

UNIVERSIDAD  DE ALCALÁ

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica



TESIS DOCTORAL

**DIANAS IMPLICADAS EN LA ENFERMEDAD RENAL:
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE
PTP-1B Y FABP**

PATRICIA SÁNCHEZ ALONSO
Alcalá de Henares, Diciembre de 2013

UNIVERSIDAD  DE ALCALÁ

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica



TESIS DOCTORAL

**DIANAS IMPLICADAS EN LA ENFERMEDAD RENAL:
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE
PTP-1B Y FABP**

MEMORIA

*Que para optar al grado de
Doctor en Química Médica
presenta*

PATRICIA SÁNCHEZ ALONSO
Alcalá de Henares, Diciembre de 2013

Campus Universitario
Ctra. Madrid–Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Tel. (91) 885 46 49
Fax (91) 885 46 86

DPTO. DE QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA

Los abajo firmantes, **Dr. Ramón Alajarín Ferrández**, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y **Prof. Dr. Juan José Vaquero López**, Catedrático del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá.

CERTIFICAN: Que la Memoria presentada por **Dña. Patricia Sánchez Alonso**, con el título: “*Dianas implicadas en la Enfermedad Renal: Síntesis y Evaluación de Nuevos Inhibidores de PTP-1B y FABP*” ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Alcalá de Henares, Diciembre de 2013

Fdo. Juan José Vaquero López

Fdo. Ramón Alajarín Ferrández

Campus Universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Tel. (91) 885 46 49
Fax (91) 885 46 86

DPTO. DE QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA

El **Prof. Dr. Manuel Gómez Rubio**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA: Que **Dña. Patricia Sánchez Alonso**, Licenciada en Química por la Universidad de Alcalá, ha realizado en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del **Prof. Dr. Juan José Vaquero López** y del **Dr. Ramón Alajarín Ferrández** el trabajo experimental recogido en la presente Memoria y titulado: ***“Dianas implicadas en la Enfermedad Renal: Síntesis y Evaluación de Nuevos Inhibidores de PTP-1B y FABP”*** y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Diciembre de 2013

Fdo. Manuel Gómez Rubio

Son muchos y diversos los sentimientos que he albergado a lo largo de estos años realizando esta Tesis Doctoral, al igual que son muchas las personas que me han apoyado, ayudado e interesado por mí y por este trabajo, además de todas aquellas que he podido conocer y disfrutar a lo largo de este camino. Es por ello, que quiero comenzar dando las gracias a todos y a cada uno de vosotros por hacer posible y, en algunos casos, más fácil la realización de esta Tesis.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis dos directores de Tesis, al Prof. Juan José Vaquero por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su apoyo e interés en todo momento; y al Dr. Ramón Alajarín Ferrández, gracias por estar siempre ahí, por resolver todas mis dudas en el campo de la química, por tus consejos, tu confianza y sobre todo, por los ánimos que me has dado en esta última parte del camino.

A la Universidad de Alcalá por la concesión de una beca sin la cual no hubiese sido posible la realización de esta Tesis y por el apoyo financiero para la realización de la estancia predoctoral.

Quiero dar las gracias al Prof. Julio Álvarez-Builla y al resto de profesores del departamento, en especial a Carolina, Marisa, David, Lourdes, etc... por su interés, consejos y buena disposición en todo momento, y a la Dra. Ana M^a Cuadro porque bajo tu codirección comencé a dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación.

Al Dr. Mijail Galakhov por su colaboración en los estudios de RMN y por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas. Al PAS y en particular a Eugenia y a Gloria, gracias por realizar tan bien vuestro trabajo y por ser como sois, he pasado muy buenos momentos con vosotras!

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han colaborado y contribuido directamente en la realización de esta Tesis:

Al Dr. Diego Rodríguez Puyol, Dra. María Luisa Díez Marqués, al Prof. Manuel Rodríguez Puyol, del Departamento de Biología de Sistemas de la UAH, por su colaboración e interés en la realización de los estudios de actividad de mis compuestos y, especialmente, a Mercedes Griera porque ha sido un placer trabajar contigo, siempre dispuesta a hacer los ensayos y a resolver mis dudas. Al Dr. Rafael Selgas, Dra. Teresa Bellón y Arancha Rodríguez, de la Unidad de Investigación del Hospital La Paz, por los ensayos de actividad que han realizado. Al Dr. Bernardo Herradón (CSIC) y su grupo por los estudios de modelado molecular. Al Dr. Manuel Temprado Morera, del Departamento de Química Analítica, Química Física e

Ingeniería Química de la UAH, por los cálculos *ab initio* realizados para la confirmación de las estructuras y del mecanismo de reacción.

Y, en especial, quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio porque con ellos he aprendido, disfrutado y compartido este camino. A Alejandro porque a pesar de que coincidimos durante muy poco tiempo en el laboratorio, nunca olvidaré esas largas charlas que mantuvimos así como los sabios consejos que me diste. A Rafa, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme. A Gonzalo, gracias por tus consejos, tu ayuda y por estar siempre pendiente cuando he tenido que manejar *tert*-butil litio!. A Raúl porque, gracias al proyecto de Servier, he podido trabajar contigo y he de decir que es todo un placer, gracias por estar siempre dispuesto a escucharme, a ayudarme con las reacciones, los espectros y gracias por todas esas risas que hemos compartido. A Roberto, porque además de compartir y coincidir en distintas fases de la tesis (laboratorio, escritura y correcciones) hemos compartido muchos cafés y con ello, muchas conversaciones. Gracias por escucharme siempre que lo he necesitado, por tus consejos y ánimos, dentro y fuera del laboratorio, y sobre todo, gracias por hacerme reír con tus tontunas! Por cierto, las columnas no son solo cosas de chicas.... Jaja!!! A mis dos italianas, Anna y Fabiana, porque en este último año he podido conoceros un poquito mejor. Anna eres un torbellino, siempre activa, enérgica y con una sonrisa en la cara y eso se contagia!. Fabiana eres todo amor, con un gran corazón pero también con una fuerte personalidad, no cambies nunca! Muchas gracias por todos los momentos que hemos compartido, por vuestra comprensión, vuestros ánimos y vuestro cariño. Espero compartir muchos más momentos en años futuros. A Bea, gracias por ser como eres, por tu sinceridad (aunque a veces duela) y por tu fortaleza, tanto en el ámbito personal como en el profesional, porque de ella he aprendido mucho. Son muchos los momentos de alegría y de tristeza que hemos compartido y, en todos y en cada uno de ellos, siempre te he sentido muy cerca. A María, porque tu frescura y vitalidad contagian...desprendes alegría y desparpajo por los cuatro costados!!! A Marta, porque en estos dos últimos años ha sido cuando realmente te he conocido y eres genial! Gracias por estar siempre ahí, por escucharme y preocuparte, gracias por tus consejos, ánimos y esa perspectiva tan positiva y alegre que tienes de la vida! A Tati, porque siempre me has apoyado en los buenos y malos momentos, gracias por escucharme! A Elena (o "Ele" como te digo yo cariñosamente), mil gracias! más que a una compañera de trabajo he encontrado a una gran amiga! Gracias por estar siempre ahí, por animarme, comprenderme y aconsejarme en mis malos momentos. Por sacarme una sonrisa en los días más grises y por acompañarme en mis días soleados. Por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas y los que vendrán! Gracias por estar siempre tan dispuesta a enseñarme dentro del laboratorio (es lo que tiene ir la primera), en la escritura y, sobretodo, en la vida! Gracias de todo corazón!! A María Rosa, porque aunque fue poco el tiempo que estuviste en el laboratorio, fue suficiente

para conocerte y ver lo increíble que eres!!!! Gracias por ser tan optimista, alegre, divertida y buena persona!!!

A los que ya no están en el laboratorio: Álvaro, Valentina, Marco... y a los que empiezan o siguen: Sara G., Pedro, Alberto, Elena G., Felipe, Idoia, Katerina, Sara S., Marina... gracias por vuestros consejos y mucho ánimo, todo llega!!!!

A Verónica, "mi amiga de la Complu", porque gracias al mundo de la química he podido conocer a una gran persona! Congreso tras congreso y quedada tras quedada, nos hemos conocido... y eres genial! Una persona muy divertida, alegre, optimista, con muchas ganas de comerse el mundo y sobre todo con un gran corazón!

A mis compis de Inorgánica, Adrián, Edwin, Carlos y María, gracias por las risas que hemos compartido a la hora de la comida!

A mis químicos favoritos, *mis pestuzos*, David, Laura, Fuyu y Alma!!! Chicos, gracias por estar siempre ahí, por apoyarme en mis malos momentos, por preocuparos por mí y por regalarme tantísimos buenos momentos! Han sido muchas las risas que hemos compartido y que seguiremos compartiendo! Me siento muy querida a vuestro lado! No cambiéis nunca!!!

A mis amigas Raquel, Ana, Elena, Patri y Claire.... porque a pesar de que nos conocemos desde no hace mucho tiempo, es increíble ver como os preocupáis por mí, me siento muy apoyada y arropada por vosotras. Gracias por todos vuestros consejos y ánimos, dentro y fuera del laboratorio, por compartir mis alegrías y mis tristezas! Mil gracias por haberme dejado conoceros, sois muy especiales e importantes para mí!

A Gregorio y M^a Jesús, porque aunque no os guste que os de las gracias, os las quiero dar. Gracias por estar tan pendientes de mí, por preocuparos y animarme en todo momento.

Y sobre todo quiero dar las gracias a las personas más importantes en mi vida, MI FAMILIA.

A mis abuelos Leoncio, Eufemia y Daniel, porque aunque ya no estéis aquí o no te haya podido conocer os llevo siempre conmigo. Me hubiese gustado compartir con vosotros este momento tan importante para mí así como momentos próximos que vendrán, y que os sintieseis orgullosos de vuestra nieta, esa niña llorona en su infancia al final se ha convertido en una persona fuerte capaz de superar los obstáculos que se le han ido presentado en la vida. Gracias por cuidarme, por enseñarme, por vuestra dedicación y vuestra ternura, pero sobre todo por todo el amor que me habéis dado. A

mi abuela Marcela, gracias por ser como eres, una persona tan vital, valiente, preocupada por todo y por todos, con una fortaleza increíble y con un corazón aún más grande! Ojalá sea yo la mitad de valiente y fuerte que has sido tú en la vida. Gracias por todo el amor que me das.

A mi tía Pilu y a mi tío Luis, gracias por estar siempre que os he necesitado, por cuidarme, mimarme, ayudarme y enseñarme cuando era una niña. Gracias por vuestro apoyo y por vuestros ánimos en todos mis proyectos, por acompañarme en mis alegrías y en mis tristezas pero, sobre todo, gracias por quererme tanto. Y a Álvaro, la alegría de la casa, contigo los problemas y tristezas desaparecen! Un día nublado se convierte en un soleado! Es increíble ver como un niño puede dar tanto! Gracias pitufo!!!!

A mi tía Loli, porque sé que siempre andas muy pendiente de nosotros aunque no hablemos a menudo. Gracias por tu preocupación, por tu comprensión y cariño, por estar siempre cuando te he necesitado, en los buenos y malos momentos. Gracias por todo.

Y a quién va dedicado este trabajo, al regalo más grande que me ha hecho la vida: MIS PADRES y MIS HERMANOS! Porque gracias a vosotros hoy estoy aquí! A mis padres, gracias por ser como sois, por todo lo que me habéis dado y enseñado, gracias por acompañarme y guiarme en el camino de la vida, por escucharme y aconsejarme, por apoyarme y animarme en todos mis comienzos, por ayudarme a levantarme cuando he tropezado, por secar mis lágrimas y por compartir mis alegrías. Y a mis hermanos, Verónica y Alejandro, gracias porque de vosotros he aprendido mucho, aunque yo sea la hermana mayor. Gracias por hacerme reír y enfadar, por vuestro apoyo y comprensión en todo momento y, por vuestros sabios consejos. Gracias por vuestra fortaleza y gran corazón. Gracias a los cuatro por quererme tanto. Gracias papas por formar esta maravillosa familia, siempre unida y, dejarme disfrutar de ella día tras día, sois mi debilidad!!!! OS QUIERO. Vero, mucho ánimo en esta recta final, porque como ves todo llega y tú puedes con todo!!!

A mi cuñada Miriam, gracias por ser tu sencillez, espontaneidad, frescura y gran corazón!

Y a Diego, otro regalo que me tenía preparada la vida. Gracias por tu apoyo y comprensión, por la paciencia que has tenido a lo largo de todo este camino, por animarme día tras día, por valorarme y recordarme todo lo que valgo en los momentos en los que me olvido de ello. Gracias por saber lo que necesito en cada momento, por hacerme sonreír y por haber hecho que este camino fuera mucho más fácil. Gracias por quererme tanto y demostrármelo día tras día. Me siento muy afortunada y feliz de compartir y disfrutar mi vida contigo. TE QUIERO.

A mis padres y hermanos

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

1,8-ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico
¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
Å	Angström
AA	Ácido araquidónico (<i>Arachidonic acid</i>)
Ac₂O	Anhídrido acético
AcO⁻	Anión acetato
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A-FABP	Proteína de unión a ácidos graso de adipocito (<i>Adipocyte fatty acid binding protein</i>)
AKT	Proteína quinasa B (<i>Protein Kinase B</i>)
Ala	Alanina
ALT	Alanina aminotransferasa (<i>Alanine transaminase</i>)
AMP	Adenosina monofosfato (<i>Adenosine monophosphate</i>)
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
anh.	Anhidro
AP1	Proteína adaptadora 1 (<i>Adaptor protein 1</i>)
aP2	Adipocito P2 (<i>Adipocyte P2</i>)
APCI	Ionización química a presión atmosférica (<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
apo E	Apolipoproteína E (<i>Apolipoprotein E</i>)
Ar	Arilo
Arg	Arginina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
atm	atmósfera
B-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de cerebro (<i>Brain fatty acid binding protein</i>)
BINAP	(2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo)
bipy	(2,2'-bipiridina)
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
<i>n</i>-Bu	Butilo
<i>n</i>-BuLi	Butil litio
<i>t</i>-Bu	<i>Terc</i> -butilo
<i>t</i>-BuLi	<i>Terc</i> -butil litio
<i>t</i>-BuOH	<i>Terc</i> -butanol
<i>t</i>-BuOK	<i>Terc</i> -butóxido potásico
c	Cuadruplete
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

c_{ap}	Cuadruplete aparente
CD36	Cluster de diferenciación 36 (<i>Cluster of differentiation 36</i>)
Cdc25	(<i>Cell division cycle 25 phosphatase</i>)
CLK	Quinasas de especificidad dual 1
col.	Colaboradores
COX2	Ciclooxigenasa 2 (<i>Cyclooxygenase-2</i>)
Cys	Cisteína
d	Deuterado
d	Doblete
dc	Doblete de cuadrupletes
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de dobletes de dobletes
DFMP	Difluorofosfonato
DHA	Ácido docosahexaenoico (<i>Docohexaenoic acid</i>)
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
DME	Dimetoxietano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTHF	2,5-dimetoxitetrahydrofurano
DPP-1V	Dipeptidil peptidasa IV (<i>Dipeptidyl peptidase 1V</i>)
dppe	1,2-bis(difenilfosfino)etano
DSP	Fosfatasa de especificidad dual (<i>Dual-specific phosphatases</i>)
dt	Doblete de tripletes
DTT	Ditiotreitol
EC₅₀	Dosis efectiva al 50%
E-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de epidermis (<i>Epidermal fatty acid binding protein</i>)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>)
EIA	Enzimoinmunoanálisis (<i>Enzyme immunoassay</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
eq	Equivalente
ER	Retículo endoplasmático (<i>Endoplasmic reticulum</i>)
ESI	Ionización por electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
Et	Etilo
EtOH	Etanol
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos (<i>Fatty acid binding protein</i>)
FABP_C	Proteína de unión a ácidos grasos citoplasmática
FABP_{PM}	Proteína de unión a ácidos grasos asociada a la membrana plasmática
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and drugs administration</i>)
FOMT	Fluoro- <i>O</i> -maloniltirosina

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

FPIA	Inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (<i>Fluorescence polarization immunoassay</i>)
FRET	Transferencia de energía de resonancia (<i>Förster Resonance Energy Transfer or Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
g	Gramos
Gln	Glutamina
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1 (<i>Glucagon-like peptide-1</i>)
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa-3 (<i>Glycogen synthase kinase 3</i>)
h	Horas
HePTP	Proteína tirosina fosfatasa hematopoyética (<i>Hematopoietic protein tyrosine phosphatase</i>)
H-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de corazón (<i>Heart fatty acid binding protein</i>)
HGO	Producción de glucosa hepática (<i>Hepatic glucose output</i>)
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
h-PTP-1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B recombinante humana (<i>Human recombinant protein tyrosine phosphatase 1B</i>)
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (<i>High resolution mass spectrometry</i>)
HSL	Lipasa sensible a hormonas (<i>Hormone-sensitive lipase</i>)
HTS	Muestreo de alta productividad (<i>High-throughput-screening</i>)
Hz	Hercios
I-BABP	Proteína de unión a ácidos biliares de ileón (<i>Ileal bile acid-binding protein</i>)
IC₅₀	Concentración inhibitoria máxima media (<i>Half maximal inhibitory concentration</i>)
IDDM	Diabetes mellitus dependiente de insulina (<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>)
I-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de intestino (<i>Intestinal fatty acid binding protein</i>)
IGF	Factor de crecimiento insulínico (<i>Insulin-like growth factor</i>)
IKK	Inhibidor de la quinasa kappa (<i>Inhibitor of kappa kinase</i>)
IKK-2	Factor nuclear de la quinasa kappa
IL 1b	Interleucina 1b (<i>Interleukin-1 beta</i>)
Ile	Isoleucina
II-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de ileón (<i>Ileal fatty acid binding protein</i>)
Inh.	Inhibición
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducida (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
i-Pr₂NH	Diisopropilamina
IR	Infrarrojo
IR	Receptor de insulina (<i>Insuline receptor</i>)
IRS	Sustrato del receptor de insulina (<i>Insulin receptor substrate</i>)

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

J	Constante de acoplamiento, en hercios
JAK	Janus quinasa (<i>Janus kinase</i>)
J_{cisoid}	Constante de acoplamiento en posición cis
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal (<i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
J_{trans}	Constante de acoplamiento en posición trans
kDa	Kilo Dalton
K-FAPB	Proteína de unión a ácidos grasos de queratinocito (<i>Keratinocyte fatty acid binding protein</i>)
K_i	Constante de inhibición o constante de disociación
LAR	(<i>Leukocyte antigen-related</i>)
LCFA	Ácidos grasos de cadena larga (<i>Long-chain fatty acids</i>)
LDA	Diisopropilamido de litio (<i>Lithium diisopropylamide</i>)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low density lipoprotein</i>)
Leu	Leucina
L-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de hígado (<i>Liver fatty acid binding protein</i>)
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amido de litio
lit.	Literatura
LPS	Lipopolisacáridos (<i>Lipopolysaccharides</i>)
LXR-α	Receptor X hepático alpha (<i>Liver X receptor-α</i>)
Lys	Lisina
M	Molaridad
m-	Sustitución en posición meta
m	Multiplete
m/e	Relación masa/carga
MAK	Proteína quinasa mitógeno activada (<i>Mitogen-activated kinase</i>)
MCP1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>)
Me	Metilo
MeI	Yoduro de metilo
MeO	Metoxilo
MeOH	Metanol
Met	Metionina
M-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de mielina (<i>Myelin fatty acid binding protein</i>)
mg	Miligramos
MG	Monoacilglicerol
MHz	Megahercios
min	Minutos
mL	Mililitros
mm Hg	Milímetros de mercurio
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
MRG	<i>MDGI (mammary-derived growth inhibitor)-related gen</i>
MS	Tamiz molecular (<i>Molecular sieve</i>)

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

MS	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
MsCl	Cloruro de mesitilensulfonilo
MSH	<i>O</i> -mesitilenosulfonilhidroxilamina
MSTs⁻	Anión mesitilenosulfonato
MTM-1	(<i>Myotubularin-1</i>)
MW	Microondas
NaOAc	Acetato sódico
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NEt₃	Trietilamina
NF-κB	Factor nuclear κB (<i>Nuclear factor-κB</i>)
⁺NHET₃	Catión trietilamonio
NIDDM	Diabetes mellitus no dependiente de insulina (<i>noninsulin-dependent diabetes mellitus</i>)
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
OBA	Ácido 2-(oxalilamino)benzoico
<i>o</i>-	Sustitución en posición orto
OMT	<i>O</i> -maloniltirosina
<i>p</i>-	Sustitución en posición <i>para</i>
P.eb.	Punto de ebullición
P.f.	Punto de fusión
p/p	peso/peso
PA	Ácido palmítico (<i>Palmitic acid</i>)
PA-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos asociada a psoriasis (<i>Psoriasis-associated fatty acid binding protein</i>)
Ph	Fenilo
(PhCO₂)₂	Peróxido de benzoilo
Phe	Fenilalanina
PhLi	Fenil litio
PI-3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa (<i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>)
pKa	Logaritmo con signo negativo de la constante de disociación ácida
PKB	Proteína quinasa B (<i>Protein Kinase B</i>)
PKC	Proteína quinasa C (<i>Protein kinase C</i>)
PLs	Fosfolípidos (<i>Phospholipids</i>)
PMP2	(<i>Peripheral myelin protein 2</i>)
<i>p</i>NPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenilo
PP	Proteína fosfatasa (<i>Protein Phosphatase</i>)
PPA	Ácido polifosfórico
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisoma (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PPh₃	Trifenilfosfina

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
pSer	Fosfoserina (<i>Phosphoserine</i>)
PTC	Catálisis de transferencia de fase (<i>Phase transfer catalysis</i>)
pThr	Fosfotreonina (<i>Phosphotreonine</i>)
PTK	Proteína tirosina quinasa (<i>Protein Tyrosine Kinase</i>)
PTP	Proteína tirosina fosfatasa (<i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>)
PTP-1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B (<i>Protein Tyrosine Phosphatase 1B</i>)
PTPN11	(<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11</i>)
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico
pTyr	Fosfotirosina (<i>phosphotyrosine</i>)
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados (<i>Polyunsaturated fatty acids</i>)
q	Quintuplete
R	Sustituyente
RA	Ácido retinoico (<i>Retinoic acid</i>)
Rf	Factor de retención
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPTP	Receptor de proteína tirosina fosfatasa (<i>receptor protein-tyrosine phosphatase</i>)
RSG	Rosiglitazona
Rto	Rendimiento
s	Singlete
SAR	Relación estructura-actividad (<i>Structure-activity relationship</i>)
sat	Saturado
Scd1	Estearoil-CoA desaturasa (<i>Stearoyl-CoA desaturase-1</i>)
Ser	Serina
sext.	Sextuplete
SGLT	Proteínas con transporte sodio-glucosa (<i>Sodium-glucose linked transporter</i>)
SHP-1	(<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 or Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6</i>)
SUMO	(<i>Small ubiquitin-related modifier</i>)
T	Temperatura
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
t_{ap}	Triplete aparente
TEBACl	Cloruro de benciltrietilamonio (<i>Benzyltriethylammonium chloride</i>)
TBACl	Cloruro de tetrabutilamonio (<i>Tetrabutylammonium chloride</i>)
TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio (<i>Tetrabutylammonium iodide</i>)
TC-PTP	Proteína tirosina fosfatasa de células T (<i>T cell protein tyrosine phosphatase</i>)
td	Triplete de dobles
TFA	Ácido trifluoroacético
T-FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de testículo (<i>Testis fatty acid binding protein</i>)
TfO⁻	Anión trifluorometanosulfonato (Triflato)

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

TfOH	Ácido trifluorometansulfónico
TG	Triglicéridos
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TMEDA	Tetrametiletilendiamina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumour necrosis factor</i>)
TosMIC	Tosilmetilisonitrilo
Trp	Triptófano
Ts	Tosilo
TsOH	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico
tt	Triplete de tripletes
Tyr	Tirosina
TZD	2,4-tiazolidindiona
UV	Ultravioleta
Val	Valina
VHR	(<i>Vaccinia H1-related protein</i>)
YPTP1	Proteína tirosina fosfatasa de levadura (<i>Yeast protein tyrosine phosphatase</i>)
°C	Grado centígrado
Δ	Reflujo
δ	Desplazamiento químico, en ppm
μM	Micromolar

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ácido graso: biomolécula de naturaleza lipídica formada por una cadena hidrocarbonada lineal larga de longitud variable en cuyo extremo hay un grupo carboxilo.

Adipocito: célula esférica especializada en la producción y almacenamiento de sustancias lipídicas en una gran vacuola del citoplasma. La agrupación de gran número de adipocitos forma el tejido adiposo.

Adipoquinas: citoquinas producidas por los adipocitos.

Agonista: sustancia capaz de unirse a un receptor celular y provocar una acción determinada en la célula generalmente similar a la producida por una sustancia fisiológica.

Albúmina: proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre y una de las más abundantes en el ser humano. Se sintetiza en el hígado.

Apolipoproteína E (ApoE): molécula de la familia de las apoproteínas que tiene afinidad por un receptor específico que se encuentra en los hepatocitos y otras células del organismo. Una producción escasa de ApoE causa un trastorno lipídico llamado disbetalipoproteinemia, en la que se eleva considerablemente la concentración de colesterol y triglicéridos en sangre.

Apoproteína: péptido que constituye la parte proteica de las lipoproteínas y que tiene la función de solubilizar las grasas para permitir su transporte por el plasma.

Ateroesclerosis: síndrome caracterizado por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de calibre mediano y grueso.

Bioisótero: grupo químico o sustituyente con similares propiedades físico-químicas que otro grupo al que pretende reemplazar en una molécula.

Carcinogénesis u oncogénesis: proceso por el cual una célula normal se convierte en una célula cancerosa. Se caracteriza por la progresión de varios cambios celulares a nivel del material genético que finalmente desembocan en la reprogramación de la célula provocando que se reproduzca de manera descontrolada, formando una masa maligna.

Carcinoma: tipo de cáncer maligno con origen en células de tipo epitelial o glandular.

Células de Schwann: células gliales periféricas que se forman en la cresta neural embrionaria y acompañan a la neurona durante su crecimiento y desarrollo. Recubren a las prolongaciones (axones) de las neuronas formando una vaina aislante de mielina.

Células gliales: células del sistema nervioso que desempeñan la función de soporte de las neuronas. Intervienen activamente en el procesamiento cerebral de la información en el organismo.

Citoquinas: proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular. Inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Se producen fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados.

Diabetes mellitus: conjunto de trastornos metabólicos que afectan a diferentes órganos y tejidos, y se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en la sangre.

Diagrama Ribbon: representaciones esquemáticas tridimensionales de la estructura de las proteínas. Es uno de los métodos más comunes de representación de proteínas utilizados en la actualidad.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Diferenciación celular: proceso por el cual las células de un linaje celular concreto sufren modificaciones en su expresión génica para adquirir la morfología y las funciones de un tipo celular específico y diferente al resto de tipos celulares del organismo.

Dislipidemia: trastorno del metabolismo de las lipoproteínas, incluyendo la sobreproducción o deficiencia de lipoproteínas.

Eicosanoides: moléculas de 20 carbonos de carácter lipídico originadas de la oxidación de los ácidos grasos esenciales tipo ω -3 y ω -6. Cumplen amplias funciones como mediadores para el sistema nervioso central, eventos de la inflamación y de la respuesta inmune tanto en vertebrados como en invertebrados.

Epidídimo: tubo estrecho y alargado situado en la parte superior del testículo que conecta los conductos deferentes al reverso de cada testículo.

Especies reactivas de oxígeno (ROS): moléculas pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada en un átomo de oxígeno.

Esteroil-CoA desaturasa 1 (Scd-1): enzima clave en el metabolismo de los ácidos grasos que se encarga de formar el doble enlace en la esteroil-CoA.

Exón: región de un gen que no se separa durante el proceso de corte y empalme y, por tanto, se mantiene en el ARN mensajero maduro.

Factor de necrosis tumoral (TNF): proteína del grupo de las citoquinas liberada por las células del sistema inmunitario y que interviene en la inflamación.

Familia génica: grupo de locus cromosómico cuya secuencia de nucleótidos es similar y que derivan de una secuencia común ancestral.

Gen supresor tumoral: gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena. Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales y normalmente inhiben la proliferación celular excesiva.

Genoma: la totalidad de la información genética que posee un organismo.

Glucógeno: polisacárido de reserva energética formado por cadenas ramificadas de glucosa.

Hepatocito: célula propia del hígado.

Hiperglicemia: cantidad excesiva de glucosa en sangre.

Hiperinsulinemia: exceso de insulina en sangre.

Hipertrigliceridemia: exceso de concentración sérica de triglicéridos.

Holoproteína: proteína que sólo contiene aminoácidos en su composición.

Homeostasis: conjunto de fenómenos de autorregulación que llevan al mantenimiento de la constancia en las propiedades y la composición del medio interno de un organismo.

Íleon: sección final del intestino delgado. Se sitúa después del yeyuno y está separado del intestino ciego por la válvula ileocecal.

Infección tifoidea: enfermedad infecciosa producida por *Salmonella typhi* (bacilo de Eberth), o *Salmonella paratyphi* A, B o C, bacterias del género *Salmonella*.

Inhibición de prepulso: uno de los mecanismos más conocidos de control de la reacción de sobresalto. Su función es impedir que un estímulo inesperado interrumpa el procesamiento de análisis de un impulso sensorial precedente, sea de la misma o distinta modalidad.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Insulina: hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y secretada por las células beta del páncreas que permite disponer a las células del aporte necesario de glucosa para los procesos de síntesis con gasto de energía.

Integrinas: superfamilia de glicoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular, aunque hay algunas que también participan en la unión célula-célula. Están presentes en la superficie celular en elevadas concentraciones.

Interleucina: conjunto de citoquinas que se sintetizan principalmente por los leucocitos. Su función principal es regular los eventos que atañen a las funciones de estas poblaciones de células del sistema inmunitario, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, regulación de otras citoquinas y factores, entre otras.

Intrón: fragmento de ADN que está presente en un gen pero que no codifica ningún fragmento de la proteína. Los intrones son eliminados en el proceso de maduración del ARN.

Isquemia: daño celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno (hipoxia), de nutrientes y de la eliminación de productos del metabolismo de un tejido.

Leucotrienos: ácidos grasos derivados del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa.

Liberación autocrina: secreción química que afecta a la misma célula que secretó la sustancia.

Liberación paracrina: comunicación celular por secreción química que afecta a una célula vecina a la célula emisora.

Lipasa sensible a hormonas (HSL): lipasa intracelular neutra cuya función es hidrolizar a una gran variedad de esteres. Se expresa en el tejido adiposo donde hidroliza los triglicéridos a ácidos grasos libres.

Lipopocalinas: proteínas que transportan moléculas hidrofóbicas pequeñas como esteroides o lípidos.

Macrófagos: células del sistema inmunitario que se localizan en los tejidos. Proceden de células precursoras de la médula ósea que se dividen dando monocitos, que tras atravesar las paredes de los capilares y penetrar en el tejido conjuntivo se convierten en macrófagos.

Microangiopatía: enfermedad de los vasos sanguíneos que produce un engrosamiento de la pared del vaso que causa sangrado, escapes de proteínas y una considerable disminución en el flujo sanguíneo por dicho vaso.

Mielina: lipoproteína que constituye la vaina de las fibras nerviosas y se produce por las células de Schwann.

Miocito: célula fusiforme y multinucleada con capacidad contráctil y de la que está compuesto el tejido muscular.

Miopatía Centronuclear ligada al cromosoma X o Miopatía Miotubular: enfermedad caracterizada por la debilidad muscular, estando principalmente afectado el músculo esquelético que afecta casi exclusivamente a varones.

Monocito: tipo de glóbulos blancos. Su principal función es la de fagocitar diferentes microorganismos o restos celulares.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Osteoporosis: enfermedad sistémica que se caracteriza por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura de los huesos, lo que supone un aumento de la fragilidad de los huesos y del riesgo de sufrir fracturas.

Proliferación: crecimiento o multiplicación de células de tejidos.

Proteínas chaperonas: conjunto de proteínas presentes en todas las células, cuya función es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas en la síntesis de proteínas. No forman parte de la estructura primaria de la proteína funcional, sino que sólo se unen a ella para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y transporte celular a otra parte de la célula donde la proteína realiza su función.

Quilomicrón: lipoproteínas sintetizadas en el epitelio del intestino caracterizadas por poseer baja densidad y gran diámetro. Son grandes partículas esféricas que recogen desde el intestino delgado los triglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol ingeridos en la dieta llevándolos hacia los tejidos a través del sistema linfático.

Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs): miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas de factores de transcripción activados por ácidos grasos y eicosanoides derivados de estos últimos. Existen tres isoformas de PPARs, alfa, beta/delta y gamma, las cuales son consideradas como piezas clave en la regulación del metabolismo lipídico, la presión arterial y en los procesos fisiopatológicos que subyacen a la sensibilización a la insulina y a la inflamación.

Retinopatía diabética: complicación ocular de la diabetes que está causada por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina.

Secretagogos: sustancia que hace que otra sustancia sea liberada o secretada.

SH-PTP2: proteína fosfatasa específica de tirosina de expresión ubicua que contiene dos dominios amino-terminales Src homólogo 2 (SH2), responsable de su asociación con proteínas tirosina fosforiladas.

Síndrome metabólico: conjunción de varias enfermedades o factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan su probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus.

Síndrome mielodisplásico: enfermedades en las cuales la médula ósea no funciona normalmente y no se producen suficientes glóbulos rojos normales.

Tejido adiposo o tejido graso: tejido conformado por la asociación de células que acumulan lípidos en su citoplasma: los adipocitos. Posee una función mecánica ya que sirve como amortiguador, protegiendo y manteniendo en su lugar los órganos internos así como a otras estructuras más externas del cuerpo, y también tiene funciones metabólicas ya que es el encargado de generar grasas para el organismo.

Transcripción: conversión de ADN en ARN antes de la expresión de la proteína.

Transmisión de energía de resonancia (FRET): mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos. Se basa en que la excitación de un cromóforo puede transferirse a otro cercano, generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula, mediante un mecanismo acoplador dipolo-dipolo.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

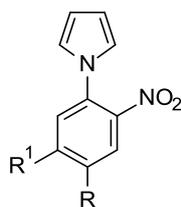
Triacilglicerol: acilgliceroles, un tipo de lípidos, formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxílicos por tres ácidos grasos, ya sean saturados o insaturados.

β -oxidación: proceso catabólico de los ácidos grasos en el cual sufren la eliminación, mediante la oxidación de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo del proceso, hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de acetil-CoA, que será posteriormente oxidada en la mitocondria para generar energía química en forma de (ATP).

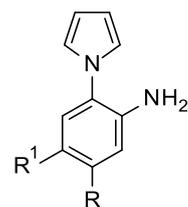
GLOSARIO DE ESTRUCTURAS

Compuestos 2-4, 7, 9, 10, 12, 13

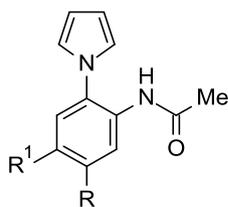
Compuesto	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
a	H	H	H	H	H
b	Me	Me	H	H	H
c	Me	H	H	H	H
d	Cl	Cl	H	H	H
e	CF ₃	H	H	H	H
f	OMe	H	H	H	H
g	H	Cl	H	H	H
h	Me	Me	Br	H	H
i	H	Cl	Br	H	H
j	H	Cl	H	Br	H
k	Me	Me	H	H	Br
l	Me	Me	Br	Br	H



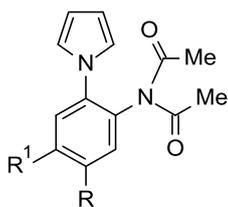
4a-g



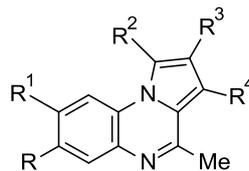
7a-g



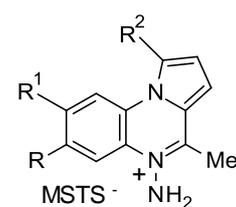
9a-g



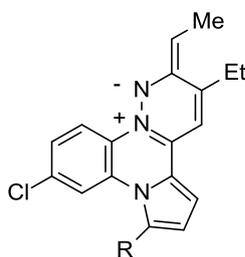
10b, c, e-g



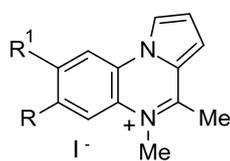
3a-l



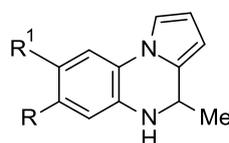
2a-i



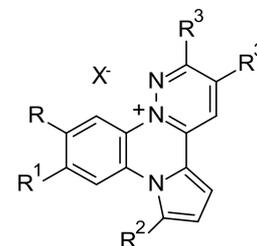
11m (R=H)
11n (R=Br)



12a-g

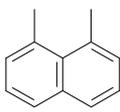


13a-g

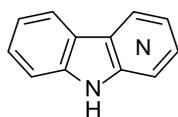


1

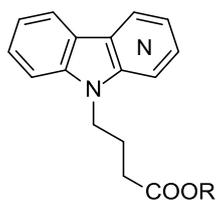
Compuestos 1

Compuesto	R	R ¹	R ²	R ³	X ⁻	Compuesto	R	R ¹	R ²	R ³	X ⁻
1^a	H	H	H	Me	MSTS ⁻	1i	Me	Me	H	H	MSTS ⁻
1b	Me	Me	H	Me	MSTS ⁻	1j	Me	Me	Br	H	MSTS ⁻
1c	Me	H	H	Me	MSTS ⁻	1k	H	Cl	H	H	MSTS ⁻
1d	Cl	Cl	H	Me	MSTS ⁻	1l	Me	Me	H	Et	MSTS ⁻
1e	CF ₃	H	H	Me	MSTS ⁻	1m	H	Cl	H	Et	Br ⁻
1f	OMe	H	H	Me	MSTS ⁻	1n	H	Cl	Br	Et	Br ⁻
1g	H	Cl	H	Me	MSTS ⁻	1o	H	H	H		MSTS ⁻
1h	Me	Me	Br	Me	MSTS ⁻						

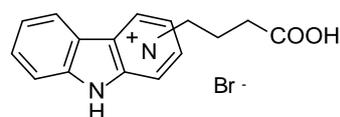
GLOSARIO DE ESTRUCTURAS



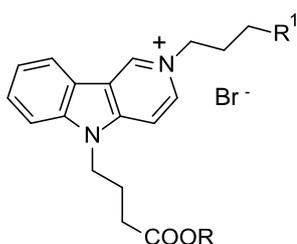
17 (N_α); **18** (N_β)
19 (N_γ); **20** (N_δ)



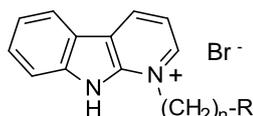
30 (N_α , R=H); **31** (N_β , R=H)
32 (N_γ , R=H); **33** (N_δ , R=H)
43 (N_α , R=Et); **44** (N_β , R=Et)
45 (N_γ , R=Et); **46** (N_δ , R=Et)



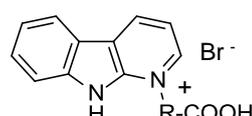
34 (N_α , R=H); **35** (N_β , R=H)
36 (N_γ , R=H); **37** (N_δ , R=H)
47 (N_α , R=Et); **48** (N_β , R=Et)
49 (N_γ , R=Et); **50** (N_δ , R=Et)



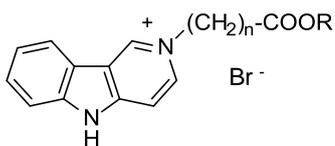
51 (R=Et, R¹=COOEt)
52 (R=H, R¹=COOH)
53 (R=Et, R¹=Me)
54 (R=H, R¹=Me)



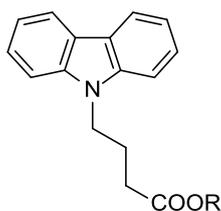
55 (n=6, R=COOEt)
56 (n=9, R=COOMe)
57 (n=15, R=COOMe)
58 (n=1, R=4-MeO₂CC₆H₄)
59 (n=1, R=Ph)



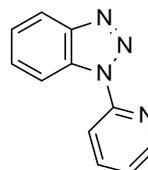
60 (R=-(CH₂)₆-)
61 (R=-(CH₂)₉-)
62 (R=-(CH₂)₁₅-)
63 (R=4-Bn)



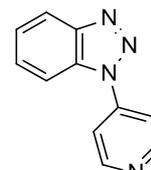
64 (n=6, R=Et)
65 (n=9, R=Me)
66 (n=15, R=Me)
67 (n=6, R=H)
68 (n=9, R=H)
69 (n=15, R=H)



38 (R=Et)
CLXXXIX (R=H)

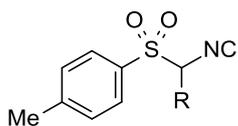


39

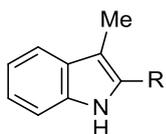


40

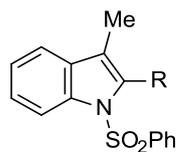
GLOSARIO DE ESTRUCTURAS



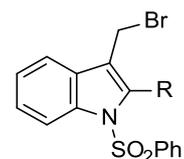
70 (R=H)
79 (R=Me)



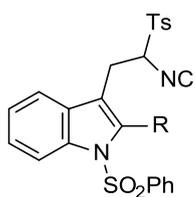
73 (R=H)
99 (R=Br)



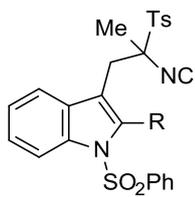
74 (R=H)
100 (R=Br)



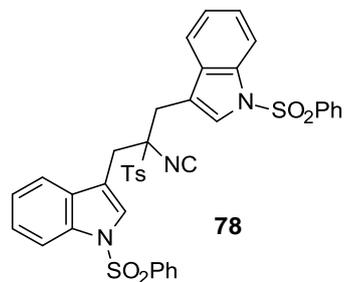
75 (R=H)
101 (R=Br)



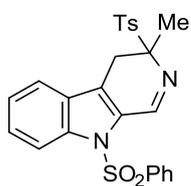
76 (R=H)
103 (R=Br)



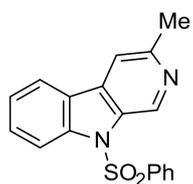
77 (R=H)
102 (R=Br)



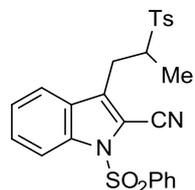
78



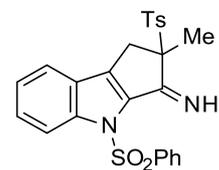
82



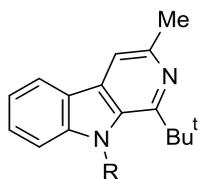
104



83

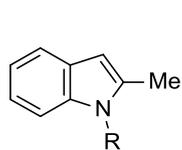


84

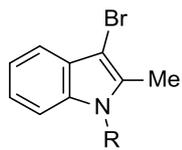


85 (R=H)
92 (R=SO₂Ph)

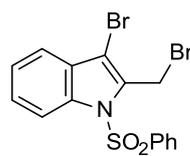
GLOSARIO DE ESTRUCTURAS



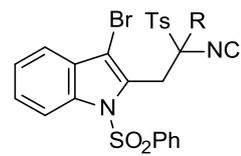
108 (R=H)
109 (R=SO₂Ph)



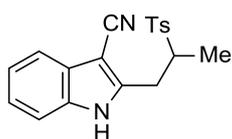
111 (R=SO₂Ph)
113 (R=H)



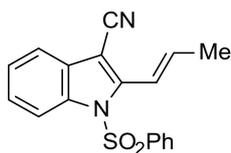
112



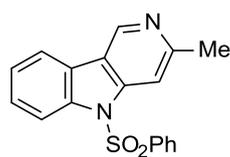
114 (R=H)
115 (R=Me)



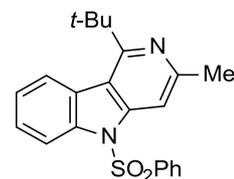
116



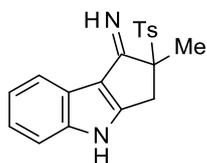
117



118



123



119

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS:	3
2. CAPÍTULO I: SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B (PTP-1B)	11
2.1. ANTECEDENTES	11
2.1.1. Introducción	11
2.1.2. Composición y diversidad de la familia de PTPs	12
2.1.2.1. PTPs específicas de fosfotirosina ó PTPs clásicas	14
2.1.2.2. Fosfatasas de especificidad dual (DSPs)	15
2.1.2.3. PTPs pseudofosfatasas	16
2.1.3. Proteína Tirosina Fosfatasa-1B (PTP-1B)	16
2.1.3.1. Estructura general	17
2.1.3.2. Estructura del sitio catalítico	17
2.1.3.3. Regulación de PTP-1B	19
2.1.3.3.1. Oxidación	19
2.1.3.3.2. Fosforilación	20
2.1.3.3.3. Sumoilación	22
2.1.3.3.4. Proteólisis	22
2.1.3.4. Implicación de PTP-1B en enfermedades humanas	23
2.1.3.4.1. PTP-1B y la acción de la insulina	30
2.1.3.4.2. Papel de PTP-1B en la cascada de señalización de la insulina	31
2.1.3.4.3. PTP-1B en diabetes y obesidad	32

ÍNDICE

2.1.3.4.4.	PTP-1B en cáncer	34
2.1.4.	Mecanismo de PTP-1B	34
2.1.5.	Inhibidores de PTP-1B	35
2.1.5.1.	Tiazolidindionas	36
2.1.5.2.	Miméticos fosfotirosilo que contienen fósforo	39
2.1.5.3.	Isotiazolidinonas.....	42
2.1.5.4.	Miméticos fosfotirosilo que contienen derivados de ácido no fosfóricos.....	47
2.1.5.5.	Bifenilbenzofuranos y bifenilbenzotiofenos	50
2.1.5.6.	Ácidos 2-(oxalilamino)benzoicos	51
2.1.5.7.	1,2-Naftoquinonas	54
2.1.5.8.	Formilcromonas	55
2.1.5.9.	Análogos de piridazina	56
2.1.5.10.	Acetofenonas	58
2.1.5.11.	Pirimido[5,4- <i>e</i>][1,2,4]triazin-5,7-diaminas	59
2.1.5.12.	Catecoles	60
2.1.5.13.	Ciclopenta[1,2- <i>d</i>]oxazina	61
2.1.5.14.	Ácidos isoxazolcarboxílicos	62
2.1.5.15.	Otras estructuras	63
2.1.5.16.	Productos naturales inhibidores de PTP-1B.....	65
2.2.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	75
2.2.1.	Introducción	75

ÍNDICE

2.2.1.1.	Síntesis de pirrolo[1,2- <i>a</i>]quinoxalina.....	75
2.2.1.1.1.	A partir de quinoxalinas.....	75
2.2.1.1.2.	A partir de 1-fenilpirroles	77
2.2.2.	Síntesis de inhibidores de PTP-1B	89
2.2.3.	Ensayos de inhibición de PTP-1B	120
2.2.4.	Estudio de modelado molecular.....	129
2.2.4.1.	Interacción con los distintos sitios de unión del centro activo	130
2.2.4.1.1.	Interacción con el centro alostérico	130
2.2.4.1.2.	Interacción con el sitio catalítico	133
2.3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	137
2.3.1.	Síntesis de 1 <i>H</i> -1-(2-nitrofenil)pirroles	137
2.3.2.	Síntesis de 2-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)anilinas.....	142
2.3.3.	Síntesis de 2-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)acetanilidas	147
2.3.4.	Síntesis de 10 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>a</i>]quinoxalinas.....	155
2.3.5.	Bromación de 10 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>a</i>]quinoxalinas	159
2.3.6.	Síntesis de mesitilenosulfonatos de 5-amino-10 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>a</i>]quinoxal-5-inio	162
2.3.7.	Síntesis de sales de piridazino[2,3- <i>a</i>]pirrolo[2,1- <i>c</i>]quinoxalinio ...	169
2.3.8.	Síntesis de yoduros de 10 <i>H</i> -4,5-dimetilpirrolo[1,2- <i>a</i>]quinoxal-5-inio.	182
2.3.9.	Síntesis de 4 <i>H</i> , 5 <i>H</i> , 10 <i>H</i> -4-metilpirrolo[1,2- <i>a</i>]quinoxalinas	186

ÍNDICE

2.4.	MÉTODOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD	191
3.	CAPÍTULO II: SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS DE ADIPOCITO (A-FABP)...	195
3.1.	ANTECEDENTES	195
3.1.1.	Introducción	195
3.1.2.	Generalidades: clasificación y estructura.....	196
3.1.2.1.	Clasificación de las FABPs	196
3.1.2.2.	Estructura de las FABPs.....	198
3.1.3.	Propiedades Fisiológicas de las FABPs	200
3.1.4.	Funciones de las FABPs.....	201
3.1.5.	Funciones de las FABP específicas de tejido.....	203
3.1.5.1.	FABP de adipocitos; A-FABP; FABP4.....	205
3.1.6.	Implicación de FABP4 en enfermedades humanas.....	211
3.1.6.1.	FABP4 y su implicación en el síndrome metabólico	212
3.1.6.1.1.	Resistencia a la insulina, hígado graso y obesidad.....	213
3.1.6.1.2.	Aterosclerosis	214
3.1.6.1.3.	Asma	214
3.1.7.	Inhibidores de FABP.....	215
3.1.7.1.	Ácidos floréticos.....	217
3.1.7.2.	4-Hidroxipirimidinas	220

ÍNDICE

3.1.7.3.	Benciléteres de ácidos hidroxibenzoicos	223
3.1.7.4.	Ácidos heteroarilfenoxi- y heteroarilbifeniloxialcanoicos	224
3.1.7.5.	Ácidos carbazolcarboxílicos y análogos	226
3.1.7.6.	Monoamidas de ácidos dicarboxílicos	228
3.1.7.7.	Inhibidores con estructura mixta.....	231
3.1.7.8.	Inhibidores protegidos bajo patente: triazolopirimidonas y azinas bicíclicas.....	233
3.2.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	235
3.2.1.	Introducción.....	235
3.2.2.	Síntesis de carbolinas a partir de derivados de piridina.....	236
3.2.2.1.	Reacción de Fischer.....	236
3.2.2.2.	Reacción de Graebe-Ullmann.....	238
3.2.2.3.	Ciclación fotoquímica de anilino piridinas	242
3.2.2.4.	Reacciones de acoplamiento C-C y C-N catalizadas por metales	242
3.2.3.	Síntesis de inhibidores de FABP-4	245
3.2.4.	Síntesis de carbolinas a partir de Tosilmetilisonitrilo (TosMIC) ...	258
3.2.4.1.	Introducción.....	258
3.2.4.2.	Síntesis de β - y γ -carbolinas empleando TosMIC.....	262
3.2.4.2.1.	Síntesis de β -carbolinas a partir de 3-metilindol y TosMIC.....	264
3.2.4.2.2.	Síntesis de γ -carbolinas a partir de 2-metilindol y TosMIC	285
3.3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	293

ÍNDICE

3.3.1. Síntesis del ácido 4-(9 <i>H</i> -carbazol-9-il)butanoico	293
3.3.2. Síntesis de carbolinas	294
3.3.2.1. Síntesis de piridilbenzotriazoles	294
3.3.2.2. Síntesis de α - y γ - carbolinas	296
3.3.2.3. Síntesis de δ -carbolina.....	297
3.3.3. Preparación de ácidos piridoindolilbutanoicos	299
3.3.3.1. Alquilación de carbolinas	299
3.3.3.2. Reacción de hidrólisis.....	303
3.3.4. Reacción de alquilación en el nitrógeno piridínico de las distintas carbolinas.	306
3.3.4.1. Reacción de alquilación.....	306
3.3.4.2. Reacción de hidrólisis.....	315
3.3.5. Reacción de alquilación en el nitrógeno piridínico e indólico del núcleo de γ -carbolina	323
3.3.5.1. Reacción de Alquilación.....	323
3.3.5.2. Reacción de hidrólisis.....	325
3.3.6. Síntesis de vinilindolcarbonitrilos:.....	327
3.3.6.1. Protección de metilindoles:	327
3.3.6.2. Halogenación electrófila:.....	328
3.3.6.3. Halogenación radicalica:	330
3.3.6.4. Preparación de derivados de tosmic:.....	332

ÍNDICE

3.3.6.4.1.	Indolilmetil derivados de TosMIC:.....	333
3.3.6.4.2.	Indolilmetil derivados de metil-TosMIC:	336
3.3.7.	Reacción de los derivados de indolilmetiltosmic con compuestos organolíticos	339
3.3.7.1.	Reacción con <i>n</i> -BuLi	339
3.3.7.2.	Reacción con <i>t</i> -BuLi	344
3.4.	MÉTODOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD	346
3.4.1.	ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).....	346
3.4.2.	Inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (FPIA) .	347
4.	CONCLUSIONES	353
5.	SUMMARY	359
6.	ANNEX	367
6.1.	INTRODUCTION	367
6.2.	DISCUSSION	369
6.2.1.	Catalyst	369
6.2.2.	Temperature and solvent.....	370
6.2.3.	Ligand	371
6.3.	EXPERIMENTAL SECTION	373

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS:

La **Red de investigaciones de enfermedades renales** (REDinREN, www.redinren.eu), financiada por el Instituto de Salud Carlos III, es una Red multidisciplinar que integra a grupos de investigación de distintas entidades ubicadas en diferentes comunidades autónomas. Nuestro grupo de investigación forma parte de esta red desde el año 2007 y nuestro objetivo en la Red se centra en el diseño y desarrollo de nuevas moléculas bioactivas frente a distintas dianas implicadas en la enfermedad renal.

El término *enfermedad renal* engloba a toda una serie de enfermedades o trastornos que afectan al riñón. La aparición y evolución de estos trastornos nefrológicos puede alterar la función renal normal y derivar en la Enfermedad Renal Crónica (ERC) o Fracaso Renal Agudo (FRA). Entre las causas más frecuentes que se asocian a la aparición de estas patologías se encuentran:

- **Diabetes mellitus:** es la causa más frecuente de ERC en los países desarrollados. La nefropatía diabética (alteraciones en el riñón en personas con diabetes) es responsable de cerca del 30% de los enfermos en diálisis periódica y la primera causa de trasplante renal en los países occidentales. La nefropatía aparece en el 50% de los pacientes después de 20 años del comienzo de la diabetes.
- **Hipertensión arterial:** produce una sobrecarga de presión en todo el sistema vascular. Se produce un engrosamiento de la pared de los vasos con disminución de su calibre, dando lugar a isquemia renal y, además, se produce una hiperpresión glomerular que somete a un excesivo trabajo al glomérulo.
- **Dislipemias:** son una serie de diversas condiciones patológicas cuyo único elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre.
- **Glomerulonefritis:** es un grupo de enfermedades del riñón que tienen como síntoma la inflamación de las estructuras internas del riñón (glomérulos). Es la enfermedad glomerular más frecuente.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

- **Nefritis tubulointersticiales:** es una inflamación de los espacios entre los túbulos renales, lo que da lugar a una isquemia y atrofia renal.
- **Procesos renales hereditarios:** es una enfermedad genética progresiva de los riñones y se caracteriza por la presencia de múltiples quistes en ambos riñones.

El objetivo de nuestro grupo de investigación implica estudios de Química Médica en diversas dianas terapéuticas de gran interés para REDinREN:

- a) Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (*Protein Tyrosine Phosphatase, PTP-1B*)
- b) Proteínas de unión a los ácidos grasos (*Fatty acid binding proteins, FABPs*)
- c) Angiotensina II/daño oxidativo
- d) Calpaína (familia de tiolproteasas)

Estas dianas terapéuticas se encuentran implicadas en distintas patologías como la diabetes tipo 2, obesidad, síndrome metabólico, hipertensión y daño vascular, y todas ellas se manifiestan en la enfermedad renal crónica (ERC).

El proyecto de Tesis Doctoral presentado en esta memoria tiene como objetivo dos de las dianas terapéuticas mencionadas anteriormente: la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) y las proteínas de unión a los ácidos grasos (FABPs).

Las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) son proteínas que catalizan la desfosforilación de residuos de tirosina. La fosforilación-desfosforilación de estos residuos se encuentra implicada en distintos procesos celulares y se ha comprobado que PTP-1B posee un papel importante en la señalización celular y en diferentes enfermedades humanas como la diabetes, la obesidad y el cáncer.

Se han descrito numerosos inhibidores de PTP-1B de origen tanto sintético como natural. En la actualidad, existe un inhibidor de PTP-1B que se encuentra en ensayos clínicos: ISIS-113715.

Por otra parte, las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) son proteínas que se unen reversiblemente y con elevada afinidad a ligandos hidrofóbicos tales como los ácidos grasos y lípidos. Distintos estudios realizados muestran que estas proteínas poseen un papel importante en los procesos mediados por lípidos, en las rutas metabólicas y en la respuesta inmune, pudiendo estar implicadas en distintas

enfermedades como la obesidad, diabetes y aterosclerosis. Sin embargo, se conoce muy poco sobre sus funciones biológicas exactas y sus mecanismos de acción.

Los inhibidores que se han descrito hasta el momento dentro de esta diana terapéutica se centran en dos de las diez isoformas conocidas de FABP: FABP de adipocito (A-FABP) y FABP de epidermis (E-FABP), debido a que existe un mayor conocimiento de estas dos isoformas que del resto de las isoformas de esta familia de proteínas.

Dentro de este contexto, esta Tesis Doctoral tiene como principal objetivo la síntesis y evaluación de la actividad biológica de nuevos inhibidores de PTP-1B y A-FABP. Los objetivos planteados se describen a continuación divididos en los dos capítulos que conforman esta memoria:

- *Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B)*: el trabajo se centrará en la síntesis de análogos de estructura **1a** (Figura 1.1), compuesto que mostró actividad frente a esta proteína en un *screening* de actividad biológica realizado a una quimioteca heterocíclica preparada previamente en nuestro grupo de investigación. Además, se ha pretendido establecer los requisitos estructurales mínimos de esta serie de compuestos que mantienen la actividad, por lo que también se han evaluado algunos precursores y análogos de estos compuestos.

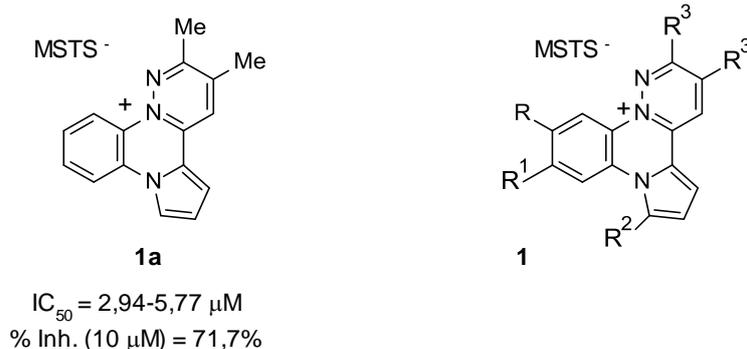


Figura 1.1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

- *Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs):*
 - a) Basándonos en la estructura del inhibidor 4-(9*H*-carbazol-9-il)butanoico **CLXXXIX** (Figura 1.2), se ha estudiado el efecto que tiene sobre la actividad de A-FABP la incorporación de un nitrógeno endocíclico en uno de los anillos bencénicos. Por este motivo, se han sintetizado cuatro isómeros estructurales con estructura base tipo carbolina. Además, se ha llevado a cabo la síntesis de las distintas carbolinas alquiladas sobre el nitrógeno piridínico.

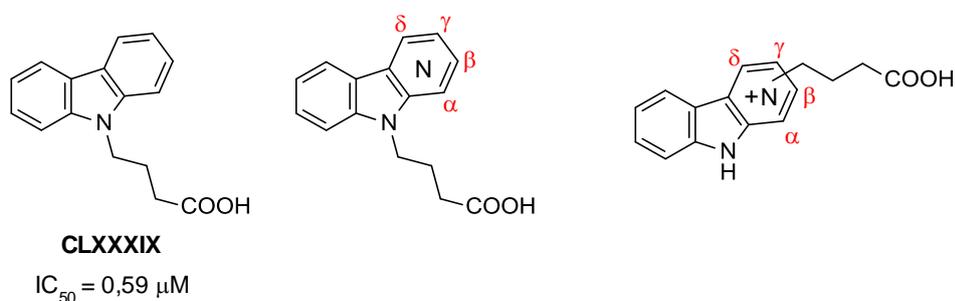


Figura 1.2

- b) Debido a la existencia en la bibliografía de inhibidores de FABP con estructura tipo carbazol y que contienen el grupo arilsulfonilo (Figura 1.3), se procedió al desarrollo de una metodología para la síntesis de β - y γ -carbolinas a partir de derivados de 2- y 3-metilindoles, empleando el TosMIC para generar el anillo piridínico (Esquema 1.1).

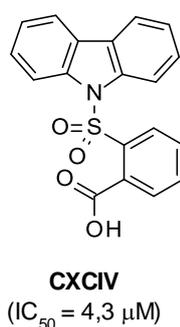
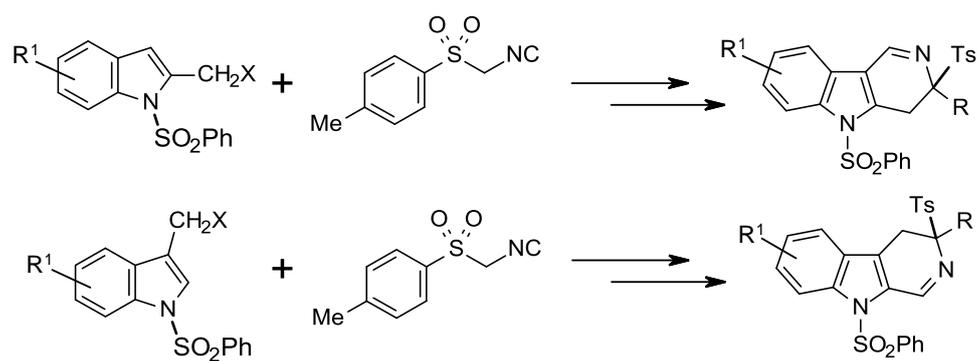


Figura 1.3

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



Esquema 1.1

2. CAPÍTULO I: SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B (PTP-1B)

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Introducción

El proceso de fosforilación de residuos de tirosina se encuentra implicado en numerosos aspectos relevantes de la fisiología eucariótica así como de la salud humana y de la enfermedad. Dicho proceso se emplea en la comunicación entre células y dentro de ellas, en la forma y motilidad de las mismas, en las decisiones de proliferación frente a diferenciación, en procesos celulares como la regulación de la transcripción genética, procesamiento de ARNm y transporte de moléculas dentro y fuera de la célula. Además, la fosforilación de residuos de tirosina juega un papel importante en la coordinación de estos procesos entre células vecinas en embriogénesis, desarrollo de órganos, homeostasis de los tejidos y en el sistema inmune. La existencia de anomalías en este proceso se relaciona con la patogénesis de numerosas enfermedades humanas hereditarias o adquiridas desde cáncer hasta deficiencia inmune.

La fosforilación de residuos de tirosina se encuentra regulada por la acción similar y equilibrada de proteínas tirosina quinasas (PTKs) que catalizan la fosforilación, y de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) que catalizan la defosforilación. Las primeras investigaciones se centraron en PTKs debido a que la primera PTP se purificó¹ y clonó² casi diez años después de la primera PTK³. Sin embargo, algunos hallazgos recientes han reconocido el papel específico y activo de las PTPs en la regulación de los niveles de fosforilación de residuos de tirosina en las células y en la regulación de muchos procesos fisiológicos. Entre todas las PTPs, PTP-1B juega un papel importante en la señalización celular y en diferentes enfermedades humanas tales como cáncer, diabetes y obesidad. Por este motivo, PTP-1B se ha reconocido como una

¹ Cool, D. E.; Tonks, N. K.; Charbonneau, H.; Walsh, K. A.; Fischer, E. H.; Krebs, E. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5257-5261.

² Guan, K.; Haun, R. S.; Watson, S. J.; Geahlen, R. L.; Dixon, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1501-1505.

³ Smart, J. E.; Oppermann, H.; Czernilofsky, A. P.; Purchio, A. F.; Erikson, R. L.; Bishop, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6013-6017.

diana terapéutica para el desarrollo de nuevas moléculas para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la obesidad.

2.1.2. Composición y diversidad de la familia de PTPs

Una vez completada la secuencia del genoma humano, se han podido catalogar los genes que comprenden la familia de las PTPs. Estos genes codifican enzimas que se dividen en fosfatasas específicas de fosfotirosina (pTyr) (Figura 2.1), las clásicas, y en fosfatasas de especificidad dual (DSPs) (Figura 2.2). Existen aproximadamente 100 genes humanos que codifican PTPs en comparación con los 90 genes que codifican PTKs. Esto sugiere la existencia de niveles similares de complejidad entre ambas familias. Aunque el número de genes sólo ilustra un nivel mínimo de complejidad en la familia, la diversidad adicional existente es debida al uso de promotores diferentes, distinto corte y empalme de ARNm y modificaciones post-translacionales. Esta diversidad estructural es indicativa de la importancia funcional de las PTPs en el control de la señalización celular. Aparentemente, las PTPs poseen la capacidad de funcionar positiva y negativamente en la regulación de la transducción de señales.⁴

⁴ Tonks, N. K. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 833-846.

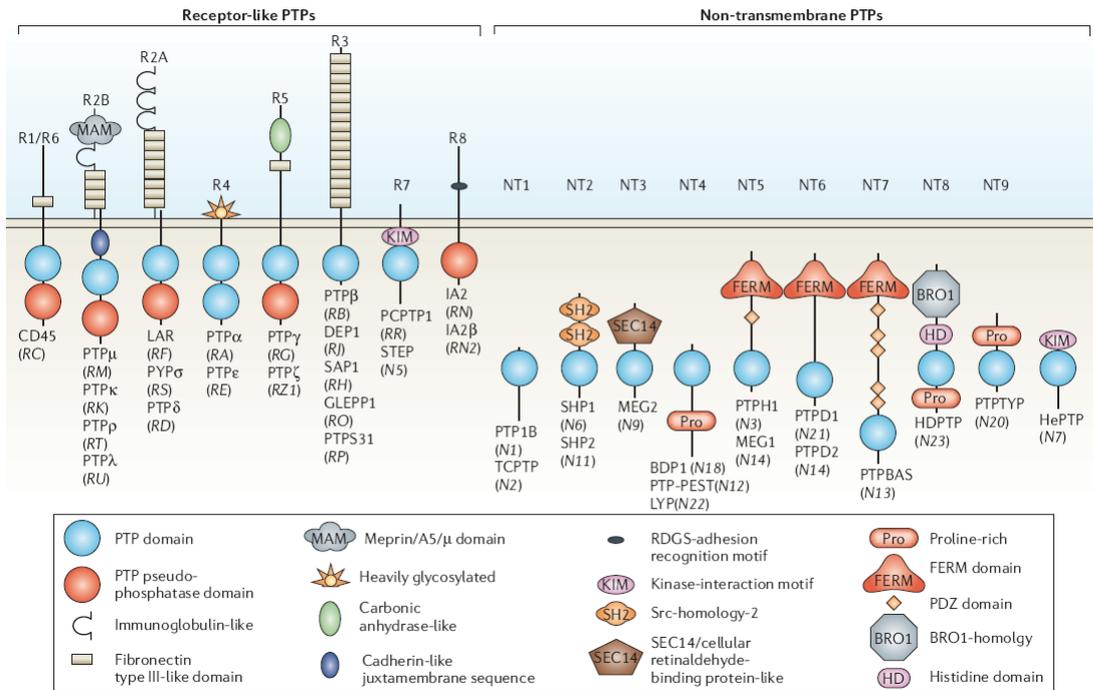


Figura 2.1. PTPs clásicas (tomado de la ref. 4).

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

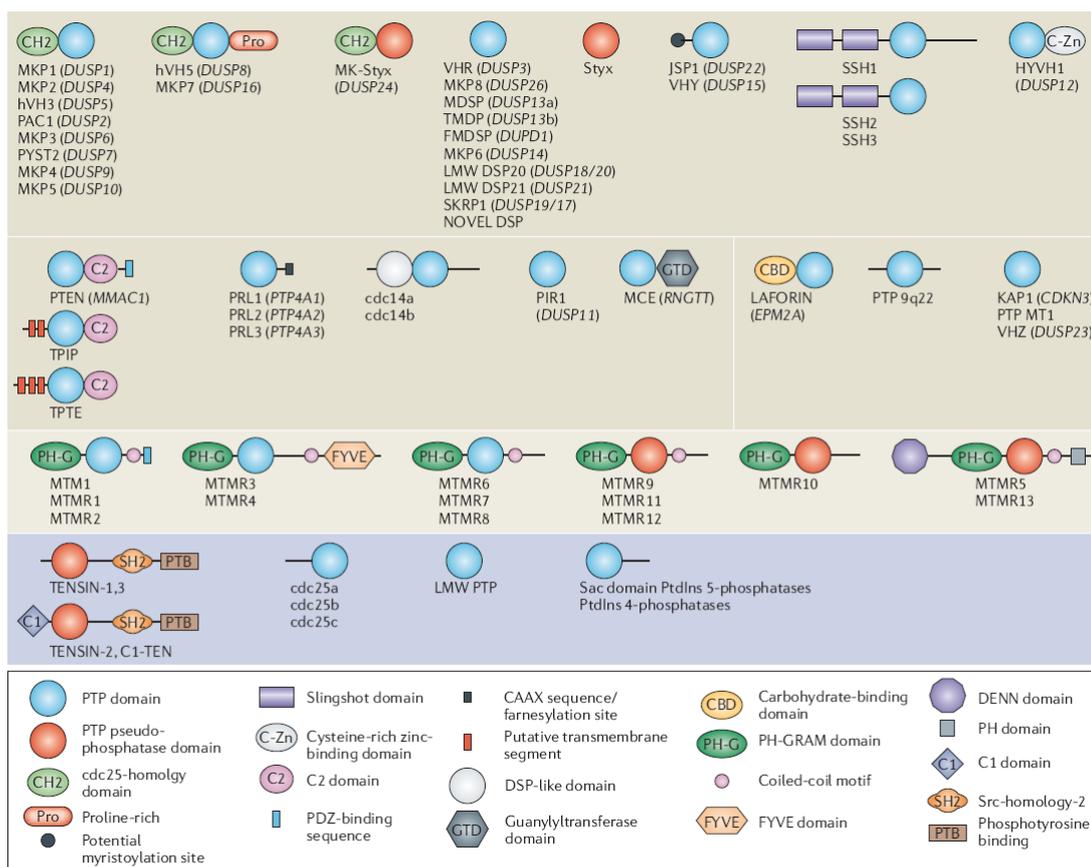


Figura 2.2. Fosfatasas de especificidad dual (tomado de la ref. 4).

2.1.2.1. PTPs específicas de fosfotirosina ó PTPs clásicas

El dominio catalítico de las PTPs clásicas comprende aproximadamente 280 residuos y está definido por varios patrones de secuencias cortas, en particular, la secuencia que funciona como bucle de unión al grupo fosfato en el sitio activo.⁵

Las PTPs clásicas incluyen receptores transmembrana de proteína (RPTPs) que regulan la señalización a través de la desfosforilación del residuo de tirosina de las

⁵ Andersen, J. N.; Mortensen, O. H.; Peters, G. H.; Drake, P. G.; Iversen, L. F.; Olsen, O. H.; Jansen, P. G.; Andersen, H. S.; Tonks, N. K.; Møller, N. P. H. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 7117-7136.

proteínas controlado por la presencia de ligando (Figura 2.1). Muchas de las RPTPs muestran características de moléculas de adhesión celular en su segmento extracelular, el cual está implicado en procesos que están relacionados con el contacto célula-célula y célula-matriz. De las 21 RPTPs, 12 poseen una disposición en tándem de los dominios de PTP en su segmento intracelular. Distintos estudios indican que todos los residuos con actividad se encuentran en el dominio D1 cercano a la membrana. Con la excepción de PTP α , el dominio D2 alejado de la membrana es inactivo. Sin embargo, la integridad estructural del dominio D2 es importante para la actividad, especificidad y estabilidad de RPTP como un conjunto. Además, el dominio D2 es importante para la interacción proteína-proteína que regula la dimerización de RPTP.

También existen PTPs citoplasmáticas no transmembranales. Estas enzimas se caracterizan por tener secuencias reguladoras que flanquean la actividad catalítica de dominio y de control, ya sea directamente por las interacciones con el sitio activo que modulan la actividad o mediante el control de la especificidad de sustrato. Estas secuencias no catalíticas también controlan la distribución subcelular. De esta manera regulan indirectamente la actividad al restringir el acceso de ciertos sustratos a localizaciones subcelulares concretas.

2.1.2.2. Fosfatasas de especificidad dual (DSPs)

Existen aproximadamente 65 genes que codifican un grupo heterogéneo de fosfatasas que se describen ampliamente como DSPs (Figura 2.2). Estas enzimas están menos conservadas, poseen una pequeña similitud en la secuencia alrededor del patrón que contiene el residuo de cisteína, aminoácido clave debido a que forma un enlace covalente con el grupo fosfato que va a ser eliminado, y poseen dominios catalíticos menores que las PTPs clásicas. En general, comparten el mismo mecanismo catalítico que las PTPs clásicas, pero la arquitectura del sitio activo de DSP les permite alojar residuos de fosfoserina (pSer) o fosfotreonina (pThr) así como residuos de pTyr.⁴

⁴ Tonks, N. K. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 833-846.

2.1.2.3. PTPs pseudofosfatasa

Existen distintos miembros de la familia de las PTPs que poseen dominios conservados con las características básicas de las PTPs, pero que carecen de residuos que son esenciales para la catálisis.⁶ Uno de estos es *Styx*, que es catalíticamente inactivo, debido a que contiene un residuo de glicina en la posición esperada para el sitio activo de cisteína.

Varios dominios D2 de RPTPs mantienen un pliegue de PTP pero la carencia de residuos es crítica para la actividad. Por ejemplo, dos mutaciones puntuales en el D2 de PTP α son suficientes para mejorar su actividad hasta el nivel de D1.⁷

2.1.3. Proteína Tirosina Fosfatasa-1B (PTP-1B)

PTP-1B fue la primera PTP en aislarse de manera homogénea y ha servido como modelo para ilustrar distintas propiedades de estas proteínas. Esta enzima se purificó a partir de placenta humana como una proteína de 321 aminoácidos,^{8,9} aunque el cADN indica que ésta es la parte NH₂-terminal derivada de una molécula de longitud de 435 residuos.^{2,10,11} El dominio conservado de la PTP se encuentra definido entre los residuos 30 a 278, y la extensión no catalítica del -COOH terminal posee una función reguladora. Los 35 residuos del -COOH terminal dirigen a la enzima a la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplásmico, mientras que los últimos 122 residuos son predominantemente hidrofóbicos y contienen lugares para la fosforilación de serina.

⁶ Wishart, M. J.; Dixon, J. E. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 301-306.

⁷ Buist, A.; Zhang, Y.-L.; Keng, Y.-F.; Wu, L.; Zhang, Z.-Y.; den Hertog, J. *Biochemistry* **1999**, 38, 914-922.

⁸ Tonks, N. K.; Diltz, C. D.; Fischer, E. H. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 6722-6730.

⁹ Charbonneau, H.; Tonks, N. K.; Kumar, S.; Diltz, C. D.; Harrylock, M.; Cool, D. E.; Krebs, E. G.; Fischer, E. H.; Walsh, K. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, 5252-5256.

² Guan, K.; Haun, R. S.; Watson, S. J.; Geahlen, R. L.; Dixon, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 1501-1505.

¹⁰ Chernoff, J.; Schievella, A. R.; Jost, C. A.; Erikson, R. L.; Neel, B. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 2735-2739.

¹¹ Brown-Shimer, S.; Johnson, K. A.; Lawrence, J. B.; Johnson, C.; Bruskin, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 5148-5152.

2.1.3.1. Estructura general

PTP-1B es una proteína de 37 kDa compuesta por un único dominio con una cadena polipeptídica organizada en 8 hélices α y 12 cadenas β (Figura 2.3a y Figura 2.3b). La lámina β compuesta por 10 cadenas adopta una conformación girada que se extiende a lo largo de toda la longitud de la molécula. La última cadena β (β -12) en la secuencia primaria está localizada cerca del centro de la lámina, dentro de la región paralela a la cadena β que posee las cadenas en el orden β -3, β -12, β -4 y β -11. Las cadenas β antiparalelas rodean a las cuatro cadenas β paralelas centrales. El centro de la lámina está acotada por hélices α , α -2 en un lado, y α -3 y α -4 en el otro. Después de α -4, la cadena se pliega en α -5 y α -6, que con α -3 y α -4 forman un bloque de 4 hélices α . El $-\text{COOH}$ terminal del dominio catalítico conservado corresponde al $-\text{COOH}$ terminal de α -6. El comienzo del dominio conservado de PTP se encuentra en una pequeña hélice α (α -1). La lámina β antiparalela (β -5 y β -6) está localizada encima de lámina β central. Finalmente, los 30 residuos situados en el $-\text{NH}_2$ terminal no conservado se doblan en dos hélices (α -1' y α -2') que se envuelven alrededor del $-\text{NH}_2$ terminal de α -6.¹²

La cisteína catalítica (Cys²¹⁵) se encuentra situada en el bucle 15 conectando β -12 y α -4 al $-\text{COOH}$ terminal de la región de la cadena β paralela de la hoja. Los bucles intermedios que conectan elementos de la estructura secundaria convergen en este lugar.

2.1.3.2. Estructura del sitio catalítico

La estructura base del sitio catalítico está formada por los residuos comprendidos entre His²¹⁴ y Arg²²¹, que corresponde al patrón conservado característico de las proteínas tirosina fosfatasas. Esta secuencia está formada por el $-\text{COOH}$ terminal de β -12, el bucle 15 que conecta β -12 con α -4, y el $-\text{NH}_2$ terminal de α -4 y, que constituye el dominio catalítico donde se encuentra la cisteína y la mayoría de residuos requeridos para la unión a fosfatos (Figura 2.3a y Figura 2.3b). Los bucles entorno al sitio catalítico que contiene aminoácidos conservados son: *l*-1 (residuos 37-55), *l*-4 (residuos 86-90), *l*-13 (residuos 177-187) y *l*-17 (residuos 255-263). La pequeña hoja β de β -5 y β -6 está situada sobre este lugar.¹³

¹² Barford, D.; Flint, A. J.; Tonks, N. K. *Science* **1994**, 263, 1397-1404.

¹³ Yip, S.-C.; Saha, S.; Chernoff, J. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, 35, 442-449.

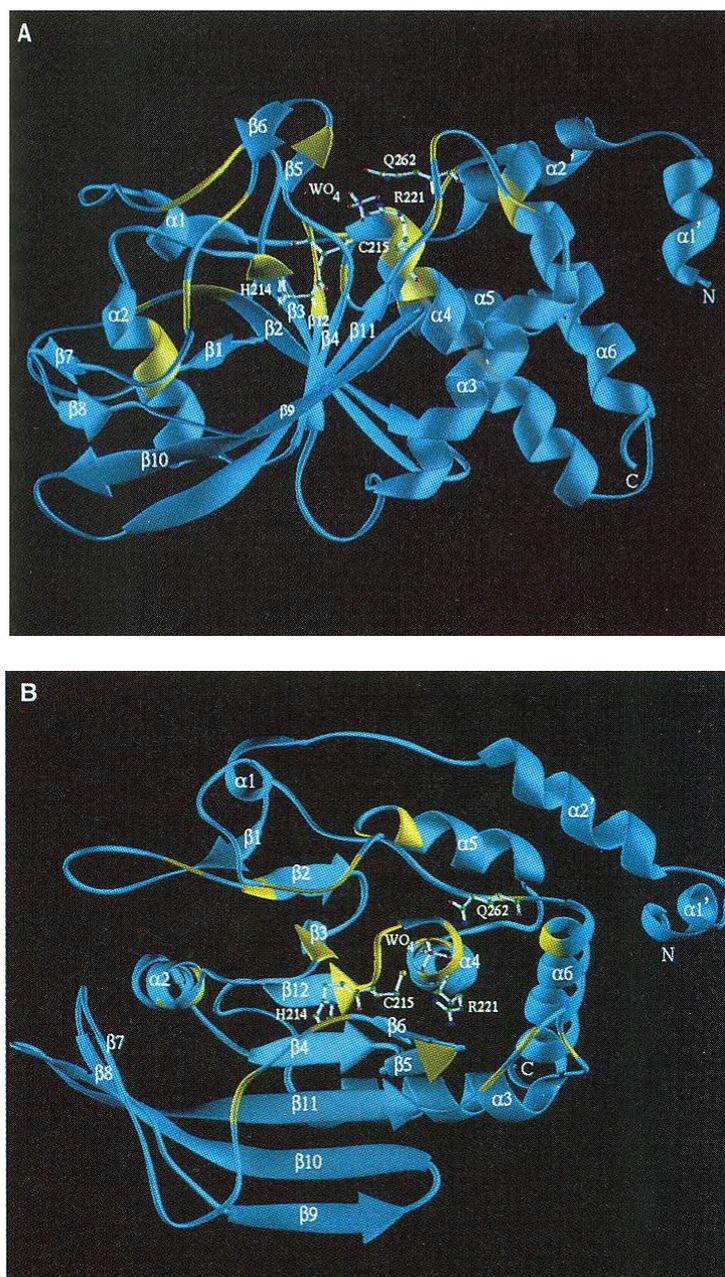


Figura 2.3 (a) Diagrama de Ribbon indicando los elementos de la estructura secundaria de PTP-1B, el sitio catalítico y residuos conservados representados en amarillo. (b) Vista aproximadamente perpendicular de (a) (Tomado de la referencia 12).

2.1.3.3. Regulación de PTP-1B

PTP-1B posee un dominio catalítico fosfatasa en el extremo *N*-terminal seguido de una región reguladora y un dominio localizado en la membrana que une a la enzima a la cara citoplasmática del retículo endoplasmático (ER) (Figura 2.4). La enzima se expresa abundantemente y posee una actividad catalítica altamente controlada. Además de su localización en la superficie del ER, lo que puede limitar su acceso a los sustratos, existen cuatro mecanismos que regulan la actividad de PTP-1B: oxidación, fosforilación, sumoilación y proteólisis.¹³

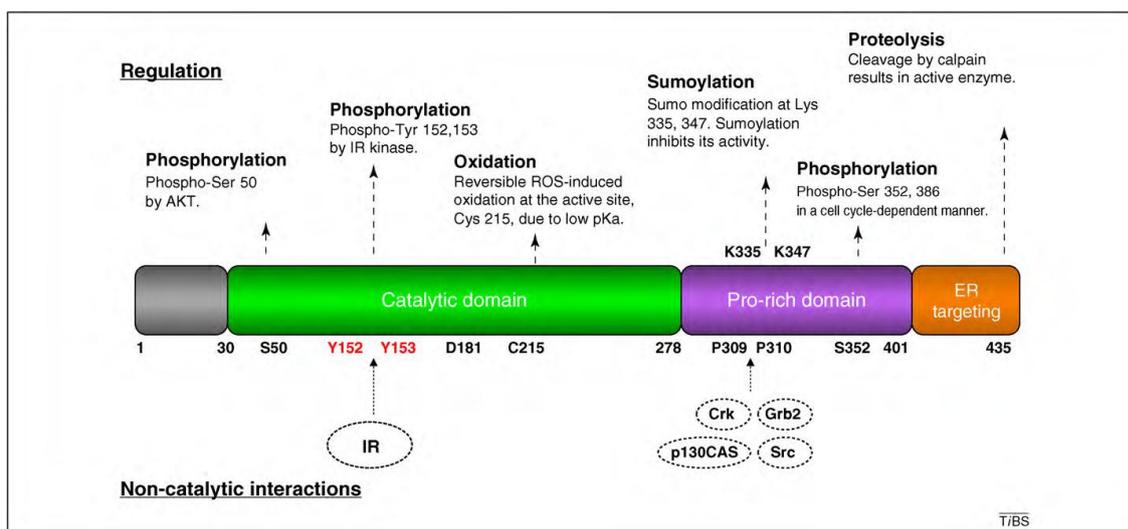


Figura 2.4. Representación esquemática de los dominios estructurales de PTP-1B y su regulación (tomado de la ref. 13).

2.1.3.3.1. Oxidación

La actividad de PTP-1B está regulada *in vivo* por un proceso de oxidación reversible en el que participa Cys²¹⁵ en su sitio activo y que, temporalmente, anula su actividad enzimática.¹⁴ El entorno químico de Cys²¹⁵ es inusualmente ácido (pH = 4,5-5,5) estando éste desprotonado a pH fisiológico, lo que implica una mejoría en su

¹³ Yip, S.-C.; Saha, S.; Chernoff, J. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 442-449.

¹⁴ Lee, S.-R.; Kwon, K.-S.; Kim, S.-R.; Rhee, S. G. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15366-15372.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

actividad nucleofílica en la catálisis. Esto se traduce en una susceptibilidad por parte de la enzima a las especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido, llegando éstas a inactivarla. Los análisis cristalográficos realizados indican que la oxidación inducida por el peróxido de hidrógeno convierte primero el grupo tiol en ácido sulfénico (SOH), y éste en una sulfenamida cíclica, acompañada de un cambio conformacional en el sitio activo.^{15,16} Mientras que la oxidación al estado sulfenamida tiene lugar para inhibir la actividad de PTP-1B de manera reversible, la oxidación a sulfínico (SO_2H) o sulfónico (SO_3H) es, en general, un proceso irreversible (Figura 2.5).¹⁷

La generación de ROS se puede producir por distintos estímulos externos, incluyendo aquellos que activan a los receptores de la proteína tirosina quinasa (RPTKs) y las integrinas. Sin embargo, la inactivación oxidativa de PTP-1B se produce en varios tipos de células en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y a la estimulación de la insulina.¹⁷

2.1.3.3.2. Fosforilación

PTP-1B está regulada tanto por la fosforilación de residuos de tirosina como de serina en múltiples lugares pero, a diferencia de la oxidación, sus efectos son o bien modestos o controvertidos. Durante la metafase, PTP-1B se fosforila por la proteína quinasa C (PKC) en Ser³⁷⁸ y Ser³⁵² y, en Ser³⁸⁶ por una quinasa desconocida (Figura 2.4). También se fosforila en estas posiciones en respuesta al estrés osmótico, pero la actividad de la enzima no se ve modificada drásticamente.¹⁸ A pesar de que no se conocen las razones por las que se fosforilan estas serinas, la fosforilación de PTP-1B en Ser⁵⁰ por AKT (también conocida como PKB, proteína quinasa B) puede disminuir la actividad de la misma y afectar a su habilidad de defosforilar al receptor de insulina (IR).¹⁹ Sin embargo, en el caso de la fosforilación de PTP-1B en Ser⁵⁰ por las quinasas de especificidad dual 1 y 2 (CLK-1 y CLK-2), se ha observado un aumento de la

¹⁵ Van Montfort, R. L. M.; Congreve, M.; Tisi, D.; Carr, R.; Jhoti, H. *Nature* **2003**, *423*, 773-777.

¹⁶ Salmeen, A.; Andersen, J. N.; Myers, M. P.; Meng, T.-C.; Hinks, J. A.; Tonks, N. K.; Barford, D. *Nature* **2003**, *423*, 769-773.

¹⁷ Mahadev, K.; Zilbering, A.; Zhu, L.; Goldstein, B. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21938-2194.

¹⁸ Shifrin, V. I.; Davis, R. J.; Neel, B. G. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2957-2962.

¹⁹ Ravichandran, L. V.; Chen, H.; Li, Y.; Quon, M. J. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1768-1780.

estimulación de la actividad fosfatasa.²⁰ Todavía se desconocen las razones de estos datos discrepantes.

Además de la fosforilación del residuo de serina, la insulina estimula la fosforilación de la tirosina de PTP-1B en tres sitios Tyr⁶⁶, Tyr¹⁵² e Tyr¹⁵³.²¹ Al igual que ocurre con la fosforilación de Ser⁵⁰, la fosforilación de estos tres lugares ha dado lugar a un aumento o a una disminución de la actividad catalítica de PTP-1B.

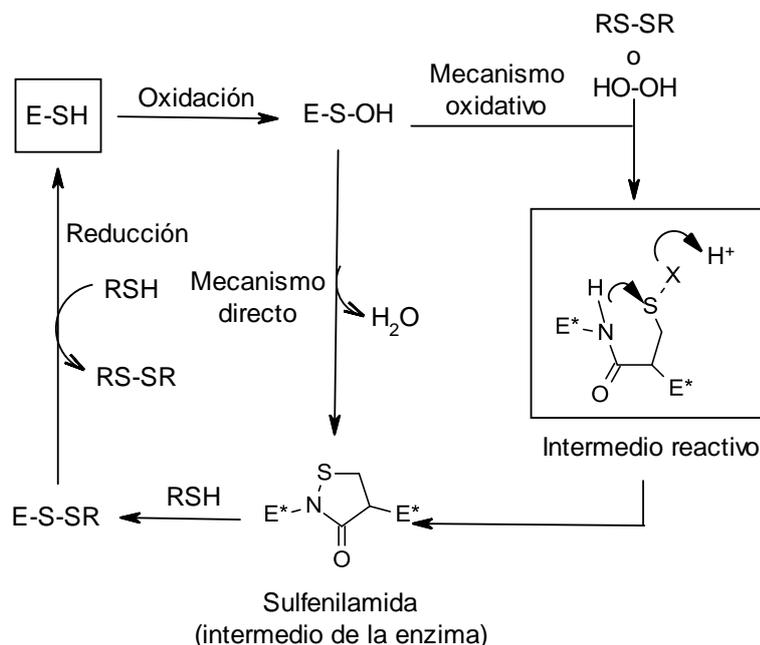


Figura 2.5. Mecanismo de la formación de sulfenilamida y su reactivación (tomado de la ref. 15). La cisteína catalítica de PTP-1B (E-SH) es oxidada a ácido sulfénico (E-S-OH). La sulfenilamida puede formarse por un mecanismo directo que implica un ataque nucleofílico de un nitrógeno de la Ser²¹⁶ al átomo S_γ de la Cys²¹⁵, con la posterior eliminación de una molécula de agua. De manera alternativa, el ácido sulfénico puede ser oxidado a un intermedio altamente reactivo por H₂O₂ o un tiorol oxidado, los cuales reaccionan para dar la sulfenilamida. La reactivación de la enzima ocurre vía formación de un disulfuro con un tiorol. [R = glutatión o DTT (ditiotreitól); X = OOH (ácido sulfenoperoxoico) o X = OS(O)R (ácido sulfinotioico)].

²⁰ Moeslein, F. M.; Myers, M. P.; Landreth, G. E. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 26697-26704.

²¹ Bandyopadhyay, D.; Kusari, A.; Kenner, K. A.; Liu, F.; Chernoff, J.; Gustafson, T. A.; Kusari, J. J. *Biol. Chem.* **1997**, 272, 1639-1645.

2.1.3.3.3. Sumoilación

La familia de proteínas SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) actúa como reguladora importante en la modulación de diversas funciones celulares. La modificación de una proteína debido a la conjugación con SUMO regula la localización, estabilidad, interacción y actividad de dicha proteína.²² Un estudio reciente ha demostrado que PTP-1B interacciona con la ligasa SUMO E3. Dicha interacción promueve modificaciones de SUMO en PTP-1B, observándose modificaciones en residuos de lisina y, todo ello, se encuentra asociado con la reducción de la actividad enzimática, lo que se traduce en una menor actividad hacia sustratos como IR.²³

La localización subcelular de la sumoilación de PTP-1B no se encuentra firmemente establecida, pero la PTP-1B sumoilada parece acumularse en la región perinuclear, en el carbono terminal, y se necesita el dominio ER para una sumoilación máxima (Figura 2.4).

2.1.3.3.4. Proteólisis

La fragmentación del C-terminal mediada por calpaína en el dominio ER de PTP-1B que se produce en las plaquetas activadas, genera una enzima activa y soluble.²⁴ Curiosamente, la existencia de alteraciones en la calpaína-1 en ratón está acompañada de defectos significativos en la agregación plaquetaria y en la retracción del coágulo, así como en una reducción global de los niveles de fosforilación de la proteína tirosina. Las plaquetas de estos ratones muestran un incremento de hasta dos veces en la cantidad de proteína PTP-1B, sin afectar a los niveles de ARNm, lo que sugiere que la calpaína-1, en lugar de activar PTP-1B mediante la escisión del dominio C-terminal, rompe PTP-1B en fragmentos inactivos *in vivo*.

²² Hay, R. T. *Mol. Cell.* **2005**, *18*, 1-12.

²³ Dadke, S.; Cotteret, S.; Yip, S. C.; Jaffer, Z. M.; Haj, F.; Ivanov, A.; Rauscher III, F.; Shuai, K.; Ng, T.; Neel, B. G.; Chernoff, J. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 80-85.

²⁴ Frangioni, J. V.; Oda, A.; Smith, M.; Salzman, E. W.; Neel, B.G. *EMBO J.* **1993**, *12*, 4843-4856.

2.1.3.4. Implicación de PTP-1B en enfermedades humanas

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica multifactorial crónica debida a la deficiencia o resistencia a la insulina.²⁵ Se trata de una enfermedad sistémica responsable de la morbilidad en los países occidentales y que gradualmente comienza a prevalecer en países en desarrollo. Esta enfermedad conlleva al desarrollo de una serie de complicaciones secundarias graves tales como aterosclerosis, microangiopatía, disfunción y fallo renal, anormalidades cardíacas, retinopatía diabética y desórdenes oculares.^{26,27} La incidencia de esta enfermedad está aumentando día a día y se estima que alcanzó 210 millones de diabéticos en 2010 y llegará a 300 millones en 2025.²⁸

Existen dos tipos de diabetes mellitus, diabetes tipo 1 y tipo 2. La diabetes tipo 1, también conocida como diabetes mellitus dependiente de insulina (*insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM), es una enfermedad genética autoinmune producida por la deficiencia absoluta de insulina debido a la destrucción de las células β pancreáticas que producen insulina, y que solo se controla por inyecciones subcutáneas diarias de insulina. La diabetes tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (*noninsulin-dependent diabetes mellitus*, NIDDM) se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre, insulina y un déficit en la acción de la insulina. Se caracteriza por una resistencia a la insulina en tejidos periféricos y una deficiencia en la secreción de insulina por las células β . Esta última es la forma más común de diabetes mellitus y se encuentra asociada predominantemente con un historial familiar de diabetes, edad elevada, obesidad y falta de ejercicio. Es más común en mujeres, especialmente en aquellas que posean un historial de diabetes gestacional. Las causas atribuidas a la diabetes tipo 2 incluyen: anormalidades en el receptor de glucosa en las células β , que son las encargadas de responder ante una elevada concentración de glucosa, sensibilidad reducida del tejido periférico a la insulina, reducción de los receptores de insulina (IRs), baja regulación de IR, y exceso de hormonas hiperglicémicas (Figura 2.6).²⁹

²⁵ Vats, R. K.; Kumar, V.; Kothari, A.; Mital, A.; Ramachandran, U. *Curr. Sci.* **2005**, *88*, 241-249.

²⁶ Sakurai, H. *Chem. Rec.* **2002**, *2*, 237-248.

²⁷ Tomlinson, D. R.; Willars, G. B.; Carrington, A. L. *Pharmacol. Ther.* **1992**, *54*, 151-194.

²⁸ King, H.; Aubert R. E.; Herman W. H. *Diabetes Care* **1998**, *21*, 1414-1431.

²⁹ Thareja, S.; Aggarwal, S.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 459-517.

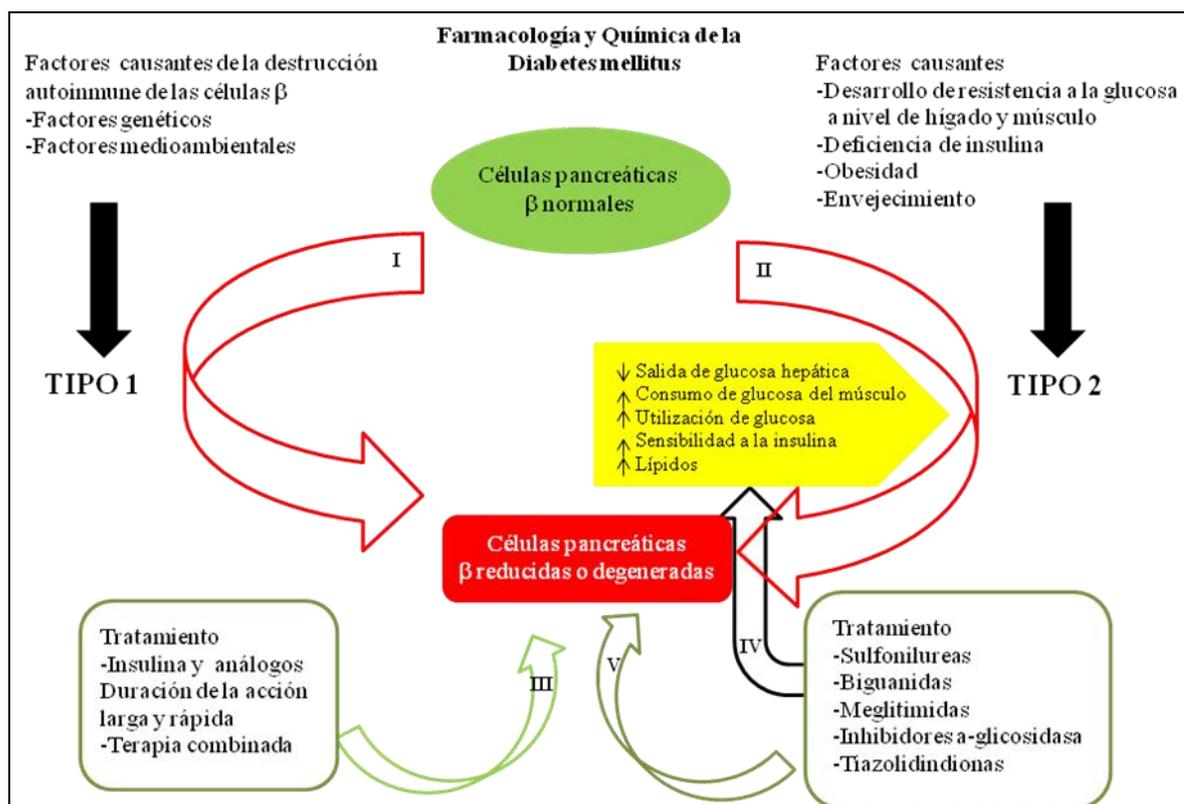


Figura 2.6. Representación esquemática de Diabetes mellitus (modificado de la ref. 29)

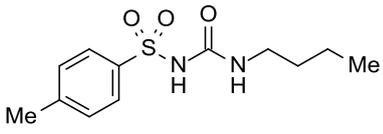
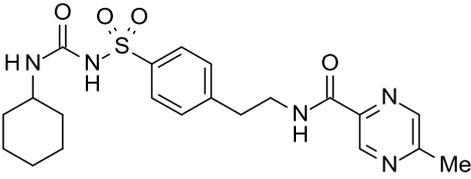
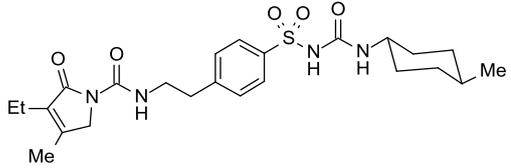
La resistencia a la insulina es el mayor factor fisiopatológico en el desarrollo de la diabetes tipo 2, teniendo lugar principalmente en el músculo, tejido adiposo e hígado, produciendo una captación y utilización reducida de glucosa, y un incremento de la producción de glucosa. La resistencia a la insulina se encuentra asociada no solo con hiperinsulinemia e hiperglicemia sino también con otros desórdenes como aterosclerosis, hipertensión y un perfil anormal lipídico, lo que se conoce como Síndrome Metabólico o desórdenes asociados a la resistencia a la insulina.³⁰

Los recursos disponibles en el sistema moderno de la medicina para el tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2 se han centrado en el ejercicio y tratamiento dietético de la obesidad para mejorar la sensibilidad a la insulina, para aumentar su secreción, y para inhibir o reducir la tasa de absorción de glucosa desde el intestino.

³⁰ Reaven, G. M. *Diabetes* **1988**, 37, 1595-1607.

Actualmente, el tratamiento de la diabetes tipo 2 se ha revolucionado con la aparición de sensibilizadores de insulina como rosiglitazona y pioglitazona que mejoran la resistencia a la insulina y normalizan los niveles elevados de glucosa en sangre, pero también están asociados con hepatotoxicidad, aumento de peso y edema (Tabla 2.1).²⁹

Tabla 2.1. Ejemplos de fármacos utilizados en el tratamiento de la Diabetes tipo 2 (tomado de la ref. 29).

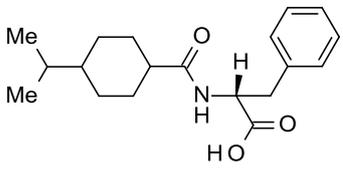
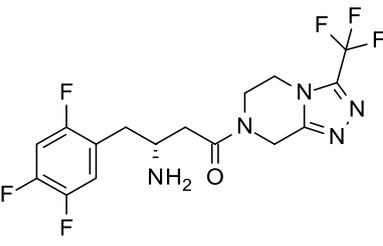
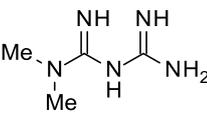
Tipo de fármaco	Fármaco	Acción
Sulfonilureas ³¹		
Primera generación	<p>Tolbutamida</p> 	Secretagogos de insulina
Segunda generación	<p>Glipizida</p> 	Secretagogos de insulina
Tercera generación	<p>Glimepirida</p> 	Secretagogos de insulina

²⁹ Thareja, S.; Aggarwal, S.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. *Med. Res. Rev.* **2012**, 32, 459-517.

³¹ García-Barrado, M.-J.; Jonas, J.-C.; Gilon, P.; Henquin, J. C. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 298, 279-286.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

Tabla 2.1. (Continuación) Ejemplos de fármacos utilizados en el tratamiento de la Diabetes tipo 2 (tomado de la ref. 29).

Tipo de fármaco	Fármaco	Acción
Meglitinidas ³² (glinidas)	<p>Nateglinida</p> 	Secretagogos de insulina
Gliptinas ^{33,34} (Inhibidores de DPP-1V)	<p>Sitagliptina</p> 	Secretagogos de insulina
Péptido similar al glucagón-1 ^{35,36} (GLP-1)	<p>Exenatida</p> <p>H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</p>	Secretagogos de insulina
Biguanidas ³⁷	<p>Metformina</p> 	<p>Sensibilizadores de insulina</p> <p>Disminuye la resistencia a la insulina</p>

³² Norman, P.; Rabasseda, X. *Drugs Today* **2001**, *37*, 411-426.

³³ Deacon, C. F.; Holst, J. J. *Adv. Ther.* **2009**, *26*, 488-499.

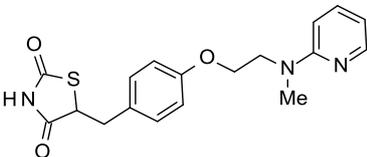
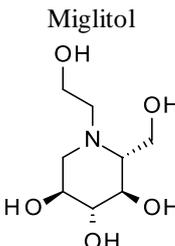
³⁴ Deacon, C. F.; Carr, R. D.; Holst, J. J. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 1780-1794.

³⁵ Baggio, L. L.; Drucker, D. J. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2131-2157.

³⁶ Knudsen, L. B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4128-4134.

³⁷ Purello, F.; Gullo, D.; Brunetti, A.; Buscema, M.; Italia, S.; Goldfine, I. D.; Vigneri, R. *Metabolism* **1987**, *36*, 774-776.

Tabla 2.1. (Continuación) Ejemplos de fármacos utilizados en el tratamiento de la Diabetes tipo 2 (tomado de la ref. 29).

Tipo de fármaco	Fármaco	Acción
Tiazolidindionas ^{38,39} (antagonistas de PPAR γ ; glitazonas)	Rosiglitazona 	Sensibilizadores de insulina Disminuye la resistencia a la insulina
Inhibidores de Alfa-glucosidasa ^{40,41}	Miglitol 	Inhibidores de la captación de glucosa

El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos orales para la diabetes tipo 2 se encuentra actualmente en auge.⁴² Las crecientes investigaciones y los esfuerzos de desarrollo son consecuencia de: un aumento de la prevalencia de la enfermedad y de las co-morbilidades relacionadas, una creciente comprensión de la fisiopatología de la enfermedad, y una identificación y validación de nuevas dianas farmacológicas. En estos objetivos se incluyen diversos receptores y enzimas que presentan mecanismos de acción distintos de aquellos sobre los que se actúa con las terapias actuales, y podrían ser beneficiosos en el tratamiento de la diabetes sin tener efectos secundarios importantes. Algunos de estos nuevos objetivos que prometen un futuro éxito clínico y que conllevan diferentes mecanismos de acción de las terapias convencionales se muestran en la Tabla 2.2, donde se encuentra PTP-1B.

³⁸ Malinowski, J. M.; Bolesta, S. *Clin. Ther.* **2000**, *22*, 1151-1168.

³⁹ Singh, F. V.; Parihar, A.; Chaurasia, S.; Singh, A. B.; Singh, S. P.; Tamrakar, A. K.; Srivastava, A. K.; Goel, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2158-2161.

⁴⁰ Fukaya, N.; Mochizuki, K.; Tanaka, Y.; Kumazawa, T.; Jiuxin, Z.; Fuchigami, M.; Goda, T. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *624*, 51-57.

⁴¹ Kageyama, S.; Nakamichi, N.; Sekino, H.; Nakano, S. *Clin. Ther.* **1997**, *19*, 720-729.

⁴² Mouser, J. F. *Nutr. Clin. Pract.* **2004**, *19*, 172-180.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

Tabla 2.2. Nuevas estrategias en el tratamiento de la Diabetes tipo 2 (tomado de la ref. 29).

Objetivos	Papel en el tratamiento de la glucosa de la sangre
Inhibidores de glucógeno sintetasa-3 ⁴³ (GSK-3)	Activación de glucógeno sintetasa
Agonistas duales de PPAR α/γ	Sensibilizadores de insulina
Inhibidores del cotransporte Na ⁺ -glucosa ⁴⁴ (SGLT)	Inhibe la reabsorción renal de la glucosa de la orina
Inhibidores de la producción de glucosa hepática ⁴⁵ (HGO)	Sensibilizadores de insulina y decrecimiento de la resistencia a la insulina
Agonistas de adrenoreceptores- β_3 ⁴⁶	Disminución del consumo de alimentos
Receptor Retinoide X ⁴⁷	Control del metabolismo de lípidos y carbohidratos
Inhibidores de proteína tirosina fosfatasa ⁴⁸ (PTP-1B)	Previene la defosforilación del receptor de insulina activado

Las PTPs, PTKs y sus derivados proporcionan una compleja red que mantiene la señalización celular. Un funcionamiento defectuoso o inapropiado de esta red conduce a una fosforilación anómala de residuos de tirosina, contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades como cáncer, desórdenes inflamatorios y diabetes. Las PTPs son enzimas que juegan un papel importante en la señalización celular mediante la regulación del estado de fosforilación y, a su vez, en las propiedades funcionales de las proteínas diana de diversas vías de transducción.

⁴³ Ring, D. B.; Johnson, K. W.; Henriksen, E. J.; Nuss, J. M.; Goff, D.; Kinnick, T. R.; Ma, S. T.; Reeder, J. W.; Samuels, I.; Slabiak, T.; Wagman, A. S.; Wernette Hammond, M.-E.; Harrison, S. D. *Diabetes* **2003**, *52*, 588-595.

⁴⁴ Asano, T.; Ogihara, T.; Katagiri, H.; Sakoda, H.; Ono, H.; Fujishiro, M.; Anai, M.; Kurihara, H.; Uchijima, Y. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2717-2724.

⁴⁵ Home, P. D.; Pacini, G. *Diabetes Obes. Metab.* **2008**, *10*, 699-718.

⁴⁶ Arch, J. R. S.; Wilson, S. *Int. J. Obes.* **1996**, *20*, 191-199.

⁴⁷ Lenhard, J. M. *Receptor Channels* **2001**, *7*, 249-258.

⁴⁸ Pei, Z.; Liu, G.; Lubben, T. H.; Szczepankiewicz, B. G. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3481-3504.

Por lo tanto, las PTPs se consideran como nuevos objetivos en el diseño de agentes terapéuticos capaces de inhibir o modular las actividades de ciertas enzimas cruciales.²⁹ En la Tabla 2.3 se muestran algunas de las PTPs implicadas en varios desórdenes o enfermedades.

Tabla 2.3. Papel de distintas PTPs (tomado de la ref. 29)

PTP(s)	Desórdenes/Enfermedades
PTP-1B, LAR	Diabetes, obesidad
PTP α	Cáncer
CD45	Autoinmunidad, inflamación, enfermedad del Alzheimer
HePTP	Síndrome mielodisplásico
Cdc25	Progresión del ciclo celular, cáncer
PTP ξ	Osteoporosis
PTP-SL, LAR	Neuroprotección
PTP Yersinia	Plaga
MTM-1	Miopatía miotubular asociada a X
PTP Salmonela	Infección por salmonela y tifoidea
SHP-1	Inflamación, leucemia
PP1/PP2A	Desórdenes malignos
VHR	Regulación de la proteína quinasa mitógeno activada (MAK)
PP2B/PP2C	Asma, desórdenes cardiovasculares

²⁹ Thareja, S.; Aggarwal, S.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. *Med. Res. Rev.* **2012**, 32, 459-517.

2.1.3.4.1. PTP-1B y la acción de la insulina

La insulina es una hormona que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La insulina ejerce sus efectos biológicos a través de la unión a su receptor en sus tejidos diana (tejido adiposo, hígado y músculo) y como resultado provoca la activación de una serie de eventos de señalización. El receptor de insulina está compuesto de dos subunidades α y dos subunidades β , unidas mediante enlaces disulfuro. Las unidades β poseen una actividad tirosina quinasa intrínseca, que se activa cuando la insulina se une a las unidades α . Tras la unión de la insulina, esta actividad quinasa autofosforila otros dominios de regulación del receptor, los cuales activan completamente al receptor de insulina tirosina quinasa y, ésta a su vez, fosforila diversos sustratos intracelulares tales como el sustrato del receptor de insulina (IRS-1), pp60, y Shc. Una vez fosforilado, estas proteínas interactúan con otras proteínas, como SH-PTP2 y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3K) además de otras, que se encuentran involucradas en posteriores pasos de la cascada de señalización de la insulina (Figura 2.7).⁴⁸ Estos acontecimientos posteriores en la transducción de señales de insulina pueden proporcionar dianas adicionales en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Aunque el aumento de la fosforilación del IR debería mejorar la señalización de la insulina, se ha observado que la modificación de eventos directos involucrados en su fosforilación puede ser un medio atractivo para mejorar la señalización insulínica y posteriores vías de señalización. Se identificaron dos fosfatasas, TCPTP (proteína tirosina fosfatas de células T) y PTP-1B, que se encuentran relacionadas con el receptor de insulina. Sin embargo, estudios TCPTP knock-out indican que la inhibición de TCPTP tiene efectos letales. Por otra parte, la inhibición de PTP-1B proporciona un enfoque potencialmente muy útil para tratar la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo 2.

⁴⁸ Pei, Z.; Liu, G.; Lubben, T. H.; Szczepankiewicz, B. G. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3481-3504.

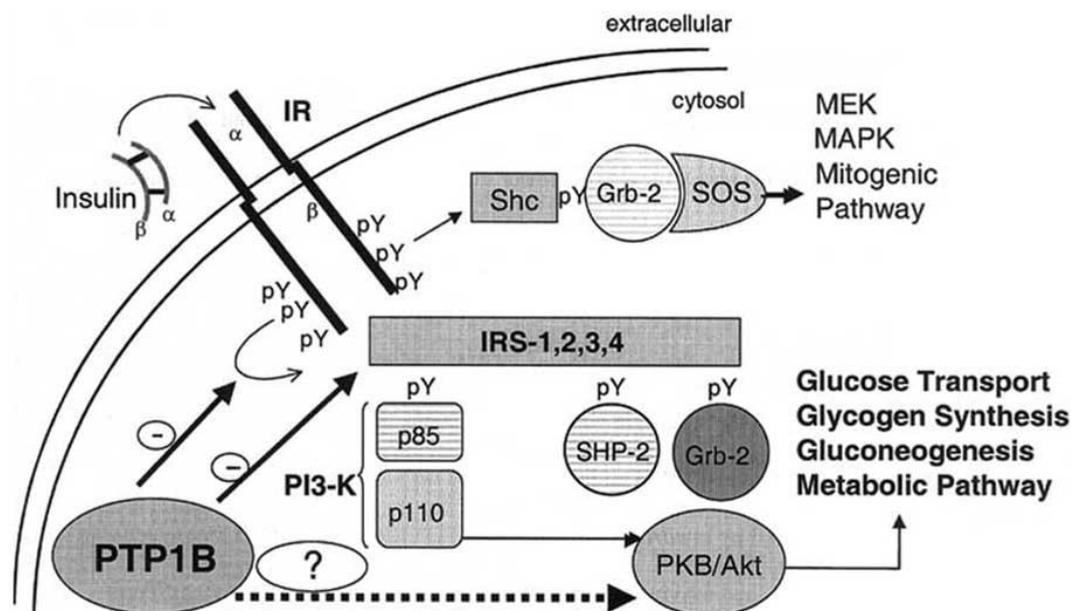


Figura 2.7. Esquema de la transducción de la señal de la insulina (tomado de la ref. 48).

2.1.3.4.2. Papel de PTP-1B en la cascada de señalización de la insulina⁴⁹

PTP-1B interacciona con el IR y elimina los grupos fosfatos de la tirosina inducido por la autofosforilación en respuesta a la unión a la insulina. Para que PTP-1B se una al IR se requiere que los residuos de tirosina de éste se encuentren fosforilados.⁵⁰ Además, es capaz de desfosforilar a los IRSs, potenciando la finalización de la transducción en la cascada de señalización de la insulina. Por otra parte, la insulina es capaz de estimular la fosforilación de residuos de tirosina y la inactivación de PTP-1B.⁵¹ Se ha demostrado que las células de adipocitos que expresan niveles altos de PTP-1B experimentan una disminución en torno al 50-60% en la fosforilación de tirosina

⁴⁹ Ukkola, O.; Santaniemi, M. *J. Int. Med.* **2002**, *251*, 467-475.

⁵⁰ Wang, X.-Y.; Bergdahl, K.; Heijbel, A.; Liljebri, C.; Bleasdale, J. E. *Mol. Cell Endocrinol.* **2001**, *173*, 109-120.

⁵¹ Tao, J.; Malbon, C. C.; Wang, H.-Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29520-29525.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

estimuladas por insulina del IR y los IRSs y una disminución de la actividad de PI3K asociada con el IRS-1.⁵²

A través de estudios *in vivo*, se ha demostrado el papel fisiológico de PTP-1B en la cascada de señalización de la insulina. Para ello, se realizaron dos experimentos independientes empleando modelos de ratones knock-out. En el primer estudio, los ratones carentes del gen de PTP-1B mostraron protección contra la resistencia a la insulina y a la obesidad.⁵³ Como resultado del incremento de la fosforilación del IR en las células de músculo e hígado, estos ratones experimentaron una mejoría en la sensibilidad a la insulina. Además estos ratones fueron resistentes a la obesidad inducida por dieta, a la resistencia a la insulina y poseían niveles de triglicéridos significativamente más bajos en una dieta alta en grasas. El hecho de que estos ratones no ganasen peso fue algo inesperado ya que un aumento en la sensibilidad a la insulina ha mostrado conducir a un aumento de la adiposidad. En un segundo estudio independiente, los ratones deficientes de PTP-1B tenían una baja adiposidad, la tasa metabólica basal aumentada así como el gasto total de energía y la obesidad inducida por la dieta. La captación de glucosa estimulada por la insulina fue elevada en el músculo esquelético, mientras que el tejido adiposo no se vio afectado, proporcionando la evidencia de que el aumento de la sensibilidad a la insulina en ratones deficientes en PTP-1B era específica de tejido.⁵⁴

2.1.3.4.3. PTP-1B en diabetes y obesidad

Desde su descubrimiento, PTP-1B ha estado asociada a la resistencia a la insulina en obesidad y a la diabetes mellitus tipo 2. Debido a que la pérdida de la actividad de PTP-1B incrementa la acción de la insulina y, al mismo tiempo, previene obesidad y diabetes, se considera a PTP-1B como una diana ideal en el desarrollo de nuevos fármacos contra estos desórdenes.

⁵² Venable, C. L.; Frevert, E. U.; Kim, Y.-B.; Fischer, B. M.; Kamatkar, S.; Neel, B. G.; Kahn, B. B. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18318-18326.

⁵³ Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A. L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-Hagen, J.; Chan, C.-C.; Ramachandran, C.; Gresser, M. J.; Tremblay, M. L.; Kennedy, B. P. *Science* **1999**, 283, 1544-1548.

⁵⁴ Klamman, L. D.; Boss, O.; Peroni, O. D.; Kim, J. K.; Martino, J. L.; Zabolotny, J. M.; Moghal, N.; Lubkin, M.; Kim, Y.-B.; Sharpe, A. H.; Stricker-Krongrad, A.; Shulman, G. I.; Neel, B. G.; Kahn, B. B. *Mol. Cell Biol.* **2000**, 20, 5479-5489.

Las propiedades metabólicas del músculo esquelético pueden jugar un papel importante en la etiología de la obesidad y en las co-morbilidades relacionadas.⁵⁵ La actividad de la PTP soluble en el músculo esquelético ha demostrado ser mayor en sujetos resistentes a la insulina en comparación con aquellos que son sensibles a ella.⁵⁶ En contraste, la actividad de PTP-1B en el músculo esquelético se reduce en pacientes con diabetes tipo 2 y la pérdida de peso está asociada con un incremento de la actividad de la proteína.⁵⁷ En el estudio realizado por Ahmad y *col.* la actividad y expresión de PTP-1B del músculo esquelético aumentó en personas obesas no diabéticas pero disminuyó en aquellos que padecían diabetes tipo 2. Estos datos sugieren que el aumento de PTP-1B puede jugar un papel importante en la patogénesis de la resistencia a la insulina en la obesidad humana mientras que otros factores pueden estar implicados en el estado diabético.

La resistencia a la insulina a nivel de los adipocitos se ha propuesto como una de las causas principales del síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.⁵⁸ Un exceso de grasa corporal se asocia con una mayor disponibilidad y oxidación de los ácidos grasos libres que aumenta la producción hepática de glucosa e inhibe la utilización de glucosa oxidativa y no oxidativa así como la secreción de insulina.⁵⁹ En sujetos obesos se ha visto que la actividad de PTP en tejido adiposo se encuentra aumentada pero se desconocen que PTPs son las que contribuyen a la actividad PTP observada.⁶⁰ Además, se ha demostrado que la mejora de la sensibilidad a la insulina en sujetos obesos después de la pérdida de peso va acompañada de una reducción de PTP1B en el tejido adiposo.⁶¹

⁵⁵ Helge, J. W.; Fraser, A. M.; Kriketos, A. D.; Jenkins, A. B.; Calvert, G. D.; Ayre, K. J.; Storlien, L. H. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **1999**, *23*, 986-991.

⁵⁶ McGuire, M. C.; Fields, R. M.; Nyomba, B. L.; Raz, I.; Bogardus, C.; Tonks, N. K.; Sommercorn, J. *Diabetes* **1991**, *40*, 939-942.

⁵⁷ Kusari, J.; Kenner, K. A.; Suh, K.-I.; Hill, D. E.; Henry, R. R. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 1156-1162.

⁵⁸ Bergman, R. N.; Mittelman, S. D. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **1998**, *9*, 205-221.

⁵⁹ Belfiore, F.; Iannello, S. *Mol. Genet. Metab.* **1998**, *65*, 121-128.

⁶⁰ Ahmad, F.; Considine, R. V.; Goldstein, B. J. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 2806-2812.

⁶¹ Ahmad, F.; Considine, R. V.; Bauer, T. L.; Ohannesian, J. P.; Marco, C. C.; Goldstein, B. J. *Metabolism* **1997**, *46*, 1140-1145.

2.1.3.4.4. PTP-1B en cáncer

La proliferación celular y la transducción de señales se encuentran reguladas mediante la relación de actividad entre las proteínas quinasas y las proteínas fosfatasas, estando éstas últimas relacionadas con la carcinogénesis.⁶² Se han observado tanto niveles aumentados como disminuidos de PTP-1B en diferentes tumores. La expresión de ARN mensajero de PTP-1B se vio disminuida en cáncer de esófago en comparación con los niveles en la mucosa normal. Esto apoya la idea de que PTP-1B podría ser un gen supresor tumoral, estando en concordancia con su efecto negativo en el crecimiento celular. Sin embargo, se han observado valores elevados de PTP-1B en células humanas de carcinoma de mama y de ovario. Además la sobreexpresión de PTP-1B es característica de distintos tipos de carcinomas epiteliales. Sin embargo, el papel exacto de PTP-1B y otras PTP en oncogénesis todavía se desconoce.⁴⁹

2.1.4. Mecanismo de PTP-1B

La estructura de PTP-1B se caracteriza por la presencia de un residuo de Cys²¹⁵ que es esencial para la catálisis. El proceso de catálisis mediado por PTP-1B se realiza en dos pasos. En el primer paso, tiene lugar un ataque nucleófilo sobre el grupo fosfato del sustrato por el átomo de azufre del grupo tiolato de la cadena de Cys²¹⁵, produciéndose, de forma simultánea, la protonación del grupo saliente tirosilo del sustrato por un residuo de Asp¹⁸¹ que actúa como un ácido. De esta manera, se produce la formación de un intermedio cisteinil-fosfato. El segundo paso se encuentra mediado por Gln²⁶², que coordina una molécula de agua, y Asp¹⁸¹, que actúa como una base conjugada, produciéndose una hidrólisis del intermedio catalítico y la eliminación de un grupo fosfato (Figura 2.8).²⁹

⁶² Ullrich, A.; Schlessinger, J. *Cell* **1990**, *61*, 203-12.

⁴⁹ Ukkola, O.; Santaniemi, M. *J. Int. Med.* **2002**, *251*, 467-475.

²⁹ Thareja, S.; Aggarwal, S.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 459-517.

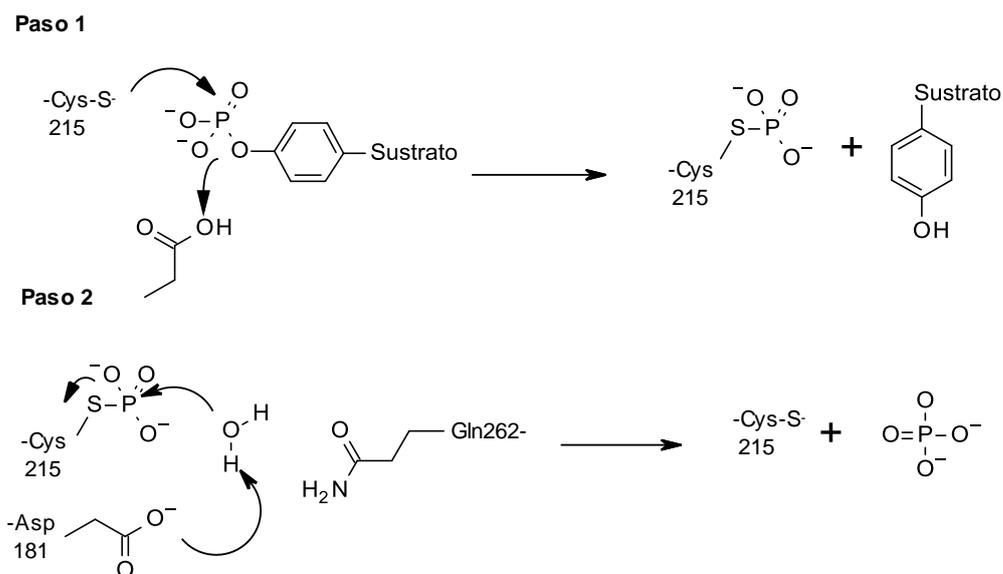


Figura 2.8. Mecanismo catalítico de PTP-1B (tomado de la ref. 29).

2.1.5. Inhibidores de PTP-1B

A partir de estudios de inhibición de PTP-1B se ha observado que es necesario que los inhibidores interaccionen con una región que se encuentra fuera del sitio catalítico además de un segundo sitio no catalítico de unión a fosfotirosina. La unión simultánea a ambos sitios podría mostrar una buena actividad y selectividad frente a PTP-1B. Además, las propiedades electrostáticas del sitio catalítico de PTP-1B son óptimas para la unión de fosfotirosina, ya que este residuo alberga dos cargas negativas a pH fisiológico. Es por este motivo que se prefieren ligandos cargados por su potente unión aunque carezcan de permeabilidad celular. Por lo tanto, es necesario descubrir y desarrollar pequeñas moléculas inhibitoras de PTP-1B que sean potentes, selectivas, permeables y biodisponibles oralmente. Actualmente solo existe un inhibidor de PTP-1B que se encuentra en ensayos clínicos: ISIS-113715. Fue descubierto por *ISIS Pharmaceutical Inc.* para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y es un oligonucleótido que disminuye la expresión de ARNm de PTP-1B en el hígado y en el tejido adiposo.²⁹

²⁹ Thareja, S.; Aggarwal, S.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. *Med. Res. Rev.* **2012**, 32, 459-517.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

A continuación se describen algunos inhibidores de PTP-1B tanto sintéticos como de origen natural.

2.1.5.1. Tiazolidindionas

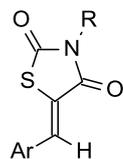
Durante la última década, la FDA ha aprobado una nueva clase de fármacos denominados glitazonas, tales como Rosiglitazona (RSG) y Pioglitazona, para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Estos fármacos comparten un núcleo común: el anillo de 2,4-tiazolidindiona (TZD). Las TZDs corrigen la hiperglicemia mejorando la sensibilidad de los tejidos a la insulina. Distintos estudios sugieren que las TZDs podrían inhibir la PTP-1B. Se ha postulado que una dieta alta en grasas aumenta los niveles de PTP-1B en músculo de ratón, aumentando la posibilidad de que los efectos antidiabéticos de RSG produzcan una disminución de los niveles de PTP-1B en el músculo. Los efectos inhibitorios de RSG en la actividad de PTP-1B parecen estar mediados por la reducción de la expresión de PTP-1B en el músculo esquelético y en el hígado. Es por este motivo, que se sugiere que rosiglitazona podría añadirse a los inhibidores de PTP-1B para aliviar el fenotipo diabético causado por una dieta alta en grasas.³⁰

Maccari y *col.* demostraron que la introducción de un grupo arilideno en la posición 5 del anillo de TZD ejercía un efecto inhibitorio contra PTP-1B humano.⁶³ Concretamente la inserción de uno o dos anillos aromáticos mejoraba la estabilidad del complejo enzima-inhibidor. En la Tabla 2.4, se recogen las estructuras de los compuestos **I** y **II**, los cuales presentaron los mejores valores de IC₅₀ en un primer estudio. En estudios posteriores, Maccari y *col.* optimizaron la estructura mediante la introducción de un segundo grupo carboxílico en el fragmento benciloxibencilideno.⁶⁴ Este segundo grupo podría mejorar la afinidad de estos inhibidores bidentados por el bolsillo secundario no catalítico de PTP-1B. Los compuestos **III** y **IV** son los que mostraron ser inhibidores potentes de PTP-1B, con valores de IC₅₀ en el rango sub-micromolar (Tabla 2.4).

⁶³ Maccari, R.; Paoli, P.; Ottana, R.; Jacomelli, M.; Ciurleo, R.; Manao, G.; Steindl, T.; Langer, T.; Vigorita, M. G.; Camici, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5137-5149.

⁶⁴ Maccari, R.; Ottana, R.; Ciurleo, R.; Paoli, P.; Manao, G.; Camici, G.; Lagner, C.; Langer, T. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 957-962.

Tabla 2.4. IC₅₀ de distintos derivados de tiazolidindionas.



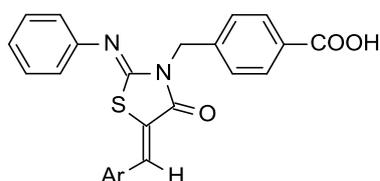
Compuesto	R	Ar	IC ₅₀ (μM)
I			1,1 ± 0,1
II			1,6 ± 0,2
III	H		0,24 ± 0,07
IV	H		0,63 ± 0,15
V	H		5,0 ± 0,1
VI	H		5,0 ± 0,4

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

En 2009, Bhattarai y *col.* identificaron, mediante un screening virtual, una serie de derivados de benciliden-2,4-tiazolidindionas con sustituyentes en el fenilo en posiciones *orto*- o *para*- del grupo tiazolidindiona como inhibidores de PTP-1B.⁶⁵ Los compuestos **V** y **VI** mostraron unos valores de IC₅₀ de 5,0 μM. Además, el compuesto **V** demostró tener una selectividad mayor frente a PTP-1B respecto de otras proteínas ensayadas (TC-PTP, LAR-D1, YPTP1) (Tabla 2.4).

En ese mismo año, Ottanà y *col.* identificaron a los compuestos **VII-XI** como potentes inhibidores de PTP-1B. En estos compuestos, el grupo carbonilo de la posición 2 del grupo 2,4-tiazolidindiona se reemplazó por un grupo fenilimino, dando lugar al desarrollo de 5-aryliden-2-fenilimino-4-tiazolidinonas (Tabla 2.5).⁶⁶

Tabla 2.5. IC₅₀ de distintos derivados de 5-aryliden-2-fenilimino-4-tiazolidinonas.



Compuesto	VII	VIII	IX	X	XI
Ar					
IC ₅₀ (μM)	1,9 ± 1,0	1,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1

⁶⁵ Bhattarai, B. R.; Kafle, B.; Hwang, J.-S.; Khadka, D.; Lee, S.-M.; Kang, J.-S.; Ham, S. W.; Han, I.-O.; Park, H.; Cho, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6161-6165.

⁶⁶ Ottana, R.; Maccari, R.; Ciurleo, R.; Paoli, P.; Jacomelli, M.; Manao, G.; Camici, G.; Laggner, C.; Langer, T. *Bioorg Med. Chem.* **2009**, *17*, 1928-1937.

2.1.5.2. Miméticos fosfotirosilo que contienen fósforo

Una estrategia común en el desarrollo de inhibidores de PTP es la incorporación de una sustitución bioisostérica de los residuos de fosfotirosina (pTyr) por un sustrato peptídico apropiado o por moléculas pequeñas. Este mimético de pTyr no hidrolizable sirve para dirigir a la molécula al sitio catalítico de unión de grupos fosfato de las fosfatasa. Se han descrito una gran variedad de miméticos de pTyr entre los que se incluyen α,α -difluorometilfosfonatos,^{67,68,69} sulfotirosina,⁷⁰ fluoro-O-maloniltirosinas,⁷¹ ácidos cinámicos,⁷² ácidos oxa-acéticos,⁷³ ácidos O-carboximetilsalicílicos,⁷⁴ ácidos 2-(oxalilamino)benzoicos⁷⁵ y ácidos diariloxámicos.⁷⁶

En 2004, Li y *col.* describieron una serie de α,α -difluoro- β -cetofosfonatos **XII** como miméticos fosfotirosilo no peptídicos que contienen fósforo (Figura 2.9).⁷⁷ Estos compuestos estimulan una serie de interacciones específicas con residuos del sitio activo de la fosfatasa. El grupo difluorofosfonato fija la interacción con el sitio de unión a fosfato a través de interacciones electrostáticas, mientras que el grupo carbonilo adyacente puede establecer enlaces de hidrógeno adicionales con residuos dentro del bolsillo de unión a pTyr. El grupo carbonilo en estos compuestos se encuentra altamente activado y tiene carácter electrofílico, con lo que puede formar fácilmente hidratos en

⁶⁷ Burke, T. R., Jr.; Kole, H. K.; Roller, P. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 129-134.

⁶⁸ Yao, Z.-Y.; Ye, B.; Wu, X.-W.; Wang, S.; Wu, L.; Zhang, Z.-Y.; Burke, T. R., Jr. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1799-1810.

⁶⁹ Taylor, S. D.; Kotoris, C. C.; Dinaut, A. N.; Wang, Q.; Ramachandran, C.; Huang, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1457-1468.

⁷⁰ Desmarais, S.; Jia, Z.; Ramachandran, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *354*, 225-231.

⁷¹ Burke, T. R., Jr.; Ye, B.; Akamatsu, M.; Ford, H.; Yan, X.; Kole, H. K.; Wolf, G.; Shoelson, S. E.; Roller, P. P. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1021-1027.

⁷² Moran, E. J.; Sarshar, S.; Cargill, J. F.; Shahbaz, M. M.; Lio, A.; Mjalli, A. M. M.; Armstrong, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10787-10788.

⁷³ Malamas, M. S.; Sredy, J.; Moxham, C.; Katz, A.; Xu, W.; McDevitt, R.; Adebayo, F. O.; Sawicki, D. R.; Seestaller, L.; Sullivan, D.; Taylor, J. R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1293-1310.

⁷⁴ Larsen, S. D.; Barf, T.; Liljebris, C.; May, P. D.; Ogg, D.; O'Sullivan, T. J.; Palazuk, B. J.; Schostarez, H. J.; Stevens, F. C.; Bleasdale, J. E. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 598-622.

⁷⁵ Andersen, H. S.; Iversen, L. F.; Jeppesen, C. B.; Branner, S.; Norris, K.; Rasmussen, H. B.; Moller, K. B.; Moller, N. P. H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7101-7108.

⁷⁶ Szczepankiewicz, B. G.; Liu, G.; Hajduk, P. J.; Abad-Zapatero, C.; Pei, Z.; Xin, Z.; Lubben, T. H.; Trevillyan, J. M.; Stashko, M. A.; Ballaron, S. J.; Liang, H.; Huang, F.; Hutchins, C. W.; Fesik, S. W.; Jirousek, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4087-4096.

⁷⁷ Li, X.; Bhandari, A.; Holmes, C. P.; Szardenings, A. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *14*, 4301-43.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

disolución acuosa. Sin embargo, la naturaleza dianiónica del grupo difluorofosfonato es un factor limitante en la permeabilidad celular.

De la serie α,α -difluoro- β -cetofosfonatos explorada, el compuesto **XIII** que contiene dos grupo difluorofosfonatos demostró ser el inhibidor más potente con un valor de IC_{50} y K_i en el rango submicromolar (Figura 2.9).

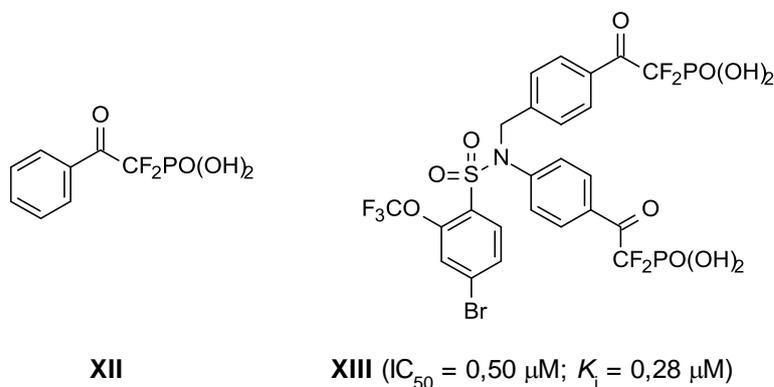


Figura 2.9

En 2005, Holmes y *col.* describieron una serie de sulfonamidas que contienen un único grupo difluorofosfonato como inhibidores potentes de PTP1B.⁷⁸ Se realizó un estudio SAR que condujo a una serie de compuestos con unos valores de IC_{50} y K_i en el rango nanomolar (**XIV-XVIII**, Tabla 2.6). Estos inhibidores basados en sulfonamidas exhiben entre 100 y 30 veces mejor actividad inhibitoria que sus correspondientes aminas terciarias y carboxamidas, respectivamente.

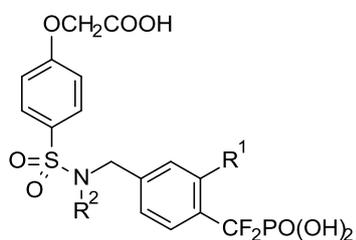
En 2008, Holmes y *col.* publicaron una serie de inhibidores de PTP-1B basados en triarilsulfonamidas, donde el grupo difluorofosfonato se reemplaza por un grupo oxalato bioisostero.⁷⁹ Aunque la mayoría de los grupos bioisosteros no son tan activos como los correspondientes miméticos de pTyr dianiónicos, el oxalato ácido de *o*-

⁷⁸ Holmes, C. P.; Li, X.; Pan, Y.; Xu, C.; Bhandari, A.; Moody, C. M.; Miguel, J. A.; Ferla, S. W.; De Francisco, M. N.; Frederick, B. T.; Zhou, S.; Macher, N.; Jang, L.; Irvine, J. D.; Grove, J. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *15*, 4336-4341.

⁷⁹ Holmes, C. P.; Li, X.; Pan, Y.; Xu, C.; Bhandari, A.; Moody, C. M.; Miguel, J. A.; Ferla, S. W.; De Francisco, N.; Frederick, B. T.; Zhou, S.; Macher, N.; Jang, L.; Irvine, J. D.; Grove, J. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2719-2724.

bromofenol parece dar resultados similares de actividad que el oxalato ácido *o*-carboxifenol y el ácido *o*-(oxalilamino)benzoico. Los compuestos mono- y dicargados **XIX-XXI** muestran ser inhibidores de PTP-1B en el rango micromolar (Tabla 2.7).

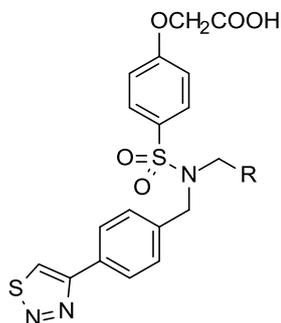
Tabla 2.6. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **XIV-XVIII**.



Compuesto	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
XIV	-H		0,074	0,056
XV	-Br		0,035	0,053
XVI	-OMe		0,060	-
XVII	-Br		0,028	0,013
XVIII	-Br		0,031	0,014

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

Tabla 2.7. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **XIX-XXI**.



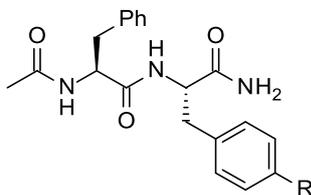
Compuesto	XIX	XX	XXI
R			
IC ₅₀ (μM)	4,1	4,4	1,7

2.1.5.3. Isotiazolidinonas

En 2005, Combs y *col.* descubrieron una serie de (*S*)-isotiazolidinonas heterocíclicas como miméticos de fosfotirosina.⁸⁰ Se observó que la incorporación de estos heterociclos en dipéptidos proporcionaba unos inhibidores potentes, competitivos y reversibles de PTP-1B (**XXII-XXV**) (Tabla 2.8). El heterociclo de isotiazolidinona se eligió debido a que los dos oxígenos del grupo sulfonilo mimetizaban de manera efectiva a los oxígenos del inhibidor difluorofosfonato (DFMP). El compuesto **XXIV** demostró ser un inhibidor potente de esta proteína con un valor de K_i de 190 nM. El compuesto **XXV** se adjunta en la tabla como valor de referencia en la comparación IC₅₀.

⁸⁰ Combs, A. P.; Yue, E. W.; Bower, M.; Ala, P. J.; Wayland, B.; Douty, B.; Takvorian, A.; Polam, P.; Wasserman, Z.; Zhu, W.; Crawley, M. L.; Pruitt, J.; Sparks, R.; Glass, B.; Modi, D.; McLaughlin, E.; Bostrom, L.; Li, M.; Galya, L.; Blom, K.; Hillman, M.; Gonneville, L.; Reid, B. G.; Wei, M.; Becker-Pasha, M.; Klabe, R.; Huber, R.; Li, Y.; Hollis, G.; Burn, T. C.; Wynn, R.; Liu, P.; Metcalf B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6544-6548.

Tabla 2.8. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **XXII-XXV**.



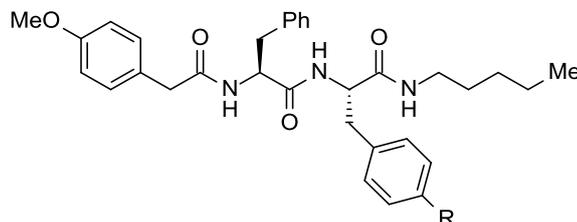
Compuesto	XXII	XXIII	XXIV	XXV
R				
IC ₅₀ (nM)	3000	16000	190	1750

En 2006, Yue y *col.* publicaron la síntesis y los estudios SAR realizados sobre una serie de heterociclos de isotiazolidinonas y péptidos (Tabla 2.9).⁸¹ El estudio SAR reveló que el heterociclo de isotiazolidinona saturado (**XXVI**) es un mimético de pTyr potente en comparación con su homólogo insaturado (**XXVII**), el regioisómero insaturado (**XXVIII**), y la tiadiazolidinona (**XXIX**). El compuesto **XXX** se une más fuertemente que el compuesto **XXXI** debido a que **XXX** alcanza una conformación de menor energía.

⁸¹ Yue, E. W.; Wayland, B.; Douty, B.; Crawley, M. L.; McLaughlin, E.; Takvorian, A.; Wasserman, Z.; Bower, M. J.; Wei, M.; Li, Y.; Ala, P. J.; Gonneville, L.; Wynn, R.; Burn, T. C.; Liu, P. C. C.; Combs, A. *P. Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5833-5849.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

Tabla 2.9. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **XXVI-XXXI**.



Compuesto	R	IC ₅₀ (nM)	Compuesto	R	IC ₅₀ (nM)
XXVI		80	XXIX		1500
XXVII		1200	XXX		40
XXVIII		6000	XXXI		15000

En 2007, Sparks y *col.* describieron una serie de (*S*)-isotiazolidinonas peptidomiméticas de las series peptídicas descritas previamente que utiliza una unidad de benzotiazol y bencimidazol como mimético.⁸² Estos derivados son unos inhibidores potentes, competitivos y reversibles de PTP-1B. La estructura de rayos X del cocrystal de PTP-1B y el compuesto **XXXII** (Figura 2.10) demostró que la unidad benzotiazol bencimidazol forma enlaces bidentados de hidrógeno con Asp⁴⁸, y además el benzotiazol interacciona con la superficie de la proteína en la zona donde se encuentra Tyr⁴⁶. El par de electrones del nitrógeno del benzotiazol forma enlaces de hidrógeno con moléculas de agua.

⁸² Sparks, R. B.; Polam, P.; Zhu, W.; Crawley, M. L.; Takvorian, A.; McLaughlin, E.; Wei, M.; Ala, P. J.; Gonneville, L.; Taylor, N.; Li, Y.; Wynn, R.; Burn, T. C.; Liu, P. C. C.; Combs, A. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 736-740.

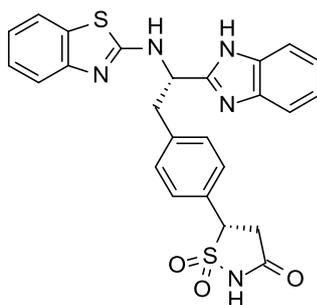
XXXII (IC₅₀ = 270 nM)

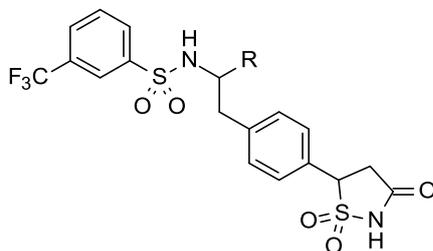
Figura 2.10

Douty *y col.* publicaron en 2008 una serie de inhibidores potentes de PTP-1B en cuya estructura se reemplazó el grupo bencimidazol por imidazoles e imidazolinas.⁸³ Ambos heterociclos mantienen las interacciones por enlace de hidrógeno con el Asp⁴⁸ de PTP-1B a través de los átomos de nitrógeno que son necesarios para una unión de afinidad elevada. Los compuestos **XXXIII** y **XXXIV** mostraron una menor afinidad en comparación con el bencimidazol **XXXV** (Tabla 2.10). Posteriormente se realizó una funcionalización dando como resultado la obtención de dos inhibidores potentes de PTP-1B, **XXXVI** y **XXXVII**, con valores de IC₅₀ de 32 y 22 nM respectivamente (Figura 2.11).

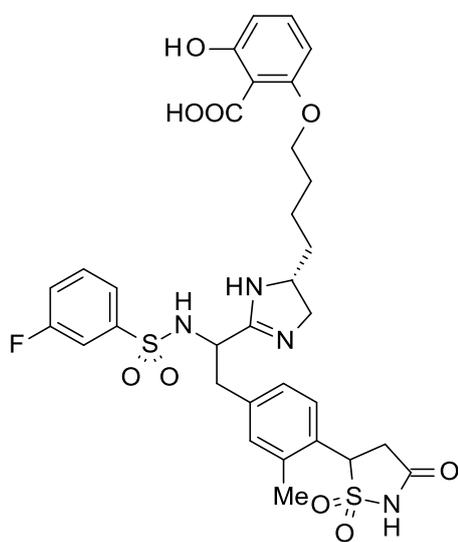
⁸³ Douty, B.; Wayland, B.; Ala, P. J.; Bower, M. J.; Pruitt, J.; Bostrom, L.; Wei, M.; Klabe, R.; Gonneville, L.; Wynn, R.; Burn, T. C.; Liu, P. C. C.; Combs, A. P.; Yue, E. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 66-71.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

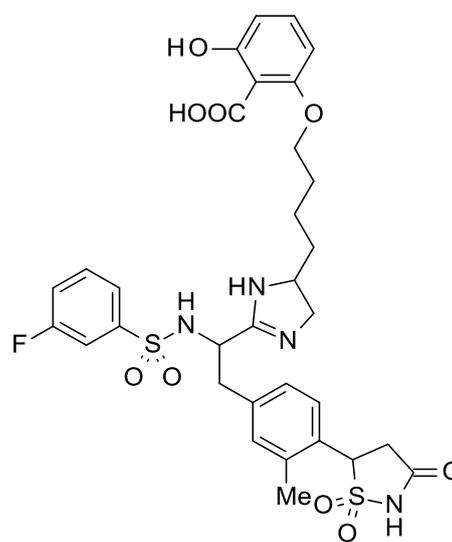
Tabla 2.10. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **XXXIII-XXV**.



Compuesto	XXXIII	XXXIV	XXXV
R			
IC ₅₀ (nM)	700	240	67



XXXVI (IC₅₀ = 32 mM)



XXXVII (IC₅₀ = 22 mM)

Figura 2.11

2.1.5.4. Miméticos fosfotirosilo que contienen derivados de ácido no fosfóricos

El grupo fosfotirosil (**XXXVIII**) es un componente importante en el diseño de inhibidores de PTP-1B basado en la estructura. Debido a que la eficacia del grupo fosfato se encuentra dificultada por su inhabilidad para penetrar en las células, existe un gran interés en el desarrollo de miméticos de pTyr que no contengan este grupo. Los isómeros de grupo fosfato más empleados son aquellos basados en la estructura del malonato y que contienen dos ácidos carboxílicos. Dentro de estos isómeros de grupo fosfato se encuentran *O*-maloniltirosina⁸⁴ (OMT) (**XXXIX**), fluoro-*O*-maloniltirosina⁷¹ (FOMT) (**XL**) y 3-carboxi-*O*-carboximetiltirosina⁴⁸ (**XLI**), siendo todos ellos inhibidores potentes de PTP-1B en el contexto peptídico (Figura 2.12).

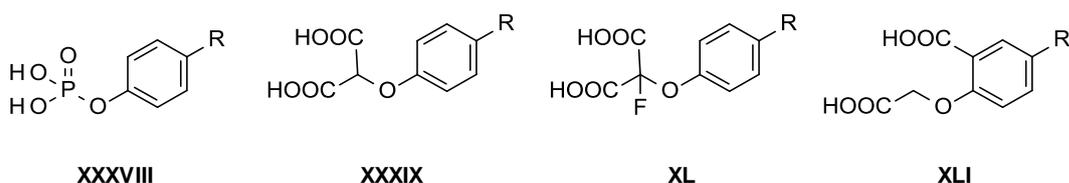


Figura 2.12

En 2000, Gao y *col.* publicaron una serie de inhibidores de PTP-1B de naturaleza peptídica que contenían en su estructura ácidos mono- y dicarboxílicos miméticos de pTyr.⁸⁵ Tal y como se muestra en la Tabla 2.11, los análogos monocarboxílicos exhiben una afinidad menor que los compuestos dicarboxílicos.

⁸⁴ Ye, B.; Akamatsu, M.; Shoelson, S. E.; Wolf, G.; Giorgetti-Peraldi, S.; Yan, X.; Roller, P. P.; Burke, T. R., Jr. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4270-4275.

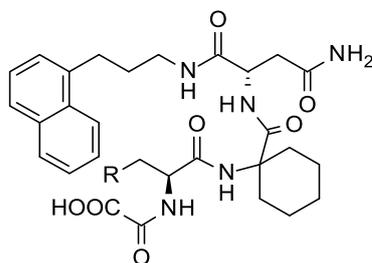
⁷¹ Burke, T. R., Jr.; Ye, B.; Akamatsu, M.; Ford, H.; Yan, X.; Kole, H. K.; Wolf, G.; Shoelson, S. E.; Roller, P. P. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1021-1027.

⁴⁸ Pei, Z.; Liu, G.; Lubben, T. H.; Szczepankiewicz, B. G. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3481-3504.

⁸⁵ Gao, Y.; Wu, L.; Luo, J. H.; Guo, R.; Yang, D.; Zhang, Z.-Y.; Burke, T. R. Jr. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 923-927.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

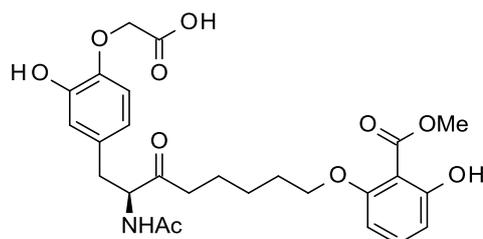
Tabla 2.11. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **XLII-XLVIII**.



Compuesto	R	IC ₅₀ (μM)	Compuesto	R	IC ₅₀ (μM)
XLII		0,07	XLVI		15
XLIII		0,17	XLVII		50
XLIV		0,6	XLVIII		>100
XLV		2			

En 2003, Xin y *col.* describieron la síntesis y actividad de un ácido monocarboxílico inhibidor selectivo de PTP-1B, **XLIX** (Figura 2.13).⁸⁶ Dicho compuesto es veinte veces más selectivo frente a PTP-1B que frente a TC-PTP (proteína tirosina fosfatasa de células T) y además posee una permeabilidad celular elevada.

⁸⁶ Xin, Z.; Liu, G.; Abad-Zapatero, C.; Pei, Z.; Szczepankiewicz, B. G.; Li, X.; Zhang, T.; Hutchins, C. W.; Hajduk, P. J.; Ballaron, S. J.; Stashko, M. A.; Lubben, T. H.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3947-3950.

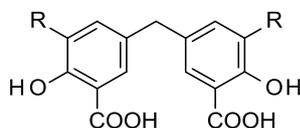


XLIX ($IC_{50} = 9,0 \pm 1,2 \mu M$)

Figura 2.13

Cho y *col.* publicaron en 2007 una serie de derivados del ácido metilendisalicílico como inhibidores de PTP-1B.⁸⁷ De toda la serie sintetizada, los compuestos **L** y **LI** son los que mejor actividad inhibitoria presentan frente a PTP-1B (Tabla 2.12).

Tabla 2.12. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **L** y **LI**.



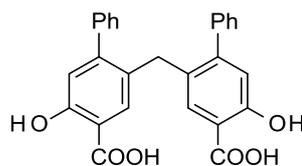
Compuesto	R	IC_{50} (μM)	K_i (μM)
L	Ph	20	9,4
LI	Bn	15	6,3

En un trabajo posterior, Cho⁸⁸ publicó los resultados de la síntesis y evaluación de la inhibición de una nueva serie de compuestos que contenían uno o dos fragmentos de ácido salicílico. El compuesto **LII** resultó ser un inhibidor potente de PTP-1B y demostró ser 14 veces más selectivo frente a TC-PTP (Figura 2.14).

⁸⁷ Shrestha, S.; Bhattarai, B. R.; Chang, K. J.; Lee, K.-H.; Cho, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2760-2764.

⁸⁸ Shrestha, S.; Bhattarai, B. R.; Lee, K.-H.; Cho, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 6535-6548.

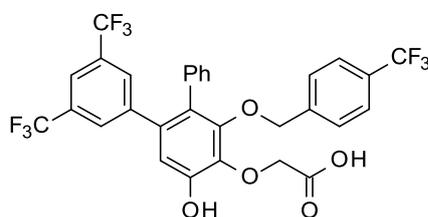
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES



LII ($IC_{50} \sim 6,5 \mu M$)

Figura 2.14

Por último, Cho y *col.* describieron la síntesis de una serie de derivados de 2-*O*-carboximetilpirogallol en un intento por mejorar la potencia inhibitoria de derivados del ácido (2-hidroxifenoxi)acético frente a PTP-1B.⁸⁹ El compuesto **LIII** (Figura 2.15) demostró ser un inhibidor potente, disminuyendo significativamente los niveles de glucosa y mejorando la tolerancia a la glucosa en modelo de ratón diabético con obesidad inducida.



LIII ($IC_{50} \sim 2,0 \pm 0,1 \mu M$)

Figura 2.15

2.1.5.5. Bifenilbenzofuranos y bifenilbenzotiofenos

En 2000, Malamas y *col.* identificaron dos nuevas series de ácidos oxoacéticos con estructura de bifenilbenzofurano y bifenilbenzotiofeno **LIV** y **LV** (Figura 2.16) y ácidos sulfonilsalicílicos como inhibidores potentes de PTP-1B con una buena actividad antihiper glucémica oral.⁷³ Los estudios cristalográficos realizados indican que los

⁸⁹ Bhattarai, B. R.; Shrestha, S.; Ham, S. W.; Kim, K. R.; Cheon, H. G.; Lee, K.-H.; Cho, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5357-5360.

⁷³ Malamas, M. S.; Sredy, J.; Moxham, C.; Katz, A.; Xu, W.; McDevitt, R.; Adebayo, F. O.; Sawicki, D. R.; Seestaller, L.; Sullivan, D.; Taylor, J. R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1293-1310.

inhibidores se unen al sitio activo de la enzima y son retenidos en dicho sitio a través de enlaces de hidrógeno débiles e interacciones de Van der Waals. Los inhibidores más activos de ambas series muestran valores de IC_{50} de 20-50 nM frente a PTP-1B recombinante humano. El compuesto **LVI** resultó ser un inhibidor potente en estudios *in vivo*, siendo capaz de normalizar los niveles de glucosa en plasma (Figura 2.16).

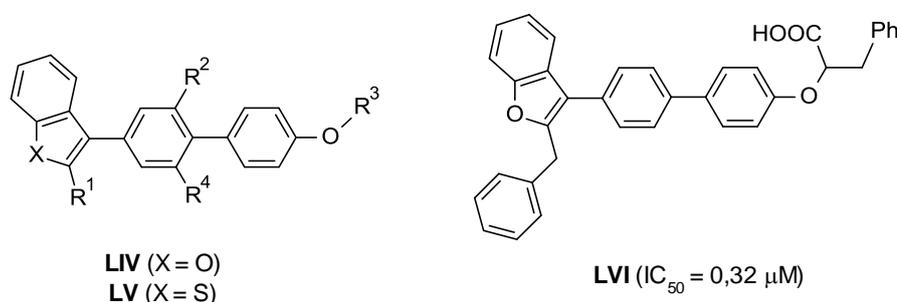


Figura 2.16

2.1.5.6. Ácidos 2-(oxalilamino)benzoicos

Empleando la técnica de muestreo de alta productividad (*high-throughput-screening*, HTS), Andersen y *col.* identificaron una serie de derivados del ácido 2-(oxalilamino)benzoico (OBA) (**LVII-LXI**) como inhibidores competitivos y reversibles de PTP-1B (Figura 2.17).⁷⁵ Para mejorar la unión de estos inhibidores con la parte hidrofóbica de la tirosina fosfato se optimizó la estructura de los mismos introduciendo sustituyentes aromáticos y heteroaromáticos tales como indol, naftaleno y tiofeno en la parte aromática de OBA. Los compuestos **LXII** y **LXIII** resultaron ser unos inhibidores prometedores con potencia y selectividad elevadas frente a PTP-1B (Tabla 2.13).⁹⁰

⁷⁵ Andersen, H. S.; Iversen, L. F.; Jeppesen, C. B.; Branner, S.; Norris, K.; Rasmussen, H. B.; Moller, K. B.; Moller, N. P. H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7101-7108.

⁹⁰ Andersen, H. S.; Olsen, O. H.; Iversen, L. F.; Sørensen, A. L. P.; Mortensen, S. B.; Christensen, M. S.; Branner, S.; Hansen, T. K.; Lau, J. F.; Jeppesen, L.; Moran, E. J.; Su, J.; Bakier, F.; Judge, L.; Shahbaz, M.; Collins, T.; Vo, T.; Newman, M. J.; Ripka, W. C.; Møller, N. P. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4443-4459.

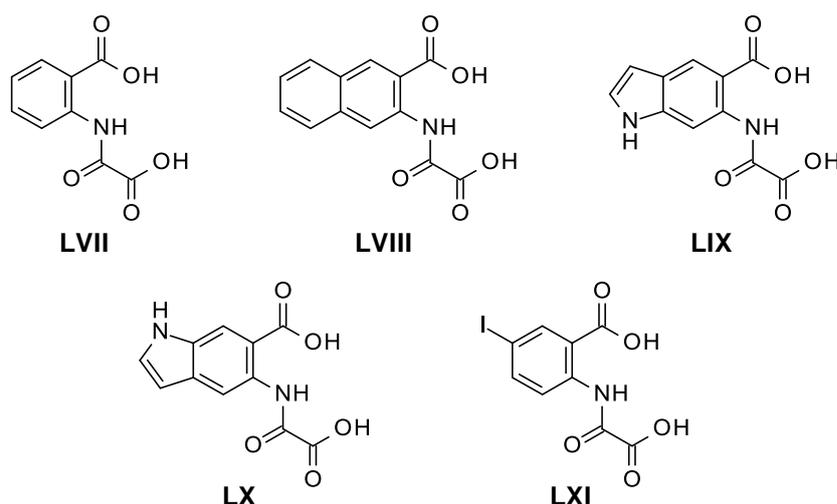
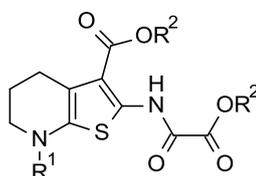


Figura 2.17

Tabla 2.13. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **LXII-LXIII**.



Compuesto	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)
LXII	H	H	0,29
LXIII	(CH ₂) ₂ Ph	H	0,27

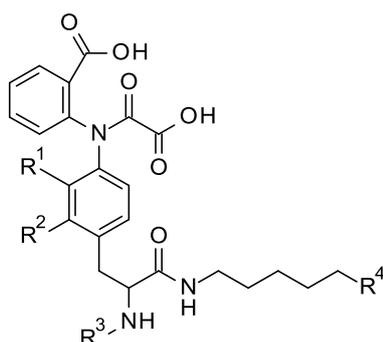
Los laboratorios Abbott publicaron en 2003 unas series de derivados del ácido 2,3-dimetilfenil-*N*-oxalilaminobenzoico como inhibidores reversibles y competitivos de PTP-1B (Tabla 2.14).⁹¹ Los derivados **LXIV-LXIX** muestran valores de *K_i* del orden micromolar, con una afinidad de unión diez veces mayor hacia PTP-1B y TC PTP que

⁹¹ Liu, G.; Szczepankiewicz, B. G.; Pei, Z.; Janowick, D. A.; Xin, Z.; Hajduk, P. J.; Abad-Zapatero, C.; Liang, H.; Hutchins, C. W.; Fesik, S. w.; Ballaron, S. J.; Stashko, M. A.; Lubben, T.; Mika, A. K.; Zinker, B. A.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2093-2103.

los compuestos **LXX** y **LXXI**. El enantiomero (*S*)-**LXXI** posee un valor de K_i de 0,17 μ M para PTP-1B y TCPTP y es unas 50 veces mejor que el compuesto **LXXII**.

Sobre esta serie de compuestos se realizó un estudio SAR para intentar mejorar la actividad inhibitoria y se observó que empleando espaciadores tales como ácido 6-aminohexanoico (**LXXIII**), *N*-(2-feniletíl)-6-aminohexanamida (**LXXIV**) y otros derivados quirales de estos (**LXXV** y **LXXVI**) muestran un aumento de la potencia inhibitoria y una selectividad moderada (Tabla 2.14).⁹²

Tabla 2.14. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **LXIV**-**LXXII**.

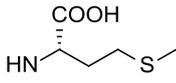
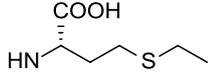


Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	K_i (μ M)
LXIV ^b			MeCO	H	1,1 \pm 0,5
LXV ^b	Et	H	MeCO	H	1,2 \pm 0,3
LXVI ^b	CH(CH ₃) ₂	H	MeCO	H	1,2 \pm 0,1
LXVII	CH ₂ CH ₂ OH	H	MeCO	H	1,5 \pm 0,7
LXVIII ^b	1-piperidinil	H	MeCO	H	2,0 \pm 1,5

a: enantiómero (*S*), b: mezcla racémica, c: mezcla de diastereoisómeros

⁹² Xin, Z.; Oost, T. K.; Abad-Zapatero, C.; Hajduk, P. J.; Pei, Z.; Szczepankiewicz, B. G.; Hutchins, C. W.; Ballaron, S. J.; Stashko, M. A.; Lubben, T.; Trevillyan, M. J.; Jirousek, M. R.; Liu, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1887-1890.

Tabla 2.14. (Continuación) Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **LXIV-LXXII**.

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	K _i (μM)
LXIX ^a	H	H	<i>t</i> -Bu-CO	H	17,3 ± 1,9
LXX ^a	H	H	MeCO	H	9,8 ± 2,1
LXXI ^a	(<i>E</i>)-CH ₂ =CH ₂ CONH ₂	H	MeSO ₂	H	0,17 ± 0,07
LXXII ^a	H	H	MeSO ₂	H	9,1
LXXIII ^b	Et	H	COMe	COOH	2,5 ± 0,2
LXXIV	Et	H	COMe	CONH(CH ₂) ₂ Ph	3,4 ± 0,9
LXXV ^c	Et	H	COMe		0,076 ± 0,015
LXXVI ^c	Et	H	COMe		0.13 ± 0,01

a: enantiómero (*S*), b: mezcla racémica, c: mezcla de diastereoisómeros

2.1.5.7. 1,2-Naftoquinonas

La estructura 1,2-naftoquinona se descubrió como un hito en la inhibición de PTP-1B a través de la técnica de muestreo de alta productividad (HTS) empleando una quimioteca de 40000 compuestos. Anh y *col.* describieron una serie de 1,2-naftoquinonas con diferentes sustituyentes (**LXXVII**).⁹³ Dentro de esta serie, los compuestos **LXXVIII** y **LXXIX** son los que mejor actividad inhibitoria presentan (Figura 2.18).

⁹³ Anh, J. H.; Cho, S. Y.; Ha, J. D.; Chu, S. Y.; Jung, S. H.; Jung, Y. S.; Baek, J. Y.; Choi, I. K.; Shin, E. Y.; Kang, S. K.; Kim, S. S.; Cheon, H. G.; Yang, S. D.; Choi, J. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1941-1946.

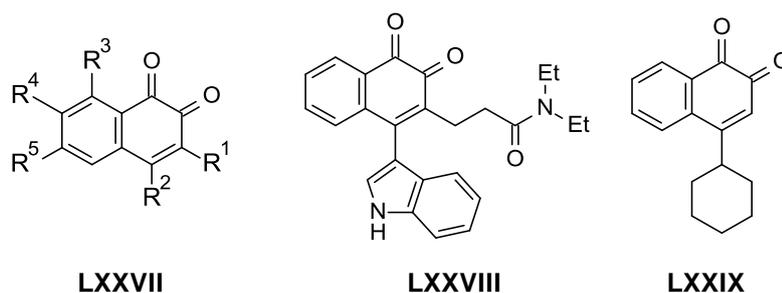
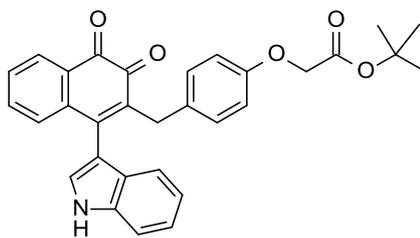


Figura 2.18

En 2004, Cheon y *col.* publicaron los distintos efectos biológicos del compuesto **KR61639** (Figura 2.19) sobre PTP-1B.⁹⁴ Los ensayos de inhibición *in vitro* indican que este compuesto es un inhibidor de PTP-1B funcionalmente activo, y muestra su comportamiento como agente hipoglucémico en los estudios *in vivo*.



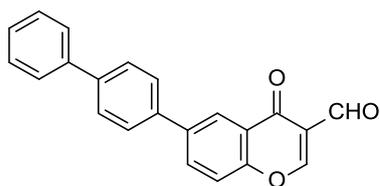
KR61639

Figura 2.19

2.1.5.8. Formilcromonas

Las formilcromonas son farmacóforos sin carga cuya estructura puede albergar distintos sustituyentes. El compuesto **LXXX**, 6-bifenil-3-formilcromona, es uno de los inhibidores más potentes de esta serie y posee un selectividad entre media a elevada contra otras PTPs humanas, LAR y TC-PTP (Figura 2.20).

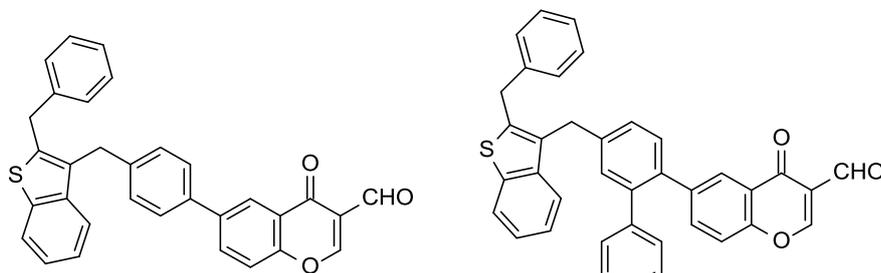
⁹⁴ Cheon, H. G.; Kim, S.-M.; Yang, S.-D.; Ha, J. D.; Choi, J.-K. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 485, 333-339.



LXXX ($IC_{50} \sim 4,3 \pm 0,1 \mu M$)

Figura 2.20

En 2005, Shim y *col.* describieron una serie de compuestos derivados de 3-formilcromona e identificaron diversos inhibidores potentes de PTP-1B con valores de IC_{50} de $1,0 \mu M$.⁹⁵ Estos compuestos exhiben una selectividad notable por PTP-1B frente a otras proteínas. En la Figura 2.21 se recogen los dos compuestos más activos de esta serie **LXXXI** y **LXXXII**.



LXXXI ($IC_{50} \sim 1,1 \pm 0,3 \mu M$)

LXXXII ($IC_{50} \sim 1,0 \pm 0,2 \mu M$)

Figura 2.21

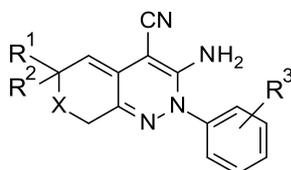
2.1.5.9. Análogos de piridazina

La empresa farmacéutica sueca *Biovitrum* identificó una serie de inhibidores no competitivos y reversibles de PTP-1B con unos valores de IC_{50} comprendidos en el

⁹⁵ Shim, Y. S.; Kim, K. C.; Lee, K. A.; Shrestha, S.; Lee, K.-H.; Kim, C. K.; Cho, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1325-1332.

rango micromolar.^{96,97} Estos compuestos fueron los primeros inhibidores no competitivos descritos que se unen a PTP-1B, lo que sugiere que exista una zona alostérica a través de la cual la actividad enzimática pueda inhibirse. En la Tabla 2.15 se recogen algunos de los compuestos con mejor actividad inhibitoria.

Tabla 2.15. Estructuras y actividades inhibitorias *in vitro* de los compuestos LXXXIII-LCVII.



Compuesto	R ¹	R ²	R ³	X	IC ₅₀ (μM)
LXXXIII	H	H	2- <i>i</i> Propil	S	2,0
LXXXIV	H	H	4-F	S	2,0
LXXXV	H	H	4-OMe	S	1,3
LXXXVI	H	H	H	S	1,1
LXXXVII	Me	Me	2-Butil	O	1,5
LXXXVIII	Me	Me	2-F	O	2,4
LXXXIX	Me	Me	4-OMe	O	2,2
XC	Me	Me	3-NHCOMe	O	2,3
XCI	Me	Me	2-Et	O	1,6
XCII	Me	Me	4-CH ₂ OH	O	1,7
XCIII	Me	Me	3-CH ₂ OH	O	2,4
XCIV	H	H	H	O	0,35
XCV	Me	Me	3-COOMe	O	2,1
XCVI	Me	Me	4-Et	O	2,8
XCVII	H	H	4- <i>i</i> Propil	S	5,6

⁹⁶ Liljebris, C.; Martinsson, J.; Tedenborg, L.; Williams, M.; Barker, E.; Duffy, J. E. S.; Nygren, A.; James, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3197-3212.

⁹⁷ Tjernberg, A.; Hallen, D.; Schultz, J.; James, S.; Benkestock, K.; Byström, S.; Weigelt, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 891-895.

2.1.5.10. Acetofenonas

En 1999, Pei y *col.* describieron una serie de derivados de α -haloacetofenonas (**XCVIII**) como inhibidores neutros potentes de PTP-1B, que alquilan covalentemente el residuo catalítico de Cys²¹⁵ en el sitio activo de la proteína.^{98,99} Al tratarse de compuestos neutros, se difunden en las células humanas e inhiben las PTPs intracelulares. Los resultados muestran que los bromuros son mucho más potentes que los correspondientes cloruros, mientras que el anillo de fenilo puede albergar distintas modificaciones. El compuesto **XCIX** es un ejemplo de derivatización de dicho anillo, donde se le ha unido el tripéptido Gly-Glu-Glu empleando el espaciador rígido bifenilo para dar lugar a un inhibidor potente y selectivo (Figura 2.22).

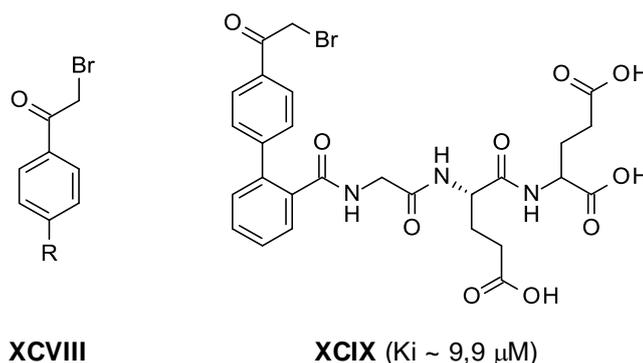


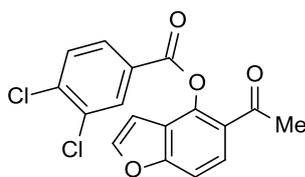
Figura 2.22

En 2005, Dixit y *col.* publicaron varias acetofenonas funcionalizadas con grupo alcoxi y ariloxi como inhibidores potentes de PTP-1B.¹⁰⁰ Uno de estos compuestos, 4-(3,4-diclorobenzoiloxi)-5-acetil-benzofurano (**C**) muestra un 54% de inhibición a una concentración de 100 μM (Figura 2.23). El resto de los compuestos estudiados son inactivos o poseen una baja actividad.

⁹⁸ Arabaci, G.; Guo, X.-C.; Beebe, K. D.; Coggeshall, K. M.; Pei, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5085-5086.

⁹⁹ Arabaci, G.; Yi, T.; Fu, H.; Porter, M. E.; Beebe, K. D.; Pei, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3047-3050.

¹⁰⁰ Dixit, M.; Tripathi, B. K.; Srivastava, A. K.; Goel, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3394-3397.



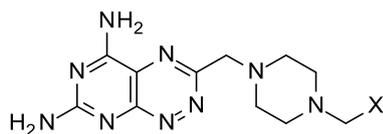
C

Figura 2.23

2.1.5.11. Pirimido[5,4-*e*][1,2,4]triazin-5,7-diaminas

Guertin y *col.* publicaron una serie de pirimido[5,4-*e*][1,2,4]triazin-5,7-diaminas para la inhibición de LAR a través de un HTS.¹⁰¹ Posteriormente, se observó que estos compuestos poseían una elevada actividad inhibitoria residual para PTP-1B, por lo que se emplearon como punto de partida en el desarrollo de nuevos inhibidores de PTP-1B. En la Tabla 2.16, se recogen los compuestos con mejores actividades de inhibición.

Tabla 2.16. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos CI-CIV.



Compuesto	X	IC ₅₀ (μM)
CI	Fenilo	6,2
CII	Bifenilo	2,9
CIII	1-Naftilo	3,5
CIV	2-Naftilo	4,5

¹⁰¹ Guertin, K. R.; Setti, L.; Qi, L.; Dunsdon, R. M.; Dymock, B. W.; Jones, P. S.; Overton, H.; Taylor, M.; Williams, G.; Sergi, J. A.; Wang, K.; Peng, Y.; Renzetti, M.; Boyce, R.; Falcioni, F.; Garippa, R.; Olivier, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2895-2898.

2.1.5.12. Catecoles

Algunos derivados de catecol tales como el compuesto **CV** y derivados similares se han descrito como inhibidores de PTP-1B. Los compuestos nafto-1,2-diol y 1,2,3,4,5,6,7,8-octahidrofenantreno-9,10-diol (**CVI** y **CVII**) muestran unos valores de IC_{50} de 1,25 y 3,65 μ M, por lo que se tomó al primero como punto de partida en la optimización de la estructura (Figura 2.24).

Los diacetoxinaftalenos **CVIII** y **CIX** con sustituyentes en posiciones 3 y 4 muestran una actividad notable *in vitro*. El compuesto **CX** es el que mejor actividad inhibitoria presenta de toda la serie (Tabla 2.17), exhibiendo además actividad hipoglicémica en ratones diabéticos.¹⁰²

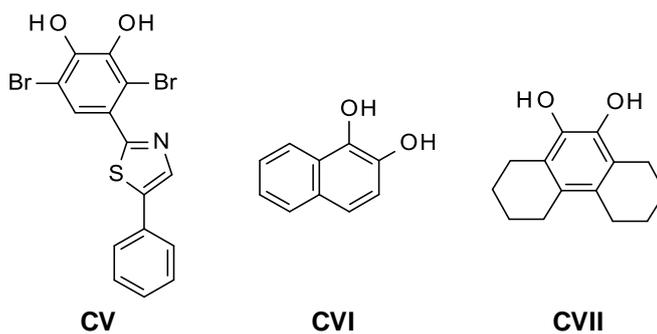
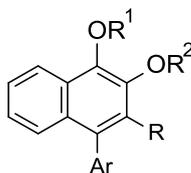


Figura 2.24

¹⁰² Cho, S. Y.; Ahn, J. H.; Ha, J. D.; Kang, S. K.; Baek, J. Y.; Han, S. S.; Shin, E. Y.; Kim, S. S.; Kim, K. R.; Cheon, H. G.; Choi, J. K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*, 1455-1464.

Tabla 2.17. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **CVIII-CX**.

Compuesto	R	R ¹	R ²	Ar	IC ₅₀ (μM)
CVIII	CH ₂ Ph-4-OMe	Ac	Ac	-Ph	3,89
CIX	CH ₂ Ph-4-OCH ₂ COO- <i>t</i> -Bu	Ac	Ac	3-Indolil	1,69
CX	H	H	H	3-Indolil	1,61

2.1.5.13. Ciclopenta[1,2-*d*]oxazina

Empleando la técnica de muestreo de alta productividad (HTS) se identificó una serie de compuestos con estructura de ciclopenta[1,2-*d*]oxazina como hitos frente a PTP-1B con valores submicromolares de IC₅₀. Debido a que estos compuestos son inhibidores de PTP-1B de tamaño molecular pequeño, se sintetizó una serie numerosa de compuestos introduciendo diversos sustituyentes en el esqueleto de ciclopenta[1,2-*d*]oxazina. La mayor parte de estos compuestos fueron activos en un muestreo *in vitro*, siendo los compuestos **CXI-CXIII** los que mejores valores de IC₅₀ presentaron (Tabla 2.18). El compuesto **CXII** es el compuesto más activo de la serie, y mediante un estudio SAR se observó que la introducción de un grupo alquilo de cadena larga aumentaba la actividad. Sin embargo, cuando se estudió la selectividad frente a distintas fosfatasas recombinantes, el compuesto **CXIII** mostró una notable selectividad, mientras que la introducción de una unidad hidrocarbonada larga como **CXII** producía una pérdida de selectividad.¹⁰³

¹⁰³ Cho, S. Y.; Baek, J. Y.; Han, S. S.; Kang, S. K.; Ha, J. D.; Ahn, J. H.; Lee, J. D.; Kim, K. R.; Cheon, H. G.; Rhee, S. D.; Yang, S. D.; Yon, G. H.; Pak, C. S.; Choi, J. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *16*, 499-502.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

Tabla 2.18. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **CXI-CXIII**.



Compuesto	R ¹	IC ₅₀ (μM)
CXI	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ CO	0,27
CXII	4-CH ₃ (CH ₂) ₁₃ C ₆ H ₄ CO	0,14
CXIII	4-MeOC ₆ H ₄ CO	0,80

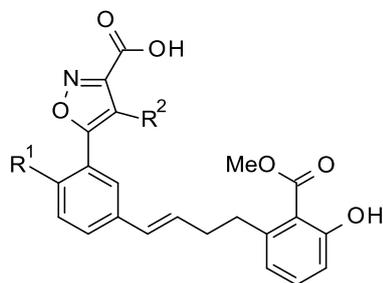
2.1.5.14. Ácidos isoxazolcarboxílicos

Los laboratorios Abbott descubrieron una serie de análogos de ácidos isoxazolcarboxílicos como inhibidores de PTP-1B moderadamente potentes, altamente selectivos y activos sobre cultivos celulares.¹⁰⁴ Los compuestos **CXIV** y **CXV** mostraron tener una actividad 30 veces mayor sobre TC-PTP y no exhibieron actividad inhibitoria frente a LAR, CD45, cdc25 y SHP-2 incluso a concentraciones elevadas (Tabla 2.19).

Posteriormente, Zhao y *col.* introdujeron distintos espaciadores y sustituyentes en el anillo de oxazol, obteniéndose los compuestos **CXVI** y **CXVII** con valores de inhibición en el rango micromolar (Tabla 2.19).¹⁰⁵

¹⁰⁴ Liu, G.; Xin, Z.; Pei, Z.; Hajduk, P. J.; Abad-Zapatero, C.; Hutchins, C. W.; Zhao, H.; Lubben, T. H.; Ballaron, S. J.; Haasch, D. L.; Kaszubska, W.; Rondinone, C. M.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4232-4235.

¹⁰⁵ Zhao, H.; Liu, G.; Xin, Z.; Serby, M. D.; Pei, Z.; Szczepankiewicz, B. G.; Hajduk, P. J.; Abad-Zapatero, C.; Hutchins, C. W.; Lubben, T. H.; Ballaron, S. J.; Haasch, D. L.; Kaszubska, W.; Rondinone, C. M.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5543-5546.

Tabla 2.19. Estructuras y actividades inhibitorias de PTP-1B *in vitro* de los compuestos **CXIV-CXVII**.

Compuesto	R ¹	R ²	K _i (μM)
CXIV	H	H	5,7 ± 0,9
CXV	F	H	6,9 ± 2,3
CXVI	H	NH ₂	2,1
CXVII	F	CH ₂ OH	0,92

2.1.5.15. Otras estructuras

En 2008, Lin y *col.* publicaron una serie de derivados dímeros de β-C-D-glucosil y β-C-D-galactosil-1,4-dimetoxibenceno o naftaleno acetilados y benzoilados que presentan en su estructura un grupo triazol, como inhibidores de PTP-1B.¹⁰⁶ Los dímeros glucosil y galactosil (**CXVIII-CXXI**) muestran actividad inhibitoria frente a PTP-1B, probablemente debido a que se unen al bolsillo hidrofóbico de la enzima, sin diferencias significativas entre los derivados de glucosa y galactosa (Figura 2.25).

¹⁰⁶ Lin, L.; Shen, Q.; Chen, G.-R.; Xie, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9757-9763.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

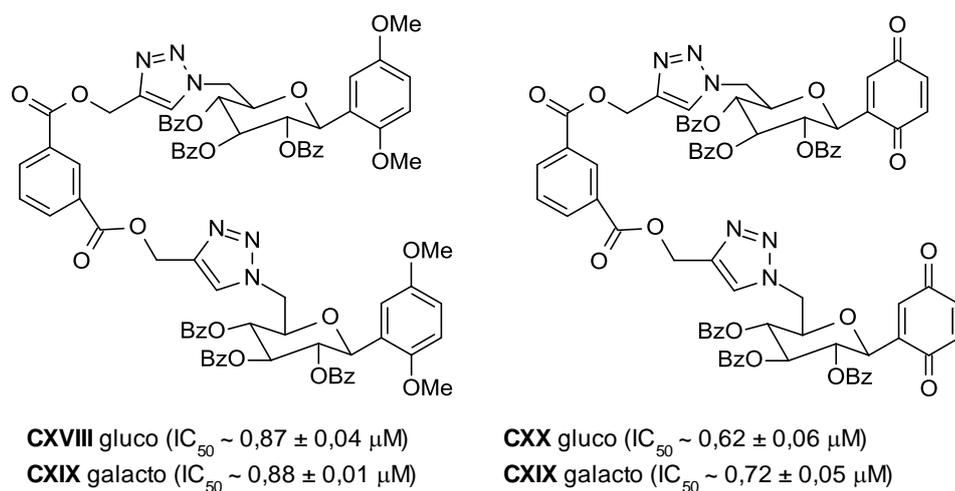
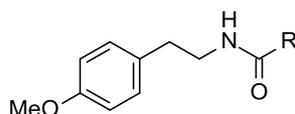


Figura 2.25

En 2009, Saxena y *col.* diseñaron una serie de derivados de *N*-2-(4-metoxifenil)etilacetamida como inhibidores de PTP-1B.¹⁰⁷ Los compuestos **CXXII**-**CXXIV** se evaluaron *in vitro* e *in vivo*, mostrando actividades inhibitorias bajas (76%, $IC_{50} = 69 \mu M$; 62,5%, $IC_{50} = 87 \mu M$; 68,2%, $IC_{50} = 71 \mu M$, respectivamente) (Figura 2.26). Los estudios de docking realizados indican que el grupo 4-metoxifenilo aporta mejor actividad, mostrando un enlace de hidrógeno con el grupo $-NH_2$ de la Arg²²¹.



- CXXII** (R = 1-metilnaftilo)
CXXIII (R = 1-metil-2-nitrofenilo)
CXXIV (R = 1-metilfenoxilo)

Figura 2.26

¹⁰⁷ Saxena, A. K.; Pandey, G.; Gupta, S.; Singh, A. B.; Srivastava, A. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2320-2323.

2.1.5.16. Productos naturales inhibidores de PTP-1B

Los productos naturales son una de las mayores fuentes de agentes bioactivos. Poseen una diversidad estructural superior a los compuestos sintéticos, de ahí su elevada importancia en el descubrimiento de nuevos fármacos o en la optimización de los mismos. Se han descubierto una gran variedad de productos naturales con actividad inhibitoria frente a PTP-1B, algunos de ellos se describen a continuación.

A partir del extracto de raíces de *Broussonetia papyrifera*, se identificaron diversos compuestos con elevada actividad inhibitoria frente a PTP-1B. De todos ellos, los compuestos 8-(1,1-dimetilalil)-5²-(3-metilbut-2-enil)-3',4',5,7-tetrahidroxifavonol (CXXV), 3,3',4',5,7-pentahidroxiavona (CXXVI), uralenol (CXXVII) y brousochalcona A (CXXVIII) fueron los que mejores actividades presentaron; mientras que el compuesto 3'-(3-metilbut-2-enil)-3',4',7-trihidroxiavona (CXXXIX) no presentó elevada actividad (Figura 2.27).¹⁰⁸

La berberina (CXL) (Figura 2.28) es un alcaloide con estructura de isoquinolina ampliamente distribuido en la naturaleza que se ha descrito en la literatura por sus potentes propiedades antidiabéticas.^{109,110} Sus efectos hipoglicémicos se descubrieron accidentalmente cuando se administró a un paciente diabético con diarrea.¹¹¹ En 2006, Bustanji¹¹² y *col.* publicaron los resultados obtenidos en la inhibición de PTP-1B recombinante, obteniéndose un valor de $K_i = 91,3$ nM en los ensayos *in vitro*.

¹⁰⁸ Chen, R. M.; Hu, L. H.; An, T. Y.; Li, J.; Shen, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3387-3390.

¹⁰⁹ Yin, J.; Hu, R.; Chen, M.; Tang, J.; Li, F.; Yang, Y.; Chen, J. *Metabolism* **2002**, *51*, 1439-1443.

¹¹⁰ Ko, B.-S.; Choi, S. B.; Park, S. K.; Jang, J. S.; Kim, Y. E.; Park, S. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1431-1437.

¹¹¹ Zhou, L.; Yang, Y.; Wang, X.; Liu, S.; Shang, W.; Yuan, G.; Li, F.; Tang, J.; Chen, M.; Chen, J. *Metabolism* **2007**, *56*, 405-412.

¹¹² Bustanji, Y.; Taha, M. O.; Yousef, A.-M.; Al-Bakri, A. G. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 163-171.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

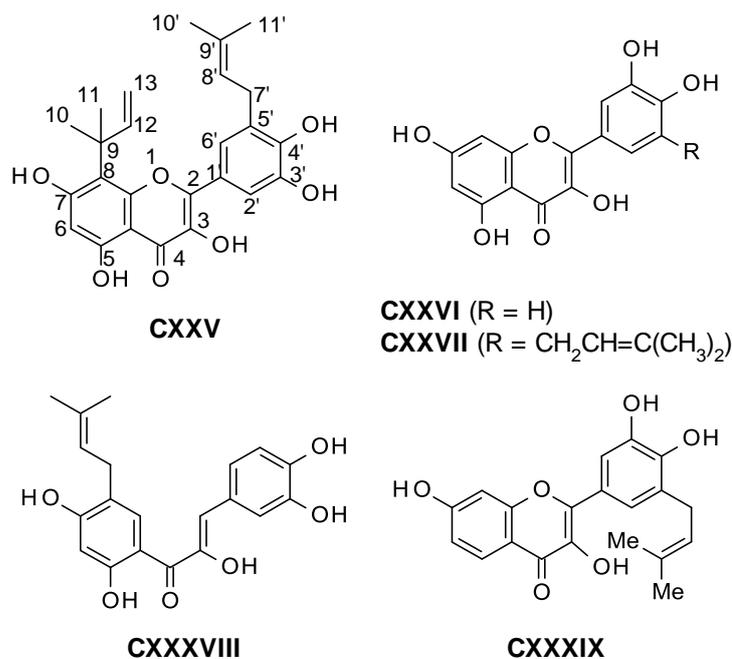


Figura 2.27

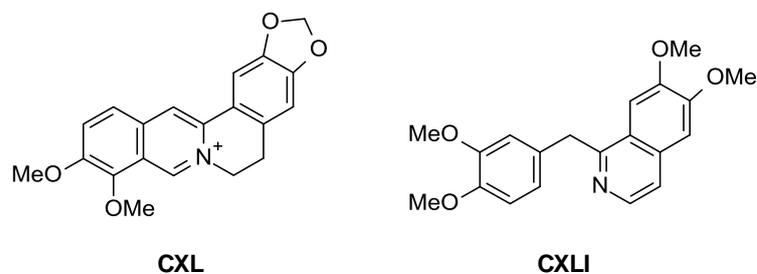


Figura 2.28

La papaverina (**CXLI**) (Figura 2.28) es otro alcaloide con estructura similar a la berberina que se une al bolsillo de unión de PTP-1B adoptando una orientación de baja energía. Exhibe un potente efecto inhibitorio *in vitro* contra *h*-PTP-1B (IC₅₀ ~ 1,20 μM) y disminuye el nivel de glucosa en sangre *in vivo*.¹¹³

¹¹³ Bustanji, Y.; Taha, M. O.; Al-Masri, I. M.; Mohammad, M. K. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 640-645.

En 2007, Na y *col.* publicaron tres compuestos con estructura derivada de 2-arilbenzofuranos (**CXLII-CXLIV**) (Figura 2.29), aislados de la corteza del tallo de *Erythrina addisoniae*, que exhiben actividades inhibitorias potentes frente a PTP-1B *in vitro* con valores de IC₅₀ comprendidos entre 13,6 y 17,5 µM.¹¹⁴

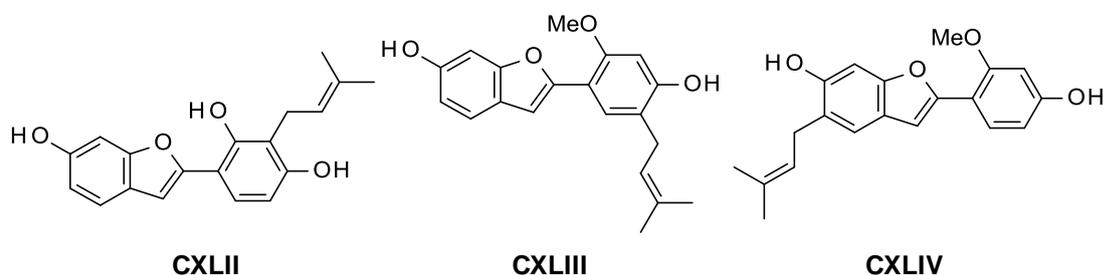


Figura 2.29

Oh y *col.* describieron una serie de flavononas (**CXLVIII-CLIX**) aisladas de *E. abyssinica* como inhibidores potentes de PTP-1B con valores de IC₅₀ comprendidos entre 13,9 y 26,7 µM (Figura 2.30 y Figura 2.31).^{115,116}

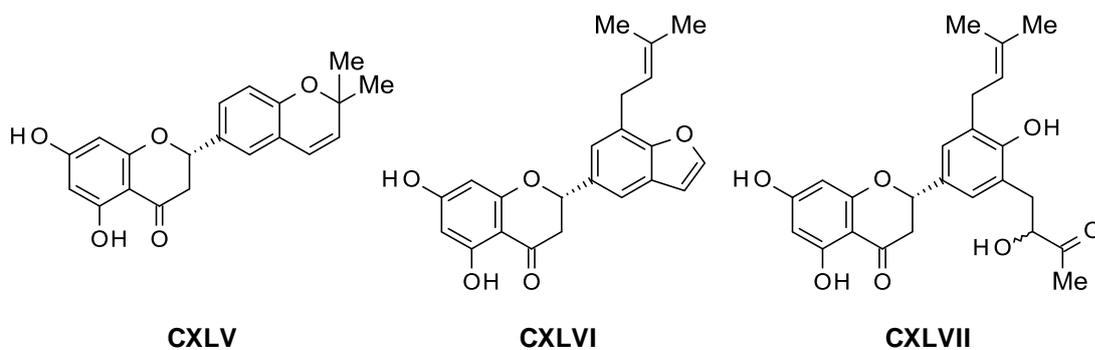


Figura 2.30

¹¹⁴ Na, M.; Hoang, D. M.; Njamen, D.; Mbafor, J. T.; Fomun Z. T.; Thuong, P. T.; Ahn, J. S.; Oh, W. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3868-3871.

¹¹⁵ Cui, L.; Ndinteh, D. T.; Na, M.; Thuong, P. T.; Silike-Muruumu, J.; Njamen, D.; Mbafor, J. T.; Fomun, Z. T.; Ahn, J. S.; Oh, W. K. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1039-1042.

¹¹⁶ Cui, L.; Thuong, P. T.; Lee, H. S.; Ndinteh, D. T.; Mbafor, J. T.; Fomun, Z. T.; Oh, W. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10356-10362.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

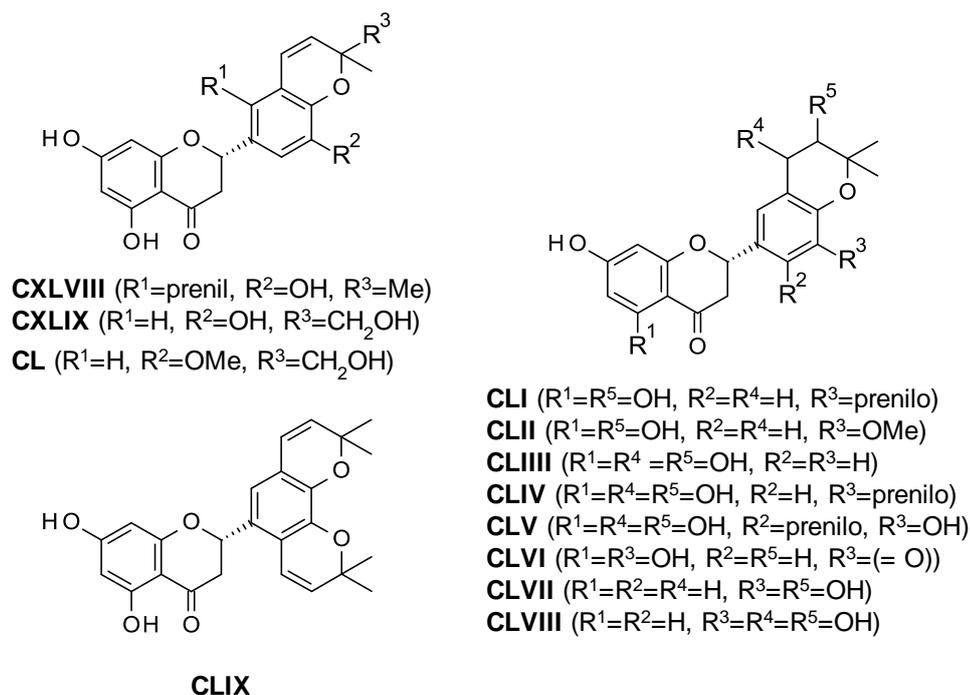


Figura 2.31

El ácido cinámico¹¹⁷ (**CLX**), compuesto extraído de la corteza de *C. cassia*, muestra una actividad inhibitoria dependiente de la dosis con una $IC_{50} = 4,4 \mu\text{g/mL}$. Moran y *col.* demostraron que la unión de un tripéptido Gly-Glu-Glu-NH₂ a la posición *para* de dicho ácido proporcionaba un inhibidor potente (**CLXI**, $K_i \sim 0,079 \mu\text{M}$).⁷² Además, Pei¹¹⁸ y *col.* publicaron el correspondiente cinamaldehido con una buena actividad inhibitoria (**CLXII**, $K_i \sim 5,42 \mu\text{M}$) pero peor que el ácido (**CLXI**) (Figura 2.32).

¹¹⁷ Lakshmi, B. S.; Sujatha, S.; Anand, S.; Sangeetha, K. N.; Narayanan, R. B.; Katiyar, C.; Kanaujia, A.; Duggar, R.; Singh, Y.; Srinivas, K.; Bansal, V.; Sarin, S.; Tandon, R.; Sharma, S.; Singh, S. *J. Diabetes* **2009**, *1*, 99-106.

⁷² Moran, E. J.; Sarshar, S.; Cargill, J. F.; Shahbaz, M. M.; Lio, A.; Mjalli, A. M. M.; Armstrong, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10787-10788.

¹¹⁸ Fu, H.; Park, J.; Pei, D. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10700-10709.

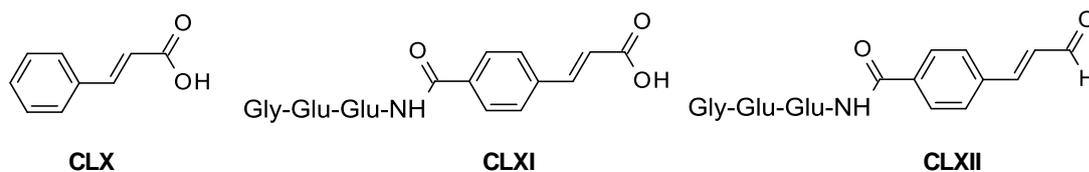


Figura 2.32

Cui y *col.* publicaron la actividad inhibitoria sobre PTP-1B de distintos compuestos aislados (**CLXIII-CLXVI**) de un extracto orgánico chino denominado “Sang-Bai-Pi” (Figura 2.33).¹¹⁹ Estos compuestos presentan unos valores de IC₅₀ comprendidos entre 1,6 y 16,9 μM.

Kim y *col.* describieron el aislamiento de nuevos diterpenos activos extraídos de *Siegesbeckia glabrescens*.¹²⁰ Solamente los compuestos **CLXVII** y **CLXVIII** inhiben la actividad de PTP-1B con unos valores de IC₅₀ de 8,7 y 30,6 μM respectivamente (Figura 2.34).

En 2006, Na y *col.* publicaron el aislamiento de ocho diterpenoides extraídos de las raíces de *Acanthopanax koreanum* que exhiben una actividad inhibitoria significativa frente a PTP-1B.¹²¹ El compuesto **CLXX** inhibe de manera no competitiva y posee un valor de IC₅₀ de 7,1 μM mientras que **CLXXI** y **CLXXII** lo hacen de forma dependiente de la dosis (Figura 2.35).

¹¹⁹ Cui, L.; Na, M.; Oh, H.; Bae, E. Y.; Jeong, D. G.; Ryu, S. E.; Kim, S.; Oh, W. K.; Ahn, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1426-1429.

¹²⁰ Kim, S.; Na, M.; Oh, H.; Jang, J.; Sohn, C. B.; Kim, B. Y.; Oh, W. K.; Ahn, J. S. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 379-383.

¹²¹ Na, M.; Oh, W. K.; Kim, Y. H.; Cai, X. F.; Kim, S.; Kim, B. Y.; Ahn, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3061-3064.

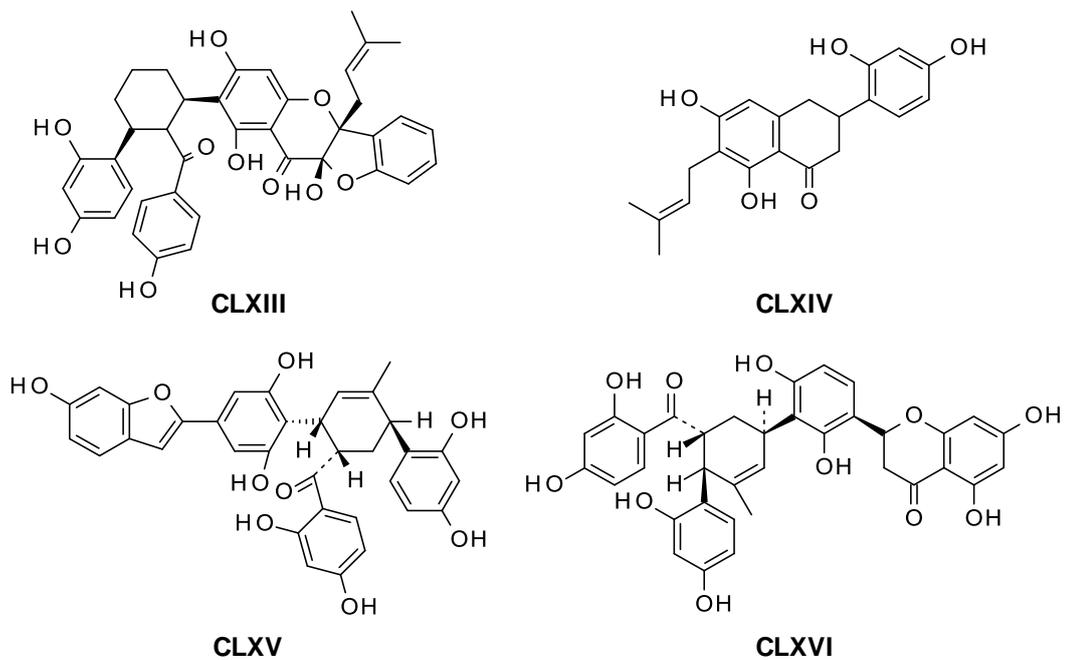


Figura 2.33

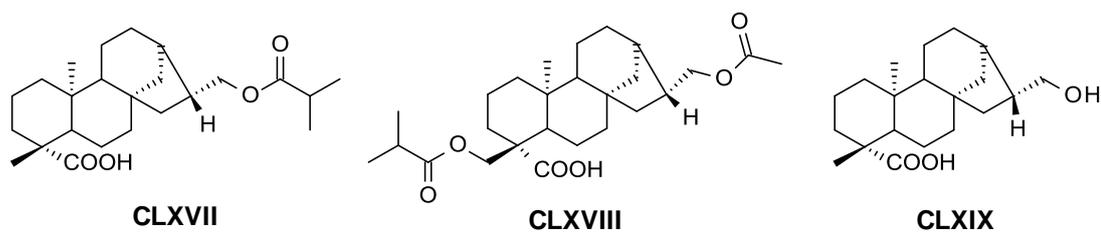


Figura 2.34

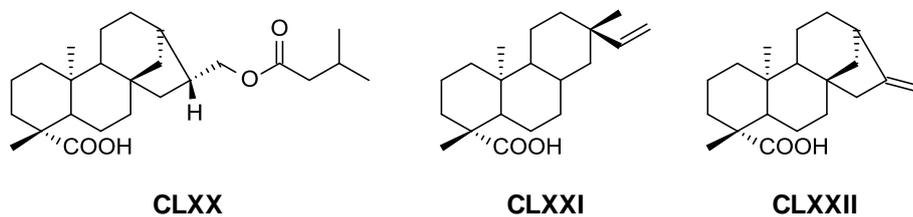


Figura 2.35

Más tarde, Na y *col.* describieron el aislamiento de un nuevo triterpeno (**CLXXIII**) junto con cuatro triterpenos conocidos (**CLXXIV-CLXXVII**) extraídos de *Astilbe koreana* (Figura 2.36 y Figura 2.37). Los estudios SAR realizados indican que la existencia de un grupo hidroxilo en posición 3 y un grupo carboxílico en este tipo de triterpenos es esencial para la actividad inhibitoria, mientras que la incorporación de otro grupo hidroxilo en el C-6 o en el C-24 pueden ser causa de una pérdida de actividad.¹²²

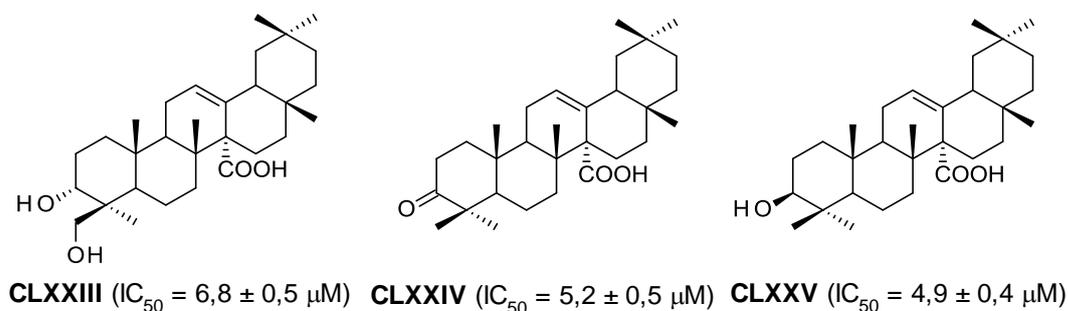


Figura 2.36

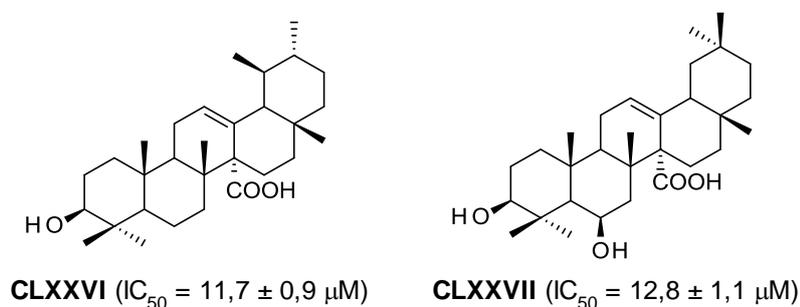


Figura 2.37

En 2003, An y *col.* publicaron un nuevo compuesto (**CLXXVIII**) junto con un compuesto ya descrito (**CLXXIX**), aislados de los extractos etanólicos de las raíces de *Juglans regia*, como inhibidores de PTP-1B (Figura 2.38).¹²³ El compuesto 4-hidroxi- α -

¹²² Na, M.; Cui, L.; Min, B. S.; Bae, K.; Yoo, J. K.; Kim, B. Y.; Oh, W. K.; Ahn, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3273-3276.

¹²³ An, T. Y.; Hu, L. H.; Chen, R. M.; Chen, Z. L.; Li, J.; Shen, Q. *Chinese Chem. Lett.* **2003**, *14*, 489-490.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

tetralona (**CLXXIX**) muestra una actividad moderada frente a PTP-1B ($IC_{50} = 66,7$ $\mu\text{mol/L}$).

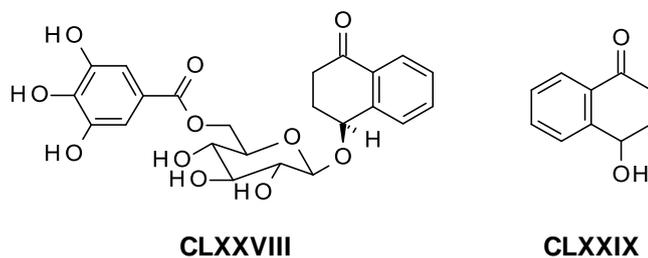


Figura 2.38

Li y *col.* estudiaron tres antraquinonas (**CLXXX-CLXXXII**) que fueron extraídas de las raíces de *Saussurea lappa clarke*, una hierba medicinal tradicional china, que mostraron una actividad moderada frente a *h*-PTP-1B (Figura 2.39).¹²⁴

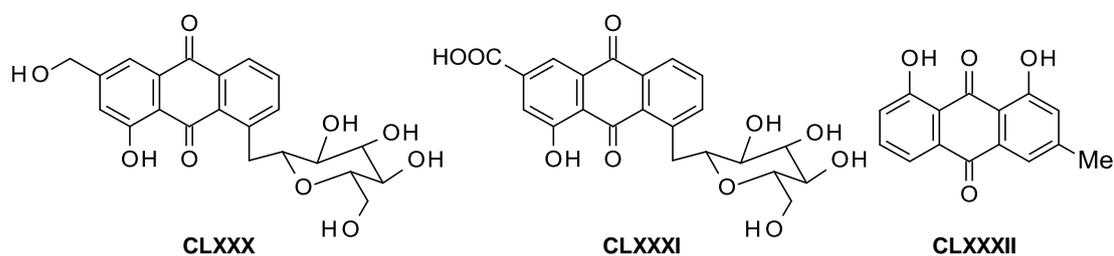


Figura 2.39

Además, Li y *col.* investigaron la actividad de dieciséis compuestos conocidos extraídos de *Ardisia japonica* y encontraron que los compuestos **CLXXXIII-CLXXXVI** poseen una actividad moderada frente a PTP-1B *in vitro* (Figura 2.40).¹²⁵

¹²⁴ Li, S.; An, T.-Y.; Li, J.; Shen, Q.; Lou, F.-C.; Hu, L.-H. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2006**, *8*, 281-286.

¹²⁵ Li, Y.-F.; Hu, L.-H.; Lou, F.-C.; Li, J.; Shen Q. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2005**, *7*, 13-18.

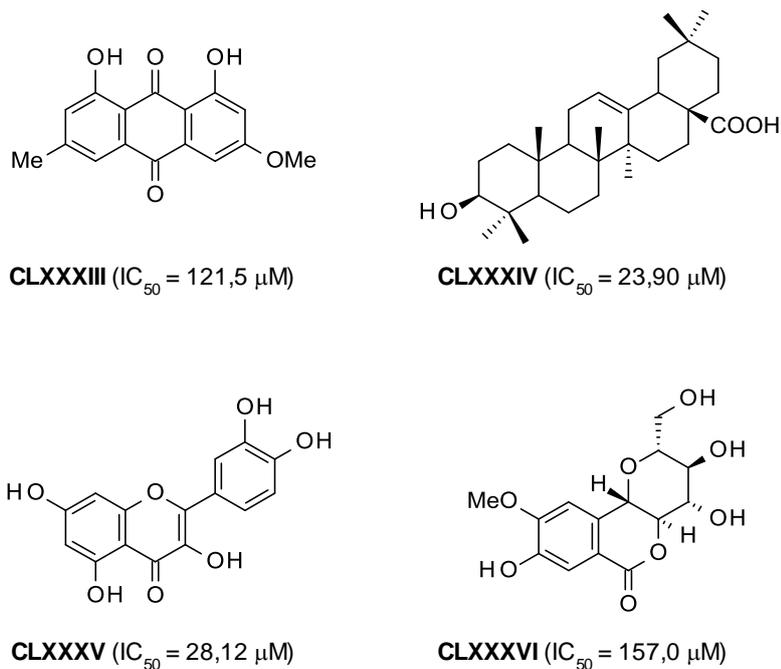


Figura 2.40

El compuesto denominado defostatina (**CLXXXVII**) (Figura 2.41) fue extraído del filtrado de cultivo de *Streptomyces* y fue descrito por Imoto y *col.* como un inhibidor de PTP-1B. Este compuesto es muy difícil de obtener debido a su producción baja por parte del microorganismo y a su inestabilidad frente al aire, el calor, la luz y los disolventes. En 2003, Watanabe y *col.* publicaron la primera síntesis de este compuesto.¹²⁶

¹²⁶ Imoto, M.; Kakeya, H.; Sawa, T.; Hayashi, C.; Hamada, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, K. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1993**, *46*, 1342-1346.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

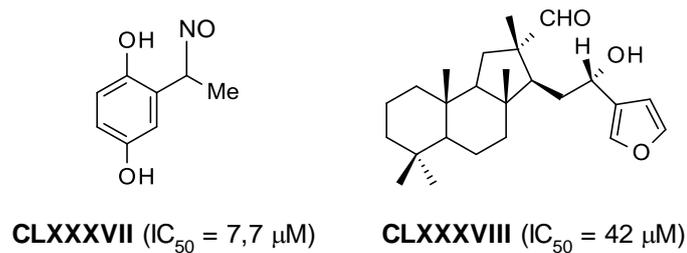


Figura 2.41

Por último, Hirtiosal (**CLXXXVIII**), un producto natural marino obtenido de una esponja denominada *Hyrtios erectus*, fue descubierto como inhibidor de PTP-1B mostrando además unos efectos celulares sobre la activación de PI3K/AKT y el transporte de la glucosa. Este compuesto es capaz de inhibir la actividad de PTP-1B de una manera dependiente de la dosis (Figura 2.41).¹²⁷

¹²⁷ Sun, T.; Wang, Q.; Yu, Z.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 187–193.

2.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

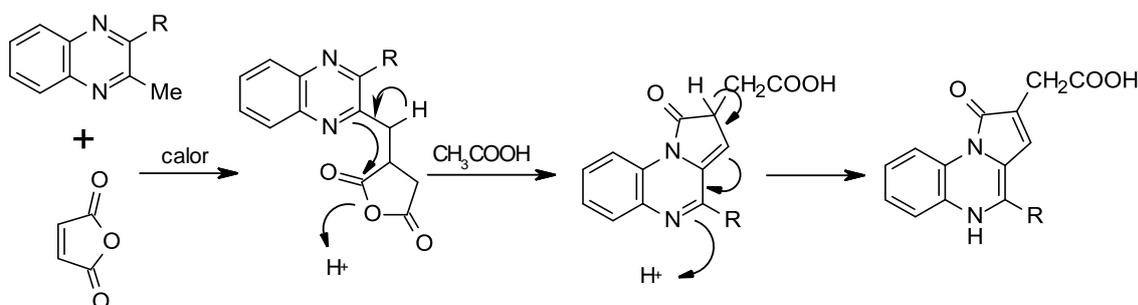
2.2.1. Introducción

2.2.1.1. Síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina

2.2.1.1.1. A partir de quinoxalinas

En 1965, Cheeseman y *col.* publicaron la síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas empleando tres rutas distintas.¹²⁸ Para ello, el sistema tricíclico se podría formar a través de un proceso que implica la adición de una unidad de dos carbonos a 2-metilquinoxalina. Esto se podría lograr mediante una adición de Michael del grupo metilo activado al anhídrido maleico o mediante una cuaternización del nitrógeno en posición 1 de la quinoxalina con una α -halocetona. El tercer método de síntesis implicaría una ciclación intramolecular de una quinoxalina sustituida con una cadena de 3 átomos de carbonos en la posición 2.

Taylor y Hand sugirieron el siguiente mecanismo de reacción para la formación de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas a partir de 2-metilquinoxalinas y anhídrido maleico (Esquema 2.1).^{129,130}



Esquema 2.1

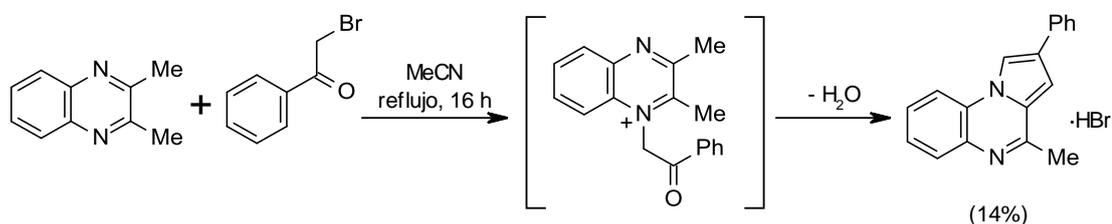
¹²⁸ Cheeseman, G. W. H.; Tuck, B. *J. Chem. Soc.* **1965**, 3678-3687.

¹²⁹ Taylor, E. C.; Hand, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 770-776.

¹³⁰ Taylor, E. C.; Cheeseman, G. W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1830-1835.

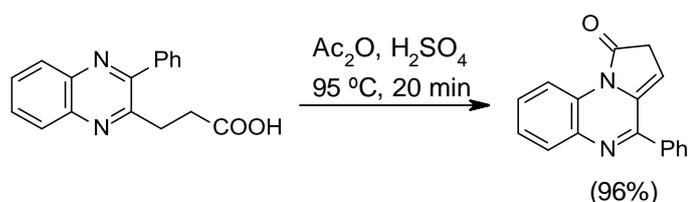
CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la segunda ruta de síntesis se propuso la formación del anillo pirrólico por ciclación y pérdida de una molécula de agua a partir de una sal cuaternaria de quinoxalina (Esquema 2.2). El problema que supone esta ruta es la dificultad para la cuaternización de dicho heterociclo.



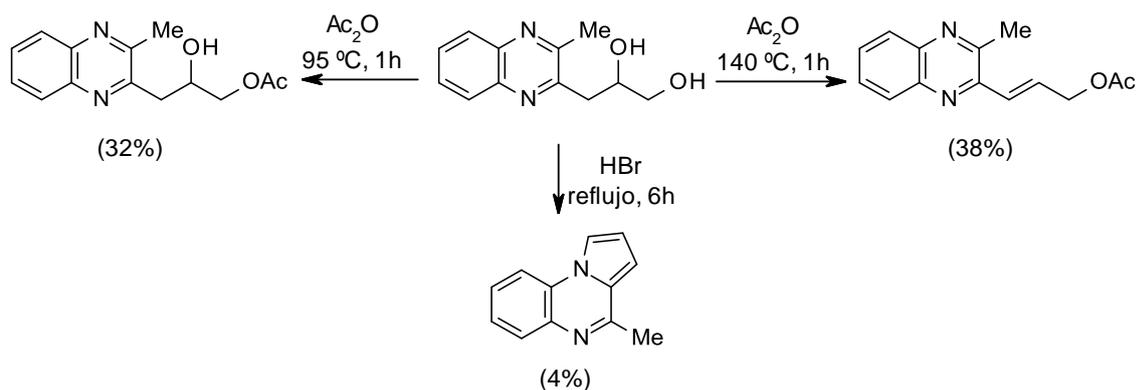
Esquema 2.2

Se han descrito distintas síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas a través de la ciclación intramolecular de ácidos 2-quinoxalinil- β -propionicos (Esquema 2.3).¹³⁰ Normalmente, dicha ciclación se lleva a cabo empleando una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico, con ácido polifosfórico u oxiclورو de fósforo, pero cuando se emplea 3-(3-metilquinoxalin-2-il)propano-1,2-diol como sustrato de partida, la ciclación intramolecular tiene lugar utilizando HBr, aunque el rendimiento obtenido fue bajo (4%) (Esquema 2.4).



Esquema 2.3

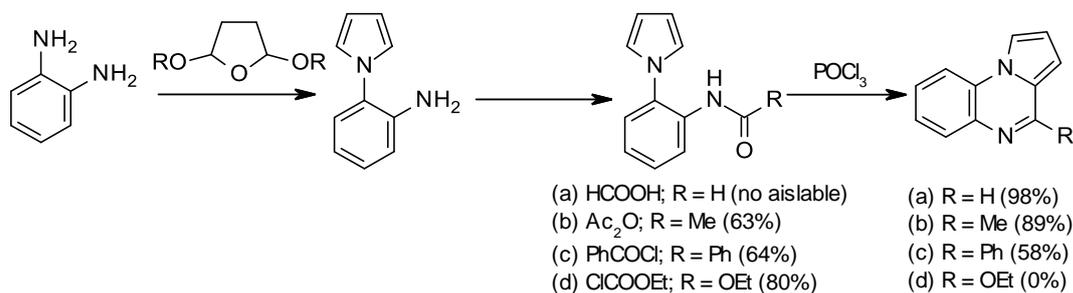
¹³⁰ Taylor, E. C.; Cheeseman, G. W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1830-1835.



Esquema 2.4

2.2.1.1.2. A partir de 1-fenilpirroles

En 1966, Cheeseman y *col.* publicaron una síntesis alternativa y más adecuada para la preparación de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas.¹³¹ Esta ruta proponía la ciclación de acil derivados de *N*-(2-aminofenil)pirroles obtenidos a partir de *o*-fenilenodiamina, y 2,5-dimetoxitetrahydrofurano o 2,5-dietoxitetrahydrofurano. La pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina se preparó refluendo *N*-(2-aminofenil)pirrol en ácido fórmico acuoso. En este caso, el intermedio que se forma cicla en las condiciones de reacción. El tratamiento de *N*-(2-aminofenil)pirrol con anhídrido acético, cloruro de benzoilo y cloroformato de etilo condujo a los derivados *N*-acilados. Las correspondientes pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas se obtuvieron por tratamiento con oxiclorigo de fósforo a reflujo (Esquema 2.5).

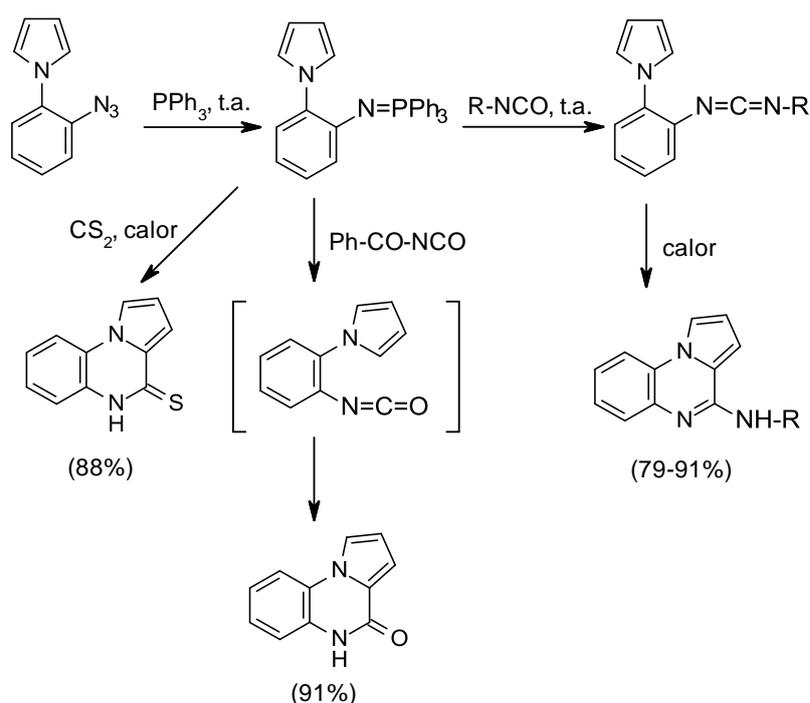


Esquema 2.5

¹³¹ Cheeseman, G. W. H.; Tuck, B. *J. Chem. Soc.* **1966**, 852-855.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

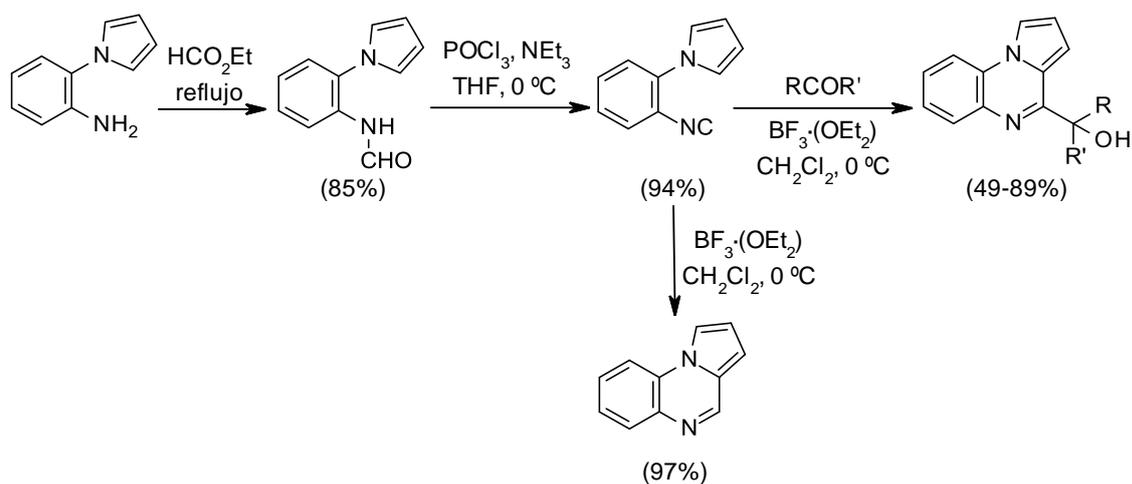
En 1989, Molina y *col.* describieron la síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas funcionalizadas empleando la reacción de aza-Wittig entre iminofosforanos y heterocumulenos.¹³² El iminofosforano se preparó a través de la reacción de Staudinger entre *N*-(*o*-azidofenil)pirrol con trifetilfosfina a temperatura ambiente. La reacción aza-Wittig entre el iminofosforano con isocianatos a temperatura ambiente condujo a las correspondientes carbodiimidas. La ciclación de las mismas se produjo por calentamiento a 180 °C obteniéndose 4-aminopirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas. Por otra parte, el iminofosforano reaccionó con benzoilisocianato para dar 5*H*-pirrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-ona. Por último, la correspondiente quinoxalin-4-tiona se preparó por reacción entre el iminofosforano y CS₂ (Esquema 2.6).



Esquema 2.6

¹³² Molina, P.; Alajarín, M.; Vidal, A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2847-2850.

Kobayashi y *col.* publicaron en 1998 la síntesis de 4-(1-hidroxiálquil)pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas mediante reacción entre 1-(2-isocianofenil)pirrol y una diversidad de cetonas y aldehidos catalizada por BF_3 (Esquema 2.7).¹³³ Esta reacción implica la formación de dos enlaces C-C en un mismo paso de la reacción. Para la obtención de 1-(2-isocianofenil)pirrol se llevó a cabo la formilación de 1-(2-aminofenil)pirrol empleando formiato de etilo y posterior deshidratación empleando POCl_3 . El tratamiento de 1-(2-isocianofenil)pirrol con $\text{BF}_3 \cdot (\text{OEt}_2)$ condujo a la pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (Esquema 2.7).



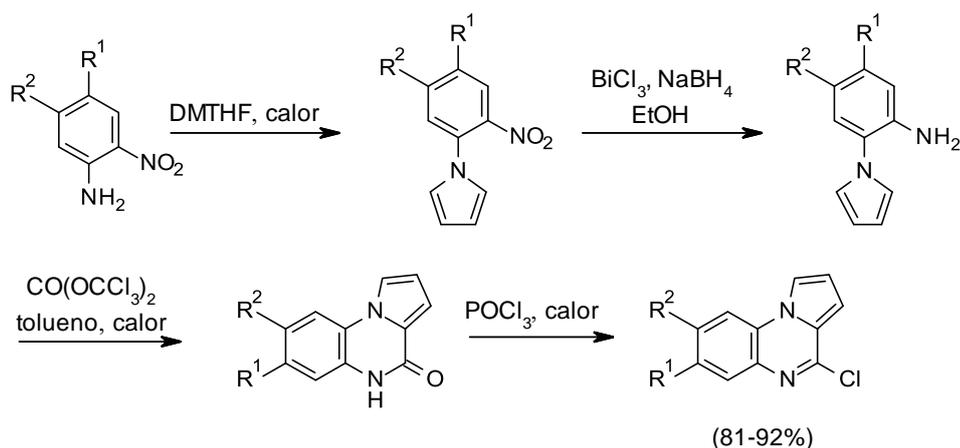
Esquema 2.7

Guillon y *col.* publicaron en 2004 una nueva síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas a partir de 2-nitroanilinas sustituidas.¹³⁴ La reacción de Clauson-Kaas entre las 2-nitroanilinas con 2,5-dimetoxitetrahydrofurano (DMTHF) en ácido acético condujo a los derivados pirrólicos, que se redujeron por tratamiento con $\text{BiCl}_3\text{-NaBH}_4$ para dar los correspondientes 1-(2-aminofenil)pirroles. La ciclación de éstos para dar las lactamas fue posible empleando trifosgeno en tolueno. Por último, el tratamiento de los mismos con oxiclورو de fósforo condujo a la formación de las diferentes cloroquinoxalinas (Esquema 2.8).

¹³³ Kobayashi, K.; Matoba, T.; Irisawa, S.; Matsumoto, T.; Morikawa, O.; Konishi, H. *Chem. Lett.* **1998**, 6, 551-552.

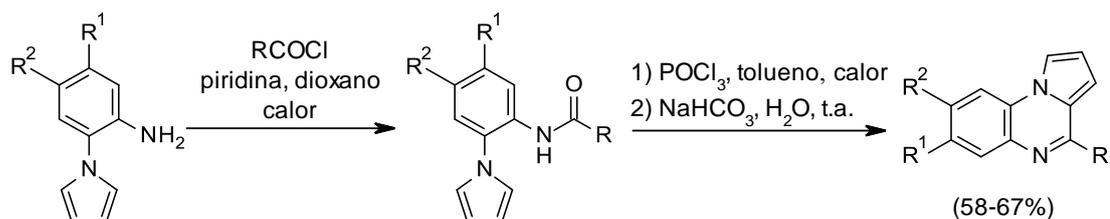
¹³⁴ Guillon, J.; Grellier, P.; Labaied, M.; Sonnet, P.; Léger, J.-M.; Déprez-Poulain, R.; Forfar-Bares, I.; Dallemagne, P.; Lemaitre, N.; Péhourcq, F.; Rochette, J.; Sergheraert, C.; Jarry, C. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1997-2009.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 2.8

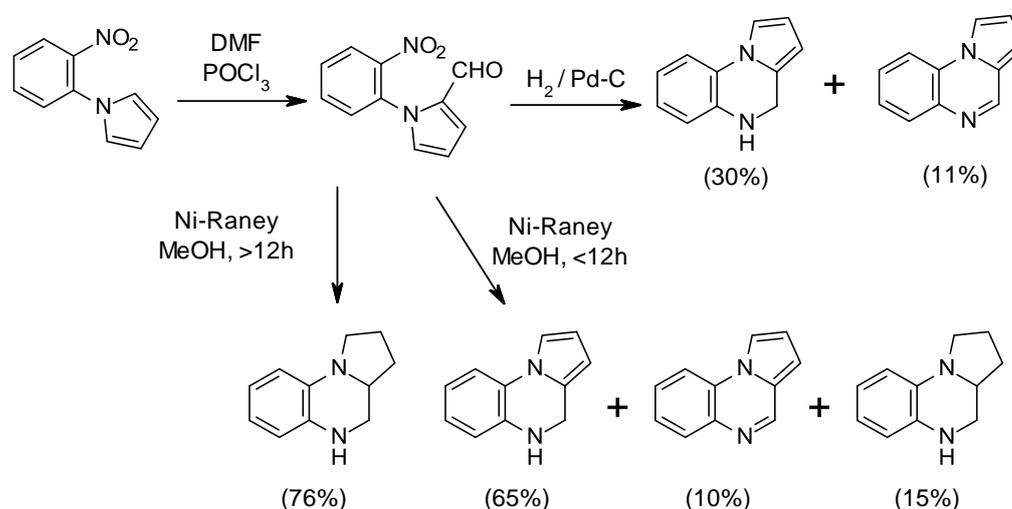
En 2007, Guillón y *col.* describieron la síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas sustituidas en posición 4 por distintas cadenas alifáticas y aromáticas.¹³⁵ La obtención de los compuestos 1-(2-aminofenil)pirroles se realizó empleando las condiciones descritas anteriormente por este grupo.⁷ La reacción de distintos cloruros de ácido alquil, alquenil o arilcarboxílicos con 1-(2-aminofenil)pirroles condujo a las correspondientes acetamidas, que ciclaron por tratamiento con oxiclورو de fósforo a reflujo, de acuerdo con la reacción de Bischler-Napieralski (Esquema 2.9).



Esquema 2.9

¹³⁵ Guillón, J.; Forfar, I.; Mamani-Matsuda, M.; Desplat, V.; Saliège, M.; Thiolat, D.; Massip, S.; Tabourier, A.; Léger, J.-M.; Dufaure, B.; Haumont, G.; Jarry, C.; Mossatayi, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 194-210.

En 2007, Harrak y *col.* publicaron dos alternativas de síntesis de derivados de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas (Esquema 2.10 y Esquema 2.11).¹³⁶ Los compuestos de partida de ambas series se prepararon haciendo reaccionar 2-nitroanilina o 2-fluoroanilina con DMTHF en presencia de ácido acético glacial. La introducción del grupo formilo en la posición C2 del sistema heterocíclico se realizó empleando las condiciones usuales de la reacción de Vilsmeier-Haak, para dar los correspondientes aldehídos con rendimientos aceptables. El nitroaldehído se redujo a la correspondiente amina por hidrogenación catalítica como paso previo a la reacción de ciclación. El mejor rendimiento se obtuvo empleando Ni-Raney en metanol, en atmósfera de hidrógeno y en un periodo de tiempo no superior a las 12 horas. Tiempos de reacción más prolongados condujeron a la hexahidropirroloquinoxalina con un 76% de rendimiento. Cuando se empleó Pd/C (10%) como catalizador en acetato de etilo se obtuvo una mezcla de los compuestos dihidropirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (30%) y pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (10%) (Esquema 2.10).



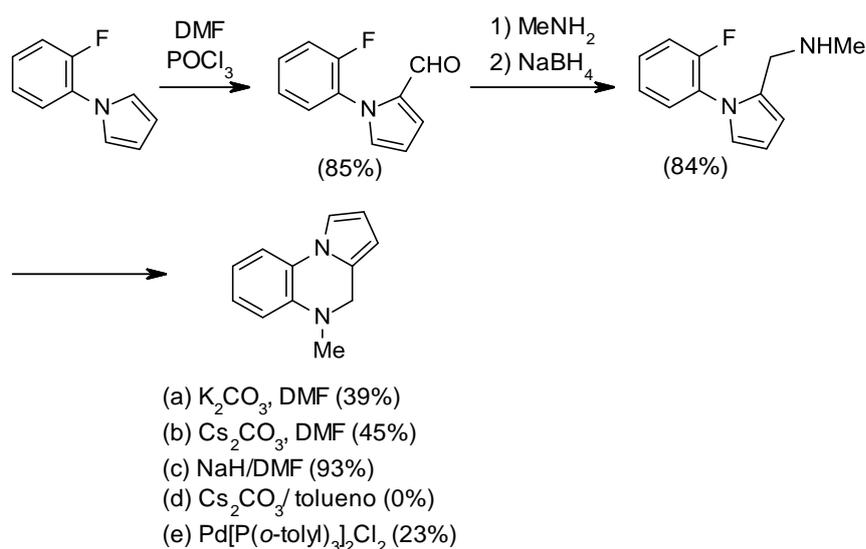
Esquema 2.10

En el caso del compuesto 1-[1-(2-fluorofenil)pirrol-2-il]-*N*-metil-metanamina se realizaron distintos intentos para la optimización de su ciclación intramolecular (Esquema 2.11). El tratamiento del mismo en tolueno a reflujo empleando como condiciones de reacción Pd[P(*o*-tolil)₃]₂/BINAP/Cs₂CO₃ condujo a la pirrolo-

¹³⁶ Harrak, Y.; Weber, S.; Gómez, A. B.; Rosell, G.; Pujol, M. D. *Arkivoc* **2007**, 251-259.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

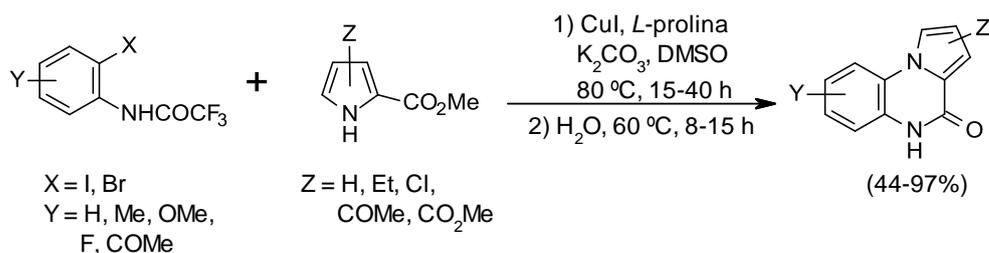
quinoxalina con un rendimiento bajo (23%). Su tratamiento con Cs_2CO_3 como base y en ausencia de catalizador no condujo al compuesto deseado, por lo que se supuso que el catalizador y el ligando se encuentran implicados en el proceso de ciclación o que el disolvente es inadecuado para la sustitución nucleófila aromática. El compuesto 5-metil-4*H*-pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina se obtuvo con buenos rendimientos por tratamiento del mismo con NaH en DMF a través de un desplazamiento nucleófilo intramolecular del anión fluoruro por la amina secundaria (93%). El empleo de otras bases anhidras como Cs_2CO_3 y K_2CO_3 en exceso (5 eq.) en DMF proporcionaron el compuesto pero con menores rendimientos (45% y 39%, respectivamente). Además, estos resultados revelaron que el exceso de base es necesario y que la DMF es un disolvente apropiado para la sustitución nucleófila aromática.



Esquema 2.11

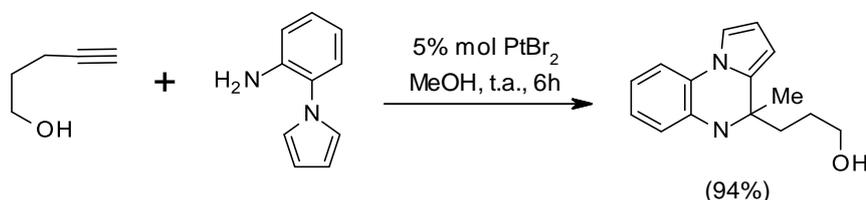
En 2008, Yuan y *col.* publicaron la síntesis de derivados de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas a través de una reacción de acoplamiento entre 2-halotrifluoroacetanilidas y ésteres de ácidos pirrol-2-carboxílicos catalizada por CuI y *L*-prolina, seguida de una hidrólisis *in situ* del grupo *N*-trifluoroacetilo y posterior condensación intramolecular para formar la amida (Esquema 2.12).¹³⁷

¹³⁷ Yuan, Q.; Ma, D. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5159-5162.



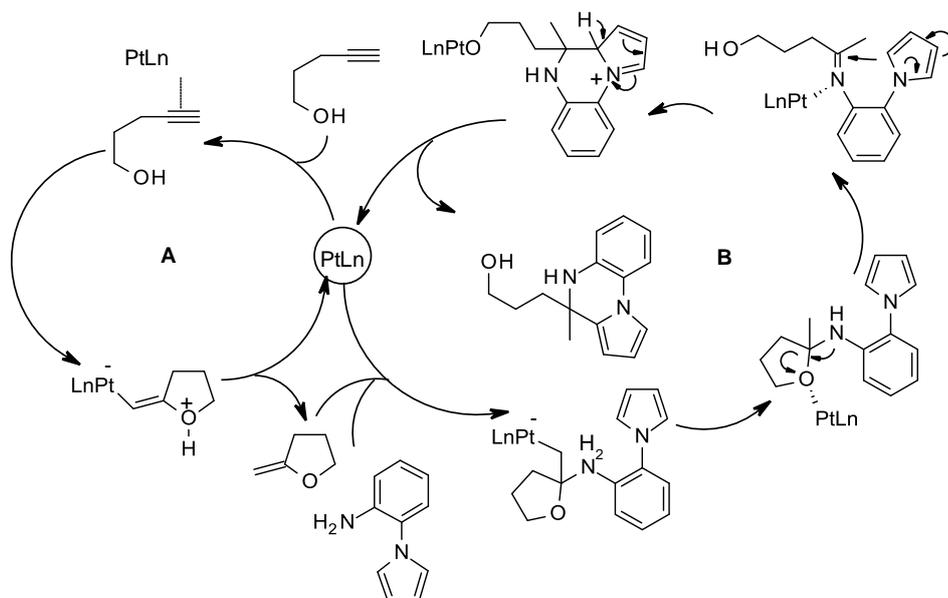
Esquema 2.12

En 2009, Patil y *col.* describieron la síntesis de este tipo de sistemas empleando un método de hidroaminación-hidroarilación tipo Markownikoff de alquinoles empleando PtBr_2 como catalizador.¹³⁸ Este método se ha empleado con una gran variedad de alquinoles y aminas aromáticas para conseguir pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas e indolo[3,2-*c*]quinoxalinas con rendimientos excelentes. Un ejemplo de este tipo de reacción se recoge en el Esquema 2.13 y el mecanismo propuesto por los autores se muestra en el Esquema 2.14.



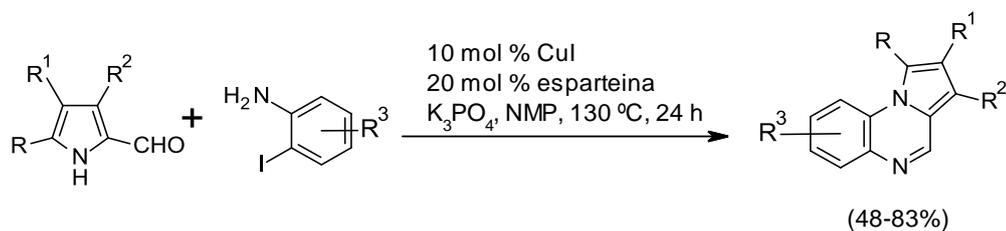
Esquema 2.13

¹³⁸ Patil, N. T.; Kavthe, R. D.; Raut, V. S.; Reddy, V. V. N. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6315-6318.



Esquema 2.14. Mecanismo propuesto de hidroaminación-hidroarilación tipo Markownikoff de alquinoles (tomado de la ref. 138).

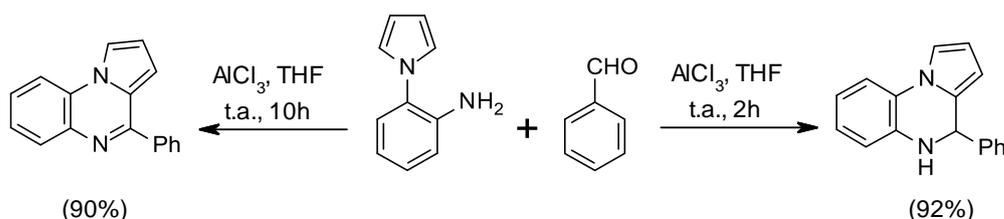
Reeves y *col.* describieron en 2010 la síntesis de este tipo de compuestos tricíclicos por reacción entre 2-formilpirroles y *o*-aminoiodoarenos catalizado por CuI y esparteína (Esquema 2.15).¹³⁹ Las condiciones óptimas para esta reacción se consiguieron empleando NMP (*N*-metil-2-pirrolidona) como disolvente, K₃PO₄ como base y como ligando esparteína.



Esquema 2.15

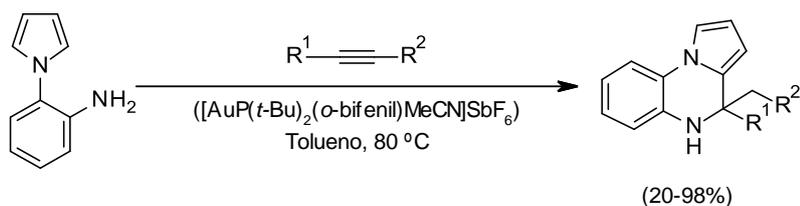
¹³⁹ Reeves, J. T.; Fandrick, D. R.; Tan, Z.; Song, J. J.; Lee, H.; Yee, N. K.; Senanayake, C. H. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 992-994.

En 2011, Verma y *col.* publicaron la síntesis de pirrolo/indolo[1,2-*a*]quinoxalinas y sus dihidroderivados empleando la reacción de Pictet-Spengler modificada.¹⁴⁰ En un estudio realizado de la reacción entre 2-(1*H*-pirrol-1-il)anilina y benzaldehído (Esquema 2.16), se observó que de los ácidos de Lewis utilizados (AlCl₃, ZnCl₂, FeCl₃, TsOH), el que mejor resultados aportaba era AlCl₃. Se utilizaron distintos disolventes (THF, CH₂Cl₂ y tolueno), siendo el THF el que condujo a mejores resultados. Por otra parte, se observó que a tiempos de reacción cortos (2 horas) se obtenía la dihidropirrolo[1,2-*a*]quinoxalina, mientras que la pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina se obtenía a tiempos más largos (10 horas).



Esquema 2.16

Liu y *col.* describieron la síntesis de estos sistemas tricíclicos a partir 2-(1*H*-pirrol-1-il)anilina y alquinos sustituidos en una reacción en cascada catalizada por oro (Esquema 2.17).¹⁴¹ Se ensayaron distintos catalizadores de oro pero el que mejores resultados proporcionó fue ([Au{P(*t*-Bu)₂(*o*-bifenil)MeCN}SbF₆)]CH₃CN).



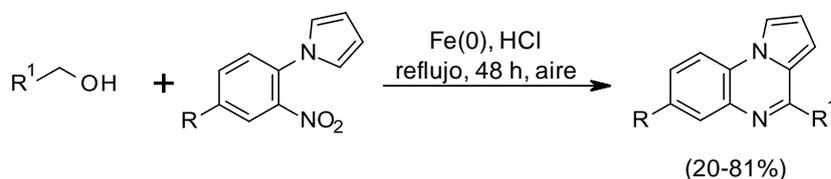
Esquema 2.17

¹⁴⁰ Verma, A. K.; Jha, R. R.; Sankar, V. K.; Aggarwal, T.; Singh, R. P.; Chandra, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6998-7010.

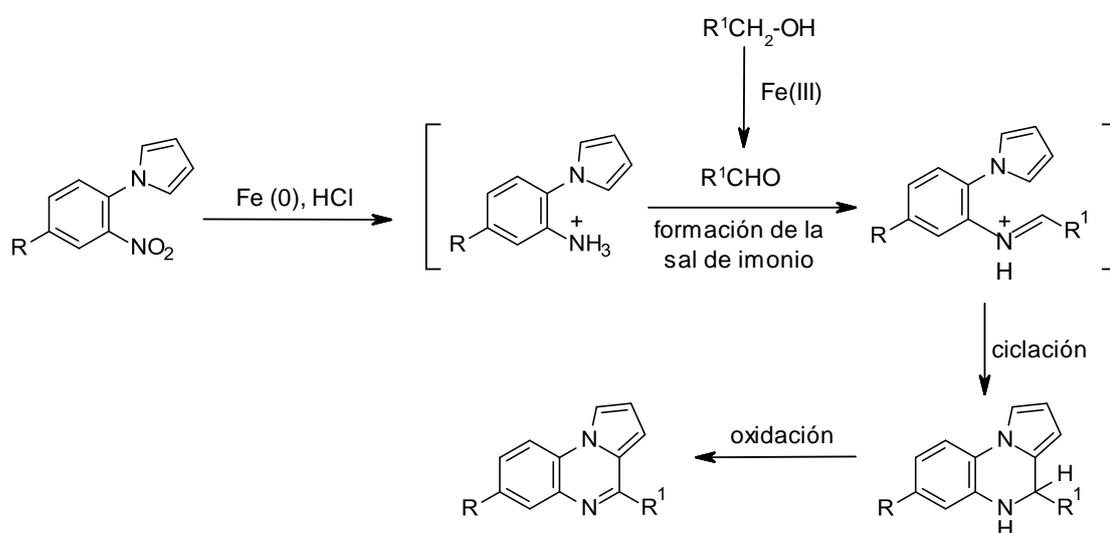
¹⁴¹ Liu, G.; Zhou, Y.; Lin, D.; Wang, J.; Zhang, L.; Jiang, H.; Liu, H. *ACS Comb. Sci.* **2011**, *13*, 209-213.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En 2012, se describió la síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas sustituidas en posición 4 a partir de 1-(2-nitrofenil)pirroles y distintos alcoholes (Esquema 2.18).¹⁴² En este proceso, los alcoholes se oxidan *in situ* a partir de la etapa de reducción del nitroareno, no siendo necesaria la adición de un agente oxidante a la mezcla de reacción. El mecanismo de la reacción que proponen los autores se recoge en el Esquema 2.19.



Esquema 2.18

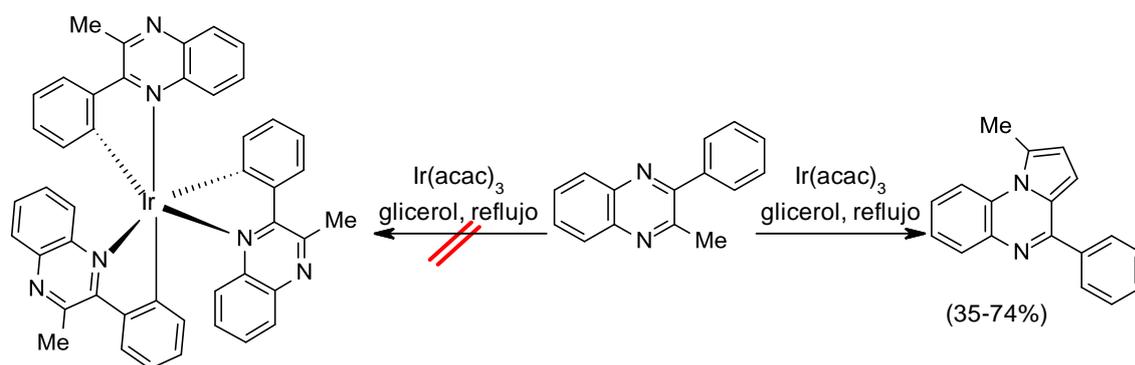


Esquema 2.19

Ammermann y *col.* publicaron la formación de 4-fenil-1-metilpirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas como productos inesperados en el tratamiento de 2-metil-3-fenilquinoxalinas con Ir(acac)₃ (Esquema 2.20).¹⁴³

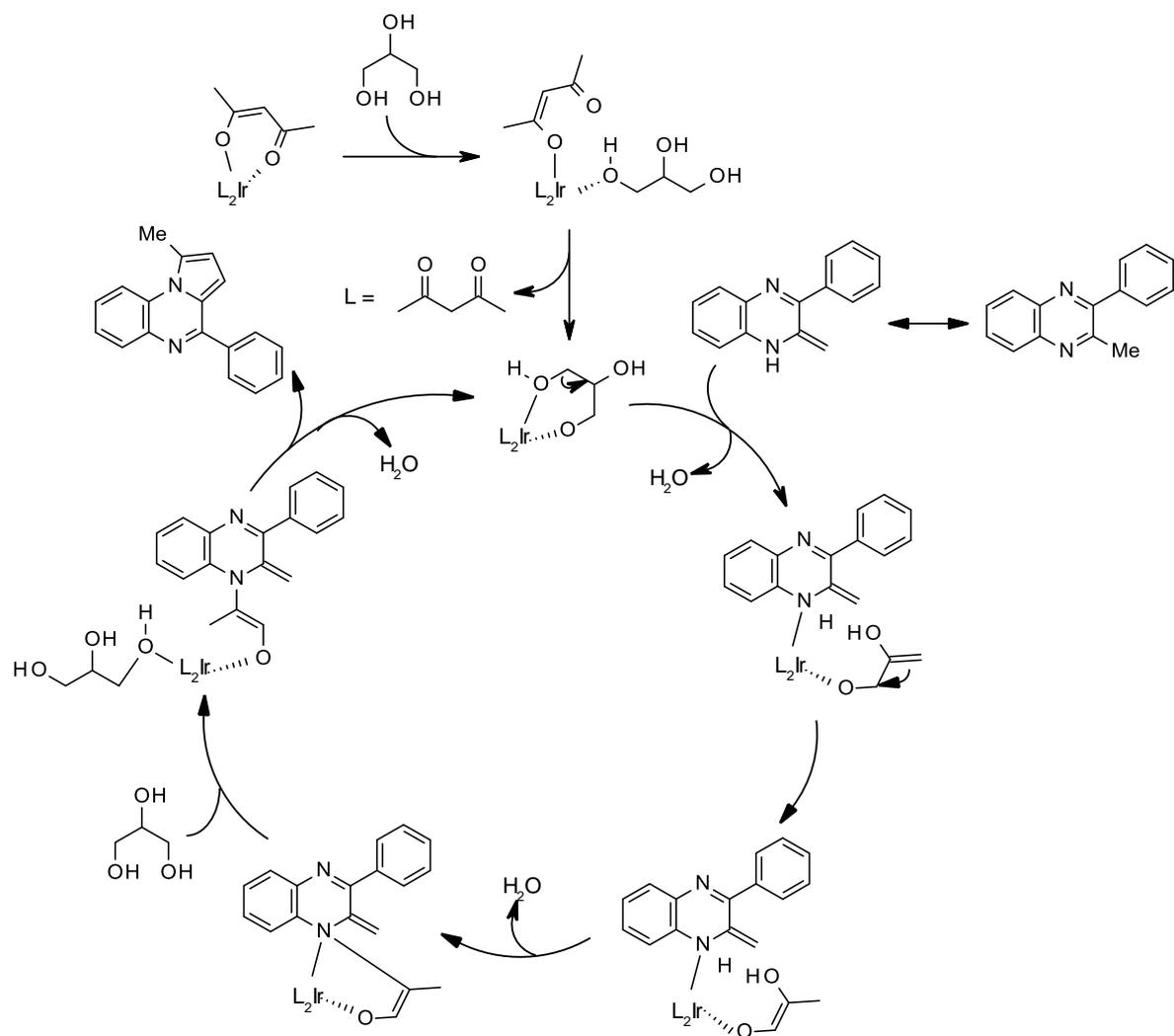
¹⁴² Pereira, M. F.; Thiéry, V. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4754-4757.

¹⁴³ Ammermann, S.; Hrib, C.; Jones, P. G.; du Mont, W. W.; Kowalsky, W.; Johannes, H.-H. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5090-5093.



Esquema 2.20

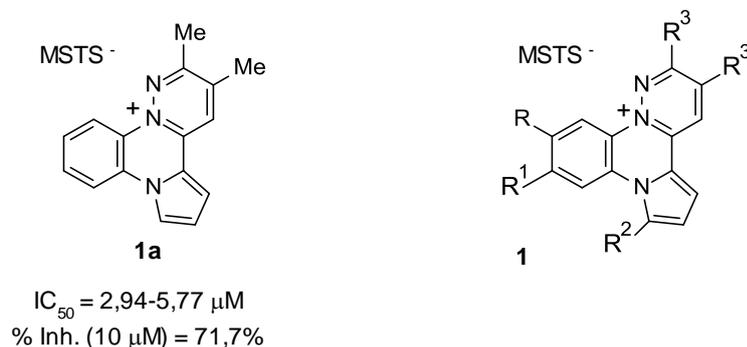
En el Esquema 2.21 se muestra el mecanismo propuesto por estos autores para la formación de 4-fenil-1-metilpirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas.



Esquema 2.21. Mecanismo propuesto para la formación de 4-fenil-1-metilpirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas (tomado de la ref. 143).

2.2.2. Síntesis de inhibidores de PTP-1B

Basándonos en un cribado (*screening*) de actividad biológica realizado a una quimioteca heterocíclica preparada en nuestro grupo de investigación frente a distintas dianas terapéuticas, se encontró que el compuesto **1a** poseía actividad de interés frente a PTP-1B ($IC_{50} = 2,94-5,77 \mu M$), por lo que se decidió llevar a cabo la síntesis de una serie de análogos de esta estructura, determinar su IC_{50} frente a PTP-1B y establecer la existencia de una posible relación estructura-actividad con la finalidad de generar compuestos más activos (Esquema 2.22). Además, se quiso establecer los requisitos estructurales mínimos de la serie **1** que mantuviesen la actividad, por lo que se evaluaron diversos precursores de **1**.

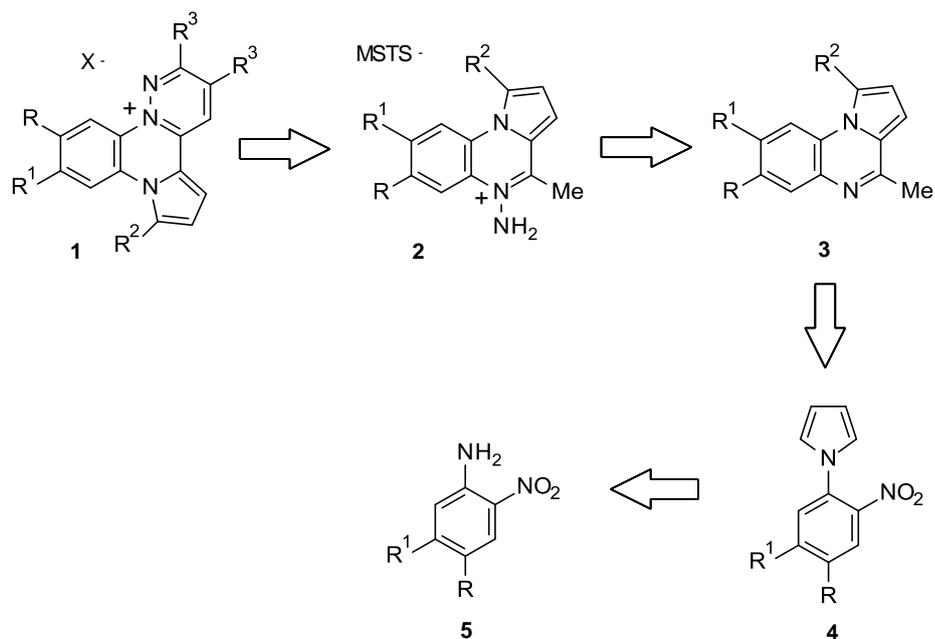


Esquema 2.22

En el Esquema 2.23 se detalla la retrosíntesis de la serie **1**. La síntesis de la pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina precursora se realizó siguiendo el método descrito por Guillon y *col.* en 2007.¹³⁵ Se eligió este método debido a que existe una gran variedad de 2-nitroanilinas con sustituyentes en posiciones 4 y/o 5 disponibles comercialmente.

¹³⁵ Guillon, J.; Forfar, I.; Mamani-Matsuda, M.; Desplat, V.; Saliège, M.; Thiolat, D.; Massip, S.; Tabourier, A.; Léger, J.-M.; Dufaure, B.; Haumont, G.; Jarry, C.; Mossatayi, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 194-210.

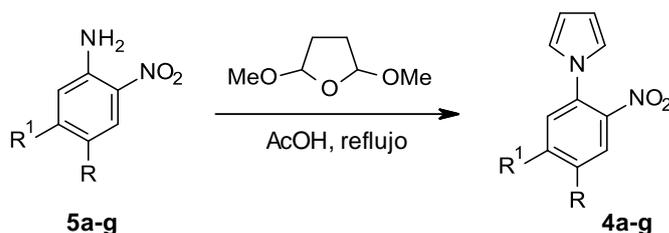
CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 2.23. Esquema retrosintético para la síntesis de sales piridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxalinio **1**.

La síntesis de 1*H*-(2-nitrofenil)pirroles **4** se llevó a cabo por reacción de Clauson-Kaas entre los derivados comerciales de 2-nitroanilinas y 2,5-dimetoxitetrahydrofurano en ácido acético. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2.20.

Tabla 2.20. Reacción de Clauson-Kaas para la obtención de 1*H*-(2-nitrofenil)pirroles.

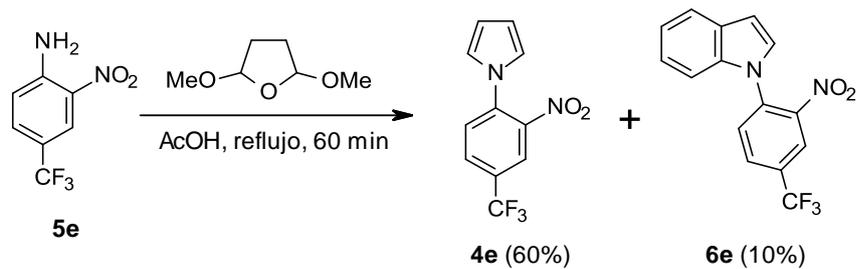


Compuesto	R	R ¹	Tiempo (min)	Rto (%)
4a	H	H	90	72
4b	Me	Me	45	98
4c	Me	H	50	83
4d	Cl	Cl	240	99
4e	CF ₃	H	60	60
4f	OMe	H	180	90
4g	H	Cl	90	92

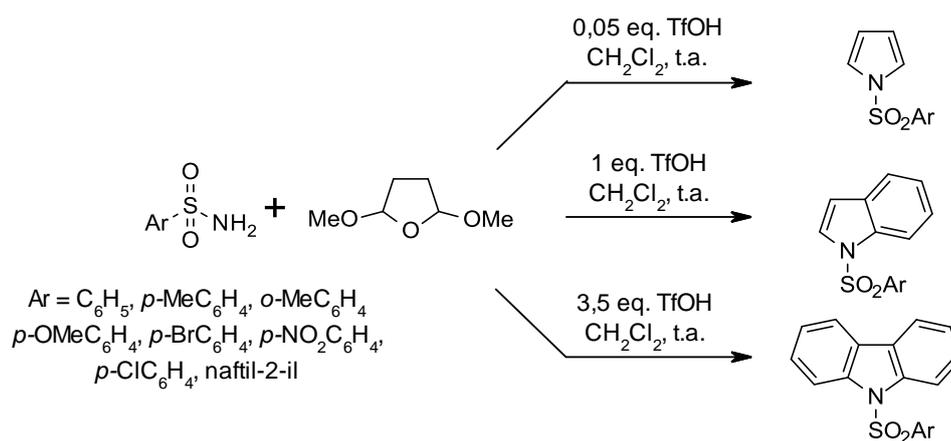
En el caso de la síntesis del compuesto **4e**, el intento de purificación por cromatografía conducía a una mezcla de dos productos de R_f muy similares, por lo que se optó por la separación mediante microdestilación a presión reducida, obteniéndose un 60% de **4e** (128 °C, 2 mm Hg) y un 10% de **6e** (142 °C, 2 mm Hg) (Esquema 2.24). La formación de **6e** tiene como antecedente la formación de *N*-sulfonilpirroles, índoles y carbazoles descrita por Abid y *col.* a partir de sulfonamidas primarias y 2,5-dimetoxitetrahidrofurano mediante sucesivas ciclaciones y anelaciones catalizadas por el ácido trifluorometanosulfónico (TfOH) (Esquema 2.25).¹⁴⁴

¹⁴⁴ Abid, M.; Teixeira, L.; Toeroek, B. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 4047-4050.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

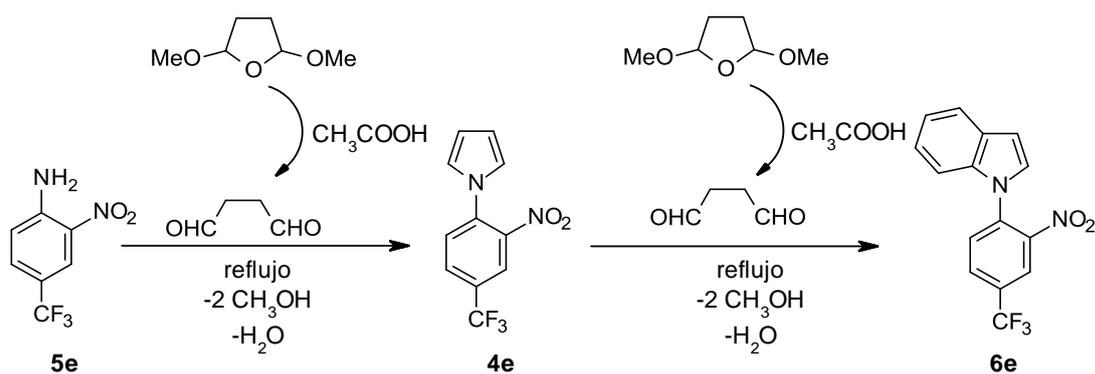


Esquema 2.24. Reacción de Clauson-Kaas para **5e**.



Esquema 2.25

En el Esquema 2.26, se recoge la propuesta del mecanismo de formación del compuesto **6e** asumiendo un mecanismo similar al descrito por estos autores y que el ácido acético presente en la mezcla de reacción actúa como catalizador de la misma.



A continuación se efectuó la reducción del grupo nitro a amino empleando como sistema de reducción $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Pd/C. En el caso del compuesto **4a**, el empleo de dicho agente reductor condujo a la formación de la amina correspondiente **7a** con un 91% de rendimiento (Tabla 2.21). Sin embargo, cuando se realizó la reducción de **4b**, ésta no fue completa, observándose por HPLC-MS la formación de especies intermedias de reducción (Figura 2.42) como el intermedio azoxi **8b** propuesto por Sharma y *col.* (Esquema 2.27).¹⁴⁵

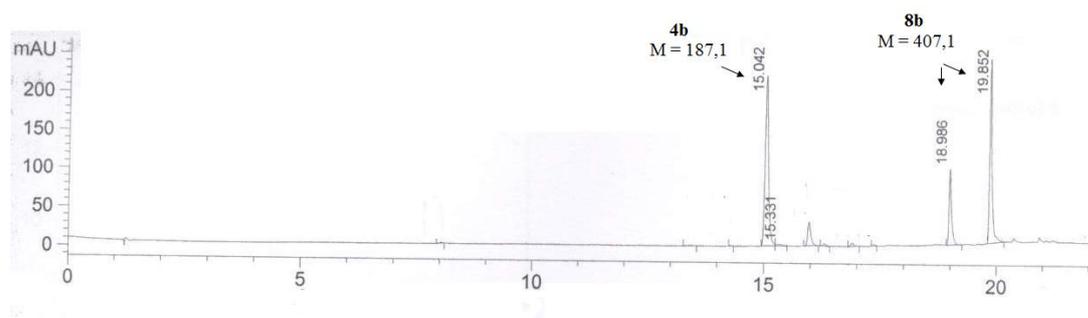
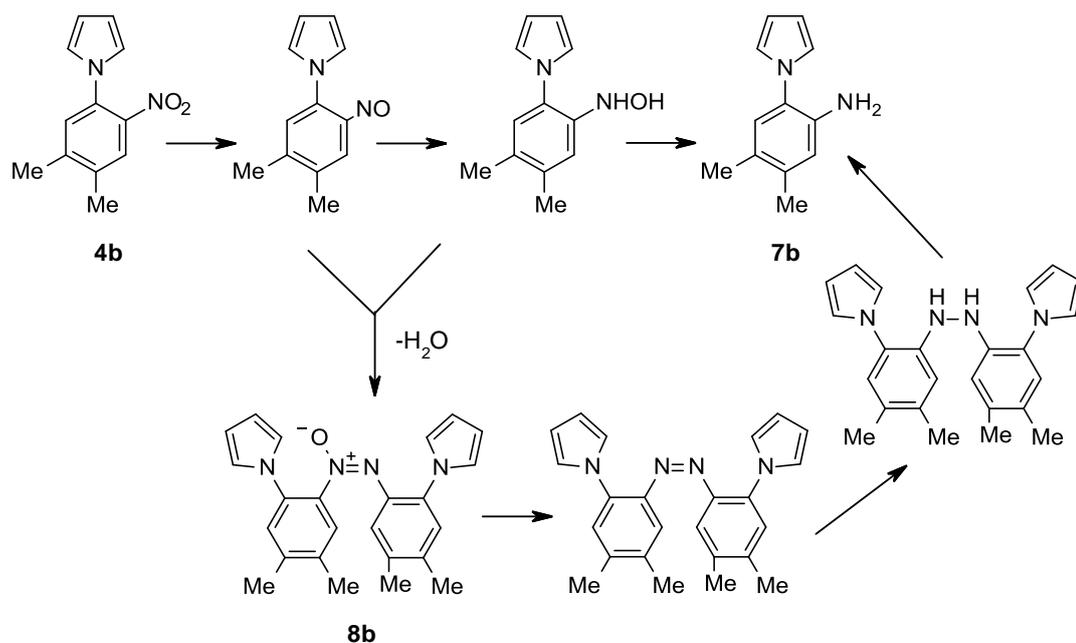


Figura 2.42. Cromatograma del crudo de reacción de la reducción de **4b** empleando $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Pd/C como agente reductor.

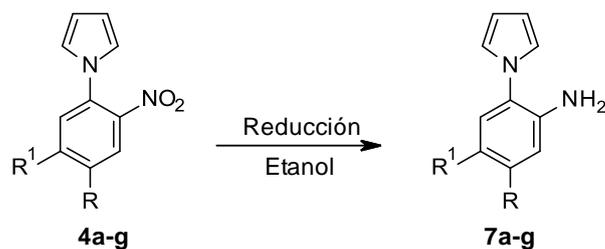
¹⁴⁵ Sharma, U.; Kumar, P.; Kumar, N.; Kumar, V.; Singh, B. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 1834-1840.



Esquema 2.27. Probable mecanismo de reducción de **4b**.

Como consecuencia de estos resultados, la reducción de los compuestos **4b-g** se llevó a cabo empleando como agente reductor $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ en etanol, obteniéndose las aminas **7b-g** con rendimientos medios-altos. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 2.21.

Tabla 2.21. Reacción de reducción de **4a-g**.

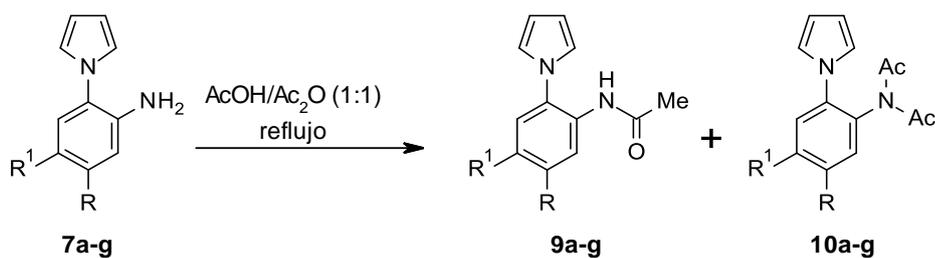


Compuesto	R	R ¹	Reductor	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Rto (%)
7a	H	H	N ₂ H ₄ , Pd/C	5.5	t.a.	91
7b	Me	Me	SnCl ₂ ·2H ₂ O	1.5	70	62
7c	Me	H	SnCl ₂ ·2H ₂ O	1	70	80
7d	Cl	Cl	SnCl ₂ ·2H ₂ O	0.5	reflujo	74
7e	CF ₃	H	SnCl ₂ ·2H ₂ O	4.5	reflujo	52
7f	OMe	H	SnCl ₂ ·2H ₂ O	0.5	70	75
7g	H	Cl	SnCl ₂ ·2H ₂ O	0.5	reflujo	67

Los derivados *N*-acilados **9a-g** se prepararon calentando a reflujo las correspondientes 2-(1*H*-pirrol-1-il)anilinas **7a-g** en una mezcla 1:1 de ácido acético y anhídrido acético. En la mayoría de los casos, también se observó la formación de la acetimida con rendimientos inferiores al 15 % (Tabla 2.22).

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 2.22. Reacción de **7a-g** con AcOH/Ac₂O.

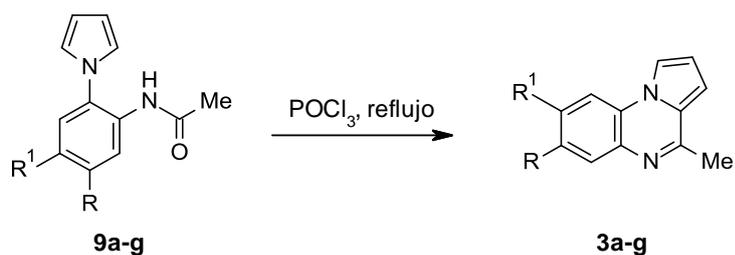


Compuesto	R	R ¹	Tiempo (min)	9 (Rto, %)	10 (Rto, %)
a	H	H	20	93	-
b	Me	Me	15	91	5
c	Me	H	30	77	15
d	Cl	Cl	10	81	-
e	CF ₃	H	25	76	9
f	OMe	H	10	70	10
g	H	Cl	20	93	5

La ciclación de los compuestos **9a-g** se produjo en las condiciones de Bischler-Napieralski por tratamiento con oxiclورو de fósforo a reflujo, para generar las correspondientes pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas **3a-g**. Los rendimientos obtenidos se recogen en la Tabla 2.23.

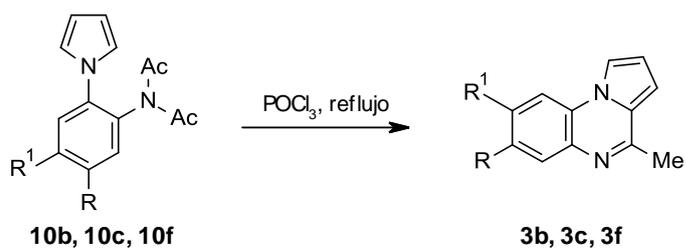
Por otra parte, cuando se ensayó la ciclación de los acetimidias **10b**, **10c** y **10f** con POCl₃ se observó que eran necesario tiempos de reacción más prolongados para la formación del sistema heterocíclico (Tabla 2.24).

Tabla 2.23. Síntesis de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas **3a-g**.



Compuesto	R	R ¹	Tiempo (min)	Rto (%)
3a	H	H	75	89
3b	Me	Me	60	91
3c	Me	H	50	77
3d	Cl	Cl	45	99
3e	CF ₃	H	40	98
3f	OMe	H	35	93
3g	H	Cl	40	87

Tabla 2.24. Reacción de **10b**, **10c** y **10f** con POCl₃.

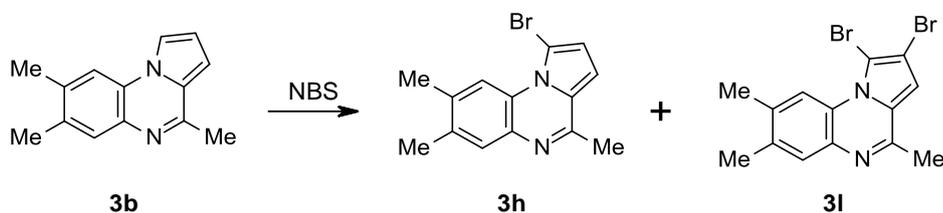


Compuesto	R	R ¹	Tiempo (h)	Rto (%)
3b	Me	Me	18	82
3c	Me	H	20	85
3f	OMe	H	22	74

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Una vez sintetizadas las pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas **3a-g**, se estudió la introducción de sustituyentes en el anillo pirrólico. En la Tabla 2.25 se recogen los resultados obtenidos en la reacción de bromación de **3b** empleando NBS como agente de bromación.

Tabla 2.25. Optimización de la reacción de bromación de **3b**.

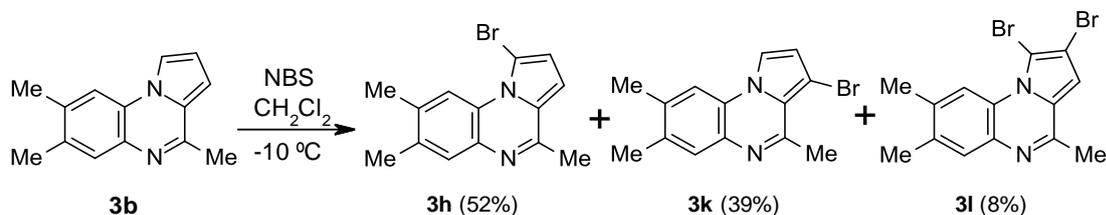


Entrada	Disolvente	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	% HPLC-MS		
				3b	3h	3l
1	CH ₂ Cl ₂	90	t.a.	-	-	-
2	DMF	15	t.a.	-	42	56
3	DMF	15	10	-	45	55
4	DMF	15	0	-	47	53
5	DMF	1140	0	14	69	17
6	DMF	320	-10	2,5	60	37,5
7	DMF ^a	40	-10	3,3	73,1	23,6

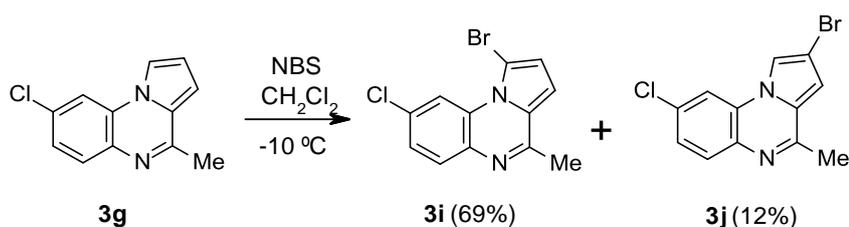
^aAdición lenta de NBS

Cuando se empleó CH₂Cl₂ como disolvente y se realizó la reacción a temperatura ambiente, se observó la descomposición del compuesto de partida **3b** (Tabla 2.25, entrada 1). La utilización de DMF como disolvente, un rango de temperaturas entre 0 °C y temperatura ambiente, y tiempos cortos de reacción condujo a una mezcla aproximadamente 1:1 de los compuestos **3h** y **3l** (Tabla 2.25, entradas 2-4). El aumento del tiempo de reacción hasta 19 horas a 0 °C proporcionó una mayor formación de **3h**. Sin embargo, se recuperó un 14% de producto de partida **3b** (Tabla 2.25, entrada 5). Para intentar que el proceso de bromación fuese lo más selectivo posible para la obtención de **3h**, se disminuyó la temperatura a -10 °C y se adicionó la disolución de NBS en CH₂Cl₂ mediante una jeringa de adición lenta, a una velocidad de 1,7 mL/h, obteniéndose un 73,6% de **3h** y un 23,6% de **3l** (Tabla 2.25, entrada 7).

Empleando dichas condiciones se llevó a cabo la bromación de los compuestos **3b** y **3g**. Los resultados se recogen en los Esquemas 2.28 y 2.29.



Esquema 2.28. Reacción de bromación de **3b**.



Esquema 2.29. Reacción de bromación de **3g**.

Aunque la sustitución electrófila aromática se efectúa en las posiciones C2 y C3 del anillo de pirrol, ésta se encuentra más favorecida en la posición C2, de ahí el mayor rendimiento de los compuestos **3h** y **3i** sustituidos en esa posición.

La posición del átomo de bromo en estos compuestos se ha determinado a partir de los valores de constantes de acoplamiento J y desplazamientos químicos δ del núcleo de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina descrito por Heffernan y *col.* (Figura 2.43).¹⁴⁶ Estos autores describen los valores de estos parámetros empleando dos disolventes deuterados distintos: CDCl_3 y $\text{DMSO-}d_6$. Los valores que se recogen en la Figura 2.43 corresponden a los valores determinados empleando CDCl_3 , mismo disolvente en el que se han registrado los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los compuestos **3h-l**. Para estos compuestos, llevamos a cabo experimentos de Efecto Nuclear Overhauser (NOE) adicionales para asignar sus estructuras.

¹⁴⁶ Heffernan, M. L.; Irvine, G. M. *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 837-45.

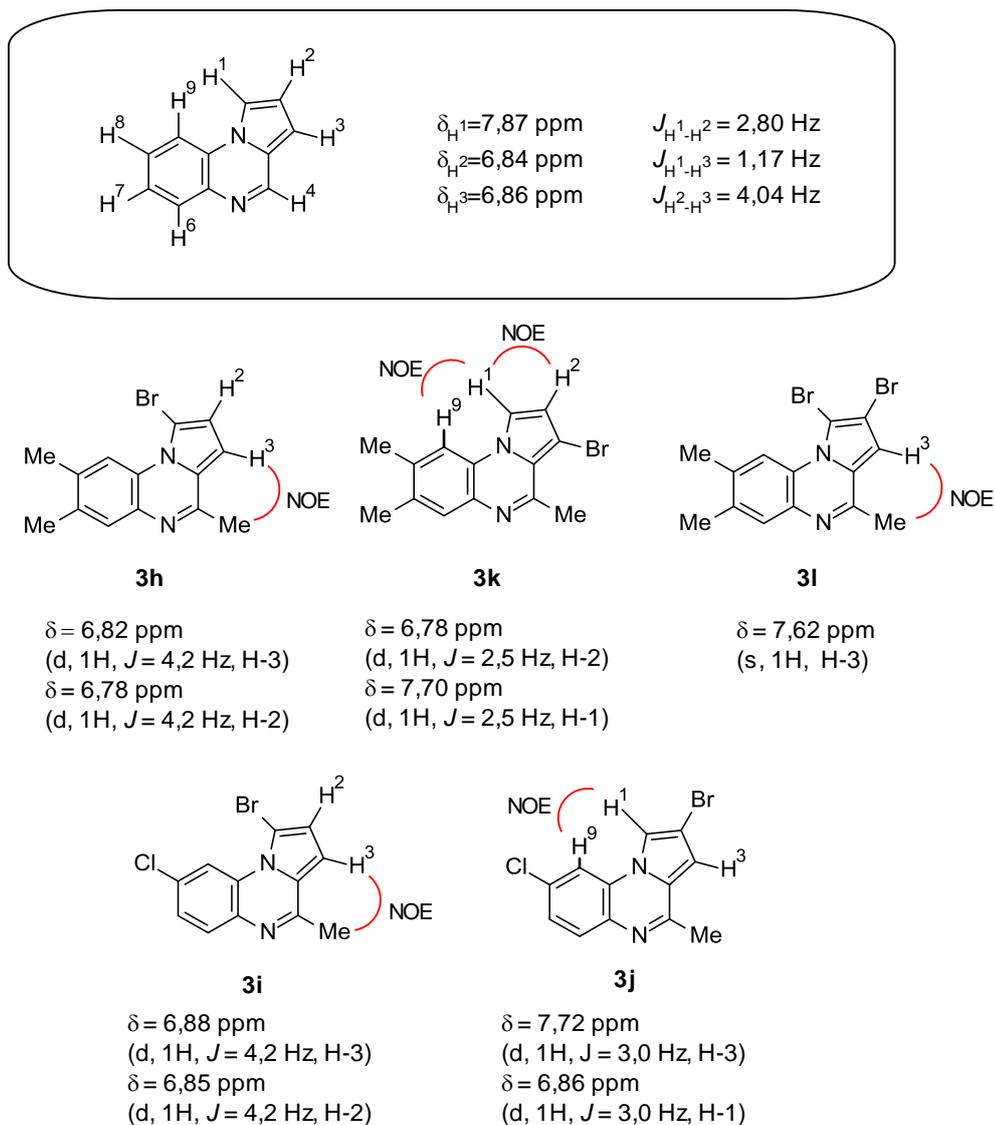
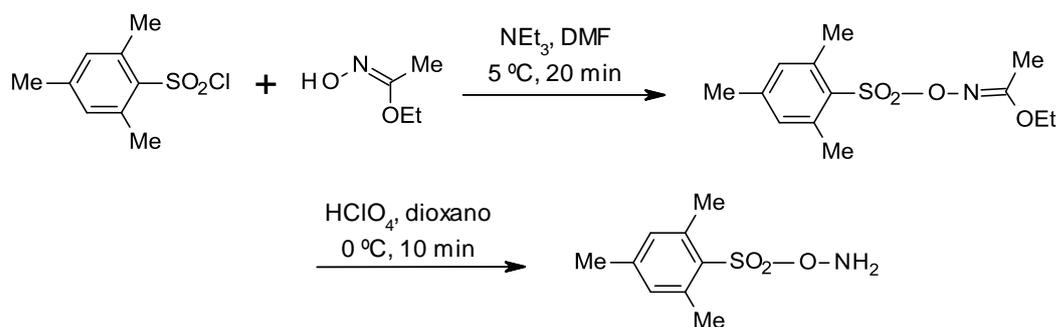


Figura 2.43. Asignación de la posición del átomo de bromo en los compuestos **3h-l**.

Como se puede observar a partir de los datos recogidos en la Figura 2.43, para los compuestos **3h** y **3i** se observa el efecto NOE entre el protón H-3 y los protones del grupo metilo situado en la posición 4 de la estructura de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina. A partir del valor de constante de acoplamiento $J = 4,2$ Hz, se establece que este valor pertenece al acoplamiento entre los protones H-2 y H-3, por lo que el átomo de bromo

se encuentra situado en la posición 1 de la estructura de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina. Para el compuesto **3k** se observa un efecto NOE entre los protones H-1 y H-9 y entre los protones H-1 y H-2, por lo que el átomo de bromo se encuentra situado en la posición 3. Además, el valor de constante de acoplamiento $J = 2,5$ Hz se corresponde con el valor de δ entre los protones H-2 y H-3. La determinación de la posición de los dos átomos de bromo en el compuesto **3l** se confirma a partir del efecto NOE entre el protón H-3 y los protones del grupo metilo. En el caso del compuesto **3j**, la existencia del efecto NOE entre los protones H-1 y H-9, pero no entre los protones H-1 y H-2 como en el compuesto **3k**, confirma que el átomo de bromo se encuentra situado en la posición 2 de la estructura de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina. En este caso hay que señalar que los valores de constante de acoplamiento entre los protones H-1 y H-3 son distintos de los determinados por Heffernan en la estructura de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina, observándose que la existencia de un átomo de bromo en la posición 2 incrementa el valor de constante de acoplamiento entre los protones H-1 y H-3 hasta 3,0 Hz.

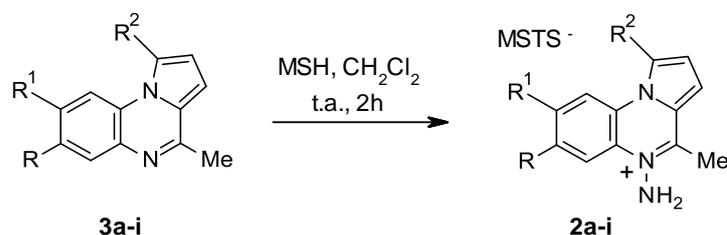
Una vez obtenidas las pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas **3a-g** y los derivados bromados de **3h** y **3i**, se llevó a cabo la aminación de las mismas para posteriormente realizar la condensación de Westphal tipo N-C. Como agente aminante se empleó *O*-mesitilenosulfonilhidroxilamina (MSH), que se preparó tal y como se describe en la bibliografía (Esquema 2.30).¹⁴⁷ La síntesis de **2a-i** se llevó a cabo con buenos rendimientos adicionando lentamente una disolución de MSH en CH₂Cl₂ sobre una disolución de **3a-i** en CH₂Cl₂. Los derivados aminados **2a-i** se aislaron por filtración y se purificaron por recristalización. En la Tabla 2.26 se recogen los rendimientos obtenidos.



Esquema 2.30. Síntesis de *O*-mesitilenosulfonilhidroxilamina (MSH).

¹⁴⁷ Tamura, Y.; Minamikawa, J.; Ikeda, M. *Synthesis* **1977**, *1*, 1-17.

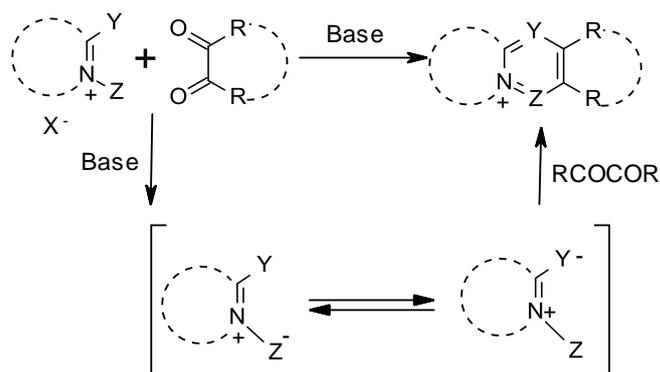
Tabla 2.26. Reacción de aminación de **3a-i**.



Entrada	Compuesto	R	R ¹	R ²	Rto (%)
1	2a	H	H	H	86
2	2b	Me	Me	H	65
3	2c	Me	H	H	77
4	2d	Cl	Cl	H	80
5	2e	CF ₃	H	H	62
6	2f	OMe	H	H	80
7	2g	H	Cl	H	81
8	2h	Me	Me	Br	69
9	2i	H	Cl	Br	56

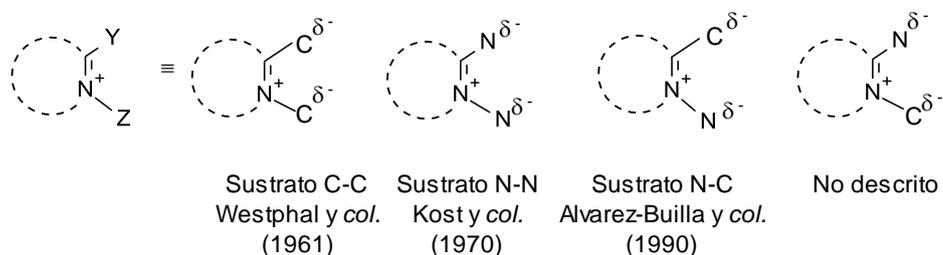
Una vez obtenidos los derivados aminados **2a-i** nos propusimos realizar la reacción de Westphal entre estos y distintos compuestos 1,2-dicarbonílicos. La reacción de Westphal¹⁴⁸ es uno de los métodos más sencillos para la preparación de sistemas bicíclicos que contengan un nitrógeno cuaternario cabeza de puente a partir de sales de azinio o azolio. Estas sales son capaces de generar iluros estabilizados en medio básico suave que pueden comportarse como 1,4-dinucleófilos y, en presencia de compuestos 1,2-dicarbonílicos, originan un nuevo heterociclo fusionado con la sal de cicloimonio de partida (Esquema 2.31).

¹⁴⁸ Westphal, O.; Jahn, K.; Heffe, W. *Arch. Pharm.* **1961**, 294, 37-45.



Esquema 2.31. Reacción de Westphal.

Este tipo de condensaciones se ha aplicado a diferentes sales de azinio y azolio. Además, la naturaleza de Y y Z se ha ido ampliando, pudiendo establecerse cuatro posibilidades distintas de condensación (C-C, C-N, N-C, N-N) aunque en la bibliografía sólo se han recogido ejemplos de condensación con los tipos C-C, N-C, N-N (Esquema 2.32).



Esquema 2.32. Tipos de condensaciones Westphal.

A principios de los ochenta nuestro grupo comenzó un estudio sistemático de la condensación de Westphal que permitió establecer una optimización de las condiciones de reacción sobre sustratos C-C y extenderlo a sustratos N-C (Figura 2.44).^{149,150}

¹⁴⁹ Vaquero, J. J.; Alvarez-Builla, J. *Adv. Nitrogen Heterocycl.* **2000**, *4*, 159-250.

¹⁵⁰ Vaquero, J. J.; Alvarez-Builla, J. *Heterocycles Containing a Ring-Junction Nitrogen. Modern Heterocyclic Chemistry*, Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J.; Barluenga, J. Ed. Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, vol. 4, ch. 22, pp 1989–2070.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

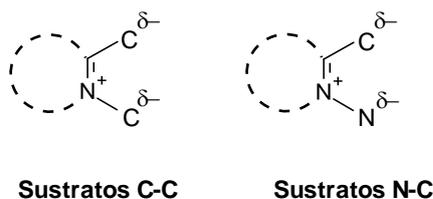


Figura 2.44

Como resultado de los estudios sintéticos se publicó la condensación de una gran variedad de sustratos de piridinio, quinolinio e isoquinolinio con diferentes compuestos 1,2-dicarbonílicos.¹⁵¹ En la Figura 2.45 se muestran diversos ejemplos de sistemas bicíclicos y policíclicos obtenidos en nuestro grupo.

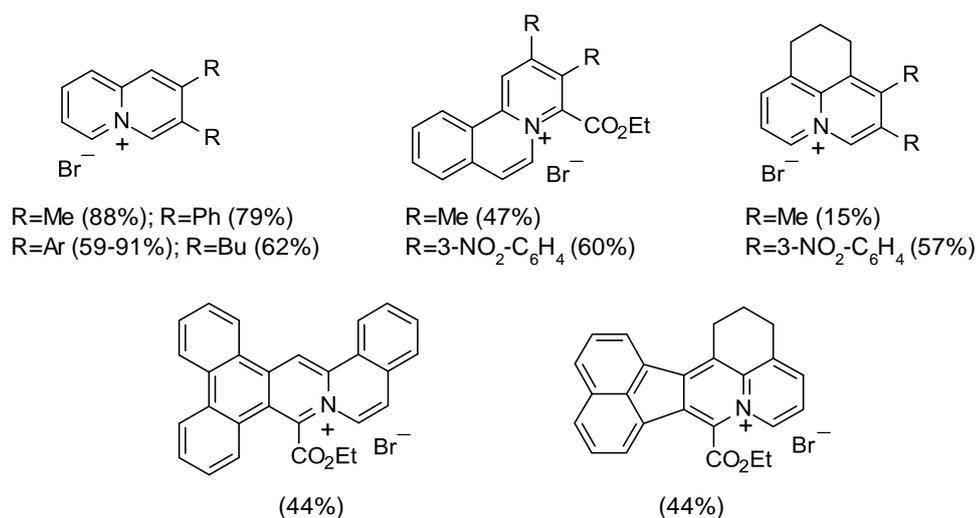


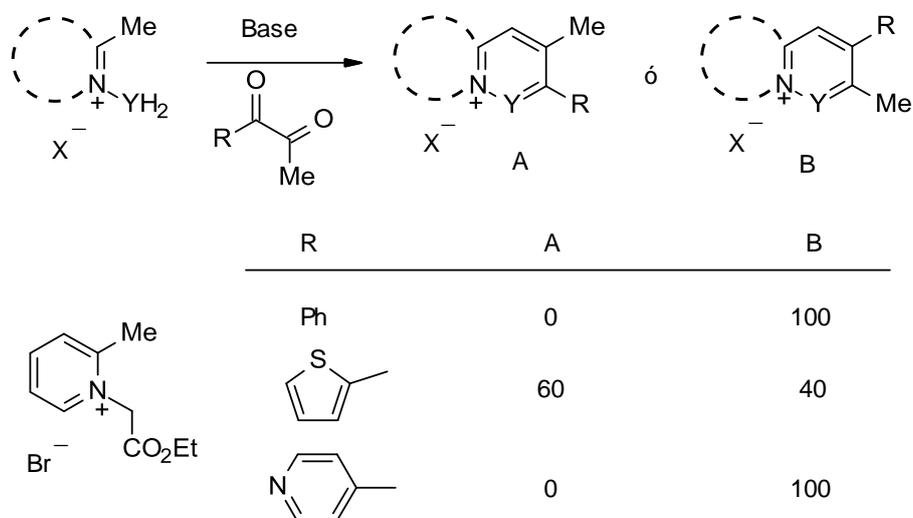
Figura 2.45

A través de un estudio más exhaustivo del método, se consiguió una versión regioselectiva. Para ello, se utilizaron diferentes compuestos 1,2-dicarbonílicos asimétricos (1-aryl-2-propanodionas),¹⁵² observándose que existía una dependencia de la proporción de regioisómeros obtenidos con respecto al carácter electrónico del grupo

¹⁵¹ a) Álvarez-Builla, J.; González, G.; Ezquerra, J.; Fombella, M. E. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, *22*, 681-685. b) Ezquerra, J.; Álvarez-Builla, J. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, *23*, 1151-1157.

¹⁵² Díaz, A.; Matía, M. P.; Ezquerra, J.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 8294-8296.

arilo (fenilo o heteroarilo) en el compuesto 1,2-dicarbonílico de partida. Algunos de esos ejemplos se muestran en el Esquema 2.33.

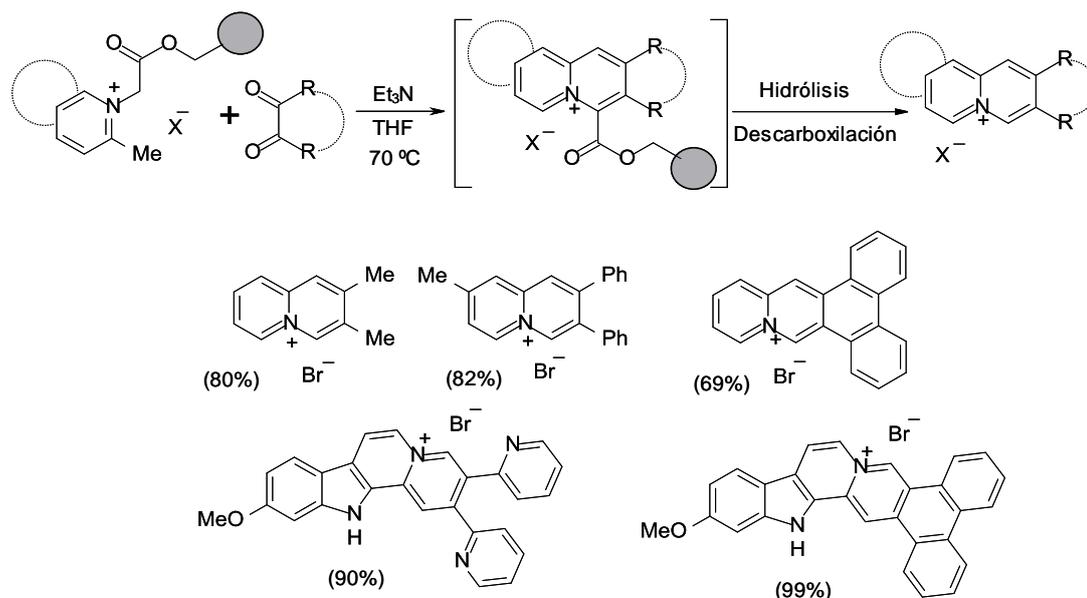


Esquema 2.33

También se ha llevado a cabo la síntesis en paralelo de sales de quinolininio utilizando fase sólida. En el Esquema 2.34 se han seleccionado algunos ejemplos, donde distintas sales de cicloimonio ancladas en la resina PS-Wang se hicieron reaccionar con diferentes compuestos 1,2-dicarbonílicos.¹⁵³

¹⁵³ Delgado, F.; Linares, M. L.; Alajarín, R.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4057-4060.

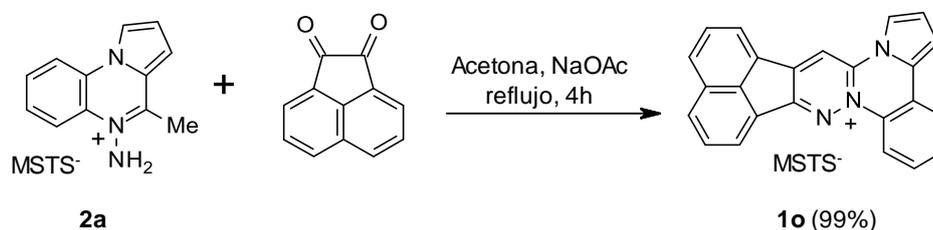
CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 2.34

Teniendo en cuenta estos antecedentes en la reacción de Westphal, se llevó a cabo dicha reacción entre los compuestos sintetizados **2** y distintos compuestos 1,2-dicarbonílicos tales como: acenaftoquinona, glioxal, butanodiona y 3,4-hexanodiona.

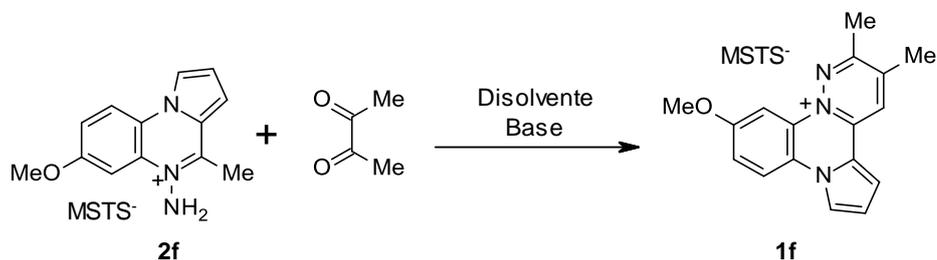
En primer lugar se llevó a cabo la condensación de Westphal entre **2a** y acenaftoquinona empleando una de las condiciones típicas de esta reacción: acetona como disolvente y acetato sódico como base. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas y la sal deseada **1o** se aisló mediante filtración de manera cuantitativa (Esquema 2.35).



Esquema 2.35. Condensación de Westphal entre **2a** y acenaftoquinona.

Los primeros ensayos de la condensación empleando butanodiona se efectuaron con el compuesto **2f** (Tabla 2.27).

Tabla 2.27. Optimización de la condensación de Westphal entre **2f** y butanodiona.



Entrada	Disolvente	Base (eq.)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% HPLC-MS	
					2f	1f
1	Acetona	NaOAc (1,1)	Reflujo	255	-	62
2	Acetona	NaOAc (1,1)	t.a.	75	78	22
3	EtOH	NEt ₃ (1,1)	reflujo	20		
4	EtOH	NEt ₃ (1)	t.a.	20	-	65

El primer intento en la síntesis de la sal **1f** fue utilizando las mismas condiciones en las que se había obtenido la sal **1o** (Tabla 2.27, entrada 1). En este ensayo, se observó la aparición de un precipitado que, tras ser filtrado y triturado en éter, presentaba un 62% (por HPLC-MS) de la sal deseada **1f** y otros compuestos no identificados. Las aguas de filtrado contenían el producto desaminado **3f**. A la vista de este resultado y, previendo la pérdida parcial del compuesto de partida **2f**, se decidió realizar el mismo ensayo a temperatura ambiente y comprobar si se obtenía el compuesto **2f** (Tabla 2.27, entrada 2). En este caso, y tras 75 minutos de reacción, se obtuvo un precipitado cuya composición era de un 78% de **2f** y un 22% de **1f**. Los intentos realizados de purificación mediante recristalización utilizando distintas mezclas de disolventes fueron infructuosos.

A partir de estos resultados, se decidió cambiar el disolvente y la base, eligiéndose etanol y trietilamina, otra combinación muy utilizada en las reacciones de Westphal. En primer lugar, se realizó la reacción a reflujo de etanol durante 20 minutos (Tabla 2.27, entrada 3), observándose un cambio en la coloración muy brusco (de amarillo a negro) y la aparición de un precipitado. Dicho precipitado se filtró y se trituró en éter, observándose por ¹H-RMN, que era una mezcla del producto deseado **1f** y de la

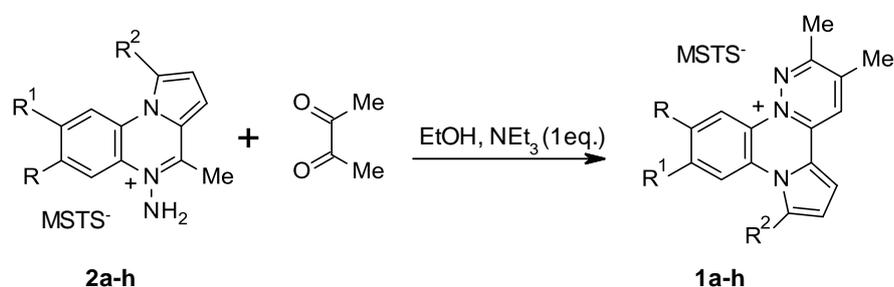
CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

sal formada por el anión mesitilenosulfonato (MSTS⁻) y el catión trietilamonio. Se realizaron distintas pruebas de recristalización pero todas fueron infructuosas y cuando se intentó purificar por cromatografía en columna se observó la descomposición del producto.

Como consecuencia de estos resultados y, previendo que estos compuestos podían ser muy sensibles a ciertos factores como altas temperaturas, se llevó a cabo el mismo ensayo a temperatura ambiente. En esta ocasión, se adicionó un equivalente de trietilamina (Tabla 2.27, entrada 4) para intentar evitar la formación de la sal mesitilenosulfonato de trietilamonio (⁺NHEt₃ MSTS⁻). En esta ocasión y, tras 30 minutos de reacción, se obtuvo un precipitado que tras triturarse en éter dietílico y recristalizarse en una mezcla AcOEt/EtOH condujo finalmente la sal deseada **1f** con un rendimiento del 38%.

Aplicando estas condiciones de reacción, se llevó a cabo la condensación de **2a-h** con butanodiona. Los resultados se muestran en la Tabla 2.28.

Tabla 2.28. Reacción de Westphal entre **2a-h** y butanodiona.

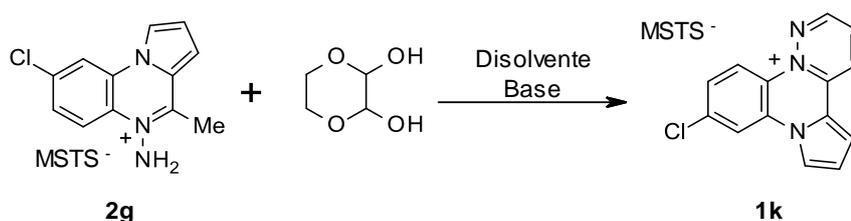


Entrada	Compuesto	R	R ¹	R ²	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Rto (%)
1	1a	H	H	H	t.a.	20	65
2	1b	Me	Me	H	t.a.	30	56
3	1c	Me	H	H	t.a.	20	49
4	1d	Cl	Cl	H	t.a.	20	35
5	1e	CF ₃	H	H	t.a.	10	48
6	1f	OMe	H	H	t.a.	30	38
7	1g	H	Cl	H	t.a.	30	43
8	1h	Me	Me	Br	t.a.	10	90

Como se observa, los rendimientos de la condensación de Westphal empleando butanodiona para la formación de este tipo de sales son medios. Sin embargo, en el caso de la formación de la sal **1h**, que posee un átomo de bromo en la posición 7, el rendimiento obtenido es de un 90%, lo que puede explicarse por su mayor insolubilidad debido a su mayor lipofilia.

La síntesis de las sales **1i-k** se realizó por condensación entre **2b**, **2g** y **2h** y glioxal (generado *in situ* a partir de 1,4-dioxan-2,3-diol). La optimización de las condiciones de reacción se efectuó con el compuesto **2g** y los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2.29.

Tabla 2.29. Optimización de la condensación de Westphal entre **2g** y 1,4-dioxan-2,3-diol.



Entrada	Disolvente	Base	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% HPLC-MS	
					2g	1k
1	Acetona	NaOAc	t.a.	60	94	6
2	Acetona	NaOAc	reflujo	60	95	5
3	MeOH	NaOAc	t.a.	80	86	15
4	EtOH	NEt ₃	reflujo	20	-	47*

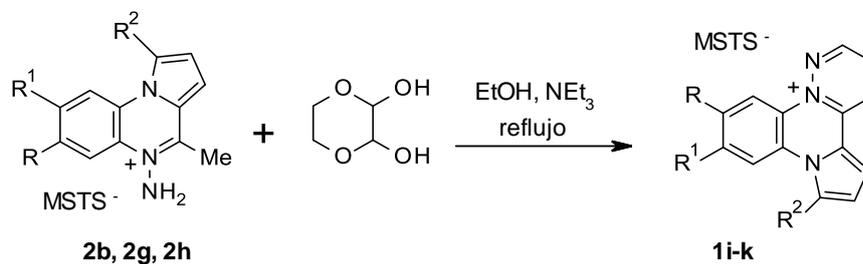
*Rto químico

Como se observa a partir de los datos de la Tabla 2.29 (entradas 1 y 2) el sistema acetona/NaOAc, no condujo a la formación mayoritaria del compuesto **1k**, independientemente de la temperatura a la que se realice la reacción. El uso de un disolvente más polar, para favorecer la disolución de **2g**, tampoco proporcionó resultados positivos (Tabla 2.29, entrada 3). Sin embargo, el empleo del sistema EtOH/NEt₃ (Tabla 2.29, entrada 4) y un calentamiento de la mezcla de reacción a reflujo durante 20 minutos condujo al producto de la condensación de Westphal deseado **1k** con un rendimiento del 47%.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

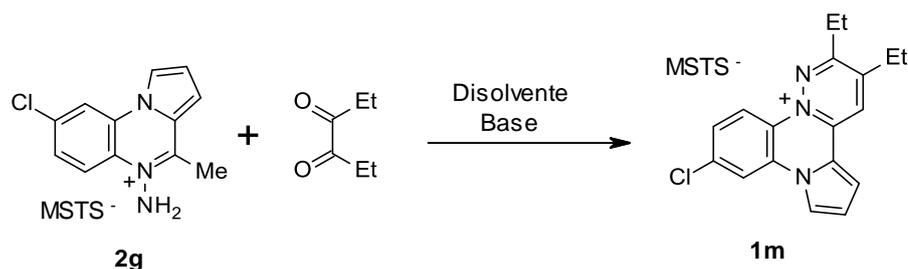
Aplicando estas mismas condiciones, se llevó a cabo la síntesis de las sales **1i-1k**. Los resultados se recogen en la Tabla 2.30.

Tabla 2.30. Reacción de condensación de Westphal entre **2b**, **2g** y **2h** con 1,4-dioxan-2,3-diol.



Entrada	Compuesto	R	R ¹	R ²	Tiempo (min)	Rto (%)
1	1i	Me	Me	H	20	56
2	1j	Me	Me	Br	10	60
3	1k	H	Cl	H	20	47

Por último, se sintetizaron las sales **1l-n** por condensación de Westphal entre los compuestos **2b**, **2g** y **2i** y 3,4-hexanodiona. Como en casos anteriores, se tuvo que llevar a cabo la optimización de las condiciones de reacción. Los ensayos realizados con el compuesto **2g** se recogen en la Tabla 2.31.

Tabla 2.31. Optimización de la condensación de Westphal entre **2g** con 3,4-hexanodiona.

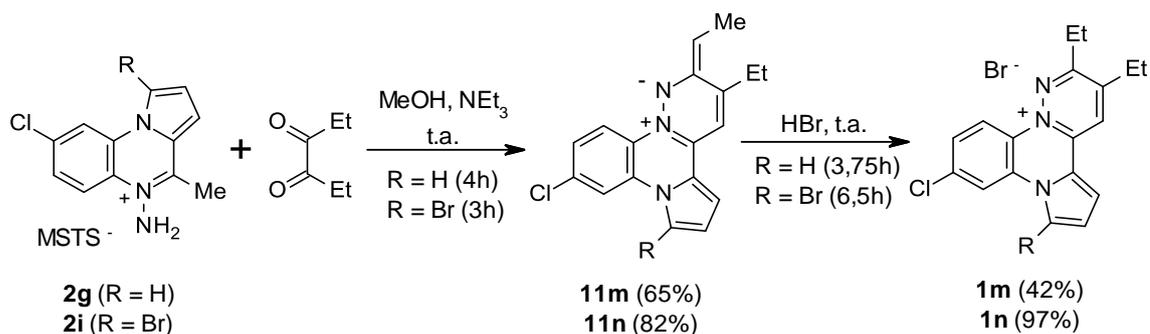
Entrada	Disolvente	Base	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% HPLC-MS	
					2g	1m
1	EtOH	NEt ₃	t.a.	1260	n.d.	n.d.
2	EtOH	NEt ₃	reflujo	20	91	9
3	Acetona	NaOAc	t.a.	70	95	-

n.d. (no detectado)

El empleo del sistema EtOH/NEt₃, temperatura ambiente y largos tiempos de reacción no condujo a la sal deseada **1m**, ni a la recuperación del producto de partida **2g** (Tabla 2.31, entrada 1). El aumento de temperatura y tiempos cortos de reacción, sólo proporcionó un 9% de **1m** (Tabla 2.31, entrada 2). La utilización del sistema acetona/NaOAc a temperatura ambiente condujo a la recuperación de un 95% del producto de partida **2g** (Tabla 2.31, entrada 3).

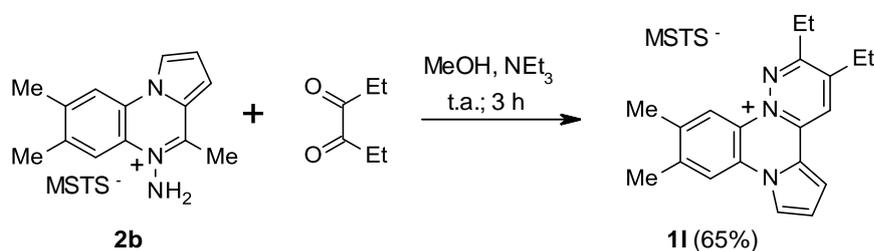
Debido a la baja solubilidad de **2g** en etanol, se decidió cambiar de disolvente y emplear metanol y NEt₃ como base. En este caso, y tras 4 horas de reacción a temperatura ambiente, se formó la heterobetaina **11m** del producto de reacción **1m**. El tratamiento posterior con HBr en agua condujo a un 42% de la sal **1m** (Esquema 2.36). Empleando estas condiciones de reacción, se realizó la condensación entre **2i** y 3,4-hexanodiona. De forma similar, se obtuvo la heterobetaina **11n** que se transformó en la sal **1n** (Esquema 2.36).

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



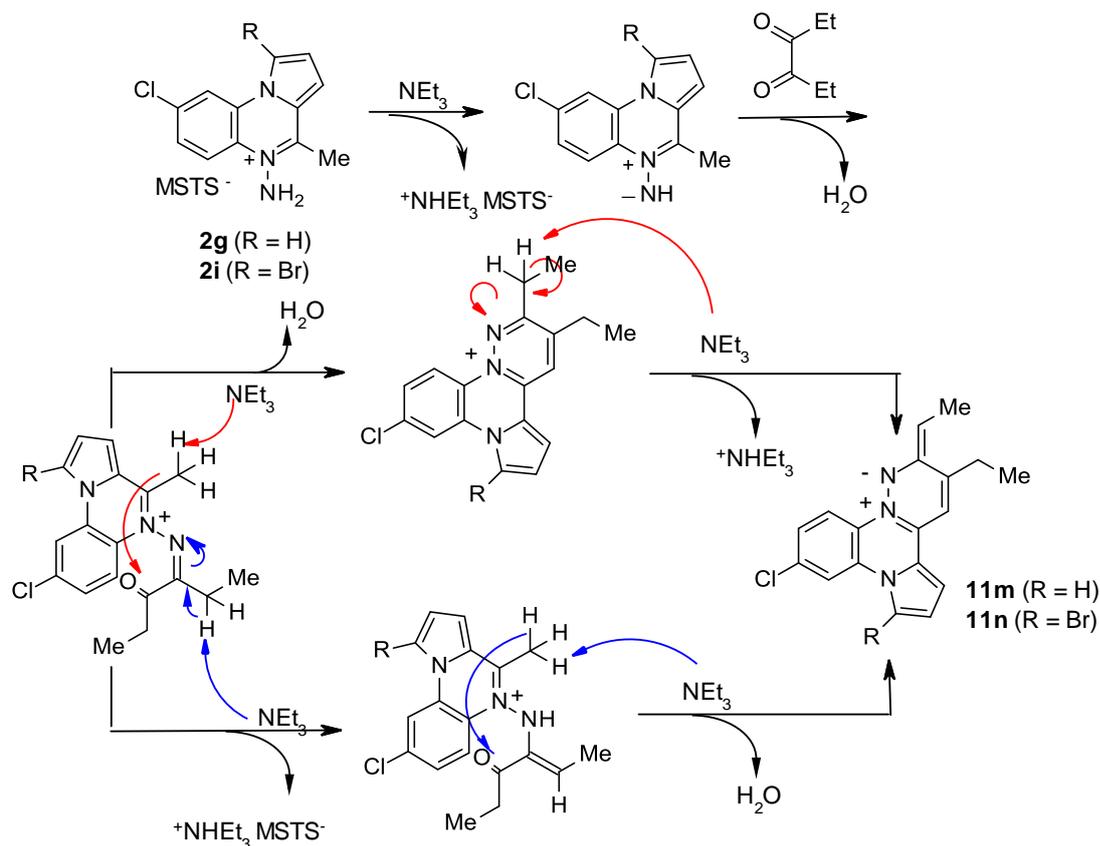
Esquema 2.36. Síntesis de **1m** y **1n**.

Sin embargo, cuando se llevó a cabo la reacción de **2b** con 3,4-hexanodiona, aplicando las mismas condiciones que en los dos casos anteriores, se obtuvo directamente la sal **1l** con un 65% de rendimiento (Esquema 2.37).



Esquema 2.37. Síntesis de **1l**.

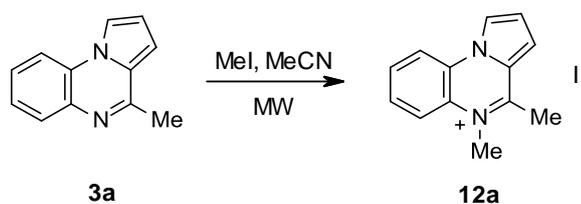
La formación de la heterobetaina en el caso de las sales **1m**, **1n** y no en el caso de la sal **1l** puede ser debida a que la heterobetaina que se forma en el medio de reacción en los dos primeros casos es insoluble en metanol, no produciéndose la protonación de las mismas *in situ*. El mecanismo propuesto de la generación de la heterobetaina se muestra en el Esquema 2.38.



Esquema 2.38. Mecanismo propuesto de la generación de la heterobetaina **11m** y **11n**.

Una vez sintetizados los compuestos **1a-o** mediante condensación de Westphal, se decidió sintetizar dos nuevas series de compuestos derivados de la estructura de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina para determinar su actividad frente a PTP-1B. La primera serie que se sintetizó correspondió a los distintos derivados de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas metilados en el nitrógeno en posición 5. Esta metilación se llevó a cabo empleando como agente metilante yoduro de metilo, y se realizó por calentamiento en un reactor de microondas en tubo cerrado. En la Tabla 2.32 se recogen las condiciones de reacción ensayadas para la optimización del proceso de metilación empleando 0.1 mmoles del sustrato de partida **3a**.

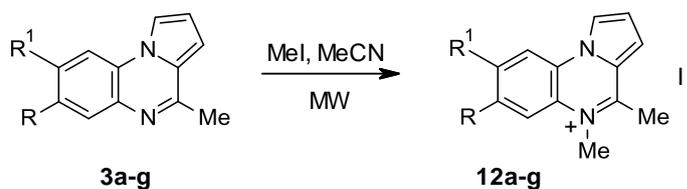
Tabla 2.32. Optimización de la reacción de metilación de **3a**.



Entrada	MeI (eq.)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	12a (Rto, %)
1	2	100	1	-
2	2	100	5	-
3	2	120	10	-
4	2	150	20	25
5	10	150	20	76
6	10	160	20	94

Como se observa, el empleo de 2 equivalentes de yoduro de metilo, un rango de temperaturas entre 100-120 °C y tiempos cortos de reacción (1-10 minutos) condujo a la recuperación del producto de partida **3a** (Tabla 2.32, entradas 1-3). Un aumento de la temperatura hasta 150 °C y del tiempo de reacción a 20 minutos, condujo a un 25% del producto metilado **12a** (Tabla 2.32, entrada 4). Debido al bajo punto de ebullición que posee el yoduro de metilo, se decidió incrementar su número de equivalentes. El uso de 10 equivalentes de yoduro de metilo y una calefacción de 150 °C proporcionó **12a** con un 76% de rendimiento (Tabla 2.32, entrada 5). Finalmente, el aumento de la temperatura hasta 160 °C, manteniendo los 20 minutos de reacción condujo a un rendimiento casi cuantitativo de **12a** (Tabla 2.32, entrada 6). Aplicando estas condiciones se efectuó la metilación de los compuestos **3a-g** en una escala cinco veces mayor con los resultados que se muestran en la Tabla 2.33.

Tabla 2.33. Reacción de metilación de **3a-g** con yoduro de metilo.



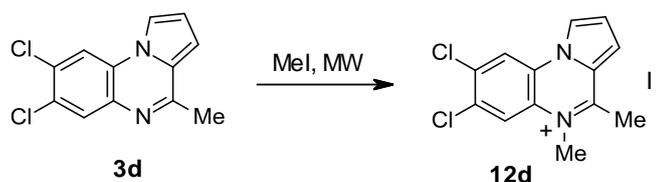
Entrada	Compuesto	R	R ¹	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	12 (Rto, %)
1	12a	H	H	160	20	77
2	12b	Me	Me	160	30	82
3	12c	Me	H	160	45	70
4	12d	Cl	Cl	160	30	32
5	12e	CF ₃	H	160	30	52
6	12f	OMe	H	160	30	87
7	12g	H	Cl	160	30	75

El escalado (x5) de la síntesis de **12a** (0,55 mmoles) condujo a un rendimiento menor (77%) en la reacción de metilación. Los compuestos **12b**, **12c**, **12f** y **12g** se obtuvieron con rendimientos buenos. Sin embargo, los compuestos **12b** y **12e** se obtuvieron con un rendimiento menor debido a la presencia de sustituyentes electroattractores en el anillo bencénico, haciendo menos nucleófilo el nitrógeno de la quinoxalina.

En la síntesis del compuesto **12d** se encontraron diversos problemas. A diferencia del resto de derivados de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina, el compuesto de partida **3d** no se disolvía completamente en acetonitrilo. Aplicando las condiciones descritas en la Tabla 2.33, éstas conducían a un 32% del compuesto metilado **12d**, observándose por ¹H-RMN trazas del compuesto de partida. Los intentos de purificación por cromatografía en columna de gel de sílice empleando diversas mezclas de eluyentes, incluyendo la utilización de metanol, tampoco condujeron a la elución del compuesto. Como consecuencia de estos resultados, se llevaron a cabo distintos ensayos para la optimización de la síntesis de **12d**. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.34.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 2.34. Optimización de la síntesis de **12d**.



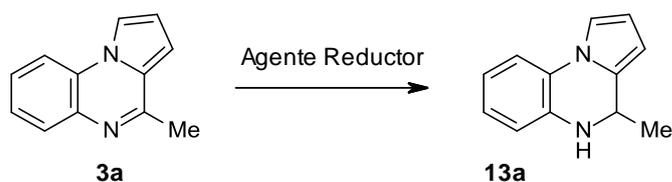
Entrada	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Relación 3d:12d
1	CH ₂ Cl ₂	45	20	1:0
2	ClCH ₂ CH ₂ Cl	150	10	2:1
3	MeCN*	160	30	1:2,3
4	MeCN*	160	45	1:1,6
5	Acetona	160	30	1:0
6	AcOEt	150	30	1:0

*adición del disolvente en caliente

El empleo de CH₂Cl₂, AcOEt y acetona como disolventes y unas temperaturas de 45, 150 y 160 °C respectivamente, solo condujeron a la recuperación del producto de partida (Tabla 2.34, entradas 1, 2 y 6). Cuando se utilizó 1,2-dicloroetano y una temperatura de 150 °C, se obtuvo un precipitado formado por una mezcla de **3d** y **12d** en proporción 2:1. A la vista de estos resultados y de la no obtención del compuesto **12d** como producto mayoritario, se optó por adicionar acetonitrilo en caliente al compuesto **3d** y ver si se mejoraba su solubilidad. Se llevó a cabo la reacción en microondas calentando a 160 °C durante 30 minutos y se obtuvo una mezcla de compuestos **3d** y **12d** en proporción 1:2,3 (Tabla 2.34, entrada 4). Un aumento del tiempo de reacción no condujo a mejores rendimientos (Tabla 2.34, entrada 5). Después de todos los intentos efectuados para la síntesis de **12d**, se observó que las mejores condiciones de reacción eran 160 °C y 30 minutos de reacción (Tabla 2.33, entrada 4), las mismas en las que se obtuvieron el resto de compuestos **12a-c**, **e-g**. Sin embargo, su purificación no se logró.

Una vez obtenida la serie de yoduros de 4,5-dimetilpirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio **12a-c**, **e-g**, nos propusimos sintetizar la serie 4-metil-4,5-dihidropirrolo[1,2-*a*]quinoxalinio **13a-g**, es decir, llevar a cabo la reducción del enlace imínico de la quinoxalina. Para ello, se exploraron distintos agentes reductores. Los resultados se recogen en la Tabla 2.35.

Tabla 2.35. Optimización del proceso de reducción del grupo imina de **3a**.



Entrada	Reductor (eq.)	Catalizador (eq.)	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	(Rto, %)	
						3a	13a
1	NaBH ₄ (1,2)	-	MeOH	reflujo	18	100	-
2	NaBH ₄ (2)	-	MeOH	reflujo	24	92 ^a	8 ^a
3	NaBH ₄ (2)	-	MeOH	150 (MW)	0,16	100	-
4 ^b	NaBH ₄ (1)	PTSA	-	t.a.	0,5	54 ^a	46 ^a
5	NaCNBH ₃ (1,1)	-	THF	t.a. - reflujo	22	98 ^a	2 ^a
6	BH ₃ ·THF (1)	HO ₂ C-(CH ₂) ₂ -CO ₂ H (1)	THF	-25	1	57	42
7	BH ₃ ·THF (2)	HO ₂ C-(CH ₂) ₂ -CO ₂ H(2)	THF	t.a.	3	34	49
8	HSiCl ₃	DMF	CH ₂ Cl ₂	t.a.	18,5	72	21
9	LiAlH ₄ (1,1)	-	THF	t.a.	17	20	25
10	LiAlH ₄ (1,1)	-	THF	reflujo	18	19	53
11	LiAlH ₄ (1,5)	-	THF	reflujo	18	9	70
12	LiAlH ₄ (2)	-	THF	reflujo	17	2	78

^aProporciones relativas determinadas por ¹H-RMN.

^bSe emplea un mortero

El empleo de NaBH₄ como agente reductor y un calentamiento de la mezcla de reacción de manera convencional durante largos tiempos o por microondas durante 10 minutos solo proporcionó la recuperación del producto de partida (Tabla 2.35, entradas 1-3). Sin embargo, cuando se adicionó un catalizador ácido como el ácido *p*-toluenosulfónico (PTSA), tal y como describen Cho y *col.*, se obtuvo una mezcla de **3a** y **13a** con una proporción relativa de de 54:46 por ¹H-RMN (Tabla 2.35, entrada 4).¹⁵⁴

¹⁵⁴ Cho, B. T.; Kang, S. K. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5725-5734.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El empleo de NaCNBH_3 como agente reductor y largos tiempos de reacción condujeron a la recuperación de **3a**. El empleo de $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ y un diácido, como el ácido succínico, condujo a un 42% de **13a**. Según describen Lu y *col.*, el papel del diácido es coordinarse al sustrato y al agente reductor favoreciendo la transferencia intramolecular del hidruro al sustrato, tal y como se muestra en la Figura 2.46.¹⁵⁵ Un aumento de la temperatura, así como del número de equivalentes del agente reductor y del diácido solo condujo a un 49% de **13a** (Tabla 2.35, entradas 6 y 7).

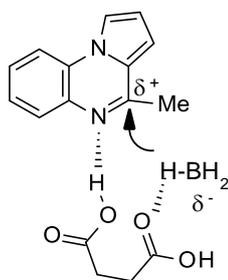


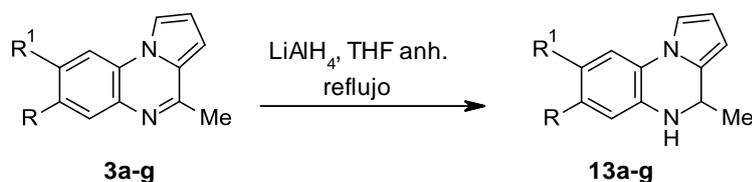
Figura 2.46

El empleo de triclorosilano-dimetilformamida (Tabla 2.35, entrada 8), agitación de la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18,5 horas de reacción, sólo condujo a un 21% de **13a**. Finalmente, el uso de LiAlH_4 como agente reductor nos proporcionó **13a** con elevados rendimientos y una mínima recuperación del producto de partida **3a**. Para ello, se realizaron diferentes ensayos modificando el número de equivalentes de LiAlH_4 y la temperatura, comprobándose que eran necesarios 2 equivalentes del agente reductor y un calentamiento a reflujo durante 17 horas para obtener un 78% de **13a** y un 2% del producto de partida **3a**.

Aplicando estas condiciones (Tabla 2.35, entrada 12), se llevó a cabo la reducción de los compuestos **3a-g** para dar las correspondientes 4-metil-4,5-dihidropirrol[1,2-*a*]quinoxalinas **13a-g**. Los resultados se muestran en la Tabla 2.36.

¹⁵⁵ Lu, Z. H.; Bhongle, N.; Su, X.; Ribe, S.; Senanayake, C. H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8617-8620.

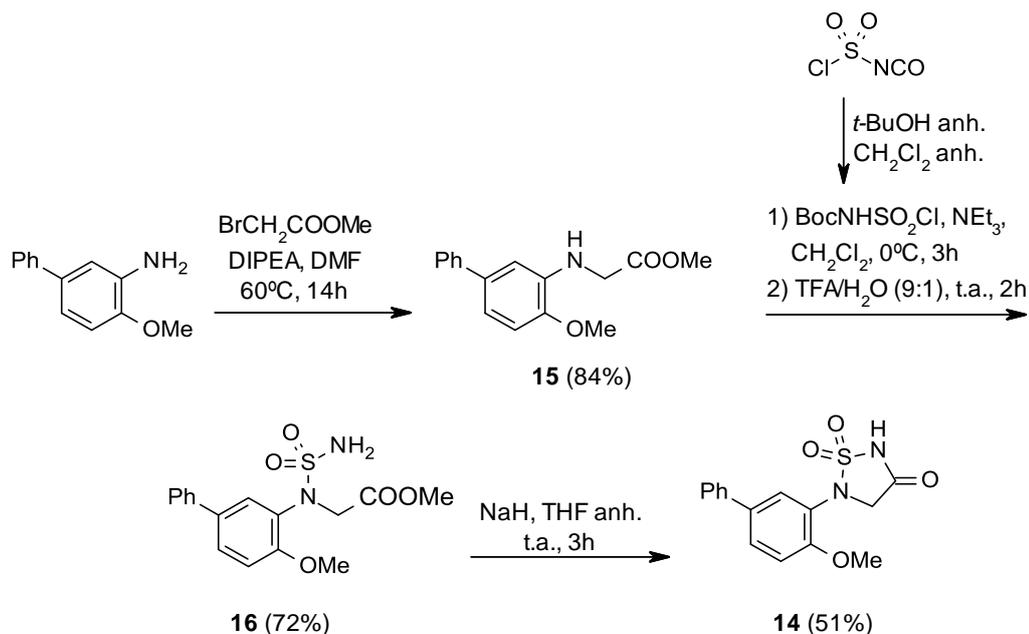
Tabla 2.36. Reducción del grupo imina de los compuestos **3a-g**.



Entrada	Compuesto	R	R ¹	Tiempo (h)	13 (Rto, %)
1	13a	H	H	17	78
2	13b	Me	Me	24	64
3	13c	Me	H	24	51
4	13d	Cl	Cl	24	86
5	13e	CF ₃	H	20	62
6	13f	OMe	H	43	41
7	13g	H	Cl	20	95

Por último, se llevó a cabo la síntesis del compuesto **14** (Esquema 2.39), descrito en la bibliografía como un inhibidor de PTP-1B, con un valor de IC₅₀ de 2,47 μM.¹⁵⁶ Dicho compuesto se tomó como referencia en los ensayos de inhibición. Para realizar su síntesis se siguió el procedimiento descrito por Black y *col.*, donde se llevó a cabo la alquilación de 2-metoxi-5-fenilamina con bromoacetato de metilo en presencia de diisopropilamina para dar la amina secundaria **15**, que reaccionó con *tert*-butil(clorosulfonyl)carbamato generado *in situ*. El tratamiento posterior con ácido trifluoroacético (TFA) para eliminar el grupo protector Boc, condujo a la fenilsulfamida **16** con un 72% de rendimiento. Por último, la ciclación se realizó empleando NaH, obteniéndose **14** en un 51%.

¹⁵⁶ Black, E.; Breed, J.; Breeze, A. L.; Embrey, K.; García, R.; Gero, T. W.; Godfrey, L.; Kenny, P. W.; Morley, A. D.; Minshull, C. A.; Pannifer, A. D.; Read, J.; Rees, A.; Russell, D. J.; Toader, D.; Tucker, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2503-2507.



Esquema 2.39. Síntesis del inhibidor **14**.

2.2.3. Ensayos de inhibición de PTP-1B

Una vez sintetizadas las tres series de compuestos: sales de piridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxalin-9-inio (**1a-o**), yoduros de 4,5-dimetilpirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (**12a-c**, **e-g**), 4-metil-4,5-dihidropirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas (**13a-g**) y el inhibidor descrito **14**, se realizaron ensayos de inhibición frente a PTP-1B utilizando el kit comercial “PTP1B Tyrosine Phosphatase Drug Discovery Kit” (BML-AK822 Enzo) de la casa comercial Enzo Life Sciences. Estos estudios se llevaron a cabo en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del Dr. Manuel Rodríguez Puyol y del Dr. Diego Rodríguez Puyol.

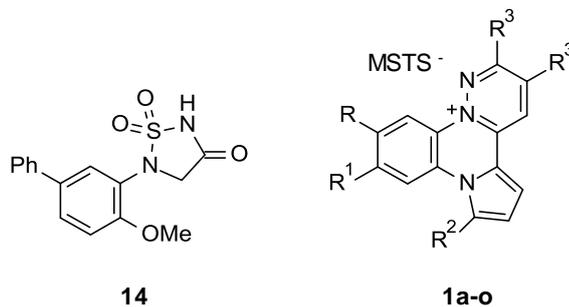
En la Tabla 2.37 se recogen los porcentajes de inhibición a una concentración 1µM de los distintos compuestos sintetizados pertenecientes a la serie **1a-o** así como el compuesto de referencia **14**.¹⁵⁷ Para los compuestos con mejores porcentajes de inhibición se determinó su valor de IC₅₀.

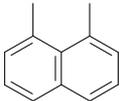
Como se puede observar a partir de los resultados de la Tabla 2.37, los compuestos más activos de la serie **1**, correspondientes a los productos obtenidos a partir de la condensación de Westphal, son los compuestos **1d**, **1g**, **1l** y **1m**, con porcentajes de inhibición superiores al 47%. El compuesto **1a**, tomado de referencia para iniciar la síntesis de derivados de su estructura, muestra un porcentaje de inhibición de 36,20%, bastante inferior al de los compuestos señalados anteriormente. El compuesto **1c** es el que menor inhibición produce frente a PTP-1B.

¹⁵⁷ Sales de piridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxalinio para el tratamiento de infecciones por leishmania y enfermedades en las que está implicada la proteína tirosina fosfatasa 1B. Jimenez, A.; Gutierrez, K.; Moreno, D.; Sánchez-Alonso, P.; Alajarín, R.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J.; Griera, M.; Díez-Marqués, M. L.; Rodríguez-Puyol, D.; Universidad de Alcalá; ES 201331052 (2013).

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 2.37. Porcentajes de inhibición de PTP-1B y valores de IC₅₀ para la serie de compuestos **1**.



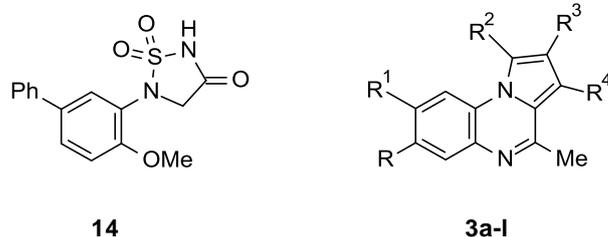
Entrada	Compuesto	R	R ¹	R ²	R ³	Inh. (% 1 μM)	IC ₅₀ (μM)
1	14	-	-	-	-	49,03 ^a	2,47 ^b
2	1a	H	H	H	Me	36,20	-
3	1b	Me	Me	H	Me	35,20	-
4	1c	Me	H	H	Me	26,35	-
5	1d	Cl	Cl	H	Me	47,33	3,31 x 10 ⁻⁶
6	1e	CF ₃	H	H	Me	40,85	-
7	1f	OMe	H	H	Me	33,50	-
8	1g	H	Cl	H	Me	48,50	-
9	1h	Me	Me	Br	Me	41,85	-
10	1i	Me	Me	H	H	41,90	-
11	1j	Me	Me	Br	H	39,90	-
12	1k	H	Cl	H	H	41,45	-
13	1l	Me	Me	H	Et	48,07	2,57 x 10 ⁻⁶
14	1m	H	Cl	H	Et	48,93	1,65 x 10 ⁻⁶
15	1n	H	Cl	Br	Et	37,60	-
16	1o	H	H	H		42,70	-

^aPorcentaje de inhibición a 1,25 μM.

^bIC₅₀ descrito en la referencia 156 empleando el ensayo de *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP).

En la Tabla 2.38 se detallan los resultados de actividad para la serie **3**.¹⁵⁸

Tabla 2.38. Porcentajes de inhibición de PTP-1B y valores de IC₅₀ para la serie de compuestos **3**.



Compuesto	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Inh. (% , 1 μM)	IC ₅₀ (μM)
14	-	-	-	-	-	49,03 ^a	2,47 ^b
3a	H	H	H	H	H	48,55	-
3b	Me	Me	H	H	H	22,10	-
3c	Me	H	H	H	H	30,20	-
3d	Cl	Cl	H	H	H	33,40	-
3e	CF ₃	H	H	H	H	33,80	-
3f	OMe	H	H	H	H	24,20	-
3g	H	Cl	H	H	H	47,90	-
3h	Me	Me	Br	H	H	47,00	1,73 x 10 ⁻⁶
3i	H	Cl	Br	H	H	36,00	-
3j	H	Cl	H	Br	H	50,00	1,81 x 10 ⁻⁶
3k	Me	Me	H	H	Br	27,40	-
3l	Me	Me	Br	Br	H	44,40	-

^aPorcentaje de inhibición a 1,25 μM.

^bIC₅₀ descrito en la referencia 156 empleando el ensayo de *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP).

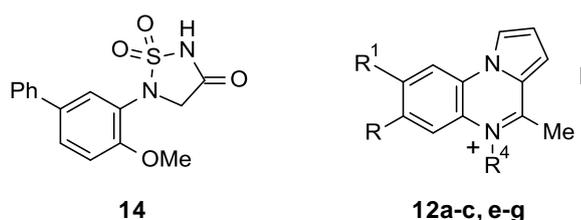
¹⁵⁸ Nuevos compuestos inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B. Sánchez-Alonso, P.; Alajarín, R.; Vaquero, J. J.; Rodríguez-Puyol, M.; Griera, M.; Díez-Marqués, M. L.; Rodríguez-Puyol, D.; Universidad de Alcalá; ES 201330691 (2013).

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los resultados recogidos en la Tabla 2.38, se puede establecer que la introducción de un átomo de bromo en la estructura de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina conduce a un aumento sustancial de la inhibición en el caso de **3b**, mientras que en el caso de los compuestos **3g**, **3i** y **3j** depende de la posición que ocupe el átomo de bromo.

Por último, en las Tablas 2.39 y 2.40 se muestran los resultados de actividad para las series de compuestos **12** y **13**.¹⁵⁸

Tabla 2.39. Porcentajes de inhibición de PTP-1B y valores de IC₅₀ para la serie de compuestos **12**.



Entrada	Compuesto	R	R ¹	R ⁴	Inh. (% 1 μM)	IC ₅₀ (μM)
1	14	-	-	-	49,03 ^a	2,47 ^b
2	2a	H	H	NH ₂	30,20	-
3	12a	H	H	Me	47,33	1,54 x 10 ⁻⁶
4	12b	Me	Me	Me	22,00	-
5	12c	Me	H	Me	44,50	-
6	12e	CF ₃	H	Me	28,85	-
7	12f	OMe	H	Me	40,25	-
8	12g	H	Cl	Me	47,00	-

^aPorcentaje de inhibición a 1,25 μM

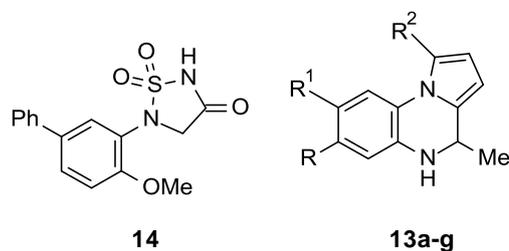
^bIC₅₀ descrito en la referencia 156 empleando el ensayo de *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP)

De la serie **12**, se destaca que los compuestos **12a** y **12g** son los que poseen una mayor acción inhibitoria frente a PTP-1B alcanzando un porcentaje de inhibición en torno a un 47% (Tabla 2.39). Además, la aminación del nitrógeno reduce drásticamente la actividad (Tabla 2.39, entradas 2 y 3).

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De la serie **13**, se observa que a excepción de **13e**, el resto de compuestos de la serie poseen valores de inhibición superiores al 45%. Los compuestos **13a**, **13d** y **13f** presentan los mejores valores de las tres series. Los resultados se recogen en la Tabla 2.40.

Tabla 2.40. Porcentajes de inhibición de PTP-1B y valores de IC₅₀ para la serie de compuestos **13**.



Entrada	Compuesto	R	R ¹	R ²	Inh. (% 1 μM)	IC ₅₀ (μM)
1	14	-	-	-	49,03 ^a	2,47 ^b
2	13a	H	H	H	55,57	8,9 x 10 ⁻⁷
3	13b	Me	Me	H	49,05	-
4	13c	Me	H	H	44,67	1,73 x 10 ⁻⁶
5	13d	Cl	Cl	H	52,60	-
6	13e	CF ₃	H	H	36,70	-
7	13f	OMe	H	H	53,35	1,23 x 10 ⁻⁶
8	13g	H	Cl	H	46,95	-

^aPorcentaje de inhibición a 1,25 μM.

^bIC₅₀ descrito en la referencia 156 empleando el ensayo de *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP).

En la Figura 2.47 se muestra para cada serie los sustituyentes que favorecen la actividad inhibitoria frente a PTP-1B de los compuestos sintetizados.

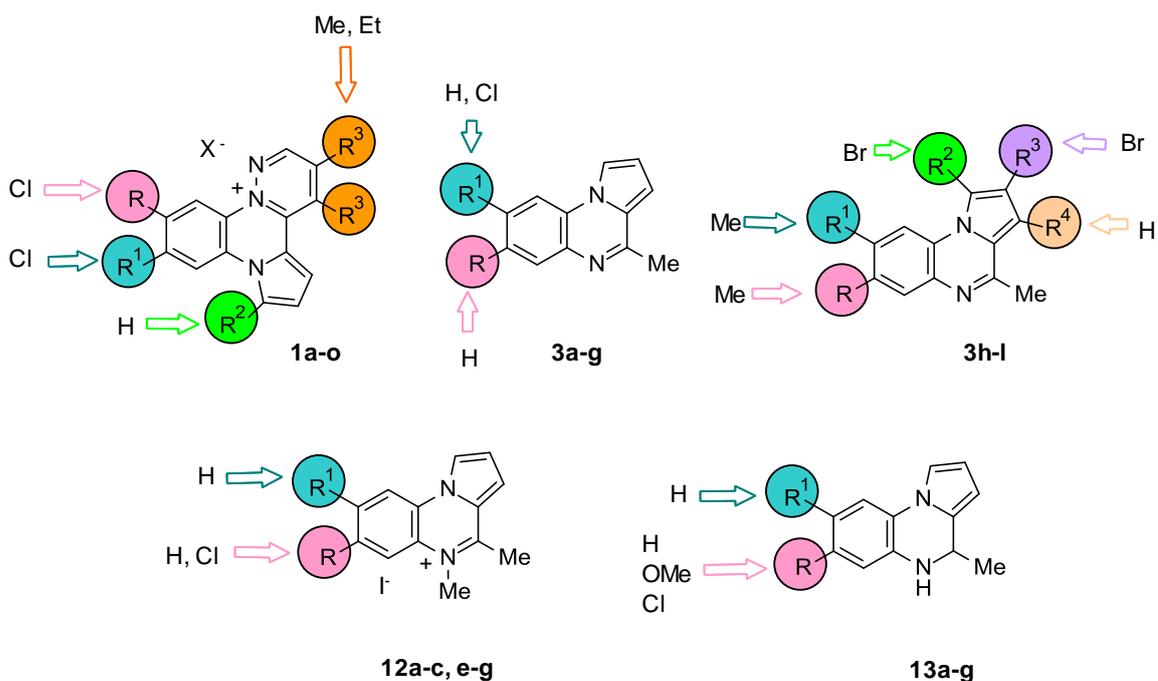


Figura 2.47. Sustituyentes que favorecen la actividad inhibitoria frente a PTP-1B.

En el caso de la serie de compuestos **1**, se observa que en R y R¹ es mejor un átomo de cloro. En R² el sustituyente que produce mayor actividad es el hidrógeno. El empleo tanto de 3,4-hexanodiona como de butanodiona en la condensación de Westphal conducen a similares resultados de actividad (R³ = Me, Et).

Como se puede apreciar para la serie de compuestos **3**, el sustituyente R más favorable para la actividad es un hidrógeno, mientras que R¹ puede ser también un átomo de cloro sin modificar notablemente la actividad inhibitoria.

Para la serie de compuestos **12**, la mejor opción en cualquiera de las dos posiciones estudiadas (R y R¹) es el átomo de hidrógeno, aunque en R un grupo metilo también es aceptable sin modificar notablemente la actividad.

Para la serie de compuestos **13**, R puede tener ser tanto un átomo de hidrógeno como un grupo metoxi o un átomo de cloro, proporcionando mejores actividades que un grupo metilo. R¹ puede ser tanto un átomo de hidrógeno como uno de cloro.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la Figura 2.48 se recoge un gráfico comparativo de la actividad de los mejores compuestos de todas las series evaluadas. Como se puede observar a partir de la Figura 2.48, los compuestos pertenecientes a las familias **1**, **3** y **12** dieron valores de inhibición similares al compuesto de referencia **14**. La familia de compuestos **13** es la más activa en comparación con el compuesto **14** (análisis estadístico *t de Student* (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$), lo que implica que los compuestos **13a** y **13f** poseen una mejor actividad inhibitoria que el compuesto de referencia **14**.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

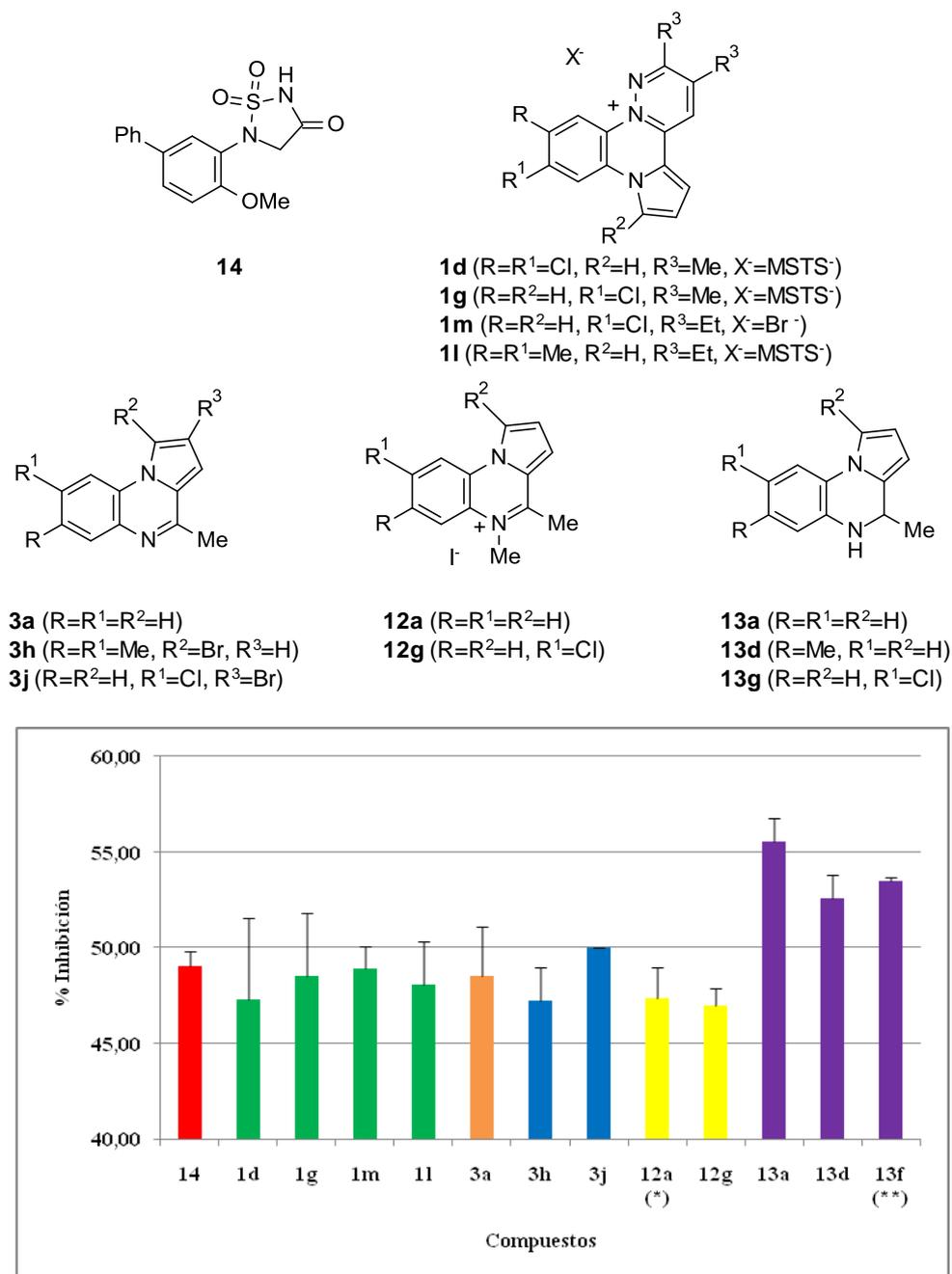


Figura 2.48. Porcentajes de inhibición a una concentración 1 μ M frente a PTP-1B de los mejores compuestos de cada serie.

2.2.4. Estudio de modelado molecular

De manera paralela a la evaluación de la actividad de los distintos compuestos sintetizados, se está llevando a cabo un estudio de modelado molecular realizado por el grupo del Dr. Bernardo Herradón (Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid).

Los dos compuestos elegidos para el estudio inicial de docking fueron los compuestos **1a** y **1g** (Figura 2.49), cuya diferencia estructural reside en la existencia de un átomo de cloro en la posición 10 de la estructura de piridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxalina.

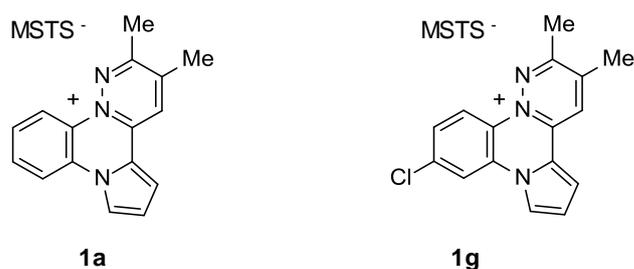


Figura 2.49. Estructura de los inhibidores de PTP1B **1a** y **1g**.

En primer lugar, se seleccionaron las estructuras cristalográficas de la PTP-1B, que servirían como modelo en el estudio de docking. Para ello, se empleó la base de datos *Protein Data Bank* (PDB), y se realizó la comprobación de la eficacia de los modelos elegidos. A continuación, se llevó a cabo el modelado molecular de los compuestos **1a** y **1g** con PTP-1B, estudiando su interacción tanto con el centro alostérico como con los distintos sitios de unión del centro activo, utilizando las estructuras cristalográficas optimizadas de PTP-1B: 1T48¹⁵⁹ y 1Q1M¹⁰⁴ (Figura 2.50), respectivamente.

¹⁵⁹ Wiesmann, C.; Barr, K. J.; Kung, J.; Erlanson, D. A.; Shen, W.; Fahr, B. J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randal, M.; McDowell, R. S.; Hansen, S. K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 730-737.

¹⁰⁴ Liu, G.; Xin, Z.; Pei, Z.; Hajduk, P. J.; Abad-Zapatero, C.; Hutchins, C. W.; Zhao, H.; Lubben, T. H.; Ballaron, S. J.; Haasch, D. L.; Kaszubska, W.; Rondinone, C. M.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4232-4235.

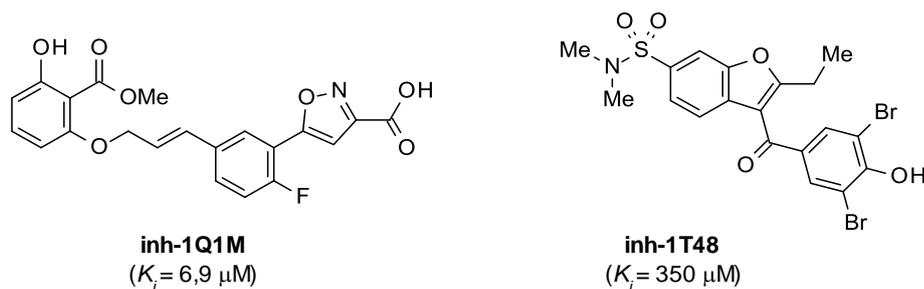


Figura 2.50. Estructura de los inhibidores cocristalizados con las estructuras cristalográficas de PTP-1B: 1Q1M y 1T48, respectivamente.

2.2.4.1. Interacción con los distintos sitios de unión del centro activo

2.2.4.1.1. Interacción con el centro alostérico

Tanto el compuesto **1a** como el compuesto **1g** interactúan con el bolsillo alostérico de manera similar (Figura 2.51). El inhibidor establece múltiples contactos hidrofóbicos con distintos residuos (Ala¹⁸⁹, Leu¹⁹², Phe¹⁹⁶, Lys¹⁹⁷, Phe²⁸⁰, Ile²⁸¹, Lys²⁹² y Trp²⁹¹) y forma un enlace de hidrógeno entre el nitrógeno del anillo de piridazina y la Asn¹⁹³ (Figura 2.52), de manera análoga a como ocurre en el ligando cocristalizado. Analizando la superposición de ambas estructuras (Figura 2.51b), se observa una pequeña variación en su posición absoluta respecto a la enzima, con valores mínimos de desviación del valor cuadrático medio (RMSD: *Root Mean Square Deviation*) de los átomos pesados de 0,17 Å. La mayor variación se encuentra en el átomo de carbono unido al átomo de cloro de **1g**, que se desvía 0,38 Å respecto al equivalente de **1a**, produciendo una distorsión de la planaridad de este anillo aromático para acomodar el átomo de cloro dentro de la cavidad, minimizando así la repulsión estérica con las cadenas laterales de los residuos de Ala¹⁸⁹ y Leu¹⁹² (Figura 2.53). Asimismo, se establece una interacción adicional de tipo areno-areno entre la Phe²⁸⁰ y la nube π del sistema bicíclico de quinoxalino ($d = 3,75\text{-}3,84 \text{ \AA}$) (Figura 2.52).

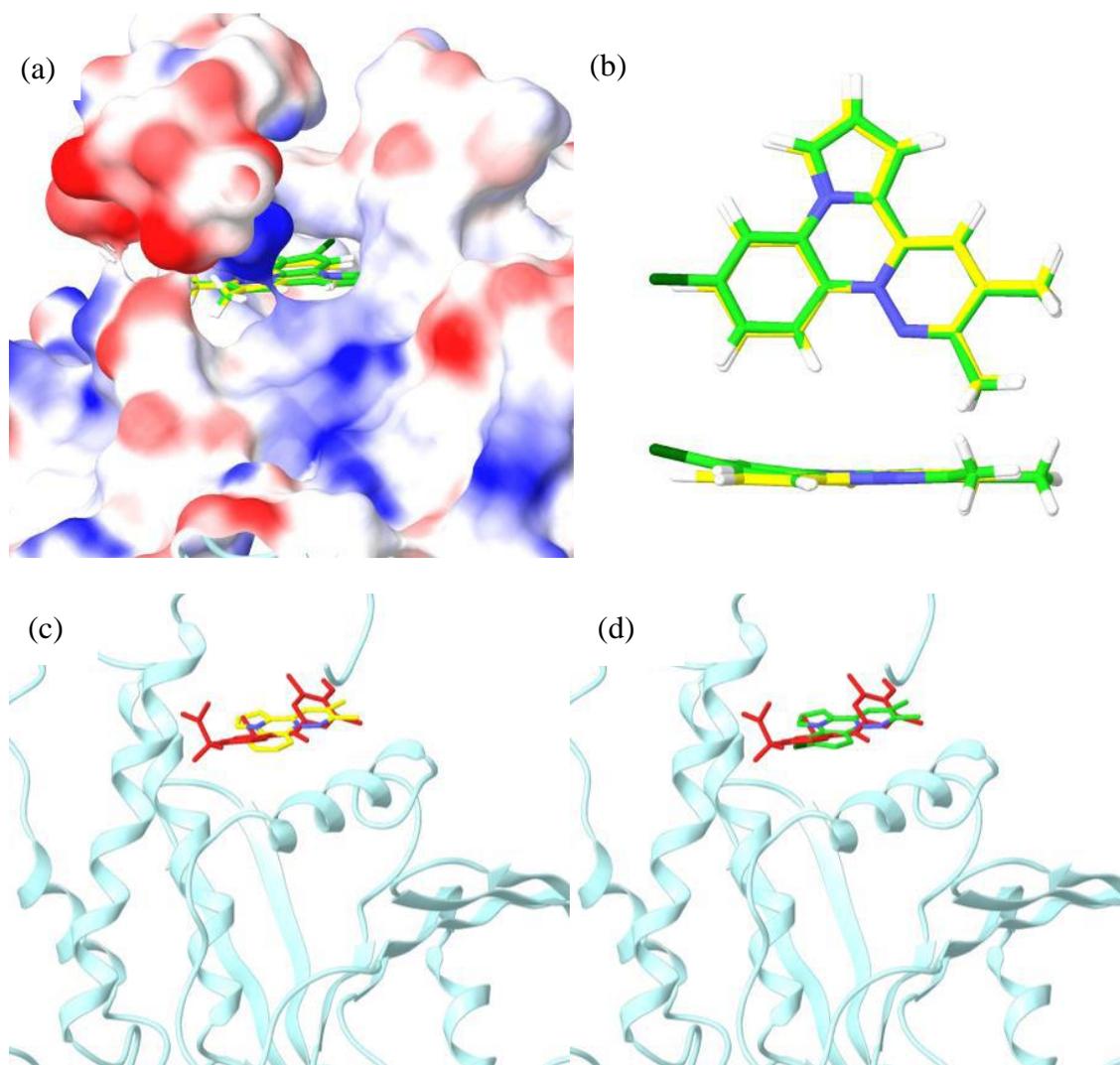


Figura 2.51. (a) Cavity ocupada por los inhibidores **1a** y **1g**. (b) Superposición de la estructura policíclica de los compuestos **1a** y **1g**. (c) Alineamiento de **1a** y el ligando que cocrystaliza en el complejo inhibidor-1T48. (d) Alineamiento de **1g** y el ligando que cocrystaliza en el complejo inhibidor-1T48.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

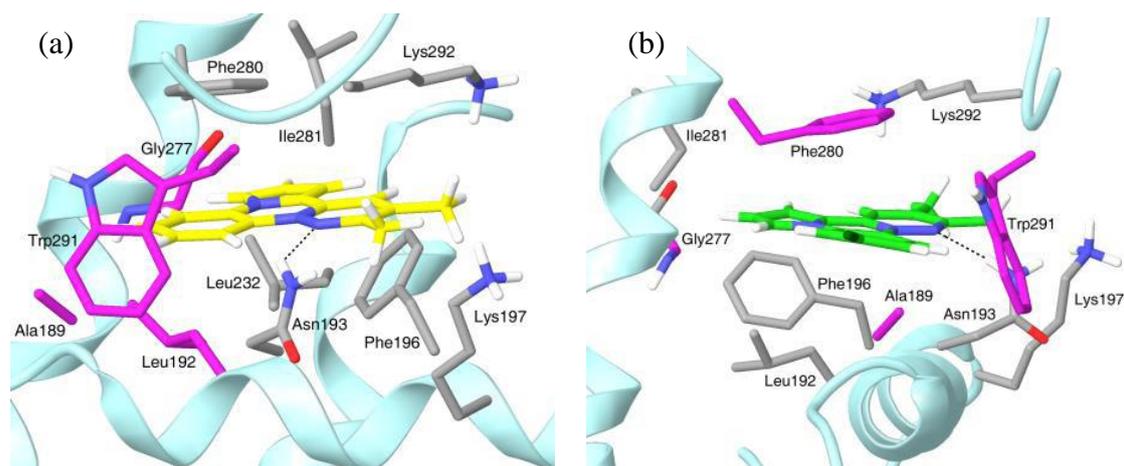


Figura 2.52. Enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de PTP-1B (1T48) con (a) **1a** y (b) **1g**. En color morado se indican los residuos con una componente de Van der Waals más negativa.

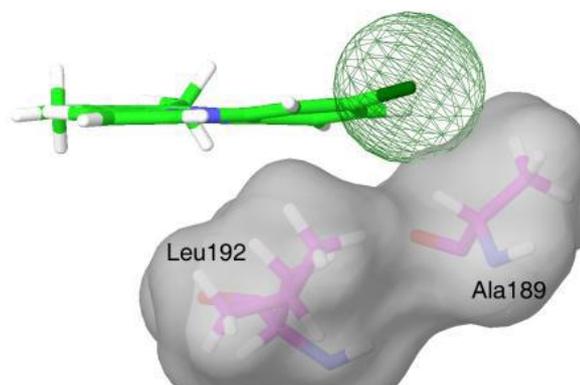


Figura 2.53

Las afinidades predichas por XP-GlideScore son -4,5 para **1g** (% I(1 μ M) = 48,5) y -4,1 para **1a** (% I(1 μ M) = 36,20), siendo muy inferiores a la obtenida para el complejo inhibidor-1T48 (XP-GlideScore = -11,08) de $IC_{50} = 350 \mu$ M.

2.2.4.1.2. Interacción con el sitio catalítico

Los compuestos **1a** y **1g** interactúan de manera distinta con el centro catalítico de PTP-1B (Figura 2.54), como se comprueba por el alto valor de distancia media cuadrática (RMS) de 5,75 Å entre los átomos del esqueleto policíclico (5,00 Å en el modo de interacción con la Cys²¹⁵ neutra). Además, el modo de interacción es dependiente del estado de protonación de Cys²¹⁵ como demuestran los elevados valores de RMS calculados con los átomos pesados de las dos estructuras de **1a** (3,64 Å) y **1g** (4,44 Å) que interactúan con ambos estados de la proteína. Sin embargo, el estado aniónico o neutro de la Cys²¹⁵ no condiciona la interacción, y tan sólo se producen mínimas variaciones en la posición global que ocupa el complejo. Es decir, tanto el modelo de docking con la forma aniónica de la enzima como con la forma neutra generan un mismo modo de interacción.

Con este estudio de docking se puede concluir que los compuestos **1a** y **1g** interactúan con el centro alostérico de manera similar a como lo hace el ligando que cocrystaliza en el complejo inhibidor-1T48 aunque las afinidades predichas por XP-GlideScore son inferiores a la obtenida para el ligando cocrystalizado. En el caso de la interacción con el centro catalítico los dos compuestos interactúan de manera diferente, siendo esta interacción dependiente del estado de protonación de la Cys²¹⁵.

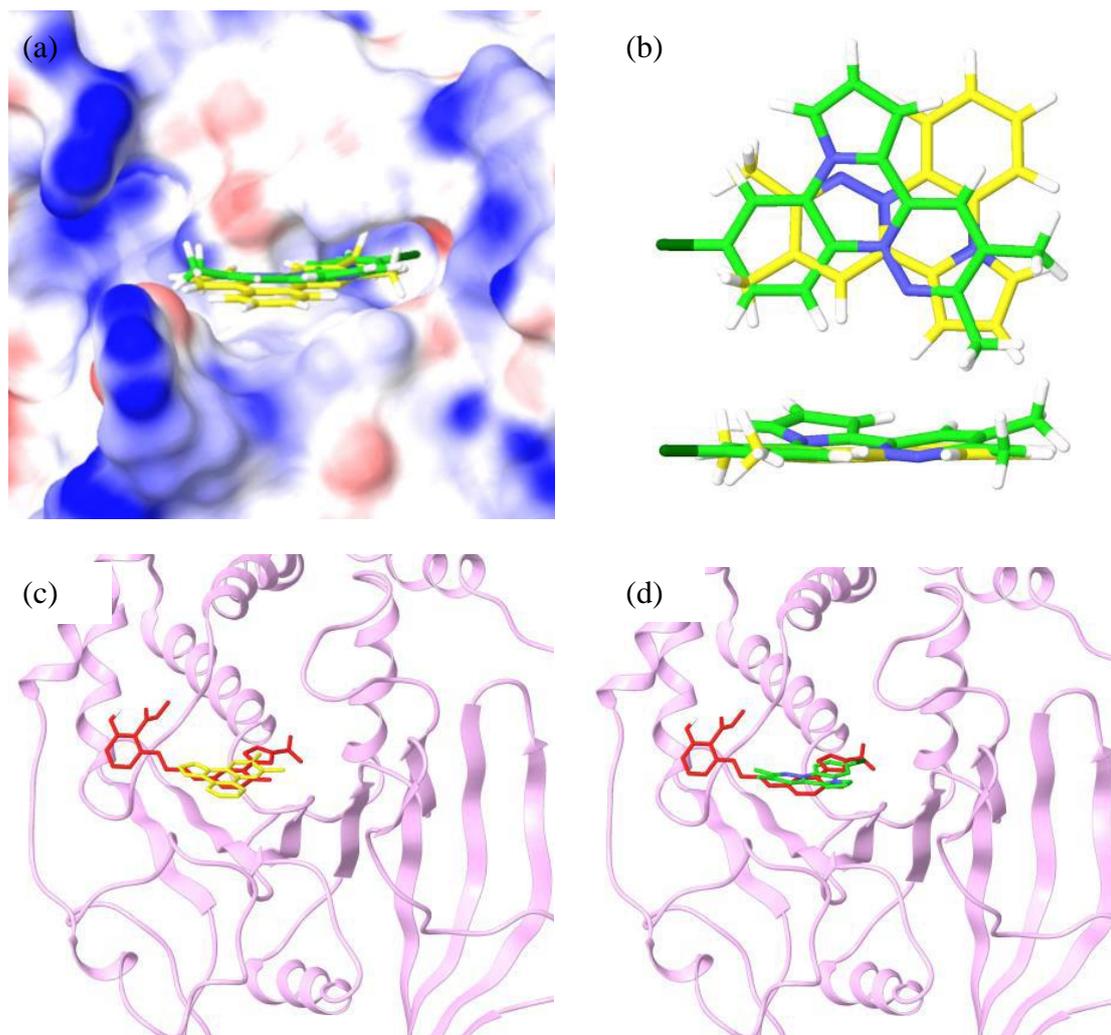


Figura 2.54. (a) Cavidad ocupada por los compuestos **1a** y **1g**. (b) Superposición de la estructura policíclica de los compuestos **1a** y **1g**. (c) Alineamiento de **1a** y ligando que cocrystaliza en el complejo inhibidor-1Q1M. (d) Alineamiento de **1g** y ligando que cocrystaliza en el complejo inhibidor-1Q1M.

Los reactivos utilizados se adquirieron de las casas comerciales *Aldrich* y *Acros* y se utilizaron sin ningún tratamiento posterior.

Las reacciones que exigieron condiciones anhidras se llevaron a cabo en atmósfera de argón desoxigenado y seco. Los disolventes anhidros utilizados se secaron por destilación sobre un agente desecante adecuado, en atmósfera de argón, inmediatamente antes de su uso,¹⁶⁰ o se hicieron pasar a través de una columna de alúmina anhidra bajo atmósfera inerte.¹⁶¹

Las adiciones de disolventes y disoluciones en condiciones anhidras se realizaron vía jeringa o cánula.

Para las reacciones a baja temperatura se utilizó una sonda de refrigeración *Haake* EK 101.

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos en un aparato *GallenKamp* y se dan sin corregir.

Para la cromatografía en columna se empleó gel de sílice *Merck* (230-400 mesh) o alúmina neutra *Fluka* (0,05-0,15 mm). El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones se indican volumen/volumen. Para la cromatografía analítica en capa fina se emplearon los cromatofolios de gel de sílice *Merk* 60 F₂₅₄ o los de alúmina neutra *Polygram Alox N/UV₂₅₄* de Machery-Nagel. En todos los casos el revelado de las placas se realizó con el visor de luz UV.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C se han registrado en los siguientes aparatos: *Varian* UNITY-300; *Varian-Mercury-VX-300* (300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C), *Varian Gemini* 200 (200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C) y en algunos casos *Varian* UNITY^{Plus}-500 (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C). Para disolver las muestras se empleó CDCl₃, CD₃OD, acetona-*d*₆ y DMSO-*d*₆ de la casa *SDS*. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en unidades de δ (ppm), utilizando como referencia interna la señal residual del disolvente y las constantes de acoplamiento en Hz.

¹⁶⁰ Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemical*, Ed. Elsevier, **2009**.

¹⁶¹ Sistema de purificación de disolventes M. Braun SPS-800.

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro *Perkin-Elmer modelo FTIR 1725X* en las condiciones indicadas en cada compuesto (pastilla de KBr ó ventanas de NaCl) y las frecuencias de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1}

Los espectros de masas (EM) utilizando técnicas de ionización química (IQ) e impacto electrónico (IE) se realizaron en un espectrómetro *Hewlett-Packard 5988A* (70eV) y en los de ES+ en un *HP 1100MSD* con analizador de trampa de iones *LCQ deca XP plus* de la casa *Thermo*. Los espectros de masas de alta resolución se realizaron en un *Agilent 6210 Time-of-flight LC/MS*. Los datos se expresan en unidades de masa (m/e).

El microondas modelo *Initiator 2.5* de Biotage se ha utilizado para las reacciones por calentamiento mediante microondas.

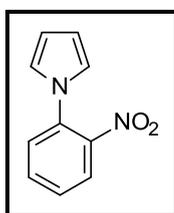
2.3. PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1. Síntesis de 1H-1-(2-nitrofenil)pirroles

Procedimiento General: A una disolución de la correspondiente anilina (1 eq.) en ácido acético (3 mL/mmol) se le adiciona, gota a gota, 2,5-dimetoxitetrahydrofurano (1,1 eq.). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante el tiempo indicado. Posteriormente, se enfría y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se disuelve en AcOEt (1,5 mL/mmol) y se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 0,78 mL/mmol), NaCl (sat) (3 x 0,78 mL/mmol) y se seca con MgSO₄ anhidro. Se filtra y se concentra a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice empleando el eluyente indicado en cada caso.

▪ 1H-1-(2-nitrofenil)pirrol (4a)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 2-nitroanilina **5a** (4,47 g; 32,3 mmol), calentando a reflujo durante 1,5 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 4,41 g (72%) de **4a** como un sólido rojo.

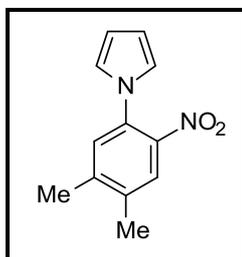


Rendimiento: 72%. **P.f.:** 56 °C (*Lit*¹⁶²: 55 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ :** 7,83 (dd, 1H, $J = 8,3$ Hz, $J = 1,5$ Hz, H-3); 7,64 (td, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,7$ Hz, H-6); 7,45 (m, 2H, H-4 y H-5); 6,78 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,3 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol) ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₀H₉N₂O₂: [M+H]⁺: 189,0664; encontrado [M+H]⁺: 189,0672.

¹⁶² Guillon, J.; Dallemagne, P.; Pfeiffer, B., Renard, P.; Manechez, D.; Kervran, A.; Rault, S. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 293-308.

▪ **1H-1-(4,5-dimetil-2-nitrofenil)pirrol (4b)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 4,5-dimetil-2-nitroanilina **5b** (4,02 g; 24,2 mmol), calentando durante 45 minutos, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 5,13 g (98%) de **4b** como un sólido marrón.



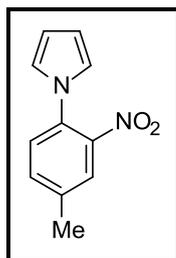
Rendimiento: 98%. **P.f.:** 58-59 °C (*Lit*¹⁶³: 60-61 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 7,66 (s, 1H, H-3); 7,19 (s, 1H, H-6); 6,74 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,31 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol); 2,34 (s, 6H, 2 CH₃) ppm. **¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃)** δ : 143,2; 136,8; 132,0; 128,9; 125,7; 121,4 (2C); 110,5 (2C); 110,4; 19,8; 19,3 ppm. **HRMS (ESI⁺)** m/e calculado para C₁₂H₁₃N₂O₂: [M+H]⁺: 217,0977; encontrado [M+H]⁺: 217,0970.

▪ **1H-1-(4-metil-2-nitrofenil)pirrol¹⁶⁴ (4c)**

A partir de 4-metil-2-nitroanilina **5c** (4,34 g; 28,5 mmol), calentando la mezcla de reacción a reflujo durante 50 minutos, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (9:1), se obtienen 4,77 g (83%) de **4c** como un aceite naranja.

¹⁶³ Campiani, G.; Morelli, E.; Gemma, S.; Nacci, V.; Butini, S.; Hamon, M.; Novellino, E.; Greco, G.; Cagnotto, A.; Goegan, M.; Cervo, L.; Dalla Valle, F.; Fracasso, C.; Caccia, S.; Mennini, T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4362-4379.

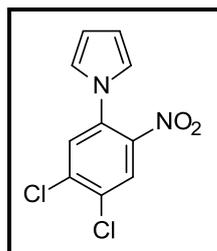
¹⁶⁴ Cheeseman, G. W. H.; Hawi, A. A. *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, *22*, 423-427.



Rendimiento: 83%. $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,64 (s, 1H, H-3); 7,43 (dd, 1H, $J = 8,1$ Hz; $J = 1,3$ Hz, H-5); 7,33 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 6,75 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,33 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol); 2,45 (s, 3H, CH_3) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 144,8; 138,3; 133,7; 131,5; 127,6; 124,8; 121,2 (2C); 110,5 (2C); 20,7 ppm. **HRMS (ESI⁺)** m/e calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 203,0821; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 203,0816.

▪ **1-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-1H-pirrol (4d)**

Según el procedimiento general descrito anteriormente, a partir de 4,5-dicloro-2-nitroanilina **5d** (2,13 g; 10,3 mmol), calentando durante 4 horas, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (9:1), se obtienen 2,61 g (99%) de **4d** como un sólido rojizo.

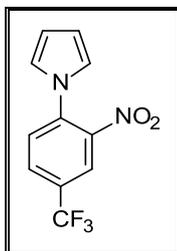


Rendimiento: 99%. **P.f.:** 71-72 °C (*Lit*¹⁶²: 70 °C). $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,98 (s, 1H, H-3); 7,57 (s, 1H, H-6); 6,73 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,36 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 142,9; 137,7; 133,3; 131,5; 129,1; 126,5; 121,1 (2C); 111,7 (2C) ppm. **HRMS (ESI⁺)** m/e calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 256,9885; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 256,9888.

¹⁶² Guillon, J.; Dallemagne, P.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Manechez, D.; Kervran, A.; Rault, S. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, 33, 293-308.

▪ **1H-1-(2-nitro-4-trifluorometilfenil)pirrol**¹⁶⁵ (**4e**)

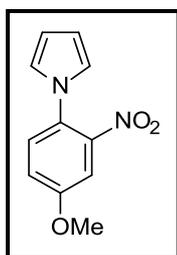
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 2-nitro-4-trifluorometilanilina **5e** (3,94 g; 19,1 mmol), calentando durante 1 hora, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (9:1) y posterior microdestilación a presión reducida (128 °C / 2 mm Hg), se obtienen 2,92 g (60%) de **4e** como un aceite marrón.



Rendimiento: 60%. **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 8,09 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-3); 7,89 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-5); 7,60 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-6); 6,79 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,39 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol) ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₁H₇F₃N₂O₂: [M+H]⁺: 257,0532; encontrado [M+H]⁺: 257,0600.

▪ **1H-1-(4-metoxi-2-nitrofenil)pirrol** (**4f**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 4-metoxi-2-nitroanilina **5f** (4,09 g; 24,3 mmol), manteniendo la calefacción durante 3 horas, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 4,75 g (90%) de **4f** como un sólido rojizo.

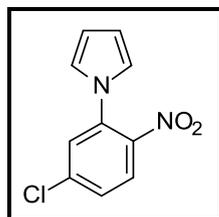


¹⁶⁵ Campiani, G.; Nacci, V.; Corelli, F.; Anzini, M. *Synthetic Commun.* **1991**, 21 (15&16), 1567-1576.

Rendimiento: 90%. **P.f.:** 56-58 °C (*Lit*¹³⁴: 57 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 7,35 (m, 2H, H-3 y H-6); 7,14 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H-5); 6,72 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,31 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol); 3,88 (s, 3H, OCH₃) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 158,6; 145,9; 129,3; 127,3; 121,7 (2C); 119,1; 110,3 (2C); 109,4; 56,1 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₁H₁₁N₂O₃: [M+H]⁺: 219,0770; encontrado [M+H]⁺: 219,0763.

▪ **1-(5-cloro-2-nitrofenil)-1H-pirrol (4g)**

Según el procedimiento general descrito anteriormente, a partir de 5-cloro-2-nitroanilina **5g** (4,09 g; 23,7 mmol), calentando la mezcla de reacción a reflujo durante 1,5 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (9:1), se obtienen 4,82 g (92%) de **4g** como un sólido rojizo.



Rendimiento: 92%. **P.f.:** 75-76 °C (*Lit*¹³⁴: 73 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 7,81 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-3); 7,46 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-6); 7,41 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H-4); 6,76 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,35 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol) ppm. **¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃)** δ : 143,0; 139,2; 135,3; 127,8; 127,5; 126,2; 121,1 (2C); 111,6 (2C) ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₀H₇N₂O₂Cl: [M+H]⁺: 223,0269; encontrado [M+H]⁺: 223,0276.

¹³⁴ Guillon, J.; Grellier, P.; Labaied, M.; Sonnet, P.; Léger, J.-M.; Déprez-Poulain, R.; Forfar-Bares, I.; Dallemagne, P.; Lemaitre, N.; Péhourcq, F.; Rochette, J.; Sergheraert, C.; Jarry, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997-2009.

2.3.2. Síntesis de 2-(1*H*-pirrol-1-il)anilinas

Procedimiento general A: Una disolución de nitroareno (1 eq.) en etanol (4,6 mL/mmol) se añade, gota a gota, sobre una suspensión de Pd/C (10%) (0,05 eq.) en HCl (35 μ L/mmol). Una vez finalizada la adición, se añade lentamente una disolución de N₂H₄·H₂O (4 eq.) sobre la misma. La mezcla de reacción se agita durante el tiempo indicado en cada caso. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtra sobre Celite[®] y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (4:1).

Procedimiento general B¹⁶⁶: A una disolución de nitroareno (1 eq.) disuelto en etanol (0,44 mL/mmol) se le adiciona SnCl₂·2H₂O (5 eq.). La mezcla de reacción se calienta a 70 °C durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizado ese tiempo, se deja enfriar y se adiciona hielo. A continuación, la mezcla de reacción se basicifica hasta pH = 7-8 con una disolución de NaHCO₃ (5%) y se extrae con AcOEt (3 x 0,68 mL/mmol). Los extractos orgánicos se reúnen y se lavan con una disolución saturada de NaCl (3 x 0,68 mL/mmol), se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice, según se indica en cada compuesto.

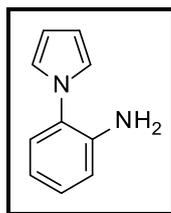
Procedimiento general C¹⁶³: Una disolución de nitroareno (1 eq.) y SnCl₂·2H₂O (5 eq.) en etanol (63 mL) se calienta a reflujo bajo atmósfera de argón durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación, se enfría y se ajusta el pH de la misma hasta 8 utilizando una disolución saturada de NaHCO₃. Se filtra sobre Celite[®], se lava con etanol y se concentra a sequedad. El crudo se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con la mezcla de disolvente indicada en cada caso.

▪ 2-(1*H*-pirrol-1-il)anilina (7a)

Siguiendo el procedimiento general A, a partir de **4a** (4,11 g; 21,8 mmol), agitando la mezcla de reacción durante 5,5 horas y purificando, se obtienen 3,15 g (91%) de **7a** como un sólido amarillo.

¹⁶⁶ Bellamy, F. D.; Ou, K. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 839-842.

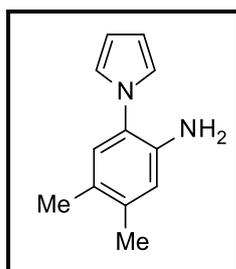
¹⁶³ Campiani, G.; Morelli, E.; Gemma, S.; Nacci, V.; Butini, S.; Hamon, M.; Novellino, E.; Greco, G.; Cagnotto, A.; Goegan, M.; Cervo, L.; Dalla Valle, F.; Fracasso, C.; Caccia, S.; Mennini, T. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4362-4379.



Rendimiento: 91%. **P.f.:** 98–100 °C (*Lit*¹⁶²: 98 °C). **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)** δ : 7,15 (td, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,6$ Hz, H-4); 7,08 (dd, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-3); 6,89 (dd, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-6); 6,83 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,75 (td, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-5); 6,03 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 141,9; 128,5; 127,4; 127,1; 121,6 (2C); 118,4; 116,0; 109,3 (2C) ppm. **HRMS (ESI⁺)** m/e calculado para C₁₀H₁₁N₂: [M+H]⁺: 159,0922; encontrado [M+H]⁺: 159,0920.

▪ **4,5-dimetil-2-(1H-pirrol-1-il)anilina (7b)**

Seguendo el procedimiento general B, a partir de **4b** (4,60 g; 21,3 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 1,5 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 2,87 g (62%) de **7b** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 62%. **P.f.:** 84–85 °C (*Lit*¹⁶³: 83–85 °C). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 6,92 (s, 1H, H-3); 6,80 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,62 (s, 1H, H-6); 6,31 (t, 2H,

¹⁶² Guillon, J.; Dallemagne, P.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Manechez, D.; Kervran, A.; Rault, S. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 293-308.

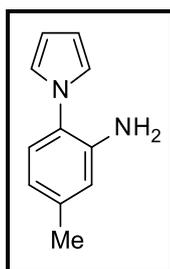
¹⁶³ Campiani, G.; Morelli, E.; Gemma, S.; Nacci, V.; Butini, S.; Hamon, M.; Novellino, E.; Greco, G.; Cagnotto, A.; Goegan, M.; Cervo, L.; Dalla Valle, F.; Fracasso, C.; Caccia, S.; Mennini, T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4362-4379.

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

$J = 2,0$ Hz, H- β pirrol); 3,51 (s_{ancho} , 2H, NH₂); 2,21 (s, 3H, CH₃); 2,16 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 139,4; 136,9; 127,9; 126,5; 125,3; 121,7 (2C); 117,5; 109,0 (2C); 19,5; 18,6 ppm. HRMS (ESI⁺) m/e calculado para C₁₂H₁₅N₂: [M+H]⁺: 187,1235; encontrado [M+H]⁺: 187,1240.

▪ 5-metil-2-(1H-pirrol-1-il)anilina (7c)

A partir de **4c** (4,47 g; 22,1 mmol), calentando la mezcla de reacción durante una hora, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (9:1), tal y como se indica en el procedimiento general B, se obtienen 3,05 g (80%) de **7c** como un sólido marrón.

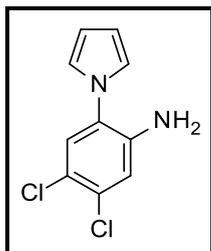


Rendimiento: 80%. **P.f.:** 89 °C (*Lit*¹⁶⁴: 89-90 °C). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,03 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-3); 6,81 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,60 (m, 2H, H-4 y H-6); 6,33 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- β pirrol); 3,63 (s_{ancho} , 2H, NH₂); 2,31 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 141,7; 138,5; 126,9; 125,1; 121,8 (2C); 119,1; 116,5; 109,1 (2C); 21,2 ppm. HRMS (ESI⁺) m/e calculado para C₁₁H₁₃N₂: [M+H]⁺: 173,1079; encontrado [M+H]⁺: 173,1074.

▪ 4,5-dicloro-2-(1H-pirrol-1-il)anilina (7d)

Siguiendo el procedimiento general C, a partir de **4d** (2,78 g; 10,8 mmol), calentando a reflujo durante 30 minutos, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (1:4), se obtienen 1,80 g (74%) de **7d** como un sólido naranja.

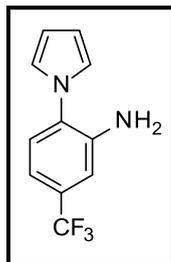
¹⁶⁴ Cheeseman, G. W. H.; Hawi, A. A. *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, 22, 423-427.



Rendimiento: 74%. **P.f.:** 57-58 °C (*Lit*¹⁶²: 58 °C). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,21 (s, 1H, H-3); 6,87 (s, 1H, H-6); 6,76 (t, 2H, *J* = 2,0 Hz, H- α pirrol); 6,32 (t, 2H, *J* = 2,0 Hz, H- β pirrol); 3,88 (*s*_{ancho}, 2H, NH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 141,5; 131,9; 128,3; 126,6; 121,4 (2C); 120,5; 116,8; 110,1 (2C) ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₀H₉N₂Cl₂: [M+H]⁺: 227,0143; encontrado [M+H]⁺: 227,0133.

▪ **5-trifluorometil-2-(1*H*-pirrol-1-il)anilina (7e)**

Seguendo el procedimiento general C, a partir de **4e** (2,92 g; 11,4 mmol), calentando a reflujo durante 4,5 horas, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 1,33 g (52%) de **7e** como un sólido naranja.



Rendimiento: 52%. **P.f.:** 93-95 °C (*Lit*¹⁶⁷: 92-94 °C). **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)** δ : 7,23 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-3); 7,16 (d, 1H, *J* = 1,4 Hz, H-6); 6,98 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,4 Hz, H-4); 6,90 (t, 2H, *J* = 2,0 Hz, H- α pirrol); 6,35 (t, 2H, *J* = 2,0 Hz, H- β pirrol) ppm. **¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃)** δ : 141,6; 129,4 (c, ²*J*_{CF} = 32,2 Hz); 129,3;

¹⁶² Guillon, J.; Dallemagne, P.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Manechez, D.; Kervran, A.; Rault, S. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 293-308.

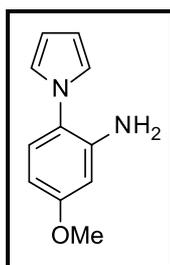
¹⁶⁷ Alleca, S.; Corona, P.; Loriga, M.; Paglietti, G.; Loddo, R.; Mascia, V.; Busonera, B.; La Colla, P. *Il Farmaco* **2003**, *58*, 639-650.

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

126,8; 123,3 (c, $^1J_{CF} = 272,4$ Hz); 120,8 (2C); 114,9 (c, $^3J_{CF} = 3,8$ Hz); 112,6 (c, $^3J_{CF} = 3,8$ Hz); 110,0 (2C) ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₁H₉N₂F₃: [M+H]⁺: 227,0791; encontrado [M+H]⁺: 227,0796.

▪ 5-metoxi-2-(1*H*-pirrol-1-il)anilina¹³⁴ (**7f**)

Tal y como se describe en el procedimiento general B, a partir de **4f** (3,54 g; 16,2 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 30 minutos, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 2,30 g (75%) de **7f** como un aceite naranja.

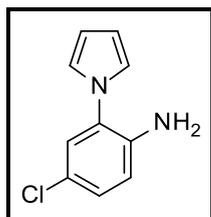


Rendimiento: 75%. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,05 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz, H-3); 6,76 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,32 (m, 4H, H-4, H-6, H- β pirrol); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 3,66 (s_{ancho} , 2H, NH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 159,8; 143,3; 128,1; 122,0 (2C); 121,2; 109,1 (2C); 103,6; 101,0; 55,4 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₁H₁₃N₂O: [M+H]⁺: 189,1028; encontrado [M+H]⁺: 189,1035.

▪ 4-cloro-2-(1*H*-pirrol-1-il)anilina (**7g**)

Siguiendo el procedimiento general C, a partir de **4g** (4,82 g; 21,7 mmol), calentando la mezcla de reacción a reflujo durante 30 minutos y purificación por cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 2,81 g (67%) de **7g** como un sólido naranja.

¹³⁴ Guillon, J.; Grellier, P.; Labaied, M.; Sonnet, P.; Léger, J.-M.; Déprez-Poulain, R.; Forfar-Bares, I.; Dallemagne, P.; Lemaitre, N.; Péhourcq, F.; Rochette, J.; Sergheraert, C.; Jarry, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997-2009.



Rendimiento: 67%. **P.f.:** 88-89 °C (*Lit*¹³⁴: 87 °C). **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)** δ : 7,13 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H-5); 7,09 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-3); 6,70 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-6); 6,85 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,32 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- β pirrol) ppm. **¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃)** δ : 140,6; 128,3; 127,9; 126,9; 122,5; 121,4 (2C); 116,8; 109,8 (2C) ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₀H₁₀N₂Cl: [M+H]⁺: 193,0533; encontrado [M+H]⁺: 193,0468.

2.3.3. Síntesis de 2-(1H-pirrol-1-il)acetanilidas

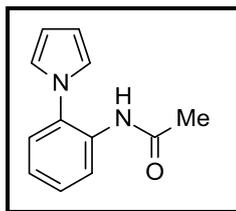
Procedimiento general: Una disolución de la correspondiente 2-pirrol-1-ilanilina (1 eq.) en una mezcla 1:1 de ácido acético y anhídrido acético (4 mL/mmol) se calienta a 120 °C durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación se deja enfriar la mezcla de reacción y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se disuelve en la mínima cantidad de AcOEt y se lava con NaCl (sat) (3 x 3,5 mL/mmol), se seca con MgSO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con la mezcla de disolventes indicada en cada caso.

▪ 2-(1H-pirrol-1-il)acetanilida¹³¹ (**9a**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7a** (2,28 g; 14,4 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 20 minutos, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 2,69 g (93%) de **9a** como un sólido naranja.

¹³⁴ Guillon, J.; Grellier, P.; Labaied, M.; Sonnet, P.; Léger, J.-M.; Déprez-Poulain, R.; Forfar-Bares, I.; Dallemagne, P.; Lemaitre, N.; Péhourcq, F.; Rochette, J.; Sergheraert, C.; Jarry, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997-2009.

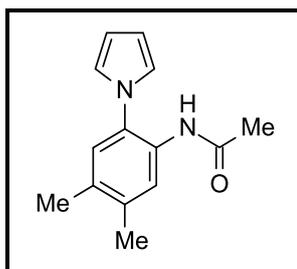
¹³¹ Cheeseman, G. W. H.; Tuck, B. *J. Chem. Soc.* **1966**, 852-855.



Rendimiento: 93%. **P.f.:** 76-78 °C (*Lit*¹³¹: 73,5- 74,5 °C). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 8,34 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,36 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,7$ Hz, H-5); 7,25 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,7$ Hz, H-3); 7,13 (t_{ap}, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 7,2$ Hz, H-4); 6,96 (s_{ancho}, 1H, NH); 6,77 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,38 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol); 2,03 (s, 3H, CH₃CONH) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 168,3; 133,6; 130,5; 128,7; 126,7; 124,1; 121,9 (2C); 121,4; 110,4 (2C); 24,7 ppm.

- **4,5-dimetil-2-(1H-pirrol-1-il)acetanilida (9b) y 4,5-dimetil-2-(1H-pirrol-1-il)acetimida (10b)**

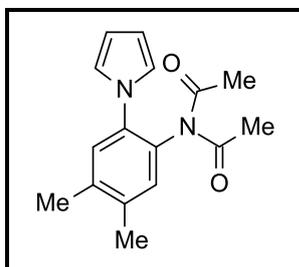
Seguendo el procedimiento general, a partir de **7b** (2,37 g; 12,7 mmol), calentando durante 15 minutos, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 2,65 g (91%) de **9b** como un sólido amarillo y 0,16 g (5%) de **10b** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 91%. **P.f.:** 138-139 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3251,4; 2917,1; 1667,0; 1592,4; 1530,2; 1451,4; 1407,9; 1368,1; 1338,5; 1320,0; 1290,5; 1266,0; 1090,0; 1070,1; 1021,9; 918,4; 870,2; 732,3; 629,7; 592,7 cm⁻¹. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 8,05 (s, 1H, H-6); 7,02 (s, 1H, H-3); 6,84 (s_{ancho}, 1H, NH); 6,74 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,34 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- β pirrol); 2,28 (s, 3H, CH₃); 2,22 (s, 3H, CH₃); 2,00 (s, 3H,

¹³¹ Cheeseman, G. W. H.; Tuck, B. *J. Chem. Soc.* **1966**, 852-855.

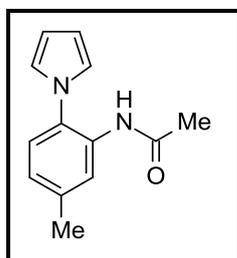
CH₃CONH) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 168,3; 137,2; 132,9; 130,8; 128,5; 127,5; 122,8; 122,0 (2C); 110,1 (2C); 24,6; 19,7; 19,1 ppm. HRMS (ESI⁺) m/e calculado para C₁₄H₁₆N₂O: [M+H]⁺: 229,1335; encontrado [M+H]⁺: 229,1411.



Rendimiento: 5%. IR (NaCl) ν_{máx}: 3017,6; 1719,2; 1512,6; 1367,6; 1338,8; 1244,5; 1069,9; 1033,4; 986,8; 756,0; 636,5 cm⁻¹. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,20 (s, 1H, H-6); 6,98 (s, 1H, H-3); 6,64 (t, 2H, J = 2.0 Hz, H-α pirrol); 6,24 (t, 2H, J = 2,2 Hz, H-β pirrol); 2,30 (s, 3H, CH₃); 2,29 (s, 3H, CH₃); 2,16 (s, 6H, CH₃CONH) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 173,2 (2C); 139,2; 137,4; 136,2; 131,5; 130,9; 128,4; 121,4 (2C); 109,8 (2C); 26,3 (2C); 19,5; 19,4 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₁₆H₁₉N₂O₂: [M+H]⁺: 271,1441; encontrado [M+H]⁺: 271,1452.

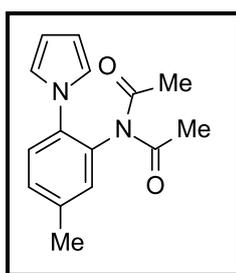
- **5-metil-2-(1H-pirrol-1-il)acetanilida (9c) y 5-metil-2-(1H-pirrol-1-il)acetimida (10c)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7c** (2,53 g; 14,7 mmol), calentando durante 30 minutos, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 2,43 g (77%) de **9c** como un sólido amarillo y 0,56 g (15%) de **10c** como un sólido amarillo.



CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

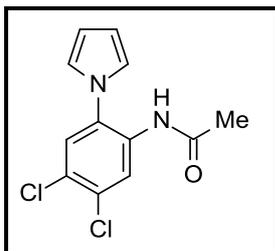
Rendimiento: 77%. **P.f.:** 114-116 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3312,7; 3138,0; 3104,6; 1663,7; 1589,1; 1533,3; 1496,5; 1416,5; 1328,8; 1289,9; 1252,3; 1102,9; 1074,9; 1066,2; 1012,8; 965,7; 950,7; 914,1; 879,2; 821,5; 731,6; 662,6; 630,7; 618,6; 588,9; 554,9 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ :** 8,16 (s, 1H, H-6); 7,13 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-4); 6,94 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-3); 6,87 (s_{ancho} , 1H, NH); 6,74 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,36 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- β pirrol); 2,38 (s, 3H, CH_3); 2,01 (s, 3H, CH_3CONH) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ :** 168,3; 138,9; 133,2; 128,1; 126,4; 124,8; 122,1 (2C); 121,9; 110,2 (2C); 24,7; 21,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$:** $[\text{M}+\text{H}]^+$: 215,1184; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 215,1190.



Rendimiento: 15%. **P.f.:** 123-124 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 1715,5; 1514,6; 1369,1; 1333,2; 1234,8; 1063,8; 1019,4; 959,6; 818,4; 729,2; 636,1; 563,9 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,29 (m, 2H, H-3, H-4); 7,04 (s, 1H, H-6); 6,64 (t, 2H, $J = 2,2$ Hz, H- α pirrol); 6,25 (t, 2H, $J = 1,9$ Hz, H- β pirrol); 2,40 (s, 3H, CH_3); 2,16 (s, 6H, CH_3CON) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ :** 173,0 (2C); 138,8; 136,2; 134,0; 130,9; 130,8; 127,2; 121,5 (2C); 109,9 (2C); 26,2 (2C); 20,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 257,1290; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 257,1301.

▪ **4,5-dicloro-2-(1H-pirrol-1-il)acetanilida (9d)**

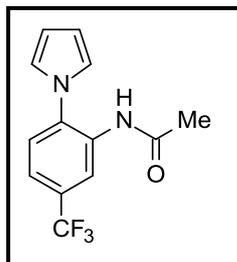
Según se describe en el procedimiento general, a partir de **7d** (2,82 g; 12,4 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 10 minutos, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 2,69 g (81%) de un sólido amarillo **9d**.



Rendimiento: 81%. **P.f.:** 143-144 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3355,6; 3131,8; 3029,2; 1691,6; 1573,5; 1481,2; 1385,9; 1328,8; 1306,9; 1279,0; 1238,7; 1142,3; 1114,8; 1066,6; 1023,5; 961,7; 942,3; 902,3; 864,8; 748,2; 682,5; 648,6; 613,8; 554,5; 536,7 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ :** 8,60 (s, 1H, H-6); 7,35 (s, 1H, H-3); 6,95 (s_{ancho} , 1H, NH); 6,74 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,40 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- β pirrol); 2,03 (s, 3H, CH_3CONH) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ :** 168,2; 132,9; 132,6; 129,4; 128,0; 127,0; 122,4; 121,7 (2C); 111,3 (2C); 24,7 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 269,0243; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 269,0259.

- **5-trifluorometil-2-(1H-pirrol-1-il)acetanilida (9e) y 5-trifluorometil-2-(1H-pirrol-1-il)acetimida (10e)**

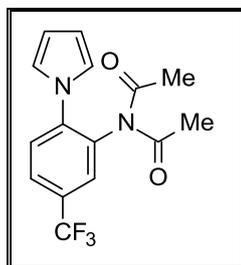
Seguendo el procedimiento general, a partir de **7e** (1,19 g; 5,2 mmol), calentando durante 25 minutos, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 1,08 g (76%) de **9e** como un sólido amarillo y 0,14 g (9%) de **10e** como un sólido marrón.



Rendimiento: 76%. **P.f.:** 115-117 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3351,9; 3139,0; 1639,9; 1619,8; 1590,6; 1533,2; 1481,2; 1434,5; 1344,7; 1274,9; 1251,6; 1225,4; 1162,8; 1116,8; 1059,9; 1010,8; 956,9; 924,2; 888,9; 835,2; 747,7; 651,1; 618,7; 544,3 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ :** 8,74 (s, 1H, H-6); 7,38 (m, 2H, H-3, H-4); 7,12 (s_{ancho} , 1H, NH);

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

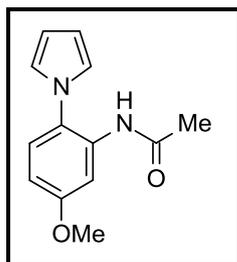
6,79 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,42 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- β pirrol); 2,06 (s, 3H, CH₃CONH) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 168,4; 133,9; 130,6 (c, ²J_{CF} = 32,8 Hz); 127,3 (c, ¹J_{CF} = 272,5 Hz); 127,4; 127,0; 121,6 (2C); 120,9 (c, ³J_{CF} = 3,7 Hz); 118,6 (c, ³J_{CF} = 3,2 Hz); 111,2 (2C); 24,7 ppm. HRMS (ESI⁺) m/e calculado para C₁₃H₁₂F₃N₂O: [M+H]⁺: 269,0896; encontrado [M+H]⁺: 269,0924.



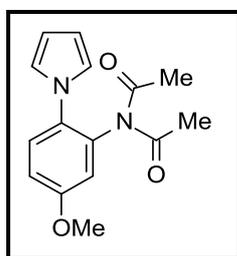
Rendimiento: 9%. **P.f.:** 65-66 °C. **IR (KBr)** $\nu_{\text{máx}}$: 1720,1; 1523,6; 1432,7; 1343,4; 1229,9; 1121,0; 1059,7; 1021,4; 954,5; 934,2; 857,4; 736,7; 636,5; 581,5; 499,9 cm⁻¹. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,76 (dd, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,4$ Hz, H-4); 7,56 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-3); 7,53 (s, 1H, H-6); 6,69 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,32 (t, 2H, $J = 1,9$ Hz, H- β pirrol); 2,18 (s, 6H, CH₃CON) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 172,5 (2C); 141,7; 134,2; 130,4 (c, ²J_{CF} = 33,4 Hz); 128,2 (c, ³J_{CF} = 3,7 Hz); 127,6; 127,2 (c, ³J_{CF} = 3,7 Hz); 121,2 (2C); 112,7 (c, ¹J_{CF} = 270,2 Hz); 111,3 (2C); 26,2 (2C) ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₅H₁₃F₃N₂O₂: [M+Na]⁺: 333,0821; encontrado [M+Na]⁺: 333,0883.

- **5-metoxi-2-(1H-pirrol-1-il)acetanilida (9f) y 5-metoxi-2-(1H-pirrol-1-il)acetimida (10f)**

A partir de **7f** (2,07 g; 11,0 mmol), calentando la mezcla de reacción a reflujo durante 10 minutos y purificación por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla CH₂Cl₂/acetona (9:1), se obtienen 1,76 g (70%) de un sólido amarillo (**9f**) y 0,28 g (10%) de **10f** como un sólido marrón.



Rendimiento: 70%. **P.f.:** 72-74 °C (*Lit*¹³⁵: 73 °C). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 8,04 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-6); 7,15 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-3); 6,89 (*Sancho*, 1H, NH); 6,71 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- α pirrol); 6,65 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-4); 6,36 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz, H- β pirrol); 3,83 (s, 3H, CH₃O); 2,00 (s, 3H, CH₃CONH) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 168,4; 159,6; 134,9; 127,5; 123,2; 122,3 (2C); 110,2 (2C); 109,8; 105,8; 55,6; 24,8 ppm. **HRMS (ESI⁺)** m/e calculado para C₁₃H₁₅N₂O₂: [M+H]⁺: 231,1128; encontrado [M+H]⁺: 231,1138.

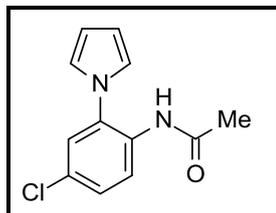


Rendimiento: 10%. **P.f.:** 86-88 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3109,3; 2938,6; 1725,0; 1614,2; 1521,9; 1369,1; 1234,2; 1072,6; 1025,6; 958,2; 820,5; 736,5; 633,13; 578,9 cm⁻¹. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,34 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, H-3); 7,01 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-4); 6,75 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H-6); 6,61 (t, 2H, $J = 2,0$ Hz, H- α pirrol); 6,24 (t, 2H, $J = 2,2$ Hz, H- β pirrol); 3,83 (s, 3H, CH₃O); 2,18 (s, 6H, CH₃CON) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ : 172,8 (2C); 159,3; 135,5; 131,9; 128,5; 121,7 (2C); 115,5; 115,4; 109,7 (2C); 55,7; 26,2 (2C) ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₅H₁₇N₂O₃: [M+H]⁺: 273,1239; encontrado [M+H]⁺: 273,1276.

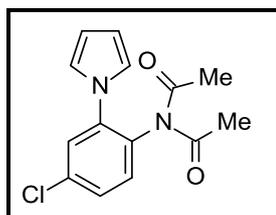
¹³⁵ Guillon, J.; Forfar, I.; Mamani-Matsuda, M.; Desplat, V.; Saliège, M.; Thiolat, D.; Massip, S.; Tabourier, A.; Léger, J.-M.; Dufaure, B.; Haumont, G.; Jarry, C.; Mossatayi, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 194-210.

- **4-cloro-2-(1*H*-pirrol-1-il)acetanilida (9g) y 4-cloro-2-(1*H*-pirrol-1-il)acetimida (10g)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7g** (2,64 g; 13,7 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 20 minutos, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (4:1), se obtienen 2,66 g (83%) de **9g** como un sólido amarillo y 0,17 g (5%) de **10g** como un aceite marrón.



Rendimiento: 83%. **P.f.:** 127-129 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3244,2; 1664,1; 1602,8; 1496,5; 1415,3; 1372,0; 1299,7; 1252,3; 1111,2; 1097,1; 1069,1; 1013,8; 937,8; 865,9; 842,7; 813,3; 759,6; 739,3; 633,9; 598,1; 580,3; 506,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ :** 8,32 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-6); 7,41 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H-5); 7,25 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-3); 6,96 (s_{ancho} , 1H, NH); 6,76 (t, 2H, $J = 1,7$ Hz, H- α pirrol); 6,39 (t, 2H, $J = 1,9$ Hz, H- β pirrol); 2,03 (s, 3H, CH_3CONH) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 168,3; 132,2; 131,3; 128,9; 128,6; 126,7; 122,5; 121,7 (2C); 110,9 (2C); 24,7 ppm. **HRMS (ESI^+) m/e calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{O}$:** $[\text{M}+\text{H}]^+$: 235,0633; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 235,0634.



Rendimiento: 5%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 3017,4; 1720,4; 1597,0; 1504,4; 1417,3; 1367,7; 1291,5; 1238,8; 1110,9; 1068,0; 1020,0; 939,5; 755,8; 629,9; 598,1 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,44 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-3); 7,41 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H-5); 7,17 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-6); 6,65 (t, 2H, $J = 2,2$ Hz, H- α pirrol); 6,28 (t, 2H, $J = 2,2$ Hz, H- β pirrol); 2,17 (s, 6H, CH_3CON) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 172,7

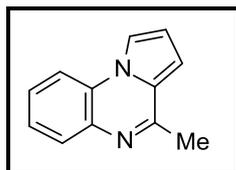
(2C); 139,7; 135,7; 132,6; 131,7; 128,5; 127,5; 121,2 (2C); 110,8 (2C); 26,2 (2C) ppm.
HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₁₄H₁₃ClN₂O₂: [M+H]⁺: 277,0738; encontrado [M+H]⁺: 277,0768.

2.3.4. Síntesis de 10H-pirrolo[1,2-a]quinoxalinas

Procedimiento General: Una mezcla de la correspondiente 2-(pirrol-1-il)acetanilida (1eq.) y POCl₃ (5 mL/mmol) se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizado dicho tiempo, la mezcla de reacción se enfría y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se vierte sobre una mezcla agua / hielo (20 mL/mmol) y se basifica con una disolución de NaHCO₃ (5%) hasta pH = 7-8. Se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL), las fases orgánicas se secan con MgSO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla CH₂Cl₂/acetona (9:1).

▪ 10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3a)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **9a** (2,18 g; 10,9 mmol), calentando durante 1 hora y 15 minutos y purificando, se obtienen 1,77 g (89%) de un sólido marrón (**3a**).

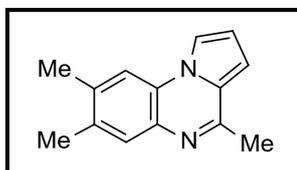


Rendimiento: 89%. **P.f.:** 138-140 °C (*Lit*¹³¹: 135,5-138 °C). **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3439; 3099; 1611; 1529; 1481; 1416; 1380; 1361; 1323; 1258; 1212; 1042; 947; 859; 760; 732; 690; 650; 609; 534; 470 cm⁻¹. **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ :** 7,89 (m, 2H); 7,82 (dd, 1H, *J* = 7,4 Hz, *J* = 2,3 Hz); 7,43 (m, 2H); 6,88 (dd, 1H, *J* = 4,2 Hz, *J* = 1,3 Hz); 6,83 (t, 1H, *J* = 3,2 Hz); 2,72 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³¹ Cheeseman, G. W. H.; Tuck, B. *J. Chem. Soc.* **1966**, 852-855.

▪ **10H-4,7,8-trimetilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3b)**

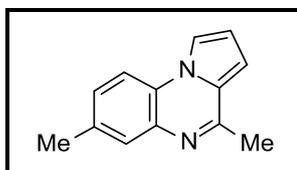
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **9b** (2,89 g; 12,8 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 1 hora y purificando, se obtienen 2,43 g (91%) de **3b** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 91%. **P.f.:** 137-139 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3434,9; 3116,5; 2918,9; 1624,7; 1522,9; 1490,0; 1412,2; 1351,1; 1313,1; 1243,7; 1085,6; 1024,1; 887,8; 852,7; 747,9; 717,5; 603,4 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,77 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-1); 7,62 (s, 1H, H-6/H-9); 7,51 (s, 1H, H-9/H-6); 6,78 (m, 2H, H-2, H-3); 2,67 (s, 3H, CH_3); 2,38 (s, 3H, CH_3); 2,34 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 152,3; 136,1; 134,0; 133,7; 129,3; 126,1; 125,1; 113,9; 113,5; 112,9; 105,7; 21,9; 20,1; 19,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 211,1230; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 211,1200.

▪ **10H-4,7-dimetilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3c)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **9c** (0,65 g; 3,05 mmol), calentando durante 50 minutos y purificando, se obtienen 0,46 g (77%) de un sólido amarillo **3c**.

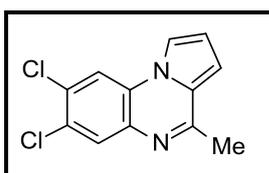


Rendimiento: 77%. **P.f.:** 273 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3423; 3095; 2624; 1885; 1624; 1598; 1550; 1507; 1405; 1377; 1285; 1260; 1111; 1046; 823; 753; 679; 601; 530 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 8,38 (s, 1H, H-6); 8,21 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz, $J = 1,6$ Hz, H-1); 7,83 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-9); 7,47 (m, 2H, H-3, H-8); 7,13 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-2); 3,16 (s, 3H, CH_3); 2,52 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3)**

δ : 152,5; 136,7; 129,7; 125,6; 124,9; 124,4; 117,9; 115,6; 113,8; 113,8; 111,7; 21,1; 19,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₃H₁₃N₂: [M+H]⁺: 197,1079; encontrado [M+H]⁺: 197,1074.

▪ **7,8-dicloro-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3d)**

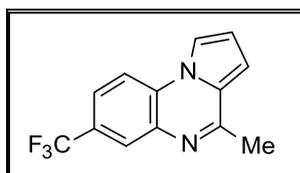
Según se indica en el procedimiento general, a partir de **9d** (2,69 g; 10,0 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 45 minutos y purificando, se obtienen 2,49 g (99%) de **3d** como un sólido marrón.



Rendimiento: 99%. **P.f.:** 197-199 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3448,4; 3093,2; 2925,4; 2361,7; 1718,3; 1606,3; 1478,0; 1409,2; 1298,0; 1216,5; 1130,4; 1047,8; 879,4; 851,8; 745,1; 638,7; 603,7; 547,8 cm⁻¹. **¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ :** 7,93 (s, 1H, H-6/H-9); 7,81 (s, 1H, H-9/H-6); 7,75 (dd, 1H, $J = 2,7$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-1); 6,90 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-3); 6,84 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H-2); 2,68 (s, 3H, CH₃) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ :** 154,9; 134,7; 130,5; 129,8; 128,7; 126,2; 125,8; 115,2; 115,1; 114,5; 108,1; 21,7 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₂H₉Cl₂N₂: [M+H]⁺: 251,0137; encontrado [M+H]⁺: 251,0158.

▪ **7-trifluorometil-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3e)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **9e** (0,96 g; 3,59 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 40 minutos y purificando, se obtienen 0,88 g (98%) de un sólido marrón **3e**.

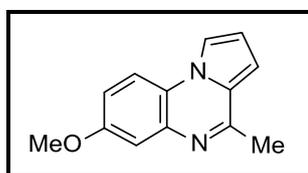


CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

Rendimiento: 98%. **P.f.:** 128-130 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3104,4; 1628,4; 1530,4; 1503,7; 1458,6; 1419,8; 1333,8; 1299,1; 1208,5; 1164,0; 1141,8; 1107,6; 1089,5; 1032,8; 899,4; 828,4; 766,2; 737,2; 695,8; 652,7; 606,3; 525,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 8,17 (s, 1H, H-6); 7,92 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H-1); 7,88 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-9); 7,67 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-8); 6,94 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-3); 6,89 (t, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-2); 2,73 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 155,0; 135,3; 129,1; 127,0 (c, $^2J_{\text{CF}} = 32,8$ Hz); 126,5 (c, $^3J_{\text{CF}} = 3,7$ Hz); 126,1; 123,9 (c, $^1J_{\text{CF}} = 271,7$ Hz); 123,1 (c, $^3J_{\text{CF}} = 3,7$ Hz); 114,8; 114,4; 114,1; 107,5; 21,8 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 251,0791; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 251,0752.

▪ **10H-4-metil-7-metoxipirrolo[1,2-a]quinoxalina (3f)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **9f** (1,61 g; 7,0 mmol), calentando durante 35 minutos y purificando, se obtienen 1,38 g (93%) de **3f** como un sólido marrón.

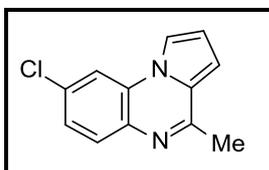


Rendimiento: 93%. **P.f.:** 49-50 °C (*Lit*¹³⁵: 50 °C). **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3085,5; 1616,1; 1593,5; 1523,6; 1490,7; 1350,0; 1299,8; 1258,9; 1245,9; 1198,3; 1160,8; 1048,5; 1029,8; 931,7; 876,9; 846,8; 770,5; 717,1; 621,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,81 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-1); 7,71 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, H-9); 7,37 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H-6); 7,06 (dd, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-8); 6,85 (dd, 1H, $J = 3,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-3); 6,79 (dd, 1H, $J = 3,9$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-2); 3,88 (s, 3H, CH_3O); 2,71 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 157,0; 153,9; 136,8; 125,9; 121,5; 115,9; 114,5; 113,9; 113,2; 110,5; 106,3; 55,6; 21,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 213,1028; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 213,1023.

¹³⁵ Guillon, J.; Forfar, I.; Mamani-Matsuda, M.; Desplat, V.; Saliège, M.; Thiolat, D.; Massip, S.; Tabourier, A.; Léger, J.-M.; Dufaure, B.; Haumont, G.; Jarry, C.; Mossatayi, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 194-210.

▪ **8-Cloro-10H-4-metilpirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (3g)**

Según se describe en el procedimiento general, a partir de **9g** (2,52 g; 10,7 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 40 minutos y purificando, se obtienen 2,03 g (87%) de **3g** como un sólido amarillo.



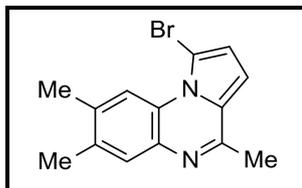
Rendimiento: 87%. **P.f.:** 143-144 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3098,8; 1609,7; 1529,8; 1476,4; 1458,4; 1417,9; 1380,9; 1350,9; 1312,4; 1253,3; 1210,3; 1129,5; 1118,5; 1085,1; 1036,3; 862,5; 845,6; 814,0; 793,2; 740,1; 676,8; 613,7; 570,4; 514,3; 463,5 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,79 (m, 3H, H-1, H-6, H-9); 7,34 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H-7); 6,88 (dd, 1H, $J = 3,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-3); 6,84 (c, 1H, $J = 2,8$ Hz, H-2); 2,69 (s, 3H, CH_3) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ :** 153,8; 134,4; 132,2; 130,3; 127,8; 126,1; 125,4; 114,4; 114,0; 113,8; 107,0; 21,9 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 217,0527; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 217,0551.

2.3.5. Bromación de 10H-pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas

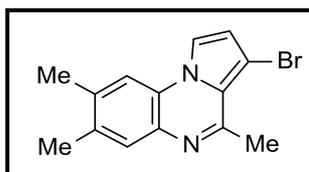
Procedimiento general: A una disolución de la correspondiente pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (1 eq.) disuelta en DMF (7,2 mL/mmol) enfriada a -10 °C, se le añade lentamente una disolución de NBS (1 eq.) disuelta en DMF (5,6 mL/mmol) a una velocidad de adición de 0,17 mL/min. Una vez finalizada la adición, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y se le añade una disolución saturada de NaCl (15 mL/mmol). Se extrae con CH_2Cl_2 (5 x 15 mL/mmol) y las fases orgánicas se secan con MgSO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (9:1).

- **1-bromo-10H-4,7,8-trimetilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3h), 3-bromo-10H-4,7,8-trimetilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3k) y 1,2-dibromo-10H-4,7,8-trimetilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3l)**

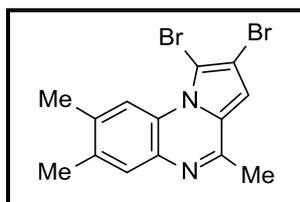
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3b** (0,40 g; 1,94 mmol), se obtiene 0,29 g (52%) de **3h** como un sólido crema, 0,21 g (39%) de **3k** como un sólido amarillo y 0,10 g (8%) de **3l** como un sólido marrón.



Rendimiento: 52%. **P.f.:** 139-140 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3435,4; 2970,1; 2914,9; 1681,8; 1624,7; 1578,9; 1530,5; 1477,7; 1410,6; 1379,9; 1352,2; 1218,1; 1153,7; 1041,6; 911,9; 882,8; 857,2; 764,4; 734,9; 684,0; 674,3 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ :** 9,00 (s, 1H, H-9); 7,64 (s, 1H, H-6); 6,82 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-3); 6,78 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-2); 2,64 (s, 3H, CH_3); 2,41 (s, 3H, CH_3); 2,36 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 152,3; 136,6; 134,4; 133,6; 129,3; 125,0; 122,7; 116,8; 113,4; 113,3; 93,8; 24,3; 20,2; 19,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Br}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 289,0340; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 289,0338.



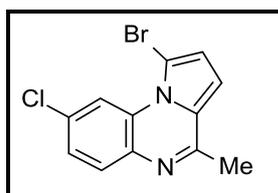
Rendimiento: 39%. **P.f.:** 190-192 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3434,3; 3107,6; 2966,2; 2917,7; 1708,5; 1621,4; 1575,7; 1512,1; 1485,5; 1408,4; 1375,7; 1342,0; 1218,1; 1137,3; 1098,2; 1006,9; 975,2; 916,7; 882,3; 853,2; 758,5; 735,5; 691,1; 673,3; 605 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ :** 7,70 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-1); 7,57 (s, 1H, H-6); 7,45 (s, 1H, H-9); 6,78 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-2); 2,93 (s, 3H, CH_3); 2,37 (s, 3H, CH_3); 2,33 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 151,6; 135,1; 134,4; 129,4; 128,0; 126,5; 118,2; 115,6; 115,5; 106,7; 98,4; 21,5; 20,5; 19,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Br}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 289,0340; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 289,0345.



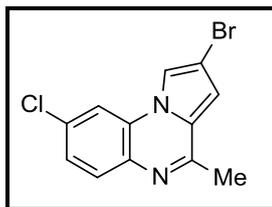
Rendimiento: 8%. **P.f.:** 177-178 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3434,2; 3120,9; 2914,5; 1574,4; 1486,1; 1475,2; 1435,8; 1402,9; 1341,3; 1192,2; 1159,8; 1013,2; 881,3; 854,7; 801,7; 675,7; 564,1 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 8,93 (s, 1H, H-9/H-6); 7,62 (s, 1H, H-3); 6,84 (s, 1H, H-6/H-9); 2,93 (s, 3H, CH_3); 2,39 (s, 3H, CH_3); 2,34 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 151,6; 135,6; 135,1; 129,3; 126,5; 125,1; 121,8; 117,6; 115,8; 115,5 (2C); 24,6; 20,5; 19,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BrN}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 368,9420; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 368,9429.

- **1-bromo-8-cloro-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3i) y 2-bromo-8-cloro-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (3j)**

Según se describe en el procedimiento general, a partir de **3g** (0,51 g; 2,37 mmol), se obtienen 0,47 g (69%) de **3i** y 84,5 mg (12%) de **3j** como sólidos amarillos.



Rendimiento: 69%. **P.f.:** 193-194 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3127,5; 2919,2; 1606,8; 1532,1; 1467,6; 1417,6; 1375,2; 1095,0; 1048,8; 848,6; 819,4; 763,4; 754,7; 677,8; 576,9; 459,8 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ :** 9,25 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-9); 7,80 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6); 7,40 (dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H-7); 6,88 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-3); 6,85 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-2); 2,66 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 152,9; 135,5; 131,1; 130,3; 128,9; 127,9; 125,9; 119,0; 115,2; 107,6; 99,4; 21,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrClN}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294,9632; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294,9648.



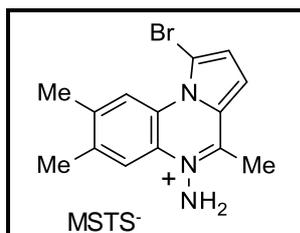
Rendimiento: 12%. **P.f.:** 180-182 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3436,0; 3099,2; 2359,3; 1604,1; 1482,5; 1409,5; 1343,9; 1111,8; 1086,9; 1009,6; 986,8; 855,9; 819,1; 760,7; 729,2; 686,0; 568,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ :** 7,75 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6); 7,72 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz, H-3); 7,71 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-9); 7,34 (dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H-7); 6,86 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz, H-1); 2,94 (s, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 153,7; 132,6; 130,4; 130,3; 126,4; 125,9; 122,5; 117,8; 114,1; 113,2; 95,3; 24,4 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrClN}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294,9632; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294,9625.

2.3.6. Síntesis de mesitilenosulfonatos de 5-amino-10H-pirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio

Procedimiento general: A una disolución del correspondiente derivado de pirrolo[1,2-a]quinoxalina (1 eq.) disuelto en el volumen indicado de CH_2Cl_2 enfriada a 0 °C se le añade, gota a gota, una disolución de MSH (1,5 eq.) en el volumen indicado de CH_2Cl_2 . Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, se añade éter dietílico y se mantiene agitando durante 30 minutos. Se filtra el precipitado formado y se purifica por recristalización en una mezcla EtOH/AcOEt.

▪ Mesitilenosulfonato de 5-amino-1-bromo-10H-4,7,8-trimetilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (2h)

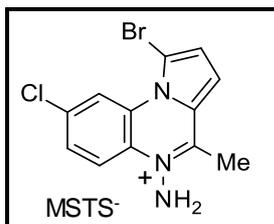
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3h** (0,25 g; 0,86 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (4 mL) y MSH (0,39 g; 1,29 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (4 mL), se obtienen 0,29 g (69%) de **2h** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 69%. **P.f.:** 232-233 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3257,9; 3135,1; 2916,0; 1601,7; 1545,5; 1483,1; 1421,8; 1379,9; 1216,6; 1178,7; 1082,9; 1014,7; 891,4; 845,3; 778,0; 676,9; 579,4; 547,4; 474,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 9,11 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,04 (d, 1H, $J = 4,6$ Hz); 7,46 (d, 1H, $J = 4,6$ Hz); 6,92 (s_{ancho} , 2H, NH_2); 6,66 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTs}}$); 3,04 (s, 3H, CH_3); 2,48 (s, 3H); 2,46 (s, 3H, CH_3); 2,43 (s, 6H, CH_3 -MSTs); 2,13 (s, 3H, CH_3 -MSTs) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 153,0; 142,1; 138,0; 136,3; 135,5; 135,2; 129,2 (2C); 126,8; 125,4; 125,2; 122,9; 119,6; 119,3; 115,6; 108,8; 101,5; 22,1 (2C); 19,7; 19,5; 19,0; 16,2 ppm. **HRMS (ESI^+) m/e** calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrN}_3$: $[\text{M}]^+$: 304,0444; encontrado $[\text{M}]^+$: 304,0438.

▪ **Mesitileno sulfonato de 5-amino-1-bromo-8-cloro-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (2i)**

Según se describe en el procedimiento general, a partir de **3i** (0,40 g; 1,36 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (40 mL) y MSH (0,63 g; 2,05 mmol) disueltos en CH_2Cl_2 (40 mL), se obtienen 0,39 g (56%) de un sólido marrón **2i**.

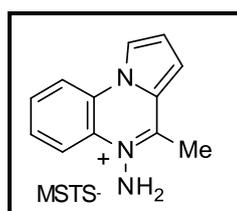


Rendimiento: 56%. **P.f.:** 232-234 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3330,7; 3121,5; 2926,6; 1604,1; 1550,4; 1480,5; 1423,1; 1403,4; 1190,1; 1131,8; 1086,5; 1018,6; 902,8; 843,9; 804,5; 678,3; 582,7; 547,9; 453,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) δ :** 9,49 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H-9); 8,54 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-6); 8,02 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-2); 7,83 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H-7); 7,45 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-3); 6,79 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTs}}$); 3,15 (s, 3H, CH_3); 2,53 (s, 6H, CH_3 -MSTs); 2,24 (s, 3H, CH_3 -MSTs) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz,**

DMSO-*d*₆ δ : 154,8; 142,1; 135,6; 135,2 (2C); 132,3; 129,2 (2C); 128,0; 127,9; 126,9; 125,8; 123,6; 121,7; 120,5; 115,2; 110,8; 22,2 (2C); 19,8; 16,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₂H₁₀BrClN₃: [M]⁺: 311,9719; encontrado [M]⁺: 311,9720.

▪ **Mesitilenosulfonato de 5-amino-10H-4-metilpirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (2a)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3a** (0,61 g; 3,34 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (13 mL) y MSH (1,54 g; 5,02 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (13 mL), se obtienen 1,14 g (86%) de **2a** como un sólido amarillo.

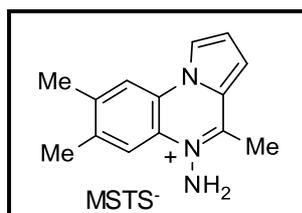


Rendimiento: 86%. **P.f.** = 225-227 °C (*Lit*¹⁶⁸: 224-226 °C). **¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆)** δ : 9,04 (dd, 1H, *J* = 2,6 Hz, *J* = 1,2 Hz); 8,54 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 8,42 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 8,00 (d, 1H, *J* = 4,4 Hz); 7,85 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,75 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,33 (m, 1H); 6,92 (s_{ancho}, 2H); 6,63 (s, 2H, H_{Ar}-MSTs); 3,09 (s, 3H, CH₃); 2,42 (s, 6H, CH₃-MSTs); 2,11 (s, 3H, CH₃-MSTs) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆)** δ : 155,4; 135,6; 135,2 (2C); 129,6; 129,2 (2C); 128,1; 126,7; 125,9; 123,9; 123,3; 119,6; 119,2; 117,8; 115,6; 101,5; 22,2 (2C); 19,7; 16,8 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₂H₁₂N₃: [M]⁺: 198,1031; encontrado [M]⁺: 198,1108.

▪ **Mesitilenosulfonato de 5-amino-10H-4,7,8-trimetilpirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (2b)**

Según se describe en el procedimiento general, a partir de **3b** (0,78 g; 3,73 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (10 mL) y MSH (1,72 g; 5,60 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (10 mL), se obtienen 1,02 g (65%) de **2b** como un sólido amarillo.

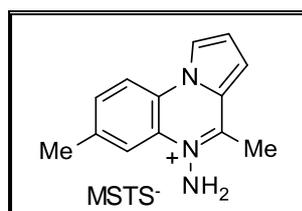
¹⁶⁸ Matia, M. P.; Ezquerro, J.; Sánchez-Ferrando, F.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 7329-7342.



Rendimiento: 65%. **P.f.** = 253-254 °C. **IR (KBr)** $\nu_{\text{máx}}$: 3240,6; 3107,1; 2971,0; 1603,5; 1547,2; 1457,5; 1415,7; 1381,4; 1211,2; 1173,9; 1082,8; 1013,7; 883,6; 843,3; 758,3; 677,9; 579,8 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, DMSO- d_6)** δ : 8,36 (m, 1H, H-1); 7,80 (s, 1H, H-6/H-9); 7,62 (s, 1H, H-9/H-6); 7,36 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-3); 6,73 (t, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-2); 6,31 (s_{anch} , 2H, NH_2); 6,10 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTs}}$); 1,91 (s, 3H, CH_3); 1,87 (s, 12H, 2 CH_3 , 2 $\text{CH}_3\text{-MSTs}$); 1,59 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTs}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6)** δ : 153,9; 142,2; 139,6; 135,9; 135,6; 135,3 (2C); 129,2 (2C); 125,9; 123,9; 123,2; 123,0; 119,3; 118,4; 117,6; 115,8; 22,2 (2C); 19,7; 19,1; 19,0; 16,6 ppm. **HRMS (ESI $^+$)** m/e calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 226,1339; encontrado $[\text{M}]^+$: 226,1342.

▪ **Mesitylsulfonato de 5-amino-10H-4,7-dimetilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (2c)**

A partir de **3c** (0,33 g; 1,71 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (7 mL) y MSH (0,78 g; 2,56 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (7 mL), y siguiendo el procedimiento general, se obtienen 0,53 g (77%) de un sólido amarillo **2c**.



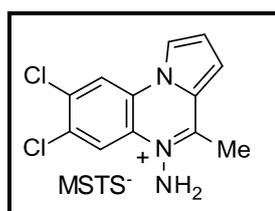
Rendimiento: 77%. **P.f.** = 284-285 °C. **IR (KBr)** $\nu_{\text{máx}}$: 3237,6; 3104,6; 1611,5; 1546,8; 1485,8; 1460,1; 1418,7; 1379,3; 1304,0; 1171,7; 1082,6; 1014,2; 841,0; 823,0; 763,4; 680,3; 579,0 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6)** δ : 8,99 (m, 1H, H-1); 8,44 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-9); 8,25 (s, 1H, H-6); 7,97 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-3); 7,70 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-8); 7,31 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-2); 6,86 (s, 2H, NH_2); 6,69 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTs}}$); 3,08 (s, 3H, CH_3); 2,54 (s, 3H, CH_3); 2,45 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3\text{-MSTs}$); 2,13 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTs}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6)** δ : 155,1; 142,3; 136,8; 135,6; 135,3 (2C);

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

130,6; 129,3 (2C); 127,9; 123,9; 123,6; 123,2; 119,1; 118,9; 117,7; 115,6; 22,2 (2C); 20,5; 19,7; 16,8 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₃H₁₄N₃: [M]⁺: 212,1182; encontrado [M]⁺: 212,1178.

▪ **Mesitilenosulfonato de 5-amino-7,8-dicloro-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (2d)**

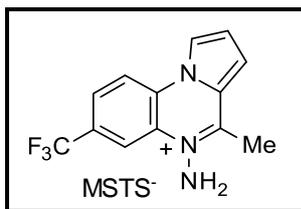
Según se describe en el procedimiento general, a partir de **3d** (0,15 g; 0,57 mmol) disueltos en CH₂Cl₂ (8 mL) y MSH (0,26 g; 0,85 mmol) disueltos en CH₂Cl₂ (3 mL), se obtienen 0,21 g (80%) de **2d** como un sólido marrón.



Rendimiento: 80%. **P.f.** = 282-284 °C. **IR (KBr) v_{máx}:** 3411,6; 3128,7; 2970,9; 2841,8; 1694,7; 1594,3; 1537,9; 1466,6; 1434,1; 1362,9; 1307,2; 1250,2; 1165,9; 1076,5; 1038,8; 864,9; 809,4; 732,1; 611,0; 566,1 cm⁻¹. **¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ:** 8,91 (dd, 1H, *J* = 2,6 Hz, *J* = 1,2 Hz, H-1); 8,79 (s, 1H, H-6/H-9); 8,70 (s, 1H, H-9/H-6); 8,02 (dd, 1H, *J* = 4,5 Hz, *J* = 1,2 Hz, H-3); 7,37 (dd, 1H, *J* = 4,5 Hz, *J* = 2,6 Hz, H-2); 6,87 (s, 2H, H_{Ar}-MSTs); 2,63 (s, 9H, CH₃, 2 CH₃-MSTs); 2,26 (s, 3H, CH₃-MSTs) ppm. **¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ:** 156,8; 135,5; 135,2 (2C); 131,9; 129,2 (2C); 128,8; 127,9; 125,5; 125,2; 123,7; 121,1; 120,5; 118,5; 117,7; 109,3; 22,2 (2C); 19,8; 16,9 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para C₁₂H₁₀Cl₂N₃: [M]⁺: 266,0246; encontrado [M]⁺: 266,0241.

▪ **Mesitilenosulfonato de 5-amino-7-trifluorometil-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (2e)**

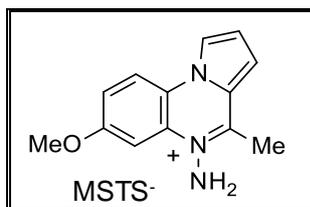
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3e** (0,28 g; 1,12 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (5 mL) y MSH (0,512 g; 1,68 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (5 mL), se obtienen 0,32 g (62%) de un sólido amarillo **2e**.



Rendimiento: 62%. **P.f.** = 299 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3245,7; 3107,0; 1601,9; 1553,2; 1462,1; 1418,9; 1383,3; 1336,2; 1302,6; 1242,3; 1175,9; 1132,6; 1084,0; 1015,6; 912,3; 848,2; 831,9; 762,4; 681,2; 580,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD) δ :** 8,96 (m, 1H, H-1); 8,84 (s, 1H, H-6); 8,62 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-8); 8,15 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-9); 8,06 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-3); 7,40 (t, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-2); 6,81 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTS}}$); 3,23 (s, 3H, CH_3); 2,58 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$); 2,24 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 157,5; 142,0; 135,8; 135,3 (2C); 129,3 (2C); 128,6; 126,7; 126,6 (c, $^1J_{\text{CF}} = 269$ Hz); 126,5 (c, $^2J_{\text{CF}} = 32,8$ Hz); 126,0; 125,4; 123,9; 122,3; 121,0 (c, $^2J_{\text{CF}} = 32,8$ Hz); 118,7; 117,4; 22,2 (2C); 19,8; 17,0 ppm. **HRMS (ESI $^+$) m/e** calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 266,0900; encontrado $[\text{M}]^+$: 266,0911.

▪ **Mesitilenosulfonato de 5-amino-10H-4-metil-7-metoxipirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (2f)**

A partir de **3f** (0,42 g; 2,01 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (8 mL) y MSH (0,92 g; 3,01 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (8 mL), y siguiendo el procedimiento general, se obtienen 0,68 g (80%) de **2f** como un sólido amarillo.



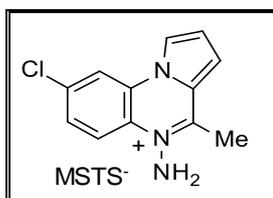
Rendimiento: 80%. **P.f.** = 285 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3218,9; 3107,0; 1613,6; 1553,9; 1525,8; 1492,2; 1406,5; 1376,3; 1316,1; 1270,2; 1219,8; 1165,4; 1086,5; 1070,4; 1031,1; 1014,2; 851,6; 828,5; 779,3; 683,9; 582,7; 528,0 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 8,96 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-1); 8,48 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-9); 7,93 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-3); 7,86 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-6); 7,47 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J = 2,4$ Hz, H-8); 7,29 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 2,4$ Hz, H-2); 6,85 (s, 2H, NH_2); 6,63 (s, 2H,

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

$H_{Ar-MSTS}$; 3,95 (s, 3H, CH_3O); 3,07 (s, 3H, CH_3); 2,42 (s, 6H, CH_{3-MSTS}); 2,11 (s, 3H, CH_{3-MSTS}) ppm. $^{13}C-RMN$ (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 157,5; 155,3; 142,1; 135,6; 135,2 (2C); 129,4; 129,2 (2C); 123,5; 123,0; 120,0; 118,6; 117,7; 117,2; 117,1; 102,6; 55,7; 22,2 (2C); 19,8; 16,9 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $C_{13}H_{14}N_3O$: $[M]^+$: 228,1131; encontrado $[M]^+$: 228,1148.

▪ Mesitilenosulfonato de 5-amino-8-cloro-10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (2g)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3g** (0,40 g; 1,88 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (9 mL) y MSH (0,91 g; 2,96 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (9 mL), se obtienen 0,66 g (81%) de **2g** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 81%. **P.f.** = 277-278 °C. **IR (KBr) $\nu_{m\acute{a}x}$:** 3251,6; 3107,5; 1602,8; 1550,1; 1483,8; 1416,9; 1381,7; 1327,1; 1217,8; 1172,9; 1083,5; 1014,1; 879,8; 835,9; 818,1; 762,2; 681,0; 580,6; 547,8; 470,0 cm^{-1} . ^1H-RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9,07 (dd, 1H, $J = 2,7$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-1); 8,78 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H-9); 8,41 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, H-6); 8,04 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-3); 7,83 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H-7); 7,36 (c, 1H, $J = 2,7$ Hz, H-2); 6,94 (s, 2H, NH_2); 6,67 (s, 2H, $H_{Ar-MSTS}$); 3,09 (s, 3H, CH_3); 2,13 (s, 6H, CH_{3-MSTS}); 2,07 (s, 3H, CH_{3-MSTS}) ppm. $^{13}C-RMN$ (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 155,7; 142,2; 135,6; 135,2 (2C); 134,0; 129,2 (2C); 127,1; 126,8; 126,6; 124,6; 123,6; 121,6; 119,8; 118,2; 115,6; 22,2 (2C); 19,7; 16,8 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $C_{12}H_{11}ClN_3$: $[M]^+$: 232,0636; encontrado $[M]^+$: 232,0635.

2.3.7. Síntesis de sales de piridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxalinio

Procedimiento general A: A una disolución del correspondiente mesitilenosulfonato de 5-aminopirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (1 eq.) en etanol (0,1 mL/mmol), se le añade 2,3-butanodiona (1 eq.) seguido de trietilamina (1 eq.). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. Se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se tritura en éter dietílico, obteniendo un precipitado que finalmente se filtra. El sólido obtenido se recrystaliza en una mezcla EtOH/AcOEt.

Procedimiento general B: A una disolución del correspondiente mesitilenosulfonato de 5-aminopirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (1 eq.) en etanol (0,1 mL/mmol), se le añade 1,4-dioxan-2,3-diol (1,1 eq.), seguido de trietilamina (1,1 eq.), y se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación, la mezcla de reacción se concentra a sequedad y se tritura en éter dietílico, obteniéndose un precipitado que se filtra y se recrystaliza empleando una mezcla EtOH/AcOEt.

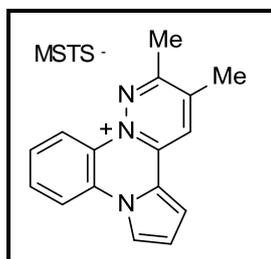
Procedimiento general C: A una disolución del correspondiente mesitilenosulfonato de 5-aminopirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (1 eq.) en acetona (0,1 mL/mmol), se le añade acenaftoquinona (1,1 eq.) y por último, NaOAc (1,1 eq.). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 4 horas. Finalizado dicho tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se tritura en éter dietílico, obteniéndose un precipitado que se filtra. El sólido obtenido se recrystaliza en una mezcla EtOH/AcOEt.

Procedimiento general D: A una disolución del correspondiente mesitilenosulfonato de 5-aminopirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (1 eq.) en metanol (0,42 mL/mmol), se le añade 3,4-hexanodiona (1,1 eq.), seguido de trietilamina (1,1 eq.). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y, posteriormente, se concentra a sequedad. El crudo de reacción se tritura en éter dietílico, obteniéndose un precipitado que se filtra y se recrystaliza en una mezcla MeOH/éter dietílico.

Procedimiento general E: A una disolución del correspondiente mesitilenosulfonato de 5-aminopirrolo[1,2-*a*]quinoxal-5-inio (1 eq.) en metanol (29,8 mL/mmol), se le añade 3,4-hexanodiona (2 eq.) seguido de trietilamina (1 eq.). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizado dicho tiempo, el precipitado formado se filtra y se tritura en MeOH.

▪ **Mesitilenosulfonato de 8H-2,3-dimetilpiridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1a)**

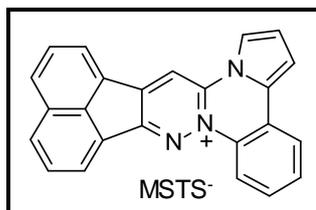
Siguiendo el procedimiento general A, a partir de **2a** (145 mg; 36,6 mmol) y manteniendo agitación durante 20 minutos, se obtienen 0,10 g (65%) de **1a** como un sólido verdoso.



Rendimiento: 65%. **P.f.:** 215-216 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3448,1; 3080,7; 1732,7; 1629,4; 1606,0; 1555,7; 1499,0; 1483,4; 1395,9; 1335,5; 1250,6; 1190,8; 1083,5; 1014,1; 918,7; 876,7; 848,7; 764,9; 676,1; 640,2; 579,8; 547,8; 527,5; 482,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 8,90 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,2$ Hz); 8,79 (s, 1H); 8,65 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz, $J = 1,2$ Hz); 8,36 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz); 7,92 (m, 2H); 7,75 (td, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,2$ Hz); 7,21 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 2,6$ Hz); 6,69 (s, 2H); 2,84 (s, 3H); 2,70 (s, 3H); 2,53 (s, 6H); 2,12 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 161,4; 147,9; 140,8; 139,8; 139,4; 138,0; 133,4; 131,5 (2C); 128,9 (2C); 128,8; 128,5; 128,1; 123,4; 121,5; 121,4; 118,3; 117,5; 116,6; 23,3 (2C); 20,8; 20,6; 19,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 248,1188; encontrado $[\text{M}]^+$: 248,1163.

▪ **Mesitilenosulfonato de 17H-acenafto[1',2':3,4]piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-8-inio (1o)**

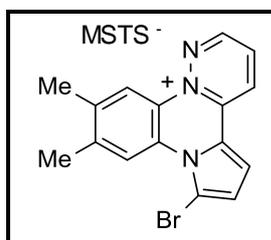
Siguiendo el procedimiento general C, a partir de **2a** (73,6 mg; 0,18 mmol) se obtienen 0,10 g (99%) de **1o** como un sólido naranja.



Rendimiento: 99%. **P.f.:** 327-328 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3424,3; 3090,9; 1631,0; 1605,4; 1543,7; 1482,2; 1445,6; 1419,3; 1212,0; 1196,2; 1085,4; 1017,0; 951,9; 852,2; 833,8; 781,2; 768,5; 675,8; 585,2; 550,3 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,49 (s, 1H); 9,02 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz); 8,72 (m, 1H); 8,56 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,52 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz); 8,38 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 8,26 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz); 8,12 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz); 7,94 (m, 3H); 7,79 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,31 (c, 1H, $J = 3,4$ Hz); 6,85 (s, 2H); 2,62 (s, 6H); 2,24 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 157,8; 140,8; 140,1; 138,5; 138,2 (2C); 133,7; 133,4; 133,0; 131,6 (2C); 131,4; 130,8; 130,6; 130,1; 129,5; 128,9 (2C); 128,7; 128,5; 127,9; 125,4; 123,9; 123,0; 121,4; 120,4; 118,9; 117,6; 117,2; 23,3 (2C); 20,8 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 344,1182; encontrado $[\text{M}]^+$: 344,1197.

▪ **Mesitilenosulfonato de 7-bromo-8H-10,11-dimetilpiridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1j)**

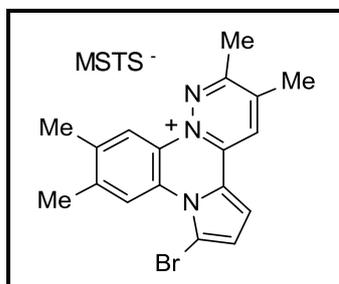
Seguendo el procedimiento general B, a partir de **2h** (94,7 mg; 18,8 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 10 minutos, se obtienen 59,4 mg (60%) de **1j** como un sólido verde.



Rendimiento: 60%. **P.f.:** 205-206 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3423,8; 3061,2; 2971,5; 2927,5; 1621,6; 1536,9; 1477,57; 1417,62; 1388,71; 1255,8; 1220,6; 1183,6; 1084,6; 1013,7; 902,8; 876,9; 848,3; 792,9; 677,6 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,36 (s, 1H, H-12); 9,23 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-2); 9,09 (dd, $J = 9,1$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-4); 8,85 (s, 1H, H-9); 8,22 (c, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-3); 8,15 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-6/H-5); 7,39 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, H-5/H-6); 6,84 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTS}}$); 2,62 (s, 3H, CH_3); 2,59 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3\text{-MSTS}$); 2,58 (s, 3H, CH_3); 2,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 150,3; 143,7; 140,0; 139,6; 139,4; 138,8; 138,1; 132,8; 131,6 (2C); 131,3; 128,4 (2C); 127,3; 124,5; 124,3; 121,6; 118,4; 117,6; 109,6; 23,2 (2C); 20,8; 20,6; 19,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrN}_3$: $[\text{M}]^+$: 326,0287; encontrado $[\text{M}]^+$: 326,0289.

▪ **Mesitilenosulfonato de 7-bromo-8*H*-2,3,10,11-tetrametilpiridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxal-13-inio (1h)**

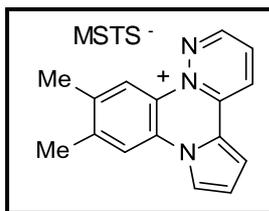
Siguiendo el procedimiento general A, a partir de **2h** (96,4 mg; 0,19 mmol) y manteniendo agitación durante 10 minutos, se obtienen 96,1 mg (90%) de **1h** como un sólido verdoso.



Rendimiento: 90%. **P.f.:** 211-213 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3413,9; 3072,9; 2918,5; 2360,0; 2314,6; 1626,0; 1594,8; 1552,7; 1478,3; 1393,4; 1262,3; 1187,6; 1083,4; 1013,0; 912,8; 884,5; 848,9; 802,1; 676 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,30 (s, 1H, H-12); 8,83 (s, 1H, H-9/H-4); 8,82 (s, 1H, H-4/H-9); 8,02 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, H-5); 7,30 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-6); 6,81 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTs}}$); 2,86 (s, 3H, CH_3); 2,71 (s, 3H, CH_3); 2,59 (s, 3H, CH_3); 2,58 (s, 9H, CH_3 , 2 $\text{CH}_3\text{-MSTs}$); 2,21 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTs}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 161,5; 147,4; 142,8; 139,9; 139,2; 138,1; 138,0; 131,6 (2C); 128,5 (2C); 128,1; 126,9; 124,0; 123,7; 121,4; 118,3; 116,6; 108,3; 101,4; 23,2 (2C); 20,8; 20,6; 20,5; 19,9; 19,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_3$: $[\text{M}]^+$: 354,0600; encontrado $[\text{M}]^+$: 354,0603.

▪ **Mesitilenosulfonato de 8*H*-10,11-dimetilpiridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxal-13-inio (1i)**

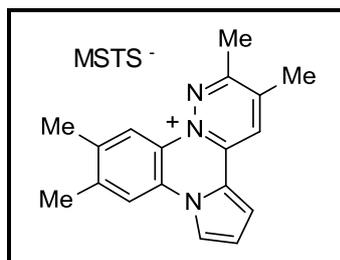
Siguiendo el procedimiento general B, a partir de **2b** (130,0 mg; 0,30 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 20 minutos, se obtienen 78,9 mg (56%) de **1i** como un sólido negro.



Rendimiento: 56%. **P.f.:** 279-280 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3393,8; 3114,7; 3044,0; 1620,4; 1553,6; 1528,6; 1500,3; 1476,8; 1448,5; 1389,1; 1346,1; 1288,5; 1246,3; 1211,3; 1166,2; 1084,7; 1012,3; 911,5; 859,3; 844,6; 830,7; 754,3; 677,1; 583,5 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,22 (s, 1H); 9,11 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 8,77 (m, 2H); 8,31 (s, 1H); 8,21 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 3,6$ Hz); 8,09 (d, 1H, $J = 4,1$ Hz); 7,32 (m, 1H); 6,87 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTS}}$); 2,64 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3\text{-MSTS}$); 2,63 (s, 3H); 2,58 (s, 3H); 2,25 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 150,1; 145,2; 140,8; 140,2; 140,0; 139,1; 138,2; 132,4; 131,7; 131,6 (2C); 127,2 (2C); 126,5; 123,7; 122,1; 121,3; 118,7; 117,8; 116,9; 23,3 (2C); 20,8; 20,3; 20,0 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 248,1182; encontrado $[\text{M}]^+$: 248,1179.

- **Mesitylsulfonato de 8H-2,3,10,11-tetrametilpiridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1b)**

Seguendo el procedimiento general A, a partir de **2b** (96,1 mg; 0,22 mmol) y agitando la mezcla de reacción durante 30 minutos, se obtienen 59 mg (56%) de **1b** como un sólido verdoso.



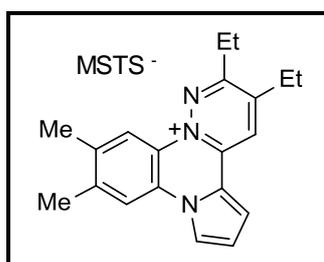
Rendimiento: 56%. **P.f.:** 242-243 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3430,8; 3080,8; 2927,6; 1626,7; 1603,2; 1553,6; 1500,1; 1474,0; 1457,2; 1394,1; 1256,5; 1173,6; 1084,4; 1012,2; 878,7; 854,3; 767,2; 678,1; 580,4; 549,4; 527,6 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 8,83 (s, 1H, H-4); 8,72 (s, 1H, H-12); 8,65 (m, 1H, H-7); 8,23 (s, 1H, H-9); 7,96 (d, 1H, $J = 3,2$

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

Hz, H-5); 7,23 (m, 1H, H-6); 6,82 (s, 2H, H_{Ar-MSTS}); 2,86 (s, 3H, CH₃); 2,71 (s, 3H, CH₃); 2,60 (s, 9H, 2 CH_{3-MSTS}, CH₃); 2,56 (s, 3H, CH₃); 2,21 (s, 3H, CH_{3-MSTS}) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 161,1; 147,0; 144,4; 140,8; 139,9; 138,8; 138,7; 138,1; 131,6 (2C); 128,9 (2C); 126,8; 126,1; 122,8; 121,5; 121,1; 118,1; 117,6; 115,8; 23,2 (2C); 20,8; 20,5; 20,2; 20,0; 19,4 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₁₈H₁₈N₃: [M]⁺: 276,1495; encontrado [M]⁺: 276,1494

▪ **Mesitilenosulfonato de 2,3-dietil-8H-10,11-dimetilpiridazino[2,3-a]pirrolo [2,1-c]quinoxal-13-inio (II)**

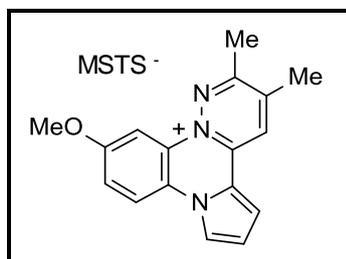
Seguendo el procedimiento general D, a partir de **2b** (101,6 mg; 0,23 mmol), se obtienen 78,7 mg (65%) de **II** como un sólido naranja.



Rendimiento: 65%. **P.f.:** 224-226 °C. **IR (KBr) v_{máx}:** 3435,9; 3090,6; 2970,2; 2918,8; 2358,9; 2341,6; 1624,4; 1552,1; 1455,0; 1386,7; 1190,1; 1084,3; 1016,4; 879,8; 849,5; 765,7; 675,7 cm⁻¹. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 8,71 (s, 1H, H-12); 8,70 (s, 1H, H-4); 8,67 (m, 1H, H-7); 8,24 (s, 1H, H-9); 8,06 (d, 1H, J = 4,1 Hz, H-5); 7,24 (dd, 1H, J = 4,1 Hz, J = 2,6 Hz, H-6); 6,80 (s, 2H, H_{Ar-MSTS}); 3,28 (c, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂); 3,06 (c, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂); 2,60 (s, 3H, CH₃); 2,58 (s, 6H, 2 CH_{3-MSTS}); 2,57 (s, 3H, CH₃); 2,20 (s, 3H, CH_{3-MSTS}); 1,59 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃); 1,52 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 151,4; 144,4; 139,9; 138,9; 138,6; 138,2; 131,6 (2C); 127,1 (2C); 126,9; 126,4; 122,8; 121,4; 121,1; 119,1; 118,1; 117,8; 117,7; 116,0; 27,4; 25,8; 23,3 (2C); 20,8; 20,3; 20,1; 12,3; 11,1 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₂₀H₂₂N₃: [M]⁺: 304,1808; encontrado [M]⁺: 304,1820.

▪ **Mesitilenosulfonato de 8H-2,3-dimetil-11-metoxipiridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1f)**

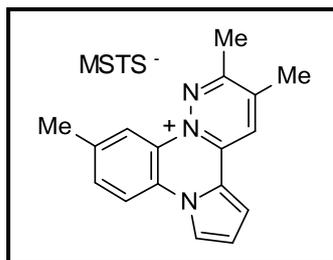
Siguiendo el procedimiento general A, a partir de **2f** (117,2 mg; 0,27 mmol) y manteniendo agitación durante 30 minutos, se obtienen 49,9 mg (38%) de **1f** como un sólido verde oscuro.



Rendimiento: 38%. **P.f.:** 273-274 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3468,5; 2930,4; 1623,4; 1555,6; 1535,5; 1508,8; 1458,7; 1396,6; 1318,0; 1257,0; 1085,9; 1016,1; 853,0; 842,7; 750,6; 677,1; 609,5; 579,6; 548,1 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD) δ :** 8,87 (s, 1H, H-4); 8,66 (m, 1H, H-7); 8,43 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-12); 8,38 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz, H-9); 7,98 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-5); 7,58 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz, $J = 2,5$ Hz, H-10); 7,25 (t_{ap} , 1H, $J = 3,4$ Hz, H-6); 6,85 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTS}}$); 4,06 (s, 3H, CH_3O); 2,87 (s, 3H, CH_3); 2,73 (s, 3H, CH_3); 2,62 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$); 2,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 161,1; 160,2; 147,5; 140,8; 139,9; 139,5; 138,1; 131,6 (2C); 129,2; 128,9 (2C); 123,0; 122,9; 121,4; 121,3; 118,9; 118,1; 115,7; 103,9; 56,8; 23,3 (2C); 20,8; 20,5; 19,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}$: $[\text{M}]^+$: 278,1288; encontrado $[\text{M}]^+$: 278,1291.

▪ **Mesitilenosulfonato de 8H-2,3,11-trimetilpiridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1c)**

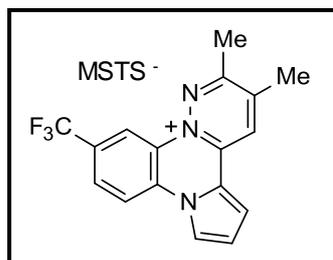
Siguiendo el procedimiento general A, a partir de **2c** (124,0 mg; 0,30 mmol) y agitando la mezcla de reacción durante 20 minutos, se obtienen 68,0 mg (49%) de **1c** como un sólido verdoso.



Rendimiento: 49%. **P.f.:** 146-147 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3432,4; 2918,0; 1735,9; 1629,9; 1603,5; 1553,6; 1509,0; 1459,1; 1393,4; 1317,7; 1188,4; 1083,8; 1014,1; 676,2; 581,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 8,79 (s, 1H); 8,72 (s, 1H); 8,62 (s, 1H); 8,25 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,94 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz); 7,75 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,21 (t, 1H, $J = 2,9$ Hz); 6,73 (s, 2H); 2,85 (s, 3H); 2,71 (s, 3H); 2,63 (s, 3H); 2,55 (s, 6H); 2,15 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 161,2; 147,6; 140,8; 139,9; 139,5; 139,3; 138,1; 134,4; 131,5 (2C); 128,9 (2C); 127,9; 126,7; 123,1; 121,4; 120,9; 118,2; 117,3; 116,2; 23,3 (2C); 21,4; 20,8; 20,5; 19,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 262,1339; encontrado $[\text{M}]^+$: 262,1339.

▪ **Mesitylsulfonato de 11-trifluorometil-8H-2,3-dimetil-piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1e)**

Seguendo el procedimiento general B, a partir de **2e** (103,1 mg; 0,22 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 10 minutos, se obtienen 54,4 mg (48%) de **1e** como un sólido negro.

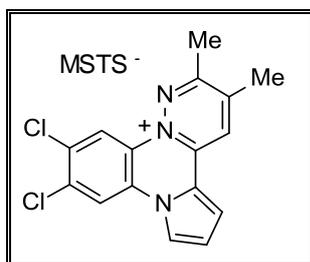


Rendimiento: 48%. **P.f.:** 288-290 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3448,2; 3105,8; 2360,9; 1629,5; 1458,0; 1335,0; 1317,7; 1126,4; 1074,8; 1014,9; 832,3; 807,2; 677,3; 578,8; 549,0 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,23 (s, 1H); 8,93 (s, 1H); 8,80 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz, J

= 1,3 Hz); 8,63 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 8,24 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 8,09 (dd, 1H, $J = 4,1$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,32 (dd, 1H, $J = 4,1$ Hz; $J = 2,9$ Hz); 6,77 (s, 2H); 2,89 (s, 3H); 2,75 (s, 3H); 2,55 (s, 6H); 2,19 (s, 3H) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ : 161,9; 149,1; 140,8; 140,5; 139,9; 138,1; 131,6 (2C); 129,6; 129,1 (2C); 124,4; 122,1; 119,1; 119,0; 117,6; 23,2 (2C); 20,8; 20,5; 19,3 ppm. **HRMS (ESI⁺)** m/e calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 316,1056; encontrado $[\text{M}]^+$: 316,1051.

▪ **Mesitilenosulfonato de 10,11-dicloro-8H-2,3-dimetilpiridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1d)**

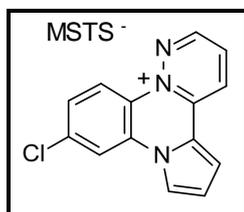
Seguendo el procedimiento general A, a partir de **2d** (132,2 mg; 0,28 mmol) y manteniendo agitación durante 20 minutos, se obtienen 51,6 mg (35%) de **1d** como un sólido negro.



Rendimiento: 35%. **P.f.:** 289-290 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3422,3; 3080,6; 1603,1; 1499,3; 1372,1; 1288,6; 1188,2; 1084,7; 1015,4; 885,7; 848,6; 762,8; 677,7; 581,7 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD) δ :** 9,13 (s, 1H, H-12); 8,92 (s, 1H, H-9); 8,82 (s, 1H, H-4); 8,76 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-7); 8,06 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-5); 7,29 (t_{ap} , 1H, $J = 3,6$ Hz, H-6); 6,82 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTS}}$); 2,88 (s, 3H, CH_3); 2,74 (s, 3H, CH_3); 2,61 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$); 2,25 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 149,3; 143,7; 140,7; 140,1; 140,0; 138,1; 137,9; 137,5; 136,2; 132,3; 131,6 (2C); 129,0; 128,3 (2C); 124,4; 123,0; 119,6; 118,9; 117,4; 23,2 (2C); 20,8; 20,4; 19,5 ppm. **HRMS (ESI⁺)** m/e calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_3$: $[\text{M}]^+$: 316,0403; encontrado $[\text{M}]^+$: 316,0401.

▪ **Mesitilenosulfonato de 10-cloro-8H-piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1k)**

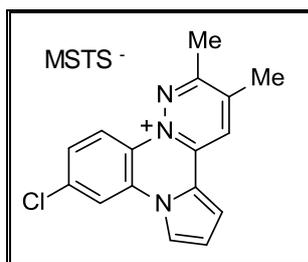
Siguiendo el procedimiento general B, a partir de **2g** (122,0 mg; 0,28 mmol) y calentando a reflujo durante 20 minutos, se obtienen 60,3 mg (47%) de **1k** como un sólido verde oscuro.



Rendimiento: 47%. **P.f.:** 275-276 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3422,3; 3091,1; 1623,3; 1605,6; 1557,7; 1535,0; 1497,0; 1472,9; 1431,8; 1189,2; 1086,1; 1016,0; 848,7; 810,3; 752,4; 678,8; 851,4 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,26 (dd, 1H, $J = 4,2$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-2); 9,15 (dd, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-4); 8,97 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H-12); 8,85 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-7); 8,66 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-9); 8,27 (dd, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 4,7$ Hz, H-3); 8,16 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-5); 7,84 (dd, 1H, $J = 9,4$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H-11); 7,35 (t_{ap} , 1H, $J = 3,6$ Hz, H-6); 6,85 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTS}}$), 2,61 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$); 2,24 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-MSTS}$) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 150,5; 141,1; 140,8; 140,1; 140,0; 138,2; 133,4; 131,8; 131,6 (2C); 130,1; 129,1 (2C); 127,6; 124,9; 123,5; 122,5; 119,2; 118,1; 117,9; 23,3 (2C); 20,8 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_3$: $[\text{M}]^+$: 254,0480; encontrado $[\text{M}]^+$: 254,0479.

▪ **Mesitilenosulfonato de 10-cloro-8H-2,3-dimetilpiridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1g)**

Siguiendo el procedimiento general A, a partir de **2g** (116,9 mg; 0,27 mmol) y manteniendo agitación durante 30 minutos, se obtienen 54,5 mg (43%) de **1g** como un sólido negro.

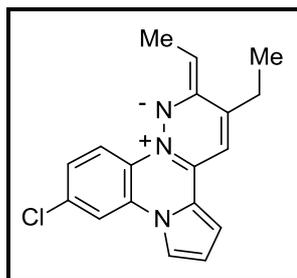


Rendimiento: 43%. **P.f.:** 231-232 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3422,4; 3076,1; 1735,1; 1602,8; 1556,7; 1472,4; 1432,1; 1248,6; 1178,3; 1084,2; 1013,0; 843,4; 827,1; 769,1; 676,8; 606,9; 578,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 8,90 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-12); 8,83 (s, 1H, H-4); 8,68 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-7); 8,53 (s, 1H, H-9); 7,99 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-5); 7,75 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J = 1,6$ Hz, H-11); 7,24 (t_{ap} , 1H, $J = 3,4$ Hz, H-6); 6,72 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-MSTS}}$); 2,87 (s, 3H, CH_3); 2,73 (s, 3H, CH_3); 2,62 (s, 6H, CH_3 -MSTS); 2,24 (s, 3H, CH_3 -MSTS) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 161,6; 148,2; 1408; 139,8; 139,5; 139,3; 138,1; 131,5 (2C); 129,7; 129,1; 128,7 (2C); 127,0; 123,9; 123,2; 121,9; 118,6; 117,6; 117,0; 23,3 (2C); 20,8; 20,5; 19,5 ppm. **HRMS (ESI⁺) m/e** calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_3$: $[\text{M}]^+$: 282,0793; encontrado $[\text{M}]^+$: 282,0795.

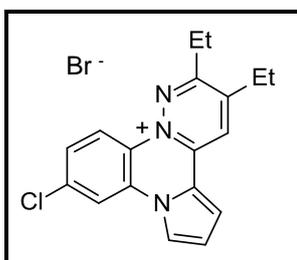
▪ **Bromuro de 10-cloro-2,3-dietil-8H-piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1m)**

Siguiendo el procedimiento general E, a partir de **2g** (0,36 g; 0,84 mmol) y agitando la mezcla de reacción durante 4 horas, se obtienen 0,16 g (65%) de la heterobetaina **11m** como un sólido de color ocre. A continuación, a una suspensión de **11m** (0,13 g; 0,42 mmol) en agua (9 mL), enfriada a 0 °C, se le añade HBr (47 μL ; 0,42 mmol) y se mantiene agitando a dicha temperatura durante 10 minutos. Pasado dicho tiempo, la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y 45 minutos y el precipitado formado se filtra. Las aguas de filtrado se liofilizan, obteniéndose así 68,5 mg (42%) de **1m** como un sólido naranja.

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL



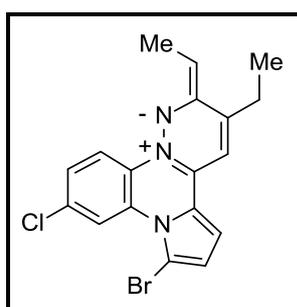
Rendimiento: 65%. **P.f.:** 157-158 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3419,0; 3108,4; 2970,9; 2359,6; 1606,7; 1503,4; 1434,4; 1363,9; 1305,4; 1154,9; 1100,1; 1034,6; 843,5; 810,2 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,85 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, H-12); 7,36 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-9); 7,26 (m, 2H, H-4, H-7); 7,09 (dd, 1H, $J = 9,1$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H-11); 6,61 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-5); 6,49 (t_{ap} , 1H, $J = 3,8$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H-6); 4,99 (c, 1H, $J = 7,3$ Hz, CH); 2,43 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH_2); 1,71 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH-CH_3); 1,26 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ :** 169,5; 162,0; 138,5; 132,5; 126,8; 126,1; 125,5; 120,8; 119,7; 117,2; 116,8; 114,8; 114,7; 110,2; 105,0; 29,7; 23,9; 10,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_3$: $[\text{M}]^+$: 310,1106; encontrado $[\text{M}]^+$: 310,1089.



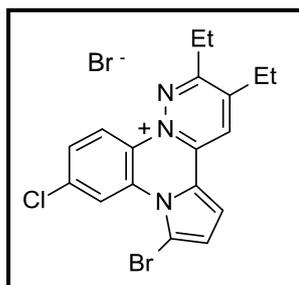
Rendimiento: 42%. **P.f.:** 251-252 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3415,1; 3025,2; 2970,4; 2932,4; 1619,7; 1601,5; 1551,3; 1473,8; 1428,5; 1375,7; 1246,7; 1160,7; 1101,8; 1051,1; 911,9; 886,6; 777,9; 698,3; 650,7 cm^{-1} . **^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) δ :** 9,00 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz, H-12); 8,81 (s, 1H, H-4); 8,78 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-7); 8,65 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-9); 8,17 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-5); 7,83 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz, $J = 1,7$ Hz, H-11); 7,30 (t_{ap} , 1H, $J = 3,4$ Hz, H-6); 3,25 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 3,09 (c, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_2); 1,61 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3); 1,53 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz, CH_3) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ :** 144,4; 140,8; 139,9; 138,7; 138,1; 131,6; 128,9; 126,8; 126,1; 122,8; 121,1; 118,1; 117,6; 115,8; 20,8; 20,5; 20,2; 20,0 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_3$: $[\text{M}]^+$: 310,1106; encontrado $[\text{M}]^+$: 310,1093.

▪ **Bromuro de 7-bromo-10-cloro-2,3-dietil-8H-piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inio (1n)**

Siguiendo el procedimiento general E, a partir de **2i** (0,23 g; 0,45 mmol) y manteniendo agitación durante 3 horas, se obtienen 0,14 g (82%) de la heterobetaina **11n** como un sólido amarillo. A continuación, a una suspensión de **11n** (52,3 mg; 0,13 mmol) en CH₂Cl₂ (12 mL), enfriada a 0 °C, se le añade HBr (15 µL; 0,42 mmol) y se mantiene agitando a dicha temperatura durante 10 minutos. Pasado dicho tiempo, la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 6 horas y 30 minutos y después se concentra a sequedad. El residuo obtenido se tritura utilizando éter etílico, aislándose así 61,1 mg (97%) de **1n** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 82%. **P.f.:** 211-212 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3424,0; 2971,6; 2908,9; 2348,3; 1639,1; 1493,4; 1387,4; 1311,8; 1104,8; 1041,9; 977,8; 847,2; 818,2; 802,2; 764,9; 749,2 cm⁻¹. **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ :** 8,75 (s, 1H); 7,85 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz); 7,11 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz); 6,58 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz); 6,48 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz); 5,88 (s, 1H); 4,98 (c, 1H, $J = 7,2$ Hz); 2,40 (c, 2H, $J = 7,0$ Hz); 1,69 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz); 1,24 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz) ppm. **¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ :** 154,9; 126,7; 126,0; 125,9; 125,7; 124,7; 118,6; 115,9; 115,6; 110,5; 106,2; 104,8; 103,9; 97,8; 93,6; 25,5; 12,6; 10,2 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₈H₁₆BrClN₃: [M]⁺: 388,0211; encontrado [M]⁺: 388,0170.



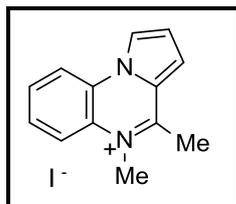
Rendimiento: 97%. **P.f.:** 200-202 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3422,5; 3022,7; 2930,5; 2363,5; 1623,8; 1599,8; 1552,0; 1471,8; 1397,3; 1373,0; 1253,4; 1100,3; 1053,0; 975,8; 932,1; 849,6; 840,5; 799,8; 780,4; 652,4 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,61 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-9); 9,11 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H-12); 8,82 (s, 1H, H-4), 8,26 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, H-5/H-6); 7,92 (dd, 1H, $J = 9,4$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H-11); 7,41 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, H-6/H-5); 3,27 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH_2); 3,09 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH_2); 1,60 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH_3); 1,53 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 164,3; 153,0; 138,9; 137,9; 130,9; 129,2; 128,3; 126,7; 124,7; 124,3; 123,3; 118,0; 117,8; 109,5; 27,4; 26,0; 12,3; 10,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrClN}_3$: $[\text{M}]^+$: 390,0189; encontrado $[\text{M}]^+$: 390,0185.

2.3.8. Síntesis de yoduros de 10H-4,5-dimetilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio

Procedimiento general: Una disolución del correspondiente derivado de pirrolo[1,2-a]quinoxalina (1 eq.) en acetonitrilo (18,2 mL/mmol) se le adiciona CH_3I (10 eq.) y se calienta a 160 °C usando un microondas focalizado durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación, se adiciona éter dietílico a la mezcla de reacción (para favorecer la precipitación del compuesto) y; el precipitado existente en el medio de reacción se filtra y se lava con éter dietílico frío.

▪ Yoduro de 10H-4,5-dimetilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (12a)

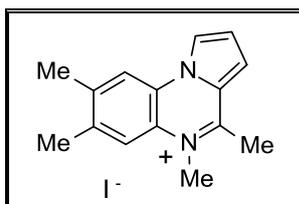
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3a** (0,10 g; 0,55 mmol) y calentando durante 20 minutos, se obtienen 0,13 g (77%) de **12a** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 77%. **P.f.:** 267-268 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3435,8; 3072,6; 3016,1; 1615,6; 1603,4; 1554,6; 1490,8; 1462,4; 1420, 4; 1327,0; 1313,8; 1124,9; 1057,4; 922,02; 766,0; 747,5 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 8,92 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz); 8,50 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,4$ Hz); 8,29 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 1,2$ Hz); 8,03 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz); 7,91 (td, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,2$ Hz); 7,82 (td, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,4$ Hz); 7,35 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 2,6$ Hz); 4,31 (s, 3H); 3,20 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 154,9; 129,3; 126,9; 126,6; 125,7; 124,2; 123,8; 119,7; 119,6; 117,8; 115,9; 37,4; 18,3 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2$: $[\text{M}]^+$: 197,1073; encontrado $[\text{M}]^+$: 197,1070.

▪ **Yoduro de 10H-4,5,7,8-tetrametilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (12b)**

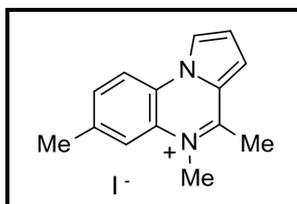
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3b** (0,10 g; 0,48 mmol) y calentando durante 30 minutos, se obtienen 0,14 g (82%) de **12b** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 82%. **P.f.:** 308-309 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3433,9; 3085,1; 3012,4; 2942,6; 1602,0; 1546,6; 1418,1; 1367,7; 1303,4; 1115,1; 1049,1; 942,9; 885,6; 766,3 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 8,98 (m, 1H, H-1); 8,42 (s, 1H, H-6); 8,09 (s, 1H, H-9); 8,02 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-3); 7,32 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H-2); 4,15 (s, 3H); 3,08 (s, 3H); 2,47 (s, 3H); 2,46 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 153,8; 139,5; 136,5; 124,7; 123,9; 123,8; 123,4; 119,5; 118,9; 117,8; 115,9; 37,3; 19,0 (2C); 18,1 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2$: $[\text{M}]^+$: 225,1386; encontrado $[\text{M}]^+$: 225,1381.

▪ **Yoduro de 10H-4,5,7-trimetilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (12c)**

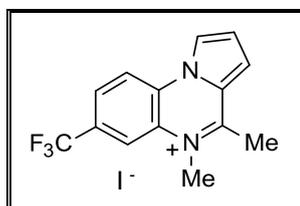
Según se describe en el procedimiento general, partiendo de **3c** (0,10 g; 0,51 mmol) y calentando durante 45 minutos, se obtienen 0,12 g (70%) de **12c** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 70%. **P.f.:** 299 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3433,7; 3072,9; 1611,3; 1549,6; 1494,7; 1420,5; 1315,5; 1132,3; 1056,9; 821,8; 765,6; 591,3 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ :** 9,03 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-1); 8,48 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-9/H-8); 8,13 (s, 1H, H-6); 8,05 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-3); 7,71 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-8/H-9); 7,33 (dd, 1H, $J = 4,2$ Hz, $J = 2,5$ Hz, H-2); 4,16 (s, 3H, N-CH₃); 3,10 (s, 3H, CH₃); 2,54 (s, 3H, CH₃) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ :** 154,7; 137,2; 130,3; 126,6; 123,9; 123,8; 123,7; 119,3; 119,3; 117,8; 115,7; 37,2; 20,4; 18,2 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₄H₁₅N₂: [M]⁺: 211,1230; encontrado [M]⁺: 211,1233.

▪ **Yoduro de 7-trifluorometil-10H-4,5-dimetilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (12e)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3e** (63,6 mg; 0,25 mmol) y calentando durante 30 minutos, se obtienen 51,4 mg (52%) de **12e** como un sólido amarillo.

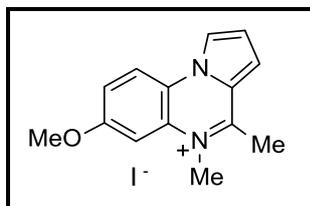


Rendimiento: 52%. **P.f.:** 289-290 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3439,8; 3073,0; 3024,7; 1613,9; 1557,9; 1423,4; 1339,7; 1254,6; 1178,9; 1123,0; 1054,0; 834,1; 763,2; 683,8 cm^{-1} . **$^1\text{H-}$**

RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 9,22 (m, 1H, H-1); 8,80 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, H-8/H-9); 8,59 (s, 1H, H-6); 8,28 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-9/H-8); 8,21 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-3); 7,43 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-2); 4,25 (s, 3H, N-CH₃); 3,15 (s, 3H, CH₃) ppm. **^{13}C -RMN (50 MHz, DMSO- d_6)** δ : 156,6; 128,4; 126,9; 126,8 (c, $^2J_{\text{CF}} = 32,9$ Hz); 125,8 (c, $^3J_{\text{CF}} = 3,8$ Hz); 125,6; 125,5; 125,3 (c, $^1J_{\text{CF}} = 273,2$ Hz); 124,4; 121,1; 118,6; 117,5; 37,7; 18,5 ppm. **HRMS [ESI-TOF]**: Calculado para C₁₄H₁₂F₃N₂: [M]⁺: 265,0947; encontrado [M]⁺: 265,0929.

▪ **Yoduro de 10H-4,5-dimetil-7-metoxipirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (12f)**

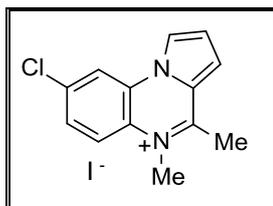
Según se describe en el procedimiento general, a partir de **3f** (0,10 g; 0,49 mmol) y manteniendo la calefacción durante 30 minutos, se obtienen 0,15 g (87%) de **12f** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 87%. **P.f.:** 257-258 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3066,5; 1614,1; 1551,6; 1493,0; 1420,9; 1291,3; 1212,8; 1130,1; 1036,8; 841,7; 805,9; 77,9 cm⁻¹. **^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6)** δ : 9,02 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-6); 8,54 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H-9); 8,03 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-3); 7,66 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-1); 7,52 (dd, 1H, $J = 9,1$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-8); 7,31 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H-2); 4,16 (s, 3H, N-CH₃); 3,98 (s, 3H, CH₃O); 3,10 (s, 3H, CH₃) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6)** δ : 157,6; 154,7; 127,8; 123,8; 123,6; 119,9; 119,0; 117,7; 117,3; 116,8; 103,2; 55,8; 37,4; 18,3 ppm. **HRMS [ESI-TOF]**: Calculado para C₁₄H₁₅N₂O: [M]⁺: 227,1179; encontrado [M]⁺: 227,1156.

▪ **Yoduro de 8-cloro-10H-4,5-dimetilpirrolo[1,2-a]quinoxal-5-inio (12g)**

Tal y como se describe en el procedimiento general, a partir de **3g** (96,2 mg; 0,44 mmol) y manteniendo la calefacción durante 30 minutos, se obtienen 0,12 g (75%) de **12g** como un sólido amarillo.



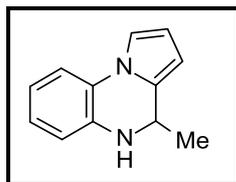
Rendimiento: 75%. **P.f.:** 267-268 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3428,8; 3065,2; 2996,5; 1616,2; 1551,9; 1413,6; 1326,5; 1133,4; 1053,2; 815,6; 762,5; 715,2; 599,4; 462,4 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ :** 9,12 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-1); 8,82 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-9); 8,31 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H-6); 8,13 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 0,9$ Hz, H-3); 7,82 (dd, 1H, $J = 9,4$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H-7); 7,38 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-2); 4,16 (s, 3H, N- CH_3); 3,11 (s, 3H, CH_3) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ :** 155,4; 133,9; 126,9; 126,8; 125,8; 124,9; 124,2; 121,7; 120,4; 118,3; 115,9; 37,6; 18,3 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_2$: $[\text{M}]^+$: 231,0684; encontrado $[\text{M}]^+$: 231,0669.

2.3.9. Síntesis de 4H,5H,10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalinas

Procedimiento general: A una disolución del correspondiente derivado de pirrolo[1,2-a]quinoxalina (1 eq.) en THF anhidro (8,4 mL/mmol) se le adiciona LiAlH_4 (2 eq.) y se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizado dicho tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente, se le añade agua (4,2 mL/mmol) y AcOEt (8,4 mL/mmol). Se separan las fases y la fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (3 x 10,4 mL/mmol), se seca sobre MgSO_4 anhidro y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con la mezcla de disolventes indicada en cada caso.

▪ 4H,5H,10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (13a)

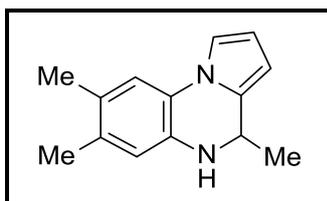
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3a** (0,10 g; 0,55 mmol), calentando durante 17 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 79,3 mg (78%) de **13a** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 78%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 3344,3; 2973,9; 1613,5; 1518,6; 1422,4; 1339,7; 1293,7; 1171,3; 1090,8; 1038,8; 889,5; 743,5; 607,3 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,26 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,12 (t, 1H, $J = 1,2$ Hz); 6,93 (t_{ap} , 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,3$ Hz); 6,79 (t_{ap} , 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,6$ Hz); 6,70 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 6,28 (m, 1H); 5,97 (t, 1H, $J = 1,4$ Hz); 4,51 (c, 1H, $J = 6,4$ Hz); 3,85 (s_{ancho} , 1H); 1,52 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 136,3; 131,1; 125,7; 124,5; 119,2; 115,2; 114,7; 114,2; 109,9; 103,2; 46,4; 20,5 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 185,1073; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 185,1089.

▪ **4H,5H,10H-4,7,8-trimetilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (13b)**

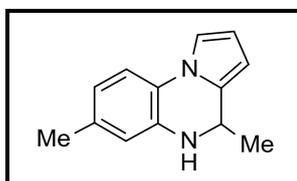
Según se describe en el procedimiento general, a partir de **3b** (0,10 g; 0,48 mmol), calentando durante 24 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (9:1), se obtienen 66,0 mg (64%) de **13b** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 64%. **P.f.:** 138-140 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3348,5; 2975,5; 2917,2; 1619,6; 1592,9; 1522,7; 1474,4; 1342,5; 1311,4; 1263,9; 1282,2; 1263,9; 1157,9; 1082,5; 1021,9; 860,7; 724,3; 618,6 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,09 (m, 1H, H-1); 7,04 (s, 1H, H-9); 6,53 (s, 1H, H-6); 6,25 (t_{ap} , 1H, $J = 3,3$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H-2); 5,94 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz, H-3); 4,46 (c, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-4); 3,67 (s_{ancho} , 1H, NH); 2,19 (s, 3H, CH_3); 2,16 (s, 3H, CH_3); 1,51 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 147,5; 134,1; 132,6; 131,2; 116,7; 115,9; 114,1; 109,5; 102,8; 99,9; 46,6; 20,3; 19,3; 19,2 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 213,1386; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 213,1386.

▪ **4*H*,5*H*,10*H*-4,7-dimetilpirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (13c)**

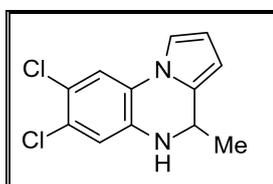
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3c** (0,10 g; 0,53 mmol), calentando durante 24 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (7:3), se obtienen 53,6 mg (51%) de **13c** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 51%. **P.f.:** 101-102 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3350,5; 2975,7; 2918,6; 2798,3; 1618,1; 1599,0; 1530,3; 1339,9; 1293,6; 1174,6; 1092,5; 858,2; 794,0; 717,5; 588,1; 450,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,15 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-9); 7,09 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-1); 6,60 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-8); 6,54 (s, 1H, H-6); 6,27 (t, 1H, $J = 3,3$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H-2); 5,94 (t, 1H, $J = 2,9$ Hz, H-3); 4,50 (c, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-4); 3,77 (Sancho, 1H, NH); 2,25 (s, 3H, CH_3); 1,52 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 136,2; 134,3; 130,9; 123,5; 119,8; 115,8; 114,5; 114,1; 109,6; 102,9; 46,5; 21,0; 20,5 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 199,1230; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 199,1234.

▪ **7,8-dicloro-4*H*,5*H*,10*H*-4-metilpirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (13d)**

Tal y como se describe en el procedimiento general, a partir de **3d** (0,10 g; 0,40 mmol), calentando durante 24 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (7:3), se obtienen 88,9 mg (86%) de **13d** como un sólido amarillo.

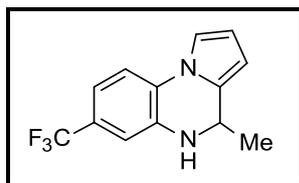


Rendimiento: 86%. **P.f.:** 133-134 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3336,9; 2979,8; 2806,8; 1610,8; 1508,4; 1340,5; 1305,5; 1273,6; 1156,3; 1121,7; 1094,5; 852,4; 719,1; 685,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,75 (s, 1H, H-9); 7,69 (s, 1H, H-6); 7,49 (dd, 1H, $J = 2,9$

Hz, $J = 1,3$ Hz, H-1); 6,75 (t_{ap}, 1H, $J = 3,3$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H-2); 6,43 (dd, 1H, $J = 2,0$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-3); 4,98 (c, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-4); 4,37 (s_{ancho}, 1H, NH); 1,97 (d, 3H, $J = 6,3$ Hz, CH₃) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 135,7; 130,5; 127,3; 125,0; 121,5; 116,1; 116,0; 114,4; 110,9; 104,1; 46,4; 20,7 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₁₂H₁₀Cl₂N₂: [M+H]⁺: 253,0294; encontrado [M+H]⁺: 253,0308.

▪ **7-trifluorometil-4H,5H,10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (13e)**

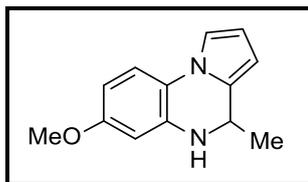
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3e** (89,4 mg; 0,35 mmol), manteniendo calefacción durante 20 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 55,8 mg (62%) de **13e** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 62%. **P.f.:** 222 °C. **IR (KBr) v_{máx}:** 3362,7; 2975,9; 1605,8; 1494,9; 1431,1; 1337,9; 1250,8; 1111,7; 984,5; 872,1; 805,5; 723,2; 695,0; 650,8; 605,9; 569,5; 510,8; 454,6 cm⁻¹. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,30 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz); 7,13 (t, 1H, $J = 1,3$ Hz); 7,04 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz); 6,9 (s, 1H); 6,33 (t, 1H, $J = 3,3$ Hz); 6,01 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz); 4,57 (c, 1H, $J = 6,3$ Hz); 4,01 (s_{ancho}, 1H); 1,54 (d, 3H, $J = 6,3$ Hz) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 136,2; 130,9; 127,8; 126,4 (²J_{CF} = 32,8 Hz); 124,1 (¹J_{CF} = 271,7 Hz); 123,4; 115,9 (³J_{CF} = 4,3 Hz); 114,5; 111,8 (³J_{CF} = 3,9 Hz); 111,0; 104,1; 46,3; 20,7 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₁₃H₁₁F₃N₂: [M+H]⁺: 253,0947; encontrado [M+H]⁺: 253,0974.

▪ **4H,5H,10H-4-metil-7-metoxipirrolo[1,2-a]quinoxalina (13f)**

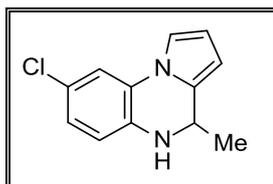
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **3f** (0,10 g; 0,50 mmol), calentando durante 43 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 44,6 mg (41%) de **13f** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 41%. **P.f.:** 89-90 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3376,0; 2975,8; 1618,8; 1526,7; 1262,4; 1035,8; 797,9; 697,8; 606,0 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,17 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-9); 7,06 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-1); 6,33 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-8); 6,29 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H-6); 6,26 (t_{ap} , 1H, $J = 3,3$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H-2); 5,95 (dd, 1H, $J = 3,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-3); 4,51 (c, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-4); 3,8 (s_{Sancho} , 1H, NH); 3,75 (s, 3H, CH_3O); 1,52 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ :** 156,9; 137,4; 130,5; 115,3; 114,6; 113,9; 109,4; 103,9; 102,7; 101,2; 55,4; 46,5; 20,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 215,1179; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 215,1198.

▪ **8-cloro-4H,5H,10H-4-metilpirrolo[1,2-a]quinoxalina (13g)**

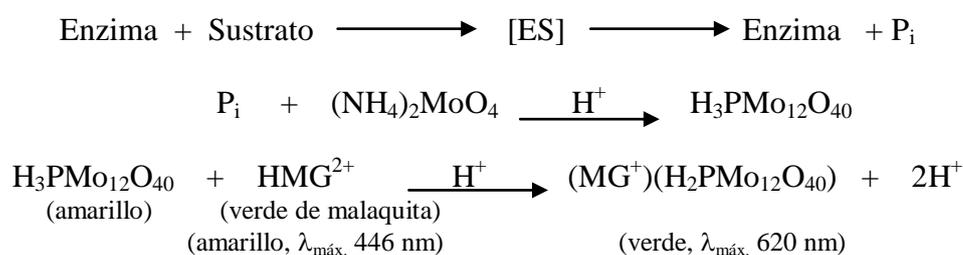
Seguendo el procedimiento general, a partir de **3g** (0,10 g; 0,46 mmol), calentando durante 20 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 97,5 mg (95%) de **13g** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 95%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 3363,0; 2969,3; 1591,3; 1509,1; 1374,2; 1316,1; 1279,1; 1165,5; 1091,1; 1023,2; 857,2; 808,9; 780,2; 759,4; 697,5; 612,8; 544,8; 444,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :** 7,23 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H-1); 7,06 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-9); 6,88 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H-7); 6,54 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-6); 6,29 (t, 1H, $J = 3,3$ Hz, H-2); 5,97 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-3); 4,52 (c, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-4); 3,86 (s_{Sancho} , 1H, NH); 1,52 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ :** 134,8; 130,9; 126,4; 124,2; 123,7; 116,0; 114,9; 114,4; 110,6; 103,7; 46,4; 20,5 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 219,0684; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 219,0686.

2.4. MÉTODOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

Para evaluar la actividad de los distintos compuestos sintetizados, el ensayo de inhibición se llevó a cabo empleando el kit comercial “*PTP1B Tyrosine Phosphatase Drug Discovery Kit*” (BML-AK822 Enzo) de la casa comercial Enzo Life Sciences. El método empleado en dicho kit es un método colorimétrico, no radiactivo que mide la actividad fosfatasa de PTP-1B purificada, basándose en el ensayo de Verde de Malaquita. Dicho ensayo mide el fosfato inorgánico libre en disolución acuosa y, se basa en la formación de un complejo entre el molibdato de verde de malaquita y el ortofosfato libre en medio ácido (Esquema 2.40). El valor de absorbancia de ese complejo a 620 nm es proporcional a la concentración de fosfato orgánico libre.



Esquema 2.40. Ensayo de Verde de Malaquita

El kit comercial “*PTP1B Tyrosine Phosphatase Drug Discovery Kit*” está compuesto por:

- la enzima PTP-1B humana recombinante,
- el sustrato fosfopeptídico IR5 (residuos 1142-1153, pY-1146 del receptor β de insulina) que debe autofosforilarse para lograr una activación total del receptor quinasa,
- suramina, un inhibidor de PTP-1B, que se suministra como control en la detección de la inhibición. La suramina es un inhibidor competitivo y reversible de PTP-1B con un valor de $K_i = 5,5 \mu\text{M}$.
- buffer
- un agente de detección de la concentración de fosfato.

CAPÍTULO I: PARTE EXPERIMENTAL

El ensayo realizado para la determinación del porcentaje de inhibición se basa en hacer reaccionar PTP1B *in vitro* con un sustrato específico, IR5, que contiene secuencias de la subunidad β del receptor de insulina, y utilizando suramina como control específico de la inhibición. El ensayo se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos, añadiendo sucesivamente el tampón de ensayo, los inhibidores a una concentración final de 1 μM , la enzima recombinante y el sustrato. Tras la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 620 nm. Pasado este tiempo, se añade el reactivo de detección y se mide la absorbancia a 620 nm después de 30 minutos. Para calcular la actividad, se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{[\text{test muestra (tiempo 30 min) (nmol PO}_4^{2-}) - \text{“tiempo cero” (nmol PO}_4^{2-})]}{[\text{Control (tiempo 30 min) (nmol PO}_4^{2-}) - \text{“tiempo cero” (nmol PO}_4^{2-})]}$$

El porcentaje de inhibición de la actividad se expresa de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ Actividad}$$

Para la determinación de la IC_{50} de los compuestos se realiza el mismo ensayo que para la determinación del porcentaje de inhibición, haciendo una curva dosis-respuesta para los distintos compuestos a las concentraciones de 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM y 4 μM . La actividad se calcula empleando la misma fórmula y con los resultados de actividad y las concentraciones se calcula el valor de IC_{50} utilizando un programa informático.

3. CAPÍTULO II: SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS DE ADIPOCITO (A-FABP)

3.1. ANTECEDENTES

3.1.1. Introducción

El transporte de los ácidos grasos dentro de la célula es un proceso complejo y dinámico que afecta a múltiples aspectos de la función celular. Los ácidos grasos poseen dos funciones fundamentales: como fuente de energía, almacenada en forma de triacilglicerol y producida en el músculo e hígado; y como señales en la regulación metabólica actuando vía enzimática y transcripcional, modulando así la expresión genética, las vías de crecimiento y desarrollo, y la respuesta inflamatoria y metabólica. Además, algunos ácidos grasos, como el ácido linoleico y el ácido araquidónico, pueden metabolizar en una gran familia de lípidos bioactivos denominados eicosanoides que pueden actuar como mediadores pro- y anti-inflamatorios. Estos nutrientes esenciales se obtienen a través de la dieta, liberados por los adipocitos o sintetizados a partir de la glucosa en el hígado. La asociación de estas moléculas hidrofóbicas con albúmina, lipocalinas y FABPs aumenta considerablemente su solubilidad acuosa, facilitándose así su transporte.^{169,170}

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) se descubrieron a principios de la década de 1970.¹⁷¹ Son proteínas altamente expresadas, de 14-15 kDa, que coordinan la respuesta a lípidos en la célula y están fuertemente asociadas a la ruta metabólica e inflamatoria. Se unen reversiblemente a ligandos hidrofóbicos tales como ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga, eicosanoides y otros lípidos, con elevada afinidad. Sin embargo, se conoce muy poco sobre sus funciones biológicas exactas y sus mecanismos de acción. Estudios realizados en cultivos celulares sugieren que las FABPs poseen una importante acción de importación, almacenaje y exportación de ácidos grasos así como del colesterol y del metabolismo de fosfolípidos. También se ha propuesto que actúen como distribuidores del ligando para la regulación de los procesos de señalización y de la actividad enzimática. A través del empleo de distintos modelos químicos y genéticos, tanto en células como en animales, las FABPs han mostrado tener un rol central en los procesos mediados por lípidos, en las rutas metabólicas y en la

¹⁶⁹ Chmurzynska, A. *J. Appl. Genet.* **2006**, *47*, 39-48.

¹⁷⁰ Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. *Nat. Rev.* **2008**, *7*, 489-503.

¹⁷¹ Ockner, R. K.; Manning, J. A.; Poppenhausen, R. B.; Ho, W. K. L. *Science* **1972**, *177*, 56-58.

respuesta inmune. Dichos estudios realzan su potencial como dianas terapéuticas asociadas a distintas enfermedades incluyendo obesidad, diabetes y aterosclerosis.¹⁷⁰

3.1.2. Generalidades: clasificación y estructura

Las FABPs son miembros de una familia génica conservada que se desarrolló aproximadamente hace 100 millones de años por duplicación secuencial de un gen ancestral, generando un elevado número de homólogos específicos de tejido. Esta diversidad es inusual ya que la mayoría de los lípidos poseen una forma sencilla de unión intracelular a la proteína con una distribución ubicua en los tejidos, siendo esto lo que sugiere una funcionalidad especializada. Esta familia de proteínas incluye nueve FABPs en mamíferos. Sus genes han sido identificados y muestran una organización similar en cuatro exones interrumpidos por tres intrones, donde la longitud de los intrones varía entre las proteínas. Además, se han identificado distintos elementos responsables de dirigir la expresión específica al tejido. Los tejidos que poseen elevados niveles del metabolismo de ácidos grasos tales como el intestino, hígado, tejido adiposo y músculo, poseen elevados niveles de FABPs que paralelamente captan los ácidos grasos y su utilización.

3.1.2.1. Clasificación de las FABPs

Los nombres de las FABPs se asignaron en función del primer tejido en el que cada proteína se identificó. Recientemente, se ha introducido una nomenclatura numérica para los distintos genes de las FABPs. Muchas de ellas se expresan únicamente en un tejido o en un tipo de célula, pero otras como H-FABP se manifiestan en una amplia variedad de tejidos. En muchos tipos de células se expresa más de un tipo de FABP, lo que sugiere que estas proteínas poseen una función especializada.

Las FABPs se pueden clasificar en dos grupos principalmente:¹⁷²

- aquellas que se asocian con la membrana plasmática (FABP_{PM})
- las proteínas citoplasmáticas o intracelulares (FABP_C)

¹⁷⁰ Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. *Nat. Rev.* **2008**, 7, 489-503.

¹⁷² Glatz, J. F.; Van der Vusse, G. J. *Prog. Lipid Res.* **1996**, 35, 243-282.

Hasta el momento, se han identificado nueve FABP_C específicas de tejido, las cuales se recogen en la Tabla 3.1.¹⁷⁰

Tabla 3.1. Expresión de los distintos tipos de genes de FABP (tomada de la ref. 170) y ampliada.

Gen	Nombre común	Nombre alternativo	Expresión
FABP1 ^{173,174,175}	FABP de hígado	L-FABP	Hígado, intestino, páncreas, riñón, pulmón, estómago
FABP2 ^{176,177,178}	FABP de intestino	I-FABP	Intestino, hígado
FABP3 ^{170,173,179}	FABP de corazón	H-FABP, MDGI	Corazón, músculo esquelético, cerebro, riñón, pulmón, estómago, testículo, aorta, glándula adrenal, placenta, ovario, tejido adiposo marrón
FABP4	FABP de adipocitos	A-FABP, aP2	Adipocito, macrófagos, células dendrítica
FABP5 ^{180,181,182,183}	FABP de epidermis	E-FABP, PA-FABP, mall	Piel, lengua, adipocito, macrófago, célula dendrítica, glándula mamaria, cerebro, intestino, riñón, hígado, pulmón, corazón, músculo esquelético, testículo, retina, cristalino, bazo
FABP6 ¹⁸⁴	FABP de ileón	II-FABP, I-BABP, gastrotropina	Íleon, ovario, glándula adrenal, estómago

¹⁷⁰ Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. *Nat. Rev.* **2008**, *7*, 489-503.

¹⁷³ Storch, J.; Corsico, B. *Annu. Rev. Nutr.* **2008**, *28*, 73-95.

¹⁷⁴ He, Y.; Yang, X.; Wang, H.; Estephan, R.; Francis, F.; Kodukula, S.; Storch, J.; Stark, R. E. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 12543-12556.

¹⁷⁵ Storch, J.; Thumser, A. E. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1486*, 28-44.

¹⁷⁶ Hsu, K.-T.; Storch, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13317-13323.

¹⁷⁷ Thumser, A. E. A.; Storch, J. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 647-656.

¹⁷⁸ Baier, L. J.; Sacchettini, J. C.; Knowler, W. C.; Eads, J.; Paolisso, G.; Tataranni, P. A.; Mochizuki, H.; Bennett, P. H.; Bogardus, C.; Prochazka, M. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 1281-1287.

¹⁷⁹ Binas, B.; Danneberg, H.; McWhir, J.; Mullins, L.; Clark, A. *FASEB J.* **1999**, *13*, 805-812.

¹⁸⁰ Simpson, M. A.; LiCata, V. J.; Coe, N. R.; Bernlohr, D. A. *Mol. Cell Biochem.* **1999**, *192*, 33-40.

¹⁸¹ Maeda, K.; Uysal, K. T.; Makowsky, L.; Görgün, C. Z.; Atsumi, G.; Parker, R. A.; Brüning, J.; Hertz, A. V.; Bernlohr, D. A.; Hotamisligil, G. S. *Diabetes*, **2003**, *52*, 300-307.

¹⁸² Owada, Y.; Suzuki, I.; Noda, T.; Kondo, H. *Mol. Cell Biochem.* **2002**, *239*, 83-86.

¹⁸³ Jing, C.; Beesley, C.; Foster, C. S.; Chen, H.; Rudland, P. S.; West, D. C.; Fujii, H.; Smith, P. H.; Ke, Y. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4357-4364.

¹⁸⁴ Smathers, R. L.; Petersen, D. R. *Human Genomics* **2011**, *5*, 170-191.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

Tabla 3.1. (Continuación) Expresión de los distintos tipos de genes de FABP (tomada de la ref. 170) y ampliada.

Gen	Nombre común	Nombre alternativo	Expresión
FABP7 ^{185,186,187,188}	FABP de cerebro	B-FABP, MRG	Cerebro, célula glial, retina, glándula mamaria
FABP8 ¹⁸⁴	FABP de mielina	M-FABP, PMP2	Sistema periférico nervioso, célula de Schwann
FABP9 ¹⁸⁴	FABP de testículo	T-FABP	Testículo, glándula salivar, glándula mamaria
FABP12 ¹⁸⁴			Retina, testículos, corteza cerebral, riñón, epidídimo

3.1.2.2. Estructura de las FABPs

Los miembros de la familia de las FABP muestran sólo una moderada similitud en su estructura primaria, con una variación en la homología de la secuencia de aminoácidos entre el 20% y el 70%. Sin embargo, estudios de cristalografía de rayos-X y de resonancia magnética nuclear han demostrado que estas proteínas exhiben una increíble similitud en su estructura terciaria. Estas proteínas se pliegan como un barril elíptico β que comprende diez cadenas β antiparalelas, con dos hélices α cortas localizadas entre la primera y la segunda cadena β (ver Figura 3.1(C)). El barril β posee una apreciable estabilidad estructural y, como se ha comprobado virtualmente, no se ve afectado por modificaciones químicas o por la presencia de grupos voluminosos fluorescentes. Las cadenas β están organizadas en dos hojas ortogonales β que envuelven la cavidad de unión con el ligando. Dicha cavidad se encuentra centrada en el extremo del barril y se cree que actúa como un portal de entrada y salida de ligando. Este portal debe atraer a la molécula de ligando hacia la región de la superficie. A partir

¹⁸⁵ Xu, L. Z.; Sánchez, R.; Sali, A.; Heintz, N. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24711-24719.

¹⁸⁶ Sánchez-Font, M. F.; Bosch-Comas, A.; Gonzalez-Duarte, R.; Marfany, G. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2769-2777.

¹⁸⁷ Watanabe, A.; Toyota, T.; Owada, Y.; Hayashi, T.; Iwayama, Y.; Matsumata, M.; Ishitsuka, Y.; Nakaya, A.; Maekawa, M.; Ohnishi, T.; Arai, R.; Sakurai, K.; Yamada, K.; Kondo, H.; Hashimoto, K.; Osumi, N.; Yoshikawa, T. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, 2469-2483.

¹⁸⁸ Shi, Y. E.; Ni, J.; Xiao, G.; Liu, Y. E.; Fuchs, A.; Yu, G.; Su, J.; Cosgrove, J. M.; Xing, L.; Zhang, M.; Li, J.; Aggarwal, B. B.; Meager, A.; Gentz R. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3084-3091.

¹⁸⁴ Smathers, R. L.; Petersen, D. R. *Human Genomics* **2011**, *5*, 170-191.

de un estudio realizado con I-FABP se sugirió que el área que se une por la hélice α II y que gira entre β C- β D y β E- β F podría requerir un menor cambio conformacional para permitir el acceso del ácido graso al núcleo de la proteína. Dada la orientación del ácido graso unido a la proteína cristalina, y asumiendo que la entrada propuesta está situada en el extremo opuesto de I-FABP a la que contiene Arg¹⁰⁶, es probable que el grupo carboxilato del extremo del ácido graso entre primero. La cadena lateral básica situada en la superficie de la proteína podría servir como un elemento atrayente para este grupo carboxilato. El ácido graso, dirigido por la interacción de dicho grupo carboxilato, podría entrar en el núcleo, junto con el disolvente. Ya sea antes, durante o después de la formación del “quinteto” que implica el carboxilato del ácido graso, Arg¹⁰⁶, Gln¹⁰⁶ y dos moléculas ordenadas de disolvente, la cadena de hidrocarburos podría asumir la conformación necesaria para maximizar sus interacciones hidrófobas. La liberación de los ácidos grasos podría ocurrir de manera inversa a la anterior o bien a través de un portal situado cerca de la parte inferior de la proteína.¹⁸⁹ La hélice α II es un elemento estructural clave en la unión con los ácidos grasos y establece interacciones de largo alcance con la disposición hélice α II entre las cadenas β C y β D.¹⁷³

La cavidad del barril β posee una longitud dos o tres veces mayor que el volumen de un ácido graso, y la estructura revela la existencia de moléculas de agua ordenadas en esta cavidad y que establecen enlaces de hidrógeno con residuos polares internos de la misma. La mayor parte de las FABPs se unen a un único ácido graso, orientando su grupo carboxilato hacia el interior. Sin embargo, L-FABP posee la propiedad de unirse a dos ácidos grasos y a moléculas hidrofóbicas más grandes.

Los estudios cristalográficos indican pequeñas diferencias entre la estructura apo- y holo- de las FABPs, sin embargo, las estructuras en disolución derivadas de los estudios de RMN demuestran considerables diferencias (Figura 3.1). Concretamente, la media distal de la hélice α II y del giro entre las cadenas β C y β D exhiben diferencias estructurales: ambas zonas se encuentran más desordenadas cuando no existe ligando y exhiben una disminución en las interacciones. Estas diferencias sugieren que durante la entrada o salida del ligando, esta región experimenta un cambio conformacional, permitiendo así que el ácido graso pase a través de ese portal.

¹⁸⁹ Sacchettini, J. C.; Gordon, J. I.; Banaszak, L. J. *J. Mol. Biol.* **1989**, 208, 327-339.

¹⁷³ Storch, J.; Corsico, B. *Annu. Rev. Nutr.* **2008**, 28, 73-95.

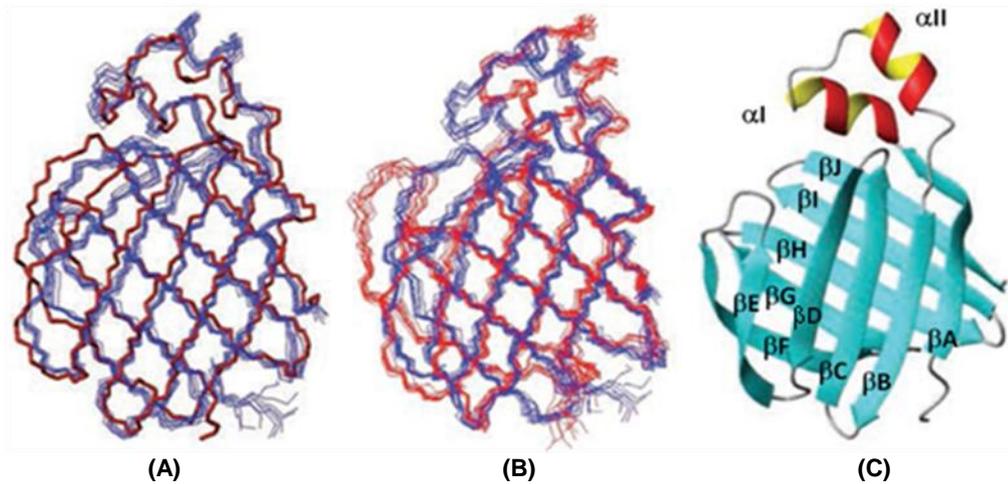


Figura 3.1 Estructura derivada de la resonancia magnética nuclear de L-FABP en disolución, y que muestran los cambios conformacionales específicos entre proteínas que no están asociadas a ligando y proteínas que se unen a ácido graso. (A) Superposición de la estructura en disolución de una familia de holo-L-FABP (azul) con la estructura cristalina (rojo). (B) Superposición de la estructura de menor energía apo-L-FABP y de la estructura holo-L-FABP. (C) Diagrama Ribbon de la estructura de menor energía de apo-L-FABP en disolución (tomado de ref. 173).

3.1.3. Propiedades Fisiológicas de las FABPs

El proceso de transporte de los ácidos grasos hacia el interior de las células se divide en tres etapas diferenciadas:

1. Adsorción: unión a la cara externa de la membrana plasmática
2. Transporte a través de la membrana
3. Desorción: abandono de la parte citosólica de la membrana plasmática.

Cada etapa debe estar catalizada por proteínas que permitan un movimiento efectivo de los ácidos grasos. Existen dos tipos de translocación de los ácidos grasos a través de las membranas plasmáticas, denominados difusión simple y translocación mediada por proteína. Una de estas translocasas es una FABP_{PM} de 43-kDa que fue aislada de hepatocitos, adipocitos y miocitos cardiacos y purificada. Los ácidos grasos se separan de la membrana citoplasmática y son liberados en el citoplasma donde las proteínas FABP_C pueden acelerar la captación de ácidos grasos de diferentes formas:

1. Aumentan la velocidad de disociación del ácido graso de las membranas mejorando su solubilidad acuosa.¹⁹⁰
2. Mejoran la transferencia de ácidos grasos a aceptores de membrana mediante interacción directa con la bicapa fosfolipídica o mediante un proceso de difusión acuosa.¹⁷²

Las proteínas FABP_C no solo estimulan la desorción de los ácidos grasos, sino también la difusión citoplasmática.¹⁹¹ El papel de las FABPs en el movimiento intracelular de los ácidos grasos se confirmó mediante una serie de experimentos¹⁷¹ a través de los cuales se pudo probar el papel de las FABPs como proteínas de transporte.

3.1.4. Funciones de las FABPs

Se han propuesto numerosas funciones para las FABPs. Como proteínas chaperonas de lípidos, las FABPs pueden facilitar activamente el transporte de lípidos a compartimentos específicos de la célula tales como el lugar de almacenamiento de lípidos, el retículo endoplasmático para la señalización, transporte y síntesis de membrana, a la mitocondria o peroxisoma para su oxidación, al citosol o a otras enzimas para regular su actividad, al núcleo para la regulación transcripcional mediada por lípidos o incluso fuera de la célula para una señalización de manera autocrina o paracrina (Figura 3.2).

El contenido de FABP en la mayoría de las células es generalmente proporcional a la velocidad del metabolismo de los ácidos grasos. Estas proteínas se encuentran involucradas en la conversión de los ácidos grasos en intermedios de eicosanoides y en la estabilización de leucotrienos.^{192,193} Además, se ha descrito la existencia de una

¹⁹⁰ Vork, M. M.; Glatz, J. F. C.; Van der Vusse, G. J. *J. Theor. Biol.* **1993**, *160*, 207-220.

¹⁷² Hsu, K.-T.; Storch, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13317-13323.

¹⁹¹ McArthur, M. J.; Atshaves, B. P.; Frolov, A.; Foxworth W. D.; Kier, A. B.; Schroeder, F. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1371-1383.

¹⁷¹ Storch, J.; Thumser, A. E. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1486*, 28-44.

¹⁹² Ek, B. A.; Cistolla, D. P.; Hamilton, J. A.; Kaduce, T. L.; Spector, A. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1346*, 75-85.

¹⁹³ Zimmer, J. S.; Dyckes, D. F.; Bernlohr, D. A.; Murphy, R. C. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 2138-2144.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

interacción directa proteína-proteína entre HSL (lipasa sensible a hormonas) y A-FABP o E-FABP en adipocitos.¹⁹⁴

Por otra parte, estas proteínas pueden llegar al núcleo e interactuar con los receptores nucleares de hormonas y, a través de este mecanismo, unirse a distintos ligandos. Sin embargo, son pocos los conocimientos sobre este mecanismo. Por el contrario, existe una clara evidencia sobre el impacto específico de las FABPs sobre la biología celular y el metabolismo lipídico en sistemas complejos. Todo ello se esclareció gracias a la utilización de modelos de ratones deficientes en esta proteína. Con estos estudios se abrieron nuevas posibilidades para hacer frente a una amplia gama de enfermedades metabólicas a través de la inhibición terapéutica de FABPs, particularmente A-FABP, con ligandos sintéticos.

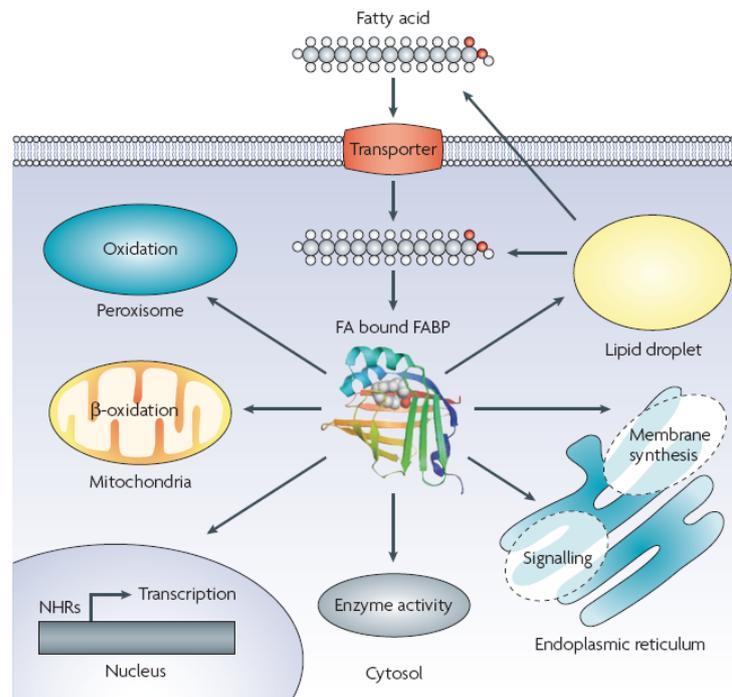


Figura 3.2. Funciones de las FABPs en la célula (tomado de la ref. 170).

¹⁹⁴ Shen, W.-J.; Sridhar, K.; Bernlohr, D. A.; Kraemer, F. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 5528-5532.

3.1.5. Funciones de las FABP específicas de tejido

La función de los ácidos grasos y otros lípidos es a menudo altamente específica de tejido, y se está haciendo evidente que la función de las FABPs también es específica de tejido (ver Tabla 3.2).¹⁹⁵ A pesar de las características similares de unión a ligando y de la alta homología en sus estructuras terciarias, cada FABP parece tener funciones únicas en tejidos específicos. En general, la función de las FABPs es la de proteínas transportadoras intracelulares de ácidos grasos de cadena larga. Las propiedades de transporte de las FABPs se encuentran gobernadas en parte por interacciones específicas proteína-proteína y proteína-membrana, y el dominio hélice-giro-hélice de estas proteínas es crítico aunque probablemente no exclusivo en la especificación de estas interacciones.

Tabla 3.2. Distribución de las FABP en los tejidos y papel funcional propuesto (tomada de la ref. 195).

Expresión de FABP	Papel Funcional	Respuesta Fisiológica Final
Tejido Adiposo A-FABP (altos niveles) y E-FABP (bajos niveles)	Almacenamiento de TG (interacción con HSL); regulación de la abundancia de ácidos grasos; interacción con los receptores nucleares PPAR; producción de citoquinas inflamatorias	Resistencia a la insulina; síndrome metabólico; enfermedades inflamatorias
Macrófagos A-FABP y E-FABP	Producción de citoquinas inflamatorias; mediación en la respuesta al estrés en el retículo endoplásmico; interacción con los receptores nucleares PPAR γ ; interacción con la vía de señalización de JAK2	Aterosclerosis inducida por la dieta; otras enfermedades inflamatorias
Hígado L-FABP	Transporte de LCFA unidos a la β -oxidación; interacción con los receptores nucleares PPAR α	Desarrollo del síndrome metabólico; exacerbación de la obesidad; reducción del colesterol y ácidos biliares del hígado

¹⁹⁵ Storch, J.; Thumser, A. E. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 32679-32683.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

Tabla 3.2. (Continuación) Distribución de las FABP en los tejidos y papel funcional propuesto (tomada de la ref. 195).

Expresión de FABP	Papel Funcional	Respuesta Fisiológica Final
Intestino		
I-FABP	División de LCFA hacia la síntesis de TG	Protección frente a la obesidad; hipertrigliceridemia; acumulación de TG en el hígado; síndrome metabólico
II-FABP	Transporte del ácido biliar	
L-FABP	Transporte de LCFA unidos a la β -oxidación; incorporación de MG a los PLs	Biogénesis de quilomicrones
Cerebro Sistema Nervioso Central		
B-FABP	Utilización neural de DHA en la síntesis de membrana y en la señalización	Proliferación de las células progenitoras neuronales y en los estados medios del desarrollo embrionario; diferenciación inicial de las células neuronales vinculado con esquizofrenia, desorden bipolar, síndrome de Down; comportamiento emocional
H-FABP	Incorporación de AA a los PLs del cerebro; mantenimiento del balance de ω 6- ω 3 PUFA	Mantenimiento del estado de diferenciación en el estado adulto vinculado a síndrome de Down; enfermedad de Alzheimer y a la función neurológica
E-FABP	Suministro LCFA y biogénesis de membrana; interacción con receptores nucleares; utilización de RA	Desarrollo de neuritas y del axón; diferenciación de las células neuronales
Cerebro Sistema Nervioso Periférico		
M-FABP	Suministro LCFA y biogénesis de membrana	Desarrollo del recubrimiento de mielina

Tabla 3.2. (Continuación) Distribución de las FABP en los tejidos y papel funcional propuesto (tomada de la ref. 195).

Expresión de FABP	Papel Funcional	Respuesta Fisiológica Final
Tejido Muscular		
<u>Cardiaco</u>		
H-FABP	Transporte de LCFA unidos a la β -oxidación; tráfico de LCFA hasta específico PL; interacción con los receptores nucleares (ej. PPAR α)	Diferenciación de cardiomiocitos e inhibición de la proliferación de los mismos; utilización de los lípidos como combustible
<u>Esquelético</u>		
H-FABP	Transporte de LCFA unidos a la β -oxidación y esterificación; interacción con los receptores nucleares (ej. PPAR α)	Diferenciación del músculo esquelético

Abreviaturas: AA: ácido araquidónico; DHA: ácido docosahexaenoico; HSL: lipasa sensible a hormona; JAK2: Janus quinasas; LCFA: ácidos grasos de cadena larga; MG: monoacilglicerol; PL: fosfolípido; PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisoma; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; RA: ácido retinoico; TG: triacilglicerol.

3.1.5.1. FABP de adipocitos; A-FABP; FABP4

El tejido adiposo es el principal almacén de calorías en forma de triglicéridos y ha llegado a ser evidente su importancia como órgano endocrino, liberando diferentes moléculas bioactivas incluyendo citoquinas implicadas en la inflamación. Por lo tanto, el metabolismo del tejido adiposo tiene efectos importantes sobre el metabolismo sistémico de la energía y de los procesos inflamatorios.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

A-FABP, también conocida como FABP4, se detectó en primer lugar en adipocitos maduros y posteriormente en el tejido adiposo.^{196,197} Esta proteína también se denomina aP2 (adipocito P2) debido a su elevada similitud de secuencia (67%) con M-FABP. Su expresión aumenta durante el proceso de diferenciación de los adipocitos y la conversión de los monocitos a macrófagos activados y su mRNA se controla transcripcionalmente por los ácidos grasos, agonistas de PPAR- γ (receptores activadores de la proliferación de peroxisomas γ) e insulina.^{198,199} A-FABP es la isoforma mejor caracterizada de esta familia de proteínas y con una biología más conocida (Figura 3.3.a y Figura 3.3.b)¹⁷⁰. Estudios realizados con ratones deficientes en esta proteína han mostrado una hiperinsulinemia reducida y una resistencia a la insulina dentro de un contexto de obesidad tanto dietética como genética. Sin embargo, el efecto de A-FABP sobre la sensibilidad a la insulina no se observó en ratones delgados.

Los adipocitos y macrófagos expresan otro tipo de proteína, K-FABP (FABP5). En ratones control, K-FABP se encuentra en niveles muy bajos en las células de grasa, pero en macrófagos, se encuentra en niveles aproximadamente equivalentes a A-FABP. La regulación y función de ambas proteínas muestran ciertas similitudes, pero también exhiben propiedades individuales.

A-FABP parece unirse solamente a ácidos grasos de cadena larga con alta afinidad. Esta especificidad de ligando, unido con el aumento en la expresión de esta proteína (que se utiliza a menudo como un marcador de la diferenciación durante la maduración de los adipocitos), ha llevado a la hipótesis general de que A-FABP juega un papel importante en el almacenamiento y liberación de triglicéridos en este tejido. La función exacta de esta proteína, tanto en adipocitos como en macrófagos, está emergiendo a partir de estudios realizados con animales que no poseen dicha proteína, así como de estudios de su estructura terciaria y estructura-función, como de estudios *in vitro* en células cultivadas.

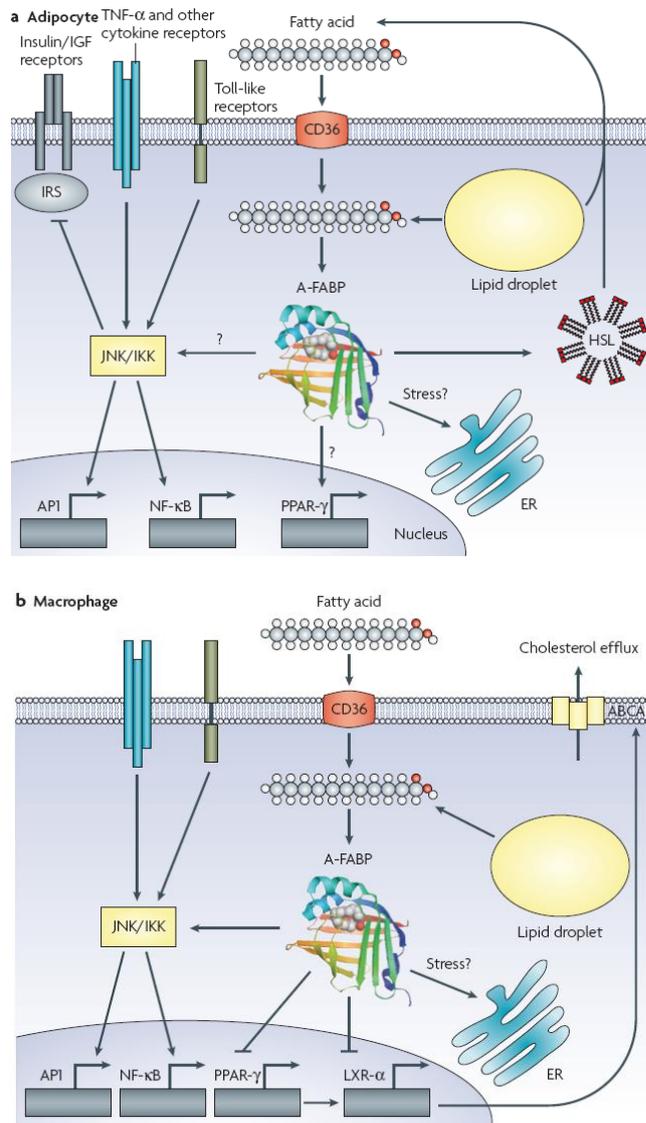
¹⁹⁶ Spiegelman, B. M.; Frank, M.; Green, H. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 10083-10089.

¹⁹⁷ Hunt, C. R.; Ro, J. H.; Dobson, D. E.; Min, H. Y.; Spiegelman, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 3786-3790.

¹⁹⁸ Haunerland, N. H.; Spener, F. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 328-349.

¹⁹⁹ Makowski, L.; Hotamisligil, G. S. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 543-548.

¹⁷⁰ Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. *Nat. Rev.* **2008**, *7*, 489-503.



Abreviaturas: AP1: proteína adaptadora 1; CD36: cluster de diferenciación 36; ER: retículo endoplasmático; HSL: lipasa sensible a hormona; IGF: factor de crecimiento insulínico; IKK: inhibidor de la quinasa kappa; IRS: sustrato del receptor de insulina; JNK: quinasas c-Jun N-terminal; LXR- α : receptor X hepático alpha; NF- κ B: factor nuclear κ B; PPAR- γ : receptor activador de la proliferación de peroxisoma gamma; TNF- α : factor de necrosis tumoral; Toll-like receptor: receptores tipo Toll.

Figura 3.3 Funciones de A-FABP en adipocito (tomado de ref. 170).

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

La eliminación de la expresión de A-FABP da como resultado una marcada regulación positiva en la expresión de K-FABP^{200,201} y está acompañada de alteraciones metabólicas menores en el tejido adiposo, probablemente debido a la similitud de unión a ligandos *in vitro* y a las propiedades de transporte de las dos FABPs.^{202,173} Sin embargo, la supresión simultánea de ambas proteínas revela su importancia en el balance energético sistémico ya que, en estudios realizados con ratones deficientes en ambas proteínas, se observa una marcada protección contra el desarrollo de resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y contra una variedad de enfermedades inflamatorias.²⁰³

Las nuevas investigaciones apuntan a varios mecanismos de acción de A-FABP. Se cree que el mecanismo por el cual A-FABP puede afectar al metabolismo lipídico intracelular se encuentra relacionado con el transporte directo de ácidos grasos o de sustratos metabolitos de ácidos grasos hacia o desde diferentes ubicaciones celulares.¹⁷⁵ En estudios realizados con ratones deficientes en esta proteína se observó que éstos podían haber reducido la actividad lipolítica adiposa, y se identificó a esta proteína como una de las que interaccionan directamente con la lipasa sensible a hormonas (HSL).¹⁹⁴ Concretamente, los residuos cargados existentes en el dominio de interacción de A-FABP comprendido entre las dos hélices, interaccionan con los residuos de carga opuesta de HSL²⁰⁴ (Figura 3.4).

²⁰⁰ Erbay, E.; Babaev, V. R.; Mayers, J. R.; Makowski, L.; Charles, K. N.; Snitow, M. E.; Fazio, S.; Wiest, M. M.; Watkins, S. M.; Linton, M. F.; Hotamisligil, G. S. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1383-1391.

²⁰¹ Coe, N. R.; Simpson, M. A.; Bernlohr, D. A. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 967-972.

²⁰² Shaughnessy, S.; Smith, E. R.; Kodukula, S.; Storch, J.; Fried, S. K. *Diabetes* **2000**, *49*, 904-911.

¹⁷³ Storch, J.; Corsico, B. *Annu. Rev. Nutr.* **2008**, *28*, 73-95.

²⁰³ Maeda, K.; Cao, H.; Kono, K.; Gorgun, C. Z.; Furuhashi, M.; Uysal, K. T.; Cao, Q.; Atsumi, G.; Malone, H.; Krishnan, B.; Minokoshi, Y.; Kahn, B. B.; Parker, R. A.; Hotamisligil, G. S. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 107-119.

¹⁷⁵ Storch, J.; Thumser, A. E. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1486*, 28-44.

¹⁹⁴ Shen, W.-J.; Sridhar, K.; Bernlohr, D. A.; Kraemer, F. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5528-5532.

²⁰⁴ Smith, A. J.; Sanders, M. A.; Juhlmann, B. E.; Hertzfel, A. V.; Bernlohr, D. A. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33536-33543.

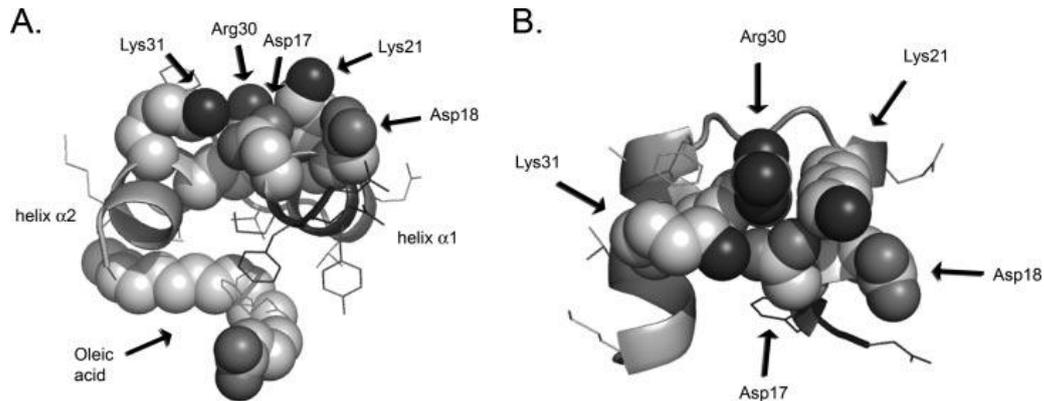


Figura 3.4. Organización espacial de la molécula cargada de A-FABP. A) Diagrama Ribbon de la región de doble hélice de A-FABP con las cadenas laterales de Asp¹⁷, Asp¹⁸ y Lys²¹ en la hélice αI; Arg³⁰ y Lys³¹ en la hélice αII; y el ácido oleico. B) Vista a 90° de la orientación de los residuos cargados (tomado de la ref. 205).

La interacción con HSL requiere que el ácido graso se encuentre unido a A-FABP. Sin embargo, no está claro como la holo-FABP serviría como aceptor de ácidos grasos desde HSL. Se han realizado más investigaciones sobre esta interacción empleando cultivos de lipocitos utilizando A-FABP marcada con una proteína fluorescente y HSL mediante microscopía FRET (transferencia de energía de resonancia). Los resultados mostraron que el complejo HSL-A-FABP existe cuando:

- a) las células están en estado basal, la actividad lipolítica es baja y HSL se localiza en el citoplasma.
- b) las células se encuentran en un estado estimulado por β-adrenérgicos y HSL se encuentra en la superficie de las moléculas de triglicéridos, aumentando su actividad e indicando que las proteínas pueden trasladar a los lípidos como un complejo.²⁰⁵

²⁰⁵ Smith, A. J.; Sanders, M. A.; Thompson, B. R.; Londos, C.; Kraemer, F. B.; Bernlohr, D. A. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 52399-52405.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

Recientes estudios de FRET demuestran que es necesaria la fosforilación de HSL para que interactúe con A-FABP, y que la lisina 21 situada en la hélice αI de A-FABP es un componente necesario en el sitio de interacción proteína-proteína. Curiosamente, este residuo en el dominio helicoidal se ha identificado en un estudio estructura-función *in vitro* de A-FABP como parte fundamental para que se establezcan interacciones proteína-membrana y el transporte de ácidos grasos a las membranas.²⁰⁶ Mientras que se requiere la fosforilación de HSL para su translocación al lípido, así como para la interacción con A-FABP,²⁰⁷ se han encontrado complejos citoplasmáticos presumiblemente cuando HSL no está fosforilada. Por lo tanto, la importancia funcional de la interacción A-FABP-HSL es potencialmente muy interesante pero aún es incierta.

Por otra parte, el funcionamiento de A-FABP también puede mediar mediante el control de los ácidos grasos en el plasma. En estudios realizados con ratones deficientes tanto en A-FABP como en K-FABP se observaron niveles altos de palmitoleato ($C_{16:1\omega9}$), un ácido graso poco abundante en el tejido adiposo y en el plasma. La incubación de células del hígado y células musculares con palmitoleato, en comparación con el palmitato saturado (PA; $C_{16:0}$), conduce a cambios constantes en la protección contra la resistencia a la insulina.²⁰⁸ El mecanismo de acción del palmitoleato y la comparación directa de palmitoleato con oleato (OA; $C_{18:1\omega9}$) aún no están claras.

Las acciones de A-FABP pueden ocurrir no solo en el compartimento citosólico y en orgánulos citoplasmáticos, sino que también pueden darse en el núcleo. Parece probable que al menos algunos de los efectos sistémicos debidos a la carencia de A-FABP, así como sus efectos en la expresión de citoquinas inflamatorias y otros moduladores inmunes, reflejan el papel de A-FABP como un regulador de la actividad del factor de transcripción nuclear. Se sabe que varios ácidos grasos de cadena larga y sus metabolitos pueden actuar como ligandos para los factores de transcripción de PPAR y se ha sugerido que las FABPs están involucradas en la entrega de ligandos a los PPARs.²⁰⁹

²⁰⁶ Liou, H.-L.; Storch, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6475-6485.

²⁰⁷ Smith, A. J.; Thompson, B. R.; Sanders, M. A.; Bernlohr, D. A. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32424-32432.

²⁰⁸ Cao, H.; Gerhold, K.; Mayers, J. R.; Wiest, M. M.; Watkins, S. M.; Hotamisligil, G. S. *Cell* **2008**, *134*, 933-944.

²⁰⁹ Wolfrum, C.; Borrmann, C. M.; Borchers, T.; Spener, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2323-2328.

A diferencia de los efectos relativamente pequeños que produce la inexistencia de A-FABP en el tejido adiposo, estos efectos pueden llegar a ser dramáticos a nivel de macrófago, revelando un papel muy importante de A-FABP en la aterosclerosis inducida por una dieta alta en lípidos. Con el transcurso de nuevas investigaciones se ha dado cada vez más importancia a la inflamación en el desarrollo de la aterosclerosis, y se cree que una respuesta inflamatoria agresiva combinada con una acumulación de lípidos en macrófagos son circunstancias críticas en el desarrollo de la enfermedad cardíaca aterosclerótica.²¹⁰

Por otra parte, A-FABP coordina la actividad inflamatoria de los macrófagos. En estudios realizados con macrófagos A-FABP^{-/-}, se observó que se suprimieron varias respuestas inflamatorias, incluyendo la producción de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1b (IL1b) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1). Además, la producción y función de enzimas proinflamatorias tales como óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX2) también se suprimieron.²¹¹

Por lo tanto, el mecanismo por el cual A-FABP (y quizás otros miembros de las FABPs) efectúa diferentes acciones e interacciones en distintos compartimentos subcelulares puede deberse a sutiles cambios conformacionales en su superficie causados por diferentes ligandos y que permite la interacción con diferentes proteínas.

A partir de los estudios realizados hasta el momento, se ha encontrado que la concentración de A-FABP puede estar asociada a la obesidad, a la diabetes tipo 2 y a la enfermedad cardiovascular.

3.1.6. Implicación de FABP4 en enfermedades humanas

La aparición de proteínas celulares liberadas en el plasma después del daño tisular, o producidas por células malignas, comúnmente denominadas marcadores bioquímicos, está ganando mucho interés por ser importantes en el seguimiento de pacientes con daño tisular debido a isquemia aguda, desórdenes neurológicos, cáncer, rechazo de un órgano o trauma.

²¹⁰ Ross, R. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 115-126.

²¹¹ Makowski, L.; Brittingham, K. C.; Reynolds, J. M.; Suttles, J.; Hotamisligil, G. S. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12888-12895.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

Unas de estas nuevas proteínas biomarcadoras prometedoras son las FABPs. En la evaluación de estas proteínas como marcadores clínicos del daño tisular, hay que tener en cuenta que después del daño celular, las proteínas de pequeño tamaño difunden más rápidamente que las proteínas más grandes por el espacio intersticial a través de las hendiduras del endotelio hasta el espacio vascular. El tamaño de las hendiduras del endotelio es variable, desde grandes hendiduras en el hígado hasta pequeños poros en el corazón, músculo esquelético y, finalmente casi completamente impermeable en el cerebro (barrera hematoencefálica). Como resultado, la velocidad de difusión de las proteínas liberadas a la circulación difiere entre unas y otras. Por lo tanto, el tiempo de aparición de estas proteínas marcadoras en el plasma no solo depende del tiempo transcurrido en la enfermedad, sino también del tamaño molecular y de la distribución hacia los compartimentos extracelulares.

3.1.6.1. FABP4 y su implicación en el síndrome metabólico

La resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia y el deterioro de la homeostasis de la glucosa están estrechamente vinculados con la obesidad, formando un conjunto de anomalías conocidas como síndrome metabólico,²¹² y se encuentra asociado a la aterosclerosis acelerada y la enfermedad cardiovascular.

Actualmente, se están explorando las vías moleculares que vinculan la obesidad metabólica y los defectos ateroscleróticos. La obesidad se considera como un estado crónico inflamatorio, en el que la acumulación en exceso de tejido adiposo desempeña un papel central. Dicho aumento muestra que el tejido adiposo no es sólo un depósito de energía inerte, sino que también ejerce importantes funciones endocrinas, segregando múltiples citoquinas, adipoquinas, hormonas y ácidos grasos libres y, por lo tanto, participa en la regulación del metabolismo de la energía, la sensibilidad a la insulina e inflamación y contribuye al desarrollo del síndrome metabólico.

La desregulación del metabolismo de los lípidos con un aumento de las concentraciones plasmáticas de los ácidos grasos libres se asocia con la resistencia a la insulina y a la diabetes tipo 2.²¹³ Niveles elevados de ácidos grasos libres no sólo modifican el metabolismo de glucosa y lípidos, sino que también influyen en las

²¹² Grundy, S. M. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, 89, 2595-2600.

²¹³ Roden, M. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2006**, 2, 335-348.

cascadas de señalización de las células y en la expresión génica.²¹⁴ Es por este motivo, que A-FABP ha ganado mucha importancia en los últimos años ya que se ha comprobado, en estudios realizados con ratones deficientes en esta proteína, su relación con la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2 y la aterosclerosis.¹⁹⁹ Aunque las investigaciones realizadas en modelo de ratón knock-out han aportado pruebas del impacto específico y de los mecanismos de acción de estas proteínas en el metabolismo y la inflamación, la biología y la función de FABPs en la fisiología humana y en las enfermedades no quedan del todo claras.²¹⁵

3.1.6.1.1. Resistencia a la insulina, hígado graso y obesidad

A pesar de la presencia de FABP4 y FABP5, fuerte y altamente regulada en adipocitos y macrófagos, la pérdida individual de la función de estas proteínas en modelos de ratón produce cambios bajo condiciones estándar en el fenotipo. Sin embargo, cuando estos ratones están cambiando metabólicamente, exhiben perfiles destacados de naturaleza sorprendentemente beneficiosa. Por ejemplo, en una dieta alta en grasas, ratones deficientes en FABP4 muestran una protección frente a la resistencia a la insulina en comparación con ratones control. Sin embargo, los ratones deficientes en FABP5 muestran una ligera reducción del peso corporal en una dieta alta en grasa y una mejoría en la sensibilidad a la insulina, pero en menor medida que en ratones deficientes en FABP4. A la inversa, la expresión transgénica de FABP5 en tejido adiposo causa una leve insensibilidad a la insulina en ratones con una dieta alta en grasas. Los fenotipos fisiológicos generales de FABP5 en ratones knockout o sobreexpresados son modestos, lo que refleja el hecho de que esta proteína no se expresa predominantemente en el tejido adiposo. Curiosamente, se observa una sobreexpresión compensatoria de FABP5 en el tejido adiposo de ratones deficientes en FABP4, lo que podría debilitar el impacto real de estas FABPs sobre la homeostasis metabólica. Apoyando esta posibilidad, los ratones deficientes en ambas proteínas exhiben una increíble mejora en la respuesta metabólica bajo condiciones de obesidad tanto dietética como genética. En una dieta alta en grasas, estos ratones muestran una reducción del peso corporal y poseen los niveles de glucosa e insulina bajos en estado de equilibrio, y exhiben una mejora significativa en la sensibilidad a ambos en las pruebas de tolerancia. Cuando se examinan los tejidos musculares de ratones, la

²¹⁴ Makowski, L.; Hotamisligil, G. S. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2464S-2468S.

¹⁹⁹ Makowski, L.; Hotamisligil, G. S. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 543-548.

²¹⁵ Krusinová, E.; Pelikánová, T. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2008**, *82S*, S127-S134.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

actividad de la quinasa activada por AMP (AMPK) y la oxidación de ácidos grasos son elevadas. Las alteraciones metabólicas que ocurren en el esqueleto muscular pueden explicar la reducción del peso corporal en ratones knockout. Además, los ratones deficientes en ambas proteínas, muestran un fenotipo de hígado que no se ha atribuido previamente a la deficiencia de cualquiera de las dos proteínas. Esta deficiencia total en ambas proteínas otorga a estos ratones una increíble protección contra la infiltración de grasa del hígado en una dieta alta en grasas o en el contexto de una obesidad genética severa.²⁰³ En un estudio más exhaustivo se observa una marcada reducción en la expresión y la actividad de estearoil-CoA desaturasa (Scd1), una enzima que juega un papel clave en la síntesis de triglicéridos. Aún son necesarios más estudios, pero se cree que esta enzima puede ser un mediador directo de las acciones de FABP en el hígado.

3.1.6.1.2. Aterosclerosis

FABP4 tiene un papel central en el desarrollo de la resistencia sistémica a la insulina y en la regulación del metabolismo de los lípidos. Debido a que la resistencia a la insulina y la aterosclerosis están estrechamente vinculadas, los hallazgos encontrados han planteado la posibilidad de que estas proteínas también puedan contribuir a la aterosclerosis.²¹⁶ Los estudios realizados implican la deficiencia de apolipoproteína E (apo E), y los resultados obtenidos conducen a defectos en la depuración de las partículas de colesterol y a niveles extremadamente altos de LDL. Sorprendentemente, los ratones deficientes en FABP4 y apo E muestran una protección contra la aterosclerosis, teniendo un 88% menos de lesiones vasculares comparando con ratones control.

3.1.6.1.3. Asma

El asma se ha reconocido en los últimos años como una enfermedad en la que la obesidad constituye un factor de riesgo importante. No existe ninguna información sobre la base molecular de esta asociación y de las posibles rutas implicadas en la inflamación de las vías respiratorias que se activan por la obesidad. Los estudios

²⁰³ Maeda, K.; Cao, H.; Kono, K.; Gorgun, C. Z.; Furuhashi, M.; Uysal, K. T.; Cao, Q.; Atsumi, G.; Malone, H.; Krishnan, B.; Minokoshi, Y.; Kahn, B. B.; Parker, R. A.; Hotamisligil, G. S. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 107-119.

²¹⁶ Semenkovich, C. F. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1813-1822.

realizados muestran que la expresión de FABP4 en células epiteliales bronquiales humanas es sensible sólo a interleucinas IL-4 y IL-13, dos citoquinas que son esenciales en el desarrollo del asma. Los niveles de expresión de FABP4 en las células epiteliales bronquiales son significativamente menores en comparación con los adipocitos y macrófagos. En estudios realizados con ratones deficientes en FABP4 se observa una protección contra la inflamación de las vías respiratorias en comparación con los ratones control. Estos estudios muestran que FABP4 desempeña un papel inesperado en la patogénesis del asma y puede conducir a importantes conocimientos con respecto a los vínculos entre la degradación metabólica y la inflamación de las vías respiratorias en el contexto de la obesidad.

3.1.7. Inhibidores de FABP

A-FABP y E-FABP actúan en la interfase de las vías metabólicas e inflamatorias, y ejercen un efecto negativo en la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, enfermedad del hígado graso, aterosclerosis y asma. La creación de agentes farmacológicos que modifiquen su función puede proporcionar un control específico de tejido o celular en las rutas de señalización de lípidos, en la respuesta inflamatoria y en la regulación metabólica, ofreciendo así una nueva clase de agentes terapéuticos.

El estudio de nuevos inhibidores de FABPs se ha centrado en las isoformas A-FABP y E-FABP debido a que se conocen mucho más extensamente que el resto de las isoformas de esta familia de proteínas.

La técnica de muestreo de alta productividad (*high-throughput-screening*, HTS) es un método de selección de una serie de hitos en la búsqueda de nuevos candidatos a fármacos. Estos hitos se modifican químicamente para el desarrollo de nuevas moléculas que posean mejores selectividades, potencias y características farmacológicas (cabeza de serie), y que con el tiempo puedan llegar a ser fármacos efectivos.

En 2002, van Dongen²¹⁷ y *col.* aplicaron un método de muestreo basado en la estructura para la identificación de nuevos ligandos que se uniesen preferiblemente a FABP4. La idea general de este método se recoge en la Figura 3.5.

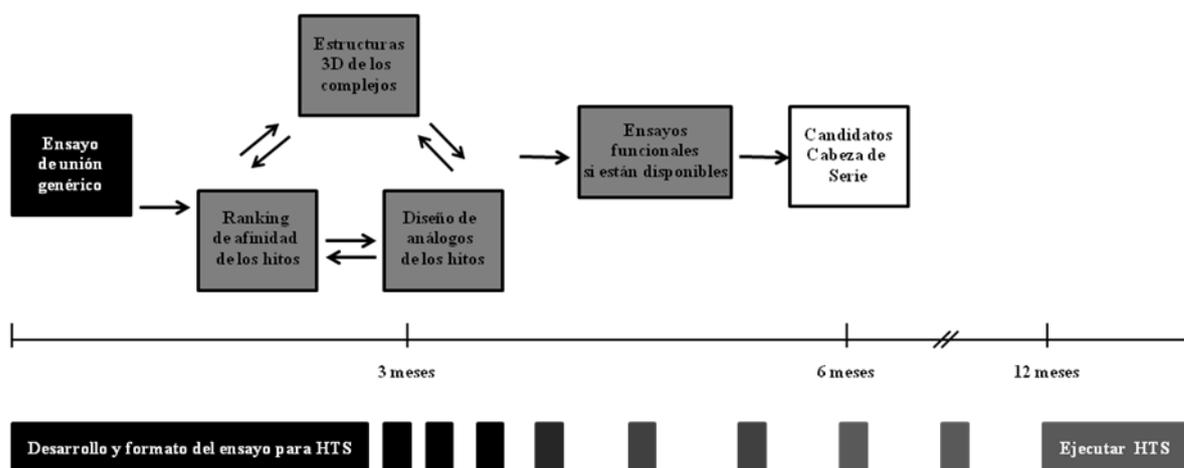


Figura 3.5. Diagrama para un muestreo basado en la estructura (adaptado de la ref. 217).

El proceso comienza con la aplicación de ensayos genéricos de unión empleando una muestroteca de compuestos bajo peso molecular ($MW < 350$ Da) que contengan grupos polares. Los métodos de RMN son una herramienta muy adecuada para esta tarea al igual que la espectrometría de masas.

A continuación, los hitos encontrados en el primer paso se clasifican en función de la afinidad y así se obtiene una primera relación estructura-afinidad. De nuevo, la técnica de RMN puede servir como herramienta para establecer este ranking. Debido a que los hitos son bastante solubles, la probabilidad de obtener estructuras cristalinas de los complejos diana-hitos es razonablemente alta, a pesar de su afinidad generalmente baja. Los hitos obtenidos de estructuras complejas establecidas son los primeros en continuar en el proceso. En el caso de que no obtener estructuras de alta resolución, se recurre a los datos de baja resolución. Los datos estructurales obtenidos son posteriormente utilizados para el diseño de nuevos ligandos potenciales con mejores propiedades de unión. Estos nuevos compuestos entran en el proceso en el segundo

²¹⁷ Van Dongen, M. J. P.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Lundbaeck, T.; Kerud, T.; Wikstroem, M.; Schultz, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11874-11880.

paso, es decir, en la clasificación de la afinidad y, posteriormente serán optimizados en base a su estructura.

3.1.7.1. Ácidos floréticos

Aplicando esta metodología, este grupo de investigación realizó un *screening* de moléculas para FABP4, obteniendo 52 hitos iniciales. Posteriormente, se realizó el estudio de la estructura cristalina de los complejos formados por FABP con los dos mejores hitos. Los datos estructurales obtenidos se emplearon en la búsqueda de análogos disponibles, así como la síntesis de 12 nuevos compuestos. De esta manera, se obtuvo una serie de tres ligandos selectivos a FABP4 con buenos perfiles farmacocúimicos y potencias iguales o inferiores a 10 μ M (Figura 3.6).

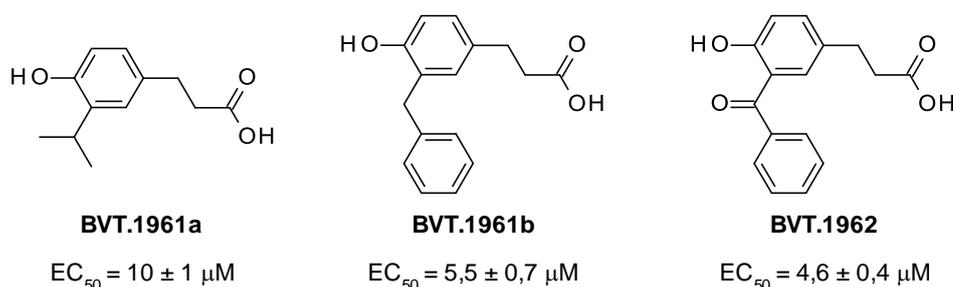


Figura 3.6

El ácido 4-(9*H*-carbazol-9-il)butanoico²¹⁸ **CLXXXIX** se identificó como un hito para A-FABP humano a través de la técnica de HTS empleando un ensayo de polarización de fluorescencia. **CLXXXIX** posee un IC₅₀ de aproximadamente 0,6 μ M (Figura 3.7, Tabla 3.3) y se encuentra dentro del rango de unión de algunos ligandos endógenos como es el ácido palmítico (PA, IC₅₀ = 0,93 μ M)). Sobre esta estructura se realizaron algunas modificaciones centradas en la longitud de la cadena alquílica. La reducción de dicha longitud en un átomo de carbono producía una pérdida de potencia (**CXC**, IC₅₀ = 9,4 μ M), mientras que si la unidad de unión era un grupo metileno, como ocurre en el compuesto **CXCI**, se perdía totalmente la inhibición de A-FABP. La elongación del linker a cuatro átomos de carbono producía una retención de la potencia

²¹⁸ Lehmann, F.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Lundbaeck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4445-4448.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

de inhibición (**CXCII**, $IC_{50} = 0,8 \mu M$). Estos inhibidores sintéticos no poseen selectividad frente a H-FABP. **CLXXXIX** muestra aproximadamente unas doce veces más preferencia por A-FABP vs E-FABP, y los compuestos de este tipo mostraron ser pobres en la unión con I-FABP.

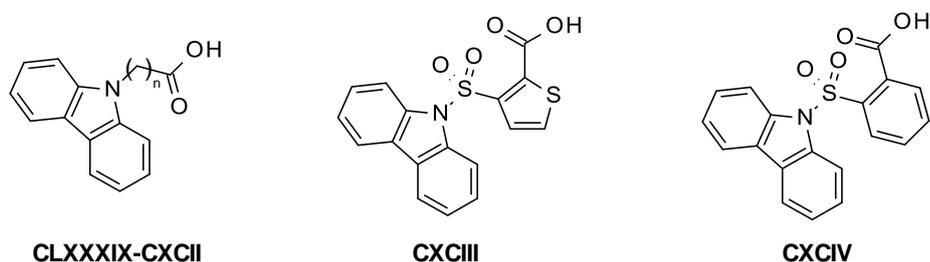


Figura 3.7

Tabla 3.3. Perfil de selectividades de análogos a ácidos grasos (tomado ref. 218)

Compuesto	n	A-FABP IC_{50} (μM)	H-FABP IC_{50} (μM)	E-FABP IC_{50} (μM)	I-FABP IC_{50} (μM)
PA	-	0,93	2,6	1,2	1,7
CXCI	1	>100	-	-	-
CXC	2	9,4	5,7	30	-
CLXXXIX	3	0,57	<0,6	6,7	>100
CXCII	4	0,8	-	3,0	-
CXCIII	-	1,1	9,9	9,1	42
CXCIV	-	4,3	42	17	>100

A partir de estos datos, se resolvió la estructura del co-cristal de **CLXXXIX** con A-FABP humano, lo que permitió el diseño de nuevos compuestos. Dicho complejo ha revelado que **CLXXXIX** se une de forma muy similar a como lo hacen los ácidos grasos de cadena larga (Figura 3.8). El grupo ácido carboxílico interacciona fuertemente con Arg¹²⁶ y Tyr¹²⁸, mientras que la cadena alquílica y el carbazol se sitúan en la zona lipofílica del bolsillo de unión, tal y como hace el ligando natural.

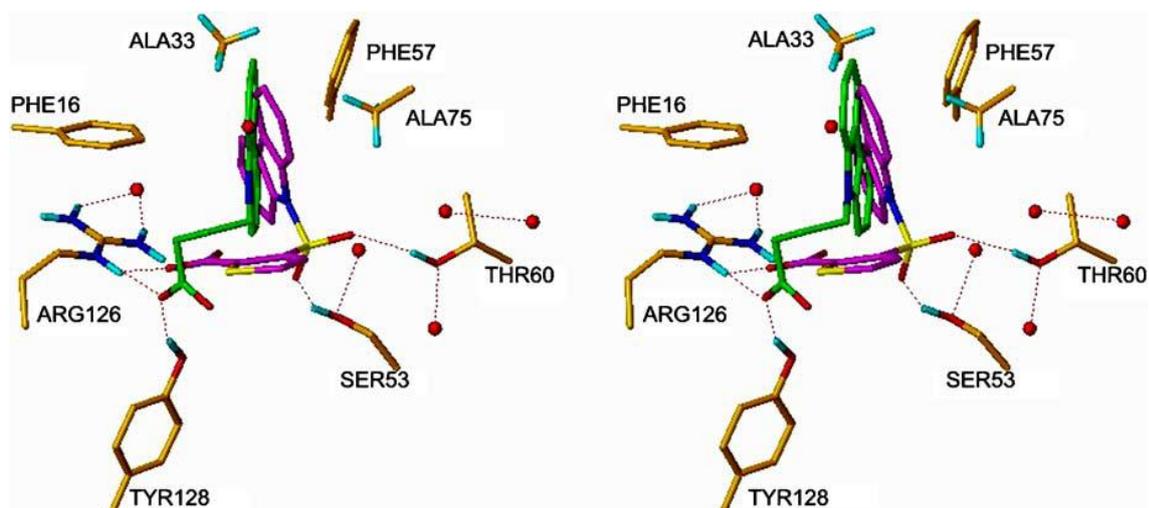
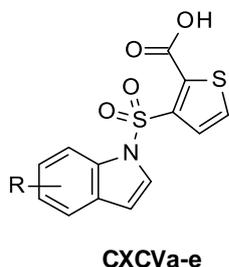


Figura 3.8. Vista del bolsillo de unión de **CLXXXIX** (verde) co-cristalizado con A-FABP humano y la superposición acoplada con **CXCIII** (magenta) (tomado de la ref. 218).

La estructura del complejo A-FABP-(**CLXXXIX**) se empleó como punto de partida en los estudios de docking de una serie limitada de compuestos virtuales. Este conjunto comprendió compuestos en el que el residuo flexible de ácido butanoico de **CLXXXIX** se intercambiaba con isómeros posicionales de ácidos benzoicos, ácidos bencilcarboxílicos, ácidos sulfoniltiofenocarboxílicos y ácidos sulfonilbenzoicos. De este conjunto, las arilsulfonamidas **CXCIII** y **CXCIV** se tomaron como candidatos interesantes después del estudio de modelización. Por ejemplo, se previó que el grupo sulfonilo de **CXCIII** formase enlaces de hidrógeno potenciales con Ser⁵³ y Thr⁶⁰ (Figura 3.8). En efecto, el compuesto **CXCIII** mostró un valor de $IC_{50} = 1,1\mu M$, en el rango del compuesto **CLXXXIX** (Tabla 3.3), mientras que **CXCIV** mostró ser aproximadamente cuatro veces menos activo que **CXCIII**. Tanto el compuesto **CXCIII** como **CXCIV** poseen un mejor perfil de selectividad que el compuesto **CLXXXIX** con una preferencia aproximadamente diez veces mayor por A-FABP que por H-FABP (Tabla 3.3).

A continuación, se llevó a cabo el estudio de la influencia de diferentes sustituyentes en el anillo arílico. Los grupos tiofenosulfonilo y bencenosulfonilo se utilizaron como linkers miméticos. Los derivados tiofenosulfonilo mostraron generalmente mejores actividades inhibitorias (entre 2 y 9 veces) que los compuestos que poseen el grupo bencenosulfonilo como grupo espaciador. Los compuestos con mejores actividades de ambos grupos se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Potencia inhibitoria de A-FABP de derivados de indol.



Compuesto	R	A-FABP IC ₅₀ (μM)
CXCVa	3-Me	1,5
CXCVb	6-Me	1,3
CXCVC	6-OMe	2,6
CXCVD	7-OMe	2,6
CXCVe	5-Br	1,3

3.1.7.2. 4-Hidroxi pirimidinas

En 2004, Ringom²¹⁹ y *col.* identificaron las 4-hidroxi pirimidinas **CXCVI** y **CXCVII** como inhibidores potentes y selectivos de A-FABP empleando un ensayo de polarización de fluorescencia (Figura 3.9).

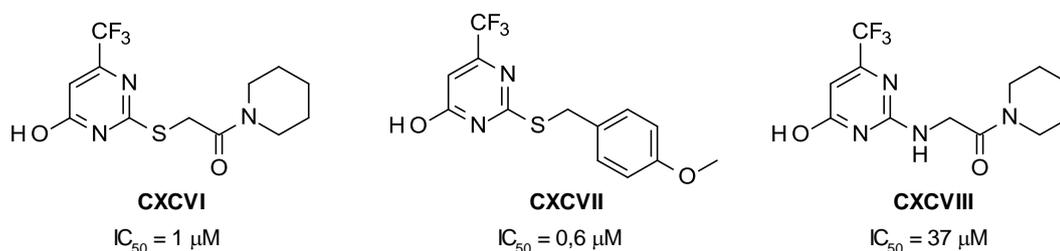


Figura 3.9

Para comprender mejor el modo de unión, se llevó a cabo la co-cristalización de **CXCVI** con A-FABP humano recombinante. La estructura cristalina (Figura 3.10) reveló que el grupo hidroxilo de la pirimidina interacciona con las cadenas laterales de Tyr¹²⁸ y Arg¹²⁶ de manera similar a como se une el grupo carboxilato con los LCFA endógenos. La piperidina se sitúa en el bolsillo lipofílico definido por Phe¹⁶, Met²⁰,

²¹⁹ Ringom, R.; Axen, E.; Uppenberg, J.; Lundbaeck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4449-4452.

Val²³, Ala³³, Phe⁵⁷ y Ala⁷⁵. El grupo CF₃ se sitúa frente a un grupo de cadenas hidrofóbicas, interaccionando polarmente con una molécula de agua.

Debido a que el grupo tioéter parecía no contribuir a la unión, se sintetizó el análogo **CXCVIII** empleando como linker un grupo amino (Figura 3.9), el cual mostró una actividad inhibitoria de 37 μM.

A pesar de la moderada actividad de **CXCVIII** frente a A-FABP, se realizó un estudio de relación estructura-actividad (SAR) para mejorar la comprensión de dicha relación. Estos estudios se llevaron a cabo mediante la sustitución del átomo de azufre por nitrógeno y carbono, y el intercambio de CF₃ por sustituyentes alifáticos y arílicos.

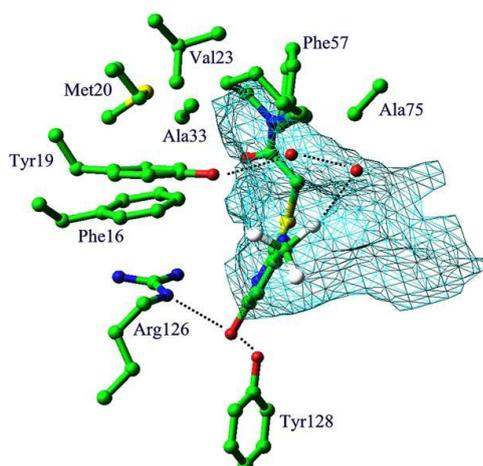


Figura 3.10 Representación cristalográfica de Rayos X del complejo A-FABP-(CXCVI) mostrando las interacciones clave por puente de hidrógeno (tomado de la ref. 219).

Sin embargo, cuando se llevó a cabo la exploración de estos nuevos compuestos derivados de la estructura **CXCVII**, se vio que el intercambio del átomo de azufre por un átomo de nitrógeno (**CXCIX**) producía un descenso de la actividad aproximadamente de 7 veces, y cuando el intercambio era por un átomo de carbono (**CC**) se observó una disminución adicional de 7 veces en la actividad con respecto al compuesto **CXCIX** (Figura 3.11).

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

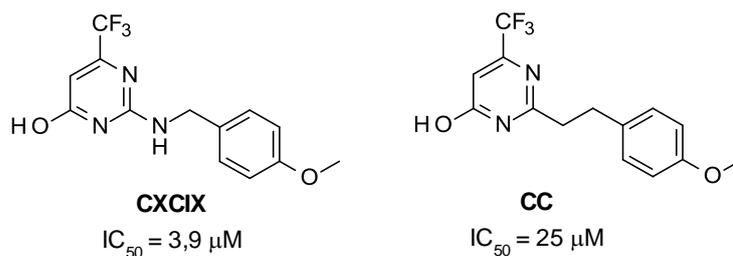
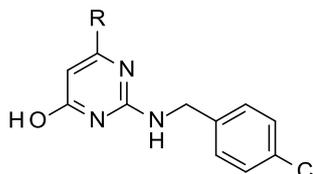


Figura 3.11

De igual forma, las modificaciones realizadas en la longitud de la cadena alquílica de la posición 2 de la pirimidina mostraron una pérdida de la actividad. Por otra parte, se observó que las sustituciones en posición *para*- en el grupo bencilo ofrecían mejores actividades que las sustituciones en posiciones *orto*- o *meta*-, pero sin llegar a superar, en ningún caso, la actividad del compuesto **CXCVII**. La sustitución del grupo CF_3 por distintos grupos arilos y fenilos se realizó sobre el compuesto **CCI**, el análogo de **CXCIX** con mejor actividad. Los resultados obtenidos mostraron inactividad de todos los compuestos ensayados excepto el compuesto sustituido por un grupo etilo (**CCIb**) que retuvo algo de actividad (Tabla 3.5).

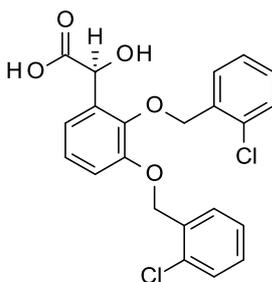
Tabla 3.5. Sustitución del grupo CF_3 y su efecto en la unión con A-FABP.



Compuesto	R	IC_{50} (μM)
CCI	CF_3	2,9
CCIa	Me	>100
CCIb	Et	47
CCId	Fenil	>100
CCId	2-fluorofenil	>100

3.1.7.3. Benciléteres de ácidos hidroxibenzoicos

La estructura de **BMS-480404**²²⁰ formando complejo con K-FABP se determinó en 2006 por McDonnell²²¹ y *col.* (Figura 3.12). Este compuesto forma parte de una serie de compuestos aromáticos que actúan como inhibidores de FABP4 y/o inhibidores duales de FABP4/FABP5, siendo un agente terapéutico potencial en el tratamiento de desórdenes metabólicos. Debido a que no se obtuvieron buenos cristales del complejo formado entre **BMS-480404** y K-FABP para realizar difracción de rayos X, este grupo de investigación determinó la estructura de RMN del complejo.

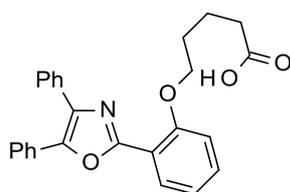
**BMS-480404** $K_i = 33 \pm 2$ nM (K-FABP) $K_i = 2,5 \pm 0,1$ nM (A-FABP)**Figura 3.12**

²²⁰ Magnin, D. R.; Sulsky, R.; Robl, J. A.; Caulfield, T. J.; Parker, R. A. WO 03043624.

²²¹ McDonnell, P. A.; Constantine, K. L.; Goldfarb, V.; Johnson, S. R.; Sulsky, R.; Magnin, D. R.; Robl, J. A.; Caulfield, T. J.; Parker, R. A.; Taylor, D. S.; Adam, L. P.; Metzler, W. J.; Mueller, L.; Farmer, B. T. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5013-5017.

3.1.7.4. Ácidos heteroarilfenoxi- y heteroarilbifeniloxialcanoicos

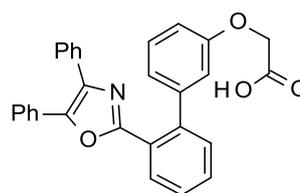
En 2007, Sulsky²²² y *col.* identificaron a los compuestos **CCII** y **CCIII** como inhibidores de A-FABP y M-FABP, siendo este último compuesto 170 veces más selectivo frente a la isoforma A-FABP que a M-FABP (Figura 3.13). El ensayo de desplazamiento de 1,8-ANS (ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico) se empleó para determinar la afinidad de unión.



CCII

$K_i = 54 (\pm 4)$ nM (A-FABP)

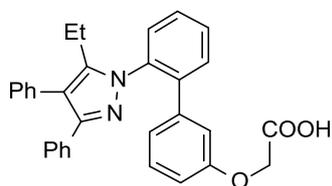
$K_i = 32 (\pm 4)$ nM (M-FABP)



CCIII

$K_i = 6 (\pm 1)$ nM (A-FABP)

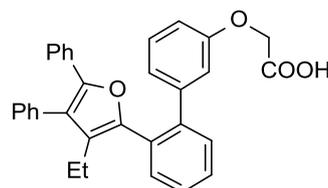
$K_i > 1000$ nM (M-FABP)



BMS309403

$K_i < 2$ nM (A-FABP)

$K_i = 250 (\pm 15)$ nM (M-FABP)



CCIV

$K_i = 3,5 (\pm 0,7)$ nM (A-FABP)

$K_i = 220 (\pm 15)$ nM (M-FABP)

Figura 3.13

²²² Sulsky, R.; Magnin, D. R.; Huang, Y.; Simpkins, L.; Taunk, P.; Patel, M.; Zhu, Y.; Stouch, T. R.; Bassolino-Klimas, D.; Parker, R.; Harrity, T.; Stoffel, R.; Taylor, D. S.; Lavoie, T. B.; Kish, K.; Jacobson, B. L.; Sheriff, S.; Adam, L. P.; Ewing, W. R.; Robl, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3511-3515.

A partir de estos datos, se llevó a cabo un estudio de la influencia del heterociclo en el compuesto **CCIII**, y se observó que la sustitución del oxazol por un imidazol no influía en la afinidad de unión ($K_i = 9,3 \pm 0,6$ nM para A-FABP). Sin embargo, cuando la sustitución se realizaba por pirazol (**BMS309403**) o furano (**CCIV**) se encontraron mejores valores de K_i (Figura 3.13).

En 2011, Liu²²³ y *col.* describieron el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de una serie de pirazoles **CCVa-g** sustituidos con anillos aromáticos como nuevos inhibidores de A-FABP humano (Figura 3.14).

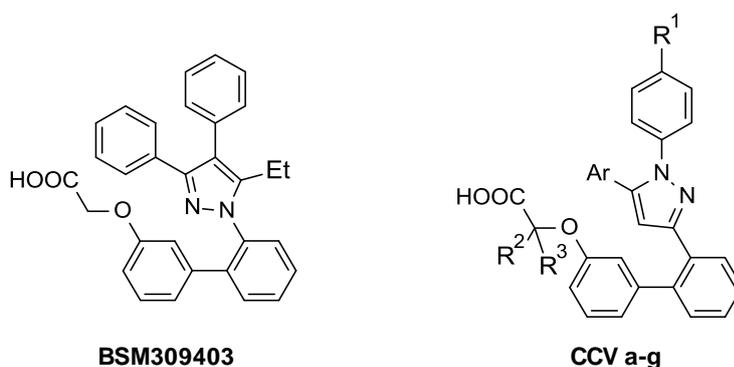


Figura 3.14

El ensayo utilizado para cuantificar la afinidad de unión del ligando con A-FABP fue el ensayo de desplazamiento de fluorescencia de 1,8-ANS. En este caso se utilizó el compuesto **BMS309403** (Figura 3.14) o su ester etílico como control positivo o negativo para validar el ensayo de *screening*. Los resultados se recogen en la Tabla 3.6.

²²³ Liu, X.; Huang, X.; Lin, W.; Wang, D.; Diao, Y.; Li, H.; Hui, X.; Wang, Y.; Xu, A.; Wu, D.; Ke, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2949-2952.

Tabla 3.6. Afinidades de unión de la serie **CCVa-g** frente a H-FABP y A-FABP.

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	Ar	K _i , μM H-FABP	K _i , μM A-FABP
BMS309403	-	-	-	-	3,47 ± 0,18	0,015 ± 0,008
Ester etílico de BMS309403	-	-	-	-	NB*	NB*
CCVa	H	H	H	Ph	5,24 ± 3,70	0,032 ± 0,004
CCVb	Cl	H	H	Ph	17,00 ± 1,83	0,013 ± 0,008
CCVc	Cl	H	H	2-furanil	4,13 ± 1,03	0,007 ± 0,004
CCVd	Cl	H	H	2-Tienil	4,24 ± 0,46	0,005 ± 0,002
CCVe	Cl	Me	H	2-Tienil	2,27 ± 0,92	< 0,001
CCVf	Cl	Et	H	2-Tienil	3,72 ± 1,52	0,006 ± 0,002
CCVg	Cl	Me	Me	2-Tienil	>50	<0,001

*no se observa unión obvia a 10μM

Los compuestos sintetizados se unen fuertemente al bolsillo hidrofóbico de unión de A-FABP, mostrando una afinidad de unión significativamente menor por la proteína homóloga H-FABP. El compuesto **CCVg** es la estructura más potente y específica de la familia de compuestos que se sintetizaron.

3.1.7.5. Ácidos carbazolcarboxílicos y análogos

El compuesto **CCVI** se identificó en 2009 por Barf²²⁴ y *col.* como un inhibidor potente y selectivo de A-FABP. El análisis de rayos X mostró que este compuesto se une a los mismos sitios que los ácidos grasos endógenos y que la actividad inhibitoria se debe a la interacción del grupo ácido carboxílico con Tyr¹²⁸ (Y128) y Arg¹²⁶ (R126), y a distintas interacciones hidrofóbicas (Figura 3.15).

²²⁴ Barf, T.; Lehmann, F.; Hammer, K.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Rondahl, L.; Lundbaeck, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1745-1748.

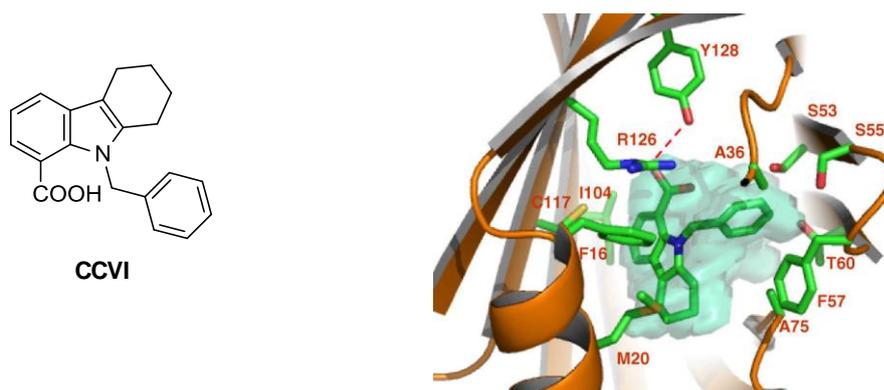


Figura 3.15 Estructura del co-cristal de **CCVI** con A-FABP humano (tomado de la ref. 224).

Se realizó un estudio SAR de **CCVI** para comprobar la relevancia que tenía la posición del grupo ácido carboxílico y se comprobó que la posición 2 era la que aportaba mayor poder de inhibición. Basándose en esta estructura, se introdujeron distintos sustituyentes en el anillo del grupo bencilo, y se observó que los sustituyentes en posición *orto*- ofrecían compuestos con mayor actividad que cuando dicho sustituyente se encontraba en *meta*- o *para*- independientemente de la naturaleza electrodonadora o electroattractora del mismo. La actividad inhibitoria de todos los compuestos se evaluó mediante un ensayo de polarización de fluorescencia. En la Figura 3.16 se muestran los compuestos con mejores valores de IC_{50} .

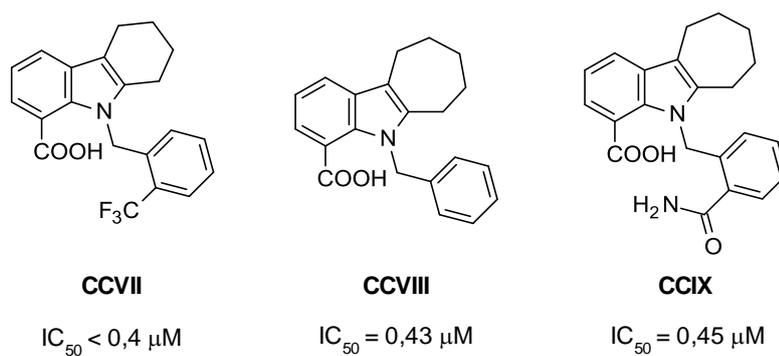
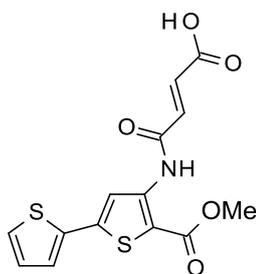


Figura 3.16

3.1.7.6. Monoamidas de ácidos dicarboxílicos

En ese mismo año, Hertz²²⁵ y *col.* publicaron la estructura de un nuevo inhibidor, **HTS01037**, que actuaba como un ligando de gran afinidad por A-FABP con un valor de $K_i = 0,67 \pm 0,18 \mu\text{M}$ (Figura 3.17). Se realizaron estudios de binding de este compuesto con otras isoformas de FABPs y se observó que tenía una menor afinidad por ellas, siendo este compuesto selectivo para A-FABP.



HTS01037

$K_i = 0,67 \pm 0,18 \mu\text{M}$ (A-FABP)

$K_i = 3,40 \pm 0,60 \mu\text{M}$ (E-FABP)

$K_i = 9,07 \pm 1,71 \mu\text{M}$ (H-FABP)

$K_i = 6,57 \pm 1,55 \mu\text{M}$ (I-FABP)

$K_i = 8,17 \pm 1,28 \mu\text{M}$ (L-FABP)

Figura 3.17

En 2010, Cai²²⁶ y *col.* identificaron una serie de compuestos inhibidores de FABP4 empleando un screening virtual, encontrando dos estructuras que exhibían una elevada afinidad por FABP3. Todos los compuestos se ensayaron empleando el método de desplazamiento de fluorescencia del ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (1,8-ANS) descubierto por Kane y Bernlohr.²²⁷ El compuesto **CCX** presentó una potencia similar al ligando endógeno de FABP4. Los compuestos **CCX** y **CCXIII** presentaron una inhibición baja frente a FABP3, mientras que los compuestos **CCXI** y **CCXII** presentaron una potencia similar frente a FABP3 y FABP4 (Figura 3.18).

²²⁵ Hertz, A. V.; Hellberg, K.; Reynolds, J. M.; Kruse, A. C.; Juhlmann, B. E.; Smith, A. J.; Sanders, M. A.; Ohlendorf, D. H.; Suttles, J.; Bernlohr, D. A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6024-6031.

²²⁶ Cai, H.; Yan, G.; Zhang, X.; Gorbenko, O.; Wang, H.; Zhu, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3675-3679.

²²⁷ Kane, C. D.; Bernlohr, D. A. *Anal. Biochem.* **1996**, *233*, 197-204.

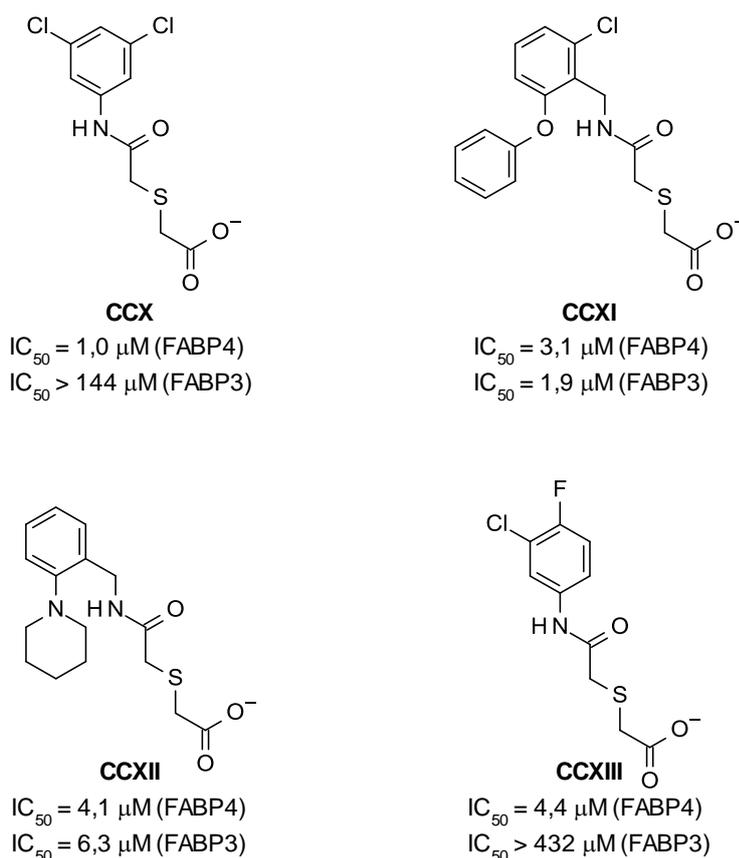


Figura 3.18

Debido a que la selectividad es un aspecto muy importante en la optimización estructural, el estudio de los diferentes modos de unión de FABP4 y FABP3, y el SAR de los compuestos sintetizados dieron información muy útil. Empleando los compuestos **CCX** y **CCXI**, se realizaron cuatro estudios de simulación dinámica molecular para averiguar qué residuos específicos importantes de FABP4 y FABP3 eran los implicados en la unión con los ligandos.

A partir de los modos de unión, se encontró que la interacción π - π juega un papel importante en la selectividad de la inhibición. El anillo aromático de **CCX** podría formar una interacción π - π con el resto Phe¹⁶ de FABP4. Sin embargo, no se observa dicha interacción entre **CCX** y FABP3, ya que el anillo aromático se encuentra lejos de Phe¹⁶. Esta diferencia podría ser debida a la mutación de Ser⁵³ en FABP4 a Thr⁵³ en

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

FABP3 que aleja el anillo aromático de **CCX** de Phe¹⁶ debido a las interacciones de hidrógeno. Esta falta de interacción con Phe¹⁶ en FABP3 condujo a una disminución de más de 144 veces en la actividad inhibitora en comparación con FABP4. En contraste, debido a que el resto difenil éter de **CCXI** podría formar una interacción π - π de Phe¹⁶ tanto en FABP4 y FABP3, no se observó diferencia inhibitora para **CCXI** (Figura 3.19).

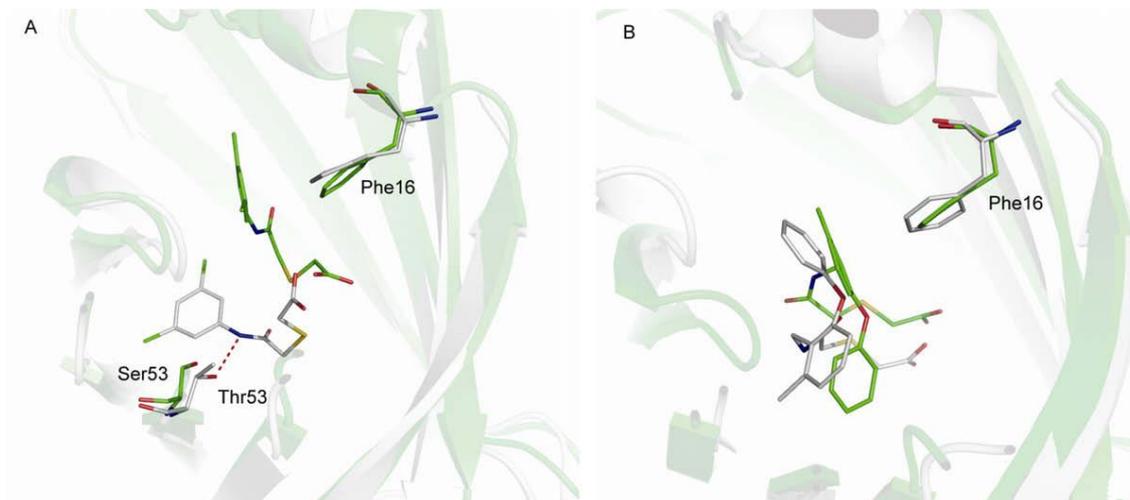


Figura 3.19 Representación del complejo FABP4-ligando (verde) y el complejo FABP3-ligando (blanco). (A) Interacción de **CCX** y la Phe¹⁶ de FABP4 e interacciones por enlace de hidrógeno entre **CCX** y FABP3. (B) Interacción π - π entre **CCXI** y la Phe¹⁶ de FABP4 y de FABP3. Las líneas rojas representan enlaces de hidrógeno (tomado de la ref. 226).

Por otra parte, la simulación dinámica molecular mostró que los grupos carboxilato de **CCX** y **CCXI** podrían formar interacciones polares con Arg¹²⁶ y Tyr¹²⁸ en el bolsillo de FABP4, las cuales son críticas en la unión de inhibidores. Además, **CCXI** establece enlaces de hidrógeno adicionales con Asp⁷⁶, Gln⁹⁵ y Arg¹⁰⁶ (Figura 3.20). Como consecuencia, los residuos Phe¹⁶, Arg¹⁰⁶, Arg¹²⁶ y Tyr¹²⁸ tanto en FABP4 como en FABP3 son muy importantes en la unión de ligandos. Arg¹⁰⁶, Arg¹²⁶ y Tyr¹²⁸ forman interacciones polares estables con los ligandos mientras que Phe¹⁶ es necesaria para formar interacciones π - π para fijar las orientaciones de unión del ligando y podría estar relacionado con la selectividad entre FABP3 y FABP4.

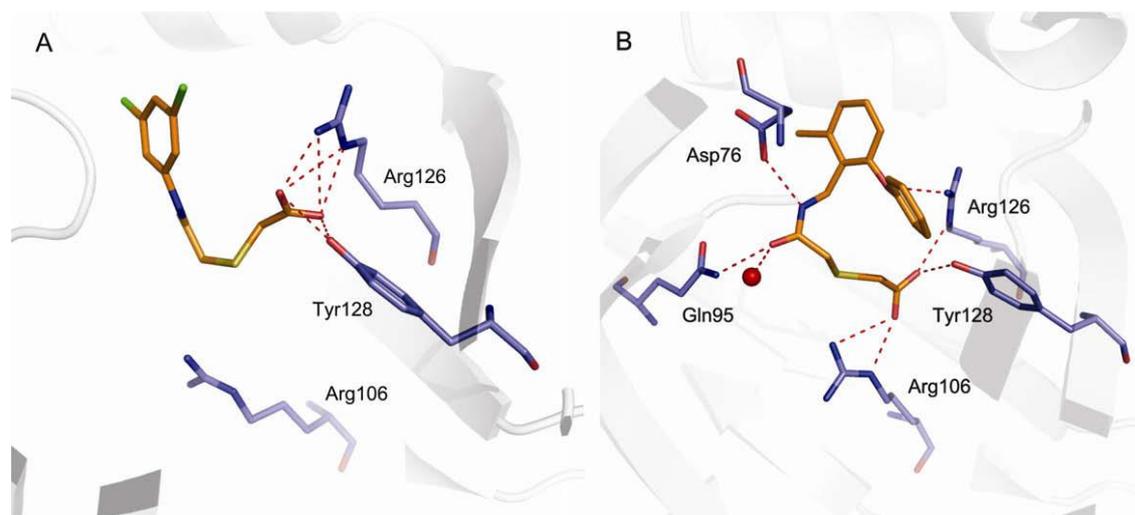


Figura 3.20 Modelos de interacción de enlace de hidrógeno de FABP4-CCX y FABP4-CCXI. (A) Interacciones de enlace de hidrógeno entre FABP4 y CCX. (B) Interacciones de enlace de hidrógeno entre FABP4 y CCXI. Las líneas de trazos rojos representan enlaces de hidrógeno. Los compuestos se representan en color naranja y los residuos en color azul (tomado de la ref. 226).

3.1.7.7. Inhibidores con estructura mixta

Por último, Xu²²⁸ y *col.* describieron en 2012 la síntesis y evaluación biológica de un nuevo candidato en la inhibición de estas proteínas. A través de una evaluación de las características estructurales de los mejores inhibidores descritos hasta el momento (**BMS309403**, **HTS01037** y **CXCVe**) (Figura 3.21), destacó que todas las moléculas poseían un anillo heterocíclico de cinco eslabones y un grupo ácido carboxílico en su estructura, y por ello, se pensó que éstos debían de ser cruciales en la inhibición de FABP4.

Se realizó el estudio de una serie de derivados de tiazoles e indoles y de sus efectos inhibitorios sobre la producción de TNF- α después de inducir las células con LPS. A una concentración de 10 μ M, se encontró que el compuesto **CCXIV** (Figura 3.21) poseía una tasa más alta de inhibición frente a TNF- α que **BMS309403** (95% vs. 85%). Por otra parte, este compuesto presentó un valor aparente de $K_i = 33$ nM obtenido del ensayo de desplazamiento de fluorescencia con 1,8-ANS. Además, la administración

²²⁸ Xu, Q.; Huang, L.; Liu, J.; Ma, L.; Chen, T.; Chen, J.; Peng, F.; Cao, D.; Yang, Z.; Qiu, N.; Qiu, J.; Wang, G.; Liang, X.; Peng, A.; Xiang, M.; Wei, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 70-81.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

oral de **CCXIV** en una dosis de 50 mg/Kg mejoró la ganancia de peso y los niveles séricos de glucosa en sangre, insulina, TG, colesterol total y ALT (alanina aminotransferasa) en una dieta alta en grasas.

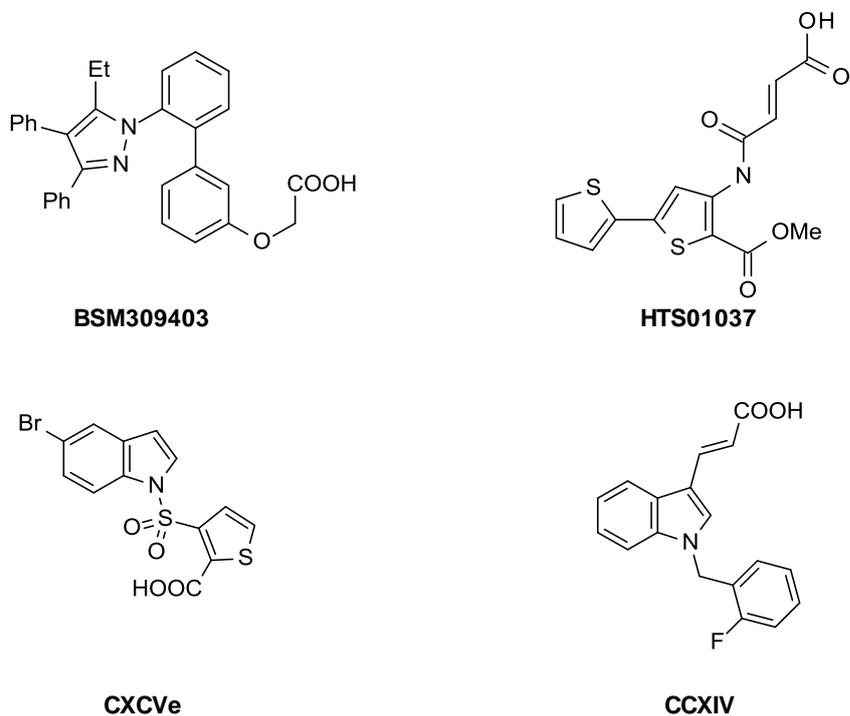


Figura 3.21

3.1.7.8. Inhibidores protegidos bajo patente: triazolopirimidonas y azinas bicíclicas

Además de los inhibidores mencionados anteriormente, otros inhibidores con estructuras de triazolopirimidonas y azinas bicíclicas han sido protegidos bajo patente. En la Figura 3.22 se muestran una serie de compuestos **CCXV**²²⁹, **CCXVI**²³⁰, **CCXVII**²³¹, **CCXVIII**²³² que actúan como inhibidores de FABP y que se encuentran implicados en la enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, dislipidemia, obesidad y diabetes.

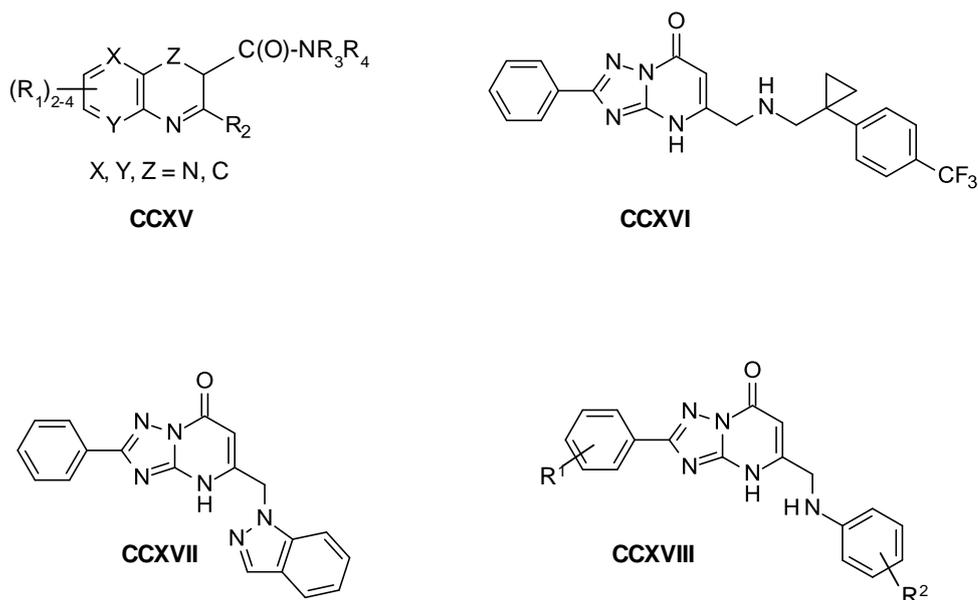


Figura 3.22

²²⁹ Cheng, C.; Shipps, G. W. Jr.; Huang, X.; Huang, Y.; Shao, N.; Rao, A.; Palani, A.; Orth, P.; Voigt, J. H.; Herr, R. J.; Rossiter, L. M.; Zeng, Q.; Sun, X. US 20120122837.

²³⁰ Shipps, G. W. Jr.; Cheng, C.; Huang, X.; Achab, A.; Orth, P.; Voigt J. H. WO 2011043994 .

²³¹ Shipps, G. W. Jr.; Cheng, C.; Huang, X.; Achab, A.; Orth, P.; Voigt J. H.; Soucy, K. A. WO 2010056631.

²³² Shipps, G. W. Jr.; Orth, P.; Voigt J. H. WO 2010056630.

3.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.2.1. Introducción

Nuestro grupo de investigación ha descrito la formación de núcleos de seis eslabones a partir de TosMIC para generar diversos compuestos tricíclicos tales como: pirimido[1,6-*a*]indoles, benzo[4,5]imidazo[1,2-*c*]pirimidinas, imidazo[1,2-*c*]pirimidinas y pirazolo[1,5-*c*]pirimidinas.^{233,234} Las carbolinas (pirido[*x,y-b*]indoles) son una clase importante de heterociclos que contienen nitrógeno en su estructura y que forman parte de un gran número de productos naturales y compuestos bioactivos. Dependiendo de la posición en la que se encuentre dicho nitrógeno en el anillo de piridina, existen cuatro isómeros (**17-20**) (Figura 3.23). De todas ellas, las β -carbolinas son las más ampliamente distribuidas en la naturaleza. Los compuestos que contienen esta estructura exhiben una gran variedad de actividades biológicas tales como propiedades antivirales y antitumorales²³⁵ debido a la formación de complejos intercalantes con el ADN o inhibición de la topoisomerasa II.²³⁶ Los derivados de β -carbolinas poseen actividades ansiolíticas, neuroprotectoras, antiinflamatorias y son inhibidores de la subunidad beta del factor nuclear quinasa *kappa* (IKK-2).^{237,238,239} La estructura de γ -carbolina se encuentra también en distintos productos naturales y en varios agentes antitumorales,²⁴⁰ mientras que las α - y δ -carbolinas son más escasas en el caso de los productos naturales.

²³³ Mendiola, J.; Minguéz, J. M.; Álvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3253-3256.

²³⁴ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Álvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4879-4882.

²³⁵ Helbecque, N.; Moquin, C.; Bernier, J. L.; Morel, E.; Guyot, M.; Henichard, J. P. *Cancer Biochem. Biophys.* **1987**, 9, 271-274.

²³⁶ Peczynska-Czoch, W.; Pognan, F.; Kaczmarek, L.; Boratynski, J. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3503-3510.

²³⁷ Barun, O.; Patra, P. K.; Ila, H.; Junjappa, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3797-3800.

²³⁸ Okamoto, T.; Akase, T.; Izumi, S.; Inaba, S.; Yamamoto, H. Japanese patent 7 220 196; *Chem. Abstr.* **1972**, 77, 152142.

²³⁹ Winters, J.; Di Mola, N. West German patent 2 442 513; *Chem. Abstr.* **1975**, 82, 156255.

²⁴⁰ Alekseyev, R. S.; Kurkin, A. V.; Yurovskaya, M. A. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2009**, 45, 889-925.

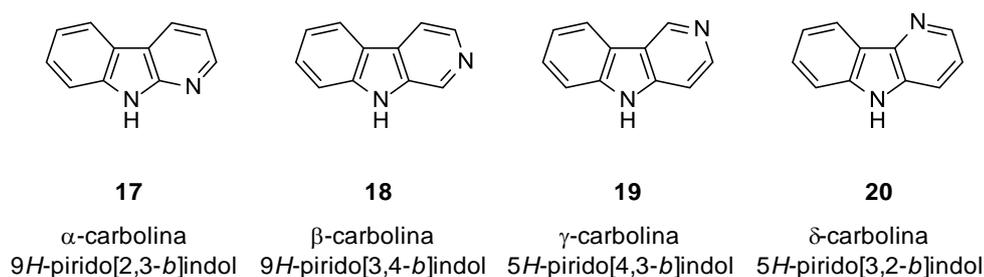


Figura 3.23. La familia de las carbolinas

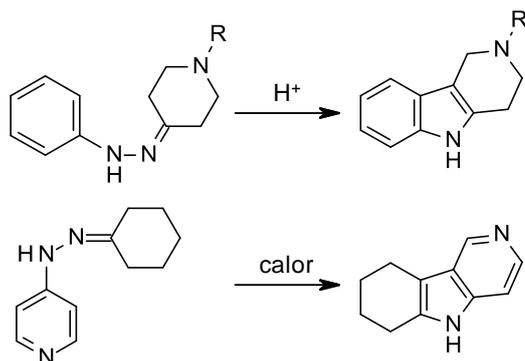
A continuación, se describen los métodos generales más relevantes para la síntesis de los núcleos de las distintas carbolinas.

3.2.2. Síntesis de carbolinas a partir de derivados de piridina

3.2.2.1. Reacción de Fischer

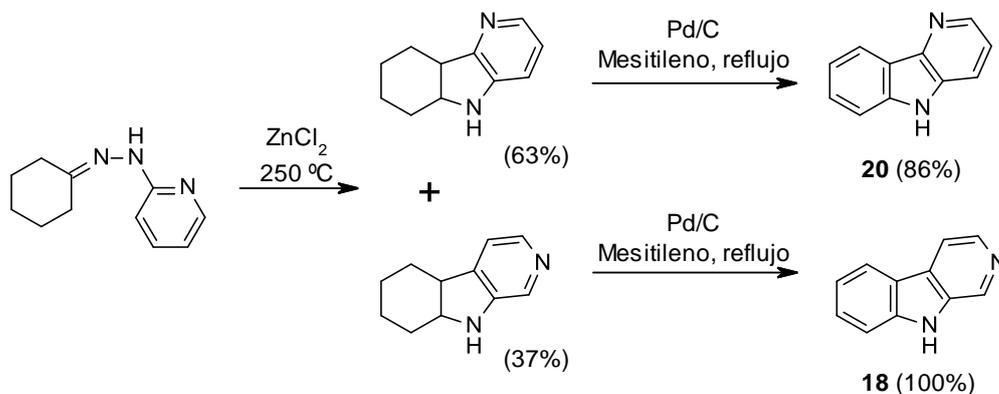
La reacción de Fischer ha demostrado ser el método más común y versátil en la preparación de tetrahidrocarbolineas y más concretamente en la síntesis de γ -carbolineas. Existen dos aproximaciones de esta reacción. La primera de ellas consiste en la formación y ciclación de fenilhidrazonas de *N*-alquilpiperidil-4-onas en presencia de un catalizador ácido. La segunda aproximación se basa en la ciclación térmica de hidrazonas de ciclohexanonas y 4-hidrazinopiridinas (Esquema 3.1).²⁴¹

²⁴¹ Smirnova, O. B.; Golovko, T. V.; Granik, V. G. *Pharm. Chem. J.* **2011**, *45*, 389-400.



Esquema 3.1

Los métodos generales de síntesis de δ -carbolidinas son escasos a pesar de la existencia de distintas metodologías. Basándose en la reacción de Fischer, Abramovitch²⁴² y *col.* describieron la ciclación de la 3-piridilhidrazona de ciclohexanona para la formación de una mezcla de los tetrahidroderivados de δ -carbolidina y, en menor proporción, el isómero β . Dichos isómeros fueron deshidrogenados para generar la β - y γ -carbolidinas **18** y **20** (Esquema 3.2).



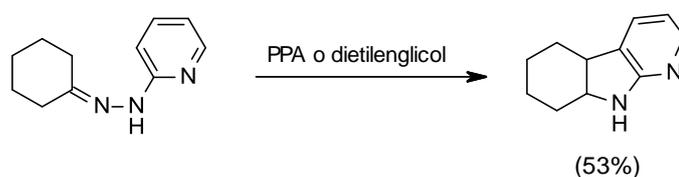
Esquema 3.2

Existen pocos estudios de síntesis de α -carbolidinas empleando la reacción de Fischer. La 2-piridilhidrazona de la ciclohexanona cicla para formar 5,6,7,8-tetrahidro-

²⁴² Abramovitch, R. A.; Adams, K. A. H. *Can. J. Chem.* **1962**, *40*, 864-869.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

α -carbolina en presencia de ácido polifosfórico²⁴³ o en presencia de dietilenglicol²⁴⁴ (Esquema 3.3).



Esquema 3.3

3.2.2.2. Reacción de Graebe-Ullmann

Un método alternativo para la síntesis de γ -carbolinas es la reacción de Graebe-Ullmann, que consiste en la síntesis de 1-(4-piridil)benzotriazoles sustituidos o 1-feniltriazol[4,5-*c*]piridinas y su posterior descomposición térmica²⁴⁵, irradiación por microondas²⁴⁶, fotólisis²⁴⁷ o calentamiento en presencia de ácidos fosfóricos^{248,249} o polifosfóricos^{250, 251, 252, 253, 254}.

Robinson²⁴⁴ y *col.* describieron en 1924 la reacción entre *o*-fenilenodiamina y 4-cloropiridina para dar *N*-(2-aminofenil)-4-aminopiridina, la cual se transforma en 1-(4-piridil)benzotriazol por diazotación. Su posterior calentamiento en ácido fosfórico o su fusión con ZnCl₂ conduce a la γ -carbolina (**19**) (Esquema 3.4). Este proceso también se

²⁴³ Okuda, S.; Robison, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 740-743.

²⁴⁴ Kelly, A. H.; Parrick, J. *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 2455-2459.

²⁴⁵ Bremer, O. *Ann.* **1934**, *514*, 279-291.

²⁴⁶ Molina, A.; Vaquero, J. J.; Garcia-Navio, J. L.; Alvarez-Builla, J. *Tetrahedron* **1993**, *34*, 2673-2676.

²⁴⁷ Mehta, L. K.; Parrick, J.; Payne, F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1993**, *11*, 1261-1267.

²⁴⁸ Robinson, R.; Thornley, S. *J. Chem. Soc.* **1924**, *125*, 2169-2176.

²⁴⁹ Nantka-Namirski, P. *Acta Pol. Pharm.* **1961**, *18*, 449-460.

²⁵⁰ Nantka-Namirski, P. *Acta Pol. Pharm.* **1961**, *18*, 391-399.

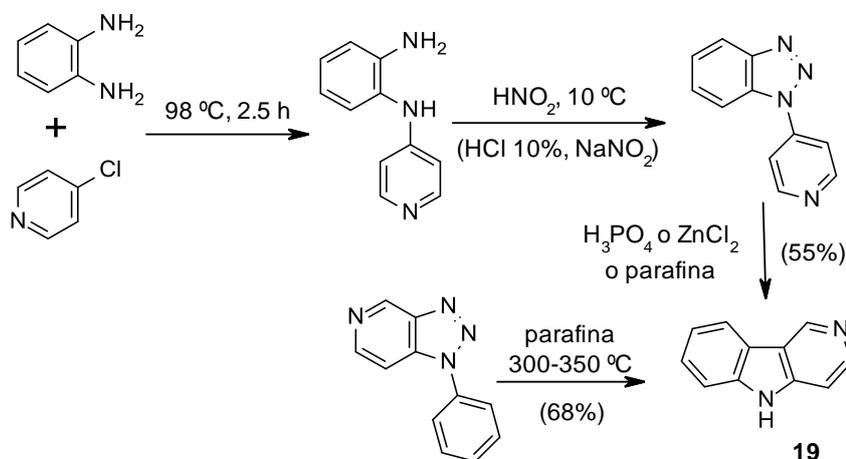
²⁵¹ Nantka-Namirski, P. *Acta Pol. Pharm.* **1962**, *19*, 229-242.

²⁵² Allen, M. S.; Tan, Y. C.; Trudell, M. L.; Narayanan, K.; Schindler, L. R.; Martin, M. J.; Schultz, C.; Hagen, T. J.; Koehler, K. F.; Coddling, P. W.; Skolnick, P.; Cook, J. M. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2343-2357.

²⁵³ Molina, A.; Vaquero, J. J.; Garcia-Navio, J. L.; Alvarez-Builla, J.; de Pascual-Teresa, B.; Gago, F.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5587-5599.

²⁵⁴ Akimoto, H.; Kawai, A.; Nomura, H.; Nagao, M.; Kawachi, T.; Sugimura, T. *Chem. Lett.* **1977**, 1061-1064.

llevó a cabo mediante irradiación con microondas.²⁵³ La descomposición térmica de 1-(4-piridil)benzotriazol y 3-fenil-3*H*-pirazolo[3,4-*c*]piridina por calentamiento a 300-350 °C en parafina también conduce a la γ -carbolina (**19**).



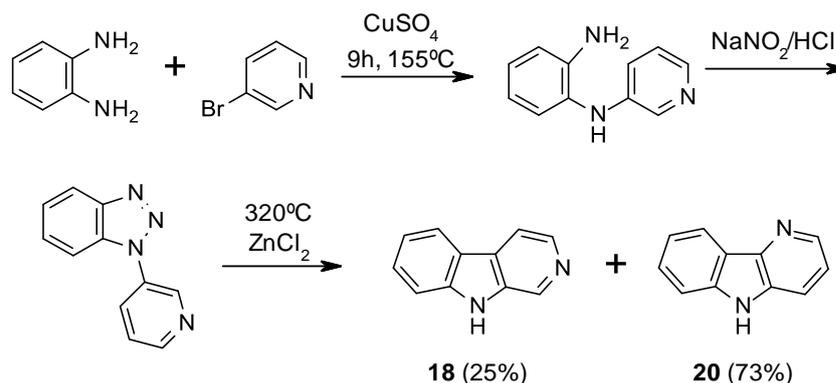
Esquema 3.4

La reacción entre *o*-fenilenodiamina y 3-bromopiridina fue la primera síntesis de δ -carbolinas empleando este método. De esta manera, se obtuvo *N*-(2-aminofenil)-3-aminopiridina que, por diazotación, produjo 1-(3-piridil)benzotriazol. A continuación, se hizo reaccionar con ZnCl_2 a elevadas temperaturas para dar una mezcla de β - y δ -carbolina (**18** y **20**, respectivamente), obteniéndose esta última en mayor proporción (Esquema 3.5).²⁵⁵

²⁵³ Molina, A.; Vaquero, J. J.; Garcia-Navio, J. L. Alvarez-Builla, J.; de Pascual-Teresa, B.; Gago, F.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5587-5599.

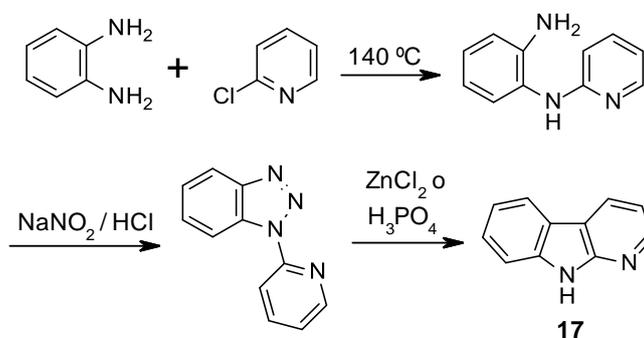
²⁵⁵ Spath, E.; Eiter, K. *Chem. Ber.* **1940**, *73*, 719-729.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 3.5

El tratamiento de *N*-(2-aminofenil)-2-aminopiridina, obtenida de la reacción entre *o*-fenilenodiamina y 2-cloropiridina por nitrosación, produjo 1-(2-piridil)benzotriazol, que por posterior reacción con ZnCl_2 ²⁵⁶ o ácido fosfórico²⁴⁸ condujo a la formación de α -carbolina (**17**) (Esquema 3.6). Este proceso también se ha llevado a cabo empleando calentamiento por microondas.²⁵⁷



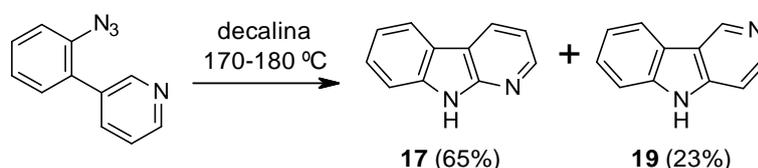
Esquema 3.6

²⁵⁶ Lawson, W.; Perkin, W. H. Jr.; Robinson, R. *J. Chem. Soc.* **1924**, 125, 626-657.

²⁴⁸ Robinson, R.; Thornley, S. *J. Chem. Soc.* **1924**, 125, 2169-2176.

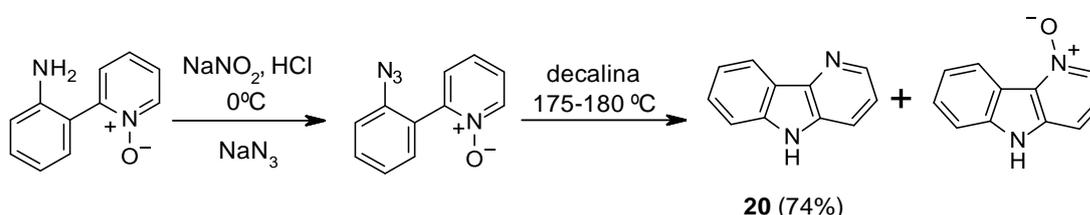
²⁵⁷ Vera-Luque, P.; Alajarin, R.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2006**, 8, 415-418.

La descomposición de azidas se considera como una reacción de Graebe-Ullmann. Por ejemplo, el calentamiento de 3-(2-azidofenil)piridina en decalina conduce a una mezcla de α - y γ -carbolinas (**17** y **19**, respectivamente) (Esquema 3.7).²⁵⁸



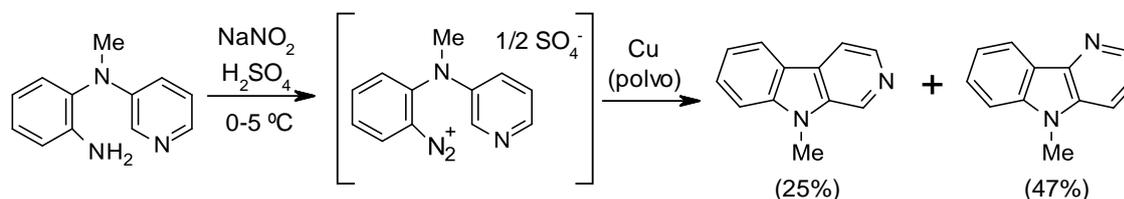
Esquema 3.7

En 1961, Abramovith²⁵⁹ y *col.* describieron la síntesis de derivados de δ -carbolinas a partir del *N*-óxido de 2-(2-aminofenil)piridina, que se transformó en la azida correspondiente y, por posterior descomposición térmica, produjo una mezcla de δ -carbolina (**20**) y su *N*-óxido (Esquema 3.8).



Esquema 3.8

El sulfato de diazonio obtenido a partir de *N*-metil-*N*-(3-piridil)-*o*-fenilenodiamina, se transformó en disolución acuosa, a temperatura ambiente y en presencia de Cu (polvo) en una mezcla de β - y δ -carbolinas (Esquema 3.9).



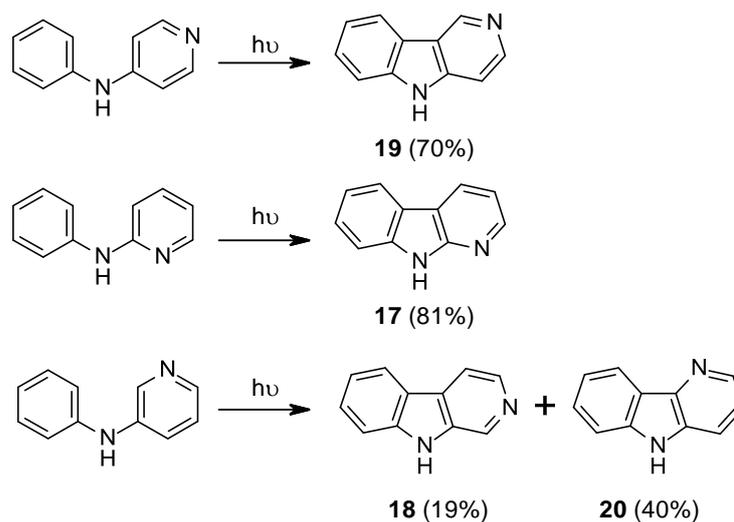
Esquema 3.9

²⁵⁸ Smith, P. A. S.; Boyer, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2626-2629.

²⁵⁹ Abramovith, R. A.; Adams, K. A. H. *Can. J. Chem.* **1961**, 39, 2516-2528.

3.2.2.3. Ciclación fotoquímica de anilino piridinas

En 1968, Clark²⁶⁰ y *col.* describieron la ciclación fotoquímica de anilino piridinas. La irradiación de 4-anilino piridina en THF durante 22 horas produjo la γ -carbolina (**19**) (70%) y la ciclación de 2-anilino piridina condujo a la α -carbolina **17** con un rendimiento del 81%. Sin embargo, la ciclación fotoquímica de 3-anilino piridina condujo a una mezcla de β - y δ -carbolinas (**18** y **20**, respectivamente) (Esquema 3.10).



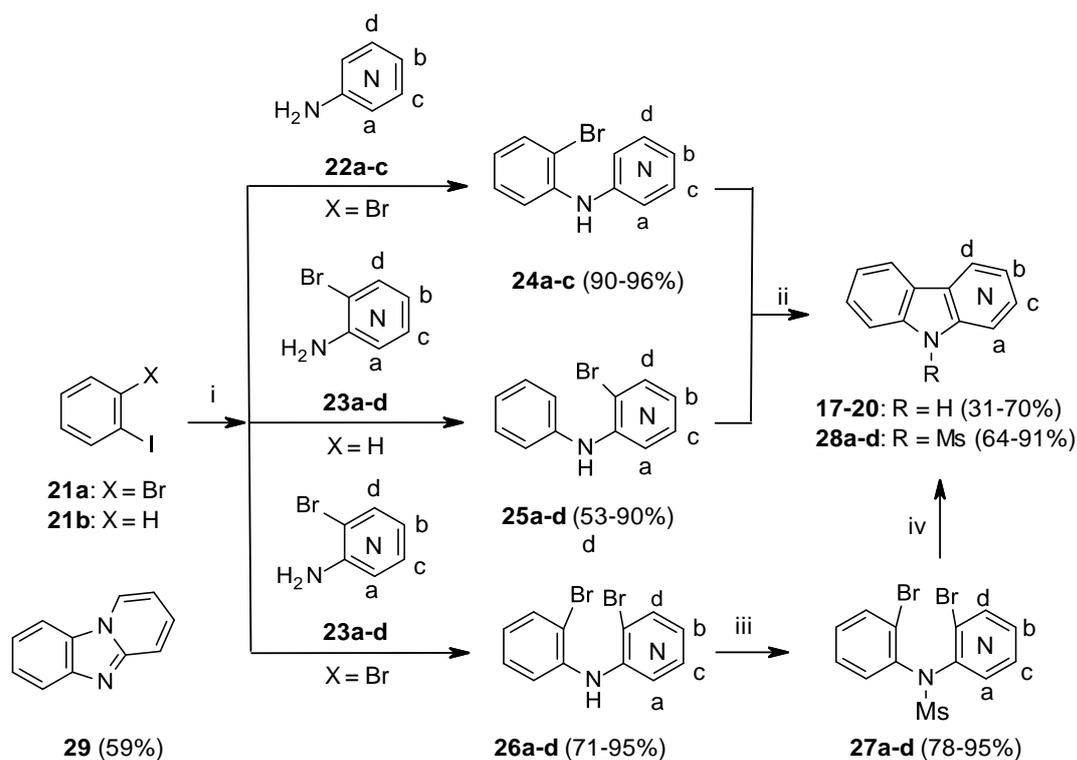
Esquema 3.10

3.2.2.4. Reacciones de acoplamiento C-C y C-N catalizadas por metales

En 1999, Iwaki²⁶¹ y *col.* describieron una nueva estrategia de síntesis basada en la C- y N-arilación de piridinas catalizada por paladio. Esta estrategia se recoge en el Esquema 3.11 y es aplicable a todas las carbolinas.

²⁶⁰ Clark, V. M.; Cox, A.; Herbert, E. J. *J. Chem. Soc. (Org.)* **1968**, 831-833.

²⁶¹ Iwaki, T.; Yasuhara, A.; Sakamoto, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 1505-1510.

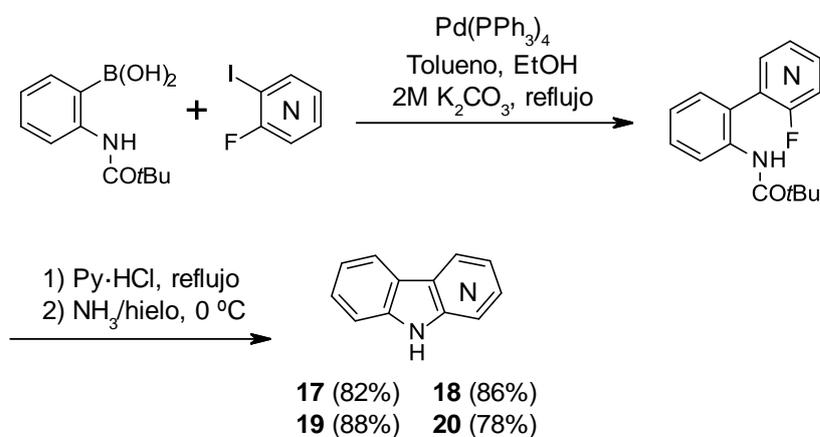


Esquema 3.11. Condiciones de la reacción: *i*: Pd₂(dba)₃, 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno o NaO^tBu, Tolueno, 100 °C; *ii*: Pd(OAc)₂, Na₂CO₃, DMF, reflujo; *iii*: NaH, MsCl, THF; *iv*: PdCl₂(PPh₃)₂, (SnBu₃)₂, Li₂CO₃, Et₄N⁺I, Tolueno o DMF.

La reacción de *N*-arilación entre **21a** y 2-aminopiridinas **22** catalizada por Pd₂(dba)₃ produjo las piridinas **24**, que proporcionaron las correspondientes γ- y δ-carbolinas (**19**, **20**) por reacción de arilación intramolecular catalizada por Pd(OAc)₂. En el caso de **24a**, ésta condujo a la formación de pirido[1,2-*a*]bencimidazol (**29**). Por otra parte, la reacción de acoplamiento entre **21b** y aminobromopiridinas **23** catalizada por Pd₂(dba)₃ produjo las fenilaminobromopiridinas **25**, que ciclan mediante catálisis con Pd(OAc)₂ para dar las correspondientes carbolinas **17-20**. La reacción de acoplamiento entre **21a** y las aminobromopiridinas **23** condujo a la formación de fenilaminopiridinas **26** con buenos rendimientos. La ciclación de **26** para dar las carbolinas **28** se realizó únicamente a través de los correspondientes *N*-metilsulfonil derivados **27** en presencia de PdCl₂(PPh₃)₂ y (SnBu₃)₂ (Esquema 3.11).

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se han estudiado otras reacciones de metalación para la síntesis de carbolinas. Rocca^{262,263} y *col.* describieron la reacción de ácidos *o*-acilaminofenilborónicos con dihalopiridinas para formar las correspondientes arilpiridinas que ciclan en presencia de hidrocloreuro de piridinio produciendo las diferentes carbolinas **17-20** con elevados rendimientos (Esquema 3.12).



Esquema 3.12

²⁶² Rocca, P.; Marsais, F.; Godard, A.; Queguiner, G. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 49-64.

²⁶³ Rocca, P.; Cochenec, C.; Marsais, F.; Thomas-dit-Dumont, L.; Mallet, M.; Godard, A.; Queguiner, G. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7832-7838.

3.2.3. Síntesis de inhibidores de FABP-4

El ácido 4-(9*H*-carbazol-9-il)butanoico **CLXXXIX** fue identificado como un hito frente a A-FABP con un valor de IC₅₀ de 0,59 μM.²¹⁸ Basándonos en su estructura, se estudió el efecto que tiene sobre la actividad de A-FABP la incorporación de un nitrógeno endocíclico en uno de los anillos bencénicos. De esta manera, se procedió al cambio de una estructura base tipo carbazol por una estructura tipo carbolina, diseñándose así cuatro isómeros **30-33** (Figura 3.24).

Por otra parte, se llevó a cabo la síntesis de las carbolinas alquiladas en el nitrógeno piridínico **34-37** para estudiar el efecto que produce la posición de la cadena alquílica sobre la actividad de A-FABP (Figura 3.24).

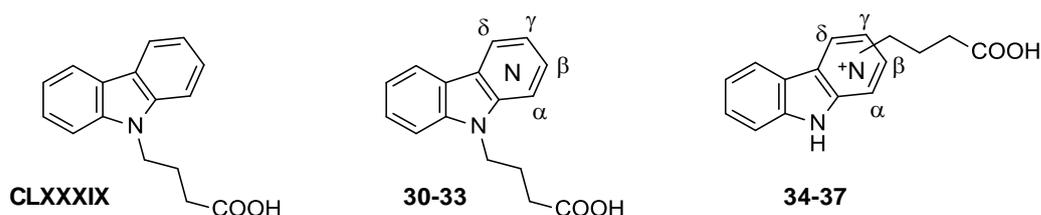
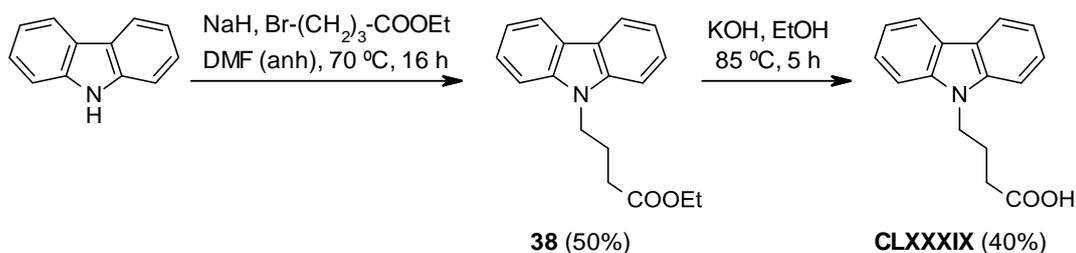


Figura 3.24

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis de **CLXXXIX**, compuesto que nos serviría de referencia en los estudios de inhibición de A-FABP. La reacción de alquilación de 9*H*-carbazol con 4-bromobutirato de etilo se realizó empleando como base NaH para dar **38**, que tras su posterior hidrólisis en medio básico condujo a **CLXXXIX** (Esquema 3.13).

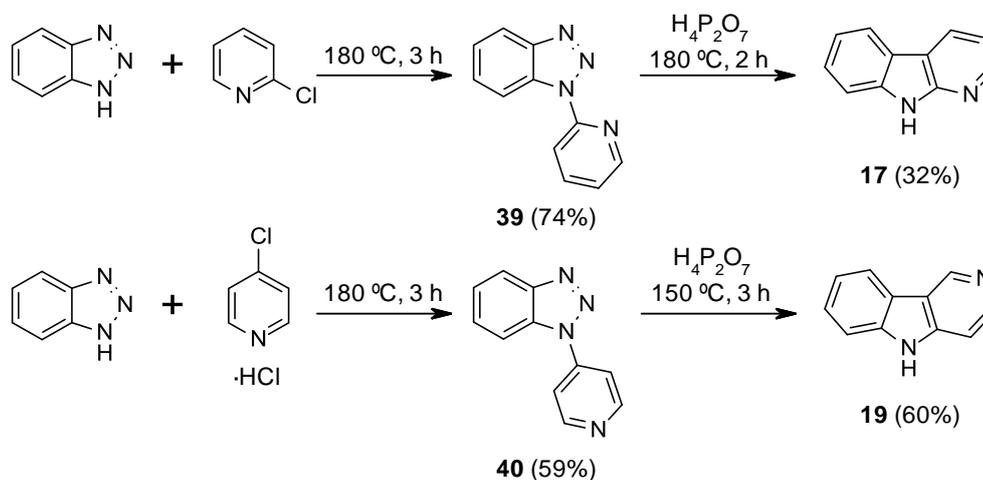
²¹⁸ Lehmann, F.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Lundbaeck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4445-4448.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 3.13

Una vez sintetizado **CLXXXIX**, se procedió a la síntesis de los ácidos carbolinilbutanoicos **30-33**. Se comenzó con la preparación de las distintas carbolinas empleando los métodos descritos en la bibliografía. En el caso de la β -carbolina no fue necesaria su síntesis ya que se encuentra disponible comercialmente. En la síntesis de la α - y γ - carbolinas se utilizó la reacción de Graebe-Ullmann empleando las condiciones desarrolladas por nuestro grupo.^{257,253} Para ello, se hizo reaccionar 1*H*-benzotriazol con 2-cloropiridina o hidrocloreto de 4-cloropiridina para dar los piridilbenzotriazoles **39** y **40**, respectivamente, que por posterior tratamiento con ácido pirofosfórico condujeron a las correspondientes carbolinas **17** y **19** (Esquema 3.14).

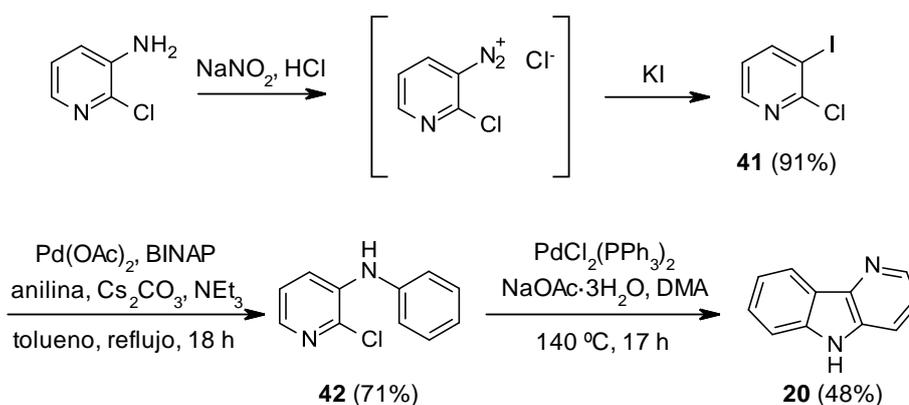


Esquema 3.14. Síntesis de α - y γ -carbolina

²⁵⁷ Vera-Luque, P.; Alajarin, R.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 415-418.

²⁵³ Molina, A.; Vaquero, J. J.; Garcia-Navio, J. L. Alvarez-Builla, J.; de Pascual-Teresa, B.; Gago, F.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5587-5599.

La síntesis de la δ -carbolina comenzó con la preparación de 2-cloro-3-iodopiridina **41**. Para ello, se empleó 3-amino-2-cloropiridina como producto de partida que por diazotación y posterior adición de KI condujo a **41**. A continuación, se llevó a cabo la aminación regioselectiva de **41** con anilina catalizada por Pd(OAc)₂ y BINAP ([2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo]), empleando Cs₂CO₃ y cantidades catalíticas de NEt₃ como bases. De esta forma se obtuvo **42** que se transformó en la δ -carbolina (**20**) realizando una arilación intramolecular catalizada por PdCl₂(PPh₃)₂ y empleando NaOAc·3H₂O como base en DMA (*N,N*-dimetilacetamida) (Esquema 3.15).^{264,265}



Esquema 3.15. Síntesis de δ -carbolina.

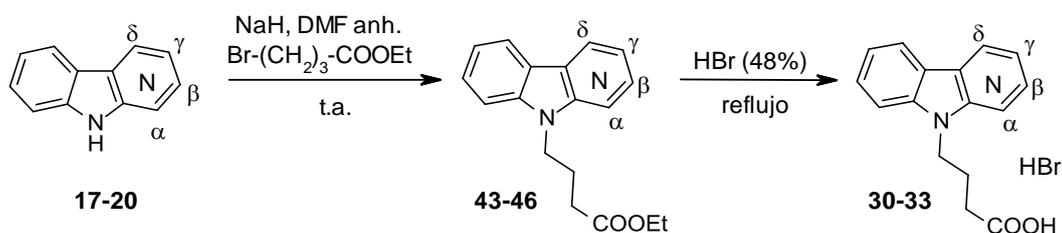
Una vez sintetizadas las distintas carbolinas, se procedió a la preparación de los compuestos **30-33**. Para ello, la reacción de alquilación en el nitrógeno indólico se llevó a cabo en DMF anhidra, empleando NaH como base y 4-bromobutirato de etilo como agente alquilante. De esta manera, se obtuvieron los compuestos **43-46** con rendimientos moderados, que tras su posterior hidrólisis ácida utilizando HBr (48%) a reflujo, condujeron a los compuestos **30-33** con rendimientos buenos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.7.

²⁶⁴ Kuethe, J. T.; Wong, A.; Davies, I. W. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7752-7754.

²⁶⁵ Franck, P.; Hostyn, S.; Dajka-Halász, B.; Polonka-Bálint, Á.; Monsieurs, K.; Mátyus, P.; Maes, B. U. W. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6030-6037.

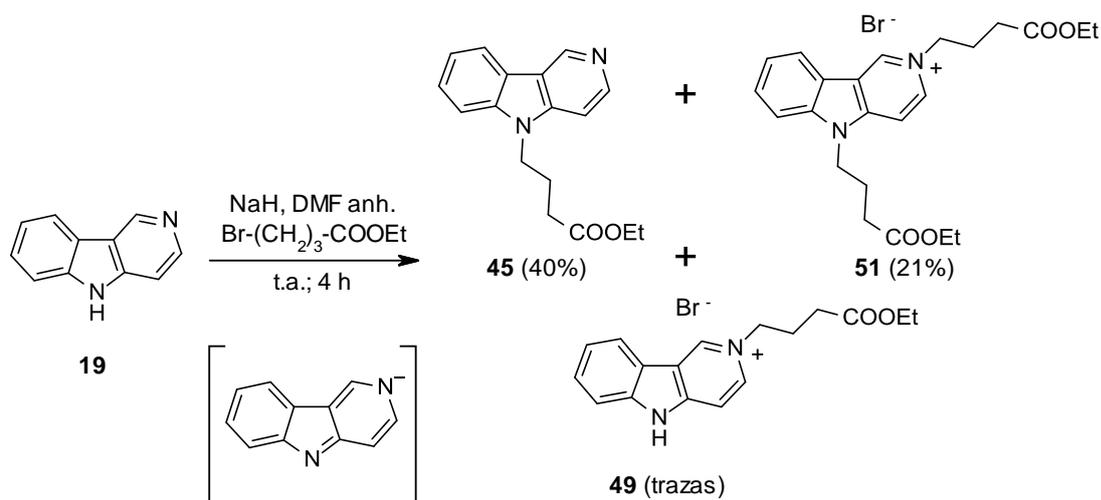
CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 3.7. Síntesis de los compuestos **30-33**.



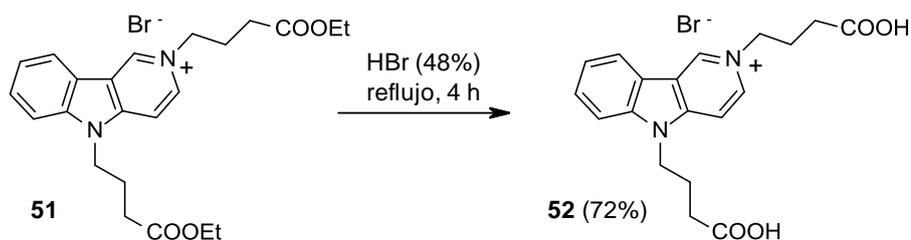
Entrada	Compuesto	Posición del N	Tiempo (h)	Rto (%)
1	43	α	4	60
2	44	β	2,5	60
3	45	γ	4	40
4	46	δ	3	50
5	30	α	2	70
6	31	β	2	68
7	32	γ	2,5	72
8	33	δ	3	85

En el caso de la reacción de alquilación de la γ -carbolina **19** se observó, además del compuesto **45**, la formación de otros dos productos de alquilación: el compuesto alquilado en el nitrógeno piridínico **49** y el compuesto dialquilado en ambos nitrógenos **51** (Esquema 3.16). Esto puede justificarse por la mayor nucleofilia del átomo de nitrógeno en posición γ debido a una mejor deslocalización de la carga negativa del anión sobre esta posición que sobre las posiciones α , β y δ de los correspondientes aniones de **17**, **18** y **20**, respectivamente.



Esquema 3.16. Reacción de alquilación de la γ -carbolina **19**.

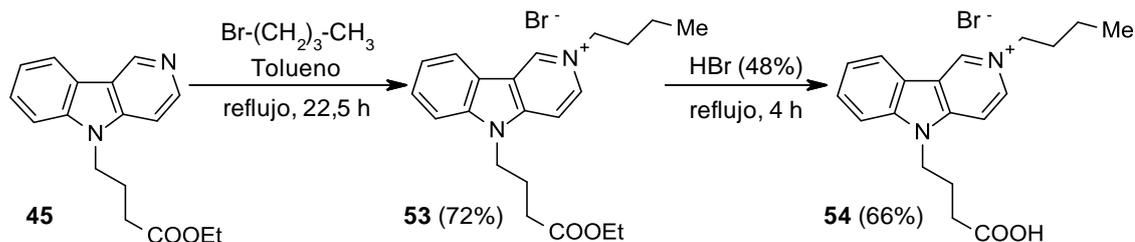
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la reacción de alquilación de **19**, se procedió a la hidrólisis del compuesto **51** empleando las mismas condiciones que en los casos anteriores y se obtuvo el ácido dicarboxílico **52** con buenos rendimientos (Esquema 3.17).



Esquema 3.17. Hidrólisis de **51**.

Por otra parte, se quiso comprobar el efecto que podría tener la doble alquilación de los nitrógenos pero eliminando uno de los dos grupos ácidos presentes en el compuesto **52**. Por este motivo, se alquiló **45** con bromuro de butilo, manteniendo así el mismo número de carbonos en la cadena (Esquema 3.18). Se obtuvo **53** con buen rendimiento que se hidrolizó después a **54**.

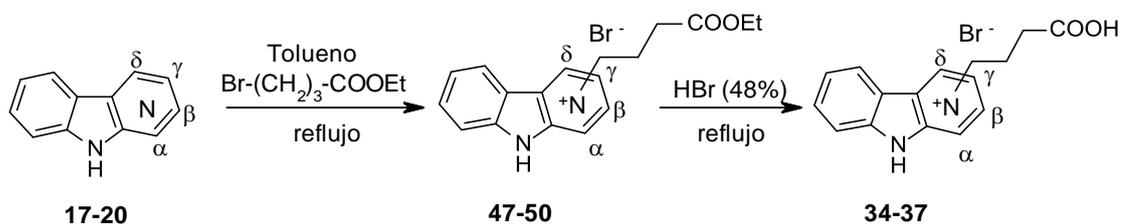
CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 3.18. Síntesis de **54**.

A continuación, se llevó a cabo la síntesis de las sales de *N*-alquilcarbolinio **34-37**. La reacción de alquilación se efectuó calentando a reflujo la mezcla de reactivos, carbolina y agente alquilante, empleando tolueno como disolvente y durante tiempos de reacción prolongados. De esta manera se obtuvieron las sales **47-50** con unos rendimientos de medios a altos. De igual manera que en el caso de los compuestos **30-33**, la hidrólisis se realizó empleando HBr (48%) y calentando a reflujo para obtener así los ácidos correspondientes **34-37** (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Síntesis de los compuestos **34-37**.



Entrada	Compuesto	Posición del N	Tiempo (h)	Rto (%)
1	47	α	21	63
2	48	β	17	81
3	49	γ	17	73
4	50	δ	21	50
5	34	α	3,5	93
6	35	β	2	92
7	36	γ	2,5	70
8	37	δ	4	54

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Una vez sintetizadas estas dos series de compuestos se procedió a estudiar su actividad biológica. Estos estudios se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación del Hospital La Paz bajo la dirección del Dr. Rafael Selgas y la Dra. Teresa Bellón y en el departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del Dr. Manuel Rodríguez Puyol y del Dr. Diego Rodríguez Puyol.

El primer estudio que se realizó fue un bioensayo para medir el efecto de las distintas moléculas sintetizadas (**30-37**, **52**, **54**) sobre la síntesis de TNF- α en células THP-1. Las células THP-1, una línea promonocítica humana, se utilizan como modelo de monocitos/macrófagos humanos. Sobre estas células se adicionó un lipopolisacárido (LPS), uno de los principales componentes de las bacterias, que genera una respuesta inflamatoria, y que nuestro organismo reconoce como dañino para iniciar una estrategia de defensa. El factor de estudio es el TNF- α , una citoquina proinflamatoria, que se produce en respuesta a la acción del LPS. El método empleado para la cuantificación de la inhibición de TNF- α fue un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). En diversos estudios realizados,²¹¹ se ha observado que macrófagos de ratón que no tienen FABP no responden a LPS, por lo que los compuestos sintetizados deberían bloquear la respuesta a LPS si actuaran como inhibidores de FABP. Los distintos compuestos sintetizados se adicionaron en diversas concentraciones (25, 50 y 100 μ M). En la Tabla 3.9 se muestran los porcentajes de inhibición de la producción de TNF- α que producen los compuestos **CLXXXIX**, **30-37**, **52** y **54**.

²¹¹ Makowski, L.; Brittingham, K. C.; Reynolds, J. M.; Suttles, J.; Hotamisligil, G. S. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12888-12895.

Tabla 3.9. Porcentajes de inhibición de la producción de TNF- α .

Compuestos	Serie	% Inhibición TNF- α				N
		10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	
CLXXXIX	carbazol	-	-23	-40	2	2
30	α -carbolina	-	5	12	21	3
31	β -carbolina	-	-58	-69	4	2
32	γ -carbolina	-	-38	-21	0.6	2
33	δ -carbolina	-	14	11	26	1
34	α -carbolinio	15	8	39	52	5
35	β -carbolinio	-	23	29	33	3
36	γ -carbolinio	6	13	39	40	7
37	δ -carbolinio	-	9	2	19	2
52	γ -carbolinio	-	17	11	14	1
54	γ -carbolinio	-	11	13	38	2

N = número de experimentos realizados

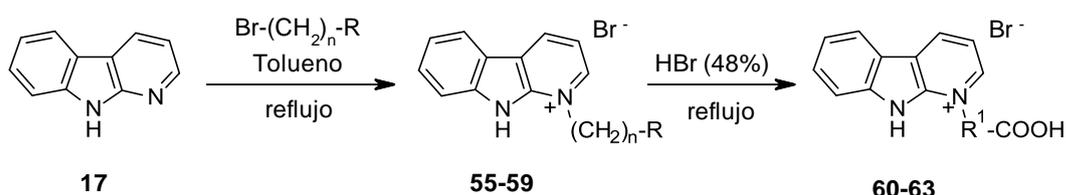
Como se puede observar a partir de los datos de la Tabla 3.9, el compuesto de referencia **CLXXXIX** y los compuestos **31** y **32**, a concentraciones de 25 y 50 μ M, producen un aumento en la producción de TNF- α , es decir, se comportan como agonistas, mientras que a una concentración de 100 μ M no ejercen ningún efecto. Los compuestos **30** y **33** producen una inhibición baja a las tres concentraciones estudiadas, alcanzando un 21 y 26% respectivamente, a una concentración de 100 μ M. Analizando los valores correspondientes a la serie de compuestos que poseen el nitrógeno piridínico alquilado, se observa que todos producen una inhibición en la producción de TNF- α a las distintas concentraciones ensayadas, pero únicamente los compuestos **34** y **36** alcanzan unos valores moderados de inhibición (52% y 40%, respectivamente). En el caso del compuesto **52**, que posee los dos nitrógenos alquilados y presenta dos grupos carboxílicos en su estructura, apenas produce inhibición. Por último el compuesto **54** alcanza un valor de un 38% de inhibición a 100 μ M.

De este primer ensayo se estableció que la serie formada por los compuestos **30-33**, que poseían el nitrógeno indólico alquilado, no modificaban o aumentaban el valor de TNF- α (comportándose en este último caso como agonistas) mientras que la serie formada por los compuestos **34-37**, con el nitrógeno piridínico alquilado, eran activos frente a TNF- α , y en especial, los compuestos **34** y **36**, aunque a concentraciones elevadas (100 μ M).

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A partir de estos resultados, se procedió a la síntesis de nuevas estructuras derivadas de **34** y **36**, en las que se modificó la longitud de la cadena alquílica para evaluar el efecto que pudiese tener sobre la respuesta a LPS. Las reacciones de alquilación e hidrólisis se llevaron a cabo empleando las mismas condiciones que en los casos anteriores. Los rendimientos obtenidos para la serie α se muestran en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Síntesis de los compuestos **59-63**.

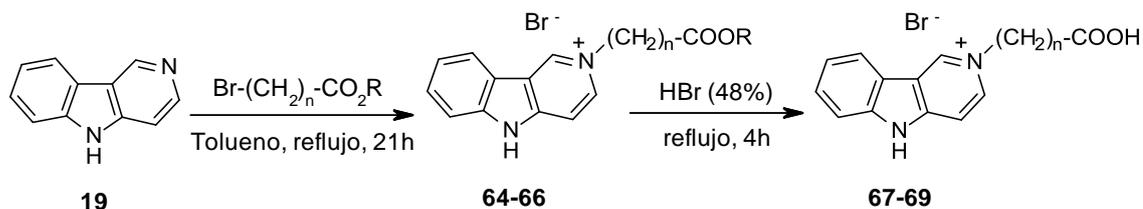


Entrada	Compuesto	n	R	R ¹	Tiempo (h)	Rto (%)
1	55	6	COOEt	-	24	55
2	56	9	COOMe	-	50	62
3	57	15	COOMe	-	66	40
4	58	1	4-MeO ₂ CC ₆ H ₄	-	48	97
5	59	1	Ph	-	24	69
6	60	-	-	-(CH ₂) ₆ -	3	96
7	61	-	-	-(CH ₂) ₉ -	2	98
8	62	-	-	-(CH ₂) ₁₅ -	2,5	63
9	63	-	-	4-Bn	2	75

Como se puede observar, a medida que aumenta el número de carbonos en la estructura del agente alquilante, los tiempos de reacción necesarios son más prolongados y los rendimientos que se obtienen en la reacción de alquilación son de medios a altos.

En el caso de la γ -carbolina, también se procedió a la obtención de los compuestos **67-69**, empleando condiciones de alquilación similares a las utilizadas en la obtención de los derivados de α -carbolinas. Los resultados se recogen en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Síntesis de los compuestos **67-69**.



Entrada	Compuesto	n	R	Rto (%)
1	64	6	Et	42
2	65	9	Me	52
3	66	15	Me	59
4	67	6	-	91
5	68	9	-	83
6	69	15	-	93

Una vez sintetizados los nuevos compuestos se procedió a la realización del mismo bioensayo para estudiar el efecto de **67-69** sobre la síntesis de TNF- α en células THP-1. Los resultados se recogen en la Tabla 3.12, donde se puede observar que el compuesto **68** no es capaz de inhibir la producción de TNF- α , e incluso la aumenta a una concentración de 25 μM . El compuesto **67** apenas ejerce un efecto sobre TNF- α a concentraciones de 10 y 25 μM , llegando a una inhibición del 23% cuando su concentración es de 50 μM . Sin embargo, el compuesto **69** alcanza una inhibición del 50% a una concentración de 25 μM , llegando a su máximo de inhibición a dicha concentración.

De este segundo ensayo se estableció que el compuesto más activo de la serie de γ -carbolinas frente a TNF- α era el compuesto **69** que poseía en su estructura una cadena de 16 átomos de carbono, seguido del compuesto **36**. En el caso de las α -carbolinas el compuesto más activo resultó ser el compuesto **34**.

Tabla 3.12. Porcentajes de inhibición de la producción de TNF- α

Compuestos	% Inhibición TNF- α (N=3)		
	10 μ M	25 μ M	50 μ M
67	5	2	23
68	-2	-13	-2
69	15	50	51

En la Figura 3.25 se muestra el gráfico comparativo de las actividades de los compuestos **34-37** frente a TNF- α y en la Figura 3.26 el de los compuestos **36, 67-69**.

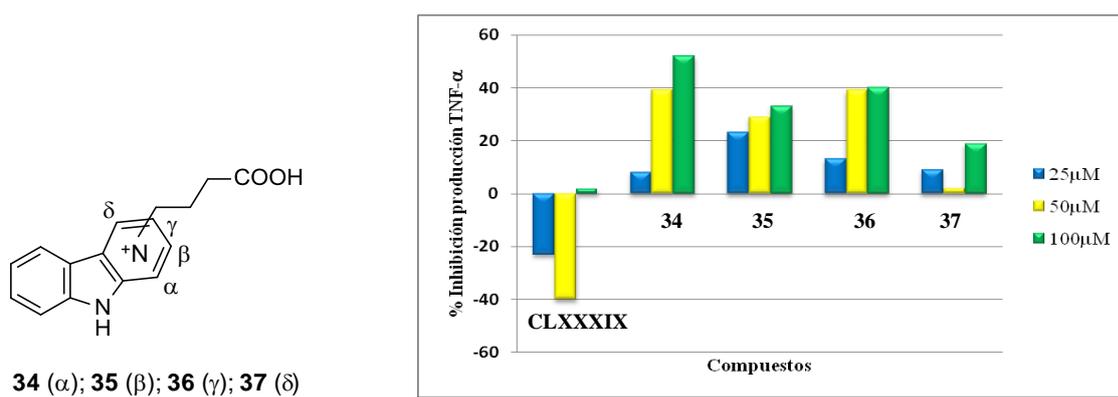


Figura 3.25

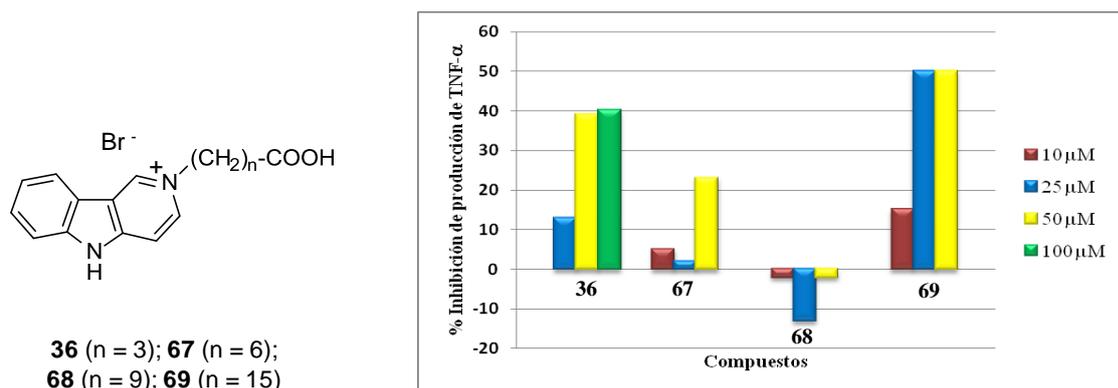


Figura 3.26

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al mismo tiempo que se realizaron los estudios de inhibición de los compuestos **67-69** frente a TNF- α , se analizó la actividad de todos los compuestos de la serie de α -carbolinas **34, 59-63** frente a FABP. Este nuevo ensayo se realizó empleando la técnica de polarización de fluorescencia y proteína recombinante. Los resultados se muestran en la Tabla 3.13 y en la Figura 3.27.

Tabla 3.13. Porcentaje de inhibición de los compuestos **CLXXXIX, 34, 59-63** frente a FABP empleando la técnica de polarización de fluorescencia

Compuesto	% Inhibición de FABP		
	0,01 μ M	1 μ M	100 μ M
CLXXXIX	11,5	18,7	28,7
34	8,4	21,8	34,7
59	7	16	36
60	12	20	32
61	0	5,4	14,7
62	19	34	41
63	26	32	38

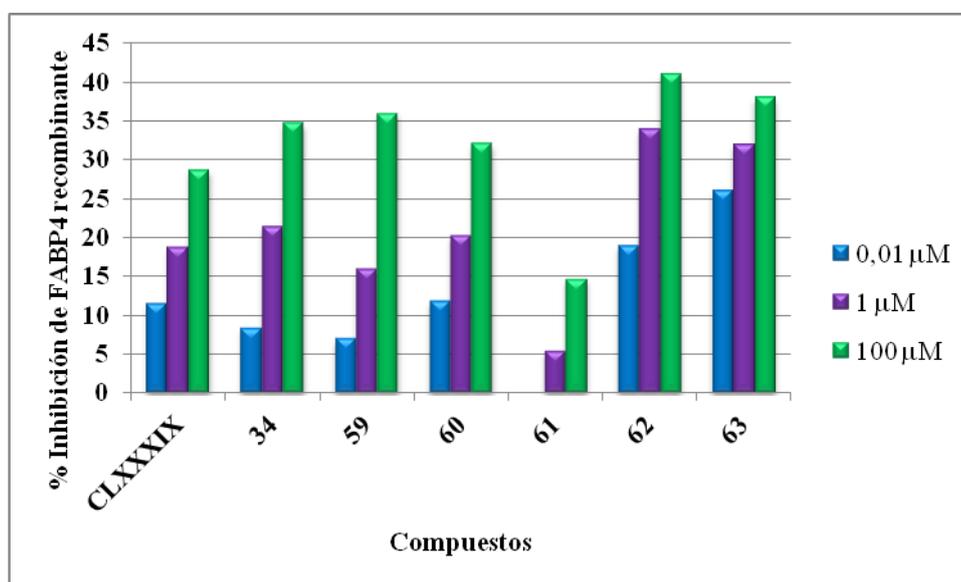


Figura 3.27

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A partir de estos datos se observa que, a una concentración de 0,01 μM , el compuesto **63** es el que produce una mayor inhibición, alcanzando un valor de un 26%. Cuando se aumenta la concentración a 1 μM , los compuestos **62** y **63** son los que conducen a un mayor efecto inhibitorio, acción que también se observa a 100 μM . Si se realiza una comparación de la actividad de los compuestos **62** y **63** con el compuesto de referencia **CLXXXIX**, se observa que éstos mejoran significativamente su actividad especialmente a la concentración de 0,01 μM .

Por lo tanto, a partir de este ensayo bioquímico se estableció que los compuestos más activos pertenecientes a la serie de α -carbolinas son los compuestos **62** y **63**, es decir, los que poseen grupos 4-carboxibencilo y 15-carboxipentadecilo, respectivamente, en el nitrógeno piridínico.

Con los resultados obtenidos hasta ahora de inhibición de la proteína FABP4 y de la producción de TNF- α , solo podemos establecer que los compuestos **62** y **63** inhiben FABP4 en el mismo orden de magnitud que el compuesto de referencia **CLXXXIX** pero que no presentan un efecto biológico de inhibición de TNF- α , por lo que no se pueden considerar antiinflamatorios potenciales.

Se ha comenzado a realizar el estudio de los compuestos que poseen un mejor perfil de inhibición frente a TNF- α y FABP4 empleando el kit comercial “*FABP4 inhibitor/ligand screening assay kit*” de la casa comercial Cayman Chemical. Este estudio se está realizando en la Unidad de Investigación del Hospital La Paz bajo la dirección del Dr. Rafael Selgas y la Dra. Teresa Bellón.

3.2.4. Síntesis de carbolinas a partir de Tosilmetilisonitrilo (TosMIC)

3.2.4.1. Introducción

El tosilmetilisonitrilo o 4-tolilsulfonilmetilisonitrilo, denominado comúnmente como TosMIC (**70**) (Figura 3.28), es un reactivo que posee una gran versatilidad debido a la existencia en su estructura de tres grupos que posibilitan toda una variedad de reacciones con múltiples aplicaciones en síntesis orgánica.²⁶⁶ Su versatilidad se debe a:

- La elevada acidez de los átomos de hidrógeno en posición α a los grupos isonitrilo y sulfonilo que hace que el grupo metileno sea capaz de transformarse en un carbanión estable que puede reaccionar con toda una serie de electrófilos.
- El comportamiento ambivalente del átomo de carbono del grupo isonitrilo que puede actuar como un centro electrofílico o nucleofílico.
- El grupo sulfonilo que puede actuar como un buen grupo saliente en condiciones diversas.

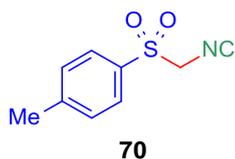
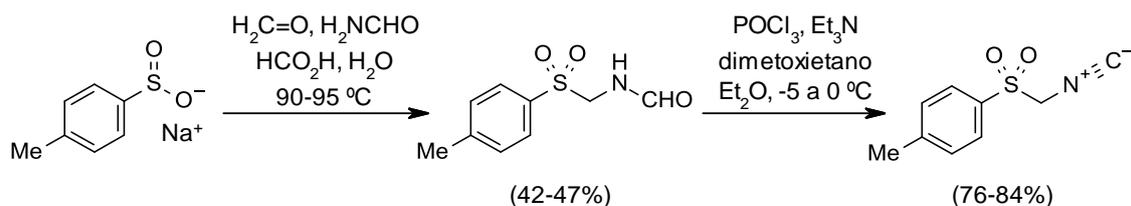


Figura 3.28. Estructura de TosMIC

El proceso de síntesis de TosMIC se realiza en dos pasos: en primer lugar una reacción de Mannich entre el ácido *p*-toluenosulfínico, formaldehído y formamida para generar el precursor de TosMIC, *N*-(*p*-tolilsulfonilmetil)formamida, que finalmente se deshidrata empleando POCl₃ y NEt₃ o *i*-Pr₂NH (Esquema 3.19).²⁶⁷

²⁶⁶ van Leusen, D.; van Leusen, A. M. *Organic Reactions* **2001**, *57*, 417-666.

²⁶⁷ Hoogenboom, B. E.; Oldenzel, O. H.; van Leusen, A. M. *Org. Synth.* **1977**, *57*, 102-106.



Esquema 3.19. Síntesis de TosMIC.

El TosMIC se ha empleado en diferentes tipos de reacciones tales como cianaciones reductivas de cetonas y aldehídos, o condensaciones tipo Knoevenagel con aldehídos y cetonas. Asimismo, puede ser monoalquilado o dialquilado. Debido a las propiedades que posee el grupo isonitrilo se ha llevado a cabo una gran variedad de transformaciones, sin embargo su mayor aplicación ha sido en la síntesis de heterociclos de cinco eslabones.^{268,269} Así, se ha utilizado ampliamente en la síntesis de heterociclos como oxazolidinonas, oxazoles, tiazoles, imidazoles, indoles, triazoles y pirroles (Figura 3.29).²⁶⁶ Nuestro grupo de investigación ha explorado el empleo de TosMIC para la generación de heterociclos de seis eslabones, obteniendo como resultado compuestos de estructura de pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidinas y imidazo[1,2-c]pirimidinas.^{234,233}

Por otra parte, el grupo isonitrilo se ha empleado en reacciones multicomponente tales como la reacción de Ugi o de Passerini, donde un isonitrilo reacciona con un ácido carboxílico, un aldehído o cetona y una amina (en el caso de la reacción de Ugi) para dar α -acilamino- α -acilamidas y α -aciloxiamidas, respectivamente (Esquema 3.20).^{270,271}

²⁶⁸ Lygin, A. V.; de Meijere, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 9094-9124.

²⁶⁹ Ono, N.; Okujima, T. *Isocyanide Chemistry Applications in Synthesis and Material Science* **2012**, 385-429.

²⁶⁶ van Leusen, D.; van Leusen, A. M. *Organic Reactions* **2001**, *57*, 417-666.

²³⁴ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4879-4882.

²³³ Mendiola, J.; Minguez, J. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3253-3256.

²⁷⁰ Xu, Z.; De Moliner, F.; Cappelli, A. P.; Hulme, C. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2738-2714.

²⁷¹ Esmaeili, A. A.; Amini Ghalandarabad, S.; Jannati, S. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 406-408.

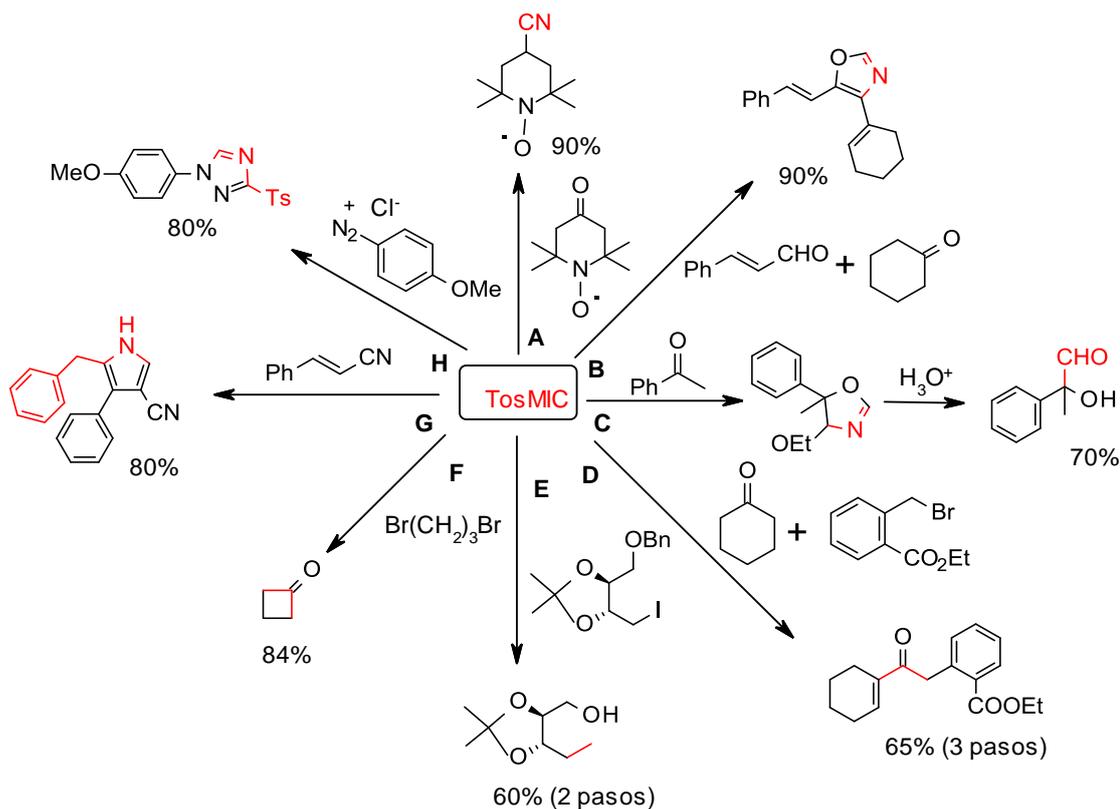
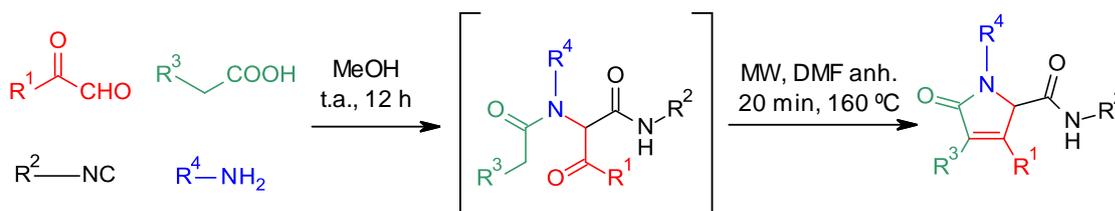
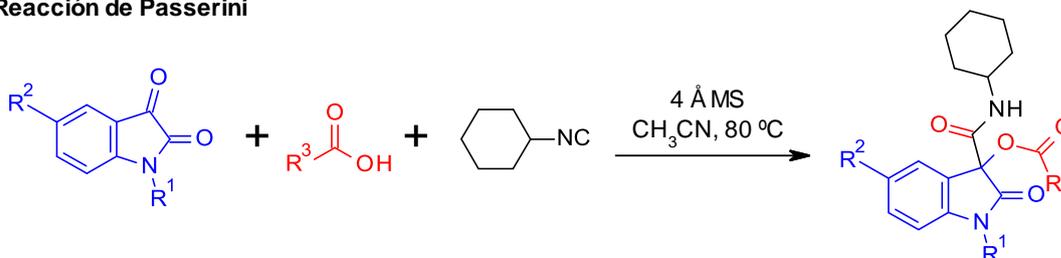


Figura 3.29. Implicación de TosMIC en distintas reacciones. Las partes en color rojo corresponden a las porciones procedentes de la molécula de TosMIC inicial. **A** (cianación reductiva selectiva de cetonas): TosMIC, *t*-BuOK; **B** (formación del anillo de oxazol): 1. Condensación de TosMIC con ciclohexanona, 2. Aldehído cinámico, 2 eq. *n*-BuLi (-70 a 0 °C, 2h); **C** (formación de 4-alcóxi-2-oxazolina): 1. Acetofenona, TosMIC, EtOH, 2. H₃O⁺; **D** (formación de cetonas α,β -insaturadas sustituidas): 1. Condensación de TosMIC con ciclohexanona, 2. Bromuro de bencilo, *t*-BuOK, DME, 3. H₃O⁺; **E** (TosMIC como un agente de conectividad, reducción): 1. Yoduro de alquilo, TosMIC, PTC, 2. Li, NH₃ (liq.); **F** (TosMIC como un agente de conectividad, hidrólisis): 1. TosMIC, dialquilación, 2. H₂SO₄ (50%), sulfolano, 20 a 100 °C, 2h. **G** (síntesis de pirroles a partir de aceptores de Michael): bencil-TosMIC, NaH, acrilonitrilo; **H** (formación de triazoles): sal de diazonio, TosMIC, K₂CO₃, DMSO, MeOH, H₂O, -10 °C (modificado de www.organic-chemistry.org).

Reacción de Ugi

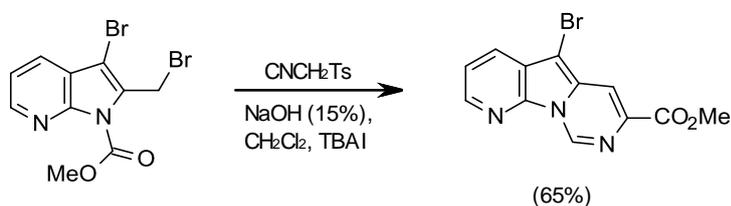


Reacción de Passerini



Esquema 3.20

Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha descrito la síntesis del sistema pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-*c*]pirimidinas, núcleo heterocíclico presente en la estructura de la familia de los alcaloides marinos denominados variolinas.²³³ La síntesis de este núcleo tricíclico se basa en la reacción entre 2-(bromometil)pirrolo[2,3-*b*]piridina-1-carboxilato de metilo y TosMIC en condiciones de transferencia de fase (Esquema 3.21). El mecanismo propuesto para dicha heterociclación implica una sustitución nucleófila inicial de TosMIC seguida de una transferencia intramolecular del grupo protector metoxicarbonilo. A continuación, tiene lugar el ataque del nitrógeno del anillo de pirrol al grupo isonitrilo, produciéndose la ciclación y posterior eliminación del ácido *p*-toluenosulfínico.

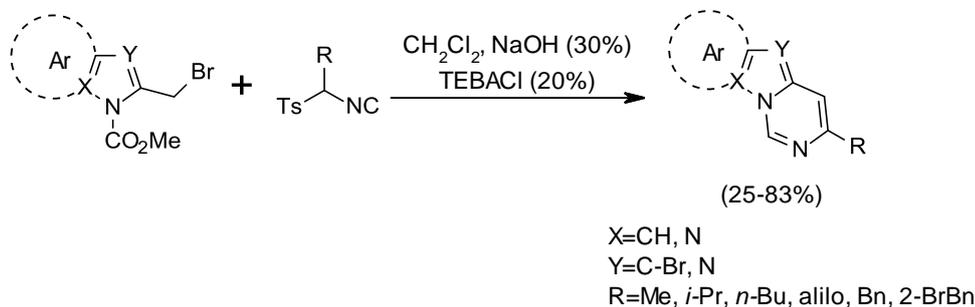


Esquema 3.21

²³³ Mendiola, J.; Minguez, J. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3253-3256.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Aplicando esta estrategia sintética, nuestro grupo de investigación ha descrito la síntesis de diversos núcleos bicíclicos y tricíclicos tales como: pirimido[1,6-*a*]indoles, benzo[4,5]imidazo[1,2-*c*]pirimidinas, imidazo[1,2-*c*]pirimidinas y pirazolo[1,5-*c*]pirimidinas (Esquema 3.22).²³⁴



Esquema 3.22

3.2.4.2. Síntesis de β - y γ -carbolinas empleando TosMIC

Basándonos en las estructuras sintetizadas tipo carbolina frente a la diana terapéutica FABP, en los antecedentes descritos por nuestro grupo de investigación en la síntesis del núcleo tricíclico pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-*c*]pirimidina y en la existencia de compuestos con actividad frente a FABP^{218,226} (Figura 3.30) que contienen el grupo fenilsulfonilo en su estructura, el objetivo que se planteó fue el desarrollo de una metodología para la síntesis de los derivados de α - y γ -carbolinas **71** y **72** a partir de metilindoles, empleando el TosMIC (**70**) para generar el anillo piridínico. El análisis retrosintético planteado para ambas series se detalla en el Esquema 2.23.

²³⁴ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4879-4882.

²¹⁸ Lehmann, F.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Lundbaeck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4445-4448.

²²⁶ Cai, H.; Yan, G.; Zhang, X.; Gorbenko, O.; Wang, H.; Zhu, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3675-3679.

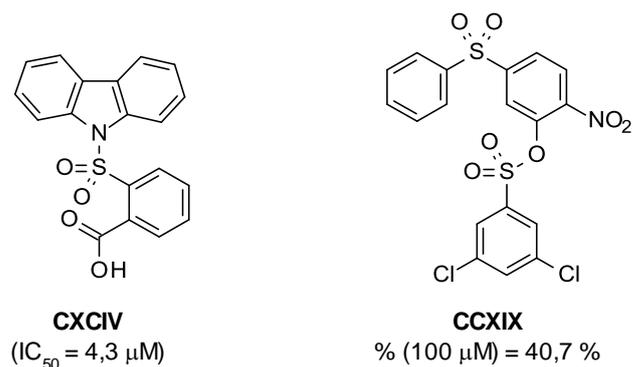
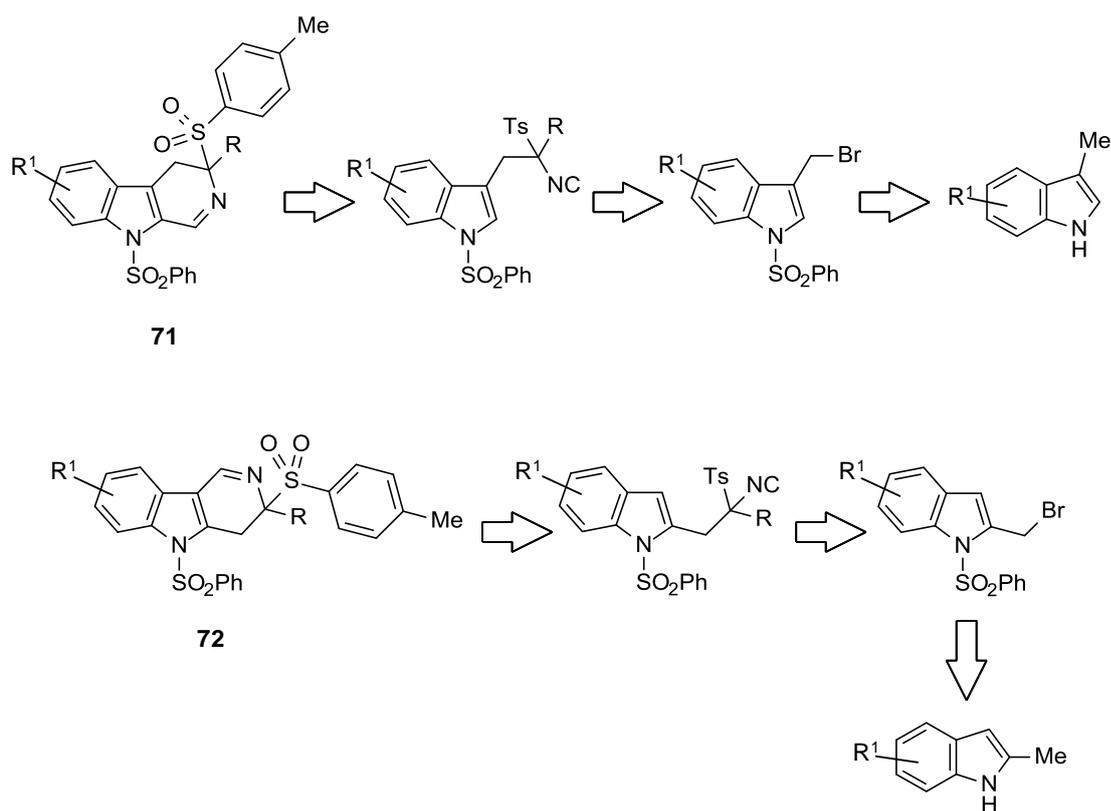


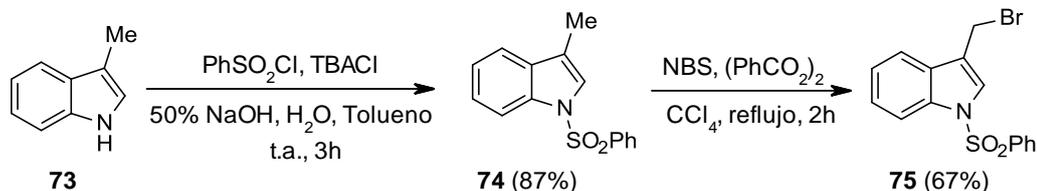
Figura 3.30



Esquema 3.23. Esquema retrosintético de **71** y **72**, potenciales inhibidores de FABP.

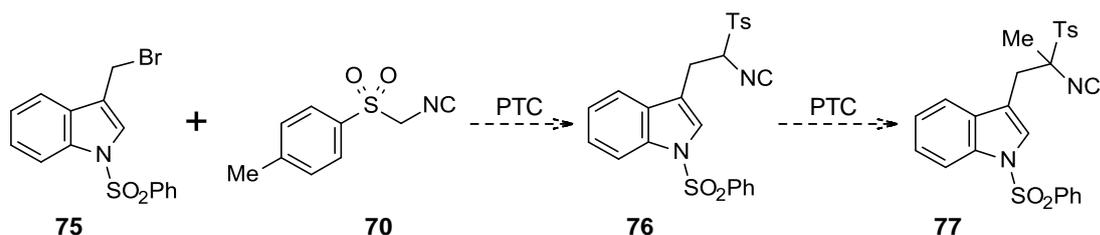
3.2.4.2.1. Síntesis de β -carbolinas a partir de 3-metilindol y TosMIC

Siguiendo el esquema retrosintético planteado para la síntesis de β -carbolinas en el Esquema 3.23, en primer lugar se procedió a la protección de 3-metilindol **73** con cloruro de fenilsulfonilo empleando catálisis de transferencia de fase (PTC). Para ello, se eligió como catalizador el cloruro de tetrabutilamonio (TBACl) y una disolución de hidróxido sódico al 50% como medio básico. De esta manera, tras 3 horas de agitación vigorosa de la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se obtuvo **74** con un 87% de rendimiento. A continuación, se llevó a cabo la bromación radicalaria del grupo metilo de **74** empleando las condiciones habituales de la reacción de Wohl-Ziegler: CCl_4 como disolvente, peróxido de benzoilo como iniciador y manteniendo la mezcla de reacción a reflujo durante 2 horas. De esta manera, se obtuvo **75** en un 67% de rendimiento (Esquema 3.24).



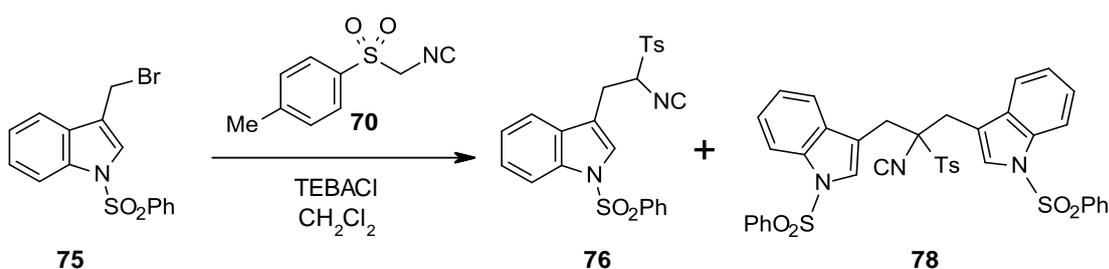
Esquema 3.24. Síntesis del bromometilindol **75**.

A continuación, se ensayó la reacción de alquilación de TosMIC (**70**) con **75** para obtener el compuesto **76** que, posteriormente sería metilado para conducir al producto **77** (Esquema 3.25). Sin embargo, todas las condiciones de reacción ensayadas conducían a una mezcla de **76** y el producto de doble alquilación **78** de difícil separación por cromatografía en columna debido a las polaridades muy similares de ambos compuestos. En la Tabla 3.14 se recogen las proporciones de los compuestos **76** y **78** obtenidas por ^1H -RMN para distintas condiciones de reacción.



Esquema 3.25

Tabla 3.14. Optimización de la reacción de alquilación de TosMIC con **75**.



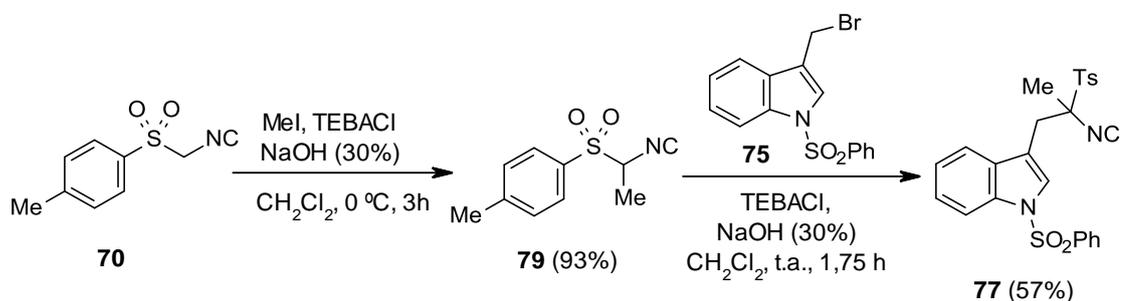
Entrada	Base	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% ¹ H-RMN	
				76	78
1	K ₂ CO ₃	t.a.	130	-	-
2	NaOH (50% p/p)	t.a.	30	58	42
3	NaOH (50% p/p)	-10	120	23	77
4	NaOH (30% p/p)	t.a.	195	14	86
5	NaOH (30% p/p)	0	195	55	45
6	NaOH (30% p/p)	-10	80	64	36
7	NaOH (15% p/p)	t.a.	60	86	14

El empleo de carbonato potásico como base no condujo al producto deseado **76** (Tabla 3.14, entrada 1). La utilización de una disolución de NaOH al 50% p/p, temperatura ambiente y 30 minutos de reacción condujo a un 58% de **76** y a un 42% del compuesto dialquilado **78** (Tabla 3.14, entrada 2). A la vista de estos resultados, se disminuyó la temperatura hasta -10 °C para intentar que la reacción fuese más selectiva. Sin embargo, se obtuvo como producto mayoritario el compuesto dialquilado **78** (Tabla 3.14, entrada 3) como consecuencia del tiempo de reacción necesario para que la reacción se completara. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se planteó la

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

utilización de una disolución de NaOH menos concentrada. El empleo de una disolución de NaOH al 30% (p/p) y un rango de temperaturas entre temperatura ambiente y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ condujeron a mezclas de **76** y **78**, formándose **78** en una elevada proporción a temperatura ambiente (Tabla 3.14, entradas 4-6) y favoreciéndose **76** a tiempos cortos y temperaturas bajas. Por último, el empleo de una disolución de NaOH al 15% (p/p), temperatura ambiente y 60 minutos de reacción condujo a un 86% de **76** y a un 14% de **78**. Sin embargo, todos los intentos de separación de ambos compuestos fueron infructuosos.

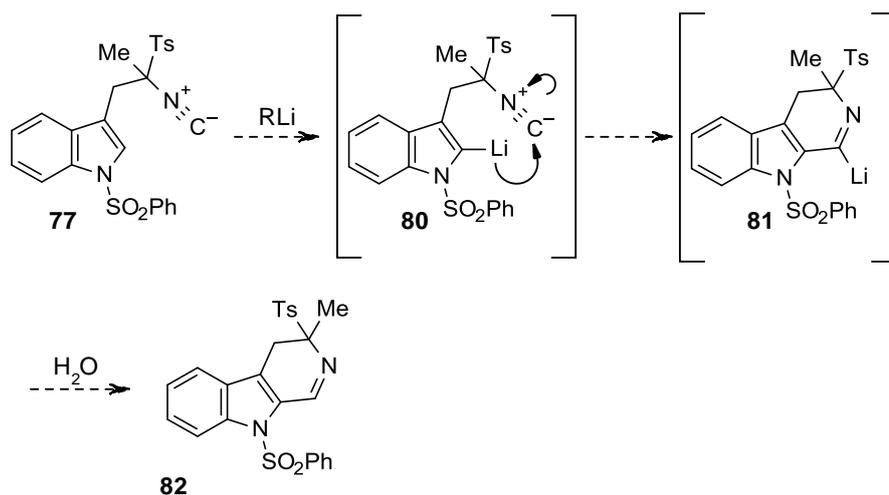
A la vista de las dificultades encontradas para el aislamiento de **76**, se ensayó en primer lugar la metilación de TosMIC para generar el derivado **79** que posteriormente sería alquilado con **75** para proporcionar **77** (Esquema 3.26). De esta manera, se consiguió evitar la formación del subproducto de dialquilación **78**. El proceso de metilación de TosMIC se realizó empleando las condiciones descritas por van Leusen y *col.* en 1975, obteniéndose **79** con un 93% de rendimiento.²⁷² A continuación, se realizó la alquilación de **79** con **75** empleando condiciones de transferencia de fase y conduciendo a un 57% de rendimiento del compuesto **77**.



Esquema 3.26. Síntesis del compuesto **77**.

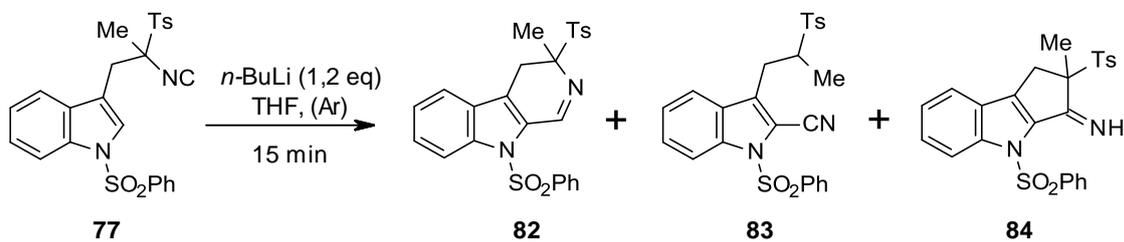
Una vez obtenido el compuesto **77**, se procedió a ensayar su tratamiento con un compuesto organolítico para conseguir la formación de **82** (Esquema 3.27). Los primeros estudios se efectuaron empleando 1,2 equivalentes de *n*-BuLi y se centraron en el efecto que ejercía la temperatura sobre la reacción ensayando distintas temperaturas durante un tiempo de 15 minutos. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.15.

²⁷² van Leusen, A. M.; Bouma, R. J.; Possel, O. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *40*, 3487-3488.



Esquema 3.27

Tabla 3.15. Evaluación de la temperatura en la reacción de **77** con $n\text{-BuLi}$.



Entrada	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) ^a	(Rto, %)			
		77	82	83	84
1	-78	29	6*	-	21*
2	-60	59	4*	-	10*
3	-40	70	8*	4	9*
4	-20	60	-	9	-
5	0	69	-	trazas	-

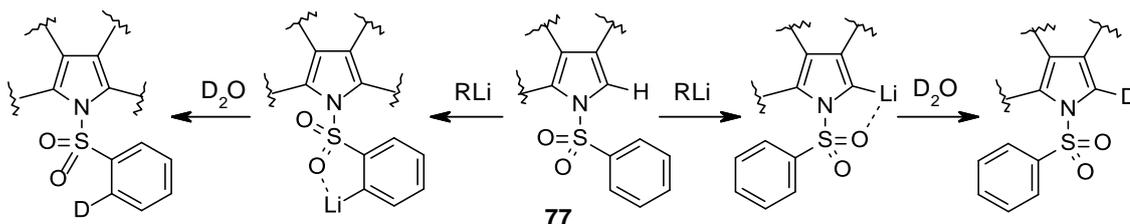
*Rto determinado por $^1\text{H-RMN}$ por cuantificación de las señales de los grupos metileno.

^aTiempo de reacción 15 minutos.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

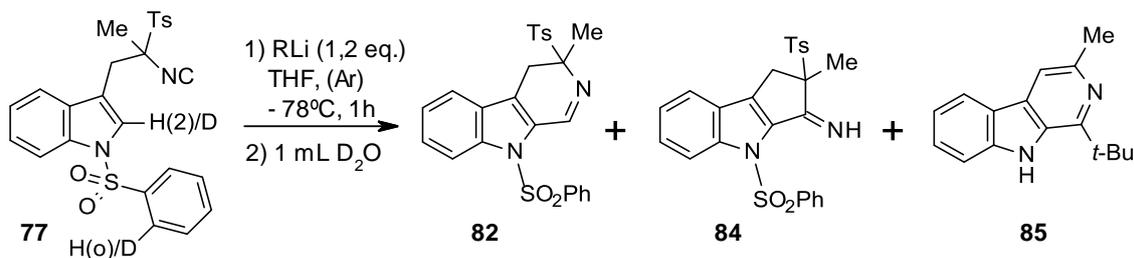
En todas las reacciones se recuperó un porcentaje elevado de producto de partida **77**, por lo que el número de equivalentes de *n*-BuLi parecía insuficiente para la abstracción completa del hidrógeno en posición C2. Además, el compuesto **82** esperado en esta reacción, se obtiene con rendimientos inferiores al 8% a muy bajas temperaturas (Tabla 3.15, entradas 1-3), no observándose a temperaturas más elevadas (Tabla 3.15, entradas 4 y 5). Sin embargo, en el rango de temperaturas entre -78 y -40 °C, se produce la formación de un producto inesperado **84** (Tabla 3.15, entradas 1-3), no observado a temperaturas entre -20 y 0 °C (Tabla 3.15, entradas 4 y 5). Por otra parte, a temperaturas entre -40 y -20 °C se observa la aparición de otro producto inesperado **83** que, en las condiciones de reacción ensayadas, se obtiene con rendimientos inferiores al 9%. Los rendimientos obtenidos para los compuestos **82** y **84** se han calculado por cuantificación de los grupos metileno en el espectro de ¹H-RMN debido a que no se han podido separar por cromatografía en columna por poseer polaridades muy similares.

Debido a la recuperación de una elevada cantidad de producto de partida **77** empleando las condiciones anteriores, se realizó un ensayo de deuteración para verificar cual era la posición que podía sufrir el proceso de litiación ya que los hidrógenos en posición *orto* del grupo fenilsulfonilo pueden ser susceptibles de reacción con *n*-BuLi. Además, en este estudio de deuteración se ensayaron distintos compuestos organolíticos. En el Esquema 3.28 se muestran los posibles intermedios litiados y los productos deuterados que se podrían producir y en la Tabla 3.16 los resultados de los ensayos de deuteración realizados.



Esquema 3.28. Posibles posiciones de litiación en el compuesto **77**.

Tabla 3.16. Ensayo de deuteración con distintos compuestos organolíticos (RLi).



Entrada	Base (pKa)	77 (Recuperación, %)	77 (Deuteración en H-2, %)	77 (Deuteración en Ho, %)	82 (Rto, %)	84 (Rto, %)	85 (Rto, %)
1	<i>t</i> -BuLi(53)	82	6	26	-	-	6
2	<i>n</i> -BuLi (50)	66	0,6	36	12*	6*	-
3	PhLi (43)	100	0	51	-	-	-
4	LDA (34)	99	3	38	-	-	-
5	LiHMDS(30)	91	0	23	-	-	-

*Rto determinado por ¹H-RMN (acetona-*d*₆)

El empleo de 1,2 equivalentes de cualquiera de las bases litiadas ensayadas es insuficiente para la abstracción cuantitativa del hidrógeno en posición 2 del anillo de indol. Concretamente, el empleo de fenil litio (PhLi), bis(trimetilsilil)amiduro de litio (LiHMDS) o diisopropilamiduro de litio (LDA) (Tabla 3.16, entradas 3-5) conduce a la recuperación total del producto de partida **77**, observándose además que la deuteración tiene lugar en el hidrógeno *orto* del grupo fenilsulfonilo. En el caso de la utilización de *n*-BuLi, se observa que la reacción progresa hacia la formación de los compuestos **82** y **84**, recuperándose un 66% de producto de partida **77**, y encontrándose un porcentaje de deuteración en el hidrógeno *orto* del grupo fenilsulfonilo del 36%. Sin embargo, el empleo de *tert*-butil litio (*t*-BuLi) como base condujo a la formación de otro producto inesperado **85** (6%), que correspondía a la β-carbolina sustituida en la posición C1 por el grupo *tert*-butilo y desprotección del nitrógeno indólico.

Hay que mencionar que la reacción de **77** con estas bases es muy sensible a la presencia de trazas de agua. Por ello, en la preparación de la misma se han tomado las siguientes precauciones:

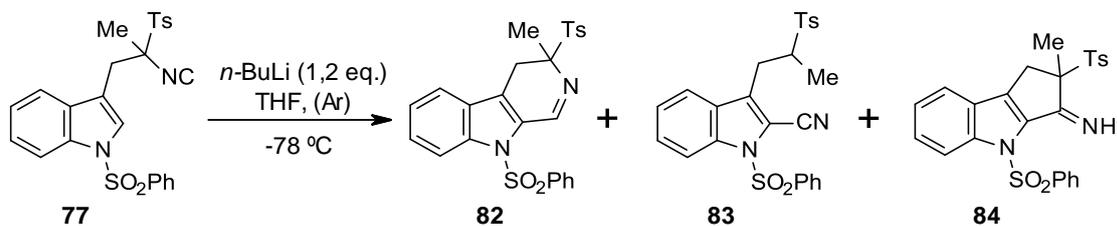
CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. El material de vidrio se introduce durante 30 minutos en una estufa a 120 °C.
2. Se realizan 3 ciclos de vacío/argón de 5 minutos cada uno aplicando calor a la parte externa del material de vidrio empleando un secador doméstico.
3. El disolvente empleado se ha secado previamente en el laboratorio con P₂O₅ seguido de Na.
4. Las disoluciones de las bases a emplear no deben contener precipitado de hidróxido de litio, es decir, tienen que estar en perfectas condiciones para su uso.
5. Una vez finalizada la reacción, la hidrólisis se realiza a -78 °C adicionando agua (o agua deuterada, en su caso) gota a gota. A continuación, la reacción se deja que alcance la temperatura ambiente fuera del baño. Tras 1 hora, se realiza la extracción con éter dietílico.

Si la reacción no se lleva a cabo con estas precauciones, los resultados no son reproducibles y los rendimientos de los compuestos formados son menores.

A la vista de estos resultados, se realizó un estudio de la reacción prolongando los tiempos de reacción. Se mantuvo el número de equivalentes de la base y se realizaron los ensayos a -78 °C ya que, a dicha temperatura, se recuperaba una menor cantidad de **77**. Los resultados se recogen en la Tabla 3.17.

Tabla 3.17. Reacción de **77** con *n*-BuLi.



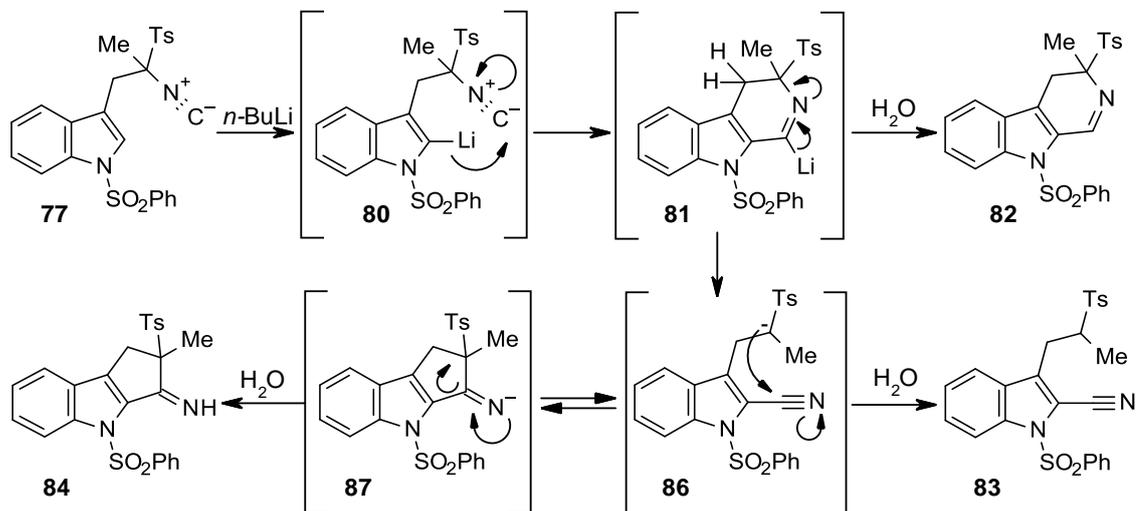
Entrada	Tiempo (min)	(Rto, %)			
		77	82	83	84
1	15	29	6*	-	21*
2	20	47	-	-	23
3	120	68	-	6	4
4	240	47	-	22	-
5	1320	53	-	10	-

*Rto determinado por ¹H-RMN por cuantificación de las señales de los grupos metileno.

A tiempos cortos, la reacción de **77** con *n*-BuLi conduce a la formación del compuesto **84** como producto principal. Sin embargo, a tiempos más prolongados (entre 2 y 22 horas) el compuesto mayoritario es **83**. En base a los resultados en estos estudios se puede concluir que el compuesto **82**, se obtiene solamente como producto muy minoritario a temperaturas bajas y tiempos cortos de reacción, al igual que el compuesto **84**. Sin embargo, tiempos más largos y temperaturas más altas conducen a la formación del compuesto **83**. Por otro lado, cuando se utilizó como base *t*-BuLi se observó la formación de la β-carbolina **85** (Tabla 3.16).

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el Esquema 3.29, se recoge el mecanismo propuesto para la formación de los compuestos **83** y **84**. La reacción de **77** con *n*-BuLi formaría el anión **80**, que cicla para conducir al sistema tricíclico **81**, el cual, generaría la dihidrocarbolina **82** por tratamiento acuoso. El intermedio **81** también puede evolucionar por apertura del anillo generando el anión estabilizado **86** que se aislaría como el nitrilo **83** por tratamiento acuoso. Por otra parte, el anión **86** puede ciclar proporcionando el intermedio tricíclico **87** que en el aislamiento acuoso genera **84**.²⁷³



Esquema 3.29. Mecanismo propuesto para la formación de **82**, **83** y **84**.

Según el mecanismo propuesto, en la reacción de **77** con *n*-BuLi se producen pequeñas cantidades del producto esperado **82**. Su precursor, el anión **81** es una base fuerte y podría estabilizarse por apertura del anillo y formación del anión estabilizado por el grupo sulfona **86**. Para intentar explicar por qué la apertura del anillo está más favorecida que la eliminación del ácido sulfínico, se ha calculado el ángulo de torsión definido por los átomos implicados en la eliminación. En primer lugar, se optimizó la geometría de **82** mediante mecánica molecular utilizando un método de campo de fuerza tipo 3D-CHARMM con el programa ACD/3D Viewer. Posteriormente, las estructuras de **81** y **82** se refinaron aplicando métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT) utilizando el funcional híbrido de tres parámetros B3LYP,^{274,275} y el

²⁷³ Coppola, A.; Sánchez-Alonso, P.; Sucunza, D.; Burgos, C.; Alajarin, R.; Alvarez-Builla, J.; Mosquera, M. E.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3388-3391.

²⁷⁴ Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

conjunto de bases 6-31+G(d) con el programa de cálculo Gaussian 09²⁷⁶ (Figura 3.31). Adicionalmente, se realizaron cálculos de frecuencias para confirmar que las estructuras optimizadas correspondían a mínimos en la superficie de energía potencial debido a la ausencia de autovalores negativos en la matriz Hessiana. Este cálculo se realizó en el Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá por el Dr. Manuel Temprado Morena.

En el caso del compuesto **82**, el ángulo de torsión definido por los enlaces Ts-C₃-C₄-H_{4a} es 149,8° y para los enlaces Ts-C₃-C₄-H_{4b} es 35,1° (Figura 3.31). En el caso del intermedio **81**, el ángulo de torsión definido por los enlaces Ts-C₃-C₄-H_{4a} es 75,7° y para los enlaces Ts-C₃-C₄-H_{4b} es 42,2° (Figura 3.31). El par de electrones sp² en el átomo C1 de **81** experimenta repulsión con los electrones de los átomos de oxígeno del grupo fenilsulfonilo en el átomo de nitrógeno indólico. Esto hace que el átomo C1 se desvie fuera del plano del anillo indólico, obligando al ángulo diedro Ts-C₃-C₄-H_{4b} a disminuir respecto de la forma neutra **82** (desde 150° a 76°). Por tanto, ninguna de las dos estructuras presenta una conformación antiperiplanar capaz de producir una eliminación *anti*, es decir, la eliminación del grupo Ts no parece estar favorecida. Esto justificaría que en la reacción de **77** con *n*-BuLi solo se detectarían trazas de **82** (Esquema 3.29).

²⁷⁵ Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.

²⁷⁶ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A. Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, S. Dapprich, J. J.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2010.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

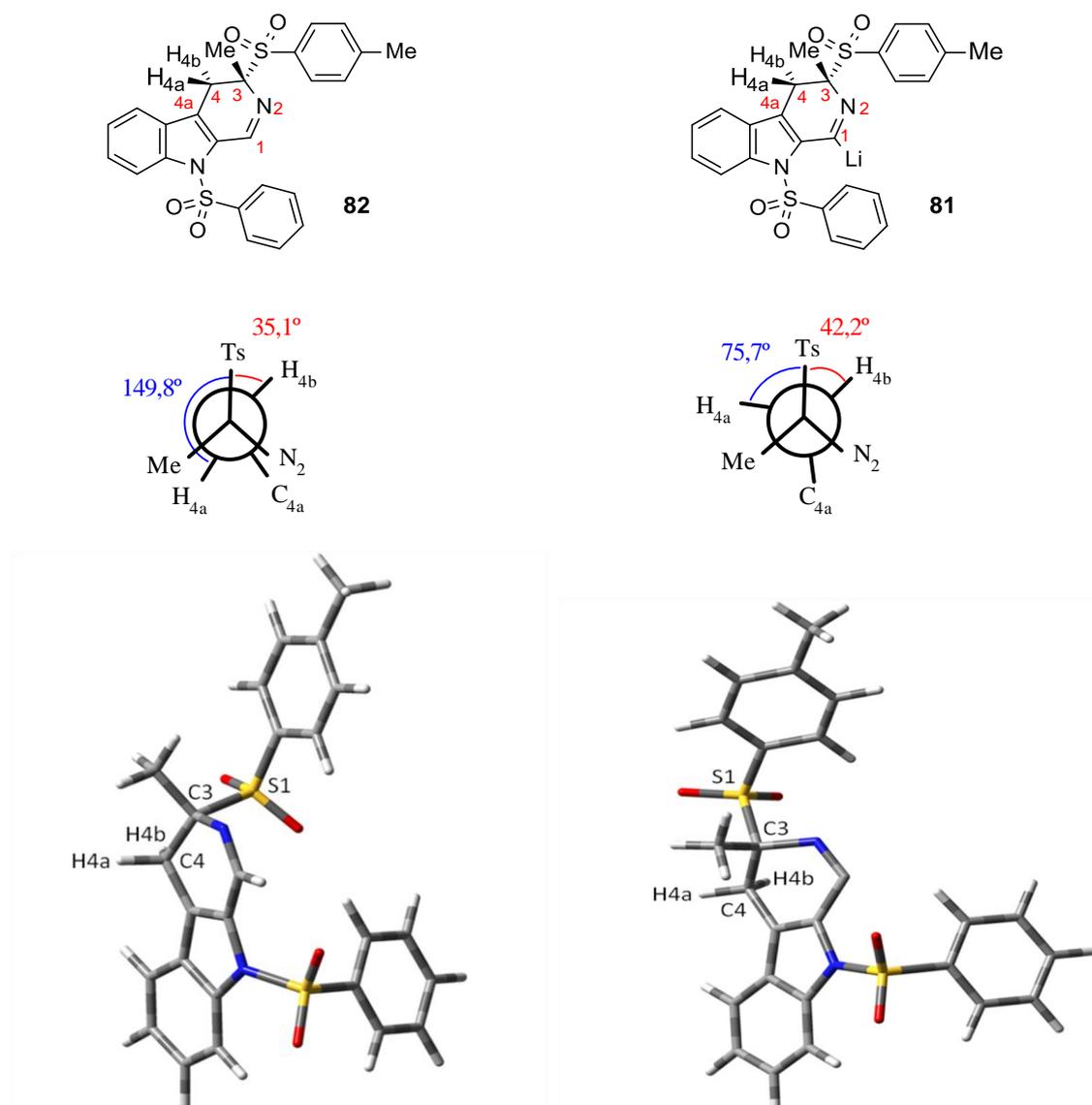
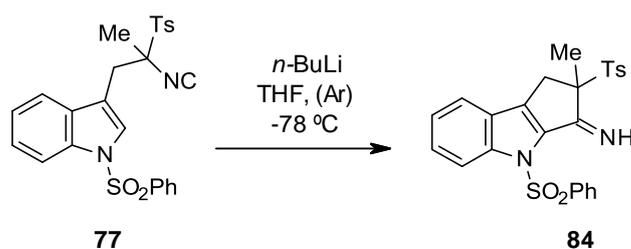


Figura 3.31. Conformaciones de mínima energía del intermedio **81** y del producto **82**.

Aunque nuestro objetivo sintético inicial, el compuesto **82**, no se pudo obtener con un rendimiento sintéticamente útil a través de esta estrategia, el compuesto **84** presentaba características estructurales que parecían igualmente interesantes como potencial inhibidor de FABP y por ello, centramos nuestros esfuerzos en la optimización de su preparación. Además, el derivado de la β -carbolina **85** también merecía un estudio de su mecanismo de formación y de las condiciones de obtención con vistas a su optimización. Los resultados de estos estudios para ambos compuestos, **84** y **85**, se recogen en las Tablas 3.18 y 3.19.

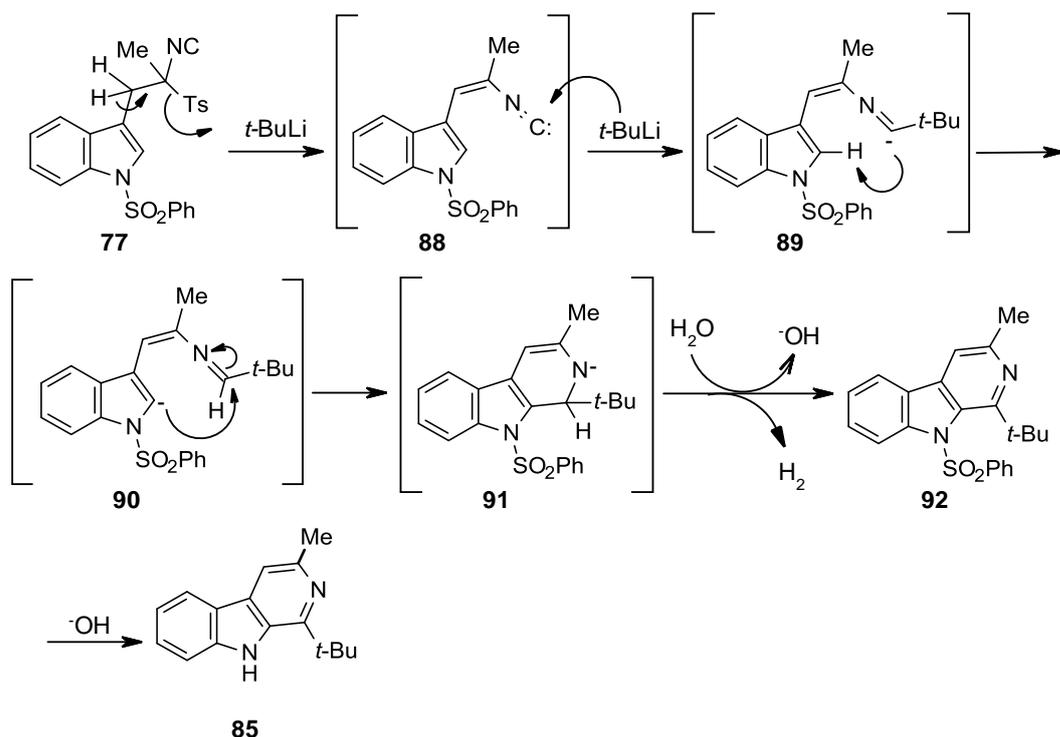
Tabla 3.18. Optimización de la síntesis de **84**.



Entrada	<i>n</i> -BuLi (eq.)	Tiempo (h)	Codisolvente	77 (Rto, %)	84 (Rto, %)	Otros (Rto, %)
1	2,2	1	-	16	45	-
2	2,2	2	-	19	54	-
3	3,3	2	-	12	26	-
4	2,2	2	TMEDA	30	5	8
5	3,3	2	TMEDA	-	13	48
6	2,2	4	-	10	50	-
7	3,3	4	-	10	26	-

El empleo de 2,2 equivalentes de *n*-BuLi conduce a mejores rendimientos de **84**, siendo el tiempo óptimo de reacción 2 horas. Un aumento en el número de equivalentes de la base conlleva a la pérdida de masa del crudo de reacción aislado, probablemente por descomposición. El empleo de un codisolvente como tetrametiletilendiamina (TMEDA) para aumentar la reactividad de la base no produce mejores resultados, obteniéndose diversos productos secundarios no identificados.

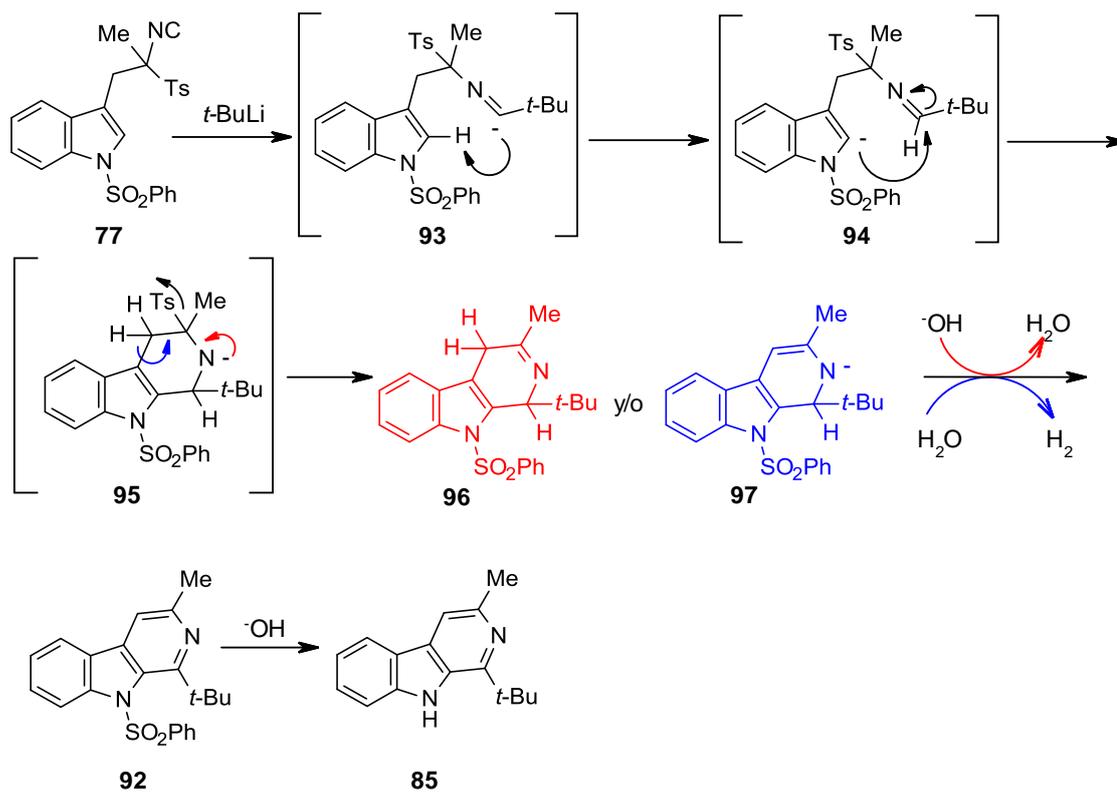
en el proceso de aislamiento. En este curso de reacción propuesto la eliminación *anti* del grupo tosilo es viable ya que ocurre antes de la reacción de ciclación.



Esquema 3.30. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de **85**.

Un posible mecanismo alternativo para explicar la formación de **85** podría implicar en primer lugar que el $t\text{-BuLi}$ actuase como nucleófilo generando en anión **93**, el cual, produciría el intermedio tricíclico **95**. Este amiduro podría eliminar ácido *p*-toluenosulfínico para dar **96** o **97**, los cuales podrían oxidarse a la β -carbolina **92** (Esquema 3.31). Sin embargo, cuando se llevó a cabo la optimización de la geometría de **98** (por protonación de **95**) mediante mecánica molecular utilizando un método de campo de fuerza tipo 3D-CHARMM con el programa ACD/3D Viewer, el ángulo de torsión de $97,2^\circ$ definido por los enlaces $\text{Ts}-\text{C}_3-\text{C}_4-\text{H}_{4b}$ no permitiría una eliminación *anti* (Figura 3.32). Por otra parte, el ángulo de torsión formado por los enlaces $\text{H}_c-\text{N}_2-\text{C}_3-\text{Ts}$ es $57,2^\circ$ por lo que la eliminación *anti* tampoco estaría favorecida.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Esquema 3.31. Mecanismo de reacción alternativo para la formación de **85** (descartado).

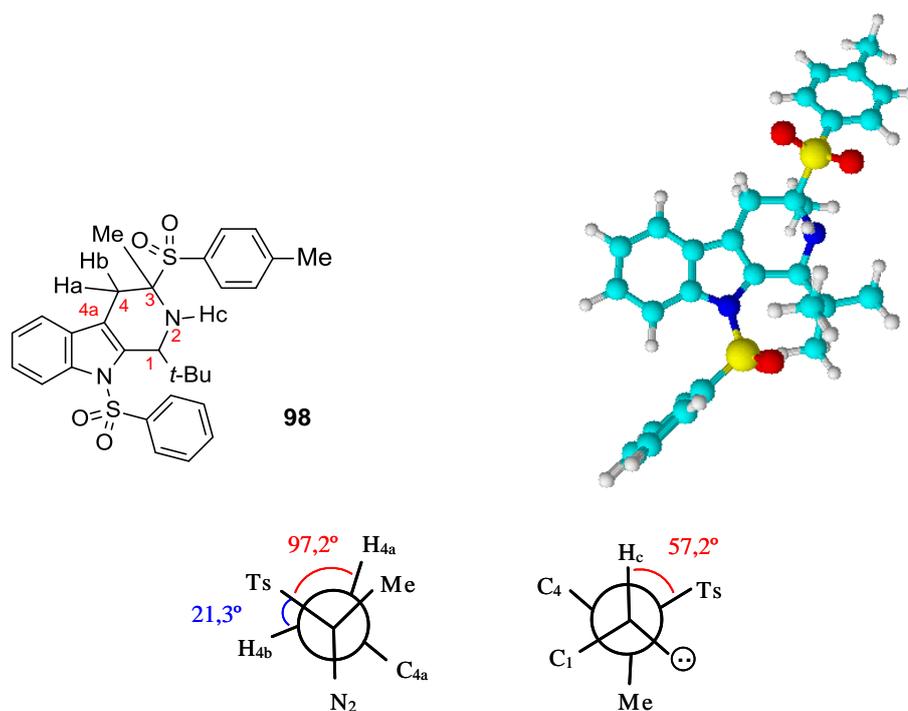
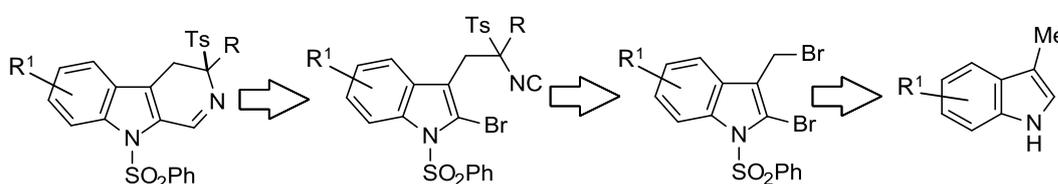


Figura 3.32. Conformación de menor energía de **98** (método de campo de fuerza) y ángulos de torsión alrededor del enlace C3-C4 y N2-C3.

A la vista de los bajos rendimientos obtenidos en la reacción de **77** con los compuestos organolíticos para la obtención de los compuestos **84** y **85**, se pensó en realizar dicha reacción recurriendo al intercambio metal-halógeno. Por este motivo, se planteó una ruta sintética alternativa a partir de 2-bromo-3-bromometilindol. El esquema retrosintético se detalla en el Esquema 3.32.

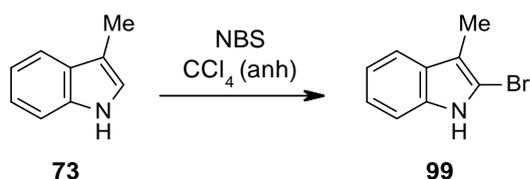


Esquema 3.32. Esquema retrosintético alternativo de potenciales inhibidores de FABP.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación del 2-bromo-3-metilindol (**99**) aplicando las condiciones descritas por Liu y *col.* (Tabla 3.20, entrada 1).²⁷⁸ Sin embargo, tras 3,5 horas de reacción solo se observó producto de partida sin reaccionar (por cromatografía en capa fina). Se llevaron a cabo distintas modificaciones de las condiciones de reacción tales como la disminución del tiempo (Tabla 3.20, entrada 2) o de la temperatura (Tabla 3.20, entrada 3), sin embargo, no se consiguió la formación del compuesto deseado **99**.

Tabla 3.20. Síntesis de 2-bromo-3-metilindol (**99**).



Entrada	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Resultado
1	reflujo	3,5	descomposición
2	reflujo	0,5	descomposición
3*	t.a.	96	descomposición

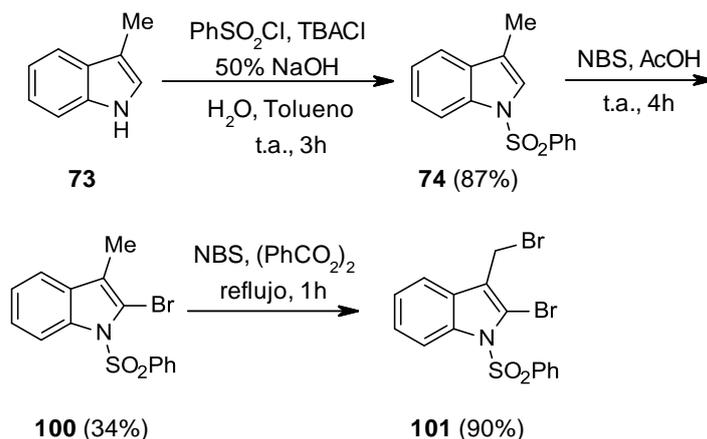
*La reacción se realiza en ausencia de luz y su purificación se realiza por cromatografía sobre alúmina neutra.

A la vista de estos resultados se planteó realizar la protección de **73** con cloruro de fenilsulfonilo y, posteriormente, la introducción del átomo de bromo en la posición C2 del núcleo indólico.

La halogenación electrofílica de **74** se realizó siguiendo el método descrito por Hino y *col.* (Esquema 3.33).²⁷⁹ Para ello, se hizo reaccionar **74** con NBS en presencia de ácido acético, a temperatura ambiente y durante 4 horas, obteniéndose un 34% del producto deseado **100** y la recuperación de un 20% del producto de partida **74**. Los rendimientos obtenidos son similares a los descritos en la bibliografía (39% y 24%, respectivamente). A continuación, se llevó a cabo la bromación radicalica de **100** en las condiciones habituales para la obtención del compuesto dibromado **101** con un 90% de rendimiento (Esquema 3.33).

²⁷⁸ Liu, R.; Zhang, P.; Gan, T.; Cook, J. M. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7447-7456.

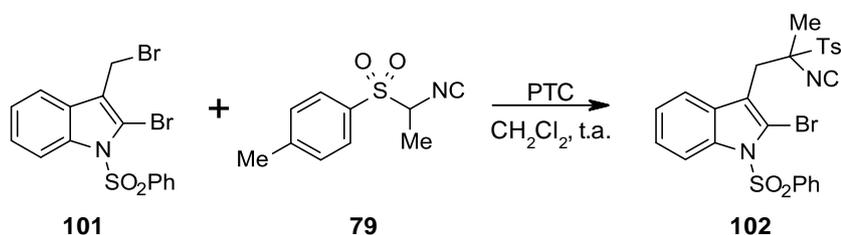
²⁷⁹ Hino, T.; Nakamura, T.; Nakagawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, 23, 2990-2997.



Esquema 3.33

Una vez sintetizado **101**, se ensayó la alquilación con **79**. En la Tabla 3.21, se recoge el estudio de las condiciones de reacción.

Tabla 3.21. Reacción de alquilación de **79** con **101**.

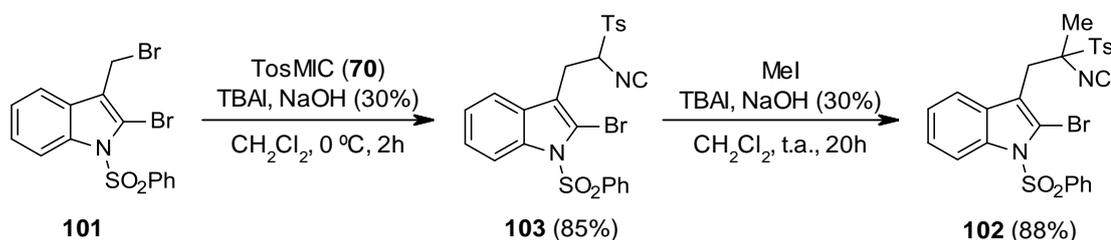


Entrada	Catalizador	Base	Tiempo (h)	102 (Rto, %)
1	TEBACl	NaOH (30%)	24	20
2	TEBACl	NaOH (50%)	23	24
3	TBAI	NaOH (50%)	72	-

El empleo de TEBACl como catalizador de transferencia de fase y una disolución de NaOH (30%) como base conducen a la obtención de un 20% de **101**. El uso de una disolución de NaOH más concentrada proporciona rendimientos similares. Por otra parte, el cambio de catalizador, TEBACl por TBAI, provoca la ausencia de reacción.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

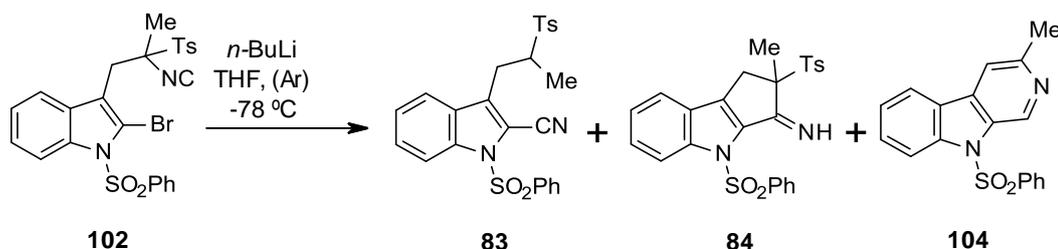
A la vista de estos resultados, se procedió a realizar la alquilación de TosMIC (**70**) con **101** para, posteriormente, llevar a cabo la metilación de **103** (Esquema 3.34). Ambos procesos se llevaron a cabo mediante una catálisis de transferencia de fase, empleando TBAI como catalizador y una disolución de NaOH al 30%. De esta manera, se obtuvo **102** con un rendimiento del 75% para las dos etapas.



Esquema 3.34

A continuación se llevó a cabo la reacción de **102** con *n*-BuLi empleando las condiciones más favorables alcanzadas para la reacción de **77**. Los resultados se recogen en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22. Estudio de la reacción de **102** con *n*-BuLi.



Entrada	<i>n</i> -BuLi (eq.)	Tiempo (h)	102 (Rto, %)	83 (Rto, %)	84 (Rto, %)	104 (Rto, %)
1	2,2	2	7	-	44	5
2	2,2	4	16	-	13	-
3	3,3	2	30	23	40	-
4	3,3	4	21	-	40	-

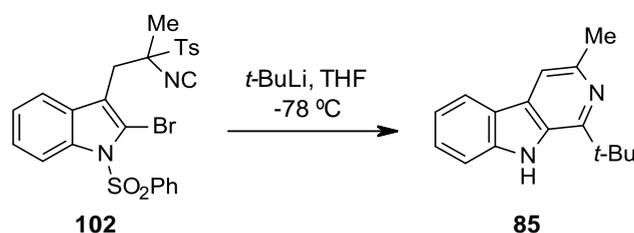
La reacción de **102** con 2,2 equivalentes de *n*-BuLi conlleva la formación de **84** con un rendimiento medio y a la recuperación de un 7% de producto de partida. Además, se observa la formación de la β -carbolina **104** a nivel de trazas. La prolongación del tiempo de reacción hasta 4 horas para intentar consumir el producto de

partida condujo a peores resultados. En el caso del empleo de 3,3 equivalentes de *n*-BuLi se obtuvieron los compuestos **83** y **84**, recuperándose un 30% de producto de partida. Cuando se prolongó el tiempo de reacción, se observó la desaparición del compuesto **83** y la aparición de otros productos de descomposición.

A partir de estos resultados y de los obtenidos en la reacción de **77** con *n*-BuLi, se puede concluir que los mejores resultados para la obtención de los compuestos **83** y **84** se alcanzan cuando se emplean 2,2 o 3,3 equivalente de base, respectivamente, y un tiempo de reacción de 2 horas.

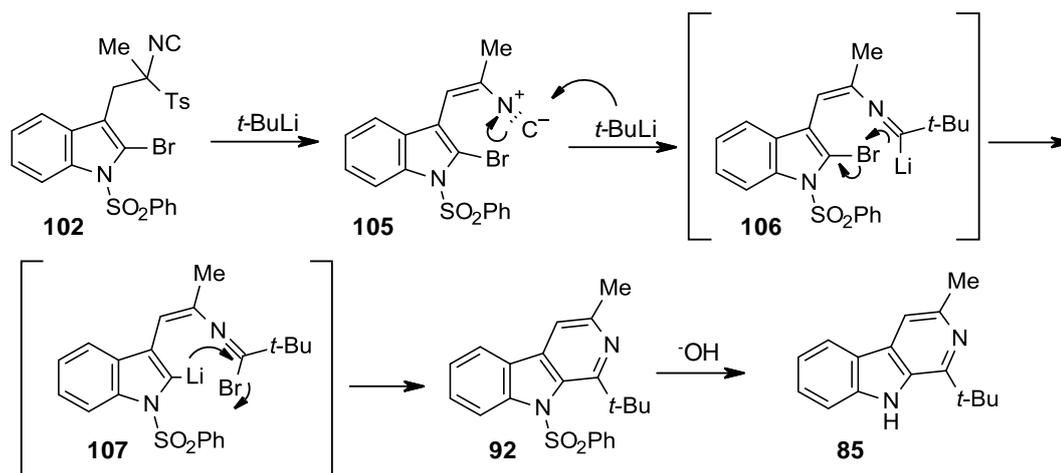
Paralelamente, se realizó un estudio de la reacción de **102** con *t*-BuLi, y se observó que, aplicando similares condiciones a las empleadas en la reacción de **77** con *t*-BuLi, se llegaba a obtener **85** con un rendimiento del 80% (Tabla 3.23).

Tabla 3.23. Estudio de la reacción de **102** con *t*-BuLi.



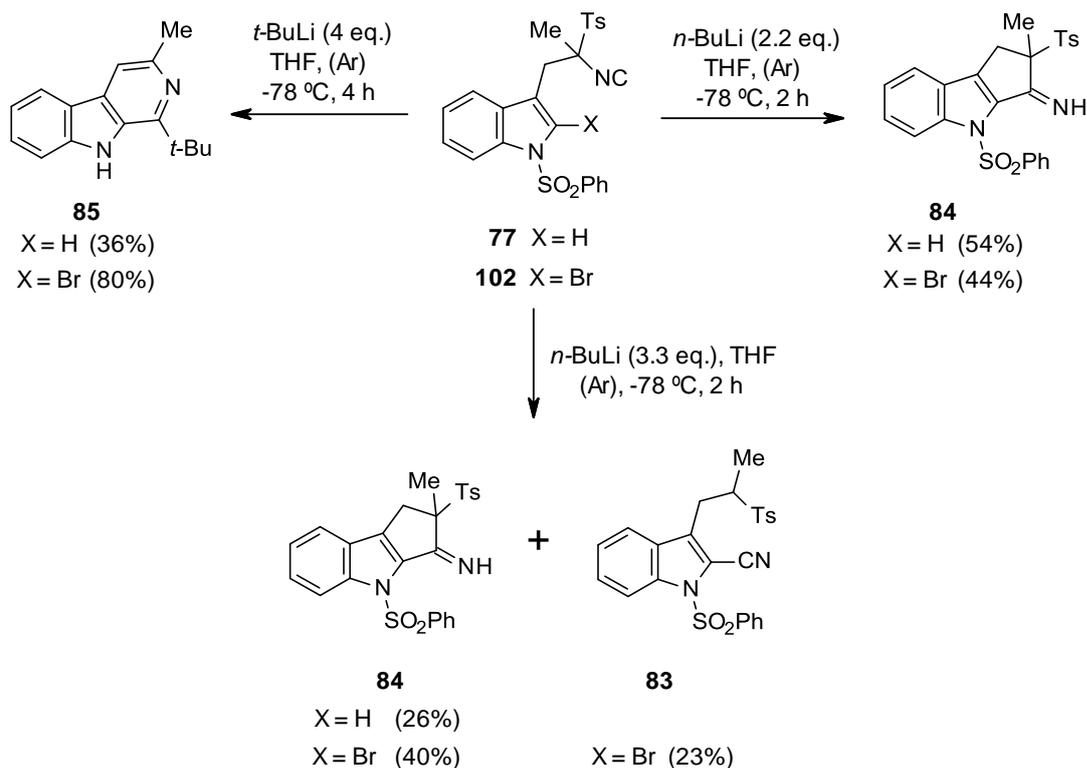
Entrada	<i>t</i> -BuLi (eq.)	Tiempo (h)	102 (Rto, %)	85 (Rto, %)
1	2,2	2	10	32
2	4	4	16	80

La diferencia de rendimiento obtenido en las reacciones de **77** y **102** con *t*-BuLi (36% y 80%, respectivamente) pueden explicarse por el distinto curso de la reacción que supone la presencia del átomo de Br. De forma similar a como se propuso para **77**, **102** puede reaccionar consecutivamente con dos moléculas de *t*-BuLi para dar **105** por eliminación de ácido *p*-toluenosulfínico seguido de adición nucleófila al grupo isonitrilo conduciendo a **106**. Sin embargo, ahora se puede producir el intercambio de bromo desde el carbono C2 indólico al carbono imínico para dar lugar a la bromoimina **107**, sobre la cual se produciría la reacción de ciclación para dar lugar a la β -carbolina **92**. Finalmente, **92** se hidroliza a **85** en el proceso de aislamiento (Esquema 3.35).



Esquema 3.35

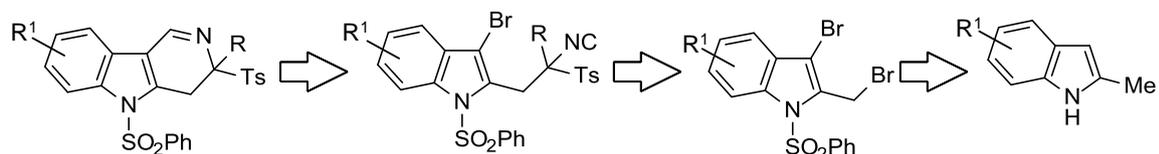
En el Esquema 3.36 se hace una comparación de las reacciones de **77** y **102** con los compuestos organolíticos $n\text{-BuLi}$ y $t\text{-BuLi}$. El empleo de 2,2 equivalentes de $n\text{-BuLi}$ proporciona en ambos casos rendimientos medios de **84**. Sin embargo, cuando se emplean 3,3 equivalentes los resultados difieren. En este caso, la reacción de **77** con $n\text{-BuLi}$ conduce únicamente a **84** con un rendimiento medio, mientras que el empleo de **102** como producto de partida proporciona los compuestos **83** y **84** con rendimientos medio y bajo, respectivamente. Por otra parte, se observa que la obtención de la β -carbolina **85** se produce con mejores rendimientos cuando se emplea **102** como producto de partida. Esto puede deberse a la mayor facilidad del intercambio bromo-litio y del proceso de la ciclación posterior conducente a la β -carbolina.



Esquema 3.36

3.2.4.2.2. Síntesis de γ -carbolinas a partir de 2-metilindol y TosMIC

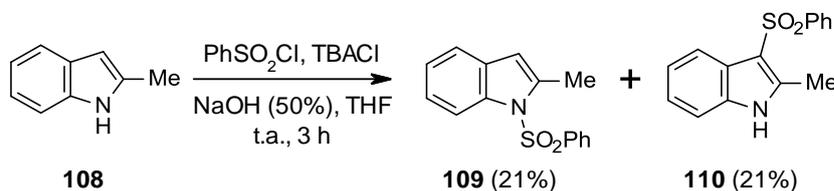
El esquema retrosintético que se planteó para la síntesis de la otra familia de inhibidores potenciales de FABP basado en el sistema de γ -carbolina fue similar al planteado para los derivados de β -carbolina (Esquema 3.37).



Esquema 3.37

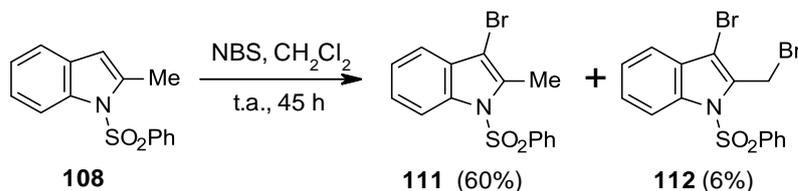
CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En primer lugar se llevó a cabo la protección de 2-metilindol. Aplicando las condiciones descritas por Dalton y *col.*²⁸⁰ se obtuvo una mezcla de los compuestos **109** y **110**, de difícil separación por cromatografía en columna debido a sus polaridades similares (Esquema 3.38).



Esquema 3.38

Siguiendo un procedimiento empleado previamente en nuestro grupo de investigación para la dibromación de 2-metil-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina,^{234,235,281,282} se adaptó para la síntesis del compuesto dibromado **112** (Esquema 3.39). Para ello, se trató **108** con dos equivalentes de NBS, a temperatura ambiente y durante 45 horas. Dichas condiciones de reacción condujeron a la obtención del compuesto **111** como producto mayoritario, observando únicamente un 6% del compuesto dibromado **112**.



Esquema 3.39

Debido al bajo rendimiento con el que se obtuvo **112**, y observando la competencia entre las posiciones bencílica y arílica en el núcleo indólico, se optó por

²⁸⁰ Dalton, L.; Humphrey, G. L.; Cooper, M. M.; Joule, J. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1983**, *10*, 2417-2422.

²³⁴ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4879-4882.

²³³ Mendiola, J.; Minguez, J. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3253-3256.

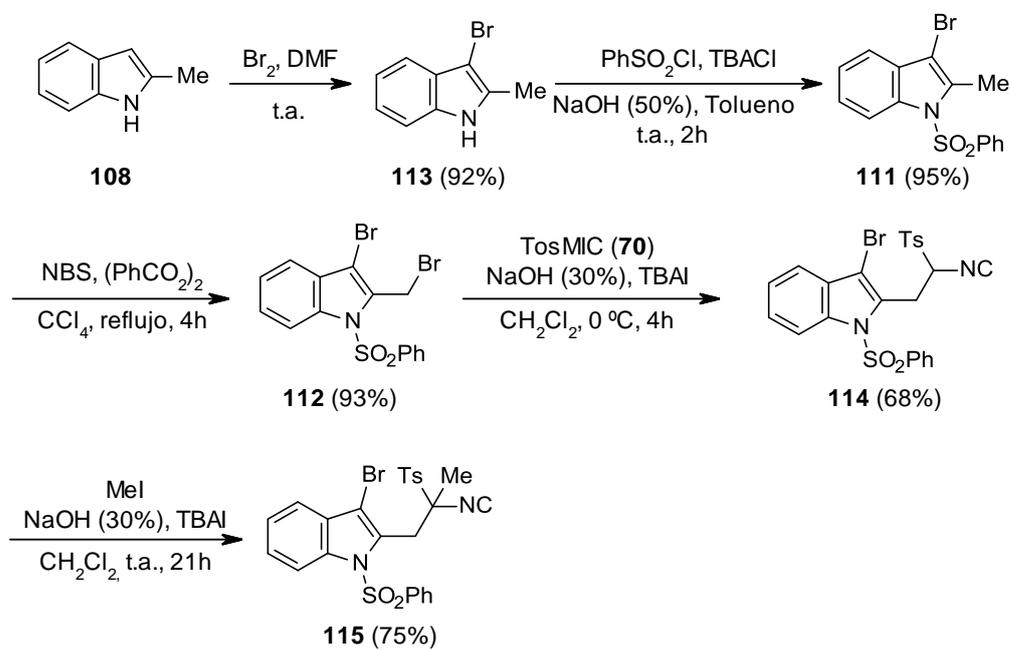
²⁸¹ Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4974-4983.

²⁸² María Morón Galán Tesis, Universidad de Alcalá, 2012.

realizar en primer lugar la bromación electrofílica en posición 3 y, posteriormente la protección del grupo amino.

Se hizo reaccionar **108** con Br₂ en DMF a temperatura ambiente para obtener **113** de forma cuantitativa.²⁸³ A continuación, se realizó la protección del nitrógeno para dar **111**, seguido de una bromación radicalaria del grupo metilo para obtener **112**. Finalmente, se efectuó la reacción de alquilación de TosMIC (**70**) con **112** para obtener el compuesto **114**, que posteriormente por reacción con ioduro de metilo proporciona el producto **115** (Esquema 3.40).

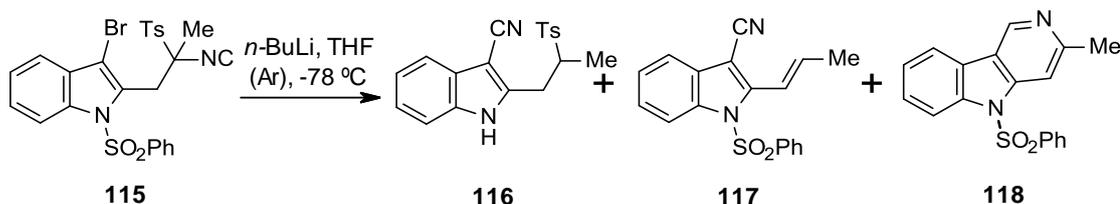
La reacción de **115** con *n*-BuLi condujo a unos resultados inesperados. En este caso y, aplicando las condiciones ensayadas en la reacción de **77** con esta base litiada, se encontró que no tenía lugar la formación de la ciclopentanimina, sino que se obtenía el indol-3-carbonitrilo **116**, el derivado 2-(1-propenil)indol-3-carbonitrilo **117** y trazas de la γ -carbolina **118** (Tabla 3.24).²⁷³



²⁸³ Bocchi, V.; Palla, G. *Synthesis* **1982**, 1096-1097.

²⁷³ Coppola, A.; Sánchez-Alonso, P.; Sucunza, D.; Burgos, C.; Alajarin, R.; Alvarez-Builla, J.; Mosquera, M. E.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3388-3391.

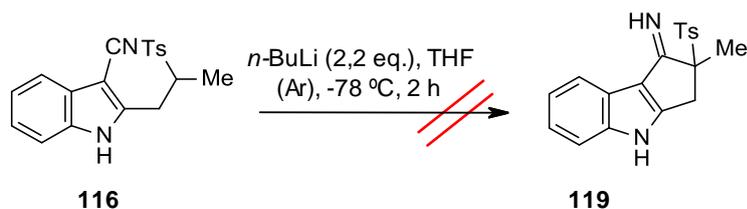
Tabla 3.24. Estudio de la reacción de **115** con *n*-BuLi.



Entrada	<i>n</i> -BuLi (eq.)	Tiempo (h)	115 (Rto, %)	116 (Rto, %)	117 (Rto, %)	118 (Rto, %)
1	2,2	2	28	26	13	6
2	2,2	4	10	28	7	-
3	3,3	2	12	34	-	-
4	3,3	4	15	52	-	-
5	3,3	6,5	11	32	-	-

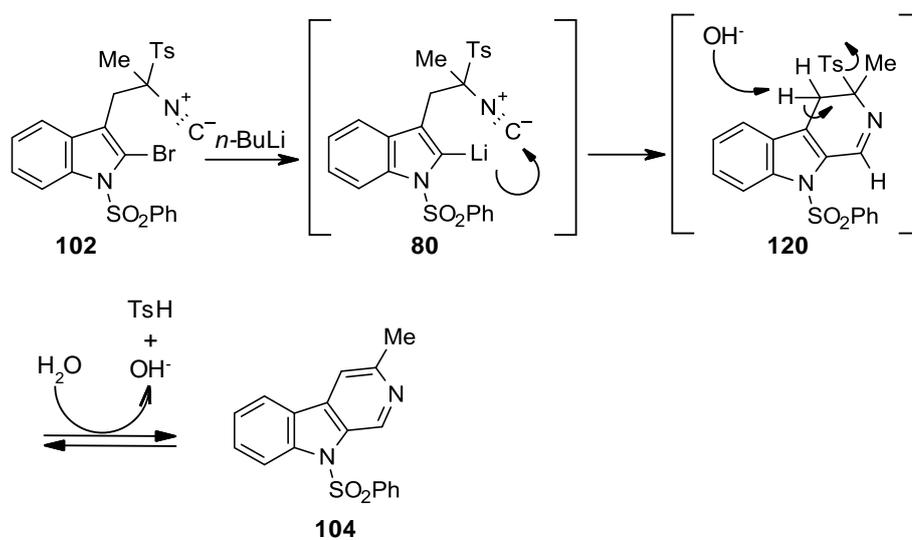
La reacción de **115** con 2,2 equivalentes de *n*-BuLi condujo a la formación de los compuestos **116**, **117** y **118**, así como a la recuperación de producto de partida **115** (Tabla 3.24, entradas 1 y 2). En este caso, la reacción no progresa hasta la formación de la ciclopentanimina, aislándose como producto mayoritario el cianoderivado **116** que puede ser considerado como su precursor. El aislamiento de **116** avalaría el mecanismo propuesto para la formación de la ciclopentanimina **84** a partir de **77** y **102**. Además, en este caso, la ciclación a la correspondiente ciclopentanimina debe estar desfavorecida por la menor electrofilia del grupo nitrilo en la posición C3 del anillo de imidazol. Un aumento en el número de equivalentes de la base para consumir el producto de partida **115** condujo únicamente al compuesto **116**, no observándose la eliminación del grupo tosilato (Tabla 3.24, entrada 3). En estas condiciones, el incremento del tiempo de reacción hasta 4 horas condujo a un 52% de **116**, mientras que cuando se prolongó hasta 6,5 horas se observó la formación de subproductos de descomposición (Tabla 3.24, entrada 5). Esto parece indicar, además, que **117** se forma probablemente por eliminación del grupo tosilato durante el proceso de aislamiento de los productos de la reacción.

Debido a que no se obtuvo la ciclopentanimina **119** en la reacción de **115** con *n*-BuLi, se intentó llevar a cabo su formación a partir del cianoderivado **116**. Para ello, se hizo reaccionar **116** con *n*-BuLi en las mismas condiciones en las que se había obtenido la ciclopentanimina **84**. Sin embargo, no se llegó a su obtención, recuperándose el producto de partida **116** (Esquema 3.41).



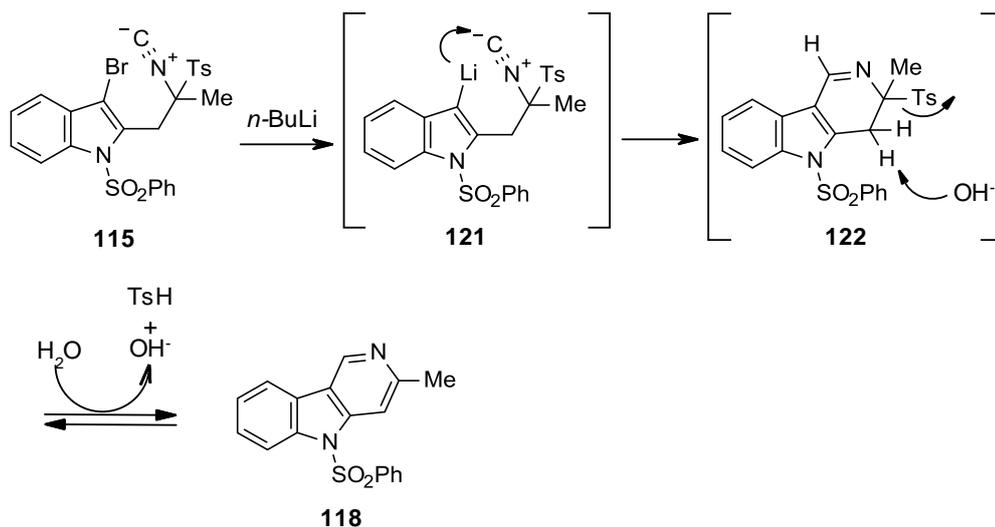
Esquema 3.41

A partir de los datos que se recogen en las Tablas 3.21 y 3.24 la formación de trazas de las β - y γ -carbolinas **104** y **118** utilizando $n\text{-BuLi}$ como base podría suponer un mecanismo de heterociclación en los pasos iniciales seguido de una eliminación poco favorecida de ácido p -toluenosulfínico (Esquemas 3.42 y 3.43).



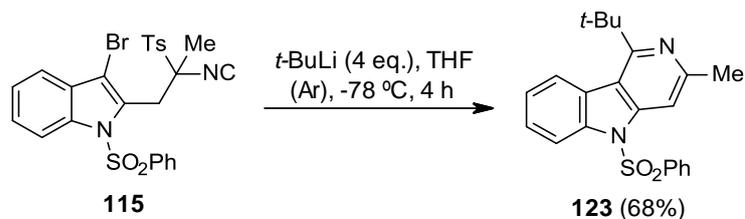
Esquema 3.42

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

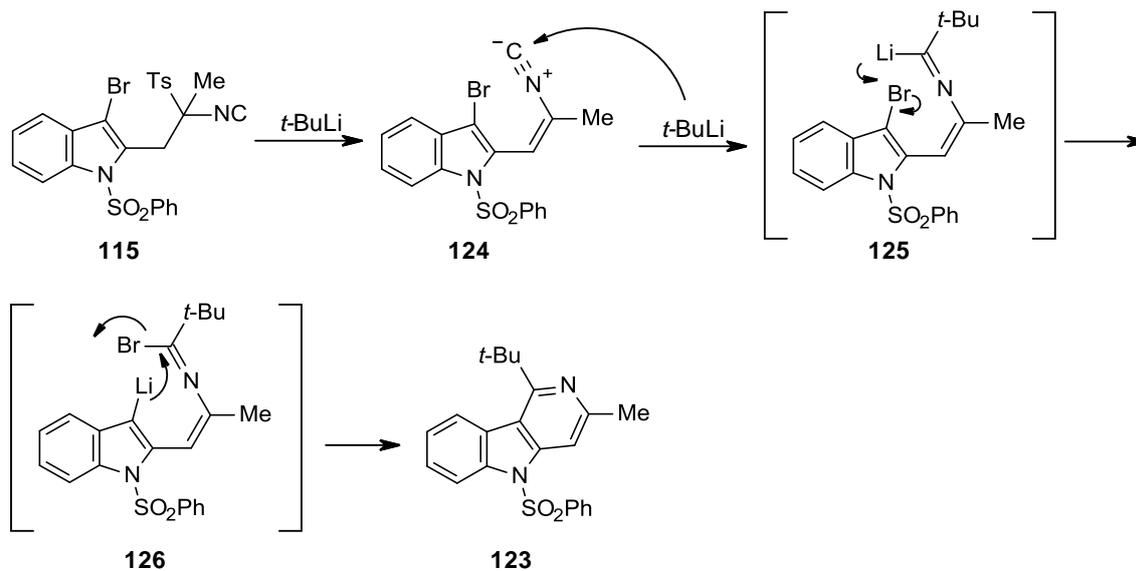


Esquema 3.43

Por último, se llevó a cabo la reacción de **115** con *t*-BuLi empleando las condiciones más favorables encontradas para la síntesis del compuesto **85**, obteniéndose la γ -carbolina **123** en un 68% (Esquema 3.44). La formación del compuesto **123** se explicaría de forma similar a la de **92** a través del mecanismo detallado en el Esquema 3.45. A destacar, que en este caso no se produce la desprotección del nitrógeno indólico.



Esquema 3.44



Esquema 3.45

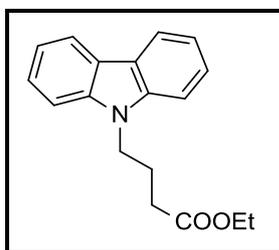
En el momento de redactar la Tesis, se ha comenzado el estudio de actividad de los compuestos **83**, **84**, **104**, **117**, **118** y **123** empleando el kit comercial “*FABP4 inhibitor/ligand screening assay kit*” de la casa comercial Cayman Chemical. Este estudio se está realizando en la unidad de investigación del Hospital Universitario La Paz bajo la dirección de la Dra. Teresa Bellón y el Dr. Rafael Selgas.

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1. Síntesis del ácido 4-(9*H*-carbazol-9-il)butanoico

- 4-(9*H*-carbazol-9-il)butanoato de etilo (**38**)

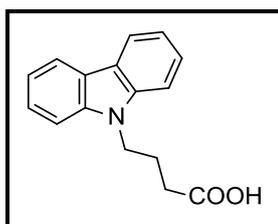
Una mezcla de carbazol (0,50 g; 2,99 mmol) y NaH (75,3 mg; 3,13 mmol) disueltos en DMF anhidro (30 mL) se deja agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se calienta a 70 °C. Transcurridos 40 minutos, se adiciona 4-bromobutirato de etilo (0,47 mL; 3,13 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene agitando a dicha temperatura durante 16 horas. Pasado ese tiempo, la reacción se para con agua (15 mL), la mezcla de reacción se vierte sobre una mezcla agua/hielo (50 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 50 mL). Se reúnen los extractos orgánicos, se lavan con una disolución saturada de NaCl (3 x 50 mL), se secan sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente. Se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla hexano/AcOEt (4:1). Se obtienen 0,42 g (50%) de **38** como un aceite incoloro.



Rendimiento: 50%. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)** δ: 8,06 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz); 7,40 (m, 3H); 7,23 (m, 3H); 4,13 (c, 2H, *J* = 7,2 Hz); 3,45 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz); 2,48 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz); 2,15 (q, 2H, *J* = 6,9 Hz); 1,23 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃)** δ: 172,9; 140,3 (2C); 125,7 (2C); 122,8 (2C); 120,3 (2C); 118,9 (2C); 110,5 (2C); 60,5; 41,9; 31,1; 23,9; 14,2 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₈H₁₉NO₂: [M+H]⁺: 282,1489; encontrado [M+H]⁺: 282,1472.

▪ **Ácido 4-(9H-carbazol-9-il)butanoico (CLXXXIX)**

A una disolución de **38** (0,41 g; 1,49 mmol) en EtOH (35 mL) se le añade KOH 1N (5 mL), gota a gota, bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se calienta a 85 °C durante 5 horas. Pasado ese tiempo, se deja que alcance temperatura ambiente y se neutraliza con HCl 1N. Se evapora el disolvente orgánico y la fase acuosa que se obtiene se extrae con CH₂Cl₂. La fase acuosa obtenida se acidifica con 1N HCl, se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El residuo que se obtiene se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (4:1) y después con MeOH. De esta manera, se obtienen 0,15 g (40%) de **CLXXXIX** como un sólido blanco.



Rendimiento: 40%. **P.f.:** 149-150 °C (*Lit*²⁸⁴: 150 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD)**
δ: 8,09 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz); 7,56 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz); 7,45 (td, 2H, *J* = 8,1 Hz, *J* = 7,6 Hz, *J* = 0,8 Hz); 7,20 (t_{ap}, 2H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 6,8 Hz); 4,44 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz); 2,32 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz); 2,17 (q, 2H, *J* = 6,8 Hz) ppm.

3.3.2. Síntesis de carbolinas

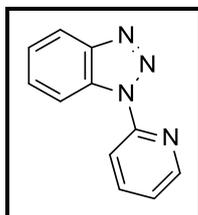
3.3.2.1. Síntesis de piridilbenzotriazoles

Procedimiento general: Una mezcla equimolar de 1*H*-benzotriazol (3,43 g; 28,8 mmol) y de la correspondiente cloropiridina (28,8 mmol) se calienta a 180 °C durante el tiempo indicado en cada caso. Una vez finalizada la reacción, se deja que la mezcla alcance temperatura ambiente. Su purificación se realiza por cromatografía en gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/ MeOH (10:0,1) o por recristalización utilizando una mezcla EtOH/H₂O, según se indique en cada caso.

²⁸⁴ Hotzel, C.; Marotto, A.; Pindur, U. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 367-378.

▪ **1H-1-(2-piridil)benzotriazol (39)**

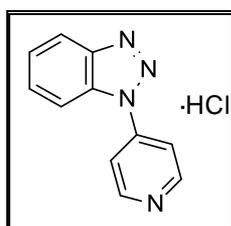
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 1H-benzotriazol (3,43 g; 28,8 mmol) y 2-cloropiridina (2,7 mL; 28,8 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 3 horas y purificando por cromatografía, se obtienen 4,95 g (74%) de **39** como un sólido blanco.



Rendimiento: 74%. **P.f.:** 111-113 °C (*Lit*²⁵⁷: 112-113 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 8,63 (m, 2H); 8,29 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz); 8,11 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz); 7,93 (td, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 8,1$ Hz, $J = 2,1$ Hz); 7,59 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz); 7,44 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz); 7,31 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 5,1$ Hz) ppm.

▪ **Hidrocloreto de 1H-1-(4-piridil)benzotriazol (40)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 1H-benzotriazol (3,19 g; 26,7 mmol) e hidrocloreto de 4-cloropiridina (4,04 g; 26,7 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 3 horas y purificando por recristalización, se obtienen 3,64 g (59%) de **40** como un sólido blanco.



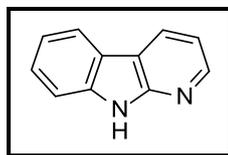
²⁵⁷ Vera-Luque, P.; Alajarin, R.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2006**, 8, 415-418.

Rendimiento: 59%. **P.f.:** 230 °C (*Lit*²⁵³: 231-232 °C). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆)** δ : 9,21 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz); 8,49 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz); 8,31 (c, 2H, *J* = 4,3 Hz); 7,82 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz); 7,63 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz); 6,7 (*S*_{ancho}, 1H) ppm.

3.3.2.2. Síntesis de α - y γ - carbolinas

▪ **9H-pirido[2,3-*b*]indol²⁵⁷ (17)**

Una mezcla de 1-(2-piridil)benzotriazol **39** (1,57 g; 8,0 mmol) y H₄P₂O₇ (22,8 g; 128,1 mmol) se calienta a 180 °C durante 2 horas. Una vez finalizado dicho tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y se disuelve en la mínima cantidad de agua. El exceso de H₄P₂O₇ se neutraliza con una disolución de NaOH (30%) hasta alcanzar pH básico, observando la aparición de un precipitado que se filtra. El precipitado obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla CH₂Cl₂/AcOEt (4:6), obteniéndose así 0,42 g (32%) de **17** como un sólido blanco.



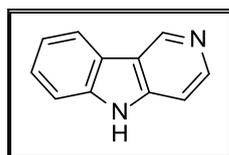
Rendimiento: 32%. **P.f.:** 209-211 °C (*Lit*²⁵³: 212 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 10,6 (s, 1H, NH); 8,51 (dd, 1H, *J* = 4,7 Hz, *J* = 1,2 Hz, H-2); 8,35 (dd, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,2 Hz, H-4); 8,06 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-5); 7,51 (m, 2H, H-7, H-8); 7,24 (m, 2H, H-3, H-6) ppm.

²⁵³ Molina, A.; Vaquero, J. J.; Garcia-Navio, J. L. Alvarez-Builla, J.; de Pascual-Teresa, B.; Gago, F.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5587-5599.

²⁵⁷ Vera-Luque, P.; Alajarin, R.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 415-418.

▪ **5H-pirido[4,3-b]indol²⁵³ (19)**

Una mezcla de 1-(4-piridil)benzotriazol **40** (0,11 g; 0,48 mmol) y H₄P₂O₇ (0,26 g; 1,46 mmol) se calienta a 150 °C durante 3 horas. Pasado ese tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente, se tritura en agua y se basifica con una disolución de NaOH (15%) observando la aparición de un precipitado que se filtra. El precipitado obtenido se purifica por recristalización empleando CH₃CN como disolvente, obteniéndose 49,3 mg (60%) de **19** como un sólido color crema.



Rendimiento: 60%. **P.f.:** 220 °C (*Lit*²⁵³: 218 °C). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ :** 11,7 (s, 1H, NH); 9,32 (s, 1H, H-1); 8,40 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-3); 8,21 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, H-9); 7,55 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-6); 7,46 (m, 2H, H-4, H-7); 7,52 (t_{ap}, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 7,2 Hz, H-8) ppm.

3.3.2.3. Síntesis de δ -carbolina

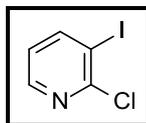
▪ **2-Cloro-3-iodopiridina (41)**

Una mezcla de HCl 5 N (13,3 mL) y 3-amino-2-cloropiridina (1,50 g; 11,6 mmol) se enfría a -5 °C y se le adiciona, gota a gota, una disolución de NaNO₂ (1,19 g; 17,2 mmol) en agua (5,1 mL). Después de 10 minutos de reacción, se le añade una disolución de KI (4,23 g; 25,5 mmol) en agua (5,1 mL). Finalizada la adición, se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente y se le añade AcOEt (25 mL). Se ajusta el pH de la fase acuosa a 11 adicionando NaOH 6 N, y posteriormente se separan las fases. La fase orgánica se lava con una disolución de Na₂S₂O₃ (0,3 M), se seca sobre MgSO₄ anhidro y se elimina el disolvente a vacío. El residuo obtenido se redissuelve en DMF (8 mL), adicionándole seguidamente agua (22 mL) gota a gota. Se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y se filtra. El

²⁵³ Molina, A.; Vaquero, J. J.; Garcia-Navio, J. L. Alvarez-Builla, J.; de Pascual-Teresa, B.; Gago, F.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5587-5599.

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

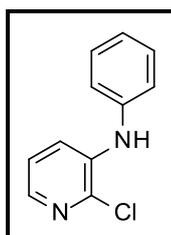
precipitado obtenido se lava con agua (2 x 8 mL) y se seca a vacío. Se obtienen 2,53 g (91%) de **41** como un sólido blanco.



Rendimiento: 91%. **P.f.:** 92-93 °C (*Lit*²⁶⁴: 92-94 °C). **¹H-RMN (200 MHz, DMSO-*d*₆)** δ : 8,38 (m, 2H); 7,17 (t_{ap}, 1H, *J* = 4,7 Hz) ppm.

▪ 2-cloro-*N*-fenilpiridin-3-amina²⁶⁴ (**42**)

A una suspensión de 2-cloro-3-iodopiridina **41** (2,53 g; 10,6 mmol) en tolueno (26,2 mL) se le añade secuencialmente Pd(OAc)₂ (72,8 mg; 0,31 mmol), rac-BINAP (20,4 mg; 0,31 mmol), CsCO₃ (17,4 g; 53,0 mmol), anilina (93,8 mg; 10,0 mmol) y NEt₃ (64,6 mg; 0,63 mmol). La mezcla resultante se desgasifica realizando 2 ciclos de vacío/N₂ y se calienta a reflujo hasta desaparición de los productos de partida. Pasadas 18 horas, el crudo de reacción se enfría hasta temperatura ambiente y se le añade agua (25 mL). Se separan las fases y la fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (4:1). Se obtienen 1,54 g (71%) de **42** como un aceite.

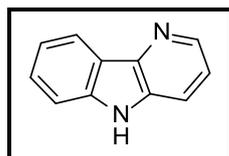


Rendimiento: 71%. **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 7,84 (dd, 1H, *J* = 4,4 Hz, *J* = 1,4 Hz); 7,48 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz); 7,32 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz); 7,16-7,05 (m, 4H); 6,14 (Sancho, 1H) ppm.

²⁶⁴ Kuethe, J. T.; Wong, A.; Davies, I. W. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7752-7754.

▪ **5H-pirido[3,2-*b*]indol²⁶⁵ (20)**

A una mezcla de 2-cloro-*N*-fenilpiridin-3-amina **42** (0,34 g; 1,69 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (95,1 mg; 0,13 mmol) y NaOAc·3H₂O (0,56 g; 4,15 mmol) se le pasa una corriente de argón durante un minuto. A continuación, se adiciona DMA (3 mL) y la mezcla resultante se calienta a 140 °C durante 17 horas. Finalizado ese tiempo, se elimina el disolvente y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla CH₂Cl₂/AcOEt (9:1) y posteriormente se recristaliza en tolueno. De esta manera, se obtienen 0,13 g (48%) de **20** como agujas.



Rendimiento: 48%. **P.f.:** 204-205 °C (*Lit*²⁶²: 206 °C). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆)**
δ: 11,4 (*S*_{ancho}, 1H, NH); 8,43 (d, 1H, *J* = 4,6 Hz, H-2); 8,16 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-9); 7,86 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-4); 7,51 (m, 2H, H-6, H-7); 7,37 (dd, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 7,9 Hz, *J* = 4,6 Hz, H-3); 7,23 (t, 1H, *J* = 6,9 Hz, H-8) ppm.

3.3.3. Preparación de ácidos piridoindolilbutanoicos

3.3.3.1. Alquilación de carbolinas

Procedimiento general: A una disolución de la correspondiente carbolina (0,10 g; 0,59 mmol) en DMF anhidro (10 mL), enfriada a 0 °C con un baño de hielo, se le adiciona NaH (17,1 mg; 0,71 mmol), y se mantiene bajo agitación a dicha temperatura durante 1 hora. A continuación, se le adiciona 4-bromobutirato de etilo (0,11 mL; 0,71 mmol) y se agita a esa temperatura durante 20 minutos más. Pasado ese tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y se agita durante el tiempo indicado en cada caso. Por último, se para la reacción por adición de agua (5 mL) a la

²⁶⁵ Franck, P.; Hostyn, S.; Dajka-Halász, B.; Polonka-Bálint, Á.; Monsieurs, K.; Mátyus, P.; Maes, B. U. W. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6030-6037.

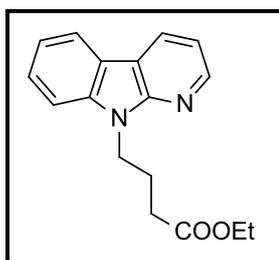
²⁶² Rocca, P.; Marsais, F.; Godard, A.; Queguiner, G. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 49-64.

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

misma. La mezcla de reacción se añade sobre una mezcla agua/hielo (20 mL) y se extrae con AcOEt (5 x 20 mL). Se reúnen los extractos orgánicos y se lavan con una disolución saturada de NaCl (3 x 20 mL), se secan sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con la mezcla de disolventes indicados en cada caso.

▪ 4-(9*H*-pirido[2,3-*b*]indol-9-il)butanoato de etilo (43)

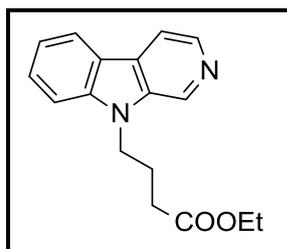
Siguiendo el procedimiento general, a partir de la α -carbolina **17** (0,10 g; 0,59 mmol), agitando la mezcla de reacción durante 4 horas, purificando por cromatografía y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (2:1), se obtienen 0,10 g (60%) de **43** como un aceite incoloro.



Rendimiento: 60%. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ : 8,21 (dd, 1H, $J = 5,1$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-2); 8,02 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-4); 7,79 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-5); 7,25 (m, 2H, H-7, H-8); 7,04 – 6,96 (m, 1H, H-6); 6,87 (c, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 5,1$ Hz, H-3); 4,27 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, NCH₂); 3,83 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, COOCH₂); 2,14–1,94 (m, 4H, 2 CH₂); 0,95 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃) ppm. ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ : 172,4; 150,9; 145,4; 138,9; 127,5; 126,2; 120,5; 119,9; 119,3; 115,3; 114,5; 108,8; 59,9; 40,1; 30,9; 23,6; 13,7 ppm. **HRMS [APCI-TOF]:** Calculado para C₁₇H₁₉O₂N₂: [M+H]⁺: 283,1447; encontrado [M+H]⁺: 283,1446.

▪ 4-(9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)butanoato de etilo (44)

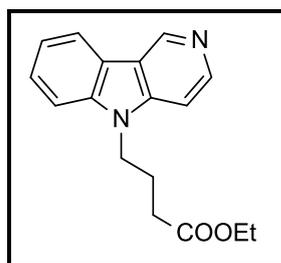
Siguiendo el procedimiento general, a partir de norharmano **18** (0,10 g; 0,59 mmol), agitando la mezcla de reacción durante 2,5 horas, purificando por cromatografía y eluyendo con AcOEt, se obtienen 0,10 g (60%) de **44** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 60%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 2926,1; 2047,2; 1727,7; 1636,5; 1536,6; 1504,9; 1456,2; 1374,2; 1216,2; 1114,9; 817,1; 755,9; 665,9 cm^{-1} . **^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ :** 8,86 (s, 1H, H-1); 8,44 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz, H-3); 8,09 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-5); 7,89 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz, H-4); 7,55 (t_{ap} , 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 0,8$ Hz, H-7); 7,44 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-8); 7,24 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 7,2$ Hz, H-6); 4,40 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, NCH_2); 4,08 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 2,24 (m, 4H, 2 CH_2); 1,20 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3) ppm. **^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ :** 172,4; 140,9; 138,9; 136,2; 131,8; 128,3; 128,2; 121,7; 120,9; 119,5; 114,4; 109,3; 60,5; 42,1; 30,9; 24,0; 14,1 ppm. **HRMS [APCI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 283,1447; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 283,1424.

▪ **4-(5H-pirido[4,3-b]indol-9-il)butanoato de etilo (45)**

Según se describe en el procedimiento general, a partir de la γ -carbolina **19** (0,10 g; 0,59 mmol), agitando la mezcla de reacción durante 4 horas, purificando por cromatografía y empleando como mezcla de eluyentes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9,5:0,5), se obtienen 68,2 mg (40%) de **45** como un aceite amarillo.



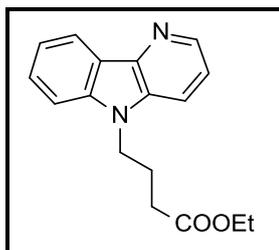
Rendimiento: 40%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 2936,0; 1730,8; 1624,7; 1591,2; 1565,9; 1495,9; 1472,7; 1376,2; 1350,5; 1218,6; 1176,0; 1128,9; 1073,3; 1030,6; 994,7; 808,2; 751,2 cm^{-1} . **^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ :** 9,05 (s, 1H, H-1); 8,29 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-3); 7,89 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-9); 7,25 (m, 2H, H-4, H-6); 7,06 (m, 2H, H-7, H-8); 4,10 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, N-CH_2); 3,88 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 2,07 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz, CH_2 -

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

COOEt); 1,93 (q, 2H, $J = 6,6$ Hz, CH₂); 0,99 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃) ppm. ¹³C- RMN (50 MHz, CDCl₃) δ : 172,5; 144,8; 144,3; 142,6; 140,0; 126,7; 121,3; 120,6; 120,4; 119,5; 109,0; 103,9; 60,6; 41,9; 30,7; 23,7; 14,1 ppm. HRMS [APCI-TOF]: Calculado para C₁₇H₁₉N₂O₂: [M+H]⁺: 283,1447; encontrado [M+H]⁺: 283,1453.

▪ 4-(5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)butanoato de etilo (46)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de la δ -carbolina **20** (0,10 g; 0,59 mmol), manteniendo agitación durante 3 horas, purificando por cromatografía y eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (9,5:0,5), se obtienen 84,0 mg (50%) de **46** como un aceite amarillo.



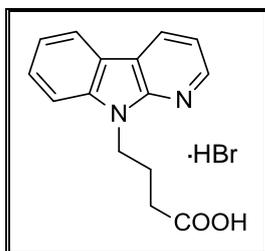
Rendimiento: 50%. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 8,47 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-2); 8,32 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-9); 7,61 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-4); 7,46 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 6,9$ Hz, H-7); 7,36 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6); 7,24 (m, 2H, H-3, H-8); 4,26 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, NCH₂); 4,03 (c, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH₂); 2,23 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, CH₂COOEt); 2,08 (q, 2H, $J = 6,6$ Hz, CH₂); 1,15 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH₃) ppm. ¹³C- RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 172,6; 141,5; 141,3; 140,9; 133,6; 127,7; 121,8; 120,8; 119,8 (2C); 115,5; 108,8; 60,5; 41,7; 30,8; 23,8; 14,1 ppm. HRMS [APCI-TOF]: Calculado para C₁₇H₁₉N₂O₂: [M]⁺: 283,1447; encontrado [M]⁺: 283,1444.

3.3.3.2. Reacción de hidrólisis

Procedimiento general: Una disolución del correspondiente piridoindolilbutanoato de alquilo (84 mg; 0,29 mmol) en HBr (48%; 0,74 mL; 6,58 mmol) se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso hasta desaparición del sustrato de partida monitorizado por $^1\text{H-RMN}$. Posteriormente, la mezcla de reacción se deja enfriar y se concentra hasta sequedad. El crudo de reacción se tritura en éter. El precipitado obtenido se filtra y se lava con éter frío.

▪ **Bromohidrato del ácido 4-(9H-pirido[2,3-b]indol-9-il)butanoico (30)**

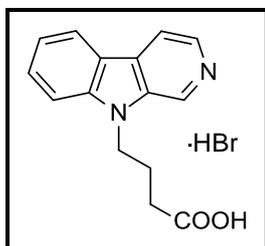
Seguendo el procedimiento general, a partir de **43** (98,8 mg; 0,35 mmol) y tras 2 horas de reacción, se obtienen 81,8 mg (70%) de **30** como un sólido rojizo.



Rendimiento: 70%. **P.f.:** 294-295 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3390,5; 1622,0; 1442,9; 1342,5; 1235,2; 759,8 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) δ :** 8,97 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-4); 8,45 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-2); 8,26 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-5); 7,77 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-8); 7,67 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, H-7); 7,54 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-3); 7,44 (t_{ap} , 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,3$ Hz, H-6); 4,48 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, NCH_2); 2,34 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz, CH_2COOH); 2,08 (q, 2H, $J = 6,7$ Hz, CH_2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CD_3OD) δ :** 172,5; 144,8; 143,8; 139,3; 137,0; 129,6; 123,6; 122,6; 119,1; 117,5; 116,3; 112,0; 44,1; 32,4; 24,8 ppm. **HRMS [APCI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 255,1134; encontrado $[\text{M}]^+$: 255,1143.

▪ **Bromohidrato del ácido 4-(9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)butanoico (31)**

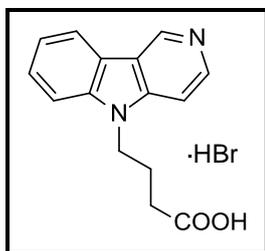
Según se describe en el procedimiento general, a partir de **44** (0,10 g; 0,35 mmol) y tras 2 horas de reacción se obtienen 81,2 mg (68%) de **31** como un sólido verde.



Rendimiento: 68%. **P.f.:** 254-256 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 2787,1; 1682,1; 1636,6; 1505,1; 1456,2; 1388,8; 1340,0; 1246,9; 1155,4; 1073,8; 817,2; 773,2; 761,4; 474,4 cm^{-1} . **^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) δ :** 8,43 (s, 1H); 8,77 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz); 8,53 (t_{ap} , 2H, $J = 9,3$ Hz, $J = 7,2$ Hz); 7,93 (m, 2H); 7,55 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 2,5$ Hz); 4,73 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz); 2,94 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 2,26 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz) ppm. **^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) δ :** 176,2; 145,8; 136,9; 135,6; 133,6; 130,2; 126,0; 124,7; 123,3; 120,9; 118,5; 112,1; 44,2; 31,4; 25,1 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 255,1134; encontrado $[\text{M}]^+$: 255,1114.

▪ **Bromohidrato del ácido 4-(5H-pirido[4,3-b]indol-5-il)butanoico (32)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **45** (68,2 mg; 0,24 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 2,5 horas, se obtienen 58,1 mg (72%) de **32** como un sólido marrón.

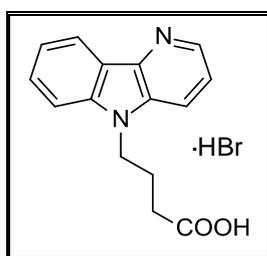


Rendimiento: 72%. **P.f.:** 272-273 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3440,1; 2908,4; 1726,8; 1644,4; 1599,2; 1508,6; 1462,6; 1390,1; 1225,4; 1174,2; 808,1; 755,8; 568,5; 529,2; 426,2 cm^{-1} .

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12,2 (*s*_{ancho}, 1H, COOH); 9,81 (*s*, 1H, H-1); 8,78 (*d*, 1H, *J* = 6,8 Hz, H-3); 8,50 (*d*, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-9); 8,25 (*d*, 1H, *J* = 6,8 Hz, H-4); 7,96 (*d*, 1H, *J* = 8,3 Hz, H-6); 7,76 (*t*, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-7); 7,53 (*t*_{ap}, 1H, *J* = 7,8 Hz, *J* = 7,3 Hz, H-8); 4,63 (*t*, 2H, *J* = 7,3 Hz, NCH₂); 2,34 (*t*, 2H, *J* = 7,3 Hz, CH₂COOH); 2,03 (*q*, 2H, *J* = 7,3 Hz, CH₂) ppm. **¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆)** δ : 173,2; 145,9; 140,9; 134,8; 134,5; 128,9; 122,3; 121,8; 119,8; 118,8; 110,9; 106,2; 42,1; 30,0; 23,2 ppm. **HRMS [APCI-TOF]**: Calculado para C₁₅H₁₅N₂O₂: [M]⁺: 255,1134; encontrado [M]⁺: 255,1138.

▪ **Bromohidrato del ácido 4-(5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)butanoico (33)**

Tal y como se describe en el procedimiento general, partiendo de **46** (84 mg; 0,29 mmol) y tras 3 horas de reacción, se obtienen 84,5 mg (85%) de **33** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 85%. **P.f.:** 200-201 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3376,8; 2607,7; 1707,6; 1643,4; 1607,0; 1527,5; 1457,7; 1419,4; 1367,4; 1327,5; 1240,1; 1156,2; 1050,9; 792,1; 757,5; 718,7; 615,8; 417,5 cm⁻¹. **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)** δ : 8,90 (*dd*, 1H, *J* = 8,6 Hz, *J* = 0,9 Hz, H-9); 8,75 (*dd*, 1H, *J* = 5,6 Hz, *J* = 0,9 Hz, H-2); 8,46 (*dd*, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 0,9 Hz, H-4); 8,07 (*dd*, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 5,8 Hz, H-3); 7,97 (*d*, 1H, *J* = 8,6 Hz, H-6); 7,93 (*td*, 1H, *J* = 8,6 Hz, *J* = 6,9 Hz, H-7); 7,56 (*td*, 1H, *J* = 6,9 Hz, *J* = 0,9 Hz, H-8); 4,72 (*t*, 2H, *J* = 7,4 Hz, NCH₂); 2,48 (*t*, 2H, *J* = 6,7 Hz, CH₂COOH); 2,22 (*q*, 2H, *J* = 7,4 Hz, *J* = 6,7 Hz, CH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD)** δ : 176,1; 144,1; 137,7; 133,3 (2C); 133,2; 127,1; 123,3; 123,1; 122,1; 115,4; 112,4; 43,8; 31,3; 25,0 ppm. **HRMS [ESI-TOF]**: Calculado para C₁₅H₁₅N₂O₂: [M]⁺: 255,1134; encontrado [M]⁺: 255,1133.

3.3.4. Reacción de alquilación en el nitrógeno piridínico de las distintas carbolinas.

3.3.4.1. Reacción de alquilación

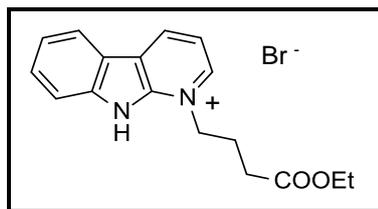
Procedimiento general A: A una disolución de la correspondiente carbolina (0,15 g; 0,93 mmol) en tolueno seco (5 mL) se le adiciona el agente alquilante (3,72 mmol) y se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizado dicho tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente, y el precipitado formado se filtra y se lava con tolueno frío. Por último, se realiza la purificación del mismo por cromatografía sobre gel de sílice o por recristalización empleando el disolvente indicado en cada caso.

Procedimiento general B: A una disolución de la correspondiente carbolina (0,10 g; 0,64 mmol) en tolueno seco (4 mL) se le adiciona el agente alquilante (2,56 mmol) y se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizado ese tiempo, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente, y el precipitado existente en el crudo de reacción se filtra y se lava con tolueno frío.

Procedimiento general C: A una disolución de la correspondiente carbolina (56,3 mg; 0,33 mmol) en tolueno seco (2,2 mL) se le adiciona el correspondiente agente alquilante (1,32 mmol) y se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Pasado ese tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en gel de sílice empleando la mezcla de eluyentes indicado en cada caso.

▪ Bromuro de 1-(3-etoxicarbonilpropil)-9*H*-pirido[2,3-*b*]indol-1-inio (**47**)

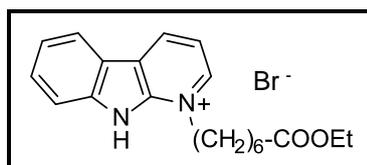
Siguiendo el procedimiento general A, a partir de α -carbolina **17** (78,3 mg; 0,46 mmol) y 4-bromobutirato de etilo (0,28 mL; 1,86 mmol), manteniendo calefacción durante 21 horas, purificando y eluyendo con AcOEt/EtOH (9:1), se obtienen 0,10 g (63%) de **47** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 63%. **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)** δ : 8,55 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 0,9$ Hz, H-4); 8,11 (m, 2H, H-2, H-5); 7,69 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-8); 7,52 (td, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 0,9$ Hz, H-7); 7,23 (t_{ap}, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,2$ Hz, H-6); 7,03 (t_{ap}, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 6,5$ Hz, H-3); 4,70 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, NCH₂); 4,06 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, COOCH₂); 2,49 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz, CH₂COO); 2,35 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH₂); 1,19 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD)** δ : 174,1; 153,4; 153,3; 135,4; 131,2; 129,0; 127,7; 123,9; 121,9; 120,4; 117,8; 109,5; 61,7; 53,6; 31,8; 25,5; 14,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₇H₁₉N₂O₂: [M]⁺: 283,1447; encontrado [M]⁺: 283,1442.

▪ **Bromuro de 1-(6-etoxicarbonilhexil)-9H-pirido[2,3-*b*]indol-1-inio (55)**

Siguiendo el procedimiento general A, a partir de α -carbolina **17** (0,20 g; 1,19 mmol) y 7-bromoheptanoato de etilo (0,95 mL; 4,76 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 24 horas, purificando y empleando como mezcla de eluyentes AcOEt/EtOH (8,5:1,5), se obtienen 0,26 g (55%) de **55** como un sólido amarillo.



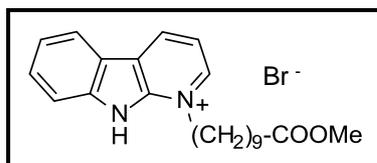
Rendimiento: 55%. **P.f.:** 97-98 °C. **IR (KBr)** $\nu_{\text{máx}}$: 2935,0; 2859,1; 1730,7; 1635,6; 1608,0; 1555,6; 1493,4; 1464,3; 1438,2; 1350,8; 1302,3; 1269,2; 1195,9; 1110,1; 1044,3; 761,6 cm⁻¹. **¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD)** δ : 8,53 (dd, 1H, $J = 7,1$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-4); 8,11 (dt, 1H, $J = 7,8$ Hz, $J = 0,9$ Hz, H-5); 8,08 (dd, 1H, $J = 6,5$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-2); 7,70 (dd, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 0,7$ Hz, H-8); 7,59 (td, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 5,9$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-6); 7,21 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-7); 7,01 (t_{ap}, 1H, $J = 6,5$ Hz, H-3); 4,64 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, NCH₂); 4,09 (c, 2H, $J = 7,1$ Hz, COOCH₂); 2,29 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH₂-2); 2,04 (q, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH₂-3); 1,62 (q,

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

2H, $J = 7,5$ Hz, CH₂-4); 1,43 (m, 4H, 2 CH₂-5,6); 1,23 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH₃) ppm. ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ : 175,4; 153,5; 153,4; 135,4; 131,0; 128,9; 127,6; 123,9; 121,9; 120,3; 117,8; 109,4; 61,4; 54,3; 34,8; 30,2; 29,7; 27,2; 25,8; 14,5 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₂₀H₂₅N₂O₂: [M]⁺: 325,1911; encontrado [M]⁺: 325,1904.

▪ Bromuro de 1-(9-etoxicarbonilnonil)-9H-pirido[2,3-*b*]indol-1-inio (56)

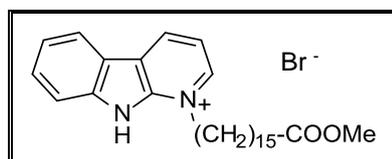
Tal y como se describe en el procedimiento general A, a partir de α -carbolina **17** (0,15 g; 0,93 mmol), 10-bromodecanoato de metilo (0,96 mL; 3,72 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 50 horas, purificando y eluyendo con AcOEt/MeOH (8,5:1,5), se obtienen 0,25 g (62%) de **56** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 62%. IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$: 2927,2; 2854,5; 1735,5; 1636,1; 1610,4; 1492,3; 1463,8; 1437,7; 1351,8; 1302,4; 1269,0; 1197,3; 1110,2; 1046,9; 761,4 cm⁻¹. ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ : 8,60 (dd, 1H, $J = 7,3$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-4); 8,15 (dd, 1H, $J = 6,6$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-2); 8,13 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-5); 7,70 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-8); 7,53 (td, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-7); 7,25 (td, 1H, $J = 7,8$ Hz, $J = 0,8$ Hz, H-6); 7,10 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-3); 4,65 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, NCH₂); 3,65 (s, 3H, CH₃); 3,51 (c, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH₂); 2,28 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂); 2,04 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂); 1,57 (q, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH₂); 1,44 (q, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂); 1,36 (q, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH₂); 1,28 (m, 2H, CH₂); 1,20 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH₂) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ : 175,9; 152,3; 151,7; 135,8; 131,7; 129,2; 127,2; 123,5; 122,0; 120,8; 117,2; 110,4; 66,9; 54,7; 51,9; 34,7; 30,3; 30,1; 30,0; 27,5; 25,9; 15,4 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₂₂H₂₉N₂O₂: [M]⁺: 353,2224; encontrado [M]⁺: 353,2224.

▪ **Bromuro de 1-(15-metoxicarbonilpentadecil)-9H-pirido[2,3-b]indol-1-inio (57)**

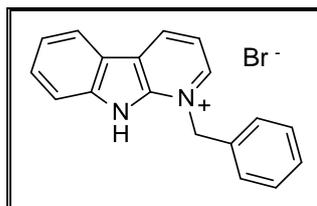
Seguendo el procedimiento general A, a partir de α -carbolina **17** (0,16 g; 0,95 mmol) y 16-bromohexadecanoato de metilo (1,37 g; 3,82 mmol), manteniendo calefacción durante 66 horas, purificando y empleando como eluyentes una mezcla AcOEt/MeOH (8,5:1,5), se obtienen 0,19 g (40%) de **57** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 40%. **P.f.:** 100-102 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3448,3; 2917,5; 2849,0; 1732,5; 1561,1; 1491,7; 1434,8; 1353,6; 1238,3; 1196,8; 1107,6; 1045,9; 748,0 cm⁻¹. **¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ :** 8,78 (d, 1H, J = 7,3 Hz, H-4); 8,34 (d, 1H, J = 6,3 Hz, H-2); 8,22 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H-5); 7,74 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H-8); 7,61 (dd, 1H, J = 8,3 Hz, J = 7,3 Hz, J = 0,9 Hz, H-7); 7,36 (t, 1H, J = 7,8 Hz, J = 7,3 Hz, H-6); 7,32 (t, 1H, J = 6,9 Hz, H-3); 4,72 (t, 2H, J = 7,6 Hz, NCH₂); 3,67 (s, 3H, CH₃); 3,52 (c, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂); 2,33 (t, 2H, J = 7,4 Hz, CH₂); 1,61 (q, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂); 1,47 (q, 2H, J = 7,8 Hz, CH₂); 1,42-1,39 (m, 4H, 2 CH₂); 1,31-1,28 (m, 12H, 6 CH₂); 1,22-1,19 (m, 4H, 2 CH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ :** 176,0; 165,7; 163,7; 136,8; 133,3; 129,9; 126,5; 122,8; 122,4; 122,0; 116,1; 112,6; 66,9; 55,5; 51,9; 34,8; 30,7 (2C); 30,6 (2C); 30,5; 30,3; 30,2; 30,2; 30,1; 27,5; 25,9; 15,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₂₈H₄₁N₂O₂: [M]⁺: 437,3163; encontrado [M]⁺: 437,3162.

▪ **Bromuro de 1-bencil-9H-pirido[2,3-b]indol-1-inio (59)**

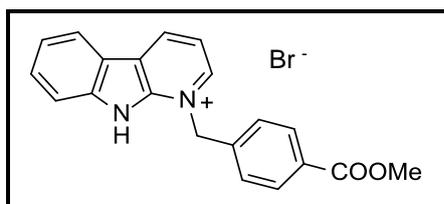
Según se indica en el procedimiento general A, a partir de α -carbolina **17** (0,20 g; 1,19 mmol) y bromuro de bencilo (0,57 mL; 4,76 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 24 horas, purificando y empleando como mezcla de eluyentes AcOEt/MeOH (8,5:1,5), se obtienen 0,30 g (69%) de **59** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 69%. **P.f.:** 102-103 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3431,0; 3012,7; 2918,7; 2359,2; 1632,6; 1608,5; 1552,5; 1488,4; 1462,7; 1345,9; 1302,2; 1269,1; 1235,7; 1193,7; 1149,9; 1161,5; 1107,8; 897,9; 839,5; 761,5; 714,6 cm^{-1} . **^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) δ :** 8,63 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 0,8$ Hz); 8,15 (m, 2H); 7,71 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz); 7,54 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,37 (m, 5H); 7,27 (td, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 6,8$ Hz, $J = 0,8$ Hz); 7,10 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz); 5,92 (s, 2H) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ :** 153,1; 152,3; 136,7; 135,4; 131,7; 130,0 (2C); 129,4; 129,2; 128,9 (2C); 127,7; 123,8; 122,1; 120,9; 117,4; 110,3; 56,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_2$: $[\text{M}]^+$: 259,1230; encontrado $[\text{M}]^+$: 259,1245.

▪ **Bromuro de 1-(4-metoxicarbonilbencil)-9H-pirido[2,3-b]indol-1-inio (58)**

Seguendo el procedimiento general A, a partir de α -carbolina **17** (0,15 g; 0,89 mmol) y 4-(bromometil)benzoato de metilo (0,83 g; 3,57 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 48 horas, purificando y eluyendo con AcOEt/MeOH (8,5:1,5), se obtienen 0,34 g (97%) de **58** como un sólido amarillo.

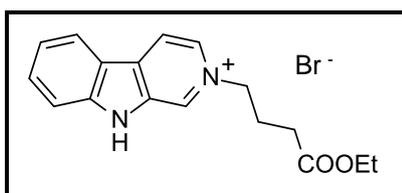


Rendimiento: 97%. **P.f.:** 158-159 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3408,5; 1719,2; 1637,4; 1615,1; 1556,5; 1498,8; 1430,6; 1343,5; 1287,4; 1187,4; 1112,3; 1043,7; 835,7; 766,7; 747,2; 567,9 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ :** 8,63 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,16 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz); 8,01 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz); 7,68 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,52 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,43 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz); 7,26 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz); 7,09 (t, 1H, $J = 6,9\text{Hz}$); 5,99 (s, 2H); 3,89 (s, 3H) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ :** 167,9; 153,4; 142,4; 135,4; 131,4; 131,2; 131,0 (2C); 129,2; 128,6 (2C); 128,2; 124,1; 122,0; 120,7; 117,8; 111,4; 109,8;

56,1; 52,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $C_{20}H_{17}N_2O_2$: $[M]^+$: 317,1285; encontrado $[M]^+$: 317,1280.

▪ **Bromuro de 2-(3-etoxicarbonilpropil)-9H-pirido[3,4-b]indol-2-inio (48)**

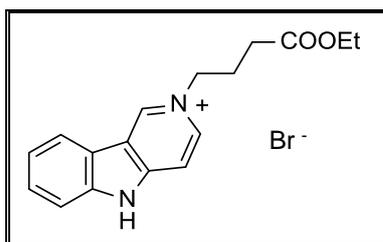
Según se indica en el procedimiento general A, a partir de norharmano **18** (98,6 mg; 0,58 mmol) y 4-bromobutirato de etilo (0,35 mL; 2,34 mmol), manteniendo calefacción durante 17 horas, recristalizando y empleando como disolvente tolueno, se obtienen 0,17 g (81%) de **48** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 81%. **P.f.:** 168-170 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 2999,5; 2282,1; 1730,5; 1645,5; 1518,7; 1499,0; 1476,6; 1337,1; 1254,5; 1187,8; 1019,5; 846,7; 733,9; 637,3; 427,4 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,31 (s, 1H, H-1); 8,70 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-4); 8,61 (dd, 1H, $J = 6,6$ Hz, $J = 0,8$ Hz, H-3); 8,43 (dd, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 0,8$ Hz, H-8); 7,82 (m, 2H, H-5, H-6); 7,49 (td, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-7); 4,85 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, NCH_2); 4,10 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, COOCH_2); 2,56 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2COO); 2,42 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2); 1,24 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 173,8; 145,9; 136,8; 134,6; 133,6; 133,5; 130,2; 124,3; 123,2; 120,8; 118,9; 113,9; 61,8; 61,7; 31,3; 27,9; 14,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $C_{17}H_{19}N_2O_2$: $[M]^+$: 283,1447; encontrado $[M]^+$: 283,1452.

▪ **Bromuro de 2-(3-etoxicarbonilpropil)-5H-pirido[4,3-b]indol-2-inio (49)**

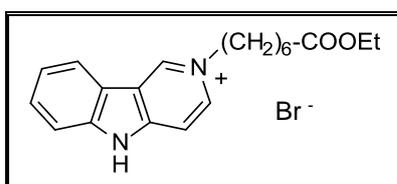
Siguiendo el procedimiento general B, a partir de γ -carbolina **19** (0,10 g; 0,64 mmol) y 4-bromobutirato de etilo (0,39 mL; 2,56 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 17 horas, se obtienen 0,17 g (73%) de **49** como un sólido marrón.



Rendimiento: 73%. **IR (NaCl)** $\nu_{\text{máx}}$: 2929,1; 1728,4; 1591,9; 1496,8; 1472,5; 1376,6; 1350,9; 1217,4; 1175,2; 1129,1; 1073,3; 1031,1; 996,1; 808,6; 751,2; 666,2 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD)** δ : 9,31 (s, 1H, H-1); 8,48 (m, 1H, H-4); 8,28 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-9); 7,71 (m, 2H, H-6, H-7); 7,63 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-3); 7,41 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 6,9$ Hz, H-8); 4,54 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, NCH_2); 4,06 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, COOCH_2); 2,43 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH_2COO); 2,23 (q, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH_2); 1,21 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3) ppm. **^{13}C -RMN (75MHz, CD_3OD)** δ : 174,4; 146,5; 143,3; 142,1; 141,5; 132,4; 129,8; 128,8; 122,4; 122,0; 111,1; 106,3; 61,6; 43,2; 31,7; 24,8; 14,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 283,1441; encontrado $[\text{M}]^+$: 283,1431.

▪ **Bromuro de 2-(6-etoxicarbonilhexil)-5H-pirido[4,3-*b*]indol-2-inio (64)**

Siguiendo el procedimiento general C, a partir de γ -carbolina **19** (56,3 mg; 0,33 mmol) y 7-bromoheptanoato de etilo (0,27 mL; 1,34 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 21 horas, purificando y eluyendo con una mezcla AcOEt/EtOH (8,5:1,5), se obtienen 55,9 mg (42%) de **64** como un aceite incoloro.

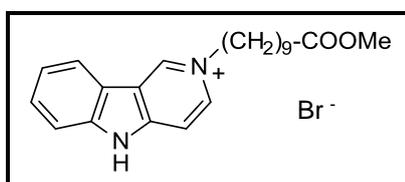


Rendimiento: 42%. **IR (NaCl)** $\nu_{\text{máx}}$: 3437,8; 2929,6; 2360,4; 1710,9; 1646,9; 1613,9; 1501,3; 1455,6; 1373,4; 1345,9; 1240,6; 1206,9; 1164,5; 1024,7; 940,8; 831,3; 751,4; 736,5; 606,1; 421,5 cm^{-1} . **^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD)** δ : 9,75 (d, 1H, $J = 0,9$ Hz, H-1); 8,63 (dd, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-3); 8,35 (dd, 1H, $J = 7,1$ Hz, $J = 0,9$ Hz, H-9); 7,92 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-4); 7,72 (dd, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 0,9$ Hz, H-6); 7,67 (dt, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 6,9$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-7); 7,46 (td, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 7,1$ Hz, $J =$

0,9 Hz, H-8); 4,65 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, NCH_2); 4,06 (c, 2H, $J = 7,1$ Hz, COOCH_2); 2,29 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH_2COO); 2,07 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 1,61 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 1,41 (m, 4H, 2 CH_2); 1,19 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ : 175,5; 147,1; 143,2; 139,1; 138,7; 130,8; 123,9; 123,0; 122,4; 121,7; 113,9; 109,7; 61,4; 61,3; 34,8; 32,5; 29,4; 26,8; 25,6; 14,5 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 325,1911; encontrado $[\text{M}]^+$: 325,1952.

▪ **Bromuro de 2-(9-etoxicarbonilnonil)-5H-pirido[4,3-b]indol-2-inio (65)**

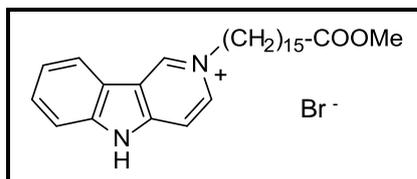
Según se describe en el procedimiento general C, a partir de γ -carbolina **19** (54,1 mg; 0,32 mmol) y 10-bromodecanoato de metilo (0,33 mL; 1,28 mmol), calentando a reflujo durante 21 horas, purificando y empleando como eluyentes una mezcla AcOEt/MeOH (8,5:1,5), se obtienen 71,7 mg (52%) de **65** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 52%. **IR (NaCl)** $\nu_{\text{máx}}$: 3422,8; 2926,3; 2851,3; 2364,4; 1730,5; 1647,6; 1611,7; 1500,0; 1437,8; 1347,4; 1212,9; 832,8; 753,3; 649,9 cm^{-1} . ^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ : 9,72 (d, 1H, $J = 0,9$ Hz, H-1); 8,61 (dd, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 1,4$ Hz, H-3); 8,36 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-9); 7,91 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-4); 7,73 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6); 7,67 (td, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 7,1$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-7); 7,46 (td, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 7,0$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-8); 4,65 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, NCH_2); 3,65 (s, 3H, CH_3); 2,29 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH_2COO); 2,08 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2); 1,56 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2); 1,41 (m, 4H, 2 CH_2); 1,28 (m, 6H, 3 CH_2) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ : 175,5; 147,1; 143,2; 139,1; 138,7; 130,8; 123,9; 123,0; 122,4; 121,7; 113,9; 109,8; 61,4; 61,3; 34,8; 32,5; 29,4 (2C); 26,8; 25,7 (2C); 14,5 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 353,2224; encontrado $[\text{M}]^+$: 353,2234.

▪ **Bromuro de 2-(15-metoxicarbonilpentadecil)-5H-pirido[4,3-*b*]indol-2-inio (66)**

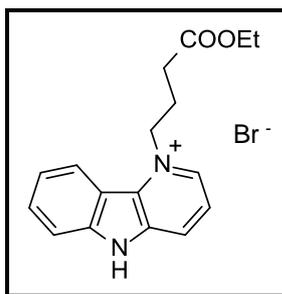
Siguiendo el procedimiento general C, a partir de γ -carbolina **19** (52,8 mg; 0,31 mmol) y 16-bromohexadecanoato de metilo (0,45 g; 1,25 mmol), calentando la mezcla de reacción durante 21 horas, purificando y eluyendo con una mezcla AcOEt/MeOH (8,5:1,5), se obtienen 95,6 mg (59%) de **66** como un sólido blanco.



Rendimiento: 59%. **P.f.:** 98-99 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3354,2; 2917,9; 2849,6; 1712,3; 1645,0; 1613,9; 1577,6; 1503,4; 1468,1; 1429,9; 1349,9; 1203,4; 754,9; 648,7; 606,9; 422,9 cm⁻¹. **¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ :** 9,75 (d, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-1); 8,66 (dd, 1H, $J = 7,0$ Hz, $J = 1,4$ Hz, H-3); 8,39 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-9); 7,97 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz, H-4); 7,78 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,74 (td, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,1$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H-7); 7,53 (td, 1H, $J = 7,1$ Hz, $J = 7,0$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-8); 4,68 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, NCH₂); 3,67 (s, 3H, CH₃); 2,33 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂COO); 2,11 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH₂); 1,61 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH₂); 1,43 (m, 4H, 2 CH₂); 1,27 (m, 18H, 9 CH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ :** 176,0; 147,2; 143,3; 139,2; 138,7; 130,9; 124,1; 122,9; 122,6; 121,7; 114,0; 109,8; 61,6; 51,9; 34,8; 32,7; 30,7 (2C); 30,6 (2C); 30,5 (2C); 30,4; 30,3; 30,1; 30,0; 27,2; 25,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₂₈H₄₁N₂O₂: [M]⁺: 437,3163, encontrado [M]⁺: 437,3286.

▪ **Bromuro de 1-(3-etoxicarbonilpropil)-5H-pirido[3,2-*b*]indol-1-inio (50)**

Según se describe en el procedimiento general A, a partir de δ -carbolina **20** (55,8 mg; 0,33 mmol) y 4-bromobutirato de etilo (0,20 mL; 1,32 mmol), calentando durante 21 horas, recristalizando y empleando como disolvente tolueno, se obtienen 60,2 mg (50%) de **50** como un sólido amarillo.



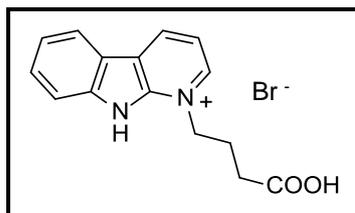
Rendimiento: 50%. **P.f.:** 205-207 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 2949,0; 1728,7; 1635,2; 1613,8; 1469,8; 1446,5; 1373,6; 1335,9; 1246,4; 1206,1; 1180,5; 1095,2; 1022,8; 864,7; 799,8; 738,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 8,80 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-2); 8,67 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-4 o H-9); 8,63 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-4 o H-9); 8,00 (t_{ap} , 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 6,2$ Hz, H-3); 7,88 (m, 2H, H-6, H-7); 7,62 (t_{ap} , 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,29 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, NCH_2); 4,15 (c, 2H, $J = 7,2$ Hz, COOCH_2); 2,70 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH_2COO); 2,49 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_2); 1,26 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CD_3OD) δ :** 173,8; 143,8; 138,0 (2C); 133,2; 132,9; 127,6; 124,5; 123,6; 122,5; 114,8; 114,3; 61,9; 59,0; 31,4; 25,6; 14,5 ppm. **HRMS [APCI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 283,1447; encontrado $[\text{M}]^+$: 283,1447.

3.3.4.2. Reacción de hidrólisis

Procedimiento general: Una disolución del correspondiente bromuro de carbolinio (88,4 mg; 0,24 mmol) en HBr (48%; 0,61 mL; 5,39 mmol) se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso hasta desaparición del sustrato de partida monitorizado por $^1\text{H-RMN}$. Posteriormente, la mezcla de reacción se deja enfriar y se concentra hasta sequedad. El crudo de reacción se tritura en éter, y el precipitado que se obtiene se filtra y se lava con éter frío.

- **Bromuro de 1-(3-carboxipropil)-9H-pirido[2,3-b]indol-1-inio (34)**

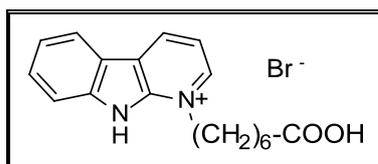
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **47** (88,4 mg; 0,24 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 3,5 horas, se obtienen 76,1 mg (93%) de **34** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 93%. **P.f.:** 290-291 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 2920,8; 1712,1; 1613,1; 1516,1; 1457,8; 1407,0; 1362,3; 1196,9; 1114,2; 1047,3; 926,9; 763,9; 681,6 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,09 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-4); 8,67 (dd, 1H, $J = 6,2$ Hz, $J = 0,6$ Hz, H-2); 8,33 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-5); 7,79-7,67 (m, 3H, H-3, H-6, H-8); 7,51 (td, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-7); 4,88 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, NCH_2); 2,63 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2COOH); 2,39 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 175,8; 145,2; 140,5; 138,9; 136,7; 131,2; 125,0; 124,3; 123,1; 121,2; 117,2; 113,7; 56,3; 31,2; 25,0 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 255,1134; encontrado $[\text{M}]^+$: 255,1129.

▪ **Bromuro de 1-(6-carboxilhexil)-9H-pirido[2,3-*b*]indol-1-inio (60)**

Según se describe en el procedimiento general, partiendo de **55** (85,5 mg; 0,21 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 3 horas, se obtienen 76,5 mg (96%) de **60** como un sólido marrón oscuro.

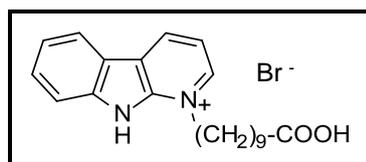


Rendimiento: 96%. **P.f.:** 120-122 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3320,7; 2950,9; 2862,21; 2361,8; 1702,2; 1613,1; 1460,4; 1374,9; 1332,3; 1261,2; 1215,9; 1193,7; 1111,4; 945,3; 779,5; 753,0; 737,5 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 13,5 (s, 1H, COOH); 12,2 (s ancho, 1H, NH); 9,19 (dd, 1H, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-4); 8,78 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-2); 8,41 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-5); 7,78 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-8); 7,72 (m, 2H, H-3, H-6); 7,50 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,1$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-7); 4,73 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, NCH_2); 2,19 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH_2COOH); 1,96 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2 -5); 1,49 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2 -4); 1,35 (m, 4H, 2 CH_2 -2,3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :** 174,9; 143,9; 139,4; 138,7; 136,2; 130,2; 123,2; 122,8; 120,2; 116,2; 114,8; 113,3;

55,7; 33,9; 28,8; 28,5; 25,9; 24,7 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $C_{18}H_{21}N_2O_2$: $[M]^+$: 297,1598; encontrado $[M]^+$: 297,1606.

▪ **Bromuro de 1-(9-carboxinonil)-9H-pirido[2,3-b]indol-1-inio (61)**

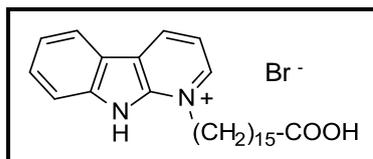
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **56** (0,11 g; 0,26 mmol), calentando a reflujo durante 2 horas, se obtienen 0,10 g (98%) de **61** como un sólido marrón claro.



Rendimiento: 98%. **P.f.:** 136-137 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3431,2; 2922,6; 1717,2; 1610,6; 1515,0; 1455,5; 1357,8; 1210,6; 1146,2; 1111,9; 1057,9; 912,5; 825,5; 761,6; 703,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ :** 13,6 (s, 1H, COOH); 11,9 (S_{ancho} , 1H, NH); 9,19 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 0,7$ Hz, H-4); 8,79 (d, 1H, $J = 6,1$ Hz, H-2); 8,41 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-5); 7,78 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-8); 7,72 (m, 2H, H-3, H-6); 7,50 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,8$ Hz, $J = 0,7$ Hz, H-7); 4,75 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, NCH₂); 2,16 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH₂COOH); 1,96 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH₂); 1,45 (q, 2H, $J = 6,8$ Hz, CH₂); 1,38-1,23 (m, 10H, 5 CH₂) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ :** 173,9; 166,1; 142,9; 138,4; 137,7; 135,2; 129,2; 122,2; 121,8; 119,2; 115,2; 112,3; 54,7; 33,1; 28,2; 28,1; 28,0; 27,9 (2C); 25,1; 23,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $C_{21}H_{27}N_2O_2$: $[M]^+$: 339,2067; encontrado $[M]^+$: 339,2074.

▪ **Bromuro de 1-(15-carboxipentadecil)-9H-pirido[2,3-b]indol-1-inio (62)**

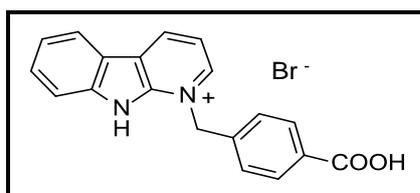
Según se describe en el procedimiento general, a partir de **57** (91,9 mg; 0,17 mmol) y calentando la mezcla de reacción a reflujo durante 2,5 horas, se obtienen 56,5 mg (63%) de **62** como un sólido crema.



Rendimiento: 63%. **P.f.:** 155-157 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3407,7; 2916,6; 2848,4; 1712,1; 1612,2; 1454,6; 1358,9; 1343,2; 1241,6; 1194,8; 1174,8; 1113,6; 800,9; 764,3; 739,7; 718,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ :** 13,6 (s, 1H, COOH); 11,9 (s_{ancho} , 1H, NH); 9,19 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-4); 8,79 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-2); 8,41 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-5); 7,78 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-8); 7,75-7,70 (m, 2H, H-3, H-6); 7,49 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 0,8$ Hz, H-7); 4,75 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, NCH₂); 2,16 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH₂COOH); 1,96 (q, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂); 1,47-1,19 (m, 22H, 11 CH₂) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ :** 174,3; 143,1; 138,7; 137,9; 135,3; 129,4; 122,4; 122,3; 121,9; 119,3; 115,4; 112,5; 55,0; 33,3; 28,63 (2C); 28,60 (2C); 28,5 (2C); 28,4; 28,3; 28,2; 28,1 (2C); 25,2; 24,1 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₂₇H₃₉N₂O₂: [M]⁺: 423,3006; encontrado [M]⁺: 423,3003.

▪ **Bromuro de 1-(4-carboxibencil)-9H-pirido[2,3-*b*]indol-1-inio (63)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **58** (98,7 mg; 0,24 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 2 horas, se obtienen 72 mg (75%) de **63** como un sólido grisáceo.

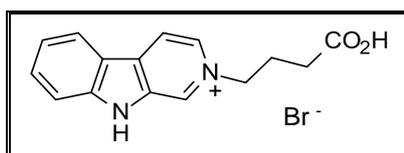


Rendimiento: 75%. **P.f.:** 320-321 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3419,0; 2968,1; 2898,3; 2813,7; 2758,3; 2675,9; 1694,6; 1609,9; 1513,3; 1455,4; 1423,0; 1319,1; 1256,4; 1193,7; 1111,0; 944,4; 875,8; 762,4; 718,9; 560,3; 541,7 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ :** 13,7 (s, 1H); 13,0 (s_{ancho} , 1H); 9,28 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz); 8,85 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz); 8,44 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz); 7,94 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 7,75 (m, 3H); 7,50 (m, 3H); 6,14 (s, 2H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ :** 166,1; 137,7; 137,5; 135,8; 130,5; 129,4 (2C); 129,3; 129,2; 127,4; 127,2 (2C); 122,7; 122,4; 121,9; 119,3; 115,6; 112,4; 56,5

ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $C_{19}H_{15}N_2O_2$: $[M]^+$: 303,1134; encontrado $[M]^+$: 303,1126.

▪ **Bromuro de 2-(3-carboxipropil)-9H-pirido[3,4-b]indol-2-inio (35)**

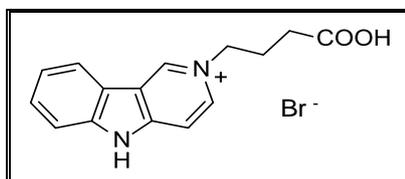
Según se describe en el procedimiento general, a partir de de **48** (66,7 mg; 0,18 mmol), calentando a reflujo durante 2 horas, se obtienen 57,0 mg (92%) de **35** como un sólido marrón.



Rendimiento: 92%. **P.f.:** 372-373 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3073,6; 1702,4; 1650,3; 1519,7; 1478,2; 1367,2; 1339,5; 1214,9; 818,7; 799,7; 751,9; 727,1; 642,1; 617,4 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ :** 9,37 (s, 1H, H-1); 8,67 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-4); 8,63 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-3); 8,44 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-5); 7,81 (m, 2H, H-7, H-8); 7,49 (td, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 6,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-6); 4,86 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, NCH_2); 2,55 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2COOH); 2,41 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ :** 175,6; 145,9; 136,8; 134,6; 133,6; 133,5; 130,3; 124,3; 123,1; 120,8; 118,9; 113,9; 61,7; 31,1; 28,0 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $C_{15}H_{15}N_2O_2$: $[M]^+$: 255,1134; encontrado $[M]^+$: 255,1134.

▪ **Bromuro de 2-(3-carboxipropil)-5H-pirido[4,3-b]indol-2-inio (36)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **49** (20,3 mg; 0,05 mmol) y calentando durante 2,5 horas, se obtienen 13,1 mg (70%) de **36** como un sólido blanco.

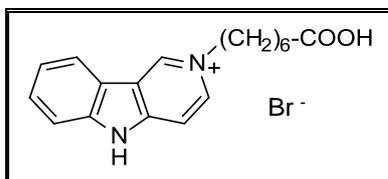


CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

Rendimiento: 70%. **P.f.:** 261-263 °C. **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ:** 9,76 (s, 1H, H-1); 8,68 (dd, 1H, *J* = 6,9 Hz, *J* = 1,3 Hz, H-3); 8,40 (dd, 1H, *J* = 7,9 Hz, *J* = 0,7 Hz, H-9); 7,98 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz, H-4); 7,80-7,72 (m, 2H, H-6, H-7); 7,54 (td, 1H, *J* = 7,9 Hz, *J* = 6,6 Hz, *J* = 1,6 Hz, H-8); 4,75 (t, 2H, *J* = 7,4 Hz, NCH₂); 2,54 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH₂COOH); 2,39 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ:** 175,7; 147,2; 143,4; 139,4; 138,9; 131,0; 124,2; 122,9; 122,6; 121,8; 113,9; 109,8; 60,7; 31,2; 27,8 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₅H₁₅N₂O₂: [M]⁺: 255,1134; encontrado [M]⁺: 255,1127.

▪ Bromuro de 2-(6-carboxihexil)-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol-2-inio (67)

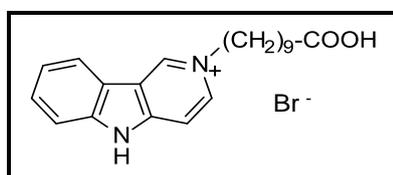
Según se describe en el procedimiento general, a partir de bromuro de **64** (44,4 mg; 0,11 mmol) y calentando durante 4 horas, se obtienen 37,8 mg (91%) de **67** como un sólido marrón oscuro.



Rendimiento: 91%. **P.f.:** 151-152 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3376,2; 2936,9; 1701,4; 1647,7; 1612,3; 1502,3; 1458,0; 1327,0; 1225,6; 820,8; 778,9; 761,6; 603,9 cm⁻¹. **¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ:** 9,72 (s, 1H, H-1); 8,64 (dd, 1H, *J* = 7,0 Hz, *J* = 1,4 Hz, H-3); 8,37 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-9); 7,94 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, H-4); 7,73 (m, 2H, H-6, H-7); 7,51 (td, 1H, *J* = 8,0 Hz, *J* = 6,8 Hz, *J* = 1,2 Hz, H-8); 4,65 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, NCH₂); 2,31 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, CH₂COOH); 2,08 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₂); 1,62 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH₂); 1,46-1,42 (m, 4H, 2 CH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ:** 177,4; 147,1; 143,1; 139,3; 138,8; 130,9; 124,1; 123,0; 122,5; 121,7; 113,9; 109,7; 61,4; 34,5; 32,5; 29,5; 26,8; 25,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₈H₂₁N₂O₂: [M]⁺: 297,1598; encontrado [M]⁺: 297,1604.

▪ **Bromuro de 2-(9-carboxinonil)-5H-pirido[4,3-b]indol-2-inio (68)**

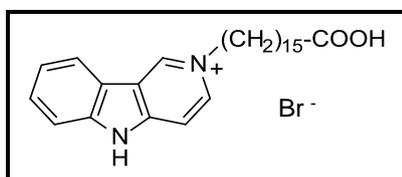
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **65** (54,9 mg; 0,12 mmol) y calentando la mezcla de reacción durante 4 horas, se obtienen 44,1 mg (83%) de **68** como un sólido marrón.



Rendimiento: 83%. **P.f.:** 183-185 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3423,4; 2923,1; 2851,9; 2360,6; 1723,6; 1648,4; 1613,8; 1501,5; 1455,5; 1395,1; 1211,7; 1165,6; 812,2; 770,9; 751,9; 603,1; 414,8 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) δ :** 9,75 (d, 1H, $J = 0,9$ Hz, H-1); 8,67 (dd, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 1,5$ Hz, H-3); 8,40 (dt, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 0,9$ Hz, H-9); 7,97 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-4); 7,77 (m, 2H, H-6, H-7); 7,55 (td, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-8); 4,68 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, NCH_2); 2,28 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH_2COOH); 2,11 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 1,59 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 1,45 (m, 4H, 2 CH_2); 1,33 (m, 6H, 3 CH_2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ :** 176,0; 147,0; 143,1; 139,3; 138,8; 130,9; 124,1; 123,0; 122,5; 121,7; 113,9; 109,7; 61,5; 34,7; 32,7; 30,2; 30,1; 30,0 (2C); 27,2; 25,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 339,2067; encontrado $[\text{M}]^+$: 339,2068.

▪ **Bromuro de 2-(15-carboxipentadecil)-5H-pirido[4,3-b]indol-2-inio (69)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **66** (74,4 mg; 0,14 mmol) y calentando durante 4 horas, se obtienen 67,6 mg (93%) de **69** como un sólido marrón.



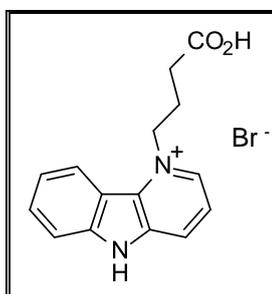
Rendimiento: 93%. **P.f.:** 189-190 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3425,5; 3064,3; 2918,4; 1723,1; 1650,2; 1614,4; 1466,9; 1455,8; 1167,0; 825,0; 744,6; 605,4; 417,4 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (500**

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

MHz, CD₃OD) δ : 9,75 (d, 1H, $J = 1,0$ Hz, H-1); 8,67 (dd, 1H, $J = 7,0$ Hz, $J = 1,6$ Hz, H-3); 8,40 (td, 1H, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-9); 7,97 (dd, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 0,5$ Hz, H-4); 7,77 (m, 2H, H-6, H-7); 7,55 (td, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 6,8$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H-8); 4,68 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, NCH₂); 2,29 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂COOH); 2,1 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH₂); 1,61 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH₂); 1,44 (m, 4H, 2 CH₂); 1,29 (m, 18H, 9 CH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD)** δ : 177,7; 147,1; 143,1; 139,3; 138,8; 131,0; 124,2; 122,9; 122,6; 121,7; 113,9; 109,7; 61,6; 34,9; 34,8; 32,7; 30,6 (2C); 30,5 (2C); 30,4; 30,3; 30,2; 30,1; 27,2; 26,1; 26,0 ppm. **HRMS [ESI-TOF]**: Calculado para C₂₇H₃₉N₂O₂: [M]⁺: 423,3006; encontrado [M]⁺: 423,3006.

▪ **Bromuro de 1-(3-carboxipropil)-5H-pirido[3,2-*b*]indol-1-inio (37)**

Según se describe en el procedimiento general, a partir de **50** (39,4 mg; 0,10 mmol), calentando durante 4 horas, purificando y eluyendo con AcOEt/MeOH (8,5:1,5) y después de MeOH, se obtienen 19,8 mg (54%) de **37** como un sólido amarillo.



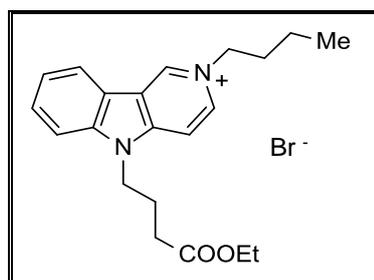
Rendimiento: 54%. **P.f.:** 141-143 °C. **IR (KBr)** $\nu_{\text{máx}}$: 3420,6; 2963,7; 1726,7; 1634,7; 1613,9; 1500,8; 1467,0; 1457,8; 1370,9; 1331,6; 1236,9; 1218,4; 1166,8; 1079,7; 1055,3; 1025,8; 797,4; 754,0; 727,3 cm⁻¹. **¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD)** δ : 8,81 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-2); 8,65 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-4 o H-9); 8,62 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-4 o H-9); 7,98 (dd, 1H, $J = 8,3$ Hz, $J = 6,1$ Hz, H-3); 7,87-7,82 (m, 2H, H-6, H-7); 7,59 (td, 1H, $J = 8,3$ Hz, $J = 6,6$ Hz, $J = 1,4$ Hz, H-8); 5,26 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, NCH₂); 2,55 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, CH₂COOH); 2,45 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂) ppm. **¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD)** δ : 178,2; 143,9; 138,1; 138,0; 133,3; 132,9; 127,5; 124,7; 123,6; 122,4; 114,3; 114,2; 59,5; 33,3; 26,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]**: Calculado para C₁₅H₁₅N₂O₂: [M]⁺: 255,1134; encontrado [M]⁺: 255,1130.

3.3.5. Reacción de alquilación en el nitrógeno piridínico e indólico del núcleo de γ -carbolina

3.3.5.1. Reacción de Alquilación

- **Bromuro de 2-butil-5-(3-etoxicarbonilpropil)-5H-pirido-[4,3-b]indol-2-inio (53)**

A una disolución de **45** (51,8 mg; 18,3 mmol) en tolueno (2 mL) se le adiciona bromuro de butilo (78 μ L; 1,27 mmol) y se calienta a reflujo durante 22,5 horas. Pasado ese tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente. El precipitado formado se filtra y se lava con tolueno frío, obteniéndose 55,4 mg (72%) de **53** como un sólido blanco.

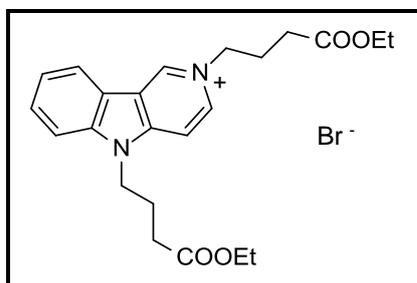


Rendimiento: 72%. **P.f.:** 199-200 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3445,9; 2954,2; 1721,8; 1644,5; 1608,2; 1504,9; 1461,7; 1378,6; 1315,0; 1243,9; 1181,7; 1153,1; 1026,4; 775,5; 752,6; 613,7; 474,0 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD) δ :** 9,78 (s, 1H, H-1); 8,75 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,3$ Hz, H-3); 8,43 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-9); 8,18 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-4); 7,95 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-6); 7,83 (td, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 0,8$ Hz, H-8); 7,59 (t_{ap} , 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 7,2$ Hz, H-7), 4,70 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 4,04 (c, 2H, $J = 7,0$ Hz, COOCH_2); 2,52 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, CH_2); 2,27 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2); 2,10 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 1,50 (sext, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH_2); 1,20 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3); 1,06 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CD_3OD) δ :** 174,2; 147,1; 143,6; 139,5; 138,5; 131,1; 124,5; 123,1; 122,2; 121,7; 112,6; 108,3; 61,7; 61,3; 44,3; 34,7; 31,6; 24,7; 20,5; 14,4; 13,9 ppm. **HRMS [APCI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$: $[\text{M}]^+$: 339,2073; encontrado $[\text{M}]^+$: 339,2087.

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

▪ Bromuro de 2,5-bis-(3-etoxicarbonilpropil)-5H-pirido[4,3-b]indol-2-inio (51)

A una disolución de γ -carbolina **19** (0,12 g; 0,74 mmol) en DMF anhidro (10 mL), enfriada con un baño de hielo, se le añade NaH (31,1 mg; 1,29 mmol), y se mantiene bajo agitación a dicha temperatura durante 40 minutos. A continuación, se le añade 4-bromobutirato de etilo (0,13 mL; 0,89 mmol) y se agita a esa temperatura durante 15 minutos más. Pasado ese tiempo, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. Se para la reacción mediante adición de agua (8 mL). La mezcla de reacción se añade sobre una mezcla agua/hielo (25 mL) y se extrae con AcOEt (5 x 25 mL). Se reúnen los extractos orgánicos y se lavan con una disolución saturada de NaCl (3 x 25 mL), se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (9,5:1,5), obteniéndose 59,2 mg (16%) de **51** como un aceite amarillo.

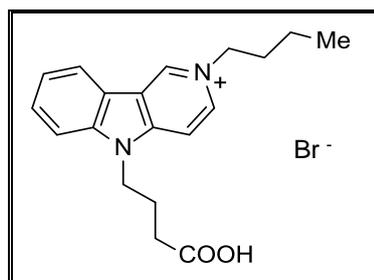


Rendimiento: 16%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 3410,2; 2937,9; 2452,7; 1727,9; 1647,7; 1611,1; 1580,9; 1519,9; 1504,6; 1459,5; 1376,3; 1351,4; 1172,1; 1029,0; 826,8; 753,4; 662,4 cm⁻¹. **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ :** 10,2 (s, 1H); 8,86 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz); 8,50 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz); 8,01 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz); 7,69 (m, 2H); 7,53 (t_{ap}, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 6,4$ Hz); 4,99 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz); 4,55 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz); 4,13 (q, 4H, $J = 7,0$ Hz); 2,54 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz); 2,45 (m, 4H); 2,21 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz); 1,25 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz); 1,23 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ :** 174,2; 173,8; 147,1; 143,5; 139,6; 138,7; 131,1; 124,6; 123,2; 122,1; 121,7; 112,6; 108,5; 61,8; 61,7; 60,6; 44,3; 31,6; 31,4 (2C); 27,8; 24,8; 14,5 ppm. **HRMS [ESITOF]:** calculado para C₂₃H₂₉N₂O₄: [M]⁺: 397,2122; encontrado [M]⁺: 397,2152.

3.3.5.2. Reacción de hidrólisis

▪ **Bromuro de 2-butil-5-(3-carboxipropil)-5H-pirido-[4,3-*b*]indol-2-inio (54)**

Una disolución de **53** (33,7 mg; 0,08 mmol) en HBr (48%; 0,20 mL; 1,78 mmol) se calienta a reflujo durante 4 horas hasta desaparición del sustrato de partida (monitorizada por ¹H-RMN). Posteriormente, la mezcla de reacción se deja enfriar y se concentra hasta sequedad. El crudo de reacción se tritura en éter y se filtra, obteniéndose 22,2 mg (66%) de **54** como un sólido blanco.



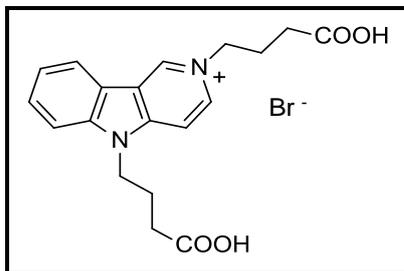
Rendimiento: 66%. **P.f.:** 95-97 °C. **IR, (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3488,5; 3057,2; 2957,8; 2929,8; 1731,0; 1645,6; 1609,8; 1577,5; 1503,8; 1459,5; 1382,4; 1347,8; 1231,6; 1175,4; 1093,8; 955,9; 898,2; 826,0; 779,4; 760,1; 610,2; 519,7 cm^{-1} . **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ :** 9,78 (s, 1H, H-1); 8,75 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,5$ Hz, H-3); 8,43 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-9); 8,18 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-4); 7,94 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-6); 7,82 (t_{ap}, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 7,2$ Hz, H-7); 7,58 (t_{ap}, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 7,2$ Hz, H-8); 4,69 (4H, m, 2 NCH₂); 2,51 (c, 2H, $J = 6,8$ Hz, CH₂COO); 2,26 (q, 2H, $J = 6,8$ Hz, CH₂-butilo); 2,10 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂-ester); 1,49 (sext, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂); 1,06 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ :** 176,0; 147,1; 143,5; 139,5; 138,5; 131,1; 124,5; 123,2; 122,2; 121,7; 112,5; 108,3; 61,4; 44,2; 34,7; 31,3; 24,8; 20,5; 13,9 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₉H₂₃N₂O₂: [M]⁺: 311,1760; encontrado [M]⁺: 311,1749.

▪ **Bromuro de 2,5-bis-(3-carboxipropil)-5H-pirido[4,3-*b*]indol-2-inio (52)**

Una disolución de **51** (0,10 g; 0,21 mmol) en HBr (48%; 1,05 mL; 9,31 mmol) se calienta a reflujo durante 4 horas hasta desaparición del sustrato de partida (analizado por ¹H-RMN). Posteriormente, la mezcla de reacción se deja enfriar y se concentra

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

hasta sequedad. El crudo de reacción se tritura en éter y se filtra, obteniéndose 64,2 mg (72%) de **52** como un sólido marrón.



Rendimiento: 72%. **P.f.:** 194-195 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3406,0; 2932,4; 1722,5; 1698,1; 1647,6; 1609,2; 1581,7; 1504,9; 1459,6; 1396,6; 1242,5; 1224,8; 1196,1; 1178,8; 1145,9; 1077,8; 915,8; 833,7; 769,5; 755,5; 606,3 cm^{-1} . **¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ :** 9,79 (d, 1H, $J = 1,0$ Hz, H-1); 8,74 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-3); 8,43 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-9); 8,19 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-4); 7,94 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-6); 7,81 (td, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-7); 7,58 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-8); 4,77 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, ⁺NCH₂); 4,68 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, NCH₂); 2,58-2,48 (4H, m, 2 CH₂COOH); 2,39 (q, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂); 2,22 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH₂) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ :** 176,1; 175,7; 147,2; 143,6; 139,6; 138,7; 131,1; 124,5; 123,3; 123,2; 121,8; 112,6; 108,4; 60,6; 44,3; 31,3; 31,2; 27,9; 24,8 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₉H₂₁N₂O₄: [M]⁺: 341,1501; encontrado [M]⁺: 341,1509.

3.3.6. Síntesis de vinilindolcarbonitrilos:

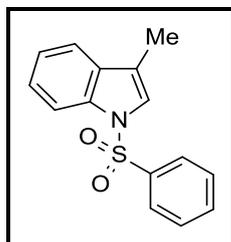
PROCEDIMIENTOS GENERALES:

3.3.6.1. Protección de metilindoles:

Procedimiento general: A una disolución constituida por el correspondiente derivado de metilindol (19,0 mmol) y cloruro de tetrabutilamonio (TBACl; 528 mg; 1,9 mmol) en tolueno (50 mL), se adiciona H₂O (50 mL) y NaOH (50%; 30 mL) y se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante unos minutos. A continuación se añade lentamente a 0 °C y con agitación, cloruro de bencenosulfonilo (5 mL; 38,0 mmol). Una vez concluida la adición, la agitación continúa durante 15 minutos más a esa temperatura. Posteriormente se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente continuando la agitación el tiempo indicado en cada caso. Transcurrido ese tiempo de reacción, se separan las fases y la fase acuosa se extrae con tolueno. Se reúnen los extractos orgánicos, se secan con MgSO₄ (anhidro), se filtra y se elimina el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se purifica por recristalización empleando etanol como disolvente o por cromatografía sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla tolueno/hexano (1:1), según se indica en cada caso.

▪ 1-Bencenosulfonil-3-metilindol (74)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 3-metilindol **73** (2,49 g; 19,0 mmol), manteniendo la agitación durante 3 horas y recristalizando, se obtienen 4,48 g (87%) de **74** como un sólido blanco.

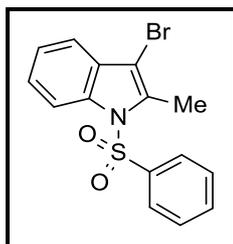


CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

Rendimiento: 87%. **P.f.:** 124-125 °C (*Lit*²⁷⁸: 126–127 °C). **¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆)** δ : 7,99 (dd, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 7,6 Hz, *J* = 0,6 Hz); 7,95 (dd, 2H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 7,0 Hz, *J* = 1,1 Hz); 7,63 (td, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,2 Hz); 7,54 (td, 2H, *J* = 7,9 Hz, *J* = 7,3 Hz, *J* = 1,0 Hz); 7,49 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz); 7,34 (t, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 7,3 Hz); 7,25 (td, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 7,3 Hz, *J* = 1,2 Hz); 2,04 (s, 3H) ppm.

▪ 1-(bencenosulfonil)-3-bromo-2-metil-indol (111)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 3-bromo-2-metilindol **113** (0,49 g; 2,34 mmol), agitando la mezcla de reacción durante 2 horas y purificando por cromatografía, se obtienen 0,78 g (95%) de **111** como un sólido rosáceo.



Rendimiento: 95%. **P.f.:** 121 -122 °C (*Lit*²⁸⁵: 120 °C). **¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆)** δ : 8,19 (dt, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,3 Hz, *J* = 1,0 Hz); 7,92 (dd, 2H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,6 Hz); 7,69 (tt, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 7,3 Hz, *J* = 1,3 Hz); 7,58 (td, 2H, *J* = 7,9 Hz, *J* = 6,9 Hz, *J* = 1,3 Hz); 7,38 (m, 3H); 2,68 (s, 3H) ppm.

3.3.6.2. Halogenación electrófila:

▪ 1-(bencenosulfonil)-2-bromo-3-metil-indol²⁷⁹ (100)

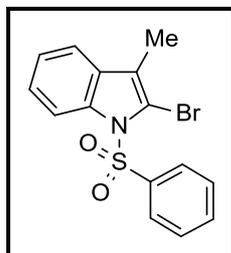
A una disolución de 1-bencenosulfonil-3-metilindol (**74**) (2,40 g; 8,87 mmol) en ácido acético (36 mL) se le adiciona una disolución de NBS (1,58 g; 8,87 mmol) en ácido acético (59 mL) bajo atmósfera inerte durante 20 minutos. A continuación, la mezcla de reacción resultante se agita a temperatura ambiente durante 4 horas.

²⁷⁸ Liu, R.; Zhang, P.; Gan, T.; Cook, J. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7447-7456.

²⁸⁵ Mohanakrishnan, A. K.; Srinivasan, P. C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2659-2662.

²⁷⁹ Hino, T.; Nakamura, T.; Nakagawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 2990-2997.

Finalizado dicho tiempo, la mezcla de reacción se lleva a un baño de agua/hielo y se neutraliza empleando una disolución de NaOH (30%). Se adiciona CH₂Cl₂ y se separan las fases. La fase orgánica se lava con H₂O, se seca sobre MgSO₄ anhidro y se evapora a presión reducida. El residuo resultante se purifica por cromatografía en gel de sílice empleando una mezcla tolueno/hexano (2:1) como eluyente. Se obtienen 1,02 g (34%) de **100** como un sólido blanco.



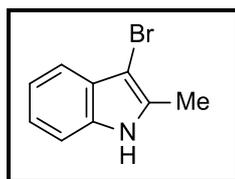
Rendimiento: 34%. **P.f.:** 127-129 °C (*Lit*²⁷⁹: 129-131 °C). **¹H-RMN (200 MHz, acetona-*d*₆)** δ : 8,25 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz); 7,89 (dd, 2H, *J* = 7,2 Hz, *J* = 1,3 Hz); 7,59 (m, 4H); 7,39 (td, 1H, *J* = 8,5 Hz, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,2 Hz); 7,30 (td, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 7,2 Hz, *J* = 1,2 Hz); 2,17 (s, 3H) ppm.

▪ **3-bromo-2-metil-1H-indol**²⁸³ (**113**)

A una disolución de 2-metilindol **108** (2,40 g; 18,0 mmol) en DMF (88 mL) se le adiciona gota a gota una disolución de Br₂ (0,93 mL; 18,0 mmol) en DMF (88 mL) a temperatura ambiente. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se vierte sobre una mezcla de agua/hielo (900 mL) que contiene bisulfito sódico (0,1%) y amoníaco (0,5%). El precipitado blanco que se obtiene se filtra, se lava con agua fría (225 mL) y se seca. El sólido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando hexano/AcOEt (4:1) como mezcla de disolventes. Se obtienen 3,46 g (92%) de **113** como un sólido blanco.

²⁷⁹ Hino, T.; Nakamura, T.; Nakagawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 2990-2997.

²⁸³ Bocchi, V.; Palla, G. *Synthesis* **1982**, 1096-1097.



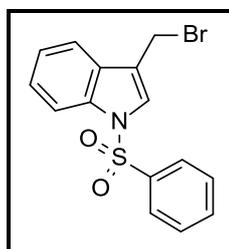
Rendimiento: 92%. **P.f.:** 90 °C (*Lit*²⁸³: 92 °C). **¹H-RMN (200 MHz, acetona-*d*₆)** δ : 10,4 (s, 1H); 7,34 (m, 2H); 7,08 (m, 2H); 2,41 (s, 3H) ppm.

3.3.6.3. Halogenación radicalica:

Procedimiento general: Una disolución del correspondiente derivado de 1-(bencenosulfonil)-metilindol (26,7 mmol) en CCl₄ seco (150 mL) se calienta a reflujo y se le adiciona peróxido de benzoilo (2,67 mmol) y NBS (26,7 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso (la reacción se sigue por ¹H-RMN hasta desaparición del producto de partida). A continuación, la mezcla resultante se deja enfriar hasta temperatura ambiente y, la suspensión obtenida se filtra, se lava con CCl₄ (50 mL) y los líquidos de filtrado se concentran hasta sequedad. Finalmente, el residuo obtenido se tritura en éter dietílico y se procede a su filtración.

▪ 1-Bencenosulfonil-3-(bromometil)indol (75)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **74** (7,24 g; 26,7 mmol) y calentando a reflujo durante 2 horas, se obtienen 6,22 g (67%) de **75** como un sólido blanco.

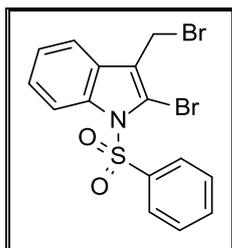


²⁸³ Bocchi, V.; Palla, G. *Synthesis* **1982**, 1096-1097.

Rendimiento: 67%. **P.f.:** 135-136 °C (*Lit*²⁷⁸: 132-134 °C). **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 7,98-7,85 (m, 4H); 7,65-7,40 (m, 4H); 7,39-7,28 (m, 2H); 4,60 (s, 2H) ppm.

▪ **1-(bencenosulfonil)-2-bromo-3-(bromometil)indol**²⁸⁶ (**101**)

Tal y como describe el procedimiento general, a partir de **100** (0,20 g; 0,58 mmol) y manteniendo calefacción durante 1 hora, se obtienen 0,22 g (90%) de **101** como un sólido blanco.



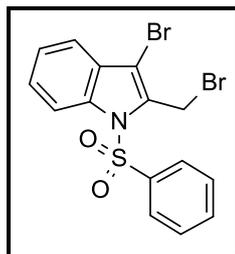
Rendimiento: 90%. **P.f.:** 102-103 °C. **¹H-RMN (200 MHz, acetona-*d*₆)** δ : 8,29 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz); 7,97 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz); 7,68 (m, 4H); 7,42 (m, 2H); 4,74 (s, 2H) ppm.

▪ **1-(bencenosulfonil)-3-bromo-2-(bromometil)indol**²⁸⁰ (**112**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **111** (0,67 g; 1,93 mmol) y calentando a reflujo durante 4 horas, se obtienen 0,77 g (93%) de **112** como un sólido blanco.

²⁷⁸ Liu, R.; Zhang, P.; Gan, T.; Cook, J. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7447-7456.

²⁸⁶ Mohanakrishnan, A. K.; Ramesh, N. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4577-1579.

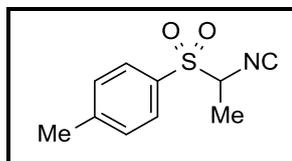


Rendimiento: 93%. **P.f.:** 104-105 °C. **¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆)** δ : 8,17 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz); 8,03 (dd, 2H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,69 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz); 7,54 (m, 4H); 7,41 (td, $J = 6,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 5,24 (s, 2H) ppm.

3.3.6.4. Preparación de derivados de tosmic:

▪ 1-(1-isocianoetilsulfonil)-4-metilbenceno²⁷² (**79**)

A una disolución de TosMIC (**70**) (0,97 g; 5 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se le adiciona yoduro de metilo (0,62 mL; 10 mmol) y cloruro de benciltrietilamonio (TEBACl; 230,0 mg; 1 mmol), y se agita vigorosamente con 10 mL de una disolución acuosa de NaOH (30%) a 0 °C durante 3 horas. Transcurrido dicho tiempo, se adicionan 50 mL de H₂O a la mezcla de reacción, se procede a la separación de las fases y la fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Se reúnen los extractos orgánicos, se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente hasta sequedad (sin calentar el baño). Por último, se adiciona éter dietílico frío sobre el crudo de reacción que se encuentra en un baño de hielo, se filtra y se concentra a presión reducida. Se obtienen 0,97 g (93%) de **79** como un aceite marrón.



Rendimiento: 93%. **¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃)** δ : 7,85 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,42 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 4,57 (c, 1H, $J = 7,2$ Hz); 1,73 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz) ppm.

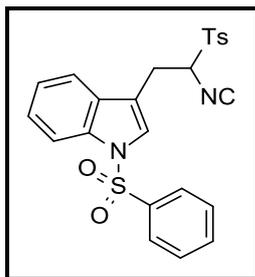
²⁷² van Leusen, A. M.; Bouma, R. J.; Possel, O. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *40*, 3487-3488.

3.3.6.4.1. Indolimetil derivados de TosMIC:

Procedimiento general: Sobre una mezcla del correspondiente derivado de 1-(bencenosulfonil)-(bromometil)indol (0,69 mmol), TosMIC (134,8 mg; 0,69 mmol) y el catalizador de transferencia de fase en CH₂Cl₂ (5,2 mL) se adicionan 5,2 mL de una disolución acuosa de NaOH de la concentración que se indica y se agita vigorosamente a la temperatura adecuada. Finalizada la reacción, se separan las fases y la fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 3 mL). Se reúnen los extractos orgánicos y se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre alúmina neutra eluyendo con el eluyente indicado en cada caso.

- **1-(Bencenosulfonil)-3-[2-isociano-2-(*p*-tolilsulfonil)etil]indol (76) y 1-(bencenosulfonil)-3-[3-[1-(bencenosulfonil)indol-3-il]-2-isociano-2-(*p*-tolilsulfonil)propil]indol (78)**

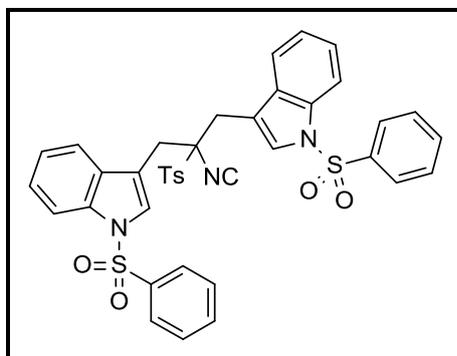
Según se describe en el procedimiento general, a partir de **75** (0,91 g; 2,63 mmol), cloruro de benciltrietilamonio (TEBACl, 119,8 mg; 0,52 mmol) y una disolución acuosa de NaOH (15%), manteniendo agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, se obtienen 1,05 g (86%) de **76** y 193,5 mg (10%) de **78** como sólidos amarillos.



Rendimiento: 86%. **P.f.:** 182-183 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3106,4; 2908,8; 2136,2; 1728,5; 1593,7; 1451,9; 1369,4; 1333,6; 1181,6; 1142,1; 1086,0; 964,5; 823,2; 754,1; 687,5; 644,1; 626,7; 572,5; 555,5; 517,7; 476,9 cm⁻¹. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ :** 7,98 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz); 7,88 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz); 7,84 (dd, 2H, *J* = 7,2 Hz, *J* = 1,3 Hz); 7,55 (s, 1H); 7,51-7,26 (m, 8H); 4,61(dd, 1H, *J* = 11,2 Hz, *J* = 2,9 Hz); 3,68 (dd, 1H, *J* = 14,5 Hz, *J* = 2,0 Hz); 3,12 (dd, 1H, *J* = 14,5 Hz, *J* = 11,2 Hz); 2,48 (s, 3H) ppm. **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ :** 165,8; 146,9; 137,7; 135,1; 133,9; 130,7; 130,3 (2C); 130,1 (2C);

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

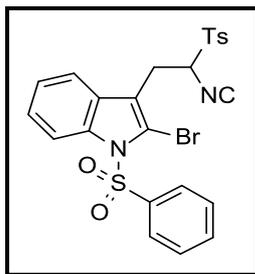
129,4; 129,3 (2C); 126,8 (2C); 125,5; 125,4; 123,6; 118,6; 114,2; 114,0; 72,1; 25,1; 21,8 ppm. **HRMS [ESI-TOF]**: Calculado para $C_{24}H_{20}N_2O_4S_2$: $[M+H]^+$: 465,0937; encontrado $[M+H]^+$: 465,0956.



Rendimiento: 10%. **P.f.:** 108-109 °C. **IR, (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3422,2; 3063,8; 2992,9; 2121,4; 1594,8; 1447,9; 1367,3; 1175,4; 1136,6; 974,6; 814,9; 745,9; 723,8; 684,6; 592,8; 570,3; 548,7; 476,7 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 7,94 (m, 6H); 7,86 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,60 (m, 4H); 7,50 (t, 6H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,2$ Hz); 7,27 (t_{ap} , 4H, $J = 8,2$ Hz); 7,09 (t, 2H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,2$ Hz); 3,55 (c, 4H, $J = 15,1$ Hz); 2,48 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ :** 168,5; 147,8 (2C); 138,6 (2C); 135,3 (2C); 135,1 (2C); 131,9 (2C); 131,5 (2C); 130,8 (2C); 130,4 (4C); 127,7 (4C); 127,6 (2C); 125,7 (2C); 124,2 (2C); 120,6 (2C); 114,9 (2C); 114,2 (2C); 81,9; 30,2; 29,0; 21,7 ppm. **HRMS [ESI-TOF]**: Calculado para $C_{39}H_{31}N_3O_6S_3$: $[M+H]^+$: 734,1448; encontrado $[M+H]^+$: 734,1452.

▪ 1-(bencenosulfonil)-2-bromo-3-[2-isociano-2-(*p*-tolilsulfonil) etil]indol (103)

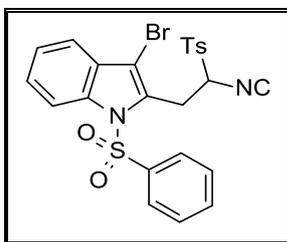
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **101** (0,29 g; 0,69 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (TBAI; 25,5 mg; 0,069 mmol) y una disolución acuosa de NaOH (30%), agitando la mezcla de reacción a 0 °C durante 2 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (2:1) se obtienen 0,32 g (85%) de **103** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 85%. **P.f.:** 91-92 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3065,1; 2926,5; 2133,3; 1731,7; 1595,2; 1445,9; 1380,5; 1335,1; 1193,5; 1152,4; 1085,1; 960,1; 752,7; 723,5; 669,6; 582,4; 571,0; 554,6 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 8,26 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 0,7$ Hz); 7,93 (dd, 2H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,67 (td, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,54 (m, 4H); 7,41 (td, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 7,3$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,31 (td, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 5,43 (dd, 1H, $J = 10,9$ Hz, $J = 3,6$ Hz); 3,54 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J = 3,6$ Hz); 3,39 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J = 10,9$ Hz); 2,49 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ :** 167,1; 147,7; 138,4; 137,9; 135,5; 132,2; 130,9 (2C); 130,8 (2C); 130,4 (2C); 129,6; 127,7 (2C); 126,4; 125,1; 119,7; 118,9; 115,9; 112,8; 70,9; 25,9; 21,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 543,0042; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 543,0052.

▪ **1-(bencenosulfonil)-3-bromo-2-[2-isociano-2-(*p*-tolilsulfonil) etil]indol (114)**

Según se describe en el procedimiento general, a partir de **112** (0,43 g; 1,02 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (TBAI; 37,7 mg; 0,10 mmol) y una disolución acuosa de NaOH (30%), manteniendo agitación a 0 °C durante 4 horas, purificando y eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt (9:1) se obtienen 0,38 g (68%) de **114** como un sólido amarillo.



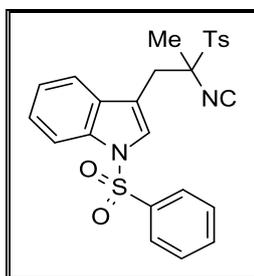
CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

Rendimiento: 68%. **P.f.:** 200-202 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3435,0; 3057,1; 2961,6; 2360,2; 2134,9; 1733,6; 1593,8; 1448,8; 1375,3; 1333,2; 1266,2; 1182,8; 1152,5; 1087,6; 1073,4; 729,8; 708,2; 582,6; 568,8 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 8,18 (dd, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 8,01 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz); 7,82 (dd, 2H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,68 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,2$ Hz); 7,59 (m, 4H); 7,49 (m, 2H); 7,40 (td, $J = 7,9$ Hz, $J = 6,9$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 5,69 (dd, 1H, $J = 10,9$ Hz, $J = 3,9$ Hz); 4,03 (dd, 1H, $J = 15,0$ Hz, $J = 3,5$ Hz); 3,85 (dd, 1H, $J = 14,8$ Hz, $J = 10,9$ Hz); 2,50 (s, 3H) ppm. **^{13}C -RMN (75MHz, acetona- d_6) δ :** 167,8; 147,8; 137,8; 137,0; 135,7; 132,5; 131,1 (2C); 130,9 (2C); 130,7 (2C); 130,5; 129,7; 137,7; 127,4 (2C); 125,9; 120,8; 115,9; 107,5; 71,8; 28,6; 21,7 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 543,0042; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 543,0053.

3.3.6.4.2. Indolilmetil derivados de metil-TosMIC:

▪ 1-(bencenosulfonil)-3-[2-isociano-2-(*p*-tolilsulfonil)propil]indol (77)

A una disolución del correspondiente derivado de **75** (0,18 g; 0,53 mmol), el derivado de TosMIC indicado (0,53 mmol) y cloruro de benciltriethylamonio (TEBACl; 24,5 mg; 0,11 mmol) en CH_2Cl_2 (2,5 mL) se le adiciona 2,5 mL de una disolución de NaOH (30%) y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y 45 minutos. A continuación, se separan las fases y la fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 2 mL). Se reúnen los extractos orgánicos y se lavan con una disolución saturada de NaCl (2 mL), se secan sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre alúmina neutra eluyendo con hexano/AcOEt (5:1). Se obtienen 0,14 g (57%) de **77** como un sólido blanco.

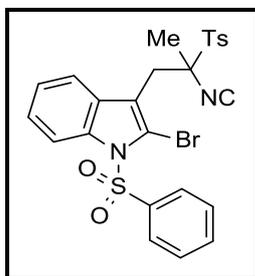


Rendimiento: 57%. **P.f.:** 147-148 °C. **IR, (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3131,9; 3060,6; 2970,1; 2126,3; 1736,5; 1591,1; 1446,4; 1380,0; 1367,4; 1326,3; 1149,1; 977,6; 816,9; 724,4; 666,4; 601,4; 570,1; 510,1; 478,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 8,03 (d, 1H, $J = 0,6$ Hz); 7,98 (m, 4H); 7,83 (s, 1H); 7,59 (m, 6H); 7,37 (td, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 7,28 (td, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 3,47 (s, 2H); 2,52 (s, 3H); 1,56 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ :** 166,2; 147,8; 138,4; 135,7; 135,2; 132,2 (2C); 131,8; 130,9 (2C); 130,5; 130,4 (2C); 127,9; 127,6 (2C); 125,9; 124,4; 120,8; 115,0; 114,4; 79,4; 30,1; 21,6; 21,5 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 479,1094; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 479,1108.

Procedimiento general: A una disolución constituida por el correspondiente derivado de indolimetilTosMIC (1,18 g; 2,05 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (TBAI; 75,9 mg; 0,20 mmol) y el haluro de alquilo deseado (4,11 mmol) en CH_2Cl_2 (25 mL) se le adiciona una disolución acuosa de NaOH (30%) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado. Finalizado dicho tiempo, se separan las fases, y la fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). Se reúnen los extractos orgánicos y se lavan con una disolución saturada de NaCl (15 mL), se secan sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre alúmina neutra eluyendo con la mezcla de eluyentes indicado en cada apartado.

▪ **1-(bencenosulfonil)-2-bromo-3-[2-isociano-2-(*p*-tolilsulfonil)propil]indol (102)**

Tal y como se describe en el procedimiento general, a partir de **103** (1,11 g; 2,05 mmol), yoduro de metilo (0,26 mL; 4,11 mmol), agitando la mezcla de reacción durante 20 horas, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (2:1), se obtiene 1,01 g (88%) de **102** como un sólido amarillo.

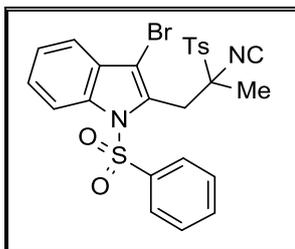


CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

Rendimiento: 88%. **P.f.:** 91-92 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3064,3; 2923,6; 2133,1; 1595,3; 1445,9; 1381,3; 1335,2; 1193,5; 1152,2; 1085,3; 961,1; 814,5; 752,4; 723,6; 669,7; 554,9 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 8,28 (dt, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 7,97 (dt, 2H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz); 7,88 (m, 2H); 7,68 (tt, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,62 (dd, 2H, $J = 8,6$ Hz, $J = 0,7$ Hz); 7,54 (m, 3H); 7,42 (td, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,32 (td, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,0$ Hz); 3,54 (d, 1H, $J = 14,5$ Hz); 3,38 (d, 1H, $J = 14,2$ Hz); 2,52 (s, 3H); 1,50 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75MHz, acetona- d_6) δ :** 167,6; 147,9; 138,4; 138,1; 135,6; 132,3 (2C); 130,9 (2C); 130,6; 130,4 (2C); 130,0; 127,7 (2C); 126,5; 125,2; 120,7; 119,1; 116,3; 114,4; 78,8; 30,5; 21,9; 21,7 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 557,0199; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 557,0201 .

▪ 1-(bencenosulfonil)-3-bromo-2-[2-isociano-2-(*p*-tolilsulfonil)propil]indol (115)

Según se indica en el procedimiento general, a partir de **114** (0,28 g; 0,52 mmol), yoduro de metilo (0,06 mL; 1,05 mmol), agitando durante 21 horas, purificando y eluyendo con hexano/AcOEt (2:1) se obtienen 0,22 g (75%) de **115** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 75%. **P.f.:** 165-166 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3448,1; 3070,5; 2923,8; 2121,2; 1735,3; 1594,9; 1449,5; 1371,0; 1329,9; 1175,9; 1149,4; 1073,9; 1038,8; 745,3; 723,6; 684,1; 578,8; 504,2 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 8,17 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz); 8,03 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz); 7,72 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz); 7,61 (m, 4H); 7,41 (m, 4H); 4,16 (c, 2H, $J = 14,6$ Hz); 2,52 (s, 3H); 1,84 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ :** 168,3; 147,9; 137,9; 136,8; 135,5; 132,4 (2C); 131,1; 130,9 (2C); 130,5; 130,2 (2C); 130,1; 127,8; 127,6 (2C); 126,3; 120,8; 117,2; 110,1; 78,7; 31,6; 22,6; 21,6 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 557,0199; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 557,0197.

3.3.7. Reacción de los derivados de indolilmetiltosmic con compuestos organolíticos

Precauciones: las reacciones con *n*-BuLi y *t*-BuLi son muy sensible a las condiciones de reacción. En su preparación se han tenido las siguientes precauciones:

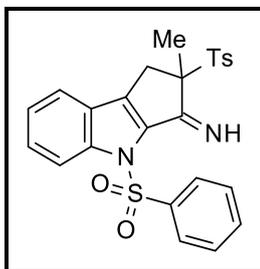
1. El material de vidrio se introduce durante 30 minutos en una estufa a 120 °C.
2. Se realizan 3 ciclos de vacío/argón de 5 minutos cada uno aplicando calor a la parte externa del material de vidrio empleando un secador doméstico.
3. El disolvente empleado se ha secado previamente en el laboratorio con P₂O₅ seguido de Na.
4. Las bases litiadas a emplear no deben contener sales litiadas en su interior, es decir, tienen que estar en perfectas condiciones para su uso.
5. Una vez finalizada la reacción, la hidrólisis se realiza a -78 °C adicionando agua gota a gota. A continuación, la reacción se deja que alcance la temperatura ambiente fuera del baño. Tras 1 hora, se realiza la extracción con éter dietílico.

3.3.7.1. Reacción con *n*-BuLi

Procedimiento general: A una disolución del isonitrilo correspondiente (1 eq.) en THF anhidro (25 mL/mmol), preparada bajo atmósfera de argón y que se encuentra a -78 °C, se adiciona *n*-BuLi (1.6 M en hexano) gota a gota. Se mantiene agitación a esa temperatura durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizado dicho tiempo, la mezcla de reacción se hidroliza a -78 °C con agua y se deja que alcance la temperatura ambiente. Se extrae con éter dietílico (3 x 15 mL), se reúnen los extractos orgánicos, se secan con MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla hexano:AcOEt (2:1).

▪ **4-(bencenosulfonil)-2-metil-2,2-[(4-metilfenil)sulfonil]-1*H*-ciclopenta[*b*]indol-3-imina (84)**

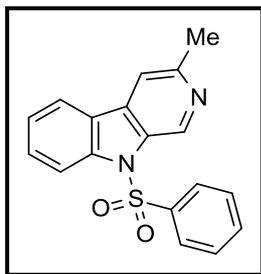
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **77** (478 mg; 1 mmol), *n*-BuLi (1,6 M en hexano; 1,37 mL; 2,2 mmol) y manteniendo agitación durante 2 horas, se obtienen 258 mg (54%) de **84** como un sólido amarillo.



Rendimiento: 54%. **P.f.:** 104-105 °C. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3299,8; 3064,6; 2925,0; 1633,3; 1596,5; 1446,9; 1370,5; 1356,1; 1300,8; 1176,2; 1141,7; 1115,8; 1069,0; 989,8; 901,9; 814,2; 755,8; 725,9; 684,5; 589,5; 571,3; 555,6 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 10,7 (s_{ancho} , 1H); 8,16 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,87 (m, 2H); 7,75 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz); 7,68 (t, 2H, $J = 7,9$ Hz); 7,54 (m, 3H); 7,38 (m, 3H); 3,88 (d, 1H, $J = 18,5$ Hz); 3,09 (d, 1H, $J = 18,5$ Hz); 2,42 (s, 3H); 1,72 (s, 3H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ :** 166,7; 145,7; 143,1; 142,8; 137,7; 136,0; 135,5; 133,2; 131,9 (2C); 130,4 (2C); 129,8 (2C); 129,7; 129,2; 127,7 (2C); 125,8; 122,6; 116,2; 76,5; 59,4; 31,5; 21,5 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 479.1099; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 479.1099.

▪ **9-(bencenosulfonil)-3-metilpirido[3,4-*b*]indol (104)**

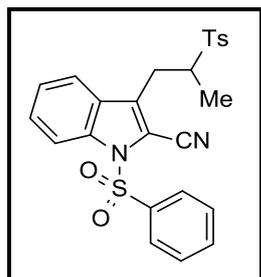
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **102** (557 mg, 1 mmol), *n*-BuLi (1,6 M en hexano; 1,37 mL; 2,2 mmol) y manteniendo agitación durante 2 horas, se obtienen 16,1 mg (5%) de **104** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 5%. **IR (NaCl)** $\nu_{\text{máx}}$: 2923,3; 1652,9; 1616,6; 1558,5; 1540,9; 1463,5; 1446,4; 1367,3; 1174,0; 1116,9; 1030,3; 970,8; 748,0; 725,8; 685,2 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6)** δ : 9,42 (s, 1H); 8,35 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 8,15 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,94 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz); 7,89 (s, 1H); 7,71 (t_{ap} , 1H, $J = 7,7$ Hz); 7,63 (t_{ap} , 1H, $J = 7,4$ Hz); 7,49 (m, 4H); 2,61 (s, 3H) ppm. **^{13}C -RMN (75 MHz, acetona- d_6)** δ : 153,7; 153,1; 139,8; 137,9; 136,7; 135,5; 134,2; 131,9; 130,9; 130,4 (2C); 127,4 (2C); 125,4; 122,7; 115,9; 114,3; 24,2 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323,0849; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323,0860.

▪ **1-(bencenosulfonil)-3-[2-(*p*-tolilsulfonil)propil]indol-2-carbonitrilo (83)**

Seguendo el procedimiento general, a partir de **102** (557 mg; 1 mmol), *n*-BuLi (1,6 M en hexano; 2,06 mL; 3,3 mmol) y manteniendo agitación durante 2 horas, se obtienen 109,9 mg (23%) de **83** como un sólido amarillo.



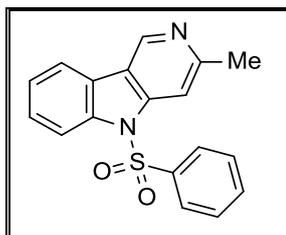
Rendimiento: 23%. **P.f.:** 104-105 °C. **IR (KBr)** $\nu_{\text{máx}}$: 3064,9; 2926,4; 2360,3; 2220,7; 1702,2; 1595,7; 1557,6; 1446,9; 1373,5; 1310,4; 1186,8; 1144,6; 1082,2; 972,7; 755,6; 724,8; 680,1; 585,3; 571,5 cm^{-1} . **^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6)** δ : 8,18 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 8,01 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz); 7,80 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz); 7,73 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 7,2$ Hz); 7,63 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz); 7,58 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz); 7,41 (m, 4H); 3,59 (m, 1H); 3,51 (dd, 1H, $J = 14,1$ Hz, $J = 3,8$ Hz); 2,97 (dd, 1H, $J = 14,1$ Hz, $J = 9,9$ Hz); 2,43 (s,

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

3H); 1,13 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz, acetona- d_6) δ : 145,8; 137,6; 137,4; 136,0; 135,2; 134,8; 130,8 (2C); 130,7 (2C); 130,0; 129,7 (2C); 128,5; 127,8 (2C); 125,8; 121,9; 115,6; 112,1; 109,1; 59,3; 26,3; 21,5; 13,6 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 479,1094; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 479,1103.

▪ 3-metil-5H-pirido[4,3-*b*]indol (118)

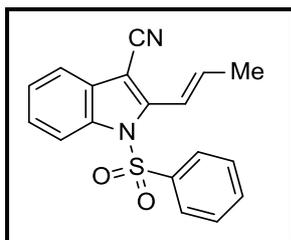
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **115** (557 mg; 1 mmol), *n*-BuLi (1,6 M en hexano; 1,37 mL; 2,2 mmol) y manteniendo agitación durante 2 horas, se obtienen 19,3 mg (6%) de **118** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 6%. IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$: 2922,2; 1616,6; 1595,1; 1558,4; 1446,17; 1366,8; 1176,7; 1147,8; 1089,9; 1009,2; 724,7; 687,5 cm^{-1} . ^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ : 9,20 (s, 1H); 8,31 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 0,7$ Hz); 8,16 (dd, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J = 0,7$ Hz); 8,12 (s, 1H); 8,01 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz); 7,68-7,43 (m, 5H); 2,70 (s, 3H) ppm. ^{13}C -RMN (50 MHz, acetona- d_6) δ : 157,6; 145,0; 142,9; 138,7; 138,2; 135,6; 130,5 (2C); 128,8; 127,4 (2C); 125,6; 125,0; 121,4; 120,8; 115,5; 108,9; 25,1 ppm. HRMS [ESI-TOF]: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323,0855; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323,0849.

▪ 1-(bencenosulfonil)-2-[(*E*)-prop-1-enil]indol-3-carbonitrilo (117)

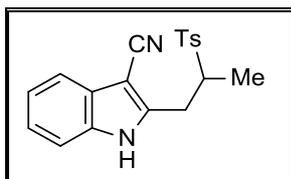
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **115** (557 mg; 1 mmol), *n*-BuLi (1,6 M en hexano; 1,37 mL; 2,2 mmol) y manteniendo agitación durante 2 horas, se obtienen 41,9 mg (13%) de **117** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 13%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 2261,6; 1558,4; 1540,8; 1447,3; 1370,7; 1175,5; 1118,7; 1088,0; 976,4; 745,8; 722,7; 685,6; 668,3 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 8,25 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 8,03 (dd, 2H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,97 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,74 (t_{ap} , 1H, $J = 7,4$ Hz); 7,67-7-61 (m, 3H); 7,44 (t_{ap} , 1H, $J = 7,6$ Hz); 6,86 (dc, 1H, $J_{\text{trans}} = 16,1$ Hz, $J = 6,6$ Hz, CH_3CH); 6,71-6,65 (dd, 1H, $J_{\text{trans}} = 16,2$ Hz, $J_{\text{cisoid}} = 1,6$ Hz, ArCH); 1,99 (dd, 3H, $J = 6,6$ Hz, $J_{\text{cisoid}} = 1,6$ Hz, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ :** 137,7; 136,2; 136,0; 134,9; 130,8 (2C); 130,2; 129,9; 128,7; 127,8(2C); 127,4; 126,0; 122,8; 120,1; 115,7; 112,9; 19,5 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323,0857; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323,0849.

▪ **2-[2-(*p*-tolilsulfonil)propil]-1H-indol-3-carbonitrilo (116)**

Si siguiendo el procedimiento general, a partir de **115** (557 mg; 1 mmol), *n*-BuLi (1,6 M en hexano; 1,37 mL; 2,2 mmol) y manteniendo agitación durante 2 horas, se obtienen 87,8 mg (26%) de **116** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 26%. **IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$:** 3380,0; 2922,8; 2360,3; 2241,9; 2213,9; 1700,1; 1596,4; 1456,1; 1300,9; 1288,1; 1143,2; 1084,8; 815,7; 802,0; 746,9; 713,8; 687,9; 566,4 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 11,1 (s_{ancho} , 1H); 7,82 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 7,55 (m, 1H); 7,46 (m, 3H); 7,23 (m, 2H); 3,72 (m, 1H); 3,58 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J = 4,6$ Hz); 3,08 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J = 9,9$ Hz); 2,41 (s, 3H); 1,23 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, acetona- d_6) δ :** 145,8; 144,6; 136,1; 135,1; 130,6 (2C); 130,3; 129,7 (2C); 128,1; 124,2; 122,6; 119,0; 115,9; 112,9; 59,5; 28,4; 21,4; 13,6 ppm.

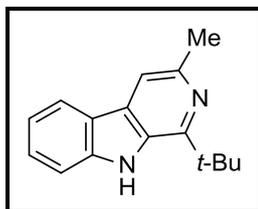
HRMS [ESI-TOF]: Calculado para C₁₉H₁₈N₂O₂S: [M+H]⁺: 339,1162; encontrado [M+H]⁺: 339,1166.

3.3.7.2. Reacción con *t*-BuLi

Procedimiento general: A una disolución del isonitrilo correspondiente (1 eq.) en THF anhidro (46 mL/mmol), preparada bajo atmósfera de argón y que se encuentra a -78 °C, se adiciona *t*-BuLi (1.7 M en hexano; 2,35 mL; 4 eq.) gota a gota. Se mantiene agitación a esa temperatura durante 4 horas. Finalizado dicho tiempo, la mezcla de reacción se hidroliza a -78 °C con agua y se deja que alcance la temperatura ambiente. Se extrae con éter dietílico (3 x 10 mL), se reúnen los extractos orgánicos, se secan con MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla hexano:AcOEt (2:1).

▪ **1-*tert*-butil-3-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (85)**

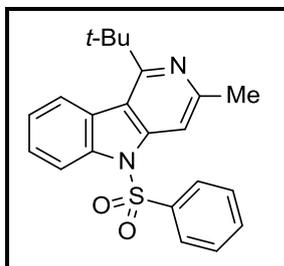
Tal y como se describe en el procedimiento general, a partir de **102** (50,2 mg; 0,10 mmol), se obtienen 20,0 mg (80%) de **85** como un aceite marrón.



Rendimiento: 80%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 3359,6; 1622,5; 1553,9; 1558,4; 1389,9; 1365,8; 1239,8; 1115,3; 800,4; 747,5 cm⁻¹. **¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆) δ :** 10,2 (s, 1H); 8,12 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 7,76 (s, 1H); 7,59 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz); 7,46 (td, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,3 Hz); 7,18 (td, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,0 Hz); 2,59 (s, 3H); 1,56 (s, 9H) ppm. **¹³C-RMN (50 MHz, acetona-*d*₆) δ :** 151,6; 145,7; 141,6; 131,7; 131,1; 128,4; 122,0; 121,7; 119,9; 112,6; 111,9; 38,2; 29,5 (3C); 24,4 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para C₁₆H₁₈N₂: [M+H]⁺: 239,1542; encontrado [M+H]⁺: 239,1543.

▪ **5-(bencenosulfonil)-1-*tert*-butil-3-metilpirido[4,3-*b*]indol (123)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **115** (54,1 mg; 0,09 mmol), se obtienen 24,9 mg (68%) de **123** como un aceite amarillo.



Rendimiento: 68%. **IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$:** 1576,5; 1558,5; 1540,9; 1447,7; 1368,0; 1355,4; 1216,7; 1147,8; 1086,6; 1045,9; 761,7; 733,8; 685,15 cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ :** 8,86 (s, 1H); 8,29 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,7$ Hz); 8,14 (dd, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 1,3$ Hz); 7,54 (m, 3H); 7,38 (m, 4H); 2,55 (s, 3H); 1,44 (s, 9H) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, acetona- d_6) δ :** 154,6; 144,6; 140,6; 139,6; 135,7; 134,8; 134,6; 129,9 (2C); 127,9; 127,8; 127,6 (2C); 126,9; 126,6; 122,7; 118,7; 38,3; 29,3 (3C); 19,8 ppm. **HRMS [ESI-TOF]:** Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 379,1475; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 379,1472.

3.4. MÉTODOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

3.4.1. ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

El ELISA es un inmunoensayo enzimático en fase sólida (EIA) para detectar la presencia de una sustancia, por lo general un antígeno, en una muestra líquida.

Esta técnica se fundamenta en la unión de los antígenos a la superficie de una placa. Se realiza una primera incubación de la placa con el anticuerpo específico del antígeno buscado. A continuación, se efectúa otra incubación con un anticuerpo unido a una enzima con especificidad hacia el anticuerpo primario. Por último, se añade un sustrato de la enzima unida al anticuerpo secundario de forma que se produce una reacción que implica un cambio de color detectable por colorimetría (Figura 3.33).

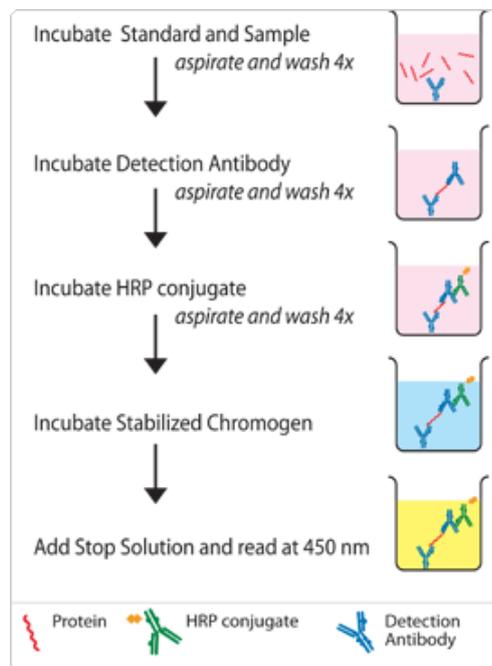


Figura 3.33. ELISA (tomado de www.invitrogen.com)

El ensayo se realizó de la siguiente manera: las células THP-1 se cultivaron durante 24 horas en medio de cultivo y suplementado con 5% de suero de ternera fetal (RPMI/5% FCS) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos elegidas dentro de los rangos que no mostraron citotoxicidad. Se estimularon con 100 ng/ml de LPS durante las últimas 4 horas de cultivo. La determinación de las concentraciones de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en el sobrenadante de los cultivos se realizó mediante Human TNF ELISA Set (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de la proteína recombinante humana. La absorbancia se midió a 450 nm en el lector de placas Synergy 4 analizando los resultados con el software Gen 5 (Biotek).

El experimento realizado para la determinación de la viabilidad celular se basó en la incubación de la línea pro-monocítica humana THP-1 durante 24 horas en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) y concentraciones crecientes de los distintos compuestos. Para determinar el efecto de la estimulación celular sobre la viabilidad, duplicados de los cultivos se estimularon con 100 ng/mL de lipopolisacárido bacteriano (LPS, SIGMA-Aldrich) durante las últimas 4 horas.

La viabilidad celular se determinó en cada caso por citometría de flujo mediante el porcentaje de exclusión de yoduro de propidio añadido a una concentración final de 0,5 μ g/mL. El análisis mediante citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur con el software CellQuest Pro (BD Bioscience, San José, CA, USA).

3.4.2. Inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (FPIA)

El FPIA es un inmunoensayo de tipo competitivo en fase homogénea que se utiliza para proporcionar una medición exacta y sensible de pequeños analitos. Su utilización más común es en toxicología.

A la muestra biológica que contiene el analito en cuestión se añaden concentraciones conocidas de anticuerpo contra el analito y analito unido de forma covalente a la molécula de fluoresceína, de forma que se produce la unión específica y de alta afinidad del anticuerpo al analito, ya sea el de la muestra biológica o el que se encuentra unido a fluoresceína.

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

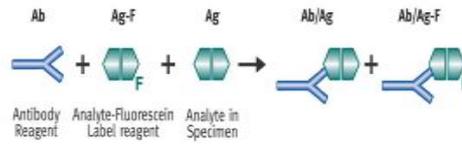
El FPIA utiliza tres conceptos claves para la detección: fluorescencia, rotación de moléculas en solución y luz polarizada.

- **Fluorescencia:** en el ensayo se utiliza fluoresceína, una marca fluorescente que absorbe la energía de la luz a 485 nm y libera esta energía a una longitud de onda superior (535 nm) como luz fluorescente.
- **Rotación de moléculas en la solución:** las moléculas más grandes rotan más lentamente en solución que las moléculas más pequeñas. Este principio se utiliza para distinguir entre la molécula más pequeña analito-fluoresceína, que rota más rápidamente, y los complejos anticuerpo-analito- fluoresceína más grandes, que rotan lentamente en la solución.
- **Luz polarizada:** la técnica de polarización por fluorescencia distingue entre la marca analito-fluoresceína y anticuerpo-analito-fluoresceína por sus diferentes propiedades de polarización por fluorescencia cuando son expuestos a la luz polarizada.

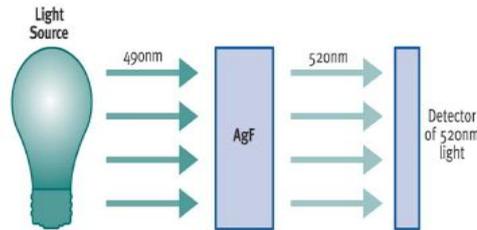
La luz polarizada describe ondas de luz que solamente están presentes en un plano simple del espacio. Cuando la luz polarizada se absorbe por la molécula más pequeña analito-fluoresceína, ésta tiene la capacidad de rotar su posición en la solución rápidamente antes de que la luz sea emitida como fluorescencia. La luz emitida se liberará en un plano diferente del espacio de donde fue absorbido y por consiguiente se le denomina luz no polarizada. Con el complejo anticuerpo-analito-fluoresceína de mayor tamaño, la misma luz polarizada absorbida se libera como fluorescencia polarizada ya que cuanto más grande sea el complejo su rotación en la solución es menor. La luz se libera en el mismo plano del espacio como luz polarizada, y el detector puede medirla.

El FPIA solo detecta los complejos de mayor tamaño anticuerpo-analito-fluoresceína de forma que se puede cuantificar el anticuerpo no detectado que es el correspondiente al unido al analito de la muestra biológica (Figura 3.34).

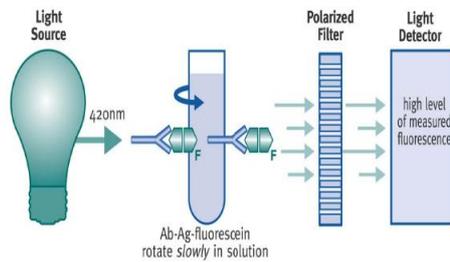
1) Inmunoensayo competitivo por polarización de fluorescencia (FPIA)



2) Detección de fluorescencia en complejos de conjugado de fluoresceína



3) Medición de grandes complejos usando fluorescencia, rotación y luz polarizada en FPIA



4) Los complejos más pequeños en FPIA dan como resultado una señal de fluorescencia más baja

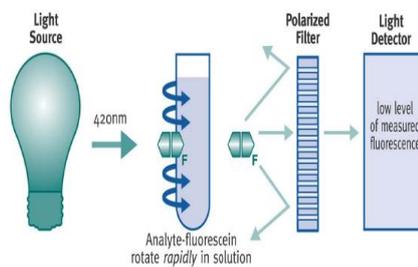


Figura 3.34. Inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (FPIA) (tomado de www.latinoamerica.abbottdiagnostics.com).

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

La determinación de la polarización de fluorescencia se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, por duplicado y empleando un volumen final de 100 μ L. En cada pocillo se adicionó FABP4 recombinante de la casa comercial *Cayman Chemical* (Num. 1009549), el compuesto de estudio a distintas concentraciones, el buffer y un fluoróforo, que en nuestro caso fue *bodipy* (4,4-difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-S-indaceno) de la casa comercial *Molecular Probes*. A los cinco minutos de adicionar el *bodipy*, se realiza la lectura de la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 485 nm (excitación) y a 535 nm (emisión).

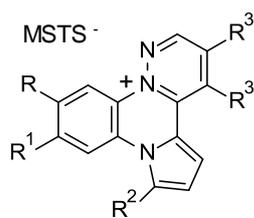
El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{(\text{Absorbancia total de Bodipy} - \text{Absorbancia de cada producto}) \times 100}{(\text{Absorbancia total de Bodipy} - \text{Absorbancia de FABP4})}$$

4. CONCLUSIONES

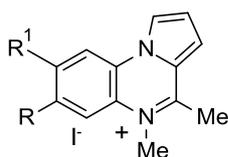
Las conclusiones del trabajo realizado y recogido en esta Tesis Doctoral se destacan a continuación:

- Se ha llevado a cabo la síntesis de sales de piridazino[2,3-*a*]pirrolo[2,1-*c*]quinoxalino **1a-o**. Para ello, ha sido necesaria la optimización de la reacción de Westphal para cada uno de los compuestos dicarbonílicos empleados.

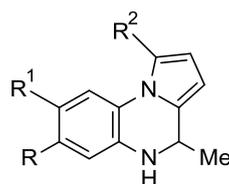


1a-o

- Se han preparado dos nuevas series de derivados de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas **12** y **13**, la primera de ellas mediante calentamiento por microondas.



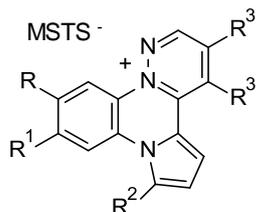
12



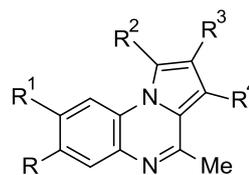
13

- Se ha realizado un estudio de actividad de los compuestos **1**, **3**, **12** y **13** como inhibidores de PTP-1B, calculándose los valores de IC₅₀ de los compuestos más activos. En base a los resultados que se iban obteniendo, se ha llevado a cabo un estudio de relación estructura-actividad (SAR), donde destaca que la serie **13** admite cierta diversidad estructural sin que se modifique en exceso su actividad inhibitoria. Los compuestos más activos para cada serie se recogen en la Figura 4.1.

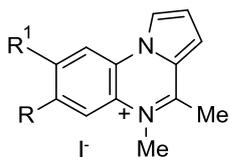
CONCLUSIONES



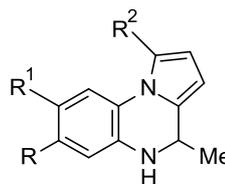
1d (R=R¹=Cl, R²=H, R³=Me) IC₅₀=3,31 μM
1l (R=R¹=Me, R²=H, R³=Et) IC₅₀=2,57 μM
1m (R=R²=H, R¹=Cl, R³=Et) IC₅₀=1,65 μM



3a (R=R¹=R²=R³=R⁴=H) % (1 μM)=48,55 %
3g (R=R²=R³=R⁴=H, R¹=Cl) % (1 μM)=47,90 %
3h (R=R¹=Me, R²=Br, R³=R⁴=H) IC₅₀=1,73 μM
3j (R=R²=R⁴=H, R¹=Cl, R³=Br) IC₅₀=1,81 μM



12a (R=R¹=H) IC₅₀=1,54 μM



13a (R=R¹=R²=H) IC₅₀=0,89 μM
13c (R=Me, R¹=R²=H) IC₅₀=1,73 μM
13f (R=OMe, R¹=R²=H) IC₅₀=1,23 μM

Figura 4.1

- Se ha llevado a cabo la alquilación de las distintas carbolinas tanto en el nitrógeno indólico como piridínico, y se ha establecido que las series de α- y γ-carbolinas que poseen los sustituyentes en el nitrógeno piridínico actúan como inhibidores en la producción de TNF-α en células THP-1. Esta inhibición se acentúa cuando se trata del núcleo de α-carbolina y los sustituyentes son los grupos 4-carboxibencilo y 15-carboxipentadecilo (Figura 4.2).

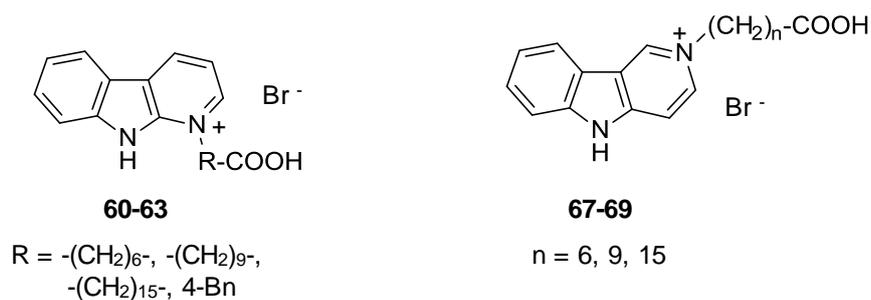


Figura 4.2

- Se ha puesto a punto metodología sintética para la síntesis de derivados de β - y γ -carbolina como potenciales inhibidores de FABP. Aunque los objetivos sintéticos iniciales no lograron obtenerse, se han puesto a punto las condiciones apropiadas para sintetizar como productos de mayor interés las pentiniminas **84**, cianoindoles **116**, *tert*-butil- β - y *tert*-butil- γ -carbolinas **85** y **123** (Figura 4.3).

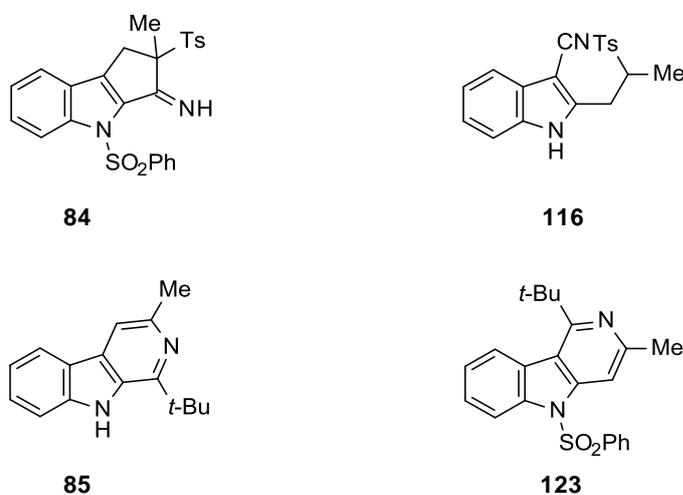


Figura 4.3

5. SUMMARY

Diabetes mellitus is a chronic multifactorial metabolic disease caused by insulin deficiency or insuline resistance.²⁵ Type 2 diabetes, also known as non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), is a worldwide endocrine disorder afflicting persons of all races and age groups. Diabetes is often associated with cardiovascular risk factors, and may lead to severe secondary complications, including atherosclerosis, microangiopathy, renal dysfunction and failure, cardiac abnormalities, diabetic retinopathy and ocular disorders.^{26,27}

Insuline resistance is a major pathophysiological factor in the development of type 2 diabetes, occurring mainly in muscle, adipose tissue, and liver, leading to reduced glucose uptake and utilization and increased glucose production, respectively. Insuline resistance is associated not only with hyperinsulinemia and hyperglycemia but also with other disorders such as atherosclerosis, hypertension and abnormal lipid profile, which are known collectively referred to as Metabolic Syndrome or Insuline Resistance Associated Disorders.

Tyrosine phosphorylation of proteins is a fundamental mechanism for the control of cell growth and differentiation. It is reversible and governed by the opposing activities of protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs), which are responsible for phosphorylation and dephosphorylation, respectively. PTPs play essential roles in intracellular signal transduction by regulating the cellular level of tyrosine phosphorylation to control cell growth and differentiation, metabolism, cell migration, gene transcription, ion-channel activity, immune response, cell apoptosis, and bone development. Unregulated operation of PTPs is responsible to many human diseases including cancer, diabetes, obesity, and osteoporosis.^{28,29}

²⁵ Vats, R. K.; Kumar, V.; Kothari, A.; Mital, A.; Ramachandran, U. *Curr. Sci.* **2005**, *88*, 241-249.

²⁶ Sakurai, H. *Chem. Rec.* **2002**, *2*, 237-248.

²⁷ Tomlinson, D. R.; Willars, G. B.; Carrington, A. L. *Pharmacol. Ther.* **1992**, *54*, 151-194.

²⁸ Lee, S.; Wang, Q. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 553-573.

²⁹ Thareja, S.; Aggarwal, S.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 459-517.

SUMMARY

One of these PTPs, PTP-1B, catalyzes the dephosphorylation of cellular substrates of the insulin receptor kinase, resulting in a down regulation of insulin signal transduction.⁴⁹ For this reason, PTP-1B has emerged as promising therapeutic target for the treatment of NIDDM and obesity.

Many described PTP-1B inhibitors are from both synthetic and natural origin. ISIS-113715 is the only PTP-1B inhibitor which is currently in clinical trials.

On the other hand, fatty acid binding proteins (FABPs) are proteins that reversibly bind hydrophobic ligands, such as saturated and unsaturated long-chain fatty acids, eicosanoids and other lipids, with high affinity. FABPs coordinate lipid responses in cells and are also strongly linked to metabolic and inflammatory pathways. Different studies show that these proteins have a role in lipid-mediated processes and metabolic pathways in the immune response and may be involved in various diseases such as obesity, diabetes and atherosclerosis. However, little is known about their exact biological functions and mechanisms of action.¹⁷⁰

Some inhibitors have been described in this therapeutic target and has centered on two of the ten FABP known isoforms: FABP adipocytes (A-FABP) and FABP epidermal (E-FABP) due to the existence of more knowledge about them.

In this context, this Thesis has focused on the synthesis and biological activity evaluation of new PTP-1B and A-FABP inhibitors.

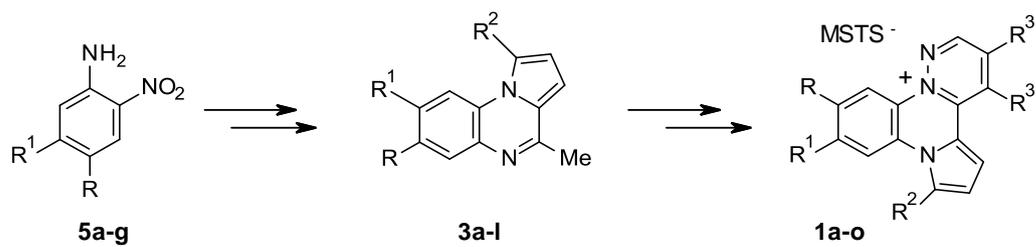
- *Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP-1B)*

A series of pyridazino-pyrrolo-quinoxalium salts were obtained through Westphal reaction at the latest stage of the synthesis (Scheme 5.1). In addition, two series of compounds, **12** and **13**, were synthesized from **3** in order to know the minimum structural requisites which are needed to keep activity (Scheme 5.2).

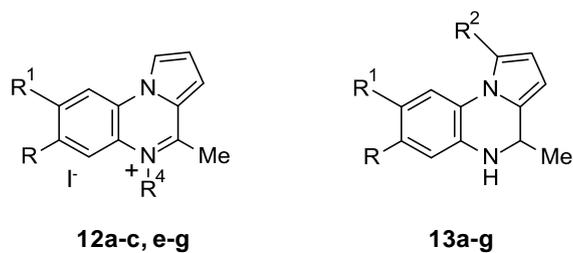
Compounds **1**, **3**, **12** and **13** were tested as PTP-1B inhibitors showing IC₅₀ values in the micro and submicromolar range. A SAR has been performed for each series of compounds (Figure 5.1).

⁴⁹ Ukkola, O.; Santaniemi, M. *J. Int. Med.* **2002**, *251*, 467-475.

¹⁷⁰ Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. *Nat. Rev.* **2008**, *7*, 489-503.



Scheme 5.1



Scheme 5.2

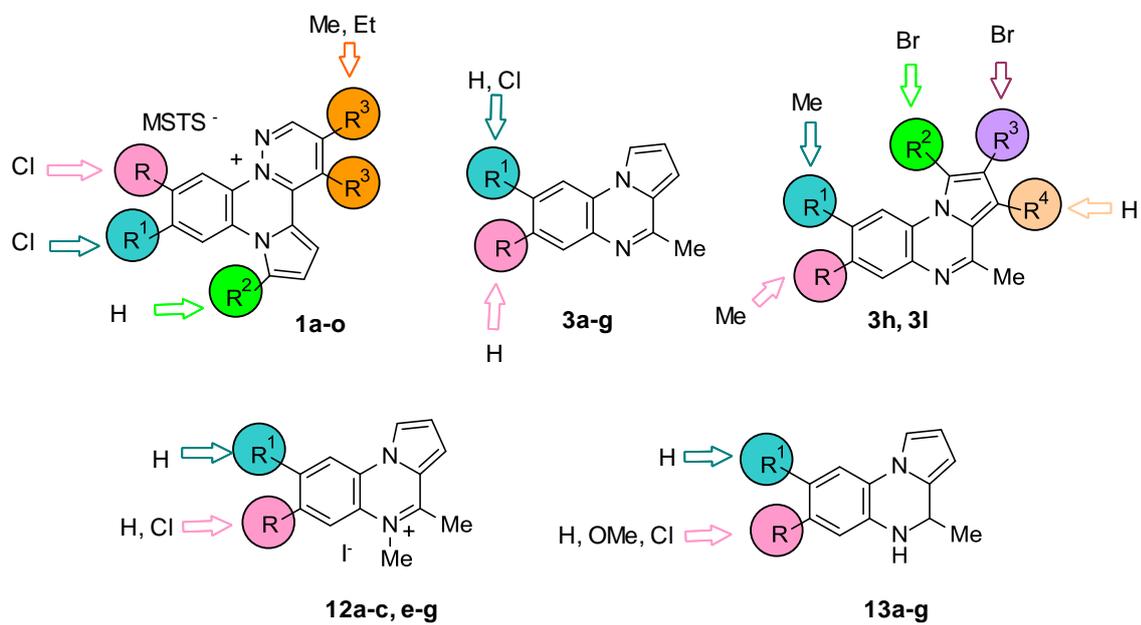


Figure 5.1

SUMMARY

- *Fatty acid binding proteins (FABPs)*

Two families of compounds based on carboline structure, **30-33** and **34-37**, were synthesized (Figure 5.2). These compounds were evaluated as inhibitors of TNF- α synthesis in THP-1 cells. This evaluation showed that compounds **34-37** inhibit TNF- α , specially, the α - and γ -carbolinium derivatives **34** and **36**.

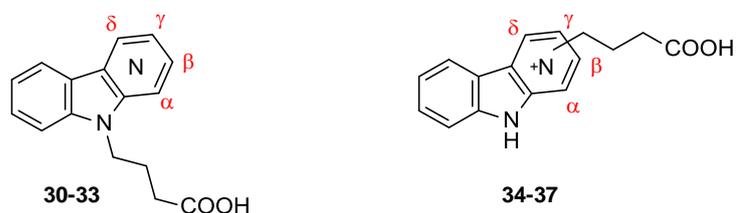


Figure 5.2

Following on this study, we also prepared two series of compounds based on α - and γ -carbolinium where the alkyl chain was enlarged. We found compounds **62** and **63** were the most active ones (Figure 5.3).

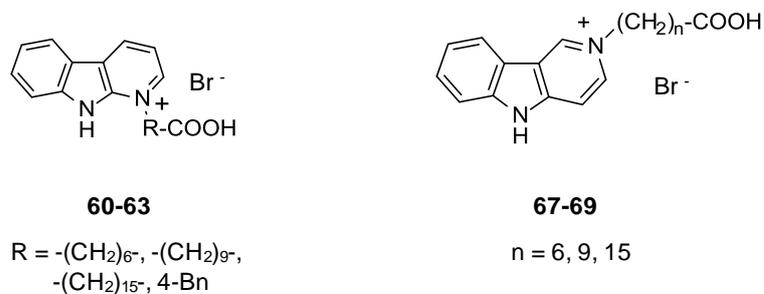
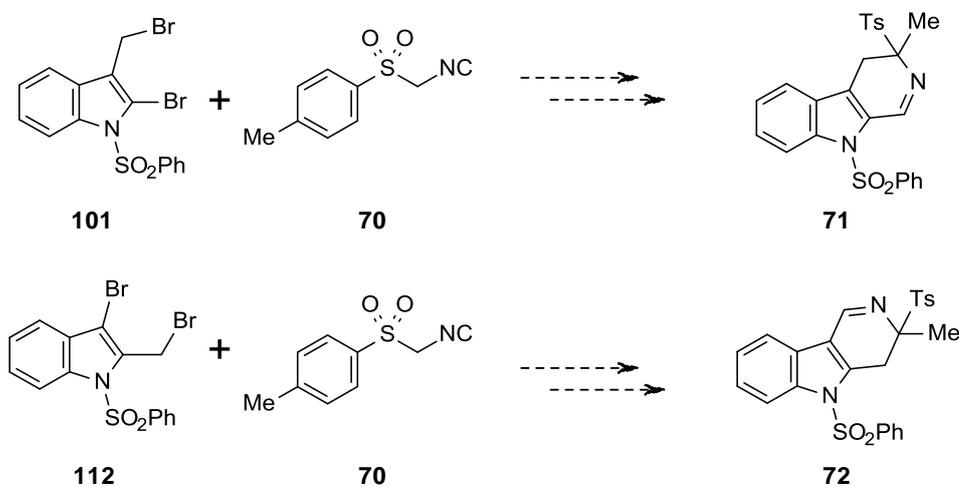


Figure 5.3

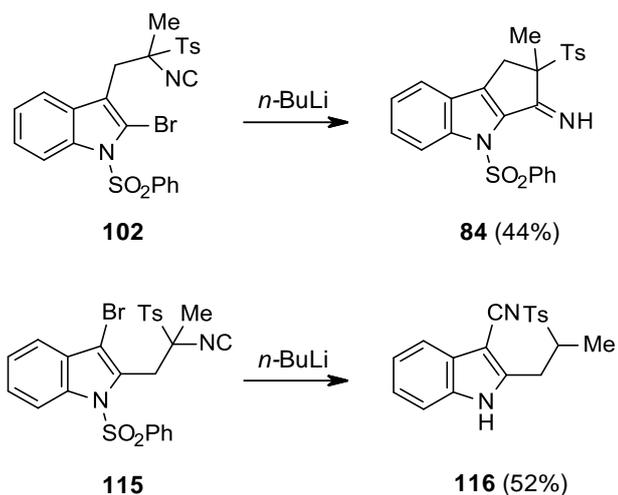
The last aim of this Thesis was focused on the design of a methodology to synthesize dihydroderivatives of β - and γ -carbolines **71** and **72** from the corresponding indole derivatives **101** and **112** and TosMIC (Scheme 5.3).



Scheme 5.3

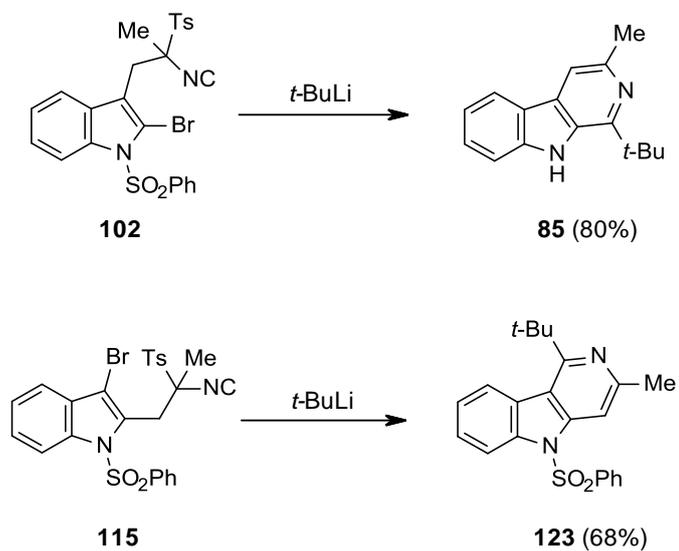
In the course of this work, the reaction of **102** or **115** with *n*-BuLi produces an unexpected cascade process that involves a six-membered ring heterocyclization reaction, followed by an isocyanide-cyanide rearrangement and subsequent five-membered ring formation to give 2,3-dihydroindolenines. The main product of these reactions were the 2,3-dihydro-1*H*-indolenine **84** and the isonitrile derivative **116**, respectively (Scheme 5.4).

SUMMARY



Scheme 5.4

Moreover, the reaction of **102** or **115** with *t*-BuLi leads to the formation of the corresponding 1-*tert*-butyl- β - and γ -carbolines (Scheme 5.5).



Scheme 5.5

6. ANNEX

6.1. INTRODUCTION

In 2010, I spent a three-month stay funded by the University of Alcalá (Mobility Grant for Researchers) in Professor Jonathan Williams's group at the University of Bath (UK), with the aim of improving my postgraduate training. Prof. J. M. J. Williams' group is working in transition metal-catalyzed organic synthesis.

The amide bond is an important functional group in contemporary chemistry because of its applications in pharmaceutical, agrochemical and polymer industry.^{288,289} Current widely used syntheses of amides include the coupling reaction of carboxylic acids^{290,291} with amines, the rearrangement of oximes²⁹² or reactions that involve the use of stoichiometric amounts of coupling agents or expensive catalysts. For this reason, the discovery of low cost and atom efficiency catalytic methods for the synthesis of amides is still of interest.^{289,293}

Williams' group has published several articles on the synthesis of primary amides from oximes using iridium,²⁹⁴ ruthenium,²⁹⁵ indium or zinc-based catalysts.²⁹⁶ The group has recently reported the synthesis of secondary and tertiary amides from nitriles and amines using iron catalysis.¹ Williams and *coll.* also described ruthenium-catalysed alcohol oxidation to yield secondary and tertiary amides.²⁹⁷ Then, the group focused on the former oxime-amide and nitrile-amide approaches to the synthesis of secondary and tertiary amides from aldehydes and amines through a *one-pot* process.^{298,299,300} In this process, an aldehyde reacts with hydroxylamine hydrochloride

²⁸⁸ Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337-2347.

²⁸⁹ Constable, D. J. C.; Dunn, P. J.; Hayler, J. D.; Humphrey, G. R.; Leazer, J. L. Jr.; Linderman, R. J.; Lorenz, K.; Manley, J.; Pearlman, B. A.; Wells, A.; Zaks, A.; Zhang, T. Y. *Green Chem.* **2007**, *9*, 411-420.

²⁹⁰ Beckwith, A. L.; Zabicky, J. *The Chemistry of Amides*; Wiley: New York, 1970.

²⁹¹ Srinivas, K. V. N. S.; Das, B. J. *Org. Chem.* **2003**, *68*, 1165-1167.

²⁹² Owston, N. A.; Parker, A. J.; Williams, J. M. J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3599-3601.

²⁹³ Al-Zoubi, R. M.; Marion, O.; Hall, D. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2876-2879.

²⁹⁴ Owston, N. A.; Parker, A. J.; Williams, J. M. J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 73-75.

²⁹⁵ Watson, A. J. A.; Maxwell, A. C.; Williams, J. M. J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2667-2670.

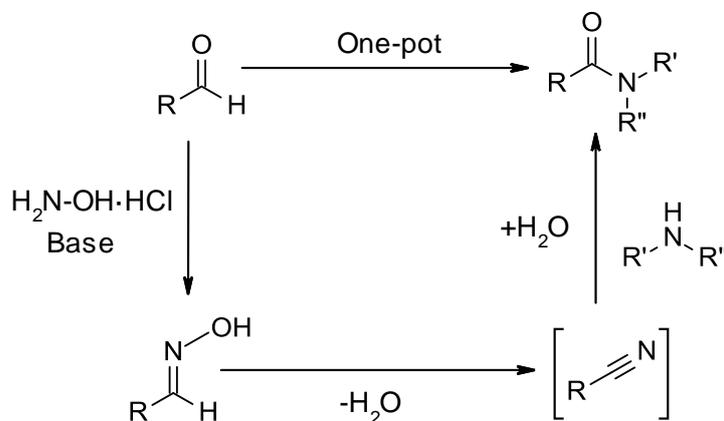
²⁹⁶ Allen, C. L.; Burel, C.; Williams, J. M. J. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2724-2726.

²⁹⁷ Watson, A. J. A.; Maxwell, A. C.; Williams, J. M. J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2667-2670.

²⁹⁸ Murahashi, S. I.; Naota, T.; Saito, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7846-7847.

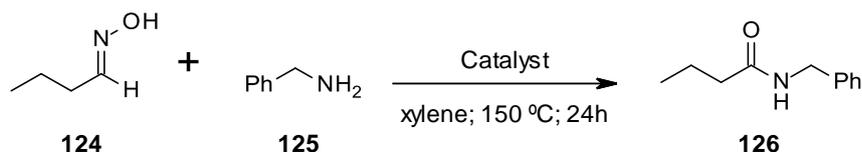
²⁹⁹ Copley, C. J.; Van den Heuvel, M.; Addabi, A.; de Vries, J. G. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2467-2470.

to give an oxime. Then, the oxime rearranges *in situ* to a nitrile followed by the addition of the amine component to the reaction mixture to give secondary or tertiary amides (Scheme 6.1).³⁰¹



Scheme 6.1. Proposed reaction course for amide formation (taken from ref. 301).

During my stay at the University of Bath, I was involved in the optimization of the model reaction between butyraldehyde oxime **124** and benzylamine **125**. A previous study of this reaction carried out in the group showed that $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20% mol) provided better conversions from an array of catalysts studied [$\text{In}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, $\text{Ru}(\text{PPh}_3)_4\text{H}_2$ and $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] (Scheme 6.2).



Scheme 6.2

³⁰⁰ Allen, C. L.; Lapkin, A. A; Williams, J. M. J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4262-4264.

³⁰¹ Allen, C. L.; Davulcu, S.; Williams, J. M. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5096-5099.

6.2. DISCUSSION

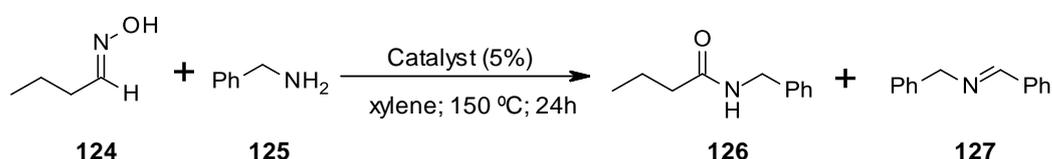
In order to gain insight into this reaction, catalyst, temperature, solvent and ligand were studied. The catalyst complexes were generated *in situ* or prepared prior to use.

Conversions shown in tables were determined by $^1\text{H-NMR}$ from the crude reaction mixture. In all the cases, purification was performed by column chromatography. Results are detailed below.

6.2.1. Catalyst

A study with Ni, Cu and Zn catalysts was performed, with catalyst load reduced to 5% mol. The best conversions were obtained with $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Table 6.1, entries 1, 2, 4 and 6).

Table 6.1. Effect of catalysts.



Entry	Catalyst	% $^1\text{H-NMR}$		
		125	126	127
1	$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	100	-
2	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	100	-
3	NiBr_2	16	84	-
4	$\text{Cu}(\text{OAc})_2$	-	89	11
5	$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{Cu}$	-	60	40
6	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	86	14
7	$\text{Zn}(\text{OTf})_2$	14	86	-

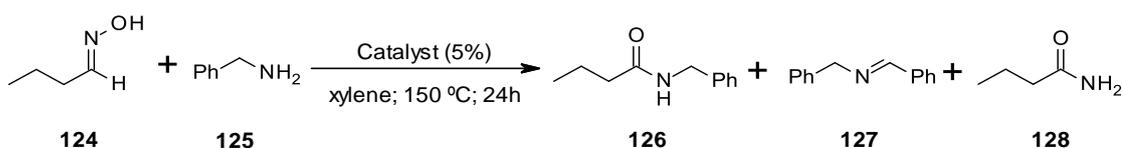
The most selective catalysts for the formation of the amide **126** were $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Table 6.1, entries 1 and 2). The use of NiBr_2 or

Zn(OTf)₂ led to the formation of amide **126** as well as the recovery of benzylamine **125** (Table 6.1, entries 3 and 7). For the Cu(OAc)₂, (CF₃SO₃)₂Cu and Zn(NO₃)₂·6H₂O catalysts, imine **127** was obtained as a by-product (Table 6.1, entries 4, 5 and 6).

6.2.2. Temperature and solvent

The effect of temperature and solvent was studied by carrying out the reactions with the best performing catalysts: Ni(NO₃)₂·6H₂O, NiCl₂·6H₂O, Cu(OAc)₂ and Zn(NO₃)₂·6H₂O identified in the previous experiment. The results are shown in Table 6.2.

Table 6.2. Effect of solvent and temperature.



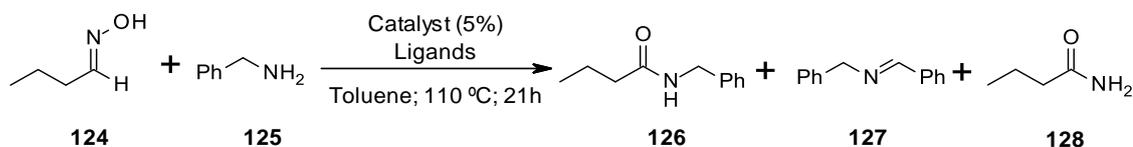
Entry	Catalyst	Solvent	Temperature (°C)	% ¹ H-NMR				
				124	125	126	127	128
1	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	<i>p</i> -xylene	150	-	-	100	-	-
2	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	<i>p</i> -xylene	100	-	26	58,5	-	15,5
3	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	toluene	110	-	47	40	-	13
4	NiCl ₂ ·6H ₂ O	<i>p</i> -xylene	150	-	-	100	-	-
5	NiCl ₂ ·6H ₂ O	<i>p</i> -xylene	100	-	36	47	-	17
6	NiCl ₂ ·6H ₂ O	toluene	110	-	71	18	-	11
7	Cu(OAc) ₂	<i>p</i> -xylene	150	-	-	89	11	-
8	Cu(OAc) ₂	toluene	110	-	-	66	14	20
9	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	<i>p</i> -xylene	150	-	-	86	14	-
10	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	toluene	110	50	50	-	-	-

The use of $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and *p*-xylene at 150 °C led quantitatively to **126** (Table 6.2, entry 1). The decrease in temperature to 100 °C as well as the change of the solvent to toluene afforded **126** in lower yield (58% and 40% respectively), with extensive recovery of benzylamine **125** and formation of amide **128** (Table 6.2, entries 2 and 3). For $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, quantitative conversion was obtained in *p*-xylene at 150 °C (Table 6.2, entry 4). A decrease in temperature resulted in 47% yield of amide **126**, partial recovery of **125** and formation of amide **128** (Table 6.2, entry 5). When toluene was used as solvent, the yield of amide **126** only reached 18% (Table 6.2, entry 6). The use of $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ showed moderate conversion to amide **126** and the imine **127** by-product (Table 6.2, entry 7). Toluene and a temperature of 110 °C led to a decrease in the conversion of **126** as well as the formation of amide **128** (Table 6.2, entry 8). The use of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in the optimal conditions of the reaction, *p*-xylene and 150 °C, provided **126** (86%) (Table 6.2, entry 9). However, the modification of the reaction conditions led to the recovery of the starting materials (Table 6.2, entry 10). Finally, reactions were also performed using ethanol at 80 °C but, in all the cases, the final product was not obtained.

Following these results, it was examined whether the presence of ligands could improve the conversion of oxime **124** and amine **125** to amide **126** in toluene at 110 °C.

6.2.3. Ligand

The ligands employed for this study were PPh_3 , TMEDA (tetramethylethylenediamine), bipy (2,2'-bipyridyl) and dppe [1,2-bis(diphenylphosphino)ethane]. First, reactions were carried out by forming the metal-ligand complex *in situ*, and the best conversions were obtained when $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and PPh_3 or dppe were used (Table 6.3, entries 1 and 4). Next, catalysts $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2(\text{PPh}_3)_2$ and $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2(\text{dppe})$ were pre-prepared and the reactions performed gave the same conversions to those carried out by the *in situ* protocol.

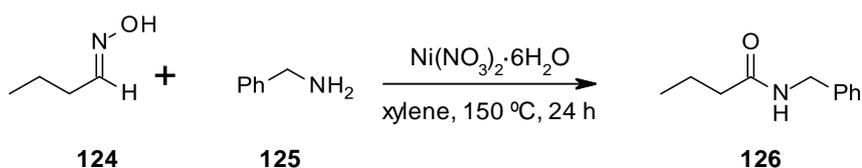
Table 6.3. Effect of ligands.

Entry	Catalyst	Ligand (%)	% ¹ H-NMR				
			124	125	126	127	128
1	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	PPh ₃ (10%)	-	21,2	78,8	-	-
2	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	TMEDA (10%)	-	20	40	-	40
3	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	bipy (5%)	-	81,8	18,2	-	-
4	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	dppe (5%)	-	27	73	-	-
5	NiCl ₂ ·6H ₂ O	PPh ₃ (10%)	-	-	51	-	49
6	NiCl ₂ ·6H ₂ O	TMEDA (10%)	-	32,2	32,3	-	35,5
7	NiCl ₂ ·6H ₂ O	bipy (5%)	-	59	41	-	-
8	NiCl ₂ ·6H ₂ O	dppe (5%)	-	66	20,2	-	13,8
9	Cu(OAc) ₂	PPh ₃ (10%)	-	56,4	29,6	-	14
10	Cu(OAc) ₂	TMEDA (10%)	-	-	72	6,5	21,5
11	Cu(OAc) ₂	bipy (5%)	-	-	78	22	-
12	Cu(OAc) ₂	dppe (5%)	13,5	80	6,5	-	-
13	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	PPh ₃ (10%)	23	11,5	65,5	-	-
14	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	TMEDA (10%)	18	71,3	10,7	-	-
15	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	bipy (5%)	28,7	71,3	-	-	-
16	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	dppe (5%)	13	80	7	-	-

PPh₃ and dppe were the ligands which led to better conversions using Ni(NO₃)₂·6H₂O (Table 6.3, entries 1 and 4). In the case of NiCl₂·6H₂O, PPh₃ afforded the highest conversion to **126** (51%) (Table 6.3, entry 5). TMEDA, bipy and dppe led to amide **126** in lower yields (41%) and benzylamine **125** was recovered in significant quantities (Table 6.3, entries 6, 7 and 8). Moreover, reaction with TMEDA or dppe gave the amide **128** (Table 6.3, entries 6 and 8). When the reaction was carried out using Cu(OAc)₂ and bipy or TMEDA, amide **126** was obtained in 78% and 72% yield, respectively (Table 6.3, entry 10 and 11). However, the use of PPh₃ and dppe gave the

recovered benzylamine **125** in over 50% yield and amide **126** than 30% yield (Table 6.3, entries 9 and 12). The most successful ligand with this system proved to be PPh₃ (Table 6.3, entry 13). All other ligands studied gave lower yields of **126** in addition to the recovery of starting materials (Table 6.3, entries 14, 15 and 16).

In summary, the optimization of the reaction conditions (catalyst, solvent, temperature) for the synthesis of *N*-benzylbutyramide has been carried out. We found that the optimal conversions were obtained using Ni(NO₃)₂•6H₂O (5% mol) in *p*-xylene at 150 °C. The presence of phosphorus ligands such as PPh₃ and dppe, did not improve the yield of the process (Scheme 6.3).



Scheme 6.3

6.3. EXPERIMENTAL SECTION

Reactions were carried out following the same general procedure as described below and using a Radleys carousel tube (Figure 1).



Figure 6.1. Radleys carousel tube.

ANNEX: WORK PERFORMED AT THE UNIVERSITY OF BATH

General procedure: Catalyst (5% mol), and ligand if used, were added into a carousel tube and kept under nitrogen for 15 minutes. Then, benzylamine **125** (0.22 mL, 2 mmol), solvent (2 mL) and butyraldoxime **124** (0.21 mL, 2.2 mmol) were added. The carousel tube was closed and the reaction mixture was heated to the corresponding temperature for the time indicated in each case. Finally, the reaction mixture was cooled at room temperature, filtered through Celite and extracted with CH₂Cl₂. The solvent was removed under reduced pressure and the crude mixture was analyzed by ¹H-NMR.