

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Búsqueda, síntesis y evaluación de nuevos agentes interruptores de la vascularización tumoral

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Dolores Canela Gómez

Directores
Eva M^a Priego Crespo
M^a Jesús Pérez Pérez

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Tesis Doctoral

BÚSQUEDA, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL

M^a Dolores Canela Gómez

Instituto de Química Médica (CSIC)
Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



Instituto de Química Médica

BÚSQUEDA, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL

MEMORIA

Para optar al grado de Doctor en Farmacia por la
Universidad Complutense de Madrid

M^ª DOLORES CANELA GÓMEZ

Madrid, 2014

DIRECTORAS

Eva M^ª Priego Crespo

M^ª Jesús Pérez Pérez



Dña. Eva M^ª PPRIEGO CRESPO, Científico Titular de Organismos Públicos de Investigación (OPIs)

y

Dña. M^ª JESÚS PÉREZ PÉREZ, Profesor de Investigación de Organismos Públicos de Investigación (OPIs)

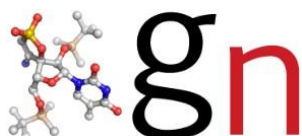
CERTIFICAN que el trabajo reflejado en la Presente Memoria, titulada "BÚSQUEDA, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL" ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Química Médica (CSIC) por Doña M^ª DOLORES CANELA GÓMEZ, autorizando así su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, mayo de 2014

FDO: Eva M^ª Priego Crespo

FDO: M^ª Jesús Pérez Pérez

C/ Juan de la Cierva, 3
28006 MADRID
Tel: (+34) 91 562 29 00
Fax: (+34) 91 564 48 53



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación *Nucleósidos y análogos como fuente de moléculas bioactivas* del Instituto de Química Médica (CSIC) (http://www.iqm.csic.es/grupo_nucleosidos/index.html) bajo la dirección de la Dra. Eva María Prego Crespo y la Dra. María Jesús Pérez-Pérez, y dentro del marco de los proyectos SAF2009-13914-C02-01 y SAF2012-39760-C02-01 del Plan Nacional, y BIPEDD2 (ref. P2010/BMD-2457) de la Comunidad de Madrid.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca JAE-Predoc financiada por el CSIC y el Fondo Social Europeo (FSE). En el transcurso de esta tesis se ha realizado una estancia predoctoral de dos meses en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica), y de dos semanas en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC).

ÍNDICE

Nota sobre puntuación y nomenclatura.....	i
Abreviaturas.....	iii
Summary.....	v

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

1. Introducción General.....	3
1.1. La terapia antivascular como estrategia frente al cáncer.....	3
1.2. Fisiología del endotelio y fisiopatología del endotelio tumoral.....	5
1.3. Clasificación y mecanismo de acción de los VDAs.....	6
1.4. Los microtúbulos como diana farmacológica frente al cáncer.....	11
1.5. El sitio de unión de colchicina en α,β -tubulina.....	14
2. Objetivos Generales.....	17
3. Bibliografía.....	19
1. CAPÍTULO 1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DERIVADOS DE 6-FENILAMINOPURINAS	
1.1. Introducción y objetivos.....	29
1.2. Resultados y discusión.....	31
1.2.1. Síntesis.....	31
1.2.2. Evaluación biológica.....	34
A) Evaluación en ensayos de proliferación celular.....	34
B) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular.....	36
1.3. Conclusiones.....	39
1.4. Bibliografía.....	41
2. CAPÍTULO 2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL DERIVADOS DE CHALCONAS	
2.1. Introducción y objetivos.....	47
2.2. Resultados y discusión.....	51
2.2.1. Síntesis.....	51
A) Síntesis de chalconas no sustituidas en la posición α ($R_1=H$).....	51
B) Síntesis de α -metilchalconas ($R_1=CH_3$).....	52
2.2.2. Evaluación de la actividad antiproliferativa celular.....	56
2.2.3. Estudios para determinar el mecanismo de acción.....	58

A) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular.....	58
B) Unión al sitio de colchicina en tubulina y determinación de K_o	59
C) Estudio del efecto sobre las fibras del huso mitótico.....	61
D) Estudio del efecto interruptor de la vascularización.....	62
E) Estudio del efecto sobre la morfología endotelial.....	62
2.2.4. Determinación de la solubilidad de 2.20.....	64
2.2.5. Síntesis y evaluación de profármacos de 2.20.....	64
A) Síntesis de profármacos de 2.20.....	66
B) Determinación de la solubilidad de 2.26 y 2.28.....	67
C) Evaluación del efecto antiproliferativo de 2.26 y 2.28.....	67
D) Determinación de la estabilidad de 2.28.....	68
2.3. Conclusiones.....	71
2.4. Bibliografía.....	73

3. CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL MEDIANTE TÉCNICAS DE CRIBADO VIRTUAL

3.1. Introducción y objetivos.....	81
3.2. Resultados y discusión.....	85
3.2.1. Cribado virtual.....	85
3.2.2. Síntesis y evaluación de análogos de 3.1.....	88
A) Síntesis de derivados sustituidos en el anillo D.....	88
B) Modificaciones en C y en D.....	91
3.2.3. Estudios de docking y dinámica molecular de 3.13c.....	94
3.2.4. Síntesis de derivados de 3.13c.....	96
A) Modificaciones en el anillo aromático D.....	96
B) Modificaciones en el anillo aromático A.....	99
C) Incorporación de heterociclos y grupos polares.....	103
3.2.5. Relaciones estructura-actividad antiproliferativa.....	107
3.2.6. Estudios para la determinación del mecanismo de acción.....	109
A) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular.....	109
B) Unión al sitio de colchicina en tubulina y determinación de K_o	110
C) Estudio del efecto sobre las fibras del huso mitótico.....	112
D) Estudio del efecto interruptor de la vascularización.....	112
E) Estudio del efecto sobre la morfología endotelial.....	113
F) Ensayo de migración celular.....	114
3.2.7. Estudios de estabilidad.....	115
3.3. Conclusiones.....	117

3.4. Bibliografía.....	119
CONCLUSIONES GENERALES.....	127
PARTE EXPERIMENTAL	
1. Métodos generales.....	135
2. Procedimientos experimentales de síntesis.....	137
2.1. Capítulo 1.....	137
2.2. Capítulo 2.....	144
2.3. Capítulo 3.....	152
3. Métodos computacionales.....	191
3.1. Preparación de la base de datos.....	191
3.2. Cribado virtual.....	191
3.3. Estudios de <i>docking</i> y dinámica molecular.....	192
A) <i>Docking</i>	192
B) Simulaciones de dinámica molecular.....	192
4. Ensayos biológicos.....	193
4.1. Proliferación celular.....	193
4.2. Análisis del ciclo celular.....	193
4.3. Formación de tubos.....	194
4.4. Unión a tubulina.....	194
4.5. Determinación de las constantes de unión.....	194
4.6. Inmunocitoquímica.....	195
4.7. Ensayos de migración e invasión celular.....	196
5. Ensayos de solubilidad y estabilidad.....	197
5.1. Medidas experimentales de solubilidad.....	197
5.2. Ensayos de estabilidad química en tampón fosfato.....	197
5.3. Ensayos de estabilidad en suero humano y extracto de hígado murino.....	197
6. Bibliografía.....	199

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y NOMENCLATURA

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la parte experimental de esta Memoria. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005 (<http://lema.rae.es/dpd/?key=punto>).

Las chalconas sintetizadas en el Capítulo 2 de esta Memoria se han nombrado según se describe en *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 7698–7710.

ABREVIATURAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en: *Journal of Organic Chemistry: "Guidelines for Authors"*. Enero 2014. (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/joceaah/joceaah_authguide.pdf).

Algunas abreviaturas de la guía anterior se han utilizado traducidas al castellano:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrometría de masas
Pf	Punto de fusión
RMN	Resonancia magnética nuclear

Otras abreviaturas empleadas son menos frecuentes y se detallan a continuación:

CA-1	Combretastatina A-1
CA-2	Combretastatina A-2
CA-4	Combretastatina A-4
CA-1P	Combretastatina A-1 fosfato
CA-4P	Combretastatina A-4 fosfato
CCTLC	Cromatografía centrífuga circular en capa fina (<i>Centrifugal Circular Thin Layer Chromatography</i>)
CD26	Dipeptidil-peptidasa tipo IV (DPP-IV)
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
COL	Colchicina
Comp	Compuesto
CS	<i>Combo Score</i>
DAMA	<i>N</i> -desacetil- <i>N</i> -2-mercaptoacetilo
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1 <i>H</i> -indol-6-carboxamida
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DMXAA	Ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético
EBI	<i>N, N</i> -etilen(bis)iodoacetamida
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAA	Ácido 8-flavon acético
F-actina	Filamentos de actina
FCS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Calf Serum</i>)
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IFN- γ	Interferón γ
K _a	Constante de asociación
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MLC	Cadena ligera de miosina (<i>Miosin Light Chain</i>)
MLCK	<i>Miosin light chain kinase</i>
MLC-p	<i>Phospho-miosin light chain</i>
MTC	2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona
MW	Microondas
PBS	Tampón fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDA	<i>Photodiode array</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
pERK	<i>Phospho-extracellular signal-regulated kinases</i>
P-gp	<i>Permeability glycoprotein</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ROCS	<i>Rapid overlay of chemical structures</i>
R-PT	(<i>R</i>)-(+)-etil-5-amino-2-metil-1,2-dihidro-3-fenilpirido[3,4-b]pirazin-7-il carbamato
SAPK2	<i>Stress-Activated Protein Kinase 2</i>
SDS	Docedil sulfato sódico
SLD	<i>Stathmin-like domain</i>
SH	Suero humano
TBME	<i>Terc</i> -butil metil éter
TEA	Trietilamina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VDA	Agente interruptor de la vascularización tumoral (<i>Vascular Disrupting Agent</i>)
VE	<i>Vascular endothelial</i>
VS	Cribado Virtual (<i>Virtual Screening</i>)

SUMMARY

IDENTIFICATION, SYNTHESIS AND EVALUATION OF NOVEL TUMOR VASCULAR DISRUPTING AGENTS

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Resistance mechanisms and lack of efficacy associated with current antineoplastic treatments demand novel approaches in the design of anticancer drugs. Vascular Disrupting Agents (VDAs) constitute an innovative approach in anticancer therapy owing to their original mechanism of action, complementary to other existing therapies. VDAs act directly and selectively over the tumor endothelium, inducing crucial morphological and functional changes. As a result, blood flow inside the tumor is quickly and dramatically decreased which unleashes the final necrosis due to the specific tumor hypoxia. The best studied VDAs are microtubule-destabilizing agents that bind the α,β -tubulin dimer at the colchicine-binding site, being combretastatine A4 (CA-4) the most representative compound. It is interesting to mention that VDAs with a colchicine-like profile are also able to behave as antimetabolic agents when affecting tumor cells, at concentrations slightly higher than those at which the antivasular effects are observed. This antimetabolic effect is closely related to the importance of the cytoskeleton of α,β -tubulin in the mitotic spindle formation. Therefore, this dual mechanism of action, that is, antivasular (against endothelial cells) and antimetabolic (against tumor cells), turns these drugs into very promising anticancer compounds. Moreover, colchicine-site binders are not recognized by P-gp and do not induce β -III tubulin isoform expression, which are the main causes of multidrug resistance (MDR) among microtubule-binding agents. It should be mentioned that there are currently a few VDA candidates in clinical trials, i.e., CA-4P, ZD6126, AVE-8062, ABT-751 and MPC-6827. However, they still present serious drawbacks that hamper their pharmaceutical validation, such as low chemical stability and limited solubility. Therefore, the development of new VDAs with a better pharmaceutical profile is critical.

Having said that, the central objective of this Thesis has consisted in the identification, synthesis, evaluation and optimization of new colchicine-site ligands that may afford novel VDAs with additional antimetabolic activity against tumor cells. The work undertaken has been organized in three Chapters. In Chapters 1 and 2 our approach has consisted in the design and synthesis of new compounds inspired in previously described VDAs, with the intention of improving their pharmacokinetic and pharmacological profile. The approach in Chapter 3 has been completely different since it has relied on a computational approach -in particular a virtual screening campaign- so as to identify novel hits that could be further explored and optimized.

RESULTS AND DISCUSSION

Chapter 1 has been focused on the synthesis and evaluation of compounds structurally related with MPC-6826, a quinazoline-based VDA which is under clinical evaluation. By incorporating a purine ring as central scaffold -a well-known privilege scaffold in medicinal chemistry- and maintaining similar substituents at the periphery, it was intended to keep crucial interactions with the target while enhancing solubility. The general structure of this family of compounds is shown in Figure A.

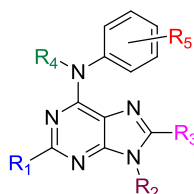


Figure A. General formula of the 6-(phenylamino)purine derivatives synthesized in Chapter 1.

The synthetic procedure employed started from 5-amino-4,6-dichloropyrimidines giving access to the final compounds in three to five steps. In addition, by employing a microwave-assisted protocol the reaction times were reduced and overall yields were improved compared to traditional heating. The synthesized purine analogues were evaluated in proliferation assays. Among the synthesized purines, five compounds exhibited cytotoxic activities with IC₅₀ values below 10 μ M, being close to 2 μ M for the most active one, a tetrahydroquinoline derivative. Furthermore, they induced a G2/M arrest in HeLa cells, a typical behavior observed with others colchicine-site binders.

Chapter 2 addressed the synthesis and evaluation of novel colchicine-site binders with a chalcone scaffold. The selection of this structural class of compounds was supported by previous reported examples of antimetabolic chalcones that bind at the colchicine-binding site. Due to the extensive presence of the dioxolane motif in natural products behaving like colchicine, this ring was incorporated at phenyl A in the proposed chalcone skeleton, as it is shown in the general formula in Figure B.

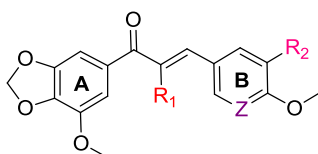


Figure B. General formula of the chalcone-based compounds synthesized in Chapter 2.

The synthetic protocol worked suitably, although some steps required to be optimized. In most cases the only isomer detected was the expected *E*-isomer, but in some cases, the *Z*-isomer was identified as the minor isomer. Interestingly, the isomerization was favored by exposition to light. Among the synthesized chalcones, two of them showed antiproliferative activity in the nanomolar range being similarly or even more active than the reference compounds colchicine and CA-4P.

Studies performed to determine the mechanism of action of this new series of chalcones revealed that they caused cell cycle arrest in G2/M phase by interfering with the mitotic spindle at metaphase. Their binding at colchicine-site in tubulin was confirmed by competition experiments using *N,N*-ethylene-bis(iodoacetamide) (EBI) and (R)-(+)-ethyl 5-amino 2-methyl-1,2-dihydro-3-

phenylpyrido[3,4-*b*]pyrazin-7-yl carbamate (R-PT). Moreover, the capacity of these chalcones to interrupt a preexisting vascular network and their effects in the endothelial cells morphology pointed to a potential antivasular activity for this family of compounds.

We designed a prodrug strategy in order to improve the water solubility of the most active compound, by conjugation of the parent compound with an amino acid or with a dipeptide. The biological evaluation of these prodrugs as antiproliferative agents showed that the amino acid derivative was 1000-fold less active than the parent compound while the dipeptide prodrug preserved the excellent activity of the parent drug. In addition, the dipeptide derivative was 2000-fold more soluble than the parent compound. Importantly, the dipeptidyl prodrug remained stable after 2 hours-incubation in PBS at 37 °C and was perfectly recognized by serum and liver extract enzymes, releasing the active drug in an efficient manner. All together, these results have led us to propose that the dipeptidyl derivative affords the right profile to be proposed for an “in vivo” experiment.

In Chapter 3 we envisaged the identification of VDAs with a scaffold different from those reported in the literature. For that purpose we carried out a ligand 3D shape similarity virtual screening (VS) approach, using as “query” the 3D structure of the colchicine-site binder TN-16, which occupies a buried area inside the β -subunit of tubulin than colchicine and analogues. The VS campaign afforded a list of potential hits that were purchased or synthesized. Fortunately, once tested, one of the hits -a cyclohexanedione derivative- showed a very significant antiproliferative activity, both in tumor cells and endothelial cells ($IC_{50} = 11-35 \mu M$). Its binding at the colchicine site was confirmed by 2-methoxy-5-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one (MTC) displacement. Therefore, we have undertaken the synthesis of structural analogues using a protocol that has allowed us to explore fragments A, C and D (Figure C).

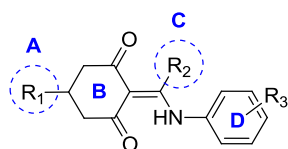


Figure C. General formula of the cyclohexanedione derivatives synthesized in Chapter 3.

Several of the new analogues synthesized have shown antiproliferative activity in the sub- μM range, being 100-fold more potent than the initial hit. It should be mentioned that the two most active compounds presented an IC_{50} value of 0.09 and 0.10 μM against HMEC-1 cells. Studies performed to determine the mechanism of action of these cyclohexanedione-related compounds revealed that they caused cell cycle arrest in G2/M, in the same manner as other colchicine-site ligands. This antimitotic effect was caused by their capacity to interact with tubulin and prevent the mitotic spindle formation during metaphase. Their binding at the colchicine site in tubulin was confirmed by competition assays with EBI and R-PT. Moreover, we have demonstrated that they may produce vascular disruption by interrupting established endothelial tubular networks. They also inhibited the migration and invasion of human breast carcinoma cells. The higher stability of the most active synthesized compound when compared to the initial hit, both in liver extract and human serum, constituted an additional evidence of the suitability of the structural changes performed. Thus, these tubulin-binding compounds represent a promising new family of antiproliferative and antivasular agents that should be further explored.

CONCLUDING REMARKS

In this Thesis we have addressed the identification, synthesis and evaluation of three new families of colchicine-site binders in α,β -tubulin. The final aim has been to provide novel chemical entities that could be useful as antitumor agents by combining a vascular disrupting activity against endothelial cells and antimetabolic activity against tumor cells. Making use of robust and well established chemical procedures, and adapting the described procedures when required, the three families of compounds have been explored in order to establish structure-activity relationships. Their biological evaluation, particularly those studies performed with compounds described in Chapters 2 and 3, strongly supports their interest as very promising antimetabolic and antivascular candidates.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El término cáncer engloba una gran variedad de enfermedades, todas ellas diferentes en etiología, naturaleza y sintomatología pero que comparten una característica común: la presencia de células anormales que se dividen de forma autónoma y sin control, invadiendo a nivel local y a distancia distintos tejidos. Estas células son las denominadas células cancerosas, y son las nuevas masas de tejidos que se originan como consecuencia del crecimiento descontrolado de dichas células lo que se conoce como neoplasia o tumor maligno. Etiológicamente, el cáncer es el resultado de alteraciones en genes fundamentales en el ciclo celular, aquéllos que controlan los procesos fisiológicos implicados en el crecimiento, la división y la muerte celular. Aunque estos cambios genéticos pueden ser debidos a factores hereditarios, la mayoría de ellos son causados por factores ambientales o del estilo de vida. Se conocen más de 200 tipos de cánceres diferentes, siendo los más frecuentes los de próstata, mama, pulmón y el cáncer colorrectal.^{1,2*}

La malignidad de las neoplasias es variable, en función de las características biológicas de cada tumor. Según la agresividad del tipo celular, las células cancerosas pueden invadir y destruir el tejido a su alrededor en muy distinto grado. No obstante, el pronóstico de la enfermedad viene principalmente determinado por la capacidad de las células para desprenderse del foco inicial y entrar al torrente sanguíneo o al sistema linfático, diseminándose a distancia y ocasionando el crecimiento de nuevos tumores en otras partes del cuerpo alejadas de la localización primitiva. Este fenómeno es lo que se denomina metástasis tumoral.^{1,2}

Lamentablemente, el cáncer constituye la segunda causa de defunción en los países desarrollados: alrededor de 8 millones de personas mueren de cáncer cada año, siendo los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama los que causan un mayor número de muertes anuales. La OMS prevé que la incidencia de cáncer aumente en todo el mundo de forma progresiva conforme al aumento en la esperanza de vida, alcanzando en 2030 la cifra del 75% de la población, y provocando 13,1 millones de muertes en dicho año. Actualmente, alrededor del 90% de las defunciones se derivan de las metástasis y del fracaso terapéutico, el cuál es debido a la aparición de distintos tipos de mecanismos de resistencia por parte de las células tumorales. Por todo ello, la búsqueda de estrategias terapéuticas innovadoras para el tratamiento del cáncer es en este momento una prioridad en nuestra sociedad.^{2,3}

1.1. La terapia antivascolar como estrategia frente al cáncer

El desarrollo de nuevas redes de vasos sanguíneos que puedan aportar oxígeno y nutrientes es una de las características esenciales para el crecimiento de tumores sólidos.⁴ Al mismo tiempo, el torrente sanguíneo es una de las vías por las que las células del tumor primario colonizan zonas distantes del organismo en el proceso de metástasis. Dada la importancia de un adecuado flujo sanguíneo en el entorno tumoral para la expansión celular y la metástasis tumoral, la búsqueda de compuestos capaces de inhibir dicha vascularización ocupa un papel primordial en el estudio actual de nuevas estrategias antineoplásicas. Mientras la quimioterapia convencional citotóxica ejerce el efecto antitumoral por medio de la inhibición del crecimiento de las células neoplásicas, la terapia antivascolar afecta a las células endoteliales en el entorno tumoral y así ejerce un efecto indirecto sobre las células tumorales. Es importante destacar que las células endoteliales no sólo son más

**Nota: la Bibliografía se recoge al final de esta Introducción General, y al final de cada capítulo.*

estables que las células tumorales a nivel genético, sino que además presentan una tasa de recambio de aproximadamente 120 días.⁵⁻⁸ Esta longevidad de las células endoteliales, unida a su mayor estabilidad genómica, convierten a los vasos tumorales en una diana complementaria y muy atractiva en el diseño de terapias combinadas frente al crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis.

Existen dos clases de terapia antivascular: los fármacos antiangiogénicos, que inhiben el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos;^{9,10} y los fármacos que actúan destruyendo la vasculatura preexistente en el entorno tumoral, también llamados agentes interruptores de la vascularización tumoral o VDAs (Vascular Disrupting Agents).^{9,11} Las principales diferencias entre ambos grupos se reflejan en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales diferencias entre los dos tipos de terapia antivascular.

FÁRMACOS ANTIANGIOGÉNICOS	FÁRMACOS VDAs
Administración crónica	Administración aguda
Inhiben la neovascularización	Destruyen la vasculatura del tumor
Previenen o limitan el crecimiento del tumor	Provocan una necrosis tumoral intensa
Particularmente activos en fases iniciales y nuevas metástasis	Especialmente activos frente a grandes masas tumorales

En la práctica, es difícil encontrar fármacos que se encuadren estrictamente en cualquiera de estas dos estrategias dado que un VDA con frecuencia tiende a presentar ciertas características antiangiogénicas, y un compuesto antiangiogénico puede manifestar algunas propiedades típicas de un VDA.¹² Esencialmente, la terapia antiangiogénica presenta un efecto citostático sobre las células endoteliales, mientras que los VDAs actúan por un mecanismo citotóxico. Así, los fármacos antiangiogénicos, al inhibir la neovascularización, previenen el crecimiento y la diseminación de los tumores sólidos; ésto justifica que su pauta de administración sea crónica y que se enfoquen al tratamiento en las fases tempranas de la enfermedad.⁹ Por su parte, los VDAs, administrados de forma aguda, interrumpen de forma rápida y dramática el flujo sanguíneo preestablecido en el tumor, producen la isquemia y posterior necrosis del mismo durante las 24 horas posteriores a la administración, y por ello estarían indicados frente a estadios avanzados de la enfermedad.¹³ Además, estos fármacos serían especialmente eficaces para tratar grandes masas tumorales, las cuales generalmente son resistentes a la terapia citotóxica convencional.¹⁴

Además de la aplicación oncológica, otras indicaciones de estos fármacos VDAs se encuentran en el campo de la oftalmología, en particular para el tratamiento de ciertas retinopatías, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE),¹⁵ principal causa de ceguera en personas mayores de 50 años en los países desarrollados. Alrededor de 150 millones de personas en todo el mundo sufren esta enfermedad -concretamente en España hay 800.000 pacientes afectados- y la OMS estima que en las próximas décadas va a triplicarse su incidencia.¹⁶ La aplicación terapéutica de los VDAs en la DMAE supone una nueva aproximación en el tratamiento de esta enfermedad, existiendo además un creciente interés en base a los distintos estudios clínicos que se están llevando a cabo en la actualidad.^{15,17}

1.2. Fisiología del endotelio y fisiopatología del endotelio tumoral

En 1982 la profesora británica Juliana Denekamp planteó que la oclusión selectiva de los vasos sanguíneos tumorales podía favorecer la regresión de la masa tumoral. Esta hipótesis fue fruto de su extenso trabajo en el campo de las células endoteliales, donde constató que aquellas que pertenecían a distintos tumores experimentales presentaban una tasa de proliferación muy superior con respecto a las que estaban asociadas a tejidos normales. Este fenómeno llevó a Denekamp a postular que las diferencias entre ambos endotelios podía ser de utilidad para el diseño de nuevos fármacos antitumorales (más tarde denominados VDAs) que específicamente actuaran sobre la vasculatura tumoral.^{18,19} Dicha hipótesis fue posteriormente validada por medio de inmunotoxinas específicamente dirigidas al endotelio tumoral de un modelo murino,²⁰ y se convirtió en el pilar fundamental para nuevas investigaciones centradas tanto en el estudio de las características particulares de este endotelio tumoral, como en el diseño de VDAs.

Como se ha comentado anteriormente, los VDAs actúan sobre las células endoteliales, células poco propensas a fenómenos de resistencia.⁵⁻⁷ Éstas son células aplanadas que recubren la pared interna o luminal de los vasos sanguíneos, donde forman un epitelio plano simple que es el endotelio vascular. Las células endoteliales forman una superficie lisa que facilita el flujo laminar de la sangre y previenen la adherencia de las células sanguíneas. Entre las numerosas funciones de estas células podemos destacar las siguientes: constituyen una barrera permeable para el transporte de oxígeno y nutrientes entre el plasma y el intersticio celular; sintetizan sustancias vasodilatadoras (como el óxido nítrico) así como vasoconstrictoras; regulan la angiogénesis y el remodelado vascular; producen factores de crecimiento, hormonas y citoquinas que regulan importantes procesos fisiológicos; y también segregan sustancias que regulan la coagulación y la fibrinólisis.

La selectividad de los VDAs por el endotelio tumoral se debe a las diferencias estructurales existentes entre éste y los vasos fisiológicos (Figura 1).²¹ En los tejidos normales, el aporte sanguíneo se realiza por medio de una red de vasos madura, ordenada, eficiente y estrictamente regulada por la demanda de oxígeno y nutrientes de cada tejido, lo que además condiciona la liberación de los denominados factores pro-angiogénicos o bien anti-angiogénicos, según estimulen o inhiban la formación de nuevos vasos sanguíneos. En el endotelio tumoral, la agresividad en el crecimiento de las células neoplásicas ocasiona que los vasos sanguíneos tumorales no sólo presenten una elevada tasa de proliferación, sino que ésto vaya acompañado de una ausencia de pericitos y de deficiencias

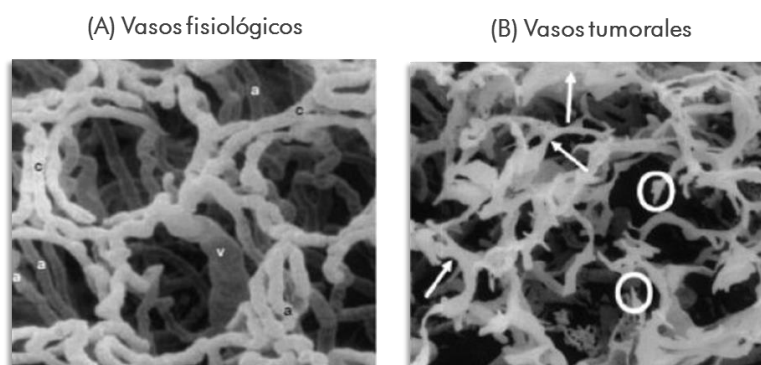


Figura 1. Evidencia biológica del carácter inmaduro y deficiente de los vasos sanguíneos tumorales. Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se observan vasos fisiológicos (A) y tumorales (B). Adaptación de la referencia *Cancer* 2010, 116, 1859-1871.

en la membrana basal y a nivel del músculo liso. Así, estos vasos tumorales se caracterizan por ser más finos, tortuosos, frágiles e inmaduros. Tal y como se puede observar en Figura 1B, al hecho de que los vasos sean muy irregulares tanto en diámetro como en longitud, se suma la existencia de terminaciones ciegas y protuberancias anormales.²² Además, estas células endoteliales del tumor suelen presentar una morfología irregular, de modo que la falta de planaridad se traduce en que la superficie luminal del vaso sea discontinua, con pérdida de puntos de conexión intercelulares. Esto desencadena una mayor permeabilidad a macromoléculas de la sangre que conduce a una mayor presión intersticial, lo cual se agrava debido al defecto existente en el drenaje linfático.¹² Todo ello en conjunto aumenta la resistencia vascular, dificultando el flujo sanguíneo. Como resultado, cualquier descenso en la perfusión sanguínea -que apenas tendría consecuencias en cualquier otro tejido- podría ser catastrófico para el tumor.²³⁻²⁵ Así, los VDAs conducen a la isquemia y a la necrosis del tumor, efecto no sólo rápido sino también muy selectivo, ya que la vascularización en el resto de tejidos apenas resulta alterada.²⁶

A pesar del efecto necrótico tan acusado que los VDAs producen sobre las masas tumorales, los ensayos clínicos llevados a cabo con este tipo de compuestos apoyan la necesidad de ser administrados en terapias combinadas y no en terapia única. Si bien los VDAs producen una necrosis rápida e intensa en el centro del tumor -zona que por su naturaleza altamente hipóxica y ácida es difícilmente accesible para la quimioterapia y la radioterapia- las células tumorales de la periferia no se ven afectadas dado que se abastecen a través de vasos fisiológicos de los tejidos en contacto, y no sufren así apenas perturbaciones tras la administración de un VDA.²⁷⁻²⁹ Sin embargo, al incluir los VDAs en terapias combinadas, el efecto antineoplásico se potencia, al mismo tiempo que se minimizan los efectos secundarios (por ejemplo, hipertensión) por reducción de la dosis. Las combinaciones que se están evaluando en ensayos clínicos incluyen bien radio o quimioterapia (generalmente carboplatino y/o paclitaxel), terapias frente a las cuales las células periféricas bien oxigenadas y resistentes al VDA sí son generalmente sensibles;³⁰ o bien agentes antiangiogénicos (principalmente bevacizumab), más efectivos contra las células tumorales de la periferia donde el proceso de angiogénesis ocurre de forma más intensa.³¹

1.3. Clasificación y mecanismo de acción de los VDAs

Debido a la fisiopatología del endotelio tumoral, la vasculatura tumoral constituye una diana muy atractiva y de gran potencial para el tratamiento del cáncer. Básicamente, los VDAs engloban a un conjunto de compuestos que actuando sobre dianas primarias diferentes producen cambios morfológicos y funcionales en el endotelio tumoral. Así, atendiendo a la complejidad molecular del agente interruptor de la vascularización, los VDAs se clasifican en dos grandes grupos: los VDAs basados en ligandos fisiológicos y las pequeñas moléculas VDAs.³²

El primer grupo engloba diferentes ligandos, generalmente péptidos o anticuerpos, dirigidos frente a antígenos o receptores específicos de las células endoteliales tumorales.³³ Si bien conceptualmente este grupo presenta un elevado interés, su desarrollo clínico actual está progresando muy lentamente, entre otros motivos por los elevados costes asociados a la producción biotecnológica de estos ligandos. El segundo grupo, constituido por las moléculas pequeñas VDAs, a su vez se divide en dos grandes familias en función del mecanismo de acción.

La primera familia la constituyen los compuestos derivados del ácido 8-flavonacético (FAA) (i.1) (Figura 2). Si bien el mecanismo de acción es complejo y aún no ha sido del todo dilucidado, el efecto global es consecuencia de la producción de sustancias vasoactivas en el endotelio tumoral (como serotonina y óxido nítrico), unido a la liberación de citoquinas por parte de los macrófagos locales, como interferones (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que desempeña un papel fundamental. Esto da como resultado la apoptosis de las células endoteliales, lo que desencadena la necrosis hemorrágica del tumor.³⁴ Dentro de esta familia, el candidato más prometedor en la actualidad es el ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (i.2, DMXAA, vadimezan o ASA404)³⁵ (Figura 2), el cual ha demostrado un efecto muy potente en la regresión tumoral tanto en estudios preclínicos como clínicos.^{28,36,37}

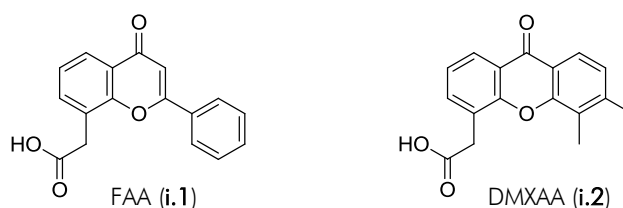


Figura 2. Estructura del ácido 8-flavonacético (FAA) (i.1) y de su derivado DMXAA (i.2).

La segunda familia de pequeñas moléculas, objeto principal de estudio de la presente memoria, está integrada por unos compuestos que actúan desestabilizando los microtúbulos intracitoplasmáticos. El mecanismo de acción de todos ellos es por unión al heterodímero de α , β -tubulina, concretamente en el sitio de unión de la colchicina (i.3) (Figura 3).

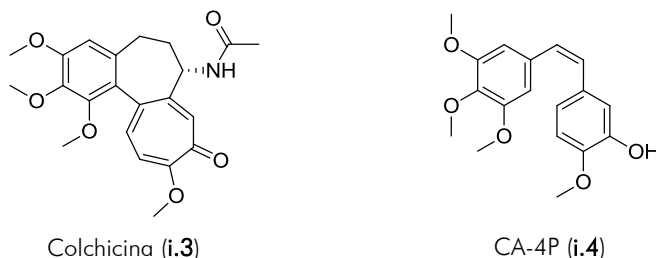


Figura 3. Estructura de la colchicina (i.3) y de la combretastatina A-4 o CA-4 (i.4).

La colchicina es un alcaloide de origen natural con propiedades antimetóticas muy potentes, que está presente en diferentes especies de plantas, principalmente en el cólchico (*Colchicum autumnale*). Si bien ha sido empleada en la medicina popular desde tiempos ancestrales, con frecuencia a modo de veneno debido a su extrema toxicidad, su uso medicinal fue descrito por primera vez en *De Materia Médica* de Dioscórides (siglo I a.C.) en forma de extracto para el tratamiento de los dolores agudos de gota. Este legado se ha conservado a lo largo de los años, encontrando en las Farmacopeas más recientes esta indicación analgésica de la colchicina. Paradójicamente, no fue hasta la década de los 40 cuando se describió por primera vez el potente efecto antitumoral de la colchicina y cuando comenzaron los estudios acerca de su mecanismo de acción antimetótico.³⁸ En el año 1968 fue empleada para la caracterización de una proteína desconocida hasta la fecha, proteína que formaba parte de los microtúbulos celulares y a la que la colchicina se unía específicamente: la tubulina.³⁹ Aunque su extrema toxicidad limita sus indicaciones actuales al tratamiento de la gota y la fiebre mediterránea familiar,⁴⁰ la colchicina posee un elevado interés en oncología para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales, dado que se ha

demostrado que aquellos compuestos que se unen en su mismo sitio en tubulina presentan propiedades antineoplásicas por un mecanismo VDA. En este sentido, la combretastatina A-4 (i.4, CA-4) (Figura 3), compuesto también de origen natural obtenido de la corteza del arbusto *Combretum caffum*,⁴¹ se une a este sitio de colchicina en tubulina, siendo el primer inhibidor de la polimerización de microtúbulos descrito con propiedades interruptoras de la vascularización a una dosis bien tolerada.⁴² Considerada como el principal prototipo para el diseño de nuevos VDAs y objeto de una extensa investigación, su desarrollo clínico ha sido inviable debido a su baja solubilidad y a su escasa vida media. Esto es consecuencia de la isomerización de la *cis*-olefina al derivado *trans* que es inactivo, en presencia calor, luz y/o medio ácido durante el almacenamiento y la administración.⁴³ La toxicidad de la colchicina (i.3) por un lado, así como la insolubilidad e inestabilidad de la CA-4 (i.4) por otro, justifican el arranque de numerosos programas de química médica focalizados en el desarrollo de nuevos VDAs que solventen los problemas de estos compuestos.

Así, los esfuerzos en la búsqueda de nuevos VDAs han culminado en la síntesis del derivado de la colchicina ZD6126⁴⁴ (i.5) y los profármacos de combretastatinas (Figura 4), tales como el fosfato de CA-4⁴⁵⁻⁴⁷ (i.6, CA-4P o Fosbretabulin) o el derivado de serina⁴⁸ (i.7, AVE-8062 u Ombrabulin), así

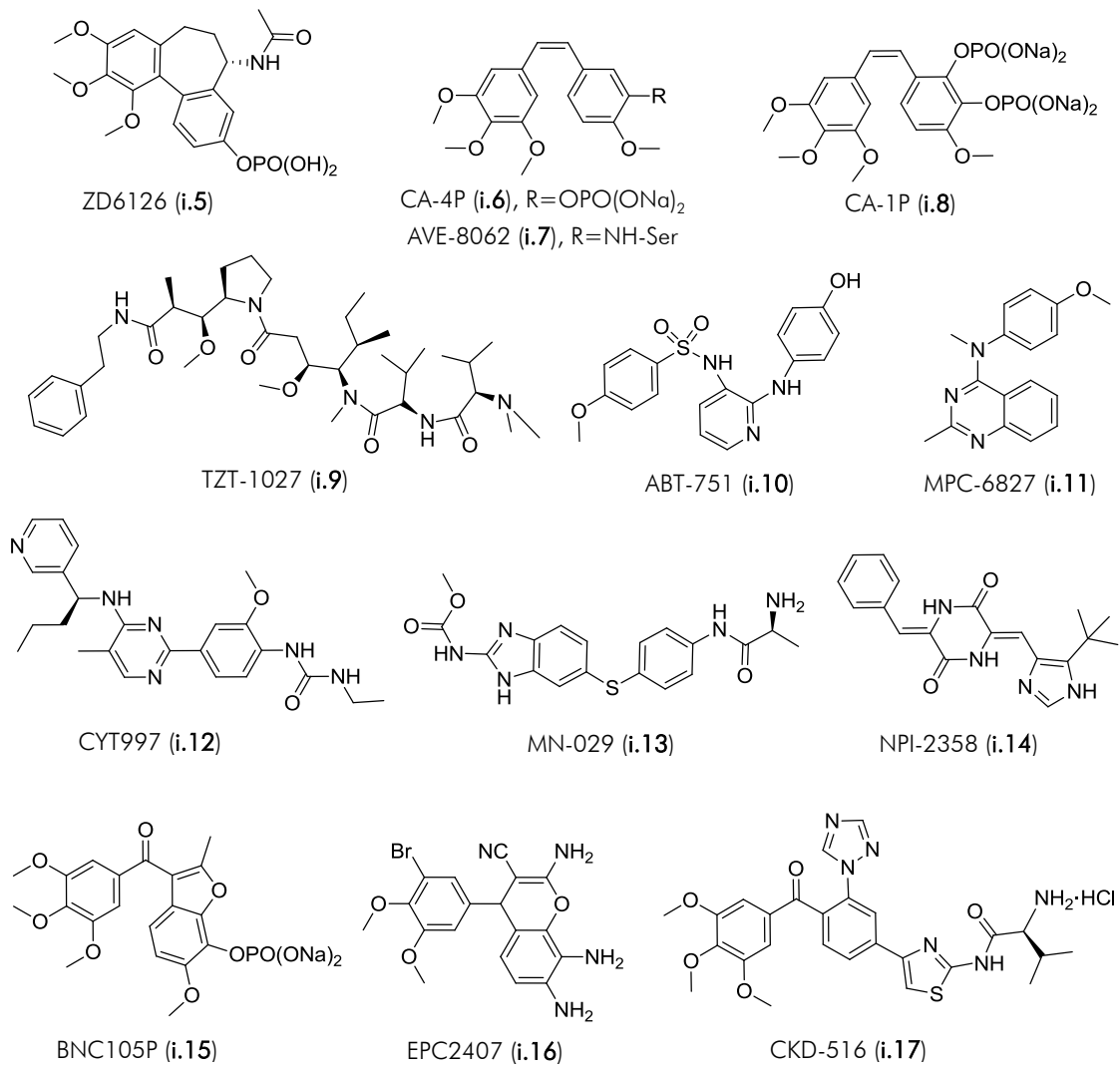


Figura 4. Estructura de las moléculas pequeñas VDAs, ligandos del sitio de colchicina, que están en evaluación clínica.

como el difosfato de combretastatina A1⁴⁹⁻⁵¹ (i.8, CA-1P u OXi-4503). Todos estos compuestos han demostrado ser seguros y eficaces en modelos animales, con un adecuado perfil de beneficio/toxicidad, encontrándose actualmente en investigación clínica avanzada (Fases II y III) con resultados muy prometedores. Además, otros compuestos de origen natural como el derivado de dolastina-10⁵² (i.9, TZT-1027 o Soblidotin), o de origen sintético, como los compuestos ABT-751⁵³ (i.10), MPC-6827⁵⁴⁻⁵⁶ (i.11, Azixa), CYT997^{57,58} (i.12), MN-029⁵⁹ (i.13, Denibulin), NPI-2358⁶⁰ (i.14), BNC105P^{61,62} (i.15), EPC2407^{63,64} (i.16, Crinobulin) y CKD-516⁶⁵ (i.17), están siendo objeto de evaluación clínica.

Estos VDAs inhiben la polimerización de los microtúbulos, y de esta forma afectan a la formación del citoesqueleto endotelial.⁶⁶ Esto va a desencadenar importantes cambios morfológicos que finalmente desatarán en cuestión de minutos el colapso vascular y la consiguiente necrosis tumoral. El citoesqueleto está constituido básicamente por filamentos de actina (F-actina), filamentos intermedios y microtúbulos de tubulina, y es un elemento dinámico que desempeña funciones fundamentales en el ciclo vital de cualquier célula ya que no sólo mantiene la forma de la misma, sino que también facilita la movilidad celular y ejerce un importante papel en el tráfico y en la división celular. Así, esta estructura es crucial para la adecuada función del endotelio ya que permite la movilidad, invasión, unión, alineamiento y proliferación de las células endoteliales.

En particular, la desestabilización de los microtúbulos por parte los VDAs desencadena la activación de la cascada de señalización de RhoA⁶⁷ (Figura 5), proteína de gran importancia ya que actúa como el coordinador intracelular de las interacciones de F-actina y los microtúbulos del

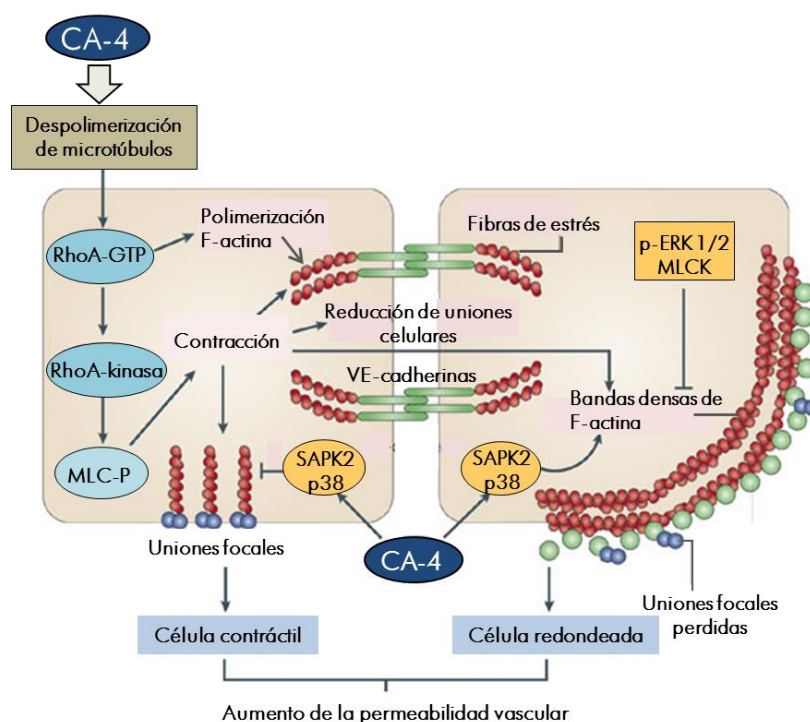


Figura 5. La combretastatina A-4 (CA-4) activa una cascada de señalización en las células endoteliales iniciada por RhoA-GTP, desencadenando cambios morfológicos y un aumento de la permeabilidad vascular. CA-4 activa la cascada de RhoA-kinasa que conduce a la fosforilación de MLC (*Miosin Light Chain*) y F-actina, la formación de fibras de estrés, uniones focales y la disociación de las uniones mediadas por VE-cadherinas. CA-4 también activa SAPK2 (*Stress-Activated Protein Kinase 2*) que promueve nuevas uniones focales, así como la condensación de las fibras de F-actina, proceso inhibido por ERK-1 y 2 y MCLK (*Miosin Light Chain Kinase*). Todo ello conduce a células contráctiles y morfológicamente redondeadas, lo que fomenta un aumento de la permeabilidad vascular. Adaptación de la referencia *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5, 423-435.

citoesqueleto.⁶⁸ Como consecuencia se produce la fosforilación de las fibras ligeras de miosina (MLC), lo que se traduce en la contracción de las fibras de estrés de F-actina y en la agregación de las mismas formando focos de adhesión. Así, las células endoteliales devienen contráctiles y adoptan una morfología redondeada. Igualmente, la estimulación de las kinasas activadas por mitógenos (MAPKs), así como de señales asociadas al estrés oxidativo mediadas por SAPK2/p38, juegan un papel fundamental en este proceso.^{12,33}

Además, la activación conjunta de RhoA y SAPK2/p38 desencadena un aumento de la permeabilidad paracelular en el endotelio. Asimismo, la contracción y agregación de la F-actina produce la desestabilización de las uniones adherentes intercelulares mediadas principalmente por VE-cadherinas.⁶⁹ Esta mayor permeabilidad endotelial provoca un descenso en el flujo sanguíneo y un aumento del hematocrito, todo ello por pérdida de volumen plasmático que sale al espacio intersticial. El aumento de la viscosidad sanguínea unido a la pérdida de planaridad de las células endoteliales, las cuales adoptan una morfología redondeada, explica la mayor resistencia al flujo sanguíneo (Figura 6). Como consecuencia, se produce una congestión y una obstrucción de los vasos que se traduce en una inhibición absoluta del flujo sanguíneo en el tumor y finalmente, en una necrosis tumoral intensa.^{12,66,70}

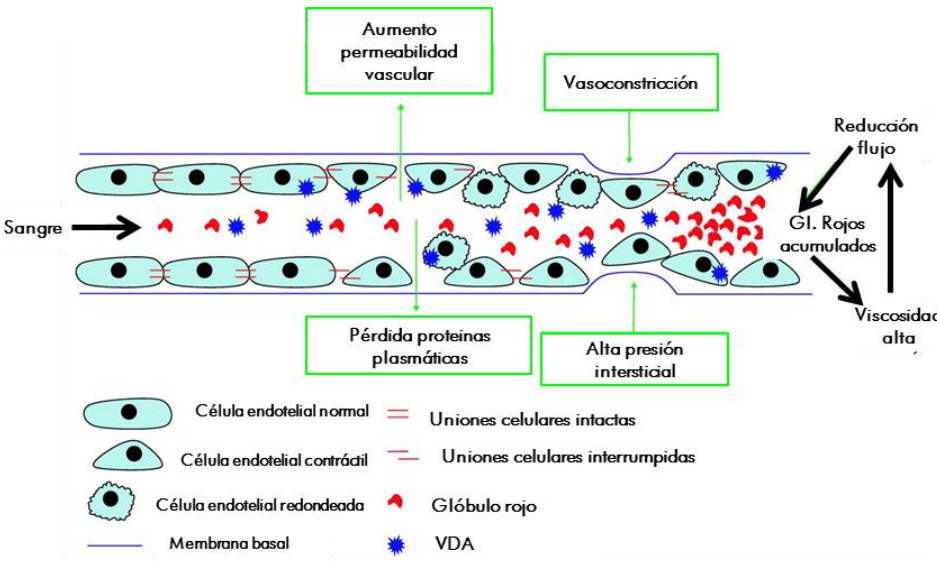


Figura 6. Mecanismo de acción de los fármacos VDA despolimerizantes de microtúbulos. Los cambios morfológicos en las células endoteliales, unidos a la interrupción de las uniones celulares entre dichas células, da lugar a la mayor permeabilidad paracelular y a la pérdida de proteínas del plasma, lo que aumenta el hematocrito y la densidad sanguínea. Esto, junto a la alta presión intersticial, explica la mayor resistencia al flujo sanguíneo y el colapso vascular final. Adaptación de la referencia *Expert Opin. Ther. Targets* 2007, 11, 1443-1457.

Respecto a otros fármacos antivascuales, los compuestos VDA que se unen al sitio de la colchicina en tubulina presentan un mecanismo de acción antimitótico adicional en células en estado proliferativo -como las células neoplásicas- a una concentración algo superior a la empleada para lograr el efecto interruptor vascular.⁷¹ Este mecanismo de acción dual de los VDA basados en colchicina frente a células endoteliales y también frente a células tumorales les convierte en un grupo terapéutico de gran potencial. En el siguiente apartado se explicará algo más en detalle el mecanismo antimitótico de aquellos fármacos que por unión a los microtúbulos de α,β -tubulina, inducen la inhibición del crecimiento de la masa tumoral.

1.4. Los microtúbulos como diana farmacológica frente al cáncer

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas que componen el citoesqueleto celular y desarrollan funciones cruciales, dado que mantienen la forma celular, y son responsables del transporte, la señalización y la división celular. Los microtúbulos están constituidos por heterodímeros de α y β -tubulina (Figura 7), que son proteínas globulares, muy semejantes entre sí, y con un peso molecular de 50 kDa aproximadamente.⁷² Existen diferentes isotipos en humanos con distinta distribución tisular: 6 formas de α -tubulina y 7 de β -tubulina. Estos heterodímeros se asocian entre sí formando protofilamentos lineales; 13 de estos filamentos son los que a su vez se asocian formando un microtúbulo, que es un cilindro hueco con un diámetro interno y externo de 12 y 25 nm respectivamente (Figura 7A). Esta estructura tiene un extremo negativo (-) constituido por subunidades de la isoforma α , y un extremo positivo (+) que expone β -tubulina, el cual crece y decrece más rápidamente.⁷³ De esta forma, los microtúbulos son polímeros muy dinámicos (Figura 7B), lo que es imprescindible para el desarrollo de sus funciones biológicas. Así, los procesos de polimerización y despolimerización ocurren de manera continua y equilibrada, hallándose estrictamente regulados.

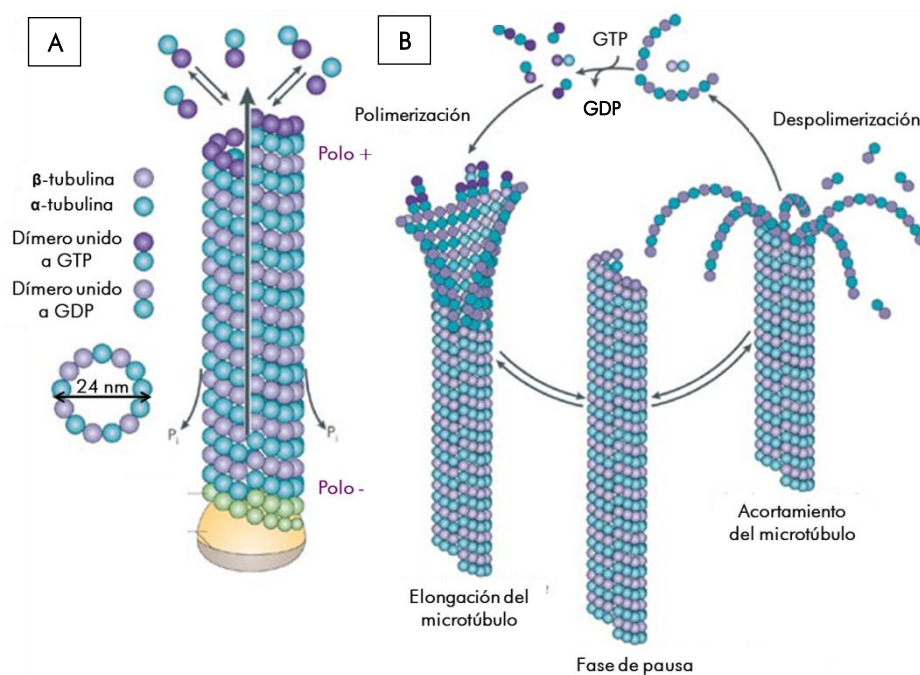


Figura 7. Estructura y dinámica de los microtúbulos celulares. (A) Los heterodímeros de α,β -tubulina se ensamblan formando 13 protofilamentos que se disponen formando un cilindro hueco, con un polo + y un polo -. (B) Dinámica de polimerización/despolimerización de los microtúbulos mediada por la unión e hidrólisis de GTP. Adaptación de la referencia *Nat. Rev. Neurosci.* 2009, 10, 319-332.

La dinámica de polimerización/despolimerización de los microtúbulos viene dictada por la unión e hidrólisis de GTP en el heterodímero de α,β -tubulina (Figura 7B).⁷¹ Así, cada subunidad del mismo está unida a una molécula de GTP, el cual desempeña una función estructural en la subunidad α , mientras que la hidrólisis a GDP ocurre en la β -tubulina. Durante la fase de elongación (polimerización), el proceso de adición de unidades de GTP- α,β -tubulina al polo (+) del microtúbulo ocurre de manera más rápida que la hidrólisis de las moléculas de GTP unidas al mismo, por lo que este extremo en crecimiento se encuentra constituido fundamentalmente por unidades de GTP-tubulina. Es importante resaltar que la unión de GTP es responsable de la adopción de una

disposición recta y rígida de los heterodímeros de α,β -tubulina, la cual es necesaria para la elongación del microtúbulo.⁷⁴ En la fase de retracción (despolimerización) predomina la hidrólisis de GTP del extremo libre, y por ello los heterodímeros de tubulina que constituyen el microtúbulo se encuentran principalmente unidos a moléculas de GDP. Esto favorece una disposición curva de los heterodímeros, perdiéndose así parte de los contactos laterales entre los protofilamentos. Esta desestabilización trae consigo la liberación de unidades de GDP- α,β -tubulina al citosol, donde pueden intercambiar el GDP por GTP y de este modo incorporarse de nuevo a un microtúbulo en fase de crecimiento.⁷⁵

Los microtúbulos constituyen una diana farmacológica de gran importancia en el tratamiento del cáncer ya que son estructuras esenciales para el progreso de la mitosis celular, donde constituyen las fibras del huso mitótico. Esta estructura de microtúbulos posibilita la separación de los cromosomas duplicados, permitiendo así que las nuevas células generadas posean la misma dotación genética. La mitosis es un proceso rápido que requiere una elevada dinámica de los microtúbulos del huso, los cuales se disponen longitudinalmente de un polo a otro de la célula y presentan características particulares según la fase del proceso de división (Figura 8). Así, en la prometafase los cromosomas se unen a través de sus cinetocoros a los microtúbulos, mientras que en la etapa siguiente, la metafase, los microtúbulos desplazan a los cromosomas y los alinean en el centro de la célula formando la placa ecuatorial. Por último, durante la anafase y telofase los microtúbulos se retraen hacia los polos, consiguiendo la separación de las cromátidas hermanas de cada cromosoma y la distribución equitativa de los mismos en las dos células hijas.

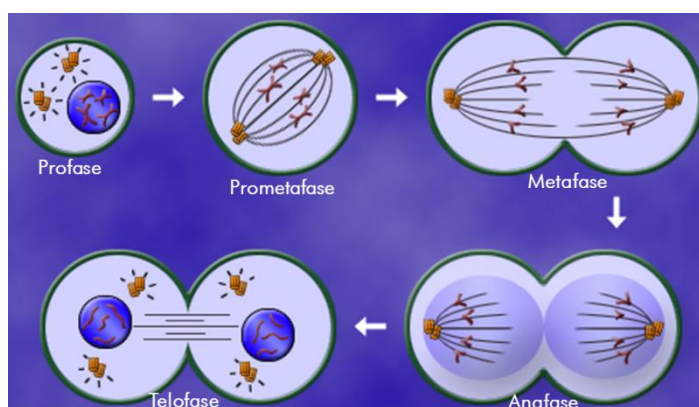


Figura 8. El proceso de mitosis celular. Representación gráfica de las distintas etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

Debido al estado de hiperproliferación característico de toda célula neoplásica, los compuestos que se unen a los microtúbulos e interfieren con su dinámica celular presentan propiedades antitumorales evidentes por inhibición de la mitosis.⁷⁶ Así, muchos de los fármacos antineoplásicos empleados actualmente como tratamiento de primera línea en una gran variedad de tumores actúan por este mecanismo. Estos agentes antimitóticos se clasifican en dos grandes grupos, según impidan o promuevan el proceso de polimerización de los microtúbulos.

El primer grupo está constituido por los agentes desestabilizantes, que actúan inhibiendo la polimerización de microtúbulos. En esta clase se han identificado dos sitios de unión: el sitio de los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina y vinflunina), que se encuentra en la interfaz de dos heterodímeros de α,β -tubulina, es decir entre la subunidad $\alpha 1$ de un

heterodímero y la subunidad $\beta 2$ del otro (Figura 9, en azul); y el sitio de la colchicina, localizado en la interfaz de las dos subunidades de α, β -tubulina de un mismo heterodímero, más próximo de la subunidad β (Figura 9, en morado). En ambos casos se forma un complejo estable, el cual retiene la morfología curva característica de la unión a GDP. Esto imposibilita que nuevas unidades de α, β -tubulina se adicione al extremo del microtúbulo en crecimiento, o bien desestabiliza los heterodímeros que constituyen el propio microtúbulo.^{77,78}

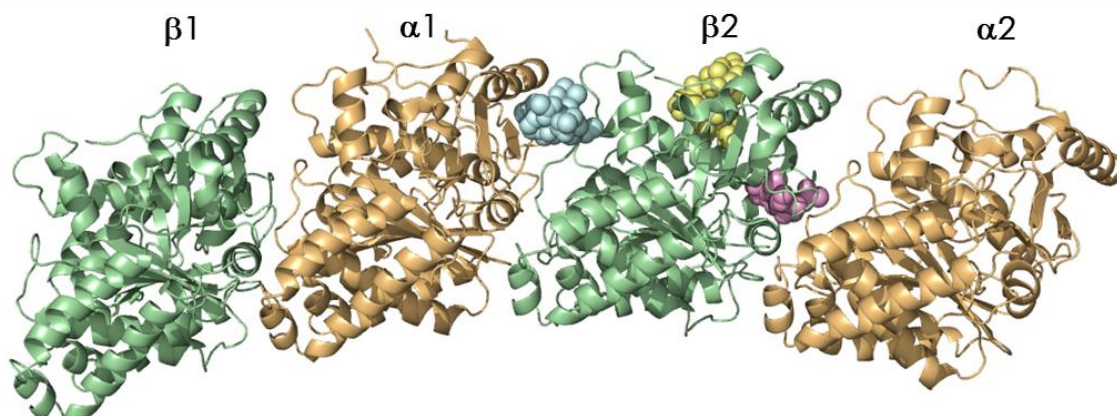


Figura 9. Localización de los tres sitios de unión en dos heterodímeros de α, β -tubulina. Los monómeros de α -tubulina se representan en marrón claro y los de β -tubulina en verde. Vinblastina (azul), paclitaxel (amarillo) y DAMA-colchicina (morado) se unen a sitios diferentes en α, β -tubulina.

El segundo grupo son los agentes estabilizantes, que estimulan la polimerización. Estos compuestos se unen a tubulina en el sitio de unión de los taxanos, localizado en la subunidad β (Figura 9, en amarillo), perteneciendo a este grupo el docetaxel y paclitaxel, así como otros compuestos estructuralmente no relacionados como las epotilonas y discodermolidas. La unión de estos compuestos a la forma polimérica estabiliza la conformación recta de los dímeros de α, β -tubulina, favoreciendo así las interacciones laterales entre los filamentos, y a su vez impidiendo que ocurra la despolimerización del microtúbulo.⁷⁹

Si bien los taxanos y la vinblastina y análogos constituyen tratamientos de primera línea en la terapia anticancerosa, la colchicina y derivados no han encontrado el mismo éxito como antimitóticos. No obstante, las propiedades VDAs de este último grupo les abre nuevas perspectivas. Además, la actividad dual antimitótica-VDA presenta gran interés desde el punto de vista de los fenómenos de resistencia y del fracaso terapéutico.⁸⁰ En concreto, los VDAs basados en colchicina estudiados hasta la fecha no presentan resistencias frente a la sobreexpresión de la proteína P-gp,⁸¹ así como a la aparición de la isoforma III de la subunidad β en sustitución a la isoforma I,⁸² que es la forma sensible y predominante en la mayoría de los tejidos. Estas observaciones avalan el interés terapéutico de este grupo de compuestos.

1.5. El sitio de unión de colchicina en α,β -tubulina

Los resultados experimentales obtenidos con el derivado DAMA-colchicina (**i.18**) pusieron de manifiesto que la colchicina se une al heterodímero de α,β -tubulina en la interfase con la subunidad α ⁸³ (Figura 10; la estructura de DAMA-colchicina (**i.18**) se representa en la Figura 11). El tamaño del sitio de colchicina es de aproximadamente 4-5 Å y el volumen queda confinado en la subunidad β por la hélice 7 (H7) -donde se encuentra la Cys β 241-, las láminas S8 y S9, el loop 7 (T7) y la hélice 8 (H8), quedando próximo del loop 5 (T5) de la subunidad α (Nota: ver referencia⁸⁴ y leyenda de la Figura 12 para la localización numérica de los residuos de cada elemento de la estructura secundaria de tubulina). Así, el anillo de trimetoxifenilo de colchicina se encuentra en el interior de un bolsillo hidrofóbico en la subunidad β donde interactúa con la Cys β 241 mediante un puente de hidrógeno a través del metoxilo en posición 4, así como con los residuos de Ala β 250, Leu β 252, Leu β 255, Ala β 354 y Cys β 356. Es característico que la unión de colchicina se acompañe de una apertura de dicho espacio, como consecuencia del desplazamiento del loop 7 (T7).⁸⁵ Además, esta unión está asociada a una inducción de la actividad GTP-asa del heterodímero de tubulina,⁸⁶ debido al cambio conformacional que en este bolsillo se produce como consecuencia de la interacción.

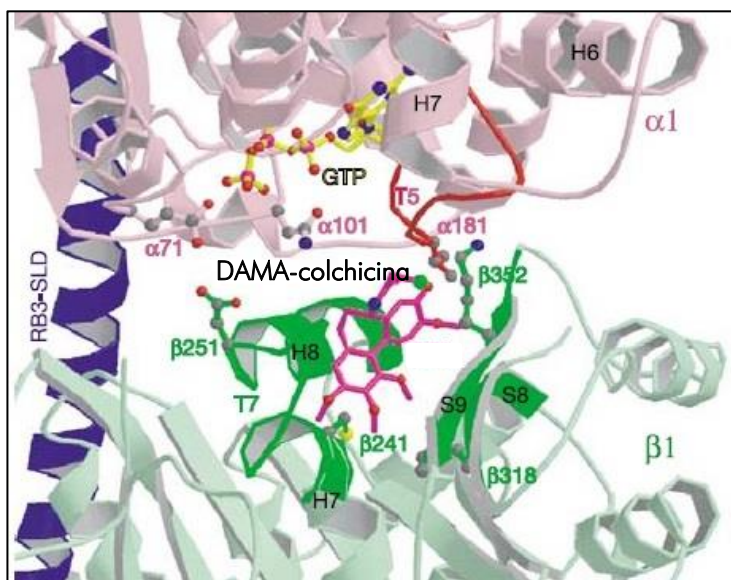
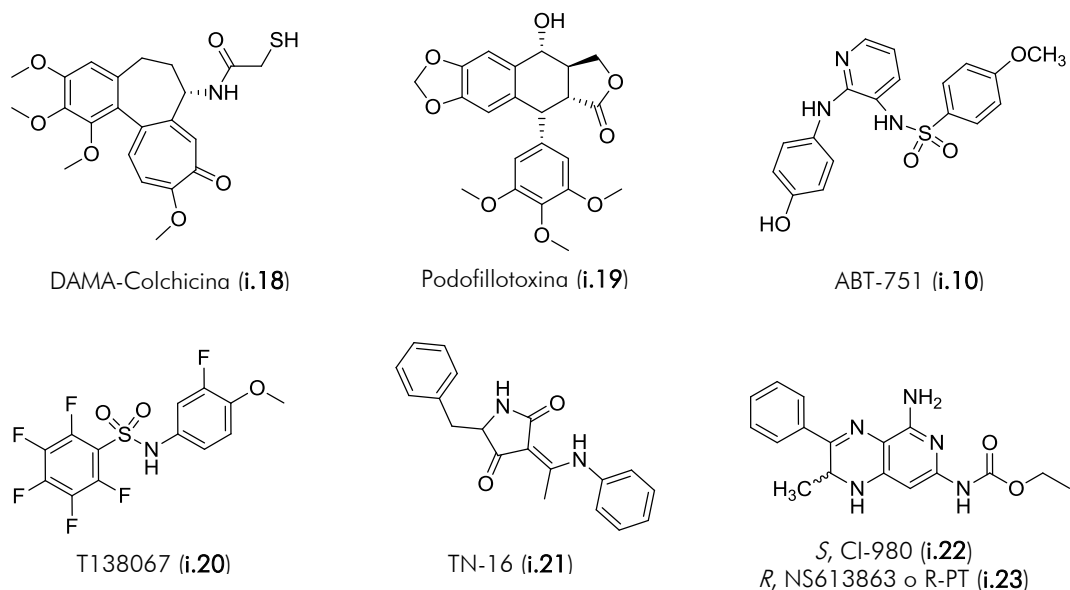


Figura 10. Sitio de unión de colchicina en el complejo tubulina:DAMA-colchicina:RB3-SLD. El sitio viene delimitado por las láminas S8 y S9, el loop T7, y las hélices H7 y H8 de la subunidad β . Existen también interacciones con el loop T5 de la subunidad α . Adaptación de la referencia *Nature* 2004, 428, 198-202.

Ravelli y col. asimismo describieron las interacciones moleculares de la podofilotoxina (**i.19**) (Figura 11) en el sitio de colchicina de tubulina (PDB:1SA1). Se trata también de un compuesto de origen natural extraído de *Podophyllum peltatum* relacionado estructuralmente con la colchicina, con la que tiene en común la presencia de un grupo trimetoxifenilo. La podofilotoxina ocupa el mismo sitio que la colchicina, y aunque se dispone de manera diferente en el mismo, ambos compuestos insertan el anillo de trimetoxifenilo en el mismo bolsillo hidrofóbico. Al igual que colchicina, la podofilotoxina establece también un enlace de hidrógeno con la Cys β 241 de la hélice 7 (H7) a través del metoxilo aceptor en *para*. No obstante, esta interacción no induce la actividad GTP-asa característica de la unión de colchicina.⁸⁷



Compuesto	Código PDB	Resolución (Å)	Referencia
DAMA-Colchicina (i.18)	1SA0	3.58	Ravelli, R.B.G. <i>Nature</i> 2004
Podofilotoxina (i.19)	1SA1	4.20	Ravelli, R.B.G. <i>Nature</i> 2004
ABT-751 (i.10)	3HKC	3.80	Dorléans, A. <i>PNAS</i> 2009
T138067 (i.20)	3HKE	3.60	Dorléans, A. <i>PNAS</i> 2009
TN16 (i.21)	3HKD	3.70	Dorléans, A. <i>PNAS</i> 2009
CI-980 (i.22, isómero S)	3N2K	4.00	Barbier, P. <i>J Biol Chem</i> 2010
NSC613863 (i.23, isómero R)	3N2G	4.00	Barbier, P. <i>J Biol Chem</i> 2010

Figura 11. Moléculas cuyas estructuras de Rayos X del complejo con α,β -tubulina se encuentran resueltas.

En los últimos años, se han descrito varios complejos cristalinos de compuestos estructuralmente muy diferentes a colchicina y podofilotoxina en el sitio de unión de colchicina en tubulina (Figuras 11 y 12).⁸⁰ El compuesto ABT-751 (i.10) (Figura 11) se introduce en una región más profunda de la subunidad β respecto a la que ocupa la DAMA-colchicina (Figura 12A),⁸⁵ no interactuando así con la subunidad α . Además, el grupo fenólico establece un puente de hidrógeno con el residuo de Tyr β 202 de la lámina S6.

El compuesto T138067 (i.20) (Figura 11) presenta un modo de unión dual, con una componente covalente. El primero de ellos (Figura 12D) se superpone con el modo de unión de colchicina, interactuando con la lámina S9 (Leu β 202, Arg β 320) y el loop T7 (Ala β 250, Phe β 244). El segundo (Figura 12E y 13) se caracteriza por la formación de un enlace covalente con la Cys β 241, a través del anillo pentafluorado.⁸⁵

TN16 (i.21) (Figura 11) se halla incluso más en el interior de la subunidad β que el compuesto i.10, donde interactúa mediante fuerzas de Van der Waals con las láminas S4, S5 y S6 de esta subunidad, en concreto con los residuos Thr β 239, Val β 238, Tyr β 202, Glu β 200 y Phe β 169 (Figura 12B y 13).⁸⁵

Los compuestos i.22 y i.23 (Figura 11) son enantiómeros y se unen también en una región más profunda del sitio de colchicina (i.23 en la Figura 12C), al igual que TN16 (i.21), no estableciendo tampoco interacciones con la subunidad α . Sólo destacar que el átomo de nitrógeno del anillo de

piridina forma un puente de hidrógeno con el Glu β 200 y el sustituyente carbamato se dispone en un bolsillo donde interacciona con los residuos Thr β 239, Tyr β 202, Asn β 167, Gln β 136, y Ile β 4.⁸⁸

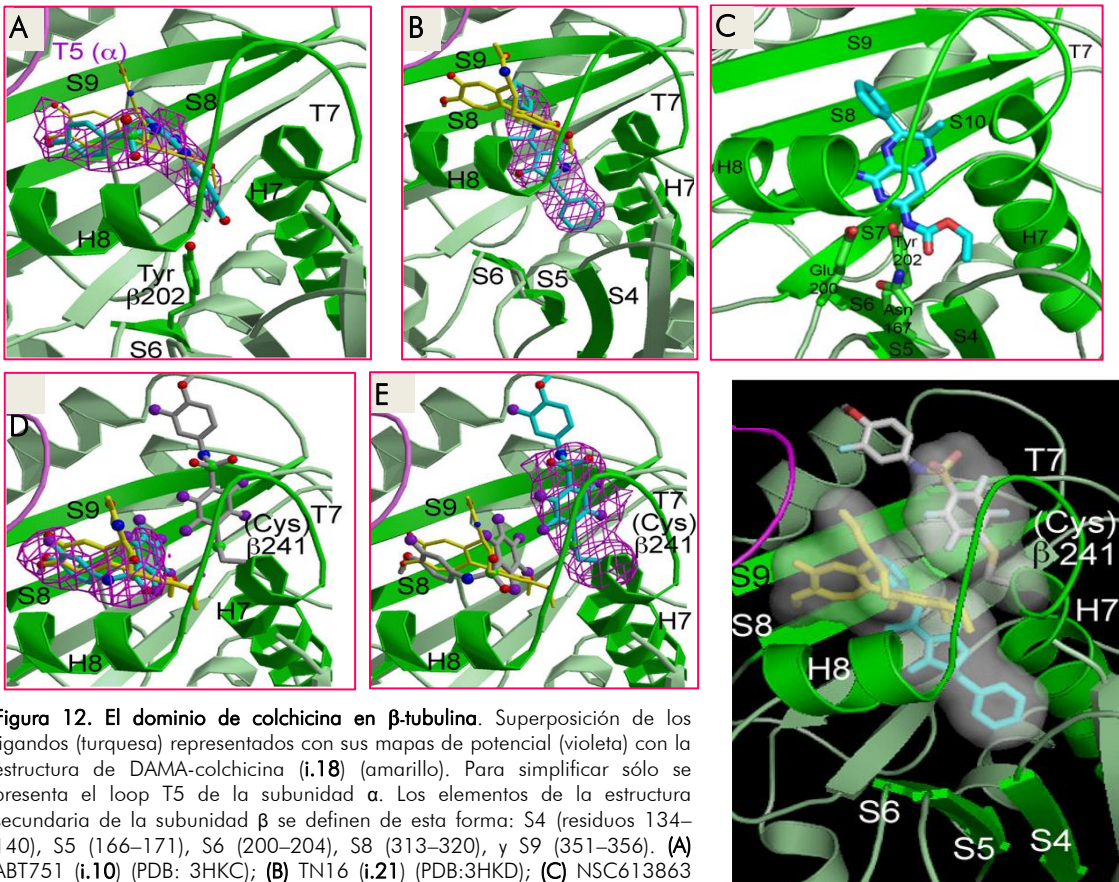


Figura 12. El dominio de colchicina en β -tubulina. Superposición de los ligandos (turquesa) representados con sus mapas de potencial (violeta) con la estructura de DAMA-colchicina (i.18) (amarillo). Para simplificar sólo se presenta el loop T5 de la subunidad α . Los elementos de la estructura secundaria de la subunidad β se definen de esta forma: S4 (residuos 134–140), S5 (166–171), S6 (200–204), S8 (313–320), y S9 (351–356). (A) ABT751 (i.10) (PDB: 3HKC); (B) TN16 (i.21) (PDB:3HKD); (C) NSC613863 (i.23) (PDB: 3N2G); (D y E) Los dos modos de unión de T138067 (i.20) (PDB: 3HKE): uno superpone con colchicina (D, turquesa; E: gris) y el otro presenta una unión covalente a Cys β 241 (E, turquesa; D: gris). Adaptación de la referencia *PNAS* 2009, 106, 13775-9.

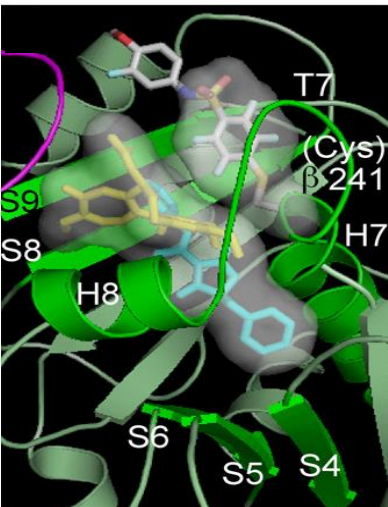


Figura 13. Volumen ocupado por los ligandos del dominio de colchicina. DAMA-colchicina (i.18) (amarillo), TN-16 (i.21) (turquesa) y T138067 (i.20) (unión covalente) (gris). Adaptación de la referencia *PNAS* 2009, 106, 13775-9.

En resumen, el sitio de colchicina es un bolsillo bastante profundo localizado en la interfase de las dos subunidades de tubulina que forman el heterodímero. Debido a la amplitud del sitio y a que la mayoría de los inhibidores que se unen a este sitio presentan una superposición sólo parcial con la propia colchicina, algunos autores han propuesto que el sitio de colchicina debería ser considerado en realidad como un dominio de unión (Figura 13).^{85,89} Así, en este “dominio de unión de colchicina” se distinguen tres regiones fundamentales: una zona principal localizada en la subunidad β y delimitada por las láminas S8 y S9, el loop T7, y las hélices H7 y H8, donde se disponen la mayoría de los ligandos; y luego dos zonas accesorias, una en la interfaz con la subunidad α , y otra que constituye una región más profunda de la subunidad β , próximo a las láminas S4, S5 y S6.

2. OBJETIVOS GENERALES

A lo largo de estos 15 últimos años, nuestro grupo de investigación ha trabajado en el campo de compuestos antivasculares tumorales, en concreto en la búsqueda de nuevos agentes antiangiogénicos inhibidores de la enzima timidina fosforilasa.⁹⁰⁻¹⁰⁰ Como se ha comentado en la Introducción, tanto la inhibición de la angiogénesis como la interrupción de la vascularización mediante VDAs comparten muchas características comunes y tienen una misma finalidad, que muy resumidamente consiste en reducir o suprimir el aporte sanguíneo al tumor en crecimiento. Por ello, los VDAs resultaban muy complementarios a nuestra línea de investigación en agentes antiangiogénicos.

En particular, los VDAs ligandos del sitio de colchicina en tubulina presentan un gran potencial dentro del arsenal terapéutico antineoplásico, ya que inhiben el crecimiento tumoral por dos mecanismos distintos: por interrupción de la vascularización tumoral y por inhibición de la mitosis de las células neoplásicas. Además, cabe destacar que hasta la fecha no se han descrito fenómenos de resistencia para estos compuestos.⁸¹ Si bien los estudios clínicos que se están llevando a cabo con este tipo de VDAs avalan la utilidad clínica de los mismos, existen serias limitaciones que dificultan el desarrollo clínico de estos compuestos, tales como la escasa solubilidad en agua, la inestabilidad metabólica o el inadecuado perfil farmacocinético.⁸⁰ De esta forma, actualmente hay una clara necesidad de desarrollar nuevos VDAs que solventen estos inconvenientes, y que a su vez no comprometan ni el efecto antiproliferativo ni la actividad antivascolar.

Por ello, el objetivo global de esta Memoria ha consistido en la búsqueda, síntesis, evaluación y optimización de nuevos ligandos del sitio de colchicina en tubulina, que pudiesen desestabilizar los microtúbulos celulares y conducir así a la inhibición tanto de la división celular como de la vascularización tumoral. El trabajo realizado se ha recopilado en tres capítulos pero el abordaje experimental se ha realizado de forma casi paralela, por lo que el orden de los mismos en esta Memoria no responde a criterios cronológicos.

El trabajo que se describe en los dos primeros capítulos, se centra en el diseño de compuestos estructuralmente relacionados con otros VDAs descritos en la literatura, con el propósito de obtener análogos con un mejor perfil tanto farmacológico como farmacocinético. Así, en el Capítulo 1 se ha abordado la síntesis y la optimización de derivados de purinas, en concreto de 6-fenilaminopurinas. Estos compuestos están estructuralmente relacionados con MPC-6826 (i.11), molécula que se encuentra actualmente en evaluación clínica y que además presenta actividad en células que sobreexpresan el transportador P-gp, principal mecanismo de resistencia de las células neoplásicas.⁵⁴⁻⁵⁶ El Capítulo 2 se ha centrado en la síntesis y evaluación de derivados de chalconas que incorporan un motivo de dioxolano sobre uno de los fenilos. En este caso se ha buscado combinar el esqueleto base de chalcona, presente en compuestos naturales y sintéticos con numerosas propiedades terapéuticas –destacando entre ellas la actividad antimitótica–, con el motivo de dioxolano, muy extendido en ligandos del sitio de colchicina aislados de productos naturales. En el tercer capítulo se propuso la identificación de nuevos ligandos del dominio de colchicina en tubulina estructuralmente no relacionados con el resto de compuestos descritos en la bibliografía. Para ello se emplearon las técnicas de cribado virtual basadas en la forma de ligandos conocidos del dominio de colchicina en α,β -tubulina. Los posibles “hits” así identificados fueron evaluados como

agentes antiproliferativos, determinando asimismo la capacidad de los mismos para unirse al sitio de colchicina en tubulina. Todo ello ha constituido el punto de partida de un programa de síntesis de análogos estructurales enfocado a la identificación de derivados más activos y con mejores propiedades farmacocinéticas.

La evaluación de la actividad antiproliferativa en cultivo celular de los compuestos sintetizados en estos tres capítulos así como la gran mayoría de ensayos para determinar el mecanismo de acción, se han llevado a cabo por el grupo de la Dra. Sandra Liekens en el Rega Institute for Medical Research de la Katholieke Universiteit Leuven (Bélgica). Gracias a una estancia de dos meses en el laboratorio de la Dra. Liekens, pude realizar algunos de los experimentos que en esta Memoria se describen. Los ensayos de medición de las constantes de asociación con tubulina se han realizado en el laboratorio del Dr. Fernando Díaz en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CIB-CSIC), a donde me desplazé durante varias semanas para realizar estas determinaciones.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/>. (Fecha consulta: 14/04/2014).
2. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. (Fecha consulta: 14/04/2014).
3. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA-Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69-90.
4. Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* **1992**, *3*, 65-71.
5. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2005**, *438*, 932-936.
6. Kerbel, R. S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* **1991**, *13*, 31-36.
7. Kerbel, R.; Folkman, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 729-739.
8. Kliche, K.; Jeggler, P.; Pavenstädt, H.; Oberleithner, H. Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Eur. J. Physiology* **2011**, *462*, 209-217.
9. Siemann, D. W.; Bibby, M. C.; Dark, G. G.; Dicker, A. P.; Eskens, F. A. L. M.; Horsman, M. R.; Marmé, D.; LoRusso, P. M. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 416-420.
10. Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **2011**, *146*, 873-887.
11. McKeage, M. J.; Baguley, B. C. Disrupting established tumor blood vessels: an emerging therapeutic strategy for cancer. *Cancer* **2010**, *116*, 1859-1871.
12. Tozer, G. M.; Kanthou, C.; Baguley, B. C. Disrupting tumour blood vessels. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 423-435.
13. Mita, M. M.; Sargsyan, L.; Mita, A. C.; Spear, M. Vascular-disrupting agents in oncology. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2013**, *22*, 317-328.
14. Siemann, D. W. Vascular targeting agents. *Horizons in Cancer Therapeutics* **2002**, *3*, 4-14.
15. Kanthou, C.; Tozer, G. M. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. *Int. J. Exp. Path.* **2009**, *90*, 284-294.
16. Centro de Información sobre la Degeneración Macular. <http://www.cidema.org/index.php/dmae>. (Fecha consulta: 21/04/2014).
17. Ibrahim, M. A.; Do, D. V.; Sepah, Y. J.; Shah, S. M.; Anden, E. V.; Hafiz, G.; Donahue, J. K.; Rivers, R.; Balkissoon, J.; Handa, J. T.; Campochiaro, P. A.; Nguyen, Q. D. Vascular disrupting agent for neovascular age related macular degeneration: a pilot study of the safety and efficacy of intravenous combretastatin A-4 phosphate. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *14*, 1-10.
18. Denekamp, J. Endothelial Cell Proliferation as a Novel Approach to Targeting Tumor Therapy. *Br. J. Cancer* **1982**, *45*, 136-139.
19. Denekamp, J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* **1993**, *66*, 181-196.
20. Burrows, F. J.; Watanabe, Y.; Thorpe, P. E. A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5954-5962.

21. Konerding, M. A.; Malkusch, W.; Klapthor, B.; Ackern, C. v.; Fait, E.; Hill, S. A.; Parkins, C.; Chaplin, D. J.; Presta, M.; Denekamp, J. Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 724-732.
22. Siemann, D. W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* **2011**, *37*, 63-74.
23. Kakolyris, S.; Fox, S. B.; Koukourakis, M.; Giatromanolaki, A.; Brown, N.; Leek, D.; Taylor, M.; Leigh, I. M.; Gatter, K. C.; Harris, A. L. Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *Br. J. Cancer* **2000**, *82*, 844-851.
24. Konerding, M. A.; Fait, E.; Gaumann, A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 1354-1362.
25. Tozer, G. M.; Lewis, S.; Michalowski, A.; Aber, V. The relationship between regional variations in blood flow and histology in a transplanted rat fibrosarcoma. *Br. J. Cancer* **1990**, *61*, 250-257.
26. Galbraith, S. M.; Maxwell, R. J.; Lodge, M. A.; Tozer, G. M.; Wilson, J.; Taylor, N. J.; Stirling, J. J.; Sena, L.; Padhani, A. R.; Rustin, G. J. S. Combretastatin A4 phosphate has tumor antivascular activity in rat and man as demonstrated by dynamic magnetic resonance imaging. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2831-2842.
27. Vaupel, P.; Hockel, M. Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *Int. J. Oncol.* **2000**, *17*, 869-879.
28. Hinnen, P.; Eskens, F. Vascular disrupting agents in clinical development. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1159-1165.
29. Iversen, A. B.; Busk, M.; Horsman, M. R. Induction of hypoxia by vascular disrupting agents and the significance for their combination with radiation therapy. *Acta Oncol.* **2013**, *52*, 1320-1326.
30. Horsman, M. R.; Siemann, D. W. Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11520-11539.
31. Fox, S. B.; Gatter, K. C.; Bicknell, R. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res.* **1993**, *54*, 4161-4163.
32. Hasani, A.; Leighl, N. Classification and toxicities of vascular disrupting agents. *Clin. Lung Cancer* **2011**, *12*, 18-25.
33. Thorpe, P. E. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 415-27.
34. Ching, L. M.; Cao, Z.; Kieda, C.; Zwain, S.; Jameson, M. B.; Baguley, B. C. Induction of endothelial cell apoptosis by the antivascular agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 1937-1942.
35. Rewcastle, G. W.; Atwell, G. J.; Zhuang, L.; Baguley, B. C.; Denny, W. A. Potential antitumor agents. 61. Structure-activity relationships for in vivo colon 38 activity among disubstituted 9-oxo-9H-xanthene-4-acetic acids. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 217-222.
36. Früh, M.; Cathomas, R.; Siano, M.; Tscherry, G.; Zippelius, A.; Mamot, C.; Erdmann, A.; Krasniqi, F.; Rauch, D.; Simcock, M.; Küttel, E.; Fustier, P.; Pless, M. Carboplatin and paclitaxel plus ASA404 as first-line chemotherapy for extensive-stage small-cell lung cancer: a multicenter single arm Phase II Trial (SAKK 15/08). *Clin. Lung Cancer.* **2013**, *14*, 34-39.
37. Lara, P. N.; Douillard, J. Y.; Nakagawa, K.; Pawel, J. v.; McKeage, M. J.; Albert, I.; Losonczy, G.; Reck, M.; Heo, D.-S.; Fan, X.; Fandi, A.; Scagliotti, G. Randomized phase III placebo-controlled trial of carboplatin and paclitaxel with or without the vascular disrupting agent vandimezan (ASA404) in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2965-2971
38. Seed, L.; Slaughter, D. P.; Limarzi, L. R. Effect of colchicine on human carcinoma. *Surgery* **1940**, *7*, 696-709.

39. Shelanski, M. L.; Taylor, E. W. Properties of the protein subunit of central-pair and outer-doublet microtubules of sea urchin flagella. *J. Cell Biol.* **1968**, *38*, 304-315.
40. Sapra, S.; Bhalla, Y.; Sharma, S.; Singh, G.; Nepali, K.; Budhiraja, A.; Dhar, K. L. Colchicine and its various physicochemical and biological aspects. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 531-547.
41. Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B. Antineoplastic agents 122. Constituents of *Combretum caffrum*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 386-391.
42. Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res.* **1997**, *84*, 832-835.
43. Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.
44. LoRusso, P. M.; Gadgeel, S. M.; Wozniak, A. J.; Barge, A. J.; Jones, H. K.; DelProposto, Z. S.; DeLuca, P. A.; Evelhoch, J. L.; Boerner, S. A.; Wheeler, C. Phase I clinical evaluation of ZD6126, a novel vascular-targeting agent, in patients with solid tumors. *Invest. New Drugs.* **2008**, *26*, 159-167.
45. Pettit, G. R.; Temple, C. J.; Narayanan, V. L.; Varma, R.; Simpson, M. J.; Boyd, M. R.; Reiner, G. A.; Bansal, N. Antineoplastic agents 322. synthesis of combretastatin A-4 prodrugs. *Anticancer Drug Des.* **1995**, *10*, 299-309.
46. Siemann, D. W.; Chaplin, D. J.; Walicke, P. A. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). *Expert Opin. Invest. Drugs* **2009**, *18*, 189-197.
47. Nagaiah, G.; Remick, S. C. Combretastatin A4 phosphate: a novel vascular disrupting agent. *Future Oncol.* **2010**, *6*, 1219-1228.
48. Delmonte, A.; Sessa, C. AVE8062: a new combretastatin derivative vascular disrupting agent. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2009**, *18*, 1541-1548.
49. Pettit, G. R.; Lippert, J. W. Antineoplastic agents 429. Syntheses of the combretastatin A-1 and combretastatin B-1 prodrugs. *Anticancer Drug Des.* **2000**, *15*, 203-216.
50. Mainwaring, P. N.; Lickliter, J.; Brown, M. P.; Millward, M.; Chaplin, D. J.; Goldberg, Z. A multicenter, open-label phase Ib/II study to assess the safety and clinical activity of intravenous combretastatin A1 diphosphate (OXi4503) as monotherapy in subjects with primary or secondary hepatic tumor burden. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, TPS164.
51. Zweifel, M.; Patterson, D. M.; Padhani, A. R.; Middleton, M. R.; Price, P.; Stratford, M. R.; Ross, P.; Halford, S.; Goldberg, Z.; Rustin, G. J. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the vascular disrupting agent OXi4503 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 5865-5871.
52. Natsume, T.; Nakamura, T.; Koh, Y.; Kobayashi, M.; Saijo, N.; Nishio, K. Gene expression profiling of exposure to TZT-1027, a novel microtubule-interfering agent, in non-small cell lung cancer PC-14 cells and astrocytes. *Invest. New Drugs.* **2001**, *2001*, 293-302.
53. Mauer, A. M.; Cohen, E. E.; Ma, P. C.; Kozloff, M. F.; Schwartzberg, L.; Coates, A. I.; Qian, J.; Hagey, A. E.; GB, G. B. G. A phase II study of ABT-751 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2008**, *3*, 631-636.
54. Grossmann, K. F.; Colman, H.; Akerley, W. A.; Glantz, M.; Matsuoko, Y.; Beelen, A. P.; Yu, M.; Groot, J. F. D.; Aiken, R. D.; Olsen, J. J.; Evans, B. A.; Jensen, R. L. Phase I trial of verubulin (MPC-6827) plus carboplatin in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **2012**, *110*, 257-264.
55. Kasibhatla, S.; Baichwal, V.; Cai, S. X.; Roth, B.; Skvortsova, I.; Skvortsov, S.; Lukas, P.; English, N. M.; Sirisoma, N.; Drewe, J.; Pervin, A.; Tseng, B.; Carlson, R. O.; Pleiman, C. M. MPC-6827: a small-molecule inhibitor of microtubule formation that is not a substrate for multidrug resistance pumps. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5865-5871.

56. Tsimberidou, A. M.; Akerley, W.; Schabel, M. C.; Hong, D. S.; Uehara, C.; Chhabra, A.; Warren, T.; Mather, G. G.; Evans, B. A.; Woodland, D. P.; Swabb, E. A.; Kurzrock, R. Phase I clinical trial of MPC-6827 (Azixa), a microtubule destabilizing agent, in patients with advanced cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 3410-3419.
57. Burns, C. J.; Fantino, E.; Phillips, I. D.; Su, S.; Harte, M. F.; Bukczynska, P. E.; Frazzetto, M.; Joffe, M.; Kruszelnicki, I.; Wang, B.; Wang, Y.; Wilson, N.; Dilley, R. J.; Wan, S. S.; Charman, S. A.; Shackelford, D. M.; Fida, R.; Malcontenti-Wilson, C.; Wilks, A. F. CYT997: a novel orally active tubulin polymerization inhibitor with potent cytotoxic and vascular disrupting activity in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 3036-3045.
58. Lickliter, J. D.; Francesconi, A. B.; Smith, G.; Burge, M.; Coulthard, A.; Rose, S.; Griffin, M.; Milne, R.; McCarron, J.; Yeadon, T.; Wilks, A.; Cubitt, A.; Wyld, D. K.; Vasey, P. A. Phase I trial of CYT997, a novel cytotoxic and vascular-disrupting agent. *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 597-606.
59. Traynor, A. M.; Gordon, M. S.; Alberti, D.; Mendelson, D. S.; Munsey, M. S.; Wilding, G.; Gammans, R. E.; Read, W. L. A dose escalation, safety, and tolerability study of MN-029 in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* **2010**, *28*, 509-515.
60. Millward, M.; Mainwaring, P.; Mita, A.; Federico, K.; Lloyd, G. K.; Reddinger, N.; Nawrocki, S.; Mita, M.; Spear, M. A. Phase 1 study of the novel vascular disrupting agent plinabulin (NPI-2358) and docetaxel. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1065-1073.
61. Kremmidiotis, G.; Leske, A. F.; Lavranos, T. C.; Beaumont, D.; Gasic, J.; Hall, A.; O'Callaghan, M.; Matthews, C. A.; Flynn, B. BNC105: A novel tubulin polymerization inhibitor that selectively disrupts tumor vasculature and displays single-agent antitumor efficacy. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1562-1573.
62. Rischin, D.; Bibby, D. C.; Chong, G.; Kremmidiotis, G.; Leske, A. F.; Matthews, C. A.; Wong, S. S.; Rosen, M. A.; Desai, J. Clinical, pharmacodynamic, and pharmacokinetic evaluation of BNC105P: A phase I trial of a novel vascular disrupting agent and inhibitor of cancer cell proliferation. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5152-5160.
63. Cai, S. X.; Drewe, J.; Kemnitzer, W. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as potent apoptosis inducers using a cell- and caspase-based anti-cancer screening apoptosis program (ASAP): SAR studies and the identification of novel vascular disrupting agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 437-456.
64. Patil, S. A.; Patil, R.; Pfeffer, L. M.; Miller, D. D. Chromenes: potential new chemotherapeutic agents for cancer. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 1647-1660.
65. Lee, J.; Kim, S. J.; Choi, H.; Kim, Y. H.; Lim, I. T.; Yang, H. M.; Lee, C. S.; Kang, H. R.; Ahn, S. K.; Moon, S. K.; Kim, D. H.; Lee, S.; Choi, N. S.; Lee, K. J. Identification of CKD-516: a potent tubulin polymerization inhibitor with marked antitumor activity against murine and human solid tumors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6337-6354.
66. Kanthou, C.; Tozer, G. M. Selective destruction of the tumour vasculature by targeting the endothelial cytoskeleton. *Drug Discov. Today Ther. Strat.* **2007**, *4*, 237-243.
67. Bayless, K. J.; Davis, G. E. Microtubule depolymerization rapidly collapses capillary tube networks in vitro and angiogenic vessels in vivo through the small GTPase Rho. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11686-11695.
68. Zheng, Y. G protein control of microtubule assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, *20*, 867-894.
69. Vincent, L.; Kermani, P.; Young, L. M.; Cheng, J.; Zhang, F.; Shido, K.; Lam, G.; Bompais-Vincent, H.; Zhu, Z.; Hicklin, D. J.; Bohlen, P.; Chaplin, D. J.; May, C.; Rafii, S. Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2992-3006.
70. Kanthou, C.; Tozer, G. M. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood* **2002**, *99*, 2060-2069.
71. Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253-265.

72. Risinger, A. L.; Giles, F. J.; Mooberry, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 255-261.
73. Pasquier, E.; Kavallaris, M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 165-170.
74. Buey, R. M.; Díaz, J. F.; Andreu, J. M. The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5933-5938.
75. Howard, J.; Hyman, A. A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **2003**, *422*, 753-758.
76. Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.
77. Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli, R. B. G.; Roussi, F.; Steinmetz, M. O.; Curmi, P. A.; Sobel, A.; Knossow, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **2005**, *435*, 519-522.
78. Ravelli, R. B. G.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.
79. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Zurwerra, D.; Field, J. J.; Díaz, J. F.; Altmann, K.-H.; Steinmetz, M. O. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* **2013**, *339*, 587-589.
80. Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943-2971.
81. Yue, Q. X.; Liu, X.; Guo, D. A. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1037-1043.
82. Stengel, C.; Newman, S. P.; Leese, M. P.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Purohit, A. Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 316-324.
83. Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 155-183.
84. Löwe, J.; Li, H.; Downing, K. H.; Nogales, E. Refined structure of α,β -tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045-1057.
85. Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli, R. B.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossowa, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 13775-13779.
86. Andreu, J. M.; Timasheff, S. N. The ligand- and microtubule assembly-induced GTPase activity of purified calf brain tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *211*, 151-157.
87. Andreu, J. M.; Gorbunoff, M. J.; Medrano, F. J.; Rossi, M.; Timasheff, S. N. Mechanism of colchicine binding to tubulin. Tolerance of substituents in ring C' of biphenyl analogues. *Biochemistry* **1991**, *30*, 3777-3786.
88. Barbier, P.; Dorléans, A.; Devred, F.; Sanz, L.; Allegro, D.; Alfonso, C.; Knossow, M.; Peyrot, V.; Andreu, J. M. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31672-31681.
89. Massarotti, A.; Coluccia, A.; Silvestri, R.; Sorba, G.; Brancale, A. The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 33-42.
90. Balzarini, J.; Gamboa, A. E.; Esnouf, R.; Liekens, S.; Neyts, J.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J. 7-Deazaxanthine, a novel prototype inhibitor of thymidine phosphorylase. *FEBS Lett.* **1998**, *438*, 91-95.

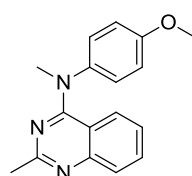
91. Balzarini, J.; Degrève, B.; Esteban-Gamboa, A.; Esnouf, R.; De Clercq, E.; Engelborghs, Y.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J. Kinetic analysis of novel multisubstrate analogue inhibitors of thymidine phosphorylase. *FEBS Lett* **2000**, *483*, 181-185.
92. Esteban-Gamboa, A.; Balzarini, J.; Esnouf, R.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J. Design, synthesis, and enzymatic evaluation of multisubstrate analogue inhibitors of *Escherichia coli* thymidine phosphorylase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 971-983.
93. Liekens, S.; Bilsen, F.; De Clercq, E.; Priego, E. M.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. Anti-angiogenic activity of a novel multi-substrate analogue inhibitor of thymidine phosphorylase. *FEBS Lett.* **2002**, *510*, 83-88.
94. Priego, E. M.; Mendieta, J.; Gago, F.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J. Towards new thymidine phosphorylase/PD-ECGF inhibitors based on the transition state of the enzyme reaction. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2003**, *22*, 951-953.
95. Liekens, S.; Hernandez, A. I.; Ribatti, D.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. The nucleoside derivative 5'-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetitive mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29598-29605.
96. Mendieta, J.; Martín-Santamaría, S.; Priego, E. M.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Gago, F. Role of histidine-85 in the catalytic mechanism of thymidine phosphorylase as assessed by targeted molecular dynamics simulations and quantum mechanical calculations. *Biochemistry* **2004**, *43*, 405-414.
97. Pérez-Pérez, M. J.; Priego, E. M.; Hernández, A. I.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Liekens, S. Thymidine phosphorylase inhibitors: Recent developments and potential therapeutic applications. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1113-1123.
98. Liekens, S.; Bronckaers, A.; Hernández, A. I.; Priego, E. M.; Casanova, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. 5'-O-tritylated nucleoside derivatives: inhibition of thymidine phosphorylase and angiogenesis. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 501-509.
99. Bronckaers, A.; Aguado, L.; Negri, A.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; Gago, F.; Liekens, S. Identification of aspartic acid-203 in human thymidine phosphorylase as an important residue for both catalysis and non-competitive inhibition by the small molecule "crystallization chaperone" 5'-O-trityl-inosine (KIN59). *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 231-240.
100. Liekens, S.; Bronckaers, A.; Belleri, M.; Bugatti, A.; Sienaert, R.; Ribatti, D.; Nico, B.; Gigante, A.; Casanova, E.; Opendakker, G.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J.; Presta, M. The thymidine phosphorylase inhibitor 5'-O-trityl-inosine (KIN59) is an antiangiogenic multitarget fibroblast growth factor-2 antagonist. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 817-829.

1

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DERIVADOS DE 6-FENILAMINOPURINAS

1.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha comentado en la Introducción General, en los últimos años se han descrito numerosos compuestos capaces de desestabilizar la polimerización de los microtúbulos por unión al sitio de colchicina en tubulina. Entre ellos se encuentra el compuesto MPC-6827 (i.11) (Figura 1.1), que fue identificado en un programa de cribado farmacológico de alto rendimiento (HTS) llevado a cabo con el fin de identificar compuestos proapoptóticos.¹



MPC-6827 (i.11)

Figura 1.1. Estructura de MPC-6827 (i.11).

Estudios realizados sobre el mecanismo de acción de MPC-6827 revelaron que sus propiedades antimitóticas eran consecuencia del efecto interruptor de la dinámica de los microtúbulos celulares por unión al sitio de colchicina. Además, MPC-6827 mostró una actividad antiproliferativa muy significativa frente a una gran variedad de células tumorales, incluyendo células multirresistentes (MDR), es decir, aquellas que sobreexpresan transportadores de membrana como la proteína Pgp-1. Si bien las propiedades de MPC-6827 para atravesar la barrera hematoencefálica han convertido a este compuesto en un buen candidato para el tratamiento de tumores cerebrales,^{2,3} su elevado carácter lipófilo obliga a una administración intravenosa y a una formulación a base de etanol y cremofor, un agente surfactante que provoca con frecuencia serias reacciones de hipersensibilidad y que además implica largos tiempos de administración.²

En el año 2010, Gangjee y col. describieron la actividad antimitótica de los compuestos derivados de pirimidina **1.1** y **1.2**, fusionados a un anillo de pirrol y ciclopentano, respectivamente (Figura 1.2). Estos compuestos, que presentan una elevada similitud estructural con el compuesto MPC-6827, provocan un efecto desestabilizante en los microtúbulos por unión específica al sitio de colchicina, siendo activos igualmente en células multirresistentes.⁴

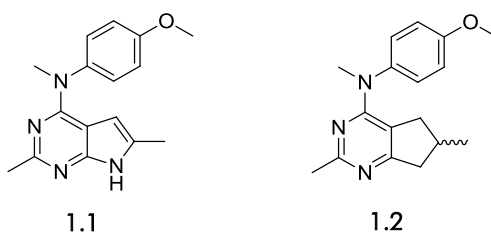


Figura 1.2. Estructura de **1.1** y **1.2**.

La estructura de estos compuestos, en particular la del derivado de pirrolopirimidina **1.1**, nos llevó a proponer la sustitución del anillo de pirrol de **1.1** por un anillo de imidazol, resultando así en un esqueleto central de purina. Si se calcula el valor teórico del coeficiente de reparto (cLogP)⁵ para el anillo de purina (esqueleto C en la Figura 1.3), el valor que resulta (cLogP: -0.22) es bastante inferior a los correspondientes para los anillos de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (cLogP: 0.41, esqueleto A en la Figura 1.3) y de ciclopenta[*d*]pirimidina (cLogP: 0.70, esqueleto B en la Figura 1.3). De esta

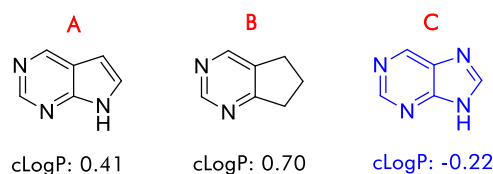


Figura 1.3. cLogP teórico de los esqueletos de ciclopenta[*d*]pirimidina (A), pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (B) y purina (C).

forma, los nuevos derivados de purina incrementarían su carácter hidrófilo, y podrían presentar un mejor perfil de solubilidad acuosa. Asimismo, la síntesis de estos derivados resultaba interesante porque, como es bien sabido, el anillo de purina representa un excelente esqueleto privilegiado en química médica, tanto por sus múltiples actividades biológicas, como por su gran versatilidad sintética.⁶

Así, el objetivo principal de este Capítulo ha consistido en la síntesis y evaluación de la actividad antiproliferativa celular de una serie de compuestos derivados de 6-fenilaminopurinas cuya fórmula general se muestra en la Figura 1.4.

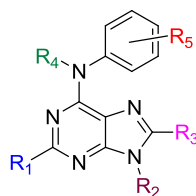


Figura 1.4. Estructura general de los derivados de 6-fenilaminopurinas objeto de este Capítulo.

De este modo, se ha pretendido obtener nuevos compuestos antimetabólicos y evaluar el impacto sobre la actividad antiproliferativa de las modificaciones incorporados en las posiciones 2, 8 y 9 del anillo de purina (sustituyentes R_1 , R_3 y R_2 respectivamente), en el nitrógeno exocíclico de la posición 6 (sustituyente R_4) y en el anillo aromático (sustituyente R_5). Los sustituyentes a explorar en estas posiciones han estado condicionados por la información disponible en la literatura de relaciones estructura-actividad tanto de los derivados de quinazolina análogos a MPC-6827,^{7,8} como de los derivados de pirrolopirimidina relacionados con 1.1.⁴

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1. SÍNTESIS

Entre las estructuras propuestas en la fórmula general (Figura 1.5), el primer compuesto a sintetizar fue aquel que más se asemejaba a los compuestos de referencia **1.1** y **1.2**. De este modo, se abordó la síntesis del derivado de purina que mantenía sin alterar todos los sustituyentes de los compuestos **1.1** y **1.2**, es decir, donde los grupos $R_1=R_3=R_4=CH_3$, $R_2=H$ y $R_5=4-OCH_3$.

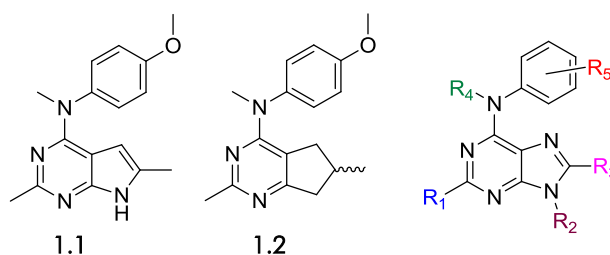
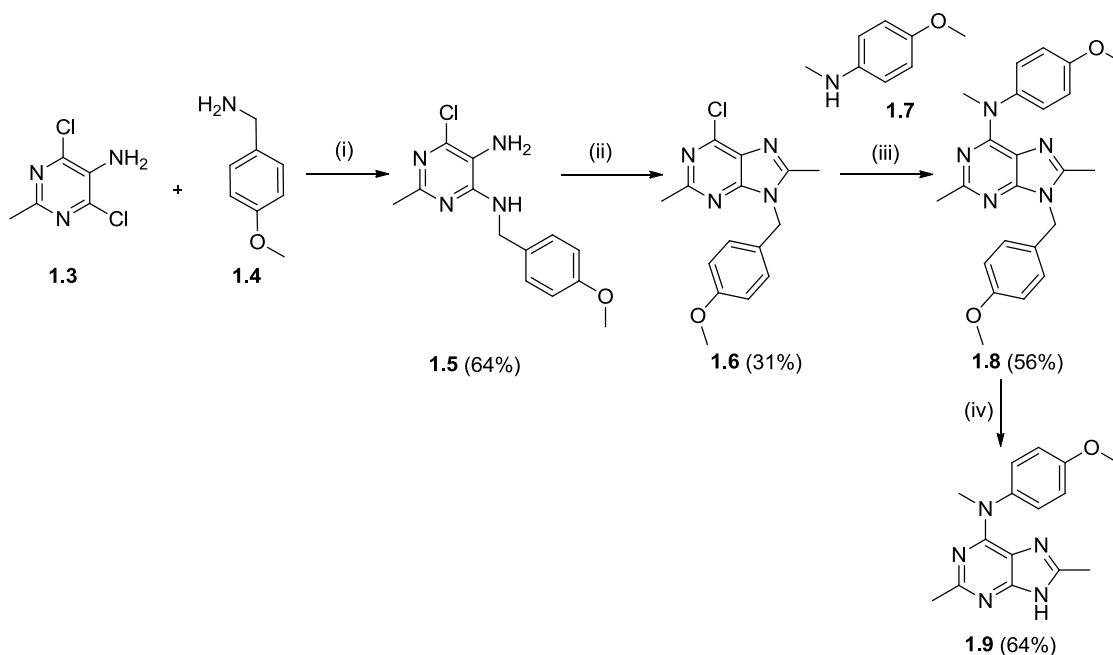


Figura 1.5. Comparativa de las estructuras de **1.1** y **1.2** y de las purinas propuestas.

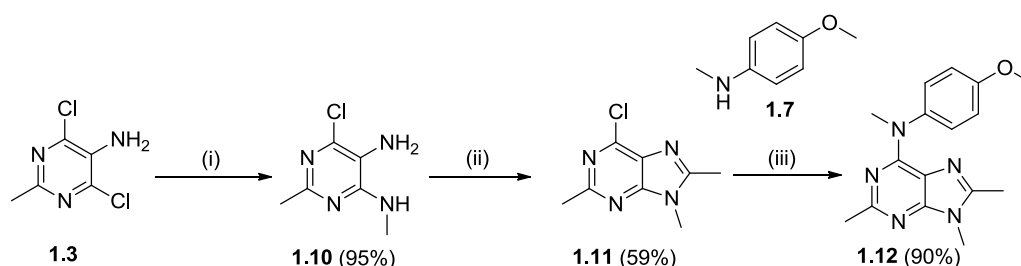
Así, la reacción de la 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina **1.3** con la 4-metoxibencilamina **1.4** en medio básico, por irradiación en microondas a 150 °C, dio lugar al producto **1.5** con un rendimiento del 64% (Esquema 1.1). A continuación se procedió a la ciclación del compuesto **1.5** con ortoacetato de trietilo, adaptando el protocolo descrito en la bibliografía⁹ a la síntesis asistida por microondas. De este modo se consiguió reducir el tiempo de reacción de 9 días a 15 minutos. Además, en lugar de emplear ácido clorhídrico concentrado para favorecer la reacción de ciclación, se usó ácido etanosulfónico y anhídrido acético, conforme a precedentes de nuestro grupo.¹⁰⁻¹² Así, la reacción de **1.5** con ortoacetato de trietilo en microondas a 120 °C en las condiciones ácidas que se acaban de mencionar, permitió la obtención de la 8-metilpurina **1.6** con un rendimiento del 31%. Posteriormente, la reacción de sustitución nucleófila de la anilina **1.7** sobre la posición 6 de la purina



Esquema 1.1. Reactivos y condiciones: (i) K_2CO_3 , DMF, MW, 150 °C, 3 h. (ii) $CH_3C(OEt)_3$, $EtSO_3H$, Ac_2O , MW, 120 °C, 15 min. (iii) HCl, iPrOH, MW, 80 °C, 10 min. (iv) H_2 , Pd(C), HCl, MeOH, 25 °C, 24 h.

1.6, por calentamiento a 80 °C en isopropanol, y en presencia de ácido clorhídrico concentrado, tal y como se describe en la bibliografía,⁴ dio lugar al compuesto **1.8** con un rendimiento cercano al 60%. Cabe destacar aquí que el empleo del reactor de microondas permitió reducir los tiempos de reacción de entre 3 y 6 horas a 10 min. Por último, la hidrogenación catalítica de **1.8** con Pd(C) y ácido clorhídrico a presión atmosférica, dio lugar al compuesto desprotegido en la posición 9 (**1.9**), con un rendimiento del 64%.

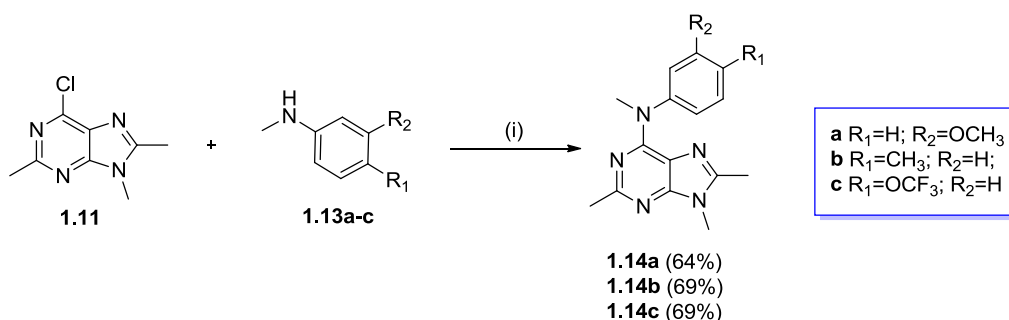
Siguiendo una ruta similar, se procedió a la síntesis del *N*-9 metil derivado **1.12** (Esquema 1.2). En este caso, se hizo reaccionar la 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina **1.3** con metilamina acuosa al 40% a 80 °C en dioxano,¹³ obteniéndose así la 4-metilaminopirimidina **1.10** con muy buen rendimiento (95%). A continuación, se procedió a la ciclación de **1.10** con ortoacetato de trietilo siguiendo las condiciones de reacción empleadas en la síntesis **1.6** (calentamiento en microondas a 120 °C, en presencia de ácido etanosulfónico y anhídrido acético) para obtener la purina **1.11** con un rendimiento próximo al 60%. Por último, la sustitución nucleófila en la posición 6 del compuesto **1.11** con la anilina **1.7**, dio lugar al producto final **1.12** con un rendimiento del 90%.



Esquema 1.2. Reactivos y condiciones: (i) CH_3NH_2 , 1,4-dioxano, 80 °C, 16 h. (ii) $\text{CH}_3\text{C}(\text{OEt})_3$, EtSO_3H , Ac_2O , MW, 120 °C, 15 min. (iii) HCl , $i\text{PrOH}$, MW, 80 °C, 10 min.

La evaluación biológica de las purinas **1.9** y **1.12** frente a líneas celulares tumorales y endoteliales, que se detallará en el siguiente apartado de este Capítulo, puso de manifiesto una actividad antiproliferativa en el rango micromolar para ambos compuestos, si bien la *N*-9-metilpurina **1.12** presentaba valores de actividad algo mejores que **1.9** frente a líneas tumorales. Este perfil de actividad antiproliferativa de **1.12**, junto al menor número de pasos necesarios para su síntesis y a los rendimientos considerablemente mejores obtenidos en cada paso, respecto a la síntesis de **1.9**, nos llevó a realizar el resto de modificaciones propuestas manteniendo el grupo metilo en la posición 9 del anillo de purina.

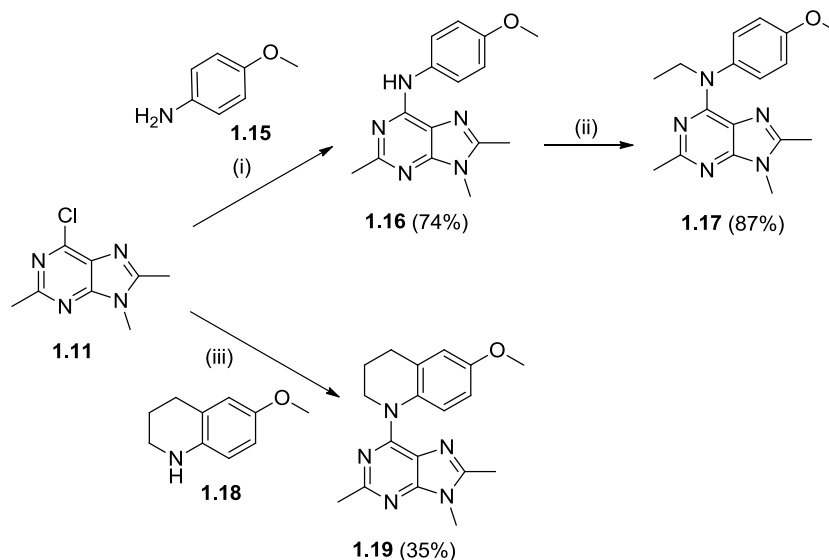
Para la síntesis de los derivados diferentemente sustituidos en el fenilo en posición 6 (Esquema 1.3) se hizo reaccionar la 6-cloropurina **1.11** con diferentes *N*-metilanilinas (**1.13a-c**) en presencia



Esquema 1.3. Reactivos y condiciones: (i) HCl , $i\text{PrOH}$, MW, 80 °C, 10 min.

de ácido clorhídrico concentrado. De esta forma se obtuvieron los compuestos **1.14a-c**, con rendimientos cercanos al 70% en los tres casos.

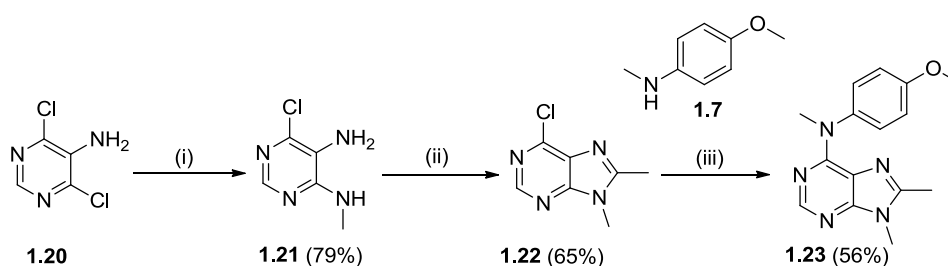
En paralelo, se llevó a cabo la síntesis de los compuestos diferentemente sustituidos en el nitrógeno exocíclico de la posición 6 (Esquema 1.4).



Esquema 1.4. (i) HCl, iPrOH, MW, 80 °C, 10 min. (ii) EtI, Cs₂CO₃, DMF, 60 °C, 2 h. (iii) HCl, iPrOH, tubo de presión, 80 °C, 16 h.

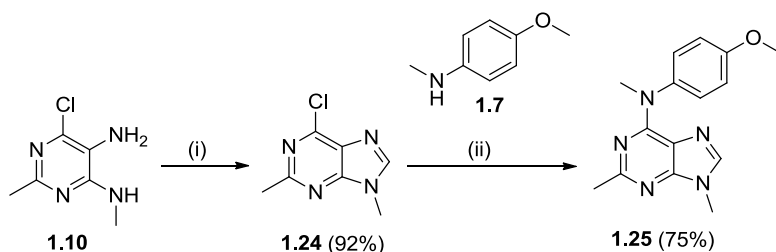
Así, la reacción de la 6-cloropurina **1.11** con 4-metoxianilina (**1.15**) condujo al compuesto **1.16**. El posterior tratamiento de **1.16** con yoduro de etilo y carbonato potásico en DMF a 60 °C,¹⁴ permitió obtener el *N*-etil derivado **1.17** con un rendimiento del 87%. En este apartado también se abordó la síntesis del derivado de tetrahydroquinolina **1.19**, que podría ser considerado un análogo conformacionalmente restringido del compuesto **1.12** o de su análogo **1.17**, conforme a precedentes bibliográficos.¹⁵ Este derivado **1.19** se obtuvo por reacción a 80 °C de la 6-cloropurina **1.11** con la tetrahydroquinolina **1.18**, con un rendimiento del 35%.

Para la síntesis del derivado no sustituido en la posición 2, se partió de la pirimidina comercial **1.20** (Esquema 1.5). Así, tras tres pasos de reacción se obtuvo el compuesto **1.23**, con rendimientos satisfactorios en cada paso.



Esquema 1.5. Reactivos y condiciones: (i) CH₃NH₂, 1,4-dioxano, 80 °C, 16 h. (ii) CH₃C(OEt)₃, EtSO₃H, Ac₂O, MW, 120 °C, 15 min. (iii) HCl, iPrOH, MW, 80 °C, 10 min.

Finalmente, se preparó la purina **1.25** no sustituida en la posición 8 (Esquema 1.6). A partir del compuesto **1.10** y por reacción con ortoformiato de trimetilo en microondas a 120 °C en presencia de ácido etanosulfónico y anhídrido acético, se obtuvo la purina **1.24** con un rendimiento del 92%. La posterior reacción de **1.24** con la *N*-metil-4-metoxianilina **1.7** permitió la obtención del producto deseado **1.25**, con un rendimiento en este caso del 75%.



Esquema 1.6. Reactivos y condiciones: (i) $\text{CH}(\text{OMe})_3$, EtSO_3H , Ac_2O , MW, 120 °C, 15 min. (ii) HCl , $i\text{PrOH}$, MW, 80 °C, 10 min.

1.2.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

A) Evaluación en ensayos de proliferación celular

Las 6-fenilaminopurinas sintetizadas en este Capítulo se representan en la Tabla 1.1, donde también se recogen los valores teóricos de cLogP .⁵ La evaluación de esta serie de compuestos se realizó en ensayos de proliferación celular, empleando para ello seis líneas celulares diferentes: tres líneas tumorales (HeLa, L1210 y CEM), y tres endoteliales (HMEC-1, MBEC Y BAEC) (Tabla 1.2).¹⁶ Los resultados de estos ensayos se expresan como concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), que es la concentración de compuesto que causa la inhibición del crecimiento del 50% de las células en cultivo. La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**), se emplearon como controles positivos en todos los experimentos de proliferación realizados y sus valores de CI_{50} se incluyen en el pie de la Tabla 1.2.

Tabla 1.1. Estructura de las 6-fenilaminopurinas sintetizadas en este Capítulo.

	$\text{cLogP}^{(a)}$	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	
	1.9	Me	H	Me	Me	4-OMe	
	1.12	Me	Me	Me	CH_3	4-OMe	
	1.14a	3.52	Me	Me	Me	CH_3	3-OMe
	1.14b	4.05	Me	Me	Me	CH_3	4-Me
	1.14c	3.10	Me	Me	Me	CH_3	4-OCF ₃
	1.16	2.94	Me	Me	Me	H	4-OMe
	1.17	3.47	Me	Me	Me	Et	4-OMe
	1.23	2.44	H	Me	Me	Me	4-OMe
	1.25	2.67	Me	Me	H	Me	4-OMe
	1.19	3.60					

^(a) Calculado con el programa ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

Tabla 1.2. Actividad antiproliferativa expresada como Cl_{50} (μM) de las 6-fenilaminopurinas sintetizadas en este Capítulo, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	$Cl_{50}^{(a)(b)}$ (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
1.9	14 ± 5	229 ± 30	7.1 ± 1.0	7.1 ± 1.0	8.9 ± 0.3	8.9 ± 1.6
1.12	4.5 ± 0.3	19 ± 1	7.3 ± 0.1	7.3 ± 0.1	8.7 ± 0.1	7.4 ± 0.3
1.14a	> 250	> 250	> 100	> 100	> 100	> 100
1.14b	> 250	> 250	> 100	> 100	> 100	> 100
1.14c	188 ± 25	> 250	> 100	> 100	> 100	> 100
1.16	197 ± 14	> 250	> 100	> 100	> 100	> 100
1.17	20 ± 0	35 ± 0	8.8 ± 2.1	8.8 ± 2.1	15 ± 0.4	11 ± 1.4
1.19	4.4 ± 0.4	5.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	4.4 ± 0.3	2.4 ± 0.1
1.23	> 250	> 250	> 100	> 100	> 100	> 100
1.25	22 ± 1	30 ± 1	9.2 ± 1.3	9.2 ± 1.3	15 ± 7	9.3 ± 0.6

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

^(b) La colchicina (**1.3**) y la CA-4P (**1.6**), con actividades comprendidas entre 4 y 31 nM y 3 y 95 nM, respectivamente, se emplearon como controles positivos.

Los datos contenidos en la Tabla 1.2 ponen de manifiesto el efecto antiproliferativo presentado por los compuestos **1.9**, **1.12**, **1.17** y **1.25** en todas las líneas ensayadas, con valores de Cl_{50} entre 4 y 30 μM en células tumorales, y entre 7 y 15 μM , en células endoteliales. Entre ellos cabe destacar el derivado de tetrahydroquinolina **1.19** que fue especialmente activo, con una Cl_{50} comprendida entre 2 y 5 μM en células tumorales y entre 2 y 4 μM en células endoteliales. Además, comparando las estructuras de los compuestos activos (**1.9**, **1.12**, **1.17**, **1.19** y **1.25**) con aquellas de los derivados inactivos (**1.14a-c**, **1.16** y **1.23**) fue posible establecer ciertas relaciones estructura-actividad, que a continuación se detallan.

Respecto a la posición *N*-9 del anillo de purina (R_2), los resultados de los compuestos **1.9** ($R_2=H$) y **1.12** ($R_2=CH_3$) indicaron que aunque en células endoteliales la actividad antiproliferativa era similar, en células tumorales la *N*-9-metilpurina (**1.12**) era algo más activa.

En referencia a los sustituyentes sobre el anillo de fenilo (R_5 en la Tabla 1.1), se puso de manifiesto que la posición y/o naturaleza del sustituyente era crucial en el efecto antiproliferativo, de modo que sólo aquellos compuestos con un grupo metoxilo en la posición 4 fueron activos. Así, cuando el metoxilo se encontraba en la posición 3 (**1.14a**), el compuesto resultó completamente inactivo. Igualmente, la sustitución del metoxilo en 4 (**1.12**) por un 4-metilo o 4-trifluorometilo (**1.14b** y **1.14c**, respectivamente) provocó la pérdida de la actividad antiproliferativa.

También hay que destacar la importancia del sustituyente en el nitrógeno exocíclico de la posición 6 (R_4 en la Tabla 1.1). En este sentido, el compuesto **1.16** en el que $R_4=H$, fue también inactivo. Por otro lado, los datos de actividad antiproliferativa de los compuestos con un metilo o un etilo en R_4 (compuestos **1.12** y **1.17**, respectivamente) fueron muy significativos y bastante similares entre sí. Como ya se ha comentado, el derivado de tetrahydroquinolina **1.19**, donde este sustituyente R_4 forma un ciclo con el fenilo, presentó los mejores datos de actividad antiproliferativa de toda la serie sintetizada, con valores de Cl_{50} comprendidos entre 2 y 5 μM .

Finalmente, las modificaciones llevadas a cabo en las posiciones 2 y 8 (compuestos **1.23** y **1.25**) respecto al patrón **1.12**, dieron lugar a compuestos muy diferentes en términos de actividad. Así, el metilo en posición 2 resultó ser indispensable para la actividad, ya que cuando esta posición no estaba sustituida (compuesto **1.23**) la actividad antiproliferativa se perdía. Sin embargo, la no

sustitución de la posición 8 (compuesto **1.25**) condujo a un compuesto con actividad similar a la del compuesto con un metilo en esta posición (**1.12**).

B) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular

Los compuestos inhibidores de la polimerización de microtúbulos que se unen al sitio de la colchicina se comportan como antimitóticos por interrupción del ciclo celular, concretamente en la fase G2/M.¹⁷ Por este motivo, se realizó un estudio sobre el efecto de estas purinas en la progresión del ciclo celular, mediante tinción con yoduro de propidio, molécula fluorescente intercalante del ADN, y posterior análisis por citometría de flujo.¹⁸ Esta técnica permite establecer de forma sencilla la distribución celular en las distintas fases del ciclo vital de una población de células en división, según el contenido en ADN.¹⁹ De este modo, si las células que se encuentran en la fase G1 (previa a la división) contienen una cantidad de ADN igual a n , aquellas que hayan pasado a la fase G2/M (en mitosis), poseerán el doble de ADN, es decir, $2n$. En línea con el razonamiento anterior, durante la fase de síntesis S (replicación) el contenido en ADN se encontrará comprendido entre n y $2n$.

Para el estudio del ciclo celular se emplearon células HeLa, línea tumoral ampliamente utilizada en estos ensayos. Como compuesto representativo se eligió a **1.12**, uno de los más activos en esta línea celular, con una CI_{50} de $4.5 \mu\text{M}$ (HeLa), valor similar al obtenido con el derivado de tetrahydroquinolina **1.19**. De esta forma, el compuesto **1.12** se incubó con las células HeLa a distintas concentraciones (0, 4 y $100 \mu\text{M}$), y tras 24 horas de tratamiento se realizó un estudio por citometría de flujo. Los datos obtenidos se representan en la Figura 1.6.

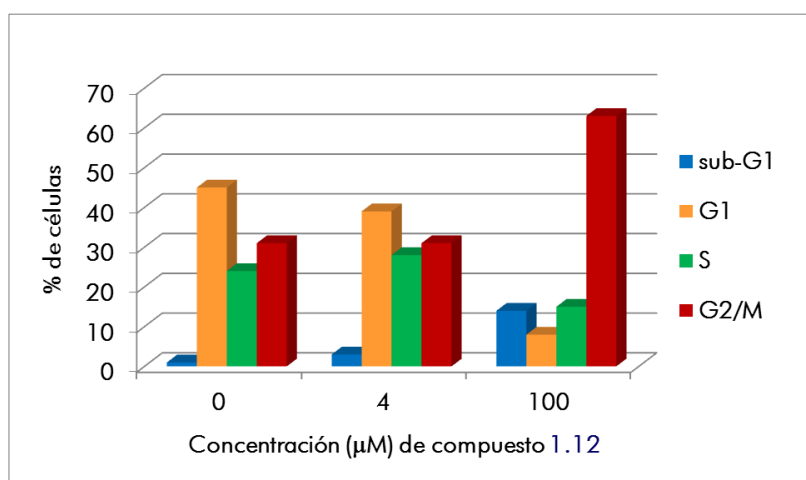


Figura 1.6. Efectos del compuesto 1.12 sobre la progresión del ciclo celular. Las células HeLa se incubaron con la 6-fenilaminopurina **1.12** a diferentes concentraciones (0, 4 y $100 \mu\text{M}$). Tras 24 horas de tratamiento se realizó un estudio por citometría de flujo, cuantificando así el % de células en cada fase del ciclo celular.

Tal y como se observa en la Figura 1.6, la purina **1.12** no tuvo efecto alguno sobre el ciclo celular a una concentración de $4 \mu\text{M}$, ya que la distribución de células en las distintas fases fue similar respecto al experimento control (concentración $0 \mu\text{M}$). Ahora bien, a una concentración de $100 \mu\text{M}$, este compuesto provocó una clara interrupción del ciclo celular en la fase G2/M, conduciendo no sólo el acúmulo de células en esta fase (resultado del bloqueo específico en esta fase) sino también al descenso del número de células en las fases G1 y S (efecto que deriva de la falta de génesis de nuevas células).

Estos resultados sobre la progresión del ciclo celular respaldaban que la actividad antiproliferativa de las 6-fenilaminopurinas sintetizadas en este Capítulo estuviese relacionada con su capacidad de inhibir la mitosis. Este patrón de comportamiento sobre la proliferación y el ciclo celular es similar al descrito para los compuestos de referencia MPC-6827 (i.11), 1.1 y 1.2, y compuestos análogos recientemente descritos,²⁰⁻²⁶ si bien en estas 6-fenilpurinas se requirió una concentración entre 1 y 2 órdenes de magnitud superior que con los compuestos anteriores para tener un efecto similar. Por este motivo no se consideró oportuno llevar a cabo experimentos adicionales para esclarecer el mecanismo de acción de esta familia de 6-fenilaminopurinas.

1.3. CONCLUSIONES

A partir de la actividad antiproliferativa y antimitótica de los compuestos **1.1** y **1.2**, derivados de pirimidinas fusionadas a un anillo de pirrol y ciclopentano, respectivamente, se propuso la síntesis de purinas análogas, basándonos en que un anillo de purina permitiría un patrón de sustitución similar al de los compuestos **1.1** y **1.2** y además conduciría a compuestos con un valor de cLogP más favorable.

El procedimiento sintético para la obtención de las 6-fenilaminopurinas propuestas, transcurrió en general con buenos rendimientos y permitió explorar las posiciones 2, 8 y 9 del anillo de purina, así como la introducción de distintos sustituyentes en el nitrógeno exocíclico de la posición 6 de la purina y en el anillo aromático. De todos los compuestos sintetizados, cabe destacar las fenilaminopurinas recogidas en la Figura 1.7, que mostraron una actividad antiproliferativa celular inferior a 10 μM en la mayoría de las líneas celulares ensayadas, siendo cercana a 2 μM para el compuesto **1.19**, el más activo de la familia. Además, estudios efectuados por citometría de flujo con un representante de esta familia (compuesto **1.12**), mostraron un claro efecto interruptor del ciclo celular en la fase G2/M, en línea con el comportamiento característico de otros antimitóticos descritos en la literatura que actúan como ligandos del sitio de colchicina en tubulina.

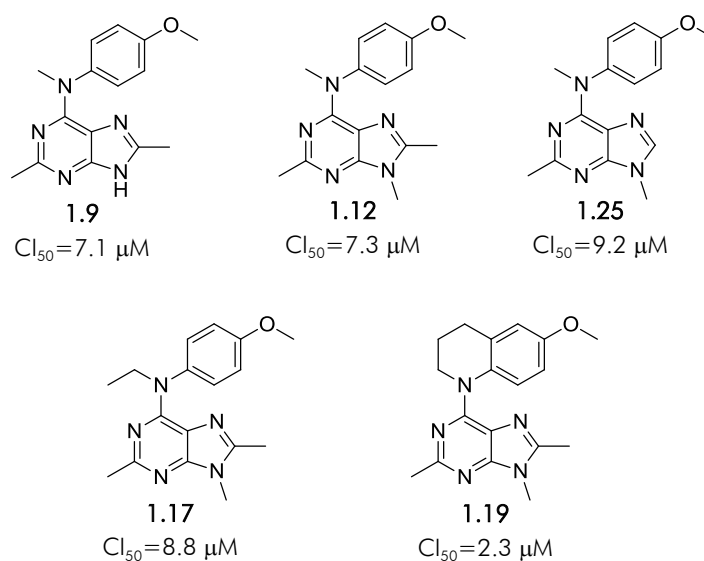


Figura 1.7. Estructuras y Cl_{50} en células endoteliales (HMEC-1) de las 6-fenilaminopurinas sintetizadas en este Capítulo que presentaron actividad antiproliferativa.

1.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Kasibhatla, S.; Baichwal, V.; Cai, S. X.; Roth, B.; Skvortsova, I.; Skvortsov, S.; Lukas, P.; English, N. M.; Sirisoma, N.; Drewe, J.; Pervin, A.; Tseng, B.; Carlson, R. O.; Pleiman, C. M. MPC-6827: a small-molecule inhibitor of microtubule formation that is not a substrate for multidrug resistance pumps. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5865-5871.
2. Grossmann, K. F.; Colman, H.; Akerley, W. A.; Glantz, M.; Matsuoko, Y.; Beelen, A. P.; Yu, M.; Groot, J. F. D.; Aiken, R. D.; Olsen, J. J.; Evans, B. A.; Jensen, R. L. Phase I trial of verubulin (MPC-6827) plus carboplatin in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **2012**, *110*, 257-264.
3. Chamberlain, M. C.; Grimm, S.; Phuphanich, S.; Recht, L.; Zhu, J. Z.; Kim, L.; Rosenfeld, S.; Fadul, C. E. A phase 2 trial of verubulin for recurrent glioblastoma: a prospective study by the brain tumor investigational consortium (BTIC). *J. Neurooncol.* **2014**, doi: 10.1007/s11060-014-1437-y.
4. Gangjee, A.; Zhao, Y.; Lin, L.; Raghavan, S.; Roberts, E. G.; Risinger, A. L.; Hamel, E.; Mooberry, S. L. Synthesis and discovery of water-soluble microtubule targeting agents that bind to the colchicine site on tubulin and circumvent Pgp mediated resistance. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8116-8128.
5. ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft). <http://www.cambridgesoft.com/>.
6. Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 347-361.
7. Sirisoma, N.; Pervin, A.; Zhang, H.; Jiang, S.; Willardsen, J. A.; Anderson, M. B.; Mather, G.; Pleiman, C. M.; Kasibhatla, S.; Tseng, B.; Drewe, J.; Cai, S. X. Discovery of *N*-(4-methoxyphenyl)-*N*,2-dimethylquinazolin-4-amine, a potent apoptosis inducer and efficacious anticancer agent with high blood brain barrier penetration. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2341-2351.
8. Sirisoma, N.; Pervin, A.; Zhang, H.; Jiang, S.; Willardsen, J. A.; Anderson, M. B.; Mather, G.; Pleiman, C. M.; Kasibhatla, S.; Tseng, B.; Drewe, J.; Cai, S. X. Discovery of *N*-methyl-4-(4-methoxyanilino)quinazolines as potent apoptosis inducers. Structure-activity relationship of the quinazoline ring. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *20*, 2330-2334.
9. Temple, C.; Rose, J. D.; Comber, R. N.; Rener, G. A. Synthesis of potential anticancer agents: imidazo[4,5-*c*]pyridines and imidazo[4,5-*b*]pyridines. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1746-1751.
10. Aguado, L.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J. Microwave-assisted synthesis of 9-arylpurines. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 210-212.
11. Aguado, L.; Thibaut, H. J.; Priego, E. M.; Jimeno, M. L.; Camarasa, M. J.; Neyts, J.; Pérez-Pérez, M. J. 9-Arylpurines as a novel class of enterovirus inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 316-324.
12. Aguado, L.; Canela, M. D.; Thibaut, H. J.; Priego, E. M.; Camarasa, M. J.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Pérez-Pérez, M. J. Efficient synthesis and anti-enteroviral activity of 9-arylurines. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 279-288.
13. Crossrow, J.; Guan, B.; Ischenko, A.; Jones, J. H.; Kumaravel, G.; Lugovskoy, A.; Peng, H.; Powell, N.; Raimundo, B. C.; Tanaka, H.; Vessels, J.; Wynn, T.; Xyn, Z. Heterocyclic compounds useful as Raf kinase inhibitors. WO 2009006404 A3. **2011** Jun 28.
14. Campos, S. A.; Harrison, L. A.; Parr, N. J.; Vipulkumar, K. P.; Vitulli, G. 1,1-dioxido-2,3-dihydro-1,2-benzisothiazol-6-yl-1*H*-indazol-4-yl-2,4-pyrimidinediamine derivatives. WO 2007009681 A1. **2007** Jan 25.
15. Gangjee, A.; Pavana, R. K.; Li, W.; Hamel, E.; Westbrook, C.; Mooberry, S. L. Novel water soluble, substituted pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidines: Design, synthesis and biological evaluation as antitubulin antitumor agents. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 3033-3039.
16. Ilić, M.; Ilaš, J.; Dunkel, P.; Mátyus, P.; Boháč, A.; Liekens, S.; Kikelj, D. Novel 1,4-benzoxazine and 1,4-benzodioxine inhibitors of angiogenesis. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 160-170.

17. Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.
18. Liekens, S.; Gijsbers, S.; Vanstreels, E.; Daelemans, D.; Clercq, E. D.; Hatse, S. The nucleotide analog cidofovir suppresses basic fibroblast growth factor (FGF2) expression and signaling and induces apoptosis in FGF2-overexpressing endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 695-703.
19. Darzynkiewicz, Z.; Zhao, H.; Halicka, H. D.; Rybak, P.; Dobrucki, J.; Wlodkowic, D. DNA damage signaling assessed in individual cells in relation to the cell cycle phase and induction of apoptosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2012**, *49*, 199-217.
20. Wang, X.-F.; Guan, F.; Ohkoshi, E.; Guo, W.; Wang, L.; Zhu, D.-Q.; Wang, S.-B.; Wang, L.-T.; Hamel, E.; Yang, D.; Li, L.; Qian, K.; Morris-Natschke, S. L.; Yuan, S.; Lee, K.-H.; Xie, L. Optimization of 4-(N-cycloamino)phenylquinazolines as a novel class of tubulin-polymerization inhibitors targeting the colchicine site. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1390-1402.
21. Mahal, K.; Resch, M.; Ficner, R.; Schobert, R.; Biersack, B.; Mueller, T. Effects of the tumor-vasculature-disrupting agent verubulin and two heteroaryl analogues on cancer cells, endothelial cells, and blood vessels. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 847-854.
22. Gangjee, A.; Zhao, Y.; Raghavan, S.; Rohena, C. C.; Mooberry, S. L.; Hamel, E. Structure-activity relationship and in vitro and in vivo evaluation of the potent cytotoxic anti-microtubule agent *N*-(4-methoxyphenyl)-*N*,2,6-trimethyl-6,7-dihydro-5*H*-cyclopenta[*d*]pyrimidin-4-aminium chloride and its analogues as antitumor agents. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6829-6844.
23. Gangjee, A.; Zaware, N.; Devambatla, R. K.; Raghavan, S.; Westbrook, C. D.; Dybdal-Hargreaves, N. F.; Hamel, E.; Mooberry, S. L. Synthesis of *N*(4)-(substituted phenyl)-*N*(4)-alkyl/desalkyl-9*H*-pyrimido[4,5-*b*]indole-2,4-diamines and identification of new microtubule disrupting compounds that are effective against multidrug resistant cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 891-902.
24. Gangjee, A.; Kurup, S.; Smith, C. D. Synthesis of 5,7-disubstituted-4-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-amines as microtubule inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1180-1189.
25. Gangjee, A.; Zhao, Y.; Hamel, E.; Westbrook, C.; Mooberry, S. L. Synthesis and biological activities of (*R*)- and (*S*)-*N*-(4-Methoxyphenyl)-*N*,2,6-trimethyl-6,7-dihydro-5*H*-cyclopenta[*d*]pyrimidin-4-aminium chloride as potent cytotoxic antitubulin agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6151-6155.
26. Gangjee, A.; Namjoshi, O. A.; Keller, S. N.; Smith, C. D. 2-Amino-4-methyl-5-phenylethyl substituted-7-*N*-benzyl-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines as novel antitumor antimetabolic agents that also reverse tumor resistance. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4355-4365.

2

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL DERIVADOS DE CHALCONAS

2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las chalconas son compuestos de origen natural muy abundantes en el reino vegetal, donde son importantes metabolitos secundarios que juegan un papel fundamental en la defensa de las plantas frente a patógenos e insectos. Estructuralmente se caracterizan por presentar dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cetona α,β -insaturada, esqueleto que se muestra en la Figura 2.1. Entre sus propiedades farmacológicas podemos destacar la actividad antioxidante, citotóxica, anticancerosa, antimicrobiana, antimalárica, antihistamínica, antiulcerosa y antiinflamatoria. El amplio espectro de actividades biológicas que las caracteriza, así como su abundancia natural en el reino vegetal y su accesibilidad sintética, convierten a las chalconas en una familia de compuestos de enorme interés para su explotación farmacéutica.^{1,2}

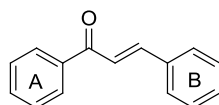


Figura 2.1. Estructura general de las chalconas.

En referencia a las propiedades antitumorales, no fue hasta la década de los 90 cuando se describieron las primeras chalconas con propiedades antimetastáticas,³ tanto sintéticas como de origen natural, siendo en este último caso extraídas de plantas como los helechos, el mirto y las magnolias. La primera evidencia de chalconas con actividad anticancerosa de origen sintético se remonta al trabajo de Edwards y col. en 1990, quienes describieron una familia de chalconas que inhibían la dinámica de microtúbulos y manifestaban efectos antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo*.⁴ Estudios adicionales realizados por Andreu y col. constataron que efectivamente el compuesto más potente, MDL-27048 (**2.1**) (Figura 2.2), actuaba como un agente despolimerizante de microtúbulos, a través de una unión rápida y específica en el sitio de colchicina (**i.3**) en tubulina.^{5,6} Esta unión era además reversible, siendo **2.1** fácilmente desplazado en presencia de podofilotoxina (**i.19**), que también se muestra en la Figura 2.2.

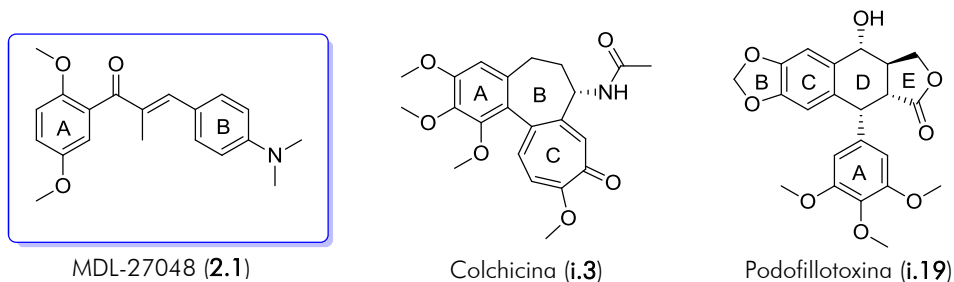


Figura 2.2. Estructura de MDL-27048 (**2.1**), colchicina (**i.3**) y podofilotoxina (**i.19**).

Tal y como se ha comentado en la Introducción General, la combretastatina A-4 o CA-4 (**i.4**) (Figura 2.3) fue el primer compuesto descrito con propiedades interruptoras de la vascularización con un adecuado perfil de toxicidad,⁷ constituyendo desde su caracterización el compuesto de referencia para el desarrollo de nuevos VDAs. Los problemas asociados a las combretastatinas, tales como la baja estabilidad química y la limitada biodisponibilidad, han motivado numerosos programas de química médica centrados en la búsqueda de compuestos más solubles y estables tanto en las condiciones de almacenamiento como a nivel metabólico. Así, se han descrito numerosos

compuestos de síntesis derivados de CA-4 (**i.4**), donde se ha modificado bien la naturaleza y/o los sustituyentes sobre el anillo A y B, o bien la *cis*-olefina que los une. A este respecto, son muy abundantes los trabajos donde dicha olefina se ha sustituido por otra cadena alquílica de distinta longitud, normalmente comprendida entre uno y cuatro carbonos, así como por distintos heterociclos aromáticos.^{8,9} En particular, la incorporación de una cetona α,β -insaturada como puente de conexión entre los anillos aromáticos A y B de CA-4 (**i.4**) ha permitido la obtención de nuevas chalconas (compuestos **2.2**, **2.3** y **2.4**, Figura 2.3) para las que se han descrito sus propiedades tanto antimitóticas como VDAs por unión al sitio de colchicina.^{10,11}

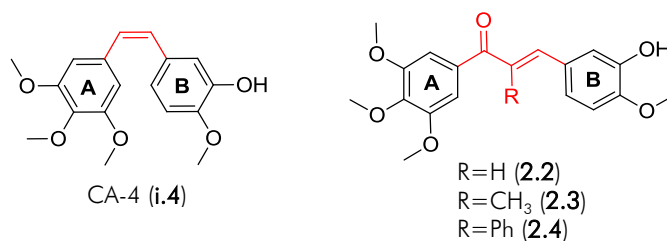


Figura 2.3. Estructura de CA-4 (**i.4**), y las chalconas **2.2**, **2.3** y **2.4**.

Estudios posteriores de *docking* llevados a cabo con la chalcona **2.3** en el sitio de unión de colchicina (Figura 2.4) han puesto de manifiesto que el modo de unión teórico de estas chalconas se asemeja más al de podofilotoxina (**i.19**) que al de la propia colchicina (**i.3**),¹² ligandos cuyos complejos con tubulina se hallan descritos por rayos X.¹³ En estos estudios de modelado molecular se observa que los anillos aromáticos A de la chalcona **2.3** y de la podofilotoxina (**i.19**) son superponibles, orientándose de manera análoga dentro de un bolsillo hidrofóbico de la subunidad β , bolsillo en el que también se dispone el anillo A de colchicina (**i.3**), aunque con distinta orientación.

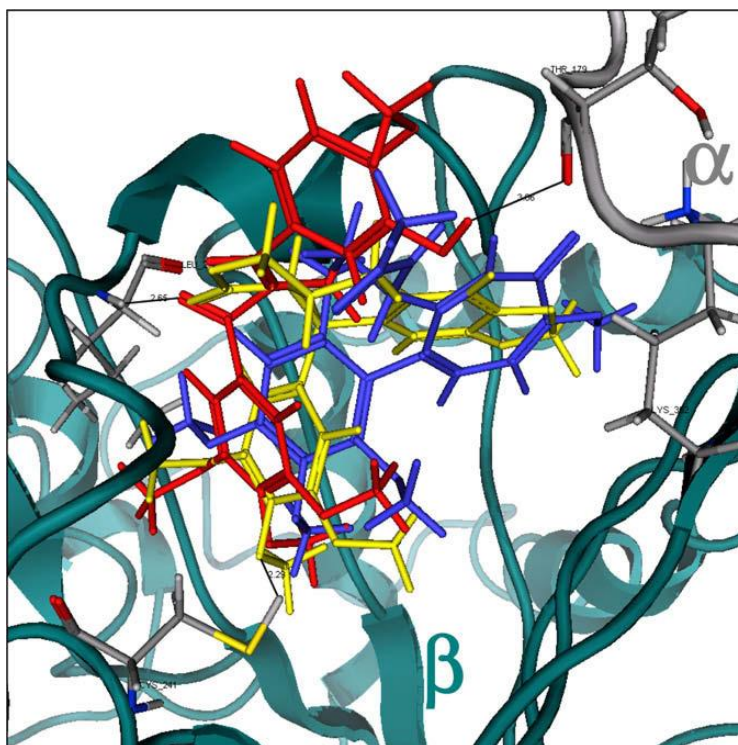


Figura 2.4. Comparación de los modos de unión en el sitio de colchicina de tubulina del compuesto **2.3** (rojo), de colchicina (**i.3**) (azul) y de podofilotoxina (**i.19**) (amarillo). Adaptada de la ref.¹²

En relación a otros compuestos naturales diferentes a chalconas, en los últimos años se han descrito diversos agentes antimitóticos de origen vegetal ligados al sitio de colchicina, destacando la presencia de un anillo de dioxolano en las estructuras de ciertos compuestos, todos con actividad muy significativa. Entre ellos cabe mencionar (Figura 2.5): la poligamaina (2.5),¹⁴ análogo de la podofillotoxina (i.19) que se extrae de las hojas del árbol *Amyris madrensis*; los compuestos relacionados con colchicina, la corcigerina (2.6),¹⁵ extraída también del colchico, y gloriosamina A (2.7),¹⁶ que se obtiene de *Gloriosa rothschildiana*; y por último la CA-2 (2.8),¹⁷ otra combretastatina abundante en la corteza de *Combretum cafrum*, cuya actividad es comparable a la de otros miembros de esta familia más estudiados, como la CA-1 y la CA-4.^{8,18,19}

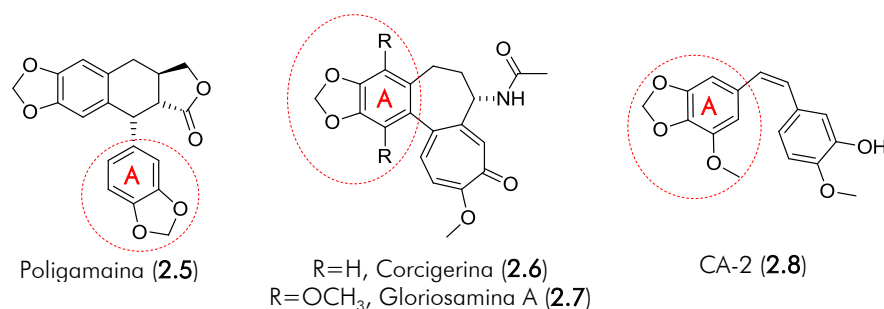


Figura 2.5. Estructura de la poligamaina (2.5), corcigerina (2.6), gloriosamina A (2.7) y combretastatina A-2 (CA-2) (2.8).

A partir de los datos anteriores, en este Capítulo se ha propuesto la síntesis de una nueva familia de chalconas, todas ellas con un anillo de dioxolano sobre las posiciones 2 y 3 del fenilo A como motivo estructural común. Asimismo, se ha añadido un metoxilo adicional en 4, por analogía a los sustituyentes presentes en el anillo A de la CA-2 (2.8). El objetivo último ha consistido en la obtención de nuevas chalconas con capacidad de unión al sitio de colchicina en tubulina, y de este modo, con propiedades antimitóticas por despolimerización de los microtúbulos y con actividad potencial como VDAs.

La estructura general de las chalconas propuestas se representa en la Figura 2.6. En primer lugar, se ha planteado la introducción de distintos sustituyentes en la posición 3 del anillo B (R₂ en la Figura 2.6), y de variaciones en la posición 5 (X en la Figura 2.6), manteniendo el anillo A inalterado. En todos los casos se ha conservado un metoxilo en la posición 4 del anillo B, conforme a precedentes bibliográficos de actividad antiproliferativa de otras chalconas descritas.^{20,21} Además, se ha considerado incorporar un grupo metilo en la posición α (R₁=CH₃ en la Figura 2.6), por similitud con la chalcona 2.3.

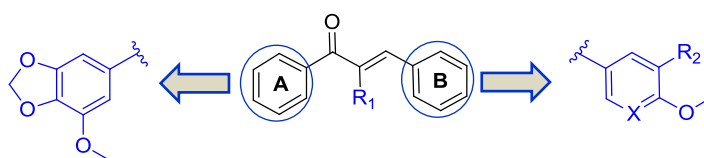


Figura 2.6. Estructura general de las chalconas sintetizadas en este Capítulo.

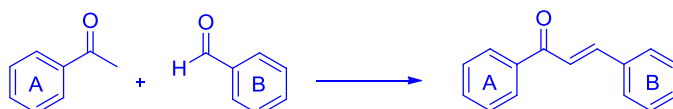
Paralelamente a la síntesis, se ha llevado a cabo la determinación de la actividad antiproliferativa de los compuestos sintetizados, así como ensayos biológicos adicionales encaminados a determinar el mecanismo de acción de esta familia de chalconas.

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1. SÍNTESIS

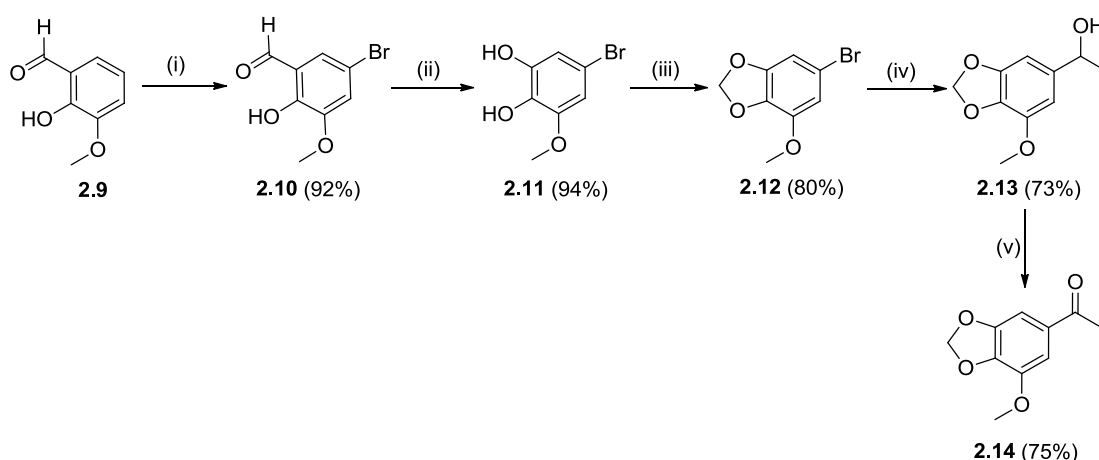
A) Síntesis de chalconas no sustituidas en la posición α ($R_1=H$)

La preparación de las diferentes chalconas no sustituidas en α se efectuó por medio de una condensación aldólica de Claisen-Schmidt, a partir de una acetofenona y un benzaldehído distintamente sustituidos, precursores de los anillo A y B, respectivamente (Esquema 2.1), reacción que da lugar al isómero *E* como compuesto mayoritario.¹¹



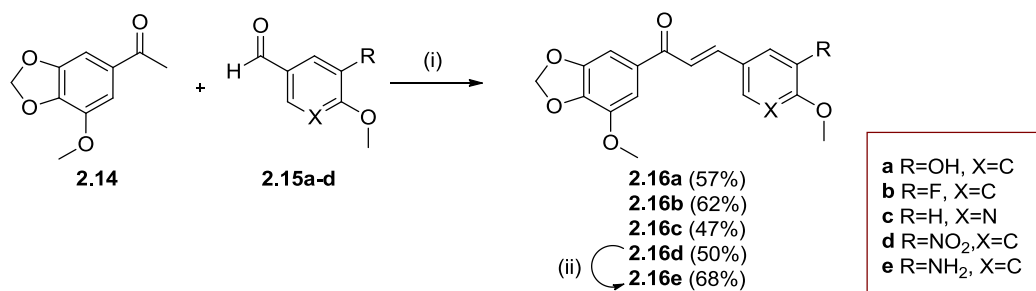
Esquema 2.1. Reacción de condensación de Claisen-Schmidt entre una acetofenona precursora del anillo A y un benzaldehído precursor de B.

Así, para la síntesis de la acetofenona **2.14** precursora del anillo A, se siguió un procedimiento sintético de 5 pasos de reacción (Esquema 2.2). El primer paso consistió en la bromación regioselectiva en la posición 5 del 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído comercial (*o*-vanillina) (**2.9**). Siguiendo un protocolo descrito en la literatura,²² la reacción de **2.9** con *N*-bromosuccinimida (NBS) y acetato amónico en acetonitrilo seco, condujo al producto **2.10** tras tres días y con un rendimiento no superior al 60%. Con el fin de mejorar el rendimiento de la reacción y de acortar el tiempo de la misma, se llevó a cabo la bromación de **2.9** con NBS en presencia de ácido acético,²³ obteniendo así el producto **2.10** tras sólo 1 hora de reacción a 70 °C y con un rendimiento excelente. A continuación, la oxidación de **2.10** con peróxido de hidrógeno y el posterior tratamiento con hidróxido sódico,²⁴ permitió sintetizar el diol **2.11** de forma cuantitativa. La formación del anillo de dioxolano se llevó a cabo por reacción del compuesto **2.11** con dibromometano en medio básico,²⁴ dando lugar al producto **2.12** con un 80% de rendimiento. En el siguiente paso, el tratamiento de **2.12** con *n*-BuLi a -32 °C y la posterior reacción con acetaldehído a -20 °C,²⁵ permitió la formación de alcohol secundario **2.13**, que finalmente se oxidó con PCC obteniéndose la acetofenona deseada **2.14**, con rendimientos en estos dos últimos pasos del 73 y 75%, respectivamente.



Esquema 2.2. Reactivos y condiciones: (i) NBS, AcOH, 70 °C, 1 h. (ii) H₂O₂, NaOH, 25 °C, 10 min. (iii) BrCH₂Br, K₂CO₃, DMF, 100 °C, 90 min. (iv) (a) *n*-BuLi, -32 °C, TBME, 1 h. (b) CH₃CHO, -20 °C, 2 h. (v) PCC, CH₂Cl₂, 25 °C, 4 h.

A continuación, se procedió a la síntesis de las chalconas objetivo (Esquema 2.3). Así, la condensación aldólica de la acetofenona **2.14** con los benzaldehídos comerciales **2.15a-d** en presencia de hidróxido potásico al 50%,²⁶ dio lugar a las chalconas **2.16a-d** con rendimientos en general moderados. A su vez, la reducción del grupo nitro de **2.16d**, empleando cloruro de estaño (II) y ácido clorhídrico concentrado,²⁷ condujo al aminoderivado **2.16e** con un 68% de rendimiento.



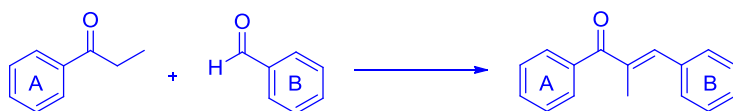
Esquema 2.3. Reactivos y condiciones: (i) KOH 50%, MeOH, 25 °C, 16 h. (ii) SnCl₂, HCl, AcOEt, EtOH, 80 °C, 2 h.

De los datos analíticos y espectroscópicos de estas chalconas cabe destacar que en la mayoría de los casos se obtuvo un único isómero (compuestos **2.16a-b** y **2.16d-e**). De este modo, solamente en el compuesto **2.16c** se observó por HPLC-MS la presencia de dos isómeros, en una relación 95:5. La configuración del doble enlace se determinó con los datos de RMN de estos compuestos (**2.16a-d**). Así, basándonos en el valor de la constante de acoplamiento de los dos hidrógenos vecinales en la cetona α/β -insaturada, que estuvo comprendida entre 15 y 16 Hz, se pudo asignar la configuración *E* al doble enlace de estas chalconas.

Como se detallará más adelante en este Capítulo, de todos los compuestos anteriores (**2.16a-e**), las chalconas **2.16a** y **2.16e**, con un sustituyente hidroxilo y amino en el anillo B, respectivamente, fueron las que presentaron mejores valores de actividad antiproliferativa en cultivo celular. Por ello, el siguiente apartado de este Capítulo (síntesis de α -metilchalconas) se ha centrado exclusivamente en la preparación de compuestos con un grupo hidroxilo o amino en la posición 3 del anillo B.

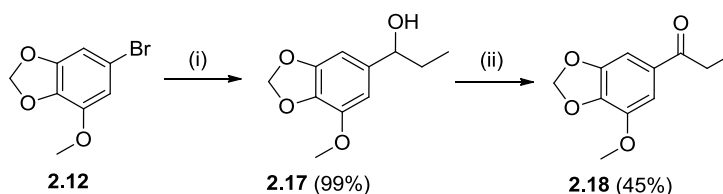
B) Síntesis de α -metilchalconas (R₁=CH₃)

La preparación de las diferentes α -metilchalconas se efectuó siguiendo el Esquema 2.4, mediante condensación de Knoevenagel de una propiofenona y un benzaldehído.



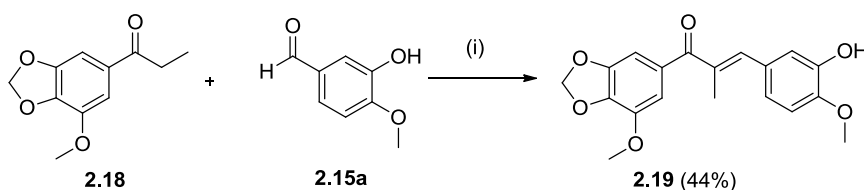
Esquema 2.4. Reacción de condensación de Knoevenagel entre una propiofenona precursora del anillo A y un benzaldehído precursor de B.

Para la síntesis de la propiofenona **2.18** se siguió la ruta descrita en el Esquema 2.5. Así, la reacción del derivado bromado **2.12** con *n*-butillitio y propionaldehído condujo al alcohol **2.17**, que posteriormente se transformó en la propiofenona **2.18** por oxidación en presencia de PCC, con rendimientos del 99 y 45%, respectivamente.



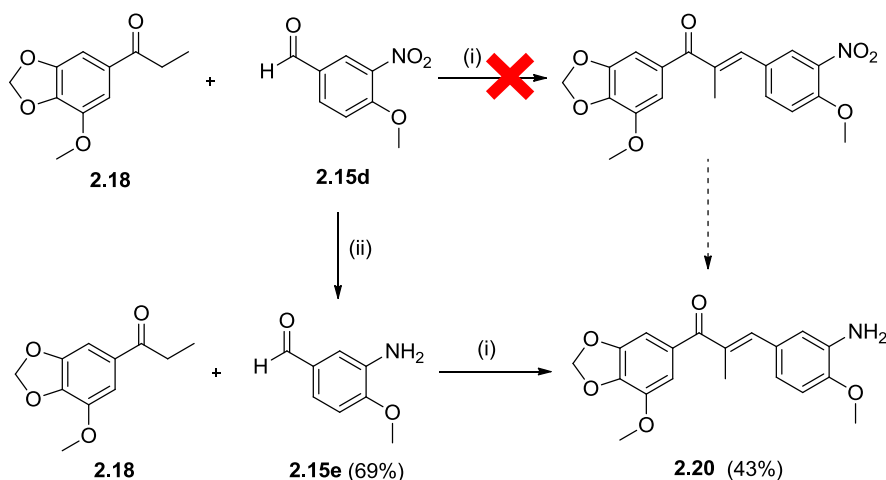
Esquema 2.5. Reactivos y condiciones: (i) (a) *n*-BuLi, -32 °C, TBME, 1 h. (b) CH₃CH₂CHO, -20 °C, 2 h. (ii) PCC, CH₂Cl₂, 25 °C, 4 h.

El siguiente paso consistió en la condensación de la propiofenona **2.18** y los correspondientes benzaldehídos, para la obtención de las chalconas deseadas. Los primeros intentos llevados a cabo para la síntesis de la hidroxichalcona **2.19** a partir de la cetona **2.18** y del benzaldehído **2.15a**, basándonos en procedimientos descritos en la bibliografía,¹¹ transcurrieron con muy bajos rendimientos (<5%). Esto nos llevó a proponer modificaciones en las condiciones de reacción, incrementando al doble la cantidad de piperidina y ácido acético (hasta 1 ml y 0.5 ml, respectivamente por cada mmol de cetona) y añadiendo tamiz molecular a la mezcla de reacción. De esta forma se consiguió sintetizar la chalcona **2.19**, con un rendimiento del 44% tras 16 horas de reacción a 80 °C (Esquema 2.6).



Esquema 2.6. Reactivos y condiciones: (i) Piperidina, AcOH, EtOH, tamiz 4 Å, 80 °C, 16 h.

Para la síntesis de la aminochalcona **2.20** (Esquema 2.7), el primer paso consistió en la reacción de condensación de la cetona **2.18** con el nitrobenzaldehído **2.15d**. En condiciones análogas a las empleadas en el esquema anterior, tras tres días de reacción no se observó la formación del producto de condensación. Por ello se decidió cambiar la estrategia de síntesis, efectuando la reducción del grupo nitro de forma previa a la condensación. Así, el tratamiento del benzaldehído **2.15d** con cloruro de estaño (II) en medio ácido, tal y como se había procedido para la síntesis de



Esquema 2.7. Reactivos y condiciones: (i) Piperidina, AcOH, EtOH, tamiz 4 Å, 80 °C, 16 h. (ii) Na₂S₂O₄, K₂CO₃, CH₂Cl₂, H₂O, 16 h.

2.16e, condujo al amino derivado **2.15e**, si bien con un rendimiento muy bajo (<30%). Sin embargo, utilizando como agente reductor ditionito sódico en medio básico,²⁸ se pudo obtener el aminobenzaldehído **2.15e** con rendimientos cercanos al 70%. Finalmente, la condensación de la propiofenona **2.18** con el benzaldehído **2.15e** condujo a la α -metilchalcona **2.20** con un 43% de rendimiento.

En el caso de la chalcona **2.19**, el cromatograma de HPLC indicó la presencia de un solo isómero. El espectro de ¹H-RMN en DMSO-d₆ también reveló la existencia de un único compuesto, que según precedentes bibliográficos de otras α -metilchalconas debía corresponder al isómero *E*.^{11,29-31} Sin embargo, en el caso de la chalcona **2.20**, por HPLC-MS se observó una mezcla de dos isómeros en proporción 85:15. Además, se puso de manifiesto un aumento de la proporción del isómero minoritario cuando esta muestra se dejaba expuesta a la luz, presumiblemente por un fenómeno de fotoisomerización en disolución que se ha descrito en otros compuestos similares.³²

Con el fin de asignar la configuración *E/Z* de los dos isómeros observados en **2.20**, se efectuó un estudio por RMN que incluyó distintos experimentos de ¹H y ¹³C, mono y bidimensionales. Estos experimentos se llevaron a cabo tanto sobre una disolución recién preparada de **2.20** en DMSO-d₆, como tras exponer esta disolución a la luz. Así, tras 16 horas se comprobó que la proporción del isómero inicialmente minoritario aumentaba hasta alcanzar una relación aproximada de 1:1 de los dos isómeros, tal y como se refleja en la Figura 2.7.

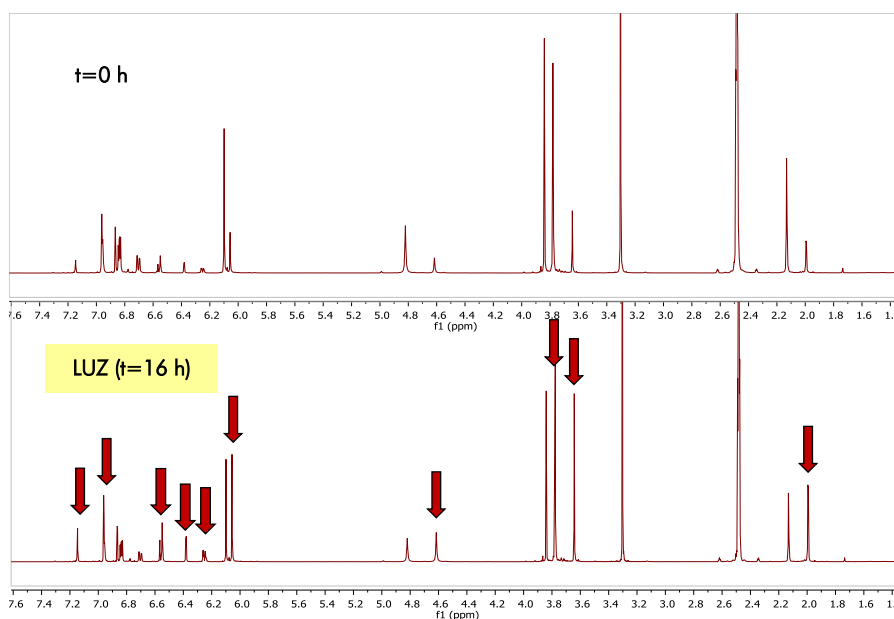


Figura 2.7. Espectros de ¹H-RMN de **2.20** en DMSO-d₆. En ausencia de luz (t=0h) existe una relación 85:15 de dos isómeros. Tras 16 h en presencia de luz el isómero minoritario aumenta en la disolución, alcanzándose aproximadamente una relación 1:1.

Para la correcta asignación de las señales del espectro ¹H-RMN se realizaron experimentos de correlación (HMBC y HSQC) que permitieron asignar las señales de ¹H y ¹³C de los dos isómeros. (Figura 2.8A). A continuación, se realizó un experimento ROESY sobre la muestra que contenía los dos isómeros. Las correlaciones obtenidas (Figura 2.8B) permitieron la asignación del isómero inicialmente mayoritario como el isómero *E*. En concreto, las correlaciones entre la señal del metilo en α a 2.13 ppm del isómero principal a tiempo 0 h, con los dos protones aromáticos en *orto* del

anillo B a 6.74 y 6.80 ppm, indicaban una configuración *E* del doble enlace en este compuesto. Con respecto al isómero minoritario a tiempo 0 h, las correlaciones entre el metilo en α ($\delta=1.99$ ppm) con el hidrógeno en β ($\delta=6.55$ ppm) y con los hidrógenos en *orto* del anillo A ($\delta=6.96$ y 7.15 ppm) confirmaron la asignación del doble enlace como *Z* para este segundo compuesto.

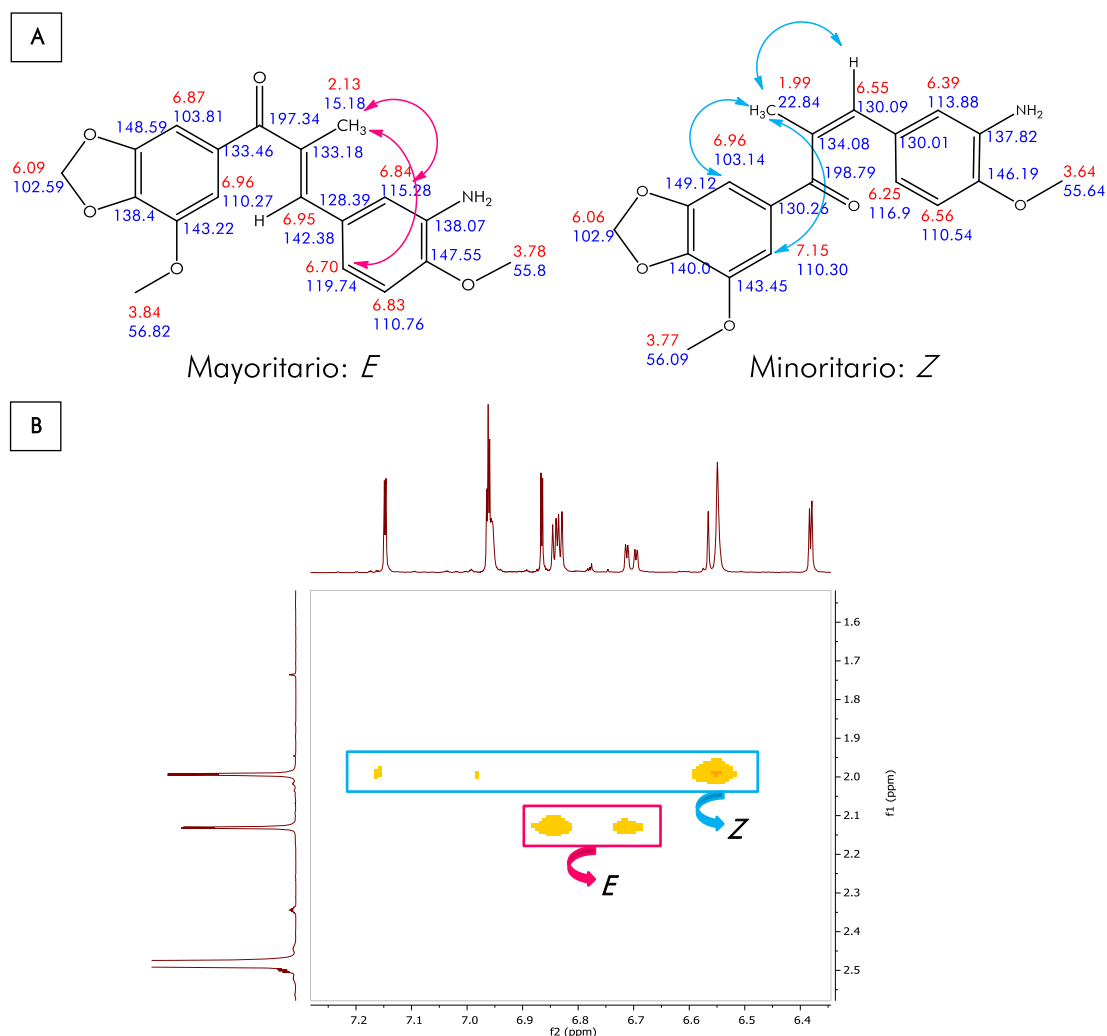
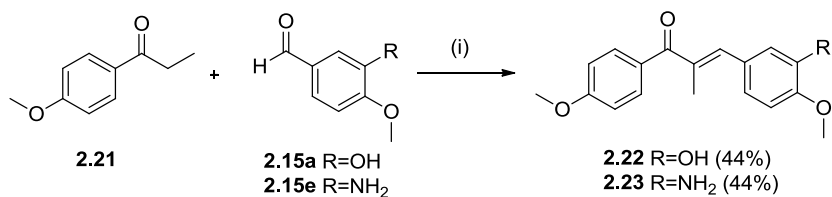


Figura 2.8. Caracterización de los isómeros *E/Z* en 2.20. (A) Asignación por HMBC y HSQC de las señales en ppm de los espectros de ^1H -RMN (en rojo) y ^{13}C -RMN (en azul) de cada isómero. (B) Correlaciones más significativas en el experimento de ROESY que han permitido la asignación de la configuración *E* al isómero mayoritario y *Z* al minoritario.

Asimismo, la comparación de los desplazamientos químicos de las señales del espectro de ^1H -RMN del compuesto **2.19**, obtenido como un único isómero, con las del isómero mayoritario en **2.20** a tiempo 0 h, permitió confirmar la configuración *E* del doble enlace de la chalcona **2.19**.

Por último, y con el propósito de explorar la importancia del anillo de dioxolano en el fenilo A, motivo estructural común de esta familia, se sintetizaron las α -metilchalconas **2.22** y **2.23** que incorporaron un sustituyente 4-metoxilo en este fenilo (Esquema 2.8). Así, la condensación de la propiofenona comercial **2.21** con los benzaldehídos **2.15a** y **2.15e** en las condiciones anteriormente empleadas, condujo a las chalconas **2.22** y **2.23** con rendimientos del 44% en ambos casos.



Esquema 2.8. Reactivos y condiciones: (i) Piperidina, AcOH, EtOH, tamiz 4 Å, 80 °C, 16 h.

Cabe destacar que si bien la chalcona **2.22**, con un grupo OH en B, se obtuvo como un único producto que debía corresponder al isómero *E*, en el aminoderivado **2.23** se distinguieron por HPLC-MS dos isómeros en proporción 81:19. De igual forma, a partir de los valores de los desplazamientos químicos en los espectros de ¹H-RMN, se pudo asignar la configuración *E* al único isómero de la chalcona **2.22** y al isómero mayoritario en **2.23**.

2.2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA CELULAR

Las chalconas sintetizadas, cuyas estructuras se recogen en la Tabla 2.1, se evaluaron en ensayos de proliferación celular en seis líneas celulares diferentes: tres líneas tumorales (HeLa, L1210 y CEM) y tres endoteliales (HMEC-1, MBEC y BAEC). Los resultados se expresan como concentración inhibitoria 50 (Cl₅₀, concentración de compuesto que causa la inhibición del crecimiento del 50% de las células en cultivo) bien en micromolar para la mayoría de los compuestos (Tabla 2.2) o en nanomolar para las chalconas **2.19** y **2.20** y para los controles positivos colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.6**) (Tabla 2.3).

Tabla 2.1. Estructuras de las chalconas sintetizadas en este Capítulo.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Z
2.16a	H	OH	OCH ₂ O		OMe	C
2.16b	H	F	OCH ₂ O		OMe	C
2.16c	H	H	OCH ₂ O		OMe	N
2.16d	H	NO ₂	OCH ₂ O		OMe	C
2.16e	H	NH ₂	OCH ₂ O		OMe	C
2.19	Me	OH	OCH ₂ O		OMe	C
2.20	Me	NH ₂	OCH ₂ O		OMe	C
2.22	Me	OH	H	OMe	H	C
2.23	Me	NH ₂	H	OMe	H	C

Tabla 2.2. Actividad antiproliferativa expresada como Cl₅₀ (μM) de las chalconas **2.16a-e**, **2.22** y **2.23**, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	Cl ₅₀ ^(a) (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
2.16a	0.35 ± 0.26	1.6 ± 0.30	0.67 ± 0.67	0.86 ± 0.90	0.43 ± 0.00	0.04 ± 0.01
2.16b	5.8 ± 5.0	59 ± 14	23 ± 0	1.6 ± 0.0	10 ± 0	1.9 ± 0.3
2.16c	16 ± 2	38 ± 6	28 ± 8	5.4 ± 0.7	11 ± 1	4.3 ± 1.5
2.16d	7.2 ± 0.1	20 ± 5	10 ± 0	2.1 ± 0.1	19.2 ± 14.1	2.9 ± 2.5
2.16e	0.22 ± 0.09	0.11 ± 0.06	0.08 ± 0.00	0.015 ± 0.007	0.043 ± 0.005	0.0095 ± 0.0078
2.22	0.26 ± 0.14	1.6 ± 0.2	0.14 ± 0.05	0.402 ^(b)	0.354 ^(b)	0.094 ^(b)
2.23	0.66 ± 0.22	1.7 ± 0.3	0.30 ± 0.03	0.49 ± 0.15	0.53 ± 0.08	0.43 ± 0.02

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

^(b)Valor de un único experimento.

Tabla 2.3. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (nM) de las chalconas **2.19** y **2.20** y de los compuestos de referencia colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.6**), en células tumorales y endoteliales.

Comp.	$CI_{50}^{(a)}$ (nM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
2.19	13 ± 4	17 ± 3	2.7 ± 1.2	13 ± 2	9.1 ± 8.5	3.6 ± 0.3
2.20	3.9 ± 3.3	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.7	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.4	2.9 ± 0.5
i.3	28 ± 0	14 ± 1	31 ± 19	3.8 ± 1.1	31 ± 15	6.9 ± 0.8
i.6	79 ± 3	82 ± 12	95 ± 6	2.9 ± 0.0	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.0

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

Tal y como se ha comentado anteriormente en este Capítulo, entre las chalconas no sustituidas en la posición α (**2.16a-e**, Tabla 2.2), los compuestos más activos fueron los que presentaron un sustituyente 3-hidroxilo (**2.16a**) o 3-amino (**2.16e**) en el anillo aromático B, con unos valores de CI_{50} en el rango submicromolar en todas las líneas celulares ensayadas. En el caso de la hidroxichalcona **2.16a**, las actividades fueron muy similares en todas las líneas celulares, con una CI_{50} comprendida entre 0.10-0.67 μ M, salvo en la línea endotelial BAEC donde el efecto fue 10 veces más potente (CI_{50} =0.04 μ M). El aminoderivado **2.16e** resultó ser más activo que **2.16a**, especialmente en células endoteliales, donde el incremento de actividad de **2.16e** respecto a **2.16a** alcanzó un orden de magnitud, con una CI_{50} en el rango nanomolar (9.5-43 nM). Las chalconas **2.16b** y **2.16d**, sustituidas en el anillo B con un átomo de flúor y un grupo nitro respectivamente, así como la chalcona **2.16c**, que presentaba en B un anillo de piridina, mostraron una actividad inferior a **2.16e** en más de dos órdenes de magnitud, tanto en células tumorales (CI_{50} =1-19 μ M) como en células endoteliales(CI_{50} =5-59 μ M).

Los mejores valores de actividad antiproliferativa se obtuvieron con las α -metilchalconas **2.19** y **2.20** (Tabla 2.3), que mostraron un efecto antiproliferativo en el rango nanomolar en todas las líneas celulares evaluadas. De este modo, la presencia de un grupo metilo en α supuso un incremento de la actividad entre uno y dos órdenes de magnitud respecto a los análogos no sustituidos en esta posición (compuestos **2.16a** y **2.16e**, respectivamente). Así, la actividad del hidroxiderivado **2.19**, comprendida entre 2 y 17 nM, fue comparable a la de los compuestos de referencia colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.6**) en las seis líneas celulares ensayadas. Aún se obtuvieron mejores resultados con el aminoderivado **2.20**, que con valores de CI_{50} entre 1 y 4 nM resultó ser incluso más potente que los compuestos prototipo.

Igualmente, la importancia del anillo de dioxolano en estas α -metilchalconas **2.19** y **2.20** se puso en evidencia al evaluar las metilchalconas análogas que carecían de este motivo estructural. De esta forma, los compuestos **2.22** y **2.23** (Tabla 2.2) mostraron una actividad antiproliferativa con valores de CI_{50} entre 1.7 y 0.1 μ M, es decir, a concentraciones dos órdenes de magnitud superiores respecto a los compuestos **2.19** y **2.20**.

Así, de las Tablas anteriores se pudieron establecer las siguientes relaciones estructura-actividad de esta familia de chalconas: 1) el anillo de dioxolano en el fenilo A era crucial en la actividad antiproliferativa de estos compuestos; 2) la introducción de un grupo metilo en la posición α se tradujo en una mejora de la CI_{50} en más de dos órdenes de magnitud; 3) en el anillo B los sustituyentes con los que se obtuvieron los resultados más satisfactorios fueron el 3-NH₂, y en menor medida, el 3-OH. Con estos datos, es importante destacar la actividad antiproliferativa de las chalconas **2.19** y **2.20**, que estuvo comprendida en el rango nanomolar en las 6 líneas celulares

ensayadas, presentando además unos valores de Cl_{50} iguales o incluso mejores respecto a los obtenidos para los compuestos prototipo, colchicina y CA-4P.

2.2.3. ESTUDIOS PARA DETERMINAR EL MECANISMO DE ACCION

Para esclarecer el mecanismo de acción de esta familia de chalconas se llevaron a cabo distintos experimentos. La mayoría de ellos los realicé en mayo y junio de 2012 durante mi estancia en el Instituto Rega (KULeuven, Bélgica), bajo la supervisión de la Dra. Sandra Liekens. De las chalconas disponibles en aquel momento, el compuesto **2.16a** era el más activo y por ello se eligió como compuesto de elección con el que efectuar estos ensayos. Para el cálculo de las constantes de asociación, me desplazé al laboratorio del Dr. Fernando Díaz en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), realizando estas medidas en mayo de 2013. Si bien hay experimentos planificados con el compuesto más activo de esta serie **2.20** que se realizarán en los próximos meses, para la redacción de esta memoria se han empleado los datos actualmente disponibles, todos ellos obtenidos de la evaluación de la chalcona **2.16a**.

A) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular

Siguiendo un procedimiento análogo al llevado a cabo en el Capítulo 1, se evaluó el efecto de estas chalconas sobre la progresión del ciclo celular. En este caso se emplearon células endoteliales HMEC-1, que se incubaron durante 8 horas bien con DMSO (0.1%), colchicina (**i.3**) (0.1 μ M), CA-4P (**i.6**) (0.1 μ M) o con el compuesto **2.16a** (0.3 μ M y 1 μ M), y luego se sometieron a estudio por citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura 2.9, en el experimento control las células

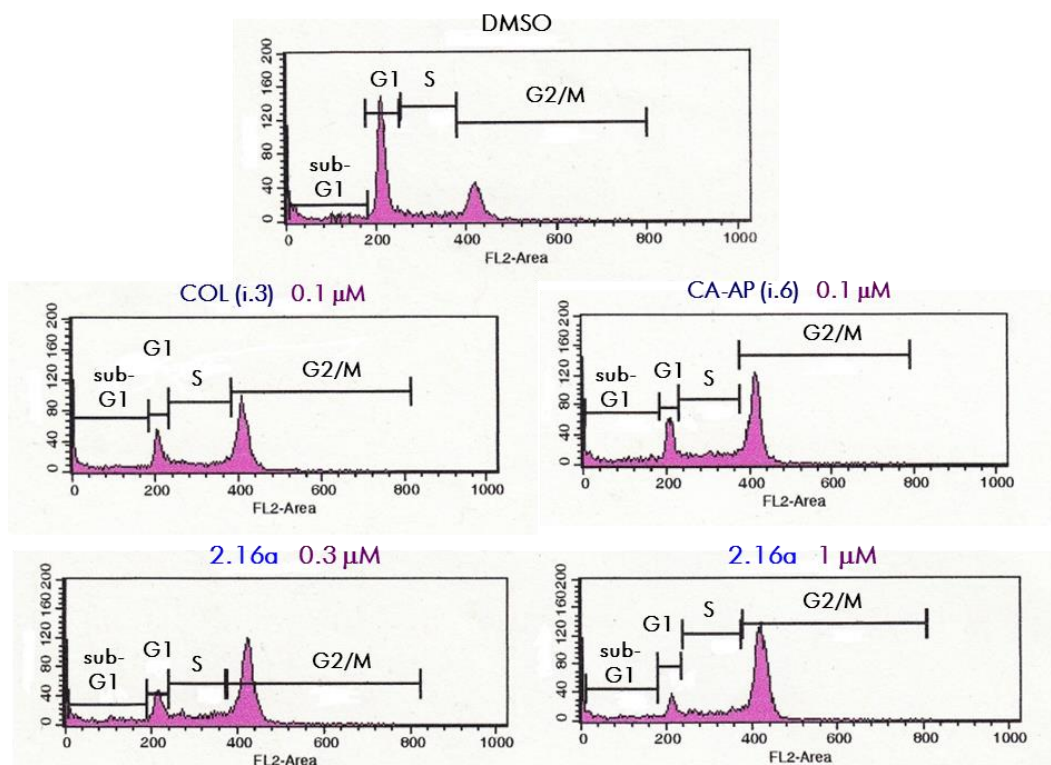


Figura 2.9. Efectos de estas chalconas sobre la progresión del ciclo celular. Las células HMEC-1 se trataron con 0.1% de DMSO, colchicina (**i.3**) (0.1 μ M), CA-4P (**i.6**) (0.1 μ M) y **2.16a** (0.3 μ M y 1 μ M), y se analizaron por citometría de flujo tras 8 h de tratamiento.

mostraron el patrón de distribución típico en las distintas fases del ciclo celular (sub-G1, G1, S y G2/M). Sin embargo, el tratamiento tanto con colchicina y CA-4P a 0.1 μM como con la chalcona **2.16a**, a una concentración de 0.3 μM o superior, provocó una acumulación de células en la fase G2/M. Se puede concluir así que el efecto antiproliferativo de **2.16a**, y presumiblemente del resto de las chalconas sintetizadas en este Capítulo, es consecuencia del bloqueo que inducen en la división celular (fase G2/M), comportamiento similar respecto a colchicina, CA-4P y al resto de ligandos descritos de este sitio en tubulina.³

B) Unión al sitio de colchicina en tubulina y determinación de las constantes de asociación

Con el fin de confirmar la unión específica de esta familia de chalconas al sitio de colchicina, se realizaron dos experimentos de competición diferentes. El primero de ellos fue cualitativo y consistió en un ensayo con un ligando irreversible. El segundo experimento, cuantitativo, permitió el cálculo de las constantes de asociación (K_a) con tubulina, haciendo uso de un ligando reversible.

Para el experimento cualitativo se empleó *N,N*-etilen-bis(iodoacetamida) (EBI), agente alquilante de los residuos de Cys239 y Cys354 presentes en el sitio de colchicina en tubulina. La unión de este compuesto a tubulina se puede visualizar fácilmente por la técnica de *western blot*, dada la mayor movilidad cromatográfica en gel de poliacrilamida del complejo de EBI/tubulina respecto a tubulina libre. Así, los ligandos del sitio de colchicina en tubulina previenen la unión de EBI a tubulina y por tanto, la formación de una segunda banda reactiva (EBI/tubulina) visible por *western blot*, convirtiendo a esta metodología en una forma fácil, rápida y económica de determinar si un compuesto se une o no al sitio de colchicina en tubulina.³³

Para este ensayo se empleó la línea de cáncer de mama MDA-MB-231, donde se visualizan mejor los resultados de este experimento de competición. Tal y como se observa en la Figura 2.10, la adición de EBI sobre células MDA-MB-231 condujo a la aparición de una segunda banda (β -tubulina/EBI) por debajo de la banda característica de β -tubulina. Las células que fueron tratadas con colchicina (**i.3**) (2.5 μM) de forma previa a la adición de EBI, no mostraron esa segunda banda (β -tubulina/EBI) ya que la presencia de colchicina impedía la unión de EBI. Del mismo modo, al añadir la chalcona **2.16a** a una concentración de 10 μM no se detectó el aducto de EBI con tubulina. Estos resultados indicaron que el efecto antimitótico de esta serie de compuestos se producía como consecuencia de su unión específica al sitio de colchicina en tubulina.

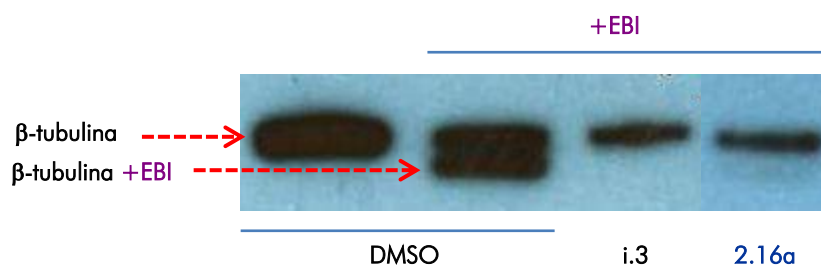


Figura 2.10. Las chalconas sintetizadas se unen a tubulina específicamente en el sitio de la colchicina. Las células MDA-MB-231 se trataron con DMSO (0.1%), con colchicina (**i.3**) (2.5 μM), y con la chalcona **2.16a** (10 μM) durante 8 h. Luego se añadió EBI (100 μM) y tras 90 min las células se recogieron y se sometieron a estudio por *western blot* con el anticuerpo β -tubulina. EBI se une a 2 residuos de cisteína del sitio de colchicina en tubulina, generando un aducto con esta proteína (banda inferior) que migra a mayor velocidad que tubulina libre (banda superior).

Para la medida de la constante de asociación (K_a) del compuesto **2.16a** con α,β -tubulina bovina, se efectuó un experimento de competición con el ligando reversible (*R*)-(+)-etil-5-amino-2-metil-1,2-dihidro-3-fenilpirido[3,4-*b*]pirazin-7-il carbamato (R-PT, **i.23**), cuyo valor de K_a es de $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.³⁴ Este compuesto se caracteriza por la emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}=374 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}=425 \text{ nm}$) al estar unido al sitio de colchicina en tubulina.³⁵ De este modo, en experimentos de competición, a una determinada concentración de ligando, se puede determinar no sólo si éste se une al sitio de colchicina en tubulina, sino también la afinidad del proceso de unión, según el descenso producido en la emisión de fluorescencia del complejo tubulina/R-PT. Así, la adición de la chalcona **2.16a** a una disolución de tubulina en PBS con R-PT produjo un descenso de la fluorescencia del complejo tubulina/R-PT, efecto que además fue dependiente de la concentración de chalcona añadida (Figura 2.11). De esta forma se pudo ratificar la unión específica de este compuesto al sitio de colchicina en tubulina.

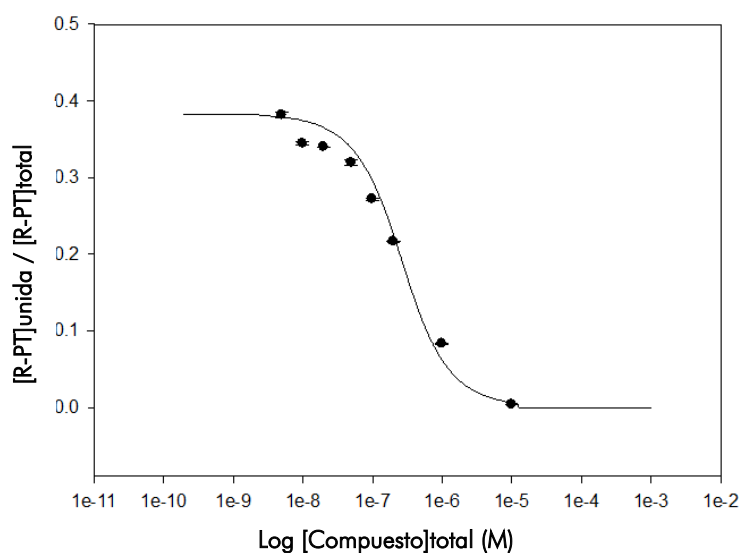


Figura 2.11. La chalcona 2.16a desplaza a R-PT del sitio de colchicina de forma concentración-dependiente. Empleando $0.2 \mu\text{M}$ de R-PT y $0.2 \mu\text{M}$ de tubulina en PBS con 0.1 mM de GTP a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, se evaluó el desplazamiento de R-PT por adición de concentraciones crecientes del compuesto **2.16a**. Los valores se obtuvieron una vez alcanzado el equilibrio, asumiendo una unión tubulina:compuesto 1:1.

Asimismo, a partir de los datos de desplazamiento de R-PT obtenidos, se pudo calcular el valor de la constante de asociación de esta chalcona **2.16a** con α,β -tubulina (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Constantes de asociación (K_a) experimentales del compuesto 2.16a, y de otros ligandos de referencia del sitio de colchicina.

Compuesto	$K_a \text{ (M}^{-1}) \text{ } 25 \text{ }^\circ\text{C}$
Colchicina (i.3)	$1.16 \times 10^7 \text{ (a } 37 \text{ }^\circ\text{C)}^{(36)}$
Podofilotoxina (i.19)	$1.8 \times 10^6 \text{ }^{(37)}$
R-PT (i.23)	$3.2 \times 10^6 \text{ }^{(34)}$
2.16a	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^7 \text{ }^{(a)}$

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

Como se puede observar, el valor de K_a experimental obtenido para el compuesto **2.16a** se encontró en el rango submicromolar ($1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Además, cabe destacar que esta constante fue muy similar a la K_a de colchicina ($1.16 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$),³⁶ y al mismo tiempo, un orden de magnitud mejor que la K_a de podofilotoxina (**i.19**) ($1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).³⁷

C) Estudio del efecto sobre las fibras del huso mitótico

Una vez comprobada la unión de estas chalconas al sitio de colchicina en tubulina, se pasó a investigar el efecto de las mismas sobre el huso mitótico, fibras que se forman durante la división celular y que están constituidas esencialmente por microtúbulos de tubulina. Para ello, las células endoteliales HMEC-1 se incubaron con colchicina (**i.3**) ($0.01 \mu\text{M}$) o con **2.16a** ($0.1 \mu\text{M}$), y transcurridas 16 horas de tratamiento, los microtúbulos celulares se analizaron por microscopía confocal (inmunofluorescencia). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.12. En las células del experimento control, tratadas con DMSO (0.1%), se visualizó el aspecto típico de los microtúbulos en metafase (panel A), con los cromosomas (en color azul) alineados en el centro de la célula formando la placa ecuatorial y los microtúbulos (en color verde) dispuestos de un polo al otro de la célula. Asimismo, se observaron células en estadios de la división algo más tardíos, como por ejemplo en anafase (panel B). Ahora bien, el tratamiento tanto con colchicina (**i.3**) (paneles C y D) como con el compuesto **2.16a** (paneles E y F) originó unos microtúbulos completamente aberrantes y desorganizados, con una distribución aleatoria en el interior de las células. De esta forma, el efecto

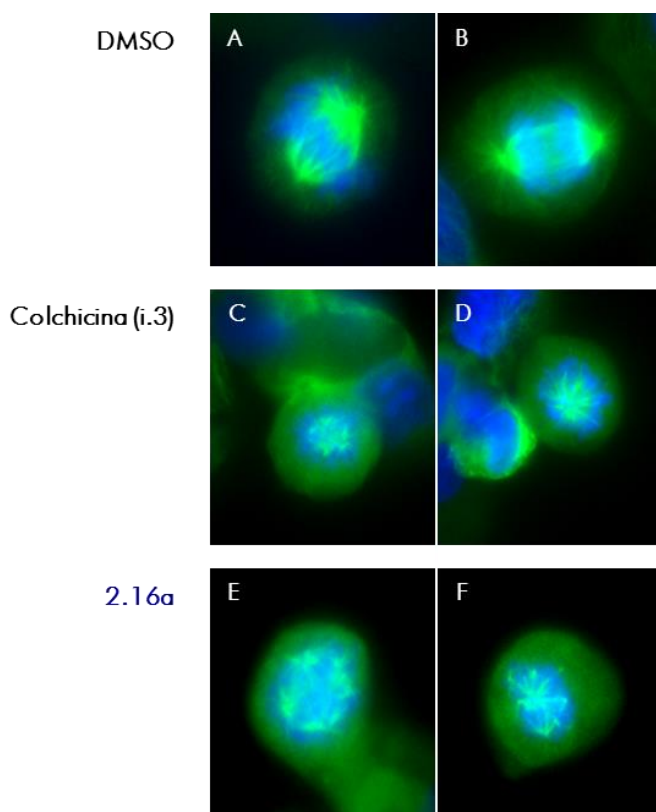


Figura 2.12. Efecto de estas chalconas sobre las fibras del huso mitótico. Las células HMEC-1 se trataron durante 16h con DMSO (0.1%) (A y B), con colchicina (**i.3**) a $0.01 \mu\text{M}$ (C y D) y con la chalcona **2.16a** a $0.1 \mu\text{M}$ (E y F). Luego se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-tubulina (verde) y con DAPI (azul) que se une al ADN. Imágenes tomadas por microscopía confocal.

interruptor del ciclo celular en la fase G2/M que estas chalconas habían manifestado, podría justificarse por la imposibilidad de las células para organizar el ADN en la placa ecuatorial durante la metafase, proceso imprescindible para completar el proceso de división celular.

D) Estudio del efecto interruptor de la vascularización

Con el propósito de valorar la potencial actividad VDA de estas chalconas, se decidió evaluar el efecto del compuesto **2.16a** sobre una red de vasos de células endoteliales previamente establecida. Para ello se cultivaron células endoteliales (HMEC-1) sobre matrigel, donde crecen formando redes de tubos.³⁸ Una vez que estos tubos fueron apreciables (3 horas), se añadió DMSO (0.1%) a modo de control negativo, CA-4P (**i.6**) (0.01, 0.03 y 0.3 μM) como compuesto de referencia, o bien el compuesto **2.16a** (0.1, 0.3 y 3 μM). Tras 90 min de incubación, las diferentes muestras se visualizaron al microscopio y fueron fotografiadas. Como se puede observar en la Figura 2.13, mientras que las células no tratadas (0.1% DMSO) mantuvieron intacta la red de tubos que se había establecido en un principio, la adición tanto de CA-4P (**i.6**) como de la chalcona **2.16a**, provocó una clara interrupción de estos tubos, fenómeno que además fue dependiente de la concentración de compuesto.

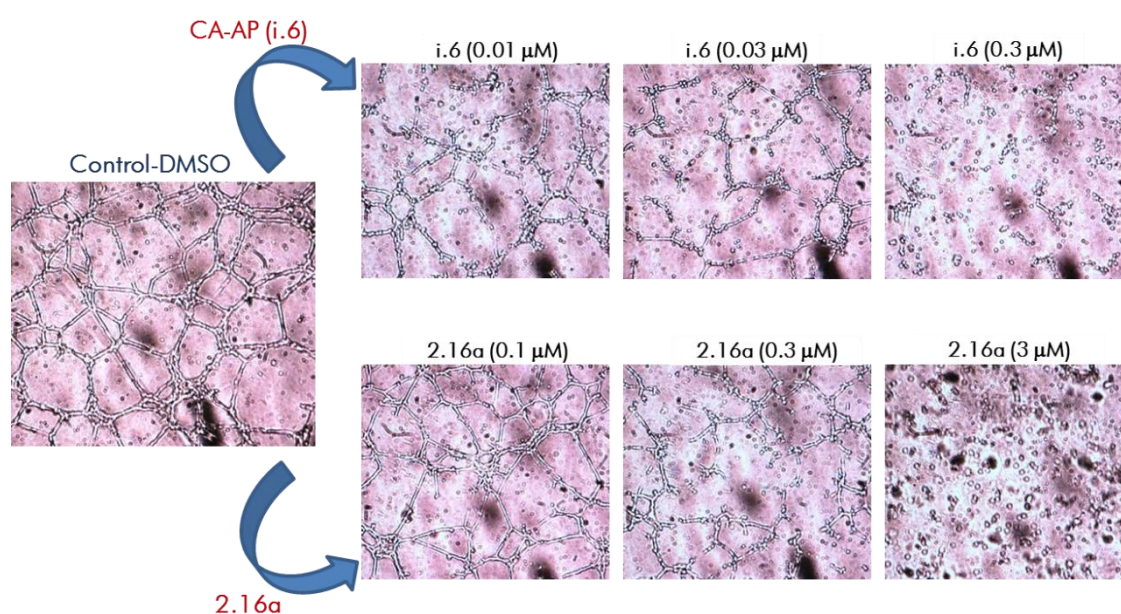


Figura 2.13. Efecto interruptor de estas chalconas sobre una red vascular de células endoteliales. Las células HMEC-1 se cultivaron sobre matrigel, donde crecen formando tubos. Tras 3 h se añadió DMSO (0.1%), CA-4P (**i.6**) (0.01, 0.03 y 0.3 μM) o **2.16a** (0.1, 0.3, y 3 μM). Fotografías tomadas tras 90 min de tratamiento con los compuestos **i.6** y **2.16a**.

E) Estudio del efecto sobre la morfología endotelial

Tal y como se ha comentado en la Introducción General, la despolimerización de los microtúbulos ocasionada por la acción de los VDAs, da lugar en las células endoteliales a la activación de una cascada intracelular de quinasas que conducen a la contracción de las fibras de actina, y en definitiva, a cambios morfológicos cruciales para la adecuada función del endotelio.³⁹ De esta forma, una vez comprobada la unión específica de estas chalconas a tubulina, así como la capacidad de las mismas para interrumpir una red de tubos endoteliales, se decidió estudiar el efecto

de estos compuestos sobre la morfología de células endoteliales (HMEC-1). Para ello, las células se incubaron durante 8 horas bien con DMSO (0.1%) o bien con la chalcona **2.16a** ($1 \mu\text{M}$), y a continuación se preparó una tinción celular para visualizar las fibras de actina por microscopía confocal. Al mismo tiempo se tiñeron tanto el ADN como los microtúbulos, con el fin de estudiar también el efecto sobre las fibras del huso mitótico antes explicado. Como se observa en la Figura 2.14, las células no tratadas (DMSO), mantuvieron la morfología típicamente alargada y plana de las células endoteliales. Ahora bien, el tratamiento con el compuesto **2.16a** condujo a células visiblemente redondeadas y contráctiles, poniendo así de manifiesto el cambio morfológico radical que estas chalconas ocasionaban sobre las células endoteliales. Esto podría dar lugar al debilitamiento de las uniones intercelulares y al incremento en la permeabilidad endotelial, y de esta forma desencadenar el colapso vascular característico de los VDAs. Asimismo, en la Figura 2.14 se presenta nuevamente el efecto interruptor del huso mitótico que la chalcona **2.16a** provocó sobre aquellas células endoteliales que se encontraban en división (panel de tubulina).

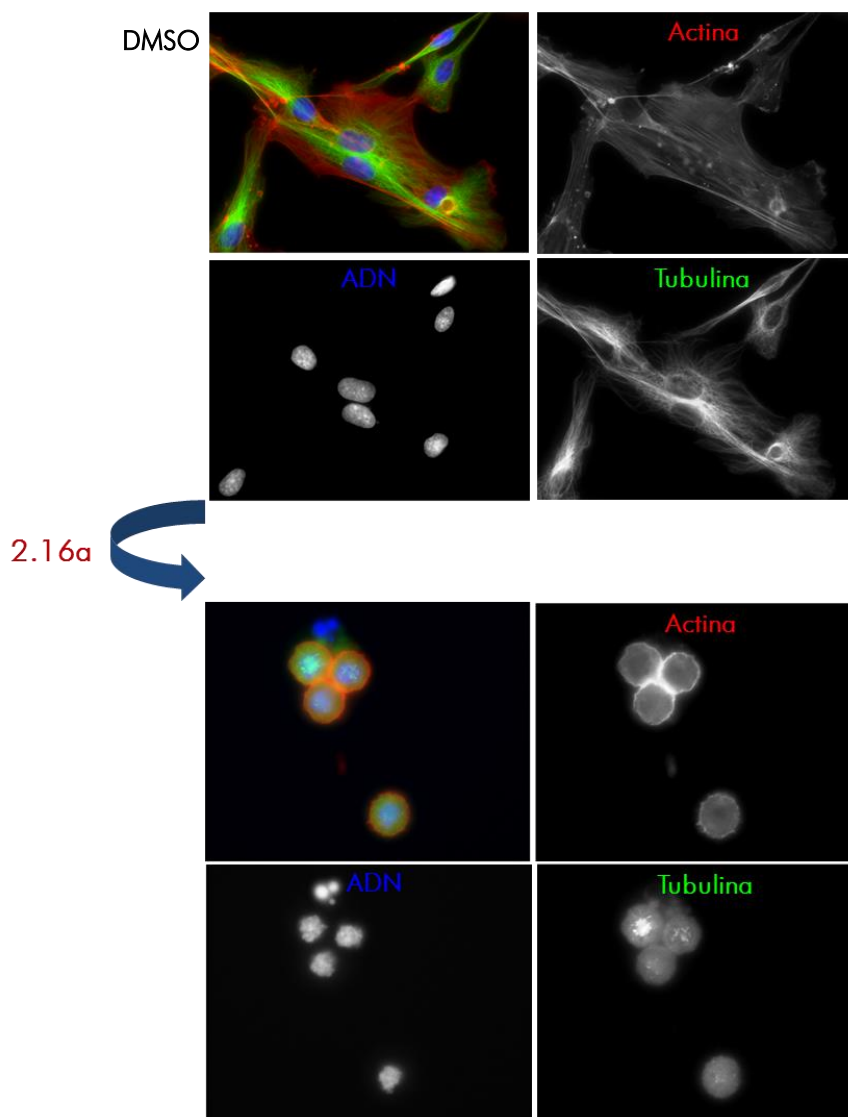


Figura 2.14. Efectos de estas chalconas sobre el citoesqueleto de actina y la morfología de las células endoteliales. Las células HMEC-1 se trataron con $1 \mu\text{M}$ de **2.16a** durante 8 h y luego fueron fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-tubulina (verde), DAPI (azul) que se fija al ADN, y tetrametilrodamina B faloidina-isocianato (rojo) que se une a las fibras de actina. Para el experimento control se emplearon células tratadas con DMSO (0.1%). Imágenes tomadas por microscopía confocal.

2.2.4. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE 2.20

Una vez demostrada que la actividad antiproliferativa de estas chalconas podía atribuirse a su capacidad de interaccionar con tubulina en el sitio de colchicina, así como su actividad antimitótica y antivascular, nos centramos en el compuesto más potente (la metilchalcona **2.20**) para determinar su solubilidad y estimar así su potencial biodisponibilidad. Para este estudio de solubilidad se suspendió un exceso del compuesto **2.20** en tampón fosfato (PBS) y la muestra se agitó durante 2 horas. Posteriormente, esta muestra se filtró y la cantidad disuelta se cuantificó por HPLC, interpolando los resultados obtenidos en rectas patrón (previamente elaboradas a partir de concentraciones conocidas de **2.20**). El valor de solubilidad de **2.20** fue de 0.016 mg/ml (46 μ M), dato que comprometía el planteamiento de los estudios de eficacia y toxicidad *in vivo*. Con el objetivo de incrementar la solubilidad de este compuesto tan prometedor, se planteó la preparación de profármacos de **2.20** mediante derivación del grupo amino del anillo B.

2.2.5. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE PROFÁRMACOS DE 2.20

Una de las estrategias más habituales para mejorar la solubilidad acuosa de compuestos activos altamente hidrófobos es a través de la preparación de profármacos. Un profármaco se define como una forma inactiva de la sustancia de interés que experimenta la conversión al compuesto activo dentro del organismo por un proceso químico o metabólico (Figura 2.15A).⁴⁰ Normalmente, un profármaco consiste en un fármaco unido covalentemente a un grupo transportador, si bien la unión debe ser lo suficientemente lábil como para permitir que el fármaco se libere con facilidad en el organismo. Es importante resaltar que el transportador debe ser inerte biológicamente (no debe presentar ninguna actividad biológica ni ser tóxico), así como fácilmente metabolizable y excretable. En este sentido, los profármacos de aminoácidos han sido ampliamente utilizados para incrementar la solubilidad de fármacos con grupos hidroxilos o aminos libres, mediante la formación de un enlace éster o amida, respectivamente (Figura 2.15B).^{40,41}

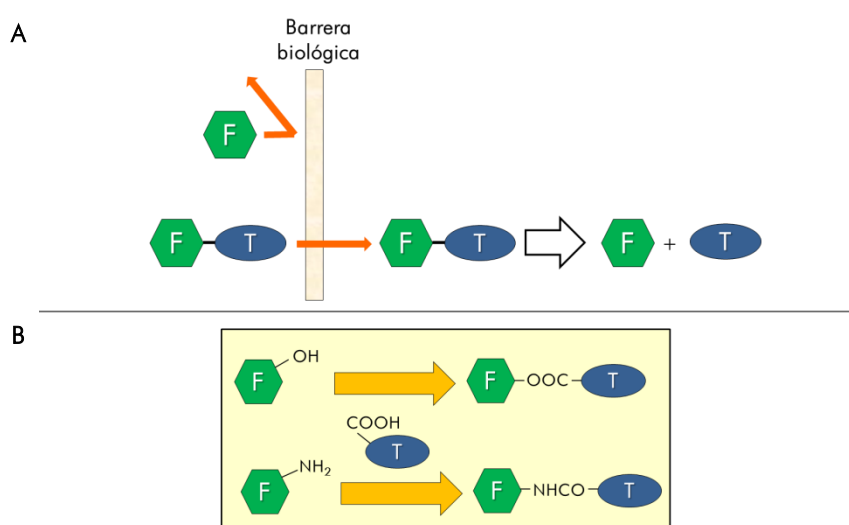


Figura 2.15. (A) Representación simplificada del concepto profármaco. (B) Derivación de un fármaco con un grupo hidroxilo o amino primario a un profármaco de éster o amida, respectivamente, a partir de un transportador con un grupo ácido carboxílico libre. F: fármaco; T: transportador.

Un ejemplo del empleo de aminoácidos como transportadores en profármacos lo constituye el compuesto **i.7** (AVE-8062 u ombrabulina) (Figura 2.16), un derivado de L-serina de la combrestatina A-4. Este profármaco con propiedades VDAs⁴² fue introducido en investigación clínica por Sanofi-Aventis, y en la actualidad se encuentra en fases II y III. Por tanto, nuestra primera aproximación para la preparación de profármacos de la chalcona **2.20** consistió en la preparación del correspondiente derivado de L-serina sobre el grupo amino del anillo B.

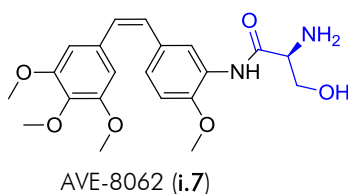
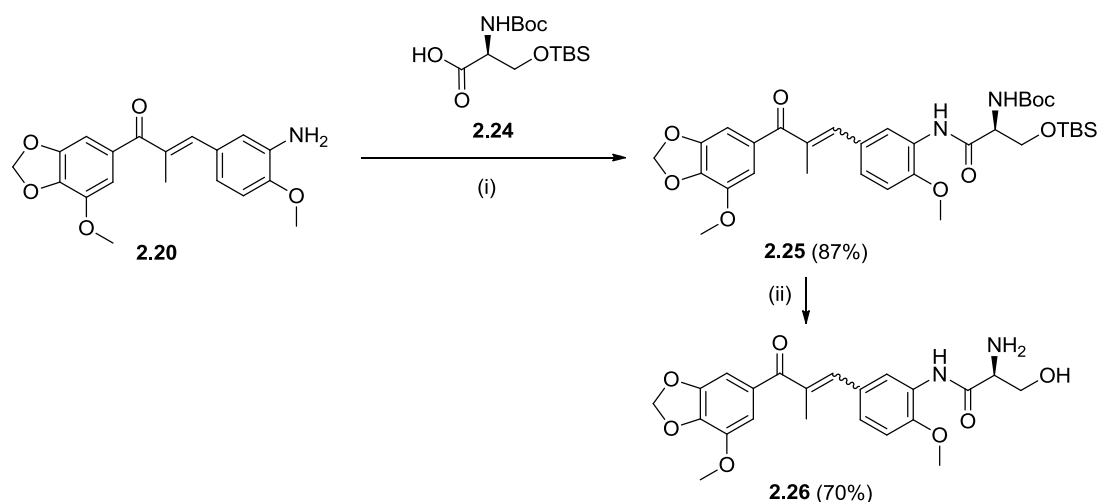


Figura 2.16. Estructura de AVE-8062 (i.7)

Como segunda aproximación para la preparación de profármacos de **2.20** se consideró utilizar el dipéptido L-lisina-L-prolina como grupo transportador. Estudios recientes de nuestro grupo de investigación en síntesis de profármacos sobre grupos OH y NH₂ de distintos fármacos, han puesto de manifiesto que el empleo de oligopéptidos mejora muy notablemente la solubilidad en agua respecto al empleo de un solo aminoácido.⁴³⁻⁴⁶ Además, estos oligopéptidos son reconocidos por la enzima endógena dipeptidil-peptidasa tipo IV (DPP-IV/CD26), presente en suero y en distintos tejidos, favoreciéndose de este modo la liberación del fármaco en su forma activa. La enzima CD26 se caracteriza por una gran especificidad de sustrato, dado que principalmente reconoce e hidroliza secuencias dipeptídicas que contienen una prolina en la penúltima posición del extremo *N*-terminal.⁴⁷⁻⁴⁹ Así, empleando el dipéptido L-lisina-L-prolina se podría incrementar la solubilidad acuosa gracias a la basicidad de la lisina terminal (con dos aminas primarias protonadas a pH fisiológico), mientras que la prolina directamente unida a **2.20** permitiría el reconocimiento por CD26, y por tanto, la liberación del compuesto activo.

A) Síntesis de profármacos de 2.20

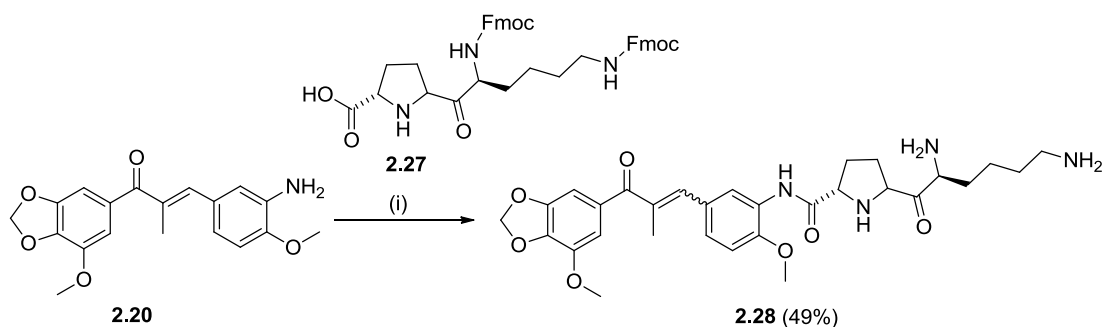
La síntesis del derivado de L-serina **2.26** se muestra en el Esquema 2.9. El primer paso consistió en la reacción de la chalcona **2.20** con la L-serina **2.24** previamente sintetizada,⁵⁰ donde los grupos amino e hidroxilo se encontraban protegidos con BOC y TBS respectivamente, empleando para el acoplamiento PyBOP y trietilamina. El compuesto así obtenido (**2.25**) se desprotegió por tratamiento con ácido trifluoroacético, dando lugar al derivado de L-serina **2.26** con un rendimiento muy bueno en las dos etapas.



Esquema 2.9. Reactivos y condiciones: (i) PyBOP, TEA, CHCl₃, 25 °C, 72 h. (ii) TFA, CHCl₃, 25 °C, 24 h.

De los datos analíticos y espectroscópicos de este profármaco es necesario destacar que si bien se partió de una mezcla de isómeros *E:Z* 85:15 de **2.20**, tras las etapas de acoplamiento y desprotección del aminoácido se detectó un aumento del isómero *Z* en **2.26** hasta alcanzar una relación 2:1, manteniéndose como mayoritario el isómero *E*.

Para la síntesis del L-lisil-L-prolil derivado **2.28**, se llevó a cabo el acoplamiento de la chalcona **2.20** con el dipéptido **2.27**, previamente sintetizado,⁴³ donde los grupos aminos primarios de la L-lisina se encontraban protegidos con Fmoc (Esquema 2.10). El acoplamiento se realizó empleando HATU y DIPEA, e irradiando al microondas a 40 °C. A continuación, se desprotegeron los grupos Fmoc por reacción con piperidina, obteniéndose el compuesto **2.28** con un rendimiento cercano al 50%. También en este caso, el profármaco se obtuvo en forma de mezcla de isómeros *E:Z* en proporción 2:1.



Esquema 2.10. Reactivos y condiciones: (i) (a) HATU, DIPEA, DMF anh., MW, 40 °C, 2 h.; (b) Piperidina, CH₂Cl₂, 25 °C, 2 h.

B) Determinación de la solubilidad de 2.26 y 2.28

La medida de la solubilidad de los profármacos **2.26** y **2.28** se efectuó tal y como se ha descrito con anterioridad en este Capítulo, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.5. Así, el profármaco de L-serina **2.26** presentó un valor de solubilidad de 0.5 mg/ml, casi 30 veces superior a la del compuesto con el grupo amino libre **2.20**. La conjugación con el derivado dipeptídico de L-lisina-L-prolina (compuesto **2.28**) condujo a un incremento espectacular de la solubilidad, consiguiendo de esta forma un valor de 31.268 mg/ml, aproximadamente dos mil veces superior a la del compuesto precursor **2.20**.

Tabla 2.5. Solubilidad en PBS del fármaco **2.20** y de los profármacos **2.26** y **2.28**.

Compuesto	Solubilidad en PBS (mg/ml)	Incremento de solubilidad
2.20	0.016	-
2.26	0.468	29
2.28	31.268	1954

C) Evaluación del efecto antiproliferativo de 2.26 y 2.28

Los resultados de la evaluación biológica de los profármacos **2.26** y **2.28** en ensayos de proliferación celular se recogen en la Tabla 2.6 expresados como valores de CI_{50} en unidades nanomolares. También se incluyen en esta tabla los datos del compuesto con el grupo amino libre **2.20**, así como los de los de colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.6**) empleados como controles positivos.

Tabla 2.6. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (nM) de las chalconas **2.20**, **2.26** y **2.28**, y de los compuestos de referencia colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.6**), en células tumorales y endoteliales de las chalconas.

Comp.	$CI_{50}^{(a)}$ (nM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
2.20	3.9 ± 3.3	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.7	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.4	2.9 ± 0.5
2.26^(b)	4400	4300	1400	8000	1500	830
2.28	17 ± 1	14 ± 2	4.1 ± 0.2	1.4 ± 0.1	-	7.3 ± 2.5
i.3	28 ± 0	14 ± 1	31 ± 19	3.8 ± 1.1	31 ± 15	6.9 ± 0.8
i.6	79 ± 3	82 ± 12	95 ± 6	2.9 ± 0.0	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.0

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

^(b) Resultados de un único experimento.

Tal y como se observa en la Tabla 2.6, el profármaco de L-serina **2.26** mostró un efecto antiproliferativo inferior en tres órdenes de magnitud respecto al compuesto **2.20**, es decir, el profármaco fue 1000 veces menos activo que el fármaco. Estos resultados podrían apuntar a una falta de liberación de **2.20** a partir de este profármaco **2.26** en las condiciones del ensayo. Por su parte, el L-lisil-L-prolil derivado **2.28** presentó una actividad en el rango nanomolar ($CI_{50}=1.4-17$ nM) equiparable a la del fármaco **2.20** en la mayoría de las líneas celulares ensayadas, e igualmente algo superior en general respecto a la presentada por colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.6**). Esto señalaba la adecuada bioconversión del profármaco **2.28** en cultivo celular (*in vitro*).

D) Determinación de la estabilidad de 2.28

Dada la extraordinaria mejora en la solubilidad conseguida con el derivado dipeptídico **2.28**, y su excelente actividad antiproliferativa, que fue comparable a la de su fármaco precursor **2.20**, se estudió la estabilidad de este profármaco **2.28** tanto a nivel químico como enzimático. Para los estudios de estabilidad química, el profármaco **2.28** se incubó en PBS a 37 °C, y por HPLC se analizaron distintas alícuotas de esta muestra en función del tiempo (0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 24 h). Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 2.17. Las barras grises del gráfico representan el porcentaje de profármaco **2.28** intacto, mientras que las barras rojas indican el porcentaje de compuesto **2.20** liberado.

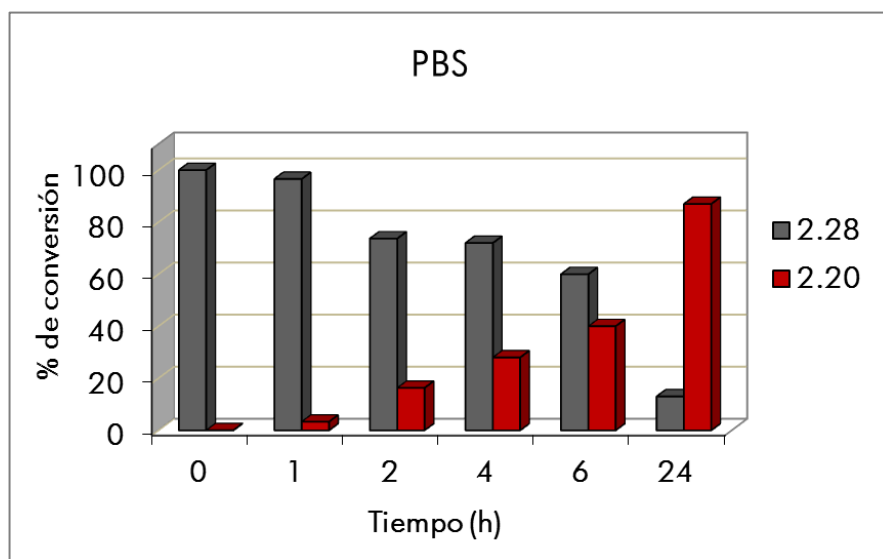


Figura 2.17. Estabilidad química de 2.28 en PBS a 37°C. Cada barra representa el área correspondiente a la suma de los picos de los isómeros E y Z en cada intervalo de tiempo.

Como se puede observar, la cantidad de profármaco **2.28** intacto fue superior al 95% tras 1 hora en disolución, detectando asimismo un 85% de compuesto inalterado transcurridas 2 horas. Teniendo en cuenta además que la vida media fue superior a 6 horas, estos resultados pusieron de manifiesto la relativa estabilidad del profármaco **2.28** en PBS.

Para los estudios de estabilidad enzimática, el compuesto **2.28** se incubó tanto en suero humano al 10%, como en extracto hepático murino al 50%. Conviene indicar que el suero humano y el hígado de ratón, además de otras muchas enzimas, contienen CD26. Como se puede observar en la Figura 2.18A, la incubación del profármaco **2.18** (barras grises) en suero humano condujo a la adecuada liberación de la aminochalcona **2.20** (barras rojas), de modo que tras 3 horas en contacto se liberó el 80% de ésta. La incubación en extracto de hígado murino (Figura 2.18B) provocó que la liberación de la aminochalcona **2.20** fuese aún más rápida, con un porcentaje de compuesto liberado superior al 80% tras 20 min y casi total tras 1 hora de incubación.

Como igualmente se puede observar en los gráficos inferiores de la Figura 2.18 (Paneles C y D), la bioconversión del profármaco **2.28** al fármaco **2.20** tanto en suero como en extracto hepático se produce de un modo similar para los isómeros E y Z, de modo que la proporción entre isómeros permanece inalterada en función del tiempo.

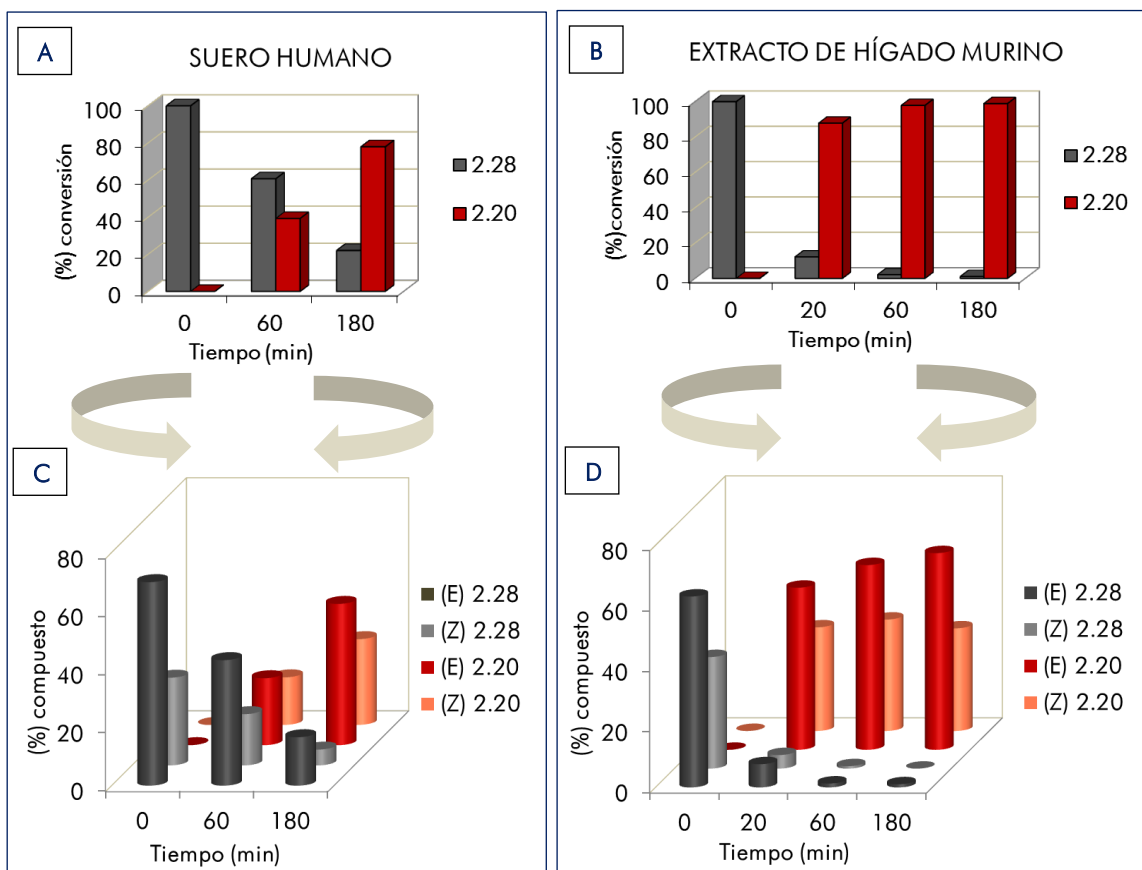


Figura 2.18. Estabilidad de **2.28** en suero humano al 10% (**A** y **C**) y en extracto de hígado murino al 50% (**B** y **D**). En los gráficos superiores (**A** y **B**) cada barra representa el área correspondiente a la suma de los picos de los isómeros *E* y *Z* en cada intervalo de tiempo. En los inferiores (**C** y **D**) se muestran los porcentajes de cada isómero *E* y *Z* de **2.28** y **2.20** en las muestras ensayadas.

Estos experimentos pusieron de manifiesto que la conversión del profármaco **2.28** en su correspondiente fármaco **2.20** se producía de manera eficaz en el medio biológico, permitiendo la liberación del compuesto activo en un intervalo de tiempo apropiado, comprendido entre 20 minutos y 3 horas.

2.3. CONCLUSIONES

El efecto antiproliferativo de chalconas previamente descritas, por unión al sitio de colchicina en tubulina, ha constituido el punto de partida del trabajo que se describe en este Capítulo, enfocado a la síntesis y evaluación de nuevas chalconas como agentes antimitóticos y antivascuales. La presencia del anillo de dioxolano en numerosos compuestos de origen vegetal ligados también del sitio de colchicina y con potentes propiedades antimitóticas, justificó la incorporación de este sustituyente sobre el anillo aromático A, constituyendo de esta forma el motivo estructural común de la serie de chalconas objeto de este Capítulo. La síntesis se ha realizado de modo satisfactorio, necesitando en ocasiones la adaptación de los procedimientos descritos para mejorar los rendimientos y/o acortar los tiempos de reacción.

La evaluación biológica en ensayos de proliferación celular de las chalconas aquí sintetizadas permitió extraer importantes relaciones de estructura-actividad. De este modo, la sustitución en la posición 3 del anillo B con un amino, y en menor medida, con un hidroxilo condujo a los mejores valores de actividad antiproliferativa. Asimismo, la introducción de un metilo en la posición α de la cetona α/β insaturada se tradujo en compuestos con una actividad superior en dos órdenes de magnitud respecto a los análogos no sustituidos. La importancia del anillo de dioxolano en el fenilo A también ha sido corroborada a partir de los compuestos carentes de este anillo, que resultaron ser 100 veces menos activos que los derivados que sí presentaron este motivo. Así, de todas las chalconas sintetizadas, cabe destacar la actividad de las α -metilchalconas **2.19** y **2.20** (Figura 2.19), consiguiendo con ambos compuestos valores de Cl_{50} en el rango nanomolar. En particular, el aminoderivado **2.20**, resultó ser más potente que compuestos tan activos como colchicina (**i.3**) o CA-4P (**i.6**).

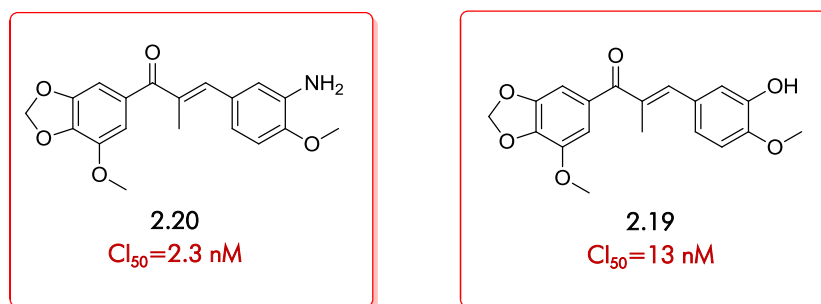


Figura 2.19. Estructuras y Cl_{50} en células endoteliales (HMEC-1) de las chalconas más potentes sintetizadas en este Capítulo.

Estudios por citometría de flujo llevados a cabo con el compuesto **2.16a** como representante de esta familia, pusieron de manifiesto el bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular, comportamiento análogo al de otros ligandos del sitio de colchicina descritos. Los ensayos de competición con EBI y con R-PT confirmaron la unión de este compuesto al sitio de colchicina en tubulina, con un valor de K_d comparable al de la propia colchicina. De igual forma, esta chalcona mostró un claro efecto inhibitorio sobre la formación de las fibras del huso mitótico en células endoteliales, afectando también a la morfología de estas células. Asimismo, el compuesto **2.16a** presentó un efecto interruptor muy significativo sobre una red preformada de tubos de células endoteliales, lo que apuntaba a un comportamiento como VDA.

Como estrategia para mejorar la solubilidad del compuesto **2.20**, el más activo de la serie, se abordó la síntesis de profármacos. De este modo, se sintetizó tanto el derivado de L-serina **2.26**, como el derivado del dipéptido de L-lisina-L-prolina **2.28**. La evaluación antiproliferativa de estos profármacos puso de manifiesto que la derivación con L-serina resultó en un compuesto notablemente menos activo en cultivo celular, mientras que el derivado dipeptídico **2.28** mostró una actividad comparable a **2.20**. Asimismo, el profármaco **2.28** fue dos mil veces más soluble que su correspondiente fármaco **2.20**. Además el derivado **2.28** fue estable en PBS en un intervalo de tiempo de 2 horas, mientras que en el medio biológico (suero o extracto hepático) liberaba de un modo eficiente el fármaco **2.20**. Por todo ello, se podría considerar al profármaco **2.28** como un candidato idóneo para la futura evaluación *in vivo* de esta familia de chalconas.

2.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Sahu, N. K.; Balbhadra, S. S.; Choudhary, J.; Kohli, D. V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: A review. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 209-225.
2. Lawrence, N. J.; McGown, A. T.; Ducki, S.; Hadfield, J. A. The interaction of chalcones with tubulin. *Anticancer Drug Des.* **2000**, *15*, 135-141.
3. Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.
4. Edwards, M. L.; Stemerick, D. M.; Sunkara, P. S. Chalcones: a new class of antimetabolic agents. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1948-1954.
5. Peyrot, V.; Leynadier, D.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Rodriguez, A.; Nieto, J. M.; Andreu, J. M. Interaction of tubulin and cellular microtubules with the new antitumor drug MDL 27048. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21296-21301.
6. Peyrot, V.; Leynadier, D.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Menendez, M.; Laynez, J.; Andreu, J. M. Mechanism of binding of the new antimetabolic drug MDL 27048 to the colchicine site of tubulin: equilibrium studies. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11125-11132.
7. Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res.* **1997**, *84*, 832-835.
8. Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.
9. Marrelli, M.; Conforti, F.; Statti, G. A.; Cachet, X.; Michel, S.; Tillequin, F.; Menichini, F. Biological potential and structure-activity relationships of most recently developed vascular disrupting agents: an overview of new derivatives of natural combretastatin A-4. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3035-3081.
10. Kerr, D. J.; Hamel, E.; Jung, M. K.; Flynn, B. L. The concise synthesis of chalcone, indanone and indenone analogues of combretastatin A4. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3290-3298.
11. Ducki, S.; Rennison, D.; Woo, M.; Kendall, A.; Chabert, J. F. D.; McGown, A. T.; Lawrence, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: synthesis and biological evaluation of antivasculature activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7698-7710.
12. Ducki, S.; Mackenzie, G.; Greedy, B.; Armitage, S.; Chabert, J. F. D.; Bennett, E.; Nettles, J.; Snyder, J. P.; Lawrence, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerisation. Part 2: Structure-based discovery of alpha-aryl chalcones. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7711-7722.
13. Ravelli, R. B. G.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.
14. Hartley, R. M.; Peng, J.; Fest, G. A.; Dakshanamurthy, S.; Frantz, D. E.; Brown, M. L.; Mooberry, S. L. Polygamain, a new microtubule depolymerizing agent that occupies a unique pharmacophore in the colchicine site. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *81*, 431-439.
15. Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 155-183.
16. Kitajima, M.; Tanaka, A.; Kogure, N.; Takayama, H. Four new colchicinoids, gloriosamines A-D, from *Gloriosa rothschildiana*. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 257-260.
17. Lin, C. M.; Ho, H. H.; Pettit, G. R.; Hamel, E. Antimitotic natural products combretastatin A-4 and combretastatin A-2: studies on the mechanism of their inhibition of the binding of colchicine to tubulin. *Biochemistry* **1989**, *37*, 2445-2449.

18. Pettit, G. R.; Lippert, J. W. Antineoplastic agents 429. Syntheses of the combretastatin A-1 and combretastatin B-1 prodrugs. *Anticancer Drug Des.* **2000**, *15*, 203-216.
19. Kingston, D. G. I. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 507-515.
20. Ducki, S. Antimitotic chalcones and related compounds as inhibitors of tubulin assembly. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 336-347.
21. Lawrence, N. J.; McGown, A. T. The chemistry and biology of antimitotic chalcones and related enone systems. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 1679-1693.
22. Das, B.; Venkateswarlu, K.; Majhi, A.; Siddaiah, V.; Reddy, K. R. A facile nuclear bromination of phenols and anilines using NBS in the presence of ammonium acetate as a catalyst. *J. Molec. Catal. A Chem.* **2007**, *267*, 30-33.
23. Yasobu, N.; Kitajima, M.; Kogure, N.; Shishido, Y.; Matsuzaki, T.; Nagaoka, M.; Takayama, H. Design, synthesis, and antitumor activity of 4-halocolchicines and their pro-drugs activated by cathepsin B. *J. Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 348-352.
24. Magnus, P.; Sebhat, I. K. Application of the β -azidonation reaction to the synthesis of the antitumor alkaloid (+)-pancratistatin. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15509-15524.
25. Messaoudi, S.; Tréguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J. F. o.; Losada, J. R. D.; Liu, J. M.; Bignon, J. r. m.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J. I.; Brion, J. D.; Alami, M. d. Isocombretastatins A versus combretastatins A: the forgotten isoCA-4 isomer as a highly promising cytotoxic and antitubulin agent. *J. Med. Chem.* **1990**, *52*, 4538-4542.
26. Chiaradia, L. D.; Santos, R. d.; Vitor, C. E.; Vieira, A. A.; Leal, P. C.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS: Quantitative Structure-Activity Relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 658-667.
27. Bonesi, M.; Loizzo, M. R.; Statti, G. A.; Michel, S.; Tillequin, F.; Menichini, F. The synthesis and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity of chalcones and their pyrazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1990-1993.
28. Park, K. K.; Oh, C. H.; Joung, W. K. Sodium dithionite reduction of nitroarenes using viologen as an electron phase-transfer catalyst. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7445-7446.
29. 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.* **2006**, *16*, 5844-5848.
30. Dyrager, C.; Wickström, M.; Fridén-Saxin, M.; Friberg, A.; Dahlén, K.; Wallén, E. A. A.; Gullbo, J.; Grotli, M.; Luthman, K. Inhibitors and promoters of tubulin polymerization: Synthesis and biological evaluation of chalcones and related dienones as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2659-2665.
31. Deshpande, S. J.; Leger, P. R.; Sieck, S. R. Microwave synthesis of α -cyano chalcones. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1772-1775.
32. Perjési, P.; Takács, M.; Ösz, E.; Pintér, Z.; Vámos, J.; Takács-Novák, 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*, 289-295.
33. Fortin, S.; Lacroix, J.; Cote, M. F.; Moreau, E.; Petitclerc, E.; Gaudreault, R. C. Quick and simple detection technique to assess the binding of antimicrotubule agents to the colchicine-binding Site. *Biol. Proced. Online* **2010**, *12*, 113-117.
34. Leynadie, D.; Peyrot, V.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Andreu, J. M.; Renier, G. A.; Temple, C. Tubulin binding of two 1-deaza-7,8-dihydropteridines with different biological properties: enantiomers NSC 613862 (S)-(-) and NSC 613863 (R)-(+). *Biochemistry* **1993**, *32*, 10675-10682.

35. Barbier, P.; Dorléans, A.; Devred, F.; Sanz, L.; Allegro, D.; Alfonso, C.; Knossow, M.; Peyrot, V.; Andreu, J. M. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31672-31681.
36. Diaz, J. F.; Andreu, J. M. Kinetics of dissociation of the tubulin-colchicine complex - Complete reaction scheme and comparison to thermodynamic measurements. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2890-2896.
37. Cortese, F.; Bhattacharyya, B.; Wolff, J. Podophyllotoxin as a probe for colchicine binding-site of tubulin. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1134-1140.
38. Ilić, M.; Ilaš, J.; Dunkel, P.; Mátyus, P.; Boháč, A.; Liekens, S.; Kikelj, D. Novel 1,4-benzoxazine and 1,4-benzodioxine inhibitors of angiogenesis. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 160-170.
39. Tozer, G. M.; Kanthou, C.; Baguley, B. C. Disrupting tumour blood vessels. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 423-435.
40. Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
41. Nam, N. H.; Kim, Y.; You, Y. J.; Hong, D. H.; Kim, H. M.; Ahn, B. Z. Water soluble prodrugs of the antitumor agent 3-[(3-amino-4-methoxy phenyl)-2-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) cyclopent-2-ene-1-one. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1021-1029.
42. Delmonte, A.; Sessa, C. AVE8062: a new combretastatin derivative vascular disrupting agent. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2009**, *18*, 1541-1548.
43. García-Aparicio, C.; Bonache, M. C.; Meester, I. D.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Design and discovery of a novel dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-based prodrug approach. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5339-5351.
44. García-Aparicio, C.; Diez-Torrubia, A.; Balzarini, J.; Lambeir, A. M.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J. Efficient conversion of tetrapeptide-based TSAO prodrugs to the parent drug by dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV/CD26). *Antiviral Res.* **2007**, *76*, 130-139.
45. Diez-Torrubia, A.; García-Aparicio, C.; Cabrera, S.; Meester, I. D.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Application of the dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) based prodrug approach to different amine-containing drugs. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 559-572.
46. Diez-Torrubia, A.; Balzarini, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Meester, I. D.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Dipeptidyl peptidase IV dependent water-soluble prodrugs of highly lipophilic bicyclic nucleoside analogues. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1927-1942.
47. Vanhoof, G.; Goossens, F.; Meester, I. D.; Hendriks, D.; Scharpe, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **1995**, *9*, 736-744.
48. Meester, I. D.; Korom, S.; Damme, J. V.; Scharpé, S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today* **1999**, *20*, 367-375.
49. Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* **1999**, *85*, 9-24.
50. Yoo, D.; Oh, J. S.; Lee, D. W.; Kim, Y. G. Efficient synthesis of a configurationally stable L-serinal derivative. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2979-2982.

3

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL MEDIANTE TÉCNICAS DE CRIBADO VIRTUAL

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El desarrollo y lanzamiento al mercado de un nuevo fármaco es un proceso largo que dura entre 12 y 20 años, lleno de obstáculos (tan sólo una de cada 10000 moléculas que inician la fase de desarrollo preclínico llega a ser comercializada) y que requiere de la industria farmacéutica una inversión que con frecuencia supera los 1200 millones de euros. Esta presión económica generada en el proceso de I+D (*Investigación y Desarrollo*), unida a la competencia existente en el sector farmacéutico debido al vencimiento de las patentes en vigor y al desarrollo de medicamentos genéricos, ha llevado a implementar nuevas técnicas en el desarrollo de fármacos novedosos, dirigidas no sólo a la reducción de costes, sino también a mejorar la eficacia y la rapidez en el proceso de descubrimiento y optimización de nuevos candidatos a fármacos o *leads*.¹⁻³

En este afán de aumentar la producción de compuestos a evaluar surgió la química combinatoria, conjunto de técnicas que permitieron sintetizar enormes librerías de compuestos (quimiotecas) en un corto espacio de tiempo. En paralelo se desarrollaron los métodos de cribado farmacológico de alto rendimiento o *high-throughput screening* (HTS), con la finalidad de reducir el tiempo necesario para evaluar la actividad biológica de toda una quimioteca. Posteriormente, los elevados costes asociados al HTS requirieron modelos para preseleccionar computacionalmente (*in silico*) aquellos candidatos con mejor potencial (*hits*), en términos tanto de afinidad frente a la diana farmacológica, como de propiedades farmacocinéticas óptimas, consiguiendo de esta forma reducir considerablemente el número de compuestos a ensayar. Estos modelos computacionales se engloban dentro de la metodología del cribado virtual o *virtual screening* (VS), cuyo objetivo fundamental es el de reducir el espacio químico (representado por moléculas pequeñas) a un número manejable, limitándolo así a los compuestos más interesantes a nivel terapéutico.^{4,5}

El VS es una técnica ampliamente utilizada en la actualidad en programas de descubrimiento de fármacos constituyendo así, más que una alternativa, un complemento al HTS como fuente de obtención de nuevos *hits*. Entre sus ventajas cabe destacar que se trata de una metodología muy económica -dado que ahorra en la compra de reactivos, síntesis, purificación, ensayos biológicos y robotización- y es al mismo tiempo muy rápida, permitiendo de este modo la evaluación *in silico* del orden de millones de compuestos, cifra que es impensable en experimentación con modelos biológicos. Asimismo, el VS puede proporcionar información acerca de las características de la interacción fármaco-diana, por lo que permite disponer de un criterio racional para la priorización de la síntesis y la adquisición de nuevos compuestos.⁶

Existen dos aproximaciones dentro de estas técnicas computacionales de cribado virtual: el VS basado en la estructura de la diana de interés y el VS basado en ligandos de dicha diana.³ El primero de ellos es de gran utilidad cuando se conoce la estructura tridimensional de la diana terapéutica, bien obtenida por métodos experimentales (cristalografía de rayos X o RMN) o bien por medio de la construcción de modelos moleculares. En esta aproximación encontramos por ejemplo las técnicas de *docking*,⁷ donde se seleccionan aquellos compuestos con mejor disposición e interacción en el sitio activo de la diana; o las técnicas de diseño de *novos*, que permiten la construcción de moléculas directamente en el sitio activo de la diana, por crecimiento secuencial o por unión de fragmentos.⁸

El VS basado en ligandos consiste en el análisis y comparación de propiedades moleculares y datos de afinidad por la diana de interés de ligandos conocidos, sin tener en cuenta la estructura de

la diana.⁹ Se incluyen aquí, entre otras, las técnicas de búsqueda de similitud mediante descriptores bi y tridimensionales (2D/3D); las técnicas de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), que cuantifican la importancia de determinados grupos funcionales de un ligando particular en la actividad del mismo; el desarrollo de modelos de farmacóforos, que identifican las propiedades estructurales claves de los ligandos que interaccionan con la diana; y las técnicas basadas en la comparación de la forma 3D (*3D-shape similarity*).³ En particular esta metodología, consistente en la superposición de ligandos en base a su forma, se consideró como la técnica de elección para efectuar el cribado virtual que en este Capítulo se describe.

Tal y como se ha comentado en la Introducción General, el sitio de colchicina en tubulina está considerado como un dominio más que como un sitio único, debido a la amplitud del espacio que lo caracteriza. Si bien el modo de interacción de varios ligandos en este sitio ha sido determinado por rayos X,¹⁰ existen muy pocos ejemplos en la literatura de VS basado en la estructura del sitio de unión de colchicina.^{11,12} Por su parte, aquellas campañas de VS que partieron de ligandos conocidos del sitio de colchicina se han basado por lo general en modelos de farmacóforos,¹³⁻¹⁵ destacando entre ellos el modelo de 7 puntos descrito Nguyen y col.¹⁶ que fue además validado en campañas posteriores de búsqueda de nuevos *hits*.¹⁵ No obstante, todos estos programas de VS basados en ligandos conocidos exploraron únicamente el sitio específico de la propia colchicina, sin tener en consideración otros bolsillos accesorios dentro del dominio de unión.

Como se ha descrito previamente en esta Memoria, la estructura cristalina del complejo del compuesto TN-16 (**i.21**) (Figura 3.1) con α,β -tubulina, resuelta en 2009,¹⁷ reveló que este ligando se disponía en un bolsillo accesorio de la subunidad β que se encontraba en una zona más profunda, no estableciendo así interacción alguna con la subunidad α . El modo de unión de TN-16 en este bolsillo nos pareció interesante de cara a desarrollar nuestra particular campaña de VS, dado que potencialmente podría permitir la identificación de entidades químicas estructuralmente diferentes de ligandos tan explorados como la propia colchicina (**i.3**) o la CA-4 (**i.4**). La posterior resolución descrita en 2010 de los complejos de α/β -tubulina con los enantiómeros CI-980 (*S*, **i.22**) y NS613863 o R-PT (*R*, **i.23**),¹⁸ que se unen en un sitio similar al del TN-16, avalaban la idea de que este sitio accesorio ocupado por el TN-16 dentro del dominio de unión de colchicina podía ser explotado para la interacción de nuevos ligandos.

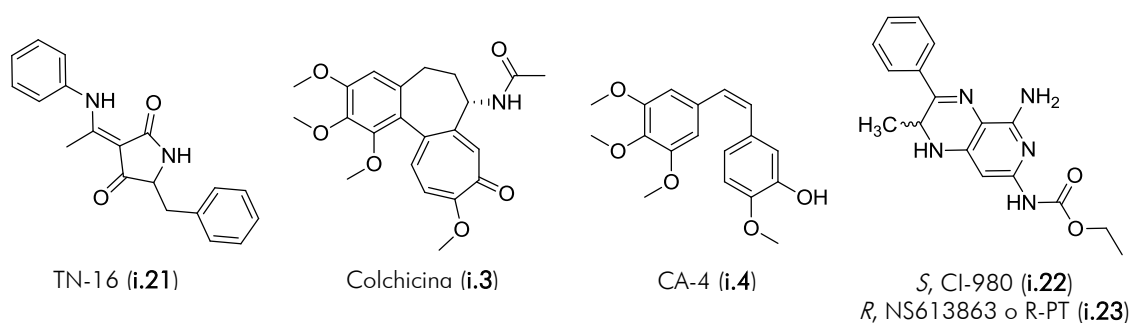


Figura 3.1. Estructuras de TN-16 (**i.21**), colchicina (**i.3**), CA-4 (**i.4**) y de los enantiómeros CI-980 (**i.22**) y NS613863 o R-PT (**i.23**).

Dentro de las distintas herramientas y aproximaciones del cribado virtual, se consideró que la metodología basada en la forma tridimensional del ligando podría conducir de un modo rápido y eficaz a la identificación de *hits* potenciales. De hecho, existen ejemplos muy recientes donde esta estrategia se ha aplicado con éxito en programas de descubrimiento de nuevos candidatos a fármaco, si bien nunca para identificar posibles ligandos del dominio de colchicina.^{19,20}

Así, el objetivo de este Capítulo ha consistido en la búsqueda e identificación de nuevos *hits* inhibidores de la polimerización de microtúbulos por unión al dominio de colchicina, mediante técnicas de VS basadas en la comparación de la forma de ligandos conocidos de este dominio. Para ello se empleó como compuesto de referencia el ligando TN-16 (**i.21**) que, como ya se ha comentado, se une a un lugar distinto del sitio propio de colchicina y análogos, y de esta forma podría permitir la identificación de esqueletos químicos diferentes a colchicina. La evaluación biológica de los compuestos así identificados nos ha llevado a un nuevo *hit*, que a su vez ha constituido el punto de partida de un programa de química médica enfocado a la optimización de este candidato. El objetivo último ha consistido en la obtención de compuestos análogos con mejores propiedades tanto farmacológicas (antimitóticas y/o VDAs) como farmacocinéticas.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1. CRIBADO VIRTUAL

El primer paso de todo cribado consiste en la elección y preparación de la base de datos a emplear. En nuestro caso se empleó la versión 8 de la base de datos ZINC que contiene casi 8,5 millones de moléculas.²¹ Esta base de datos se filtró con el *software* FILTER.²² Así, a partir del filtro denominado “drug-like”, se modificaron distintos parámetros con respecto a los valores establecidos por defecto, tales como el rango de peso molecular permitido (150-800), el número de átomos distintos de hidrógeno (9-60), el valor máximo de clogP (6.85) o los grupos funcionales reactivos a descartar. A continuación, con el programa OMEGA²³ se obtuvieron las estructuras 3D de aquellos compuestos que pasaron el filtro, y se generaron los confórmers de estas estructuras.

En referencia al ligando utilizado como modelo en la búsqueda de nuevos compuestos, se seleccionó el compuesto TN-16 (**i.21**), tomando la conformación de este ligando en el complejo cristalino con α,β -tubulina (PDB:3HKD).¹⁷ Como se observa en la Figura 3.2, la colchicina (**i.3**, en verde) y el TN-16 (**i.21**, en turquesa) ocupan diferentes bolsillos dentro del dominio de colchicina. Ésto nos permitía explorar un espacio químico diferente, aumentando así las probabilidades de encontrar candidatos estructuralmente no relacionados con la colchicina y sus análogos.

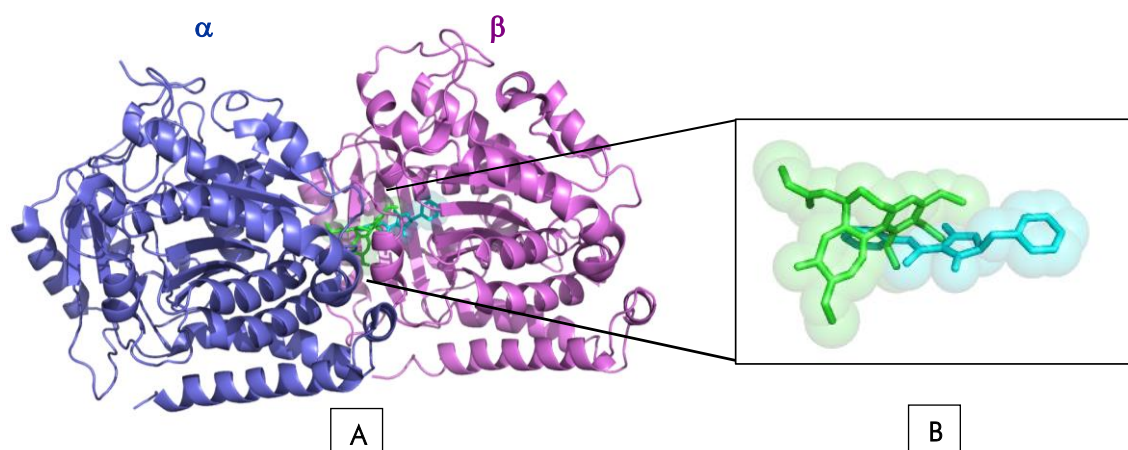


Figura 3.2. (A) Estructura del dímero de α,β -tubulina. Los ligandos colchicina (**i.3**) en verde y TN-16 (**i.21**) en turquesa, se localizan en el dominio de unión de colchicina. (B) Superposición de las estructuras de los dos ligandos, que ocupan distintos bolsillos dentro del dominio de unión.

El cribado virtual basado en la comparación de la forma tridimensional del TN-16 (Figura 3.3) se efectuó gracias al programa ROCS de la compañía OpenEye.²⁴ Este programa se basa en el concepto de que moléculas diferentes presentan una forma similar siempre que sus volúmenes, representados por una función gaussiana, superpongan de manera correcta.^{25,26} Como parámetro de medida de similitud de forma se aplicó el coeficiente de Tanimoto, para el que se fijó un valor de corte de 0.75, conforme a ejemplos bibliográficos precedentes.²⁶ A continuación, se realizó una comparación en base a la similitud química o “color” con los confórmers que pasaron el filtro anterior. Así, se definió un nuevo parámetro de medida, el denominado *Combo Score*, que fue la suma de los coeficientes de forma y color y cuyo punto de corte se fijó en un valor de 1.4. Por último, se analizaron visualmente las moléculas resultantes de este cribado, observando la existencia de

estructuras diferentes respecto a otros ligandos conocidos del sitio de colchicina, estructuras que finalmente fueron agrupadas en 9 familias distintas.

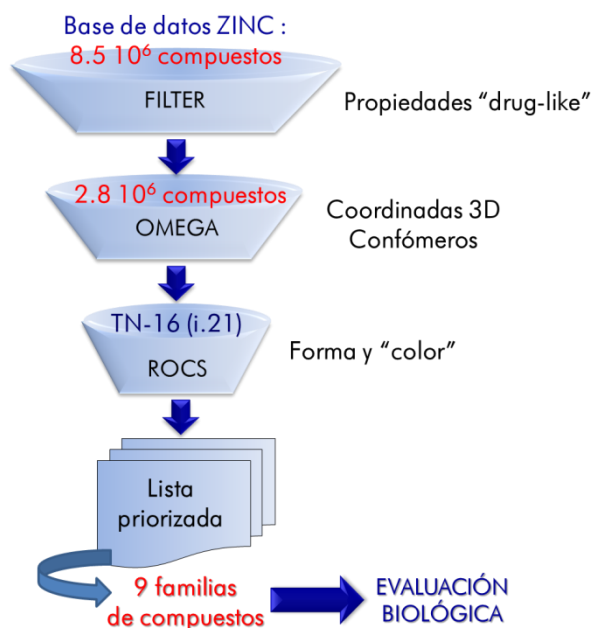


Figura 3.3. Esquema del cribado virtual (VS) llevado a cabo en este Capítulo.

Cinco representantes de estas nueve familias, los compuestos **3.1-3.5**, se obtuvieron de diferentes casas comerciales, mientras que un sexto candidato (**3.6**) se sintetizó siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía.²⁷⁻²⁹ Las estructuras de estos seis *hits* virtuales se muestran en la Figura 3.4.

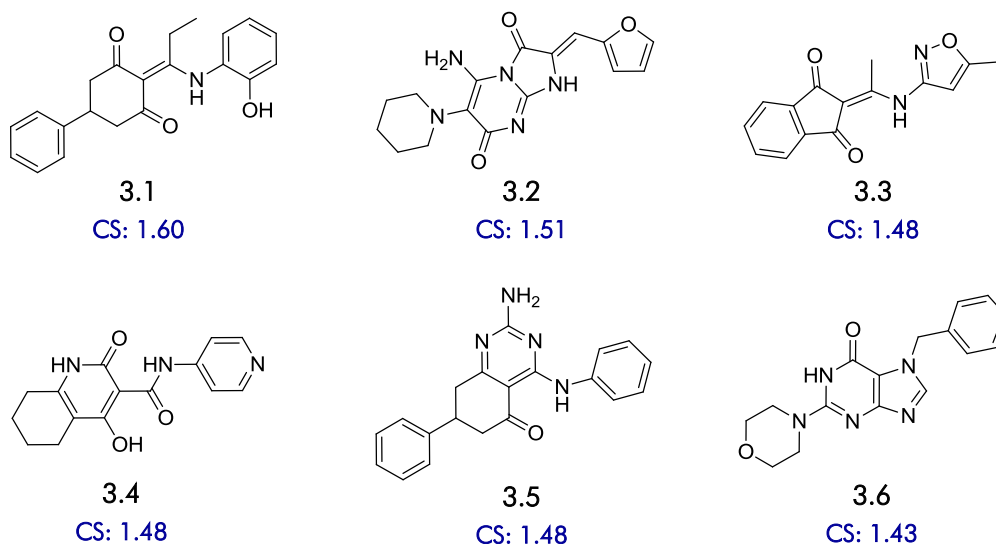


Figura 3.4. Estructuras y puntuaciones (CS: *Combo Score*) de los 6 *hits* virtuales (**3.1-3.6**) que se sometieron a evaluación biológica.

Como ya se ha descrito en los capítulos anteriores, los compuestos que interaccionan con el sitio de unión de colchicina en tubulina inhiben la proliferación celular. Así, como primera aproximación para la validación experimental de los *hits* **3.1-3.6** obtenidos en el VS, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiproliferativa de estos compuestos en cultivos celulares, y los resultados obtenidos

se recogen en la Tabla 3.1. Al igual que en los capítulos precedentes, los candidatos se ensayaron en seis líneas celulares, tres líneas tumorales (L1210, CEM y HeLa) y tres endoteliales (HMEC-1, MBEC Y BAEC). Los datos se expresan como CI_{50} (concentración de compuesto que inhibe el crecimiento del 50% de las células en cultivo), y la colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**), se emplearon como controles positivos en todos los experimentos realizados, y sus valores de CI_{50} se incluyen en el pie de la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (μM) de los compuestos **3.1-3.6**, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	$CI_{50}^{(a)(b)}$ (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
3.1	11 \pm 8	13 \pm 1	15 \pm 9	22 \pm 13	13 \pm 5	35 \pm 1
3.2	>100	>100	>100	>100	>100	>100
3.3	>100	>100	>100	>100	>100	>100
3.4	>250	>250	>250	>100	>100	>100
3.5	-	>100	-	57 \pm 14	-	-
3.6	>250	>250	>250	>100	>100	>100

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

^(b) La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**) con actividades comprendidas entre 4 y 31 nM y 3 y 95 nM, respectivamente, se emplearon como controles positivos.

Tal y como se puede observar en la Tabla 3.1, solamente el *hit* **3.1** mostró un efecto antiproliferativo significativo en las líneas celulares ensayadas, con una actividad muy prometedora en el rango micromolar tanto en células tumorales (CI_{50} =11-15 μM) como en endoteliales (CI_{50} =13-35 μM).

Para confirmar que la actividad antiproliferativa del *hit* **3.1** se debía a su unión en el sitio de colchicina en tubulina, se realizó un experimento de competición con el compuesto 2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (MTC). Este ligando emite fluorescencia cuando se encuentra unido a α,β -tubulina en el sitio de colchicina ($\lambda_{excitación}$ =374 nm) (línea negra en la Figura 3.5). Así, la adición del compuesto **3.1** a una disolución de α,β -tubulina bovina en PBS con MTC

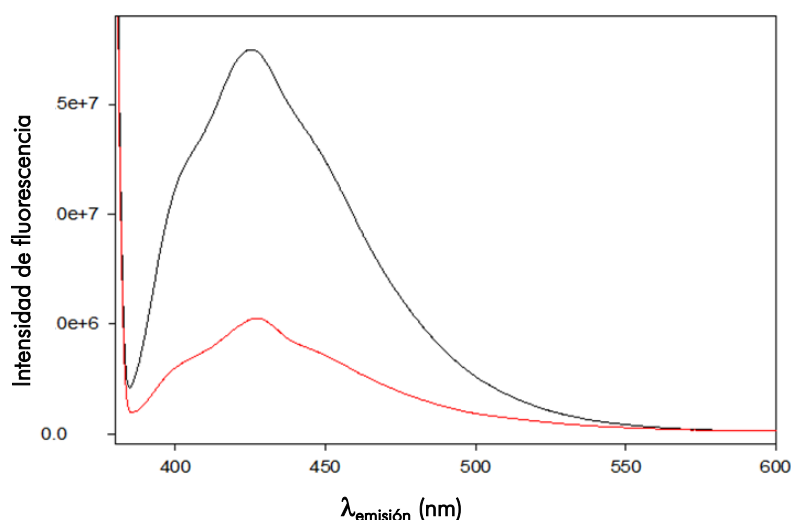


Figura 3.5. Desplazamiento de MTC en el sitio de colchicina de tubulina en presencia del compuesto **3.1**. Espectro de fluorescencia (excitación a 374 nm) de una disolución en PBS de MTC (10 μM) y α,β -tubulina bovina (10 μM) en ausencia (línea negra) o en presencia (línea roja) del *hit* **3.1** (20 μM).

produjo un descenso de la fluorescencia del complejo tubulina/MTC (línea roja en la Figura 3.5). Esto indicó la unión específica del compuesto **3.1** al sitio de colchicina.

Estos datos, unidos al bajo peso molecular del compuesto **3.1** ($P_m=335$) y a su accesibilidad sintética (síntesis que se detallará en el siguiente apartado de este Capítulo), apoyaron la idoneidad de este candidato para constituir el punto de partida de un programa de química médica encaminado a la búsqueda de análogos más potentes.

3.2.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE ANÁLOGOS DE 3.1.

Como se ha mencionado con anterioridad, el compuesto **3.1** había sido adquirido y su síntesis no estaba descrita. Así, la primera tarea consistió en poner a punto un procedimiento sintético que permitiese explorar los distintos fragmentos de la molécula, en particular, los anillos aromáticos A y D, y la cadena alquílica C, manteniendo la ciclohexanodiona B como motivo estructural común de la familia (Figura 3.6).

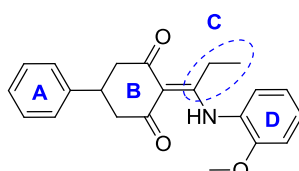


Figura 3.6. Estructura del compuesto **3.1** fragmentada en A, B, C y D.

El esquema propuesto (Figura 3.7) consistió en la reacción de ciclohexano-1,3-dionas diferentemente sustituidas en la posición 5 (fragmentos A y B) con distintos cloruros de acilo (fragmento C) y posterior reacción con anilinas (fragmento D).

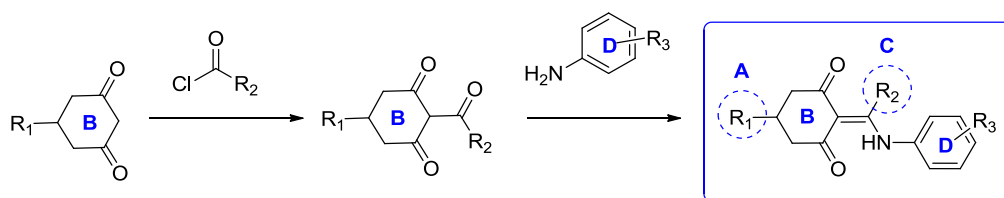
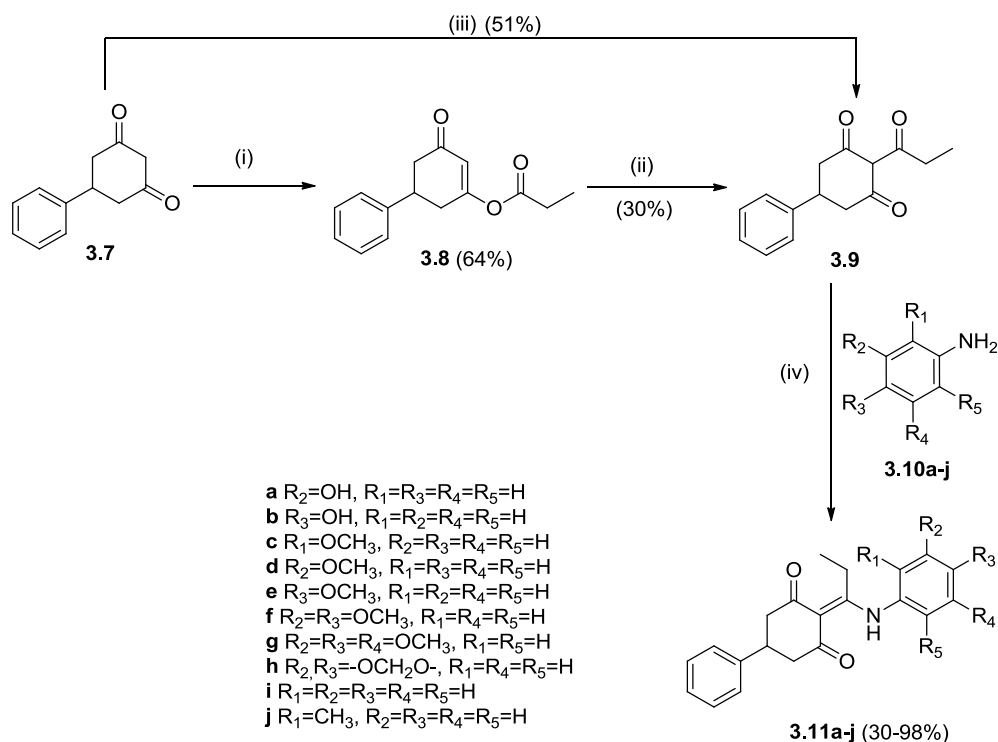


Figura 3.7. Ruta sintética propuesta para la obtención de compuestos análogos al *hit* **3.1**.

A) Síntesis de derivados diferentemente sustituidos en el anillo D

La primera serie de modificaciones efectuadas sobre la estructura compuesto **3.1** se realizaron sobre el fragmento D de la molécula, elemento estructural incorporado en el último paso conforme a la ruta de síntesis propuesta. Así, la reacción de la 5-fenilciclohexano-1,3-diona **3.7** con cloruro de propionilo en presencia de DMAP y DIPEA a 70 °C, según condiciones descritas para compuestos análogos,³⁰ dio lugar al derivado *O*-acilado **3.8** con un 60% de rendimiento, aunque sin detectar el compuesto *C*-acilado, como cabía esperar (Esquema 3.1). La conversión de derivados *O*-acilados a los correspondientes análogos *C*-acilados se encuentra descrita en la bibliografía,³¹ empleando K_2CO_3 en acetonitrilo en presencia de 1,2,4-triazol, variando la temperatura desde -10 °C a 100 °C, o adicionando un catalizador de transferencia de fase. De este modo, la reacción del compuesto **3.8** con K_2CO_3 y 1,2,4-triazol a 30 °C dio lugar al isómero *C*-acilado **3.9**, si bien con un



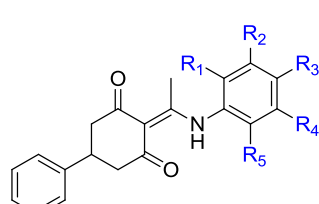
Esquema 3.1. Reactivos y condiciones: **(i)** DMAP, DIPEA, CH₂Cl₂, 70 °C, 2 h. **(ii)** CH₃CH₂CH₂COCl, K₂CO₃ anh., 1,2,4-triazol, CH₃CN, 30 °C, >48 h. **(iii)** CH₃CH₂CH₂COCl, K₂CO₃ anh., 1,2,4-triazol, TBAB, CH₃CN, MW, 70 °C, 2 h. **(iv)** Tolueno, tamiz 4 Å, MW, 150 °C, 2 h.

rendimiento muy moderado (30%) tras tres días de reacción. Con el fin de mejorar los bajos rendimientos globales se propuso realizar las dos reacciones anteriores “one-pot”, aplicando además condiciones de calentamiento en microondas para reducir los tiempos de reacción. Así, se hizo reaccionar la ciclohexanodiona **3.7** con el cloruro de propionilo a 70 °C, en presencia de K₂CO₃, 1,2,4-triazol y bromuro de tetrabutilamonio como catalizador de transferencia de fase, obteniéndose la *C*-acilciclohexanodiona **3.9** en tan sólo dos horas y con un rendimiento del 51%. La siguiente etapa consistió en la reacción del derivado *C*-acilado **3.9** con anilinas diferentemente sustituidas (**3.10a-j**), por irradiación al microondas en tolueno a 150 °C y añadiendo tamiz molecular de 4Å al medio de reacción, que condujo a los compuestos deseados **3.11a-j** con rendimientos entre moderados y muy buenos.

Las estructuras de estos compuestos **3.11a-j** se determinaron por métodos analíticos (HPLC-MS) y espectroscópicos de RMN mono y bidimensionales (¹H, ¹³C y experimentos de correlación de HSQC y HMBC). En todos los espectros de ¹H-RMN en DMSO-d₆ se observó un singlete ancho a 15 ppm aproximadamente, correspondiente al grupo NH. Este desplazamiento químico a campo tan bajo parecía indicar la implicación de este NH en un puente de hidrógeno con uno de los carbonilos del anillo de ciclohexanodiona. Con este fin, se registró el espectro de ¹H-RMN del compuesto **3.11c**, tanto en DMSO-d₆ como en CDCl₃, y en ambos casos se mantuvo inalterado el desplazamiento químico de la señal asignada al NH (δ= 14.7 ppm). Igualmente se registró el espectro de una muestra de diez veces más diluida en DMSO-d₆, sin que se observaran cambios en el desplazamiento químico de dicha señal. Estos datos apoyaban la existencia de un puente de hidrógeno intramolecular entre uno de los carbonilos de la ciclohexanodiona y el NH en el derivado **3.11c** y por extensión, en esta familia de compuestos.

En las Tablas 3.2 y 3.3 se recogen las estructuras de esta serie de compuestos (**3.11a-j**) y los resultados de su evaluación en ensayos de proliferación celular, respectivamente, incluyendo también el compuesto de referencia **3.1**, a modo comparativo. Con el fin de simplificar la comprensión de las relaciones estructura-actividad, la discusión de los resultados biológicos se centrará principalmente en los datos de la línea tumoral HeLa y de la línea endotelial HMEC-1.

Tabla 3.2. Estructuras de **3.1** y de sus derivados **3.11a-j**, diferentemente sustituidos en el anillo D.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
3.1	OH	H	H	H	H
3.11a	H	OH	H	H	H
3.11b	H	H	OH	H	H
3.11c	OMe	H	H	H	H
3.11d	H	OMe	H	H	H
3.11e	H	H	OMe	H	H
3.11f	H	OMe	OMe	H	H
3.11g	H	OMe	OMe	OMe	H
3.11h	H	-OCH ₂ O-	H	H	H
3.11i	H	H	H	H	H
3.11j	Me	H	H	H	H

Tabla 3.3. Actividad antiproliferativa expresada como Cl₅₀ (μM) de los compuestos **3.1** y **3.11a-j**, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	Cl ₅₀ ^{(a)(b)} (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
3.1	11 ± 8	13 ± 1	15 ± 9	22 ± 13	13 ± 5	35 ± 1
3.11a	75 ± 25	15 ± 12	48 ± 26	13 ± 6	12 ± 3	7.8 ± 0.9
3.11b	79 ± 42	14 ± 7	34 ± 0	28 ± 21	18 ± 0	36 ± 2
3.11c	4.3 ± 0.7	1.5 ± 0.2	2.3 ± 1.7	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.6
3.11d	66 ± 9	32 ± 9	45 ± 12	18 ± 9	16 ± 4	64 ± 14
3.11e	> 100	58 ± 13	67 ± 11	> 100	57 ± 7	> 100
3.11f	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
3.11g	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
3.11h	76 ± 5	38 ± 0	53 ± 22	53 ± 11	50 ± 18	43 ± 6
3.11i	56 ± 3	22 ± 17	21 ± 11	15 ± 6	8.3 ± 2.1	16 ± 11
3.11j	9.2 ± 5.0	6.9 ± 1.5	6.3 ± 1.2	2.1 ± 2.0	2.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

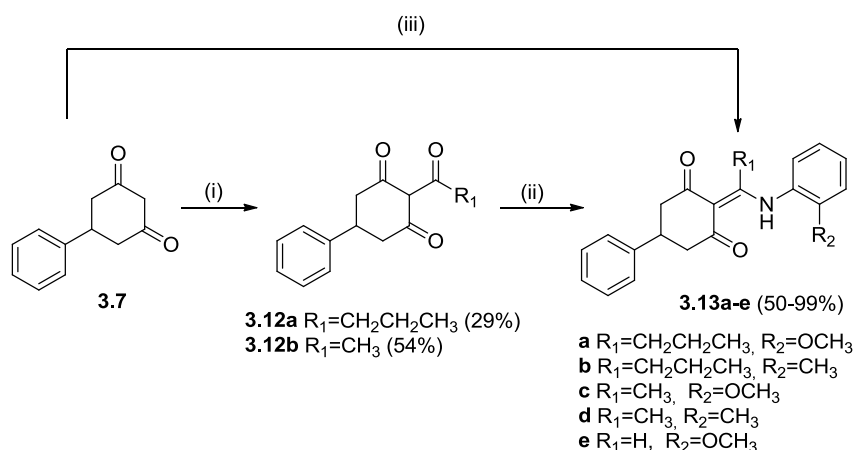
^(b) La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**), con actividades comprendidas entre 4 y 31 nM y 3 y 95 nM, respectivamente, se emplearon como controles positivos.

Como se observa en la Tabla 3.3, los derivados con un grupo hidroxilo en *orto*, *meta* o *para* en el anillo aromático D (compuestos **3.1**, **3.11a** y **3.11b**, respectivamente) fueron moderadamente activos, con actividades en general muy próximas entre ellos. Sin embargo, los compuestos con un grupo metoxilo en las anteriores posiciones (compuestos **3.11c-e**) mostraron un comportamiento más diverso en términos de actividad. Así, mientras que el derivado con un grupo *p*-OCH₃ (**3.11e**) no presentó actividad significativa, su análogo con un *m*-OCH₃ (**3.11d**) resultó ser algo más activo, con una actividad comparable al correspondiente *m*-OH derivado **3.11a**. El compuesto sustituido en *orto* con un grupo OCH₃ (**3.11c**) mostró una actividad muy superior, con valores de Cl₅₀ comprendidos entre 1 y 4 μM, siendo de esta forma entre 10 y 30 veces más potente que el *hit* inicial **3.1**. Por otro lado, los compuestos con una doble o triple sustitución en el anillo D fueron inactivos (compuestos **3.11f** y **3.11g**) o moderadamente activos (compuesto **3.11h**). Asimismo, el derivado con el anillo de fenilo D no sustituido (**3.11i**), mostró una actividad comparable a la del compuesto de referencia **3.1**. Por último, cabe destacar el derivado con un grupo CH₃ en *orto* (compuesto **3.11j**), que fue diez

veces más potente en células HMEC-1 ($Cl_{50}=2.1 \mu M$) respecto al *hit* **3.1**, con una actividad próxima, aunque algo inferior, a la del derivado **3.11c** con un OCH_3 en *orto*.

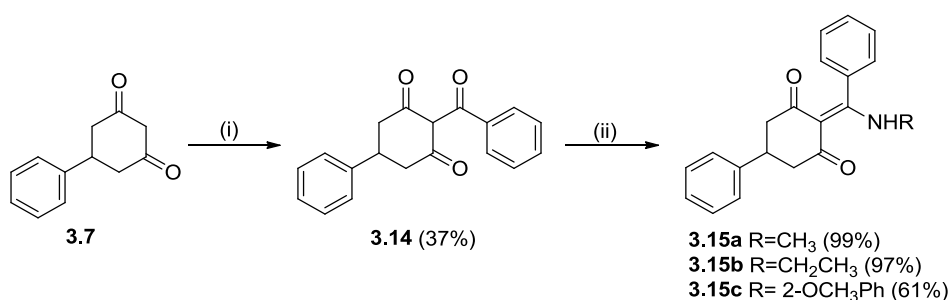
B) Modificaciones en C y en D

A continuación, se propuso determinar en qué medida la longitud o la naturaleza de la cadena lateral sobre el doble enlace (fragmento C de la Figura 3.3) afectaba a la actividad de estos compuestos. En todos los casos se mantuvo un grupo metoxilo o metilo en la posición *orto* del fenilo en D. Así, se hizo reaccionar la ciclohexanodiona **3.7** con cloruro de butanoilo o acetilo en las condiciones anteriormente descritas (K_2CO_3 , 1,2,4-triazol y bromuro de tetrabutilamonio, en microondas a $70 \text{ }^\circ C$), dando lugar a los productos **3.12a** y **3.12b** respectivamente, con rendimientos moderados (Esquema 3.2). La reacción de cada uno de estos C-acil derivados con *o*-anisidina o con *o*-toluidina condujo a los compuestos **3.13a-d** con muy buenos rendimientos. De forma paralela se sintetizó el compuesto **3.13e** no sustituido en C, a partir de la reacción de la ciclohexanodiona **3.7** con ortoformiato de trietilo y *o*-anisidina en etanol a $80 \text{ }^\circ C$,³² con un rendimiento del 50 %.



Esquema 3.2. Reactivos y condiciones: (i) R_1COCl , K_2CO_3 anh., 1,2,4-triazol, TBAB, CH_3CN , MW, $70 \text{ }^\circ C$, 2 h. (ii) *o*-anisidina (**3.13a** y **3.13c**) u *o*-toluidina (**3.13b** y **3.13d**), tolueno, tamiz 4 Å, MW, $150 \text{ }^\circ C$, 2 h (60-84%). (iii) **3.13e**: *o*-anisidina, ortoformiato de trietilo, EtOH, $80 \text{ }^\circ C$, 2 h (50%).

Posteriormente, con el fin de determinar la importancia del anillo aromático en D en la actividad de estos compuestos, se sintetizaron los derivados **3.15a-c**, donde se sustituyó el anillo D por un metilo, un etilo o un 2-metoxifenilo (compuestos **3.15a**, **3.15b** y **3.15c**, respectivamente), y la cadena alquímica C por un fenilo (Esquema 3.3). Para ello se llevó a cabo la reacción en microondas de la diona **3.7** con cloruro de benzoilo en presencia de K_2CO_3 , 1,2,4-triazol y bromuro de

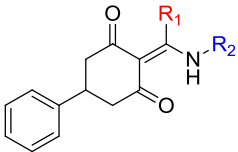


Esquema 3.3. Reactivos y condiciones: (i) $PhCOCl$, K_2CO_3 anh., 1,2,4-triazol, TBAB, CH_3CN , MW, $70 \text{ }^\circ C$, 2 h. (ii) RNH_2 , tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, $110 \text{ }^\circ C$, 16 h.

tetrabutilamonio a 70 °C, obteniéndose el C-acil derivado **3.14** con un rendimiento del 37%. En una etapa posterior, el compuesto **3.14** se hizo reaccionar en tolueno a 110 °C con metilamina, etilamina u *o*-anisidina, dando lugar a los productos **3.15a**, **3.15b** y **3.15c**, respectivamente, con rendimientos entre buenos y muy buenos.

Las estructuras de los compuestos sintetizados en este apartado, así como los resultados de los ensayos de proliferación celular se recogen en las Tablas 3.4 y 3.5, respectivamente.

Tabla 3.4. Estructuras de **3.1**, **3.11c** y **3.11j**, y de los derivados **3.13a-e** y **3.15a-c**.



	R ₁	R ₂
3.1	Et	2-OHPh
3.11c	Et	2-OMePh
3.11j	Et	2-MePh
3.13a	Prop	2-OMePh
3.13b	Prop	2-MePh
3.13c	Me	2-OMePh
3.13d	Me	2-MePh
3.13e	H	2-OMePh
3.15a	Ph	Me
3.15b	Ph	Et
3.15c	Ph	2-OMePh

Tabla 3.5. Actividad antiproliferativa expresada como CI₅₀ (μM) de los compuestos de **3.1**, **3.11c**, **3.11j**, **3.13a-e** y **3.15a-c**, en células tumorales y endoteliales.

	CI ₅₀ ^{(a)(b)} (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
3.1	11 ± 8	13 ± 1	15 ± 9	22 ± 13	13 ± 5	35 ± 1
3.11c	4.3 ± 0.7	1.5 ± 0.2	2.3 ± 1.7	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.6
3.11j	9.2 ± 5.0	6.9 ± 1.5	6.3 ± 1.2	2.1 ± 2.0	2.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2
3.13a	59 ± 23	36 ± 8	41 ± 1	31 ± 3	27 ± 4	16 ± 3
3.13b	> 100	41 ± 19	> 100	44 ± 2	47 ± 3	46 ± 4
3.13c	0.18 ± 0.00	0.16 ± 0.08	0.18 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01
3.13d	0.48 ± 0.26	0.30 ± 0.18	0.68 ± 0.09	0.26 ± 0.08	0.32 ± 0.04	0.17 ± 0.03
3.13e	34 ± 0	72 ± 1	69->250 ^(c)	9.3 ± 4.1	7.6 ± 2.6	3.8 ± 2.5
3.15a	> 250	147 ± 21	124 ± 12	55 ± 11	> 100	38 ± 2
3.15b	136 ± 6	85 ± 3	91 ± 1	> 100	> 100	> 100
3.15c	89 ± 0	31 ± 7	30 ± 3	45 ± 4	45 ± 1	44 ± 8

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

^(b)La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**), con actividades comprendidas entre 4 y 31 nM y 3 y 95 nM, respectivamente, se emplearon como controles positivos.

^(c)No existió relación dosis-respuesta a las concentraciones ensayadas, imposibilitando el cálculo de una CI₅₀ fiable.

Tal y como se observa en la Tabla 3.5, el alargamiento de la cadena en C con un propilo (compuestos **3.13a** y **3.13b**) condujo a la pérdida de la actividad antiproliferativa en más de un orden de magnitud respecto a los análogos con etilo en esta posición (compuestos **3.11c** y **3.11j** respectivamente). Sin embargo, la presencia de un metilo (**3.13c** y **3.13d**) se tradujo en compuestos entre 10 y 25 veces más potentes que los derivados con etilo (**3.11c** y **3.11j**, respectivamente) y a su vez 100 veces más potentes que el *hit* inicial **3.1**. De este modo, se obtuvieron valores de CI₅₀ de 0.18 y 0.09 μM en células HeLa y HMEC-1 respectivamente, para el *o*-metoxiderivado **3.13c**, y de 0.48 μM (HeLa) y 0.26 μM (HMEC-1) para el *o*-metilderivado **3.13d**. Por otra parte, el análogo **3.13e** no sustituido en C fue menos activo que los compuestos con etilo y metilo, especialmente en células tumorales. Asimismo, entre los compuestos que incorporaron un fenilo en C (**3.15a-c**), los que presentaron un grupo alquilo en D (compuestos **3.15a** y **3.15b**) perdieron notablemente la

actividad, de modo que sólo el compuesto **3.15c**, que conservaba el anillo aromático en D, mostró actividad moderada.

Con los anteriores resultados de actividad antiproliferativa, se seleccionó al compuesto **3.13c** como nuevo compuesto de referencia o “cabeza de serie”. Además, y puesto que ya se disponía de ciertas relaciones estructura-actividad, se decidió realizar estudios de *docking* y dinámica molecular que ayudaran a una mejor elección de las siguientes modificaciones estructurales.

3.2.3. ESTUDIOS DE DOCKING Y DINÁMICA MOLECULAR DE 3.13c

Para los estudios de *docking* del compuesto **3.13c** se utilizó el programa AutoDock 4.0.1 y se partió de la estructura del complejo de tubulina con colchicina (**i.3**) (PDB: 1SA0). La superposición de esta estructura con la del complejo con TN-16 (PDB: 3HKD) nos permitió extender la caja en la que se realizó el *docking* a todo el dominio de unión de colchicina. Con las dos mejores soluciones encontradas se llevaron a cabo estudios de dinámica molecular con el fin de evaluar la viabilidad de estos dos posibles modos de unión. En la Figura 3.8 se representan los complejos tubulina/**3.13c** obtenidos tras la simulación (10 ns).

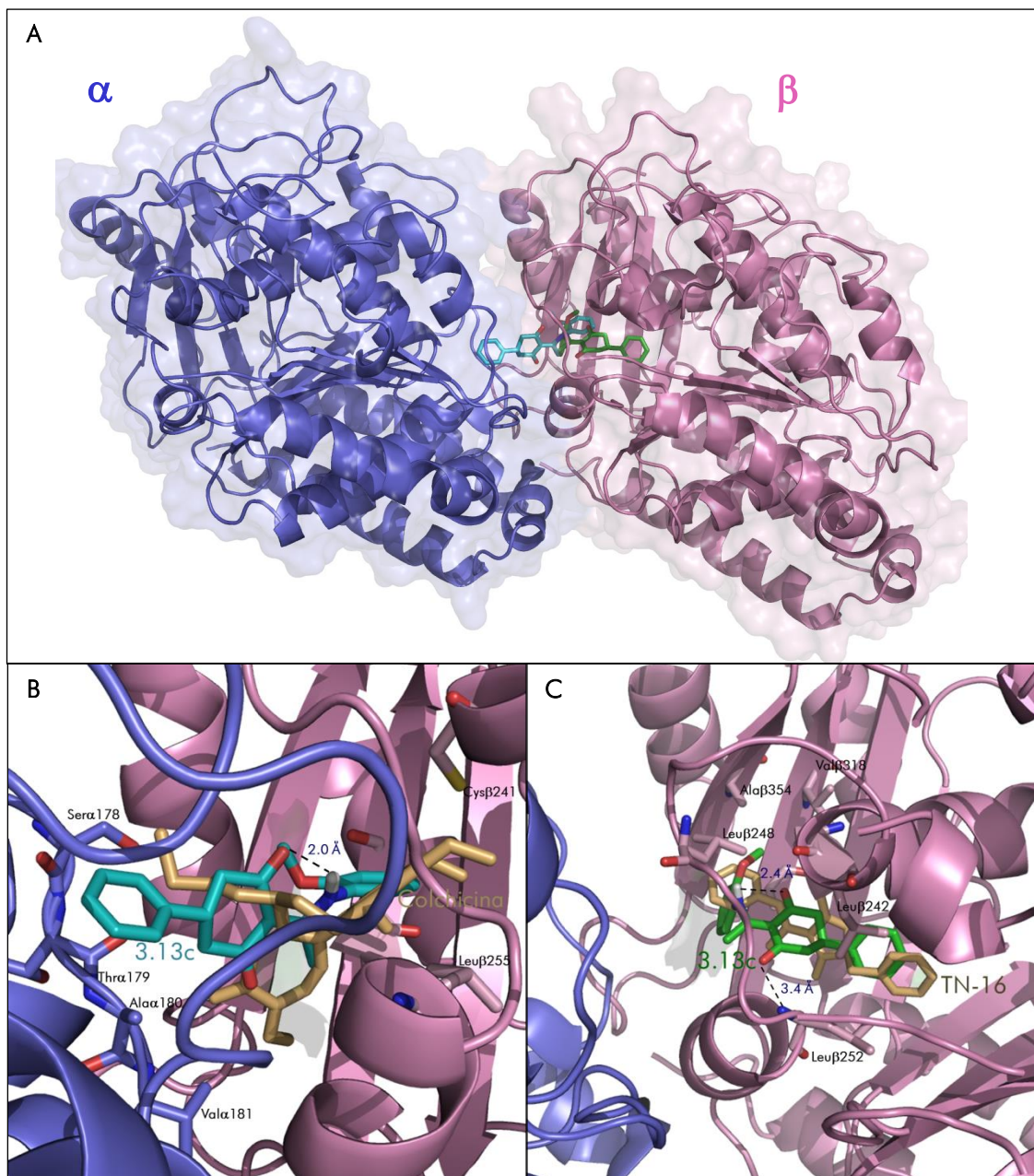


Figura 3.8. (A) Representación de los modos de unión propuestos para **3.13c**. La subunidad α se representa en azul y la subunidad β en rosa. (B) Vista ampliada de la pose situada en la interfaz de α,β -tubulina. **3.13c** se representa en turquesa y colchicina en marrón claro. (C) Vista ampliada de la pose situada en el interior de la subunidad β de tubulina. **3.13c** se representa en verde y TN-16 en marrón claro. Algunos de los residuos más relevantes se muestran en "sticks". Por claridad, todos los hidrógenos excepto el NH de **3.13c** han sido omitidos.

Como se observa en la Figura 3.8A, se encontraron dos posibles modos de unión o “poses” para el compuesto **3.13c**, que además presentaron disposiciones espaciales muy distintas, dado que, al compararlos, la conformación de **3.13c** aparece girada 180 grados sobre el eje Y alrededor del esqueleto central de ciclohexanodiona.

En una de estas poses (Panel B) el compuesto **3.13c** (en turquesa) queda alojado en el sitio de colchicina (en marrón claro), en la interfaz entre las subunidades α y β de tubulina, situando el anillo A hacia el exterior de esta interfaz. Así, en esta pose **3.13c** establece contactos con los residuos Thr α 179, Ala α 180, Val α 181, Ser α 178, Leu β 255, Cys β 241, Ala β 316 y Ala β 317, entre otros. Cabe destacar que en esta conformación de **3.13c** la distancia entre el grupo NH y uno de los carbonilos del anillo del ciclohexanodiona es de 2.0 Å, distancia adecuada para la formación del enlace de hidrógeno intramolecular que se había observado por RMN.

En la segunda de las poses (Panel C), **3.13c** (en verde) aparece alojado en una zona más profunda de la subunidad β , más próximo al sitio de unión de TN-16 (en marrón claro), ocupando así una cavidad delimitada por los residuos Cys β 241, Leu β 242, Leu β 248, Leu β 252, Leu β 255, Ala β 316, Val β 318 y Ala β 354, entre otros. En este caso, el anillo A se sitúa hacia el interior de la subunidad β . Al igual que en la pose anterior, la distancia entre el grupo NH y el carbonilo de la ciclohexanodiona (2.4 Å) es también adecuada para la formación del enlace intramolecular observado experimentalmente. Además, se establece un posible enlace de hidrógeno entre el segundo CO de la ciclohexanodiona y el NH del residuo de Leu β 255 ($d=3.4$ Å), que se mantuvo estable a lo largo de la simulación por dinámica molecular.

Las dos poses encontradas dificultaban la racionalización de las relaciones estructura-actividad establecidas hasta el momento, así como la propuesta de nuevas modificaciones estructurales. La existencia de estos dos modos de unión hacía razonable la incorporación de nuevas modificaciones tanto en el fenilo A como en el D del compuesto **3.13c** (Figura 3.9), que en función de la pose elegida, era el anillo situado más hacia el exterior. En todas las modificaciones estructurales propuestas se mantuvo el metilo en C, al igual que el grupo NH entre C y D, que posibilitaba el puente de H intramolecular con la cetona de la ciclohexanodiona B.

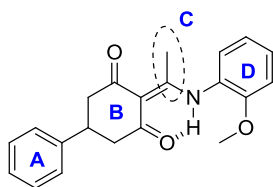
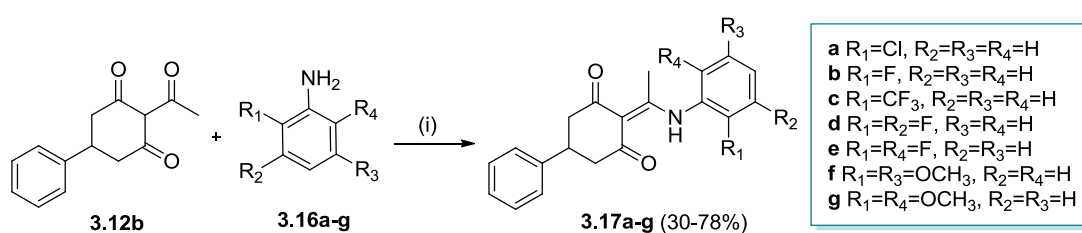


Figura 3.9. Estructura del cabeza de serie **3.13c**.

3.2.4. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 3.13c

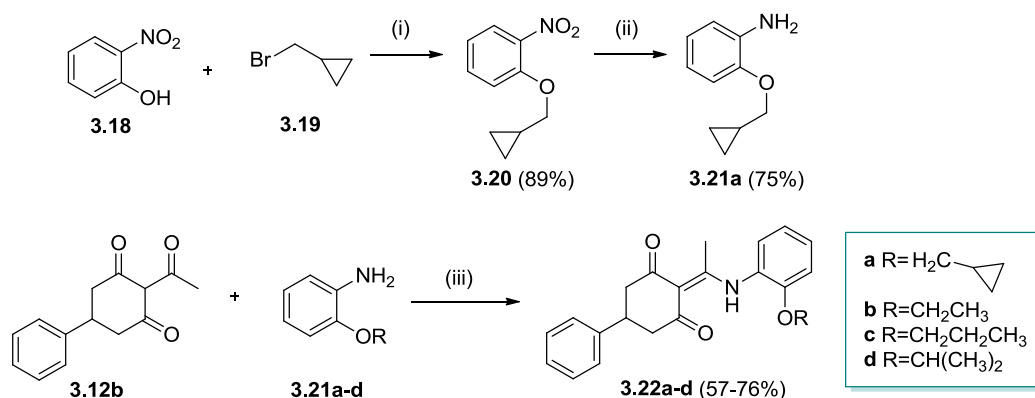
A) Modificaciones en el anillo aromático D

Para la incorporación de otras sustituciones sobre el fenilo en D, la ciclohexanodiona **3.12b** se hizo reaccionar con distintas anilinas sustituidas en *orto* con grupos alternativos al metilo o al metoxilo. Además se prepararon compuestos disustituidos en el anillo D, manteniendo al menos uno de los dos sustituyentes en la posición *orto* de este anillo. Así, por reacción en microondas de la *C*-acilciclohexanodiona **3.12b** con las anilinas **3.16a-c** se obtuvieron los compuestos **3.17a-c**, que incorporaron un Cl, un F, o un grupo trifluorometilo en *orto* (compuestos **3.17a**, **3.17b** y **3.17c**, respectivamente) (Esquema 3.4). Del mismo modo, por reacción de **3.12b** con las anilinas **3.16d-g**, se obtuvieron los 2,3 y 2,6 difluoro derivados **3.17d** y **3.17e**, así como los 2,5 y 2,6-dimetoxi derivados **3.17f** y **3.17g**.



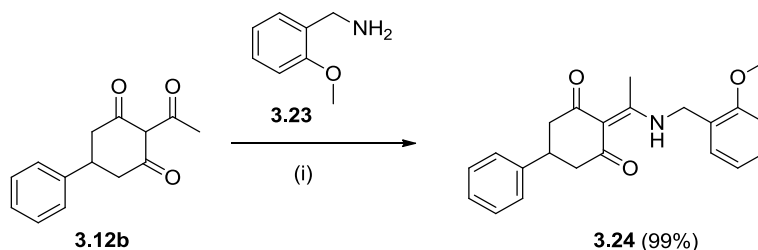
Esquema 3.4. Reactivos y condiciones: (i) Tolueno, tamiz 4 Å, MW, 150 °C, 2 h.

Al mismo tiempo se decidió introducir otros éteres en posición *orto* del anillo D, siendo en algunos casos necesaria la síntesis previa de las correspondientes anilinas (Esquema 3.5). Así, la reacción en medio básico del 2-nitrofenol **3.18** con bromuro de ciclopropilmetilo (**3.19**) a 85 °C, siguiendo un procedimiento descrito,³³ condujo al nitroderivado **3.20** con muy buen rendimiento. La posterior reducción de este compuesto por hidrogenación catalítica con Pd(C) dio lugar a la anilina **3.21a** con un rendimiento del 75%. Finalmente, la reacción en tolueno de la acilciclohexanodiona **3.12b** con la anilina **3.21a** o con las anilinas comerciales **3.21b-d** a 110 °C, permitió la obtención de los compuestos finales **3.22a-d**, con un grupo ciclopropilmetoxilo, etoxilo, propoxilo o isopropoxilo en *orto*, respectivamente.



Esquema 3.5. Reactivos y condiciones: (i) K₂CO₃, CH₃CN, 85 °C, 16 h. (ii) H₂, 10 % Pd(C), EtOH, 25 °C, 24 h. (iii) Tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h.

Por último, se sintetizó el derivado bencílico **3.24** (Esquema 3.6), introduciendo así cierta libertad conformacional entre el anillo D y el resto de la molécula. Para ello se utilizó la bencilamina **3.23**, que por reacción con la acilciclohexanodiona **3.12b** dio lugar al producto deseado con un rendimiento cuantitativo.



Esquema 3.6. Reactivos y condiciones: (ii) Tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, 110 °C, 5 h.

Las estructuras de todos estos compuestos (**3.17a-g**, **3.22a-d** y **3.24**) y sus valores de Cl_{50} , se recogen en las Tablas 3.6 y 3.7, respectivamente. Tal y como se ha hecho en la serie de compuestos precedente, la discusión de los resultados biológicos se centrará en las líneas HeLa y HMEC-1.

Tabla 3.6. Estructuras de **3.13c** y de los derivados sintetizados diferentemente sustituidos en D (**3.17a-g**, **3.22a-d** y **3.24**).

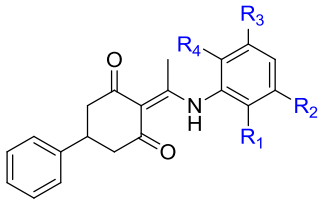

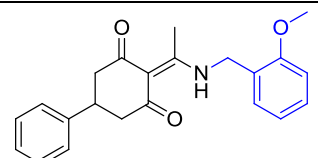
	R_1	R_2	R_3	R_4	
	3.13c	OMe	H	H	H
	3.17a	Cl	H	H	H
	3.17b	F	H	H	H
	3.17c	CF ₃	H	H	H
	3.17d	F	F	H	H
	3.17e	F	H	H	F
	3.17f	OMe	H	OMe	H
	3.17g	OMe	H	H	OMe
	3.22a	OCH ₂ - 	H	H	H
	3.22b	OEt	H	H	H
	3.22c	OProp	H	H	H
	3.22d	O <i>i</i> -Prop	H	H	H
	3.24				

Tabla 3.7. Actividad antiproliferativa expresada como Cl_{50} (μM) de los compuestos **3.13c**, **3.17a-g**, **3.22a-d** y **3.24**, en células tumorales tumorales y endoteliales.

Comp.	$Cl_{50}^{(a)(b)}$ (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
3.13c	0.18 ± 0.00	0.16 ± 0.08	0.18 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01
3.17a	0.71 ± 0.20	0.70 ± 0.62	0.64 ± 0.18	0.56 ± 0.16	0.47 ± 0.05	0.29 ± 0.03
3.17b	3.4 ± 2.4	1.9 ± 0.7	1.1 ± 0.3	0.93 ± 0.46	1.0 ± 0.1	0.51 ± 0.01
3.17c	32 ± 18	14 ± 10	18 ± 2	7.7 ± 2.1	8.7 ± 0.1	8.1 ± 0.5
3.17d	36 ± 3	19 ± 1	25 ± 18	10 ± 2	12 ± 0	14 ± 2
3.17e	17 ± 4	11 ± 2	21 ± 6	6.6 ± 0.5	9.2 ± 1.8	8.4 ± 1.5
3.17f	46 ± 3	36 ± 22	6 - >100 ^(c)	2.6 ± 0.2	3.2 ± 0.2	2.6 ± 0.5
3.17g	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.7	1.4 ± 0.8	1.2 ± 0.2	0.46 ± 0.29
3.22a	0.62 ± 0.06	0.25 ± 0.03	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.09
3.22b	0.18 ± 0.00	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.086 ± 0.024
3.22c	0.81 ± 0.11	0.71 ± 0.04	0.86 ± 0.10	0.46 ^(d)	0.42 ^(d)	0.37 ^(d)
3.22d	0.32 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.19 ± 0.02	≤ 0.2	0.30 ± 0.01	≤ 0.2
3.24	136 ± 6	85 ± 3	91 ± 1	>100	>100	>100

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

^(b) La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**), con actividades comprendidas entre 4 y 31 nM y 3 y 95 nM, respectivamente, se emplearon como controles positivos.

^(c)No existió relación dosis-respuesta a las concentraciones ensayadas, imposibilitando el cálculo de una Cl_{50} fiable.

^(d)Valor de un único experimento.

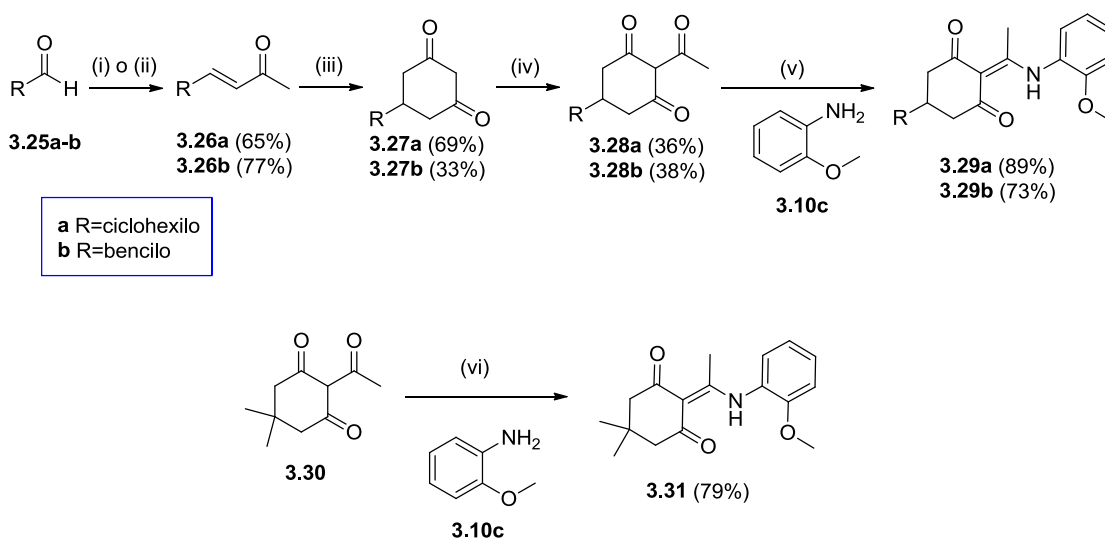
En primer lugar, la introducción de un cloro en la posición *orto* del anillo D resultó en un compuesto (**3.17a**) con una actividad antiproliferativa muy destacable, en el rango submicromolar (Cl_{50} =0.71 y 0.56 μM en células HeLa y HMEC-1 respectivamente), si bien fue cerca de 5 veces menos efectivo que el compuesto de referencia **3.13c**. Con el fluoroderivado **3.17b** la pérdida de actividad fue de un orden de magnitud (Cl_{50} =3.4 y 0.93 μM), mientras que con el compuesto **3.17c**, con un grupo 2-trifluorometilo, la pérdida de actividad fue aún más notable. En relación a los compuestos disustituídos, los difluoroderivados **3.17d** y **3.17e**, y los dimetoxiderivados **3.17g** y **3.17f** presentaron una pérdida de la actividad significativa en comparación con sus correspondientes análogos monosustituídos (**3.17b** y **3.13c**, respectivamente).

En cuanto a la serie de modificaciones que afectaban a la longitud y/o al volumen del sustituyente alcoxilo en la posición 2, la sustitución por un grupo etoxilo (**3.22b**) dio lugar a un compuesto con muy buena actividad antiproliferativa (Cl_{50} =0.18 y 0.10 μM en células HeLa y HMEC-1, respectivamente), similar en potencia al metoxiderivado **3.13c**. Esta actividad fue también muy destacable en los compuestos **3.22a** y **3.22d** donde se introdujeron un grupo ciclopropilmetoxilo (Cl_{50} =0.62 y 0.24 μM) o un isopropoxilo (Cl_{50} =0.32 y ≤0.2 μM), respectivamente, aunque el efecto fue ligeramente inferior en relación al de los análogos con metoxilo (**3.13c**) o etoxilo (**3.22b**). Asimismo, el propoxiderivado **3.22c** mantuvo la actividad en el rango submicromolar (Cl_{50} =0.81 y 0.46 μM), si bien fue el menos activo de esta serie de alcoxiderivados. Por último, la sustitución del anillo de fenilo en D por un bencilo (compuesto **3.24**), ocasionó una pérdida casi total de la actividad antiproliferativa.

B) Modificaciones en el anillo aromático A

De forma paralela a las modificaciones efectuadas sobre el anillo D, se abordó la sustitución del fenilo A del compuesto prototipo **3.13c**, bien por grupos no aromáticos, o bien por otros anillos aromáticos diferentemente sustituidos. En la mayoría de los casos, la preparación de estos compuestos implicó dos nuevos pasos de síntesis, necesarios para la preparación de las correspondientes ciclohexanodionas.

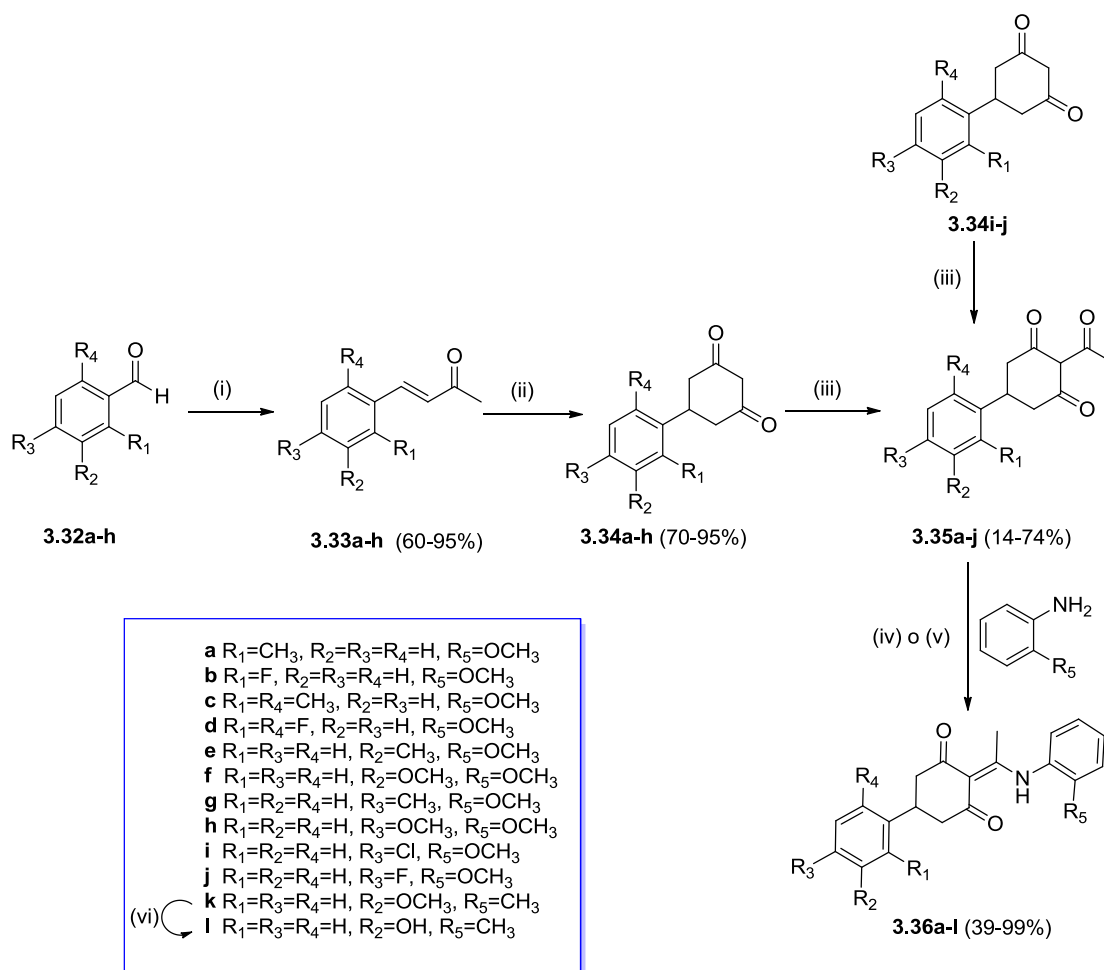
Primeramente, se sustituyó el fenilo A de **3.13c** por diferentes grupos alquílicos (ciclohexilo o *gem*-dimetilo) o por un bencilo. Para la síntesis del ciclohexilderivado **3.29a** y del bencilderivado **3.29b**, se partió de los aldehídos **3.25a** y **3.25b**, que se convirtieron en las correspondientes metilcetonas α,β -insaturadas **3.26a** y **3.26b** por medio de dos aproximaciones diferentes (Esquema 3.7). Por un lado, la cetona **3.26a** se obtuvo por reacción a temperatura ambiente del ciclohexanocarbaldehído (**3.25a**) con acetona, en presencia de NaOH acuoso,³⁴ con un rendimiento del 65%. Por otro lado, la cetona **3.26b** se sintetizó por reacción de Wittig a 60 °C del fenilacetaldehído (**3.25b**) con 1-trifenilfosforaniliden-2-propanona,³⁵ siendo el rendimiento cercano al 80%. A continuación, la ciclación de las metilcetonas **3.26a** y **3.26b** con malonato de dietilo,³⁴ condujo a las dicetonas **3.27a** y **3.27b** con rendimientos del 69% y 33%, respectivamente. Finalmente, la reacción de **3.27a** y **3.27b** en medio básico con cloruro de acetilo y la posterior reacción de los acilderivados **3.28a** y **3.28b** así obtenidos con la *o*-anisidina **3.10c** condujo a los compuestos deseados **3.29a** y **3.29b**, con muy buenos rendimientos.



Esquema 3.7. Reactivos y condiciones: **(i)** **3.26a**: NaOH (1%), acetona, H₂O, 25 °C, 16 h. **(ii)** **3.26b**: Ph₃P=CHCOCH₃, CHCl₃, 60 °C, 4 h. **(iii)** (a) Malonato de etilo, EtONa, EtOH, 1 h; (b) NaOH, 80 °C, 2 h; (c) HCl, 100 °C, 1 h. **(iv)** CH₃COCl, K₂CO₃ anh., 1,2,4-triazol, TBAB, DMF, MW, 70 °C, 2 h. **(v)** Tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h. **(vi)** Tolueno, tamiz 4 Å, MW, 150 °C, 2 h.

Como igualmente se muestra en el Esquema 3.7, la síntesis del *gem*-dimetilderivado **3.31** implicó un único paso de reacción, a partir de la acilciclohexanodiona comercial **3.30** y *o*-anisidina (**3.10c**), con un rendimiento cercano al 80%.

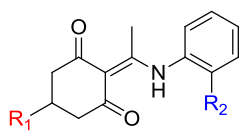
Asimismo, con el propósito de evaluar el impacto en la actividad de la incorporación de sustituyentes en el anillo aromático A del prototipo **3.13c**, se sintetizaron los compuestos **3.36a-l** (Esquema 3.8). De este modo, el tratamiento de los benzaldehídos sustituidos **3.32a-h** con acetona, y la reacción posterior con malonato de dietilo, permitió preparar las correspondientes ciclohexanodionas **3.34a-h**.^{36,37} Estas ciclohexanodionas, además de otras disponibles comercialmente (**3.34i-j**), se hicieron reaccionar con cloruro de acetilo, dando lugar a los *C*-acilderivados **3.35a-j**. La reacción de estos compuestos con *o*-anisidina o con *o*-toluidina condujo a los derivados **3.36a-k**. Por último, el tratamiento del metoxiderivado **3.36k** con BBr_3 a temperatura ambiente permitió la obtención del derivado fenólico **3.36l**.



Esquema 3.8. Reactivos y condiciones: **(i)** NaOH (1%), acetona, H_2O , 25 °C, 16 h. **(ii)** (a) Malonato de etilo, EtONa, EtOH, 1 h; (b) NaOH, 80 °C, 2 h; (c) HCl, 100 °C, 1 h. **(iii)** CH_3COCl , K_2CO_3 anh., 1,2,4-triazol, TBAB, CH_3CN o DMF, MW, 70 °C, 2 h. **(iv) 3.36e-j**: Tolueno, tamiz 4 Å, MW, 150 °C, 2 h. **(v) 3.36a-d,k**: Tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h. **(vi)** BBr_3 , CH_2Cl_2 , 25 °C, 12 h (23%).

Las estructuras y los resultados de la evaluación biológica de los compuestos diferentemente sustituidos en el fragmento A sintetizados en este apartado, se muestran en las Tablas 3.8 y 3.9, respectivamente.

Tabla 3.8. Estructuras de **3.13c** y de los derivados diferentemente sustituidos en A (**3.29a-b**, **3.31** y **3.36a-l**).



	R ₁	R ₂
3.13c	Ph	OMe
3.29a	Ciclohex	OMe
3.29b	Bn	OMe
3.31	di- <i>gem</i> -Me	OMe
3.36a	2-Me-Ph	OMe
3.36b	2-F-Ph	OMe
3.36c	2,6-diMe-Ph	OMe
3.36d	2,6-diF-Ph	OMe
3.36e	3-Me-Ph	OMe
3.36f	3-OMe-Ph	OMe
3.36g	4-Me-Ph	OMe
3.36h	4-OMe-Ph	OMe
3.36i	4-Cl-Ph	OMe
3.36j	4-F-Ph	OMe
3.36k	3-OMe-Ph	Me
3.36l	3-OH-Ph	Me

Tabla 3.9. Actividad antiproliferativa expresada como CI₅₀ (μM) de **3.13c**, **3.29a-b**, **3.31** y **3.36a-l**, en células tumorales y endoteliales y endoteliales

Comp.	CI ₅₀ ^{(a)(b)} (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
3.13c	0.18 ± 0.00	0.16 ± 0.08	0.18 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01
3.29a	11 ± 5	8 - >100 ^(c)	15 ± 6	12 ± 1	21 ± 5	12 ± 1
3.29b	>100	>100	>100	22 ± 2	87 ± 15	>100
3.31	>100	>100	>100	76 ± 18	71 ± 41	48 ± 11
3.36a	13 ± 3	11 ± 0	7.2 ± 0.2	5.8 ± 0.4	6.8 ± 0.8	3.2 ± 0.2
3.36b	4.8 ± 0.1	6.3 ± 0.6	4.9 ± 1.4	4.3 ± 0.3	5.4 ± 0.6	2.7 ± 0.2
3.36c	55 ± 27	24 ± 3	23 ± 0	35 ± 1	39 ± 2	41 ± 2
3.36d	>100	>100	>100	39 ± 8	60 ± 9	>100
3.36e	0.79 ± 0.12	0.17 ± 0.11	0.31 ± 0.07	0.33 ± 0.12	0.42 ± 0.01	0.26 ± 0.07
3.36f	0.69 ± 0.01	0.21 ± 0.09	0.24 ± 0.10	0.30 ± 0.08	0.41 ± 0.08	0.23 ± 0.09
3.36g	90 ± 4	>100	>100	11 ± 3	9.2 ± 1.1	8.4 ± 0.2
3.36h	>100	>100	>100	>100	>100	>100
3.36i	58 ± 23	22 ± 0	28 ± 8	55 ± 16	46 ± 1	42 ± 1
3.36j	4.0 ± 0.4	3.3 ± 0.4	5.3 ± 1.0	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.4
3.36k	0.66 ± 0.03	0.26 ± 0.22	0.72 ± 0.25	0.67 ± 0.07	0.64 ± 0.05	0.48 ± 0.04
3.36l	4.1 ± 0.2	3.5 ± 1.7	6.2 ± 0.2	2.2 ± 0.6	2.5 ± 0.2	2.1 ± 0.1

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

^(b) La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**), con actividades comprendidas entre 4 y 31 nM y 3 y 95 nM, respectivamente, se emplearon como controles positivos.

^(c) No existió relación dosis-respuesta a las concentraciones ensayadas, imposibilitando el cálculo de una CI₅₀ fiable.

De los datos contenidos en la Tabla 3.9, se puede deducir que la sustitución del fenilo en A por un anillo de ciclohexilo dio lugar a un compuesto (**3.29a**) considerablemente menos activo respecto al compuesto de referencia **3.13c**. La pérdida de actividad fue aún más acusada para los derivados con un bencilo o un *gem*-dimetilo en A (**3.29b** y **3.31**, respectivamente). Estos resultados pusieron de manifiesto la importancia del fenilo en A para la óptima actividad antiproliferativa de esta familia de compuestos.

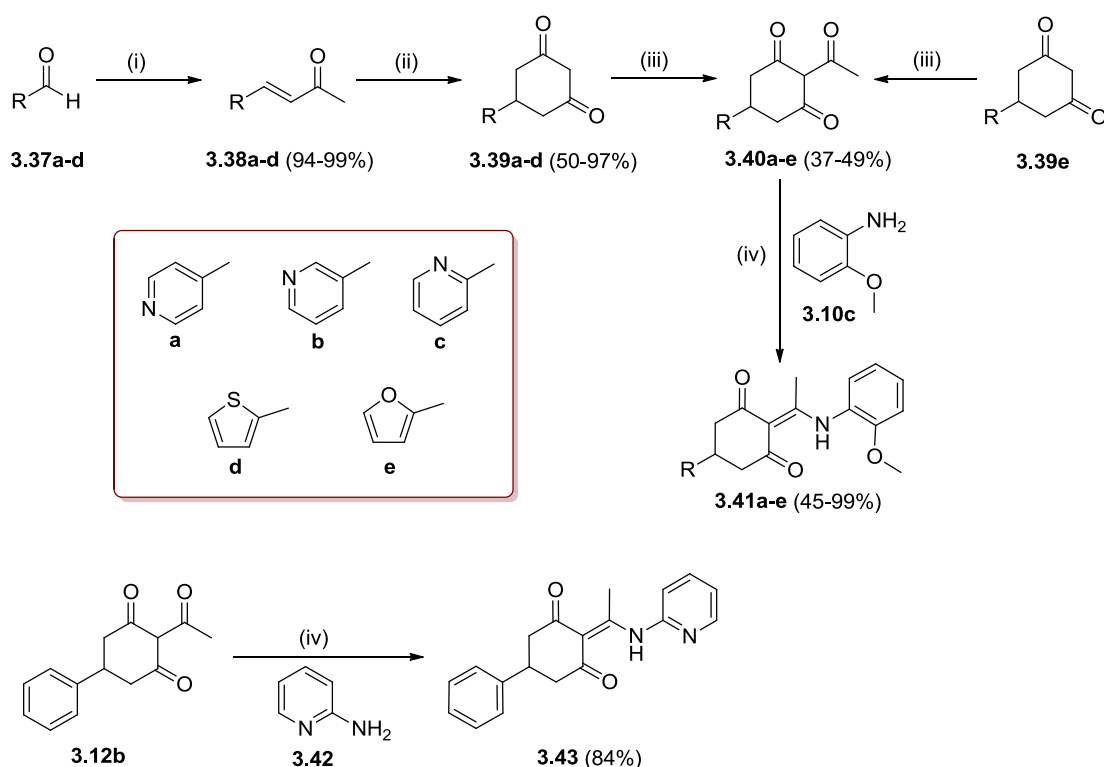
Dentro de la serie de compuestos diferentemente sustituidos en el anillo aromático A (**3.36a-l**), los derivados con un metilo o un flúor en *orto* (**3.36a** y **3.36b**, respectivamente) presentaron cierta actividad, si bien fueron casi 50 veces menos potentes que el cabeza de serie **3.13c**. Los análogos disustituidos en las posiciones 2 y 6 con metilo (**3.36c**) o flúor (**3.36d**) fueron entre 10 y 20 veces menos activos que los anteriores compuestos monosustituidos (**3.36a** y **3.36b**, respectivamente). En

referencia a la posición *meta*, la incorporación de sustituyentes en esta posición tuvo un menor impacto en la actividad. Así, la sustitución con un metilo (compuesto **3.36e**) o un metoxilo (compuestos **3.36f**) condujo a compuestos que consiguieron mantener la actividad antiproliferativa en el rango submicromolar ($Cl_{50}=0.6-0.8$ y $0.3-0.7 \mu\text{M}$ en células HeLa y HMEC-1, respectivamente), aunque en todos los casos el efecto fue algo inferior al del compuesto **3.13c** no sustituido en este anillo A. Respecto a las sustituciones introducidas en la posición *para*, casi todos los compuestos manifestaron una pérdida muy notable de la actividad antiproliferativa, con la excepción del 4-fluoroderivado **3.36j**, que mostró una actividad en torno a $2-5 \mu\text{M}$. Resulta curioso el comportamiento del compuesto con un grupo 4-Me (**3.36g**), que presentó cierta actividad sólo en células endoteliales. Por último, los compuestos **3.36k** y **3.36l**, con un grupo OMe y OH respectivamente en la posición *meta*, y un sustituyente 2-Me en el anillo D, mostraron un comportamiento diferente entre ellos. Así, mientras el derivado **3.36k** con OMe mantuvo la actividad del compuesto no sustituido **3.13c**, con valores de Cl_{50} de $0.7 \mu\text{M}$ en células HeLa y HMEC-1, su análogo **3.36l** con OH sólo fue activo a concentraciones entre 5 y 6 veces superiores.

C) Incorporación de heterociclos y grupos polares

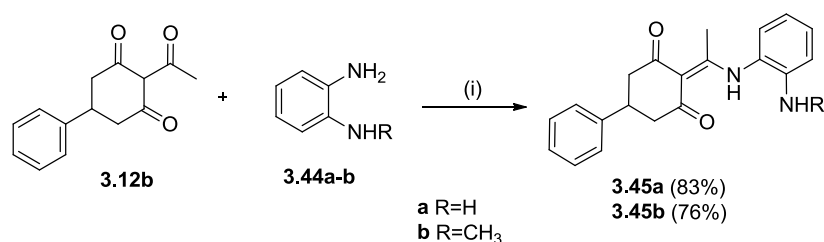
La solubilidad acuosa en tampón fosfato del cabeza de serie **3.13c** se determinó de manera experimental, siguiendo un procedimiento análogo al descrito para las chalconas en el Capítulo 2, y el valor obtenido fue inferior a 3.3×10^{-3} mg/ml ($< 10 \mu\text{M}$). Esta escasa solubilidad imposibilitaba la evaluación *in vivo* de este compuesto tan prometedor. Con el objetivo de conseguir incrementar la hidrofilia y la solubilidad en esta familia de compuestos, se plantearon nuevas modificaciones sobre los fragmentos A, C y D específicamente encaminadas a introducir sustituyentes de mayor polaridad en la estructura de **3.13c**.

Una de las estrategias más utilizadas en química médica para mejorar la solubilidad en compuestos con anillos aromáticos consiste en la sustitución del anillo de fenilo por un anillo de piridina o bien por otros heterociclos. De esta forma, se abordó la síntesis de los derivados **3.41a-e** (Esquema 3.9), con un grupo 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, 2-tiofenilo y 2-furanilo en A, respectivamente. Además se sintetizó el compuesto **3.43**, con un anillo de 2-piridina en D en sustitución al fenilo. Así, la preparación de los compuestos **3.41a-d** implicó 4 pasos de síntesis a partir de los aldehídos **3.37a-d**, tal y como se ha descrito previamente en este Capítulo. Para el caso del compuesto **3.41e** con un 2-furanilo en A, sólo fueron necesarios 2 pasos sintéticos, a partir de la ciclohexanodiona precursora **3.39e**, disponible comercialmente. Por otra parte, la síntesis del derivado con un 2-piridilo en D (**3.43**), se llevó a cabo por reacción de la C-acilciclohexanodiona **3.12b** con la 2-aminopiridina **3.42** (84% de rendimiento).



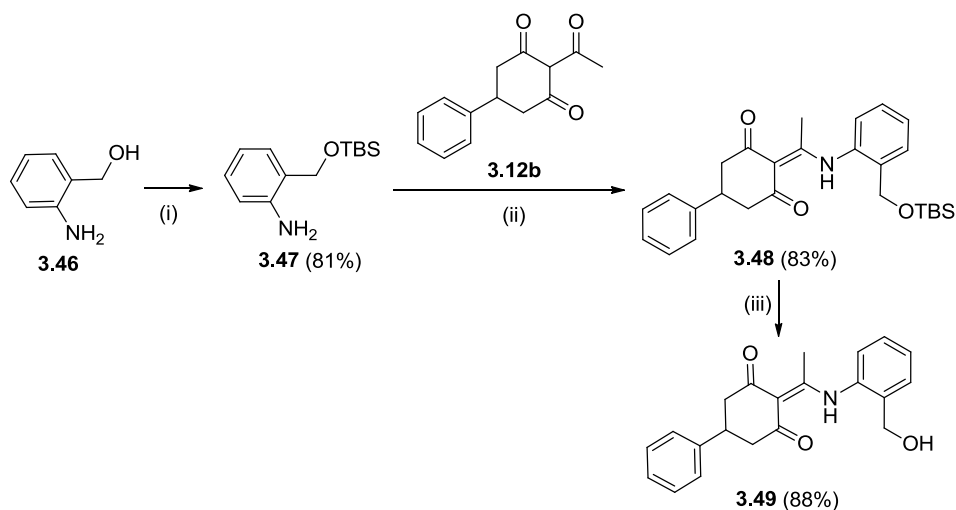
Esquema 3.9. Reactivos y condiciones: (i) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCOCH}_3$, CHCl_3 , 60°C , 4 h; (ii) (a) Malonato de etilo, EtONa , EtOH , 1 h; (b) NaOH , 80°C , 2 h; (c) HCl , 100°C , 1 h; (iii) CH_3COCl , K_2CO_3 anh., 1,2,4-triazol, TBAB, CH_3CN o DMF , MW, 70°C , 2 h; (iv) Tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, 110°C , 16 h.

La segunda estrategia consistió en la incorporación de grupos polares (aminos o hidroximetilos) que pudieran no sólo mejorar la solubilidad, sino también ser derivados a la preparación de profármacos. Con este objetivo se sintetizaron los compuestos **3.45a** y **3.45b**, que presentaban en la posición *orto* del anillo D un amino y un metilamino, respectivamente (Esquema 3.10). Estos compuestos podrían además estar protonados a pH fisiológico, incrementando de esta forma su solubilidad. Así, la reacción de la ciclohexanodiona **3.12b** con *o*-fenilendiamina (**3.44a**) o con *N*-metil-1,2-fenilendiamina (**3.44b**) a 80 °C dio lugar a los compuestos **3.45a** y **3.45b**, con rendimientos muy buenos en ambos casos.



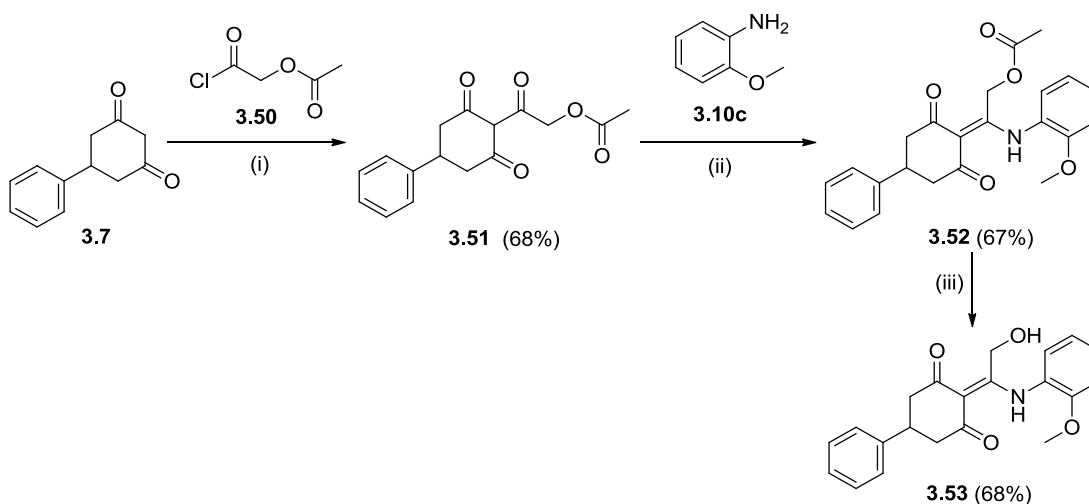
Esquema 3.10. Reactivos y condiciones: (i) tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, 80 °C, 4 h.

En paralelo se planteó la síntesis del compuesto **3.49** (Esquema 3.11) con un grupo hidroximetilo en la posición *orto* del anillo D. En primer lugar, se llevó a cabo la protección del grupo OH de la anilina **3.46** empleando cloruro de *tert*-butildimetilsililo en condiciones básicas, según se describe en la literatura,³⁸ para obtener la anilina **3.47** con muy buen rendimiento. La reacción de esta anilina **3.47** con el *C*-acilderivado **3.12b**, y la posterior desprotección del hidroxilo con fluoruro de tetrabutilamonio condujo al compuesto **3.49**, con un rendimiento cercano al 90%.



Esquema 3.11. Reactivos y condiciones: (i) TBSCl, imidazol, DMF, 25 °C, 16 h. (ii) Tolueno, tamiz 4 Å, MW, 150 °C, 2 h. (iii) TBAF, THF, 25 °C, 1 h.

Por último, se introdujo un grupo hidroximetilo en el fragmento C. La reacción de la ciclohexanodiona **3.7** con cloruro de acetoxiacetilo (**3.50**) (Esquema 3.12), conforme a precedentes bibliográficos de ciclohexanodionas análogas,³⁹ condujo al derivado C-acilado **3.51** (68% de rendimiento). La reacción de **3.51** con *o*-anisidina (**3.10c**) dio lugar al compuesto **3.52**, que posteriormente se desacetiló en medio básico, para obtener así el derivado **3.53** con un hidroxilo primario en C, con un rendimiento cercano al 70%.



Esquema 3.12. Reactivos y condiciones: (i) (a) TEA, DMAP, 25 °C, 3 h; (b) CH₂Cl₂, AcOH, 30 min. (ii) Tolueno, tamiz 4 Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h. (iii) K₂CO₃, MeOH, 25 °C, 1 h.

Como en los casos anteriores, los compuestos descritos en este último apartado, cuyas estructuras se muestran en la Tabla 3.10, se evaluaron como agentes antiproliferativos en células tumorales y endoteliales (Tabla 3.11).

Tabla 3.10. Estructuras del compuesto **3.13c** y de los derivados **3.41a-e**, **3.43**, **3.45a-b**, **3.49**, **3.52** y **3.53**.

	R ₁	R ₂	R ₃	Z
3.13c	Ph	OMe	Me	C
3.41a	4-Py	OMe	Me	C
3.41b	3-Py	OMe	Me	C
3.41c	2-Py	OMe	Me	C
3.41d	2-Tiofenil	OMe	Me	C
3.41e	2-Furanil	OMe	Me	C
3.43	Ph	H	Me	N
3.45a	Ph	NH ₂	Me	C
3.45b	Ph	NHMe	Me	C
3.49	Ph	CH ₂ OH	Me	C
3.52	Ph	OMe	CH ₂ OAc	C
3.53	Ph	OMe	CH ₂ OH	C

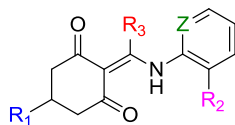


Tabla 3.11. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (μM) de los compuestos **3.13c**, **3.41a-e**, **3.43**, **3.45a-b**, **3.49**, **3.52** y **3.53**, en células tumorales y endoteliales

Comp.	$CI_{50}^{(a)(b)}$ (μM)					
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES		
	HeLa	L1210	CEM	HMEC-1	MBEC	BAEC
3.13c	0.18 ± 0.00	0.16 ± 0.08	0.18 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01
3.41a	> 250	110 ± 31	185 ± 23	>100	>100	>100
3.41b	4.3 ± 1.0	1.8 ± 0.8	4.3 ± 1.0	3.3 ± 0.5	2.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1
3.41c	5.4 ± 0.4	4.6 ± 0.5	6.5 ± 0.3	1.7 ± 0.6	2.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2
3.41d	1.1 ± 0.4	0.59 ± 0.54	0.55 ± 0.41	0.41 ^(c)	0.55 ^(c)	0.38 ^(c)
3.41e	0.63 ± 0.37	0.21 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.24 ± 0.08	0.29 ± 0.04	0.15 ± 0.04
3.43	112 ± 10	74 ± 17	93 ± 21	> 100	> 100	58 ± 23
3.45a	27 ± 2	14 ± 5	21 ± 5	29 ± 2	18 ± 10	14 ± 1
3.45b	18 ± 1	12 ± 6	13 ± 9	14 ± 2	14 ± 1	9.4 ± 0.1
3.49	113 ± 1	102 ± 8	117 ± 29	31 ± 1	36 ± 2	22 ± 1
3.52	≥ 250	> 250	113 ± 11	> 100	> 100	> 100
3.53	86 ± 1	54 ± 36	33 ± 7	48 ± 10	39 ± 3	50 ± 14

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

^(b) La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.6**), con actividades comprendidas entre 4 y 31 nM y 3 y 95 nM, respectivamente, se emplearon como controles positivos.

^(c) Valor de un único experimento.

En primer lugar, los resultados recogidos en la Tabla 3.11 pusieron de manifiesto que la incorporación de un heterociclo en el fragmento A afectaba de forma muy diferente a la actividad de los compuestos. Así, el 4-piridil derivado **3.41a** resultó completamente inactivo, mientras que los 3-piridil y 2-piridil derivados (**3.41b** y **3.41c** respectivamente) mostraron actividad en el rango μM , siendo 10 veces menos activos que el prototipo **3.13c**. Por el contrario, el efecto antiproliferativo de los compuestos con un anillo de 2-tiofenilo y de 2-furanilo en A (**3.41d** y **3.41e** respectivamente) fue muy significativo, con valores de CI_{50} submicromolares y muy cercanos a los del cabeza de serie **3.13c**, sobre todo en el caso del furanil derivado **3.41e**. En lo que respecta al derivado con un 2-piridilo en D (compuesto **3.43**), se observó una pérdida casi completa de la actividad antiproliferativa. Siguiendo con las modificaciones en D, la incorporación de los grupos 2-amino (**3.45a**) o 2-metilamino (**3.45b**) sobre el fenilo condujo a compuestos con actividad moderada (15-30 μM). Por su parte, el derivado **3.49** donde se incorporó un grupo 2-hidroximetilo en este anillo aromático D resultó prácticamente inactivo en células tumorales, si bien mantuvo actividad moderada en células endoteliales (15-30 μM). Por último, el compuesto con un grupo hidroximetilo en C (**3.53**) fue prácticamente inactivo, del mismo modo que su análogo acetilado **3.52**. Por tanto, la incorporación de grupos polares en distintos fragmentos de estos derivados de ciclohexanodionas se tradujo en un claro detrimento de la actividad antiproliferativa.

Con el derivado más activo de esta serie, el compuesto **3.41e**, donde en A se incorporó un anillo de 2-furanilo, se llevó a cabo la determinación de la solubilidad experimental, obteniéndose un valor de 1.8×10^{-2} mg/ml. Si bien este dato fue 6 veces superior respecto al del compuesto prototipo **3.13c** (3.3×10^{-3} mg/ml), la solubilidad continuaba siendo demasiado limitada para considerar este compuesto como un candidato adecuado con el que efectuar estudios *in vivo*.

3.2.5. RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

A modo de resumen, se presentan las relaciones de estructura-actividad antiproliferativa que se han obtenido tras la evaluación de todos los compuestos sintetizados en este Capítulo (Figura 3.10):

1) En el fragmento D debe estar presente un anillo de fenilo, siendo además fundamental para la actividad la presencia de un sustituyente en la posición *orto* del mismo. Los mejores valores de CI_{50} se encontraron en los derivados con un grupo alcoxilo, en particular con un metoxilo o etoxilo, y en menor medida, con un ciclopropilmetoxilo, isopropoxilo o propoxilo. La actividad de los compuestos con metilo y con cloro en *orto* fue también muy significativa, siendo algo inferior para el fluoroderivado. Por otra parte, la introducción de grupos polares en esta posición (OH, CH_2OH , NH_2 o $NHCH_3$) fue en detrimento de la actividad antiproliferativa. La incorporación de sustituyentes en la posición *meta* ocasionó también una pérdida muy acusada de la actividad antiproliferativa, del mismo modo que la sustitución en *para*, que se tradujo en compuestos inactivos.

2) En cuanto a los grupos introducidos en C, los mejores resultados se obtuvieron con un grupo metilo. La actividad disminuyó al alargar la cadena con un etilo, siendo casi nula para los derivados con propilo. Asimismo, la incorporación de restos polares (CH_2OH frente a CH_3) condujo a una pérdida de la actividad de entre 100 y 500 veces.

3) En referencia al fragmento A, en esta parte de la molécula fue también crucial la existencia de un anillo de fenilo, preferentemente no sustituido. Así, la incorporación de sustituyentes en este anillo llevó a un descenso de actividad antiproliferativa, especialmente notable en los compuestos sustituidos en *para* y *orto*. La pérdida de efecto fue menos importante en los derivados sustituidos en *meta*, donde la incorporación de un metilo o metoxilo condujo a compuestos muy activos. Igualmente, la sustitución del fenilo por un anillo de 2-furanilo, y en menor medida por un 2-tiofenilo, dio lugar a compuestos que destacaron por su marcado efecto antiproliferativo.

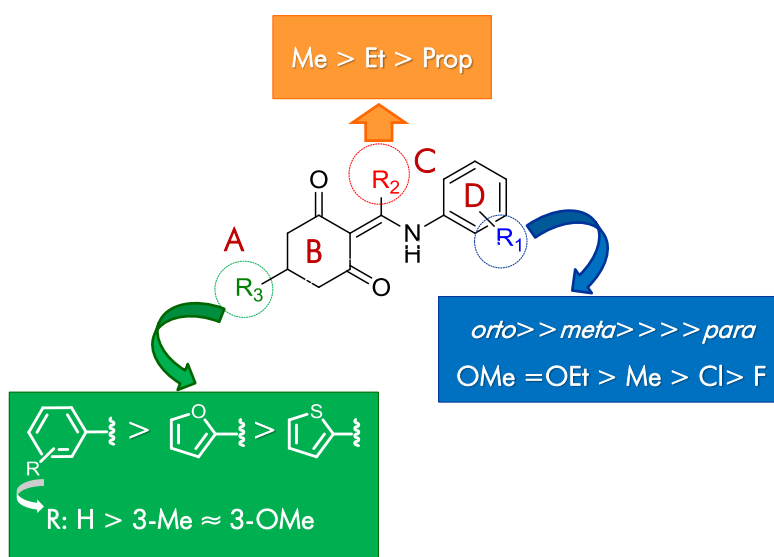


Figura 3.10. Relaciones estructura-actividad antiproliferativa de estos derivados de ciclohexanodiona.

Los datos de relaciones estructura-actividad antiproliferativa de los compuestos que incorporaban sustituyente polares en el anillo A, así como la pérdida de actividad mostrada por aquellos que contenían grupos en la posición *para* de este anillo, apuntaban como pose más posible a la segunda de las obtenidas tras los estudios de *docking* con el derivado **3.13c**. En esta pose, este compuesto se situaba próximo el sitio de unión de TN-16, situando el anillo A en una zona más profunda y altamente hidrofóbica de la subunidad β (Figura 3.11). Además, la falta de actividad de los compuestos sustituidos en la posición *orto* del anillo A (tanto mono como disustituidos), así como la tolerancia a la incorporación de sustituyentes pequeños en la posición *meta* de este anillo, eran compatibles con este modo de unión. Aun así, esta pose no permitía justificar la pérdida de actividad al alargar la cadena alquílica en C, o la poca tolerancia a la introducción de grupos en el anillo D más allá de la sustitución en la posición *orto*.

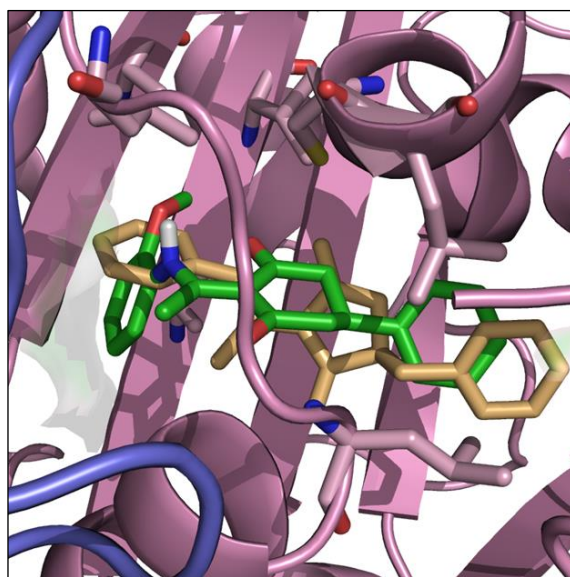
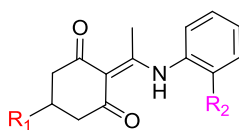


Figura 3.11. Representación del modo de unión más probable de esta familia de compuestos. La subunidad α se representa en azul y la subunidad β en rosa. El compuesto **3.13c** se representa en verde y TN-16 en marrón claro. Por claridad, todos los hidrógenos excepto el NH de **3.13c** han sido omitidos.

Para finalizar con este apartado dedicado a la síntesis y optimización, se presenta la Tabla 3.12, donde se reúnen las estructuras y los resultados de la evaluación biológica en la línea endotelial HMEC-1 de los compuestos más prometedores, todos ellos con una CI_{50} en el rango submicromolar.

Tabla 3.12. Estructuras de los compuestos sintetizados en este Capítulo con mejor perfil de actividad antiproliferativa.

	R_1	R_2	CI_{50} (μM) HMEC-1
3.13c	Ph	OMe	0.09 ± 0.01
3.13d	Ph	Me	0.26 ± 0.08
3.17a	Ph	Cl	0.56 ± 0.16
3.17b	Ph	F	0.93 ± 0.46
3.22a	Ph	OCH_2	0.24 ± 0.02
3.22b	Ph	OEt	0.10 ± 0.02
3.22c	Ph	OProp	0.46
3.22d	Ph	O- <i>i</i> -Prop	≤ 0.2
3.36e	3-Me-Ph	OMe	0.33 ± 0.12
3.36f	3-OMe-Ph	OMe	0.30 ± 0.08
3.36k	3-OMe-Ph	Me	0.67 ± 0.07
3.41d	2-tiofenil	OMe	0.41
3.41e	2-furanil	OMe	0.24 ± 0.08



3.2.6. ESTUDIOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

Con estos datos de actividad antiproliferativa tan prometedores se plantearon ensayos biológicos adicionales, con los que poder esclarecer el mecanismo de acción de esta familia de compuestos. Puesto que la finalidad de cada uno de estos ensayos ya ha sido ampliamente descrita en el Capítulo 2, se pasará directamente a la presentación de los resultados.

A) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular

Para estos ensayos se empleó la línea endotelial HMEC-1 y los compuestos a evaluar (**3.13c** y **3.13d**) se incubaron durante 8 horas a tres concentraciones diferentes (0.3, 1 y 3 μM). Como compuesto de referencia se empleó la colchicina (0.1 μM). El análisis celular se realizó por citometría de flujo, según se ha descrito previamente en esta Memoria. Como se puede observar en la Figura 3.12, las células tratadas únicamente con 0.1% de DMSO (panel A), mostraron el patrón de distribución en las fases G1, S y G2/M típico de células en estado proliferativo. Al añadir 0.1 μM de colchicina (**1.3**) (panel B) se puso de manifiesto una acumulación de células en la fase G2/M, efecto que igualmente se observó al adicionar nuestros compuestos. Así, el derivado **3.13c** a una concentración de 0.3 μM (panel C), provocó un claro aumento del número de células en la fase G2/M. El compuesto **3.13d** (panel D) mostró el mismo efecto, si bien a una concentración de 1 μM . Estos resultados pusieron de manifiesto que la capacidad antiproliferativa de estos compuestos era consecuencia del bloqueo que inducían en la fase G2/M del ciclo celular, comportamiento similar al de la mayoría de inhibidores del sitio de colchicina descritos.⁴⁰

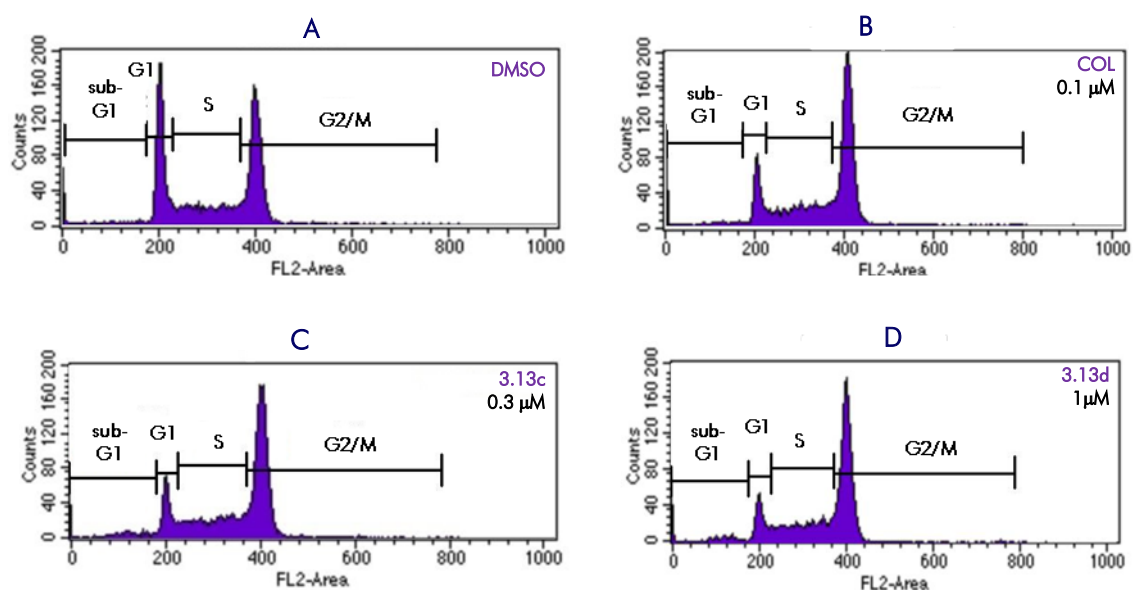


Figura 3.12. Efectos sobre la progresión del ciclo celular. Las células HMEC-1 se trataron con DMSO al 0.1% (A), colchicina (0.1 μM , B), **3.13c** (0.3 μM , C) y **3.13d** (1 μM , D), y se analizaron por citometría de flujo tras 8 h de tratamiento.

B) Unión al sitio de colchicina en tubulina y determinación de las constantes de asociación

Para confirmar la unión específica de esta familia de chalconas al sitio de colchicina en tubulina, se realizaron dos experimentos de competición diferentes, uno cualitativo y otro cuantitativo.

En el ensayo de competición cualitativo se empleó EBI, agente alquilante de los residuos de Cys239 y Cys354 presentes en el sitio de colchicina en tubulina. La unión de este compuesto a tubulina se puede visualizar fácilmente por la técnica de *western blot*, dada la mayor movilidad cromatográfica en gel de poliacrilamida del complejo de EBI/tubulina respecto a tubulina libre. Así, los compuestos que se unen a este sitio previenen la unión de EBI y por tanto, la formación de la segunda banda reactiva (EBI/tubulina).⁴¹ Tal y como se muestra en la Figura 3.13, la adición de EBI sobre las células MDA-MB-231 no tratadas (0.1% DMSO) dio lugar a una segunda banda (β -tubulina/EBI) por debajo de aquella característica de β -tubulina. Por otra parte, cuando se añadió EBI sobre células que habían sido tratadas con 2.5 μ M de colchicina (**i.3**), no se observó esta banda de β -tubulina/EBI, dado que colchicina estaba unida. Este mismo efecto tuvo lugar al adicionar EBI sobre células tratadas con los compuestos de esta familia (**3.17a**, **3.17b** y **3.13c** en la Figura 3.13) a una concentración de 10 μ M, poniendo así de manifiesto que el efecto antimitótico que habían presentado era consecuencia de su unión específica al sitio de colchicina en tubulina.

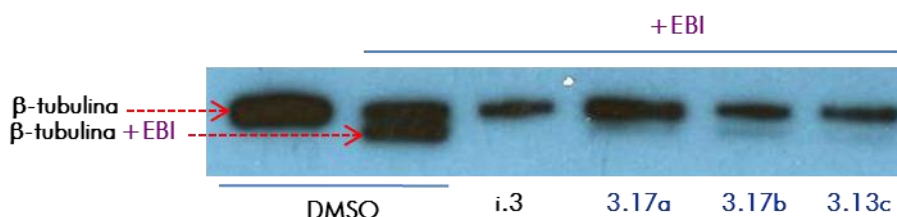


Figura 3.13. Los compuestos de esta familia se unen a tubulina específicamente en el sitio de la colchicina. Las células MDA-MB-231 se trataron con DMSO (0.1 %), colchicina (**i.3**) (2.5 μ M), y los compuestos **3.17a**, **3.17b** y **3.13c** (10 μ M) durante 8 h. Luego se añadió EBI (100 μ M) y tras 90 min, las células se recogieron y se sometieron a estudio por *western blot* con el anticuerpo β -tubulina. EBI se une a 2 residuos de cisteína del sitio de colchicina de tubulina, generando un aducto con esta proteína (banda inferior) que migra a mayor velocidad que β -tubulina libre (banda superior).

Para la medida de las constantes de asociación (K_a) de estos derivados con α,β -tubulina bovina, se efectuó un experimento de competición con el ligando R-PT (**i.23**).⁴² Este compuesto se caracteriza por la emisión de fluorescencia ($\lambda_{excitación}=374$ nm) al estar unido al sitio de colchicina en tubulina. Así, la adición de compuestos representativos de esta familia de ciclohexanodionas (**3.11c**, **3.13c** y **3.36f**) a una disolución de α,β -tubulina bovina en PBS con R-PT produjo un descenso de la fluorescencia del complejo tubulina/R-PT, que además fue dependiente de la concentración de compuesto añadido (Figura 3.14). De esta forma se pudo corroborar la unión específica de esta serie de derivados al sitio de colchicina en tubulina.

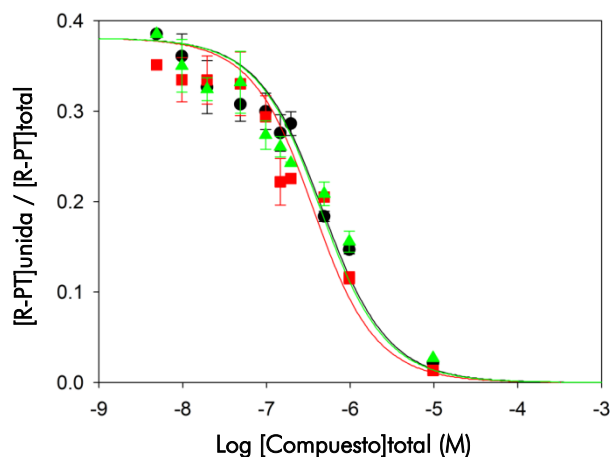


Figura 3.14. Los compuestos **3.11c**, **3.13c** y **3.36f** desplazan a R-PT del sitio de colchicina de forma concentración-dependiente. Empleando $0.2 \mu\text{M}$ de R-PT y $0.2 \mu\text{M}$ de tubulina en PBS con 0.1 mM de GTP, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ se evaluó el desplazamiento de R-PT por adición de concentraciones crecientes de los compuestos **3.11c** (líneas negras con círculos), **3.13c** (líneas rojas y cuadrados) y **3.36f** (líneas verde y triángulos). Los valores se obtuvieron una vez alcanzado el equilibrio, asumiendo una unión tubulina:compuesto 1:1.

A partir de los valores de desplazamiento de R-PT obtenidos, se determinaron las constantes de asociación (K_a) de estos compuestos (Tabla 3.13). Todas ellas se encontraron en el rango submicromolar, destacando especialmente la obtenida para el compuesto **3.13c** ($K_a = 9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), que estuvo muy próxima a la de la propia colchicina ($K_a = 1.16 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$).⁴³

Tabla 3.13. Constantes de asociación (K_a) de los compuestos **3.11c**, **3.13c** y **3.36f**, y de otros ligandos de referencia del sitio de colchicina.

Compuesto	$K_a \text{ (M}^{-1}\text{) } 25 \text{ }^\circ\text{C}$
Colchicina (i.3)	1.16×10^7 (a $37 \text{ }^\circ\text{C}$) ⁽⁴³⁾
Podofillotoxina (i.19)	1.8×10^6 ⁽⁴⁴⁾
R-PT (i.23)	3.2×10^6 ⁽⁴²⁾
3.11c	$(7.1 \pm 1.2) \times 10^6$ ^(a)
3.13c	$(9.6 \pm 1.2) \times 10^6$ ^(a)
3.36f	$(7.5 \pm 0.8) \times 10^6$ ^(a)

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

C) Estudio del efecto sobre las fibras del huso mitótico

En este experimento, las células MDA-MB-231 se incubaron con colchicina (**i.3**) ($0.1 \mu\text{M}$) o con el compuesto **3.13c** ($1 \mu\text{M}$) durante 8 horas, y luego los microtúbulos celulares se analizaron por microscopía confocal (inmunofluorescencia) (Figura 3.15). Así, en las células controles tratadas con DMSO (0.1%), se visualizó el aspecto típico de los microtúbulos en metafase, con los cromosomas (en color azul) alineados en el centro de la célula formando la placa ecuatorial y los microtúbulos (en color verde) dispuestos de un polo al polo contrario. El tratamiento con colchicina (**i.3**) a $0.1 \mu\text{M}$ condujo a unos microtúbulos completamente aberrantes y desorganizados, con distribución errática. Este mismo efecto se observó con el compuesto **3.13c** a $1 \mu\text{M}$.

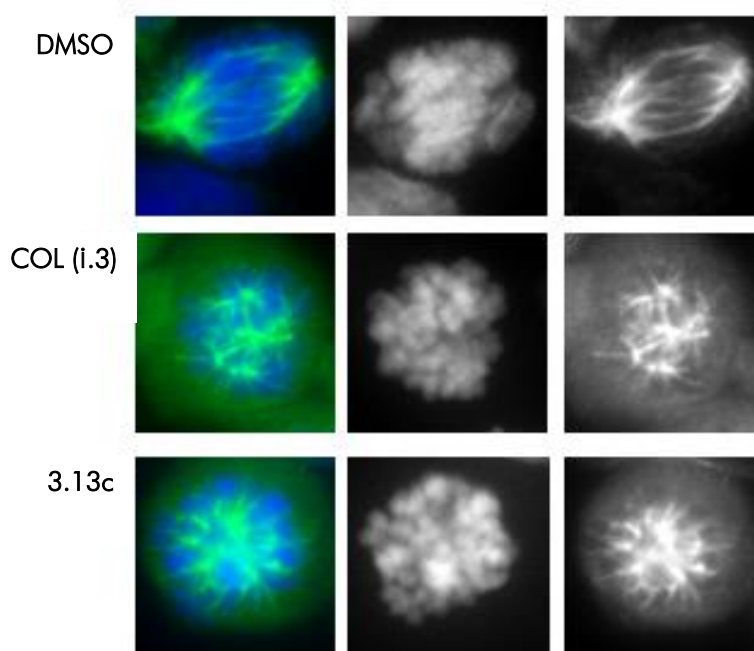


Figura 3.15. Efecto del compuesto **3.13c** sobre las fibras del huso mitótico. Las células MDA-MB-231 se trataron durante 8h con DMSO (0.1%), colchicina (**i.3**) a $0.1 \mu\text{M}$ y **3.13c** a $1 \mu\text{M}$. Luego se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-tubulina (verde) y con DAPI (azul) que se une al ADN. Columna 1: doble tinción; columna 2: solo tinción del ADN; columna 3: solo tinción de β -tubulina. Imágenes tomadas por microscopía confocal.

Así, el bloqueo del ciclo celular derivado de la acción de nuestros compuestos se podría deber a la imposibilidad de las células para disponer el ADN en la placa ecuatorial durante la metafase, proceso que es imprescindible para completar el proceso de división celular.

D) Estudio del efecto interruptor de la vascularización

Tal y como se ha descrito en el capítulo precedente, en este ensayo se emplearon células endoteliales (HMEC-1), las cuales crecen formando tubos cuando se cultivan sobre matrigel. Una vez que estos tubos fueron apreciables, se añadió bien DMSO (0.1%), o bien colchicina (entre 0.01 y $0.1 \mu\text{M}$) o el compuesto **3.13c** (entre 0.1 y $10 \mu\text{M}$). Como se puede observar en la figura 3.16, la adición de DMSO mantuvo intactas las redes de tubos establecidas inicialmente. Por el contrario, al añadir colchicina a una concentración de $0.01 \mu\text{M}$, así como el compuesto **3.13c** a $1 \mu\text{M}$, se produjo una destrucción parcial de estas redes de tubos. Este efecto fue aún más significativo a concentraciones de $0.3 \mu\text{M}$ de colchicina o $3 \mu\text{M}$ del compuesto **3.13c**.

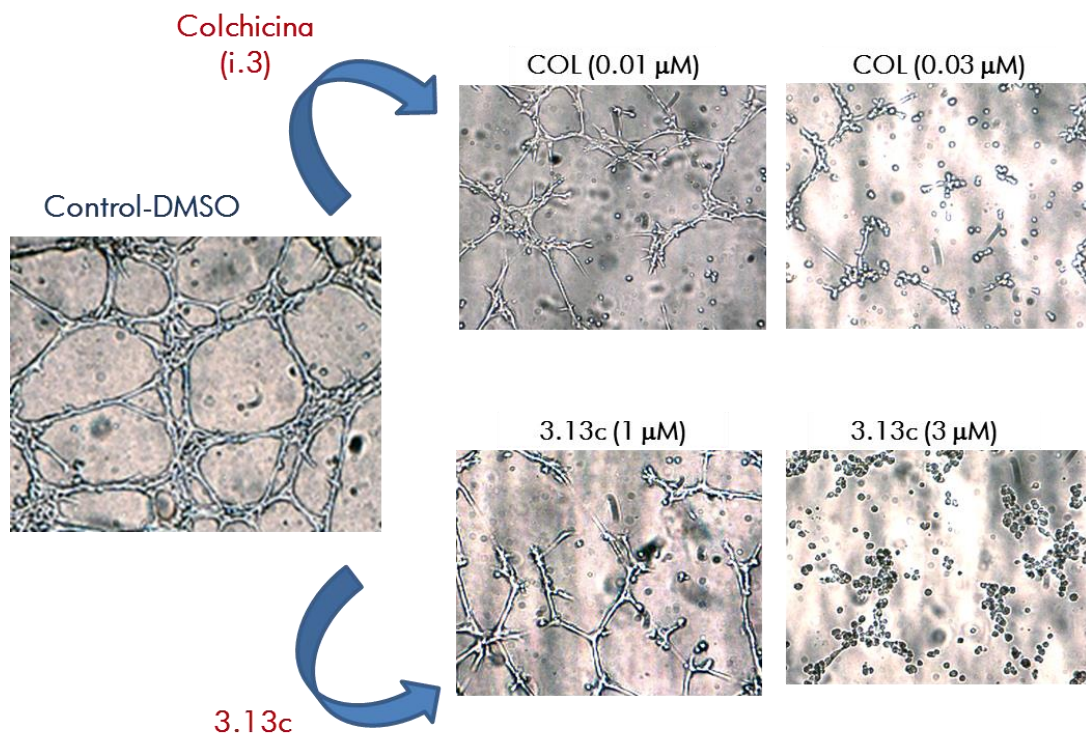


Figura 3.16. Efecto interruptor de 3.13c sobre una red vascular de células endoteliales. Las células HMEC-1 se cultivaron sobre matrigel, donde crecen formando tubos. Tras 3 h se añadió DMSO (0.1%), colchicina (0.1 y 0.3 μM) o 3.13c (0.3, 1 y 3 μM (D)). Fotografías tomadas tras 90 min de tratamiento con los compuestos.

E) Estudio del efecto sobre la morfología endotelial

El efecto del compuesto 3.13c sobre el citoesqueleto de actina y la morfología de las células endoteliales (HMEC-1) se muestra en la Figura 3.17. Como se puede observar, las células del experimento control (con DMSO al 0.1%) presentaron la morfología alargada y aplanada característica de las células endoteliales. Sin embargo, el tratamiento con el compuesto 3.13c a una

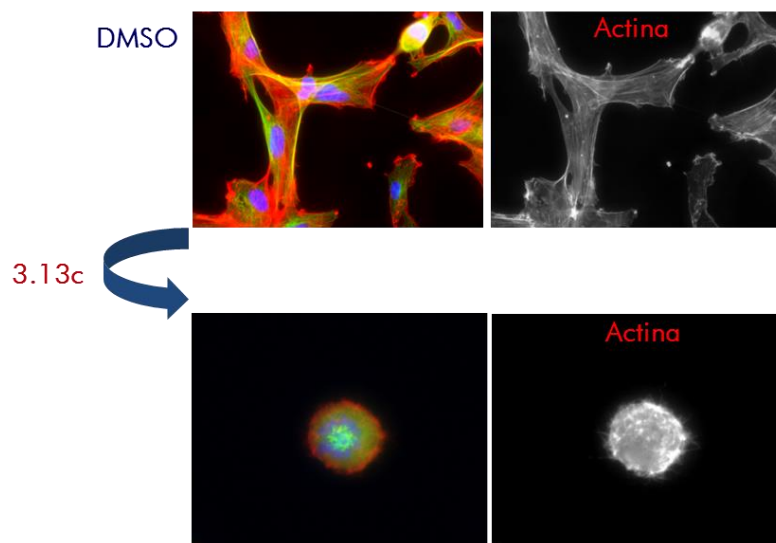


Figura 3.17. Efectos de 3.13c sobre el citoesqueleto de actina y la morfología celular. Las células HMEC-1 se incubaron durante 8h con DMSO (0.1%) o con 3.13c a 1 μM . Luego fueron fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-tubulina (verde), DAPI (azul) que se une al ADN y tetrametilrodamina B faloidina-isocianato (rojo) que se une a las fibras de actina. Imágenes tomadas por microscopía confocal.

concentración de 1 μM condujo a formas visiblemente redondeadas y contráctiles. Estas alteraciones podrían estar relacionados con una presumible actividad VDA del compuesto **3.13c**, ya que la falta de planaridad celular llevaría a un debilitamiento de las uniones intercelulares y por tanto, a un incremento en la permeabilidad endotelial.

F) Ensayo de migración celular

Dada la capacidad de muchos ligandos de tubulina de inhibir tanto la migración como las propiedades invasivas de las células tumorales,^{45,46} se puso a punto un experimento con células MDA-MB-231 (cáncer de mama) que permitió evaluar el efecto que nuestros compuestos tenían sobre la movilidad celular. Así, las células se cultivaron sobre una membrana con poros de 8 μm de diámetro cubierta de matrigel, que se dispuso sobre la superficie de una placa de cultivo, hacia donde debían migrar las células sembradas sobre la membrana. Es importante destacar que para este ensayo se emplearon concentraciones 0.016-0.08 y 0.08-0.4 μM de colchicina (**i.3**) y del compuesto **3.13c**, respectivamente, concentraciones inferiores a las empleadas para conseguir el efecto antiproliferativo. En la Figura 3.18 se presentan algunas fotografías tomadas a partir de las distintas placas empleadas en este ensayo, donde se muestran las células que consiguieron migrar. Como se puede observar, en el experimento control (0.1% DMSO) existieron multitud de células que migraron desde la membrana a la placa. Si bien el tratamiento con colchicina a 0.016 μM y con el compuesto **3.13c** a 0.8 μM , produjo un leve descenso del número de células que migraron, este efecto fue mucho más significativo a concentraciones de 0.08 de colchicina y 0.4 μM del compuesto **3.13c**, concentraciones a las que se consiguió inhibir el proceso migratorio casi en su totalidad.

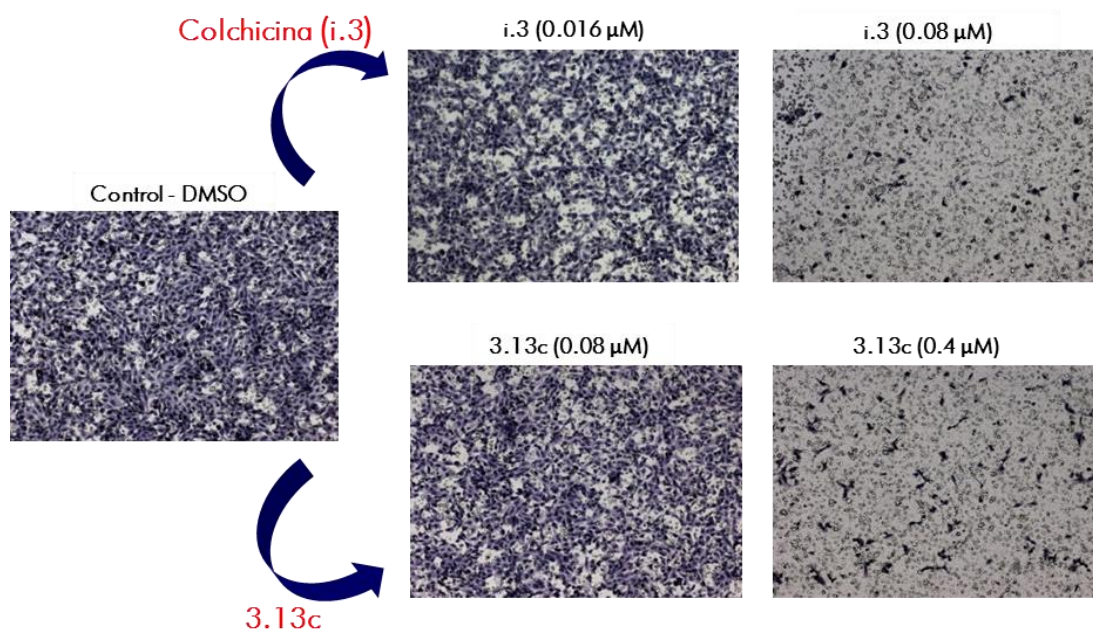


Figura 3.18. El compuesto 3.13c Inhibe la migración y la invasión de células tumorales. Las células MDA-MB-231 se cultivaron sobre una membrana con orificios de 8 μm , que permitía la migración de las mismas a una placa situada en la parte inferior. Tras 17 horas de incubación en presencia de DMSO (0.1%), colchicina (**i.3**) o **3.13c**, las placas se visualizaron al microscopio, donde se tomaron las fotografías que se muestran.

3.2.7. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Una característica estructural común de esta familia de compuestos es la presencia de una cetona α,β -insaturada, que podría dar lugar a reacciones de adición de Michael con nucleófilos celulares, tanto con residuos del sitio de unión como con otros componentes fisiológicos. Aunque se han descrito numerosas reacciones de Michael que son reversibles,⁴⁷ un posible mecanismo irreversible podría conducir no sólo a fenómenos de toxicidad, sino también a una baja estabilidad metabólica y a una corta vida media, bien por ataque de nucleófilos relevantes en el plasma o tras conjugación con las reservas de glutatión hepático.⁴⁸

Con el fin de determinar la estabilidad biológica de estos compuestos, los derivados **3.1** y **3.13c** se incubaron tanto en suero humano al 10% como en extracto de hígado de ratón al 50%. La cantidad de compuesto intacto se analizó por HPLC a diferentes intervalos de tiempo (0, 20, 60 y 180 min) (Figura 3.19). Así, el *hit* inicial **3.1**, con un OH fenólico (posición 2 del anillo D), presentó una vida media inferior a 20 min en suero (en rosa claro, panel A) y de aproximadamente 30 min en extracto de hígado (en azul claro, panel B), siendo completamente degradado tras 3 horas de incubación. Por su parte, el compuesto **3.13c** resultó ser perfectamente estable tanto en suero humano (en rosa oscuro, panel A) como en extracto de hígado murino (en azul oscuro, panel B), con un porcentaje del 70 y 90 % de compuesto intacto, respectivamente, tras 3 horas de incubación. Por tanto, la baja estabilidad del *hit* inicial **3.1**, se podría deber a la presencia del OH fenólico y no a la cetona α,β -insaturada.

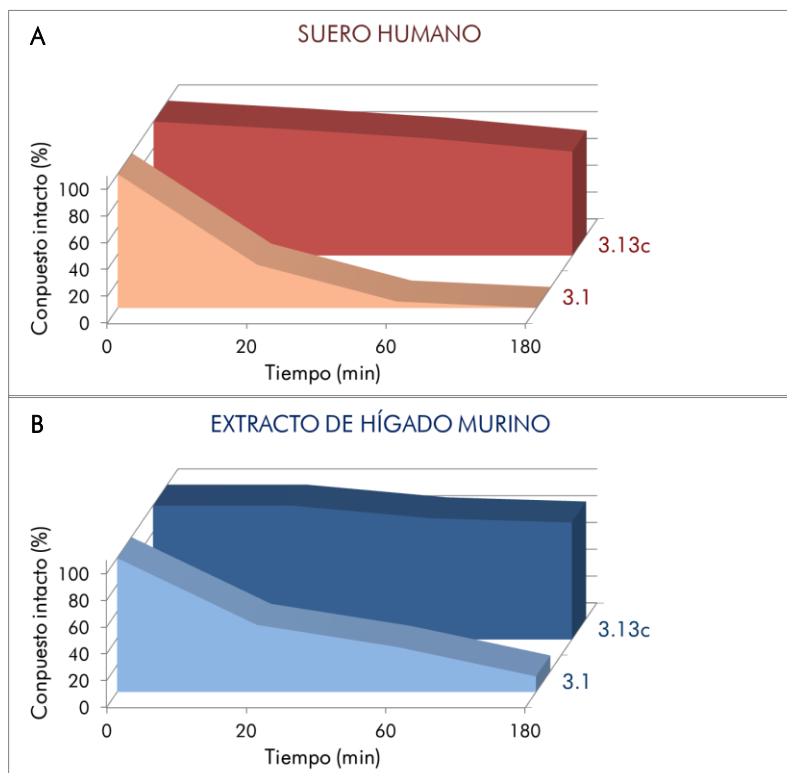


Figura 3.19. Estabilidad de **3.1** y **3.13c** en suero humano al 10% (A) y extracto de hígado murino al 50% (B).

Así, el compuesto **3.13c** no sólo ha permitido incrementar 100 veces la potencia antiproliferativa respecto al *hit* inicial **3.1**, sino que también ha posibilitado mejorar su estabilidad metabólica.

3.3. CONCLUSIONES

Con el propósito de identificar nuevos ligandos del sitio de unión de colchicina en tubulina, estructuralmente diferentes tanto de la propia colchicina (**i.3**) como de la CA-4 (**i.4**) y análogos, se emprendió una campaña de búsqueda de nuevos compuestos empleando las herramientas computacionales de cribado virtual. La metodología empleada se basó en la comparación de la forma 3D de ligandos conocidos de tubulina. Para ello se empleó el compuesto TN-16 (**i.21**) como ligando de referencia, dado que permitía explorar un bolsillo accesorio dentro del dominio de colchicina y de este modo acceder a estructuras novedosas respecto al resto de ligandos descritos del sitio de colchicina. Este cribado virtual reveló la existencia de 9 familias de posibles *hits*, 6 de los cuales fueron evaluados en ensayos de proliferación celular. Esta evaluación permitió la identificación del compuesto **3.1** como un *hit* potencial, que presentó una actividad antiproliferativa en el rango micromolar ($Cl_{50} = 11-35 \mu\text{M}$). Tras verificar la unión de este compuesto al sitio de unión de colchicina en tubulina, **3.1** pasó a ser objeto de un programa de síntesis de análogos estructurales, con el que se establecieron extensas relaciones estructura-actividad. De esta forma, se han sintetizado compuestos relacionados que inhibieron el crecimiento de células tanto endoteliales como tumorales a concentraciones submicromolares, destacando en particular los compuestos **3.13c** y **3.21b** (Figura 3.20), con una actividad de 0.09 y 0.10 μM (HMEC-1), respectivamente, dos órdenes de magnitud más potentes que el *hit* inicial **3.1**. Además, estas modificaciones estructurales han permitido mejorar la estabilidad metabólica del *hit* **3.1**.

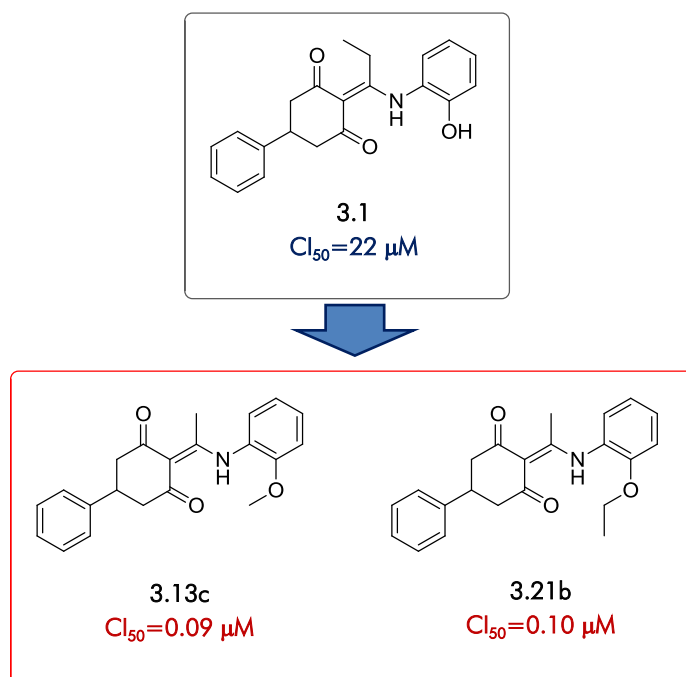


Figura 3.20. Estructuras y Cl_{50} en células endoteliales (HMEC-1) del hit inicial **3.1** y de los 2 derivados con mejores resultados de actividad antiproliferativa (compuestos **3.13c** y **3.21b**).

Sin embargo, los intentos realizados hasta el momento para mejorar la solubilidad acuosa de estos compuestos, mediante la introducción de sustituyentes polares o heterociclos, han conducido a la pérdida de la actividad antiproliferativa.

Estudios biológicos adicionales llevados a cabo con los compuestos de mejor perfil antiproliferativo, han mostrado la capacidad de éstos para detener el ciclo celular en la fase G₂/M a una concentración de 0.3-1 μ M (Figura 3.21). Además, el mecanismo de acción de estos compuestos por unión al sitio de colchicina en tubulina se ha confirmado mediante dos ensayos de competición diferentes, bien por *western blot* con el inhibidor EBI, o bien por espectroscopía de fluorescencia a partir del desplazamiento del ligando R-PT. Igualmente, se han podido determinar las constantes de asociación asociadas a esta unión, todas ellas en el rango submicromolar, resaltando especialmente la del compuesto **3.13c** ($K_a=9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), muy próxima a la de la propia colchicina. A partir de técnicas de inmunofluorescencia se puso de manifiesto que el mecanismo antimitótico de esta familia era consecuencia de su efecto interruptor del huso mitótico, fibras compuestas por tubulina. Además, se ha comprobado la potencial actividad antivascular de estos compuestos, tanto por interrupción de una red de tubos endoteliales previamente formados, como por inducción de cambios morfológicos cruciales en las células endoteliales. Por último, se ha demostrado el efecto inhibitorio de estos compuestos sobre la migración e invasión de células tumorales.

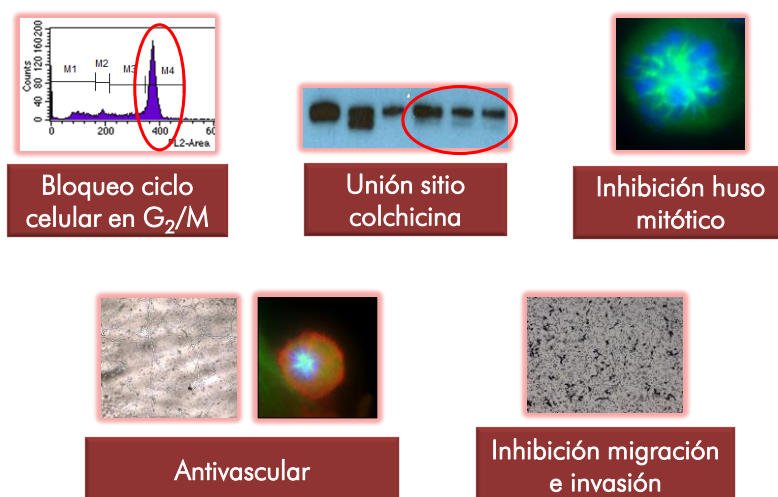


Figura 3.21. Resumen de las actividades biológicas de esta familia. Imágenes correspondientes al compuesto **3.13c**.

Con los experimentos realizados con el compuesto **3.13c**, se ha conseguido poner de manifiesto su actividad dual como antimitótico y como interruptor de la vascularización, conforme al objetivo marcado.

3.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Smith, A. Screening for drug discovery: The leading question. *Nature* **2002**, *418*, 453-459.
2. Magazzini, L.; Pammolli, F.; Riccaboni, M. Dynamic competition in pharmaceuticals. Patent expiry, generic penetration, and industry structure. *Eur. J. Health Econom.* **2004**, *5*, 175–182.
3. Lavecchia, A.; Giovanni, C. D. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2839-2860.
4. Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 882-894.
5. Schneider, G. Virtual screening: an endless staircase? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 273-276.
6. McInnes, C. Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 494-502.
7. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
8. Schneider, G.; Fechner, U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 649-663.
9. Ripphausen, P.; Nisius, B.; Bajorath, J. State of the art in ligand-based virtual screening. *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 372-376.
10. Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943-2971.
11. Kim, N. D.; Park, E. S.; Kim, Y. H.; Moon, S. K.; Lee, S. S.; Ahn, S. K.; Yu, D. Y.; No, K. T.; Kim, K. H. Structure-based virtual screening of novel tubulin inhibitors and their characterization as anti-mitotic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7092–7100.
12. Cao, R.; Liu, M.; Yin, M.; Liu, Q.; Wang, Y.; Huang, N. Discovery of novel tubulin inhibitors via structure-based hierarchical virtual screening. *J. Chem. Inf. Model* **2012**, *52*, 2730-2740.
13. Kim, D. Y.; Kim, K. H.; Kim, N. D.; Lee, K. Y.; Han, C. K.; Yoon, J. H.; Moon, S. K.; Lee, S. S.; Seong, B. L. Design and biological evaluation of novel tubulin inhibitors as antimetabolic agents using a pharmacophore binding model with tubulin. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5664-5670.
14. Chiang, Y. K.; Kuo, C. C.; Wu, Y. S.; Chen, C. T.; Coumar, M. S.; Wu, J. S.; Hsieh, H. P.; Chang, C. Y.; Jseeng, H. Y.; Wu, M. H.; Leou, J. S.; Song, J. S.; Chang, J. Y.; Lyu, P. C.; Chao, Y. S.; Wu, S. Y. Generation of ligand-based pharmacophore model and virtual screening for identification of novel tubulin inhibitors with potent anticancer activity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4221-4233.
15. Massarotti, A.; Theeramunkong, S.; Mesenzani, O.; Caldarelli, A.; Genazzani, A. A.; Tron, G. C. Identification of novel antitubulin agents by using a virtual screening approach based on a 7-point pharmacophore model of the tubulin colchicine site. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *78*, 913-922.
16. Nguyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Zaharevitz, D. W.; Day, B. W.; Wipf, P.; Hamel, E.; Gussio, R. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107–6116.
17. Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli, R. B.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossowa, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 13775-13779.
18. Barbier, P.; Dorléans, A.; Devred, F.; Sanz, L.; Allegro, D.; Alfonso, C.; Knossow, M.; Peyrot, V.; Andreu, J. M. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31672-31681.

19. Nicholls, A.; McGaughey, G. B.; Sheridan, R. P.; Good, A. C.; Warren, G.; Mathieu, M.; Muchmore, S. W.; Brown, S. P.; Grant, J. A.; Haigh, J. A.; Nevins, N.; Jain, A. N.; Kelley, B. Molecular shape and medicinal chemistry: A perspective. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3862-3806.
20. Mohammed, M. Z.; Vyjayanti, V. N.; Laughton, C. A.; Dekker, L. V.; Fischer, P. M.; Wilson, D. M.; Abbotts, R.; Shah, S.; Patel, P. M.; Hickson, I. D.; Madhusudan, S. Development and evaluation of human AP endonuclease inhibitors in melanoma and glioma cell lines. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 653-663.
21. Weininger, D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, *28*, 31-36.
22. FILTER OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, NM, USA. www.eyesopen.com.
23. OMEGA OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, NM, USA. www.eyesopen.com.
24. ROCS OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, NM, USA. www.eyesopen.com.
25. Grant, J. A.; Gallardo, M. A.; Pickup, B. T. A fast method of molecular shape comparison: A simple application of a Gaussian description of molecular shape. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 1653-1666.
26. Rush, T. S.; Grant, J. A.; Mosyak, L.; Nicholls, A. A shape-based 3-D scaffold hopping method and its application to a bacterial protein-protein interaction. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1489-1495.
27. Gundersen, L. L.; Bakkestuen, A. K.; Aasen, A. J.; Øver, H.; Rise, F. 6-Halopurines in palladium-catalyzed coupling with organotin and organozinc reagents. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9743-9756.
28. Seiji, Y.; Eita, E.; Fumiyoshi, M.; Richard, C.; Hironori, I.; Kazunobu, K.; Nobuyuki, Y.; Tadashi, N.; Kazuto, Y. Condensed imidazole derivatives. US 20040116328 A1. **2004** Jun 17.
29. Pottabathini, N.; Bae, S.; Pradhan, P.; Hahn, H.-G.; Mah, H.; Lakshman, M. K. Synthesis and reactions of 2-chloro- and 2-tosyloxy-2'-deoxyinosine derivatives. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7188-7195.
30. Huang, K. H.; Veal, J. M.; Fadden, R. P.; Rice, J. W.; Eaves, J.; Strachan, J.-P.; Barabasz, A. F.; Foley, B. E.; Barta, T. E.; Ma, W.; Silinski, M. A.; Hu, M.; Partridge, J. M.; Scott, A.; DuBois, L. G.; Freed, T.; Steed, P. M.; Ommen, A. J.; Smith, E. D.; Hughes, P. F.; Woodward, A. R.; Hanson, G. J.; McCall, W. S.; Markworth, C. J.; Hinkley, L.; Jenks, M.; Geng, L.; Lewis, M.; Otto, J.; Pronk, B.; Verleysen, K.; Hall, S. E. Discovery of novel 2-aminobenzamide inhibitors of heat shock protein 90 as potent, selective and orally active antitumor agents. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4288-4305.
31. Brown, S. M.; Bentley, T. W.; Jones, R. O. Process for the preparation of acylated cyclic 1,3-dicarbonyl compounds. WO 1999028282 A1. **1999** Jun 10.
32. Otto, S. W. Zur reaktivität von C=N-doppelbindungssystemen, X¹ synthesen von kondensierten heterocyclen. *Z. Naturforsch.* **1976**, *31b*, 1519-1525.
33. Armani, E.; Amari, G.; Capaldi, C.; Esposito, O.; Peretto, I. Derivatives of 1-phenyl-2-pyridinyl alkyl alcohols as phosphodiesterase inhibitors. US 8383826 B2. **2013** Mar 28.
34. Barker, J. J.; Barker, O.; Boggio, R.; Chauhan, V.; Cheng, R. K. Y.; Corden, V.; Courtney, S. M.; Edwards, N.; Falque, V. M.; Fusar, F.; Gardiner, M.; Hamelin, E. M. N.; Hesterkamp, T.; Ichihara, O.; Jones, R. S.; Mather, O.; Mercurio, C.; Minucci, S.; Montalbetti, C. A. G. N.; Müller, A.; Patel, D.; Phillips, B. G.; Varasi, M.; Whittaker, M.; Winkler, D.; Yarnold, C. J. Fragment-based Identification of Hsp90 Inhibitors. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 963-966.
35. Donkor, I. O.; Li, H.; Queener, S. F. Synthesis and DHFR inhibitory activity of a series of 6-substituted-2,4-diaminothieno[2,3-d]pyrimidines. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 605-611.
36. Tamura, Y.; Yoshimoto, Y.; Kunimoto, K.; Tada, S.; Tomita, T.; Wada, T.; Seto, E.; Murayama, M.; Shibata, Y. Nonsteroidal antiinflammatory agents. 1. 5-Alkoxy-3-biphenylacetic acids and related compounds as new potential antiinflammatory agents. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 709-714.

37. Zhang, W.; Benmohamed, R.; Arvanites, A. C.; Morimoto, R. I.; Ferrante, R. J.; Kirsch, D. R.; Silverman, R. B. Chiral cyclohexane 1,3-diones as inhibitors of mutant SOD1-dependent protein aggregation for the treatment of ALS. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1029-1045.
38. McCalmont, W. F.; Patterson, J. R.; Lindenmuth, M. A.; Heady, T. N.; Haverstick, D. M.; Gray, L. S.; Macdonald, T. L. Investigation into the structure–activity relationship of novel concentration dependent, dual action T-type calcium channel agonists/antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3821-3839.
39. Huang, K. H.; Ommen, A. J.; Barta, T. E.; Hughes, P. F.; Veal, J. M.; Ma, W.; Smith, E. D.; Woodward, A. R.; McCall, W. S. Preparation of tetrahydroindazole derivatives and analogs as HSP-90 inhibitors. WO 2008130879 A2. **2008** Oct 30.
40. Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.
41. Fortin, S.; Lacroix, J.; Cote, M. F.; Moreau, E.; Petitclerc, E.; Gaudreault, R. C. Quick and simple detection technique to assess the binding of antimicrotubule agents to the colchicine-binding Site. *Biol. Proced. Online* **2010**, *12*, 113-117.
42. Leynadie, D.; Peyrot, V.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Andreu, J. M.; Renner, G. A.; Temple, C. Tubulin binding of two 1-deaza-7,8-dihydropteridines with different biological properties: enantiomers NSC 613862 (S)-(-) and NSC 613863 (R)-(+). *Biochemistry* **1993**, *32*, 10675-10682.
43. Diaz, J. F.; Andreu, J. M. Kinetics of dissociation of the tubulin-colchicine complex - Complete reaction scheme and comparison to thermodynamic measurements. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2890-2896.
44. Cortese, F.; Bhattacharyya, B.; Wolff, J. Podophyllotoxin as a probe for colchicine binding-site of tubulin. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1134-1140.
45. Ganguly, A.; Yang, H.; Sharma, R.; Patel, K. D.; Cabral, F. The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43359-43369.
46. Zheng, S.; Zhong, Q.; Jiang, Q.; Mottamal, M.; Zhang, Q.; Zhu, N.; Burow, M. E.; Worthylake, R. A.; Wang, G. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 191-196.
47. Serafimova, I. M.; Pufall, M. A.; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frödin, M.; Taunton, J. Reversible targeting of noncatalytic cysteines with chemically tuned electrophiles. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 471-476.
48. Wilson, A. J.; Kerns, J. K.; Callahan, J. F.; Moody, C. J. Keep calm, and carry on covalently. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7463-7476.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente memoria se ha abordado la búsqueda, síntesis, evaluación y optimización de nuevos ligandos del dominio de colchicina en tubulina con propiedades interruptoras de la vascularización tumoral (VDAs). El mecanismo de acción antimitótico por despolimerización de los microtúbulos celulares asociado a este tipo de compuestos ha sido también explorado, de cara a obtener compuestos con un mecanismo de acción dual y por tanto, de doble interés para el tratamiento de tumores sólidos. Los resultados más relevantes de esta Memoria se comentan a continuación, agrupados por capítulos.

En el Capítulo 1 se ha llevado a cabo la síntesis y optimización de derivados de 6-fenilaminopurinas como análogos estructurales de MPC-6826 (**1.11**), un derivado de quinazolina que actúa por unión al sitio de colchicina en tubulina, y que actualmente se encuentra en evaluación clínica con resultados muy prometedores.

- La síntesis de las 6-fenilaminopurinas propuestas transcurrió con buenos rendimientos y permitió explorar las posiciones 2, 8 y 9 del anillo de purina, así como introducir distintos sustituyentes tanto en el nitrógeno exocíclico de la posición 6 de la purina como en el anillo aromático.
- De todas las 6-fenilaminopurinas sintetizadas, los compuestos **1.9**, **1.12**, **1.17**, **1.19** y **1.25** presentaron una actividad antiproliferativa celular inferior a 10 μM tanto en células endoteliales como tumorales, siendo cercana a 2 μM para el derivado de tetrahydroquinolina **1.19**, el más activo de la familia.
- Estudios efectuados por citometría de flujo con el derivado **1.12** mostraron una clara interrupción en la fase G2/M del ciclo celular. Este efecto es característico de otros antimitóticos descritos en la literatura que actúan como ligandos del sitio de colchicina en tubulina.

El Capítulo 2 se ha centrado en la síntesis y evaluación de derivados de chalconas con un anillo de dioxolano como sustituyente en el anillo aromático A. Con este elemento estructural común se ha buscado conseguir compuestos de mayor potencial antimitótico y/o VDA. Por un lado, el esqueleto base de chalcona es característico de numerosos compuestos naturales o sintéticos con actividades farmacológicas muy diversas, existiendo así algunos ejemplos de VDAs. Por otro, el motivo de dioxolano posee un gran interés por encontrarse en otros agentes despolimerizantes de microtúbulos de origen natural que actúan por unión al sitio de colchicina.

- La síntesis se ha realizado de modo satisfactorio, necesitando en ocasiones la adaptación de los procedimientos descritos para mejorar los rendimientos y/o acortar los tiempos de reacción.
- La evaluación biológica de estas chalconas en ensayos de proliferación celular permitió extraer importantes relaciones de estructura-actividad: 1) la sustitución en la posición 3 del anillo B con un amino, y en menor medida, con un hidroxilo se traduce en compuestos notablemente más activos; 2) la introducción de un metilo en la posición α de la cetona

α/β insaturada conduce a compuestos con una actividad superior en dos órdenes de magnitud respecto a los análogos no sustituidos; 3) la presencia de un anillo de dioxolano en el fenilo A es crucial en la actividad de estas chalconas, dado que los análogos que no incorporan este sustituyente resultan ser 100 veces menos activos que los derivados con este anillo.

- De los datos anteriores hay que destacar la actividad de las α -metilchalconas **2.19** y **2.20**, con un 3-OH y 3-NH₂ en el anillo B, respectivamente, que presentaron valores de CI₅₀ en el rango nanomolar. De esta forma, si bien el compuesto **2.19** (CI₅₀=2-17 nM) fue igual de activo que los compuestos prototipo colchicina (**i.3**) o CA-4P (**i.6**), el derivado **2.20** (CI₅₀=1-4 nM) llegó a ser incluso más potente que los compuestos de referencia anteriores.
- Estudios llevados a cabo con el derivado **2.16a** para la determinación del mecanismo de acción de esta familia de chalconas, mostraron que: 1) este compuesto induce un bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular, en línea con otros ligandos del sitio de colchicina descritos; 2) se une a tubulina en el sitio de la colchicina, presentando además una constante de asociación comparable a colchicina; 3) inhibe la formación de las fibras del huso mitótico durante la división celular; 4) interrumpe de manera muy significativa redes de tubos de células endoteliales, apuntando así a una potencial actividad VDA; 5) conduce a cambios morfológicos radicales en las células endoteliales, en particular hacia células redondeadas y contráctiles, cambios que presumiblemente irían en detrimento con la adecuada función del endotelio. Estos resultados se podrían extrapolar al resto de compuestos de esta familia.
- Como estrategia para mejorar la solubilidad de la chalcona **2.20** se abordó la síntesis de profármacos. En particular, se sintetizaron el derivado de L-serina **2.26** y el derivado del dipéptido de L-lisina-L-prolina **2.28**.
- La evaluación antiproliferativa de estos profármacos puso de manifiesto una pérdida drástica de actividad con el derivado de L-serina respecto al compuesto con el grupo amino libre **2.20**. Ahora bien, la derivación con el dipeptido de L-lisina-L-prolina se tradujo en un compuesto (**2.28**) con actividad antiproliferativa comparable a la chalcona precursora **2.20**.
- El profármaco **2.28** fue dos mil veces más soluble que su correspondiente fármaco **2.20**, cumpliendo así con el objetivo marcado de mejora de la solubilidad. Además, este profármaco se mantuvo estable en PBS durante 2 horas y en el medio biológico (suero o extracto hepático) fue capaz de liberar de un modo eficiente el fármaco **2.20**.
- Estos resultados apuntaban a la idoneidad del profármaco **2.28** para ser evaluado como VDA *in vivo*.

En el tercer capítulo se propuso la identificación de nuevos ligandos del dominio de colchicina en tubulina estructuralmente no relacionados con el resto de ligandos descritos en la bibliografía. Para ello se emprendió una campaña de búsqueda de nuevos compuestos empleando las herramientas computacionales de cribado virtual. La metodología empleada se basó en la comparación de la forma 3D de ligandos conocidos de tubulina, seleccionando en particular al compuesto TN-16 (**i.21**) como ligando de referencia. Se consideró así que el modo de unión TN-16 en un bolsillo más

profundo de la subunidad β dentro del dominio de colchicina en tubulina, podría permitirnos acceder a entidades químicas diferentes respecto a colchicina, CA-4 y análogos.

- Uno de los 9 hits virtuales identificados, el compuesto **3.1**, con un esqueleto central de ciclohexanodiona, mostró actividad antiproliferativa significativa ($CI_{50}=11-35 \mu M$).
- La unión del compuesto **3.1** al sitio de colchicina en tubulina se demostró mediante un ensayo de competición con MTC.
- Para la síntesis de derivados estructurales de **3.1** se diseñó una estrategia sintética de 2 a 4 pasos de reacción, que transcurrieron en general con buenos rendimientos.
- Tras la evaluación antiproliferativa de la batería de compuestos sintetizados, hay que destacar los compuestos **3.13c** y **3.21b**, con una CI_{50} de 0.09 y 0.10 μM (HMEC-1), respectivamente, dos órdenes de magnitud más potentes que el *hit* inicial **3.1**.
- Las modificaciones estructurales llevadas a cabo han permitido además mejorar la estabilidad metabólica del *hit* **3.1**.
- Estudios adicionales para la determinación del mecanismo de acción realizados con el compuesto **3.13c**, pusieron de manifiesto que: 1) este compuesto detiene el ciclo celular en la fase G2/M; 2) su mecanismo de acción es por unión al sitio de colchicina en tubulina, con una constante de asociación en el rango submicromolar y próxima a la de la colchicina; 3) su efecto antimitótico se deriva de la interrupción de las fibras huso mitótico; 4) presenta una potencial actividad antivascular, ya que es capaz de destruir redes de tubos endoteliales previamente formados, y además induce cambios morfológicos cruciales en las células endoteliales; 5) inhibe los procesos de migración e invasión de células tumorales.
- Con estos experimentos se ha conseguido poner de manifiesto la actividad dual del compuesto **3.13c** como antimitótico y como interruptor de la vascularización, conforme al objetivo marcado.

PARTE EXPERIMENTAL

1. MÉTODOS GENERALES

El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F₂₅₄ (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm y se visualizaron con luz ultravioleta (254 nm), mediante pulverización con disolución de ninhidrina en etanol al 2% o con disolución de ácido fosfomolibdico en etanol al 5% y calefacción. Este seguimiento también se llevó a cabo por HPLC-MS, mediante un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ, empleando una columna Sunfire C-18 (150 mm x 19 mm x 5 µm) con un flujo de 1 ml/min.

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron bajo estrictas condiciones anhidras. El acetonitrilo, diclorometano y 1,4-dioxano se secaron refluendolos sobre CaH₂ o con tamiz molecular 4 Å activado previamente en la estufa. Asimismo, la piperidina se secó sobre tamiz, mientras que el tetrahidrofurano seco se obtuvo por destilación en presencia de sodio y benzofenona como indicador. La *N,N*-dimetilformamida y el *tert*-butilmetiléter anhidros se obtuvieron de fuentes comerciales (Aldrich).

Los experimentos de irradiación de microondas se realizaron en un reactor de microondas monomodo Emrys™ Synthesizer (Biotage AB).

La purificación de los productos de reacción se efectuó por cromatografía centrífuga circular en capa fina (CCTLC) en Cromatotrón® (gel de sílice 60 PF₂₅₄ con CaSO₄) en placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 ml/min respectivamente, o por cromatografía flash (HPFC) en Biotage Horizon.

El análisis de la pureza de los productos se llevó a cabo por HPLC en un aparato Agilent 1120 compact LC, en una columna ACE 5 C18-300 (15 cm x 4.6 mm), con detección UV ($\lambda = 254$ nm), y velocidad de flujo de 1 ml/min.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ¹H y ¹³C fueron registrados en un espectrofotómetro Varian UNIT INOVA-300 (α 300 y 75 Hz), Varian UNITY-400 (α 400 y 100 Hz) y Varian 500 (α 500 y 125 Hz), respectivamente. Los espectros monodimensionales de ¹H y ¹³C se obtuvieron en condiciones estándares. Se han indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuadruplete; sept, septete; dd, doble doblete; ddd, doble doblete; dt, doble triplete; td, triplete doblete; tt, triplete triplete; m, multiplete), el valor de las constantes de acoplamiento *J* (Hz) y la asignación estructural.

Los espectros bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC) utilizaron la misma anchura espectral en el dominio de protón (6000 Hz) y en el dominio de carbono (30000 Hz), con un tiempo de espera de 1 s. Para el experimento de HSQC, los datos se procesaron en una matriz de 4098 x 2048 puntos y las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace de 145 Hz. En el caso del experimento HMBC, los datos se procesaron en una matriz de 4096 x 4096 puntos, optimizando las condiciones del experimento para una constante de acoplamiento a larga distancia de 8 Hz.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard LC/MS HP 1100, mediante las técnicas de Impacto Electrónico o Electro spray. También se registraron en un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ.

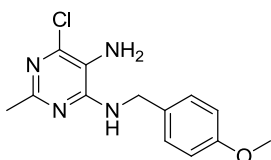
Los puntos de fusión se midieron en un aparato Mettler Toledo M170. Los análisis elementales de los compuestos se encuentran en el rango de ± 0.5 respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se realizaron con un analizador Heareus CHN-O-RAPID.

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

2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE SÍNTESIS

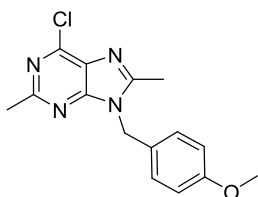
2.1. CAPÍTULO 1

6-Cloro-2-metil-*N*-(4-metoxibencil)-pirimidin-4,5-diamina (1.5)



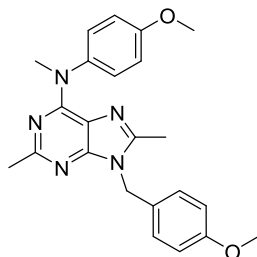
Un vial de microondas que contiene una disolución de 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (**1.3**) (700 mg, 3.91 mmol), 4-metoxibencilamina (**1.4**) (510 μ l, 3.91 mmol) y K_2CO_3 (810 mg, 5.86 mmol) en DMF anhidra (10 ml), se sella y se irradia en el microondas a 150 °C durante 3 horas. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se añaden 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de una disolución acuosa saturada de cloruro amónico. La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol), obteniéndose 696 mg (64%) de un sólido amarillo que se identifica como **1.5**. Pf 155-157 °C. EM (ES, modo positivo): m/z 279 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.23 (s, 3H, CH₃-2), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.52 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, CH₂), 4.80 (s ancho, 2H, NH₂), 6.89 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, Ar), 7.09 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, NH), 7.26 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Ar).

6-Cloro-2,8-dimetil-9-(4-metoxibencil)-9*H*-purina (1.6)



Un vial que contiene una disolución de **1.5** (700 mg, 2.51 mmol), ácido etanosulfónico (41 μ l, 0.50 mmol) y ortoacetato de trietilo (1.37 ml, 7.53 mmol) en anhídrido acético (10 ml) se sella y se calienta 15 min en el reactor de microondas a 120 °C. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el crudo de reacción se diluye con 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y 15 ml de salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (30:1) como eluyente, obteniéndose 232 mg de **1.6** (31%) como un aceite marrón claro. EM (ES, modo positivo): m/z 303 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.52 (s, 3H, CH₃-2), 2.68 (s, 3H, CH₃-8), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 5.39 (s, 2H, CH₂), 6.89 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, Ar), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Ar).

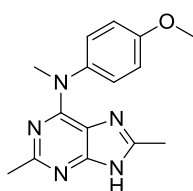
N,2,8-Trimetil-9-(4-metoxibencil)-*N*-(4-metoxifenil)-9*H*-purin-6-amina (1.8)



Un vial de microondas que contiene una disolución de **1.6** (200 mg, 0.66 mmol), *N*-metil-4-metoxianilina (**1.7**) (236 mg, 1.00 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (200 μ l) en 2-propanol (2.6 ml), se sella y se calienta 10 min en el reactor de microondas a 80 °C. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se añaden 20 ml de diclorometano, y luego se lava con 15 ml una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (20:1) como

eluyente, obteniéndose 150 mg (56%) de **1.8** como un aceite rosáceo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 404 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.31 (s, 3H, CH₃-2), 2.36 (s, 3H, CH₃-8), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃-N6), 5.26 (s, 2H, CH₂), 6.91 (m, 4H, Ar), 7.18 (m, 4H, Ar).

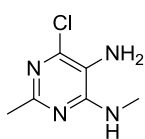
N,2,8-Trimetil-N-(4-metoxifenil)-9H-purin-6-amina (1.9)



El compuesto **1.8** (80 mg, 0.20 mmol) se disuelve en 2 ml de metanol y, manteniendo la temperatura a 0 °C, se añade ácido clorhídrico al 37% (200 μ l) y Pd(C) al 10% (80 mg). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 24 horas. Luego se filtra, se concentra y se purifica por CCTLC empleando como eluyente diclorometano/metanol (20:1).

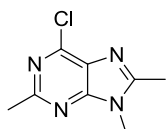
Finalmente se obtienen 36 mg (64%) de **1.9** como un sólido blanco. **Pf** 190-192 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 285 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.31 (s, 3H, CH₃-2), 2.34 (s, 3H, CH₃-8), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃-N6), 6.93 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar), 7.21 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar), 12.46 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 15.2 (CH₃-8), 26.1 (CH₃-2), 40.1 (CH₃-N6), 55.6 (OCH₃), 117.9 (C-5), 114.3, 128.1, 139.3, 157.3 (Ar), 147.3 (C-8), 153.0 (C-6), 154.0 (C-4), 159.4 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₅H₁₇N₅O: C, 63.59; H, 6.05; N, 24.72. Encontrado: C, 63.29; H, 5.94; N, 24.81.

6-Cloro-N⁴,2-dimetilpirimidin-4,5-diamina (1.10)



Una disolución con 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (**1.3**) (400 mg, 2.25 mmol) y metilamina acuosa al 40% (742 μ l, 8.62 mmol) en 1,4-dioxano (11 ml) se calienta en un tubo de presión a 80 °C durante 16 horas. La reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se añaden 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y 15 ml de salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol), obteniéndose 370 mg (95%) de **1.10** como un sólido blanco. **Pf**: 129-131 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 173 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.23 (s, 3H, CH₃-2), 2.86 (d, J = 4.4 Hz, 3H, CH₃-N9), 4.74 (s ancho, 2H, NH₂), 6.87 (s ancho, 1H, NH). El rendimiento obtenido fue mejor que el descrito con un procedimiento similar en una publicación reciente.¹

6-Cloro-2,8,9-trimetil-9H-purina (1.11)



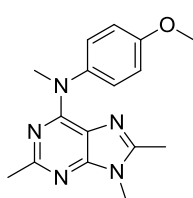
Un vial que contiene una disolución de **1.10** (200 mg, 1.16 mmol), ácido etanosulfónico (19 μ l, 0.23 mmol) y ortoacetato de trietilo (0.63 ml, 1.74) en anhídrido acético (5 ml), se sella y se calienta 15 min en el reactor de microondas a 120 °C. El crudo de reacción se diluye con 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y 15 ml de salmuera. La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (30:1) como eluyente, obteniéndose 135 mg (59%) de **1.11** como un sólido blanco. **Pf** 122-124 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 197 (M+H)⁺ con

distribución isotópica de Cl. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.59 (s, 3H, CH₃-2), 2.65 (s, 3H, CH₃-8), 3.71 (s, 3H, CH₃-N9).

Procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas

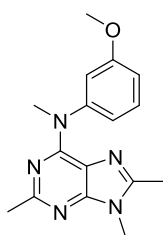
A un vial de microondas que contiene una disolución de la correspondiente 6-cloropurina (1.0 mmol) y la anilina sustituida (1.5 mmol) en isopropanol (1-4 ml) se añade ácido clorhídrico al 37% (1.2 mmol), y se sella y se calienta 10 min en el reactor de microondas a 80 °C. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se añaden 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo obtenido se purifica como se especifica en cada producto.

***N*,2,8,9-Tetrametil-*N*-(4-metoxifenil)-9*H*-purin-6-amina (1.12)**



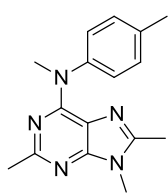
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas, **1.11** (98 mg, 0.50 mmol) se hace reaccionar con *N*-metil-4-metoxianilina (**1.7**) (103 mg, 0.75 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (150 μl) en 2-propanol (2 ml). El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (30:1) como eluyente, obteniéndose 134 mg (90%) de **1.12** como un sólido rosáceo. **Pf** 127-129 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 298 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.35 (s, 3H, CH₃-2), 2.39 (s, 3H, CH₃-8), 3.59 (s, 3H, CH₃-N9), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃-N6), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Ar), 7.20 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Ar). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 13.5 (CH₃-8), 25.7 (CH₃-2), 28.2 (CH₃-N9), 40.1 (CH₃-N6), 55.2 (OCH₃), 116.7 (C-5), 113.9, 127.6, 138.8, 156.9 (Ar), 147.9 (C-8), 151.7 (C-6), 152.1 (C-4), 159.0 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₆H₁₉N₅O: C, 64.63; H, 6.44; N, 23.55. Encontrado: C, 64.91; H, 6.72; N, 23.58.

***N*,2,8,9-Tetrametil-*N*-(3-metoxifenil)-9*H*-purin-6-amina (1.14a)**



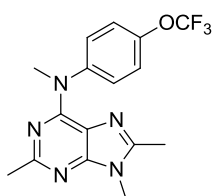
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas, **1.11** (43 mg, 0.22 mmol) se hace reaccionar con *N*-metil-3-metoxianilina (**1.13a**) (44 μl, 0.34 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (66 μl) en 2-propanol (1 ml). El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano-metanol (30:1) como eluyente, obteniéndose 42 mg (64%) de **1.14a** como un sólido blanco. **Pf** 131-133 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 298 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.37 (s, 3H, CH₃-2), 2.41 (s, 3H, CH₃-8), 3.60 (s, 3H, CH₃-N9), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, CH₃-N6), 6.79 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 2.5, 0.8 Hz, Ar), 6.86 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 1.9, 0.8 Hz, Ar), 6.89 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz, Ar), 7.26 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 13.5 (CH₃-8), 25.7 (CH₃-2), 28.3 (CH₃-N9), 40.1 (CH₃-N6), 55.1 (OCH₃), 117.1 (C-5), 110.9, 111.9, 118.2, 129.2, 146.9, 159.4 (Ar), 148.4 (C-8), 152.3 (C-6), 153.2 (C-4), 159.0 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₆H₁₉N₅O: C, 64.63; H, 6.44; N, 23.55. Encontrado: C, 64.55; H, 6.31; N, 23.48.

N,2,8,9-Tetrametil-*N*-(*p*-tolil)-9*H*-purin-6-amina (1.14b)



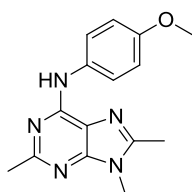
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas, **1.11** (80 mg, 0.41 mmol) se hace reaccionar con *N*,4-dimetilanilina (**1.13b**) (78 μ l, 0.62 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (123 μ l) en 2-propanol (2 ml). El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (40:1) como eluyente, obteniéndose 79 mg (69%) de un sólido blanco que se caracteriza como **1.14b**. **Pf** 133-135 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 282 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.32 (s, 3H, CH₃-Ph), 2.35 (s, 3H, CH₃-2), 2.41 (s, 3H, CH₃-8), 3.60 (s, 3H, CH₃-N9), 3.78 (s, 3H, CH₃-N6), 7.17 (m, 4H, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 13.4 (CH₃-8), 20.6 (CH₃-Ph), 25.7 (CH₃-2), 28.2 (CH₃-N9), 40.4 (CH₃-N6), 116.9 (C-5), 125.9, 129.1, 134.3, 143.3 (Ar), 148.1 (C-8), 152.4 (C-6), 153.1 (C-4), 159.0 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₆H₁₉N₅: C, 68.30; H, 6.81; N, 24.89. Encontrado: C, 68.11; H, 6.57; N, 24.66.

N-(4-(Trifluorometoxi)fenil)-*N*,2,8,9-tetrametil-9*H*-purin-6-amina (1.14c)



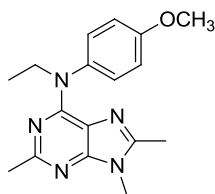
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas, **1.11** (80 mg, 0.41 mmol) se hace reaccionar con 4-trifluorometoxi-*N*-metilanilina (**1.13c**) (92 μ l, 0.62 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (123 μ l) en 2-propanol (2 ml). El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (40:1) como eluyente, obteniéndose 100 mg (69%) de **1.14c** como un sólido blanco. **Pf** 133-135 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 352 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.39 (s, 3H, CH₃-2), 2.40 (s, 3H, CH₃-8), 3.61 (s, 3H, CH₃-N9), 3.80 (s, 3H, CH₃-N6), 7.34 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar), 7.45 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 13.6 (CH₃-8), 25.6 (CH₃-2), 28.3 (CH₃-N9), 40.1 (CH₃-N6), 117.2 (C-5), 120.6 (c, J = 256.0, CF₃), 121.3, 127.7, 144.8, 145.3 (Ar), 148.8 (C-8), 152.2 (C-6), 153.3 (C-4), 159.1 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₆H₁₆F₃N₅O: C, 54.70; H, 4.59; N, 19.93. Encontrado: C, 54.45; H, 4.38; N, 19.67.

2,8,9-Trimetil-*N*-(4-metoxifenil)-9*H*-purin-6-amina (1.16)



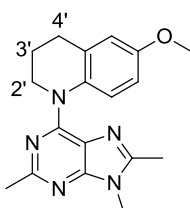
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas, **1.11** (43 mg, 0.22 mmol) se hace reaccionar con 4-metoxianilina (**1.15**) (42 mg, 0.34 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (66 μ l) en 2-propanol (1 ml). El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (30:1) como eluyente, obteniéndose 46 mg (74%) de un sólido rosáceo que se identifica como **1.16**. **Pf** 204-206 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 284 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.49 (s, 3H, CH₃-2), 2.52 (s, 3H, CH₃-8), 3.64 (s, 3H, CH₃-N9), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 6.88 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ar), 7.86 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ar), 9.40 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 13.4 (CH₃-8), 25.9 (CH₃-2), 28.3 (CH₃-N9), 55.1 (OCH₃), 116.5 (C-5), 113.5, 121.7, 133.4, 154.5 (Ar), 149.1 (C-8), 150.5 (C-6), 151.4 (C-4), 159.6 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₅H₁₇N₅O: C, 63.59; H, 6.05; N, 24.72. Encontrado: C, 63.46; H, 6.11; N, 24.57.

N-Etil-2,8,9-trimetil-*N*-(4-metoxifenil)-9*H*-purin-6-amina (1.17)



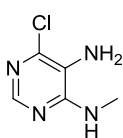
Una disolución de **1.16** (60 mg, 0.21 mmol) y Cs₂CO₃ (208 mg, 0.64 mmol) en DMF anhidra (2 ml) se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 30 minutos. A continuación se añade yoduro de etilo (67 µl, 0.84 mmol) y la mezcla se calienta 2 horas a 60 °C. Se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se evapora el disolvente y el residuo se disuelve en diclorometano (15 ml). Luego se lava con 15 ml de salmuera, se extrae con diclorometano (2 x 20 ml) y la fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se evapora. La purificación se realiza por CCTLC en diclorometano/metanol (30:1), obteniéndose 57 mg (87%) de un sólido blanco que se identifica como **1.17**. **Pf** 136-138 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 312 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.14 (t, 3H, J = 6.9 Hz, CH₃CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃-2), 2.40 (s, 3H, CH₃-8), 3.58 (s, 3H, CH₃-N9), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 4.33 (c, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂), 6.94 (d, 2H, J = 8.9 Hz, Ar), 7.15 (d, 2H, J = 8.9 Hz, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 13.8 (CH₃CH₂), 13.9 (CH₃-8), 26.1 (CH₃-2), 28.6 (CH₃-N9), 46.3 (CH₂), 55.5 (OCH₃), 116.6 (C-5), 114.3, 129.3, 137.2, 157.4 (Ar), 148.1 (C-8), 152.5 (C-6), 153.3 (C-4), 159.4 (C-2) **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₇H₂₁N₅O: C, 65.57; H, 6.80; N, 22.49. Encontrado: C, 65.28; H, 6.54; N, 22.19.

1-(2,8,9-Trimetil-9*H*-purin-6-il)-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (1.19)



A una disolución de **1.11** (100 mg, 0.51 mmol) en 2-propanol (2 ml), se añade 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (**1.18**) (125 mg, 0.77 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (150 µl) y se calienta a 80 °C en un tubo de presión durante 16 horas. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se añaden 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por CCTLC empleando hexano/acetato de etilo (2:1) como eluyente, obteniéndose 57 mg (35%) de **1.19** como un sólido blanco. **Pf** 180-182 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 324 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 1.90 (m, 2H, CH₂-3'), 2.38 (s, 3H, CH₃-2), 2.48 (s, 3H, CH₃-8), 2.78 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂-4'), 3.63 (s, 3H, CH₃-N9), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.43 (m, 2H, CH₂-2'), 6.72 (d, 1H, J = 2.8 Hz, Ar), 6.68 (dd, 1H, J = 8.9, 3.0 Hz, Ar), 7.40 (d, 1H, J = 8.9 Hz, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 13.6 (CH₃-8), 23.3 (CH₂-3'), 25.6 (CH₃-2), 26.3 (CH₂-4'), 28.3 (CH₃-N9), 46.1 (CH₂-2'), 55.1 (OCH₃), 117.4 (C-5), 111.2, 112.7, 125.8, 131.0, 133.0, 155.1 (Ar), 148.6 (C-8), 151.5 (C-6), 153.4 (C-4), 159.0 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₈H₂₁N₅O: C, 66.85; H, 6.55; N, 21.66. Encontrado C, 66.70; H, 6.38; N, 21.49.

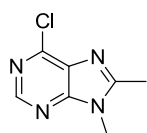
6-Cloro-*N*⁴-metilpirimidin-4,5-diamina (1.21)



De forma análoga a la síntesis de **1.10**, la reacción de 5-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.20**) (330 mg, 2.00 mmol) y metilamina acuosa al 40% (664 µl, 7.71 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol), obteniéndose 250 mg (79%) de **1.21** como un sólido blanco. **Pf** 165-167 °C (lit² 167 °C). **EM** (ES, modo positivo): m/z 159 (M+H)⁺ con distribución

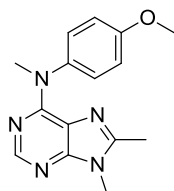
isotópica de Cl. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.88 (d, $J = 3.9$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-N9}$), 4.94 (s ancho, 2H, NH_2), 6.85 (s ancho, 1H, NH), 7.75 (s, 1H, H-2). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.³

6-Cloro-8,9-dimetil-9H-purina (1.22)



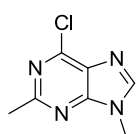
Siguiendo el procedimiento descrito en la síntesis de **1.11**, la reacción en microondas de **1.21** (210 mg, 1.33 mmol), ácido etanosulfónico (22 μl , 0.27 mmol) y ortoacetato de trietilo (0.73 ml, 4.00 mmol) en anhídrido acético (6 ml), da lugar a un residuo que se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (30:1) como eluyente. Se obtienen 157 mg (65%) de **1.22** como un sólido blanco. **Pf** 136-138 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 183 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ con distribución isotópica de Cl. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-8}$), 3.77 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N9}$), 8.69 (s, 1H, H-2).

N,8,9-Trimetil-N-(4-metoxifenil)-9H-purin-6-amina (1.23)



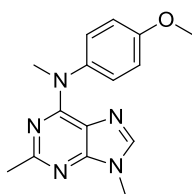
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas, **1.22** (62 mg, 0.34 mmol) se hace reaccionar con *N*-metil-4-metoxianilina (**1.7**) (70 mg, 0.51 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (100 μl) en 2-propanol (1.4 ml). El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (30:1) como eluyente, obteniéndose 54 mg (56%) de **1.23** como un sólido rosáceo. **Pf** 172-174 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 284 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.45 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-8}$), 3.64 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N9}$), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N6}$), 6.95 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, Ar), 7.21 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, Ar), 8.11 (s, 1H, H-2). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 13.4 ($\text{CH}_3\text{-8}$), 28.3 ($\text{CH}_3\text{-N9}$), 40.2 ($\text{CH}_3\text{-N6}$), 55.3 (OCH_3), 118.4 (C-5), 114.0, 127.5, 138.5, 157.0 (Ar), 148.6 (C-8), 150.5 (C-6), 152.2 (C-4), 153.1 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}$: C, 63.59; H, 6.05; N, 24.72. Encontrado: C, 63.30; H, 5.99; N, 24.58.

6-Cloro-2,9-dimetil-9H-purina (1.24)



Según el procedimiento descrito en la síntesis de **1.11**, la reacción en microondas de **1.10** (500 mg, 2.90 mmol), ácido etanosulfónico (24 μl , 0.29 mmol) y ortoformiato de trimetilo (0.95 ml, 8.70 mmol) en anhídrido acético (12 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Finalmente se obtienen 487 mg (92%) de **1.24** como un sólido blanco. **Pf** 167-169 °C (lit¹ 168-171 °C). **EM** (ES, modo positivo): m/z 183 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ con distribución isotópica de Cl. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.68 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-2}$), 3.82 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N9}$), 8.53 (s, 1H, H-8). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹

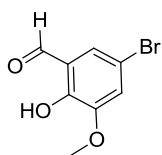
N,2,9-Trimetil-*N*-(4-metoxifenil)-9*H*-purin-6-amina (1.25)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 6-fenilaminopurinas, **1.24** (500 mg, 2.74 mmol) se hace reaccionar con *N*-metil-4-metoxianilina (**1.7**) (563 mg, 4.11 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (822 μ l) en 2-propanol (11 ml). El residuo se purifica por CCTLC empleando diclorometano/metanol (30:1) como eluyente, obteniéndose 580 mg (75%) de **1.25** como un sólido blanco. **Pf** 152-154 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 284 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.40 (s, 3H, CH₃-2), 3.66 (s, 3H, CH₃-N9), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃-N6), 6.93 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, Ar), 7.22 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, Ar), 7.91 (s, 1H, H-8). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 25.8 (CH₃-2), 29.3 (CH₃-N9), 39.9 (CH₃-N6), 55.2 (OCH₃), 117.6 (C-5), 114.0, 127.9, 138.7, 157.2 (Ar), 140.4 (C-8), 151.9 (C-6), 153.6 (C-4), 160.0 (C-2). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₅H₁₇N₅O: C, 63.59; H, 6.05; N, 24.72. Encontrado: C, 63.47; H, 5.95; N, 24.61.

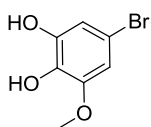
2.2. CAPÍTULO 2

5-Bromo-2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (2.10)



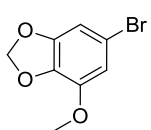
A una disolución de *o*-vanillina (**2.9**) (0.5 g, 3.29 mmol) en 13 ml de ácido acético glacial se añade, gota a gota, *N*-bromosuccinimida (0.7 g, 3.95 mmol) previamente disuelta en ácido acético (40 ml). La mezcla de reacción se calienta a 70 °C durante 1 hora. Luego se añaden 20 ml de una disolución acuosa de Na₂S₂O₃ al 10% y se extrae con cloroformo (2 x 15 ml). Se repite el lavado con Na₂S₂O₃ al 10% (2 x 15 ml), y la fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 0.7 g (92%) de **2.10** como un sólido amarillo. **Pf** 130-132 °C (lit⁴ 122-124 °C). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 231 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Br. **¹H-RMN** (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.90 (s, 3H, OCH₃), 7.16 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar), 7.29 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, Ar), 9.84 (s ancho, 1H, OH), 11.00 (s, 1H, CHO). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.⁴

5-Bromo-3-metoxibenceno-1,2-diol (2.11)



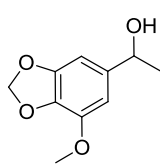
El compuesto **2.10** (377 mg, 1.63 mmol) se disuelve en NaOH acuoso al 2% (8.15 ml) y se agita 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se añade H₂O₂ acuoso al 33% (9.75 ml) y se agita durante 10 minutos. A continuación se añade ácido clorhídrico al 37% hasta alcanzar un valor de pH de 2. El crudo de reacción se extrae con diclorometano (3 x 20 ml), se lava con 15 ml de salmuera y luego se seca sobre sulfato sódico anhidro. El residuo se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 335 mg (94%) de un aceite que se caracteriza como **2.11**. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 219 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Br. **¹H-RMN** (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.74 (s, 3H, OCH₃), 6.57 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, Ar), 6.60 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, Ar), 8.48 (s ancho, 1H, OH), 9.32 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.⁴

3,4-Metilendioxi-5-metoxibromobenceno (2.12)



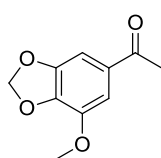
Sobre una disolución de **2.11** (275 mg, 1.26 mmol) en DMF anhidra (6.3 ml) se añade K₂CO₃ (208 mg, 1.50 mmol) y dibromometano (105 μl, 1.50 mmol) y se calienta a 100 °C durante 90 minutos. Tras evaporar el disolvente, el crudo de reacción se disuelve en 20 ml de diclorometano y se lava 15 ml de una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y 15 ml de salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 232 mg (80%) de **2.12** como un sólido blanco. **Pf** 76-78 °C (lit⁴ 80-81 °C). **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ: 3.82 (s, 3H, OCH₃), 6.02 (s, 2H, CH₂), 6.84 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, Ar), 6.85 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.⁴

1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)etan-1-ol (2.13)



A una disolución de **2.12** (150 mg, 0.65 mmol) en TBME anhidro (1.5 ml) se añade, gota a gota, 1.2 ml de una disolución 1.6 M de *n*-butilitio en hexano (2.00 mmol) a una temperatura de -32 °C y se agita 1 hora bajo atmósfera de argón. A continuación se añade acetaldehído (110 µl, 1.95 mmol) y la mezcla se deja en agitación a -20 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se añade 10 ml de una disolución acuosa saturada de cloruro amónico, y luego se extrae con 15 ml de acetato de etilo y se lava con salmuera. La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 103 mg (73%) de **2.13** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 219 (M+Na)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ: 1.28 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, CH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.62 (c, 1H, *J* = 6.3 Hz, CH), 5.09 (s ancho, 1H, OH), 5.94 (s, 2H, CH₂), 6.55 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, Ar), 6.60 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz, Ar).

1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)etanona (2.14)

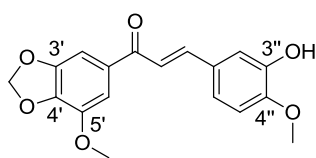


A una disolución de **2.13** (110 mg, 0.50 mmol) en diclorometano (1 ml) se añade lentamente PCC (216 mg, 1.00 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. Luego se filtra la mezcla de reacción, se evapora el disolvente y el residuo se purifica por CCTLC con diclorometano/metanol (20:1) como eluyente, obteniéndose 72 mg (75%) de **2.14** como un sólido blanco. **Pf** 81-83 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 195 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ: 2.52 (s, 3H, CH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 6.12 (s, 2H, CH₂), 7.21 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, Ar), 7.28 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, Ar).

Procedimiento general para la síntesis de chalconas

Una disolución de **2.14** (1.0 mmol), KOH acuoso al 50% w/v (10 ml) y el correspondiente benzaldehído (1.2 mmol) en metanol (10 ml) se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Los compuestos precipitan al añadir ácido clorhídrico 1N y luego se purifican por cromatografía flash empleando como eluyente hexano/acetato de etilo.

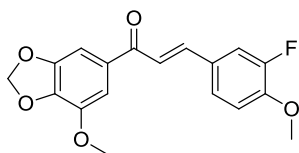
(*E*)-3-(3''-Hidroxi-4''-metoxifenil)-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.16a)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de chalconas, la reacción de **2.14** (40 mg, 0.21 mmol) con 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (**2.15a**) (38 mg, 0.25 mmol) permitió la obtención de 39 mg (57%) de **2.16a** como un sólido amarillo. **Pf** 162-164 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 329 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ: 3.84 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.94 (s, 3H, OCH₃-5'), 6.14 (s, 2H, CH₂), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.30 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.1 Hz, Ar), 7.35 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, Ar), 7.45 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, Ar), 7.47 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, Ar), 7.60 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H-2), 7.70 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H-3), 9.12 (s ancho, 1H, OH). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 55.7 (OCH₃-4''), 56.5 (OCH₃-5'), 102.4 (CH₂), 102.7, 109.1, 111.8, 115.0, 122.2, 127.8, 132.8, 139.2, 143.2, 146.6,

148.8, 150.2 (Ar), 119.3 (C-2), 144.2 (C-3), 186.8 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{18}H_{16}O_6$: C, 65.85; H, 4.91. Encontrado: C, 66.02; H, 4.71.

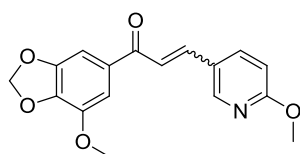
(E)-3-(3''-Fluoro-4''-metoxifenil)-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.16b)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de chalconas, la reacción de **2.14** (40 mg, 0.21 mmol) con 3-fluoro-4-metoxibenzaldehído (**2.15b**) (39 mg, 0.25 mmol) permitió la obtención de 43 mg (62%) de **2.16b** como un sólido amarillo. **Pf** 159-161 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 331 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.94 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.99 (s, 3H, OCH₃-5'), 6.15 (s, 2H, CH₂), 7.22 (t, 1H, J = 8.7 Hz, Ar), 7.46 (d, 1H, J = 1.4 Hz, Ar), 7.50 (d, 1H, J = 1.7 Hz, Ar), 7.62 (dd, 1H, J = 7.5, 1.9 Hz, Ar), 7.64 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H-2), 7.83 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H-3), 7.96 (dd, 1H, J = 13.0, 2.0 Hz, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 56.2 (OCH₃-4''), 56.5 (OCH₃-5'), 102.4 (CH₂), 102.9, 109.3, 113.7, 114.9, 127.3, 128.0, 139.4, 143.2, 148.8, 149.1, 150.7, 152.6 (Ar), 120.7 (C-2), 142.6 (C-3), 186.6 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{18}H_{15}FO_6$: C, 65.45, H, 4.58. Encontrado: C, 65.28; H, 4.39.

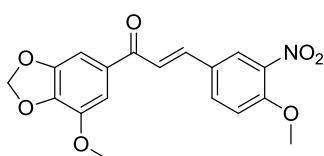
(E/Z)-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)-3-(4''-metoxipiridin-3''-il)prop-2-en-1-ona (2.16c)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de chalconas, la reacción de **2.14** (40 mg, 0.21 mmol) con 6-metoxi-3-piridincarboxaldehído (**2.15c**) (35 mg, 0.25 mmol) permitió la obtención de 31 mg (47%) de **2.16c** como un sólido amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 314 (M+H)⁺. **Relación (E/Z)**: 95/5. **¹H-RMN**

(DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (isómero *E*): 3.91 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.94 (s, 3H, OCH₃-5'), 6.15 (s, 2H, CH₂), 6.93 (d, 1H, J = 8.7 Hz, Ar), 7.47 (d, 1H, J = 1.1 Hz, Ar), 7.50 (d, 1H, J = 1.2 Hz, Ar), 7.72 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H-2), 7.90 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H-3), 8.39 (dd, 1H, J = 8.8, 2.5 Hz, Ar), 8.59 (d, 1H, J = 2.5 Hz, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (isómero *E*): 53.6 (OCH₃-4''), 56.5 (OCH₃-5'), 102.4 (CH₂), 102.9, 111.1, 120.9, 132.4, 137.8, 139.4, 143.2, 148.8, 149.5, 164.8, 186.6 (Ar), 124.6 (C-2), 140.3 (C-3), 186.8 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{17}H_{15}NO_5$: C, 65.17; H, 4.83; N, 4.47. Encontrado: C, 65.32; H, 4.75; N, 4.28.

(E)-3-(4''-Metoxi-3''-nitrofenil)-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.16d)

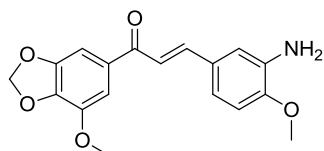


Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de chalconas, la reacción de **2.14** (100 mg, 0.51 mmol) con 4-metoxi-3-nitrobenzaldehído (**2.15d**) (112 mg, 0.62 mmol) permitió la obtención de 90 mg (50%) de **2.16d** como un sólido amarillo. **Pf** 199-201 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 358 (M+H)⁺. **¹H-RMN**

(DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.94 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.99 (s, 3H, OCH₃-5'), 6.16 (s, 2H, CH₂), 7.44 (d, 1H, J = 8.9 Hz, Ar), 7.47 (d, 1H, J = 1.5 Hz, Ar), 7.55 (d, 1H, J = 1.5 Hz, Ar), 7.72 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H-2), 7.95 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H-3), 8.17 (dd, 1H, J = 8.9, 2.2 Hz, Ar), 8.51 (d, 1H, J = 2.2 Hz, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 56.5 (OCH₃-4''), 57.0 (OCH₃-5'), 102.5 (CH₂), 103.0, 109.4, 114.5, 124.4, 127.6, 132.3, 135.0, 139.5, 139.9, 143.3, 148.8, 152.9 (Ar), 122.0

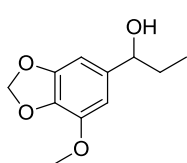
(C-2), 141.2 (C-3), 186.5 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{18}H_{15}NO_7$: C, 60.50; H, 4.23; N, 3.92. Encontrado: 60.12; H, 4.36; N, 3.78.

(*E*)-3-(3''-Amino-4''-metoxifenil)-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.16e)



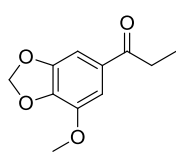
A una disolución de **2.16d** (140 mg, 0.39 mmol) en 6 ml de etanol/acetato de etilo (1:1) se añade cloruro de estaño (II) (371 mg, 1.96 mmol) y ácido clorhídrico al 37% (0.20 ml), y se calienta a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añaden 10 ml de acetato de etilo y se lava con 10 ml de una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 87 mg (68%) de **2.16e** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 328 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 3.83 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.93 (s, 3H, OCH₃-5'), 4.81 (s ancho, 2H, NH₂) 6.14 (s, 2H, CH₂), 6.87 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar), 7.11 (m, 2H, Ar, H-2), 7.40 (d, 1H, J = 1.0 Hz, Ar), 7.41 (d, 1H, J = 1.2 Hz, Ar), 7.57 (m, 2H, Ar, H-3). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 55.5 (OCH₃-4''), 56.5 (OCH₃-5'), 102.4 (CH₂), 102.6, 109.1, 110.4, 112.9, 118.6, 124.5, 127.4, 132.9, 137.9, 139.1, 143.2, 148.9 (Ar), 119.2 (C-2), 144.8 (C-3), 186.8 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{18}H_{17}NO_5$: C, 66.05; H, 5.23; N, 4.28. Encontrado: C, 65.78; H, 5.12; N, 4.06.

1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)propan-1-ol (2.17)



A una disolución de **2.12** (500 mg, 2.16 mmol) en 4.5 ml de TBME anhidro se añade 4.5 ml de *n*-butillitio 1.6 M en hexano (7.20 mmol), y se agita 1 hora a -32 °C bajo atmósfera inerte. A continuación se añade propionaldehído (540 μ l, 7.50 mmol) y se continúa agitando durante 2 horas a -20 °C. Transcurrido este tiempo, se añaden 10 ml de una disolución acuosa saturada de cloruro amónico, se extrae con 15 ml de acetato de etilo y se lava con salmuera. La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 450 mg (99%) de **2.17** como un aceite amarillo. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.17 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃), 1.56 (m, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.33 (m, 1H, CH), 5.05 (d, 1H, J = 4.5 Hz, OH), 5.94 (s, 2H, CH₂), 6.53 (d, 1H, J = 1.4 Hz, Ar), 6.57 (d, 1H, J = 1.4 Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.⁵

1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)propan-1-ona (2.18)



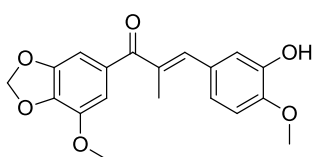
De manera similar a la síntesis del compuesto **2.14**, a una disolución de **2.17** (400 mg, 1.91 mmol) en diclorometano (7.5 ml) se añade PCC (821 mg, 3.81 mmol) y la mezcla se agita 4 horas a temperatura ambiente. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 180 mg (45%) de **2.18** como un sólido blanco. **Pf** 82-84 °C (lit⁵ 88-89 °C). **EM** (ES, modo positivo): m/z 209 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.05 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH₃), 2.98 (c, 2.98, J = 7.2 Hz, CH₂),

3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.11 (s, 2H, OCH₂O), 7.20 (d, 1H, *J* = 1.3 Hz, Ar), 7.28 (d, 1H, *J* = 1.3 Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.⁵

Procedimiento general para la síntesis de α -metilchalconas

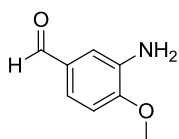
A una disolución de la correspondiente propiofenona (1.0 mmol) en etanol seco (4 ml) se añade el correspondiente benzaldehído (0.5-1.0 mmol), piperidina (1 ml), ácido acético glacial (0.5 ml) y tamiz molecular de 4 Å, y la mezcla se calienta a 80 °C bajo atmósfera de argón durante 16 horas. El crudo de reacción se filtra, se lava con una disolución acuosa saturada de cloruro amónico y se extrae con diclorometano. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo obtenido se purifica según se especifica en cada caso.

(*E*)-3-(3''-Hidroxi-4''-metoxifenil)-2-metil-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.19)



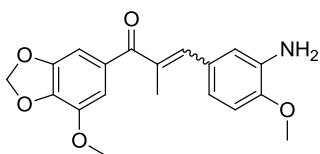
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de α -metilchalconas, la reacción de **2.18** (100 mg, 0.48 mmol) con 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (**2.15a**) (37 mg, 0.24 mmol) da lugar a un residuo que se purifica por CCTLC (hexano/acetato de etilo, 4:1), obteniéndose 72 mg (44%) de **2.19** como un sólido blanco. **Pf** 144-146 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 343 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 2.14 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.86 (s, 3H, OCH₃-5'), 6.12 (s, 2H, CH₂), 6.91 (s, 1H, Ar), 6.94 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar), 6.97 (s, 1H, Ar), 7.00 (m, 3H, Ar, H-3), 9.18 (s ancho, 1 H, OH). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 14.7 (CH₃), 56.0 (OCH₃-4''), 56.4 (OCH₃-5'), 102.2 (CH₂), 103.5, 110.0, 112.0, 116.7, 122.2, 128.1, 132.5, 138.1, 140.8, 146.3, 148.2, 148.4 (Ar), 133.6 (C-2), 142.8 (C-3), 197.3 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₉H₁₈O₆: C, 66.38; H, 5.30. Encontrado: C, 66.38; H, 5.09.

3-Amino-4-metoxibenzaldehído (2.15e)



Sobre una disolución de K₂CO₃ (763 mg, 5.50 mmol) y Na₂S₂O₄ (862 mg, 4.95 mmol) en agua (4 ml) se añade lentamente 4-metoxi-3-nitrobenzaldehído (**2.15d**) (200 mg, 1.10 mmol) disuelto en diclorometano (7.5 ml), y se calienta a 40 °C durante 16 horas. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se extrae con diclorometano (3 x 15 ml). La fase orgánica resultante se lava con 20 ml de salmuera y luego se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra, obteniendo así 115 mg (69%) de **2.15e** como un sólido amarillo con pureza suficiente para el siguiente paso sintético. **Pf** 88-90 °C (lit⁶ 89.8 °C). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 152 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 3.87 (s, 3H, OCH₃), 5.08 (s ancho, 2H, NH₂), 6.99 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar), 7.11 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, Ar), 7.16 (dd, 1H, *J* = 8.1, 2.0 Hz, Ar), 9.72 (s, 1H, CHO). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.⁶

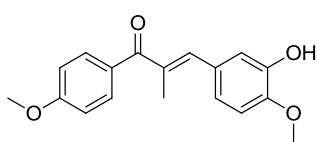
(*E/Z*)-3-(3''-Amino-4''-metoxifenil)-2-metil-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.20)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de α -metilchalconas, se hace reaccionar **2.18** (100 mg, 0.48 mmol) con el benzaldehído **2.15e** (72 mg, 0.48 mmol). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 71 mg (43%) de **2.20** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z

342 (M+H)⁺. **Relación (*E/Z*):** 85/15. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (isómero *E*): 2.13 (d, 3H, $J = 1.3$ Hz, CH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.84 (s, 3H, OCH₃-5'), 4.82 (s ancho, 2H, NH₂), 6.09 (s, 2H, CH₂), 6.70 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.1$ Hz, Ar), 6.83 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, Ar), 6.84 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, Ar), 6.87 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, Ar), 6.97 (s, 1H, H-3), 6.98 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, Ar). δ (isómero *Z*): 1.99 (d, 3H, $J = 1.6$ Hz, CH₃), 3.64 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.77 (s, 3H, OCH₃-5'), 4.61 (s ancho, 2H, NH₂), 6.06 (s, 2H, CH₂), 6.25 (dd, 1H, $J = 8.2, 2.0$ Hz, Ar), 6.39 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, Ar), 6.55 (s, 1H, H-3), 6.56 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 6.96 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, Ar), 7.15 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, Ar). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ (isómero *E*): 22.8 (CH₃), 55.6 (OCH₃-4''), 56.1 (OCH₃-5'), 102.9 (CH₂), 103.1, 110.3, 110.5, 113.9, 116.9, 128.4, 133.5, 138.1, 138.4, 143.2, 147.6, 148.6 (Ar), 133.2 (C-2), 142.4 (C-3), 197.3 (CO). δ (isómero *Z*): 15.2 (CH₃), 55.8 (OCH₃-4''), 56.8 (OCH₃-5'), 102.6 (CH₂), 103.8, 110.3, 110.6, 113.9, 116.9, 130.0, 130.3, 137.8, 140.0, 143.5, 146.2, 149.1 (Ar), 130.1 (C-2), 134.1 (C-3), 198.8 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₉H₁₉NO₅: C, 66.85; H, 5.61; N, 4.10. Encontrado: C, 67.02; H, 5.84; N, 4.00.

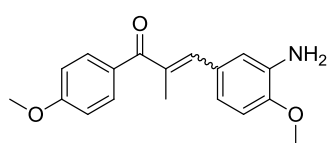
(*E*)-3-(3''-Hidroxi-4''-metoxifenil)-2-metil-1-(4'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.22)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de α -metilchalconas, la reacción de la 4'-metoxipropiofenona (**2.21**) (200 mg, 1.22 mmol) con 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (**2.15a**) (185 mg, 1.22 mmol), seguido de purificación por cromatografía flash

(hexano/acetato de etilo), condujo a 160 mg (44%) de **2.22** como un sólido blanco. **Pf** 131-133 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 299 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.15 (d, 3H, $J = 1.3$ Hz, CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.84 (s, 3H, OCH₃-4'), 6.92 (dd, 1H, $J = 8.5, 2.1$ Hz, Ar), 6.94 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz, Ar), 6.97 (s, 1H, H-3), 6.98 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, Ar), 7.04 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Ar), 7.05 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Ar), 7.69 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, Ar), 7.70 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Ar), 9.17 (s ancho, 1H, OH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 14.1 (CH₃), 55.5 (OCH₃-4''), 55.6 (OCH₃-4'), 112.0, 113.7, 116.6, 122.1, 128.1, 130.4, 131.6, 146.3, 148.2, 162.2 (Ar), 133.8 (C-2), 140.2 (C-3), 197.3 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₈H₁₈O₄: C, 72.47; H, 6.08. Encontrado: C, 72.53; H, 5.99.

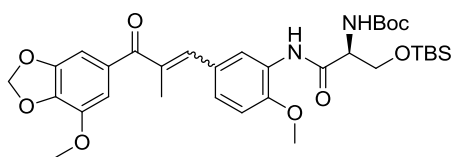
(*E/Z*)-3-(3''-Amino-4''-metoxifenil)-2-metil-1-(4'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.23)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de α -metilchalconas, la reacción de la 4'-metoxipropiofenona (**2.21**) (100 mg, 0.61 mmol) con el benzaldehído **2.15e** (92 mg, 0.61 mmol) seguido de purificación por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), dio lugar a 78 mg (43%) de **2.23** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 298

(M+H)⁺. **Relación (E/Z):** 81/19. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ (isómero *E*): 2.16 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.84 (s, 3H, OCH₃-4'), 4.83 (s ancho, 2H, NH₂), 6.70 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.2 Hz, Ar), 6.85 (m, 2H, Ar), 6.92 (s, 1H, H-3), 7.04 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar), 7.05 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, Ar), 7.66 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, Ar), 7.68 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, Ar). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ (isómero *E*): 14.7 (CH₃), 55.3 (OCH₃-4''), 55.4 (OCH₃-4'), 110.3, 113.6, 114.8, 119.2, 128.0, 130.6, 131.4, 137.6, 147.0, 162.1 (Ar), 133.2 (C-2), 141.4 (C-3), 197.4 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₈H₁₉NO₃: C, 72.71; H, 6.44; N, 4.71. Encontrado: C, 72.42; H, 6.35; N, 4.63.

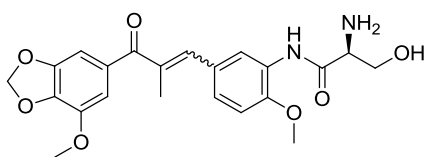
(E/Z)-3-(3''-amino-L- Boc-Ser(TBS)-4''-metoxifenil)-2-metil-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.25)



A una disolución de **2.20** (41 mg, 0.12 mmol) en cloroformo (1 ml) se añade Boc-Ser(TBS)-OH (**2.24**)⁷ (77 mg, 0.24 mmol), PyBOP (156 mg, 0.30 mmol) y trietilamina (50 μl, 0.36 mmol), y se agita a temperatura ambiente durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, la

mezcla se disuelve en diclorometano (20 ml) y se lava con una disolución saturada de bicarbonato sódico (10 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (4:1), obteniéndose 67 mg (87%) de **2.25** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 665 (M+Na)⁺. **Relación (E/Z):** 2/1. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (isómero *E*): 0.82 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.40 (s, 9H, (CH₃)₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃-4''), 3.88 (s, 3H, OCH₃-5'), 4.09 (m, 1H, CH), 4.28 (m, 2H, CH₂), 6.12 (s, 2H, OCH₂O), 6.91 (s, 1H, H-3), 7.02 (m, 2H, Ar), 7.14 (m, 2H, Ar), 7.25 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.3 Hz, Ar), 8.35 (s ancho, 1H, NH), 9.12 (s ancho, 1H, NH).

(E/Z)-3-(3''-amino-L-seril-4''-metoxifenil)-2-metil-1-(3',4'-metilendioxi-5'-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (2.26)

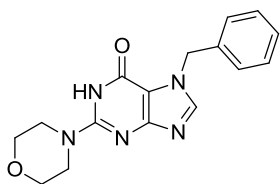


A una disolución de **2.25** (66 mg, 0.10 mmol) en cloroformo (1 ml) se añade TFA (230 μl, 3.00 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego se adiciona dietil éter y el precipitado que se forma se purifica por CCTLC en diclorometano/metanol (20:1), obteniéndose

30 mg (70 %) de **2.26** como un sólido blanco. **EM** (ES, modo positivo): m/z 429 (M+H)⁺. **Relación (E/Z):** 2/1. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ (isómero *E*): 2.16 (s, 3H, CH₃), 3.80 (m, 1H, CH), 3.83 (s, 6H, OCH₃), 3.90 (s ancho, 2H, NH₂), 3.99 (d, 2H, *J* = 3.3 Hz, CH₂), 4.88 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz, OH), 6.16 (s, 2H, OCH₂O), 6.81 (m, 2H, Ar), 6.89 (s, 1H, H-3), 6.97 (m, 2H, Ar), 8.10 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.3 Hz, Ar), 10.11 (s ancho, 1H, CONH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ (isómero *E*): 15.3 (CH₃), 55.9 (OCH₃), 59.1 (CH), 63.4 (CH₂), 102.8 (OCH₂O), 96.3, 110.6, 116.5, 116.8, 121.8, 127.4, 130.5, 130.6, 139.8, 143.5, 146.5, 150.6, (Ar), 135.7 (C-2), 143.6 (C-3), 171.8 (CONH), 205.2 (C-1). **Análisis elemental (%)** para C₂H₂₄N₂O₇ calculado: C, 61.68; H, 5.65; N, 6.54. Encontrado: C, 61.56; H, 6.11; N, 6.33.

2.3. CAPÍTULO 3

7-Bencil-2-morfolino-1*H*-purin-6(7*H*)-ona (3.6)⁹⁻¹¹



Una disolución con 2,6-dicloropurina (0.5 g, 2.65 mmol) y carbonato potásico (1.0 g, 7.95 mmol) en 11 ml de DMF anhidra se agita bajo atmósfera inerte de argón a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación se añade bromuro de bencilo (472 μ l, 3.97 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evapora y el residuo se disuelve en 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (diclorometano/acetato de etilo). La fracción de menor movilidad cromatográfica obtenida (180 mg, 0.65 mmol) se disuelve en DMF anhidra (3 ml); luego se añade acetato sódico (161 mg, 1.96 mmol) y la mezcla se irradia en microondas a 120 °C durante 1 hora. Se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se evapora el disolvente y el residuo se disuelve en 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por CCTLC empleando como eluyente diclorometano/metanol (10:1). El compuesto obtenido (80 mg, 0.31 mmol) se disuelve en *tert*-butanol (2.5 ml) y se hace reaccionar con morfolina (134 μ l, 1.53 mmol), por calentamiento en microondas a 80 °C durante 120 minutos. Tras eliminar el disolvente, el residuo se disuelve en 20 ml de diclorometano y se lava con 15 ml de una disolución acuosa saturada de cloruro amónico. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por CCTLC en diclorometano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 52 mg de **3.6** como un sólido blanco. **Pf** 267-269 °C (lit¹² 295-297° C). **EM** (ES, modo positivo): m/z 312 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.46 (m, 4H, CH₂-2', CH₂-6'), 3.63 (m, 4H, CH₂-3', CH₂-5'), 5.45 (s, 2H, CH₂), 7.28 (m, 5H, Ar), 8.08 (s, 1H, H-8), 11.15 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 45.9 (CH₂-2', CH₂-6'), 49.1 (CH₂), 65.9 (CH₂-3', CH₂-5'), 108.8 (C-5), 127.5, 127.6, 128.6, 138.0 (Ar), 143.0 (C-8), 153.8 (C-2), 156.9 (C-4), 159.2 (C-6). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₆H₁₇N₅O₂: C, 61.72; H, 5.50; N, 22.40. Encontrado: C, 61.48; H, 5.49; N, 22.24.

SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL HIT3.1

PROCEDIMIENTOS GENERALES

I. Procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona.

Sobre una disolución del correspondiente aldehído (1.0 mmol) en una mezcla acetona/agua (1:1.25 v/v) (0.9 ml) se añade una solución de NaOH al 1% (0.5 ml) y la mezcla de reacción se agita durante 16 horas a temperatura ambiente. Luego, el crudo se neutraliza con HCl 1M, se extrae con diclorometano (3 x 15 ml) y se lava con salmuera (20 ml). La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. El residuo obtenido se purifica según se especifica en cada caso.

II. Procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas.

A una disolución de etóxido sódico en etanol al 25% (1.1 mmol) se añade, gota a gota, malonato de dietilo (1.1 mmol), manteniendo la temperatura por debajo de 25 °C. A continuación, la mezcla se diluye con etanol (1.2 ml) y se calienta a 60 °C. Alcanzada esta temperatura, se añade la correspondiente but-3-en-2-ona (1.0 mmol) disuelta en etanol (0.35 ml). La reacción se calienta a reflujo hasta que por cromatografía en capa fina se observa la desaparición del producto de partida. A continuación se añade NaOH 6 M (2.2 mmol) y se calienta a 80 °C durante 2 horas. Se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se evapora el etanol y el residuo se lava con 20 ml de tolueno. La fase orgánica se desecha y el residuo acuoso se trata con HCl al 37% hasta alcanzar un pH de 2. La mezcla resultante se calienta a 100 °C durante 1 hora. Una vez enfriada la disolución, la correspondiente ciclohexanodiona se obtiene bien por precipitación, o bien como se indica en cada caso.

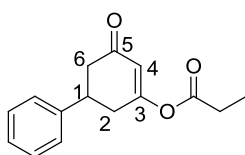
III. Procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas.

Un vial de microondas que contiene la correspondiente ciclohexano-1,3-diona (1.0 mmol), el cloruro de acilo (2.0 mmol), K₂CO₃ anhidro (2.2 mmol), 1,2,4-triazol (0.4 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (0.5 mmol) en acetonitrilo anhidro o DMF anhidra (4 ml), se sella y se agita durante 10 minutos bajo atmósfera de argón. Luego se irradia a 70 °C durante 2 horas en el reactor de microondas. Transcurrido ese tiempo, se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se neutraliza con ácido clorhídrico 1N y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica resultante se lava con 15 ml de salmuera, se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo).

IV. Procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas.

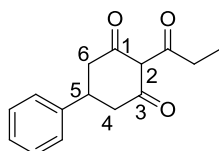
A una disolución de la correspondiente 2-acilciclohexano-1,3-diona (1.0 mmol) en tolueno (10 ml), se adiciona la correspondiente amina (1.5 mmol) y tamiz molecular de 4 Å. La reacción se calienta en un reactor de microondas a 150 °C durante 2 horas o en tubo de presión a 110 °C durante 16 horas, según se especifica en cada caso. Transcurrido el tiempo de reacción, el tolueno se evapora y el residuo se purifica como se describe para cada compuesto.

5-Oxo-1,2,5,6-tetrahydro-[1,1'-bifenil]-3-il propionato (3.8)



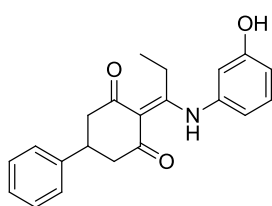
A una disolución de 5-fenilciclohexano-1,3-diona (**3.7**) (300 mg, 1.59 mmol) y DMAP (59 mg, 0.48 mmol) en diclorometano (1.6 ml) se añade DIPEA (277 μ l, 1.59 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente. A continuación se adiciona lentamente cloruro de propionilo (139 μ l, 1.59 mmol) y se calienta a reflujo durante 2 horas. Una vez enfriada, se añade ácido clorhídrico 1N (10 ml) y se extrae con acetato de etilo (30 ml). La fase orgánica resultante se lava con 15 ml de salmuera, se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 250 mg (64%) de un aceite que se caracteriza como **3.8**. **EM** (ES, modo positivo): m/z 245 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 1.07 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH₃), 2.47 (dd, 1H, J = 16.6, 2.9 Hz, H-2), 2.57 (c, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂), 2.73 (dd, 1H, J = 16.2, 12.9 Hz, H-2), 2.63 (dd, 1H, J = 17.7, 4.3 Hz, H-6), 2.87 (ddd, 1H, J = 17.6, 10.9, 2.0 Hz, H-6), 3.28 (m, 1H, H-1), 5.91 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-4), 7.24 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar), 7.35 (m, 4H, Ar).

5-Fenil-2-propionilciclohexano-1,3-diona (3.9)



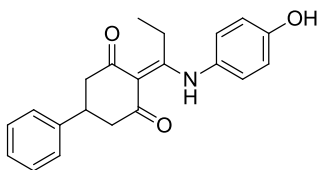
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar 5-fenilciclohexano-1,3-diona (**3.7**) (500 mg, 2.66 mmol), cloruro de propionilo (464 μ l, 5.31 mmol), K₂CO₃ anhidro (809 mg, 5.85 mmol), 1,2,4-triazol (73 mg, 1.06 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (429 mg, 1.33 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 ml), obteniéndose 330 mg (51%) de **3.9** como un sólido blanco. **Pf** 71-73 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 245 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 1.05 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃), 2.67 (m, 2H, H-4, H-6), 2.91 (m, 2H, H-4, H-6), 3.01 (c, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂), 3.46 (tt, 1H, J = 11.8, 4.1 Hz, H-5), 7.23-7.38 (m, 5H, Ar).

5-Fenil-2-(1-((3-hidroxifenil)amino)propiliden)-ciclohexano-1,3-diona (3.11a)



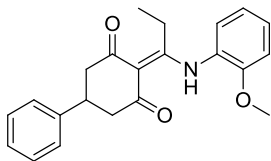
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (40 mg, 0.16 mmol) y 3-aminofenol (**3.10a**) (26 mg, 0.24 mmol) en tolueno (1.6 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por CCTLC empleando como eluyente diclorometano/metanol (40:1), obteniéndose 50 mg (93%) de **3.11a** como un sólido blanco. **Pf** 199-201 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 336 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 1.06 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃), 2.62 (dd, 2H, J = 16.4, 3.9 Hz, H-4, H-6), 2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 2.89 (c, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂), 3.33 (tt, 1H, J = 12.2, 4.1 Hz, H-5), 6.67 (t, 1H, J = 2.2 Hz, Ar), 6.72 (ddd, 1H, J = 7.9, 2.1, 0.9 Hz, Ar), 6.82 (ddd, 1H, J = 8.3, 2.4, 0.8 Hz, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.29 (t, 1H, J = 8.0 Hz, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 9.90 (s ancho, 1H, OH), 14.94 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 12.8 (CH₃), 23.4 (CH₂), 36.0 (C-5), 46.0 (C-4, C-6), 106.7 (NHC=C), 112.9, 115.8, 116.4, 126.5, 126.7, 128.5, 130.4, 136.8, 143.4, 158.2 (Ar), 177.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₁NO₃: C, 75.20; H, 6.31; N, 4.18. Encontrado: C, 75.33; H, 6.12; N, 4.36.

5-Fenil-2-(1-((4-hidroxifenil)amino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11b)



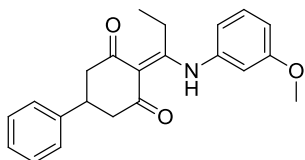
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (40 mg, 0.16 mmol) y 4-aminofenol (**3.10b**) (26 mg, 0.24 mmol) en tolueno (1.6 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por CCTLC en diclorometano/metanol (40:1), obteniéndose 30 mg (56%) de **3.11b** como un sólido blanco. **Pf** 203-205 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 336 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.02 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃), 2.61 (dd, 2H, *J* = 16.6, 3.8 Hz, H-4, H-6), 2.83 (m, 2H, H-4, H-6), 2.85 (c, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 3.32 (tt, 1H, *J* = 12.2, 4.0 Hz, H-5), 6.85 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar), 7.11 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.23 (m, 1H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 9.81 (s ancho, 1H, OH), 14.73 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO d₆, 100 MHz) δ: 13.0 (CH₃), 23.7 (CH₂), 36.5 (C-5), 46.5 (C-4, C-6), 107.1 (NHC=C), 116.4, 127.0, 127.2, 127.3, 127.7, 128.9, 143.9, 157.5 (Ar), 178.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₁NO₃: C, 75.20; H, 6.31; N, 4.18. Encontrado: C, 74.98; H, 6.13; N, 4.37.

5-Fenil-2-(1-((2-metoxifenil)amino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11c)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (34 mg, 0.14 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (24 μl, 0.21 mmol) en tolueno (1.4 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por CCTLC empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 48 mg (98%) de **3.11c** como un sólido blanco. **Pf** 93-95 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 350 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 0.98 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃), 2.61 (dd, 2H, *J* = 16.3, 2.4 Hz, H-4, H-6), 2.82 (m, 4H, *J* = 12.8 Hz, H-4, H-6, CH₂), 3.35 (tt, 1H, *J* = 8.2, 4.1 Hz, H-5), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 7.06 (td, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz, Ar), 7.21 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.2 Hz, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.30 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.5 Hz, Ar), 7.33 (d, 2H, *J* = 1.4 Hz, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.43 (m, 1H, Ar), 14.69 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 12.2 (CH₃), 25.5 (CH₂), 36.0 (C-5), 46.1 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 106.9 (NHC=C), 112.4, 120.7, 124.2, 126.5, 126.7, 127.5, 128.5, 129.7, 143.5, 153.5 (Ar), 178.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.48; H, 6.52; N, 4.00.

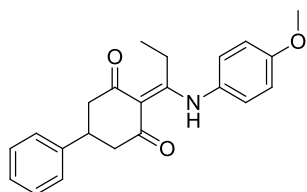
5-Fenil-2-(1-((3-metoxifenil)amino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11d)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (40 mg, 0.16 mmol) y *m*-anisidina (**3.10d**) (27 μl, 0.24 mmol) en tolueno (1.6 ml) mediante calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 55 mg (98%) de **3.11d** como un sólido blanco. **Pf** 104-106 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 350 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 1.06 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃), 2.64 (dd, 2H, *J* = 16.4, 4.1 Hz, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 2.89 (c, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂), 3.35 (m, 1H, H-5), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 6.89 (dd, 1H, *J* = 7.8, 2.0 Hz, Ar),

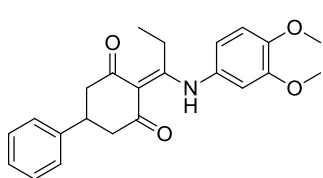
6.92 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz, Ar), 7.01 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.5$ Hz, Ar), 7.24 (ddd, 1H, $J = 8.6, 5.1, 3.3$ Hz, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.41 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 14.99 (s ancho, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 12.7 (CH₃), 23.4 (CH₂), 36.0 (C-5), 46.0 (C-4, C-6), 55.4 (OCH₃), 106.8 (NHC=C), 111.8, 113.9, 118.2, 126.5, 126.7, 128.5, 130.4, 134.0, 143.4, 160.0 (Ar), 177.1 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.45; H, 6.49; N, 4.08.

5-Fenil-2-(1-((4-metoxifenil)amino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11e)



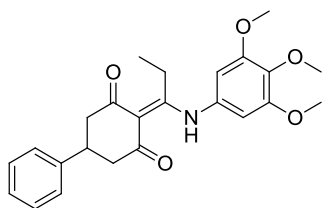
Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (24 mg, 0.10 mmol) y *p*-anisidina (**3.10e**) (18 mg, 0.15 mmol) en tolueno (1.0 ml) mediante calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 30 mg (86%) de **3.11e** como un sólido blanco. **Pf** 122-124 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 350 (M+H)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.03 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃), 2.62 (dd, 2H, $J = 16.5, 4.0$ Hz, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 2.86 (c, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH₂), 3.32 (tt, 1H, $J = 12.1, 4.0$ Hz, H-5), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 7.05 (m, 2H, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.26 (m, 2H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 14.80 (s ancho, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 13.0 (CH₃), 23.7 (CH₂), 36.5 (C-5), 46.5 (C-4, C-6), 55.9 (OCH₃), 107.2 (NHC=C), 115.1, 127.0, 127.2, 127.8, 128.8, 128.9, 143.9, 159.1 (Ar), 178.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.37; H, 6.54; N, 3.96.

5-Fenil-2-(1-((3,4-dimetoxifenil)amino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11f)



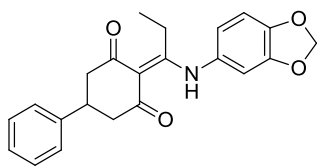
Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (40 mg, 0.16 mmol) y 3,4-dimetoxianilina (**3.10f**) (37 mg, 0.24 mmol) en tolueno (1.6 ml) mediante calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 20 mg (33%) de **3.11f** como un sólido blanco. **Pf** 209-211 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 380 (M+H)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.06 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 2.63 (dd, 2H, $J = 16.5, 4.0$ Hz, H-4, H-6), 2.81 (m, 2H, H-4, H-6), 2.88 (c, 2H, $J = 7.5$, CH₂), 3.39 (m, 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 6.85 (dd, 1H, $J = 8.5, 2.4$ Hz, Ar), 6.94 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, Ar), 7.04 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, Ar), 7.23 (dd, 1H, $J = 8.7, 5.2, 3.4$ Hz, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 14.82 (s ancho, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 13.2 (CH₃), 23.9 (CH₂), 36.5 (C-5), 46.5 (C-4, C-6), 56.1 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 107.2 (NHC=C), 110.2, 110.6, 112.2, 118.5, 127.0, 127.2, 128.9, 143.9, 148.8, 149.5 (Ar), 178.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₃H₂₅NO₄: C, 72.80; H, 6.64; N, 3.69. Encontrado: C, 72.77; H, 6.59; N, 3.76.

5-Fenil-2-(1-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11g)



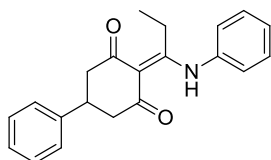
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (40 mg, 0.16 mmol) y 3,4,5-trimetoxianilina (**3.10g**) (44 mg, 0.24 mmol) en tolueno (1.6 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 20 mg (31%) de **3.11g** como un sólido blanco. **Pf** 160-162 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 410 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 1.10 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃), 2.63 (dd, 2H, J = 16.4, 4.1 Hz, H-4, H-6), 2.83 (m, 2H, H-4, H-6), 2.91 (c, 2H, J = 6.8, CH₂), 3.35 (m, 1H, H-5), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 6H, OCH₃), 6.67 (m, 2H, Ar), 7.24 (ddd, 1 H, J = 8.3, 5.3, 3.3 Hz, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 14.90 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 11.8 (CH₃), 22.5 (CH₂), 38.1 (C-5), 44.8 (C-4, C-6), 55.0 (OCH₃), 59.0 (OCH₃), 105.6 (NHC=C), 102.8, 125.4, 125.6, 127.3, 130.3, 135.7, 142.2, 152.1 (Ar), 173.3 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₄H₂₇NO₅: C, 70.40; H, 6.65; N, 3.42. Encontrado: C, 70.70; H, 6.68; N, 3.62.

2-(1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ilamino)propiliden)-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.11h)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (40 mg, 0.16 mmol) y 3,4-metilendioxianilina (**3.10h**) (33 mg, 0.24 mmol) en tolueno (1.6 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 58 mg (99%) de **3.11h** como un sólido blanco. **Pf** 131-133 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 364 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 1.03 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃), 2.62 (dd, 2H, J = 16.6, 3.8 Hz, H-4, H-6), 2.81 (m, 2H, H-4, H-6), 2.87 (c, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂), 3.33 (tt, 1H, J = 8.1, 4.1 Hz, H-5), 6.11 (s, 2H, CH₂), 6.79 (dd, 1H, J = 8.3, 2.1 Hz, Ar), 7.01 (m, 2H, Ar), 7.23 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 14.78 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 12.6 (CH₃), 23.3 (CH₂), 36.0 (C-5), 46.0 (C-4, C-6), 101.9 (CH₂), 106.7 (NHC=C), 107.4, 108.4, 119.6, 126.5, 126.7, 128.5, 129.5, 143.4, 147.9, 149.9 (Ar), 177.8 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₁NO₄: C, 72.71; H, 5.82; N, 3.85. Encontrado: C, 73.02; H, 6.01; N, 3.96.

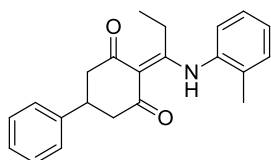
5-Fenil-2-(1-(fenilamino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11i)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), **3.7** (40 mg, 0.16 mmol) reacciona con anilina (**3.10i**) (22 μ l, 0.24 mmol) en tolueno (1.6 ml) mediante calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por CCTLC empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 41 mg (80%) de **3.11i** como un sólido blanco. **Pf** 112-114 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 320 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 1.04 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃), 2.64 (dd, 2H, J = 16.5, 3.8 Hz, H-4, H-6), 2.81 (m, 2H, H-4, H-6), 2.87 (c, 2H, J = 8.0 Hz, CH₂), 3.34 (m, 1H, H-5), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 3H, Ar), 7.34 (m, 3H, Ar), 7.45 (m, 1H, Ar), 7.52 (m, 2H,

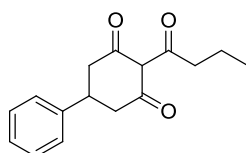
Ar), 15.01 (s ancho, 1H, NH). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 13.0 (CH₃), 23.8 (CH₂), 36.5 (C-5), 46.5 (C-4, C-6), 107.3 (NHC=C), 126.6, 127.0, 127.20, 128.5, 128.9, 130.1, 136.3, 143.9 (Ar), 177.5 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₁NO₂: C, 78.97; H, 6.63; N, 4.31. Encontrado: C, 78.68; H, 6.60; N, 4.21.

5-Fenil-2-(1-(*o*-tolilamino)propiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.11j)



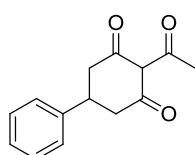
Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.7** (24 mg, 0.10 mmol) y *o*-toluidina (**3.10j**) (16 μ l, 0.15 mmol) en tolueno (1.0 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 25 mg (75%) de **3.11j** como un sólido blanco. **Pf** 132-134 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 334 (M+H)⁺. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 0.98 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.63 (dd, 2H, $J = 16.6, 4.0$ Hz, H-4, H-6), 2.80 (c, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂), 2.86 (m, 2H, H-4, H-6), 3.36 (tt, 1H, $J = 12.3, 4.0$ Hz, H-5), 7.24 (ddd, 1H, $J = 8.6, 5.7, 2.5$ Hz, Ar), 7.28 (dd, 1H, $J = 7.2, 2.1$ Hz, Ar), 7.31-7.38 (m, 6H, Ar), 7.41 (dd, 1H, $J = 7.0, 2.1$ Hz, Ar), 14.88 (s ancho, 1H, NH). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 12.7 (CH₃), 17.9 (CH₃), 23.8 (CH₂), 36.5 (C-5), 46.5 (C-4, C-6), 107.3 (NHC=C), 127.0, 127.2, 127.3, 127.4, 128.9, 129.0, 131.4, 134.1, 135.0, 143.9 (Ar), 178.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₂: C, 79.25; H, 6.95; N, 4.20. Encontrado: C, 79.40; H, 6.15; N, 4.01.

2-Butiril-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.12a)



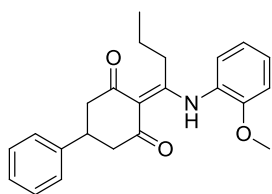
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar 5-fenilciclohexano-1,3-diona (**3.7**) (500 mg, 2.66 mmol), cloruro de butanoilo (550 μ l, 5.31 mmol), K₂CO₃ (809 mg, 5.85 mmol), 1,2,4-triazol (73 mg, 1.06 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (429 mg, 1.33 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 ml), obteniéndose 200 mg (29%) de **3.12a** como un sólido blanco. **Pf** 68-70 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 259 (M+H)⁺. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 0.92 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃), 1.58 (m, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₂), 2.70 (m, 2H, H-4, H-6), 2.92 (m, 2H, H-4, H-6), 2.97 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₂), 3.46 (tt, 1H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 4H, Ar).

2-Acetil-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.12b)



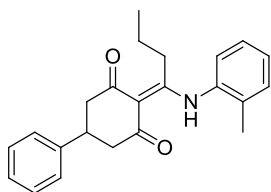
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar 5-fenilciclohexano-1,3-diona (**3.7**) (500 mg, 2.66 mmol), cloruro de acetilo (378 μ l, 5.31 mmol), K₂CO₃ (809 mg, 5.85 mmol), 1,2,4-triazol (73 mg, 1.06 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (429 mg, 1.33 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 ml), obteniéndose 350 mg (54%) de **3.12b** como un sólido blanco. **Pf** 100-102 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 231 (M+H)⁺. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.69 (m, 2H, H-4, H-6), 2.94 (m, 2H, H-4, H-6), 3.41 (tt, 1H, $J = 8.6, 4.2$ Hz, H-5), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.34 (m, 4H, Ar).

5-Fenil-2-(1-((2-metoxifenil)amino)butiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.13a)



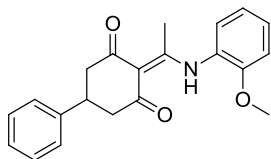
Una disolución de **3.12a** (60 mg, 0.23 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (52 μ l, 0.46 mmol) en tolueno (2.5 ml) se calienta durante dos días a reflujo en un matraz acoplado a un embudo Dean-Stark. El disolvente se evapora y el crudo se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 70 mg (84%) de **3.13a** como un sólido amarillo. **Pf** 108-110 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 364 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 0.92 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH₃), 1.58 (m, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂), 2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.80 (m, 2H, H-4, H-6), 2.95 (t, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂), 3.34 (m, 1H, H-5), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 7.05 (td, 1H, J = 7.6, 1.2 Hz, Ar), 7.21 (dd, 1H, J = 8.4, 1.2 Hz, Ar), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.28 (dd, 1H, J = 7.7, 1.6 Hz, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.42 (m, 1H, Ar), 14.73 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 14.1 (CH₃), 21.3 (CH₂), 31.9 (CH₂), 36.0 (C-5), 46.0, 46.5 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 107.2 (NHC=C), 112.3, 120.7, 124.4, 126.5, 126.5, 127.5, 128.5, 129.6, 143.4, 153.5 (Ar), 176.4 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₃H₂₅NO₃: C, 76.01; H, 6.93; N, 3.85. Encontrado: C, 75.93; H, 6.68; N, 4.10.

5-Fenil-2-(1-(*o*-tolilamino)butiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.13b)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12a** (30 mg, 0.12 mmol) y *o*-toluidina (**3.10j**) (18 μ l, 0.17 mmol) en tolueno (1.2 ml) mediante calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por CCTLC empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 42 mg (99%) de **3.13b** como un sólido blanco. **Pf** 98-100 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 348 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 0.74 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃), 1.40 (m, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.63 (dd, 2H, J = 16.7, 3.7 Hz, H-4, H-6), 2.75 (t, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂), 2.85 (m, 2H, H-4, H-6), 3.35 (tt, 1H, J = 12.2, 4.0 Hz, H-5), 7.24 (ddd, 1H, J = 8.6, 5.7, 2.7 Hz, Ar), 7.27 (dd, 1H, J = 7.2, 2.1 Hz, Ar), 7.32 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 1H, Ar), 7.41 (m, 1H, Ar), 14.91 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 14.2 (CH₃), 17.5 (CH₃), 21.3 (CH₂), 31.8 (CH₂), 36.0 (C-5), 46.0 (C-4, C-6), 107.0 (NHC=C), 126.5, 126.7, 126.8, 126.9, 128.3, 128.5, 131.0, 133.6, 135.0, 143.5 (Ar), 176.1 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₃H₂₅NO₂: C, 79.51; H, 7.25; N, 4.03. Encontrado: C, 79.27; H, 6.98; N, 4.11.

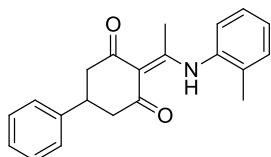
5-Fenil-2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.13c)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (30 μ l, 0.26 mmol) en tolueno (1.7 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC empleando hexano/acetato de etilo (5:1) como eluyente, obteniéndose 49 mg (86%) de **3.13c** como un sólido blanco. **Pf** 139-141 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 336 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 3.36 (tt, 1H, J = 12.2, 4.1 Hz, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 7.04

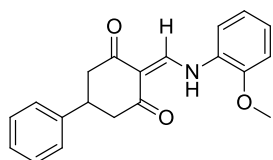
(td, 1H, $J = 7.6, 1.2$ Hz, Ar), 7.20 (dd, 1H, $J = 8.5, 1.2$ Hz, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.32 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.6$ Hz, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.39 (m, 1H, Ar), 14.78 (s ancho, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 19.7 (CH₃), 36.1 (C-5), 46.4 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.3, 120.6, 124.5, 126.5, 126.7, 128.9, 128.5, 129.2, 143.5, 153.1 (Ar), 172.4 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₁NO₃: C, 75.20; H, 6.31; N, 4.31. Encontrado: C, 74.98; H, 6.32; N, 4.20.

5-Fenil-2-(1-(α -tolilamino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.13d)



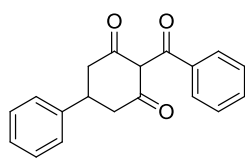
Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12b** (30 mg, 0.13 mmol) y α -toluidina (**3.10j**) (22 μl , 0.20 mmol) en tolueno (1.3 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC empleando hexano/acetato de etilo (5:1) como eluyente, obteniéndose 25 mg (60%) de **3.13d** como un sólido blanco. **Pf** 128-130 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 320 (M+H)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.63 (dd, 2H, 1H, $J = 16.4, 3.7$ Hz, H-4, H-6), 2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 3.36 (tt, 1H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5), 7.23-7.40 (m, 9H, Ar), 14.91 (s ancho, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 17.4 (CH₃), 19.6 (CH₃), 36.1 (C-5), 45.8 (C-4, C-6), 108.2 (NHC=C), 126.5, 126.7, 126.9, 128.1, 128.49, 131.0, 133.3, 135.1, 143.5, 159.9 (Ar), 172.7 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₁NO₂: C, 78.97; H, 6.63; N, 4.39. Encontrado: C, 78.69; H, 6.54; N, 4.27.

5-Fenil-2-(((2-metoxifenil)amino)metilén)ciclohexano-1,3-diona (3.13e)



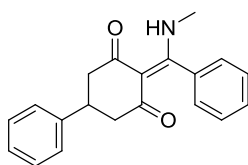
Una disolución de 5-fenil-1,3-ciclohexanodiona (**3.7**) (150 mg, 0.80 mmol) en etanol (1 ml) se calienta a 80 °C durante 15 min. A continuación se añade ortoformiato de trietilo (145 μl , 0.88 mmol) y α -anisidina (**3.10c**) (91 μl , 0.80 mmol) y se calienta a reflujo durante 2 horas. El residuo se filtra, se lava con agua y se extrae con dietiléter. La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 130 mg (50%) de **3.13e** como un sólido amarillo. **Pf** 210-212 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 322 (M+H)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.65 (m, 2H, H-4, H-6), 2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 3.41 (tt, 1H, $J = 11.5, 3.9$ Hz, H-5), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, Ar), 7.18 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, Ar), 7.25 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 4H, Ar), 7.70 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, Ar), 8.62 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz, CH), 13.04 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 36.1 (C-5), 44.9, 46.1 (C-4, C-6), 56.7 (OCH₃), 109.8 (NHC=C), 112.5, 116.6, 121.9, 124.9, 127.0, 127.2, 127.5, 129.0, 149.4 (Ar), 143.9 (NHC=C), 194.9, 199.0 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₀H₁₉NO₃: C, 74.75; H, 5.96; N, 4.36. Encontrado: C, 74.70; H, 5.99; N, 4.28.

2-Benzoil-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.14)



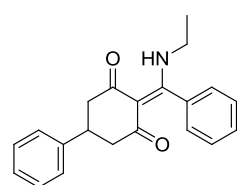
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar 5-fenil-1,3-ciclohexanediona (**3.7**) (200 mg, 1.06 mmol), cloruro de benzoilo (246 μ l, 2.12 mmol), K_2CO_3 anhidro (322 mg, 2.33 mmol), 1,2,4-triazol (29 mg, 0.42 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (171 mg, 0.53 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 ml), obteniéndose 115 mg (37%) de **3.14** como un sólido blanco. Pf 143-145 °C (lit¹³ 142-142.5 °C). EM (ES, modo positivo): m/z 293 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz). δ (forma enólica): 2.59 (m, 2H, H-4, H-6), 2.86 (m, 2H, H-4, H-6), 3.53 (m, 1H, H-5), 7.26 (m, 1H, Ar), 7.38 (m, 4H, Ar), 7.47 (m, 2H, Ar), 7.58 (m, 1H, Ar), 7.79 (m, 2H, Ar), 12.04 (s ancho, 1H, OH).

5-Fenil-2-((fenil)(metilamino)metilen)ciclohexano-1,3-diona (3.15a)



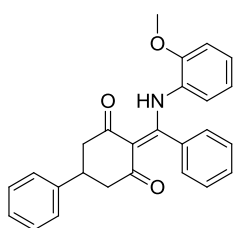
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.14** (40 mg, 0.14 mmol) en tolueno (1.4 ml) y metilamina 2M en metanol (100 μ l, 0.20 mmol). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 43 mg (99%) de **3.15a** como un sólido blanco. Pf 176-178 °C. EM (ES, modo positivo): m/z 306 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 2.46 (m, 2H, H-4, H-6), 2.66 (m, 2H, H-4, H-6), 2.70 (d, 3H, $J = 5.2$ Hz, CH₃), 3.34 (tt, 1H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5), 7.16 (m, 1H, Ar), 7.17 (m, 1H, Ar), 7.22 (m, 1H, Ar), 7.31 (m, 2H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.43 (m, 3H, Ar), 12.90 (m, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 31.1 (CH₃), 36.4 (C-5), 45.6 (C-4, C-6), 107.6 (NHC=C), 126.2, 126.42, 126.8, 128.3, 128.4, 128.4, 134.6, 143.7 (Ar), 172.3 (NHC=C). Análisis elemental (%) calculado para C₂₀H₁₉NO₂: C, 78.66; H, 6.27; N, 4.59. Encontrado: C, 78.37; H, 6.09; N, 4.43.

2-((Etilamino)(fenil)metilen)-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.15b)



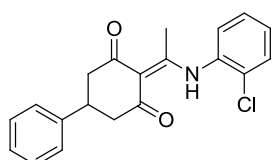
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.14** (29 mg, 0.10 mmol) en tolueno (1.0 ml) y etilamina 2M en metanol (75 μ l, 0.15 mmol). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 31 mg (97%) de un aceite que se caracteriza como **3.15b**. EM (ES, modo positivo): m/z 320 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 1.03 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 2.45 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68 (m, 2H, H-4, H-6), 3.02 (m, 2H, CH₂), 3.34 (m, 1H, H-5), 7.15 (m, 1H, Ar), 7.17 (m, 1H, Ar), 7.20 (m, 1H, Ar), 7.29 (m, 2H, Ar), 7.30 (m, 2H, Ar), 7.40 (m, 2H, Ar), 7.42 (m, 1H, Ar), 13.06 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 15.5 (CH₃), 36.8 (CH₂), 36.8 (C-5), 46.1 (C-4, C-6), 107.8 (NHC=C), 124.9, 126.6, 126.9, 127.2, 128.6, 128.9, 134.9, 144.1 (Ar), 171.7 (NHC=C). Análisis elemental (%) calculado para C₂₁H₂₁NO₂: C, 78.97; H, 6.63; N, 4.39. Encontrado: C, 78.68; H, 6.49; N, 4.21.

5-Fenil-2-(((fenil)(2-metoxifenil)amino)metileno)ciclohexano-1,3-diona (3.15c)



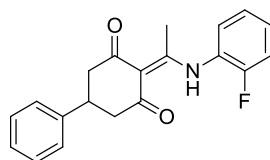
Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.14** (20 mg, 0.07 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (11 μ l, 0.10 mmol) en tolueno (1.0 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 17 mg (61%) de **3.15c** como un sólido amarillo. Pf 152-154 °C. EM (ES, modo positivo): m/z 398 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 2.60 (m, 2H, H-4, H-6), 2.81 (m, 2H, H-4, H-6), 3.46 (tt, 1H, $J = 12.1, 4.1$ Hz, H-5), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.52 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, Ar), 6.62 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, Ar), 6.99 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.10 (m, 2H, Ar), 7.25 (m, 5H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 14.32 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 36.1 (C-5), 45.7 (C-4, C-6), 55.82 (OCH₃), 108.9 (NHC=C), 111.8, 119.9, 125.6, 126.17, 126.6, 126.9, 127.6, 127.8, 128.0, 128.6, 128.8, 134.2, 143.5, 152.7 (Ar), 169.1 (NHC=C). Análisis elemental (%) calculado para C₂₆H₂₃NO₃: C, 78.57; H, 5.83; N, 3.52. Encontrado: C, 78.83; H, 5.74; N, 3.37.

2-(1-((2-Clorofenil)amino)etilideno)-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.17a)



Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12b** (35 mg, 0.15 mmol) y 2-cloroanilina (**3.16a**) (29 mg, 0.23 mmol) en tolueno (1.5 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo de reacción se purifica por CCTLC en hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 30 mg (59%) de **3.17a** como un sólido blanco. Pf 125-127 °C. EM (ES, modo positivo): m/z 340 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.41-2.67 (m, 2H, H-4, H-6), 2.86 (m, 2H, H-4, H-6), 3.38 (m, 1H, H-5), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 7.46 (m, 2H, Ar), 7.54 (m, 1H, Ar), 7.68 (m, 1H, Ar), 15.07 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 20.1 (CH₃), 36.3 (C-5), 46.9 (C-4, C-6), 109.0 (NHC=C), 127.0, 127.2, 128.7, 129.0, 129.1, 129.7, 130.0, 130.6, 134.2, 143.8 (Ar), 173.0 (NHC=C). Análisis elemental (%) calculado para C₂₀H₁₈ClNO₂: C, 70.69; H, 5.34; N, 4.12. Encontrado: C, 70.94; H, 5.34; N, 4.20.

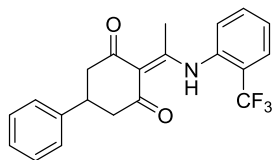
5-Fenil-2-(1-((2-fluorofenil)amino)etilideno)ciclohexano-1,3-diona (3.17b)



Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y 2-fluoroanilina (**3.16b**) (25 μ l, 0.26 mmol) en tolueno (1.7 ml) por calentamiento en microondas. El residuo de reacción se purifica por CCTLC empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose 45 mg (78%) de **3.17b** como un sólido blanco. Pf 146-147 °C. EM (ES, modo positivo): m/z 324 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.63 (m, 2H, H-4, H-6), 2.89 (m, 2H, H-4, H-6), 3.36 (tt, 1H, $J = 12.1, 4.0$ Hz, H-5), 7.23 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 3H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.44 (m, 1H, Ar), 7.47 (m, 1H, Ar), 7.51 (td, 1H, $J = 7.9, 1.3$ Hz, Ar), 14.90 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 19.6 (CH₃), 35.9 (C-5), 45.3 (C-4, C-6), 108.8 (NHC=C), 116.4, 125.2, 126.5, 126.7, 128.2, 128.5, 129.8, 143.4, 154.9, 156.9 (Ar), 172.8

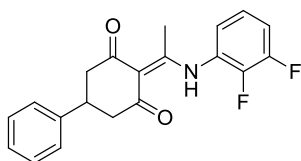
(NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{20}H_{18}FNO_2$: C, 74.29; H, 5.61; N, 4.33. Encontrado: C, 73.99; H, 5.34; N, 4.29.

5-Fenil-2-(1-((2-(trifluorometil)fenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.17c)



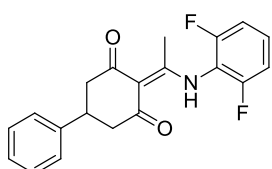
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) reacciona con 2-trifluorometilánilina (**3.16c**) (33 μ l, 0.26 mmol) en tolueno (1.7 ml) por calentamiento en un reactor de microondas. El residuo se purifica por CCTLC empleando hexano/acetato de etilo (4:1) como eluyente, obteniéndose 19 mg (30%) de **3.17c** como un sólido blanco. **Pf** 167-169 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 374 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.62 (m, 2H, H-4, H-6), 2.87 (m, 2H, H-4, H-6), 3.36 (m, 1H, H-5), 7.24 (ddd, 1H, $J = 8.6, 6.1, 2.2$ Hz, Ar), 7.44 (m, 4H, Ar), 7.65 (m, 2H, Ar), 7.82 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, Ar), 7.90 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, Ar), 15.28 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 19.9 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.0 (C-4, C-6), 108.6 (NHC=C), 126.6 (c, $J = 217.1$ Hz, CF₃), 124.3 (d, $J = 38.3$ Hz), 124.8, 126.7, 126.9 (d, $J = 4.9$ Hz), 128.5, 128.8, 129.6, 133.0, 134.2, 143.4 (Ar), 173.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{21}H_{18}F_3NO_2$: C, 67.55; H, 4.86; N, 3.75. Encontrado: C, 67.63; H, 4.74; N, 3.82.

5-Fenil-2-(1-((2,3-difluorofenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.17d)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar en el microondas **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y 2,3-difluoroanilina (**3.16d**) (26 μ l, 0.26 mmol) en tolueno (1.7 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 24 mg (41%) de **3.17d** como un sólido blanco. **Pf** 131-133 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 342 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.62 (m, 2H, H-4, H-6), 2.85 (m, 2H, H-4, H-6), 3.37 (tt, 1H, $J = 12.1, 3.9$ Hz, H-5), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.34 (m, 6H, Ar), 7.51 (m, 1H, Ar), 14.93 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 19.7 (CH₃), 35.8 (C-5), 45.4 (C-4, C-6), 109.0 (NHC=C), 116.8, 117.0, 123.7, 124.9, 126.5, 126.7, 128.5, 143.3, 149.1, 151.0 (Ar), 172.8 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{20}H_{17}F_2NO_2$: C, 70.37; H, 5.02; N, 4.10. Encontrado: C, 70.41; H, 5.00; N, 3.98.

5-Fenil-2-(1-((2,6-difluorofenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.17e)

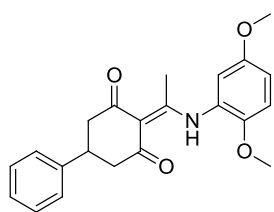


Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar en el microondas **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y 2,6-difluoroanilina (**3.16d**) (26 μ l, 0.26 mmol) en tolueno (1.7 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 20 mg (37%) de **3.17e** como un sólido blanco. **Pf** 135-137 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 342 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.37 (s, 3H, CH₃), 2.60 (m, 2H, H-4, H-6), 2.83 (m, 2H, H-4, H-6), 3.38 (tt, 1H, $J = 12.5, 4.2$ Hz, H-5), 7.24 (m, 1H, $J = 4.2$ Hz, Ar), 7.34 (m, 6H, Ar), 7.54 (m, 1H, Ar), 14.61 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 19.4 (CH₃), 35.8 (C-5), 46.4 (C-4, C-6), 109.1 (NHC=C),

112.4, 113.8, 124.5, 126.7, 126.9, 128.5, 130.2, 143.3, 156.0, 157.9 (Ar), 173.5 (NHC=C).

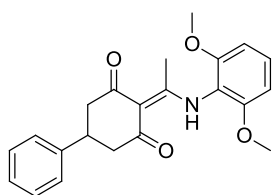
Análisis elemental (%) calculado para $C_{20}H_{17}F_2NO_2$: C, 70.37; H, 5.02; N, 4.10. Encontrado: C, 70.53; H, 4.99; N, 4.06.

5-Fenil-2-(1-((2,5-dimetoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.17f)



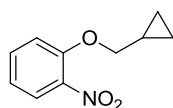
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y 2,5-dimetoxianilina (**3.16f**) (40 mg, 0.26 mmol) en tolueno (1.7 ml) por calentamiento en microondas. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 30 mg (48%) de **3.17f** como un sólido blanco. **Pf** 183-185 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 366 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.60 (m, 2H, H-4, H-6), 2.78 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (m, 1H, H-5), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 6.95 (m, 2H, Ar), 7.12 (m, 1H, Ar), 7.23 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 14.76 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 19.7 (CH₃), 36.1 (C-5), 46.6 (C-4, C-6), 55.7 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.9, 113.1, 113.9, 125.0, 126.5, 126.7, 128.5, 143.5, 147.2, 153.0 (Ar), 172.6 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{22}H_{23}NO_4$: C, 72.31; H, 6.34; N, 3.83. Encontrado: C, 72.20; H, 6.28; N, 3.54.

5-Fenil-2-(1-((2,6-dimetoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.17g)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar en microondas **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y 2,6-dimetoxianilina (**3.16g**) (100 mg, 0.65 mmol) en tolueno (1.7 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 36 mg (58%) de **3.17g** como un sólido blanco. **Pf** 159-160 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 366 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.57 (m, 2H, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 3.35 (m, 1H, H-5), 3.81 (s, 6H, OCH₃), 6.82 (m, 2H, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.37 (t, 1H, J = 8.5 Hz, Ar), 14.39 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 19.4 (CH₃), 36.1 (C-5), 46.6 (C-4, C-6), 56.0 (OCH₃), 108.1 (NHC=C), 104.6, 112.8, 126.5, 126.7, 128.5, 129.6, 143.6, 154.5 (Ar), 174.0 (NHC=C), 196.9 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{22}H_{23}NO_4$: C, 72.31; H, 6.34; N, 3.83. Encontrado: C, 72.60; H, 6.61; N, 3.92.

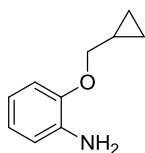
1-(Ciclopropilmetoxi)-2-nitrobenzoceno (3.20)



A una disolución de 2-nitrofenol (**3.18**) (500 mg, 3.59 mmol) en 20 ml de acetonitrilo se añade bromometilciclopropano (**3.19**) (418 μ l, 4.31 mmol) y K_2CO_3 (596 mg, 4.31 mmol), y se calienta a 85 °C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se añade agua (10 ml) y se extrae con acetato de etilo (3 x 15 ml). La fase orgánica resultante se lava con 15 ml de salmuera, se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra. Se obtienen así 620 mg (89%) de **3.20** como un aceite amarillo, con pureza suficiente para el siguiente paso de reacción. **EM** (ES, modo positivo): m/z 194 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 0.34 (m, 2H, H-2', H-3'), 0.56 (m, 2H, H-2', H-3'), 1.22 (m, 1H, H-1'), 4.02 (d, 2H, J

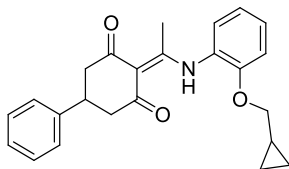
= 6.9 Hz, OCH₂), 7.09 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, Ar), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, Ar), 7.61 (m, 1H, Ar), 7.83 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz, Ar).

2-(Ciclopropilmetoxi)anilina (3.21a)



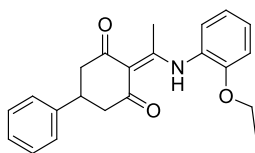
Una disolución de **3.20** (600 mg, 3.11 mmol) en 8 ml de etanol con Pd(C) al 10% (200 mg) se somete a hidrogenación a presión atmosférica y a temperatura ambiente (12 horas). Tras filtrar la disolución y evaporar el disolvente, se obtienen 380 mg (75%) de **3.21a** como un aceite rosáceo, con pureza suficiente para el siguiente paso sintético. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 164 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 0.32 (m, 2H, H-2', H-3'), 0.55 (m, 2H, H-2', H-3'), 1.23 (m, 1H, H-1'), 3.77 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, OCH₂), 4.61 (s, 2H, NH₂), 6.48 (m, 1H, Ar), 6.65 (m, 2H, Ar), 6.75 (m, 1H, Ar).

2-(1-((2-(Ciclopropilmetoxi)fenil)amino)etiliden)-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.22a)



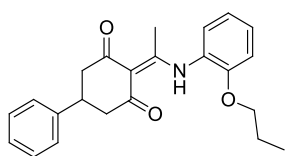
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.12b** (50 mg, 0.22 mmol) con **3.21a** (54 mg, 0.33 mmol) en tolueno (2.2 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 45 mg (57%) de **3.22a** como un sólido rosáceo. **Pf** 76-78 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 376 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 0.32 (m, 2H, H-2', H-3'), 0.53 (m, 2H, H-2', H-3'), 1.20 (m, 1H, H-1'), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.65 (m, 2H, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 3.38 (m, 1H, H-5), 3.94 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, OCH₂), 7.03 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, Ar), 7.19 (m, 1H, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.30 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 3H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 14.80 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 3.0 (C-2', C-3'), 9.9 (C-1'), 19.9 (CH₃), 36.1 (C-5), 45.9 (C-6, C-4), 72.8 (OCH₂), 108.5 (NHC=C), 113.8, 120.7, 125.0, 126.5, 126.8, 126.8, 128.5, 129.1, 143.5, 152.4 (Ar), 172.4 (NHC=C), 206.5 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₄H₂₅NO₃: C, 76.77; H, 6.71; N, 3.73. Encontrado: C, 76.48; H, 6.50; N, 3.72.

2-(1-((2-Etoxfenil)amino)etiliden)-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.22b)



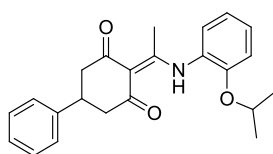
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.12b** (62 mg, 0.27 mmol) con *o*-fenetidina (**3.21b**) (53 μl, 0.41 mmol) en tolueno (2.7 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 69 mg (76%) de **3.22b** como un sólido blanco. **Pf** 125-127 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 350 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.30 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃CH₂O), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 3.35 (m, 1H, H-5), 4.11 (c, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₃CH₂O), 7.02 (td, 1H, *J* = 7.6, 1.3 Hz, Ar), 7.18 (m, 1H, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 6H, Ar), 14.81 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 14.5 (CH₃CH₂O), 19.7 (CH₃), 36.1 (C-5), 45.9 (C-6, C-4), 64.0 (CH₃CH₂O), 108.5 (NHC=C), 113.37, 120.6, 124.8, 126.5, 126.7, 126.9, 128.5, 129.1, 143.5, 152.2 (Ar), 172.3 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.47; H, 6.61; N, 3.89.

5-Fenil-2-(1-((2-propoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.22c)



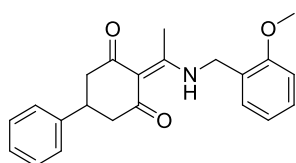
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.12b** (62 mg, 0.27 mmol) y 2-propoxianilina (**3.21c**) (61 mg, 0.41 mmol) en tolueno (2.7 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 64 mg (65%) de **3.22c** como un sólido blanco. **Pf** 120-122 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 364 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 1.01 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₃CH₂CH₂O), 1.81 (m, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₃CH₂CH₂O), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.73 (m, 2H, H-4, H-6), 2.83 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (tt, 1H, $J = 11.8, 4.7$ Hz, H-5), 3.97 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH₃CH₂CH₂O), 6.98 (m, 2H, Ar), 7.12 (ddd, 1H, $J = 8.4, 6.8, 1.4$ Hz, Ar), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.27 (m, 2H, Ar), 7.30 (m, 1H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 14.67 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75 MHz) δ : 10.6 (CH₃CH₂CH₂O), 20.6 (CH₃), 22.6 (CH₃CH₂CH₂O), 37.1 (C-5), 45.9, 47.3 (C-6, C-4), 70.3 (CH₃CH₂CH₂O), 109.2 (NHC=C), 112.8, 120.6, 125.7, 126.8, 127.1, 128.9, 129.2, 143.3, 153.4, 165.2 (Ar), 174.0 (NHC=C), 196.5, 199.1 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₃H₂₅NO₃: C, 76.01; H, 6.93; N, 3.85. Encontrado: C, 76.28; H, 6.78; N, 4.04.

5-Fenil-2-(1-((2-isopropoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.22d)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.12b** (51 mg, 0.22 mmol) y 2-isopropoxianilina (**3.21d**) (50 mg, 0.33 mmol) en tolueno (2.2 ml). El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 52 mg (66%) de **3.22d** como un sólido blanco. **Pf** 89-91 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 364 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 1.26 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz, OCH(CH₃)₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 3.34 (m, 1H, H-5), 4.66 (sept, 1H, $J = 6.0$ Hz, OCH(CH₃)₂), 7.01 (td, 1H, $J = 7.7, 1.1$ Hz, Ar), 7.21 (m, 1H, Ar), 7.23 (m, 1H, Ar), 7.31 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 5H, Ar), 14.82 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 20.0 (CH₃), 21.8 (OCH(CH₃)₂), 36.1 (C-5), 45.9 (C-6, C-4), 71.0 (OCH(CH₃)₂), 108.5 (NHC=C), 115.1, 120.6, 125.8, 126.5, 126.8, 126.8, 128.5, 128.9, 143.6, 151.3, (Ar), 172.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₃H₂₅NO₃: C, 76.01; H, 6.93; N, 3.85. Encontrado: C, 76.30; H, 7.02; N, 4.00.

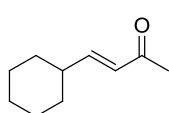
5-Fenil-2-(1-((2-metoxibencil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.24)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y 2-metoxibencilamina (**3.23**) (34 μ l, 0.26 mmol) en tolueno (1.7 ml) por calentamiento a 80 °C durante 5 horas. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 59 mg (99%) de **3.24** como un sólido blanco. **Pf** 98-100 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 350 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 2.53 (m, 2H, H-4, H-6), 2.57 (s, 3H, CH₃), 2.69 (m, 2H, H-4, H-6), 3.25 (tt, 1H, $J = 12.1, 3.9$ Hz, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 4.63 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz, CH₂), 6.97 (td, 1H, $J = 7.4, 1.1$ Hz, Ar), 7.07 (dd, 1H, $J = 8.2, 1.0$ Hz, Ar), 7.21 (m, 1H,

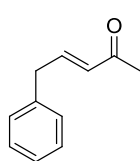
Ar), 7.28 (m, 2H, Ar) 7.29 (m, 2H, Ar), 7.31 (m, 1H, Ar), 7.34 (m, 1H, Ar), 13.45 (s ancho, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 17.4 (CH₃), 36.3 (C-5), 42.4 (CH₂), 45.8 (C-6, C-4), 55.5 (OCH₃), 107.7 (NHC=C), 111.2, 120.5, 124.0, 126.4, 126.7, 129.1, 129.6, 143.7, 143.7, 157.1 (Ar), 172.8 (NHC=C), 196.1 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.91; H, 6.56; N, 3.88.

(E)-4-Ciclohexilbut-3-en-2-ona (3.26a)



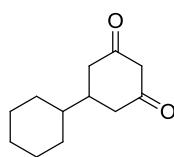
Seguendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), la mezcla de reacción con ciclohexanocarbaldehído (3.25a) (1.21 ml, 10 mmol) y NaOH al 1% (5 ml) en acetona/agua (4 ml/5 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 984 mg (65%) de 3.26a como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 153 (M+H)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.11-1.27 (m, 5H, H-2', H-3' H-4', H-5', H-6'), 1.69-1.70 (m, 5H, H-2', H-3' H-4', H-5', H-6'), 2.12 (m, 1H, H-1'), 2.18 (s, 3H, CH₃), 5.96 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H-3), 6.78 (dd, 1H, $J = 16.1, 6.7$ Hz, H-4). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁴

(E)-5-Fenilpent-3-en-2-ona (3.26b)



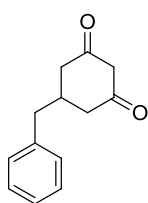
Una disolución de fenilacetaldehído (3.25b) (1.17 ml, 10 mmol) y 1-(trifenilfosforaniliden)-2-propanona (2.87 g, 9 mmol) en cloroformo (50 ml) se calienta a 60 °C durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se evapora y el residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 1.11 g (77%) de 3.26b como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 161 (M+H)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.19 (s, 3H, CH₃), 3.55 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 6.02 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H-3), 6.98 (dt, 1H, $J = 15.9, 6.9$ Hz, H-4), 7.22-7.42 (m, 5H, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁵

[1,1'-Bi(ciclohexano)]-3,5-diona (3.27a)



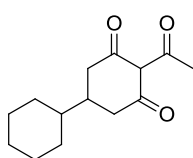
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.04 ml, 6.86 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (1.9 ml, 6.86 mmol) se añade 3.26a (950 mg, 6.24 mmol) en etanol (2.2 ml), dando lugar a 840 mg (69%) de 3.27a como un sólido marrón. **Pf** 158-160 °C (lit¹⁶ 162 °C). **EM** (ES, modo positivo): m/z 195 (M+H)⁺. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 0.94-1.2 (m, 6H, H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 1.62-1.77 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 1.80 (m, 1H, H-5), 2.02 (m, 2H, H-4, H-6), 2.25 (dd, 2H, $J = 16.7, 4.7$ Hz, H-4, H-6), 5.18 (s, 1H, H-2).

5-Bencilciclohexano-1,3-diona (3.27b)



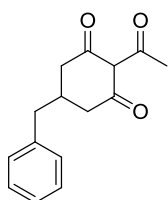
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.04 ml, 6.86 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (1.9 ml, 6.86 mmol) se añade **3.26b** (1.0 g, 6.25 mmol) en etanol (2.2 ml). Se obtienen así 420 mg (33%) de **3.27b** como un sólido marrón. **Pf** 118-120 °C (lit¹⁷ 117 °C). **EM** (ES, modo positivo): m/z 203 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.13 (m, 4H, H-4, H-6), 2.24 (m, 1H, H-5), 2.63 (d, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂), 5.18 (s, 1H, H-2), 7.17-7.33 (m, 5H, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁸

4-Acetil-[1,1'-bi(ciclohexano)]-3,5-diona (3.28a)



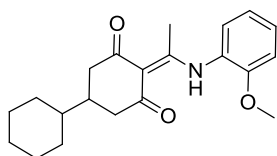
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.27a** (300 mg, 1.54 mmol), cloruro de acetilo (220 μ l, 3.09 mmol), K₂CO₃ (469 mg, 3.39 mmol), 1,2,4-triazol (43 mg, 0.62 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (248 mg, 0.77 mmol) en DMF anhidra (4 ml), obteniéndose 134 mg (36%) de **3.28a** como un sólido amarillo. **Pf** 52-54 °C. **EM** (ES, modo positivo): 237 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 1.12 (m, 8H, H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-4, H-6), 1.70 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-4, H-5, H-6), 2.51 (s, 3H, CH₃).

2-Acetil-5-bencilciclohexano-1,3-diona (3.28b)



Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.27b** (100 mg, 0.49 mmol), cloruro de acetilo (70 μ l, 0.98 mmol), K₂CO₃ (150 mg, 1.08 mmol), 1,2,4-triazol (14 mg, 0.20 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (80 mg, 0.25 mmol) en DMF anhidra (4 ml), obteniéndose 46 mg (38%) de **3.28b** como un aceite marrón. **EM** (ES, modo positivo): 245 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.34 (m, 5H, H-4, H-5, H-6), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.64 (d, 2H, J =5.5 Hz, CH₂), 7.11-7.33 (m, 5H, Ar).

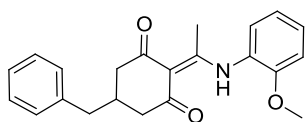
4-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-[1,1'-bi(ciclohexano)]-3,5-diona (3.29a)



Seguendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.28a** (100 mg, 0.42 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (72 μ l, 0.63 mmol) en tolueno (4.2 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 128 mg (89%) de **3.29a** como un sólido blanco. **Pf** 131-133 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 342 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.93-1.20 (m, 6H, H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 1.60-1.77 (m, 6H, H-5, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 2.30 (m, 2H, H-4, H-6), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.43 (m, 2H, H-4, H-6), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 7.03 (t, 1H, J = 7.7 Hz, Ar), 7.18 (d, 1H, J = 8.1 Hz, Ar), 7.29 (d, 1H, J = 7.5 Hz, Ar), 7.37 (t, 1H, J = 7.8 Hz, Ar), 14.74 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 19.5 (CH₃), 25.9 (C-3', C-5'), 26.1 (C-4'), 29.2 (C-2', C-6'), 36.9 (C-5), 40.8 (C'-1), 42.2

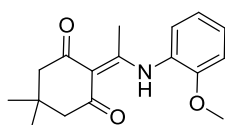
(C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.3, 120.6, 124.5, 126.9, 129.1, 153.1 (Ar), 172.1 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₇NO₃: C, 73.87; H, 7.97; N, 4.10. Encontrado: C, 74.05; H, 8.15; N, 4.09.

5-Bencil-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.29b)



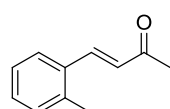
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar en un tubo de presión **3.28b** (40 mg, 0.16 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (28 μ l, 0.25 mmol) en tolueno (1.6 ml). El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 41 mg (73%) de **3.29b** como un sólido blanco. **Pf** 165-167 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 350 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.27 (m, 2H, H-4, H-6), 2.33 (m, 1H, H-5), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.38 (m, 2H, H-4, H-6), 2.60 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, CH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 7.02 (td, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz, Ar), 7.18 (m, 2H, Ar), 7.22 (m, 2H, Ar), 7.28 (m, 2H, Ar), 7.31 (m, 1H, Ar), 7.37 (m, 1H, Ar), 14.72 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 19.6 (CH₃), 32.6 (C-5), 39.7 (CH₂), 46.5 (C-4, C-6), 55.7 (OCH₃), 108.6 (NHC=C), 112.3, 115.2, 117.9, 120.6, 124.51, 126.1, 126.9, 129.0, 129.2, 139.4 (Ar), 172.3 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.86; H, 6.71; N, 4.08.

5,5-Dimetil-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)-1,3-diona (3.31)



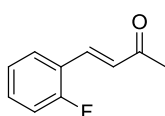
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar la 2-acetil-5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (**3.30**) (116 mg, 0.59 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (100 μ l, 0.88 mmol) en tolueno (6.0 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 134 mg (79%) de **3.31** como un sólido blanco. **Pf** 101-103 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 288 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ : 0.98 (s, 6H, CH₃), 2.34 (m, 4H, H-4, H-6), 2.35 (s, 3H, CH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 7.02 (td, 1H, *J* = 7.7, 1.1 Hz, Ar), 7.16 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar), 7.26 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.6 Hz, Ar), 7.36 (m, 1H, Ar), 14.73 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 20.0 (CH₃), 28.2 (CH₃), 30.2 (C-5), 52.7 (C-4, C-6), 56.2 (OCH₃), 108.3 (NHC=C), 112.7, 121.1, 124.6, 127.3, 129.7, 153.4 (Ar), 172.2 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₇H₂₁NO₃: C, 71.06; H, 7.37; N, 4.87. Encontrado: C, 71.24; H, 7.61; N, 4.94.

(E)-4-(*o*-Tolil)but-3-en-2-ona (3.33a)



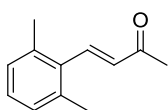
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), una disolución que contiene de 2-metilbenzaldehído (**3.32a**) (1.15 ml, 10 mmol) y NaOH (5 ml) en acetona/agua (4 ml/5 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.05 g (66%) de **3.33a** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 161 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 6.71 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-3), 7.28 (m, 3H, Ar), 7.69 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar), 7.79 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, H-4). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁴

(E)-4-(2-Fluorofenil)but-3-en-2-ona (3.33b)



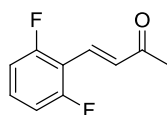
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), una disolución de 2-fluorobenzaldehído (**3.32b**) (1.05 ml, 10 mmol) y NaOH al 1% (5 ml) en acetona/agua (4 ml/5 ml), conduce a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.44 g (88%) de **3.33b** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 165 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.35 (s, 3H, CH₃), 6.89 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, H-3), 7.30 (m, 2H, Ar), 7.48 (m, 1H, Ar), 7.59 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, H-4), 7.84 (dt, 1H, $J = 7.8, 1.6$ Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

(E)-4-(2,6-Dimetilfenil)but-3-en-2-ona (3.33c)



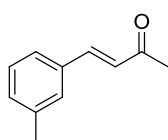
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), de una disolución de 2,6-dimetilbenzaldehído (**3.32c**) (1341 μ l, 10 mmol) y NaOH al 1% (5 ml) en acetona/agua (4 ml/5 ml), se obtienen 1.60 g (92%) de **3.33c** como un aceite marrón y con pureza suficiente para el siguiente paso sintético. **EM** (ES, modo positivo): m/z 175 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.30 (s, 6H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 6.32 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz, H-3), 7.12 (m, 3H, Ar), 7.69 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz, H-4). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²⁰

(E)-4-(2,6-Difluorofenil)but-3-en-2-ona (3.33d)



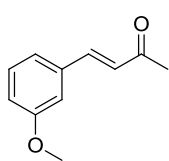
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), una disolución de 2,6-difluorobenzaldehído (**3.32d**) (1075 μ l, 10 mmol) en acetona/agua (4 ml/5 ml) con NaOH al 1% (5 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.11 g (61%) de **3.33d** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 183 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.36 (s, 3H, CH₃), 6.90 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz, H-3), 7.23 (m, 2H, Ar), 7.50 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz, H-4), 7.54 (m, 1H, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²¹

(E)-4-(*m*-Tolil)but-3-en-2-ona (3.33e)



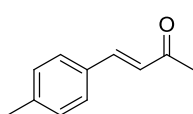
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), una disolución de 3-metilbenzaldehído (**3.32e**) (1.18 ml, 10 mmol) en acetona/agua (4 ml/5 ml) con NaOH al 1% (5 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.29 g (81%) de **3.33e** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 161 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.33 (s, 6H, CH₃), 6.78 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, H-3), 7.29 (m, 2H, Ar), 7.53 (m, 2H, Ar), 7.55 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, H-4). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²²

(*E*)-4-(3-Metoxifenil)but-3-en-2-ona (3.33f)



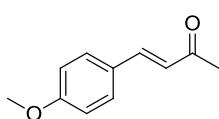
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), una disolución que contiene 3-metoxibenzaldehído (**3.32f**) (0.97 ml, 8 mmol) y NaOH (4 ml) en acetona/agua (3.2 ml/4 ml) conduce a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 1.17 g (83%) de **3.33f** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 177 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.33 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.80 (d, 1H, J = 16.4 Hz, H-3), 7.00 (m, 1H, Ar), 7.28 (m, 2H, Ar), 7.33 (m, 1H, Ar), 7.59 (d, 1H, J = 16.4 Hz, H-4). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²³

(*E*)-4-(*p*-Tolil)but-3-en-2-ona (3.33g)



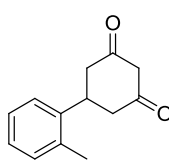
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), una disolución de 4-metilbenzaldehído (**3.32g**) (1.18 ml, 10 mmol) y NaOH (5 ml) en acetona/agua (4 ml/5 ml) conduce a 1.53 g (96%) de **3.33g** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 161 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 6.75 (d, 1H, J = 16.5 Hz, H-3), 6.24 (d, 2H, J = 7.9 Hz, Ar), 7.58 (d, 2H, J = 7.9 Hz, Ar), 7.60 (d, 1H, J = 16.4 Hz, H-4). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

(*E*)-4-(4-Metoxifenil)but-3-en-2-ona (3.33h)



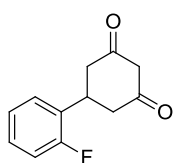
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de aldehídos con acetona (I), una disolución de 4-metoxibenzaldehído (**3.32h**) (0.97 ml, 8 mmol) y NaOH (4 ml) en acetona/agua (3.2 ml/4 ml) conduce a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.33 g (94%) de **3.33h** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 177 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.30 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.68 (d, 1H, J = 16.3 Hz, H-3), 6.99 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar), 7.58 (d, 1H, J = 16.3 Hz, H-4), 7.67 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²³

5-(*o*-Tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.34a)



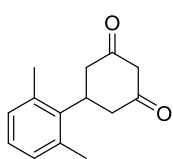
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.04 ml, 6.86 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (1.9 ml, 6.86 mmol) se adiciona **3.33a** (1.00 g, 6.24 mmol) en etanol (2.2 ml), conduciendo a 1.01 g (80%) de **3.34a** como un sólido marrón. **Pf** 167-169 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 203 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.35 (m, 2H, H-4, H-6), 2.57 (m, 2H, H-4, H-6), 3.49 (tt, 1H, J = 11.7, 4.5 Hz, H-5), 5.30 (s, 1H, H-2), 7.15 (m, 3H, Ar), 7.34 (m, 1H, Ar), 11.18 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁸

5-(2-Fluorofenil)ciclohexano-1,3-diona (3.34b)



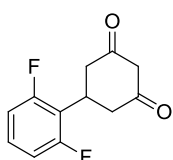
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.42 ml, 9.38 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.55 ml, 9.38 mmol) se añade **3.33b** (1.42 g, 8.53 mmol) en etanol (3 ml), dando lugar a 1.35 g (77%) de **3.34b** como un sólido marrón. **Pf** 177-178 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 207 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.40 (dd, 2H, $J = 16.6, 3.0$ Hz, H-4, H-6), 2.62 (m, 2H, H-4, H-6), 3.57 (tt, 1H, $J = 11.4, 4.7$ Hz, H-5), 5.30 (s, 1H, H-2), 7.18 (m, 2H, Ar), 7.30 (m, 1H, Ar), 7.41 (m, 1H, Ar), 11.17 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁸

5-(2,6-Dimetilfenil)ciclohexano-1,3-diona (3.34c)



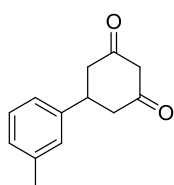
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.63 ml, 10.73 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.92 ml, 10.73 mmol) se adiciona **3.33c** (1.70 g, 9.75 mmol) en etanol (3.5 ml). Se obtienen así 1.47 g (70%) de un sólido marrón que se caracteriza como **3.34c**. **Pf** 77-79 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 217 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.22 (m, 2H, H-4, H-6), 2.35 (s, 6H, CH₃), 2.89 (m, 2H, H-4, H-6), 3.73 (tt, 1H, $J = 13.2, 4.7$ Hz, H-5), 5.31 (s, 1H, H-2), 7.00 (m, 3H, Ar), 11.19 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁸

5-(2,6-Difluorofenil)ciclohexano-1,3-diona (3.34d)



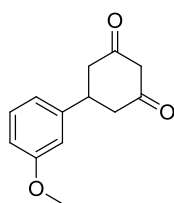
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (0.92 ml, 6.05 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (1.65 ml, 6.05 mmol) se añade **3.33d** (1.00 g, 5.50 mmol) en etanol (2 ml), conduciendo a 1.03 g (84%) de **3.34d** como un sólido marrón. **Pf** 193-195 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 225 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.60 (m, 2H, H-4, H-6), 2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 3.66 (tt, 1H, $J = 13.2, 4.7$ Hz, H-5), 5.31 (s, 1H, H-2), 7.10 (m, 2H, $J = 8.5$ Hz, Ar), 7.37 (m, 1H, Ar), 11.28 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁸

5-(*m*-Tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.34e)



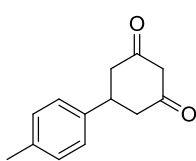
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.25 ml, 8.24 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.24 ml, 8.24 mmol) se adiciona **3.33e** (1.20 g, 7.49 mmol) en etanol (3 ml). Se obtienen así 1.29 g (85%) de **3.34e** como un sólido marrón. **Pf** 151-153 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 203 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.35 (m, 2H, H-4, H-6), 2.57 (m, 2H, H-4, H-6), 3.25 (m, 1H, H-5), 5.28 (s, 1H, H-2), 7.04 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ar), 7.13 (m, 2H, Ar), 7.10 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ar), 11.16 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁸

5-(3-Metoxifenil)ciclohexano-1,3-diona (3.34f)



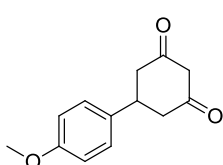
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.04 ml, 6.87 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.41 ml, 8.87 mmol) se añade **3.33f** (1.10 g, 6.24 mmol) en etanol (2 ml), obteniéndose 1.24 g (91%) de **3.34f** como un sólido marrón. **Pf** 85-87 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 219 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.29 (m, 2H, H-4, H-6), 2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 3.25 (m, 1H, H-5), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.28 (s, 1H, H-2), 6.80 (m, 1H, Ar), 6.91 (m, 2H, Ar), 7.23 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 11.17 (s ancho, 1H, OH).

5-(*p*-Tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.34g)



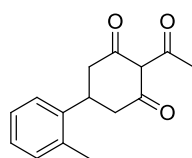
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.57 ml, 10.30 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.80 ml, 10.30 mmol) se añade **3.33g** (1.50 g, 9.36 mmol) en etanol (3.3 ml), dando lugar a 1.38 g (73%) de **3.34g** como un sólido marrón. **Pf** 169-171 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 203 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.27 (s, 3H, CH₃), 2.37 (m, 2H, H-4, H-6), 2.58 (m, 2H, H-4, H-6), 3.25 (tt, 1H, $J = 11.6, 4.6$ Hz, H-5), 5.22 (s, 1H, H-2), 7.12 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar), 7.21 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar), 11.15 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

5-(4-Metoxifenil)ciclohexano-1,3-diona (3.34h)



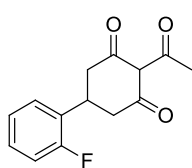
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a una disolución de malonato de dietilo (1.23 ml, 8.11 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.21 ml, 8.11 mmol) se añade **3.33h** (1.30 g, 7.38 mmol) en etanol (2.6 ml). Se obtienen así 1.50 g (93%) de **3.34h** como un sólido marrón. **Pf** 174-176 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 219 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.35 (m, 2H, H-4, H-6), 2.56 (m, 2H, H-4, H-6), 3.23 (m, 1H, H-5), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 5.27 (s, 1H, H-2), 6.88 (d, 2H, $J = 9.1$ Hz, Ar), 7.25 (d, 2H, $J = 9.1$ Hz, Ar), 11.14 (s ancho, 1H, OH).

2-Acetil-5-(*o*-tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.35a)



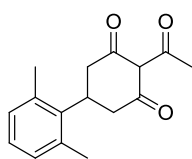
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34a** (100 mg, 0.49 mmol), cloruro de acetilo (70 μ l, 0.98 mmol), K₂CO₃ (150 mg, 1.08 mmol), 1,2,4-triazol (14 mg, 0.20 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (81 mg, 0.25 mmol) en DMF anhidra (4 ml), obteniéndose 42 mg (35%) de **3.35a** como un sólido amarillo. **Pf** 165-167 °C. **EM** (ES, modo positivo): 245 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.63 (m, 2H, H-4, H-6), 2.93 (m, 2H, H-4, H-6), 3.60 (m, 1H, H-5), 7.17 (m, 3H, Ar), 7.32 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, Ar).

2-Acetil-5-(2-fluorofenil)ciclohexano-1,3-diona (3.35b)



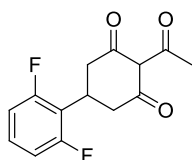
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34b** (101 mg, 0.49 mmol), cloruro de acetilo (70 μ l, 0.98 mmol), K_2CO_3 (150 mg, 1.08 mmol), 1,2,4-triazol (14 mg, 0.20 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (81 mg, 0.25 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 ml), obteniéndose 59 mg (48%) de **3.35b** como un sólido amarillo. Pf 71-73 °C. EM (ES, modo positivo): 249 m/z (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.70 (m, 2H, H-4, H-6), 3.00 (m, 2H, H-4, H-6), 3.68 (tt, 1H, $J = 11.9, 4.1$ Hz, H-5), 7.20 (m, 2H, Ar), 7.33 (m, 1H, Ar), 7.41 (td, 1H, $J = 7.9, 2.0$ Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

2-Acetil-5-(2,6-dimetilfenil)ciclohexano-1,3-diona (3.35c)



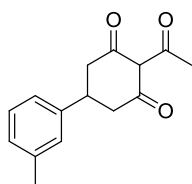
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34c** (400 mg, 1.85 mmol), cloruro de acetilo (0.26 ml, 3.70 mmol), K_2CO_3 (563 mg, 4.07 mmol), 1,2,4-triazol (51 mg, 0.74 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (300 mg, 0.93 mmol) en DMF anhidra (5 ml). Se obtienen así 139 mg (29%) de **3.35c** como un sólido blanco. Pf 140-142 °C. EM (ES, modo positivo): 259 m/z (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.37 (s, 6H, CH₃), 2.43 (m, 2H, H-4, H-6), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.64 (m, 2H, H-4, H-6), 3.79 (tt, 1H, $J = 13.8, 3.8$ Hz, H-5), 7.00 (m, 3H, Ar).

2-Acetil-5-(2,6-difluorofenil)ciclohexano-1,3-diona (3.35d)



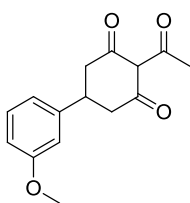
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34d** (400 mg, 1.78 mmol), cloruro de acetilo (0.26 ml, 3.57 mmol), K_2CO_3 (543 mg, 3.93 mmol), 1,2,4-triazol (49 mg, 0.71 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (287 mg, 0.89 mmol) en acetonitrilo anhidro (5 ml). Se obtienen así 66 mg (14%) of **3.35d** como un sólido blanco. Pf 88-90 °C. EM (ES, modo positivo): 267 m/z (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.66 (m, 2H, H-4, H-6), 3.04 (m, 2H, H-4, H-6), 3.78 (m, 1H, H-5), 7.11 (m, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar), 7.39 (m, 1H, Ar).

2-Acetil-5-(*m*-tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.35e)



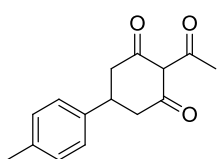
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34e** (202 mg, 1.00 mmol), cloruro de acetilo (143 μ l, 2.00 mmol), K_2CO_3 (304 mg, 2.20 mmol), 1,2,4-triazol (28 mg, 0.40 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (161 mg, 0.50 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 ml), obteniéndose 110 mg (45%) de **3.35e** como un sólido blanco. Pf 68-70 °C. EM (ES, modo positivo): 245 m/z (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.27 (s, 3H, CH₃), 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.65 (m, 2H, H-4, H-6), 2.91 (m, 2H, H-4, H-6), 3.37 (tt, 1H, $J = 11.9, 4.3$ Hz H-5), 7.06 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar), 7.13 (m, 2H, Ar), 7.22 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar).

2-Acetil-5-(3-metoxifenil)ciclohexano-1,3-diona (3.35f)



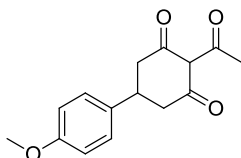
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34f** (202 mg, 0.98 mmol), cloruro de acetilo (131 μ l, 1.84 mmol), K_2CO_3 (276 mg, 2.00 mmol), 1,2,4-triazol (25 mg, 0.36 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (148 mg, 0.46 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 ml), obteniéndose 127 mg (50%) de **3.35f** como un sólido blanco. **Pf** 110-112 °C. **EM** (ES, modo positivo): 261 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.79 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (m, 1H, H-5), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 6.81 (m, 1H, Ar), 6.90 (m, 2H, Ar), 7.25 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, Ar).

2-Acetil-5-(*p*-tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.35g)



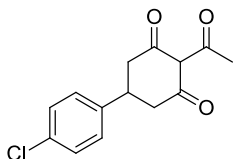
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34g** (202 mg, 1.00 mmol), cloruro de acetilo (131 μ l, 1.84 mmol), K_2CO_3 (276 mg, 2.00 mmol), 1,2,4-triazol (25 mg, 0.36 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (148 mg, 0.46 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 ml), obteniéndose 110 mg (45%) de **3.35g** como un sólido blanco. **Pf** 98-100 °C. **EM** (ES, modo positivo): 245 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.27 (s, 3H, CH₃), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.66 (m, 2H, H-4, H-6), 2.91 (m, 2H, H-4, H-6), 3.36 (tt, 1H, $J = 11.7, 4.4$ Hz, H-5), 7.14 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.21 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

2-Acetil-5-(4-metoxifenil)ciclohexano-1,3-diona (3.35h)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.34h** (300 mg, 1.38 mmol), cloruro de acetilo (197 μ l, 2.76 mmol), K_2CO_3 (415 mg, 3.00 mmol), 1,2,4-triazol (37 mg, 0.54 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (222 mg, 0.69 mmol) en acetonitrilo anhidro (5.5 ml), obteniéndose 180 mg (50%) de **3.35h** como un sólido blanco. **Pf** 85-87 °C. **EM** (ES, modo positivo): 261 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.53 (s, 3H, CH₃), 2.66 (m, 2H, H-4, H-6), 2.88 (m, 2H, H-4, H-6), 3.34 (tt, 1H, $J = 11.6, 4.2$ Hz, H-5), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 6.88 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar), 7.23 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar).

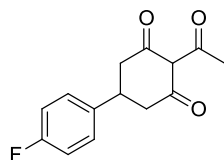
2-Acetil-5-(4-clorofenil)ciclohexano-1,3-diona (3.35i)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar 5-(4-clorofenil)ciclohexano-1,3-diona (**3.34i**) (200 mg, 0.90 mmol), cloruro de acetilo (129 μ l, 1.80 mmol), K_2CO_3 (274 mg, 1.98 mmol), 1,2,4-triazol (25 mg, 0.36 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (145 mg, 0.45 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 ml), obteniéndose 176 mg (74%) de **3.35i** como un sólido blanco. **Pf** 140-142 °C. **EM** (ES, modo positivo): 265 m/z (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.55 (s, 3H, CH₃),

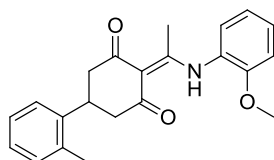
2.71 (m, 2H, H-4, H-6), 2.90 (m, 2H, H-4, H-6), 3.43 (tt, 1H, $J = 11.7, 4.1$ Hz, H-5), 7.38 (m, 4H, Ar).

2-Acetil-5-(4-fluorofenil)ciclohexano-1,3-diona (3.35j)



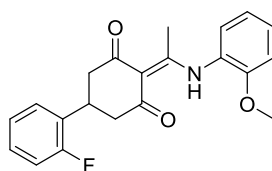
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar 5-(4-fluorofenil)ciclohexano-1,3-diona (**3.34j**) (101 mg, 0.49 mmol), cloruro de acetilo (70 μ l, 0.98 mmol), K_2CO_3 (150 mg, 1.08 mmol), 1,2,4-triazol (14 mg, 0.20 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (81 mg, 0.25 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 ml), obteniéndose 73 mg (60%) de **3.35j** como un sólido blanco. **Pf** 110-112 $^{\circ}C$. **EM** (ES, modo positivo): 249 m/z ($M+H$) $^+$. 1H -RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.71 (m, 2H, H-4, H-6), 2.95 (m, 2H, H-4, H-6), 3.40 (m, 1H, $J = 11.8, 4.1$ Hz, H-5), 7.26 (m, 1H, Ar), 7.34 (m, 3H, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-5-(*o*-tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.36a)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35a** (92 mg, 0.37 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (62 μ l, 0.55 mmol) en tolueno (3.7 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 60 mg (46%) de **3.36a** como un sólido blanco. **Pf** 142-144 $^{\circ}C$. **EM** (ES, modo positivo): m/z 350 ($M+H$) $^+$. 1H -RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.55 (m, 2H, H-4, H-6), 2.80 (m, 2H, H-4, H-6), 3.51 (tt, 1H, $J = 12.6, 3.3$ Hz, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 7.05 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, Ar), 7.17 (m, 4H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.39 (m, 1H, Ar), 14.79 (s ancho, 1H, NH). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 19.7 (CH_3), 19.9 (CH_3), 32.1 (C-5), 45.1 (C-4, C-6), 55.8 (OCH_3), 108.3 (NHC=C), 112.3, 120.6, 124.5, 125.2, 126.2, 126.3, 126.9, 129.2, 130.3, 135.2, 141.4, 153.1 (Ar), 174.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{22}H_{23}NO_3$: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.78; H, 6.73; N, 3.84.

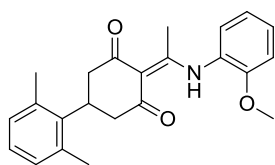
5-Fenil-2-(1-((2-fluorofenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36b)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35b** (80 mg, 0.32 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (55 μ l, 0.48 mmol) en tolueno (3.2 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 80 mg (71%) de **3.36b** como un sólido blanco. **Pf** 133-135 $^{\circ}C$. **EM** (ES, modo positivo): m/z 354 ($M+H$) $^+$. 1H -RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.61 (dd, 2H, $J = 16.5, 2.5$ Hz, H-4, H-6), 2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 3.60 (tt, 1H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 7.04 (td, 1H, $J = 7.6, 1.2$ Hz, Ar), 7.20 (m, 3H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.38 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.7$ Hz, Ar), 7.42 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.7$ Hz, Ar), 14.75 (s ancho, 1H, NH). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 19.7 (CH_3), 29.6 (C-5), 45.0 (C-4, C-6), 56.1 (OCH_3), 108.1 (NHC=C), 108.3, 112.3, 115.3, 120.6, 124.4,

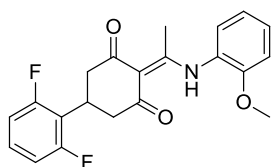
126.9, 127.8, 128.4, 129.3, 129.90, 153.1, 161.4 (Ar), 172.7 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₀FNO₃: C, 71.37; H, 5.70; N, 3.96. Encontrado: C, 71.09; H, 5.98; N, 4.02.

5-(2,6-Dimetilfenil)-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36c)



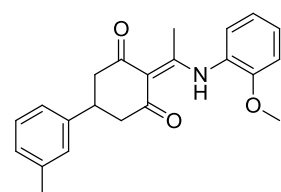
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35c** (130 mg, 0.50 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (85 μ l, 0.75 mmol) en tolueno (5 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 120 mg (66%) de **3.36c** como un sólido marrón. **Pf** 140-142 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 364 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.38 (s, 6H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.47 (m, 2H, H-4, H-6), 3.17 (m, 2H, H-4, H-6), 3.77 (m, 1H, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 6.99 (m, 3H, Ar), 7.05 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar), 7.20 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ar), 7.32 (dd, 1H, J = 7.6, 1.7 Hz, Ar), 7.39 (m, 1H, Ar), 14.81 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 19.8 (CH₃), 21.5 (CH₃), 32.6 (C-5), 42.7 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.3 (NHC=C), 112.3, 120.6, 124.5, 126.2, 126.9, 129.2, 129.7, 136.1, 138.1, 153.1 (Ar), 172.7 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₄: C, 76.01; H, 6.93; N, 3.85. Encontrado: C, 76.30; H, 7.05; N, 3.79.

5-(2,6-Difluorofenil)-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36d)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35d** (57 mg, 0.21 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (36 μ l, 0.32 mmol) en tolueno (5 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 44 mg (56%) de **3.36d** como un sólido blanco. **Pf** 141-142 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 372 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.57 (dd, 2H, J = 16.6, 2.9 Hz, H-4, H-6), 3.00 (m, 2H, J = 13.9 Hz, H-4, H-6), 3.71 (tt, 1H, J = 12.9, 3.8 Hz, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (td, 1H, J = 7.6, 1.2 Hz, Ar), 7.10 (m, 2H, J = 8.6 Hz, Ar), 7.20 (dd, 1H, J = 8.4, 1.2 Hz, Ar), 7.32 (dd, 1H, J = 7.8, 1.7 Hz, Ar), 7.36 (m, 1H, Ar), 7.40 (m, 1H, Ar), 14.72 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 19.8 (CH₃), 27.0 (C-5), 43.0 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.2 (NHC=C), 112.0, 112.3, 117.5, 120.6, 124.4, 126.9, 129.27, 153.1, 159.6, 162.1 (Ar), 172.9 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₁₉F₂NO₃: C, 67.92; H, 5.16; N, 3.77. Encontrado: C, 67.85; H, 4.98; N, 3.67.

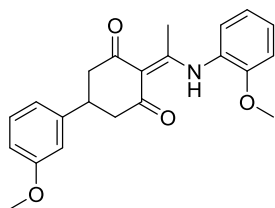
2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-5-(*m*-tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.36e)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35e** (49 mg, 0.20 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (42 μ l, 0.37 mmol) en tolueno (2 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 53 mg (75%) de **3.36e** como un sólido blanco. **Pf** 107-109 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 350 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.59 (m, 2H, H-4,

H-6), 2.80 (m, 2H, H-4, H-6), 3.31 (m, 1H, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (m, 2H, Ar), 7.13 (m, 2H, Ar), 7.20 (m, 2H, Ar), 7.32 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.7 Hz, Ar), 7.39 (m, 1H, Ar), 14.78 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 19.5 (CH₃), 20.9 (CH₃), 35.9 (C-5), 46.2 (C-4, C-6), 55.6 (OCH₃), 108.2 (NHC=C), 112.1, 120.4, 123.6, 124.3, 126.7, 127.0, 127.2, 128.2, 129.0, 137.4, 143.3, 152.9 (Ar), 172.3 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.66; H, 6.90; N, 4.02.

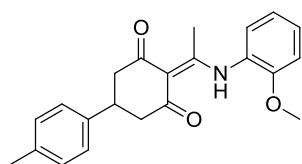
5-(3-Metoxifenil)-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36f)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35f** (60 mg, 0.23 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (40 μl, 0.35 mmol) en tolueno (2.3 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 44 mg (52%) de **3.36f** como un sólido blanco. **Pf** 127-129 °C. **EM** (ES, modo positivo):

m/z 366 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.60 (m, 2H, H-4, H-6), 2.78 (m, 2H, H-4, H-6), 3.38 (m, 1H, H-5), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.80 (m, 1H, Ar), 6.90 (m, 2H, Ar), 7.04 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Ar), 7.24 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar), 7.31 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.7 Hz, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 14.77 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 19.7 (CH₃), 36.1 (C-5), 45.4, 46.3 (C-4, C-6), 54.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 111.8, 112.3, 112.68, 118.9, 120.6, 124.5, 126.9, 129.2, 129.5, 145.2, 153.0, 159.4 (Ar), 172.4 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₄: C, 72.31; H, 6.31; N, 3.94. Encontrado: C, 72.43; H, 6.31; N, 3.94.

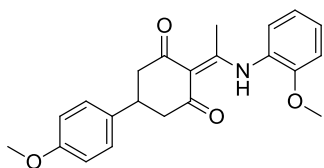
2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-5-(*p*-tolil)ciclohexano-1,3-diona (3.36g)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35g** (49 mg, 0.20 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (34 μl, 0.30 mmol) en tolueno (2 ml) por calentamiento en microondas. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo)

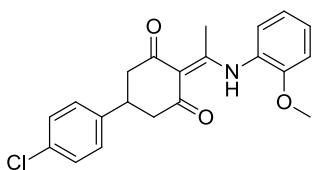
obteniéndose 41 mg (59%) de **3.36g** como un sólido blanco. **Pf** 172-174 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 350 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.58 (m, 2H, H-4, H-6), 2.78 (m, 2H, H-4, H-6), 3.27 (m, 1H, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 7.05 (td, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz, Ar), 7.13 (d, 2H, *J* = 7.9, Ar), 7.21 (m, 3H, Ar), 7.31 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.7 Hz, Ar), 7.39 (m, 1H, Ar), 14.78 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 19.7 (CH₃), 20.6 (CH₃), 35.7 (C-5), 46.2 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.3, 120.6, 124.5, 126.6, 126.9, 129.0, 129.2, 135.5, 140.5, 153.1 (Ar), 172.4 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.59; H, 6.39; N, 3.82.

5-(4-Metoxifenil)-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36h)



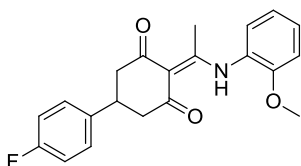
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35h** (60 mg, 0.23 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (40 μ l, 0.35 mmol) en tolueno (2.3 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 33 mg (39%) de **3.36h** como un sólido blanco. **Pf** 140-142 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 366 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.58 (m, 2H, H-4, H-6), 2.77 (m, 2H, H-4, H-6), 3.29 (tt, 1H, J = 12.0, 3.9 Hz, H-5), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.89 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar), 7.04 (td, 1H, J = 7.6, 1.2 Hz, Ar), 7.19 (dd, 1H, J = 8.3, 1.2 Hz, Ar), 7.24 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar), 7.31 (dd, 1H, J = 7.8, 1.6 Hz, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 14.79 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 19.7 (CH₃), 35.3 (C-5), 45.7 (C-4, C-6), 55.0 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 108.5 (NHC=C), 112.3, 113.9, 120.6, 124.5, 126.9, 127.7, 129.2, 135.5, 153.1, 157.9 (Ar), 172.4 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₄: C, 72.31; H, 6.34; N, 3.83. Encontrado: C, 72.38; H, 6.29; N, 4.01.

5-(4-Clorofenil)-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36i)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35i** (53 mg, 0.20 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (34 μ l, 0.30 mmol) en tolueno (2 ml) por calentamiento en microondas. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 70 mg (95%) de **3.36i** como un sólido blanco. **Pf** 138-140 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 370 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.60 (m, 2H, H-4, H-6), 2.81 (m, 2H, H-4, H-6), 3.36 (m, 1H, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (td, 1H, J = 7.6, 1.3 Hz, Ar), 7.20 (dd, 1H, J = 8.3, 1.3 Hz, Ar), 7.32 (dd, 1H, J = 7.8, 1.5 Hz, Ar), 7.37 (m, 5H, Ar), 14.76 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 19.7 (CH₃), 35.5 (C-5), 45.6 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.3, 120.1, 124.5, 126.9, 128.4, 128.7, 129.2, 131.0, 142.5, 153.1 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₀ClNO₃: C, 68.20; H, 5.45; N, 3.79. Encontrado: C, 68.31; H, 5.64; N, 3.88.

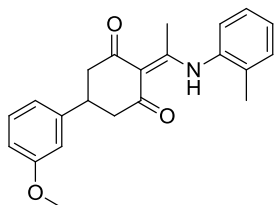
5-(4-Fluorofenil)-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36j)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35j** (42 mg, 0.17 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (28 μ l, 0.25 mmol) en tolueno (1.7 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 60 mg (99%) de **3.36j** como un sólido blanco. **Pf** 126-128 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 354 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.59 (m, 2H, H-4, H-6), 2.78 (m, 2H, H-4, H-6), 3.35 (tt, 1H, J = 12.1, 3.8 Hz, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 7.03 (td, 1H, J = 7.6, 1.3 Hz, Ar), 7.15 (m, 2H, Ar), 7.19 (dd, 1H, J = 8.5, 1.3 Hz, Ar), 7.31 (dd, 1H, J = 7.8, 1.6 Hz, Ar), 7.37 (m, 3H, Ar), 14.79 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ :

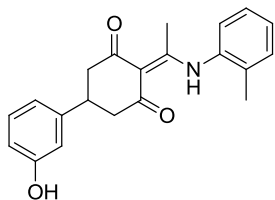
19.7 (CH₃), 35.4 (C-5), 45.6, 46.3 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.3, 115.2, 120.6, 124.5, 126.9, 128.6, 129.2, 139.7, 139.7, 153.1, 159.9, 161.8 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₀NO₃: C, 71.37; H, 5.70; N, 3.96. Encontrado: C, 71.62; H, 5.84; N, 4.05.

5-(3-Metoxifenil)-2-(1-(*o*-tolilamino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36k)



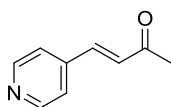
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.35f** (250 mg, 0.96 mmol) y *o*-toluidina (**3.10j**) (153 μ l, 1.44 mmol) en tolueno (10 ml) por calentamiento en un tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 141 mg (42%) de **3.36k** como un sólido blanco. **Pf** 105-107 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 350 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), 2.61 (dd, 2H, J = 16.2, 3.7 Hz, H-4, H-6), 2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 3.46 (m, 1H, H-5), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 6.80 (m, 1H, Ar), 6.91 (m, 2H, Ar), 7.29 (m, 4H, Ar), 7.40 (m, 1H, Ar), 14.90 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75 MHz) δ : 17.4 (CH₃), 19.6 (CH₃), 36.2 (C-5), 45.8 (C-4, C-6), 55.0 (OCH₃), 108.2 (NHC=C), 11.8, 112.7, 118.9, 126.6, 126.9, 128.1, 129.5, 131.0, 133.3, 135.1, 145.1, 159.4 (Ar), 172.6 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₂₃NO₃: C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Encontrado: C, 75.44; H, 6.51; N, 3.98.

5-(3-Hidroxifenil)-2-(1-(*o*-tolilamino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.36l)



A una disolución de **3.36k** (150 mg, 0.43 mmol) en diclorometano (2 ml), se añade lentamente una disolución 1M de BBr₃ en diclorometano (800 μ l, 0.80 mmol) a 0 °C, y se agita a temperatura ambiente. Tras 16 horas de reacción se obtiene un precipitado que se filtra, se lava con diclorometano y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), dando lugar a 35 mg (23%) de un aceite amarillo que se caracteriza como **3.36l**. **EM** (ES, modo positivo): m/z 336 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), 2.60 (dd, 2H, J = 16.4, 4.5 Hz, H-4, H-6), 2.77 (m, 2H, H-4, H-6), 3.25 (tt, 1H, J = 12.0, 3.7 Hz, H-5), 6.62 (ddd, 1H, J = 8.0, 2.4, 0.9 Hz, Ar), 6.70 (t, 1H, J = 1.9 Hz, Ar), 6.75 (d, 1H, J = 7.7 Hz, Ar), 7.11 (t, 1H, J = 7.8 Hz, Ar), 7.26 (m, 1H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.40 (m, 1H, Ar), 9.35 (s ancho, 1H, OH), 14.91 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 17.5 (CH₃), 19.7 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.8 (C-4, C-6), 108.2 (NHC=C), 113.4, 113.7, 117.3, 126.6, 126.9, 128.1, 129.5, 131.0, 133.3, 135.2, 145.0, 157.5 (Ar), 172.6 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₁NO₃: C, 75.20; H, 6.31; N, 4.18. Encontrado: C, 74.98; H, 6.33; N, 4.05.

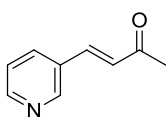
(*E*)-4-(Piridin-4-il)but-3-en-2-ona (3.38a)



De forma análoga a la síntesis de **3.26b**, la reacción de 4-piridincarboxaldehído (**3.37a**) (1.00 g, 9.34 mmol) y 1-(trifenilfosforaniliden)-2-propanona (2.68 g, 8.41 mmol) en cloroformo (45 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.22 g (99%) de un

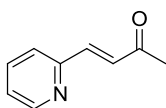
aceite que se caracteriza como **3.38a**. **EM** (ES, modo positivo): m/z 148 ($M+H$)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.02 (d, 1H, J = 16.5 Hz, H-3), 7.54-7.67 (m, 3H, H-4, Ar), 8.64 (m, 2H, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²⁴

(*E*)-3-(Piridin-3-il)but-3-en-2-ona (3.38b)



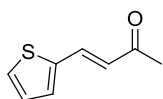
De forma análoga a la síntesis de **3.26b**, la reacción de 3-piridincarboxaldehído (**3.37b**) (1.00 g, 9.34 mmol) y 1-(trifenilfosforaniliden)-2-propanona (2.68 g, 8.41 mmol) en cloroformo (45 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.19 g (96%) de **3.38b** como un aceite. **EM** (ES, modo positivo): m/z 148 ($M+H$)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.35 (s, 3H, CH₃), 6.95 (d, 1H, J = 16.5 Hz, H-3), 7.40 (dd, 1H, J = 7.8, 4.9 Hz, Ar), 7.60 (d, 1H, J = 16.5 Hz, H-4), 8.16 (dt, 1H, J = 8.1, 1.9 Hz, Ar), 8.16 (dd, 1H, J = 4.6, 1.7 Hz, Ar), 8.88 (d, 1H, J = 4.7 Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²⁴

(*E*)-2-(Piridin-2-il)but-3-en-2-ona (3.38c)



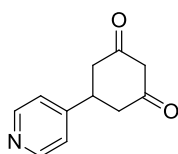
De forma análoga a la síntesis de **3.26b**, la reacción de 2-piridincarboxaldehído (**3.37c**) (1.00 g, 9.34 mmol) y 1-(trifenilfosforaniliden)-2-propanona (2.68 g, 8.41 mmol) en cloroformo (45 ml) da lugar a un residuo que se purifica por cromatografía flash en hexano/acetato de etilo. Se obtienen así 1.16 g (94%) de **3.38c** como un aceite. **EM** (ES, modo positivo): m/z 148 ($M+H$)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.02 (d, 1H, J = 16.5 Hz, H-3), 7.41 (ddd, 1H, J = 7.5, 4.7, 1.3 Hz, Ar), 7.61 (d, 1H, J = 16.1 Hz, H-4), 7.74 (dt, 1H, J = 7.8, 0.9 Hz, Ar), 7.87 (td, 1H, J = 7.7, 1.8 Hz, Ar), 8.65 (ddd, 1H, J = 4.7, 1.6, 0.8 Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²⁴

(*E*)-4-(Tiofen-2-il)but-3-en-2-ona (3.38d)



De forma análoga a la síntesis de **3.26b**, la reacción de 2-tiofencarboxaldehído (**3.37d**) (1.00 g, 8.92 mmol) y 1-(trifenilfosforaniliden)-2-propanona (2.56 g, 8.02 mmol) en cloroformo (50 ml) conduce a un residuo que se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.20 mg (98%) de **3.38d** como un aceite. **EM** (ES, modo positivo): m/z 153 ($M+H$)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.29 (s, 3H, CH₃), 6.48 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H-3), 7.16 (dd, 1H, J = 4.9, 3.7 Hz, Ar), 7.54 (d, 1H, J = 3.4 Hz, Ar), 7.74 (d, 1H, J = 5.0 Hz, Ar), 7.79 (d, 1H, J = 16.1 Hz, H-4). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²⁴

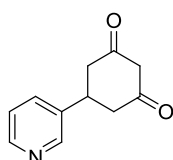
5-(Piridin-4-il)ciclohexano-1,3-diona (3.39a)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), una disolución de **3.38a** (1.81 mg, 12.32 mmol) en etanol (3 ml) se añade sobre una mezcla de malonato de dietilo (2.06 ml, 13.55 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (3.69 ml, 13.55 mmol). Tras tratamiento con HCl el producto no precipita. A continuación, el crudo se neutraliza con NaOH y se extrae con una mezcla 1:1 de isobutanol/acetato de etilo (3 x 20 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se

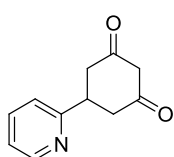
filtra y se concentra, obteniéndose 1.42 mg (61%) de **3.39a** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 190 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.40 (dd, 2H, $J = 16.7, 4.6$ Hz, H-4, H-6), 2.59 (m, 2H, H-4, H-6), 3.34 (m, 1H, H-5), 5.23 (s, 1H, H-2), 7.36 (m, 2H, $J = 4.2, 1.6$ Hz, Ar), 8.50 (m, 2H, $J = 4.6, 1.4$ Hz, Ar).

5-(Piridin-3-il)ciclohexano-1,3-diona (**3.39b**)



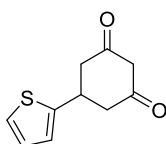
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), se hace reaccionar **3.38b** (1.20 g, 8.15 mmol) en etanol (3 ml) con malonato de dietilo (1.36 ml, 8.97 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.44 ml, 8.97 mmol). El producto no precipita tras tratamiento con HCl. A continuación, el crudo se neutraliza con NaOH y se extrae con una mezcla 1:1 de isobutanol/acetato de etilo (3 x 20 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra, para finalmente obtener 0.77 g (50%) de **3.39b** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 190 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.10 (dd, 2H, $J = 15.7, 4.5$ Hz, H-4, H-6), 2.23 (m, 2H, H-4, H-6), 3.15 (tt, 1H, $J = 11.4, 4.7$ Hz, H-5), 4.51 (s, 1H, H-2), 7.28 (m, 1H, Ar), 7.66 (dt, 1H, $J = 7.8, 2.1$ Hz, Ar), 8.37 (dd, 1H, $J = 4.7, 1.7$ Hz, Ar), 8.47 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, Ar).

5-(Piridin-2-il)ciclohexano-1,3-diona (**3.39c**)



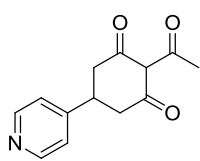
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), se hace reaccionar **3.38c** (1.20 g, 8.15 mmol) en etanol (3 ml) con malonato de dietilo (1.36 ml, 8.97 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (2.44 ml, 8.97 mmol). El producto no precipita tras tratamiento con HCl. A continuación, el crudo se neutraliza con NaOH y se extrae con una mezcla 1:1 de isobutanol/acetato de etilo (3 x 20 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra, obteniéndose 1.51 g (97%) de **3.39c** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 190 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.08 (m, 2H, $J = 16.3, 4.5$ Hz, H-4, H-6), 2.32 (m, 2H, H-4, H-6), 3.23 (tt, 1H, $J = 11.7, 4.7$ Hz, H-5), 4.51 (s, 1H, H-2), 7.17 (ddd, 1H, $J = 7.4, 4.8, 1.2$ Hz, Ar), 7.27 (dt, 1H, $J = 7.8, 0.9$ Hz, Ar), 7.67 (td, 1H, $J = 7.6, 1.9$ Hz, Ar), 8.47 (m, 1H, Ar).

5-(Tiofen-2-il)ciclohexano-1,3-diona (**3.39d**)



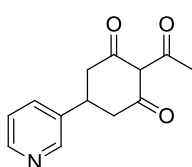
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ciclohexano-1,3-dionas (II), a disolución de malonato de dietilo (0.44 ml, 2.89 mmol) y etóxido sódico al 25% en etanol (0.79 ml, 2.89 mmol) se añade **3.38d** (0.40 g, 2.63 mmol) en etanol (2.5 ml). Se obtienen así 0.35 g (69%) de **3.39d** como un sólido blanco. **Pf** 138-141 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 195 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.60 (m, 2H, H-4, H-6), 2.70 (m, 2H, H-4, H-6), 3.63 (tt, 1H, $J = 10.1, 5.2$ Hz, H-5), 5.27 (s, 1H, H-2), 6.96 (m, 2H, Ar), 7.37 (dd, 1H, $J = 4.0, 2.2$ Hz, Ar), 11.24 (s ancho, 1H, OH). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

2-Acetil-5-(piridin-4-il)ciclohexano-1,3-diona (3.40a)



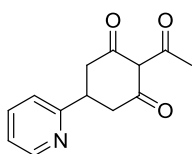
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.39a** (200 mg, 1.06 mmol), cloruro de acetilo (150 μ l, 2.11 mmol), K_2CO_3 (322 mg, 2.33 mmol), 1,2,4-triazol (29 mg, 0.42 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (171 mg, 0.53 mmol) en DMF anhidra (4 ml), obteniéndose 90 mg (37%) de **3.40a** como un sólido blanco. **Pf** 121-123 °C. **EM** (ES, modo positivo): 232 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.76 (m, 2H, H-4, H-6), 2.95 (m, 2H, H-4, H-6), 3.46 (tt, 1H, $J = 11.7, 4.2$ Hz, H-5), 7.37 (m, 2H, $J = 4.4, 1.8$ Hz, Ar), 8.52 (m, 2H, $J = 4.3, 1.8$ Hz, Ar).

2-Acetil-5-(piridin-3-il)ciclohexano-1,3-diona (3.40b)



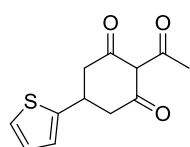
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.39b** (200 mg, 1.06 mmol), cloruro de acetilo (150 μ l, 2.11 mmol), K_2CO_3 (322 mg, 2.33 mmol), 1,2,4-triazol (29 mg, 0.42 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (171 mg, 0.53 mmol) en DMF anhidra (4 ml), obteniéndose 91 mg (37%) de **3.40b** como un aceite. **EM** (ES, modo positivo): 232 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.73 (m, 2H, H-4, H-6), 3.01 (m, 2H, H-4, H-6), 3.48 (tt, 1H, $J = 12.0, 4.1$ Hz, H-5), 7.38 (ddd, 1H, $J = 7.7, 4.8, 0.9$ Hz, Ar), 7.78 (dt, 1H, $J = 8.0, 2.0$ Hz, Ar), 8.47 (dd, 1H, $J = 4.7, 1.7$ Hz, Ar), 8.56 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, Ar).

2-Acetil-5-(piridin-2-il)ciclohexano-1,3-diona (3.40c)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.39c** (200 mg, 1.06 mmol), cloruro de acetilo (150 μ l, 2.11 mmol), K_2CO_3 (322 mg, 2.33 mmol), 1,2,4-triazol (29 mg, 0.42 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (171 mg, 0.53 mmol) en DMF anhidra (4 ml), obteniéndose 120 mg (49%) de **3.40c** como un sólido blanco. **Pf** 91-93 °C. **EM** (ES, modo positivo): 232 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.83 (m, 2H, H-4, H-6), 3.03 (m, 2H, H-4, H-6), 3.60 (tt, 1H, $J = 9.9, 4.7$ Hz, H-5), 7.27 (ddd, 1H, $J = 7.4, 4.8, 1.1$ Hz, Ar), 7.39 (dt, 1H, $J = 7.8, 1.0$ Hz, Ar), 7.77 (td, 1H, $J = 7.7, 1.8$ Hz, Ar), 8.52 (ddd, 1H, $J = 4.9, 1.9, 0.9$, Ar), 11.98 (s ancho, 1H, OH).

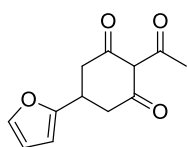
2-Acetil-5-(tiofen-2-il)ciclohexano-1,3-diona (3.40d)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar **3.39d** (300 mg, 1.54 mmol), cloruro de acetilo (220 μ l, 3.08 mmol), K_2CO_3 (469 mg, 3.39 mmol), 1,2,4-triazol (43 mg, 0.62 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (248 mg, 0.77 mmol) en acetonitrilo anhidro (6 ml), obteniéndose 150 mg (41%) de **3.40d** como un sólido blanco. **Pf** 74-76 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 237 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.53 (m, 3H, CH₃), 2.57 (m, 2H, H-4, H-6), 2.91 (m, 2H, H-4, H-6), 3.73 (tt, 1H, $J = 8.4, 5.9$ Hz, H-5), 6.99 (m,

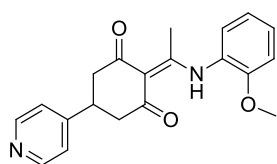
2H, Ar), 7.40 (dd, 1H, $J = 3.9, 2.4$ Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

2-Acetil-5-(furan-2-il)ciclohexano-1,3-diona (3.40e)



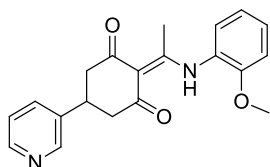
Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 2-acilciclohexano-1,3-dionas (III), se hace reaccionar 5-(furan-2-il)ciclohexano-1,3-diona (**3.39e**) (300 mg, 1.68 mmol), cloruro de acetilo (240 μ l, 3.36 mmol), K_2CO_3 (511 mg, 3.70 mmol), 1,2,4-triazol (46 mg, 0.67 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (271 mg, 0.84 mmol) en acetonitrilo anhidro (5 ml), obteniéndose 150 mg (41%) de **3.40d** como un sólido blanco. Pf 80-82 °C. EM (ES, modo positivo): m/z 221 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (forma enólica): 2.51 (m, 3H, CH₃), 2.86 (m, 4 H, H-4, H-6), 3.53 (tt, 1H, $J = 9.1, 4.8$ Hz, H-5), 6.19 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, Ar), 6.38 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, Ar), 7.58 (m, 1H, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.¹⁹

2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-5-(piridin-4-il)ciclohexano-1,3-diona (3.41a)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.40a** (150 mg, 0.65 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (110 μ l, 0.97 mmol) en tolueno (6.5 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 96 mg (44%) de **3.41a** como un sólido blanco. Pf 146-148 °C. EM (ES, modo positivo): m/z 337 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.64 (m, 2H, H-4, H-6), 2.83 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (tt, 1H, $J = 11.5, 3.8$ Hz, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (td, 1H, $J = 7.6, 1.2$ Hz, Ar), 7.20 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.2$ Hz, Ar), 7.32 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.5$ Hz, Ar), 7.37 (m, 2H, Ar), 7.40 (m, 1H, Ar), 8.51 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, Ar), 8.51 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, Ar), 14.75 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 19.8 (CH₃), 35.3 (C-5), 45.1 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.3, 120.6, 122.3, 124.4, 126.9, 129.2, 149.7, 152.0, 153.0 (Ar), 172.6 (NHC=C). Análisis elemental (%) calculado para C₂₀H₂₀N₂O₃: C, 71.41; H, 5.99; N, 8.33. Encontrado: C, 71.70; H, 6.18; N, 8.10.

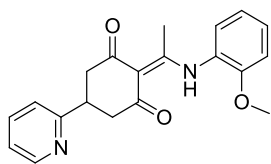
2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-5-(piridin-3-il)ciclohexano-1,3-diona (3.41b)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.40b** (130 mg, 0.56 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (95 μ l, 0.84 mmol) en tolueno (5.5 ml) por calentamiento en un tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 105 mg (56%) de **3.41b** como un aceite. EM (ES, modo positivo): m/z 337 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.63 (dd, 2H, $J = 15.6, 3.1$ Hz, H-4, H-6), 2.87 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (m, 1H, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (td, 1H, $J = 7.6, 1.1$ Hz, Ar), 7.20 (dd, 1H, $J = 8.4, 0.8$ Hz, Ar), 7.32 (m, 1H, Ar), 7.37 (m, 2H, Ar), 7.78 (dt, 1H, $J = 7.9, 1.9$ Hz, Ar), 8.46 (dd, 1H, $J = 4.7, 1.5$ Hz, Ar), 8.57 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Ar), 14.76 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 19.7 (CH₃), 33.7 (C-5), 45.1 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.4 (NHC=C), 112.3, 120.6,

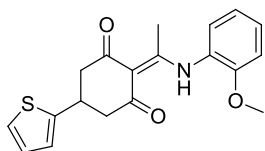
123.5, 124.4, 126.9, 129.2, 134.3, 138.8, 147.8, 148.6, 153.1 (Ar), 172.6 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₀H₂₀N₂O₃: C, 71.41; H, 5.99; N, 8.33. Encontrado: C, 71.19; H, 6.02; N, 8.12.

2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-5-(piridin-2-il)ciclohexano-1,3-diona (3.41c)



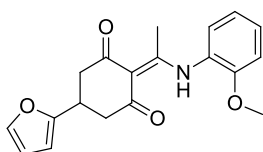
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.40c** (180 mg, 0.78 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (132 μ l, 1.17 mmol) en tolueno (8 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 185 mg (71%) de **3.41c** como un sólido blanco. **Pf** 127-129 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 337 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.69 (m, 2H, H-4, H-6), 2.87 (m, 2H, H-4, H-6), 3.50 (tt, 1H, J = 11.4, 4.2 Hz, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (td, 1H, J = 7.6, 1.3 Hz, Ar), 7.21 (dd, 1H, J = 8.3, 0.6 Hz, Ar), 7.26 (ddd, 1H, J = 7.3, 4.9, 1.1 Hz, Ar), 7.31 (dd, 1H, J = 7.9, 1.6 Hz, Ar), 7.37 (m, 2H, Ar), 7.76 (td, 1H, J = 7.7, 1.9 Hz, Ar), 8.54 (m, 1H, Ar), 14.77 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 19.7 (CH₃), 37.9 (C-5), 44.3 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.5 (NHC=C), 112.3, 120.6, 121.8, 121.9, 124.5, 126.9, 129.2, 136.8, 149.0, 153.1, 161.7 (Ar), 172.6 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₀H₂₀N₂O₃: C, 71.41; H, 5.99; N, 8.33. Encontrado: C, 71.80; H, 6.21; N, 8.23.

2-(1-((2-Metoxifenil)amino)etiliden)-5-(tiofen-2-il)ciclohexano-1,3-diona (3.41d)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar en tubo de presión **3.40d** (60 mg, 0.25 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (43 μ l, 0.38 mmol) en tolueno (2.5 ml). El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 86 mg (99%) de **3.41d** como un sólido amarillo. **Pf** 105-107 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 342 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.80 (m, 4H, H-4, H-6), 3.64 (tt, 1H, J = 9.4, 4.6 Hz, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.96 (dt, 1H, J = 3.5, 1.2 Hz, Ar), 6.98 (dd, 1H, J = 5.0, 3.5 Hz, Ar), 7.03 (td, 1H, J = 7.6, 1.2 Hz), 7.19 (dd, 1H, J = 8.4, 1.1 Hz, Ar), 7.31 (dd, 1H, J = 7.8, 1.5 Hz, Ar), 7.38 (m, 2H, Ar), 14.74 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75 MHz) δ : 19.8 (CH₃), 31.6 (C-5), 46.2 (C-4, C-6), 55.9 (OCH₃), 108.6 (NHC=C), 112.3, 120.6, 123.5, 123.9, 124.4, 126.9, 126.9, 129.2, 147.2, 153.1 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₉H₁₉NO₃S: C, 66.34; H, 5.61; N, 4.10; S, 9.39. Encontrado: C, 67,02; H, 5.50; N, 3.89; S, 9.16.

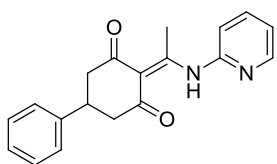
5-(Furan-2-il)-2-(1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.41e)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.40e** (60 mg, 0.27 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (46 μ l, 0.41 mmol) en tolueno (2.7 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 87 mg (99%) de **3.41e** como un sólido amarillo. **Pf** 98-100 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 326 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-d₆,

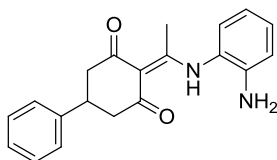
300 MHz) δ : 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.76 (m, 4H, H-4, H-6), 3.44 (m, 1H, H-5), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 6.16 (d, 1H, J = 3.2 Hz, Ar), 6.38 (dd, 1H, J = 3.2, 1.9 Hz, Ar), 7.03 (td, 1H, J = 7.7, 1.0 Hz, Ar), 7.19 (dd, 1H, J = 8.3, 0.8 Hz, Ar), 7.30 (dd, 1H, J = 7.7, 1.2 Hz, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 7.57 (d, 1H, J = 1.1 Hz, Ar), 14.73 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ : 19.8 (CH₃), 29.9 (C-5), 42.8 (C-4, C-6), 55.8 (OCH₃), 108.6 (NHC=C), 104.7, 110.4, 112.3, 120.6, 124.4, 126.9, 129.2, 141.8, 153.1, 156.4 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₉H₁₉NO₄: C, 70.14; H, 5.89; N, 4.31. Encontrado: C, 69.95; H, 5.90; N, 4.17.

5-Fenil-2-(1-(piridin-2-il-amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.43)



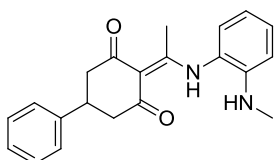
Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12b** (100 mg, 0.43 mmol) y 2-aminopiridina (**3.42**) (62 mg, 0.65 mmol) en tolueno (4.3 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 111 mg (84%) de **3.43** como un aceite. **EM** (ES, modo positivo): m/z 307 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.64 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68 (s, 3H, CH₃), 2.85 (m, 2H, H-4, H-6), 3.29 (m, 1H, H-5), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.34 (d, 4H, J = 4.3 Hz, Ar), 7.38 (dd, 1H, J = 7.3, 5.0, Ar), 7.44 (d, 1H, J = 8.1, Ar), 7.95 (td, 1H, J = 7.8, 1.7 Hz, Ar), 8.53 (m, 1H, Ar), 15.19 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 20.2 (CH₃), 35.8 (C-5), 46.0 (C-4, C-6), 109.3 (NHC=C), 119.3, 122.4, 126.6, 126.8, 128.5, 139.0, 143.3, 149.1, 150.0 (Ar), 171.0 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₁₉H₁₈N₂O₂: C, 74.49; H, 5.92; N, 9.14. Encontrado: C, 74.27; H, 5.81; N, 9.00.

2-(1-((2-Aminofenil)amino)etiliden)-5-fenilciclohexano-1,3-diona (3.45a)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en tubo de presión se hace reaccionar **3.12b** (40 mg, 0.17 mmol) y *o*-fenilendiamina (**3.44a**) (19 mg, 0.17 mmol) en tolueno (1.7 ml) por calentamiento a 80 °C durante 4 horas. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 45 mg (83%) de **3.45a** como un sólido amarillo. **Pf** 135-136 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 321 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.37 (s, 3H, CH₃), 2.61 (dd, 2H, J = 15.9, 3.9 Hz, H-4, H-6), 2.79 (m, 2H, H-4, H-6), 3.31 (m, 1H, H-5), 5.19 (s ancho, 2H, NH₂), 6.61 (td, 1H, J = 7.7, 1.2 Hz, Ar), 6.81 (dd, 1H, J = 7.8, 1.0 Hz, Ar), 6.97 (d, 1H, J = 7.6 Hz, Ar), 7.09 (t, 1H, J = 7.7 Hz, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 14.46 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 20.0 (CH₃), 36.9 (C-5), 46.7 (C-4, C-6), 109.2 (NHC=C), 116.5, 116.9, 121.5, 127.2, 127.4, 127.7, 129.2, 129.5, 144.2, 144.5 (Ar), 174.4 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₀H₂₀N₂O₂: C, 74.98; H, 6.29; N, 8.74. Encontrado: C, 74.78; H, 6.02; N, 8.53.

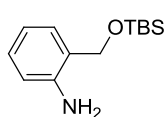
5-Fenil-2-(1-((2-(Metilamino)fenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.45b)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), en un tubo de presión se hace reaccionar **3.12b** (100 mg, 0.43 mmol) y *N*-metil-1,2-bencenodiamina (**3.44b**) (49 μ l, 0.43 mmol) en tolueno (4.3 ml) por

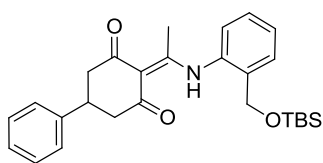
calentamiento a 80 °C durante 4 horas. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 110 mg (76%) de **3.45b** como un sólido blanco. **Pf** 144-146 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 335 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.58 (dd, 2H, $J = 16.2, 3.7$ Hz, H-4, H-6), 2.64 (m, 2H, H-4, H-6), 2.70 (d, 3H, $J = 4.8$ Hz, NHCH₃) 3.39 (m, 1H, H-5), 5.40 (c, 1H, $J = 4.5$ Hz, NHCH₃), 6.67 (m, 2H, Ar), 7.01 (dd, 1H, $J = 7.6, 1.2$ Hz, Ar), 7.23 (m, 2H, Ar), 7.35 (d, 4H, $J = 4.4$ Hz, Ar), 14.46 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 19.3 (CH₃), 29.7 (NHCH₃), 36.2 (C-5), 46.0 (C-4, C-6), 108.6 (NHC=C), 110.7, 115.6, 121.3, 126.5, 126.7, 126.8, 128.5, 129.3, 143.5, 144.7 (Ar), 174.1 (NHC=C). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₂N₂O₂: C, 75.42; H, 6.63; N, 8.38. Encontrado: C, 75.44; H, 6.40; N, 8.19.

2-(((*Terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)anilina (**3.47**)



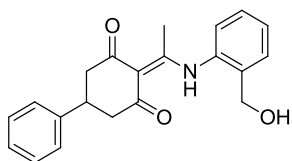
Sobre una disolución de 2-aminofenilmetanol (**3.46**) (1.00 g, 8.12 mmol) en THF anhidra (40 ml) se añade cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBSCl) (1.16 g, 7.72 mmol) e imidazol (0.55 g, 8.12 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. El crudo se lava con 15 ml de salmuera y se extrae con de acetato de etilo (2 x 20 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.48 g (81%) de **3.47** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): 238 m/z (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 0.89 (s, 9H, CH₃), 4.57 (s, 2H, CH₂), 4.87 (s ancho, 2H, NH₂), 6.53 (td, 1H, $J = 7.7, 1.2$ Hz, Ar), 6.62 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.2$ Hz, Ar), 6.96 (td, 1H, $J = 7.3, 1.9$ Hz, Ar), 7.07 (dd, 1H, $J = 7.5, 1.7$ Hz, Ar). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la literatura.²⁵

2-(1-((2-(((*Terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)amino)etiliden)-5-fenil-ciclohexano-1,3-diona (**3.48**)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.12b** (100 mg, 0.43 mmol) y **3.47** (155 mg, 0.65 mmol) en tolueno (4.5 ml) por calentamiento en el reactor de microondas. El residuo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo) obteniéndose 160 mg (83%) de **3.48** como un aceite amarillo. **EM** (ES, modo positivo): m/z 450 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 0.86 (s, 9H, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), 2.58 (m, 2H, H-4, H-6), 2.82 (m, 2H, H-4, H-6), 3.38 (m, 1H, H-5), 4.61 (s, 2H, OCH₂), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.30 (m, 3H, Ar), 7.25 (m, 2H, Ar), 7.42 (m, 2H, Ar), 7.53 (m, 1H, Ar), 14.84 (s ancho, 1H, NH).

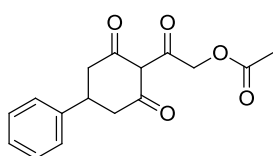
5-Fenil-2-(1-((2-(hidroximetil)fenil)amino)etiliden)-ciclohexano-1,3-diona (**3.49**)



A una disolución de **3.48** (80 mg, 0.18 mmol) en THF anhidra (1 ml) se adiciona una solución 1M de TBAF en THF (200 μ l, 0.20 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante una hora. Luego se añaden 10 ml de agua y el crudo se extrae con diclorometano (2 x 20 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 53 mg (88%) de **3.49** como un sólido blanco. **Pf** 166-168 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 336 (M+H)⁺. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 2.37 (s,

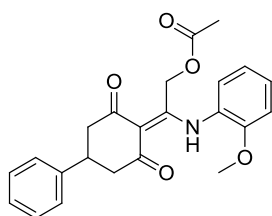
3H, CH₃), 2.62 (dd, 2H, *J* = 16.5, 3.0 Hz, H-4, H-6), 2.83 (m, 2H, *J* = 13.6 Hz, H-4, H-6), 3.34 (tt, 1H, *J* = 12.2, 4.0 Hz, H-5), 4.41 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz, CH₂), 5.27 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz, OH), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.28 (dd, 1H, *J* = 7.2, 1.7 Hz, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 7.40 (m, 2H, Ar), 7.55 (dd, 1H, *J* = 7.3, 2.0 Hz, Ar), 14.83 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 19.8 (CH₃), 36.1 (C-5), 45.9 (C-4, C-6), 59.5 (CH₂), 108.3 (NHC=C), 126.5, 126.7, 127.9, 128.0, 128.5, 128.6, 134.2, 137.4, 143.5 (Ar), 172.6 (NHC=C), 196.6 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₁H₂₁NO₃: C, 75.20; H, 6.31; N, 4.18. Encontrado: C, 75.35; H, 6.60; N, 4.07.

(4-Fenil-2,6-dioxo-ciclohexil)metil acetato (3.51)



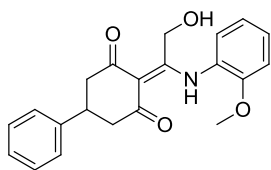
A una disolución de 5-fenil-1,3-ciclohexanodiona (**3.7**) (1.0 g, 5.32 mmol) en diclorometano (14 ml) se añade trietilamina (1.48 ml, 10.64 mmol) y DMAP (7 mg, 0.06 mmol). A continuación se adiciona lentamente cloruro de acetoxiacetilo (**3.50**) (628 μl, 5.84 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se añade ácido acético (0.4 ml, 6.92 mmol) y se agita durante 30 minutos. Posteriormente, se lava con 10 ml agua, se extrae con diclorometano (2 x 20 ml) y la fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 1.04 g (68%) de **3.51** como un sólido blanco. **Pf** 116-118 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 289 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (forma enólica): 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.70 (m, 2H, H-4, H-6), 2.98 (m, 2H, H-4, H-6), 3.45 (tt, 1H, *J* = 11.8, 4.2 Hz, H-5), 4.85 (s, 1H, H-2), 5.21 (s, 2H, CH₂), 7.27 (m, 1H, Ar), 7.35 (m, 4H, Ar).

2-(4-Fenil-2,6-dioxo-ciclohexiliden)-2-((2-metoxifenil)amino)etil acetato (3.52)



Siguiendo el procedimiento general para la reacción de 2-acilciclohexano-1,3-dionas con aminas (IV), se hace reaccionar **3.51** (1.0 g, 3.47 mmol) y *o*-anisidina (**3.10c**) (588 μl, 5.20 mmol) en tolueno (50 ml) por calentamiento en tubo de presión. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo), obteniéndose 910 g (67%) de un aceite marrón que se caracteriza como **3.52**. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 394 (M+H)⁺. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 1.69 (s, 3H, CH₃), 2.64 (m, 2H, H-4, H-6), 2.86 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (tt, 1H, *J* = 11.9, 3.8 Hz, H-5), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 5.22 (s, 2H, CH₂), 7.02 (td, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz, Ar), 7.18 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.2 Hz, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.30 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.6 Hz, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 2H, Ar), 7.35 (s, 1H, Ar), 14.87 (s ancho, 1H, NH). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 19.8 (CH₃), 36.0 (C-5), 46.1 (C-4, C-6), 55.9 (OCH₃), 60.4 (CH₂), 108.3 (NHC=C), 112.3, 120.6, 125.3, 125.6, 126.6, 126.8, 128.5, 129.2, 143.3, 152.6 (Ar), 167.4 (NHC=C), 169.2 (COCH₃). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₃H₂₃NO₅: C, 70.21; H, 5.89; N, 3.56. Encontrado: C, 69.92; H, 6.01; N, 3.68.

5-Fenil-2-(2-hidroxi-1-((2-metoxifenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (3.53)



A una disolución de **3.52** (98 mg, 0.25 mmol) en metanol (1 ml) se añade K_2CO_3 (52 mg, 0.38 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo se neutraliza con HCl 1N, se extrae con acetato de etilo (3 x 10 ml), y la fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo). Se obtienen así 60 mg (68%) de **3.53** como un sólido rosáceo. **Pf** 131-133 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 352 ($M+H$)⁺. **¹H-RMN** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.66 (dd, 2H, $J = 16.3, 2.9$ Hz, H-4, H-6), 2.86 (m, 2H, H-4, H-6), 3.35 (tt, 1H, $J = 12.8, 4.0$ Hz, H-5), 4.37 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 5.34 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, OH), 7.04 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ar), 7.18 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 7.23 (m, 1H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.37 (m, 1H, Ar), 7.44 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.1$ Hz, Ar), 14.83 (s ancho, 1H, NH). **¹³C-RMN** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 36.5 (C-5), 46.0 (C-4, C-6), 56.4 (CH_2), 58.4 (O CH_3), 108.9 (NHC=C), 112.6, 121.0, 125.2, 126.3, 127.0, 127.2, 129.0, 129.5, 143.7, 152.9 (Ar), 171.2 (NHC=C), 196.7, 200.1 (CO). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{21}H_{22}NO_4$: C, 71.78; H, 6.02; N, 3.99. Encontrado: C, 71.72; H, 5.98; N, 4.01.

3. MÉTODOS COMPUTACIONALES

Todos los cálculos realizados para el cribado virtual se realizaron en el sistema Dell Precision T7400. El conjunto de los programas empleados (FILTER, OMEGA, ROCS y VIDA) pertenecen a OpenEye Scientific Software²⁶ y se obtuvieron mediante una licencia académica.

3.1. Preparación de la base de datos

Se empleó la versión 8 de la base de datos ZINC,²⁷ que contiene aproximadamente 8,5 millones de moléculas almacenadas en formato SMILES.

En primer lugar se llevó a cabo un filtro de dicha base de datos a partir de la herramienta “drug-like filter” que se encuentra en el programa FILTER v2.1.1. La mayoría de los parámetros se mantuvieron según los valores que el programa establece por defecto, si bien algunos se modificaron, por ejemplo: el rango de peso molecular permitido (150-800), el número de átomos distintos de hidrógeno (9-60), el valor máximo de clogP (6.85) o los grupos funcionales reactivos a descartar. Tras este filtro, la base de datos se redujo a aproximadamente 2,8 millones de moléculas.

A continuación, mediante el programa OMEGA v2.3.2. se obtuvieron las estructuras 3D y las cargas atómicas de las moléculas pertenecientes a la base de datos filtrada, generando asimismo los distintos confórmeros de todas ellas. Se utilizaron los parámetros tal y como se encuentran predeterminados en el programa, salvo tres de ellos: el número máximo de confórmeros generados para cada molécula, que se limitó a 300; la ventana de energía, la cual se estableció en 20 kcal/mol; y un límite de RMSD (*Root Mean Square Deviations*) entre confórmeros de 0.75 Å, para así eliminar duplicados. Como resultado se obtuvieron un total de 510 millones de entidades químicas en formato *mol2* con las que efectuar el cribado virtual.

3.2. Cribado virtual

Para el cribado virtual se empleó el programa ROCS v3.1.2 (*Rapid Overlay of Chemical Structures*). ROCS superpone las distintas estructuras 3D de los compuestos con la del ligando de referencia, en base a la forma y al mapa de potencial electrostático o “color”. El ligando empleado como “query” fue el compuesto TN-16, cuya estructura de rayo X con el dímero de tubulina se encuentra depositada en el PDB (*Protein Data Bank*) (PDBID: 3HKD).

ROCS se ejecutó a través de las herramientas establecidas por defecto. Como parámetro de medida de similitud de la forma se empleó el coeficiente de Tanimoto, fijando su punto de corte en 0.75. La analogía global en los parámetros forma y “color” se valoró mediante el parámetro denominado *ComboScore*, cuyo valor mínimo se limitó a 1.4.

Finalmente, se efectuó un análisis visual de los resultados del cribado virtual mediante el programa VIDA v4.1.1, seleccionando tras ello los compuestos más prometedores para la evaluación biológica. Los *hits* 3.1 y 3.4 se obtuvieron de la casa comercial AKOS. Los *hits* 3.2 y 3.5 se compraron en ChemDiv, y 3.3 en Menai Organics. El compuesto 3.6 se sintetizó conforme precedentes bibliográficos.⁹⁻¹¹

3.3. Estudios de *docking* y dinámica molecular.

A) *Docking*

La estructura de **3.16c** generada con el servidor CORINA, se optimizó mediante el programa semiempírico de orbitales moleculares MOPAC2007,²⁸ haciendo uso del hamiltoniano AM1. Las cargas atómicas puntuales (ESP) se calcularon también con MOPAC2007. Para la exploración de los posibles modos de unión se definió una caja que incluía todo el denominado “dominio de unión de colchicina”, con un número total de puntos de grid de 44x44x44. Para generar los distintos modos de unión de **3.16c** se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano implementado en Autodock 4.0.5,²⁹ modificando aleatoriamente la orientación de la molécula y los ángulos torsionales de todos los enlaces rotables. Se emplearon los parámetros por defecto del programa, excepto el número de resultados (250), el tamaño de la población (100) y el número máximo de evaluaciones de energía (250000). Mediante el cálculo previo con Autogrid de los potenciales de afinidad del sitio de unión para carbonos alifáticos y aromáticos, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno en una red tridimensional con un espaciado de 0.375 Å, se consiguió una rápida evaluación de la energía intra e intermolecular de cada configuración. Para el cálculo de las interacciones electrostáticas se utilizó una función dieléctrica dependiente de la distancia.

B) Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo empleando los programas de la suite de AMBER 10.0.³⁰ Los complejos tubulina/**3.16c** se neutralizaron mediante la adición de iones de sodio³¹ y se hidrataron introduciéndolos en una octahedro truncado de moléculas de agua TIP3P.³² Los efectos de borde se minimizaron empleando condiciones de límite periódico. Para el cálculo de las interacciones electrostáticas de la celdilla unidad se usó PME (*Particle Mesh Ewald*),³³ con un espaciado de red de 1 Å. La distancia de corte para las interacciones no enlazantes fue de 9 Å. Se aplicó el algoritmo SHAKE³⁴ a todos los enlaces y un tiempo de integración de 2.0 fs. Las moléculas de disolvente y los contraiones fueron sometidos a una minimización energética y se redistribuyeron alrededor del soluto restringido posicionalmente (25 Kcal mol⁻¹ Å⁻²) durante 50 ps de la dinámica molecular a temperatura y presión constantes (300 K y 1 atm, respectivamente). Las restricciones armónicas se fueron eliminando gradualmente y el sistema resultante se equilibró en ausencia de restricciones durante 10 ns, recogiendo cada 2 ps las coordenadas del sistema para su posterior análisis.

Las estructuras tridimensionales de los complejos y las trayectorias de dinámica molecular se visualizaron e inspeccionaron con el programa PyMOL.³⁵ La posterior monitorización de los cambios producidos durante la dinámica (distancias interatómicas, torsionales y RMSD) se realizaron con el módulo Ptraj de AMBER.

4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

En todos los ensayos efectuados los compuestos a evaluar se solubilizaron en medio de cultivo DMEM (Gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies) con FCS (suero fetal bovino, *Fetal Calf Serum*, Life Technologies) y con DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) al 0.1%. Todos los ensayos incluyeron un control negativo empleando una muestra que únicamente contuvo DMSO al 0.1%, y al menos un control positivo con colchicina (i.3) y/o CA-4P (i.6) a distintas concentraciones.

4.1. Proliferación celular.

Los datos se expresaron como Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}), que se define como la concentración de compuesto que inhibe la proliferación del 50% de las células, como la media \pm la desviación estándar de tres ensayos diferentes. En cada ensayo se hicieron triplicados de cada pocillo a estudio para conseguir minimizar al máximo los errores experimentales.

El medio de cultivo celular fue DMEM con FCS al 10%, donde crecieron las diferentes líneas de células endoteliales y tumorales que a continuación se describen:

- Células tumorales. La línea celular HeLa (carcinoma de cervix humano) se cultivó en una placa de 96 pocillos a una concentración de 15000 células por pocillo y se incubó en presencia de los compuestos a 37 °C durante 4 días. Las líneas L1210 (leucemia linfocítica de ratón) y CEM (leucemia linfoblástica humana) se cultivaron en una densidad de 60000 células por pocillo en una placa de 96, y se incubaron 2 y 4 días respectivamente, tras la adición de los compuestos. Luego se añadió tripsina para recoger las células acumuladas en el fondo de la placa, que se contabilizaron en un Coulter Counter, calculándose finalmente el valor medio de los distintos triplicados.

- Células endoteliales. Las líneas celulares MBEC (células endoteliales de cerebro de ratón) y BAEC (células endoteliales de la arteria aórtica de bovino) se cultivaron en una placa de 48 pocillos a una concentración de 10000 células por pocillo, mientras que la línea HMEC-1 (células endoteliales microvasculares de la dermis humana) se cultivó a una concentración de 20000 células por pocillo. Las células proliferaron durante 3 días a 37 °C (4 días para el caso de HMEC-1), en presencia de los compuestos a estudio, a distintas concentraciones. Transcurrido este tiempo, se añadió tripsina para recoger las células acumuladas en el fondo de la placa, que se contabilizaron en un aparato Coulter Counter (Analis, Belgium), obteniendo el valor medio de los distintos triplicados.

4.2. Análisis del ciclo celular.

Las células (HeLa o HMEC-1) se cultivaron en medio DMEM con FCS al 10% a una concentración de 125000 células por pocillo, empleando una placa de 6 pocillos. Tras 24 horas se añadieron los compuestos a estudio, que se incubaron durante 8-24 horas a 37 °C. Luego se añadió yoduro de propidio para la detección del ADN celular, utilizando el Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit (BD Biosciences, San Jose, CA). Transcurridas tres horas, el contenido en ADN de las células se midió en un citómetro FACSCalibur y el análisis posterior se efectuó por medio del programa CellQuest (BD Biosciences), excluyendo los desechos y aglomerados celulares. Los porcentajes de las

células en las fases sub-G1, G1, S y G2/M se estimaron empleando marcadores apropiados de cada región.³⁶

4.3. Formación de tubos.

En primer lugar, se rellenó una placa de 96 pocillos con 70 μ l de matrigel (10 mg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) manteniendo la temperatura a 4 °C. Tras 30 minutos de incubación a 37 °C el matrigel adquirió un aspecto gelatinoso y sobre esta superficie se sembraron para la continuación las células HMEC-1 en medio DMEM con FCS al 10% (200 μ l), a una concentración de 60000 células por pocillo. Transcurridos varios minutos de incubación a 37 °C, las células endoteliales se organizaron en unas estructuras tubulares, que fueron muy claras tras 3 horas. En este momento se añadieron los compuestos a estudio a diferentes concentraciones. 90 minutos más tarde se tomaron fotografías al microscopio de cada uno de los pocillos, empleando el objetivo 100x.

4.4. Unión a tubulina.

La línea MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) se cultivó en medio DMEM con FCS al 10% sobre una placa de 96 pocillos, a una concentración de 500000 células por pocillo. Transcurridas 48 horas, los compuestos se añadieron y se dejaron en contacto con las células 16 horas más. En este punto se adicionó EBI (*N,N*-etilen(bis)iodoacetamida) (100 μ M) que se incubó durante 90 minutos. Luego, las células se recogieron de cada pocillo y se prepararon para el análisis por inmunoblot. Para la electroforesis en gel se sembraron 20 μ g de proteínas de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 10% con 0.1% de SDS (docedil sulfato sódico) cuya pureza fue del 85%, porcentaje que permitía una óptima separación de las proteínas. Tras la electroforesis, las bandas de las distintas proteínas de cada muestra se transfirieron a una membrana Hybond-P de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (Amersham Biosciences). Estas membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en *buffer* de bloqueo, constituido por PBS (tampón fosfato salino, *Phosphate Buffered Saline*) con leche desnatada al 2.5% y Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0.1%. El anticuerpo primario (anti β -tubulina) se añadió disuelto en *buffer* de bloqueo (1/1000) y se dejó en contacto durante 16 horas a 4 °C. Tras sucesivos lavados con Tween 20 al 0.1% en PBS, se adicionó el anticuerpo secundario de ratón conjugado con peróxidasa de rábano, también disuelto en *buffer* de bloqueo (1/20000). Transcurridos 25 minutos a temperatura ambiente, las membranas se lavaron nuevamente con Tween 20 al 0.1% en PBS (x3) y se midió la reacción quimioluminiscente. EBI se une por una doble alquilación a los residuos de cisteína de las posiciones 239 y 354 de la subunidad β de tubulina, dando como resultado una nueva banda (EBI/tubulina) de mayor movilidad electroforética respecto a la banda de tubulina libre.³⁷

4.5. Determinación de las constantes de asociación.

▪ Proteínas y ligandos. La tubulina de cerebro de ternero se purificó tal y como se describe en la literatura.³⁸ El compuesto 2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (MTC)³⁹ se obtuvo del Profesor T.J. Fitzgerald (School of Pharmacy, Florida A & M University). (*R*)-(+)-etil-5-amino-2-metil-1,2-dihidro-3-fenilpirido[3,4-*b*]pirazin-7-il carbamato (*R*-PT)⁴⁰ fue suministrado por el Profesor G.A. Rener (Organic Chemistry Research Department, Southern Research Institute,

Birmingham, Alabama). Tanto MTC como R-PT son ligandos específicos del sitio de colchicina en tubulina.

- Estudio de competición con el ligando MTC. La competición de los compuestos sintetizados con MTC por la ocupación del sitio de colchicina en tubulina se estudió en base a la variación de la intensidad de fluorescencia del complejo MTC/tubulina. Así, la fluorescencia emitida por el complejo MTC/tubulina ($\lambda_{\text{excitación}}=374$ nm) disminuye en presencia de un inhibidor competitivo del sitio de colchicina.⁴¹ El espectro de emisión de fluorescencia de una muestra 10 μM de tubulina y 10 μM de MTC en PBS, con 0.1 mM de GTP y a un pH de 7.0, se midió en ausencia y presencia de compuesto (20 μM) mediante Jobin-Yvon SPEX Fluoromax-2 (HORIBA, Ltd. Kyoto, Japan). Una disminución en la intensidad de fluorescencia indicaría la unión del compuesto de interés al sitio de colchicina en tubulina.

- Determinación de la constante de asociación. Una muestra 0.2 μM de R-PT se incubó en PBS con 0.1 mM de GTP a un pH de 7.0 y a 25 °C, añadiendo cantidades crecientes de tubulina hasta 10 μM y viceversa, es decir, a una muestra de tubulina 0.2 μM se adicionaron cantidades crecientes de R-PT hasta 10 μM . El espectro de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}=374$ nm) de las distintas muestras se determinó empleando Jobin-Yvon SPEX Fluoromax-2 (HORIBA, Ltd. Kyoto, Japan). Mediante el espectro obtenido se calculó la concentración R-PT unido o libre de cada muestra, lo que proporcionó la constante de asociación de R-PT con tubulina (K_a), cuyo valor fue de $5.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. De esta forma, este compuesto se pudo utilizar como ligando de referencia para la medición de las constantes de asociación de los compuestos a estudio. Para ello, a distintas muestras con 0.2 μM de R-PT y 0.2 μM de tubulina en una placa de 96 pocillos, se añadieron concentraciones crecientes de los ligandos de interés (0; 0.05; 0.2; 0.5; 2; 5; 10; 30; 50; 70 μM), y la placa se incubó durante 30 minutos a 25 °C en un Varioskan Plate Reader (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA), donde se midió la intensidad de fluorescencia emitida a $\lambda=456$ nm ($\lambda_{\text{excitación}}=374$ nm). Los resultados se analizaron y las constantes se determinaron empleando el programa Equigra V5.0.⁴²

4.6. Inmunocitoquímica

Las células MDA-MB-231 se cultivaron en DMEM con FCS al 10% sobre cámaras de 8 celdas (Lab-Tek, Nunc, Roskilde, Denmark) cubiertas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), y tras 24 horas se añadió el compuesto a evaluar. Después de 8 horas de incubación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron con PBS (x3) y se permeabilizaron tratándolas con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.25% en PBS durante 10 minutos. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon mediante tratamiento con BSA (albúmina de suero bovino) al 0.5% en PBS. A continuación, las células se incubaron a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti β -tubulina (2 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) durante 2 horas, se lavaron con PBS (x3) y fueron de nuevo incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario de ratón, Alexa Fluor 488 (4 $\mu\text{g/ml}$; Molecular Probes, Invitrogen) en PBS con 0.5% de BSA. Tras varios lavados, el ADN celular se tiñó con 300 nM de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich). En los experimentos encaminados a visualizar las fibras de actinas se adicionó tetrametilrodamina B faloidina-isocianato (Life Technologies) antes de la adición de DAPI, y las muestras se lavaron con PBS (x3). Las muestras se analizaron en un microscopio invertido Axiovert

200 M (Zeiss, Göttingen, Germany), empleando un objetivo EC Plan-Neofluar 40x/1.30, impregnado de aceite. Las imágenes se tomaron con una cámara AxioCamMRm y se procesaron con el programa AxioVision Release 4.6 (Zeiss).

4.7. Ensayos de migración e invasión celular

En este experimento se emplearon membranas perforadas con poros de 8 μm (BD Biosciences) que se cubrieron con matrigel al 10% (BD Biosciences) y se mantuvieron 1 hora a 37°C. A continuación, sobre estas membranas se sembraron las células MDA-MB-231 en medio de cultivo DMEM con FCS al 1%, a una concentración de 50000 células por membrana. A continuación, se adicionaron los compuestos a ensayar, así como DMSO. Para conseguir la migración celular a través de los poros, se dispuso una placa en contacto con medio DMEM, que en este caso contenía FCS al 10%, que actuaba como quimioatrayente. Tras 15 horas se eliminaron las células que no consiguieron migrar y luego se tomaron fotografías de aquellas que alcanzaron la placa, para ser contabilizadas.

5. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD

5.1. Medidas experimentales de solubilidad

Una suspensión en PBS con exceso de compuesto se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se filtró y dicho filtrado se analizó por HPLC. La medición se efectuó en un cromatógrafo Aligent Technologies 1120 Compact LC utilizando una columna de fase reversa ACE 5 C-18-300 (150 x 4.6 mm), un detector Photodiode Array (PDA), y como fase móvil: A: CH₃CN y B: H₂O con 0.05% de TFA. Se utilizaron distintos tipos de gradientes en función del compuesto a analizar, manteniendo el flujo a 1 ml/min. La solubilidad se calculó interpolando el área del pico obtenido por HPLC a 254 nm en la recta de calibrado, que se obtuvo previamente a partir de concentraciones conocidas del compuesto a estudio y que se prepararon a partir de una disolución patrón en DMSO. Cuando la absorbancia excedió los valores de la recta de calibrado se tuvo que diluir la muestra en PBS hasta conseguir un valor dentro del rango.

5.2. Ensayos de estabilidad química en tampón fosfato

Para llevar a cabo estos ensayos se prepararon disoluciones 50 µM en PBS de cada compuesto a estudiar, a partir de disoluciones patrón 50 mM en DMSO, y luego se incubaron a 37 °C. A continuación, se analizaron alícuotas de 100 µl a determinados periodos de tiempo (0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h) en un cromatógrafo HPLC Aligent Technologies 1120 Compact LC, utilizando una columna de fase reversa ACE 5 C-18-300 (150 x 4.6 mm), un detector Photodiode Array (PDA) y como fase móvil: A: CH₃CN y B: H₂O con 0.05% de TFA. En todos los casos el flujo fue de 1 ml/min y se usaron distintos tipos de gradientes según el compuesto a estudio.

5.3. Ensayos de estabilidad en suero humano (SH) y extracto de hígado murino

Los ensayos se realizaron en tubos Eppendorf a 37 °C y a un pH de 7.4, para simular las condiciones fisiológicas. A uno de estos tubos se añadió SH al 10% en PBS (300 µl) y a otro extracto de hígado murino al 50% (300 µl). Luego, se añadió el compuesto a ensayar, a una concentración de 100 µM con DMSO al 5%. A determinados periodos de tiempo (0, 20, 60 y 180 min) se tomaron alícuotas de 50 µl de cada mezcla de reacción, y a continuación se adicionó 100 µl de MeOH previamente enfriado. Se mantuvieron 10 minutos en hielo, y transcurrido este tiempo, se centrifugaron los contenidos del tubo durante otros 10 minutos a 10000 rpm, y luego el sobrenadante se evaporó con el aparato Speedvac (Savant; Werchter, Belgium). El residuo resultante se redisolvió en PBS y se analizó por HPLC (Waters, Milford, MA) utilizando una columna de fase reversa C-18 (LiChroCard, Merck, Darmstadt, Germany). Fase móvil: 50% A (H₂O con TFA al 0.05%) y 50% B (CH₃CN). El flujo fue de 1 ml/min y para la detección se empleó el detector Photodiode Array (PDA).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Roggen, H.; Gundersen, L. L. Synthetic studies directed towards agelasine analogs—synthesis, tautomerism, and alkylation of 2-substituted *N*-methoxy-9-methyl-9*H*-purin-6-amines. *Eur. J. Org. Chem* **2008**, *30*, 5099-5106.
2. Montgomery, J. A.; Temple, C. Synthesis of potential anticancer agents. XXIII. 9-Aminohypoxanthine and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *82*, 4592-4596.
3. Kearney, P. Inhibitors of PI3K-delta and methods of their use and manufacture. WO 2012037226 A1. **2012** Mar 22.
4. Magnus, P.; Sebhat, I. K. Application of the β -azidonation reaction to the synthesis of the antitumor alkaloid (+)-pancratistatin. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15509-15524.
5. Scheiders, G. E.; Stevenson, R. Structure and synthesis of (\pm)-wuweizisu C. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2969-2971.
6. Han, X.; Pradeep, S. N. D.; Critchley, K.; Sheikh, K.; Bushby, R. J.; Evans, S. D. Supported bilayer lipid membrane arrays on photopatterned self-assembled monolayers. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7956-7964.
7. Yoo, D.; Oh, J. S.; Lee, D. W.; Kim, Y. G. Efficient synthesis of a configurationally stable L-serinal derivative. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2979-2982.
8. García-Aparicio, C.; Bonache, M. C.; Meester, I. D.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Design and discovery of a novel dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-based prodrug approach. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5339-5351.
9. Gundersen, L. L.; Bakkestuen, A. K.; Aasen, A. J.; Øver, H.; Rise, F. 6-Halopurines in palladium-catalyzed coupling with organotin and organozinc reagents. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9743-9756.
10. Seiji, Y.; Eita, E.; Fumiyoshi, M.; Richard, C.; Hironori, I.; Kazunobu, K.; Nobuyuki, Y.; Tadashi, N.; Kazuto, Y. Condensed imidazole derivatives. US 20040116328 A1. **2004** Jun 17.
11. Pottabathini, N.; Bae, S.; Pradhan, P.; Hahn, H.-G.; Mah, H.; Lakshman, M. K. Synthesis and reactions of 2-chloro- and 2-tosyloxy-2'-deoxyinosine derivatives. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7188-7195.
12. Kochergin, P. M.; Persanova, L. V.; Aleksandrova, E. V.; Gutorov, L. A.; Korsunskii, V. S. Syntheses of *N*2-alkyl(aryl, dialkyl, cycloalkyl)guanines. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1996**, *32*, 391-394.
13. Hamano, S.; Kitamura, S.; Nakajima, Y. 2-substituted-cyclohexane-1,3 dione derivatives, and pharmaceutical composition containing them. EP 0017195 B1. **1980** Oct 15.
14. Zumbansen, K.; Döhring, A.; List, B. Morpholinium trifluoroacetate-catalyzed aldol condensation of acetone with both aromatic and aliphatic aldehydes. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1135-1138.
15. Poulhès, F.; Sylvaina, R.; Perfettia, P.; Bertrand, M. P.; Gil, G.; Gastaldi, S. Straightforward access to α -methylamines through cross-metathesis. *Synthesis* **2010**, *8*, 1334-1338.
16. Kon, G. A. R. The chemistry of the three-carbon system. Part V. The alkylation of unsaturated ketones. *J. Chem. Soc.* **1926**, *129*, 1792-1801.
17. Bardhan, J. C.; Banerjee, R. C. Synthesis of polycyclic compounds. Part V. The cyclodehydration of 3-benzylcyclohexanol. *J. Chem. Soc.* **1956**, 1809-1812.
18. Zhang, W.; Benmohamed, R.; Arvanites, A. C.; Morimoto, R. I.; Ferrante, R. J.; Kirsch, D. R.; Silverman, R. B. Chiral cyclohexane 1,3-diones as inhibitors of mutant SOD1-dependent protein aggregation for the treatment of ALS. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1029-1045.

19. Barker, O. R.; Courtney, S. M.; Gardiner, M. D.; Hestekamp, T.; Mather, O. C.; Montalbetti, C. A. G. N.; Whittaker, M.; Yarnold, C. J. Quinazolin-oxime derivatives as hsp90 inhibitors. WO 2008142720 A2. **2008** Nov 27.
20. Johannes, K. A.; Kalervo, P. E.; Antero, K. K. O. Substituted imidazole derivatives and their preparation and use. EP 0058047 A1. **1983** Jan 12.
21. Keith, L. J.; Ann, H. M. Fungicidal pyrazoles. WO 2012030922 A1. **2012** Mar 08.
22. Kumar, N. N. B.; Chakravarty, M.; Kumar, N. S.; Sajna, K. V.; Swamy, K. C. K. Allenylphosphonates with a 1,3,2-dioxaphosphorinane ring: synthesis, structures, stability and utility. *J. Chem. Sci.* **2009**, *121*, 23-36.
23. Stern, T.; Rückbrod, S.; Czekelius, C.; Donner, C.; Brunner, H. A selective and benign synthesis of functionalized benzalacetones via mizoroki-heck reaction using aryldiazonium salts. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1983-1990.
24. Le, P. Q.; Nguyen, T. S.; May, J. A. A general method for the enantioselective synthesis of α -chiral heterocycles. *Organic Lett.* **2012**, *14*, 6104-6107.
25. McCalmont, W. F.; Patterson, J. R.; Lindenmuth, M. A.; Heady, T. N.; Haverstick, D. M.; Gray, L. S.; Macdonald, T. L. Investigation into the structure-activity relationship of novel concentration dependent, dual action T-type calcium channel agonists/antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3821-3839.
26. OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, NM, USA. www.eyesopen.com.
27. Irwin, J. J.; T, S.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model* **2012**, *52*, 1757-1768.
28. Stewart, J. Stewart Computational Chemistry, version 7.326L. <http://openmopac.net/>.
29. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.
30. Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Crowley, M.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Kollman, P. A. (2008), AMBER 10, University of California, San Francisco. <http://amber.scripps.edu/>.
31. Aqvist, J. Ion water interaction potential-derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.
32. L. Jorgensen, W.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
33. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh ewald - an n.Log(n) method for ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.
34. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - Molecular dynamics of N-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327-341.
35. DeLano, W. PyMOL version 0.99, DeLano Scientific LLC, South San Francisco, California, USA. <http://pymol.sourceforge.net/>.
36. Liekens, S.; Gijsbers, S.; Vanstreels, E.; Daelemans, D.; Clercq, E. D.; Hatse, S. The nucleotide analog cidofovir suppresses basic fibroblast growth factor (FGF2) expression and signaling and induces apoptosis in FGF2-overexpressing endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 695-703.
37. Fortin, S.; Lacroix, J.; Cote, M. F.; Moreau, E.; Petitclerc, E.; Gaudreault, R. C. Quick and simple detection technique to assess the binding of antimicrotubule agents to the colchicine-binding Site. *Biol. Proced. Online* **2010**, *12*, 113-117.

38. Andreu, J. M. Large scale purification of brain tubulin with the modified Weisenberg procedure. *Methods Mol. Med.* **2007**, *137*, 17-28.
39. Fitzgerald, T. J. Molecular features of colchicine associated with antimetabolic activity and inhibition of tubulin polymerization. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 1383-1387.
40. Temple, C.; Rener, G. A.; Comber, R. N. New anticancer agents - Alterations of the carbamate group of ethyl (5-amino-1,2-dihydro-3-phenylpyrido-3,4-b-pyrazin-7-yl)carbamates. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2363-2367.
41. Leynadie, D.; Peyrot, V.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Andreu, J. M.; Rener, G. A.; Temple, C. Tubulin binding of two 1-deaza-7,8-dihydropteridines with different biological properties: enantiomers NSC 613862 (S)-(-) and NSC 613863 (R)-(+). *Biochemistry* **1993**, *32*, 10675-10682.
42. Díaz, J. F.; Buey, R. M. Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol. Med.* **2007**, *137*, 245-260.

