = 8.4, 3.4$ Hz, 1-H), 6.79 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 7-H), 6.84 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, 18-H y 20-H), 6.93 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 5-H), 7.14 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, 17-H y 21-H), 7.16 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, 8-H), 7.59 (sa, 1H, NH-indol) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$** (100 MHz, CDCl_3) δ : 22.86 (C-15), 31.39 (C-4), 37.10 (C-14), 42.60 (C-3), 52.41 (C-1), 55.43 (OMe), 56.11 (OMe), 100.52 (C-5), 109.11 (C), 111.41 (C-7), 111.49 (C-8), 114.09 (C-18, C-20), 128.00 (C), 129.45 (C-17, C-21), 130.85 (C), 133.96 (C), 136.99 (C), 154.17 (C), 158.06 (C) ppm. **EM** (ES^+): m/z 337.4 (M+H) $^+$.

6-Hidroxi-1-(4-hidroxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina (2.80)

Obtenido a partir de **2.99** (75 mg) usando 8 equivalentes de BBr_3 . Sólido rojizo (31 mg) que no necesita de purificación ulterior. Rdto: 45%. (P.f.: >212 °C $^{(d)}$). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 0.91$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min).

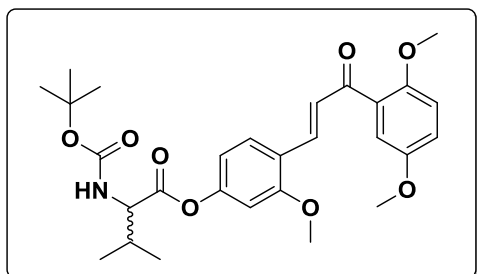
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.98-2.11 (m, 2H, 14a-H), 2.36-2.39 (m, 1H, 14b-H), 2.63-2.73 (m, 2H, 15-H), 2.80-2.92 (m, 2H, 4-H), 3.30-3.36 (m, 2H, 3-H), 4.60-4.65 (m, 1H, 1-H), 6.63 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 7-H), 6.70 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, 18-H y 20-H), 6.75 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, 5-H), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, 17-H y 21-H), 7.15 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, 8-H), 9.00 (sa, 1H, NH-indol), 9.42 (s, 1H, OH), 10.81 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 18.47 (C-4), 30.20 (C-15), 34.06 (C-14), 41.47 (C-3), 52.96 (C-1), 102.43 (C-5), 106.29 (C), 112.15 (C-7), 112.30 (C-8), 115.56 (C-18, C-20), 126.62 (C), 129.47 (C-17, C-21), 130.41 (C), 130.97 (C), 130.99 (C), 150.99 (C), 155.86 (C) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 309.4 (M+H)⁺. **HRMS** (ES⁺) *m/z* encontrada 309.16009 ([M+H]⁺ C₁₉H₂₀N₂O₂ calculada 309.15975).

2.6.10 Síntesis de Profármacos

2.6.10.1 Derivado de Valina

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[2-metoxi-4-(Boc-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.82)

A una disolución del compuesto **2.81** (0.015 g, 0.047 mmol), en CH₂Cl₂ (1 mL) se le añade Boc-Val-OH (0.03 g, 0.143 mmol), clorhidrato de EDC (0.027 g, 0.143 mmol), y DMAP (0.001 g, 0.014 mmol). La reacción se mantiene en agitación y a temperatura ambiente durante 15 horas. La fase orgánica se lava con ácido cítrico 5%, seguido de una disolución de NaHCO₃ saturado y finalmente con una disolución de NaCl saturado. Se seca sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El compuesto final se purifica por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice (eluyente: gradiente de 0 a 40% de AcOEt en hexano), obteniéndose el producto deseado en forma de aceite.

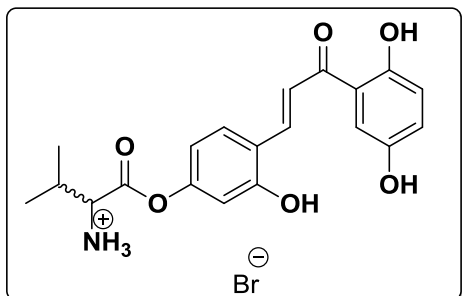


(255 mg. Rdto: 78%). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 8.56$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.00 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, γ -Val), 1.40 (s, 9H, CH_3 ^tBu), 2.14 (m, 1H, β -Val), 3.73 (s,

3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.84 (s, 3H, OMe), 4.00 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, α -Val), 6.73 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 5-H), 6.80 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, 3-H), 7.02 (dd, 1H, $J = 2.6, 1.0$ Hz, 4'-H), 7.11 (d, 2H, $J = 2.6$ Hz, 3'-H y 6'-H), 7.41 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H_α), 7.47 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, NH-Val), 7.71 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H_β), 7.78 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, 6-H) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 18.95 (γ -Val), 19.54 (γ -Val), 28.61 (CH_3 -Boc), 29.95 (β -Val), 56.01 (OMe), 56.51 (OMe), 56.80 (OMe), 60.20 (α -Val), 79.00 (C-Boc), 105.99 (C-3), 114.37 (C-5), 114.42 (C-6'), 114.56 (C-4'), 119.00 (C-3'), 121.22 (C_α), 127.47 (C), 129.81 (C), 130.02 (C-6), 137.15 (C_β), 152.36 (C), 153.49 (C), 153.72 (C), 156.43 (OCONH), 159.46 (C), 171.10 (CONH), 192.23 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 514.5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 336.5 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

(E)-1-(2',5'-Dihydroxifenil)-3-[2-hidroxi-4-(L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.83)

Se realiza el mismo procedimiento general descrito en la página 98, teniendo en cuenta que en el caso de todos los profármacos hidroxilados, se evapora el CH_2Cl_2 a sequedad y la fase acuosa se extrae con AcOEt. Una vez aislado el compuesto, se purifica según se indica en cada caso.



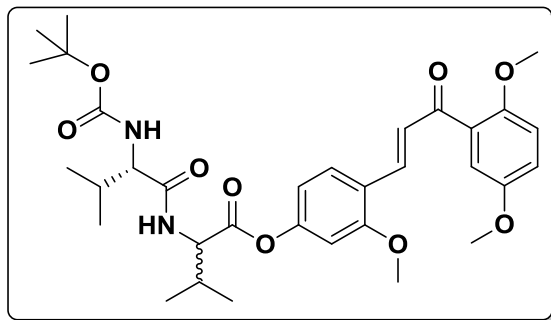
Obtenido a partir de **2.103** (100 mg) usando 10 equivalentes de BBr_3 . Sólido rojizo (35 mg). Rdto: 39 %. (P.f.: 194-197°C). Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 10 a 30% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): $t_R = 5.11$

min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.07, 1.10 (d, 3H, $J = 7.3$ Hz, γ -Val), 2.32 (m, 1H, β -Val), 4.21 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, α -Val), 6.72 (dd, 1H, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 5-H), 6.79 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 6.84 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 7.03 (dd, 1H, $J = 8.9, 3.0$ Hz, 4'-H), 7.44 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, 6'-H), 7.89 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, H_α), 7.97 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 6-H), 8.04 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, H_β), 8.37 (sa, 3H, NH_3^+), 9.23 (s, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 17.72 (γ -Val), 18.28 (γ -Val), 29.58 (β -Val), 57.42 (α -Val), 109.07 (C-3), 112.60 (C-5), 114.77 (C-6'), 118.37 (C-4'), 120.03 (C-3'), 120.98 (C-1), 121.44 (C_α), 124.29 (C-1'), 130.53 (C-6), 138.87 (C_β), 149.49 (C), 152.02 (C), 154.59 (C), 158.34 (C), 167.47 (CONH), 193.29 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 372.4 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2.6.10.2 Derivados de Valina-Valina

A una disolución de la correspondiente chalcona (0.837 mmol) en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ (6 mL/1mL) se le añade Boc-Val-Val-OH (2.62 mmol), clorhidrato de EDC (2.62 mmol) y DMAP (0.26 mmol). La reacción se mantiene en agitación y a temperatura ambiente durante 15 horas. La fase orgánica se lava con ácido cítrico 5%, seguido de una disolución de NaHCO_3 saturado y finalmente con una disolución de NaCl saturado. Se seca sobre MgSO_4 y se evapora el disolvente a sequedad. El compuesto final se purifica por cromatografía flash utilizando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[2-metoxi-4-(Boc-L-Val-L,D-Val)oxy]fenil-2-propenona (2.84)



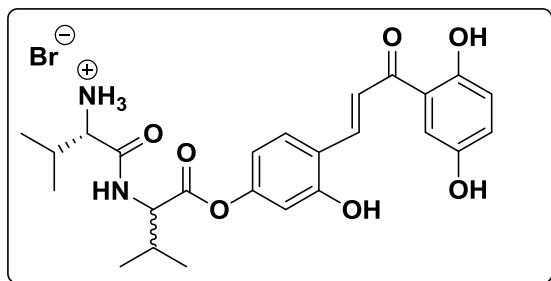
Aceite (138 mg). Rdto: 47%.

Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano.

HPLC (Sunfire): Mezcla de diastereoisómeros (49:51) $t_R =$

8.22 min y $t_R =$ 8.33 min (gradiente de 30 a 95% de A en B en 10 min). **1H -RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.85, 1.01 (d, 6H, $J = 7.7$ Hz, γ -Val), 1.36 (s, 9H, CH_3 t Bu), 1.97 (m, 1H, β -Val), 2.25 (m, 1H, β -Val), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.84 (s, 3H, OMe), 3.93 (m, 1H, α -Val), 4.36 (m, 1H, α -Val), 6.70 (m, 1H, NH), 6.72, 6.74 (dd, 1H, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 5-H), 6.80, 6.82 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, 3-H), 7.02 (m, 1H, 4'-H), 7.11 (m, 2H, 6-H, 3'-H), 7.41 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H_α), 7.71 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H_β), 7.76, 7.77 (d, 1H, $J = 8.6$, 6'-H), 8.26 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, NH), 8.30 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, NH) ppm. **EM** (ES^+): m/z 613.3 ($M+H$) $^+$.

(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-[2-hidroxi-4-(L-Val-L,D-Val)oxy]fenil-2-propenona (2.85)



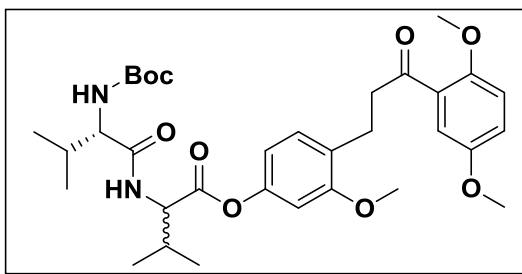
Obtenido a partir de **2.106** (100 mg) usando 20 equivalentes de BBr_3 . Sólido rojizo (65 mg). Rdto: 72%. (P.f.: 189-191°C).

Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:**

gradiente de 2 a 30% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): Mezcla

de diastereoisómeros (47:53) t_{R1} = 5.92 min y t_{R2} = 6.12 min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.96, 0.98, 1.03, 1.06 (d, 3H, J = 6.9 Hz, γ -Val), 2.14 (m, 1H, β -Val), 2.25 (m, 1H, β -Val), 3.74, 3.77 (m, 1H, α -Val), 4.41, 4.50 (m, 1H, α -Val), 6.62, 6.65 (dd, 1H, J = 8.6, 2.3 Hz, 5-H), 6.70, 6.72 (d, 1H, J = 2.3 Hz, 3-H), 6.80, 6.84 (d, 1H, J = 8.9 Hz, 3'-H), 7.02, 7.04 (dd, 1H, J = 8.9, 3.0 Hz, 4'-H), 7.41, 7.42 (d, 1H, J = 3.0 Hz, 6'-H), 7.87, 7.89 (d, 1H, J = 15.7 Hz, H_α), 7.92, 7.93 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 6-H), 8.02, 8.03 (d, 1H, J = 15.7 Hz, H_β), 8.14 (sa, 3H, NH_3^+), 8.82 (d, 1H, J = 6.8 Hz, CONH), 8.93 (d, 1H, J = 7.9 Hz, CONH), 10.83, 10.85 (s, 1H, OH), 11.83, 11.84 (s, 1H, OH), 12.25 (s, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 17.29, 17.53 (γ -Val), 18.15, 18.25 (γ -Val), 18.25, 18.44 (γ -Val), 18.68, 18.87 (γ -Val), 29.67, 29.98 (β -Val), 30.03, 31.05 (β -Val), 57.06, 57.24 (α -Val), 57.75, 58.14 (α -Val), 109.14, 109.23 (C-3), 112.72, 112.88 (C-5), 114.74 (C-6'), 118.30, 118.38 (C-4'), 119.56, 119.60 (C-1), 120.94, 120.96 (C-3'), 121.08, 121.12 (C α), 123.98, 124.28 (C-1'), 130.41, 130.44 (C-6), 139.11 (C β), 149.30, 149.47 (C), 152.77, 152.78 (C), 154.61, 154.63 (C), 158.33 (C), 168.63, 168.67 (CONH), 169.35, 169.63 (OCO), 193.32 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 471.2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(*E*)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[2-metoxi-4-(Boc-L-Val-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.87)

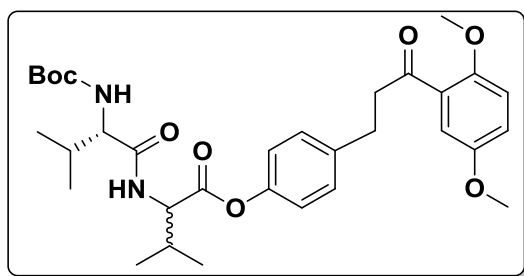


Aceite (342 mg). Rdto: 86%. Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano. **HPLC** (Sunfire): Mezcla de diastereoisómeros

(50:50) t_{R1} = 8.49 min y t_{R2} = 8.66 min (gradiente de 30 a 95% de A en B en 10

min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.84, 1.00 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz, γ -Val), 1.37 (s, 9H, CH₃ ^tBu), 1.95 (m, 1H, β -Val), 2.22 (m, 1H, β -Val), 2.83 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H $_{\beta}$), 3.16 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H $_{\alpha}$), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.94 (m, 1H, α -Val), 4.34 (m, 1H, α -Val), 6.55, 6.60 (d, 1H, *J* = 8.1, 2.2 Hz, 5-H), 6.63, 6.66 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, 3-H), 6.69, 6.75 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, NHCOO) 7.05 (m, 1H, 4'-H), 7.10 (m, 2H, 3'-H, 6'-H), 7.15, 7.16 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, 6-H), 8.22 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, CONH), 8.25 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, CONH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 18.73, 18.92 (γ -Val), 18.94, 18.98 (γ -Val), 19.65, 19.79 (γ -Val), 19.79, 19.89 (γ -Val), 24.88, 24.93 (C $_{\beta}$), 28.79, 28.81 (CH₃-Boc), 30.34, 30.40 (β -Val), 31.00, 31.20 (β -Val), 43.52 (C $_{\alpha}$), 56.17 (OMe), 56.21 (OMe), 56.89 (OMe), 58.30, 58.33 (α -Val), 60.19, 60.21 (α -Val), 78.70 (C-Boc), 99.51 (C-3), 105.14, 105.23 (C-5), 114.18 (C-6'), 114.59 (C-3'), 119.89 (C-4'), 127.29 (C), 128.85 (C), 130.51, 130.53 (C-6), 150.24 (C), 153.00 (C), 153.54 (C), 156.10 (OCONH), 158.31 (C), 170.95 (CONH), 172.84 (OCO), 201.52 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 615.5 (M+H)⁺, 515.5 (M-Boc)⁺, 637.5 (M+Na)⁺.

(*E*)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[4-(Boc-L-Val-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.88)



Aceite (495 mg). Rdto: 97%.

Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice.

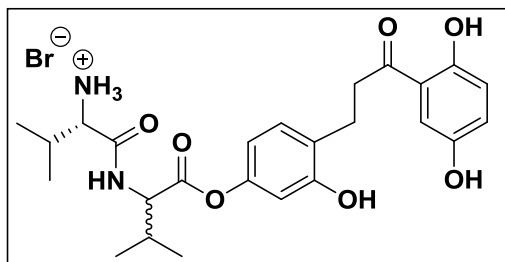
Eluyente: gradiente de 0 a 25% de AcOEt en hexano. **HPLC**(Sunfire):

Mezcla de diastereoisómeros

(52:48) *t*_R = 8.42 min y *t*_R = 8.53 min (gradiente de 30 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.84, 0.86, 1.00, 1.01 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz, γ -Val), 1.37 (s, 9H, CH₃ ^tBu) 1.97 (m, 1H, β -Val), 2.21 (m, 1H, β -Val), 2.89

(t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_β), 3.24 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_α), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.81 (s, 3H, OMe), 3.94 (m, 1H, α -Val), 4.32 (m, 1H, α -Val), 6.68, 6.73 (m, 1H, NHCOO), 6.94, 6.98 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 3-H y 5-H), 7.07 (m, 1H, 3'-H), 7.11 (m, 2H, 4'-H y 6'-H), 7.26, 7.29 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 2-H y 6-H), 8.24 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, CONH), 8.26 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, CONH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 18.59, 18.70 (γ -Val), 18.74, 18.80 (γ -Val), 19.34, 19.48 (γ -Val), 19.53, 19.64 (γ -Val), 28.58 (CH_3 -Boc), 29.52, 29.58 (C_β), 30.03, 30.19 ($\text{C-}\beta$ -Val), 30.82, 30.91 ($\text{C-}\beta$ -Val), 45.01 (C_α), 56.00 (OMe), 56.69 (OMe), 58.24, 58.43 ($\text{C}\alpha$ -Val), 60.00, 60.19 ($\text{C}\alpha$ -Val), 78.88 (C-Boc), 113.98 ($\text{C-6}'$), 114.45 ($\text{C-4}'$), 115.57 ($\text{C-3}'$), 121.74, 121.81 (C-3 , C-5), 128.58 (C), 129.89, 129.94 (C-2 , C-6), 139.60 (C), 148.80 (C), 152.88 (C), 153.31 (C), 156.04 (OCONH), 170.82, 170.91 (CONH), 172.96, 173.04 (OCO), 201.41 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 585.2 (M+H^+), 485.2 (M-Boc^+), 607.2 (M+Na^+).

(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-[2-hidroxi-4-(L-Val-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.89)



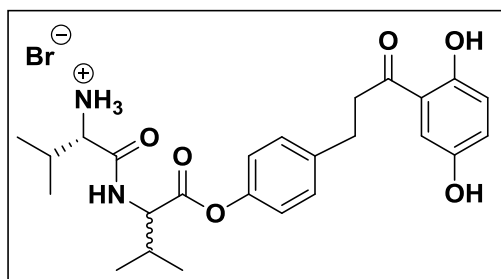
Obtenido a partir de **2.109** (110 mg) usando 20 equivalentes de BBr_3 . Sólido rojizo (69 mg). Rdto: 69%. (P.f.: 162-165 °C). Purificación por cromatografía flash en fase reversa.

Eluyente: gradiente de 2 a 30% de

ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): Mezcla de diastereoisómeros (56:44) $t_R = 6.16$ min y $t_R = 6.30$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.95, 0.97, 1.01, 1.04 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, γ -Val), 2.11 (m, 1H, β -Val), 2.21 (m, 1H, β -Val), 2.86 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_β), 3.27 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_α), 3.74, 3.77 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz, α -Val), 4.38, 4.48 (m, 1H, α -Val), 6.43, 6.47 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.4$ Hz, 5-H), 6.53, 6.55 (d,

1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 6.81 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 6.98 (dd, 1H, $J = 8.9, 3.0$ Hz, 4'-H), 7.14, 7.15 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, 6-H), 7.21 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, 6'-H), 8.10 (sa, 3H, NH_3^+), 8.76 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, CONH), 8.89 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, CONH), 9.15, 9.17 (s, 1H, OH), 9.82, 9.83 (s, 1H, OH), 11.23 (s, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 17.23, 17.53 (γ -Val), 18.12, 18.25 (γ -Val), 18.28, 18.46 (γ -Val), 18.86, 19.02 (γ -Val), 24.24, 24.26 (C_β), 29.73, 29.99 (β -Val), 30.03, 30.17 (β -Val), 38.81, 38.83 (C_α), 57.07, 57.25 (α -Val), 57.61, 58.06 (α -Val), 108.07, 108.11 (C-3), 111.45 (C-4'), 111.59 (C-3'), 114.67 (C-5), 118.41 (C-6'), 120.13, 120.16 (C-1), 124.15 (C-1'), 125.08 (C), 130.21, 130.23 (C-6), 149.42 (C), 153.54 (C), 155.83 (C), 168.58, 168.59 (CONH), 169.66, 169.93 (OCO), 204.86 (CO) ppm. **EM** (ES^+): m/z 473.3 ($\text{M}+\text{H}^+$). **HRMS** (ES^+) m/z encontrada 473.22990 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$ calculada 473.22823).

(E)-1-(2',5'-Dihidroxifenil)-3-[4-(L-Val-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.90)



Obtenido a partir de **2.108** (185 mg) usando 20 equivalentes de BBr_3 , Sólido rojizo (117 mg). Rdto: 69%. (P.f.: 129-131 °C). Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 2 a

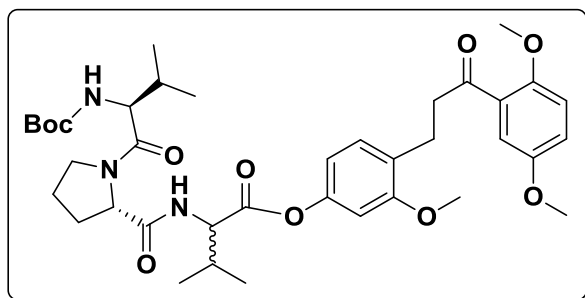
30% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): Mezcla de diastereoisómeros (50:50) $t_R = 6.00$ min y $t_R = 6.21$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.94, 0.98, 1.02, 1.05 (d, 3H, $J = 7.00$ Hz, γ -Val), 2.12 (m, 1H, β -Val), 2.26 (m, 1H, β -Val), 2.94 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, H_β), 3.24 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_α), 3.74, 3.78 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, α -Val), 4.39, 4.48 (m, 1H, α -Val), 6.81 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 6.97, 6.99 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 3-H y 5-H), 7.02 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.5$ Hz, 4'-H), 7.21 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, 6'-H), 7.32, 7.35 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 2-H y 6-H), 8.10 (sa, 3H, NH_3^+),

8.78 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, CONH), 8.91 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, CONH), 9.18, 9.19 (s, 1H, OH), 11.17, 11.18 (s, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 17.26, 17.49 (γ -Val), 18.19, 18.25 (γ -Val), 18.29, 18.44 (γ -Val), 18.90, 19.07 (γ -Val), 28.69, 28.71 (C_β), 29.65, 29.68 (β -Val), 29.99, 30.04 (β -Val), 40.48, 40.49 (C_α), 57.08, 57.24 (α -Val), 57.77, 58.12 (α -Val), 114.71 (C-6'), 118.39 (C-3'), 120.28, 120.32 (C-1), 121.17, 121.28 (C-3, C-5), 124.12 (C-4'), 129.53, 129.57 (C-2, C-6), 139.08 (C), 148.32 (C), 149.44 (C), 153.40 (C), 168.62, 168.66 (CONH), 169.84, 170.08 (OCO), 204.23 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 457.3 (M+H)⁺. **HRMS** (ES⁺) m/z encontrada 457.23240 ([M+H]⁺ C₂₅H₃₂N₂O₆ calculada 457.23331).

2.6.10.3 Derivados de Valina-Prolina-Valina

A una disolución de la correspondiente chalcona (0.30 mmol) en CH₂Cl₂/THF (5 mL/1mL) se le añade Boc-Val-Pro-Val-OH **2.115** (0.54 mmol), clorhidrato de EDC (0.54 mmol) y DMAP (0.09 mmol). La reacción se mantiene en agitación y a temperatura ambiente durante 15 h. La fase orgánica se lava con ácido cítrico 5%, seguido de una disolución de bicarbonato sódico saturado y finalmente con una disolución de NaCl saturado. Se seca sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El compuesto final se purifica por cromatografía flash utilizando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[2-metoxi-4-(L-Val-L-Pro-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.93)



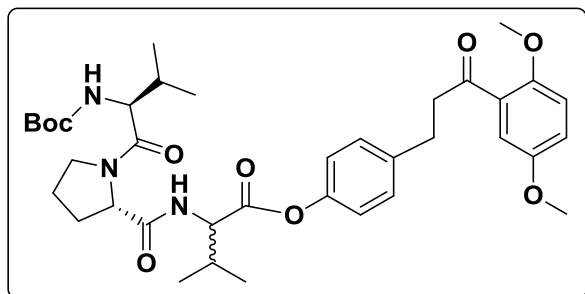
Aceite (152 mg). Rdto: 88%.

Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 30% de AcOEt en hexano.

HPLC (Sunfire): Mezcla de

diastereoisómeros (46:54) $t_R = 8.47$ min y $t_R = 8.59$ min (gradiente de 30 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.85, 0.91, 0.97, 1.02 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, γ -Val), 1.36 (s, 9H, CH_3 ^tBu), 1.98 (m, 2H, γ -Pro), 2.02 (m, 1H, β -Val), 2.11 (m, 2H, β -Pro), 2.21 (m, 1H, β -Val), 2.83 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, H_β), 3.16 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_α), 3.44 (m, 1H, δ -Pro), 3.57 (m, 1H, δ -Pro), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.99 (m, 1H, α -Val), 4.36 (m, 1H, α -Val), 4.50 (m, 1H, α -Pro), 6.57, 6.60 (d, 1H, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 5-H), 6.64, 6.70 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, 3-H), 6.76, 6.79 (m, 1H, OCONH), 7.05 (m, 1H, 4'-H), 7.10 (m, 2H, 3'-H, 6'-H), 7.14, 7.17 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, 6-H), 8.33, 8.35 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, CONH) ppm. **EM** (ES^+): m/z 712.7 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[4-(L-Val-L-Pro-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.94)



Aceite (162 mg). Rdto: 79%.

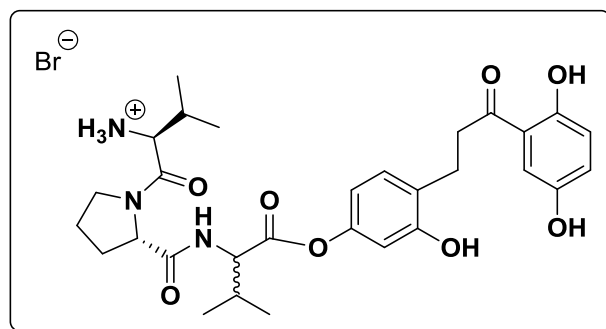
Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 25% de AcOEt en hexano.

HPLC (Sunfire): Mezcla de

diastereoisómeros (51:49) $t_R = 8.25$ min y $t_R = 8.36$ min (gradiente de 30 a 95%

de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.87, 0.91, 0.97, 1.02 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, γ -Val), 1.36 (s, 9H, CH₃ ^tBu), 1.90 (m, 2H, γ -Pro), 2.04 (m, 1H, β -Val), 2.08 (m, 2H, β -Pro), 2.19 (m, 1H, β -Val), 2.89 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H _{β}), 3.24 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H _{α}), 3.47 (m, 1H, δ -Pro), 3.58 (m, 1H, δ -Pro), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.81 (s, 3H, OMe), 4.00 (m, 1H, α -Val), 4.29 (m, 1H, α -Val), 4.50 (m, 1H, α -Pro), 6.78, 6.80 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NHCOO), 6.96, 7.00 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 3-H y 5-H), 7.07 (m, 1H, 3'-H), 7.11 (m, 2H, 4'-H y 6'-H), 7.26, 7.28 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 2-H y 6-H), 8.33 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, CONH), 8.36 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, CONH) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 18.90, 18.93 (γ -Val), 19.04, 19.07 (γ -Val), 19.61, 19.65 (γ -Val), 19.73, 19.75 (γ -Val), 25.17, 25.21 (γ -Pro), 28.88 (CH₃-Boc), 29.73 (C _{β}), 29.81, 3.12 (β -Pro), 30.47, 30.50 (β -Val), 30.70, 30.80 (β -Val), 45.28 (C _{α}), 47.75 (δ -Pro), 56.20 (OMe), 56.93 (OMe), 57.93, 58.00 (α -Val), 58.36, 58.43 (α -Val), 59.50, 59.75 (α -Pro), 78.61 (C-Boc), 114.19 (C-6'), 114.65 (C-3'), 120.01 (C-4'), 121.95, 122.11 (C-3, C-5), 128.77 (C), 130.00, 130.10 (C-2, C-6), 139.70, 139.75 (C), 149.07 (C), 153.09 (C), 153.57 (C), 156.28 (OCONH), 171.00, 171.09 (CONH), 172.71, 172.92 (OCO), 201.09 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): m/z 682.2 (M+H)⁺, 582.2 (M-Boc)⁺, 704.2 (M+Na)⁺.

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[-2-metoxi-4-(L-Val-L-Pro-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.95)

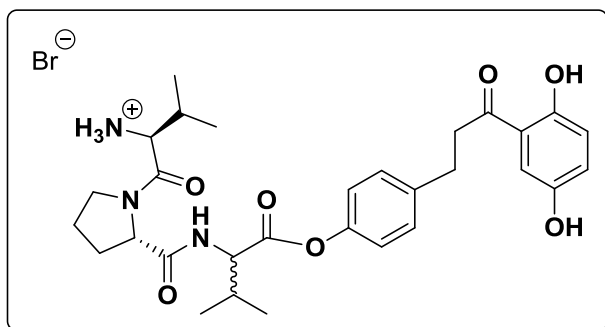


Obtenido a partir de **2.116** (115 mg) usando 20 equivalentes de BBr_3 . Sólido rojizo (50 mg). Rdto: 48%. (P.f.: 170-173 °C). Purificación por cromatografía flash en fase

reversa. **Eluyente:** gradiente de 2 a 30% de ACN en H_2O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): Mezcla de diastereoisómeros (38:62) $t_{\text{R}} = 5.85$ min y $t_{\text{R}} = 5.99$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.91, 0.97, 1.02, 1.05 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, γ -Val), 1.87 (m, 2H, γ -Pro), 1.99 (m, 1H, β -Val), 2.10 (m, 2H, β -Pro), 2.20 (m, 1H, β -Val), 2.84 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_β), 3.26 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_α), 3.42 (m, 1H, δ -Pro), 3.61 (m, 1H, δ -Pro), 3.99 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, α -Val), 4.32, 4.36 (m, 1H, α -Val), 4.52 (m, 1H, α -Pro), 6.43, 6.45 (dd, 1H, $J = 8.1, 2.4$ Hz, 5-H), 6.53, 6.55 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, 3-H), 6.80 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 6.98 (dd, 1H, $J = 8.9, 3.0$ Hz, 4'-H), 7.13, 7.15 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 6-H), 7.21 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, 6'-H), 7.96 (sa, 3H, NH_3^+), 8.44, 8.46 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, CONH), 9.16, 9.17 (s, 1H, OH), 9.77, 9.80 (s, 1H, OH), 11.24 (s, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 17.15, 17.17 (γ -Val), 18.12, 18.26 (γ -Val), 18.41, 18.48 (γ -Val), 18.98, 19.04 (γ -Val), 24.25 (C_β), 24.63, 24.70 (γ -Pro), 29.19, 29.37 (β -Pro), 29.44, 29.63 (β -Val), 29.99, 30.35 (β -Val), 38.84 (C_α), 47.44, 47.46 (δ -Pro), 55.75, 55.77 (α -Val), 57.45, 57.65 (α -Val), 59.16, 59.45 (α -Pro), 108.12, 108.23 (C-3), 111.56 (C-5), 114.66 (C-6'), 118.41 (C-4'), 120.12 (C-3'), 124.15 (C), 124.90, 124.93 (C), 130.12, 130.18 (C-6), 149.13 (C), 149.42 (C), 153.55 (C), 155.80 (C), 166.71, 166.98 (CONH), 170.12, 170.23 (CONH), 171.45, 171.69 (OCO), 204.89 (CO)

ppm. **EM** (ES⁺): m/z 570.4 (M+H)⁺, 552.4 (M-H₂O)⁺. **HRMS** (ES⁺) m/z encontrada 570.28226 ([M+H]⁺ C₃₀H₃₉N₃O₈ calculada 570.28099).

(E)-1-(2',5'-Dimetoxifenil)-3-[-2-metoxi-4-(L-Val-L-Pro-L,D-Val)oxy]fenil-1-propanona (2.96)



Obtenido a partir de **2.117** (115 mg) usando 20 equivalentes de BBr₃. Sólido rojizo (43 mg). Rdto. 41%. (P.f.: 130-133 °C). Purificación por cromatografía flash en fase

reversa. **Eluyente**: gradiente de 2 a 30% de ACN en H₂O (0.05% TFA). **HPLC** (Sunfire): Mezcla de diastereoisómeros (49:51) $t_R = 5.81$ min y $t_R = 6.03$ min (gradiente de 15 a 95% de A en B en 10 min). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.94, 0.97 (d, 3H, $J = 6.80$ Hz, γ -Val), 1.00 (d, 6H, $J = 6.80$ Hz, γ -Val), 1.85 (m, 2H, γ -Pro), 1.97 (m, 1H, β -Val), 2.08 (m, 2H, β -Pro), 2.20 (m, 1H, β -Val), 2.92 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H $_{\beta}$), 3.24 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H $_{\alpha}$), 3.49 (m, 1H, δ -Pro), 3.70 (m, 1H, δ -Pro), 3.97 (m, 1H, α -Val), 4.32, 4.36 (m, 1H, α -Val), 4.55 (m, 1H, α -Pro), 6.79 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 3'-H), 6.96 (m, 4'-H, 3-H, 5-H), 7.19 (d, 1H, $J = 3.00$ Hz, 6'-H), 7.28, 7.31 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 2-H y 6-H), 7.91 (sa, 3H, NH₃⁺), 8.45, 8.46 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, CONH), 9.15, 9.16 (s, 1H, OH), 11.18 (s, 1H, OH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 17.58, 17.59 (γ -Val), 18.65, 18.66 (γ -Val), 18.83, 18.87 (γ -Val), 19.47, 19.51 (γ -Val), 25.09, 25.17 (γ -Pro), 29.13 (C $_{\beta}$), 29.62, 29.84 (β -Pro), 29.87, 30.09 (β -Val), 30.45, 30.60 (β -Val), 40.93 (C $_{\alpha}$), 47.84, 47.89 (δ -Pro), 56.18 (α -Val), 58.00, 58.07 (α -Val), 59.60, 59.75 (α -Pro), 115.13 (C-6'), 118.81 (C-3'), 120.70, 120.72 (C), 121.69, 121.79 (C-3, C-5), 124.53 (C-4'), 129.83, 129.92 (C-2, C-6), 139.44 (C),

148.84 (C), 149.86 (C), 153.84 (C), 167.16, 167.36 (CONH), 170.70, 170.78 (CONH), 171.98, 172.10 (OCO), 204.67 (CO) ppm. **EM** (ES⁺): *m/z* 554.3 (M+H)⁺. **HRMS** (ES⁺) *m/z* encontrada 554.28563 ([M+H]⁺ C₃₀H₃₉N₃O₇ calculada 554.28608).

2.6.11 Ensayos Biológicos

Los ensayos biológicos han sido realizados por distintos grupos colaboradores, según se indica a continuación:

- Expresión de receptores nACh en ovocitos, estudio electrofisiológico y ensayo de viabilidad celular en células HT22 de hipocampo neuronal (Dr. Manuel Criado UMH, Alicante).

- Estudios de citotoxicidad y actividad analgésica (Dra. Asia Fernández Carvajal, Dr. Antonio Ferrer-Montiel, UMH, Elche).

- Estudios en órganos aislados y test de memoria (Dr. Ricardo Borges, ULL, Tenerife).

- Ensayos de neuroprotección (Dra. Manuela García, Instituto Teófilo Hernando, Madrid).

Los métodos utilizados se describen en la referencia ²⁴⁹

CAPÍTULO 3: Chalconas con actividad antitumoral y antileishmania

3.1 INTRODUCCIÓN



Como ya se comentó en la introducción del capítulo 2 de esta Memoria, la actividad biológica de las chalconas es muy variada, habiendo sido descrita su utilidad en distintas áreas terapéuticas^{177,241,250,251}.

Teniendo en cuenta el elevado número de chalconas descritas con actividad antitumoral o antileishmania se decidió evaluar una selección de los compuestos del capítulo anterior en relación a estas indicaciones.

3.1.1. Chalconas con Actividad Antitumoral

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y aunque existen tratamientos disponibles hoy en día, los efectos secundarios y las limitaciones asociadas a los mismos llevan a los investigadores a desarrollar agentes más seguros, potentes y selectivos. En este sentido, se han descrito numerosas chalconas que han mostrado eficacia terapéutica prometedora en distintos tipos de cáncer¹⁷². La actividad de las chalconas sobre el ciclo y el crecimiento celular viene determinada por la presencia, el número y la disposición de los sustituyentes en ambos anillos aromáticos, que con frecuencia suelen ser grupos hidroxilo y metoxilo^{252,253}.

Los efectos antitumorales de varias chalconas de origen natural han sido explorados sobre todo en cuanto a su mecanismo de acción y como una fuente de inspiración para el desarrollo de nuevos fármacos. Por citar algunos ejemplos, la isoliquiritigenina (Figura 63), induce apoptosis bloqueando el ciclo celular en diferentes líneas celulares tumorales, como HepG2²⁵⁴ (hígado), MDA-MB-231²⁵⁵ (mama) y U87²⁵⁶ (glioma) entre otras. Se ha descrito también que la Floretina, un chalconoide reducido de origen natural, induce la muerte por apoptosis en melanomas en ratones B16, así

como en la línea celular HL-60 de leucemia humana²⁵⁷ (Figura 63). Estas propiedades de algunas chalconas naturales y derivados pueden ser aprovechadas para su uso como quimiopreventivos del cáncer, ya que activan la muerte celular programada de células tumorales.

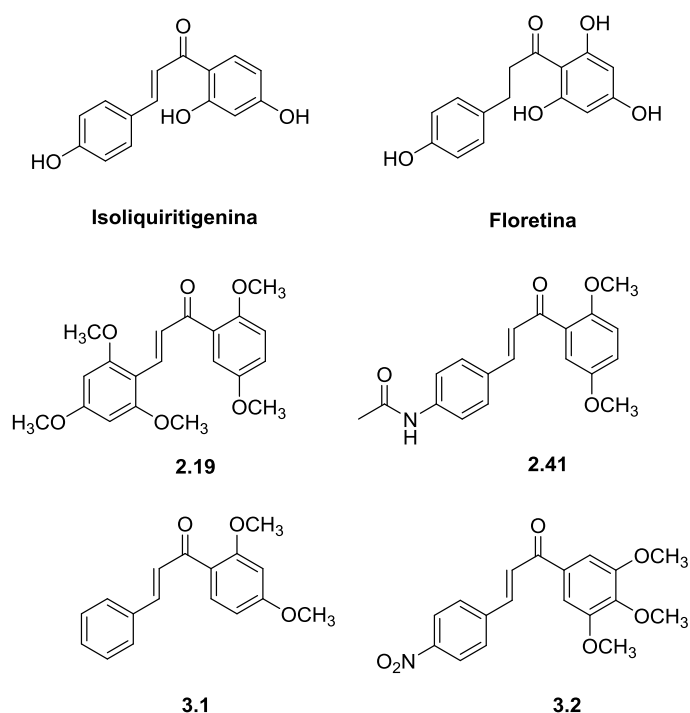
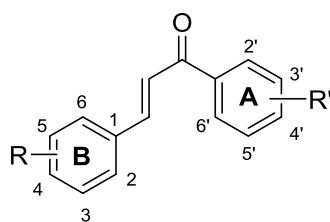


Figura 63. Compuestos de origen natural y sintético con actividad antitumoral

Los esfuerzos para sintetizar compuestos antitumorales basados en el esqueleto de chalcona han dado lugar a un conjunto de derivados bioactivos. Por citar algunos ejemplos, el compuesto **3.1**, a una concentración de 10 μM , mostró inhibición del crecimiento celular de más del 90% frente a cinco líneas celulares de cáncer humano: carcinoma de células renales (ACHN), carcinoma de páncreas (Pancc1), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Calu1), carcinoma de pulmón de células no microcíticas, (H460) y carcinoma de colon (HCT116). La presencia de tres grupos OCH_3 en el anillo

aromático A y el grupo NO₂ en posición *para* del anillo B (compuesto **3.2**) aumentó significativamente la actividad antitumoral respecto a otros análogos¹⁶⁶. Además, los compuestos **2.19** y **2.41**, incluidos en nuestra quimioteca, se encuentran ya descritos como antitumorales²⁵⁸. Concretamente, el compuesto **2.19** fue capaz de interactuar con la tubulina e inhibir el ensamblaje de los microtúbulos, actuando como antimetabólico²⁵⁸, en una línea celular de leucemia humana (IC₅₀=40 nM)²³⁹. El compuesto **2.41** mostró actividad modesta en células HeLa, mientras que algunos de sus derivados, con grupos amino en posición 4 del anillo B y dos o más metoxilos en el anillo A presentaron actividad en modelos animales *in vivo*²⁴⁴.



Los estudios de relación estructura-actividad (SAR) en chalconas antitumorales ponen de manifiesto que el patrón de sustitución que da lugar a compuestos activos varía en función de las líneas celulares tumorales en las que se evalúen los diferentes compuestos, por lo que es difícil establecer de forma general las mejores posiciones para ser ocupadas por los sustituyentes. Por ejemplo, en el estudio de Valdameri y *col.*²⁵⁹ con chalconas como inhibidores selectivos de ABCG2, una proteína de eflujo que confiere resistencia frente a los antitumorales en el cáncer de mama, la presencia de tres grupos OMe en el anillo aromático A (2',4' y 6') conduce a actividad moderada. Destacan las posiciones 2' y 4' como las más favorables para presentar un grupo metoxilo e imprescindibles para conseguir una inhibición potente y selectiva de la proteína ABCG2²⁵⁹. Además, la sustitución del grupo metoxilo en posición 6' por un grupo hidroxilo mejora considerablemente la

actividad, mientras que el cambio de los grupos metoxilo del anillo A por grupos etoxilo reduce drásticamente dicha actividad²⁵⁹. Por otra parte, en este mismo estudio se muestra que la sustitución del anillo aromático B con halógenos no resulta muy favorable, mientras que la presencia de grupos metoxilo en posiciones 2 y 6 ó 3 y 5 es adecuada para conseguir actividad antitumoral²⁵⁹. En compuestos con un único grupo metoxilo en el anillo B las mejores posiciones son la 2 y la 3, mientras que la 4 parece ser desfavorable, puesto que aumenta la toxicidad y disminuye la actividad²⁵⁹.

Un trabajo llevado a cabo por Mai y *col.*²⁶⁰ con 46 chalconas para determinar su actividad antiproliferativa frente a 10 líneas celulares tumorales destacó que la presencia de varios grupos OH en ambos anillos, A y B, no mejora la actividad, si lo comparamos con chalconas monosustituídas con un grupo OH en el anillo A o B. Sin embargo, este estudio corroboró que los grupos hidroxilo juegan un papel clave en la actividad frente a estas líneas celulares antitumorales. Además, destacó que las chalconas con grupos hidroxilo en posiciones 2 y 4 en el anillo aromático B mostraron efectos antiproliferativos potentes y selectivos frente a células HT-29. También determinaron que sustituyentes como Cl y OCH₃ en el anillo B contribuyen al efecto antiproliferativo.

Haciendo mención a la sustitución del anillo aromático A por grupos hidroxilo, los resultados de un trabajo realizado por Shenvi y *col.* permitieron concluir que la sustitución en 2' y 4' es más favorable que la sustitución en 2' y 5' frente a las tres líneas celulares tumorales humanas ensayadas, MCF-7, SW-982 y HeLa²⁶¹.

Por otra parte, un estudio realizado por Lawrence y *col.*²⁶² en una serie de 25 chalconas mostró que la sustitución en α por un grupo flúor daba lugar a chalconas con potentes propiedades citotóxicas actuando como inhibidores de tubulina. La presencia del flúor en α facilita la adopción de una

conformación *s-trans*, que permite que los dipolos CO y CF se encuentren alineados, lo que favorece la actividad.

Además, se ha determinado que la presencia del doble enlace conjugado en la cadena que sirve de unión de los dos anillos aromáticos es importante para la actividad citotóxica. Prueba de ello son los resultados obtenidos por Li y *col.* en un estudio realizado sobre un panel de seis líneas celulares tumorales diferentes, carcinoma murino de colon 26-L5, melanoma murino B16-BL6, carcinoma murino de células de Lewis, adenocarcinoma humano de pulmón A549, adenocarcinoma humano de cérvix HeLa y fibrosarcoma humano HT-1080²⁶³. En todos los casos la reducción de dicho doble enlace disminuyó drásticamente la actividad.

El hecho de que muchas de las chalconas activas frente a diferentes cánceres presenten en sus anillos aromáticos sustituyentes de naturaleza metoxilo o hidroxilo, nos animó a ensayar una buena parte de nuestra colección de compuestos finales e intermedios de síntesis del capítulo 2, con el fin de explorar su potencial actividad antitumoral, como se explicará más adelante.

3.1.2 Chalconas con actividad Anti-Leishmania

Leishmania es un protozoo responsable de la enfermedad conocida como leishmaniasis que se transmite por la picadura de mosquitos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*²⁶⁴. Esta enfermedad afecta hoy en día a unos 12 millones de personas en todo el mundo. Se clasifican en dos tipos de síndrome; Leishmaniasis cutánea, que afecta únicamente a la piel, y leishmaniasis visceral, que afecta a órganos bañados por el torrente sanguíneo²⁶⁵. Actualmente, se han identificado 21 especies de Leishmania relacionadas con la patogenicidad humana, siendo las de más relevancia *L. braziliensis* y *L. donovani*. Existen dos formas del parásito responsables de la enfermedad, la forma promastigote (extracelular y flagelada) que es la forma

de leishmania liberada por el mosquito al torrente sanguíneo tras la picadura, y la forma amastigote, que únicamente es capaz de sobrevivir dentro de la célula fagocitada (principalmente en macrófagos)²⁶⁵. No existen protocolos estandarizados de tratamiento frente a leishmania, utilizándose distintos fármacos según el caso clínico. Por citar algunos, destacar la pentamidina²⁶⁶, efectiva frente a leishmania pero para la que desafortunadamente la forma intracelular presenta resistencia. Otro fármaco es la anfotericina B²⁶⁷, un antifúngico que por su alta toxicidad renal no puede ser utilizado en primera línea de tratamiento. También son efectivos la miltefosina^{268,269} y la paromomicina²⁷⁰, destacando que esta última afecta al crecimiento de los amastigotes.

Existen diversos trabajos que describen la actividad antileishmania de chalconas, tanto sintéticas como de origen natural. Aunque se han ensayado un gran número de compuestos sintéticos, la licochalcona A, aislada de una especie de *Glycyrrhiza* (regaliz), es una chalcona de origen natural cuya actividad antileishmania se sigue estudiando²⁷¹. Su mecanismo de acción parece que consiste en inhibir, en primer lugar, la enzima fumarato reductasa, a continuación interviene en la cadena respiratoria del parásito, afectando a la función y estructura de las mitocondrias, destruyendo finalmente al parásito. Además, la licochalcona C inhibe el crecimiento de *Leishmania major* en la misma medida que la licochalcona A²⁷². Otros ejemplos son las chalconas **3.3-3.5** que son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de la forma promastigote de *Leishmania major* y amastigote de *Leishmania donovani* en monocitos derivados de macrófagos humanos. Estos compuestos inhiben la respiración del parásito y la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales²⁷³. Adicionalmente, el compuesto **3.6** mostró actividad *in vitro* frente a promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*²⁷⁴ y además, algunos análogos del compuesto **3.6**, que contienen grupos nitro, flúor o

bromo en la posición *para* del anillo aromático A, mostraron un aumento de selectividad frente a dichos parásitos²⁷⁵.

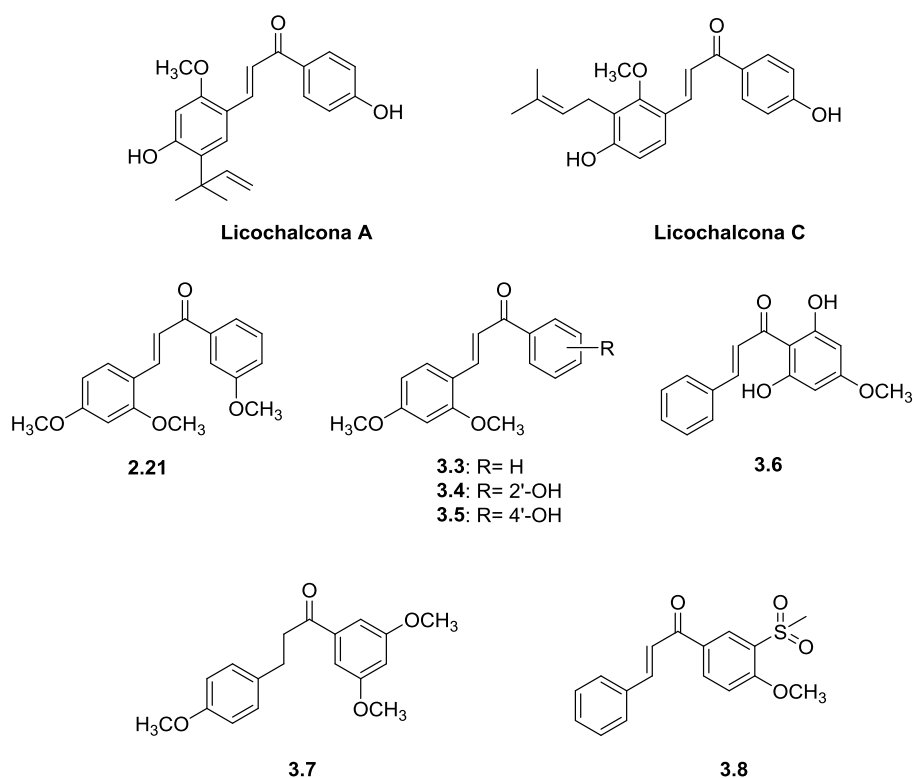


Figura 64. Compuestos de origen natural y sintético con actividad frente a Leishmania

En base al estudio realizado por Bello y *col.* con una serie de chalconas sustituidas por grupos metoxilo, hidroxilo, halógenos como el Cl y grupos NO₂, se puede determinar que la introducción de dos grupos metoxilo en las posiciones orto del anillo A impone una rigidez estructural, debida a la reducción de la libertad conformacional del anillo de fenilo, que al parecer mejora la actividad frente a leishmania. Además, la incorporación junto con estos dos grupos metoxilo en orto de otro metoxilo adicional en meta mejora considerablemente su actividad²⁷⁶. Adicionalmente, el estudio de Aponte y *col.*

destacó que la presencia de grupos polares en el anillo A, como grupos hidroxilo en posiciones 2' y 4', incrementa la actividad antileishmania de estas chalconas²⁷⁷.

Por otra parte, según describen Hermoso y *col.*²⁷⁸, la conjugación del doble enlace del sistema carbonilo α,β -insaturado reduce la actividad, por lo que las dihidrochalconas son también importantes en la búsqueda de compuestos con actividad antileishmania, como por ejemplo el compuesto **3.7**. Dentro de este grupo de compuestos, la sustitución de grupos hidroxilo por acetoxilo no solo incrementa la actividad antileishmania sino que también disminuye la citotoxicidad en macrófagos²⁷⁸.

En los últimos años ha aumentado la relevancia de las sulfonamido-chalconas, dando lugar a derivados con mejor perfil inhibitorio que las chalconas clásicas frente a algunas especies de *Leishmania*, entre ellas *L. braziliensis*²⁷⁹. Un ejemplo de estas sulfonamido-chalconas se encuentra representado por el compuesto **3.8**.

El compuesto **2.21**, preparado en el capítulo 2, presenta actividad antileishmania^{240,280}, por lo que lo tomaremos como referencia de los compuestos de nuestra quimioteca que serán evaluados frente a *Leishmania*.

3.2 OBJETIVOS

En base a los antecedentes comentados, el objetivo de este capítulo se centra en la evaluación de una selección de chalconas y derivados de nuestra colección, con el fin de explorar su posible actividad antitumoral y/o antileishmania.

Estos ensayos eran accesibles para nosotros, gracias a las colaboraciones que nuestro grupo de trabajo mantiene con la empresa PharmaMar, por una parte, y con el grupo de investigación del Dr. Luis Rivas (CIB-CSIC), por otra.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

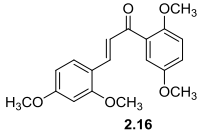
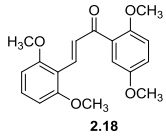
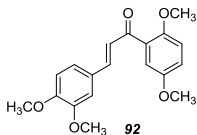
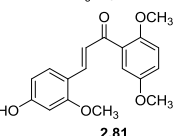
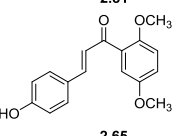
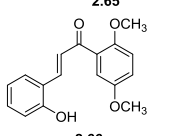
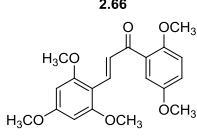
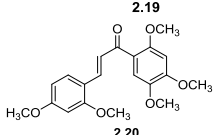
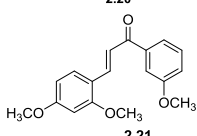
3.3.1 Actividad biológica como antitumorales

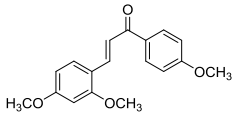
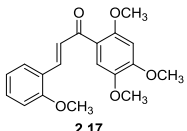
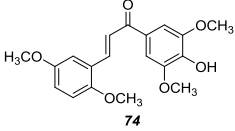
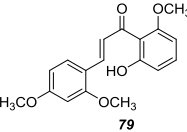
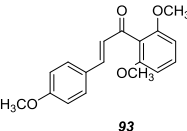
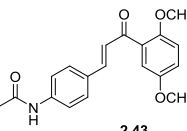
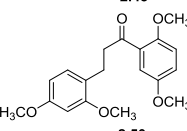
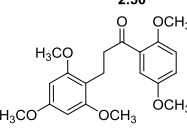
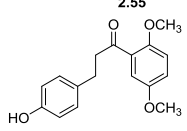
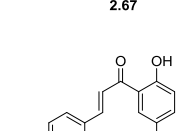
Como se ha comentado anteriormente, en colaboración con la empresa PharmaMar, se han realizado ensayos *in vitro* (HTS) para determinar la actividad antitumoral en cuatro líneas de células tumorales.

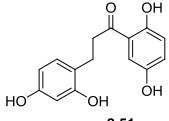
- La línea A549 es una línea de células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano de pulmón.
- La línea HT29 es una línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon.
- La línea MDA-MB-231 es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama hormono-independiente. Se ha comprobado que estas células presentan crecimientos extraordinariamente rápidos en medios de cultivo poco enriquecidos, en parte por una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celulares que ellas mismas secretan al medio.
- La línea PSN1 son células de adenocarcinoma de páncreas.

La evaluación se llevó a cabo sobre una selección de compuestos, que incluyen chalconas y derivados reducidos, ambos con grupos metoxilo e hidroxilo o combinaciones de ambos. Se incluyeron tanto compuestos preparados en el capítulo 2 como algunos de los derivados comerciales (Anexo I). En la Tabla 26 se recogen las estructuras de las chalconas metoxiladas que dieron lugar a los resultados más relevantes en este estudio. Además, a efectos comparativos, se incluyeron algunos análogos hidroxilados y/o reducidos que resultaron inactivos.

Tabla 26. Resultados más relevantes de las chalconas de la quimioteca evaluadas

Compuestos		Pulmón A549 (μM)	Colon HT29 (μM)	Mama MDA-MB-231 (μM)	Páncreas PSN1 (μM)
 2.16	GI₅₀ LC₅₀	1.98 27.4	1.13 30.5	1.31 30.5	1.55 30.5
 2.18	GI₅₀ LC₅₀	2.77 11.3	1.86 30.5	2.62 30.5	2.25 16.7
 92	GI₅₀ LC₅₀	2.73 >31	1.29 >31	2.36 20.2	4.60 25.1
 2.81	GI₅₀ LC₅₀	10.8 >32	13.7 >32	7.32 >32	12.7 >32
 2.65	GI₅₀ LC₅₀	10.6 28.5	9.85 34.8	8.44 26.7	10.6 19.0
 2.66	GI₅₀ LC₅₀	1.27 5.63	1.93 3.87	1.55 5.28	0.95 2.46
 2.19	GI₅₀ LC₅₀	0.089 31.8	0.044 31.8	0.089 36.7	0.058 36.7
 2.20	GI₅₀ LC₅₀	13.4 27.9	12.0 27.9	22.0 27.9	12.0 27.9
 2.21	GI₅₀ LC₅₀	8.05 >34	3.35 >21	8.72 >26	12.7 >15

 <p>2.22</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>11.4 >34</p>	<p>10.1 >34</p>	<p>14.4 >34</p>	<p>15.8 >34</p>
 <p>2.17</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>10.0 30.5</p>	<p>11.9 30.5</p>	<p>13.7 30.5</p>	<p>12.5 30.5</p>
 <p>74</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>8.71 >29</p>	<p>12.5 >29</p>	<p>11.3 >29</p>	<p>10.7 11.6</p>
 <p>79</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>18.8 >32</p>	<p>>32 >32</p>	<p>>32 >32</p>	<p>>32 >32</p>
 <p>93</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>>33 >33</p>	<p>9.05 >33</p>	<p>16.4 >33</p>	<p>16.4 >33</p>
 <p>2.43</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>4.92 >31</p>	<p>10.8 >31</p>	<p>11.4 13.2</p>	<p>12.3 14.1</p>
 <p>2.50</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>>30 >30</p>	<p>>30 >30</p>	<p>>30 >30</p>	<p>>30 >30</p>
 <p>2.55</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>>28 >28</p>	<p>>28 >28</p>	<p>>28 >28</p>	<p>>28 >28</p>
 <p>2.67</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>18.5 >35</p>	<p>>35 >35</p>	<p>9.43 >35</p>	<p>15.7 >35</p>
 <p>2.23</p>	<p>GI₅₀ LC₅₀</p>	<p>>37 >37</p>	<p>>37 >37</p>	<p>>37 >37</p>	<p>>37 >37</p>

 <p style="text-align: center;">2.51</p>	GI₅₀ LC₅₀	>32 >32	>32 >32	>32 >32	>32 >32
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------	------------	------------	------------	------------

Estableciendo relaciones estructura-actividad a partir de los resultados, se observa que una buena parte de los compuestos activos presentan dos grupos metoxilo en 2' y 5' en el anillo A. Los derivados que combinan esta sustitución con la presencia de dos grupos metoxilo en el anillo B, bien en posiciones 2, 4 (**2.16**) ó 2, 6 (**2.18**) ó 3, 4 (**92**) muestran valores de GI₅₀ muy similares en un rango entre 1.13 y 4.60 μM en las cuatro líneas celulares tumorales ensayadas. Con respecto a **2.16** (2,4,2',5'-OMe), el compuesto **2.81**, que mantiene los grupos 2, 2',5'-OMe, y sustituye el 4-OMe por un 4-OH, disminuye ligeramente la actividad antitumoral, al igual que el derivado 4-desmetoxilado **2.65** (4-OH, 2',5'-OMe). Sin embargo, el compuesto **2.66** que incorpora como único sustituyente en el anillo B un grupo 2-OH, mantiene la actividad micromolar en tres de las líneas ensayadas, aumentando ligeramente la actividad en la línea pancreática PSN1, con un valor de GI₅₀ de 0.95 μM . El compuesto **2.19** con tres grupos metoxilo en las posiciones 2, 4 y 6 del anillo B fue el que presentó mejor actividad antitumoral, con valores entre 0.06 y 0.09 μM . Estos resultados son similares a los publicados para este compuesto en una línea celular de leucemia, también en el rango del nanomolar alto²⁵⁸. La presencia de un grupo acetamido en posición 4 del anillo B dio lugar a un compuesto con actividad antitumoral moderada (**2.43**), siendo algo más efectivo en la línea de pulmón A549. Estos valores de GI₅₀ están en la misma línea de lo reportado previamente para este compuesto en células HeLa.

Por otra parte, los compuestos 2,4-OMe-sustituídos y monometoxilados en el anillo A, **2.20** y **2.21**, presentaron actividad antitumoral moderada de orden micromolar, inferior a la del análogo con dos grupos metoxilo en 2',5',

2.16. Aunque muy similares, las actividades de **2.20** (3'-OMe), fueron algo mejores que las de **2.21** (4'-OMe), especialmente en la línea celular HT29 de cáncer de colon. La incorporación de un metoxilo adicional en posición 4 del anillo A, compuestos **2.17** y **2.20**, disminuyó la actividad antitumoral en un orden de magnitud, aproximadamente, con respecto a **2.16**. Otras sustituciones del anillo A que dieron lugar a compuestos activos fueron: 3',5'-OMe,4'-OH (**74**), 2'-OMe,6'-OH (**79**) y 2-6'-OMe (**93**).

Por otra parte, los compuestos polimetoxilados que presentaban el doble enlace reducido perdieron drásticamente la actividad antitumoral (comparar **2.50** y **2.55** con **2.16** y **2.19**, respectivamente). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Li y *col.*²⁶³ que mostraba que la reducción del doble enlace en estos compuestos α,β -insaturados disminuía mucho la actividad citotóxica. Sin embargo, el derivado reducido **2.67** sustituido con grupos metoxilo en 2' y 5' del anillo B e hidroxilo en posición 4 del anillo A, presentó una actividad antitumoral moderada en las líneas A549 y PSN1 y una actividad ligeramente mayor en la línea MDA-MB-231, comparables a las de su chalcona precursora **2.65**. También es de destacar que los compuestos totalmente hidroxilados perdieron completamente la actividad antitumoral en las cuatro líneas celulares evaluadas.

Aunque la mayoría de las chalconas ensayadas no mostraron valores significativos de actividad antitumoral, varios compuestos resultaron ser activos en el rango micromolar para las cuatro líneas evaluadas (Tabla 26). Cabe destacar dos compuestos:

2.19: que en las cuatro líneas tumorales ensayadas por PharmaMar presentó valores de GI_{50} dos órdenes de magnitud más alto que el resto de la quimioteca. Este compuesto había presentado también actividad antitumoral en una línea celular de leucemia²⁵⁸, con valores similares a los aquí

reportados. Nuestros resultados corroboran que se trata de un compuesto muy eficaz como inhibidor del crecimiento tumoral, aunque no es selectivo.

2.66: que en concreto para la línea celular de páncreas (PSN1), mostró un valor de GI₅₀ de orden submicromolar.

Las sustituciones que han dado lugar a los mejores resultados en este apartado, junto con otras previamente recogidas en la bibliografía, podrían combinarse para el diseño de nuevas chalconas con actividades antitumorales y selectividades mejoradas.

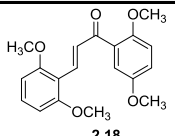
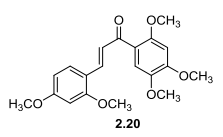
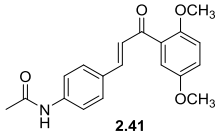
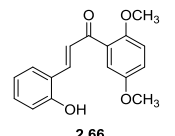
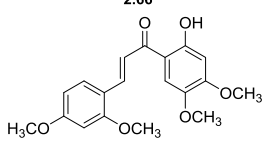
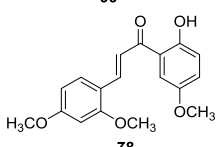
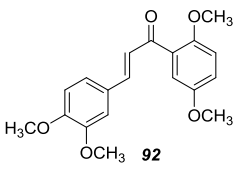
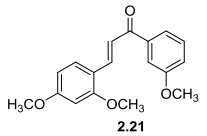
3.3.2 Actividad biológica frente a Leishmania

En colaboración con el Dr. Luis Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) de Madrid se han realizado ensayos para determinar el porcentaje de inhibición de la proliferación en la forma promastigote de *L. donovani* y en la forma amastigote de *L. pifanoi*. Los ensayos se han realizado con un total de 38 chalconas y derivados reducidos. Al igual que en el caso de la evaluación como antitumorales, se realizó una selección representativa de compuestos de nuestra colección que incluía las chalconas metoxiladas **2.16-2.22**, los derivados polihidroxilados **2.23** y **2.51**, un acetamido derivado **2.41**, compuestos con el doble enlace reducido **2.52-2.56** y derivados de pirrol **2.72-2.73**. El compuesto **2.21**, cuya actividad antileishmania había sido descrita previamente^{240,280} se ensayó como referencia. También se incluyeron dentro de esta selección algunos compuestos de la colección comercial de chalconas (Anexo I).

Aquellos compuestos que a una concentración de 10 µM mostraron al menos un 75% de inhibición de la proliferación respecto al control no tratado fueron seleccionados para determinar su IC₅₀. Se midieron estos valores en ambas formas del parásito, promastigotes extracelulares de *L. donovani* y amastigotes intracelulares de *L. pifanoi*. Además se determinó la citotoxicidad

en macrófagos peritoneales murinos por ser las células huésped para *Leishmania* en mamíferos (Tabla 27).

Tabla 27. Datos de IC₅₀ (μM) para los compuestos seleccionados, tras el primer cribado de actividad antileishmania.

Compuesto	Promastigotes <i>L. donovani</i> IC ₅₀ (μM)	Amastigotes <i>L. pifanoi</i> IC ₅₀ (μM)	Macrófagos peritoneales IC ₅₀ (μM)
 2.18	31	12	21.1
 2.20	>50	15	8.5
 2.41	>50	4	>50
 2.66	4	3.5	14.2
 66	>50	21	>25
 78	>50	>50	>25
 92	13.3	2.1	20
 2.21	20	18	>50

En nuestras manos el compuesto **2.21**, presentó una actividad antileishmania comparable a la descrita previamente^{240,280}.

Del estudio de relaciones estructura-actividad (SAR), teniendo en cuenta también los compuestos no incluidos en la tabla, se pudo deducir que, en compuestos 2',5'-metoxilados (Anillo A), la sustitución en las posiciones 2, 6 del anillo B con OMe (**2.18**) es preferida sobre la 2,4 (compuesto **2.16**, inactivo). Por otra parte, la introducción de tres grupos metoxilo en posiciones 2,4,6 del anillo B disminuyó drásticamente la actividad antileishmania. Sin embargo, la existencia de tres grupos metoxilo en el anillo A aumentó la actividad antileishmania en amastigotes (compuesto **2.20**), aunque este compuesto fue claramente citotóxico en macrófagos.

También se ensayaron compuestos parcialmente hidroxilados en ambos anillos. Se observó que la presencia de grupos metoxilo 2',5' en el anillo A y un 2-hidroxilo en el B, compuesto **2.66**, conduce a la mejor actividad antileishmania dentro de esta serie de compuestos. Los compuestos con un grupo 2-OH en el anillo A fueron o bien inactivos (**78**), o presentaron actividad marginal (**66**). Sin embargo, los análogos totalmente hidroxilados, no recogidos en la tabla, resultaron totalmente inactivos.

La introducción en el anillo A de un grupo acetamido en posición 4 favoreció la actividad antileishmania, fundamentalmente en amastigotes.

Por otra parte, los compuestos que presentaban el doble enlace del sistema α,β -insaturado reducido perdieron drásticamente la actividad frente a Leishmania, indicando la importancia de este doble enlace en la inhibición del parásito. Estos resultados son contrarios a los de los estudios de SAR realizados por Hermoso y *col.*, que mostraban que la reducción del doble enlace de las chalconas mejoraba la actividad frente Leishmania. En nuestro caso, no se ha observado un comportamiento similar, ya que también el

derivado reducido **2.68**, análogo del mejor compuesto de la serie, **2.66**, resultó inactivo en los ensayos.

En general, se observó una cierta correlación entre los compuestos que presentaron actividad antitumoral y los que inhibieron las distintas fases del parásito de leishmania, aunque **2.19**, el antitumoral más potente, no presentó actividad antileishmania. Así, los compuestos con mejores valores de IC_{50} frente a promastigotes y amastigotes, **2.18**, **2.21**, **2.66** y **92**, mostraron inhibición del crecimiento tumoral a concentraciones micromolares (Tabla 26).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores de todas las chalconas a las que se les midió la IC_{50} , se seleccionaron los compuestos **2.21**, como referencia, y **2.66** para estudiar su actividad y mecanismo de acción.

En primer lugar se determinó la variación intracelular de ATP libre. Para este fin se utilizaron promastigotes de *L. donovani*, que expresan una forma citoplasmática de luciferasa. En presencia de DMNP-luciferina como sustrato se produce una reacción de bioluminiscencia dependiente de ATP, siendo el ATP intracelular libre el sustrato limitante. Ambos compuestos producen una disminución en la luminiscencia de manera dependiente de la concentración de ATP, como se observa en la Figura 65²⁸¹. Esta variación de ATP podría deberse a que los compuestos hacen poros en la membrana plasmática, liberando por tanto el ATP, o bien a que puedan afectar a alguna fase de la cadena respiratoria.

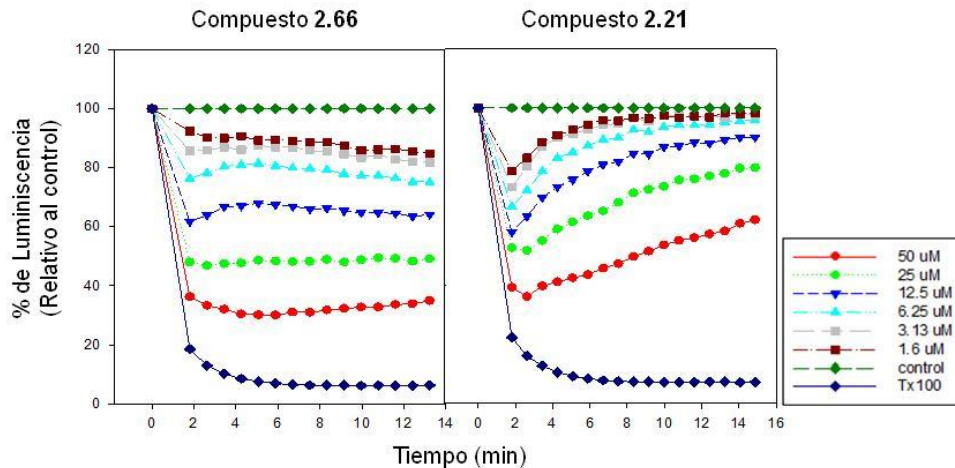


Figura 65. Inhibición de la luminiscencia en promastigotes de *L. donovani* tras la adición de los compuestos **2.66** y **2.21**.

Para descartar la formación de poros se determinó la capacidad de los compuestos para permeabilizar la membrana plasmática en promastigotes de *L. donovani*. Para ello, se evaluó el aumento de la fluorescencia producido por el colorante verde SYTOX una vez unido a los ácidos nucleicos intracelulares. Este colorante no puede atravesar membranas celulares, por lo que el aumento de la fluorescencia sólo es factible en los parásitos con la membrana dañada, excluyendo por tanto a los parásitos con la membrana intacta. Como se representa en las Figuras 66 y 67, ninguno de los dos compuestos seleccionados produjo daño en la membrana plasmática, tal y como se evaluó tras cuatro horas de incubación, lo que nos indica que los compuestos evaluados tienen dianas intracelulares concretas. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control (células completamente permeabilizadas, obtenidas mediante la adición de Triton X 100)²⁸¹.

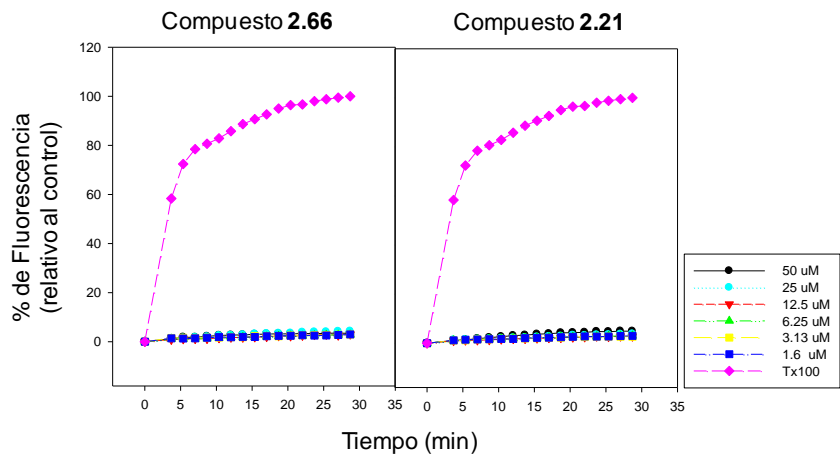


Figura 66. Estudios de permeabilización de la membrana plasmática de promastigotes de *L. donovani* por los compuestos **2.66** y **2.21**

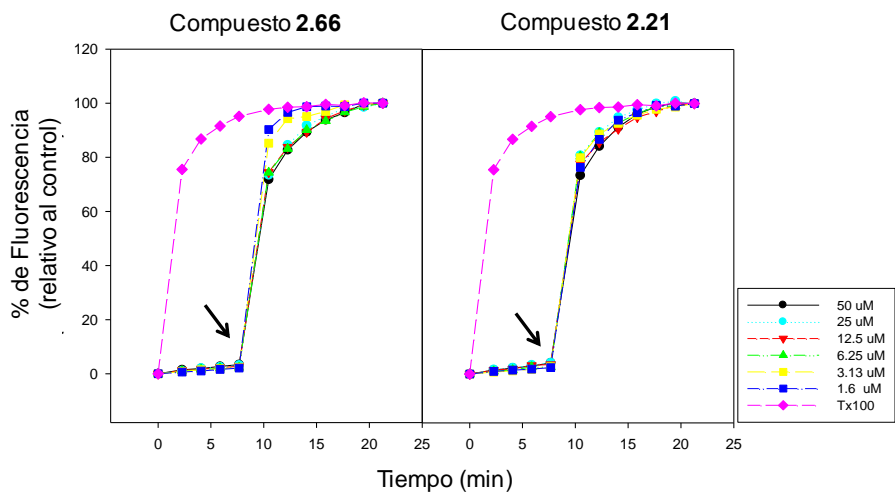


Figura 67. Permeabilización de la membrana plasmática de promastigotes de *L. donovani* tras cuatro horas de incubación por los compuestos **2.66** y **2.21**. El colorante verde SYTOX se añadió al final de la incubación. La flecha indica la adición de Triton X 100.

Las diferentes especies del género *Leishmania* presentan una sola mitocondria que exhibe características estructurales y funcionales únicas, que hacen de este orgánulo un objetivo importante para el estudio de la actividad

de los compuestos evaluados. De hecho, un gran número de fármacos producen alteraciones en la mitocondria en tripanosomiasis, como se ha recogido en la bibliografía²⁸². Dado que nuestros compuestos podrían tener como diana intracelular a la mitocondria de los parásitos, se evaluó la despolarización mitocondrial utilizando Rodamina 123 y análisis mediante citometría de flujo. Solamente el compuesto **2.66** mostró efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial, como se muestra en la Figura 68. El control de los parásitos con la membrana mitocondrial completamente despolarizada se obtuvo por incubación de éstos con KCN 10 mM durante 30 minutos antes de la carga del colorante. El desequilibrio del potencial de membrana mitocondrial podría conducir a una disminución de ATP, reducción en la transcripción y transducción mitocondrial, y a un aumento de la producción de radicales libres (ROS), lo que generaría la muerte celular por apoptosis o necrosis²⁸².

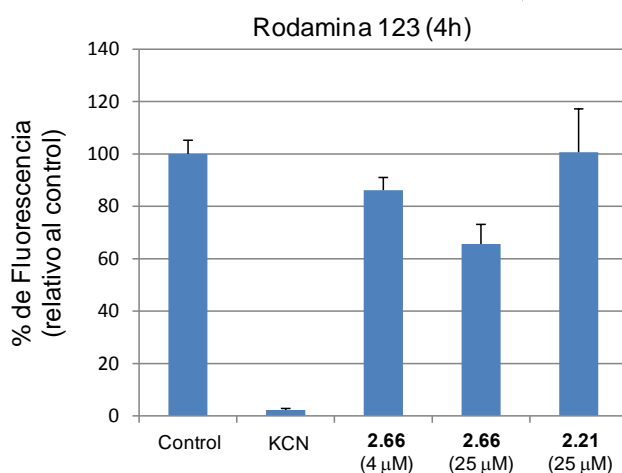


Figura 68. Diagrama de barras que representa la actividad de despolarización mitocondrial de los compuestos **2.66** y **2.21**. Las células fueron tratadas primero con el compuesto correspondiente y seguidamente se tiñeron con Rodamina 123.

Para el compuesto **2.66** se realizó el correspondiente histograma de citometría de flujo, que se representa en la Figura 69. En el histograma, el compuesto control (línea negra continua) representa células que han adquirido la máxima fluorescencia por un tratamiento previo con un fluoróforo (Rodamina 123). Estas células presentan la membrana mitocondrial sana, de ahí que adquieran el fluoróforo y puedan alcanzar la máxima fluorescencia. El tratamiento con KCN (línea negra discontinua) afecta a la cadena respiratoria de las células provocando un cambio en el potencial de membrana mitocondrial, lo que se traduce en que las células no emitan fluorescencia y por tanto la curva aparece desplazada hacia la izquierda. Cuando las células son incubadas con el compuesto **2.66** a 4 μM (línea roja) la curva del histograma se desplaza hacia la izquierda, lo que se traduce en que el compuesto afecta al potencial de membrana mitocondrial. Este efecto aumenta a mayor concentración, como tras la incubación durante 4 horas con **2.66** a una concentración de 25 μM (línea verde).

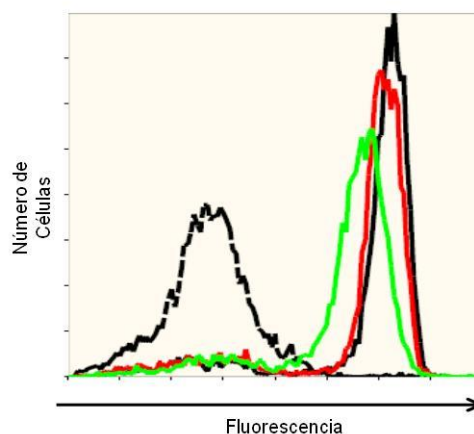


Figura 69. Histograma de citometría de flujo para el compuesto **2.66**. Las células fueron tratadas primero con el compuesto 2.65 durante 4 horas y después se tiñeron con Rodamina 123. Leyenda: (-) Control, (---) KCN, (—) **2.66** (4 μM) y (—) **2.66** (25 μM).

Adicionalmente, se estudió el efecto morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), más visible para el compuesto **2.66** como

se muestra en la Figura 70. Este efecto se observa en la mitocondria, y es fácilmente reconocible por la presencia del cinetoplasto (mancha alargada oscura). La flecha roja indica el cinetoplasto en parásitos tratados, mientras que la flecha verde lo señala en parásitos control (sin tratar). Las imágenes de TEM mostraron que las células no tratadas presentaban una morfología del cinetoplasto alargada normal. Sin embargo, en los parásitos tratados con el compuesto **2.66** se observaron cambios morfológicos en el cinetoplasto, compatibles con la pérdida de viabilidad.

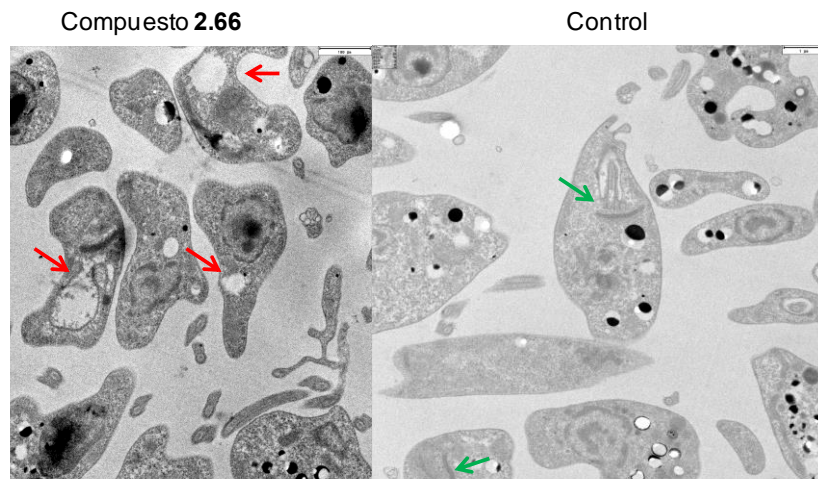


Figura 70. Microscopía electrónica de transmisión en promastigotes de *L. donovani* tratados con el compuesto **2.66** y sin tratar

Los cambios morfológicos en las mitocondrias de *Leishmania* también se observaron mediante microscopía confocal, utilizando la tinción rojo de Mitotracker, un marcador fluorescente típico de mitocondrias. Tras la tinción se incubaron en la oscuridad con los compuestos seleccionados **2.66** y **2.21**. En la Figura 71 se puede observar la mitocondria hinchada en los parásitos tratados con el compuesto **2.66** en comparación con el control y el compuesto **2.21**. Se puede observar también que en todos los casos el parásito está entero, tanto en el control como tras el tratamiento con ambos compuestos.

En rojo (Rojo de Mitotracker) se observa la mitocondria, que en el caso del compuesto **2.66** se encuentra aumentada respecto al control, lo que corrobora que el compuesto afecta a la morfología de ésta, compatible con la pérdida de viabilidad, mientras que en el compuesto **2.21** se aprecia más difusa y no tan marcada como en el caso del control. En azul (DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) se observa el núcleo y el cinetoplasto del parásito, que en todos los casos parece similar al control.

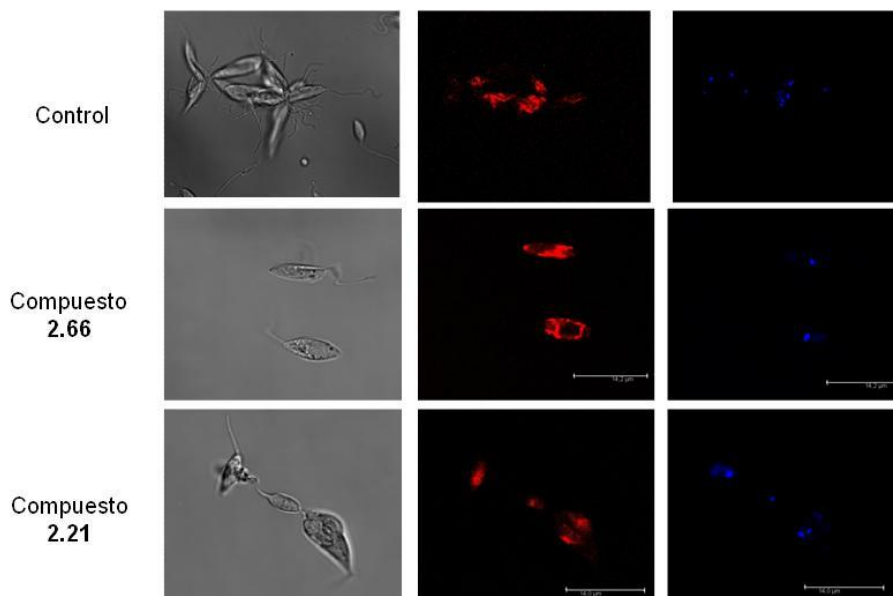


Figura 71. Microscopia confocal de promastigotes de *L. donovani*

Finalmente, se infectaron macrófagos peritoneales murinos con amastigotes axénicos de *L. pifanoi* y se trataron con el compuesto **2.66** durante 16 horas. Como se muestra en la Figura 72, se produjo una reducción de la carga parasitaria de 2,2 amastigotes por macrófago en el control a 1,3 en los macrófagos tratados con el compuesto **2.66**.

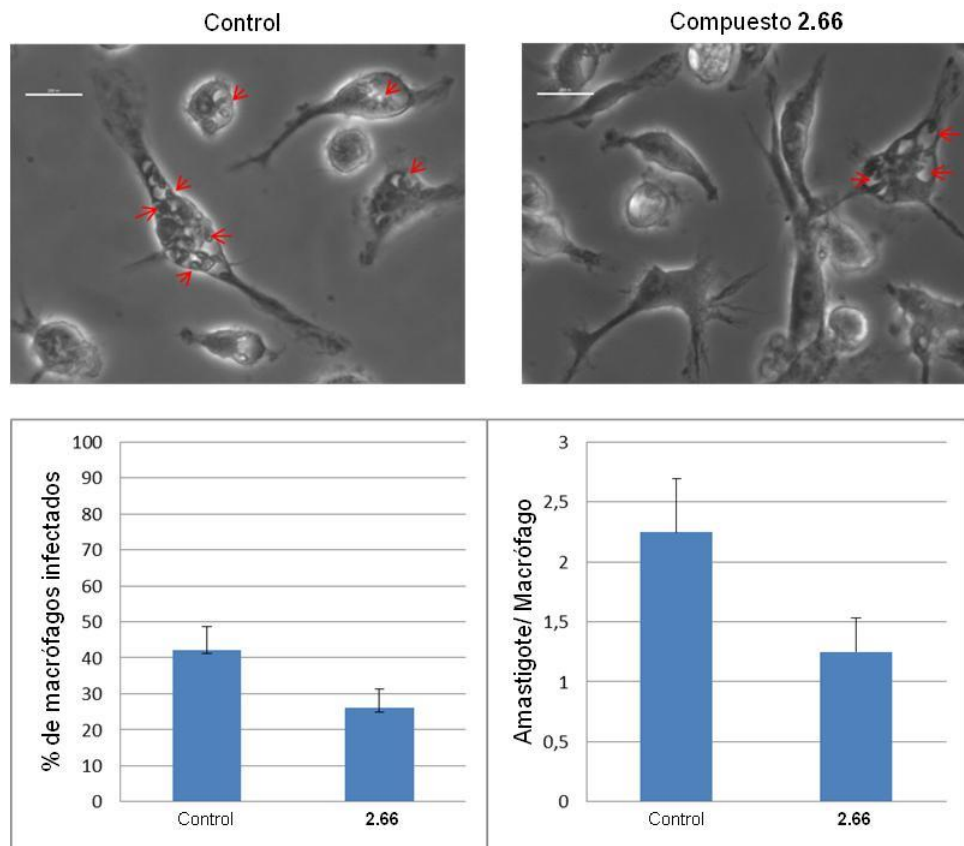


Figura 72. Microscopia confocal de los macrófagos peritoneales murinos infectados con amastigotes de *L. pifanoi* incubados con el compuesto **2.66**. Las flechas señalan amastigotes dentro de las vacuolas parasitóforas. Los datos se representan como la media \pm SE.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, cabe destacar los buenos resultados encontrados para el compuesto **2.66** en todas las formas ensayadas hasta el momento, promastigotes de *L. donovani*, amastigotes de *L. pifanoi* y macrófagos peritoneales murinos infectados con amastigotes de *L. pifanoi*. Así, podemos concluir que el compuesto **2.66** muestra una buena actividad antileishmania. Estos resultados son suficientemente prometedores como para seguir trabajando con esta serie de compuestos con objeto de identificar análogos con un perfil farmacológico óptimo.

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes del trabajo que se recoge en el capítulo 3 de esta memoria, cuyo objetivo principal era la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral y/o antileishmania, se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

- La evaluación de una selección de compuestos de la colección de chalconas sintetizadas en el capítulo 2 en cultivos de células tumorales ha permitido determinar que el compuesto **2.19** presenta valores de GI_{50} en el rango de 10^{-8} M frente a las cuatro líneas celulares ensayadas, así como una serie de derivados con actividad micromolar, entre los que destaca **2.66**.

- Los ensayos en dos cepas de Leishmania, en concreto promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*, con una selección de derivados de chalcona de nuestra quimioteca y de una colección comercial, han permitido descubrir que el compuesto **2.66** presenta actividad antileishmania prometedora y que su mecanismo de acción podría estar relacionado con la despolarización y cambio de morfología de las mitocondrias de estos parásitos.

- Estos resultados podrían ser un punto de partida para diseñar y sintetizar nuevos compuestos con actividad antitumoral y antileishmania más potentes y selectivos.

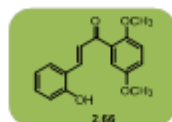
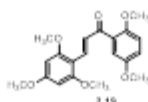
ACTIVIDAD ANTITUMORAL

A549
Pulmón

HT29
Colon

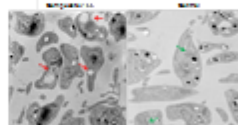
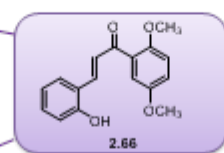
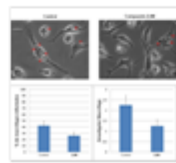
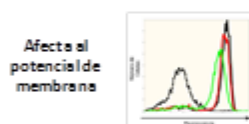
MDA-MB-231
Mama

PSN1
Páncreas



QUIMIOTECA CHALCONAS

Activo el compuesto 2.19 en el rango nanomolar y el compuesto 2.66 en el rango micromolar en las cuatro líneas antitumorales. Destacamos el compuesto 2.66 para la línea PSN-1



Pérdida de viabilidad del parásito

ACTIVIDAD ANTILEISHMANIA

Figura 73. Resumen de resultados y conclusiones del capítulo 3

BIBLIOGRAFÍA

1. Hille, B., Ionic channels of excitable membranes. **2001**.
2. Venkatachalam, K.; Montell, C., TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 387-417.
3. Planells-Cases, R.; Garcia-Sanz, N.; Morenilla-Palao, C.; Ferrer-Montiel, A., Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2005**, *451*, 151-159.
4. Planells-Cases, R.; Ferrer-Montiel, A., Drug design and development through the vanilloid receptor. *Exp. Opin. Drug. Discov.* **2007**, *2*, 1053-1063.
5. Montell, C., The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* **2005**, *2005*, re3.
6. Caterina, M., Transient receptor potential ion channel as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *292*, 64-76.
7. Caterina, M. J.; Julius, D., The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci* **2001**, *24*, 487-517.
8. Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **1997**, *389*, 816-24.
9. Szolcsanyi, J., Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* **2004**, *38*, 377-84.
10. Dhaka, A.; Viswanath, V.; Patapoutian, A., Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* **2006**, *29*, 135-61.
11. Story, G. M.; Peier, A. M.; Reeve, A. J.; Eid, S. R.; Mosbacher, J.; Hricik, T. R.; Earley, T. J.; Hergarden, A. C.; Andersson, D. A.; Hwang, S. W.; McIntyre, P.; Jegla, T.; Bevan, S.; Patapoutian, A., ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **2003**, *112*, 819-29.
12. Peier, A. M.; Moqrich, A.; Hergarden, A. C.; Reeve, A. J.; Andersson, D. A.; Story, G. M.; Earley, T. J.; Dragoni, I.; McIntyre, P.; Bevan, S.; Patapoutian, A., A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **2002**, *108*, 705-15.
13. Julius, D.; Basbaum, A. I., Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **2001**, *413*, 203-10.
14. Nilius, B.; Owsianik, G.; Voets, T.; Peters, J. A., Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 165-217.
15. Huang, J.; Zhang, X.; McNaughton, P. A., Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharmacol.* **2006**, *4*, 197-206.

16. Wilson, S. R.; Gerhold, K. A.; Bifolck-Fisher, A.; Liu, Q.; Patel, K. N.; Dong, X.; Bautista, D. M., TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 595-602.
17. Banner, K. H.; Igney, F.; Poll, C., TRP channels: emerging targets for respiratory disease. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *130*, 371-84.
18. Prevarskaya, N.; Flourakis, M.; Bidaux, G.; Thebault, S.; Skryma, R., Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 133-5.
19. Caterina, M. J.; Leffler, A.; Malmberg, A. B.; Martin, W. J.; Trafton, J.; Petersen-Zeitz, K. R.; Koltzenburg, M.; Basbaum, A. I.; Julius, D., Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **2000**, *288*, 306-13.
20. Davis, J. B.; Gray, J.; Gunthorpe, M. J.; Hatcher, J. P.; Davey, P. T.; Overend, P.; Harries, M. H.; Latcham, J.; Clapham, C.; Atkinson, K.; Hughes, S. A.; Rance, K.; Grau, E.; Harper, A. J.; Pugh, P. L.; Rogers, D. C.; Bingham, S.; Randall, A.; Sheardown, S. A., Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **2000**, *405*, 183-7.
21. Golan, D. E.; Tashjian, A. H.; Armstrong, E. J.; Armstrong, A. W., *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. Ed; Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business: Philadelphia, 2011.
22. Walpole, C. S.; Bevan, S.; Bovermann, G.; Boelsterli, J. J.; Breckenridge, R.; Davies, J. W.; Hughes, G. A.; James, I.; Oberer, L.; Winter, J.; et al., The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1942-54.
23. McDonnell, M. E.; Zhang, S. P.; Dubin, A. E.; Dax, S. L., Synthesis and in vitro evaluation of a novel iodinated resiniferatoxin derivative that is an agonist at the human vanilloid VR1 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1189-92.
24. Wahl, P.; Foged, C.; Tullin, S.; Thomsen, C., Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 9-15.
25. Lee, J.; Szabo, T.; Gonzalez, A. F.; Welter, J. D.; Blumberg, P. M., N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-dihydroxytetrahydrobenzazepine and tetrahydroisoquinoline thiourea analogues as vanilloid receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1713-20.
26. Zygmunt, P. M.; Petersson, J.; Andersson, D. A.; Chuang, H.; Sorgard, M.; Di Marzo, V.; Julius, D.; Hogestatt, E. D., Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **1999**, *400*, 452-7.
27. Huang, S. M.; Bisogno, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T. J.; Krey, J. F.; Chu, C. J.; Miller, J. D.; Davies, S. N.;

- Geppetti, P.; Walker, J. M.; Di Marzo, V., An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, *99*, 8400-5.
28. Vidal-Mosquera, M.; Fernández-Carvajal, A.; Moure, A.; Valente, P.; Planells-Cases, R.; González-Ros, J. M.; Bujons, J.; Ferrer-Montiel, A.; Messeguer, A., Triazine-Based Vanilloid 1 Receptor Open Channel Blockers: Design, Synthesis, Evaluation, and SAR Analysis. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7441-7452.
29. Guimaraes, M. Z. P.; Jordt, S. E., TRPA1 : A Sensory Channel of Many Talents. In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, Liedtke, W. B.; Heller, S., Eds. Boca Raton (FL), 2007.
30. Ferrer-Montiel, A.; Fernandez-Carvajal, A.; Planells-Cases, R.; Fernandez-Ballester, G.; Gonzalez-Ros, J. M.; Messeguer, A.; Gonzalez-Muniz, R., Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 999-1017.
31. Defalco, J.; Steiger, D.; Gustafson, A.; Emerling, D. E.; Kelly, M. G.; Duncton, M. A., Oxime derivatives related to AP18: Agonists and antagonists of the TRPA1 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 276-9.
32. Bang, S.; Yoo, S.; Yang, T. J.; Cho, H.; Hwang, S. W., Isopentenyl pyrophosphate is a novel antinociceptive substance that inhibits TRPV3 and TRPA1 ion channels. *Pain* **2011**, *152*, 1156-64.
33. Proudfoot, C. J.; Garry, E. M.; Cottrell, D. F.; Rosie, R.; Anderson, H.; Robertson, D. C.; Fleetwood-Walker, S. M.; Mitchell, R., Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 1591-605.
34. Babes, A.; Ciobanu, A. C.; Neacsu, C.; Babes, R. M., TRPM8, a sensor for mild cooling in mammalian sensory nerve endings. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 78-88.
35. Sulfonamides as TRPM8 modulators. NZ 582555 A, 2008.
36. Benzimidazole derivatives useful as TRPM8 receptor modulators. WO 132247 A1, 2009.
37. New use for cannabinoid-containing plant extracts. WO 129258 A1, 2008.
38. Gotti, C.; Clementi, F., Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* **2004**, *74*, 363-96.
39. Jensen, A. A.; Frolund, B.; Liljefors, T.; Krosgaard-Larsen, P., Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4705-45.

40. Clementi, F.; Fornasari, D.; Gotti, C., Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from structure to therapeutics. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 35-37.
41. Bunnelle, W. H.; Dart, M. J.; Schrimpf, M. R., Design of ligands for the nicotinic acetylcholine receptors: the quest for selectivity. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 299-334.
42. Peng, X.; Katz, M.; Gerzanich, V.; Anand, R.; Lindstrom, J., Human alpha 7 acetylcholine receptor: cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 546-54.
43. Clarke, P. B., The fall and rise of neuronal alpha-bungarotoxin binding proteins. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 407-13.
44. Pugh, P. C.; Berg, D. K., Neuronal acetylcholine receptors that bind alpha-bungarotoxin mediate neurite retraction in a calcium-dependent manner. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 889-96.
45. Miner, L. L.; Marks, M. J.; Collins, A. C., Classical genetic analysis of nicotine-induced seizures and nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *231*, 545-54.
46. Renshaw, G. M.; Dyson, S. E., Alpha-BTX lowers neuronal metabolism during the arrest of motoneurone apoptosis. *Neuroreport* **1995**, *6*, 284-8.
47. Albuquerque, E. X.; Pereira, E. F.; Alkondon, M.; Rogers, S. W., Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 73-120.
48. Parri, H. R.; Hernandez, C. M.; Dineley, K. T., Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 931-42.
49. Kihara, T.; Shimohama, S.; Sawada, H.; Kimura, J.; Kume, T.; Kochiyama, H.; Maeda, T.; Akaike, A., Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 159-63.
50. Araki, H.; Suemaru, K.; Gomita, Y., Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: functional and behavioral effects of nicotine. *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, *88*, 133-8.
51. Shytle, R. D.; Silver, A. A.; Lukas, R. J.; Newman, M. B.; Sheehan, D. V.; Sanberg, P. R., Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol. Psychiatry.* **2002**, *7*, 525-35.
52. Damaj, M. I.; Fei-Yin, M.; Dukat, M.; Glassco, W.; Glennon, R. A.; Martin, B. R., Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 1058-65.

53. Wang, Y.; Su, D. M.; Wang, R. H.; Liu, Y.; Wang, H., Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience* **2005**, *132*, 49-56.
54. Marrero, M. B.; Lucas, R.; Salet, C.; Hauser, T. A.; Mazurov, A.; Lippiello, P. M.; Bencherif, M., An alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-selective agonist reduces weight gain and metabolic changes in a mouse model of diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *332*, 173-80.
55. Gwilt, C. R.; Donnelly, L. E.; Rogers, D. F., The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol. Ther.* **2007**, *115*, 208-22.
56. van Maanen, M. A.; Lebre, M. C.; van der Poll, T.; LaRosa, G. J.; Elbaum, D.; Vervoordeldonk, M. J.; Tak, P. P., Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis. Rheum.* **2009**, *60*, 114-22.
57. Romanelli, M. N.; Gratteri, P.; Guandalini, L.; Martini, E.; Bonaccini, C.; Gualtieri, F., Central nicotinic receptors: structure, function, ligands, and therapeutic potential. *Chem. Med. Chem.* **2007**, *2*, 746-67.
58. Kanne, D. B.; Abood, L. G., Synthesis and biological characterization of pyridohomotropanes. Structure-activity relationships of conformationally restricted nicotinoids. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 506-9.
59. Slater, Y. E.; Houlihan, L. M.; Maskell, P. D.; Exley, R.; Bermudez, I.; Lukas, R. J.; Valdivia, A. C.; Cassels, B. K., Halogenated cytosine derivatives as agonists at human neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Neuropharmacology* **2003**, *44*, 503-15.
60. Papke, R. L.; Meyer, E. M.; Lavieri, S.; Bollampally, S. R.; Papke, T. A.; Horenstein, N. A.; Itoh, Y.; Porter Papke, J. K., Effects at a distance in alpha 7 nAChR selective agonists: benzylidene substitutions that regulate potency and efficacy. *Neuropharmacology* **2004**, *46*, 1023-38.
61. Papke, R. L.; Porter Papke, J. K.; Rose, G. M., Activity of alpha7-selective agonists at nicotinic and serotonin 5HT3 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1849-53.
62. Mullen, G.; Napier, J.; Balestra, M.; DeCory, T.; Hale, G.; Macor, J.; Mack, R.; Loch, J., 3rd; Wu, E.; Kover, A.; Verhoest, P.; Sampognaro, A.; Phillips, E.; Zhu, Y.; Murray, R.; Griffith, R.; Blosser, J.; Gurley, D.; Machulskis, A.; Zongrone, J.; Rosen, A.; Gordon, J., (-)-Spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octane-3,5'-oxazolidin-2'-one], a conformationally restricted analogue of acetylcholine, is a highly selective full agonist at the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4045-50.
63. Bodnar, A. L.; Cortes-Burgos, L. A.; Cook, K. K.; Dinh, D. M.; Groppi, V. E.; Hajos, M.; Higdon, N. R.; Hoffmann, W. E.; Hurst, R. S.; Myers, J. K.; Rogers, B. N.;

Wall, T. M.; Wolfe, M. L.; Wong, E., Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 905-8.

64. Mazurov, A. A.; Speake, J. D.; Yohannes, D., Discovery and development of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor modulators. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7943-61.

65. Tietje, K. R.; Anderson, D. J.; Bitner, R. S.; Blomme, E. A.; Brackemeyer, P. J.; Briggs, C. A.; Browman, K. E.; Bury, D.; Curzon, P.; Drescher, K. U.; Frost, J. M.; Fryer, R. M.; Fox, G. B.; Gronlien, J. H.; Hakerud, M.; Gubbins, E. J.; Halm, S.; Harris, R.; Helfrich, R. J.; Kohlhaas, K. L.; Law, D.; Malysz, J.; Marsh, K. C.; Martin, R. L.; Meyer, M. D.; Molesky, A. L.; Nikkel, A. L.; Otte, S.; Pan, L.; Puttfarcken, P. S.; Radek, R. J.; Robb, H. M.; Spies, E.; Thorin-Hagene, K.; Waring, J. F.; Ween, H.; Xu, H.; Gopalakrishnan, M.; Bunnelle, W. H., Preclinical characterization of A-582941: a novel alpha7 neuronal nicotinic receptor agonist with broad spectrum cognition-enhancing properties. *CNS. Neurosci. Ther.* **2008**, *14*, 65-82.

66. Paleari, L.; Cesario, A.; Fini, M.; Russo, P., alpha7-Nicotinic receptor antagonists at the beginning of a clinical era for NSCLC and Mesothelioma? *Drug discovery today* **2009**, *14*, 822-36.

67. Sheridan, R. D.; Smith, A. P.; Turner, S. R.; Tattersall, J. E., Nicotinic antagonists in the treatment of nerve agent intoxication. *J. R. Soc. Med.* **2005**, *98*, 114-5.

68. Panagis, G.; Kastellakis, A.; Spyraiki, C.; Nomikos, G., Effects of methyllycaconitine (MLA), an alpha 7 nicotinic receptor antagonist, on nicotine- and cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward. *Psychopharmacology* **2000**, *149*, 388-96.

69. Tsuneki, H.; You, Y.; Toyooka, N.; Kagawa, S.; Kobayashi, S.; Sasaoka, T.; Nemoto, H.; Kimura, I.; Dani, J. A., Alkaloids indolizidine 235B¹, quinolizidine 1-epi-207I, and the tricyclic 205B are potent and selective noncompetitive inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1061-9.

70. Peng, Y.; Zhang, Q.; Snyder, G. L.; Zhu, H.; Yao, W.; Tomesch, J.; Papke, R. L.; O'Callaghan, J. P.; Welsh, W. J.; Wennogle, L. P., Discovery of novel alpha7 nicotinic receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4825-30.

71. Terlau, H.; Olivera, B. M., Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 41-68.

72. Whiteaker, P.; Christensen, S.; Yoshikami, D.; Dowell, C.; Watkins, M.; Gulyas, J.; Rivier, J.; Olivera, B. M.; McIntosh, J. M., Discovery, Synthesis, and Structure Activity of a Highly Selective α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist[†]. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6628-6638.

73. Stites, W. E., Protein-protein interactions: Interface structure, binding, thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233-1250.
74. Reichmann, D.; Rahat, O.; Cohen, M.; Neuvirth, H.; Schreiber, G., The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 67-76.
75. Halperin, I.; Wolfson, H.; Nussinov, R., Protein-protein interactions; coupling of structurally conserved residues and of hot spots across interfaces. Implications for docking. *Structure* **2004**, *12*, 1027-38.
76. Russell, R. B.; Alber, F.; Aloy, P.; Davis, F. P.; Korkin, D.; Pichaud, M.; Topf, M.; Sali, A., A structural perspective on protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 313-24.
77. Yin, H.; Hamilton, A. D., Strategies for targeting protein-protein interactions with synthetic agents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 4130-63.
78. Perez de Vega, M. J.; Martin-Martinez, M.; Gonzalez-Muñiz, R., Modulation of protein-protein interactions by stabilizing/mimicking protein secondary structure elements. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 33-62.
79. Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J., Inhibition of alpha-helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161-73.
80. Houston, M. E., Jr.; Wallace, A.; Bianchi, E.; Pessi, A.; Hodges, R. S., Use of a conformationally restricted secondary structural element to display peptide libraries: a two-stranded alpha-helical coiled-coil stabilized by lactam bridges. *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 270-82.
81. Perez de Vega, M. J.; Garcia-Aranda, M. I.; Gonzalez-Muniz, R., A role for ring-closing metathesis in medicinal chemistry: Mimicking secondary architectures in bioactive peptides. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 677-715.
82. Johnson, L. M.; Gellman, S. H., alpha-Helix mimicry with alpha/beta-peptides. *Method. Enzymol.* **2013**, *523*, 407-29.
83. Cummings, C. G.; Hamilton, A. D., Disrupting protein-protein interactions with non-peptidic, small molecule alpha-helix mimetics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 341-6.
84. Mahon, A. B.; Miller, S. E.; Joy, S. T.; Arora, P. S., Rational design strategies for developing synthetic inhibitors of helical protein interfaces. *Top. Med. Chem.* **2012**, *8*, 197-230.
85. Bullock, B. N.; Jochim, A. L.; Arora, P. S., Assessing helical protein interfaces for inhibitor design. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14220-3.

86. Doig, A. J., Stability and design of alpha-helical peptides. *Prog. Mol. Biol. Transl.* **2008**, *83*, 1-52.
87. Guzzo, A. V., The influence of amino-acid sequence on protein structure. *Biophys. J.* **1965**, *5*, 809-22.
88. Davies, D. R., A Correlation between Amino Acid Composition and Protein Structure. *J. Mol. Biol.* **1964**, *9*, 605-9.
89. Silva, R. A.; Yasui, S. C.; Kubelka, J.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Keiderling, T. A., Discriminating 3_{10} from alpha-helices: vibrational and electronic CD and IR absorption study of related Aib-containing oligopeptides. *Biopolymers* **2002**, *65*, 229-43.
90. Cochran, D. A.; Penel, S.; Doig, A. J., Effect of the N1 residue on the stability of the alpha-helix for all 20 amino acids. *Protein. Sci.* **2001**, *10*, 463-70.
91. Sean, M. D., IR spectroscopy of isotope-labeled helical peptides: Probing the effect of N-acetylation on helix stability. *Biopolymers* **2000**, *54*, 180-185.
92. Munoz, V.; Serrano, L., Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. II. Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 275-96.
93. Walker, K. D.; Causgrove, T. P., Contribution of arginine-glutamate salt bridges to helix stability. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 1213-9.
94. Huyghues-Despointes, B. M.; Klingler, T. M.; Baldwin, R. L., Measuring the strength of side-chain hydrogen bonds in peptide helices: the Gln.Asp (i, i + 4) interaction. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13267-71.
95. Andrew, C. D.; Penel, S.; Jones, G. R.; Doig, A. J., Stabilizing nonpolar/polar side-chain interactions in the alpha-helix. *Proteins* **2001**, *45*, 449-55.
96. Andrew, C. D.; Bhattacharjee, S.; Kokkoni, N.; Hirst, J. D.; Jones, G. R.; Doig, A. J., Stabilizing interactions between aromatic and basic side chains in alpha-helical peptides and proteins. Tyrosine effects on helix circular dichroism. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12706-14.
97. Stellwagen, E.; Park, S. H.; Shalongo, W.; Jain, A., The contribution of residue ion pairs to the helical stability of a model peptide. *Biopolymers* **1992**, *32*, 1193-200.
98. Huyghues-Despointes, B. M.; Baldwin, R. L., Ion-pair and charged hydrogen-bond interactions between histidine and aspartate in a peptide helix. *Biochemistry* **1997**, *36*, 1965-70.
99. Olson, C. A.; Spek, E. J.; Shi, Z.; Vologodskii, A.; Kallenbach, N. R., Cooperative helix stabilization by complex Arg-Glu salt bridges. *Proteins* **2001**, *44*, 123-32.

100. Vijayakumar, M.; Qian, H.; Zhou, H. X., Hydrogen bonds between short polar side chains and peptide backbone: prevalence in proteins and effects on helix-forming propensities. *Proteins* **1999**, *34*, 497-507.
101. Maison, W.; Arce, E.; Renold, P.; Kennedy, R. J.; Kemp, D. S., Optimal N-caps for N-terminal helical templates: effects of changes in H-bonding efficiency and charge. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10245-54.
102. Lewis, A.; Wilkie, J.; J. Rutherford, T.; Gani, D., Design, construction and properties of peptide N-terminal cap templates devised to initiate [small alpha]-helices. Part 2.[dagger] Caps derived from N-[(2S)-2-chloropropionyl]-(2S)-Pro-(2S)-Pro-(2S,4S)-4-thioPro-OMe. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 3777-3794.
103. Mimna, R.; Tuchscherer, G.; Mutter, M., Toward the Design of Highly Efficient, Readily Accessible Peptide N-caps for the Induction of Helical Conformations. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 237-244.
104. Patgiri, A.; Jochim, A. L.; Arora, P. S., A hydrogen bond surrogate approach for stabilization of short peptide sequences in alpha-helical conformation. *Accounts. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1289-300.
105. Cabezas, E.; Satterthwait, A. C., The Hydrogen Bond Mimic Approach: Solid-Phase Synthesis of a Peptide Stabilized as an α -Helix with a Hydrazone Link. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3862-3875.
106. Chapman, R. N.; Dimartino, G.; Arora, P. S., A highly stable short alpha-helix constrained by a main-chain hydrogen-bond surrogate. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12252-3.
107. Wang, D.; Chen, K.; Kulp lii, J. L.; Arora, P. S., Evaluation of biologically relevant short alpha-helices stabilized by a main-chain hydrogen-bond surrogate. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9248-56.
108. Wang, D.; Chen, K.; Dimartino, G.; Arora, P. S., Nucleation and stability of hydrogen-bond surrogate-based alpha-helices. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4074-81.
109. Chapman, R.; Kulp, J. L., 3rd; Patgiri, A.; Kallenbach, N. R.; Bracken, C.; Arora, P. S., Trapping a folding intermediate of the alpha-helix: stabilization of the pi-helix. *Biochemistry* **2008**, *47*, 4189-95.
110. Wang, D.; Liao, W.; Arora, P. S., Enhanced metabolic stability and protein-binding properties of artificial alpha helices derived from a hydrogen-bond surrogate: application to Bcl-xL. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6525-9.
111. Davis, J. M.; Tsou, L. K.; Hamilton, A. D., Synthetic non-peptide mimetics of alpha-helices. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 326-34.

112. Rodríguez, J. M.; Nevola, L.; Ross, N. T.; Lee, G. I.; Hamilton, A. D., Synthetic inhibitors of extended helix-protein interactions based on a biphenyl 4,4'-dicarboxamide scaffold. *Chembiochem*. **2009**, *10*, 829-33.
113. Volonterio, A.; Moisan, L.; Rebek, J., Jr., Synthesis of pyridazine-based scaffolds as alpha-helix mimetics. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3733-6.
114. Restorp, P.; Rebek, J., Jr., Synthesis of alpha-helix mimetics with four side-chains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5909-11.
115. Clapham, D. E.; Runnels, L. W.; Strubing, C., The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 387-96.
116. Covic, L.; Gresser, A. L.; Talavera, J.; Swift, S.; Kuliopulos, A., Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, *99*, 643-8.
117. Valente, P.; Fernandez-Carvajal, A.; Camprubi-Robles, M.; Gomis, A.; Quirce, S.; Viana, F.; Fernandez-Ballester, G.; Gonzalez-Ros, J. M.; Belmonte, C.; Planells-Cases, R.; Ferrer-Montiel, A., Membrane-tethered peptides patterned after the TRP domain (TRPducins) selectively inhibit TRPV1 channel activity. *FASEB. J.* **2011**, *25*, 1628-40.
118. Ponsati, B.; Carreno, C.; Curto-Reyes, V.; Valenzuela, B.; Duart, M. J.; Van den Nest, W.; Cauli, O.; Beltran, B.; Fernandez, J.; Borsini, F.; Caprioli, A.; Di Serio, S.; Veretchy, M.; Baamonde, A.; Menendez, L.; Barros, F.; de la Pena, P.; Borges, R.; Felipo, V.; Planells-Cases, R.; Ferrer-Montiel, A., An inhibitor of neuronal exocytosis (DDO4107) displays long-lasting in vivo activity against chronic inflammatory and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *341*, 634-45.
119. Blanes-Mira, C.; Merino, J. M.; Valera, E.; Fernandez-Ballester, G.; Gutierrez, L. M.; Viniegra, S.; Perez-Paya, E.; Ferrer-Montiel, A., Small peptides patterned after the N-terminus domain of SNAP25 inhibit SNARE complex assembly and regulated exocytosis. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 124-35.
120. Andrews, M. J. I.; Tabor, A. B., Forming stable helical peptides using natural and artificial amino acids. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11711-11743.
121. Harrison, B.; Kraus, M.; Burch, L.; Stevens, C.; Craig, A.; Gordon-Weeks, P.; Hupp, T. R., DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9999-10014.
122. Usui, K.; Kakiyama, T.; Tomizaki, K. Y.; Mie, M.; Kobatake, E.; Mihara, H., Cell fingerprint patterns using designed alpha-helical peptides to screen for cell-specific toxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6281-4.
123. Hidalgo, P.; Neely, A., Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell. Calcium*. **2007**, *42*, 389-96.

124. Levitan, I. B., Signaling protein complexes associated with neuronal ion channels. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 305-10.
125. Keskin, O.; Gursoy, A.; Ma, B.; Nussinov, R., Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact? *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1225-44.
126. Munoz, V.; Serrano, L., Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 399-409.
127. Marqusee, S.; Robbins, V. H.; Baldwin, R. L., Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, *86*, 5286-90.
128. Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y.; Kasheva, T. N.; Villa, A. E., Estimation of aqueous solubility of chemical compounds using E-state indices. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1488-93.
129. Cheng, A.; Merz, K. M., Jr., Prediction of aqueous solubility of a diverse set of compounds using quantitative structure-property relationships. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3572-80.
130. Chan, W. C.; White, P. D., Fmoc solid phase peptide synthesis. *Oxford University Press* **2000**, *3*, 64-66.
131. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-8.
132. Gómez-Moreno, C.; Sancho, J., Estructura de proteínas. *Ariel Ciencia Barcelona* **2003**, 148-152.
133. Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1751*, 119-39.
134. Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P., Single turn peptide alpha helices with exceptional stability in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2974-83.
135. Luo, P.; Baldwin, R. L., Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413-21.
136. Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D., ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR.* **1995**, *5*, 67-81.
137. www.cyana.org.

138. Millard, M.; Pathania, D.; Grande, F.; Xu, S.; Neamati, N., Small-molecule inhibitors of p53-MDM2 interaction: the 2006-2010 update. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 536-59.
139. Haselhorst, T.; Lamerz, A.-C.; Itzstein, M. v., Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy as a Technique to Investigate Protein-Carbohydrate Interactions in Solution. In *Glycomics*, Packer, N.; Karlsson, N., Eds. Humana Press: 2009; Vol. 534, pp 375-396.
140. Neufeld, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB. J.* **1999**, *13*, 9-22.
141. Lowe, J.; Araujo, J.; Yang, J.; Reich, M.; Oldendorp, A.; Shiu, V.; Quarmby, V.; Lowman, H.; Lien, S.; Gaudreault, J.; Maia, M., Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. *Exp. Eye. Res.* **2007**, *85*, 425-30.
142. Garcia-Aranda, M. I.; Gonzalez-Lopez, S.; Santiveri, C. M.; Gagey-Eilstein, N.; Reille-Seroussi, M.; Martin-Martinez, M.; Inguibert, N.; Vidal, M.; Garcia-Lopez, M. T.; Jimenez, M. A.; Gonzalez-Muniz, R.; Perez de Vega, M. J., Helical peptides from VEGF and Vammin hotspots for modulating the VEGF-VEGFR interaction. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1896-905.
143. D'Andrea, L. D.; Iaccarino, G.; Fattorusso, R.; Sorriento, D.; Carannante, C.; Capasso, D.; Trimarco, B.; Pedone, C., Targeting angiogenesis: structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, *102*, 14215-20.
144. Gautier, B.; Goncalves, V.; Diana, D.; Di Stasi, R.; Teillet, F.; Lenoir, C.; Huguenot, F.; Garbay, C.; Fattorusso, R.; D'Andrea, L. D.; Vidal, M.; Inguibert, N., Biochemical and structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4428-40.
145. Goncalves, V.; Gautier, B.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N., Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal. Biochem.* **2007**, *366*, 108-10.
146. Sasaki, K.; Glass, T. R.; Ohmura, N., Validation of Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Hybridoma Screening and Proposal of an Improved Screening Method. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1933-1939.
147. Garcia-Martinez, C.; Humet, M.; Planells-Cases, R.; Gomis, A.; Caprini, M.; Viana, F.; De La Pena, E.; Sanchez-Baeza, F.; Carbonell, T.; De Felipe, C.; Perez-Paya, E.; Belmonte, C.; Messeguer, A.; Ferrer-Montiel, A., Attenuation of thermal

- nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, *99*, 2374-9.
148. Ohta, T.; Komatsu, R.; Imagawa, T.; Otsuguro, K.-i.; Ito, S., Molecular cloning, functional characterization of the porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) and pharmacological comparison with endogenous pTRPV1. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *71*, 173-187.
149. Changeux, J. P.; Edelman, S. J., Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* **2005**, *308*, 1424-8.
150. Williams, D. K.; Wang, J.; Papke, R. L., Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: advantages and limitations. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 915-30.
151. Thomsen, M. S.; Mikkelsen, J. D., Type I and II positive allosteric modulators differentially modulate agonist-induced up-regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* **2012**, *123*, 73-83.
152. Timmermann, D. B.; Gronlien, J. H.; Kohlhaas, K. L.; Nielsen, E. O.; Dam, E.; Jorgensen, T. D.; Ahring, P. K.; Peters, D.; Holst, D.; Christensen, J. K.; Malysz, J.; Briggs, C. A.; Gopalakrishnan, M.; Olsen, G. M., An allosteric modulator of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 294-307.
153. Dunlop, J.; Lock, T.; Jow, B.; Sitzia, F.; Grauer, S.; Jow, F.; Kramer, A.; Bowlby, M. R.; Randall, A.; Kowal, D.; Gilbert, A.; Comery, T. A.; Larocque, J.; Soloveva, V.; Brown, J.; Roncarati, R., Old and new pharmacology: positive allosteric modulation of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by the 5-hydroxytryptamine(2B/C) receptor antagonist SB-206553 (3,5-dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo[1,2-b:4,5-b']di pyrrole-1(2H)-carboxamide). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328*, 766-76.
154. Herman, J. N.; Edward, R. W.; Minhtam, B. T.; Derk, J. H.; Ron, S. B.; Timothy, B. J.; Lijun, Z.; Karen, E. S.; Kelvin, W. G., Nootropic α 7 nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proc. Nat. Aca. Sci.* **2007**, *104*, 8059-8064.
155. Hurst, R. S.; Hajos, M.; Raggenbass, M.; Wall, T. M.; Higdon, N. R.; Lawson, J. A.; Rutherford-Root, K. L.; Berkenpas, M. B.; Hoffmann, W. E.; Piotrowski, D. W.; Groppi, V. E.; Allaman, G.; Ogier, R.; Bertrand, S.; Bertrand, D.; Arneric, S. P., A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 4396-405.
156. Dinklo, T.; Shaban, H.; Thuring, J. W.; Lavreysen, H.; Stevens, K. E.; Zheng, L.; Mackie, C.; Grantham, C.; Vandenberk, I.; Meulders, G.; Peeters, L.; Verachtert, H.; De Prins, E.; Lesage, A. S., Characterization of 2-[[4-fluoro-3-

(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a novel positive allosteric modulator of the α_7 nicotinic acetylcholine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 560-74.

157. Malysz, J.; Gronlien, J. H.; Anderson, D. J.; Hakerud, M.; Thorin-Hagene, K.; Ween, H.; Wetterstrand, C.; Briggs, C. A.; Faghieh, R.; Bunnelle, W. H.; Gopalakrishnan, M., In vitro pharmacological characterization of a novel allosteric modulator of α_7 neuronal acetylcholine receptor, 4-(5-(4-chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl)benzenesulfonamide (A-867744), exhibiting unique pharmacological profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330*, 257-67.

158. Gronlien, J. H.; Hakerud, M.; Ween, H.; Thorin-Hagene, K.; Briggs, C. A.; Gopalakrishnan, M.; Malysz, J., Distinct profiles of α_7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 715-24.

159. Chimienti, F.; Hogg, R. C.; Plantard, L.; Lehmann, C.; Brakch, N.; Fischer, J.; Huber, M.; Bertrand, D.; Hohl, D., Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 3017-24.

160. Henderson, B. J.; Carper, D. J.; González-Cestari, T. F.; Yi, B.; Mahasenan, K.; Pavlovicz, R. E.; Dalefield, M. L.; Coleman, R. S.; Li, C.; McKay, D. B., Structure-Activity Relationship Studies of Sulfonylpiperazine Analogues as Novel Negative Allosteric Modulators of Human Neuronal Nicotinic Receptors. *J. Med.Chem.* **2011**, *54*, 8681-8692.

161. Yi, B.; Long, S.; Gonzalez-Cestari, T. F.; Henderson, B. J.; Pavlovicz, R. E.; Werbovetz, K.; Li, C.; McKay, D. B., Discovery of benzamide analogs as negative allosteric modulators of human neuronal nicotinic receptors: pharmacophore modeling and structure-activity relationship studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4730-43.

162. Jeon, J.-H.; Kim, S.-J.; Kim, C.-G.; Kim, J.-K.; Jun, J.-G., Synthesis of biologically active chalcones and their anti-inflammatory effects. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 953-957.

163. Nasir Abbas Bukhari, S.; Jasamai, M.; Jantan, I.; Ahmad, W., Review of Methods and Various Catalysts Used for Chalcone Synthesis. *Mini Rev. Org. Chem.* **2013**, *10*, 73-83.

164. Xu, C.; Chen, G.; Huang, X., Chalcones by the Wittig reaction of a stable ylide with aldehydes under microwave irradiation. *Org. Prep. Proced. Int.* **1995**, *27*, 559-561.

165. Zhang, Y.-G.; Liu, X.-L.; He, Z.-Y.; Li, X.-M.; Kang, H.-J.; Tian, S.-K., Palladium/Copper-Catalyzed Oxidative Arylation of Terminal Alkenes with Aroyl Hydrazides. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 2765-2769.
166. Singh, P.; Anand, A.; Kumar, V., Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 758-777.
167. Dimmock, J. R.; Elias, D. W.; Beazely, M. A.; Kandepu, N. M., Bioactivities of chalcones. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 1125-49.
168. Sahu, N. K.; Balbhadra, S. S.; Choudhary, J.; Kohli, D. V., Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 209-25.
169. Jandial, D. D.; Blair, C. A.; Zhang, S.; Krill, L. S.; Zhang, Y. B.; Zi, X., Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones. *Curr. Cancer Drug Targets* **2014**, *14*, 181-200.
170. Carocho, M.; Ferreira, I. C., The role of phenolic compounds in the fight against cancer--a review. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 1236-58.
171. Sharma, V.; Kumar, V.; Kumar, P., Heterocyclic chalcone analogues as potential anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 422-32.
172. Batovska, D. I.; Parushev, S. P., An update on the anticancer effects of chalcones. *Int. J. Curr. Chem.* **2010**, *1*.
173. Bukhari, S. N.; Jantan, I.; Jasamai, M., Anti-inflammatory trends of 1, 3-diphenyl-2-propen-1-one derivatives. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 87-94.
174. Yadav, V. R.; Prasad, S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B., The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *International Immunopharmacology* **2011**, *11*, 295-309.
175. Kontogiorgis, C.; Mantzanidou, M.; Hadjipavlou-Litina, D., Chalcones and their potential role in inflammation. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1224-42.
176. Ritter, M.; Martins, R. M.; Dias, D.; Pereira, C. M. P., Recent advances on the synthesis of chalcones with antimicrobial activities: A brief review. *Lett. Org. Chem.* **2014**, *11*, 498-508.
177. Tomar, V.; Bhattacharjee, G.; Kamaluddin; Kumar, A., Synthesis and antimicrobial evaluation of new chalcones containing piperazine or 2,5-dichlorothiophene moiety. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2007**, *17*, 5321-4.
178. Bag, S.; Ramar, S.; Degani, M., Synthesis and biological evaluation of α , β -unsaturated ketone as potential antifungal agents. *Med. Chem. Res.* **2009**, *18*, 309-316.

179. Heidari, M. R.; Foroumadi, A.; Amirabadi, A.; Samzadeh-Kermani, A.; Azimzadeh, B. S.; Eskandarizadeh, A., Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of a Novel Rigid 3, 4-Dihydroxy Chalcone in Mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1171*, 399-406.
180. El-Sayed, Y. S.; Gaber, M., Studies on chalcone derivatives: Complex formation, thermal behavior, stability constant and antioxidant activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *137*, 423-431.
181. Rao, Y. K.; Fang, S.-H.; Tzeng, Y.-M., Synthesis and biological evaluation of 3',4',5'-trimethoxychalcone analogues as inhibitors of nitric oxide production and tumor cell proliferation. *Bioorg. Med.Chem.* **2009**, *17*, 7909-7914.
182. Echeverria, C.; Santibañez, J. F.; Donoso-Tauda, O.; Escobar, C.; Ramirez-Tagle, R., Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 221-231.
183. Jeon, J.-H.; Kim, S.-K.; Kim, C. G.; Kim, J.-K.; Jun, J.-G., Synthesis of Biologically Active Chalcones and their Anti-inflammatory Effects. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 953-957.
184. Foroumadi, A.; Emami, S.; Sorkhi, M.; Nakhjiri, M.; Nazarian, Z.; Heydari, S.; Ardestani, S. K.; Poorrajab, F.; Shafiee, A., Chromene-based synthetic chalcones as potent antileishmanial agents: synthesis and biological activity. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *75*, 590-6.
185. Habib, S. I.; Kumar, P.; Kulkarni, A., Synthesis and antimicrobial activity of some new chalcones of pyridine/pyrrole carboxaldehyde. *Der. Pharm. Lett.* **2013**, *5*, 101-104.
186. Hussain, T.; Siddiqui, H. L.; Zia-ur-Rehman, M.; Masoom Yasinzai, M.; Parvez, M., Anti-oxidant, anti-fungal and anti-leishmanial activities of novel 3-[4-(1H-imidazol-1-yl) phenyl]prop-2-en-1-ones. *Eur. J. Med.Chem.* **2009**, *44*, 4654-4660.
187. dos Santos, L.; Lima, L. A.; Cechinel-Filho, V.; Corrêa, R.; de Campos Buzzi, F.; Nunes, R. J., Synthesis of new 1-phenyl-3-{4-[(2E)-3-phenylprop-2-enoyl]phenyl}-thiourea and urea derivatives with anti-nociceptive activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8526-8534.
188. Yarishkin, O. V.; Ryu, H. W.; Park, J.-Y.; Yang, M. S.; Hong, S.-G.; Park, K. H., Sulfonate chalcone as new class voltage-dependent K⁺ channel blocker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 137-140.
189. Kim, E.-J.; Ryu, H. W.; Curtis-Long, M. J.; Han, J.; Kim, J. Y.; Cho, J. K.; Kang, D.; Park, K. H., Chemoselective regulation of TREK2 channel: Activation by sulfonate

- chalcones and inhibition by sulfonamide chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4237-4239.
190. Lin, C.-N.; Hsieh, H.-K.; Ko, H.-H.; Hsu, M.-F.; Lin, H.-C.; Chang, Y.-L.; Chung, M.-I.; Kang, J.-J.; Wang, J.-P.; Teng, C.-M., Chalcones as potent antiplatelet agents and calcium channel blockers. *Drug Develop. Res.* **2001**, *53*, 9-14.
191. McOmie, J. F. W.; Watts, M. L.; West, D. E., Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2289-2292.
192. Chiruta, C.; Schubert, D.; Dargusch, R.; Maher, P., Chemical modification of the multitarget neuroprotective compound fisetin. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 378-89.
193. Huang, D.; Wang, J.-X.; Hu, Y.; Zhang, Y.; Tang, J., A NEW SOLVENT-FREE SYNTHESIS OF α, β -UNSATURATED KETONES FROM ACETALS WITH ARYL KETONES UNDER MICROWAVE IRRADIATION. *Synthetic. Commun.* **2002**, *32*, 971-979.
194. Narender, T.; Papi Reddy, K., A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 3177-3180.
195. Kim, B. T.; O, K. J.; Chun, J. C.; Hwang, K. J., Synthesis of Dihydroxylated Chalcone Derivatives with Diverse Substitution Patterns and Their Radical Scavenging Ability toward DPPH Free Radicals. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29*, 1125-1130.
196. Mai, J.; Hoxha, E.; Morton, C. E.; Muller, B. M.; Adler, M. J., Towards a dynamic covalent molecular switch: substituent effects in chalcone/flavanone isomerism. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3421-3423.
197. Perjesi, P.; Takacs, M.; Osz, E.; Pinter, Z.; Vamos, J.; Takacs-Novak, K., In-solution and on-plate light-catalyzed E/Z isomerization of cyclic chalcone analogues. Lipophilicity of E- and Z-2-(X-benzylidene)-1-benzosuberones. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 289-95.
198. Iwata, S.; Nishino, T.; Inoue, H.; Nagata, N.; Satomi, Y.; Nishino, H.; Shibata, S., Antitumorigenic activities of chalcones (II). Photo-isomerization of chalcones and the correlation with their biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 1266-70.
199. Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W., *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. Ed. Alhambra, S.A. ed.; 1980.
200. Zwart, R.; De Filippi, G.; Broad, L. M.; McPhie, G. I.; Pearson, K. H.; Baldwinson, T.; Sher, E., 5-Hydroxyindole potentiates human $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology* **2002**, *43*, 374-384.

201. Robinson, M. W.; Overmeyer, J. H.; Young, A. M.; Erhardt, P. W.; Maltese, W. A., Synthesis and Evaluation of Indole-Based Chalcones as Inducers of Methuosis, a Novel Type of Nonapoptotic Cell Death. *J. Med. Chem* **2012**, *55*, 1940-1956.
202. Mori, A.; Miyakawa, Y.; Ohashi, E.; Haga, T.; Maegawa, T.; Sajiki, H., Pd/C-catalyzed chemoselective hydrogenation in the presence of diphenylsulfide. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3279-81.
203. Luche, J. L., Lanthanides in organic chemistry. 1. Selective 1,2 reductions of conjugated ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2226-2227.
204. Luo, Y.; Song, R.; Li, Y.; Zhang, S.; Liu, Z.-J.; Fu, J.; Zhu, H.-L., Design, synthesis, and biological evaluation of chalcone oxime derivatives as potential immunosuppressive agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3039-3043.
205. Broad, L. M.; Zwart, R.; Pearson, K. H.; Lee, M.; Wallace, L.; McPhie, G. I.; Emkey, R.; Hollinshead, S. P.; Dell, C. P.; Baker, S. R.; Sher, E., Identification and Pharmacological Profile of a New Class of Selective Nicotinic Acetylcholine Receptor Potentiators. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 1108-1117.
206. Hormaza, A.; Arbelaez Perez, O. F., Síntesis de una nueva serie de pirroles vía cicloadición. *Rev. Soc. Quim. Peru.* **2009**, *75*, 12-16.
207. Pignataro, S.; Lunazzi, L.; Boicelli, C. A.; Di Marino, R.; Ricci, A.; Mangini, A.; Danieli, R., Charge density distribution in organo-metal sulfides by means of ¹³C NMR and S2p32 ESCA chemical shifts. *Tetr. Lett.* **1972**, *13*, 5341-5344.
208. Maes, B. U. W., *Synthesis of heterocycles via multicomponent reactions I*. NY, 2010.
209. Rao, C. B.; Raju, G. V. S.; Raju, P. V. N., Studies on Pyrazolines: Synthesis, Pyrolysis and reactivity of some 3-Aroyl-4-Aryl- Δ^2 -pyrazolines. *Indian J. Chem.* **1986**, *25B*, 400-403.
210. Exley, R.; Iturriaga-Vásquez, P.; Lukas, R. J.; Sher, E.; Cassels, B. K.; Bermudez, I., Evaluation of benzyltetrahydroisoquinolines as ligands for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 15-24.
211. Cox, E. D.; Cook, J. M., The Pictet-Spengler condensation: a new direction for an old reaction. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1797-1842.
212. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J., Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv.* **1981**, *391*, 85-100.
213. Sala, F.; Nistri, A.; Criado, M., Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta. Physiol.* **2008**, *192*, 203-212.

214. Santangelo Freil, R. M.; Ogden, K. K.; Strong, K. L.; Khatri, A.; Chepiga, K. M.; Jensen, H. S.; Traynelis, S. F.; Liotta, D. C., Synthesis and Structure Activity Relationship of Tetrahydroisoquinoline-Based Potentiators of GluN2C and GluN2D Containing N-Methyl-d-aspartate Receptors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5351-5381.
215. Kim, H. S.; Park, E. J.; Park, S. W.; Kim, H. J.; Chang, K. C., A tetrahydroisoquinoline alkaloid THI-28 reduces LPS-induced HMGB1 and diminishes organ injury in septic mice through p38 and PI3K/Nrf2/HO-1 signals. *International Immunopharmacology* **2013**, *17*, 684-692.
216. Wu, L.; Noyan Ashraf, M. H.; Facci, M.; Wang, R.; Paterson, P. G.; Ferrie, A.; Juurlink, B. H., Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 7094-9.
217. Egea, J.; Rosa, A. O.; Cuadrado, A.; García, A. G.; López, M. G., Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1842-1852.
218. Liu, J.; Li, L.; Suo, W. Z., HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life. Sci.* **2009**, *84*, 267-271.
219. Vogel, S.; Barbic, M.; Jürgenliemk, G.; Heilmann, J., Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2206-2213.
220. Todorova, I. T.; Batovska, D. I.; Stamboliyska, B. A.; Parushev, S. P., Evaluation of the radical scavenging activity of a series of synthetic hydroxychalcones towards the DPPH radical. *Journal of the Serbian Chemical Society* **2011**.
221. Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G., Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free. Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 303-11.
222. Capitani, C. D.; Carvalho, A. C. L.; Rivelli, D. P.; Barros, S. B. M.; Castro, I. A., Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* **2009**, *111*, 1090-1099.
223. Freedman, R., α 7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for Cognitive Enhancement in Schizophrenia. *Annual Review of Medicine* **2014**, *65*, 245-261.
224. Lendvai, B.; Kassai, F.; Szajli, A.; Nemethy, Z., α 7 nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain. Res. Bull.* **2013**, *93*, 86-96.
225. Munro, G.; Hansen, R.; Erichsen, H.; Timmermann, D.; Christensen, J.; Hansen, H., The α 7 nicotinic ACh receptor agonist compound B and positive allosteric modulator PNU-120596 both alleviate inflammatory hyperalgesia and cytokine release in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 421-35.

226. Freitas, K.; Negus, S. S.; Carroll, F. I.; Damaj, M. I., In vivo pharmacological interactions between a type II positive allosteric modulator of alpha7 nicotinic ACh receptors and nicotinic agonists in a murine tonic pain model. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 567-79.
227. Nagakura, Y.; Okada, M.; Kohara, A.; Kiso, T.; Toya, T.; Iwai, A.; Wanibuchi, F.; Yamaguchi, T., Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 490-7.
228. Artursson, P.; Karlsson, J., Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *175*, 880-885.
229. Smith, D. A.; Di, L.; Kerns, E. H., The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, *9*, 929-39.
230. Thomas, W. A., Peptide derivatives as prodrugs. *Biochemical Society transactions* **1986**, *14*, 383-7.
231. Reissmann, S., Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J. Peptide Science* **2014**, *20*, 760-784.
232. Talluri, R. S.; Samanta, S. K.; Gaudana, R.; Mitra, A. K., Synthesis, metabolism and cellular permeability of enzymatically stable dipeptide prodrugs of acyclovir. *Int. J. Pharmaceut.* **2008**, *361*, 118-124.
233. Santos, C.; Mateus, M. L.; dos Santos, A. P.; Moreira, R.; de Oliveira, E.; Gomes, P., Cyclization-activated prodrugs. Synthesis, reactivity and toxicity of dipeptide esters of paracetamol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1595-8.
234. Santos, C. R.; Capela, R.; Pereira, C. S.; Valente, E.; Gouveia, L.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Moreira, R.; Gomes, P., Structure-activity relationships for dipeptide prodrugs of acyclovir: implications for prodrug design. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2339-46.
235. Garcia-Aparicio, C.; Bonache, M. C.; De Meester, I.; San-Felix, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velazquez, S., Design and discovery of a novel dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-based prodrug approach. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5339-51.
236. Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpe, S., Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB. J.* **1995**, *9*, 736-44.
237. Diez-Torrubia, A.; Cabrera, S.; de Castro, S.; Garcia-Aparicio, C.; Mulder, G.; De Meester, I.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Velazquez, S., Novel water-soluble

prodrugs of acyclovir cleavable by the dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26) enzyme. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 456-68.

238. Kauffmann, H.; Kieser, F., Über die Basische Funktion des Methoxyls. *Chem. Ber.* **1913**, *46*, 3788-3801.

239. Lawrence, N. J.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Ducki, S.; Gul, L. A.; Hadfield, J. A.; Khan, N., Linked parallel synthesis and MTT bioassay screening of substituted chalcones. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 421-426.

240. Nielsen, S. F.; Christensen, S. B.; Cruciani, G.; Kharazmi, A.; Liljefors, T., Antileishmanial Chalcones: Statistical Design, Synthesis, and Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4819-4832.

241. Bandgar, B. P.; Gawande, S. S.; Bodade, R. G.; Totre, J. V.; Khobragade, C. N., Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1364-1370.

242. Won, S.-J.; Liu, C.-T.; Tsao, L.-T.; Weng, J.-R.; Ko, H.-H.; Wang, J.-P.; Lin, C.-N., Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 103-112.

243. Tambor, J., Hydroxychalcones. **1916**, *49*, 1704-1711.

244. Edwards, M. L.; Stemerick, D. M.; Sunkara, P. S., Chalcones: a new class of antimetabolic agents. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1948-1954.

245. Pati, H. N.; Holt, H. L., Jr.; LeBlanc, R.; Dickson, J.; Stewart, M.; Brown, T.; Lee, M., Synthesis and cytotoxic properties of nitro- and aminochalcones. *Med. Chem. Res.* **2005**, *14*, 19-25.

246. Sharma, A.; Kumar, V.; Sinha, A. K., A Chemoselective Hydrogenation of the Olefinic Bond of α, β -Unsaturated Carbonyl Compounds in Aqueous Medium under Microwave Irradiation. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 354-360.

247. González, A. G.; León, F.; Sánchez-Pinto, L.; Padrón, J. I.; Bermejo, J., Phenolic Compounds of Dragon's Blood from *Dracaena draco*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1297-1299.

248. Mons, E.; Wanner, M. J.; Ingemann, S.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H., Organocatalytic Enantioselective Pictet–Spengler Reactions for the Syntheses of 1-Substituted 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7380-7390.

249. Balsera, B.; Mulet, J.; Fernandez-Carvajal, A.; de la Torre-Martinez, R.; Ferrer-Montiel, A.; Hernandez-Jimenez, J. G.; Estevez-Herrera, J.; Borges, R.; Freitas, A. E.; Lopez, M. G.; Garcia-Lopez, M. T.; Gonzalez-Muniz, R.; Perez de Vega, M. J.; Valor, L. M.; Svobodova, L.; Sala, S.; Sala, F.; Criado, M., Chalcones as positive allosteric

modulators of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: a new target for a privileged structure. *Eur J Med Chem* **2014**, *86*, 724-39.

250. Boumendjel, A.; Boccard, J.; Carrupt, P.-A.; Nicolle, E.; Blanc, M.; Geze, A.; Choisnard, L.; Wouessidjewe, D.; Matera, E.-L.; Dumontet, C., Antimitotic and Antiproliferative Activities of Chalcones: Forward Structure–Activity Relationship. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2307-2310.

251. Heidari, M. R.; Dadollahi, Z.; Mehrabani, M.; Mehrabi, H.; Pourzadeh-Hosseini, M.; Behravan, E.; Etemad, L., Study of antiseizure effects of *Matricaria recutita* extract in mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1171*, 300-4.

252. Rao, Y. K.; Fang, S.-H.; Tzeng, Y.-M., Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2679-2686.

253. Ducki, S.; Forrest, R.; Hadfield, J. A.; Kendall, A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T.; Rennison, D., Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1051-1056.

254. Loa, J.; Chow, P.; Zhang, K., Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* **2009**, *63*, 1007-16.

255. Li, Y.; Zhao, H.; Wang, Y.; Zheng, H.; Yu, W.; Chai, H.; Zhang, J.; Falck, J. R.; Guo, A. M.; Yue, J.; Peng, R.; Yang, J., Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicology and applied pharmacology* **2013**, *272*, 37-48.

256. Zhou, G. S.; Song, L. J.; Yang, B., Isoliquiritigenin inhibits proliferation and induces apoptosis of U87 human glioma cells in vitro. *Molecular medicine reports* **2013**, *7*, 531-6.

257. Kobori, M.; Iwashita, K.; Shinmoto, H.; Tsushida, T., Phloretin-induced Apoptosis in B16 Melanoma 4A5 Cells and HL60 Human Leukemia Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1999**, *63*, 719-725.

258. Ducki, S., Antimitotic chalcones and related compounds as inhibitors of tubulin assembly. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 336-47.

259. Valdameri, G.; Gauthier, C.; Terreux, R.; Kachadourian, R.; Day, B. J.; Winnischofer, S. M. B.; Rocha, M. E. M.; Frachet, V.; Ronot, X.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A., Investigation of Chalcones as Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein: Critical Role of Methoxylation in both Inhibition Potency and Cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3193-3200.

260. Mai, C. W.; Yaeghoobi, M.; Abd-Rahman, N.; Kang, Y. B.; Pichika, M. R., Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure–activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 378-387.
261. Shenvi, S.; Kumar, K.; Hatti, K. S.; Rijesh, K.; Diwakar, L.; Reddy, G. C., Synthesis, anticancer and antioxidant activities of 2,4,5-trimethoxy chalcones and analogues from asaronaldehyde: Structure–activity relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 435-442.
262. Lawrence, N. J.; Patterson, R. P.; Ooi, L.-L.; Cook, D.; Ducki, S., Effects of α -substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5844-5848.
263. Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S., Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5434-5440.
264. David, C. V.; Craft, N., Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy* **2009**, *22*, 491-502.
265. Kobets, T.; Grekov, I.; Lipoldová, M., Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1443-1474.
266. Croft, S. L.; Barrett, M. P.; Urbina, J. A., Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* *21*, 508-512.
267. Natera, S.; Machuca, C.; Padrón-Nieves, M.; Romero, A.; Díaz, E.; Ponte-Sucre, A., Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int. J. Antimicrob. Ag.* *29*, 637-642.
268. Sindermann, H.; Engel, J., Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100*, S17-S20.
269. Berman, J.; Bryceson, A. D. M.; Croft, S.; Engel, J.; Gutteridge, W.; Karbwang, J.; Sindermann, H.; Soto, J.; Sundar, S.; Urbina, J. A., Miltefosine: issues to be addressed in the future. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100*, S41-S44.
270. Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K., Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 2571-2581.
271. Chen, M.; Zhai, L.; Christensen, S. B.; Theander, T. G.; Kharazmi, A., Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2001**, *45*, 2023-9.

272. Nielsen, S. F.; Chen, M.; Theander, T. G.; Kharazmi, A.; Brøgger Christensen, S., Synthesis of antiparasitic licorice chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 449-452.
273. Zhai, L.; Chen, M.; Blom, J.; Theander, T. G.; Christensen, S. B.; Kharazmi, A., The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, *43*, 793-803.
274. Torres-Santos, E. C.; Moreira, D. L.; Kaplan, M. A.; Meirelles, M. N.; Rossi-Bergmann, B., Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1999**, *43*, 1234-41.
275. Boeck, P.; Bandeira Falcao, C. A.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Filho, V. C.; Torres-Santos, E. C.; Rossi-Bergmann, B., Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1538-45.
276. Bello, M. L.; Chiaradia, L. D.; Dias, L. R. S.; Pacheco, L. K.; Stumpf, T. R.; Mascarello, A.; Steindel, M.; Yunes, R. A.; Castro, H. C.; Nunes, R. J.; Rodrigues, C. R., Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–activity relationship (SAR). *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5046-5052.
277. Aponte, J. C.; Castillo, D.; Estevez, Y.; Gonzalez, G.; Arevalo, J.; Hammond, G. B.; Sauvain, M., In vitro and in vivo anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 100-103.
278. Hermoso, A.; Jiménez, I. A.; Mamani, Z. A.; Bazzocchi, I. L.; Piñero, J. E.; Ravelo, A. G.; Valladares, B., Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3975-3980.
279. Andrighetti-Fröhner, C. R.; de Oliveira, K. N.; Gaspar-Silva, D.; Pacheco, L. K.; Joussef, A. C.; Steindel, M.; Simões, C. M. O.; de Souza, A. M. T.; Magalhaes, U. O.; Afonso, I. F.; Rodrigues, C. R.; Nunes, R. J.; Castro, H. C., Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 755-763.
280. Rando, D. G.; Giarolla, J.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I., Chalcones and N-acylhydrazones: direct analogues? Exploratory data analysis applied to potential novel antileishmanial agents. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46*, 311-321.
281. Luque-Ortega, J. R.; Saugar, J. M.; Chiva, C.; Andreu, D.; Rivas, L., Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 221-30.

282. dos Santos Alianca, A. S.; dos Anjos, K. F.; de Vasconcelos Reis, T. N.; Higinio, T. M.; Brelaz-de-Castro, M. C.; Bianco, E. M.; de Figueiredo, R. C., The in vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* **2014**, *19*, 14052-65.

RESUMEN EN INGLÉS

Helical peptides and chalcone derivatives in the search of ion channel modulators

Introduction

Ion channels are key elements of the plasmatic membranes. They are constituted as homo- or heteromeric protein complexes and selectively mediate the ion flux through the lipid bilayer to keep a gradient between both sides of the membrane. Cells make use of this gradient to regulate basic functions and, as a consequence, deregulation or abnormal functioning of ion channels are responsible for severe pathologies.

Thus, and as a general approach, the modulation of such ion channels is crucial to treat several pathologies. Many of the explored strategies have been focused on the design of agonists and antagonists. However, alternative methodologies are required to overcome adverse effects associated to the classic design of substrate analogs. In this regard, the design of protein-protein interaction (PPI) and allosteric modulators are current powerful strategies.

Objetives

In the present report the main objective has been the design, synthesis and evaluation of molecules able to affect the function of two types of ion channels. On one hand the transient receptor potential channels (TRPs, Chapter 1) and on the other hand the $\alpha 7$ acetylcholine nicotinic receptor ($\alpha 7$ nAChR, Chapter 2). The strategies will respectively be the modulation of protein-protein interactions (PPIs) related to the TRP channels functioning and an the allosteric modulation of $\alpha 7$ nAChR. In addition, as an extension of the previous work, several synthetic intermediates of chapter 2 were also evaluated as potential antiproliferative and antileishmania drugs (Chapter 3).

1.- Helical peptides for PPI modulation: Antagonist effect of helicoidal peptides on the TRPV1 and TRPA1 receptors (Chapter 1)

Linear peptides could represent a quick and effective approach to discover initial PPI hits, particularly if they have inherent ability to adopt specific peptide secondary structures (α -helix). Based on this idea, a peptide library was designed by theoretical predictions of helicity (Agadir software) and synthesized by solid-phase peptide synthesis (Figure 1). As a main requisite, the selected 13-*mer* peptides fixed either a combination of three aromatic, or two aromatic and one aliphatic residue, on one face of the helix (Ac-SSEEX⁵ARNX⁹AAX¹²N-NH₂), since these are structural features quite common at PPIs interfaces. Circular dichroism and NMR measurements in solution (conformational analysis) confirmed the theoretical predicted helical propensities. Next, the validation of the library in two well-known PPIs (p53-MDM2, VEGF-VEGFRs), for which a hydrophobic α -helix is essential for the interaction, verified the usefulness of this library, and allowed the identification of new modulators of VEGF-Flt-1. Finally, these peptides were evaluated and some identified as novel hits to block TRPV1 and TRPA1 ion channels. These results could be considered a starting point to develop new modulators of these channels.

2.- Chalcones as allosteric modulators of $\alpha 7$ nAChRs (Chapter 2)

A screening campaign of a heterogeneous library of small natural products, led us to identify the 4,2',4'-trihydroxychalcone as a compound able to selectively modulate the $\alpha 7$ nAChR. Thus, taking this compound as hit, we performed the synthesis of several structurally-diverse chalcone derivatives. We explored: (i) the number and position of the hydroxyl groups on the phenyl rings, (ii) the introduction of other functional groups in place of OH, (iii) the

introduction of a novel aromatic ring, or (iv) the chemical nature of the spacer between the two aromatic rings.

In vitro evaluation of the new compounds prepared on *Xenopus* oocytes allowed us the identification of some potent and selective positive allosteric modulators (PAMs) of the $\alpha 7$ AChR. The best compound in the chalcone series was compound **2.23** (2,4,2',5'-tetrahydroxychalcone) and from the chalcone derivatives two compounds stood out **2.51** (2,4,2',5'-OH) and **2.69** (4,2',5'-OH), products of the reduction of the chalcone's spacer double bond. These compounds have an acceptable security profile in cytotoxic and organ bath studies.

In cellular cultures treated with Rotenone and Oligomycin A, the **2,4,2',5'-tetrahydroxychalcone**, exhibited a neuroprotective activity similar to that of the reference compound PNU-282987 (an $\alpha 7$ selective agonist). Additionally, *in vivo* evaluation of some of the most potent compounds in a rat model of mechanical hyperalgesia proved that they have antinociceptive effects, comparable to that displayed by the internal control PNU-120596, a well-known type II PAM. Interestingly, the best compound in the chalcone series, **2,4,2',5'-tetrahydroxychalcone**, also improved the cognitive process in rodents in the Morris test. This suggests a positive effect on the murine cognitive functions, and therefore, its potential interest as a neuroprotective agent for the treatment of Alzheimer's type disorders. In addition to the above indicated *in vitro* and *in vivo* activities, some of these compounds displayed remarkable antioxidant properties, as determined by ORAC experiments.

Finally, we worked on the improvement of the pharmacokinetic profile of the more active compounds. In this regard, amino acid and peptide-based prodrugs were prepared because of their well-known ability to improve permeability and solubility. Regarding peptide prodrugs, two different strategies were followed. From one side, the use of a self-cleavable linker that

would liberate *in vivo* the parent compound by the formation of a diketopyperazine ring. On the other side, the introduction of Val-Pro-Val tripeptide, which will be recognized and cleaved by the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), releasing the parent drug. The stability studies performed point out to the dipeptide derivatives as the more promising pro-drugs of the active compounds.

3.- Antiproliferative and antileishmania effect of chalcone derivatives (Chapter 3)

Several methoxy chalcone derivatives, synthetic intermediates of the hydroxyl chalcones described in Chapter 2, were evaluated for their antitumor and antileishmania activities, two indications for which methoxy chalcones have been widely described.

First, a selection of the prepared methoxy chalcones was tested as growth inhibitors in four tumor cell lines (A549, HT29, MDA-MB-231, PSN1). The results proved that some compounds showed not negligible IC_{50} values, in the μ M range in the four cell lines.

Secondly, the evaluation of these compounds in both *Leishmania donovani* (promastigote) and *L. pifanoi* (amastigote) cell cultures was also carried out, finding that some compounds had a promising antileishmania activity. Flow cytometry and electronic microscopy studies unravel that one of these chalcone derivatives significantly affect the parasite mitochondrial stability (polarization and morphology).

ANEXOS

ANEXO I CAPÍTULO 1

L1: (Ac-SSEER⁵ARNR⁹AAAR¹²N-NH₂)

Peptido ^a	HPLC Eclipse C18 Grad (10-30%) t _R (min)	[M+2H/2] ²⁺ Calculada (Masa Exacta)	[M+2H/2] ²⁺ Encontrada (Masa Exacta)	Pureza Crudo (%)	Rdto ^b (%)	Pureza Final (%)
FFF	17.48	766.30 (1529.6899)	766.35 (1529.6894)	85	16	99 ^c
WFF	18.11	785.81	785.84	76	7	89 ^c
YFF	14.38	774.30	774.30	86	74	86 ^d
FWF	17.36	785.81 (1568.7008)	785.84 (1568.6979)	83	18	98 ^c
WWF	18.25	805.33	805.88	82	9	88 ^e
YWF	14.72	793.81	793.87	89	21	91 ^c
FYF	13.58	774.30	774.30	85	74	85 ^d
WYF	14.92	793.81	793.87	91	20	96 ^c
YYF	11.06	782.3	782.26	86	65	86 ^d
FFW	17.80	785.81	786.13	71	11	88 ^c
WFW	18.45	805.33	805.88	73	27	92 ^c

YFW	14.46	793.95	794.34	57	16	88^c
FWW	17.50	805.33	805.33	57	11	85^c
WWW	18.51	824.85	824.82	75	11	85^c
YWW	15.91	813.33	813.36	82	14	95^c
FYW	14.23	793.81	794.10	80	26	98^c
WYW	15.45	813.33	813.63	82	19	88^c
YYW	11.92	801.81	802.15	70	16	88^c
FFY	14.38	774.30	774.38	64^f	29	97^c
WFY	15.42	794.82 (1584.6957)	794.02 (1584.7008)	73^f	21	92^c
YFY	11.51	782.29 (1561.6797)	782.34 (1561.6801)	85^f	38	94^c
FWY	14.69	793.81	793.87	70^f	15	90^c
WWY	16.40	813.33	813.99	86^f	64	86^c
YWY	12.40	801.81	801.90	81^f	15	93^c
FYY	11.27	782.29	783.09	78^f	31	96^c

WYY	12.78	801.81	802.61	75^f	30	98^c
YYY	8.69	790.29	790.61	76^f	22	90^c

^a Los peptidos son nombrados según los residuos que se encuentran en posiciones 5, 9 y 12

^b Rendimiento del compuesto aislado. ^c Purificado en cartuchos de fase reversa utilizando gradientes de ACN/H₂O. ^d No purificado. ^e Purificado por HPLC-Semipreparativo en columna de fase reversa C₁₈ (Sunfire, 5μ, 10 x 150 mm) usando un gradiente de ACN (0.1% HCO₂H)/H₂O (0.1% HCO₂H), 2-40% en 15 min, flujo 8 mL/min.

^f Síntesis automática.

L2: (Ac-SSEAI⁵ARNAr⁹AAAr¹²N-NH₂)

Peptido	HPLC Sunfire C18 Grad (5-50) t _R (min)	[M+2H/2] ²⁺ Calculada (Masa Exacta)	[M+2H/2] ²⁺ Encontrada (Masa Exacta)	Pureza Crudo (%)	Rdto (%)	Pureza Final (%)
LFF	8.44	749.35	749.27	99	47	99 ^d
LWF	8.42	768.86	768.78	88	40	88 ^d
LYF	7.64	757.35	757.15	78	30	97 ^c
IFF	8.41	749.35	749.33	98	53	99 ^d
IWF	8.37	768.86	768.37	87	42	87 ^d
IYF	7.10	757.35	757.43	96	56	96 ^d
LFW	8.32	768.86	768.58	86	47	86 ^d
LWW	8.37	788.37 (1574.7352)	788.03 (1574.7348)	73	20	97 ^c
LYW	7.28	776.85	776.87	85	47	85 ^d
IFW	8.54	768.86	768.65	91	44	91 ^d
IWW	8.53	788.37	788.16	65	11	93 ^c

IYW	7.32	776.85	776.67	83	37	83 ^d
LFY	7.47	757.35	757.15	82	40	82 ^d
LWY	8.17	776.86 (1551.7180)	777.15 (1551.7192)	69	15	95 ^c
LYY	6.33	765.35 (1528.7029)	765.11 (1528.7032)	72	18	98 ^c
IFY	7.48	757.35	757.02	77	15	92 ^c
IWY	4.91	776.85	776.67	71	16	98 ^c
IYY	6.24	765.35	765.59	71	14	95 ^c

^a Los péptidos son nombrados según los residuos que se encuentran en posiciones 5, 9 y 12
^b Rendimiento del compuesto aislado. ^c Purificado en cartuchos de fase reversa utilizando gradientes de ACN/H₂O. ^d No purificado. ^e Purificado por HPLC-Semipreparativo en columna de fase reversa C₁₈ (Sunfire, 5μ, 10 x 150 mm) usando un gradiente de ACN (0.1% HCO₂H)/H₂O (0.1% HCO₂H), 2-40% en 15 min, flujo 8 mL/min.

L3: (Ac-SSEEA⁵ARNAI⁹AAAr¹²N-NH₂)

Peptido	HPLC Eclipse C18 Grad (5-50) t _R (min)	[M+2H/2] ²⁺ Calculada (Masa Exacta)	[M+2H/2] ²⁺ Encontrada (Masa Exacta)	Pureza Crudo (%)	Rdto. (%)	Pureza (%)
FLF	11.37	749.35	749.20	54	22	97 ^c
FIF	11.15	749.35	749.20	82	12	97 ^c
FLW	11.64	768.86	768.65	45	15	99 ^c
FIW	11.52	768.86 (1535.7243)	768.65 (1535.7248)	51	15.5	99 ^c
FLY	9.93	757.35	757.22	57	12	99 ^c
FIY	9.63	757.35	757.22	58	18	97 ^c
WLF	11.91	768.86	768.65	79	15	96 ^c
WIF	11.55	768.86	768.65	61	9	99 ^c
WLW	11.97	788.36	788.23	45	11	99 ^c
WIW	11.70	788.36 (1574.7352)	788.23 (1574.7367)	46	13	98 ^c

WLY	10.50	776.85	776.67	57	17	97^c
WIY	10.17	776.85	776.67	42	14	94^c
YLF	9.99	757.35 (1512.7083)	757.18 (1512.7079)	73	13	97^c
YIF	9.73	757.35	757.15	60	10	90^c
YLW	10.21	776.86	777.21	54	8	90^c
YIW	9.73	776.86	776.81	33	3	90^c
YLY	8.69	765.35	765.65	49	2	99^e
YIY	8.38	765.35	765.18	63	8	85^c

^a Los péptidos son nombrados según los residuos que se encuentran en posiciones 5, 9 y 12

^b Rendimiento del compuesto aislado. ^c Purificado en cartuchos de fase reversa utilizando gradientes de ACN/H₂O. ^d No purificado. ^e Purificado por HPLC-Semipreparativo en columna de fase reversa C₁₈ (Sunfire, 5μ, 10 x 150 mm) usando un gradiente de ACN (0.1% HCO₂H)/H₂O (0.1% HCO₂H), 10-30% en 12 min, flujo 8 mL/min.

Se observaron péptidos con una delección de Arg (10-38%) en la mayoría de los casos.

L4: (Ac-SSEEA⁵ARNAR⁹AAAI¹²N-NH₂)

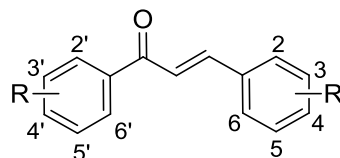
Peptido	HPLC Eclipse C18 Grad (5-50) t _R (min)	[M+2H/2] ²⁺ Calculada (Masa Exacta)	[M+2H/2] ²⁺ Encontrada (Masa Exacta)	Pureza Crudo (%)	Rdto. (%)	Pureza (%)
FFL	11.37	749.35	749.15	93	31	93 ^d
FFI	10.96	749.35 (1496.7134)	749.15 (1496.7114)	82	16	99 ^c
FWL	11.48	768.86 (1535.7243)	768.67 (1535.7290)	88	24	98 ^c
FWI	11.27	768.86	768.67	64	17	87 ^e
FYL	9.66	757.35	757.13	82	20	82 ^d
FYI	9.35	757.35	757.13	89	18	89 ^d
WFL	11.78	768.86	768.60	91	23	97 ^c
WFI	11.42	768.86	768.60	91	29	91 ^d
WWL	11.95	788.37	788.12	88	31	88 ^d
WWI	11.54	788.37	788.12	69	24	92 ^d

WYL	10.00	776.85	776.65	84	19	90^c
WYI	9.73	776.85	776.65	81	18	95^c
YFL	10.03	757.35	757.13	94	29	94^d
YFI	9.59	757.35	757.13	91	23	92^d
YWL	10.27	776.85 (1551.7192)	776.58 (1551.7208)	84	27	99^d
YWI	9.82	776.85	776.65	68	18	99^e
YYL	8.53	765.35	765.10	85	16	8^d
YYI	8.22	765.35	765.10	85	19	85^d

^a Los péptidos son nombrados según los residuos que se encuentran en posiciones 5, 9 y 12

^b Rendimiento del compuesto aislado. ^c Purificado en cartuchos de fase reversa utilizando gradientes de ACN/H₂O. ^d No purificado. ^e Purificado por HPLC-Semipreparativo en columna de fase reversa C₁₈ (Sunfire, 5μ, 10 x 150 mm) usando un gradiente de ACN (0.1% HCO₂H)/H₂O (0.1% HCO₂H), 10-40% ACN en 15 min para FWI y en 10 min para el análogo YWI.

ANEXO I CAPÍTULO 2



Comp ^b	2	3	4	5	2'	3'	4'	5'	6'	Imax ^c	EC ₅₀ ^c
1	H	H	OH	H	OH	H	OH	H	H	6.5±0.8	11.6±1.4
2	H	H	OBenzyl	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
3	H	OCH ₃	OBenzyl	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
4	H	H	Cl	H	OH	H	H	Br	H	-	-
5	H	OCH ₃	OH	H	OH	H	H	Br	H	-	-
6	H	Br	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
7	H	H	OCH ₃	H	OH	H	H	Br	H	-	-
8	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-
9	H	OCH ₃	OH	H	OH	H	OCH ₃	Cl	H	-	-
10	H	H	Cl	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	-	-
11	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	Cl	H	H	-	-
12	H	H	Cl	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
13	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	H	Cl	H	-	-

14	H	H	Cl	H	OH	H	H	F	H	-	-
15	H	H	OCH ₃	H	OH	Cl	H	H	H	-	-
16	OH	OCH ₃	H	H	H	H	Cl	H	H	-	-
17	H	H	OCH ₃	H	OH	H	CH ₃	Cl	H	-	-
18	H	H	OCH ₃	H	H	H	Cl	H	H	-	-
19	H	H	Cl	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
20	H	H	OCH ₃	H	Cl	H	Cl	F	H	-	-
21	H	H	Cl	H	OH	H	CH ₃	Cl	H	-	-
22	OH	H	H	H	OH	H	H	H	H	-	-
23	H	OH	H	H	OH	H	H	H	H	-	-
24	H	H	OH	H	OH	H	H	H	H	-	-
25	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	-	-
26	H	H	H	H	OH	H	H	OH	H	-	-
27	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H	OH	H	H	-	-
28	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	OH	H	H	-	-
29	H	H	OH	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
30	OCH ₃	H	H	H	OH	H	OH	H	H	-	-
31	H	H	OCH ₃	H	OH	H	OH	H	H	-	-
32	H	H	OCH ₃	H	OH	H	H	OH	H	-	-
33	H	OCH ₃	OH	H	OH	H	H	CH ₃	H	-	-
34	H	OH	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-

35	H	OCH ₃	OH	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
36	H	H	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	-	-
37	H	H	(CH ₃) ₂ N	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
38	H	H	F	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-	-
39	H	H	F	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
40	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	H	H	H	-	-
41	OCH ₃	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	H	-	-
42	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	H	H	H	-	-
43	H	OCH ₃	H	H	OH	H	OCH ₃	H	H	-	-
44	H	H	H	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	-	-
45	H	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	H	-	-
46	H	H	OCH ₃	H	OH	H	H	H	OCH ₃	-	-
47	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	H	CH ₃	H	-	-
48	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	H	CH ₃	H	-	-
49	H	H	CH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
50	H	NO ₂	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
51	H	H	(CH ₃) ₂ N	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
52	H	H	OCH ₃	H	OH	H	H	F	H	-	-
53	H	H	F	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
54	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	-	-

55	H	H	OH	H	H	H	H	H	H	-	-
56	H	H	H	H	H	H	OH	H	H	-	-
57	H	H	OCH ₃	H	OH	H	H	H	H	-	-
58	H	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	H	-	-
59	H	H	OCH ₃	H	OH	H	H	CH ₃	H	-	-
60	H	H	OCH ₃	H	CH ₃	H	OH	H	H	-	-
61	H	H	CH ₃	H	OH	H	H	H	H	-	-
62	OCH ₃	H	H	H	OH	H	H	CH ₃	H	-	-
63	H	OCH ₂ O		H	OH	H	H	H	CH ₃	-	-
64	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	OH	H	H	2.1±0.32	7.3±1.4
65	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
66	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	-	-
67	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
68	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	H	OCH ₃	-	-
69	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	-	-
70	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
71	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	H	OCH ₃	-	-
72	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
73	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
74	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	-	-
75	H	H	Cl	H	OH	Cl	H	Cl	H	-	-

76	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H	OCH ₃	H	H	-	-
77	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	H	-	-
78	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	H	OCH ₃	H	-	-
79	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	H	H	OCH ₃	-	-
80	OCH ₃	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
81	H	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	-	-
82	H		OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	-	-
83	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	H	-	-
84	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H		OCH ₃	H	-	-
85	H	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
86	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
87	H	OCH ₃	OH	H	OH	H	H	OH	H	6.5±0.4	17.2±1.9
88	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
89	H	NO ₂	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
90	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
91	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
92	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	-	-
93	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-	-
94	H	H	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-
95	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	-	-

96	H	H	H	H	OH	OH	OH	H	H	-	-
97	H	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	33±9.6 ^d	25±2.8 ^d
98	OH	H	H	H	OH	H	OH	H	H	2.6±0.18	4±0.9
99	OH	H	H	H	OH	H	H	OH	H	3.4±0.24	1.9±0.4
100	H	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	-	-
101	H	H	OH	H	OH	H	OH	H	OH	2.8±0.15	4±1.3

^b Numeración de los compuestos. ^c Imax: Respuesta máxima con respecto al control sin compuesto (Valor =1). EC₅₀: Concentración del compuesto (μM) a la que se obtiene la mitad de la respuesta máxima.

ANEXO II CAPÍTULO 2

Tabla AII.1. Actividad a 10 μM frente a $\alpha 7$ estimulado con ACh de Chalconas metoxiladas

Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a <i>IC₅₀</i> (μM)	Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a <i>IC₅₀</i> (μM)
2.16		35	2.65		100
2.17		45	2.66		53
2.18		32 3.64	2.102		75
2.19		47 4.3	2.41		65
2.20		50	2.42		*
2.21		88	2.47		38
2.22		91			

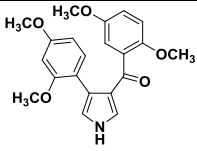
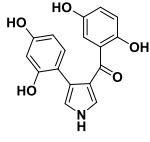
^aRespuesta del compuesto a 10 μM en ovocitos de $\alpha 7$. *No determinado

Tabla AII.2. Actividad a 10 μM frente a $\alpha 7$ estimulado con ACh de Chalconas metoxiladas reducidas

Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a IC ₅₀ (μM)	Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a IC ₅₀ (μM)
2.49		40	2.56		35
2.50		15	2.57		32
2.52		45	2.67		61
2.53		29	2.68		69
2.54		36	2.105		*
2.55		42			

^aRespuesta del compuesto a 10 μM en ovocitos de $\alpha 7$. *No determinado

Tabla AII.3. Actividad a 10 μM frente a $\alpha 7$ estimulado con ACh de derivados de chalcona

Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a <i>IC</i> ₅₀ (μM)	Comp	Estructura	Actividad a 10 μM (%) ^a <i>IC</i> ₅₀ (μM)
2.72		80	2.73		86

^aRespuesta del compuesto a 10 μM en ovocitos de $\alpha 7$.