



Universidad
de Alcalá

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE HETEROARIIDEN-
3,5-DIHIDROIMIDAZOLONAS Y 4H-OXAZOLONAS
COMO INHIBIDORES DE CALPAÍNA**

Tesis Doctoral

María Morón Galán

Alcalá de Henares, Enero 2012



Universidad
de Alcalá

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE HETEROARIUDEN- 3,5-DIHIDROIMIDAZOLONAS Y 4H-OXAZOLONAS COMO INHIBIDORES DE CALPAÍNA

Tesis Doctoral

Memoria para optar al grado de
Doctor en Química Médica

María Morón Galán

Alcalá de Henares, Enero 2012



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Campus Universitario. Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares, Madrid. Tfno. +34 91 885 46 49 - Fax. +34 91 885 46 86

El **Dr. Antonio Lorente Pérez**, Profesor Titular y Director del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá

Certifica: Que **Dña. María Morón Galán**, Licenciada en Química por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del **Prof. Dr. Juan José Vaquero López** y de la **Dra. Carolina Burgos García**, el trabajo experimental recogido en la presente Memoria y titulado:

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE HETEROARILIDEN-
3,5-DIHIDROIMIDAZOLONAS Y 4-H-OXAZOLONAS
COMO INHIBIDORES DE CALPAÍNA**

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, Enero de 2012

Fdo. Antonio Lorente Pérez



Universidad
de Alcalá

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Campus Universitario. Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares, Madrid. Tfno. +34 91 885 46 49 - Fax. +34 91 885 46 86

Los abajo firmantes, **Prof. Dr. Juan José Vaquero López**, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá y **Dra. Carolina Burgos García**, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá

Certifican: Que la Memoria presentada por **Dña. María Morón Galán**, con el título:

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE HETEROARILIDEN-
3,5-DIHIDROIMIDAZOLONAS Y 4-H-OXAZOLONAS
COMO INHIBIDORES DE CALPAÍNA**

ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica 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, Enero de 2012

**Fdo. Prof. Dr. Juan José
Vaquero López**

**Fdo. Dra. Carolina
Burgos García**

La etapa como estudiante de doctorado, al ser un periodo formativo, tiene como finalidad APRENDER. Es verdad que parte de ese aprendizaje te viene dado por tu experiencia dentro del laboratorio en donde una suma de resultados negativos, en momentos determinados, te hacen desear no aprender más... lo único que quieres es que te salgan todas la reacciones jeje. Pero otra parte de ese aprendizaje, también muy importante, te viene de las personas que te rodean tanto dentro del laboratorio como fuera de él y que han contribuido, de algún modo, en esta tesis.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis al Prof. Juan José Vaquero y a la Dra. Carolina Burgos. A Juanjo le agradezco, primero que me aceptara en su grupo para poder realizar la tesis y segundo todo su apoyo y ayuda en intentar resolver las dificultades que me he ido encontrando en el proyecto, al igual que su confianza depositada. A Carolina me gustaría agradecerla que siempre haya estado disponible para cualquier duda que he tenido, ayudándome con sus consejos a poder realizar esta tesis. Y a los dos por la motivación que han mostrado en este trabajo, ya que eso se contagia.

A la Universidad de Alcalá mi agradecimiento por la concesión de la beca que me ha permitido poder realizar mi tesis.

Al Prof. Julio Álvarez-Builla y al resto de profes (Marisa, Lourdes, David, Ramón, Ana, ... etc.) agradecerles su buena disposición siempre que he necesitado ayuda.

No puedo olvidar a nuestra secretaria, Gloria, menos mal que estás y nos recuerdas todos los plazos, que haríamos sin ti! y a los técnicos de laboratorio Eugenia y Desi.

Agradecer a todas aquellas personas que han colaborado y han contribuido directamente para la realización de esta tesis:

Al Dr. Mijail Galakhov por su ayuda en los estudios de resonancia magnética nuclear y por resolver las dudas que han ido surgiendo. Al Dr. Antonio Salgado (CNIO) por su colaboración en la determinación estructural con los estudios de resonancia. A la Dra. Leonor Nozal (Planta Piloto de Química Fina) por el trabajo realizado para la separación de compuestos por HPLC preparativo. Al Dr. Bernardo Herradón (CSIC) por los estudios de modelado molecular. A la Dra. Marta Elena González Mosquera (Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá) por la resolución de Rayos X. Agradecer a los que han realizado los ensayos de actividad biológica, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá, a Mercedes Griera por su trabajo y porque colaborar con ella ha sido muy fácil, al Dr. Diego Rodríguez Puyol por su ayuda en el mundo de la calpaína y de manera especial y personal agradecer a la Dra. María Luisa Díez Marqués y al Prof. Manuel Rodríguez

Puyol, porque gracias a ellos empecé en este mundo de la investigación y siempre me animaron y lo siguen haciendo a continuar con mi trabajo. Manolo sé que envidias la, según tú, privilegiada posición de becaria, cuando quieras nos cambiamos eh? Jaja.

Y por supuesto agradecer a aquellas personas que me 'sufren' día a día en el laboratorio, me estoy refiriendo a mis compis. Primeramente a aquellos que ya no están en el labo, a Arantxa y Araceli, con ellas compartí mis mejores momentos en el laboratorio y me ayudaron muchísimo en mis comienzos y sobre todo me encanta, después de estos años, poder seguir contando con su amistad. A Alejandro porque me descubrió el mundo de la investigación y a Rafa porque siempre estuvo allí para aclararme todas las dudas, y resolverme mi pregunta preferida ¿cuál es el pka de ...? jeje. Dentro de los que siguen en el laboratorio agradecer de una manera especial a Marta, por soportar mi 'orden', por ayudarme siempre tanto dentro como fuera del laboratorio, por los momentos tan buenos que hemos pasado, porque siempre me has animado cuando lo he necesitado, y porque esta tesis no hubiera sido lo mismo sin ... tus broncas jajajaja (es broma maja, que te quiero tía eres una gran persona y muy buena amiga). Gracias a Bea, porque ha sido muy guay compartir estos años contigo, por las risas que hemos tenido, por esos grandes congresos (siempre me acordaré de Virgi:), por toda tu ayuda y por esas conversaciones de las que he aprendido un montón. A Valentina, no sólo porque es la persona que hace el mejor tiramisú del mundo, sino por toda tu ayuda siempre que la he necesitado. A Tati, porque eres una gran compañera y porque siempre has estado ahí dispuesta a ayudarme sobre todo en el mundo tan difícil de la informática. A Elena por las laaarrgggaasss conversaciones (sobre todo después de vacaciones jeje) podríamos ser psicólogas, es un placer hablar contigo. A Patri, porque el mundo de la química medica es complicado pero esta genial poder compartirlo contigo. A Raúl, Gonzalo, Katerina, Anna, Felipe y Fabiana, espero no dejarme a nadie, gracias por todo.

No puedo olvidar al mundo inorgánico importantísimo en mi periodo de tesis, ya que me llevo buenas amigas con las que he compartido mis alegrías y mis penas durante estos años, Agradecer a Lore, porque lo hemos pasado genial y porque me encanta poder contar contigo, a Mari Carmen por acompañarme en esos viajes de vuelta en el tren del infierno jeje, y porque tienes una gran virtud que es saber escuchar. A Cris por las risas en nuestra gran carrera en el mundo del pádel y porque me has ayudado siempre que lo he necesitado y a Alba porque la alegría y la ilusión con la que haces cada cosa, hace que la gente quiera estar a tu lado.

Fuera del mundo de la química hay muchísimas personas que me han ayudado y por eso se lo quiero agradecer.

En primer lugar quiero agradecer a mis amigas 'LAS PARDAS' y sus correspondientes, claro, a: Anafer, Ana Mari, Bordis, Cabe, Chiki, Dono, Maby, Natalita, Palaces, Sasa, Sisi, Tere y Vero, porque sois las mejores amigas que nadie puede tener, porque cada una de vosotras me aporta algo que me hace ser mejor persona, y siempre estáis ahí cuando os necesito, animándome y apoyándome. Pero sobre todo gracias por todos los buenísimos momentos de estos años y de los que nos quedan por vivir, por las risas, viajes, charlas, salidas nocturnas, Vistillas con sus pipas Tijuana ... que nunca podré olvidar. De una manera especial me gustaría mencionar a Chiki y Alfonso, porque sois un ejemplo de superación en la vida, de la que no dejo de aprender. Gracias a todos, os quiero un montón.

A aquellos que me acompañaron en mis años de universidad en la Autónoma, a Mario, Nuria, Juli, Laura, Inma pero sobretodo a mis amigos que soportan mi ocupación de agenda a Cristi, Gonzalito y Marta, porque junto a vosotros pasé los mejores años de mi vida, por esos increíbles viajes, gracias por todos vuestros consejos y por poder seguir contando con vuestra amistad después de estos años.

También quiero agradecer a Lourdes y Raúl que siempre me habéis hecho partícipes de vuestra vida y los buenísimos momentos que hemos pasado. A Manuel, porque eres una persona increíble, admiro tu discreción y prudencia que hacen de ti ser un gran amigo. A las personas que conocí en un pueblo de Venezuela llamado Morichalito, en especial a Socorro y Josefa (seguro que me estás viendo por un agujerito), que son modelos de bondad dando su vida por los demás, si todos fuéramos como ellas el mundo iría de manera diferente. A Raquel, ha sido genial haber compartido esos veranos contigo que no hubieran sido lo mismo sin ti, ya nos queda poco para acabar. Por último, y no por eso menos importante jeje, a Álvaro porque cada día me descubres algo nuevo, gracias por toda tu comprensión y sobre todo por tu paciencia, me encanta estar contigo.

Y por supuesto no podría olvidar a las personas más importantes de mi vida, mi familia.

A mis padres y hermano, la verdad que no encuentro las palabras adecuadas para agradecer todo lo que hacéis por mí, porque sois los que más me aguantáis en los malos momentos. A mis padres les debo todo lo que soy, siempre me animáis en todo lo que hago y con vuestro apoyo sigo adelante, gracias por creer en mí y aunque no os lo diga lo suficiente, sabéis que os quiero muchísimo, no sé qué haría sin vosotros. A mi hermano Jorge, porque eres una de las personas más buenas que conozco con un gran corazón, sé que no ha sido fácil tenerme como hermana mayor jaja, pero todo lo hago por tu bien, además te he dejado un montonazo de días el mando de la tele jeje.

A mis tíos y primos, y como pertenezco a una familia bastante numerosa no los voy a nombrar a todos que no acabo, porque se agradece saber que cuento con una familia que está ahí, siempre preocupándose y preguntándome por la tesis, parece que ya llega el final. En especial quería agradecerle a mi tío Dani por todo el trabajo que has hecho en el diseño de la tesis, menos mal que tenemos un artista en la familia, y a mi tío Jaime, por ser mi modelo profesional... tío yo de mayor quiero ser como tú jeje.

Y por último me gustaría agradecer a las personas a las que va dedicada esta tesis, MIS ABUELOS, ojala yo consiguiera ser la mitad de lo que son ellos. A mi abuela María, porque tu alegría hace que sea todo un placer pasar tiempo contigo, esa risa contagiosa que ensancha los pulmones y llena de luz todos los rincones de la casa, te agradezco todo lo que haces por mí, porque tú y yo sabemos que desde que me regalaste el San Pancraccio me fue mejor la química jeje, gracias por todo el cariño que me das cada día, ya sé que soy tu nieta preferida aunque claro soy la única jaja. A mi abuelo Julián, porque si algo he aprendido de ti, es que trabajando es como se consiguen las cosas, siempre he valorado tu afán de superación y esfuerzo por sacar a delante a todos pero sobre todo tu bondad. A mi abuela Rosa, porque siempre que me siento en esa mesa camilla junto a ti, te conviertes en nuestra confidente, yo creo que utilizas esa maravillosa comida para sacarnos información jaja, siempre he admirado tu discreción, elegancia y saber estar, pero en especial el cariño que me demuestras día a día. A mi abuelo Juan, que aunque desgraciadamente no le conocí mucho me hubiera encantado poder haber escuchado todas esas historias y disfrutar de su compañía y cariño. Tengo muchísima suerte de tenerlos a mi lado, entre todos habéis formado una gran familia a la que estoy muy orgullosa de pertenecer. OS QUIERO.

A mis abuelos

ac	Acuoso
at	Triplete aparente
Ac₂O	Anhídrido acético
AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AIBN	Azabis(isobutironitrilo)
AMC	7-Amino-4-metilcoumarina
APCI	Ionización química a presión atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
Ar	Arilo / Argón
Arg	Arginina
ATA	Ácido aurintricarboxílico
atm	Atmósfera
BMIM	1-Butil-3-metilimidazolio
Bn	Bencilo
t-Bu	<i>tert</i> -Butilo
t-BuOH	<i>tert</i> -Butanol
Bu₃Sn	Tributilestannilo
Bz	Benzoilo
°C	Grado centígrado
cat.	Catalítico / Catalizador
CAPN	Calpaína
col.	Colaboradores
COSY	(<i>Correlation Spectroscopy</i>)
¹³C RMN	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
Cys	Cisteína
d	Doblete
d	Deuterado
δ	Desplazamiento químico, en ppm
Δ	Reflujo
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
dd	Doblete de dobletes
deg	Degradianes
Desc.	Descomposición / descompone

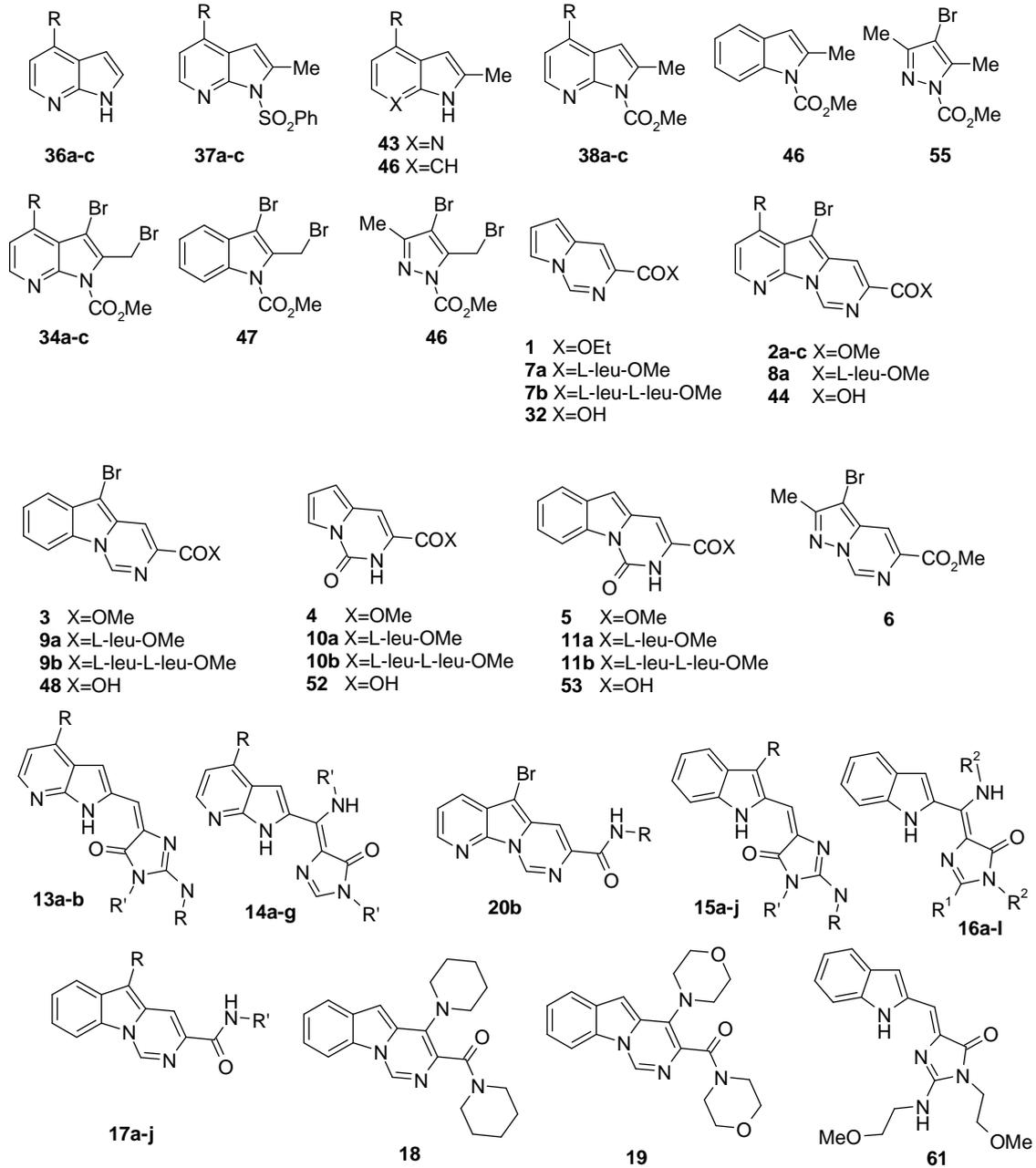
GLOSARIO DE ABREVIATURAS

DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DME	Dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Doblete de triplete
E⁺	Electrófilo
ED₅₀	Dosis efectiva al 50%
EDC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
EGF	<i>(Epidermal growth factor)</i>
eq.	Equivalentes
EH	Enlace de hidrógeno
ER	Receptores de estrógeno
ERN	<i>(Extracelular signal-regulated kinase)</i>
ESI	Ionización por electrospray <i>(ElectroSpray Ionization)</i>
Et	Étilo
Et₃N	Trietilamina
Et₂O	Diethyléter
EtOH	Etanol
eV	Electronvoltios
h	Horas
Het	Heterociclo
Hit	Cabeza de serie
His	Histidina
HMBC	<i>(Heteronuclear multiple bond correlation)</i>
HOMO	<i>(Highest occupied molecular orbital)</i>
HOBT	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia <i>(High Performance Liquid Chromatography)</i>
HRMS	Espectrometría de Masas de alta resolución <i>(High Resolution Mass Spectrometry)</i>
¹HRMN	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
HTT	<i>(Huntington protein)</i>
Hz	Hercio
IC₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IVC	Isovalerocarnitina
Inh	Inhibición

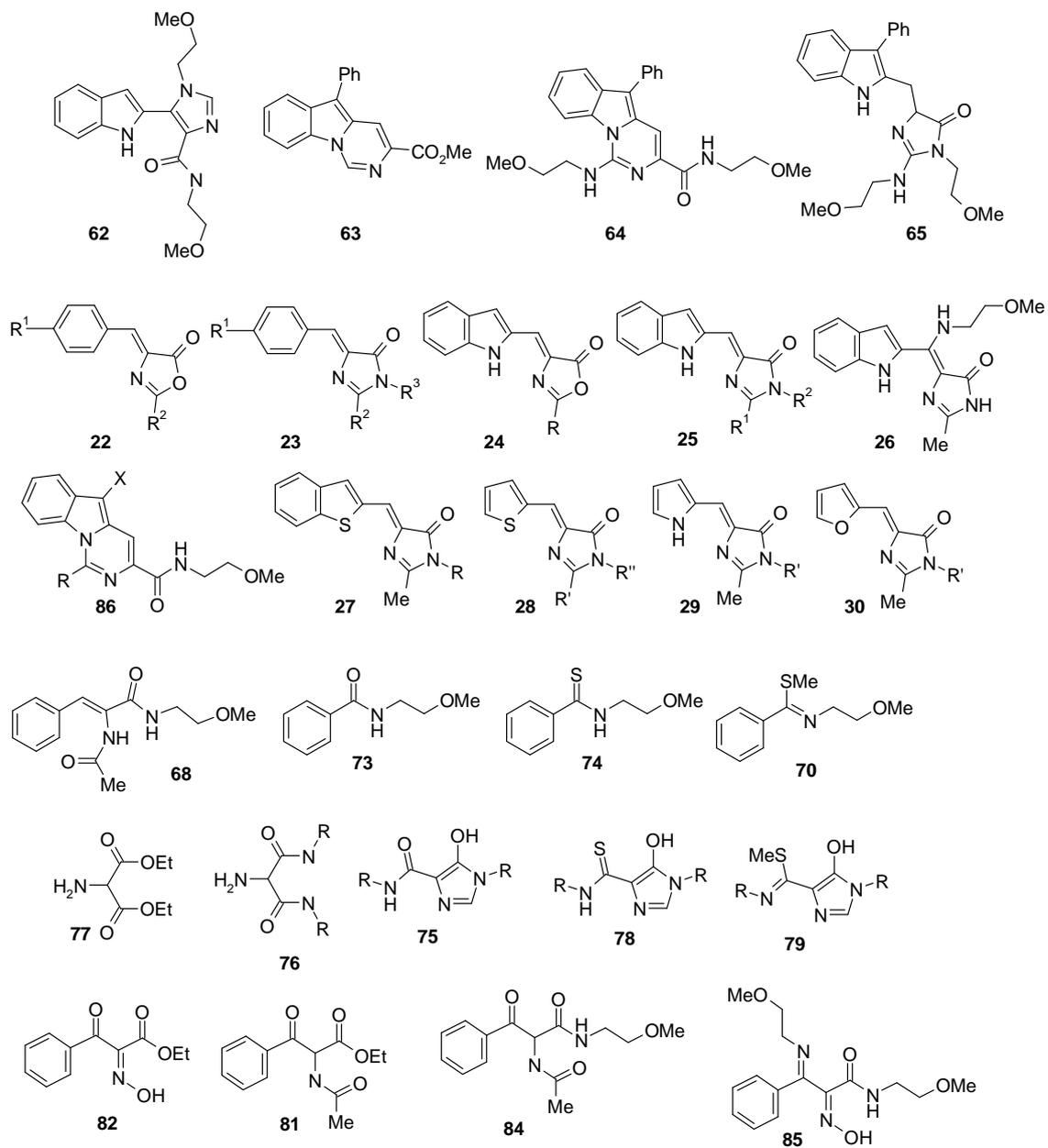
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento, en hercios
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramos
K_i	Constante de disociación del complejo enzima-inhibidor
LDA	Diisopropilamiduro de litio
Leu	Leucina
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amiduro de litio
Lit.	Literatura
LUMO	<i>(Lowest unoccupied molecular orbital)</i>
m	Multiplete
M	Molaridad
MCPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico
Me	Metilo
MeI	Yoduro de metilo
MeNH₂	Metil amina
MeO	Metoxi
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertzios
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MW	Microondas
m/z	Relación masa/carga
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
NIS	<i>N</i> -Yodosuccinimida
NIDDM	Diabetes mellitus no dependiente de insulina
nM	Nanomolar
NOE	<i>(Nuclear Overhauser Effect)</i>
NOESY	<i>(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)</i>
PBH	Pal B-homólogo
P.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo
Ph₂O	Difenil éter

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

PKA	Fosforil kinasa A
ppm	Partes por millón
PTC	Catálisis de transferencia de fase
q	Cuadruplete
R	Sustituyente
Rdto.	Rendimiento
ROESY	<i>(Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy)</i>
s	Singlete
sa	Singlete ancho
SAR	Estudio relación estructura-actividad
SOL H	<i>(Small optic lobe homology)</i>
t	Triplete
T	Temperatura
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2
t.a.	Temperatura ambiente
TBACl	Cloruro de tetrabutilamonio
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio
td	Triplete de dobletes
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético
TMG	1,1,3,3-tetrametilguanidina
TOCSY	<i>(Total Correlation Spectroscopy)</i>
TosMIC	Tosilmetilisonitrilo
Ts	Tosilo
TMSS	Tris(trimetil)silil silano
Tyr	Tirosina
µM	Micromolar
X	Halógeno / haluro



GLOSARIO DE ESTRUCTURAS



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. CALPAÍNAS	9
2.1.1. Introducción	9
2.1.2. Generalidades: Estructura y clasificación	10
2.1.3. Estructura de calpaína	13
2.1.4. Mecanismo de activación y de regulación de la calpaína	17
2.1.5. Función fisiológica de la calpaína	20
2.1.6. Implicación de la calpaína en enfermedades humanas	22
2.1.6.1. Calpaínas implicadas en la enfermedad renal	25
Calpaína 10 y la diabetes tipo 2	25
Calpaína 5 y el síndrome metabólico	26
2.2. INHIBIDORES DE CALPAÍNA	27
2.2.1. Inhibidor natural: calpastatina	27
2.2.2. Inhibidores sintéticos	29
2.2.2.1. Inhibidores peptídicos	29
Peptidil epóxidos	29
Peptidil aldehídos	31
Peptidil α -cetocarboxil derivados	37
Inhibidores peptídicos sin un grupo funcional clásico	41
2.2.2.2. Inhibidores no peptídicos	44
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
3.1. INTRODUCCIÓN	51
3.1.1. Síntesis de pirrolo[1,2-d]pirimidina	55
3.1.2. Síntesis total de la variolina B	56
3.2. HÍBRIDOS PÉPTIDOS-HETEROCICLO	61
3.2.1. Síntesis de heterociclos	61

3.2.2. Síntesis de péptidos	68
3.2.3. Síntesis de híbridos péptido-heterociclo	69
3.2.4. Reacción de pirrolopirimidinas con 2-metoxietilamina	74
3.2.5. Ensayos de inhibición de calpaína	87
3.3. MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL	91
3.3.1. Obtención de la conformación de mínima energía	93
3.3.2. Cálculo de las propiedades electrónicas	93
3.3.3. Cálculo de superficies de energía potencial	95
3.4. REACCIÓN DE LAS AZOLOPIRIMIDINAS 2a Y 3 CON AMINAS	98
3.4.1. Reacción de otras azolopirimidinas con 2-metoxietilamina	103
3.4.2. Ensayos de inhibición de calpaína de los compuestos 13-16, 18 y 19 .	105
3.4.3. Estudio de la reacción de pirrolopirimidinas con 2- metoxietilamina: optimización y mecanismo.	110
3.4.3.1. Optimización de la reacción	110
3.4.3.2. Mecanismo de la reacción	127
3.5. BÚSQUEDA DE RUTAS SINTÉTICAS ALTERNATIVAS	137
3.5.1. Ruta a	140
3.5.1.1. Síntesis de benzilidenoxazolonas 22	141
3.5.1.2. Síntesis de benzilidenimidazolonas 23	142
3.5.1.3. Reacción de oxazolonas 22 e imidazolonas 23 con aminas	143
3.5.1.4. Reacciones de aza-Michael	145
3.5.2. Ruta b	146
3.5.3. Ruta c	148
3.5.4. Ruta d	150
3.5.5. Ensayos de inhibición de calpaína para los compuestos 22, 23 y 68 .	152
3.6. OBTENCIÓN DE POSIBLES INHIBIDORES DE CALPAÍNA POR RUTAS ALTERNATIVAS	154

3.6.1. Derivados de indol	154
3.6.1.1. Síntesis de indolometilenoaxazonas	154
3.6.1.2. Síntesis de indolmetilimidazonas	154
3.6.1.3. Reacción de indolometilimidazonas con 2-metoxietilamina	156
3.6.1.4. Ensayos de inhibición de calpaína para los compuestos 16 , 24 , 25 y 26a .	164
3.6.2. Derivados de otros heterociclos	168
3.6.2.1. Ensayos de inhibición de calpaína.	170
4. PARTE EXPERIMENTAL	179
4.1. SÍNTESIS DE PIRROLO[1,2- <i>d</i>]PIRIMIDINAS	183
4.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PIRROLO[2,3- <i>b</i>]PIRIDINA	184
4.3. SÍNTESIS DE 1-(BENCENOSULFONIL)PIRIDO[2,3- <i>b</i>]PIRIDINAS	187
4.4. SÍNTESIS DE 1-(BENCENOSULFONIL) PIRIDO[2,3- <i>b</i>] 2-SUSTITUÍDAS	189
4.5. SÍNTESIS DE PIRROLO[2,3- <i>b</i>]PIRIDINAS 2-SUSTITUÍDAS	192
4.6. SÍNTESIS DE <i>N</i> -METOXCARBONIL-2-METILAZOLES	195
4.7. REACCIONES DE HALOGENACIÓN DE AZOLES	198
4.7.1. Reacción de dibromación	198
4.7.2. Reacciones de monobromación radicalica	200
4.8. REACCIONES DE HETEROCICLACIÓN CON TosMIC	201
4.9. REACCIÓN DE SUZUKI- MIYAJURA	204
4.10. SÍNTESIS DE PIRROLOPIRIMIDONAS	204
4.11. REACCIONES DE HIDRÓLISIS	206

4.12. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	209
4.12.1. Reacción de esterificación de aminoácidos	209
4.12.2. Reacción de protección con el grupo Boc	210
4.12.3. Reacción de acoplamiento peptídico	211
4.12.4. Reacción de desprotección del grupo Boc	211
4.13. SÍNTESIS DE HÍBRIDOS PÉPTIDO-HETEROCICLO	212
4.13.1. Reacción de acoplamiento de los heterociclos con el clorhidrato de L-Leucina carboxilato de metilo	212
4.13.2. Reacción de acoplamiento de los heterociclos con trifluoroacetato de L-leucina- <i>N</i> [(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-L-leucil-carboxilato de metilo	217
4.14. REACCIÓN DE PIRROLOPIRIMIDINAS CON AMINAS	222
4.14.1. Reacción de 3- Pirrolo[1,2- <i>c</i>]pirimidina carboxilato de etilo (1) con 2-metoxietilamina	222
4.14.2. Reacción de 5-Bromo-pirido[1,6- <i>a</i>]indol-3-carboxilato de metilo (3) con distintas aminas	223
4.14.3. Reacción de 5-bromo-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2- <i>c</i>]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2a) con distintas aminas	246
4.14.4. Reacción de 5-bromo-4-cloro-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2- <i>c</i>]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2b) con 2-metoxietilamina	252
4.14.5. Reacción de 5-Bromo-4-metoxi- pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2- <i>c</i>]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2c) con 2-metoxietilamina	253
4.14.6. Reacción de 3- bromo- 2- metal-pirazolo[2,3- <i>c</i>]pirimidina-5-carboxilato de metilo (6) con 2-metoxietilamina	255
4.14.7. Reacción de 5-Fenil-3-metoxicarbonilpirido[1,6- <i>a</i>]indol (63) con 2-metoxietilamina	256
4.15. SÍNTESIS DE OXAZOLONAS	259
4.15.1. Obtención de oxazolonas 2-metil sustituidas	259
4.15.2. Obtención de oxazolonas 2-fenil sustituidas	261

4.16. SÍNTESIS DE IMIDAZOLONAS	263
4.16.1. Obtención de imidazolonas 2-metil sustituidas	263
4.16.2. Obtención de imidazolonas 2-fenil sustituidas	273
4.17. REACCIÓN DE BROMACIÓN DE IMIDAZOLONAS	276
4.18. REACCIÓN DE METILAMINA Y 2-METOXIETILAMINA CO OXAZOLONAS E IMIDAZOLONAS	279
4.18.1. Reacción de metilamina y 2-metoxietilamina con oxazolonas	279
4.18.2. Reacción de 2-metoxietilamina con 2-metil o 2-fenil imidazolonas	282
4.18.3. Reacción de 2-metoxietilamina con bromoheteroarilimidazolonas	285
4.19. INTERMEDIOS OBTENIDOS MEDIANTE LA RUTA B	284
4.20. INTERMEDIOS OBTENIDOS MEDIANTE LA RUTA C	292
4.21. INTERMEDIOS OBTENIDOS MEDIANTE LA RUTA D	295
4.22. DATOS DE RAYOS X	298
5. CONCLUSIONES	299
6. SUMMARY	303
7. ANEXO: Trabajo realizado durante la estancia predoctoral en The Scripps Research Institute (La Jolla, Estados Unidos)	309

Nuestro grupo de investigación forma parte desde el año 2007 de la **Red de investigaciones de enfermedades renales** (REDinREN, www.redinren.eu), financiada por el Instituto de Salud Carlos III. Nuestro grupo fue seleccionado como grupo de síntesis química para abordar el diseño y desarrollo de nuevas moléculas bioactivas frente a dianas implicadas en la enfermedad renal. Esta investigación se realiza en colaboración con otros grupos de investigación básica o clínica de REDinREN, que desarrollan investigaciones punteras en la identificación de dichas dianas o en el estudio de aquellas identificadas como relevantes en el desarrollo de patologías renales.

Las enfermedades o trastornos que afectan al riñón constituyen un conjunto numeroso de patologías (nefropatías) que se engloban genéricamente bajo la denominación de *enfermedad renal*. La aparición y evolución de estos trastornos nefrológicos puede acabar alterando la función renal normal y adoptar la forma clínica de 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. Se suele producir afectación renal a partir de los 10 años de evolución de la diabetes, aunque se manifiesta clínicamente a los 20 años. Influye en la evolución el control de la diabetes y la aparición de patologías acompañantes.
- **Hipertensión arterial:** produce una sobrecarga de presión en todo el sistema vascular. En el riñón 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. El proceso se agrava con la edad.
- **Glomerulonefritis:** consiste en una afectación glomerular acompañada de afectación vascular e intersticial renal en algunos casos. De origen inmunológico, mediada por anticuerpos contra antígenos renales o de depósito de anticuerpos unidos a antígenos procedentes de otros órganos o sistemas.
- **Nefritis tubulointersticiales:** procesos que afectan de forma predominante al intersticio -una de las zonas del riñón- con destrucción de túbulo y vasos, lo cual da lugar a una isquemia y atrofia renal. Las causas son muy

diversas, aunque predominan las tóxicas por abuso de fármacos (sobre todo analgésicos), que producen daño tubular y fibrosis intersticial.

- **Procesos renales hereditarios:** representados en prácticamente su totalidad por la poliquistosis renal. Es un proceso hereditario que se transmite de forma autosómica dominante. Se trata de un defecto en la formación de los túbulos renales, que degeneran en quistes que crecen progresivamente y destruyen el parénquima renal sano.

Nuestro grupo ha abordado una investigación que tiene como objetivo varias dianas terapéuticas de interés para el plan estratégico de REDinREN:

- a) Angiotensina II/daño oxidativo.
- b) Calpaína (una familia de tiolproteasas).
- c) Proteínas que se unen a los ácidos grasos (Fatty acid binding proteins, FABPs).
- d) Fosfatasa 1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B, PTP1B).

Estas dianas están implicadas en patologías como hipertensión, daño vascular, diabetes Tipo 2 y obesidad, todas ellas relacionadas con la aparición de la enfermedad renal, fundamentalmente bajo la forma de enfermedad renal crónica (ERC), como ya se ha indicado anteriormente.

El proyecto de Tesis Doctoral presentado en esta memoria, tiene como objetivo a las calpaínas, una familia de enzimas dependientes de calcio que pertenecen al grupo de las cisteína proteasas neutras, también llamadas tiolproteasas. Las calpaínas son responsables de la proteólisis neutra calcio-dependiente, en virtud de un dominio de unión al calcio. La regulación de esta enzima está implicada en numerosas enfermedades; más concretamente algunas de sus isoformas, las calpaínas 10 y 5, han adquirido gran interés por su posible implicación en la aparición de la diabetes mellitus Tipo 2 y síndrome metabólico, respectivamente. De ahí la importancia del desarrollo de inhibidores de calpaína para el posible tratamiento de estas enfermedades, en las que la calpaína juega un papel relevante.

A lo largo de estos años se han descrito un gran número de inhibidores de calpaínas, tanto reversibles como irreversibles, de carácter peptídico (o péptido miméticos) o no peptídico. Aunque se ha llegado a conseguir compuestos con potentes actividades inhibitorias, existen diversas limitaciones que restringen su uso en terapéutica, entre las que cabe destacar su falta de selectividad frente a calpaína, relativa a otras tiolproteasas y un perfil farmacocinético poco adecuado (mala absorción, baja solubilidad en agua, inestabilidad química... etc.)

Dentro de este contexto, esta Tesis tiene como objetivo principal la síntesis y evaluación de la actividad biológica de nuevos inhibidores de calpaína. El planteamiento inicial para lograr este objetivo se centraba en la síntesis de híbridos **péptido-heterociclo**, como los representados en la **Figura 1.1** en los que el sistema heterocíclico está constituido por distintos derivados del sistema de azolopirimidina cuya síntesis se había llevado a cabo anteriormente en nuestro grupo.

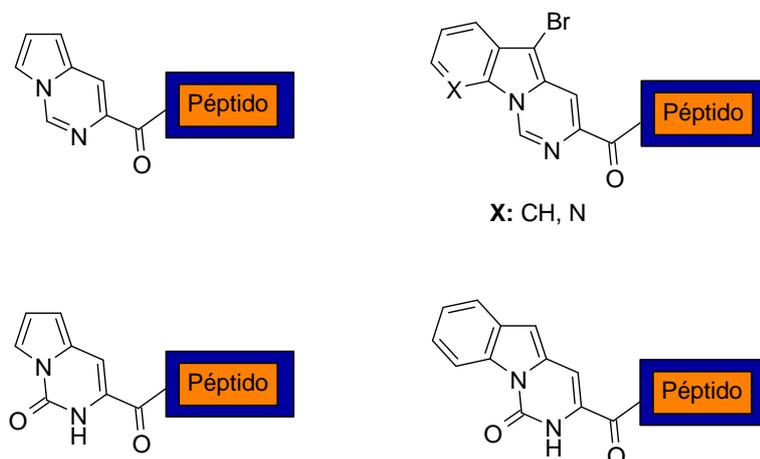
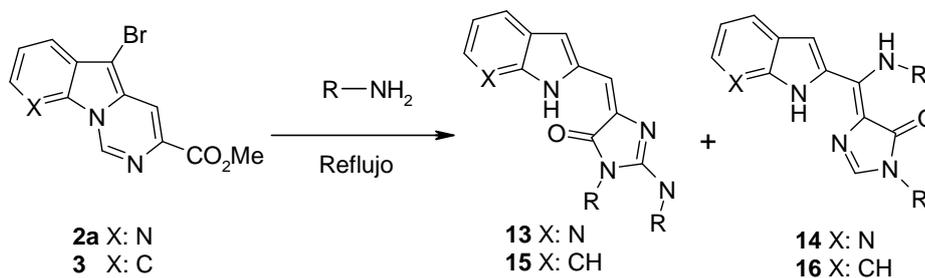


Figura 1.1

En el curso de la síntesis de estos sistemas se produjo una reacción inesperada que produjo la apertura del sistema de pirrolopirimidina generando los derivados de azaindol representado en el **Esquema 1.1**. El derivado **14a** (R= CH₂CH₂OMe) mostró poseer una importante actividad como inhibidor de calpaína y fue considerado como cabeza de serie (*hit*) para llevar a cabo sobre él un estudio de relación estructura-actividad (*SAR*) y obtener un candidato (*lead*) con actividad mejorada.



Esquema 1.1

La memoria de esta tesis detalla la síntesis de un importante número de análogos obtenidos al introducir diversidad estructural en los tres dominios detallados en la **Figura 1.2** para el cabeza de serie. Asimismo, incluye estudios básicos de modelado molecular sobre **14a**, estudios estructurales y de rayos X para la caracterización de los compuestos obtenidos, propuestas de mecanismos de formación y la evaluación biológica de todos los compuestos sintetizados como inhibidores de calpaína.

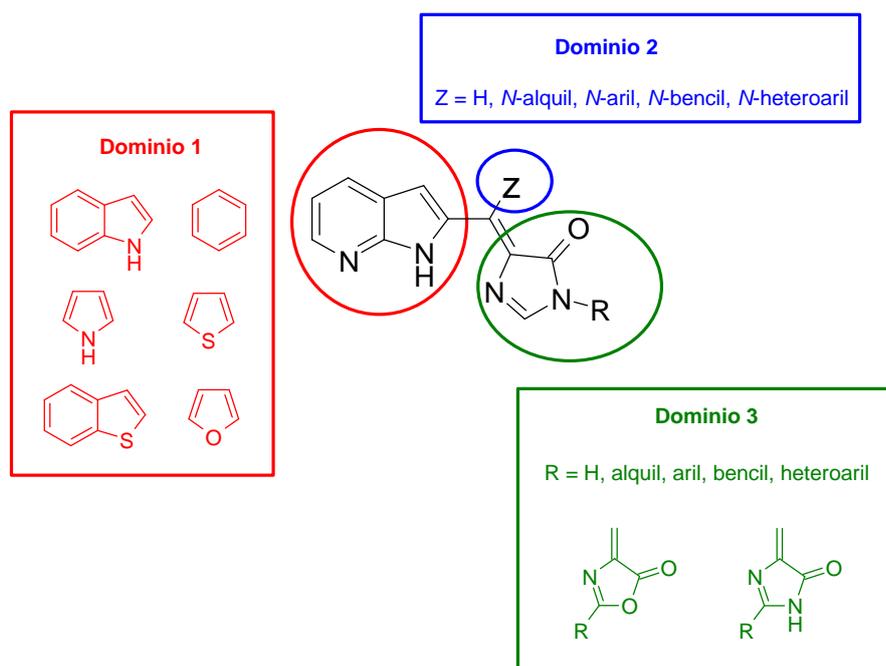


Figura 1.2

2.1. CALPAÍNAS

2.1.1. Introducción

La historia de las calpaínas se remonta a mediados de los años 60, cuando Guroff¹ describe por primera vez una proteasa neutra dependiente de calcio en una fracción soluble del cerebro de rata, que finalmente fue purificada a homogeneidad como una enzima por Ishiura y col. en 1978.² Esta proteasa se denominó 'calpaína'.³ Este nombre deriva de sus similitudes con dos proteínas conocidas en ese momento: la calmodulina, que es la proteína reguladora en la transducción de la señal de calcio en la célula, y la papaína, una cisteín proteasa presente en la papaya.

Las calpaínas constituyen una familia de enzimas dependientes de calcio para su actividad. Pertenecen al grupo de las cisteín proteasas neutras e incluyen una gran variedad de isoformas, las cuales, pueden expresarse de forma ubicua como la m-calpaína, μ -calpaína, calpaína 4, calpaína 5... etc o en tejidos específicos como en el músculo (calpaína 3), en el estómago (calpaína 8), en la retina... etc.⁴

Las calpaínas están involucradas en una gran variedad de procesos celulares regulados por calcio, tales como la modulación de la señal de transducción de proteínas, proliferación celular y diferenciación, apoptosis, activación de plaquetas, fusión de membranas...etc.^{4,5} Aunque hasta hace poco las calpaínas eran consideradas enzimas citoplasmáticas, estudios recientes han demostrado que alguna de las isoformas se pueden encontrar en las mitocondrias⁶ (m-calpaína, μ -calpaína y la calpaína 10), por lo que se le atribuye un papel muy importante en procesos de necrosis y apoptosis celular, como ya se ha indicado anteriormente.

¹ Guroff, G. *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 149-155

² Ishiura, S; Murofushi, H; Suzuki, K; Imahori, K. *J. Biochem.* **1978**, 84, 225-230.

³ Murachi, T.; Tanaka, K.; Hatanaka, M.; Murakami, T. *Advances in Enzyme Regulation* **1981**, 407-424.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H; Wei, W; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, 83, 731-801.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, 12, 615-638.

⁶ Kar, P; Samanta, K; Shaikh, S; Chowdhury, A; Chakraborti, T; Chakraborti, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, 495, 1-7.

La participación de las calpaínas en esta gran variedad de funciones fisiológicas, determina el relevante papel que parecen jugar en distintas enfermedades humanas,^{4,5,7,8,9} como desórdenes neurológicos, isquemia, cáncer, distrofia muscular, Parkinson, cataratas y diabetes, entre otras.

2.1.2. Generalidades: Estructura y clasificación

Los miembros de las calpaínas humanas se caracterizan por poseer como elemento estructural y funcional un dominio¹⁰ proteolítico: el dominio II, que posee una triada catalítica (Cys-His-Arg, en la mayor parte de los casos). La localización de estos aminoácidos determina que, en presencia de Ca^{2+} , se conforme un 'bolsillo catalítico activo'.

Debido al descubrimiento de nuevas proteínas de esta familia, no existe una clasificación claramente definida. Hasta el momento se han dividido en dos grupos diferentes^{7,11} según la estructura de la proteína y la presencia o ausencia de subunidades reguladoras independientes.

Calpaínas típicas o clásicas: (1-3, 8, 9, 11, 12 y 14) todas ellas están constituidas por una unidad formada por cuatro dominios (I-IV) que puede o no, estar asociada a otra subunidad pequeña constituida por los dominios V y VI. Las calpaínas típicas se caracterizan por poseer cinco manos-EF¹⁰ en los dominios IV y VI.

Calpaínas atípicas: (5-7, 10, 13 y 15) los miembros de esta subfamilia resultan bastante dispares poseyendo, al igual que en las calpaínas típicas, un dominio II pero carecen de manos-EF y frecuentemente poseen otros dominios funcionales.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H; Wei, W; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

⁷ Saez, M. E.; Ramirez-Lorca, R; Moron, F. J.; Ruiz, A. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 917-923.

⁸ Branca, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 1098-1104.

⁹ Huang, Y.; Wang, K. K. W. *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 355-362.

¹⁰ **Dominio:** segmento proteico que forma una unidad compacta, estructuralmente independiente, el cual posee una función específica (por ejemplo la unión a un ión o molécula pequeña).

Manos-EF: es un dominio estructural de proteínas del tipo hélice-bucle-hélice, que se encuentra en un gran número de proteínas que se unen al calcio. Consta de dos hélices α (hélice E y hélice F) unidas por una región corta de aproximadamente doce aminoácidos, formando la zona de unión al Ca^{2+} . El motivo toma su nombre de la nomenclatura tradicional de proteínas. Las manos-EF aparecen también en cada dominio estructural de la calmodulina. Mckee T.; Mckee J.R. *Bioquímica*, McGraw Hill Interamericana, **2003**, 3ª Ed, 133-134.

¹¹ Nemova, N. N.; Lysenko, L. A.; Kantserova, N. P. *Ontogenez* **2010**, *41*, 381-389.

En la **Tabla 2.1** se muestra un resumen de las calpaínas encontradas hasta el momento, su ubicación en humanos, las estructuras cristalinas publicadas en su caso y su clasificación.

Tabla 2.1. *La familia de calpaínas.*

Calpaínas	Ubicación	Estructura cristalina	Típica/Atípica
Calpaína 1	Ubicua	Dominio catalítico	Típica
Calpaína 2	Ubicua	Completa	Típica
Calpaína 3	Músculo, retina	-	Típica
Calpaína 4	Ubicua	Dominio VI	Atípica
Calpaína 5	Ubicua	-	Atípica
Calpaína 6	Placenta	-	Atípica
Calpaína 7	Ubicua	-	Atípica
Calpaína 8	Estómago	-	Típica
Calpaína 9	Tracto digestivo	Dominio catalítico	Típica
Calpaína 10	Ubicua y tejido específico	-	Atípica
Calpaína 11	Testículos	-	Típica
Calpaína 12	Ubicua	-	Típica
Calpaína 13	Testículos y pulmón	-	Atípica
Calpaína 14	Ubicua	-	Típica
Calpaína 15	Ubicua	Dominio VI	Atípica

En la **Figura 2.1** se muestra un esquema resumen de la estructura de todas las calpaínas que hasta el momento se conocen en humanos.

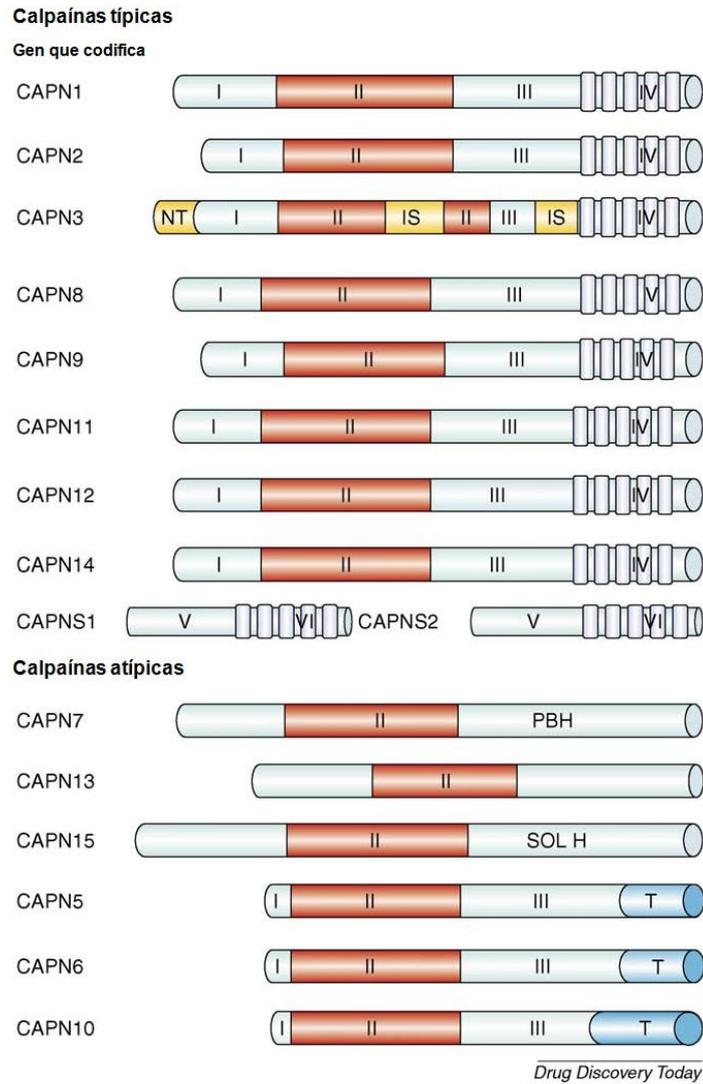


Figura 2.1. Estructura de las diferentes calpaínas (adaptada de ref.7).

⁷ Saez, M. E.; Ramirez-Lorca, R; Moron, F. J.; Ruiz, A. *Drug Discov.Today* **2006**, 11, 917-923.

2.1.3. Estructura de las calpaínas

Los miembros más conocidos de la familia de las calpaínas son las calpaínas clásicas μ -calpaína o calpaína 1 y la m -calpaína o calpaína 2. Los prefijos μ - y m -, derivan de las concentraciones de ion Ca^{2+} requeridas para su activación ($\approx 5 \mu\text{M}$ y $\approx 0.3\text{-}0.5 \text{ mM}$ respectivamente).^{4,12} Ambas son heterodímeros compuestos por una subunidad grande de 80 KDa asociada a una subunidad pequeña de 30 KDa. A su vez la subunidad grande está compuesta por cuatro dominios (I-IV) y la pequeña por dos (V y VI) (**Figura 2.2**).¹³ Como ya se ha comentado anteriormente, el dominio II contiene la triada catalítica Cys-His-Arg y es el dominio proteolítico, mientras que los dominios IV y VI contienen las cinco manos-EF por donde puede unirse a Ca^{2+} .

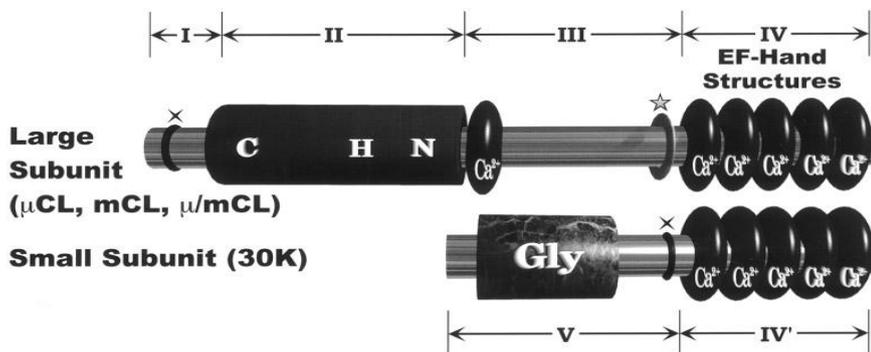


Figura 2.2. Estructura de las subunidades grande y pequeñas de la μ - y m -calpaínas (tomado de ref. 13)

Aunque las subunidades de 80 KDa de la μ - y la m -calpaína son diferentes comparten entre un 55-65% de la secuencia de aminoácidos. Estructuras cristalográficas recientes de la m -calpaína muestran en realidad la presencia, no de cuatro sino de seis dominios^{4,14,15} en la subunidad grande, aunque dos de estos dominios contienen sólo 17 y 18 aminoácidos, por lo que no son considerados como dominios típicos, en la terminología normalmente usada.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H; Wei, W; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

¹² Friedrich, Peter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323*, 1131-1133.

¹³ Ono, Y; Sorimachi, H; Suzuki, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*, 289-294.

¹⁴ Strobl, S; Fernandez-Catalan, C; Braun, Marianne; Huber, R; Masumoto, H; Nakagawa, K; Irie, A; Sorimachi, H; Bourenkow, G; Bartunik, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, *97*, 588-592.

¹⁵ Hosfield, C. M.; Elce, J. S.; Davies, P. L.; Jia, Z. *EMBO J.* **1999**, *18*, 6880-6889.

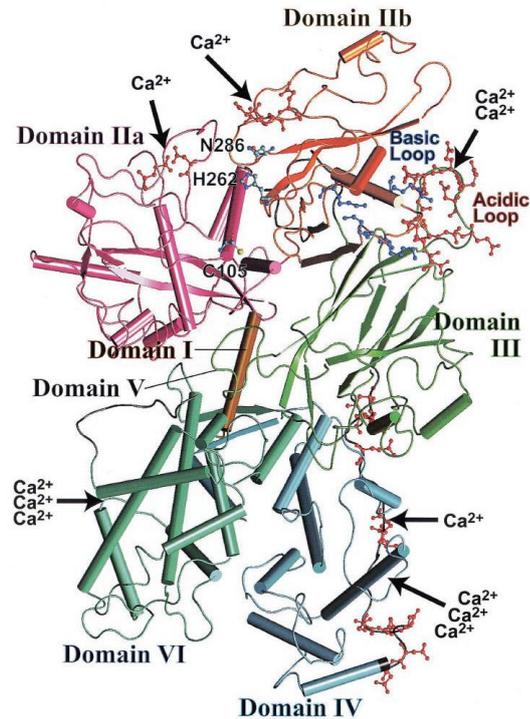


Figura 2.3. Estructura cristalina de la m-calpaína en ausencia de Ca^{2+} (tomado de ref.16).

Mientras que la estructura cristalográfica de m-calpaína está perfectamente descrita,¹⁷ (**Figura 2.3**) no ocurre lo mismo con la μ -calpaína, existiendo únicamente la estructura cristalográfica descrita para el dominio catalítico (ver tabla **Tabla 2.1**). Sin embargo, sí se conoce la secuencia de aminoácidos que forman los dominios de ambas calpaínas, exponiéndose a continuación sus características más relevantes.

- **Dominio I:** es el dominio $-\text{NH}_2$ terminal. Hasta el momento no se conoce ningún otro polipéptido con una secuencia similar. Coincide con el dominio I de otras especies entre 72-86%.

¹⁶ Suzuki, K; Hata, S; Kawabata, Y; Sorimachi, H. *Diabetes* **2004**, 53, S12-S18.

¹⁷ Reverter, D; Sorimachi, H; Bode, W. *Trends Cardiovasc. Med.* **2001**, 11, 222-229.

- **Dominio II:** este dominio contiene la triada catalítica característica de las cisteín proteasas como la papaína o la captasinas B, L, o S. Está constituido por dos subdominios: subdominio IIa y subdominio IIb. Es de señalar que mientras la Cys-105 que constituye parte de la triada catalítica, se encuentra en el subdominio IIa, His-262 y Asn-286, la parte restante de la triada catalítica, se encuentra en el subdominio IIb en la estructura cristalográfica de m-calpaína. De acuerdo con los datos cristalográficos existe una separación entre los dos subdominios de 1.05 nm. Sin embargo, la unión con Ca^{2+} induce una alteración conformacional del tamaño total de la molécula, reduciéndose la distancia entre los residuos de la triada hasta 0.37 nm lo que va a proporcionar una interacción efectiva.
- **Dominio III:** para este dominio tampoco se conoce, hasta el momento, una secuencia similar en otro polipéptido. Además de estar unido al dominio catalítico (dominio II) y al dominio responsable de la unión con el Ca^{2+} (dominio IV), puede estar implicado en la unión con fosfolípidos¹⁸ y en la regulación de la actividad de la calpaína debido a su participación en interacciones electrostáticas,¹⁴ que resultan críticas en estos casos.
- **Dominio IV:** al igual que el dominio VI, la secuencia de este dominio es homóloga a la de la calmodulina conteniendo cinco grupos de manos-EF. Todos los grupos de manos-EF presentes en este dominio pueden unirse al Ca^{2+} , salvo la quinta, que constituye el extremo -COOH terminal y que está involucrada en la dimerización con la subunidad pequeña de 30 KDa.

En cuanto a la subunidad de 30 KDa, es idéntica en la μ - y en la m-calpaína. El dominio V, que es la región -NH₂ terminal de la subunidad, es rico en glicina y se considera un dominio hidrófobo al que se pueden unir fosfolípidos. Este dominio nunca se ha podido caracterizar en una estructura cristalina.^{4,16}

¹⁸ Tompa, P; Emori, Y; Sorimachi, H; Suzuki, K; Friedrich, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 1333-1339.

¹⁴ Strobl, S; Fernandez-Catalan, C; Braun, Marianne; Huber, R; Masumoto, H; Nakagawa, K; Irie, A; Sorimachi, H; Bourenkow, G; Bartunik, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, *97*, 588-592.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H; Wei, W; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

¹⁶ Suzuki, K; Hata, S; Kawabata, Y; Sorimachi, H. *Diabetes* **2004**, *53*, S12-S18.

El dominio VI, que constituye el extremo -COOH terminal de la subunidad, es considerado como un dominio semejante a la calmodulina. Aunque los estudios iniciales sugerían la presencia de cuatro manos-EF (como en la calmodulina), sin embargo la posterior estructura cristalina reveló la presencia de cinco manos-EF.⁴

Con respecto a las otras calpaínas, como ya hemos dicho anteriormente, las calpaínas 3, 8, 9, 11 y 12^{7,16} poseen los cuatro dominios encontrados en las calpaínas 1 y 2 y por eso son llamadas calpaínas típicas. Las calpaínas 1, 2 y 9 son las más parecidas entre sí e interaccionan con la subunidad de 30 KDa para conseguir su conformación funcional. Sin embargo, las calpaínas 3, 8, 11 y 12 aparentemente no interaccionan con ninguna subunidad de 30 KDa a pesar de poseer un dominio IV importante en la asociación con la subunidad de 30 KDa, semejante a los de las calpaínas 1, 2 y 9.⁵

Las calpaínas 5, 6, 7, 10, 13 y 15,^{7,16} se denominan calpaínas atípicas. En ellas ciertos dominios han sido, bien suprimidos o bien reemplazados por otros. Todas ellas carecen del dominio IV, con sus grupos de manos-EF por lo que no pueden formar dímeros con la subunidad de 30 KDa.

Las calpaínas 7 y 15 son los términos más divergentes de la familia y su homología con las calpaínas clásicas está restringida al dominio II. La calpaína 7 se caracteriza por un dominio -NH₂ grande y un dominio -COOH terminal, que reemplaza a los dominios III y IV de las calpaínas clásicas, muy diferentes a los demás términos de la serie, y denominado Pal B-homólogo (PBH). Su nombre alude a la semejanza con una proteasa caracterizada en el género *Aspergillus* y que se denomina *Aspergillus nidulans* Pal B proteasa.¹⁹

La calpaína 15, a menudo denominada SOL H²⁰ (*Small optic lobe homology*) por semejanza a la secuencia peptídica encontrada en una proteína codificada por el gen de *Drosophila melanogaster* '*small optic lobes*', se caracteriza por poseer la secuencia SOL y en el extremo -COOH terminal motivos de '*dedo de cinc*'.¹⁰

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H; Wei, W; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

⁷ Saez, M. E.; Ramirez-Lorca, R; Moron, F. J.; Ruiz, A. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 917-923.

¹⁶ Suzuki, K; Hata, S; Kawabata, Y; Sorimachi, H. *Diabetes* **2004**, *53*, S12-S18.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

¹⁹ Franz, T; Vingron, M; Boehm, T; Dear, T. N. *Mamm Genome.* **1999**, *10*, 318-321.

²⁰ Kamei, M; Webb, G. C.; Young, I. G.; Campbell, H. D. *Genomics* **1998**, *51*, 197-206.

¹⁰ **Dedo de cinc**: es un dominio estructural de proteínas que se encuentra habitualmente en proteínas que interaccionan con el ADN. Los residuos de Cys que poseen estos motivos proporcionan los lugares de

Las calpaínas 5, 6 y 10, poseen además del dominio II, el dominio III semejante a las calpaínas típicas, pero éste se encuentra unido a un dominio T,²¹ una secuencia peptídica semejante a la encontrada en la proteína del nematodo *Caenorhabditis elegans* TRA-3. De las calpaínas atípicas, quizás la calpaína 10 sea la más estudiada, demostrándose por Weedon y col.²² la asociación de la calpaína 10 con la diabetes mellitus tipo 2.

En la **Figura 2.1** (pág. 12) se mostraba un esquema resumen de las calpaínas que hasta el momento se conocen en humanos.

2.1.4. Mecanismo de activación y de regulación de la calpaína^{4,5,11,16}

Habitualmente la calpaína se encuentra en el citosol como una enzima inactiva, que se desplaza hacia la membrana en respuesta a un incremento de los niveles de Ca^{2+} celulares. En la membrana, la calpaína se activa en presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos. Durante la activación se produce la hidrólisis autocatalítica del dominio I y como consecuencia, las subunidades de 80 y 30 KDa²³ se disocian. Una vez que la calpaína está en la forma activada hidroliza los sustratos proteicos en la membrana, o bien en el citosol, después de abandonar la membrana.

En ausencia de Ca^{2+} , los subdominios que constituyen el dominio catalítico IIa y IIb, se encuentran separados debidos a restricciones conformacionales impuestas por los aminoácidos que conforman la proteína. La presencia de Ca^{2+} induce cambios estructurales y facilita la formación de un sitio catalítico y funcional.^{24,25} Recientes estructuras de Rayos X han revelado que la unión al Ca^{2+} provoca un mecanismo de activación a nivel molecular.²⁴ Para la m-calpaína se pueden encontrar al menos tres sitios de unión al Ca^{2+} diferentes: a los dominios tipo calmodulina (IV y VI), a un bucle ácido presente en el dominio III y al dominio proteolítico (dominio II).

unión de los dedos de cinc. Mckee, T.; Mckee, J.R. *Bioquímica*, McGraw Hill Interamericana, **2003**, 3ª Ed, 133-134.

²¹ Dear, N.; Matena, K.; Vingron, M.; Boehm, T. *Genomics* **1997**, *45*, 175-184.

²² Weedon, M.N. *et al. Am. J. Hum. Genet.* **2003**, *73*, 1208-1212.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H; Wei, W; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

¹¹ Nemova, N. N.; Lysenko, L. A.; Kantserova, N. P. *Ontogenez* **2010**, *41*, 381-389.

¹⁶ Suzuki, K; Hata, S; Kawabata, Y; Sorimachi, H. *Diabetes* **2004**, *53*, S12-S18.

²³ Suzuki, K; Sorimachi, H; Yoshizawa, T; Kinbara, K; Ishiura, S. *Biol. Chem.* **1995**, *376*, 523-529.

²⁴ Moldoveanu, T; Hosfield, C. M.; Lim, D; Elce, J. S.; Jia, Z; Davies, P. L. *Cell* **2002**, *108*, 649-660.

²⁵ Nakagawa, K; Masumoto, H; Sorimachi, H; Suzuki, K. *J. Biochem.* **2001**, *130*, 605-611.

El mecanismo propuesto para la regulación de la actividad de la m-calpaína comprende dos etapas.^{24,25} La primera es la liberación de las restricciones conformacionales impuestas por las interacciones de los dominios. La unión del Ca^{2+} a los dominios IV, VI y III, rompe la unión del dominio I con VI y del dominio II con III lo que conlleva una disociación de la subunidad de 30 de la de 80 KDa. La segunda etapa consiste en una reorganización del sitio activo en el dominio II como consecuencia de la unión de dos átomos de Ca^{2+} al mismo (uno al subdominio IIa y otro al IIb).

Este mecanismo de activación en dos etapas se considera un mecanismo general de activación aplicable a las calpaínas que no interaccionan con la subunidad de 30 KDa o a las calpaínas atípicas, debido a que en todos los casos el dominio proteolítico está siempre constituido por los subdominio IIa y IIb y los residuos que interaccionan con las dos unidades de Ca^{2+} en IIa y IIb se conservan en todas las calpaínas. En el caso de las calpaínas no asociadas con subunidad pequeña de 30 KDa o en aquellas que carecen de dominios III o IV, la primera etapa de activación puede ser obviada y se activan mediante la segunda etapa.

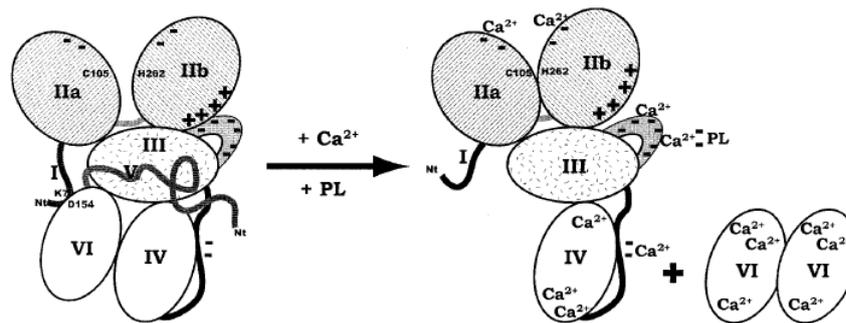


Figura 2.4. Activación de la calpaína.

En la **Figura 2.4** se encuentra representado un esquema del mecanismo de activación de la calpaína. En éste, tras la activación de la calpaína por Ca^{2+} y fosfolípidos, se produce un acercamiento de los dos subdominios IIa y IIb, produciéndose la disociación de la subunidad de 30 KDa de la de 80 KDa.

²⁴ Moldoveanu, T; Hosfield, C. M.; Lim, D; Elce, J. S.; Jia, Z; Davies, P. L. *Cell* **2002**, *108*, 649-660.

²⁵ Nakagawa, K; Masumoto, H; Sorimachi, H; Suzuki, K. *J. Biochem.* **2001**, *130*, 605-611.

La actividad de la calpaína está regulada principalmente por la presencia de Ca^{2+} , tanto temporal como espacialmente, pero se ha visto que la fosforilación de la calpaína puede ser otro mecanismo importante para la regulación de su actividad. Así, Glading y col.^{26,27} han demostrado que factores del crecimiento tales como *Epidermal growth factor* (EGF) son capaces de activar a la calpaína 2 mediante la fosforilación mediada por la kinasa *Extracelular signal-regulated kinase* (ERN) tanto *in vivo* como *in vitro* y que esa activación puede ocurrir incluso en ausencia de un flujo de calcio en el citosol. Por otro lado la fosforilación de la calpaína en Ser-369 del dominio III por la proteína kinasa A, restringe el movimiento del dominio y 'congela' a la calpaína en su estado inactivo.²⁸

La unión de calpaína a moléculas tanto exógenas como endógenas, de estructura proteica o no, puede regular también su actividad proteolítica. Así, isovalerocarnitina (IVC), un producto que proviene del metabolismo de L-leucina, es un potente activador de calpaína 2. La activación por parte de IVC tiene un efecto doble: por un lado incrementa la afinidad de calpaína por Ca^{2+} y por otro incrementa la v_{max} respecto a los valores observados,^{29,30} trabajando la enzima en una disolución saturada de Ca^{2+} .

La proteína acil-co A-protein (*Acyl-CoA protein*) es un homodímero que ejerce multitud de funciones. También es un potente activador de calpaínas, disminuyendo la concentración de Ca^{2+} requerida para la activación de la m-calpaína.³¹

La calpastatina, el inhibidor endógeno natural de la calpaína, también está implicada en su regulación. Los cuatro dominios inhibidores de la calpastatina pueden inhibir cuatro moléculas de calpaína al mismo tiempo. Por otra parte la modulación del balance de los niveles de calpaína relacionados con la calpastatina puede también regular su actividad. La degradación de la calpastatina mediada por la calpaína está relacionada con la activación de la misma *in vivo*.^{32,33}

²⁶ Glading, A; Lauffenburger, D. A.; Wells, A. *Trends Cell Biol.* **2002**, *12*, 46-54.

²⁷ Glading, A.; Bodnar, R. J.; Reynolds, I. J.; Shiraha, H.; Satish, L.; Potter, D. A.; Blair, H. C.; Wells, A. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 2499-2512.

²⁸ Shiraha, H; Glading, A; Chou, J; Jia, Z; Wells, A. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 2716-2727.

²⁹ Pontremoli, S.; Melloni, E.; Michetti, M.; Sparatore, B.; Salamino, F.; Siliprandi, N.; Horecker, B. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *148*, 1189-1195.

³⁰ Pontremoli, S.; Melloni, E.; Viotti, P. L.; Michetti, M.; Di Lisa, F.; Siliprandi, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *167*, 373-380.

³¹ Melloni, E; Aversa, M; Salamino, F; Sparatore, B; Minafra, R; Pontremoli, S. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 82-86.

³² Sorimachi, Y; Harada, K; Saido, T; Ono, T; Kawashima, S; Yoshida, K. *J. Biochem.* **1997**, *122*, 743-748.

En la **Figura 2.5** se muestra el mecanismo de regulación de la calpaína que se ha detallado anteriormente en este apartado.

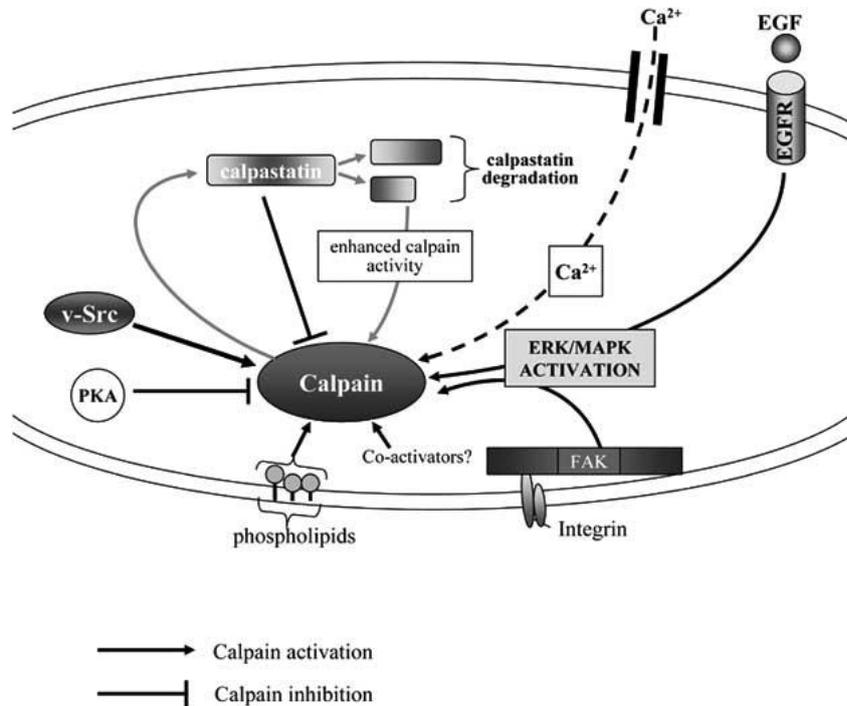


Figura 2.5. Mecanismo de regulación de la calpaína (tomado de la ref.5).

2.1.5. Función fisiológica de la calpaína⁵

Aunque la función fisiológica de la calpaína no está totalmente establecida, la identificación de sustratos fisiológicos junto con estudios moleculares y farmacológicos han proporcionado ciertos indicios de la función celular de la calpaína.

Se ha identificado un gran grupo de proteínas diferentes como sustratos de calpaína. Entre ellas podemos encontrar proteínas citoesqueléticas, receptores de membrana, kinasas y factores de transcripción. Un rasgo característico de las

³³ Blomgren, K; Hallin, U; Andersson, A; Puka-Sundvall, M; Bahr, B. A.; McRae, A; Saido, T. C.; Kawashima, S; Hagberg, H. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14046-14052.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

calpaínas es que actúan preferentemente mediante una escisión proteolítica de ciertos substratos en fragmentos estables más que por digestión completa de proteínas. Así, por ejemplo, en diferentes estadios de enfermedad tales como la arterosclerosis, se observa la aparición de fragmentos de colágeno degradado. Estos fragmentos de colágeno degradado, a su vez, promueven el rápido desensamblaje de adhesiones focales del músculo liso, lo que se correlaciona con la proteólisis, por parte de calpaínas 1 y 2 de una kinasa denominada pp125FAK.³⁴ En moléculas de señalización pueden generar fragmentos negativos dominantes³⁵ o proteínas activas con funciones definidas, además pueden alterar la distribución de proteínas^{36,37} y aumentar la estabilidad de substratos por la eliminación de aquellas regiones que dirigen la proteína hacia la destrucción en otros pasos proteolíticos.³⁸

Cabe destacar la influencia de la actividad de la calpaína en importantes procesos fisiológicos tales como: activación de plaquetas (en la agregación y en la disgregación del coágulo),³⁹ en la migración y la proliferación celular, en la apoptosis⁴⁰ (cuyo papel específico dependerá del tipo de célula y de la naturaleza del estímulo apoptótico) y en la transducción de la señal.^{4,5}

³⁴ Cooray, P.; Yuan, Y.; Schoenwaelder, S.M.; Mitchell, C.A.; Salem, H.H.; Jackson, S.P. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 41-47.

³⁵ Kulkarni, S.; Goll, D. E.; Fox, Joan E. B. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24435-24441.

³⁶ Carragher, N. O.; Levkau, B.; Ross, R.; Raines, E. W. *J. Cell. Biol.* **1999**, *147*, 619-629.

³⁷ a) Frangioni, John V.; Oda, Atsushi; Smith, Marianne; Salzman, Edwin W.; Neel, Benjamin G. *EMBO J.* **1993**, *12*, 4843-4856. b) Cooray, P.; Yuan, Y.; Schoenwaelder, S. M.; Mitchell, C. A.; Salem, H. H.; Jackson, S. P. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 41-47. c) Oda, A.; Druker, B. J.; Ariyoshi, H.; Smith, M.; Salzman, E. E. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12603-12608.

³⁸ Welm, A. L.; Timchenko, N. A.; Ono, Y.; Sorimachi, H.; Radomska, H. S.; Tenen, D. G.; Lekstrom-Himes, J.; Darlington, G. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33848-33856.

³⁹ a) Kuchay, S. M.; Chishti, A. H. *Curr. Opin. Hematology* **2007**, *14*, 249-254. b) Brown, C. S.; Dean, W. L. *Platelets* **2007**, *18*, 207-211. c) Bachelot-Loza, C.; Badol, P.; Brohard-Bohn, B.; Fraiz, N.; Cano, E.; Rendu, F. *British Journal of Hematology* **2006**, *133*, 419-426. d) Rutledge, T. W.; Whiteheart, S. W. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37009-37015. e) Gilligan, D. M.; Sarid, R.; Weese, J. *Blood* **2002**, *99*, 2418-2426.

⁴⁰ a) Crespo-Biel, N.; Canudas, A. M.; Camins, A.; Pallas, M. *Apoptosis* **2010**, 73-86. b) Ciarimboli, G. *Am. J. Phys.* **2007**, *293*, C837-C838. c) Raynaud, F.; Marcilhac, A. *FEBS J.* **2006**, *273*, 3437-3443. d) Wang, Y.; Gu, Z.; Qin, Z. *Neurosci. Bull.* **2005**, *21*, 224-229. e) Sedarous, M.; Keramaris, E.; O'Hare, M.; Melloni, E.; Slack, R. S.; Elce, J. S.; Greer, P. A.; Park, D. S. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 26031-26038. f) Mathiasen, I. S.; Sergeev, I.N.; Bastholm, L.; Elling, F.; Norman, A. W.; Jaattela, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30738-30745. g) McCollum, A. T.; Nasr, P.; Estus, S. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 1208-1220. h) Mandic, A.; Viktorsson, K.; Strandberg, L.; Heiden, T.; Hansson, J.; Linder, S.; Shoshan, M. C. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 3003-3013.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

2.1.6. Implicación de la calpaína en enfermedades humanas

La actividad de la calpaína está implicada en distintas patologías en humanos. Muchos estudios recientes indican que existe una relación entre calpaína y cáncer. Estudios iniciales ya demostraron que la actividad calpaína está significativamente aumentada en el cáncer de los tejidos del pecho, en comparación con los tejidos de un pecho sano. Se ha encontrado que la afinidad de la calpaína está incrementada en tumores que poseen una sobreexpresión de receptores de estrógeno (ER positivo, los receptores de estrógeno ER están sobreexpresados en aproximadamente el 70% de los cánceres de pecho), con respecto a los tumores ER negativos. Así, el tratamiento de células cancerosas de pecho con el inhibidor de calpaína calpeptina, inhibe el crecimiento de las células cancerosas ER positivas pero no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de células cancerosas ER negativas.⁵

La activación de calpaínas se ha identificado como un elemento común en una gran variedad de desórdenes neurológicos. Se cree que las calpaínas 'clásicas' intervienen en los eventos moleculares que desembocan en la 'hiperfosforilación de tau',⁴¹ que es la proteína principal encontrada en el cerebro de los enfermos de Alzheimer.⁴²

Otro desorden neurológico asociado a la actividad de la calpaína es la enfermedad de Huntington. Las calpaínas, aunque también el proteosomas y caspasas, han demostrado que pueden escindir a la proteína HTT (*Huntington protein*, una proteína no enteramente conocida que juega un papel importante en las células nerviosas) por multitud de lugares, generando fragmentos proteicos tóxicos, lo que finalmente conllevan una pérdida neuronal.⁴³

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

⁴¹ Hoy en día el único diagnóstico que permite confirmar que un paciente presenta definitivamente la enfermedad de Alzheimer es el diagnóstico neuropatológico post-mortem que evidencia la presencia de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en determinadas áreas del cerebro. Estos ovillos o acumulaciones neurofibrilares están formadas intraneuronalmente a partir de diversas proteínas, entre las que se encuentra la proteína tau en su forma hiperfosforilada. Flórez, J. *Farmacología Humana*. Elsevier Masson, **2008**, 5ª edición, 691.

⁴² a) Garg, S.; Timm, T.; Mandelkow, E.; Wang, Y. *Neurobiology of Aging* **2011**, *32*, 1-14. b) Zhang, J.; Peng, C.; Shi, H.; Wang, S.; Wang, Q.; Wang, J. *Journal of Alzheimer's Disease* **2009**, *16*, 39-47. c) Higuchi, M.; Iwata, N.; Saido, T. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 60-67.

⁴³ a) Southwell, A. L.; Bugg, C. W.; Kaltenbach, L. S.; Dunn, D.; Butland, S.; Weiss, A.; Paganetti, P.; Lo, D. C.; Patterson, P. H. *PLoS One*. **2011**, *6*, e16676. b) Wang, Y.; Gu, Z.; Qin, Z. *Neurosci. Bull.* **2005**, *21*, 224-229. c) Gafni, J.; Ellerby, L. M. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 4842-4849.

En la enfermedad de Parkinson,⁴⁴ se ha observado que la α -sinucleína⁴⁵ (una proteína que constituye el mayor componente de las inclusiones fibrilares neuronales denominadas *Cuerpos de Lewy* y que son estructuras eosinofílicas localizadas en el citoplasma de la neurona de los enfermos de Parkinson) son también substratos típicos de calpaínas. Además se ha observado una sobreexpresión de la m-calpaína en el cerebro de enfermos de Parkinson.⁴⁶ El papel de la actividad de la calpaína en enfermedades desmielinizantes está relacionado con la proteólisis de mielina y otras proteínas citoesqueléticas. Estos mecanismos proteolíticos son mecanismos importantes en la patología de enfermedades del cerebro y médula espinal.⁴⁷

Se ha detectado una disminución de la actividad calpaína en las enfermedades de distrofia muscular de Duchenne y Becker, dos enfermedades musculares relacionadas con la ausencia de distrofina (una proteína citoplasmática que es parte importante de complejo proteico que conecta el citoesqueleto de una fibra muscular con la matriz extracelular, a través de la membrana celular).⁴

En cuanto a otras patologías no neuronales en las que intervienen calpaínas clásicas, por ejemplo, la acción proteolítica de la calpaína 2 en las proteínas del lente cristalino produce cataratas en humanos. Aunque se ha logrado identificar en el cristalino humano varios tipos de calpaínas como la calpaína 10, parece ser que la falta de regulación de la calpaína 2 es la causa principal del aumento de la opacidad en las estructuras oculares. Como se ha señalado, en distintos tipos de cáncer de pecho, ovarios, próstata, piel o de colon se ha observado una alteración de la actividad de la calpaína, en especial de las calpaínas 1 y 2.⁴⁸

⁴⁴ a) Samantaray, S.; Ray, S. K.; Banik, N. L. *Drug Targets* **2008**, *7*, 305-312. b) Alvira, D.; Ferrer, I.; Gutierrez-Cuesta, J.; Garcia-Castro, B.; Pallas, M.; Camins, A. *Parkinsonism & related disorders* **2008**, *14*, 309-313.

⁴⁵ Dufty, B. M.; Warner, L. R.; Hou, S. T.; Jiang, S. X.; Gomez-Isla, T.; Leenhouts, K. M.; Oxford, J. T.; Feany, M. B.; Masliah, E.; Rohn, T. T. *American Journal of Pathology* **2007**, *170*, 1725-1738.

⁴⁶ Mouatt-Prigent, A.; Karlsson, J. O.; Agid, Y.; Hirsch, E. C. *Neuroscience* **1996**, *73*, 979-987.

⁴⁷ a) Ray, S. K.; Hogan, E. L.; Banik, N. L. *Brain Res. Rev.* **2003**, *42*, 169-185. b) Biswas, S.; Harris, F.; Dennison, S.; Singh, J. P.; Phoenix, D. *Med. Sci. Monit.* **2005**, *11*, RA301-RA310. c) Hall, E. D. *Comprehensive Med. Chem. II*, **2006**, *6*, 253-277.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

⁴⁸ Storr, S. J.; Carragher, N. O.; Frame, M. C.; Parr, T.; Martin, S. G. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 364-374.

En cuanto a la calpaína 3 parece estar implicada en la distrofia muscular limb-girdle de tipo 2, un desorden neuromuscular caracterizado por una atrofia simétrica progresiva y una debilidad de las extremidades proximales.⁴⁹ La calpaína 9 se ha detectado en cáncer de estómago y enfermedades de riñón y de corazón.⁵⁰

Una de las calpaínas que últimamente ha despertado más interés y por lo tanto ha sido más estudiada por su posible implicación en la diabetes de tipo 2,⁵¹ es la calpaína 10, además también está implicada en enfermedades cardiovasculares y en niveles elevados de colesterol.

En la **Tabla 2.2** se resumen las enfermedades asociadas a cada tipo de calpaína.

Tabla 2.2. Las calpaínas en distintas enfermedades humanas.

Calpaínas	Nombre del gen	Enfermedades
Calpaína 1	CAPN1	Enfermedad de Huntington, cataratas, distrofia muscular, daños cerebrales, daños en la médula espinal, Alzheimer, cáncer, esclerosis múltiple, enfermedad de Lou Gehrig, osteopenia, isquemia
Calpaína 2	CAPN2	Cataratas, distrofia muscular, isquemia, daños cerebrales, daños en la médula espinal, Alzheimer, Parkinson, arterioesclerosis, esclerosis múltiple, enfermedad de Lou Gehrig, cáncer, psoriasis.
Calpaína 3	CAPN3	Distrofia muscular Limb-girdle de tipo 2A, cataratas
Calpaína 5	CAPN5	Enfermedad de Huntington, ovarios poliquísticos, síndrome metabólico
Calpaína 7	CAPN7	Enfermedad de Huntington
Calpaína 9	CAPN9	Cáncer de estómago
Calpaína 10	CAPN10	Enfermedad de Huntington, diabetes mellitus, aterosclerosis, síndrome metabólico.

⁴⁹ Richard, I.; Broux, O.; Allamand, V.; Fougerousse, F.; Chiannikulchai, N.; Bourg, N.; Brenguier, L.; Devaud, C.; Pasturaud, P.; et al. *Cell* **1995**, *81*, 27-40.

⁵⁰ Markmann, A.; Schaefer, S.; Linz, W.; Loehn, M.; Busch, A.; Wohlfart, P. *Cell. Physiol. Biochem.* **2005**, *15*, 109-116.

⁵¹ Horikawa, Y.; Oda, N.; Cox, N. J.; Li, X.; Orho-Melander, M.; Hara, M.; Hinokio, Y.; Lindner, T. H.; Mashima, H.; Schwarz, P. E. H.; et al. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 163-175.

2.1.6.1. Calpaínas implicadas en la enfermedad renal

Calpaína 10 y la diabetes tipo 2^{16,52}

La calpaína 10, como ya se ha descrito anteriormente, es una calpaína atípica que conserva el dominio III y en la que el dominio IV de las calpaínas típicas ha sido sustituido por un dominio parecido al dominio III (dominio T). Aunque la secuencia de los residuos del sitio activo (triada catalítica en el dominio II) se conserva para todos los miembros de la familia de calpaínas, la calpaína 10 se diferencia de otras calpaínas en el resto de la secuencia de aminoácidos. Así, los residuos en el dominio II, importantes para su unión con Ca^{2+} y común para las calpaínas típicas, no se conserva. Los bucles ácidos y básicos en el dominio III, importantes para la unión con el Ca^{2+} y fosfolípidos, no se encuentran ni en el dominio III ni en el dominio T de la calpaína 10.^{24,53} Como consecuencia, probablemente, calpaína 10 no posee los sitios de interacción con Ca^{2+} en los dominios II y III identificados en las calpaínas típicas, y la regulación de la actividad de la calpaína 10 por Ca^{2+} será diferente que en las calpaínas típicas. Además, hay que señalar que todavía no ha sido detectada su actividad como proteasa.

Esta calpaína se expresa de forma ubicua en tejidos humanos y animales.⁵⁴ El nivel del mensaje varía con el tejido, pero es muy alto en el corazón seguido por el cerebro, hígado, riñón y páncreas.⁵⁵ Se han identificado al menos ocho variaciones de calpaína 10, tres de ellas carecen por completo del dominio II y por tanto de la actividad como proteasa.⁵⁵ La distribución subcelular de esta calpaína atípica todavía no está definida. Una fracción de la calpaína 10 se encontró en la fracción insoluble en agua de los tejidos de ratas. Además, estudios de inmunotinción han revelado una localización preferente en la membrana plasmática, en el cristalino de ratones y en el músculo esquelético. Más recientemente, la calpaína 10 se ha identificado como la calpaína mitocondrial predominante.⁶ La sobreexpresión de esta calpaína causa

¹⁶ Suzuki, K; Hata, S; Kawabata, Y; Sorimachi, H. *Diabetes* **2004**, 53, S12-S18.

⁵² Branca, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 322, 1098-1104.

²⁴ Moldoveanu, T; Hosfield, C. M.; Lim, D; Elce, J. S.; Jia, Z; Davies, P. L. *Cell* **2002**, 108, 649-660.

⁵³ Sorimachi, H; Suzuki, K. *J. Biochem.* **2001**, 129, 653-664.

⁵⁴ Ma, H; Fukiage, C; Kim, Yung H; Duncan, M. K.; Reed, N. A.; Shih, M.; Azuma, M; Shearer, T. R. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 28525-28531.

⁵⁵ Horikawa, Y; Oda, N; Cox, N. J.; Li, X; Orho-Melander, M; Hara, M; Hinokio, Y; Lindner, T. H.; Mashima, H; Schwarz, P. E. H. *Nat. Genet.* **2000**, 26, 163-175.

⁶ Kar, P; Samanta, K; Shaikh, S; Chowdhury, A; Chakraborti, T; Chakraborti, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, 495, 1-7.

disfunciones mitocondriales mientras que la disminución de la calpaína 10 causa la muerte de las células epiteliales.

De las calpaínas atípicas, la calpaína 10 es quizás la más estudiada ya que se ha identificado que variantes genéticas del gen CAPN10, el gen que codifica para la calpaína 10 (ver **Tabla 2.2**) están asociados con niveles elevados de ácidos grasos, resistencia a la insulina y puede relacionarse con la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) o diabetes senil, también denominada diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM). Es el tipo de diabetes más común y depende de factores genéticos y medioambientales. Afecta al 4% de la población adulta del mundo, generalmente con edades comprendidas entre 40 y 60 años, aunque a veces se han observado casos en adolescentes obesos. Los pacientes de este tipo de diabetes son propensos a la obesidad además de presentar otros rasgos característicos como resistencia a la insulina, hipertensión e hipertrigliceridemia.

Aunque varios estudios recientes han probado la relación entre la calpaína 10 y la diabetes de tipo 2,⁵⁶ hay muchos aspectos que todavía no se han aclarado. De ahí la importancia del desarrollo de nuevas investigaciones sobre este tipo de calpaína y sus posibles inhibidores.

Calpaína 5 y el síndrome metabólico

La calpaína 5, al igual que la calpaína 10, pertenece al grupo de calpaínas atípicas, caracterizadas por poseer un dominio-T homólogo a la proteína TRA-3 de los *C.elegans*.^{57,58}

Diversos estudios han demostrado la relación que existe entre la calpaína 5 y el síndrome metabólico. Este tipo de enfermedad es una conjunción de varios factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan la probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular.

⁵⁶ a) Bodhini, D.; Radha, V.; Ghosh, S.; Sanapala, K. R.; Majumder, P. P.; Rao, M. R. S.; Mohan, V. *Metabolism, Clinical and Experimental* **2011**, *60*, 681-688. b) Ezzidi, I.; Mtiraoui, N.; Nemr, R.; Kacem, M.; Al-Khateeb, G. M.; Mahjoub, T.; Almawi, W. Y. *Diabetes & Metabolism*. **2010**, *36*, 357-362. c) Zhou, X.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Gao, P.; Zhu, D. *Clinica Chimica Acta*, **2010**, *411*, 1126-1131.

⁵⁷ Barnes, T. M.; Hodgkin, J. *EMBO J.*, **1996**, *15*, 4477-4484.

⁵⁸ Dear, N.; Matena, K.; Vingron, M.; Boehm, T. *Genomics* **1997**, *45*, 175-184.

Se ha relacionado al gen CAPN5, que es el gen que codifica para la calpaína 5, con la hipertensión y otros componentes del síndrome metabólico. Los resultados sugieren que los alelos de CAPN5 pueden modular la presión arterial diastólica y los niveles de colesterol.⁵⁹ Además, el halotipo de CAPN5 característico de individuos obesos, está también asociado al grupo de factores de riesgo cardiovasculares típicos del síndrome metabólico.

2.2. INHIBIDORES DE CALPAÍNA

La importancia de la actividad de la calpaína en las fisiopatologías de muchas enfermedades humanas, ha aumentado el interés por el desarrollo de inhibidores de calpaína.

2.2.1. Inhibidor natural: calpastatina^{60,5}

El inhibidor endógeno de la calpaína es la calpastatina, cuyo nombre fue propuesto por Takashi Murachi en 1979. La calpastatina posee una alta selectividad frente a la calpaína,⁶¹ siendo totalmente inactiva frente a otras cisteín proteasas como la papaína, catepsina B, bromelina, etc. e incluso frente a otras familias de proteasas como por ejemplo la tripsina, plasmina, pepsina, trombina, etc.

La calpastatina se puede dividir en cinco dominios. El dominio -NH₂ terminal que corresponde al dominio L va seguido por cuatro dominios inhibidores repetitivos (dominios I-IV), cada uno de los cuales posee alrededor de 140 aminoácidos y cada uno de estos dominios es capaz de unirse a una molécula de calpaína.^{4,62}

El dominio L no posee ninguna actividad inhibidora directa hacia la calpaína, sin embargo desempeña un papel importante en la regulación de la calpastatina. Muchos estudios indican que el dominio L interviene en la localización subcelular de la calpastatina en las membranas biológicas.

⁵⁹ Saez, M. E.; Martínez-Larrad, M. T.; Ramírez-Lorca, R.; González-Sánchez, J. L.; Zabena, C.; Martínez-Calatrava, M. J.; González, A.; Morón, F. J.; Ruiz, A.; Serrano-Ríos, M. *BMC Med. Genet.* **2007**, 8,1.

⁶⁰ Pietsch, M.; Chua, K. C. H.; Abell, A. D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, 10, 270-293.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, 12, 615-638.

⁶¹ Crawford, C.; Brown, N. R.; Willis, A. C. *Biochem. J.* **1993**, 296, 135-142.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, 83, 731-801

⁶² Hanna, R. A.; García-Díaz, B. E.; Davies, P. L. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 2894-2898.

La distribución intracelular de la calpastatina depende de la concentración de iones Ca^{2+} libres. A concentraciones bajas de Ca^{2+} la calpastatina se agrega en dos gránulos cercanos al núcleo celular. Sin embargo, un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} libre conlleva la solubilización de la calpastatina y su redistribución en el citosol.⁶³ Estos procesos de formación de agregados y de solubilización son mediados por la kinasa A (PKA) que fosforila a la calpastatina en el dominio L formando agregados y por fosfoproteínas, que desfosforilan a la proteína y la redistribuyen en su forma soluble.⁶⁴

Los cuatro dominios repetitivos de calpastatina (I-IV) son los dominios activos y por lo tanto los responsables de la inhibición de la calpaína. El orden de inhibición de los dominios, de mayor a menor efectividad, es dominio I > dominio IV > dominio III > dominio II. Estos dominios están divididos en tres subdominios cada uno (A, B y C). El subdominio A se une al dominio IV de la calpaína, el B se une al dominio II y el C se une al dominio VI. La inhibición óptima de la calpaína por la calpastatina requiere los tres subdominios, y la unión simultánea de los mismos para una inhibición eficaz.⁶⁵

Recientemente, se ha descrito la estructura cristalina de un mutante inactivo de la calpaína 2 (C105S)⁶⁶ y el dominio IV de la calpastatina. En la **Figura 2.6** la estructura cristalina del dominio IV enlaza con C105C en presencia de Ca^{2+} . El dominio IV (de calpastatina) forma tres α -hélices en el complejo. Las hélices del subdominio A y C interactúan con los subdominios IV y VI,^{65,67} respectivamente de la calpaína, mientras que el subdominio B está enlazado con el núcleo de la enzima.

⁶³ De Tullio, R.; Passalacqua, M.; Averna, M.; Salamino, F.; Melloni, E.; Pontremoli, S. *Biochem. J.* **1999**, *343*, 467-472.

⁶⁴ a) Melloni, E.; Averna, M.; Stifanese, R.; De Tullio, R.; Defranchi, E.; Salamino, F.; Pontremoli, S. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24945-24954. b) Averna, M.; De Tullio, R.; Passalacqua, M.; Salamino, F.; Pontremoli, S.; Melloni, E. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 25-30.

⁶⁵ Todd, B.; Moore, D.; Deivanayagam, C. C. S.; Lin, G.; Chattopadhyay, D.; Maki, M.; Wang, K. K. W.; Narayana, S. V. L. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 131-146

⁶⁶ Elce, J. S., Hegadorn, C., Gauthier, S., Vince, J. W. & Davies, P. L. *Protein Eng.* **1995**, *8*, 843-848.

⁶⁷ Hanna, R. A.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. *Nature* **2008**, *456*, 409-412.

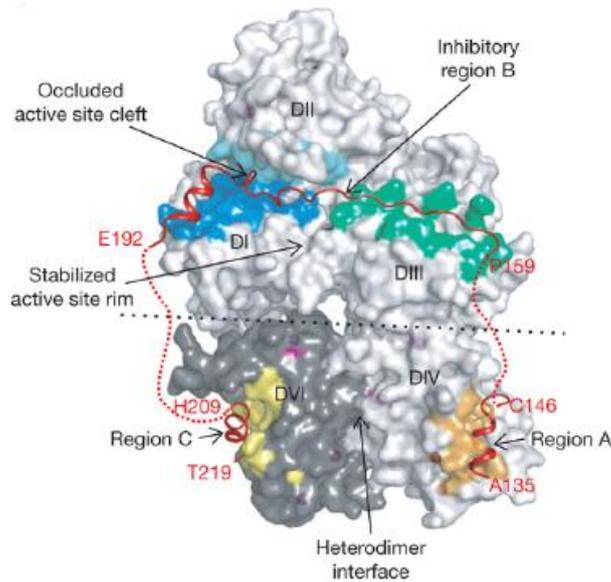


Figura 2.6. Asociación de la calpaína con la calpastatina (tomada de ref.67).

2.2.2. Inhibidores sintéticos

La bibliografía recoge un gran número de inhibidores sintéticos de calpaína, tanto reversibles como irreversibles, que se pueden dividir en dos grupos: inhibidores peptídicos e inhibidores no peptídicos.

2.2.2.1. Inhibidores peptídicos^{5,60}

La mayor parte de los inhibidores de calpaína que se han descrito son péptidos o péptidomiméticos, los cuales pueden clasificarse en tres clases, según el grupo funcional que se une al sitio activo de la cisteína en la calpaína.

Peptidil epóxidos

Los peptidil epóxidos son inhibidores de calpaína no selectivos que actúan por alquilación irreversible del grupo tiol de la cisteína en el sitio activo. En la **Figura 2.7** se muestra la estructura de los inhibidores más importantes de este grupo.

⁶⁷ Hanna, R. A.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. *Nature* **2008**, *456*, 409-412.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

⁶⁰ Pietsch, M.; Chua, K. C. H.; Abell, A. D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 270-293.

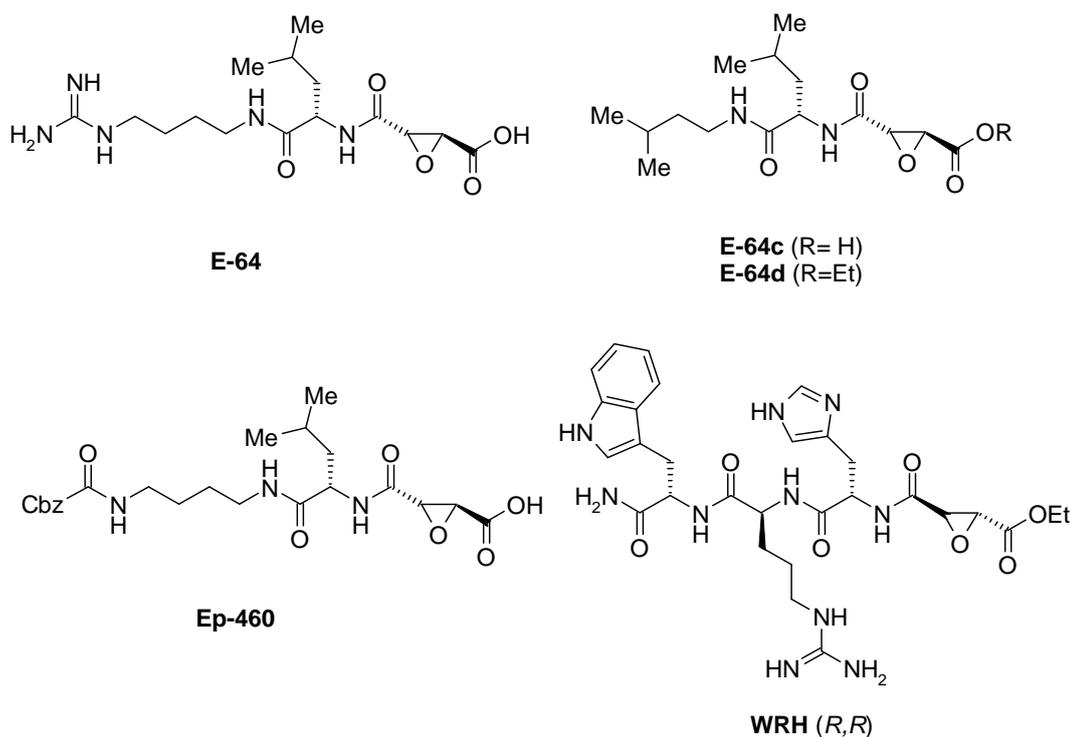


Figura 2.7. Inhibidores de calpaína con estructura de peptidil epóxidos.

El *trans*-epoxisuccinil-L-leucilamido-4-guanidino-butano (**E-64**) es un miembro característico de esta clase de inhibidores, aislado originalmente de *Aspergillus japonicus*.^{68,69} El inconveniente de **E-64** es que no atraviesa la membrana celular debido a la presencia de los grupos de guanidinio y carboxilato (a pHs fisiológicos). Cuando se produce la esterificación del grupo carboxilato y se sustituye el grupo guanidinio por un grupo alquilo, se obtiene **E-64d**, que presenta una mejor permeabilidad en la célula. *In vivo* **E-64d** se convierte en su forma más activa (**E-64c**)⁷⁰ por hidrólisis del éster.

⁶⁸ Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 523-528.

⁶⁹ Hanada, K.; Tamai, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Seki, T.; Tanaka, I. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 529-536.

⁷⁰ Claveau, D.; Riendeau, D.; Mancini, J. A. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 759-769

La administración *in vivo* de **E-64c** y **E-64d**, proporciona una neuroprotección importante en daños en la médula ósea y en isquemia cerebral.⁷¹ El inhibidor **E-64d** además reduce la degeneración y la distrofia muscular en ratones y hámsters. Los inhibidores **E-64**, **E-64c** y **E-64d** reducen también la opacidad nuclear y la proteólisis de cristalinos, implicadas en cataratas. El derivado **Ep-460** (**Figura 2.7**) es más potente que el análogo **E-64**, pero no muestra mejor especificidad sobre otras cisteín proteasas.⁷²

La mejora de especificidad y de potencia de esta clase de inhibidores se ha logrado mediante la optimización de grupos unidos a P₂-P₄,⁷³ junto con la utilización de los epóxidos (S,S) o (R,R). El compuesto **WRH (R,R)** es el inhibidor más específico de calpaína que inactiva irreversiblemente a calpaínas 1 y 2, mientras que es un inhibidor reversible débil de varias catepsinas.⁷⁴

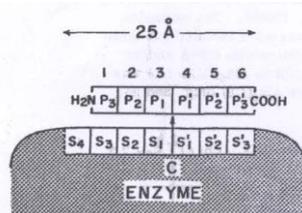
Peptidil aldehídos

Constituyen el grupo más numeroso de inhibidores de calpaína. Son inhibidores que forman enlaces covalentes (hemioacetálicos) reversibles con el grupo tiol de la cisteína en el sitio activo.^{75,5} La estructura de los ejemplos más representativos se muestra a continuación en la **Figura 2.8**.

⁷¹ Tsubokawa, T.; Yamaguchi-Okada, M.; Calvert, J. W.; Solaroglu, I.; Shimamura, N.; Yata, K.; Zhang, J. H. *J. Neurosci. Res.* **2006**, *84*, 832-840.

⁷² Pfizer, J. M.; Assfalg-Machleidt, I.; Machleidt, W.; Moroder, L.; Schaschke, N. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 93-104.

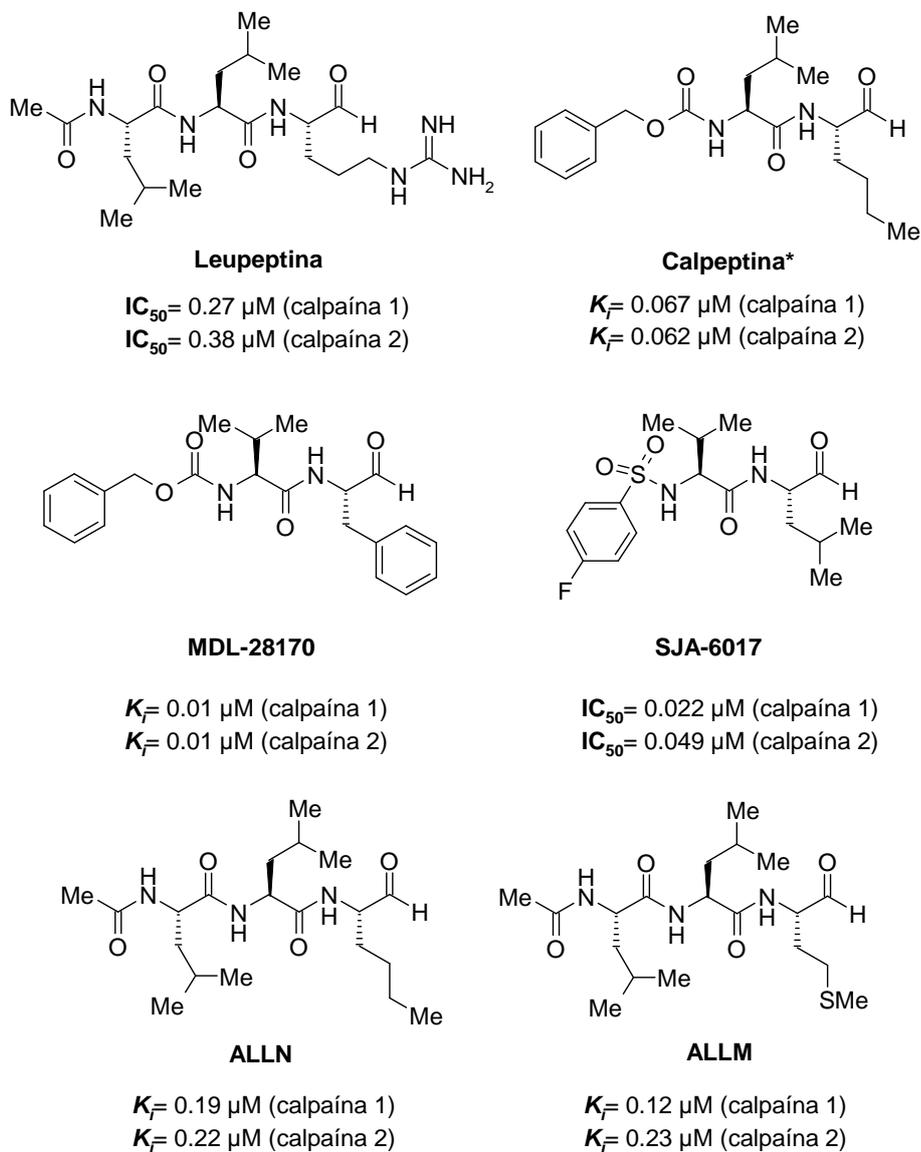
⁷³ Las estructuras cristalinas conjuntas de Ca²⁺-modelos de calpaína-inhibidores reversibles o irreversibles, muestran que el inhibidor adquiere en esos complejos una estructura extendida o prácticamente extendida, para el esqueleto principal. Esta conformación viene definido por tres enlaces de hidrógeno entre el modelo de calpaína y diferentes fragmentos del inhibidor, que se suelen nombrar con la terminología P1-P3, de acuerdo con los trabajos de Schechter y Berger. Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1967**, *27*, 157-162.



⁷⁴ Cuerrier, D.; Moldoveanu, T.; Campbell, R. L.; Kelly, J.; Yoruk, B.; Verhelst, S. H. L.; Greenbaum, D.; Bogoy, M.; Davies, P. L. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9600-9611.

⁷⁵ Moldoveanu, T.; Campbell, R. L.; Cuerrier, D.; Davies, P. L. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1313-1326.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.



* K_f = constante de disociación del complejo enzima-inhibidor

Figura 2.8. Inhibidores con estructura de peptidil aldehídos

La leupeptina, un ejemplo representativo de esta clase de inhibidores, fue aislada en varias especies de *Streptomyces*⁷⁶ y presenta una potente actividad inhibitoria frente a calpaína 1 y 2.⁷⁷ La administración intramuscular de leupeptina inhibe la degeneración muscular en ratones,⁷⁸ también se ha observado que aumenta la supervivencia neuronal en jerbos tras una isquemia transitoria e incluso puede reducir el daño axonal en enfermedades de médula espinal en experimentos *in vivo*. Sin embargo, debido a la presencia del grupo guanidino (que debe estar protonado a pH fisiológico), la leupeptina posee una baja permeabilidad, por lo que las modificaciones en su estructura han originado la aparición de una segunda generación de este tipo de inhibidores, con un aumento significativo en cuanto a permeabilidad celular, clasificándose, a su vez, en derivados dipeptídicos y tripeptídicos.

Uno de los primeros compuestos, obtenido de la eliminación del grupo guanidino de la leupeptina, es la calpeptina con el grupo guanidino sustituido por un grupo alquilo. Puede considerarse como un dipeptidil aldehído, apareciendo en este caso un resto de carbamato en su estructura. La calpeptina es un inhibidor efectivo tanto de calpaína 1 como de calpaína 2. La inhibición que ocasiona la calpeptina es capaz de evitar la muerte celular en ensayos, tanto *in vivo* como *in vitro* sobre modelos de daños en médula espinal y modelos de isquemia cerebral.⁷⁹

Los compuestos **MDL-28170** y **SJA-6017** también pertenecen al grupo de dipeptidil aldehídos y, como en el caso de la calpeptina, inhiben la calpaína 1 y 2. La administración de **MDL-28170** en modelos de isquemia cerebral en ratas⁸⁰ y en modelos de enfermedad de Párkinson,⁸¹ reduce el daño neuronal. En cuanto a **SJA-6017** resulta efectivo en la prevención de cataratas corticales dependientes del calcio,

⁷⁶ Kondo, S.; Kawamura, K.; Iwanaga, J.; Hamada, M.; Aoyagi, T.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, *17*, 1896-901.

⁷⁷ Saito, K.; Nixon, R. A. *Neurochem. Res.* **1993**, *18*, 231-233.

⁷⁸ a) Kieran, D.; Greensmith, L. *Neuroscience* **2004**, *125*, 427-439. b) Badalamente, M. A.; Stracher, A. *Muscle Nerve*, **2000**, *23*, 106-111.

⁷⁹ a) Peng, S.; Kuang, Z.; Zhang, Y.; Xu, H.; Cheng, Q. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 905-912. b) Ray, S. K.; Karmakar, S.; Nowak, M. W.; Banik, N. L. *Neuroscience* **2006**, *139*, 577-595. c) Das, A.; Garner, D. P.; Del Re, A. M.; Woodward, J. J.; Kumar, D. M.; Agarwal, N.; Banik, N. L.; Ray, S. K. *Brain Res.* **2006**, *1084*, 146-157. d) Das, A.; Sribnick, E. A.; Wingrave, J. M.; Del Re, A. M.; Woodward, J. J.; Appel, S. H.; Banik, N. L.; Ray, S. K. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *81*, 551-562.

⁸⁰ Kawamura, M.; Nakajima, W.; Ishida, A.; Ohmura, A.; Miura, S.; Takada, G. *Brain Res.* **2005**, *1037*, 59-69.

⁸¹ Crocker, S. J.; Smith, P. D.; Jackson-Lewis, V.; Lamba, W. R.; Hayley, S. P.; Grimm, E.; Callaghan, S. M.; Slack, R. S.; Melloni, E.; Przedborski, S.; et al. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 4081-4091.

además de proporcionar neuroprotección como ocurre con otros inhibidores de esta subfamilia.⁸²

En el grupo de tripéptidos podemos encontrar **ALLN** y **ALLM**. Estos inhibidores son capaces de disminuir la expansión de células tumorales y de aumentar la apoptosis de dichas células y, por ello, se han investigado como potenciales antitumorales.⁸³

La mayoría de los inhibidores de calpaínas descritos poseen L-leucina o L-valina en posición P₂ (el segundo aminoácido o aminoácido mimético desde el centro reactivo que interacciona con el centro activo de la enzima, aldehído, en estos casos) pero estudios recientes han demostrado que la introducción de restricciones conformacionales en la posición P₂ como: *N*-arilsulfonil-D-prolinas (**Ia**),⁸⁴ *N*-arilsulfonil-D-tiaprolinas (**Ib**),⁸⁵ 1,2-benzotiazinas 1,1-dióxido (**Ila**), 1,2,4-benzotiadiazina (**Iib**), junto con la adición de sistemas cíclicos (**III**)^{86,87} y la introducción de macrociclos (**IV**)⁸⁸ que unen los residuos P₁ a P₃ en tripeptidil aldehídos, proporcionan una mejora en cuanto a la permeabilidad celular, una mejora de estabilidad en cuanto a degradación proteolítica y mejoras en la selectividad. En la **Figura 2.9** se muestra la estructura de algunos de estos inhibidores.

⁸² Biswas, S.; Harris, F.; Singh, J.; Phoenix, D. A. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *261*, 169-173.

⁸³ Zhu, H.; Zhang, L.; Huang, X.; Davis, J. J.; Jacob, D. A.; Teraishi, F.; Chiao, P.; Fang, B. *Mol. Ther.* **2004**, *9*, 666-673.

⁸⁴ Donkor, I. O.; Korukonda, R.; Huang, T. L.; LeCour, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 783-784.

⁸⁵ Korukonda, R.; Guan, N.; Dalton, J. T.; Liu, J.; Donkor, I. O. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5282-5290.

⁸⁶ Jones, M. A.; Morton, J. D.; Coxon, J. M.; McNabb, S. B.; Lee, H. Y.-Y.; Aitken, S. G.; Mehrtens, J. M.; Robertson, L. J. G.; Neffe, A. T.; Miyamoto, S.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6911-6923.

⁸⁷ Jones, S. A.; Jones, M. A.; McNabb, S. B.; Aitken, S. G.; Coxon, J. M.; Abell, A. D. *Protein & Peptide Letters* **2009**, *16*, 1466-1472

⁸⁸ Abell, A. D.; Jones, M. A.; Coxon, J. M.; Morton, J. D.; Aitken, S. G.; McNabb, S. B.; Lee, H. Y.-Y.; Mehrtens, J. M.; Alexander, N. A.; Stuart, B. G.; et al. *Angew. Chem. Inter. Ed.* **2009**, *48*, 1455-1458.

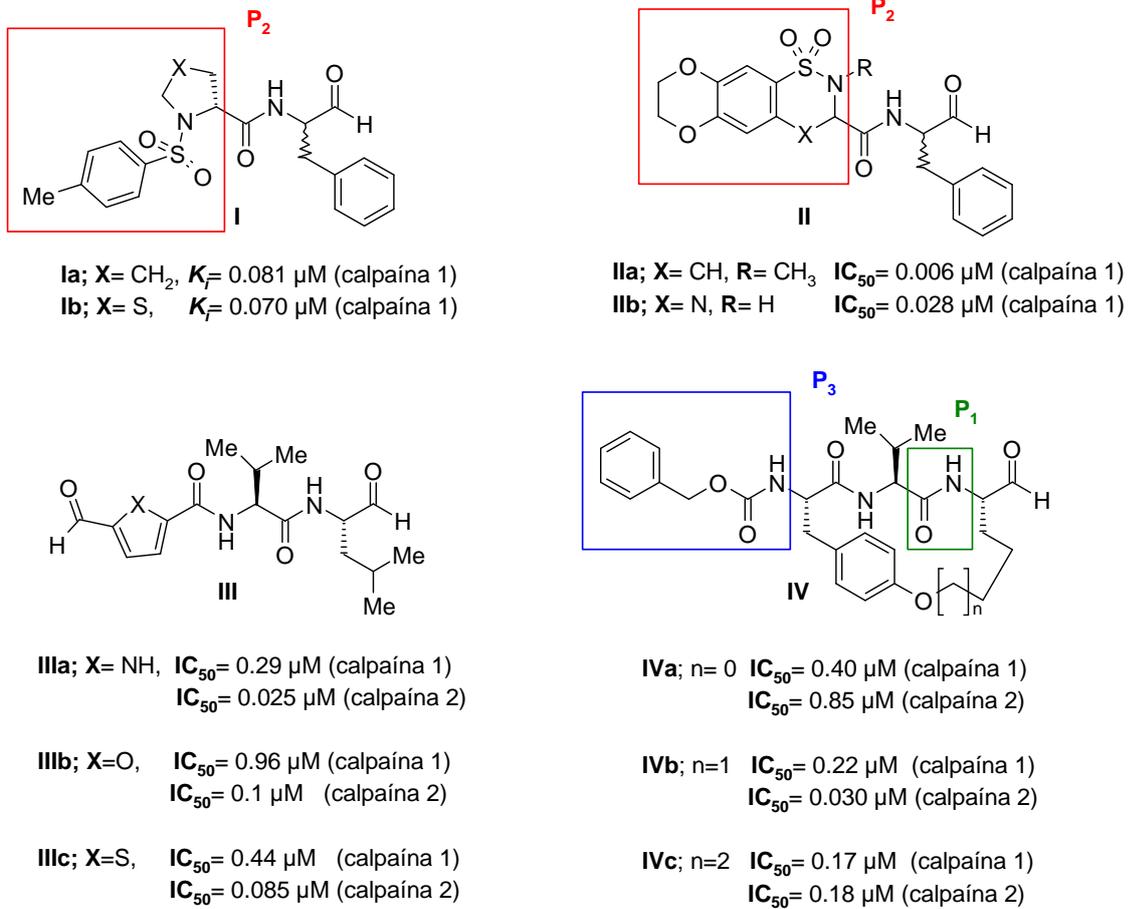


Figura 2.9

Algunos peptidil aldehídos, como **SJA-6017** (Figura 2.8), son inhibidores potentes pero muestran poca biodisponibilidad, debido a su baja permeabilidad celular, baja estabilidad metabólica y baja solubilidad en agua. Además, el grupo aldehído es muy reactivo frente a nucleófilos, como grupos amino y tioles de moléculas biológicas. Por ello, la formación de hemiacetales cíclicos derivados de los peptidil aldehídos, ha resultado ser una opción muy positiva para la mejora de las características farmacocinéticas (Figura 2.10).

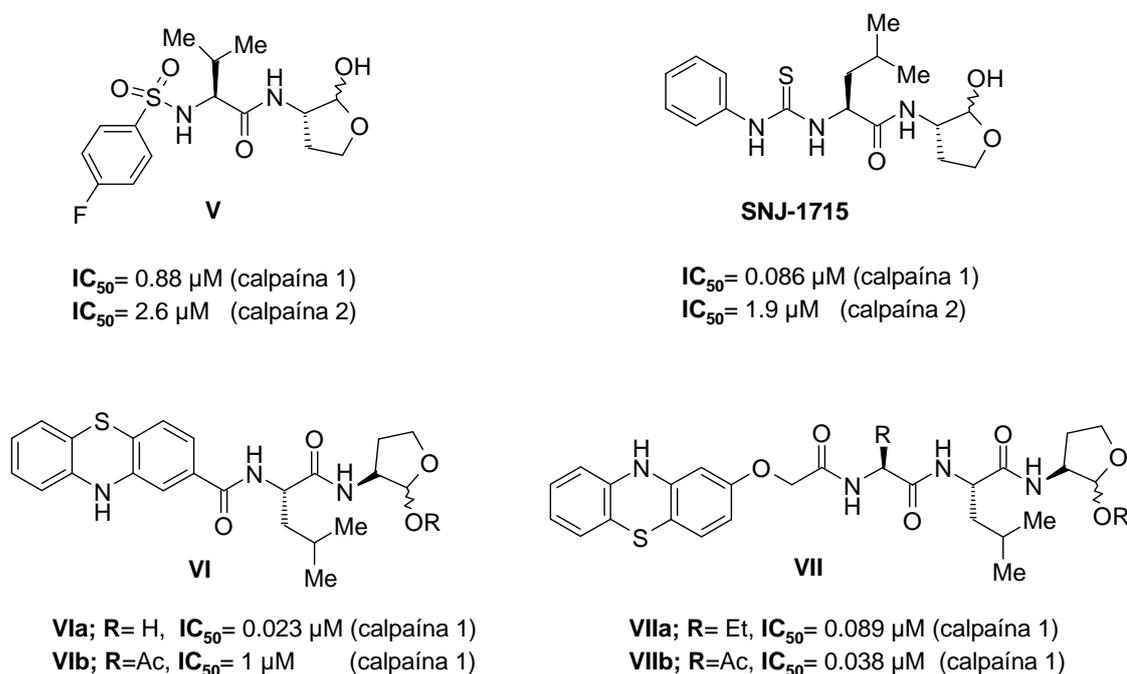


Figura 2.10

El hemiacetal **V** muestra una mejor permeabilidad de la membrana (0.39 vs. 0.051 μ g/mLh) y mejor solubilidad en agua (1.5 vs. 0.10 mg/mL), comparado con **SNJ-6017** (Figura 2.8); sin embargo, presenta menor potencia frente a la calpaína 1 y 2. El compuesto **SNJ-1715** tiene una solubilidad en agua similar, pero mejor potencia y permeabilidad celular (1.7 μ g/mLh). Tanto **V** como **SNJ-1715** son más estables metabólicamente que **SNJ-6017**. Además, **SNJ-1715** muestra una absorción rápida, excelente biodisponibilidad oral y una semivida prolongada, lo que le proporciona una gran eficacia contra las cataratas inducidas por calcio.⁸⁹

⁸⁹ Shirasaki, Y.; Nakamura, M.; Yamaguchi, M.; Miyashita, H.; Sakai, O.; Inoue, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3926-3932.

En cuanto a los hemiacetales **VI** y **VII** (**Figura 2.10**), sintetizados como inhibidores de calpaína y de la peroxidación de lípidos,⁹⁰ son potentes inhibidores de la calpaína 1 destacando por su actividad los derivados de **VIIa** y **VIIb**.

Peptidil α -cetocarboxil derivados

Estos inhibidores reversibles de calpaína se unen en el sitio activo, presentan una mejor permeabilidad en la membrana y no poseen tanta inestabilidad metabólica *in vivo* como los aldehídos. La potencia inhibitoria de los peptidil α -cetocarboxil derivados frente a las calpaína 1 y 2 sigue el siguiente orden α -cetoácidos > α -cetoamidas > α -cetoésteres. Un ejemplo de esto se puede observar en la **Figura 2.11**, en el que los α -cetoácidos representados presentan un constante de disociación del complejo enzima-inhibidor (K_i) menor, lo que implica una mayor potencia de inhibición.

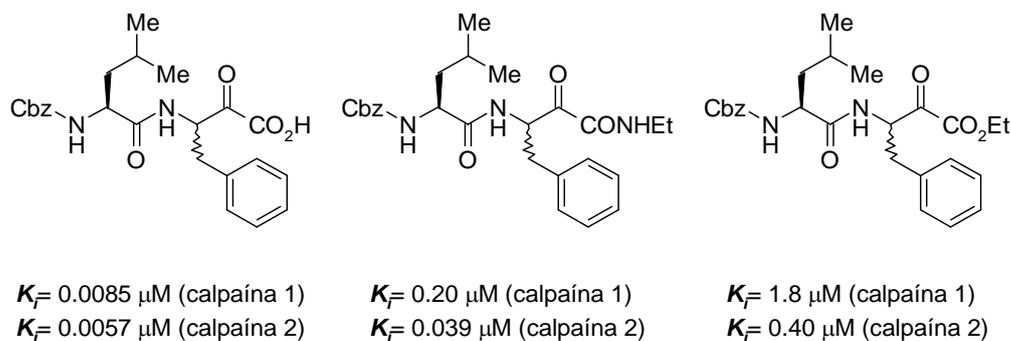
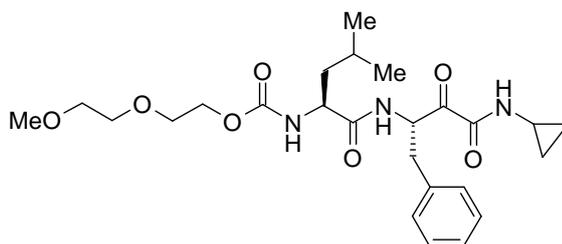
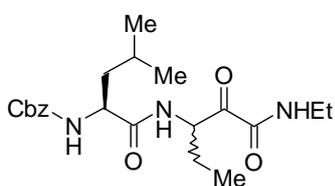
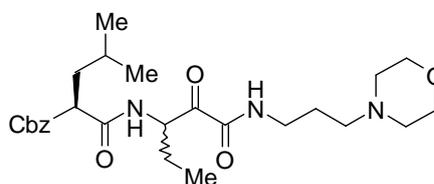


Figura 2.11

A pesar de ello, algunas α -cetoamidas presentan mayor efectividad para calpaínas intracelulares que los α -cetoácidos debido a su gran permeabilidad en la membrana⁹¹ y mayor estabilidad metabólica. En la **Figura 2.12** se presentan algunos ejemplos de inhibidores de este tipo.

⁹⁰ Auvin, S.; Pignol, B.; Navet, E.; Troadec, M.; Carre, D.; Camara, J.; Bigg, D.; Chabrier, P.-E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1586-1589.

⁹¹ Lescop, C.; Herzner, H.; Siendt, H.; Bolliger, R.; Henneboehle, M.; Weyermann, P.; Briguet, A.; Courdier-Fruh, I.; Erb, M.; Foster, M.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5176-5181.

**SNJ-1945** IC_{50} = 0.14 μ M (calpaína 1) IC_{50} = 0.041 μ M (calpaína 2)**AK-275** K_f = 0.25 μ M (calpaína 1) K_f = 0.21 μ M (calpaína 2)**AK-295** K_f = 0.150 μ M (calpaína 1) K_f = 0.041 μ M (calpaína 2)**Figura 2.12**

Los inhibidores **SNJ-1945**,⁹² **AK-275**⁹³ y **AK-295**⁹⁴ muestran efectos neuroprotectores frente a daños cerebrales en modelos de isquemia en animales de experimentación. El compuesto **SNJ-1945** presenta buena biodisponibilidad oral y buena penetración retinal.⁹⁵ El derivado **AK-295** inhibe el desarrollo de cataratas *in vitro*⁹⁶ y muestra efectos neuroprotectores en modelos *in vitro*.⁹⁷

⁹² Shirasaki, Y.; Miyashita, H.; Yamaguchi, M.; Inoue, J.; Nakamura, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4473-4484.

⁹³ Li, Z.; Patil, G. S.; Golubski, Z. E.; Hori, H.; Tehrani, K.; Foreman, J. E.; Eveleth, D. D.; Bartus, R. T.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3472-80.

⁹⁴ Li, Z.; Ortega-Vilain, A.; Patil, G. S.; Chu, D.; Foreman, J. E.; Eveleth, D. D.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4089-4098.

⁹⁵ Oka, T.; Nakajima, T.; Tamada, Y.; Shearer, T. R.; Azuma, M. *Exp. Neurol.* **2007**, *204*, 39-48.

⁹⁶ Mathur, P.; Peshenko, I. V.; Shichi, H. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2003**, *19*, 483-492.

⁹⁷ Caba, E.; Brown, Q. B.; Kawasaki, B.; Bahr, B. A. *J. Neurosci. Res.* **2002**, *67*, 787-794.

Con el fin de mejorar las características de este tipo de inhibidores, se han realizado modificaciones en su estructura. Así, con la incorporación de grupos funcionales polares en la posición P₁' (**Figura 2.13**), se obtiene **VIII**,⁹⁸ un potente inhibidor de calpaína 1. La incorporación en el compuesto **IX** de grupos aromáticos y un grupo amino básico en P₂-P₃, mejora la solubilidad en agua y la permeabilidad en la membrana, presentando una alta estabilidad metabólica, una disponibilidad oral excelente y unas propiedades farmacocinéticas⁹⁹ muy mejoradas. Estudios *in vivo*^{99,100} e *in vitro*¹⁰¹ de este inhibidor demuestran propiedades cardioprotectoras asociadas con la inhibición de la calpaína y no de la catepsina B o L.

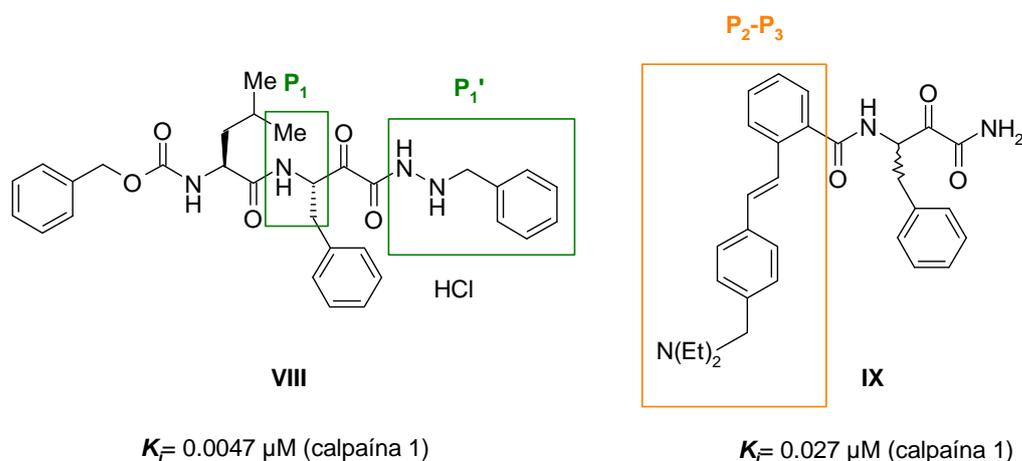


Figura 2.13

Un caso parecido ocurre cuando se incorporan heterociclos en la posición P₂-P₃ (**Figura 2.14**). Los compuestos **X** y **XI**, muestran alta selectividad por calpaína en relación con otras cisteín proteasas.¹⁰² El inhibidor **XI** es capaz de penetrar en el cerebro cuando se administra sistémicamente y, además, presenta propiedades anticonvulsivantes potentes (ED₅₀= 1 mg/kg).

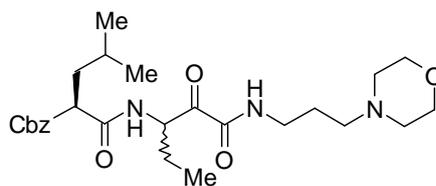
⁹⁸ Donkor, I. O.; Han, J.; Zheng, X. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 72-79.

⁹⁹ Neuhof, C.; Fabiunke, V.; Deibele, K.; Speth, M.; Moeller, A.; Lubisch, W.; Fritz, H.; Tillmanns, H.; Neuhof, H. *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 1077-1082.

¹⁰⁰ Neuhof, C.; Goette, O.; Trumbeckaite, S.; Attenberger, M.; Kuzkaya, N.; Gellerich, F.; Moeller, A.; Lubisch, W.; Speth, M.; Tillmanns, H.; et al. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1597-1603.

¹⁰¹ Khalil, P. N.; Neuhof, C.; Huss, R.; Pollhammer, M.; Khalil, M. N.; Neuhof, H.; Fritz, H.; Siebeck, M. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *528*, 124-131.

¹⁰² Lee, K. S.; Seo, S. H.; Lee, Y. H.; Kim, H. D.; Son, M. H.; Chung, B. Y.; Lee, J. Y.; Jin, C.; Lee, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2857-2860.



AK-295

 $K_f = 0.150 \mu\text{M}$ (calpaína 1)

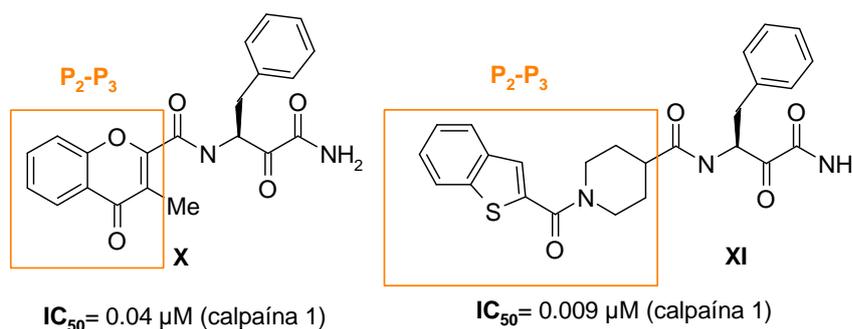
 $K_f = 0.041 \mu\text{M}$ (calpaína 2)


Figura 2.14

Cuando al inhibidor **AK-295** se le sustituye el grupo de morfolina por la base adenina para generar el derivado **XII** (Figura 2.15), se consigue una mejora en la potencia inhibitora con respecto a la calpaína 1, pero no ocurre lo mismo con la calpaína 2.¹⁰³ Resultados semejantes pueden observarse en los derivados **XIII-XV**, en los que se ha introducido en la molécula un resto de adenina metoxilada (**XIII** y **XV**) y/o restos aromáticos adicionales (**XIV** y **XV**) (Figura 2.15).

¹⁰³ Ovat, A.; Li, Z. Z.; Hampton, C. Y.; Asress, S. A.; Fernandez, F. M.; Glass, J. D.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6326-6336.

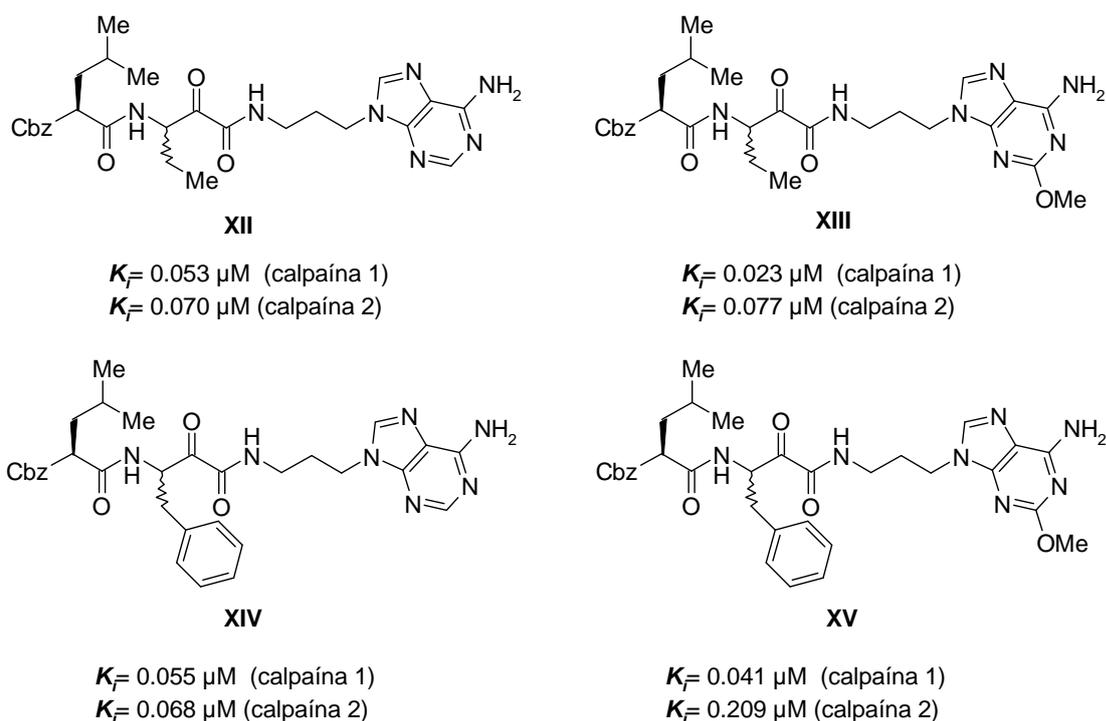


Figura 2.15

Inhibidores peptídicos sin un grupo funcional clásico

Un ejemplo de este grupo lo constituyen los híbridos bifeníl-peptidos representados en la **Figura 2.16**. Los compuestos **XVI** y **XVII** son inhibidores de calpaína potentes y selectivos.¹⁰⁴ El compuesto **XVII**, más concretamente, es muy activo frente a la calpaína 1 e inactivo frente a la papaína o la tripsina. Ninguno de estos compuestos presenta citotoxicidad y ambos muestran actividad citoprotectora en experimentos sobre cultivos de células. Estudios de espectrometría de masas y espectroscopía de ¹H-RMN han revelado que estos compuestos interactúan con Ca²⁺ para modular indirectamente la actividad de la calpaína.¹⁰⁴ La secuencia de aminoácidos o aminoácidos miméticos parece importante para la unión con la enzima.¹⁰⁵ El derivado cíclico **XVIII** (**Figura 2.16**) fue diseñado y sintetizado con el

¹⁰⁴ Montero, A.; Mann, E.; Chana, A.; Herradon, B. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 442-457.

¹⁰⁵ Montero, A.; Alonso, M.; Benito, E.; Chana, A.; Mann, E.; Navas, J. M.; Herradon, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2753-2757.

objetivo de mejorar las actividades biológicas de estos híbridos bifeníl-péptido, sin embargo la actividad frente calpaína 1 es moderada.¹⁰⁶

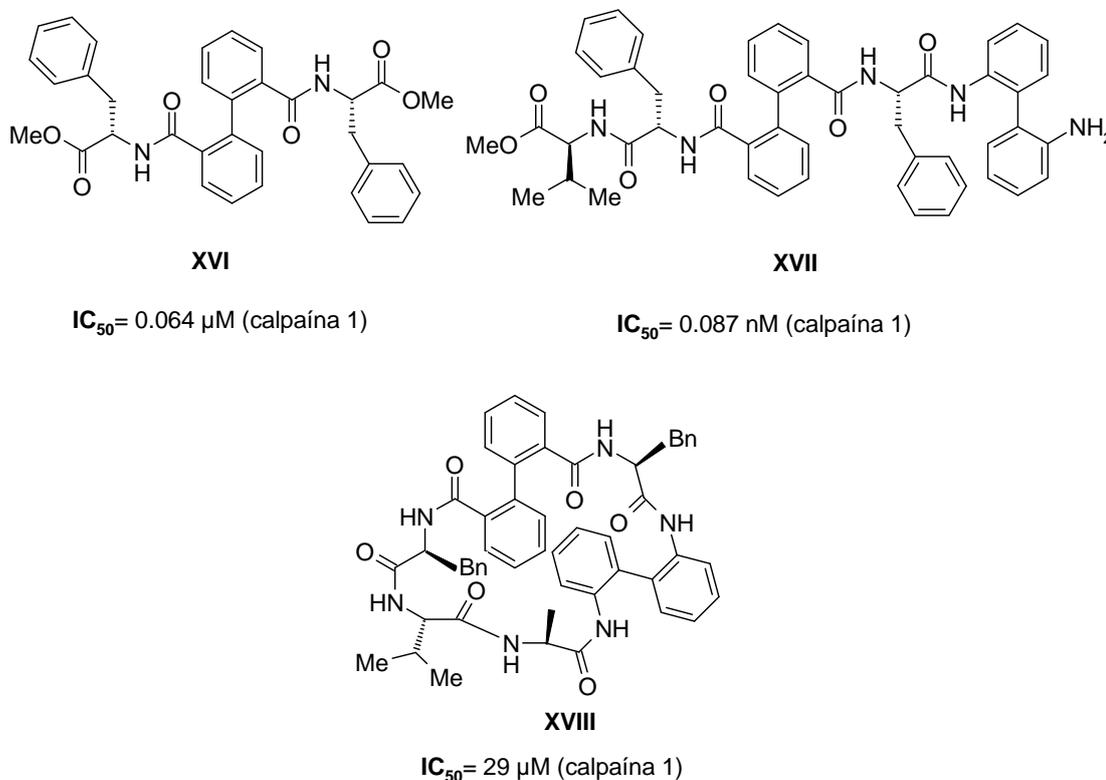
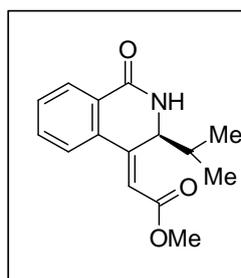


Figura 2.16

Una gran variedad de derivados de isoquinolina (genéricamente denominados híbridos péptido-heterociclo), se han preparado y evaluado como inhibidores de calpaína.¹⁰⁷ Para que estos compuestos presenten actividad es necesario la presencia de una cadena peptídica, de cuya longitud dependerá su actividad biológica. Así, como se puede observar en la **Figura 2.17**, el derivado sencillo de la isoquinolina no presenta actividad inhibitoria, mientras que los derivados con una cadena peptídica presentan cierta actividad.

¹⁰⁶ Montero, A.; Albericio, F.; Royo, M.; Herradon, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1301-1308.

¹⁰⁷ Mann, E.; Chana, A.; Sanchez-Sancho, F.; Puerta, C.; Garcia-Merino, A.; Herradon, B. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 855-867.



Inactivo

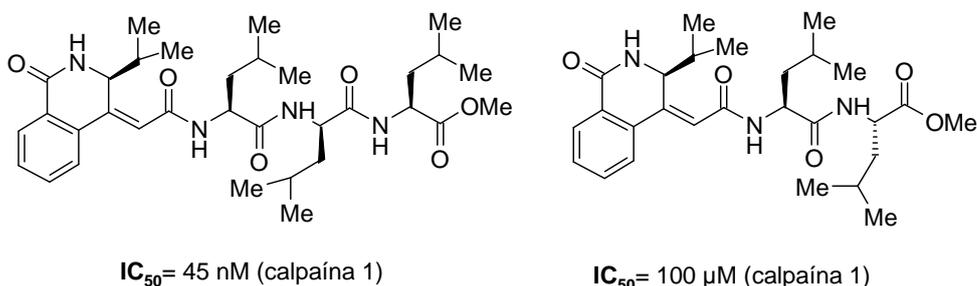
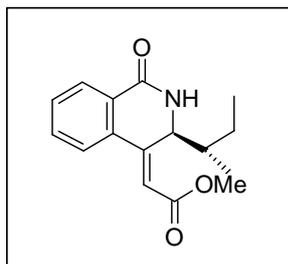
 $IC_{50} = 45 \text{ nM}$ (calpaína 1) $IC_{50} = 100 \text{ μM}$ (calpaína 1)

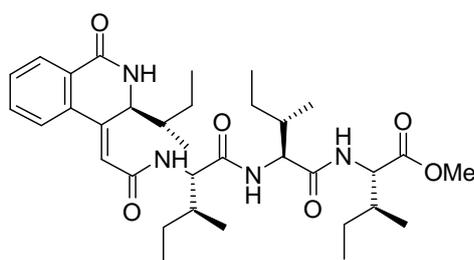
Figura 2.17

Sin embargo, estudios posteriores demostraron que cuando el sustituyente en posición C3 del anillo de isoquinolina era un grupo *sec*-butilo la actividad inhibitoria de la calpaína aumentaba de manera considerable,¹⁰⁸ demostrándose que la presencia de cadenas peptídicas no era totalmente necesaria para lograr actividad, lo que incrementa su potencial utilidad terapéutica como inhibidores enzimáticos. Algunos de estos ejemplos se muestran en la **Figura 2.18**.

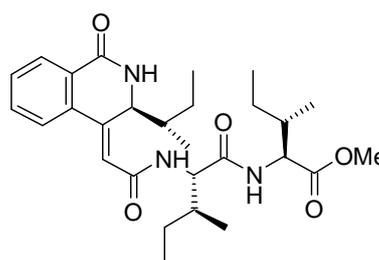
¹⁰⁸ Herradon, B.; Chicharro, R.; Aran, V. J.; Alonso, M. PCT Int. Appl., **2006**, WO 2006064075 A1 20060622.



IC_{50} = 25 nM (calpaína 1)



IC_{50} = 159 nM (calpaína 1)



IC_{50} = 447 nM (calpaína 1)

Figura 2.18

2.2.2.2. Inhibidores no peptídicos

Como ya se ha descrito anteriormente, la mayor parte de inhibidores de calpaína que se han desarrollado tienen un carácter peptídico y su mayor limitación para su uso en terapéutica es su falta de selectividad frente a calpaínas, relativa a otras tiolproteasas. Además, su estructura polar, característica de una estructura peptídica, presenta un perfil farmacocinético poco adecuado. Con el fin de mejorar todas estas limitaciones se han sintetizado un nuevo tipo de inhibidores de carácter no peptídico.

Los inhibidores no peptídicos poseen mayor especificidad frente a diversas calpaínas. Son inhibidores reversibles, que parecen no interaccionar con el centro catalítico de las calpaínas sino que se unen a una región alostérica que induce alteraciones o restricciones en la estructura de la calpaína, lo que afecta a la disposición conformacional requerida para la activación de la calpaína.⁵

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

Uno de los ejemplos más representativos de este grupo son los ácidos α -mercaptoacrílicos **PD-150606** y **PD-151746**. (Figura 2.19).

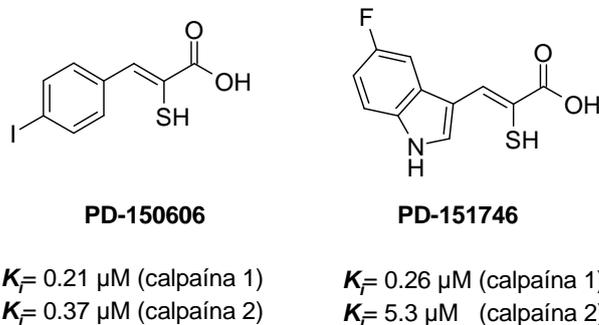


Figura 2.19

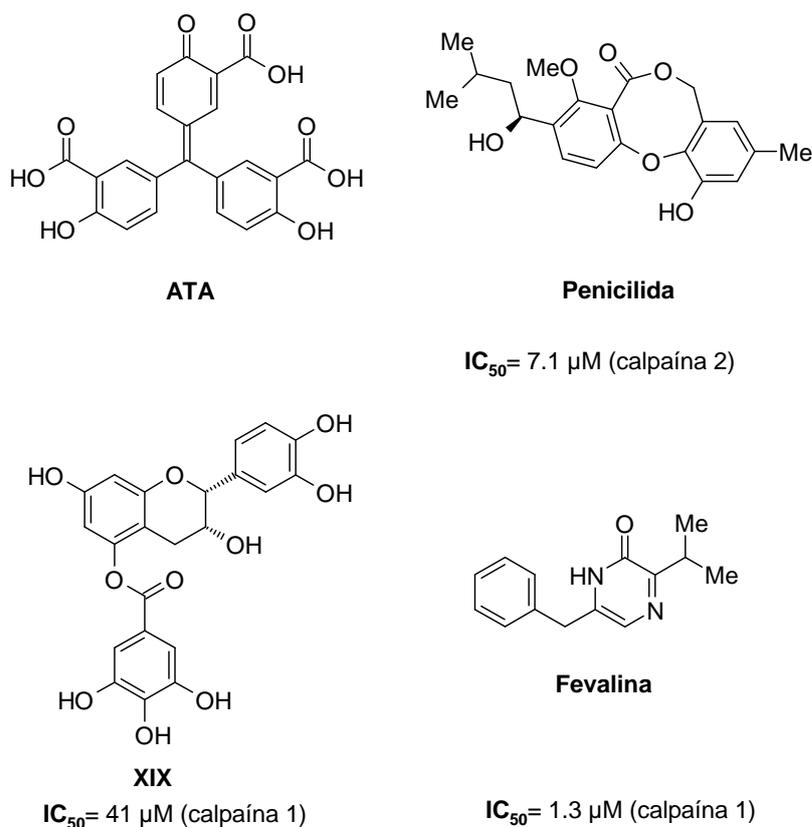
Estos inhibidores presentan buena permeabilidad celular y una gran selectividad frente a calpaínas, especialmente frente a μ -calpaína (calpaína 1). Los compuestos **PD-150606** y **PD-151746** tienen potencial terapéutico en el tratamiento de daños celulares. El inhibidor **PD-150606** posee efectos neuroprotectores como la disminución de daños excitotóxicos en modelos de animales *in vitro*,¹⁰⁹ además de reducir la disfunción y el daño renal¹¹⁰ facilitando la recuperación del tejido. Hay que añadir que tanto **PD-150606** como **PD-151746** disminuyen la apoptosis dependiente de calpaína en varios cultivos celulares utilizados como modelos.¹¹¹

Otras estructuras no péptidicas con una reconocida acción inhibitoria de calpaína se muestran en la **Figura 2.20**.

¹⁰⁹ Farkas, B.; Tantos, A.; Schlett, K.; Vilagi, I.; Friedrich, P. *Brain Res.* **2004**, *1024*, 150-158.

¹¹⁰ Chatterjee, P. K.; Todorovic, Z.; Sivarajah, A.; Mota-Filipe, H.; Brown, P. A. J.; Stewart, K. N.; Mazzon, E.; Cuzzocrea, S.; Thiernemann, C. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1121-1131.

¹¹¹ Verdaguer, E.; Alvira, D.; Jimenez, A.; Rimbau, V.; Camins, A.; Pallas, M. J. *Pharmacol.* **2005**, *145*, 1103-1111.

**Figura 2.20**

El ácido aurintricarboxílico (ATA), es un colorante de estructura quinoide que presenta una inhibición débil ($IC_{50} = 22 \mu M$) y poca selectividad frente a las calpaínas.¹¹²

Algunos productos naturales, que carecen de funcionalidad electrofílica han demostrado su actividad como inhibidores de calpaína. Éste es el caso de la penicilida (**Figura 2.20**), aislada de *Penicillium sp*, que es capaz de inhibir la calpaína 2 ($IC_{50}=7.1 \mu M$)¹¹³ mostrando selectividad frente a papaina. Otro ejemplo es (-)-epicatecina-6-galato (**XIX**), aislado de la planta *Orostachys japonicus A*, que es un inhibidor de la calpaína 1.

¹¹² Posner, A., Raser, K. J., Hajimohammadreza, I., Yuen, P. W., Wang K. K. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *36*, 291-299.

¹¹³ Chung, M.; Lee, H.; Chun, H.; Kho, Y. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *8*, 188-190.

En cuanto a las 4-quinolonas **XX**¹¹⁴ y **XXI**¹¹⁵ (Figura 2.21) han sido identificadas como potentes inhibidores de calpaína 1 (con un valor de IC_{50} en un rango micromolar). Además, presentan entre moderada y buena selectividad frente a otras cisteín proteasas como la captepsina B y L. Mientras que el compuesto **XX** no se comporta como un inhibidor competitivo,¹¹⁴ el compuesto **XXI** es capaz de unirse al sitio activo de la calpaína.¹¹⁵

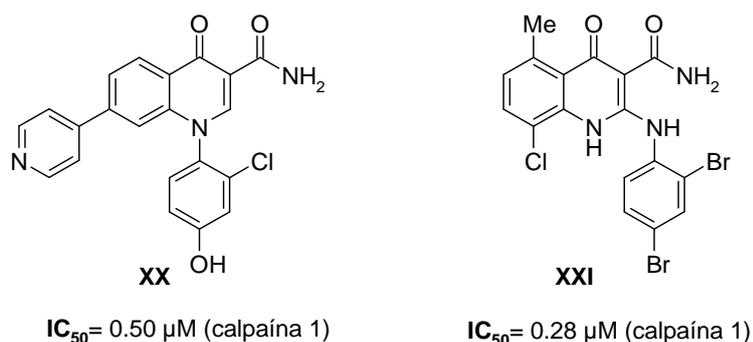


Figura 2.21

Aunque han sido muchos los inhibidores de calpaína que se han descrito a lo largo de estos últimos años, todavía quedan muchos aspectos por resolver, como la especificidad o las propiedades farmacocinéticas, de ahí la importancia de la síntesis de nuevos inhibidores de calpaína que presenten un mejor perfil farmacológico.

¹¹⁴ Graybill, T. L.; Dolle, R. E.; Osifo, I. K.; Schmidt, S. J.; Gregory, J. S.; Harris, A. L.; Miller, M. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 387-392.

¹¹⁵ Kang, D.; Jun, K.; Lee, J. P.; Pak, C. S.; Na, Y.; Kwon, Y. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3093-3097.

3.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado anteriormente, la presente Tesis se enmarca en un proyecto en Química Médica cuya diana terapéutica objetivo es la calpaína. En este proyecto se pretende desarrollar nuevos inhibidores de calpaína, debido a la importante implicación de ésta en diversas enfermedades que afectan a la función renal, tal y como se ha descrito en los antecedentes de esta memoria.

En la bibliografía, se han descrito un buen número de inhibidores de calpaína, entre ellos, inhibidores del tipo péptido-heterociclo,^{107,108} con los que se han obtenido resultados de actividad muy positivos frente a la calpaína. Se caracterizan por poseer una cadena peptídica unida a un sistema heterocíclico siendo éste un derivado de isoquinolina y la estructura general del híbrido resultante es la que se muestra en la **Figura 3.1**.

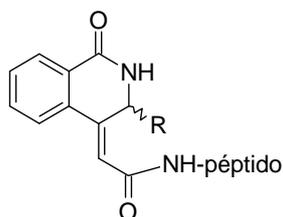


Figura 3.1. *Inhibidor de calpaína del tipo híbridos péptido-heterociclo.*

El primer objetivo que se propuso para esta Tesis fue la síntesis de inhibidores del tipo péptido-heterociclo, utilizando como heterociclo derivados de azolodiazinas, cuya química se había desarrollado anteriormente en nuestro grupo (**Figura 3.2**).

¹⁰⁷ Mann, E.; Chana, A.; Sanchez-Sancho, F.; Puerta, C.; Garcia-Merino, A.; Herradon, B. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 855-867.

¹⁰⁸ Herradon, B.; Chicharro, R.; Aran, V. J.; Alonso, M. *PCT Int. Appl.*, **2006**, WO 2006064075 A1 20060622.

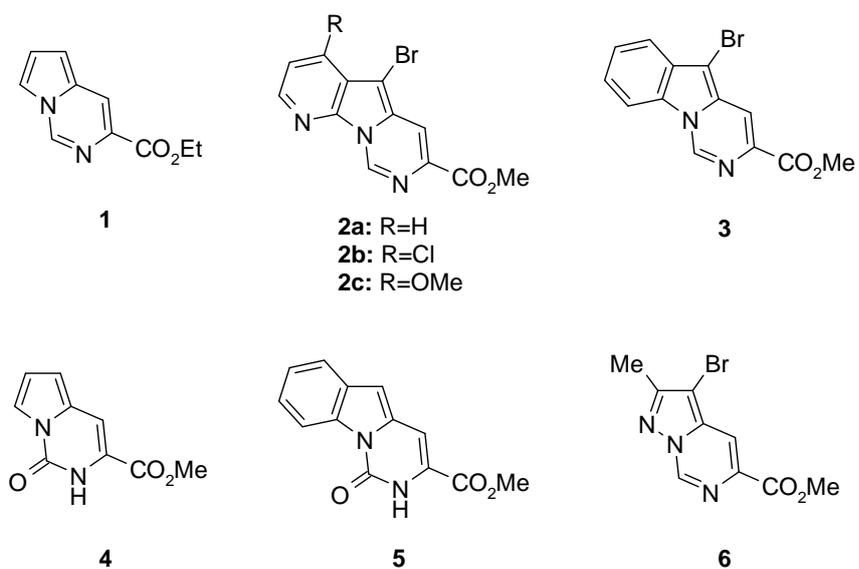


Figura 3.2. Azolopirimidinas utilizadas en híbridos péptido-heterociclo como potenciales inhibidores de calpaína.

Las pirrolo diazinas, también llamadas azaindolizinas, representan una clase de este tipo de heterociclos y comprenden cuatro sistemas heterocíclicos en función de la posición que ocupe el segundo nitrógeno de la diazina.

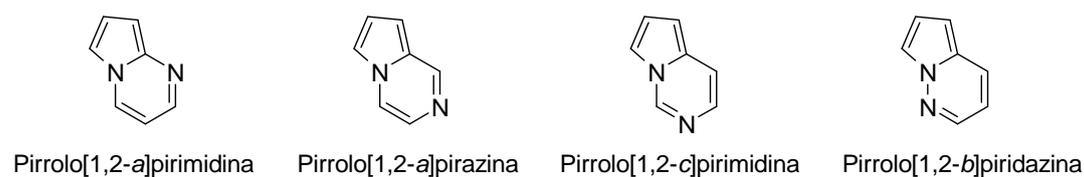


Figura 3.3. Estructura de los distintos sistemas de pirrolo diazinas

Las azaindolizinas, a diferencia de la indolizinas,¹¹⁶ han sido poco estudiadas tanto en lo que respecta a sus métodos de síntesis como a su reactividad general. No obstante, una gran parte de la síntesis y reactividad de este tipo de compuestos ha sido recogida en varias revisiones generales.^{117,116b} En ellas se muestra que, aunque es posible la obtención de pirrolodiazinas sustituidas con buenos rendimientos, la síntesis de los heterociclos sin sustituyentes resulta más complicada y se describe con rendimientos inferiores al 15%. Por ello, uno de los proyectos de nuestro grupo de investigación ha tenido como objetivo prioritario el desarrollo de nuevos métodos de síntesis de este tipo de sistemas, fundamentalmente de pirrolo[1,2-*a*]pirazina¹¹⁸ y pirrolo[1,2-*c*]pirimidina¹¹⁹ (**Figura 3.3**). Este último sistema presenta un interés adicional ya que es el único de los sistemas de pirrolodiazinas que se encuentra presente en varios productos naturales, concretamente en la estructura de la familia de alcaloides **variolinas** (**Figura 3.4**)¹²⁰ y del alcaloide **hinckdentina A**,¹²¹ todos ellos productos naturales de origen marino.

¹¹⁶ a) Flitschy, W. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Eds. **1994**, *4*, 443. b) Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J.; Barluenga, J. *Heterocycles Containing a Ring-Junction Nitrogen in Modern Heterocyclic Chemistry*. Eds. Wiley, **2011**, vol. 4, pag 1989-2070.

¹¹⁷ a) Kuhla, D. E.; Lombardino, J. G. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1997**, *21*, 1. b) Terenin, V. I.; Kabanova, E.V.; Feoktistova, E. S. *Khim. Geterotskl. Soedin* **1991**, *10*, 1299-1311. c) Maury, G. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1977**, *30*, 179-244. d) Blewitt, H. L. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1977**, *30*, 117-178. e) Amarnath, V.; Madhav, R. *Synthesis* **1974**, 873-859.

¹¹⁸ a) Mínguez, J. M.; Castellote, M. I.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J.; Castaño, O.; Andrés, J. L. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9341-9356. b) Mínguez, J. M.; Castellote, M. I.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J.; Castaño, O.; Andrés, J. L. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4655-4665. c) De Pablo, M. S.; Gandásegui, T.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8793-8800. d) Matía, M. P.; Ezquerro, J.; Sánchez-Ferrado, F.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J.J.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 7329-7342.

¹¹⁹ a) Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J.; Castaño, O.; Andrés, J. L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7788-7801. b) Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4263-4266.

¹²⁰ a) Trimurtulu, G.; Faulkner, D. J.; Perry, N. B.; Ettouati, L.; Litaudon, M.; Blunt, J. W.; Munro, M. H.G.; Jameson, G. B. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3993-4000. b) Perry, N. B.; Ettouati, L.; Litaudon, M.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G.; Parkin, S.; Hope, H. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3987-3992.

¹²¹ Blackman, A. J.; Hambley, T. W.; Picker, R.; Taylor, W. C.; Thirasasana, N. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5561-5562.

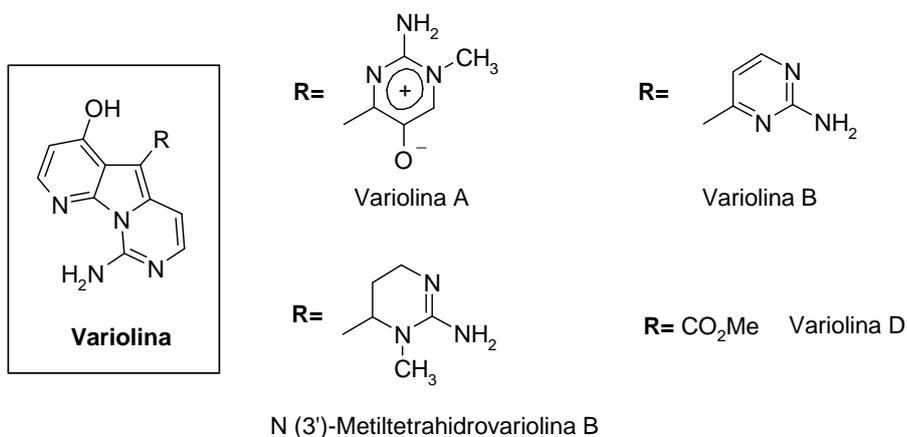


Figura 3.4. Estructura de los alcaloides variolinas.

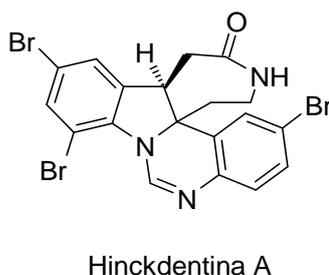
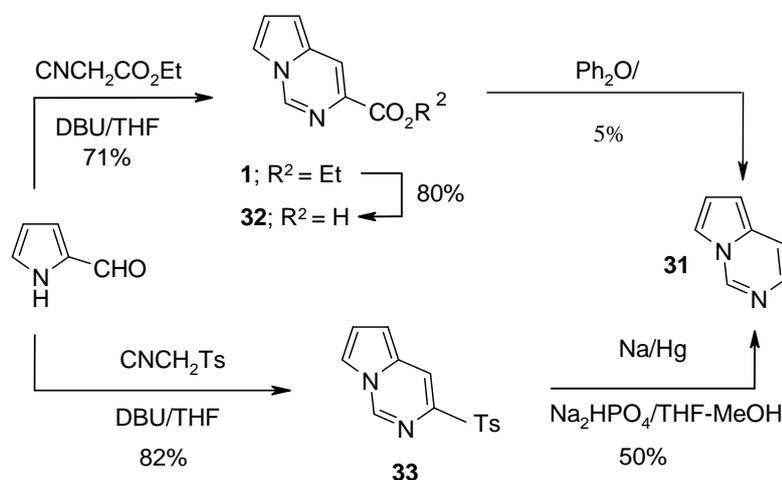


Figura 3.5. Estructura del alcaloide hinckdentina A.

Algunos de los proyectos concretos que se desarrollaron en nuestro grupo de investigación en este campo fueron, una nueva estrategia de preparación del núcleo de pirrolo[1,2-c]pirimidina y la aplicación de dicha estrategia a la síntesis total de la variolina B.

3.1.1. Síntesis de pirrolo[1,2-c]pirimidina

La síntesis de pirrolo[1,2-c]pirimidina **31** (**Esquema 3.1**), fue mejorada por nuestro grupo (42% de rendimiento global) con respecto a la síntesis precedente,¹²² en la que se obtenía con un rendimiento global del 5%. Para ello se llevó a cabo una nueva estrategia de heterociclación para construir el sistema de pirimidina.¹¹⁹ El paso clave de esta síntesis es la condensación de pirrol-2-carboxaldehído e isocianoacetato de etilo que conduce a pirrolo[1,2-c]pirimidin-3-carboxilato de etilo (**1**) con un rendimiento del 71% (**Esquema 3.1**). Sin embargo, los intentos de descarboxilación del ácido resultante de la hidrólisis del éster **32** se saldaron con rendimientos de sólo el 5% en el mejor de los casos (reflujo de Ph₂O).



Esquema 3.1

¹²² Wong, J. L.; Brown, M. S.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2398-2402.

¹¹⁹ a) Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J.; Castaño, O.; Andrés, J. L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7788-7801. b) Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4263-4266.

A la vista de estos resultados, se ensayó la condensación con tosilmetilisonitrilo (TosMIC)¹²³ asumiendo que la sulfona resultante sería más fácil de eliminar que el grupo ácido. La reacción de heterociclación con TosMIC y el pirrolo[1,2-c]pirimidina en presencia de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) proporcionó el producto esperado **33** con buen rendimiento (82%).

La eliminación de la sulfona se logró con el tratamiento de amalgama Na/Hg/Na₂HPO₄ en THF-MeOH, obteniéndose la pirrolo[1,2-c]pirimidina **31** en dos pasos y con un rendimiento global del 40%. Aplicando esta metodología, toda una serie de pirrolo[1,2-c]pirimidinas fueron sintetizadas con rendimientos moderados-altos. La única limitación fue la compatibilidad del sustituyente en las condiciones de desulfonilación.

3.1.2. Síntesis total de la variolina B

En 1994, Munro y Blunt describieron el aislamiento y la estructura de las variolinas, una familia de alcaloides aisladas de la esponja *Kirtpatrickia variolosa*¹²⁰ que se encuentra en la Antártida. Las variolinas presentan actividad antiproliferativa frente a P388 y a través de screening in vitro se ha demostrado la alta actividad como agente antiviral de la variolina B (*Herpes simplex* Tipo I, *polio* Tipo 1).

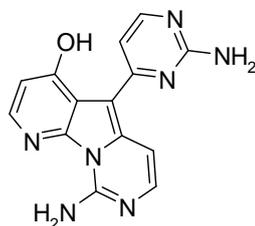


Figura 3.6. Estructura de la variolina B.

¹²³ a) Saikachi, H.; Kitigawa, T.; Sasaki, H.; van Leusen, A. M. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 4199-4204.

b) Saikachi, H.; Kitigawa, T.; Sasaki, H.; van Leusen, A. M. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 793-796.

¹²⁰ a) Trimurtulu, G.; Faulkner, D. J.; Perry, N. B.; Ettouati, L.; Litaudon, M.; Blunt, J. W. ; Munro, M. H.G.; Jameson, G. B. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3993-4000. b) Perry, N. B.; Ettouati, L.; Litaudon, M.; Blunt, J. W. ; Munro, M. H. G.; Parkin, S.; Hope, H. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3987-3992.

Debido a que la variolina B es la que presenta mejor perfil de actividad biológica, nuestro grupo y otros (Morris,¹²⁴ Molina¹²⁵ y Álvarez¹²⁶) abordaron su síntesis total. Nuestro grupo ha publicado recientemente una nueva síntesis total de la variolina B y de la desoxivariolina B.¹²⁷ Esta nueva estrategia sintética no es sólo útil para la síntesis de la variolina B sino que además, permite realizar modificaciones estructurales del producto natural a través de reacciones de acoplamiento C-N, C-C, y C-O catalizadas por Pd, con la incorporación de sustituyentes en el sistema tricíclico de pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidina, que es el intermedio heterocíclico clave (**Figura 3.7**).

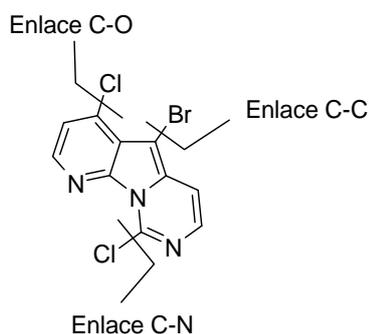


Figura 3.7

La estrategia inicial consistió en la síntesis de 5-bromopirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (**2a**). Para ello, la metodología que se desarrolló¹²⁸ se basa en hacer reaccionar 3-bromo-2-bromometilpirrolo[2,3-b]piridina-1-carboxilato de metilo (**34a**) con tosilmetil isonitrilo (TosMIC) en condiciones de catálisis de transferencia de fase (PTC), (TBAI, NaOH, CH₂Cl₂) (**Esquema 3.2**). Esta reacción proporciona la formación del compuesto **2a** con un 65% de rendimiento.

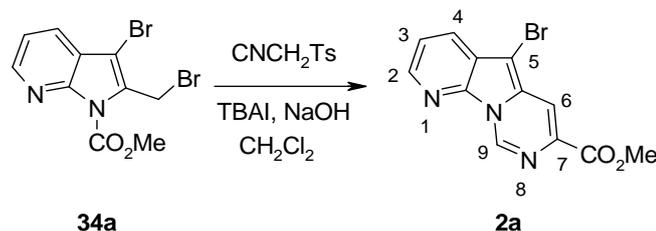
¹²⁴ a) Anderson, R. J.; Morris, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8697-8699; b) Anderson, R. J.; Hill, J. B.; Morris, J. C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6204-6212; c) Walker, S. R.; Carter, E. J.; Huff, B. C.; Morris, J. C. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3080-3098.

¹²⁵ a) Molina, P.; Fresneda, P. M.; Delgado, S.; Bleda, J. A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1005-1007; b) Molina, P.; Fresneda, P. M.; Delgado, S. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 489-499.

¹²⁶ a) Ahaidar, A.; Fernandez, D.; Danelon, G.; Cuevas, C.; Manzanares, I.; Albericio, F.; Joule, J. A.; Alvarez, M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10020-10029; b) Ahaidar, A.; Fernandez, D.; Perez, O.; Danelon, G.; Cuevas, C.; Manzanares, I.; Albericio, F.; Joule, J. A.; Alvarez, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6191-6194.

¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

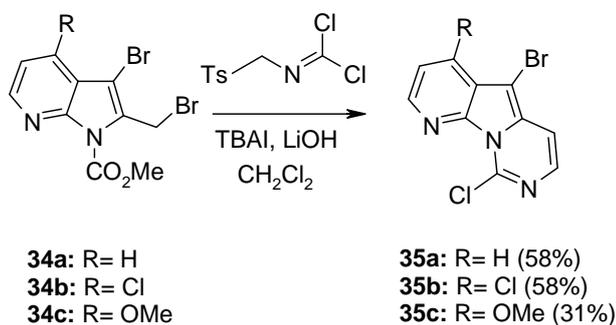
¹²⁸ a) Mendiola, J.; Minguez, J. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3253-3256. b) Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4974-4983.



Esquema 3.2

La transformación del compuesto **2a** en la desoxivariolina B requería la eliminación del grupo éster en C7 y la funcionalización del sistema en C5 y C9. Aunque tanto la eliminación del grupo éster como la introducción de la pirimidina en C5, se lograron llevar a cabo, la introducción del sustituyente amino en C9 no pudo resolverse.

En este punto, se planteó un cambio de estrategia con el fin de buscar una síntesis que permitiera acceder al sistema tricíclico de la variolina B con alguna funcionalización en C9 y que posteriormente pudiera transformarse en el grupo amino. Para ello, en el proceso de heterociclación, en vez de usar el TosMIC se utilizó un equivalente sintético del mismo, *N*-tosilmetil dicloroformimida¹²⁹ (**Esquema 3.3**).



Esquema 3.3

¹²⁹ Olijnsma, T.; Engberts, J. B. F. N. *Synthetic Comm.* **1973**, 3, 1-8.

La obtención del compuesto **35**, funcionalizado en la posición C9 con un cloro, permitió la introducción del grupo amino en esa posición a través de reacciones de acoplamiento de paladio C-N, resolviendo de esta manera el problema que presentaba la anterior estrategia propuesta y pudiéndose realizar la síntesis total de la variolina B, que se recoge en el **Esquema 3.4**.

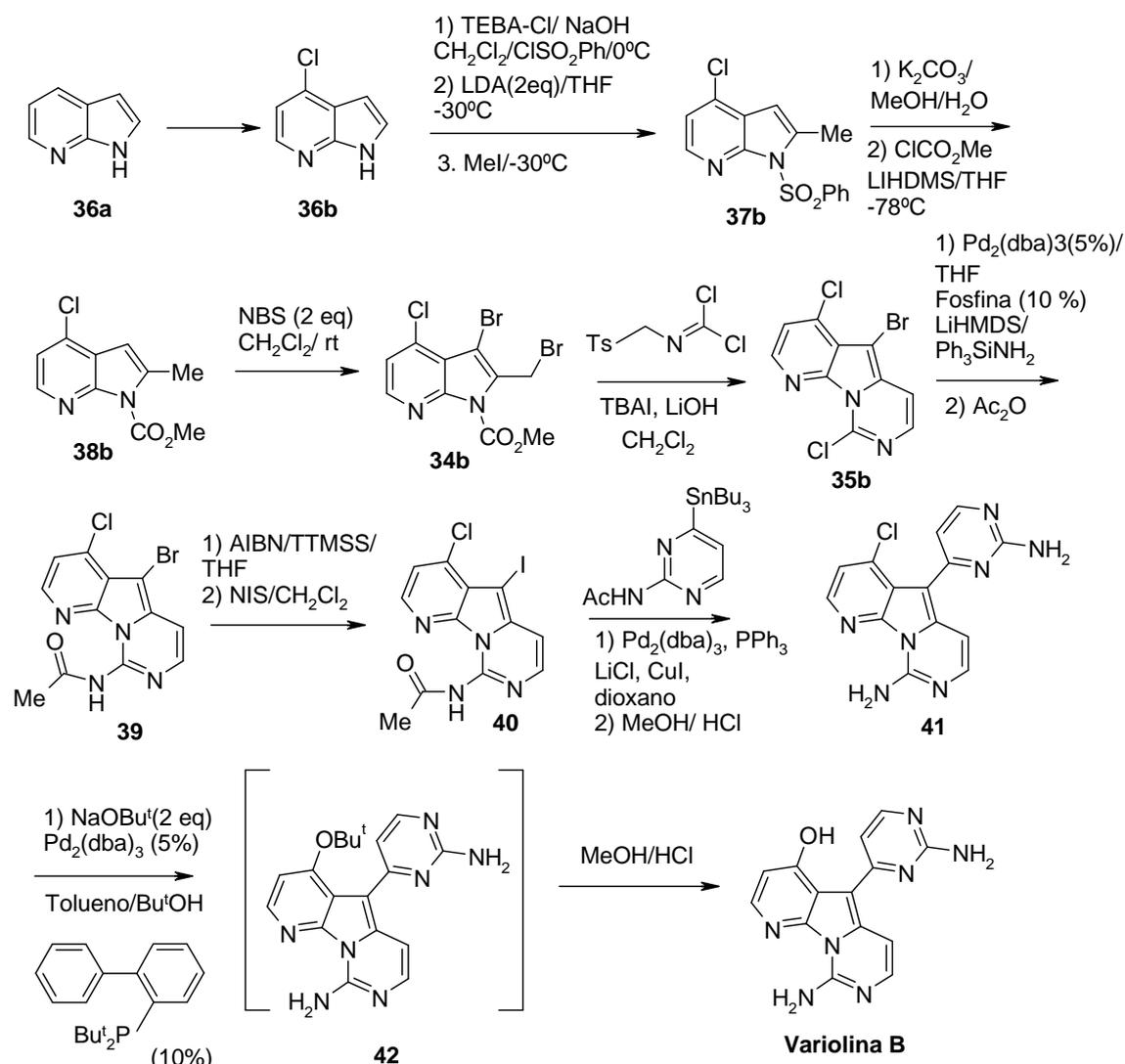
La síntesis parte del producto comercial 7-azaindol (**36a**) que se transforma en 4-cloro-7-azaindol (**36b**), según las condiciones descritas en la bibliografía.¹³⁰ La posterior protección del compuesto **36b** con un grupo sulfona seguido de su metilación en posición C2 conduce a la obtención de **37b** con buenos rendimientos. El grupo sulfona no permite la reacción de heterociclación con el TosMIC y derivados, por lo que el siguiente paso consistió en la desprotección del grupo sulfona en condiciones básicas y su posterior protección como carbamato (**38b**), grupo imprescindible para las reacciones de heterociclación. La bromación del compuesto **38b** se consiguió con dos equivalentes de *N*-bromosuccinimida (NBS), resultando así el compuesto **34b** con un 75% de rendimiento.

El siguiente paso fue la reacción de heterociclación del compuesto **34b** con *N*-tosilmetildicloroformimida en condiciones de catálisis de transferencia de fase (TBAI, LiOH, CH₂Cl₂) consiguiéndose a la formación del sistema tricíclico **35b**. A continuación se procedió a la funcionalización del sistema tricíclico a través de reacciones de acoplamiento catalizada por paladio. La introducción del grupo amino se llevó a cabo usando trifenilsililamina (Ph₃SiNH₂), un equivalente sintético del amoníaco, en presencia de bis(trimetilsilil)amiduro de litio (LiHMDS), 2 mol% de Pd₂(dba)₃ y 4 mol% de (2-bifenil)di-*tert*-butilfosfina. Dicho grupo amino era necesario proteger para realizar el resto de las reacciones, usando anhídrido acético a reflujo.

El posterior acoplamiento con el estannano, preparado de acuerdo al procedimiento descrito por Álvarez,^{126a} en la posición C5 requiere la presencia de yodo en vez de bromo, lo cual se consigue reduciendo el compuesto **39** con condiciones radicalarias y posterior yodación con *N*-yodosuccinimida (NIS). Una vez obtenido el compuesto **40** se realizó un acoplamiento de paladio C-C (**41**) y otro C-O (**42**) para introducir un grupo *tert*-butóxido en C4 que, por posterior tratamiento con MeOH/ HCl, condujo a la variolina B.

¹³⁰ Clark, B. A. J.; Patrick, J. *J. Chem. Soc.; Perkin Trans. I.* **1974**, 2270-2274.

^{126a} a) Ahaidar, A.; Fernandez, D.; Danelon, G.; Cuevas, C.; Manzanares, I.; Albericio, F.; Joule, J. A.; Alvarez, M. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 10020-10029.



Esquema 3.4. Síntesis total de variolina B.¹²⁷

¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

3.2. HÍBRIDOS PÉPTIDO-HETEROCICLO

Basándonos en estos precedentes, se iniciaron los trabajos sintéticos para la preparación de los híbridos péptido-heterociclo. En primer lugar se abordó la síntesis de los heterociclos, los cuales se unirían a los péptidos seleccionados para generar los correspondientes híbridos.

3.2.1. Síntesis de heterociclos

Los primeros heterociclos utilizados para la preparación de los inhibidores de calpaína del tipo péptido-heterociclo fueron, como ya se ha indicado anteriormente, derivados de pirrolopirimidina. Los compuestos que inicialmente se seleccionaron para esta finalidad se muestran en la **Figura 3.8**.

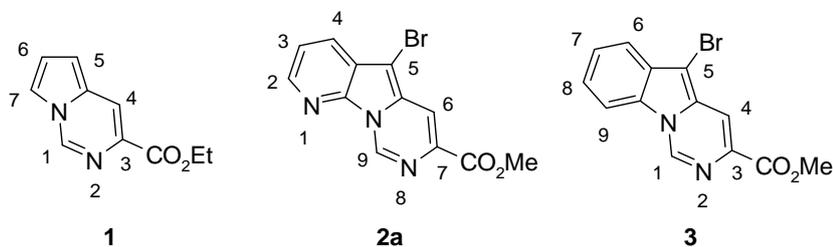


Figura 3.8

Este tipo de sistemas heterocíclicos en los que la posición C1 del compuesto **1** y **3** y C9 del compuesto **2a** tienen carácter electrófilo, podrían cumplir algunos de los rasgos característicos de los inhibidores de calpaína y, además, tras la hidrólisis de los grupos éster, se les podrían acoplar diferentes péptidos formando así los híbridos péptido-heterociclo que se buscaban.

La introducción de un grupo carbonilo en posición C1 (**1** y **3**) y C9 (**2a**), podría ser una opción interesante para la síntesis de otro tipo de heterociclos, ya que estos derivados presentan una mayor similitud con los derivados isoquinolínicos previamente descritos en la bibliografía (**Figura 3.9**).

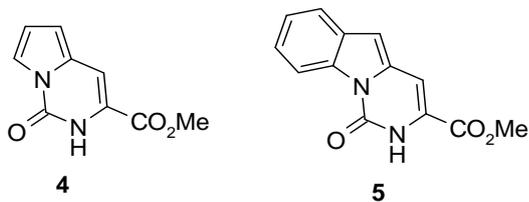


Figura 3.9

La síntesis del compuesto **5** se había descrito anteriormente en la literatura,¹³¹ así que se aprovechó la misma metodología para sintetizar el compuesto **4**, como se detallará más adelante. Al igual que con los compuestos anteriores, una vez que se realizara la hidrólisis del grupo éster al correspondiente ácido, se podría acoplar con los péptidos. En la **Figura 3.10**, se muestra un resumen de los diferentes híbridos que se pretendían preparar como primer objetivo sintético.

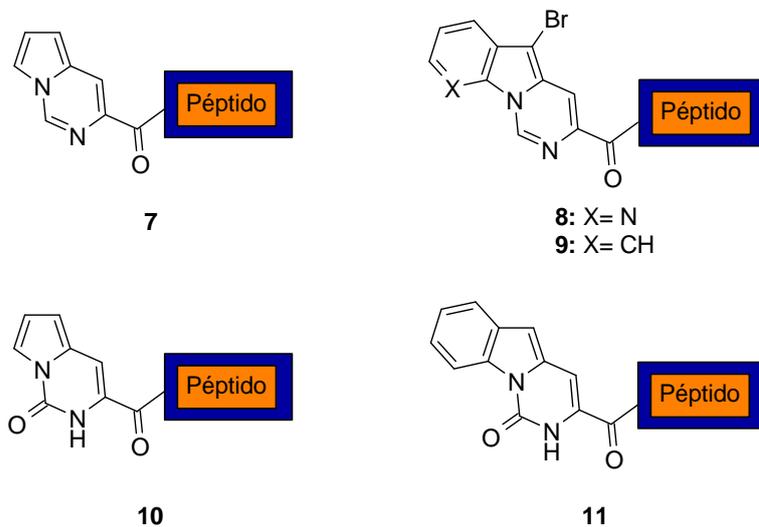
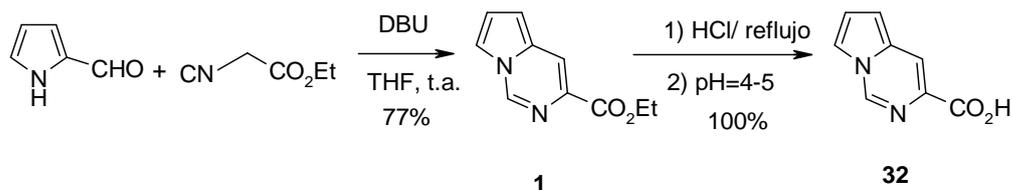


Figura 3.10

¹³¹ Carlier, P. R.; Lam, P. C. H.; Wong, D. M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6256-6259.

La síntesis del compuesto **1** y su posterior hidrólisis queda recogida en el **Esquema 3.5**. Se utilizó la metodología desarrollada en nuestro grupo¹¹⁹ partiendo del pirrol-2-carboxaldehído y haciéndolo reaccionar con isocianoacetato de etilo en presencia de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, (DBU). Para la hidrólisis del producto de ciclación **1** se utilizaron condiciones convencionales, obteniéndose el correspondiente clorhidrato, el cual, con tratamiento básico condujo al ácido buscado (**32**) con un rendimiento cuantitativo.



Esquema 3.5

El sistema de pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidina (**2a**) se sintetizó siguiendo la ruta representada en el **Esquema 3.6**. Esta síntesis se realizó a partir del 7-azaindol **36a** en una secuencia sintética de varias etapas. Utilizando la metodología que fue descrita por Desabre y *col.*¹³² la 1-fenilsulfonil- 2-metil-pirrolo[2,3-*b*]piridina (**37a**) se sintetizó a través de un proceso de protección y metilación empleando bases litiadas. Se realizó la protección con cloruro de fenilsulfonilo en condiciones de transferencia de fase. La metilación se efectuó utilizando dos equivalentes de diisopropilamido de litio (LDA) y como electrófilo yoduro de metilo.

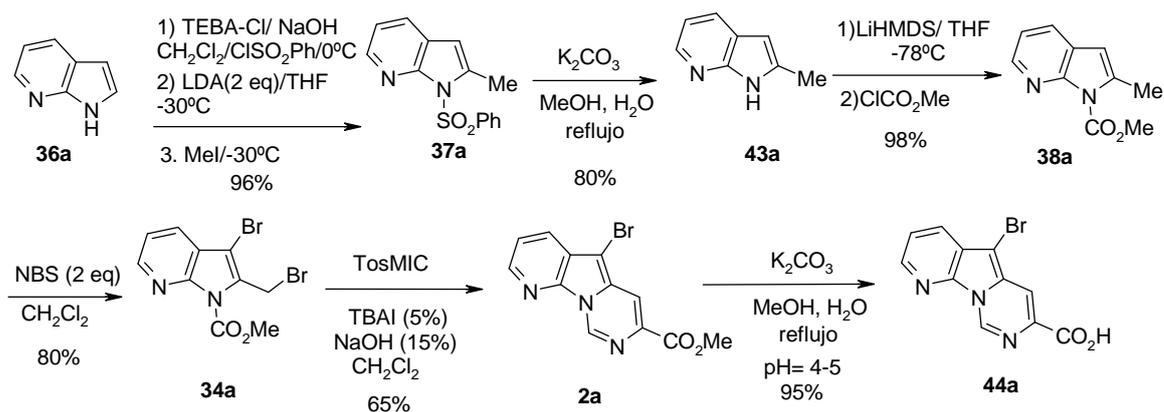
La desprotección de la sulfona en medio básico proporcionaría **43a** y su posterior protección con cloroformiato de metilo proporcionó el derivado **38a** con un 98% de rendimiento. Las reacciones de bromación se realizaron en un solo paso, empleando dos equivalentes de NBS, en CH₂Cl₂, a temperatura ambiente para proporcionar el derivado dibromado **34a**. Por último, se efectuó la reacción de heterociclación con TosMIC, en condiciones de transferencia de fase, obteniéndose el derivado **2a**.¹²⁸

¹¹⁹ a) Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J.; Castaño, O.; Andrés, J. L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7788-7801. b) Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4263-4266.

¹³² Desabre, E.; Coudret, S.; Meheust, C.; Mèrou, J.-Y. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3637-3648.

¹²⁸ a) Mendiola, J.; Mínguez, J. M.; Álvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3253-3256. b) Mendiola, J.; Baeza, A.; Álvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4974-4983.

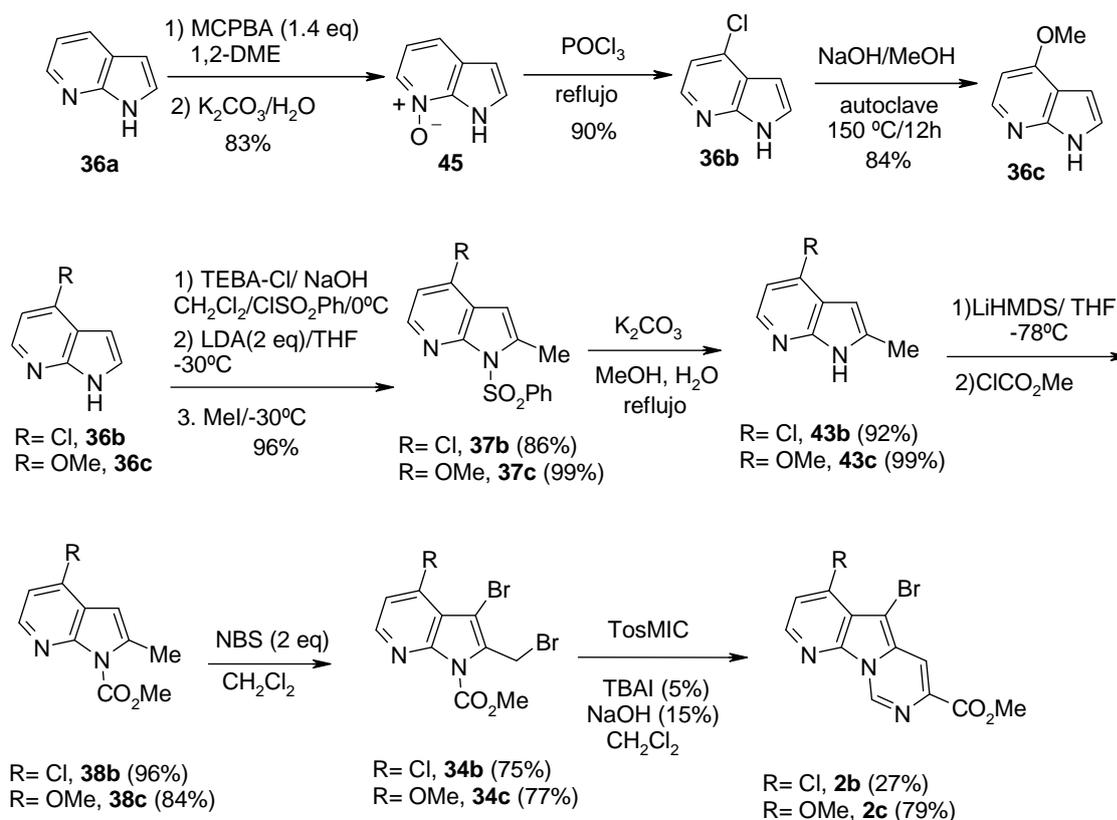
El mecanismo propuesto para esta reacción conlleva una sustitución nucleófila del anión del TosMIC sobre **34a**, seguido de una transferencia intramolecular de grupo protector; posteriormente se produce el ataque del nitrógeno del azaindol sobre el grupo isonitrilo produciéndose la ciclación y posterior eliminación del grupo tosilo, formándose así el compuesto **2a**.¹²⁸ La hidrólisis de **2a** se llevó a cabo en condiciones básicas convencionales. Una vez terminada la reacción se acidificó precipitando en el medio el compuesto **44**, como un sólido amarillo y con elevado rendimiento (95%).



Esquema 3.6

La preparación de los sistemas tricíclicos **2b** y **2c** se llevó a cabo siguiendo una ruta semejante. Partiendo de nuevo del 7-azaindol comercial **36a**, a través del N-óxido **45** y preparando los azaindoles 4-sustituidos correspondientes **36b** y **36c** (Esquema 3.7). El resto de pasos, semejantes a los ya descritos, se recogen en el Esquema 3.7.

¹²⁸ a) Mendiola, J.; Minguéz, J. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3253-3256. b) Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974-4983.



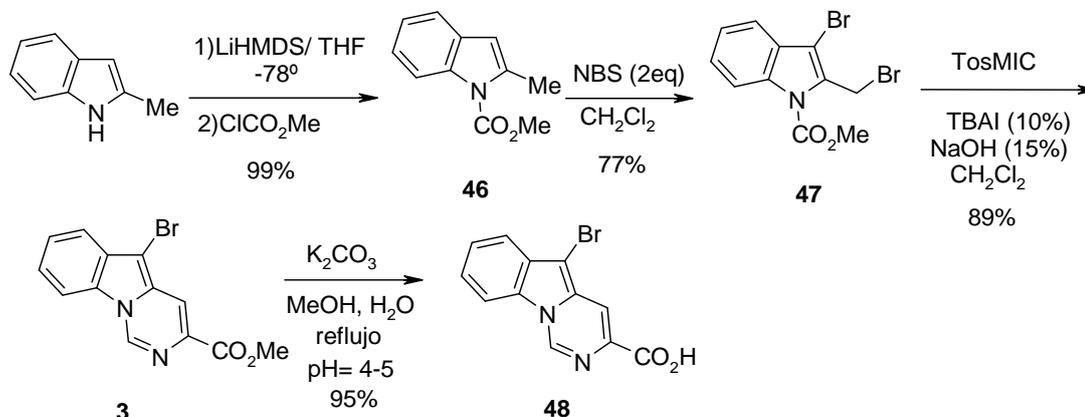
Esquema 3.7

Para la síntesis del 5-bromopirimido[1,6-a]indol-3-carboxilato de metilo (**3**) se siguió un esquema sintético muy similar al anterior (**Esquema 3.8**). La reacción de protección del producto comercial 2-metilindol empleando metoxicarbonilo como grupo protector, fue efectuada siguiendo la metodología descrita en la bibliografía,¹³³ con bis(trimetilsilil) amiduro de litio (LiHMDS) como base, a baja temperatura y posterior tratamiento con cloroformiato de metilo para suministrar **46**. Una vez sintetizado el bromometilindol **47** por tratamiento de **46** con dos equivalentes de NBS, se procedió a realizar la heterociclación en presencia de TosMIC en condiciones de transferencia de fase¹²⁸ para obtener el derivado tricíclico **3**. La posterior hidrólisis, al igual que en el

¹³³ Nagarathnam, D. *Synthesis* **1992**, 743-745.

¹²⁸ a) Mendiola, J.; Minguez, J. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3253-3256. b) Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974-4983.

caso anterior, se realizó en condiciones básicas conduciendo al ácido tras acidificación, y obteniéndose **48** con un rendimiento casi cuantitativo.

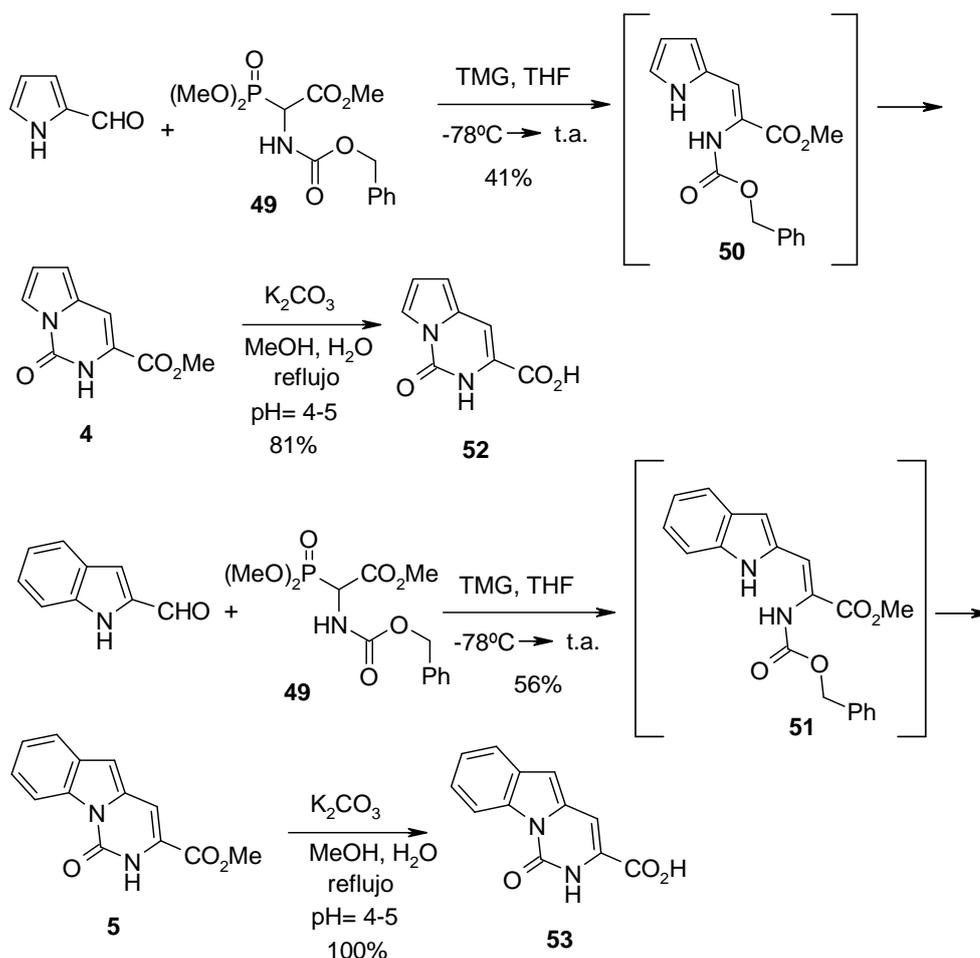


Esquema 3.8

En cuanto a la síntesis de los compuestos **4** y **5**, se utilizaron condiciones ya descritas en la bibliografía para la preparación de **5**.¹³¹ El primer paso de esta síntesis fue una reacción de Wittig entre los correspondientes aldehídos y la fosforilglicina sustituida **49** en presencia de 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG) siguiendo las condiciones descritas por Schmidt.¹³⁴ Posteriormente, el nitrógeno indólico o pirrólico reaccionó con el grupo carbonilo del grupo carbamato en los intermedios **50** y **51**, produciéndose la ciclación intramolecular con eliminación de alcohol bencílico y la consiguiente formación de los compuestos **4** y **5**. Las condiciones de hidrólisis fueron semejantes a las utilizadas en los ejemplos anteriores, obteniéndose buenos rendimientos en ambos casos de los ácidos **52** y **53**.

¹³¹ Carlier, P. R.; Lam, P. C. H.; Wong, D. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6256-6259.

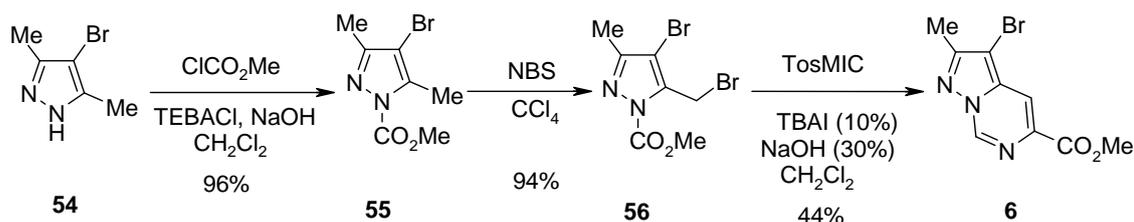
¹³⁴ Schmidt, U.; Griesser, H.; Leitenberger, V.; Lieberknecht, A.; Mangold, R.; Meyer, R. *Synthesis* **1992**, 487-490.



Esquema 3.9

Por último, el compuesto **6** se preparó siguiendo el procedimiento general descrito en nuestro grupo^{128b} y que se detalla en el **Esquema 3.10**, partiendo del derivado comercial **54**, por protección (**55**), bromación (**56**) y heterociclación en presencia de TosMIC (**6**).

^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4974-4983.



Esquema 3.10

3.2.2. Síntesis de péptidos.

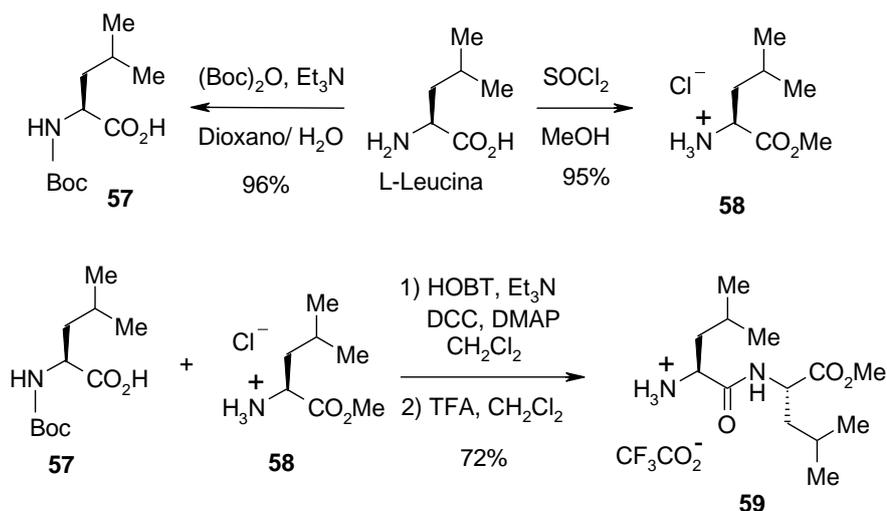
La elección del péptido que formaría parte de los híbridos, se llevó a cabo teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la bibliografía.^{5,135,136} En base a que la L-leucina y L-valina se presentaban como los aminoácidos más utilizados, se decidió el uso de la L-leucina para la formación del péptido. Como inicialmente se desconocía el nivel de actividad que se podría conseguir con estos híbridos (en el supuesto de que resultasen activos), se decidió no sintetizar más péptidos hasta la obtención de los primeros datos de actividad.

La ruta de síntesis del péptido se muestra a continuación en el **Esquema 3.11**. Los primeros pasos que se realizaron fueron reacciones para proteger tanto el grupo amino, con el grupo Boc (**57**), como el grupo ácido, en forma de éster (**58**), de la L-leucina. El posterior acoplamiento de estos aminoácidos se llevó a cabo empleando la siguiente combinación de reactivos de acoplamiento: 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), diciclohexilcarbodiimida (DCC), trietilamina y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP). A continuación, usando ácido trifluoroacético se produjo la desprotección del grupo amino, formándose el péptido **59** con buenos rendimientos.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, 12, 615-638.

¹³⁵ Neffe, Axel T.; Abell, Andrew D. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2005**, 8, 684-700.

¹³⁶ Donkor, I. O. *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 1171-1188.

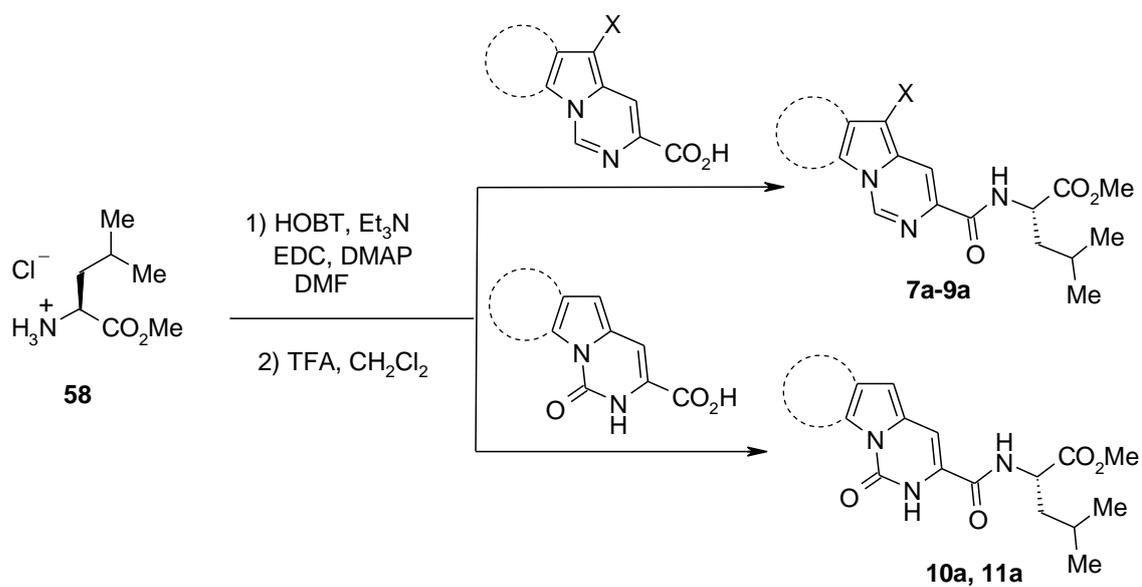


Esquema 3.11

3.2.3. Síntesis de híbridos péptido-heterociclo 7-11.

En primer lugar se realizó el acoplamiento de los distintos heterociclos con el aminoácido protegido en forma de éster **58** así como con el péptido **59**. De esta manera se pensó que sería interesante poder comprobar la influencia de la longitud de la cadena sobre la actividad inhibitoria de estos compuestos.

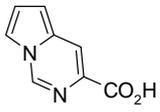
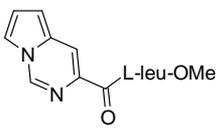
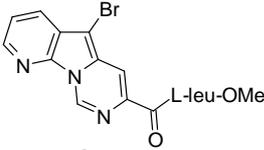
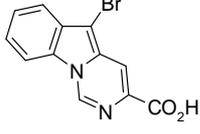
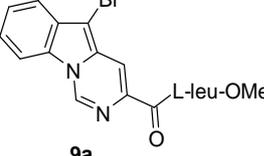
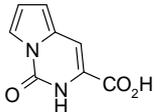
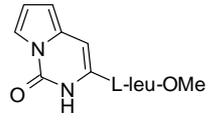
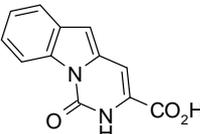
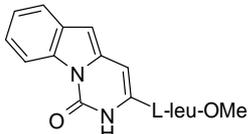
Las condiciones usadas para el acoplamiento fueron muy similares a la empleada en la síntesis del péptido. En este caso, se usaron como reactivos 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), trietilamina y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) para los acoplamientos del aminoácido protegido **58**.



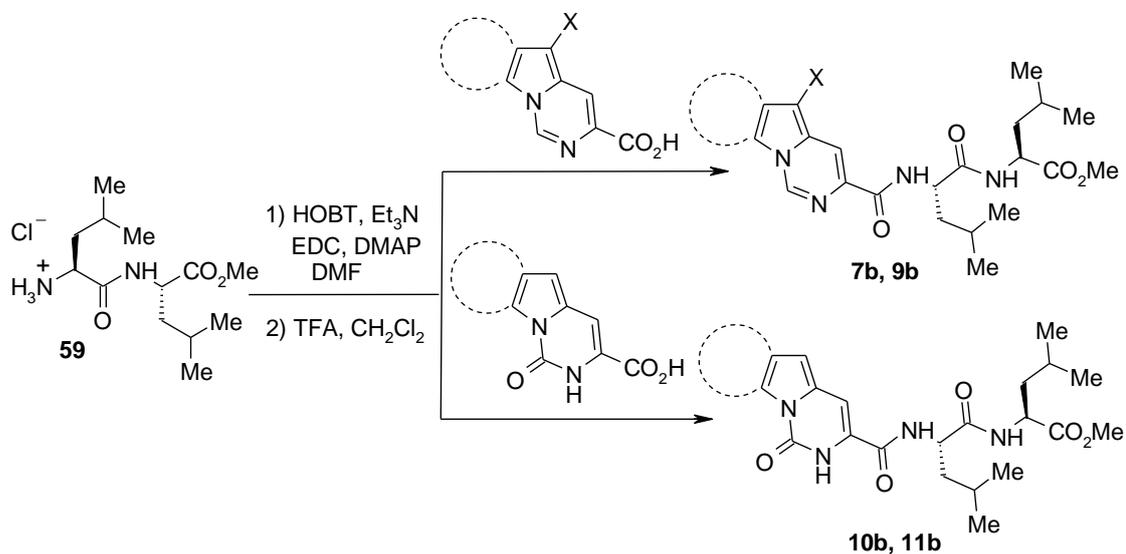
Esquema 3.12

Los resultados obtenidos de la reacción de acoplamiento se recogen en la **Tabla 3.1**. Los rendimientos conseguidos están entre medios y buenos, pudiendo acceder de una manera fácil a los compuestos que se buscaban.

Tabla 3.1. Reacción de acoplamiento de los ácidos **32**, **44**, **48**, **52** y **53** con **58**.

Entrada	Heterociclo	Tiempo	Híbrido	Rdto (%)
1	 32	2 días	 7a	36
2	 44	1 día	 8a	98
3	 48	2 días	 9a	69
4	 52	2 días	 10a	67
5	 53	2 días	 11a	53

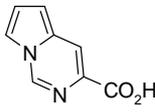
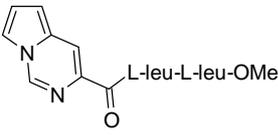
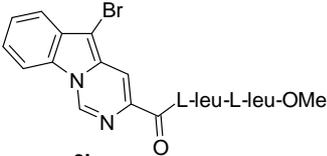
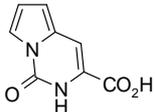
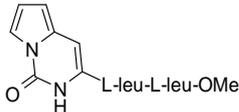
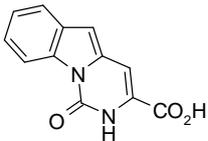
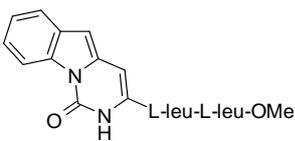
En cuanto a la reacción de acoplamiento con el péptido **59**, se utilizaron las mismas condiciones que en el caso anterior (**Esquema 3.12**).



Esquema 3.13

En la **Tabla 3.2** se encuentran recogidos los resultados obtenidos en la reacción de acoplamiento de los distintos heterociclos con el péptido **59**.

Tabla 3.2. Reacción de acoplamiento de los ácidos **32**, **48**, **52** y **53** con el péptido **59**.

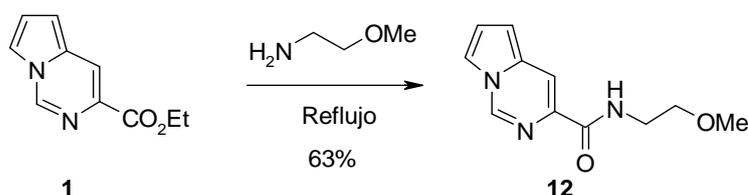
Entrada	Heterociclo	Tiempo	Híbrido	Rdto (%)
1	 32	2 días	 7b	83
2	 48	4 días	 9b	43
3	 52	2 días	 10b	30
4	 53	2 días	 11b	39

La potencial actividad inhibitoria que pudiera presentar esta primera serie de híbridos péptido-heterociclo, permitiría hacer una primera selección del heterociclo más apropiado para el desarrollo de series posteriores, mediante el acoplamiento con una variedad de péptidos.

3.2.4. Reacción de pirrolopirimidinas con 2-metoxietilamina.

La reacción con aminas de los derivados de pirrolopirimidinas utilizados para formar los híbridos, llevaría a la formación de las amidas correspondientes de este tipo de heterociclos. Estas amidas presentan estructuras más sencillas que podrían proporcionar información en este estudio de relación estructura-actividad.

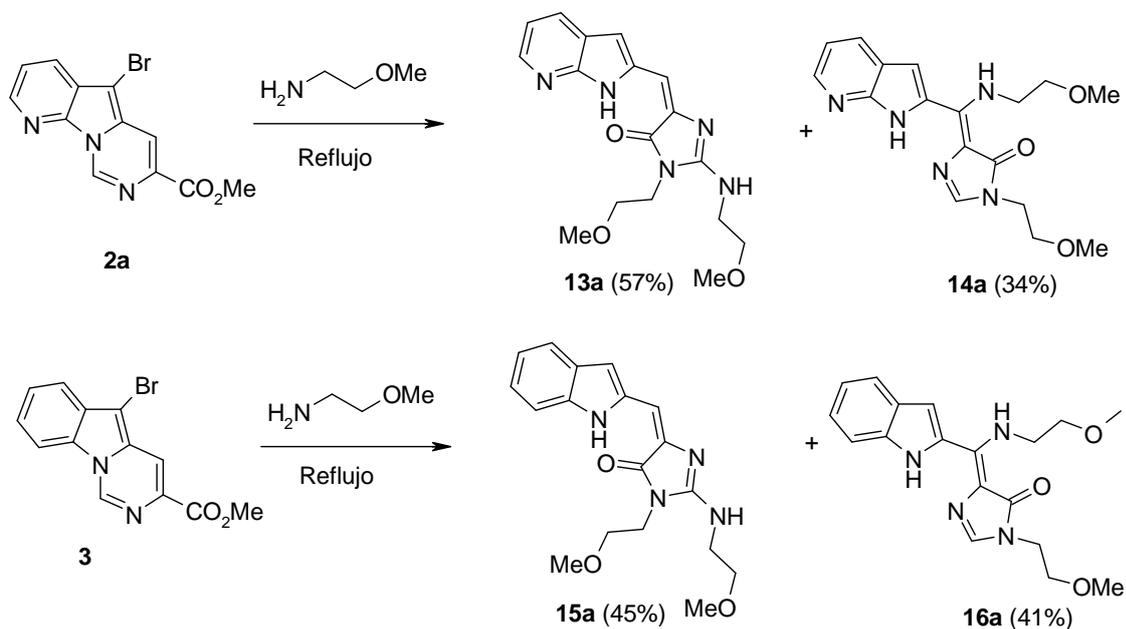
La primera de las aminas ensayadas fue una amina primaria, la 2-metoxietilamina, que se hizo reaccionar con el carboxilato de etilo de la 3-pirrolo [1,2-c]pirimidina (**1**) para suministrar la amida **12** (**Esquema 3.14**).



Esquema 3.14

Cuando se calentó a reflujo el compuesto **1** usando como disolvente la propia amina, se obtuvo la correspondiente amida **12**, con un rendimiento moderado. Sin embargo, no ocurrió lo mismo cuando se realizó esta misma reacción, en las mismas condiciones, con los sistemas tricíclicos **2a** y **3**.

En su lugar, sorprendentemente, se obtuvieron dos nuevos tipos de compuestos, ambos procedentes de la apertura del sistema tricíclico y posterior formación de una imidazolona. En los compuestos **13a** y **15a** el núcleo de imidazolona lleva incorporada en la posición C2 la amina empleada mientras que en los compuestos **14a** y **16a** la amina se encuentra en el doble enlace exocíclico que une la imidazolona y el indol o el azaindol. Además, en ambos tipos de compuestos se ha incorporado una segunda molécula de amina al núcleo de imidazolona y en ambos se ha producido la pérdida del bromo presente en los sistemas tricíclicos de partida.

**Esquema 3.15**

La determinación estructural de estos compuestos se llevó a cabo por el Dr. Antonio Salgado (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) y el Dr. Mijail Galakhov (Universidad de Alcalá). Dicha determinación se realizó a través de estudios de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas tomando como modelos para los estudios los compuestos **15a** y **16a**.

Los desplazamientos químicos de ^1H , ^{13}C y ^{15}N del compuesto **15a** (Figura 3.11) se determinaron mediante espectros de RMN mono- y bidimensionales. Igualmente se realizaron espectros 1D ROESY para complementar la determinación estructural.

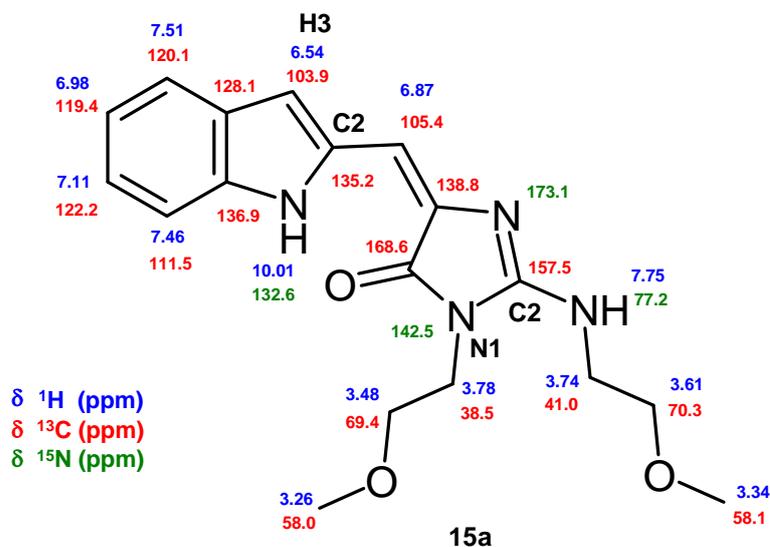


Figura 3.11. Desplazamientos químicos (δ , ppm) ^1H , ^{13}C y ^{15}N de 15a.

El espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6 , 700 MHz) mostró un sistema de spin, constituido por cuatro señales que aparecían a 7.51 (d), 7.46 (d), 7.11 (t) y 6.98 ppm (t), y que junto a las señales a 6.54 y 11.01 ppm sugerían la presencia de un anillo de indol. Además el valor de desplazamiento químico de ^{15}N (132.6 ppm) que correlacionaba a un enlace con la resonancia de protón a 10.01 ppm, también apoyaba esta teoría. Con el desplazamiento químico de ^{13}C (103.9 ppm) correspondiente a las señales de 6.54 ppm, se pudo determinar que el indol estaba sustituido en C2.

El experimento ^1H - ^{15}N HMBC permitió distinguir otras tres señales de nitrógenos. La señal de ^{15}N a 77.2 ppm (correlacionada a un enlace con las resonancias de ^1H a 7.75 ppm) concordaba con una amina pseudoanilínica. Las señales a 173.1 y 142.5 ppm correspondían con un nitrógeno aromático (173.1 ppm) y con una amida (lactama) muy conjugada (142.5 ppm). Esto, junto a la resonancia de ^{13}C a 168.6 ppm, indicarían la presencia de un residuo de 1H-imidazol-5-ona en el compuesto. Adicionalmente, correlaciones heteronucleares (^{13}C y ^{15}N con ^1H) a larga distancia entre las señales alifáticas justifica que las posiciones N1 y C2 de los anillos de 1H-imidazol-5-ona están alquiladas.

Para asignar la configuración del doble enlace exocíclico se realizaron experimentos 1D ROESY. Fue posible distinguir los distintos grupos metileno alifáticos unidos a las posiciones N1 y C2 de la imidazolona. La irradiación selectiva a 3.78 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMe}$ unido al nitrógeno lactámico N1) dio interacción NOE con el NH de la otra cadena alifática (7.75 ppm) y, más intensamente, con el protón H3 indólico (6.54 ppm). Dado que la señal a 3.78 ppm corresponde inequívocamente al CH_2 unido al nitrógeno lactámico de la imidazolona (N1), entonces el NOE observado, solo es compatible con el isómero *E*. (Figura 3.12)

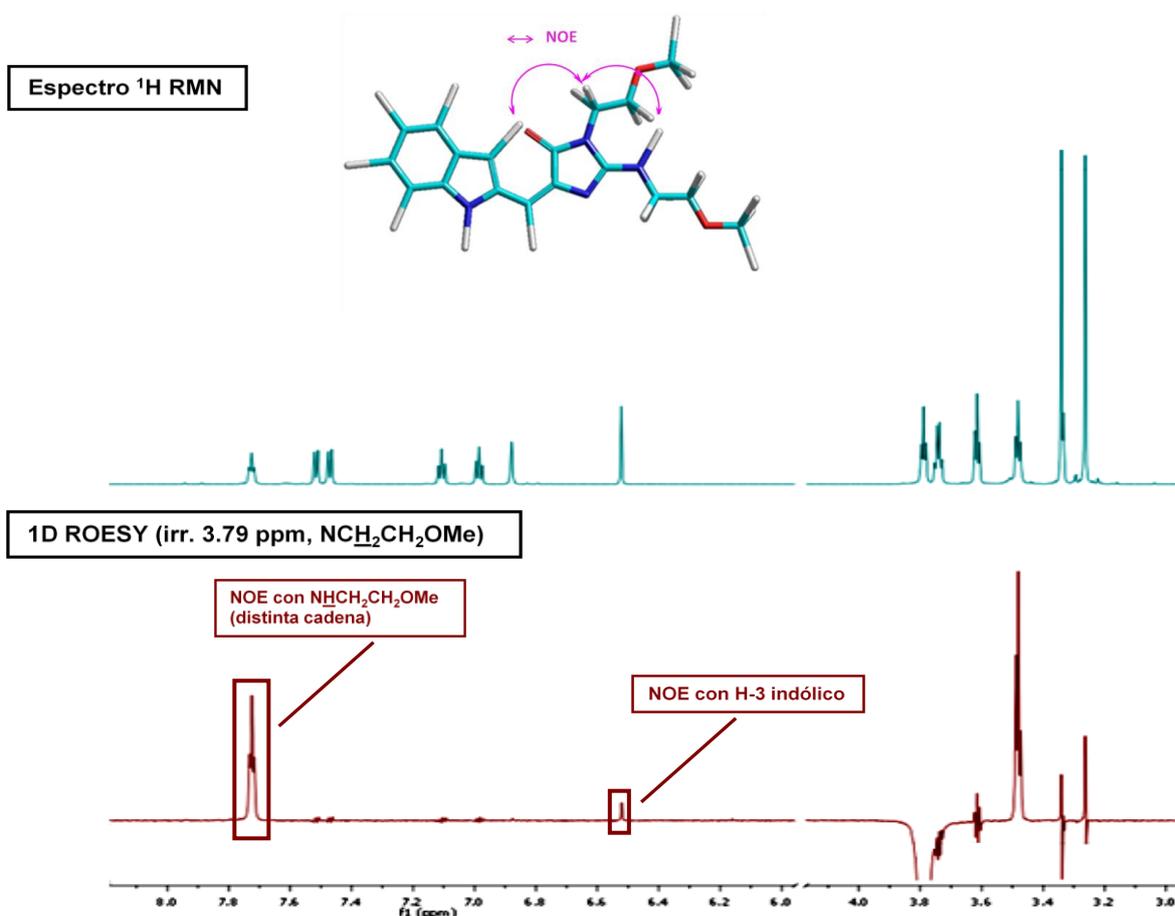


Figura 3.12 Espectros 1D ROESY, DMSO-d_6 , 700 MHz, 25°C para el derivado 15a.

Por otra parte con un experimento MS/MS, se obtuvo un espectro complejo correspondiente a la fragmentación del ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 343.3 como se puede ver en el espectro representado en la siguiente figura.

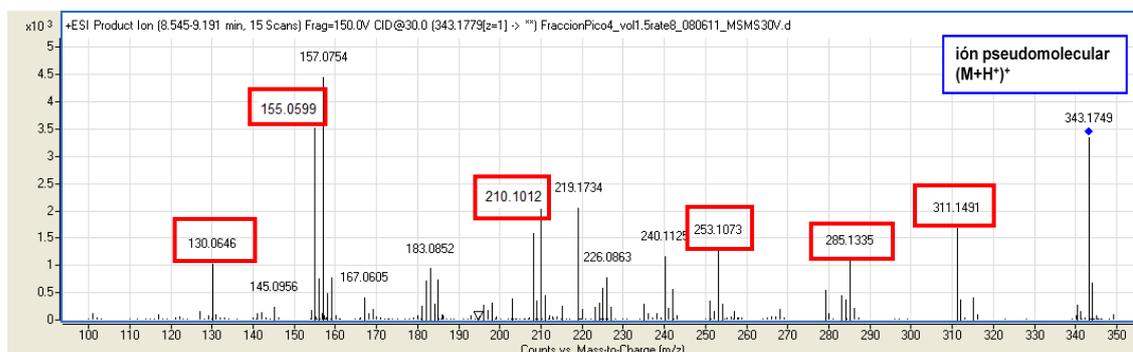


Figura 3.13

Los iones secundarios a m/z 311.1491 y m/z 285.1335 coincidían respectivamente con la pérdida de metanol y de metilviniléter, este último por una β -eliminación del ión principal (m/z 343.1749). El ión a m/z 253.1073 resultaría de la pérdida de MeOH (32 Da) del ión a m/z 285.1335, y el ión a m/z 210.1012 por (hipotética) pérdida de vinilamina (43 Da). Este ión de m/z 210.1012, todavía con el anillo de imidazolona intacto, podría perder secuencialmente CO y HCN para resultar en un ión a m/z 155.0599, ya con la pérdida de la imidazolona. A continuación se muestra un esquema con las posibles fragmentaciones.

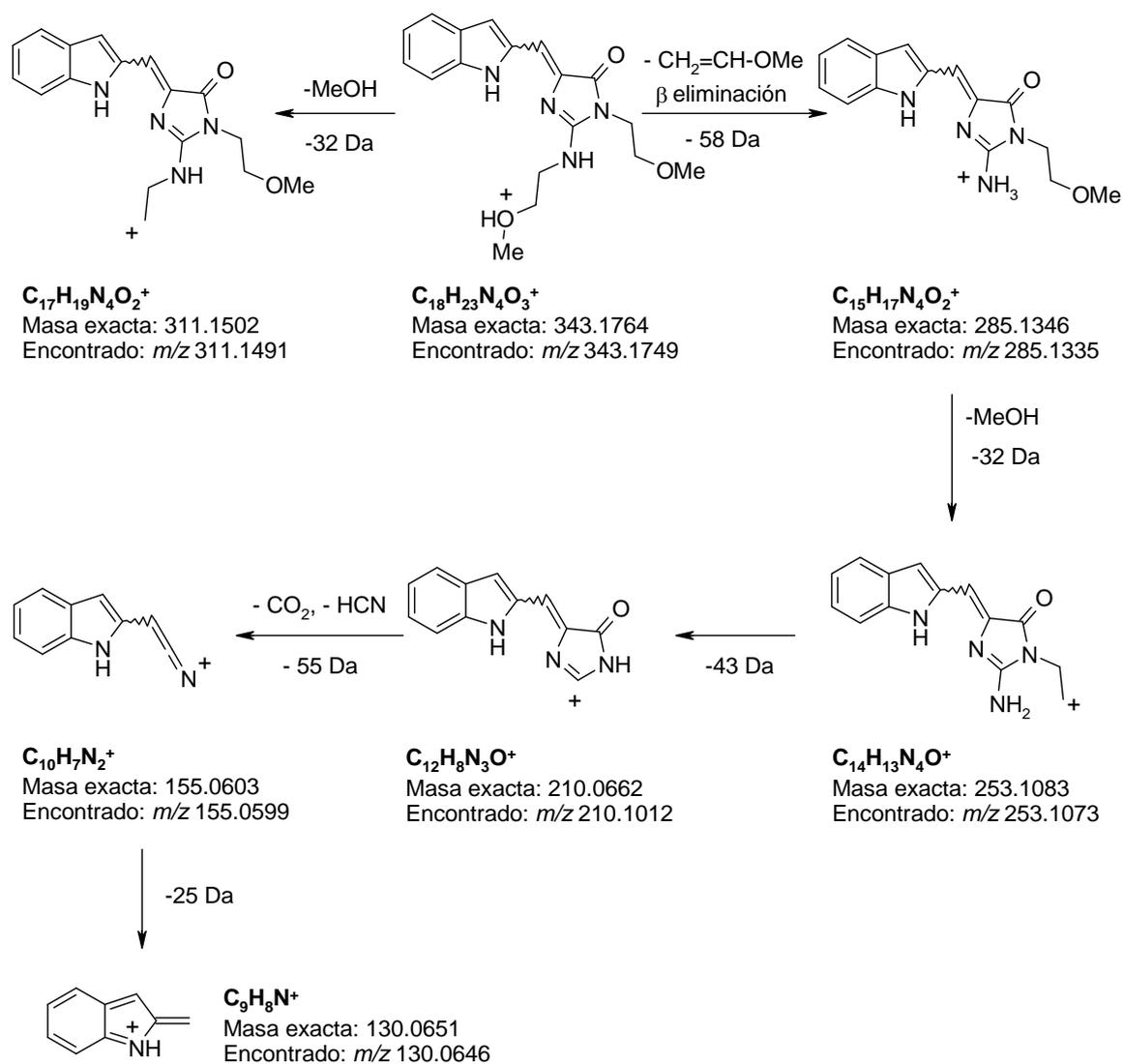


Figura 3.14

Todos estos datos apoyaban la estructura propuesta para este compuesto. Aunque el carácter aceitoso de los mismos no permitió la obtención de cristales aptos para estudios de difracción de rayos X, para confirmar mediante esta técnica la estructura.

Para la determinación estructural del compuesto **16a** se siguió el mismo procedimiento. Al igual que en el caso anterior, se determinaron los desplazamientos químicos de ^1H , ^{13}C y ^{15}N mediante espectros de RMN mono- y bidimensionales y se realizaron espectros 1D ROESY para complementar la determinación estructural.

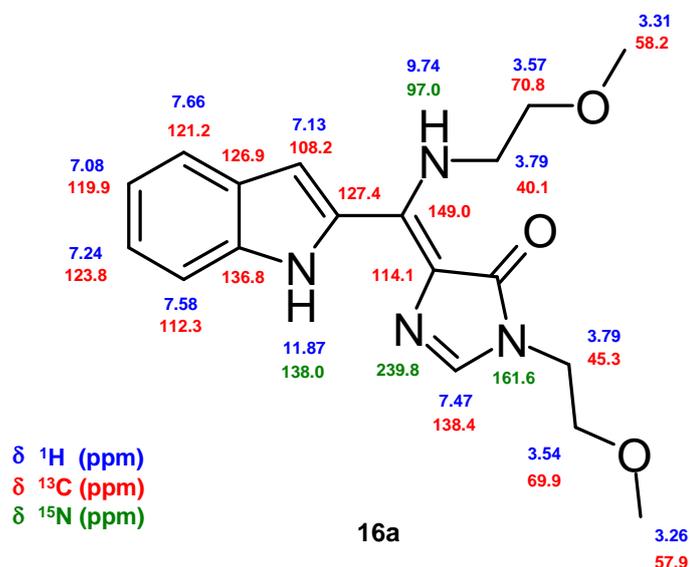


Figura 3.15. Desplazamientos químicos (δ , ppm) ^1H , ^{13}C y ^{15}N de **16a**.

El espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6 , 700 MHz) presentaba ocho señales entre 7.0 y 12.0 ppm, cada una de ellas integraba por 1H. Un singlete a 11.87 ppm, dos dobletes a 7.66 y 7.58 ppm, dos tripletes a 7.24 y 7.08 ppm, y un doblete a 7.13 ppm, sugerían la presencia de un anillo de indol. Este punto se confirmó con un experimento ^1H - ^{15}N HMBC, en el que se detectó una correlación a un enlace entre la señal a 11.87 ppm con una resonancia de ^{15}N a 138 ppm, propia de un nitrógeno indólico. Por otra parte, el singlete a 7.47 ppm que en el experimento ^1H - ^{15}N HMBC correlacionaba con dos señales de ^{15}N a 161.6 y 239.8 ppm y que en un experimento ^1H - ^{13}C HMBC con una señal de ^{13}C a 166.1 ppm, confirmaban la presencia de un residuo de imidazolona.

El experimento ^1H - ^{15}N HMBC permitió distinguir un cuarto nitrógeno (^{15}N 97 ppm, correlacionado a un enlace con un pseudotriplete de ^1H a 9.74 ppm), lo que era conforme con una amina pseudobencílica. Mediante experimentos 1D TOCSY, se determinó un sistema de spin constituido por dicha señal a 9.74 ppm con otras dos a 3.57 y 3.80 ppm cada una de los cuales integra por 2H, conformes con una cadena de

2-metoxietilamina. Un segundo sustituyente 2-metoxietilo está unido al nitrógeno lactámico de la imidazolona, en base a correlaciones a larga distancia con señales de ^{13}C (166.1 ppm) y ^{15}N (161.6 y 239.8 ppm).

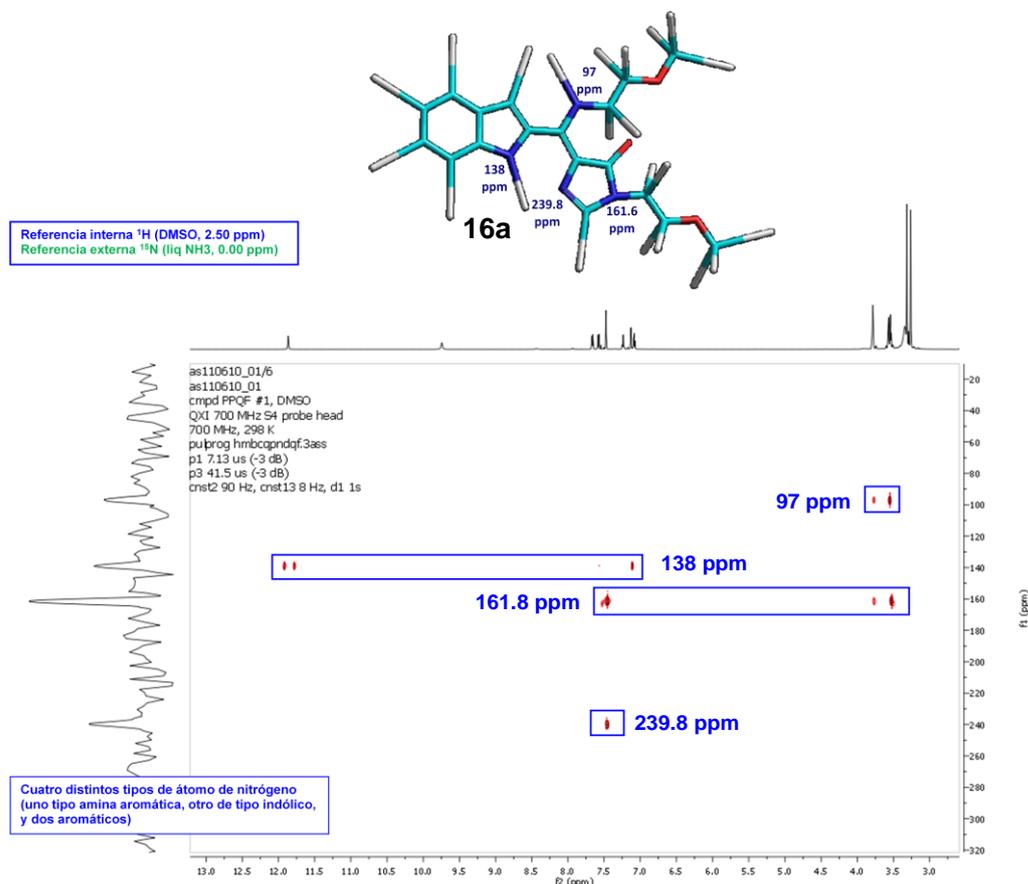


Figura 3.16. Espectro ^1H - ^{15}N HMBC, DMSO-d_6 , 700 MHz, 25°C para **16a**.

La configuración del doble enlace (*E*) se confirmó mediante experimentos 1D ROESY, observándose interacción NOE entre las señales a 7.13 ppm (indol H-3) y 9.76 ppm ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OMe}$) es solo compatible con el isómero *E*.

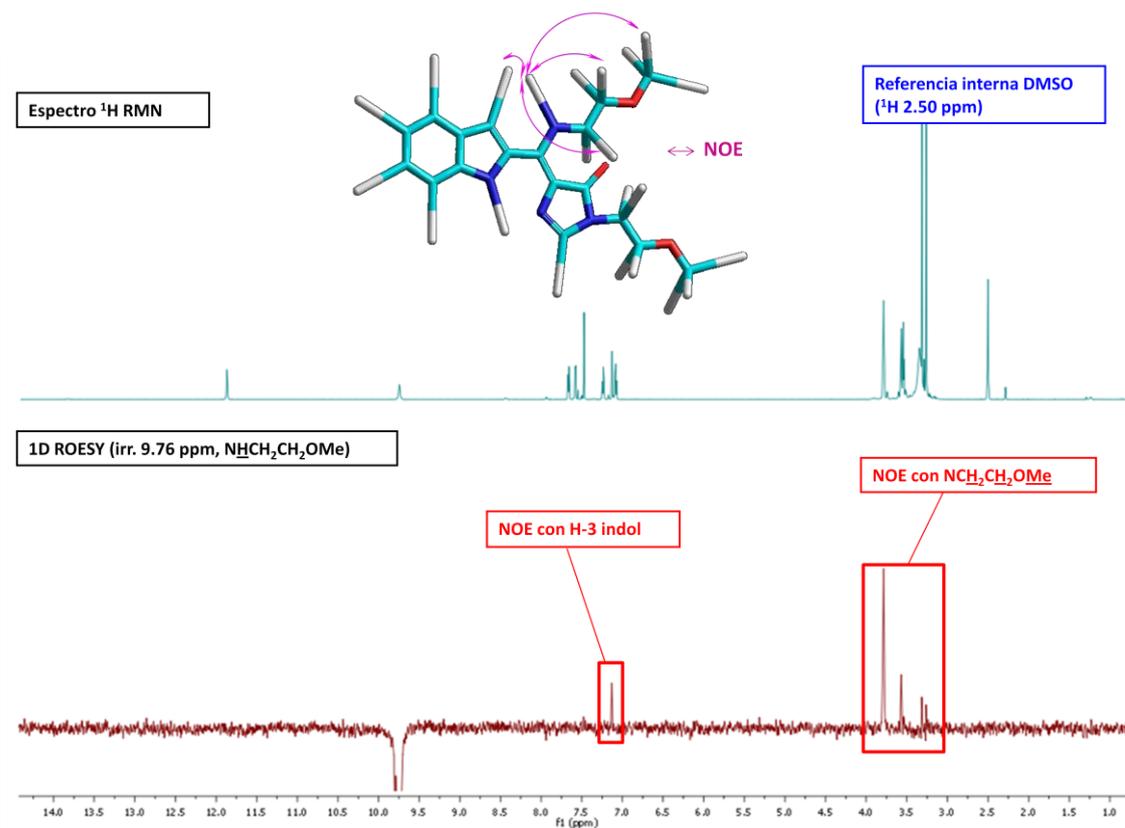


Figura 3.17. Espectros 1D ROESY, $\text{DMSO-}d_6$, 700 MHz, 25°C para **16a**. Por otra parte, en un experimento MS/MS, la fragmentación del ión pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 343.2 produce el siguiente espectro.

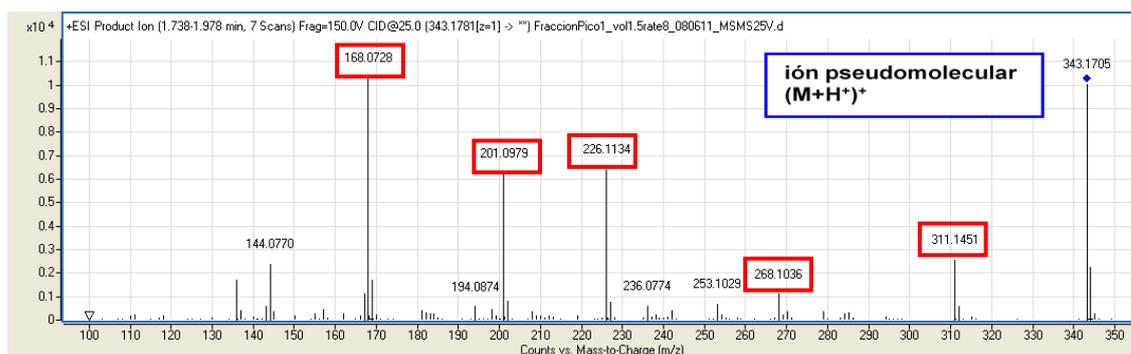


Figura 3.18

La fragmentación dió lugar a dos iones secundarios a m/z 311.1451 y 268.1036, que resultan de la pérdida secuencial de MeOH (32 Da) y vinilamina (43 Da), respectivamente. A través de una fragmentación distinta, el ión a m/z 226.1134 resultaría de la pérdida de indol (117 Da) directamente del ión pseudomolecular (m/z 343.2). Este ión secundario, a su vez, perdería metilviniléter (58 Da) o HCN (27 Da) para dar lugar, respectivamente, a los iones a m/z 168.0728 y m/z 201.0979.

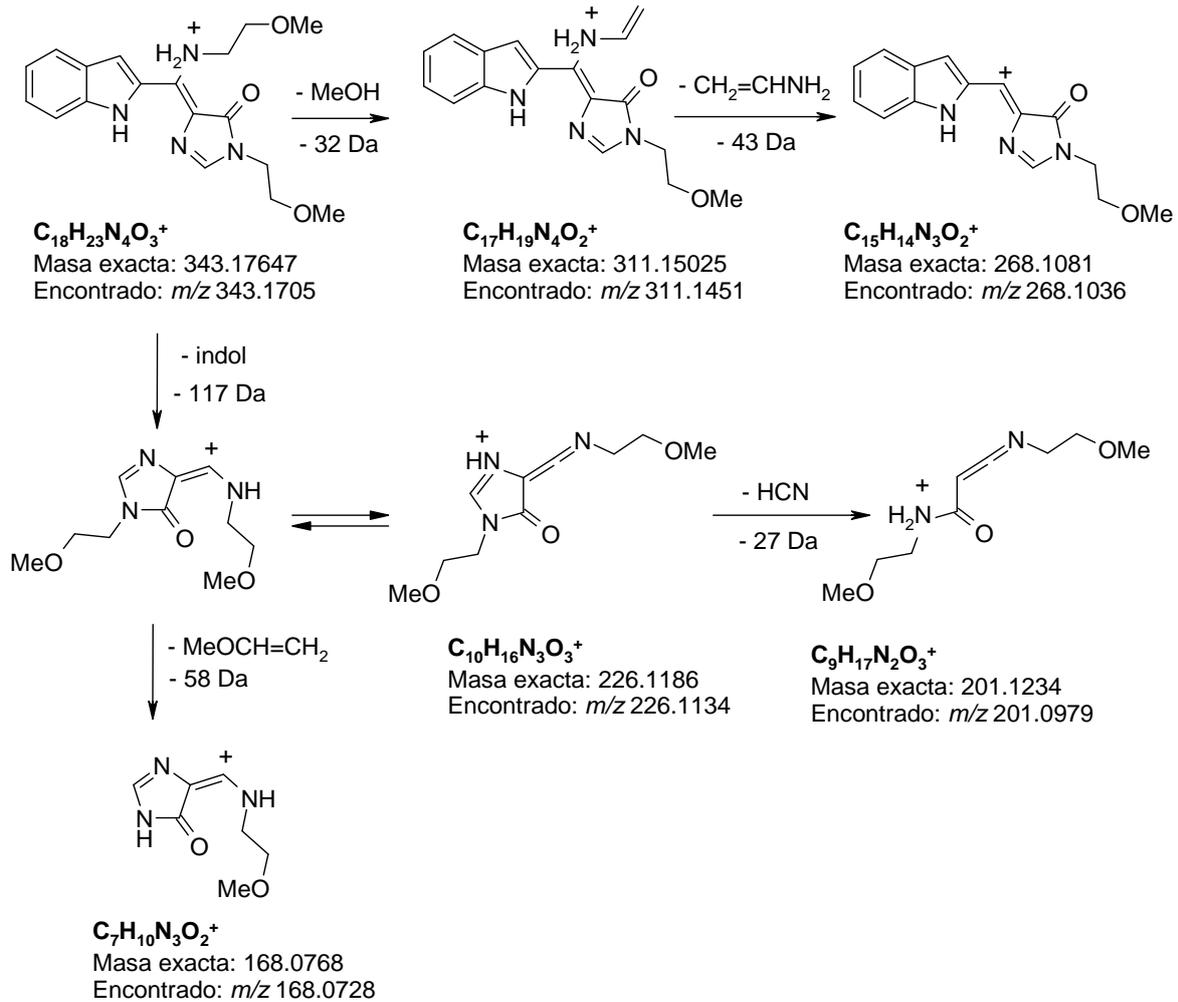


Figura 3.19

Estas fragmentaciones estaban de acuerdo con la estructura propuesta. Además, para el caso del compuesto **14a**, derivado del azaindol, se obtuvieron cristales aptos para el estudio de difracción de rayos X realizado por la Dra. Marta Elena González Mosquera (Departamento Química Inorgánica, Universidad de Alcalá), con lo que se confirmaron las estructuras propuestas para estos compuestos.

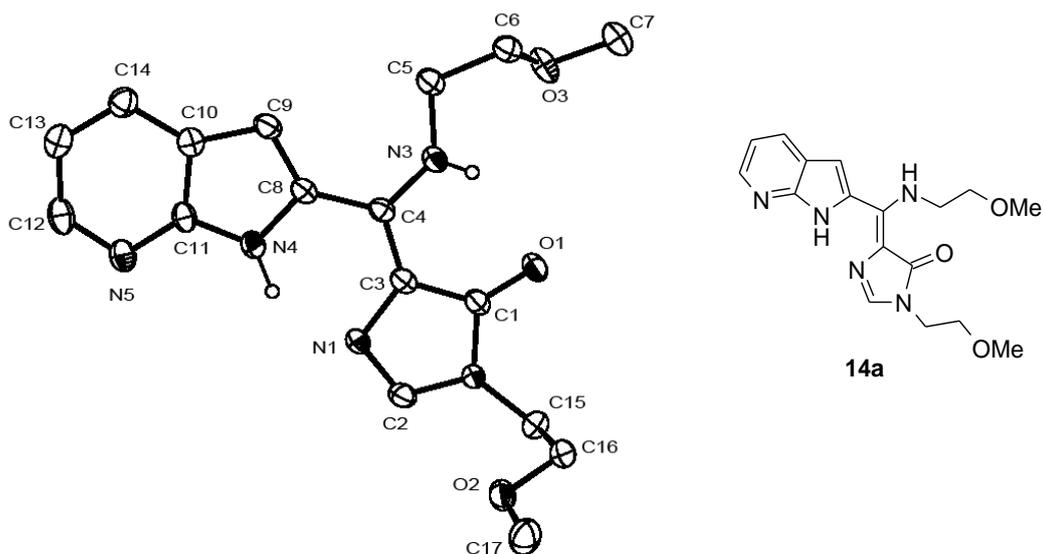


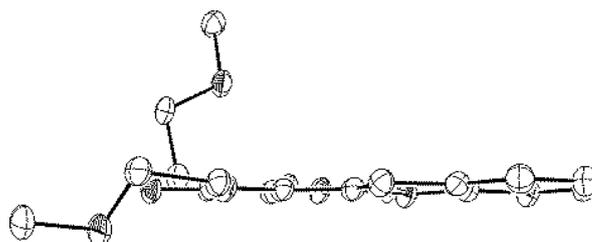
Figura 3.20. Estructura de rayos X de **14a**. Elipsoides dibujados a un nivel del 30% de probabilidad ORTEP

En la **Tabla 3.3** se muestran algunas distancias y ángulos de enlace, donde se puede destacar que la distancia C(8)-C(4) es 1.478(6) Å, más corta que el valor medio para un enlace sencillo C-C (1.54 Å), mientras que la distancia C(4)-C(3) es 1.401(6) Å, ligeramente más larga que el valor medio para un enlace doble C=C (1.34 Å), sugiriendo que existe una deslocalización electrónica de los electrones π del doble enlace exocíclico que une el azaindol con la imidazolona.

Tabla 3.3. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) para **14a**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
N(1)-C(2)	1.321(6)	C(2)-N(1)-C(3)	104.6(3)
N(1)-C(3)	1.430(5)	C(6)-O(3)-C(7)	111.3(4)
N(5)-C(12)	1.339(6)	C(16)-O(2)-C(17)	112.5(3)
N(5)-C(11)	1.359(6)	C(2)-N(2)-C(1)	107.6(3)
N(2)-C(2)	1.374(6)	C(1)-N(2)-C(15)	125.5(3)
N(2)-C(1)	1.410(5)	C(11)-N(4)-C(8)	108.9(4)
N(2)-C(15)	1.468(5)	C(9)-C(8)-N(4)	109.0(4)
N(4)-C(11)	1.365(6)	C(9)-C(8)-C(4)	133.3(4)
N(4)-C(8)	1.401(5)	N(4)-C(8)-C(4)	117.7(4)
C(8)-C(9)	1.387(6)	C(4)-N(3)-C(5)	129.9(4)
C(8)-C(4)	1.478(6)	N(3)-C(4)-C(3)	117.0(4)
N(3)-C(4)	1.368(5)	N(3)-C(4)-C(8)	121.0(4)
N(3)-C(5)	1.456(6)	C(3)-C(4)-C(8)	122.0(3)
C(4)-C(3)	1.401(6)	C(4)-C(3)-N(1)	126.1(4)
C(3)-C(1)	1.427(6)	C(4)-C(3)-C(1)	123.9(4)
C(5)-C(6)	1.527(6)	N(1)-C(3)-C(1)	109.8(4)
C(9)-C(10)	1.432(6)	O(1)-C(1)-N(2)	124.5(4)

Además, cabe señalar que el esqueleto central y los anillos presentes en la molécula son prácticamente coplanares (**Figura 3.21**). Así pues, el ángulo diedro entre la imidazolona y el esqueleto central es 5.91°, el ángulo entre dicho esqueleto y el azaindol es 3.95°, y entre la imidazolona y el azaindol es 8.96°. Los sustituyentes en los nitrógenos N2 y N3 se disponen perpendicularmente al plano formado por los anillos y el esqueleto central, en direcciones opuestas.

**Figura 3. 21**

En dicha estructura se pueden observar la presencia de dos enlaces de hidrógeno intramoleculares, N(4)-H \cdots N(1) y N(3)-H \cdots O(1). Las distancias y los ángulos de los dos enlaces de hidrógeno se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.4. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace ($^{\circ}$) de los enlaces de hidrógeno en **14a**

N-H \cdots X	d(N-H \cdots X)	d(N \cdots X)	Ángulo (N-H-X)
N(4)-H \cdots N	1.71(4) Å	2.667(6) Å	145(4) $^{\circ}$
N(3)-H \cdots O	1.88(5) Å	2.762(5) Å	145(4) $^{\circ}$

En la **Figura 3.22** se muestra la disposición de las moléculas en la celdilla unidad, donde se empaquetan mediante interacciones débiles C-H \cdots O y C-H \cdots C.

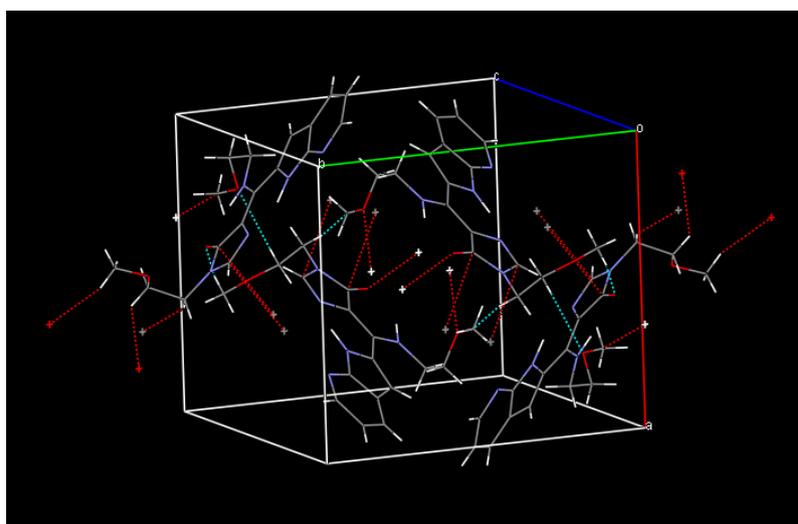


Figura 3.22. Disposición de las moléculas de **14a** en la celdilla unidad

3.2.5. Ensayos de inhibición de calpaína

En este punto, y con todos los compuestos que se habían sintetizado hasta el momento, se realizaron ensayos de inhibición frente a la calpaína. Estos estudios se llevaron a cabo en el departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá bajo la dirección de los Dres. Manuel Rodríguez Puyol y Diego Rodríguez Puyol.

Para evaluar la actividad de los distintos inhibidores, se realizó un ensayo de lisis de un sustrato fluorescente conteniendo dos puentes disulfuro, Suc-Leu-Tyr-AMC (Calpain Substrate II, fluorogenic, Calbiochem, Ref: 208731, Darmstad, Alemania), de forma que la actividad enzimática es proporcional a la señal fluorescente. El ensayo se realizó de la siguiente manera:

- Obtención de un extracto proteico a partir de células de músculo liso vascular de rata en cultivo. Siempre se trabajó con el extracto recién obtenido, en condiciones adecuadas para mantener la actividad enzimática.
- Incubación de 100 µg de proteínas, con 80 µM de Suc-Leu-Tyr-AMC y 50 µM de los distintos inhibidores de calpaína. En todos los casos se utilizó un control con la calpeptina, un inhibidor peptídico de la calpaína (50 µM de calpeptin, Calbiochem, Ref: 03-34-0051).

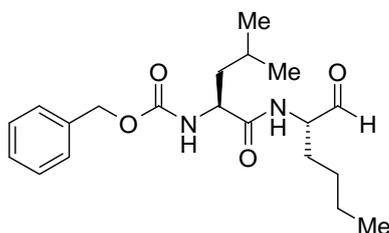
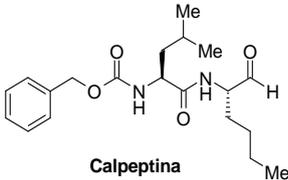
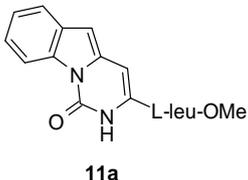
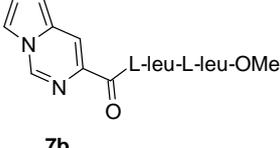
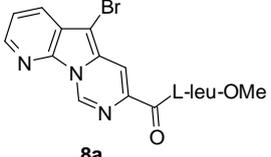
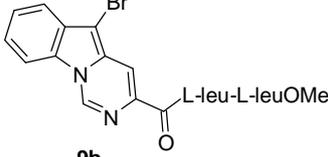
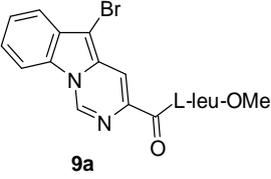
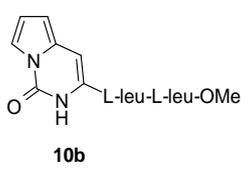
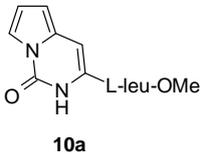
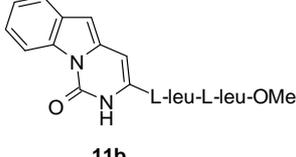


Figura 3.23. *Calpeptina.*

- Lectura de la fluorescencia (Excitación: 380 nm. Emisión: 460 nm).

El porcentaje de inhibición de la actividad se expresa en comparación con el de la calpeptina, considerando ésta como el 100 %. Este ensayo se utilizó para realizar una evaluación rápida de todos los compuestos sintetizados con la finalidad de detectar una potencial actividad inhibitoria de los mismos.

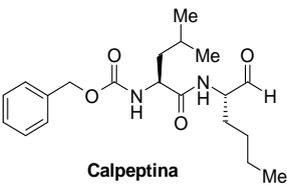
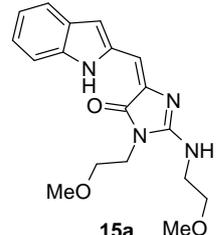
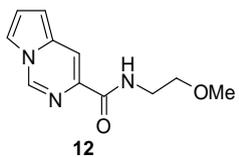
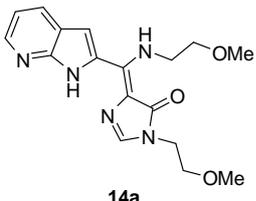
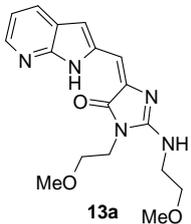
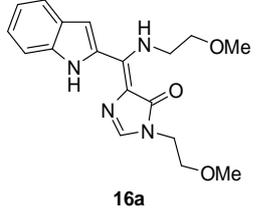
Tabla 3.5. Porcentajes de inhibición de calpaína de los híbridos sintetizados.

Híbrido	Inh. (%)	Híbrido	Inh. (%)
 <p>Calpeptina</p>	100	 <p>11a</p>	0
 <p>7a</p>	0	 <p>7b</p>	0
 <p>8a</p>	5.7	 <p>9b</p>	17.4
 <p>9a</p>	0.14	 <p>10b</p>	0
 <p>10a</p>	0	 <p>11b</p>	0

Los resultados de actividad que se obtuvieron en la primera serie de híbridos evaluados mostraron que éstos o bien eran completamente inactivos o mostraban una baja actividad inhibitoria cuando se comparaban con calpeptina, siendo el compuesto **9b** el que mostraba un mejor porcentaje de inhibición que, en todo caso, resultó muy bajo (17.4 %).

Los compuestos resultantes de la reacción de **1**, **2a** y **3** con 2-metoxietilamina también fueron evaluados, obteniéndose los resultados que se detallan en la **Tabla 3.6**.

Tabla 3.6. Porcentajes de inhibición de calpaína para los compuestos **12**, **13a**, **14a**, **15a** y **16a**.

Compuesto	Inh. (%)	Compuesto	Inh. (%)
 <p>Calpeptina</p>	100	 <p>15a</p>	0
 <p>12</p>	0	 <p>14a</p>	99.4
 <p>13a</p>	0	 <p>16a</p>	73.7

Como se puede observar, mientras que la amida **12** y los derivados de azaindol e indol **13a** y **15a** resultaron inactivos, los compuestos **14a** y **16a** mostraron una actividad inhibitoria significativa, especialmente el primero de estos que resultó ser tan activo como la propia calpeptina. Consecuentemente, dado que los híbridos péptido-heterociclo sintetizados no presentaban actividad y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos para el compuesto **14a** como inhibidor de calpaína, este compuesto se tomó como cabeza de serie (*hit*) para la realización de un estudio de relación estructura actividad (*SAR*).

Para ello, se establecieron en **14a** tres dominios de posible variación estructural que permitieran la generación de análogos y derivados con vistas a la optimización de la actividad inhibitoria de calpaína.

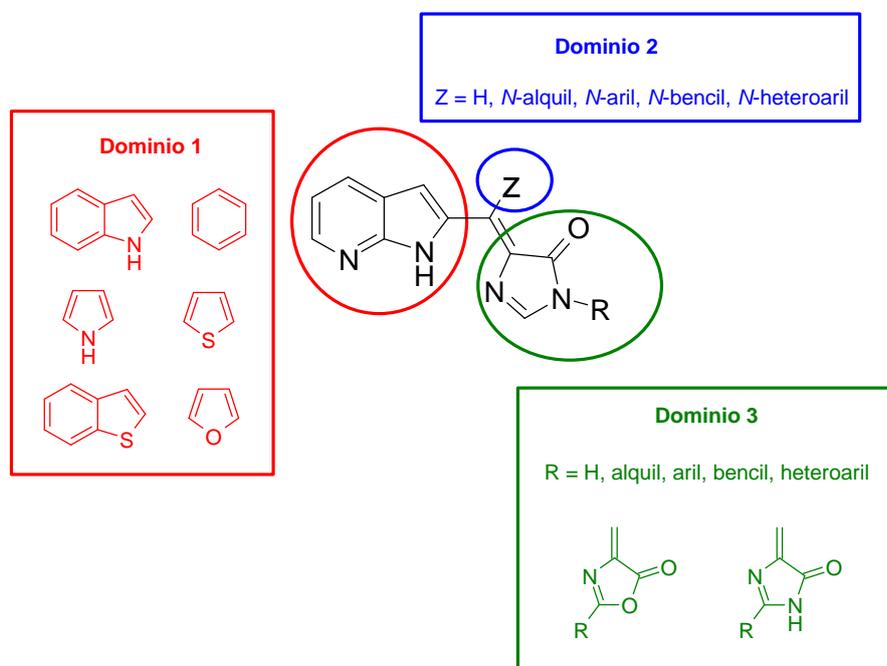


Figura 3.24

La introducción de diferentes sistemas arílicos y heteroarílicos (pirrol, fenilo, tiofeno, furano...etc.) en el dominio 1, diferentes aminas (alquílicas o arílicas) en el dominio 2 y la modificación de la imidazolona en el dominio 3, generaría un amplio número de compuestos entre los que se podrían identificar inhibidores más potentes que el cabeza de serie (**14a**), para realizar sobre éstos o algunos de ellos (lead) estudios complementarios posteriores.

Antes de abordar la síntesis de nuevos compuestos, se procedió a realizar estudios de modelado molecular con el compuesto **14a** con la finalidad de disponer de un posible modelo de interacción entre **14a** y la calpaína que orientara la búsqueda de análogos de dicho compuesto y facilitara el descubrimiento de análogos con actividad mejorada.

3.3. MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL

Los estudios de modelado molecular que se describen a continuación se llevaron a cabo por el grupo del Dr. Bernardo Herradón (Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid).

3.3.1. Obtención de la conformación de mínima energía

En primer lugar, se optimizó la geometría obtenida mediante difracción de rayos X, caracterizándose mediante un cálculo de frecuencias a un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d). La ausencia de frecuencias imaginarias confirmó que la estructura es un mínimo de la superficie de energía potencial. La geometría de mínima energía correspondió a la conformación en la que los tres anillos aromáticos se encuentran prácticamente en el mismo plano, formando un ángulo diedro de 13.6°. Las distancias de enlace indicaron que, existe una deslocalización electrónica de los electrones π a lo largo de la molécula. Con el fin de evaluar la aromaticidad de los anillos individuales, se calcularon el HOMA y los índices NICS en el centro del anillo a 1 Å por encima y por debajo del plano molecular. Los tensores NICS se han calculado con el método GIAO//B3LYP/6-31++G(d,p). Además, se determinó la componente fuera del plano del tensor NICS(± 1). Para ello se orientó el eje z perpendicular al plano que forma cada uno de los anillos. Los valores de los índices de aromaticidad se muestran en la siguiente figura.

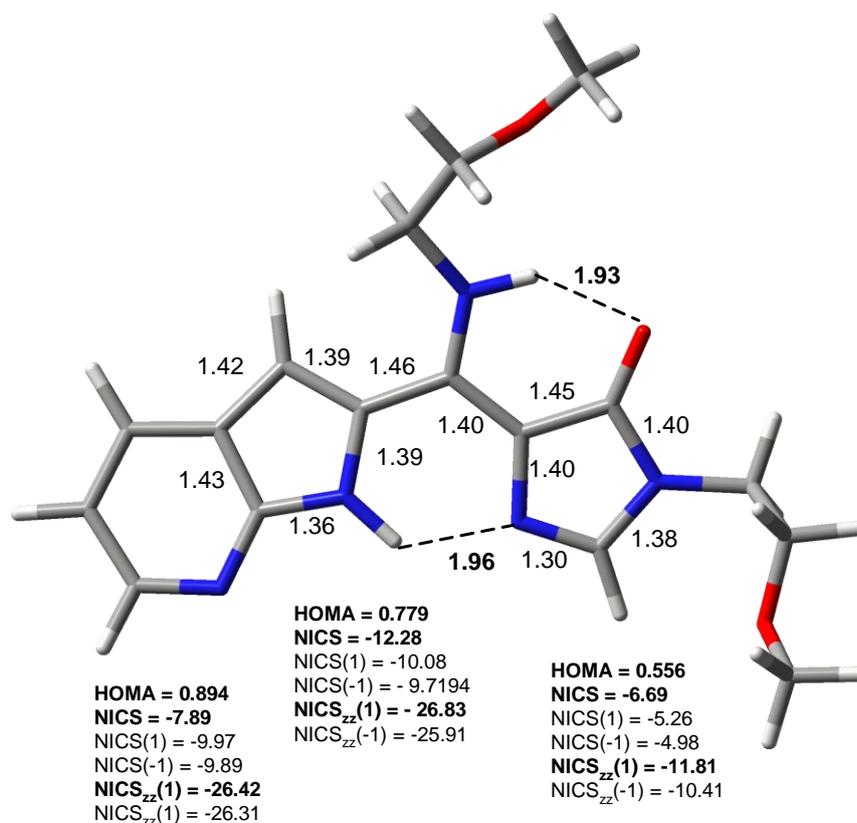


Figura 3.25. Conformación de mínima energía del compuesto **14a** optimizada con la base 6-31G(d).

Esta conformación se encontraba estabilizada por la formación de dos enlaces de hidrógeno (EHs) intramoleculares: un EH se forma entre el NH del anillo de 7-azaindol y el N del anillo de imidazolona y el otro se forma entre el NH de la cadena alifática y el O carbonílico del anillo de imidazolona.

Las distancias y los ángulos de los dos EHs se muestran en la siguiente tabla.

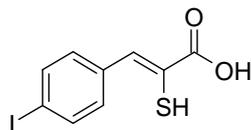
Tabla 3. 7. Distancias y ángulos de los enlaces de hidrógeno.

N-H...X	d(N-H...X)	d(N...X)	Ángulo (N-H-X)
N-H...N	1.956 Å	2.716 Å	128.9°
N-H...O	1.933 Å	2.794 Å	139.6°

3.3.2. Cálculo de las propiedades electrónicas

Para el cálculo de los índices de reactividad, los coeficientes de los orbitales HOMO y LUMO y el potencial electrostático molecular se empleó un nivel de teoría B3LYP/6-31++G(d,p). El momento dipolar obtenido para **14a** con este nivel de teoría es 3.58 Debyes.

Los datos obtenidos para **14a** se compararon con los de **PD150606**, un inhibidor de carácter no peptídico que se ha mencionado anteriormente en el capítulo de antecedentes de esta Tesis y que presenta algunas características estructurales también reconocibles en el inhibidor **14a**.

**Figura 3.26.** Estructura del inhibidor **PD150606**.

Los datos obtenidos se presentan a continuación.

Tabla 3.8. Descriptores de la reactividad calculados al nivel de teoría B3LYP/6-31++G(d,p).*

Compuesto	ϵ_{LUMO}	ϵ_{HOMO}	$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$	A	I	μ	η	ω
PD150606	-2.32	-6.10	3.79	0.655	7.711	-4.183	3.528	2.480
38a	-2.01	-5.97	3.96	0.663	6.787	-3.725	3.062	2.266

* ϵ_{HOMO} , ϵ_{LUMO} , $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$, A , I , μ , η y ω están expresadas en eV.

En esta tabla se han recogido datos de: la energía de los orbitales HOMO y LUMO (ϵ_{HOMO} and ϵ_{LUMO}), la diferencia de energías de los orbitales frontera ($\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$), los índices de reactividad (potencial químico, μ ; dureza química, η ; índice de electrofilicidad, ω), afinidad electrónica (A) y el potencial de ionización (I).

Un mecanismo común para la inhibición de las cisteín proteasas como la calpaína, se produce a través de la reacción del grupo SH del residuo de cisteína situado en el dominio catalítico, con una funcionalidad electrofílica del inhibidor, por lo que la capacidad inhibitoria, en el caso de que siga este mecanismo de reacción, está relacionada con la afinidad electrónica (A); cuanto más elevado sea este valor, mejor debe ser la actividad inhibitoria. Como puede observarse en la **Tabla 3.8**, el valor de **14a** resultó ser ligeramente superior al obtenido para **PD150606**.

Una representación de los orbitales HOMO y LUMO de **14a** se muestran a continuación en la **Figura 3.27**. Los mayores coeficientes de los orbitales se localizan sobre el doble enlace exocíclico y el anillo de imidazolona. Al igual que en el **PD150606**, el mayor coeficiente se sitúa sobre el carbono del doble enlace exocíclico que actúa de puente entre los anillos de indol e imidazolona. La magnitud de este coeficiente es además muy similar en los dos inhibidores: 0.296 (**PD150606**) y 0.290 (**14a**). Esto sugiere que, de producirse un ataque nucleófilo durante el proceso de inhibición, éste posiblemente se produciría sobre el doble enlace exocíclico.

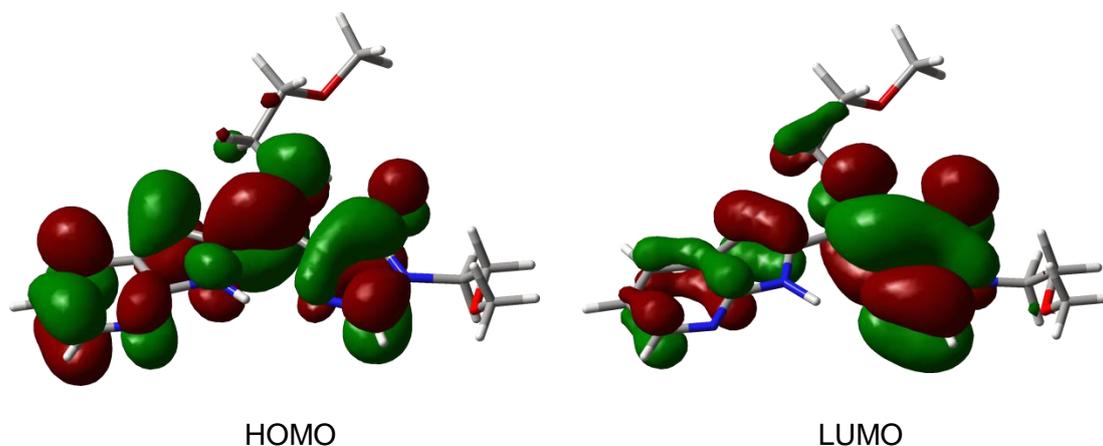


Figura 3.27

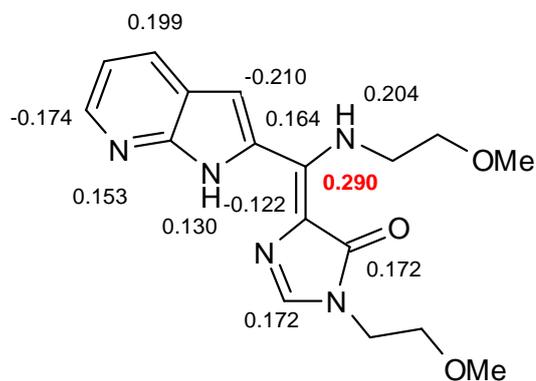
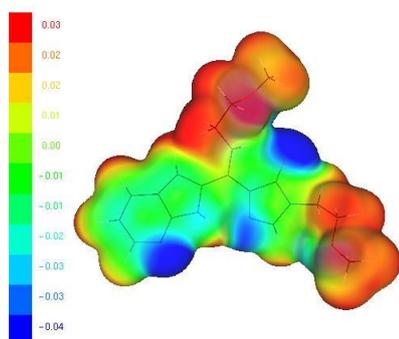


Figura 3.28. Coeficientes del orbital LUMO para **14a**.

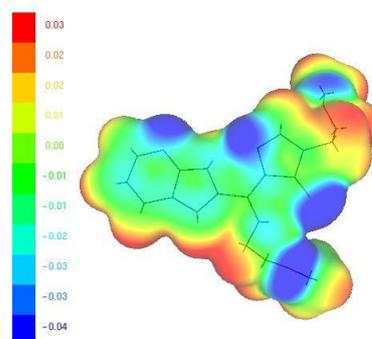
3.3.3. Cálculo de superficies de energía potencial.

Para el cálculo de las superficies de energía potencial se utilizó una gradilla de 80 puntos por lado generado con la opción *cube*gen.

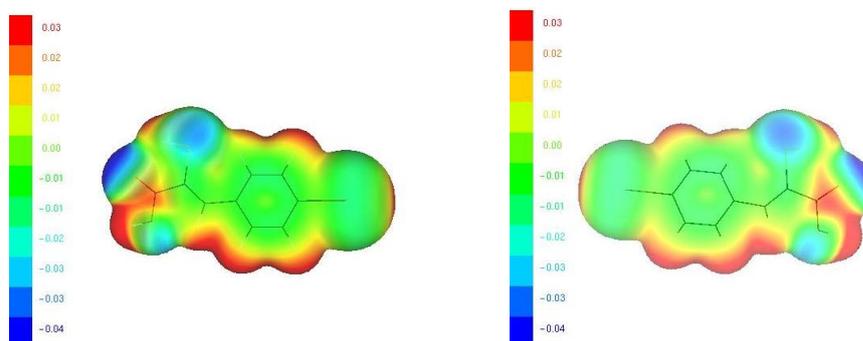
Los resultados fueron los siguientes:



Cara más impedida C=C (**14a**)



Cara menos impedida C=C (**14a**)



Cara más impedida C=C (**PD150606**) Cara menos impedida C=C (**PD150606**)

Figura 3.29. Superficies de energía potencial de **PD150606** y **14a**.

Los descriptores de Politzer de los inhibidores se recogen en la **Tabla 3.9**.

Tabla 3.9. Descriptores de Politzer obtenidos del análisis estadístico del MEP de los inhibidores de calpaína.*

Compuesto	$V_{S,max}$	$V_{S,min}$	\bar{V}_S	\bar{V}_S^+	\bar{V}_S^-	Π	σ_-^2	σ_+^2	σ_{tot}^2	ν
PD150606	70.23	-35.10	2.51	12.84	-7.01	10.11	48.6	122.7	171.3	0.203
38a	27.60	-44.44	1.86	13.09	-13.43	13.01	125.0	33.4	158.4	0.167

* $V_{S,max}$, $V_{S,min}$, $V_{S,anillo}$, \bar{V}_S , \bar{V}_S^+ , \bar{V}_S^- y Π están expresados en $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; σ_-^2 , σ_+^2 y σ_{tot}^2 en $(\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1})^2$; ν es adimensional.

En la estructura cristalina del inhibidor **PD150606** con el dominio VI de la calpaína se observó que esta molécula se unía al bolsillo hidrofóbico, presente en el mismo, creado por la superficie de tres hélices (E1, F1 y F2E3). Los mapas de diferencia de densidad, descritos en la bibliografía,⁶⁵ mostraron la localización del inhibidor **PD150606** con el átomo de yodo inmerso en el bolsillo hidrofóbico. (**Figura 3.30**)

⁶⁵ Todd, B.; Moore, D.; Deivanayagam, C. C. S.; Lin, G.; Chattopadhyay, D.; Maki, M.; Wang, K. K. W.; Narayana, S. V. L. *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 131-146.

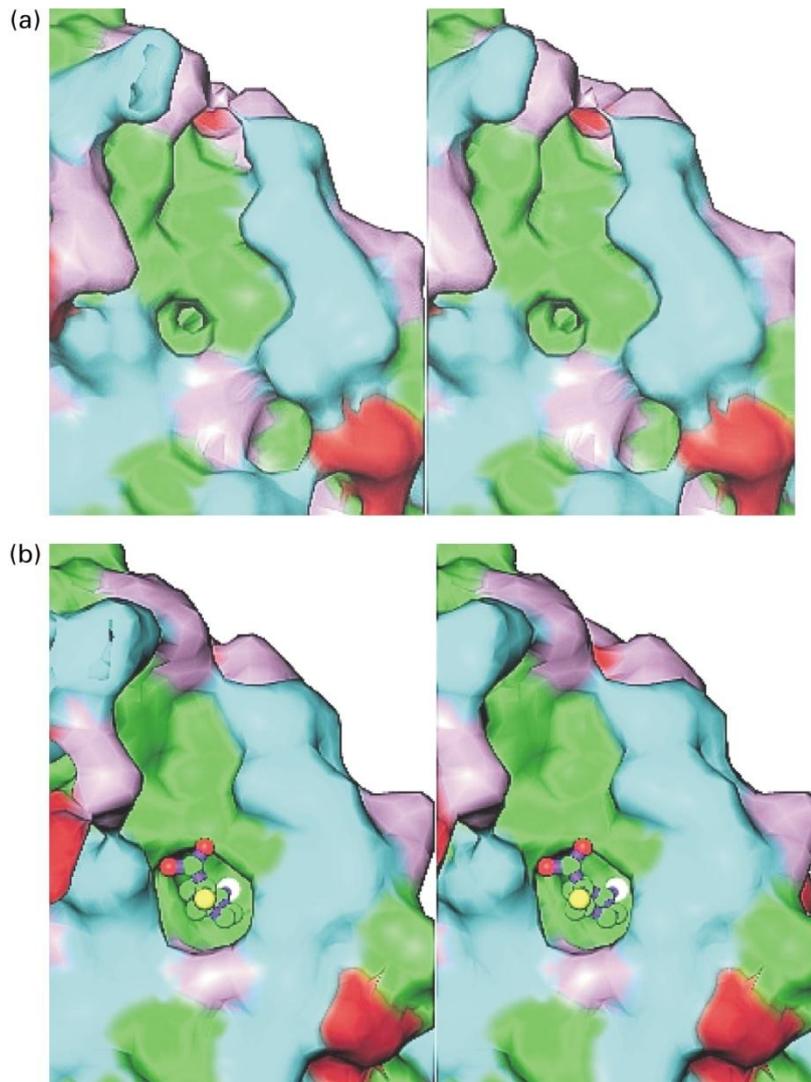


Figura 3.30

Estas superficies se calcularon con la ayuda del programa Ribbons;¹³⁷ las regiones hidrofóbicas están representadas en verde, las polares en magenta, las regiones cargadas negativamente en rojo y las regiones positivas en azul.

¹³⁷ Carson, M. *Methods in Enzymology* **1997**, 277, 493-505.

En primer lugar, en la **Figura 3.30**, está representada la región hidrofóbica, formada por tres hélices localizadas en el dominio VI de la calpaína y, en segundo lugar, se encuentra representada la unión del inhibidor **PD150606** a esa región hidrofóbica. Cuando el inhibidor se unía a esta región se producía una expansión de la misma adaptándose al tamaño de la molécula.

Las únicas interacciones que se observaron en la estructura de Rayos X del **PD150606** y el dominio VI fue una interacción de EH entre el grupo SH y el N de la cadena lateral de un residuo de lysina (LYS170) y una posible interacción electrostática entre el carboxilato y el residuo de HIS117.

En cuanto al compuesto **14a**, analizando los resultados obtenidos con los MEPSs se puede considerar que cumple los requerimientos electrostáticos para unirse al anillo hidrofóbico. Sin embargo, al ser una molécula de mayor tamaño que **PD150606** tendría más dificultad para cumplir los requisitos estéricos para unirse al bolsillo hidrofóbico del dominio VI, aunque como se ha indicado anteriormente, éste tiende a expandirse para adaptarse al tamaño del inhibidor.

3.4. REACCIÓN DE LAS AZOLOPIRIMIDINAS **2a** Y **3** CON AMINAS.

Tras el estudio de modelado molecular y con el fin de conseguir la primera serie explorativa se procedió a seleccionar una serie de aminas para hacerlas reaccionar con los sustratos **2a** y **3**. Inicialmente y debido a la mayor facilidad de síntesis de **3** frente a **2a** (tres pasos para **3** frente a seis pasos para **2a**) el primero de éstos fue elegido para probar la generalidad de la reacción y, al mismo tiempo, determinar cuál de las aminas ensayadas era la que proporcionaba una mejor actividad.

La reacción se realizó en las mismas condiciones empleadas para la formación de **15a** y **16a** utilizando la propia amina como disolvente y calentando a reflujo. Las aminas primarias empleadas y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.10**. En la mayoría de los casos se observó la desaparición total del sustrato de partida en unos tiempos de reacción que varían entre 1-3 horas, con rendimientos para la mezcla **15/16** que oscilan entre 41-86%. Como resultado más destacable, cuando se utilizó anilina no se observa reacción, recuperándose el producto de partida inalterado (entrada 6). Este resultado puede atribuirse a la menor nucleofilia de esta amina que impediría la formación de la amida correspondiente, incluso después de 24 horas a reflujo.

En la reacción con la isopropilamina (entrada 2) se observó la formación, junto a los derivados **15b** y **16b**, de la amida **17b**. Asumiendo que las correspondientes amidas **17** son los productos iniciales del proceso y que evolucionarían a los otros derivados (**15/16**), probablemente al tener la amina un punto de ebullición bajo, la reacción de apertura del sistema tricíclico es más lenta pudiéndose aislar la amida inicial **17**. No ocurrió lo mismo con las otras aminas ensayadas.

Finalmente, de la reacción con la 2-etanolamina (entrada 7) solo se aisló la imidazolona **15g**, no observándose la formación de **16g**.

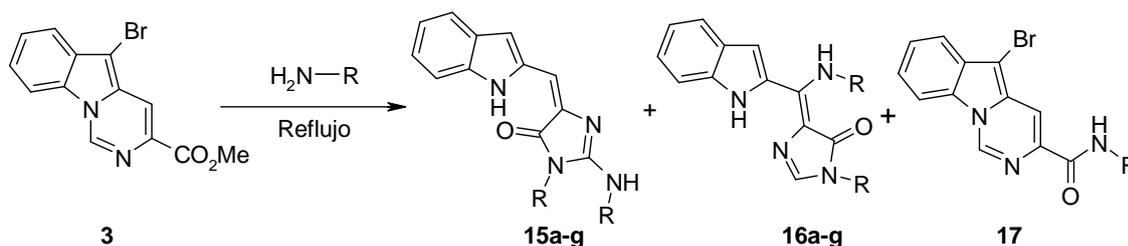
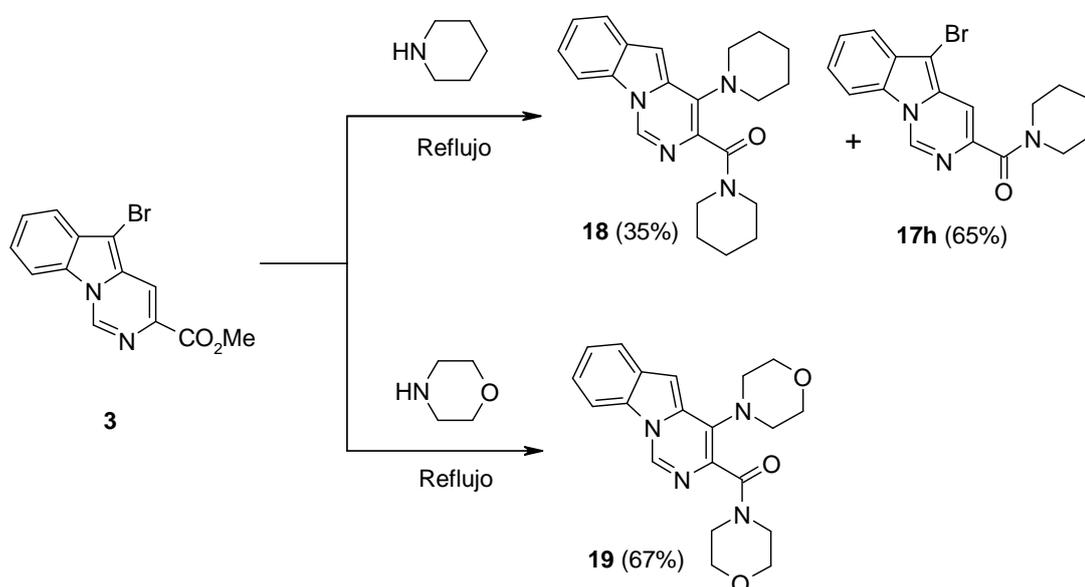


Tabla 3.10. Reacción de **3** con aminas primarias.

Entrada	Amina	Tiempo	Compuesto	Rdto 15 (%)	Rdto 16 (%)	Rdto 17(%)
1		1 h	a	45	41	---
2		2 h	b	24	17	29
3		1 h	c	34	42	---
4		1 h	d	33	34	---
5		3 h	e	22	52	---
6		1 día	f	---	---	---
7		1h	g	20	---	---

Aunque a la vista de las estructuras obtenidas, parecía lógico pensar que este proceso podría únicamente producirse con aminas primarias, se pensó en realizar alguna prueba con aminas secundarias para observar su comportamiento frente al mismo sustrato en similares condiciones de reacción.

Los ensayos se realizaron con dos aminas cíclicas, piperidina y morfolina. A pesar de la similitud de ambas aminas, los resultados obtenidos fueron sensiblemente diferentes. De la reacción con piperidina se aisló como producto mayoritario (65%) la amida esperada **17h**, junto a un compuesto minoritario (35%) que se identificó como el derivado disustituido de pirimido[1,6-*a*]indol **18**. En el caso de la morfolina sólo se aisló, con un rendimiento moderado el derivado **19**.



Esquema 3.16

La determinación estructural de los compuestos **18** se confirmó a través de estudios de resonancia magnética nuclear que incluían ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ROESY, ^{15}N -RMN, tocsy, cosy, gHMBC, gHSQC, y espectrometría de masas (EM).

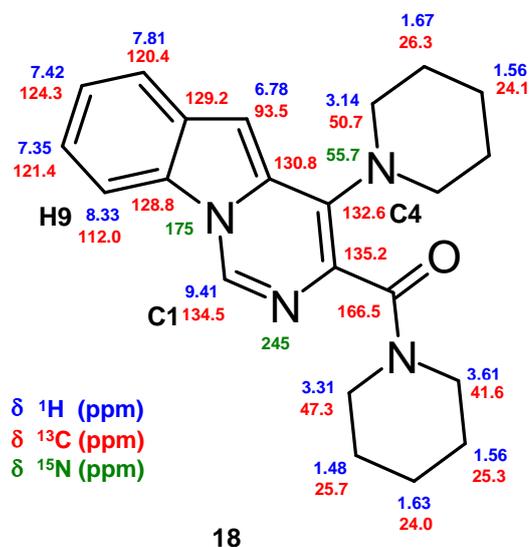


Figura 3.31. Desplazamientos químicos (δ , ppm) ^1H , ^{13}C y ^{15}N de **18**.

Este tipo de amidas mantienen la estructura tricíclica a la que se incorpora una segunda molécula de la amina en posición C4. La posibilidad de que la amina se hubiese incorporado en la posición C1 del sistema tricíclico quedó totalmente descartada con un experimento 1D ROESY ya que irradiando a 8.33 ppm (H9) se produce interacción NOE con el singlete a 9.41 ppm, pero no con las señales propias de la piperidina alifática (3.14, 1.67 y 1.56 ppm).

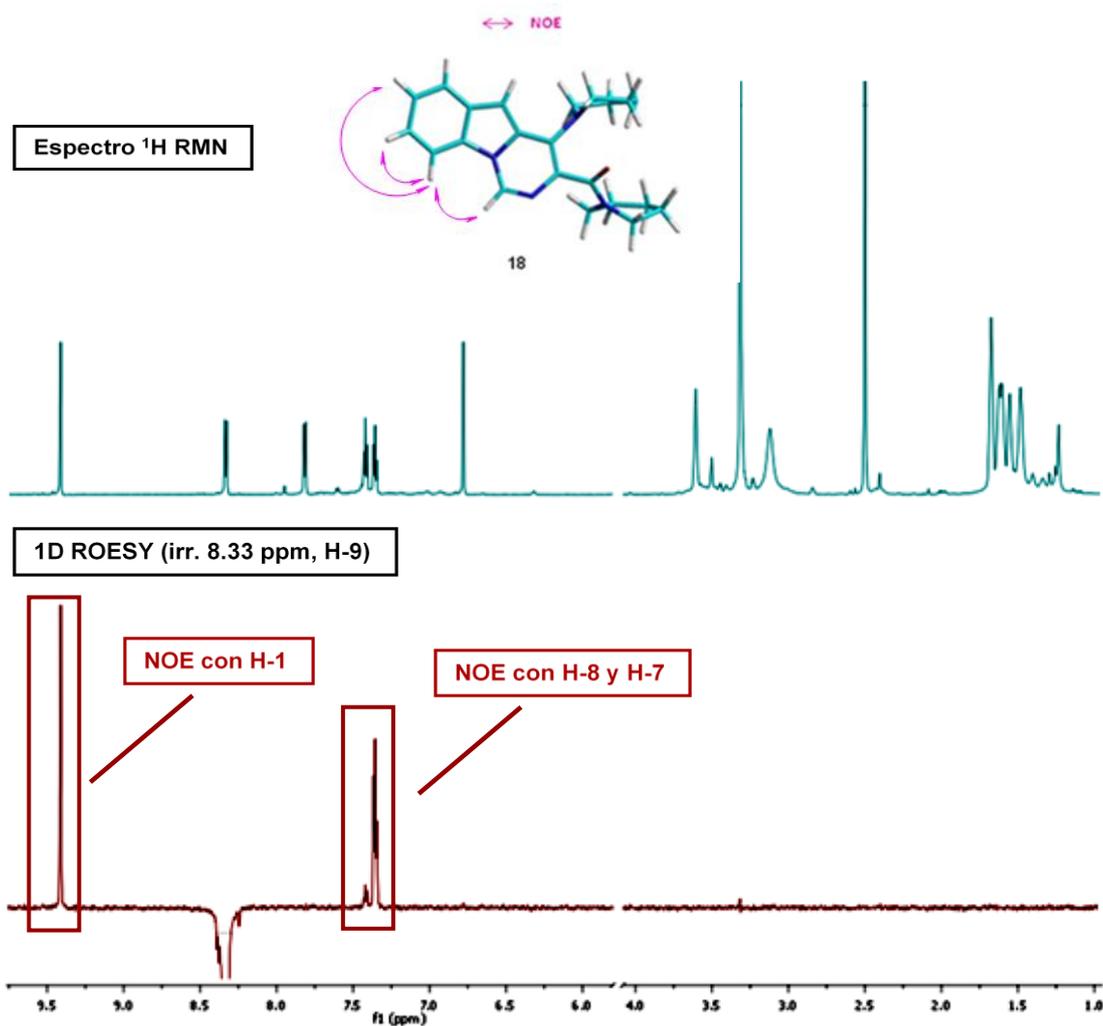


Figura 3.32. Espectro 1D ROESY, DMSO- d_6 , 700 MHz, 25°C.

Los resultados obtenidos en la reacción de la pirrolopirimidina **2a** con aminas primarias se detallan en la **Tabla 3.11**. Los resultados obtenidos con 2-metoxietilamina e isopropilamina (entradas 1 y 2) son similares a los obtenidos con **3**, aunque en este caso la reacción con isopropilamina generase mejor rendimiento de la mezcla **13/14**. En el caso de la bencilamina y ciclohexilamina (entradas 3 y 4) la reacción conduce en ambos casos a la formación como producto casi exclusivo de los derivados de azaindol **14c,d**.

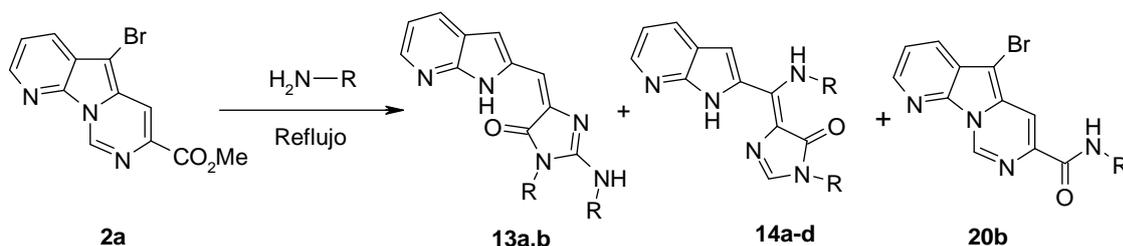


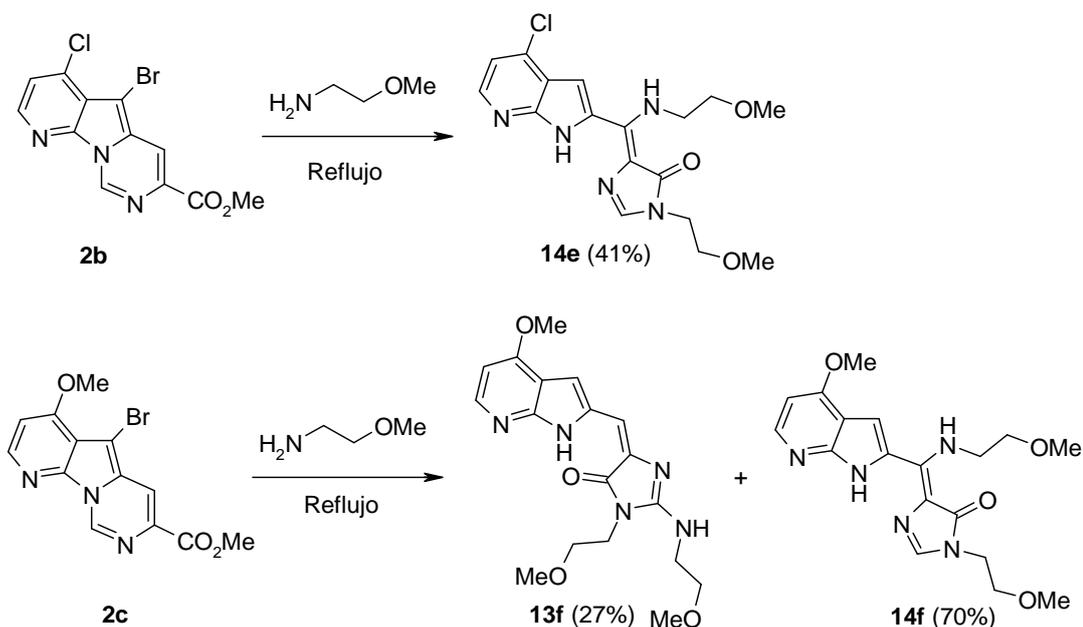
Tabla 3.11. Reacción de **2a** con aminas primarias.

Entrada	Amina	Tiempo	Compuesto	Rdto 13(%)	Rdto 14(%)	Rdto 20(%)
1		1 h	a	57	34	---
2		2 h	b	19	49	21
3		2 h 30 min	c	---	42	---
4		2 h 30 min	d	Trazas	67	---

3.4.1. Reacción de otras azolopirimidinas con 2-metoxietilamina.

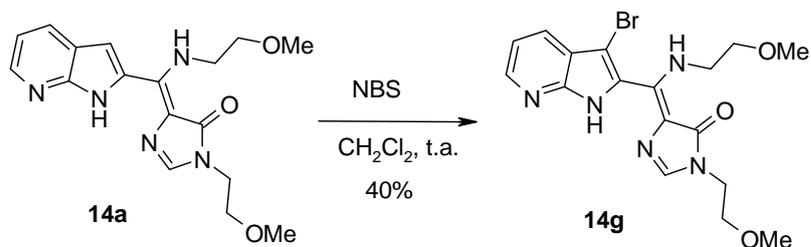
Con la finalidad de generar análogos de **14** y **16** y, al mismo tiempo, comprobar que la reacción de apertura del sistema heterociclo con aminas se podía extender a otros sistemas de azolopirimidinas, se ensayó la reacción de la 2-metoxietilamina con otros sistemas heterocíclicos como **1**, **2b,c** y **6**.

Para ver el efecto de los sustituyentes en la reactividad y en la actividad de los productos de la reacción, se ensayó la reacción con los sistemas tricíclicos **2b** y **2c** (para su preparación, consultar el **Esquema 3.7**, pág.65). La reacción de estos compuestos con la 2-metoxietilamina proporcionó resultados bastantes dispares. Así, el sistema **2b** con un grupo electroattractor en el núcleo de piridina reaccionó con la amina aislándose únicamente la imidazolona **14e** con un rendimiento moderado (41%). Sin embargo en el caso del sustrato **2c**, de su reacción con la amina se generó una mezcla de azaindoles en proporción aproximada 7:3 con un rendimiento total del 97%, siendo la imidazolona **14f** el producto mayoritario de esta reacción.



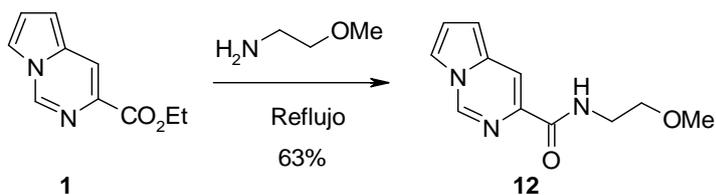
Esquema 3.17

Para completar esta serie de derivados indólicos y azaindólicos se procedió a las bromación del compuesto **14a** para comparar su actividad con el propio compuesto **14a**.

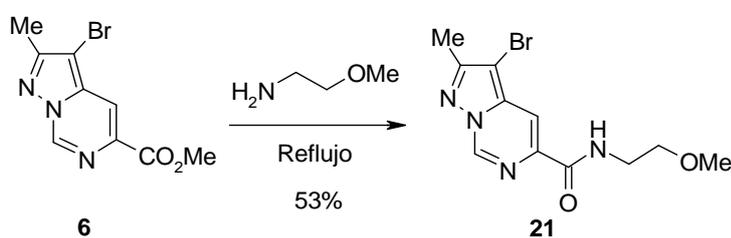


Esquema 3.18

En el caso del éster de pirrolopirimidina **1**, como ya se ha indicado, la reacción condujo exclusivamente a la formación de la correspondiente amida **12** con un 63% de rendimiento (**Esquema 3.14**).

**Esquema 3.14.**

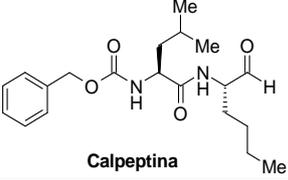
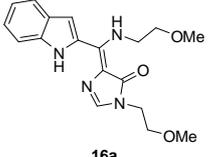
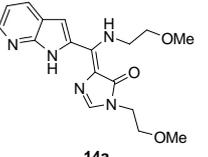
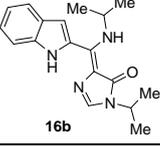
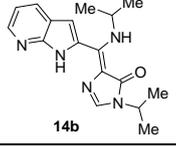
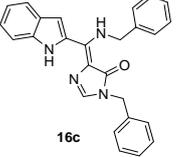
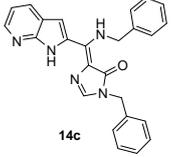
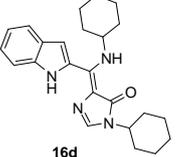
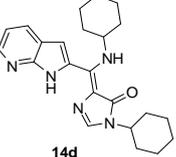
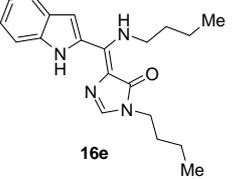
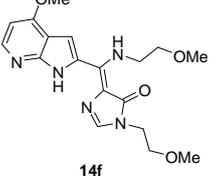
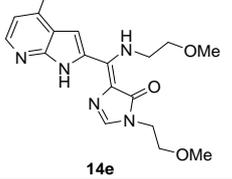
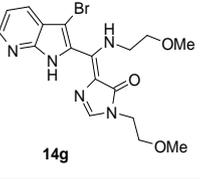
Finalmente, la reacción de la pirazolopirimidina **6** (**Esquema 3.10**, pág. 68) condujo del mismo modo a la formación de la amida sencilla **21** con un rendimiento del 53%.

**Esquema 3.19**

3.4.2. Ensayos de inhibición de calpaína de los compuestos 13-16, 18 y 19

Para la determinación de la actividad inhibitoria se utilizó el mismo método empleado con los compuestos ensayados anteriormente. Con los resultados obtenidos que se muestran en la **Tabla 3.12** se comprobó que los compuestos que procedían de la reacción con la 2-metoxietilamina eran los que presentaban mejores resultados de actividad inhibitoria de calpaína, manteniéndose **14a** como el compuesto más activo de la serie.

Tabla 3.12. Porcentajes de inhibición de calpaína de los compuestos 14 y 16.

Compuesto	Inh. (%)	Compuesto	Inh. (%)
 <p>Calpeptina</p>	100		
 <p>16a</p>	73.7	 <p>14a</p>	99.4
 <p>16b</p>	57.8	 <p>14b</p>	37.2
 <p>16c</p>	28.2	 <p>14c</p>	11.7
 <p>16d</p>	9	 <p>14d</p>	4.5
 <p>16e</p>	14	 <p>14f</p>	54.2
 <p>14e</p>	45.8	 <p>14g</p>	87.7

En la **Figura 3.33** se muestra un gráfico en el que se comparan las actividades de los compuestos preparados derivados del indol y azaindol pertenecientes a la serie que resultó activa. Como se puede observar, los compuestos generados en la reacción con 2-metoxietilamina resultaron ser los más activos tanto en la serie del indol como en la de azaindol. El otro resultado significativo se produce al comparar la actividad del indol y azaindol, ya que los primeros resultaron ser más activos que sus correspondientes derivados de azaindol cuando incorporan isopropilamina, bencilamina y ciclohexilamina, pero la situación se invierte en el caso de la 2-metoxietilamina que generan un derivado de azaindol (**14a**) significativamente más activo que su homólogo indólico (**16a**).

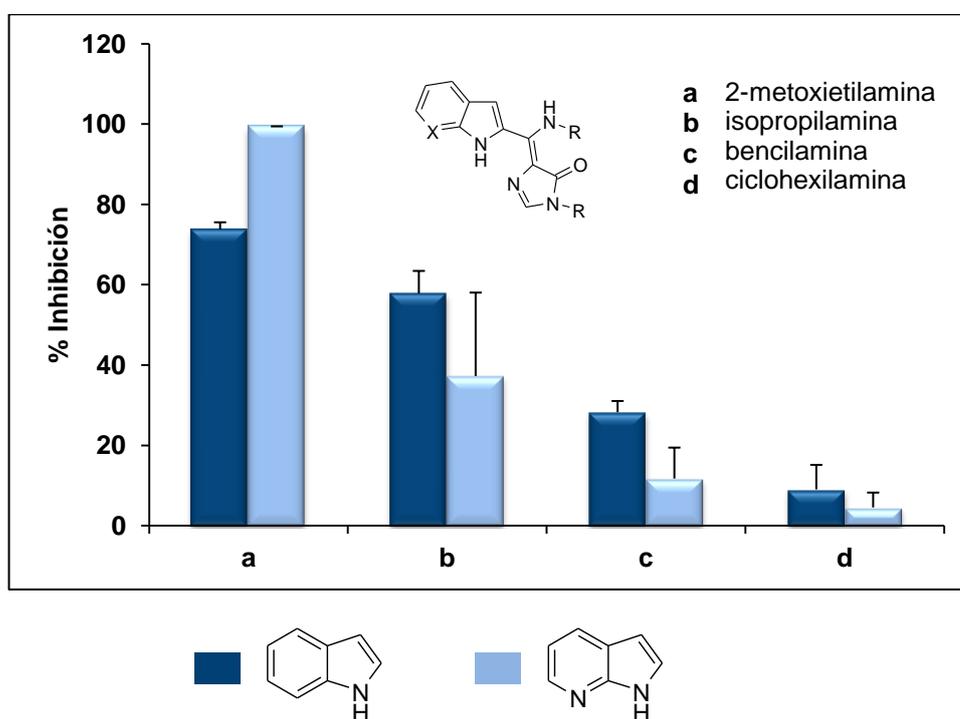


Figura 3.33

En el gráfico de la **Figura 3.34** se representa la actividad del derivado **14a** y los generados al introducir sustituyentes en el anillo de piridina y de pirrol. Como puede comprobarse el derivado **14a** sigue siendo el más activo de los obtenidos. El compuesto bromado en C3 (**14g**) no mejora el porcentaje de inhibición (87.7%) cuando se compara con **14a** (99.4%), sin embargo, comparado con los compuestos **14e** (4-cloro) y **14f** (4-metoxi) presenta mejor actividad inhibitoria.

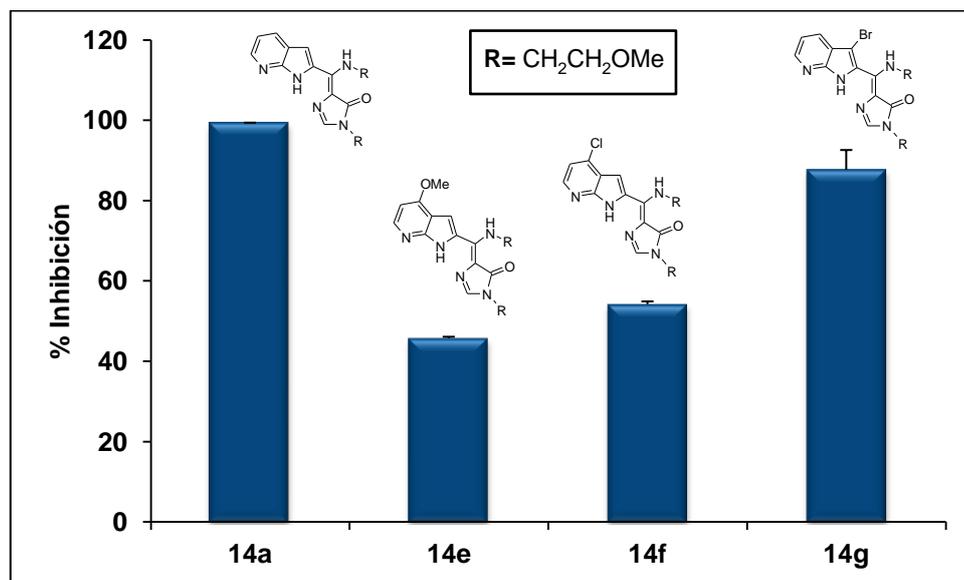
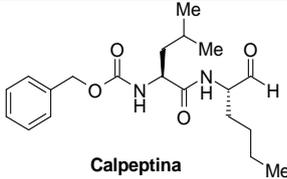
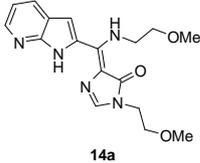
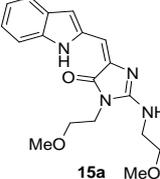
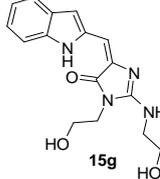
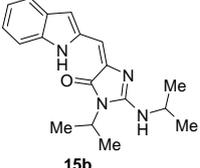
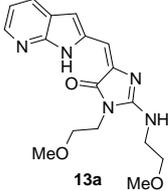
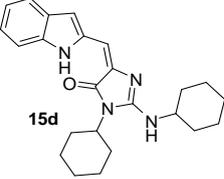
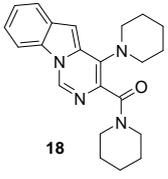
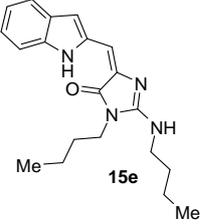
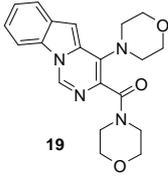


Figura 3.34

Si bien los compuestos **13** y **15** que se habían analizado anteriormente no presentaron actividad, se decidió determinar la actividad de todos los compuestos sintetizados, incluyendo los compuestos también tricíclicos obtenidos en la reacción con las aminas secundarias. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 3.13**.

Como se puede observar en la tabla los derivados de indol y azaindol obtenidos son inactivos en la mayoría de los casos, siendo únicamente activos el derivado de indol **15g** obtenido en la reacción con 2-aminoetanol y el derivado formado en la reacción con ciclohexilamina (**15d**), aunque en ambos casos el porcentaje de inhibición es bajo (27.5% y 7.6% respectivamente). Sin embargo los dos derivados tricíclicos **18** y **19** son ambos activos siendo el derivado **18**, obtenido en la reacción con piperidina, el más activo de los dos con un porcentaje de inhibición del 40.7 %.

Tabla 3.13. Porcentajes de inhibición de calpaína de los compuestos **13**, **15**, **18** y **19**.

Compuesto	Inh. (%)	Compuesto	Inh. (%)
 <p>Calpeptina</p>	100	 <p>14a</p>	99.4
 <p>15a</p>	0	 <p>15g</p>	27.5
 <p>15b</p>	0	 <p>13a</p>	0
 <p>15d</p>	7.6	 <p>18</p>	40.7
 <p>15e</p>	0	 <p>19</p>	26.5

3.4.3. Estudio de la reacción de derivados de pirrolopirimidinas con 2-metoxietilamina: optimización y mecanismo

La reacción de apertura de 5-bromo-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (**2a**) y 5-bromo-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxilato de metilo (**3**) empleando aminas primarias resultó de gran interés tanto desde el punto de vista de los objetivos de la Tesis -búsqueda de nuevos inhibidores no peptídicos de calpaína- como desde el punto de vista de la reactividad de estas azolopirimidinas ya que se trata de una reacción no descrita previamente que genera derivados novedosos tanto de indol como de azaindol. Por ello, nos planteamos un estudio de esta reacción en profundidad para conocer como se veía afectada por las condiciones de reacción y, al mismo tiempo, intentar el aislamiento de posibles intermedios que avalasen una propuesta mecanística para la reacción de apertura del sistema tricíclico, la formación de la imidazolona y la pérdida de bromo.

3.4.3.1. Optimización de la reacción

El estudio se centró en la modificación de los tiempos de reacción, del número de equivalentes necesarios de la amina y del tipo de calentamiento (convencional y por microondas). Con estos cambios también se pretendía comprobar si se podía favorecer la formación de la imidazolona activa (o más activa).

Para este objetivo, se usó como referente el sistema tricíclico **3** y su reacción con 2-metoxietilamina. Lo primero que se hizo fue rebajar el número de equivalentes de la amina, utilizando el mismo tiempo de reacción (1 hora). Con el fin de mantener la concentración de la mezcla de reacción, se utilizó como disolvente tolueno, ya que tiene un punto de ebullición muy parecido a la 2-metoxietilamina. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica. Los resultados de este experimento muestran que a medida que se disminuye el número de equivalentes de la amina, aumenta el porcentaje del producto de partida que sólo se consume con el empleo mínimo de 50 equivalentes.

En los tres ensayos en los que se produce la desaparición del producto de partida (50, 100 y 233 eq) la presencia de la amida tricíclica **17a** se ve favorecida por la disminución del número de equivalentes empleados y, en los tres casos, la imidazolona disustituida (**15a**) es el producto mayoritario cuando se compara con la imidazolona monosustituida (**16a**).

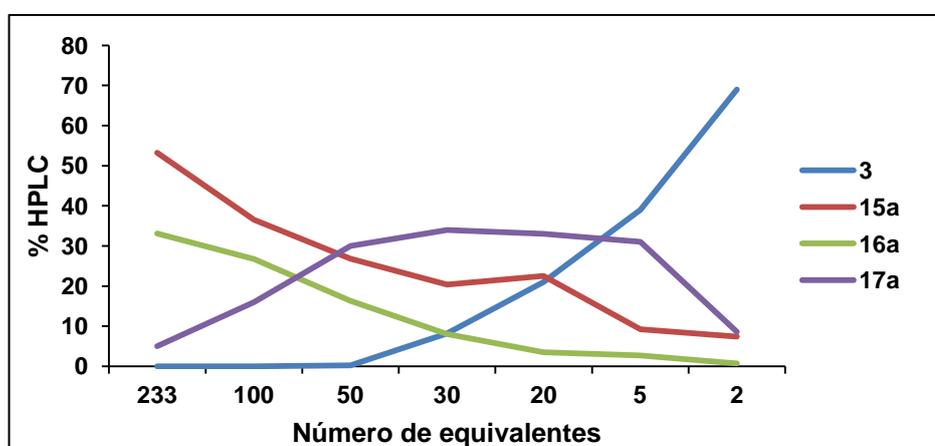
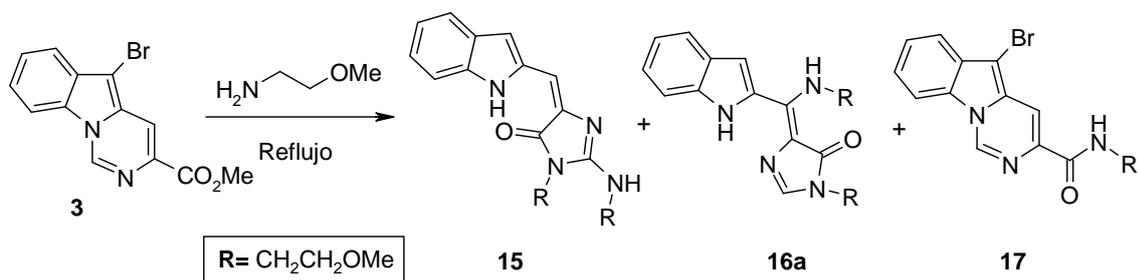


Figura 3.35. Reacción de **3** con distintos equivalentes de 2-metoxietilamina (1 h de reacción).

A continuación se ensayó la reacción empleando 20 equivalentes de la amina prolongando los tiempos de reacción hasta un máximo de cinco días a la temperatura de reflujo. Los resultados que se detallan en la **Figura 3.36** muestran que a las 5 horas desapareció el producto de partida, siendo el compuesto **17a** el producto mayoritario, lo que nos permitió aislarlo y caracterizarlo. El aumento del tiempo de reacción no produce una variación significativa de los rendimientos del resto de los compuestos. El compuesto **15a** parece sufrir una pequeña descomposición a los 5 días de reacción.

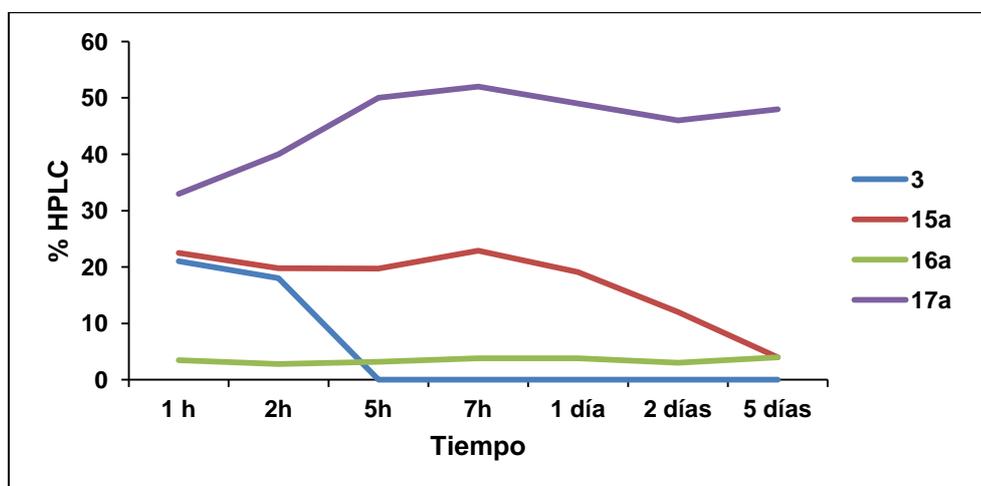
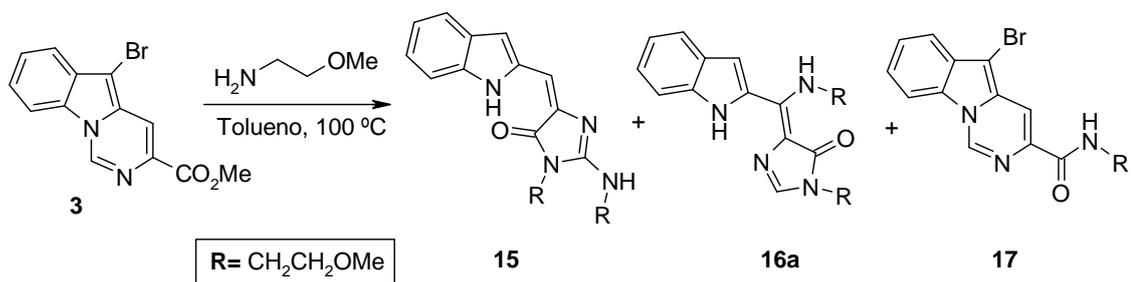


Figura 3.36. Reacción de **3** con 20 equivalentes de 2-metoxietilamina en tolueno.

Para comprobar la influencia del disolvente se llevó a cabo un ensayo empleando un disolvente prótico y polar como el propanol que, al igual que el tolueno, presenta un punto de ebullición similar a la 2-metoxietilamina. En este caso la formación del éster **60** como consecuencia de un proceso de transesterificación con el disolvente complica la mezcla de reacción obtenida, aunque se observó un ligero aumento en el rendimiento de los compuestos **15a** y **16a**, sugiriendo que el uso de un disolvente polar podría servir para mejorar el porcentaje de los isómeros **15a** y **16a**.

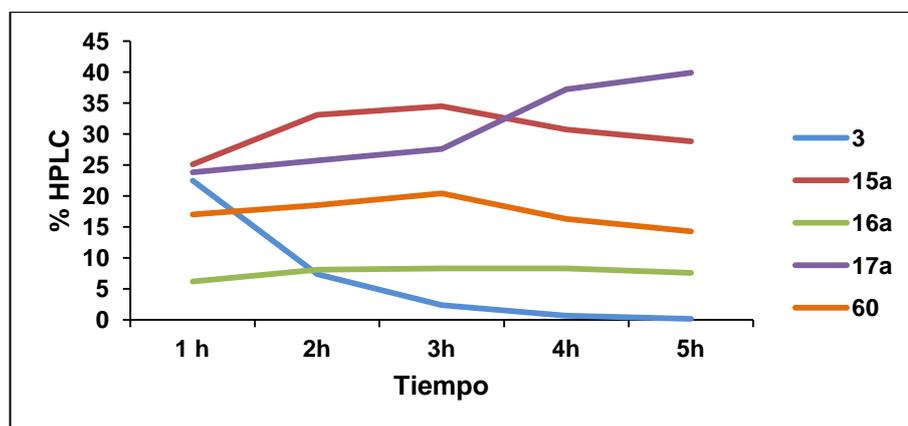
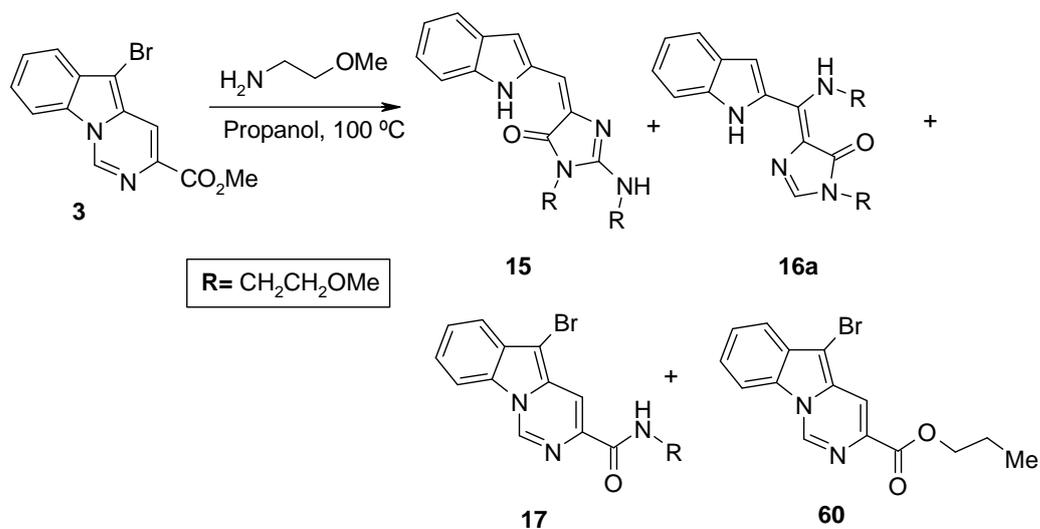


Figura 3.37. Reacción de **3** con 20 equivalentes de 2-metoxietilamina en propanol.

Por ello se decidió emplear como disolvente la dimetilformamida (DMF), ya que tiene la ventaja de tener un punto de ebullición elevado, carácter polar y se evita la reacción de transesterificación. En este disolvente la desaparición del compuesto **3** se produce al cabo de unas horas, observándose un aumento considerable en los rendimientos de **15a** con respecto a los obtenidos con los otros disolventes. En cuanto a **16a**, aunque mejoró su rendimiento con respecto a los obtenidos en propanol y tolueno, éste resultó inferior al obtenido en las condiciones iniciales (amina como disolvente).

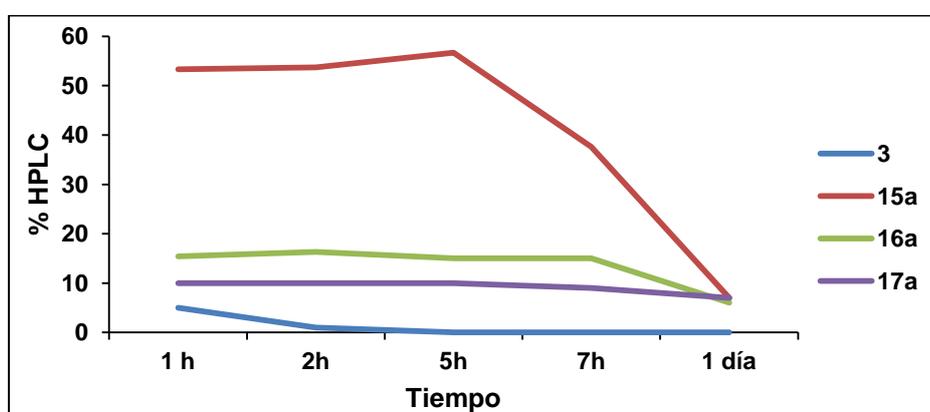
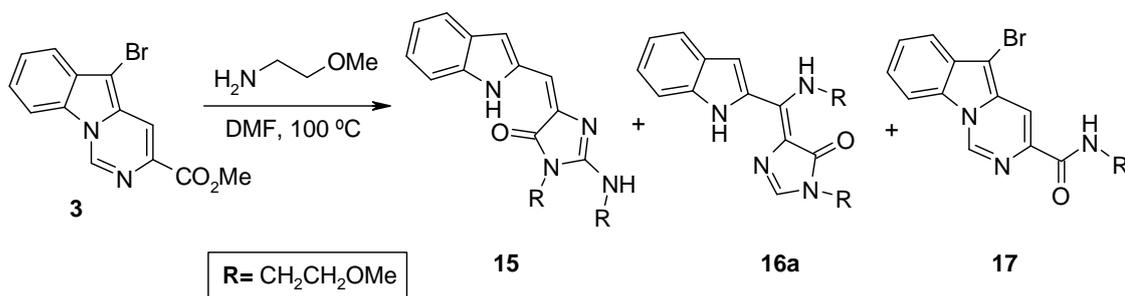


Figura 3.38. Reacción de **3** con 20 equivalentes de 2-metoxietilamina en DMF.

A la vista de estos resultados se decidió realizar un estudio a distintas temperaturas, usando un microondas focalizado Biotage® para efectuar la reacción. El tiempo que se eligió fue de 10 minutos y las temperaturas que se emplearon estuvieron comprendidas entre 40 °C y 160 °C. Al modificar la temperatura de la reacción se observó la formación de dos nuevos compuestos que no se habían observado al efectuar la reacción con calefacción convencional, a tiempos de retención 13.100 min (**61**) y 14.531 min (**62**). (**Figura 3.39**).

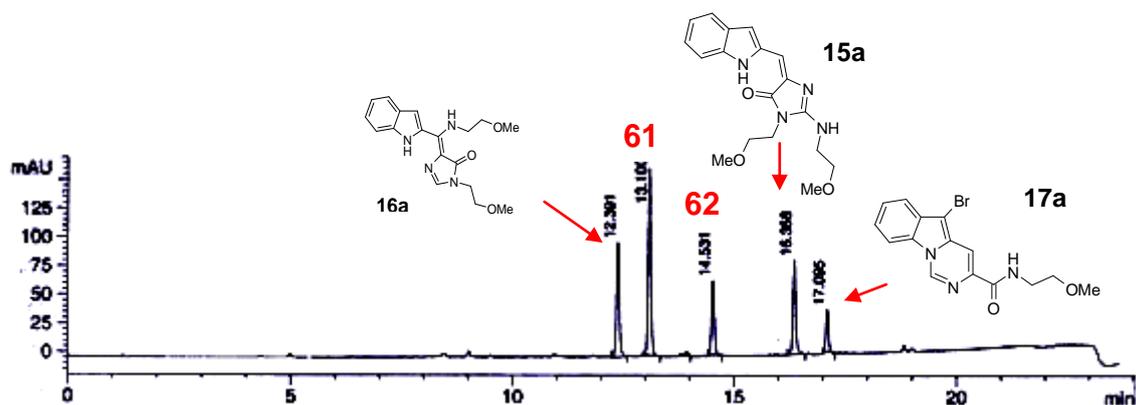


Figura 3.39. Espectro de HPLC de la reacción obtenida a 50 °C, 10 min, MW.

De los cinco compuestos formados, cuatro poseían el mismo peso molecular y misma composición elemental, por lo que se trataban de isómeros estructurales. Se intentaron aislar para poder proceder a su caracterización, pero no se encontró ninguna mezcla de eluyentes que permitiera separar el compuesto **61**. Debido al interés que podían presentar estos nuevos productos, ya que podía tratarse de intermedios de reacción que pudieran ser útiles para establecer el mecanismo de reacción, se procedió a realizar la separación de los mismos por HPLC preparativo.

Para conseguir el aislamiento de los cuatro compuestos se procedió a la optimización de las condiciones experimentales del método de HPLC a escala analítica para su posterior transferencia a un método de HPLC preparativo. El estudio y optimización de las condiciones se realizó por la Dra. Leonor Nozal en la Unidad Analítica de la Planta Piloto de Química Fina de la Universidad de Alcalá. La principal dificultad consistió en conseguir una resolución elevada entre los picos, ya que en el HPLC preparativo un factor limitante de la separación es la sobrecarga de los picos, que pueden dar lugar al ensanchamiento de los mismos y consiguientes solapamientos entre ellos. Por este motivo, se optimizó la resolución más allá de la requerida para un sistema de HPLC analítico. Las condiciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.14. Condiciones cromatográficas para la reacción de **3** con 2-metoxietilamina en MW.

Columna analítica	KROMAPHASE C18 de 250 mm x 4.6 mm x 5 µm		
Modo de elución	Gradiente de elución:		
	t (min)	A (%)	B (%)
	0	50	50
	20	30	70
	30	50	50
Fase móvil	A: 0.1% ácido fórmico en H ₂ O B: 0.1% ácido fórmico en MeOH		
Flujo de fase móvil	1.6 mL/min		
Volumen de inyección	20 µL		
Temperatura de columna	Temperatura ambiente		
Detección	UV 254 nm		

Se estudió la posibilidad de cambiar el disolvente de la fase móvil, en lugar de emplear metanol sustituirlo por acetonitrilo, con el cual se podrían reducir los tiempos de análisis. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que a pesar de reducirse el tiempo de retención de los compuestos, la resolución entre ellos era menor que empleando metanol. Finalmente, se adaptó el gradiente de elución y el flujo de la fase móvil.

Para adaptar a escala preparativa el método desarrollado, se tuvo que aumentar el flujo de la fase móvil y el volumen de inyección, ya que la columna preparativa (250 mm x 20 mm x 10 µm) tiene unas dimensiones mucho mayores que la columna analítica (250 mm x 4.6 mm x 5 µm). Las condiciones del método preparativo (las mismas de la **Tabla 3.14**) permitieron recoger por separado las fracciones correspondientes a cada uno de los productos de reacción.

Una de las principales estrategias para la identificación de compuestos desconocidos es la utilización de un sistema de espectrometría de masas con suficiente resolución espectral para poder medir “masas exactas”, dada la importancia de disponer de una masa exacta para centrar la búsqueda de compuestos desconocidos. En este caso al tratarse de isómeros estructurales, todos ellos tienen la misma masa molecular y por ello, se empleó un sistema de LC-MS/MS con un analizador QTOF.

Una vez realizada la optimización de parámetros instrumentales del sistema MS/MS, se obtuvo el siguiente cromatograma del ión extraído (EIC) correspondiente al ión precursor (343.2 m/z) de la disolución de la muestra que contenía los cuatro isómeros de interés con las nuevas condiciones del método de LC-MS/MS.

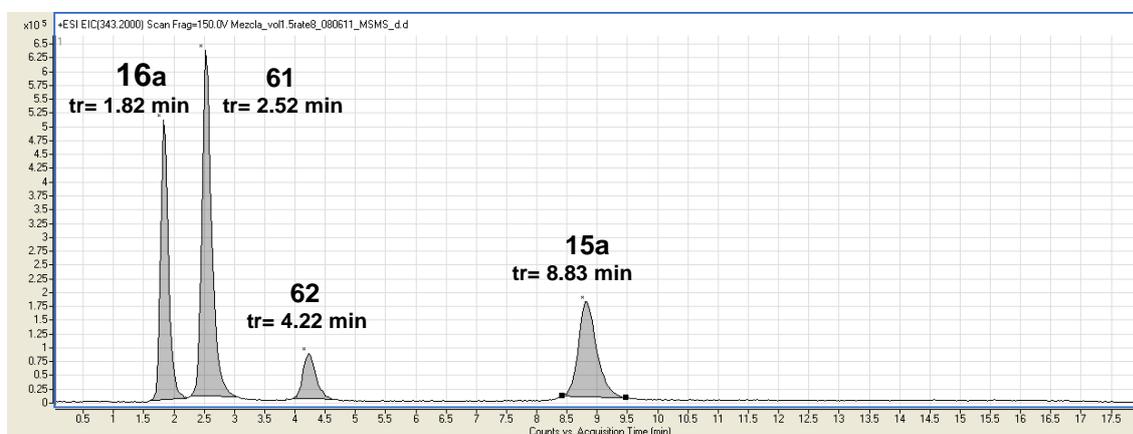


Figura 3.40

Para cada una de las fracciones independientes de los cuatro productos se obtuvieron los correspondientes cromatogramas y espectros de masas de los iones productos obtenidos de la fragmentación del ión precursor m/z 343.2. Entre éstos cabía destacar la presencia de dos picos en las fracciones de los productos **61** y **15a**, como se puede observar en las siguientes figuras, cuando se esperaba la presencia de un único pico para cada una de las fracciones.

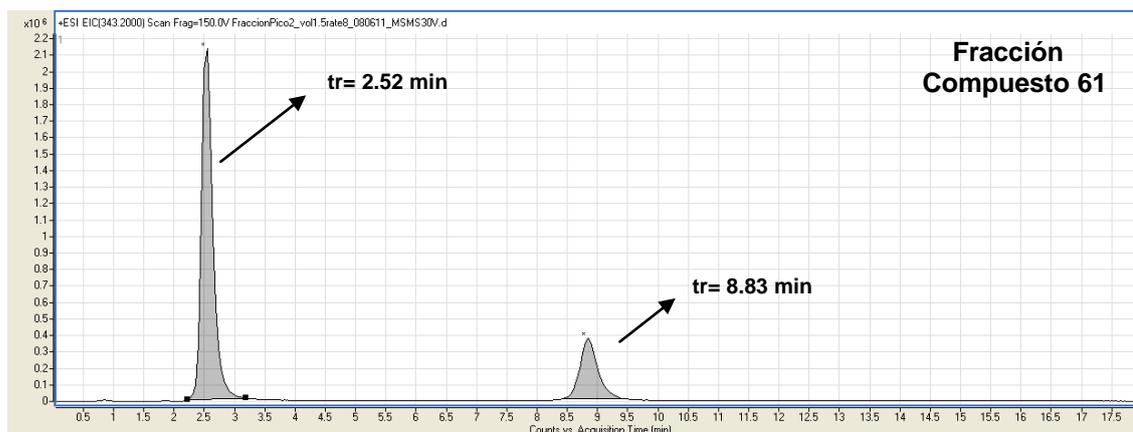


Figura 3.41

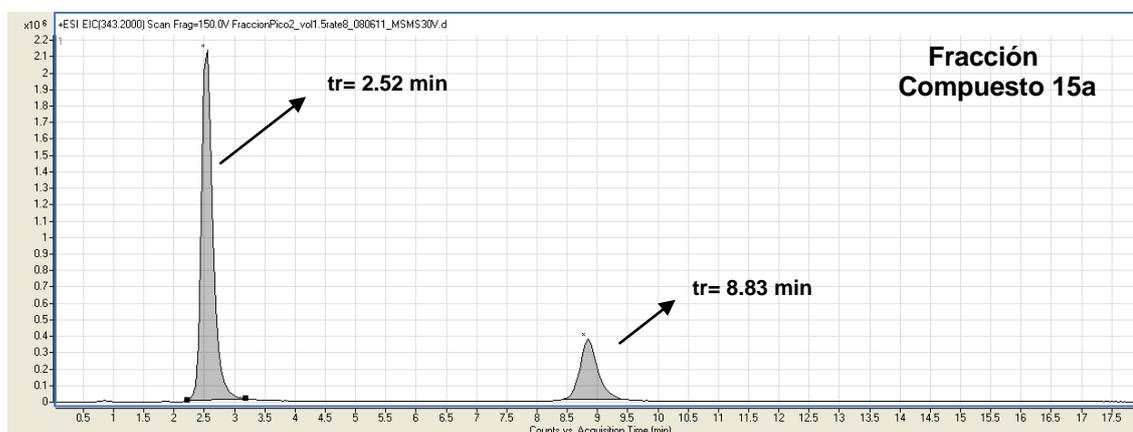


Figura 3.42

Se pudo observar que los picos de cada fracción tenían los mismos tiempos de retención. La relación de áreas entre el primer y segundo pico de los dos cromatogramas era prácticamente la misma (2:1). Además, los espectros de iones producto en masa exacta de cada uno de los picos eran idénticos entre sí.

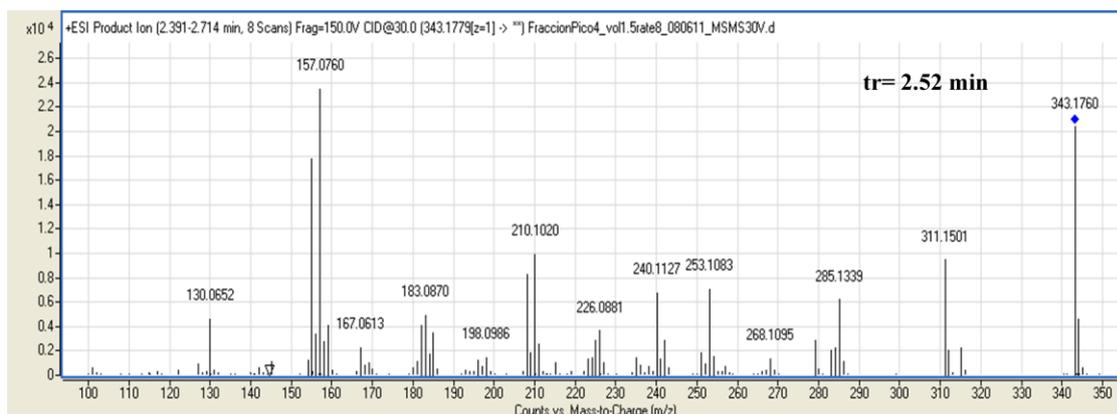


Figura 3.43

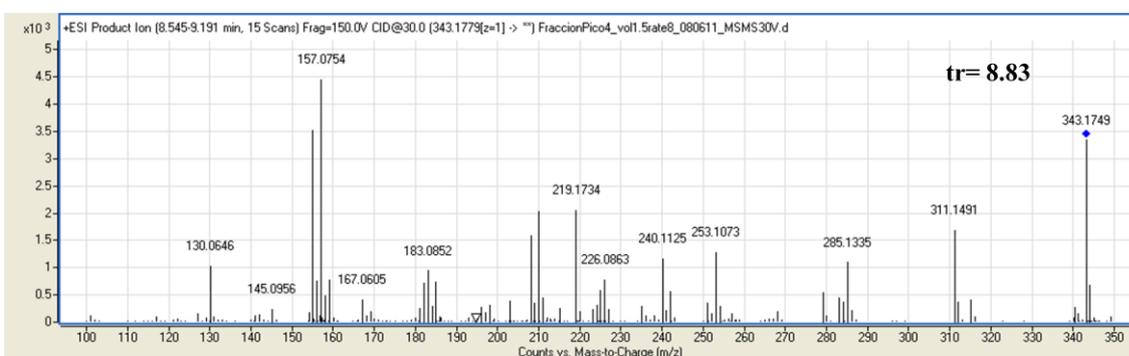


Figura 3.44

La conclusión que parecía extraerse de estos resultados era que los isómeros **61** y **15a** se interconvertían entre sí en disolución hasta alcanzar un equilibrio, en el cual el producto **61** era el mayoritario en una relación de 2:1 frente a **15a**.

Para confirmarlo, se realizaron estudios de RMN que permitieron comparar los espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C de las muestras **61** y **15a** pudiéndose confirmar que ambas muestras eran la misma sustancia, ya que los desplazamientos químicos de todas las señales de ^1H y ^{13}C de ambas muestras coincidían. Además, un experimento DOSY 2D mostró que las dos sustancias tenían igual coeficiente de difusión, lo que avalaría que las dos sustancias en cuestión son isómeras entre sí y de estructura muy similar.

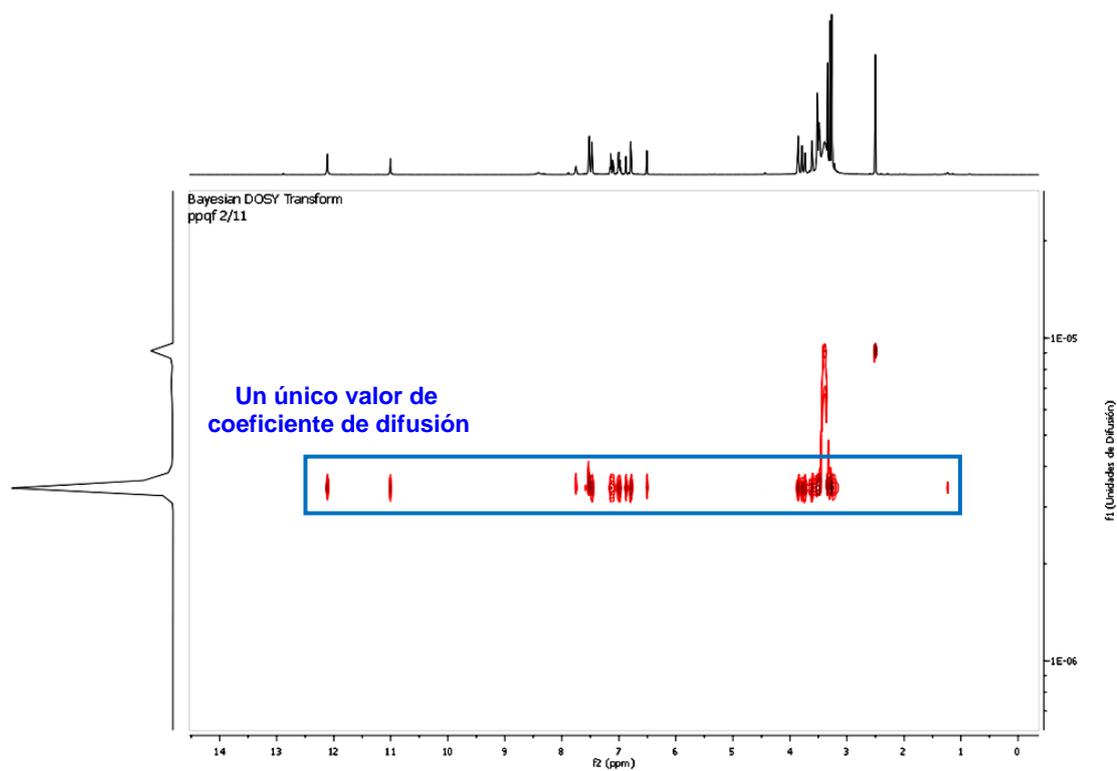


Figura 3.45. Espectro DOSY 2D, DMSO- d_6 , 700 MHz, 25°C, proyección Bayesiana.

Finalmente, se determinaron los desplazamientos químicos de ^1H , ^{13}C y ^{15}N mediante espectros de RMN mono- y bidimensionales, y de esta forma se pudo determinar que el compuesto desconocido y mayoritario (**61**) se correspondía con el isómero Z.

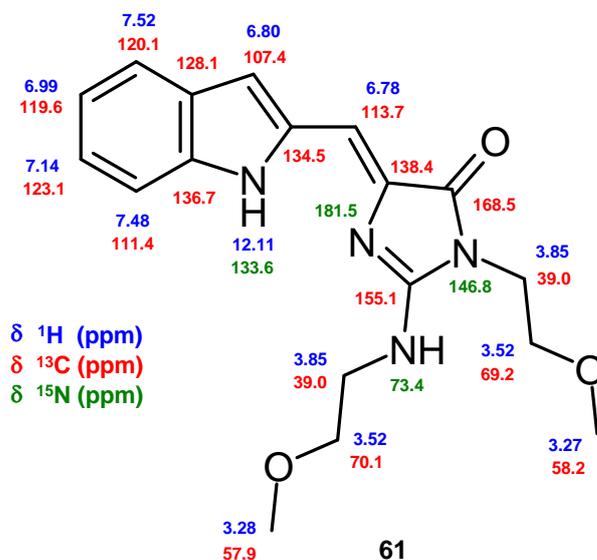


Figura 3.46. Desplazamiento químico (δ , ppm) ^1H , ^{13}C y ^{15}N de **61**.

El último compuesto que quedaba por determinar su estructura presentó un cromatograma de un solo pico.

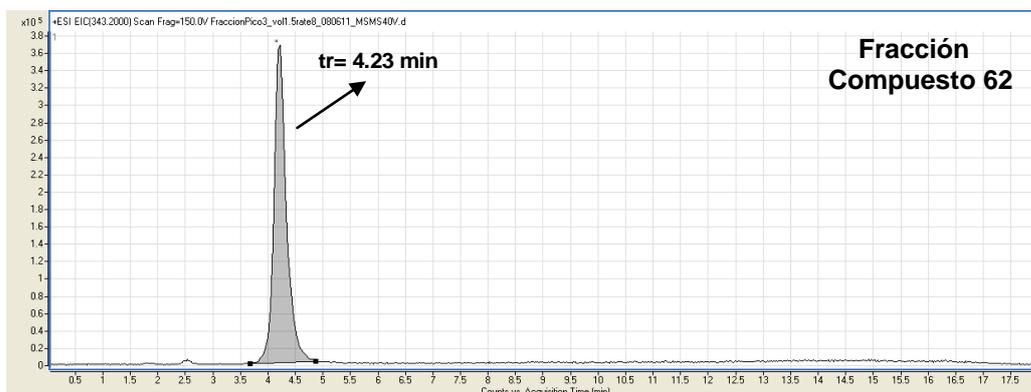


Figura 3.47

Como en los casos anteriores se hicieron estudios de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas para determinar la estructura. Se determinaron los desplazamientos químicos de ^1H , ^{13}C y ^{15}N mediante espectros de RMN mono- y bidimensionales.

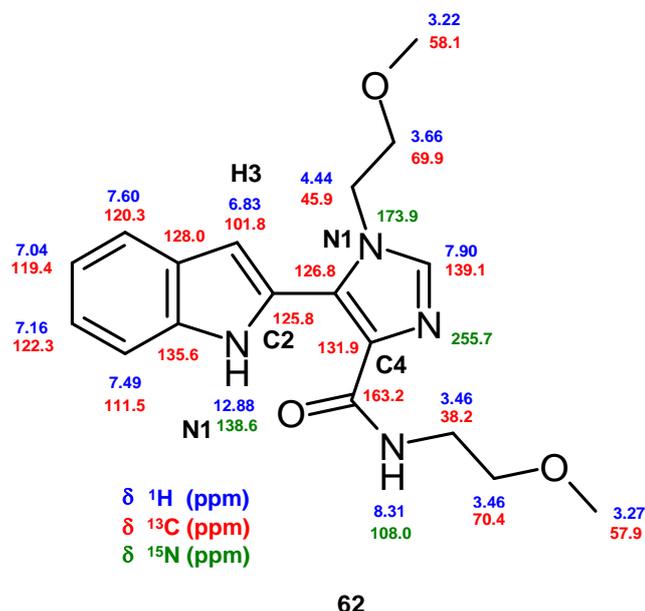


Figura 3.48. Desplazamiento químico (δ , ppm) ^1H , ^{13}C y ^{15}N de **62**.

El espectro de ^1H RMN presentó un sistema de spin constituido por cuatro señales a 7.60 ppm (d, 1H), 7.49 ppm (d, 1H), 7.16 ppm (t, 1H) y 7.04 ppm (t, 1H) además de dos singletes a 6.83 ppm y 12.88 ppm que corroboraron la presencia de un anillo indol. La magnitud de los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del singlete a 6.85 ppm (^{13}C 101.8 ppm) indicó que este indol estaba sustituido en la posición C2. La presencia de un indol también se vio avalada por el desplazamiento de N1 (^{15}N 138.6 ppm), consistente con el nitrógeno de un indol.

El experimento ^1H - ^{15}N HMBC permitió distinguir dos señales de nitrógenos aromáticos a 173.9 y 255.7 ppm, que fueron compatibles con los dos nitrógenos de un anillo de imidazol. La correlación a larga distancia de la señal de ^{15}N a 173.9 ppm con las señales de ^1H a 4.44 y 3.66 ppm (una cadena de $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMe}$) indicaron que dicho átomo de nitrógeno estaba alquilado. Por último, el experimento ^1H - ^{15}N HMBC también permitió distinguir una cuarta señal de ^{15}N a 108.0 ppm que se corresponde con un nitrógeno amídico alifático. La presencia de dicha amida se corrobora por las señales de ^1H a 8.31 ppm (NH) y de ^{13}C a 163.2 ppm (CO).

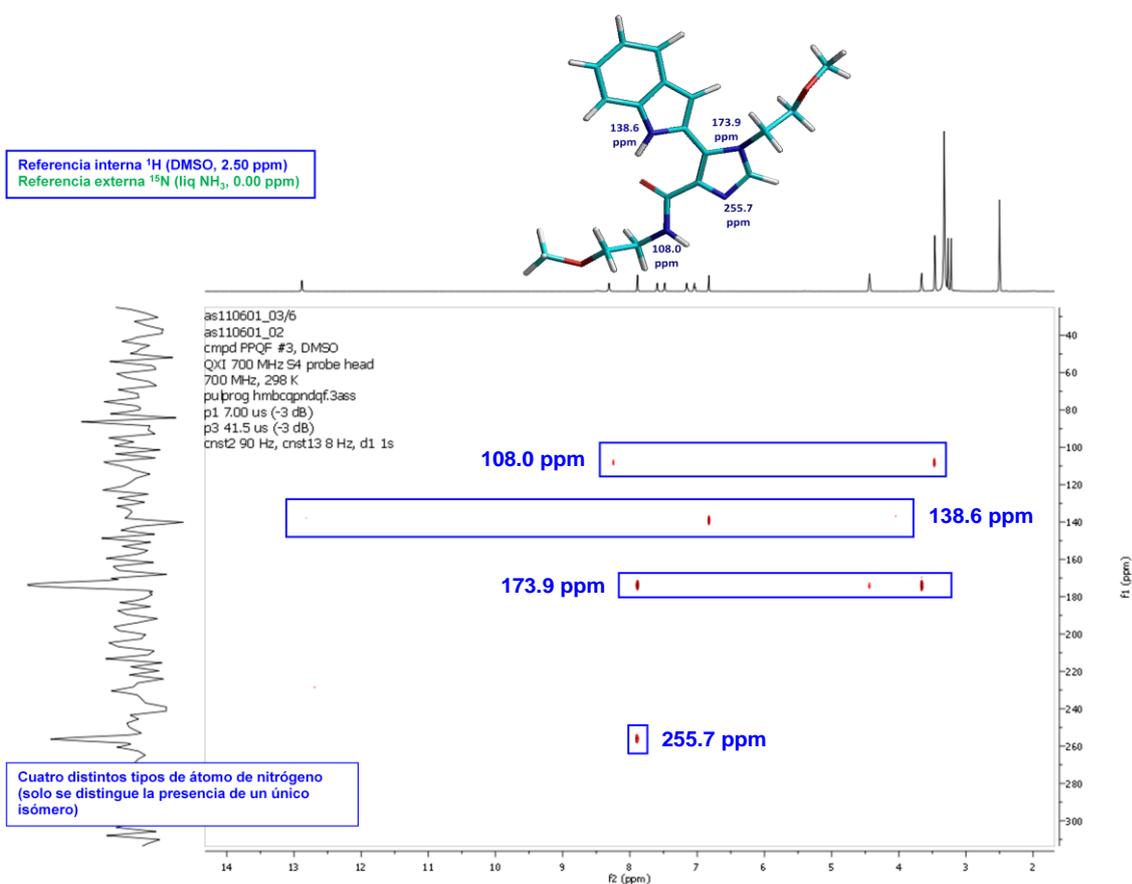


Figura 3.49. Espectro ^1H - ^{15}N HMBC, DMSO- d_6 , 700 MHz, 25°C para **62**.

Los experimentos 1D ROESY permitieron concluir la posición relativa del imidazol y de los sustituyentes en el mismo. La irradiación a 6.83 pp (H3 indol) dio lugar a una interacción NOE particularmente intensa con la señal a 4.44 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OME}$ en imidazol N1) y, en menor medida, con la de 3.66 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OME}$ en imidazol N1). Ésto indicó la proximidad entre H3 del indol y dicha cadena alifática, confirmando la alquilación en N1 del imidazol. En otro experimento, la irradiación a 7.90 ppm (H2 imidazol) dio un NOE con la anterior cadena alifática en N1 del imidazol (3.66 y 4.44 ppm), pero no con las señales debidas al sustituyente 2-metoxietilcarbamido (la otra cadena alifática), lo que indicaría que la amida alifática estaría en la posición C4 del imidazol.

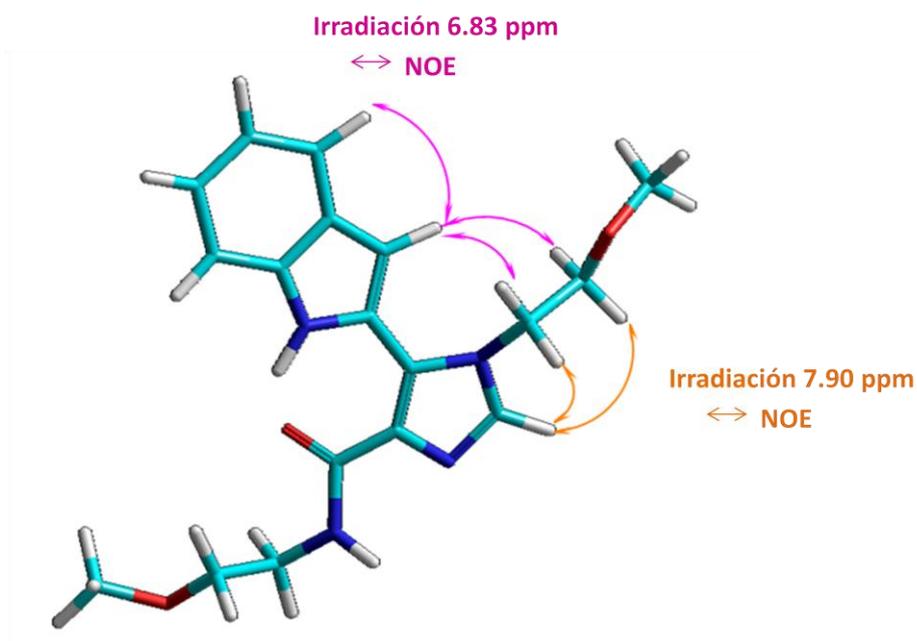


Figura 3.50. Interacciones *nOe* relevantes para **62**.

El espectro de Ms/Ms que se obtuvo se muestra a continuación.

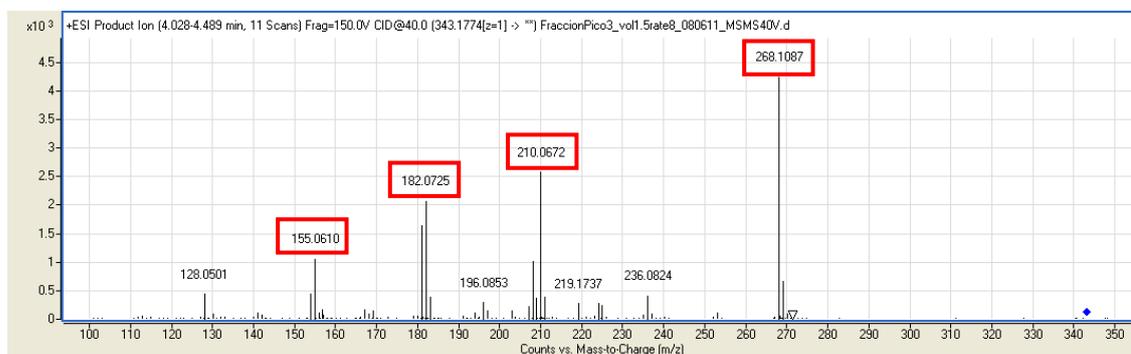


Figura 3.51

Respecto a las fragmentaciones observadas en el espectro de MS/MS, la fragmentación del ión pseudomolecular (m/z 343.1764) dio lugar a un ión secundario a m/z 268.1, que se correspondió con un ión resultante de la pérdida de $\text{H}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{OMe}$. Se tuvo en cuenta que este tipo de fragmentación de enlaces peptídicos (amidas) es muy común en proteómica (*iones de la serie b*). Este resultado apoya la presencia de una amida alifática. El resto de señales en el espectro MS/MS (m/z 210.0, 181.9 y 155.0) respectivamente, resultarían de la posterior pérdida de metilviniléter (por β -eliminación), de monóxido de carbono y de HCN (**Figura 3.52**).

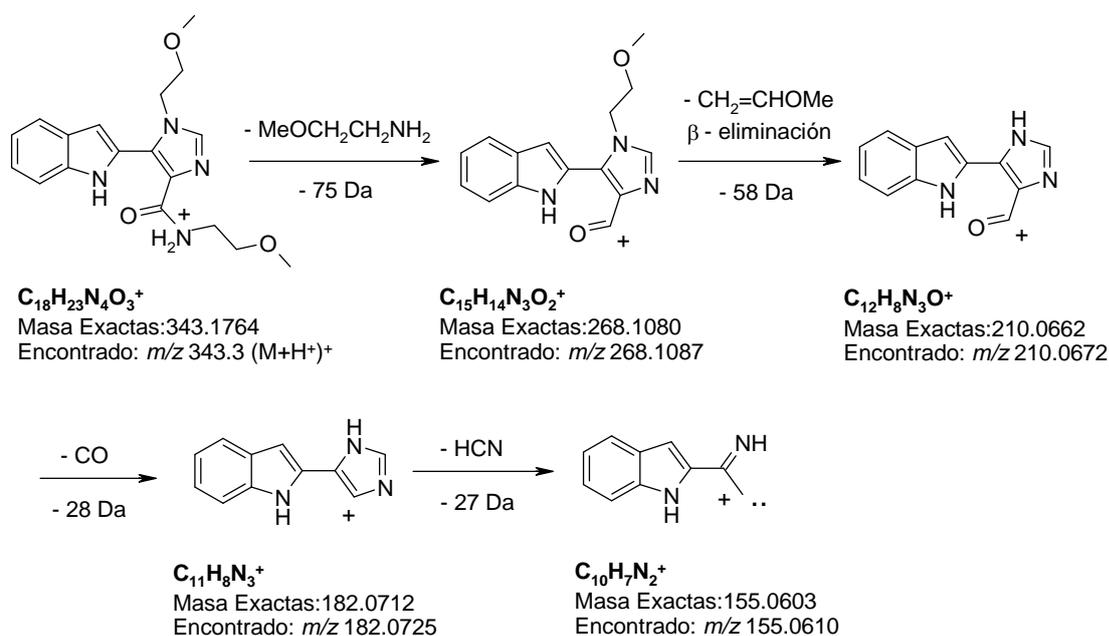


Figura 3.52

De este modo quedaron totalmente caracterizados todos los compuestos obtenidos de esta reacción.

El porcentaje por HPLC que se obtuvo para cada uno de ellos, a distintas temperaturas, bajo irradiación de microondas se detalla en la **Figura 3.53**. El producto de partida desapareció a 50 °C y para el compuesto **16a** prácticamente se mantenían los mismos porcentajes a todas las temperaturas. La formación del compuesto **15a** (el isómero *E*) estaba favorecido a altas temperaturas, sin embargo, el caso contrario se

producía con el compuesto **61** (el isómero *Z*) en el que a altas temperaturas apenas se observaba su formación, obteniéndose los mayores porcentajes entre 50 °C y 70 °C. La formación del compuesto **62** fue muy minoritaria, el máximo porcentaje alcanzado (HPLC) fue de un 14%.

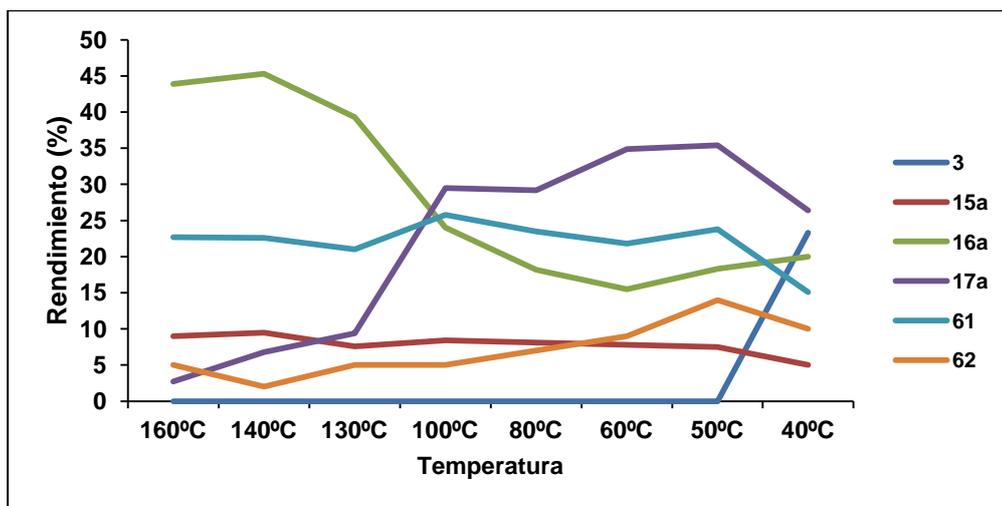
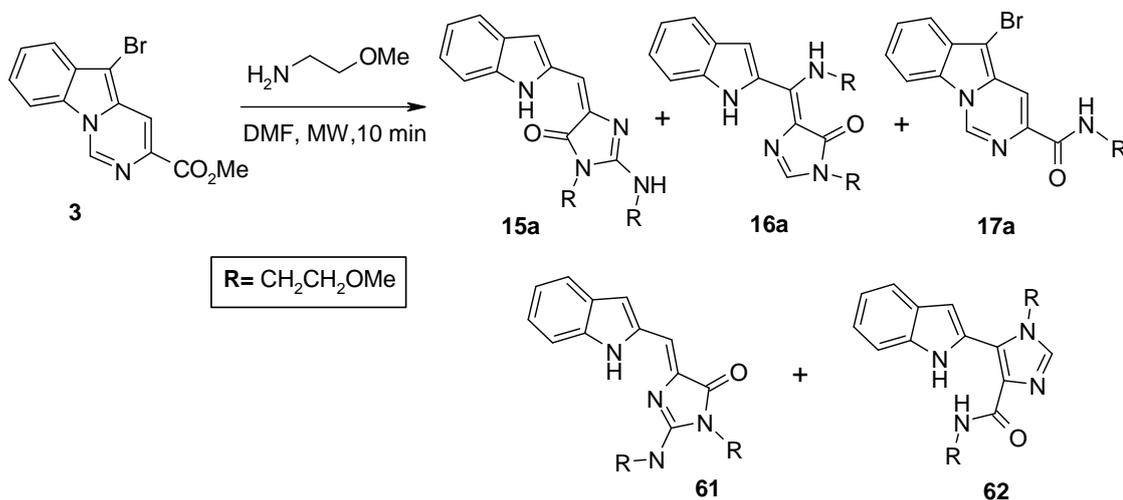


Figura 3.53. Reacción de **3** con 20 equivalentes de 2-metoxietilamina en DMF, MW, 10 min.

En el estudio realizado no llegaron a encontrarse unas condiciones que mejoraran el rendimiento de **16a** pero se pudieron aislar productos que no se habían detectado en las condiciones iniciales de esta reacción, lo que suministró información adicional para la propuesta mecanística de este proceso.

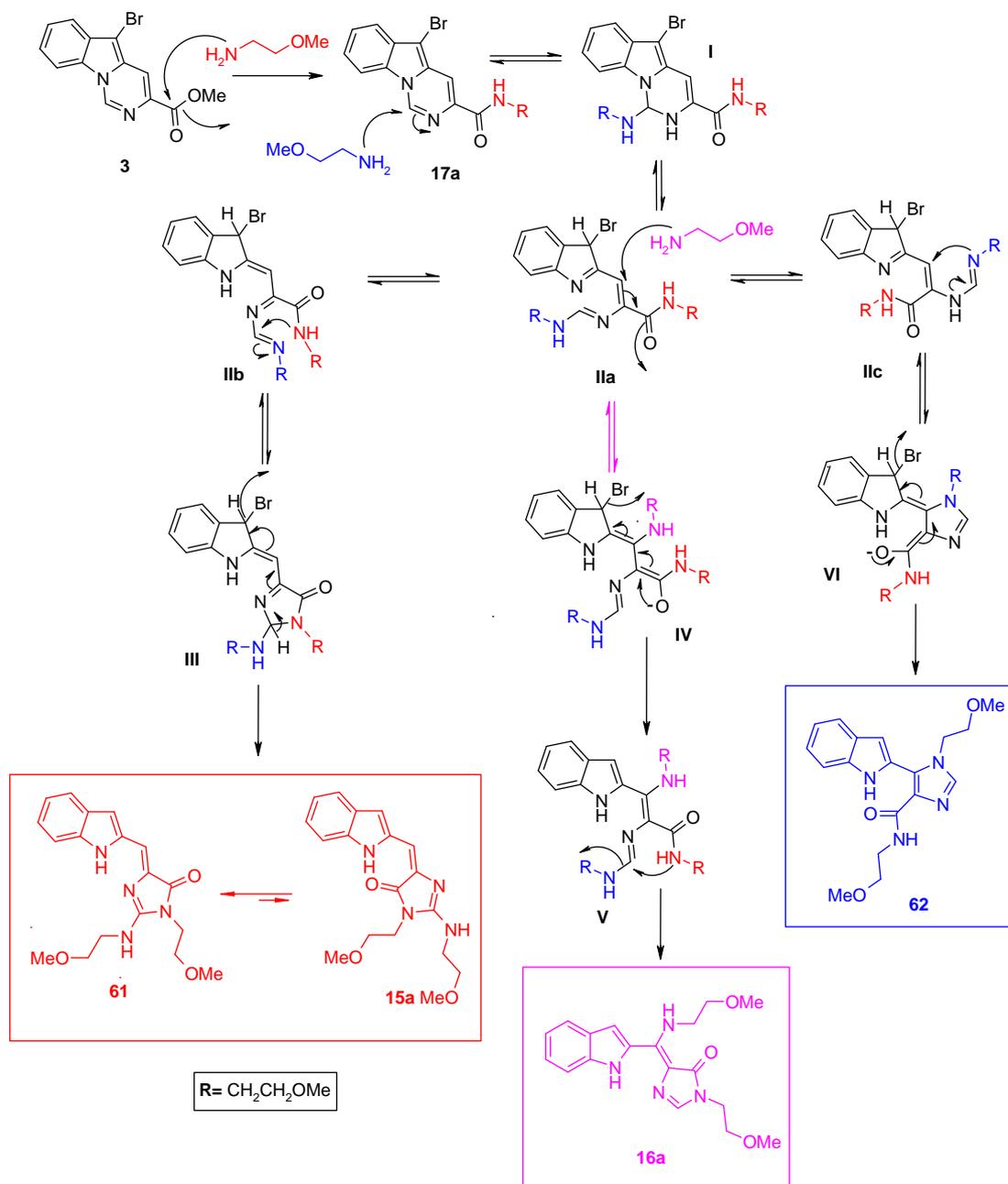
3.4.3.2. Mecanismo de la reacción

Como se indicó anteriormente, los estudios llevados a cabo sobre la reacción del compuesto **3** con aminas iban, en parte, orientados a conseguir toda la información posible para avalar una propuesta mecanística para la reacción de apertura del sistema tricíclico y formación de la imidazolona.

Los mecanismos propuestos para los distintos compuestos originados en la reacción de apertura de **3** con la 2-metoxietilamina se detallan a continuación. Para cada uno de los compuestos formados (**15a**, **16a**, **61** y **62**) el primer paso de la reacción supondría la formación de la amida **17a** seguido de un ataque de la amina en la posición C1 para generar el intermedio **I** que, en el caso de la formación de **16a**, evolucionaría al intermedio **Ila** procedente de la apertura del anillo pirimidínico. Sobre **Ila** se produciría una reacción tipo Michael implicando un segundo ataque nucleófilo de la amina sobre el carbono deficitario (C6 en el sistema tricíclico) de la enamida para generar el intermedio **IV**. La rearomatización del indol a través del desplazamiento electrónico indicado conllevaría la eliminación de bromo y la formación del intermedio **V**, el cual, evolucionaría a la formación de **16a** en un proceso intramolecular de transamidación que implica el ataque nucleófilo del nitrógeno amidínico sobre el carbono formamidínico y la consiguiente eliminación de una molécula de amina para generar la imidazolona-2-ona.

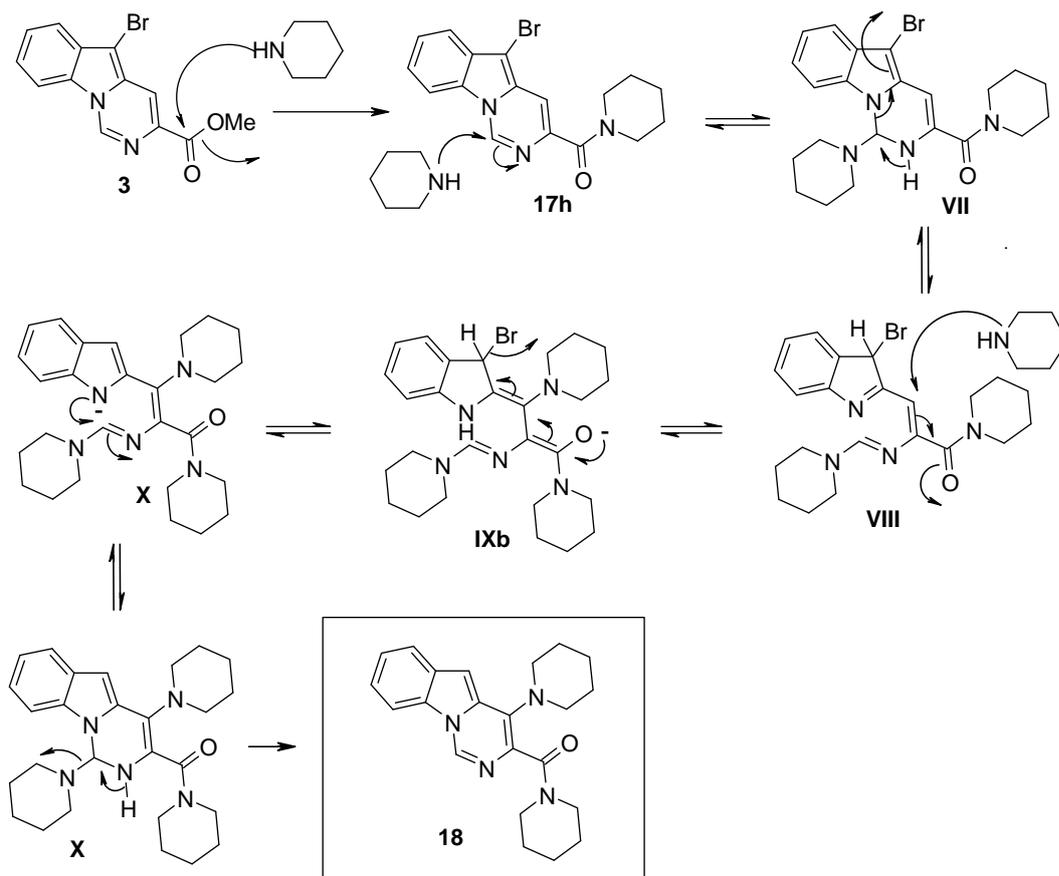
La formación de **15a** y **61** implica la formación del intermedio **Ilb**, el cual, en este caso evolucionaría hacia la formación de la imidazolona por ataque del nitrógeno amidínico o de su correspondiente forma desprotonada sobre el carbono formamidínico. Este intermedio, **III**, evolucionaría hacia **15a** y **16** por eliminación de bromuro y la consiguiente rearomatización del sistema indólico.

La formación del compuesto **62** se explicaría a través del intermedio **Ilc**, a partir del cual se formaría el anillo de imidazol por reacción de Michael intramolecular del nitrógeno formamidínico y el carbono deficitario de la enamida, formándose el intermedio **VI**, a partir del cual se produciría **62** vía aromatización del indol y eliminación del bromo como en los casos anteriores.



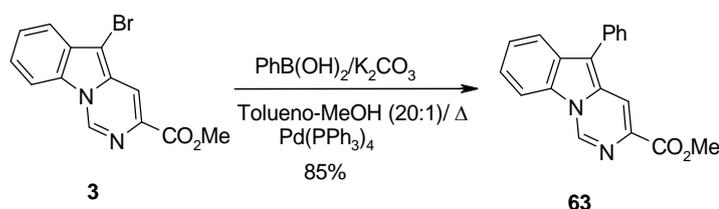
Esquema 3.20

El mecanismo de reacción que se propone para explicar los productos de reacción obtenidos con aminas secundarias se detalla en el **Esquema 3.21** para la reacción con piperidina. La reacción transcurre a través de los mismos intermedios propuestos para la reacción con aminas primarias hasta generar el intermedio indólico **X**, similar al intermedio **V** precursor del compuesto **16a**. A partir de este compuesto se regeneraría en este caso el sistema tricíclico por ataque del nitrógeno indólico sobre el carbono imínico y eliminación de una molécula de piperidina.



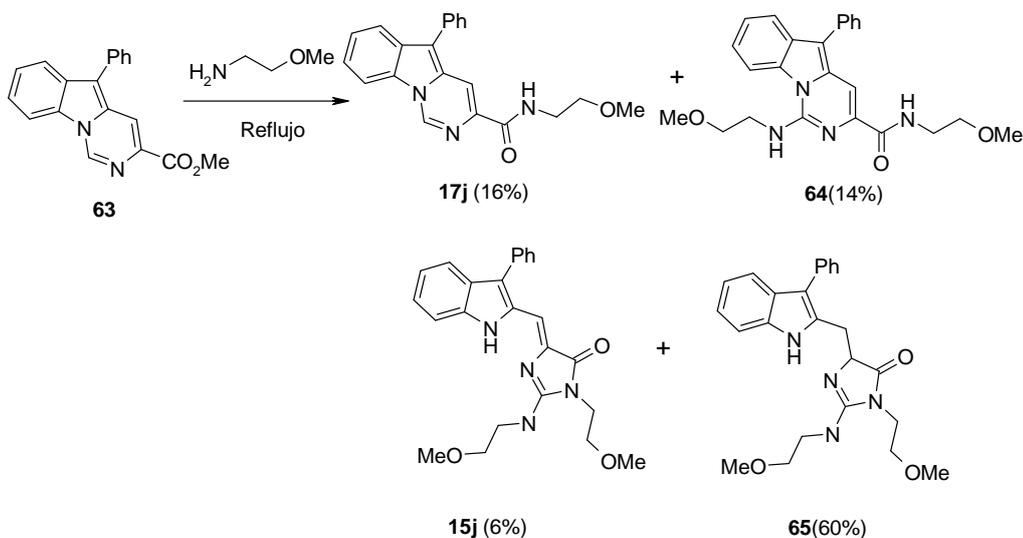
Esquema 3.21

Seguidamente se quiso comprobar el papel del bromo en la reacción, ya que en la formación de los derivados de indol y azaindol se producía la eliminación del mismo. Con el fin de conocer si la presencia del bromo en C5 era imprescindible para que se produjera la reacción, se procedió a bloquear esa posición con un fenilo a través de una reacción de acoplamiento de paladio del tipo Suzuki-Miyaura¹³⁸ (**Esquema 3.22**).



Esquema 3.22

Una vez sintetizado el compuesto **63** se ensayó la reacción con la 2-metoxietilamina (**Esquema 3.23**). En este caso, junto a la formación de los productos minoritarios **15j** y **17j**, similares a los obtenidos en la reacción con el compuesto **3**, se aislaron dos nuevos compuestos que se identificaron como **64** (minoritario, 14%) y **65** (mayoritario, 60%).



Esquema 3.23

¹³⁸ Mendiola, J.; Castellote, I.; Alvarez-Builla, J.; Fernandez-Gadea, J.; Gomez, A.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1254-1257.

Como en los casos anteriores se hicieron estudios de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas para determinar la estructura de los nuevos compuestos **64** y **65**. Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del compuesto **64** se determinaron mediante espectros de RMN mono- y bidimensionales.

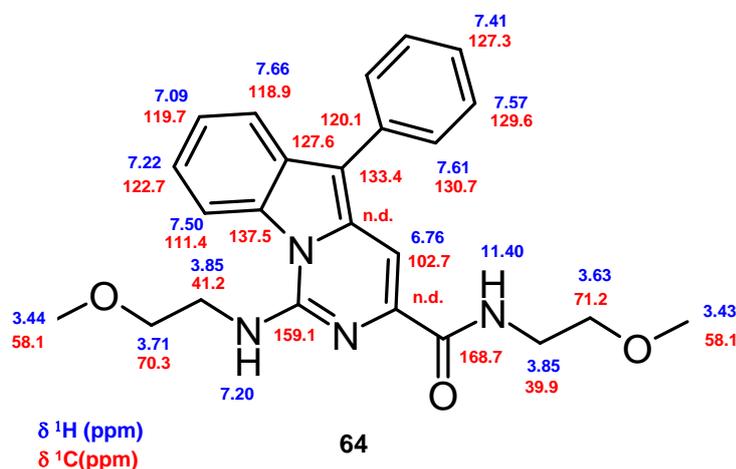


Figura 3.54. Desplazamiento químico (δ , ppm) ^1H , ^{13}C y ^{15}N de **64**.

El espectro de ^1H (700 MHz, acetona- d_6 , 25°C) muestra un singlete a 11.40 ppm, posiblemente debido a un NH amídico, y señales que integran por 11H entre 6.6 y 7.6 ppm. Entre estas señales, un singlete ancho a 7.20 ppm, que correlaciona con un multiplete a 3.85 ppm y se atribuye a un NH amínico. El resto de las mencionadas señales se identifican en base a experimentos 1D TOCSY. Cuatro señales a 7.66 ppm (d, 1H), 7.50 ppm (d, 1H), 7.22 ppm (t, 1H) y 7.09 ppm (t, 1H) forman un sistema de spin y se atribuyen a los cuatro hidrógenos de un benceno fusionado. Otras tres señales a 7.61 ppm (d, 2H), 7.57 ppm (t, 2H) y 7.41 ppm (t, 1H) constituyen otro sistema de spin, y se atribuyen respectivamente a los protones *orto*, *meta* y *para* de un grupo fenilo. Por último, un singlete a 6.76 ppm (1H) constituye un sistema de spin en sí mismo. En la zona alifática, un multiplete a 3.85 ppm (4H), que correlaciona con sendas señales de ^{13}C a 39.9 y 41.2 ppm se asocia a dos grupos CH_2 unidos a sendos átomos de nitrógeno. Dos tripletes a 3.71 y 3.63 ppm (cada uno 2H), que correlacionan con señales de ^{13}C a 70.3 y 71.2 ppm, se asignan a grupos CH_2 unidos a átomos de oxígeno. Finalmente, dos singletes agudos a 3.43 y 3.44 ppm (cada uno 3H) se consideran originados por dos grupos metoxi. Las señales de ^1H en la zona alifática indican que realmente se han incorporado dos equivalentes de 2-metoxietil amina.

El resto de señales de ^1H y ^{13}C , junto con experimentos 1D NOESY, en el que una radiación selectiva a 6.76 ppm presentó una interacción NOE con los protones del fenilo situado en C5 (**Figura 3.55**) corroboraban esta estructura.

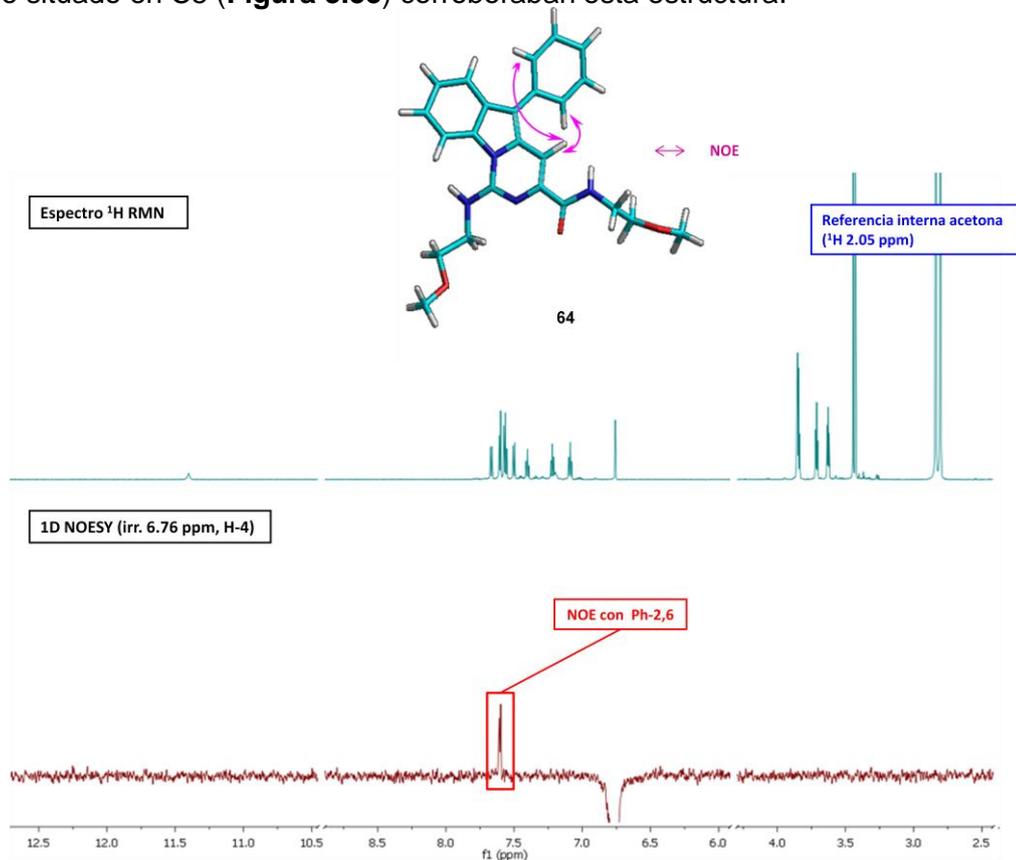


Figura 3.55. Espectros 1D NOESY, Acetona- d_6 , 700 MHz, 25°C de **64**.

Para la determinación estructural del compuesto **65** se siguió el mismo procedimiento. Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C quedan recogidos en la siguiente figura.

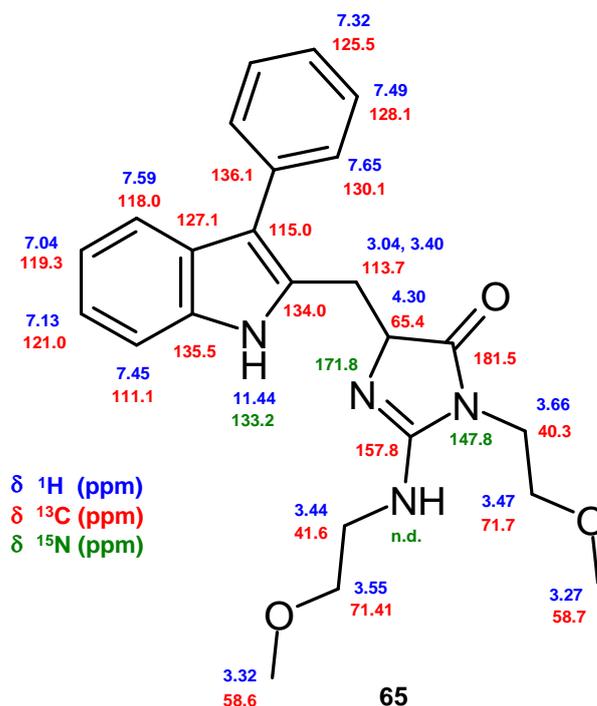


Figura 3.56. Desplazamiento químico (δ , ppm) ^1H , ^{13}C y ^{15}N de **65**.

El espectro de ^1H RMN (700 MHz, acetona- d_6 , 25°C) presenta señales propias de dos restos de 2-metoxietilamina, aunque se observa también un singlete ancho a 10.40 ppm, que correlaciona con una señal de ^{15}N a 133 ppm, lo que indicaría la presencia de un NH de un anillo de 1H-indol. Experimentos 1D TOCSY permitieron identificar dos sistemas de spin, uno constituido por señales a 7.45 (d, 1H), 7.13 (t, 1H), 7.04 (t, 1H) y 7.59 ppm (d, 1H) y a 7.63 (d, 2H), 7.49 (t, 2H) y 7.32 ppm (t, 1H), que se corresponden respectivamente con los cuatro protones del anillo de benceno de un indol y con un sustituyente fenilo.

El aspecto más destacable de esta muestra es otro sistema de spin constituido por un multiplete a 4.30 ppm (1H), y dos dobles dobles a 3.04 y 3.40 ppm (ambos 1H). El experimento HSQCED (700 MHz, acetona- d_6 , 25°C) demostró que las señales a 3.04 y 3.40 ppm se debían a dos hidrógenos geminales unidos a un mismo átomo de carbono a 29.0 ppm, y que la señal a 4.30 se debía a un CH terciario y simétrico (CHCH_2). Experimentos 1D NOESY permitieron concluir que el CH_2 estaba unido a la posición C2 del anillo de 1H-indol.

No obstante, el experimento HSQCED a 25°C no dio correlación alguna con la señal a 4.30 ppm. Por otra parte, el espectro de ^{13}C (acetona- d_6 , 75 MHz, 25°C) daba algunas señales particularmente anchas. De hecho, algunas señales de ^{13}C que cabría esperar (en la zona alifática y en la zona carbonílica) no se veían.

Con la hipótesis de que la excesiva anchura de estas señales se podía deber a una relajación excesivamente rápida de algunos núcleos de ^{13}C , se repitieron los experimentos HSQCED, HMBC y ^{13}C a -20°C para de este modo ralentizar la relajación y conseguir señales de ^{13}C más estrechas. El espectro HSQCED a -20°C (acetona- d_6 , 300 MHz) permitió correlacionar la señal de 1H a 4.30 ppm con una resonancia de ^{13}C a 65.4 ppm. Igualmente, el espectro HMBC (acetona- d_6 , 300 MHz, -20°C) permitió ver claramente dos correlaciones a tres enlaces entre la señal de protón a 3.65 ppm (NCH₂CH₂OMe) con dos señales de ^{13}C a 157.8 y 181.5 ppm. Estas dos resonancias de carbono se asignaron respectivamente a los átomos C2 y C5 de un anillo de 3,5-dihidroimidazol-4-ona. Esta hipótesis se veía apoyada por dos señales de ^{15}N a 147.8 y 171.8 ppm, atribuidas a N3 y N1 de la 3,5-dihidroimidazo-4-ona.

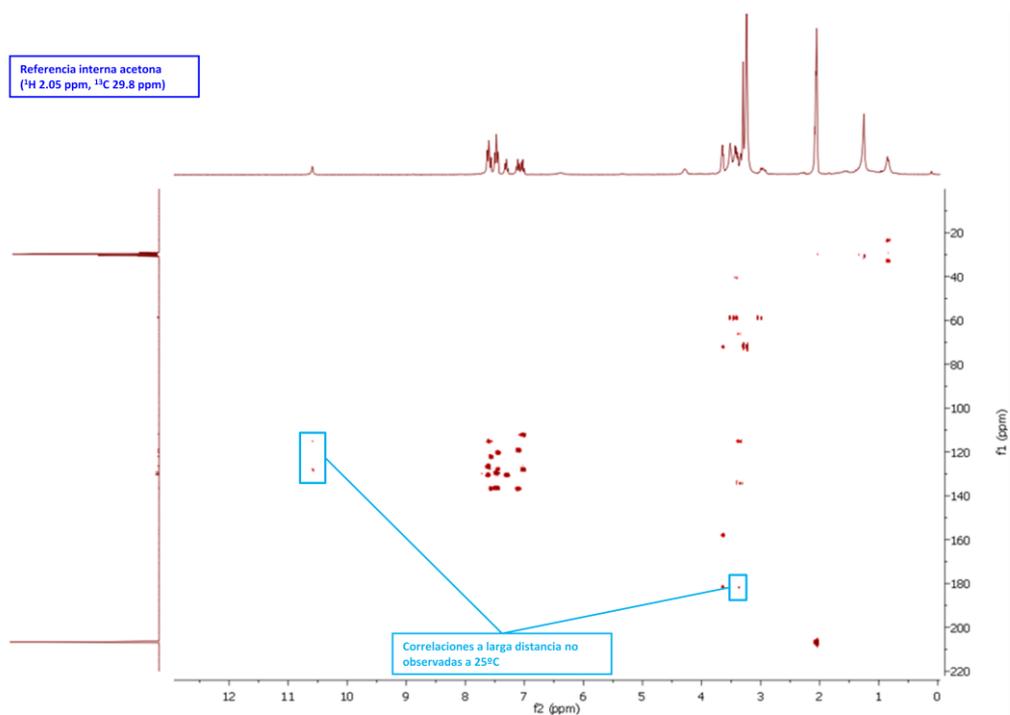


Figura 3.57. Espectro HSQCED, Acetona- d_6 , 300 MHz, -20°C de **65**.

Junto a todo esto se realizaron experimentos 1D NOESY que corroboraron la estructura.

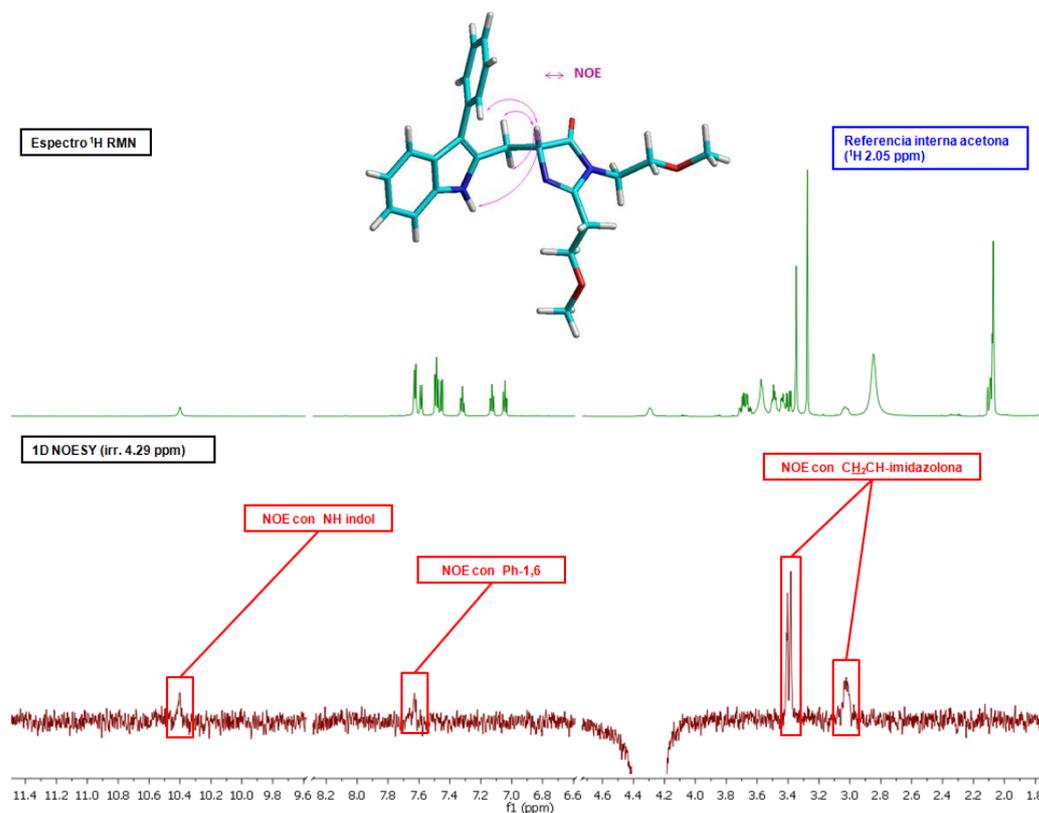
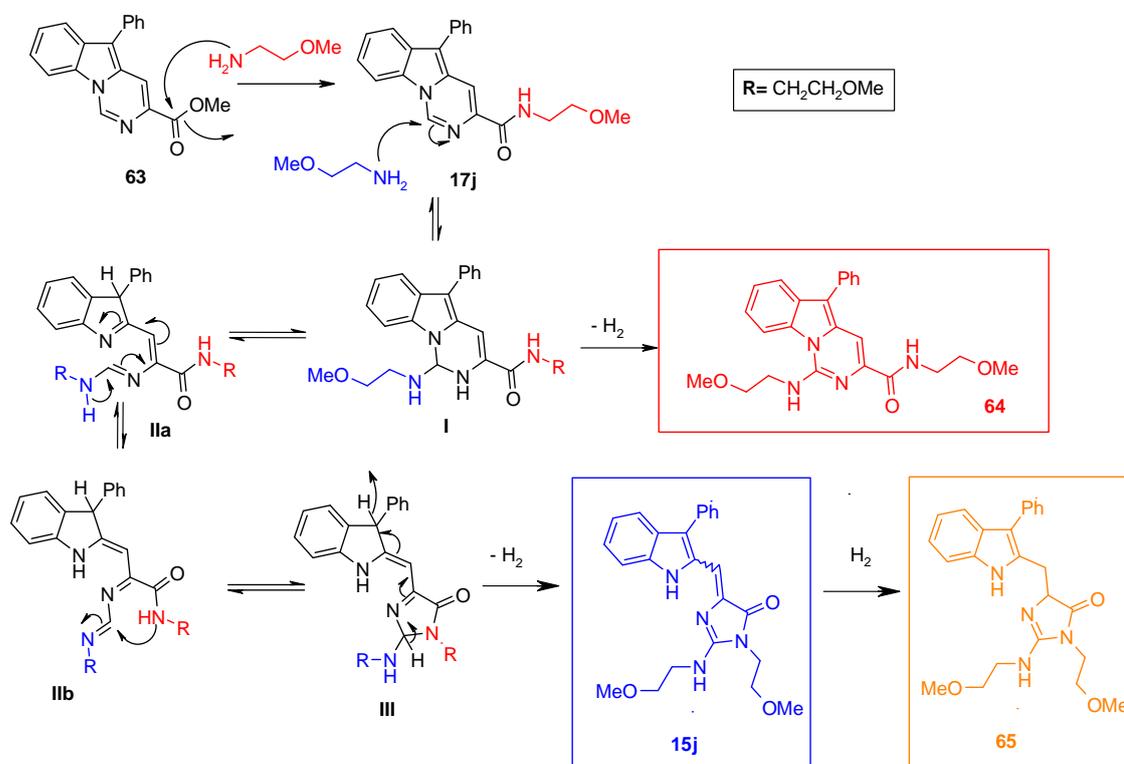


Figura 3.58. Espectros 1D NOESY, Acetona- d_6 , 700 MHz, 25°C de **65**.

La propuesta mecanística para la formación de estos compuestos se muestra en el **Esquema 3.24**. Al igual que ocurría en los casos anteriores, el primer paso supone la formación de la amida **17j** seguido de un ataque de la amina en posición C1. La formación de **15j** implica la formación del intermedio **11b**, el cual evolucionaría hacia la formación de la imidazolona por ataque del nitrógeno amídico sobre el carbono formamidínico y proporcionaría la formación del compuesto **15j**. El hidrógeno generado en la formación de este compuesto y de **64**, reduciría el doble enlace exocíclico de **15j**¹³⁹ dando lugar a la formación del compuesto **65**.

¹³⁹ Kidwai, A. R.; Devasia, G. M. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 4527-31.

Por otro lado se observó la formación del sistema tricíclico **64**, como consecuencia del ataque del nitrógeno indólico sobre el carbono imínico (**IV**) y posterior rearomatización.



Esquema 3.24

De la reacción del sistema tricíclico **63** (con un sustituyente fenilo en C5 en lugar de bromo) con la 2-metoxietilamina se podría concluir que la presencia de bromo podría ser un requisito indispensable para que se produzca la reacción tipo Michael, tanto por un ataque nucleófilo intermolecular de la amina (formación del compuesto **16a**) como por el ataque intramolecular del nitrógeno formamidínico (formación del compuesto **62**). Además, la ausencia de bromo, conllevaría en este caso a la formación de hidrógeno en el medio, el cual actuaría como reductor del doble enlace exocíclico y daría lugar a **65**. Por último, destacar que en este caso se produce la formación del sistema tricíclico **64** el cual no se había observado en los ejemplos

anteriores. La formación de este compuesto prueba el ataque nucleófilo de la amina sobre la posición C1 como paso previo a la apertura del anillo de pirimidina.

3.5. BÚSQUEDA DE RUTAS SINTÉTICAS ALTERNATIVAS

Como ya se ha indicado, el derivado de azaindol **14a** resultó ser el compuesto más activo de todos los sintetizados por lo que éste se tomó como cabeza de serie (*hit*) sobre el que realizar el estudio de relación estructura actividad (SAR). La limitación de la reacción de azolopirimidinas con aminas y su restricción a los derivados tricíclicos de indolopirimidina y piridopirrolopirimidina, unido al hecho de que los productos activos de la reacción aparecen acompañados de compuestos inactivos con la consiguiente limitación del rendimiento, nos llevó a estudiar una ruta sintética alternativa para **14a** que, además, pudiese ser aplicable para generar la diversidad estructural que exigía el SAR. Los posibles dominios de modificación sobre **14a** que se propusieron fueron los que se indican en la **Figura 3.59**.

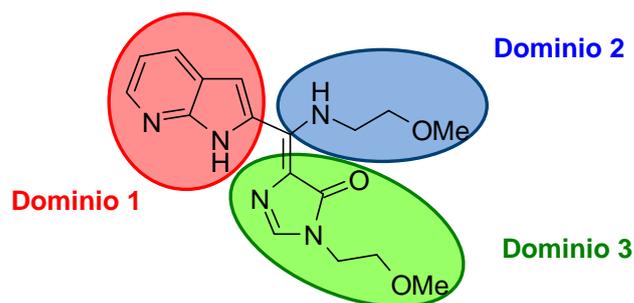


Figura 3.59

En la búsqueda bibliográfica, se encontró que los cromóforos de la proteína verde fluorescente (GFP),¹⁴⁰ tenían rasgos estructurales similares al compuesto **14a** ya que ambos comparten un sistema de imidazolona a través de un puente metilénico. En realidad estos cromóforos son más similares a los compuestos **15a/61** aunque estos resultaron inactivos.

¹⁴⁰ a) Dong, J.; Solntsev, K. M.; Tolbert, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 662-670. b) Wei-Ti, C.; Cheng-Chi, H.; Chin-Hung, L.; Cheng-Hsuan, L.; Chun-Wei, S.; Kew-Yu, C.; Wen-Yi, H.; Yu-Hsiang, H.; Pi-Tai, C. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8189-8202.

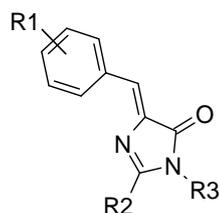
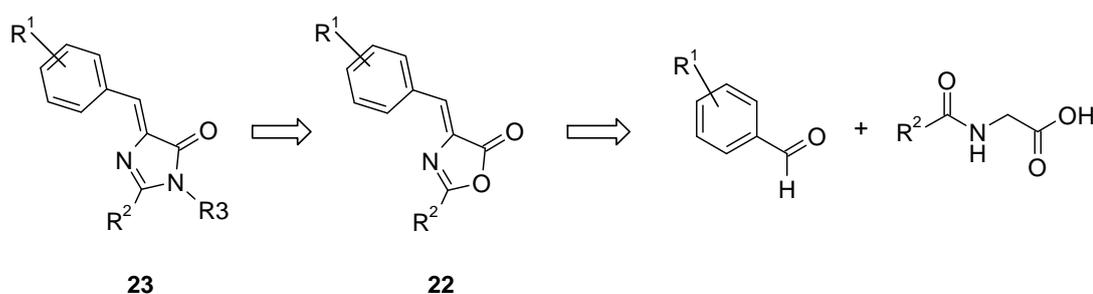


Figura 3.60. Cromóforos de la proteína verde fluorescente.

Estos cromóforos están descritos en la bibliografía empleando una ruta sintética¹⁴¹ cuya retrosíntesis se indica en el **Esquema 3.25**. La síntesis es sencilla e implica la condensación de un aldehído aromático con un aminoácido sustituido para formar una oxazolona que, por reacción con una amina primaria, sufre un proceso de apertura y reciclación para formar la imidazolona.



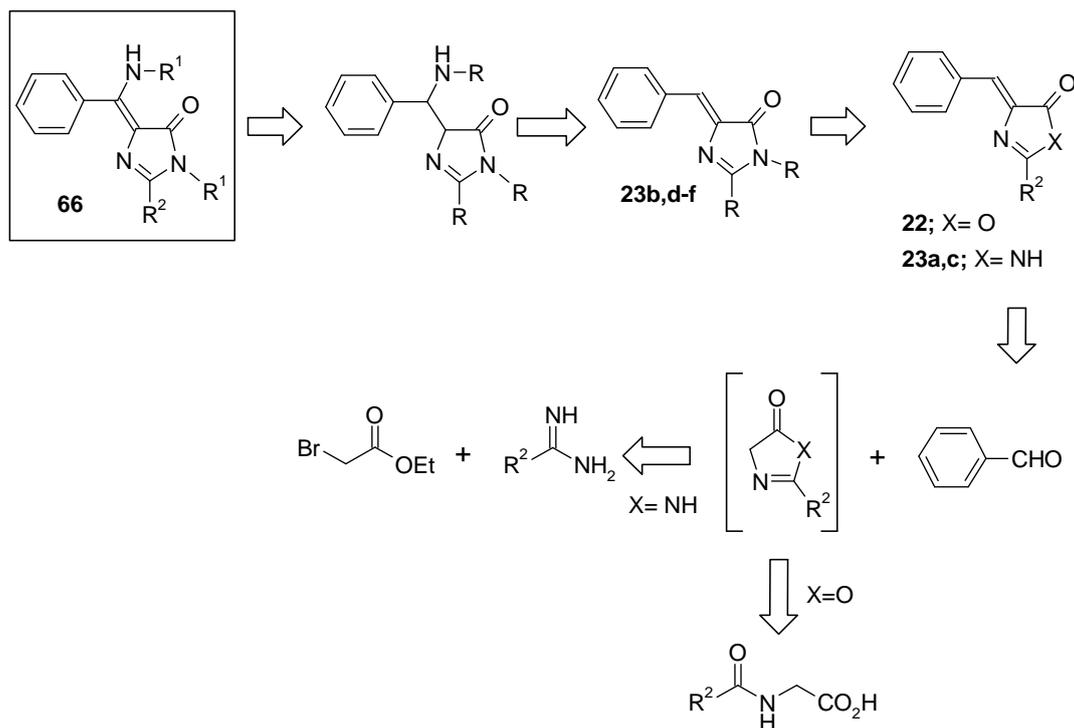
Esquema 3.25

Tomando como modelo esta síntesis, se inició el estudio sintético de **14a** y sus análogos comenzando por el sistema más sencillo que consistía en reemplazar en **14a** el anillo de azaindol por un benceno y obtener los derivados **66**. En el **Esquema 3.26** se detallan las posibles retrosíntesis de dicho compuesto.

¹⁴¹ a) Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Gomes, M., Jr.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F. *Amino Acids* **2010**, *38*, 701-709. b) Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.-F.; Pommery, N.; Pommery, J.; Henichart, J.-P.; Cotelle, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1222-1229.

3.5.1. Ruta a

En esta primera ruta sintética se aprovecharía la metodología descrita para los compuestos **22** y **23**.¹⁴¹ Se ensayarían reacciones aza-Michael sobre los compuestos **23a,c** y una posterior transformación generaría el tipo de compuestos que se estaban buscando. La ruta retrosintética que se ensayó, fue la que se muestra en la **Esquema 3.27**.



Esquema 3.27

¹⁴¹ a) Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Gomes, M., Jr.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F. *Amino Acids* **2010**, *38*, 701-709. b) Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.-F.; Pommery, N.; Pommery, J.; Henichart, J.-P.; Cotelle, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1222-1229.

3.5.1.1. Síntesis de bencilidenoxazolonas 22

Para la síntesis de estas bencilidenoxazolonas **22**, se emplearon las mismas condiciones descritas en la bibliografía,¹⁴¹ basadas en la reacción de acetilglicina **67** ($R^2=CH_3$) o ácido hipúrico **67** ($R^2=Ph$) con diferentes aldehídos aromáticos en presencia de acetato de sodio y anhídrido acético. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la siguiente tabla. Se realizaron ensayos con acetilglicina (entrada 1 y 2) y benzaldehído (entrada 1 y 3) o 4-hidroxibenzaldehído (entrada 2), obteniéndose los derivados **22a-c** con rendimientos moderados. Sin embargo, los intentos de reacción con formilglicina (**67**, $R^2=H$) no suministraron el correspondiente derivado **22d** en ninguno de los casos ensayados (**Tabla 3.15**, entrada 4) debido a que la oxazolona intermedia resultó ser inestable.

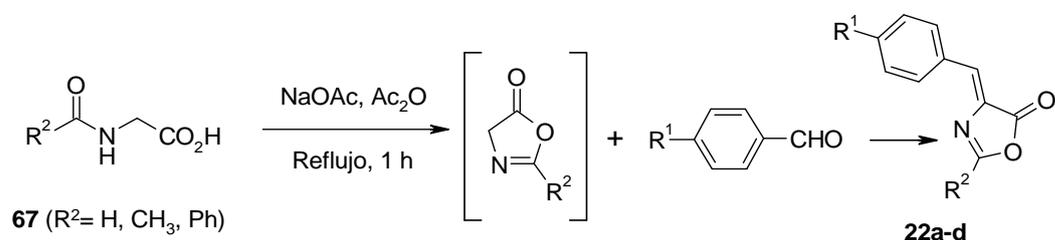


Tabla 3.15. Síntesis de bencilidenoxazolonas **22a-d**.

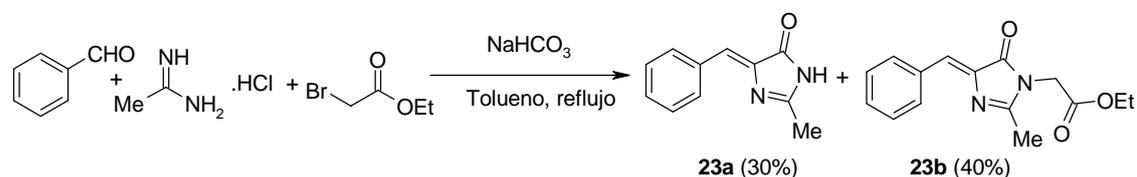
Entrada	Compuesto	R ¹	R ²	Rdto (%)
1	22a	H	Me	55
2	22b	CH ₃ COO ^{-a}	Me	40
3	22c	H	Ph	40
4	22d	H	H	---

^a Se produce acilación en el curso de la reacción

¹⁴¹ a) Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Gomes, M., Jr.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F. *Amino Acids* **2010**, 38, 701-709. b) Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.-F.; Pommeroy, N.; Pommeroy, J.; Henichart, J.-P.; Cotellet, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 1222-1229.

3.5.1.2. Síntesis de bencilidenimidazolonas 23

Esta síntesis se fundamenta en una reacción multicomponente de bromoacetato de etilo con distintas amidinas y benzaldehído en presencia de bicarbonato de sodio. En el esquema siguiente se describe la síntesis de los compuestos **23a** y **23b** en presencia de acetamidina. Aunque en el ejemplo encontrado en la bibliografía se utilizaba *n*-propanol¹⁴² como disolvente, cuando se repitieron esas condiciones se obtuvieron algunos productos secundarios, resultantes de la reacción con el disolvente, y por ello se reemplazó *n*-propanol por tolueno. La formación de **23b** no se pudo evitar y se produce por reacción de la imidazolona **23a** con otra molécula de bromoacetato de etilo, o bien por reacción de la acetamidina con dos equivalentes de bromoacetato de etilo.

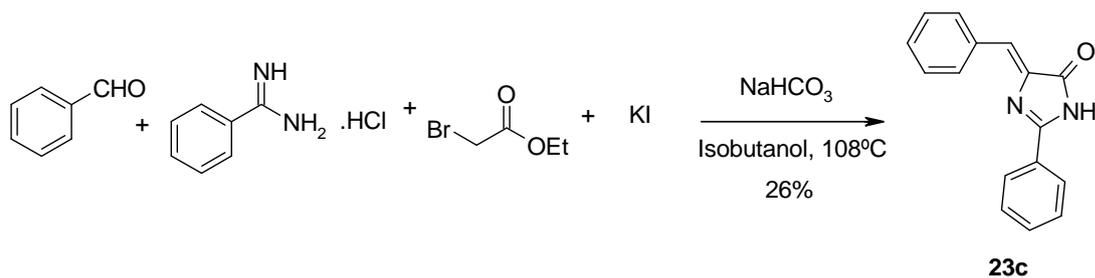


Esquema 3.28

En el **Esquema 3.29** se muestra la reacción del benzaldehído con la benzaminida.¹⁴³ En este caso se adiciona yoduro potásico para producir un intercambio del bromo por yodo en el bromoacetato de etilo y así hacerlo más reactivo. En estas condiciones no se observó la formación del producto resultante de la adición de otra molécula de bromoacetato de etilo. Al igual que en el caso de las oxazolonas, todos los intentos que se hicieron con la formaminida resultaron infructuosos.

¹⁴² Dalla Croce, P.; La Rosa, C. J. *Chem. Research*. **1985**, *11*, 360-361.

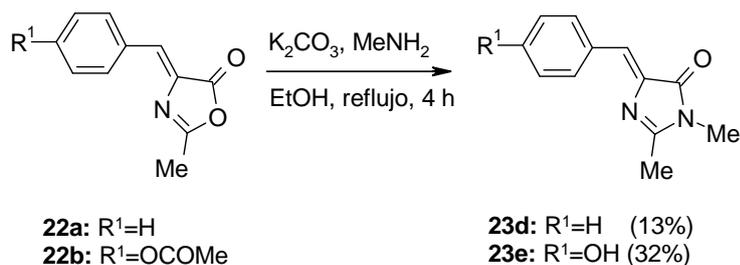
¹⁴³ Shafi, P. M. *Current Science*. **1985**, *54*, 1231-1232.



Esquema 3.29

3.5.1.3. Reacción de oxazolonas **22** e imidazolona **23a** con aminas

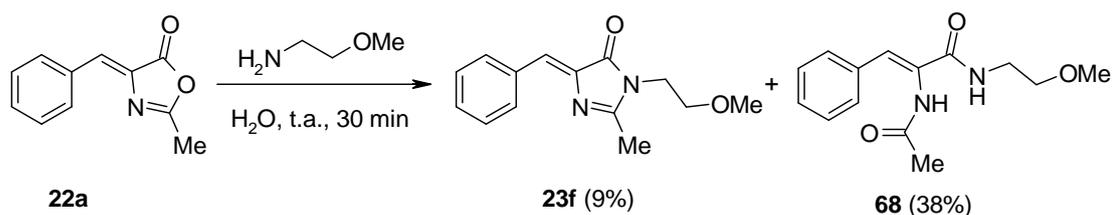
Para la obtención de los compuestos **23d-f** se hicieron reaccionar las oxazolonas **22a,b** con diferentes aminas.¹⁴⁴ La reacción de **22a,b** con metilamina condujo a las imidazolonas **23d,e**, aunque con bajos rendimientos (**Esquema 3.30**).



Esquema 3.30

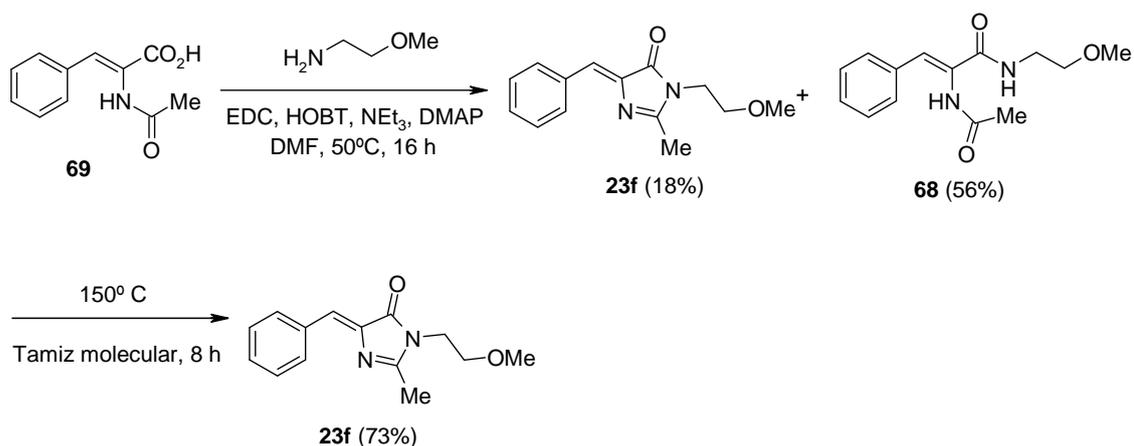
Sin embargo, los intentos para obtener **23f** partiendo de la oxazolona **22a** y utilizando 2-metoxietilamina no suministraron buenos resultados, ni en las condiciones que las que se obtienen **23d,e** (K_2CO_3 , EtOH) ni ensayando otro tipo de disolventes tales como el agua, en que el producto **23f** se obtiene únicamente con un 9% de rendimiento, aislándose adicionalmente el derivado **68** con un 38% de rendimiento (**Esquema 3.31**)

¹⁴⁴ He, X.; Bell, A. F.; Tonge, P. J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1523-1526.



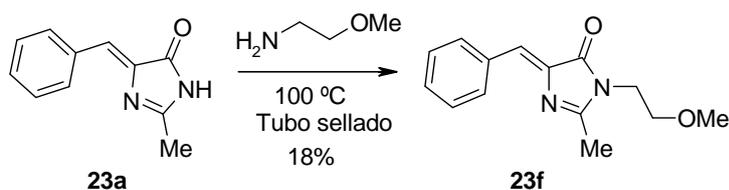
Esquema 3.31

Como alternativa se partió del ácido α -acetamidocinámico comercial (**69**), al que se le acopló la amina usando como reactivos 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), trietilamina y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), en DMF a 50 °C. A la mezcla de reacción obtenida [una mezcla **23f/68** (1:3)] se le añadió tamiz molecular y se calentó durante 8 horas a 150 °C, lo que permitió la ciclación de **68** y la formación de **23f** con buen rendimiento (73%).



Esquema 3.32

También se ensayó la reacción de la bencilidenimidazolona **23a** con 2-metoxietilamina en tubo cerrado a 100 °C. La reacción generó **23f**, aunque con un bajo rendimiento (18%) (**Esquema 3.33**).



Esquema 3.33

3.5.1.4. Reacciones de aza-Michael

El siguiente paso era ensayar que las bencilidenimidazolonas **23** se podían comportar como sustratos de Michael frente aminas primarias. En las primeras pruebas que se realizaron se ensayó la reacción de **23d,f** con la 2-metoxietilamina a reflujo, pero no se obtuvo el derivado esperado en ninguno de los casos ensayados (Tabla 3.16).

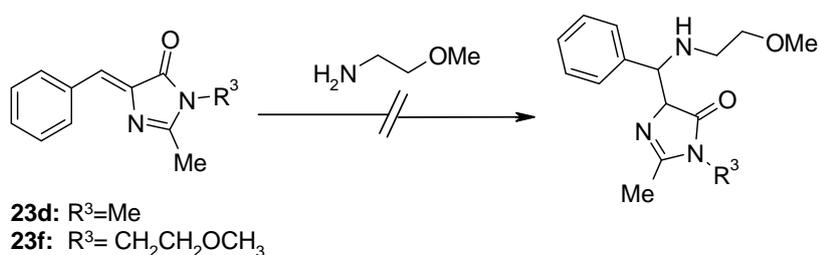
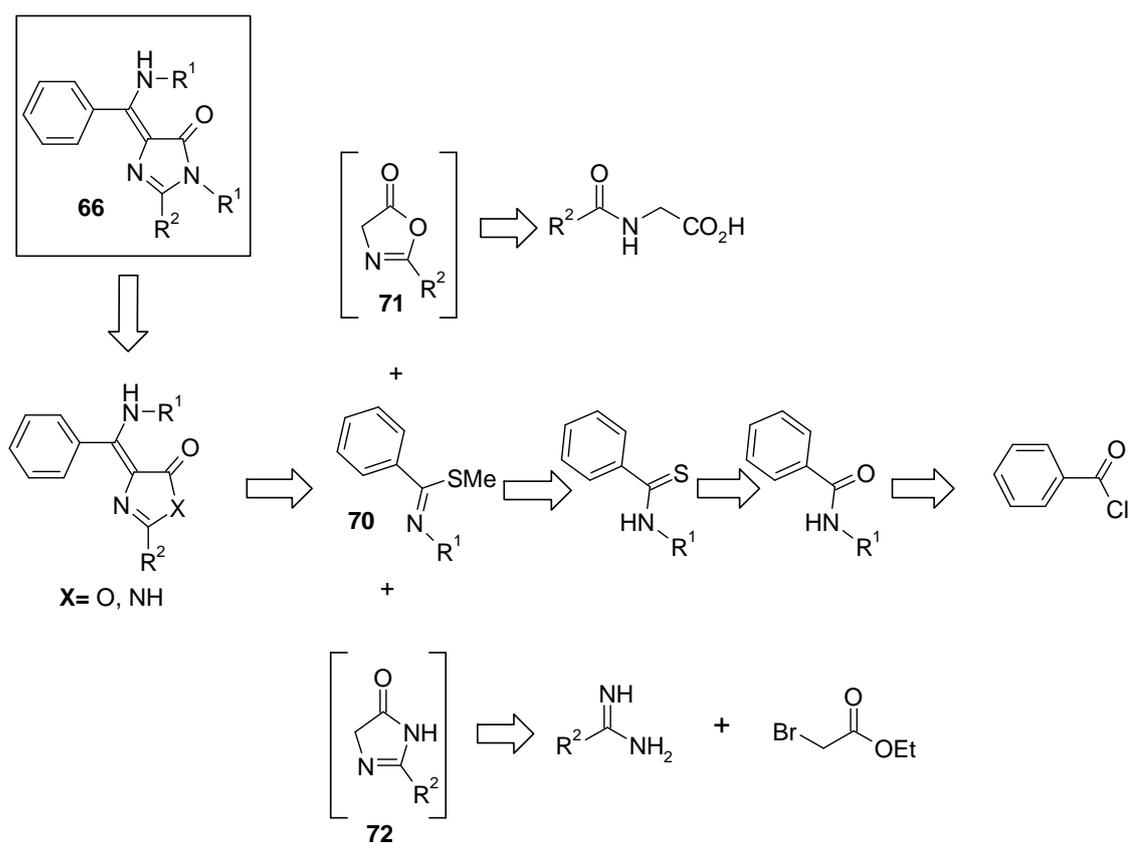


Tabla 3.16. Reacción de bencilidenimidazolonas **23d** y **23f** con 2-metoxietilamina.

Entrada	Compuesto	R ³	Temperatura	Disolvente	Catalizador
1	23d	Me	reflujo	----	----
2	23d	Me	reflujo/ tubo sellado	----	----
3	23d	Me	reflujo	----	NH ₄ Cl
4	23f	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	reflujo	----	----
5	23f	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	reflujo/ tubo sellado	----	----
6	23f	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	reflujo	----	NH ₄ Cl
7	23f	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	t.a	agua	C ₁₆ H ₃₃ N ⁺ Me ₃ .Br ⁻

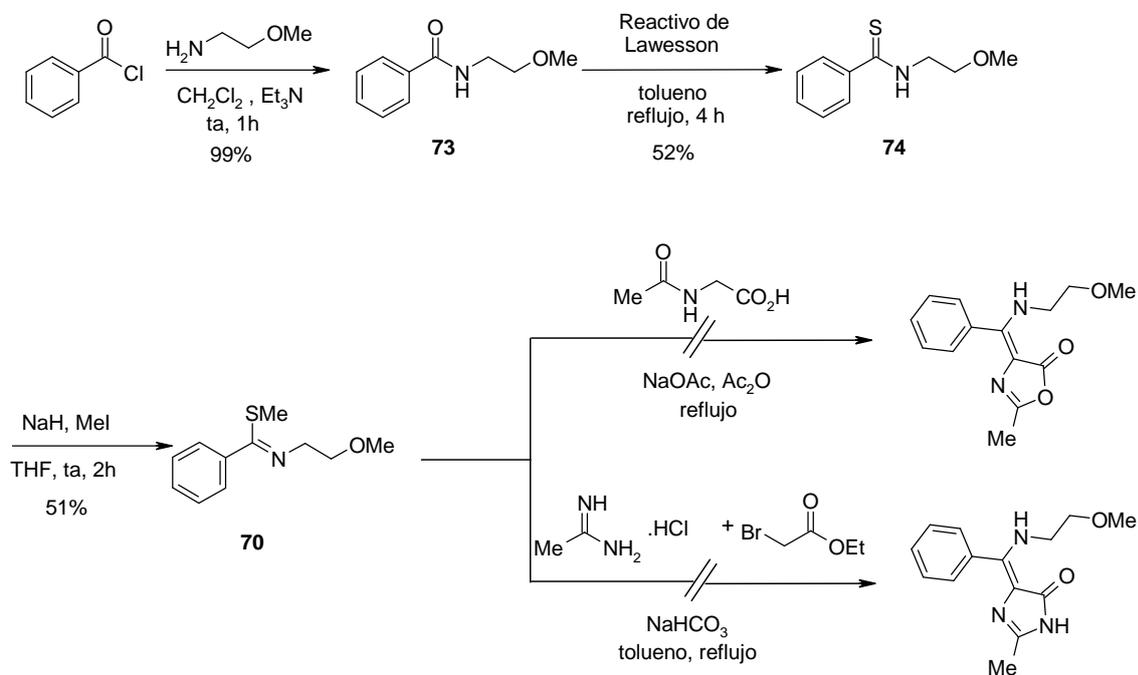
3.5.2. Ruta b

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al ensayar la **ruta a**, se abordó una síntesis en la que el intermedio clave era un tiobencimidato de metilo (**70**) que debería reaccionar con la correspondiente oxazolona o imidazolona **71** o **72** generadas *in situ* para proporcionar el intermedio precursor del compuesto buscado.



Esquema 3.34

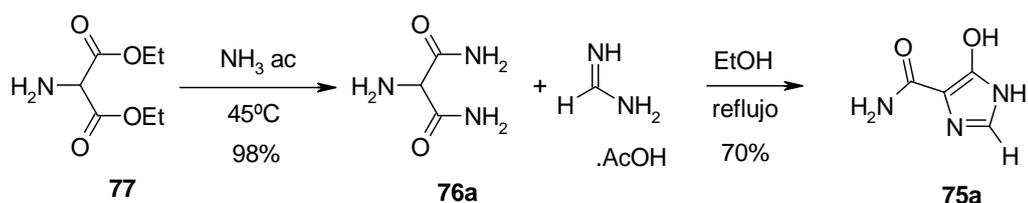
La síntesis del tiobencimidato **70** se llevó a cabo según se muestra en el esquema siguiente y se consiguió con rendimientos moderados partiendo del cloruro de benzoilo, al que se le añadió lentamente la 2-metoxietilamina para formar la amida **73** con rendimientos casi cuantitativos. Seguidamente, el tratamiento de **73** con el reactivo de Lawesson condujo a la tioamida **74** con un rendimiento del 52%. Cuando ésta se trató con hidruro sódico y yoduro de metilo, se obtuvo **70** con un rendimiento del 51%. El paso siguiente, la reacción de **70** en presencia bien de acetilglicina o bien de clorhidrato de acetamida y bromoacetato de etilo en las condiciones descritas, no generó en ningún caso la oxazolona o la imidazolona esperada, aislándose el producto de partida **70** inalterado.



Esquema 3.35

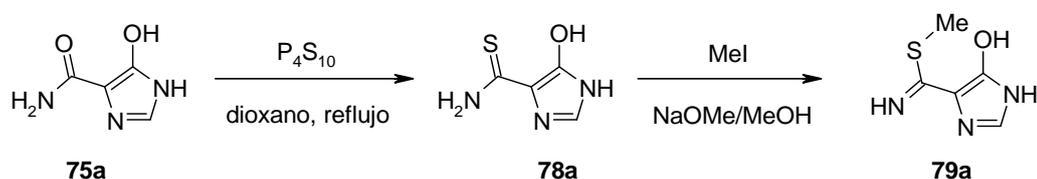
3.5.3. Ruta c

Esta ruta se inspira en una patente coreana reciente¹⁴⁵ que describe la síntesis del hidroximidazol **75a** a partir de formamidina y de aminomalonamida **76a**, fácilmente accesible a partir del aminomalonato de etilo (**77**). Este compuesto parecía de interés para nuestro objetivo puesto que se trata de un precursor del sistema de imidazolona y, además, posibilitaba la preparación del anillo de imidazolona sin sustituyentes en C2, una posibilidad más complicada en las alternativas **a** y **b**.



Esquema 3.36

Además, también se había descrito anteriormente¹⁴⁶ la formación de la tioamida **78a** a partir de la amida **75a** en presencia de P_4S_{10} y su posterior transformación en la correspondiente tiobencimidato (**79a**) con metóxido sódico y yoduro de metilo como se muestra en el **Esquema 3.37**.

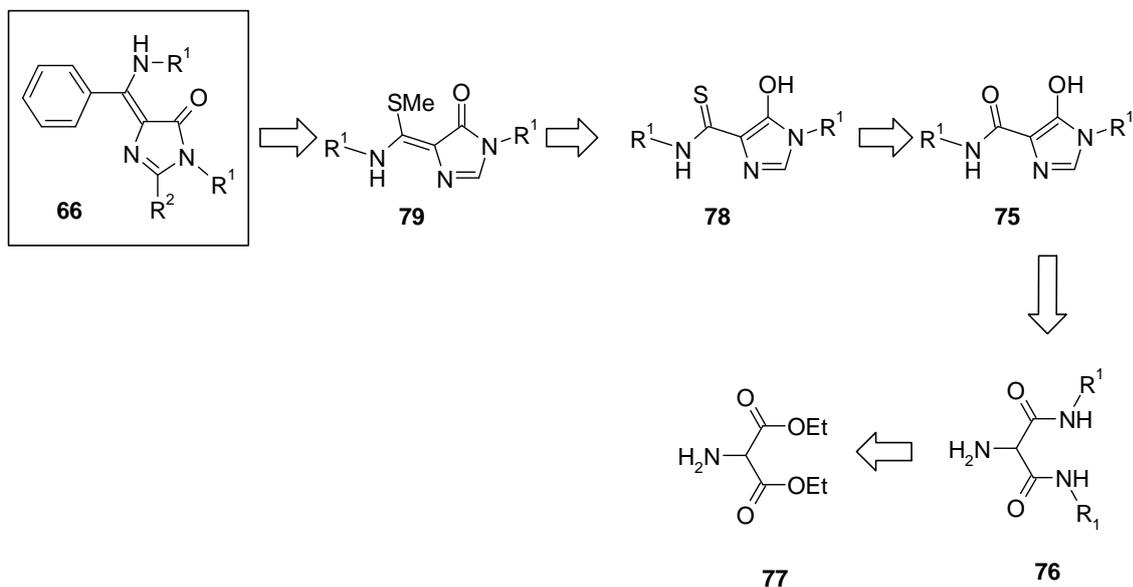


Esquema 3.37

Con estos antecedentes se planteó el siguiente esquema retrosintético, en el que la introducción del fenilo o de un sistema heterocíclico tendría lugar en el último paso.

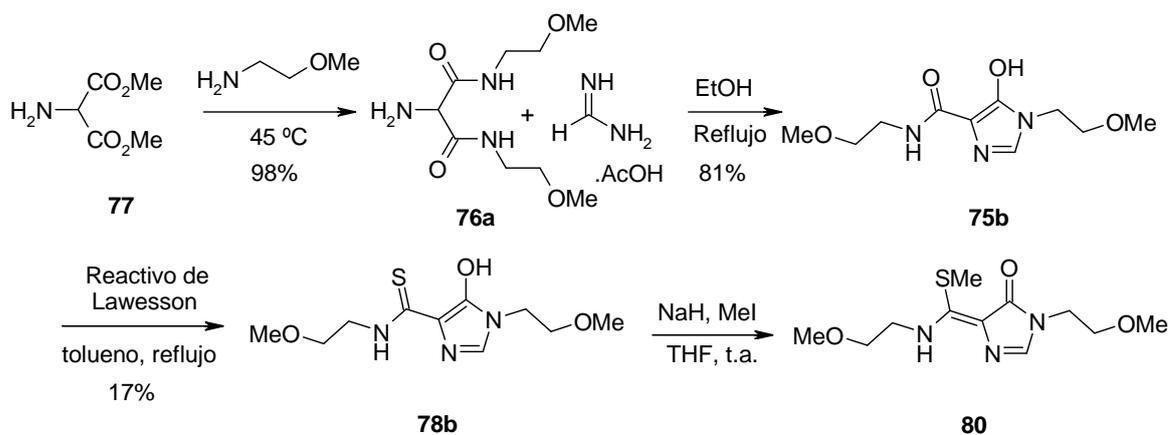
¹⁴⁵ Kim, J. W.; Park, H. H.; Cha, Y. G.; Seo, I. T.; Jeon, T. H.; Jang, J. S.; Kim, S. H.; Yoo, H. C. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* **2009**, KR 2009085445 A 20090807.

¹⁴⁶ Bakulev, V. A.; Mokrushin, V. S.; Grishakov, A. N.; Pushkareva, Z. V. *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii* **1982**, 957-962.



Esquema 3.38

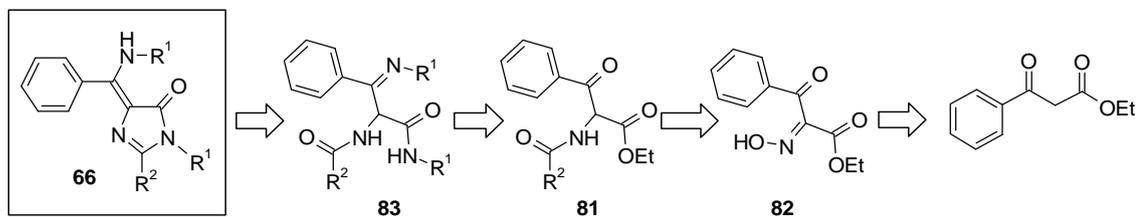
La ruta se inició adaptando el procedimiento descrito para la síntesis de **75a** para preparar con buen rendimiento el imidazol **75b** a partir de la 2-metoxietilamina y el aminomalonato de dietilo (**77**). Así, la reacción de **77** con 2-metoxietilamina a 45 °C proporcionó el derivado **76b** con un rendimiento del 98%. Su reacción con acetato de formamidina proporcionó el hidroximidazol deseado **75b** con un rendimiento del 81%, por calentamiento en etanol a reflujo. Sin embargo, el tratamiento de **75b** con el reactivo de Lawesson proporcionó **78b** con rendimientos muy bajos (17% en el mejor de los casos ensayados), siendo el principal problema de la reacción la poca reproducibilidad de la misma. Aunque el siguiente paso sí se consiguió, aislándose **80**, las dificultades en la reacción anterior nos llevaron a abandonar esta estrategia y abordar la estrategia que se detalla en el **Esquema 3.40**.



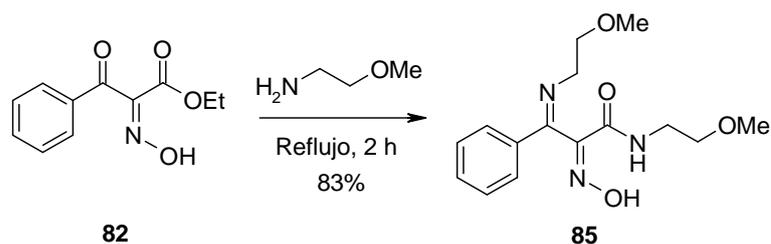
Esquema 3.39

3.5.4. Ruta d

La retrosíntesis de esta ruta se muestra en el siguiente esquema. Esta ruta se basa en la fácil accesibilidad al compuesto **81**, un derivado que puede obtenerse a partir de la oxima **82** a su vez fácilmente accesible a partir del derivado comercial benzoilacetato de etilo. La transformación de **81** en **83** y su ciclación podría proporcionar el derivado buscado.



Esquema 3.40



Esquema 3.43

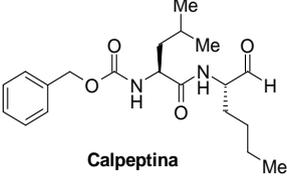
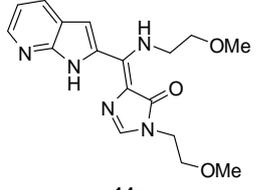
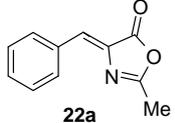
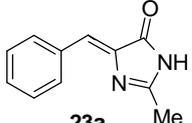
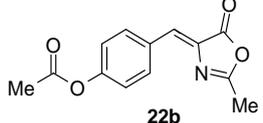
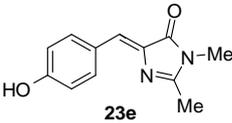
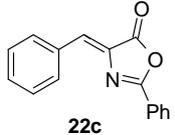
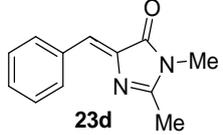
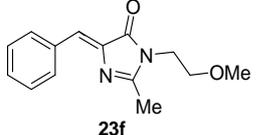
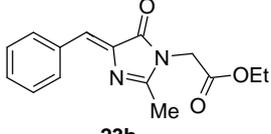
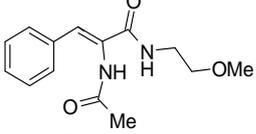
Sin embargo la reducción selectiva de la oxima **85** resultó imposible en presencia de la imina, por lo que la preparación de **83** no pudo completarse y esta ruta también resultó fallida para acceder al objetivo sintético buscado, el cual, como ya se ha explicado tampoco resultó accesible por las estrategias **a-c**.

En este estadio se decidió proceder a determinar la actividad inhibitoria de calpaína de los intermedios obtenidos al ensayar las estrategias **a-d** comentadas.

3.5.5. Ensayos de inhibición de calpaína para los compuestos **22**, **23** y **68**

Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que en los casos anteriores. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.17** en la que puede observarse que las oxazolonas **22** y las imidazolonas **23** resultaron activas a pesar de que dichos compuestos presentan una estructura mucho más sencilla que el cabeza de serie **14a**. Merece destacar la actividad encontrada para los compuestos **23d** y **23f** los cuales presentan en los tres casos analizados un porcentaje de inhibición superior al 82%. Además, se vuelve a probar que la 2-metoxietilamina produce una mejora de la actividad cuando se compara con otras aminas (**23d** vs **23f**)

Tabla 3.17. Porcentajes de inhibición de calpaína de los compuestos **22**, **23** y **68**.

Compuesto	Inh. (%)	Compuesto	Inh. (%)
 Calpeptina	100	 14a	99.4
 22a	17	 23a	66.7
 22b	69.2	 23e	89.4
 22c	16.8	 23c	0
 23d	82.4	 23f	86.8
 23b	28.7	 68	0

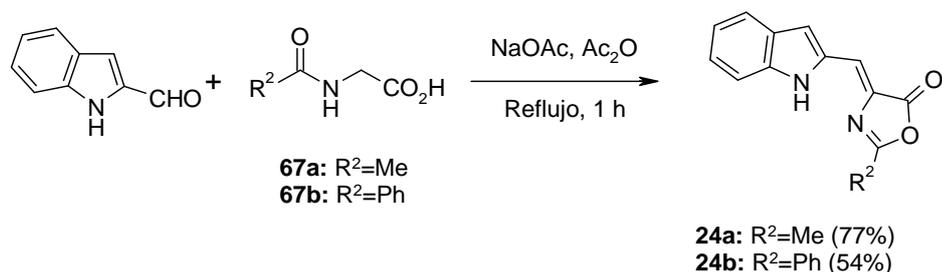
Estos buenos resultados de actividad reorientaron la búsqueda hacia análogos de la serie **23**, planteándonos en primer lugar la modificación del sistema arílico en la serie **23** por otros heterociclos, principalmente indol y azaindol.

3.6. OBTENCIÓN DE POSIBLES INHIBIDORES DE CALPAÍNA POR RUTAS ALTERNATIVAS

3.6.1. Derivados de indol

3.6.1.1. Síntesis de indolmetileno oxazonas

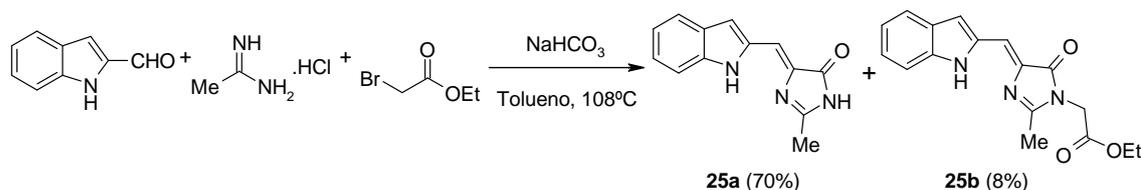
Al igual que para la síntesis de los derivados **22**, el indol-2-carboxaldehído se hizo reaccionar con la acetilglicina y ácido hipúrico (**67**) para obtener los derivados **24a,b**.



Esquema 3.44

3.6.1.2 Síntesis de indolmetilenoimidazonas

Las primeras pruebas que se realizaron para la síntesis de estos compuestos empleaban las mismas condiciones utilizadas para los derivados **23**. Así se obtuvo una mezcla de los compuestos **25a** y **25b** el primero de los cuales se obtenía con buen rendimiento (70%) y el segundo aparecía como un producto secundario con un 8% de rendimiento.



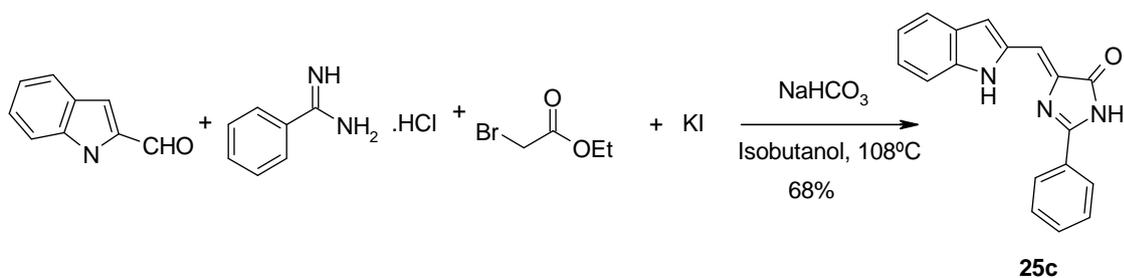
Esquema 3.45

Sin embargo la reacción era poco reproducible y no se podía escalar a más de un milimol del producto de partida. Se realizaron diversas pruebas para conseguir unas condiciones mejores (**Tabla 3.18**) ensayando distintos tiempos, temperaturas y disolventes. Al utilizar dioxano como disolvente fue cuando se consiguieron unas condiciones más reproducibles, aunque el rendimiento de **25a** era más bajo.

Tabla 3.18. Reacción de indol-2-carbaldehído con acetaminida y bromoacetato de etilo.

Entrada	Disolvente	Temperatura	Tiempo	Rdto (%) 25a	Rdto (%) 25b
1	Tolueno	115 °C	1 h	45	8
2	Tolueno	115 °C	4 h	30	7
3	Tolueno	115 °C	8 h	10	7
4	Tolueno	120 °C	1 h	15	15
5	Tolueno	108 °C	1 h	70	8
6	DMSO	108 °C	1 h	10	8
7	DMF	108 °C	1 h	---	---
8	Dioxano	108 °C	1 h	51	23

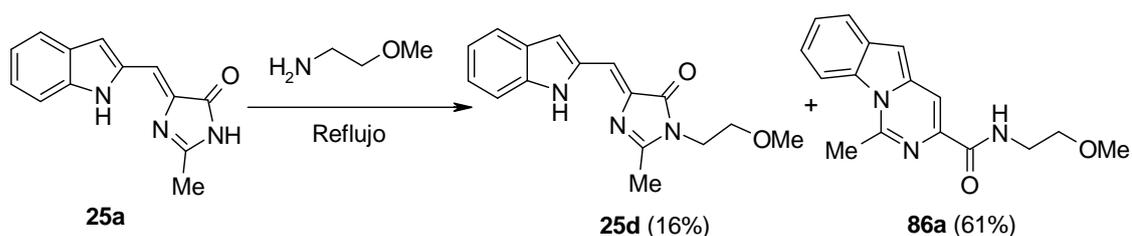
La reacción con el clorhidrato de la benzaminida con el correspondiente aldehído y bromoacetato de etilo, utilizando yoduro potásico e isobutanol como disolvente, condujo a la obtención del compuesto **25c** con un 68% de rendimiento.



Esquema 3.46

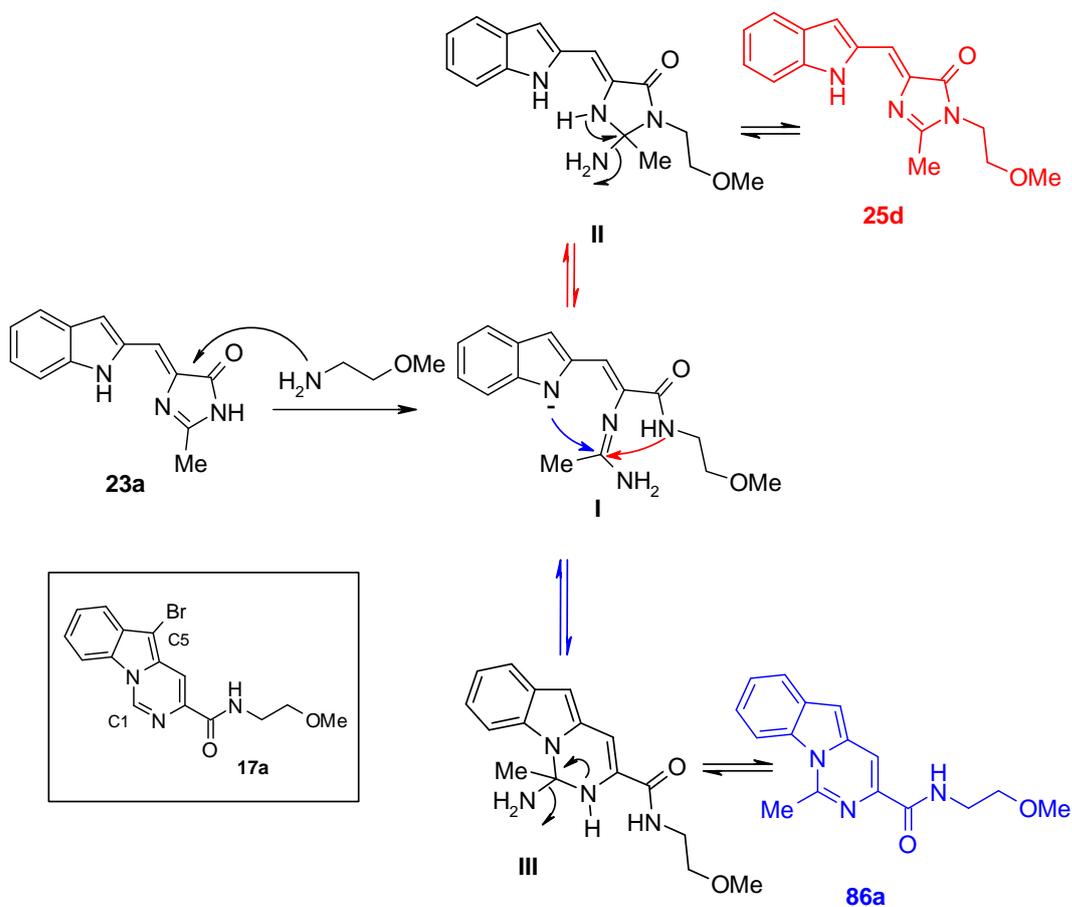
3.6.1.3. Reacción de indolmetilenimidazolonas con 2-metoxietilamina

La reacción de **25a** con 2-metoxietilamina se intentó con el objetivo de preparar la imidazolona **25d**, un análogo del derivado **23f**, el cual, como ya se ha mostrado presenta una elevada actividad inhibitoria (86.8% de inhibición). El derivado **25d** se obtuvo aunque con bajo rendimiento (16%), aislándose como producto mayoritario la amida tricíclica **86a**.



Esquema 3.47

Mientras que la formación de **25d** se explica a través del mecanismo habitual de apertura del anillo de imidazolona y reciclación con pérdida de amoníaco, la formación de **86a** implicaría un mecanismo como el detallado en el **Esquema 3.48**. En éste el ataque del nitrógeno indólico sobre el carbono del resto acetamídínico en el intermedio **I** generaría el anillo de pirimidina previa eliminación de una molécula de amoníaco.

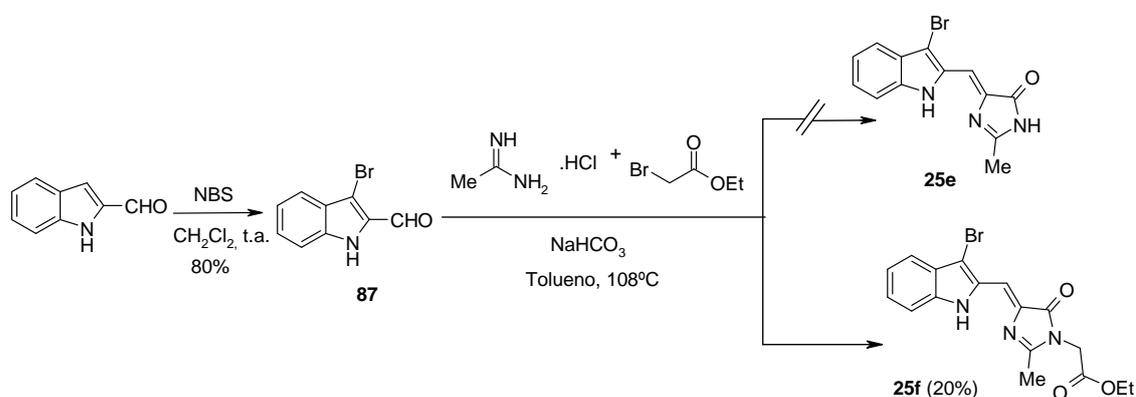


Esquema 3.48

La amida tricíclica **86a** presenta una estructura muy similar a la amida **17a**, con la diferencia que en esta última la posición C1 no está sustituida y presenta, además, un bromo en la posición C5.

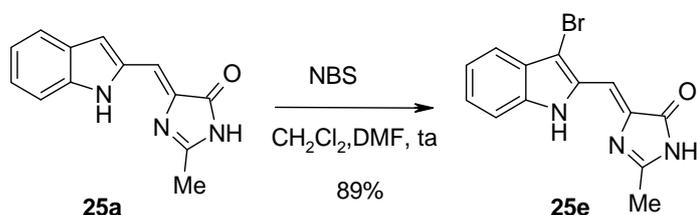
Como la amida **17a** es el compuesto precursor de los derivados indólicos **16**, entre los que se encuentran los compuestos más activos de todos los sintetizados, parecía evidente estudiar la formación de la amida tricíclica sustituida con bromo en C5 a partir de la correspondiente imidazolona **25a** o del 3-bromo-2-indolcarbaldehído (**87**).

Primeramente se bromó con NBS el indol-2-carboxaldehído en C3 para obtener **87** y a continuación se intentó la reacción con la acetamida y el bromoacetato de etilo. Sin embargo, en estas condiciones, no se obtuvo el producto que se buscaba (**25e**), formándose el compuesto **25f** con un 20% de rendimiento.



Esquema 3.49

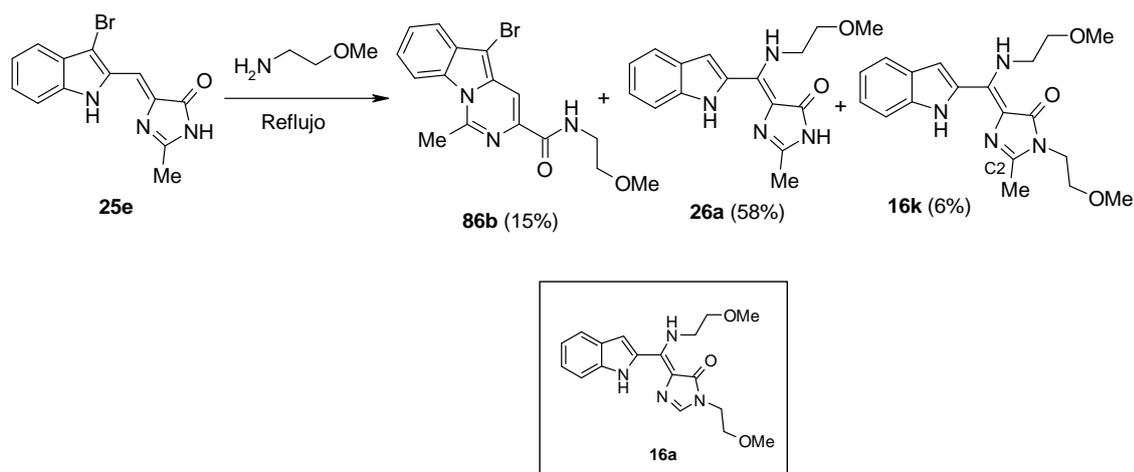
Además, en la reacción se formaban otros productos secundarios por lo que se optó por bromar directamente **25a** con NBS, lográndose así la síntesis de **25e** con buen rendimiento (89%).



Esquema 3.50

La reacción de **25e** con 2-metoxietilamina transcurre de forma rápida, desapareciendo el producto de partida en apenas 1 hora de reacción. En la reacción se formaron tres productos mayoritarios que se aislaron e identificaron como la amida tricíclica esperada **86b** y las imidazolonas **16k** y **26a**. La formación de estas dos últimas, resultó de gran interés porque implicaba la incorporación en ambas de una molécula de la amina en el carbono metilénico puente entre el indol y la imidazolona. Comparando los resultados obtenidos en las reacciones con **23a** y **25e**, la presencia

del bromo es esta última sería el requisito necesario para la incorporación de la amina en el carbono exocíclico y la formación de los compuestos **26a** y **16k**. Además, estos compuestos son muy interesantes desde el punto de vista del SAR ya que **16k** es el análogo metilado de **16a** en la posición C2 de la imidazolona y **26a** es análogo de **16k** (NH de la imidazolona sin sustituyente). Ninguno de estos dos compuestos había resultado asequible por las rutas sintéticas exploradas para el SAR de **14a**.



Esquema 3.51

En la **Tabla 3.19** se muestra cómo afecta a la distribución de los productos de reacción el tiempo de reacción, utilizando tanto calefacción convencional como irradiación por microondas a 100 °C y 150 °C. En el caso de la calefacción convencional puede observarse que el aumento del tiempo de reacción de 1 hora a 8 horas produce un aumento del rendimiento de **16k**, que pasa de 6% al 16% produciéndose una disminución similar de **86b** que pasa del 15% al 6%. El compuesto **26a** sigue siendo el producto mayoritario aunque el rendimiento disminuye desde el 58% al 50% (entradas 1 y 2).

Tabla 3.19. Reacción de **25e** con 2-metoxietilamina.

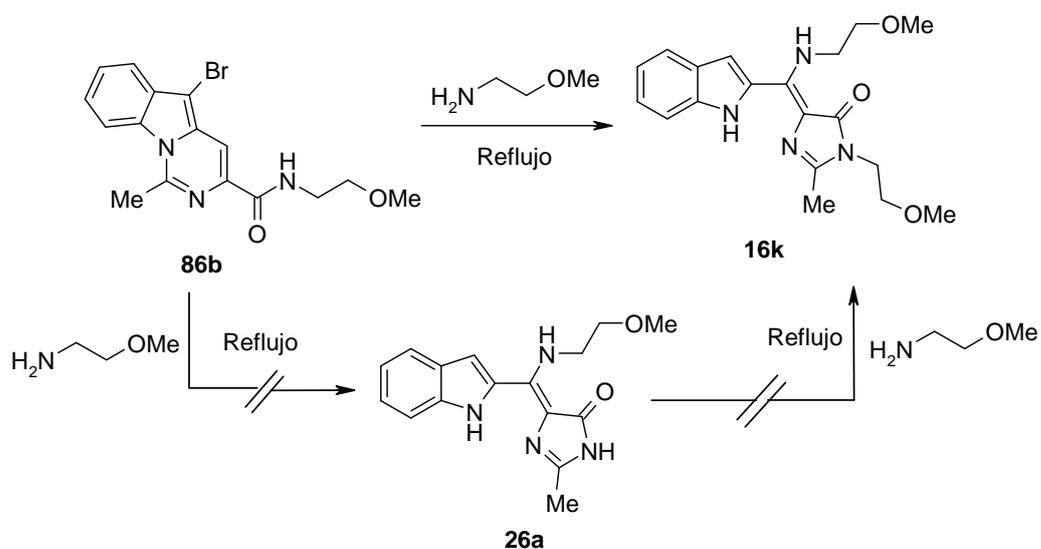
Entrada	Calentamiento	Tiempo	T ^a (°C)	Rdto 86b (%)	Rdto 26a (%)	Rdto 16k (%)
1	Convencional	1 h	100	15	58	6
2	Convencional	8 h	100	6	50	16
3	MW	10 min	100	30*	49*	10*
4	MW	30 min	100	41*	36*	10*
5	MW	10 min	150	54*	24*	12*
6	MW	30 min	150	42*	23*	15*

* % HPLC.

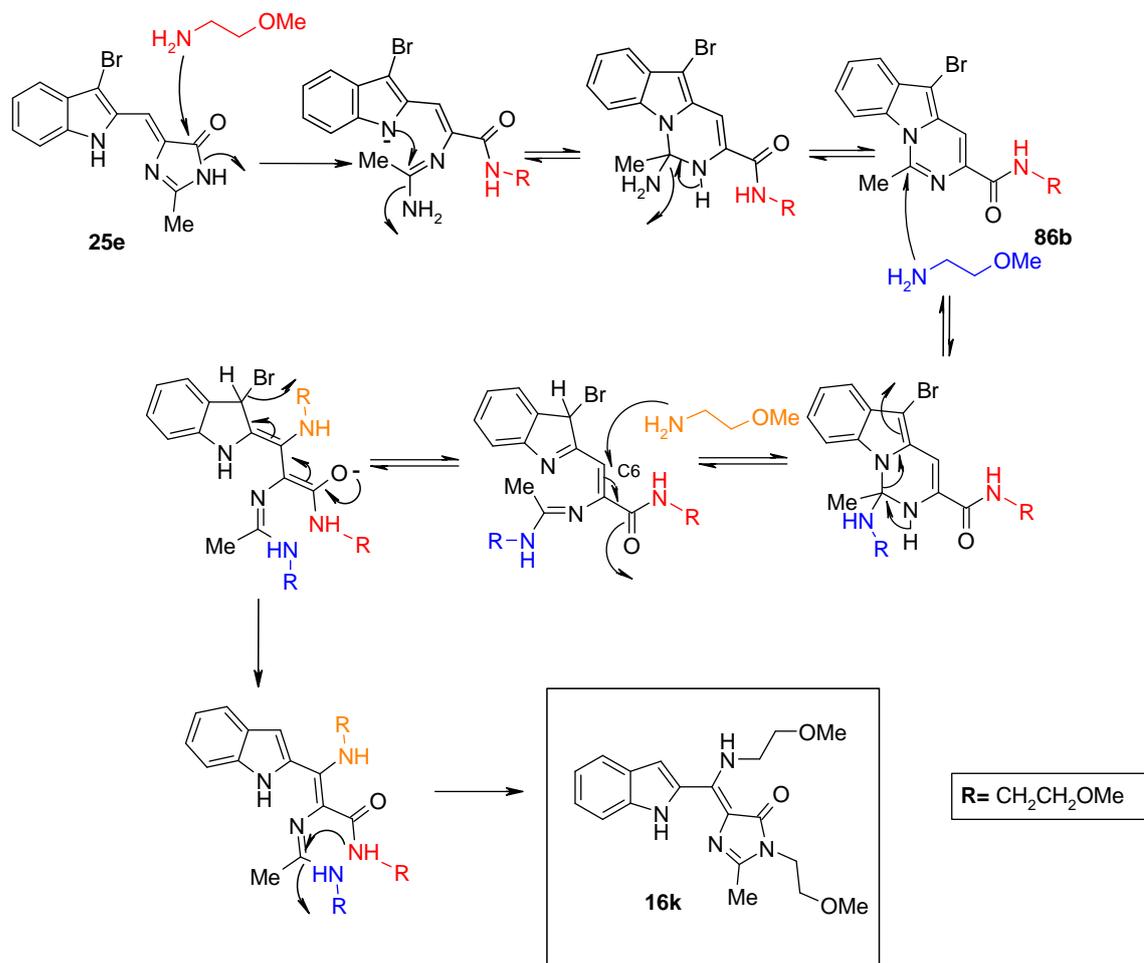
Al irradiar con microondas tanto a 100 °C como 150 °C el rendimiento de **16k** apenas varia, situándose en torno al 10% cuando se calienta a 100 °C a 10 y 30 minutos y llegando al 12% y 15% respectivamente cuando se irradia la reacción a 150 °C. Sin embargo la proporción de **86b/26a** se modifica notablemente en función de la temperatura y el tiempo de reacción. En general, la irradiación con microondas favorece de forma apreciable la formación de **86b** (entradas 4-6) que es el producto mayoritario al irradiar a 150 °C tanto a los 10 como a los 30 minutos de reacción. A 100 °C su formación también se encuentra favorecida, aunque en el caso de irradiación durante 10 minutos **26a** es el producto mayoritario (30% vs 49%, entrada 3), mientras a 30 minutos lo es **86b** (41% vs 36%, entrada 4).

El compuesto de mayor interés, **16k**, sigue siendo un producto minoritario de la reacción, formándose con un rendimiento máximo del 16% al calentar durante 8 horas con calefacción convencional.

En un experimento adicional, se hicieron reaccionar los compuestos **26a** y **86b** por separado con la 2-metoxietilamina en las mismas condiciones (**Esquema 3.52**). Esta reacción probó que **16k** tiene como precursor la amida tricíclica **86b** y que **16k** no se formaba a partir de la metilimidazolona **26a**.

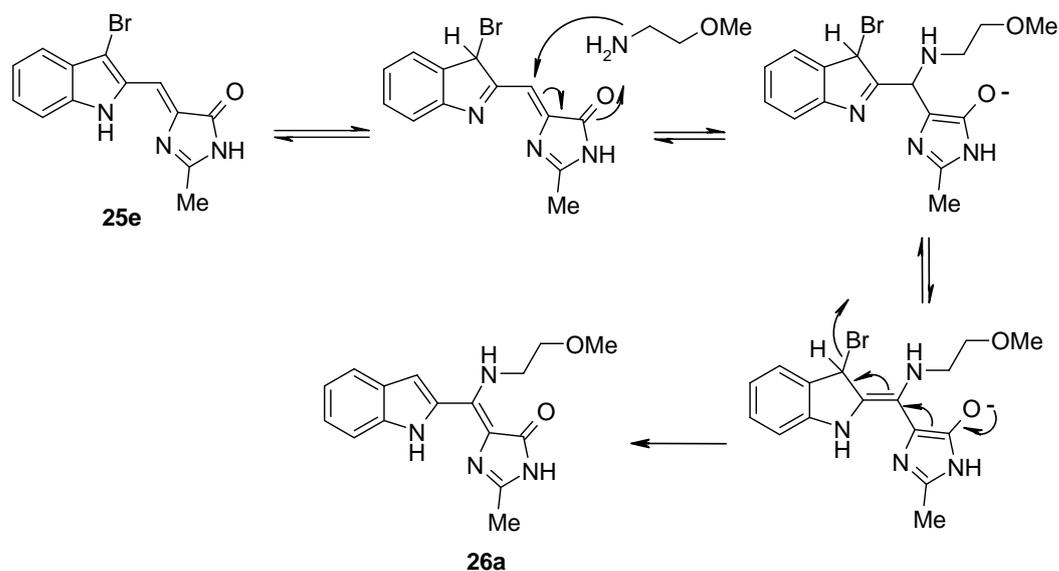
**Esquema 3.52**

En el esquema siguiente se muestra el mecanismo propuesto para la formación de los compuestos **86b** y **16k**, que es similar al que se propuso anteriormente para la formación del compuesto **16a** (**Esquema 3.20**). En este caso el primer ataque de la amina produciría la apertura de la imidazolona formándose el sistema tricíclico **86b**. Un segundo ataque de la amina en C1 daría la apertura del anillo pirimidínico y posteriormente se produciría una reacción tipo Michael implicando un tercer ataque nucleófilo de la amina sobre el carbono deficitario de la enamida. La rearomatización del indol con pérdida de bromo y la posterior transamidación generaría **16k**.



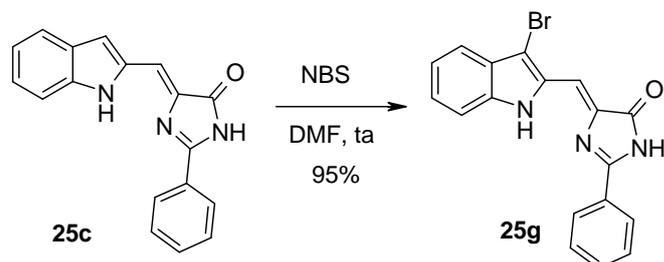
Esquema 3.53

Para la formación del compuesto **26a**, el mecanismo propuesto es diferente puesto que el sistema tricíclico **86b** no es un precursor como ya se ha demostrado. La adición de la amina en el doble enlace exocíclico y la posterior rearomatización del indol con pérdida de bromo podrían explicar la formación de **26a**.



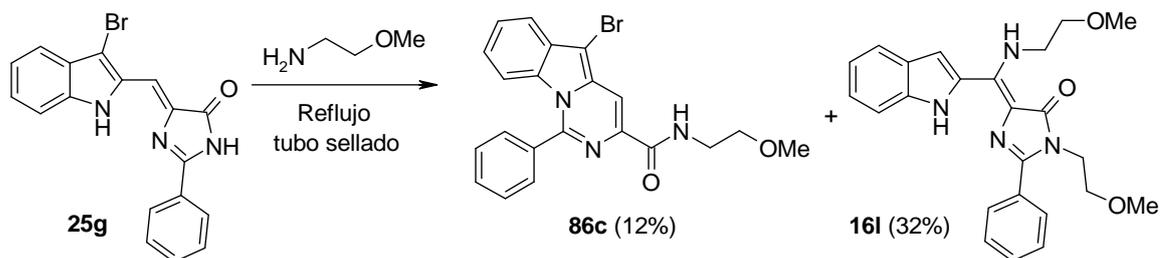
Esquema 3.54

La fenilimidazolona **25c** también se bromó con NBS en C3 con excelentes rendimientos (95%).



Esquema 3.55

Al igual que en el ejemplo anterior se hizo reaccionar **25g** con la 2-metoxietilamina aislándose en este caso sólo dos productos, **86c** y **16l**. Cuando se calentó a reflujo sólo se obtuvo un 7% de rendimiento del compuesto **16l**. Sin embargo, cuando el calentamiento se realizó en un tubo sellado se alcanzó el máximo rendimiento de **16l** (32%) sin llegar a conseguirse una conversión total de **86c** (12%).

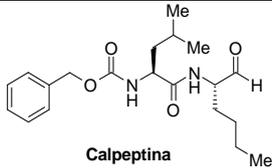
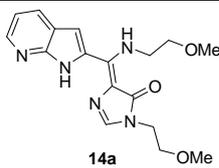
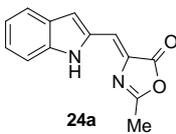
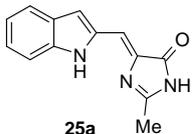
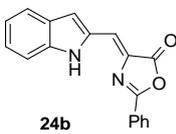
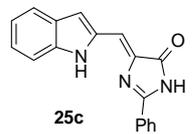
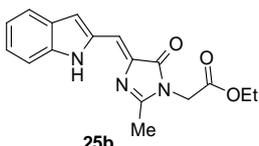
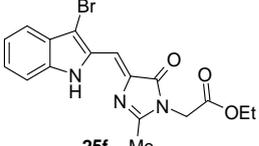
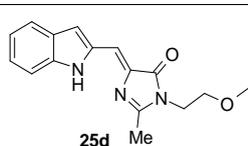
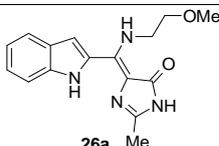
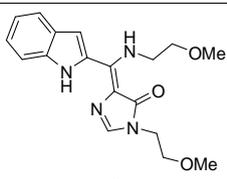
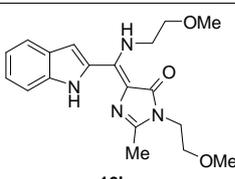
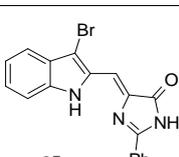
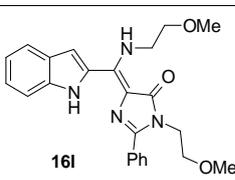


Esquema 3.56

3.6.1.4. Ensayos de inhibición de calpaína para los compuestos 16, 24, 25 y 26a.

La nueva serie de derivados indólicos obtenidos se sometió al ensayo de inhibición de calpaína con los resultados que se muestran en la **Tabla 3.20**. Como puede observarse todos los compuestos de esta serie son activos, destacando tres de éstos que superan el 90% de inhibición. De estos compuestos dos de ellos presentan una estructura de imidazolona (**25b** y **16k**) y el otro se trata de la oxazolona **24b**. El único que puede compararse con éste último es **24a** y como puede observarse el cambio de metilo por fenilo incrementa de forma muy importante la actividad inhibitoria.

Tabla 3.20. Porcentajes de inhibición de calpaína de los compuestos **16**, **24**, **25**, **26a**.

Compuesto	Inh. (%)	Compuesto	Inh. (%)
 <p>Calpeptina</p>	100	 <p>14a</p>	99.4
 <p>24a</p>	45	 <p>25a</p>	61
 <p>24b</p>	93.3	 <p>25c</p>	10.2
 <p>25b</p>	94.5	 <p>25f</p>	4.7
 <p>25d</p>	43.3	 <p>26a</p>	80.4
 <p>16a</p>	73.7	 <p>16k</p>	93
 <p>25g</p>	36.8	 <p>16l</p>	21.5

Comparando los derivados con anillo de oxazolona con aquellos con anillo imidazolona (**Figura 3.61**) puede observarse una disminución drástica de la actividad al comparar **24b** con **25c** (93.3% vs 10.2%), ambos con un sustituyente fenílico en la posición equivalente del anillo mientras que se produce un aumento apreciable de la actividad al comparar **24a** con **25a** (45% vs 61%), ambos con un sustituyente metilo en sus respectivos anillos.

La sustitución del NH imidazolónico por un grupo estoxicarbonilmetil genera el compuesto más activo de esta serie (**25b**), con una actividad notablemente mejor que el análogo **25d**, sustituido por el grupo metoxietilo. Sin embargo la introducción de un bromo en C3 del indol en **25b** prácticamente transforma a éste en inactivo (**25b** vs **25f**)

Asimismo, la comparación entre **25a**, **25b** y **25d** apunta a que la sustitución en el nitrógeno imidazolónico es un factor relevante, ya que la actividad se ve notablemente mejorada por el sustituyente etoxicarbonilmetilo y significativamente disminuida por el grupo metoxietilo.

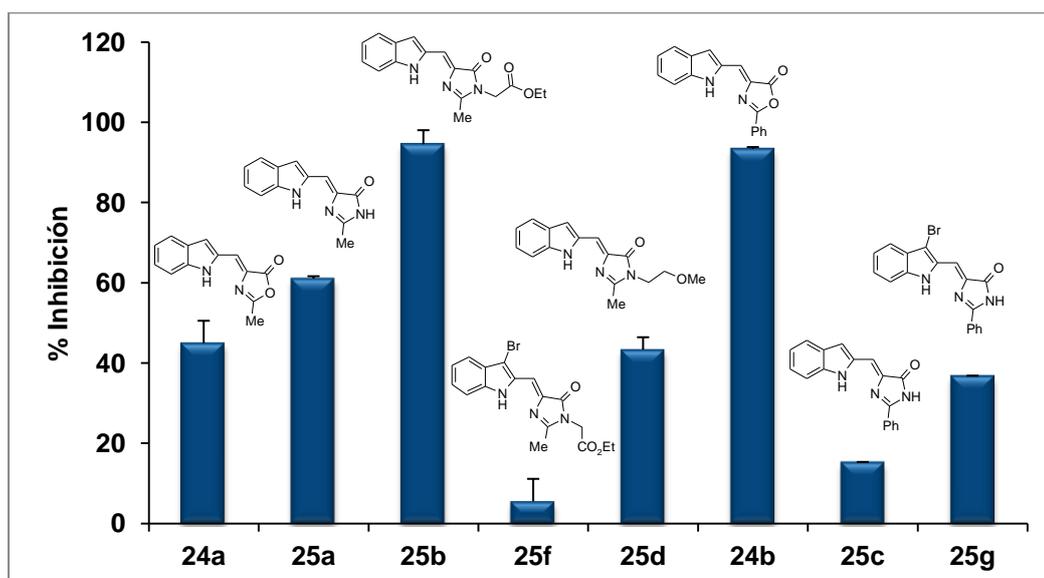


Figura 3.61

La presencia del sustituyente amínico en el carbono exocíclico aumenta significativamente la actividad en la serie de la 2-metilimidazolona como se hace evidente al comparar **25a** con **26a** (61% vs 80.4%) y **25d** con **16k** (43.3% vs 93%) (**Figura 3.62**). Sin embargo, en la serie de la 2-fenilimidazolona la sustitución por el resto amínico en el carbono exocíclico sólo tiene una modesta influencia en la actividad (**16l** (21.5 %) vs **25c** (10.2%)).

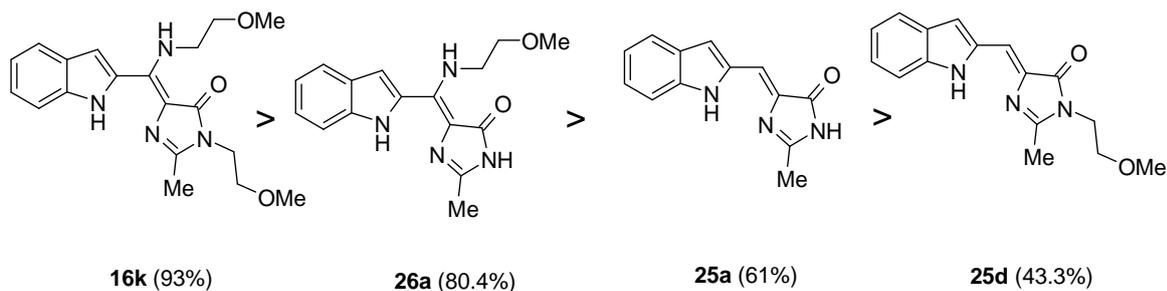


Figura 3.62

Estos porcentajes de inhibición nos permitieron llegar a una conclusión relevante al disponer de los datos de actividad de los compuestos **16a**, **16k** y **16l** y poder establecer que el orden de preferencia para la actividad en la posición C2 del anillo de imidazolona es Me>H>Ph (**Figura 3.63**).

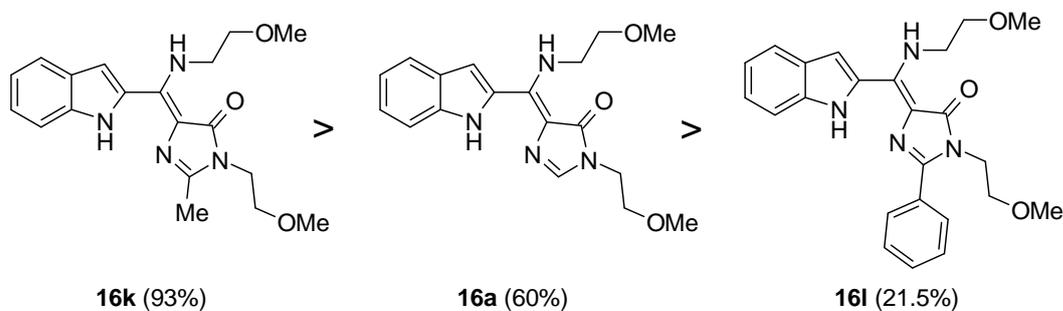
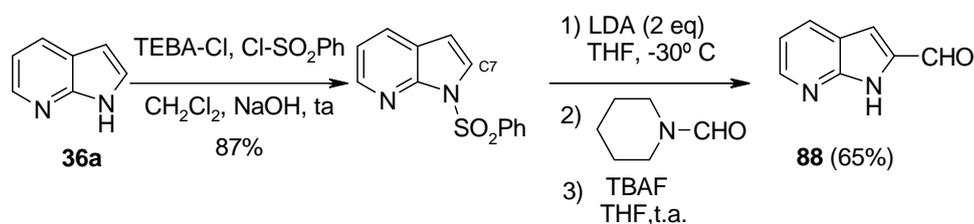


Figura 3.63

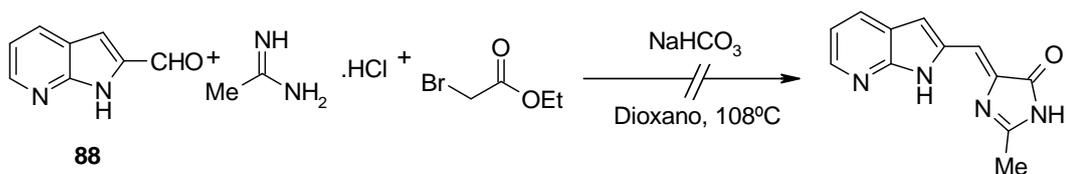
3.6.2. Derivados de otros heterociclos

A la vista de los resultados de actividad obtenidos con las últimas series de derivados de indol se pretendió sintetizar análogos estudiando otro tipo de heterociclos. El estudio se inició con el azaindol para el cual se preparó el azaindolcarboxaldehído **88** siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía¹³² a partir del azaindol **36a** (**Esquema 3.57**) que incluye protección del nitrógeno pirrólico, formilación en C7 y desprotección. La etapa de desprotección resultó más complicada de lo esperado debido a la inestabilidad del producto final con la temperatura. Se llevó a cabo una búsqueda de otras condiciones diferentes a las que se habían utilizado con los anteriores ejemplos y finalmente se pudo realizar esta reacción con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) a temperatura ambiente, obteniéndose el compuesto **88** con un 31% de rendimiento global.



Esquema 3.57

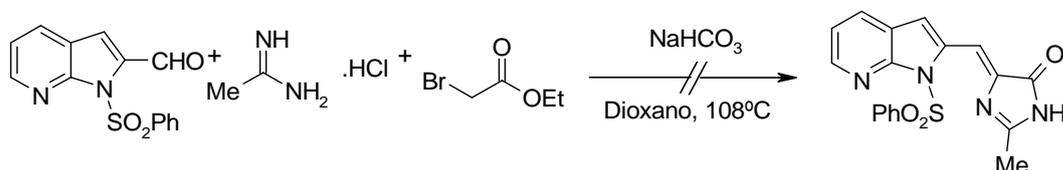
La primera reacción ensayada de **88** fue para generar la correspondiente imidazolona (**Esquema 3.58**) en las mismas condiciones empleadas con el indol. Sin embargo en este caso la reacción no tuvo lugar y aunque se observó la desaparición del producto de partida no llegó a formarse el producto buscado.



Esquema 3.58

¹³² Desabre, E.; Coudret, S.; Meheust, C.; Mèrou, J-Y. *Tetrahedron* **1997**, 53, 3637-3648.

Este resultado se atribuyó a la inestabilidad de **88** en medio básico y por ello se procedió a ensayar la reacción con el azaindol protegido **62**, pero en este caso se recuperó el producto de partida inalterado.



Esquema 3.59

Cuando se ensayaron otros formilheterociclos como pirrol, furano, tiofeno y benzotiofeno se obtuvieron las mezclas de las imidazolonas **27-30** con los rendimientos que se indican en la **Tabla 3.21**. Sin embargo la reacción con el 2-piridincarboxaldehído tampoco tiene lugar, observándose un comportamiento muy similar al obtenido con el azaindol. En el caso del benzo[*b*]tiofeno-2-carboxaldehído sólo se producía la reacción cuando se usaba como disolvente dioxano. Los rendimientos obtenidos son, en general, moderados para la mezcla de los compuestos **27a-30a** (imidazolona monosustituída) y los compuestos **27b-30b** (imidazolona disustituída). En la mayoría de los casos las imidazolonas monosustituídas son el producto principal de la reacción mientras que los etoxicarbonilmetilderivados se aislan como producto secundarios con rendimientos que oscilan entre el 9-29%, salvo para el caso del furancarboxaldehído que se obtiene **30b** con un rendimiento ligeramente superior a **30a**.

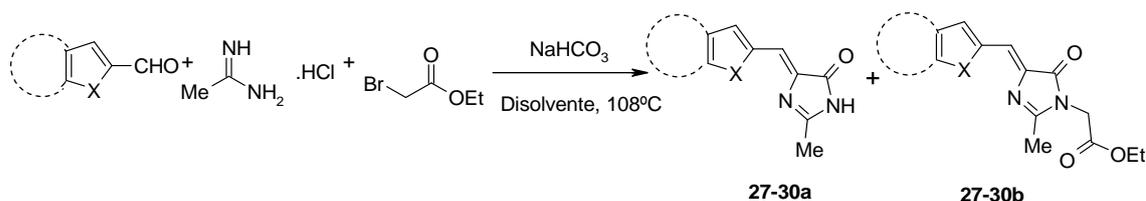


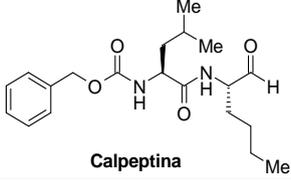
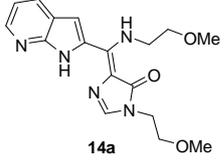
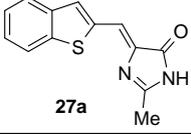
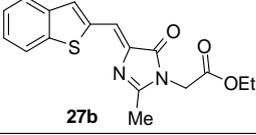
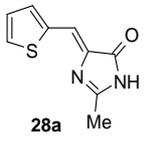
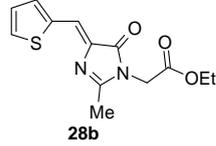
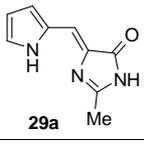
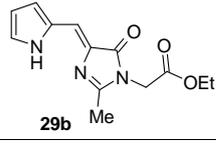
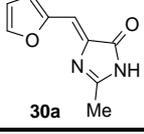
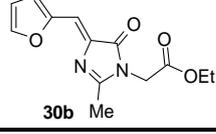
Tabla 3.21. *Reacción de distintos 2-heteroarilcarbaldehídos con metilimidazolona.*

Entrada	Aldehído	Disolvente	Compuesto	Rdto(%) 27a-30a	Rdto(%) 27b-30b
1		Dioxano	27	50	29
2		Tolueno	28	32	9
3		Tolueno	29	32	15
4		Tolueno	30	17	21
5		Tolueno/ Dioxano	---	---	---

3.6.2.1. Ensayos de inhibición de calpaína.

Los resultados de la actividad inhibitoria de calpaína para las imidazolonas **27a-30a** y **27b-30b** se detallan en la **Tabla 3.22**. Como puede observarse todos los compuestos sintetizados son activos frente a calpaína, destacando cuatro de los compuestos obtenidos que presentan un porcentaje de inhibición superior al 90%. Más concretamente, los dos derivados de tiofeno y especialmente **28a** que, con un porcentaje de inhibición del 122%, es un compuesto significativamente más activo que la calpeptina tomada como compuesto de referencia.

Tabla 3.22. Porcentajes de inhibición de los compuestos 27-30.

Compuesto	Inh. (%)	Compuesto	Inh. (%)
 <p>Calpeptina</p>	100	 <p>14a</p>	99.4
 <p>27a</p>	34.8	 <p>27b</p>	27.6
 <p>28a</p>	122	 <p>28b</p>	96.2
 <p>29a</p>	90.2	 <p>29b</p>	26
 <p>30a</p>	78	 <p>30b</p>	90.4

En la siguiente figura se muestra una gráfica comparando la actividad de esta serie de compuestos. Como puede comprobarse, la sustitución del nitrógeno imidazolónico disminuye la actividad cuando se compara con el derivado sin sustituir excepto para los casos del furano y el indol.

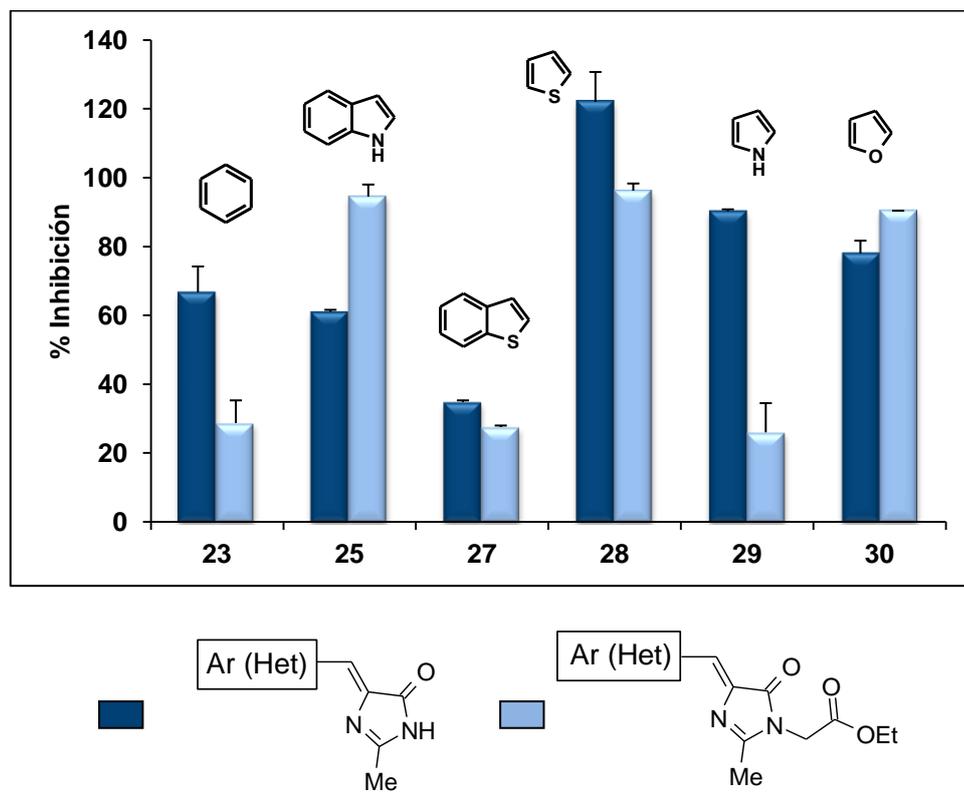


Figura 3.64

El orden decreciente de actividad para la serie de imidazolonas con el NH libre en función del resto arilideno o heteroarilideno se indica en la **Figura 3.65**.

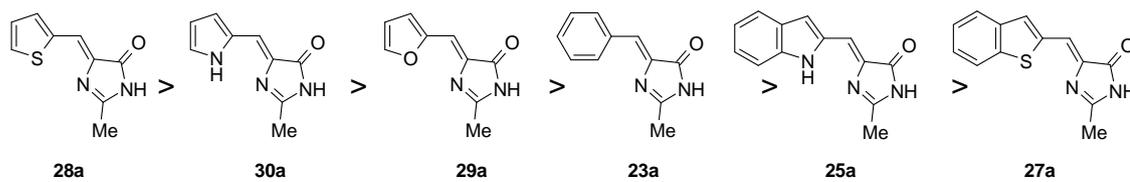


Figura 3.65

En la **Figura 3.66** se detalla la variación para la serie que presenta la imidazolona sustituida por el grupo etoxicarbonilmetilo.

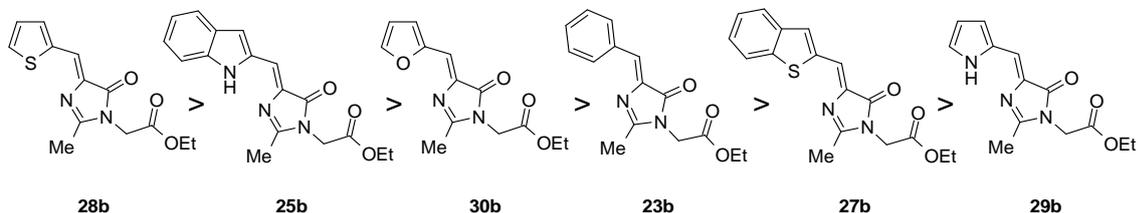
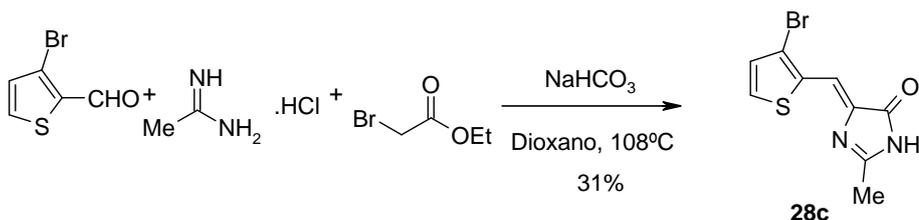


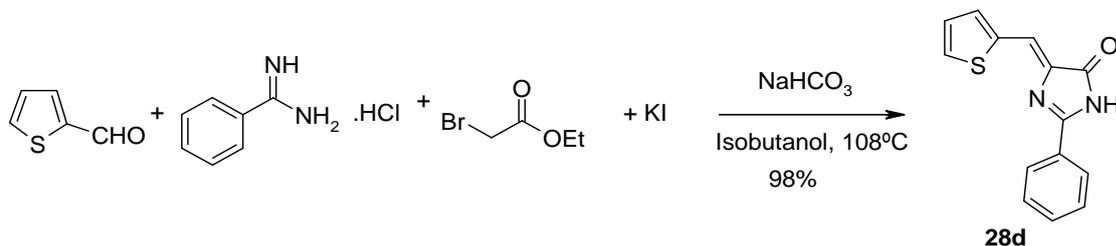
Figura 3.66

Los buenos resultados obtenidos con el sistema de tiofeno avalaban la obtención de análogos del compuesto **28a** introduciendo cierta diversidad estructural tanto en el anillo de tiofeno como en la imidazolona. En primer lugar y aprovechando que el 3-bromotiofeno-2-carboxaldehído es comercial, se ensayó la reacción con la acetamida aislándose de la reacción el compuesto **28c** con bajo rendimiento (31%) y no se observó la formación del compuesto con la imidazolona disustituida.



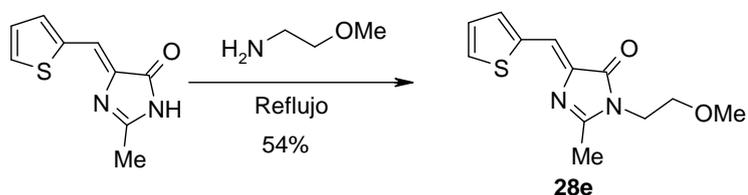
Esquema 3.60

Seguidamente, se preparó con muy buen rendimiento (98%) el compuesto **28d** resultante de la reacción del tiofeno-2-carboxaldehído y la bezamidina (**Esquema 3.61**).



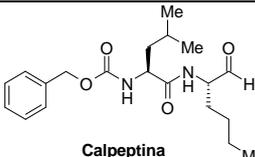
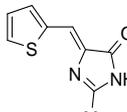
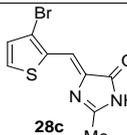
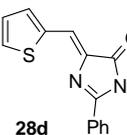
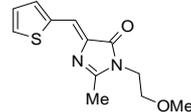
Esquema 3.61

Por último, se sintetizó el metil derivado **28e** con un rendimiento moderado, obtenido al calentar a reflujo **28a** usando como disolvente la 2-metoxietilamina (Esquema 3.62).



Para estos nuevos compuestos obtenidos se determinó la actividad como inhibidores de calpaína, con los resultados que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.23. Porcentajes de inhibición para los compuestos **28c-e**.

Entrada	Compuesto	Inhibición (%)
1	 Calpeptina	100
2	 28a	122
3	 28c	24.9
4	 28d	92.6
5	 28e	43.7

Como puede observarse todos ellos resultaron menos activos que el compuesto **28a**, produciéndose una significativa pérdida de actividad al introducir el bromo en el anillo tiofénico (**28c** vs **28a**) y al introducir el resto de metoxietilo en el anillo de imidazolona (**28e** vs **28a**). El cambio del metilo en la posición C2 de la imidazolona por un fenilo también conduce a una disminución de la actividad, aunque el análogo **28d** continúa manteniendo una buena actividad con un porcentaje de inhibición superior al 90%. En la **Figura 3.67** se muestra el gráfico comparativo de los resultados de actividad para esta serie.

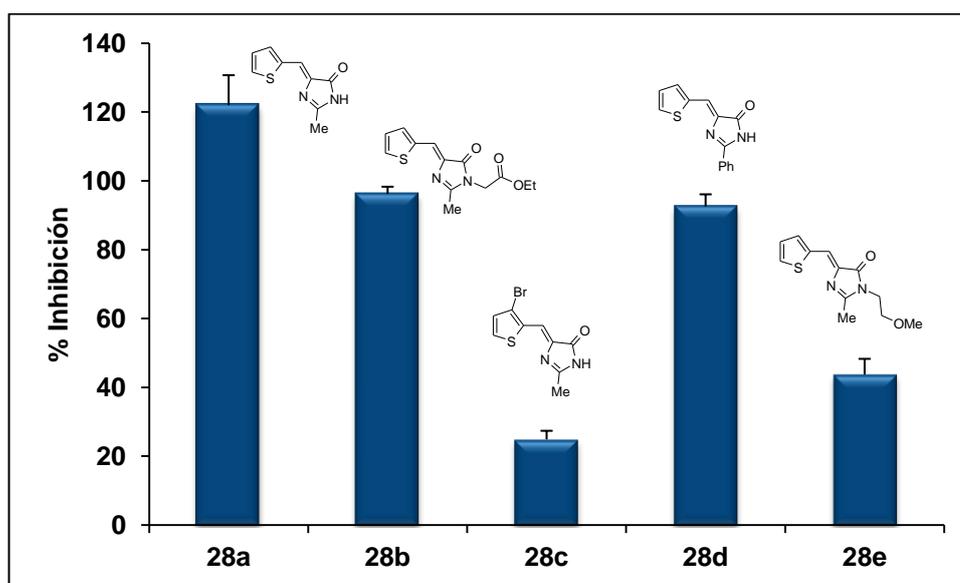


Figura 3.67

En este estadio del proyecto se habían preparado un gran número de compuestos a través de las reacciones y rutas que se han ido detallando y se habían explorado los tres dominios que contemplaba el SAR sobre el compuesto **14a**, tomado inicialmente como cabeza de serie. Este estudio nos ha permitido identificar un total de 8 análogos que presentan un porcentaje de inhibición de calpaína superior al 90% y, además, encontrar un análogo (**28a**) cuya actividad inhibitoria es significativamente superior a la de **14a** y de la propia calpeptina empleada como compuesto de referencia. Los inhibidores de calpaína que se sintetizaron y que muestran un porcentaje de inhibición superior al 90%, se presentan en la siguiente gráfica.

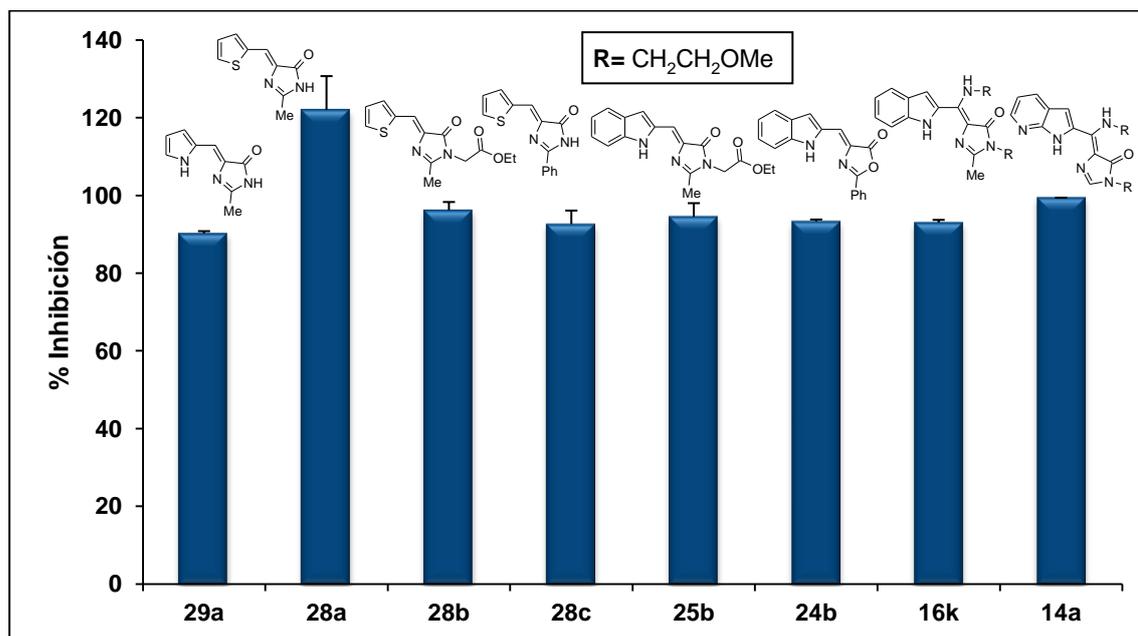


Figura 3.68

Sobre este grupo de inhibidores que presentan el mejor porcentaje de inhibición se realizó un ensayo adicional de actividad utilizando un kit específico para la medida de la actividad calpaína comercializado por BioVision (Calpain Assay Kit, Ref. K240-100, Mountain View, CA, E.U.A). Con este kit se determinaron las inhibiciones a siete concentraciones diferentes, comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-12} , de los compuestos sintetizados en relación con el 100% de actividad proporcionado por el ensayo comercial.

A partir de los porcentajes de inhibición obtenidos a estas distintas concentraciones se calculó el IC_{50} de los compuestos recogidos en la figura **Figura 3.68**. Los datos de IC_{50} y los porcentajes de inhibición se recogen en la **Figura 3.69**. En ésta puede observarse que cinco de los compuestos obtenidos presentan valores de IC_{50} notablemente mejores que la propia calpeptina ($IC_{50}=0.252$ nM) siendo los compuestos **16k** y **28c** los más activos de todos los sintetizados con un valor de IC_{50} en un rango picomolar, seguidos de los compuestos **28a** y **24b** que son aproximadamente 200 veces más activo que calpeptina y de **25b** que es siete veces más activo que ésta. Los derivados **29a**, **14a** y **28b** son los menos activos de la serie.

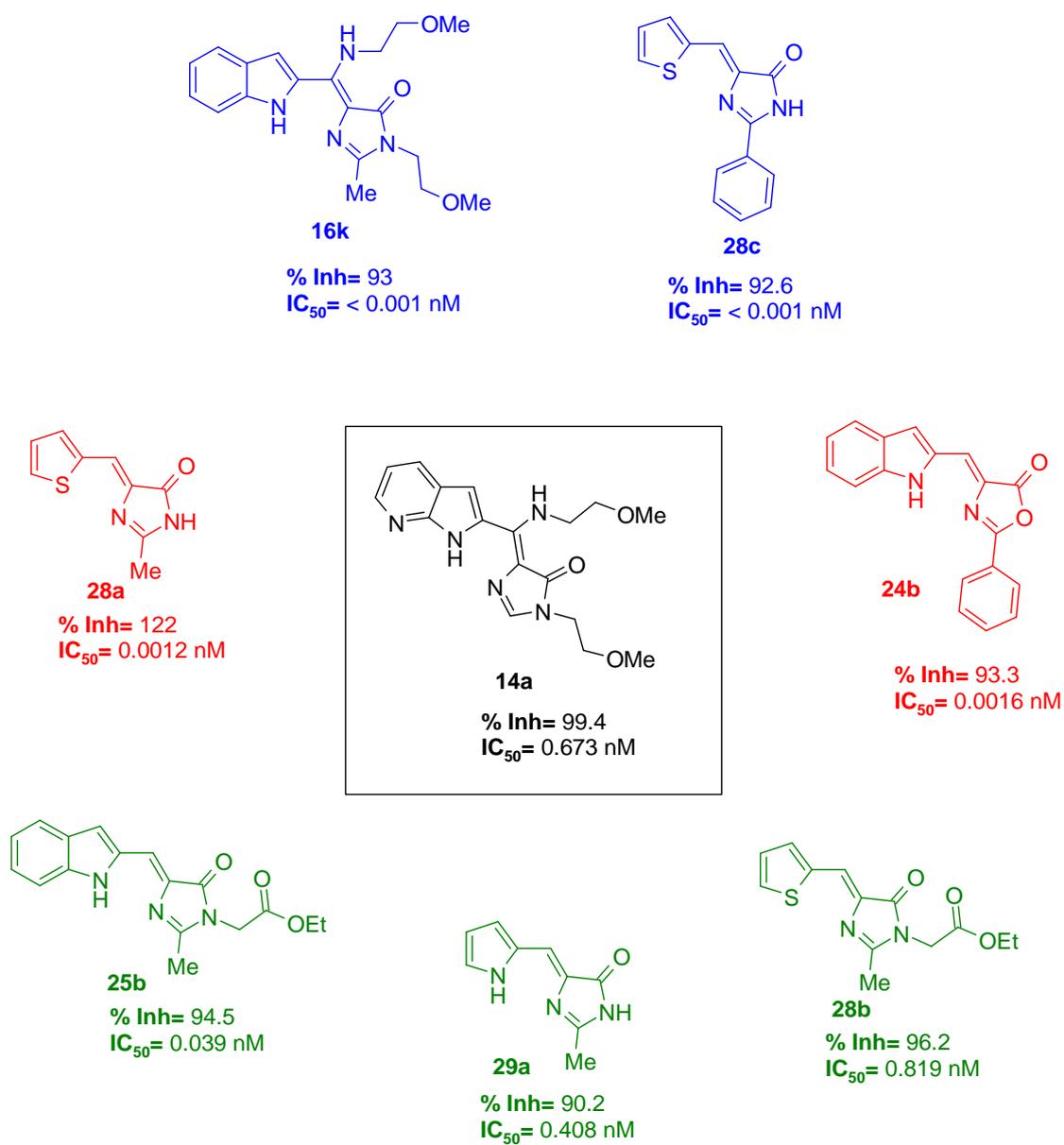


Figura 3.69

A modo de conclusión de este trabajo orientado a la búsqueda de nuevos inhibidores no peptídicos de calpaína, se puede destacar el hallazgo del derivado azaindólico **14a**, cuyo SAR ha conducido a identificar:

- Un análogo indólico, **16k**, al menos 600 veces más activo que **14a**.
- Un análogo indólico de estructura simplificada, **25b**, unas veinte veces más activo que **14a**.
- Un análogo indólico que incorpora una feniloxazolona, **24a**, unas 400 veces más activo que **14a**.
- Dos análogos tiofénicos con estructura simplificada, **28c** y **28a**, que al menos resultaron 500 veces más activos que **14a**.

Los nuevos inhibidores sintetizados se han protegido en una patente¹⁴⁸ y sobre los cinco mejores inhibidores se han comenzado a realizar ensayos complementarios sobre selectividad frente a las calpaínas 1, 2, 5 y 10, sobre permeabilidad celular y propiedades farmacocinéticas.

¹⁴⁸ Morón, M.; Burgos, C.; Vaquero, J.J.; Grier, M.; Díez, M.L.; Rodríguez, M.; Rodríguez, D. **2011**, P201131263

Los reactivos utilizados se han adquirido en las casas comerciales *Aldrich*, *Acros* y *Strem* y se utilizaron sin ningún tratamiento posterior.

Las reacciones que exigieron condiciones anhidras se llevaron a cabo en atmósferas de argón desoxigenado y seco. Los disolventes anhidros utilizados en estas reacciones se secaron por destilación sobre un agente desecante adecuado, en atmósfera de argón, inmediatamente antes de su uso.

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 *Electrothermal IA 6304*.

Para la cromatografía en columna se ha empleado gel de sílice *Merck* (230-400 mesh). El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones se dan en volumen/volumen. Para la cromatografía analítica en capa fina se emplearon los cromatofolios de gel de sílice *Merk 60 F₂₅₄*. En todos los casos el revelado de las placas se realizó con vapores de I₂, KMnO₄ al 15% en agua con 5% de NaOH y 10% de K₂CO₃, disolución de ninhidrina al 0.3% en etanol o *n*-butanol con 3% de AcOH o visor de luz UV.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H y de ¹³C se han registrado en los siguientes aparatos: *Varian UNITY-300*, *Varian-Mercury-VX-300* (300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C), en algunos casos *Varian Gemini 200* (200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C) y *Varian UNITY^{Plus}-500* (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C), *Bruker AVANCE 700*, provisto con una sonda QXI 700 MHz S4 (700 MHz para ¹H, 175 MHz para ¹³C y 70 MHz para ¹⁵N) y *Bruker AVANCE II 300* (300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C). Para los espectros de RMN se emplearon disolventes deuterados CDCl₃, CD₃OD, acetona-*d*₆ y DMSO-*d*₆ de la casa *SDS*. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en unidades δ (ppm), utilizando como referencia interna la señal residual del disolvente y las constantes de acoplamiento en Hz.

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

Para las medidas de rotación óptica se utilizó un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341, con lámpara de Mercurio a la longitud de onda indicada en cada caso.

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) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas, respecto del pico base.

Los equipos de HPLC utilizados fueron HPLC preparativo *Dynamax* de Varian y HPLC modelo 1100 acoplado a sistema QTOF modelo 6530 de *Agilent Technologies*.

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

4.1. SÍNTESIS DE PIRROLO[1,2-*c*]PIRIMIDINAS

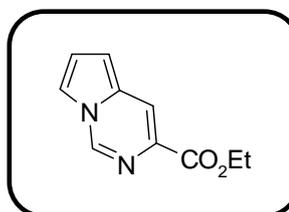
3-Pirrolo[1,2-*c*]pirimidina carboxilato de etilo (1)

Se disuelve isocianoacetato de etilo (3.3 mL, 30 mmol) en 60 mL de THF anhidro bajo atmósfera de argón. A esta disolución se le añade DBU (4.6 mL, 30 mmol) y una disolución de pirrol-2-carboxaldehído (3.0 g, 30 mmol) en 50 mL de THF anhidro. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 horas. Pasado este tiempo se neutraliza con ácido acético al 10%. El disolvente se elimina a presión reducida y se lleva a cabo una extracción con AcOEt. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano: AcOEt (3:7). Se obtienen 4.4 g de **1** (77%) como un sólido marrón claro.

Rendimiento: 77%

Pf: 68-70 °C.

Lit.^{119a} (69-71 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

1.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 4.44 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.75 (dd, *J* = 4.0, 1.1 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 4.0, 2.5 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 2.5, 1.1 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.83 (s, 1H).

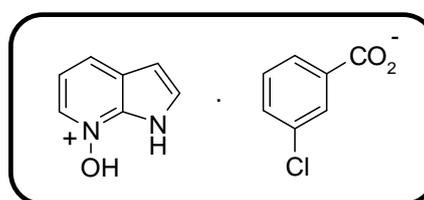
^{119a} Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J.; Castaño, O.; Andrés, J. L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7788-7801.

4.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PIRROLO[2,3-*b*]PIRIDINA.

m-Clorobenzoato de 7-hidroxi-pirrolo[2,3-*b*]piridinio

A 10 g de pirrolo[2,3-*b*]piridina **36a** (84.7 mmol) disueltos en 250 mL de 1,2-dimetoxietano (DME), se adicionan 25 g de ácido *m*-cloroperbenzoico 80% w/w (116 mmol). La solución amarilla se agita a temperatura ambiente durante 2.5 horas, tiempo durante el cual aparece un precipitado amarillo. La suspensión se enfría en agua/hielo, se filtra el sólido y se lava con Et₂O para proporcionar 23.2 g de *m*-clorobenzoato de 7-hidroxi-pirrolo[2,3-*b*]piridinio (94%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 94%
Pf: 140-142 °C
Lit.¹⁴⁹ (145-145.5 °C)



¹H-RMN (200 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

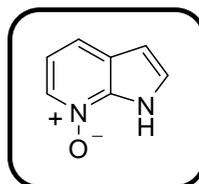
6.58 (m, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.50 (m, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.87 (m, 2H), 8.13 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 12.50 (sa, 1H).

Pirrolo[2,3-*b*]piridina-7-óxido (**45**)

Una suspensión de 23.2 g de *m*-clorobenzoato de 7-hidroxi-pirrolo[2,3-*b*]piridinio (80 mmol) en 140 mL de H₂O se basifica con K₂CO₃ hasta pH ≈ 9. La fase acuosa se extrae en continuo con CH₂Cl₂ durante 12 horas. El extracto orgánico se concentra a presión reducida proporcionando 10.4 g de **45** (97%) como un sólido blanco.

¹⁴⁹ Scheneller, S. W.; Luo, J-Y. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4045-4048

Rendimiento: 97%
Pf: 134-136 °C
Lit.¹⁵⁰ (138-139 °C)



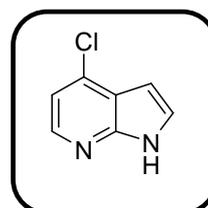
¹H-RMN (200 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

6.56 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 8.0, 6.0 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 12.50 (sa, 1H).

4-Cloropirrolo[2,3-*b*]piridina (**36b**)

Sobre 100 mL de oxiclورو de fósforo enfriado a 0-4 °C en un baño de hielo se adiciona, en pequeñas porciones, 10.0 g de **45** (74.6 mmol). Cuando la adición ha concluido, la mezcla de reacción se calienta hasta temperatura de reflujo, y ésta se mantiene durante 12 horas. El oxiclورو de fósforo se elimina mediante destilación a presión reducida y sobre el residuo previamente enfriado se adicionan 100 mL de agua-hielo. La solución se basifica con Na₂CO₃ y se extrae con AcOEt. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de eliminar el agente desecante y el disolvente a presión reducida, el aceite así obtenido se purifica por cromatografía flash en gel desílíce utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 10.9 g de **36b** (96%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 96%
Pf: 170-172 °C
Lit.¹⁵¹ (175-176 °C)



¹⁵⁰ Antonini, H.; Claudi, F.; Cristalli, G.; Franchetti, P.; Grifatini, M.; Martelli, S. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1258-1261.

¹⁵¹ Clark, B. A. J.; Partick, J. *J. Chem. Soc.; Perkin Trans. I* **1974**, 2270-2274.

¹H-RMN (300 MHz,CDCl₃), δ(ppm):

6.63 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 10.66 (sa, 1H).

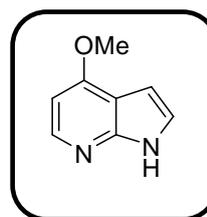
4-Metoxipirrolo[2,3-*b*]piridina (36c)

Una suspensión de 1.0 g de **36b** (6.56 mmol) en una disolución de hidróxido sódico en metanol (0.88 g, 22 mmol en 20 mL) se calienta en un autoclave a 150 °C durante 12 horas. Después de enfriar, se filtra sobre celita lavando con metanol. Los líquidos de filtrado se concentran a sequedad y el residuo obtenido se tritura con agua, obteniéndose un sólido en suspensión. La suspensión se extrae con AcOEt y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica se filtra y se concentra a sequedad por destilación a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (8:2). Se obtienen 820 mg de **36c** (84%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 84%

Pf: 178-179 °C

Lit.¹⁵² (180-182 °C)

**¹H-RMN (300 MHz,CDCl₃), δ(ppm):**

4.00 (s, 3H), 6.49 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H).

¹⁵² Girgis, N.S.; Larson, S. B.; Robin, R. K.; Cottan, H. B. *J. Heterocyclic Chem.* **1989**, 26, 317-325.

4.3. SÍNTESIS DE 1-(BENCENOSULFONIL)PIRIDO[2,3-*b*]PIRIDINAS.

Procedimiento general

A una disolución constituida por la correspondiente pirrolo[2,3-*b*]piridina (50.85 mmol) y cloruro de benciltriethylamonio (TEBACl, 300 mg, 1.32 mmol) disueltos en CH₂Cl₂ (100 mL), se adiciona NaOH pulverizado (6.32 g, 158 mmol). A continuación se añade lentamente a 0 °C y con agitación, cloruro de bencenosulfonilo (8.4 mL, 66 mmol) recién destilado. Una vez concluida la adición, la agitación continúa durante 15 minutos a esa temperatura, posteriormente se deja a la mezcla alcanzar la temperatura ambiente continuando la agitación el tiempo indicado en cada caso. Transcurrido el tiempo de reacción, la suspensión resultante se filtra sobre celita, lavando el sólido filtrado con CH₂Cl₂. El conjunto de líquidos se evaporan a presión reducida. El residuo así obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice, utilizando el eluyente indicado en cada caso para proporcionar el correspondiente 1-fenilsulfonil derivado.

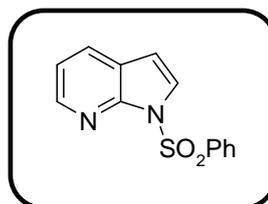
1-Bencenosulfonilpirrolo[2,3-*b*]piridina

A partir de 6.00 g de **36a** y siguiendo el método general, el tiempo de reacción es de 2.5 horas. Tras la elaboración se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 11.41 g de 1-fenilsulfonilpirrolo[2,3-*b*]piridina (87%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 87%

Pf: 130-132 °C

Lit.¹³² (129-131 °C)



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

6.60 (d, *J* = 4.0 Hz), 7.17 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz), 7.47 (m, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.73 (d, *J* = 4.0 Hz), 7.84 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz), 8.19 (m, 2H), 8.43 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz).

¹³² Desabre, E.; Coudret, S.; Meheust, C.; Mèrou, J-Y. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3637-3648.

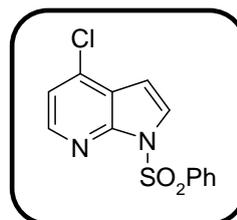
1-Bencenosulfonil-4-cloropirrolo[2,3-*b*]piridina

A partir de 7.75 g de **36b** y siguiendo el método general, el tiempo de reacción es de 6 horas. Tras la elaboración se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (9:1). Se obtienen 14.12 g de 1-bencenosulfonil-4-cloropirrolo[2,3-*b*]pirimidina (95%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 95%

Pf: 118-120 °C

Lit.¹⁵³ (117-118 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

6.69 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.51 (m, 3H), 7.76 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 8.17 (m, 2H), 8.30 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H).

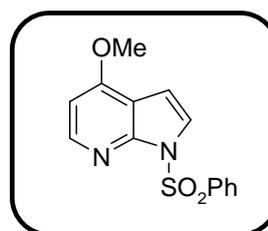
1-Bencenosulfonil-4-metoxipirrolo[2,3-*b*]piridina

A partir de 7.52 g de **36c** y siguiendo el método general, el tiempo de reacción es de 4 horas. Tras la elaboración se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 11.5 g de 1-bencenosulfonil-4-metoxipirrolo[2,3-*b*]piridina (79%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 79%

Pf: 149-151 °C

Lit.¹²⁷ (149-151 °C)



¹⁵³ Layek, M.; Gajare, V.; Kalita, D.; Islam, A.; Mukkanti, K.; Pal, M.. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4814-4819.

¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

3.91 (s, 3H), 6.59 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.54 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 8.14 (m, 2H), 8.28 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H).

4.4. SÍNTESIS DE 1-(BENCENOSULFONIL) PIRROLO[2,3-*b*] PIRIDINAS 2-SUSTITUÍDAS.

Procedimiento general:

A una disolución de THF anhidro (290 mL) conteniendo los bencenosulfonil derivados (27.13 mmol) enfriada a -30 °C y en atmósfera de argón, se adicionan 27.1 mL de diisopropilamido de litio (LDA, solución 2M en THF, 54.2 mmol). Después de 40 minutos a -30 °C se adiciona yoduro de metilo (10.1 mL, 162 mmol). Transcurrido el tiempo de reacción indicado en cada caso, la reacción se deja evolucionar a temperatura ambiente y se hidroliza con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. La mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice con el eluyente indicado en cada caso.

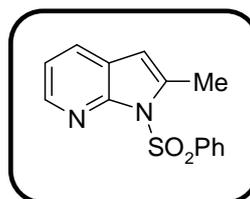
1-Bencenosulfonil-2-metilpirrolo[2,3-*b*]piridina (37a)

A partir de 7.00 g de 1-fenilsulfonilpirrolo[2,3-*b*]piridina y siguiendo el método general, el tiempo de reacción fue de 3 horas. Tras la elaboración el residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (9:1). Se obtienen 7.08 g de **37a** (96%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 96%

Pf: 103-105 °C.

Lit.¹³² (100-102 °C).



¹³² Desabre, E.; Coudret, S.; Meheust, C.; Mèrou, J-Y. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3637-3648.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.71 (s, 3H), 6.26 (s, 1H), 7.10 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 7.48 (m, 3H), 7.66 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.12 (m, 2H), 8.33 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H).

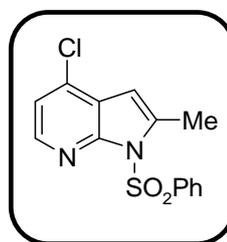
1-Bencenosulfonil-4-cloro-2-metilpirrolo[2,3-*b*]piridina (37b)

A partir de 7.94 g de 4-cloro-1-fenilsulfonilpirrolo[2,3-*b*]pirimidina y siguiendo el método general, el tiempo de reacción fue de 16 horas. Tras la elaboración el residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (9:1). Se obtienen 7.15 g de **37b** (86%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 86%

Pf: 78-79 °C

Lit.^{128b} (75-76 °C).



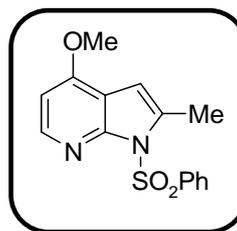
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.74 (s, 3H), 6.40 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.52 (m, 3H), 8.13 (m, 2H), 8.24 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H).

1-Bencenosulfonil-2-metil-4-metoxipirrolo[2,3-*b*]piridina (37c)

A partir de 7.81 g de 1-fenilsulfonil-4-metoxipirrolo[2,3-*b*]piridina y siguiendo el método general, el tiempo de reacción fue de 6 horas. Tras la elaboración el residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 8.10 g de **37c** (99%) como un sólido amarillo claro.

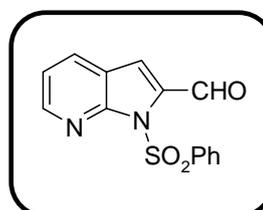
^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4974-4983.

Rendimiento: 99%**Pf:** 99-101 °C**Lit.**¹²⁷ (99-101 °C).**¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):**

2.69 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.36 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.59 (m, 3H), 8.11 (m, 2H), 8.25 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H).

1-Bencenosulfonilpirrolo[2,3-*b*]piridina-2-carbaldehído (**89**)

A una disolución de 1-fenilsulfonilpirrolo[2,3-*b*]piridina (258 mg, 1 mmol) en THF anhidro (10 mL) enfriada a -30 °C y en atmósfera de argón, se adiciona diisopropilamido de litio (LDA, 1 mL, solución 2M en THF, 2 mmol). Después de 40 minutos a -30 °C se adiciona *N*-formilpiperidina (63 μL, 3 mmol). Después de 12 horas, la reacción se lleva a temperatura ambiente y se hidroliza con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. La mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 154 mg de **89** (54%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 54%**Pf:** 149-150 °C.**Lit.**¹³² (140-145 °C).**¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):**

7.25 (dd, $J = 7.9, 4.8$ Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.47 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.57 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.96 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H), 8.14 (m, 2H), 8.60 (dd, $J = 4.8, 1.5$ Hz, 1H), 10.61 (s, 1H).

¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

¹³² Desabre, E.; Coudret, S.; Meheust, C.; Mèrou, J-Y. *Tetrahedron* **1997**, 53, 3637-3648.

4.5. SÍNTESIS DE PIRROLO[2,3-*b*]PIRIDINAS 2-SUSTITUÍDAS.

Procedimiento general:

A una disolución del bencenosulfonil derivado **37** (10 mmol) en 130 mL metanol y 43 mL de agua, se adiciona 6.91 g de K_2CO_3 sólido (50 mmol) y la correspondiente suspensión se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Transcurrido ese tiempo el metanol se elimina en el rotavapor y se añaden otros 20 mL adicionales de agua, extrayendo la disolución con AcOEt. Después de secar sobre Na_2SO_4 anhidro, eliminar el desecante y concentrar, el residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando el eluyente indicado en cada caso.

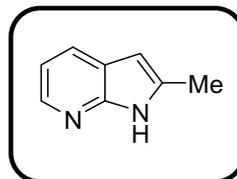
2-Metilpirrolo[2,3-*b*]piridina (43a)

Partiendo de 2.72 g de **37a** la reacción transcurre durante 20 horas. Después de la elaboración, se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 1.05 g de **43a** (80%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 80%

Pf: 131-133 °C.

Lit.¹⁵⁴ (136 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.52 (s, 3H), 6.16 (s, 1H), 7.01 (dd, $J = 7.5, 4.8$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 11.00 (sa, 1H).

¹⁵⁴ Clemo, G. R.; Swan, G. A. *J. Chem. Soc.* **1945**, 603-607.

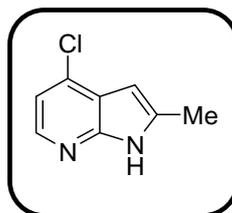
4-Cloro-2-metilpirrolo[2,3-*b*]piridina (43b)

Partiendo de 3.10 g de **37b** la reacción transcurre durante 16 horas. Después de la elaboración, se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (8:2). Se obtienen 1.53 g de **43b** (92%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 92%

Pf: 134-136 °C

Lit.¹⁵⁵ (134-136 °C).



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.51 (s, 3H), 6.27 (s, 1H), 7.03 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 10.36 (sa, 1H).

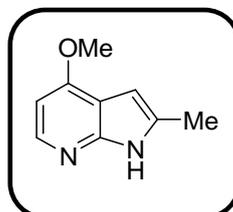
2-Metil-4-metoxipirrolo[2,3-*b*]piridina (43c)

Partiendo de 3.00 g de **37c** la reacción transcurre durante 16 horas. Después de la elaboración se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (9:1). Se obtienen 1.6 g de **43c** (99%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 99%

Pf: 208-210 °C

Lit.¹²⁷ (207-209 °C)



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.38 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 6.15 (s, 1H), 6.57 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H).

¹⁵⁵ Baeza, A. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá, **2007**, 148.

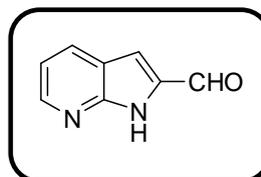
¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

Pirrolo[2,3-b]piridina-2-carbaldehído (89)

A una disolución de **89** (286 mg, 1 mmol) en THF anhidro (30 mL) en atmósfera de argón, se adiciona fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF, 5 mL, solución 1M en THF, 5 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 95 mg de **88** (65%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 65%

Pf: 163-165 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3409, 2757, 1673, 1448, 1112.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

7.24 (dd, $J = 8.1, 4.7$ Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 8.24 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H), 8.63 (dd, $J = 4.7, 1.7$ Hz, 1H), 9.97 (s, 1H), 12.44 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

111.9, 117.1, 120.0, 132.4, 136.5, 148.2, 149.6, 182.6.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₈H₇N₂O₃ [M+H]⁺ : 147.0553

encontrado: 147.0543.

4.6. SÍNTESIS DE *N*-METOXCARBONIL-2-METILAZOLES.

Procedimiento general

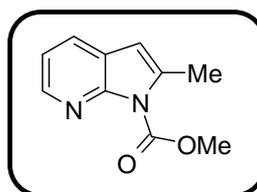
Se disuelven 7.62 mmol de producto de partida en 25 mL de THF anhidro bajo atmósfera de argón. La disolución se enfría a -78 °C. Se adiciona 8.4 mL de hexametildisilazano de litio (LiHMDS, solución 1M en THF, 8.4 mmol) y se deja agitando a esa temperatura durante 20 minutos. Posteriormente se deja evolucionar a temperatura ambiente durante 2 horas hasta la aparición de una coloración rojiza. La disolución se enfría de nuevo a -78 °C y se adicionan 0.7 mL de clorofornato de metilo (8.4 mmol), manteniéndose a esa temperatura durante 1 hora. A continuación la reacción se deja evolucionar a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso hasta la desaparición del sustrato de partida (seguida por TLC). Finalmente, la reacción se hidroliza con una disolución saturada de NH₄Cl, se extrae con AcOEt y se lava con una disolución saturada de NaCl. Se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando el eluyente indicado en cada caso.

2-Metilpirrolo[2,3-*b*]piridina-1-carboxilato de metilo (**38a**)

A partir de 1.00 g de **43a** y siguiendo el método general la reacción finaliza después de 6 horas. Tras la elaboración, se obtiene un residuo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (9:1). Se obtienen 1.42 g de **38a** (98%) como un aceite amarillo.

Rendimiento: 98%

Aceite¹⁵⁵



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.61 (sa, 3H), 4.09 (s, 3H), 6.28 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 7.5, 4.8 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H).

¹⁵⁵ Baeza, A. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá, **2007**, 148.

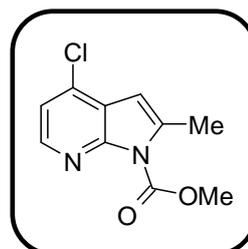
4-Cloro-2-metilpirrolo[2,3-*b*]piridin-1-carboxilato de metilo (**38b**)

A partir de 1.26 g de **43b** y siguiendo el método general la reacción finaliza después de 5 horas. Tras la elaboración, se obtiene un residuo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (9:1). Se obtienen 1.47 g de **38b** (86%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 86%

Pf: 100-101 °C

Lit.¹⁵⁶ (97-98 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.63 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 6.41 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.25 (d, 5.3 Hz, 1H)

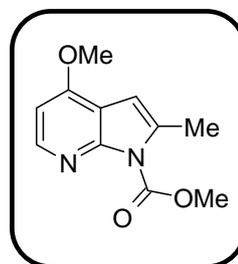
2-Metil-4-metoxipirrolo[2,3-*b*]pirimidina-1-carboxilato de metilo (**38c**)

A partir de 1.23 g de **43c** y siguiendo el método general, la reacción finaliza después de 12 horas. Tras la elaboración, se obtiene un residuo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente AcOEt. Se obtienen 1.40 g de **38c** (84%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 84%

Pf: 88-89 °C

Lit.¹²⁷ (88-90 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.51 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 6.28 (s, 1H), 6.55 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H)

¹⁵⁶ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4073-4077.

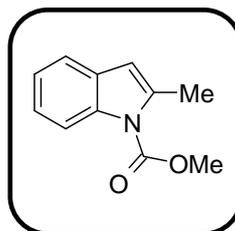
¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

2-Metilindol-1-carboxilato de metilo (46)

A partir de 1.10 g de 2-metilindol y siguiendo el método general, la reacción finaliza tras 2 horas. Tras la elaboración, se obtiene un residuo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (8:2). Se obtienen 1.43 g de **46** (99%) como un aceite marrón claro.

Rendimiento: 99%

Aceite¹⁵⁷



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.60 (s, 3H), 4.04 (s, 3H), 6.34 (s, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H)
8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H).

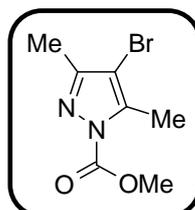
4-Bromo-3,5-dimetilpirazol-1-carboxilato de metilo (55)

A una disolución constituida por 322 mg de 4-bromo-3,5-dimetilpirazol (**54**, 1.84 mmol), 21 mg cloruro de benciltrietilamonio (TEBACl, 0.09 mmol) y 220 mg de NaOH (5.5 mmol) finamente pulverizado en CH₂Cl₂ (10 mL), se adiciona lentamente y a 0 °C 0.17 mL de cloroformiato de metilo (2.20 mmol). Concluida la adición se agita a esa temperatura durante 15 minutos y posteriormente se deja evolucionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La suspensión así obtenida se filtra sobre celita, lavando con CH₂Cl₂ y los líquidos de filtrado se evaporan a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (9:1). Se obtienen 412 mg de **55** (96%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 96%

Pf: 102-104 °C

Lit.^{128b} (102-104 °C)



¹⁵⁷ Nagarathnam, D. *Synthesis* **1992**, 743-745.

^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974-4983.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.24 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 4.00 (s, 3H).

4.7. REACIONES DE HALOGENACIÓN DE AZOLES

4.7.1. Reacción de dibromación.

Procedimiento general

Sobre una disolución del correspondiente metilazol derivado (20 mmol) en 200 mL de CH₂Cl₂, se adiciona *N*-bromosuccinimida (NBS, 7.12 g, 40 mmol). La suspensión obtenida se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. La reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía flash en gel de sílice.

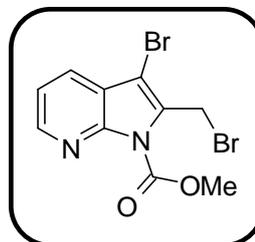
3-Bromo-2-bromometilpirrolo[2,3-*b*]piridina-1-carboxilato de metilo (**34a**)

Partiendo de 3.8 g de **38a** y tras 72 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en CH₂Cl₂:acetona (9:1). Se obtienen 5.56 g de **34a** (80%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 80%

Pf: 148-149.

Lit.^{128b} (147-148 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

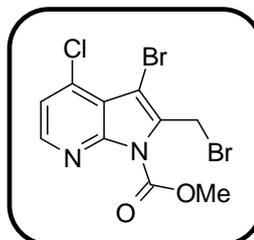
4.05 (s, 3H), 4.97 (s, 2H), 7.20 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 8.45 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H).

^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4974-4983.

3-Bromo-2-bromometil-4-cloropirrolo[2,3-*b*]piridina-1-carboxilato de metilo (34b)

Partiendo de 4.49 g de **38b** y tras 72 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en CH₂Cl₂:acetona (9:1). Se obtienen 5.73 g de **34b** (75%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 75%
Pf: 158-160 °C.
Lit.^{128b} (160-162 °C).



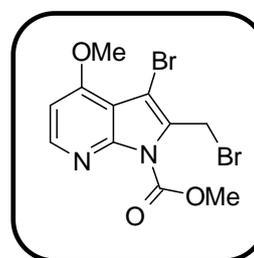
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

4.17 (s, 3H), 5.06 (s, 2H), 7.26 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.37 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H).

3-Bromo-2-bromometil-4-metoxipirrolo[2,3-*b*]piridina-1-carboxilato de metilo (34c)

Partiendo de 4.40 g de **38c** y tras 48 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en CH₂Cl₂:acetona (98:2). Se obtienen 5.82 g de **34c** (77%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 75%
Pf: 173-175 °C.
Lit.¹²⁷ (169-170 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

3.99 (s, 3H), 4.14 (s, 3H), 5.04 (s, 2H), 6.70 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H).

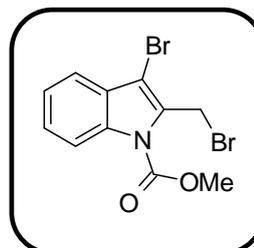
^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974-4983.

¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

3-Bromo-2-bromometilindol-1-carboxilato de metilo (**47**)

Partiendo de 3.78 g de **46** y tras 48 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (9:1). Se obtienen 5.96 g de **47** (86%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 86%
Pf: 119-120 °C.
Lit.^{128b} (118-119 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

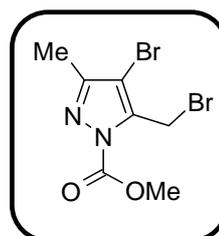
4.11 (s, 3H), 5.05 (s, 2H), 7.32 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.52 (m, 1H), 8.10 (m, 1H).

4.7.2. Reacciones de monobromación radicalica

4-Bromo-5-bromometilpirazol-1-carboxilato de metilo

Una disolución constituida por 2.33 g de 4-bromo-3,5-dimetilpirazol-1-carboxilato de metilo (10 mmol) en CCl₄ (100 mL), se calienta a reflujo y se le adicionan 20 mg de peróxido de benzoilo (0.15 mmol) y 1.78 g de NBS (10 mmol). La mezcla de reacción se calienta durante 17 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión obtenida se filtra sobre celita y los líquidos del filtrado se concentran a sequedad. El residuo así obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂. Se obtienen 2.93 g de **56** (94%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 94%
Pf: 77-78 °C.
Lit.^{128b} (75-76 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.28 (s, 3H), 4.10 (s, 3H), 4.79 (s, 2H).

^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4974-4983.

4.8. REACCIONES DE HETEROCICLACIÓN CON TosMIC.

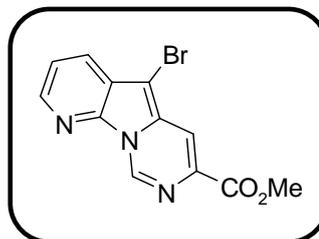
Procedimiento general

Sobre una mezcla del bromometilazol (3.28 mmol), TosMIC (703 mg, 3.6 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (TBAI, 240 mg, 0.65 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) se adicionan 20 mL de una disolución acuosa de NaOH de la concentración que se indica y se agita vigorosamente a la temperatura adecuada. Finalizada la reacción, la mezcla se vierte sobre agua y se extrae con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lava con una solución acuosa saturada de NaCl y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de filtrar el desecante y concentrar a presión reducida, se obtiene un producto crudo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice, en los casos indicados.

5-Bromo-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1, 2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2a)

A partir de 1.14 g de **34a** y tras 1 hora a -10 °C, utilizando una disolución acuosa de NaOH (15%), el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (95:5). Se obtienen 652 mg de **2a** (65%) como un sólido amarillo intenso.

Rendimiento: 65%
Pf: 198-199 °C
Lit.^{128b} (208-209 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

4.04 (s, 3H), 7.57 (dd, *J* = 8.1, 4.6 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H) 8.26 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.61 (dd, *J* = 4.6, 1.4 Hz, 1H), 9.55 (d, *J* = 1.2Hz, 1H).

^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974-4983.

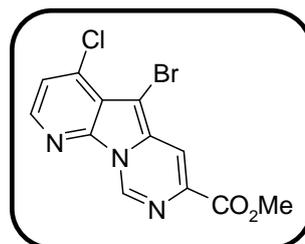
5-Bromo-4-cloro-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2b)

A partir de 1.25 g de **34b** y tras 2 horas de reacción a 0 °C, utilizando una disolución acuosa de NaOH al 15%, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice en hexano: AcOEt (8:2). Se obtienen 302 mg de **2b** (27%) como un sólido amarillo intenso.

Rendimiento: 27%

Pf: 197-199 °C

Lit.^{128b} (195-196 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

4.06 (s, 3H), 7.55 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 9.56 (s, 1H).

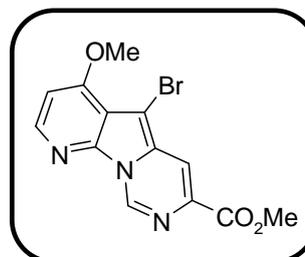
5-Bromo-4-metoxi- pirido[3', 2': 4,5]pirrolo[1, 2- c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2c)

A partir de 1.24 g de **34c** y tras 17 horas de reacción a -10 °C, utilizando una disolución acuosa de NaOH al 15%, se obtiene un residuo que se tritura con acetona y se filtra aislando 0.82 g de **2c** (79%) como un sólido amarillo intenso.

Rendimiento: 79%

Pf: 256-258 °C

Lit.¹²⁷ (256-257 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

4.01 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 6.86 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 9.44 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H).

¹²⁷ Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607-5618.

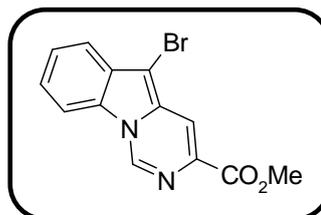
5-Bromo-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxilato de metilo (3)

A partir de 1.14 g de **47** y tras 4 horas de reacción a temperatura ambiente, utilizando una disolución acuosa de NaOH (30%), se obtiene un residuo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice, empleando como eluyente hexano:AcOEt (8:2). Se obtienen 780 mg de **3** (89%) como un sólido amarillo intenso.

Rendimiento: 89%

Pf: 255-256 °C.

Lit.^{128b} (260-261 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

4.02 (s, 3H), 7.56 (m, 2H), 7.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 9.14 (s, 1H).

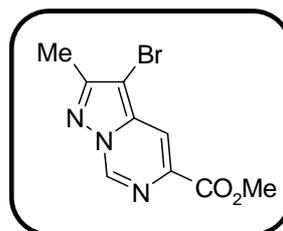
3-Bromo-2-metil-pirazolo[2,3-c]pirimidina-5-carboxilato de metilo (6)

A partir de 1.02 g de **56** y tras 20 minutos de reacción a -10 °C, utilizando una disolución acuosa de NaOH (30%), se obtiene un residuo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice, empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 390 mg de **6** (44%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 44%

Pf: 183-185 °C

Lit.^{128b} 180-181 °C.



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.48 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 8.17 (s, 1H), 9.08 (s, 1H).

^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974-4983.

4.9. REACCIÓN DE SUZUKI- MIYAURA.

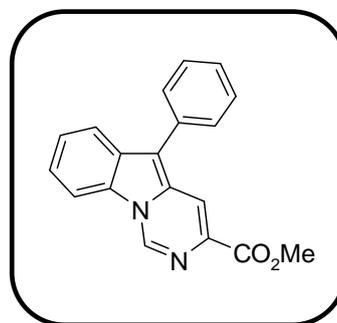
5-Fenilpirimido[1,6-a]indol-3-carboxilato de metilo (63)

Sobre una suspensión de 5-Bromo-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxilato de metilo (**3**) (305 mg, 1 mmol), ácido fenilborónico (134 mg, 1.1 mmol) y K_2CO_3 (193 mg, 1.4 mmol) en tolueno/ MeOH (20/1, 25 mL) bajo argón, se adiciona $Pd(PPh_3)_4$ (57 mg, 0.049 mmol) y se calienta a reflujo durante 10 horas. Posteriormente se deja enfriar y el precipitado formado se filtra y se lava con tolueno y AcOEt. El sólido se disuelve en CH_2Cl_2 y se lava con agua. Se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y después de eliminar el desecante la fase orgánica resultante, se vuelve a filtrar sobre celita, lavando con CH_2Cl_2 , finalmente se elimina el disolvente a vacío. Se obtienen 256 mg de **63** (85%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 85%

Pf: 202-203 °C

Lit.¹³⁸ (208-209 °C).



¹H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

3.98 (s, 3H), 7.41 (at, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.55 (m, 3H), 7.65 (m, 2H), 8.06 (m, 2H), 8.39 (s, 1H), 9.23 (s, 1H).

4.10. SÍNTESIS DE PIRROLOPIRIMIDONAS

Procedimiento general

Se disuelve (2-benciloxicarbonilamino-2-dimetoxifosfonil) acetato de metilo (1.44 g, 6 mmol) en 5 mL de THF anhidro bajo atmósfera de argón. La disolución se enfría a -78 °C. Posteriormente se adiciona 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG, 0.75 mL, 6 mmol) y se deja agitando a esa temperatura durante 5 minutos, seguidamente se adicionan 4 mmol del aldehído correspondiente. La mezcla de reacción se agita a -78 °C durante 1 hora, a continuación la reacción se deja evolucionar a temperatura

¹³⁸ Mendiola, J.; Castellote, I.; Alvarez-Builla, J.; Fernandez-Gadea, J.; Gomez, A.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1254-1257.

ambiente durante el tiempo indicado en cada caso, hasta la desaparición del producto de partida (seguida por TLC). Finalmente, se le añaden 10 mL de agua y se extrae con AcOEt, la fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando el eluyente indicado en cada caso.

1-Oxo-1,2-dihidro-pirrolo[1,2-c]pirimidina-3-carboxilato de metilo (4)

Partiendo de 381 mg de pirrol-2-carboxaldehído y tras 4 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 315 mg de **4** (41%) como un sólido marrón claro.

Rendimiento: 41%

Pf: 145-147 °C.

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3206, 2955, 1688, 1432, 1381, 1328, 1283.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

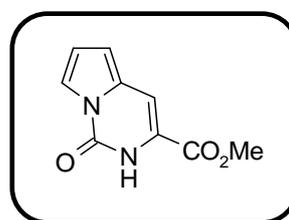
3.93 (s, 3H), 6.64 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.70 (at, $J = 3.3$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.74 (m, 1H), 8.34 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

53.0, 105.5, 110.5, 115.9, 117.7, 121.1, 129.6, 145.5, 162.2.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₉H₉N₂O₃ [M+H]⁺: 193.0613

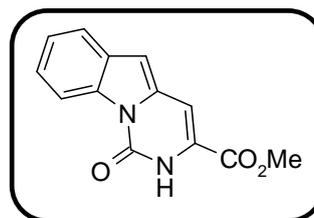
encontrado: 193.0606



1-Oxo-1,2-dihidro-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxilato de metilo (5)

Partiendo de 580 mg de indol-2-carboxaldehído y tras 3 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (8:2). Se obtienen 543 mg de **5** (56%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 56%
Pf: 218-220 °C.
Lit.¹³¹ (220-221 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

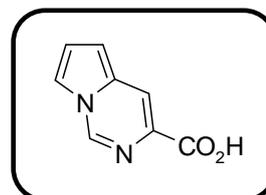
3.95 (s, 3H), 6.86 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.9 Hz, 2 H), 7.40 (m, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.6, 1.9 Hz, 1H), 8.23 (sa, 1H), 8.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H).

4.11. REACCIONES DE HIDRÓLISIS

Ácido 3-pirrolo[1,2-c]pirimidin carboxílico (**32**)

Una disolución del compuesto **1** (4.30 g, 23 mmol) en 140 mL de HCl 6N se calienta a reflujo durante 24 horas. Se elimina el ácido a presión reducida obteniéndose el clorhidrato de **32** como un sólido verde oscuro que se lava con éter. Para liberarlo, se disuelve en agua y se basifica hasta pH 4-5 con una disolución saturada de NaHCO₃. A continuación se extrae con CH₂Cl₂, utilizando para ello, debido a la complicada emulsión que se forma, un sistema de extracción en continuo. Es importante que durante el proceso se controle la subida de pH que se produce al ir retirándose el ácido de la fase acuosa, manteniéndose el pH entorno a 4-5 añadiendo más base. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y se elimina el disolvente. Se obtienen 3.70 g de **32** (100 %) como un sólido verde.

Rendimiento: 85%
Pf: 246-248 °C.
Lit.^{119a} (246-248 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

6.84 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.05 (at, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.58 (m, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.80 (s, 1H).

¹³¹ Carlier, P. R.; Lam, P. C. H.; Wong, D. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6256-6259.

^{119a} Mínguez, J. M.; Vaquero, J. J.; García-Navío, J. L.; Álvarez-Builla, J.; Castaño, O.; Andrés, J. L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7788-7801.

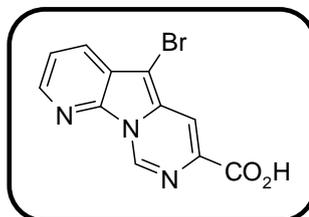
Procedimiento general

Sobre una suspensión de 1.0 mmol del éster de partida en 10 mL de una mezcla MeOH:H₂O (3:1), se adiciona 442 mg de K₂CO₃ (3.2 mmol) y se calienta a la temperatura de reflujo de la mezcla de disolventes durante el tiempo indicado en cada caso. Finalizada la reacción se concentra el MeOH, se adiciona más agua y se lleva a pH=4-5 con HCl (1N). Se obtiene un sólido que se filtra a vacío, y se lava sucesivamente con agua, hexano y Et₂O.

Ácido 5-bromopirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxílico (44)

A partir de 306 mg de **2a** y tras 4 horas de reacción, se obtienen 260 mg de **44** (85%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 85%
Pf: >250 °C (Desc.)
Lit.^{128b} (>250 °C (Desc.)).



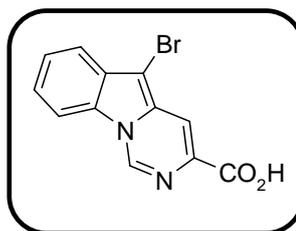
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

7.69 (dd, *J* = 8.2, 4.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 8.66 (dd, *J* = 4.6, 1.5 Hz, 1H), 9.63 (sa, 1H), 13.50 (sa, 1H).

Ácido 5-bromopirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxílico (48)

Partiendo de 305 mg de **3** y tras 4 horas de reacción se obtienen 272 mg de **48** (89%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 89%
Pf: >300 °C (Desc.)
Lit.^{128b} (>300 °C (Desc.))



^{128b} Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974-4983.

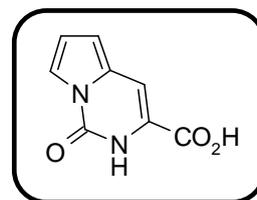
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm)

7.57 (m, 2H), 7.74 (m, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.51 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 9.76 (s, 1H).

Ácido 1-oxo-1,2-dihidro-pirrolo[1,2- c]pirimidin-3-carboxílico (52)

A partir de 192 mg de **4** y tras 2 horas de reacción, se obtienen 144 mg de **52** (81 %) como un sólido blanco.

Rendimiento: 81%
Pf: >300 °C (Desc.).



IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}):

3274, 3107, 1701, 1649, 1621, 1379.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm):

6.36 (dd, $J = 3.5, 1.6$ Hz, 1H), 6.60 (at, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 7.46 (m, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm):

98.0, 102.8, 105.0, 113.9, 115.0, 132.5, 140.7, 145.9.

HRMS (ESI -TOF) m/z Calculado para $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 179.0460.

encontrado: 179.0460.

Ácido 1-oxo-1,2-dihidro-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxílico (53)

A partir de 242 mg de **5** y tras 4 h de reacción, se obtienen 228 mg de **53** (100 %) como un sólido blanco.

Rendimiento: 100%

Pf: >300 °C (Desc.).

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3207, 1644, 1453, 1377, 1223.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

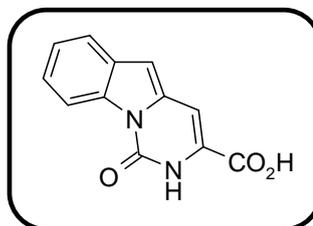
6.66 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

96.3, 97.2, 114.6, 119.0, 121.1, 122.7, 129.9, 131.6, 135.0, 136.1, 146.7, 161.1.

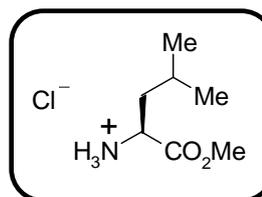
HRMS (APCI -TOF) *m/z* Calculado para C₁₂H₉N₂O₃ [M+H]⁺ : 229.0613

encontrado: 229.0619.

**4.12. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS****4.12.1. Reacción de esterificación de aminoácidos****Clorhidrato del éster metílico de L-leucina (57)**

Sobre una suspensión de L-leucina (8.77 g, 67 mmol) en MeOH (100 mL) a 0 °C se añade gota a gota cloruro de tionilo (7.33 mL, 100.5 mmol). A continuación la mezcla se deja alcanzar temperatura ambiente y se mantiene con agitación a la misma temperatura durante toda la noche. Una vez eliminado el disolvente a vacío se obtiene el producto crudo, que se purifica por recristalización de MeOH/Et₂O. Se obtienen 11.97 g de **57** (95 %) como un sólido blanco.

Rendimiento: 95%
Pf: 151-153 °C.
Lit.¹⁵⁸ (149-151 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

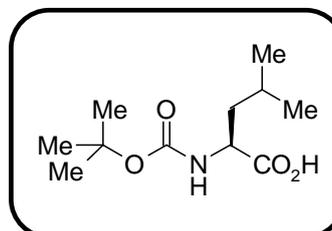
0.89 (m, 6H), 1.65 (m, 2H), 1.82 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.10 (t, 1H).

4.12.2. Reacción de protección con el grupo Boc

***N*-(*t*-Butoxicarbonil)-L-leucina (58a)**

Sobre una suspensión de L-leucina (11.19 g, 85.4 mmol) en una mezcla dioxano/H₂O 1/1 (100 mL) a 0 °C se añade Et₃N (17 mL, 122.2 mmol) y dicarbonato de di-*tert*-butilo (16.4 g, 75 mmol). Concluida la adición se deja que la mezcla de reacción evolucione hasta temperatura ambiente, y se agita a la misma temperatura durante toda la noche. Se elimina el dioxano a vacío, se acidifica con HCl 5% hasta pH = 2 y la fase acuosa se extrae con AcOEt. Las fases orgánicas se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO₄. Una vez eliminado a vacío el disolvente se obtiene el producto puro. Se obtienen 18.86 g de **58** (96 %) de un aceite incoloro.

Rendimiento: 96%
Aceite¹⁵⁹



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

0.93 (m, 6H), 1.38 (s, 9H), 1.55(m, 3H), 4.25 (m, 1H), 4.90 (sa, 1H).

¹⁵⁸ Zhou, Z. ; Guo, Y. *Synthetic Comm.* **2008**, 38, 684-696.

¹⁵⁹ Candelon, N.; Shinkaruk, S.; Bennetau, B.; Bennetau-Pelissero, C.; Dumartin, M-L; Degueil, M.; Babin, P. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 2463-2469.

4. 12.3. Reacción de acoplamiento peptídico

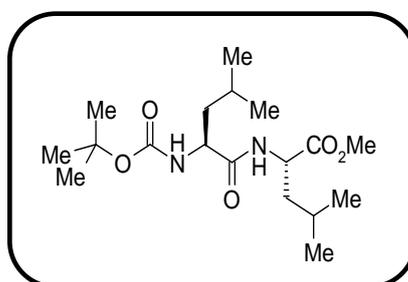
Éster metílico de *N*-(*t*-butoxicarbonil)-*L*-leucil-*L*-leucina (**58b**).

Sobre una suspensión de **57** (3.89 g, 21.4 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (100 mL) bajo atmósfera de argón, se añaden secuencialmente **58a** (6.95 g, 30.0 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 3.3 g, 24.4 mmol), Et₃N (4.6 mL, 33.0 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 5.3 g, 25.7 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 2.8 g, 23.0 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche. Posteriormente se filtra sobre celita, el disolvente se elimina a vacío y el producto crudo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice, utilizando como eluyente AcOEt. Se obtienen 5.90 g de **58b** (77%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 77%

Pf: 140-141 °C.

Lit.¹⁶⁰ (139-140 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

0.91 (m, 12H), 1.41 (s, 9H), 1.72 (m, 6H), 3.70 (s, 3H), 4.09 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 4.83 (sa, 1H), 6.42 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H).

4.12.4. Reacción de desprotección del grupo Boc

Trifluoroacetato del éster metílico de *N*-*L*-leucil-*L*-leucina (**59**)

Sobre una disolución de **58b** (7.34 g, 20.5 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (100 mL) se añade gota a gota ácido trifluoroacético (50 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2.5 horas. Posteriormente, el disolvente orgánico se elimina a vacío y el sólido formado se tritura con hexano. Se obtienen 5.46 g de **59** (72 %).

¹⁶⁰ Davis, M. R.; Styers, T. J.; Rodríguez, R. A.; Pan, Po-Shen; Vasko, R. C.; McAlpine, Shelli R. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 177-180.

Rendimiento: 72%

Pf: 189-190 °C

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3353, 2961, 1727, 1667, 1524, 1139.

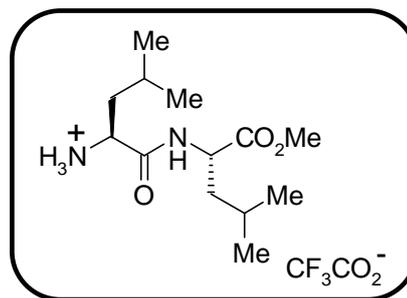
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

0.94 (m, 6H), 0.96 (m, 6H), 1.63 (m, 3H), 1.73 (m, 3H), 3.70 (s, 3H), 4.13 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 7.46 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

21.6, 22.1, 22.2, 22.5, 24.3, 24.7, 40.4, 40.6, 51.7, 52.4, 52.6, 169.3, 172.8

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₃H₂₇N₂O₃ [M+H]⁺ :259.2016.
encontrado: 259.2026.



4.13. SÍNTESIS DE HÍBRIDOS PÉPTIDO-HETEROCICLO

4.13.1. Reacción de acoplamiento de los heterociclos con el clorhidrato de L-leucina carboxilato de metilo

Procedimiento general:

A una disolución del ácido correspondiente (1 mmol) en DMF anhidra (3.5 mL) bajo atmósfera de argón, se añade secuencialmente **58** (0.22 gr, 1.2 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 162 mg, 1.2 mmol), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 212 μ L, 1.2 mmol), Et₃N (418 μ L, 3 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 12 mg, 0.1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. Posteriormente se elimina el disolvente a vacío y el producto crudo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice.

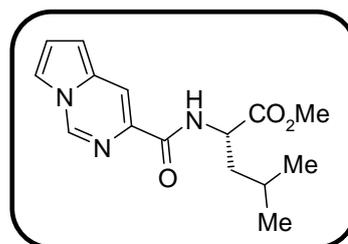
Éster metílico de *N*-(pirrolo[1,2-*c*]pirimidin-3-il-carbonil)-L-leucina (7a)

A partir de 162 mg de **32** y tras 2 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (98:2). Se obtienen 104 mg de **7a** (36 %) como un aceite marrón.

Rendimiento: 36%

Aceite

$[\alpha]_{365}^{20} = -42^{\circ}$ (c = 0.1, CHCl₃)



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3387, 2956, 1743, 1660, 1348.

¹H-RMN (300 MHz, Acetone-*d*₆), δ (ppm):

0.96 (m, 6H), 1.71 (m, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.81 (m, 1H), 6.68 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.70 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

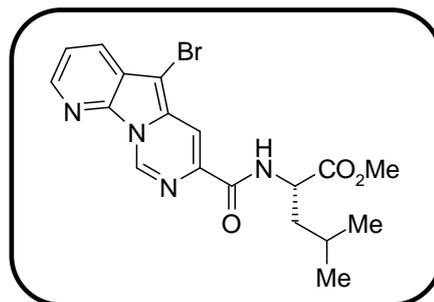
21.9, 22.9, 24.9, 41.7, 50.8, 52.3, 104.5, 112.9, 114.3, 117.7, 131.2, 132.4, 137.0, 164.1, 173.4.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₅H₁₉N₃O₃ [M+H]⁺ :290.1505.
encontrado: 290.1499.

Éster metílico de *N*-(5-bromo-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-*c*]pirimidina-3-il-carbonil)-L-leucina (8a)

Partiendo de 292 mg de **44** y tras 1 día de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (98:2). Se obtienen 411 mg de **8a** (98 %) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 98%
Pf: 152-153 °C
[α]²⁰₄₃₆ = -24 ° (c = 0.1, CHCl₃)



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3403, 2957, 1746, 1684, 1434, 1210.

¹H-RMN (300 MHz, Acetone- *d*₆), δ (ppm):

0.98 (d, *J* = 5.0 Hz, 6H), 1.78 (m, 2H), 1.90 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 4.79 (m, 1H), 7.68 (dd, *J* = 8.1, 4.4 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.21 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.63 (dd, *J* = 4.4, 1.5 Hz, 1H), 9.55 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

21.9, 23.0, 24.9, 41.7, 51.0, 52.4, 84.3, 112.2, 121.6, 122.1, 128.1, 131.0, 137.2, 138.1, 139.9, 144.6, 163.0, 173.1.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₀⁷⁹BrN₄O₃ [M+H]⁺: 419.0719.
 encontrado: 419.0701.

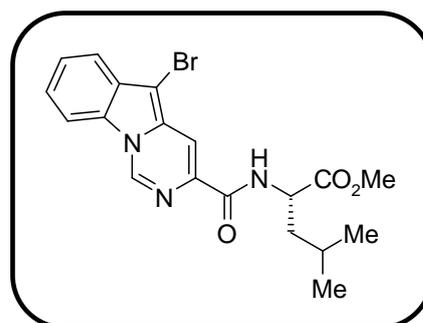
Éster metílico de *N*-(5-bromo-pirimido[1, 6-*a*]indol-3-il-carbonil)-*L*-leucina (9a)

Partiendo de 291 mg de **48** y tras 2 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (98:2). Se obtienen 289 mg de **9a** (69 %) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 69%

Pf: 140-142 °C

[α]_D²⁰ = -19 ° (c = 0.1, CHCl₃)



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3389, 2956, 1747, 1667, 1547, 1363.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

0.94 (m, 6H), 1.75 (m, 3H), 3.76 (s, 3H), 4.86 (m, 1H), 7.52 (m, 2H), 7.79 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 9.05 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

21.9, 22.9, 24.9, 41.7, 50.9, 52.3, 83.9, 110.6, 112.3, 119.7, 123.7, 125.7, 128.1, 129.2, 131.1, 136.5, 137.4, 163.2, 173.24.

**HRMS (APCI) *m/z* Calculado para C₁₉H₂₀⁷⁹BrN₃O₃ [M+H]⁺ : 418.0766.
encontrado : 418.0776.**

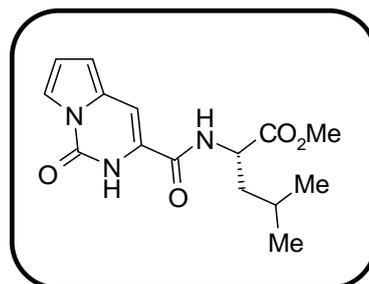
Éster metílico de *N*-(1-oxo-1,2-dihidro-pirroló[1,2-*c*]pirimidina-3-il-carbonil)-L-leucina (10a)

Partiendo de 178 mg de **52** y tras 2 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 204 mg de **10a** (67%) como un aceite verde oscuro.

Rendimiento: 67%

Aceite

$[\alpha]_{365}^{20} = -35^\circ$ (c = 0.1, CHCl₃)



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3304, 2958, 1743, 1619, 1547, 1204, 724.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

0.94 (d, *J* = 5.5 Hz, 6H), 1.75 (m, 3H), 3.77 (s, 3H), 4.80 (m, 1H), 6.53 (dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, 1H), 6.67 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.66 (m, 1H), 8.83 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

21.9, 22.8, 24.9, 41.5, 31.3, 52.7, 100.3, 109.1, 115.7, 116.8, 123.7, 129.2, 145.6, 160.8, 173.5.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₅H₁₉N₃O₄ [M+H]⁺ : 306.1454.
encontrado: 306.1459.

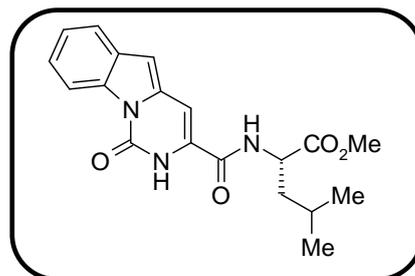
Éster metílico de *N*-(1-oxo-1,2-dihidro-pirimido[1,6-*a*]indol-3-il-carbonil)-*L*-leucina (11a)

A partir de 228 mg de **53** y tras dos días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 188 mg de **11a** (53%) como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 53%

Pf: >230 °C (Desc.).

[α]²⁰₃₆₅ = -46 ° (c = 0.1, CHCl₃)



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3311, 2956, 1748, 1687, 1656, 1629, 1543, 1442, 781, 751.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

0.96 (m, 6H), 1.76 (m, 3H), 3.71 (s, 3H), 4.69 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 7.67 (m, 3H), 7.70 (m, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.61 (m, 1H), 9.16 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

22.0, 22.7, 24.9, 41.8, 51.4, 52.7, 99.1, 103.8, 116.2, 120.3, 124.1, 124.2, 127.2, 130.3, 133.2, 133.6, 147.0, 160.5, 173.1.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₉H₂₁N₃O₄ [M+H]⁺ : 356.1610. encontrado: 356.1600.

4.13.2. Reacción de acoplamiento de los heterociclos con trifluoroacetato del éster metílico de *N*-*L*-leucil-*L*-leucina.

Procedimiento general:

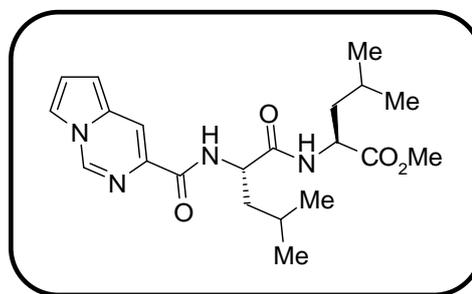
A una disolución del ácido correspondiente (1 mmol) en DMF anhidra (3.5 mL) bajo argón, se añade secuencialmente **59** (0.446 g, 1.2 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 162 mg, 1.2 mmol), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 212 μ L,

1.2 mmol), Et₃N (417 µL, 3 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 12 mg, 0.1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. Posteriormente se elimina el disolvente a vacío y el producto crudo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice.

Éster metílico de *N*-(pirrolo[1,2-*c*]pirimidina-3-il-carbonil)-*L*-leucil-*L*-leucina (**7b**)

A partir de 162 mg de **32** y tras 2 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (98:2). Se obtienen 334 mg de **7b** (83%) como un sólido marrón.

Rendimiento: 83%
Pf: 70-72 °C
[α]²⁰₃₆₅ = -28 ° (c = 0.1, CHCl₃)



IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹):

3294, 2957, 1747, 1649, 1347.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

0.83 (d, *J* = 5.3 Hz, 6H), 0.94 (m, *J* = 5.7 Hz, 6H), 1.56 (m, 3H), 1.69 (m, 2H), 1.80 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 4.56 (m, 1H), 4.67 (m, 1H), 6.69 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.94 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.47 (m, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.69 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

21.9, 22.1, 22.7, 23.0, 24.8, 40.5, 41.4, 50.8, 51.6, 52.3, 103.3, 104.6, 112.9, 114.3, 117.7, 131.2, 132.3, 137.1, 164.5, 171.6, 173.2.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₂₁H₃₀N₄O₄ [M+H]⁺ : 403.2345.
 encontrado: 403.2341.

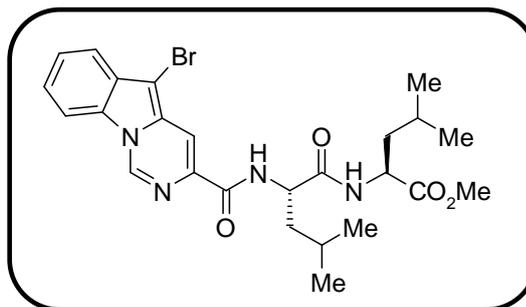
Éster metílico de *N*-(5-bromo-pirimido[1, 6-*a*]indol-3-il-carbonil)-*L*-leucil-*L*-leucina (9b)

A partir de 291 mg de **48** y tras 4 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂:acetona (98:2). Se obtienen 228.3 mg de **9b** (43%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 43%

Pf: 89-92 °C.

[α]²⁰₃₆₅ = -34 ° (c = 0.1, CHCl₃)



IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹):

3308, 2957, 1747, 1654, 13578, 743.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

0.81 (m, *J* = 6.2 Hz, 6H), 0.96 (m, *J* = 6.2 Hz, 6H), 1.60 (m, 3H), 1.72 (m, 2H), 1.80 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.59 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 6.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.56 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 9.05 (s, 1H).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

21.9, 22.1, 22.7, 23.0, 24.8 (2C), 40.8, 41.3, 50.9, 51.8, 52.3, 87.2, 110.6, 112.4, 119.8, 123.9, 125.7, 128.2, 129.3, 131.0, 136.3, 137.5, 163.6, 171.5, 173.1.

HRMS (APCI -TOF) m/z Calculado para C₂₅H₃₁⁷⁹BrN₄O₄ [M+H]⁺ : 531.1607.
encontrado: 531.1617.

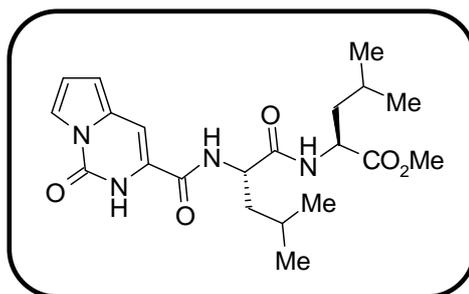
Éster metílico de *N*-(1-oxo-1,2-dihidro-pirroló[1,2-*c*]pirimidina-3-il-carbonil)-L-leucil-L-leucina (10b)

Partiendo de 178 mg de **52** y tras 2 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 126 mg (30%) de **10b** como un aceite verde oscuro.

Rendimiento: 30%

Aceite.

$[\alpha]_{365}^{20} = -37^\circ$ (c = 0.1, CHCl₃)



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3288, 2957, 2382, 2349, 1748, 1643.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

0.84 (m, 6H), 0.95 (m, 6H), 1.60 (m, 3H), 1.70 (m, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.57 (m, 1H), 4.77 (m, 1H), 6.54 (dd, *J* = 3.3, 1.3 Hz, 1H), 6.68 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 2.9, 0.1 Hz, 1H), 9.20 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

21.7, 22.2, 22.6, 22.7, 24.8 (2C), 41.1, 41.5, 50.9, 52.2, 52.4, 100.4, 109.1, 115.7, 116.8, 123.9, 129.3, 145.8, 161.1, 171.8, 172.9.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₂₁H₃₀N₄O₅ [M+H]⁺ : 419.2289.
encontrado: 419.2285.

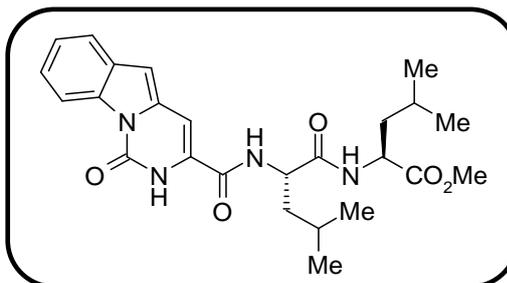
Éster metílico de *N*-{1-oxo-1,2-dihidropirimido[1,6-*a*]indol}-3-il-carbonil-*N*-L-leucil-L-leucina (11b)

Partiendo de 228 mg de **53** y tras 2 días de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (6:4). Se obtienen 183 mg (39%) de **11b** como un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 39%

Pf: 237-238 °C.

[α]²⁰₃₆₅ = -45 ° (c = 0.1, CHCl₃)



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3300, 2958, 1741, 1650, 1538, 1339.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

0.74 (m, 6H), 0.97 (m, 6H), 1.56 (m, 3H), 1.73 (m, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.58 (m, 1H), 4.91 (m, 1H), 6.76 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.37 (m, 3H), 7.65 (m, 1H), 8.64 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.54 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

21.7, 22.4, 22.6, 22.7, 24.8 (2C), 41.2, 41.6, 51.0, 52.3, 52.4, 99.7, 102.8, 116.2, 120.4, 124.0, 124.2, 127.5, 130.4, 133.3, 133.5, 147.5, 160.8, 171.6, 172.9.

HRMS (APCI -TOF) *m/z* Calculado para C₂₅H₃₂N₄O₅ [M+H]⁺ : 469.2451. encontrado: 469.2442.

4.14. REACCIÓN DE PIRROLOPIRIMIDINAS CON AMINAS

Procedimiento general

Una disolución de la pirrolopirimidina en la correspondiente amina o bien en la amina y los disolventes indicados en cada caso, se calienta a reflujo o mediante MW focalizado, bajo las condiciones que se indican. Concluida la reacción se elimina el disolvente. Una vez eliminado a vacío el disolvente se obtiene el producto crudo, el cual se purifica por cromatografía en gel de sílice en los casos indicados.

4.14.1. Reacción de 3-pirrolo[1,2-c]pirimidina carboxilato de etilo (1) con 2-metoxietilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 190 mg (1 mmol) de **1** en 20.3 mL (233 mmol) de 2-metoxietilamina y tras 7 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtienen 138 mg de **12** (63 %) como un sólido marrón.

***N*-(2-Metoxietil)-pirrolo[1,2-c]pirimidina-3-carboxamida (12)**

Rendimiento: 63 %

Pf: 90-92 °C

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3321, 2929, 1645, 1196.

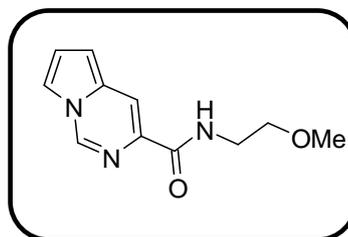
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

3.36 (s, 3H), 3.53 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.62 (m, 2H), 6.64 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.9 (dd, $J = 2.5, 3.7$ Hz, 1H), 7.44 (m, 1H), 8.02 (sa, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.67 (s, 1H).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

39.2, 58.9, 71.3, 104.1, 112.6, 113.8, 117.5, 131.3, 132.9, 136.9, 164.3.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₁H₁₃N₃O₂ [M+H]⁺ : 220.1086.
encontrado: 220.1091.



4.14.2. Reacción de 5-bromo-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxilato de metilo (3) con distintas aminas bajo diferentes condiciones.

Reacción con 2-metoxietilamina utilizando la propia amina como disolvente

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 20.3 mL (233 mmol) de 2-metoxietilamina y tras 1 hora de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtienen 154 mg de **15a** (45%) como un aceite naranja y 140.2 mg de **16a** (41%) como un sólido naranja.

5-[(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3-(2-metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (**15a**)

Rendimiento: 45%

Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3330, 2929, 1716, 1651, 1589.

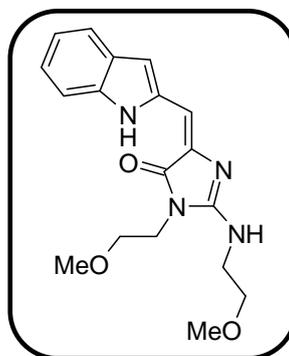
¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

3.26 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.48 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 11.01 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

40.9, 41.0, 58.1, 58.1, 69.4, 70.3, 103.9, 105.5, 111.5, 119.4, 120.2, 122.3, 128.2, 135.2, 136.9, 138.8, 157.4, 168.6.

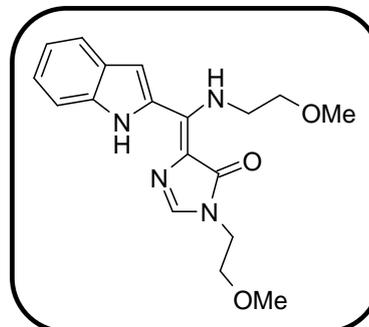
HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770.
encontrado: 343.1780.



5-[(1*H*-Indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metilen]-3-(2-metoxietil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16a)

Rendimiento: 41%

Pf: 72-74 °C.



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3213, 2932, 1632, 1467, 1112.

¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

3.26 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.79 (m, 4H), 7.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 11.87 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

40.1, 45.0, 57.9, 58.2, 69.9, 70.9, 108.2, 112.3, 114.1, 119.9, 121.2, 123.8, 126.9, 127.4, 136.8, 138.4, 148.9, 166.1.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770. encontrado: 343.1760.

Reacción con 2-metoxietilamina utilizando tolueno como disolvente

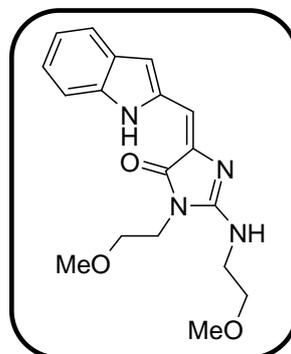
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3**, utilizando 1.7 mL (20 mmol) de 2-metoxietilamina y 18 mL de tolueno, tras 4 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtienen 68.5 mg de **15a** (20%), 12 mg de **16a** (4%) y 191.4 mg de **17a** (55%) como un sólido amarillo

5-[(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3-(2-metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15a)**Rendimiento:** 20%**Aceite****IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3330, 2929, 1716, 1651, 1589.

¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):3.26 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.48 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 11.01 (s, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):**

40.9, 41.0, 58.1, 58.1, 69.4, 70.3, 103.9, 105.5, 111.5, 119.4, 120.2, 122.3, 128.2, 135.2, 136.9, 138.8, 157.4, 168.6.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770.
encontrado: 343.1780.

5-[(1*H*-Indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metilen]-3-(2-metoxietil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16a)

Rendimiento: 4%

Pf: 72-74 °C.

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3213, 2932, 1632, 1467, 1112.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

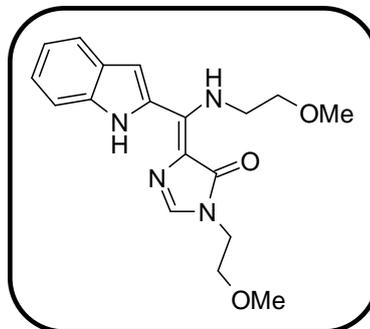
¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

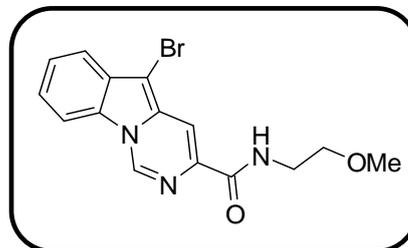
3.26 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.79 (m, 4H), 7.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 11.87 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

40.1, 45.0, 57.9, 58.2, 69.9, 70.9, 108.2, 112.3, 114.1, 119.9, 121.2, 123.8, 126.9, 127.4, 136.8, 138.4, 148.9, 166.1.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770.
encontrado: 343.1760.



N*-(2-Metoxietil)-5-bromo-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (17a)*Rendimiento:** 55%**Pf:** 180-182 °C.**IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3405, 2359, 1666, 1505.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):3.41 (s, 3H), 3.58 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 3.68 (q, $J = 4.4$ Hz, 2H), 7.48 (at, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.56 (at, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 8.2, 0.1$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.2, 0.1$ Hz, 1H), 8.13 (sa, 1H), 8.23 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 9.04 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

39.3, 58.9, 71.2, 86.7, 110.5, 112.0, 119.8, 123.6, 125.6, 128.1, 129.3, 131.3, 137.1, 137.3, 163.5.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₅H₁₅⁷⁹BrN₃O₂ [M+H]⁺ : 348.0348.
encontrado :

348.0348.

Reacción con 2-metoxietilamina utilizando *n*-propanol como disolvente

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3**, utilizando 1.7 mL (20 mmol) de 2-metoxietilamina y 18 mL de *n*-propanol, tras 3 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtienen 106.2 mg de **15a** (20%) como un aceite naranja, 24 mg de **16a** (8%) como un sólido naranja, 97.4 mg de **17a** (28%) como un sólido naranja y 67 mg de **60** (20%) como un aceite naranja.

5-[(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3-(2-metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15a)

Rendimiento: 20%

Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3330, 2929, 1716, 1651, 1589.

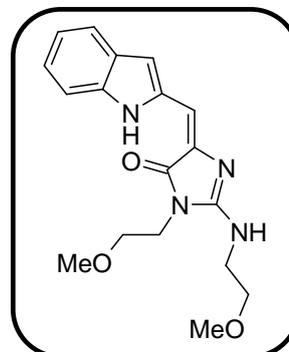
¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

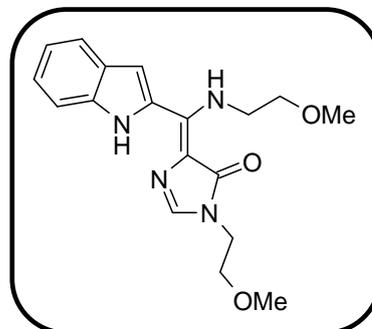
3.26 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.48 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 11.01 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

40.9, 41.0, 58.1, 58.1, 69.4, 70.3, 103.9, 105.5, 111.5, 119.4, 120.2, 122.3, 128.2, 135.2, 136.9, 138.8, 157.4, 168.6.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770.
encontrado: 343.1780.



5-[(1*H*-Indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metilen]-3-(2-metoxietil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16a)**Rendimiento:** 8%**Pf:** 72-74 °C.**IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3213, 2932, 1632, 1467, 1112.

¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):3.26 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.79 (m, 4H), 7.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 11.87 (s, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):**

40.1, 45.0, 57.9, 58.2, 69.9, 70.9, 108.2, 112.3, 114.1, 119.9, 121.2, 123.8, 126.9, 127.4, 136.8, 138.4, 148.9, 166.1.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770.
encontrado: 343.1760.

***N*-(2-Metoxietil)-5-bromo-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (17a)**

Rendimiento: 28%

Pf: 180-182 °C.

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3405, 2359, 1666, 1505.

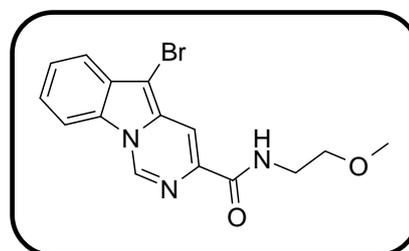
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

3.41 (s, 3H), 3.58 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 3.68 (q, $J = 4.4$ Hz, 2H), 7.48 (ta, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.56 (ta, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 8.2, 0.1$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.2, 0.1$ Hz, 1H), 8.13 (sa, 1H), 8.23 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 9.04 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

39.3, 58.9, 71.2, 86.7, 110.5, 112.0, 119.8, 123.6, 125.6, 128.1, 129.3, 131.3, 137.1, 137.3, 163.5.

**HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₅H₁₅⁷⁹BrN₃O₂ [M+H]⁺ : 348.0348.
encontrado: 348.0348.**



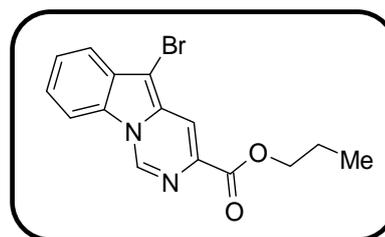
5-Bromo-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxilato de propilo (60)

Rendimiento: 20%

Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3340, 2968, 1728, 1372, 1220.



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

1.04 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.86 (hex, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.52 (at, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.58 (at, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 9.16 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

10.4, 22.1, 67.5, 87.5, 110.8, 116.0, 119.9, 124.2, 125.8, 128.2, 129.2, 130.6, 135.1, 138.3, 164.6.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₅H₁₄⁷⁹BrN₂O₂ [M+H]⁺ : 333.0239.
encontrado: 333.0245.

Reacción con 2-metoxietilamina utilizando DMF como disolvente y bajo irradiación de MW

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 153 mg (0.5 mmol) de **3**, utilizando 85 μL (10 mmol) de 2-metoxietilamina y 9 mL de DMF, tras 10 minutos de reacción por calentamiento por MW a 50 °C, el residuo obtenido se purifica por HPLC preparativo (*Dynamax* de Varian, fase móvil: **A**: 0.1% ácido fórmico en H₂O y **B**: 0.1% ácido fórmico en MeOH). Se obtienen 31 mg de **15a** (18%) como un aceite naranja, 41 mg de **16a** (24%) como un sólido naranja, 60 mg de **61** (35%) como un aceite naranja y 24 mg de **62** (14%) como un sólido amarillo.

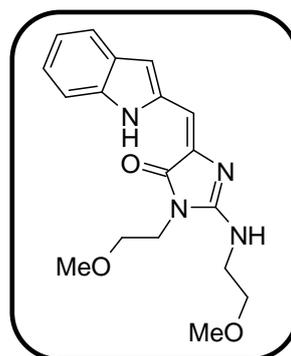
5-[(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3-(2-metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15a**)**

Rendimiento: 18%

Aceite

IR (NaCl), *v*_{max} (cm⁻¹):

3330, 2929, 1716, 1651, 1589.



¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

3.26 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.48 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 11.01 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

40.9, 41.0, 58.1, 58.1, 69.4, 70.3, 103.9, 105.5, 111.5, 119.4, 120.2, 122.3, 128.2, 135.2, 136.9, 138.8, 157.4, 168.6.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770.
encontrado : 343.1780.

5-[(1*H*-Indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metilen]-3-(2-metoxietil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16a)

Rendimiento: 24%
Pf: 72-74 °C.

IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹):

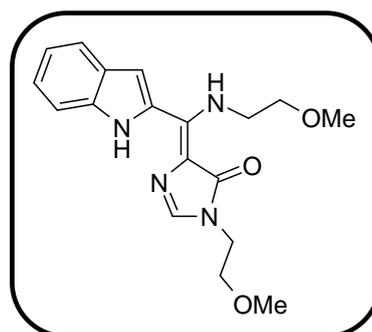
3213, 2932, 1632, 1467, 1112.

¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

3.26 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.79 (m, 4H), 7.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 11.87 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

40.1, 45.0, 57.9, 58.2, 69.9, 70.9, 108.2, 112.3, 114.1, 119.9, 121.2, 123.8, 126.9, 127.4, 136.8, 138.4, 148.9, 166.1.



HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para $C_{18}H_{23}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 343.1770.
encontrado: 343.1760.

5-[(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3-(2-metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (61)

Rendimiento: 35%
Aceite

IR (NaCl), ν_{max} (cm⁻¹):

3334, 2930, 2359, 1717, 1654.

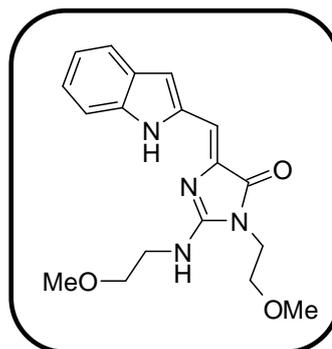
¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

3.27 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.52 (m, 4H), 3.85 (m, 4H), 6.78 (s, 1H), 6.80 (s, 1H),
6.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.52 (d,
 $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.53 (m, 1H), 12.11 (s, 1H),

¹³C-RMN (175 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

38.52, 58.04, 58.16, 69.24, 70.14, 107.41, 111.44, 113.75, 119.64, 120.18,
123.10, 128.11, 134.59, 136.72, 138.43, 155.12, 168.52.

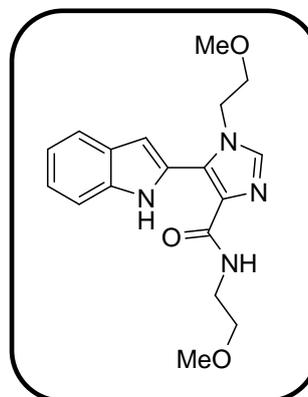
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $C_{18}H_{23}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 343.1770.
encontrado: 343.1756.



***N*-(2-Metoxietil)-5-(1*H*-indol-2-il)-1-(metoxietil)-imidazol-4-carboxamida (**62**).**

Rendimiento: 14%

Pf: 110-112 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3399, 2891, 2360, 1643, 1533.

¹H-RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

3.22 (s, 3H), 3.27 (s, 3H), 3.46 (m, 4H), 3.66 (m, 2H), 4.44 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 7.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 12.88 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

38.2, 46.0, 57.9, 58.2, 69.9, 70.4, 101.8, 111.6, 119.5, 120.3, 122.3, 125.9, 127.0, 128.0, 131.9, 135.6, 139.1, 163.2.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ : 343.1770.
encontrado: 343.1765.

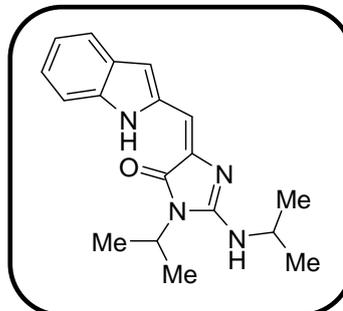
Reacción con isopropilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 20.0 mL (233 mmol) de isopropilamina y tras 2 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 74 mg de **15b** (24%) como un aceite naranja, 523 mg de **16b** (17%) como un aceite naranja y 96 mg de **17b** (29%) como un sólido amarillo.

5-[(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3-isopropil-2-(isopropilamino)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15b)

Rendimiento: 24%

Aceite



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3352, 2973, 1698, 1645, 1576, 1367.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

1.36 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.46 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 4.25 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 6.50 (sa, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.98 (at, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.10 (at, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 11.05 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

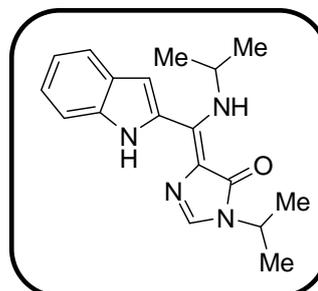
19.9, 22.6, 45.1, 45.1, 104.5, 106.0, 111.8, 120.1, 121.0, 123.2, 129.3, 136.9, 138.2, 139.9, 157.2, 169.6.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₃N₄O [M+H]⁺ : 311.1872. encontrado: 311.1862.

5-[(1*H*-indol-2-il)-isopropilamino-metilen]-3-isopropil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16b)

Rendimiento: 17%

Aceite



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3273, 2973, 1623, 1532, 1469.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

1.40 (d, $J = 6.9$ Hz, 12H), 4.34 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 7.10 (ta, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.27 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 10.00 (sa, 1H), 12.26 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

22.2, 24.3, 44.2, 47.6, 109.2, 112.9, 115.8, 121.1, 122.4, 125.3, 128.5, 129.5, 135.7, 138.0, 148.2, 166.9.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₈H₂₃N₄O [M+H]⁺ : 311.1872.
encontrado: 311.1862.

***N*-Isopropil-5-bromo-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (17b)**

Rendimiento: 29%

Pf: 198-199 °C.

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

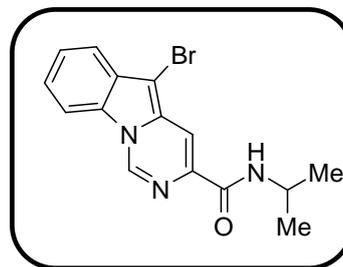
3381, 2965, 1665, 1217, 739.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

1.29 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 4.28 (m, 1H), 7.48 (at, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.56 (at, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.65 (sa, 1H), 7.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 9.03 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

22.7, 42.1, 85.4, 110.8, 112.9, 119.5, 124.3, 126.5, 128.9, 129.7, 132.2, 139.3, 140.0, 162.6.



HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para $C_{15}H_{15}^{79}BrN_3O$ $[M+H]^+$: 332.0398.
encontrado : 332.0408.

Reacción con bencilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 25.4 mL (233 mmol) de bencilamina y tras 1 hora de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtienen 138 mg de **15c** (34%) como un aceite naranja y 170 mg de **16c** (42%) como un sólido amarillo.

3-Bencil-2-bencilamino-5-(1H-indol-2-ilmetilen)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15c)

Rendimiento: 34%
Aceite

IR (NaCl), ν_{max} (cm⁻¹):

3328, 2920, 1646, 1581.

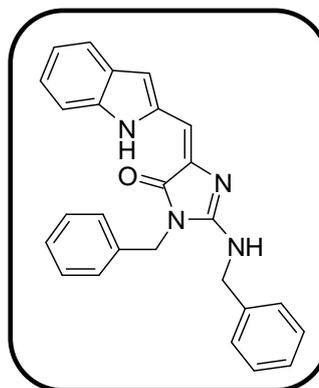
¹H-RMN (300 MHz, Acetone-*d*₆), δ (ppm):

4.80 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 6.68 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.98 (at, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.11 (at, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.33 (m, 12H), 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 11.04 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetone-*d*₆), δ (ppm):

42.8, 46.0, 106.4, 106.9, 112.0, 120.3, 121.3, 123.6, 127.6, 127.9, 128.3, 128.4, 129.2, 129.3, 129.5, 136.7, 137.3, 138.5, 139.4, 139.9, 157.9, 169.4.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para $C_{26}H_{23}N_4O$ $[M+H]^+$: 407.1872.
encontrado: 407.1862.



3-Bencil-5-[bencilamino-(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16c)

Rendimiento: 42%

Pf: 184-186 °C.

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3188, 2919, 1607, 1272, 701.

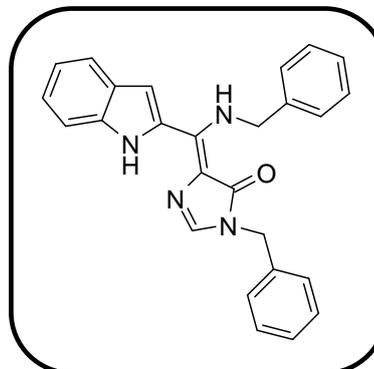
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

4.88 (s, 2H), 5.02 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 7.11 (ta, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.38 (m, 12H), 7.63 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 10.34 (sa, 1H), 12.19 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

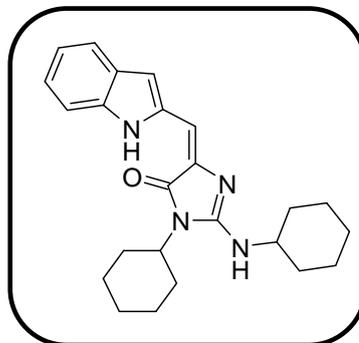
44.7, 50.3, 110.0, 112.2, 114.2, 120.6, 121.9, 125.2, 127.2, 127.3, 127.6, 127.8, 127.9, 128.4, 128.9, 129.1, 135.9, 136.5, 137.1, 137.3, 148.9, 166.2.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₂₆H₂₃N₄O [M+H]⁺ : 407.1872.
encontrado: 407.1863.



Reacción con ciclohexilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 26.6 mL (233 mmol) de ciclohexilamina y tras 1 hora de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂. Se obtienen 129 mg de **15d** (33%) como un aceite naranja y 152 mg de **16d** (39%) como un sólido naranja.

3-Ciclohexil-2-ciclohexilamino-5-(1H-indol-2-il-metilen)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15d)**Rendimiento:** 33%**Aceite****IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3334, 2930, 2854, 1645, 1575.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):1.25, (m, 4H), 1.42, (m, 4H), 1.58 (m, 2H), 1.73 (m, 2H), 1.83 (m, 4H), 2.17 (m, 2H), 2.29 (m, 2H), 3.83 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.58 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.98 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.11 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 11.11 (sa, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):**

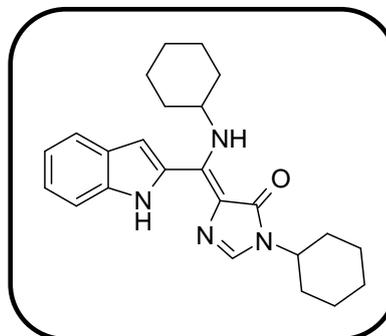
25.7, 26.0, 26.4, 26.5, 33.6, 52.5, 52.6, 53.1, 104.5, 106.0, 111.8, 120.3, 121.2, 123.3, 129.4, 137.2, 138.2, 140.1, 157.3, 169.6.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₂₄H₃₁N₄O [M+H]⁺ : 391.2498.
encontrado: 391.2497.

3-Ciclohexil-5-[ciclohexilamino-(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16d)

Rendimiento: 39%

Pf: 167-168 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3242, 2931, 2854, 1625, 1533, 1467.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

1.26 (m, 2H), 1.43 (m, 8H), 1.67 (m, 4H), 1.95 (m, 6H), 3.95 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 7.09 (at, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.59 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 10.15 (sa, 1H), 12.26 (sa, 1H).

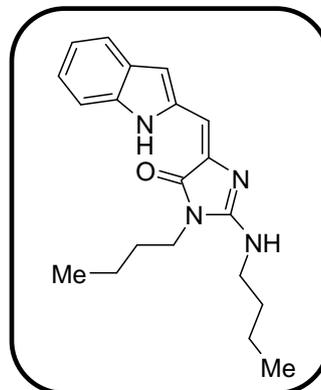
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

24.3, 25.3, 25.4, 25.7, 33.1, 33.8, 50.8, 53.6, 108.7, 112.2, 114.2, 120.5, 121.7, 124.9, 127.4, 128.5, 133.2, 137.0, 148.0, 165.5.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₂₄H₃₁N₄O [M+H]⁺ : 391.2498.
encontrado: 391.2498.

Reacción con butilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 23 mL (233 mmol) de butilamina y tras 3 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 74 mg de **15e** (22%) como un sólido naranja y 176 mg de **16e** (52% rto) como un sólido amarillo.

3-Butil-2-butilamino-5-(1*H*-indol-2-il-metilen)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15e)**Rendimiento:** 22%**Pf:** 151-153°C.**IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3332, 2958, 2931, 1648, 1588.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):0.91 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.00 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.33 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 3.65 (m, 4H), 6.58 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.94 (sa, 1H), 6.98 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.10 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 11.11 (sa, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):**

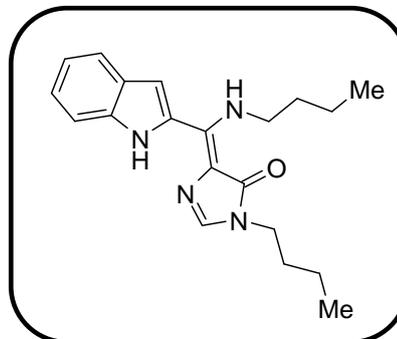
13.1, 13.3, 19.6, 19.8, 30.7, 31.5, 38.5, 41.3, 104.2, 105.4, 111.0, 119.5, 120.4, 122.6, 128.6, 136.3, 137.5, 139.2, 157.5, 168.5.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₂₀H₂₇N₄O [M+H]⁺ : 339.2185.
encontrado: 339.2185.

3-Butil-5-[butilamino-(1*H*-indol-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16e)

Rendimiento: 52%

Pf: 72-73 °C.



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3228, 2956, 1622, 1463, 1274.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

0.96 (m, 6H), 1.37 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 3.70 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.81 (m, 2H), 7.10 (at, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.29 (at, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 10.09 (sa, 1H), 12.38 (sa, 1H).

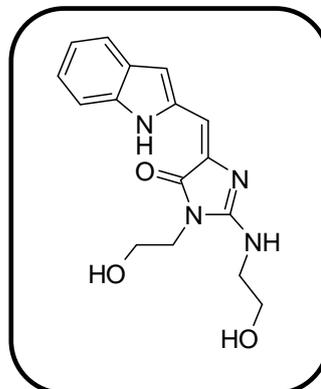
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

13.6, 13.8, 20.0, 20.1, 31.8, 32.0, 41.1, 46.3, 109.9, 112.2, 113.6, 120.5, 121.8, 125.1, 127.3, 128.7, 135.2, 137.2, 148.9, 165.8.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₂₀H₂₇N₄O [M+H]⁺ : 339.2185.
encontrado: 339.2185.

Reacción con etanolamina

A partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 14 mL (2333 mmol) de etanolamina y tras 1 hora de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt:EtOH (9:1). Se obtienen 63 mg de **15g** (20%) como un aceite naranja.

3-Hidroxi-etil-2-hidroxi-etilamino-5-(1H-indol-2-il-metilen)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (15 g).**Rendimiento:** 20%**Aceite****IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3384, 2917, 2849, 1652, 1260.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):3.70 (m, 2H), 3.78 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 3.89 (m, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 7.04 (at, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.17 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 10.50 (sa, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

42.2, 44.3, 61.9, 62.4, 107.5, 107.9, 111.1, 119.9, 120.9, 123.4, 128.2, 135.2, 137.3, 137.6, 158.2, 169.0.

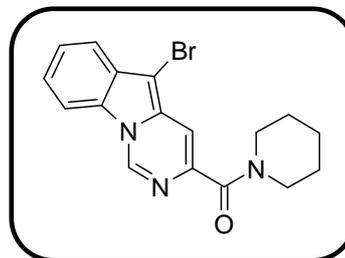
HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₆H₁₉N₄O₃ [M+H]⁺ : 315.1457.
encontrado: 315.1448.**Reacción con piperidina**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 23 mL (233 mmol) de piperidina y tras 3 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtienen 233 mg de **17h** (65% rto) como un sólido amarillo y 127 mg de **18** (35%) como un aceite marrón.

(5-Bromo-pirimido[1,6-a]indol-3-il)-piperidin-1-il-metanona (17h)

Rendimiento: 65%

Pf: 182-184 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3416, 2935, 2855, 1626, 1457.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

1.67 (m, 6H), 3.63 (m, 4H), 7.53 (at, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.61 (at, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 9.58 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

25.3, 26.4, 27.3, 43.6, 48.7, 83.5, 111.5, 112.8, 119.2, 123.8, 126.4, 129.2, 129.6, 132.1, 139.8, 144.1, 166.5.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₇H₁₇⁷⁹BrN₃O [M+H]⁺ : 358.0555.
encontrado: 358.0545.

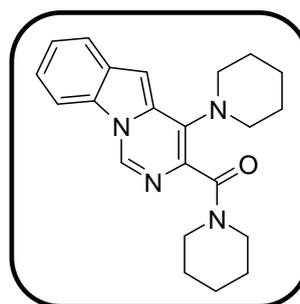
Piperidin-1-il-(4-piperidin-1-il-pirimido[1,6-a]indol-3-il)-metanona (18)

Rendimiento: 35%

Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3446, 2934, 2852, 1628, 1471.



¹H-RMN (700 MHz, DMSO- *d*₆), δ(ppm):

1.48 (m, 2H), 1.56 (m, 4H), 1.63 (m, 2H), 1.67 (m, 4H), 3.14 (m, 4H), 3.31 (m, 2H), 3.61 (m, 2H), 6.78 (s, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 9.41 (s, 1H).

¹³C-RMN (175 MHz, DMSO- *d*₆), δ(ppm):

24.01, 24.03, 25.3, 25.7, 26.3, 41.6, 47.3, 50.7, 93.5, 112.0, 120.4, 121.4, 124.3, 128.8, 129.2, 130.7, 132.6, 134.5, 135.2, 166.5.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₂₂H₂₇N₄O [M+H]⁺ : 363.2176.
encontrado: 363.2166.

Reacción con morfolina

A partir de 305 mg (1 mmol) de **3** en 20.5 mL (233 mmol) de morfolina y tras 2.5 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtienen 245 mg de **19** (67%) como un aceite marrón.

Morfolin-4-il-(4-morfolin-4-il-pirimido[1,6-*a*]indol-3-il)-metanona (19**)**

Rendimiento: 67%

Aceite

IR (NaCl), *v*_{max} (cm⁻¹):

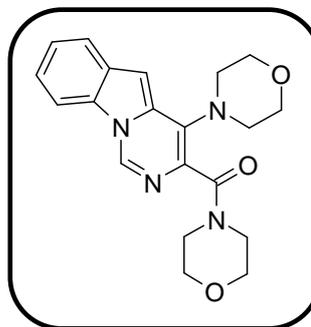
3480, 2962, 2916, 2852, 1644, 1531.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

3.29 (m, 4H), 3.46 (m, 2H), 3.67 (m, 2H), 3.80 (m, 4H), 3.87 (m, 4H), 6.77 (s, 1H), 7.40 (m, 2H), 7.78 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.91 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

42.2, 47.5, 50.5, 66.7, 66.8, 67.6, 94.9, 110.7, 121.1, 122.3, 124.9, 129.0, 129.9, 130.1, 132.5, 133.8, 135.8, 167.4.



HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para $C_{20}H_{22}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 367.1770.
encontrado: 367.1769.

4.14.3. Reacción de 5-bromo-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2a) con distintas aminas

Reacción con 2-metoxietilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 306 mg (1 mmol) de **2a** en 20.3 mL (233 mmol) de 2-metoxietilamina y tras 1 hora de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como AcOEt:EtOH (9:1). Se obtienen 195 mg de **13a** (57%) como un aceite naranja y 117 mg de **14a** (34%) como un sólido naranja.

3-(2-Metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-5-[(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (13a)

Rendimiento: 57%

Aceite

IR (NaCl), ν_{max} (cm⁻¹):

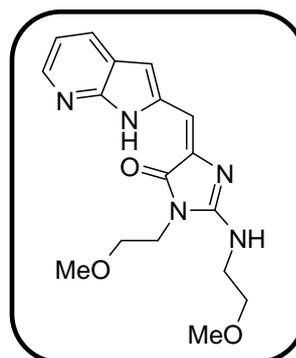
3302, 2927, 1717, 1652.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

3.39 (s, 6H), 3.60 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.68 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.83 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 6.59 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 7.03 (dd, $J = 7.9, 4.6$ Hz, 1H), 7.27 (sa, 1H), 7.96 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.21 (dd, $J = 4.6, 1.3$ Hz, 1H), 11.19 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

40.7, 42.2, 58.8, 59.0, 71.3, 72.1, 104.3, 104.6, 116.9, 121.6, 128.7, 137.1, 141.1, 144.6, 150.0, 159.6, 169.0.



HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para $C_{18}H_{23}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 344.1723.
encontrado: 344.1710.

3-(2-Metoxietil)-5-[(2-metoxietilamino)-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (14a)

Rendimiento: 34%
Pf: 80-83 °C.

IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}):

3127, 2931, 2886, 1639, 1274, 1117.

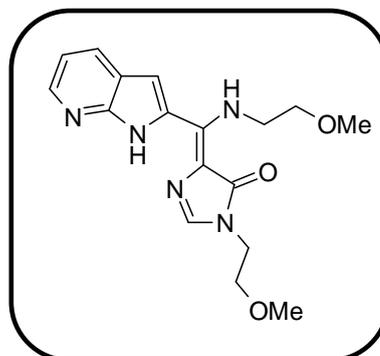
1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

3.33 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.56 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.84 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.90 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H), 7.07 (dd, $J = 7.9, 4.6$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 8.40 (dd, $J = 4.6, 1.3$ Hz, 1H), 9.91 (sa, 1H), 12.24 (sa, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm):

40.5, 45.9, 57.9, 58.2, 70.4, 71.1, 107.7, 114.6, 116.8, 119.6, 129.3, 129.8, 138.6, 146.5, 147.2, 148.7, 166.5.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para $C_{17}H_{22}N_5O_3$ $[M+H]^+$: 344.1723.
encontrado: 344.1732.



Reacción con isopropilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 306 mg (1 mmol) de **2a** en 20 mL (233 mmol) de isopropilamina y tras 2 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 59 mg de **13b** (19%) como un aceite naranja, 152 mg de **14b** (49%) como un sólido amarillo y 65 mg de **20b** (20%) como un sólido amarillo.

3-Isopropil-2-isopropilamino-5-[(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (13b).

Rendimiento: 19%

Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3334, 2973, 1646, 1575, 1337.

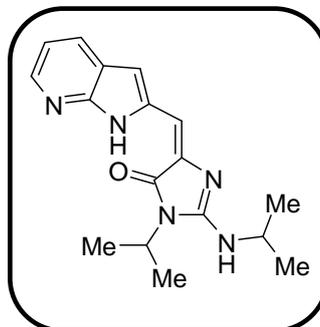
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

1.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.46 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 4.28 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.48 (m, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.69 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.03 (dd, *J* = 7.9, 4.6 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 8.20 (dd, *J* = 4.6, 1.6 Hz, 1H), 11.20 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

20.6, 23.1, 43.8, 44.6, 104.4, 105.9, 116.2, 120.9, 128.4, 136.1, 139.1, 144.1, 149.3, 155.9, 168.8.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₇H₂₁N₅O [M+H]⁺: 312.1824. encontrado: 312.1822.



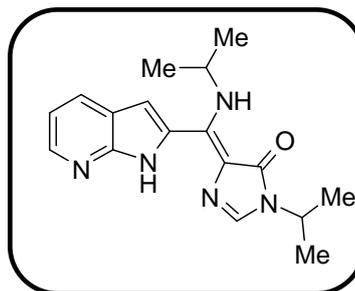
3-Isopropil-5-[isopropilamino-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (14b)

Rendimiento: 49%

Pf: 194-195 °C.

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3127, 2970, 1622, 1281.



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

1.40 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 1.43 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 4.39 (hept, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.10 (dd, $J = 8.1, 4.6$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.98 (dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz, 1H), 8.43 (dd, $J = 4.6, 1.4$ Hz, 1H), 9.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 12.52 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

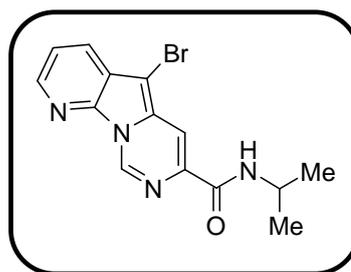
22.3, 24.1, 43.5, 47.2, 106.9, 115.2, 116.8, 119.7, 129.0, 130.0, 133.9, 146.7, 147.1, 148.5, 166.1.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₇H₂₂N₅O [M+H]⁺: 312.1824.
encontrado: 312.1824.

***N*-Isopropil-5-bromo-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-*c*]pirimidin-7-carboxamida (20b)**

Rendimiento: 20%

Pf: 166-167 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3402, 2918, 1671, 1541, 836 .

¹H-RMN (300 MHz), δ(ppm):

1.30 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H), 4.29 (m, 1H), 7.53 (dd, $J = 8.1, 4.7$ Hz, 1H), 7.70 (sa, 1H), 8.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 9.42 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

22.8, 41.6, 83.9, 111.6, 121.5, 122.1, 128.0, 131.2, 136.9, 138.8, 139.9, 144.3, 162.2.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $C_{14}H_{14}^{79}BrN_4O$ $[M+H]^+$: 333.0351.
encontrado: 333.0353.

Reacción con bencilamina

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 306 mg (1 mmol) de **2a** en 25.4 mL (233 mmol) de bencilamina y tras 2.5 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (3:7). Se obtiene 171 mg de **14c** (42%) como un sólido amarillo.

3-Bencil-5-[bencilamino-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (14c)

Rendimiento: 42%

Pf: 155-157 °C.

IR (NaCl), ν_{max} (cm⁻¹):

3280, 3030, 2923, 1615, 1595, 1538.

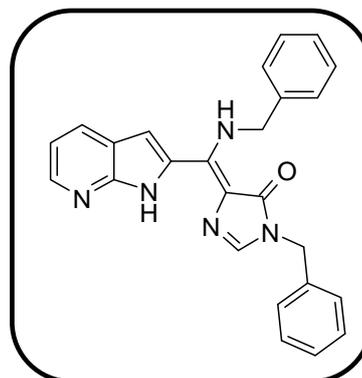
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

4.86 (s, 2H), 4.99 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.08 (dd, $J = 7.9, 4.8$ Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.28 (m, 3H), 7.33 (m, 3H), 7.41 (m, 4H), 7.94 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 8.42 (dd, $J = 4.8, 1.4$ Hz, 1H), 10.20 (sa, 1H), 12.49 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

44.7, 50.2, 107.9, 115.0, 116.9, 119.6, 127.0, 127.7, 127.9, 128.0, 128.8, 128.9, 129.1, 130.3, 136.4, 136.8, 137.1, 146.9, 148.0, 148.6, 166.6.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para $C_{25}H_{22}N_5O$ $[M+H]^+$: 408.1824.
encontrado: 408.1814.

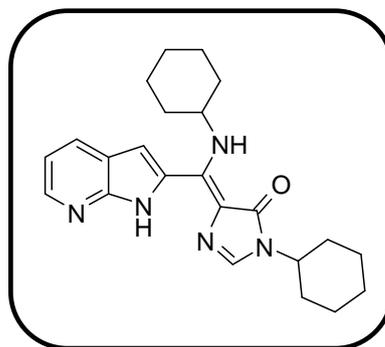


Reacción con ciclohexilamina**3-Ciclohexil-5-[ciclohexilamino-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (14d)**

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 306 mg (1 mmol) de **2a** en 26.6 mL (233 mmol) de ciclohexilamina y tras 2.5 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano: AcOEt (1:1). Se obtiene 262 mg de **14d** (67%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 67%

Pf: 170-171 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3247, 2930, 2854, 1622, 1467, 1280.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

1.23 (m, 2H), 1.55 (m, 12H), 1.86 (m, 4H), 2.02 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.10 (dd, $J = 7.9, 4.6$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.99 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 8.43 (dd, $J = 4.6, 1.3$ Hz, 1H), 10.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 12.52 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

24.2, 25.3, 25.4, 25.6, 33.0, 33.9, 50.8, 53.6, 106.7, 115.1, 116.8, 119.6, 129.1, 129.9, 134.2, 146.7, 147.1, 148.5, 166.0.

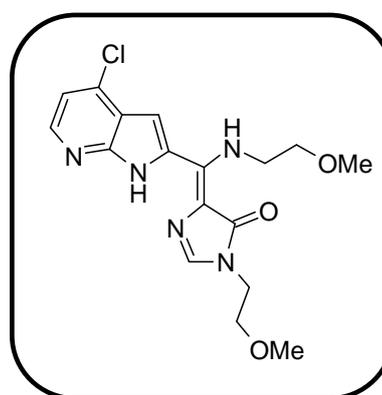
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₂₃H₃₀N₅O [M+H]⁺: 392.2450.
encontrado: 392.2454.

4.14.4. Reacción de 5-bromo-4-cloro-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2b) con 2-metoxietilamina

5-[(4-Cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-(2-metoxietilamino)-metileno]-3-(2-metoxietil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (14e)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 340 mg (1 mmol) de **2b** en 20.3 mL (233 mmol) de 2-metoxietilamina y tras 3 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt: EtOH (9:1). Se obtiene 155 mg de **14e** (41%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 41 %
Pf: 83-85 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

2926, 1635, 1470, 1277, 1119.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

3.32 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.60 (t, $J = 5.35$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.86 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.00 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H), 7.25(d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 8.22 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 9.95 (sa, 1H), 12.70 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

41.3, 46.6, 58.7, 58.9, 71.2, 71.9, 105.8, 115.9, 117.4, 119.6, 130.9, 137.0, 139.9, 140.9, 147.5, 149.9, 167.4.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₇H₂₁ClN₅O₃ [M+H]⁺: 378.1327.
encontrado: 378.1317.

4.14.5. Reacción de 5-bromo-4-metoxi-pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo (2c) con 2 metoxietilamina.

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 336 mg de **2c** en 20.3 mL de 2-metoxietilamina y tras 1 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt: EtOH (9:1). Se obtienen 101 mg de **13f** (27 %) como un aceite naranja y 261 mg de **14f** (70 %) como un sólido naranja.

3-(2-Metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-5-[(4-metoxi-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)metileno]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (13f)

Rendimiento: 27%

Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3300, 2923, 2361, 1721, 1656, 1338.

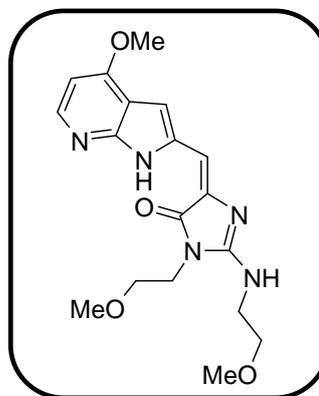
¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

3.39 (s, 6H), 3.59 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.66 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.76 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.82 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 6.58 (s, 1H), 6.61 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.21 (sa, 1H), 8.14 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 11.15 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

40.7, 42.3, 55.8, 58.7, 59.0, 71.3, 72.1, 98.9, 102.0, 105.1, 111.9, 135.0, 140.3, 146.8, 151.8, 159.3, 160.3, 168.9.

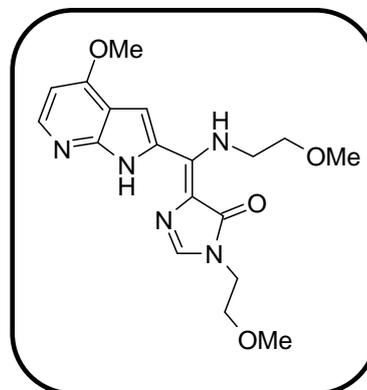
HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₈H₂₄N₅O₄ [M+H]⁺: 374.1823.
encontrado: 374.1785.



3-(2-Metoxietil)-5-[(2-metoxietilamino)-(4-metoxi-1H-pirrol-2-il)-metilen]-3,5-dihidroimidazol-4-ona (14f)

Rendimiento: 70 %

Pf: 117-119 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3538, 3407, 2963, 1625, 1514, 1261.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

3.32 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.60(t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.75 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.85 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.00 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 6.70 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 10.08 (sa, 1H), 12.60 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

41.3, 46.7, 56.1, 58.7, 58.9, 71.2, 71.8, 99.0, 106.0, 111.3, 115.0, 127.9, 138.9, 148.0, 149.6, 151.3, 161.5, 167.1.

**HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₈H₂₄N₅O₄ [M+H]⁺: 374.1823.
encontrado: 378.1814.**

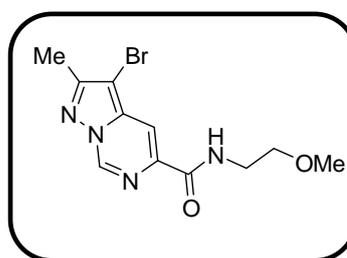
4.14.6. Reacción de 3-bromo-2-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidina-5-carboxilato de metilo (6) con 2-metoxietilamina.

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 270 mg (1 mmol) de **6** en 20.3 mL (233 mmol) de 2-metoxietilamina y tras 2 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 138 mg de **21** (53 %) como un sólido blanco.

***N*-(2-Metoxietil)-3-bromo-2-metil-pirazolo[1,5-c]pirimidina-5-carboxamida (21)**

Rendimiento: 53 %

Pf: 193-194 °C



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3295, 2918, 2358, 1661, 1548.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

2.49 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.56 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.67 (q, $J = 4.9$ Hz, 2H), 8.12 (sa, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.99 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

12.7, 39.4, 58.9, 71.1, 89.4, 110.7, 139.28, 139.33, 139.4, 154.9, 162.8.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₁H₁₄⁷⁹BrN₄O₂ [M+H]⁺ : 313.0295.
encontrado : 313.0280.

4.14.7. Reacción de 5-fenil-3-metoxicarbonilpirimido[1,6-a]indol (63) con 2-metoxietilamina.

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 302 mg (1 mmol) de **63** en 20.3 mL (233 mmol) de 2-metoxietilamina y tras 4 horas de reacción a reflujo, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente ciclohexano:AcOEt (8:2). Se obtienen 110 mg de **15j** (6 %) como un aceite naranja, 55 mg de **17j** (26 %) como un sólido naranja, 58 mg de **64** (14 %) como un sólido amarillo y 252 mg de **65** (60 %) como un aceite naranja.

3-(2-Metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-5-[(3-fenil-1H-indol-2-il)-metilen]-3,5-dihidro-imidazol-4-one (15j)

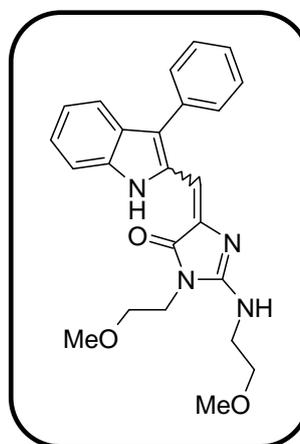
Rendimiento: 6%
Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3281, 2924, 2360, 1735, 1655.

¹H-RMN (700 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

3.35 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.51 (m, 1H), 3.56 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.62 (m, 3H), 3.76 (m, 2H), 6.50 (s, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.10 (m, 1H), 7.19 (m, 1H), 7.26 (m, 3H), 7.44 (m, 3H).

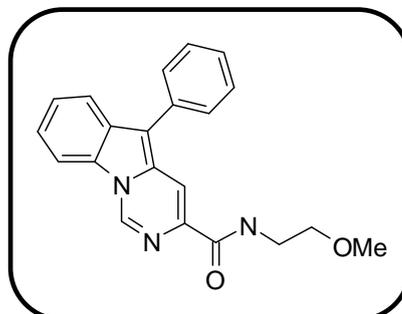


N-(2-Metoxietil)-5-fenil-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxamida (17j)**Rendimiento:** 16%**Pf:** 197-198 °C.**IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

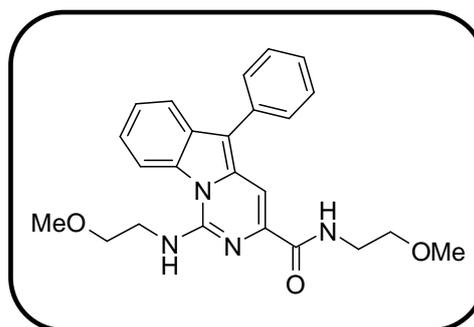
3413, 2932, 2359, 1663, 1369.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):2.15 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.58 (ta, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.67 (c, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.37 (ta, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.50 (m, 3H), 7.66 (m, 2H), 8.03 (m, 2H), 8.16 (sa, 1H), 8.38 (s, 1H), 9.13 (s, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

30.9, 39.3, 58.9, 71.2, 110.6, 112.2, 113.0, 120.4, 123.2, 125.3, 127.1, 128.8, 129.1, 129.2, 130.4, 132.9, 136.7, 137.7, 163.8.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₂₁H₂₀N₃O₂ [M+H]⁺: 346.1556.
encontrado: 346.1561.**N-(2-Metoxietil)-5-fenil-1-metoxietilamino-pirimido[1,6-a]indol-3-carboxamida (64)****Rendimiento:** 14%**Pf:** 193-194°C.**IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3303, 2926, 2360, 1715, 1647, 1587.



^1H -RMN (700 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm):

3.40 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.60 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.69 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.82 (m, 4H), 6.74 (s, 1H), 7.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.20 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 11.38 (s, 1H),

^{13}C -RMN (75 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm):

39.9, 41.2, 58.1, 70.3, 71.2, 102.7, 111.4, 118.9, 119.2, 120.1, 122.7, 127.3, 127.6, 129.6, 130.7, 133.4, 137.5, 159.1, 168.7.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 419.2083.
encontrado: 419.2086.

3-(2-Metoxietil)-2-(2-metoxietilamino)-5-(3-fenil-1H-indol-2-ilmetil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (65)

Rendimiento: 60%

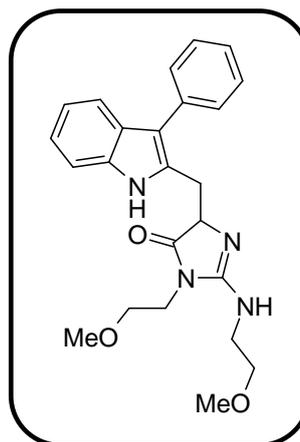
Aceite

IR (NaCl), ν_{max} (cm^{-1}):

3321, 2929, 1732, 1645, 1196.

^1H -RMN (700 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm):

3.04 (m, 1H), 3.27 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.41 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 3.66 (m, 4H), 4.29 (m, 1H), 7.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.49 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 10.40 (s, 1H).



¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

28.9, 40.5, 41.3, 58.5, 59.0, 66.2, 71.0, 72.1, 110.8, 115.2, 119.1, 119.6, 121.5, 125.9, 127.3, 128.5, 129.8, 132.7, 135.2, 135.4, 157.2, 181.9.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₂₄H₂₉N₄O₃ [M+H]⁺ : 421.2240.
encontrado: 421.2240.

4.15. SÍNTESIS DE OXAZOLONAS**4.15.1. Obtención de oxazolonas 2-metil sustituidas.*****Procedimiento general***

A una disolución del aldehído correspondiente (1.15 mmol) en anhídrido acético (0.78 mL), se le añade acetato sódico (NaOAc, 90.2 mg, 1.1 mmol) y *N*-acetilglicina (117 mg, 1 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 30 minutos, seguidamente se adiciona agua (5 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales. Finalmente precipita un sólido que se filtra y se lava con EtOH. El producto crudo obtenido, en ciertos casos no requiere mayor purificación. En los casos señalados se purifica por cromatografía flash en gel de sílice en las condiciones indicadas.

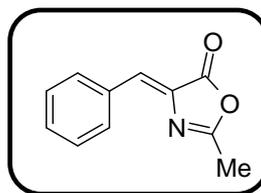
4-Benciliden-2-metil-4*H*-oxazol-5-ona (22a)

Partiendo de 0.12 mL benzaldehído y siguiendo el procedimiento general, se obtienen, 103 mg de **22a** (55%) como un sólido marrón claro.

Rendimiento: 55%

Pf: 163-165 °C.

Lit.^{141a} (158 °C).



^{141a} Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Gomes, M., Jr.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F. *Amino Acids* **2010**, *38*, 701-709.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

2.39 (s, 3H), 7.13 (s, 1H), 7.42 (m, 3H), 8.05 (m, 2H).

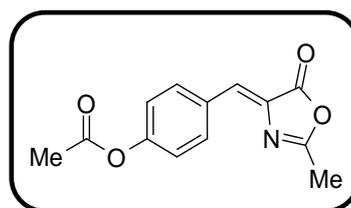
Acetato de 4-(2-metil-5-oxo-oxazol-4-ilidenmetil)-fenilo (22b)

Partiendo de 140 mg 4-hidroxibenzaldehído y siguiendo el procedimiento general, se obtienen 98 mg de **22b** (40%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 40%

Pf: 134-135 °C.

Lit.^{141b} (134-136 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

2.33 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 7.18 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 8.21 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H).

4-(1H-Indol-2-ilmetilen)-2-metil-4H-oxazol-5-ona (24a)

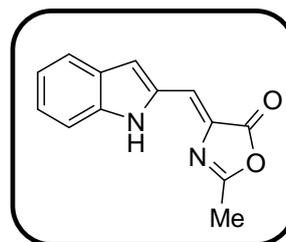
Partiendo de 145 mg indol-2-carboxaldehído y siguiendo el procedimiento general, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice usando como eluyente hexano: AcOEt (8:2). Se obtienen 174.0 mg de **24a** (77%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 77%

Pf: 180-182°C.

IR (NaCl), ν_{max} (cm^{-1}):

3390, 2390, 1773, 1654, 1112.



^{141b} Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.-F.; Pommery, N.; Pommery, J.; Henichart, J.-P.; Cotelle, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1222-1229.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.42 (s, 3H), 7.01 (s, 1H), 7.16 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 10.38 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

15.6, 111.6, 113.3, 120.7, 120.9, 122.1, 125.9, 127.8, 129.6, 132.9, 139.1, 164.5, 166.7.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₃H₁₁N₂O₂ [M+H]⁺: 227.0821.
encontrado: 227.0819.

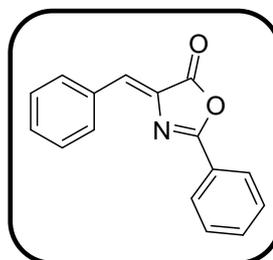
4.15.2. Obtención de oxazolonas 2-fenil sustituidas.**4-Benciliden-2-fenil-4H-oxazol-5-ona (22c)**

A una disolución de benzaldehído (0.12 mL, 1.15 mmol) en anhídrido acético (0.78 mL), se le añade acetato sódico (NaOAc, 90 mg, 1.1 mmol) y ácido hipúrico (179 mg, 1 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 2 horas, se echa agua y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales, precipitando un sólido que se filtra y se lava con EtOH. Se obtienen 99.6 mg de **22c** (40%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 40%

Pf: 165-167 °C.

Lit.^{141a} (169-170 °C).

**¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):**

7.25 (s, 1H), 7.46 (m, 3H), 7.53 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.18 (m, 2H), 8.21 (m, 2H).

^{141a} Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Gomes, M., Jr.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F. *Amino Acids* **2010**, 38, 701-709.

4-(1H-Indol-2-ilmetilen)-2-fenil-4H-oxazol-5-ona (24b)

A una disolución de indol-2-carboxaldehído (145 mg, 1.15 mmol) en anhídrido acético (0.78 mL), se le añade acetato sódico (NaOAc, 90 mg, 1.1 mmol) y ácido hipúrico (179 mg, 1 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 1 hora, Una vez terminada la reacción se añade una disolución saturada de NaHCO₃ y se extrae con AcOEt. Las fases orgánicas se lavan repetidas veces con una disolución saturada de NaHCO₃ y se secan sobre Na₂SO₄. Después de eliminar el disolvente a vacío se obtienen 155 mg de **24b** (54%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 54%

Pf: 186-188 °C.

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3384, 2344, 1791, 1652, 1325, 1116.

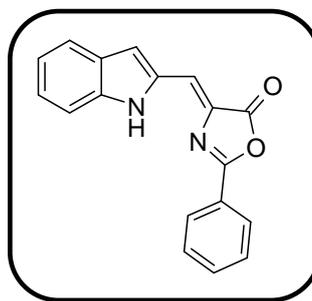
¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

7.09 (at, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.30 (m, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.64 (m, 5H), 8.25 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 11.05 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

113.2, 114.5, 116.3, 121.4, 121.6, 122.7, 126.5, 127.2, 128.2, 128.9, 129.9, 133.6, 134.1, 140.8, 162.9, 166.9.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₈H₁₃N₂O₂ [M+H]⁺: 289.0977.
encontrado: 289.0980.



4.16. SÍNTESIS DE IMIDAZOLONAS

4.16.1. Obtención de imidazolonas 2-metil sustituidas.

Procedimiento general

A una disolución del aldehído correspondiente (1 mmol) en tolueno (1.5 mL), se le añaden sucesivamente NaHCO₃ (420.0 mg, 5 mmol), clorhidrato de acetamidina (146 mg, 1.54 mmol) y bromoacetato de etilo (0.27 mL, 2.4 mmol). La mezcla se calienta a 108 °C durante el tiempo indicado en cada caso. El sólido formado se filtra y se lava con AcOEt, los líquidos del filtrado se concentran a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice.

Derivados de fenilo

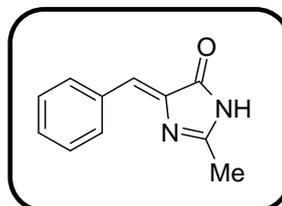
Partiendo de 0.1 mL de benzaldehído y tras 1 hora de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 56 mg de **23a** (30%) como un sólido amarillo y 109 mg **23b** (40%) como aceite naranja.

5- Benciliden-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (23a)

Rendimiento: 30%

Pf: 178-179 °C.

Lit.¹⁶¹ (178-180 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.37 (s, 3H), 7.06 (s, 1H), 7.40 (m, 3H), 8.11 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 2H), 9.07 (sa, 1H).

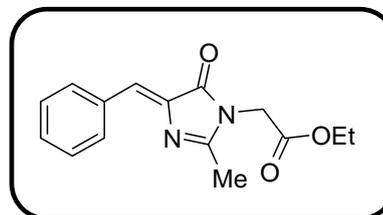
¹⁶¹ Gong, X.; Yang, H.; Liu, H.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Fu, H. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3128-3131.

(4- Benciliden-2 metil-5-oxo-4,5-dihidroimidazol-il)-acetato de etilo (23b)

Rendimiento: 40%

Pf: 129-130 °C.

Lit.¹⁶² (134 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.28 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.38 (m, 3H), 8.12 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H).

Derivados de indol

A partir de 145 mg de indol-2-carboxaldehído y tras 1 hora de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 157 mg de **25a** (70%) como un sólido naranja y 31 mg **25b** (10%) como un sólido naranja.

5-(1*H*-Indol-2-ilmetileno)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (25a)

Rendimiento: 70%

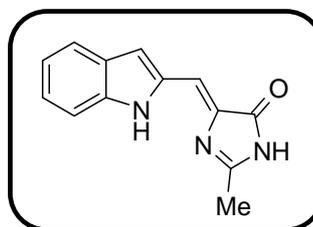
Pf: 249-250 °C.

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3322, 3146, 2375, 1717, 1633, 1226.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ(ppm):

2.40 (s, 3H), 6.97 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.04 (at, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.21 (at, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 10.27 (sa, 1H), 11.28 (sa, 1H)



¹⁶² Granacher, Ch.; Mahler, M. *Helv. Chim. Acta* **1927**, *10*, 246-262.

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ(ppm):

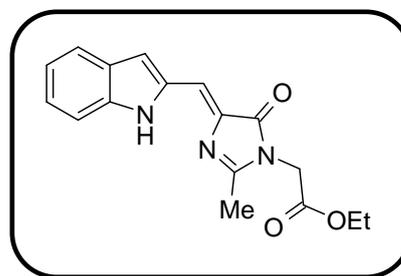
16.2, 111.0, 112.4, 114.9, 120.6, 121.9, 125.0, 128.9, 135.1, 139.1, 139.5, 162.0, 170.7.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₃H₁₂N₃O [M+H]⁺: 226.0980.
encontrado: 226.0979.

[4-(1*H*-Indol-2-ilmetilen)-2-metil-5-oxo-4,5-dihidroimidazol-1-il]-acetato de etilo (25b)

Rendimiento: 10%

Pf: 124-126 °C.



IR (NaCl), ν_{max} (cm⁻¹):

3354, 2983, 2343, 1748, 1711, 1641, 1214.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ(ppm):

1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.38 (s, 3H), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.50 (s, 2H), 7.05 (m, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.22 (at, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 11.08 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ(ppm):

14.3, 15.4, 41.9, 62.3, 112.1, 112.7, 116.8, 120.9, 122.3, 125.5, 129.0, 135.0, 137.4, 139.9, 162.2, 168.8, 169.2.

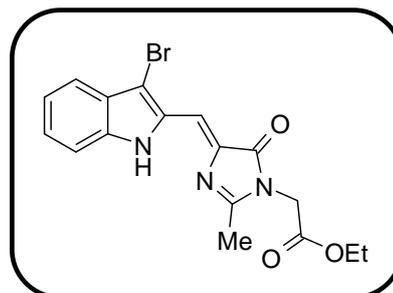
HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₇H₁₈N₃O₃ [M+H]⁺: 312.1348.
encontrado: 312.1345.

[4-(3-Bromo-1*H*-indol-2-ilmetilen)-2-metil-5-oxo-4,5-dihidroimidazol-1-il]-acetato de etilo (25f)

Partiendo de 224 mg de 3-bromoindol-2-carboxaldehído y tras 1 hora de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 78 mg de **25f** (20%) como un sólido ocre.

Rendimiento: 20%

Pf: 170-171 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3339, 2926, 2344, 1748, 1714, 1640, 1212.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 2.41 (s, 3H), 4.22 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.53 (s, 2H), 7.09 (m, 2H), 7.18 (at, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (at, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 11.37 (sa, 1H).

¹³C-RMN (50 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

14.3, 15.6, 42.0, 62.3, 100.0, 112.6, 113.3, 120.2, 121.9, 126.7, 127.9, 129.5, 131.9, 132.5, 138.6, 163.7, 168.6.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₇H₁₇⁷⁹Br N₃O₃ [M+H]⁺: 390.0453.
encontrado: 390.0443.

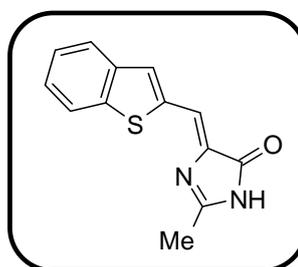
Derivados de benzotiofeno

Partiendo de 162 mg de benzo[*b*]tiofeno-2-carboxaldehído y tras 2.5 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 121 mg de **27a** (50%) como un sólido amarillo y 95 mg **27b** (29%) como un sólido anaranjado.

5-Benzo[*b*]tiofen-2-ilmetilen-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (**27a**)

Rendimiento: 50%

Pf: 224-225 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3415, 2916, 2304, 1707, 1646.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

2.33 (s, 3H), 7.24 (s, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.91 (m, 3H), 10.25 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

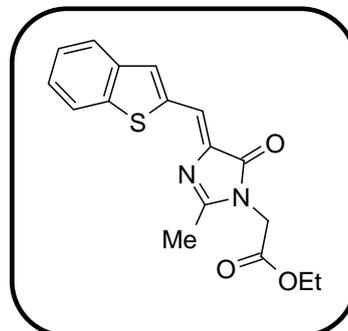
15.7, 117.5, 122.1, 123.9, 124.3, 125.5, 130.4, 137.6, 137.9, 139.2, 142.7, 162.8, 170.3.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₃H₁₁N₂OS [M+H]⁺: 243.0592.
encontrado: 243.0590.

(4-Benzo[*b*]tiofen-2-ilmetilen-2-metil-5-oxo-4,5-dihidroimidazol-1-il)-acetato de etilo (27b)

Rendimiento: 29%

Pf: 132-133°C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

2982, 1713, 1643, 1412, 1210.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

1.26 (t, *J*=7.0 Hz, 3H), 2.40 (s, 3H), 4.22 (q, *J*=7.0 Hz, 2H), 4.50 (s, 2H), 7.40 (m, 3H), 7.92 (m, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

15.4, 29.2, 41.9, 62.2, 120.5, 123.1, 125.3, 125.4, 126.8, 132.0, 139.0, 139.1, 139.6, 144.8, 163.2, 168.7, 169.4.

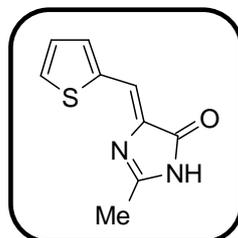
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₇H₁₇N₂O₃S [M+H]⁺: 329.0960.
encontrado: 329.0964.

Derivados de tiofeno

Partiendo de 112 mg de tiofeno-2-carboxaldehído y tras 7 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 159 mg de **28a** (32%) como un sólido amarillo y 26 mg **28b** (9%) como un sólido ocre.

2-Metil-5-tiofen-2-ilmetileno-3,5-dihidroimidazol-4-ona (28a)

Rendimiento: 32%
Pf: 230 °C (descomp.).



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3450, 3089, 2344, 1710, 1640, 1410.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

2.28 (s, 3H), 7.13 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 10.13 (sa, 1H).

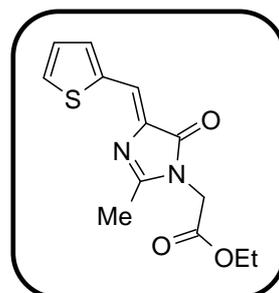
¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

15.6, 117.3, 127.0, 133.1, 133.6, 137.0, 137.2, 161.6, 170.4.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₉H₉N₂OS [M+H]⁺: 193.0436.
 encontrado: 193.0438.

(2-Metil-5-oxo-4-tiofen-2-ilmetilen-4,5-dihidroimidazol-1-il)-acetato de etilo (28b)

Rendimiento: 9%
Pf: 129-130 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

2982, 1717, 1645, 1415, 1207.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

1.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.21 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.34 (s, 2H), 7.08 (dd, $J = 5.1, 3.7$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

14.1, 15.6, 41.4, 62.0, 121.5, 127.5, 133.6, 134.4, 135.7, 137.5, 160.2, 167.5, 169.2.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 279.0803.
encontrado :
279.0808.

Derivados de pirrol

A partir de 95 mg de pirrol-2-carboxaldehído y tras 5 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt. Se obtienen 56 mg de **29a** (32%) como un sólido amarillo y 39 mg **29b** (15%) como un sólido ocre.

2-Metil-5-(1H-pirrol-2-ilmetilen)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (29a)

Rendimiento: 32%

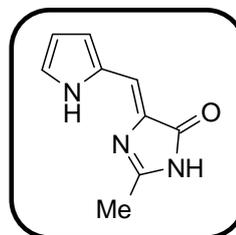
Pf: 199-200 °C.

IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}):

3084, 2345, 1689, 1626, 1111.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

2.33 (s, 3H), 6.28 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 10.30 (sa, 1H), 11.04 (sa, 1H).



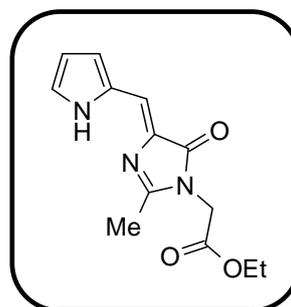
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

16.2, 111.1, 117.8, 119.0, 125.5, 129.2, 134.1, 156.9, 172.3.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₉H₁₀N₃O [M+H]⁺: 176.0824.
encontrado: 176.0824.

[2-Metil-5-oxo-4-(1H-pirrol-2-ilmetilen)-4,5-dihidroimidazol-1-il]-acetato de etilo (29b)

Rendimiento: 15%
Pf: 113-114°C.



IR (NaCl), ν_{max} (cm⁻¹):

3342, 2918, 2367, 1731, 1339.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ(ppm):

1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.21 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.54 (s, 2H), 6.34 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 12.92 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-*d*₆), δ(ppm):

14.4, 14.8, 42.3, 62.2, 112.3, 121.1, 125.9, 126.7, 129.8, 133.4, 155.5, 168.8, 169.4.

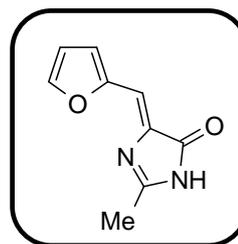
HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₃H₁₆N₃O₃ [M+H]⁺: 262.1192.
encontrado: 262.1192.

Derivados de furano

Partiendo de 96 mg (0.08 mL) de furano-2-carboxaldehído y tras 1.5 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 30 mg de **30a** (17%) como un sólido ocre y 55 mg **30b** (21%) como un sólido ocre.

5-Furan-2-ilmetilen-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (30a)

Rendimiento: 17%
Pf: >145 °C (Desc.).



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3264, 2665, 1960, 1719, 1642, 1259.

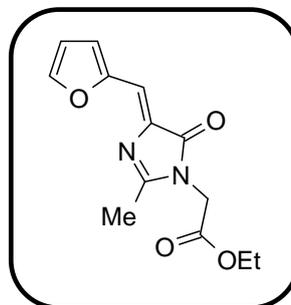
¹H-RMN (300 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

2.28 (s, 3H), 6.64 (m, 1H), 6.72 (m, 1H), 7.40 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 10.18 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

16.6, 110.6, 113.1, 119.0, 142.8, 146.3, 150.6, 160.8, 172.3.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₉H₉N₂O₂ [M+H]⁺: 177.0664.
encontrado: 177.0664.

(4-Furan-2-ilmetilen-2-metil-5-oxo-4,5-dihidroimidazol-1-il)-acetato de etilo (30b)**Rendimiento:** 21%**Pf:** 115-116°C.**IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3415, 2982, 1747, 1647, 1563, 1469.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):1.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.20 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.33 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.62 (s, 1H).**¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

14.1, 15.6, 41.4, 62.1, 113.1, 114.9, 119.1, 135.1, 146.3, 150.7, 160.9, 167.4, 169.5

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₃H₁₅N₂O₄ [M+H]⁺: 263.1032.
encontrado: 263.1031.**4.16.2. Obtención de imidazolonas-2-fenil sustituidas.*****Procedimiento general***

Una disolución de yoduro potásico (399 mg, 2.4 mmol) y bromoacetato de etilo (0.27 mL, 2.4 mmol) en isobutanol (0.5 mL) se calienta a reflujo durante 1 hora, seguidamente se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente y posteriormente se le añade sucesivamente el aldehído correspondiente (1 mmol), NaHCO₃ (420.0 mg, 5 mmol), clorhidrato de benzamidina (241.0 mg, 1.54 mmol) y isobutanol (1.5 mL). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 1 hora, posteriormente el precipitado formado se filtra y lava con H₂O y EtOH.

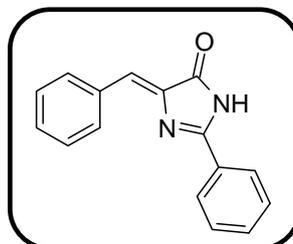
5-Bencilideno-2-fenil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (23c)

Partiendo de 106 mg (0.1 mL) de benzaldehído y siguiendo el procedimiento general, se obtienen 69 mg de **23c** (26%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 26%

Pf: 270-272 °C.

Lit.¹⁶¹ (270-273 °C).



¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

7.02 (s, 1H), 7.46 (m, 3H), 7.60 (m, 3H), 8.18 (m, 2H), 8.30 (m, 2H).

5-(1*H*-Indol-2-ilmetilen)-2-fenil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (25c)

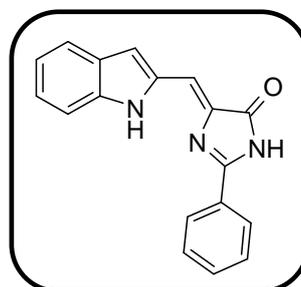
Partiendo de 145 mg de indol-2-carboxaldehído y siguiendo el procedimiento general, se obtienen 195 mg de **25c** (68%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 68%

Pf: > 300 °C.

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3358, 3059, 2364, 1696, 1632, 1239.



¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

7.04 (at, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.62 (m, 5H), 8.34 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 2H), 11.22 (sa, 1H), 12.27 (sa, 1H).

¹⁶¹ Gong, X.; Yang, H.; Liu, H.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Fu, H. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3128-3131.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

110.9, 111.9, 115.1, 119.6, 120.7, 123.9, 126.0, 127.2, 127.4, 128.4, 131.9, 133.3, 138.0, 138.4, 158.7, 170.6.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₈H₁₄N₃O [M+H]⁺: 288.1137.
encontrado: 288.1139.

2-Fenil-5-tiofen-2-ilmetilen-3,5-dihidroimidazol-4-ona (28c)

A partir de 112 mg (0.09 mL) de tiofeno-2-carboxaldehido y siguiendo el procedimiento general, se obtienen 250.0 mg de **28c** (98%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 98%

Pf: > 300 °C.

IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹):

3425, 2986, 2344, 1698, 1635, 1420.

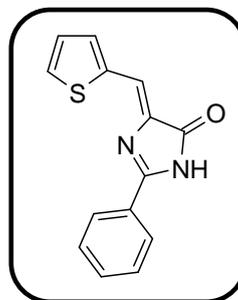
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

7.18 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.59 (m, 3H), 7.72 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.14 (dd, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 2H), 12.06 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm):

119.0, 126.7, 127.2, 127.4, 128.5, 131.9, 134.2, 134.4, 137.4, 137.5, 158.6, 170.6.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₄H₁₁N₂OS [M+H]⁺: 255.0592.
encontrado: 255.0590.

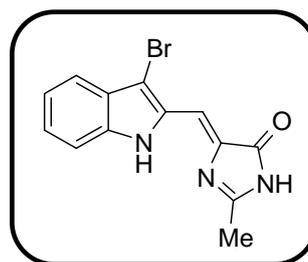


4.17. REACCIÓN DE BROMACIÓN DE IMIDAZOLONAS

5-(3-Bromo-1H-indol-2-ilmtilen)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (25e)

A una disolución de **25a** (225 mg, 1 mmol) en DMF (7 mL) y CH₂Cl₂ (14 mL) se le añade *N*-bromosuccinimida (NBS, 196.0 mg, 1.1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 8 h. Una vez terminada la reacción, el precipitado formado se filtra y se lava sucesivamente con CH₂Cl₂ y agua, obteniéndose 270.0 mg de **25e** (89%) como sólido naranja.

Rendimiento: 89%
Pf: >245 °C (Desc.).



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3338, 3059, 1710, 1634, 1215.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

2.36 (s, 3H), 6.98 (s, 1H), 7.17 (at, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.30 (at, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 10.39 (sa, 1H), 11.35 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

15.7, 97.7, 109.1, 112.7, 118.3, 120.4, 124.9, 129.9, 130.5, 137.1, 138.8, 163.2, 170.0.

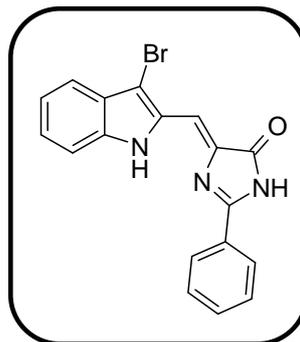
HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₃H₁₁⁷⁹Br N₃O [M+H]⁺: 304.0085.
encontrado: 304.0089.

5-(3-Bromo-1H-indol-2-ilmtilen)-2-fenil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (25g)

A una disolución de **25c** (287 mg, 1 mmol) en DMF (13.5 mL) se le añade *N*-bromosuccinimida (NBS, 196.0 mg, 1.1 mmol), la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 h. Una vez terminada la reacción se adiciona *n*-hexano y el precipitado formado se filtra y se lava con abundante agua, obteniéndose 348.0 mg de **25g** (95%) como un sólido naranja.

Rendimiento: 95%

Pf: >246 °C (Desc.).



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3346, 3060, 1705, 1633, 1219, 925.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

6.98 (s, 1H), 7.18 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.34 (at, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.65 (m, 3H), 7.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 11.41 (sa, 1H), 12.27 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

100.0, 111.3, 113.8, 119.5, 121.6, 126.2, 127.3, 128.4, 128.6, 129.4, 131.8, 133.2, 138.7, 140.5, 161.1, 171.4.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para para C₁₈H₁₃⁷⁹Br N₃O [M+H]⁺: 366.0242. encontrado: 366.0242.

5-[(3-Bromo-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-(2-metoxietilamino)-metilen]-3-(2-metoxietil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (14g)

A una disolución de **14a** (343 mg, 1 mmol) en CH₂Cl₂ (13.8 mL) se le añade *N*-bromosuccinimida (NBS, 356 mg, 2 mmol), la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez terminada la reacción se elimina el disolvente a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt:EtOH (9:1). Se obtienen 169 mg de **14g** (40%) como un aceite naranja.

Rendimiento: 40%

Aceite

IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3382, 2922, 1746, 1412, 1117.

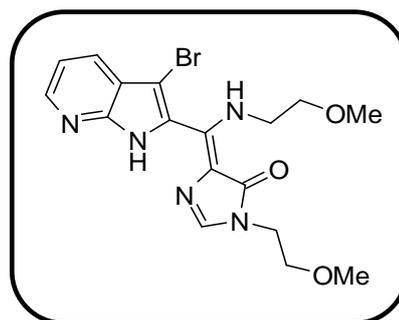
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

3.34 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.54 (m, 4H), 3.58 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.83 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.13 (dd, *J* = 7.8, 4.3 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 9.35 (sa, 1H), 11.43 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-*d*₆), δ (ppm):

41.0, 45.4, 58.9, 59.3, 70.8, 71.8, 93.6, 116.2, 117.2, 120.5, 125.7, 128.7, 140.4, 145.9, 147.4, 148.3, 166.8.

HRMS (APCI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₇H₂₁⁷⁹BrN₅O₃ [M+H]⁺: 422.0828.
encontrado: 422.0818.



4.18. REACCIÓN DE METILAMINA Y 2-METOXIETILAMINA CON OXAZOLONAS E IMIDAZOLONAS.

4.18.1. Reacción de metilamina y 2-metoxietilamina con oxazolonas

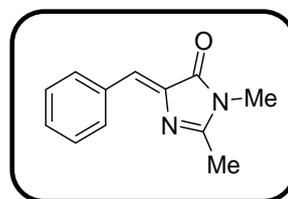
Reacción de la oxazolona (22a) con metilamina: Preparación de 5-bencilideno-2,3-dimetil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (23d)

A una disolución de 187 mg de **22a** (1 mmol) en EtOH (3.7 mL), se le añade K_2CO_3 (359.3 mg, 2.6 mmol) y metilamina (0.5 mL, 15 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 4 horas. Posteriormente se elimina el disolvente a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 26 mg de **23d** (13%) como un sólido marrón claro.

Rendimiento: 13%

Pf: 101-103 °C.

Lit.¹⁶³(107-108 °C).



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

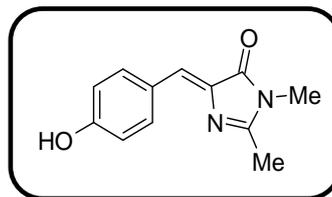
2.35 (s, 3H), 3.16 (s, 3H), 7.08 (s, 1H), 7.37 (m, 3H), 8.10 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H).

Reacción de la oxazolona (22b) con metilamina: Preparación de 5-(4-Hidroxibenciliden)-2,3-dimetil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (23e)

A una disolución de 245 mg de **22b** (1 mmol) en EtOH (3.7 mL), se le añade K_2CO_3 (359.3 mg, 2.6 mmol) y metilamina (0.5 mL, 15 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 4 horas. Posteriormente se elimina el disolvente a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (7:3). Se obtienen 97.6 mg de **23e** (40%) como un sólido amarillo.

¹⁶³ Stafforst, T.; Diederichsen, U. *Eur. J. Org.Chem.* **2007**, 899-911.

Rendimiento: 40%
Pf: 218 °C (descomp.).
Lit.¹⁶³



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.35 (s, 3H), 3.16 (s, 3H), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H)

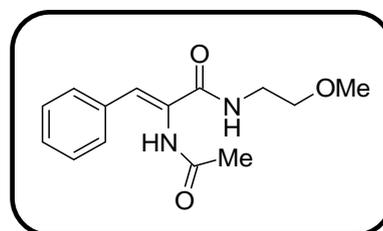
Reacción de la oxazolona (22a) con metilamina: Preparación *N*-(2-metoxietil)-2-acetilamino-3-fenil-acrilamida (68) y 5-benciliden-3-(2-metoxietil)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (23f)

MÉTODO A

A una disolución de 187 mg de **22a** (1 mmol) en H₂O (2.1 mL), se le añade 2-metoxietilamina (1 mL, 1.1 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente se elimina el disolvente a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt. Se obtienen 99.6 mg de **68** (38%) como un sólido blanco y 12 mg de **23f** (5%) como sólido marrón claro.

***N*-(2-Metoxietil)-2-acetilamino-3-fenil-acrilamida (68)**

Rendimiento: 38%
Pf: 135-137 °C.



IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹):

3350, 3203, 2914, 1677, 1620, 1550

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2,13 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.52 (m, 4H), 7.19 (s, 1H), 7.39 (m, 3H), 7.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H),

¹⁶³ Stafforst, T.; Diederichsen, U. *Eur. J. Org.Chem.* **2007**, 899-911.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

22.6, 40.6, 58.9, 71.9, 129.7, 130.0, 130.3, 130.4, 130.6, 135.3, 168.1, 173.2.

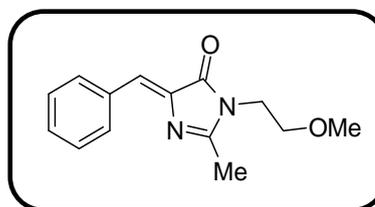
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₄H₁₉N₂O₃ [M+H]⁺: 263.1396.
encontrado: 263.1388.

5-Benciliden-3-(2-metoxietil)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (23f)

Además del método descrito anteriormente, también se preparó por otro procedimiento que se describe a continuación.

MÉTODO B

A una disolución del ácido α-acetamidocinámico en DMF anhidra (3.5 mL) bajo atmósfera de argón, se le añade secuencialmente 2-metoxietilamina (90 mg, 0.06 mL, 1.2 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 162 mg, 1.2 mmol), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 186 mg, 0.2 mL, 1.2 mmol), Et₃N (303 mg, 0.41 mL, 3 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 12.0 mg, 0.1 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 50 °C durante una noche. Posteriormente, se añade tamiz molecular y se calienta la mezcla a 150 °C durante 8 horas. Una vez terminada la reacción se filtra el tamiz molecular y se elimina el disolvente a vacío, el producto crudo se purifica por cromatografía en gel de sílice usando como eluyente AcOEt. Se obtienen 178 mg de **23f** (73%) como un sólido ocre.

Rendimiento: 73%**Pf:** 45-47 °C.**IR (NaCl), ν_{max}** (cm⁻¹):

3408, 2893, 1713, 1645, 1576.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):2.39 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.50 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 7.36 (m, 3H), 8.10 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

15.9, 40.9, 59.0, 70.5, 127.0, 128.6, 129.9, 132.0, 134.1, 138.5, 163.3, 170.6

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 245.1290.
encontrado: 245.1280.

4.18.2. Reacción de 2-metoxietilamina con 2-metil o 2-fenil imidazolonas

Procedimiento general

Una disolución de la correspondiente imidazolona (1 mmol) en 2-metoxietilamina (20.1 mL) se calienta a 100 °C durante el tiempo indicado en cada caso, posteriormente se elimina el disolvente a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía en gel de sílice.

Reacción con 5-(1H-indol-2-ilmetilen)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona con 2-metoxietilamina: Preparación de 5-(1H-indol-2-ilmetilen)-3-(2-metoxietil)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (**25d**) y *N*-(2-metoxietil)-1-metil-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (**86a**).

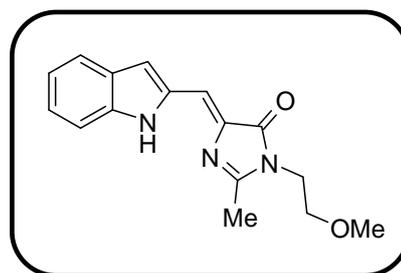
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 225 mg de **25a** y tras 6 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 45.3 mg de **25d** (16%) como un aceite ocre y 172.6 mg **86a** (61%) como un sólido amarillo.

5-[(1*H*-indol-2-il)-metilen]-2-metil-3-(2-metoxietil)-3,5-dihidroimidazol-4-ona (25d**)**

Rendimiento: 16%
Aceite

IR (NaCl), ν_{max} (cm^{-1}):

3364, 2925, 2360, 1707, 1635.



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

2.45 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.07 (at, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.25 (at, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 10.79 (sa, 1H).

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₆H₁₈N₃O₂ [M+H]⁺: 284.1399.
encontrado: 284.1378.

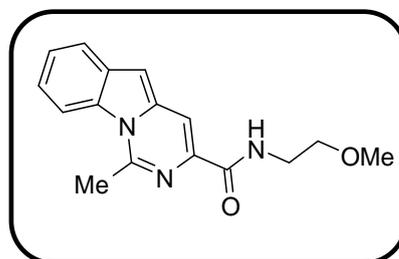
***N*-(2-Metoxietil)-1-metil-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (86a)**

Rendimiento: 61%

Pf: 135-137 °C.

IR (NaCl), *v*_{max} (cm⁻¹):

3360, 2926, 1664, 1385.

**¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):**

3.14 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.59 (at, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.68 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 7.39 (at, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.45 (at, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.13 (m, 2H), 8.22 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

25.2, 39.2, 58.9, 71.4, 98.2, 111.8, 115.2, 121.1, 122.2, 124.1, 130.3, 131.1, 135.3, 135.8, 149.3, 164.2.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* Calculado para C₁₆H₁₈N₃O₂ [M+H]⁺: 284.1399.
encontrado : 284.1389.

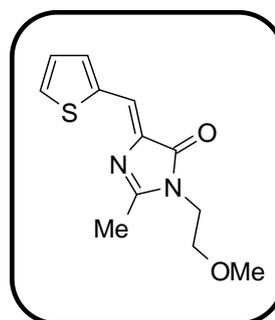
Reacción con 2-metil-5-tiofen-2-ilmetilen-3,5-dihidro-imidazol-4-ona con 2-metoxietilamina: Preparación de 3-(2-metoxietil)-2-metil-5-tiofen-2-ilmetilen-3,5-dihidroimidazol-4-ona (28e)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 192 mg de **28a** y tras 9 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 135 mg de **28e** (54%) como un aceite naranja.

2-Metil-3-(2-metoxietil)-5-tiofen-2-il-metilen-3,5-dihidroimidazol-4-ona (28e)

Rendimiento: 54%

Aceite



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3397, 2979, 1705, 1640, 1404.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

2.40 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.50 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.74 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 7.07 (dd, $J = 4.9, 3.6$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

16.0, 41.0, 59.0, 70.5, 120.5, 127.5, 133.2, 134.0, 136.3, 137.7, 162.3, 169.9.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₁₂H₁₅N₂O₂S [M+H]⁺: 251.0854.
encontrado: 251.0857.

4.18.3. Reacción de 2-metoxietilamina con bromoheteroarilimidazolonas

Procedimiento general

A una disolución de la correspondiente bromoheteroarilimidazolonas (1 mmol) en 2-metoxietilamina (20 mL) se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Posteriormente se elimina el disolvente a vacío y se obtiene el producto crudo, el cual se purifica por cromatografía en gel de sílice.

Reacción con 5-(3-bromo-1H-indol-2-ilmetilene)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona con 2-metoxietilamina: Preparación de 5-[(1H-indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metileno]-3-(2-metoxietil)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (**16k**), 5-[(1H-indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metileno]-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (**26a**) y *N*-(2-metoxietil)-5-bromo-1-metil-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (**86b**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 304 mg de **25e** y tras 3 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt. Se obtienen 21 mg de **16k** (6%) como un sólido naranja, 173 mg de **26a** (58%) como un sólido naranja, y 54 mg de **86b** (15%) como un sólido amarillo.

5-[(1H-Indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metileno]-3-(2-metoxietil)-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (**16k**)

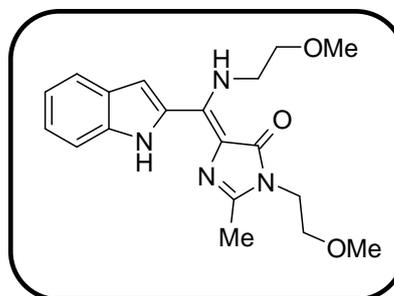
Rendimiento: 6%
Pf: 116-118 °C.

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3279, 2925, 1626, 1469, 1121.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

2.36 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.57 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.72 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.85 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.94 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 7.11 (m, 2H), 7.27 (ta, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 9.71 (sa, 1H), 12.19 (sa, 1H).



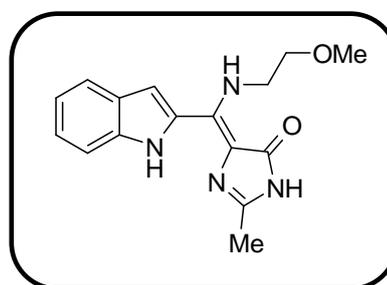
^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

15.0, 40.7, 46.1, 59.0, 59.3, 71.0, 71.3, 109.2, 112.2, 114.0, 120.4, 121.7, 124.7, 127.5, 129.3, 137.0, 145.7, 146.9, 167.4.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$:357.1927.
encontrado: 357.1930.

5-[(1H-Indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metilen]-2-metil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (26a)

Rendimiento: 58%
Pf: 233-235 °C.



IR (NaCl), ν_{max} (cm^{-1}):

3342, 2917, 2368, 1651, 1599, 1259.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

2.34 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.72 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.94 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H), 7.10 (ta, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.28 (ta, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 9.71 (sa, 1H), 10.41 (sa, 1H), 12.16 (sa, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

15.4, 46.1, 59.2, 71.2, 109.3, 112.2, 114.3, 120.4, 121.6, 124.8, 127.4, 128.8, 137.0, 143.5, 147.6, 168.9

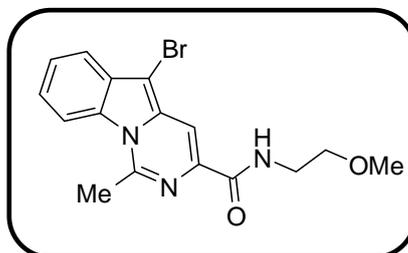
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$:299.1508.
encontrado: 299.1508.

N*-(2-Metoxietil)-5-bromo-1-metil-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (86b)*Rendimiento:** 15%**Pf:** 134-136 °C.**IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3354, 3160, 1697, 1193.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):3.14 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.59 (at, $J = 45.3$ Hz, 2H), 3.68 (q, $J = 45.3$ Hz, 2H), 7.45 (at, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.55 (at, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.20 (s, 2H).**¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

25.1, 39.4, 58.9, 71.3, 87.7, 110.1, 115.2, 119.5, 123.3, 124.9, 129.7, 130.0, 133.4, 136.3, 149.3, 163.7.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₆H₁₇⁷⁹BrN₃O₂ [M+H]⁺: 362.0504.
encontrado: 362.0512.

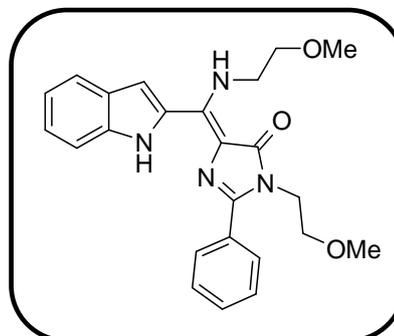
Reacción con 5-(3-bromo-1H-indol-2-ilmetileno)-2-fenil-3,5-dihidroimidazol-4-ona con 2-metoxietilamina: Preparación de 5-[(1H-indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metileno]-3-(2-metoxietil)-2-fenil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (**16I**) y *N*-(2-metoxietil)-5-bromo-1-fenil-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (**86c**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 366 mg de **28g** y tras 8 horas de reacción, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en gel de sílice utilizando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 125.4 mg de **16I** (30%) como un sólido naranja y 63.6 mg de **86c** (15%) como un sólido naranja.

5-[(1*H*-Indol-2-il)-(2-metoxietilamino)-metilen]-3-(2-metoxietil)-2-fenil-3,5-dihidroimidazol-4-ona (16l)

Rendimiento: 30%

Pf: 109-111°C.



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3258, 2964, 2344, 1627, 1261.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

3.26 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.65 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.77 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.03 (m, 4H), 7.11 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.27 (at, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.57 (m, 4H), 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 10.10 (sa, 1H), 12.41 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

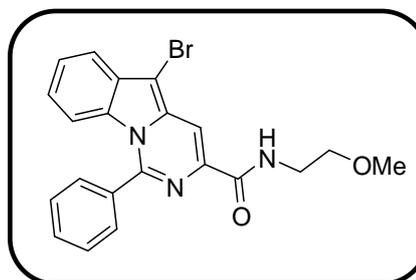
41.4, 46.2, 58.8, 59.2, 70.4, 71.1, 109.6, 112.2, 114.8, 120.4, 121.7, 124.9, 127.4, 128.6 (2C), 129.0, 129.3, 130.8, 137.0, 146.2, 148.1, 167.9.

HRMS (APCI-TOF) m/z Calculado para C₂₄H₂₇N₄O₃ [M+H]⁺: 419.2083.
encontrado: 419.2073.

***N*-(2-Metoxietil)-5-bromo-1-fenil-pirimido[1,6-*a*]indol-3-carboxamida (86c)**

Rendimiento: 15%

Pf: >248 °C (Desc.).



IR (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):

3346, 2850, 1705, 1634, 1333.

¹H-RMN (300 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

3.29 (s, 3H), 3.52 (at, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.61 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H), 6.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.13 (at, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.50 (at, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.75 (m, 6H), 8.10 (s, 1H), 8.32 (sa, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm):

41.3, 60.1, 73.2, 88.7, 111.7, 117.7, 121.1, 125.1, 127.6, 130.7, 131.8, 132.0, 133.3, 136.4, 137.7, 140.4, 152.8, 165.3.

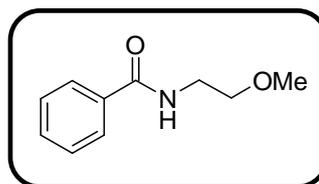
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₂₁H₁₉⁷⁹BrN₃O₂ [M+H]⁺: 424.0661.
encontrado: 424.0651.

4.19. INTERMEDIOS OBTENIDOS MEDIANTE LA RUTA B.

***N*-(2-Metoxietil)-benzamida (73)**

A una disolución de cloruro de benzoilo (1.16 mL, 10 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 mL) en atmósfera de argón, se adicionan 2-metoxietilamina (0.82 mg, 0.96 mL, 11 mmol) y trietilamina (1.52 mL, 10 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez terminada la reacción se evapora el disolvente y se obtiene un producto crudo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente AcOEt. Se obtienen 1.80 g de **73** (99%) como un aceite marrón.

Rendimiento: 99%
Aceite¹⁶⁴



¹⁶⁴ Pelletier, G.; Bechara, W. S.; Charette, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12817-12819.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

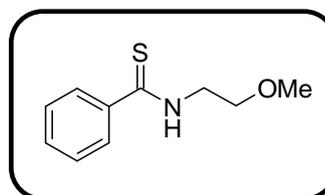
3.34 (s, 3H), 3.51 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 6.64 (sa, 1H), 7.41 (m, 3H), 7.75 (dd, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 2H).

***N*-(2-Metoxietil)-tiobenzamida (74)**

A una disolución de **73** (1.79 g, 10 mmol) en tolueno anhidro (43 mL) en atmósfera de argón, se adiciona el reactivo de Lawesson (4.45 g, 11 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 4 horas. Una vez terminada la reacción se evapora el disolvente y se obtiene un producto crudo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (8:2). Se obtienen 1.01 g de **74** (52%) como un aceite amarillo.

Rendimiento: 52%

Aceite



IR (NaCl), ν_{max} (cm^{-1}):

3260, 2929, 2361, 1523, 1120.

^1H -RMN (300 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm):

3.32 (s, 3H), 3.69 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.99 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 7.42 (m, 3H), 7.75 (dd, $J = 7.9, 0.7$ Hz, 2H), 9.33 (sa, 1H).

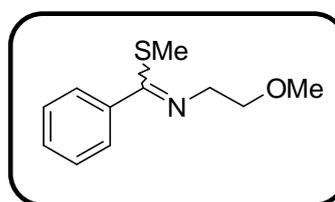
^{13}C -RMN (75 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm):

46.9, 58.6, 69.8, 127.8, 128.7, 131.3, 142.6, 199.5.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NOS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 196.0796.
encontrado: 196.0790.

***N*-(2-Metoxi-etil)-tiobenzimidato de metilo (70)**

A una disolución de **74** (195 mg, 1 mmol) en THF anhidro (2 mL) enfriada a 0 °C y en atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (80 mg, 2 mmol). Después de 30 min a 0 °C se adiciona yoduro de metilo (0.12 mL, 2 mmol). Después la reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se hidroliza con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. La mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (8:2). Se obtienen 107 mg de **70** (mezcla de isómeros Z/E) (51%) como un aceite incoloro.

Rendimiento: 51%**Aceite****IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3059, 2923, 1621, 1444, 1125.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):2.10 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.69 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.99 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.78 (m, 4H), 7.29 (m, 2H), 7.40 (m, 6H), 7.47 (m, 2H).**¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

13.3, 16.1, 52.9, 53.5, 58.7, 58.8, 72.5, 72.9, 127.1, 128.0, 128.2, 129.0, 129.1, 136.5, 137.8, 166.4, 167.1.

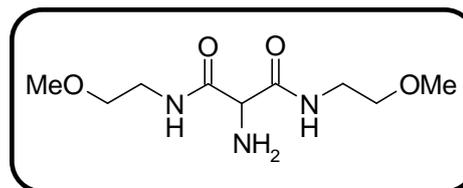
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₁H₁₆NOS [M+H]⁺: 210.0953.
encontrado: 210.0943.

4.20. INTERMEDIOS OBTENIDOS MEDIANTE LA RUTA C.

N,N'-Bis-(2-metoxietil)-2-aminomalonamida (**78b**)

Una disolución de aminomalonato de dietilo (1.75 g, 10 mmol) en 18 mL de 2-metoxietilamina se calienta a 45 °C durante 1 día. Posteriormente se elimina el disolvente a vacío y obteniéndose 2.28 g de **78b** (98%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 98%
Pf: 50-51 °C.



IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3322, 3099, 2890, 2359, 1652, 1126.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

2.19 (sa, 2H), 3.29 (s, 6H), 3.39 (m, 8H), 3.96 (s, 1H), 7.98 (sa, 2H).

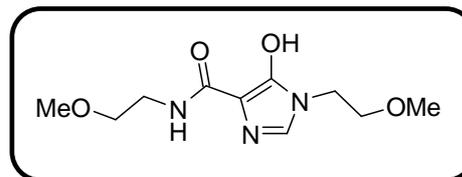
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

39.3, 56.7, 58.7, 70.7, 169.5.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₉H₂₀N₃O₄ [M+H]⁺: 234.1454.
encontrado: 234.1460.

N-(2-Metoxietil)-5-hidroxi-1-(2-metoxietil)-1H-imidazol-4-carboxamida (**75b**)

Una disolución de **76b** (1.16 g, 5 mmol) y acetato de formamidina (0.63 g, 6.05 mmol) en EtOH (17 mL) se calienta a reflujo durante 1 hora. Finalizada la reacción se evapora el disolvente a vacío y se añade CH₂Cl₂, formándose un precipitado que se filtra y se desecha. Las aguas madres se evaporan a vacío de nuevo, repitiéndose esta última operación varias veces hasta que no se observe la formación de ningún precipitado, de esta forma, se obtienen 1.96 g de **75b** (81%) como un aceite verde.

Rendimiento: 81%**Aceite****IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

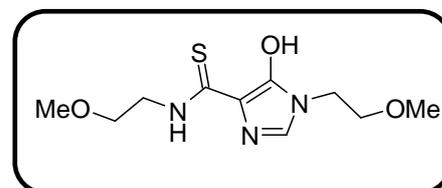
3522, 2830, 2359, 1684, 1456, 1117.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):3.32 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.49 (m, 2H), 3.57 (m, 4H), 3.99 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 8.12 (sa, 1H).**¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

38.4, 41.7, 58.8, 58.9, 70.2, 71.4, 125.1, 139.8, 155.7, 162.2.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₀H₁₈N₃O₄ [M+H]⁺: 244.1297.
encontrado: 244.1300.***N*-(2-Metoxietil)-5-hidroxi-1-(2-metoxietil)-1*H*-imidazol-4-tiocarboxamida (78b)**

A una disolución de **75b** (242 mg, 1 mmol) en tolueno anhidro (9 mL) en atmósfera de argón, se adiciona el reactivo de Lawesson (445 mg, 1.1 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 2 horas. Una vez terminada la reacción se evapora el disolvente y se obtiene un producto crudo que se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente AcOEt:EtOH (9:1). Se obtienen 44 mg de **78b** (17%) como un aceite verde oscuro.

Rendimiento: 17%**Aceite****IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):**

3509, 2829, 1628, 1555, 1120.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

3.23 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.55 (m, 4H), 3.93 (m, 4H), 7.69 (s, 1H), 9.64 (sa, 1H).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

42.0, 43.5, 58.6, 58.7, 69.8, 70.4, 107.2, 126.9, 152.3, 181.0.

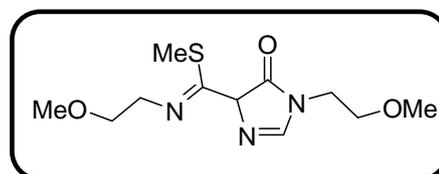
HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₀H₁₈N₃O₃S [M+H]⁺: 260.1069.
encontrado: 260.1082.

***N*-(2-Metoxietil)-5-hidroxi-1-metoxietil-1*H*-imidazol-4-carboxitioimidato de etilo (80)**

A una disolución de **78b** (273 mg, 1 mmol) en THF anhidro (2 mL) enfriada a 0 °C y en atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (80 mg, 2 mmol). Después de 30 min a 0 °C se adiciona yoduro de metilo (0.12 mL, 2 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se hidroliza con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. La mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente AcOEt:EtOH (9:1). Se obtienen 142 mg de **80** (52%) como un aceite amarillo.

Rendimiento: 52%

Aceite



IR (NaCl), ν_{max} (cm⁻¹):

3531, 2928, 2830, 1728, 1444.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

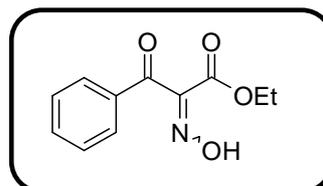
2.86 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.54 (m, 4H), 3.70 (m, 2H), 3.79 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 9.92 (sa, 1H).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

17.9, 40.9, 44.5, 58.9, 59.1, 70.9, 110.5, 136.6, 162.5, 164.4.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₁H₁₉N₃O₃S [M+H]⁺: 274.1225.
encontrado: 274.1222.**4.21. INTERMEDIOS OBTENIDOS MEDIANTE LA RUTA D.****2-Hidroxiimino-benzoilacetato de etilo (82)**

Una disolución de benzoilacetato de etilo (192 mg, 1 mmol) en ácido acético (1 mL) se enfría a 5 °C. Posteriormente se le adiciona gota a gota una disolución de NaNO₂ (80 mg, 1.16 mmol) en H₂O (0.2 mL). Una vez terminada la adición se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente se le añade H₂O y se agita vigorosamente durante 1 hora. El precipitado formado se filtra y se lava varias veces con H₂O. Se obtienen 201 mg de **82** (91%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 91%**Pf:** 132-133 °C.**Lit.**¹⁴⁷**¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm):**1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.29 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.50 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.62 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H).

¹⁴⁷ Fell, S. C. M.; Pearson, M. J.; Burton, G.; Elder, J. S. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1* **1995**, 12, 1483-93.

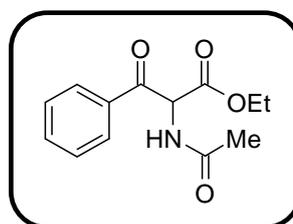
2-Acetamido-benzoilacetato de etilo (81)

A una disolución de **82** (221 mg, 1 mmol) en H₂O (0.5 mL) se le añade ácido acético (0.08 mL) y anhídrido acético (0.3 mL) y se enfría a 0 °C. Posteriormente se le adiciona poco a poco cinc en polvo (131 mg, 2 mmol). Una vez terminada la adición se agita durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrae con éter, las fases orgánicas se lavan con una disolución de NaHCO₃ y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Seguidamente se elimina el disolvente por destilación a presión reducida obteniéndose 204 mg de **81** (82%) como un sólido marrón claro, que se utilizó en el siguiente paso de reacción sin más purificación.

Rendimiento: 82%

Pf: 78-82 °C.

Lit.¹⁶⁵ (75-80 °C).



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

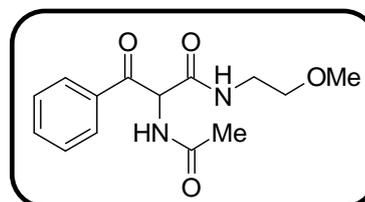
1.13 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 2.09 (s, 3H), 4.15 (c, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.18 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.77 (sa, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.62 (m, 2H), 8.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H).

***N*-(2-Metoxietil)-2-acetamido-benzoilacetato de etilo (84)**

Una disolución de **81** (130 mg, 0.5 mmol) en 2-metoxietilamina (5 mL) se calienta durante 10 minutos a 100 °C, usando un microondas focalizado. Una vez terminada la reacción se elimina la amina a vacío y el producto crudo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 20 mg de **84** (14%) como un sólido blanco.

Rendimiento: 14%

Pf: 157-159 °C.



¹⁶⁵ Bolhofer, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5459-5461.

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3288, 2923, 2421, 1694, 1633.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

2.09 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.37 (m, 4H), 5.90 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 6.92 (sa, 1H), 7.12 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 7.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.58 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

23.0, 39.5, 58.8, 59.7, 70.6, 128.8, 128.9, 134.2, 134.4, 166.3, 170.4, 192.6.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₄H₁₉N₂O₄ [M+H]⁺: 279.1345.
encontrado: 279.1353.

***N*-(2-Metoxietil)-2-hidroxiimino-3-(2-metoxietilimino)-3-fenil-propionamida (**85**)**

Una disolución de **82** (221 mg, 1 mmol) en 2-metoxietilamina (0.6 mL) se calienta durante 10 minutos a 100 °C, usando un microondas focalizado. Una vez terminada la reacción se elimina la amina a vacío y el crudo se purifica por cromatografía flash en gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 255 mg de **85** (83%) como un aceite marrón.

Rendimiento: 83%

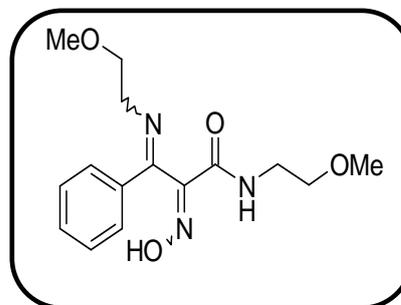
Aceite

IR (NaCl), ν_{\max} (cm⁻¹):

3408, 2849, 1686, 1535, 1449.

¹H-RMN (300 MHz, CD Cl₃), δ (ppm):

3.32 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.45 (m, 4H), 3.55 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.72 (ta, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H).



¹³C-RMN (75 MHz, Acetona-d₆), δ(ppm):

39.5, 54.5, 58.6, 58.7, 71.2, 72.9, 127.6, 129.0, 131.0, 136.9, 149.9, 161.7, 162.1.

HRMS (ESI-TOF) m/z Calculado para C₁₅H₂₂N₃O₄ [M+H]⁺:308.1610.
encontrado: 308.1611.

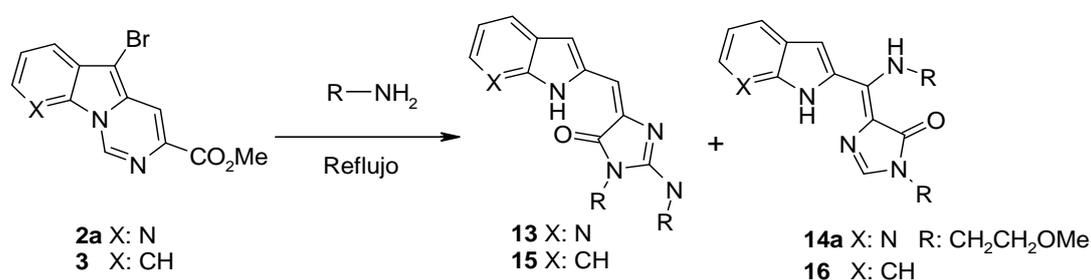
4.22. DATOS DE RAYOS X

En la siguiente tabla aparecen recogidos los datos cristalográficos de la estructura cristalina de **14a**.

Tabla 4.1. Datos cristalográficos del compuesto **14a**.

Compuesto 14a	
Fórmula Molecular	C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O ₃
Peso Molecular	343.39
Temperatura (K)	200(2)
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c
a (Å)	11.542(10)
b (Å)	14.112(11)
c (Å)	10.758(11)
α (°)	90
β (°)	94.60(11)
γ (°)	90
Volumen (Å ³)	1747(3)
Z	4
F(000)	728
D calc. (mg/m ³)	1.306
Coef. de absorción μ (mm ⁻¹)	0.093
Dimensiones del cristal (mm)	0.45 x 0.35 x 0.20
Θ (°)	3.39 a 25.39
Reflexiones medidas / únicas	10245 / 3171 [R(int) = 0.1424]
GOF	1.038
Índices R finales [I > 2σ(I)] ^a	R1 = 0.0776 wR2 = 0.1853
R todos los datos	R1 = 0.1448 wR2 = 0.2330

- Se han preparado cinco series de compuestos del tipo híbrido péptido-heterociclo, en los que el sistema heterocíclico está constituido por diferentes azolopirimidinas. Este tipo de híbridos péptido-heterociclo resultaron ser inactivos, en la mayoría de los casos, como inhibidores de calpaína.
- Se han obtenido dos series de imidazolnilmetiléníndoles y azaindoles, como resultado de la reacción de apertura de los derivados de azolopirimidina **2a** y **3** con diferentes aminas. Además de lo novedoso de esta reacción, el compuesto **14a** (R= CH₂CH₂OMe, X=N) formado en la misma, presentó una significativa actividad como inhibidor de calpaína.



Esquema 5.1

- Se ha realizado un estudio de la reacción de apertura del sistema de azolopirimidina comprobándose que ésta sólo se produce con los sistemas tricíclicos **2a**, **3** y derivados de los mismos. Los intentos de optimización del proceso han permitido aislar e identificar varios intermedios y, en base a ellos y los productos finales, proponer un mecanismo para la reacción de apertura y formación de la imidazolona.
- Se ha realizado un estudio de modelado molecular del compuesto **14a**, estableciéndose que este derivado cumpliría con los requerimientos estéricos y electrónicos para su unión con calpaína y exhibir actividad inhibitoria de la misma.
- Se ha realizado un estudio de relación estructura-actividad (SAR) sobre el compuesto **14a**, obteniéndose alrededor de 60 análogos. Seis de estos resultaron más activos que el cabeza de serie, destacando:

- Un análogo indólico, **16k**, al menos 600 veces más activo que **14a**.
- A un análogo indólico de estructura simplificada, **25b**, unas veinte veces más activo que **14a**.
- Un análogo indólico que incorpora una feniloxazolona, **24a**, unas 400 veces más activo que **14a**.
- Dos análogos tiofénicos con estructura simplificada, **28c** y **28a**, que al menos resultaron 500 veces más activos que **14a**.

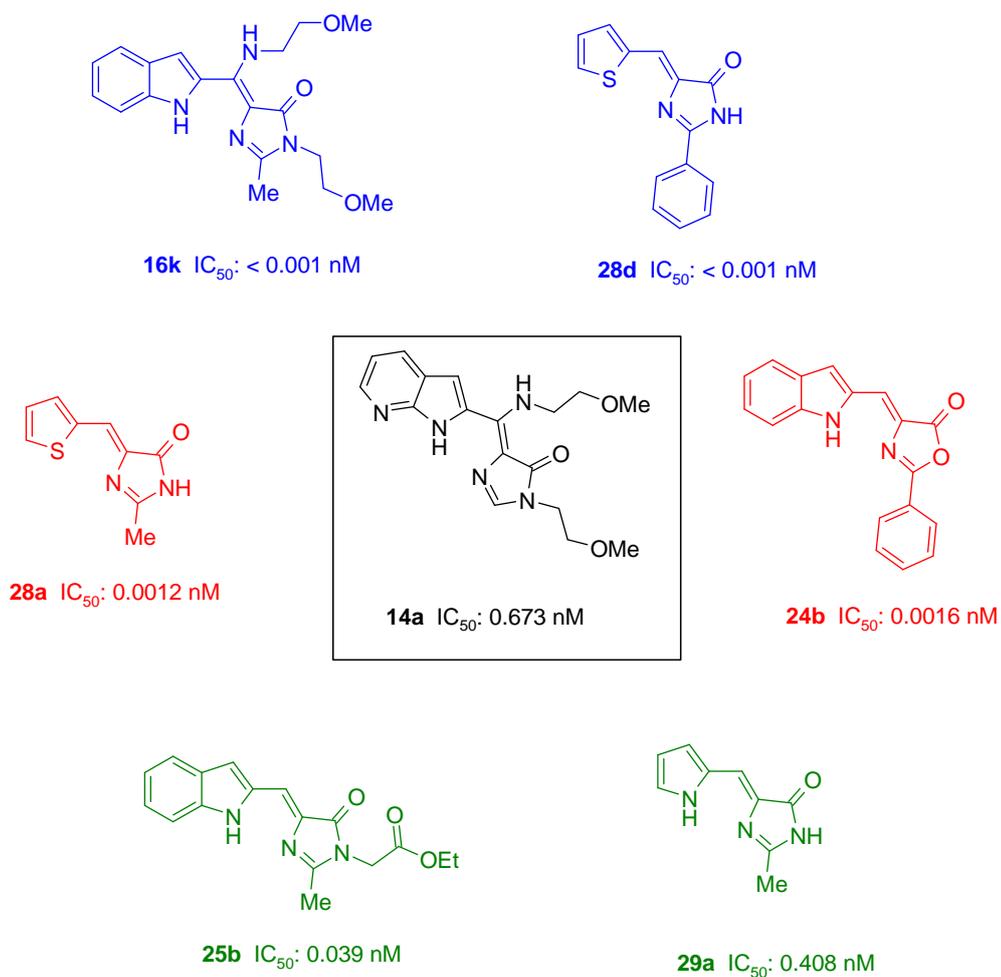


Figura 5.1

The calpain family is a group of cysteine proteases unique in their dependency on calcium to attain functionally active forms. Calpains are involved in a wide range of cellular calcium-regulated functions, including signal transduction, cell proliferation and differentiation, and apoptosis. Their physiological roles have been extensively studied over many years. An elevation in calpain activity has been implicate in the pathology of a number of human diseases^{4,5,7,8,9} like Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases, diabetes Type II ... etc.

For this reason the importance to develop new calpain inhibitor to avoid the increase of calpain activity, which is tightly regulated *in vivo* by the ubiquitous, endogenous inhibitor, calpastatin^{60,5} and by intracellular concentratioes of free Ca²⁺.

A large number of synthetic calpain inhibitors are been described in the last years.⁶⁰ The majority of them are based on peptides, with some non-peptide examples having recently been identified. Most of these inhibitors are classified according to the functional group (warhead) that reacts with the active site cysteine of calpains. The main classes include the epoxysuccinate derivatives, aldehydes, aldehydes prodrugs (hemiacetals) and α -ketocarbonil compounds. A number of inhibitors lacking such warhead are also known and some of them are called peptide-heterocycle hybrids.¹⁰⁷

In this context, this Thesis has focused on the design and synthesis of new calpain inhibitors, as the main purpose. Firstly, we envisaged the pyrido[3',2':4,5]pyrrolo[1,2-c]pyrimidine system and other related azolopyrimidines could be of interest as new heterocyclic templates in the development of new calpain inhibitors (**Figure 6.1**). However, several series of new azolopyrimidine-peptide hibrids prepared were inactive as calpain inhibitors.

⁴ Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H; Wei, W; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.

⁵ Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 615-638.

⁷ Saez, M. E.; Ramirez-Lorca, R; Moron, F. J.; Ruiz, A. *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 917-923.

⁸ Branca, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 1098-1104.

⁹ Huang, Y.; Wang, K. K. W. *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 355-362.

⁶⁰ Pietsch, M.; Chua, K. C. H.; Abell, A. D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 270-293.

¹⁰⁷ Mann, E.; Chana, A.; Sanchez-Sancho, F.; Puerta, C.; Garcia-Merino, A.; Herradon, B. *Adv. Synth. Catal.*, **2002**, *344*, 855-867.

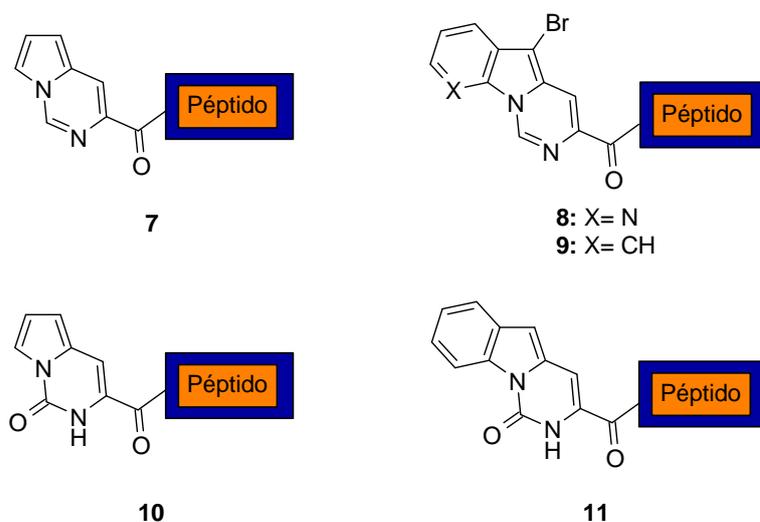
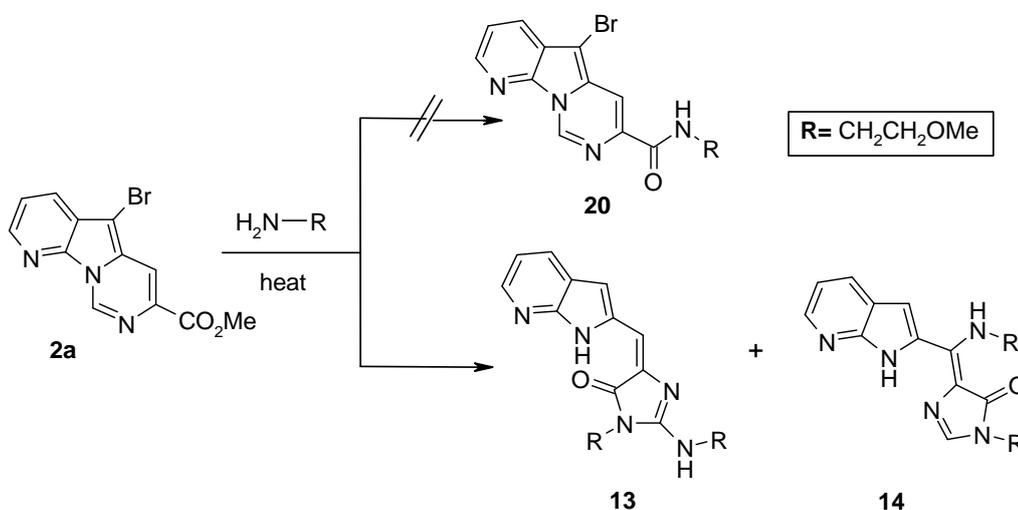


Figure 6.1

In the course of this work, the reaction of methyl-5-bromo-pyrido[3',2':4,5]pyrrolo[1, 2-c]pyrimidine-7-carboxylate with of 2-methoxyethylamine did not afford the expected amide derivative but the unexpected azaindole derivatives **13** and **14** as shown in **Scheme 6.1**.



Scheme 6.1

The two compounds were separated by chromatography and their structure was established by their analytical and spectral data, and X-ray diffraction (**14a**, R=CH₂CH₂OMe). This azaindole derivative (**14a**) showed good activity as calpain inhibitor (99.8% inhibition). Consequently we focused this project on a structure-activity relationship (SAR) study on compound **14a**.

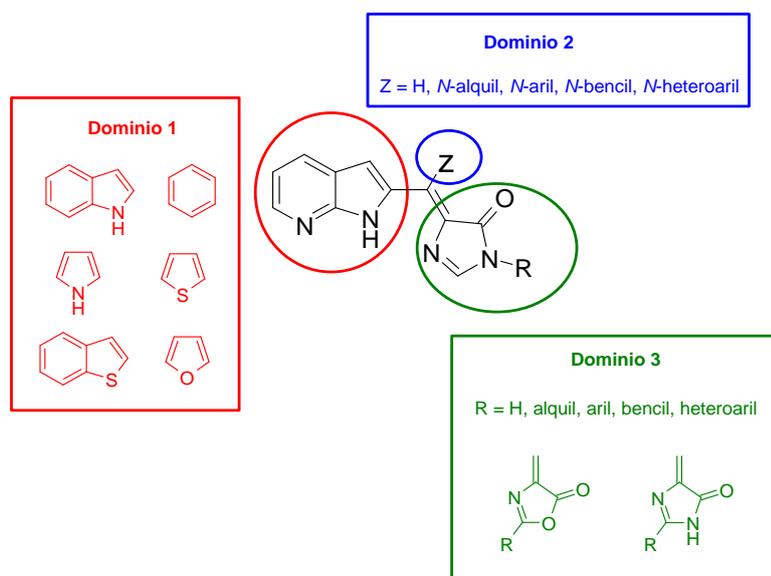
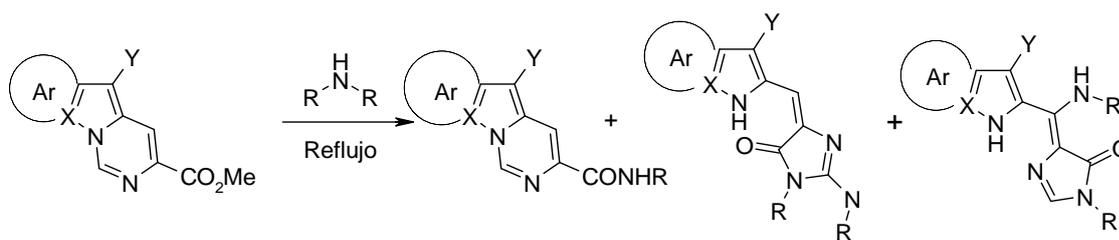


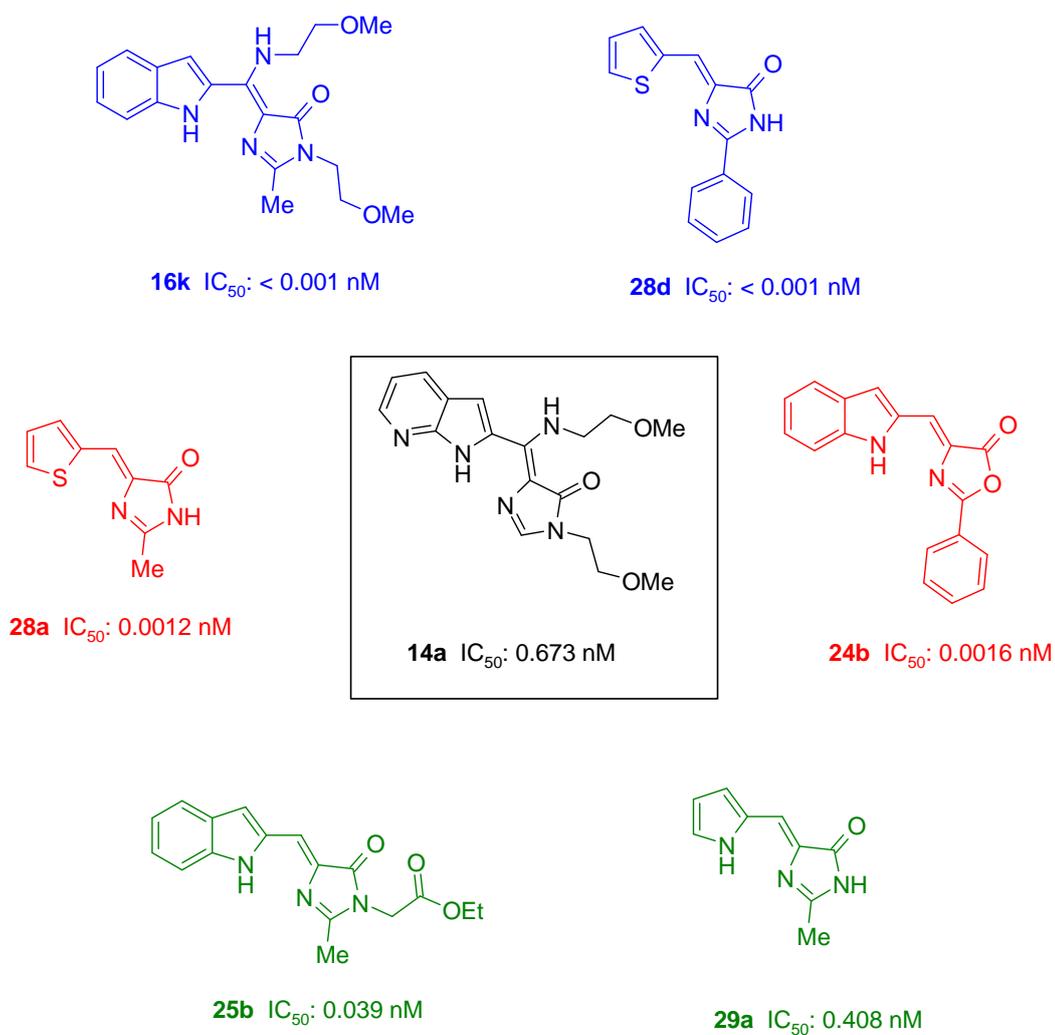
Figure 6.2

In order to illustrate the versatility and synthetic potential of this unexpected ring-opening reaction for the preparation of these unusual azole derivatives, we studied the reaction with various representative primary and secondary amines and with different azolopyrimidine substrates



Scheme 6.2

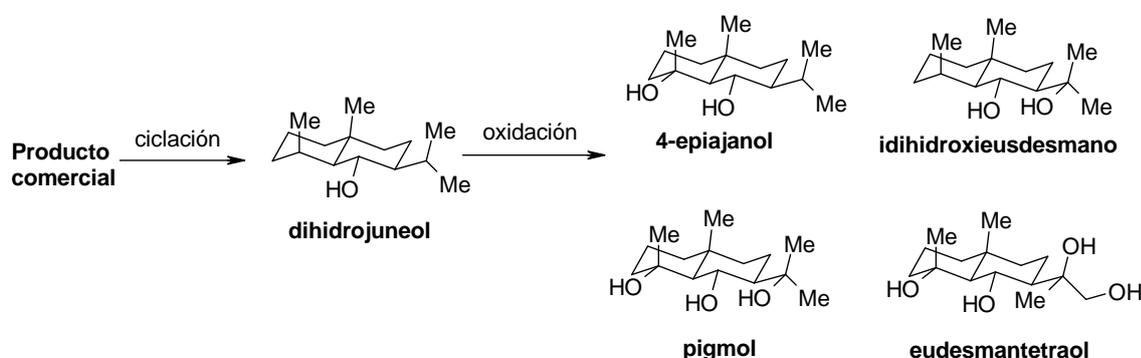
As we found some limitations of this reaction to prepare some of the desired analogues, we studied some synthetic alternative routes. On the course of these studies we were able to synthesize a great number of oxazolones and imidazolones derivatives which were tested as calpain inhibitors. In **Figure 6.3** are shown the most active compounds.

**Figure 6.3**

Como parte de mi formación predoctoral, en el verano del 2008 realicé una estancia de tres meses en el centro de investigación The Scripps Research Institute en La Jolla (San Diego, Estados Unidos), bajo la dirección del Profesor Phil Baran.

El trabajo del grupo del Profesor Phil Baran se enmarca principalmente dentro de la síntesis total de productos naturales. Para conseguir su objetivo, y de manera paralela, desarrollan distintas metodologías para diferentes tipos de procesos de interés en Síntesis Orgánica.

Unos de los proyectos que se estaba abordando en el grupo, en el periodo en que realicé mi estancia allí, era la síntesis total de terpenos del eudesmano tales como los recogidos en el **Esquema 7.1**, por oxidación selectiva de enlaces C-H no activados, siendo éste el proyecto en el que trabajé durante mi estancia.

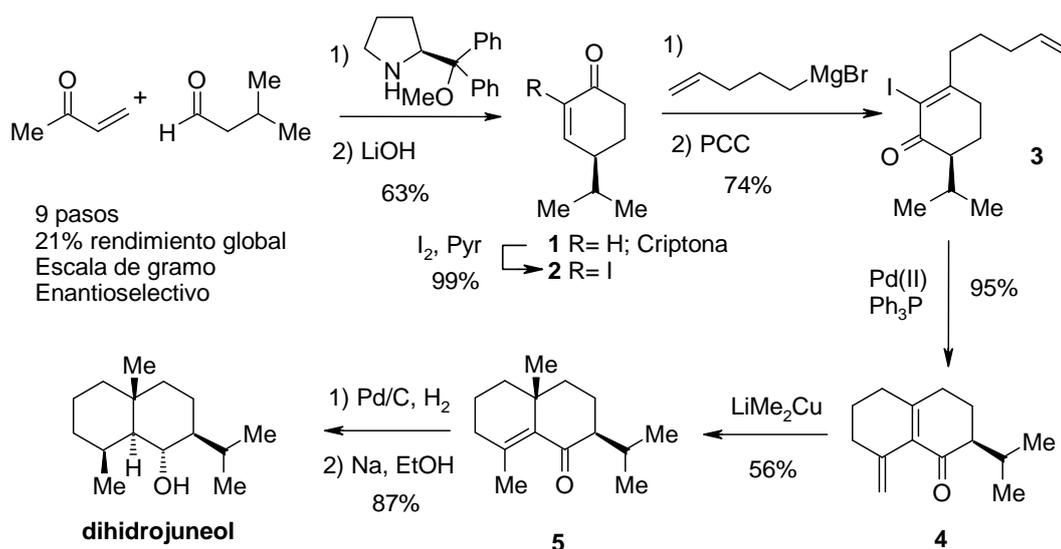


Esquema 7.1

La síntesis comprende dos etapas claves: la de ciclación, para la formación del dihidrojuneol, y la de oxidación C-H para la síntesis de los distintos terpenos. La síntesis del dihidrojuneol¹⁶⁶ (**Esquema 7.2**) conlleva una secuencia de nueve pasos, cinco de ellos para generar enlaces C-C y cuatro para establecer los centros estereogénicos. La reacción intramolecular enantioselectiva de 3-metilbutirato y metilvinil cetona, catalizada por prolina y seguida de tratamiento con base, conduce a la formación del producto natural criptonina (**1**), la cual, posteriormente se transformó en la yodoenona **2** con un rendimiento casi cuantitativo. La introducción de la cadena mediante la adición del reactivo de Grignard y la posterior transposición 1,3-carbonílica producen la formación de **3** con un 74% de rendimiento. La ciclación se produjo

¹⁶⁶ Chen, K.; Ishihara, Y.; Moron Galan, M.; Baran, P. S. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4738-4744.

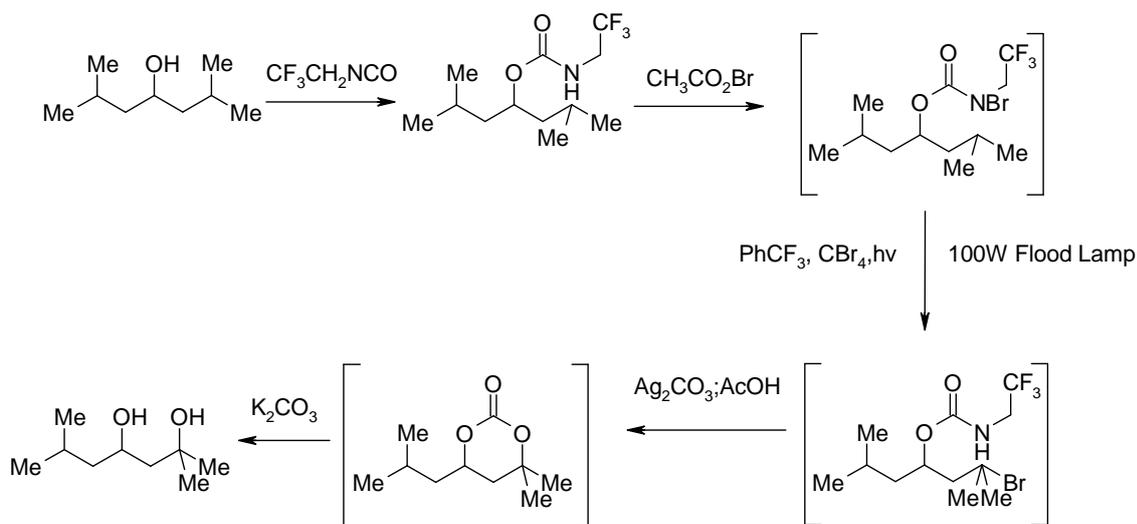
mediante una reacción intramolecular de Heck bajo condiciones estándar para dar el compuesto **4** que, tras una adición 1,4 regio- y estereoselectiva e isomerización en tándem condujo a la formación de la enona **5**. La reducción en dos pasos permitió establecer los tres estereocentros del dihidrojunol en un 87% de rendimiento y con un único diastereómero. El rendimiento global de la síntesis es del 21%.



Esquema 7.2

Para la fase de oxidación del dihidrojunol, se estaba desarrollando en el grupo una metodología para las reacciones de oxidación C-H. Ese tipo de reacciones representaban un reto debido a que no se había logrado conseguir un control quimio-, regio-, y estereoselectivo de las mismas. El grupo había publicado un ejemplo de oxidación C-H aplicado a la obtención de 1,3-dioles¹⁶⁷ que se muestra en el **Esquema 7.3**.

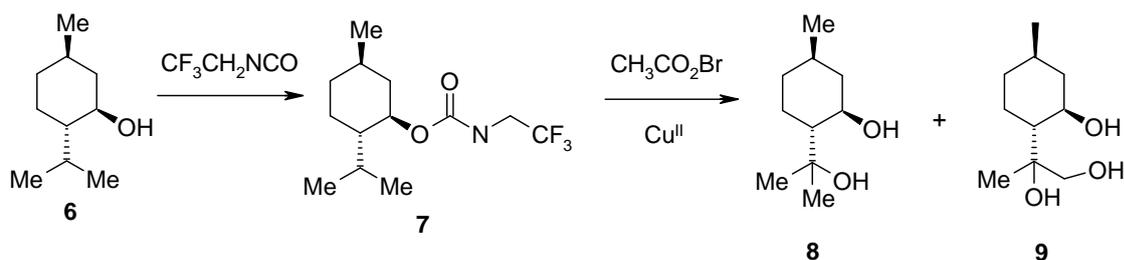
¹⁶⁷ Chen, K.; Richter, J. M.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7247-7249.



Esquema 7.3

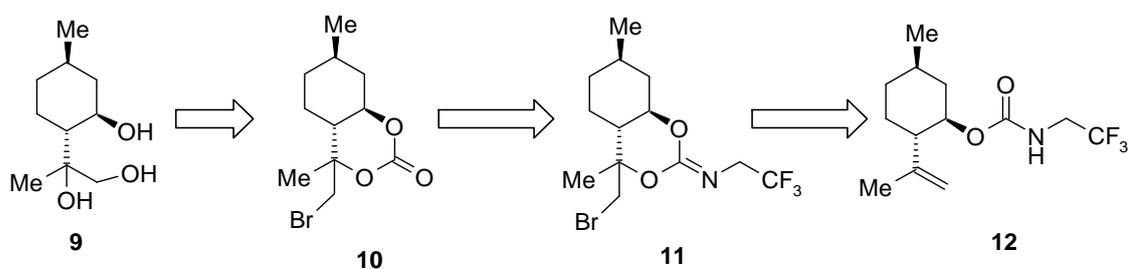
A pesar de la utilidad de esta reacción, ensayada tanto a escala de laboratorio como a gran escala, ésta presentaba ciertas limitaciones ya que la oxidación sólo se producía sobre carbonos terciarios o bencílicos, y no era compatible con la presencia de grupos funcionales tales como olefinas, ácidos carboxílicos, aminas, amidas, alcoholes y azidas.

Por ello se ensayaron otras condiciones que permitieran mejorar el proceso, (**Esquema 7.4**). Aunque el producto mayoritario procedía de la oxidación del carbono terciario, también se pudo aislar un producto que provenía de la oxidación de un carbono primario. En estas nuevas condiciones además se disminuían los tiempos de reacción, se mejoraban los rendimientos y se abarataba el coste de la reacción.



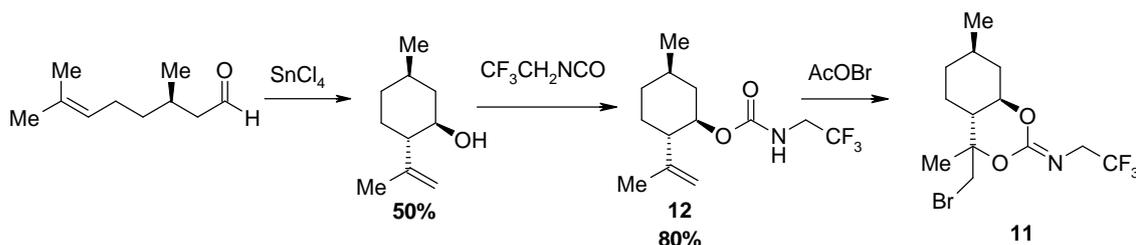
Esquema 7.4

Mientras que la formación de **8** se explicaba por el mecanismo detallado en el **Esquema 7.3**, la formación del compuesto **9** por oxidación de un metilo no había sido previamente descrito. Teniendo en cuenta que en el proceso de obtención de **8** se habían aislado como posibles intermedios **10** y **11**, la formación de este último se postulaba que debía tener lugar a partir del alqueno **12**.



Esquema 7.5

Por ello se procedió a la síntesis de **12** y se hizo reaccionar con el agente bromante (AcOBr). En estas condiciones se aisló el compuesto **11**, demostrándose así la intervención del alqueno **12** como intermedio de reacción.



Esquema 7.6

La síntesis total de terpenos de eudesmano por oxidación selectiva de enlaces C-H se consiguió en el año 2009 y el trabajo fue publicado en la revista *Nature*.¹⁶⁸

¹⁶⁸ Chen, Ke; Baran, Phil S. *Nature* **2009**, *459*, 824-828.

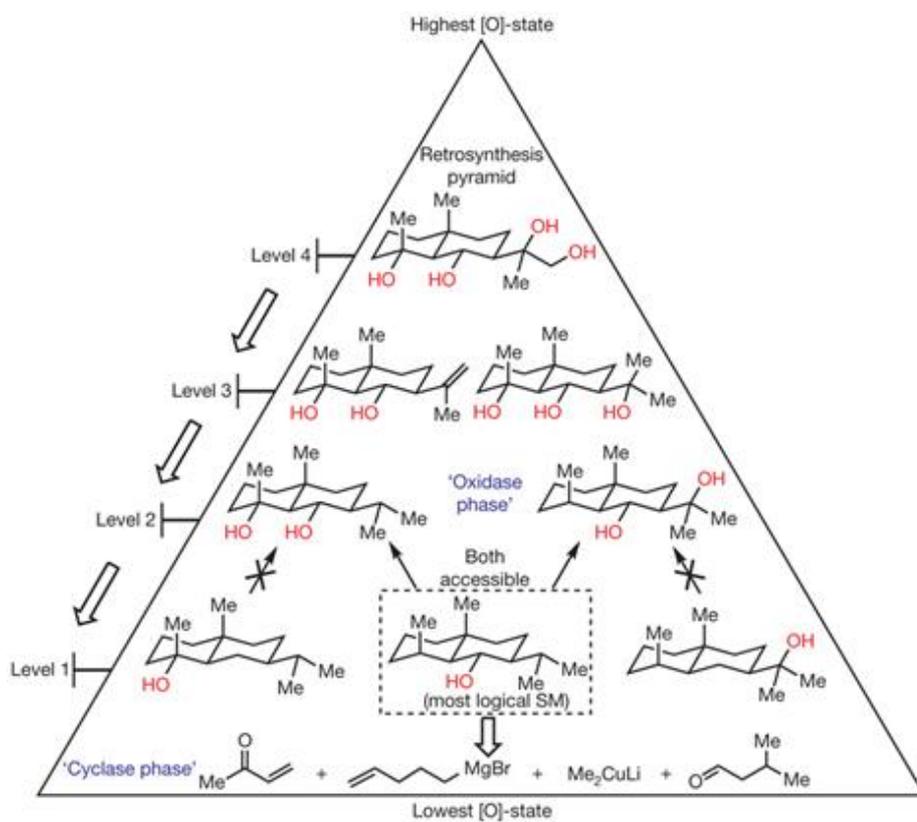


Figura 7.1