






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Síntesis de nuevos compuestos con actividad farmacológica diseñados a través de simulaciones computacionales

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Química

Adrià Sánchez Morales

2022

Supervisores:

Dr. Félix Busqué Sánchez

Dr. Ramon Alibés Arqués

Memoria presentada para aspirar
al grado de Doctor por Adrià Sánchez Morales

Adrià Sánchez Morales

Con el visto bueno de,

Dr. Ramon Alibés Arqués

Dr. Félix Busqué Sánchez

Bellaterra, 23 de septiembre del 2022

“Aprendí que si uno avanza confiado en la dirección de sus ensueños y acomete la vida que se ha imaginado para sí, hallará un éxito inesperado en sus horas comunes.”

“Lo importante no es lo que miras, sino lo que ves”

-Henry Thoreau-

“La mente es como un paracaídas, si no la abres no sirve para nada.”

- Frank Zappa –

“En cuestiones de cultura y de saber, sólo se pierde lo que se guarda, sólo se gana lo que se da.”

- Antonio Machado –

A mi familia,
Amistades,
La iaia

Agradecimientos

Como dice el refrán “Es de bien nacidos ser agradecidos”, y yo con estos once años en la UAB, entre carrera, máster, contratillos y doctorado, tengo muchas cosas que agradecer. Obviamente han pasado muchísimas personas en este camino, que, si no llega a ser por ellas, no sería quien soy. Personas con las que he aprendido a aprender y con las que he aprendido a enseñar. Pues en mi vertiente más utópica siempre he visto la universidad como un templo de sabiduría, en el que se comparte, con mayores y pequeños, el conocimiento y la vida misma. Haber estado tanto tiempo rodeado de esto, amigos y amigas, es un auténtico privilegio del que estoy inmensamente agradecido.

Primero de todo, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Félix Busqué y Ramon Alibès, la oportunidad de haber vivido estos años tan a gusto en el grupo FONT y el hecho de abrirme las puertas del mundillo de la investigación, donde mi mente inquieta tiene un extenso campo para poder correr; Félix, algo más que un tutor, para mí un mentor, un psicólogo, “un padre en la ciencia” y un amigo. Miro hacia atrás y recuerdo la motivación de tus clases en tercero de carrera, y como poco a poco, siguiendo la misma regla que en la química “lo igual disuelve a lo igual”, hemos formado equipo, compartido charlas de música, viajes, montañas y filosofía de vida. De tu mano llegué aquí y siempre te lo agradeceré; Ramon, moltes gràcies per confiar en mi durant aquests anys i ser sempre una gran font de coneixement en la síntesi orgànica. Dintre de totes les teves punyetes sobre lo punki/cantautor/seductor/i-demès que soc se que s’amaga una gran admiració com la que sento jo per tu. ¡¡Muchas gracias a los dos por todo!!

Voldria fer extensiu el meu agraïment al Pau Bayon, per la seva proximitat y enteniment mutu durant aquests anys; a la Marta Figueredo, pels seus conselles i ser una referent en quant a coneixements sobre orgànica; Al Jordi Hernando, pel seu *feedback* de comentaris ingeni-humorístics i ser font inesgotable de coneixement (el que abre y cierra la UNI); també agrair a l’Ona Illa (la meva màxima confiança en ser el pilar fonamental d’ALIBUSILLA 😊) la seva gran amabilitat i el seu tracte insuperable de igual-a-igual que et fa sentir que la teva opinió es vàlida i escoltada, i això s’agraeix. Amb la llicència que m’atorga l’antiguitat a aquesta universitat, puc dir que de grans professors durant la carrera heu passat a ser bons companys de feina, i això m’ha fet créixer.

Tal i com m’han ensenyat en aquesta vida, s’ha de respectar i aprendre molt dels nostres grans, per tant, vull agrair al Prof. Font tot el seu esforç per tirar endavant la ciència i la universitat al territori.

Toda esta tesis no hubiera sido posible sin nuestros colaboradores y sus ingeniosas ideas. Agradecer a Arnau Cordmí y Leonardo Pardo su confianza, ayuda y oportunidad de aprender a trabajar en equipo. Agradecer también a Jean-Marc Devaud, por acogerme con mucho cariño y amabilidad durante mi

estancia en Toulouse, preocuparse por mi integración allí y brindarme una gran experiencia. Sin olvidar agradecer a los grupos de investigación de Salvador Ventura, Rafael Franco, Mercé Perez y Mariona Sodupe, y a todas las personas que investigan en ellos, por trabajar en sinergia para llevar a cabo los proyectos de esta tesis doctoral.

A partir de aquí me gustaría dedicarle unas palabras a aquellas personas que se cruzaron conmigo en este camino y aquellas que estuvieron allí para caminar juntos.

Primero de todo, me gustaría empezar por aquellas personas que me han dejado más huella y luego ya el orden es un poco difuso... hahaha. Gisela y Sergio, con vosotros dos empezó todo. Se germinó, creció y se alimentó esta planta para luego poder dar su fruto a otras generaciones. ¡Tres cachorrillos en un laboratorio sin ley! Hahaha Nos lo pasábamos genial en el 457 ¡Eso era un hogar!; Gisela, la pija, somos como lo más opuesto en muchos aspectos, pero debe haber alguna especie de esencia conjunta que nos haga compenetrarnos tan bien. Muchísimas gracias, por escucharme, comprenderme, criticarme, ayudarme, y ser sincera conmigo. Aunque ahora seas cara de ver, siempre has sido fácil de querer. Ya sabes que te tengo un cariño especial incombustible; Sergio, eres un ejemplo a seguir en cuanto a esfuerzo y motivación, y que seas el *boss* de la orgánica es casi secundario. Hemos compartido mil tardes en la UNI, mil historias, charlas, risas y canturreos. Siempre me ha gustado de ti tu esfuerzo, paciencia y cariño por cuidar tu entorno, del que me considero parte, por algo eres el maldito Leon de la manada. ¡¡Enhorabuena por tu pequeño!!

Kevin, a veces parece que vengamos de planetas diferentes, o quizás soy yo el que viene de Plutón. Me alegro de haberte conocido, haber charlado, contrastado opiniones muy dispares y seguir siendo amigos. Eres un maestro de las gestiones y te estoy muy agradecido por la paciencia que has tenido para salvarme el culo a última hora siempre. Siento haberte robado los pretendientes en nuestras p***vueltas... hahaha; Ruben, buenos ratos en el lab donde estábamos como en casa, siempre con tu ingenio y humor para todos los momentos, y cada año con más frescura; Carolina, ¡tú siempre tan atenta y amable para todo! Eres única.

Cris y Silvia, habéis sido dos personas muy importantes y especiales en mi vida. Con cada una de vosotras tengo muchas historias atesoradas, muy buenos momentos (y no tan buenos xD), que me han hecho crecer muchísimo, y eso no todo el mundo lo consigue. Mil gracias :)

Los Moreno, la otra dinastía de orgánica. Aunque los Font siempre hemos molado más, siempre habéis sido unos buenos hermanastros; Parejo, mira que nos conocemos desde primero de carrera, pero... cada día te tengo más cariño! Gracias por confiar en mi como cantautor e ir siempre un paso por delante en todo para luego poder enseñarme como se hacen las cosas 😊; Marc, gracias por todas las horas compartidas haciendo de la ciencia y la química un juego interesante que compartir. Eres un

libro abierto lleno de conocimiento; Kevin Jr, a pesar de nuestras evidentes diferencias siempre nos hemos mostrado mucho buen rollo, y eso se valora. Aunque vas de *tete*, creo que te falta calle! hahaha Carolina G; La buena Marujilla! Siempre tan divina y alegre; Guillem, gracias por los buenos momentos de risas por la UNI! Desde los primeros *top-ropes* en roca del Port del Compte, no he podido parar. Para mis siempre serás uno de mis escaladores referentes! Sin olvidarme de los puertillas Granados y Salavert!

Cuando yo llegué a este mundillo ya había gente que habitaba en él. Ellos me sirvieron de ejemplo y motivación para adentrarme. Estoy muy agradecido de cruzarme al principio de esta etapa con Albert G., Ms. Protón, Marc P., Ruben S., Laura A., Anna F., Carme, Izar, Alba, André, Eva, Julen, ..., y seguir compartiendo algunas palabras hoy en día.

Al igual que esta tesis, la vida también es multidisciplinar, así que no puedo olvidarme de la gente de Inorgánica, analítica y demás que ha pasado por esta etapa; Rodri, hemos compartido muchas historias de todos los colores durante estos años. ¡Eres único!; Katia, gracias por confiar siempre en mí; Momo, tú siempre mi *Don. Ramomo* y yo tu *Perxita*, para nuestras locuras; Borràs, ¡Ets un crack de la vida!; Clara, incombustible punkarrilla, siempre tan alegre! Gloria; ¡Desde que empezamos la carrera cada año estas más guerrera! Eres una joya de persona. Y también... Quim y Creus.

Me gustaría agradecer también a todos "mis TFGs" (Anna, Mónica, Arnau y Carlos Z.) por toda su mano de obra fundamental en esta tesis. Con vosotros he aprendido a enseñar y espero haber sido un buen mentor para vosotras. Sin olvidarme de todos los momentos compartidos con todos los estudiantes que han ido pasando por la planta, Selma, David, Ferran, Andrea Flores, Marcelo, Roger, Aleix, Alguno de estos *pipiolos* ya me ha pasado la mano por la cara en su carrera científica.

Las nuevas generaciones pegan fuerte, estos últimos años he tenido el placer de compartir muy buenos momentos (como las casas rurales) con todas estas personitas que son las que mantienen vivo el departamento actualmente. De los Font; Alba, ¡Mi coterránea favorita! Hemos hecho muy buenas migas, la verdad 😊. Gracias por escuchar mis ralladas, por las risas y buenos momentos. De la chiquilla *pihippie* que le hice sus primeras rastitas, a toda una guerrera cada día más empoderada; Marc, un placer compartir nuestras historietas musicales y festivaleras. Eres de lo más singular, ¡Un referente del ingenio!; Batten, vienes con tus *tuppers* vacíos para rapiñar comida, pero con un alma llena de inocencia. Muchas penas y alegrías científicas compartidas en estos últimos años; Dani, ¡Mi sucesor de proyectos científicos! ¡La que te ha tocado! A ver si con las 17 horas al día que te pasas en el lab empezamos a publicar algún articulillo juntos ya. Eres un crack cuñao!

Al igual que de los Font... ¡también hay *Lil-Morenos*!! Albert, Axel, Cris y Joel. Unos buenos liantes con todos los ingredientes que se necesitan para seguir manteniendo el espíritu de la planta de Orgánica.

Gracias por los buenos momentos y confío plenamente en vosotras. No me olvido también a los que vienen pisando fuerte de los centros de investigación con pasta Jaume y Albert R.

Fuera del departamento, pero dentro de la UAB, quiero agradecer también a Jorge y a Miriam, por todas las charlas, sonrisas y saludos por los pasillos de la UAB. Vosotras habéis hecho mucho más por esta universidad que alguno con renombre. Agradecer a toda la gente con la que me crucé en Toulouse y que hizo de aquella estada una experiencia fantástica.

A mi espíritu más combativo, que también soy yo, le gustaría también agradecer a todas las personas y plataformas que luchan por un conocimiento científico libre para todo el mundo, este es el camino. Al igual que, agradecer también a las compañeras de “Doctorants en lluita” por seguir corroborando que sin la lucha no es posible el cambio, y con el EPIF se demostró.

Por no dejar hueco en blanco en esta página, y partiendo de la base de ser el *Bohemio* del departamento, me gustaría hacer unos agradecimientos un poco más abstractos a los bosques de Bellaterra que siempre me han servido de relajación y fuente de inspiración durante mediodías y tardes (las mañanas...bueno).

Aparte de la universidad, en toda esta etapa siempre ha habido amigos (Rave, Castells, Climbers, Can Bonikelo <3 y demás) y familiares que me han dado su apoyo incondicional, que sin ellos esto no habría sido posible. ¡¡MUCHAS GRACIAS a TODAS!!

En último lugar quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida, que por suerte y por que con estos valores me han criado, son mis padres, mi hermana Silvia y mi abuela. Gracias por creer en mí. ¡Lo sois todo!

Así que, a todos y todas, de corazón, ¡GRACIAS!

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Capítulo I: Introducción general	5
I.1. La multidisciplinariedad en la ciencia	7
I.2. El diseño de fármacos	8
I.2.1. Historia del medicamento	8
I.2.2. La creación de un fármaco	9
I.2.2.1. Herramientas computacionales	10
I.2.2.2. Quimioinformática	13
I.3. La química orgánica sintética y su papel en el diseño de fármacos	14
I.4. Referencias del capítulo I.....	16
Capítulo II: Antagonistas del ASTA-R	19
II.1. Introducción	21
II.1.1. Abejas	21
II.1.1.1. Morfología de las abejas	21
II.1.2. Importancia de las abejas en el mundo	22
II.1.3. Situación de las abejas	23
II.1.4. Factores de estrés y de riesgo para las abejas	23
II.1.5. Sistema de alarma de las abejas	25
II.1.6. Las alostatinas (ASTs) y el receptor de alostatinas (AST-R)	26
II.1.7. Diseño de nuevos antagonistas del ASTA-R	27
II.1.7.1. Cribado virtual de nuevos candidatos con actividad en el ASTA-R, <i>in silico</i>	27
II.1.7.2. Ensayos de competitividad (compuestos A), <i>in vitro</i>	29
II.1.7.3. Ensayos de comportamiento de abejas (compuestos A), <i>in vivo</i>	30
II.1.8. Diseño de los nuevos compuestos B a partir del <i>hit</i> del cribado	33
II.2. Objetivos	34
II.3. Resultados y discusión	35
II.3.1. Ruta sintética para la obtención de los compuestos B	35
II.3.1.1. Síntesis de los compuestos 3a y 3b	35
II.3.1.1.1. Metodología de Kommu <i>et al.</i>	35
II.3.1.1.2. Metodología de Zarudnitskii <i>et al.</i>	36
II.3.1.2. Síntesis de las aminas 4a y 4b	38

II.3.1.3. Síntesis de los ácidos carboxílicos 9-11	39
II.3.1.4. Síntesis de los compuestos finales B1a-B3b	40
II.3.2. Evaluación de la actividad biológica de los nuevos compuestos B	44
II.3.2.1. Experimentos de competitividad de los compuestos B vs. ASTs-Dy647 en ASTA-R, <i>in vitro</i>	44
II.3.2.2. Experimentos de comportamiento de las abejas frente al estrés, <i>in vivo</i>	46
II.3.2.3. Capacidad de B2b y B3b como antagonistas de la señalización de las ASTA, <i>in vitro</i>	47
II.4. Resumen y conclusiones	49
II.5 Referencias del capítulo II	51
Capítulo III: Inhibidores de la señalización CN-NFATc.....	55
III.1. Introducción	57
III.1.1. El sistema inmunitario.....	57
III.1.1.1. Calcineurina (CN)	58
III.1.1.2. Inmunosupresores	60
III.1.1.3. Angiogénesis tumoral	61
III.1.2. Diseño de nuevos fármacos inhibidores de la señalización CN-NFATc	60
III.1.2.1. Cribado virtual sobre la base de datos de ZINC, <i>in silico</i>	63
III.1.2.2. Experimentos de competitividad con los 32 candidatos del VS, <i>in vitro</i>	63
III.1.3. Diseño de los nuevos compuestos C1 y C2 a partir de los <i>hits</i> del cribado	64
III.1.3.1. Síntesis de las familias de compuestos C1 y C2	66
III.2. Objetivos	68
III.3. Resultados y discusión	70
III.3.1. Compuestos de la familia C1 y C2	70
III.3.1.1. Caracterización de las familias C1 y C2	70
III.3.1.2. Experimentos de competitividad de las familias C1 y C2 vs CF-PRIEIT en CN, <i>in vitro</i>	72
III.3.1.3. Modelización de los compuestos C1a y C1e en interacción con la cavidad PxlxIT	74
III.3.2. Síntesis del ácido carboxílico C3a	75
III.3.2.1. Síntesis de la amina 31	77
III.3.2.2. Obtención del compuesto 35 en lugar del carbamato 32	77
III.3.2.3. Síntesis de la amina 39	79

III.3.2.4. Síntesis del compuesto 40g	80
III.3.2.5. Síntesis de la amina 41	82
III.3.2.6. Intento de síntesis del compuesto C3a	83
III.3.3. Síntesis de los ácidos carboxílicos C3c-C3e, C3h y C3i	85
III.3.4. Síntesis del compuesto C4a	88
III.3.5. Experimentos de competitividad con los compuestos C4a y C3 vs. CF-PRIEIT en la cavidad PxlXIT-CN, <i>in vitro</i>	89
III.3.6. Optimización y escalado de la síntesis de los compuestos C1a y C1e	91
III.3.7. Experimentos para medir el efecto en la angiogénesis tumoral, <i>in vivo</i>	94
III.3.7.1. Citotoxicidad	94
III.3.7.2. Biodisponibilidad de los compuestos C1a y 20	94
III.3.7.3. Angiogénesis tumoral	95
III.4. Resumen y conclusiones	97
III.5. Referencias del capítulo III	101
Capítulo IV: Estabilizadores de la TTR	103
IV.1. Introducción	105
IV.1.1. Amiloidosis	105
IV.1.2. Transtiretina (TTR)	106
IV.1.3. Terapia contra la amiloidosis por transtiretina (ATTR)	108
IV.1.4. Simulaciones de dinámica molecular (DM)	110
IV.1.4.1. Estudio de las cavidades de unión de la TTR	111
IV.1.4.2. Diseño y simulaciones de DM de los nuevos análogos halogenados del tolcapone (compuestos TES)	113
IV.1.5. Precedentes sintéticos del tolcapone	115
IV.2. Objetivos	118
IV.3. Resultados y discusión	119
IV.3.1. Síntesis del compuesto TES1c	119
IV.3.2. Síntesis de la batería de compuestos TES1a, TES1b, TES1d y TES1e	121
IV.3.2.1. Formación de la benzofenona en la reacción de Grignard	125
IV.3.2.2. Reacción Grignard con otros yodoarilos de partida	128
IV.3.3. Experimentos para medir la actividad biológica de TES1a- TES1e , <i>in vitro</i>	129
IV.3.3.1. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	129
IV.3.3.3. Estabilización cinética de la TTR	131

IV.3.3.3. Actividad como antiagregante de la TTR	132
IV.3.4. Optimización de la síntesis del TSE1e	133
IV.3.5. Ensayos de la actividad farmacológica de TES1e	135
IV.3.5.1. Estabilización de la TTR en plasma humano	135
IV.3.5.2. Citotoxicidad	136
IV.3.6. Estructura cristalográfica del complejo WT-TTR/ TSE1e	136
IV.3.7. Síntesis del compuesto TSE2e	138
IV.4. Resumen y conclusiones	140
IV.5 Referencias del capítulo IV	143
Capítulo V: Moduladores alostéricos del CB₂R	147
V.1. Introducción	149
V.1.1. <i>Cannabis sativa</i>	149
V.1.2. Cannabinoides	150
V.1.3. Precedentes sintéticos del cannabidiol (CBD)	152
V.1.4. Receptores de cannabinoides (CBRs) y el sistema endocannabinoide (SEC)	154
V.1.5. El CBD en el SEC	155
V.1.6. Estudios previos al desarrollo de nuevos moduladores alostéricos	157
V.1.6.1. El CBD como agonista parcial y NAM del CB ₂ R.....	157
V.1.6.2. Cavidad alostérica del CB ₂ R	158
V.2. Objetivos	161
V.3. Resultados y discusión	163
V.3.1. Plan sintético para la obtención de los derivados del CBD	163
V.3.2. Síntesis del CBD para evaluar la ruta sintética escogida	164
V.3.2.1. Síntesis del compuesto 84a	164
V.3.2.2. Síntesis del compuesto dibromado 85a	164
V.3.2.3. Síntesis del derivado de olivetol 76a	166
V.3.2.4. Síntesis del aducto 77a	166
V.3.2.5. Reacción de deshalogenación y obtención del CBD	167
V.3.3. Síntesis de los derivados del CBD CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f	170
V.3.3.1. Síntesis de los derivados del resorcinol 76b-76f	171
V.3.3.2. Síntesis de los análogos del CBD CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f	171
V.3.4. Diseño y síntesis del compuesto CBD_{AM}2	172
V.3.4.1. Síntesis del aldehído 89	174

V.3.4.2. Síntesis del alcohol 90	175
V.3.4.3. Síntesis del compuesto 93	175
V.3.4.4. Síntesis del análogo del CBD CBD_{AM2}	178
V.3.5. Estudios de la actividad biológica de los análogos del CBD	180
V.3.5.1. Estudio de la capacidad como moduladores alostéricos de CBD_{AM1b}-CBD_{AM1e}	180
V.3.5.2. Estudio de la capacidad como modulador alostérico de CBD_{AM2}	183
V.3.6. Diseño de nuevos fármacos bivalentes moduladores alostérico-vestíbulo	184
V.3.6.1. Introducción a los fármacos bivalentes	184
V.3.6.1.1. Cavidades alostéricas de los RAPGs; el vestíbulo	185
V.3.6.1.2. Diseño de nuevos fármacos bitópicos alostérico-vestíbulo de CB ₂ R	186
V.3.6.2. Plan sintético para la obtención de los nuevos derivados bitópicos del CBD	187
V.3.6.2.1. Anclaje a través del isopropileno, familia CBD_{BT2}	187
V.3.6.2.2. Ruta sintética con unión por el hidroxilo del fragmento de resorcinol	189
V.3.6.2.2.1. Síntesis del compuesto monoprotegido 110c	190
V.3.6.2.2.2. Pruebas para la síntesis del compuesto 111c	192
V.4. Resumen y conclusiones	195
V.5. Referencias del capítulo V	197
Capítulo VI: Experimental section	203
VI.1. General procedures	205
VI.2. Experimental procedures of chapter II: antagonists of ASTA-R	207
VI.2.1. Synthesis of new antagonists of ASTA-R (B compounds)	209
VI.2.2. Computational simulations, <i>in silico</i>	216
VI.2.3. Biological experiments with A and B compounds	216
VI.2.3.1 <i>In vitro</i> assays with A and B compounds.....	218
VI.2.3.2 <i>In vivo</i> assays with bees and A and B compounds	217
VI.2.3.3 Statistical analysis.....	219
VI.3. Experimental procedures of chapter III: inhibitors of CN-NFATc signalling	221
VI.3.1. Synthesis of new CN-NFATc signalling inhibitors	221
VI.3.1.1. Synthesis of compounds of family C1	221
VI.3.1.2. Synthesis of compounds of family C2	226
VI.3.1.3. Synthesis of compounds of family C3	232
VI.3.1.4. Synthesis of compound C4a	246
VI.3.2. Computational simulations, <i>in silico</i>	248

VI.3.3. Biological experiments with new compounds	248
VI.3.3.1. <i>In vitro</i> assays	248
VI.3.3.1. <i>in vivo</i> assays	250
VI.4. Experimental procedures of chapter IV: TTR stabilizers	252
VI.4.1. Synthesis of new TTR stabilizers (TES compounds)	252
VI.4.2. Computational simulations, <i>in silico</i>	269
VI.4.2.1. Molecular dynamics protocol	270
VI.4.3. Biological experiments with TES compounds	270
VI.4.3.1. Statistical analysis.....	272
VI.4.4. Crystallization and structure determination of the WT/ TES1e complex	273
VI.5. Experimental procedures of chapter V: CB ₂ R allosteric modulators	274
VI.5.1. Synthesis of new allosteric modulators of CB ₂ R	274
VI.5.1.1. Synthesis of different elongation alkyl chain CBD derivatives CBD_{AM}1a-CBD_{AM}1f	274
VI.5.1.2. Synthesis of compound CBD_{AM}2	296
VI.5.1.3. Synthesis of allosteric-vestibule CBD analogues bitopic ligands	302
VI.5.2. Computational simulations, <i>in silico</i>	304
VI.5.3. Biological experiments; cAMP levels determination assays	304
VI.6 References	305
Capítulo VII: Anexo	311
VII.II.1. Espectros de ¹ H y ¹³ C RMN de los compuestos finales del capítulo II	311
VII.II.2. Figuras del capítulo II	317
VII.III.1. Espectros de ¹ H y ¹³ C RMN de los compuestos finales del capítulo III	319
VII.III.2. Figuras y tablas del capítulo III	338
VII.III.3. Espectros de HPLC de los compuestos finales C1a y C1e	339
VII.IV.1. Espectros de ¹ H y ¹³ C RMN de los compuestos finales del capítulo IV	341
VII.IV.2. Figuras del capítulo IV	347
VII.IV.3. Espectros de HPLC de los compuestos finales TES1a- TES1e y TES2e	349
VII.V.1. Espectros de ¹ H y ¹³ C RMN de los compuestos finales del capítulo V	353
VII.V.2. Figuras del capítulo V	360
VII.V.3. Espectros de 1D ¹ H RMN (HRMNC) de los compuestos finales CBD_{AM}1a-CBD_{AM}1e	361
VII.6. Referencias	367
Índice de figuras	369

Abreviaturas

δ	Desplazamiento químico	CCF o TLC	Cromatografía por capa fina
2-AG	2-araquidonilglicerol	CD31	Antígeno de adhesión de células endoteliales
AC	Ciclasa de adenilato	CD4⁺	Limfocitos T colaboradores
Abn-CBD	Cannabidiol anormal	DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarisation transfer</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	CF	Carboxifluorosceína
AEA	Anandamida	C_{max}	Concentración máxima
anh.	Anhidro	CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
amb.	Ambiente	CN	Calcineurina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico	CNA/CNB	Subunidad de calcineurina A y B
ANOVA	Análisis de la Varianza	COMT	Catecol <i>O</i> -metiltransferasa
APC	Célula presentadora de antígenos	COX2	Ciclooxigenasa-2
AST	Alatostatina	COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
ASTA/ASTC	Alatostatina del tipo A y C	CRAC	Canales activados por liberación de calcio
ASTA-R	Receptor de alarostatinas A	CsA	Ciclosporina
AST-R	Receptor de alarostatinas	cuant.	Cuantitativo
ATR	Reflectancia total atenuada	DAB	3,3'-diaminobenzidina
ATTR	Amiloidosis por transtiretina	DFT	Transformada discreta de Fourier
BALB/c	<i>Bagg</i> y <i>ALBino</i>	DiFAC	Diseño de Fármacos Asistido por Computadora
BHE	Barrera hematoencefálica	DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
Bn	Bencilo	disv.	disolvente
Boc	<i>Terc</i> -butiloxicarbonilo	DM	Dinámica molecular
BSA	Albumina de suero bovino	DMAP	4-dimetilaminopiridina
<i>c</i>	Concentración	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
CaM	Calmodulina	DMPI	Dess-Martin periodinano
CBD	Cannabidiol	DMS	Sulfuro de dimetilo
CBDB	Cannabidibutol	DMSO	Dimetilsulfóxido
CBDP	Cannabidiphorol	DTT	Ditiotreitól
CBDV	Cannabidivarin	Dy647	Fosforamida DyLight 647
CB₁R/CB₂R	Receptor de cannabinoides 1 y 2	EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
CBz o Z	Carboxibencilo	EDT	1,2-etanditiol

Abreviaturas

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	HPF	Campo de alta potencia
EGTA	Ácido egtazico	HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
EHA	Enlace de hidrogeno aceptor	HTS	Cribado farmacológico de alto rendimiento
EHD	Enlace de hidrogeno donador	HTRF	Espectroscopía de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo
E_{max}	Efecto máximo	HYD1/HYD2	Interacciones hidrofóbicas 1 y 2
eq.	Equivalente	IC₅₀	Concentración inhibidora media máxima
ESI	Ionización por electrospray	IEF	Isoelectroenfoque
EtOAc	Acetato de etilo	IHC	Inmunohistoquímica
Exp.	Experimento	IL-2	Interleucina-2
F	Cociente de dos varianzas	Io	Ionomicina
FBS	Suero bovino fetal	IPA	Acetato de isoamilo
fg	Fase gas	IR	Infrarrojo
FK506	Tacrolimus	ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonilo	K_d	Constante de disociación / afinidad
FP	<i>Fluorescence polarization</i>	LBVS	Cribado virtual basado en el ligando
GST	Glutatión S-transferasa	LCE	Líquido cerebroespinal
Gly	Glicina	luc	Luciferasaaminoacido
H2L	<i>Hit-to-lead</i>	LxVP	Leu-x-Val-Pro
HATU	Hexafluorofosfato azabenzotriazol tetrametil uronio	mCPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
HBP	Cavidad de enlace de halógenos	Mp	Punto de fusión
HeLa	Células de cáncer cérvico-uterino humano	Ms	Mesilo
HEK293T	Células T embrionarias de riñón humano 293	MTD	Dosis máxima tolerada
HepG2	Células de cáncer de hígado humano	NAM	Modulador alostérico negativo
HJ	Hormona juvenil	NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>	NFATc	Factor nuclear de células T activadas
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución	NK	<i>Natural killer</i>
HOBt	1-hidroxibenzotriazol	NOESY	Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser
holo-RBP	Proteína de union del holo-retinol	NPT	Ensamble isotérmico-isobárico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión (resolución)	NVT	Ensamble canónico

p	Probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula.	SBVS	Cribado virtual basado en la estructura
PAF	Polineuropatía amiloide familiar	SD	Desviación estándar
PAM	Modulador alostérico positivo	S_EAr	Sustitución electrofílica aromática
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida	SEC	Sistema endocannabinoide
PBS	Tampón fosfato salino	SEM	Error estándar de la media
PCC	Clorocromato de piridinio	S_N2	Sustitución nucleófila bimolecular
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	SNC	Sistema nervioso central
PEG	Polietilenglicol	solv.	Solvatación
PFA	Paraformaldehído	SRS	Valores de respuesta a la sacarosa
PGE₂	Prostaglandina E2	SSA	Amiloidosis sistemática senil
PLCγ	Fosfolipasa	t.	Tiempo
PMA	forbol-12-miristrato-13-acetato	T	Temperatura
pNPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenil	t_{1/2}	Tiempo de semividua
PP	Producto de partida	T₃	Triyodotironina
POL	Interacciones polares	T₄	Tiroxina
PP2B	serina-treonina proteína fosfatasa 2B	T_{max}	Tiempo máximo en alcanzar la C _{max}
PPP3	proteína fosfatasa 3	TBAB	Bromuro de tetrabutilamonio
PRIEIT	Pro-Arg-Ile-Glu-Ile-Thr	TBDMSCI	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsililo
prod.	Producto	TCDI	<i>N,N'</i> -tiocarbonildiimidazol
PSVVVH	Pro-Ser-Val-Val-Val-His	TEA	Trietanolamina
PSVAAQ	Pro-Ser-Val-Ala-Ala-Gln	TFA	Ácido trifluoroacético
p-TsOH	Ácido <i>para</i> -toluensulfónico	THC	Tetrahidrocannabinol
PxIxIT	Pro-x-Ile-x-Ile-Thr	THF	Tetrahidrofurano
py	piridina	TM	Helice transmembranal
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad	TNBC	Cáncer de mama triple negativo
RAPG	Receptor acoplado a proteína G	TTR	Transtiretina
rdt.	Rendimiento	UZOS	Células epiteliales de osteosarcoma de huesos humanos
RE	Retículo endoplasmático	UV	Ultravioleta
Rf	Factor de retención	VEGF	Factor vascular de crecimiento endotelial
RMN o NMR	Resonancia magnética nuclear	VEGFR	Receptor del factor vascular de crecimiento endotelial
Rt o ta	Temperatura ambiente	VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana
SAP	Feromona de alarma (de picadura)	Vis	<i>Visible</i>
SBVS	Cribado virtual basado en la estructura	VS	Cribado virtual
SD	Desviación estándar	WT	Tipo salvaje

Capítulo I

Introducción general

I. Introducción general

I.1. La multidisciplinariedad en la ciencia

La combinación de conocimientos, habilidades y métodos para poder desarrollar actividades satisfactoriamente en las cuales se requieren diferentes puntos de vista, es lo que comúnmente podemos describir como multidisciplinariedad.¹

Durante los últimos siglos, científicos de distintas ramas y ubicados en diferentes espacios han colaborado entre si con el fin de lograr muchos de los grandes hallazgos presentes en la ciencia actual. Un claro ejemplo fue el caso de los biofísicos James Watson y Francis Crick, ubicados en la Universidad de Cambridge, que en colaboración con la cristalógrafa Rosalind Franklin situada en el King's Collage, descubrieron la estructura del ADN en 1953.²

En el pasado, la distancia física y las barreras de comunicación limitaban la colaboración entre científicos ubicados en diferentes puntos del mapa.³ Actualmente, los avances en tecnología han propiciado un incremento exponencial en el número de colaboraciones a distancia entre científicos de diferentes ámbitos.

La multidisciplinariedad se entiende como algo que debería aumentar las oportunidades de innovación simplemente por la yuxtaposición de ideas. Pero al mismo tiempo, los proyectos multidisciplinarios, especialmente los que involucran una dispersión en el espacio, requieren de nuevos enfoques de coordinación para realizar el trabajo de forma exitosa y fomentar la confianza entre grupos, suponiendo esto un esfuerzo adicional.

De tal manera, el desafío actual se rige en la coordinación del trabajo y la gestión de las relaciones interpersonales con la finalidad de poder aprovechar eficazmente las aportaciones de todos los investigadores sin una frecuente interacción cara a cara. Comúnmente, los científicos de distintas ramas se han formado con diferentes conocimientos. Por lo tanto, es muy probable que los vínculos que los conectan sean más débiles que fuertes.¹

Sin embargo, grandes colaboraciones que involucran multidisciplinariedad y dispersión geográfica han logrado la coordinación necesaria para realizar sus hallazgos de forma exitosa, escribiendo nuevas páginas en la historia de la ciencia.

En las últimas décadas, el diseño y la obtención de nuevos fármacos se ha convertido en una tarea que cada vez abarca más áreas del conocimiento. Hoy en día, físicos, matemáticos, químicos, farmacólogos y biólogos, entre otros, trabajan en sinergia para optimizar los tan costosos procesos de creación de nuevos compuestos biológicamente activos que puedan acabar suponiendo nuevos fármacos.

I.2. El diseño de fármacos

I.2.1. Historia del medicamento

La historia del medicamento va de la mano de la historia de la evolución del ser humano. Desde que existe, el ser humano sufre, enferma e inevitablemente muere. Esto le ha llevado a buscar siempre una explicación sobre estos fenómenos y una solución a sus males. Desde la prehistoria existen evidencias del uso de pócimas y hierbas con el fin de intentar mitigar o curar diversos dolores y enfermedades.⁴

La cultura egipcia asentó unas bases sobre las cuales la Grecia clásica daría un vuelco a la medicina con una transición desde unas consideraciones religiosas a una visión más científica.⁵ En el *Corpus Hipocrático* (V a.C.), un importante número de obras de medicina reunidas en la Biblioteca de Alejandría, ya aparecía toda una gradación de formas farmacéuticas (tisanas, ungüentos, ...), y también serían citados varios medicamentos de origen vegetal (mandrágora, belladona, adormidera, ...), animal y mineral (sulfato de cobre, malaquita, ...).⁶ Tras la conquista de Grecia, los romanos adoptaron un gran número de conocimientos de los griegos sobre medicina.⁷

Con los árabes y la alquimia, se respetó y mejoró el conocimiento de la antigüedad clásica, apareciendo los primeros listados de hierbas medicinales y las primeras boticas, e introduciendo los jarabes, alcoholes, y muchos medicamentos nuevos. Después de los estancamientos de la Edad Media, llega el Renacimiento y aparecen nombres como da Vinci, Vesalio, Paracelso y muchos más, y también las nuevas escuelas médicas muestran una nueva visión.⁶ Tras la colonización del continente americano, plantas como la quina, la coca o el tabaco empezaron a recorrer el mundo.⁸

La modernización aparece con cambios sociales, intelectuales, históricos y geográficos, dejando a los medicamentos en medio de los nuevos conceptos que surgirían en la medicina: el empirismo, el mecanicismo y el organicismo vitalista.

Un gran hito en la farmacología surgió con el descubrimiento de los diferentes alcaloides de las plantas, como por ejemplo la morfina.⁹ A mediados de siglo XIX, primero en Europa, y luego en América, los pioneros de la industria farmacéutica empezaron a abrir sus farmacias, y a pensar de manera más comercial en la producción y distribución de los fármacos. La investigación tomó el timón de la mano de Bernard, Pasteur, Lister, Hoffman, Banting, Fleming y muchos más que dieron un giro espectacular a la terapéutica y a la novedosa ciencia de la farmacología.

La verdadera revolución del medicamento pertenece indudablemente al siglo XX. Algunos empresarios empezaron a comprender la utilidad de la investigación, de la industrialización, de la tecnología y de la creación de redes de distribución. Entonces, empezó a tenerse en cuenta la importancia de la

economía en escala, las necesidades de los consumidores y de los médicos, y el requisito de calidad en la producción.¹⁰

En los años veinte, de los típicos “remedios secretos” (Píldoras de vida del doctor Ross, Las Píldoras Hermosina de Zoilo Ruiz para la mujer, ...) se pasó, en plena posguerra, a la producción en cantidades industriales de penicilinas, aspirinas, corticoides, antiácidos y demás. Años más tarde, la farmacología se adentró en la sofisticación de los agonistas y antagonistas de receptores, el manejo del sistema neurovegetativo y de los elaborados antibióticos, o de los inhibidores enzimáticos.¹⁰

Así pues, con los avances exponenciales en ciencia y tecnología de finales del siglo XX, empezaron a estar muy presentes las sofisticadas bibliotecas de moléculas almacenadas en ordenadores, la manipulación de sus estructuras para acercarse a los medicamentos ideales, y por último a los estudios clínicos, la bioética y los entes reguladores.

I.2.2. La creación de un fármaco

En pleno siglo XXI, el proceso de desarrollo de un fármaco sigue siendo un proceso complejo. Todo comienza con la investigación sobre las causas de una enfermedad, que en algunos casos puede llevar a la identificación de una o varias dianas moleculares (ej. enzima, canal iónico, receptor acoplado a proteína G [RAPG]) asociadas con esa enfermedad. Los siguientes pasos involucran la identificación de compuestos que sean activos con la diana molecular, a través de ensayos *in vitro* con estas dianas objetivo y aisladas en cultivos celulares. Los compuestos que muestran la mejor actividad biológica son los llamados *hits*. El siguiente paso es encontrar compuestos que tengan propiedades adecuadas, tanto biológicas (ej. toxicidad) como físicas (ej. solubilidad en medio biológico) o farmacocinéticas (ej. distribución y estabilidad del fármaco en el organismo). Tales compuestos, surgidos de la optimización de los *hits* a través de modificaciones estructurales utilizando como herramienta la química sintética, son los llamados “líderes, cabezas de serie o *leads*”.¹¹ Este proceso es comúnmente conocido como *hit-to-lead* (H2L).

Los *leads* son sometidos a múltiples evaluaciones experimentales que implican ensayos en líneas celulares, en animales y pruebas clínicas en humanos, a lo largo de sucesivas fases. Si los compuestos pasan satisfactoriamente todas estas etapas son aprobados para uso clínico por un agente regulatorio, por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) en los Estados Unidos o la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA) en Europa. Se estima que el desarrollo de un fármaco tarda aproximadamente entre 10 y 15 años, y se

invierte en promedio más de 1000 millones de euros, invirtiendo el mayor coste económico y de tiempo en las pruebas clínicas en humanos.¹¹

Típicamente, los *hits* son encontrados por el cribado de un gran número de moléculas. Teniendo en cuenta que el número de moléculas orgánicas que son sintéticamente factibles es muy elevado, y que se estima que una de cada 9000 moléculas biológicamente activas podría tener uso clínico,¹² es evidente que el análisis y cribado de entre tantos posibles candidatos podría ser optimizado con el uso de técnicas computacionales que pudieran ayudar en la selección de moléculas candidatas a ser testeadas.

Aunque el descubrimiento y desarrollo de fármacos se ha realizado durante muchísimos años usando únicamente métodos experimentales, en las últimas décadas el proceso ha conseguido un nivel superior de eficiencia gracias al uso de métodos computacionales (también llamados *in silico*). Estos métodos permiten procesar grandes cantidades de información y codificar con precisión modelos teóricos.¹¹ Además, la aplicación de modelos generados *in silico* contribuye a entender los mecanismos de acción de los compuestos biológicamente activos, y también a mejorar las propiedades de estos.¹³

I.2.2.1. Herramientas computacionales

Una de las estrategias para identificar *hits* es el diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC). Esta estrategia aplica diferentes técnicas que frecuentemente se suelen emplear en las primeras etapas del desarrollo de los fármacos. Los orígenes del DiFAC pueden remontarse a los primeros estudios de Corwin Hansch K *et al.* sobre el desarrollo del método de relaciones cuantitativas estructura-actividad (Quantitative structure-activity relationship, QSAR), en la década de los sesenta.¹⁴

Los objetivos principales del DiFAC se pueden dividir en: (i) diseño o identificación de nuevos compuestos (*hits*), o alternativamente, buscar dentro de una colección de compuestos existentes moléculas que tengan una actividad específica sobre una diana terapéutica deseada; (ii) seleccionar los candidatos sobre las cuales se deberán enfocar las primeras las pruebas experimentales; (iii) optimizar los mejores compuestos encontrados para incrementar las propiedades deseadas y disminuir los efectos adversos.

Hay diferentes métodos computacionales que se utilizan comúnmente en el diseño de fármacos y que en muchas ocasiones coexisten en el mismo proceso de desarrollo. En esta tesis y los diferentes proyectos que abarca, nuestros colaboradores han utilizado varios de los diferentes métodos computacionales en función del compuesto a desarrollar, la diana objetivo, la enfermedad a tratar y la información de partida.

- **Acoplamiento molecular automatizado (*molecular docking*)**

El acoplamiento molecular automatizado consiste en buscar la conformación y posición óptima de un ligando (ej. molécula orgánica pequeña) dentro de una diana molecular (ej. centro activo de una enzima). El acoplamiento molecular automatizado tiene dos componentes: (i) el *docking* o proceso de búsqueda de la conformación y orientación de las moléculas (espacio conformacional del complejo); y (ii) el *scoring*, que consiste en asignar un valor o puntuación que mida la interacción entre las dos estructuras (afinidad de la interacción).¹⁵

En el *docking* los cálculos se centran en la movilidad del ligando sobre la cavidad proteica, considerando esta última inmóvil. Otra técnica complementaria es la simulación de dinámica molecular (DM). Esta técnica permite estudiar el comportamiento del sistema en función del tiempo, simulando la dinámica de éste mediante la integración de las ecuaciones de Newton del movimiento para cada átomo del ligando y de la cavidad proteica considerada.¹⁶ Esta técnica permite aportar datos complementarios para poder descartar los falsos positivos que se obtienen del *docking*.

- **Farmacóforo**

El farmacóforo se define como una plantilla tridimensional de las características mínimas necesarias estéricas y electrónicas que ha de tener un ligando para asegurar interacciones óptimas con un blanco farmacológico específico, para poder desencadenar o bloquear una respuesta biológica. Es importante entender que un farmacóforo no representa una molécula real o una asociación real de grupos funcionales, sino que indica la capacidad de interacción molecular común de un grupo de compuestos dirigidos a una diana farmacológica. En otras palabras, se podría considerar como un denominador común de un conjunto de moléculas activas.¹¹

- **El cribado virtual (VS)**

El objetivo principal del cribado virtual (*virtual screening*, VS), es diferenciar, de entre un conjunto de ligandos (quimioteca), aquellos que teóricamente pueden encajar en una cavidad para bloquear/activar la función de una determinada diana molecular.¹⁷ Se trata de una alternativa teórica al método experimental conocido como cribado farmacológico de alto rendimiento (*High-Throughput Screening* [HTS]; cribaje de compuestos a través de ensayos bioquímicos), pero con un coste y una necesidad de recursos mucho más reducida. En el VS a medida que va disminuyendo el número de compuestos seleccionados, la complejidad de los filtros del cribaje va aumentando (Figura I-1). Esta técnica cada vez va cogiendo más peso dentro del campo del diseño de fármacos, a pesar de estar todavía en un estado de desarrollo.

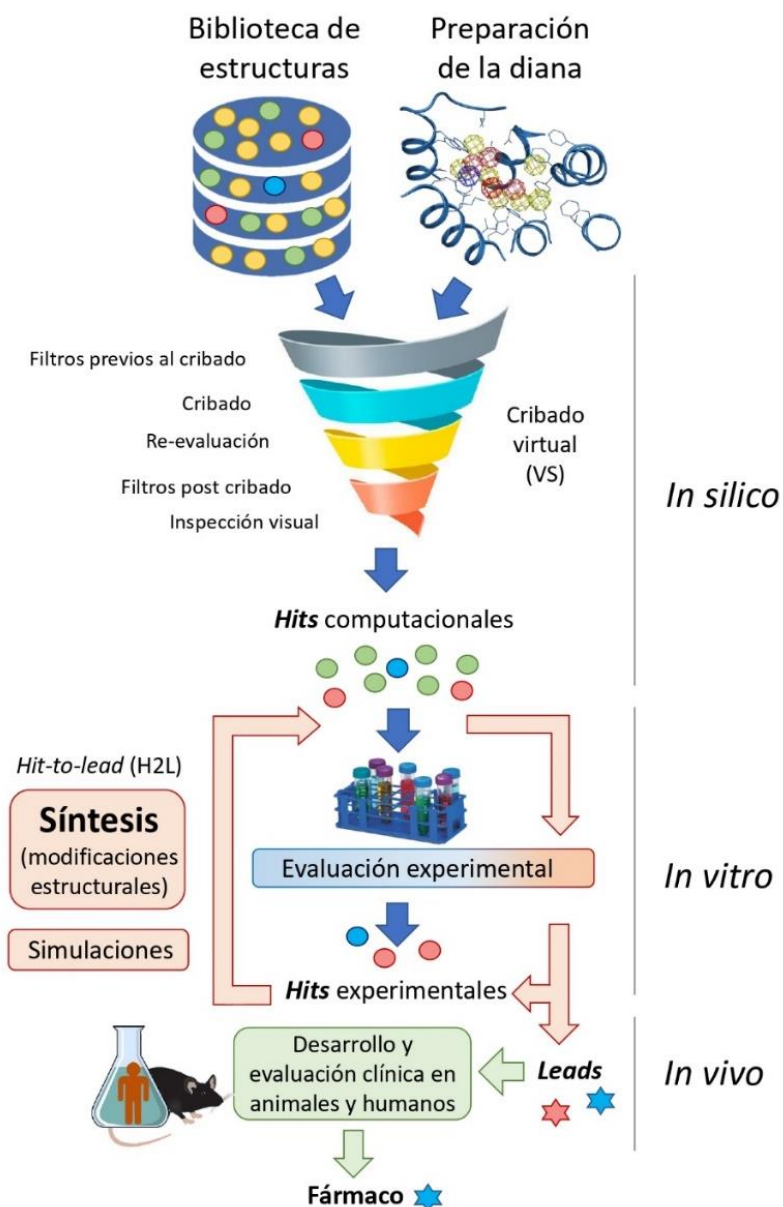


Figura I-1. Explicación esquematizada del diseño de un fármaco a través de un proceso de VS.

Dependiendo de la información inicial que se disponga existen dos tipos de cribaje: (i) el VS basado en la estructura (*Structure-Based virtual Screening, SBVS*), cuando la estructura 3D de la diana es conocida, y (ii) el VS basado en el ligando (*Ligand-Based Virtual Screening, LBVS*), cuando lo que se conoce es la estructura de un grupo de ligandos activos (o no) frente a la diana de interés. Las técnicas utilizadas en cada caso son distintas, siendo en el primer caso el *docking*, mientras que en el segundo caso la estrategia dominante está basada en seleccionar los motivos comunes entre los ligandos para definir el farmacóforo (estudios de similitud).¹⁸

En comparación, el número de publicaciones donde se aplica el SBVS es aproximadamente el triple al correspondiente a LBVS, aunque este último ha demostrado ser más eficiente en la identificación de nuevas moléculas. Sin embargo, quizás el mejor enfoque sería combinar, en la medida de lo posible,

las dos técnicas, de manera que se pueda aprovechar toda la información disponible relativa al problema que se está tratando.¹⁸

Uno de los VS utilizados es la reposición de fármacos. Consiste en encontrar una nueva aplicación terapéutica a un fármaco existente, distinta a por la cual fue diseñado y que no necesariamente tiene que ser con la misma dosis. Bajo la hipótesis de que “moléculas similares tienen propiedades similares”, se han aplicado estrategias computacionales encaminadas a reposicionar fármacos.¹⁹

I.2.2.2. Quimioinformática

La quimioinformática es una herramienta que surge de la combinación de recursos informáticos y datos químicos, y se emplea en el manejo, visualización y análisis sistemático de la información química. Esta herramienta permite analizar de forma eficiente infinitos de datos, con el fin de manejar y organizar información sobre el espacio químico, hacer minería de datos y establecer asociaciones matemáticas entre la estructura y la actividad. La quimioinformática tiene aplicaciones especialmente valiosas en el análisis y manejo de bases de datos moleculares.¹¹ Ejemplos de colecciones usadas con frecuencia en descubrimiento de fármacos son ZINC, DrugBank, ChEMBL, Binding Database y Pubchem. Estas colecciones contienen información para realizar cribados virtuales, quimiogenómica, análisis estructura-actividad y reposicionamientos de fármacos.

En las últimas décadas, bajo estos métodos de DiFAC, se han desarrollado fármacos que han sido aprobados exitosamente para su uso clínico. Uno de estos primeros casos lo protagonizó la antibacteriana norfloxacina. Estudios de QSAR ayudaron al desarrollo de este fármaco que se comercializó por primera vez en 1983 con el nombre de Noroxin®.²⁰ Otro ejemplo fue el sulfato de indinavir (Crixivan®),²¹ utilizado para el tratamiento del sida y con un proceso de diseño basado en la estructura (Figura I-2).

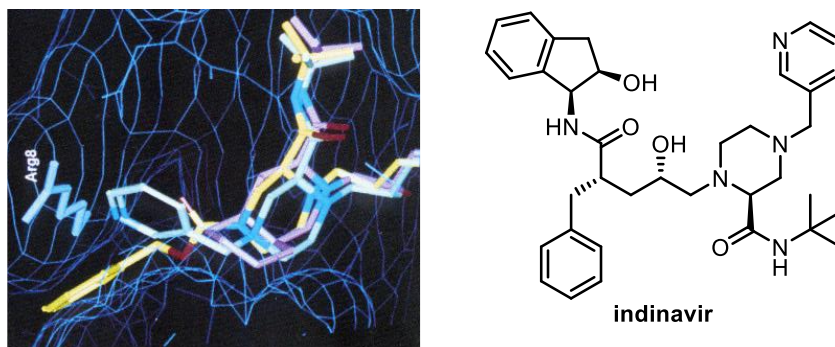


Figura I-2. Captura de pantalla de una simulación del indinavir en complejo con la proteasa VIH-1 publicada en 1995 y estructura molecular del indinavir.²¹

A lo largo de la tesis se han utilizado gran parte de las técnicas sobre simulación computacional comentadas anteriormente. Los grupos colaboradores en esta disciplina encargados de realizar todos los cálculos computacionales fueron el *Laboratory of Computational Medicine Research Group*, del Dr. Leonardo Pardo de la facultad de medicina (para los capítulos II, III y V) y el grupo de *Computational Studies of (Bio)inorganic Systems* (GETAB) de la Dra. Mariona Sodupe del departamento de química (para el capítulo IV), ambos ubicados en la UAB.

I.3. La química orgánica sintética y su papel en el diseño de fármacos

En el diseño de fármacos, la química orgánica sintética siempre ha tenido un papel muy importante. En sus inicios, casi todo el peso de la creación de nuevos fármacos recaía en el ensayo-error de la síntesis de nuevos compuestos y la posterior evaluación biológica de estos. Con la incorporación de los nuevos avances en computación en el diseño de fármacos, el papel de la síntesis orgánica se ha visto encaminado a ser la herramienta que permite que las ideas sobre posibles fármacos efectivos sean transformadas en un compuesto real para poder ser evaluado a través de los ensayos biológicos.

Una de las piedras angulares de los químicos sintéticos ha sido siempre intentar acortar la distancia entre la eficiencia de los sistemas vivos para crear compuestos y la de la química sintética. La lejanía actual de la “perfección sintética”,²² queda reflejada en el hecho de que gran parte de las síntesis de moléculas de alta complejidad estructural realizadas hasta la fecha no son económicamente viables para su utilidad comercial, incluso siendo sustancias de muy alto valor añadido. Un ejemplo claro de estos hitos sintéticos alcanzados son la síntesis de la vitamina B12²³ o la palitoxina,²⁴ que podría considerarse el *Everest* de la química sintética. (Figura I-3).²⁵

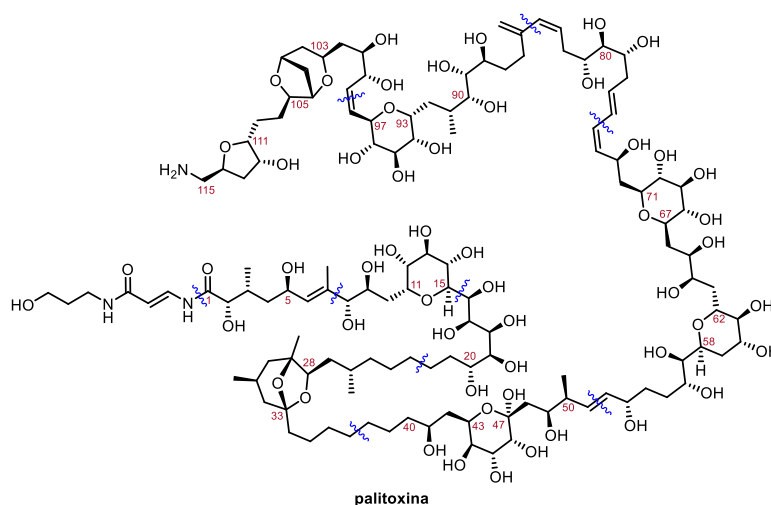


Figura I-3. Estructura molecular de la palitoxina, producida por ciertos animales marinos y considerada una de las sustancias no proteicas más venenosas (vasoconstrictor). Solo la unión de los diferentes fragmentos

estructurales que conforman la palitoxina y la desprotección de los 42 grupos protectores utilizados (8 tipos diferentes) ya supera las 35 etapas de reacción

Los químicos sintéticos requieren de materias primas disponibles y económicas, catalizadores, disolventes (usualmente orgánicos) para realizar reacciones en las que finalmente hay que purificar y aislar el producto final de interés. El proceso en su conjunto está sujeto a la selectividad química, espacial y rendimientos limitados, creación de residuos, alto consumo de energía, etc.²⁶ Un sinnúmero de factores en los que en los últimos años la química orgánica se ha centrado en optimizar para poder viabilizar cada vez más la química sintética.

La química orgánica ha tenido un impacto fundamental en la prolongación de la vida humana gracias a todos los avances, en síntesis, metodología y elucidación estructural conseguidos en el último siglo. No obstante, quizás cabe plantearse la pregunta de si la química orgánica sintética sigue siendo una disciplina en constante evolución, o si por lo contrario se encuentra en un cierto estancamiento. En palabras del prestigioso químico José Elguero: “*A estas alturas de la película es muy difícil hacer ciencia revolucionaria en química, pero no siempre ha sido así.*”²⁷ Modelos de investigación que sirvieron tan bien en el pasado, quizás no lo harán igual de bien en el futuro.

Sin embargo, lo que sí que podemos plantear sin temor a equivocarnos es que la humanidad aún se enfrenta a retos apasionantes referentes al entendimiento y mejora de la salud humana, en los que la síntesis orgánica tiene absoluta cabida para resolverlos.²⁸

En resumen, se pretende dejar claro que la síntesis orgánica, en combinación con otras disciplinas, forma parte de la solución de muchas situaciones planteadas en forma de problema, como podría ser el diseño de nuevos fármacos. En esta tesis doctoral se puede observar un reflejo de las tendencias actuales sobre la creación de nuevos compuestos con actividad farmacológica, a partir de rutas sintéticas cortas y eficientes para generar moléculas de estructura relativamente sencilla, sobre los que ya se ha trabajado previamente a través de herramientas computacionales.

I.4 Referencias del capítulo I

- (1) Benítez Guerrero, V. *Multidisciplinariedad en la investigación científica*, 1a ed., Universidad Tecnocientífica del Pacífico, 2018.
- (2) Crick, F. H. C.; Watson, J. D. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- (3) Kiesler, S.; Cummings, J. N. *What do we know about proximity and distance in work groups? A legacy of research*; Hinds, P. & Kiesler, S. Eds., Boston Review, 2002.
- (4) Di Aichelburg, U.; Faganello, B. *Triunfo. Año XX* **1965**, *141*, 50-57.
- (5) Lips Castro, W.; Arias, C. U.; Castro, W. L.; Psiquiatra, M. *Gac. Med. Mex.* **2014**, *150*, 369-376.
- (6) Folch Jou, G. *Historia general de la farmacia: El medicamento a través del tiempo*, 1a ed., Ediciones Sol S.A., Madrid, 1986.
- (7) Fernández Ferriol, C.; Ferriol Rodríguez, M. R.; Jorge Fleites, C. *Med. Centro* **2018**, *12*, 228-234.
- (8) Toffoli de Matheos, M. R. *Acta Farm. Bonaerense* **1982**, *1*, 53-59.
- (9) Jácome-Roca, A. *Historia de Los Medicamentos*, 1a ed., Academia nacional de medicina, 2003.
- (10) Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. *Farmacología*, Elsevier, Madrid, 2003.
- (11) Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. *Educ. Quím.* **2017**, *28*, 51-58.
- (12) Ertl, P. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 374-380.
- (13) Navarro, G.; Gonzalez, A.; Sánchez-Morales, A.; Casajuana-Martin, N.; Gómez-Ventura, M.; Cordomí, A.; Busqué, F.; Alibés, R.; Pardo, L.; Franco, R. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 9354-9364.
- (14) Hansch, C.; Muir, R. M.; Fujita, T.; Maloney, P. P.; Geiger, F.; Stretch, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2817-2824.
- (15) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
- (16) Rabal Gracia, O. *Tesis Doctoral*, Universidad Ramon Llul, 2006.
- (17) Shoichet, B. K. *Nature* **2004**, *432*, 862-865.
- (18) Morreale, A.; Perona, A.; Klett, J.; Cortés-Cabrera, A.; Dos Santos, H. G. *16-Diseño de Fármacos Asistido Por Ordenador*, Zenodo, 2014, 401-425.
- (19) Sant'Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L. Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M. R.; Reixach, N.; Insa, R.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Reig, N.; Ventura, S. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10787.
- (20) Boyd, D. B. *ACS Symp. Ser.* **1999**, *719*, 346-356.
- (21) Holloway, M. K.; Wai, J. M.; Halgren, T. A.; Fitzgerald, P. M. D.; Vacca, J. P.; Dorsey, B. D.; Levin, R. B.; Thompson, W. J.; Chen, L. J.; deSolms, S. J.; Gaffin, N.; Ghosh, A. K.; Giuliani, E.

- A.; Graham, S. L.; Guare, J. P.; Hungate, R. W.; Lyle, T. A.; Sanders, W. M.; Tucker, T. J.; Wiggins, M.; Wiscount, C. M.; Woltersdorf, O. W.; Young, S. D.; Darke, P. L.; Zugayl, J. A. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 305-317.
- (22) Gaich, T.; Baran, P. S. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4657-4673.
- (23) Eschenmoser, A.; Wintner, C. E. *Science* **1977**, *196*, 1410-1420.
- (24) Suh, E. M.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11205-11206.
- (25) Kishi, Y. *Pure & Appl. Chem.* **1989**, *61*, 313-324.
- (26) Sotero Martín Garcia, V. *La Química Orgánica Sintética Como Ciencia Esencial En El Desarrollo de La Humanidad*, 1a ed, Servicio de Publicaciones Universidad de La Laguna, La Laguna, 2021.
- (27) Elguero, J. *An. Quím.* **2009**, *105*, 234-238.
- (28) Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3196-3209.

Fuentes de las Figuras I

Figura I-2. Figura extraída de la referencia 22.

* El resto de las figuras presentes en este capítulo han sido creadas por el autor de la tesis doctoral.

Capítulo II

Antagonistas del ASTA-R

Resumen

Las abejas tienen una gran importancia económica y ecológica, pero se enfrentan a múltiples factores de estrés que pueden poner en peligro su eficacia polinizadora y su supervivencia. Por lo tanto, comprender las bases fisiológicas de su respuesta al estrés puede ayudar a definir tratamientos para mejorar su resiliencia. En este capítulo se ha tomado un enfoque original para diseñar moléculas con este objetivo. Aprovechando el neuropéptido alostatina A (ASTA) y su receptor (ASTA-R) identificados previamente como probables mediadores de la respuesta de las abejas al estrés, se identificó una primera serie de ligandos de ASTA-R mediante un VS utilizando un modelo homólogo del receptor en 3D y experimentos de competitividad *in vitro*. Uno de estos compuestos (**A8**) también demostró ser eficaz *in vivo*, ya que podía contrarrestar dos efectos conductuales de la exposición de las abejas a las feromonas de alarma (*sting alarm pheromone, SAP*), aunque solo en el rango milimolar. Este antagonista putativo se usó como referente para la síntesis química de una segunda generación de ligandos potenciales (familia **B**), sobre los cuales también se ha evaluado su actividad farmacológica.

II.1. Introducción

II.1.1. Abejas

Los antófilos (del griego *anthophilia* “que aman las flores”) son un tipo de insectos himenópteros aculeados, dentro de la superfamilia Apoidea conocidos comúnmente como abejas. Hay más de veinte mil especies conocidas, la mayoría de las cuales son abejas solitarias y solo un 10% vive en sociedad. La especie más conocida es la abeja doméstica (*Apis mellifera*) catalogada por primera vez por el científico Carlos Linneo en 1758.

La abeja doméstica es un insecto social que vive en enjambres formados por tres clases de individuos: reina, obrera y zánganos (Figura II-1). Concretamente, las abejas domésticas viven en alta eusocialidad. Este modelo es el tipo más avanzado de colonias que existe, y se caracteriza por tener un cuidado cooperativo de la cría, una división entre castas (las cuales tienen diferencias morfológicas entre sí), además de haber una superposición de generaciones.¹

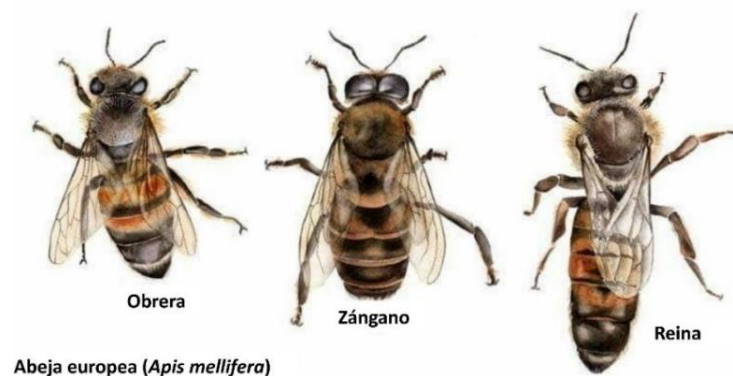


Figura II-1. Diferencias morfológicas entre las abejas obreras, zánganos y la abeja reina.²

Dentro de esta eusocialidad, las abejas obreras son hembras infértiles encargadas de segregar la cera utilizada para construir el panal, de limpiar y mantener la colmena, criar a las larvas, vigilar el panal y recolectar el néctar y el polen. Tiene una vida de entre 6 a 7 semanas.

II.1.1.1. Morfología de las abejas

La abeja reina adquiere su morfología debido a su alimentación con jalea real a lo largo de su vida. En cambio, las abejas obreras, al cambiar su alimentación a polen y néctar en un estado prematuro, adquieren otra morfología diferente. Las abejas obreras suelen medir entre 1.2 y 1.5 cm, mientras que la abeja reina y los zánganos pueden medir aproximadamente 2 cm.

Muchas abejas tienen coloración aposemática (que anuncia a sus enemigos que les puede causar daño con su picadura). Generalmente son colores como naranja, amarillo y negro, con matices brillantes.

II.1 Introducción

El cuerpo de una abeja está dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen. En cuanto a la cabeza se refiere, las abejas tienen un par de ojos compuestos, y tres ojos simples (ocelos) encargados de determinar la intensidad de la luz. Las antenas en forma de codos, con entre doce y trece segmentos, están cargadas de un gran número de quimiorreceptores, órganos del olfato y del gusto. Entre sus piezas bucales masticadoras, aparece una lengua larga, llamada probóscide (compuesta de varias partes) que les permite libar el néctar (Figura II-2).³

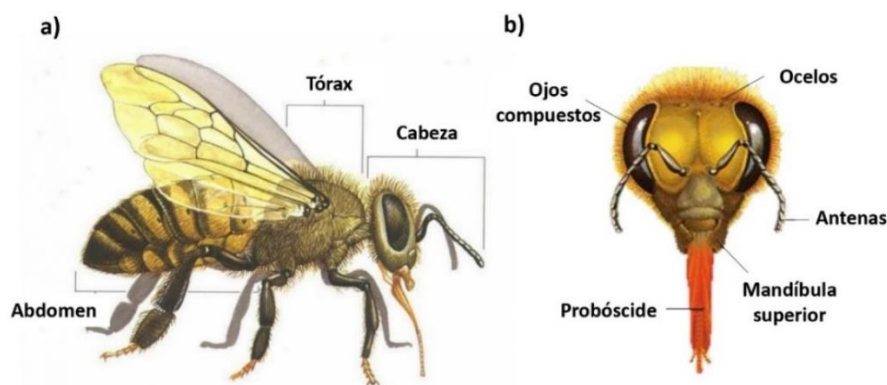


Figura II-2. a) Partes del cuerpo de una abeja. b) Diferentes partes de la cabeza de una abeja.

Además, el último segmento del abdomen de las hembras está modificado en forma de aguijón, que en esencia es un ovopositor. Por esa razón, los zánganos no tienen aguijón.

II.1.2. Importancia de las abejas en el mundo

Los cultivos más nutritivos e interesantes para nuestra dieta, como la fruta, la verdura y algunos cultivos de forraje utilizados para la producción de carne y lácteos, son polinizados a través de polinizadores silvestres.⁴ Un estudio reciente pone de manifiesto que un 87.5% de las plantas de florecimiento, tanto silvestres como cultivadas, se polinizan gracias a animales.⁵

Un cálculo reciente del beneficio económico global en productividad debido a la polinización asciende a un total de 265000 millones de euros. Por supuesto, como en cualquier valoración de un servicio ecológico, si éste se ve comprometido, su valor tiende a infinito al resultar irremplazable.⁶

De los muchos organismos silvestres implicados en la polinización, las abejas, en concreto la *Apis mellifera*, son el grupo de polinizadores predominante y principal desde el punto de vista económico en la mayoría de las regiones geográficas. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA) se calculó que, en 2010, de unas 100 especies de cultivo que proporcionan el 90% del alimento en el mundo, 71 se polinizan gracias a las abejas. Solo en Europa, el 84% de 264 especies de cultivo depende de la polinización intermediada por animales, y 4000 variedades vegetales existen gracias a la polinización llevada a cabo por las abejas.⁷

Todos estos datos subrayan la importancia crucial de las abejas, como uno de los principales polinizadores globales, en el mantenimiento de la producción alimentaria y en los ecosistemas de flora silvestre.

II.1.3. Situación actual de las abejas

El número total de abejas y otros polinizadores, tanto silvestres como criados, está disminuyendo en todo el mundo, en especial Norteamérica y Europa.⁸ En los EEUU, desde el 2006 se ha relacionado la pérdida de entre el 30% y el 40% de las colonias manejadas (no silvestres) de abejas melíferas con el “colapso de colonias”, un síndrome que se caracteriza por la desaparición de las abejas obreras.⁹ En los últimos años, los apicultores chinos, que cuentan con 6 millones de colonias de abejas en todo el territorio, se han enfrentado a pérdidas de colonias de forma inexplicable y con síntomas extremadamente complejos. Muchas de estas colonias manejadas requieren del uso de alimento complementario y medicamentos para poder sobrevivir.⁶

En Europa central los cálculos son de un 25% de pérdida de las colonias de abejas de la miel desde 1985, con un 54% de pérdidas en el Reino Unido.⁸ Durante los últimos inviernos, la mortalidad media de las colonias en Europa ha sido del 20%.

II.1.4. Factores de estrés y de riesgo para las abejas

El descenso de las poblaciones de abejas y la disminución de su salud global son producto de múltiples factores, unos conocidos y otros no, que pueden actuar combinados o por separado.¹⁰ Se pueden distinguir algunos de los factores generales que causan estrés en las abejas:

- **Enfermedades:** Las abejas tienen sus propios parásitos y enfermedades que las debilitan y, a menudo, causan su muerte. Muchos de estos parásitos son especies invasivas que las abejas locales no pueden combatir mediante adaptación natural o inmunizándose contra ellos. Los parásitos más conocidos son el *Varroa destructor* (Figura II-3), del tamaño de una cabeza de alfiler y originario de Asia, y el microsporidio *Nosema caranae*.¹¹ Las abejas enfermas pueden, a su vez, ser más vulnerables a otros factores, como una mala nutrición o la exposición a sustancias tóxicas.



Figura II-3. *Varroa destructor*.

- **Depredadores:** Existe un gran número de depredadores, tanto vertebrados como invertebrados, que amenazan a las abejas. Dentro de los invertebrados cabe destacar a los avispones, como es el ejemplo de la avispa asiática (Figura II-4), también especie invasiva causante de grandes estragos en las colmenas europeas recientemente.¹²

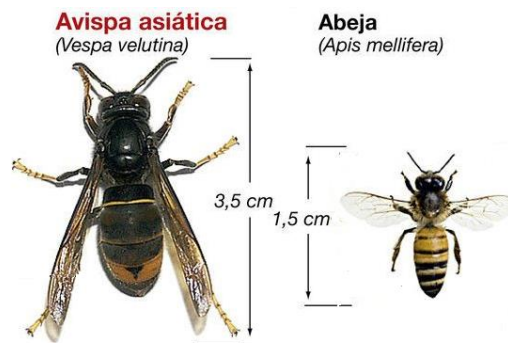


Figura II-4. Comparación entre la abeja melífera y la avispa asiática.

- **Malnutrición:** Las abejas se alimentan de un suministro estable de flores para recolectar polen, su principal alimento y fuente de proteínas, alrededor del panal. Cuando no hay suficientes plantas en flor durante la temporada las abejas pueden pasar hambre. Uno de los principales factores relacionados con este suceso son las prácticas de agricultura industrial: (i) los monocultivos que producen una única clase de flor en un determinado espacio tiempo; (ii) los herbicidas que reducen la diversidad de las plantas silvestres en las tierras de cultivo y alrededores; y (iii) la expansión de la agricultura eliminando las praderas, bosques, setos en los lindes de los campos y demás, los cuales ayudan a mantener la diversidad alrededor del área cultivada. Además, el cambio climático en ocasiones modifica los patrones de floración causando un “desplazamiento de las estaciones”, en las que el nuevo periodo de floración ya no coincide con el reaparecer de las abejas en primavera.⁶
- **Envenenamiento:** El medioambiente en torno a las abejas se haya a menudo bajo la contaminación de sustancias químicas, en su gran mayoría, plaguicidas. Estos insecticidas, herbicidas y fungicidas se aplican a los cultivos, pero desgraciadamente llegan a las abejas a través del polen, el néctar, el aire, el agua o el suelo. Se han encontrado diversos efectos subletales a dosis bajas de estos compuestos, que pueden clasificarse en: (i) efectos fisiológicos, como por ejemplo malformaciones y retraso en alcanzar la edad adulta; (ii) efectos en el aprendizaje y la orientación, como la alteración en del patrón de pecoreo y la “danza de la abeja”, pudiendo provocar que las abejas se pierdan de vuelta a la colmena;¹³ (iii) interferencias en el comportamiento alimentario, pudiendo inhibirse la alimentación o reducir la capacidad de detectar fuentes de alimento por pérdida olfativa.

Algunos de los insecticidas sobre los cuales se tienen datos de ser causantes de la muerte de abejas son del tipo: fenilpirazoles (finopril), piretroides (cipermitrina y deltametrina), organofosforados (cloropirifos) y neonicotinoides (imidaclopirid, clotianidina y tiametoxam). En un estudio en 2008 se llegaron a detectar hasta diecisiete plaguicidas distintos en una sola muestra de polen de una colonia de abejas melíferas.¹⁴ Desde el año 2017 en adelante, la Unión Europea los ha prohibido en cultivos exteriores y ha restringido su uso en invernaderos aislados. Esto supone un pequeño avance en cuanto al salvamento de las abejas. Pero todavía hay inconvenientes con algunos plaguicidas y la contaminación de las aguas residuales en torno a los invernaderos que los usan, de las cuales las abejas también están en contacto.¹⁵

Los neonicotinoides son el grupo de insecticidas más peligroso para las abejas ya que actúan en el sistema nervioso central (SNC) de los insectos, causándoles la muerte por parálisis. Estos compuestos funcionan de forma sistémica, es decir, al aplicarlos en la planta penetran en el sistema vascular y se distribuyen por ella. Algunos neonicotinoides se utilizan en recubrimiento de semillas, y al crecer la planta, estos son segregados en el agua de gutación (las gotitas que exuda la planta en el extremo de las hojas),¹⁶ polen y néctar. Luego, las abejas suelen beber de esta agua y recolectar ese polen y néctar.

Como se puede observar muchos de los factores de riesgo son correlativos entre sí, dejando a las abejas en un estado de vulnerabilidad muy grave y propiciando así el camino hacia su extinción. Todos estos factores generan un estrés en las abejas y una respuesta fisiológica a consecuencia de este estrés.

II.1.5. Sistema de alarma de las abejas

Las feromonas son sustancias químicas secretadas por seres vivos con el fin de provocar comportamientos específicos en otros individuos de la misma especie. Suelen ser moléculas de carácter volátil que se dispersan por el aire para ser recibidas por el resto de los individuos. Las feromonas de las abejas han sido estudiadas en numerosas ocasiones con el fin de observar sus múltiples consecuencias en el comportamiento y fisiología de dichos insectos.¹⁷ De entre todas las feromonas liberadas por las abejas obreras, la feromona de alarma de picadura (*Sting Alarm Pheromone, SAP*), excretada desde la cavidad donde se sitúa el aguijón, provoca un estado de agresividad en las abejas y un reclutamiento de otras abejas de la colmena para defender los recursos de la colonia frente a un peligro potencial (Figura II-5).¹⁸ Bajo la presencia de esta feromona, las abejas son más susceptibles a picar con su aguijón.

II.1 Introducción

Cuando una abeja obrera se siente en peligro, es decir, bajo una situación de estrés, avisa al resto de abejas de la colmena mediante la liberación de la SAP. Las abejas “guardianas” de la colonia amenazada se sitúan en la entrada de la colmena buscando objetos en movimiento potencialmente peligrosos y exponiendo su aguijón hacia ellos. Al mismo tiempo que agitan sus alas liberan la SAP alertando al resto de compañeras de la colmena contra cualquier depredador. En esta feromona de defensa se han detectado más de 40 compuestos de los cuales 15 tienen un efecto de alarma. El componente principal de esta feromona es el acetato de isoamilo (*isopentil acetate*, IPA), y se caracteriza por su fuerte olor a banana y ligeramente a pera.¹⁷

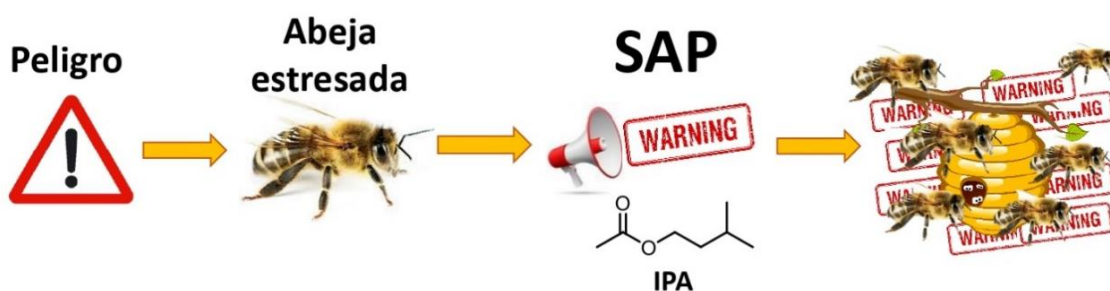


Figura II-5. Esquematización del sistema de alarma de las abejas utilizando la feromona SAP.

La respuesta fisiológica que induce esta feromona en el resto de las abejas del panal recuerda mucho a la respuesta al estrés que padecen los vertebrados: aumento de la respiración, reducción de la sensibilidad a los estímulos nocivos (“analgesia”)¹⁹, desmotivación por la comida²⁰ y problemas de aprendizaje.^{18,21,22}

II.1.6. Las alatoestatinas (ASTs) y el receptores de alatoestatinas (AST-R)

Las alatoestatinas (ASTs) son una familia de hormonas neuropeptídicas propias de los invertebrados, como insectos y crustáceos. Dentro de los tres tipos de alatoestatinas que se han descubierto (tipo A, B y C), solo del tipo A (ASTA) y del tipo C (ASTC) han sido identificadas en los cerebros de abejas adultas (Figura II-6).²³

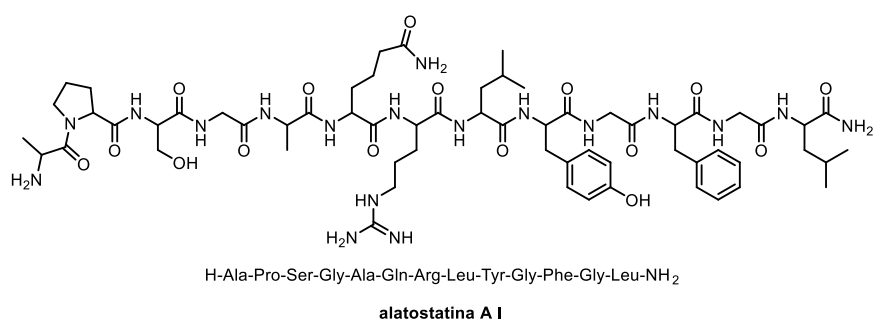


Figura II-6. Ejemplo de estructura molecular de un neuropeptido tipo alatoestatina, la ASTA I.

Estos neuropéptidos son objetivo de dos tipos de receptores, el del tipo C (ASTC-R) para las ASTCs, y el del tipo A (ASTA-R) para las ASTAs. Estos receptores son del tipo RAPG y fueron originalmente identificados basándose en su similitud con los receptores de opioides de los vertebrados, como por ejemplo los de galanina y somatostatinas, los cuales están estrechamente relacionados con la repuesta fisiológica al estrés.²⁴ Las allostatinas y sus receptores son expresados por todo el cerebro de las abejas, incluyendo los órganos involucrados en el procesamiento de la información olfatoria y el aprendizaje asociativo, como también en los lóbulos de las antenas y en los neuropilos del cerebro.²⁵

Aunque las allostatinas se definen como neuropéptidos inhibitorios, identificar su rol en el cerebro de las abejas todavía es complejo. En experimentos en los que se ha inyectado los dos tipos de ASTs (A y C) en cerebros de abejas, se ha podido observar una modulación del comportamiento del aprendizaje y del apetito. De hecho, los efectos en el aprendizaje recuerdan a los efectos del estrés inducido por la SAP.^{21,22} Esto sugiere que las allostatinas juegan un papel importante mediando la respuesta fisiológica y el comportamiento hacia el estrés. Asimismo, se conoce que las allostatinas regulan la síntesis de la hormona juvenil (HJ) en muchos insectos y que en el caso de las abejas está relacionada de forma muy estrecha con la respuesta al estrés.²⁶

La modulación de la respuesta al estrés por parte de las allostatinas es todavía objeto de estudio. Es por este motivo que en colaboración con los grupos de investigación del Dr. Jean-Marc Devaud del *Centre de Recherches sur la Cognition Animale* (CRCA) en Toulouse, la Dra. Véronique Gigoux del *Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse* (CRCT) en Toulouse y del Dr. Leonardo Pardo de la UAB, se decidió trabajar en el diseño de una nueva serie de moléculas que permitieran inhibir los ASTA-R para poder estudiar y mejorar la respuesta al estrés de la *Apis mellifera*. De esta manera, estos nuevos ligandos actuarían de forma antagonista a cómo actúan las allostatinas en sus receptores, buscando así una inhibición de la respuesta tanto fisiológica como de comportamiento de las abejas frente al estrés.

II.1.7. Diseño de nuevos antagonista del ASTA-R

II.1.7.1. Cribado virtual de nuevos candidatos con actividad en el ASTA-R, *in silico*

Los primeros estudios computacionales para el desarrollo de los nuevos ligandos fueron realizados por el Dr. Arnau Cordoní del grupo *Laboratory of Computational Medicine* liderado por el del Dr. Leonardo Pardo, de la UAB.

Con el objetivo de realizar un VS para encontrar un ligando no peptídico para los ASTA-Rs se creó un modelo homólogo²⁷ del ASTA-R basándose en la estructura del receptor δ -opioide de los humanos en

II.1 Introducción

interacción con un antagonista (PDB: 4N6H).²⁸ Se construyó un modelo de puntos farmacofóricos basados en Mapas Electroestáticos, aplicados en la típica cavidad ortostérica de los RAPGs de clase A para definir el posible modelo del farmacóforo putativo de los ligandos para el ASTA-R. Este modelo constaba de 12 puntos farmacofóricos definidos: 7 hidrofóbicos, 4 enlaces de hidrogeno aceptores (EHA) y 1 donador (EHD) (Figura II-7).

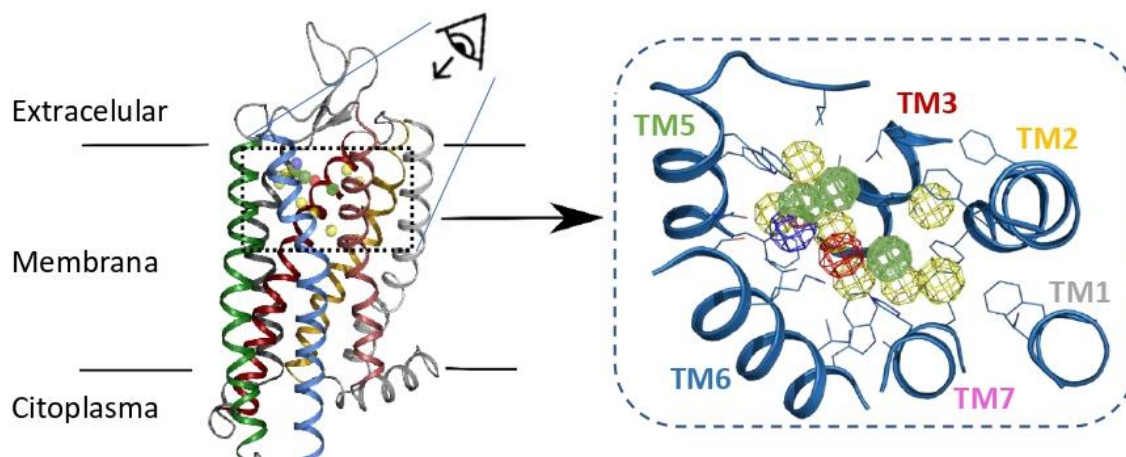


Figura II-7. Representación del modelo homólogo del ASTA-R, con sus hélices transmembranales en diferentes colores. El rectángulo de puntos indica la típica cavidad ortostérica del RAPG. Las esferas de colores representan los 12 puntos farmacofóricos: 7 hidrofóbicos (amarillo), 1 grupo ionizable (rojo), 3 EHA (verde) y 1 EHD (azul).

Con el software Discovery Studio 3.5 se realizó un VS de ~ 5.5 millones de compuestos comerciales, extraídos de una base de datos filtrada de ZINC.²⁹ Se usaron modelos de farmacóforos resultantes de combinaciones de entre 5 y 7 puntos farmacofóricos de los 12 obtenidos. A partir de la puntuación del valor de ajuste (*fit value scoring*), para clasificar los compuestos de mejor a peor ajuste, y tras una inspección visual, se seleccionaron 24 compuestos de entre los 1000 que mejor encajaban para poder ser testeados *in vitro*.

En este punto de la investigación, todavía no se podía distinguir si los compuestos seleccionados tenían un carácter agonista o antagonista. A pesar de que el modelo farmacofórico se creó a partir de un modelo inactivo del receptor, lo que debería favorecer la identificación de un compuesto antagonista, se desconocía si los puntos farmacofóricos seleccionados estaban asociados al antagonismo o al agonismo.

II.1.7.2. Ensayos de competitividad (compuestos A), *in vitro*

El siguiente paso en el proceso de desarrollo de los nuevos inhibidores de los ASTA-Rs fue la evaluación experimental *in vitro* de los candidatos seleccionados tras el VS. Los ensayos de competitividad fueron realizados por la Dra. Véronique Gigoux y el Dr. Daniel Fourmy (CRCT), en Toulouse.

Los 24 compuestos seleccionados fueron evaluados en experimentos *in vitro* con células T embrionarias de riñón humano 293 (HEK293T) para evaluar la capacidad de competición con ^{125}I -ASTA (alostatinas tipo A marcadas con I^{125} radiactivo) en ASTA-Rs.²² Para cuantificar la radioactividad se utilizó un contador gamma. A pesar de que las ASTAs (neuropéptido endógeno) tienen una concentración inhibitoria media máxima (*Half maximal inhibitory concentration*, IC_{50}) en un rango nanomolar, solo tres de los compuestos del cribado (**A8**, **A16** y **A23**) (Figura II-8) fueron capaces de competir de manera dependiente a la dosis con una afinidad baja a nivel micromolar (Figura II-9). Estos compuestos activos fueron utilizados para optimizar los modos de unión del ligando en los modelos computacionales y también para realizar los ensayos *in vivo* de comportamiento en abejas.

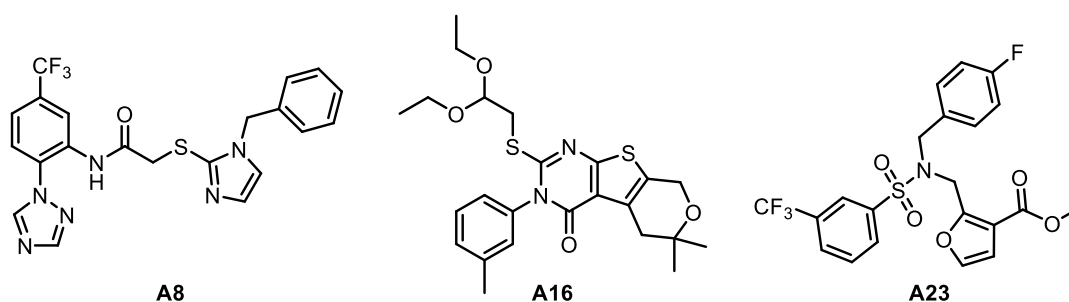


Figura II-8. Estructuras moleculares de los compuestos **A8**, **A16** y **A23**.

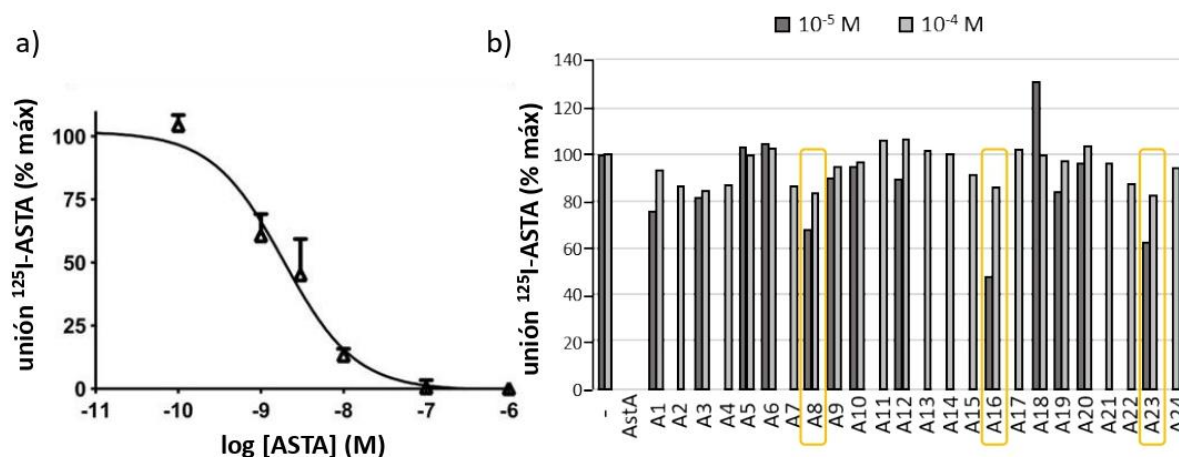


Figura II-9. a) Curva del ensayo de competitividad de las ASTAs con células HEK293T. b) Resultados (% máx.) obtenidos de los ensayos de competitividad entre los 24 compuestos **A** seleccionados y las ^{125}I -ASTA en células HEK293T.

II.1.7.3. Ensayos de comportamiento en abejas (compuestos A), *in vivo*

Una vez encontrados los tres compuestos comerciales (**A8**, **A16** y **A23**) capaces de interactuar con los ASTA-Rs *in vitro*, fue el momento de testear sus capacidades como antagonistas en experimentos de comportamiento en abejas sometidas a estrés. Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Jean-Marc Devaud (CRCA) en la Universidad Paul-Sabatier en Toulouse.

Como agente estresante se utilizó la exposición de las abejas al IPA. En trabajos anteriores del grupo de investigación del Dr. Devaud se mostró que el IPA reduce tanto el aprendizaje como la probabilidad de respuesta al apetito.¹⁸ De esta forma, tratando a las abejas con los compuestos seleccionados del cribado, previo a la exposición del IPA, se esperaba una reducción de los efectos del estrés provocado por el IPA en el comportamiento de las abejas.

Primero, las abejas fueron inyectadas con los compuestos objetivo, seguido de una exposición al IPA. Seguidamente, se sometieron a un ensayo de acondicionamiento clásico. Este ensayo consistió en que las abejas aprendieran a responder a un olor suministrado repetidamente y que estaba asociado a una recompensa alimentaria. Como término general, cuando las abejas perciben la cercanía de un alimento a través de los receptores de sus antenas, éstas muestran la probóscide en señal de que van a alimentarse. En el proceso de aprendizaje de olor-alimento, las abejas acaban asociando un olor con la proximidad de un alimento, y muestran su probóscide en cuanto perciben ese olor.

Para estos experimentos, se realizaron dos grupos de control inyectados con una solución de PBS (solución tampón de fosfato) sin fármacos: uno expuesto a IPA (sometidas a estrés) y el otro expuesto a un aceite mineral (no estrés). Como era de esperar, el grupo de control con PBS estresado mostró una disminución del aprendizaje en comparación con el de las abejas no estresadas al final del acondicionamiento. Todos los datos estadísticos fueron evaluados a través de un análisis de la varianza (*Analysis of variance*, ANOVA) de un factor (p: probabilidad de que un valor estadístico calculado sea posible dada una hipótesis nula cierta).

Los experimentos con los compuestos **A16** y **A23** no tuvieron resultados significativos (Figura A-II-1, anexo). La grafica del resultado de las abejas tratadas con **A8** mostró una curva dosis-dependencia en forma de U (efecto ensayo x dosis: $p = 0.0345$) (Figura II-10). Tanto las abejas tratadas con la dosis más alta como la más baja, no diferían mucho del control negativo (abejas no estresadas inyectadas con PBS) ($p < 0.0049$). Para la concentración más baja (10^{-7} M), la curva no sigue una tendencia dosis-dependencia y la concentración es límite, y por lo tanto, no se pudo tomar ese valor como reproducible. Sin embargo, para concentraciones de 10^{-4} M se obtuvo un resultado significativamente mejor al control de abejas estresadas.

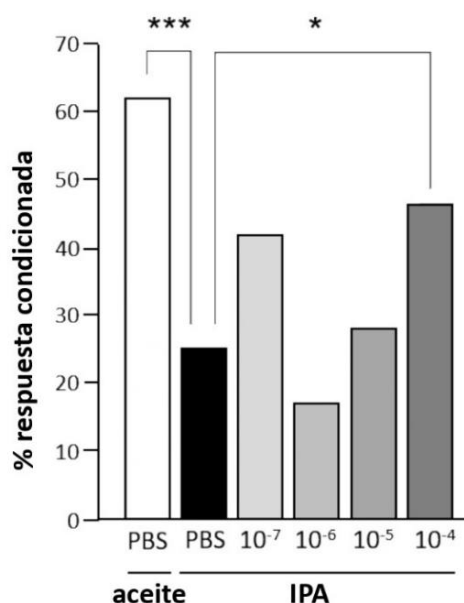


Figura II-10. Resultados del estudio de aprendizaje: proporción de individuos que mostraron una respuesta condicionada por el olor vinculado a una recompensa de sacarosa tras la sesión de condicionamiento (3 replicados). *: $p < 0.025$; ***: $p < 0.0005$ (PBS: $n = 100$; A8: $n = 47 - 99$ /grupo).

En el mismo experimento, se comparó también la proporción de abejas que tuvieron que ser descartadas debido a la falta de reflejos de extensión de la probóscide en respuesta a la sacarosa (recompensa). De hecho, la exposición al IPA aumentó notablemente esta proporción en abejas inyectadas con PBS (IPA/PBS: 38,5%; aceite/PBS: 1,9%, $p < 0.001$), de manera consistente con los trabajos anteriores que indicaban una menor motivación por la comida.¹⁸ Sin embargo, para concentraciones de 10^{-4} M de A8 esta proporción disminuyó significativamente (IPA/ 10^{-4} M A8: 23,4%, $p < 0.05$).

En conclusión, dosis altas de A8 podrían restaurar el nivel de aprendizaje de abejas estresadas a un nivel comparable a abejas no estresadas. Además, A8 mejoró la probabilidad de responder a disoluciones del 50% de sacarosa, aunque a una concentración tan elevada de sacarosa puede haber respuesta a pesar de que las abejas estén estresadas.

Con el fin de explorar en profundidad los efectos de A8 sobre el apetito en abejas estresadas, se utilizó un protocolo estándar diseñado para proporcionar una evaluación más sensible a través del cálculo individual de los valores de respuesta a la sacarosa (*Sucrose Responsiveness Scores*, SRS). Este protocolo consiste en observar si las abejas muestran su probóscide cuando sus antenas son estimuladas con muestras de diferentes concentraciones de una disolución de sacarosa en rangos de entre 0.1% a 30%. Finalmente, se hace un control con una disolución al 50% en sacarosa (Figura II-11).

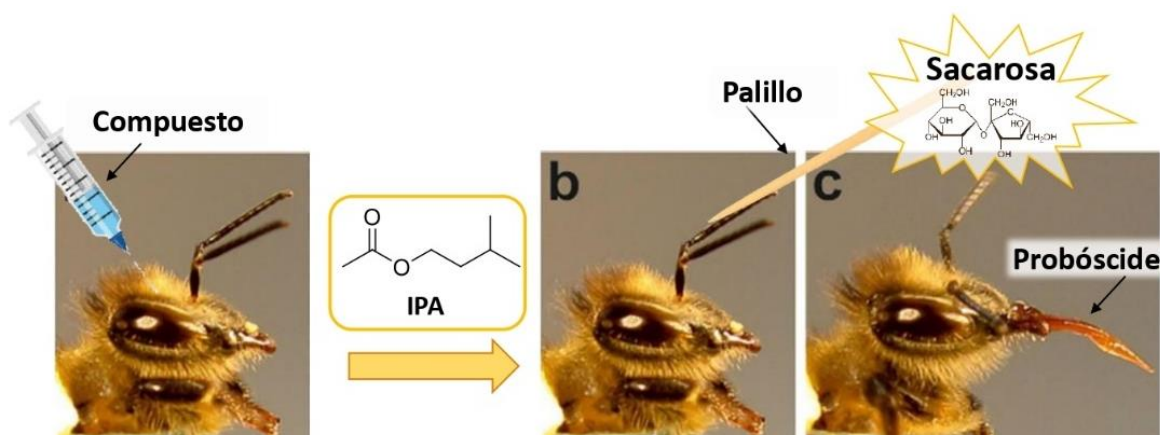


Figura II-11. Descripción gráfica del procedimiento de los ensayos de SRS.

Después de la inyección con **A8** (de 10^{-8} a 10^{-4} M) y la posterior exposición a IPA, se evaluó en diferentes grupos de abejas su capacidad de mostrar una respuesta de apetito tras la estimulación de las antenas con distintas concentraciones de sacarosa (de 0.1% a 30%). Como era de esperar, las abejas fueron más propensas a responder a medida que se aumentaba la concentración de sacarosa, pero esta progresión dependió del tratamiento (interacción dosis x [sacarosa]: $p = 0.035$). Si se observa la gráfica de la Figura II-12, los valores de puntuación media siguen una curva en forma de U, pero ninguna de las dosis a diferentes concentraciones de **A8** probadas pudo aumentar significativamente las capacidades de respuesta. De forma muy sutil, en comparación con el control de PBD, la puntuación más alta fue la de las abejas tratadas con **A8** a 10^{-4} M.

En definitiva, a dosis altas de **A8** se podría restaurar parcialmente el rendimiento sobre el aprendizaje y la motivación por obtener un 50% de sacarosa en abejas estresadas. Por lo tanto, el compuesto **A8** fue el seleccionado sobre el cual se estudiaron computacionalmente nuevas modificaciones estructurales, en busca de un candidato con posibles mejoras en los resultados experimentales.

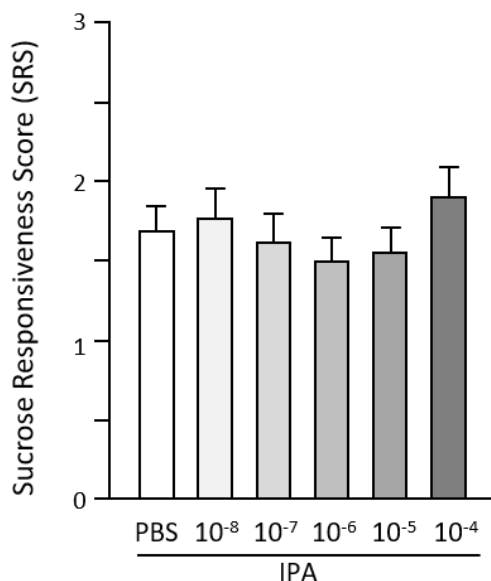


Figura II-12. Resultados del SRS: valores medios de puntuación de la sensibilidad a la sacarosa de abejas inyectadas con PBS o **A8** antes de la exposición al IPA (PBS: $n = 78$; **A8**: $n = 44-47$ /grupo).

II.1.8. Diseño de los nuevos compuestos B a partir del *hit* del cribado

A partir de las simulaciones con el compuesto **A8** y el modelo del farmacóforo del ASTA-R, se plantearon las diferentes modificaciones estructurales para diseñar una nueva familia de compuestos (Figura II-13). Concretamente, se planteó el estudio de dos factores para evaluar su influencia en la actividad final de las moléculas: (i) un trifluorometilo como clásico bioisómero enlazado al fragmento bicíclico de 1-(fenil)-1*H*-1,2,4-triazol, y (ii) la longitud de una cadena alquímica uniendo el sistema bicíclico con el fenilo terminal, la cual permitiera al fenilo adoptar diferentes conformaciones para interactuar con la cavidad hidrofóbica.

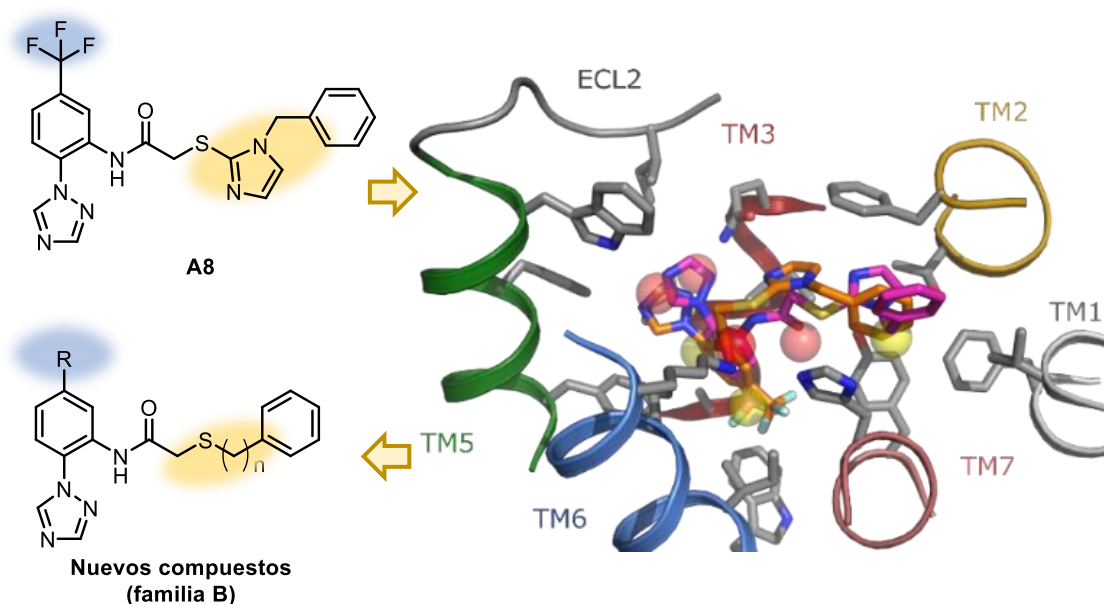


Figura II-13. Estructura molecular del compuesto *hit* **A8**, simulación de interacción del compuesto **A8** con el modelo farmacofórico del ASTA-R y planteamiento de la estructura común de la nueva familia de compuestos candidatos a mejorar la actividad del **A8** sobre el ASTA-R.

II.2. Objetivos

Los resultados prometedores, tanto *in vitro* como *in vivo*, obtenidos sobre el compuesto **A8** como posible inhibidor de la respuesta del estrés en abejas, hizo de su estructura un referente a modificar para crear una nueva familia de compuestos candidatos. Así, en la búsqueda de un antagonista de los ASTA-Rs para seguir profundizando sobre el conocimiento de los mecanismos de respuesta al estrés en las abejas, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) **Síntesis de la familia de compuestos B.** Las modificaciones principales sobre el compuesto **A8** consistieron en: (i) la sustitución del espaciador imidazol entre el tiol y el bencilo por una cadena alquílica ($n = 1, 2$ o 3); y (ii) la sustitución del trifluorometilo por un metilo (Figura II-14). Todas las conjugaciones posibles de estos nuevos factores plantearon una batería de seis nuevos compuestos que podrían mejorar la actividad del compuesto **A8**.

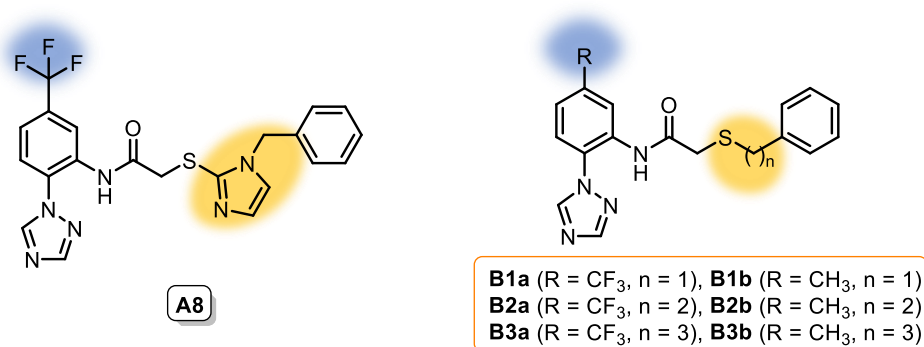


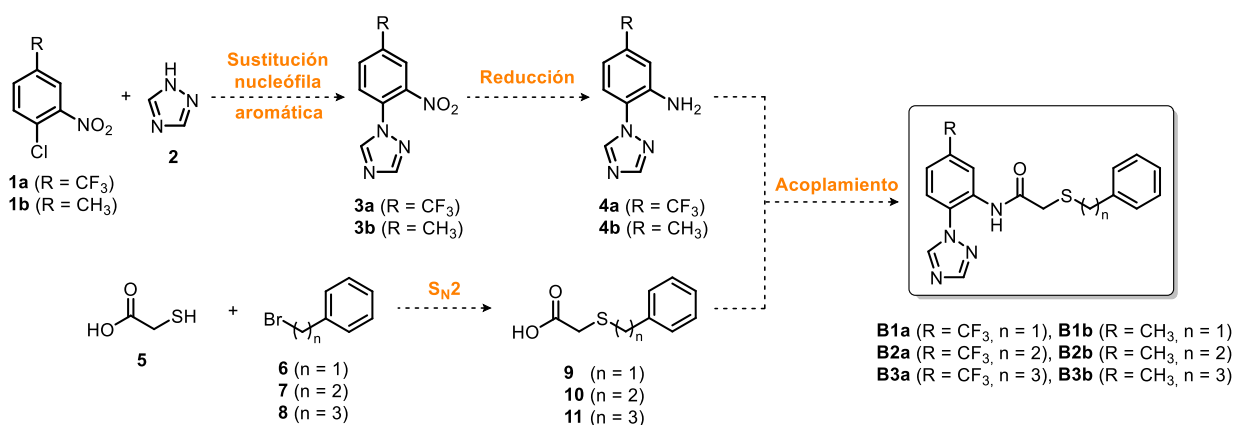
Figura II-14. Estructura molecular del compuesto **A8** del cual parten todos los diferentes compuestos de la familia **B**.

- 2) **Evaluar los compuestos B con abejas en experimentos *in vivo* de sensibilidad a la respuesta a la sacarosa (SRS),** bajo una situación de estrés. Con estos experimentos se podría evaluar la capacidad como antagonista de los nuevos compuestos **B** sintetizados.

II.3. Resultados y discusión

II.3.1. Ruta sintética para la obtención de los compuestos B

La secuencia para la obtención de las dos series de compuestos objetivo empezaría con una reacción de sustitución nucleófila aromática entre los halobencenos comerciales **1a** y **1b**, y el 1,2,4-triazol **2**, también comercial, para formar los nitrobenenos **3a** y **3b** (Esquema II-1). Seguidamente, el grupo nitro de estos compuestos sería reducido para obtener las aminas **4a** y **4b**. Por otra parte, los ácidos carboxílicos **9-11**, provendrían de una reacción de sustitución nucleófila bimolecular (S_N2) entre el ácido tioglicólico **5** y los bromoalcanos de diferente elongación **6-8**, todos comerciales. Finalmente, los compuestos objetivo **B1a-B3b** se obtendrían con la formación de un enlace amida entre las aminas **4a** y **4b**, y los diferentes ácidos carboxílicos **9-11**.

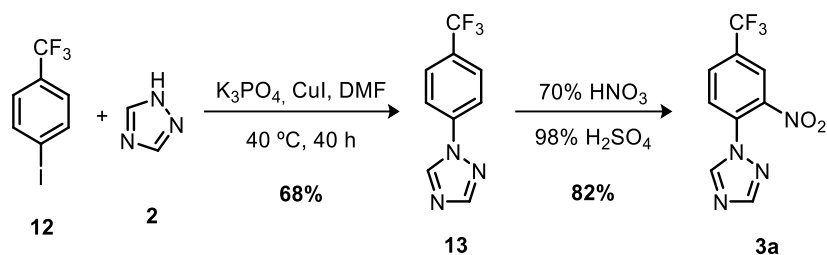


Esquema II-1. Ruta sintética planteada para obtener los nuevos candidatos a antagonistas de los ASTA-Rs.

II.3.1.1. Síntesis de los compuestos 3a y 3b

II.3.1.1.1. Metodología de Kommu *et al.*

La primera etapa de la ruta sintética fue la formación de los compuestos **3a** y **3b**. Inicialmente, para la obtención del intermedio **3a** se pensó en seguir la metodología descrita por Kommu *et al.* (Esquema II-2).³⁰ Ésta consistió en una reacción de acoplamiento catalizada por cobre entre los reactivos de partida comerciales 1,2,4-triazol y los yoduros de arilo *para*-sustituídos, usando el K₃PO₄ como base en el seno de *N,N*-dimetilformamida (DMF), seguida de una reacción sustitución electrófila aromática de nitración (S_EAr) con una mezcla de HNO₃/H₂SO₄. Cabe destacar, que este procedimiento no era aplicable para la obtención de **3b**, como los propios autores comprueban,³⁰ debido al distinto carácter electrónico y orientador de los grupos metilo y fluorometilo en la reacción de nitración.



Esquema II-2. Secuencia sintética para la síntesis del compuesto **3a** descrita por Kommu *et al.*

Tras varios experimentos siguiendo esta metodología, en los cuales se utilizaron reactivos de partida recién comprados y condiciones de atmósfera inerte de N₂, solo se obtuvo un máximo rendimiento del 6% para el compuesto **13**. En la bibliografía, Zhu *et al.*³¹ remarcan la importancia de lavar el CuI con tetrahidrofurano (THF) utilizando un Soxhlet para garantizar una actividad catalítica satisfactoria. Tras incluir esta nueva práctica dentro de la metodología seguida solo se mejoró el rendimiento final del compuesto **13** hasta un 18%.

La siguiente etapa consistió en una S_EAr de nitración del compuesto **13** utilizando HNO₃ al 70% y H₂SO₄ al 98% a 90 °C durante 24 horas obteniendo así el compuesto **3a** con un rendimiento del 79%.

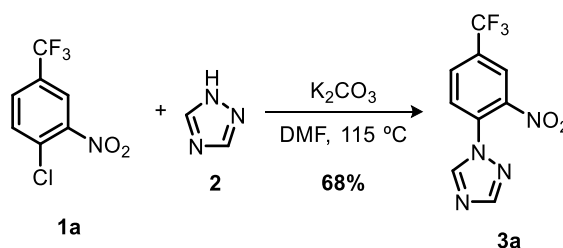
En el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (¹H RMN) del compuesto **13** se pudo observar como las señales de los cuatro protones del anillo aromático pasaron de estar separadas en dos dobletes a solaparse en un único multiplete a δ 7.82. Por otro lado, las señales de los dos protones del anillo de triazol quedaron desplazadas hacia la izquierda respecto a al espectro del producto de partida (PP). Tras la reacción de nitración, en el espectro de ¹H RMN del compuesto **3a** se pudo observar la aparición de tres señales de un protón cada una (dos dobletes y un singlete) en lugar del multiplete con integral de cuatro protones del anillo aromático del compuesto **13** comentado anteriormente. Este hecho elucidó el intercambio de uno de los protones aromáticos por un grupo nitro. Todos los datos espectroscópicos de los productos obtenidos coincidieron con los descritos en la bibliografía.^{30,32}

Debido a la baja reproducibilidad obtenida con la propuesta sintética de Kommu *et al.*, y así como que ésta no fuese extrapolable para la obtención de **3b**, se decidió buscar una nueva estrategia para la síntesis de los compuestos **3a** y **3b**.

II.3.1.1.2. Metodología de Zarudnitskii *et al.*

La metodología publicada por Zarudnitskii *et al.*³² (Esquema II-3) presentaba la síntesis del compuesto **3a** en una sola etapa de reacción y sin la utilización de catalizadores de cobre sensibles como en la de Kommu *et al.*

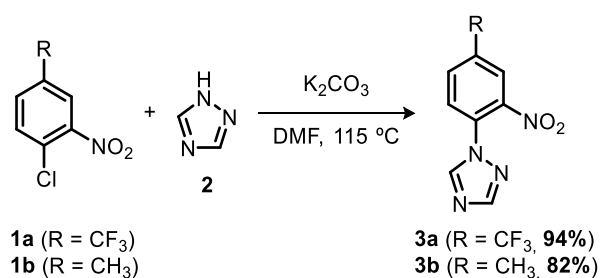
Esta reacción consistió en una sustitución nucleófila aromática entre el 1,2,4-triazol (**2**) y el cloro derivado aromático **1a**, donde el K_2CO_3 actúa como base para captar el ácido (H^+) generado. La presencia del grupo nitro posibilita que la reacción también pueda funcionar cuando como sustituyente en el cloro derivado aromático exista un metilo en lugar de un trifluorometilo.³³



Esquema II-3. Síntesis del compuesto **3a** descrita por Zarudnitskii *et al.*³²

Así pues, los compuestos **3a** y **3b** fueron obtenidos con una reacción de sustitución nucleófila aromática entre los halobencenos comerciales **1a** y **1b**, y el 1,2,4-triazol **2**, utilizando K_2CO_3 como base en el seno de DMF a 115 °C. El tiempo de reacción fue de 2 h para el compuesto **3a** y de una noche para el **3b**. El aumento del tiempo de reacción de 0.5 h (descrito en la bibliografía) a 2 h incrementó el rendimiento de la reacción al 94%, en comparación al 68% descrito por Zarudnitskii *et al.* El rendimiento obtenido para el **3b** fue del 82% (Esquema II-4).

El espectro de 1H RMN del **3b** fue muy parecido al de su análogo trifluorametilado **3a**. La señal del carbono del que soportaba al grupo nitro en el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C RMN) mostró un desplazamiento químico (δ 144.5) muy superior al del resto de carbonos aromáticos. La estructura del compuesto **3b** fue elucidada gracias a la caracterización por RMN de 1H y ^{13}C .

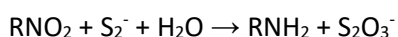


Esquema II-4. Condiciones de reacción utilizadas para la síntesis de los compuestos **3a** y **3b**.

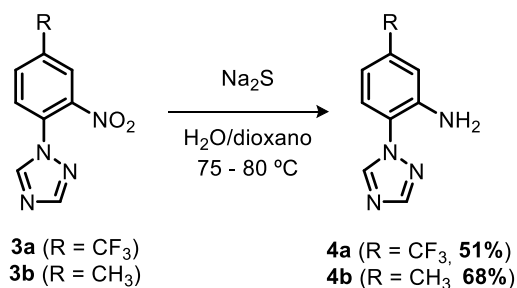
II.3.1.2. Síntesis de las aminas **4a** y **4b**

La siguiente etapa de la ruta sintética consistió en la reducción de los grupos nitro de los compuestos **3a** y **3b** en sus correspondientes aminas primarias. En primera instancia se pensó en la utilización de H₂ catalizado por Pd/C en acetato de etilo (EtOAc). Sin embargo, al realizar diferentes pruebas se observó en todas ellas productos de degradación como resultado.

Entre las muchas alternativas a la utilización de H₂ como reductor, algunos estudios ponen de manifiesto la eficacia del sulfuro de sodio (Na₂S) como agente reductor de grupos nitro aromáticos, en el seno de una mezcla de agua y disolventes orgánicos.³⁴ En nuestro grupo de investigación es común utilizar una mezcla de agua/dioxano para este tipo de reacciones.³⁵ En el artículo de Bullock y Forbes se planteó la siguiente ecuación global donde se observa la importancia de utilizar una mezcla acuosa/orgánica, ya que interviene un mol de agua por cada mol de reactivo, a la vez que el disolvente orgánico permite la disolución de los reactivos.³⁶



Por lo tanto, **3a** y **3b** fueron tratados con Na₂S en una mezcla desgasificada de agua/dioxano a partes iguales durante 3 h y a 75 - 80 °C. De esta manera se obtuvieron las aminas **4a** y **4b**, con un rendimiento del 51% y 68% respectivamente (Esquema II-5).



Esquema II-5. Condiciones de reacción de la reducción de nitrobenzenos para la preparación de los compuestos **4a** y **4b**.

Al comparar los espectros de ¹H RMN de los productos respecto a sus correspondientes reactivos de partida, se pudo observar una reducción de los desplazamientos químicos de todas las señales. La más destacada fue la del protón en *orto* al grupo reducido (el H-3' para el **3a** y el H-6 en el caso del **4a**) que fue el que sufrió una influencia más grande por la transformación de un grupo electroceptor (nitro) a un grupo electrodonador (amino).

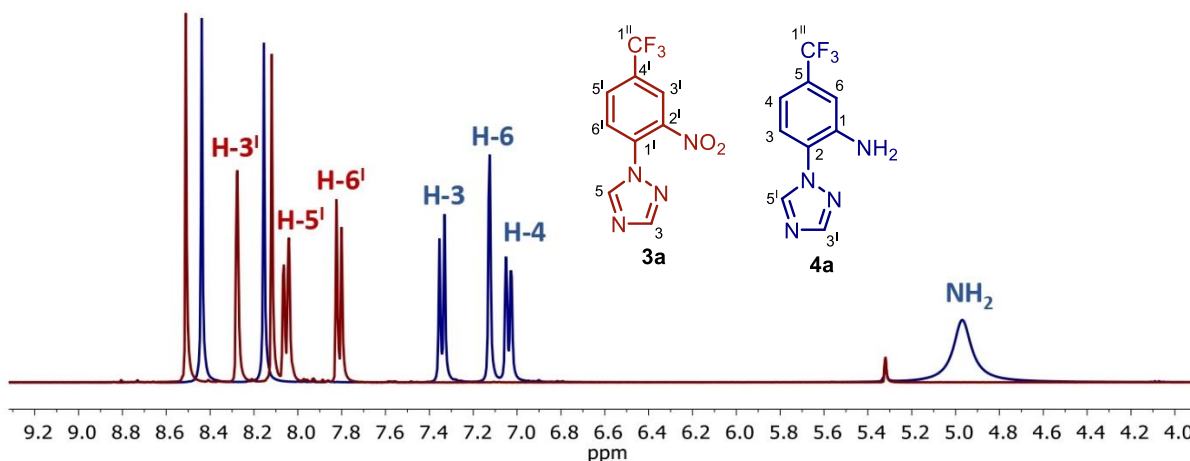


Figura II-15. Espectros de ^1H RMN de los compuestos **3a** (granate) y **4a** (azul) superpuestos. Los compuestos **3b** y **4b** siguen la misma tendencia.

También cabe destacar la aparición de una señal amplia que integraba 2 H con un desplazamiento químico de δ 4.97 en el caso del **4a** y δ 4.41 en el del **4b**. Esta señal correspondía a los dos protones de la amina primaria, $-\text{NH}_2$ (Figura II-15). El espectro de ^1H RMN del compuesto **4a** coincidió correctamente con los datos espectroscópicos publicados por Zarudnitskii *et al.*³²

La estructura del compuesto **4b** se pudo elucidar gracias a una completa caracterización por RMN de ^1H y ^{13}C y sus experimentos de correlación bidimensionales correspondientes. Gracias al experimento de HSQC se pudieron asignar los protones con sus carbonos correspondientes. El resto de las señales se asignaron por comparativa con el compuesto trifluorometilado **4a**.

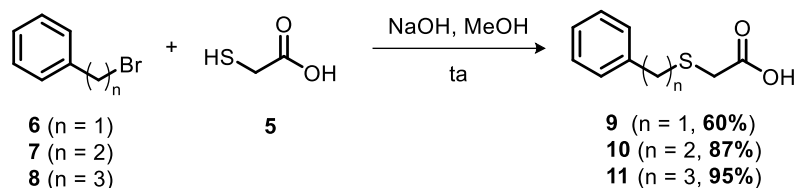
II.3.1.3. Síntesis de los ácidos carboxílicos 9-11

Los diferentes ácidos carboxílicos fueron sintetizados siguiendo la metodología publicada por Ning *et al.*³⁷ a partir de una reacción de $\text{S}_{\text{N}}2$ entre el ácido tioglicólico **5** y los diferente bromoalcanos **6-8**, todos comerciales, usando hidróxido de sodio (NaOH) como base en el seno de metanol (MeOH) a temperatura ambiente durante 3 horas (Esquema II-6).

Aprovechando que en el crudo de reacción el producto se encontraba en forma de carboxilato, se realizaron lavados del crudo con EtOAc para eliminar todas las impurezas orgánicas. Finalmente, tras una acidificación del medio y unos lavados con agua, se obtuvieron los ácidos carboxílicos **9-11** con una gran pureza y unos rendimientos de entre 60% - 95%. Los espectros de ^1H RMN de los compuestos **9-11** concordaron con los descritos por Ning *et al.*³⁷ Los rendimientos de los compuestos **10** (87%) y **11** (95%) fueron ligeramente superiores a los descritos en la bibliografía (85% para **10** y 90% para **11**). En

II.3 Resultados y discusión

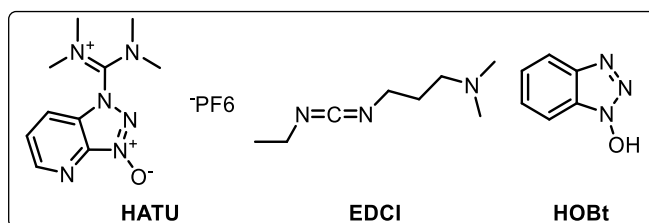
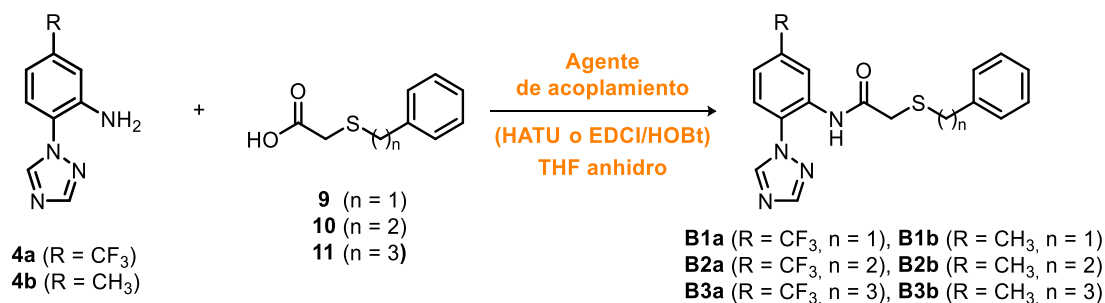
cambio, para el compuesto **9** (60%) no se consiguió alcanzar el rendimiento de 93% descrito en la bibliografía.



Esquema II-6. Reacción de S_N2 para la síntesis de los diferentes ácidos carboxílicos **9-11**.

II.3.1.4. Síntesis de los compuestos finales B1a-B3b

Una vez obtenidas las aminas **4a** y **4b** y los diferentes ácidos carboxílicos **9-11**, llegó el momento de unir estos dos fragmentos, en sus distintas posibles combinaciones, mediante la formación de las correspondientes amidas, para así obtener los seis nuevos candidatos a antagonistas de los ASTA-Rs. Para ello, inicialmente se pensó en activar los ácidos carboxílicos implicados mediante la utilización de diversos agentes de acoplamiento. En primer lugar, se realizó la reacción utilizando dos agentes de acoplamiento, en concreto se usó la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) acoplada con 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), y la sal de hexafluorofosfato azabenzotriazol tetrametil uronio (HATU) (Esquema II-7).



Esquema II-7. Formación del enlace amida con agentes de acoplamiento y estructuras del HATU, EDCI y HOBT.

exp. ^a	amina	á. carboxílico	reactivos	eq.	eq. base	prd.	rdt. (%)
1	4a	9	1.5 EDCI/HOBt	1.5/1.5	4	-	-
2	4a	9	1.5 HATU	1.5	4	-	-
3	4a	10	1.3 EDCI/HOBt	1.3 /1.3	4	-	-
4	4a	10	1.5 HATU	1.5	4	B2a	-
5	4a	11	1.7 EDCI/HOBt	1.7 /1.5	4	B3a	5
6	4a	11	1.7 HATU	1.6	4	B3a	26
7	4b	9	1.6 EDCI/HOBt	1.4/1.4	3.7	B1b	30
8	4b	9	1.6 HATU	1.6	5	B1b	60
9	4b	10	1.5 EDCI/HOBt	1.5/1.5	4	B2b	35
10	4b	10	1.5 HATU	1.5	3.9	B2b	83
11	4b	11	1.5 EDCI/HOBt	1.5/1.5	4	B3b	16
12	4b	11	1.5 HATU	1.5	4	B3b	50

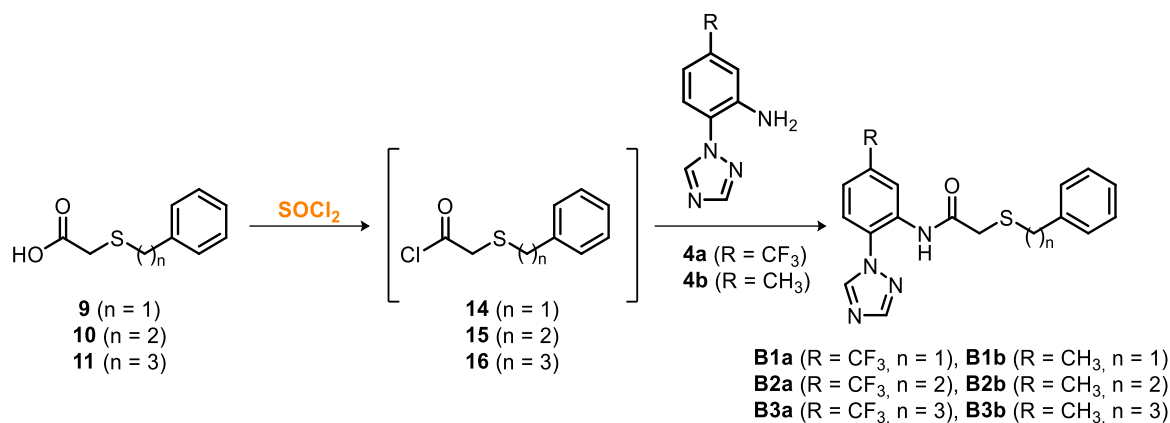
^a Todos los experimentos se realizaron utilizando *N,N*-diisopropilamina (DIPEA) como base, en el seno de THF anhidro a temperatura ambiente y durante una noche en agitación.

Tabla II-1. Resultados de los experimentos de formación del enlace amida usando agentes de acoplamiento.

En la tabla de resultados (Tabla II-1), se pueden observar unas tendencias claras. En los experimentos con la amina **4a** (-CF₃), independientemente de si se utilizó HATU o EDCI/HOBt, no se observó la formación de la amida correspondiente, excepto en el caso de los experimentos 5 (EDCI/HOBt) y 6 (HATU), donde se usó el ácido carboxílico **11** (n = 3) y se obtuvo el compuesto **B3a** con rendimiento del 5% y del 26% respectivamente.

Sin embargo, cuando se aplicaron condiciones de reacción parecidas utilizando la amina **4b** (-CH₃) en todos los casos se obtuvieron las correspondientes amidas con rendimientos variables, y además se obtuvieron mejores resultados utilizando HATU que al emplear EDCI/HOBt. Así, en los experimentos 7, 9 y 11, donde se utilizó EDCI/HOBt sobre los distintos ácidos carboxílicos **9-11**, los rendimientos obtenidos fueron del 30%, 35% y 16%, para los compuestos **B1b-B3b** respectivamente. En cambio, para los experimentos 8, 10 y 12, al utilizar HATU en los mismos ácidos carboxílicos, los rendimientos obtenidos fueron 60%, 83% y 50%, para los compuestos **B1b-B3b** respectivamente.

Con el fin de poder obtener las amidas derivadas de **4a** que no se habían conseguido sintetizar, y de mejorar los rendimientos de las amidas derivadas de **4b**, se procedió a activar los correspondientes ácidos carboxílicos utilizando cloruro de tionilo (SOCl₂) en el seno de diclorometano (CH₂Cl₂). A continuación se realizó la reacción de formación de las amidas a partir de las aminas **4a** y **4b** (Esquema II-8), obteniéndose unos resultados bastante distintos a los observados con la utilización de los agentes de acoplamiento (Tabla II-2).



Esquema II-8. Obtención de las amidas finales con derivados de cloruros de acilo.

NH ₂	Formación del cloruro de acilo ^a			base	disv.	T	t. (h)	prod.	rdt. (%)			
	ác. carbox.	eq. SOCl ₂	disv.									
1	4a	9	1.3	1.4	CH ₂ Cl ₂	piridina	1.2	CH ₂ Cl ₂	amb.	1	B1a	12
2	4a	9	1.2	1.4	CH ₂ Cl ₂ ^b	piridina	1.2	CH ₂ Cl ₂	amb.	1	B1a	19
3	4a	10	1.2	1.4	CH ₂ Cl ₂ ^b	DIPEA	1.2	CH ₂ Cl ₂	amb.	3	B2a	8
4	4a	10	1.5	2.1	CH ₃ CN anh. ^b	DIPEA	1.5	CH ₃ CN anh	amb.	1	-	-
5	4a	9	1.2	1.7	CH ₂ Cl ₂ anh. ^b	DIPEA	1.2	CH ₃ CN anh	reflujo	1	B1a	33
6	4a	9	2	2.4	CH ₂ Cl ₂ anh. ^b	DIPEA	2	CH ₃ CN anh	reflujo	5	B1a	83
7	4a	10	2.5	3	CH ₂ Cl ₂ anh. ^b	DIPEA	2	CH ₃ CN anh	reflujo	6	B2a	60
8	4a	11	2	2.6	CH ₂ Cl ₂ anh. ^b	DIPEA	2	CH ₃ CN anh	reflujo	6	B3a	56
9	4b	9	2	2.5	CH ₂ Cl ₂ anh. ^b	DIPEA	2	CH ₃ CN anh	reflujo	5	B1b	15
10	4b	10	1.5	2.5	CH ₂ Cl ₂ anh. ^b	DIPEA	2	CH ₃ CN anh	reflujo	5	B2b	17
11	4b	11	2	6	CH ₂ Cl ₂ anh. ^b	DIPEA	2	CH ₃ CN anh	reflujo	4	B3b	55

^a En todos los experimentos la formación del cloruro de acilo se ha realizado a temperatura de reflujo durante 4 h.

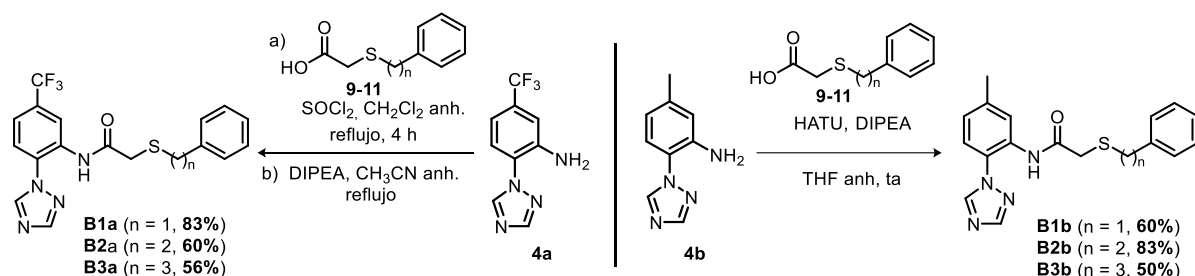
^b Adición de 2 - 3 gotas de DMF como catalizador.

Tabla II-2. Resultados de los experimentos de la formación del enlace amida usando cloruros de acilo.

El estudio se inició empleando como amina el compuesto **4a**, dado los malos resultados previos comentados en la obtención de sus correspondientes amidas con agentes de acoplamiento. Así, en un primer experimento se utilizaron unas condiciones de reacción que se podrían catalogar como estándar; esto sería, formación del cloruro de acilo con SOCl₂ en CH₂Cl₂ y posterior reacción con la amina en CH₂Cl₂ utilizando un equivalente de base adicional, obteniéndose un bajo rendimiento (12%) de la amida esperada (Tabla II-2, entrada 1).

A continuación, se procedió a cambiar distintas condiciones de reacción (entradas 2 a 6). Por una parte, el cambio del disolvente en la formación del cloruro de acilo de CH₂Cl₂ a acetonitrilo (CH₃CN) fue contraproducente (entrada 4). En otros casos, se consiguió mejorar el resultado final, cómo al introducir DMF catalítico en la formación de cloruro de acilo³⁸ (entrada 2) o cambiar el disolvente y temperatura en la reacción de amidación de CH₂Cl₂ a 20 °C, por un reflujo de CH₃CN (entrada 5). Por último, al aumentar los equivalentes de cloruro de acilo y base utilizadas, también se consiguió una mejora clara del rendimiento hasta el 83% con el ácido **9** (entrada 6).

Una vez optimizadas las condiciones de reacción, se procedió a la aplicación de éstas para la formación de todos los compuestos. En el caso de la familia de moléculas con el sustituyente trifluorometilo, al aplicar las condiciones sobre los ácidos **10** y **11** con la amina **4a** se obtuvieron los productos **B2a** y **B3a**, con rendimientos del 60% y 56%, respectivamente. En cambio, en el caso de la familia con sustituyente metilo los rendimientos obtenidos fueron inferiores. Al tratar los ácidos **9-11**, y la amina **4b**, con las mismas condiciones de reacción, se obtuvieron los productos **B1b**, **B2b** y **B3b**, con diferentes rendimientos del 15%, 17% y 55%, respectivamente.



Esquema II-9. Condiciones de reacción escogidas para la formación de los compuestos finales **B1a-B3b**.

En el Esquema II-9 quedan resumidos los mejores resultados obtenidos en la síntesis de las amidas objetivo. En el caso de utilizar la amina **4a**, los resultados más satisfactorios se obtuvieron activando los ácidos en forma de los correspondientes cloruros de acilo. Por el contrario, las condiciones óptimas encontradas para la formación del enlace amida con la amina con sustituyente metilo **4b** fueron la utilización del agente de acoplamiento HATU en THF anhidro.

En todos los espectros de ^1H RMN de los productos finales se observó la desaparición de la señal de los dos protones de la amina primaria y la aparición de una nueva señal que integraba 1 H y con desplazamientos químicos de entre δ 9.97 - 10.60. Esta señal correspondía al protón que soporta el nitrógeno del enlace amida. En los espectros bidimensionales de HMBC de los compuestos trifluorometilados también se puede distinguir como el protón de la amida tiene una ligera interacción tanto con el carbonilo (C_1) como con los carbonos aromáticos $\text{C}_{6\text{III}}$ y $\text{C}_{2\text{III}}$ (Figura II-16).

Todos los compuestos finales obtenidos fueron elucidados estructuralmente a partir de experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C , y sus correspondientes correlaciones bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY), y en el caso de la familia con sustituyente trifluorometilo, también mediante espectros de resonancia magnética de flúor (^{19}F RMN). La asignación de los carbonos de los compuestos trifluorometilados resultó más sencilla que la de los compuestos metilados debido al desdoblamiento en forma de

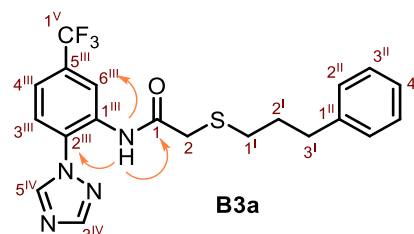


Figura II-16. Correlaciones observadas en el espectro de HMBC del compuesto **B3a**.

II.3 Resultados y discusión

cuadruplete que presentaban los carbonos contiguos al trifluorometilo, y que permitían diferenciarse de los del fenilo terminal. Todos los datos de los experimentos de espectroscopia de masas ESI (+) concuerdaron perfectamente con los esperados.

En definitiva, todos los nuevos compuestos candidatos a antagonistas del ASTA-R fueron obtenidos mediante una síntesis convergente de cuatro etapas. La familia de compuestos con sustituyente trifluorometilo presentó unos rendimientos globales del 40%, 29% y 27% para los compuestos **B1a**, **B2a** y **B3a**, respectivamente. Para la familia de moléculas con sustituyente metilo, los rendimientos globales fueron del 33%, 46% y 28% para los correspondientes compuestos **B1b**, **B2b** y **B3b** (Figura II-17).

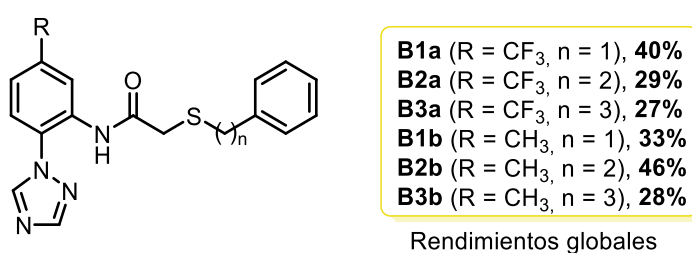


Figura II-17. Rendimientos globales de los compuestos finales candidatos a ser antagonistas de ASTA-R.

Una vez lograda la síntesis de todos los compuestos objetivo se dio paso a los experimentos *in vitro* e *in vivo* para poder comprobar su eficacia como antagonistas del ASTA-R.

II.3.2. Evaluación de la actividad biológica de los nuevos compuestos B

II.3.2.1. Experimentos de competitividad de los compuestos B vs. ASTs-Dy647 en ASTA-R, *in vitro*.

Los experimentos *in vitro* de competitividad entre los compuestos de la familia **B** y alarostatinas en ASTA-R se llevaron a cabo a cargo de la Dra. Veronique Gigoux en el CRCT en Toulouse. La habilidad de estos nuevos ligandos para interactuar con los ASTA-Rs fue evaluada en células HEK293T, en ensayos de competitividad, y cuantificados por fluorescencia asociada a las células (Figura II-18). Esta vez, a diferencia de para la primera serie de compuestos **A**, se utilizaron alarostatinas-Dy647 marcadas con un fotosensibilizador fluorescente, en lugar de las ¹²⁵I-alarostatinas marcadas con yodo radiactivo. Por lo tanto, la cuantificación de la fluorescencia asociada a las células se determinó usando un citómetro de flujo.

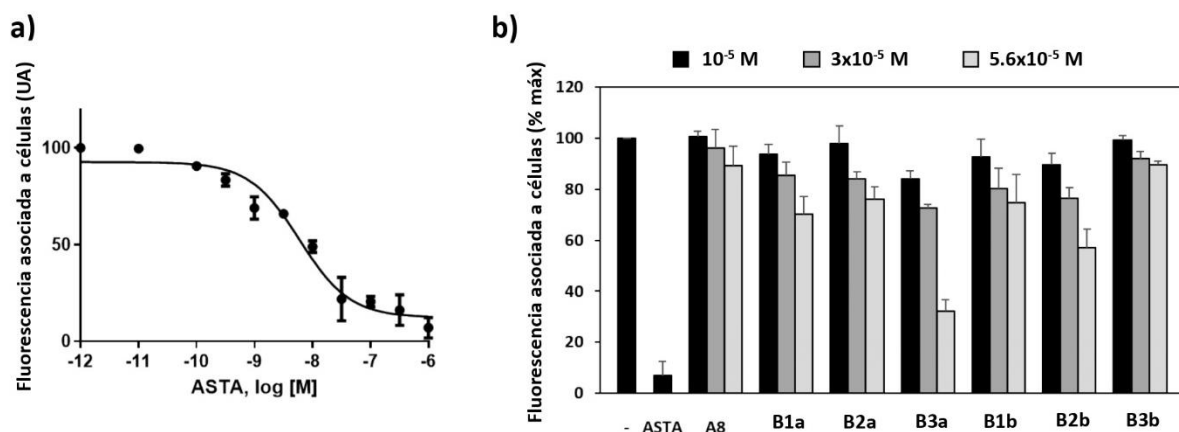


Figura II-18. a) Curva de la competición de las ASTA en células HEK293T. b) Resultados (% máx.) para los compuestos de la familia **B** en comparación con las ASTAs (10⁻⁵ M) y el **A8** (5 replicados).

En los seis casos las afinidades fueron bajas, como indican los valores de IC₅₀ superiores a concentraciones de 10⁻⁵ M (Figura II-19). Solo en el caso de los compuestos **B3a** y **B2b** aparecen afinidades que están levemente mejoradas en comparación a las de **A8**, pero todavía muy lejos de los valores de los ligandos endógenos ASTA.

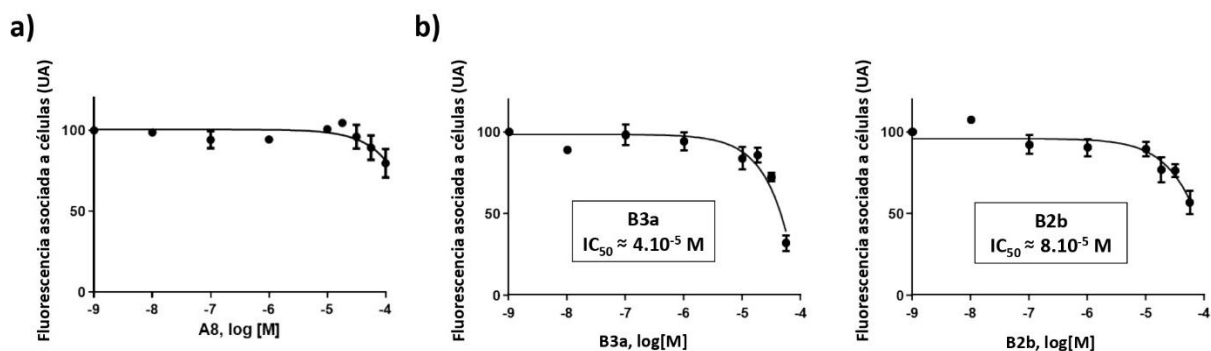


Figura II-19. a) Curva de competición para **A8**. b) Curvas de competición y valores de IC₅₀ obtenidos para **B3a** y **B2b** (5 replicados).

II.3.2.2. Experimentos de comportamiento de las abejas frente al estrés, *in vivo*

La primera parte de estos experimentos se llevó a cabo durante la primavera del 2018 en una estancia en el CRCA, en la Universidad de Paul-Sabatier III en Toulouse, bajo la tutoría del Dr. Jean-Marc Devaud. A posteriori, estos experimentos fueron complementados por estudiantes del centro.

Para los compuestos de la familia **B** no se realizaron experimentos de aprendizaje, sino que solo se realizaron experimentos de cuantificación del apetito del tipo SRS, de la misma forma que para la serie **A**. Los SRS son menos complejos que los experimentos de aprendizaje y permiten un cribado entre compuestos más rápido que realizando experimentos de aprendizaje (información detallada sobre el procedimiento experimental; capítulo VI.2.4.).

Al igual que para la serie de compuestos **A** obtenida del cribaje, todos los datos estadísticos fueron evaluados a través de un ANOVA de un factor (F: cociente de dos varianzas). Con el propósito de comparar la eficacia relativa de estas moléculas, todos los controles que se hicieron inyectando una solución de PBS sin compuestos **B** fueron agrupados en un grupo control común, ya que no había diferencias significativas entre los respectivos grupos de control ($F_{6,5305} = 0.764$; $p = 0.577$). Las tendencias de respuesta en el rango de concentraciones de sacarosa se pueden visualizar en la Figura A-II-2 del anexo.

En general, aunque las abejas respondían con más frecuencia a medida que la concentración de sacarosa aumentaba ($F_{5,5305} = 513.3$; $p < 0.001$), su sensibilidad se vio afectada de forma diferente para las seis moléculas probadas ($F_{6,1061} = 6.11$; $p < 0.001$). En el caso de los compuestos **B2a**, **B1a** y **B1b**, las proporciones de abejas que respondieron tiende a disminuir después del tratamiento, pero sin ninguna dependencia obvia a la dosis. Al contrario, **B3a**, **B2b** y **B3b** parecieron mejorar la respuesta a la sacarosa en dosis más altas (Figura II-20). Solo para los compuestos **B2b** y **B3b** se reveló un efecto dependiente de la dosis de forma significativa (**B2b**: $F_{4,340} = 4.06$; $p = 0.003$; **B3b**: $F_{4,337} = 2.75$; $p = 0.029$). Como medio para determinar el rango eficiente de concentraciones de **B2b** y **B3b**, se realizaron múltiples comparaciones entre cada dosis y el grupo de PBS. Como resultado, **B2b** indujo una mejora significativa de la capacidad de respuesta de la sacarosa en dosis que van de 10^{-7} a 10^{-5} M (10^{-7} : $F_{1,240} = 7.92$; $p = 0.005$; 10^{-6} : $F_{1,237} = 6.76$; $p = 0.010$; 10^{-5} : $F_{1,247} = 8.05$; $p = 0.005$), y **B3b** lo hizo solo para 10^{-5} M ($F_{1,240} = 9.64$; $p = 0.002$).

También se comparó el efecto de **B2b** y **B3b** a dosis altas de 10^{-4} M con el de **A8** a la misma concentración. Los resultados mostraron que ninguno de los dos compuestos mejoraba la respuesta a la sacarosa a esta alta concentración en comparación con el **A8**, siendo 10^{-4} M la concentración que proporciona un efecto más elevado ($F_{1,267} = 9.64$; $p = 0.002$).

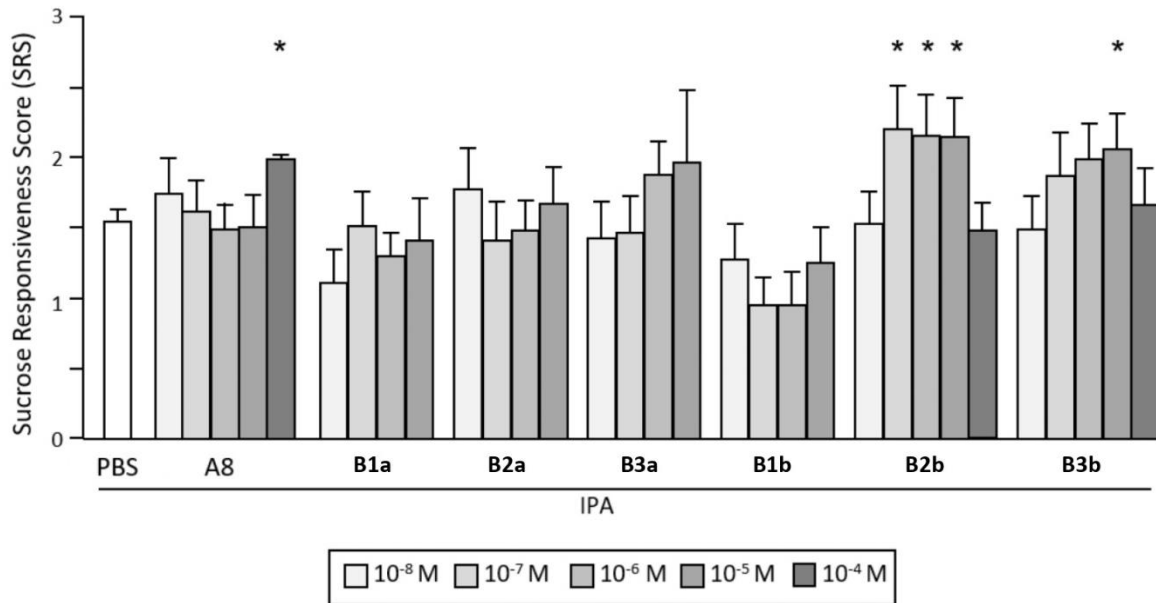


Figura II-20. Comparación de la media de los SRS en abejas inyectadas con PBS, **A8** o con los compuestos **B** (entre 10^{-8} y 10^{-4} M), y luego expuestas al IPA (2 replicados). *: $p < 0.0125$. (PBS: $n = 186$; compuestos **B**: 28-41/grupo).

Así pues, **B2b**, y **B3b** en menor medida, demostraron ser eficaces para reducir los efectos del estrés sobre el apetito, a dosis más bajas que para **A8**.

II.3.2.3. Capacidad de **B2b** y **B3b** como antagonistas de la señalización de las ASTAs, *in vitro*

Dado que los compuestos **B2b** y **B3b** contrarrestaban los efectos del comportamiento frente al estrés, se planteó la hipótesis de que este hecho podría ser provocado por la inhibición de las ASTAs como una supuesta señalización del estrés. Por lo tanto, se probó su capacidad para modular la acción de la ASTAs sobre sus receptores en células transfectadas. Dado que ha sido demostrado que el ASTA-R está acoplado al subtipo $G\alpha i^{22}$ que disminuye la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) a través de la inhibición de la adenilil ciclasa o ciclasa de adenilato (AC), se trataron las células con forskolina, que activa la AC y aumenta los niveles intracelulares de AMPC, en presencia o ausencia de ASTA y/o los compuestos **B2b** y **B3b**.

Como se indica en la Figura II-21, la ASTA disminuyó significativamente los niveles de AMPC intracelular inducidos por forskolina en un $32.2 \pm 8.2\%$ ($p = 0.0045$). En presencia de **B2b** ($10 \mu\text{M}$: $p = 0.013$, $56.5 \mu\text{M}$: $p = 0.0002$) o **B3b** ($10 \mu\text{M}$: $p = 0.0007$), esta capacidad de la ASTA para inhibir la AC se redujo significativamente, por lo que la producción de AMPC fue similar a las de los grupos control. Es importante destacar que, en ausencia de ASTA, ni **B2b** ni **B3b** solos, podrían disminuir los niveles de AMPC intracelulares inducidos por forskolina.

II.3 Resultados y discusión

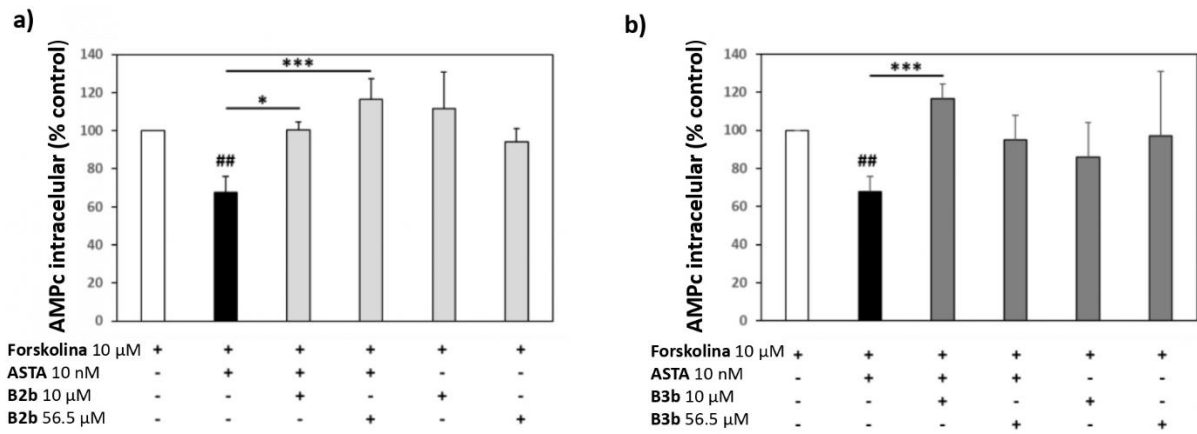
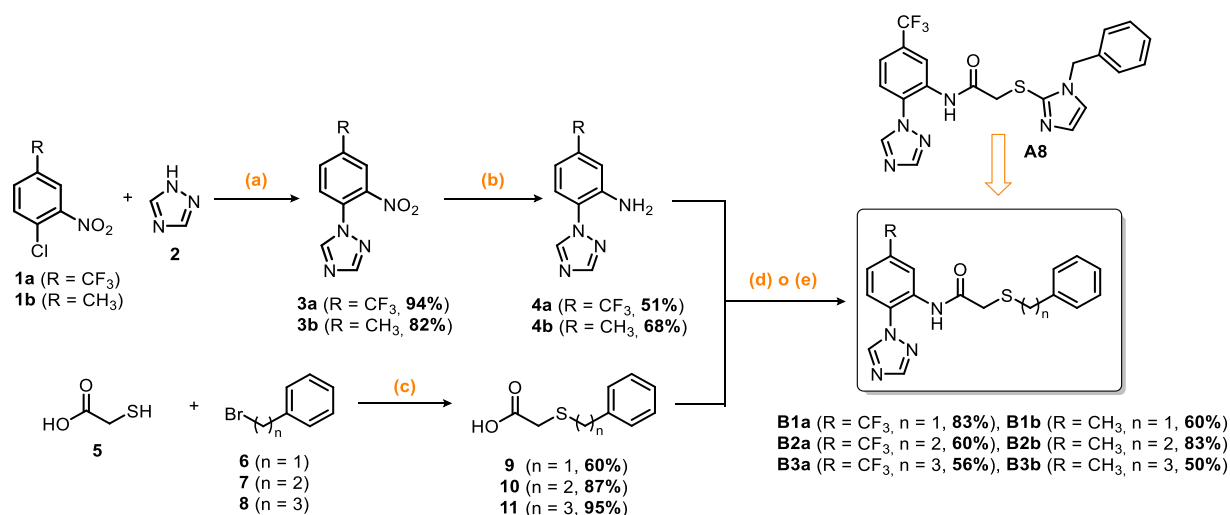


Figura II-21. Niveles relativos de AMPc intracelular inducido por forskolina (expresados como porcentajes de los niveles de control, es decir, solo con forskolina). #: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.0005$ (al menos 5 replicados por combinación).

Estos resultados sugieren que tanto **B2b** como **B3b** actúan como antagonistas de la señalización de las ASTAs al interactuar con el ASTA-R.

II.4. Resumen y conclusiones

En el momento de iniciarse este capítulo de la tesis, los estudios de modelización y de actividad *in vitro* e *in vivo* habían llevado a considerar el compuesto **A8** como una molécula a partir de la cual poder desarrollar antagonistas eficientes del ASTA-R. Además, mediante nuevos estudios de modelización partiendo de dicha molécula se había propuesto una nueva familia de compuestos tipo **B** como posibles candidatos a tener una actividad mejorada a la vez que una estructura molecular más sencilla. En la presente tesis, se han diseñado una serie de 6 compuestos basados en **B**, y se ha procedido a su obtención mediante una misma secuencia sintética de 4 etapas (Esquema II-10). Para los compuestos con sustituyente trifluorometilo **B1a-B3a**, la generación del enlace amida se ha llevado a cabo utilizando cloruros de acilo y se obtuvieron unos rendimientos totales de la ruta sintética del 29%, 27% y 40% respectivamente. En el caso de los compuestos con sustituyente metilo **B1b-B3b**, la creación del enlace amida fue realizada con agentes de acoplamiento y se obtuvieron unos rendimientos totales de la ruta sintética del 33%, 46% y 28%, respectivamente.



Esquema II-10. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la familia **B**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) K₂CO₃, DMF, 115 °C; (b) Na₂S, H₂O/dioxano, 75 °C; (c) NaOH, MeOH, ta; (d) i) SOCl₂, CH₂Cl₂ anh., T. reflujo, 4 h; ii) DIPEA, CH₃CN anh., T reflujo; (e) HATU, DIPEA, THF anh. *overnight*.

De todo el trabajo realizado para lograr sintetizar los nuevos antagonistas del ASTA-R se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los compuestos sustituidos con el trifluorometilo son menos reactivos frente a los agentes de acoplamiento que los sustituidos con metilo. Al tratarse de aminas menos nucleófilas, su síntesis ha requerido del uso de cloruros de acilo, para poder formar las amidas finales
- El agente de acoplamiento HATU ha sido con el que mejores resultados se ha obtenido en la reacción de acoplamiento tipo amida con los compuestos **B**.

Los compuestos de la familia **B** fueron evaluados en experimentos de competitividad en ASTA-R frente a ASTs-Dy647, y solo en el caso de los compuestos **B3a** y **B2b** se mostraron afinidades levemente mejoradas en comparación a las de **A8**, pero todavía muy lejos de los valores de los ligandos endógenos ASTA. Por otro lado, los compuestos **B** fueron evaluados en experimentos *in vivo* en abejas durante una estancia en el CRCA de la Universidad Paul-Sabatier III de Toulouse. Estos experimentos se basaron en los SRS en abejas estresadas y dieron como resultado que el compuesto **B2b**, y **B3b** en menor medida, son eficaces para reducir los efectos del estrés sobre el apetito, a dosis más bajas que para **A8**.

Finalmente, se evaluó la capacidad de **B2b** y **B3b** como antagonistas de la señalización de la ASTA midiendo la producción de AMPc en células transfectadas tratadas con forskolina, ASTA y los compuestos a estudio. En presencia de **B2b** y **B3b** la producción de AMPc fue similar a las de los grupos control y mucho mayor que con las células tratadas solo con ASTA, por lo que se demostró su capacidad como antagonistas.

Así pues, la sustitución del grupo trifluorometilo del **A8** por un metilo, grupo común tanto en el **B2b** como en el **B3b**, parece ser el cambio con mayor impacto, debido a que ninguno de los derivados fluorados parece tener un efecto interesante en el comportamiento de las abejas. Además, la longitud de entre 2 y 3 átomos de carbono en la cadena que conecta el fenilo terminal parece ser óptima, ya que el **B1b** con una cadena de un único metileno no ofrece un efecto claro sobre el comportamiento. Curiosamente, **B3a**, con su cadena de 3 átomos, es el único compuesto fluorado que presenta cierta tendencia positiva a responder de forma dependiente a la dosis en los SRS. Como el compuesto fluorado **B3a** también presenta cierta afinidad por el receptor en los ensayos *in vitro*, cuesta relacionar esta sustitución de trifluorometilo por metilo con la especificidad química, las propiedades de unión con el receptor y los efectos fisiológicos, de forma simultánea. Hay varias posibles explicaciones para estas discrepancias. La conformación real del receptor *in vivo* podría ser más favorable para la interacción del compuesto **B2b**, o que los compuestos sin flúor podría mostrar una mejor permeabilidad (y por lo tanto eficiencia) debido a su menor hidrofobicidad.^{39,40}

Cabe destacar, que todavía serían necesarios más experimentos en un futuro para evaluar otros parámetros de comportamiento de la respuesta al estrés y poder afirmar con rotundidad las hipótesis planteadas. Este trabajo podría ser un primer paso hacia una nueva dirección en el estudio de nuevos ligandos de los receptores de insectos.

II.5 Referencias del capítulo II

- (1) Brady, S. G.; Sipes, S.; Pearson, A.; Danforth, B. N. *Proc. R. Soc. B.* **2006**, *273*, 1643-1649.
- (2) García Paoloni, M. S. *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional del Sur, 2021.
- (3) Michener, C. D. *The bees of the world*, 2a ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2007.
- (4) Spivak, M.; Mader, E.; Vaughan, M.; Euliss, N. H. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 34-38.
- (5) Ollerton, J.; Winfree, R.; Tarrant, S. *Oikos* **2011**, *120*, 321-326.
- (6) Tirado, R.; Simon, G.; Johnston, P. *El declive de las abejas: Peligros para los polinizadores y la agricultura de Europa*, Greenpeace, Amsterdam, 2013.
- (7) Kluser, S.; Neumann, P.; Chauzat, M. P.; Pettis, J. S. *Global honeybee colony disorder and other threats to insect pollinators*, UNEP, 2010.
- (8) Potts, S. G.; Biesmeijer, J. C.; Kremen, C.; Neumann, P.; Schweiger, O.; Kunin, W. E. *Trends Ecol. Evol.* **2010**, *25*, 345-353.
- (9) Lebuhn, G.; Droege, S.; Connor, E. F.; Gemmill-Herren, B.; Potts, S. G.; Minckley, R. L.; Griswold, T.; Jean, R.; Kula, E.; Roubik, D. W.; Cane, J.; Wright, K. W.; Frankie, G.; Parker, F. *Conserv. Biol.* **2013**, *27*, 113-120.
- (10) Brown, M. J. F.; Paxton, R. J. *Apidologie* **2009**, *40*, 410-416.
- (11) Higes, M.; Meana, A.; Bartolomé, C.; Botías, C.; Martín-Hernández, R. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5*, 17-29.
- (12) Requier, F.; Rome, Q.; Chiron, G.; Decante, D.; Marion, S.; Menard, M.; Muller, F.; Villemant, C.; Henry, M. *J. Pest. Sci.* **2019**, *92*, 567-578.
- (13) Henry, M.; Béguin, M.; Requier, F.; Rollin, O.; Odoux, J. F.; Aupinel, P.; Aptel, J.; Tchamitchian, S.; Decourtye, A. *Science* **2012**, *336*, 348-350.
- (14) Mullin, C. A.; Frazier, M.; Frazier, J. L.; Ashcraft, S.; Simonds, R.; vanEngelsdorp, D.; Pettis, J. S. *PLoS One* **2010**, *5*, e9754.
- (15) Casillas, A.; de la Torre, A.; Navarro, I.; Sanz, P.; Martínez, M. de los Á. *Sci. Total Environ.* **2022**, *809*, 151161.
- (16) Girolami, V.; Mazzon, L.; Squartini, A.; Mori, N.; Marzaro, M.; Bernardo, A. di; Greatti, M.; Giorio, C.; Tapparo, A. A. *J. Econ. Entomol.* **2009**, *102*, 1808-1815.
- (17) Padilla Alvarez, F. *El Colmenar* **2012**, *108*, 5-19.
- (18) Urlacher, E.; Francés, B.; Giurfa, M.; Devaud, J. M. *Front. Behav. Neurosci.* **2010**, *4*, 157.
- (19) Núñez, J.; Almeida, L.; Balderrama, N.; Giurfa, M. *Physiol. Behav.* **1998**, *63*, 75-80.
- (20) Balderrama, N.; Núñez, J.; Guerrieri, F.; Giurfa, M. J. *Comp. Physiol. A.* **2002**, *188*, 485-491.
- (21) Urlacher, E.; Devaud, J. M.; Mercer, A. R. *PLoS One* **2017**, *12*, e0174321.

- (22) Urlacher, E.; Soustelle, L.; Parmentier, M. L.; Verlinden, H.; Gherardi, M. J.; Fourmy, D.; Mercer, A. R.; Devaud, J. M.; Massou, I. *PLoS One* **2016**, *11*, e0146248.
- (23) Even, N.; Devaud, J. M.; Barron, A. B *Insects* **2012**, *3*, 1271-1298.
- (24) Kormos, V.; Gaszner, B. *Neuropeptides* **2013**, *47*, 401-419.
- (25) Audsley, N.; Weaver, R. J. *Peptides* **2006**, *27*, 512-520.
- (26) Stay, B.; Tobe, S. S. *Annu. Rev. Entomol.* **2007**, *52*, 277-299.
- (27) Martí-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Andrejšali, A. A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291-325.
- (28) Fenalti, G.; Giguere, P. M.; Katritch, V.; Huang, X. P.; Thompson, A. A.; Cherezov, V.; Roth, B. L.; Stevens, R. C. *Nature* **2014**, *506*, 191-196.
- (29) Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757-1768.
- (30) Kommu, N.; Ghule, V. D.; Kumar, A. S.; Sahoo, A. K. *Chem. Asian. J.* **2014**, *9*, 166-178.
- (31) Zhu, L.; Li, G.; Luo, L.; Guo, P.; Lan, J.; You, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2200-2202.
- (32) Zarudnitskii, E. v.; Ivanov, V. v.; Yurchenko, A. A.; Pinchuk, A. M.; Tolmachev, A. A. *Heteroat. Chem.* **2002**, *13*, 146-152.
- (33) Volhardt, P.; Schore, N. *Organic Chemistry: Structure and function*, 7a ed., WH Freeman, New York, 2014.
- (34) Cope, O. J.; Brown, R. K. *Can. J. Chem.* **1961**, *39*, 1695-1710.
- (35) Cabré, G.; Garrido-Charles, A.; González-Lafont, À.; Moormann, W.; Langbehn, D.; Egea, D.; Lluch, J. M.; Herges, R.; Alibés, R.; Busqué, F.; Gorostiza, P.; Hernando, J. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3780-3784.
- (36) Bullock, J. L.; Forbes, G. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 232-238.
- (37) Ning, X.; Guo, Y.; Wang, X.; Ma, X.; Tian, C.; Shi, X.; Zhu, R.; Cheng, C.; Du, Y.; Ma, Z.; Zhang, Z.; Liu, J. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4302-4312.
- (38) Arrieta, A.; Aizpurua, J. M.; Palomo, C. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3365-3368.
- (39) Wang, M.; Li, X.; Chen, M.; Wu, X.; Mi, Y.; Kai, Z.; Yang, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 890-895.
- (40) Robalo, J. R.; Huhmann, S.; Kokschi, B.; Vila Verde, A. *Chem* **2017**, *3*, 881-897.

Fuentes de las Figuras II

- Figura II-1.** Figura extraída de la referencia 2.
- Figura II-2.** Llorente, J. Recuperada a 08/02/2022 de <https://abejas.org/anatomia-externa-de-las-abejas/>
- Figura II-3.** Natuur 12, Recuperada a 15/02/2022 de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Varroa_destructor_dorsal_male.jpg
- Figura II-4.** Madrideojos, A. EPGraficos, Recuperada y modificada a 18/02/2022 de <https://www.elperiodico.com/es/medio-ambiente/20160529/avispa-asiatica-coloniza-norte-espana-5166897>

* El resto de las figuras presentes en este capítulo han sido creadas por el autor de la tesis doctoral o los colaboradores directos del proyecto.

Capítulo III

Inhibidores de la señalización CN-NFATc

Resumen

La actividad como fosfatasa mediada por calcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) de la calcineurina (CN) integra también la señalización involucrada en el control de procesos celulares esenciales para la salud y la enfermedad, como la respuesta inmunitaria, la progresión del cáncer y la metástasis. Estos procesos mencionados están controlados a partir de la señalización con el factor nuclear de células T activadas (NFATc). Además, la CN es el objetivo de los fármacos inmunosupresores ciclosporina A (CsA) y tacrólimus (FK506). Desafortunadamente, la administración a largo plazo de estos medicamentos produce efectos secundarios graves. En este capítulo, se describe el diseño, la síntesis y la evaluación de nuevos compuestos sintéticos capaces de inhibir la actividad del factor NFATc, sin interferir en la actividad como fosfatasa de la CN. Estos compuestos han sido diseñados usando un modelo de farmacóforo basado en la estructura de una secuencia PxlIT derivada de un péptido que se une a la subunidad CNA, involucrada en la señalización CN-NFATc.

^a Los resultados explicados en este capítulo han sido publicados en “Design and synthesis of a novel non peptide CN-NFATc signaling inhibitor for tumor suppression in triple negative breast cancer.” Sánchez-Morales, A.; Biçer, A.; Panagiotopoulos, V.; Crecente-García, S.; Benaiges, C.; Bayod, S.; Hernández, J. L.; Busqué, F.; Matsoukas, M.; Pérez-Riba, M.; Alibés, R.; *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *238*, 114514.

III.1. Introducción

III.1.1. El sistema inmunitario

El sistema inmunitario es un sistema de defensa formado por el conjunto de estructuras y procesos biológicos en el interior de un organismo que le permiten mantener la homeostasis interna frente a cualquier tipo de agresión externa (agentes patógenos, agentes contaminantes o radiaciones) o interna (células cancerosas).¹

La respuesta inmunitaria es la forma como el organismo reconoce y se defiende a si mismo contra las sustancias que parecen extrañas o dañinas, lo que comúnmente se conoce como antígenos. En los animales vertebrados existen dos grandes tipos de inmunidad: innata (natural o inespecífica) y adquirida (adaptativa o específica).¹

La inmunidad innata es constitucional e independiente de la experiencia antigénica previa del individuo. Esta respuesta agrupa las células y los mecanismos que defienden al ser vivo de la infección por otros organismos de forma no específica y genérica, de forma inmediata y sin otorgar la inmunidad a largo plazo o protectora al huésped.² La inmunidad innata requiere de la actuación de varios mecanismos y elementos externos e internos. De entre los mecanismos externos encontramos las barreras físicas (piel y mucosa), químicas (enzimas de secreciones corporales) y biológicas (la microbiota de cada órgano). Por otro lado, hay dos tipos de mecanismos internos: (i) los factores solubles, cuya función es la activación de la cascada del sistema de complemento y el reclutamiento de células inmunes hacia los sitios de infección y de inflamación, mediante la producción mediadores químicos especializados, como las citoquinas; y (ii) mecanismos internos a través de células, incluyendo las células fagocíticas y linfocitos.²

La inmunidad adquirida se compone de células y procesos sistemáticos altamente especializados que tienen como función tanto el reconocimiento de antígenos, de forma específica, como su eliminación y la generación de una memoria inmunitaria ante estos antígenos. El proceso de respuesta de la inmunidad adquirida consiste en: (i) el reconocimiento específico y presentación de antígenos; (ii) activación de los linfocitos; (iii) diferenciación de las células específicas que están en reposo a activas y; (iv) inactivación y eliminación de los patógenos.²

Los linfocitos son un tipo de leucocitos que se originan y desarrollan en la médula ósea (excepto los linfocitos T, que maduran en el timo) y que tras su maduración circulan por todo el organismo a través del aparato circulatorio y el sistema linfático. Su función principal es reaccionar frente a los elementos extraños gracias a los receptores específicos para el reconocimiento de antígenos. Tras dicho

III.1 Introducción

reconocimiento se activan, proliferan y se diferencian en células efectoras y células memoria.¹ Se puede diferenciar tres tipos principales de linfocitos:

- Las denominadas **células asesinas** o NK (*natural killer*), que forman parte de la respuesta inmune innata mediada por células y se encarga de la destrucción de célula infectadas o cancerosas.
- Los **linfocitos tipo B**, encargados de la respuesta inmune adaptativa mediada por anticuerpos (inmunoglobulinas). También se pueden clasificar como células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cell*, APC).
- Los **linfocitos de tipo T**, también forman parte de la respuesta inmune mediada por células, pero en este caso adaptativa. Únicamente reconocen antígenos de naturaleza peptídica del complejo mayor de histocompatibilidad CMH (I o II) presentados por APCs. Los linfocitos T colaboradores (CD4⁺) se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmune mediante la interacción con un APC y tras su activación, secretan citoquinas con efectos autocrinos o paracrinos.¹

III.1.1.1. Calcineurina (CN)

La calcineurina (CN), también conocida como proteína fosfatasa 3 (PPP3) o serina-treonina proteína fosfatasa 2B (PP2B) es una enzima que depende de los niveles de calcio (Ca²⁺) y de la calmodulina (CaM), para ejecutar su actividad como catalizadora de la reacción de desfosforilación de una fosfoproteína.³ Esta proteína en forma de heterodímero consta de la subunidad catalizada por la interacción con calmodulina (CaM) (calcineurina A, CNA) y de la subunidad regulada por la interacción con Ca²⁺ (calcineurina B, CNB).⁴ La CN se encuentra relacionada con procesos como el desarrollo, la memoria, la función cardíaca y la respuesta inmunitaria. Es la responsable de la activación de la transcripción de la interleucina-2 (IL-2),³ una proteína que forma parte de las citoquinas del sistema inmunitario, y que a su vez es responsable de la estimulación del crecimiento y diferenciación de linfocitos T y de la proliferación de linfocitos B. También induce la producción de otras citoquinas y quimiocinas.

Cuando un antígeno interacciona con los receptores de linfocitos T, hay un incremento en el nivel citoplasmático de Ca²⁺ que activa la CN uniéndose a una unidad reguladora y activando la unión de la CaM. Entonces, La CN es la encargada de desfosforilar el componente citoplasmático Factor Nuclear de células T Activadas (*Nuclear Factor of activated T-cell*, NFATc). Este factor de transcripción cuando es desfosforilado puede traspasar la membrana lipídica hacia el núcleo y transcribir los genes involucrados en la respuesta inmunitaria, como por ejemplo los de la síntesis de la citoquina IL-2

(Figura III-1).⁵ Se cree que la cantidad de IL-2 producida por las células T es signo de la amplitud de la respuesta inmunitaria.⁶ A todo este proceso desencadenado por la actividad de la calcineurina sobre el NFATc se le denominará señalización CN-NFATc.

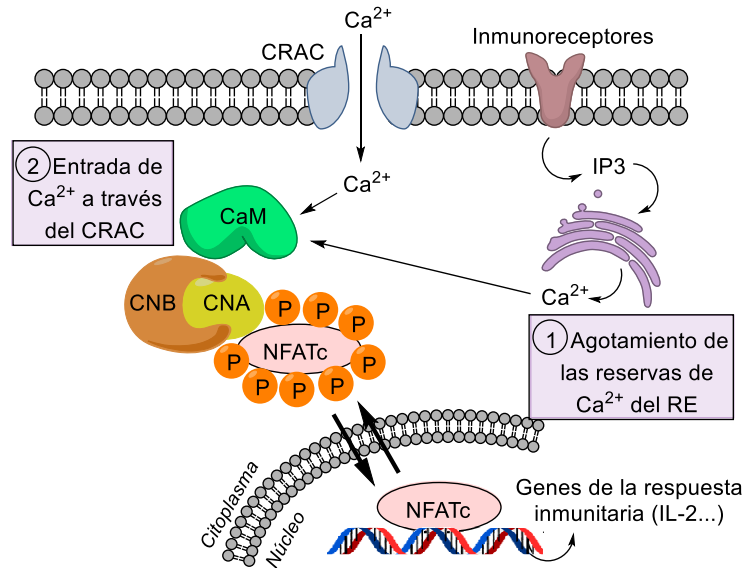


Figura III-1. Vía de señalización bioquímica CN-NFATc en la respuesta inmunitaria.

Estudios de *docking* de la interacción del NFATc con la CN han concretado que para producirse la desfosforilación es necesaria la interacción simultánea con dos cavidades diferentes; (i) la cavidad periférica que interacciona con el fragmento peptídico del NFATc del tipo PxlIT (Pro-x-Ile-x-Ile-Thr), y (ii) la cavidad principal para la interacción con el fragmento del tipo LxVP (Leu-x-Val-Pro), la cual proporciona la orientación correcta al sustrato hacia la cavidad catalítica de la CN (Figura III-2).^{7,8}

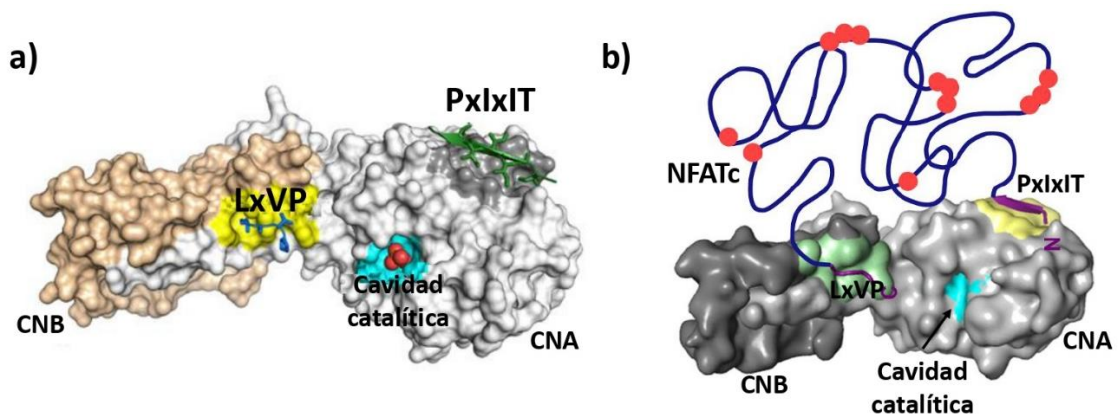


Figura III-2. a) Estructura de la CN con su cavidad PxlIT periférica, la cavidad ortostérica LxVP, y la cavidad catalítica donde se produce la desfosforilación.⁹ b) Representación de la interacción CN-NFATc.⁸

III.1.1.2. Inmunosupresores

Un inmunosupresor es una sustancia química que produce la supresión del sistema inmunitario. Estas sustancias pueden ser de carácter exógeno, como es el caso de los fármacos inmunosupresores, o endógeno como el cortisol. Los fármacos inmunosupresores se suelen utilizar para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o para evitar el rechazo de un órgano trasplantado. Debido a que la mayoría de estos fármacos no actúan de forma selectiva, son causantes de un gran número de efectos secundarios y riesgos para el paciente, ya que, con su consumo, el sistema inmunitario también pierde capacidad para resistir a otras infecciones.

Para bloquear la respuesta inmunitaria la mayoría de los fármacos inmunosupresores actúan sobre las células responsables del ataque a los antígenos, los linfocitos, impidiendo su activación o proliferación. Los más conocidos son los fármacos que actúan sobre las aminofilinas, una serie de peptidil-propil isomerasas que en combinación con dichos fármacos son capaces de inhibir enzimas relacionadas con la respuesta inmunitaria, como es el caso de la CN. Los inmunosupresores más utilizados son (Figura III-3a):¹⁰

- **Ciclosporina (CsA):** Es un péptido no ribosomal cíclico de once aminoácidos producido por un hongo (*Tolypocladium inflatum*) y aislado originalmente de una muestra de suelo noruego. Es usada como uno de los tratamientos inmunosupresivos por excelencia desde 1983, tanto en el tratamiento del rechazo de trasplantes como en muchas más enfermedades autoinmunes. Su capacidad inmunosupresora se debe a su unión con la ciclofilina (inmunofilina) en el citosol de linfocitos T. Este complejo inhibe la señalización CN-NFATc y su capacidad para activar la transcripción de IL-2.
- **Tacrólimus (FK506):** Es un macrólido que fue aislado por primera vez de la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. A través de la unión con la inmunofilina FKBP12 inhibe las funciones de la CN.

Estos fármacos actúan interaccionando con la cavidad principal LxVP de la CN y por impedimento estérico bloquean la cavidad de unión catalítica de ésta, inhibiendo así su función como fosfatasa. Esto hace que no solo sean selectivos para inhibir la desfosforilación de la NFATc, y por lo tanto la activación del sistema inmunitario, sino que inhiben también gran parte de las funciones de la CN (Figura III-3b).¹¹⁻¹³ Esta es la causa principal de la gran cantidad de efectos adversos que genera el tratamiento con este tipo de compuestos, entre los que destaca la toxicidad renal.¹⁰

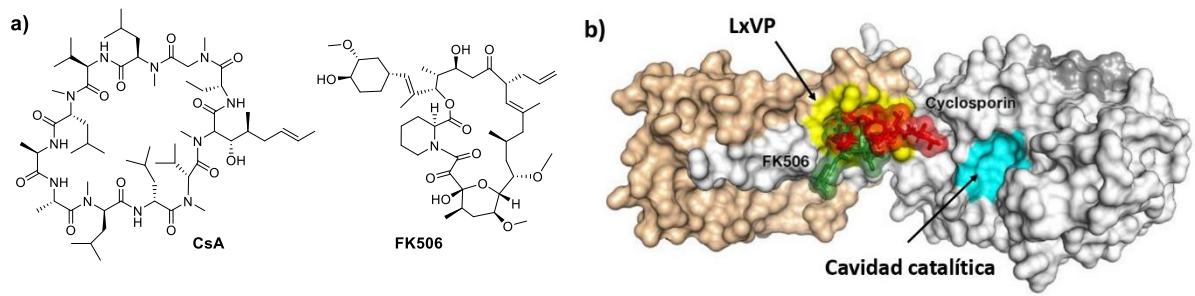


Figura III-3. a) Estructuras moleculares de la CsA y el FK506. b) Simulación de la Interacción de la CsA y el FK506 con la cavidad LxVP de la CN.⁹

III.1.1.3. Angiogenesis tumoral

La angiogenesis es un proceso biológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos sanguíneos preexistentes en el organismo. La angiogenesis desempeña un papel fundamental en el desarrollo de un cáncer, ya que los tumores precisan de un suministro de sangre para obtener el oxígeno y los nutrientes necesarios para crecer.¹⁴ Esta proliferación de vasos provoca también la expansión del cáncer por otras zonas del cuerpo formando nuevas colonias de células cancerosas, llamadas metástasis.

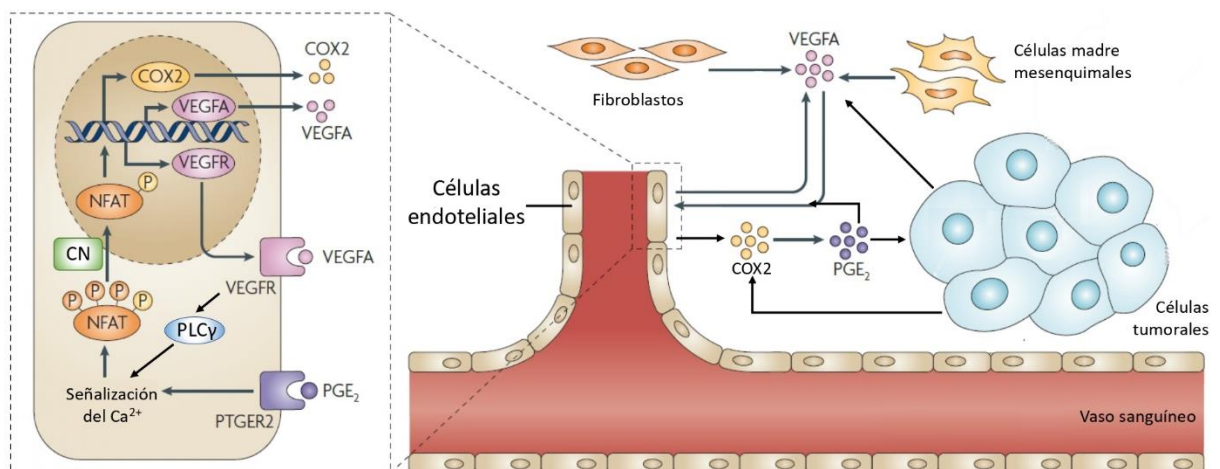


Figura III-4. Vía de señalización del NFATc en el proceso de angiogenesis tumoral.¹⁴

El proceso de angiogenesis está controlado por las señales químicas del factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF). El VEGF es segregado en la matriz extracelular por células endoteliales y las propias células tumorales, entre otras. La unión de estos VEGFs con sus respectivos receptores (VEGFR1 y VEGFR2) en las células endoteliales induce la activación de la enzima fosfolipasa (PLC γ), que a su vez conduce a un aumento del flujo de Ca²⁺ en dichas células, activando la cascada de procesos que supone la señalización CN-NFATc. Se ha demostrado que esta señalización induce una sobreexpresión del VEGFA, sus receptores y del COX2 (catalizador de la síntesis de prostaglandina E2 [PGE₂] en la matriz

III.1 Introducción

extracelular) provocando así un ciclo de expansión de todo este proceso que induce la angiogénesis tumoral.¹⁵ La PGE₂, induce también la migración y proliferación de dichas células tumorales (Figura III-4).¹⁴

III.1.2. Diseño de nuevos fármacos inhibidores de la señalización CN-NFATc

La actividad de la NFATc no solo interviene en la respuesta inmunitaria, sino que también es moduladora de muchos otros procesos biológicos. Es por esa razón, que en los últimos años se ha convertido en un objeto de estudio con gran valor en la química médica.

Desde hace ya más de 15 años se han descubierto derivados de proteínas con secuencias peptídicas de PxlIT, que se encuentran presentes en diferentes sustratos de la CN, que han confirmado la existencia de esta cavidad hidrofóbica en la CNA.^{8,16}

Cabe destacar, que estos péptidos no alteran la cavidad catalítica de la CN responsable de su actividad como fosfatasa,¹⁷ permitiendo así centrarse solo en inhibir la desfosforilación del NFATc, afectando solo en su actividad frente a la respuesta inmunitaria. Así pues, conseguir la inhibición selectiva de la cavidad PxlIT de la CN sin interrumpir el resto de sus funciones, permitiría la creación de nuevos inmunosupresores con un menor número de efectos secundarios que los que existen con los fármacos actuales.

Los grupo de investigación del *Laboratory of Computational Medicine* del Dr. Leonardo Pardo (UAB) y el de la Dra. Mercè Pérez-Riba en el Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) empezaron hace unos años el proyecto de diseño de nuevos inmunosupresores desarrollado en este apartado de la tesis.⁹ Para llevarlo a cabo siguieron una metodología ya vista en este manuscrito; empezar por un VS de compuestos comerciales; seguido de la evaluación *in vitro* de los mejores candidatos del cribado para obtener el *hit* sobre el cual se trabajarían las mejoras estructurales.

El propósito principal final es el diseño y obtención de nuevos fármacos inmunosupresores de origen no peptídico capaces de interactuar con la cavidad PxlIT de la CN, para inhibir la desfosforilación de la NFATc, por tanto, la respuesta inmunitaria, pero sin interactuar con el centro catalítico de la CN, dejando intactas el resto de las funciones de la misma.

III.1.2.1. Cribado virtual sobre la base de datos de ZINC, *in silico*

En primer lugar, se creó un modelo farmacofórico utilizando para ello una estructura cristalográfica del péptido EIPIAIIITDTE derivado de la AKAP79 en complejo con la CN¹⁶ (Figura III-5). En este modelo se incluyeron: (i) 5 puntos **hidrofóbicos** posicionados sobre las interacciones entre las Ile¹⁰, Ile⁹ y Ile⁸ del ligando, y entre los residuos de Tyr²⁸⁸ y Ile³³¹; Val³²⁸; y Met²⁹⁰, Phe²⁹⁹, Pro³⁰⁰ y Met³²⁹ de la CNA, respectivamente; (ii) 4 puntos de **EHA** posicionados sobre los oxígenos de las cadenas de Ala⁷, Ile⁹, y Thr¹¹; y (iii) 3 puntos de **EHD** posicionados sobre los grupos NH de las Ile⁹ y Thr¹¹, y el oxígeno del Gln³³³.

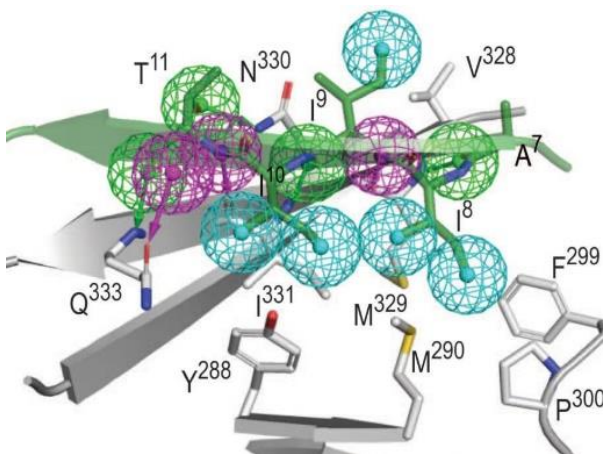


Figura III-5. Modelo del farmacóforo, basado en la estructura, de la interacción CN-NFATc (A: Ala, F: Phe, I: Ile, M: Met, N: Asn, P: Pro, Q: Glu, T: Thr, V: Val, Y: Tyr).⁹

Los compuestos comerciales utilizados para el VS sobre el modelo del farmacóforo fueron extraídos de la base de datos de ZINC con ~ 5.5 millones de compuestos.¹⁸ Diversas conformaciones de estos compuestos (entre 150 y 250 dependiendo del tamaño) fueron evaluados con un software Discovery Studio en 864 modelos farmacofóricos (combinación de 7 de los 12 puntos generados) a través de un método de encaje de cuerpo rígido, obteniendo así ~ 160000 inhibidores en potencia. Los ~ 1700 mejores (valores de encaje > 3) fueron mapeados otra vez en el farmacóforo, pero esta vez con un método de encaje flexible. Los 641 compuestos obtenidos con valores > 4.5 en el modelo flexible fueron inspeccionados de forma visual en complejo con la CN. Tras descartar los más tóxicos utilizando una base de datos existente¹⁹ y los más similares, 32 moléculas fueron seleccionadas para ser evaluadas en experimentos *in vitro* de competitividad.

III.1.2.2. Experimentos de competitividad con los 32 candidatos del VS, *in vitro*

Para ser unos inhibidores de la señalización CN-NFATc selectivos, los candidatos deberían competir con el NFATc sin bloquear la actividad como fosfatasa de la CN. En este contexto, las 32 moléculas fueron evaluadas para ver su capacidad de inhibir la desfosforilación del fosfato de *p*-nitrofenil (pNPP) por la CN. Solo el compuesto 1 de los 32 inhibió parcialmente la actividad de la fosfatasa en referencia con el control con ZnCl₂.

Por otro lado, la habilidad de los 32 compuestos por inhibir la señalización CN-NFATc fue evaluada en células HEK293T a través de un ensayo de gen indicador de luciferasa (luc) que incluía un promotor del

III.1 Introducción

gen que codifica la IL-2 dependiente del NFATc. Los resultados mostraron que 7 de los compuestos inhibían la actividad del NFATc en más del 75%.

Para elucidar la actividad de los 7 compuestos seleccionados sobre la cavidad PxlIT-CNA se realizaron una serie de pruebas adicionales que mostraron los siguientes resultados: (i) ninguno de los compuestos competía con el péptido phosphoRll o el LxVP derivado de la glutatión *S*-transferasa (GST), péptidos que solo se enlazan a la cavidad LxPV de la CNA; (ii) todos los compuestos interrumpían la interacción CNA-NFATc2 (el NFATc2 contiene tanto la secuencia peptídica LxVP como PxlIT). Cuatro de los siete compuestos (**17**, **18**, **19** y **20**) (Figura III-6) mostraron rangos de IC₅₀ de entre 7 y 15 μM, siendo los compuestos **19** y **20** los más efectivos. También, tanto en células HEK293T como en células epiteliales de osteosarcoma de huesos humanos (U2OS) se pudo comprobar que los compuestos **17-20** inhibían la actividad de la NFATc2 y su translocación hacia el núcleo de las células.

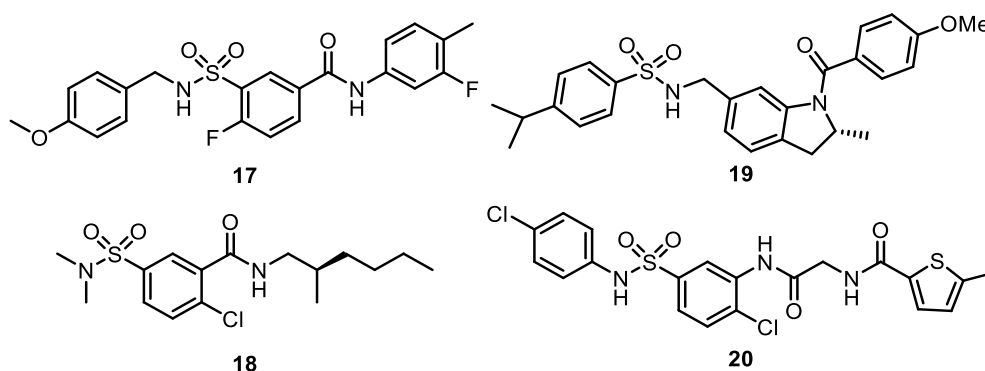


Figura III-6. Estructura molecular de los compuestos **17-20**.

III.1.3. Diseño de los nuevos compuestos C1 y C2 a partir de los *hits* del cribado

Los compuestos **19** y **20** fueron seleccionados como los mejores candidatos y de nuevo estudiados con cálculos computacionales por el Dr. Minos-Timotheos Matsoukas del *Laboratory of Computational Medicine* (UAB). Una estructura común entre ellos, con los grupos sulfona-aromático-carbonilo, fue asociada a la interacción típica de los péptidos PxlIT con la β -sheet de la CN (Figura III-7). Estas particulares áreas de interacción protagonizadas por estos elementos fueron divididas en tres áreas: (i) Interacciones polares (**POL**); los dos oxígenos de la sulfona forman dos puentes de hidrogeno con los grupos NH de la cadena principal de la Gln³³³ y la cadena lateral de la Asn³³⁰. (ii) **HYD1**; interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático y los residuos Ile³³¹ y Tyr²⁸⁸ y la interacción del carbonilo con el grupo NH del residuo Ile³³¹. (iii) **HYD2**; cavidad hidrofóbica formada por los residuos Met³²⁹, Phe²⁹⁹, Pro³⁰⁰ y Met²⁹⁰.

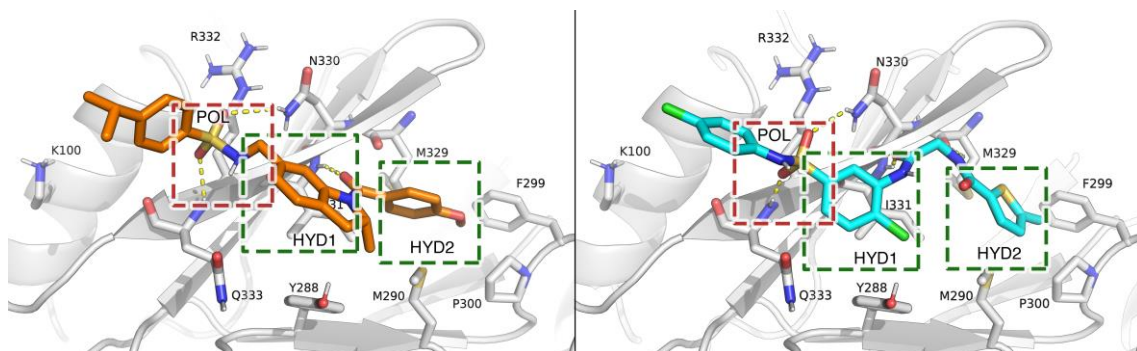


Figura III-7. Capturas de una simulación de *docking* de los compuestos **19** (ZINC65003396) (naranja) y **20** (ZINC13038446) (azul) en la cavidad PxlIT de la CNA. En recuadros de línea discontinua están remarcadas las áreas subdivididas de interacciones comunes de la cavidad PxlIT (POL, HYD1 y HYD2) (K: Lys, R: Arg).

La estrategia para diseñar la nueva familia de inhibidores de la señalización CN-NFATc con estructuras moleculares similares fue eliminar los grupos funcionales irrelevantes de los compuestos seleccionados de la base datos de ZINC, **19** y **20**, para obtener dos familias compuestos, la **C1** y la **C2**. En base al compuesto **19** se diseñó la familia de compuestos **C1a-C1f**. Los cambios estructurales propuestos fueron: (i) la sustitución del grupo 2-metilindol por un fenilo; (ii) la sustitución del isopropilbenceno terminal por un metilo, dado que no presentaba interacciones aparentes y podría presentar problemas de solubilidad; y finalmente, la (iii) sustitución del 4-metoxibenceno por seis grupos funcionales aromáticos y heteroaromáticos cíclicos o bicíclicos diferentes (**a-f**) (Figura III-8). Estas unidades estructurales aromáticas de carácter variado (indol, naftaleno, tiofeno, etilbenceno o benzotiofeno) fueron seleccionados para estudiar las posibles interacciones con el farmacóforo HYD2.

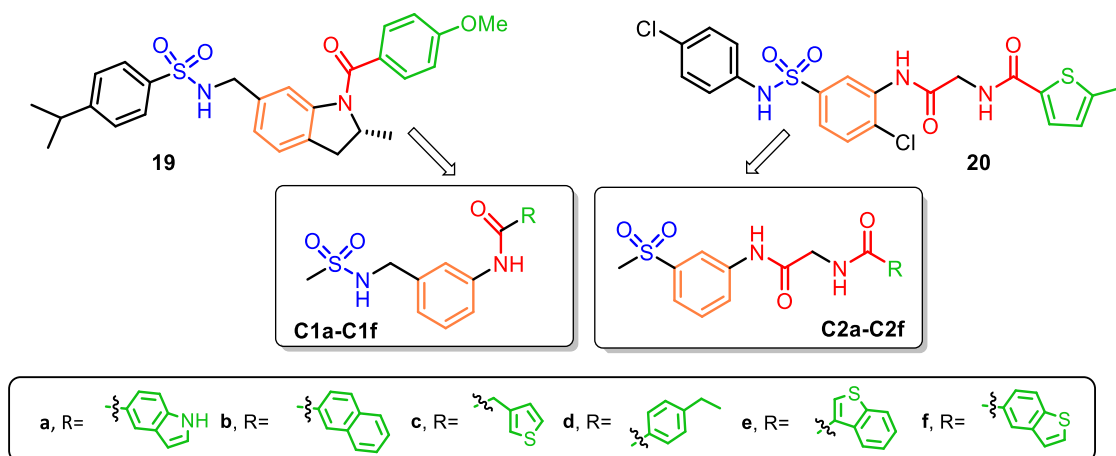


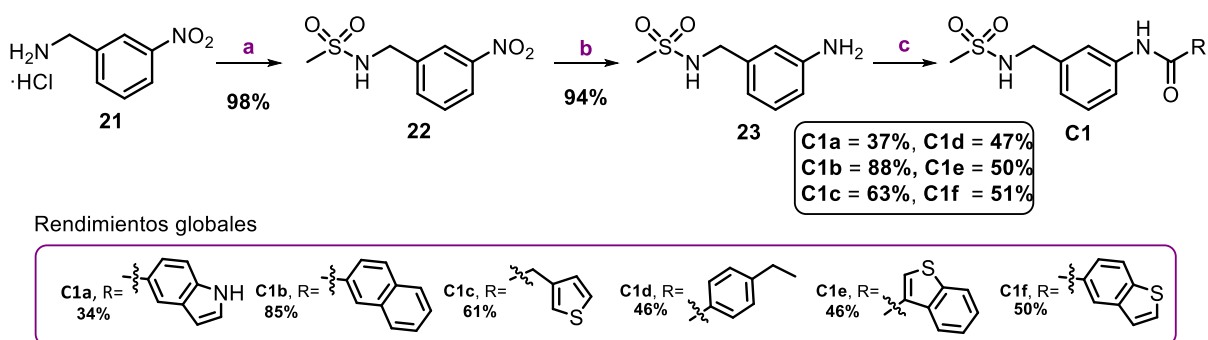
Figura III-8. Estructuras moleculares de los *hits* **19** y **20**, y de las familias **C1** y **C2** derivadas de las modificaciones estructurales de estos compuestos. De diferentes colores quedan remarcados los elementos comunes entre los *hits* y las nuevas series **C1** y **C2**.

Por otro lado, en base al compuesto **20** se diseñó la familia de compuestos **C2a-C2f** con una estrategia similar a la familia **C1**. En particular, (i) la estructura del anillo bencénico central y sulfona continuó siendo igual; (ii) el grupo clorobenceno terminal unido a la sulfonamida fue sustituido por un metilsulfonilo, ya que no tenía interacciones aparentes con la CN; (iii) y el grupo 2-metiltiofeno fue remplazado por los mismos grupos funcionales (**a-f**) que en la serie **C2** (Figura III-8).

III.1.3.1. Síntesis de las familias de compuestos **C1** y **C2**

A continuación, en nuestro grupo de investigación se procedió a la obtención de los nuevos compuestos candidatos propuestos. Para ello la Dra. Cristina Benaiges puso a punto una ruta sintética efectiva para cada una de las familias de moléculas objetivo tipo **C1** y **C2**.

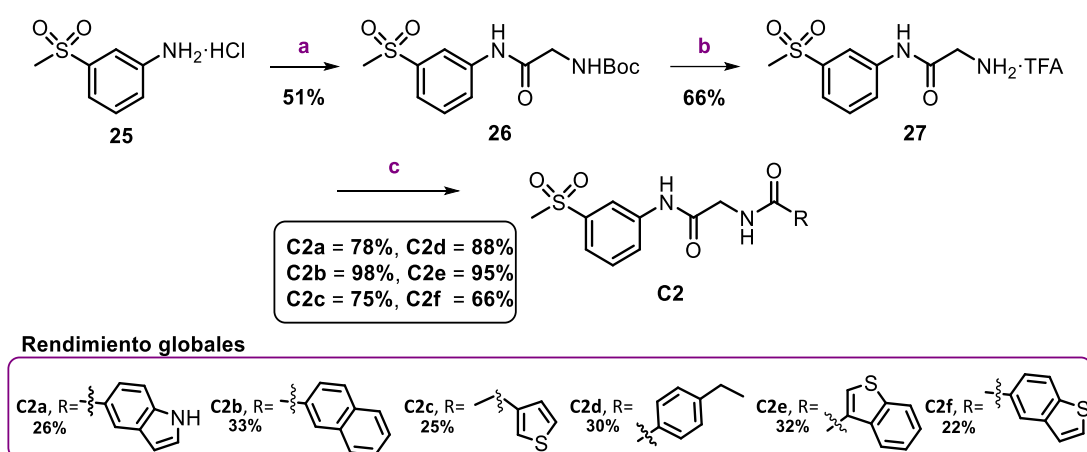
La secuencia sintética para la familia **C1** se inició a con la formación de la sulfonamida **22** a partir de cloruro de mesilo (MsCl) y la amina **21**, utilizando trietilamina (Et₃N) en el seno de CH₂Cl₂, con un rendimiento del 98%. A continuación, el grupo nitro de la sulfonamida **22** se redujo utilizando H₂ con Pd/C como catalizador en EtOAc, obteniendo así el intermedio común **23** con un 94% de rendimiento. Finalmente, la reacción de acoplamiento tipo amida entre dicha amina **23** y los diferentes ácidos carboxílicos comerciales **24a-24f**, utilizando EDCI y HOBt como agentes de acoplamiento y DIPEA como base en el seno de THF/DMF anhidros, condujo a la obtención de los compuestos de la familia **C1a-C1f** con rendimientos de entre el 37% - 88%. La ruta sintética es una secuencia lineal de 3 etapas que permite obtener los compuestos **C1a-C1f** con rendimientos globales de entre el 34% - 85%, siendo la formación del enlace amida la etapa clave limitante del rendimiento global (Esquema III-1).



Esquema III-1. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la familia **C1**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; (b) H₂, Pd/C, EtOAc; (c) **24a-24f**, EDCI, HOBt, DIPEA, THF/DMF anh.

En el caso de la ruta sintética desarrollada para la obtención de la familia de candidatos **C2**, ésta empezó con una reacción de acoplamiento tipo amida entre la amina **25** y el ácido Boc-Gly-OH comercial, utilizando EDCI y HOBt como agentes de acoplamiento y Et₃N como base en el seno de THF/DMF anhidros, para obtener la amida **26** con un rendimiento del 51%. Seguidamente, el grupo

protector *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) del fragmento de glicina (Gly) fue desprotegido usando ácido trifluoroacético (TFA) en CH₂Cl₂, obteniendo la amina **27** con un rendimiento del 66%. Finalmente, con otra reacción de acoplamiento tipo amida, esta vez entre la amina **27** y los diferentes ácidos carboxílicos comerciales **24a-24f**, utilizando EDCI/HOBt y DIPEA en el seno de THF/DMF anhidros, se obtuvieron los compuestos de la familia **C2a-C2f** con rendimientos de entre el 66% - 98%. La secuencia sintética es una ruta lineal de 3 etapas que permite obtener los compuestos **C2a-C2f** con rendimientos globales de entre el 22% - 33%, siendo el primer acoplamiento la etapa limitante del rendimiento global en la obtención de los distintos productos (Esquema III-2).



Esquema III-2. Secuencia sintética para la obtención de los compuestos de la familia **C2**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) Boc-Gly-OH, HATU, HOBt, Et₃N, THF/DMF anh. (b) TFA, CH₂Cl₂; (c) **24a-24f**, EDCI, HOBt, DIPEA, THF/DMF anh.

En ambos casos se priorizó el poder llegar a la obtención de todos los productos finales, con el fin de realizar nuevos ensayos biológicos. Como consecuencia, para muchos de estos compuestos, tanto finales como intermedios, quedó pendiente su plena caracterización estructural.

III.2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto se basa en hallar nuevas moléculas pequeñas que puedan suponer fármacos inmunosupresores a través de la inhibición de la señalización del CN-NFATc, sin alterar el resto de las funciones de la CN como fosforilasa.

Como se ha comentado con anterioridad, los resultados prometedores del VS e *in vitro* dejaron entrever el potencial de los compuestos **19** y **20** como posibles inhibidores de la señalización CN-NFATc. A raíz de modificaciones estructurales de estos dos *hits* se diseñaron las familias de nuevos candidatos **C1** y **C2**. La Dra. Cristina Benaiges realizó una primera síntesis de estos compuestos, abriendo así el camino de un largo proyecto hacia la búsqueda de nuevos inhibidores de la respuesta inmunitaria. De estos precedentes surgieron los siguientes objetivos para esta tesis:

1) Caracterización y elucidación estructural completa de todos los compuestos de las familias **C1** y **C2** (Figura III-9).

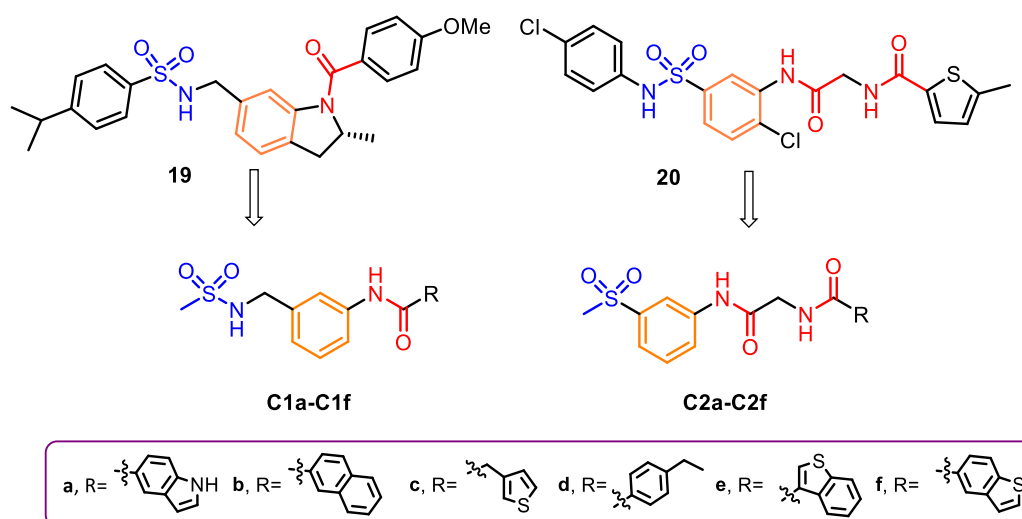


Figura III-9. Estructuras moleculares de las familias **C1** y **C2**.

2) Diseño y síntesis de los nuevos compuestos **C3a** y **C4a**. Con estos compuestos se pretendía expandir la familia **C2** evaluando la influencia de una posible interacción iónica terminal de un ácido carboxílico al oeste de la molécula (**C3a**), o bien de reincorporar la funcionalidad de sulfonamida presente en **20** (**C4a**) (Figura III-10). En cuanto al sustituyente presente en la parte oeste de la molécula, en primera instancia se eligió incorporar una unidad de indol, ya que en los resultados preliminares de los correspondientes ensayos biológicos con los candidatos de las familias **C1** y **C2** se había observado como este sustituyente parecía una de las mejores opciones de cara a conferir actividad al compuesto.

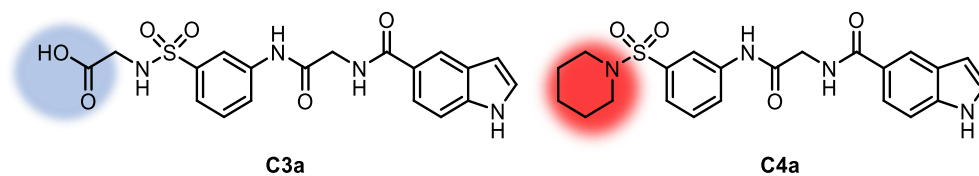


Figura III-10. Estructuras moleculares de los compuestos **C3a** y **C4a**.

- 3) **Escalado y optimización de la síntesis de los compuestos C1a y C1e** (Figura III-11). Dado a que, en los estudios preliminares de actividad biológica, los compuestos **C1a** y **C1e** fueron los que presentaban mejores resultados, fue necesaria su obtención en escala de multigramo para poder afrontar posibles experimentos *in vivo* con ratones BALB/c (*Bagg* y *ALBino*).

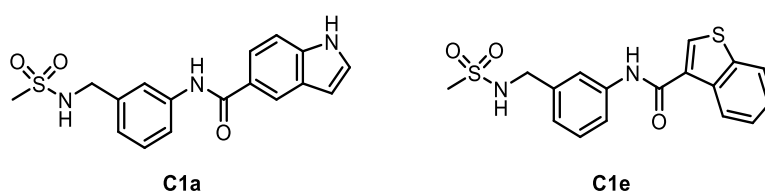


Figura III-11. Estructuras moleculares de los compuestos **C1a** y **C1e**.

III.3. Resultados y discusión

III.3.1. Compuestos de las familias C1 y C2

III.3.1.1. Caracterización de las familias C1 y C2

Una vez sintetizados nuevamente todos los compuestos de las familias **C1** y **C2**, se realizó la completa caracterización de todos ellos. Todos los productos fueron sintetizados a una escala de entre 50 - 100 mg, suficiente para poder realizar los experimentos de caracterización, así como para la realización de los correspondientes ensayos biológicos *in vitro*. Para la asignación de las señales de protón y carbono, se realizaron experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C y sus correspondientes correlaciones bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC). También se realizaron experimentos de espectroscopia de masas, con resultados concordantes con los calculados para cada molécula, puntos de fusión y espectros de infrarrojo-visible (IR-Vis).

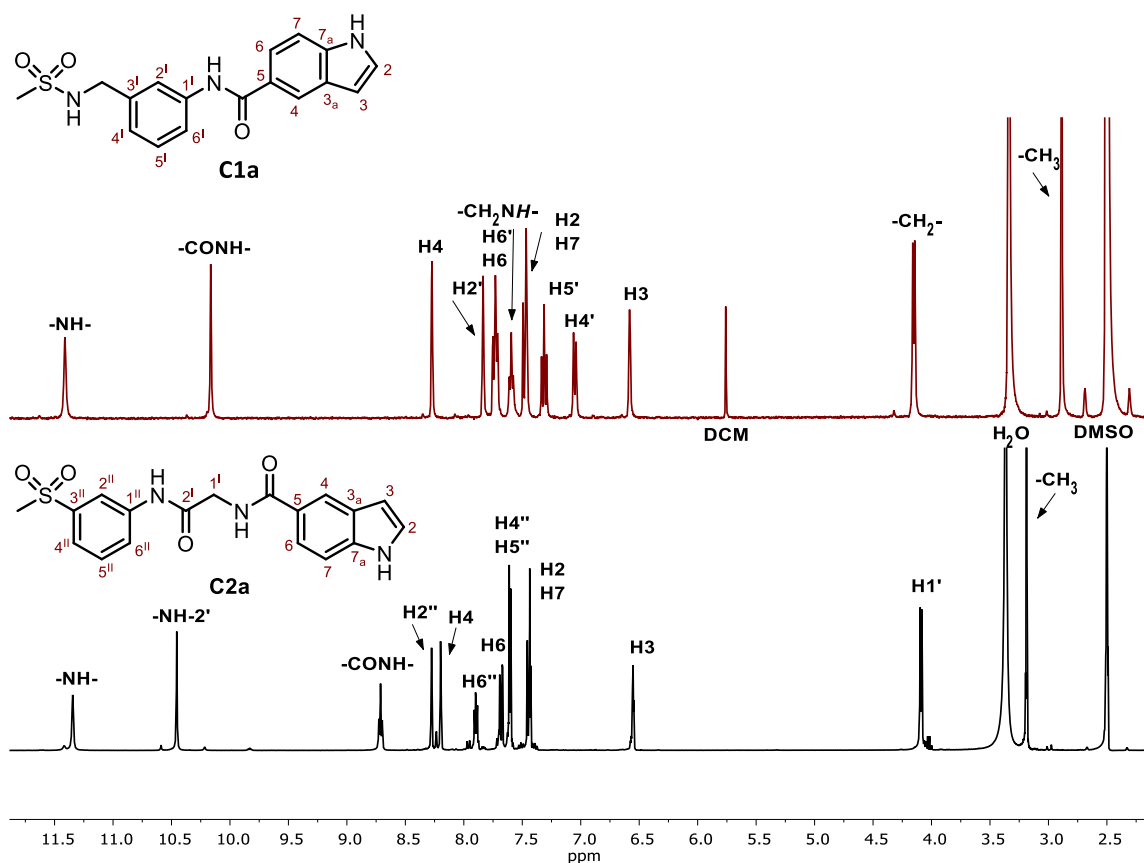


Figura III-12. Espectros de ^1H RMN en dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) de los compuestos **C1a** y **C2a**.

Como ejemplo, la Figura III-12 muestra el espectro de ^1H RMN del compuesto **C1a** y del **C2a**. Las señales de protón que no son propias del anillo de indol también son comunes, con desplazamientos químicos similares, para el resto de los compuestos finales de la familia **C1**. Sobre todo, las señales del metilo ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$) a δ 2.86 - 2.90, el triplete de la sulfonamida ($-\text{SO}_2\text{NH}-$) a δ 7.52 - 7.62, y el doblete del metileno

(-CH₂-) a δ 4.11 - 4.18, que son las señales que menos se ven afectadas electrónicamente por los diferentes fragmentos enlazados a la amida. De la misma manera, en el espectro de ¹H RMN del compuesto **C2a**, las señales de protón que no son propias del anillo de indol también son comunes en el resto de los compuestos finales de la familia **C2**. En este caso, cabe destacar el singlete propio del metilo (-CH₃) a δ 3.19 - 3.20, el singlete de la amida contigua al anillo aromático (-NH-2') a δ 10.39 - 10.51 y el doblete del metileno (C₁) a δ 3.92 - 4.16.

Todas estas similitudes se ven igualmente reflejadas en los espectros de ¹³C RMN. Para los compuestos de la familia **C1**, se puede destacar en común las señales del metilo (-SO₂CH₃) a δ 39.1 - 40.0, el carbonilo de la amida (-NHCO-) a δ 161.9 - 168.7, y la del metileno (-CH₂-) δ 46.0 - 46.2. En el caso de la familia **C2** también se puede destacar el singlete propio del metilo (-CH₃) a δ 43.6, el carbonilo de la amida contigua al anillo aromático (C₂) a δ 168.4 - 168.9 y del metileno (C₁) a δ 43.1 - 43.5.

Los espectros de HSQC permitieron asignar cada protón con su correspondiente carbono al que se encuentra enlazado. Para la familia de compuestos **C1**, con el experimento de COSY se pudo discernir entre los dos protones sin carbono enlazado correspondientes a la sulfonamida y a la amida. El protón de la sulfonamida mostró un acoplamiento con el -CH₂-, algo que también se ve reflejado en la multiplicidad de triplete de la señal.

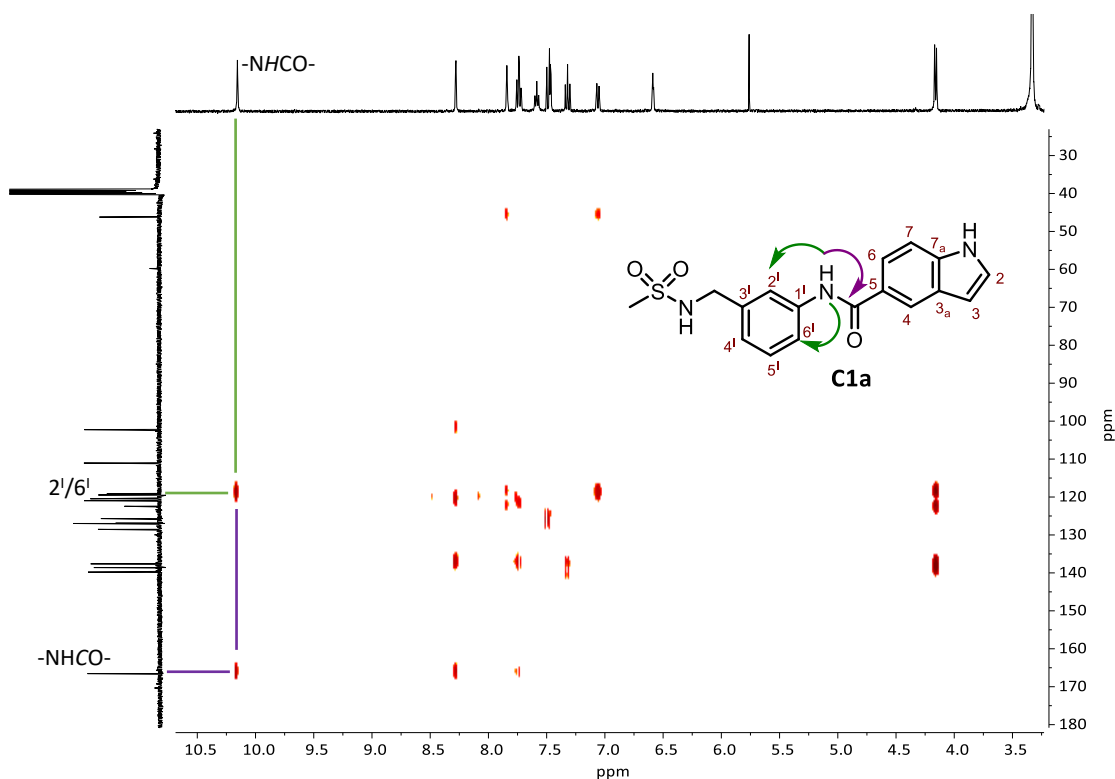


Figura III-13. Espectro de HMBC del compuesto **C1a**.

A partir de los espectros de HMBC de los compuestos de la familia **C1** se pudo elucidar la correcta distribución de los fragmentos de partida en la molécula. Como se puede observar en la Figura III-13 el protón de la amida -NHCO- con δ 10.61 tiene un acoplamiento tanto con el carbonilo de la amida como con los carbonos aromáticos C_{2l} y C_{6l}.

Con los bidimensionales de la familia **C2** se observaron los mismos hechos, aparte de la interacción del protón de la amida que enlaza los diferentes fragmentos terminales tanto con el carbonilo a δ 166.6 - 168.5 como con el metileno C_{1l}.

III.3.1.2. Experimentos de competitividad de las familias **C1** y **C2** vs CF-PRIEIT en CN, *in vitro*

En colaboración con la Dra. Mercè Pérez-Riba (IDBELL), los compuestos sintetizados **C1a-C1e** y **C2a-C2f** fueron sometidos a experimentos de competitividad en CNA con péptidos PRIEIT (Pro-Arg-Ile-Glu-Ile-Thr) derivados del NFATc2 y marcados con carboxifluorosceína (CF) (CF-PRIEIT), usando ensayos de anisotropía fluorescente. Los compuestos **C1a**, **C1c**, **C1d** y **C1e** (en menor medida), interrumpieron la interacción CNA-CF-PRIEIT de forma similar al compuesto **20** a concentraciones de 100 μ M, compuesto previamente descrito como inhibidor potencial de la actividad del NFATc en la CNA.⁹ Por lo contrario, ni el compuesto **C1b** ni la totalidad de los compuestos de la familia **C2** presentaron actividad relevante (Figura III-14).

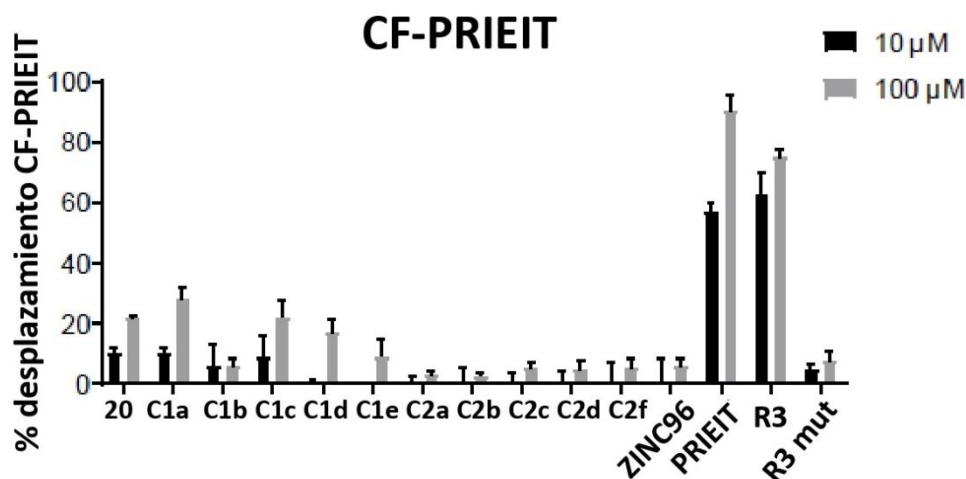


Figura III-14. a) Resultados de los ensayos de competitividad entre los compuestos de las familias **C1** y **C2** vs. el CF-PRIEIT en CNA. Para el control positivo se usó el péptido CF-PRIEIT (108-119 aminoácidos) y el CF-R3 (181-202 aminoácidos incluyendo la secuencia PxlxIT, PSVVVH [Pro-Ser-Val-Val-Val-His]) derivado del hRCAN3. Al contrario, como control negativo se utilizaron el péptido CF-R3mut (mutación en la secuencia PxlxIT, PSVAAQ, [Pro-Ser-Val-Ala-Ala-Gln]) y el compuesto ZINC9632125 de la base de datos ZINC que en experimentos previos no presentaba actividad NFATc).

La posible inhibición de la actividad como fosfatasa de la CN se midió usando el pNPP como sustrato. Ninguno de los compuestos de la familia **C1** y la **C2** interrumpieron la actividad de la CN como fosfatasa frente al sustrato pNPP (Figura III-15).

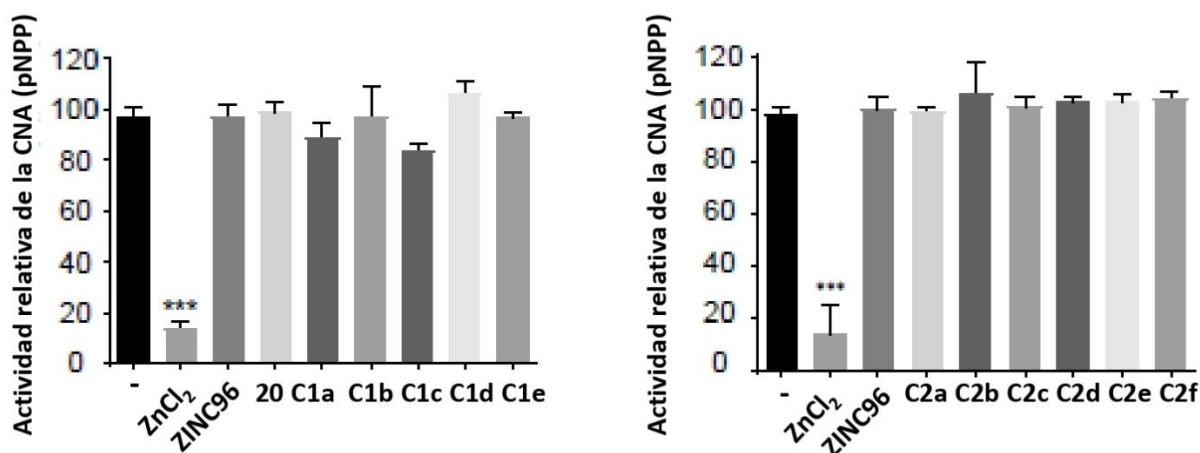


Figura III-15. Resultados de la inhibición de la actividad como fosfatasa de la CNA frente al sustrato pNPP. Los resultados son expresados como el porcentaje de la actividad relativa de la CNA como fosfatasa en presencia de 50 μ M de cada compuesto, en comparación a la actividad de la CNA en ausencia de los compuestos a estudio (valor del 100%). Control negativo: 1 μ M de ZnCl₂. Los datos son representados como el valor \pm SD de 3 experimentos independientes con triplicados. La significancia estadística fue determinada con un ANOVA de 2 factores (***) $p < 0.001$.

Finalmente, la habilidad de las familias **C1** y **C2** para inhibir la actividad transcripcional de la NFATc fue evaluada en células humanas HEK293T usando un ensayo de gen indicador de luc que incluía un promotor del gen que codifica la IL-2 dependiente del NFATc (3xNFATc-luc). Como control de la eficiencia de transfección interna se utilizó pRLnull-luc, con un promotor no regulado por la actividad NFATc. Al no haber datos previos sobre la permeabilidad ni estabilidad de los nuevos compuestos, las células fueron incubadas con cada compuesto varias horas antes de la estimulación con I α +PMA (una combinación del ionóforo de Ca²⁺ ionomicina y forbol-12-miristrato-13-acetato, un activante de las quinasas) para determinar su efecto en la actividad de la NFATc. Los compuestos **C1a**, **C1e** y el ya estudiado **20** fueron capaces de inhibir la actividad NFATc en más de un 80%, mientras que los compuestos **C1c** y **C1d** inhibían entre un 60% - 75%, en concentraciones de 50 μ M (Figura III-16). Los compuestos **C1b** y la familia **C2** no fueron capaces de inhibir la actividad NFATc a ninguna concentración en condiciones experimentales.

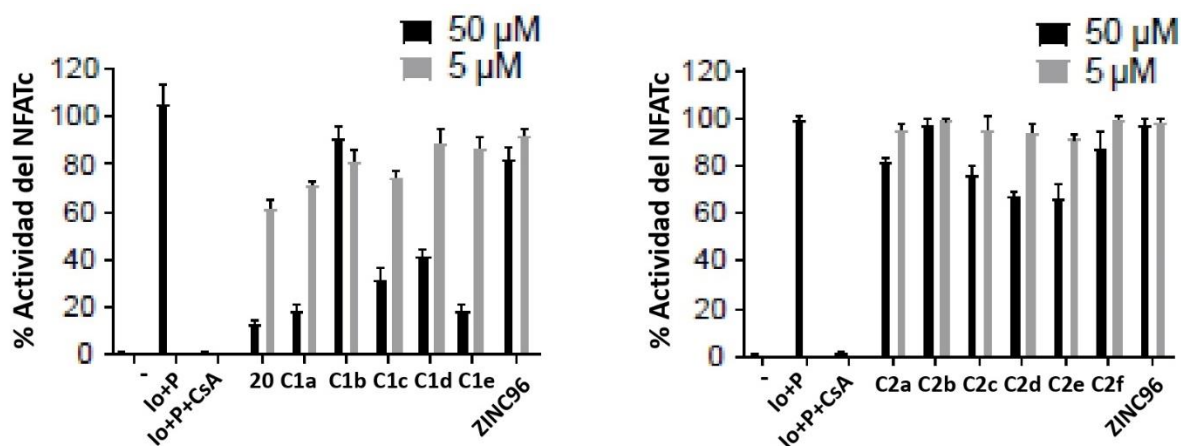


Figura III-16. Resultados de la inhibición de la actividad del NFATc en células HEK293T. Como control de la inhibición de la actividad NFATc se utilizó 1 μM de CsA 30 min. antes de la estimulación con Io+PMA. El valor de 100% corresponde a la activación por NFATc estimulada por Io+PMA durante 4 h.

III.3.1.3. Modelización de los compuestos C1a y C1e en interacción con la cavidad PxlIT

En vista de los resultados positivos de los compuestos **C1a** y **C1e** en los ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad del NFATc, se decidió examinar con mayor detenimiento las interacciones de estos compuestos con la proteína a través de un modelo de *docking* en una interfaz de interacción CNA-CF-PRIEIT. Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Minos-Timotheos Matsoukas del *Laboratory of Computational Medicine* (UAB).

En concordancia con las predicciones sobre el compuesto **20**,⁹ el compuesto **C1a** mostró el mismo patrón respecto a la interacción de puentes de hidrogeno entre los oxígenos de la sulfonamida y los átomos de NH de los residuos Asn³³⁰ y Gln³³³. Como era de esperar, las zonas HYD1 y HYD2 estaban ocupadas por el fenilo y el indol respectivamente. Mientras que el fenilo se estabilizaba con interacciones hidrofóbicas entre las cadenas secundarias de los residuos Ile³³¹, Met²⁹⁰ y Tyr²⁸⁸, el indol interaccionaba con los residuos Phe²⁹⁹ y Met³²⁹, estabilizándose también por el puente de hidrogeno extra con la cadena principal del residuo Asn³²⁷. También se observó un puente de hidrogeno entre el NH de la amida y el carbonilo de la cadena principal del residuo Met³²⁹ (Figura III-17).

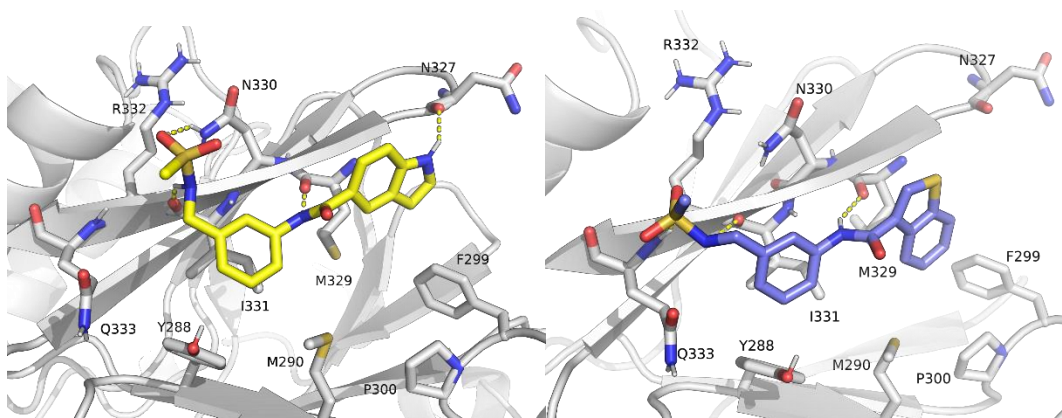


Figura III-17. Capturas de las simulaciones de docking de los compuestos **C1a** (amarillo) y **C1e** (azul) en interacción con la cavidad PxlIT de la CNA.

En cuanto al compuesto **C1e**, los oxígenos y NH de la sulfonamida formarían puentes de hidrogeno con las cadenas principales del Ile³³¹ (NH) y Gln³³³ (carbonilo), respectivamente. Este hecho concuerda con la tendencia de este tipo de sulfonamidas con interaccionar entre los residuos Asn³³⁰ o Gln³³³ a través de puentes de hidrogeno. También se formó un puente de hidrogeno entre la amida y el carbonilo de la cadena principal de Met³²⁹. Los grupos fenilo y benzotiofeno ocuparon las áreas HYD1 y HYD2 respectivamente, como en el compuesto **C1a** (Figura III-17).

La interacción adicional en el compuesto **C1a** en forma de puente de hidrogeno entre el NH del indol y el residuo de Asn³²⁷ podría ser el motivo de su mayor capacidad de interacción con la CNA frente al resto de compuestos, aunque la diferencia respecto al compuesto **C1e** es pequeña.

III.3.2. Síntesis del ácido carboxílico C3a

Con el fin de poder mejorar las actividades de la familia del compuesto tipo **C2**, se volvió a estudiar el farmacóforo diseñado inicialmente y se planteó una nueva hipótesis que condujo al diseño de un nuevo candidato, **C3a**, que cumpliera las siguientes características; (i) un **ácido carboxílico** terminal, para proporcionar una carga negativa fuerte que interaccionase de forma iónica con la Lys¹⁰⁰, un residuo positivamente cargado cerca de una subcavidad polar extendida del POL; (ii) la **sulfonamida** característica común de la familia **C1** y presente en todos los *hits* del VS; (iii) el **espaciador** característico de la familia **C2** y del el compuesto original **20** que originó esta familia de candidatos; y (iv) el grupo **indol** presente en la molécula **C1a**, ya que tenía una buena retroalimentación con el área HYD2 del farmacóforo como se estudió anteriormente (Figura III-18).

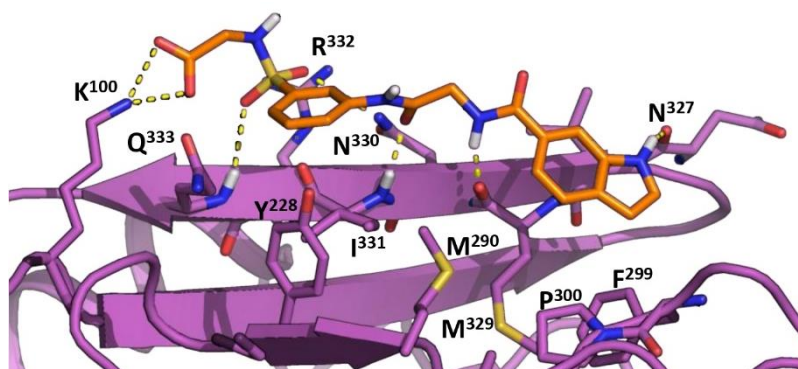
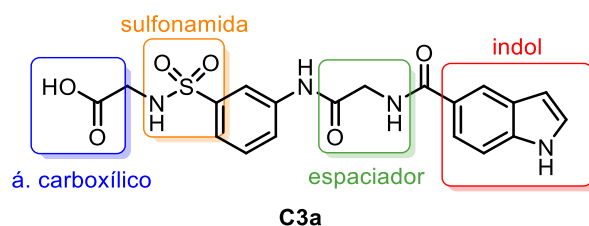
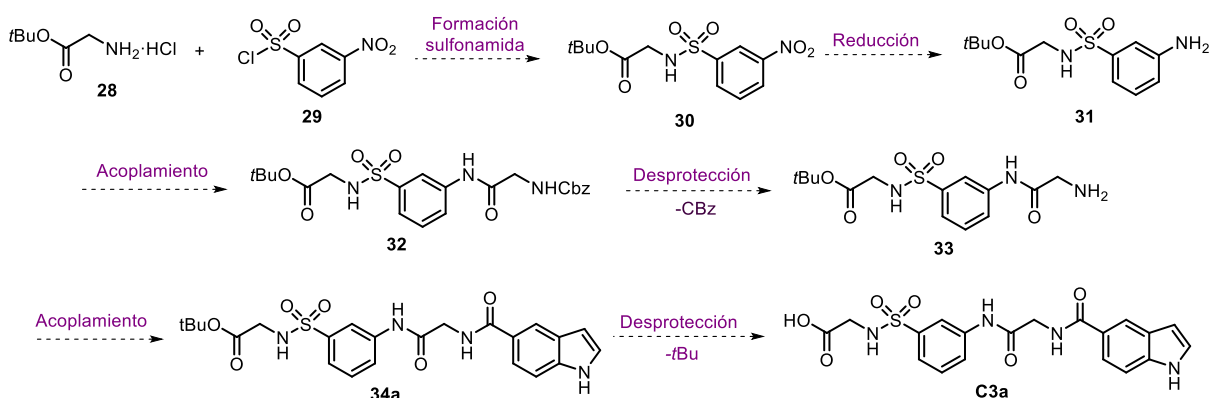


Figura III-18. Estructura molecular del compuesto **C3a** y captura de *docking* del compuesto **C3a** (naranja) en interacción con la cavidad PxlIXT de la CNA.

Para la obtención de este nuevo candidato, la ruta sintética empezaría (Esquema III-3) con un acoplamiento entre los compuestos comerciales cloruro de 3-nitrobenzenosulfonilo **29** y el clorhidrato del éster *tert*-butílico de la Gly **28**, para formar la sulfonamida **30**. El grupo nitro de la sulfonamida **30** sería reducido a amina y esta se haría reaccionar con el ácido carboxílico de la Z-Gly-OH comercial, para formar la amida **32**. Seguidamente, se desprotegería el grupo protector carboxibencilo (CBz) y la amina resultante **33** reaccionaría con el ácido indol-5-carboxílico (**24a**) comercial para formar la amida **34a**. Finalmente se eliminaría el *tert*-butilo terminal obteniendo así el ácido carboxílico **C3a**.

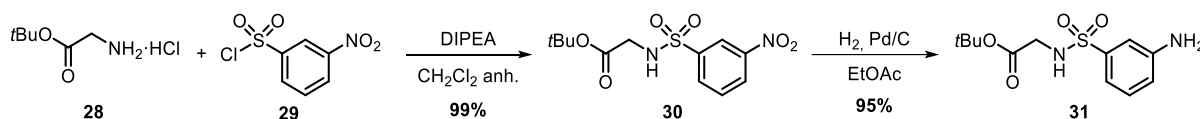


Esquema III-3. Posible secuencia sintética para la obtención del compuesto **C3a**.

III.3.2.1. Síntesis de la amina **31**

La primera etapa de la ruta sintética planteada consistió en un acoplamiento tipo reacción de Hinsberg entre la amina **28** y el cloruro de 3-nitrobenzenosulfonilo (**29**) para formar la sulfonamida correspondiente. Los reactivos comerciales fueron tratados con DIPEA en CH₂Cl₂ anhidro bajo atmósfera de N₂ durante 2.5 h para obtener la sulfonamida **30** con un 99% de rendimiento (Esquema III-4).²⁰

En el espectro de ¹H RMN del compuesto **30** se pudo observar la aparición de un singlete ancho a δ 5.48 que con integral de 1 protón que correspondía al de la sulfonamida -NHSO₂-. La elucidación estructural se llevó a cabo a partir de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C, y por comparativa con el espectro de ¹H RMN publicado por la base de datos de Spectrabase (ID: 2B2Vfjq4vI4). En el espectro de masas aparece un pico de [M+Na]⁺ = 339.0627, que concuerda con el calculado.



Esquema III-4. Secuencia sintética para la obtención del compuesto **31**.

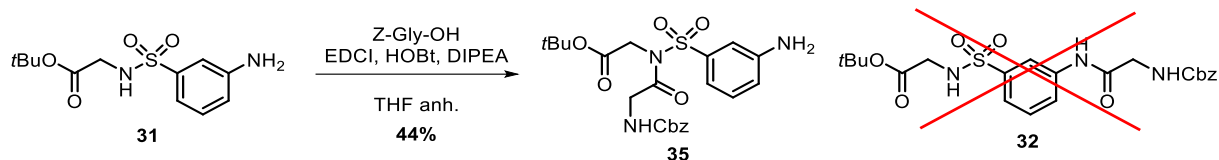
A continuación, el compuesto **31** se obtuvo reduciendo el grupo nitro de **30** en presencia de H₂ a dos atmósferas de presión y usando Pd/C como catalizador en el seno de EtOAc durante una noche. El rendimiento de la reacción fue del 95%.

En el espectro de ¹H RMN de la amina **31** se pudo observar que las señales aromáticas tenían desplazamientos químicos de entre 7.26 - 6.82 ppm. Al comparar con el espectro de ¹H RMN del compuesto **30** (señales aromáticas a δ 8.69 - 7.74) se observó una disminución del desplazamiento químico provocado por la reducción del grupo nitro a amina. También se pudo observar la aparición de un singlete con integral dos a δ 3.93 correspondiente a los dos protones de la amina primaria -NH₂.

III.3.2.2. Obtención del compuesto **35** en lugar del carbamato **32**

Una vez obtenida la amina **31**, ésta se hizo reaccionar con el ácido carboxílico Z-Gly-OH y EDCI/HOBt en presencia de DIPEA en el seno de THF anhidro durante una noche. Se obtuvo un producto con un rendimiento del 44% una vez purificado que no era el compuesto **32** esperado, sino que, tras observar los espectros de RMN de ¹H y ¹³C y sus correlaciones bidimensionales, se llegó a la conclusión de que se trataba de su isómero constitucional **35** (Esquema III-5).

III.3 Resultados y discusión



Esquema III-5. Condiciones de reacción para la síntesis de la acilsulfonamida **35**.

En el espectro de ^1H RMN se pueden observar tres señales para los $-\text{CH}_2-$ correspondientes a dos singletes (H-1 y $-\text{CH}_2\text{Ph}$) y un doblete (H-2^{II}) de **35**. Si se tratara del compuesto **32** habría dos dobletes (H-1 y H-2^{II}) y un singlete ($-\text{CH}_2\text{Ph}$). También esperaríamos encontrar el protón de la sulfonamida, el cual no aparece en el espectro, ya que la sulfonamida esperada es en realidad una acilsulfonamida. En el espectro bidimensional de HMBC se puede observar que tanto los protones H-1, como el H-2^{II}, tienen correlación con el carbonilo C_{1^{II}}, algo que no se esperaría en la sulfonamida **32**, donde solo el protón H-2^{II} tendría correlación con el C_{1^{II}} (Figura III-19).

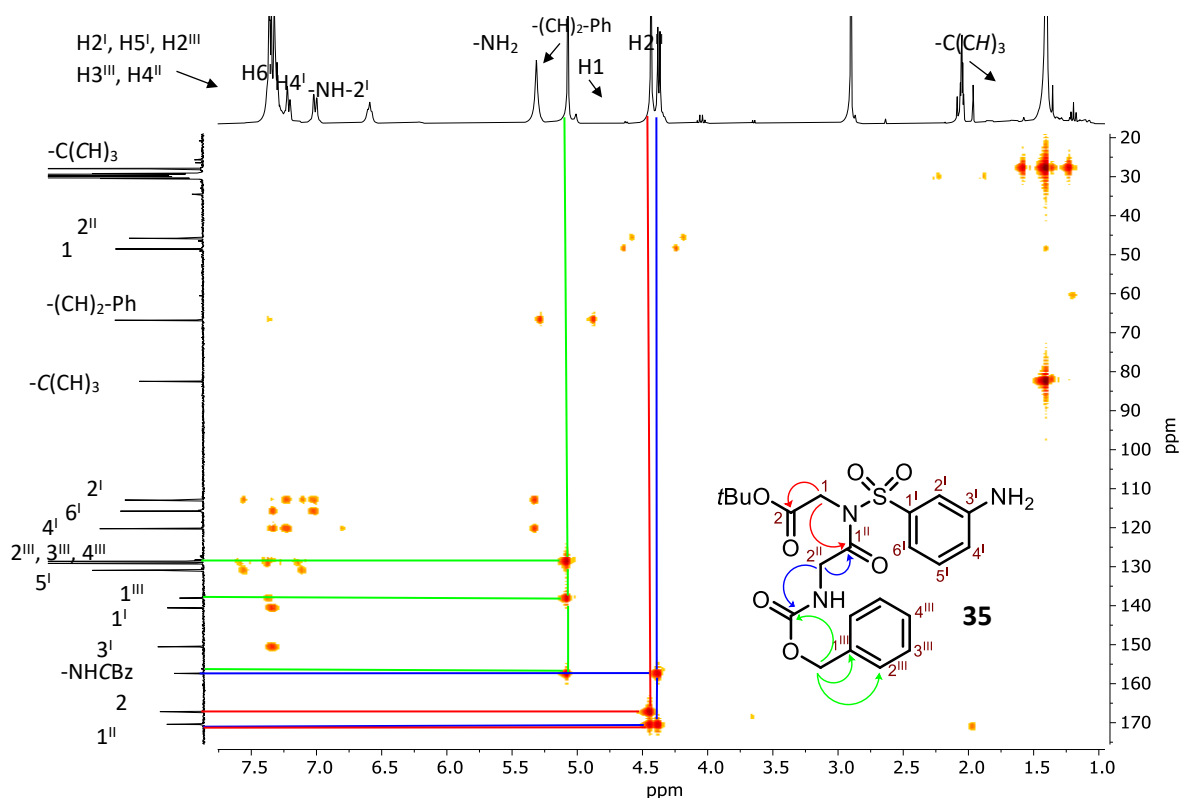
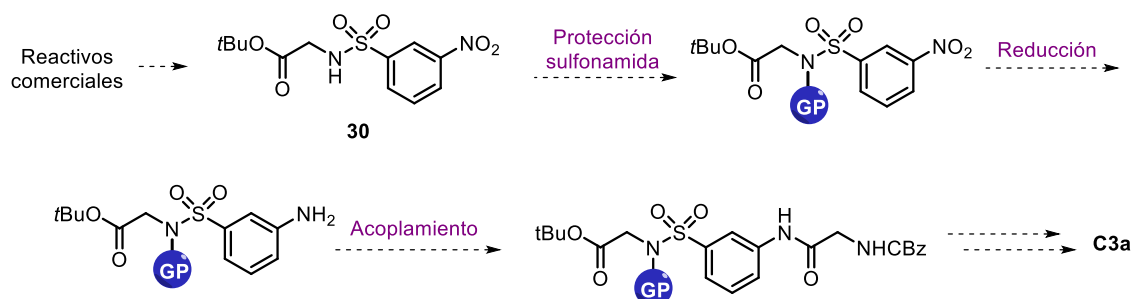


Figura III-19. Espectro de HMBC del compuesto **35**.

Por lo tanto, se concluyó que la sulfonamida presentó una mayor reactividad que la anilina en su reacción de acoplamiento con el ácido carboxílico de la Z-Gly-OH.

III.3.2.3. Síntesis de la amina 39

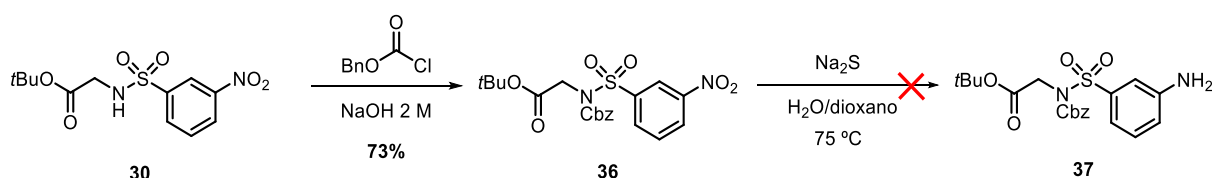
Después de los resultados insatisfactorios en la reacción entre la amina **31** y el ácido carboxílico Z-Gly-OH, se decidió replantear la ruta sintética. Concretamente, se pensó en una protección de la sulfonamida previa al acoplamiento para formar la amida (Esquema III-6).



Esquema III-6. Nueva variante de la ruta sintética planteada para el compuesto **C3a**.

En primera instancia se planteó una protección con un grupo protector bencilo. El compuesto **30** fue tratado con cloroformiato de bencilo en el seno de una disolución de NaOH 2 M a -5 °C durante 2.5 h, obteniendo el sulfonilcarbamato **36** con un 73% de rendimiento.

En este caso, la posterior reducción del grupo nitrilo no pudo realizarse con H₂ + Pd/C ya que también se desprotegería el bencilo protector de la sulfonamida. Por ese motivo, se trató el compuesto **36** con Na₂S en una mezcla de agua/dioxano a 75 °C durante 2 horas, una metodología de reducción ya vista en el capítulo anterior. No obstante, no se obtuvo ningún indicio de la formación de la amina **37**, solo de productos de degradación (Esquema III-7).



Esquema III-7. Condiciones de reacción para la síntesis del sulfonilcarbamato **37**.

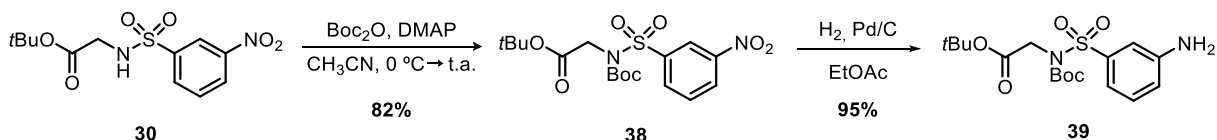
También se realizó una prueba con el grupo protector fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), haciendo reaccionar el compuesto **30** con el cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo, en presencia de DIPEA y en el seno THF durante una noche. Desafortunadamente, no se observó consumo del reactivo de partida, pero sí la descomposición del reactivo Fmoc-Cl.

Finalmente, se realizó un experimento con el grupo protector Boc que permitía mantener la sulfonamida protegida en forma de sulfonilcarbamato hasta la última etapa de reacción donde sería desprotegida junto al ácido carboxílico utilizando las mismas condiciones de reacción. Así pues, se trató la sulfonamida **30** con anhídrido de Boc (Boc₂O) (adición controlada a 0 °C) utilizando 4-

III.3 Resultados y discusión

dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador en el seno de CH_3CN anhidro durante 4 h y a temperatura ambiente. Se obtuvo el compuesto sulfonilcarbamato **38** con un 82% de rendimiento (Esquema III-8).

La desaparición de la señal del protón de la sulfonamida $-\text{NHSO}_2-$ (δ 5.48 en el espectro de ^1H RMN de **30**) y la aparición de una nueva señal a δ 1.35 con integral de 9 H, correspondiente a la incorporación de un nuevo *tert*-butilo en la molécula, corroboraron la correcta protección de la sulfonamida con el Boc.

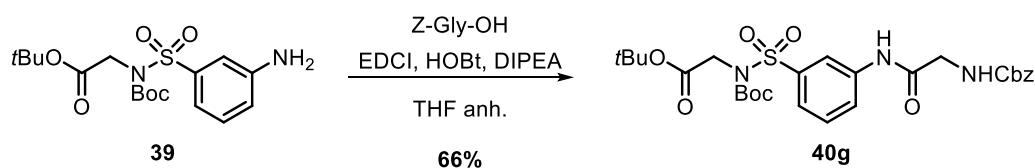


Esquema III-8. Condiciones de reacción para la síntesis del sulfonilcarbamato **39**.

La amina **39** se obtuvo con una reducción utilizando H_2 a dos atm de presión catalizada por Pd/C en el seno de EtOAc durante una noche y con un rendimiento del 95%. La aparición de un singlete ancho a δ 5.18 y con integral de dos protones correspondiente a la amina primaria $-\text{NH}_2$ verificó la correcta reducción del grupo nitro a amino. En el espectro de IR-visible también aparecen dos bandas a ν 3363 y 1604 propias de la anilina formada.

III.3.2.4. Síntesis del compuesto **40g**

Con la sulfonamida protegida en forma de sulfonilcarbamato fue el momento de repetir las condiciones del acoplamiento con Z-Gly-OH.



Esquema III-9. Formación del enlace amida del compuesto **40g** con agentes de acoplamiento.

La amina **39** se hizo reaccionar con el ácido carboxílico comercial Z-Gly-OH activado con EDCl/HOBT, usando DIPEA como base en el seno de THF anhidro durante una noche. El resultado fue la obtención del compuesto **40g** con un 66% de rendimiento, tras la purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Esquema III-9). En el espectro de ^1H RMN de este producto se puede observar una señal de singlete a δ 9.62 consistente con el protón $-\text{NH}-2^{\text{H}}$ de la amida formada (Figura III-20).

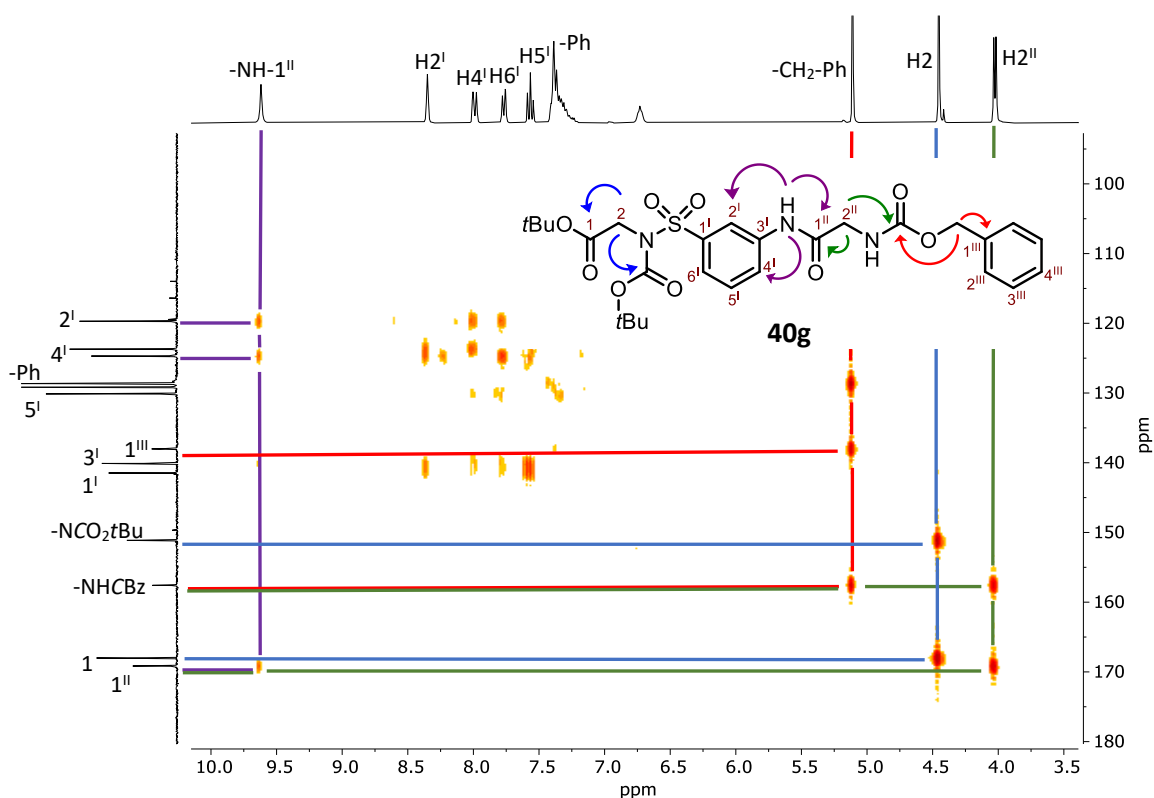


Figura III-20. Espectro de HMBC del compuesto **40g**.

A través del espectro de HMBC se pudo elucidar correctamente la estructura del compuesto **40g**. Como se puede observar en la Figura III-20, a diferencia que con el compuesto **35**, el protón de la amida formada con la reacción de acoplamiento (-NH-1'') tiene interacción tanto con los carbonos aromáticos C_{4'} y C_{2'} como con el carbonilo C_{1''}. El metileno (C₂) contiguo a la sulfonamida también tiene interacción con el carbonilo del Boc, lo que también verifica la correcta y útil protección de la sulfonamida.

Como se explicará a lo largo del capítulo, este compuesto se convirtió en un intermedio clave de la ruta sintética, y, por lo tanto, fue necesario sintetizarlo en varias ocasiones. Como se puede ver en la Tabla III-1, tras realizar varias pruebas de preparación de **40g** a escala miligramo y escala gramo, se pudo observar la tendencia de que cuanto mayor era la cantidad de reactivo de partida utilizada peor era el rendimiento obtenido. En general, los rendimientos obtenidos con EDCI/HOBt fueron bastante bajos. Esto hizo pensar en el bajo carácter nucleófilo de la anilina del compuesto **39**, un hecho ya observado con la obtención del compuesto **35**.

En consecuencia, en el experimento 9 de la Tabla III-1 se utilizó HATU como agente de acoplamiento, pero solo se obtuvo un rendimiento del 26%, resultado que no mejoraba los obtenidos con EDCI/HOBt. En el experimento 10 se optó por la formación de un cloruro de acilo utilizando SOCl₂ en CH₂Cl₂ anhidro y usando DMF como catalizador a reflujo durante 4 h, para después hacerlo reaccionar

III.3 Resultados y discusión

con la amina **39** en el seno de CH₃CN anhidro a reflujo durante una noche. Sorprendentemente, no se observó formación alguna de la amida deseada.

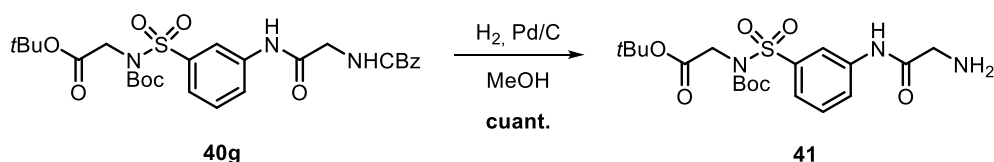
exp.*	39	39 (mmol)	reactivos	40g (mg)	40g (mmol)	rdt. (%)
1	84 mg	0.22	EDCI/HOBt	83	0.14	66
2	140 mg	0.36	EDCI/HOBt	87	0.15	42
3	670 mg	1.73	EDCI/HOBt	388	0.67	39
4	991 mg	2.56	EDCI/HOBt	526	0.91	36
5	1.27 g	3.28	EDCI/HOBt	551	0.95	29
6	1.36 g	3.53	EDCI/HOBt	402	0.70	20
7	1.55 g	4.01	EDCI/HOBt	351	0.61	15
8	2.15 g	5.55	EDCI/HOBt	490	0.85	15
9	31 mg	0.08	HATU	12	0.02	26
10	204 mg	0.98	SOCl ₂	-	-	-

*En todos los experimentos del 1 al 9 se utilizaron entre 1.4 - 1.5 eq. de agente de acoplamiento, 4 eq. de DIPEA como base en el seno de THF anhidro durante una noche.

Tabla III-1. Resultados de los diversos ensayos de la síntesis del compuesto **40g**.

III.3.2.5. Síntesis de la amina **41**

Para obtener la amina **41** se desprotegió la amina del compuesto **40g** en forma de CBz utilizando H₂ a una atmósfera de presión catalizado por Pd/C en el seno de MeOH durante una noche. Tras una rápida filtración a través de Celite® se obtuvo el producto con un rendimiento cuantitativo y con elevada pureza (Esquema III-10).



Esquema III-10. Reacción de desprotección del CBz del compuesto **40g**.

El compuesto **41** es inestable dependiendo del medio en el que se encuentre. Se pudo observar que descomponía al someterlo a una columna cromatográfica en gel de sílice o al disolverse en acetona. Es por ese motivo que se utilizó directamente para la siguiente reacción sin ningún tipo de purificación adicional.

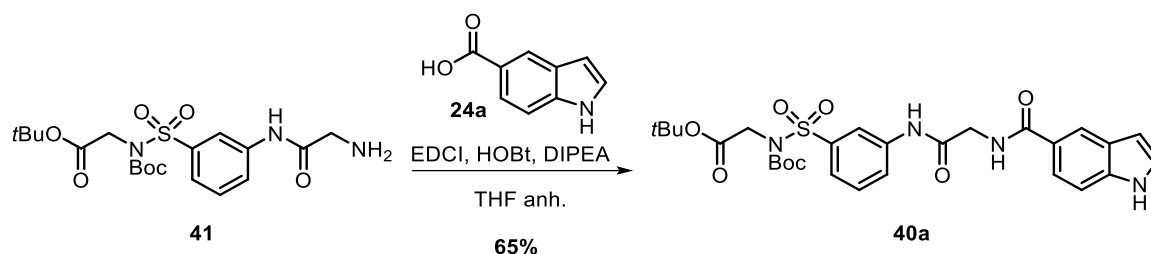
En el espectro de ¹H RMN que se realizó en CDCl₃, disolvente en el cual el compuesto es estable, se pudo observar la aparición de un singlete ancho con integral de dos protones a δ 1.67 que correspondía a la amina primaria alifática -NH₂, así como la desaparición de las señales características del grupo bencilo (el singlete a δ 5.11 del -CH₂- y el multiplete con integral de 5 protones a δ 7.42 - 7.23 del fenilo

del espectro de ^1H RMN del **40g**), lo que confirmaba la correcta eliminación del CBz. En el espectro de ^{13}C RMN ya no apareció el carbonilo del carbamato a δ 157.6 que aparecía en el espectro de **40g**. El resto de las señales de protón y carbono han sido asignadas gracias a los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C , sus correlaciones bidimensionales y por comparativa con los precursores anteriores de la secuencia.

III.3.2.6. Intento de síntesis del compuesto C3a

A continuación, se intentó obtener el candidato final planteado **C3a**, que incorporaba la unidad indol en su estructura. En primer lugar, mediante la formación del enlace amida entre la amina alifática **41** y el ácido indol-5-carboxílico (**24a**) comercial activado con los agentes de acoplamiento EDCI/HOBt se obtuvo el compuesto **40a**, usando DIPEA como base en el seno de THF anhidro en agitación durante una noche. El rendimiento del acoplamiento fue del 65% una vez purificado (Esquema III-11).

En el espectro de ^1H RMN se pudo observar la desaparición de los protones de la amina primaria $-\text{NH}_2$ (δ 1.67 en el espectro de ^1H RMN del **41**) y la aparición de un triplete ancho a δ 8.10 que correspondía al protón de la nueva amida formada $-\text{NHCO}$ -indol. En el espectro de HMBC de **40a** se pudo comprobar que el protón de la amida formada tenía interacción con el carbonilo C_{111} (δ 169.5) y los carbonos aromáticos C_{21} y C_{41} (δ 119.8 y 124.8, respectivamente). El resto de las señales de protón y carbono fueron asignadas gracias a los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C y sus correlaciones bidimensionales.



Esquema III-11. Condiciones de reacción del acoplamiento tipo amida para la síntesis del **40a**.

Finamente, la última etapa de la ruta sintética consistió en la desprotección simultánea del ácido carboxílico en forma de éster *tert*-butílico y de la sulfonamida en forma de sulfonilcarbamato *tert*-butílico en medio ácido (Esquema III-12). Para este proceso se probaron diferentes condiciones de reacción, recopiladas en la Tabla III-2.



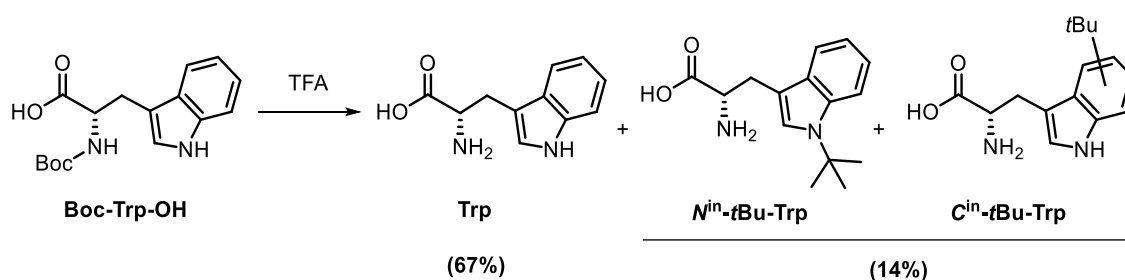
Esquema III-12. Desprotección de los grupos protectores *tert*-butílicos del compuesto **40a**.

exp.	40a (μmol)	reactivos	eq.	disv.	T (°C)	t.	C3a	rdt. (%)
1	87	TFA	27	CH ₂ Cl ₂	ta	3 h	-	-
2	25	TFA	55	CH ₂ Cl ₂ anh.	-5	5 h	-	-
3	48	HCl 2 M	300	Et ₂ O anh.	ta	overnight	-	-
4	31	TFA	50	CH ₂ Cl ₂ anh.	-5	7 h	-	-
		EDT	13					
5	31	DMS	50	CH ₂ Cl ₂ anh.	2	overnight	-	-
		TFA	50					
		EDT	13					
		DMS	50					

Tabla III-2. Condiciones de reacción probadas para la desprotección de los *tert*-butilos del **40a**.

En los experimentos 1 y 2 se probaron unas condiciones de desprotección de *tert*-butilos clásicas utilizando el ácido fuerte TFA en CH₂Cl₂.²¹ Tanto en condiciones anhidras a temperaturas bajas, como en condiciones normales a temperatura ambiente, no se obtuvo el producto deseado, sino que se obtuvieron productos de degradación. En el experimento 3 se probó la utilización una solución de HCl 2 M en lugar del TFA, pero también se obtuvieron productos de degradación.

En un artículo de Masui *et al.* se pone de manifiesto la formación de productos secundarios cuando se realiza una rotura acidolítica de grupos protectores *tert*-butilo en moléculas que contienen un fragmento de triptófano (que incorpora la unidad indol) (Esquema III-13).²² Al tratar este tipo de moléculas con TFA o HCl se pueden producir destrucciones oxidativas del anillo de indol o se puede alquilar el propio anillo, tanto por los carbonos como por el nitrógeno. En este artículo se propone la utilización de antioxidantes y secuestradores como el 1,2-etanditioil (EDT) y el sulfuro de dimetilo (DMS) para reducir la formación de estos productos indeseados.

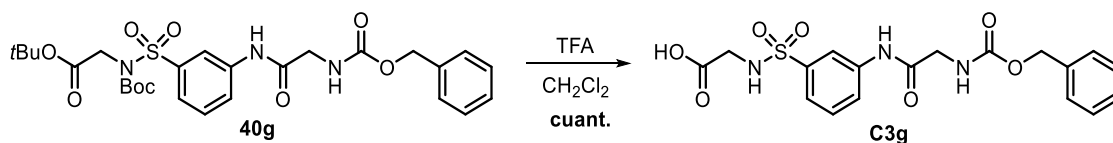


Esquema III-13. Productos obtenidos en la desprotección del Boc-Trp-OH realizada por Masui *et al.*²²

En los experimentos 4 y 5 al utilizar estas nuevas condiciones y tratar el compuesto **40a** con TFA, EDT y DMS en CH₂Cl₂ anhidrido tampoco se consiguió obtener el compuesto **C3a** deseado. Los espectros de ¹H RMN solo mostraban productos de degradación.

Como prueba de que la desprotección no funcionaba por la presencia del fragmento de indol en la molécula, se decidió hacer una prueba control desprotegiendo el intermedio **40g** con las condiciones

clásicas de TFA. De esta manera, se trató el compuesto **40g** con TFA en el seno de CH₂Cl₂ a 0 °C durante 5 h obteniendo como resultado el ácido carboxílico **C3g** con un rendimiento cuantitativo (Esquema III-14).



Esquema III-14. Condiciones de reacción para la obtención del compuesto **C3g**.

La total desaparición de las dos señales de los *terc*-butilos en el espectro de ¹H RMN corroboraron la completa desprotección del ácido carboxílico y la sulfonamida. Gracias a los espectros de RMN de ¹H y ¹³C, y a sus correlaciones bidimensionales, se pudo elucidar estructuralmente el compuesto **C3g**. En el espectro de masas se pudo observar un pico que correspondía a [M+H]⁺ = 422.1015 y que cuadraba con los valores calculados.

III.3.3. Síntesis de los ácidos carboxílicos **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i**

En este momento del desarrollo del proyecto se decidió reconsiderar la naturaleza de la nueva molécula candidata objetivo de la síntesis, debido a que:

- Se habían encontrado serias dificultades en la última etapa de la síntesis del compuesto **C3a**, el cual incorpora una unidad de indol en su estructura, desfavorable para la eliminación de los grupos protectores.
- El principal objetivo asociado a esta nueva molécula era evaluar la influencia de la existencia de un ácido carboxílico terminal en su estructura.
- La elección de incorporar una unidad indol se había valorado también entre otras posibilidades de sustituyentes que en la familia de compuestos **C1** habían llevado a resultados casi igual de positivos, tales como el metilentiofeno (**C1c**), etilbenzeno (**C1d**) o benzotiofeno (**C1e**).

Así pues, las nuevas moléculas objetivo planteada fueron las siguientes (Figura III-21):

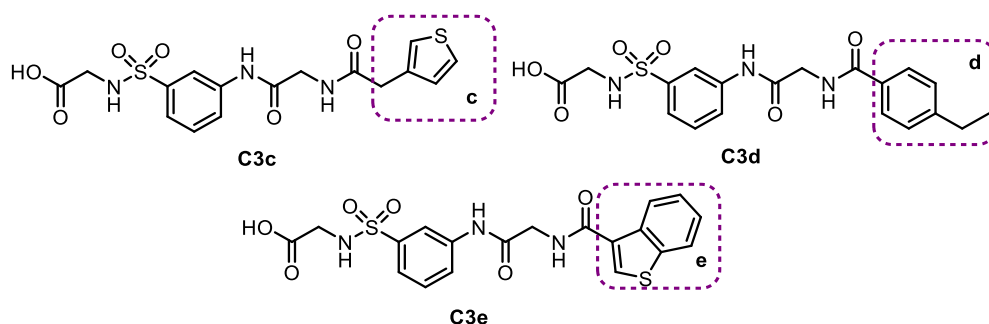


Figura III-21. Compuestos **C3c-C3e** candidatos a ser inhibidores de la señalización CNA-NFATc.

III.3 Resultados y discusión

Por otra parte, tratando de emular la interacción que tendría el grupo indol con la CN, se decidió ampliar la familia de nuevas moléculas candidatas con los compuestos **C3h** y **C3i** (Figura III-22), que incorporaban en el extremo de su estructura un anillo aromático y un nitrógeno.

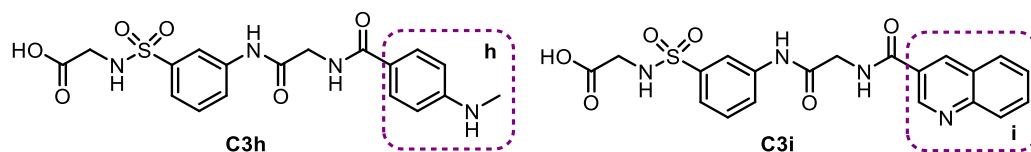
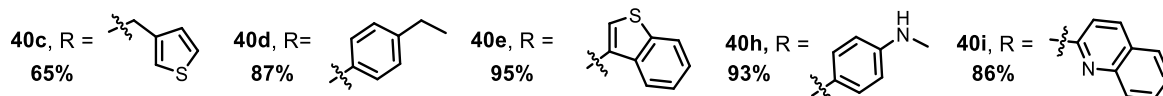
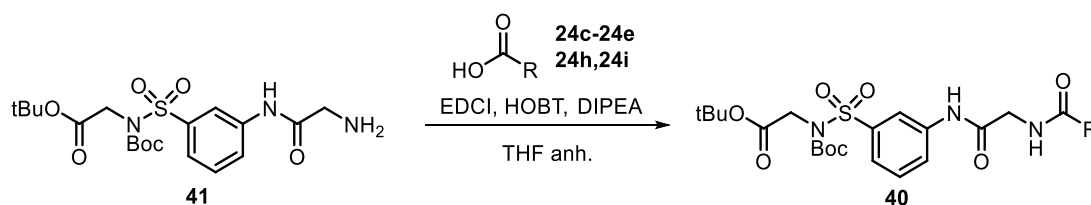


Figura III-22. Compuestos **C3h** y **C3i** candidatos a ser inhibidores de la de la señalización CN-NFATc.

Para poder sintetizar los compuestos objetivo **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i** se siguió el mismo procedimiento que el planteado para el compuesto **C3a**. Primero acoplar los ácidos carboxílicos comerciales **24c-24e** y **24h-24i** con la amina **41** utilizando agentes de acoplamiento para obtener los intermedios **40c-40e**, **40h** y **40i**, y finalmente la desprotección de los grupos *tert*-butilo y Boc para obtener los compuestos finales.

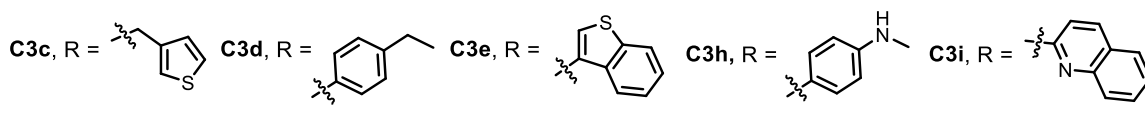
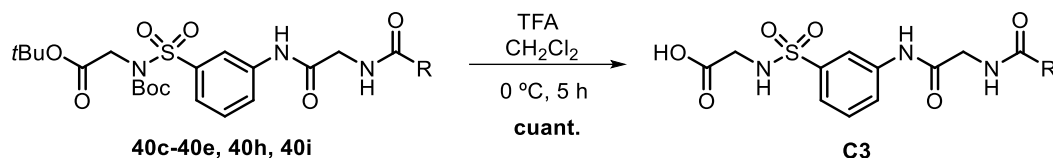
De esta manera, la amina **41** se hizo reaccionar con los ácidos carboxílicos **24c-24e** y **24h-24i** activados previamente con EDCI y HOBt, en el seno de THF anhidro y usando DIPEA como base. Transcurrida una noche en agitación a temperatura ambiente y tras una purificación por columna cromatográfica en gel de sílice se obtuvieron los compuestos **40c-40e**, **40h** y **40i** con rendimientos considerablemente elevados del 65% al 95% (Esquema III-15).



Esquema III-15. Condiciones de reacción para la obtención de los compuestos **40c-40e**, **40h** y **40i**.

La aparición de un singlete/triplete ancho en el espectro de ^1H RMN con desplazamientos químicos de entre 8.87 - 7.87 ppm (dependiendo del producto) y con integral de un protón, correspondía al protón de la amida formada entre el ácido carboxílico comercial y la amina **41**. Este hecho demostró la correcta formación de los productos **40c-40e**, **40h** y **40i**. Al igual que para el compuesto **40a**, en los espectros de HMBC se pudo comprobar que el protón de la amida formada en cada compuesto de la familia **C3** tenía interacción con el carbonilo C_{11} (δ 168.5 - 169.7) y los carbonos aromáticos C_{21} y C_{41} (δ 118.3 - 119.8 y 124.7 - 124.8, respectivamente).

Finalmente, los compuestos **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i** fueron obtenidos mediante la desprotección del ácido carboxílico en forma de éster *tert*-butílico y de la sulfonamida en forma de sulfonilcarbamato *tert*-butílico por acción del TFA en el seno de CH₂Cl₂ a 0 °C durante 5 h. Esta reacción transcurrió de forma muy eficaz y limpia. Los ácidos carboxílicos finales **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i** se obtuvieron con un rendimiento cuantitativo y una alta pureza (Esquema III-16).



Esquema III-16. Condiciones de reacción para la síntesis de los productos finales **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i**.

Al observar los espectros de ¹H RMN, la desaparición de las dos señales a δ 1.4 y 1.3 con integral de nueve protones cada una, correspondientes a los *tert*-butilos, corroboraron la correcta desprotección de los grupos protectores *tert*-butílicos. En los espectros de ¹³C RMN también se pudo observar la desaparición de los carbonos de los dos *tert*-butilos (terciarios a δ 81.3 - 85.1 y primarios a δ 27.3 - 28.1) y del carbonilo del Boc (δ 149.9 - 151.2) que aparecían en los espectros de ¹³C de sus precursores.

Las estructuras moleculares de los productos finales **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i** fueron elucidadas a partir de los experimentos de RMN de ¹H y ¹³C, y sus correlaciones bidimensionales, y por analogía con sus precursores. Los experimentos de espectroscopía de masas también mostraron picos correspondientes a [M+H]⁺ que cuadraban perfectamente con los calculados.

En resumen, los compuestos finales **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i** fueron sintetizados siguiendo una secuencia sintética lineal de siete etapas, cada uno de ellos, con rendimientos totales de entre el 35% - 50%. Las cinco primeras etapas de la síntesis son comunes para todos los productos. La etapa clave de la síntesis fue el acoplamiento del fragmento de Gly protegido en forma de CBz (Figura III-23).

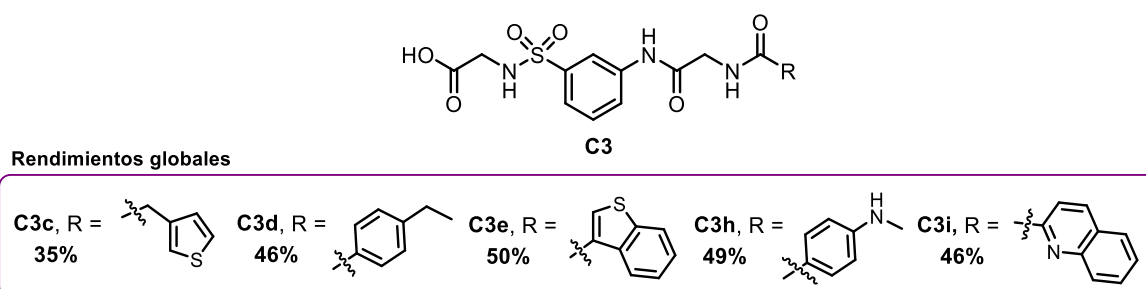


Figura III-23. Resumen de los rendimientos globales de la síntesis de los compuestos finales **C3c-C3e**, **C3h** y **C3i**.

III.3.4. Síntesis del compuesto C4a

De forma paralela a la síntesis de los compuestos **C3c-C3i**, se diseñó la molécula **C4a** con el afán de recuperar la sulfonamida que se mantenía presente en los inhibidores potenciales de la actividad del NFATc **C1a** y **20**, y ausente en la familia **C2**, pudiendo motivar su escasa respuesta biológica. De esta manera, el compuesto **C4a** presentaba las siguientes características: (i) el grupo **hidrofóbico** terminal; (ii) la **sulfonamida** común de la familia **C1** y de todos los inhibidores de la actividad de la NFATc estudiados; (iii) el **espaciador** característico de la familia **C2**, diseñada a partir del compuesto **20**; y (iv) el grupo **indol** presente en la molécula **C1a**, y que tenía un buen ajuste en el con el área HYD2 del farmacóforo (Figura III-24).

A pesar de todos los problemas generados por la presencia del grupo indol en la familia de compuestos **C3**, se decidió volver a incorporarlo en la molécula objetivo debido a que en la secuencia sintética planteada no se utilizó TFA una vez ya incorporado éste fragmento en la molécula.

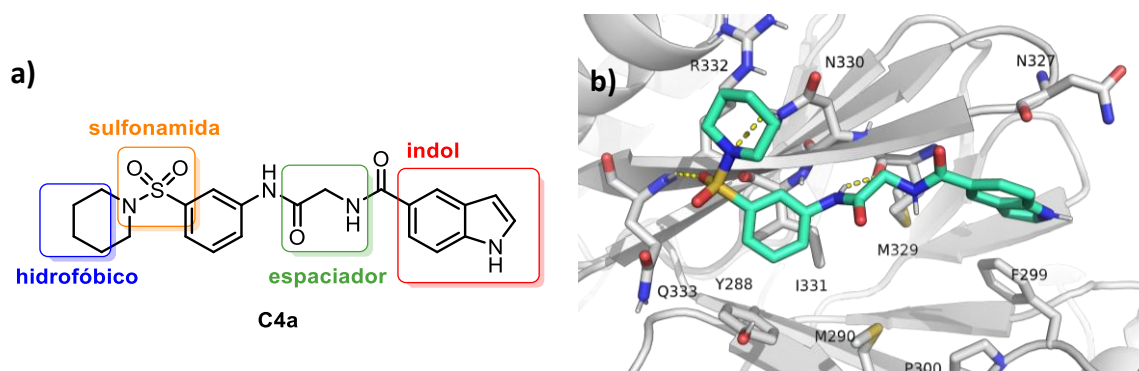
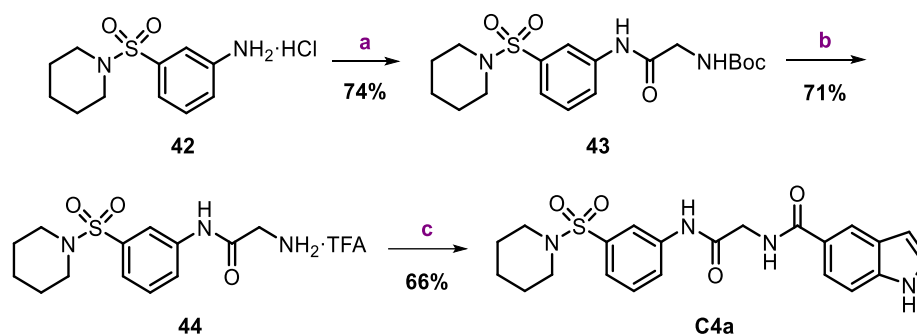


Figura III-24. a) Estructura molecular del compuesto **C4a**. b) Captura de la simulación *docking* con el compuesto **C4a** y la cavidad PxlXIT de la CNA.

Con la sustitución de la metilsulfona presente en la familia 9 por un piperidinilsulfonil, se esperaba evaluar la posible influencia de las interacciones hidrofóbicas y alifáticas del candidato con la región cerca del residuo Arg³³², e interacciones polares con la Asn³³⁰.

La síntesis del compuesto **C4a** fue realizada por la Dra. Selma Crecente durante su trabajo de final de grado en nuestro grupo de investigación, mediante una secuencia sintética de 3 etapas que se inició con la formación de un enlace tipo amida entre la anilina primaria comercial **42** y el ácido carboxílico comercial Boc-Gly-OH (Esquema III-17). Este acoplamiento se realizó utilizando EDCI/HOBt como agentes de acoplamiento, Et₃N como base en el seno de una mezcla de THF-DMF anhidros durante una noche a temperatura ambiente. El compuesto **43** fue obtenido con un 74% de rendimiento tras una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice.



Esquema III-17. Ruta sintética para la obtención del compuesto **C4a**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) Boc-Gly-OH, EDCI, Et₃N, HOBT, THF/DMF anh.; (b) TFA, CH₂Cl₂; (c) **24a**, EDCI, Et₃N, HOBT, THF/DMF anh.

En la siguiente reacción, la amina en forma de carbamato *terc*-butílico del compuesto **44** fue desprotegida utilizando TFA en el seno de CH₂Cl₂ durante 2 h para obtener la amina **44** con un rendimiento del 71%, en forma de su correspondiente sal de trifluoroacetato, que a su vez se hizo reaccionar con el ácido indol-5-carboxílico comercial **24a** para formar un enlace amida y así obtener el compuesto **C4a** con un rendimiento del 66%. En esta reacción también se usó EDCI/HOBT como agentes de acoplamiento y Et₃N como base en el seno de una mezcla de THF-DMF anhidros durante una noche a temperatura ambiente.

La estructura molecular de los nuevos productos **43**, **44** y **C4a** fue elucidada a partir de los experimentos de RMN de ¹H y ¹³C, y sus correlaciones bidimensionales. Los resultados de espectroscopia de masas mostraron unos picos que concordaron perfectamente con los calculados. En resumen, el compuesto final **C4a** fue obtenido con una sencilla síntesis lineal de tres etapas y con un rendimiento global del 35%.

III.3.5. Experimentos de competitividad con los compuestos **C4a** y **C3** vs. CF-PRIEIT en la cavidad PxlIT-CN, *in vitro*

Al igual que con las familias **C1** y **C2**, la nueva batería de compuestos **C4a** y **C3** también fue sometida a experimentos de competitividad con la interacción CNA-CF-PRIEIT y a experimentos para evaluar la capacidad inhibitoria de la actividad de la NFATc. Los estudios de competitividad entre el **C4a** y el CF-PRIEIT mostraron su capacidad para interrumpir parcialmente la interacción CNA-CF-PRIEIT a una concentración de 10 μM de una manera menos eficiente que en comparación con los compuestos **C1a** y **20**, ya estudiados (Figura III-25a). En otro conjunto de experimentos, al comparar la interacción del compuesto **C4a** con la familia **C3** solo los compuestos **C3g** y **C3i** mejoraron ligeramente la interrupción de la interacción CNA-PRIEIT respecto al **C4a**, **C1a** o **20**, a concentraciones de 10 μM. El resto de los

III.3 Resultados y discusión

compuestos de la familia **C3** también interfirieron parcialmente en la interacción CNA-CF-PRIEIT pero con mucha menos eficacia (Figura III-25b).

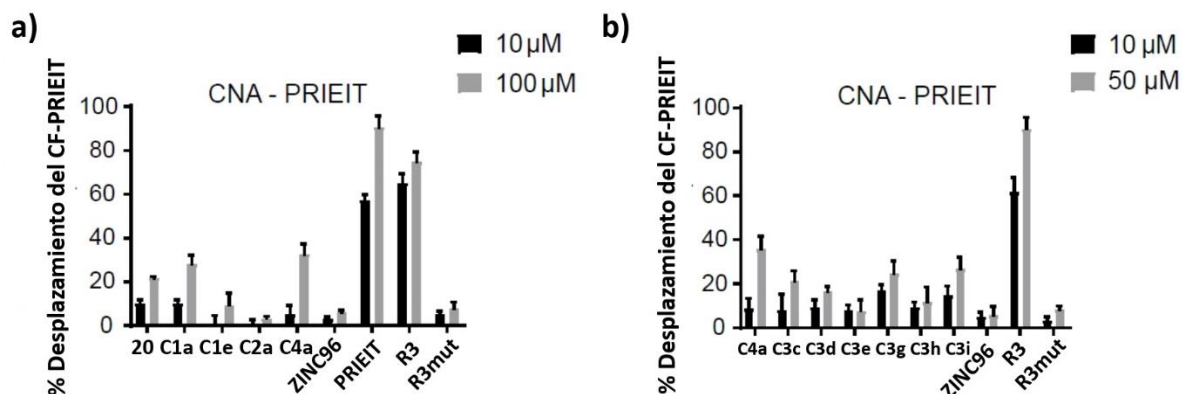


Figura III-25. a) Resultados del desplazamiento de la interacción CNA-CF-PRIEIT focalizados en la comparación del compuesto **C4a** respecto a **20**, **C1a**, **C1e**, ZINC9632125 (-), R3mut(-), PRIEIT(+) y R3(+), a concentraciones de 10 y 100 µM. b) Resultados del desplazamiento de la interacción CNA-CF-PRIEIT de los compuestos **C3c-C3e** y **C3g-C3i** en comparación con **C4a**, ZINC9632125 (-), R3mut(-), y R3(+), a concentraciones de 10 y 50 µM.

Los estudios de la inhibición de la actividad de la NFATc fueron realizados, como en ocasiones anteriores, sobre células HEK239T tratadas con disoluciones de 50 y 10 µM de los compuestos sometidos a estudio y posteriormente estimuladas con (Io+PMA). El compuesto **C4a** inhibió la actividad de la NFATc a 50 µM de forma muy similar al compuesto **20** y a la CsA (+), en cambio los compuestos **C3c-C3e** y **C3g-C3i** inhibían la actividad de la NFATc con una eficiencia muchísimo menor a la misma concentración (Figura III-26a). Para evaluar mejor la actividad del **C4a**, también se sometió a ensayo de dosis-respuesta de la inhibición de la actividad de la NFATc en rangos de concentración de entre 0.1 µM a 50 µM. El compuesto **C4a** mostró una respuesta similar a la estudiada el compuesto **C1e**, pero todavía muy lejana a la de la CsA (Figura III-26b).

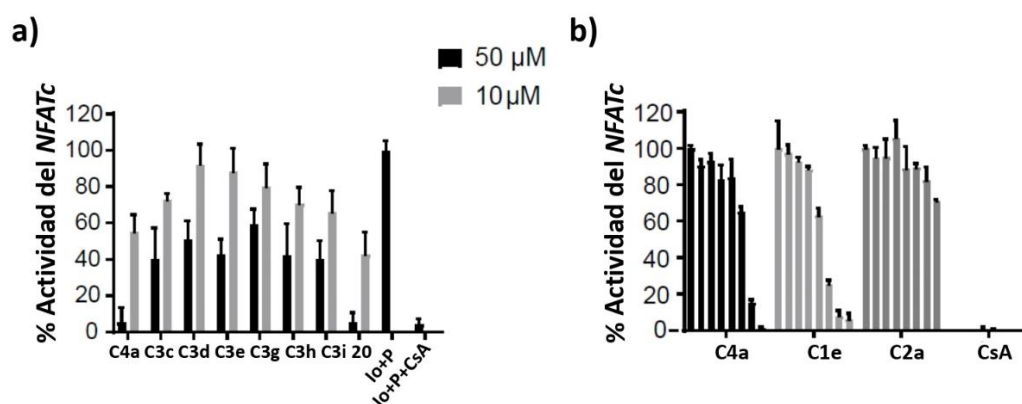


Figura III-26. Análisis de la actividad del NFATc utilizando un gen reportero 3xNFAT-luc en células HEK293T para los compuestos **C4a**, **C3c-C3e** y **C3g-C3i**. En el experimento representado en el gráfico de la izquierda las células

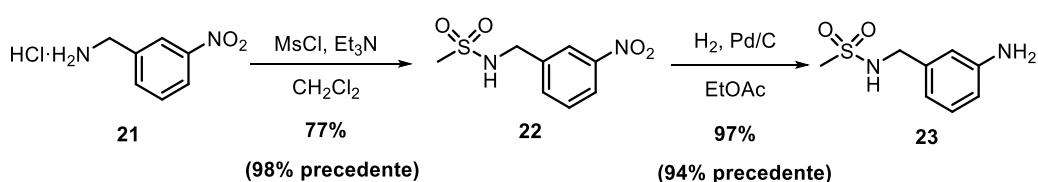
fueron tratadas con concentraciones de 50 y 10 μM , y en el de la derecha con concentraciones de 0 / 0.1 / 0.5 / 2 / 5 / 10 / 20 / 50 μM . Control negativo: **C2a**

Todos estos datos sugirieron, que la nueva batería de compuestos **C4a**, **C3c-C3e** y **C3g-C3i** no representaba una mejora como inhibidores de la actividad de la NFATc, siendo la actividad de **C4a** similar a la de los compuestos **C1a**, **C1e** y **20**, y la de los compuestos de la familia **C3** notablemente peor. Por lo tanto, la incorporación del ácido carboxílico en el extremo oeste de las moléculas candidatas resulta contraproducente para su actividad. Por otro lado, la incorporación de una sulfonamida a una molécula con estructura del tipo **C2**, como es el caso del compuesto **C4a**, incrementa su actividad biológica de forma comparable a la de los mejores candidatos de la familia **C1**.

III.3.6. Optimización y escalado de la síntesis de los compuestos **C1a** y **C1e**

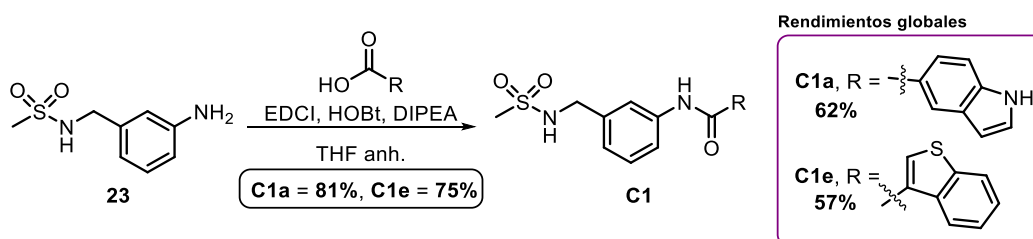
Los resultados satisfactorios de las pruebas biológicas *in vitro* mostraron los compuestos **C1a** y **C1e** como los mejores candidatos. Por ese motivo, se decidió optimizar su obtención a escala superior al gramo y poder contar así con las cantidades necesarias para experimentos *in vivo*. Para ello, se siguió la ruta sintética previamente puesta a punto por la Dr. Benaiges en nuestro grupo de investigación.

Al escalar el procedimiento de unos pocos centenares de miligramos a varios gramos, la primera etapa de formación de la sulfonamida **22** experimentó una asumible bajada de rendimiento (del 98% al 77%), mientras que en la segunda etapa de reducción del nitro derivado a la correspondiente amina **23** se observó un ligero aumento (del 94% al 97%) (Esquema III-18).



Esquema III-18. Secuencia para la síntesis de la amina **23** a escala multigramo.

La última etapa de la síntesis consistió en la formación del enlace amida entre la amina **23** y los ácidos carboxílicos comerciales **a** y **e** (Figura III-19). Siendo esta reacción la etapa limitante de la síntesis, se realizó un estudio de las condiciones de reacción previo al escalado en gramo (Tabla III-3).



Esquema III-19. Condiciones de reacción para la síntesis de los compuestos **C1a** y **C1e**.

exp.	amina 23	á. carboxílico	agentes de acoplamiento	Prod.	rdt.**
1	229 mg	24a	1.5 eq. EDCI/HOBt	1.5/1.5 eq. C1a + 45	81% + 13%
2	206 mg	24a	1.5 eq. HATU	1.5 eq. C1a + 46	60% + 21%
3	58 mg	24a	1.5 eq. EDCI·HCl	-	-
4	50 mg	24a	1.5 eq. EDCI	-	-
5	295 mg	24e	1.5 eq. EDCI/HOBt	1.5/1.5 eq. C1e	75%
6	1.63 g	24e	1.5 eq. EDCI·HCl/HOBt	1.5/1.5 eq. C1e	57%
7	2.00 g	24a	1.5 eq. EDCI·HCl/HOBt	1.5/1.5 eq. C1a + 45	34% + 41%

*Todas las reacciones se han llevado a cabo utilizando 4 eq. de DIPEA como base (5 eq. si se usa EDCI·HCl) en el seno de THF anhidro. ** Los rendimientos de las impurezas están calculados en utilizando el ácido carboxílico **a** como reactivo limitante.

Tabla III-3. Condiciones de reacción de las pruebas para el escalado de la síntesis del **C1a** y **C1e**.

En primer lugar, se empezó probando diferentes agentes de acoplamiento para la síntesis del compuesto **C1a**. Al utilizar 1.5 eq. de EDCI/HOBt se obtuvo el compuesto **C1a** con un 81% y la impureza **45** con un 13% de rendimiento. Utilizando 1.5 eq. de HATU el rendimiento del compuesto **C1a** fue del 60% y una nueva impureza **46** se aisló con un 21% de rendimiento.

Una vez aisladas y purificadas estas impurezas se elucidaron estructuralmente con la ayuda de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , y sus correlaciones bidimensionales. También los espectros de masas dieron picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ que concordaban con los calculados.

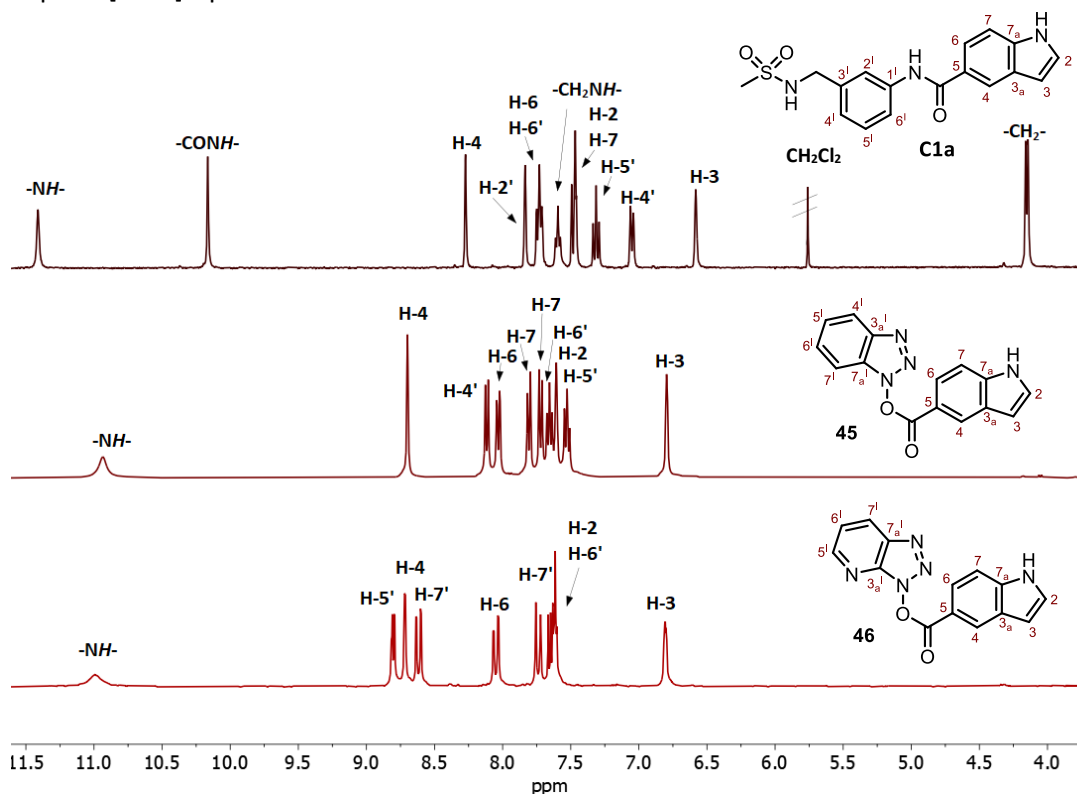
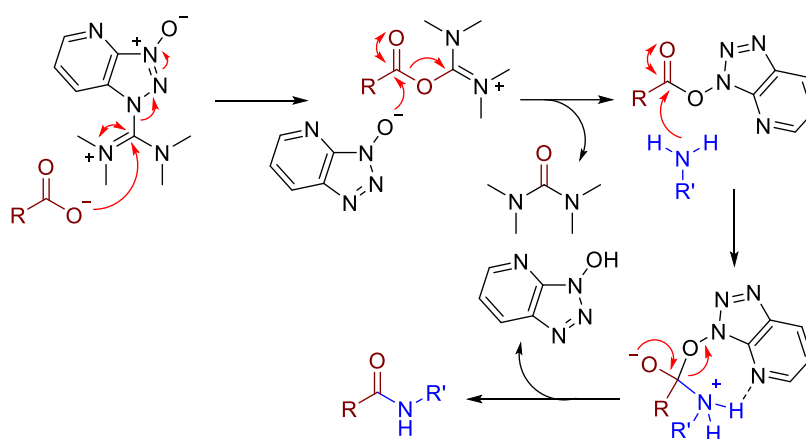


Figura III-27. Espectros de ^1H -RMN en $\text{DMSO}-d_6$ de los compuestos **C1a**, **45** y **46**.

Estas impurezas correspondían al ácido carboxílico **a** activado con los diferentes hidroxibenzotriazoles, HOBt y HATU. En los espectros de ^1H RMN del **45** y **46** de la Figura III-27 se puede observar la presencia

de las señales características del grupo indol, proveniente de ácido indol-5-carboxílico (**a**), al igual que las correspondientes a los diferentes benzotriazoles para cada impureza. Las señales del indol mantienen unos δ similares entre los espectros de ^1H RMN de las dos impurezas. En cambio, los δ de los fragmentos de benzotriazol son bastante dispares ya que la impureza proveniente del HATU incorpora un nitrógeno más en el fragmento de benzotriazol.

Observando el mecanismo de reacción del HATU con un ácido carboxílico (Esquema III-20) se puede identificar la impureza aislada del crudo de reacción **46** como un intermedio de la reacción. Esta impureza provendría del ataque nucleófilo del benzotriazol sobre el intermedio ácido carboxílico activado con la "carbodiimida". Si la amina no es lo suficientemente nucleófila para atacar el ácido carboxílico activado con el benzotriazol, la especie **46** no reacciona y queda intacta en el crudo de reacción.



Esquema III-20. Mecanismo de reacción de HATU con un ácido carboxílico y una amina primaria.

Para evitar la formación de estas impurezas generadas en los experimentos anteriores, se decidió en utilizar solo la carbodiimida EDCI como agente de acoplamiento. Así pues, en el experimento 3 se trató el ácido carboxílico **24a** con 1.5 eq. de EDCI·HCl y en el experimento 4 con 1.5 eq. de EDCI. En ninguno de los casos se observó formación del producto **C1a** y solo se obtuvieron impurezas no identificadas.

En el experimento 5 se trató el ácido carboxílico **24e** con las mismas condiciones que en el experimento 1, las más efectivas para la formación del compuesto **C1a**, obteniéndose el compuesto **C1e** con un 75% de rendimiento, tras una recristalización con CH_2Cl_2 , esta vez sin la presencia de la impureza derivada del ácido carboxílico.

Finalmente, al escalar las reacciones de formación de los compuestos **C1a** y **C1e** a escala de gramo utilizando EDCI·HCl y HOBT en el seno de THF anhidro durante una noche, se obtuvieron rendimientos del 57% para el compuesto **C1e** y del 34% para el compuesto **C1a**. Estos rendimientos fueron inferiores a los obtenidos en las pruebas a escala miligramo y parecidos a los previamente obtenidos en el grupo

de investigación (50% y 37% respectivamente). En el experimento 7 también se obtuvo una gran cantidad de impureza **45** (41%).

A partir de los experimentos de cromatografía líquida de alta resolución HPLC se pudo determinar que la pureza tanto del **C1a** como de **C1e** fue superior al 98%.

En resumen, se consiguió mantener los rendimientos globales en la síntesis de los candidatos **C1a** y **C1e** a escala gramo respecto a los obtenidos anteriormente en nuestro grupo de investigación por la Dra. Benaiges a escala de centenares de miligramos.

III.3.7. Experimentos para medir el efecto en la angiogénesis tumoral, in vivo

III.3.7.1. Citotoxicidad

Previo a los ensayos *in vivo* del efecto en la angiogénesis tumoral de los compuestos, se decidió determinar si estos eran citotóxicos. En este contexto, varias células humanas y de ratones (normales y tumorales) fueron tratadas con 1 y 10 μM de los compuestos **C1a**, **C1e** y **20**, durante 72 h, para desarrollar un ensayo de viabilidad celular usando un método *CellTiter-Glo*[®]. Estos compuestos no resultaron ser citotóxicos para ningún tipo de célula analizada a una concentración de 10 μM (Figura A-III-1). Además, para profundizar más en la toxicidad de los compuestos **C1a** y **20** un ensayo de dosis máxima tolerada (*maximum tolerated dosis*, MTD) se practicó *in vivo* en animales BALB/c. Una dosis diaria de cada compuesto, correspondiente a 50 mg/kg, fue administrada a estos animales de forma intraperitoneal durante siete días. No se observó ningún efecto citotóxico en ningún compuesto a esta concentración.

III.3.7.2. Biodisponibilidad de los compuestos **C1a** y **20**

Los análisis de biodisponibilidad fueron realizados en sangre de ratón. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos para la administración de los compuestos en una dosis de 100 mg/kg por vía intraperitoneal están ilustrados en la Tabla A-III-1 del anexo. El $t_{1/2}$ fue relativamente bajo para los compuestos **C1a** y **20** (0.65 h y 1.48 h, respectivamente), igual que el T_{max} (menos de 1 h) y la máxima concentración conseguida en plasma (Figura A-III-2). El pico de concentración máxima en sangre (C_{max}) fue de 32.1 $\mu\text{g/mL}$ para el compuesto **C1a**, mientras que para el compuesto **20** fue de solo 0.077 $\mu\text{g/mL}$.

III.3.7.3. Angiogénesis tumoral

Finalmente, el efecto de los dos compuestos **C1a** y **20** fue evaluado en la angiogénesis tumoral de células de cáncer de mama triple negativo (*triple negative breast cancer*, TNBC), a través un modelo ortotópico de células de ratón 4T1 TNBC en ratones inmunocompetentes BALB/c. La inyección de las células 4T1 y la posterior inyección intraperitoneal de los compuestos no supuso un efecto negativo en el peso, comportamiento reproductivo y condiciones generales de salud de los ratones. Cuando el volumen de los tumores se evaluó tras 15 días de tratamiento, no se observaron diferencias significativas en el volumen de los tumores entre el grupo control y el grupo de tratamiento con **C1a**, **20** o **FK506** (Figura III-28).

Estudios previos en el grupo de investigación de la Dra. Mercè Pérez Riba habían mostrado la capacidad de interrumpir la angiogénesis de TNBC en ratones a través de la inhibición de la actividad de la NFATc.²³ Para caracterizar el efecto de los compuestos **C1a**, **20** sobre la angiogénesis de tumores, los tumores TNBC provocados en ratones fueron diseccionados al final de los experimentos, fijados en 4% de paraformaldehído (PFA) y analizados por un análisis de inmunohistoquímica (IHC) con el anticuerpo marcador de células endoteliales CD31. La angiogénesis tumoral de animales tratados con el compuesto **C1a** mostró una tendencia a ser reducida ($p = 0.0721$) (Figura III-29). En contraste, la angiogénesis tumoral en los animales tratados con el compuesto **20** fue similar a la del grupo de control. FK506 redujo de forma significativa la angiogénesis tumoral en comparación con los ratones vehículo. Por lo tanto, se puede afirmar que el compuesto **C1a** muestra una tendencia a reducir la angiogénesis en modelos ortotópicos singénicos de TNBC.

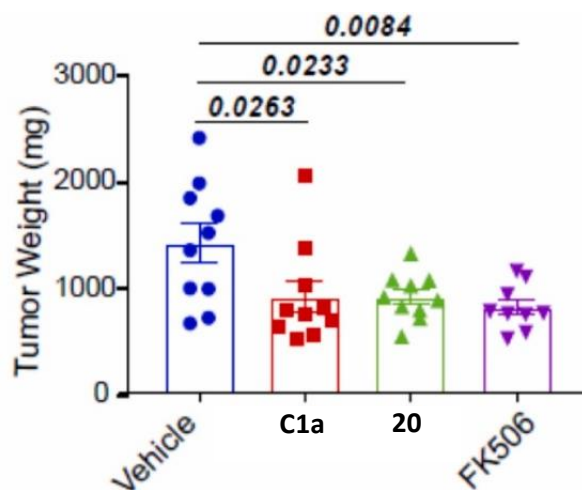


Figura III-28. Tamaño de los tumores de cada grupo experimental \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional con test de post-hoc de Dun-nett. La significancia estadística se muestra en negrita.

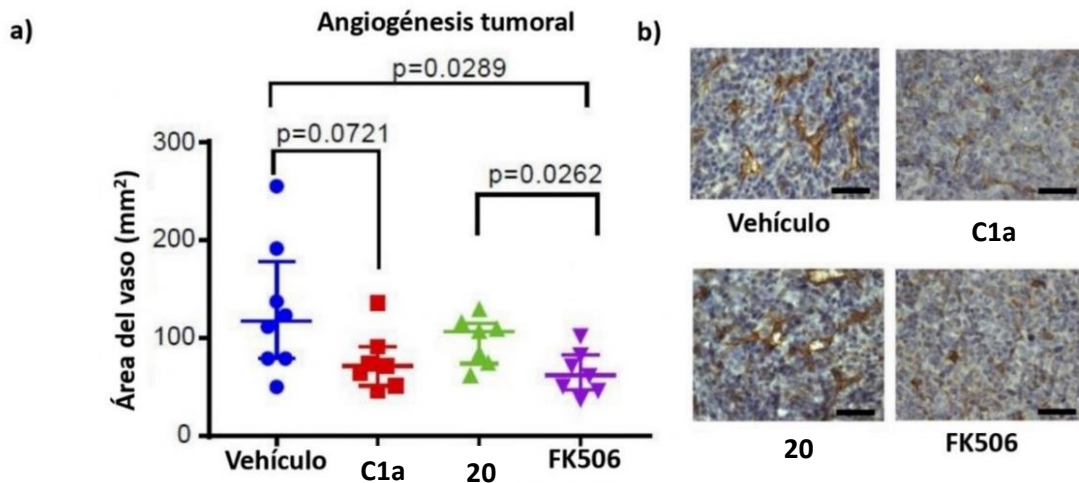


Figura III-29. a) Cuantificación del área medida del vaso/mm² por campo de alta potencia (HPF). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,1$ especificados en el gráfico). Los datos se presentan como la media +/- rango intercuartílico. b) Imágenes representativas de secciones histológicas de TNBC de ratón tratada con los compuestos **C1a**, **20** y FK506, y teñidas con anti-CD31 de conejo. La escala de las barras es de 200 μm .

III.4. Resumen y conclusiones

Antes del inicio de esta tesis, el Dr. Matsoukas en el grupo de investigación del Dr. Leonardo Pardo (UAB), mediante un VS de los ~ 5.5 millones de compuestos de la base de datos de ZINC, seleccionó 32 compuestos para un cribado en experimentos *in vitro* en el grupo de investigación de la Dra. Mercé Pérez Riba (IDBELL), sobre la posible actividad como inhibidores de la señalización CN-NFATc sin interferir en la actividad de la CN como fosfatasa. De estos 32 compuestos dos de ellos presentaron de una manera destacable la actividad buscada.

Estos dos *hits* **19** y **20** sirvieron para diseñar dos nuevas familias de compuestos **C1** y **C2** a partir de algunos cambios estructurales sobre estos *hits* (Figura III-30). Estos cambios se basaban en eliminar algunos fragmentos aparentemente sin valor interactivo, y modificar sus extremos para potenciar posibles interacciones con ciertos residuos de la enzima.

Las familias **C1** y **C2** fueron sintetizadas de forma exitosa con unas rutas sencillas de tres etapas con rendimientos globales de entre el 22% - 85%. Todos los compuestos **C1** y **C2** fueron elucidados estructuralmente y caracterizados gracias a experimentos de RMN ^1H y ^{13}C , espectroscopia de masas, puntos de fusión y espectroscopia de IR-Vis.

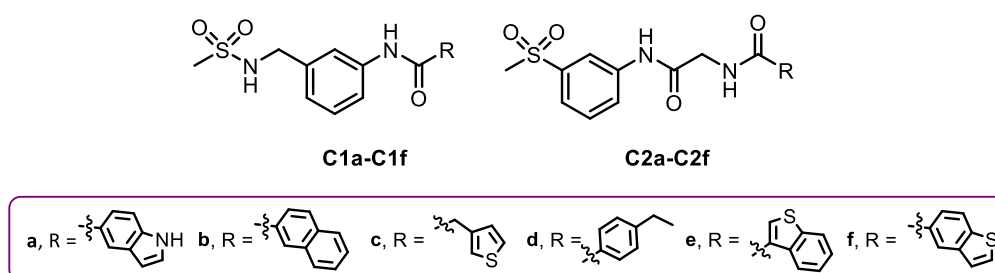
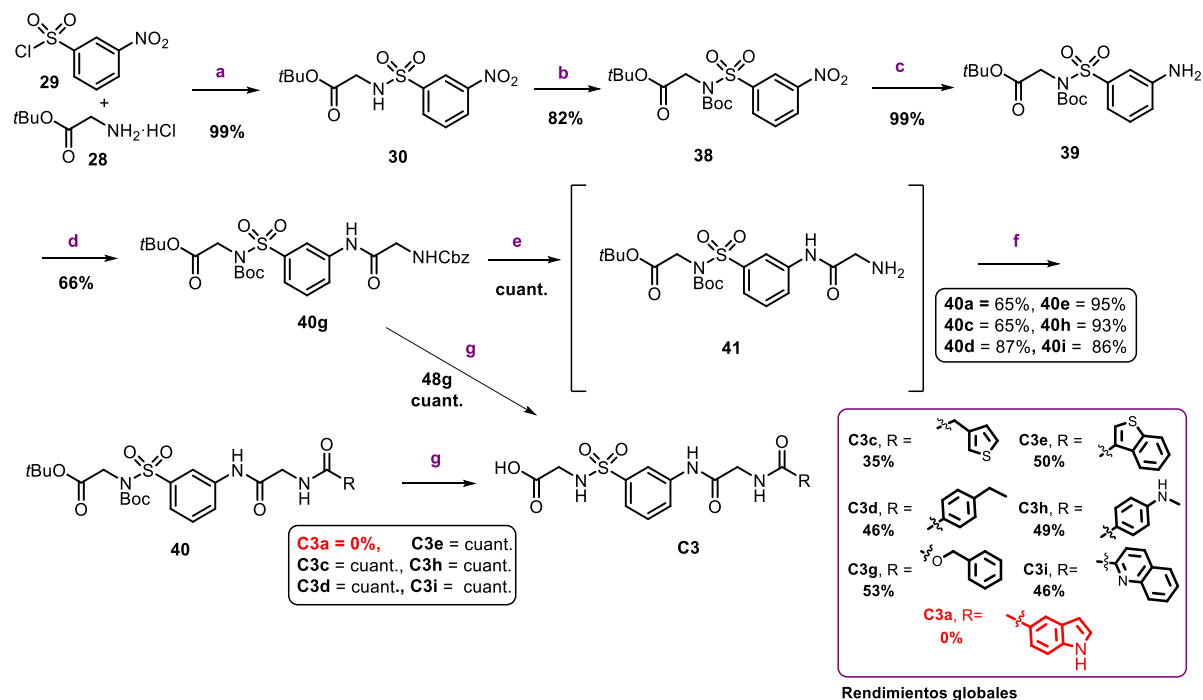


Figura III-30. Estructura de los compuestos de las familias **C1** y **C2**.

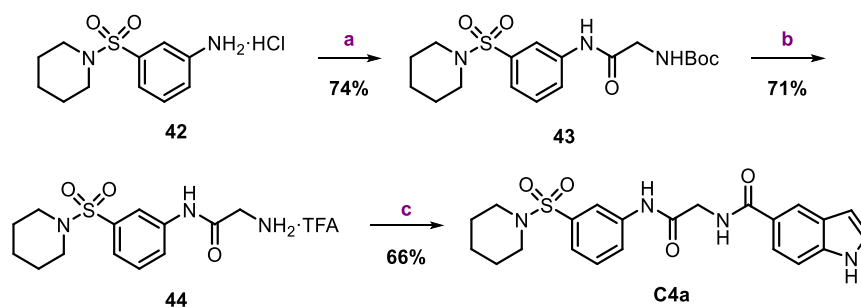
A parte de estas dos familias también se diseñó el candidato **C3a**, con un cambio estructural respecto a los compuestos **C1** y **C2**, correspondiente a la incorporación de un grupo ácido carboxílico en el extremo oeste de la molécula para estudiar su posible interacción con la enzima. Casi al final de la ruta sintética planteada para este compuesto se abandonó su obtención por otra batería de compuestos que igualmente eran útiles para comprobar la efectividad de los cambios estructurales planteados. De esta manera, se sintetizó la serie de compuestos **C3c-C3e** y **C3g-C3i** con la misma metodología, una ruta sintética lineal de 7 etapas con el mismo intermedio hasta la etapa 5 y que luego divergía en las dos últimas etapas. Los rendimientos globales fueron de entre el 35% - 53% (Esquema III-21). De forma paralela, para evaluar otros factores en la interacción con la enzima, tales como una posible combinación de interacciones hidrofóbicas y polares al oeste de la cavidad, también se sintetizó el

III.4 Resumen y conclusiones

compuesto **C4a** con una sencilla síntesis de tres etapas y con un rendimiento global del 35% (Esquema III-22).



Esquema III-21. Ruta de síntesis para la obtención de los compuestos **C3c-C3e** y **C3g-C3i**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) DIPEA, CH₂Cl₂ anh.; (b) Boc₂O, DMAP, CH₃CN, 0 °C, ta; (c) H₂, Pd/C, EtOAc; (d) Z-Gly-OH, EDCI, HOBT, Et₃N, THF anh.; (e) H₂, Pd/C, MeOH; (f) **24a/24c-24e/24h/24i**, EDCI, HOBT, DIPEA, THF anh.; (g) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 5 h.



Esquema III-22. Ruta sintética para la obtención del compuesto **C4a**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) Boc-Gly-OH, EDCI, Et₃N, HOBT, THF/DMF anh.; (b) TFA, CH₂Cl₂; (c) **a**, EDCI, Et₃N, HOBT, THF/DMF anh.

Durante la síntesis de los compuestos **C3** se pudo observar la gran reactividad inesperada de la sulfonamida respecto a la reactividad de la anilina poco activada. A pesar de proteger la sulfonamida, la reactividad de la anilina continuó siendo baja, incluso activando el ácido carboxílico con un cloruro de acilo, el cual no reaccionó. Esta formación del enlace amida se determinó como la etapa limitante de la síntesis.

Todos los compuestos sintetizados (el **C4a** y las familias **C1**, **C2** y **C3**) fueron evaluados biológicamente en experimentos *in vitro* en colaboración con el grupo de la Dra. Mercè Pérez del IDBELL. Estos experimentos consistieron en comprobar la capacidad de los nuevos compuestos de competir por la interacción sobre la cavidad PxlxIT-CNA de la CN con diferentes sustratos, y de esta forma medir su potencial como inmunosupresores.

Los resultados mostraron que tanto las familias **C1** y **C3** como el compuesto **C4a** interrumpían parcialmente la interacción entre la CNA y el péptido derivado del NFATc2, PRIEIT. Además, la mayor parte de los compuestos de las familias **C1** y **C3** y el compuesto **C4a** inhibían la actividad del NFATc en células estimuladas con Ca^{2+} de forma comparable al compuesto **20**, ya estudiado previamente. Sin embargo, los compuestos **C3** lo hacían de manera mucho menos eficaz que el resto. Interesantemente, la familia **C2** falló en los experimentos tanto con el PRIEIT como con la actividad del NFATc.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del grupo sulfonamida presente en la familia **C1** y **C3** y compuesto **C4a**. Por otro lado, el grupo ácido carboxílico de la familia **C3** no supuso una mejora considerable en la interacción con la cavidad PxlxIT, sino que actuó de forma perjudicial. En cuanto a la influencia del espaciador Gly entre el anillo aromático central y los sustituyentes terminales del área HYD, presente en las familias **C3** y **C2**, y el compuesto **C4a**, no supuso un factor relevante y concluyente debido a la actividad tan dispar entre estos diferentes compuestos.

De todos los compuestos sintetizados, las carboxamidas **C1a**, **C1e** y **C4a** fueron las moléculas más efectivas frente a la interacción con la CNA y la inhibición de la señalización del NFATc. En particular, el mejor compuesto fue el **C1a** y los cálculos computacionales mostraron que su interacción era similar a la del compuesto **20**, más una interacción polar potencialmente importante entre el indol y el residuo Asn³²⁷ como posible causa de su singularidad.

Además, en otro experimento se pudo observar que la interacción de la familia **C1** no afectaba a la actividad como fosforilasa de la CNA frente al sustrato pNPP. Por lo tanto, se puede afirmar que los compuestos **C1a** y **C1e**, los cuales son capaces de interactuar con la cavidad PxlxIT de la CNA inhibiendo la señalización CN-NFATc y sin afectar a su actividad como fosfatasa, son nuevas herramientas de valor para la terapia inmunosupresora. Además, ni el compuesto **C1a** ni el **C1e** mostraron citotoxicidad.

Finalmente, en vista del protagonismo de la señalización CNA-NFATc frente a la angiogénesis tumoral y el crecimiento de tumores²³, se analizó el mejor candidato, **C1a**, en un modelo *in vivo* singénico ortotópico de células TNBC de ratón en comparativa con el compuesto **20** y el conocido inmunosupresor FK506. Los resultados mostraron una tendencia en la reducción de la angiogénesis tumoral en ratones tratados con el compuesto **C1a** en comparación con el grupo control.

III.4 Resumen y conclusiones

Sorprendentemente, el *hit* **20** no afectó a la angiogénesis tumoral mientras que el FK506 la reducía significativamente.

Esta diferencia entre los compuestos **20** y **C1a** podría ser explicada debido a las diferencias observadas en la biodisponibilidad de estos compuestos. A pesar de que la distribución de los dos compuestos en sangre a través del tiempo es similar, el **C1a** mostró un pico de concentración máxima en sangre (C_{max}) mucho más elevado que para el **20**, lo que sugiere que los animales tratados con dos dosis diarias de **C1a** pudieran sufrir un descenso significativo en la angiogénesis tumoral.

En resumen, de todos los compuestos sintetizados, la carboxamida **C1a**, una nueva molécula pequeña no peptídica, es la molécula más efectiva para interactuar con la cavidad PxlIT de la CNA inhibiendo la señalización CNA-NFATc sin interferir en la actividad enzimática de la CN como fosfatasa. Además, el compuesto **C1a** también muestra una tendencia a reducir la angiogénesis tumoral.

III.5. Referencias del capítulo III

- (1) Farreras, P.; Rozman, C. *Medicina Interna*, 17a ed., Elsevier, Barcelona, 2012.
- (2) Collado, V. M.; Porras, R.; Cutuli, T.; Gómez-Lucía, E. *Rev. Complut. Cien. Vet.* 2008, 2, 1-16.
- (3) Aramburu, J.; Rao, A.; Klee, C. B. *Curr. Top. Cell. Regul.* **2001**, 36, 237-295.
- (4) Li, H.; Zhang, L.; Rao, A.; Harrison, S. C.; Hogan, P. G. *J. Mol. Biol.* **2007**, 369, 1296-1306.
- (5) Hogan, P. G.; Chen, L.; Nardone, J.; Rao, A. *Genes. Dev.* **2003**, 17, 2205-2232.
- (6) Prieto, M. *Med. Infant.* **2015**, 22, 35-39.
- (7) Rodríguez, A.; Roy, J.; Martínez-Martínez, S.; López-Maderuelo, M. D.; Niño-Moreno, P.; Ortí, L.; Pantoja-Uceda, D.; Pineda-Lucena, A.; Cyert, M. S.; Redondo, J. M. *Mol. Cell.* **2009**, 33, 616-626.
- (8) Grigoriu, S.; Bond, R.; Cossio, P.; Chen, J. A.; Ly, N.; Hummer, G.; Page, R.; Cyert, M. S.; Peti, W. *PLoS. Biol.* **2013**, 11, e1001492.
- (9) Matsoukas, M. T.; Aranguren-Ibáñez, Á.; Lozano, T.; Nunes, V.; Lasarte, J. J.; Pardo, L.; Pérez-Riba, M. *Sci. Signal.* **2015**, 8, p.ra63.
- (10) Martínez-Martínez, S.; Redondo, J. M. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 997-1007.
- (11) Jin, L.; Harrison, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 13522-13526.
- (12) Griffith, J. P.; Kim, J. L.; Kim, E. E.; Sintchak, M. D.; Thomson, J. A.; Fitzgibbon, M. J.; Fleming, M. A.; Caron, P. R.; Hsiao, K.; Navia, M. A. *Cell* **1995**, 82, 507-522.
- (13) Huai, Q.; Kim, H.-Y.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Mondragon, A.; Liu, J. O.; Ke, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 12037-12042.
- (14) Müller, M. R.; Rao, A. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, 10, 645-656.
- (15) Shou, J.; Jing, J.; Xie, J.; You, L.; Jing, Z.; Yao, J.; Han, W.; Pan, H. *Cancer Lett.* **2015**, 361, 174-184.
- (16) Li, H.; Pink, M. D.; Murphy, J. G.; Stein, A.; Dell'Acqua, M. L.; Hogan, P. G. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 337-345.
- (17) Garcia-Cozar, F. J.; Okamura, H.; Aramburu, J. F.; Shaw, K. T. Y.; Pelletier, L.; Showalter, R.; Villafranca, E.; Rao, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 23877-23883.
- (18) Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 1757-1768.
- (19) Athanasiadis, E.; Cournia, Z.; Spyrou, G. *Bioinformatics* **2012**, 28, 3002-3003.
- (20) Xiang, J. S.; Hu, Y.; Rush, T. S.; Thomason, J. R.; Ipek, M.; Sum, P. E.; Abrous, L.; Sabatini, J. J.; Georgiadis, K.; Reifenberg, E.; Majumdar, M.; Morris, E. A.; Tam, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 311-316.

III.5 Referencias

- (21) Nuti, E.; Santamaria, S.; Casalini, F.; Yamamoto, K.; Marinelli, L.; La Pietra, V.; Novellino, E.; Orlandini, E.; Nencetti, S.; Marini, A. M.; Salerno, S.; Taliani, S.; Da Settimo, F.; Nagase, H.; Rossello, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 379-394.
- (22) Masui, Y.; Chino, N.; Sakakibara, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, *53*, 464-468.
- (23) Martínez-Høyer, S.; Solé-Sánchez, S.; Aguado, F.; Martínez-Martínez, S.; Serrano-Candelas, E.; Hernández, J. L.; Iglesias, M.; Redondo, J. M.; Casanovas, O.; Messeguer, R.; Pérez-Riba, M. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 792-799.

Fuente de las Figuras III

Figura III-2. a) Figura extraída y modificada de la referencia 9; b) Figura extraída y modificada de referencia 8.

Figura III-3. b) Figura extraída y modificada de la referencia 9.

Figura III-4. Figura extraída y modificada de la referencia 14.

Figura III-5. Figura extraída de la referencia 9.

* El resto de las figuras presentes en este capítulo han sido creadas por el autor de la tesis doctoral o extraídas del artículo "Design and synthesis of a novel non peptide CN-NFATc signaling inhibitor for tumor suppression in triple negative breast cancer. Sánchez-Morales, A.; Biçer, A.; Panagiotopoulos, V.; Crecente-García, S.; Benaiges, C.; Bayod, S.; Hernández, J. L.; Busqué, F.; Matsoukas, M.; Pérez-Riba, M.; Alibés, R.; *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *238*, 114514", del cual el autor de la tesis es coautor.

Capítulo IV

Estabilizadores de la TTR

Resumen

La amiloidosis por transtiretina (ATTR) son un grupo de enfermedades potencialmente mortales caracterizadas por la agregación y plegamiento anormal de la transtiretina (TTR). Una de las estrategias más utilizadas para combatir estas patologías es el uso de moléculas pequeñas que puedan unirse y estabilizar el tetrámero de TTR, evitando su disociación y agregación. Gracias a una combinación de diseño racional y simulaciones de DM sobre la estructura cristalográfica de la TTR en combinación con el tolcapone, un potente fármaco que estabiliza el tetrámero y descubierto por reposición, se ha diseñado una serie de nuevos compuestos estabilizadores de la TTR. En este capítulo se describe el diseño, la síntesis y la evaluación farmacológica de la capacidad como estabilizadores de la TTR, entre otras cualidades, de estos nuevos compuestos (familia TES).

IV.1. Introducción

IV.1.1. Amiloidosis

Las amiloidosis son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por el depósito, agregación y plegamiento anormal de una proteína en forma de fibras insolubles en tejidos y órganos, alterando su funcionamiento.¹ En 1854, Rudolf Virchow, médico y biólogo alemán, utilizó el término amiloide para referirse a estas agregaciones patológicas. Virchow describió la reacción de estos cúmulos con yodo y sulfúrico de una forma similar a la que sucedía con el almidón, es por eso por lo que amiloide, del latín “amylum”, significa “material similar al almidón”.²

El material amiloide está compuesto básicamente por tres elementos: (i) el componente amiloide P sérico, una glicoproteína pentagonal (pentaxina) que constituye un 14% del peso; (ii) las proteínas fibrilares del amiloide insolubles que se agrupan en forma de polímeros; y (iii) los componentes de la matriz extracelular (proteoglicanos y glucosaminoglicanos) que ocupan apenas un 5% del peso y se cree que contribuyen a la estabilización de las fibras.³ Cualquier proteína que presente este tipo de repliegamiento y características físico-químicas, independientemente de la secuencia de aminoácidos sobre la que se repliega, es considerada un amiloide.⁴

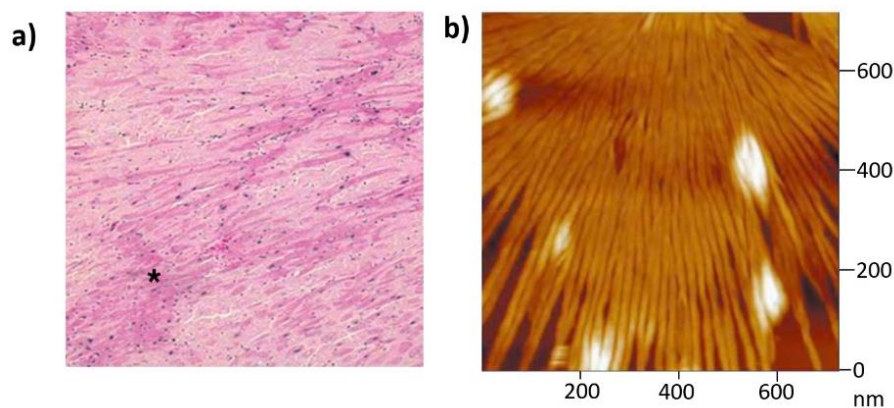


Figura IV-1. Demostración histológica del amiloide a) en una muestra en hematoxilina eosina (el * señala el depósito amiloide extracelular amorfo; y b) en visión del amiloide por microscopía electrónica.⁵

Se han propuesto múltiples clasificaciones de la amiloidosis. Clásicamente, se han clasificado según el cuadro clínico o según la localización histológica del depósito de amiloide y del patrón de distribución por órganos.⁶ La tendencia actual es clasificarlas según la naturaleza de las proteínas precursoras de las fibras del amiloide.³

Este tipo de enfermedades son de carácter progresivo y suelen tener una evolución fatal en pocos años. Habitualmente, la causa de la muerte suele ser la insuficiencia cardíaca o renal, hemorragia

IV.1 Introducción

gastrointestinal, insuficiencia respiratoria o infecciones superpuestas, pero también es muy frecuente la muerte súbita, presumiblemente por arritmias. En algunas ocasiones, estas enfermedades pueden remitir dependiendo del tipo de infección, de si los tumores son extirpables o curables y del tratamiento.⁶

IV.1.2. Transtiretina (TTR)

La transtiretina (TTR) es una de las más de 30 proteínas asociada a este tipo de enfermedades.⁷ La TTR humana es sintetizada principalmente en el hígado, en el epitelio pigmentario retinal y en el plexo coroideo. La TTR transporta la proteína de unión al holo-retinol (holo-RBP) y funciona como transportador de apoyo para la tiroxina (T_4) en sangre (Figura IV-3). También es el transportador principal de la T_4 en el líquido cerebroespinal (LCE).^{8,9}

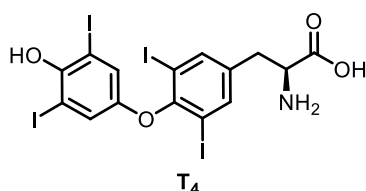


Figura IV-2. Estructura molecular de la hormona tiroidea T_4 .

La T_4 es una de las principales hormonas (mensajero químico del cuerpo) tiroideas secretada por las células foliculares de la glándula de la tiroides (Figura IV-2). Este compuesto, que contiene en su estructura 4 átomos de yodo, es una prohormona de la triyodotironina (T_3). La T_3 está relacionada con casi todos los procesos fisiológicos del cuerpo como el crecimiento y desarrollo, la actividad metabólica celular y las funciones corporales específicas, como por ejemplo la temperatura corporal y el ritmo cardíaco.¹⁰

La TTR es un homotetrámero formado por 4 subunidades ricas en láminas β de 127 aminoácidos cada una, nombradas como A, B, C y D. Los monómeros se agrupan a través de sus cadenas β del borde resultando en dos dímeros (AB y CD), los cuales se agrupan de forma simétrica para formar el tetrámero (Figura IV-3). En la interfaz generada entre los dos dímeros AB/CD se originan dos cavidades idénticas en forma de embudo, situadas de forma opuesta y propicias para la interacción con la T_4 .¹¹

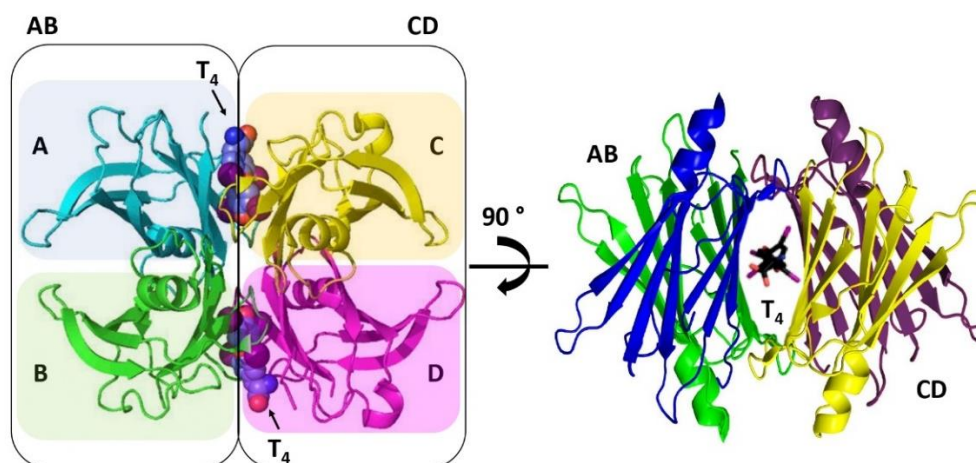


Figura IV-3. Estructura cristalográfica del homotetrámero de TTR transportando T_4 .¹²

La disociación del tetrámero de TTR por los puntos de unión con la T_4 genera dímeros, que rápidamente se disocian en monómeros amiloidogénicos. Estos monómeros empiezan a replegarse de forma anómala, formando oligómeros pequeños o agregados amorfos, dando lugar a la creación y acumulación de fibras amiloides (Figura IV-4). El plegamiento anormal de la TTR extracelular en forma de fibras amiloides en tejidos varios da lugar a distintos síndromes clínicos conocidos como amiloidosis por transtiretina (ATTR).¹³ La disociación por la interfaz AB/CD supone el paso clave durante la formación de la amiloidosis.¹⁴

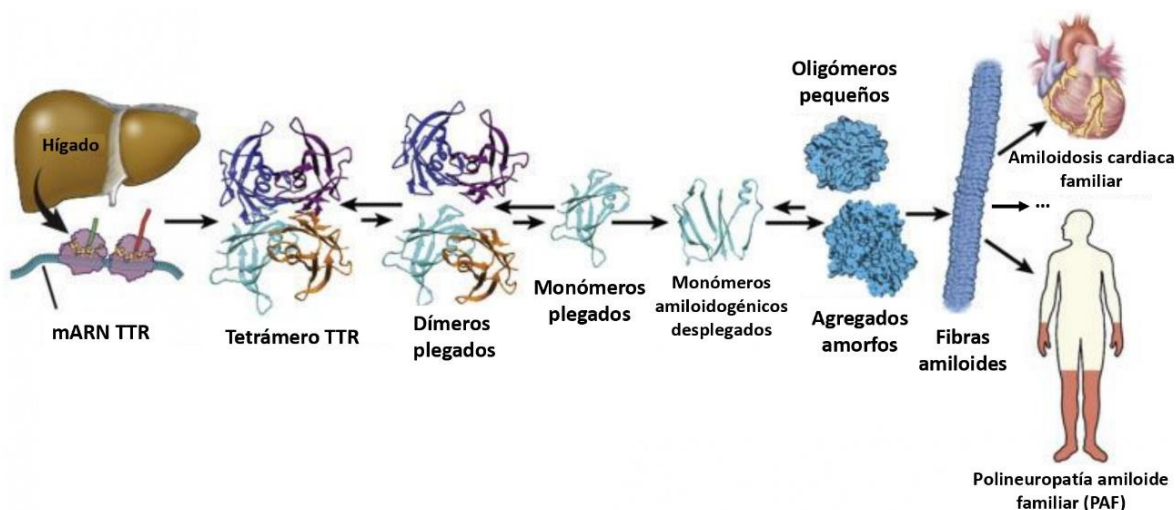


Figura IV-4. Proceso de formación de las fibras amiloides y las ATTRs, a partir de la desnaturalización del tetrámero de TTR formado en el hígado.¹⁵

Las mutaciones en la TTR asociadas a la enfermedad aceleran la amiloidosis a través de una desestabilización termodinámica o cinética de la proteína.¹⁶ Mas de 130 mutaciones en el gen de la TTR resultan en un patrón autosómico dominante de la amiloidosis familiar.¹⁷ La mayoría de estas variantes patogénicas corresponden a mutaciones de cambio de sentido (contrasentido) y se

IV.1 Introducción

manifiestan en una deposición de la amiloidosis de forma selectiva en tejidos. La polineuropatía amiloide familiar (PAF)¹⁸ y la amiloidosis cardiaca familiar¹⁹ son las formas más comunes de ATTR hereditarias. La amiloidosis cardiaca familiar es causada por la agregación y el depósito de TTR mutante preferentemente en el corazón. La PAF se caracteriza por el depósito de TTR mutante en el sistema nervioso periférico y autonómico, y en el corazón, pero también en otros sitios como el pulmón, el túnel carpiano y el intestino. En algunos casos mutaciones de la TTR poco comunes provocan que la agregación se desarrolle en el SNC, lo que resulta en depósitos de amiloides en las leptomeninges, en el parénquima cerebral y en los ojos.^{20,21}

El envejecimiento es otro factor de riesgo para las ATTRs, y la deposición de TTR de tipo salvaje (*wild type*, WT) dentro de la matriz extracelular del corazón y otros tejidos causan la amiloidosis sistémica senil (SSA), una miocardiopatía esporádica de inicio tardío e infradiagnosticada, que afecta entre el 10% - 20% de la población mayor de 65 años.²² Como dato curioso, la SSA es la causa de muerte principal de personas mayores de 110 años.²³

A pesar de que la mayoría de las mutaciones de la TTR son perjudiciales, se han detectado algunos casos donde las mutaciones son beneficiosas para la enfermedad, como el caso de la Thr¹¹⁹M-TTR. La mutación Thr¹¹⁹M reduce la ratio de disociación del tetrámero TTR y, en consecuencia, la propensión amiloidogénica del conjunto nativo.²⁴ Este mecanismo, conocido como estabilización cinética, sentó las bases para estrategias terapéuticas para mejorar la ATTR.²⁵

IV.1.3. Terapias contra la amiloidosis por transtiretina (ATTR)

Durante muchos años, el trasplante hepático o trasplante combinado de hígado-corazón han sido los únicos tratamientos paliativos para la ATTR.²⁶ Más recientemente, el paradigma ha cambiado dejando paso al uso de ligandos capaces de estabilizar la desnaturalización de la proteína TTR evitando la amiloidosis.

La tiroglobulina y la albumina son las proteínas encargadas de transportar la mayor parte de la T₄ en sangre. Solo un 1% de la TTR es transportadora de esta hormona y, por lo tanto, las cavidades para la T₄ están normalmente vacías. Por consiguiente, los ligandos capaces de interactuar en los sitios de unión de TTR-T₄ podrían aumentar la barrera de energía de la disociación del tetrámero, actuando como estabilizadores cinéticos y deteniendo así la agregación de TTR.

En las últimas décadas, moléculas pequeñas con afinidad y selectividad por la interacción con las cavidades de T₄ han surgido como nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la ATTR (Figura IV-5). Hasta la fecha, solo el tafamidis²⁷ (Vyndaquel® y Vyndamax®) ha sido comercializado para las ATTRs. El tafamidis ha sido aprobado para su uso en enfermedades como la PAF y la amiloidosis

cardíaca familiar, ya que ha demostrado ser un fármaco seguro y eficaz para ralentizar el desarrollo de estas enfermedades.^{28,29} Por otra parte, aproximadamente el 30% de los pacientes con ATTR familiar polineuropática no responden al tafamidis,³⁰ indicando la necesidad de explorar nuevas estrategias para estabilización cinética de la TTR.

Tal y como se ha mencionado en la introducción general, la reposición de fármacos es un método potencialmente valioso y productivo para identificar candidatos existentes para nuevas aplicaciones farmacológicas. Como estos candidatos ya tienen aceptado un perfil de seguridad óptimo, los tiempos y costes invertidos en los ensayos clínicos para la nueva aplicación se reducen.³¹ El diflunisal, un agente antiinflamatorio no esteroide aprobado por la FDA, fue identificado también como un estabilizador cinético de la TTR.³² A pesar de que su afinidad *in vitro* por la cavidad T₄-TTR es ligeramente menor que la del tafamidis, un ensayo clínico aleatorizado mostró que el tratamiento con diflunisal de pacientes con PAF durante 2 años reducía el ratio de progresión del deterioro neurológico.³³

Usando este mismo enfoque de reposición de fármacos, en el grupo del Dr. Salvador Ventura del *Institut de Biotecnologia i Biomedicina* y el *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular* (UAB) se identificó el tolcapone como un compuesto con gran afinidad y especificidad para enlazarse a las dos cavidades de unión de la TTR, promoviendo su estabilización y previniendo la formación de fibras amiloides y especies oligoméricas citotóxicas.³⁴

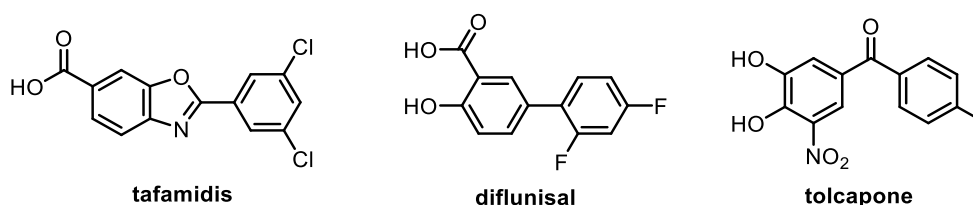


Figura IV-5. Estructuras moleculares del tafamidis, diflunisal y tolcapone.

El tolcapone (Tasmar®, 3,4-dihidroxi-4'-metil-5-nitrobenzofenona) es un inhibidor de la catecol *O*-metiltransferasa (COMT), autorizado en los Estados Unidos y en Europa, para ser administrado de forma oral en el tratamiento de la enfermedad del Parkinson. En un estudio clínico en fase IIa de la PAF,^{35,36} el tolcapone indujo una clara y robusta estabilización de la TTR plasmática en todos los pacientes estudiados, el fármaco fue bien tolerado, y el tratamiento no planteó ningún problema de seguridad. Cabe destacar que, el tolcapone penetra en la barrera hematoencefálica (BHE)³⁷ e inhibe de forma efectiva la agregación de las variantes altamente desestabilizantes y de disociación rápida que causan la rara, pero fatídica, amiloidosis SNC.³⁸

Un análisis termodinámico reveló que el tolcapone interaccionaba y estabilizaba la TTR de forma más efectiva que el tafamidis, exhibiendo una actividad antiamiloidogénica *ex vivo* superior. Esta potencia superior del tolcapone podría provenir de una unión entálpicamente más favorecida con la TTR (tolc. $\Delta H = -12.8$ kcal/mol; tafa. $\Delta H = -6$ kcal/mol); junto a qué la afinidad del tafamidis ($K_{d2} = 260$ nM) por la segunda cavidad de unión T_4 es significativamente menor que la del tolcapone ($K_{d2} = 58$ nM).³⁴

El tolcapone fue el mejor candidato de la base de datos propuesto como fármaco reposicionado para combatir la ATTR. Sin embargo, esto no significa que las interacciones que es capaz de establecer con las cavidades T_4 -TTR sean las más óptimas. En cierto modo, el descubrimiento de la reposición de un fármaco implica también la posible optimización de éste para poder aumentar su potencia y selectividad con su proteína objetivo, especialmente si se precisa de la información estructural atómica del complejo proteína-fármaco. En este proyecto, se ha trabajado sobre este concepto con el objetivo de generar un estabilizador cinético de la TTR con una afinidad y actividad antiamiloidogénica mejorada con relación a la del tolcapone, partiendo de la optimización estructural de éste.

IV.1.4. Simulaciones de dinámica molecular (DM)

Un estudio detallado de 23 estructuras de la TTR publicadas en el *Protein Data Bank* (PDB)³⁹ en alta resolución, incluyendo variantes WT, antiamiloidogénica y amiloidogénicas concluyó que todas eran casi superponibles. Además, diferencias en el posicionamiento de ciertos bucles o en los rotámetros de las cadenas secundarias de algunos residuos, incluyendo los de la cavidad T_4 , no eran específicos.⁴⁰ En concordancia, la interacción con los ligandos estabilizadores cinéticos no resultaba en reordenamientos estructurales significativos en la TTR. De hecho, las estructuras de la TTR en presencia o ausencia de ligandos son esencialmente idénticas (Figura IV-6), exceptuando un número reducido de rotámetros de las cadenas laterales de algunos residuos en la vecindad de los ligandos. Esto indica que a partir las capturas de las estructuras cristalográficas es difícil captar el impacto dinámico tanto de las mutaciones como de los ligandos en la estabilidad de la TTR, dificultando el uso de las relaciones entre estructura-actividad para desarrollar ligandos de la TTR con más potencial.

Las simulaciones de DM permiten investigar la dinámica estructural de sistemas biológicos a una resolución atómica.⁴¹ Las simulaciones DM son especialmente útiles para modelar y evaluar la capacidad de unión de moléculas pequeñas a proteínas diana, ya que no solo proporcionan información sobre la interacción, sino que también permiten estimar la energía de unión. Las simulaciones de DM han sido utilizadas para investigar el impacto de mutaciones en la flexibilidad conformacional de la TTR⁴² e investigar el mecanismo de protección de la TTR frente a estabilizadores cinéticos conocidos.⁴³ Sin embargo, hasta donde se sabe, los métodos basados en la DM para estimar

las afinidades de unión no se han empleado para ayudar al diseño de nuevos compuestos capaces de interactuar con las cavidades de unión T₄ y estabilizar la TTR.

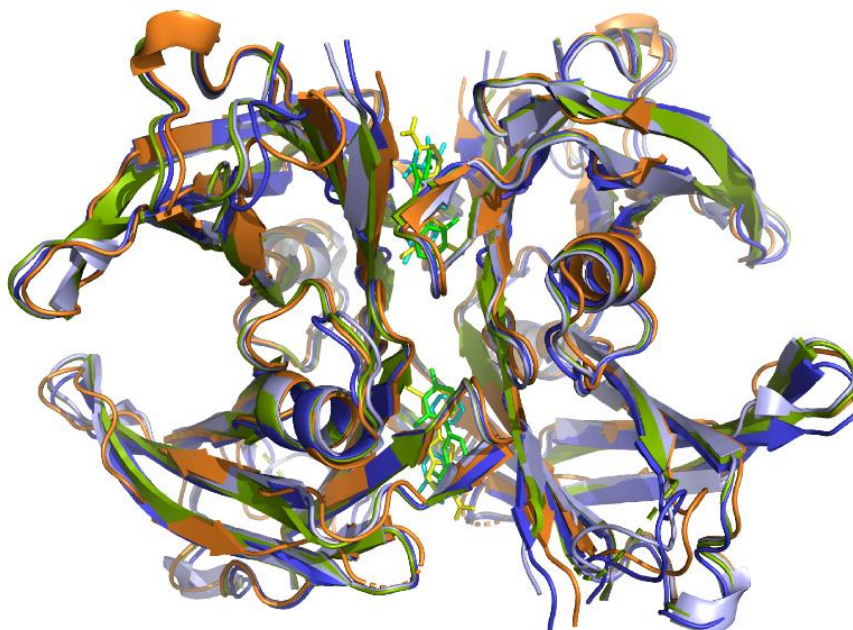


Figura IV-6. Superposición de la WT-TTR en forma Apo (azul suave) y en complejo con el diflunisal (verde oliva), tolcapone (azul) y tafamidis (naranja). Los tetrámeros superpuestos se muestran en forma de dibujo y el diflunisal (verde), tolcapone (cian) y tafamidis (amarillo) en forma de *sticks*.

IV.1.4.1. Estudio de las cavidades de unión de la TTR

En colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Mariona Sodupe del departamento de química de la UAB, se estudió al detalle los puntos de unión de la TTR y como interactuaban con los fármacos conocidos para poder desarrollar un diseño coherente de los nuevos compuestos basados en la estructura del tolcapone.

Cada una de las dos cavidades de unión T₄-TTR contiene 3 áreas simétricas llamadas cavidades de unión de halógenos (*halogen-binding pockets*, HBPs: HBP1 y HBP1', HBP2 y HBP2', y HBP3 y HBP3'), donde interactúan los átomos de yodo de la hormona T₄ (Figura IV-7). El área que se encuentra en mayor profundidad de la cavidad es la HBP3, y está formada por las cadenas secundarias de los residuos de Ser¹¹⁷, Leu¹¹⁰, Thr¹¹⁹ y Ala¹⁰⁸. El HBP1 está localizado a la

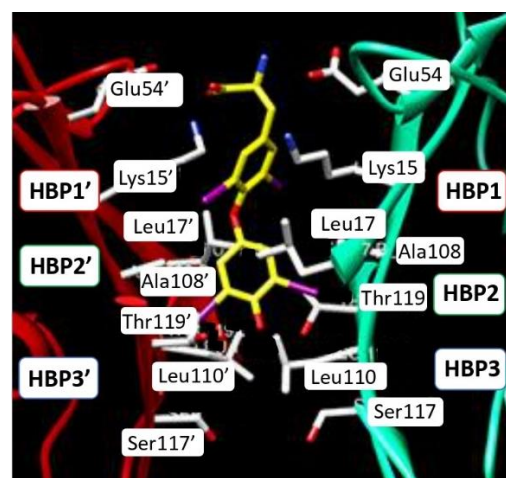


Figura IV-7. T₄ en interacción con la cavidad T₄-TTR (áreas HBPs).⁴⁴

entrada de la cavidad de unión de la T₄ y consiste en residuos de Lys¹⁵, Leu¹⁷, Thr¹⁰⁶ y Val¹²¹, mientras que el área central HBP2, comprende los residuos de Leu¹⁷, Ala¹⁰⁸, Ala¹⁰⁹ y Leu¹¹⁰, al igual que los metilenos de Lys¹⁵.

Los estabilizadores cinéticos de la TTR suelen estar compuestos por dos anillos aromáticos. El anillo aromático que suele contener halógenos suele estar ubicado en el HBP2/HBP3, y el resto de los sustituyentes hidrofílicos se suelen ubicar en el área HBP1. Los estabilizadores estudiados fueron el diflunisal, el tafamidis y el tolcapone.

El diflunisal ejemplifica estas propiedades comentadas. Su anillo de difluorofenilo se ubica en el HBP2/HBP3, mientras que en el HBP1 se haya un puente iónico entre el carboxilo del fármaco y el grupo amino de la Lys¹⁵. (Figura IV-8a) El tafamidis, también encaja muy bien en este perfil, ubicando su grupo diclorofenilo entre los dos HBP3 simétricos, mientras que su carboxilo terminal también forma un puente de hidrogeno mediado por agua con la Lys¹⁵. (Figura IV-8b) Se cree que la mayor afinidad de interacción del tafamidis, respecto a la del diflunisal, viene atribuida a la fuerte interacción de los cloruros.

En el caso del tolcapone, su anillo de 4-metil-fenilo se ubica en el HBP3 y un puente de hidrogeno se forma ente el carbonilo central y el hidroxilo de la cadena lateral de la Thr¹¹⁹. El anillo de 3,4-dihidroxi-5-nitrofenilo del tolcapone se sitúa en el HBP1, estableciendo un puente de hidrogeno con la Lys¹⁵, que a su vez estabiliza las interacciones iónicas entre la Lys¹⁵ y la Glu⁵⁴ (Figura IV-8c). Estas interacciones directas con la zona exterior de la cavidad, en combinación con el puente de hidrogeno de la Thr¹¹⁹, contribuyen a generar una entalpia de enlace favorable para esta molécula, explicando así su capacidad como estabilizador de la TTR superior a la del tafamidis.

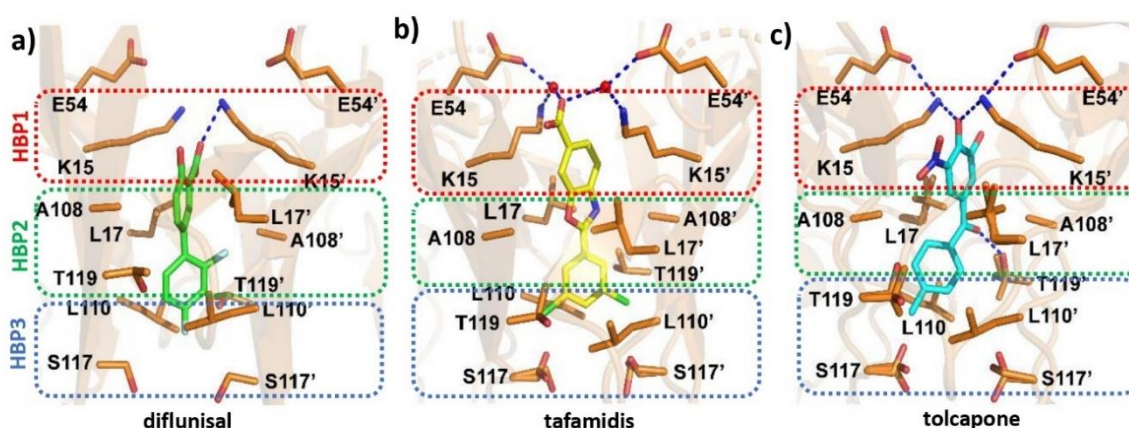


Figura IV-8. Capturas de las simulaciones de interacción entre la WT-TTR y el diflunisal (a), el tafamidis (b) y el tolcapone (c). las líneas de puntos azules entre los ligandos y la proteína representan puentes de hidrogeno e

interacciones iónicas. Las estructuras fueron preparadas a partir de las estructuras PDB: 3D2T (**a**), 3TCT (**b**) y 4D7B (**c**) (A: Ala, E: Glu, K: Lys, L: Leu, S: Ser, T: Thr).

En contraste con el tafamidis y el diflunisal, el tolcapone no presenta halógenos, y a pesar de que su grupo metilo este situado en un ambiente favorable en el HBP3, no puede establecer la interacción por halógenos que caracteriza a la T4, el diflunisal y el tafamidis. Se ha podido observar que la halogenación de algunos estabilizadores estudiados ha incrementado su afinidad, como es el caso del iododiflunisal.⁴⁵ Es por este motivo que en este proyecto se ha decidido usar las simulaciones de DM para estudiar si el “refuerzo” del tolcapone con halógenos optimizaría su capacidad como estabilizador cinético de la TTR.

IV.1.4.2. Diseño y simulaciones de DM de los nuevos análogos halogenados del tolcapone (compuestos TES)

Todos los nuevos candidatos consisten en derivados de la benzofenona que comparten el fragmento de 3,4-dihidroxi-5-nitrofenilo originario del tolcapone. Al otro lado de la cetona se han incluido diferentes sustituyentes, la mayoría halogenados, para mejorar la interacción con las áreas HBP3s. En la siguiente Figura IV-9 se muestran los compuestos que presentaron los resultados más prometedores en las simulaciones de DM.

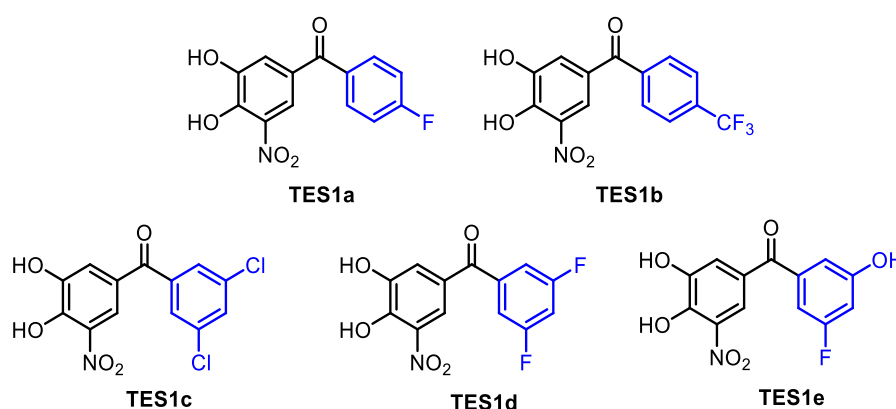


Figura IV-9. Estructuras moleculares de los mejores candidatos a estabilizadores de la TTR.

Por un lado, se diseñaron dos moléculas donde el grupo 4-CH₃ del tolcapone fue sustituido por un grupo -F o -CF₃, el **TES1a** y **TES1b**, respectivamente. Por otro lado, basándose en teoría de que los dos cloruros en *meta* del tafamidis contribuían a la interacción con el área interna HBP3, se diseñaron los compuestos disustituídos **TES1c** y **TES1d**. El **TES1c**, diseñado como un híbrido entre el tolcapone y el tafamidis, combinando las interacciones no covalentes favorables del tolcapone (3,4-dihidroxi-5-nitrofenilo) sobre la parte más expuesta de la cavidad T₄, y las interacciones de los halógenos (3,5-

diclorofenilo) sobre el área más profunda de la cavidad propias del tafamidis. Por otro lado, como las interacciones entre los cloruros y los fluoruros con el área de interacción HBP3 tienen un carácter diferente,⁴⁶ como se ha podido comprobar entre el tafamidis y el diflunisal, se diseñó el compuesto **TES1d**. En este compuesto el anillo de 4-metilfenilo se sustituyó por un 3,5-difluorofenilo, siendo éste un híbrido entre el tolcapone y el diflunisal. El **TES1e** fue el último compuesto en ser diseñado. Este ligando presentaba un hidroxilo en lugar de uno de los dos fluoruros del compuesto **TES1d**.

Las energías de unión calculadas del tolcapone y de los nuevos compuestos con la WT-TTR humana, y los principales contactos de enlaces de hidrógeno ligando-TTR (> 10% de frecuencia a lo largo de la trayectoria) se muestran en la Tabla IV-1. Las simulaciones mostraron unos valores aproximados, con unas tendencias adecuadas, debido a que no se incluyó el término entrópico a la hora de realizar los cálculos.

En las simulaciones de DM, todas las estructuras iniciales, derivadas de la estructura cristalográfica del complejo tolcapone-TTR (PDB: 4D7B), con sus dos ligandos relacionados por un eje de simetría C_2 , perdieron su simetría inicial durante la simulación, es decir las interacciones entre cada ligando AB o CD, aunque similares, dejaron de ser idénticas. Exceptuando las interacciones con el carbonilo central y la Thr¹¹⁹, y las interacciones específicas resultante de los nuevos sustituyentes con la parte más profunda de la cavidad, el resto de las interacciones se mantuvieron en < 5% de la trayectoria.

	$\Delta G_{\text{enlace}}^a$	ΔE_{fg}^b	$\Delta G_{\text{L-solv}}$	dist. ligandos (Å)	contactos ligando...TTR	frecuencia media ^c	dist. mínima contact. (Å)
tolc.	59.7	81.5	-10.9	15.8	C=O...Thr ¹¹⁹	10%	2.63
TES1a	68.0	90.2	-11.1	19.9	C=O...Thr ¹¹⁹	50%	2.55
					F...Ser ¹¹⁷	21%	2.67
					F...Thr ¹¹⁹	34%	2.68
TES1b	55.4	76.6	-10.6	19.9			
TES1c	57.0	79.0	-11.0	19.4	Cl...Thr ¹¹⁹	52%	2.94
TES1d	74.0	95.2	-10.6	15.3	C=O...Thr ¹¹⁹	20%	2.63
					F...Ser ¹¹⁷	11%	2.7
					C=O...Thr ¹¹⁹	42%	2.61
TES1e	84.4	116.2	-15.9	15.3	OH...Ser ¹¹⁷	15% - 90%	2.52 - 2.60
					F...Ser ¹¹⁷	87%	2.59

^a $\Delta G_{\text{enlace}} = \Delta E_{\text{fg}} + 2 \cdot \Delta G_{\text{L-solv}}$; ^b $\Delta E_{\text{fg}} = E_{\text{TTR}} + 2E_{\text{L}} - E_{\text{TTR-2L}}$; ^c media de la frecuencia de la interacción de los dos ligandos.

Tabla IV-1. Resultados obtenidos de las simulaciones de DM con los compuestos M y el tolcapone. Energías de enlace TTR-Ligando (ΔG_{enlace}), energías de enlace en fase gas (ΔE_{fg}) y energías de solvatación del ligando ($\Delta G_{\text{L-solv}}$), en kcal/mol, y los contactos principales de puentes de hidrógeno entre el ligando-TTR.

Para el **TES1b**, las interacciones se perdieron, apareciendo solo en < 1% de la trayectoria, debido a la presencia del grupo voluminoso trifluorometilo, que introduce unas fuerzas repulsivas que le impiden

la entrada a la cavidad. En consecuencia, la energía de enlace calculada (55.4 kcal/mol) fue menor que la del resto de compuestos. Por el contrario, para el **TES1a** la interacción del carbonilo central se mantuvo con una frecuencia media de ~ 50%, y los nuevos contactos del flúor con la Thr¹¹⁹ y Ser¹¹⁷ incrementaron la energía de unión ligando-TTR calculada (68.0 kcal/mol) respecto al tolcapone (59.7 kcal/mol).

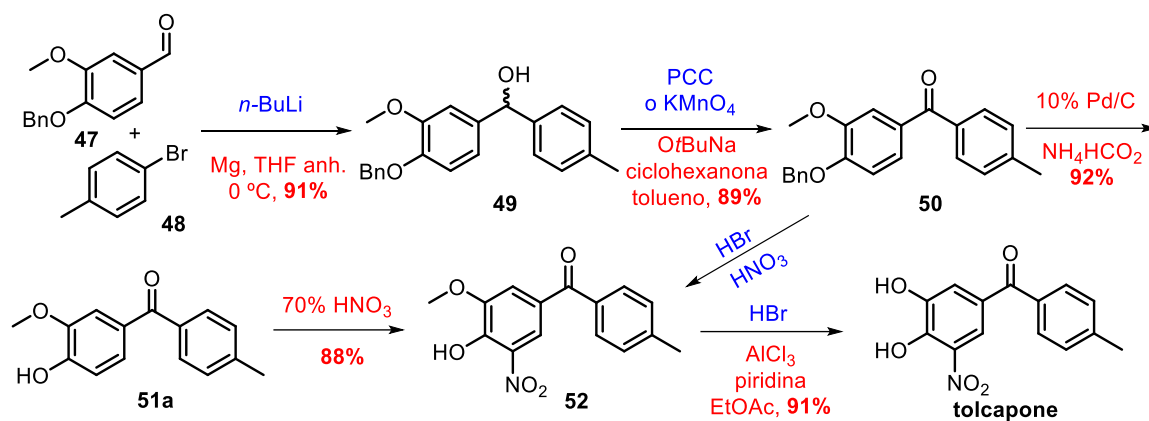
En similitud al **TES1b**, los voluminosos cloruros del compuesto **TES1c** incrementaron la distancia entre los ligandos y disminuyeron la energía de enlace respecto al tolcapone. Los cloruros de **TES1c** interaccionaron con la Thr¹¹⁹ en lugar del carbonilo central. En cambio, la buena interacción de los fluoruros de **TES1d** con la Ser¹¹⁷ en la cavidad HBP3 y del carbonilo central con la Thr¹¹⁹, disminuyeron la distancia entre ligandos e incrementaron la energía de enlace calculada respecto al tolcapone.

Con respecto al compuesto **TES1e**, las simulaciones de DM indicaron que la interacción del hidroxilo en forma de puente de hidrogeno con la cadena lateral de la Ser¹¹⁷ se mostraba con unos rangos de frecuencia de entre 15% - 90%. Asimismo, el contacto C=O...Thr¹¹⁹ presentaba una frecuencia media de 42%, entre los dos ligandos. Como resultado, la energía de unión calculada para el compuestos **TES1e** fue la más grande de todos los compuestos modelizados (84.4 kcal/mol), al igual que la distancia más corta calculada entre ligandos (15.3 Å).

Otro hecho observable en las simulaciones de DM, que podría contribuir a la estabilización del tetrámero, fue las nuevas interacciones potenciales entre residuos de la proteína, inducidas por la interacción ligando-TTR. En particular, el residuo de Ser¹¹⁷ de cada subunidad de TTR podría establecer un puente de hidrógeno entre las Ser¹¹⁷ de cada subunidad, reforzando así la interacción entre los dímeros (contactos A-B o C-D). Obviamente, entre todos los ligandos, el compuesto **TES1e** fue el que generó una de las distancias promedio más pequeña entre los residuos de Ser¹¹⁷ en la débil interfaz AB/CD.

IV.1.5. Precedentes sintéticos del tolcapone

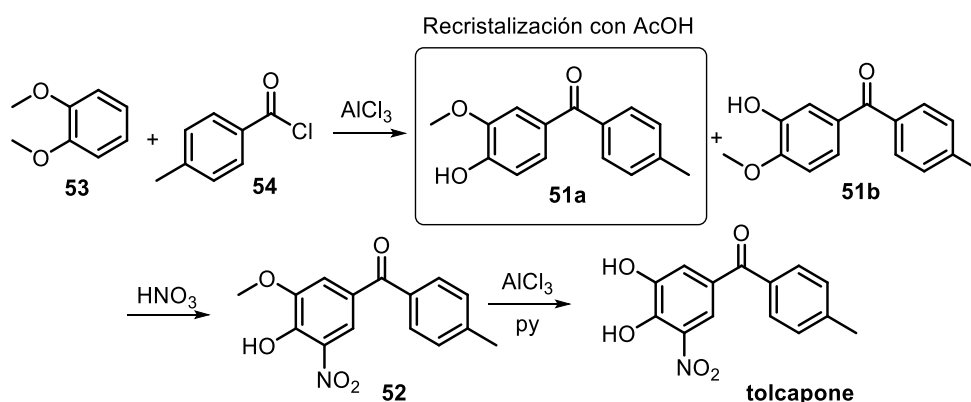
La síntesis del tolcapone fue descrita por primera vez en una patente de Bernauer *et al.* (US5236952A), asignada a Hoffman-La Roche Inc. en 1993 (Esquema IV-1, en azul).⁴⁷ La síntesis empezaba con un acoplamiento entre el aldehído **47** y el 4-bromotolueno (**48**) utilizando *n*-BuLi y baja temperatura. El alcohol **49** secundario resultante fue oxidado utilizando clorocromato de piridinio (PCC) o KMnO₄. Seguidamente, en una sola etapa se nitró y eliminó la protección de bencilo utilizando HBr/HNO₃. Finalmente, una *O*-desalquilación del compuesto **52** empleando HBr dio como resultado el tolcapone.



Esquema IV-1. Síntesis del tolcapone por Bernauer *et al.*⁴⁷ (azul) y por Govindarajan *et al.*⁴⁸ (rojo).

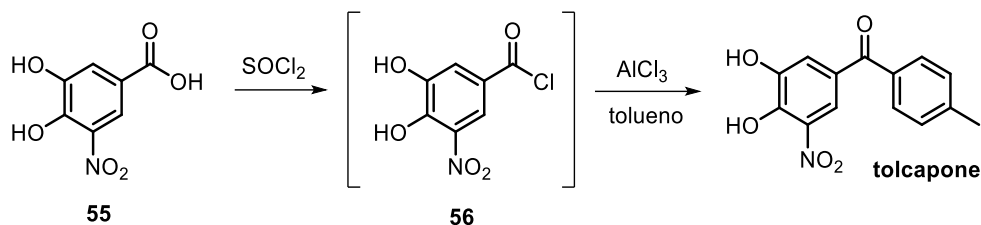
En 2008, Govindarajan *et al.* publicaron una ruta sintética en la que obtenían el tolcapone en cinco etapas y con un 60% de rendimiento global (Esquema IV-1, en rojo).⁴⁸ La primera etapa de esta ruta consistió en el acoplamiento entre el reactivo comercial *O*-bencilvanilina y el magnesiano formado a partir del compuesto comercial 4-bromotolueno, para formar el alcohol secundario **49**. Este alcohol fue oxidado a la cetona **50** utilizando una reacción de Oppenauer. Posteriormente, la desprotección del bencilo permitió la orientación de la nitración consecutiva sobre compuesto **50** en la posición deseada. Finalmente, con la desprotección del metóxido con cloruro de aluminio sobre la cetona **52** se obtuvo el tolcapone deseado.

En una patente del 2013 (US5877353A) (Esquema IV-2)⁴⁹ se planteó una síntesis a partir de una acilación de Friedel-Craft sobre el veratrol con el cloruro de *p*-metilbenzoil en presencia de tricloruro de aluminio para formar una mezcla de isómeros de los compuestos **51a/51b**. Tras una recristalización en ácido acético el producto **51a** aislado fue tratado con ácido nítrico, para obtener el producto nitrado **52**. Finalmente, con una desmetilación con tricloruro de aluminio se pudo obtener el tolcapone.



Esquema IV-2. Síntesis del tolcapone publicada en la patente US5877353A.⁴⁹

Incluso, en otra solicitud de patente por parte de RA Chem Pharma Limited (India) (Esquema IV-3),⁵⁰ se planteó una síntesis con una única acilación de Friedel-Craft entre el cloruro de acilo **56** formado a partir del ácido 3,4-dihidroxi-5-nitrobenzoico (**55**) y tolueno, catalizada con tricloruro de aluminio, para formar el tolcapone.



Esquema IV-3. Síntesis del tolcapone publicada en la solicitud de patente de RA Chem Pharma Limite.⁵⁰

IV.2. Objetivos

Debido al gran potencial del tolcapone en su reposicionamiento como fármaco para tratar la ATTR, el objetivo principal de este proyecto ha sido encontrar nuevos fármacos con actividad antiamiloidogénica en el la TTR, a partir de estructuras análogas al tolcapone.

En base a los resultados prometedores de las simulaciones de DM se diseñaron una serie de nuevos compuestos, que marcaron los siguientes objetivos:

- 1) **Sintetizar los compuestos de la familia TES** diseñados para ser estabilizadores de la TTR y evitar su agregación amiloidogénica (Figura IV-10). Estos compuestos fueron diseñados a partir de la estructura del tolcapone, dejando fijo el fragmento de 3,4-dihidroxi-5-nitrofenilo y la estructura bicíclica en forma de benzofenona, pero variando la sustitución del otro anillo aromático con diferentes sustituyentes halogenados.

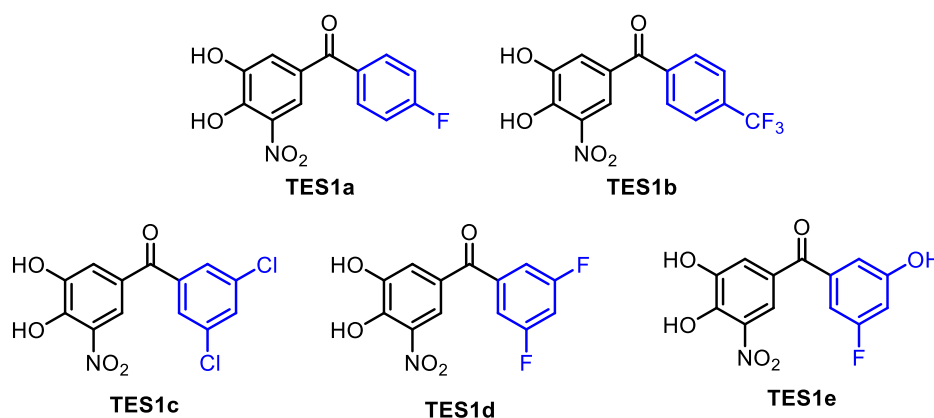


Figura IV-10. Estructuras moleculares de la batería de compuestos TES1a-TES1e.

- 2) **Sintetizar el compuesto prometedor TES2e**, análogo del compuesto TES1e pero sin el hidroxilo en la posición 5' del anillo aromático de la izquierda (Figura IV-11).

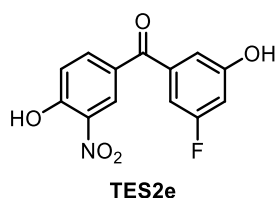
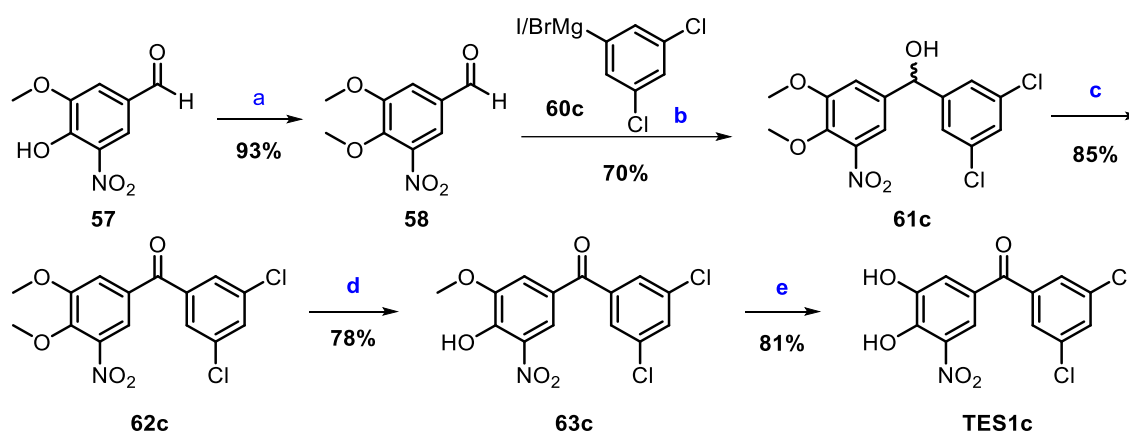


Figura IV-11. Estructura molecular del compuesto TES2e.

IV.3. Resultados y discusión

IV.3.1. Síntesis del compuesto TES1c

El compuesto seleccionado para poner a punto la ruta sintética para aplicar a todos los compuestos de la familia **TES** fue el **TES1c**, el híbrido entre el tolcapone y el tafamidis. El estudiante de doctorado Marcelo Osorio trabajó en la puesta a punto de la síntesis del compuesto **TES1c** durante su trabajo de fin de máster (Esquema IV-5).⁵¹



Esquema IV-5. Secuencia sintética para la obtención del compuesto **TES1c**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) Me_2SO_4 , NaOH , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1), 24 h; (b) **60c**, THF anh., *overnight*; (c) DMPI, CH_2Cl_2 anh., *overnight*; (d) BBr_3 , CH_2Cl_2 , 1.5 h; (e) AlCl_3 , piridina, CHCl_3 anh. reflujo.

La ruta sintética empezó con la protección en forma de metóxido del grupo hidroxilo de la 5-nitrovanilina (**57**) comercial. Para llevar a cabo esta reacción se trató el reactivo de partida con sulfato de dimetilo (Me_2SO_4), en presencia de NaOH , en agitación en el seno de una mezcla de agua/ CH_2Cl_2 a partes iguales, obteniendo así el compuesto **58** con un 93% de rendimiento.

El compuesto **61c** se obtuvo con una reacción entre el aldehído **58** y el magnesiano **60c**. El reactivo de Grignard fue formado *in situ* al tratar el compuesto comercial 1,3-dicloro-5-yodobenceno (**59c**) con una solución 1 M de *i*PrMgBr en el seno de THF anhidro a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ y durante 1 h. Tras reaccionar durante una noche el compuesto **58** con el magnesiano **60c** en el seno de THF anhidro, se obtuvo el compuesto **61c** con un 70% de rendimiento.

La siguiente etapa de la síntesis consistió en la oxidación del alcohol secundario del compuesto **61c** a un grupo carbonilo utilizando Dess-Martin periodinano (DMPI) en el seno de CH_2Cl_2 anhidro durante una noche. Como resultado se obtuvo la cetona **62c** con un 85% de rendimiento.

El último tramo de la ruta sintética consistió en la desprotección del catecol en forma de éteres metílicos. A priori, cabría esperar unas únicas condiciones de reacción para realizar esta desprotección.

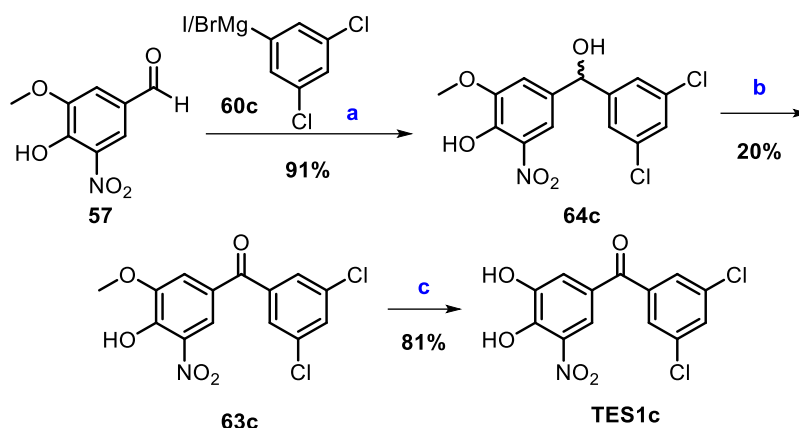
Al intentar la desprotección del catecol del compuesto **62c** con AlCl_3 y piridina en cloroformo (CHCl_3) anhidro a reflujo, la reacción no tuvo lugar y se recuperó el reactivo de partida. Otra opción clásica de desprotección de catecoles en moléculas de estructura similar es la utilización de tribromuro de boro (BBr_3).⁵² Tras probar varias condiciones de reacción (variación de eq. de BBr_3 y tiempo) solo se pudo obtener el producto de mono protección **63c** y un sólido marrón muy poco soluble en disolventes orgánicos convencionales, que a priori se catalogó como mezcla de impurezas de descomposición, ya que el espectro de RMN de este sólido mostraba unas señales muy anchas y muy poco definidas que no concordaban con el producto final esperado. Este producto fue identificado más adelante.

Finalmente, se decidió realizar esta desprotección en dos etapas consecutivas con diferentes condiciones. Una primera desprotección de uno de los metóxidos con BBr_3 , y una segunda desprotección con AlCl_3 , la cual resulta muy efectiva para un catecol monoprotegido, tal y como se ilustra en los precedentes sintéticos del tolcapone explicados en la introducción.

Así pues, la primera etapa consistió en la desprotección del hidroxilo en la posición 4^l utilizando una solución de 1 M de BBr_3 en el seno de CH_2Cl_2 durante 1.5 h. De esta forma se obtuvo el compuesto **63c** con un 78% de rendimiento. Finalmente, el producto final **TES1c** se sintetizó a partir de la desprotección del hidroxilo en la posición 3^l del compuesto **63c** utilizando AlCl_3 y piridina (base) en el seno de CHCl_3 anhidro a reflujo durante 24 h. El rendimiento de ésta última etapa fue del 81%.

En resumen, el compuesto **TES1c** fue sintetizado con una síntesis lineal de cinco etapas y un rendimiento global del 30%.

Por otro lado, también se probó una ruta sintética similar, pero partiendo de la 5-nitrovanillina (**57**) comercial, sin proteger el hidroxilo libre (Esquema IV-6). A pesar de que la reacción de Grignard dio un rendimiento superior a la del catecol totalmente protegido, la oxidación del alcohol a cetona se tuvo que realizar con una reacción de Swern, en lugar de una Dess-Martin, dando lugar a un rendimiento del 20%, a causa de la aparición de productos de degradación por las reacciones con la funcionalización del anillo aromático. Se decidió descartar esta ruta debido a la reducción del rendimiento global de un 30% a un 15%.

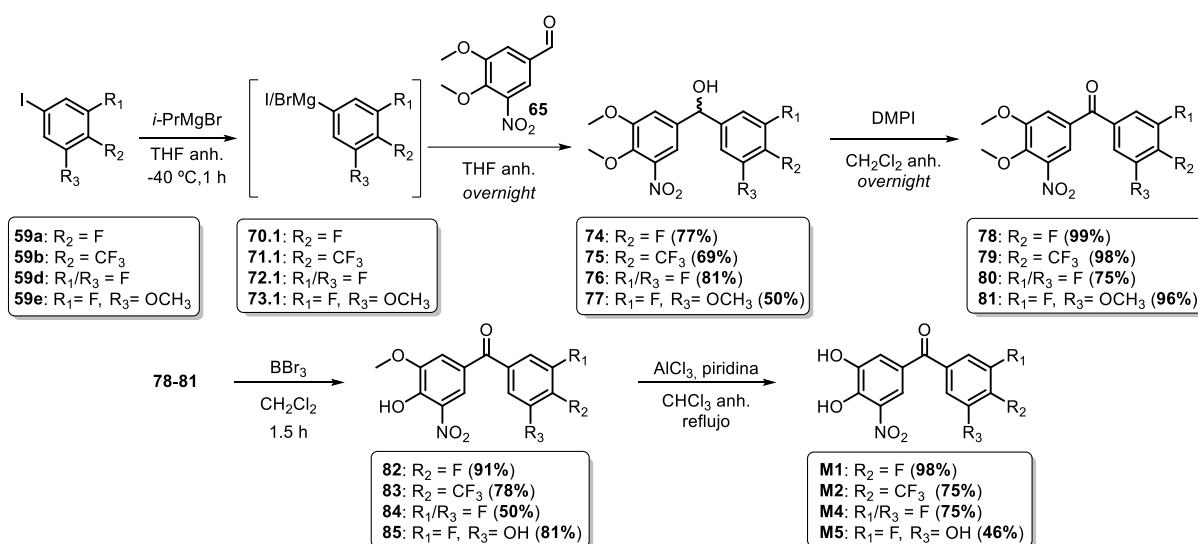


Esquema IV-6. Ruta alternativa propuesta para la síntesis del compuesto **TES1c**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) **60c**, THF anh., *overnight*; (b) DMSO, (COCl)₂, TEA, CH₂Cl₂; (c) AlCl₃, piridina, CHCl₃ anh., reflujo.

IV.3.2. Síntesis de la batería de compuestos TES1a, TES1b, TES1d y TES1e

Una vez puesta a punto la ruta sintética para el **TES1c** se decidió sintetizar el resto de nuevos compuestos de la batería **TES** basados en los cálculos de DM.

En el siguiente Esquema IV-7 se muestra la ruta sintética planteada para la síntesis de la batería de derivados halogenados del tolcapone. La ruta sintética para estos compuestos fue exactamente igual que la diseñada para el **TES1c**.

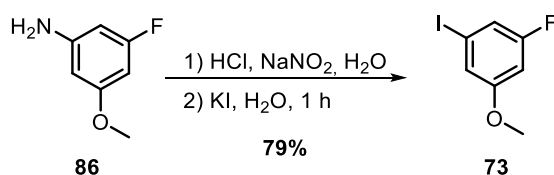


Esquema IV-7. Secuencia sintética para los compuestos **TES1a**, **TES1b**, **TES1d** y **TES1e**. Cuando R₁, R₂ o R₃ no están especificados, se trata de un hidrogeno (H).

La síntesis empieza con una reacción de transmetalación. La formación de los reactivos de Grignard **60a**, **60b**, **60d** y **60e** se llevó a cabo al tratar sus correspondientes yoduros de arilo **59a-b** y **59d-e** con *i*PrMgBr en el seno de THF anhidro a -40 °C durante 1 h.

A partir de modificaciones en las condiciones de reacción encontradas en un artículo de Jorgensen *et al.*,⁵³ el yoduro **59e** se tuvo que sintetizar a partir del compuesto comercial 3-fluoro-5-metoxianilina, transformando la amina primaria en una sal de diazonio y sustituyéndola por un yodo. Para formar la sal de diazonio se trató la anilina comercial con HCl concentrado y nitrito sódico a 0 °C en agua. Tras la rápida formación de la sal de diazonio *in situ*, se le añadió una disolución de yoduro de potasio y se dejó reaccionar a reflujo durante 1 h. Con una purificación por columna cromatográfica en gel de sílice se obtuvo el compuesto **59e** con un 79% de rendimiento en forma de aceite incoloro (Esquema IV-8).

En el espectro de ¹H RMN no se observó ninguna señal correspondiente a los dos protones de la anilina, al igual que, en el espectro de ¹³C NMR el carbono que soportaba la anilina bajo considerablemente a un δ de 93.3 al estar enlazado con el yodo. En el espectro de IR tampoco se observó ninguna banda característica de una anilina. La elucidación estructural del compuesto **59e** se llevó a cabo a partir de los experimentos de RMN de ¹H, ¹³C y ¹⁹F correspondientes.



Esquema IV-8. Condiciones de reacción para la síntesis del compuesto **59e**.

Una vez formados los magnesianos, se añadió *in situ* una disolución del compuesto **58** en THF anhidro. Tras una noche en agitación a temperatura ambiente se obtuvieron los compuestos **61a-b** y **61d-e** con rendimientos de entre el 50% - 81%.

Al observar los espectros de ¹H RMN de los productos aislados, la aparición de un singlete a δ 5.70 - 5.95 correspondiente al H-1, hidrogeno enlazado al mismo carbono que el hidroxilo, demostró la correcta formación del alcohol secundario de los compuestos **61a-b** y **61d-e** (Figura IV-13). Todos los compuestos fueron caracterizados a través de los experimentos de RMN de ¹H y ¹³C, y sus correlaciones bidimensionales. En los espectros HMBC de todos los compuestos **61a-b** y **61d-e** se pudo observar la correlación del H-1 tanto con el C₁ del anillo aromático este, como con el C₁₁ del anillo aromático oeste, además de correlaciones con otros carbonos de ambos lados de las moléculas (flechas azules en la molécula de la Figura IV-13). Los espectros de masas también dieron resultados totalmente coherentes con los calculados teóricamente.

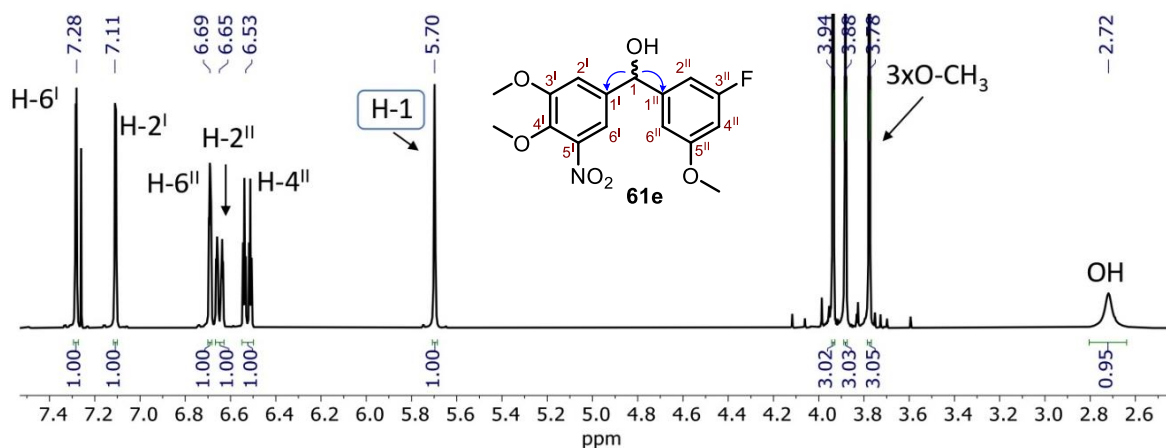


Figura IV-13. Espectro de ^1H RMN y de correlación $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HMBC del compuesto **61e**.

En la siguiente etapa de la síntesis se oxidó el alcohol secundario de los compuestos **61a-b** y **61d-e** a cetona usando DMPI en el seno de CH_2Cl_2 anhidro durante una noche. De esta manera se obtuvieron las cetonas **62a-b** y **62d-e** con unos rendimientos elevados de entre 75% - 99%. Como en los espectros de ^1H RMN, ya no se observaba ninguna señal correspondiente a ningún protón alifático, esto ponía en evidencia la correcta oxidación del hidroxilo, y por tanto la formación de los compuestos **62a-b** y **62d-e**. En los espectros de ^{13}C RMN de los compuestos **62a-b** y **62d-e** se pudo observar que las señales del C_1 que tenían unos δ de entre 74.2 - 74.8 en los espectros de los compuestos **61a-b** y **61d-e**, pasaron a tener unos δ superiores de entre 191.8 - 192.4 propios de un carbonilo. Gracias a los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C , y sus correlaciones bidimensionales, y de espectroscopia de masas, se pudo elucidar estructuralmente estos compuestos.

La desprotección del catecol en forma de éteres metílicos de los compuestos **62a-b** y **62d-e** se llevó a cabo en dos etapas consecutivas, tal y como se ha mencionado anteriormente en la síntesis del **TES1c**. En una primera etapa, se trató a los compuestos **62a-b** y **62d-e** con una solución 1 M de BBr_3 en CH_2Cl_2 a -10°C , y luego se dejó en agitación durante una hora y media a temperatura ambiente. De esta manera, se consiguió desproteger el hidroxilo enlazado al C_4 y obtener así los productos aislados **63a-b** y **63d-e** con rendimientos de entre el 50% - 91%.

Al revisar los espectros de ^{13}C RMN de los compuestos **63a-b** y **63d-e**, se pudo observar una única señal a δ 56.8 - 57.2 correspondiente al carbono del metilo del $\text{CH}_3\text{O}-3^1$. En cambio, en los espectros de ^{13}C RMN de los compuestos **62a-b** y **62d-e** se podían observar dos señales distintas correspondientes a metóxidos, una a δ 56.8 - 56.9 para $\text{CH}_3\text{O}-3^1$ y una a δ 61.8 - 62.4 para $\text{CH}_3\text{O}-4^1$. Al desaparecer la señal correspondiente al $\text{CH}_3\text{O}-4^1$ se pudo verificar la completa desprotección del $\text{HO}-4^1$, y por tanto, la correcta obtención de los compuestos **63a-b** y **63d-e**. En el caso de la molécula **63e**, con estas condiciones de reacción también se eliminó el metóxido $\text{CH}_3\text{O}-5^{\text{II}}$.

Por último, la segunda etapa de desprotección se llevó a cabo tratando los compuestos **63a-b** y **63d-e** con AlCl_3 y piridina en el seno de CHCl_3 anhidro a reflujo. Los compuestos finales **TES1a**, **TES1b**, **TES1d** y **TES1e** totalmente purificados fueron aislados con rendimientos de entre el 46% - 98%.

Para la purificación de estos compuestos finales se pusieron en práctica dos metodologías: (i) por recristalización con agua/acetona o hexano/EtOAc; o (ii) columna cromatográfica en gel de sílice. En el caso de utilizar la columna cromatográfica se observó un comportamiento anómalo. Después de cada columna cromatográfica, al evaporar los tubos de ensayo con la fracción del producto deseado aislado, se obtenía un sólido marrón muy poco soluble en disolventes orgánicos. Al realizar un experimento de ^1H RMN de sólido se observaban unas señales muy anchas con desplazamiento químico igual al del producto final, pero de forma muy difusa (Figura IV-14a). Aparentemente el sólido parecía un producto de descomposición. Bajo la hipótesis de que el producto podría haber sufrido un cambio en forma de sal iónica, se decidió tratarlo con una solución de HCl al 0.5% w/w (condiciones ácidas de $\text{pH} < 2$), igual que en el último paso del tratamiento final de la reacción con el AlCl_3 . Sorprendentemente, el sólido marrón se disolvió en el disolvente (EtOAc), y la fase orgánica obtuvo una tonalidad amarilla translúcida. Finalmente, al realizar un espectro de ^1H RMN de sólido resultante, el espectro volvía a tener la apariencia óptima del producto (Figura IV-14b).

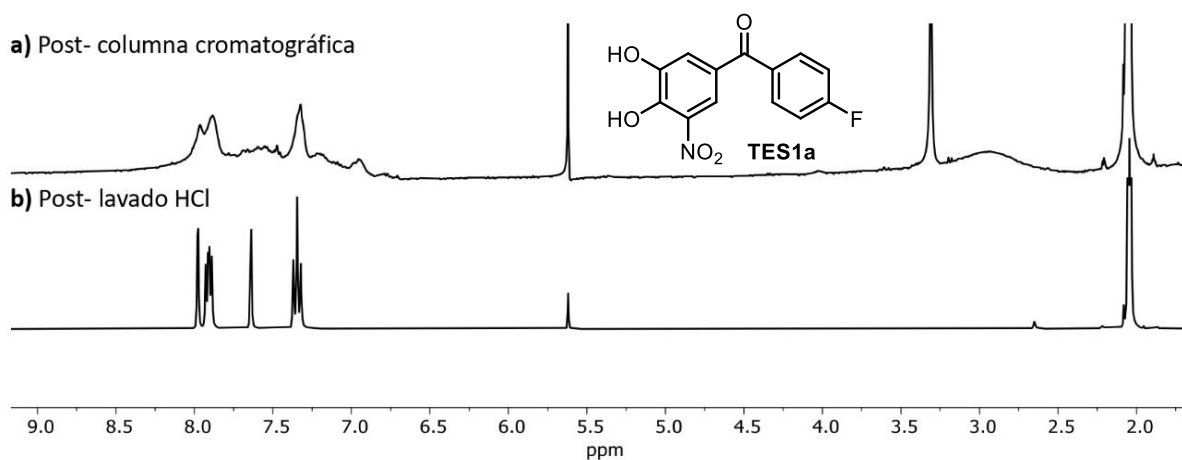


Figura IV-14. Espectros de ^1H RMN del compuesto **TES1a**, como ejemplo del comportamiento anómalo tras una purificación por columna cromatográfica: (a) recién salido de una columna cromatográfica y (b) tratado con una disolución de HCl al 0.5% w/w después de la columna cromatográfica.

Tanto los intermedios **63a-b** y **63d-e** como los productos finales **TES1a**, **TES1b**, **TES1d** y **TES1e** fueron elucidados estructuralmente gracias a los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , y sus correlaciones bidimensionales. La completa desaparición de las señales correspondientes a metóxidos en los espectros de ^1H RMN corroboró la completa desprotección de los catecoles. Cabe destacar que los experimentos de espectroscopía de masas también dieron señales de $[\text{M}-\text{H}]^-$ que concordaban con los

resultados calculados. En cuanto a la pureza de los productos finales, los experimentos de HPLC demostraron una pureza > 96.5% para estos compuestos (incluido el **TES1c**) y exceptuando la del compuesto **TES1b** que fue del 89%. (Anexo VII.IV.3.).

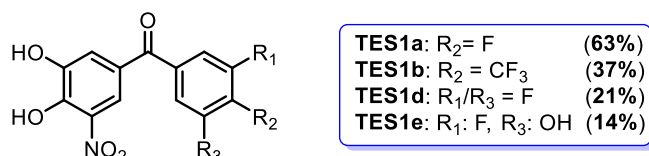
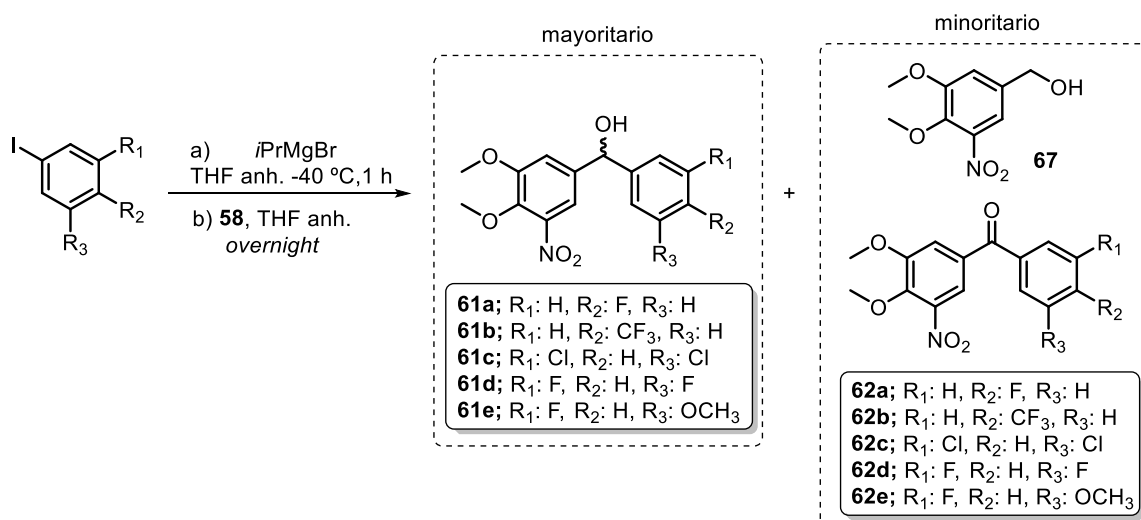


Figura IV-15. Estructuras moleculares de los compuestos finales análogos halogenados del tolcapone. Si R₁, R₂ o R₃ no están especificado, se trata de un hidrogeno (H).

En resumen, los compuestos **TES1a**, **TES1b**, **TES1d** y **TES1e** fueron sintetizados con rutas sintéticas de 5 etapas y rendimientos globales de entre el 14% - 63% (Figura IV-15).

IV.3.2.1. Formación de la benzofenona en la reacción de Grignard

Al realizar los experimentos de purificación con columna cromatográfica en gel de sílice de los crudos de las reacciones de Grignard se aislaron diferentes productos. A parte del producto mayoritario en forma de alcohol y el aldehído de partida, se aislaron también los derivados de benzofenona **68** y **62a,b,d,e**, y el (3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)metanol (Esquema IV-9). En la siguiente Tabla IV-2 se recogen los datos de los productos obtenidos en las diferentes pruebas realizadas para la reacción de Grignard.



Esquema IV-9. Condiciones de reacción y productos obtenidos de la reacción del **58** con los magnesianos.

exp.	alcohol	cantidad (mg)	rdt. (%)	cetona	cantidad (mg)	rdt. (%)
1	61c	322	48	62c	74	11
2	61d	612	82	62d	40	5
3	61b	167	69	62b	15	6
4	61b	319	46	62b	269	54
5	61a	213	77	62a	15	6
6	61a	320	46	62a	122	18
7	61a	249	37	62a	203	31
8	61e	57	40	62e	55	39
9	61e	191	49	62e	56	14
10	61e	133	42	62e	45	14
11	61e	1678	50	62e	385	12

* Todos los experimentos se han realizado bajo las mismas condiciones de 1.2 equivalentes de aldehído **58** i 1.1 eq. de *i*PrMgBr en el seno de THF anhidro durante una noche.

Tabla IV-2. Datos experimentales de la reacción del aldehído **58** con los reactivos de Grignard formados a partir de los yoduros de arilo.

Como se puede observar en la Tabla IV-2, el producto mayoritario formado en esta reacción normalmente es el alcohol secundario resultante del ataque del magnesiano sobre el carbonilo del aldehído **58**, con unos rendimientos de entre el 37% - 82%. Sorprendentemente, tras la purificación de los crudos se pudo observar la obtención de las cetonas **62a-62e** con unos rendimientos de entre el 5% - 18%, y en algunos casos, como en los experimentos 4, 7 y 8, rendimientos equiparables a los de los alcoholes **61a-61e** de entre el 31% - 54%. También se observó la presencia de alcohol bencílico **67** (Figura IV-14) en la mayoría de los crudos, pero no fue cuantificada.

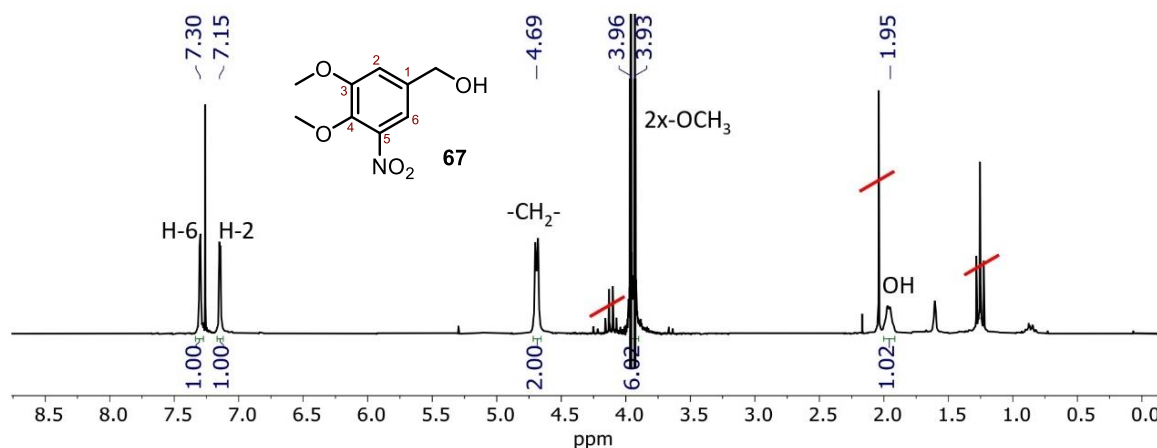


Figura IV-14. Espectro de ¹H RMN del subproducto **67**.

Estudiar este hecho fue de gran interés debido a que las cetonas **62a-62e** eran el producto de la siguiente etapa de la síntesis, y si se llegaba a optimizar esta reacción para poder obtener como

producto mayoritario las cetonas **62a-62e** se podría evitar el uso de una etapa consecutiva de oxidación de los alcoholes **61a-61e** aislados.

Para estudiar este fenómeno y tratar de encontrar una explicación plausible se decidió realizar los experimentos detallados a continuación.

En la Tabla IV-3 se recogen varios resultados obtenidos en la realización de la reacción de formación del alcohol secundario utilizando el yodoarilo **59e** y el aldehído **58**. Las variables a modificar entre los diferentes experimentos fueron los equivalentes de aldehído **58**, el tiempo de reacción y la temperatura. Como se puede observar, para experimentos con una relación molar de 1:1.2 entre los compuestos **59e:58** se obtuvo una relación de 1:0.3 entre el alcohol **61e** y la cetona **62e**. Al aumentar la cantidad de aldehído **58** a una relación de 1:3 se obtuvo una relación de aproximadamente 1:1 entre los productos **61e:62e**. Finalmente, para relaciones de 1:6 se obtuvo una mayor cantidad del producto cetona **62e** que del alcohol **61e**, con relaciones de 1:3.5 aproximadamente. Por lo tanto, aumentar los equivalentes de aldehído de partida **58** causa una mayor obtención de cetona **62e** que del alcohol **61e** esperado en una reacción con magnesianos de este tipo. Al modificar las variables de tiempo y temperatura no se observaron cambios relevantes en la relación entre los productos **61e** y **62e**. Las relaciones entre **61e:62e** fueron cuantificadas a partir de la relación entre las señales características de cada compuesto en los espectros de ^1H RMN del crudo. La relación con el alcohol bencílico **67** no se pudo identificar debido al solapamiento de señales características de este con señales de los otros compuestos.

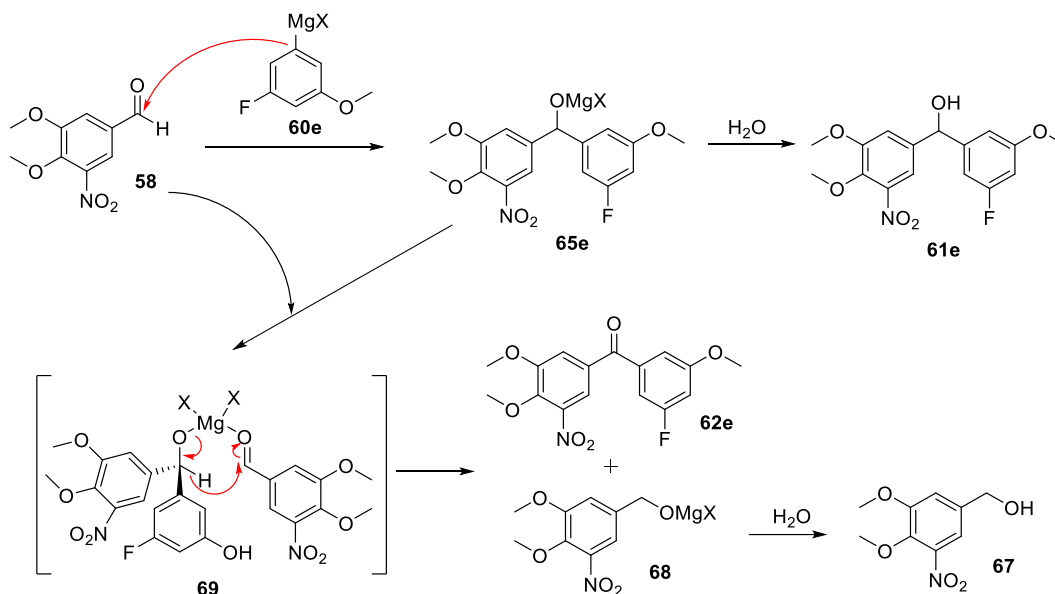
exp.	59e (mmol)	58 (mmol)	eq. 58	t.	proporción RMN		T (°C)
					61e	62e	
1	0.94	1.30	1.2	16 h	1	0.3	ta
2	0.42	0.51	1.2	17 h	1	0.3	ta
3	0.23	0.66	3	20 h	1	0.8	ta
4	0.13	0.39	3	24 h	1	1	50
5	0.47	2.75	6	24 h	1	4.2	ta
6	0.47	2.75	6	7 h	1	3.5	ta
7	0.40	2.33	6	24 h	1	3.3	ta

* La relación entre el *i*PrMgBr y el **59e** siempre es 1:1.

Tabla IV-3. Diferentes condiciones de reacción para la reacción de formación del alcohol **61e** utilizando el aldehído **58** y el derivado de magnesiano del compuesto **59e**.

En base a un artículo publicado con un mecanismo de reacción tipo Cannizzaro entre dos aldehídos y usando un magnesiano como reactivo,⁵⁴ se ha propuesto el mecanismo de reacción ilustrado en el Esquema IV-10. Al reaccionar el aldehído **58** con el reactivo de Grignard **60e** se genera el alcóxido difenílico **65e** que al reaccionar con agua durante el tratamiento final de la reacción da como producto

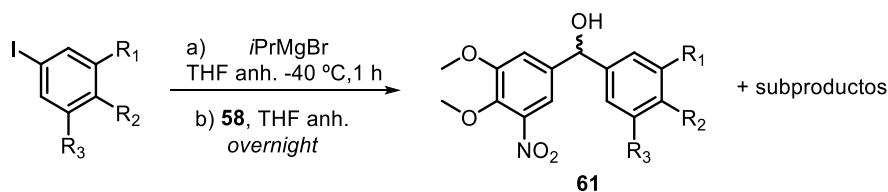
el alcohol **61e**. Por otra parte, este alcóxido **65e** podría interaccionar con otra molécula de aldehído **58** y formar así un intermedio muy reactivo **69** que tras una reacción intramolecular daría como resultado la cetona **62e** y el alcóxido bencílico **68** que al ser tratado con agua resultaría en el alcohol bencílico **67**.



Esquema IV-10. Propuesta de mecanismo de reacción para la formación de los subproductos **62e** y el alcohol bencílico **67**.

IV.3.2.2. Reacción de Grignard con otros yodoarilos de partida

A lo largo de la tesis otros análogos del tolcapone (incluido el propio tolcapone) se intentaron sintetizar con la misma ruta sintética propuesta para los compuestos **TES1a-TES1e**. Desafortunadamente, muchas de estas síntesis fracasaron en la primera etapa de reacción, la reacción de Grignard. Dependiendo del yodoarilo de partida utilizado, la formación del magnesiano con *i*PrMgBr y su posterior ataque nucleófilo sobre el aldehído **58** no siempre funcionó de la forma esperada. Por otra parte, esta reacción también se realizó con otros sustratos para obtener productos finales que no aparecen en este manuscrito (Esquema IV-11.).



Esquema IV-11. Condiciones de reacción para la formación del alcohol secundario.

exp.	Reactivo			Rdt. del alcohol secundario (%)
	R ₁	R ₂	R ₃	
1	H	CH ₃	H	-
2	H	OCH ₃	H	-
3	H	CH ₂ F	H	-
4	H	F	H	77
5	H	CF ₃	H	69
6	Cl	H	Cl	70
7	F	H	OCH ₃	50
8	F	H	F	81
9	Br	H	F	48
10	CF ₃	H	CF ₃	65

*Todos los experimentos se han realizado bajo las mismas condiciones de 1.2 equivalentes de aldehído **58** i 1.1 eq. de *i*PrMgBr en el seno de THF anhidro durante una noche.

Tabla IV-4. Resultados de la reacción entre los diferentes reactivos de Grignard derivados de los yodoarilos correspondientes y el aldehído **58**.

Observando la Tabla IV-4 se puede ver la importancia de la influencia de los sustituyentes de los yodoarilos. Para los yodoarilos con sustituyentes activantes/activantes débiles (CH₃, OCH₃ y CH₂F) en posición *para*, la reacción con el aldehído **58** no se produjo. En cambio, para sustituyentes desactivantes (F y CF₃) en la posición *para*, la reacción se desarrolló correctamente. Finalmente, para yodoarilos disustituídos en posiciones *meta* con sustituyentes halógenos desactivantes débiles (2xF, 2xCl, 2xCF₃ o F/Br) o con una combinación de sustituyente desactivante con activante (F y OCH₃), la reacción también se desarrolló correctamente. Como siguiente objetivo, se debería estudiar si el problema se halla en la incorrecta formación del reactivo de Grignard o en la falta de reactividad con el aldehído **58**. Para ello se podría realizar la reacción con las mismas condiciones experimentales, pero con diferentes aldehídos.

IV.3.3 Experimentos para medir la actividad biológica de TES1a-TES1e, *in vitro*

Todos los experimentos *in vitro* para evaluar la capacidad de interacción y actividad biológica de los compuestos **TES1a-TES1e** en el tetrámero de TTR fueron realizados en el grupo de investigación del Dr. Salvador Ventura en el (UAB).

IV.3.3.1. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) fue la técnica aplicada para caracterizar las afinidades de la interacción de los nuevos compuestos con la WT-TTR y determinar los parámetros termodinámicos

de la interacción. Esta técnica funciona mediante la medición del calor que se libera o absorbe durante un proceso de interacción biomolecular, sin necesidad de modificar los componentes de la interacción, ya sea con un marcador fluorescente, por medio de movilización, etc.⁵⁵

La interacción ligando-TTR puede ser cooperativa (positiva y negativa) o no cooperativa.⁵⁶ Lo deseado es no cooperatividad o cooperatividad positiva. Sin embargo, la mayoría de los estabilizadores de la TTR interaccionan de manera negativa,⁵⁷⁻⁵⁹ lo que implica una pérdida de afinidad por la segunda cavidad en cuanto el primer ligando interactúa, como por ejemplo el tafamidis. Ni el tolcapone, ni ninguno de los compuestos sintetizados interaccionaron con la TTR de forma cooperativa (Tabla IV-5; Figura A-IV-1).

	K_d (nM)	ΔG (kca/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
tolcapone	34	-10.2	-12.8	2.6
tafamidis	9.9 ^a	-10.9 ^a	-6.0 ^a	-4.9 ^a
	260 ^b	-9.0 ^b	-6.5 ^b	-2.5 ^b
TES1a	31	-10.3	-14.0	3.7
TES1b	310	-8.9	-9.2	0.3
TES1c	85	-9.7	-11.7	2.0
TES1d	26	-10.4	-11.3	0.9
TES1e	6.2	-11.2	-16.6	5.4

^a y ^b corresponden a los parámetros asociados a la primera y segunda cavidad T₄-TTR, respectivamente.

Tabla IV-5. Parámetros termodinámicos determinados por ITC para la interacción de los compuestos a estudio con la WT-TTR. El tolcapone y el tafamidis fueron evaluados como referencia.

En concordancia con los cálculos de DM, el **TES1b** tuvo la K_d (310 nM) más alta y una contribución entálpica de interacción ($\Delta H = -9.2$ kcal/mol) más baja que la del tolcapone ($K_d = 34$ nM y $\Delta H = -12.8$ kcal/mol). Por otro lado, la afinidad y la entalpia de enlace de **TES1a** ($K_d = 31$ nM y $\Delta H = -14$ kcal/mol) fueron superiores a las del tolcapone. La compensación de los efectos de entalpía en relación con los de entropía resultaron en valores de ΔG similares para **TES1a** y tolcapone.

En cuanto a los compuestos halogenados disustituidos, el compuesto **TES1c** mostró una K_d (85 nM) mayor y una entalpia de enlace menor ($\Delta H = -11.7$ kcal/mol) que las del tolcapone. En cuanto al **TES1d**, la afinidad ($K_d = 26$ nM) fue superior a la del tolcapone, mientras que el factor entálpico fue inferior ($\Delta H = -11.3$ kcal/mol). A pesar de todo, el bajo factor entrópico para la interacción de **TES1d** resultó en un leve incremento de la ΔG (-10.4 kcal/mol) relativa a la del tolcapone.

La K_d del compuesto **TES1e** fue excepcionalmente baja (6.2 nM), correspondiendo a una afinidad de enlace 5 veces mayor que la del tolcapone, con una entalpia de enlace muy alta ($\Delta H = -16.6$ kcal/mol). La interacción de **TES1e** está completamente guiada por el factor entálpico, y a pesar de tener un factor

entrópico ($\Delta S = 5.4$ kcal/mol) superior al del tolcapone ($\Delta S = 2.6$ kcal/mol), debido a su alta polaridad, la ΔG (-11.2 kcal/mol) continúa siendo superior. Comparado con el tafamidis, **TES1e** ofrece una afinidad superior tanto para la primera cavidad de enlace como, en especial, para la segunda cavidad, siendo unas 40 veces superior. Además, la contribución entálpica para cualquiera de los dos puntos de unión con el **TES1e** es en definitiva 2.5 veces superior a la del tafamidis.

En general, el análisis termodinámico concuerda con las simulaciones de DM que se hicieron previas a la síntesis de los compuestos, y han demostrado una gran optimización para la interacción **TES1e**-TTR.

IV.3.3.2. Estabilización cinética de la TTR

Para evaluar la estabilización cinética de la TTR propiciada por los compuestos sintetizados se midió la inhibición de la disociación del tetrámero en presencia de urea. El uso de diferentes concentraciones de urea en la región post-transición para cambios en la estructura terciaria de la proteína permitió medir la disociación del tetrámero, ya que los monómeros se despliegan en cuestión de milisegundos y luego permanecen desplegados.⁶⁰ Por consiguiente, las muestras de TTR fueron incubadas en ausencia o presencia de los compuestos y la desnaturalización de la TTR fue inducida añadiendo una solución de urea 6 M. Los cambios en la estructura terciaria fueron monitorizados a través del tiempo por un ensayo de fluorescencia intrínseca de triptófano, el cual fue usado para calcular la fracción de proteína desplegada durante el tiempo.

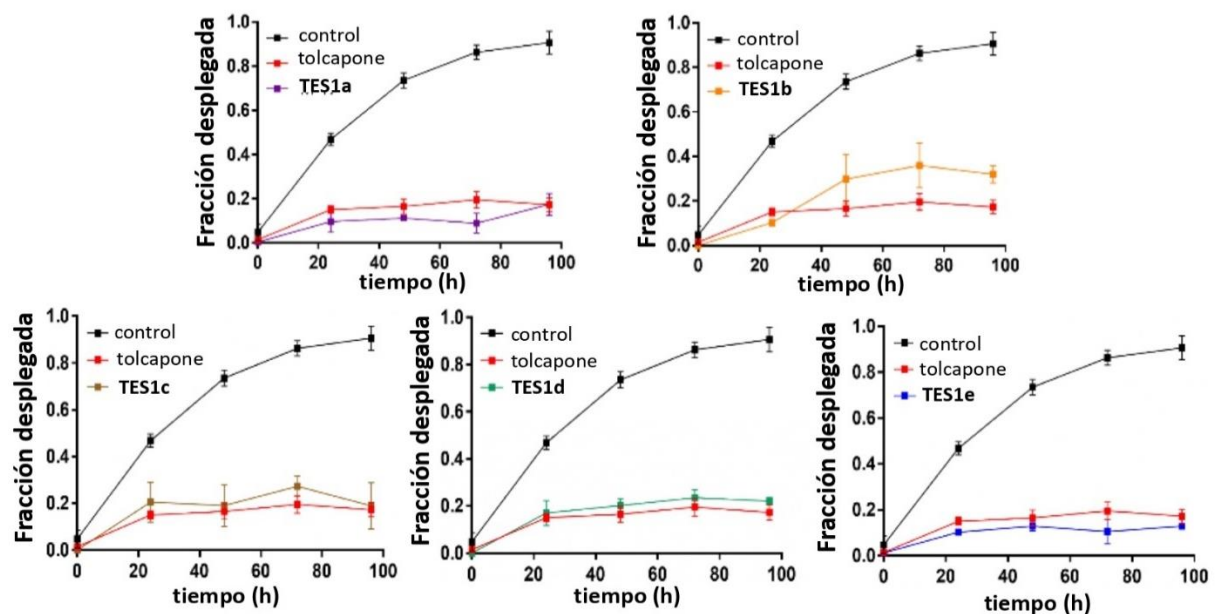


Figura IV-15. Disociación del tetrámero WT-TTR (1.8 μM) en presencia o ausencia de tolcapone, **TES1a**-**TES1e** (a 3.6 μM), medida por fluorescencia intrínseca de triptófano. Los valores representan la media \pm SEM ($n = 3$). El tolcapone fue analizado en paralelo como control positivo para poder compararlo con el resto de los compuestos.

Todos los derivados halogenados del tolcapone, incluido el mismo tolcapone, disminuían significativamente la cantidad de tetrámero disociado, así como la ratio de disociación del tetrámero, cuando estaban presentes en niveles equimolares relativos a la cavidad de unión T₄ (Figura IV-15). El **TES1b** y **TES1c** actuaron peor que el tolcapone, mientras que **TES1d** lo hacía de forma parecida. El **TES1a** actuó ligeramente mejor, protegiendo hasta el $82.5 \pm 4.9\%$ de las moléculas de TTR del desdoblamiento inducido por urea. El **TES1e** ofreció la estabilización cinética más fuerte en las condiciones experimentales, protegiendo hasta un $87 \pm 0.1\%$ de las TTRs del desdoblamiento inducido por urea.

IV.3.3.3. Actividad como antiagregante de la TTR

La actividad antiamiloidogénica fue evaluada usando un ensayo de formación de fibrillas⁶¹ y comparando los resultados con los del tolcapone. La TTR (7.2 μM) fue incubada con diferentes concentraciones de los compuestos a estudio (0 - 20 μM) durante 30 minutos (pH 7.4 a 37 °C) y luego, el pH fue ajustado a 4.2 (pH óptimo para la fibrilación de la TTR).⁶² Después de una incubación de 72 h, el porcentaje de conversión de TTR en fibras amiloides fue determinado midiendo la turbidez a 340 nm y se comparó con la TTR incubada con las mismas condiciones en ausencia de los inhibidores (100%).

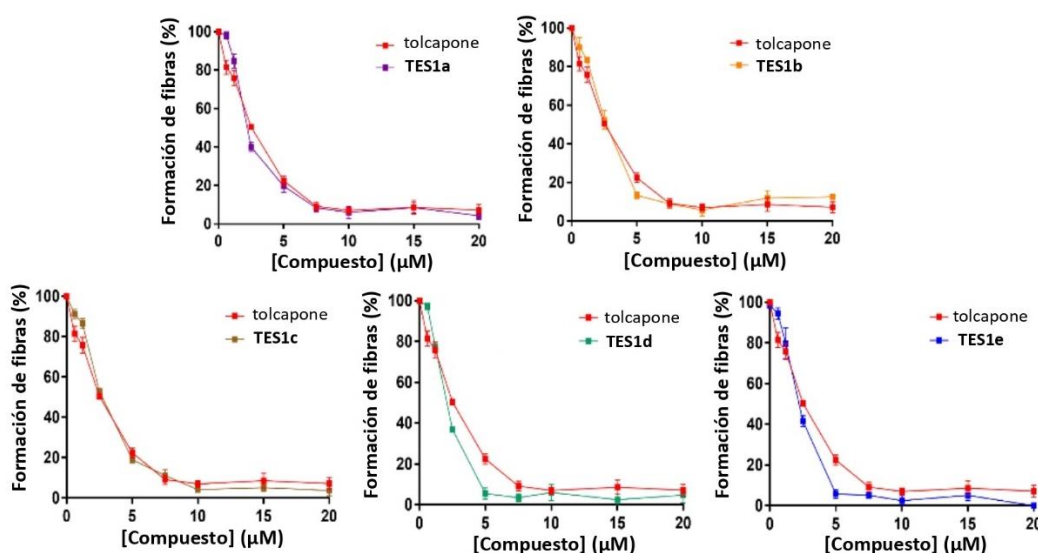


Figura IV-16. Agregación de la TTR (3.6 μM) inducida por ácido en función de la concentración del inhibidor y determinada por turbidimetría a 340 nm. Los valores representan la media \pm SEM (n = 3).

Todos los compuestos mostraron una fuerte actividad antiamiloidogénica, disminuyendo la agregación de la TTR de forma dependiente de la concentración. En todos los casos, la protección fue superior al 60% para concentraciones equimolares ligando/TTR (1:1) y $\geq 87.4\%$ cuando las concentraciones de los

compuestos eran \geq a la de las cavidades de unión de la T₄ (Figura IV-16). Estos resultados remarcan la alta capacidad del tolcapone y sus análogos como potentes inhibidores de la agregación de la TTR. En cuanto al **TES1a**, a pesar de que presentó mejores resultados en interacción y como estabilizador cinético que el tolcapone, estas propiedades no se traducen en una optimización en las propiedades de antiagregación, a pHs ácidos. De los compuestos disustituídos, el **TES1c**, siendo el peor ligando de los tres, iguala la potencia del tolcapone, mientras que el **TES1d** y el **TES1e** funcionan mejor, aboliendo completamente la formación de fibras amiloides cuando están presentes a concentraciones $\geq 20 \mu\text{M}$.

IV.3.4. Optimización de la síntesis de TES1e

Como se ha podido observar, el compuesto **TES1e** ha sido de gran interés por su prometedora actividad biológica. Por lo tanto, su síntesis fue estudiada, escalada y optimizada para poder obtener grandes cantidades de producto.

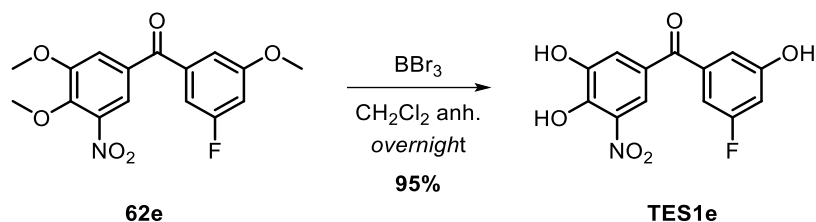
Al realizar la síntesis a escala de gramo los rendimientos de las reacciones se comportaron de manera similar que a escala de miligramos.

En el caso de la primera desprotección en tándem de los metóxidos del catecol utilizando BBr₃ en CH₂Cl₂, en vez de utilizar una atmosfera normal durante 1 hora y media, se decidió utilizar condiciones de atmosfera inerte de N₂ y disolvente anhidro durante una noche en agitación. El resultado observado en los análisis de cromatografía por capa fina (CCF) fue el consumo total del reactivo de partida, ninguna señal referente al producto monoprotegido **63e** y una señal con cola y R_f muy bajo. Tras evaporar el disolvente del crudo, apareció un sólido marrón muy poco soluble en disolventes orgánicos convencionales. Este comportamiento de la reacción fue muy semejante al obtenido durante el proceso de puesta a punto de la desprotección final del catecol del compuesto **TES1c** y al sólido obtenido después de purificar los productos finales por columna cromatográfica.

Considerando los precedentes, se realizó un lavado del sólido marrón con una solución de HCl al 0.5% w/w (condiciones ácidas de pH < 2). Sorprendentemente, el sólido marrón también se disolvió en el disolvente (EtOAc), y la fase orgánica obtuvo una tonalidad amarilla translúcida. Tras evaporar el disolvente, se obtuvo un sólido de color amarillo identificado como el producto deseado **TES1e**. Este hecho da que pensar que durante la puesta a punto de la síntesis del compuesto **TES1c**, el sólido marrón obtenido tras la desprotección con BBr₃ del catecol, que bajo desconocimiento se identificó como producto de descomposición, en realidad se trataba del producto final en forma iónica.

Por lo tanto, con estas condiciones anhidras de BBr₃ se pudo realizar la desprotección total de los dos metóxidos del catecol **62e** de forma prácticamente cuantitativa (95%, post recristalización). A raíz de

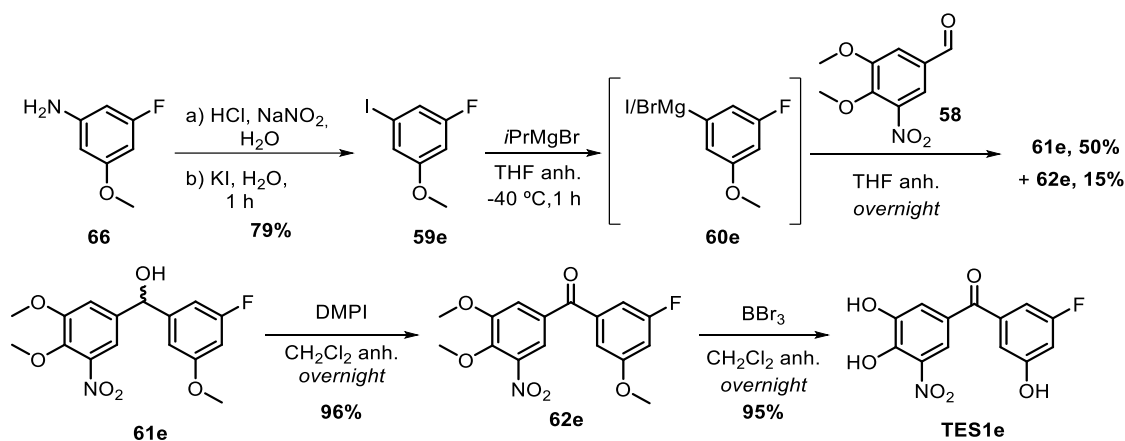
las experiencias previas, también se pueden considerar estas condiciones como una metodología aplicable al resto de compuestos de la batería **TES1a- TES1d**. (Esquema IV-12).



Esquema IV-12. Condiciones experimentales para obtener el producto **TES1e** a partir de la cetona **62e**.

El único inconveniente de esta vía en comparativa a la utilización de las dos reacciones consecutivas fue la obtención de una impureza (< 7%), no identificada y que no se pudo separar por columna cromatográfica. Finalmente, gracias a una serie de recristalizaciones consecutivas con EtOAc y hexano del producto **TES1e**+impureza, la cantidad de impureza se pudo reducir a prácticamente cero.

Con esta optimización de la ruta sintética para la obtención del compuesto **TES1e** se pudo obtener el compuesto final con una sencilla síntesis de 4 etapas con un rendimiento global del 36%, bastante mejorado respecto al de la síntesis anterior (5 etapas, 14% de rendimiento global) (Esquema IV-13). El rendimiento global calculado no incluye la cetona **62e** que también se obtiene en la reacción de Grignard.



Esquema IV-13. Ruta sintética optimizada para la obtención de **TES1e**.

IV.3.5. Ensayos de la actividad farmacológica de TES1e

IV.3.5.1. Estabilización de la TTR en plasma humano

La habilidad de **TES1e** para prevenir la disociación de la TTR en plasma humano fue monitorizada usando una técnica de electroforesis de isoelectroenfoque (IEF), bajo condiciones de semidesnaturalización (urea 4 M) y usando el tolcapone como control. Este tipo de ensayo permitió cuantificar la proporción de monómeros y tetrámeros en la muestra, y calcular el grado de estabilización del tetrámero.

Primero, se quiso evaluar si el ensayo podía detectar diferencias en la estabilización del tetrámero a través de **TES1e** o tolcapone cuando se usaban proteínas recombinantes purificadas. Una solución 6 μM de TTR fue incubada en presencia y ausencia de soluciones de 30 μM y 60 μM de **TES1e** durante una noche a 4 °C. Como se puede apreciar en la Figura IV-17a, el compuesto **TES1e** muestra una estabilización superior a la del tolcapone en ambas concentraciones. Posteriormente, este experimento se repitió en plasma humano (Figura IV-17b), y el compuesto **TES1e** volvió a mostrar una efectividad claramente superior, con un efecto estabilizador cinco veces superior al del tolcapone. Estos resultados indican una estrecha y selectiva capacidad de interacción de **TES1e** con la TTR presente en el plasma humano.

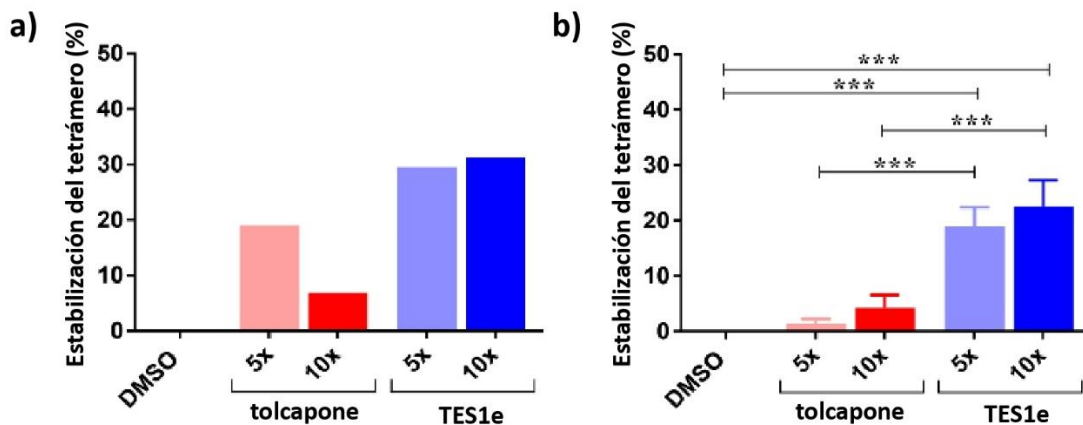


Figura IV-17. Efecto de **TES1e** sobre la estabilización del tetrámero evaluado con IEF bajo condiciones de semidesnaturalización. Porcentajes del tetrámero de TTR estabilizado tras la incubación de **TES1e** con (a) WT-TTR recombinante o (b) plasma humano. El compuesto **TES1e** fue concentrado cinco (5x) o diez (10x) veces más que la WT-TTR. Las barras de error representan la SEM de la media de los valores; ***p < 0.001.

Esta gran potencia estabilizadora del compuesto **TES1e** en plasma, relativa a la del tolcapone, responde a su mayor entalpia de enlace, como indicaban los valores del ITC. Este hecho está en concordancia con publicaciones recientes que sugieren que la correlación entre la ΔH y la selectividad/eficacia de los

estabilizadores de la TTR en el plasma humano es más importante que la de ΔG o K_d ,⁶³ dos parámetros que son igualmente buenos en el caso de **TES1e**.

IV.3.5.2. Citotoxicidad

Los análisis de citotoxicidad fueron realizados para evaluar la toxicidad química potencial de **TES1e** en células humanas. En este estudio se utilizaron dos tipos de células: células de cáncer cérvico-uterino humano (HeLa); y células de cáncer de hígado humano (HepG2). Estas células fueron expuestas a un incremento de concentraciones de **TES1e** (0 - 1 mM) durante 72 h a 37 °C, usando el *PrestoBlue® cell viability reagent*. Para las dos líneas celulares, **TES1e** no mostró efectos de citotoxicidad a 1 mM, que en definitiva es un orden de magnitud superior a la concentración esperada del compuesto en sangre. (Figura A-IV-2).

IV.3.6. Estructura cristalográfica del complejo WT-TTR/TES1e

Las simulaciones de DM, junto con los análisis termodinámicos, apuntaban a que la buena afinidad y la alta contribución entálpica de unión de **TES1e**-TTR venía dada por el aumento del número y/o fuerzas de interacciones entre este ligando y la TTR, con respecto al tolcapone. Para atestiguar estos hechos, se consiguió resolver la estructura cristalográfica de la TTR en complejo con el **TES1e** a una resolución de 1.2 Å (PDB: 7QC5) (Figura IV-18). Este cristal de alta resolución permitió la colocación inequívoca del compuesto **TES1e** en el mapa de densidad electrónica en forma de “mariposa” de la interfaz dímero-dímero de la TTR. El eje de simetría doble a lo largo de la cavidad crea dos modos de unión de **TES1e** relacionados entre sí por una rotación de 180°. Tal y como se predijo, el **TES1e** se asienta más profundamente en la cavidad T₄ que el tolcapone.

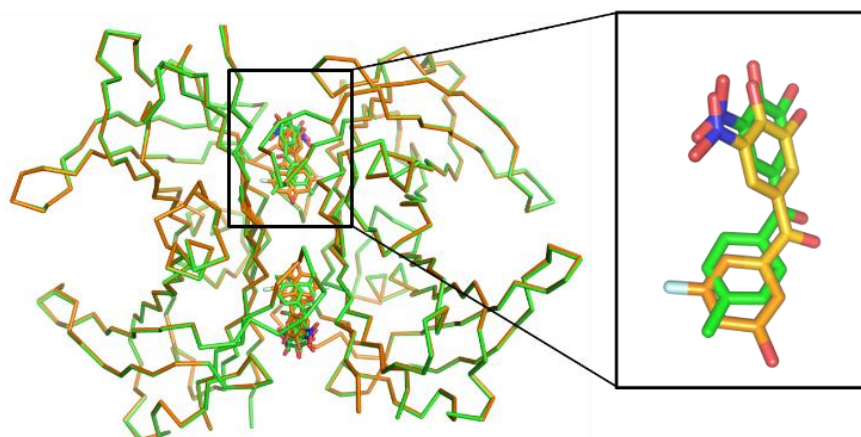


Figura IV-18. Estructura cristalográfica de la WT-TTR en complejo con el **TES1e**. Superposición de la WT-TTR en complejo con el **TES1e** (naranja) o tolcapone (verde).

Como ocurre con el tolcapone, en la región de enlace más externa, el anillo de 3,4-dihidroxi-5-nitrofenilo del compuesto **TES1e** se ubica en el entorno creado por los residuos del HBP2 y HBP1 (Lys¹⁵, Leu¹⁷, Thr¹⁰⁶ y Ala¹⁰⁸) (Figura IV-19). El grupo ϵ -amino de la Lys¹⁵ es intercalado entre los grupos hidroxilo del anillo de **TES1e** y el grupo carboxilato del Glu⁵⁴. Estas interacciones electrostáticas por parte de la Lys¹⁵ cierran la cavidad alrededor de **TES1e**, protegiéndolo de forma efectiva del disolvente. Aunque el **TES1e** está más hundido en la cavidad que el tolcapone, la distancia entre la Lys¹⁵ y los hidroxilos es igual o incluso más corta, resultando en un movimiento de la Lys¹⁵ hacia dentro de la cavidad, mientras que el Glu⁵⁴ sigue en la misma posición (Figura A-IV-3).

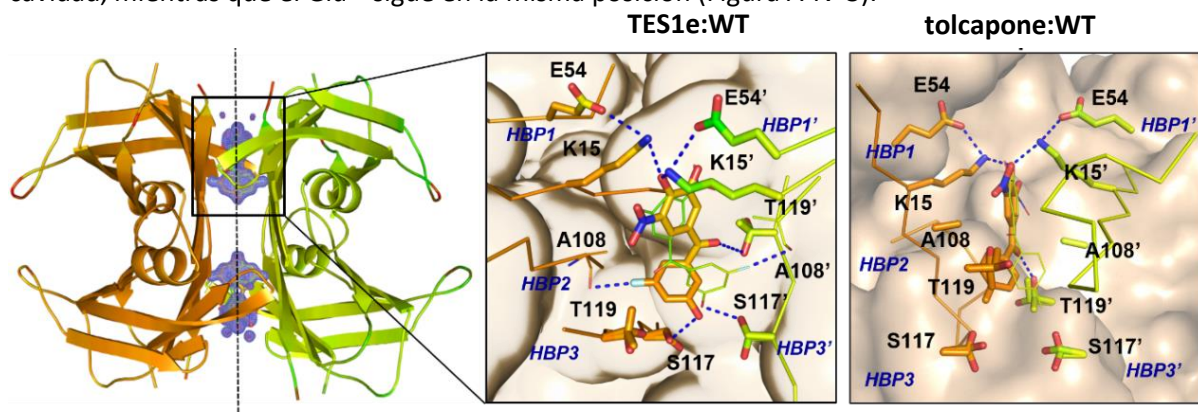


Figura IV-19. Visión global de la WT-TTR enlazada al **TES1e** a 1.2 Å (representación a dibujo). El mapa de densidad electrónica de las dos cavidades T₄ del compuesto **TES1e** está representado de color azul. La línea de puntos indica el eje de simetría doble de la interfaz dímero-dímero. La imagen ampliada de la izquierda muestra una visión detallada de **TES1e** en interacción con la cavidad T₄-TTR. La de la derecha del tolcapone en interacción con la cavidad T₄-TTR (PDB: 4D7B).

Como en la estructura de la tolcapone-TTR, el grupo carbonilo de **TES1e** establece un puente de hidrogeno con el hidroxilo de la cadena lateral de la Thr¹¹⁹. Como indicaba en las simulaciones de DM, el anillo de 3-fluoro-5hidroxifenilo se proyecta profundamente dentro de la cavidad donde participa en interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals con las dos cavidades simétricas HBP2 y HBP3 (Ala¹⁰⁸, Leu¹¹⁰, y Thr¹¹⁹). Además, el grupo HO-5^{II} de **TES1e** forma un puente de hidrogeno corto con la Ser¹¹⁷ (2.8 Å) y el sustituyente F-3^{II} está en contacto con la Ala¹⁰⁸ (2.8 Å), coincidiendo con las calculadas en las simulaciones de DM (2.76 Å) (Figura IV-20). Estas dos interacciones no están presentes en las estructuras TTR-tolcapone y TTR-tafamidis, confirmando que **TES1e** establece un número superior de puentes de hidrogeno no covalentes con la proteína, que podrían ser lo que impulsa al **TES1e** a tener una gran afinidad y una excepcional entalpia de enlace por la TTR.

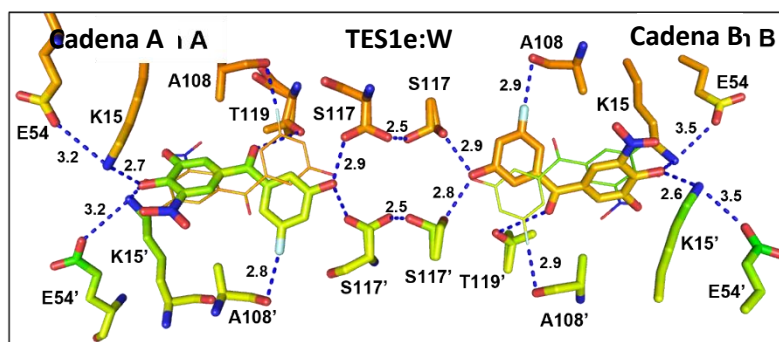


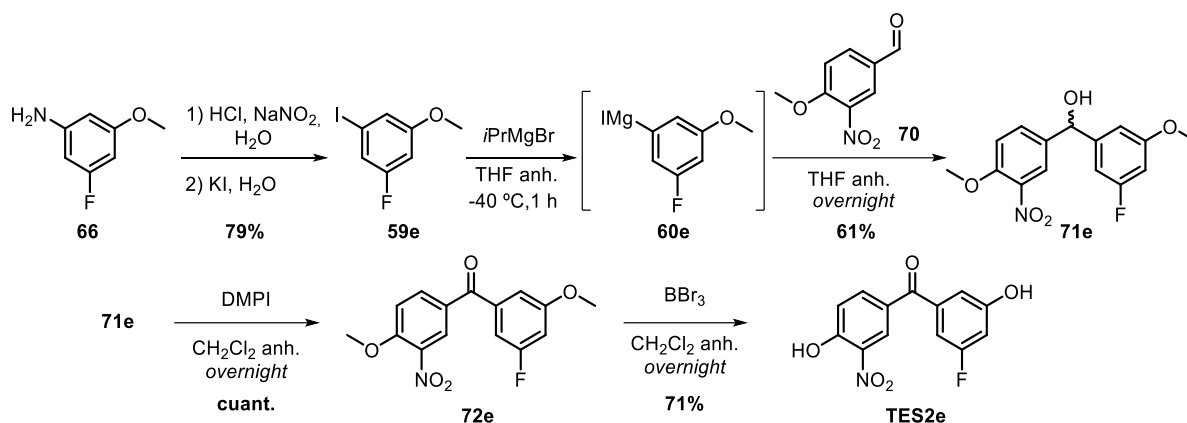
Figura IV-20. Interfaz dímero-dímero de la WT-TTR en interacción con el **TES1e**. Las líneas de puntos representan las interacciones clave entre el **TES1e** y la WT-TTR y entre los hidroxilos de los residuos Ser¹¹⁷/Ser¹¹⁷.

Finalmente, las interacciones de los puentes de hidrogeno de **TES1e** con la Ser¹¹⁷ en las cavidades de HBP3s ayudan a acercar las subunidades del dímero y a fortalecer los contactos moleculares entre ellas, aumentando la barrera de disociación.^{64,65} En la Figura IV-21 se puede ver como una de las conformaciones de la cadena lateral de la Ser¹¹⁷ de la subunidad A, puede establecer un puente de hidrogeno corto (2.5 Å) con la Ser¹¹⁷ de la subunidad B, que podría contribuir aún más a estabilizar la estructura cuaternaria de la proteína.

IV.3.7. Síntesis del compuesto TES2e

En una publicación de Valentina Laconte *et al.* del 2020 se presentó un compuesto análogo al tolcapone, el 3-desoxitolcapone, que no contenía ningún sustituyente en el C₅ del anillo nitro-fenilo. La reducción de los impedimentos estéricos del anillo nitro-fenilo permitía una penetración más profunda en la cavidad T₄-TTR, al igual que una orientación totalmente inversa a la del tolcapone dentro de la cavidad. Estos hechos hacían del 3-desoxitolcapone un estabilizador más efectivo y selectivo de la TTR en plasma humano, respecto al tolcapone. Además, la ausencia de este sustituyente también resultó en un incremento del tiempo de semivida en el plasma en relación con el del tolcapone.⁶⁶

Juntando los prometedores resultados del compuesto **TES1e** con los datos experimentales presentados en el artículo de Loconte y colaboradoras, se diseñó el compuesto **TES2e**. Este compuesto está formado por el fragmento nitro-fenilo sin sustituyente hidroxilo en el C₅ del 3-desoxitolcapone del artículo, y el fragmento de 3-fluoro-5-hidroxifenilo de **TES1e**, unidos en forma de benzofenona. Con estos cambios estructurales se pretendía evaluar su capacidad como estabilizador de la TTR respecto al **TES1e**, el mejor candidato hasta la fecha.



Esquema IV-14. Condiciones de reacción de la ruta sintética diseñada para la obtención de **TES2e**.

La síntesis del compuesto **TES2e** se realizó de la misma manera que para los otros compuestos **TES**. La primera etapa consistió en la formación del yodoarilo **59e** a partir de la formación de la sal de diazonio en la amina del compuesto comercial 3-fluoro-5-metoxianilina (**70**) y una sustitución de esta por un yodo utilizando yoduro potásico. La siguiente etapa fue la transformación del compuesto **59e** en un reactivo de Grignard utilizando *i*PrMgBr u posterior reacción con el aldehído comercial **70** para formar el alcohol secundario **71e** con un 61% de rendimiento. Este alcohol fue oxidado a la cetona **72e** de forma prácticamente cuantitativa utilizando DMPI. Finalmente, los metóxidos de la cetona **72e** fueron desprotegidos en presencia de BBr_3 , en una única etapa y con un 71% de rendimiento. De esta forma se obtuvo el producto final **TES2e** con una síntesis de 4 etapas y un rendimiento global del 35% (Esquema IV-14).

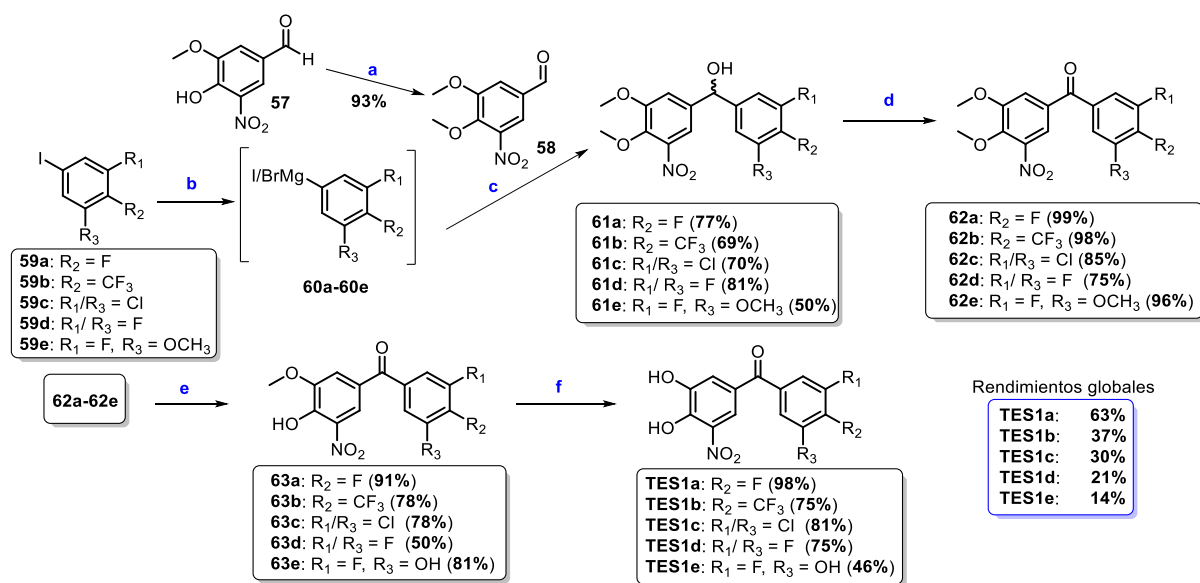
La elucidación estructural y caracterización de los compuestos de esta síntesis se completó gracias a los espectros de ^1H y ^{13}C RMN, y por comparativa con la síntesis del compuesto **TES1e**.

Actualmente, el compuesto **TES1e**, junto a otros compuestos que no se aparecen en la memoria, se encuentra bajo ensayos para evaluar su actividad farmacológica en el grupo del Dr. Salvador Ventura en el *Institut de Biotecnologia i Biomedicina* y el *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular* (UAB).

IV.4. Resumen y conclusiones

Gracias a la técnica de reposicionamiento de fármacos, se ha descubierto que el tolcapone, un fármaco diseñado para tratar la enfermedad del Parkinson, podría ser un buen candidato para la terapia contra la ATTR, estabilizando el tetrámero de TTR y evitando la agregación.³⁴ En colaboración con los grupos de investigación de la Dra. Mariona Sodupe (UAB) y el del Dr. Salvador Ventura (UAB), se diseñó una serie de nuevos compuestos halogenados derivados del tolcapone con la ayuda de cálculos computacionales de DM.

De esta manera, cinco nuevos compuestos han sido sintetizados a partir de una ruta sintética de cinco etapas (Esquema IV-15). La ruta sintética parte de los yodoarilos comerciales correspondientes y la 5-nitrovanilina comercial. En el caso de la ruta del compuesto **TES1e**, también se tuvo que sintetizar el yodoarilo **59e** precursor del alcohol secundario **61e**. Los rendimientos globales de las rutas van del 14% al 63%. Además, la ruta de **TES1e** se optimizó consiguiendo desproteger los dos metóxidos del catecol en una sola etapa de forma cuantitativa y mejorando el rendimiento global de un 14% a un 36%.



Esquema IV-15. Condiciones de reacción para la síntesis de los compuestos de la familia **TES**. **Reactivos y condiciones experimentales:** (a) Me₂SO₄, NaOH, H₂O/CH₂Cl₂ (1:1), 24 h; (b) *i*PrMgBr, THF anh., -40 °C, 1 h; (c) **58**, THF anh., *overnight*; (d) DMPI, CH₂Cl₂ anh., *overnight*; (e) BBr₃, CH₂Cl₂, 1.5 h; (f) AlCl₃, CHCl₃ anh., reflujo, *overnight*. Si R₁, R₂ o R₃ no están especificado, se trata de un hidrogeno (H).

Durante la realización de la reacción de Grignard y el aldehído **58** se pudo observar que también se formaban las benzofenonas **62a-62e** como producto secundario. Este fenómeno podría ser causado por una reacción secundaria tipo Cannizzaro con los reactivos de Grignard y el aldehído **58**. Tras una serie de pruebas, se pudo observar que en aumentar la presencia de **58** en el medio, la reacción se

decantaba más por la formación de la cetona que por la del alcohol. En esta reacción también se pudo observar que para yodoarilos con sustituyentes activantes en la posición *para*, la reacción de formación del alcohol secundario con reactivos de Grignard no funcionaba.

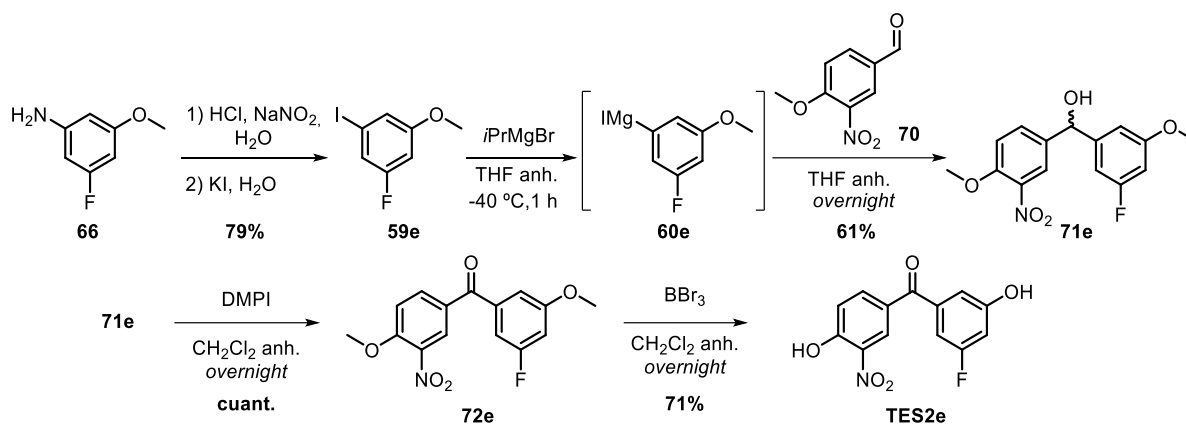
Todos los compuestos de la familia **TES** fueron evaluados en experimentos *in vitro* para definir su capacidad como estabilizadores de la TTR y comparados con el tolcapone o tafamidis. Los experimentos de ITC mostraron que ninguno de los compuestos interaccionaba de forma cooperativa con la TTR. Los compuestos **TES1b** y **TES1c**, debido a sus voluminosos sustituyentes, no mostraron una buena interacción con la TTR respecto al tolcapone. El **TES1a** y **TES1d** se comportaron de forma relativamente similar a la del tolcapone. En cuanto al compuesto **TES1e** la mejora fue muy notable, con una constante de afinidad (K_d) cinco veces mayor a la del tolcapone y una ΔG más favorable.

En cuanto a la capacidad como estabilizador de tetrámero de TTR, todos los derivados halogenados **TES** disminuían significativamente la cantidad de tetrámero disociado. Siguiendo las mismas tendencias que para los cálculos de DM y los experimentos de ITC el **TES1e** presentó la estabilización cinética más fuerte. Por otro lado, La actividad antiamiloidogénica de la TTR fue evaluada usando un ensayo de formación de fibrillas. Todos los compuestos mostraron una fuerte actividad antiamiloidogénica, disminuyendo la agregación de la TTR de forma dependiente a la concentración. Solo los compuestos **TES1d** y **TES1e** funcionaron mejor que el tolcapone.

Profundizando más en la actividad de **TES1e**, se pudo comprobar que la actividad estabilizadora de **TES1e** sobre la TTR en plasma humano era cinco veces superior la del tolcapone. El compuesto **TES1e** no presentó citotoxicidad alguna en cultivos de células HeLa y HepG2.

Finalmente, se consiguió resolver la estructura cristalográfica del compuesto **TES1e** en complejo con la WT-TTR (PDB: 7QC5). Gracias a esta estructura cristalográfica se pudieron conocer los parámetros de interacción por los cuales se podría atribuir la mejora en la actividad de **TES1e** respecto a la del tolcapone: (i) una mayor penetración en la cavidad T_4 , con interacciones electrostáticas por parte del residuo de Lys¹⁵, provocando un cierre de la cavidad y mayor protección frente al disolvente; (ii) un puente de hidrógeno del OH-5^{II} con el residuo Ser¹¹⁷ y una interacción del F-3^{II} con el residuo Ala¹⁰⁸; (iii) distancia más corta entre la interacción de los residuos Ser¹¹⁷ de cada dímero.

En un estadio superior del proyecto, se diseñó el compuesto **TES2e** a partir de la estructura del 3-desoxitolcapone y el **TES1e**, en forma de híbrido. Este compuesto se sintetizó con una ruta sintética de 4 etapas, idéntica a la de **TES1e** pero partiendo del 3-nitro-4-anisaldeído comercial (**89**), y con un rendimiento global del 35% (Esquema IV-16).



Esquema IV-16. Ruta sintética para la obtención de TES2e.

IV.5 Referencias del capítulo IV

- (1) Eisenberg, D.; Jucker, M. *Cell* **2012**, *148*, 1188-1203.
- (2) Sipe, J. D.; Cohen, A. S. J. *Struct. Biol.* **2000**, *130*, 88-98.
- (3) Álvarez-Ruiz, S. B.; García-Río, I.; Daudén, E. *Actas Dermosifiliogr.* **2005**, *96*, 69-82.
- (4) James, D. W.; Berger, T.G.; Elston, D. M. *Andrew's diseases of the skin Clinical dermatology*, 12a ed., Elsevier, Philadelphia, 2016.
- (5) Silva Sayago, I. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, 2017.
- (6) Lado Lado, F. L.; Ferreiro Regueiro, M. J.; Cabana González, B.; Díez Díez, V.; Maceda Vilariño, S.; Antúnez López, J. *Med. Integral* **2000**, *36*, 137-141.
- (7) Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S. I.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Westermark, P. *Amyloid* **2016**, *23*, 209-213.
- (8) Kanai, M.; Raz, A.; Goodman, D. S. *J. Clin. Invest.* **1968**, *47*, 2025-2044.
- (9) Hagen, G. A.; Elliott, W. J. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1973**, *37*, 415-422.
- (10) Hall, J. E.; Guyton, A. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, 13 ed., Elsevier, 2016, 951-963.
- (11) Hamilton, J. A.; Benson, M. D. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1491-1521.
- (12) Richardson, S. J. *Front. Endocrinol.* **2015**, *5*, 245.
- (13) Benson, M. D. *Amyloid* **2017**, *24*, 76-77.
- (14) Foss, T. R.; Wiseman, R. L.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **2005**, *44*, 15525-15533.
- (15) Fine, N. M.; Davis, M. K.; Anderson, K.; Delgado, D. H.; Giraldeau, G.; Kitchlu, A.; Massie, R.; Narayan, J.; Swiggum, E.; Venner, C. P.; Ducharme, A.; Galant, N. J.; Hahn, C.; Howlett, J. G.; Mielniczuk, L.; Parent, M. C.; Reece, D.; Royal, V.; Toma, M.; Virani, S. A.; Zieroth, S. *Can. J. Cardiol.* **2020**, *36*, 322-334.
- (16) Hurshman Babbes, A. R.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **2008**, *47*, 6969-6984.
- (17) Finsterer, J.; Iglseder, S.; Wanschitz, J.; Topakian, R.; Löscher, W. N.; Grisold, W. *Neurol. Scand.* **2019**, *139*, 92-105.
- (18) Hou, X.; Aguilar, M. I.; Small, D. H. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1637-1650.
- (19) Rapezzi, C.; Quarta, C. C.; Riva, L.; Longhi, S.; Gallelli, I.; Lorenzini, M.; Ciliberti, P.; Biagini, E.; Salvi, F.; Branzi, A. *Nat. Rev. Cardiol.* **2010**, *7*, 398-408.
- (20) Goren, H.; Steinberg, M. C.; Farboody, G. H. *Brain* **1980**, *103*, 473-495.
- (21) Sekijima, Y.; Hammarström, P.; Matsumura, M.; Shimizu, Y.; Iwata, M.; Tokuda, T.; Ikeda, S. ichi; Kelly, J. W. *Lab. Invest.* **2003**, *83*, 409-417.
- (22) Westermark, P.; Sletten, K.; Johansson, B.; Cornwell III, G. G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 2843-2845.

- (23) Coles, L. S.; Young, R. D. *Prev. Med.* **2012**, *54*, S9-S11.
- (24) Coelho, T.; Chorão, R.; Sousa, A.; Alves, I.; Torres, M. F.; Saraiva, M. J.M. *Neuromuscul. Disord.* **1996**, *20*.
- (25) Johnson, S. M.; Connelly, S.; Fearn, C.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. *J. Mol. Bio.* **2012**, *421*, 185-203.
- (26) Herlenius, G.; Wilczek, H. E.; Larsson, M.; Ericzon, B. G. *Transplantation* **2004**, *77*, 64-71.
- (27) Bulawa, C. E.; Connelly, S.; DeVit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J. A.; Packman, J.; Powers, E. T.; Wiseman, R. L.; Foss, T. R.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W.; Labaudinière, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 9629-9634.
- (28) Coelho, T.; Maia, L. F.; da Silva, A. M.; Cruz, M. W.; Planté-Bordeneuve, V.; Suhr, O. B.; Conceição, I.; Schmidt, H. H. J.; Trigo, P.; Kelly, J. W.; Labaudinière, R.; Chan, J.; Packman, J.; Grogan, D. R. *J. Neurol.* **2013**, *260*, 2802-2814.
- (29) Maurer, M. S.; Schwartz, J. H.; Gundapaneni, B.; Elliott, P. M.; Merlini, G.; Waddington-Cruz, M.; Kristen, A. v.; Grogan, M.; Witteles, R.; Damy, T.; Drachman, B. M.; Shah, S. J.; Hanna, M.; Judge, D. P.; Barsdorf, A. I.; Huber, P.; Patterson, T. A.; Riley, S.; Schumacher, J.; Stewart, M.; Sultan, M. B.; Rapezzi, C. *N. Eng. J. Med.* **2018**, *379*, 1007-1016.
- (30) Monteiro, C.; Mesgazardeh, J. S.; Anselmo, J.; Fernandes, J.; Novais, M.; Rodrigues, C.; Brighty, G. J.; Powers, D. L.; Powers, E. T.; Coelho, T.; Kelly, J. W. *JCI Insight* **2019**, *4*, 126526.
- (31) Li, Y. Y.; Jones, S. J.; Smith, M. *Genome Med.* **2012**, *4*, 27.
- (32) Sekijima, Y.; Dendle, M. A.; Kelly, J. W. *Amyloid* **2006**, *13*, 236-249.
- (33) Berk, J. L.; Suhr, O. B.; Obici, L.; Sekijima, Y.; Zeldenrust, S. R.; Yamashita, T.; Heneghan, M. A.; Gorevic, P. D.; Litchy, W. J.; Wiesman, J. F.; Nordh, E.; Corato, M.; Lozza, A.; Cortese, A.; Robinson-Papp, J.; Colton, T.; Rybin, D. v.; Bisbee, A. B.; Ando, Y.; Ikeda, S. I.; Seldin, D. C.; Merlini, G.; Skinner, M.; Kelly, J. W.; Dyck, P. J. *JAMA* **2013**, *310*, 2658-2667.
- (34) Sant'Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L. Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M. R.; Reixach, N.; Insa, R.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Reig, N.; Ventura, S. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10787.
- (35) Reig, N.; Ventura, S.; Salvadó, M.; Gámez, J.; Insa, R. *Orphanet. J. Rare. Dis.* **2015**, *10*, P9.

- (36) Gamez, J.; Salvadó, M.; Reig, N.; Suñé, P.; Casanovas, C.; Rojas-Garcia, R.; Insa, R. *Amyloid* **2019**, *26*, 74-84.
- (37) Russ, H.; Müller, T.; Woitalla, D.; Rahbar, A.; Hahn, J.; Kuhn, W. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1999**, *360*, 719-720.
- (38) Pinheiro, F.; Varejão, N.; Esperante, S.; Santos, J.; Velázquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Pallarès, I.; Ventura, S. *FEBS J.* **2021**, *288*, 310-324.
- (39) Palaninathan, S. K. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2324-2342.
- (40) Hörnberg, A.; Eneqvist, T.; Olofsson, A.; Lundgren, E.; Sauer-Eriksson, A. E. A. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 649-669.
- (41) Shaw, D. E.; Maragakis, P.; Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Dror, R. O.; Eastwood, M. P.; Bank, J. A.; Jumper, J. M.; Salmon, J. K.; Shan, Y.; Wriggers, W. *Science* **2010**, *330*, 341-346.
- (42) Das, J. K.; Mall, S. S.; Bej, A.; Mukherjee, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12781-12784.
- (43) Yee, A. W.; Aldeghi, M.; Blakeley, M. P.; Ostermann, A.; Mas, P. J.; Moulin, M.; de Sanctis, D.; Bowler, M. W.; Mueller-Dieckmann, C.; Mitchell, E. P.; Haertlein, M.; de Groot, B. L.; Boeri Erba, E.; Forsyth, V. T. A. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 925.
- (44) Guo, X.; Liu, Z.; Zheng, Y.; Li, Y.; Li, L.; Liu, H.; Chen, Z.; Wu, L. *Drug Des. Devel. Thr.* **2020**, *14*, 1057-1081.
- (45) Cotrina, E. Y.; Pinto, M.; Bosch, L.; Vilà, M.; Blasi, D.; Quintana, J.; Centeno, N. B.; Arsequell, G.; Planas, A.; Valencia, G. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9110-9121.
- (46) Yokoyama, T.; Mizuguchi, M. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 14228-14242.
- (47) Bernauer, K.; Borgulya, J.; Bruderer, H.; Darada, M.; Zircher, G. U.S. Patent, US5236952A, 1993.
- (48) Manikumar, G.; Jin, C.; Rehder, K. S. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 810-815.
- (49) Bruhin, J.; Switzerland, B. US Patent, US5877353A, 1999.
- (50) Battula Sirinivasa, R.; Sureh, B.; Suri, B. PCT Int. Appl. WO2014147464A2, 2013.
- (51) Osorio Celis, M. *Trabajo de Fin de Máster*, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2017.
- (52) Bailey, K.; Tan, E. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5740-5749.
- (53) Jorgensen, W. L.; Bollini, M.; Thakur, V. V.; Domaal, R. A.; Spasov, K. A.; Anderson, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15686-15696.
- (54) Abaee, M. S.; Sharifi, R.; Mojtahedi, M. M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5893-5895.
- (55) Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. *Methods* **1999**, *19*, 213-221.

- (56) Mccammon, M. G.; Scott, D. J.; Keetch, C. A.; Greene, L. H.; Purkey, H. E.; Petrassi, H. M.; Kelly, J. W.; Robinson, C. *Structure* **2002**, *10*, 851-863.
- (57) Ferguson, R. N.; Edelhofer, H.; Saroff, H. A.; Robbins, J.; Cahnmann, H. J. *Biochemistry* **1975**, *14*, 282-289.
- (58) Bulawa, C. E.; Connelly, S.; DeVit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J. A.; Packman, J.; Powers, E. T.; Wiseman, R. L.; Foss, T. R.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W.; Labaudinière, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2012**, *109*, 9629–9634.
- (59) Green, N. S.; Palaninathan, S. K.; Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13404-13414.
- (60) Jiang, X.; Buxbaum, J. N.; Kelly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2001**, *98*, 14943-14948.
- (61) Hurshman, A. R.; White, J. T.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **2004**, *43*, 7365-7381.
- (62) Dolado, I.; Nieto, J.; Saraiva, M. J. M.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Planas, A. *Kinetic J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 246-252.
- (63) Miller, M.; Pal, A.; Albusairi, W.; Joo, H.; Pappas, B.; Haque Tuhin, M. T.; Liang, D.; Jampala, R.; Liu, F.; Khan, J.; Faaij, M.; Park, M.; Chan, W.; Graef, I.; Zamboni, R.; Kumar, N.; Fox, J.; Sinha, U.; Alhamadsheh, M. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7862-7876.
- (64) Kim, J. H.; Oroz, J.; Zweckstetter, M. *Angew. Chem. In. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 16168-16171.
- (65) Sebastião, M. P.; Lamzin, V.; Saraiva, M. J.; Damas, A. M. *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 733-744.
- (66) Loconte, V.; Cianci, M.; Menozzi, I.; Sbravati, D.; Sansone, F.; Casnati, A.; Berni, R. *Bioorg. Chem.* **2020**, *103*, 104144.

Fuente de las Figuras IV

- Figura IV-1.** Figura extraída de la referencia 5.
- Figura IV-3.** Figura extraída y modificada de la referencia 12.
- Figura IV-4.** Figura extraída de la referencia 15.
- Figura IV-7.** Figura extraída y modificada de la referencia 44.

* El resto de las figuras presentes en este capítulo han sido creadas por el autor de la tesis doctoral o por los colaboradores directos del proyecto.

Capítulo V

Moduladores alostéricos del CB₂R

Resumen

El interés sobre el estudio del cannabidiol (CBD), el segundo compuesto activo más abundante de la planta del *cannabis sativa*, se ha incrementado en los últimos años debido a la aprobación para el uso humano y también por no ser euforizante ni adictivo, como lo es el componente principal de la planta, el tetrahidrocannabinol (THC). A parte de su actividad como agonista parcial cuando se une a la cavidad ortostérica del receptor cannabinoide 2 (CB₂R), el CBD ha sido identificado como un modulador alostérico negativo (NAM) cuando se une a una cavidad alostérica del receptor. Gracias a simulaciones de DM y estudios de mutagénesis dirigida, la cavidad alostérica ha sido identificada cerca de la entrada del receptor. Este conocimiento ha permitido realizar el diseño y la síntesis de nuevos moduladores alostéricos negativos y positivos del CB₂R, basados en la estructura del CBD, y con gran potencial terapéutico. Además, esto ha permitido iniciar el desarrollo de nuevas propuestas farmacológicas como el uso de ligandos bitópicos basados en análogos del CBD como moduladores alostéricos.

^a Los resultados explicados en este capítulo han sido publicados en “Design of negative and positive allosteric modulators of the cannabinoid CB₂ receptor derived from the natural product cannabidiol” Navarro, G.; Gonzalez, A.; Sánchez-Morales, A.; Casajuana-Martin, N.; Gómez-Ventura, M.; Cordoní, A.; Busqué, F.; Alibés, R.; Pardo, L.; Franco, R J. *Med. Chem.* **2021**, *64*, 9354-9364.

V.1. Introducción

V.1.1. *Cannabis sativa*

El *cannabis sativa* es una planta anual de la familia *cannabaceae* originaria de las cordilleras del Himalaya, Asia. Es difícil saber cuándo el ser humano empezó a usarla y cultivarla. Los primeros descubrimientos arqueológicos sobre el *cannabis* están datados del periodo Neolítico (4000 a.C.) en la China.¹ Esta planta ha sido siempre de especial interés para el ser humano por sus numerosos usos: extracción de aceite de sus semillas (los cañamones), como fuente de fibra textil, como planta medicinal y como uso recreativo.

Dentro del *cannabis sativa* existen dos fenotipos diferentes. Uno de ellos es el conocido como cáñamo (*hemp*), tradicionalmente cultivado por sus fibras para el sector textil y papel. Esta especie es de maduración rápida, pero no tiene apenas cannabinoides psicoactivos. La otra especie, de maduración lenta, es tradicionalmente cultivada por su gran cantidad de principios activos para uso medicinal y recreativo, y es coloquialmente conocida como planta de *marihuana* (Figura V-1).²



Figura V-1. Ilustración del cannabis sativa.

El cannabis es una planta dioica, es decir, tiene género masculino y femenino, el cual puede ser distinguido por su morfología. Las plantas macho producen el polen para fertilizar a las plantas hembra. Para ayudar a atrapar el polen que es transportado por el viento, las hembras producen una resina pegajosa, sobre todo alrededor de las flores, que también protege las semillas del ataque de los pájaros e insectos.¹ Esta resina está formada por tricomas glandulares (Figura V-2) que son los encargados de sintetizar los metabolitos secundarios de la planta (cannabinoides, terpenos y flavonoides) y expulsarlos al exterior desde la intrincada cutícula.

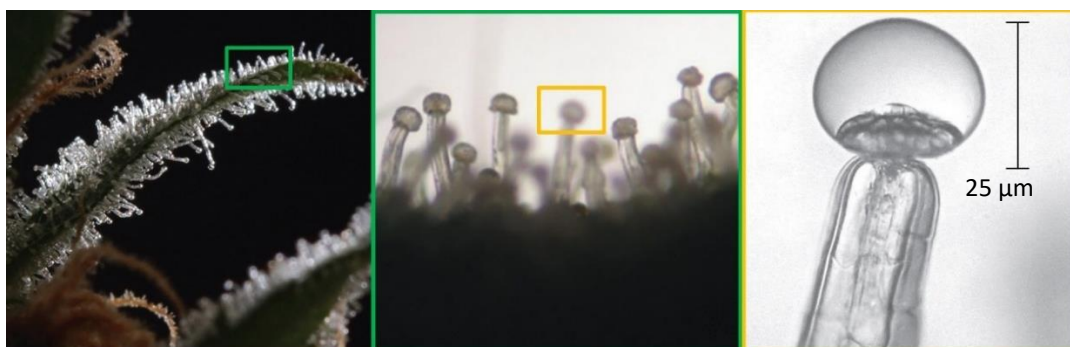


Figura V-2. Imágenes ampliadas de la resina y tricomas glandulares de la planta de cannabis.³

V.1 Introducción

Los principios activos del cannabis se pueden consumir de diferentes maneras. La forma más familiar es la conocida como *marihuana*. El término podría tener un origen mejicano y se utilizaba para referirse al tabaco barato, pero con el tiempo fue acuñado para referirse a las hojas y flores secas (cogollos) de las plantas hembra de *cannabis sativa* (Figura V-3a). La otra forma de consumir la planta es el *hachís*, también conocido como *charas* en India, y es la resina seca y prensada de las plantas hembra (Figura V-3b). Ambas formas se pueden consumir por inhalación del humo de su combustión. También se suelen consumir por ingestión en preparados o por vía cutánea en forma de aceites.



Figura V-3. a) Cogollos de marihuana. b) Hachís o *charas*.

A lo largo de la historia, el cannabis ha sido también un medicamento de gran importancia en la sociedad humana. Durante miles de años ha sido utilizado por diferentes culturas y extendido por todo el planeta. Sus efectos siempre han despertado un gran interés en aquellos que investigaban las propiedades beneficiosas de las plantas. Desde que Carlos Linneo lo clasificara por primera vez en 1753, se han ido identificando propiedades anestésicas, analgésicas, psicoactivas, antianoréxicas; y ser eficaz para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, la gota, cólicos, la rabia, el tétanos, artritis, quemaduras, la migraña, el Parkinson, etc.^{4,5}

No obstante, a pesar de estar muy introducida en el mundo de la farmacéutica y en la comunidad científica, a raíz de asociar el consumo de cannabis a conductas delictivas y ser catalogado como nocivo para la sociedad, en cada país hay una legislación diferente que concierne al cultivo, posesión, venta y consumo de cannabis. En la mayoría de los países hay penas por tráfico, cultivo o consumo propio, la dureza de las cuales varía dependiendo de cada territorio.

V.1.2. Cannabinoides

El número total de compuestos naturales identificados o aislados del *C. Sativa* ha ido en incremento en las últimas cinco décadas. Desde los 423 compuestos publicados en 1980, el número total actual de metabolitos secundarios identificados en el cannabis asciende a los 565 compuestos. Los compuestos con más protagonismo son los cannabinoides (fitocannabinoides) y se han llegado a aislar 120

diferentes hasta la fecha.⁶ A parte de estos, la planta también cuenta con la presencia de otros metabolitos secundarios que también influyen en sus propiedades, como por ejemplo terpenoides, flavonoides, esteroides, fenantrenos, etc.

El compuesto más conocido y estudiado del cannabis es el (-)- Δ -9-*trans*-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o THC) (Figura V-4). Su estructura fue descrita por primera vez por Gaoni y Mechoulam en 1964.⁷ Es el cannabinoide más abundante y psicoactivo de la planta, y con mayor interés en aplicaciones en química médica hasta la fecha. Se conoce que tiene un efecto antiemético, antiespasmódico, relajante, analgésico moderado, y un gran efecto psicotrópico, que suele ser utilizado para tratar los dolores neuropáticos. Otros efectos incluyen alteración de los sentidos visuales, auditivos, olfativos, fatiga y estimulación del apetito.²

No obstante, en los últimos años ha crecido el interés y la investigación por el segundo cannabinoide más abundante de la planta, el cannabidiol (CBD) (Figura V-4). Fue aislado por primera vez por Adams *et al.* en 1940⁸ y sintetizado por Petrizilla *et al.* en 1969.⁹ A diferencia del THC, se considera que el CBD no es un compuesto psicotrópico ni adictivo. El CBD presenta un perfil bastante seguro y favorable para los humanos.¹⁰ A pesar de que sus aplicaciones médicas exactas están siendo investigadas actualmente, se considera un cannabinoide de mucho interés debido a sus beneficiosas propiedades como neuroprotector, antiepiléptico, ansiolítico, antipsicótico y antiinflamatorio.¹¹

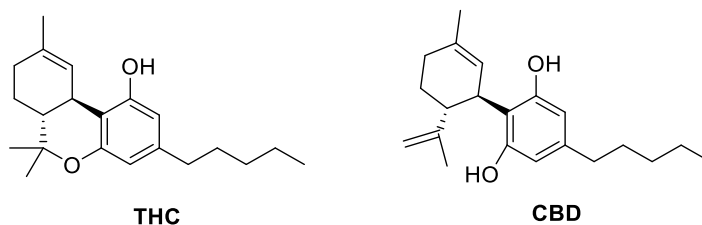


Figura V-4. Estructuras moleculares del THC y el CBD.

Estos cannabinoideos son muy valorados por la investigación y utilizados por la industria farmacéutica para el tratamiento de diferentes enfermedades. El Dronabinol®, un fármaco antiemético compuesto exclusivamente de THC sintético, se utiliza para tratar efectos secundarios como náuseas, vómitos o pérdida de apetito, en quimioterapia o VIH. El Sativex®, una mezcla 1:1 de CBD/THC, es un fármaco aprobado que se utiliza en el tratamiento del dolor neuropático y de la espasticidad provocada por la esclerosis múltiple.¹² En 2018 la FDA aprobó el primer y único fármaco compuesto por únicamente CBD (Epidolex®) usado para tratar la epilepsia refractaria debida a los síndromes de Lennox-Gastaut o Dravet.¹³

El consumo de THC de forma recreativa causa efectos psicoactivos agudos como relajación, euforia o inquietud, pero también puede causar despersonalización transitoria y en ocasiones, psicosis. El uso

crónico de esta sustancia perjudica la percepción, la memoria y otras funciones cognitivas, especialmente en los individuos que iniciaron este consumo desde la adolescencia. Al mismo tiempo, con la abstinencia del cannabis aparecen síntomas como temblores, insomnio, problemas gastrointestinales y delirios.¹⁴ En animales, el uso prolongado de THC bloquea e internaliza los receptores de cannabinoides 1 (CB₁R) causando tolerancia.¹⁵

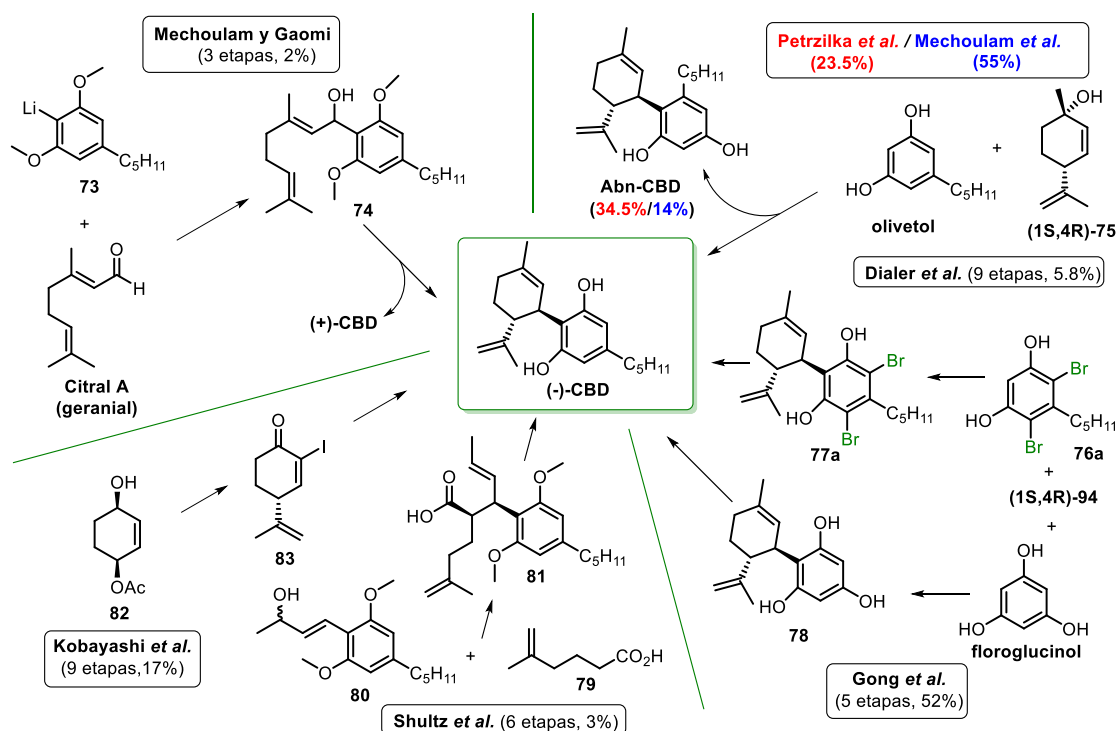
En el caso del CBD, no se produce síndrome de abstinencia o tolerancia, y su efecto sobre el CB₁R reduce la psicoactividad del THC, tolerancia y síntomas de la abstinencia.¹⁶ Además, un estudio sobre el abuso de CBD en humanos, en el cual se les suministraba repetidas dosis de diferentes sustancias psicoactivas a los sujetos a estudio, con el CBD se mostró poco o ningún efecto placentero sobre el organismo de forma subjetiva comparado con el efecto al administrar el placebo. En cuanto a la hora de evaluar el deseo de los sujetos por repetir dosis de las sustancias psicoactivas, no se mostraron intenciones de querer repetir dosis con el CBD, a diferencia del THC o Lorazepam (benzodiazepina). En un estudio de dependencia, el CBD no mostró ninguna dependencia física.¹⁷

Actualmente, la presión por legalizar el uso de los productos del *cannabis*, en concreto de CBD, para el uso médico y alimenticio está creciendo. Cada país cuenta con sus propias regulaciones. Por ejemplo, en España, al igual que en otros países más, el CBD no se ha registrado en la “lista de suplementos alimenticios autorizados” de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), y por lo tanto no se puede comercializar dicha sustancia para el consumo humano. No obstante, al no ser el CBD una sustancia ilegal, se puede comercializar para su uso externo, es decir, como cosmético o producto coleccionable. De esta forma, los consumidores aprovechan este tipo de “vacío legal” para adquirir estos productos en tiendas como herboristerías, estancos o *grow shops*, y darle los usos terapéuticos o recreativos deseados.

V.1.3. Precedentes sintéticos del cannabidiol (CBD)

En el 1965 Mechoulam y Gaomi¹⁸ consiguieron la primera síntesis del (±)-CBD a partir de un derivado litiado del éter dimetílico del olivetol **73** y el geranial, de una forma bastante inspirada en la biosíntesis del compuesto, y con un rendimiento global del 2%. En 1969, Petrzilka *et al.*⁹ conseguirían realizar la primera síntesis estereoselectiva del (-)-CBD a partir de un acoplamiento directo entre el *cis*-isolimonenol ((**1S,4R**)-**75**) y el olivetol en presencia de ácido oxálico. Desafortunadamente, obtuvieron como producto mayoritario el llamado cannabidiol anormal (Abn-CBD), que es un regioisómero del CBD, con un 34.5% de rendimiento y el CBD con un 23.5% de rendimiento, aparte de otras impurezas y PP recuperado (Esquema V-1). Años más tarde, Mechoulam *et al.* mejoraron las condiciones de reacción con la utilización de BF₃·Et₂O en alúmina y exceso de olivetol, obteniendo el

CBD con un 55% de rendimiento frente a un 14% de rendimiento de Abn-CBD.¹⁹ Mejorar la regioselectividad de esta reacción siempre ha sido uno de los grandes retos de la síntesis del CBD, en el cual varios grupos de investigación han trabajado modificando las condiciones de reacción.²⁰



Esquema V-1. Esquema resumen de diferentes rutas sintéticas para la obtención del CBD. Las flechas del esquema pueden indicar más de una etapa de reacción consecutiva.

Como termino general, aparecen dos tipos de aproximaciones para obtener el CBD: una basada en la modificación del fragmento de olivetol para reducir los problemas de regioselectividad y otra basada en la generación de los centros estrogénicos del fragmento de terpeno a partir de una síntesis asimétrica.

Por un lado, Dialer *et al.*²¹ patentaron en 2018 una metodología que consistía en la protección de las posiciones en *orto* a la cadena de pentilo del olivetol con halógenos, y tras la reacción de alquilación, la consiguiente deshalogenación del compuesto. De esta forma se evitaba la formación del Abn-CBD, resolviendo así los problemas de regioselectividad (Esquema V-1). Más reciente, Shen y Aisa²² apostaron también por evitar los problemas de regioselectividad utilizando el floroglucinol en lugar del olivetol.

Por otro lado, la utilización de la síntesis asimétrica también ha sido fuente de motivación para otros grupos de investigación, como es el caso de Gong *et al.*,²³ que planteó en 2006 una ruta sintética partiendo del compuesto **82**, y obteniendo el CBD tras varias reacciones catalizadas por metales. En

2018, Shultz *et al.*²⁴ también sintetizaron el CBD a partir de la generación del fragmento de terpeno con un reordenamiento de Ireland-Claisen (Esquema V-1).

Además de estas rutas sintéticas, otros grupos de investigación han obtenido de diversas formas el CBD y sus derivados de interés. No obstante, ninguno de estos trabajos proporciona todavía una metodología que proporcione un suministro grande y sostenible de CBD como API.²⁵ Actualmente, muchas empresas farmacéuticas como AMRI, BioVectra, Insys Therapeutics, Johnson, Matthey, Noramco y THC Pharm, entre otras, están trabajando en ofrecer un CBD totalmente sintético.

V.1.4. Receptores de cannabinoides (CBRs) y el sistema endocannabinoide (SEC)

La farmacología de los cannabinoides es de especial complejidad. Bien conocido es el cannabis por su “efecto séquito” (Figura V-5), donde la combinación de todos los compuestos activos de la planta, actuando de forma sinérgica, consiguen un mayor o diferente efecto que si se trataran de forma aislada.²⁶

Tras los estudios de los primeros fitocannabinoides en los seres humanos, se descubrieron los receptores de proteínas sobre los cuales tenían interacción. Los receptores de cannabinoides (CBRs) son una clase de receptor de membrana celular dentro de la familia de RAPGs, con sus característicos siete dominios de membrana.²⁷ Los CBRs más abundantes e importantes en el cuerpo humano son los de tipo 1 (CB₁R) y de tipo 2 (CB₂R).

El CB₁R fue descubierto por Devane *et al.* en 1988.²⁸ Los CB₁Rs se encuentran fundamentalmente en la parte terminal de los axones de las neuronas, localizadas en el cerebro, medula espinal y ganglios de la raíz dorsal.²⁹ Se expresan de forma presináptica y modulan la liberación de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios como la acetilcolina, noradrenalina, dopamina, 5-HT, glutamato, D-aspartato y colecistoquinina, mediante la inhibición de la entrada de Ca²⁺ y la hiperpolarización debida a la activación de los canales de potasio.²⁹ A través de su acción primaria como RAPG, el CB₁ inhibe la producción de AMPc, inhibiendo metabotrópicamente la liberación de todos estos neurotransmisores (Figura V-6).



Figura V-5. Definición gráfica del efecto séquito del cannabis.

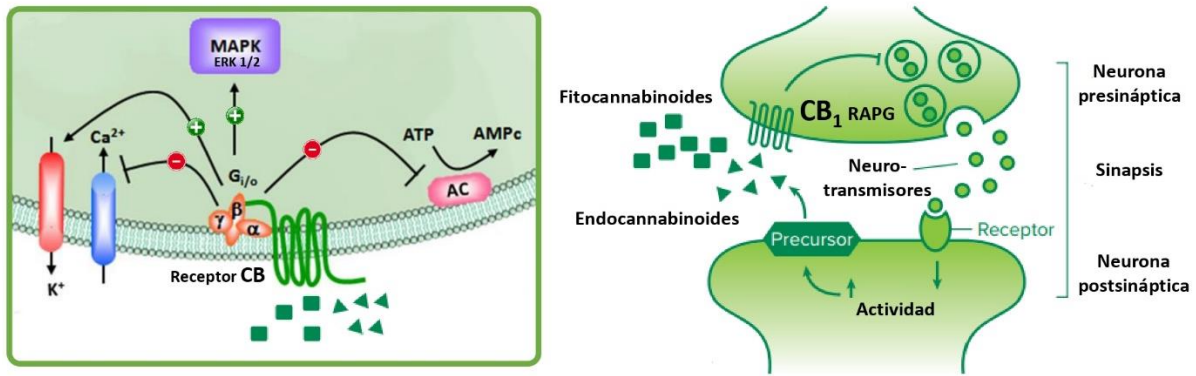


Figura V-6. Señalización de los CBRs en el cuerpo. Señalización del CB₁R en el sistema neuronal (derecha).

El CB₂R fue identificado por primera vez por Munro *et al.* en 1993.³⁰ Se encuentra principalmente en los nodos linfáticos y su activación tiene numerosas implicaciones en el sistema inmune y en la respuesta inflamatoria. Es un inmunosupresivo que ralentiza, o incluso inhibe, la formación de esplenocitos y macrófagos. Al igual que el CB₁, también actúa como inhibidor de la AC a través de su interacción con proteínas G_{i/o}.³¹

Los endocannabinoides son cannabinoides endógenos del cuerpo humano encargados de interactuar con los CBRs, y activar sus funciones intrínsecas y comunes en el cuerpo. El primer endocannabinoide identificado en 1992 fue la anandamida (AEA) y posteriormente el 2-araquidonilglicerol (2-AG) en 1995 (Figura V-7).³¹ Ambos ligandos provienen del ácido graso esencial araquidónico y son agonistas de los receptores CB₁ y CB₂, en mayor o menor medida.

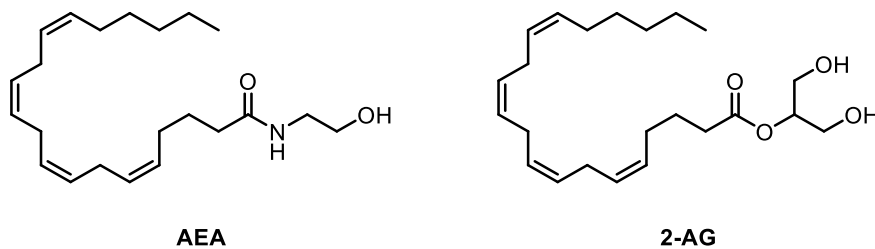


Figura V-7. Estructuras moleculares de la AEA y del 2-AG.

El conjunto de estos receptores, los cannabinoides endógenos y las enzimas responsables de su síntesis y degradación, forman lo que se conoce por sistema endocannabinoide (SEC).

V.1.5. El CBD en el SEC

La habilidad del CBD para interactuar con los diferentes CBRs acoplados a proteínas G ha sido estudiada en bastantes investigaciones. Además, hay estudios que evidencian que el CBD también modula otros receptores como los de serotonina, adenosina, opiáceos o RAPGs huérfanos.³² Existen

ciertas divergencias en cuanto a la farmacología del CBD, pues algunos investigadores apoyan la teoría de que es un potente antagonista de los receptores de CB₁ y CB₂,³³ y otros que es un agonista con poca afinidad sobre los receptores de CB₁.³⁴

Por otra parte, estudios recientes han determinado que el CBD también puede actuar como NAM tanto del CB₁³⁵ como del CB₂.³⁶

Un modulador alostérico es un ligando que cumple una función de regulación de forma alostérica incrementando o disminuyendo indirectamente el efecto de un agonista o un agonista inverso sobre un receptor celular, mediante la activación de una cavidad de la proteína ajena a la cavidad ortostérica (Figura V-8). Un modulador alostérico positivo (PAM) incrementa la actividad del receptor, mientras que un modulador alostérico negativo (NAM) la disminuye.

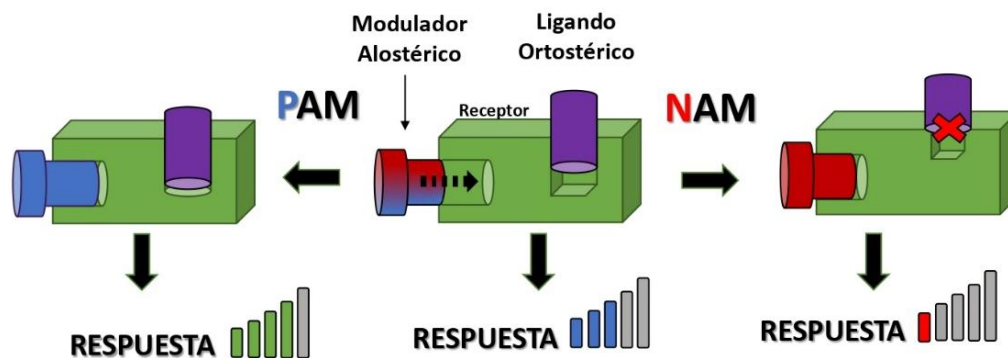


Figura V-8. Esquematización del funcionamiento de los moduladores alostéricos de receptores de proteínas.

En química médica, el uso de este tipo de moduladores como fármacos ofrece muchas ventajas frente al uso de los fármacos convencionales ortostéricos. Por ejemplo, el uso de estos moduladores puede disminuir el número de efectos secundarios, ya que funcionan en un rango de concentraciones muy bajo y solo son activos cuando el agonista ortostérico está presente. Su uso también requiere de una menor concentración de agonista debido a que en combinación con el modulador alostérico la actividad sobre el receptor es mayor.

Es por esto que el diseño de nuevos compuestos que actúen como PAMs en combinación con agonistas ortostéricos sobre CBRs representaría una gran propuesta terapéutica para tratar diferentes trastornos, como por ejemplo los desórdenes degenerativos y el dolor neuropático.³⁷ Hasta la fecha, los únicos moduladores alostéricos del CB₂R publicados, además del CBD (NAM), son PAMs: el péptido de 12 residuos endógeno (pepcan-12)³⁸ y el compuesto sintético **PAM-C2** publicado por Gado *et al.* (Figura V-9).³⁹

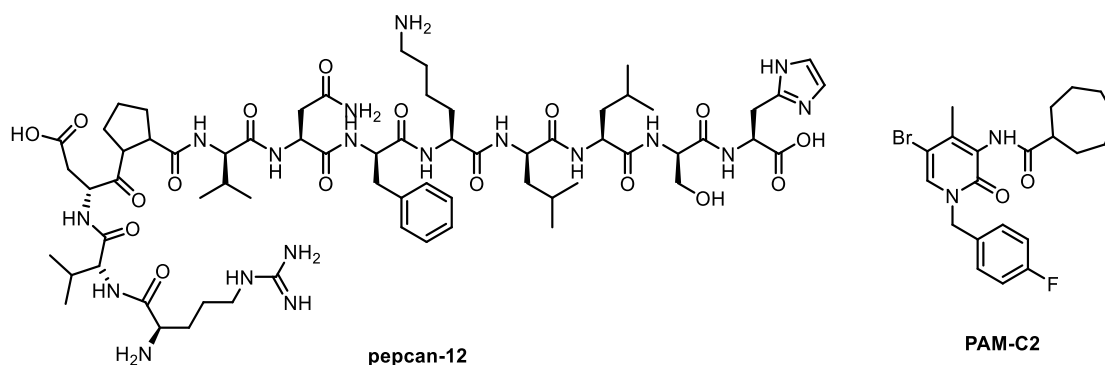


Figura V-9. Estructuras moleculares de los PAM-CB₂R; Pepcan-12 y del compuesto **PAM-C2** de Gado *et al.*

A lo largo de este capítulo de la tesis se plantean estrategias para el diseño de nuevos moduladores alostéricos de los CB₂R.

V.1.6. Estudios previos al desarrollo de nuevos moduladores alostéricos

Previo al desarrollo de los nuevos moduladores alostéricos de los CB₂R el grupo de investigación del Dr. Rafael Franco en el departamento de bioquímica y biomedicina molecular de la UB y el grupo del Dr. Leonardo Pardo (UAB), realizaron una serie de experimentos para localizar y estudiar las cavidades del receptor de CB₂, tanto ortostérica como alostérica, para poder pautar el diseño de nuevos moduladores.

V.1.6.1. El CBD como agonista parcial y NAM del CB₂R

El primer factor que se comparó fue la capacidad como agonista del CBD sobre los CB₂R en comparación a la del JWH-133, un potente agonista comercial de los CB₂R. Para medir la actividad biológica de los compuestos se evaluó su capacidad como inhibidores de la AC midiendo los niveles de AMPc resultantes en los cultivos celulares tras el tratamiento con los compuestos a estudio, entre otros experimentos. Los resultados definieron al CBD como un agonista parcial, ya que las distintas respuestas biológicas tenían un valor de menor magnitud que los del JWH-133, comparándose de forma relativa.

Por otra parte, también se generaron propuestas de modelos computacionales con el JWH-133 y el CBD interaccionando en la cavidad ortostérica del CB₂R, sobrepuestos a la estructura cristalográfica del complejo CB₂R con el ligando agonista AM12033 (PDB: 6KPC),⁴⁰ de estructura parecida a los cannabinoides de estudio (Figura V-10). Como los tres compuestos tenían una estructura molecular similar era de esperar que interaccionaran de forma semejante con la cavidad ortostérica del CB₂R. Para validar esta hipótesis, la cadena secundaria de Val¹¹³, que se encuentra situada en el centro de la

V.1 Introducción

cavidad, fue mutada por una cadena más larga y voluminosa de metionina (Met), para luego realizar las mismas pruebas de actividad biológica anteriores, pero con un receptor mutado. Este hecho hizo empeorar tanto la respuesta biológica como agonista del CBD, como la del JWH-133 en todos los experimentos, dando veracidad al papel del CBD en la cavidad ortostérica.

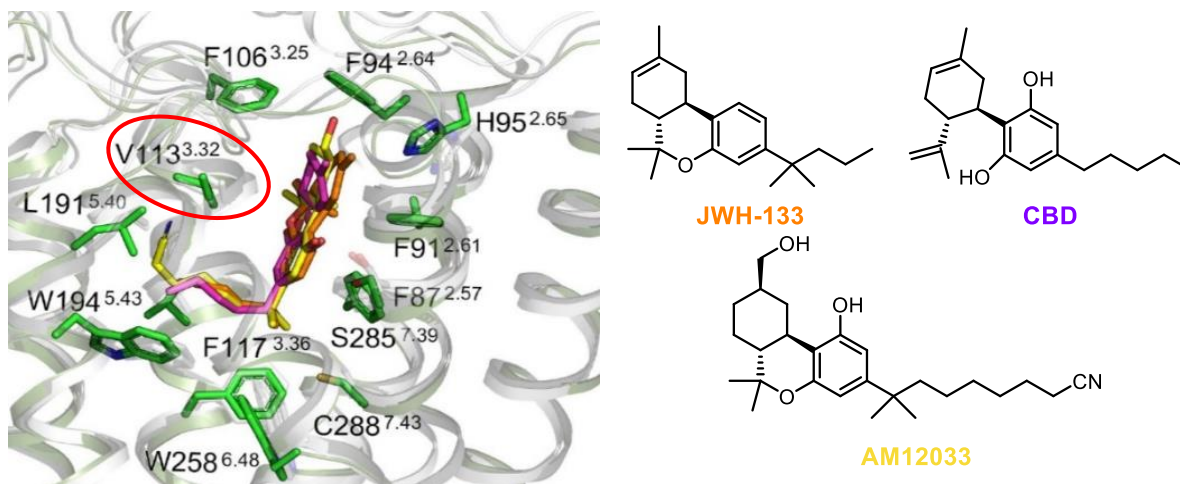


Figura V-10. Superposición de los modelos de docking de los ligandos JW133 (naranja), CBD (magenta) y AM12033 (amarillo) en interacción con la cavidad ortostérica del CB₂R. En rojo está marcada la Val¹³³ que fue mutada por una Met (C: Cys, F: Phe, H: His, L: Leu, S: Ser, V: Val, W: Trp).

Finalmente, los resultados para los experimentos de la influencia del CBD como modulador sobre el JWH-133, en los que se midió la actividad biológica de muestras que contenían una mezcla de JWH-133 + CBD en comparación con que las que contenían solo JWH-133, mostraron claramente que el CBD bloqueaba la actividad del JWH-133. De esta manera, se pudo elucidar que el CBD, en todos estos ensayos, actuaba como un NAM disminuyendo la eficacia del agonista JWH-133.

V.1.6.2. Cavidad alostérica del CB₂R

Existen precedentes bibliográficos en los que se ha propuesto que ligandos que interactuaban con RAPGs en una cavidad entre la entrada y la cavidad de unión ortostérica podían actuar como moduladores alostéricos.⁴¹ Este hecho se ha podido visualizar en la estructura cristalina del receptor muscarínico M2 enlazado simultáneamente a un agonista ortostérico y a un PAM.⁴² Superponiendo el modelo computacional del CB₂R en complejo con el JWH-133 sobre la estructura cristalográfica del complejo CB₁R con el antagonista AM6538, se pudo observar que el ligando AM6538 ocupaba, aparte del hueco ortostérico, una especie de “cavidad lateral”⁴³ que estaba adyacente al JWH-133 (Figura A-V-1). La idea que surgió a partir de esto fue que el CBD, cuando actúa como NAM, interactúa con esta cavidad alostérica situada cerca de la entrada del receptor, entre las hélices transmembranales (TMs) 1 y 7.

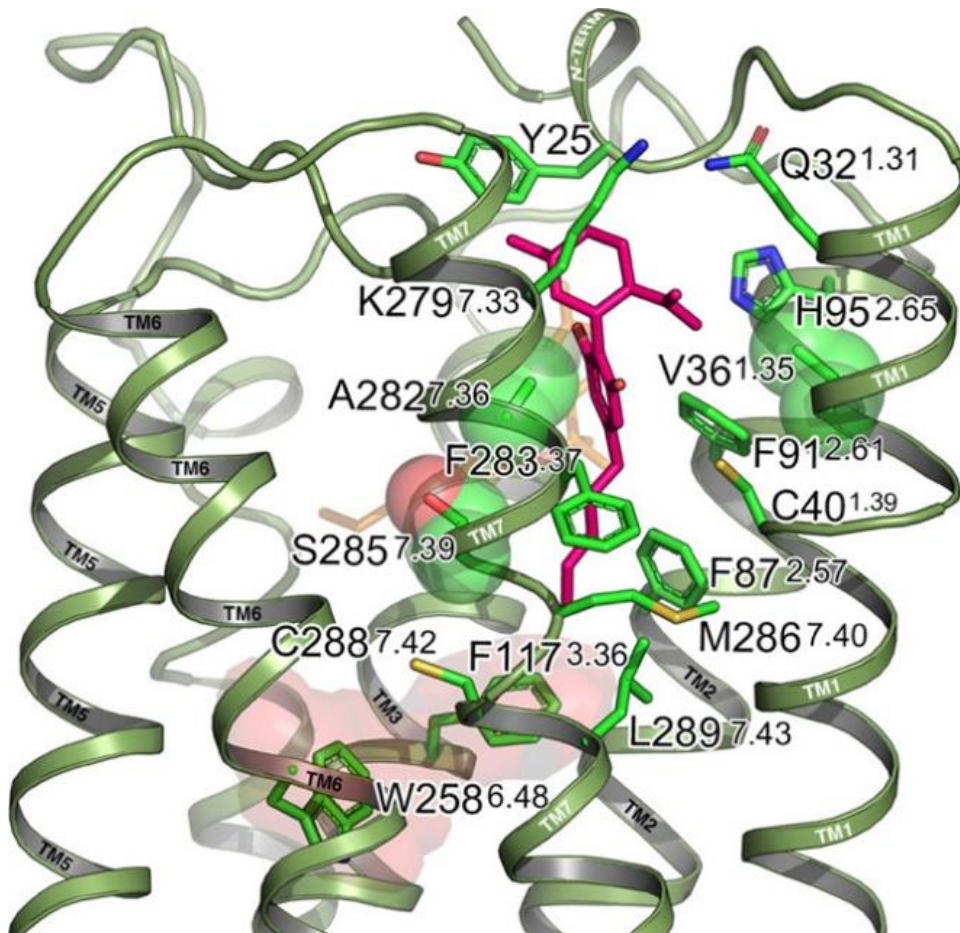


Figura V-11. Vista detallada del modelo de docking del CBD (magenta) en la cavidad alostérica y del JW-133 (naranja transparente) en la cavidad ortostérica del CB₂R. Destacar los residuos de Ala²⁸², Val³⁶ y Ser²⁸⁵ que fueron mutados (esferas verdes) y la Phe¹¹⁷ y Trp²⁵⁸ posibles interruptores de la actividad (esferas rojas) (A: Ala, K: Lys, M: Met, Q: Gln, Y: Tyr).

Para delinear mejor esta cavidad alostérica en el receptor, se hicieron simulaciones de DM de 1 μ s del JWH-133 enlazado a todo el complejo de CB₂R-Gi. A continuación, a partir de unas instantáneas de la estructura del complejo extraídas de la simulación durante una exploración de la cavidad alostérica, en combinación con cálculos de docking del CBD dentro de estas cavidades (Figura A-V-2), se pudo proponer un modelo de unión del CBD en la cavidad alostérica (Figura V-11).

En este modelo computacional, el fragmento de propenil-metilciclohexeno del CBD apunta hacia la entrada del canal, y la cadena de pentilo apunta hacia la zona intracelular. En detalle, el sustituyente de isopropenilo se situaría entre los residuos de Val³⁶ y Ala²⁸². Con el objetivo de verificar este modelo de forma experimental, se mutaron los residuos de Val³⁶ y Ala²⁸² por unos residuos de metionina (Met), que ocuparan más espacio. Como era de esperar, estos cambios desmejoraron los efectos del CBD como NAM frente al agonista JWH-133, ocupando la Met la cavidad alostérica propuesta y no dejando interactuar al CBD.

V.1 Introducción

Además, también se mutó el residuo de Ser²⁸⁵ por uno de leucina (Leu) para verificar el puente de hidrogeno que supuestamente se da entre la Ser y uno de los sustituyentes de hidroxilo del fragmento de *meta*-benzodiol del CBD. Esta mutación solo desmejoró parcialmente el efecto como NAM del CBD.

La cadena de pentilo del CBD se expande a través de una cavidad intracelular hidrofóbica formada por la Phe⁸⁷, Cys²⁸⁸, Leu²⁸⁹ y, la más importante, Phe¹¹⁷ (Figura V-11). Esta Phe^{3.36} (Phe¹¹⁷) y un residuo de Trp^{6.48} (Trp²⁵⁸) han sido descritos como una especie de palanca a modo de interruptor desencadenante involucrado en la activación inicial inducida de los CB₁R^{44,45} y otros RAPGs.⁴⁶ (Figura V-12). Es por esto por lo que se cree que la colocación e interacción de la cadena de pentilo del CBD en la cavidad alostérica, próxima a estos residuos de Phe y Trp, sería la causante de la modulación de la actividad del receptor.

Con estos resultados en la mano, se decidió intentar demostrar esta hipótesis sobre la influencia de la cadena de pentilo del CBD sobre el efecto como modulador alostérico de los receptores de CB₂, y aprovechar este conocimiento para el futuro diseño de nuevos PAMs de los CB₂R.

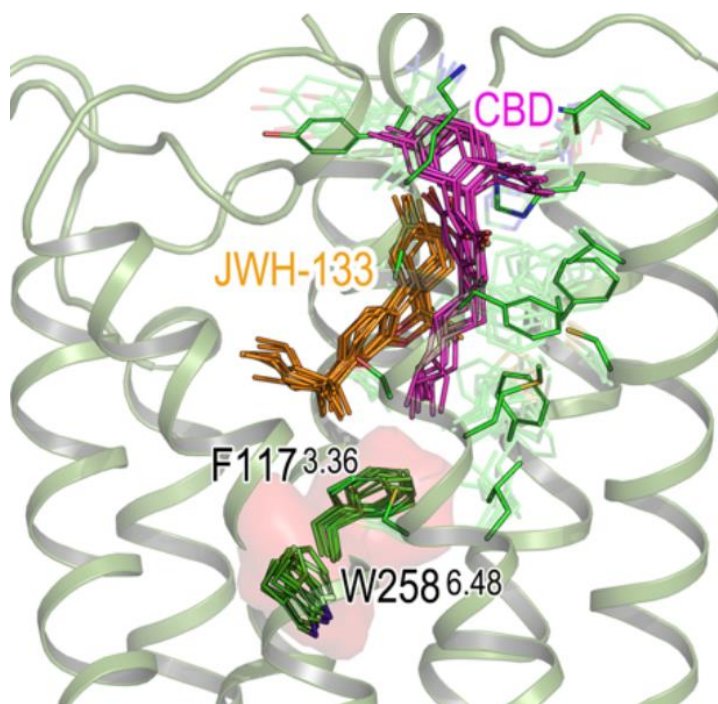


Figura V-12. Capturas superpuestas de las simulaciones de DM con el complejo JWH-133 + CBD + CB₂R. La Phe¹¹⁷ y el Trp²⁵⁸ aparecen como esferas rojas.

V.2 Objetivos

Tras los estudios previos mencionados y con el propósito de seguir estudiando esta cavidad alostérica de los receptores de CB₂ y crear nuevos moduladores alostéricos, se pautaron una serie de objetivos:

- 1) **La síntesis de una familia de compuestos análogos del CBD** (Figura V-13). Estos nuevos compuestos compartían prácticamente la misma estructura que el CBD, pero se diferenciaban en la longitud de la cadena alquílica, que los estudios de modelización y actividad con mutaciones en el receptor habían identificado como clave para entender la actividad como modulador alostérico del CBD.

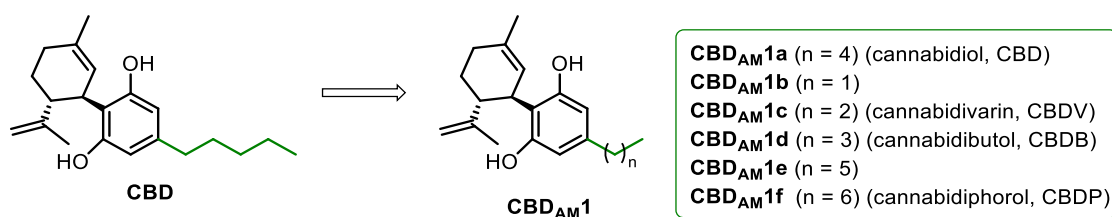


Figura V-13. Estructura molecular de los análogos del CBD **CBD_{AM1a}-CBD_{AM1f}** Entre paréntesis aparecen los nombres de los fitocannabinoides que se han extraído de la planta del cannabis.

- 2) **La síntesis del compuesto CBD_{AM2}** como posible PAM de los receptores del CB₂ (Figura V-14). Tras basarse en simulaciones y el artículo publicado por Gado *et al.*³⁹ esta molécula que presenta un sustituyente 4-fluorobencilo en lugar de la cadena pentílica del CBD fue diseñada con el objetivo de modular de forma positiva el CB₂R.

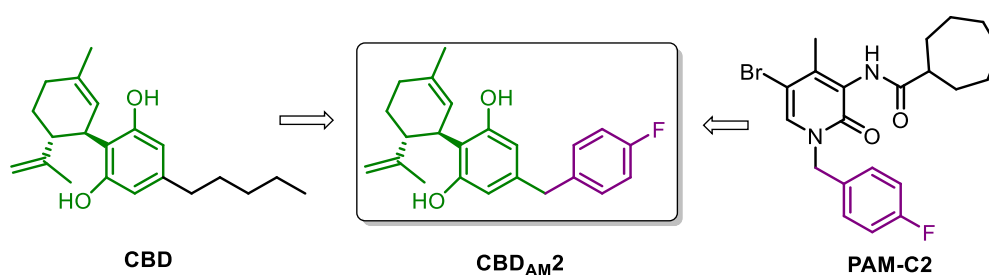


Figura V-14. Estructura molecular el compuesto **CBD_{AM2}**.

- 3) **Diseño de nuevos fármacos bivalentes alostérico-vestíbulo.** Una vez estudiado los principios de la interacción en la cavidad alostérica en los CB₂R y los aspectos que hacen que sea de forma positiva, se planteó la posibilidad de crear una serie de nuevos ligandos bivalentes con interacción en la cavidad alostérica y en el vestíbulo del receptor de forma simultánea con modulación positiva (Figura V-15).

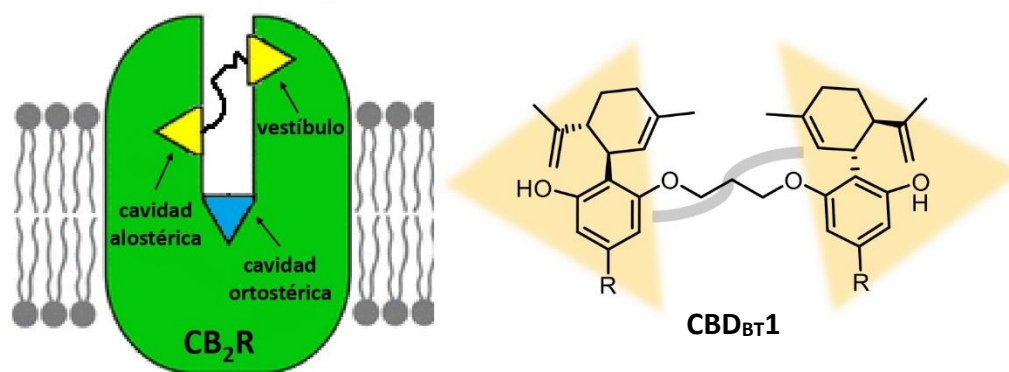
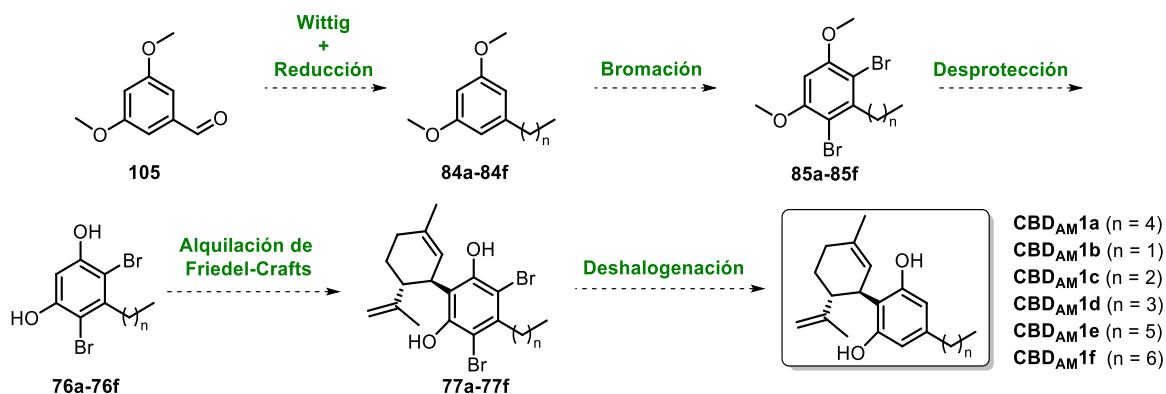


Figura V-15. Esquematación y estructura molecular de los fármacos bivalentes alostérico-vestíbulo CBD_{BT1} .

V.3. Resultados y discusión

V.3.1. Plan sintético para la obtención de los derivados del CBD

En el siguiente Esquema V-2 se puede observar la ruta sintética planteada para obtener los análogos del CBD con cadena alquílica de diferente longitud. Como ya se ha visto en la introducción, a pesar de que hay rutas sintéticas descritas en la bibliografía para obtener el CBD y derivados con menor número de etapas,^{25,47} se decidió aplicar la descrita en el Esquema V-2.



Esquema V-2. Secuencia sintética planteada para la obtención de los derivados del CBD **CBD_{AM}1a-CBD_{AM}1f**.

La síntesis de los análogos del CBD empezaría con una reacción de Wittig entre iluros de fósforo con cadenas alquílicas de diferente elongación y el compuesto comercial 3,5-dimetoxibenzaldehído (**83**), para dar las correspondientes olefinas, que serían reducidas generando los distintos derivados alquílicos del resorcinol **84a-84f**. La siguiente etapa consiste en una bromación aromática regioselectiva dando como producto los compuestos 4,6-dibromados **85a-85f**. A continuación, la desprotección de los hidroxilos en forma de éteres metílicos daría como resultado los intermedios derivados del resorcinol **76a-76f**, los cuales serían sometidos a una reacción de alquilación de Friedel-Crafts con el terpenoide comercial (**1S,4R**)-**75** con el fin de obtener los aductos **77a-77f**. Finalmente con la deshalogenación reductiva de los bromos de los aductos **77a-77f** se obtendrían los cannabinoides objetivos **CBD_{AM}1a-CBD_{AM}1f**.

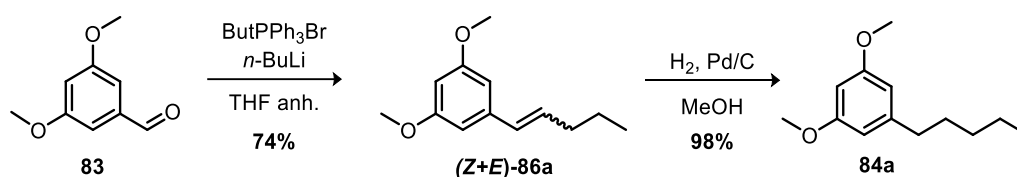
Esa metodología sintética permitiría: (i) acoplar con la reacción de Wittig inicial un gran número de sustituyentes que aportarían diferencias estructurales en la zona de los análogos del CBD que nos genera interés estudiar; y (ii) obtener una alta regioselectividad de la reacción de formación del aducto, tal y como describieron Dialer *et al.*²¹

V.3.2. Síntesis del CBD para evaluar la ruta sintética escogida

En primer lugar, se decidió sintetizar el CBD para evaluar y optimizar la secuencia sintética planteada.

V.3.2.1. Síntesis del compuesto 84a

Las primeras etapas de la ruta sintética consistieron en una reacción de Wittig entre el compuesto comercial **83** y el iluro de fósforo derivado del bromuro de butiltrifenilfosfina comercial para producir la olefina correspondiente, y la reducción de la olefina para obtener el compuesto **84a**.



Esquema V-3. Condiciones de reacción para la síntesis del compuesto **84a**.

Para formar iluros de fosfonio no estabilizados como en este caso se requiere el uso de una base fuerte. En esta reacción se trató el bromuro de butiltrifenilfosfonio, con una disolución de 2.5 M de *n*-BuLi en THF anhidro a 0 °C durante 20 min. Tras formarse el iluro de fósforo, se adicionó el aldehído **83** y se dejó en agitación durante 2 h. Finalmente se obtuvo el compuesto **86a** como mezcla de las olefinas *E* y *Z* (1:1.3), con un rendimiento del 74% (Esquema V-3).

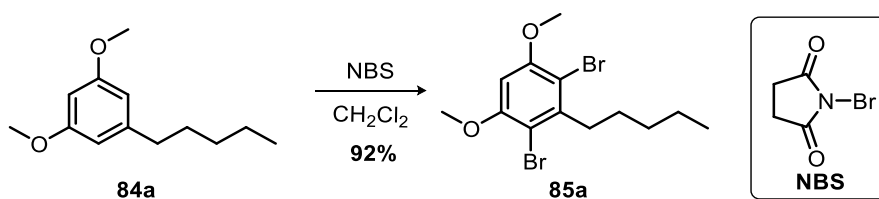
También se realizó la reacción utilizando *terc*-butóxido potásico como base, pero el tiempo de reacción fue de más de 12 h y la conversión del reactivo de partida a producto no fue completa.

El compuesto **84a** se obtuvo a partir de la reducción de la mezcla de olefinas (*E*+*Z*)-**86a** con H₂, a una atmósfera de presión y catalizada con Pd/C, en el seno de MeOH con un 98% de rendimiento y una alta pureza. Se pudo verificar si la reducción había salido correctamente a través de la desaparición de las señales de entre δ 6.40 - 6.30 que correspondían a los protones olefínicos y la desaparición del desdoblamiento del resto de señales.

Los datos espectroscópicos del **86a** y **84a** coincidieron con los descritos en la bibliografía.^{48,49}

V.3.2.2. Síntesis del compuesto dibromado 85a

La siguiente etapa de la secuencia sintética consistió en la dibromación aromática regioselectiva de las posiciones en *orto* de la cadena alifática. La *N*-bromosuccinimida (NBS) es una buena fuente de bromo tanto para reacciones radicalarias como para adiciones electrofílicas.⁵⁰ Antes de su utilización en cualquier reacción es recomendable purificarla con una recristalización en agua.



Esquema V-4. Condiciones de reacción para la dibromación del **84a** con NBS.

El compuesto dibromado **85a** fue obtenido a partir de una reacción de bromación aromática utilizando NBS como agente bromante en el seno de CH_2Cl_2 . El rendimiento de la reacción fue del 92% (Esquema V-4). El consumo de reactivo de partida se controló a través de CCF (hexano/EtOAc, 9:1). A medida que transcurrió la reacción se observó en la CCF la aparición de una mancha con un factor de retención inferior al del PP correspondiente al producto de monobromación. Al añadir más equivalentes de NBS se observó el consumo del producto de monobromación y apareció otra mancha con un factor de retención (R_f) todavía más bajo correspondiente al producto de dibromación deseado (Figura V-16a).

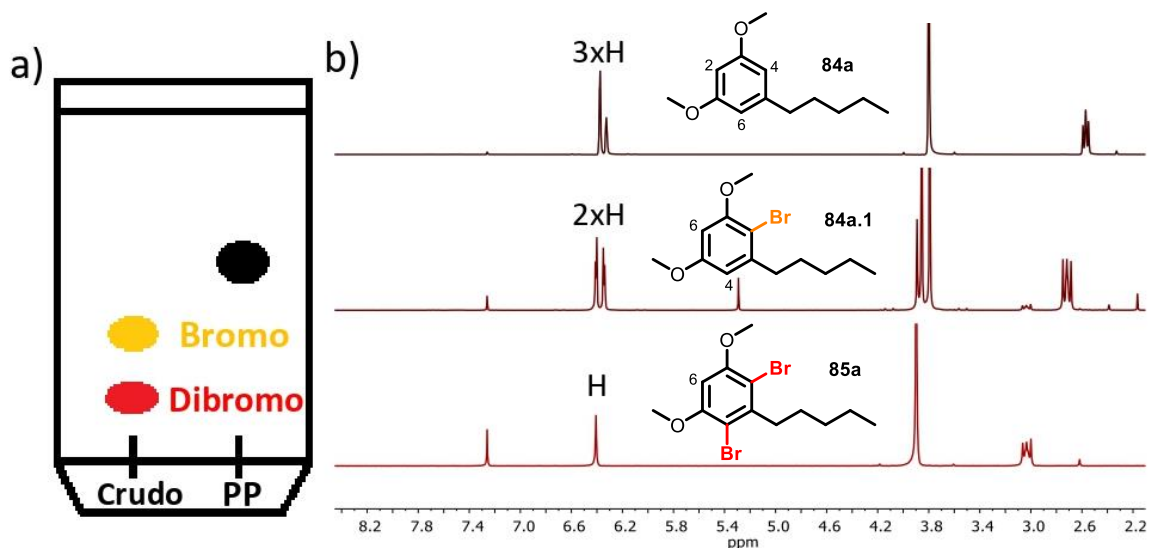
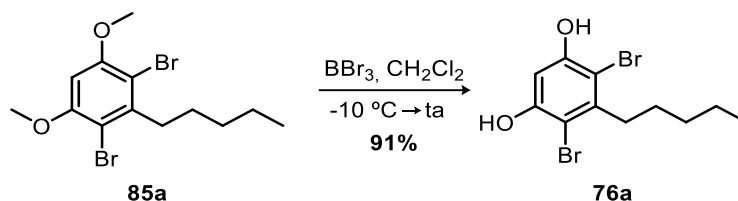


Figura V-16. a) CCF de la reacción de bromación del compuesto **84a**. b) Espectros de ^1H RMN de los compuestos **84a**, **84.1a** y **85a**.

Como se puede observar en los espectros de ^1H RMN de la Figura V-16b, en el intermedio de monobromación se observa la desaparición de uno de los protones aromáticos y aparecen dos señales a δ 6.40 y 6.35 correspondientes a los dos protones aromáticos. Se puede elucidar que la posición bromada es la *orto* a la cadena alifática, ya que las señales de los metóxidos quedan desdobladas, y por lo tanto la molécula pierde su plano de simetría. En el producto **85a** solo se observa una señal de protón aromático a δ 6.40, correspondiente al H-6. En este caso, los metóxidos dejan de estar desdoblados porque la molécula vuelve a tener un plano de simetría.

V.3.2.3. Síntesis del derivado de olivetol 76a

El derivado de olivetol **76a** se obtuvo a partir de la desprotección de los grupos metóxidos del compuesto **85a** con BBr_3 en el seno de CH_2Cl_2 . La adición del BBr_3 sobre el reactivo de partida se hizo a $-10\text{ }^\circ\text{C}$, debido a que este tipo de reacciones suelen ser bastante exotérmicas inicialmente, después la reacción transcurrió a temperatura ambiente. Tras el tratamiento de la reacción con agua (adición muy controlada) se obtuvo el compuesto **76a** con un 91% de rendimiento (Esquema V-5).

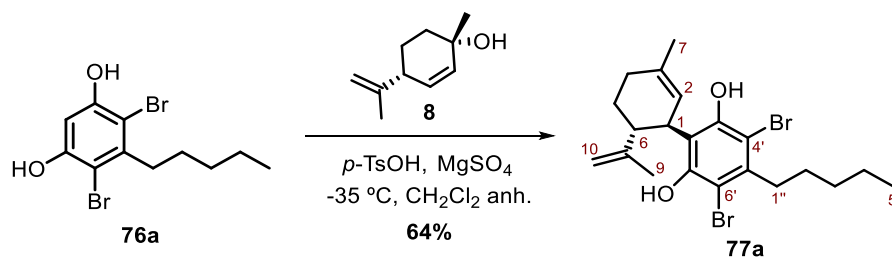


Esquema V-5. Condiciones de reacción para la desprotección de los éteres metílicos del **85a**.

En el espectro de ^1H RMN del producto **76a** se pudo observar la desaparición de las señales correspondientes a los dos metóxidos que aparecían a δ 3.90 en el espectro del **85a** y la aparición de un pico ancho con integral dos que correspondía a los protones fenólicos. A parte de la elucidación estructural a partir de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , y sus correlaciones, el espectro de masas ESI (-) mostró una señal del pico molecular $[\text{M}-\text{H}]^- = 334.9291$ que concuerda con el valor calculado.

V.3.2.4. Síntesis del aducto 77a

Las dos últimas etapas de la ruta sintética se realizaron siguiendo la innovadora metodología de Dialer *et al.* publicada en una patente en 2018.²¹ Para la reacción de alquilación del derivado de olivetol **76a** se trató el terpeno comercial (**1S,4R**)-**75** con ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) y sulfato de magnesio, como agente desecante, en el seno de CH_2Cl_2 anhidro a $-35\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 h, y luego a temperatura ambiente durante una noche. De esta forma se obtuvo como único diastereoisomero el compuesto (**1R,6R**)-**77a** con un 64% de rendimiento (Esquema V-6). El reactivo de partida **76a** que no reaccionó se pudo recuperar tras la purificación con columna cromatográfica en gel de sílice (hexanos/EtOAc, 100:0 \rightarrow 100:1).



Esquema V-6. Condiciones de reacción de alquilación de Friedel-Crafts sobre el compuesto **77a**.

En esta reacción de alquilación de Friedel-Crafts el ácido *p*-toluensulfónico protona el grupo hidroxilo y este abandona la molécula en forma de agua, atrapada por el sulfato de magnesio. Trabajar a esta temperatura tan baja de -35 °C permite que la reacción vaya por la vía cinética, y, por lo tanto, el carbocatión atacado es el que se forma sobre carbono secundario alílico.

Como se puede observar en la Tabla V-1 los datos espectroscópicos del espectro de ^1H RMN coinciden con los publicados en la bibliografía.^{51,52} En la señal del H-1 es donde se observa el cambio más notable al formarse el aducto, pasando de un δ 5.69 para el alcohol de partida, propio de un protón olefínico, a un desplazamiento más bajo de δ 4.07. El resto de la asignación de señales de todos los protones y carbonos que no aparecen como asignados en la bibliografía se ha realizado con ayuda de experimentos de RMN ^1H y ^{13}C .

posición	δ (ppm) ^1H RMN 77a exp.	^a δ (ppm) ^1H RMN 77a biblio.	^b δ (ppm) ^1H RMN 77a biblio.	δ (ppm) ^1H RMN (1S,4R)-75
1	4.07 (dm)	4.07 (m)	3.84 - 4.17 (m)	5.69 (m)
2	5.46 (s)	5.46 (brs)	5.47 (brs)	5.67 (m)
10 _{trans/cis}	4.53/4.41 (s)	4.54/4.41 (s)	4.52/4.42 (brs)	4.78/4.74 (m)
9	1.68 (s)	1.77 (s)	1.67 (brs)	1.74 (s)
7	1.77 (s)	-	1.77 (brs)	1.29 (s)
1 ^{II}	2.92 (m)	2.92 (t)	2.80 (t)	-
5 ^{II}	0.92 (t)	0.92 (t)	0.92 (t)	-

^a Datos extraídos el artículo de Usami *et al.* publicado en 1999.⁵¹ ^b Datos extraídos del artículo publicado por Beak *et al.* en 1991.⁵²

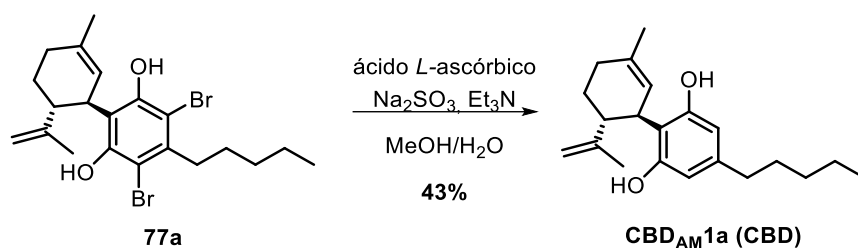
Tabla V-1. Datos espectroscópicos de ^1H RMN experimentales y bibliográficos.

El compuesto **77a** se degrada con el paso del tiempo, es por eso que conviene utilizarlo en la siguiente etapa de reacción lo antes posible o hacer una filtración en gel de sílice con hexano antes de su utilización.

V.3.2.5. Reacción de deshalogenación y obtención del CBD

La última etapa de la síntesis del CBD (**CBD_{AM1a}**) consistió en una deshalogenación reductiva de los bromos del arilo, sustituyéndolos por hidrógenos.

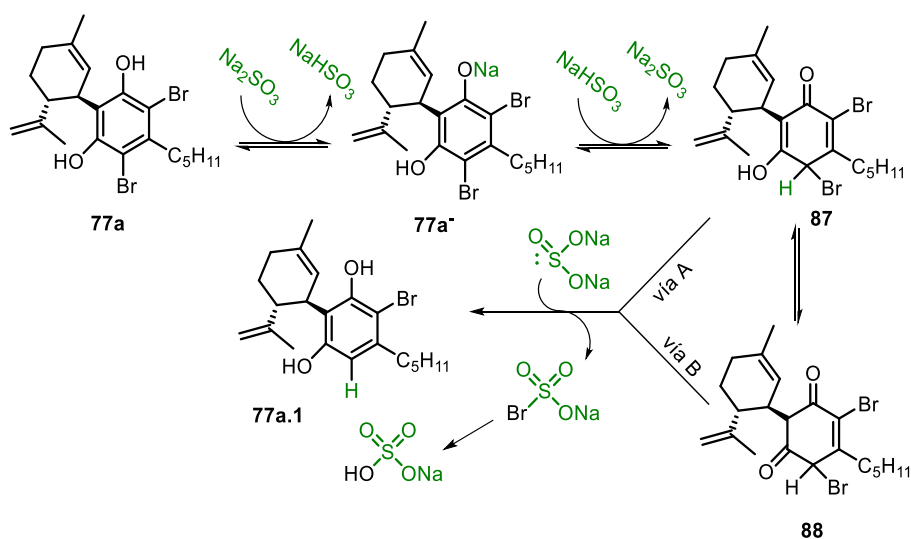
Para esta reacción se trató el 4^I,6^I-dibromo **77a** con sulfito de sodio y ácido *L*-ascórbico catalítico en una mezcla de agua/MeOH a 75 °C durante 24 horas. Tras una acidificación del medio y una posterior purificación con columna cromatográfica se obtuvo el producto final **CBD_{AM1a}** con un 43% de rendimiento (Esquema V-7).



Esquema V-7. Reacción de desbromación reductiva para la formación del **CBD_{AM}1a**.

Según Tomanová *et al.* en su artículo del 2019,⁵³ en este tipo de reacciones el Na_2SO_3 juega un papel doble: (i) mediando el intercambio de protones desde el **77a** a través del anión **77a⁻** para formar el tautómero cetónico **87**, papel que también desenvuelve la base; y (ii) abstrayendo el bromo del tautómero **87** para formar el producto final **CBD_{AM}1a**. En el paso final, el bromosulfonato sufre una rápida e irreversible hidrólisis en bisulfato de sodio. El mecanismo también podría ir por el tautómero dicetónico **88**, que es termodinámicamente más estable, y se da este caso cuando su formación a partir del **87** es más rápida que la extracción del bromo del **87** (vía B). Este proceso se repite para eliminar el segundo bromo del anillo aromático (Esquema V-8).

Todavía no se ha podido identificar el papel del ácido *L*-ascórbico en esta reacción. Al intentar desarrollar la reacción con las mismas condiciones, pero en ausencia del ácido *L*-ascórbico, se obtuvo una mezcla de impurezas y nada de producto deseado. Estudios más recientes en nuestro grupo de investigación han conseguido realizar esta etapa con el uso de microondas a 130 °C durante 30 minutos y sin la utilización del ácido *L*-ascórbico, obteniendo el producto deseado con un rendimiento del 64%.



Esquema V-8. Mecanismo de la deshalogenación reductiva propuesto por Tomanová *et al.*⁵³

La asignación de todos los protones y carbonos de la molécula **CBD_{AM}1a** ha sido realizada a partir de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , y por la comparativa con los espectros publicados en la bibliografía

(Figura V-17).⁵⁴ Si se comparan los datos, todos los valores cuadran correctamente (Tabla V-2). En cuanto a la estereoquímica, se pudo elucidar que se trataba del compuesto *trans*-CBD en lugar del *cis*-CBD por la semejanza en los valores experimentales y bibliográficos recopilados de la Tabla V-3 (comparativa de las δ de H-1, H-2 y H-3).⁵⁵ Por último, el poder rotatorio dio como resultado $[\alpha]^{20}_D = -122.0$ (*c* 1.11, EtOH), que en comparación con el dato bibliográfico del (-)-*trans*-CBD $[\alpha]^{22}_D = -121.4$ (*c* 1.0, EtOH),⁵⁶ sirvió para elucidar que se trataba del compuesto (-)-*trans*-CBD (1*R*,6*R*), en lugar del enantiómero (+)-*trans*-CBD (1*S*,6*S*).

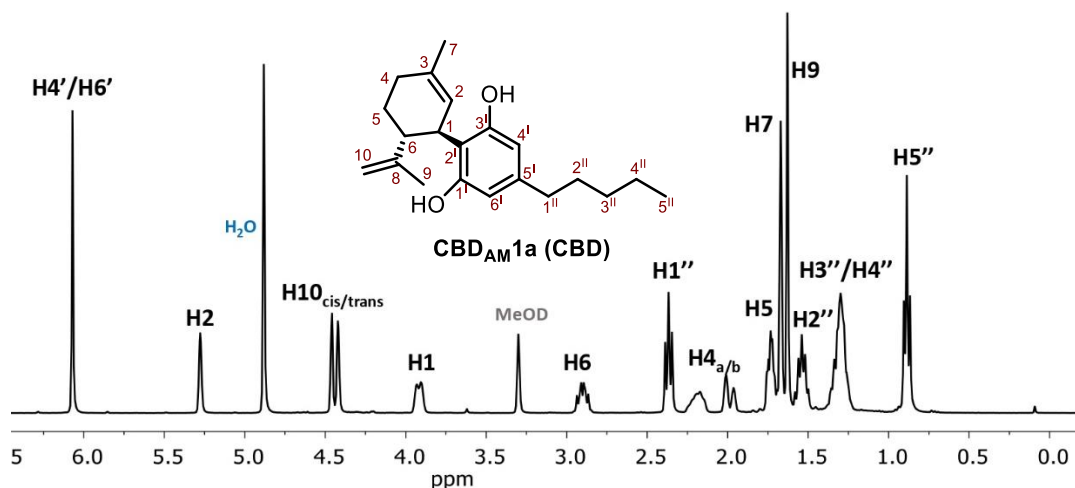


Figura V-17. Espectro de ^1H RMN del $\text{CBD}_{\text{AM}1\text{a}}$ en MeOD.

posición	δ ^1H RMN CBD exp.	δ ^1H RMN CBD biblio. ⁵⁴	δ ^{13}C RMN CBD exp.	δ ^{13}C RMN CBD biblio. ⁵⁴
1	3.93 (1H, dm, 8.7 Hz)	3.93 (1H, dm, 11.1 Hz)	37.5	37.5
2	5.28 (1H, s)	5.28 (1H, s)	127.3	127.3
3	-	-	134.1	134.2
4	2.18 (1H, m), 1.99 (1H, m)	2.18 (1H, m), 1.99 (1H, m)	30.7	30.7
5	1.74 (2H, m)	1.74 (2H, m)	31.7	31.7
6	2.89 (1H, m)	2.89 (1H, td, 15.1 Hz, 5.05 Hz)	46.3	46.4
7	1.67 (3H, s)	1.67 (3H, s)	23.7	23.7
8	-	-	150.3	150.3
9	1.63 (3H, s)	1.63 (3H, s)	19.5	19.5
10	4.46 (trans, 1H, m) 4.42 (cis, 1H, m)	4.46 (trans, 1H, m) 4.42 (cis, 1H, m)	110.5	110.5
1'	-	-	150.3	150.3
2'	-	-	115.9	115.9
3'	-	-	157.5	157.5
4'	6.07 (2H, s)	6.07 (2H, s)	108.3	108.3
5'	-	-	142.7	142.7
6'	6.07 (2H, s)	6.07 (2H, s)	108.3	108.3
1''	2.37 (2H, t, 7.5 Hz)	2.37 (2H, t, 7.46 Hz)	36.6	23.6
2''	1.53 (2H, q, 7.5 Hz)	1.53 (2H, q, 7.34 Hz)	32.0	32.0
3''	1.29 (4H, m)	1.29 (4H, m)	32.7	32.6
4''	1.29 (4H, m)	1.29 (4H, m)	23.6	23.6
5''	0.89 (3H, t, 6.9 Hz)	0.89 (3H, t, 7.13 Hz)	14.4	14.4

V.3 Resumen y discusión

*Los desplazamientos químicos (en ppm) están determinados en referencia al TMS. **Todos los experimentos están hechos en metanol deuterado MeOD.

Tabla V-2. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C de los espectros experimentales y bibliográficos del CBD.

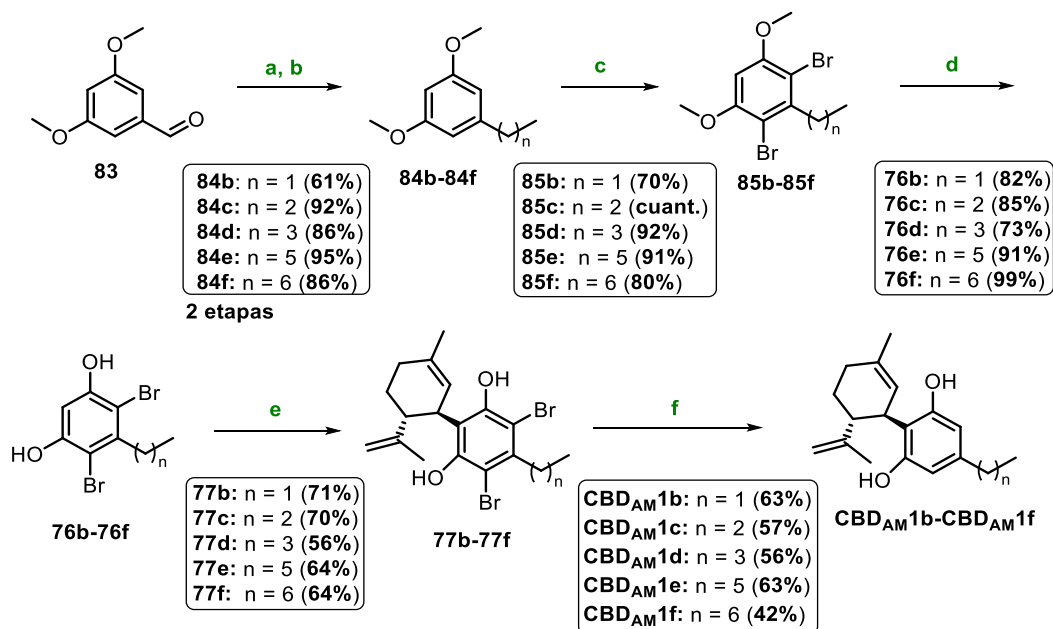
Posición	δ ^1H RMN CBD experimental en CDCl_3	δ ^1H RMN (-)- <i>trans</i> -CBD bibliográfico en CDCl_3 ⁵⁴	δ ^1H RMN (-)- <i>cis</i> -CBD bibliográfico en CDCl_3 ⁵⁵
1	3.85	3.90	3.75 - 3.35
2	5.57	5.57	5.40
6	2.39	2.40	2.90

Tabla V-3. Datos del ^1H RMN de los espectros experimentales y bibliográficos del (-)-*trans*-CBD y el (-)-*cis*-CBD.

En resumen, se consiguió sintetizar el CBD (**CBD_{AM}1a**) con una ruta sintética lineal de seis etapas y con un rendimiento global del 17%.

V.3.3. Síntesis de los derivados del CBD **CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f**

Una vez conseguida y optimizada la obtención del CBD, se realizó la síntesis de todos los análogos del CBD con diferente elongación en la cadena alifática ($n = 2 - 6$ carbonos) siguiendo la ruta sintética diseñada de seis etapas. El punto donde diverge la ruta sintética es en la primera etapa, y, por lo tanto, se podría decir que cada análogo requiere de una secuencia propia completa.



Esquema V-9. Secuencia sintética para la obtención de los derivados del CBD **CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f**. **Reactivos y condiciones:** (a) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_3\text{Br}$ ($n = 0 - 5$), $n\text{-BuLi}$, THF anh.; (b) H_2 , Pd/C, MeOH; (c) NBS, CH_2Cl_2 ; (d) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $-10^\circ\text{C} \rightarrow \text{ta}$; (e) **(1S,4R)-75**, $p\text{-TSOH}$, MgSO_4 , CH_2Cl_2 anh., $-35^\circ\text{C} \rightarrow \text{ta}$; (f) Na_2SO_3 , ácido *L*-ascórbico, Et_3N , MeOH/ H_2O .

V.3.3.1. Síntesis de los derivados del resorcinol **76b-76f**

En la primera etapa, se trataron las diferentes sales de fosfonio comerciales de distinta elongación de cadena alifática con *n*-BuLi para formar sus correspondientes iluros de fósforo en el seno de THF anhidro. Acto seguido, se hicieron reaccionar con el 3,5-dimetoxibenzaldehído (**83**) comercial durante dos horas para obtener las mezclas de olefinas *Z* y *E* de los compuestos **86b-86f** con unos rendimientos excelentes de entre el 87% y cuantitativo. Gran parte del óxido de trifenilfosfina formado como subproducto se eliminó a través de una recristalización en hexano.

Las sales de fosfonio utilizadas para la síntesis de los compuestos **86e** (*n* = 6) y **86f** (*n* = 7) fueron sintetizadas a partir de los bromuros de pentilo y de hexilo tratados con trifenilfosfina. Se obtuvieron sus correspondientes sales de fosfonio con rendimientos del 87% para el pentilo y del 67% para el hexilo.

En la siguiente etapa, las olefinas **86b-86f** fueron reducidas usando H₂ a una atmósfera de presión catalizado por Pd/C en el seno de MeOH. Tras una purificación por filtrado en Celite® se obtuvieron los productos **84b-84f** con unos rendimientos muy buenos de entre el 70% - 99%.

Una vez obtenidos los compuestos **84b-84f** se realizó la reacción de dibromación utilizando varios equivalentes de NBS en el seno de CH₂Cl₂ muy limpia que dio como resultado rendimientos de entre el 70% - 92%, para los compuestos **85b-85f**.

Por último, los derivados del resorcinol **76b-76f** se obtuvieron a partir de la desprotección de los grupos metóxidos utilizando BBr₃, como ácido de Lewis, en el seno de CH₂Cl₂. Tras una purificación con columna cromatográfica, para evitar posibles interferencias en la siguiente reacción, se obtuvieron los compuestos **76b-76f** con rendimientos de entre el 73% - 99%.

Todos los compuestos obtenidos hasta este punto que no se encontraban descritos en la bibliografía fueron caracterizados a partir de experimentos de RMN de ¹H y ¹³C por comparativa con los descritos para la síntesis del CBD. Todos los experimentos de espectroscopia de masas de todos los compuestos dieron un picos que concordaban con los valores calculados.

V.3.3.2. Síntesis de los análogos del CBD **CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f**

Una vez sintetizados los derivados del resorcinol **76b-76f** se procedió a la formación de los aductos **77b-77f** a partir de la reacción de alquilación de Friedel-Crafts con el terpenoide comercial (**1S,4R**)-**75**. En esta etapa se hicieron reaccionar los compuestos **76b-76f** con el (**1S,4R**)-**75**, tratado con ácido *p*-TsOH en el seno de CH₂Cl₂ anhidro a -35 °C durante 5 horas y luego a temperatura ambiente durante

una noche. Los rendimientos fueron de entre el 64% - 71%. Todos los compuestos fueron caracterizados a partir de los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C . En todos los espectros de ^1H RMN aparece la señal característica del H-1 a δ 3.93 - 3.94 que elucida la correcta formación del aducto por el punto de anclaje deseado. También confirma la estereoquímica del producto en *trans* por comparativa con los δ de la señal del H-1 de los datos bibliográficos del (-)-*trans*-CBD y del (-)-*cis*-CBD. Finalmente, los aductos **77b-77f** fueron tratados con sulfito de sodio, ácido *L*-ascórbico catalítico y Et_3N en una mezcla de MeOH/agua destilada a 75 °C durante un día. De esta forma se obtuvieron los productos finales **CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f** con rendimientos de entre el 42% - 63%.

La asignación de las señales de protón y carbono de los espectros de RMN se realizó a partir de la comparativa con los experimentos del CBD. La señal del H-1 δ 3.93 - 3.94 común en todos los espectros de ^1H RMN y los valores de los poderes rotatorios negativos de los compuestos **CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f** en concordancia con el valor del CBD ($[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -122.0$ (c 1.1, EtOH), -51.3 (c 1.7, CHCl_3)) corroboran la correcta estereoquímica de los compuestos finales. Todos los experimentos de espectroscopia de masas dieron valores que concordaban con los calculados. En cuanto a la pureza de los productos finales, los experimentos de pureza de 1D ^1H RMN cuantitativa (HRMNC) con patrón interno demostraron una pureza > 95 % para estos compuestos (anexo VII.V.3.).

En resumen, todos los análogos del CBD **CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f** fueron sintetizados a través de una ruta sintética lineal de seis etapas donde la desbromación reductiva fue la etapa limitante. Los rendimientos globales se muestran en la siguiente Figura V-18.

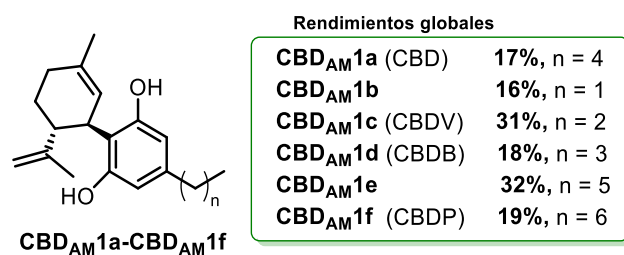


Figura V-18. Rendimientos globales de los análogos del CBD de diferente elongación en la cadena alifática. Entre paréntesis está escrita la abreviatura del fitocannabinoides aislado de la planta.

V.3.4. Diseño y síntesis del compuesto CBD_{AM}2

De forma paralela a la síntesis de los análogos del CBD de diferente cadena alquílica, se diseñó el compuesto **CBD_{AM}2** bajo la inspiración del artículo publicado por Gado *et al.* en 2019, en el cual publicaron el primer PAM sintético de los CB₂R.³⁹ Unos estudios de docking preliminares predecían una buena superposición entre el CBD y el PAM sintético en la cavidad alostérica del CB₂R (Figura V-19a).

La cadena alquílica del CBD coincidía en espacio con el anillo de fluorobenceno del PAM sintético. Así pues, se diseñó un híbrido entre el CBD y el PAM sintético para estudiar la influencia de este sustituyente de fluorobenceno y con la esperanza de modular de forma positiva el CB₂R (Figura V-19b).

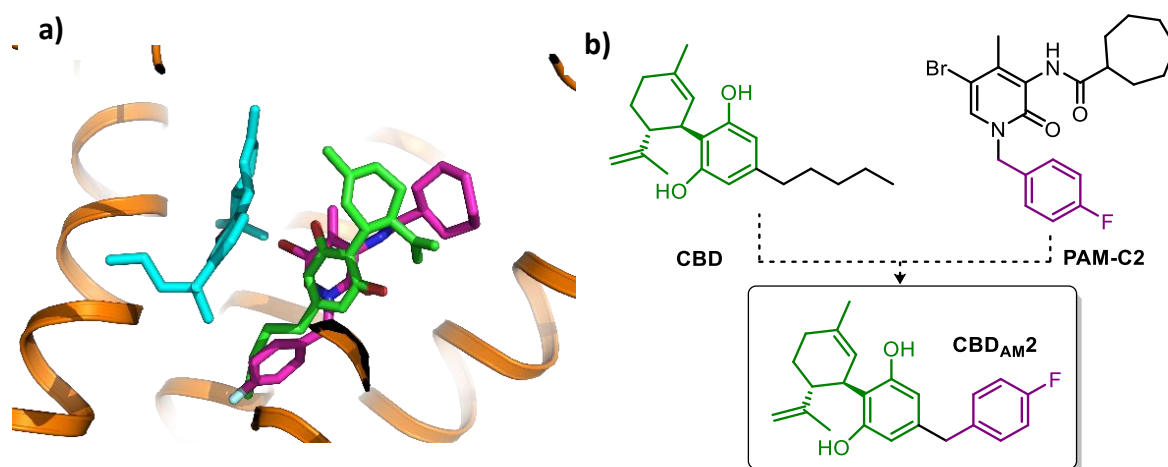
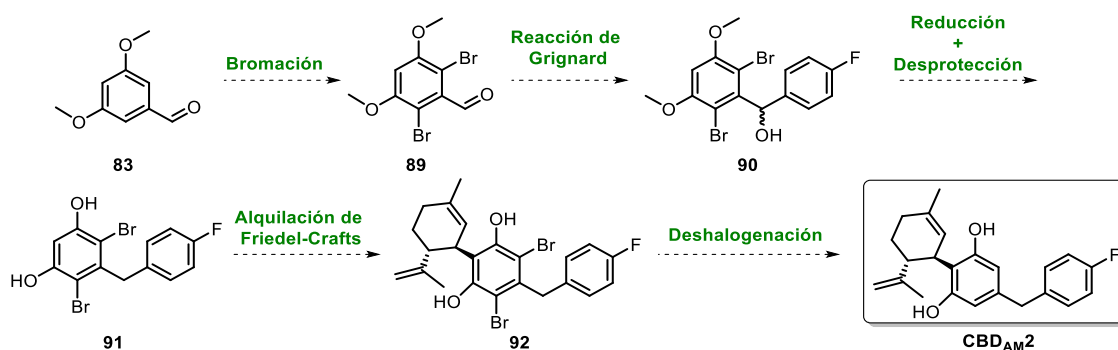


Figura V-19. a) Captura de una simulación de docking con el compuesto JWH-133 (azul) en la cavidad ortostérica y el CBD (verde) y el PAM sintético (magenta) sobrepuestos en la cavidad alostérica de un modelo homólogo del CB₂R, basado en el CB₁R (captura realizada por el grupo de investigación del Dr. Pardo). b) Estructura molecular de los compuestos CBD, PAM sintético y el híbrido **CBD_{AM2}**.

Para la síntesis del compuesto **CBD_{AM2}** se diseñó una secuencia sintética similar a la planteada para el CBD, pero variando la forma de introducir el sustituyente 4-fluorobencilo



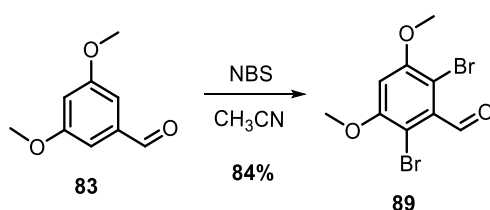
Esquema V-10. Planteamiento sintético para la obtención del compuesto **CBD_{AM2}**.

La secuencia sintética empezaría con la bromación aromática regioselectiva del compuesto comercial 3,5-dimetoxibenzaldehído (**83**) para obtener el aldehído **89**. Este aldehído reaccionaría con un reactivo de Grignard, preparado a partir del 4-fluoriodobenceno comercial, obteniendo el compuesto **90**. El alcohol **90** se reduciría con una reacción de desoxigenación, y tras una posterior desprotección de los fenoles en forma de éteres metílicos se obtendría el derivado del resorcinol **91**. Finalmente, igual que en la síntesis del CBD, las últimas dos etapas consistirían en la alquilación de Friedel-Crafts con el

terpenoide (**1S,4R**)-**75** y la deshalogenación reductiva de los bromos aromáticos. De esta forma se obtendría el análogo del CBD **CBD_{AM2}** (Esquema V-10).

V.3.4.1. Síntesis del aldehído **89**

La primera etapa de la ruta consistió en una dibromación regioselectiva de las posiciones en *orto* del carbonilo del 3,5-dimetoxibenzaldehído comercial utilizando la NBS como agente bromante en el seno de CH₃CN durante una noche. Como resultado se obtuvo el compuesto **89** con un 84% de rendimiento (Esquema V-11). Los datos espectroscópicos del aldehído resultante concordaron con los descritos en la bibliografía.⁵⁷

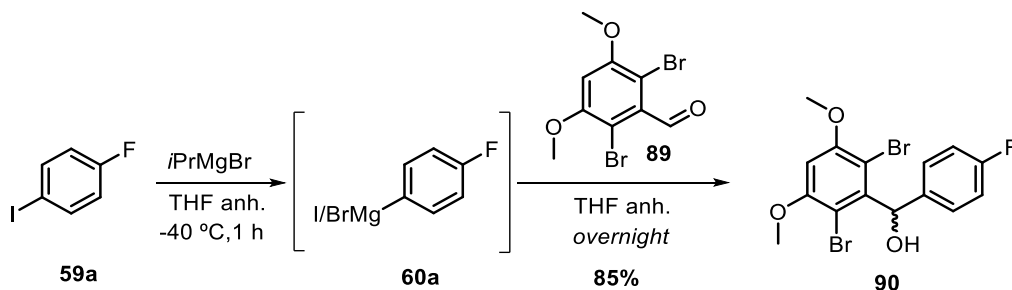


Esquema V-11. Condiciones de reacción de la dibromación del 3,5-dimetoxibenzaldehído (**83**).

Esta reacción también fue realizada en el seno de CH₂Cl₂ dando como resultado rendimientos más bajos. Al ser el compuesto **89** insoluble en CH₃CN, a medida que se va formando el producto, éste precipita y ayuda a que la reacción se desplace hacia los productos. Asimismo, se puede purificar el producto **89** con una rápida filtración.

V.3.4.2. Síntesis del alcohol **90**

En esta ocasión, para poder acoplar el fluorobencilo al anillo aromático se utilizó una reacción de formación de enlace C-C entre el aldehído **89** y el derivado de Grignard del 4-fluoriodobenceno.



Esquema V-12. Condiciones de reacción para sintetizar el compuesto **90**.

El compuesto comercial 4-fluoriodobenceno fue tratado con *i*PrMgBr en THF anhidro a -40 °C durante 1 hora. El magnesiano formado *in situ* se añadió sobre una solución del aldehído **89** en THF anhidro y

se dejó en agitación durante una noche. El alcohol **90** se obtuvo con un 85% de rendimiento (Esquema V-12). Para obtener un rendimiento satisfactorio fue esencial la completa disolución del aldehído **89** en un gran volumen de THF anhidro debido a la baja solubilidad del compuesto en THF.

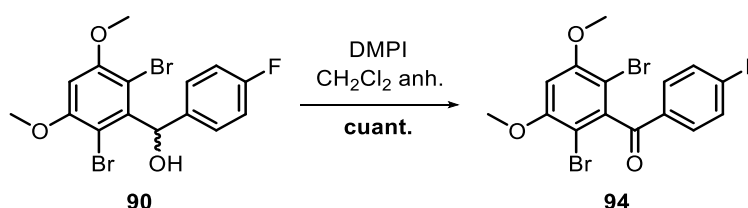
En el espectro de ^1H RMN del compuesto **90** se pudo apreciar la aparición de una señal de doblete a δ 6.74 correspondiente al $-\text{CH}-$ que soporta el grupo hidroxilo y otro doblete a δ 3.87 correspondiente al protón del hidroxilo (ningún carbono asociado a esta señal en el HSQC). En el experimento de ^{13}C RMN del **90** el carbono que en el reactivo de partida correspondía a un carbonilo (δ 191.8), pasó a tener un δ 76.0 acorde con un $-\text{CH}(\text{OH})-$.

V.3.4.3. Síntesis del compuesto **93**

Antes de encontrar las condiciones de reacción idóneas para la reacción de desoxigenación del alcohol **90** se realizaron una serie de pruebas. La primera estrategia que se pensó fue en oxidar el alcohol a cetona y luego reducir el carbonilo a alcano. Hay muchos tipos de condiciones de reacción para reducir cetonas a alcanos como, por ejemplo, la reducción de Wolff-Kishner, la Clemmensen, la Mozingo, ...^{58,59}

En primer lugar, la cetona **94** se obtuvo a partir de la oxidación del compuesto **90** con el DMPI en el seno de CH_2Cl_2 anhidro durante una noche, con un rendimiento cuantitativo.

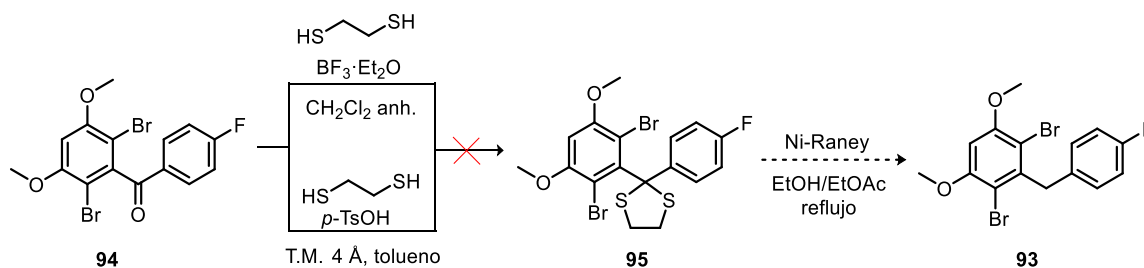
En el espectro de ^1H RMN del compuesto **94** se pudo apreciar la desaparición de la señal de doblete δ 3.87 (correspondiente al protón $-\text{CH}(\text{OH})-$ en el espectro de ^1H RMN del compuesto **90**). En el espectro de ^{13}C RMN se apreció la aparición de una señal a δ 191.6 correspondiente al carbonilo. La asignación de los protones y carbonos se realizó con la ayuda de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , y por comparativa con sus precursores. El espectro de HRMS dio un pico de $[\text{M}+\text{H}]^+ = 416.9137$, que concordaba con el calculado para el compuesto **94** (Esquema V-13).



Esquema V-13. Condiciones de reacción para la síntesis del derivado de benzofenona **94**.

En la bibliografía, Krishnamurthy *et al.* utilizaron la reducción de Mozingo para reducir cetonas a metilenos en la síntesis de unos derivados de cannabinoides de estructura similar.⁶⁰ De esta forma, se trató el alcohol **90** con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y etano-1,2-ditioil (EDT) en el seno de CH_2Cl_2 anhidro durante una noche, pero no se observó consumo de reactivo de partida por CCF. Al cambiar las condiciones de

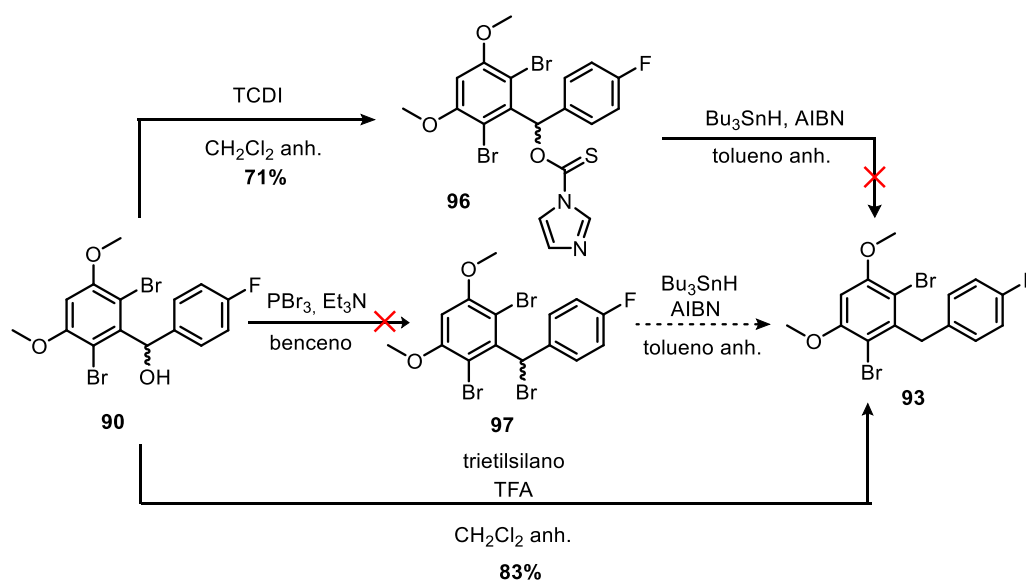
reacción y tratar el alcohol **90** con *p*-TsOH y EDT con tamices moleculares de 4 Å en el seno de tolueno, tampoco se observó consumo de reactivo por CCF (Esquema V-14).



Esquema V-14. Reacción de Mozingo para la síntesis del compuesto **93**.

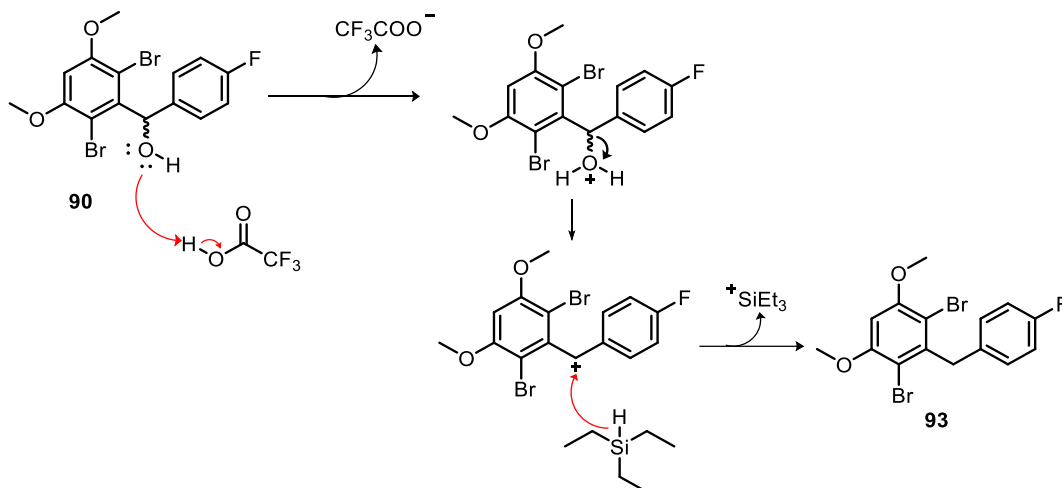
De forma paralela a las pruebas de reducción de la cetona **94**, también se plantearon otras estrategias de desoxigenación sin la necesidad de pasar por el intermedio carbonílico **94** (Esquema V-15). Una de las reacciones planteadas fue la reacción de Barton-McCombie.⁶¹ Siguiendo estas condiciones se trató el alcohol **90** con *N,N'*-tiocarbonildiimidazol (TCDI) en el seno de CH_2Cl_2 anhidro a reflujo durante 3 h, obteniendo el compuesto **96** con un 71% de rendimiento. Seguidamente se trató el compuesto **96** con AIBN y Bu_3SnH en tolueno anhidro a reflujo durante una noche y se obtuvo el alcohol intermedio **90** como producto mayoritario, sin ningún indicio del producto **93** esperado.

Otra estrategia similar a la Barton-McCombie, encontrada en un artículo de Balaydin *et al.* para moléculas difenílicas dibromo- y dimetoxi- sustituidas,⁶² fue tratar el alcohol **90** con Et_3N y tribromuro de fósforo (PBr_3) en el seno de benceno a temperatura ambiente durante una noche. Desafortunadamente solo se encontraron productos de degradación en el crudo de reacción.



Esquema V-15. Diferentes reacciones de desoxigenación para sintetizar el **93**.

Finalmente, en un artículo de Devereaux *et al.*⁶³ se encontraron unas condiciones que permitían la desoxigenación de un alcohol difenílico en una sola etapa. Siguiendo esta metodología, se trató el alcohol **90** con trietilsilano y 15 equivalentes de TFA en CH_2Cl_2 anhidro a $-5\text{ }^\circ\text{C}$ y luego se dejó en agitación a $0\text{ }^\circ\text{C}$ → ta durante 3 h, obteniendo el compuesto **93** con un 83% de rendimiento.



Esquema V-16. Mecanismo de reacción de la desoxigenación del compuesto **90**.

Inspirándose en el mecanismo propuesto por Adlington *et al.*⁶⁴ se podría decir que el TFA protona el grupo hidroxilo del compuesto **90** y este abandona la molécula en forma de agua. El carbocatión doblemente bencílico resultante recibe un hidruro transferido por el trietilsilano, el cual queda oxidado en forma de catión como sal conjugada con el trifluoroacetato. El producto resultante de esta reducción es el **93** (Esquema V-16).

En el espectro de ^1H RMN del compuesto **93** se observa un desplazamiento de la señal del $-\text{CH}_2-$ de δ 6.74 a δ 4.42 y un aumento de la integral de uno a dos protones. También desaparece la señal del hidroxilo que aparecía a δ 3.87 en el espectro de ^1H RMN del compuesto **90**. (Figura V-20). Ambos compuestos han sido caracterizados gracias a los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , y a los experimentos de espectroscopia de masas.

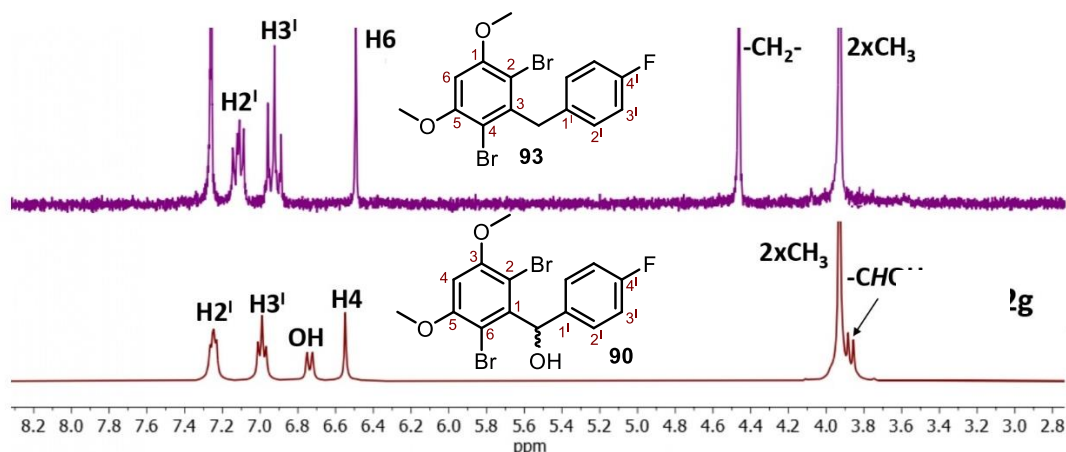
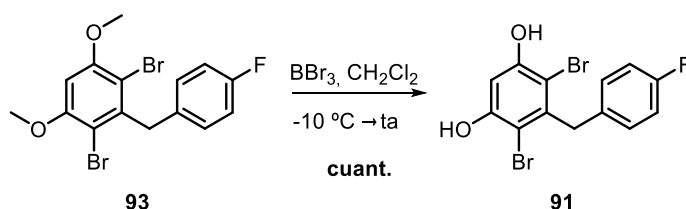


Figura V-20. Espectros de ^1H RMN de los compuestos **93** (lila) y **90** (granate).

V.3.4.4. Síntesis del análogo del CBD $\text{CBD}_{\text{AM}2}$

Las últimas tres etapas de la ruta sintética fueron exactamente igual que para la síntesis de los análogos del CBD $\text{CBD}_{\text{AM}1\text{a}}$ - $\text{CBD}_{\text{AM}1\text{f}}$.

Para empezar, el derivado del resorcinol **91** se preparó a partir de una reacción de desprotección de los fenoles en forma de éteres metílicos del compuesto **93** utilizando una solución 1 M de BBr_3 en el seno de CH_2Cl_2 durante una noche. El rendimiento de la reacción fue cuantitativo (Esquema V-17).

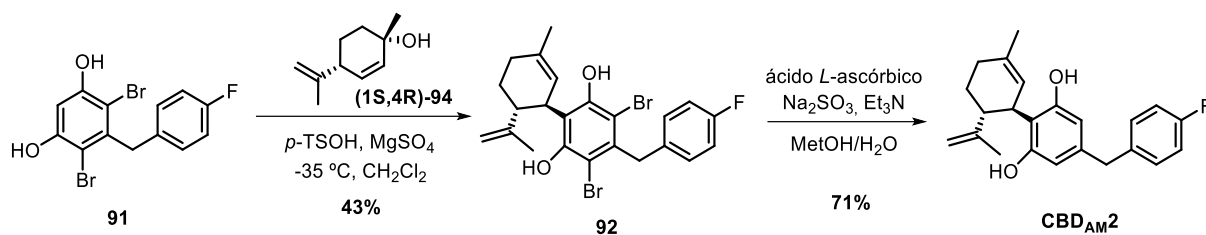


Esquema V-17. Condiciones de reacción para la desprotección de éteres metílicos del compuesto **93**.

El compuesto **91** fue elucidado estructuralmente gracias a los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C . El experimento de espectroscopia de masas dio un pico de $[\text{M}-\text{H}]^- = 372.8886$, que coincidía con el calculado.

El aducto **92** se obtuvo a partir de la reacción de alquilación de Friedel-Crafts del terpenoide (**1S,4R**)-**75** sobre el derivado de resorcinol **91** utilizando *p*-TsOH y sulfato de magnesio a $-35\text{ }^\circ\text{C}$ en el seno de CH_2Cl_2 anhidro durante 5 h y luego a temperatura ambiente durante una noche. El rendimiento de la reacción fue de 43% (Esquema V-18).

La aparición de la señal a δ 4.11 del protón H-1 en el espectro de ^1H RMN, y la concordancia de las integrales, elucidaron la formación del aducto **92**. El resto de asignación de señales de todos los protones y carbonos se ha realizado con ayuda de experimentos de RMN ^1H y ^{13}C .



Esquema V-18. Secuencia sintética para la obtención del compuesto **CBD_{AM2}** a partir del derivado de resorcinol **91**.

Finalmente, el análogo del CBD **CBD_{AM2}** se obtuvo a partir de una desbromación reductiva del compuesto **92** en reacción con sulfito de sodio, ácido *L*-ascórbico catalítico y Et₃N como base, en el seno de una mezcla de MeOH/agua a 75 °C durante un día, con un rendimiento del 71%.

La aparición de dos señales aromáticas a en forma de singletes anchos a δ 6.26 y δ 6.08, que corresponden a los dos protones aromáticos H-4¹ y H-6¹, confirmaron la correcta desbromación (Figura V-21). Todas las señales de protón y carbono han sido asignadas a partir de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C y sus correspondientes correlaciones bidimensionales. En el espectro de NOESY se puede apreciar correlación espacial entre los dos protones de los hidroxilos HO-1¹ y HO-3¹, y entre los protones de los hidroxilos y el protón H-9 del metilo. El pico de [M+H]⁺ = 353.1916 encontrado en el espectro de masas concuerda con el calculado. El valor del poder rotatorio de $[\alpha]^{20}_D$: -47.3 (c 0.5, CHCl₃) también concuerda con el del CBD ($[\alpha]^{20}_D$: -51.3 (c 1.7, CHCl₃)).

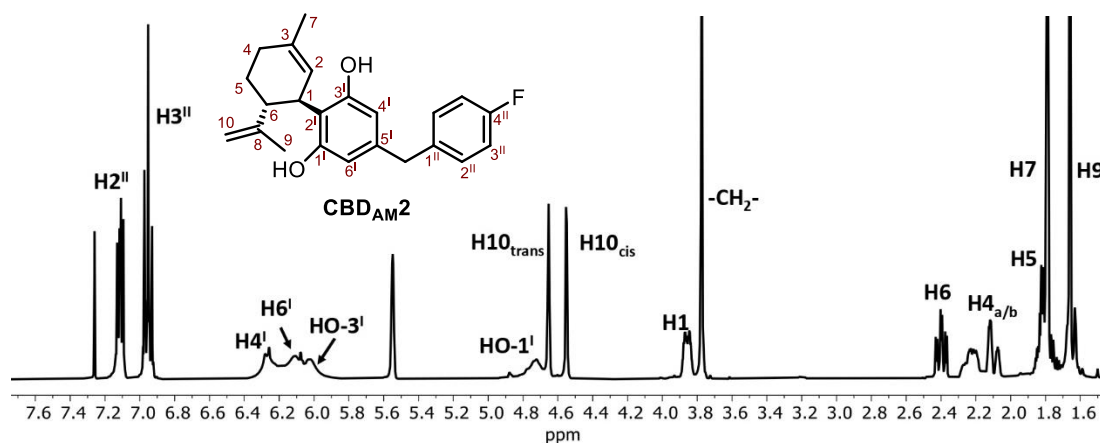


Figura V-21. Espectro de ¹H RMN del compuesto **CBD_{AM2}** en CDCl₃.

En resumen, se ha conseguido sintetizar el compuesto **CBD_{AM2}** a partir de una ruta sintética lineal de seis etapas y con un rendimiento global del 18%, siendo la formación del aducto con una alquilación de Friedel-Crafts la etapa determinante de la secuencia.

V.3.5. Estudios de la actividad biológica de los análogos del CBD

V.3.5.1. Estudio de la capacidad como moduladores alostéricos de CBD_{AM}1a-CBD_{AM}1e

Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, según las simulaciones la habilidad del CBD de bloquear la actividad del CB₂R, en presencia de un ligando ortostérico, puede ser debida a la inserción de su cadena de pentilo en una cavidad hidrofóbica entre las TMs 2, 3 y 7 del receptor, y estimulando los residuos de Phe¹¹⁷ y Trp²⁵⁸ a modo de interruptores.

Para probar esta hipótesis, una vez sintetizados los nuevos análogos del CBD con diferente sustituyente del anillo aromático se evaluaron sus propiedades funcionales en ensayos de inhibición de la producción de AMPc. Como en los experimentos realizados con el JWH-133 + CBD, células HEK293T con expresión de CB₂R estabilizada y tratadas con forskolina para activar la AC fueron utilizadas en combinación con el JWH-133 + análogos del CBD. A pesar de haberse sintetizado también el compuesto CBD_{AM}1f, por temas de logística no se llegó a evaluar su actividad.

Al observar la gráfica de la Figura V-22 se puede deducir que los derivados con cadena etílica CBD_{AM}1c y propílica CBD_{AM}1b (n = 1 y 2) actúan como PAM, ya que ayudan a reducir más los niveles de AMPc inducidos por el JWH-133 (en combinación) que cuando interactúa solo el JWH-133 (E_{max} 45.3 o 48.0 vs 56.0). El compuesto CBD_{AM}1c es más potente que el CBD_{AM}1b ya que su cadena propílica desplaza la curva de dosis-respuesta hacia la izquierda (0.4 unidades log) en relación con la cadena etílica del compuesto CBD_{AM}1b. El compuesto CBD_{AM}1d (n = 3), con su cadena butílica, se comporta de forma bastante similar al CBD (n = 4), siendo los dos NAMs. La extensa cadena de seis metilenos del CBD_{AM}1e (n = 5) hace ser a este compuesto un NAM más eficaz (E_{max} 83.5) que el CBD (E_{max} 67.8) (Tabla V-4).

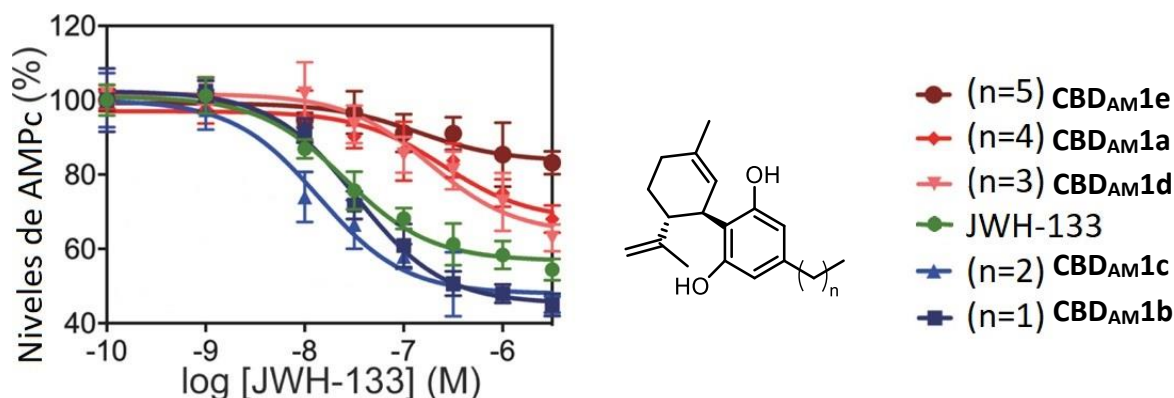


Figura V-22. Descenso de los niveles de AMPc inducido por forskolina en células HEK293T (normalizado a 100%), bajo la estimulación de receptores de CB₂R con el agonista ortostérico JWH-133 (línea verde) en conjunto con los diferentes análogos de CBD con menor (CBD_{AM}1b- CBD_{AM}1d, n = 1 - 3) o mayor (CBD_{AM}1e, n = 5) número de metilenos en la cadena alquílica respecto al CBD (CBD_{AM}1a, n = 4).

cavidad ortostérica	cavidad alostérica	pEC ₅₀ (nM)	E _{max} (%) ^a	efecto máx. (% respecto JWH-133) ^b
JWH-133	-	7.6 ± 0.1	56.0 ± 1.3	100%
JWH-133	CBD_{AM1b}	7.5 ± 0.2	45.3 ± 1.5	124% PAM
JWH-133	CBD_{AM1c}	7.9 ± 0.2	48.0 ± 1.8	118% PAM
JWH-133	CBD_{AM1d}	6.7 ± 0.2	64.1 ± 3.2	82% NAM
JWH-133	CBD (CBD_{AM1a})	6.6 ± 0.2	67.8 ± 3.3	73% NAM
JWH-133	CBD_{AM1e}	6.9 ± 0.2	83.5 ± 2.3	38% NAM

^a La inhibición máxima de los niveles de AMPc estimulados por forskolina (normalizada al 100%). Estos valores fueron calculados usando una regresión no lineal. Los datos son expresados como la medida ± SEM de por lo menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. ^b La eficiencia (en %) de los compuestos **CBD_{AM1a}-CBD_{AM1e}** en combinación con el JWH-133 en disminución del AMPc en relación con el JWH-133 (100%).

Tabla V-4. Modulación de la señal agonista del JWH-133 por los moduladores alostéricos diseñados **CBD_{AM1a}-CBD_{AM1e}**.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* del descenso de AMPc están en concordancia con la hipótesis sobre que el residuo de Phe¹¹⁷ actúa como interruptor modulador. De hecho, la influencia de la longitud de la cadena del ligando en la activación de otros RAPGs lipídicas ya ha sido estudiada y descrita en otras publicaciones del grupo de investigación del Dr. Leonardo Pardo (UAB).⁶⁵ Es por esto que para reforzar esta idea se realizaron simulaciones de DM con los compuestos PAM **CBD_{AM1c}** (n = 2) y NAM **CBD_{AM1e}** (n = 5) en CB₂R para estudiar la influencia de la longitud de cadena sobre la conformación de los residuos de la proteína que supuestamente actúan a modo de interruptores tipo palanca o gatillo. Como se puede observar en la Figura V-23, la larga cadena del NAM **CBD_{AM1e}** interacciona con la Phe¹¹⁷ (53%), Cys²⁸⁸ (56%) o Leu²⁸⁹ (40%), mientras que la cadena del PAM **CBD_{AM1c}**, que es 3 metilenos más corta, no interacciona con ninguno de estos residuos.

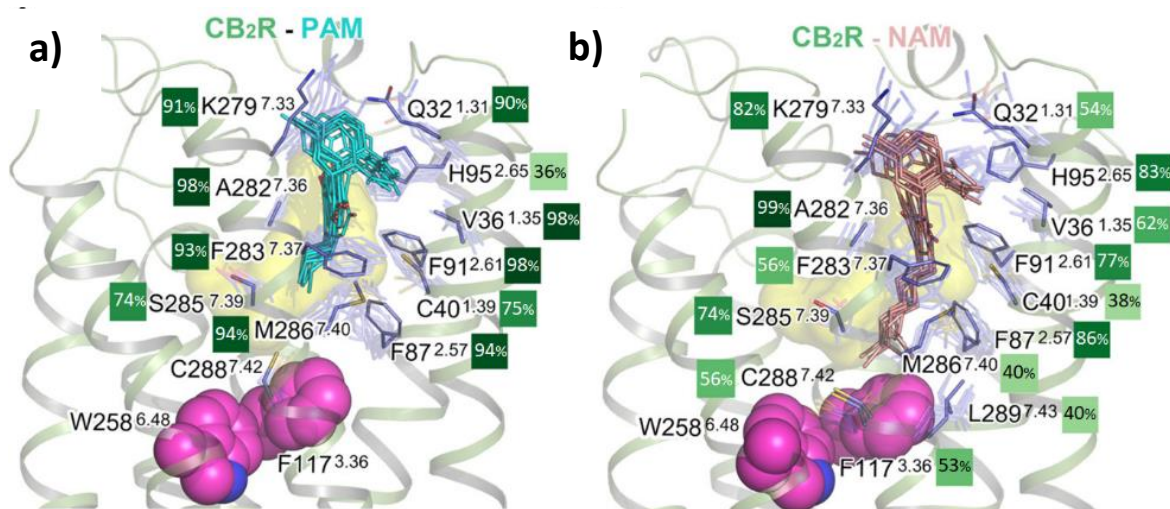


Figura V-23. Capturas de una simulación de DM (10 estructuras recogidas cada 100 ns) del CB₂R-G_i en complejo con el agonista JWH-133 (superficies amarillas) enlazado en la cavidad ortostérica y el PAM **CBD_{AM1c}** (cian, a) o

el NAM **CBD_{AM1e}** (salmón, **b**) enlazados en la cavidad alostérica. Los interruptores palanca/gatillo aparecen como esferas rojas (Phe¹¹⁷ y W²⁵⁸). La frecuencia de contacto calculada entre los residuos de la proteína y los moduladores alostéricos NAM o PAM durante las simulaciones de DM aparece en recuadros de color verde.

En las simulaciones de DM del CB₂R-G_i en complejo con el agonista JWH-133 interactuando en la cavidad ortostérica y el PAM **CBD_{AM1c}** o el NAM **CBD_{AM1e}** en la cavidad alostérica se pudo estudiar el ángulo diedro χ_1 de la cadena lateral de la Phe117. La Phe117 puede adoptar un ángulo *gauche+* (*g+*, $\chi_1 = -60^\circ$), o un ángulo *trans* (*t*, $\chi_1 = -180^\circ$). En la Figura V-24 se puede observar que la evolución del ángulo χ_1 en una simulación de DM de 1 μ s tanto de la interacción con JWH-133 como del JWH-133 + PAM **CBD_{AM1c}**, se mantiene constante en intervalos de $-60^\circ/-90^\circ$. En cambio, para la interacción JWH-133 + NAM **CBD_{AM1e}** se ve un claro desplazamiento del ángulo diedro del intervalo de $-60^\circ/-90^\circ$ a $-160^\circ/-180^\circ$.

Estos estudios determinaron que la interacción de la cadena de hexilo del NAM **CBD_{AM1e}** con el residuo de Phe¹¹⁷ favorece la conformación *trans* inactiva, mientras que la forma activa de *gauche+* es favorecida con la interacción del JWH-133 y el PAM **CBD_{AM1c}**.

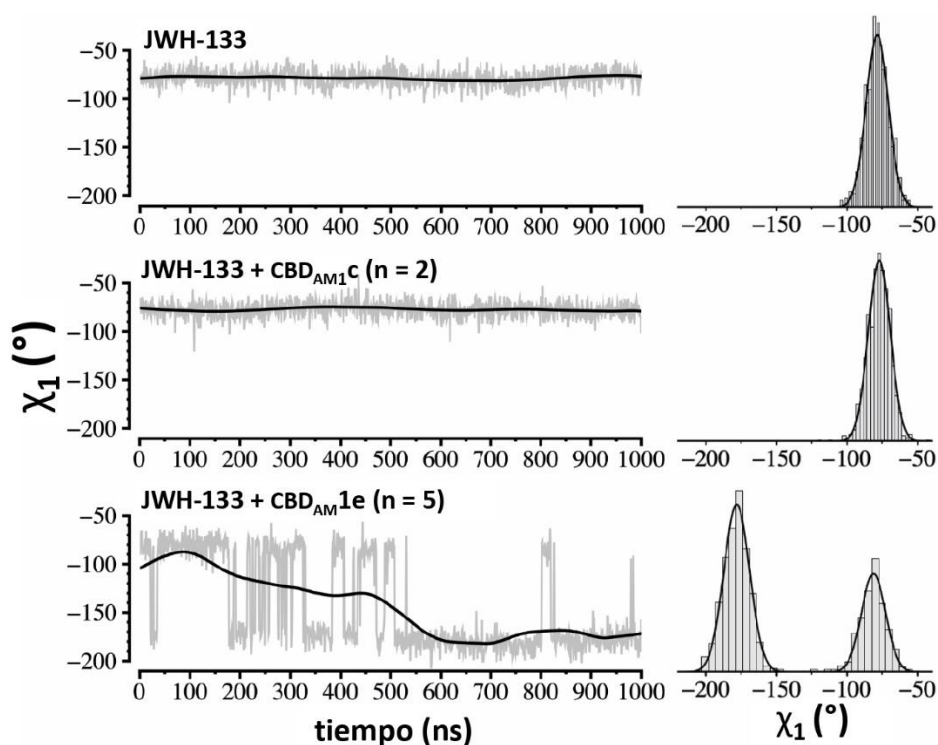


Figura V-24. Evolución (paneles de la derecha) del ángulo diedro χ_1 de la cadena lateral de la Phe¹¹⁷ a lo largo de una simulación de 1 μ s de DM del CB₂R-G_i en complejo con el agonista JWH-133 (**a**), y el PAM **CBD_{AM1c}** (**b**) o el NAM **CBD_{AM1e}** (**c**). A la izquierda, el ajuste de las funciones gaussianas a la distribución del histograma del ángulo diedro χ_1 obtenido en las simulaciones.

V.3.5.2. Estudio de la capacidad como modulador alostérico del compuesto $\text{CBD}_{\text{AM}2}$

El compuesto $\text{CBD}_{\text{AM}2}$ se diseñó con el afán de ser un PAM de lo CB_2R , combinando el anillo de fluorobenceno del PAM-C2 sintético y la estructura del CBD. Para probar la actividad como modulador del compuesto se midieron los niveles de AMPc en células HEK293T con expresión de CB_2R estabilizada y tratadas con forskolina para activar la AC en combinación con el JWH-133 + $\text{CBD}_{\text{AM}2}$.

En contra de todo pronóstico, en la gráfica de la Figura V-25 se puede observar como el compuesto $\text{CBD}_{\text{AM}2}$ actúa como NAM de forma mucho más negativa que el CBD e incluso que el compuesto $\text{CBD}_{\text{AM}1\text{e}}$, el mejor de los NAMs análogos del CBD sintetizados.

A pesar de que el grupo fluorobenceno podría ser un sustituyente que propiciara una buena interacción con el interruptor modulador Phe¹¹⁷, la longitud de la molécula y el volumen del sustituyente son equiparables a una cadena alquílica de gran longitud, y, por lo tanto, este compuesto estimularía más la posición *trans* inactiva de la Phe¹¹⁷ que la *gauche+*.

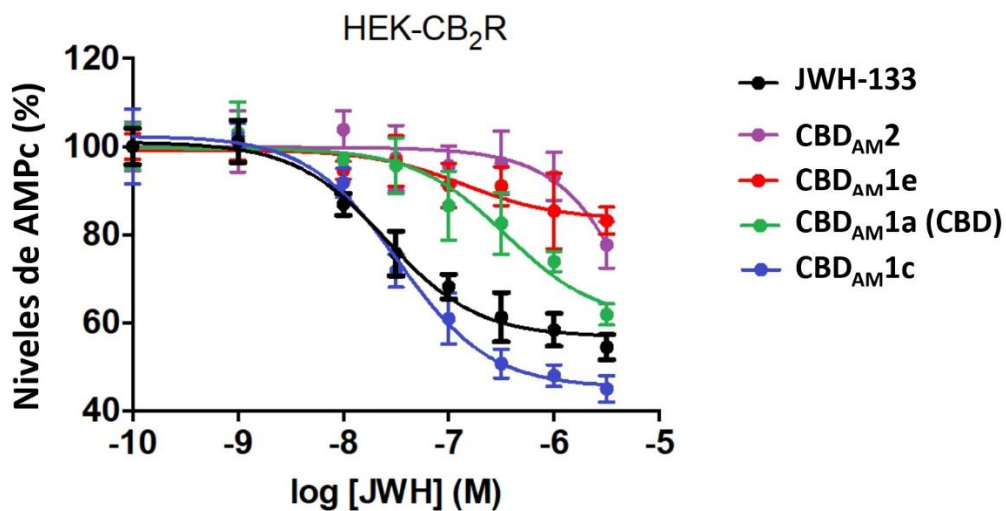


Figura V-25. Descenso de los niveles de AMPc inducido por forskolina en células HEK293T (normalizado a 100%), bajo la estimulación de receptores de CB_2R con el agonista ortostérico JWH-133 (línea negra) en conjunto con el compuesto $\text{CBD}_{\text{AM}2}$ y los diferentes análogos de CBD con menor ($\text{CBD}_{\text{AM}1\text{c}}$, $n = 3$) o mayor ($\text{CBD}_{\text{AM}1\text{e}}$, $n = 5$) número de metilenos en la cadena alquílica respecto al CBD ($\text{CBD}_{\text{AM}1\text{a}}$, $n = 4$).

V.3.6. Diseño de nuevos fármacos bivalentes moduladores alostérico-vestíbulo

V.3.6.1. Introducción a los fármacos bivalentes

Los ligandos bivalentes son compuestos químicos que contienen dos fragmentos biológicamente activos unidos por una cadena conectora y que pueden estimular una combinación de dos sitios de unión alostéricos y/o ortostéricos simultáneamente. Si el compuesto bivalente es simétrico, es decir los dos fragmentos conectados contienen los mismos puntos farmacofóricos, el ligando se define como homobivalente. En cambio, si el compuesto es asimétrico, los dos fragmentos tienen diferentes farmacóforos, el ligando es definido como heterobivalente.⁶⁶

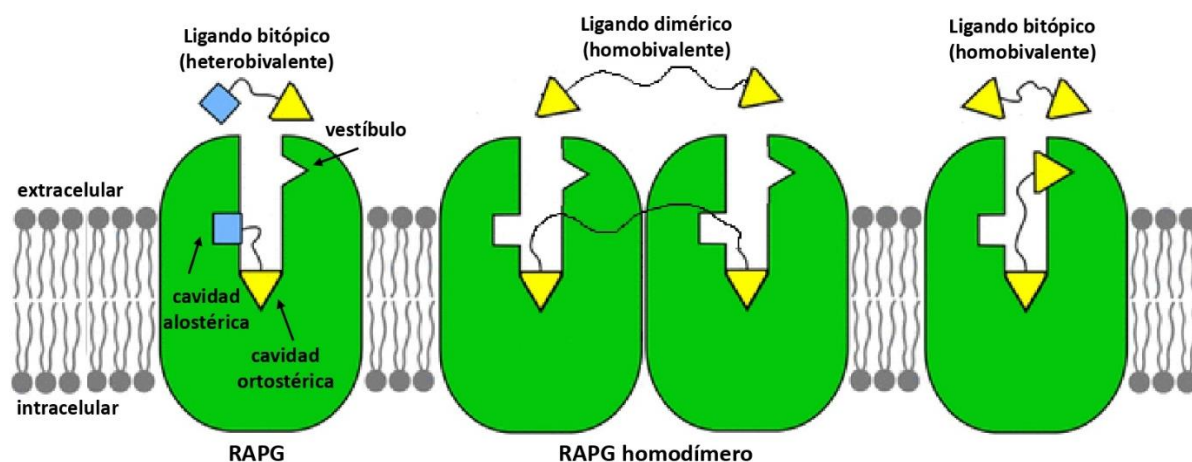


Figura V-26. Diferentes tipos de ligandos bivalentes utilizados en RAPGs.⁶⁶

Hay diferentes subclases de ligandos bivalentes como por ejemplo los ligandos diméricos (Ligandos homobivalentes que han sido diseñados para conectar receptores de proteínas en forma de dímeros)⁶⁷ o los ligandos bitópicos (ligandos heterobivalentes o homobivalentes que han sido sintetizados para conectar sitios de unión ortostérico/alostérico de un mismo receptor) (Figura V-26).⁶⁸ En otros estudios también han sido diseñados ligandos heterobivalentes capaces de conectar dos tipos de receptores diferentes con proximidad espacial (como por ejemplo, los receptores de opioides y cannabinoides).⁶⁹

Para conectar los dos fragmentos es necesaria una cadena de átomos a modo de puente entre estos. Por lo tanto, es importante la naturaleza de los átomos (entorno de residuos de aminoácidos por los que pasa la cadena), la longitud (espacio entre las cavidades) y la flexibilidad (orientación de las cavidades) de la cadena, por tal de conseguir las propiedades deseadas del ligando bitópico.

Compuestos químicos con la capacidad de estimular dos sitios de unión simultáneamente son estrategias emergentes dentro de la química médica. Los ligandos bitópicos agrupan las ventajas de ambos ligandos ortostéricos y alostéricos combinando una gran afinidad y una selectividad de farmacóforos secundarios respectivamente. Además, los ligandos bitópicos ortostérico-alostérico

tienen potencial de inducir señalización sesgada (*biased*). Otra ventaja del uso de bitópicos frente a los ligandos puramente alostéricos es la dependencia de los moduladores alostéricos sobre la presencia adecuada de agonista para modular sus efectos, mientras que en los fármacos bitópicos no dependen de ello al incluir ambas partes en una misma molécula.

V.3.6.1.1. Cavidades alostéricas de los RAPGs; el vestíbulo

Mientras que muchos RAPGs reconocen ligandos polares, hay una serie de RAPGs que responden a mediadores de tipo lipídico, como es el caso del CB₁R y CB₂R. Como ya se ha comentado en la introducción del capítulo, estructuras cristalográficas de estos RAPGs lipídicos sugieren que la interacción del ligando tipo lipídico con el RAPG tiene lugar a través de un canal estrecho entre las TMs 1 y 7 y conecta la cavidad ortostérica con la membrana bilipídica.⁷⁰

Los RAPGs pueden adoptar múltiples sitios activos vinculados a distintos procesos funcionales que pueden ser estabilizados tanto por ligandos ortostéricos como alostéricos.⁷¹ Varios estudios coinciden en que los ligandos ortostéricos a menudo interaccionan de forma estable en la entrada de los receptores y adoptan conformaciones energéticamente estables antes de continuar su camino hacia la cavidad de unión o disociarse. Estas cavidades de unión transitorias han sido nombradas cavidades de unión metaestable,⁶⁶ entrada⁷² o vestíbulo extracelular.⁷³ En esta tesis se referirán a estos nuevos tipos de cavidades alostéricas como vestíbulos. Este vestíbulo se situaría en la parte superior del TM 7 del CB₂R. La investigación sobre los vestíbulos puede ser muy útil en el diseño de nuevos moduladores alostéricos y ligandos bitópicos.

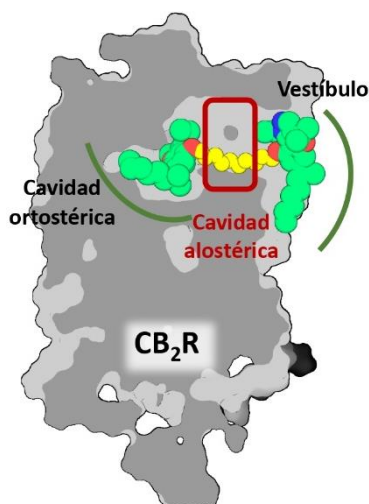
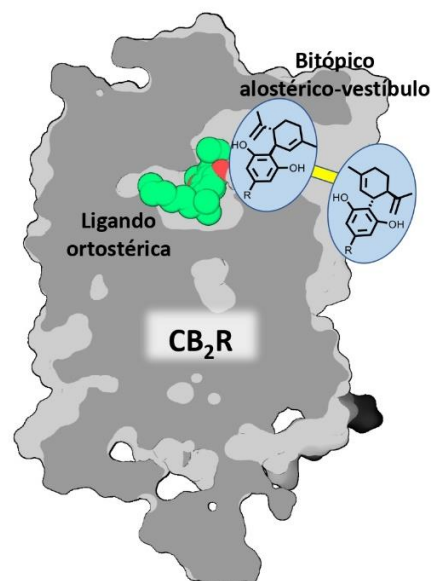


Figura V-27. Dibujo del CB₂R en complejo con el bitópico basado en *chromenopyrazoles* ortostérico-vestíbulo.⁷⁵

En diferentes artículos se ha publicado información sobre ligandos bivalentes para CB₁R⁶⁷ y CB₂R.⁷⁴ En el grupo de nuestro colaborador el Dr. Leonardo Pardo se ha publicado recientemente el diseño de ligandos bitópicos homovivalentes basados en *chromenopyrazoles* capaces de interaccionar con la cavidad ortostérica y el vestíbulo (Figura V-27).⁷⁵ Esta teoría también ha sido apoyada con el modelo de ligando bitópico CTL01-05-B-A05, un bitópico simétrico basado en agomelatina, que interacciona tanto en la cavidad ortostérica como en el vestíbulo de los receptores MT1 de melatonina.⁷⁶ Estos ligandos bitópicos que tienen como objetivo interaccionar simultáneamente con la cavidad ortostérica y el vestíbulo mejoran la selectividad,^{77,78} y la señalización sesgada,^{68,71,79} manteniendo la biodisponibilidad y propiedades de penetración en el cerebro de ratones.⁸⁰

V.3.6.1.2. Diseño de nuevos fármacos bitópicos alostérico-vestíbulo de CB₂R

La propuesta innovadora de esta parte del proyecto es el diseño de nuevos fármacos moduladores alostéricos positivos bitópicos que interactúen con la cavidad alostérica y el vestíbulo simultáneamente en CB₂R. Con este tipo de fármacos se pretende incrementar la capacidad como PAM del fármaco bitópico debido a una mayor interacción propiciada por la cavidad alostérica y el vestíbulo simultáneamente, al mismo tiempo que, se prolongaría la estancia del ligando agonista en la cavidad ortostérica debido impedimento estérico generado en el túnel de entrada y salida del receptor (Figura V-28).



A partir de unas simulaciones propuestas por nuestros colaboradores del grupo del Dr. Leonardo Pardo en comparación con su bitópico ortostérico-vestíbulo, se pudo

Figura V-28. Dibujo del complejo Bitópico(alostérico/vestíbulo) + ligando(ortostérico) + CB₂R.⁷⁵

ubicar donde se situarían los cannabinoides y la distancia entre ellos (Figura V-29). De esta manera, se pudo plantear la forma y longitud de la cadena para unir los dos cannabinoides.

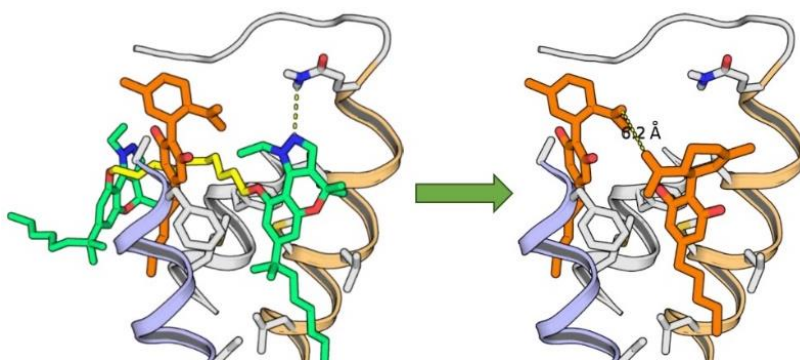


Figura V-29. Capturas de las simulaciones del complejo CB₂R con el bitópico de *chromenopyrazoles* ortostérico-vestíbulo (verde-amarillo) y el CBD (naranja) en la cavidad alostérica (izquierda); y el complejo de CB₂R con dos moléculas de CBD (naranja) situadas en la cavidad alostérica y vestíbulo.

A partir de estos resultados *in silico* se plantearon dos posibles familias de ligandos bitópicos; i) la familia **CBD_{BT1}**, uniendo los cannabinoides con un enlace tipo éter a través fenoles del fragmento tipo resorcinol del cannabinoide; y ii) la familia **CBD_{BT2}**, uniendo los cannabinoides por un enlace tipo éter a través del isopropileno (Figura V-30). Inicialmente, se planteó unir los dos cannabinoides con una cadena de propilo, aparentemente óptima para la distancia calculada en las simulaciones.

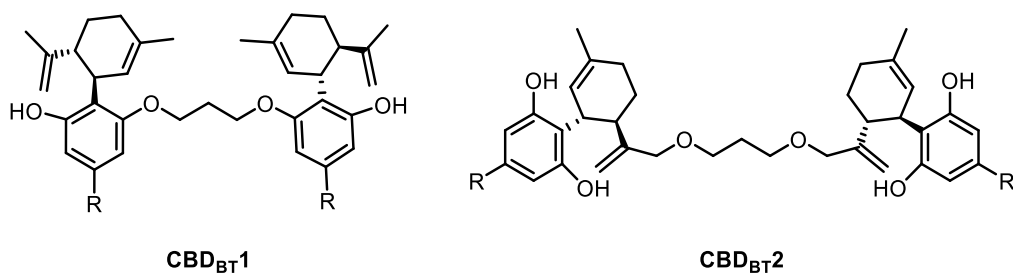
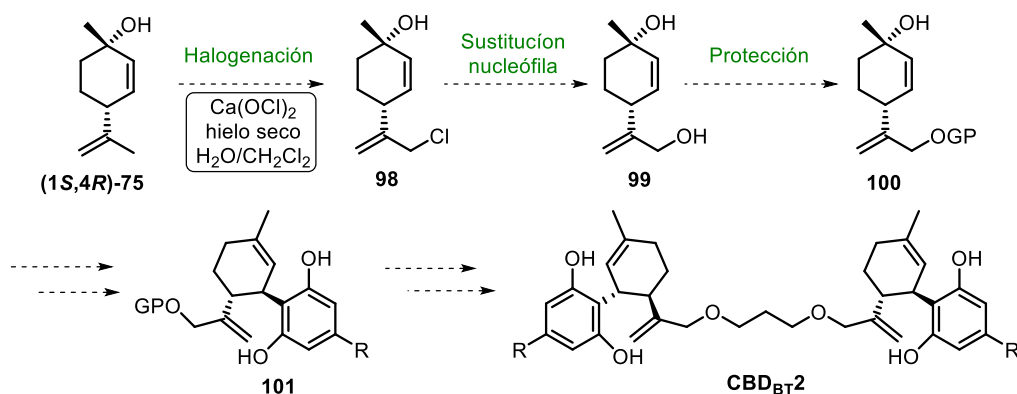


Figura V-30. Estructura molecular de las familias de nuevos fármacos bitópicos alostérico-vestíbulo **CBD_{BT2}** y **CBD_{BT1}**.

V.3.6.2. Plan sintético para la obtención de los nuevos derivados bitópicos del CBD

V.3.6.2.1. Pruebas con el anclaje a través del isopropileno, familia **CBD_{BT2}**

Una de las posibilidades escogidas para generar un punto de anclaje a través de los isopropilenos entre los dos cannabinoides fue la de halogenar el carbono alílico terminal del isopropileno del terpeno de partida, para después sustituir el halógeno por un hidroxilo y protegerlo. Una vez formado el cannabinoide a partir del terpeno modificado y el del derivado de resorcinol, se generaría la unión de los dos cannabinoides a partir de dos éteres entre los dos isopropilenos y una cadena de propilo (Esquema V-19). En la bibliografía, se encontró una metodología para este tipo de halogenaciones en isopropilenos de terpenoides (*R*-carvona y **(1S,4R)-75**). Esta metodología consistía en hacer reaccionar el reactivo de partida con hipoclorito cálcico en el seno de una mezcla de agua y CH₂Cl₂, en presencia de nieve carbónica.^{81,82}

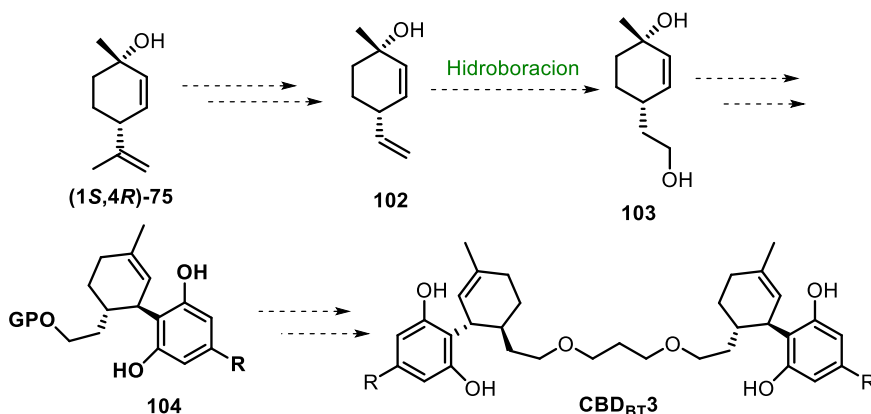


Esquema V-19. Planteamiento sintético para la obtención de nuevos fármacos bivalentes derivados de cannabinoides con punto de unión en la cadena de isopropileno **CBD_{BT2}**.

Desafortunadamente, al tratar de emular las condiciones de reacción de la bibliografía en diversas pruebas, tanto con la *R*-carvona (prueba de concepto) como con el **(1S,4R)-75**, no se consiguió identificar ninguno de los productos deseados. Uno de los motivos principales fue la falta de hielo seco

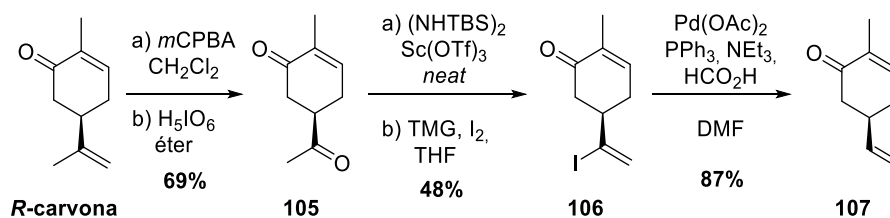
para realizar la reacción. Como alternativas al hielo seco se utilizó un aparato de refrigeración Haake™, un baño de EtOH/N₂ líquido, baño de hielo o la realización a temperatura ambiente, pero con ninguna de estas alternativas se obtuvo un resultado satisfactorio.

Otra metodología que se probó fue transformar el isopropileno del **(1S,4R)-75** en un vinilo terminal, para tras una hidroborcación en antimarkovnikov utilizar el hidroxilo terminal resultante como punto de unión en forma de éter entre los dos cannabinoides y una cadena propílica (Esquema V-20).



Esquema V-20. Planteamiento sintético para la obtención de la familia de bitópicos **CBD_{BT}3**.

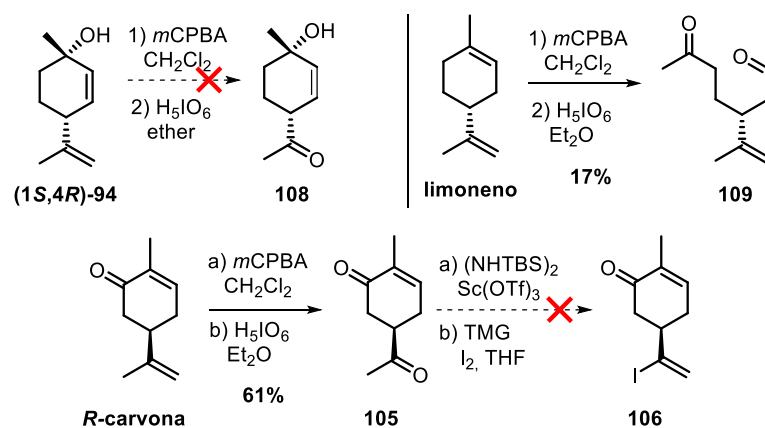
Esta metodología fue extraída de un artículo publicado por Robinson *et al.*⁸³ La primera reacción consiste en una rotura oxidativa del doble enlace terminal de la *R*-carvona provocada, primero por la formación de un epóxido utilizando ácido *meta*-cloroperbenzoico (*m*CPBA), y segundo por una rotura tipo reacción de Malaprade con ácido ortoperoyódico, dando como resultado la cetona **105** con un 69% de rendimiento. Esta cetona es tratada con una sofisticada hidrazina (NHTBS)₂, en presencia catalítica de triflato de escandio. La hidrazona resultante se trata con yodo y exceso de tetrametilguanidina (TMG) en el seno de THF para experimentar una yodación de hidrazonas de Burton y formar el yoduro de α -vinilo **106** con un 48% de rendimiento. Finalmente, el yodo se elimina con una reducción catalizada por paladio utilizando ácido fórmico como fuente de hidruros para obtener el vinilo monosustituido **107** con un 87% de rendimiento (Esquema V-21).



Esquema V-21. Síntesis del derivado de *R*-carvona por E. E. Robinson *et al.*

Desafortunadamente, al intentar generar el epóxido con *m*CPBA sobre el **(1S,4R)-75** en el seno de CH₂Cl₂ y la consecutiva rotura tipo reacción de Malaprade con ácido ortoperoyódico en el seno de éter dietílico (Et₂O) solo se obtuvieron productos de degradación. También se realizaron pruebas con otros

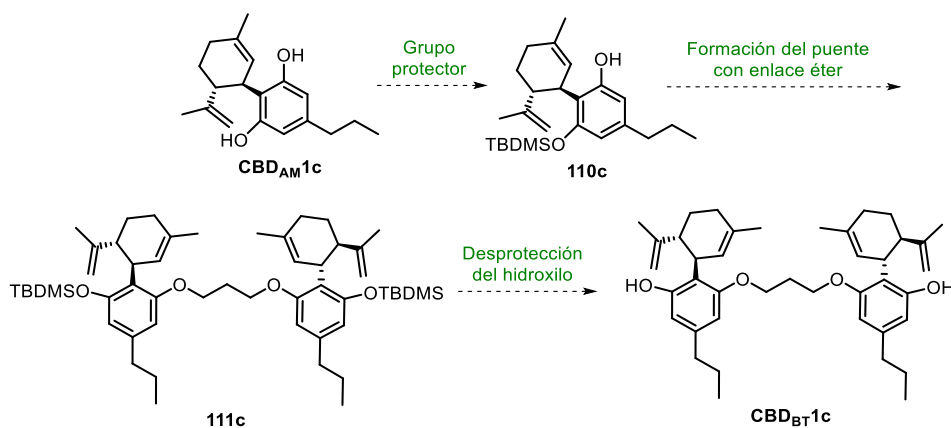
terpenoides: la *R*-carvona y el limoneno. Con la *R*-carvona se obtuvo la cetona **105** con un 61% de rendimiento, pero al intentar la yodación sobre la hidrazona generada *in situ* solo se obtuvieron productos de degradación. Este hecho podría ser causado por dos motivos: i) la dificultosa obtención del derivado de hidrazina (NHTBS)₂ de forma pura, a través de una reacción con hidrazina y cloruro de *tert*-butildimetilsililo; y ii) la falta de material para trabajar en las condiciones de vacío y de oscuridad requeridas oscura para la reacción de formación del yodo vinilo. En el caso del limoneno al reaccionar con *m*CPBA y ácido ortoperiódico se produjo una rotura oxidativa de la olefina trisustituída, dando como producto de la reacción el compuesto **109** con un 17% de rendimiento (Esquema V-22).



Esquema V-22. Condiciones de reacción utilizadas en las diferentes pruebas para la obtención de **109** y la obtención fallida de los compuestos **108** y **106**.

V.3.6.2.2. Ruta sintética con unión por el hidroxilo del fragmento de resorcinol

Otra estrategia diseñada fue la de la unión de los cannabinoides a partir de los hidroxilos del fragmento de resorcinol del cannabinoide. Esta estrategia fue inspirada en la utilizada en el artículo publicado por Pardo *et al.*⁷⁵ Para probar la ruta sintética se decidió utilizar como reactivo de partida el **CBD_{AM}1c**, ya que fue el derivado del CBD que presentaba mayor actividad como PAM.

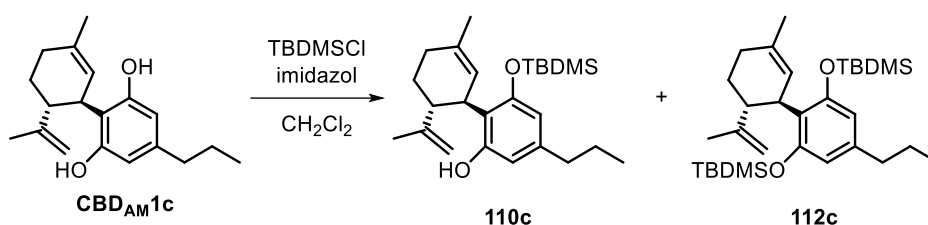


Esquema V-23. Planteamiento sintético para la obtención del **CBD_{Br}1c**.

La primera etapa consistiría en la protección de uno de los hidroxilos aromáticos del cannabinoide en forma de éter de sililo como grupo protector, para obtener el compuesto monoprotegido **110c**. La siguiente etapa sería la unión de los dos derivados del CBD a través de 1,3-dibromopropano y utilizando los hidroxilos libres como punto de anclaje. Finalmente, la desprotección de los hidroxilos nos proporcionaría el compuesto final **CBD_{BT}1c**. Esta ruta sintética se diseñó con el afán de poder ser aplicada para cualquier derivado de cannabinoide de partida con un fenol libre para el anclaje y para cualquier dihalcano de diferente elongación como puente (Esquema V-23).

V.3.6.2.2.1. Síntesis del compuesto monoprotegido **110c**

La primera etapa de esta ruta sintética consistió en la protección selectiva de uno de los grupos hidroxilo del anillo aromático del compuesto **CBD_{AM}1c** reaccionando con cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMSCl) e imidazol en el seno de CH₂Cl₂ (Esquema V-24).



Esquema V-24. Condiciones de reacción para la síntesis del **110c** y el diprotegido **112c**.

exp.	eq. De TBDMSCl	eq. de imidazol	t.	PP recup.	110c	112c
1	1	1.2	3 h	73%	27%	0%
2	2.5 + 1.4 + 1 + 0.8 = 5.7	1.2	overnight	25%	75%	0%
3	1.2 + 0.5 + 1.2 = 2.9	1.3 + 1.3 = 2.6	overnight	3%	64%	33%

*Los equivalentes extra de TBDMSCl e imidazol se van adicionando de en intervalos de una hora.

Tabla V-5. Diferentes pruebas de condiciones de reacción para la protección de los hidroxilos del **CBD_{AM}1c**.

Dependiendo de los equivalentes de TBDMSCl e imidazol que se utilizaron, la reacción se decantó más por el producto de monoprotección **110c** o el diprotegido **112c** (Tabla V-5). Cuando se utilizó un equivalente del sililo y 1.2 equivalentes de imidazol solo se obtuvo un 27% de **110c**, y el resto fue reactivo de partida recuperado. Cuando se aumentó en 5.7 equivalentes el TBDMSCl pero se mantuvieron los equivalentes de imidazol, se mejoró el rendimiento del producto **110c** en un 75% y el resto fue reactivo de partida recuperado. Finalmente utilizando 3 equivalentes de TBDMSCl y doblando los equivalentes de imidazol, se obtuvo un 64% de producto monoprotegido **110c** y un 33% de producto de diprotección **112c**. Por CCF se pudo comprobar que el hecho de dejar las reacciones en

agitación durante toda la noche no influía tanto en los rendimientos de los productos como el aumento de los equivalentes.

En el espectro de ^1H RMN del compuesto **110c** (Figura V-31) se puede ver la aparición de un singlete a δ 0.98 que integraba 9 protones y dos singletes a δ 0.21 y 0.17 que integraban 3 protones cada una. Estas señales pertenecen al grupo protector *tert*-butildimetilsililo y están en relación con las señales del cannabinoide de forma coherente. También se observa la desaparición de una de las señales del hidroxilo, ya que este se encontraba protegido por el sililo. Estas dos observaciones fueron cruciales para verificar la protección selectiva de uno de los dos fenoles del **110c**.

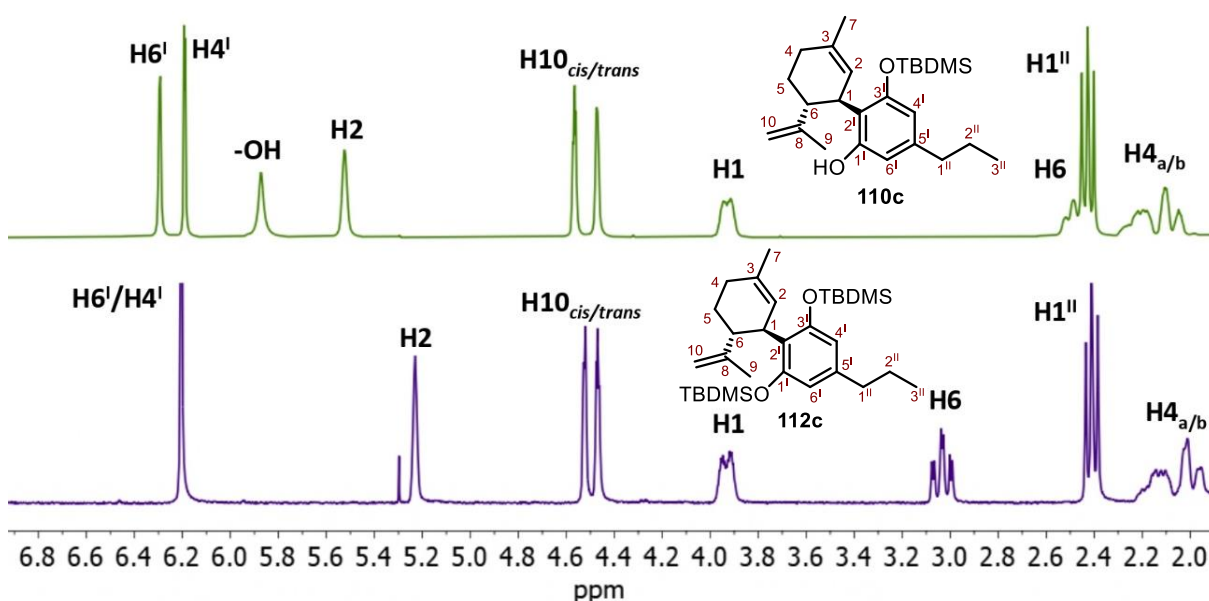


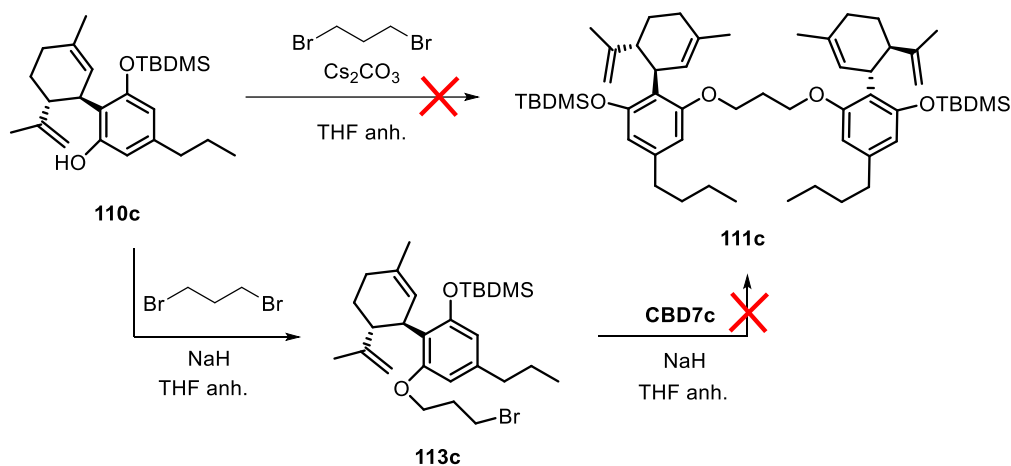
Figura V-31. Espectros de ^1H RMN de los compuestos **110c** y **112c**.

En el caso del espectro de ^1H RMN del compuesto **112c** se puede observar que las señales de los grupos protectores TBDMS integraban el doble que en el espectro del compuesto monoprotegido **110c**. También se puede observar en el espectro de la Figura V-31 la desaparición de las señales de los hidroxilos y una única señal para los hidrógenos aromático H-4' y H-6' a δ 6.19 que indica la simetría del fragmento de divarinol diprotegido con el sililo.

Los compuestos **110c** y **112c** fueron caracterizados gracias a los experimentos de ^1H y ^{13}C RMN y sus correspondientes experimentos de correlación $^1\text{H}/^{13}\text{C}$. Los experimentos de HMRS mostraron señales de $[(\text{M})+\text{H}]^+ = 401.2856$ y $[(\text{M})+\text{H}]^+ = 515.3719$ que concordaban con las calculadas para el **110c** y **112c**, respectivamente.

V.3.6.2.2.2. Pruebas para la síntesis del compuesto **111c**

Una vez obtenido el cannabinoide monoprotegido **110c**, se planteó el reto más ambicioso de la ruta sintética, la unión de los dos cannabinoide por el hidroxilo aromático libre utilizando una cadena alquílica de tres unidades a través de un puente éter.



Esquema V-25. Condiciones de reacción fallidas para la síntesis del **111c** y los productos de reacción con estas condiciones.

En primer lugar, se intentó realizar el acoplamiento directo de los dos cannabinoide, en una sola etapa, mezclando dos equivalentes de **110c** con una de 1,3-dibromopropano en exceso de carbonato de cesio (10 eq.) en el seno de THF anhidro para obtener el compuesto **111c** (Esquema V-25).⁷⁵ Desafortunadamente, al realizar esta reacción bajo estas condiciones a reflujo durante una noche se obtuvo una mezcla de diferentes productos, pero no se pudo identificar el compuesto **111c**. Estos compuestos obtenidos fueron el **CBD_{AM}1c** (reactivo de partida de la reacción anterior), el **112c**, y dos compuestos más; y el **113c** y una impureza no identificada. Por un lado, se pudo observar que, en presencia de carbonato de cesio, una de las reacciones paralelas que ocurría era que por cada dos moléculas de **110c** de partida se obtenía una del compuesto diprotegido **112c** y una del compuesto desprotegido **CBD_{AM}1c** (reactivo de partida de la síntesis).

A priori, basándose en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C y sus correlaciones bidimensionales se identificó al compuesto **113c** como el producto resultante del acoplamiento de un extremo del 1,3-dibromopropano sobre el hidroxilo libre del compuesto **110c**. En el espectro de ^1H RMN del compuesto **113c** se pudo observar la desaparición de la señal a δ 5.87 correspondiente al hidroxilo aromático que aparecía en el espectro de ^1H RMN del compuesto **110c**. Otro indicio del acoplamiento de la cadena alquílica en forma de éter fue la aparición de tres señales a δ 4.00, 3.61 y 2.27 con integrales de dos protones correspondiente a los tres metilenos de la cadena alifática (Figura V-32). Los espectros de correlación $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ también concordaban con la estructura predicha.

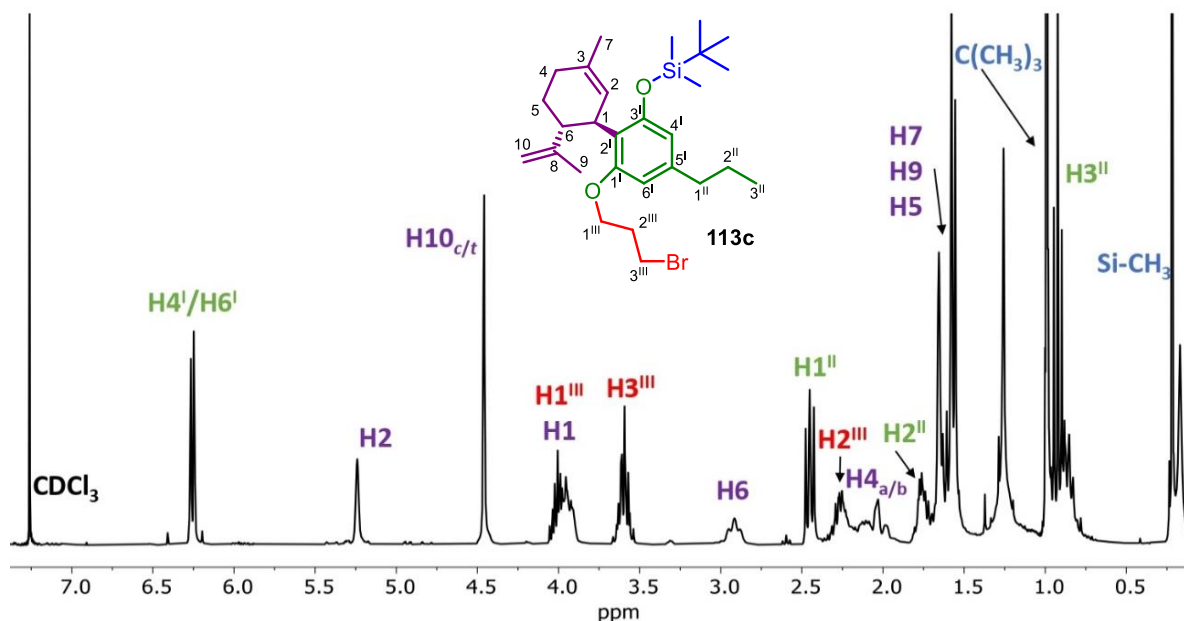


Figura V-32. Espectro de ^1H RMN del compuesto **113c**.

Visto el desafortunado resultado de intentar juntar los dos cannabinoides en una sola etapa y que aparentemente se podía aislar el producto intermedio **113c** en una sola reacción se decidió hacer el acoplamiento por partes. Primero, acoplar uno de los extremos del 1,3-dibromopropano con un hidroxilo del compuesto **110c** mediante un ataque nucleófilo, y una vez aislado el producto de la reacción **113c**, acoplar el fragmento terminal de la cadena alquímica de este producto con otra molécula de **110c** a través de otra sustitución nucleófila. (Esquema V-25).

La sustitución nucleófila del 1,3-dibromopropano por el hidroxilo del **110c** se realizó utilizando 3 equivalentes de hidruro de sodio sobre el cannabinoide **110c** en el seno de THF anhidro y adicionando un exceso de 1,3-dibromopropano a 75 °C durante 6 horas. El producto **113c** fue obtenido como producto mayoritario. Tras purificar el crudo con una columna cromatográfica en gel de sílice también se aislaron el producto de diprotección **112c** y una impureza desconocida.

Una vez aislado el compuesto **113c**, la idea fue sintetizar el compuesto **111c** a partir de una reacción de sustitución nucleófila entre el hidroxilo libre del **110c** y el carbono terminal que soporta el bromo en el compuesto **113c**. En la Tabla V-6 se recogen las diferentes pruebas que se realizaron para obtener el compuesto **111c**.

Exp.	Base	Eq. de base	tiempo	Temp.	Producto
1	NaH	3 + 3	overnight	65 °C	110c + impureza
2	NaH	4	overnight	65 °C	110c + impureza
3	Cs ₂ CO ₃	3	overnight	70 °C	112c + CBD _{AM} 1c + PPs

*Todas las reacciones se han llevado a cabo utilizando los reactivos de partida **110c** y **113c** en el seno de THF anhidro en atmosfera inerte de nitrógeno

Tabla V-6. Diferentes condiciones de reacción para lograr la síntesis del compuesto **111c**.

En el experimento 1 se utilizaron seis equivalentes de hidruro de sodio (en dos porciones de tres equivalentes) como base, a 65 °C durante una noche. Con estas condiciones se obtuvo una mezcla del intermedio de partida **110c** y una impureza, que por RMN se pudo intuir que contenía la estructura de cannabinoide y la cadena propano, pero no se pudo identificar la estructura de forma precisa. Disminuyendo los equivalentes de hidruro de sodio a cuatro y durante una noche en agitación a 65 °C, también se obtuvo una mezcla de **110c** y la impureza. Por otro lado, al usar carbonato de cesio como base durante una noche a 70 °C se obtuvo una mezcla del cannabinoide diprotegido **112c**, **CBD_{AM}1c** y mezcla de los reactivos de partida sin reaccionar, tal y como había ocurrido con anterioridad al utilizar carbonato de cesio.

Al realizar un experimento de espectroscopía de masas para caracterizar el compuesto **113c** no se encontró ningún pico referente a la estructura molecular propuesta, ni ningún indicio de que la molécula contuviera bromo en su estructura (Figura V-33). Este suceso explicaría el porqué de que el acoplamiento entre el compuesto **113c** y el **110c** no diera como resultado el compuesto **111c**.

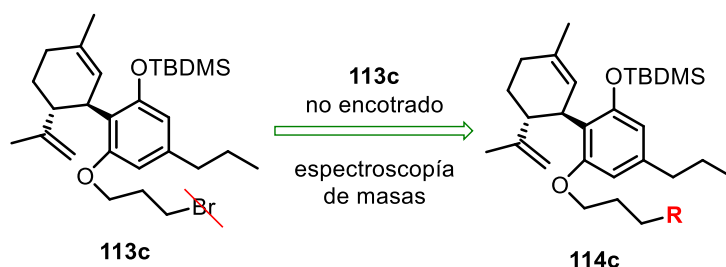


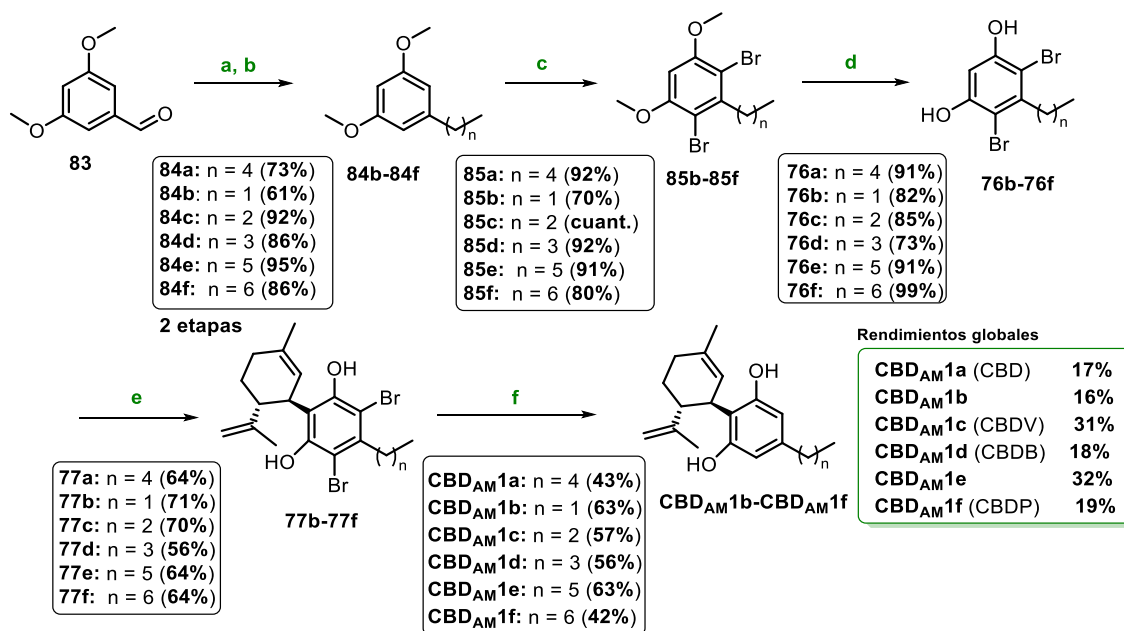
Figura V-33. Ilustración esquematizada de la ausencia de bromo y del pico correspondiente al compuesto **113c** en los experimentos de espectroscopía de masas.

En vista de justificar también la problemática con el grupo protector TBDMS, en la bibliografía se encontró que varios grupos de investigación habían planteado la utilización de medios básicos tales como el carbonato de cesio o el hidruro de sodio, en disolventes muy polares, para establecer métodos suaves de desprotección de éteres de arilsililo.^{84,85} De forma paralela, también se encontró que con algunas condiciones de medio básico (*tert*-butoxido potásico) algunas moléculas experimentaban una migración intramolecular del grupo protector *tert*-butildimetilsililo.⁸⁶ Estos hechos darían un indicio del porqué al intentar la sustitución nucleofílica con estas bases y en presencia de *tert*-butildimetilsililo, se obtuvo siempre una mezcla de productos donde los grupos sililos migraban entre los cannabinoides.

V.4. Resumen y conclusiones

Uno de los últimos hallazgos sobre el CBD ha sido su potencial como NAM de los CBRs. Varios estudios sobre este tipo de RAPGs han ubicado esta cavidad alostérica moduladora en mitad de un estrecho conducto entre la cavidad metaestable de entrada y la cavidad ortostérica del receptor, ubicadas entre las TMs 2, 3 y 7. Concretamente, diferentes estudios abalan que los residuos de Phe^{3,36} y Thp^{6,48} ubicados en este tipo de cavidades de los RAPGs son responsables de la modulación alostérica de este tipo de receptores, actuando como interruptores según su conformación. Junto con la colaboración de los grupos de investigación del Dr. Leonardo Pardo (UAB) y el Dr. Rafael Franco (UB), se planteó la posible influencia de la cadena de pentilo del cannabidiol sobre el residuo de Phe^{3,36} como causante de la modulación del receptor. Para validar esta hipótesis se diseñó una nueva familia de análogos del CBD con diferente elongación en la cadena carbonada terminal y una ruta sintética aplicable a este tipo de compuestos.

De esta manera, el CBD y seis compuestos más (**CBD_{AM}1b-CBD_{AM}1f**), análogos del CBD con de cadena alquílica de entre 1 y 6 metilenos, fueron sintetizados con una ruta sintética de seis etapas lineales, siendo la deshalogenación reductiva la etapa limitante. El 3,5-dimetoxibenzaldehído fue el reactivo de partida comercial para todas las rutas sintéticas. El rendimiento global de todos los compuestos oscila entre el 16% - 32% (Esquema V-26), y la pureza de los compuestos finales fue > 95%.



Esquema V-26. Secuencia sintética para la obtención de los derivados del CBD **CBD_{AM}1a-CBD_{AM}1f**. **Reactivos y condiciones:** (a) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_3\text{Br}$ ($n = 0 - 6$), $n\text{-BuLi}$, THF anh.; (b) H_2 , Pd/C, MeOH; (c) NBS, CH_2Cl_2 ; (d) BBR_3 , CH_2Cl_2 , $-10\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{ta}$; (e) **(1S,4R)-75**, $p\text{-TsOH}$, MgSO_4 , CH_2Cl_2 anh., $-35\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{ta}$; (f) Na_2SO_3 , ácido *L*-ascórbico, Et_3N , MeOH/ H_2O .

De forma paralela también se diseñó el compuesto **CBD_{AM2}**, un híbrido entre el CBD y un PAM sintético creado por Gado *et al.*³⁹ El compuesto **CBD_{AM2}** fue sintetizado con una ruta lineal de seis etapas, partiendo del 3,5-dimetoxibenzaldehído comercial, siendo la alquilación de Friedel-Crafts la etapa limitante y con un rendimiento global del 18% (Esquema V-27).

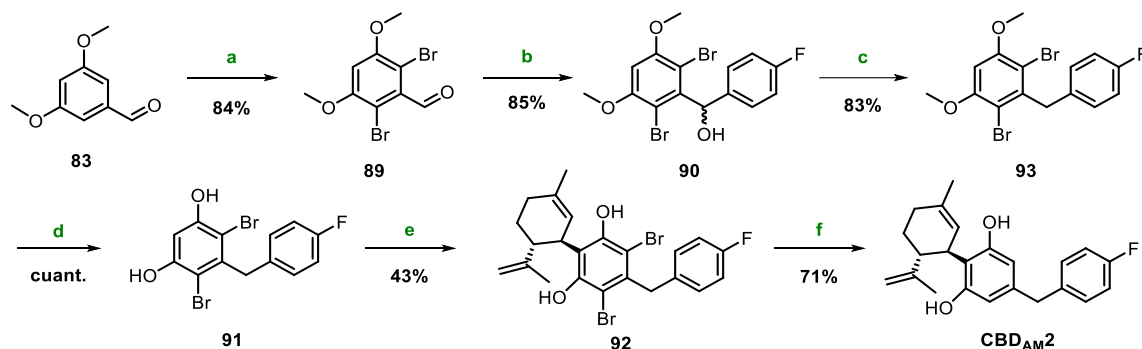


Figura V-27. Secuencia sintética para la obtención del **CBD_{AM2}**. **Reactivos y condiciones:** (a) NBS, CH₃CN; (b) 4-fluoriodobenceno, *i*PrMgBr, THF anh.; (c) trietilsilano, TFA, CH₂Cl₂ anh.; (d) BBr₃, CH₂Cl₂, -10 °C → ta; (e) (1S,4R)-75, *p*-TsOH, MgSO₄, CH₂Cl₂ anh., -35 °C → ta; (f) Na₂SO₃, ácido *L*-ascórbico, Et₃N, MeOH/H₂O.

La actividad biológica de todos los compuestos sintetizados, a excepción del **CBD_{AM1f}**, fue testada en experimentos de inhibición del AMPc (vía de señalización de los CB₂R) a través de la interacción con CB₂R en presencia del agonista sintético JWH-133. Los compuestos con cadena alquílica de entre dos y tres carbonos, **CBD_{AM1b}** y **CBD_{AM1c}** modularon el CB₂R de forma positiva, mientras que los compuestos con cadena alquílica de cuatro carbonos y superior, **CBD_{AM1d}**-**CBD_{AM1f}** y **CBD_{AM2}**, lo hicieron de forma negativa. El **CBD_{AM1c}** resultó ser el mejor PAM de todos los sintetizados, mientras que el **CBD_{AM2}**, en contra de todo pronóstico, mostró la mayor actividad como NAM.

Gracias a estos resultados y las simulaciones de DM se pudo concluir que cuanto más voluminosa es la cadena alquílica terminal del cannabinoide, más se estimula el conformero de la Phe¹¹⁷ en posición *trans*, generando una modulación negativa del receptor. Por otro lado, si la cadena contiene tres carbonos o menos, la Phe¹¹⁷ adopta una posición de *gauche+*, modulando el receptor de forma positiva.

En un estadio superior del proyecto se decidió diseñar una nueva serie de fármacos bitópicos moduladores alostérico-vestíbulo basados en la estructura del PAM **CBD_{AM1c}**, y sobre los cuales se está trabajando actualmente en el grupo de investigación.

V.5 Referencias del capítulo V

- (1) McKim, W. A.; Hancock, S. *In Drugs and Behavior: An introduction to behavioral pharmacology. Chapter 14: Cannabis*, Campanella, C., 7a ed., Pearson, 2013, 312-331.
- (2) Hartsel, J. A.; Eades, J.; Hickory, B.; Makriyannis, A. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity. Chapter 53: Cannabis sativa and hemp*, Ramesh C. Gupta, Elsevier, 2016, 735-754.
- (3) Pertwee, R. G. *Handbook of cannabis*, 1a ed., Pertwee, R. G, Oxford, 2014.
- (4) Russo, E. *Historia Del Cannabis Como Medicamento*, Grupo Ars Xxi de Comunicación, S.L., Barcelona, 2015.
- (5) Ben Amar, M. J. *Ethnopharmacol.* **2006**, *105*, 1–25.
- (6) Gonçalves, E. C. D.; Baldasso, G. M.; Bicca, M. A.; Paes, R. S.; Capasso, R.; Dutra, R. C. *Molecules* **2020**, *25*, 1567-1614.
- (7) Gaoni, Y.; Mechoulam, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1646-1647.
- (8) Adams, R.; Baker, B. R.; Wearn, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 2204-2207.
- (9) Petrzilka, V. T.; Haefliger, W.; Sikemeier, C. *Helv. Chim. Acta.* **1969**, *52*, 1102-1134.
- (10) Iffland, K.; Grotenhermen, F. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2017**, *2*, 139-154.
- (11) White, C. M. *J. Clin. Pharmacol.* **2019**, *59*, 923-934.
- (12) Giacoppo, S.; Bramanti, P.; Mazzon, E. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2017**, *17*, 22-31.
- (13) Billakota, S.; Devinsky, O.; Marsh, E. *Curr. Opin. Neurol.* **2019**, *32*, 220-226.
- (14) Favrat, B.; Ménétrey, A.; Augsburg, M.; Rothuizen, L. E.; Appenzeller, M.; Buclin, T.; Pin, M.; Mangin, P.; Giroud, C. *BMC Psychiatry* **2005**, *5*, 17.
- (15) Rosenberg, E. C.; Patra, P. H.; Whalley, B. J. *Epilepsy Behav.* **2017**, *70*, 319-327.
- (16) McPartland, J. M.; Russo, E. B. *J. Cannabis Ther.* **2001**, *1*, 103-132.
- (17) Schoedel, K. A.; Szeto, I.; Setnik, B.; Sellers, E. M.; Levy-Cooperman, N.; Mills, C.; Etges, T.; Sommerville, K. *Epilepsy Behav.* **2018**, *88*, 162-171.
- (18) Mechoulam, R.; Gaoni, Y. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3273-3275.
- (19) Baek, S. H.; Srebnik, M.; Mechoulam, R. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1083-1086.
- (20) Kupper, R. PCT Int. Appl. WO2006133941A2, 2006.
- (21) Dialer, L.; Petrovic, D.; Weigl, U. PCT Int. Appl. WO2017011210A1, 2017.
- (22) Gong, X.; Sun, C.; Abame, M. A.; Shi, W.; Xie, Y.; Xu, W.; Zhu, F.; Zhang, Y.; Shen, J.; Aisa, H. A. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 2704-2715.
- (23) Kobayashi, Y.; Takeuchi, A.; Wang, Y. G. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2699-2702.
- (24) Shultz, Z. P.; Lawrence, G. A.; Jacobson, J. M.; Cruz, E. J.; Leahy, J. W. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 381-384.
- (25) Pirrung, M. C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12131-12136.

- (26) Mechoulam, R.; Fride, E.; Marzo, V. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *359*, 1-18.
- (27) Mackie, K. J. *Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 10-14.
- (28) Devane, W. A.; Dysarz Iii, F. A.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Howlett, A. C. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605-613.
- (29) Pertwee, R. G. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 199-215.
- (30) Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. *Nature* **1993**, *365*, 61-65.
- (31) Howlett, A. C.; Barth, F.; Bonner, T. I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A.; Felder, C. C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B. R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R. G. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161-202.
- (32) Morales, P.; Reggio, P. H.; Jagerovic, N. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 1-18.
- (33) Thomas, A.; Baillie, G. L.; Phillips, A. M.; Razdan, R. K.; Ross, R. A.; Pertwee, R. G. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 613-623.
- (34) McPartland, J. M.; Duncan, M.; di Marzo, V.; Pertwee, R. G. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 737-753.
- (35) Laprairie, R. B.; Bagher, A. M.; Kelly, M. E. M.; Denovan-Wright, E. M. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 4790-4805.
- (36) Martínez-Pinilla, E.; Varani, K.; Reyes-Resina, I.; Angelats, E.; Vincenzi, F.; Ferreiro-Vera, C.; Oyarzabal, J.; Canela, E. I.; Lanciego, J. L.; Nadal, X.; Navarro, G.; Borea, P. A.; Franco, R. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 744.
- (37) Polini, B.; Cervetto, C.; Carpi, S.; Pelassa, S.; Gado, F.; Ferrisi, R.; Bertini, S.; Nieri, P.; Marcoli, M.; Manera, C. *Life* **2020**, *10*, 1-14.
- (38) Petrucci, V.; Chicca, A.; Glasmacher, S.; Paloczi, J.; Cao, Z.; Pacher, P.; Gertsch, J. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-14.
- (39) Gado, F.; di Cesare Mannelli, L.; Lucarini, E.; Bertini, S.; Cappelli, E.; Digiacomo, M.; Stevenson, L. A.; Macchia, M.; Tuccinardi, T.; Ghelardini, C.; Pertwee, R. G.; Manera, C. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 276-287.
- (40) Hua, T.; Li, X.; Wu, L.; Iliopoulos-Tsoutsouvas, C.; Wang, Y.; Wu, M.; Shen, L.; Brust, C. A.; Nikas, S. P.; Song, F.; Song, X.; Yuan, S.; Sun, Q.; Wu, Y.; Jiang, S.; Grim, T. W.; Benchama, O.; Stahl, E. L.; Zvonok, N.; Zhao, S.; Bohn, L. M.; Makriyannis, A.; Liu, Z. J. *Cell* **2020**, *180*, 655-665.
- (41) González, A.; Perez-Acle, T.; Pardo, L.; Deupi, X. *PLoS One* **2011**, *6*, e23815.
- (42) Kruse, A. C.; Ring, A. M.; Manglik, A.; Hu, J.; Hu, K.; Eitel, K.; Hübner, H.; Pardon, E.; Valant, C.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A.; Felder, C. C.; Gmeiner, P.; Steyaert, J.; Weis, W. I.; Garcia, K. C.; Wess, J.; Kobilka, B. K. *Nature* **2013**, *504*, 101-106.

- (43) Hua, T.; Vemuri, K.; Pu, M.; Qu, L.; Han, G. W.; Wu, Y.; Zhao, S.; Shui, W.; Li, S.; Korde, A.; Laprairie, R. B.; Stahl, E. L.; Ho, J. H.; Zvonok, N.; Zhou, H.; Kufareva, I.; Wu, B.; Zhao, Q.; Hanson, M. A.; Bohn, L. M.; Makriyannis, A.; Stevens, R. C.; Liu, Z. J. *Cell* **2016**, *167*, 750-762.
- (44) McAllister, S. D.; Hurst, D. P.; Barnett-Norris, J.; Lynch, D.; Reggio, P. H.; Abood, M. E. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48024-48037.
- (45) Krishna Kumar, K.; Shalev-Benami, M.; Robertson, M. J.; Hu, H.; Banister, S. D.; Hollingsworth, S. A.; Latorraca, N. R.; Kato, H. E.; Hilger, D.; Maeda, S.; Weis, W. I.; Farrens, D. L.; Dror, R. O.; Malhotra, S. v.; Kobilka, B. K.; Skiniotis, G. *Cell* **2019**, *176*, 448-458.
- (46) Pérez-Benito, L.; Doornbos, M. L. J.; Cordoní, A.; Peeters, L.; Lavreysen, H.; Pardo, L.; Tresadern, G. *Structure* **2017**, *25*, 1153-1162.
- (47) Jung, B.; Lee, J. K.; Kim, J.; Kang, E. K.; Han, S. Y.; Lee, H. Y.; Choi, I. S. *Chem. Asian. J.* **2019**, *14*, 3749-3762.
- (48) Lesch, B.; Toräng, J.; Nieger, M.; Bräse, S. *Synthesis* **2005**, *11*, 1888-1900.
- (49) Poldy, J.; Peakall, R.; Barrow, R. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4296-4300.
- (50) Zysman-Colman, E.; Arias, K.; Siegel, J. S. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 440-447.
- (51) Usami, N.; Okuda, T.; Yoshida, H.; Kimura, T.; Watanabe, K.; Yoshimura, H.; Yamamoto, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1641-1645.
- (52) Beak, S.-H.; Park, N.-Y. Halogenation of Cannabinoids. *J. Korean Chem. Soc.* **1991**, *35*, 59-63.
- (53) Tomanová, M.; Jedinák, L.; Cankař, P. *Green Chem.* **2019**, *21*, 2621-2628.
- (54) Choi, Y. H.; Hazekamp, A.; Peltenburg-Looman, A. M. G.; Frédéricich, M.; Erkelens, C.; Lefebber, A. W. M.; Verpoorte, R. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 345-354.
- (55) Citti, C.; Linciano, P.; Forni, F.; Vandelli, M. A.; Gigli, G.; Laganà, A.; Cannazza, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *175*, 112752.
- (56) Kinney, W. A.; McDonnell, M. E.; Zhong, H. M.; Liu, C.; Yang, L.; Ling, W.; Qian, T.; Chen, Y.; Cai, Z.; Petkanas, D.; Brenneman, D. E. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 424-428.
- (57) Slavov, N.; Cvengroš, J.; Neudörfl, J. M.; Schmalz, H. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7588-7591.
- (58) Lewis, E. D. *The Wolff-Kishner Reduction and Related Reactions*, 1a ed., Elsevier, 2019.
- (59) Burton, J. W. *Reduction of C X to CH₂*; Elsevier Ltd., Oxford, 2014.
- (60) Krishnamurthy, M.; Ferreira, A. M.; Moore, B. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3487-3490.
- (61) McCombie, S. W.; Motherwell, W. B.; Tozer, M. J.; *Org. React.* **2012**, *77*, 164-591.
- (62) Balaydin, H. T.; Gülçin, I.; Menzek, A.; Göksu, S.; Şahin, E. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 685-695.

- (63) Devereaux, J.; Ferrara, S. J.; Banerji, T.; Placzek, A. T.; Scanlan, T. S. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 2459-2465.
- (64) Adlington, M. G.; Orfanopoulos, M.; Fry, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 2955-2958.
- (65) Troupiotis-Tsaïlaki, A.; Zachmann, J.; González-Gil, I.; Gonzalez, A.; Ortega-Gutiérrez, S.; López-Rodríguez, M. L.; Pardo, L.; Govaerts, C. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2020.
- (66) Fronik, P.; Gaiser, B. I.; Sejer Pedersen, D. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4126-4134.
- (67) Zhang, Y.; Gilliam, A.; Maitra, R.; Damaj, M. I.; Tajuba, J. M.; Seltzman, H. H.; Thomas, B. F. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7048-7060.
- (68) Valant, C.; Robert Lane, J.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 153-178.
- (69) Le Naour, M.; Akgün, E.; Yekkirala, A.; Lunzer, M. M.; Powers, M. D.; Kalyuzhny, A. E.; Portoghese, P. S. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5505-5513.
- (70) Stanley, N.; Pardo, L.; De Fabritiis, G. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22639.
- (71) Lane, J. R.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 59-66.
- (72) Wang, C.; Jiang, Y.; Ma, J.; Wu, H.; Wacker, D.; Katritch, V.; Han, G. W.; Liu, W.; Huang, X. P.; Vardy, E.; McCorvy, J. D.; Gao, X.; Zhou, X. E.; Melcher, K.; Zhang, C.; Bai, F.; Yang, H.; Yang, L.; Jiang, H.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C.; Xu, H. E. *Science* **2013**, *340*, 610-614.
- (73) Dror, R. O.; Pan, A. C.; Arlow, D. H.; Borhani, D. W.; Maragakis, P.; Shan, Y.; Xu, H.; Shaw, D. E.; Research, D. E. S.; York, N.; Lefkowitz, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13119.
- (74) Nimczick, M.; Pemp, D.; Darras, F. H.; Chen, X.; Heilmann, J.; Decker, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3938-3946.
- (75) Morales, P.; Navarro, G.; Gómez-Autet, M.; Redondo, L.; Fernández-Ruiz, J.; Pérez-Benito, L.; Cordoní, A.; Pardo, L.; Franco, R.; Jagerovic, N. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 15839-15842.
- (76) Stauch, B.; Johansson, L. C.; McCorvy, J. D.; Patel, N.; Han, G. W.; Huang, X. P.; Gati, C.; Batyuk, A.; Slocum, S. T.; Ishchenko, A.; Brehm, W.; White, T. A.; Michaelian, N.; Madsen, C.; Zhu, L.; Grant, T. D.; Grandner, J. M.; Shiriaeva, A.; Olsen, R. H. J.; Tribo, A. R.; Yous, S.; Stevens, R. C.; Weierstall, U.; Katritch, V.; Roth, B. L.; Liu, W.; Cherezov, V. *Nature* **2019**, *569*, 284-288.
- (77) Masureel, M.; Zou, Y.; Picard, L. P.; van der Westhuizen, E.; Mahoney, J. P.; Rodrigues, J. P. G. L. M.; Mildorf, T. J.; Dror, R. O.; Shaw, D. E.; Bouvier, M.; Pardon, E.; Steyaert, J.; Sunahara, R. K.; Weis, W. I.; Zhang, C.; Kobilka, B. K. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 1059-1066.
- (78) Medina, R. A.; Vázquez-Villa, H.; Gómez-Tamayo, J. C.; Benhamú, B.; Martín-Fontecha, M.; de La Fuente, T.; Caltabiano, G.; Hedlund, P. B.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M. L. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6879-6884.

- (79) Gaiser, B. I.; Danielsen, M.; Marcher-Rørsted, E.; Røpke Jørgensen, K.; Wróbel, T. M.; Frykman, M.; Johansson, H.; Bräuner-Osborne, H.; Gloriam, D. E.; Mathiesen, J. M. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7806-7839.
- (80) Tan, L.; Zhou, Q.; Yan, W.; Sun, J.; Kozikowski, A. P.; Zhao, S.; Huang, X. P.; Cheng, J. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 4579-4602.
- (81) Xuan, M.; Paterson, I.; Dalby, S. M. A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5492-5495.
- (82) Brocksom, T. J.; Zanotto, P. R.; Brocksom, U. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2397-2398.
- (83) Robinson, E. E.; Thomson, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5, 1956-1965.
- (84) Fernandes, R. A.; Gholap, S. P.; Mulay, S. V. *RSC Adv.* **2014** *4*, 16438-16443.
- (85) Jiang, Z. Y.; Wang, Y. G. A Mild *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3859-3861.
- (86) Ku, Y. Y.; Grieme, T.; Raje, P.; Sharma, P.; King, S. A.; Morton, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4282-4286.

Fuentes de las Figuras V

- Figura V-1.** Eugen Köhler, F. recuperada a 5/04/2022 de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cannabis_sativa_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-026.jpg
- Figura V-2.** Figura extraída de la referencia 3.
- Figura V-3.** Coleman, G., Weedmaps, recuperada a 11/04/2022 de <https://elplanteo.com/todo-sobre-el-hashish-hachis-o-hash/>
- Figura V-5.** Tittle, D., recuperada a 13/04/2022 de <https://www.jordigimeno.com/cannabinoides-terpenos-y-el-efecto-sequito/>
- Figura V-6.** Recuperadas a 14/04/2022 de https://www.iqm.csic.es/cannabinoides_y_ppar/nuevos-ligandos-de-los-receptores-cb1-y-cb2/ y <https://bedrocan.com/es/explicacion-de-nuestro-sistema-endocannabinoide/>
- Figura V-26.** Figura extraída de la referencia 67.
- Figura V-27.** Figura extraída de la referencia 75.
- Figura V-28.** Figura extraída y modificada de la referencia 75.

* El resto de las figuras presentes en este capítulo han sido creadas por el autor de la tesis doctoral o extraídas del artículo "Design of negative and positive allosteric modulators of the cannabinoid CB₂ receptor derived from the natural product cannabidiol Navarro, G.; Gonzalez, A.; Sánchez-Morales, A.; Casajuana-Martin, N.; Gómez-Ventura, M.; Cordoní, A.; Busqué, F.; Alibés, R.; Pardo, L.; Franco, R. *J. Med. Chem.* 2021, *64*, 13, 9354-9364", del cual el autor de la tesis es coautor.

Capítulo VI

Experimental Section

VI.1. General procedures

Reagents and solvents

All commercially available reagents were used as received (Merck or Cymit suppliers). Solvents were dried by distillation over the appropriate drying agents: CHCl_3 (CaH_2), CH_2Cl_2 (CaH_2), CH_3CN (CaH_2), THF (Na^0), dioxane (molecular sieve 0.4 nm). When needed, reactions were performed avoiding moisture by standard procedures and under N_2 or Ar atmosphere.

Spectroscopy

Nuclear magnetic resonance spectra (NMR) were registered at the *Servei de Resonància Magnètica Nuclear* of the Universitat Autònoma de Barcelona. ^1H NMR spectra were recorded at Bruker Avance DPX250 (250 MHz), Bruker Ascend 300 (300 MHz), Bruker Avance DPX360 (360 MHz), Bruker Avance III 400sb (400 MHz) and Bruker Ascend 400 (400 MHz) spectrometers. Proton chemical shifts are reported in ppm (δ) (CDCl_3 , 7.26 ppm; CD_2Cl_2 , 5.32 ppm; $\text{MeOD-}d_4$, 3.31 ppm; $\text{DMSO-}d_6$, 2.50 ppm; and acetone- d_6 , 2.06 ppm). ^{13}C NMR spectra were recorded at Bruker Avance DPX250 (62.5 MHz), Ascend 300 (75 MHz), Bruker Avance DPX360 (90.5 MHz), Bruker Avance III 400sb (100.6 MHz) and Bruker Ascend 400 (100.6 MHz) spectrometers. Carbon chemical shifts are reported in ppm (CDCl_3 , 77.2 ppm; CD_2Cl_2 , 53.84 ppm, $\text{MeOD-}d_4$, 49.0 ppm; $\text{DMSO-}d_6$, 39.5 ppm; and acetone- d_6 , 206.7 ppm and 29.9 ppm). ^{19}F NMR spectra were recorded at Bruker Avance DPX250 (250 MHz), Bruker Ascend 300 (300 MHz) spectrometers. NMR signals were assigned with the help of COSY, DEPT135, HSQC, HMBC and NOESY experiments. All spectra were measured at 298 K.

The abbreviations used to describe signal multiplicities are: m (multiplet), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quint. (quintet), sext (sextet), br s (broad singlet), br t (broad triplet), dd (double doublet), dt (double triplet), dq (double quartet), dm (double multiplet), ddt (double double triplet), td (triple doublet) and J (coupling constant).

Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker Tensor 27 Spectrophotometer equipped with a Golden Gate Single Refraction Diamond ATR (Attenuated Total Reflectance) accessory at *Servei d'Anàlisi Química* of the Universitat Autònoma de Barcelona. Peaks are reported in cm^{-1} .

Mass spectrometry

High resolution mass spectrometry (HRMS) were recorded at the *Centro de I+D+I* of the *Parque Científico Tecnológico* of the Burgos University in an Argilent 6454 Q-TP spectrometer with an Argilent Jetstream Technology (AJT) source using Electrospry ionization (ESI); and at *Servei d'Anàlisi Química (SAQ)* of the *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)* in a ICP-MS: coupled inductive plasma mass spectrometer 7500 ce, Agilent Technologies.

Chromatography

All reactions were monitored by analytical **thin-layer chromatography (TLC)** using silica gel 60 F254 pre-coated aluminium plates (0.25 mm thickness). Development was made using an UV lamp at 254 nm and/or using a KMnO₄/KOH aqueous solution or Vanillin solution. **Flash column chromatography** was performed using silica gel (230-400 mesh).

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) were recorded at *Servei d'Anàlisi Química (SAQ)* of the *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)* in a 1200RR Agilent technologies chromatographer with a UV-Vis detector (DAD) and a Luna Omega C18 column chromatography.

Optical rotatory power

Specific optical rotations ($[\alpha]_{D20}$) were measured at 20 ± 2 °C and 589.6 nm using a AUTOPOL I automatic polarimeter of RUDOLPH RESEARCH ANALYTICAL and using a 0.1 dm long cuvette at *Servei d'Anàlisi Química (SAQ)* in the *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)*.

Melting point

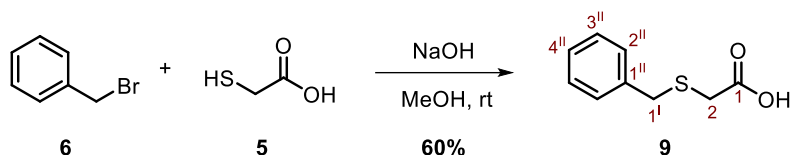
Melting points (MP) were determined on a REICHERT Koffler hot stage melting point apparatus and were not corrected.

In this work some of the compounds prepared were already described in the literature. Therefore, only the physical and/or spectroscopic data necessary for their identification are presented.

VI.2. Experimental procedures of chapter II: antagonists of ASTA-R

VI.2.1 Synthesis of new antagonists of ASTA-R (B compounds)

Synthesis of (benzylsulfanyl)acetic acid, **9**¹

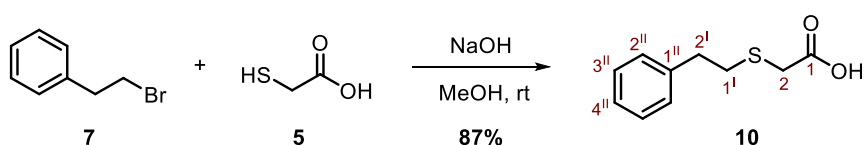


A mixture of benzyl bromide (3.13 mL, 26.32 mmol), thioglycolic acid (1.84 mL, 26.32 mmol) in MeOH (10 mL) was prepared. Then, a solution of NaOH (2.11 g, 52.64 mmol) in MeOH (53 mL) was added slowly and the resulting mixture was stirred during 2 h. After this time, the solvent was removed under vacuum using a rotatory evaporator. The resulting white solid was dissolved in water (100 mL) and cleaned with EtOAc (2 x 75 mL). The aqueous layer was acidified drop by drop with a solution of 1 M HCl until pH 3 and extracted with EtOAc (3 x 75 mL). The whole organic layers were rinsed with brine (100 mL). Finally, the solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting solid was purified by hexane washings to furnish **9** (2.87 g, 15.74 mmol, 60% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **9**¹

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.61 (s, 1H, -COOH), 7.35 - 7.22 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4''), 3.80 (s, 2H, H-2), 3.11 (s, 2H, H-1'). ¹³C NMR (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.3 (C₁), 137.8 (C_{1''}), 129.0 (C_{2''/C_{3''}}), 128.4 (C_{2''/C_{3''}}), 127.0 (C_{4''}), 35.4 (C_{1'}), 32.6 (C₂).

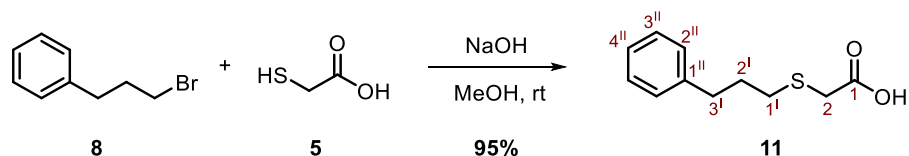
Synthesis of (phenethylsulfanyl)acetic acid, **10**¹



Compound **10** was prepared as described for **9** by using 1-bromo-2-phenylethane (3.28 mL, 24.02 mmol) and thioglycolic acid (2.00 mL, 28.79 mmol) in MeOH (10 mL), and a solution of NaOH (2.19 g, 54.78 mmol) in MeOH (40 mL). The resulting white solid was washed with hexane to furnish **10** (4.10 g, 20.91 mmol, 87% yield).

Physical and spectroscopic data of **10**¹

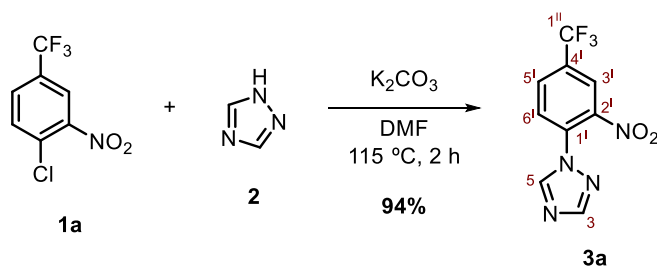
¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.57 (s, 1H, -COOH), 7.31 - 7.18 (m, 5H, H-2^{II}, H-3^{II}, H-4^{II}), 3.26 (s, 2H, H-2), 2.83 (s, 4H, H-1^I, H-2^I). ¹³C NMR (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.6 (C₁), 140.3 (C_{1II}), 128.5 (C_{3II}, C_{2II}), 126.2 (C_{4II}), 34.9 (C_{1I}), 33.2 (C₂, C_{2I}).

Synthesis of ((3-phenylpropyl)sulfanyl)acetic acid, **11**

Compound **11** was prepared as described for **9** by using 1-bromo-3-phenylpropane (5.45 mL, 35.86 mmol) and thioglycolic acid (3.00 mL, 43.18 mmol) in MeOH (20 mL), and a solution of NaOH (3.31 g, 82.76 mmol) in MeOH (60 mL). The resulting colourless oil was identified as **11** (7.18 g, 34.13 mmol, 95% yield).

Physical and spectroscopic data of **11**¹

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.55 (s, 1H, -COOH), 7.30 - 7.16 (m, 5H, H-2^{II}, H-3^{II}, H-4^{II}), 3.23 (s, 2H, H-2), 2.65 (t, *J*_{1,2I} = 7.4 Hz, 2H, H-1^I), 2.58 (t, *J*_{3I,2I} = 7.3 Hz, 2H, H-3^I), 1.82 (m, *J*_{2I,1I} = *J*_{2I,3I} = 7.5 Hz, 2H, H-2^I). ¹³C NMR (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.6 (C₁), 141.4 (C_{1II}), 128.3 (C_{3II}, C_{2II}), 125.8 (C_{4II}), 34.0 (C_{3I}), 33.2 (C₂), 31.3 (C_{2I}), 30.4 (C_{1I}).

Synthesis of 1-(2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-1,2,4-triazole, **3a²**

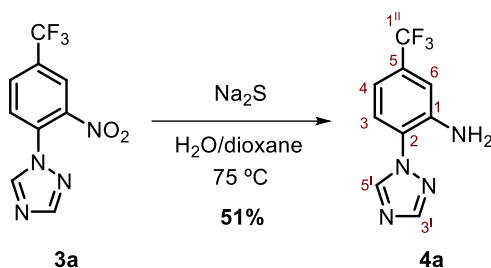
To a solution of 1,2,4-triazole, **2**, (2.04 g, 29.48 mmol) in DMF (3.6 mL) was added 4-chloro-3-nitrobenzotrifluoride, **1a**, (4.00 mL, 27.22 mmol) and was heated to 100 - 105 °C. Once reached that temperature, K₂CO₃ (6.40 g, 48.31 mmol) was added slowly, and the mixture was stirred at 115 °C during 2 h. Then, it was cooled to room temperature and 20 mL of cold water was added. The reaction crude and was extracted with EtOAc (4 x 20 mL) and the combined extracts were cleaned with water (3 x 15 mL) and brine (15 mL). Finally, the organics were dried with anhydrous Na₂SO₄ filtered and

concentrated under vacuum. An orange solid was obtained identified as **3a** (6.61 g, 25.59 mmol, 94% yield).

Physical and spectroscopic data of **3a**²

Mp = 67 - 69 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.51 (s, 1H, H-5), 8.28 (s, 1H, H-3'), 8.12 (s, 1H, H-3), 8.05 (d, *J*_{5l,6l} = 7.2 Hz, 1H, H-5'), 7.81 (d, *J*_{6l,5l} = 7.2 Hz, 1H, H-6'). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ 63.39 (s, -CF₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CD₂Cl₂): δ 153.9 (C₃), 144.4 (C_{2l}), 144.2 (C₅), 133.1 (C_{1l}), 132.4 (q, *J*_{4l,F} = 34.2 Hz, C_{4l}), 130.9 (q, *J*_{5l,F} = 4.5 Hz, C_{5l}), 128.0 (C_{6l}), 123.5 (q, *J*_{3l,F} = 3.6 Hz, C_{3l}), 122.7 (q, *J*_{1ll,F} = 271.8 Hz, C_{1ll}). **IR** (ATR): ν 2999, 1543, 1363, 1322, 1135, 1036 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₉H₅F₃N₄O₂+H]⁺: 259.0443, found [M+H]⁺: 259.0442.

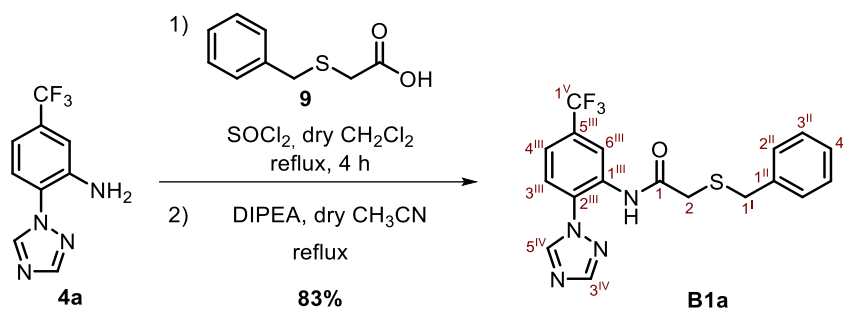
Synthesis of 2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)aniline, **4a**



Compound **3a** (9.98 g, 38.65 mmol) and Na₂S (3.02 g, 38.60 mmol) were dissolved with a 1:1 degassed mixture of dioxane and water (140 mL) under N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated to 75 - 80 °C and stirred over 2 h. Another portion of Na₂S (1.50 g, 19.25 mmol) was added and the mixture was stirred 1 h. Then, the reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (15 mL) and the crude product was extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic layers were cleaned with water (3 x 20 mL) and brine (20 mL). Then, it was dried over anhydrous Na₂SO₄, and the solvent was removed under vacuum. The resulting orange oil was purified by column chromatography (EtOAc/hexanes, 1:1 → 1:2) to furnish a yellow solid identified as **4a** (4.48 g, 19.65 mmol, 51% yield).

Physical and spectroscopic data of **4a**²

Mp = 122 - 123 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.44 (s, 1H, H-5'), 8.15 (s, 1H, H-3'), 7.34 (d, *J*_{3,4} = 8.3 Hz, 1H, H-3), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.04 (d, *J*_{4,3} = 8.3 Hz, 1H, H-4), 4.97 (s, 2H, -NH₂). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ 63.53 (s, -CF₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CD₂Cl₂): δ 153.0 (C_{3l}), 143.9 (C_{5l}), 141.8 (C₁), 131.9 (q, *J*_{5,F} = 33.5 Hz, C₅), 125.2 (C₂), 124.8 (C₃), 124.1 (q, *J*_{1ll,F} = 270.5 Hz, C_{1ll}), 114.6 (q, *J*_{4,F} = 4.1 Hz, C₄), 114.4 (q, *J*_{6,F} = 3.5 Hz, C₆). **IR** (ATR): ν 3432, 3320, 1635, 1456, 1344, 1271, 1149, 1102, 958 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₉H₇F₃N₄+H]⁺: 229.0701; found [M+H]⁺: 229.0699.

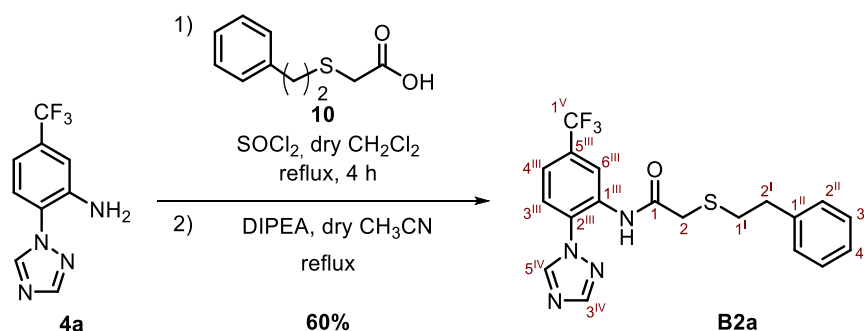
Synthesis of *N*-(2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)-2-(benzylthio)acetamide, **B1a**

To a solution of compound **9** (807 mg, 4.43 mmol), DMF (4 drops) in dry CH_2Cl_2 (8 mL) under N_2 atmosphere, SOCl_2 (0.95 mL, 13.09 mmol) was added dropwise, and the mixture was heated to reflux conditions during 4 h. After that, the solvent was removed under reduced pressure and the crude was redissolved in dry CH_2Cl_2 (8 mL), and the corresponding solution concentrated again under reduced pressure. This operation was repeated 3 times in order to remove the traces of SOCl_2 and the obtained acyl chloride was solved in anhydrous CH_3CN (10 mL) under N_2 atmosphere conditions. In another round bottom flask, DIPEA (0.77 mL, 4.42 mmol) was added to a solution of compound **4a** (501 mg, 2.20 mmol) in dry CH_3CN (10 mL) under N_2 atmosphere. This mixture was heated to reflux temperature, and the acyl chloride solution was slowly added in small portions (1.5 mL) every 15 min. Next, the mixture was let stirred during overnight at rt. The reaction was quenched with water (30 mL) and diluted with CH_2Cl_2 (30 mL). The organic layer was separated and cleaned with water (2 x 30 mL) and brine (30 mL), dried with anhydrous Na_2SO_4 and removed under vacuum. The brown oil obtained was purified by column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$, 2:1) to furnish **B1a** (713 mg, 1.82 mmol, 83% yield) as a pale brown solid.

Physical and spectroscopic data of **B1a**

Mp = 104 - 107 °C (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, CD_2Cl_2): δ 10.51 (s, 1H, -NHCO-), 8.82 (s, 1H, H-6^{III}), 8.53 (s, 1H, H-5^{IV}), 8.24 (s, 1H, H-3^{IV}), 7.54 (m, $J_{3\text{III},4\text{III}} = 8.3$ Hz, 1H, H-3^{III}), 7.50 (m, $J_{4\text{III},3\text{III}} = 8.3$ Hz, 1H, H-4^{III}), 7.28 - 7.16 (m, 5H, 2xH-2^{II}, 2xH-3^{II}, H-4^{II}), 3.72 (s, 2H, H-1^I), 3.27 (s, 2H, H-2). **$^{19}\text{F NMR}$** (250 MHz, CDCl_3): δ 63.30 (s, -CF₃). **$^{13}\text{C NMR}$** (90.5 MHz, CD_2Cl_2): δ 168.1 (C₁), 153.6 (C_{3IV}), 144.3 (C_{5IV}), 137.2 (C_{1II}), 132.6 (C_{1III}), 131.5 (q, $J_{5\text{III},\text{F}} = 32.5$ Hz, C_{5III}), 129.4 (C_{2II}), 128.9 (C_{3II}), 128.7 (C_{2III}), 127.7 (C_{4II}), 123.9 (q, $J_{1\text{V},\text{F}} = 270.9$ Hz, C_{1V}), 123.9 (C_{3III}), 121.4 (q, $J_{4\text{III},\text{F}} = 3.9$ Hz, C_{4III}), 120.2 (q, $J_{6\text{III},\text{F}} = 4.1$ Hz, C_{6III}), 37.4 (C_{1I}), 37.0 (C₂). **IR** (ATR): ν 3286, 1687, 1531, 1476, 1435, 1330, 1132 cm^{-1} . **HRMS** (ESI⁺): calcd. for $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_4\text{OS}+\text{H}]^+$: 393.0997; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 393.0991.

Synthesis of *N*-(2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)-2-(phenethylthio)acetamide, **B2a**

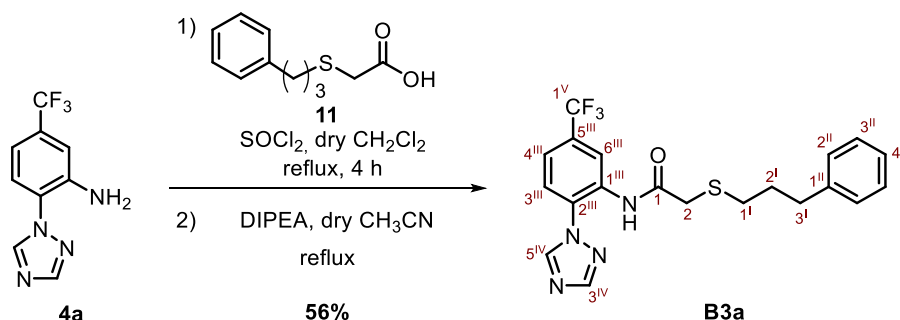


Compound **B2a** was prepared as described for **B1a** by using compound **10** (739 mg, 3.94 mmol), SOCl_2 (0.93 mL, 12.86 mmol) and DMF (5 drops) in dry CH_2Cl_2 (7 mL). The resulting acyl chloride was solved in dry CH_3CN (10 mL) and was added in a solution of compound **4a** (224 mg, 0.98 mmol), DIPEA (0.35 mL, 2.04 mmol) in dry CH_3CN (5 mL). The brown oil obtained was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}/\text{hexanes}$, 2:1:0.5) to furnish **B2a** (238 mg, 0.59 mmol, 60% yield) as pale-yellow solid.

Physical and spectroscopic data of **B2a**

Mp = 70 - 72 °C (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 10.60 (s, 1H, $-\text{NHCO}-$), 8.89 (s, 1H, H-6^{III}), 8.51 (s, 1H, H-5^{IV}), 8.22 (s, 1H, H-3^{IV}), 7.55 (m, $J_{3\text{III},4\text{III}} = 8.4$ Hz, 1H, H-3^{III}), 7.51 (m, $J_{4\text{III},3\text{III}} = 8.5$ Hz, 1H, H-4^{III}), 7.30 - 7.17 (m, 5H, 2xH-2^{II}, 2xH-3^{II}, H-4^{II}), 3.37 (s, 2H, H-2), 2.86 (s, 2H, H-2^I), 2.77 (s, 2H, H-1^I). **$^{19}\text{F NMR}$** (250 MHz, CDCl_3): δ 63.29 (s, $-\text{CF}_3$). **$^{13}\text{C NMR}$** (100.6 MHz, CD_2Cl_2): δ 168.5 (C_1), 153.8 ($\text{C}_{3\text{IV}}$), 144.4 ($\text{C}_{5\text{IV}}$), 140.4 ($\text{C}_{1\text{II}}$), 132.9 ($\text{C}_{1\text{III}}$), 131.8 (q, $J_{5\text{III},\text{F}} = 33.2$ Hz, $\text{C}_{5\text{III}}$), 129.0 (5C, $\text{C}_{2\text{III}}$, 2x $\text{C}_{2\text{II}}$, 2x $\text{C}_{3\text{II}}$), 127.0 ($\text{C}_{4\text{II}}$), 124.3 ($\text{C}_{3\text{III}}$), 124.1 (q, $J_{1\text{V},\text{F}} = 273.0$ Hz, $\text{C}_{1\text{V}}$), 121.6 (q, $J_{4\text{III},\text{F}} = 4.1$ Hz, $\text{C}_{4\text{III}}$), 120.4 (q, $J_{6\text{III},\text{F}} = 4.1$ Hz, $\text{C}_{6\text{III}}$), 37.9 (C_2), 36.0 ($\text{C}_{2\text{I}}$), 34.8 ($\text{C}_{1\text{I}}$). **IR** (ATR): ν 3275, 1687, 1536, 1479, 1434, 1333, 1124 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{OS}+\text{H}]^+$: 407.1153; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 407.1151.

Synthesis of *N*-(2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)-2-((3-phenylpropyl)thio)acetamide, **B3a**

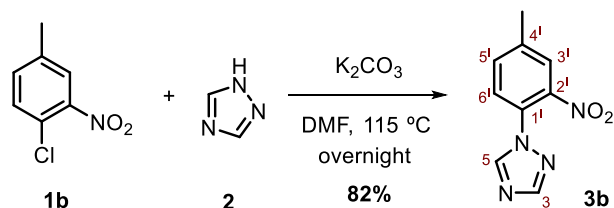


Compound **B3a** was prepared as described for **B1a** by using compound **11** (832 mg, 3.95 mmol), SOCl_2 (0.75 mL, 10.38 mmol) and DMF (5 drops) in dry CH_2Cl_2 (8 mL). The resulting acyl chloride was solved in dry CH_3CN (10 mL) and was added in a solution of compound **4a** (448 mg, 1.96 mmol), DIPEA (1.00 mL, 5.74 mmol) in dry CH_3CN (10 mL). The brown oil obtained was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$, 2:1) to furnish **B3a** (463 mg, 1.10 mmol, 56% yield) as pale-yellow solid.

Physical and spectroscopic data of B3a

Mp = 78 - 80 °C (from CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 10.60 (s, 1H, -NHCO-), 8.87 (s, 1H, H-6^{III}), 8.48 (s, 1H, H-5^{IV}), 8.24 (s, 1H, H-3^{IV}), 7.55 (m, $J_{3\text{III},4\text{III}} = 8.4$ Hz, 1H, H-3^{III}), 7.52 (m, $J_{4\text{III},3\text{III}} = 8.5$ Hz, $J_{4\text{III},6\text{III}} = 1.8$ Hz, 1H, H-4^{III}), 7.26 - 7.13 (m, 5H, 2xH-2^{II}, 2xH-3^{II}, H-4^{II}), 3.37 (s, 2H, H-2), 2.66 (m, $J_{3\text{I},2\text{I}} = 7.4$ Hz, 2H, H-3^I), 2.51 (m, $J_{1\text{I},2\text{I}} = 7.6$ Hz, 2H, H-1^I), 1.86 (m, $J_{2\text{I},1\text{I}/3\text{I}} = 7.6$ Hz, 2H, H-2^I). $^{19}\text{F NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 63.27 (s, - CF_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CD_2Cl_2): δ 168.7 (C₁), 153.8 (C_{3IV}), 144.4 (C_{5IV}), 141.8 (C_{1II}), 132.9 (C_{1III}), 131.8 (q, $J_{5\text{III},\text{F}} = 32.9$ Hz, C_{5III}), 129.0 (C_{2III}), 128.9 (4C, 2xC_{2II}, 2xC_{3II}), 126.5 (C_{4II}), 124.3 (C_{3III}), 124.1 (q, $J_{1\text{V},\text{F}} = 272.0$ Hz, C_{1V}), 121.6 (q, $J_{4\text{III},\text{F}} = 4.2$ Hz, C_{4III}), 120.4 (q, $J_{6\text{III},\text{F}} = 4.2$ Hz, C_{6III}), 37.8 (C₂), 35.0 (C_{3I}), 32.8 (C_{1I}), 31.1 (C_{2I}). **IR** (ATR): ν 3186, 1690, 1533, 1479, 1426, 1330, 1170, 1127 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}+\text{H}]^+$: 421.1310; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 421.1308.

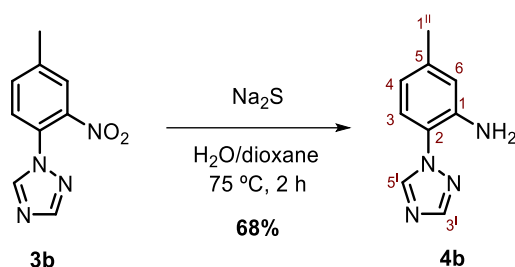
Synthesis of 1-(4-methyl-2-nitrophenyl)-1H-1,2,4-triazole, **3b**



To a solution of 1,2,4-triazole, **2**, (137 mg, 1.98 mmol) in DMF (0.25 mL) was added 4-chloro-3-nitrotoluene, **1b**, (0.24 mL, 1.80 mmol) and was heated to 105 °C. Once reached that temperature, K_2CO_3 (438 mg, 3.08 mmol) was added slowly and the mixture was heated to 115 °C and stirred for 6 hours. Then, another portion of 1,2,4-triazole (130 mg, 1.88 mmol) and DMF (0.25 mL) was added and the mixture was stirred overnight. The crude was cooled to room temperature and poured into a beaker with water/ice (10 mL). The resulting suspension was extracted with EtOAc (3 x 15 mL) and cleaned with brine (15 mL). Finally, the organic layers were dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The resulting red oil was purified by column chromatography (EtOAc/hexanes, 1:1) to obtain **3b** (301 mg, 1.47 mmol, 82% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of 3b

Mp = 65 - 67 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (s, 1H, H-5), 8.09 (s, 1H, H-3), 7.83 (m, *J*_{3,5l} = 1.2 Hz, 1H, H-3^l), 7.54 (dm, *J*_{5l,6l} = 8.1 Hz, *J*_{5l,3l} = 1.2 Hz, 1H, H-5^l), 7.44 (d, *J*_{6l,5l} = 8.1 Hz, 1H, H-6^l), 2.52 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 153.1 (C₃), 144.5 (C_{2l}), 144.0 (C₅), 141.7 (C_{4l}), 134.3 (C_{5l}), 127.9 (C_{1l}), 127.5 (C_{6l}), 125.9 (C_{3l}), 21.2 (-CH₃). **IR** (ATR): ν 3113, 1533, 1355, 1278, 1142, 1042 cm⁻¹. **¹HRMS** (ESI+): calcd. for [C₉H₈N₄O₂+H]⁺: 205.0726; found [M+H]⁺: 205.0724.

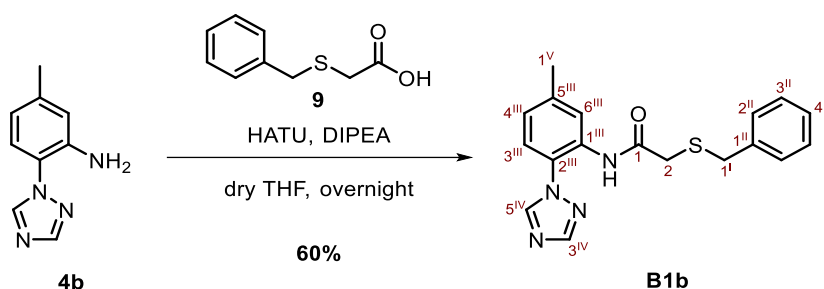
Synthesis of 5-methyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)aniline, 4b

Compound **3b** (5.00 g, 24.49 mmol) and Na₂S (2.87 g, 36.77 mmol) were dissolved with a 1:1 degassed mixture of dioxane and water (100 mL) under N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated to 75 °C and stirred over 1 h. Then, a second portion of Na₂S (956 mg, 12.25 mmol) was added and the mixture was stirred 1 h. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (15 mL) and the crude product was extracted with AcOEt (3 x 100 mL). The combined organic layers were cleaned with water (2 x 150 mL) and brine (250 mL). Then, it was dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum. The resulting yellow solid was purified by column chromatography (EtOAc/hexanes, 2:1) to **4b** (2.91 g, 16.70 mmol, 68% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of 4b

Mp = 134 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.31 (s, 1H, H-5^l), 8.12 (s, 1H, H-3^l), 7.05 (d, *J*_{3,4} = 8.0 Hz, 1H, H-3), 6.66 (s, 1H, H-6), 6.60 (d, *J*_{4,3} = 8.0 Hz, 1H, H-4), 4.41 (s, 2H, -NH₂), 2.30 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 152.4 (C_{3l}), 143.4 (C_{5l}), 140.9 (C₁), 140.4 (C₅), 124.3 (C₃), 120.7 (C₂), 119.3 (C₄), 117.9 (C₆), 21.3 (-CH₃). **IR** (ATR): ν 3422, 3336, 3118, 1631, 1518, 1276, 1137 cm⁻¹. **¹HRMS** (ESI+): calcd. for [C₉H₁₀N₄+H]⁺: 175.0984; found [M+H]⁺: 175.0980.

Synthesis of 2-(benzylthio)-*N*-(5-methyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)acetamide, **B1b**

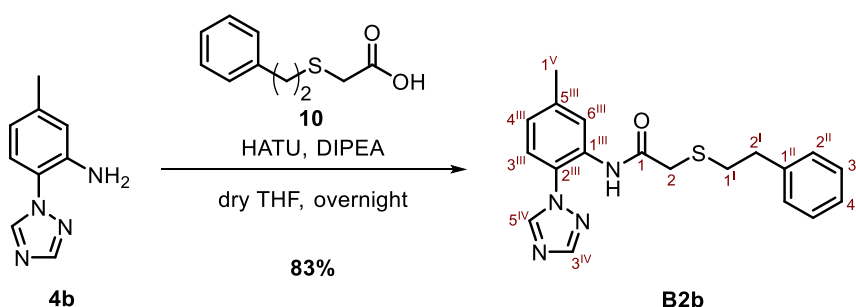


To a solution of compound **9** (514 mg, 2.82 mmol) and HATU (1.05 g, 2.76 mmol) in anhydrous THF (16 mL) and anhydrous DMF (2 mL), DIPEA (1.50 mL, 7.60 mmol) was added under N₂ atmosphere and the mixture was stirred for 30 minutes. Then, another solution of amine **4b** (307 mg, 1.76 mmol) in anhydrous THF (5 mL) under N₂ atmosphere was prepared and added to the previous solution. The reacting mixture was stirred overnight, quenched with water (20 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). The combined organic extracts were cleaned with brine (75 mL), dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The obtained brown oil was purified by column chromatography (EtOAc/hexanes, 1:1) to furnish **B1b** (401 mg, 1.19 mmol, 60% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **B1b**

Mp = 104 - 106 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, acetone-*d*₆): δ 9.97 (s, 1H, -NHCO-), 8.79 (s, 1H, H-5^{IV}), 8.22 (s, 1H, H-6^{III}), 8.22 (s, 1H, H-3^{IV}), 7.47 (m, *J*_{3^{III},4^{III}} = 8.1 Hz, 1H, H-3^{III}), 7.29 - 7.19 (m, 5H, 2xH-2^{II}, 2xH-3^{II}, H-4^{II}), 7.11 (m, *J*_{4^{III},3^{III}} = 8.1 Hz, 1H, H-4^{III}), 3.75 (s, 2H, H-1^I), 3.26 (s, 2H, H-2), 2.41 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, acetone-*d*₆): δ 168.0 (C₁), 153.5 (C_{3^{IV}}), 145.3 (C_{5^{IV}}), 140.3 (C_{5^{III}}), 138.4 (C_{1^{II}}), 132.7 (C_{1^{III}}), 129.9 (C_{2^{II}}), 129.3 (C_{3^{II}}), 127.9 (C_{4^{II}}), 125.9 (C_{4^{III}}), 125.8 (C_{2^{III}}), 125.0 (C_{3^{III}}), 124.1 (C_{6^{III}}), 37.0 (C₁), 36.5 (C₂), 36.5 (-CH₃). **IR** (ATR): ν 3273, 1673, 1592, 1538, 1498, 1374, 1141 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₁₈N₄OS+Na]⁺: 361.1099; found [M+Na]⁺: 361.1097.

Synthesis of *N*-(5-methyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)-2-(phenethylthio)acetamide, **B2b**

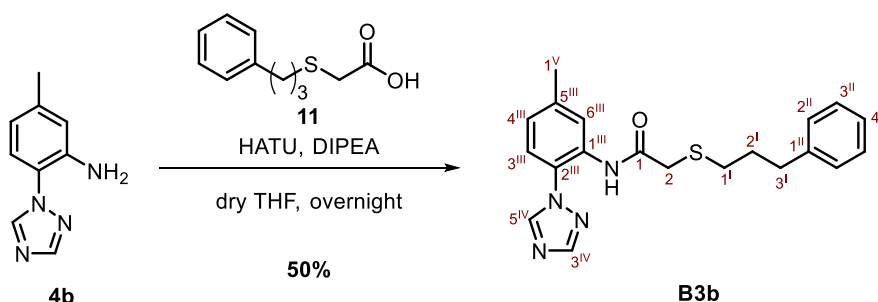


Compound **B2b** was prepared as described for **B1b** by using a solution of compound **10** (518 mg, 2.64 mmol), HATU (1.00 g, 2.63 mmol) and DIPEA (1.2 mL, 6.9 mmol) in anhydrous THF (17 mL) and anhydrous DMF (2 mL). The activated acid solution was added to a solution of amine **4b** (306 mg, 1.76 mmol) in dry THF (8 mL). The obtained brown oil was purified by column chromatography (EtOAc/hexanes, 1:1) to furnish **B2b** (514 mg, 1.46 mmol, 83% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of B2b

Mp = 109 - 110 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CD₂Cl₂): δ 10.07 (s, 1H, -NHCO-), 8.39 (s, 1H, H-5^{IV}), 8.26 (s, 1H, H-6^{III}), 8.15 (s, 1H, H-3^{IV}), 7.30 - 7.16 (m, 6H, H-3^{III}, 2xH-2^{II}, 2xH-3^{II}, H-4^{II}), 7.07 (m, *J*_{4^{III},3^{III}} = 8.1 Hz, 1H, H-4^{III}), 3.31 (s, 2H, H-2), 2.81 (s, 2H, H-2'), 2.71 (s, 2H, H-1'), 2.43 (s, 1H, -CH₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CD₂Cl₂): δ 167.8 (C₁), 153.2 (C_{3^{IV}}), 144.1 (C_{5^{IV}}), 140.7 (C_{5^{III}}), 140.3 (C_{1^{II}}), 131.9 (C_{1^{III}}), 128.8 (4C, 2xC_{2^{II}}, 2xC_{3^{II}}), 126.8 (C_{4^{II}}), 125.6 (C_{3^{III}}), 124.6 (C_{2^{III}}), 123.9 (C_{4^{III}}), 123.7 (C_{6^{III}}), 37.7 (C₂), 35.8 (C_{2'}), 34.6 (C_{1'}), 21.7 (-CH₃). **IR** (ATR): ν 3277, 1683, 1588, 1529, 1482, 1280 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₉H₂₀N₄OS+H]⁺: 353.1436; found [M+H]⁺: 353.1433.

Synthesis of *N*-(5-methyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)-2-((3-phenylpropyl)thio)acetamide, B3b



Compound **B3b** was prepared as described for **B1b** by using a solution of compound **11** (197 mg, 0.94 mmol), HATU (360 mg, 0.94 mmol) and DIPEA (0.44 mL, 2.50 mmol) in anhydrous THF (5 mL) and anhydrous DMF (1 mL). The activated acid solution was added to a solution of amine **4b** (109 mg, 0.63 mmol) in dry THF (5 mL). The obtained brown oil was purified by column chromatography (EtOAc/hexanes, 1:1) to furnish **B3b** (120 mg, 0.31 mmol, 50% yield) as white solid.

Physical and spectroscopic data of B3b

Mp = 78 - 80 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 10.06 (s, 1H, -NHCO-), 8.35 (s, 1H, H-5^{IV}), 8.24 (s, 1H, H-6^{III}), 8.16 (s, 1H, H-3^{IV}), 7.27 - 7.14 (m, 6H, H-3^{III}, 2xH-2^{II}, 2xH-3^{II}, H-4^{II}), 7.07 (m, *J*_{4^{III},3^{III}} = 8.2 Hz, *J*_{4^{III},6^{III}} = 1.2 Hz, 1H, H-4^{III}), 3.30 (s, 2H, H-2), 2.65 (m, *J*_{3',2'} = 7.5 Hz, 2H, H-3'), 2.46 (m, *J*_{1',2'} = 7.6 Hz, 2H, H-1'), 2.44 (s, 3H, -CH₃), 1.84 (m, *J*_{2',1'/3'} = 7.5 Hz, 2H, H-2'). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CD₂Cl₂): δ 168.0 (C₁), 153.2 (C_{3^{IV}}), 144.1 (C_{5^{IV}}), 141.7 (C_{1^{II}}), 140.7 (C_{5^{III}}), 132.0 (C_{1^{III}}), 128.8 (C_{2^{II}}/C_{3^{II}}), 128.7 (C_{2^{II}}/C_{3^{II}}), 126.3

(C_{4II}), 125.6 (C_{4III}), 124.7 (C_{2III}), 123.9 (C_{3III}), 123.8 (C_{6III}), 37.6 (C₂), 35.0 (C_{3I}), 32.7 (C_{1I}), 31.0 (C_{2I}), 21.7 (-CH₃). **IR** (ATR): ν 2946, 1688, 1593, 1542, 1509, 1414, 1283, 1112 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₂₀H₂₂N₄OS+H]⁺: 367.1593; found [M+H]⁺: 367.1591.

VI.2.2. Computational simulations, *in silico*

These assays were performed by Dr. Minos-Timotheos Matsoukas and Dr. Arnau Cordoní at the *Unitat de Bioestadística* (UAB). An homology model of the honey bee allatostatin A receptor ASTA-R (NCBI: XP_006560262.1) was created using Modeller 9.12³ based on the crystal structure of the antagonist-bound human δ -opioid receptor (PDB: 4N6H).⁴ It has been constructed a pharmacophore model based on Electrostatic Maps (hydrophobic, hydrogen bond donor and hydrogen bond acceptor) as implemented in MOE 2013.08 (Molecular Operating Environment, Chemical Computing) which consisted in 12 pharmacophore features: 7 hydrophobic, 4 hydrogen bond acceptors and 1 hydrogen bond donors. Discovery Studio 3.5 software (Accelrys Software Inc., Discovery Studio Environment) was used for the virtual screening of ~ 5.5 million compounds from a filtered subset of the ZINC database⁵ using all pharmacophore models resulting from combinations of 5 to 7 pharmacophoric features out of the 12. To avoid steric clashes with the receptor, it has been used exclusion volumes derived from the receptor model. The fit value scoring was used to rank the compounds from best to worst fitting. Molecular dockings of the active compounds were performed with MOE 2016.08 using the Alpha Triangle method. The conformers were ranked by London dG scoring function to estimate the free energy of binding of the ligand from a given pose.

VI.2.3. Biological experiments with A and B compounds

VI.2.3.1. *In vitro* assays with A and B compounds

These experiments were performed by Dra. Véronique Gigoux and Dr. Daniel Fourmy at CRCT. A subset of compounds selected from the screening (compounds **A**) were tested in a competition binding assay with ¹²⁵I-allatostatin A transfected with ASTA-R. HEK293T cells were grown onto 60 mm diameter culture dishes for 24 h in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂. Cells were transfected using Lipofectamin 2000 (Invitrogen Life Technologies) following provider's instructions (1 μ g DNA/ 3 μ l Lipofectamin 2000). 24 h later, cells were transferred to 24-well plates and incubated for 24 h. Cells were incubated for 60 min at 37 °C in 0.5 mL DMEM containing 0.1% bovine serum albumin with 5 nM of high-performance liquid chromatography-purified Allatostatin-Dy647 (for compounds **B**), (NHSDY647-PEG1, Dyomics GmbH, Jena, Germany) or ¹²⁵I-Allatostatin (for compounds **A**), in the presence or in the absence of increased concentrations of unlabeled antagonists or allatostatin.

GRQPYSFGL-amide was used, the most abundant isoform of allatostatin A in the brain, which already proved effective both *in vitro* and *in vivo*.⁶ Cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 2% bovine serum albumin and once with cold phosphate-buffered saline, pH 7.4.

For binding studies using ¹²⁵I-Allatostatin (for compounds **A**), cell-associated radioligand was collected by cell lysis with 0.1 N NaOH and the radioactivity was directly counted in a gamma counter (Auto-Gamma, Packard). For binding studies using allatostatin-Dy647 (for compounds **B**), cells were recovered, transferred to flow cytometer tubes and cell-associated fluorescence was determined using a BD FACSCalibur™ flow cytometer. IC₅₀ (concentration inhibiting half of specific binding) was calculated using the non-linear curve fitting software GraphPad Prism (San Diego, CA).

VI.2.3.2. *In vivo* assays with bees and A and B compounds

The new generation of compounds **B** *in vivo* assays were performed by my own in a stay abroad at *Centre the Recherchers sur la Cognition Animale* (CRCA) in Paul Sabatier University between May-June of 2018. This kind of experiments were carried out during the spring because it is the time of the year were forager bees have their maximum activity. It was important to follow every day the same timetable, and more or less the same weather conditions, to have reproducible results. Bees are very sensitive to weather changes.

General procedure for prepare bees to a behavioural experiment

1. (8:00 h) Bees were collected early in the morning from the university apiary (more or less 50 bees/experiment). It was necessary to wear an approved beekeeper suit and use a smoker. Bees were collected in glass vials with capacity of 5/6 bees each one and with a leaky plug to let them breath. After that they were transferred to the laboratory.
2. (9:00 h) Bees were cold-anesthetized introducing the vials in a portable fridge full of crushed ice during 10 minutes. It allows their manipulation without being bitted by them. More than 20 minutes in cold makes the bees die.
3. Once the bees fallen asleep, they were mounted in restraining holders (Figure VI-1). (10:00 h) Their heads were fixed to the harness using their own wax with a tin welder at 100 °C.

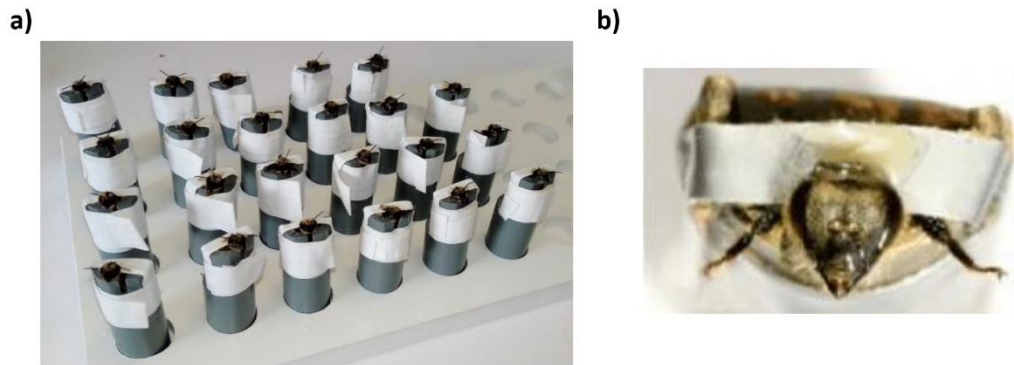


Figure VI-1. a) Bees mounted in PVC restraining holders with scotch tape. b) Aerial view of a bee put on its harness. It can be observed the wax fixation to the scotch tape behind its head to immobilize it.

4. (10:30 h) Bees were fed with 3 μL of 50% sucrose solution in water using a micropipette. Bee's antennae have several sucrose receptors that if they get in contact with sugar (micropipette tip), bees release their proboscides. A solution little drop was put on their proboscides to feed them.
5. (11:00 h) With a microscope and a needle, the central ocellus of the bee's head was removed, to open a direct entry route to the haemolymph that surrounds the brain.
6. (12:20 h) Bees were fed another time with 2 μL of 50% sucrose solution in water using a micropipette and left them rest in a dark and humid place.
7. (13:45 h) Finally, the injection of 0.2 μL of a well-known concentration solution of any compound to study (e.g. compounds **B**) in PBS (it can be used <2% of DMSO to improve solubility) or control solution (only PBS or PBS/DMSO) with a microsyringe through the ocellus hole made before. The placement of the needle into the hole was done with the help of a microscope (Figure VI-2).

SRS assays

8. (14:30 h) **Exposure to IPA.** A 1 x 3 cm filter paper was placed in a vial and it was impregnated with 25 μL of a 24% IPA solution in paraffin oil using a micropipette. The immobilized bee was placed inside the vial facing away from the filter paper. The vial was closed with a leaky plug and the bee was left to rest in the dark for 30 min. After this time, the bee was removed from the vial and left to rest in a dark and humid place for 15 min.

9. (15:15 h) Bees were given water to satiety with the help of a micropipette and are left to rest again for 15 min in a humid and dark place.
10. (15:30 h) **SRS assay**. All subjects were placed in the same row and their antennae were stimulated with a stick impregnated in different concentration sucrose/water solutions (0.1%, 0.3%, 1%, 3%, 10%, 30%). The main objective was to observe if they released their proboscides when the antennae was stimulated, what a good appetite means. It was started with the lowest concentration solution and it was increased. Between testing of each concentration, an extra test was done with sticks dipped in mineral water in order to find out the bees which respond to an antennae stimulus regardless of whether it was sugar or water.
11. Once the study was finished, a last stimulation with a 50% sucrose solution was done to see what bees do not respond to any stimulus (50% sucrose is a high stimulus to which any subjects would react regardless of whether the effect of stress).
12. (16:30 h) Finally, experimental bees were euthanized by placing them into a freezer at negative temperature during 24 h.



Figure VI-2. Microscope with holder for microsyringes on the right.

Assessment of learning performance for compound **A8**

These experiments were performed by Dr. Jean Marc Devaud at *CRCA* in Paul-Sabatier III University (Toulouse). Bees were injected with **A8** diluted in phosphate buffer saline (PBS) or PBS alone for controls (0.2 μ L in the head capsule), 1 h after feeding. One hour later, they were exposed for 15 min to isopentyl acetate (IPA, 24% in paraffin oil), and underwent a 3-trial olfactory conditioning 45 min later. Briefly, on each trial they were trained to associate an odorant (1-hexanol or 1-nonanol, presented for 4 s) with a sucrose reward (delivered for 3 s). Extension of the proboscis (mouthparts) during the odor presentation and before the reward delivery was counted as a conditioned response. Details of the protocol can be found elsewhere.⁶ Bees not responding to sucrose alone were discarded.

VI.2.3.3 Statistical analysis

Learning performance of compound **A8** was measured, for each treatment group, as the percentage of bees displaying a conditioned response at the corresponding trial. The effect of treatment on

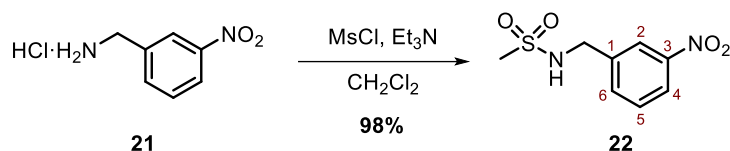
learning performance was assessed using a one-factor ANOVA on the proportions of conditioned responses by the end of conditioning (3rd trial). Appetitive responses were analyzed in two ways. For each treatment of compounds **B**, an individual SRS (ranging between 0 and 6) was calculated as the sum of PER displayed over the 6 sucrose presentations. For each tested molecule, effects of molarity were assessed by comparing percentages of responses to increasing sucrose concentrations with a repeated-measure ANOVA, as well as average SRS values with a one-factor ANOVA. Multiple comparisons were applied using a Bonferroni correction.

VI.3. Experimental procedures of chapter III: inhibitors of CN-NFATc signalling

VI.3.1. Synthesis of new CN-NFATc signalling inhibitors

VI.3.1.1. Synthesis of compounds of family C1

Synthesis of *N*-(3-nitrobenzyl)methanesulfonamide, **22**

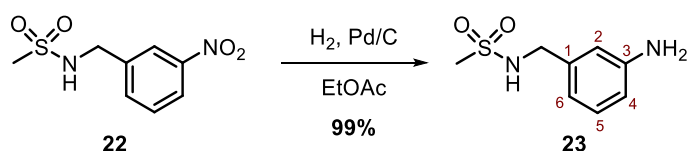


To a solution of 3-nitrobenzylamine hydrochloride, **21**, (730 mg, 3.87 mmol) in CH_2Cl_2 (25 mL), Et_3N (1.10 mL, 7.74 mmol) and then MsCl (0.32 mL, 4.06 mmol) were sequentially added. The mixture was stirred at room temperature for 10 min. Then, the reaction was quenched with water (25 mL), and the layers were separated. The organic one was washed with brine (2 x 25 mL), dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to obtain the sulphonamide **22** (864 mg, 3.75 mmol, 98% yield) as a yellow solid

Physical and spectroscopic data of **22**

Mp = 75 - 78 °C (from CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.30 (s, 1H, H-2), 8.16 (d, $J_{4,5} = 7.9$ Hz, 1H, H-4), 7.87 (d, $J_{6,5} = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 7.67 (t, $J_{5,4} = J_{5,6} = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 6.74 (br s, 1H, -NH-), 4.50 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}} = 6.5$ Hz, 2H, - CH_2 -), 2.97 (s, 3H, - CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, acetone- d_6): δ 149.3 (C_3), 142.0 (C_1), 134.9 (C_5), 130.6 (C_6), 123.2 (C_2), 123.0 (C_4), 46.6 (- CH_2 -), 40.5 (- SO_2CH_3). **IR** (ATR): ν 3231, 1527, 1352, 1300, 1138 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}+\text{Na}]^+$: 253.0259; found $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 253.0254.

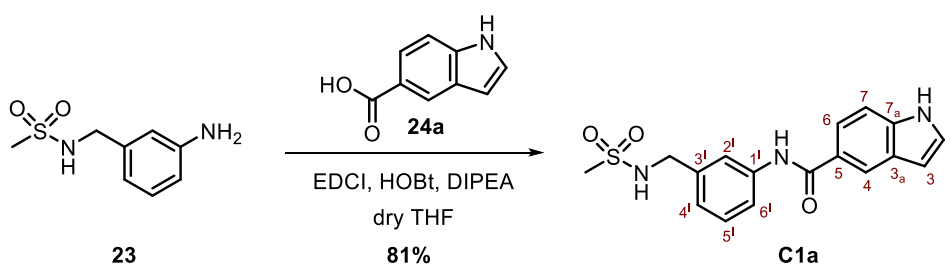
Synthesis of *N*-(3-aminobenzyl)methanesulfonamide, **23**



A mixture of **22** (830 mg, 3.61 mmol) and 10% Pd/C (83 mg, 78 μmol) in EtOAc (11 mL) and was stirred under H_2 (1 atm) overnight. The suspension was filtered over Celite[®] and the filtrate was concentrated to obtain **23** (718 mg, 3.59 mmol, 99% yield) as a brown solid.

Physical and spectroscopic data of **23**

Mp = 69 - 71 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.42 (t, $J_{\text{NH,CH}_2}$ = 6.2 Hz, 1H, -NH-), 6.98 (t, $J_{5,4} = J_{5,6} = 7.6$ Hz, 1H, H-5), 6.55 (s, 1H, H-2), 6.49 - 6.45 (m, 2H, H-4, H-6), 5.06 (br s, 2H, -NH₂), 3.99 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}}$ = 6.2 Hz, 2H, -CH₂-), 2.82 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 148.3 (C₃), 138.7 (C₁), 128.9 (C₅), 115.5 (C₆), 113.4 (C₂), 113.2 (C₄), 46.4 (-CH₂-), 40.0 (-SO₂CH₃). **IR** (ATR): ν 3416, 3328, 3037, 2847, 1593, 1465, 1299, 1141 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₈H₁₂N₂O₂S+H]⁺: 201.0698; found [M+H]⁺: 201.0695. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

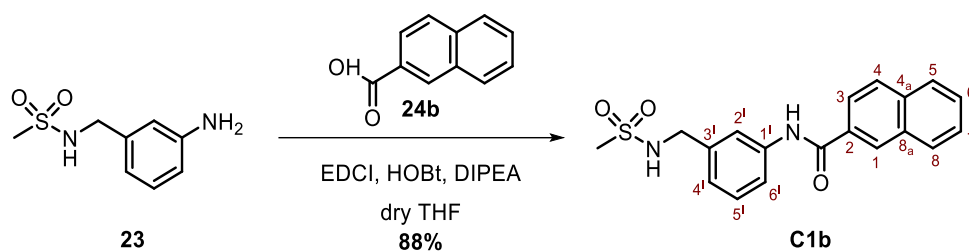
Synthesis of *N*-(3-[[[(methylsulfonyl)amino]methyl]phenyl]-1*H*-indole-5-carboxamide, **C1a**

To a stirred solution of amine **23** (229 mg, 1.14 mmol) in dry THF (10 mL) under N₂ atmosphere, a solution of Indole-5-carboxylic acid, **24a** (276 mg, 1.72 mmol), EDCI (0.30 mL, 1.71 mmol), HOBT (231 mg, 1.71 mmol) and DIPEA (1.00 mL, 5.74 mmol) in dry THF (10 mL) was added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Then, the reaction was quenched with water (10 mL) and extracted with EtOAc (10 mL). Then, the organic layer was washed with water (3 x 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 30:1) afforded compound **C1a** (318 mg, 0.93 mmol, 81% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C1a**

Mp = 89 - 90 °C (from acetone). **¹H NMR** (360 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.41 (s, 1H, -NH-), 10.16 (s, 1H, -CONH-), 8.27 (s, 1H, H-4), 7.83 (s, 1H, H-2^l), 7.73 (m, 2H, H-6, H-6^l), 7.59 (t, $J_{\text{NH,CH}_2}$ = 6.4 Hz, 1H, -CH₂NH-), 7.49 - 7.46 (m, 2H, H-2, H-7), 7.31 (t, $J_{5^l,4^l} = J_{5^l,6^l} = 7.8$ Hz, 1H, H-5^l), 7.05 (d, $J_{4^l,5^l} = 7.8$ Hz, 1H, H-4^l), 6.58 (s, 1H, H-3), 4.15 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}}$ = 6.4 Hz, 2H, -CH₂NH-), 2.89 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 166.5 (-CONH-), 139.8 (C_{1^l}), 138.6 (C_{3^l}), 137.6 (C_{7^a}), 128.5 (C_{5^l}), 127.0 (C_{3^a}/C_{5^l}), 126.9 (C_{2^l}), 125.7 (C_{3^a}/C_{5^l}), 122.4 (C_{4^l}), 121.0 (C_{6^l}), 120.5 (C_{4^l}), 119.5 (C_{6^l}), 119.1 (C_{2^l}), 111.1 (C_{7^l}), 102.2 (C_{3^l}), 46.2 (-CH₂NH-), 40.0 (-SO₂CH₃). **IR** (ATR): ν 3291, 1611, 1540, 1436, 1310, 1146 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₇H₁₇N₃O₃S+H]⁺: 344.1069; found [M+H]⁺: 344.1065. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded. HPLC purity: 98.27%.

Synthesis of *N*-(3-(((methylsulfonyl)amino)methyl)phenyl)-2-naphthamide, **C1b**

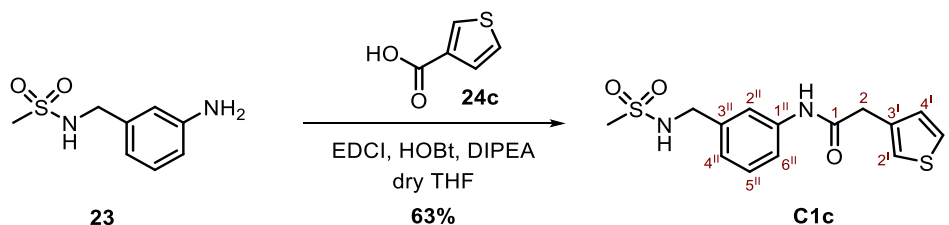


Compound **C1b** was prepared as described for **C1a** by using solution of compound **23** (58 mg, 0.29 mmol) in dry THF (2 mL) and a solution of commercially available 2-naphthoic acid, **24b** (75 mg, 0.44 mmol), EDCI (80 μ L, 0.44 mmol), HOBT (60 mg, 0.44 mmol) and DIPEA (200 μ L, 1.16 mmol) in dry THF/DMF (3 mL/2 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C1b** (88 mg, 0.26 mmol, 88% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C1b**

Mp = 178 - 183 °C (from acetone). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.47 (s, 1H, -CONH-), 8.59 (s, 1H, H-1), 8.10 - 8.00 (m, 4H, H-3/H-4/H-5/H-6/H-7/H-8), 7.84 (s, 1H, H-2'), 7.76 (d, $J_{6',5'} = 7.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.67 - 7.59 (m, 3H, H-5/H-6/H-7/H-8/-CH₂NH-), 7.36 (t, $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 7.9$ Hz, 1H, H-5'), 7.11 (d, $J_{4',5'} = 7.9$ Hz, 1H, H-4'), 4.18 (d, $J_{\text{CH}_2, \text{NH}} = 6.3$ Hz, 2H, -CH₂NH-), 2.90 (s, 3H, -SO₂CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.6 (-CONH-), 139.3 (C₁), 138.8 (C_{3'}), 134.3 (C₂), 132.2 (C_{4a}/C_{8a}), 132.1 (C_{4a}/C_{8a}), 128.9/128.0/127.8/127.7/126.8/124.4 (C₁/C₃/C₄/C₅/C₆/C₇/C₈), 128.7 (C_{5'}), 123.0 (C_{4'}), 119.6 (C_{2'}), 119.3 (C_{6'}), 46.1 (-CH₂NH-), 40.0 (-SO₂CH₃). IR (ATR): ν 3207, 1645, 1543, 1437, 1302, 1130 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₁₉H₁₈N₂O₃S+H]⁺: 355.1116; found [M+H]⁺: 355.1112. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of *N*-(3-(((methylsulfonyl)amino)methyl)phenyl)-2-(3-thienyl)acetamide, **C1c**



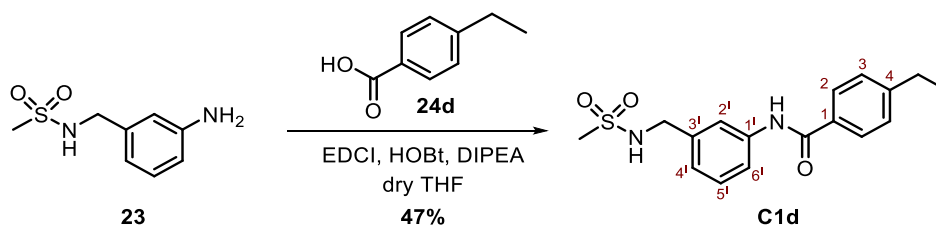
Compound **C1c** was prepared as described for **C1a** by using solution of compound **23** (64 mg, 0.32 mmol) in dry THF (3 mL) and a solution of commercially available 3-thiopheneacetic acid, **24c** (68 mg, 0.48 mmol), EDCI (85 μ L, 0.48 mmol), HOBT (65 mg, 0.48 mmol) and DIPEA (220 μ L, 1.28 mmol) in dry

THF/DMF (3 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C1c** (65 mg, 0.20 mmol, 63% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of C1c

Mp = 153 - 157 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.16 (s, 1H, -CONH-), 7.58 - 7.52 (m, 3H, H-6^{II}, H-2^{II}, -CH₂NH-), 7.48 (m, 1H, H-5^I), 7.32 (m, 1H, H-2^I), 7.26 (t, *J*_{5^{II},4^{II}} = *J*_{5^{II},6^{II}} = 7.8 Hz, 1H, H-5^{II}), 7.09 (dd, *J*_{4^I,5^I} = 4.9 Hz, *J*_{4^I,2^I} = 1.1 Hz, 1H, H-4^I), 7.01 (d, *J*_{4^{II},6^{II}} = 7.8 Hz, 1H, H-4^{II}), 4.11 (d, *J*_{CH₂,NH} = 6.4 Hz, 2H, -CH₂NH-), 3.65 (s, 2H, H-2), 2.86 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.7 (-CONH-), 139.3 (C_{1^{II}}), 138.9 (C_{3^{II}}), 135.6 (C_{3^I}), 128.7 (C_{4^I/C_{5^{II}}), 128.7 (C_{4^I/C_{5^{II}}), 125.8 (C_{5^I}), 122.5 (C_{4^{II}, C_{2^I}), 118.3 (C_{2^{II}/C_{6^{II}}), 118.0 (C_{2^{II}/C_{6^{II}}), 46.0 (-CH₂NH-), 39.9 (-SO₂CH₃), 38.1 (C₂). **IR** (ATR): ν 3259, 1657, 1535, 1309, 1147 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₄H₁₆N₂O₃S₂+Na]⁺: 347.0500; found [M+Na]⁺: 347.0495. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.}}}}}

Synthesis of 4-ethyl-*N*-(3-(((methylsulfonyl)amino)methyl)phenyl)benzamide, C1d



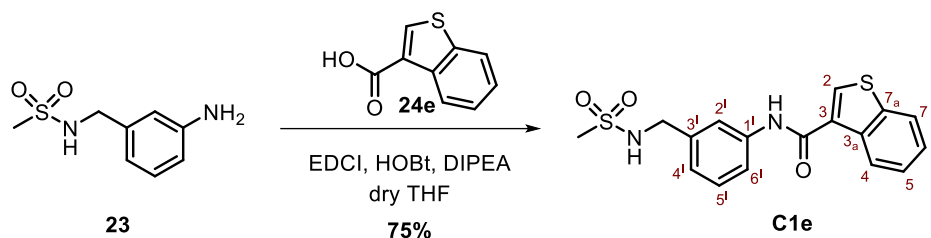
Compound **C1d** was prepared as described for **C1a** by using solution of compound **23** (66 mg, 0.32 mmol) in dry THF (3 mL) and a solution of commercially available 4-ethylbenzoic acid, **24d** (72 mg, 0.48 mmol), EDCI (85 μL, 0.48 mmol), HOBt (65 mg, 0.48 mmol) and DIPEA (220 μL, 1.28 mmol) in dry THF/DMF (3 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C1d** (50 mg, 0.15 mmol, 47% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of C1d

Mp = 145 - 149 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.19 (s, 1H, -CONH-), 7.90 (d, *J*_{2,3} = *J*_{6,5} = 8.3 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.79 (s, 1H, H-2^I), 7.70 (m, *J*_{6^I,5^I} = 8.0 Hz, 1H, H-6^I), 7.57 (t, *J*_{NH,CH₂} = 6.4 Hz, 1H, -CH₂NH-), 7.36 (d, *J*_{3,2} = *J*_{5,6} = 8.3 Hz, 2H, H-3, H-5), 7.32 (t, *J*_{5^I,4^I} = *J*_{5^I,6^I} = 7.9 Hz, 1H, H-5^I), 7.08 (d, *J*_{5^I,6^I} = 7.9 Hz, 1H, H-4^I), 4.15 (d, *J*_{CH₂,NH} = 6.3 Hz, 2H, -CH₂NH-), 2.88 (s, 3H, -SO₂CH₃), 2.69 (q, *J*_{CH₂,CH₃} = 7.6 Hz, 2H, -CH₂CH₃), 1.22 (t, *J*_{CH₃,CH₂} = 7.6 Hz, 3H, -CH₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.4 (-CONH-), 147.7 (C₄), 139.3 (C₁), 138.7 (C_{3^I}), 132.3 (C₁), 128.5 (C_{5^I}), 127.7 (C₂, C₆), 127.7 (C₃, C₅), 122.8 (C_{4^I}), 119.5 (C_{2^I}), 119.2 (C_{6^I}), 46.1 (-CH₂NH-), 40.0 (-SO₂CH₃), 28.0 (-CH₂CH₃), 15.4 (-CH₂CH₃). **IR** (ATR): ν 3263, 2966,

1645, 1538, 1307, 1144 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): calcd. for $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+$: 333.1273; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 333.1267. COSY, DEPT135 and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation were recorded.

Synthesis of *N*-(3-(((methylsulfonyl)amino)methyl)phenyl)-1-benzothiophene-3-carboxamide, **C1e**

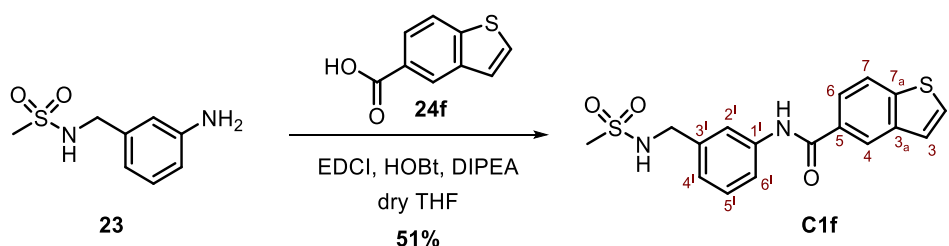


Compound **C1e** was prepared as described for **C1a** by using solution of compound **23** (295 mg, 1.47 mmol) in dry THF (10 mL) and a solution of commercially available benzothiophene-3-carboxylic acid, **24e** (399 mg, 2.24 mmol), EDCI (0.40 mL, 2.26 mmol), HOBT (302 mg, 2.23 mmol) and DIPEA (1.10 mL, 6.31 mmol) in dry THF (10 mL). The residue was purified by a recrystallization in CH_2Cl_2 to furnish product **C1e** (399 mg, 1.11 mmol, 75% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C1e**

Mp = 139 - 140 $^\circ\text{C}$ (from acetone). $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.39 (s, 1H, -CONH-), 8.57 (s, 1H, H-2), 8.42 (d, $J_{4,5} = 7.5$ Hz, 1H, H-4), 8.08 (d, $J_{7,6} = 7.6$ Hz, 1H, H-7), 7.80 (s, 1H, H-2'), 7.70 (d, $J_{6',5'} = 8.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.61 (t, $J_{\text{NH},\text{CH}_2} = 6.3$ Hz, 1H, - CH_2NH -), 7.51 - 7.43 (m, 2H, H-5, H-6), 7.35 (t, $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.09 (d, $J_{4',5'} = 8.0$ Hz, 1H, H-4'), 4.17 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}} = 6.3$ Hz, 2H, - CH_2NH -), 2.90 (s, 3H, - SO_2CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 161.9 (-CONH-), 139.4 ($\text{C}_{3a}/\text{C}_{7a}$), 139.2 (C_{3i}), 138.9 (C_{1i}), 137.1 ($\text{C}_{3a}/\text{C}_{7a}$), 131.9 (C_2), 131.0 (C_3), 128.7 (C_{5i}), 125.0 (C_5 , C_6), 124.3 (C_4), 122.9 (C_7 , C_{4i}), 119.4 (C_{6i}), 119.1 (C_{2i}), 46.1 (- CH_2NH -), 39.9 (- SO_2CH_3). IR (ATR): ν 3250, 1643, 1543, 1420, 1305, 1149 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): calcd. for $[\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2+\text{Na}]^+$: 383.0500; found $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 383.0497. COSY, DEPT135 and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation were recorded. HPLC purity: 98.10%.

Synthesis of *N*-(3-(methylsulfonylamidomethyl)phenyl)benzo[*b*]thiophene-5-carboxamide, **C1f**



VI.3 Experimental section

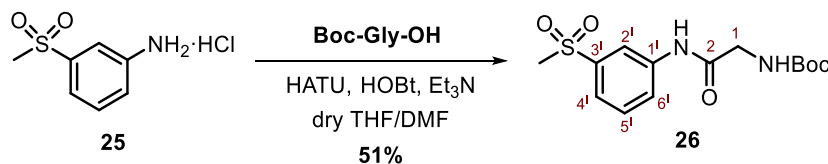
Compound **C1f** was prepared as described for **C1a** by using solution of compound **23** (34 mg, 0.17 mmol) in dry THF (2 mL) and a solution of commercially available 1-benzothiophene-5-carboxylic acid, **24f** (25 mg, 0.14 mmol), EDCI (24 μ L, 0.15 mmol), HOBt (21 mg, 0.15 mmol) and DIPEA (100 μ L, 0.56 mmol) in dry THF/DMF (2 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C1f** (26 mg, 72 μ mol, 51% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of C1f

Mp = 172 - 176 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.39 (s, 1H, -CONH-), 8.53 (m, $J_{4,3}$ = 1.4 Hz, 1H, H-4), 8.16 (d, $J_{7,6}$ = 8.5 Hz, 1H, H-7), 7.94 (dd, $J_{6,7}$ = 8.5 Hz, $J_{6,4}$ = 1.4 Hz, 1H, H-6), 7.90 (d, $J_{3,2}$ = 5.5 Hz, 1H, H-3), 7.83 (s, 1H, H-2'), 7.74 (d, $J_{6',5'}$ = 8.3 Hz, 1H, H-6'), 7.62 - 7.57 (m, 2H, H-2, -CH₂NH-), 7.34 (m, 1H, H-5'), 7.09 (d, $J_{4',5'}$ = 7.5 Hz, 1H, H-4'), 4.17 (d, $J_{\text{CH}_2, \text{NH}}$ = 6.4 Hz, 1H, -CH₂NH-), 2.89 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.7 (-CONH-), 142.1 (C_{7a}), 139.4 (C₃), 139.1 (C₁), 138.8 (C_{3a}/C₅), 131.2 (C_{3a}/C₅), 129.0 (C₆), 128.6 (C₅), 124.5 (C₇), 123.3 (C₃), 123.2 (C₄), 122.9 (C₄), 122.6 (C₂), 119.6 (C₂'), 119.2 (C₆'), 46.1 (-CH₂NH-), 39.1 (-SO₂CH₃). **IR** (ATR): ν 3254, 1641, 1536, 1428, 1309, 1131 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₇H₁₆N₂O₃S₂+H]⁺: 361.0681; found [M+H]⁺: 361.0668. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

VI.3.1.2. Synthesis of compounds of family C2

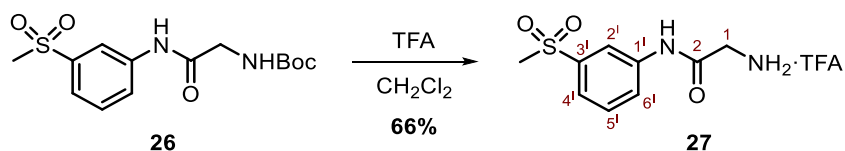
Synthesis of *tert*-butyl (2-((3-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)carbamate, **26**



The salt of 3-(methylsulfonyl)aniline hydrochloride, **25**, (1.01 g, 4.84 mmol) was diluted in dry THF (25 mL) under N₂ atmosphere, then Et₃N (1.35 mL, 9.69 mmol) was added and the solution was stirred for 5 min at rt. Then, a solution of Boc-Gly-OH (1.27 g, 7.26 mmol), HATU (2.21 g, 5.81 mmol), HOBt (785 mg, 8.81 mmol) and Et₃N (1.35 mL, 9.69 mmol) in dry THF/DMF (20 mL/3 mL) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (25 mL) and washed successively with water (3 x 30 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2 x 30 mL), and brine (3 x 30 mL). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was diluted in methylene chloride (20 mL) washed again with water (3 x 60 mL) and brine (3 x 60 mL) in order to remove the remains of tetramethylurea. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to obtain the carbamate **26** (810 mg, 2.47 mmol, 51% yield) as a brown solid.

Physical and spectroscopic data of 26

Mp = 100 - 104 °C (from acetone). **¹H NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ 8.81 (br s, 1H, -NH-2), 8.03 (m, 1H, H-2'), 7.90 (d, $J_{4',6'}$ = 7.7 Hz, 1H, H-4'), 7.63 (d, $J_{6',5'}$ = 7.7 Hz, 1H, H-6'), 7.48 (m, 1H, H-5'), 5.45 (br s, 1H, -NHCO₂⁻), 3.97 (d, $J_{1,NHCO_2}$ = 6.0 Hz, 2H, H-1), 3.06 (s, 3H, -SO₂CH₃), 1.47 (s, 9H, -C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 168.6 (C₂), 156.9 (-NHCO₂⁻), 141.2 (C_{3'}), 138.9 (C_{1'}), 130.3 (C_{5'}), 125.0 (C_{4'}), 122.8 (C_{6'}), 118.4 (C_{2'}), 81.1 (-C(CH₃)₃), 45.6 (C₁), 44.5 (-SO₂CH₃), 28.5 (-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 3284, 2976, 1703, 1516, 1296, 1136 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₄H₂₀N₂O₅S+H]⁺: 329.1171; found [M+H]⁺: 329.1157. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

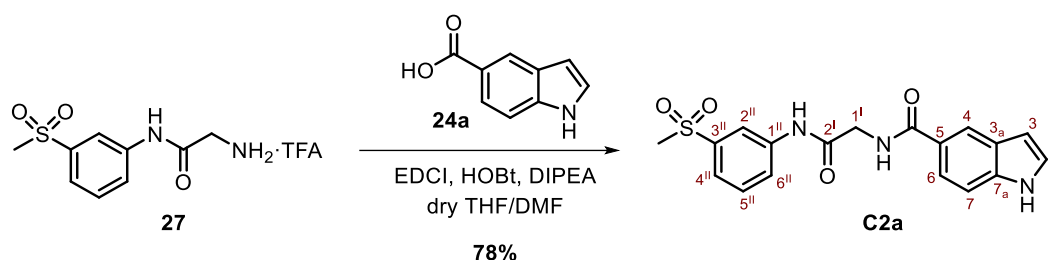
Synthesis of 2-amino-N-(3-(methylsulfonyl)phenyl)acetamide, 27

To a stirred solution of compound **26** (800 mg, 2.43 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL), TFA (5 mL) was added. The mixture was stirred at rt until the starting material was consumed (TLC). Then, the mixture was concentrated under vacuum and the resulting brown syrup was taken up in acetone and precipitated with diethyl ether to deliver **27** (553 mg, 1.62 mmol, 66% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 27

Mp = 179 - 183 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.01 (s, 1H, -NH-2), 8.29 (s, 3H, -NH₃⁺), 8.24 (s, 1H, H-2'), 7.85 (br d, $J_{6',5'}$ = 6.7 Hz, 1H, H-6'), 7.66 - 7.62 (m, 2H, H-4', H-5'), 3.85 (s, 2H, H-1), 3.21 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.5 (C₂), 158.5 (q, $J_{CO_2CF_3,F}$ = 31.3 Hz, CO₂CF₃⁻), 141.6 (C_{3'}), 139.0 (C_{1'}), 130.4 (C_{4'}), 123.7 (C_{6'}), 122.1 (C_{5'}), 117.8 (q, $J_{CF_3,F}$ = 301.0 Hz, -CF₃), 117.0 (C_{2'}), 43.6 (C₁), 41.1 (-SO₂CH₃). **IR** (ATR): ν 3084, 1677, 1427, 1294, 1134 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₁H₁₃F₃N₂O₅S+H]⁺: 229.0641; found [M+H]⁺: 229.0636. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *N*-(2-((3-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)-1*H*-indole-5-carboxamide, **C2a**

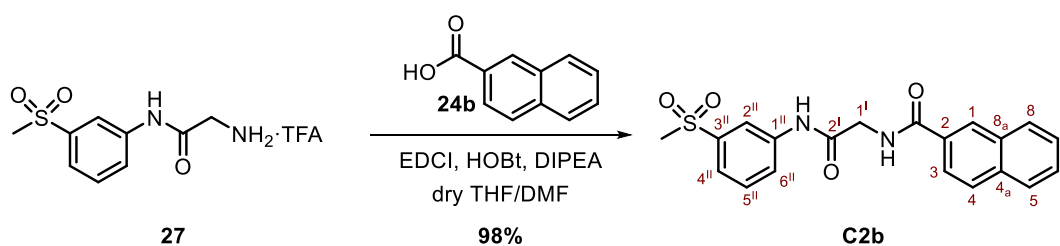


To a stirred solution of amine **27** (96 mg, 0.28 mmol) in dry THF (4 mL) under N₂ atmosphere, a solution of Indole-5-carboxylic acid, **24a** (68 mg, 0.42 mmol), EDCI (75 μL, 0.42 mmol), HOBT (57 mg, 0.42 mmol) and DIPEA (0.20 mL, 1.12 mmol) in dry THF/DMF (4 mL/1 mL) was added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Then, the reaction was quenched with water (10 mL) and extracted with EtOAc (10 mL). The organic layer was washed with water (3 x 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C2a** (81 mg, 0.22 mmol, 78% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C2a**

Mp = > 230 °C (from acetone). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.34 (s, 1H, -NH-), 10.46 (s, 1H, -NH-2''), 8.71 (t, *J*_{NHCO,1'} = 5.8 Hz, 1H, -NHCO-indole), 8.28 (m, 1H, H-2''), 8.20 (m, 1H, H-4), 7.90 (m, 1H, H-6''), 7.68 (dd, *J*_{6,7} = 8.6 Hz, *J*_{6,4} = 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.61 - 7.60 (m, 2H, H-4'', H-5''), 7.46 - 7.43 (m, 2H, H-2, H-7), 6.56 (m, 1H, H-3), 4.09 (d, *J*_{1',NHCO} = 5.8 Hz, 2H, H-1'), 3.19 (s, 3H, -SO₂CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.9 (C_{2'}), 167.8 (-NHCO-indole), 141.3 (C_{3''}), 139.8 (C_{1''}), 137.5 (C_{7a}), 130.1 (C_{5''}), 127.0 (C_{3a}/C₅), 126.7 (C₂), 124.9 (C_{3a}/C₅), 123.6 (C_{6''}), 121.4 (C_{4''}), 120.6 (C₆), 120.2 (C₄), 117.0 (C_{2''}), 110.9 (C₇), 102.2 (C₃), 43.6 (-SO₂CH₃), 43.5 (C_{1'}). IR (ATR): ν 3395, 1705, 1617, 1427, 1292, 1139 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₁₉H₂₀N₄O₄S+H]⁺: 372.1018; found [M+H]⁺: 372.1000. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of *N*-(2-((3-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)-2-naphthamide, **C2b**



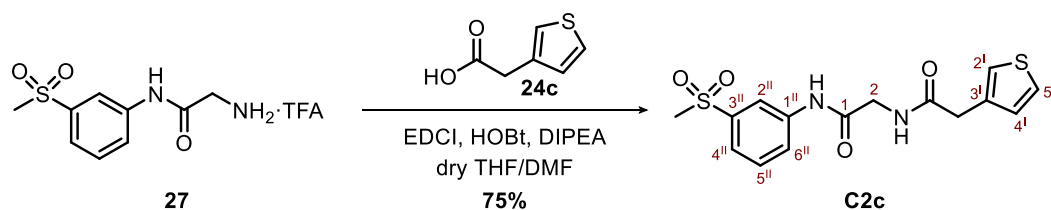
Compound **C2b** was prepared as described for **C2a** by using solution of compound **27** (44 mg, 0.13 mmol) in dry THF (2 mL) and a solution of commercially available 2-naphthoic acid, **24b** (35 mg, 0.19

mmol), EDCI (35 μ L, 0.19 mmol), HOBt (26 mg, 0.19 mmol) and DIPEA (90 μ L, 0.51 mmol) in dry THF/DMF (2 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C2b** (48 mg, 0.13 mmol, 98% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C2b**

Mp = 194 - 199 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.51 (s, 1H, -NH-2'), 9.08 (t, $J_{\text{NHCO},1}$ = 5.9 Hz, 1H, -NHCO-), 8.53 (s, 1H, H-1), 8.29 (m, 1H, H-2''), 8.06 - 7.98 (m, 4H, H-3/H-4/H-5/H-6/H-7/H-8), 7.91 (m, 1H, H-6''), 7.65 - 7.59 (m, 4H, H-5/H-6/H-7/H-8/H-4''/H-5''), 4.16 (d, $J_{1,\text{NHCO}}$ = 5.9 Hz, 2H, H-1'), 3.19 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.5 (-NHCO-), 168.8 (C_{2I}), 141.3 (C_{11I}), 139.7 (C_{31I}), 134.2 (C₂), 132.1 (C_{4a/C8a}), 131.2 (C_{4a/C8a}), 130.1 (C_{51I}), 128.9/127.9/127.7/127.6/126.8/124.2 (C_{1/C3/C4/C5/C6/C7/C8}), 123.6 (C_{61I}), 121.5 (C_{41I}), 117.0 (C_{21I}), 43.6 (-SO₂CH₃), 43.5 (C_{1I}). **IR** (ATR): ν 3407, 3283, 1625, 1522, 1296, 1141 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₂₀H₁₈N₂O₄S+H]⁺: 383.1066; found [M+H]⁺: 383.1048. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *N*-(3-(methylsulfonyl)phenyl)-2-(2-(thiophen-3-yl)acetamido)acetamide, **C2c**



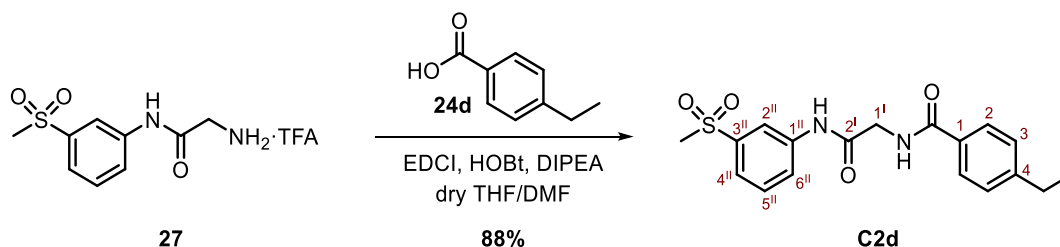
Compound **C2c** was prepared as described for **C2a** by using solution of compound **27** (91 mg, 0.27 mmol) in dry THF (4 mL) and a solution of commercially available 3-thiopheneacetic acid, **c** (57 mg, 0.40 mmol), EDCI (70 μ L, 0.40 mmol), HOBt (54 mg, 0.40 mmol) and DIPEA (185 μ L, 1.06 mmol) in dry THF/DMF (4 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C2c** (70 mg, 0.20 mmol, 75% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C2c**

Mp = 169 - 173 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.39 (s, 1H, -NH-1), 8.39 (t, $J_{\text{NHCO},2}$ = 5.8 Hz, 1H, -NHCO-), 8.23 (m, 1H, H-2''), 7.85 (m, 1H, H-6''), 7.62 - 7.59 (m, 2H, H-4''/H-5''), 7.46 (m, 1H, H-5'), 7.29 (m, 1H, H-2'), 7.06 (m, 1H, H-4'), 3.92 (d, $J_{2,\text{NHCO}}$ = 5.8 Hz, 2H, H-2), 3.53 (s, 2H, -CH₂-thiophene), 3.19 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.3 (-NHCO-), 168.4 (C₁), 141.3 (C_{31I}), 139.6 (C_{11I}), 135.9 (C_{3I}), 130.1 (C_{51I}), 128.8 (C_{4I}), 125.6 (C_{5I}), 123.5 (C_{61I}), 122.3 (C_{2I}), 121.5 (C_{41I}), 116.9 (C_{21I}), 43.6 (-SO₂CH₃), 42.8 (C₂), 36.7 (-CH₂-thiophene). **IR** (ATR): ν 3392, 3270, 1644, 1511, 1299, 1145

cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₅H₁₆N₂O₄S₂+H]⁺: 353.0630; found [M+H]⁺: 353.0615. **COSY**, **DEPT135** and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of 4-ethyl-N-(2-((3-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)benzamide, **C2d**

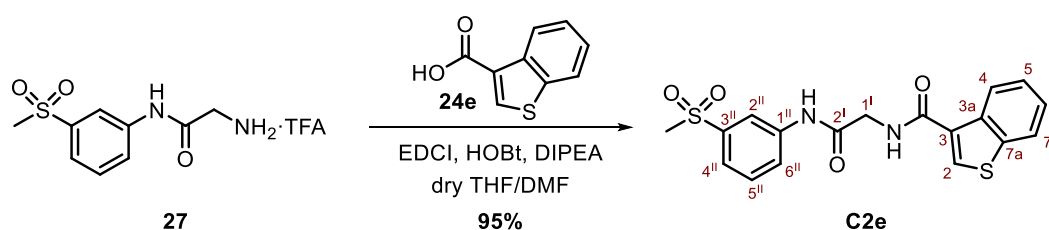


Compound **C2d** was prepared as described for **C2a** by using solution of compound **27** (90 mg, 0.26 mmol) in dry THF (4 mL) and a solution of commercially available 4-ethylbenzoic acid, **24d** (59 mg, 0.39 mmol), EDCI (70 μL, 0.39 mmol), HOBt (53 mg, 0.39 mmol) and DIPEA (185 μL, 1.05 mmol) in dry THF/DMF (4 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C2d** (84 mg, 0.23 mmol, 88% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C2d**

Mp = 169 - 172 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.46 (s, 1H, -NH-2'), 8.82 (t, *J*_{NHCO,2'} = 5.8 Hz, 1H, -NHCO-), 8.26 (m, 1H, H-2''), 7.89 (m, 1H, H-6''), 7.84 (d, *J*_{2,3} = *J*_{6,5} = 8.3 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.61 - 7.60 (m, 2H, H-4'', H-5''), 7.32 (d, *J*_{2,3} = *J*_{6,5} = 8.2 Hz, 2H, H-3, H-5), 4.08 (d, *J*_{2',NHCO} = 5.8 Hz, 2H, H-2'), 3.19 (s, 3H, -SO₂CH₃), 2.67 (q, *J*_{CH₂,CH₃} = 7.6 Hz, 2H, -CH₂CH₃), 1.20 (t, *J*_{CH₃,CH₂} = 7.6 Hz, 2H, -CH₂CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.5 (C₂'), 166.6 (-NHCO-), 147.5 (C₄), 141.3 (C₃''), 139.7 (C₁''), 131.4 (C₁), 130.1 (C₅''), 127.7 (C₂, C₆), 127.4 (C₃, C₅), 123.6 (C₆''), 121.5 (C₄''), 117.0 (C₂''), 43.6 (-SO₂CH₃), 43.4 (C₁'), 28.0 (-CH₂CH₃), 15.3 (-CH₂CH₃). **IR** (ATR): ν 3422, 3274, 1705, 1638, 1303, 1147 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₂₀N₂O₄S+H]⁺: 361.1222; [M+H]⁺ found: 361.1206.

Synthesis of N-(2-((3-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)benzo[*b*]thiophene-3-carboxamide, **C2e**

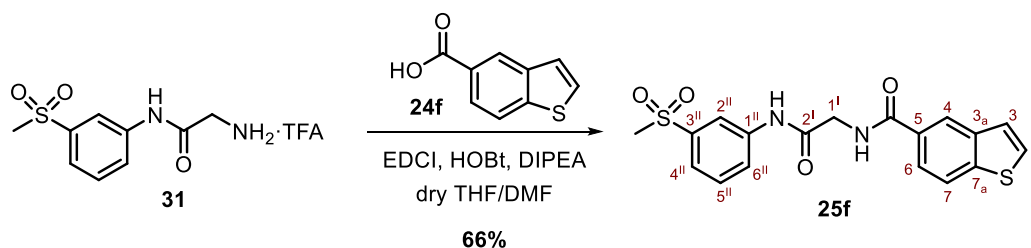


Compound **C2e** was prepared as described for **C2a** by using solution of compound **27** (89 mg, 0.26 mmol) in dry THF (4 mL) and a solution of commercially available benzothiophene-3-carboxylic acid, **24e** (70 mg, 0.39 mmol), EDCI (70 μ L, 0.39 mmol), HOBT (53 mg, 0.39 mmol) and DIPEA (0.18 mL, 1.04 mmol) in dry THF/DMF (4 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C2e** (96 mg, 0.25 mmol, 95% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of C2e

Mp = 175 - 178 °C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.52 (s, 1H, -NH-2^I) 8.89 (t, $J_{\text{NHCO},2^{\text{I}}}$ = 5.8 Hz, 1H, -NHCO-), 8.49 (m, 1H, H-4), 8.46 (s, 1H, H-2), 8.29 (m, 1H, H-2^{II}), 8.05 (m, 1H, H-7), 7.91 (m, 1H, H-6^{II}), 7.63 - 7.61 (m, 2H, H-4^{II}, H-5^{II}), 7.48 - 7.41 (m, 2H, H-5, H-6), 4.13 (d, $J_{1^{\text{I}},\text{NHCO}}$ = 5.8 Hz, 2H, H-1^I), 3.20 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.5 (C_{2^I}), 163.6 (-NHCO-), 141.4 (C_{3^{II}}), 139.7 (C_{1^{II}}), 139.4 (C_{7^a}), 137.1 (C_{3^a}), 131.3 (C₂), 130.4 (C₃), 130.1 (C_{5^{II}}), 124.9 (C_{5/C₆}), 124.5 (C_{5/C₆}), 123.6 (C_{6^{II}}), 122.8 (C₇), 121.5 (C_{4^{II}}), 117.0 (C_{2^{II}}), 43.6 (-SO₂CH₃), 43.1 (C_{1^I}). **IR** (ATR): ν 3328, 3084, 1623, 1530, 1322, 1146 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₁₆N₂O₄S₂+H]⁺: 411.0433; found [M+H]⁺: 411.0449.

Synthesis of *N*-(2-((3-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)benzo[*b*]thiophene-5-carboxamide, **C2f**



Compound **C2f** was prepared as described for **C2a** by using solution of compound **27** (56 mg, 0.17 mmol) in dry THF (2 mL) and a solution of commercially available 1-benzothiophene-5-carboxylic acid, **24f** (25 mg, 0.14 mmol), EDCI (24 μ L, 0.15 mmol), HOBT (21 mg, 0.15 mmol) and DIPEA (100 μ L, 0.56 mmol) in dry THF/DMF (2 mL/1 mL). The residue was purified by a recrystallization in Et₂O to furnish product **C2f** (36 mg, 93 μ mol, 66% yield) as a white solid.

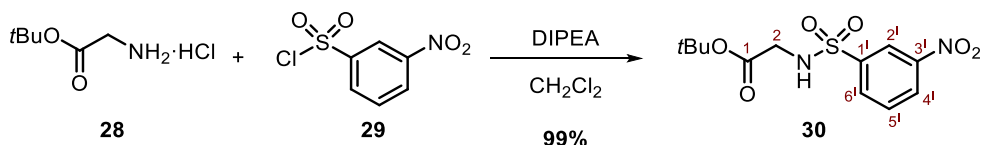
Physical and spectroscopic data of C2f

Mp = > 230 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.50 (s, 1H, -NH-2^I), 8.99 (t, $J_{\text{NHCO},1^{\text{I}}}$ = 5.9 Hz, 1H, -NHCO-), 8.46 (m, 1H, H-4), 8.27 (m, 1H, H-2^{II}), 8.12 (d, $J_{7,6}$ = 8.5 Hz, 1H, H-7), 7.92 - 7.86 (m, 3H, H-3, H-6, H-6^{II}), 7.63 - 7.57 (m, 3H, H-2, H-4^{II}, H-5^{II}), 4.12 (d, $J_{1^{\text{I}},\text{NHCO}}$ = 5.9 Hz, 2H, H-1^I), 3.19 (s, 3H, -SO₂CH₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.6 (C_{2^I}), 166.9 (-NHCO-), 142.0 (C_{7^a}), 141.4 (C_{3^{II}}), 139.7 (C_{1^{II}}), 139.2 (C_{3^a/C₅}), 130.4 (C_{3^a/C₅}), 130.2 (C_{5^{II}}), 128.9 (C₆), 124.5 (C₂), 123.6 (C_{6^{II}}), 123.0 (C₃, C₄), 122.5

(C₇), 121.6 (C₄₁), 117.1 (C₂₁), 43.6 (-SO₂CH₃), 43.5 (C₁). **IR** (ATR): ν 3408, 3277, 1706, 1629, 1521, 1296, 1143 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₁₆N₂O₄S₂+Na]⁺: 411.0449; found [M+Na]⁺: 411.0437. **COSY**, **DEPT135** and ¹H/¹³C correlation were recorded.

VI.3.1.3. Synthesis of compounds of family C3

Synthesis of *tert*-butyl *N*-[(3-nitrophenyl)sulfonyl]glycinate, **30**

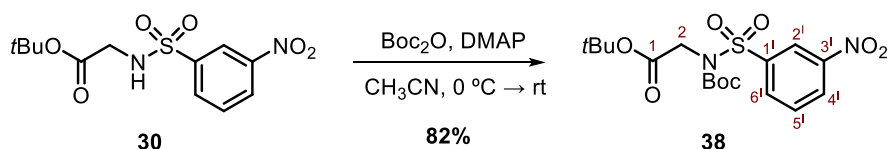


To a solution of commercially available 3-nitrobenzenesulfonyl chloride, **29**, (3.96 g, 17.86 mmol), and glycine *tert*-butyl ester HCl, **28**, (3.08 g, 18.34 mmol) in dry CH₂Cl₂ (110 mL), DIPEA (9.40 mL, 53.68 mmol) was added dropwise, and the mixture was stirred for 2.5 h at rt. Then, the reaction was quenched with water (50 mL), the layers were separated, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to deliver the sulphonamide **30** (5.57 g, 17.61 mmol, 99% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of **30**

Mp = 105 - 108 °C (from CH₂Cl₂). ¹H **NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ 8.69 (m, 1H, H-2'), 8.42 (ddd, $J_{4',5'} = 8.2$ Hz, $J_{4',6'} = 2.2$ Hz, $J_{4',2'} = 1.1$ Hz, 1H, H-4'), 8.20 (ddd, $J_{6',5'} = 8.2$ Hz, $J_{6',4'} = 2.2$ Hz, $J_{6',2'} = 1.1$ Hz, 1H, H-6'), 7.74 (t, $J_{2',4'} = J_{2',6'} = 8.2$ Hz, 1H, H-2'), 5.48 (br t, 1H, -NHSO₂-), 3.77 (s, 2H, H-2), 1.34 (s, 9H, -C(CH₃)₃). ¹³C **NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 167.8 (C₁), 148.2 (C_{3'}), 142.0 (C_{1'}), 132.9 (C_{6'}), 130.6 (C_{5'}), 127.2 (C_{4'}), 122.4 (C_{2'}), 83.2 (-C(CH₃)₃), 44.8 (C₂), 27.8 (-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 3164, 1738, 1523, 1441, 1349, 1236, 1162 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₂H₁₆N₂O₆S+Na]⁺: 339.0627; found [M+Na]⁺: 339.0624.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-[(3-nitrophenyl)sulfonyl]glycinate, **38**



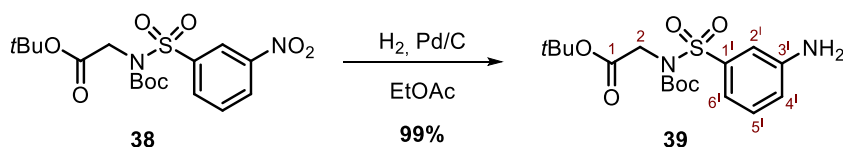
To an ice-cooled solution of *tert*-butyl ester **30** (301 mg, 1.05 mmol) in anhydrous CH₃CN (5 mL), DMAP (52 mg, 0.42 mmol) and Boc₂O (546 mg, 2.48 mmol) were added. The solution was stirred at 0 °C for

30 minutes and then warmed up to rt and let stir for 2 h. The solvent was removed under vacuum and the resulting residue was purified by column chromatography (hexanes/EtOAc, 4:1 → 3:1) to provide compound **38** (722 mg, 1.73 mmol, 82% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of **38**

Mp = 80 - 84 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 8.88 (br t, $J_{2',4'} = J_{2',6'}$ = 1.9 Hz, 1H, H-2'), 8.48 - 8.43 (m, 2H, H-4', H-6'), 7.75 (t, $J_{5',4'} = J_{5',6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 4.49 (s, 2H, H-2), 1.47 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.35 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 167.5 (C₁), 150.1 (-NCO₂tBu), 147.9 (C₃), 141.5 (C₁), 134.7 (C₆), 129.9 (C₅), 128.0 (C₄), 124.5 (C₂), 85.8 (carbamate-C(CH₃)₃), 83.0 (-C(CH₃)₃), 47.8 (C₂), 28.1 (-C(CH₃)₃), 27.9 (carbamate-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 2981, 1730, 1533, 1360, 1346, 1145 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₇H₂₄N₂O₈S+Na]⁺: 439.1151; found [M+Na]⁺: 439.1149. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-[(3-aminophenyl)sulfonyl]-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)glycinate, **39**

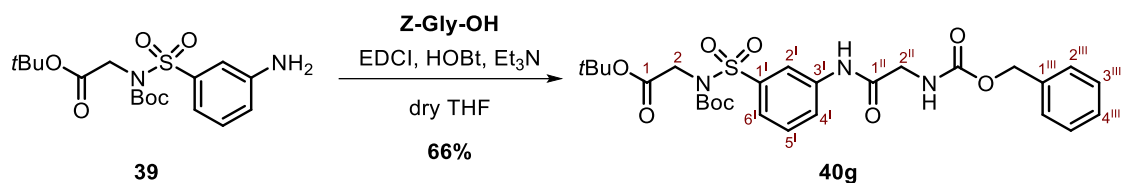


A mixture of **38** (1.57 g, 3.76 mmol) and 10% Pd/C (305 mg, 0.28 mmol) in EtOAc (33 mL) and was stirred under H₂ (1 atm) overnight. The suspension was filtered over Celite® and the filtrate was concentrated to obtain **39** (1.45 g, 3.75 mmol, 99% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **39**

Mp = 109 - 111 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 7.29 (m, 1H, H-2'), 7.27 - 7.21 (m, 2H, H-5', H-6'), 6.95 (m, $J_{4',5'}$ = 7.6 Hz, 1H, H-4'), 5.18 (br s, 2H, -NH₂), 4.41 (s, 2H, H-2), 1.46 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.35 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, acetone-*d*₆): δ 168.1 (C₁), 151.4 (-NCO₂tBu), 149.7 (C₃), 141.7 (C₁), 130.1 (C₅), 119.5 (C₄), 116.4 (C₆), 114.0 (C₂), 84.6 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.3 (-C(CH₃)₃), 48.3 (C₂), 28.1 (-C(CH₃)₃), 28.0 (carbamate-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 3363, 2981, 1723, 1604, 1490, 1359, 1243, 1140 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₇H₂₆N₂O₈S+H]⁺: 387.1590; found [M+H]⁺: 387.1586. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-{[3-({*N*-[(benzyloxy)carbonyl]glycyl)amino]phenyl}sulfonyl}-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)glycinate, **40g**

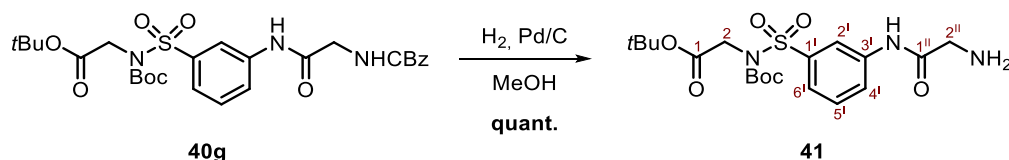


To a stirred solution of aniline **39** (84 mg, 0.22 mmol) in dry THF (2 mL) under N₂ atmosphere, a solution of Z-Gly-OH (68 mg, 0.33 mmol), EDCI (60 μL, 0.34 mmol), HOBT (44 mg, 0.34 mmol) and Et₃N (0.12 mL, 0.86 mmol) in dry THF (2.5 mL) was added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. The reaction was quenched with water (5 mL) and extracted with EtOAc (8 mL). Then, the organic layer was washed with water (3 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (CHCl₃/Et₂O, 2:1) to furnish a white solid identified as carbamate **40g** (83 mg, 0.14 mmol, 66% yield).

Physical and spectroscopic data of **40g**

Mp = 134 - 137 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 9.62 (s, 1H, -NH-1^{''}), 8.35 (s, 1H, H-2¹), 7.99 (br d, *J*_{4¹,5¹} = 8.8 Hz, 1H, H-4¹), 7.77 (d, *J*_{6¹,5¹} = 7.9 Hz, 1H, H-6¹), 7.57 (t, *J*_{6¹,4¹} = *J*_{5¹,6¹} = 8.1 Hz, 1H, H-5¹), 7.42 - 7.23 (m, 5H, phenyl), 6.73 (t, *J*_{NHCBz,2^{''}} = 5.8 Hz, 1H, -NHCBz), 5.11 (s, 2H, -CH₂-phenyl), 4.45 (s, 2H, H-2), 4.02 (d, *J*_{2^{''},NHCBz} = 6.0 Hz, 2H, H-2^{''}), 1.46 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.33 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, acetone-*d*₆): δ 169.2 (C_{1^{''}}), 168.0 (C₁), 157.6 (-NHCBz), 151.1 (-NCOOtBu), 141.5 (C_{1¹}), 140.1 (C_{3¹}), 138.0 (C_{1^{''''}}), 130.1 (C_{5¹}), 129.2 (C_{4^{''''}}), 128.7 (C_{2^{''''}}, C_{3^{''''}}), 124.7 (C_{4¹}), 123.7 (C_{6¹}), 119.7 (C_{2¹}), 85.0 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.5 (-C(CH₃)₃), 66.9 (-CH₂-phenyl), 48.5 (C₂), 45.6 (C_{2^{''}}), 28.1 (-C(CH₃)₃), 27.9 (carbamate-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 3423, 3288, 1687, 1509, 1348, 1232, 1143 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₇H₃₅N₃O₉S+Na]⁺: 600.1992; found [M+Na]⁺: 600.1985. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-{[3-(glycylamino)phenyl]sulfonyl}glycinate, **41**

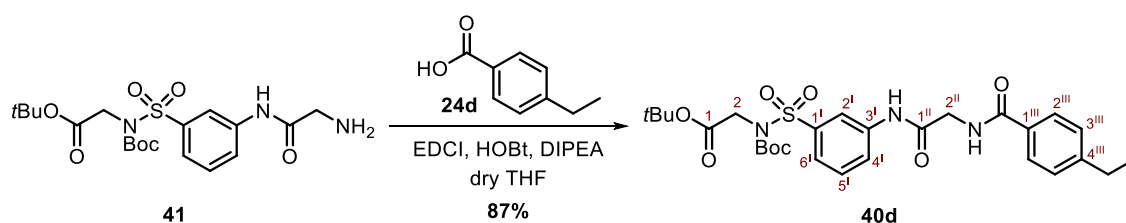


A mixture of **40g** (262 mg, 0.45 mmol) and 10% Pd/C (33 mg, 31 μmol) in MeOH (7.3 mL) and was stirred under H₂ (1 atm) overnight. The suspension was filtered over Celite® and the filtrate was concentrated to obtain **41** (199 mg, 0.45 mmol, quant. yield) as a brown solid.

Physical and spectroscopic data of 41

Mp = 81 - 83 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 9.67 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.18 (dd, $J_{4',5'} = 8.0$ Hz, $J_{4',2'} = 1.9$ Hz, 1H, H-4^I), 8.01 (t, $J_{2',4'} = J_{2',6'} = 1.9$ Hz, 1H, H-2^I), 7.77 (ddd, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 1.9$ Hz, $J_{6',4'} = 0.9$ Hz, 2H, H-6^I), 7.47 (t, $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.0$ Hz 1H, H-5^I), 4.45 (s, 2H, H-2), 3.48 (d, $J_{2'',NH_2} = 3.3$ Hz, 2H, H-2^{II}), 1.67 (br s, 2H, -NH₂), 1.46 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.33 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 171.1 (C_{2II}), 167.5 (C₂), 150.5 (-NCO₂tBu), 140.5 (C_{1'}/C_{3'}), 138.2 (C_{1'}/C_{3'}), 129.6 (C_{5'}), 124.2 (C_{4'}), 123.7 (C_{6'}), 119.0 (C_{2'}), 85.0 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.5 (-C(CH₃)₃), 47.7 (C₁), 45.2 (C_{1II}), 28.1 (-C(CH₃)₃), 28.0 (carbamate-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 2981, 1731, 1478, 1356, 1249, 1139 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₉H₂₉N₃O₇S+H]⁺: 444.1804; found [M+H]⁺: 444.1804. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-N-[(3-[[N-(4-ethylbenzoyl)glycyl]amino]phenyl)sulfonyl]glycinate, 40d



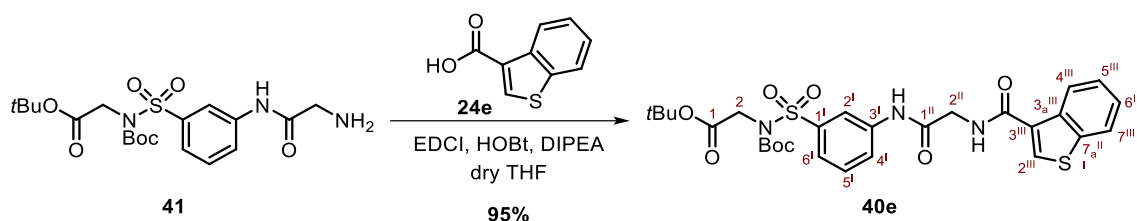
To a stirred solution of aniline **41** (202 mg, 0.46 mmol) in dry THF (5 mL) under N₂ atmosphere, a solution of 4-ethylbenzoic acid, **24d** (109 mg, 0.73 mmol), EDCI (120 μL, 0.73 mmol), HOBT (101 mg, 0.68 mmol) and DIPEA (0.32 mL, 1.84 mmol) in dry THF (6 mL) was added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Then, the mixture was quenched with water (5 mL) and extracted with EtOAc (8 mL). The organic layer was washed with water (3 x 10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc 2:1 → 1:1) to furnish a white solid identified as compound **40d** (227 mg, 0.39 mmol, 87% yield).

Physical and spectroscopic data of 40d

Mp = 78 - 81 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 9.71 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.34 (br t, $J_{2',4'} = J_{2',6'} = 1.9$ Hz, 1H, H-2^I), 8.11 (br t, $J_{NHCO,2''} = 5.8$ Hz, 1H, -NHCO-), 8.01 (dd, $J_{4',5'} = 8.2$ Hz, $J_{4',2'} = 1.9$ Hz, 1H, H-4^I), 7.89 (d, $J_{2''',3'''} = 8.1$ Hz, 2H, H-2^{III}), 7.76 (dd, $J_{6',5'} = 8.0$ Hz, $J_{6',2'} = 1.7$ Hz, 1H, H-6^I), 7.56 (t, $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.1$ Hz, 1H, H-5^I), 7.33 (d, $J_{3''',2'''} = 8.1$ Hz, 2H, H-3^{III}), 4.44 (s, 2H, H-2), 4.24 (d, $J_{2'',NHCO} = 5.8$ Hz, 2H, H-2^{II}), 2.70 (q, $J_{CH_2,CH_3} = 7.7$ Hz, 2H, -CH₂CH₃), 1.45 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.33 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃), 1.23 (t, $J_{CH_3,CH_2} = 7.7$ Hz, 2H, -CH₂CH₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, acetone-*d*₆): δ 169.2 (C_{1II}), 168.0 (C₁), 167.9 (-

NHCO-), 151.2 (-NCO₂tBu), 148.9 (C₄^{III}), 141.5 (C₁^I /C₃^I), 140.2 (C₁^I /C₃^I), 132.6 (C₁^{III}), 130.1 (C₅^I), 128.7 (C₃^{III}), 128.3 (C₂^{III}), 124.8 (C₄^I), 123.7 (C₆^I), 119.8 (C₂^I), 85.0 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.5 (-C(CH₃)₃), 48.5 (C₂), 44.8 (C₂^{II}), 29.3 (-CH₂CH₃), 28.1 (-C(CH₃)₃), 28.0 (carbamate-C(CH₃)₃), 15.8 (-CH₂CH₃). **IR** (ATR): ν 3280, 2923, 1731, 1536, 1479, 1360, 1141 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₈H₃₇N₃O₈S+Na]⁺: 598.2199; found [M+Na]⁺: 598.2204. **COSY**, **DEPT135** and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-[(3-[[*N*-(1-benzothien-3-ylcarbonyl)glycyl]amino]phenyl)sulfonyl]-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)glycinate, **40e**

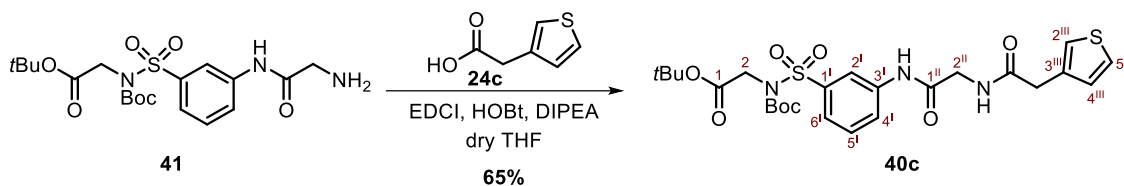


Compound **40e** was prepared as described for **40d** by using solution of compound **41** (153 mg, 0.35 mmol) in dry THF (6 mL) and a solution of commercially available benzothiophene-3-carboxylic acid, **24e** (94 mg, 0.53 mmol), EDCI (90 μ L, 0.51 mmol), HOBT (73 mg, 0.54 mmol) and DIPEA (0.24 mL, 1.38 mmol) in dry THF (6 mL). The residue was purified by flash column chromatography (CHCl₃/Et₂O, 2:1) to furnish **40e** (198 mg, 0.33 mmol, 95% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **40e**

Mp = 134 - 137 °C (from CH₂Cl₂). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.50 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.87 (t, $J_{\text{NHCO},2\text{II}}$ = 6.0 Hz, 1H, -NHCO-), 8.48 (m, 1H, H-4^{III}), 8.45 (s, 1H, H-2^{III}), 8.32 (br t, $J_{2\text{I},4\text{I}} = J_{2\text{I},6\text{I}} = 1.9$ Hz, 1H, H-2^I), 8.06 (m, 2H, H-7^{III}), 7.92 (br ddd, $J_{4\text{I},5\text{I}} = 8.1$ Hz, $J_{4\text{I},2\text{I}} = 1.9$ Hz, $J_{4\text{I},6\text{I}} = 1.1$ Hz, 1H, H-4^I), 7.68 (br ddd, $J_{6\text{I},5\text{I}} = 7.9$ Hz, $J_{6\text{I},2\text{I}} = 1.8$ Hz, $J_{6\text{I},4\text{I}} = 1.1$ Hz, 1H, H-6^I), 7.60 (t, $J_{5\text{I},4\text{I}} = J_{5\text{I},6\text{I}} = 8.0$ Hz, 1H, H-5^I), 7.47 - 7.41 (m, 2H, H-5^{III}, H-6^{III}), 4.41 (s, 2H, H-2), 4.12 (d, $J_{2\text{II},\text{NHCO}} = 6.0$ Hz, 2H, H-2^{II}), 1.40 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.27 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.5 (C₁^{II}), 167.0 (C₁), 163.6 (-NHCO-), 149.9 (-NCO₂tBu), 139.7 (C₁^I), 139.4 (C₃^I), 139.3 (C_{3a}^{III}), 137.2 (C_{7a}^{III}), 131.3 (C₂^{III}), 130.4 (C₃^{III}), 129.7 (C₅^I), 124.9 (C₆^{III}), 124.8 (C₅^{III}), 124.5 (C₄^{III}), 123.8 (C₄^I), 122.7 (C₇^{III}), 122.1 (C₆^I), 118.3 (C₂^I), 84.3 (carbamate-C(CH₃)₃), 81.8 (-C(CH₃)₃), 47.7 (C₂), 43.0 (C₂^{II}), 27.5 (-C(CH₃)₃), 27.3 (carbamate-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 3260, 2981, 1733, 1628, 1348, 1228, 1138, cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₈H₃₃N₃O₈S₂+H]⁺: 604.1787; found [M+H]⁺: 604.1771. **COSY**, **DEPT135** and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-[3-[[*N*-(3-thienylacetyl)glycyl]amino]phenyl]sulfonyl]glycinate, **40c**

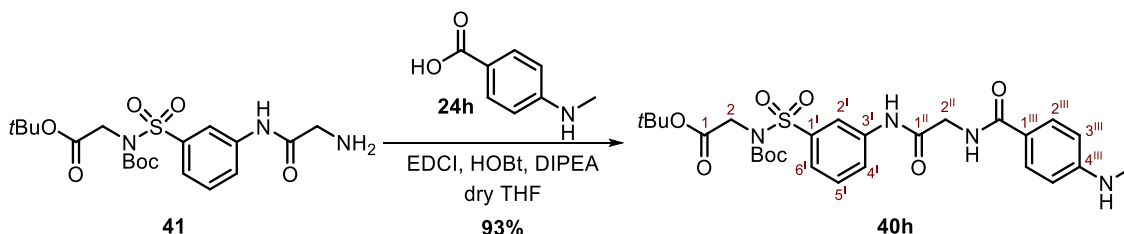


Compound **40c** was prepared as described for **40d** by using solution of compound **41** (153 mg, 0.35 mmol) in dry THF (4 mL) and a solution of commercially available 3-thiopheneacetic acid, **24c** (68 mg, 0.46 mmol), EDCI (80 μ L, 0.46 mmol), HOBT (58 mg, 0.43 mmol) and DIPEA (0.20 mL, 1.15 mmol) in dry THF (4 mL). The residue was purified by a recrystallization in hexanes/EtOAc (2:1) to furnish **40c** (105 mg, 0.18 mmol, 65% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **40c**

Mp = 130 - 134 $^{\circ}$ C (from CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, acetone- d_6): δ 9.57 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.32 (br t, 1H, H-2^I), 7.93 (br d, $J_{4^I,5^I} = 8.0$ Hz, 1H, H-4^I), 7.76 (d, $J_{6^I,5^I} = 8.0$ Hz, 1H, H-6^I), 7.57 (t, $J_{5^I,4^I} = J_{5^I,6^I} = 8.0$ Hz, 1H, H-5^I), 7.52 (m, 1H, -NHCO-), 7.41 (br dd, $J_{5^{III},4^{III}} = 4.7$ Hz, $J_{5^{III},2^{III}} = 3.0$ Hz, 1H, H-5^{III}), 7.31 (br s, 1H, H-2^{III}), 7.12 (d, $J_{4^{III},5^{III}} = 4.7$ Hz, 1H, H-4^{III}), 4.46 (s, 2H, H-2), 4.07 (s, 2H, H-2^{II}), 3.65 (s, 2H, -CH₂-thiophene), 1.46 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.34 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, acetone- d_6): δ 171.5 (-NHCO-), 168.9 (C_{1^{II}}), 168.1 (C₁), 151.2 (-NCO₂tBu), 141.6 (C_{1^I}), 140.1 (C_{3^I}), 136.6 (C_{1^{III}}), 130.2 (C_{5^I}), 129.6 (C_{4^{III}}), 126.4 (C_{5^{III}}), 124.7 (C_{4^I}), 123.8 (C_{6^I}), 123.4 (C_{2^{III}}), 119.7 (C_{2^I}), 85.1 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.5 (-C(CH₃)₃), 48.5 (C₁), 44.3 (C_{1^{II}}), 38.0 (-CH₂-thiophene), 28.1 (-C(CH₃)₃), 28.0 (carbamate-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 3391, 3274, 2975, 1740, 1640, 1360, 1300, 1146 cm^{-1} . **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₅H₃₃N₃O₈S₂+Na]⁺: 590.1607; found [M+H]⁺: 590.1603. **COSY**, **DEPT135** and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-[3-[[*N*-(4-(methylamino)benzoyl)glycyl]amino]phenyl]sulfonyl]glycinate, **40h**



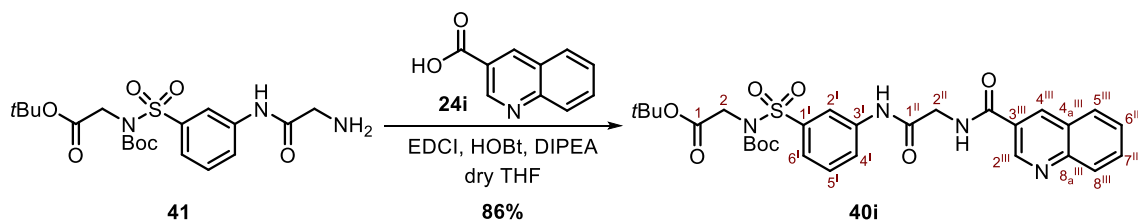
Compound **40h** was prepared as described for **40d** by using solution of compound **41** (128 mg, 0.29 mmol) in dry THF (5 mL) and a solution of commercially available 4-(methylamino)benzoic acid, **24h** (70 mg, 0.46 mmol), EDCI (80 μ L, 0.45 mmol), HOBT (60 mg, 0.44 mmol) and DIPEA (0.20 mL, 1.15

mmol) in dry THF (5 mL). The residue was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 1:1) to furnish **40h** (155 mg, 0.27 mmol, 93% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **40h**

Mp = 100 - 103 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, acetone-*d*₆): δ 9.78 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.34 (s, 1H, H-2^I), 7.99 (d, *J*_{4^I,5^I} = 8.1 Hz, 1H, H-4^I), 7.87 (br s, 1H, -NHCO-), 7.79 (d, *J*_{2^{III},3^{III}} = 8.5 Hz, 2H, H-2^{III}), 7.74 (d, *J*_{6^I,5^I} = 8.1 Hz, 1H, H-6^I), 7.54 (t, *J*_{5^I,4^I} = *J*_{5^I,6^I} = 8.1 Hz, 1H, H-5^I), 6.62 (d, *J*_{3^{III},2^{III}} = 8.4 Hz, 2H, H-3^{III}), 5.57 (br q, *J*_{NHCH₃,CH₃} = 5.2 Hz, 1H, -NHCH₃), 4.44 (s, 2H, H-2), 4.21 (d, *J*_{2^{II},NHCO} = 5.2 Hz 2H, H-2^{II}), 2.83 (d, *J*_{CH₃,NHCH₃} = 5.2 Hz, 3H, -CH₃), 1.47 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.33 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, acetone-*d*₆): δ 169.7 (C_{1^{II}}), 168.2 (-NHCO-), 168.0 (C₁), 153.7 (C_{4^{III}}), 151.2 (-NCO₂*t*Bu), 141.5 (C_{1^I}), 140.3 (C_{3^I}), 130.1 (C_{5^I}), 129.8 (C_{2^{III}}), 124.8 (C_{4^I}), 123.7 (C_{6^I}), 121.8 (C_{1^{III}}), 119.7 (C_{2^I}), 111.6 (C_{3^{III}}), 85.0 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.5 (-C(CH₃)₃), 48.5 (C₁), 45.0 (C_{1^I}), 29.6 (-CH₃), 28.1 (-C(CH₃)₃), 28.0 (carbamate-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 3414, 2980, 1730, 1604, 1509, 1302, 1140 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₇H₃₆N₄O₈S+H]⁺: 577.2332; found [M+H]⁺: 577.2329. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-[(3-{[*N*-(quinolin-3-ylcarbonyl)glycyl]amino}phenyl)sulfonyl]glycinate, **40i**



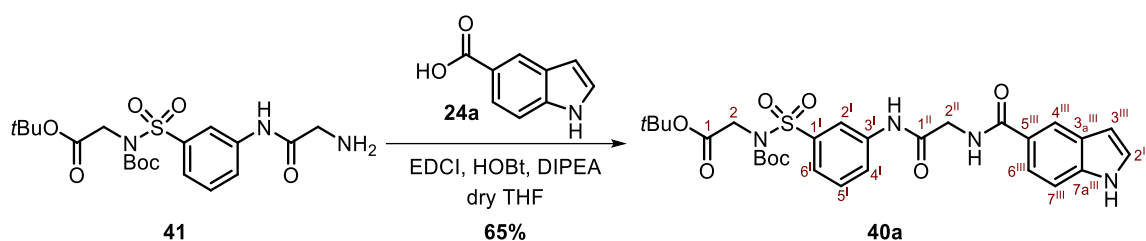
Compound **40** was prepared as described for **40d** by using solution of compound **41** (36 mg, 81 μmol) in dry THF (1.5 mL) and a solution of commercially available 3-quinolinecarboxylic acid, **24i** (27 mg, 0.16 mmol), EDCI (22 μL, 0.13 mmol), HOBT (20 mg, 0.15 mmol) and DIPEA (60 μL, 0.34 mmol) in dry THF/DMF (2 mL/0.2 mL). The residue was purified by flash column chromatography (EtOAc, 100%) to furnish **40i** (42 mg, 0.07 mmol, 86% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of **40i**

Mp = 155 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 9.77 (s, 1H, -NH-1^{II}), 9.40 (d, *J*_{2^{III},4^{III}} = 2.0 Hz, 1H, H-2^{III}), 8.87 (d, *J*_{4^{III},2^{III}} = 2.0 Hz, 1H, H-4^{III}), 8.54 (br t, *J*_{NHCO,2^{II}} = 5.6 Hz, 1H, -NHCO-), 8.37 (s, 1H, H-2^I), 8.11 (d, *J*_{8^{III},7^{III}} = 8.7 Hz, 1H, H-8^{III}), 8.07 (d, *J*_{5^{III},6^{III}} = 8.0 Hz, 1H, H-5^{III}), 8.01 (d, *J*_{4^I,5^I} = 8.2 Hz, 1H, H-4^I), 7.87 (m, 1H, H-7^{III}), 7.77 (d, *J*_{6^I,5^I} = 8.1 Hz, 1H, H-6^I), 7.68 (m, 1H, H-6^{III}), 7.57 (t, *J*_{5^I,4^I} = *J*_{5^I,6^I} = 8.1 Hz, 1H,

H-5^I), 4.45 (s, 2H, H-2), 4.36 (d, $J_{2\text{II},\text{NHCO}} = 5.8$ Hz 2H, H-2^{II}), 1.45 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.33 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). ¹³C NMR (90.5 MHz, acetone-*d*₆): δ 168.8 (C_{1II}), 168.0 (C₁), 166.6 (-NHCO-), 151.2 (-NCOOtBu), 150.2 (C_{8aIII}), 149.8 (C_{2III}), 141.5 (C_{1I}), 140.1 (C_{3I}), 136.3 (C_{4III}), 131.9 (C_{7III}), 130.2 (C_{8III}), 130.1 (C_{5I}), 129.9 (C_{5III}), 128.2 (C_{6III}), 127.7 (C_{3III}), 127.6 (C_{4aIII}), 124.8 (C_{4I}), 123.8 (C_{6I}), 119.8 (C_{2I}), 85.0 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.5 (-C(CH₃)₃), 48.5 (C₁), 44.7 (C_{1II}), 28.1 (-C(CH₃)₃), 28.0 (carbamate-C(CH₃)₃). IR (ATR): ν 3281, 2980, 1730, 1647, 1535, 1358, 1140 cm⁻¹. HRMS (ESI+): calcd. for [C₂₉H₃₄N₄O₈S+H]⁺: 599.2176; found [M+H]⁺: 599.2168. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

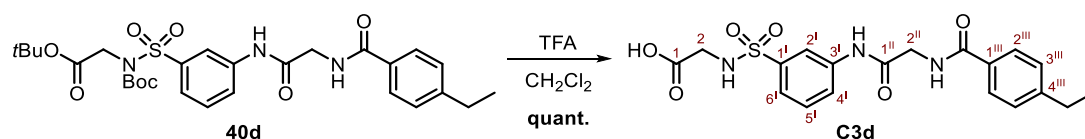
Synthesis of tert-butyl *N*-(tert-butoxycarbonyl)-*N*-[(3-*N*-(1*H*-indol-5-ylcarbonyl)glycyl)amino]phenyl)sulfonyl]glycinate, 40a



Compound **40a** was prepared as described for **40d** by using solution of compound **41** (47 mg, 0.11 mmol) in dry THF (2 mL) and a solution of commercially available 3-quinolinecarboxylic acid, **24a** (28 mg, 0.17 mmol), EDCI (40 μL, 0.23 mmol), HOBT (30 mg, 0.22 mmol) and Et₃N (70 μL, 0.50 mmol) in dry THF (2 mL). The residue was purified by flash column chromatography (EtOAc/hexanes 7:5) to furnish **40a** (40 mg, 70 μmol, 65% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 40a

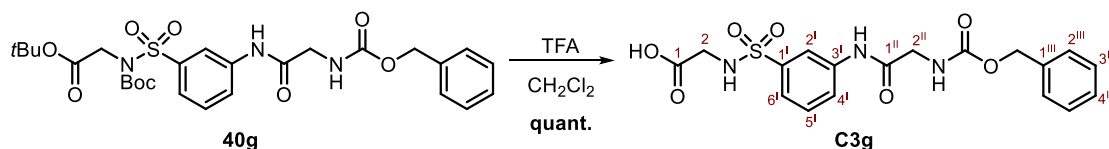
Mp = 157 - 161 °C (from CH₂Cl₂). ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.54 (s, 1H, -NH-), 9.79 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.36 (m, 1H, H-2^I), 8.28 (m, 1H, H-4^{III}), 8.10 (br t, $J_{\text{NHCO},2\text{II}} = 5.6$ Hz, 1H, indole-CONH-), 8.01 (d, $J_{4\text{I},5\text{I}} = 8.2$ Hz, 1H, H-4^I), 7.79 - 7.75 (m, 2H, H-6^I, H-6^{II}), 7.56 (t, $J_{5\text{I},4\text{I}} = J_{5\text{I},6\text{I}} = 8.1$ Hz, 1H, H-5^I), 7.51 (d, $J_{7\text{III},6\text{III}} = 8.1$ Hz, 1H, H-7^{III}), 7.44 (m, 1H, H-2^{III}), 6.60 (m, 1H, H-6^{III}), 4.44 (s, 1H, H-2), 4.28 (d, $J_{2\text{II},\text{NHCO}} = 5.7$ Hz, 2H, H-2^{II}), 1.44 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.33 (s, 9H, carbamate-C(CH₃)₃). ¹³C NMR (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.5 (C_{1II}), 169.2 (indole-CONH-), 168.0 (C₁), 151.2 (-NCO₂tBu), 141.5 (C_{1I}/C_{3I}), 140.3 (C_{1I}/C_{3I}), 138.9 (C_{7aIII}), 130.1 (C_{5I}), 128.5 (C_{3aIII}/C_{5III}), 127.2 (C_{2III}), 126.2 (C_{3aIII}/C_{5III}), 124.8 (C_{4I}), 123.7 (C_{6I}), 121.7 (C_{6III}), 121.2 (C_{4III}), 119.8 (C_{2I}), 111.8 (C_{7III}), 103.5 (C_{3III}), 85.0 (carbamate-C(CH₃)₃), 82.5 (-C(CH₃)₃), 48.5 (C₂), 45.1 (C_{2II}), 28.1 (-C(CH₃)₃), 27.9 (carbamate-C(CH₃)₃). IR (ATR): ν 3380, 2930, 1721, 1605, 1531, 1363, 1229, 1150 cm⁻¹. HRMS (ESI+): calcd. for [C₂₉H₃₄N₄O₈S+H]⁺: 587.2176; found [M+H]⁺: 587,2164. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of *N*-[3-[[*N*-(4-ethylbenzoyl)glycyl]amino]phenyl]sulfonylglycine, **C3d**

To a stirred solution of compound **40d** (208 mg, 0.36 mmol) in CH_2Cl_2 (2.2 mL), TFA (1.50 mL, 19.87 mmol) was added. The mixture was stirred at rt for 5 h. Then, the solution was concentrated under vacuum and the resulting purple solid was washed with cold CH_2Cl_2 to furnish **C3d** (150 mg, 0.36 mmol, quant. yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C3d**

Mp = 222 - 225 °C (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.38 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.80 (t, $J_{\text{NHCO},2^{\text{II}}}$ = 5.9 Hz, 1H, -NHCO-), 8.13 (br t, $J_{2^{\text{I}},4^{\text{I}}} = J_{2^{\text{I}},6^{\text{I}}} = 1.8$ Hz, 1H, H-2^I), 8.07 (br t, $J_{\text{NHSO}_2,1}$ = 5.9 Hz, 1H, -NH SO_2 -), 7.84 (d, $J_{2^{\text{III}},3^{\text{III}}} = 8.3$ Hz, 2H, H-2^{III}), 7.81 (m, 1H, H-4^I), 7.51 (t, $J_{5^{\text{I}},4^{\text{I}}} = J_{5^{\text{I}},6^{\text{I}}} = 7.9$ Hz, 1H, H-5^I), 7.47 (dt, $J_{6^{\text{I}},5^{\text{I}}} = 8.0$ Hz, $J_{6^{\text{I}},2^{\text{I}}} = J_{6^{\text{I}},4^{\text{I}}} = 1.5$ Hz, 1H, H-6^I), 7.32 (d, $J_{3^{\text{III}},2^{\text{III}}} = 8.3$ Hz, 2H, H-3^{III}), 4.07 (d, $J_{2^{\text{II}},\text{NHCO}} = 5.9$ Hz, 2H, H-2^{II}), 3.58 (d, $J_{1,\text{NHSO}_2} = 5.7$ Hz 2H, H-2), 2.66 (q, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.4$ Hz, 2H, - CH_2CH_3), 1.20 (t, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.5$ Hz, 2H, - CH_3). **$^{13}\text{C NMR}$** (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 170.2 (C₁), 168.4 (C_{1^{II}}), 166.6 (-NHCO-), 147.5 (C_{4^{III}}), 141.2 (C₁/C₃), 139.5 (C₁/C₃), 131.4 (C_{1^{III}}), 129.7 (C_{5^I}), 127.7 (C_{3^{III}}), 127.5 (C_{2^{III}}), 122.5 (C_{4^I}), 121.0 (C_{6^I}), 116.9 (C_{2^I}), 43.8 (C₂), 43.4 (C_{2^{II}}), 28.1 (- CH_2CH_3), 15.8 (- CH_3). **IR** (ATR): ν 3324, 2935, 1731, 1598, 1544, 1306, 1149 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}+\text{H}]^+$: 420.1229; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 420.1216. **COSY**, **DEPT135** and **$^1\text{H}/^{13}\text{C}$** correlation were recorded.

Synthesis of *N*-[3-[[*N*-[(benzyloxy)carbonyl]glycyl]amino]phenyl]sulfonylglycine, **C3g**

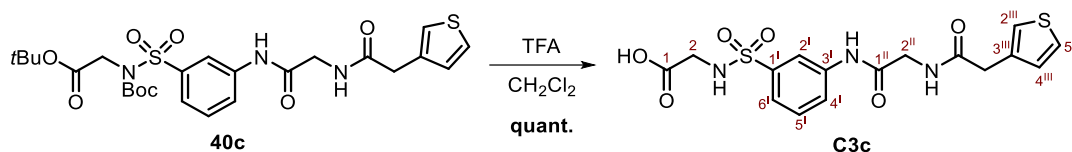
Compound **C3g** was prepared as described for **C3d** by using compound **40g** (231 mg, 0.40 mmol), TFA (1.69 mL, 22.08 mmol) in CH_2Cl_2 (2.0 mL). The residue was washed with hexane/ Et_2O (1:1) to furnish **C3g** (166 mg, 0.39 mmol, quant. yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C3g**

Mp = 160 - 165 °C (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.70 (br s, 1H, -COOH), 10.31 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.10 (s, 1H, H-2^I), 8.08 (t, $J_{\text{NHSO}_2,1}$ = 5.8 Hz, 1H, -NH SO_2 -), 7.80 (d, $J_{4^{\text{I}},5^{\text{I}}} = 7.9$ Hz, 1H, H-4^I), 7.61 (br t, $J_{\text{NHCO},2^{\text{II}}}$ = 5.9 Hz, 1H, -NHCBz), 7.53 - 7.45 (m, 2H, H-5^I, H-6^I), 7.38 - 7.23 (m, 5H, -phenyl), 5.05 (s,

2H, -CH₂-Ph), 3.82 (d, $J_{2\text{II},\text{NHCO}_2} = 6.2$ Hz, 2H, H-2^{II}), 3.56 (s, d, $J_{2,\text{NHSO}_2} = 6.1$ Hz, 2H, H-2). ¹³C NMR (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.2 (C₁), 168.5 (C_{1^{II}}), 156.6 (-NHCBz), 141.2 (C_{1^I}), 139.4 (C_{3^I}), 137.0 (C_{1^{III}}), 129.7 (C_{5^I}), 128.4 (C_{3^{III}}), 127.8 (C_{2^{III}}, C_{4^{III}}), 122.4 (C_{4^I}), 121.0 (C_{6^I}), 116.8 (C_{2^I}), 65.6 (-CH₂-Ph), 44.1 (C_{2^{II}}), 43.8 (C₂). IR (ATR): ν 3285, 1685, 1594, 1525, 1433, 1246, 1154 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₁₉N₃O₇S+Na]⁺: 444.0841; found [M+Na]⁺: 444.0839. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of *N*-[(3-[[*N*-(3-thienylacetyl)glycyl]amino]phenyl)sulfonyl]glycine, **C3c**

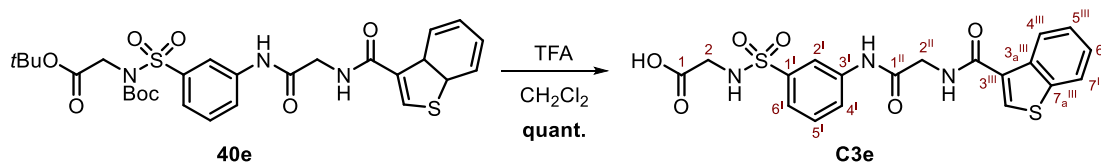


Compound **C3c** was prepared as described for **C3d** by using compound **40c** (104 mg, 0.18 mmol), TFA (0.77 mL, 10.07 mmol) in CH₂Cl₂ (1.0 mL). The residue was washed with CH₂Cl₂ to furnish **C3c** (74 mg, 0.18 mmol, quant. yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C3c**

Mp = 175 - 179 °C (from CH₂Cl₂). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.68 (br s, 1H, -COOH), 10.32 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.39 (t, $J_{\text{NHCO},2\text{II}} = 5.8$ Hz, 1H, -NHCO-), 8.11 (s, 1H, H-2^I), 8.06 (m, 1H, -NHSO₂-), 7.79 (d, $J_{4',5'} = 7.9$ Hz, 1H, H-4'), 7.51 (t, $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 7.47 - 7.45 (m, 2H, H-6', H-5^{III}), 7.29 (m, 1H, H-2^{III}), 7.07 (dd, $J_{4\text{III},5\text{III}} = 4.9$ Hz, $J_{4\text{III},2\text{III}} = 1.1$ Hz, 1H, H-4^{III}), 3.92 (m, 2H, H-2^{II}), 3.58 (d, $J_{2,\text{NHSO}_2} = 5.7$ Hz, 2H, H-2), 3.54 (s, 2H, -CH₂-thiophene). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.4 (C₁), 170.2 (-NHCO-), 168.3 (C_{1^{II}}), 141.2 (C_{1^I}), 139.4 (C_{3^I}), 136.0 (C_{3^{III}}), 129.7 (C_{5^I}), 128.8 (C_{4^{III}}), 125.7 (C_{5^{III}}), 122.5 (C_{4^I}), 122.3 (C_{2^{III}}), 121.0 (C_{6^I}), 116.8 (C_{2^I}), 43.8 (C₂), 42.8 (C_{2^{II}}), 36.8 (-CH₂-thiophene). IR (ATR): ν 3265, 2402, 1728, 1627, 1413, 1341, 1247, 1159 cm⁻¹. HRMS (ESI⁻): calcd. for [C₁₆H₁₇N₃O₆S₂-H]⁻: 410.0481; found [M-H]⁻: 410.0488. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

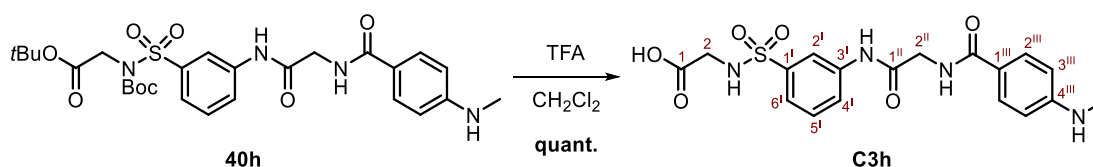
Synthesis of *N*-[(3-[[*N*-(1-benzothien-3-ylcarbonyl)glycyl]amino]phenyl)sulfonyl]glycine, **C3e**



Compound **C3e** was prepared as described for **C3d** by using compound **40e** (114 mg, 0.19 mmol), TFA (0.79 mL, 10.32 mmol) in CH₂Cl₂ (2.2 mL). The residue was washed with hexane/Et₂O (1:1) to furnish **C3e** (84 mg, 0.19 mmol, quant. yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of C3e

Mp = 213 - 216 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.44 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.87 (t, $J_{\text{NHCO},2^{\text{II}}}$ = 5.9 Hz, 1H, -NHCO-), 8.48 (m, 1H, H-4^{III}), 8.46 (s, 1H, H-2^{III}), 8.14 (br t, $J_{2^{\text{I}},4^{\text{I}}} = J_{2^{\text{I}},6^{\text{I}}} = 1.8$ Hz, 1H, H-2^I), 8.09 (t, $J_{\text{NHSO}_2,2}$ = 6.2 Hz, 1H, -NHSO₂-), 8.06 (m, 1H, H-7^{III}), 7.84 (m, 1H, H-4^I), 7.53 (t, $J_{5^{\text{I}},4^{\text{I}}} = J_{5^{\text{I}},6^{\text{I}}} = 7.9$ Hz, 1H, H-5^I), 7.49 (m, 1H, H-6^I), 7.47 - 7.40 (m, 2H, H-5^{III}, H-6^{III}), 4.12 (d, $J_{2^{\text{II}},\text{NHCO}} = 5.9$ Hz, 2H, H-2^{II}), 3.58 (d, $J_{2,\text{NHSO}_2} = 6.2$ Hz, 2H, H-2). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.2 (C₁), 168.4 (C_{1^{II}}), 163.6 (-NHCO-), 141.2 (C_{1^I}), 139.5 (C_{3^I}), 139.5 (C_{3a^{III}}), 137.2 (C_{7a^{III}}), 131.3 (C_{2^{III}}), 130.4 (C_{3^{III}}), 129.7 (C_{5^I}), 124.9 (C_{6^{III}}), 124.9 (C_{5^{III}}), 124.5 (C_{4^{III}}), 122.8 (C_{7^{III}}), 122.5 (C_{4^I}), 121.1 (C_{6^I}), 116.9 (C_{2^I}), 43.8 (C₂), 43.0 (C_{2^{II}}). **IR** (ATR): ν 3256, 1732, 1633, 1531, 1408, 1306, 1159 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₉H₁₇N₃O₆S₂+H]⁺: 448.0637; found [M+H]⁺: 448.0633. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

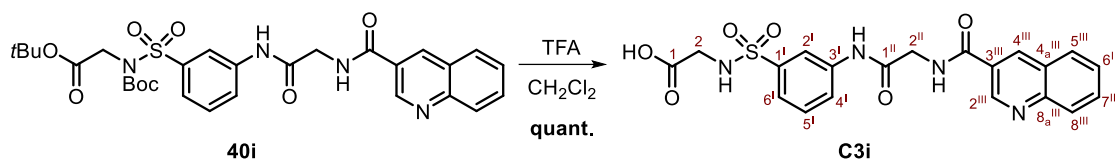
Synthesis of *N*-{[3-({*N*-[4-(methylamino)benzoyl]glycyl)amino]phenyl]sulfonyl}glycine, C3h

Compound **C3h** was prepared as described for **C3d** by using compound **40h** (84 mg, 0.15 mmol), TFA (0.61 mL, 8.03 mmol) in CH₂Cl₂ (0.8 mL). The residue was solved in acetone and CH₂Cl₂ was added to precipitate **C3h** (60 mg, 0.14 mmol, quant. yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of C3h

Mp = 225 - 230 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.33 (s, 1H, -NH-1^{II}), 8.43 (br t, $J_{\text{NHCO},2^{\text{II}}}$ = 5.5 Hz, 1H, -NHCO-), 8.12 (s, 1H, H-2^I), 8.07 (t, $J_{\text{NHSO}_2,2}$ = 5.9 Hz, 1H, -NHSO₂-), 7.82 (d, $J_{4^{\text{I}},5^{\text{I}}} = 8.0$ Hz, 1H, H-4^I), 7.69 (d, $J_{2^{\text{III}},3^{\text{III}}} = 8.8$ Hz, 2H, H-2^{III}), 7.51 (t, $J_{5^{\text{I}},4^{\text{I}}} = J_{5^{\text{I}},6^{\text{I}}} = 8.0$ Hz, 1H, H-5^I), 7.46 (d, $J_{6^{\text{I}},5^{\text{I}}} = 8.0$ Hz, 1H, H-6^I), 6.55 (d, $J_{3^{\text{III}},2^{\text{III}}} = 8.8$ Hz, 2H, H-3^{III}), 4.01 (d, $J_{2^{\text{II}},\text{NHCO}} = 5.3$ Hz, 2H, H-2^{II}), 3.57 (d, $J_{2,\text{NHSO}_2} = 5.9$ Hz, 2H, H-2), 2.72 (s, 3H, -CH₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.5 (C₁), 168.4 (C_{1^{II}}), 166.5 (-NHCO-), 152.0 (C_{4^{III}}), 141.1 (C_{1^I}), 139.1 (C_{3^I}), 129.0 (C_{5^I}), 128.4 (C_{2^{III}}), 122.4 (C_{4^I}), 120.6 (C_{6^I}), 120.5 (C_{1^{III}}), 116.8 (C_{2^I}), 110.2 (C_{3^{III}}), 43.6 (C₂), 43.2 (C_{2^{II}}), 29.0 (-CH₃). **IR** (ATR): ν 3391, 3328, 2449, 1719, 1601, 1525, 1300, 1152 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₂₀N₄O₆S+H]⁺: 421.1182; found [M+H]⁺: 421.1182. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *N*-[(3-[[*N*-(quinolin-3-ylcarbonyl)glycyl]amino]phenyl)sulfonyl]glycine, **C3i**

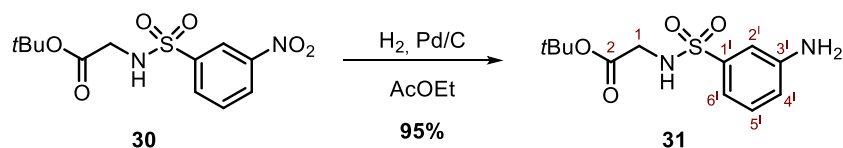


Compound **C3i** was prepared as described for **C3d** by using compound **40i** (172 mg, 0.29 mmol), TFA (1.20 mL, 15.81 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL). The residue was solved in acetone and recrystallized adding CH₂Cl₂. The resulting solid was washed with hexane to obtain **C3i** (125 mg, 0.28 mmol, quant. yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **C3i**

Mp = > 230 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.45 (s, 1H, -NH-1^{''}), 9.37 (s, 1H, H-2^{'''}), 9.32 (br t, *J*_{NHCO,2^{''}} = 5.5 Hz, 1H, -NHCO-), 8.97 (s, 1H, H-4^{'''}), 8.17 - 8.11 (m, 3H, H-2['], H-5^{'''}, H-8^{'''}), 8.07 (m, 1H, -NHSO₂-), 7.92 (t, *J*_{7^{'''},6^{'''}} = *J*_{7^{'''},8^{'''}} = 7.5 Hz, 1H, H-7^{'''}), 7.83 (d, *J*_{4['],5[']} = 7.7 Hz, 1H, H-4[']), 7.74 (t, *J*_{6^{'''},5^{'''}} = *J*_{6^{'''},7^{'''}} = 7.5 Hz, 1H, H-6^{'''}), 7.55 - 7.47 (m, 2H, H-5['], H-6[']), 4.19 (d, *J*_{2^{''},NHCO} = 5.5 Hz, 2H, H-2^{''}), 3.58 (d, *J*_{2,NHSO₂} = 5.8 Hz, 2H, H-2). **¹³C NMR** (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.2 (C₁), 168.1 (C_{1^{''}}), 165.2 (-NHCO-), 148.6 (C_{2^{'''}}), 147.7 (C_{8a^{'''}}), 141.2 (C_{1[']}), 139.4 (C_{3[']}), 136.6 (C_{4^{'''}}), 131.7 (C_{7^{'''}}), 129.7 (C_{5[']}), 129.3 (C_{5^{'''}}), 128.2 (C_{8^{'''}}), 127.7 (C_{6^{'''}}), 126.7 (C_{3^{'''}}), 126.6 (C_{4a^{'''}}), 122.6 (C_{4[']}), 121.1 (C_{6[']}), 116.9 (C_{2[']}), 43.8 (C_{2^{''}}), 43.4 (C₂). **IR** (ATR): ν 3253, 3083, 1648, 1594, 1518, 1428, 1314, 1155 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₀H₁₈N₄O₆S+H]⁺: 443.1025; found [M+H]⁺: 443.1019. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl [(3-aminophenyl)sulfonyl]glycinate, **31**⁷

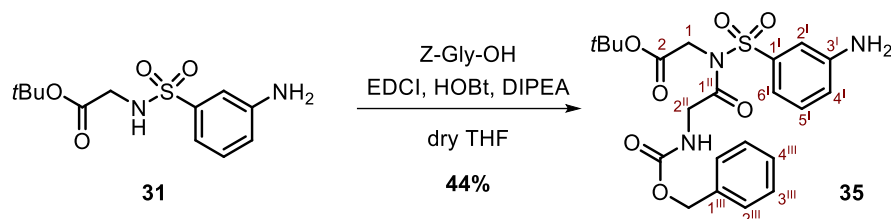


A mixture of **30** (62 mg, 0.20 mmol) and 10% Pd/C (13.5 mg, 0.13 mmol) in EtOAc (33 mL) and was stirred under H₂ (1 atm) overnight. The suspension was filtered over Celite® and the filtrate was concentrated to obtain **31** (53 mg, 0.19 mmol, 95% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **31**

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 7.26 - 7.13 (m, 3H, H-2['], H-6['], H-5[']), 6.82 (ddd, *J*_{4['],5[']} = 7.6 Hz, *J*_{4['],6[']} = 2.3 Hz, *J*_{4['],2[']} = 1.3 Hz, 1H, H-4[']), 5.17 (br t, 1H, -NHSO₂-), 3.93 (br s, 2H, -NH₂), 3.66 (d, *J*_{2,NHSO₂} = 5.4 Hz, 2H, H-2), 1.36 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

Synthesis of *tert*-butyl *N*-[(benzyloxy)carbonyl]glycyl-*N*-[(3-aminophenyl)sulfonyl]glycinate, **35**

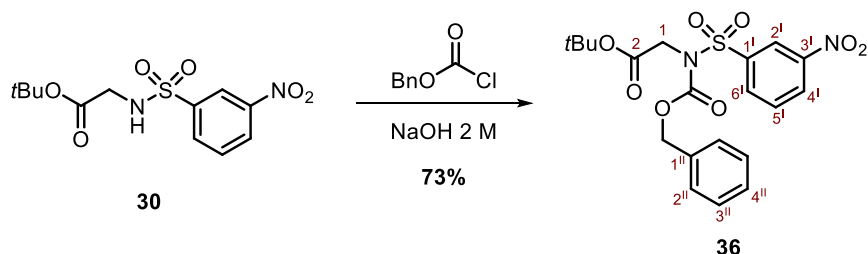


To a stirred solution of aniline **31** (146 mg, 0.51 mmol) in dry THF (3 mL) under N_2 atmosphere, a solution of Z-Gly-OH (222 mg, 1.04 mmol), EDCI (90 μ L, 0.51 mmol), HOBT (69 mg, 0.51 mmol) and DIPEA (0.70 mL, 4.00 mmol) in dry THF (6 mL) was added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. The reaction was quenched with water (5 mL) and extracted with EtOAc (8 mL). Then, the organic layer was washed with water (3 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by column chromatography ($CHCl_3/Et_2O$, 2:1) to furnish a brown solid identified as carbamate **35** (107 mg, 0.22 mmol, 44% yield).

Physical and spectroscopic data of **35**

Mp = 85 - 87 $^{\circ}C$ (from CH_2Cl_2). 1H NMR (360 MHz, acetone- d_6): δ 7.37 - 7.29 (m, 7H, H-2', H-5', -phenyl), 7.21 (d, 1H, $J_{6',5'} = 7.9$ Hz, H-6'), 7.01 (d, $J_{4',5'} = 8.2$ Hz, $J_{4',NH_2} = 1.5$ Hz, 1H, H-4'), 6.59 (br t, $J_{NH,CH_2} = 6.0$ Hz, 1H, -NH-2''), 5.31 (br s, 2H, -NH₂), 5.07 (s, 2H, -CH₂-phenyl), 4.43 (s, 2H, H-1), 4.37 (d, $J_{CH_2,NH} = 6.1$ Hz, 2H, H-2''), 1.40 (s, 9H, -C(CH₃)₃). ^{13}C NMR (90.5 MHz, acetone- d_6): δ 170.4 (C₁₁), 167.2 (C₂), 157.4 (-NHCBz), 150.5 (C₃), 140.6 (C₁), 138.1 (C₁₁), 131.0 (C₅), 129.2/128.6 (C₂''''/C₃''''/C₄'''), 120.3 (C₄), 115.8 (C₆), 112.9 (C₂), 82.5 (-C(CH₃)₃), 66.8 (-CH₂-phenyl), 48.6 (C₁), 45.8 (C₂''), 28.0 (-C(CH₃)₃). IR (ATR): ν 3379, 2933, 1695, 1632, 1538, 1353, 1143 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₂₂H₂₇N₃O₇S+H]⁺: 478.1648; found [M+H]⁺: 478.1641. COSY, DEPT135 and $^1H/^{13}C$ correlation were recorded.

Synthesis of *tert*-butyl *N*-[(benzyloxy)carbonyl]-*N*-[(3-nitrophenyl)sulfonyl]glycinate, **36**



To a stirred solution of sulfonamide **30** (202 mg, 0.71 mmol) in 2 M NaOH (0.35 mL) at 0 $^{\circ}C$, a cooled solution of benzyl chloroformate (0.11 mL, 0.78 mmol) in 2 M NaOH (0.41 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 2 h at 0 $^{\circ}C$. Then, the mixture was extracted with EtOAc (2 x 5 mL).

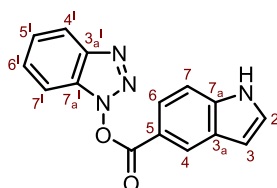
The organic layer was washed with water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) to furnish product **36** (231 mg, 0.51 mmol, 73% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **36**

Mp = 102 - 104 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 8.76 (t, $J_{2^1,4^1} = J_{2^1,6^1} = 2.0$ Hz, 1H, H-2¹), 8.54 (ddd, $J_{4^1,5^1} = 8.3$ Hz, $J_{4^1,2^1} = 2.2$ Hz, $J_{4^1,6^1} = 1.0$ Hz, 1H, H-4¹), 8.41 (ddd, $J_{6^1,5^1} = 8.0$ Hz, $J_{6^1,2^1} = 1.8$ Hz, $J_{6^1,4^1} = 1.0$ Hz, 1H, H-6¹), 7.88 (t, $J_{5^1,4^1} = J_{5^1,6^1} = 8.1$ Hz, 1H, H-5¹), 7.34 - 7.24 (m, 5H, -phenyl), 5.15 (s, 2H, -CH₂-phenyl), 4.62 (s, 2H, H-1), 1.42 (s, 9H, -C(CH₃)₃). **¹³C NMR** (90.5 MHz, acetone-*d*₆): δ 168.0 (C₂), 152.2 (-NCBz), 148.7 (C₃), 141.6 (C₁), 135.5 (C₆, C₁₁), 131.4 (C₅), 129.4 (C₄), 129.3/129.2 (C₂||/C₃||/C₄||), 124.8 (C₂), 83.1 (-C(CH₃)₃), 70.0 (-CH₂-phenyl), 48.8 (C₁), 28.0 (-C(CH₃)₃). **IR** (ATR): ν 2979, 1737, 1529, 1352, 1321, 1224, 1161 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₂₀H₂₂N₂O₈S+H]⁺: 473.0995; found [M+H]⁺: 473.0990. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

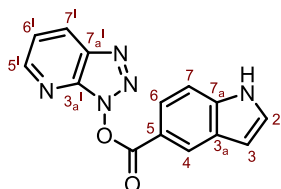
Physical and spectroscopic data of impurities **45** and **46**

1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 1H-indole-5-carboxylate, **45**



Mp = 185 - 187 °C (from acetone). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 10.95 (br s, 1H, -NH-), 8.70 (s, 1H, H-4), 8.12 (d, $J_{4^1,5^1} = 8.5$ Hz, 1H, H-4¹), 8.03 (d, $J_{6,7} = 8.7$ Hz, 1H, H-6), 7.81 (d, $J_{7^1,6^1} = 8.5$ Hz, 1H, H-7¹), 7.72 (d, $J_{7,6} = 8.7$ Hz, 1H, H-7), 7.66 (m, 1H, H-6¹), 7.61 (m, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-5¹), 6.80 (m, 1H, H-3). **¹³C NMR** (100.6 MHz, acetone-*d*₆): δ 164.8 (-COO-), 144.3 (C_{3a}), 141.1 (C_{7a}), 130.0 (C_{7a}), 129.3 (C₅), 129.1/128.2/125.9/125.3 (C₂/C₅/C_{3a}/C₄), 123.6 (C₆), 120.4 (C₄), 115.9 (C₇), 112.8 (C₇), 109.3 (C₃), 104.2 (C₃). **IR** (ATR): ν 3188, 1763, 1614, 1446, 1309, 1239, 1094 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₅H₁₀N₄O₂+H]⁺: 279.0882; found [M+H]⁺: 279.0883.

3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yl 1H-indole-5-carboxylate, **46**

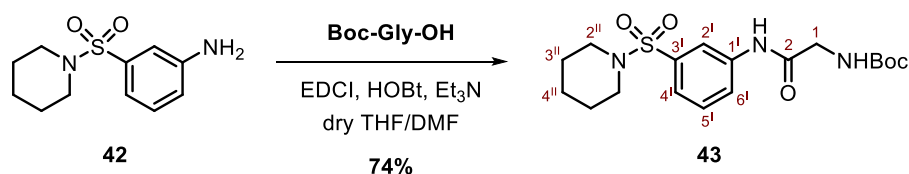


Mp = 215 - 219 °C (from acetone). **¹H NMR** (250 MHz, acetone-*d*₆): δ 11.00 (s, 1H, -NH-), 8.80 (dd, $J_{5^1,6^1} = 4.5$ Hz, $J_{5^1,7^1} = 1.5$ Hz, 1H, H-5¹), 8.72 (s, 1H, H-4), 8.62 (dd, $J_{7^1,6^1} = 8.4$ Hz, $J_{7^1,5^1} = 1.4$ Hz, 1H, H-7¹), 8.05 (dd, $J_{6,7} = 8.7$ Hz, $J_{6,4} = 1.7$ Hz, 1H, H-6), 7.74 (d, $J_{7,6} = 8.7$ Hz, 1H, H-7), 7.67 - 7.60 (m, 2H, H-2, H-6¹), 6.81 (m, 1H, H-3). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.6 (-COO-), 152.7 (C₅), 140.2 (C_{3a}), 140.0 (C_{7a}), 134.5 (C_{7a}), 129.9 (C₇), 128.5 (C₂), 127.8/127.2 (C₅, C_{3a}), 125.1 (C₄), 122.8 (C₆), 121.8 (C₆), 112.6 (C₇), 103.4 (C₃). **IR** (ATR): ν 3235, 1763, 1599, 1403, 1238, 1114 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for

$[C_{14}H_9N_5O_2+H]^+$: 280.0834; found $[M+H]^+$: 280.0816. **COSY**, **DEPT135** and $^1H/^{13}C$ correlation were recorded.

VI.3.1.4. Synthesis of compound C4a

Synthesis of *tert*-butyl (2-oxo-2-[[3-(piperidin-1-ylsulfonyl)phenyl] amino]ethyl)carbamate, **43**

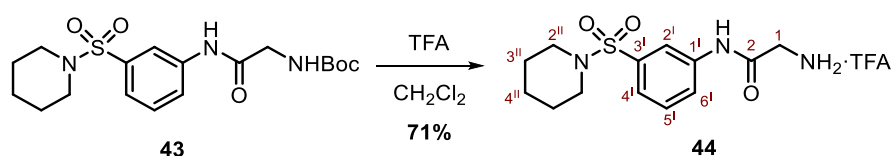


To a stirred solution of aniline **42** (50 mg, 0.21 mmol) in dry THF (2.50 mL) under N_2 atmosphere, a solution of Boc-Gly-OH (73 mg, 0.42 mmol), EDCI (73 μ L, 0.42 mmol), HOBT (56 mg, 0.42 mmol) and Et_3N (0.16 mL, 1.14 mmol) in dry THF/DMF (3 mL/2 mL), stirred for 1 hour previously, was added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Then, the mixture was quenched with water (8 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (8 mL). The organic layer was washed with water (3 x 10 mL), a saturated $NaHCO_3$ solution (2 x 6 mL) and brine (2 x 10 mL). The resulting organics were dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexanes/ $EtOAc$, 2:1) to furnish a white solid identified as carbamate **43** (61 mg, 0.15 mmol, 74% yield).

Physical and spectroscopic data of **43**

mp = 75 $^{\circ}C$ (from CH_2Cl_2). 1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ 8.92 (s, 1H, -NHCO), 7.86 (s, 1H, H-2'), 7.83 (m, 1H, H-4'/H-5'/H-6'), 7.43 - 7.42 (m, 2H, H-4'/H-5'/H-6'), 5.59 (t, $J_{NHCO_2,1} = 5.5$ Hz, 1H, -NHCO₂-), 3.98 (d, $J_{1,NHCO_2} = 5.5$ Hz, 2H, H-1), 2.95 (t, $J_{2'',3''} = J_{6'',5''} = 5.2$ Hz, 4H, H-2'', H-6''), 1.59 (m, 4H, H-3'', H-5''), 1.44 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.41 - 1.38 (m, 2H, H-4'). ^{13}C NMR (90.5 MHz, $CDCl_3$): δ 168.6 (-NHCO-), 156.6 (-NHCO₂-), 138.6 (C₁/C₃), 136.7 (C₁/C₃), 129.8/124.1/123.1 (C₄/C₅/C₆), 118.7 (C₂), 80.7 (-C(CH₃)₃), 47.1 (C_{2''}, C_{6''}), 45.2 (C₁), 28.4 (-C(CH₃)₃), 25.2 (C_{3''}, C_{5''}), 23.5 (C_{4''}). **IR** (ATR): ν 3324, 2364, 1684, 1510, 1160 cm^{-1} . **HRMS** (ESI⁺): Calcd. for $[C_{18}H_{27}N_3O_5S+Na]^+$: 398.1750; found $[M+Na]^+$: 398.1746. **COSY**, **DEPT135** and $^1H/^{13}C$ correlation were recorded.

Synthesis of 2-oxo-2-[[3-(piperidin-1-ylsulfonyl)phenyl]amino]ethan-1-aminium trifluoroacetate, **44**

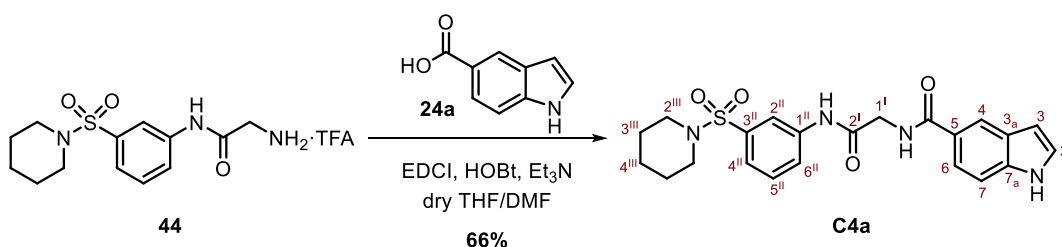


To a stirred solution of carbamate **43** (58 mg, 0.15 mmol) in CH₂Cl₂ (1.5 mL), TFA (0.36 mL, 4.74 mmol) was added. The mixture was stirred at rt and the progress of the reaction was followed by TLC analysis (hexane/EtOAc 1:3). After 2 hours, diethyl ether was added to the crude product and the mixture was stirred for 15 min. The precipitated was filtered to furnish compound **44** (33 mg, 80 μmol, 71% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **44**

Mp = 173 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.87 (s, 1H, -NHCO-), 8.18 (s, 3H, -NH₃⁺), 8.10 (t, *J*_{2I,4I} = *J*_{2I,6I} = 2.0 Hz, 1H, H-2^I), 7.79 (dd, *J*_{6I,5I} = 8.1 Hz, *J*_{6I,2I} = 2.0 Hz, 1H, H-6^I), 7.63 (t, *J*_{5I,4I} = *J*_{5I,6I} = 8.1 Hz, 1H, H-5^I), 7.45 (dd, *J*_{4I,5I} = 8.1 Hz, *J*_{4I,2I} = 2.0 Hz, 1H, H-4^I), 3.83 (s, 2H, H-1), 2.89 (t, *J*_{2II,3II} = 5.7 Hz, 4H, H-2^{II}, H-6^{II}), 1.54 (m, 4H, H-3^{II}, H-5^{II}), 1.37 (m, 2H, H-4^{II}). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.5 (C₂), 158.0 (q, *J*_{COCF₃,F} = 30.6 Hz, -COCF₃), 138.9 (C_{1I}), 136.3 (C_{3I}), 130.2 (C_{5I}), 123.1 (C_{6I}), 122.5 (C_{4I}), 117.5 (C_{2I}), 117.4 (q, *J*_{CF₃,F} = 300.2 Hz, -CF₃), 46.6 (C_{2II}, C_{6II}), 41.1 (C₁), 24.7 (C_{3II}, C_{5II}), 22.8 (C_{4II}). **IR** (ATR): ν 3329, 2943, 1677, 1209, 1343, 1164 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. For [C₁₃H₂₀N₃O₃S+H]⁺: 298.1220; found [M+H]⁺: 298.1220. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

Synthesis of *N*-(2-oxo-2-[[3-(piperidin-1-ylsulfonyl)phenyl]amino]ethyl)-1*H*-indole-5-carboxamide, **C4a**



To a stirred solution of compound **44** (100 mg, 0.24 mmol) in dry THF/DMF (2.80 mL/0.70 mL) under N₂ atmosphere, a solution of Indole-5-carboxylic acid, **24a** (59 mg, 0.37 mmol), EDCI (64 μL, 0.37 mmol), HOBT (49 mg, 0.37 mmol) and Et₃N (0.14 mL, 0.98 mmol) in dry THF/DMF (1.4 mL/0.7 mL), stirred during 1 h previously, was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Then, the mixture was quenched with water (4 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (4 mL). Then, the organic layer was washed with water (3 x 4 mL), and brine (2 x 4 mL). The resulting organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The yellow residue was purified by flash column chromatography (hexane/EtOAc 2:1 → 1:2 → 0:1) and recrystallized in a mixture of hexanes/EtOAc (4:1) to furnish a white solid identified as carbamate **C4a** (71 mg, 0.16 mmol, 66% yield).

Physical and spectroscopic data of C4a

Mp = 197 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.34 (s, 1H, -NH-), 10.43 (s, 1H, -NH-2^{II}), 8.69 (m, 1H, -NHCO-), 8.19 (s, 1H, H-4), 8.11 (s, 1H, H-2^{II}), 7.86 (d, $J_{6II,5II} = 7.6$ Hz, 1H, H-6^{II}), 7.68 (d, $J_{6,7} = 8.3$ Hz, 1H, H-6), 7.58 (t, $J_{5II,4II} = J_{5II,6II} = 7.6$ Hz, 1H, H-5^{II}), 7.45 - 7.43 (m, 2H, H-2, H-7), 7.39 (m, 1H, H-4^{II}), 6.55 (m, 1H, H-3), 4.09 (m, 2H, H-1^I), 2.90 - 2.87 (m, 4H, H-2^{III}, H-6^{III}), 1.55 - 1.52 (m, 4H, H-3^{III}, H-5^{III}), 1.35 (m, 2H, H-4^{III}). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.9 (C_{2I}), 167.7 (-NHCO-), 139.8 (C_{1II}), 137.5 (C_{7a}), 136.0 (C_{3II}), 129.8 (C_{5II}), 127.0 (C_{3a}/C₅), 126.7 (C₂), 124.8 (C_{3a}/C₅), 123.0 (C_{6II}), 121.8 (C_{4II}), 120.6 (C₆), 120.2 (C₄), 117.4 (C_{2II}), 110.9 (C₇), 102.2 (C₃), 46.6 (C_{2III}, C_{6III}), 43.5 (C_{1I}), 24.7 (C_{3III}, C_{5III}), 22.8 (C_{4III}). **IR** (ATR): ν 3364, 2925, 1641, 1481, 1339, 1162 (cm⁻¹). **HRMS** (ESI⁺): calcd. For [C₂₂H₂₄N₄O₄S+H]⁺: 441.1597; found [M+H]⁺: 441.1594. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

VI.3.2. Computational simulations, *in silico*

All of these molecular simulation experiments were performed by Dr. Minos-Timotheos Matsoukas in the research group *Laboratory of Computational Medicine* of Dr. Leonardo Pardo (Faculty of Medicine, UAB) The crystal structure of the AKAP79-derived peptide and CNA (PDB: 3LL8) was used for the docking calculations. For the docking, selected compounds were flexibly docked into the binding sites of receptor using AutoDock Vina. The Auto Dock Tools program was used to prepare the corresponding protein file. The receptor was held rigid during the docking process, while ligands were allowed to be flexible. Docking simulations were performed using a grid box with dimensions of 17 × 15 × 24 Å, a search space of 10 binding modes, and the exhaustiveness parameter was set to 50.

VI.3.3. Biological experiments with new compounds

All of these *in vitro* and *in vivo* experiments were performed in the research group of Dra. Mercè Pérez-Riba in the *Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge* (IDBELL).

VI.3.3.1. *in vitro* assays

Cell line

The mouse triple negative breast cancer 4T1 cell line was maintained in DMEM high glucose with Glutamax supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, at 37 °C and 5% CO₂. Cells were expanded when reached 90% confluence. Viability was monitored before and after injection, that should be > 90%. For cytotoxicity assays, HEK293T, CP15T, 768O, BxPC-3, PANC-1, HCI-

H1650, A549 cell lines were grown in DMEM high glucose with Glutamax supplemented with 10% FBS and antibiotics.

Purified CD4⁺ T cells were maintained in RPMI high glucose with Glutamax supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 ug/mL streptomycin, at 37 °C and 5% CO₂.

Fluorescence polarization

In fluorescence polarization (FP) competition assays of the CNA-SPRIEIT (NFATc2 derived peptide) interaction, 10 μM of human CNAα (amino acids 2-347) were preincubated with different concentrations of each inhibitory molecule in OptiPlate black 384-well flat-bottom plates (PerkinElmer Life Sciences) for 15 min at rt. CF- tagged NFATc2-derived SPRIEIT peptide (CF-SPRIEIT, 10 nM) was added to each well and incubated for 15 more min. Measurements were performed using a Victor™ X5 2030 Multilabel Reader (PerkinElmer Life Sciences) with excitation and emission wavelengths of 485 nm and 535 nm, respectively. All data were obtained from triplicates of at least three independent experiments.

Calcineurin Phosphatase Activity

CNA phosphatase activity towards the pNPP substrate was measured. Briefly, to determine the optimal concentration of CN in the assay increasing concentrations of human CNAα (amino acids 2-347) were incubated with 5 mM pNPP in 100 μL final volume in 1x colorimetric assay buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,02% β-mercaptoethanol and 0.1 mg/mL bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 30°C in 96-well microtiter plates. Reaction was stopped by adding 10 μL 5 N NaOH and read at 405 nm wavelength on a Victor™ X5 2030 Multilabel Reader (PerkinElmer Life Sciences).

For the assessment of CNA phosphatase activity inhibition by inhibitory hit molecules, preincubation of 0.5 μM human CNAα and inhibitors at 50 μM final concentration in 1x colorimetric assay buffer was carried out at 30 °C. After 30 min of incubation, pNPP was added to each well and incubated for 30 more min at 30 °C. Reaction was stopped and readed as before. 50 μM ZnCl₂ was used as a negative control of CNA phosphatase activity. Background values obtained from a sample containing pNPP but not CNA was subtracted to each sample. Data were obtained from triplicates of three independent experiments.

NFATc activity

NFATc activity was determined by using a 3xNFAT-luc plasmid under the control of a NFATc promoter. Briefly, 7.5×10^4 HEK 293T cells per well were seeded in 48-well plates. The next day, each well was transfected with 100 ng of 3xNFAT-luc reporter plasmid and 1 ng pRL-null as internal control of transfection using CaCl_2 transfection technique. Then, 24 h after transfection, cells were treated with indicated concentration of the selected compounds for 2 hours and then stimulated with $1 \mu\text{M}$ Ionomycin, 10 nM of PMA and 10 mM CaCl_2 for 6 h. CsA ($1 \mu\text{M}$) was used as positive control of calcineurin inhibition. After stimulation, cells were lysed, and crude extracts were analysed for luc gene expression using the Dual-Luc Reporter Assay (Promega) following manufacturer's instructions on a Victor™ X5 2030 Multilabel Reader (PerkinElmer Life Sciences). Luc units were normalized to Renilla luc values. The NFATc activity value, in the absence of any compound, was considered as 100 % (positive control of CN activation). Data were obtained from at least three independent experiments. Data from Dose-Response experiment is plotted in a XY dispersion plot. EC_{50} values are calculated using non-linear regression curve (three-way) in GraphPad Prism8.

Cell viability assay

The cytotoxicity of the NFATc inhibitory molecules in several human and mouse normal and tumoral cell lines was determined by Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay (Promega). Briefly, cells were treated with different concentrations (0, 1, 10 μM) of inhibitory compounds in a total volume of 100 μL /well for 2 h, and then 100 μL Cell Titer-Glo reagent was added into each well, and luminescence was recorded with Victor X5 microplate reader (Perkin Elmer). The cell viability was expressed as the percentage of the control which was without treatment.

VI.3.3.2. *in vivo* assays

Syngeneic orthotopic animal model of TNBC

As for the animals, food and water were available *ad libitum*. BALB/c animals were purchased at least 1 week before the cells inoculation and housed at constant room temperature (20 - 24 °C) and relative humidity (45% - 65%) under a 12 h light-dark cycle. Mice were housed in special conditions. Animal experimentation is performed in accordance with local, national and European legislation. The *Parc Científic de Barcelona* (PCB) Ethical Committee approved all the procedures for Animal Experimentation and the protocol accepted by the competent authorities, Generalitat de Catalunya, exp. number 9912.

For primary tumor growth, 4T1 cells in exponential growth were injected ($0.5 \cdot 10^6$ cells/animal) in 50 μL of a 1:1 mixture of DMEM and Matrigel (Corning, 356234) into the number four mammary fat pad mice (8 weeks, female, 18 - 19 g). A chip identified each animal and tumor growth was monitored biweekly measuring the diameter of tumors. When tumors reached a volume more than 100 mm^3 (at day 11 from cell injection), mice were distributed randomly in four groups of 9 - 10 animals each one. The treatment for each group was: i) vehicle (DMSO); (ii) compound **C1a**; (iii) compound **20**; and iv) FK506, as a negative control negative of CN activity. Compounds **C1a**, **20** and FK506 were administered daily at 50 mg/Kg/animal (Monday to Friday). After 15 days of treatment animals were killed, tumours were surgically removed, and tissue samples were either immediately frozen or fixed in 4 % paraformaldehyde and paraffin embedded.

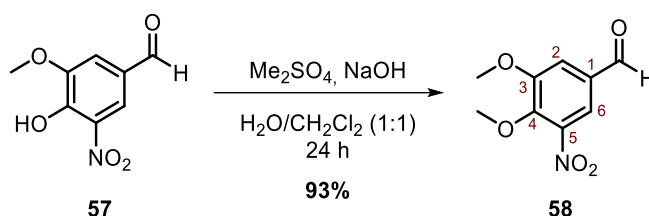
Immunohistochemistry

For IHC analysis of mouse TNBC samples, paraffin sections (4 μm thickness) were blocked with 10% BSA for 1 h and then stained with CD31 (rabbit-Abcam) by overnight incubation at 4°C . Sections were washed and incubated with UltraVisionQuanto Detection System HRP (Thermo Scientific). Tissue sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen (Thermo Scientific) and counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted with DPX (Sigma). Antibody staining quantification was performed on at least five different HPF $\times 20$ per sample (Nikon Eclipse 80i).

VI.4. Experimental procedures of chapter IV: TTR stabilizers

VI.4.1. Synthesis of new TTR stabilizers (TES compounds)

Synthesis of 3,4-dimethoxy-5-nitrobenzaldehyde, **58**⁸

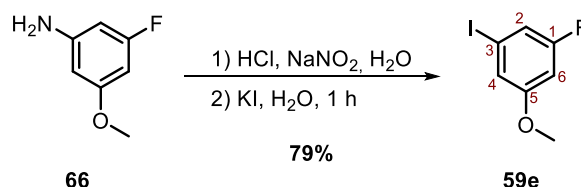


To a solution of commercially available 5-nitrovanillin, **57** (500 mg, 2.50 mmol), NaOH 3 M (1.7 ml, 5.00 mmol) and TBAB (82 mg, 0.25 mmol) in a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 10 mL), dimethyl sulphate (1.3 mL, 13.40 mmol) was added slowly under a N_2 atmosphere. The final mixture was stirred vigorously for 24 h (TLC, hexane/EtOAc, 3:2). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Then, the organic layer was concentrated under vacuum and washed with 20 mL of water, 20 mL of ammonia 2 M solution and 20 mL of 2 M NaOH solution to remove unreacted phenol and dimethyl sulphate. The organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 3:2) afforded aldehyde **58** (498 mg, 2.36 mmol, 93% yield) as a pale brown solid.

Physical and spectroscopic data of **58**⁹

¹H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 9.91 (s, 1H, -COH), 7.83 (d, $J_{6,2} = 1.8$ Hz, 1H, H-6), 7.62 (d, $J_{2,6} = 1.8$ Hz, 1H, H-2), 4.08 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-4}$), 4.00 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-3}$).

Synthesis of 1-fluoro-3-iodo-5-methoxybenzene, **59e**¹⁰



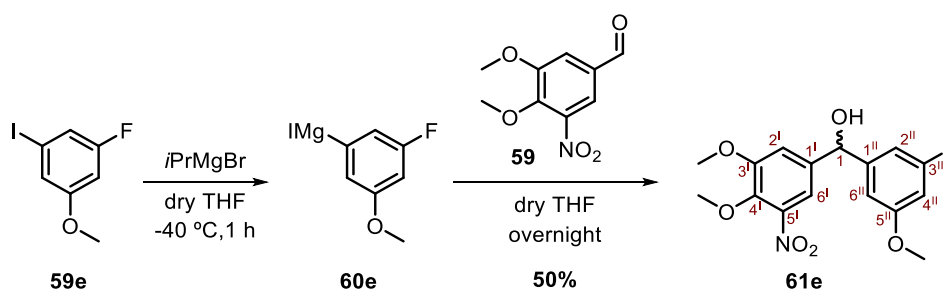
To a solution of commercially available 3-fluoro-5-methoxyaniline **66** (2.38 g, 16.86 mmol) in H_2O (7.7 mL) was added concentrated HCl (7.7 mL) at 0 °C. After stirring for 30 min, a solution of 1.8 M NaNO_2 in H_2O (11.00 mL, 20.30 mmol) was added dropwise. Then, the resulting mixture was stirred for 15 min at 0 °C and then an ice cold 3 M solution of KI (11.00 mL, 33.72 mmol) was added slowly. The ice bath was removed, and the reaction mixture was heated at reflux temperature for 1 h. The reaction mixture

was allowed to cool to rt and extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layer was washed with brine (2 x 100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash column chromatography (hexanes, 100%) to obtain **59e** (3.38 g, 13.40 mmol, 79% yield) as a colourless oil.

Physical and spectroscopic data of **59e**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.05 - 7.02 (m, 2H, H-2, H-4), 6.58 (dt, $J_{6,F} = 10.6$ Hz, $J_{6,4} = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 3.78 (s, 3H, CH₃O-5). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -110.76 (s, F-3). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 163.2 (d, $J_{1,F} = 250.0$ Hz, C₁), 161.4 (d, $J_{5,F} = 11.1$ Hz, C₅), 119.5 (d, $J_{4,F} = 3.2$ Hz, C₄), 117.4 (d, $J_{2,F} = 24.0$ Hz, C₂), 102.0 (d, $J_{6,F} = 25.2$ Hz, C₆), 93.3 (d, $J_{3,F} = 11.0$ Hz, C₃), 55.9 (CH₃O-5). **IR** (ATR): ν 1738, 1601, 1578, 1423, 1277, 1143, cm⁻¹.

Synthesis of (3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)(3-fluoro-5-methoxyphenyl)methanol, **61e**¹¹



To a solution of **59e** (2.50 g, 9.93 mmol) in dry THF (25 mL) at -40 °C, *i*PrMgBr (1 M in THF, 15.9 mL, 11.92 mmol) was added dropwise in 5 min under a N₂ atmosphere and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h. Then, a solution of 3,4-dimethoxy-5-nitrobenzaldehyde, **58**, (2.53 g, 12.00 mmol) in dry THF (20 mL) was added. The final mixture was warmed to rt and stirred overnight. The reaction was quenched by slow addition of brine (20 mL) and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 35 mL). All organic layers were collected, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under vacuum obtaining a yellow oil that was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 5:1) to furnish **61e** (1.68 mg, 4.98 mmol, 50% yield) as a white solid.

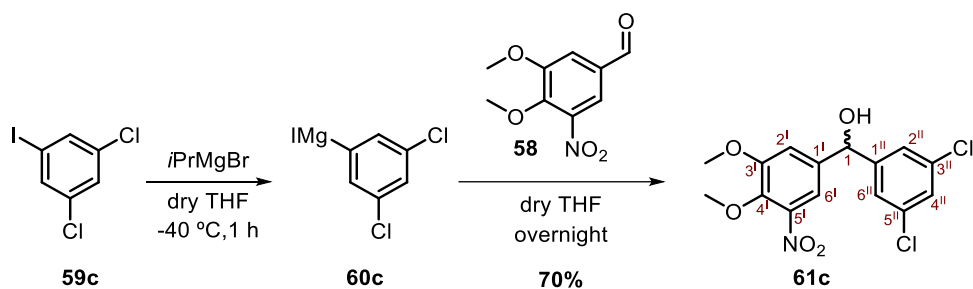
Physical and spectroscopic data of **61e**

Mp = 100 - 101 °C (from CHCl₃). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 7.28 (dd, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, $J_{6',1} = 0.6$ Hz, 1H, H-6'), 7.11 (d, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.69 (m, H-6''), 6.65 (br dm, $J_{2'',F} = 9.1$ Hz, $J_{2'',4''} = J_{2'',6''} = 2.0$ Hz, 1H, H-2''), 6.53 (dt, $J_{4'',F} = 10.5$ Hz, $J_{4'',2''} = J_{4'',6''} = 2.3$ Hz, 1H, H-4''), 5.70 (s, 1H, H-1), 3.94 (s, 3H, CH₃O-4'), 3.88 (s, 3H, CH₃O-3'), 3.78 (s, 3H, CH₃O-5''), 2.72 (br s, 1H, -OH). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -110.76 (s, F-3''). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 163.9 (d, $J_{3'',F} = 246.3$ Hz, C_{3''}), 161.3 (d, $J_{5'',F} = 11.2$ Hz, C_{5''}),

VI.4 Experimental section

154.3 (C_{3I}), 145.8 (d, $J_{1II,F} = 8.8$ Hz, C_{1II}), 144.6 (C_{5I}), 142.2 (C_{4I}), 139.5 (C_{1I}), 114.0 (C_{2I}), 113.8 (C_{6I}), 108.4 (d, $J_{6II,F} = 3.8$ Hz, C_{6II}), 105.7 (d, $J_{2II,F} = 22.7$ Hz, C_{2II}), 101.1 (d, $J_{4II,F} = 25.4$ Hz, C_{4II}), 74.8 (d, $J_{1,F} = 2.3$ Hz, C₁), 62.1 (CH₃O-4^I), 56.6 (CH₃O-3^I), 55.7 (CH₃O-5^{II}). IR (ATR): ν 3444, 2955, 2837, 1594, 1530, 1453, 1344, 1133 cm⁻¹. HRMS (ESI⁻): calcd. for [C₁₆H₁₆FNO₆-H₂O]⁻: 320.0934; found [M-H₂O]⁻: 320.0936. DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of (3,5-dichlorophenyl)(3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)metanol, 61c

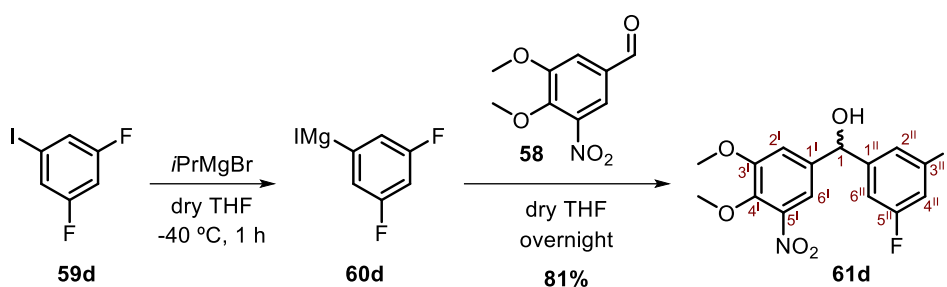


Compound **61c** was prepared as described for **61e** by using a solution of 3,5-dichloriodobenzene, **59c**, (558 mg, 2.04 mmol) in dry THF (5 mL), *i*PrMgBr (1 M in THF, 2.0 mL, 2.00 mmol) and a solution of **58** (360 mg, 1.70 mmol) in dry THF (5 mL). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 1:1) furnished **61e** (427 mg, 1.19 mmol, 70% yield) as an orange solid.

Physical and spectroscopic data of **61e**

Mp = 100 - 103 °C (from acetone). ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆): δ 7.50 (dd, $J_{2II,4II} = J_{6II,4II} = 1.9$ Hz, $J_{2II,1} = J_{6II,1} = 0.6$ Hz, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 7.48 (d, $J_{2I,6I} = 2.0$ Hz, 1H, H-2^I), 7.44 (dd, $J_{6I,2I} = 2.0$ Hz, $J_{6I,1} = 0.6$ Hz, 1H, H-6^I), 7.35 (t, $J_{4II,2II} = J_{4II,6II} = 1.9$ Hz, 1H, H-4^{II}), 5.95 (d, $J_{1,OH} = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 5.50 (d, $J_{OH,1} = 3.9$ Hz, 1H, -OH), 3.95 (s, 3H, CH₃O-3^I), 3.90 (s, 3H, CH₃O-4^I). ¹³C NMR (90.5 MHz, acetone-*d*₆): δ 155.0 (C_{3I}), 149.5 (C_{1I}), 145.9 (C_{5I}), 142.0 (C_{4I}), 141.7 (C_{1II}), 135.5 (C_{3II}, C_{5II}), 127.9 (C_{4II}), 125.9 (C_{2II}, C_{6II}), 115.0 (C_{2I}), 113.7 (C_{6I}), 73.9 (C₁), 62.0 (CH₃O-4^I), 57.0 (CH₃O-3^I). IR (ATR): ν 3470, 3078, 2948, 1530, 1431, 1370, 1290, 1139, 1062 cm⁻¹. HRMS (ESI⁻): calcd. for [C₁₅H₁₃Cl₂NO₅-H₂O]⁻: 340.0143; found [M-H₂O]⁻: 340.0145. DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of (3,5-difluorophenyl)(3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)methanol, **61d**

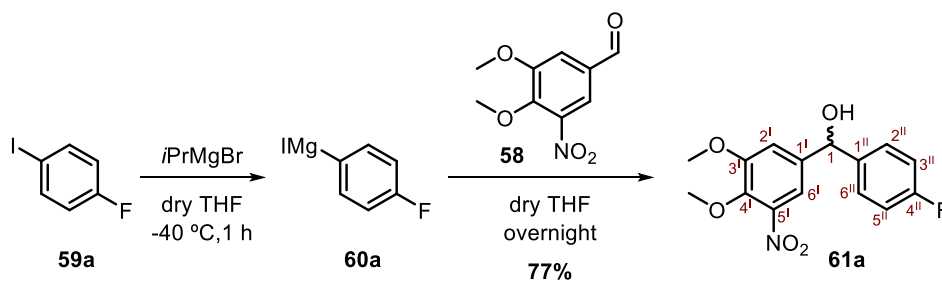


Compound **61d** was prepared as described for **61e** by using a solution of 3,5-difluoriodobenzene, **59d**, (555 mg, 2.31 mmol) in dry THF (5 mL), *i*PrMgBr (1 M in THF, 2.5 mL, 2.5 mmol) and a solution of **58** (582 mg, 2.78 mmol) in dry THF (5 mL). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 3:1) afforded **61d** (612 mg, 1.88 mmol, 81% yield) as an orange oil.

Physical and spectroscopic data of **61d**

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.25 (d, $J_{6^1,2^1} = 2.0$ Hz, 1H, H-6¹), 7.07 (d, $J_{2^1,6^1} = 2.0$ Hz, 1H, H-2¹), 6.87 (m, $J_{2^{\text{II}},\text{F}} = J_{6^{\text{II}},\text{F}} = 6.0$ Hz, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 6.70 (tt, $J_{4^{\text{II}},2^{\text{II}}} = J_{4^{\text{II}},6^{\text{II}}} = 2.4$ Hz, $J_{4^{\text{II}},\text{F}} = 8.9$ Hz, 1H, H-4^{II}), 5.71 (br s, 1H, H-1), 3.92 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-4^{\text{I}}$), 3.88 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-3^{\text{I}}$), 3.10 (br s, 1H, -OH). $^{19}\text{F NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ -108.97 (m, F-3^{II}, F-5^{II}). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ 163.2 (dd, $J_{3^{\text{II}},\text{F}} = J_{5^{\text{II}},\text{F}} = 12.5$ Hz, $J_{3^{\text{II}},\text{F}} = J_{5^{\text{II}},\text{F}} = 249.7$ Hz, C_{3^{II}}, C_{5^{II}}), 154.3 (C_{3^I}), 146.6 (t, $J_{1^{\text{II}},\text{F}} = 8.6$ Hz, C_{1^{II}}), 144.4 (C_{5^I}), 142.2 (C_{4^I}), 139.3 (C_{1^I}), 114.0 (C_{2^I}), 113.8 (C_{6^I}), 109.4 (m, $J_{2^{\text{II}},\text{F}} = J_{6^{\text{II}},\text{F}} = 18.7$ Hz, C_{2^{II}}, C_{6^{II}}), 103.4 (t, $J_{4^{\text{II}},\text{F}} = 25.3$ Hz, C_{4^{II}}), 74.2 (C_{1^I}), 62.1 ($\text{CH}_3\text{O}-4^{\text{I}}$), 56.5 ($\text{CH}_3\text{O}-3^{\text{I}}$). IR (ATR): ν 3415, 2946, 1598, 1534, 1461, 1360, 1281, 1119 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): calcd. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{NO}_5+\text{Na}]^+$: 348.0659; found $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 348.0663. DEPT135 and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlations were recorded.

Synthesis of (3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)(4-fluorophenyl)methanol, **61a**



Compound **61a** was prepared as described for **61e** by using a solution of 4-fluoriodobenzene, **59a**, (200 μL , 0.90 mmol) in dry THF (2 mL), *i*PrMgBr (1 M in THF, 900 μL , 0.90 mmol) and a solution of **58**

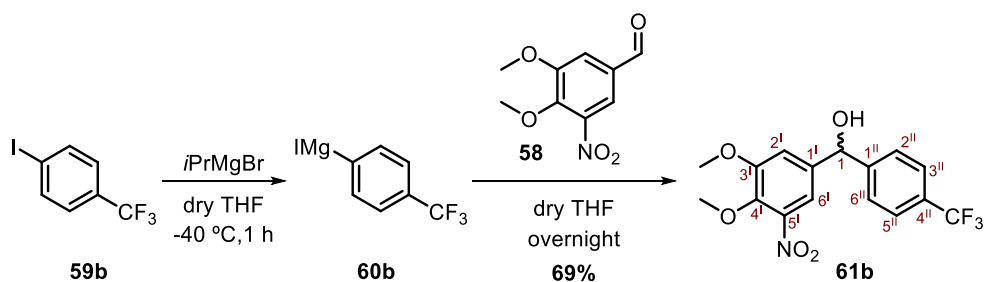
VI.4 Experimental section

(210 mg, 0.99 mmol) in dry THF (2.2 mL). Purification by flash column chromatography (hexane/EtOAc, 4:1) afforded **61a** (213 mg, 0.69 mmol, 77% yield) as a colourless oil.

Physical and spectroscopic data of 61a

¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆): δ 7.50 (br ddd, $J_{2''',3'''} = J_{6''',5'''} = 9.0$ Hz, $J_{2''',F} = J_{6''',1} = 5.5$ Hz, $J_{2''',1} = J_{6''',1} = 0.6$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.41 (d, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 7.38 (dd, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, H-6'), 7.09 (br t, $J_{2''',F} = J_{2',6'} = J_{3''',2'''} = J_{5''',6'''} = 9.0$ Hz, 1H, H-3'', H-5''), 5.91 (d, $J_{1,OH} = 3.3$ Hz, 1H, H-1), 5.26 (d, $J_{1,OH} = 3.3$ Hz, 1H, -OH), 3.93 (s, 3H, CH₃O-4'), 3.90 (s, 3H, CH₃O-3'). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -117.36 (m, F-4''). **¹³C NMR** (100.6 MHz, acetone-*d*₆): δ 162.9 (d, $J_{4''',F} = 243.6$ Hz, C_{4''}), 154.8 (C_{3'}), 145.8 (C_{5'}), 142.9 (C_{1'}), 141.7 (C_{3'}), 141.5 (C_{1''}), 129.3 (d, $J_{2''',F} = J_{6''',F} = 7.8$ Hz, C_{2''}, C_{6''}), 115.8 (d, $J_{4''',F} = 21.6$ Hz, C_{3''}, C_{5''}), 115.0 (C_{2'}), 113.6 (C_{6'}), 74.4 (C₁), 62.0 (CH₃O-4'), 56.9 (CH₃O-3'). **IR** (ATR): ν 3416, 2944, 2837, 1531, 1508, 1359, 1280, 1223 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₅H₁₄FNO₅+H]⁺: 308.0934; found [M+H]⁺: 308.0931. **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlations were recorded.

Synthesis of (3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)[4-(trifluoromethyl)phenyl]methanol, 61b



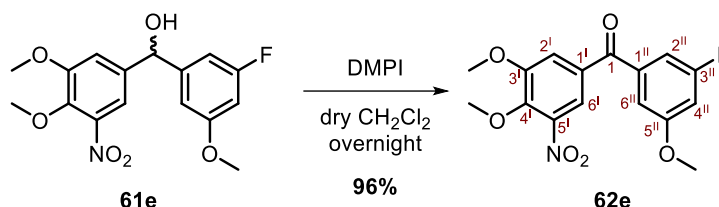
Compound **61b** was prepared as described for **61e** by using a solution of 4-iodobenzotrifluoride, **59b**, (100 μL, 0.68 mmol) in dry THF (1 mL), *i*PrMgBr (1 M in THF, 0.68 mL, 0.68 mmol) and a solution of **58** (151 mg, 0.72 mmol) in dry THF (1.2 mL). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) afforded **61b** (167 mg, 0.47 mmol, 69% yield) as an orange oil.

Physical and spectroscopic data of 61b

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.61 (d, $J_{3''',2'''} = 8.1$ Hz, 2H, H-3''), 7.48 (d, $J_{2''',3'''} = 8.1$ Hz, 2H, H-2''), 7.29 (dd, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, $J_{6',1} = 0.7$ Hz, 1H, H-6'), 7.09 (d, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 5.83 (s, 1H, H-1), 3.93 (s, 3H, CH₃O-4'), 3.88 (s, 3H, CH₃O-3'), 2.77 (br s, 1H, -OH). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -63.04 (s, -CF₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 154.4 (C_{3'}), 146.5 (C_{1''}), 144.6 (C_{5'}), 142.2 (C_{4'}), 139.5 (C_{1'}), 130.4 (q, $J_{4''',F} = 32.2$ Hz, C_{4''}), 126.8 (C_{2''}, C_{5''}, C_{6''}), 125.9 (q, $J_{3''',F} = 3.8$ Hz, C_{3'}), 124.1 (q, $J_{CF_3,F} = 272.0$ Hz, -CF₃), 114.0 (C_{2'}), 113.8 (C_{6'}), 74.7 (C₁), 62.1 (CH₃O-4'), 56.5 (CH₃O-3'). **IR** (ATR): ν 3422, 2945, 1534, 1360, 1325, 1281, 1165 cm⁻¹.

¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₆H₁₄F₃NO₅+H]⁺: 358.2932; found [M+H]⁺: 358.0900. **DEPT135** and ¹H/¹³C correlations were recorded.

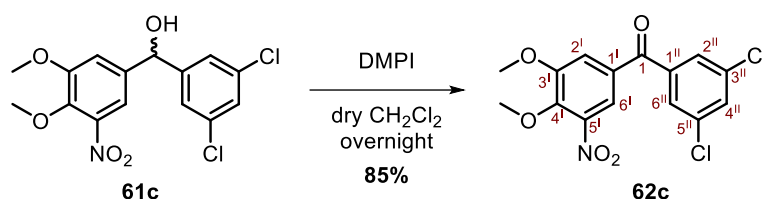
Synthesis of (3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)(3-fluoro-5-methoxyphenyl)methanone, **62e**



To a solution of alcohol **61e** (784 mg, 2.32 mmol) in dry CH₂Cl₂ (50 mL) under a nitrogen atmosphere, a solution of DMPPI (1.72 g, 3.49 mmol) in dry CH₂Cl₂ was added dropwise and the mixture was stirred overnight at rt. The reaction was quenched with the addition of 1.1 mL of a prepared solution of Na₂S₂O₃ (1.70 g) in a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (9 mL) and the mixture was stirred for 15 min. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) and the combined organic extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 5:2) of the resulting residue provided the ketone **62e** as a white solid (746 mg, 2.23 mmol, 96% yield).

Physical and spectroscopic data of **62e**

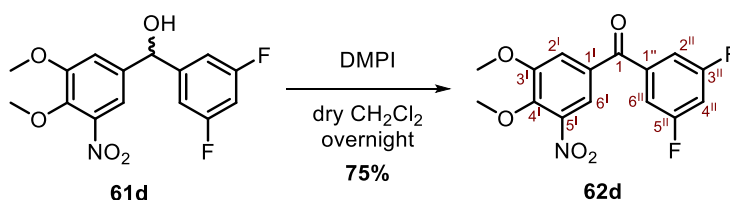
Mp = 95 °C (from CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.69 (d, *J*_{6^l,2^l} = 2.0 Hz, 1H, H-6^l), 7.63 (d, *J*_{2^l,6^l} = 2.0 Hz, 1H, H-2^l), 7.08 (m, H-6^{ll}), 7.02 (ddd, *J*_{2^{ll},F} = 8.4 Hz, *J*_{2^{ll},4^{ll}} = 2.3 Hz, *J*_{2^{ll},6^{ll}} = 1.4 Hz, 1H, H-2^{ll}), 6.86 (dt, *J*_{4^{ll},F} = 10.2 Hz, *J*_{4^{ll},2^{ll}} = *J*_{4^{ll},2^{ll}} = 2.3 Hz, 1H, H-4^{ll}), 4.07 (s, 3H, CH₃O-4^l), 3.99 (s, 3H, CH₃O-3^l), 3.85 (s, 3H, CH₃O-5^{ll}). ¹⁹F NMR (250 MHz, CDCl₃): δ -110.1 (s, F-3^{ll}). ¹³C NMR (90.5 MHz, CDCl₃): δ 192.4 (d, *J*_{1,F} = 2.8 Hz, C₁), 163.3 (d, *J*_{3^{ll},F} = 248.3 Hz, C_{3^{ll}}), 161.1 (d, *J*_{5^{ll},F} = 10.8 Hz, C_{5^{ll}}), 154.4 (C_{3^l}), 146.7 (C_{4^l}), 144.2 (C_{5^l}), 139.0 (d, *J*_{1^{ll},F} = 8.4 Hz, C_{1^{ll}}), 132.0 (C_{1^l}), 118.7 (C_{6^l}), 116.3 (C_{2^l}), 111.2 (d, *J*_{6^{ll},F} = 2.8 Hz, C_{6^{ll}}), 109.1 (d, *J*_{2^{ll},F} = 23.1 Hz, C_{2^{ll}}), 106.4 (d, *J*_{4^{ll},F} = 25.0 Hz, C_{4^{ll}}), 62.4 (CH₃O-4^l), 56.8 (CH₃O-3^l), 56.1 (CH₃O-5^{ll}). **IR** (ATR): ν 2921, 2843, 1651, 1597, 1530, 1429, 1318, 1146 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₆H₁₄FNO₆+Na]⁺: 358.0703; found [M+Na]⁺: 358.0705. **DEPT135** and ¹H/¹³C correlations were recorded.

Synthesis of (3,5-dichlorophenyl)(3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)methanone, 62c

Compound **62c** was prepared as described for **62e** by using alcohol **61c** (583 mg, 1.63 mmol) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) and a solution of DMPI (1.04 g, 2.44 mmol) in dry CH_2Cl_2 (15 mL). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 3:1) afforded **62c** (495 mg, 1.39 mol, 85% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 62c

Mp = 112 - 114 °C (from acetone). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.96 (m, 1H, H-4^{II}), 7.75 (m, 3H, H-2^{II}, H-6^{II}, H-6^I), 7.69 (d, $J_{2,6^I} = 2.0$ Hz, H-2^I), 3.98 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-4^I$), 3.96 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-3^I$). **$^{13}\text{C NMR}$** (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 190.8 (C₁), 153.5 (C_{3I}), 145.3 (C_{4I}), 143.9 (C_{5I}), 139.6 (C_{1II}), 134.6 (C_{3II}, C_{5II}), 132.1 (C_{4II}), 131.3 (C_{1I}), 128.0 (C_{2II}, C_{6II}), 117.9 (C_{6I}), 116.9 (C_{2I}), 61.9 ($\text{CH}_3\text{O}-4^I$), 56.9 ($\text{CH}_3\text{O}-3^I$). **IR** (ATR): ν 3077, 2956, 1659, 1535, 1365, 1290, 1239, 1135 cm^{-1} . **HRMS** (ESI⁺): calcd. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_5+\text{H}]^+$: 356.0093; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 356.0087. **DEPT135** and **$^1\text{H}/^{13}\text{C}$** correlations were recorded.

Synthesis of (3,5-difluorophenyl)(3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)methanone, 62d

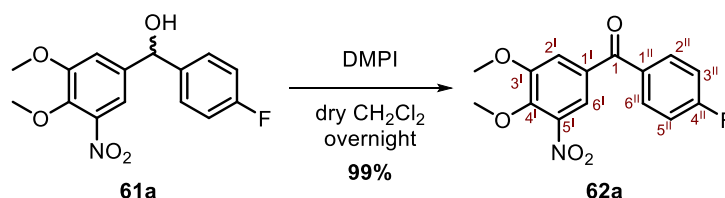
Compound **62d** was prepared as described for **62e** by using alcohol **61d** (233 mg, 0.72 mmol) in dry CH_2Cl_2 (4 mL) and a solution of DMPI (456 mg, 1.07 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 3:1) afforded **62d** (175 mg, 0.54 mmol, 75% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 62d

Mp = 151 - 152 °C (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, CDCl_3): δ 7.67 (d, $J_{6^I,2^I} = 2.0$ Hz, 1H, H-6^I), 7.63 (d, $J_{2^I,6^I} = 2.0$ Hz, 1H, H-2^I), 7.28 (m, $J_{2^II,6^II} = J_{6^II,6^I} = 5.2$ Hz, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 7.09 (tt, $J_{4^II,2^II} = J_{4^II,6^II} = 2.2$ Hz, $J_{4^II,6^I} = 8.5$ Hz, 1H, H-4^{II}), 4.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-4^I$), 4.00 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-3^I$). **$^{19}\text{F NMR}$** (250 MHz, CDCl_3): δ -107.50 (t, $J = 6.9$ Hz, F-3^{II}, F-5^{II}). **$^{13}\text{C NMR}$** (90.5 MHz, CDCl_3): δ 191.2 (br t, $J_{\text{CO},\text{F}} = 2.3$ Hz, C₁), 163.0 (dd, $J_{3^II,\text{F}} = J_{5^II,\text{F}} = 12.0$ Hz, $J_{3^II,\text{F}} = J_{5^II,\text{F}} = 252.5$ Hz, C_{3II}, C_{5II}), 154.6 (C_{3I}), 147.0 (C_{4I}), 144.2 (C_{5I}), 139.6 (t, $J_{1^II,\text{F}} = 7.8$ Hz, C_{1II}),

131.4 (C₁), 118.7 (C₆), 116.2 (C₂), 112.9 (m, $J_{2\text{II},\text{F}} = J_{6\text{II},\text{F}} = 18.6$ Hz, C₂II, C₆II), 108.5 (t, $J_{4\text{II},\text{F}} = 25.5$ Hz, C₄II), 62.4 (CH₃O-4^I), 56.9 (CH₃O-3^I). **IR** (ATR): ν 3084, 2955, 2847, 1665, 1589, 1438, 1375, 1320 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₅H₁₁F₂NO₅+Na]⁺: 346.050; found [M+Na]⁺: 346.0501. **DEPT135** and ¹H/¹³C correlations were recorded.

Synthesis of (3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)(4-fluorophenyl)methanone, 62a

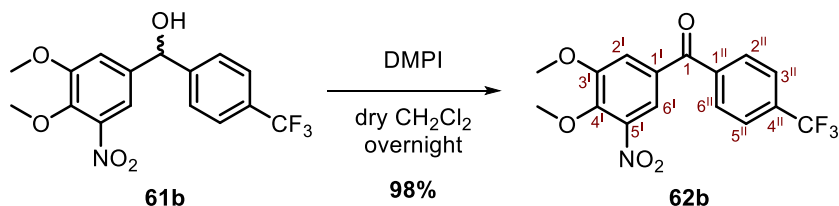


Compound 62a was prepared as described for 62e by using alcohol 61a (230 mg, 0.75 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3 mL) and a solution of DMPI (475 mg, 1.12 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 3:1) afforded 62a (226 mg, 0.74 mmol, 99% yield) as a brown solid.

Physical and spectroscopic data of 62a

Mp = 73 - 75 °C (from CHCl₃). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.89 (br dd, $J_{2\text{II},3\text{II}} = J_{6\text{II},5\text{II}} = 8.9$ Hz, $J_{2\text{II},\text{F}} = J_{6\text{II},\text{F}} = 5.5$ Hz, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 7.70 (d, $J_{6\text{I},2\text{I}} = 2.0$ Hz, 1H, H-6^I), 7.66 (d, $J_{2\text{I},6\text{I}} = 2.0$ Hz, 1H, H-2^I), 7.41 (br t, $J_{3\text{II},\text{F}} = J_{5\text{II},\text{F}} = J_{3\text{II},2\text{II}} = J_{5\text{II},6\text{II}} = 8.9$ Hz, 2H, H-3^{II}, H-5^{II}), 3.97 (s, 3H, CH₃O-4^I), 3.96 (s, 3H, CH₃O-3^I). **¹⁹F NMR** (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ -106.21 (F-4^{II}). **¹³C NMR** (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 191.8 (C₁), 165.0 (d, $J_{4\text{II},\text{F}} = 252.0$ Hz, C₄II), 153.4 (C₃I), 144.7 (C₄I), 143.8 (C₅I), 132.8 (d, $J_{2\text{II},\text{F}} = J_{6\text{II},\text{F}} = 9.3$ Hz, C₂II, C₆II), 132.7 (C₁II), 132.4 (C₁I), 117.2 (C₆I), 116.9 (C₂I), 115.9 (d, $J_{3\text{II},\text{F}} = J_{5\text{II},\text{F}} = 22.1$ Hz, C₃II, C₅II), 61.8 (CH₃O-4^I), 56.8 (CH₃O-3^I). **IR** (ATR): ν 3081, 2954, 2842, 1650, 1598, 1359, 1229, 1126 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₅H₁₂FNO₅+Na]⁺: 328.0597; found [M+Na]⁺: 328.0595. **DEPT135** and ¹H/¹³C correlations were recorded.

Synthesis of (3,4-dimethoxy-5-nitrophenyl)[4-(trifluoromethyl)phenyl]methanone, 62b



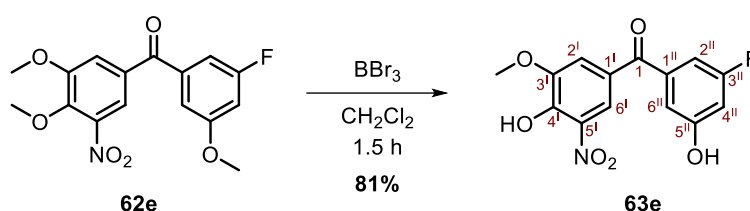
VI.4 Experimental section

Compound **62b** was prepared as described for **62e** by using alcohol **61b** (139 mg, 0.45 mmol) in dry CH₂Cl₂ (2 mL) and a solution of DMPI (307 mg, 0.72 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3 mL). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 3:1) afforded **62b** (135 mg, 0.44 mmol, 98% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 62b

Mp = 118 - 119 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 7.87 (d, $J_{2''',3''}$ = 8.2 Hz, 2H, H-2'''), 7.79 (d, $J_{3''',2''}$ = 8.2 Hz, 2H, H-3'''), 7.67 (d, $J_{2',6'}$ = 2.0 Hz, 1H, H-2'), 7.65 (d, $J_{6',2'}$ = 2.0 Hz, 1H, H-6'), 4.08 (s, 3H, CH₃O-4'), 4.00 (s, 3H, CH₃O-3'). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -63.58 (s, -CF₃). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 192.7 (C₁), 154.6 (C_{3'}), 147.0 (C_{4'}), 144.2 (C_{5'}), 139.8 (C_{1''}), 134.4 (q, $J_{4''',F}$ = 33.2 Hz, C_{4''}), 131.7 (C_{1'}), 130.1 (C_{2''}), 125.9 (q, $J_{3''',F}$ = 3.9 Hz, C_{3''}), 123.6 (q, $J_{CF_3,F}$ = 272.6 Hz, -CF₃), 118.9 (C_{6'}), 116.2 (C_{2'}), 62.4 (CH₃O-4'), 56.9 (CH₃O-3'). **IR** (ATR): ν 3086, 2950, 2840, 1655, 1531, 1323, 1292, 1163 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₆H₁₂F₃NO₅+H]⁺: 356.0746; found [M+H]⁺: 356.0740. **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlations were recorded.

Synthesis of (3-fluoro-5-methoxyphenyl)(4-hydroxy-3-methoxy-5-nitrophenyl)methanone, 63e⁸



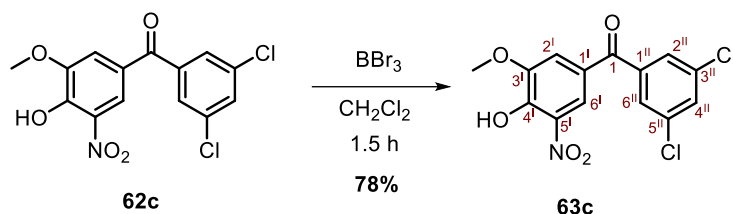
To a solution of **62e** (199 mg, 0.56 mmol) in CH₂Cl₂ (3.0 mL) was added dropwise BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 4.50 mL, 4.50 mmol) at -10 °C. The reaction was allowed to proceed at rt for 1.5 h (TLC, CH₂Cl₂/MeOH, 10:1). The reaction was quenched carefully with water (4 mL) and the resulting aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The organic extracts were dried with Na₂SO₄ and the solvent removed under vacuum to give the crude product. Purification by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1) afforded **63e** as a yellow solid (139 mg, 0.45 mmol, 81% yield).

Physical and spectroscopic data of 63e

Mp = 155 - 156 °C (from CHCl₃). **¹H NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (d, $J_{6',2'}$ = 1.9 Hz, 1H, H-6'), 7.69 (d, $J_{2',6'}$ = 1.9 Hz, 1H, H-2'), 7.04 (m, H-6''), 6.99 (ddd, $J_{2'',F}$ = 8.4 Hz, $J_{2'',4''}$ = 2.3 Hz, $J_{2'',6''}$ = 1.4 Hz, 1H, H-2''), 6.85 (dt, $J_{4'',F}$ = 9.4 Hz, $J_{4'',2''}$ = $J_{4'',2''}$ = 2.3 Hz, 1H, H-4''), 4.02 (s, 3H, CH₃O-3'). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -110.01 (F-3''). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 192.3 (C₁), 163.4 (d, $J_{3''',F}$ = 248.5 Hz, C_{3''}), 157.5 (d, $J_{5'',F}$ = 11.8 Hz, C_{5''}), 150.7 (C_{3'}), 150.2 (C_{4'}), 139.4 (d, $J_{1'',F}$ = 8.1 Hz, C_{1''}), 132.9 (C_{5'}), 127.8 (C_{1'}), 119.7 (C_{6'}), 117.2

(C₂^I), 112.6 (d, $J_{6''I,F} = 2.7$ Hz, C₆^{II}), 109.3 (d, $J_{2''I,F} = 23.1$ Hz, C₂^{II}), 107.8 (d, $J_{4''I,F} = 25.0$ Hz, C₄^{II}), 57.2 (CH₃O-3^I). IR (ATR): ν 3095, 2922, 2852, 1738, 1650, 1546, 1440, 1330, 1242, 1134 cm⁻¹. HRMS (ESI⁻): calcd. for [C₁₄H₁₀FNO₆-H]⁻: 306.0414; found [M-H]⁻: 306.0424.

Synthesis of (3,5-dichlorophenyl)(4-hydroxy-3-methoxy-5-nitrophenyl)methanone, **63c**

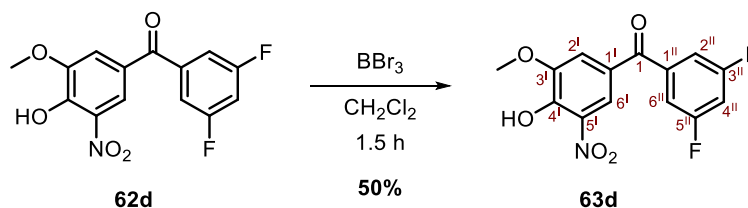


Compound **63c** was prepared as described for **63e** by using ketone **62c** (130 mg, 0.37 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) and a solution of BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 2.90 mL, 2.90 mmol). Purification by recrystallization from acetone furnished **63c** (98 mg, 0.28 mmol, 78% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of **63c**

Mp = 204 - 205 °C (from acetone). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.94 (t, $J_{4''I,2''I} = J_{4''I,6''I} = 2.0$ Hz, 1H, H-4^{II}), 7.78 (d, $J_{6''I,2''I} = 2.0$ Hz, 1H, H-6^I), 7.73 (d, $J_{2''I,4''I} = J_{6''I,4''I} = 2.0$ Hz, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 7.59 (d, $J_{2''I,6''I} = 2.0$ Hz, 1H, H-2^I), 3.95 (s, 3H, CH₃O-3^I). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ 190.5 (C₁), 149.8 (C₃^I), 147.3 (C₄^I), 140.3 (C₅^I), 136.6 (C₁^I), 134.4 (C₃^{II}, C₅^{II}), 131.6 (C₄^{II}), 127.7 (C₂^{II}, C₆^{II}), 125.4 (C₁^{II}), 120.2 (C₆^I), 114.8 (C₂^I), 56.8 (CH₃O-3^I). IR (ATR): ν 3190, 3079, 2948, 1652, 1543, 1405, 1285, 1134 cm⁻¹. HRMS (ESI⁻): calcd. for [C₁₄H₉Cl₂NO₅-H]⁻: 339.9780; found [M-H]⁻: 339.9786. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlations were recorded.

Synthesis of (3,5-difluorophenyl)(4-hydroxy-3-methoxy-5-nitrophenyl)methanone, **63d**

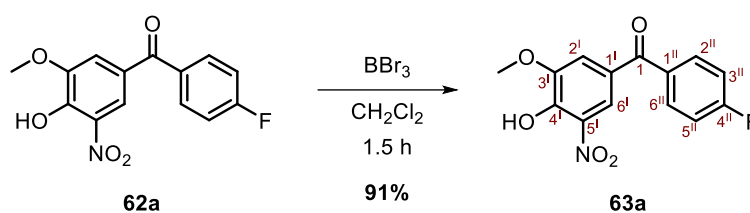


Compound **63d** was prepared as described for **63e** by using ketone **62d** (216 mg, 0.67 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4 mL) and a solution of BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 5.40 mL, 5.40 mmol). Purification by recrystallization from acetone afforded **63d** (103 mg, 0.33 mmol, 50% yield) as a green solid.

Physical and spectroscopic data of **63d**

Mp = 190 - 192 °C (from CHCl₃). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 11.18 (s, 1H, -OH), 8.08 (br d, $J_{6I,2I} = 1.6$ Hz, 1H, H-6^I), 7.70 (br d, 1H, H-2^I), 7.28 (m, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 7.10 (tt, $J_{4II,2II} = J_{4II,6II} = 2.2$ Hz, $J_{4II,F} = 8.5$ Hz, 1H, H-4^{II}), 4.04 (s, 3H, CH₃O-3^I). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -110.05 (t, $J = 7.6$ Hz, F-3^{II}, F-5^{II}). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 191.1 (C₁), 163.0 (dd, $J_{3II,F} = J_{5II,F} = 12.0$ Hz, $J_{3II,F} = J_{5II,F} = 252.5$ Hz, C_{3II}, C_{5II}), 150.9 (C_{3I}), 150.4 (C_{4I}), 139.7 (t, $J_{1II,F} = 7.8$ Hz, C_{1II}), 132.9 (C_{5I}), 127.3 (C_{1I}), 119.7 (C_{6I}), 117.0 (C_{2I}), 112.7 (m, $J_{2II,F} = J_{6II,F} = 18.8$ Hz, C_{2II}, C_{6II}), 108.4 (t, $J_{4II,F} = 25.4$ Hz, C_{4II}), 57.2 (CH₃O-3^I). **IR** (ATR): ν 3200, 3098, 2923, 1656, 1613, 1590, 1326, 1242, 1143 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁻): calcd. for [C₁₄H₉F₂NO₅-H]⁻: 308.0371; found [M-H]⁻: 308.0378. **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlations were recorded.

Synthesis of (4-fluorophenyl)(4-hydroxy-3-methoxy-5-nitrophenyl)methanone, 63a

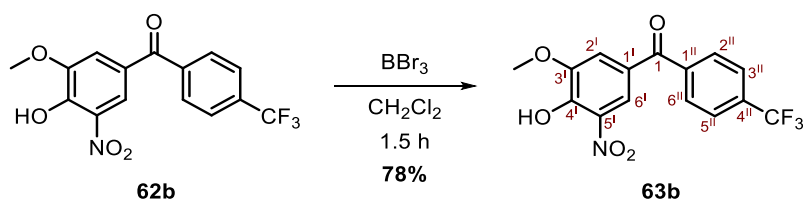


Compound **63a** was prepared as described for **63e** by using ketone **63a** (259 mg, 0.85 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4 mL) and a solution of BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 6.80 mL, 6.80 mmol). Purification by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 30:1) afforded **63a** (225 mg, 0.77 mmol, 91% yield) as a green solid.

Physical and spectroscopic data of 63a

Mp = 120 - 122 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, MeOD): δ 7.92 (d, $J_{6I,2I} = 1.9$ Hz, 1H, H-6^I), 7.85 (br dd, $J_{2II,3II} = J_{6II,5II} = 8.8$ Hz, $J_{2II,F} = J_{6II,F} = 5.4$ Hz, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 7.63 (d, $J_{2I,6I} = 1.8$ Hz, 1H, H-2^I), 7.28 (br t, $J_{3II,F} = J_{5II,F} = J_{3II,2II} = J_{5II,6II} = 8.8$ Hz, 2H, H-3^{II}, H-5^{II}), 3.98 (s, 3H, CH₃O-3^I). **¹⁹F NMR** (250 MHz, MeOD): δ -108.63 (F-4^{II}). **¹³C NMR** (100.6 MHz, MeOD): δ 194.0 (C₁), 166.8 (d, $J_{4II,F} = 252.9$ Hz, C_{4II}), 151.8 (C_{3I}), 150.2 (C_{4I}), 136.4 (C_{5I}), 134.9 (d, $J_{1II,F} = 3.0$ Hz, C_{1II}), 133.5 (d, $J_{2II,F} = J_{6II,F} = 9.2$ Hz, C_{2II}, C_{6II}), 128.2 (C_{1I}), 121.2 (C_{6I}), 116.6 (d, $J_{3II,F} = J_{5II,F} = 22.3$ Hz, C_{3II}, C_{5II}), 116.5 (C_{2I}), 57.3 (CH₃O-3^I). **IR** (ATR): ν 3170, 2924, 1649, 1599, 1547, 1283, 1229, 1155 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁻): calcd. for [C₁₄H₁₀FNO₅-H]⁻: 290.0475; found [M-H]⁻: 290.0465. **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlations were recorded.

Synthesis of (4-(trifluoromethyl)phenyl)(4-hydroxy-3-methoxy-5-nitrophenyl)methanone, 63b

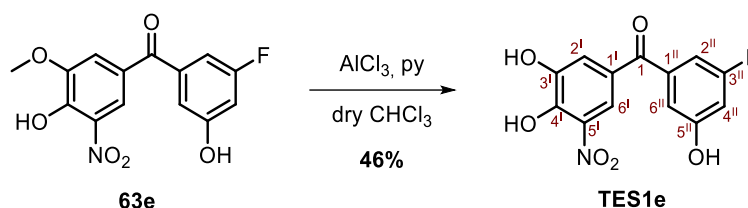


Compound **63b** was prepared as described for **63e** by using ketone **62b** (359 mg, 1.01 mmol) in dry CH_2Cl_2 (5.5 mL) and a solution of BBr_3 (1 M in CH_2Cl_2 , 8.00 mL, 8.00 mmol). Purification by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 30:1) afforded **63d** (270 mg, 0.79 mmol, 78% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of **63d**

Mp = 178 - 181 °C (from MeOH). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.94 (m, 4H, H-2^{II}, H-3^{II}, H-5^{II}, H-6^{II}), 7.78 (d, $J_{6^I,2^I} = 1.9$ Hz, 1H, H-6^I), 7.64 (d, $J_{2^I,6^I} = 1.9$ Hz, 1H, H-2^I), 3.96 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-3^I$). **$^{19}\text{F NMR}$** (250 MHz, CDCl_3): δ -63.51 (- CF_3). **$^{13}\text{C NMR}$** (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 192.2 (C_1), 149.7 (C_{3^I}), 146.9 (C_{4^I}), 140.5 ($\text{C}_{1^{II}}$), 136.5 (C_{5^I}), 132.0 (q, $J_{4^{II},F} = 32.1$ Hz, $\text{C}_{4^{II}}$), 130.1 ($\text{C}_{2^{II}}$, $\text{C}_{6^{II}}$), 125.9 (C_{1^I}), 125.6 (q, $J_{3^{II},F} = J_{5^{II},F} = 4.2$ Hz, $\text{C}_{3^{II}}$, $\text{C}_{5^{II}}$), 123.8 (q, $J_{\text{CF}_3,F} = 272.4$, - CF_3), 120.0 (C_{2^I}), 115.0 (C_{6^I}), 56.8 ($\text{CH}_3\text{O}-3^I$). **IR** (ATR): ν 3198, 2926, 1652, 1614, 1551, 1328, 1287, 1163 cm^{-1} . **HRMS** (ESI): calcd. for [$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_5\text{-H}$]: 340.0439; found [M-H]: 340.0439.

Synthesis of (3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)(3-fluoro-5-hydroxyphenyl)methanone, **TES1e**¹²



To a mixture of mono-protected catechol **63e** (158 mg, 0.52 mmol) and AlCl_3 (511 mg, 3.80 mmol) in dry CHCl_3 (10 mL) in an argon atmosphere, pyridine (0.36 mL, 4.45 mmol) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was heated to the reflux temperature and stirred until the starting material was consumed (TLC, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1). The orange suspension was concentrated under vacuum, and HCl (5 M, 5 mL) was added controlling the temperature (< 25 °C). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 30 mL) and the combined yellow extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to give a crude product. After a purification by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 19:1), the resulting brown solid was washed with 5 M HCl solution to furnish the catechol **TES1e** (69 mg, 0.24 mmol, 46% yield) as a brown solid.

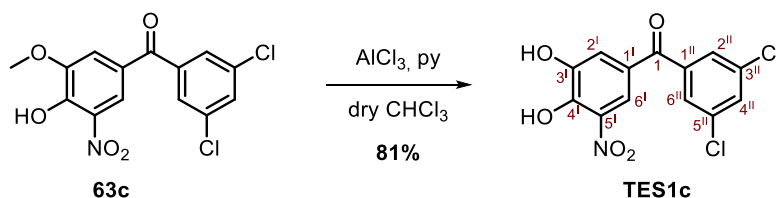
Physical and spectroscopic data of **TES1e**

Mp = 215 - 217 °C (from acetone). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, acetone- d_6): δ 10.74 (br s, 1H, -OH), 9.25 (br s, 2H, 2x-OH), 8.03 (d, $J_{6^I,2^I} = 2.0$ Hz, 1H, H-6^I), 7.66 (d, $J_{2^I,6^I} = 2.0$ Hz, 1H, H-2^I), 7.09 (s, H-6^{II}), 7.00 (br dt, $J_{2^{II},F} = 8.8$ Hz, 1H, H-2^{II}), 6.90 (br dt, $J_{4^{II},2^{II}} = 2.2$ Hz, $J_{4^{II},F} = 10.3$ Hz, 1H, H-4^{II}). **$^{19}\text{F NMR}$** (250 MHz, acetone- d_6): δ -112.87 (t, $J = 9.5$ Hz, F-3^{II}). **$^{13}\text{C NMR}$** (90.5 MHz, acetone- d_6): δ 192.4 (d, $J_{\text{CO},F} = 2.7$ Hz, C_1), 164.1

VI.4 Experimental section

(d, $J_{3\text{II},\text{F}} = 254.0$ Hz, $\text{C}_{3\text{II}}$), 159.9 (d, $J_{5\text{II},\text{F}} = 11.7$ Hz, $\text{C}_{5\text{II}}$), 148.8 ($\text{C}_{3\text{I}}$), 148.1 ($\text{C}_{4\text{I}}$), 140.6 (d, $J_{1\text{II},\text{F}} = 8.4$ Hz, $\text{C}_{1\text{II}}$), 135.2 ($\text{C}_{5\text{I}}$), 128.7 ($\text{C}_{1\text{I}}$), 121.8 ($\text{C}_{2\text{I}}$), 119.1 ($\text{C}_{6\text{I}}$), 113.5 (d, $J_{6\text{II},\text{F}} = 2.2$ Hz, $\text{C}_{6\text{II}}$), 108.1 (d, $J_{2\text{II},\text{F}} = 23.3$ Hz, $\text{C}_{2\text{II}}$), 107.4 (d, $J_{4\text{II},\text{F}} = 24.2$ Hz, $\text{C}_{4\text{II}}$). **IR** (ATR): ν 3229, 2928, 1599, 1545, 1442, 1325, 1252, 1207, 1136 cm^{-1} . **HRMS** (ESI-): calcd. for $[\text{C}_{13}\text{H}_8\text{FNO}_6\text{-H}]^-$: 292.0257; found $[\text{M-H}]^-$: 292.0265. **COSY**, **DEPT135** and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlations were recorded.

Synthesis of (3,5-dichlorophenyl)(3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)methanone, TES1c

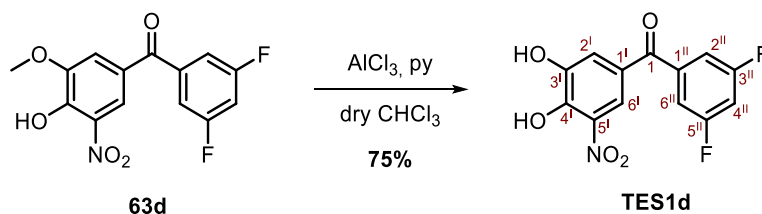


Compound TES1c was prepared as described for TES1e by using **63c** (45 mg, 0.13 mmol), AlCl_3 (35 mg, 0.26 mmol) and pyridine (50 μL , 0.39 mmol) in dry CHCl_3 (4 mL). Purification by recrystallization with acetone and water furnished TES1c (35 mg, 0.10 mmol, 81% yield) as a yellow solid.

Physical and spectroscopic data of TES1c

Mp = 182 - 184 $^\circ\text{C}$ (from acetone). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6): δ 10.62 (br s, 1H, -OH), 8.07 (d, $J_{6\text{I},2\text{I}} = 2.0$ Hz, 1H, H-6^I), 7.86 (t, $J_{4\text{II},2\text{II}} = J_{4\text{II},6\text{II}} = 1.9$ Hz, 1H, H-4^{II}), 7.78 (d, $J_{2\text{II},4\text{II}} = J_{2\text{II},6\text{II}} = 1.9$ Hz, 2H, H-2^{II}, H-6^{II}), 7.70 (d, $J_{2\text{I},6\text{I}} = 2.0$ Hz, H-2^I). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, acetone- d_6): δ 191.3 (C_1), 148.9 ($\text{C}_{3\text{I}}$), 148.4 ($\text{C}_{4\text{I}}$), 141.2 ($\text{C}_{5\text{I}}$), 135.9 ($\text{C}_{3\text{II}}$, $\text{C}_{5\text{II}}$), 135.3 ($\text{C}_{1\text{I}}$), 132.6 ($\text{C}_{4\text{II}}$), 128.7 ($\text{C}_{2\text{II}}$, $\text{C}_{6\text{II}}$), 128.2 ($\text{C}_{1\text{II}}$), 121.7 ($\text{C}_{2\text{I}}$), 119.3 ($\text{C}_{6\text{I}}$). **IR** (ATR): ν 3331, 3070, 1617, 1544, 1436, 1308, 1267, 1122 cm^{-1} . **HRMS** (ESI-): calcd. for $[\text{C}_{13}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_5\text{-H}]^-$: 325.9623; found $[\text{M-H}]^-$: 325.9630. **DEPT135** and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlations were recorded.

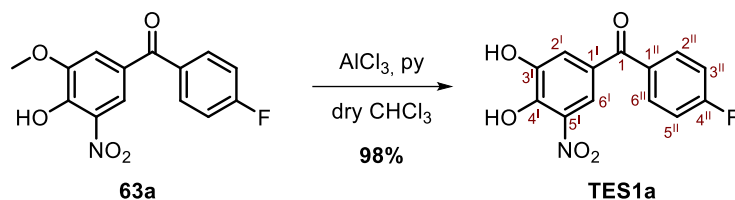
Synthesis of (3,5-difluorophenyl)(3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)methanone, TES1d



Compound TES1d was prepared as described for TES1e by using **63d** (100 mg, 0.32 mmol), AlCl_3 (86 mg, 0.65 mmol) and pyridine (105 μL , 1.29 mmol) in dry CHCl_3 (10 mL). Purification by recrystallization with acetone and water furnished TES1d (71 mg, 0.24 mmol, 75% yield) as an orange solid.

Physical and spectroscopic data of TES1d

Mp = 135 - 137 °C (from acetone). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 10.80 (br s, 1H, -OH), 9.33 (br s, 1H, -OH), 8.02 (d, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.67 (m, 1H, H-2'), 7.44 – 7.36 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''). **¹⁹F NMR** (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ -110.07 (s, F-3'', F-5''). **¹³C NMR** (90.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 190.7 (C₁), 162.0 (dd, $J_{3'',F} = J_{5'',F} = 12.6$ Hz, $J_{3'',F} = J_{5'',F} = 249.9$ Hz, C_{3''}, C_{5''}), 147.9 (C_{3'}), 146.6 (C_{4'}), 140.4 (t, $J_{1'',F} = 8.0$ Hz, C_{1''}), 136.9 (C_{5'}), 125.4 (C_{1'}), 118.5 (C_{6'}), 118.5 (C_{2'}), 112.5 (m, $J_{2'',F} = J_{6'',F} = 18.5$ Hz, C_{2''}, C_{6''}), 107.7 (t, $J_{4'',F} = 25.8$ Hz, C_{4''}). **IR** (ATR): ν 3363, 3091, 2925, 1617, 1587, 1436, 1323, 1212 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁻): calcd. for [C₁₃H₇F₂NO₅-H]⁻: 294.0214; found [M-H]⁻: 294.0221. **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlations were recorded.

Synthesis of (3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)(4-fluorophenyl)methanone, TES1a

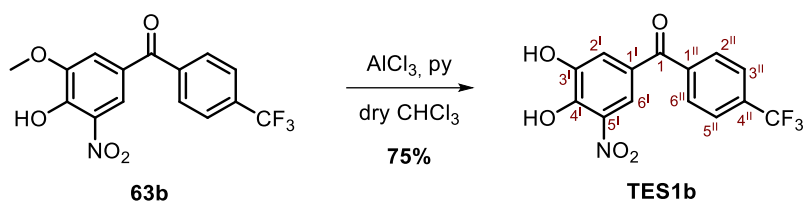
Compound TES1a was prepared as described for TES1e by using **63a** (73 mg, 0.25 mmol), AlCl₃ (67 mg, 0.50 mmol) and pyridine (61 μL, 0.75 mmol) in dry CHCl₃ (3 mL). Purification by digestion in hexane afforded TES1a (66 mg, 0.24 mmol, 98% yield) as a pale brown solid.

Physical and spectroscopic data of TES1a

M.P. = 162 - 165 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, acetone-*d*₆): δ 7.98 (d, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.91 (br dd, $J_{2'',3''} = J_{6'',5''} = 8.7$ Hz, $J_{2'',F} = J_{6'',F} = 5.5$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.65 (d, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 7.35 (br t, $J_{3'',2''} = J_{6'',5''} = 8.7$ Hz, $J_{3'',F} = J_{5'',F} = 8.7$ Hz, 2H, H-3'', H-5''). **¹⁹F NMR** (250 MHz, acetone-*d*₆): δ -105.17 (F-4''). **¹³C NMR** (90.5 MHz, acetone-*d*₆): δ 192.5 (C₁), 166.2 (d, $J_{3'',F} = 252.0$ Hz, C_{4''}), 148.6 (C_{3'}), 147.7 (C_{4'}), 135.1 (C_{5'}), 134.5 (d, $J_{1'',F} = 2.8$ Hz, C_{1''}), 133.4 (d, $J_{2'',F} = J_{6'',F} = 9.1$ Hz, C_{2''}, C_{6''}), 129.2 (C_{1'}), 121.9 (C_{2'}), 118.9 (C_{6'}), 116.4 (d, $J_{3'',F} = J_{5'',F} = 22.0$ Hz, C_{3''}, C_{5''}). **IR** (ATR): ν 3194, 2923, 2853, 1651, 1585, 1296, 1228, 1157 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁻): calcd. for [C₁₃H₈FNO₅-H]⁻: 276.0308; found [M-H]⁻: 276.0318. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlations were recorded.

Synthesis of (3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)[4-(trifluoromethyl)phenyl]methanone, TES1b

VI.4 Experimental section

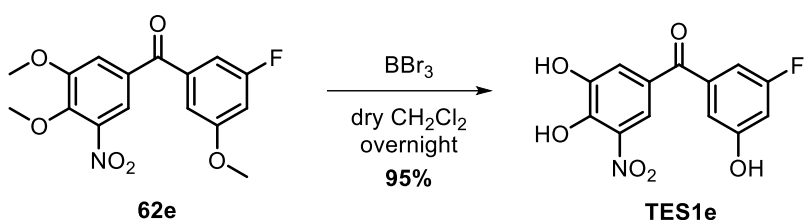


Compound **TES1b** was prepared as described for **TES1e** by using **63b** (20 mg, 62 μmol), AlCl_3 (15 mg, 0.11 mmol) and pyridine (13 μL , 0.17 mmol) in dry CHCl_3 (1 mL). Purification by recrystallization with acetone and water furnished **TES1b** (15 mg, 45 μmol , 75% yield) as a pale brown solid.

Physical and spectroscopic data of TES1b

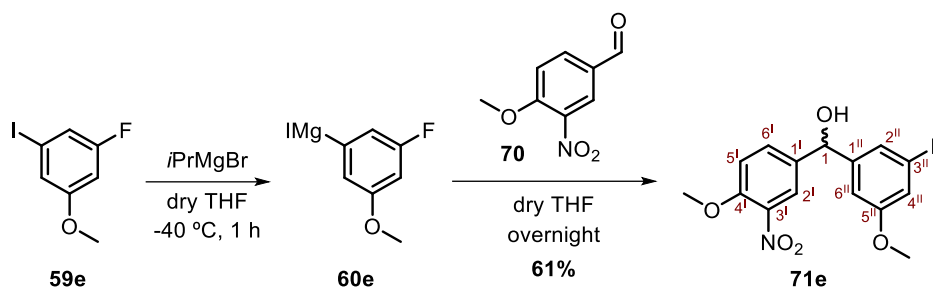
Mp = 68 - 71 $^\circ\text{C}$ (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, acetone- d_6): δ 8.02 - 8.00 (m, $J_{2'',3''} = J_{6'',5''} = 8.1$ Hz, 3H, H-2'', H-6'', H-6'), 7.94 (br d, $J_{3'',2''} = J_{6'',5''} = 8.1$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.68 (d, $J_{2',6'} = 1.9$ Hz, 1H, H-2'). **$^{19}\text{F NMR}$** (250 MHz, acetone- d_6): δ -68.53 (- CF_3). **$^{13}\text{C NMR}$** (91 MHz, acetone- d_6): δ 193.0 (C_1), 148.9 (C_3), 148.2 (C_4), 141.6 ($\text{C}_{1''}$), 135.3 ($\text{C}_{5''}$), 133.8 (q, $J_{4'',\text{F}} = 32.4$ Hz, $\text{C}_{4''}$), 130.9 ($\text{C}_{2''}$, $\text{C}_{6''}$), 128.5 ($\text{C}_{1'}$), 126.4 (q, $J_{3'',\text{F}} = J_{5'',\text{F}} = 3.8$ Hz, $\text{C}_{3''}$, $\text{C}_{5''}$), 125.0 (q, $J_{\text{CF}_3,\text{F}} = 286.7$, - CF_3), 121.7 ($\text{C}_{2'}$), 119.3 ($\text{C}_{6'}$). **IR** (ATR): ν 3449, 3247, 2929, 1655, 1545, 1408, 1247, 1106 cm^{-1} . **HRMS** (ESI-): calcd. for $[\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_5\text{-H}]^-$: 326.0276; found $[\text{M-H}]^-$: 326.0284. **COSY**, **DEPT135** and **$^1\text{H}/^{13}\text{C}$** correlations were recorded.

Other experimental conditions for the synthesis of (3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)(3-fluoro-5-hydroxyphenyl)methanone, TES1e



To a solution of **62e** (617 mg, 1.840 mmol) in dry CH_2Cl_2 (15.0 mL) was added dropwise a BBr_3 1 M solution in dry CH_2Cl_2 (15.0 mL, 14.72 mmol) in an argon atmosphere at -10 $^\circ\text{C}$. The reaction was allowed to proceed at room temperature overnight. The reaction was followed by TLC using a mixture of solvents $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1). When the reaction was finished the mixture was quenched with water (5 mL) carefully and the resulting aqueous layer was extracted with AcOEt (2 x 20 mL). The organic extracts were dried with Na_2SO_4 and the solvent removed under vacuum. The resulting brown solid was redissolved in a mixture of EtOAc/HCl 0.5% solution (1:1) and the layers were separated. The organic extracts were dried with Na_2SO_4 and the solvent removed under vacuum. The demethylation compound was purified by recrystallization with $\text{EtOAc}/\text{hexanes}$. The resulting yellow solid was identified as **TES1e** (525 mg, 1.79 mmol, 95% yield).

Synthesis of (3-fluoro-5-methoxyphenyl)(4-methoxy-3-nitrophenyl)methanol, **71e**

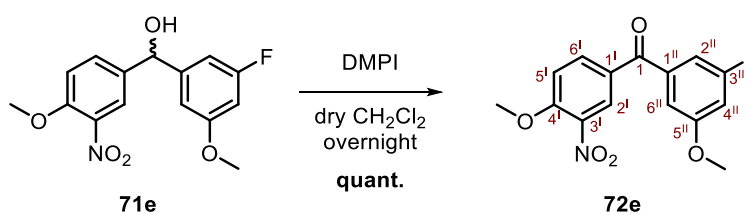


To a solution of **59e** (550 mg, 2.18 mmol) in dry THF (5 mL) at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, *i*PrMgBr (0.75 M in THF, 4.50 mL, 3.40 mmol) was added dropwise in 10 min under a nitrogen atmosphere and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h. Then, a solution of commercially available 4-methoxy-3-nitrobenzaldehyde, **70**, (390 mg, 2.16 mmol) in dry THF (7 mL) was added. The final mixture was warmed to rt and stirred overnight. The reaction was quenched by slow addition of brine (8 mL) and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 30 mL). All organic layers were collected, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum obtaining a yellow oil that was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) to furnish **71e** (410 mg, 1.33 mmol, 61% yield) as brown oil.

Physical and spectroscopic data of **71e**

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6): δ 7.89 (d, $J_{2',6'} = 2.3$ Hz, 1H, H-2'), 7.66 (dd, $J_{6',5'} = 8.7$ Hz, $J_{6',2'} = 2.3$ Hz, 1H, H-6'), 7.28 (d, $J_{5',6'} = 8.7$ Hz, 1H, H-5'), 6.88 (m, H-6''), 6.79 (br d, $J_{2'',F} = 10$ Hz, 1H, H-2''), 6.60 (dt, $J_{4'',F} = 10.0$ Hz, $J_{4'',2''} = J_{4'',6''} = 2.3$ Hz, 1H, H-4''), 5.86 (m, 1H, H-1), 5.24 (d, $J_{\text{OH},1} = 3.8$ Hz 1H, -OH), 3.95 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-4'$), 3.78 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-5''$). $^{19}\text{F NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6): δ -112.98 (t, F-3''). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, acetone- d_6): δ 167.1 (d, $J_{3'',F} = 245.0$ Hz, $\text{C}_{3''}$), 162.1 (d, $J_{5'',F} = 11.0$ Hz, $\text{C}_{5''}$), 152.4 ($\text{C}_{4'}$), 149.2 (d, $J_{1'',F} = 8.9$ Hz, $\text{C}_{1''}$), 138.4 ($\text{C}_{3'}$), 132.8 ($\text{C}_{6'}$), 126.5 ($\text{C}_{1'}$), 123.6 ($\text{C}_{2'}$), 114.8 ($\text{C}_{5'}$), 109.1 (d, $J_{6'',F} = 2.4$ Hz, $\text{C}_{6''}$), 105.8 (d, $J_{2'',F} = 22.6$ Hz, $\text{C}_{2''}$), 100.7 (d, $J_{4'',F} = 25.4$ Hz, $\text{C}_{4''}$), 74.2 (d, $J_{1,F} = 2.2$ Hz, C_1), 57.1 ($\text{CH}_3\text{O}-3'$), 56.0 ($\text{CH}_3\text{O}-5''$). **IR** (ATR): ν 3385, 1620, 1527, 1435, 1334, 1263, 1145, 1017 cm^{-1} . **HRMS** (ESI $^+$): calcd. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FNO}_5 + \text{Na}]^+$: 330.0748; found $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 330.0744.

Synthesis of (3-fluoro-5-methoxyphenyl)(4-methoxy-3-nitrophenyl)methanone, **72e**

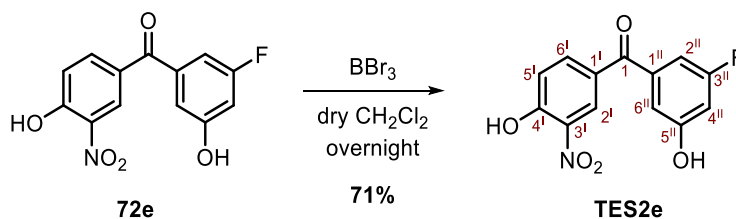


To a solution of alcohol **71e** (61 mg, 0.20 mmol) in dry CH₂Cl₂ (2 mL) and under a nitrogen atmosphere, a solution DMPI (123 mg, 0.29 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at rt. The reaction was quenched with the addition of 3 mL of a Na₂S₂O₃ (1.70 g) in a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (9 mL) and the mixture was stirred for 15 min. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) and the combined organic extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The resulting brown solid was identified as **72e** (60 mg, 0.19 mmol, quant. yield).

Physical and spectroscopic data of 72e

Mp = 125 - 128 °C (from acetone). **¹H NMR** (300 MHz, acetone-*d*₆): δ 8.28 (d, $J_{2^I,6^I} = 2.2$ Hz, 1H, H-2^I), 8.11 (dd, $J_{6^I,5^I} = 8.8$ Hz, $J_{6^I,2^I} = 2.3$ Hz, 1H, H-6^I), 7.52 (d, $J_{5^I,6^I} = 8.8$ Hz, 1H, H-5^I), 7.14 (ddd, $J_{6^{II},4^{II}} = 2.3$ Hz, $J_{6^{II},2^{II}} = 1.4$ Hz, $J_{6^{II},F} = 0.5$ Hz, 1H, H-6^{II}), 7.07 (ddd, $J_{2^{II},F} = 8.9$ Hz, $J_{2^{II},4^{II}} = 2.3$ Hz, $J_{2^{II},6^{II}} = 1.4$ Hz, 1H, H-2^{II}), 7.02 (dt, $J_{4^{II},F} = 10.5$ Hz, $J_{4^{II},2^{II}} = J_{4^{II},6^{II}} = 2.2$ Hz, 1H, H-4^{II}), 4.11 (s, 3H, CH₃O-4^I), 3.90 (s, 3H, CH₃O-5^{II}). **¹⁹F NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ -111.74 (s, F-3^{II}). **¹³C NMR** (75 MHz, acetone-*d*₆): δ 192.3 (d, $J_{1,F} = 2.7$ Hz, C₁), 164.1 (d, $J_{3^{II},F} = 245.6$ Hz, C_{3^{II}}), 162.1 (d, $J_{5^{II},F} = 11.1$ Hz, C_{5^{II}}), 156.6 (C_{4^I}), 140.6 (d, $J_{1^{II},F} = 8.1$ Hz, C_{1^{II}}), 140.6 (C_{1^{II}}), 136.5 (C_{6^I}), 129.2 (C_{1^I}), 127.7 (C_{2^I}), 114.8 (C_{5^I}), 112.1 (d, $J_{6^{II},F} = 2.7$ Hz, C_{6^{II}}), 109.0 (d, $J_{2^{II},F} = 23.5$ Hz, C_{2^{II}}), 106.2 (d, $J_{4^{II},F} = 25.4$ Hz, C_{4^{II}}), 57.6 (CH₃O-4^I), 56.4 (CH₃O-5^{II}). **IR** (ATR): ν 3092, 2952, 1665, 1588, 1433, 1340, 1147 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₅H₁₂FNO₅+Na]⁺: 328.0592; found [M+Na]⁺: 328.0584.

Synthesis of (3-fluoro-5-hydroxyphenyl)(4-hydroxy-3-nitrophenyl)methanone, TES2e



To a solution of **72e** (84 mg, 0.26 mmol) in dry CH₂Cl₂ (2 mL) was added dropwise a BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 1.41 mL, 1.41 mmol) at -10 °C. The reaction was allowed to proceed at rt overnight. The reaction mixture was quenched with carefully water (5 mL) carefully and the resulting aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 10 mL). The organic extracts were dried with Na₂SO₄ and the solvent removed under vacuum to give a crude product. Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1 → 1:1) afforded TES2e (51 mg, 0.18 mmol, 71% yield) as a brown solid.

Physical and spectroscopic data of TES2e

Mp = 185 °C (from acetone). **¹H NMR** (400 MHz, acetone-*d*₆): δ 8.53 (d, $J_{6^I,2^I}$ = 2.2 Hz, 1H, H-6^I), 8.15 (dd, $J_{2^I,3^I}$ = 8.7 Hz, $J_{2^I,6^I}$ = 2.2 Hz, 1H, H-2^I), 7.38 (d, $J_{3^I,2^I}$ = 8.7 Hz, 1H, H-3^I), 7.09 (m, 1H, H-6^{II}), 7.00 (ddd, $J_{2^{II},F}$ = 8.9 Hz, $J_{2^{II},4^{II}}$ = 2.3 Hz, 1H, H-2^{II}), 6.90 (dt, $J_{4^{II},2^{II}}$ = 2.3 Hz, $J_{4^{II},F}$ = 10.3 Hz, 1H, H-4^{II}). **¹⁹F NMR** (300 MHz, acetone-*d*₆): δ -112.36 (t, F-3^{II}). **¹³C NMR** (100.6 MHz, acetone-*d*₆): δ 192.3 (d, $J_{CO,F}$ = 2.9 Hz, C₁), 164.1 (d, $J_{3^{II},F}$ = 245.5 Hz, C_{3^{II}}), 160.0 (d, $J_{5^{II},F}$ = 11.7 Hz, C_{5^{II}}), 158.2 (C_{4^I}), 140.6 (d, $J_{1^{II},F}$ = 8.8 Hz, C_{1^{II}}), 138.5 (C_{6^I}), 134.9 (C_{3^I}), 129.9 (C_{1^I}), 128.5 (C_{2^I}), 121.2 (C_{5^I}), 113.5 (d, $J_{6^{II},F}$ = 2.8 Hz, C_{6^{II}}), 108.1 (d, $J_{2^{II},F}$ = 23.2 Hz, C_{2^{II}}), 107.5 (d, $J_{4^{II},F}$ = 24.2 Hz, C_{4^{II}}). **IR** (ATR): ν 3242, 1615, 1587, 1422, 1334, 1110 cm⁻¹. **HRMS** (ESI-): calcd. for [C₁₃H₈FNO₅-H]⁻: 276.0303; found [M-H]⁻: 276.0300. **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlations were recorded.

VI.4.2. Computational simulations, *in silico*

These experiments were performed by Dra. Mariona Sodupe's research group at *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)*. Binding energies have been estimated from gas-phase interaction energies of a collection of frames generated from a classical molecular dynamics (MD) simulation and including solvent effects as the ligand solvation energy. This means that it has been assumed that the complex and the receptor had approximately the same solvation energy and that the solvation contribution to the binding energy only arose from ligands desolvation. MD simulations were performed with the Amber suite,¹³ using the ff14SB force field.¹⁴ Production was run for 150 ns in the isothermal-isobaric ensemble (NPT), at a constant temperature of 300 K (see molecular dynamics protocol for detail) and binding energies were estimated from 140 structures evenly sampled from the last 140 ns. Ligand solvation energies were computed with the SMD continuum model¹⁵ at the DFT (B3LYP/6-31+G (d,p)) level of theory with the Gaussian09 program.

Models were built by replacing Tolcapone molecules with their derivatives in the high-resolution X-ray diffraction tetrameric WT-TTR-Tolcapone complex structure PDB: 4D7B.¹⁶ Complex structures were neutralized with the appropriate number of Na⁺ counterions, and water molecules were added up to a minimum distance of 8 Å from the protein. It should be noted that while in the tetrameric WT-TTR-Tolcapone crystal structure the two ligands are symmetrically placed, simulations without any structural constraints led to an asymmetric organization with one ligand at the center of the TTR tetramer, and the second in the binding channel, though further exposed to the solvent than in the crystallographic structure (Figure A-IV-4). This striking difference between the simulations and the X-ray structure may be due either to (i) a dynamic disorder of the two ligands in the complex in solution, which collapses to a symmetric organization upon crystallization, or (ii) to the inadequacy of the

molecular mechanics model to properly describe the system's structural features. Thus, it was decided to enforce a small harmonic constraint on the protein backbone so that the structure did not drift significantly apart from the crystallographic one. After extensive testing, it has been found that including a constraint of $2 \text{ kcal/mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ on the backbone, the symmetry of the two binding sites was preserved while allowing a reorganization of the ligand binding residues. Thus, this was the protocol adopted all along this work.

VI.4.2.1. Molecular dynamics protocol

The molecular dynamics protocol included (i) a 200 ps equilibration run in the canonical ensemble (NVT) rising the temperature from 0 to 100 K (ii) 2 ns equilibration in the NPT ensemble, raising the temperature from 100 to 300 K; (iii) 150 ns production run in the NPT ensemble with the temperature kept constant to 300 K. A Langevin thermostat and a Monte Carlo barostat were employed. Hydrogen bonds were calculated with cpptraj default values (distance cutoff of 3 Å) in all cases except for Cl··X contacts for which the threshold was set to 3.5 Å. Visualization and post-processing were done with VMD and MDtraj packages.^{17,18}

VI.4.3. Biological experiments TSE compounds

All of these experiments were performed by Dr. Salvador Ventura's research group at *Universitat Autònoma de Brcelona (UAB)*.

Isothermal titration calorimetry

The kinetic parameters that characterize the binding of TTR ligands to WT-TTR were determined using a MicroCal Auto-iTC200 Calorimeter (MicroCal, Malvern-Panalytical), as detailed before.¹⁹ A 100 μM solution of compound in PBS buffer pH 7.0, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 2.5% DMSO, was titrated (25 °C) into an ITC cell containing 5 μM solution of WT-TTR in the same buffer. A stirring speed of 750 rpm. and 2 μl injections were programmed, with a 150 s equilibration period between each injection to allow the calorimetric signal (thermal power) to return to baseline. Two independent titrations were done for each TTR ligand. The experimental data was analyzed with a general model for a protein with two-ligand-binding sites^{20,21} implemented in Origin 7.0 (OriginLab). The best-fit of the binding isotherm was attained with a model considering two identical binding sites.

Urea-induced TTR tetramer dissociation kinetics

TTR solutions (1.8 μM in PBS) were incubated with the different TTR ligands (3.6 μM) for 30 min at rt and 6 M urea was added. A control sample containing the same amount of DMSO rather than compound was prepared. The process of unfolding was tracked by intrinsic fluorescence spectroscopy, using a FP-8200 Spectrofluorometer (Jasco). Trp residues were excited at 295 nm and emission spectra was collected from 310 to 400 nm. Trp exposure upon denaturation red shifts the wavelength of maximum fluorescence from 335 nm to 355 nm, approximately. The 355/335 fluorescence emission intensity was normalized from minimum (100% folded) to maximum (0% folded) and plotted as a function of time. TTR fluorescence of the control sample after incubation at RT for 96 h in 6 M urea was considered maximum.

TTR *in vitro* aggregation assay

The antiaggregational activity of TTR ligands was evaluated using the established acid-mediated aggregation assay.¹⁹ In short, WT-TTR solutions (7 μM in 10 mM sodium phosphate, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.0) were mixed with increasing concentrations of test compounds (prepared in 100% DMSO). The percentage of DMSO was adjusted to 5% (v/v) in the final reaction assay mixture. After incubating 30 min at 37 °C, the pH of the samples was dropped to 4.2 by the addition of acetate buffer (100 mM sodium acetate, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 4.2) and the solutions were further incubated for 72 h at 37 °C. The extent of TTR aggregation was assessed by measuring turbidity at 340 nm, using a Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies). As some of the compounds present dose-dependent absorbance at 340 nm, each measurement was corrected with a buffer containing the same concentration of test compound but lacking TTR. For each inhibitor concentration, the percentage of TTR aggregation was given by the ratio of the turbidity of the sample of interest to that of a control sample incubated without compound, multiplied by 100%.

TTR stabilization studies by isoelectric focusing

Isoelectric focusing (IEF) under semi-denaturing conditions was performed as described previously²² to evaluate the stabilizing effect of both tolcapone and TES1e on recombinant TTR and in plasma TTR. Recombinant WT-TTR was produced using an *Escherichia coli* bacterial expression system, as detailed elsewhere.²³ For the plasma assays, human plasma from control individuals (n = 6), TTR WT carriers (\approx 3.9 μM) were incubated overnight at 4 °C with tolcapone or TES1e at two different concentrations (19.5 μM and 39 μM). Similarly, recombinant WT-TTR (6 μM) was also treated overnight at 4 °C with the same compounds at concentrations of 30 μM and 60 μM . DMSO (5%) was used as vehicle. Control

samples were incubated in similar conditions without the compounds. After incubation, the samples were loaded into a native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and, the gel band containing TTR was excised and applied to an IEF gel. The IEF gel contained 4 M urea (semi-denaturing conditions) and 5% (v/v) ampholytes, pH 4 - 6.5 (Sigma-Merck) and was run at 1200 V for 5 h. Proteins were fixed and stained with Coomassie blue. The gels were scanned using GS-900 calibrated densitometer (Bio-Rad, Hercules) and analyzed by densitometry using the QuantityOne software version 4.6.6 (Bio-Rad, Hercules). The ratio of TTR tetramer over total TTR (TTR tetramer + monomer) was calculated for each plasma sample and the percentage of tetramer stabilization was calculated as $((\text{ratio treated sample} - \text{ratio control sample}) / \text{ratio control sample}) \times 100$. Treated and control plasma samples come from the same donor.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity analyses were performed for evaluating the potential TES1e chemical toxicity to human cells. Two cell lines, HeLa and HepG2 cells, were cultured in MEM ALPHA (Gibco), 10% FBS at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere. HeLa cells were seeded at 3500 cells/well and HepG2 cells at 4500 cells/well in 96-well plates and incubated with increasing concentrations of TES1e at a range of concentrations from 2 μM to 1 mM during 72 h at 37 °C. Controls were performed with the equivalent amount of DMSO relative to each concentration of compound diluted in PBS. Then, cell viability was determined by adding 10 μL of PrestoBlue® reagent (ThermoFisher Scientific) and, after an incubation period of 15 min at 37 °C, the fluorescence intensity was collected using a 590/20 filter, with an excitation wavelength of 535 in a Victor3 Multilabel Reader (PerkinElmer). Experiments were carried out in triplicate and the values were normalized to the mean of the control cells.

VI.4.3.1. Statistical analysis

All the graphs were generated with GraphPad Prism software version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Data are shown as means ± standard error of mean (SEM). The results obtained from TTR stabilization studies in human plasma were analyzed by one-way ANOVA Tukey's test using GraphPad Prism 6.0. $p < 0.05$ was considered statistically significant (* statistically significant at $p < 0.05$; ** statistically significant at $p < 0.01$; *** statistically significant at $p < 0.001$).

VI.4.4. Crystallization and structure determination of the WT-TTR/ TES1e complex

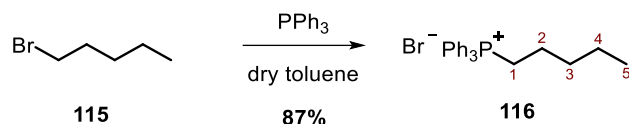
Cocrystals of WT-TTR/ TES1e were obtained as described previously.¹⁹ In short, WT-TTR (85 μ M) was mixed with 10-fold molar excess of TES1e and co-crystallized at 18 °C by hanging-drop vapor diffusion method (1:1, complex and reservoir solution). Crystals were grown from a solution containing 30% polyethylene glycol (PEG) 400, 200 mM CaCl₂, 100 mM HEPES, pH 8.0 and directly flash-frozen in liquid nitrogen before analysis. Diffraction data were recorded from PEG400 cryo-cooled crystals (100 K) at the ALBA Synchrotron in Barcelona (BL13-XALOC beamline).²⁴ Data were integrated and merged using XDS²⁵ and scaled, reduced, and further analyzed using Ccp4.²⁶ The structure of TTR/ TES1e complex was determined by molecular replacement with Phenix (version 1.19.2-4158)²⁷ using the crystal structure of TTR (PDB: 1F41) as a search model. Refinement was performed with Phenix, and model building was performed with Coot.²⁸ Refinement and data statistics are provided in Table A-IV-3. Figures were prepared with Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC).

VI.5. Experimental procedures of chapter V: CB₂R allosteric modulators

VI.5.1. Synthesis of new allosteric modulators of CB₂R

VI.5.1.1. Synthesis of different elongation alkyl chain CBD analogues CBD_{AM}1a-CBD_{AM}1f

Synthesis of pentyltriphenylphosphonium bromide, **116**

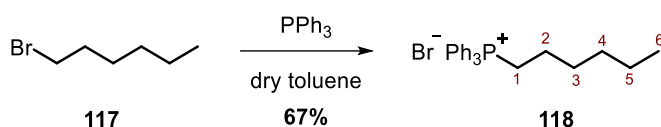


To a solution of triphenylphosphine (315 mg, 1.20 mmol) in anhydrous toluene (5 mL), 1-bromopentane (0.12 mL, 1.00 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux temperature overnight. Then, the solution was cooled to rt, and the solvent was reduced under vacuum. To the resulting suspension, diethyl ether was added dropwise, and a precipitate appeared. The solid was filtered, cleaned with diethyl ether, and dried. The white solid was identified as compound **116** (360 mg, 0.87 mmol, 87% yield).

Physical and spectroscopic data of **116**

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 7.90 - 7.73 (m, 15H, 3xPh), 3.70 (m, 2H, H-1), 1.69 - 1.58 (m, 4H, H-2, H-3), 1.32 (m, 2H, H-4), 0.82 (t, *J*_{5,4} = 6.8 Hz, 3H, H-5).

Synthesis of hexyltriphenylphosphonium bromide, **118**

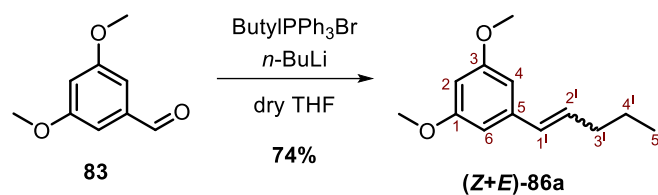


To a solution of triphenylphosphine (14.66 g, 55.89 mmol) in anhydrous toluene (110 mL), 1-bromohexane (8.50 mL, 60.55 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux temperature overnight. Then, the solution was cooled to rt and the solvent was reduced under vacuum. To the resulting suspension, diethyl ether was added dropwise, and a precipitate appeared. The solid was filtered, cleaned with diethyl ether, and dried. The white solid was identified as compound **118** (17.33 g, 40.56 mmol, 67% yield).

Physical and spectroscopic data of **118**

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 7.87 - 7.69 (m, 15H, 3xPh), 3.71 (m, 2H, H-1), 1.64 - 1.62 (m, 4H, H-2, H-3), 1.27 - 1.22 (m, 4H, H-4, H-5), 0.82 (t, *J*_{5,4} = 6.8 Hz, 3H, H-6).

Synthesis of (*Z*)- and (*E*)-1,3-dimethoxy-5-(pent-1-en-1-yl)benzene, (*Z*)- and (*E*)-**86a**

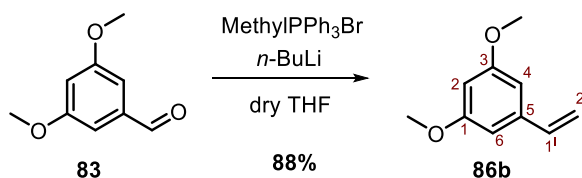


To a suspension of the butyltriphenylphosphonium bromide (7.38 g, 18.17 mmol) in anhydrous THF (35 mL), a solution of *n*-BuLi (2.5 M in dry THF, 7.40 mL, 18.50 mmol) was added dropwise at 0 °C. After continued stirring for 20 min, a solution of 3,5-dimethoxybenzaldehyde, **83**, (2.05 g, 12.32 mmol) in dry THF (60 mL) was slowly added dropwise. Then, the reaction mixture was stirred at rt until the consumption of the starting material (TLC, hexane/EtOAc, 9:1). The reaction was quenched by the slow addition of water (50 mL) and extracted with EtOAc (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, concentrated, and purified by column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) to give a 1.3:1 mixture of (*Z*)- and (*E*)-olefins **86a** (1.88 g, 9.11 mmol, 74% yield) as a colourless oil.

Physical and spectroscopic data of (*Z*)- and (*E*)-**86a**²⁹

(E)-86a; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 6.52 (d, $J_{4,2} = J_{6,2} = 2.2$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.38 - 6.21 (m, 3H, H-2, H-1', H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.20 (q, $J_{3',2'/4'} = 7.2$ Hz, 2H, H-3'), 1.54 - 1.46 (m, 2H, H-4'), 0.99 - 0.93 (m, 3H, H-5'). ¹³C NMR (90.5 MHz, CDCl₃): δ 161.0 (C₁, C₃), 140.1 (C₅), 131.7 (C_{2'}), 129.9 (C_{1'}), 104.1 (C₄, C₆), 99.2 (C₂), 55.4 (2x-OCH₃), 35.2 (C_{3'}), 22.6 (C_{4'}), 13.9 (C_{5'}). **(Z)-86a**; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 6.46 (d, $J_{4,2} = J_{6,2} = 2.2$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.38 - 6.31 (m, 2H, H-2, H-1'), 5.67 (dt, $J_{2',1'} = 11.7$ Hz, $J_{2',3'} = 7.2$ Hz, 1H, H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.34 (q, $J_{3',2'/4'} = 7.3$ Hz, 2H, H-3'), 1.50 (q, $J_{4',2'/3'} = 7.3$ Hz, 2H, H-4'), 0.96 (q, $J_{5',4'} = 7.3$ Hz, 2H, H-5'). ¹³C NMR (90.5 MHz, CDCl₃): δ 160.6 (C₁, C₃), 139.8 (C₅), 133.7 (C_{2'}), 128.9 (C_{1'}), 107.0 (C₄, C₆), 98.8 (C₂), 55.4 (2x-OCH₃), 30.9 (C_{3'}), 23.3 (C_{4'}), 14.0 (C_{5'}).

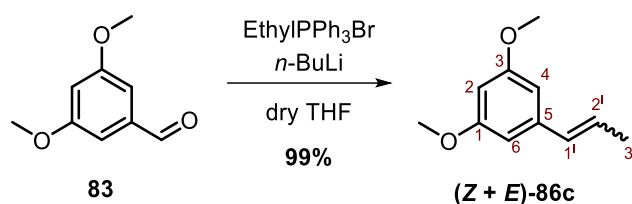
Synthesis of 1,3-dimethoxy-5-vinylbenzene, **86b**³⁰



Compound **86b** was prepared as described for **86a**, by using 3,5-dimethoxybenzaldehyde (2.01 g, 12.08 mmol), methyltriphenylphosphonium bromide (6.51 g, 18.20 mmol) and *n*-BuLi (2.5 M in THF, 7.22 mL, 18.05 mmol). Purification by column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1 → 2:1) afforded compound **86b** (1.74 g, 10.61 mmol, 88% yield) as a colorless oil.

Physical and spectroscopic data of **86b**³¹

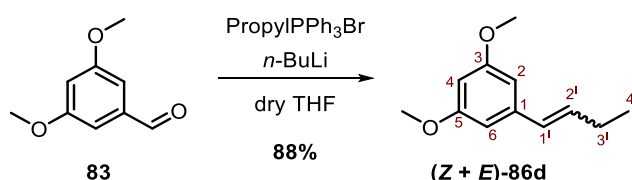
¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 6.66 (dd, $J_{trans} = 17.5$ Hz, $J_{cis} = 10.9$ Hz, 1H, H-1^l), 6.57 (d, $J_{4,2} = J_{6,2} = 2.4$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.39 (t, $J_{2,4} = J_{2,6} = 2.4$ Hz, 1H, H-2), 5.73 (dd, $J_{trans} = 17.5$ Hz, $J_{gem} = 0.9$ Hz, 1H, H-2a^l), 5.25 (dd, $J_{cis} = 10.9$ Hz, $J_{gem} = 0.9$ Hz, 1H, H-2b^l), 3.81 (s, 6H, 2x-OCH₃). ¹³C NMR (90.5 MHz, CDCl₃): δ 161.0 (C₁, C₃), 139.7 (C₅), 136.9 (C₁'), 114.5 (C₂'), 104.4 (C₄, C₆), 100.1 (C₂), 55.4 (2x-OCH₃).

Synthesis of (Z)- and (E)-1,3-dimethoxy-5-(prop-1-en-1-yl)benzene, (Z)- and (E)-86c

A mixture of olefins (Z)- and (E)-**86c** was prepared as described for **86a**, by using 3,5-dimethoxybenzaldehyde (2.07 g, 12.47 mmol), ethyltriphenylphosphonium bromide (6.70 g, 18.53 mmol) and *n*-BuLi (2.5 M in THF, 7.20 mL, 18.05 mmol). Purification by column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) afforded a 1:1.2 mixture of (Z)- and (E)-**86c** (2.20 g, 12.34 mmol, 99% yield) as a colorless oil.

Physical and spectroscopic data of (Z)- and (E)-**86c**³¹

(E)-86c; ¹H NMR (360 MHz, CD₃OD): δ 6.48 (m, 2H, H-4, H-6), 6.37 - 6.21 (m, 3H, H-2, H-1^l, H-2^l), 3.76 (s, 6H, 2x-OCH₃), 1.88 - 1.84 (m, 3H, H-3^l). ¹³C NMR (90.5 MHz, CD₃OD): δ 162.4 (C₁, C₃), 141.3 (C₅), 132.4 (C₁'), 126.4 (C₂'), 104.9 (C₄, C₆), 99.9 (C₂), 55.6 (2x-OCH₃), 18.5 (C₃'). **(Z)-86c**; ¹H NMR (360 MHz, CD₃OD): δ 6.42 (m, 2H, H-4, H-6), 6.37 - 6.21 (m, 2H, H-2, H-1^l), 5.76 (m, 1H, H-2^l), 3.76 (s, 6H, 2x-OCH₃), 1.88 - 1.84 (m, 3H, H-3^l). ¹³C NMR (90.5 MHz, CD₃OD): δ 162.0 (C₁, C₃), 140.7 (C₅), 131.1 (C₁'), 127.7 (C₂'), 107.9 (C₄, C₆), 99.6 (C₂), 55.7 (2x-OCH₃), 14.9 (C₃').

Synthesis of (Z)- and (E)-1-(but-1-en-1-yl)-3,5-dimethoxybenzene, (Z)- and (E)-86d

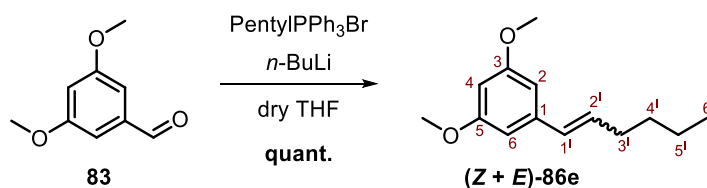
A mixture of olefins (Z)- and (E)-**86d** was prepared as described for **86a**, by using 3,5-dimethoxybenzaldehyde (2.03 g, 12.19 mmol), propyltriphenylphosphonium bromide (7.10 g, 18.42 mmol) and *n*-BuLi (2.5 M in THF, 7.20 mL, 18.05 mmol). Purification by column chromatography

(hexanes/EtOAc, 9:1) afforded a 1:1.5 mixture of (*Z*)- and (*E*)-**86d** (2.05 g, 10.66 mmol, 88% yield) as a colorless oil.

Physical and spectroscopic data of (*Z*)- and (*E*)-**86d**

(*E*)-86d; $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.52 (d, $J_{2,4} = J_{6,4} = 2.3$ Hz, 2H, H-2, H-6), 6.34 (d, $J_{4,2} = J_{4,6} = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 6.37 - 6.22 (m, 2H, H-1', H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.22 (m, 2H, H-3'), 1.12 - 1.05 (m, 3H, H-4'). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 161.0 (C₃, C₅), 140.1 (C₁), 133.3 (C₁'/ C₂'), 128.9 (C₁'/ C₂'), 104.1 (C₂, C₆), 99.2 (C₄), 55.4 (2x-OCH₃), 26.1 (C₃'), 13.7 (C₄'). **(*Z*)-86d**; $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.44 (d, $J_{2,4} = J_{6,4} = 2.2$ Hz, 2H, H-2, H-6), 6.37 - 6.22 (m, 2H, H-4, H-1'), 5.65 (m, 1H, H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.36 (m, 2H, H-3'), 1.12 - 1.05 (m, 3H, H-4'). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 160.6 (C₃, C₅), 139.8 (C₁), 135.4 (C₂'), 128.3 (C₁'), 106.9 (C₂, C₆), 98.8 (C₄), 55.4 (2x-OCH₃), 22.3 (C₃'), 14.6 (C₄'). **IR** (ATR): ν 2960, 1591, 1457, 1204, 1152, 1065 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₂₄H₁₆O₂+H]⁺: 193.1229; found [M+H]⁺: 193.1220.

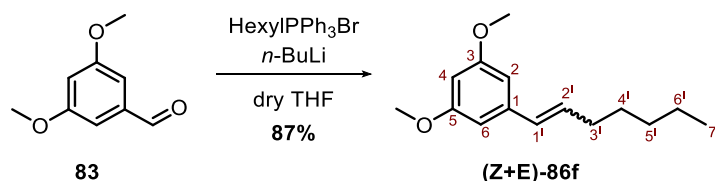
Synthesis of (*Z*)- and (*E*)-1-(hex-1-en-1-yl)-3,5-dimethoxybenzene, (*Z*)- and (*E*)-86e****



A mixture of olefins (*Z*)- and (*E*)-**86e** was prepared as described for **86a**, by using 3,5-dimethoxybenzaldehyde (1.65 g, 9.93 mmol), pentyltriphenylphosphonium bromide, **114**, (6.15 g, 14.89 mmol) and *n*-BuLi (2.5 M in THF, 6.00 mL, 14.89 mmol). Purification by column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) afforded a 1.2:1 mixture of (*Z*)- and (*E*)-**86e** (2.19 g, 9.93 mmol, quant. yield) as a colorless oil.

Physical and spectroscopic data of (*Z*)- and (*E*)-**86e**

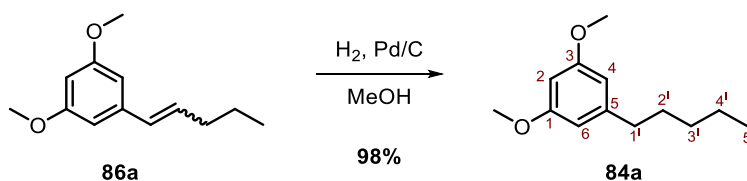
(*E*)-86e; $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.52 (m, 2H, H-2, H-6), 6.37 - 6.19 (m, 3H, H-4, H-1', H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.22 (m, 2H, H-3'), 1.49 - 1.36 (m, 4H, H-4', H-5'), 0.96 - 0.89 (m, 3H, H-6'). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 160.6 (C₃, C₅), 139.8 (C₁), 131.9 (C₁'/C₂'), 129.7 (C₁'/C₂'), 104.0 (C₂, C₆), 99.2 (C₄), 55.4 (2x-OCH₃), 32.8 (C₃'), 31.6 (C₄'), 22.4 (C₅'), 14.1 (C₆'). **(*Z*)-86e**; $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.46 (m, 2H, H-2, H-6), 6.37 - 6.19 (m, 2H, H-2, H-1'), 5.67 (m, 1H, H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.36 (m, 2H, H-3'), 1.49 - 1.36 (m, 4H, H-4', H-5'), 0.96 - 0.89 (m, 3H, H-6'). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 160.9 (C₃, C₅), 140.1 (C₁), 133.8 (C₁'/C₂'), 128.8 (C₁'/C₂'), 106.9 (C₂, C₆), 98.7 (C₄), 55.4 (2x-OCH₃), 32.3 (C₃'), 28.6 (C₄'), 22.6 (C₅'), 14.1 (C₆'). **IR** (ATR): ν 2957, 1591, 1458, 1205, 1154, 1067 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₄H₂₀O₂+H]⁺: 221.1542; found [M+H]⁺: 221.1535.

Synthesis of (Z)- and (E)-1-(hept-1-en-1-yl)-3,5-dimethoxybenzene, (Z)- and (E)-86f

A mixture of olefins (Z)- and (E)-**86f** was prepared as described for **86a**, by using 3,5-dimethoxybenzaldehyde (2.99 g, 17.97 mmol), hexyltriphenylphosphonium bromide, **116**, (11.56 g, 27.05 mmol) and *n*-BuLi (2.5 M in THF, 11.00 mL, 27.50 mmol). Purification by column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) afforded a 1:1.3 mixture of (Z)- and (E)-**86f** (3.69 g, 15.60 mmol, 87% yield) as a colorless oil.

Physical and spectroscopic data of (Z)- and (E)-**86f**³²

(E)-86f; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.51 (m, 2H, H-2, H-6), 6.34 - 6.30 (m, 2H, H-2, H-1'), 6.22 (m, 1H, H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.20 (m, 2H, H-3'), 1.35 - 1.30 (m, 6H, H-4', H-5', H-6'), 0.93 - 0.89 (m, 3H, H-7'). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 161.0 (C₃, C₅), 140.2 (C₁), 132.0 (C₁₁/C₂₁), 129.7 (C₁₁/C₂₁), 104.0 (C₂, C₆), 99.1 (C₄), 55.5 (2x-OCH₃), 33.1 (C₅₁), 31.6 (C₄₁), 29.2 (C₃₁), 22.4 (C₆₁), 14.1 (C₇₁). **(Z)-86f**; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.44 (m, 2H, H-2, H-6), 6.36 - 6.30 (m, 2H, H-2, H-1'), 5.66 (m, 1H, H-2'), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.33 (m, 2H, H-3'), 1.51 - 1.44 (m, 6H, H-4', H-5', H-6'), 0.93 - 0.89 (m, 3H, H-7'). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 160.6 (C₃, C₅), 139.9 (C₁), 133.8 (C₁₁/C₂₁), 128.7 (C₁₁/C₂₁), 106.9 (C₂, C₆), 98.7 (C₄), 55.3 (2x-OCH₃), 33.1 (C₅₁), 31.7 (C₃₁), 29.8 (C₄₁), 22.7 (C₆₁), 14.3 (C₇₁). IR (ATR): ν 2927, 1739, 1592, 1458, 1206, 1155, 1066 cm⁻¹.

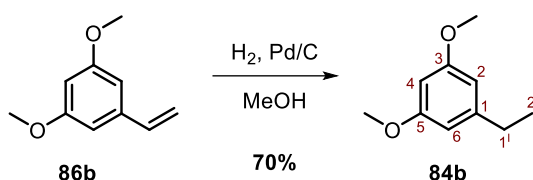
Synthesis of 1,3-dimethoxy-5-pentylbenzene, 84a

A stirred solution of **86a** (1.87 g, 9.09 mmol) and two drops of acetic acid in MeOH (50 mL) was hydrogenated over Pd/C (10% in wt of Pd, 190 mg, 0.18 mmol) under 1 atm of H₂ for 24 h. Then, the catalyst was removed by filtration over Celite® and the solvent was evaporated under reduced pressure to deliver compound **84a** (1.85 g, 8.88 mmol, 98% yield) as a yellow oil.

Physical and spectroscopic data of **84a**³³

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.37 (m, 2H, H-4, H-6), 6.32 (m, 1H, H-2), 3.80 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.56 (t, $J_{1,2^1} = 7.6$ Hz, 2H, H-1¹), 1.62 (quint., $J_{2^1,1^1/3^1} = 7.6$ Hz, 2H, H-2¹), 1.38 - 1.28 (m, 4H, H-3¹, H-4¹), 0.91 (m, 3H, H-5¹). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 160.7 (C₁, C₃), 145.5 (C₅), 106.5 (C₄, C₆), 97.6 (C₂), 55.3 (2x-OCH₃), 36.4 (C_{1^1}), 31.7 (C_{3^1}), 31.1 (C_{2^1}), 22.7 (C_{4^1}), 14.2 (C_{5^1}).

Synthesis of 1-ethyl-3,5-dimethoxybenzene, **84b**

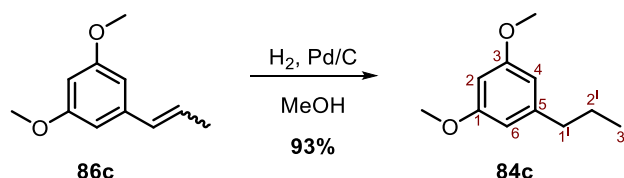


Compound **84b** was prepared as described for **84a** by using a solution of **86b** (1.67 g, 10.19 mmol) and Pd/C (10% in wt of Pd, 168 mg, 0.16 mmol) in MeOH (60 mL). The resulting yellow oil was identified as **84b** (1.17 g, 7.01 mmol, 70% yield).

Physical and spectroscopic data of **84b**³³

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.38 (d, $J_{2,4} = J_{6,4} = 2.1$ Hz, 2H, H-2, H-6), 6.31 (t, $J_{4,2} = J_{4,6} = 2.1$ Hz 1H, H-4), 3.79 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.60 (q, $J_{1,2^1} = 7.6$ Hz, 2H, H-1¹), 1.23 (t, $J_{2^1,1^1} = 7.6$ Hz, 3H, H-2¹). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 160.8 (C₃, C₅), 146.8 (C₁), 106.0 (C₂, C₆), 97.6 (C₄), 55.4 (2x-OCH₃), 29.3 (C_{1^1}), 15.6 (C_{2^1}).

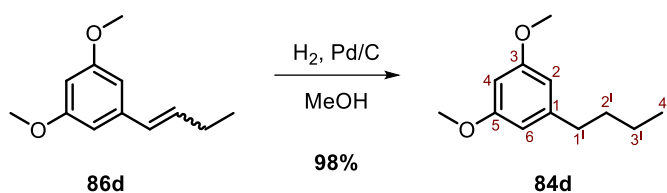
Synthesis of 1,3-dimethoxy-5-propylbenzene, **84c**



Compound **84c** was prepared as described for **84a** by using a solution of **86c** (2.03 g, 11.38 mmol) and Pd/C (10% in wt of Pd, 215 mg, 0.20 mmol) in MeOH (70 mL). The resulting yellow oil was identified as **84c** (1.91 g, 10.60 mmol, 93% yield).

Physical and spectroscopic data of **84c**³³

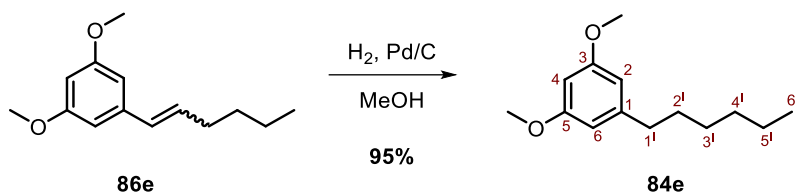
¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 6.36 (d, $J_{4,2} = J_{6,2} = 2.2$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.31 (m, 1H, H-2), 3.79 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.54 (t, $J_{1,2'} = 7.5$ Hz, 2H, H-1'), 1.64 (quint., $J_{2',1'/3'} = 7.5$ Hz, 2H, H-2'), 0.95 (t, $J_{3',2'} = 7.5$ MHz, 3H, H-3'). ¹³C NMR (90.5 MHz, CDCl₃): δ 160.7 (C₁, C₃), 145.3 (C₅), 106.9 (C₄, C₆), 97.7 (C₆), 55.3 (2x-OCH₃), 38.5 (C_{1'}), 24.5 (C_{2'}), 14.0 (C_{3'}).

Synthesis of 1-butyl-3,5-dimethoxybenzene, **84d**

Compound **84d** was prepared as described for **84a** by using a solution of **86d** (2.05 g, 10.66 mmol) and Pd/C (10% in wt of Pd, 212 mg, 0.20 mmol) in MeOH (60 mL). The resulting yellow oil was identified as **84d** (2.03 g, 10.44 mmol, 98% yield).

Physical and spectroscopic data of **84d**³³

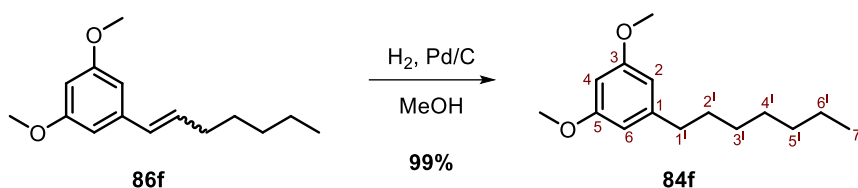
¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 6.35 (m, 2H, H-2, H-6), 6.30 (m, 1H, H-4), 3.78 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.56 (t, $J_{1,2'} = 7.6$ Hz, 2H, H-1'), 1.59 (quint., $J_{2',1'/3'} = 7.6$ Hz, 2H, H-2'), 1.36 (sext., $J_{3',2'/4'} = 7.5$ Hz, 2H, H-3'), 0.93 (t, $J_{4',3'} = 7.4$ Hz, 3H, H-4'). ¹³C NMR (90.5 MHz, CDCl₃): δ 160.8 (C₃, C₅), 145.5 (C₁), 106.6 (C₂, C₆), 97.6 (C₄), 55.3 (2x-OCH₃), 36.1 (C_{1'}), 33.6 (C_{2'}), 22.5 (C_{3'}), 14.1 (C_{4'}).

Synthesis of 1-hexyl-3,5-dimethoxybenzene, **84e**

Compound **84e** was prepared as described for **84a** by using a solution of **86e** (2.00 g, 9.08 mmol) and Pd/C (10% in wt of Pd, 200 mg, 0.19 mmol) in MeOH (70 mL). The resulting yellow oil was identified as **84e** (1.97 g, 9.07 mmol, 95% yield).

Physical and spectroscopic data of **84e**

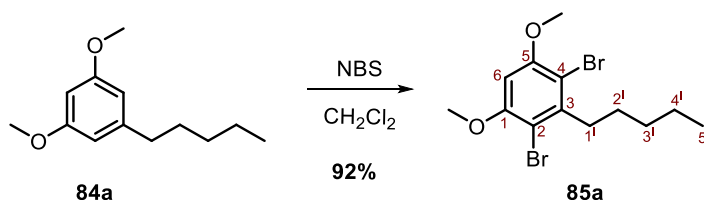
$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.35 (m, 2H, H-2, H-6), 6.30 (s, 1H, H-4), 3.78 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.54 (t, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, 2H, H-1'), 1.61 (m, 2H, H-2'), 1.33 (m, 6H, H-3', H-4', H-5'), 0.88 (m, 3H, H-6'). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 160.8 (C₃, C₅), 145.6 (C₁), 106.6 (C₃, C₆), 97.6 (C₄), 55.4 (2x-OCH₃), 36.5 (C₁'), 31.9 (C₄'), 31.4 (C₂'), 29.2 (C₃'), 22.8 (C₅'), 14.3 (C₆'). **IR** (ATR): ν 2930, 2856, 1598, 1464, 1210, 1153, cm^{-1} . **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₄H₂₂O₂+H]⁺: 223.1698; found [M+H]⁺: 223.1693.

Synthesis of 1-heptyl-3,5-dimethoxybenzene, **84f**

Compound **84f** was prepared as described for **84a** by using a solution of **86f** (2.52 g, 10.67 mmol) and Pd/C (10% in wt of Pd, 268 mg, 0.25 mmol) in MeOH (70 mL). The resulting yellow oil was identified as **84f** (2.47 g, 10.54 mmol, 99% yield).

Physical and spectroscopic data of **84f**^{32,33}

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.36 (s, 2H, H-2, H-6), 6.31 (s, 1H, H-4), 3.79 (s, 6H, 2x-OCH₃), 2.56 (t, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, 2H, H-1'), 1.61 (m, 2H, H-2'), 1.33 - 1.29 (m, 8H, H-3', H-4', H-5', H-6'), 0.90 (m, 3H, H-7'). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ 160.8 (C₃, C₅), 145.5 (C₁), 106.5 (C₃, C₅), 97.5 (C₄), 55.2 (2x-OCH₃), 36.5 (C₁'), 32.0 (C₂'/C₅'), 31.4 (C₂'/C₅'), 29.5 (C₃'/C₄'), 29.2 (C₃'/C₄'), 22.8 (C₆'), 14.1 (C₇'). **IR** (ATR): ν 2927, 1739, 1597, 1459, 1353, 1207, 1153 cm^{-1} .

Synthesis of 2,4-dibromo-1,5-dimethoxy-3-pentylbenzene, **85a**

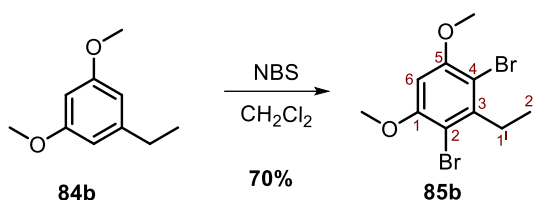
To a solution of **84a** (515 mg, 2.47 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL), NBS (525 mg, 2.95 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Then, another portion of NBS (499 mg, 2.81 mmol) and CH_2Cl_2 (5 mL) was added, and the mixture was stirred for 1 h. After this time, a third portion of NBS (276 mg, 1.55 mmol) and CH_2Cl_2 (3 mL) was added, and the mixture was stirred overnight. The reaction

was quenched by slow addition of water (5 mL) and the organic layer was washed with water (5 x 15 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated under vacuum. The resulting solid was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) to furnish the **85a** (806 mg, 2.20 mmol, 92% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 85a

Mp = 70 - 71 °C (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, CDCl_3): δ 6.40 (s, 1H, H-6), 3.90 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.03 (m, 2H, H-1'), 1.55 (m, 2H, H-2'), 1.39 (m, 4H, H-3', H-4'), 0.92 (m, 3H, H-5'). **$^{13}\text{C NMR}$** (90.5 MHz, CDCl_3): δ 155.9 (C₁, C₅), 143.5 (C₃), 105.4 (C₂, C₄), 94.9 (C₆), 56.7 (2x-OCH₃), 37.3 (C₁), 32.0 (C₂), 27.8 (C₃), 22.5 (C₄), 14.2 (C₅). **IR** (ATR): ν 2928, 1571, 1449, 1423, 1332, 1212, 1085 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{O}_2+\text{Na}]^+$: 386.9571; found $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 386.9563.

Synthesis of 2,4-dibromo-3-ethyl-1,5-dimethoxybenzene, 85b

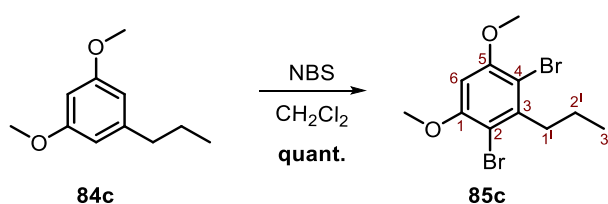


Compound **85b** was prepared as described for **85a** by using **84b** (1.66 g, 7.02 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL; 10 mL; and 5 mL) and NBS (1.29 g, 7.22 mmol; 1.50 g, 8.45 mmol; 0.79 g, 4.43 mmol). The resulting solid was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 8:1) to furnish **85b** (1.60 g, 4.98 mmol, 70% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 85b

Mp = 89 - 91 °C (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, CDCl_3): δ 6.40 (s, 1H, H-6), 3.89 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.08 (q, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz, 2H, H-1'), 1.03 (t, $J_{2',1'} = 7.5$ Hz, 3H, H-2'). **$^{13}\text{C NMR}$** (90.5 MHz, CDCl_3): δ 155.9 (C₁, C₅), 144.3 (C₃), 105.1 (C₂, C₄), 94.9 (C₆), 56.6 (2x-OCH₃), 30.9 (C₁), 12.5 (C₂). **IR** (ATR): ν 2975, 2943, 1422, 1334, 1092, 1054, 986 cm^{-1} .

Synthesis of 2,4-dibromo-1,5-dimethoxy-3-propylbenzene, 85c

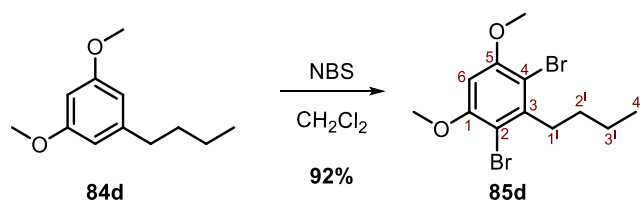


Compound **85c** was prepared as described for **85a** by using **84c** (1.91 g, 10.61 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL; 20 mL; and 10 mL) and NBS (1.91 g, 10.71 mmol; 1.90 g, 10.69 mmol; 950 mg, 5.34 mmol). The resulting solid was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 8:1) to furnish **85c** (3.58 g, 10.61 mmol, quant. yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 85c

Mp = 82 - 84 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.40 (s, 1H, H-6), 3.90 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.01 (m, 2H, H-1'), 1.58 (m, 2H, H-2'), 1.03 (t, $J_{3',2'} = 7.3$ Hz, 3H, H-3'). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 155.9 (C₁, C₅), 143.2 (C₃), 105.4 (C₂, C₄), 94.9 (C₆), 56.6 (2x-OCH₃), 39.2 (C_{1'}), 21.6 (C_{2'}), 14.3 (C_{3'}). **IR** (ATR): ν 2965, 1570, 1447, 1422, 1329, 1209, 1081 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₁H₁₄Br₂O₂+H]⁺: 336.9439; found [M+H]⁺: 336.943.

Synthesis of 2,4-dibromo-3-butyl-1,5-dimethoxybenzene, 85d

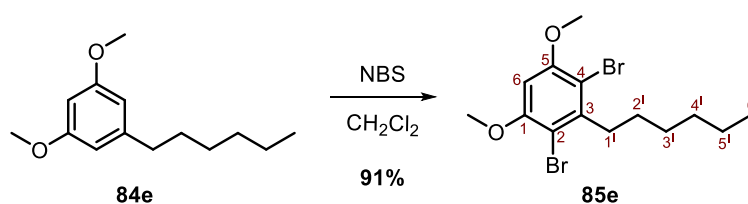


Compound **85d** was prepared as described for **85a** by using **84d** (2.03 g, 10.44 mmol) in CH₂Cl₂ (45 mL; 20 mL; and 10 mL) and NBS (1.94 g, 10.90 mmol; 1.98 g, 11.12 mmol; 963 mg, 5.41 mmol). The resulting solid was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 4:1) to furnish **85d** (3.39 g, 9.64 mmol, 92% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of 85d

Mp = 64 - 66 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.40 (s, 1H, H-6), 3.90 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.03 (m, 2H, H-1'), 1.50 (m, 2H, H-2', H-3'), 0.97 (t, $J_{4',3'} = 7.0$ Hz, 3H, H-4'). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 155.9 (C₁, C₅), 143.4 (C₃), 105.4 (C₂, C₄), 94.8 (C₆), 55.6 (2x-OCH₃), 37.1 (C_{1'}), 30.3 (C_{2'}), 23.0 (C_{3'}), 14.0 (C_{4'}). **IR** (ATR): ν 2960, 1571, 1449, 1423, 1335, 1211, 1082 cm⁻¹.

Synthesis of 2,4-dibromo-3-hexyl-1,5-dimethoxybenzene, 85e

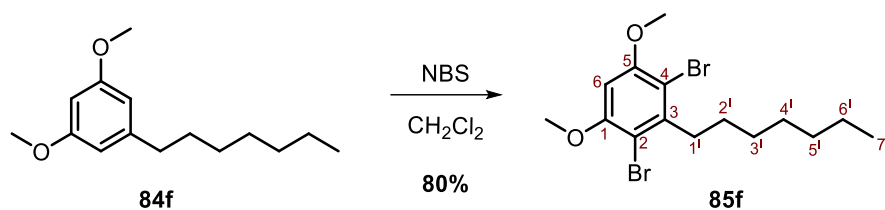


Compound **85e** was prepared as described for **85a** by using **84e** (1.94 g, 8.72 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL; 20 mL; and 10 mL) and NBS (1.86 g, 10.47 mmol; 1.86 mg, 10.47 mmol; 1.00 g, 5.62 mmol). The resulting solid was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) to furnish **85e** (3.01 g, 7.91 mmol, 91% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **85e**

Mp = 63 - 65 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.40 (s, 1H, H-6), 3.89 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.02 (m, 2H, H-1'), 1.54 (m, 2H, H-2'), 1.43 (m, 2H, H-3'), 1.34 (m, 4H, H-4', H-5'), 0.90 (m, 3H, H-6'). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 152.9 (C₁, C₅), 143.4 (C₃), 105.4 (C₂, C₄), 94.8 (C₆), 55.6 (2x-OCH₃), 37.4 (C₁₁), 31.6 (C₄₁), 29.5 (C₃₁), 28.1 (C₂₁), 22.8 (C₅₁), 14.3 (C₆₁). **IR** (ATR): ν 2928, 2857, 1569, 1450, 1422, 1343, 1209, 1088 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₄H₂₀Br₂O₂+H]⁺: 378.9908; found [M+H]⁺: 378.9905.

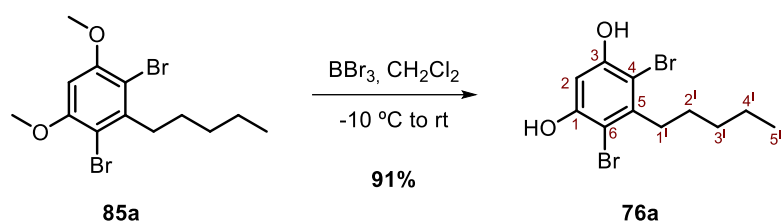
Synthesis of 2,4-dibromo-3-heptyl-1,5-dimethoxybenzene, **85f**



Compound **85f** was prepared as described for **85a** by using **84f** (757 mg, 3.23 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL; 15 mL) and NBS (1.15 g, 6.46 mmol; 1.30 g, 7.30 mmol). The resulting solid was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) to furnish **85f** (1.02 g, 2.59 mmol, 80% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **85f**

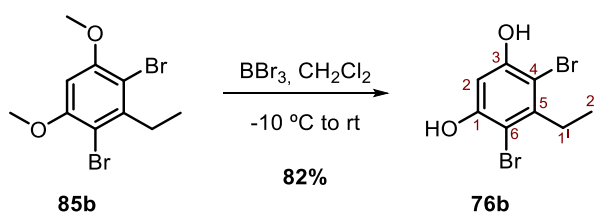
Mp = 73 - 74 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 6.40 (s, 1H, H-6), 3.90 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.03 (m, 2H, H-1'), 1.54 (m, 2H, H-2'), 1.47 - 1.29 (m, 8H, H-3', H-4', H-5', H-6'), 0.89 (m, 3H, H-7'). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 155.8 (C₁, C₅), 143.4 (C₃), 105.4 (C₂, C₄), 94.7 (C₆), 56.4 (2x-OCH₃), 37.3 (C₁₁), 31.8 (C₅₁), 29.7/29.0/28.0 (C₂₁/C₃₁/C₄₁), 22.7 (C₆₁), 14.0 (C₇₁). **IR** (ATR): ν 2931, 1572, 1424, 1332, 1214, 1089, 1053 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₅H₂₂Br₂O₂+H]⁺: 393.0065; found [M+H]⁺: 393.0058.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-pentylbenzene-1,3-diol, 76a

A solution of BBr_3 1 M in CH_2Cl_2 (2.50 mL, 2.50 mmol) was slowly added to a solution of compound **85a** (230 mg, 0.63 mmol) in CH_2Cl_2 (12 mL) at $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred at rt overnight. The reaction was quenched by the slow addition of water (16 mL) was slowly added to quench the reaction and the organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 8 mL) and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The resulting crude solid product was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) to furnish **76a** (193 mg, 0.57 mmol, 91% yield) as a grey solid.

Physical and spectroscopic data of 76a

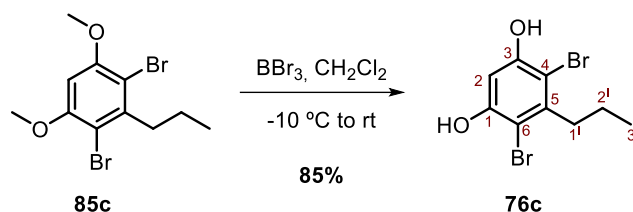
Mp = 65 - 66 $^{\circ}\text{C}$ (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (360 MHz, CDCl_3): δ 6.65 (s, 1H, H-2), 5.72 (s, 2H, HO-1, HO-3), 2.92 (m, 2H, H-1'), 1.55 (m, 2H, H-2'), 1.40 (m, 4H, H-3', H-4'), 0.93 (m, 3H, H-5'). **$^{13}\text{C NMR}$** (90.5 MHz, CDCl_3): δ 152.6 (C_1, C_3), 141.5 (C_5), 104.2 (C_4, C_6), 100.9 (C_2), 37.2 ($\text{C}_{1'}$), 31.9 ($\text{C}_{2'}$), 27.9 ($\text{C}_{3'}$), 22.9 ($\text{C}_{4'}$), 14.2 ($\text{C}_{5'}$). **IR** (ATR): ν 3427, 3217, 2927, 1577, 1426, 1230, 1164 cm^{-1} . **HRMS** (ESI⁻): calcd. for $[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{O}_2\text{-H}]^-$: 334.9282; found $[\text{M-H}]^-$: 334.9291.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-ethylbenzene-1,3-diol, 76b

Compound **76b** was prepared as described for **76a** by using a solution of **85b** (1.40 g, 4.32 mmol) in CH_2Cl_2 (70 mL) and BBr_3 (1 M in CH_2Cl_2 , 24.50 mL, 24.50 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) afforded **76b** (1.05 g, 3.53 mmol, 82% yield) as a grey solid.

Physical and spectroscopic data of 76b

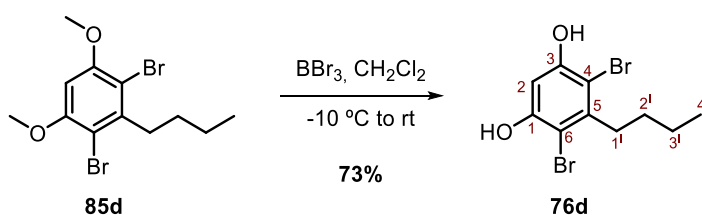
Mp = 105 - 107 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.66 (s, 1H, H-2), 5.68 (s, 2H, HO-1/HO-3), 2.99 (q, *J*_{1',2'} = 7.4 Hz, 2H, H-1'), 1.16 (t, *J*_{2',1'} = 7.4 Hz, 3H, H-2'). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 152.7 (C₁, C₃), 142.5 (C₅), 103.9 (C₄, C₆), 100.9 (C₂), 31.3 (C_{1'}), 12.5 (C_{2'}). **IR** (ATR): ν 3476, 3240, 1583, 1462, 1429, 1336, 1231, 1165 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₈H₈Br₂O₂-H]⁻: 292.8813; found [M-H]⁻: 292.8821.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-propylbenzene-1,3-diol, 76c

Compound **76c** was prepared as described for **76a** by using a solution of **85c** (2.04 g, 6.89 mmol) in CH₂Cl₂ (80 mL) and BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 24.00 mL, 24.00 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) afforded **76c** (1.82 g, 5.87 mmol, 85% yield) as a grey solid.

Physical and spectroscopic data of 76c³⁴

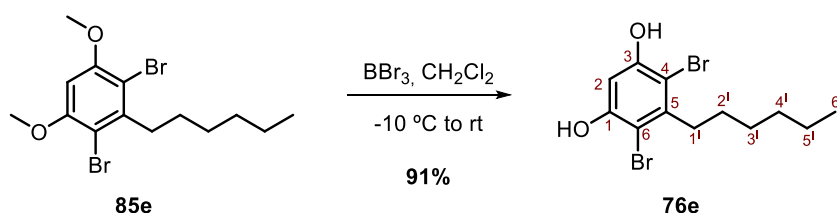
Mp = 89 - 91 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.66 (s, 1H, H-2), 5.65 (s, 2H, HO-1/HO-3), 2.91 (m, 2H, H-1'), 1.59 (t, *J*_{2',1'/3'} = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.04 (t, *J*_{3',2'} = 7.4 Hz, 3H, H-3'). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 152.7 (C₁, C₃), 141.3 (C₅), 104.3 (C₄, C₆), 100.9 (C₂), 39.6 (C_{1'}), 21.7 (C_{2'}), 14.2 (C_{3'}). **IR** (ATR): ν 3422, 3155, 2968, 1581, 1423, 1339, 1238 cm⁻¹.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-propylbenzene-1,3-diol, 76d

Compound **76d** was prepared as described for **76a** by using a solution of **85d** (2.00 g, 5.68 mmol) in CH₂Cl₂ (80 mL) and BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 22.7 mL, 22.7 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) afforded **76d** (1.34 g, 4.13 mmol, 73% yield) as a grey solid.

Physical and spectroscopic data of 76d

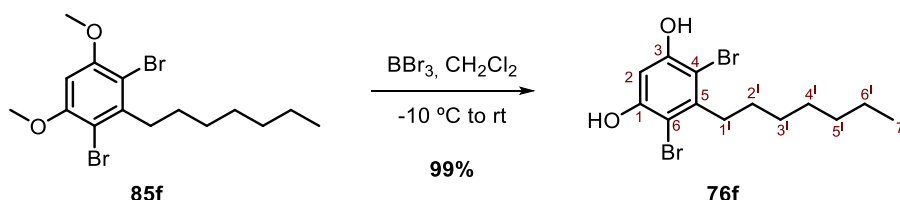
Mp = 96 - 97 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.65 (s, 1H, H-2), 5.65 (s, 2H, HO-1/HO-3), 2.94 (m, 2H, H-1'), 1.49 (m, 4H, H-2', H-3'), 0.98 (t, *J*_{4',3'} = 7.1 Hz, 3H, H-4'). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 152.7 (C₁, C₃), 141.5 (C₅), 104.2 (C₄, C₆), 100.9 (C₂), 37.5 (C_{1'}), 30.3 (C_{2'}), 22.9 (C_{3'}), 14.0 (C_{4'}). **IR** (ATR): ν 3432, 3224, 2962, 1582, 1424, 1260, 1145 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₀H₁₂Br₂O₂-H]⁻: 320.9126; found [M-H]⁻: 320.9138.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-hexylbenzene-1,3-diol, 76e

Compound **76e** was prepared as described for **76a** by using a solution of **85e** (1.00 g, 2.63 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) and BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 10.50 mL, 10.50 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) afforded **76e** (846 mg, 2.40 mmol, 91% yield) as a grey solid.

Physical and spectroscopic data of 76e

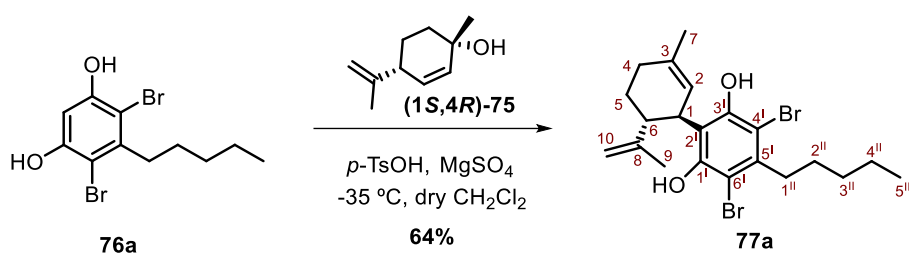
Mp = 55 - 53 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.65 (s, 1H, H-2), 5.67 (s, 2H, HO-1/HO-3), 2.92 (m, 2H, H-1'), 1.52 (m, 2H, H-2'), 1.43 (m, 2H, H-3'), 1.33 (m, 4H, H-4', H-5'), 0.90 (m, 3H, H-6'). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 152.6 (C₁, C₃), 141.6 (C₅), 104.2 (C₄, C₆), 100.8 (C₂), 37.8 (C_{1'}), 31.6 (C_{4'}), 29.4 (C_{3'}), 28.1 (C_{2'}), 22.9 (C_{5'}), 14.2 (C_{6'}). **IR** (ATR): ν 3427, 3173, 2926, 1578, 1421, 1341, 1231 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₂H₁₆Br₂O₂-H]⁻: 348.9439; found [M-H]⁻: 348.9449.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-heptylbenzene-1,3-diol, 76f

Compound **76f** was prepared as described for **76a** by using a solution of **85f** (1.01 g, 2.57 mmol) in CH₂Cl₂ (35 mL) and BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 12.70 mL, 12.70 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 2:1) afforded **76f** (929 mg, 2.54 mmol, 99% yield) as a grey solid.

Physical and spectroscopic data of 76f

Mp = 64 - 65 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 6.65 (s, 1H, H-2), 5.73 (s, 1H, HO-1/HO-3), 2.92 (m, 2H, H-1'), 1.54 (m, 2H, H-2'), 1.46 - 1.29 (m, 8H, H-3', H-4', H-5', H-6'), 0.90 (m, 3H, H-7'). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 152.7 (C₁, C₃), 141.6 (C₅), 104.2 (C₄, C₆), 100.8 (C₂), 37.8 (C₁₁), 31.9 (C₅₁), 29.7/29.1/28.2 (C₂₁/C₃₁/C₄₁), 22.8 (C₆₁), 14.2 (C₇₁). **IR** (ATR): ν 3425, 3173, 2925, 1580, 1424, 1232 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₃H₁₈Br₂O₂+H]⁺: 364.9752; found [M+H]⁺ 364.9753.

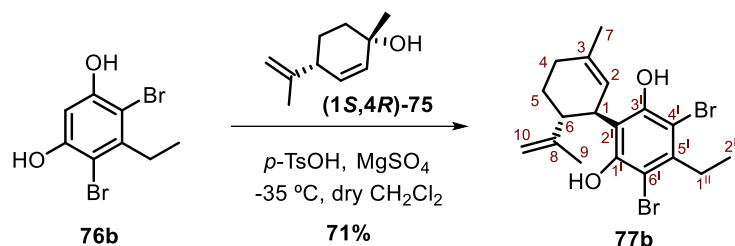
Synthesis of 4,6-dibromo-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol, 77a

A mixture of **76a** (152 mg, 0.45 mmol), (1*S*,4*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-2-en-1-ol, (**1*S*,4*R***)-**75** (82 mg, 0.54 mmol), and magnesium sulphate (136 mg, 1.16 mmol), in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was cooled to -35 °C in a N₂/Ar atmosphere. Then, *p*-TsOH·H₂O (43 mg, 0.23 mmol) was added in one portion and the resulting mixture was stirred during 5 h at -35 °C. After this time, the reaction was allowed to proceed at rt overnight. The reaction mixture was quenched with a solution of tribasic potassium phosphate (401 mg, 1.89 mmol) in water (7 mL), and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (5 mL) and the combining layers separated. The volatiles were removed under pressure, and the resulting oil was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 → 100:1) to afford **77a** (137 mg, 0.29 mmol, 64% yield) as a yellow oil.

Physical and spectroscopic data of 77a^{35,36}

[α]_D²⁰: -100.1 (c 6.5, EtOH). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.55 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.66 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.46 (s, 1H, H-2), 4.53 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.41 (m, 1H, H_{cis}-10), 4.07 (dm, 1H, H-1), 2.92 (m, 2H, H-1''), 2.55 (m, 1H, H-6), 2.22 (m, 1H, H_a-4), 2.07 (m, 1H, H_b-4), 1.81 - 1.74 (m, 2H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-7), 1.68 (s, 3H, H-9), 1.58 - 1.49 (m, 2H, H-2''), 1.43 - 1.38 (m, 4H, H-3'', H-4''), 0.92 (m, 3H, H-5''). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 151.6 (C₃₁), 150.5 (C₁₁), 147.3 (C₈), 139.9 (C₅₁), 139.5 (C₃), 123.3 (C₂), 115.7 (C₂₁), 111.6 (C₁₀), 104.4 (C₄₁, C₆₁), 45.9 (C₆), 38.1 (C₁), 37.6 (C₁₁₁), 31.9 (C₄₁₁), 30.4 (C₄), 28.2 (C₅), 27.9 (C₃₁₁), 23.9 (C₇), 22.5 (C₄₁₁), 19.0 (C₉), 14.2 (C₅₁₁). **IR** (ATR): ν 3497, 3395, 2924, 1599, 1429, 1356, 1248 cm⁻¹.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-ethyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, **77b**

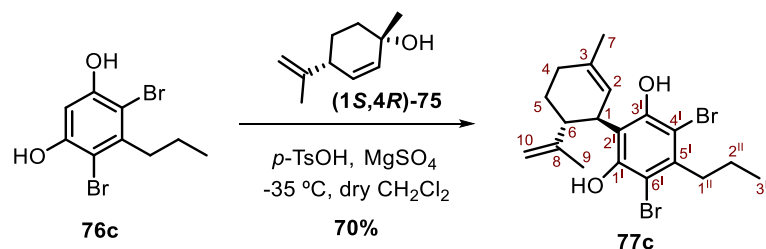


Compound **77b** was prepared as described for **77a** by using a mixture of **76b** (804 mg, 2.72 mmol), **(1*S*,4*R*)-75** (476 mg, 2.99 mmol), MgSO₄ (818 mg, 6.79 mmol) in dry CH₂Cl₂ (12 mL) and *p*-TsOH acid monohydrate (258 mg, 1.35 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 → 100:1) afforded **77b** (829 mg, 1.93 mmol, 71% yield) as a yellow oil.

Physical and spectroscopic data of **77b**

$[\alpha]_D^{20}$: -47.3 (*c* 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 6.57 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.56 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.46 (s, 1H, H-2), 4.53 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.41 (m, 1H, H_{cis}-10), 4.07 (dm, *J*_{1,6} = 10.2 Hz, 1H, H-1), 2.98 (m, *J*_{1'',2''} = 7.5 Hz, 2H, H-1''), 2.55 (m, 1H, H-6), 2.22 (m, 1H, H_a-4), 2.08 (m, 1H, H_b-4), 1.81 - 1.74 (m, 2H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-7), 1.68 (s, 3H, H-9), 1.15 (t, *J*_{2'',1''} = 7.5 Hz, 3H, H-2''). ¹³C NMR (90.5 MHz, CDCl₃): δ 151.7 (C_{3'}), 150.2 (C_{1'}), 147.3 (C₈), 140.5 (C_{5'}), 140.1 (C₃), 123.2 (C₂), 115.7 (C_{2'}), 111.6 (C₁₀), 104.3 (C_{4'}, C_{6'}), 45.9 (C₆), 38.0 (C₁), 31.2 (C₅), 30.4 (C₄), 28.2 (C_{1''}), 23.9 (C₇), 19.0 (C₉), 12.6 (C_{2''}). IR (ATR): ν 3491, 2925, 1737, 1596, 1410, 1244, 1204, 890 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₂₂Br₂O₂-H]⁺: 426.9908; found [M-H]⁺: 426.9918.

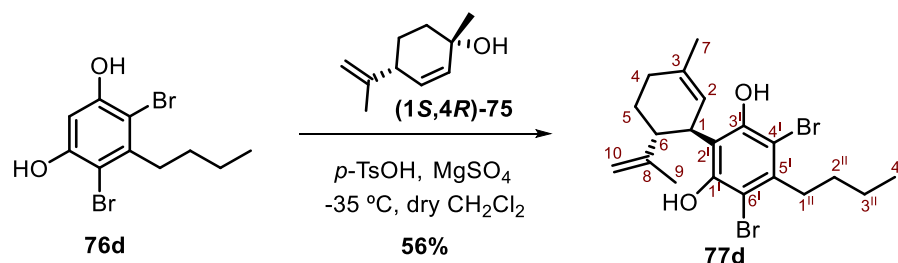
Synthesis of 4,6-dibromo-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-propylbenzene-1,3-diol, **77c**



Compound **77c** was prepared as described for **77a** by using a mixture of **76c** (383 g, 1.24 mmol), **(1*S*,4*R*)-75** (242 mg, 1.59 mmol), MgSO₄ (372 mg, 3.09 mmol) in dry CH₂Cl₂ (6 mL) and *p*-TsOH acid monohydrate (118 mg, 0.62 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 → 100:1) afforded **77c** (380 mg, 0.86 mmol, 70% yield) as a yellow oil.

Physical and spectroscopic data of **77c**³⁴

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: -61.8 (*c* 0.5, CHCl₃). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.56 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.66 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.46 (s, 1H, H-2), 4.53 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.40 (m, 1H, H_{cis}-10), 4.07 (dm, 1H, H-1), 2.90 (m, 2H, H-1''), 2.55 (m, 1H, H-6), 2.20 (m, 1H, H_a-4), 2.07 (m, 1H, H_b-4), 1.81 - 1.74 (m, 2H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-7), 1.68 (s, 3H, H-9), 1.58 (sext., $J_{2\text{II},1\text{I}/3\text{II}} = 7.3$ Hz, 2H, H-2''), 1.02 (t, $J_{3\text{II},2\text{II}} = 7.3$ Hz, 3H, H-3''). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 151.6 (C_{3I}), 149.9 (C_{1I}), 147.2 (C₈), 139.9 (C_{5I}), 139.3 (C₃), 123.2 (C₂), 115.7 (C_{2I}), 111.6 (C₁₀), 104.5 (C_{4I}, C_{6I}), 45.9 (C₆), 39.5 (C_{11I}), 38.0 (C₁), 30.4 (C₄), 28.2 (C₅), 23.9 (C₇), 21.7 (C_{2II}), 18.9 (C₉), 14.2 (C_{3II}). **IR** (ATR): ν 3493, 3387, 2925, 1598, 1428, 1325, 1245, 1099, 889 cm⁻¹.

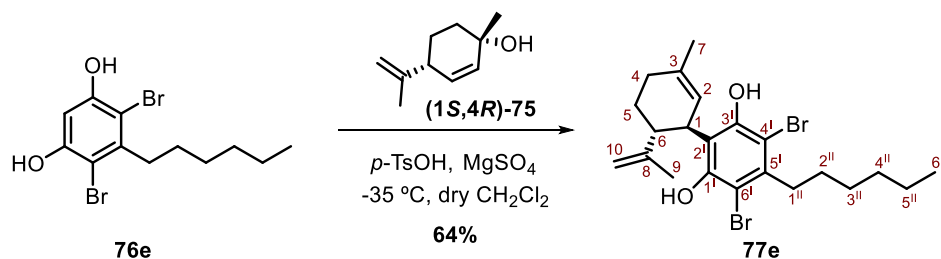
Synthesis of 4,6-dibromo-5-butyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, **77d**

Compound **77d** was prepared as described for **77a** by using a mixture of **76d** (663 mg, 2.05 mmol), **(1*S*,4*R*)-75** (365 mg, 2.39 mmol), MgSO₄ (615 mg, 5.11 mmol) in dry CH₂Cl₂ (11 mL) and *p*-TsOH acid monohydrate (199 mg, 1.05 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 → 100:1) afforded **77d** (522 mg, 1.14 mmol, 56% yield) as a yellow oil.

Physical and spectroscopic data of **77d**

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: -63.1 (*c* 1.9, CHCl₃). **¹H NMR** (360 MHz, CDCl₃): δ 6.57 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.56 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.46 (s, 1H, H-2), 4.53 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.40 (m, 1H, H_{cis}-10), 4.06 (dm, 1H, H-1), 2.92 (m, 2H, H-1''), 2.54 (m, 1H, H-6), 2.20 (m, 1H, H_a-4), 2.09 (m, 1H, H_b-4), 1.81 - 1.74 (m, 2H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-7), 1.68 (s, 3H, H-9), 1.57 - 1.42 (m, 4H, H-2'', H-3''), 0.97 (t, $J_{4\text{II},3\text{II}} = 7.0$ Hz, 3H, H-4''). **¹³C NMR** (90.5 MHz, CDCl₃): δ 151.8 (C_{3I}), 150.0 (C_{1I}), 147.3 (C₈), 140.1 (C_{5I}), 139.5 (C₃), 123.2 (C₂), 115.7 (C_{2I}), 111.6 (C₁₀), 104.4 (C_{4I}, C_{6I}), 45.9 (C₆), 38.1 (C₁), 37.4 (C_{11I}), 30.4 (C₄), 30.4 (C_{2II}), 28.2 (C₅), 23.9 (C₇), 22.9 (C_{3II}), 19.0 (C₉), 14.0 (C_{4II}). **IR** (ATR): ν 3494, 2924, 1600, 1429, 1328, 1247, 892 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₀H₂₆Br₂O₂-H]⁺: 455.0221; found [M-H]⁺: 455.0228.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-hexyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, **77e**

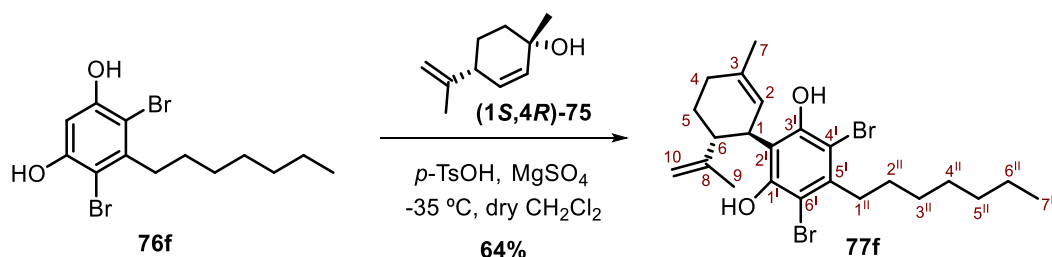


Compound **77e** was prepared as described for **77a** by using a mixture of **76e** (629 mg, 1.79 mmol), **(1*S*,4*R*)-75** (299 mg, 1.97 mmol), MgSO_4 (537 mg, 4.47 mmol) in dry CH_2Cl_2 (7 mL) and *p*-TsOH acid monohydrate (170 mg, 0.89 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 \rightarrow 100:1) afforded **77e** (555 mg, 1.14 mmol, 64% yield) as a yellow oil.

Physical and spectroscopic data of **77e**

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: -56.53 (*c* 1.6, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 6.57 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.67 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.47 (s, 1H, H-2), 4.53 (s, 1H, $H_{\text{trans-10}}$), 4.40 (m, 1H, $H_{\text{cis-10}}$), 4.06 (dm, 1H, H-1), 2.91 (m, 2H, H-1''), 2.56 (m, 1H, H-6), 2.23 (m, 1H, $H_{\text{a-4}}$), 2.08 (m, 1H, $H_{\text{b-4}}$), 1.81 - 1.77 (m, 2H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-7), 1.68 (s, 3H, H-9), 1.57 - 1.49 (m, 2H, H-2''), 1.43 - 1.34 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-5''), 0.91 (m, 3H, H-6''). $^{13}\text{C NMR}$ (90.5 MHz, CDCl_3): δ 151.7 ($\text{C}_{3\text{I}}$), 150.0 ($\text{C}_{1\text{I}}$), 147.3 (C_8), 140.1 ($\text{C}_{5\text{I}}$), 139.6 (C_3), 123.2 (C_2), 115.7 ($\text{C}_{2\text{I}}$), 111.6 (C_{10}), 104.6 ($\text{C}_{4\text{I}}$, $\text{C}_{6\text{I}}$), 46.0 (C_6), 38.1 (C_1), 37.7 ($\text{C}_{1\text{II}}$), 31.7 ($\text{C}_{4\text{II}}$), 30.4 (C_4), 29.4 ($\text{C}_{4\text{II}}$), 28.2 (C_5), 28.2 ($\text{C}_{2\text{II}}$), 23.9 (C_7), 22.8 ($\text{C}_{5\text{II}}$), 19.0 (C_9), 14.2 ($\text{C}_{6\text{II}}$). IR (ATR): ν 3499, 3394, 2924, 1593, 1428, 1246, 890 cm^{-1} . HRMS (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{O}_2\text{-H}]^-$: 483.0534; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 483.0537.

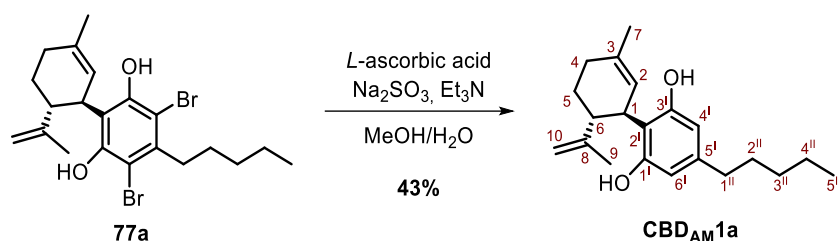
Synthesis of 4,6-dibromo-5-heptyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, **77f**



Compound **77f** was prepared as described for **77a** by using a mixture of **76f** (417 mg, 1.14 mmol), **(1*S*,4*R*)-75** (233 mg, 1.26 mmol), MgSO_4 (368 mg, 2.85 mmol) in dry CH_2Cl_2 (6 mL) and *p*-TsOH acid monohydrate (111 mg, 0.57 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 \rightarrow 100:1) afforded **77f** (366 mg, 0.73 mmol, 64% yield) as a yellow oil.

Physical and spectroscopic data of **77f**

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 6.54 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.68 (bs, 1H, HO-1'/HO-3'), 5.46 (s, 1H, H-2), 4.54 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.40 (m, 1H, H_{cis}-10), 4.06 (dm, 1H, H-1), 2.92 (m, 2H, H-1''), 2.55 (m, 1H, H-6), 2.20 (m, 1H, H_a-4), 2.07 (m, 1H, H_b-4), 1.82 - 1.75 (m, 2H, H-5), 1.77 (s, 3H, H-7), 1.68 (s, 3H, H-9), 1.55 - 1.52 (m, 2H, H-2''), 1.44 - 1.26 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 0.89 (m, 3H, H-7'').

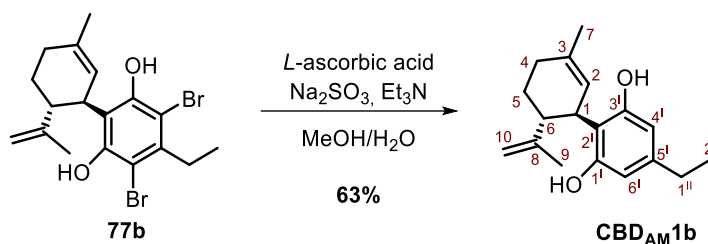
Synthesis of 2-[(1R,6R)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol,**CBD_{AM}1a**

To a solution of **77a** (130 mg, 0.28 mmol) in MeOH (1.5 mL) was added a solution of sodium sulphite (92 mg, 0.73 mmol), *L*-ascorbic acid (7 mg, 40 μmol) in water (1.5 mL). To the pink suspension formed, Et₃N (0.14 mL, 1.20 mmol) was added in one portion. The resulting mixture was heated to 75 °C for 24 h. After cooling to rt, the reaction mixture was partially concentrated under reduced pressure to remove most of MeOH and volatiles. The pH of the remaining aqueous phase was adjusted to 2 with hydrochloric acid 5% w/w. Hexane (10 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 minutes. The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with hexane (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (25 mL), dried with Na₂SO₄, and then evaporated under reduced pressure. The obtained oil was purified by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:1 → 10:1) to deliver **CBD_{AM}1a** (38 mg, 12 μmol, 43% yield) as a light-yellow oil.

Physical and spectroscopic data of **CBD_{AM}1a**³⁷

[α]²⁰_D = -122.0 (c 1.1, EtOH), -51.3 (c 1.7, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 6.07 (s, 2H, H-4', H-6'), 5.28 (s, 1H, H-2), 4.46 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.42 (m, 1H, H_{cis}-10), 3.93 (dm, *J*_{1,6} = 8.7 Hz, 1H, H-1), 2.89 (m, 1H, H-6), 2.37 (t, *J*_{1'',2''} = 7.5 Hz, 2H, H-1''), 2.18 (m, 1H, H_a-4), 1.99 (m, 1H, H_b-4), 1.74 (m, 2H, H-5), 1.67 (s, 3H, H-7), 1.63 (s, 3H, H-9), 1.53 (quint., *J*_{2'',1''/3''} = 7.5 Hz, 2H, H-2''), 1.29 (m, 4H, H-3'', H-4''), 0.89 (t, *J*_{5'',4''} = 6.9 Hz, 3H, H-5''). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ 157.5 (C_{3'}), 150.3 (C₈, C_{1'}), 142.7 (C_{5'}), 134.1 (C₃), 127.3 (C₂), 115.9 (C_{2'}), 110.5 (C₁₀), 108.3 (C_{4'}, C_{6'}), 46.3 (C₆), 37.5 (C₁), 36.6 (C_{1''}), 32.7 (C_{3''}), 32.0 (C_{2''}), 31.7 (C₅), 30.7 (C₄), 23.7 (C₇), 23.6 (C_{4''}), 19.5 (C₉), 14.4 (C_{5''}). IR (ATR): ν 3424, 2926, 1632, 1586, 1447, 1218, 891 cm⁻¹.

Synthesis of 5-ethyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, **CBD_{AM}1b³⁴**

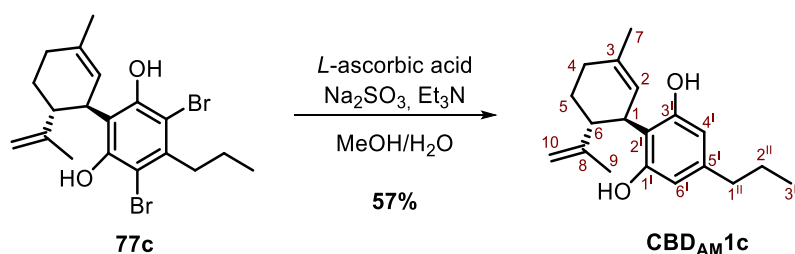


Compound **CBD_{AM}1b** was prepared as described for **CBD_{AM}1a** by using a solution of **77b** (709 mg, 1.65 mmol) in MeOH (7 mL) and a solution of Na₂SO₃ (551 mg, 4.37 mmol), *L*-ascorbic acid (43.6 mg, 0.25 mmol) in water (7 mL) and Et₃N (0.83 mL, 5.94 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:1 → 10:1) afforded **CBD_{AM}1b** (282 mg, 1.04 mmol, 63% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **CBD_{AM}1b**

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: -86.9 (*c* 1.9, CHCl₃). **Mp** = 87 - 89 °C (from CHCl₃). **¹H NMR** (400 MHz, CD₃OD): δ 6.10 (s, 2H, H-4', H-6'), 5.28 (s, 1H, H-2), 4.48 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.44 (m, 1H, H_{cis}-10), 3.93 (dm, *J*_{1,6} = 8.7 Hz, 1H, H-1), 2.92 (m, 1H, H-6), 2.42 (q, *J*_{1'',2''} = 7.6 Hz, 2H, H-1''), 2.18 (m, 1H, H_a-4), 1.99 (m, 1H, H_b-4), 1.74 (m, 2H, H-5), 1.68 (s, 3H, H-7), 1.64 (s, 3H, H-9), 1.15 (t, *J*_{2'',1''} = 7.6 Hz, 3H, H-2''). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CD₃OD): δ 157.5 (C₃₁), 150.3 (C₈, C₁₁), 144.1 (C₅₁), 134.1 (C₃), 127.3 (C₂), 115.9 (C₂₁), 110.5 (C₁₀), 107.7 (C₄₁, C₆₁), 46.3 (C₆), 37.4 (C₁), 31.7 (C₅), 30.8 (C₄), 29.5 (C₁₁₁), 23.7 (C₇), 19.5 (C₉), 15.8 (C₂₁₁). **IR** (ATR): ν 3405, 2925, 1628, 1582, 1439, 1215, 888 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₈H₂₄O₂+H]⁺: 273.1855; found [M+H]⁺: 273.1849.

Synthesis of 2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-propylbenzene-1,3-diol, **CBD_{AM}1c**



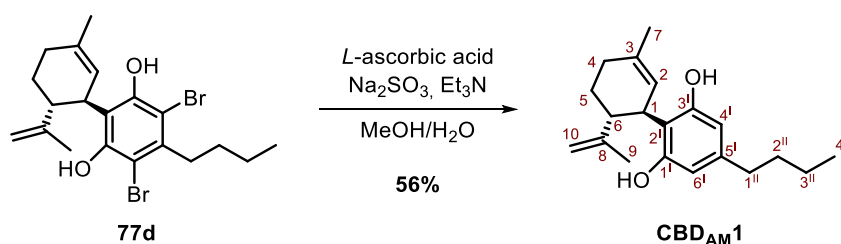
Compound **CBD_{AM}1c** was prepared as described for **CBD_{AM}1a** by using a solution of **77c** (177 mg, 0.40 mmol) in MeOH (4 mL) and a solution of Na₂SO₃ (139 mg, 1.20 mmol), *L*-ascorbic acid (18 mg, 0.1 mmol)

in water (4 mL) and Et₃N (0.22 mL, 1.60 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:1 → 10:1) afforded **CBD_{AM}1c** (67 mg, 0.23 mmol, 57% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data **CBD_{AM}1c**³⁴

[α]_D²⁰: -138.3 (c 2.3, EtOH), -72.23. (c 0.5, CHCl₃). **Mp** = 116 - 118 °C (from CHCl₃). **¹H NMR** (400 MHz, CD₃OD): δ 6.09 (s, 2H, H-4', H-6'), 5.30 (s, 1H, H-2), 4.47 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.44 (m, 1H, H_{cis}-10), 3.94 (dm, $J_{1,6}$ = 8.6 Hz, 1H, H-1), 2.90 (m, 1H, H-6), 2.36 (t, $J_{11,211}$ = 7.5 Hz, 2H, H-1''), 2.18 (m, 1H, H_a-4), 2.00 (m, 1H, H_b-4), 1.74 (m, 2H, H-5), 1.68 (s, 3H, H-7), 1.64 (s, 3H, H-9), 1.57 (sext., $J_{211,11/311}$ = 7.5 Hz, 2H, H-2''), 0.90 (t, $J_{311,211}$ = 7.5 Hz, 3H, H-3''). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CD₃OD): δ 157.4 (C₃₁), 150.2 (C₈, C₁₁), 142.4 (C₅₁), 134.3 (C₃), 127.2 (C₂), 115.9 (C₂₁), 110.5 (C₁₀), 108.3 (C₄₁, C₆₁), 46.3 (C₆), 38.8 (C₁₁₁), 37.4 (C₁), 31.6 (C₅), 30.7 (C₄), 25.4 (C₂₁₁), 23.7 (C₇), 19.5 (C₉), 14.2 (C₃₁₁). **IR** (ATR): ν 3412, 2924, 1629, 1534, 1443, 1217, 889 cm⁻¹. **HRMS** (ESI+): calcd. for [C₁₉H₂₆O₂+H]⁺: 287.2011; found [M+H]⁺: 287.2009.

Synthesis of 5-butyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, **CBD_{AM}1d**



Compound **CBD_{AM}1d** was prepared as described for **CBD_{AM}1a** by using a solution of **77d** (292 mg, 0.64 mmol) in MeOH (4 mL) and a solution of Na₂SO₃ (229 mg, 1.97 mmol), L-ascorbic acid (31 mg, 0.18 mmol) in water (4 mL) and Et₃N (0.35 mL, 2.51 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:1 → 10:1) afforded **CBD_{AM}1d** (108 mg, 0.36 mmol, 56% yield) as a white solid.

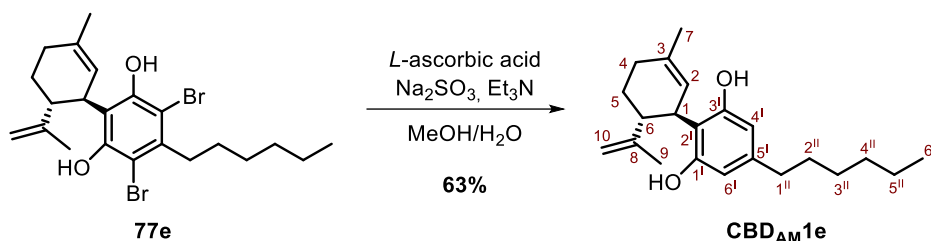
Physical and spectroscopic data of **CBD_{AM}1d**³⁸

[α]_D²⁰: -56.1 (c 1.0, CHCl₃). **¹H NMR** (400 MHz, CD₃OD): δ 6.08 (s, 2H, H-4', H-6'), 5.28 (s, 1H, H-2), 4.47 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.43 (m, 1H, H_{cis}-10), 3.93 (dm, $J_{1,6}$ = 8.6 Hz, 1H, H-1), 2.91 (m, 1H, H-6), 2.39 (t, $J_{11,211}$ = 7.6 Hz, 2H, H-1''), 2.18 (m, 1H, H_a-4), 1.99 (m, 1H, H_b-4), 1.74 (m, 2H, H-5), 1.68 (s, 3H, H-7), 1.64 (s, 3H, H-9), 1.53 (quint., $J_{211,11/311}$ = 7.6 Hz, 2H, H-2''), 1.34 (sext., $J_{311,211/411}$ = 7.4 Hz, 2H, H-3''), 0.92 (t, $J_{411,311}$ = 7.4 Hz, 3H, H-4''). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CD₃OD): δ 157.5 (C₃₁), 150.3 (C₈, C₁₁), 142.6 (C₅₁), 134.0 (C₃), 127.4 (C₂), 115.9 (C₂₁), 110.5 (C₁₀), 108.3 (C₄₁, C₆₁), 46.3 (C₆), 37.4 (C₁), 36.3 (C₁₁₁), 34.6 (C₂₁₁), 31.7 (C₅), 30.8 (C₄),

23.7 (C₇), 23.4 (C_{3II}), 19.5 (C₉), 14.3 (C_{4II}). IR (ATR): ν 3429, 2925, 1629, 1583, 1441, 1213, 1025 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₂₀H₂₈O₂+H]⁺: 301.2168; found [M+H]⁺: 301.2163.

Synthesis of 5-hexyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol,

CBD_{AM1e}



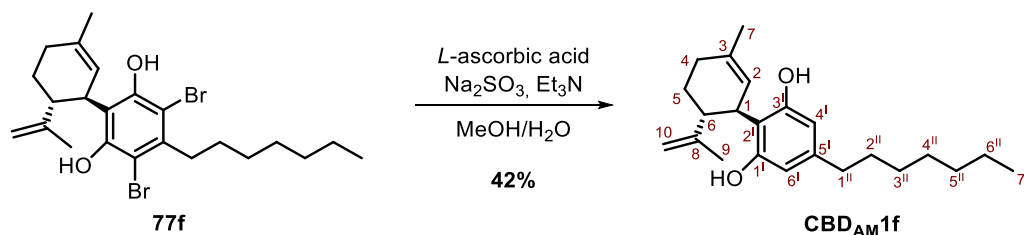
Compound **CBD_{AM1e}** was prepared as described for **CBD_{AM1a}** by using a solution of **77e** (26 mg, 53 μ mol) in MeOH (1 mL) and a solution of Na₂SO₃ (19 mg, 167 μ mol), L-ascorbic acid (4 mg, 14 μ mol) in water (1 mL) and Et₃N (30 μ L, 0.21 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:1 \rightarrow 10:1) afforded **CBD_{AM1e}** (11 mg, 33 μ mol, 63% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **CBD_{AM1e}**

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: -50.2 (c 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 6.09 (s, 2H, H-4^I, H-6^I), 5.30 (s, 1H, H-2), 4.47 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.43 (m, 1H, H_{cis}-10), 3.93 (dm, $J_{1,6}$ = 8.7 Hz, 1H, H-1), 2.89 (m, 1H, H-6), 2.38 (t, $J_{1\text{II},2\text{II}}$ = 7.6 Hz, 2H, H-1^{II}), 2.18 (m, 1H, H_a-4), 1.99 (m, 1H, H_b-4), 1.74 (m, 2H, H-5), 1.68 (s, 3H, H-7), 1.64 (s, 3H, H-9), 1.54 (m, 2H, H-2^{II}), 1.30 (m, 6H, H-3^{II}, H-4^{II}, H-5^{II}), 0.89 (m, 3H, H-6^{II}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ 157.4 (C_{3I}), 150.2 (C₈, C_{1I}), 142.6 (C_{5I}), 134.3 (C₃), 127.3 (C₂), 115.8 (C_{2I}), 110.6 (C₁₀), 108.3 (C_{4I}, C_{6I}), 46.3 (C₆), 37.4 (C₁), 36.6 (C_{1\text{II}}), 32.9 (C_{4\text{II}}), 32.3 (C_{3\text{II}}), 31.7 (C₅), 30.6 (C₄), 30.0 (C_{2\text{II}}), 23.8 (C_{5\text{II}}), 23.7 (C₇), 19.5 (C₉), 14.5 (C_{6\text{II}}). IR (ATR): ν 3438, 2923, 1629, 1583, 1444, 1217, 1027, 888 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₂₂H₃₂O₂+H]⁺: 329.2481; found [M+H]⁺: 329.2477.

Synthesis of 5-heptyl-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol,

CBD_{AM1f}



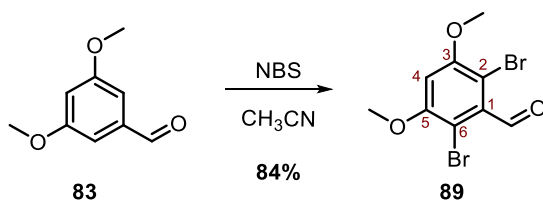
Compound **CBD_{AM}1f** was prepared as described for **CBD_{AM}1a** by using a solution of **77f** (366 mg, 0.73 mmol) in MeOH (5 mL) and a solution of Na₂SO₃ (259 mg, 2.20 mmol), L-ascorbic acid (39 mg, 0.18 mmol) in water (5 mL) and Et₃N (0.41 mL, 2.93 mmol). Purification by flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:1 → 10:1) afforded **CBD_{AM}1f** (105 mg, 0.31 mmol, 42% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **CBD_{AM}1f**

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: -53.2 (c 1.5, CHCl₃). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 6.28 (br s, 1H, H-4^l), 6.17 (br s, 1H, H-6^l), 5.99 (br s, 1H, HO-3^l), 5.57 (s, 1H, H-2), 4.77 (br s, 1H, HO-6^l), 4.66 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.56 (m, 1H, H_{cis}-10), 3.86 (m, 1H, H-1), 2.46 - 2.37 (m, 3H, H-6, H-1^{ll}), 2.23 (m, 1H, H_a-4), 2.10 (m, 1H, H_b-4), 1.83 - 1.79 (m, 2H, H-5), 1.79 (s, 3H, H-7), 1.66 (s, 3H, H-9), 1.55 (m, 2H, H-2^{ll}), 1.31 - 1.27 (m, 8H, H-3^{ll}, H-4^{ll}, H-5^{ll}, H-6^{ll}), 0.88 (m, 3H, H-7^{ll}). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 156.2 (C_{3l}), 154.1 (C_{1l}), 149.4 (C₈), 143.2 (C_{5l}), 140.1 (C₃), 124.3 (C₂), 113.9 (C_{2l}), 111.0 (C₁₀), 109.9 (C_{6l}), 108.1 (C_{4l}), 46.3 (C₆), 37.3 (C₁), 35.7 (C_{1ll}), 31.9 (C_{5ll}), 31.1 (C_{2ll}), 30.5 (C₄), 29.4/29.3 (C_{3ll}, C_{4ll}), 28.5 (C₅), 23.8 (C₇), 22.8 (C_{6ll}), 20.6 (C₉), 14.2 (C_{7ll}). **IR** (ATR): ν 3396, 2926, 1737, 1632, 1585, 1440, 1024 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₂₃H₃₄O₂+H]⁺: 343.2637; found [M+H]⁺: 343.2634.

VI.5.1.2. Synthesis of compound **CBD_{AM}2**

Synthesis of 2,6-dibromo-3,5-dimethoxybenzaldehyde, **89**

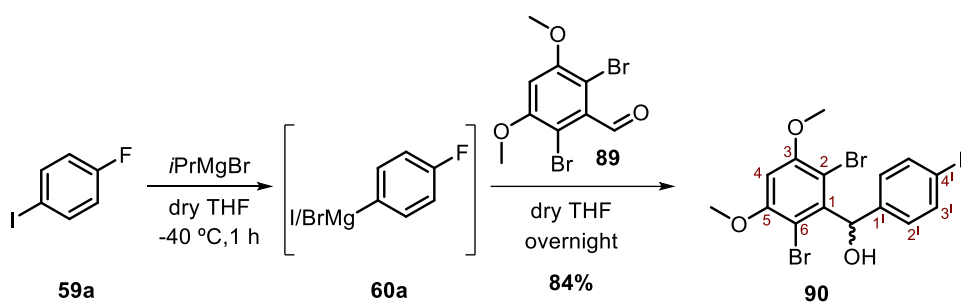


To a solution of 3,5-dimethoxybenzaldehyde (1.08 g, 6.47 mmol) in CH₃CN (30 mL), NBS (1.09 g, 6.10 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then, another portion of NBS (1.05 g, 5.92 mmol) and CH₃CN (10 mL) was added and the mixture was stirred for 1 h. After this time, a third portion of NBS (1.02 g, 5.7 mmol) and CH₃CN (10 mL) was added, and the mixture was stirred overnight. Finally, the crude was filtered and the precipitated was cleaned with cold CH₃CN and dried to furnish **89** (1.75 g, 5.41 mmol, 84% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **89**³⁹

Mp = 220 - 225 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.08 (s, 1H, -COH), 7.04 (s, 1H, H-4), 3.96 (s, 6H, 2x-CH₃). **IR** (ATR): ν 2946, 1698, 1568, 1429, 1325, 1212, 1058 cm⁻¹.

Synthesis of (2,6-dibromo-3,5-dimethoxyphenyl)(4-fluorophenyl)methanol, **90**

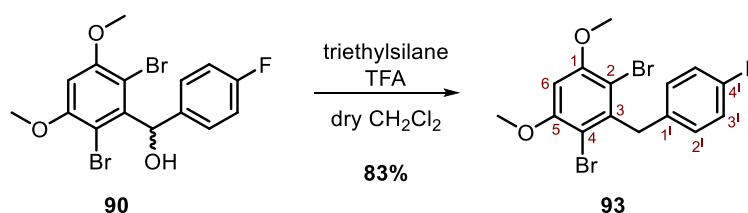


To a solution of 4-iodobenzene, **59a**, (2.71 g, 12.34 mmol) in dry THF (50 mL) at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, *i*PrMgBr (0.75 M in THF, 18.00 mL, 13.5 mmol) was added dropwise in 5 min under a N_2 atmosphere and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h. Then, the reaction crude was added dropwise to a solution of aldehyde **89** (3.05 g, 9.42 mmol) in dry THF (210 mL). The final mixture was warmed to room temperature and stirred overnight. The reaction was quenched by slow addition of brine (100 mL) and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 150 mL). All organic layers were collected, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum obtaining a yellow oil that was purified by flash column chromatography (hexanes/ CH_2Cl_2 , 1:2) to furnish **90** (3.36 g, 8.00 mmol, 85% yield) as a white solid.

Physical and spectroscopic data of **90**

Mp = $123 - 126\text{ }^{\circ}\text{C}$ (from CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3): δ 7.25 (m, 2H, H-2^l), 6.99 (t, $J_{3^l,2^l} = J_{3^l,F} = 8.5$ Hz, 2H, H-3^l), 6.74 (d, $J_{\text{CH},\text{OH}} = 11.0$ Hz, 1H, -CH(OH)-), 6.55 (s, 1H, H-4), 3.93 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.87 (d, $J_{\text{OH},\text{CH}} = 8.5$ Hz, 1H, -OH). **$^{19}\text{F NMR}$** (250 MHz, CDCl_3): δ -116.4 (s, F-4^{ll}). **$^{13}\text{C NMR}$** (100.6 MHz, CDCl_3): δ 161.9 (d, $J_{4^l,F} = 245.0$ Hz, C_{4^l}), 156.4 (C₃, C₅), 141.4 (C₁), 137.4 (C_{1^l}), 127.4 (d, $J_{2^l,F} = 8.0$ Hz, C_{2^l}), 115.1 (d, $J_{3^l,F} = 20.5$ Hz, C_{3^l}), 105.3 (C₂, C₆), 96.4 (C₄), 76.0 (-CH(OH)-), 56.8 (2x-OCH₃). **IR** (ATR): ν 3500, 2941, 1570, 1505, 1424, 1328, 1209, 1032 cm^{-1} . **HRMS** (ESI⁺): calcd. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{FO}_3 + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$: 400.9188; found $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$: 400.9184. **COSY**, **DEPT135** and **$^1\text{H}/^{13}\text{C}$** correlation were recorded.

Synthesis of 2,4-dibromo-3-(4-fluorobenzyl)-1,5-dimethoxybenzene, **93**



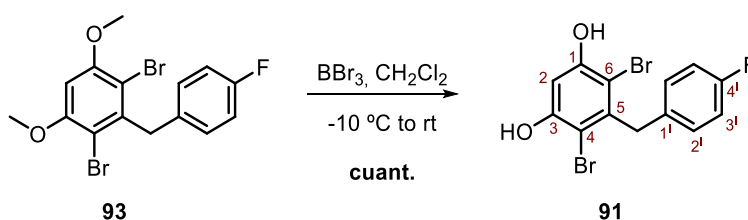
VI.5 Experimental section

To a solution of alcohol **90** (205 mg, 0.48 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4 mL) at -5 °C, triethylsilane (80 µL, 0.50 mmol) was added under N₂ atmosphere. Then, TFA (0.55 mL, 7.18 mmol) was added dropwise, and the solution was stirred at 0 °C for 1 h. Afterwards, the reaction mixture was warmed at rt and was stirred until the starting material was consumed (TLC, CH₂Cl₂/hexanes, 2:1). The solvent was removed under vacuum and the resulting crude was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/hexanes, 1:1) to furnish **93** (159 mg, 0.39 mmol, 83% yield) as a pale brown solid.

Physical and spectroscopic data of **93**

Mp = 121 - 125 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ 7.12 (dd, $J_{2,3} = 8.8$ Hz, $J_{2,F} = 5.7$ Hz, 2H, H-2'), 6.92 (t, $J_{3,2} = J_{3,F} = 8.8$ Hz, 2H, H-3'), 6.49 (s, 1H, H-6), 4.46 (d, 2H, -CH₂-), 3.93 (s, 6H, 2x-OCH₃). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -117.75 (s, F-4'). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 161.3 (d, $J_{4,F} = 245.0$ Hz, C₄), 156.2 (C₁, C₅), 141.0 (C₃), 133.5 (C₁), 129.8 (d, $J_{2,F} = 9.0$ Hz, C₂), 115.1 (d, $J_{3,F} = 20.5$ Hz, C₃), 106.4 (C₂, C₄), 95.4 (C₆), 56.5 (2x-OCH₃), 41.6 (-CH₂-). **IR** (ATR): 2941, 1572, 1507, 1428, 1330, 1211, 1078 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁺): calcd. for [C₁₅H₁₃Br₂FO₂+H]⁺: 402.9345; found [M+H]⁺: 402.9159.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-(4-fluorobenzyl)benzene-1,3-diol, **91**

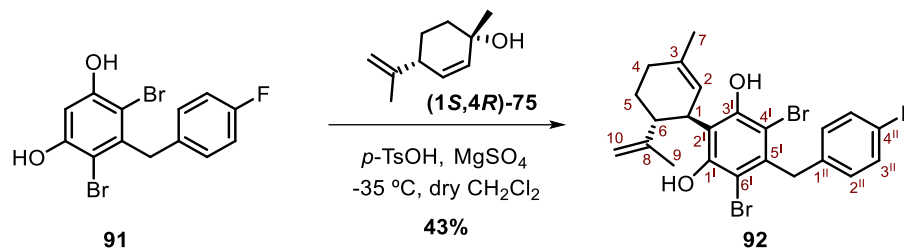


A solution of BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 2.30 mL, 2.30 mmol) was slowly added to a solution of compound **93** (115 mg, 0.29 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) at -10 °C. The resulting mixture was stirred at rt overnight. The reaction was quenched by slow addition of water (3 mL), and the organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum to furnish **91** (106 g, 0.28 mmol, quant.) as a pale yellow solid.

Physical and spectroscopic data of **91**

Mp = 113 - 115 °C (from CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 7.09 (m, 2H, H-2'), 6.96 (t, $J_{3,2} = J_{3,F} = 8.6$ Hz, 2H, H-3'), 6.75 (s, 1H, H-2), 5.70 (s, 2H, 2x-OH), 4.35 (d, 2H, -CH₂-). **¹⁹F NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ -116.99 (s, F-4'). **¹³C NMR** (100.6 MHz, CDCl₃): δ 162.7 (C₄), 152.9 (C₁, C₃), 139.0 (C₅), 132.7 (C₁), 129.6 (d, $J_{2,F} = 8.0$ Hz, C₂), 115.4 (d, $J_{3,F} = 20.5$ Hz, C₃), 105.2 (C₄, C₆), 101.8 (C₆), 42.0 (-CH₂-). **IR** (ATR): ν 3567, 3486, 3322, 1580, 1507, 1426, 1341, 1222 cm⁻¹. **HRMS** (ESI⁻): calcd. for [C₁₃H₉Br₂FO₂-H]⁻: 372.8875; found [M-H]⁻: 372.8886.

Synthesis of 4,6-dibromo-5-(4-fluorobenzyl)-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, **92**

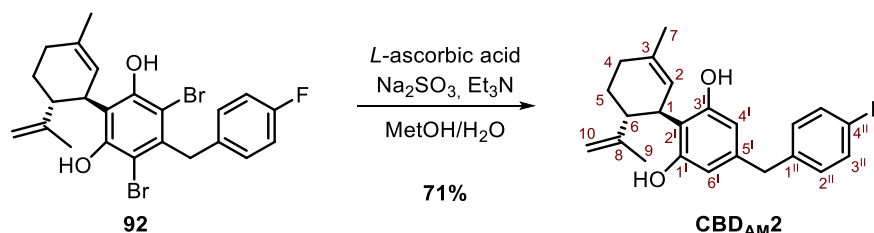


A mixture of **91** (191 mg, 0.51 mmol), **(1*S*,4*R*)-75** (97 mg, 0.64 mmol), and magnesium sulphate (159 mg, 1.32 mmol), in dry CH₂Cl₂ (3 mL) was cooled to -35 °C in a N₂/Ar atmosphere. Then, *p*-TsOH·H₂O (48 mg, 0.25 mmol) was added in one portion and the resulting mixture was stirred for 5 h at -35 °C. After this time, the reaction was stirred at rt overnight. The reaction mixture was quenched with a solution of tribasic potassium phosphate (0.3 M, 3 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (5 mL), and the combining layers were separated. The volatiles were removed under pressure, and the resulting oil was purified by a flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 → 10:1) to afford **92** (112 mg, 0.22 mmol, 43% yield) as an orange oil.

Physical and spectroscopic data of **92**

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 7.08 (m, 2H, H-2^{II}), 6.94 (m, 2H, H-3^{II}), 6.66 (br s, 1H, HO-3^I), 5.57 (br s, 1H, HO-6^I), 5.50 (s, 1H, H-2), 4.56 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.41 (m, 1H, H_{cis}-10), 4.35 (s, 2H, -CH₂-), 4.11 (m, 1H, H-1), 2.56 (td, *J*_{6,5} = 11.1 Hz, *J*_{6,1} = 4.0 Hz, 1H, H-6), 2.24 (m, 1H, H_a-4), 2.10 (m, 1H, H_b-4), 1.83 - 1.78 (m, 5H, H-5, H-7), 1.70 (s, 3H, H-9). ¹⁹F NMR (250 MHz, CDCl₃): δ -117.48 (s, F-4^I). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 161.5 (d, *J*_{4^{II},F} = 245.2 Hz, C_{4^{II}}), 152.3 (C_{3^I}), 150.6 (C_{1^I}), 147.2 (C₈), 140.6 (C_{5^I}), 137.2 (C₃), 133.5 (d, *J*_{1^{II},F} = 2.9 Hz, C_{1^{II}}), 129.7 (d, *J*_{2^{II},F} = 7.9 Hz, C_{2^{II}}), 123.0 (C₂), 116.8 (C_{1^I}), 115.3 (d, *J*_{3^{II},F} = 21.2 Hz, C_{3^{II}}), 111.7 (C₁₀), 105.6 (C_{6^I}/C_{4^I}), 46.1 (C₆), 42.0 (-CH₂-), 38.2 (C₁), 30.5 (C₄), 28.1 (C₅), 23.9 (C₇), 18.9 (C₉).

Synthesis of 5-(4-fluorobenzyl)-2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol, CBD_{AM2}

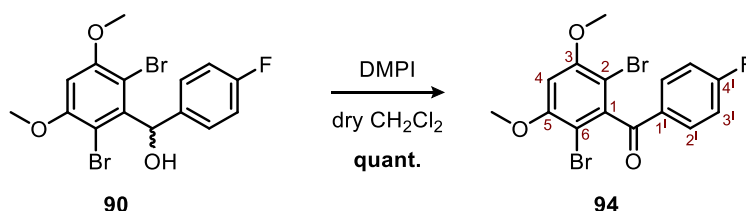


To a solution of **92** (61 mg, 0.12 mmol) in MeOH (1 mL) was added a solution of sodium sulphite (43 mg, 0.37 mmol), *L*-ascorbic acid (5.1 mg, 29 μ mol) in water (1 mL). To the pink suspension formed, Et₃N (67 μ L, 0.48 mmol) was added in one portion. The resulting mixture was heated to 75 °C for 24 h. After cooling to rt, the reaction mixture was partially concentrated under reduced pressure to remove most of MeOH and volatiles. The pH of the remaining aqueous phase was adjusted to 2 with hydrochloric acid 5 % w/w. CH₂Cl₂ (5 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 minutes. The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried with Na₂SO₄, and then evaporated under reduced pressure. The obtained oil was purified by a flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:1 → 10:1) to deliver **CBD_{AM2}** (29.7 mg, 84 μ mol, 71% yield) as a light brown oil.

Physical and spectroscopic data of **CBD_{AM2}**

$[\alpha]_D^{20}$: -47.3 (c 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.12 (dd, $J_{2II,3II} = 8.8$ Hz, $J_{2II,F} = 5.5$ Hz, 2H, H-2^{II}), 6.95 (t, $J_{3II,2II} = J_{3II,F} = 8.8$ Hz, 2H, H-3^{II}), 6.26 (br s, 1H, H-4^I), 6.08 (br s, 1H, H-6^I), 6.02 (br s, 1H, HO-3^I), 5.55 (s, 1H, H-2), 4.72 (br s, 1H, HO-1^I), 4.65 (s, 1H, H_{trans}-10), 4.55 (m, 1H, H_{cis}-10), 3.86 (m, 1H, H-1), 3.77 (s, 2H, -CH₂-), 2.40 (td, $J_{6,5} = 10.8$ Hz, $J_{6,1} = 3.6$ Hz, 1H, H-6), 2.23 (m, 1H, H_a-4), 2.11 (m, 1H, H_b-4), 1.82 (m, 2H, H-5), 1.79 (s, 3H, H-7), 1.66 (s, 3H, H-9). ¹⁹F NMR (250 MHz, CDCl₃): δ -117.86 (s, F-4^{II}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 161.5 (d, $J_{4II,F} = 245.0$ Hz, C_{4II}), 156.5 (C_{3I}), 154.3 (C_{1I}), 149.3 (C₈), 141.0 (C_{5I}), 140.4 (C₃), 136.6 (d, $J_{1II,F} = 3.1$ Hz, C_{1II}), 130.4 (d, $J_{2II,F} = 8.2$ Hz, C_{2II}), 124.0 (C₂), 115.3 (d, $J_{3II,F} = 21.0$ Hz, C_{3II}), 114.6 (C_{1I}), 111.1 (C₁₀), 110.5 (C_{6I}), 108.5 (C_{4I}), 46.3 (C₆), 40.7 (-CH₂-), 37.3 (C₁), 30.5 (C₄), 28.5 (C₅), 23.8 (C₇), 20.5 (C₉). IR (ATR): ν 3397, 2922, 1629, 1585, 1509, 1444, 1219, 1029 cm⁻¹. HRMS (ESI+): calcd. for [C₂₃H₂₅FO₂+H]⁺: 353.1917; found [M+H]⁺: 353.1916. COSY, DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of (2,6-dibromo-3,5-dimethoxyphenyl)(4-fluorophenyl)methanone, **94**



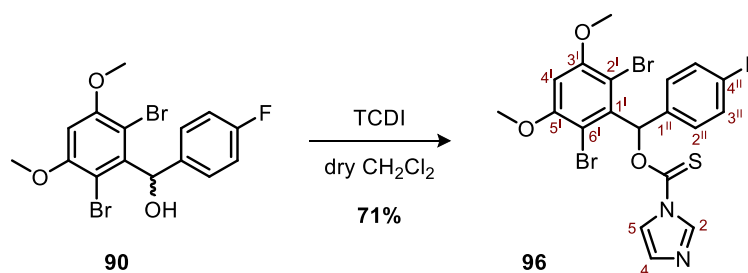
To a solution of alcohol **90** (494 mg, 1.18 mmol) in dry CH₂Cl₂ (30 mL) and under a N₂ atmosphere, a solution of DMPPI (786 mg, 1.79 mmol) in dry CH₂Cl₂ (30 mL) was added dropwise, and the mixture was stirred at rt overnight. The reaction was quenched with 1.1 mL of a prepared solution of Na₂S₂O₃ (1.70 g) in a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (9 mL) and the mixture was stirred for 15 min. The

aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL) and the combined organic extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The resulting beige solid was identified as **94** (490 mg, 1.18 mmol, quant. yield).

Physical and spectroscopic data of **94**

Mp = 207 - 213 °C (from CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 7.86 (dd, $J_{2',3'} = 8.9$ Hz, $J_{2',F} = 5.4$ Hz, 2H, H-2'), 7.13 (t, $J_{3',2'} = J_{3',F} = 8.9$ Hz, 2H, H-3'), 6.60 (s, 1H, H-4), 3.96 (s, 6H, 2x-OCH₃). $^{19}\text{F NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ -103.84 (s, F-4''). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 191.6 (-CO-), 165.8 (d, $J_{4',F} = 242.0$ Hz, C_{4'}), 156.2 (C₃, C₅), 141.3 (C₁), 132.2 (C_{1'}), 130.9 (d, $J_{2',F} = 7.0$ Hz, C_{2'}), 115.1 (d, $J_{3',F} = 21.0$ Hz, C_{3'}), 109.5 (C₂, C₆), 98.1 (C₄), 56.9 (2x-OCH₃). **IR** (ATR): ν 2948, 1671, 1573, 1427, 1337, 1217, 1151, 1053 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrFO}_3+\text{Na}]^+$: 438.8657; found $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 438.8954.

Synthesis of O-[(2,6-dibromo-3,5-dimethoxyphenyl)(4-fluorophenyl)methyl] 1H-imidazole-1-carbothioate, **96**



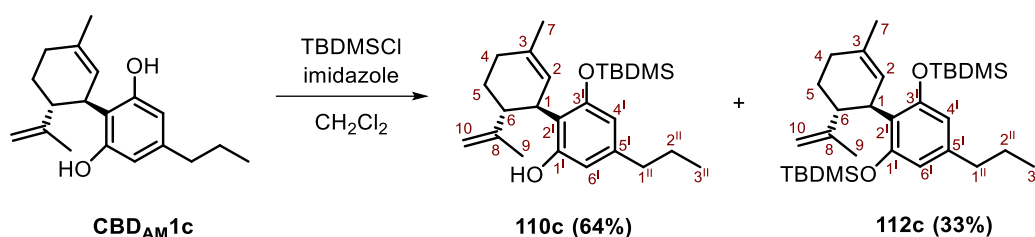
A solution of alcohol **90** (104 mg, 0.5 mmol) and *N,N'*-thiocarbonyldiimidazole, TCDI, (86 mg, 0.48 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) was prepared under N_2 atmosphere. Afterwards, the reaction mixture was stirred at reflux temperature until the starting material was consumed (TLC, (CH_2Cl_2 /hexanes, 2:1). The reaction was quenched with a tartaric acid solution (5% w/w, 1 mL) and the organic phase was cleaned with water (2 x 2 mL) and a NaHCO_3 saturated solution (2 mL). Then, the solvent was removed under vacuum and the resulting crude was purified by flash column chromatography (EtOAc/hexanes, 1:3) to furnish **96** (93 mg, 0.18 mmol, 71% yield) as a pale brown solid.

Physical and spectroscopic data of **96**

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 8.51 (br s, 1H, H-5), 8.33 (s, 1H, H-2), 7.80 (br s, 1H, H-4), 7.23 (m, 2H, H-2''), 7.07 - 7.00 (m, 2H, -CH(OTCI)-, H-3''), 6.58 (s, 1H, H-4'), 3.93 (s, 6H, 2x-OCH₃). $^{19}\text{F NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ -114.05 (s, F-4''). **IR** (ATR): ν 2926, 1739, 1574, 1458, 1379, 1213 cm^{-1} . **HRMS** (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{FN}_2\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+$: 528.9232; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 528.9220.

VI.5.1.3. Synthesis of allosteric-vestibule CBD Bitopic ligands

Synthesis of (1*R*,2*R*)-6-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5'-methyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-4-propyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2-ol and (((1*R*,2*R*)-5'-methyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-4-propyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diyl)bis(oxy))bis(*tert*-butyldimethylsilane), **110c** and **112c**



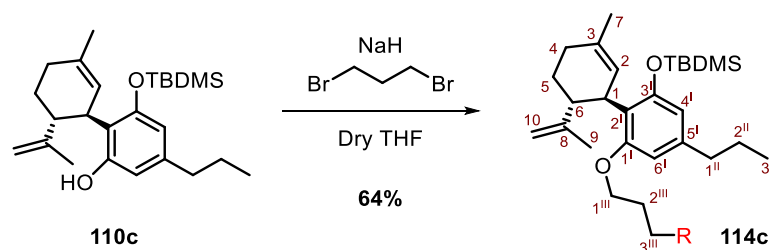
A solution of **CBD_{AM}1c** (251 mg, 0.88 mmol) and imidazole (76 mg, 1.11 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was cooled to 0 °C. Then, TBDMSCl (156 mg, 1.04 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at the same temperature. The solution was stirred at rt for 2h. Then, the solution was cooled to 0 °C and another portion of TBDMSCl (156 mg, 1.04 mmol) and imidazole (76 mg, 1.11 mmol) were added. The reaction was let stirred to rt overnight. The mixture was diluted with distilled water and extracted with CH_2Cl_2 (2 x 15 mL). The organics were dried over Na_2SO_4 and then removed under reduced pressure using a rotatory evaporator. The resulting oil was purified by a flash column chromatography (hexanes/EtOAc, 100:0 → 200:1) obtaining two different products; (i) a light brown oil identified as **110c** (225 mg, 0.56 mmol, 64% yield); (ii) a light brown oil identified as **112c** (147 mg, 0.29 mmol, 33% yield).

Physical and spectroscopic data **110c**

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: -26.7 (c 0.2, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.29 (m, 1H, H-6'), 6.19 (m, 1H, H-4'), 5.87 (s, 1H, -OH), 5.52 (s, 1H, H-2), 4.57 (m, 1H, H_{trans}-10), 4.48 (s, 1H, H_{cis}-10), 3.93 (m, 1H, H-1), 2.48 (m, 1H, H-6), 2.43 (t, $J_{1''',2'''} = 7.5$ Hz, 2H, H-1''), 2.21 (m, 1H, H_a-4), 2.08 (m, 1H, H_b-4), 1.86 - 1.78 (m, 5H, H-5, H-7), 1.62 (s, 3H, H-9), 1.58 (m, 2H, H-2''), 0.98 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.91 (t, $J_{3''',2'''} = 7.5$ Hz, 3H, H-3''), 0.21 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$), 0.17 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ 156.2 (C_{1'}), 154.0 (C_{3'}), 147.6 (C₈), 142.1 (C_{5'}), 139.6 (C₃), 124.6 (C₂), 117.9 (C_{2'}), 111.7 (C_{4'}), 111.0 (C₁₀), 110.2 (C_{6'}), 45.8 (C₆), 37.8 (C_{1''}), 37.0 (C₁), 30.5 (C₄), 28.3 (C₅), 26.1 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.2 (C_{2''}), 23.8 (C₇), 20.2 (C₉), 18.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 13.9 (C_{3''}), -3.8/-4.0 (2x- SiCH_3). IR (ATR): ν 2927, 2858, 1622, 1464, 1262, 1037, 840 cm^{-1} . HRMS (ESI+): calcd. for $[\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{Si}+\text{H}]^+$: 401.2870; found $[\text{M}+\text{H}]^+$: 401.2856. COSY, DEPT135, NOESY and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation were recorded.

Physical and spectroscopic data of **112c**

$[\alpha]_D^{20}$: -62.9 (*c* 3.4, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.20 (m, 2H, H-4^I, H-6^I), 5.23 (s, 1H, H-2), 4.53 (m, 1H, H_{trans}-10), 4.46 (s, 1H, H_{cis}-10), 3.93 (m, 1H, H-1), 3.03 (td, *J*_{6,5} = 11.2 Hz, *J*_{6,1} = 3.0 Hz, 1H, H-6), 2.41 (t, *J*_{1^{II},2^{II}} = 7.5 Hz, 2H, H-1^{II}), 2.14 (m, 1H, H_a-4), 1.98 (m, 1H, H_b-4), 1.78 - 1.69 (m, 2H, H-5), 1.62 (s, 3H, H-7), 1.57 - 1.53 (m, 5H, H-7, H-2^{II}), 1.00 (s, 18H, 2x-C(CH₃)₃), 0.91 (t, *J*_{3^{II},2^{II}} = 7.5 Hz, 3H, H-3^{II}), 0.23 (s, 6H, -SiCH₃), 0.22 (br s, 6H, -SiCH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 155.3 (C₁, C₃), 149.9 (C₈), 140.5 (C₅), 130.8 (C₃), 127.4 (C₂), 122.5 (C₂), 112.0 (C₄, C₆), 109.6 (C₁₀), 44.1 (C₆), 37.9 (C₁₁), 37.6 (C₁), 31.1 (C₄), 30.2 (C₅), 26.2 (-C(CH₃)₃), 24.2 (C₂), 23.7 (C₇), 19.9 (C₉), 18.6 (-C(CH₃)₃), 13.9 (C₃), -3.6 (-SiCH₃). IR (ATR): ν 2928, 2858, 1573, 1428, 1259, 1067, 830 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): calcd. for [C₃₁H₅₄O₂Si₂+H]⁺: 515.3735; found [M+H]⁺: 515.3719. DEPT135 and ¹H/¹³C correlation were recorded.

Synthesis of impurity 114c

To a solution of **110c** (76.4 mg, 0.19 mmol) in dry THF (1 mL), NaH (13.8 mg, 0.35 mmol) was added under a N₂ atmosphere. The mixture was warmed to 50 °C and let stirred for 1 h. A solution of 1,3-dibromopropane (118 mg, 0.57 mmol) in dry THF (1.5 mL) was added to the mixture and warmed to reflux temperature. The mixture was stirred overnight and quenched with MeOH, to remove the excess of NaH. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude was diluted with water (3 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (2 x 3mL). The combining organic layers were dried with Na₂SO₄ and removed under reduced pressure. The resulting oil was purified by a flash column chromatography (hexanes/Et₂O, 100:0 → 500:1) to furnish **114c** (63.5 mg, 0.12 mmol, 64% yield) as a light brown oil.

Physical and spectroscopic data of **114c**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.27 (m, 1H, H-6^I), 6.25 (m, 1H, H-4^I), 5.24 (s, 1H, H-2), 4.46 (s, 2H, H-10), 4.05 - 3.91 (m, 2H, H-1^{III}, H-1), 3.61 (m, 2H, H-3^{III}), 2.92 (m, 1H, H-6), 2.45 (t, *J*_{1^{II},2^{II}} = 7.5 Hz, 2H, H-1^{II}), 2.27 (m, 2H, H-2^{III}), 2.11 (m, 1H, H-4), 2.03 (m, 1H, H-4), 1.77 (m, 2H, H-5), 1.66 (s, 3H, H-7), 1.61 - 1.56 (m, 5H, H-9, H-2^{II}), 0.99 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 0.92 (t, *J*_{3^{II},2^{II}} = 7.4 Hz, 3H, H-3^{II}), 0.22 (s, 3H, -SiCH₃), 0.17 (s, 3H, -SiCH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 158.4 (C₁), 154.1 (C₃), 149.4 (C₈), 141.1 (C₅), 130.9 (C₃), 127.0 (C₂), 120.4 (C₂), 112.2 (C₄), 109.7 (C₁₀), 105.2 (C₆), 65.1 (C₁), 45.0 (C₆), 38.1 (C₁), 37.2 (C₁), 33.0

(C_{2III}), 31.0 (C₄), 30.3 (C_{3III}), 29.8 (C₅), 26.0 (-C(CH₃)₃), 24.2 (C_{2II}), 23.5 (C₇), 19.7 (C₉), 18.4 (-C(CH₃)₃), 13.9 (C_{3II}), -3.7 (2x-SiCH₃). **COSY**, **DEPT135** and **¹H/¹³C** correlation were recorded.

VI.5.2. Computational simulations, *in silico*

The CB₂RAM12033-Gi cryo-EM structure (PDB id 6KPF)⁴⁰ (missing residues 55 - 181 and 233 - 239 of α i were built from the CB₂R-WIN55, 212- 2-Gi structure, 6PT0,⁴¹ using MODELLER v9.25) was used in docking studies and MD simulations. JWH-133 and CBD were docked into the orthosteric binding cavity (Figure V-17), and CBD, PAM **CBD_{AM1c}**, and NAM **CBD_{AM1e}** were docked into the allosteric binding cavity using the Molecular Operating Environment software (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada). These structures were embedded in a lipid bilayer box, constructed using PACKMOL-memgen,⁴² containing 1 palmitoyl-2-oleoyl-snglycero- 3-phosphocholine, cholesterol, water molecules (TIP3P), and monoatomic Na⁺ and Cl⁻ ions MD simulation of these systems was performed with GROMACS 2019⁴³

VI.5.3. Biological activity; cAMP levels determination assays

Determination of cAMP levels in HEK293T cells transiently expressing CB₂R (1 μ g of cDNA) was performed using the Lance-Ultra cAMP kit (PerkinElmer). 2 h before initiating the experiment, the medium was substituted by a serum-free medium. Then, transfected cells were dispensed in white 384-well microplates at a density of 3000 cells per well and incubated for 15 min at rt with compounds, followed by 15 min incubation with forskolin, and 1 h more with homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay reagents. Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with an HTRF optical module (BMG Labtech). Data analysis was made based on the fluorescence ratio emitted by the labeled cAMP probe (665 nm) over the light emitted by the europium cryptate-labeled anti-cAMP antibody (620 nm). A standard curve was used to calculate cAMP concentration. Forskolin-stimulated cAMP levels were normalized to 100%

VI.6 References

- (1) Ning, X.; Guo, Y.; Wang, X.; Ma, X.; Tian, C.; Shi, X.; Zhu, R.; Cheng, C.; Du, Y.; Ma, Z.; Zhang, Z.; Liu, J. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4302-4312.
- (2) Zarudnitskii, E. v.; Ivanov, V. v.; Yurchenko, A. A.; Pinchuk, A. M.; Tolmachev, A. A. *Heteroat. Chem.* **2002**, *13*, 146-152.
- (3) Martí-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Andrejšali, A. A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291-325.
- (4) Kozlovsky, N.; Matar, M. A.; Kaplan, Z.; Zohar, J.; Cohen, H. *Biol. Psychiatry.* **2009**, *65*, 383-391.
- (5) Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177-182.
- (6) Urlacher, E.; Soustelle, L.; Parmentier, M. L.; Verlinden, H.; Gherardi, M. J.; Fourmy, D.; Mercer, A. R.; Devaud, J. M.; Massou, I. *PLoS One* **2016**, *11*, e0146248.
- (7) Xiang, J. S.; Hu, Y.; Rush, T. S.; Thomason, J. R.; Ipek, M.; Sum, P. E.; Abrous, L.; Sabatini, J. J.; Georgiadis, K.; Reifenberg, E.; Majumdar, M.; Morris, E. A.; Tam, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 311-316.
- (8) Bailey, K.; Tan, E. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5740-5749.
- (9) Kiss, L. E.; Ferreira, H. S.; Torrão, L.; Bonifácio, M. J.; Nuno Palma, P.; Soares-Da-Silva, P.; Learmonth, D. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8, 3396-3411.
- (10) Jorgensen, W. L.; Bollini, M.; Thakur, V. V.; Domoaal, R. A.; Spasov, K. A.; Anderson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 39, 15686-15696.
- (11) Abarbri, M.; Thibonnet, J.; Bérillon, L.; Dehmel, F.; Rottländer, M.; Knochel, P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4618-4634.
- (12) Manikumar, G.; Jin, C.; Rehder, K. S. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 810-815.
- (13) Case, D. A.; Betz, R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham III, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N.; Izadi, S.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Mermelstein, D.; Merz, K. M.; Monard, G.; Nguyen, H.; Nguyen, H. T.; Omelyan, I.; Onufriev, A.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Simmerling, C. L.; Botello-Smith, W. M.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Xiao, L.; Kollman, P. A. *AMBER 2016*, University of California, San Francisco, 2016.
- (14) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.; Simmerling, C.; Hauser, K. E. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696-3713.
- (15) Marenich, A. v.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378-6396.

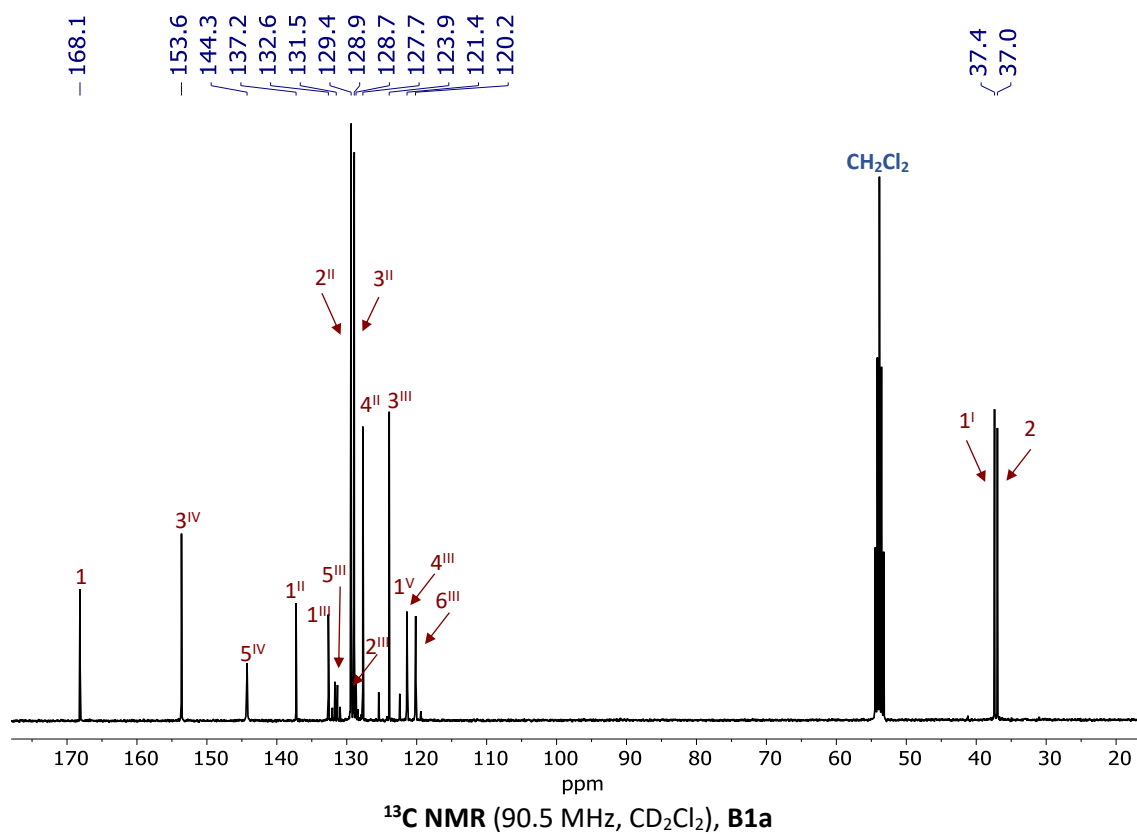
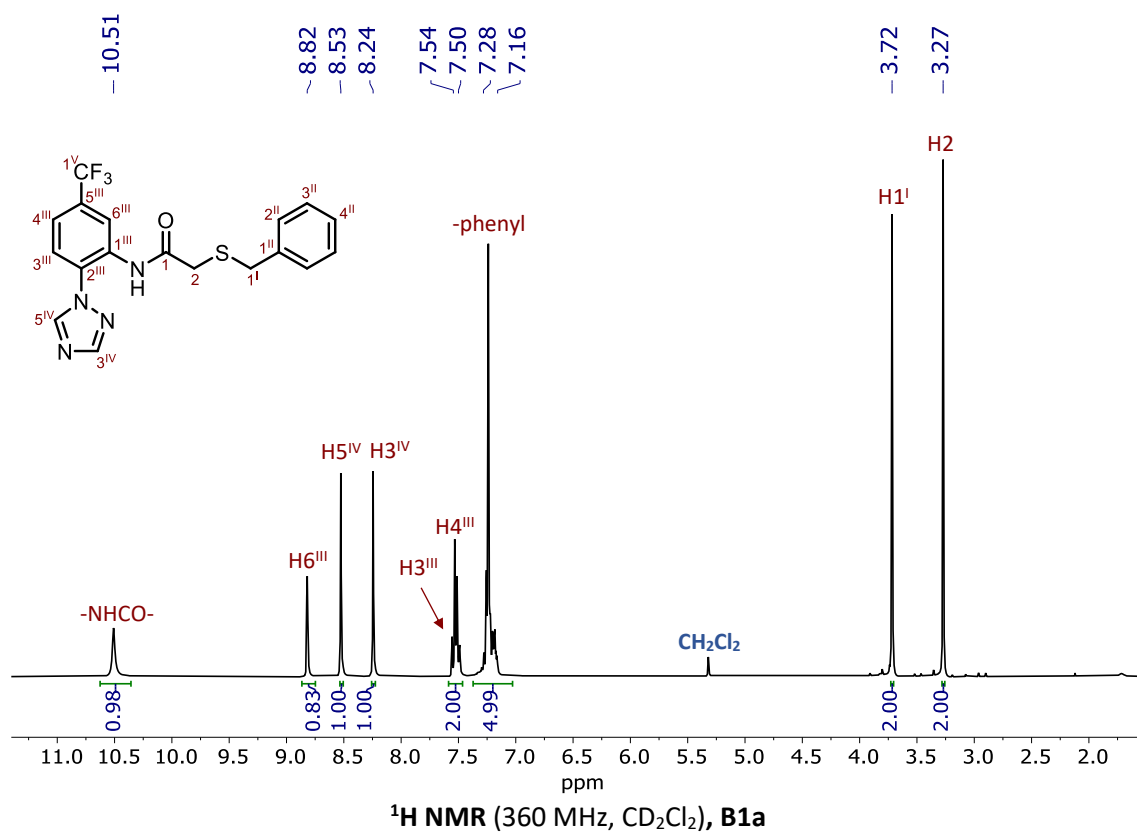
- (16) Sant'Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L. Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M. R.; Reixach, N.; Insa, R.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Reig, N.; Ventura, S. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10787.
- (17) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33-38.
- (18) McGibbon, R. T.; Beauchamp, K. A.; Harrigan, M. P.; Klein, C.; Swails, J. M.; Hernández, C. X.; Schwantes, C. R.; Wang, L. P.; Lane, T. J.; Pande, V. S. *Biophys J.* **2015**, *109*, 1528-1532.
- (19) Pinheiro, F.; Varejão, N.; Esperante, S.; Santos, J.; Velázquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Pallarès, I.; Ventura, S. *FEBS J.* **2021**, *288*, 310-324.
- (20) Vega, S.; Abian, O.; Velazquez-Campoy, A. *Methods* **2015**, *76*, 99-115.
- (21) Freire, E.; Schön, A.; Velazquez-Campoy, A. *Methods Enzymol.* **2009**, *455*, 127-155.
- (22) Ferreira, N.; Cardoso, I.; Domingues, M. R.; Vitorino, R.; Bastos, M.; Bai, G.; Saraiva, M. J.; Almeida, M. R. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 3569-3576.
- (23) Almeida, M. R.; Macedo, B.; Cardoso, I.; Alves, I.; Valencia, G.; Arsequell, G.; Planas, A.; Saraiva, M. J. *Biochem J.* **2004**, *381*, 351-356.
- (24) Juanhuix, J.; Gil-Ortiz, F.; Cuní, G.; Colldelram, C.; Nicolás, J.; Lidón, J.; Boter, E.; Ruget, C.; Ferrer, S.; Benach, J. J. *Synchrotron. Radiat.* **2014**, *21*, 679-689.
- (25) Kabsch, W. *Acta. Cryst.* **2010**, *66*, 133-144.
- (26) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. *Acta. Cryst.* **2011**, *67*, 235-242.
- (27) Adams, P. D.; Afonine, P. v.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213-221.
- (28) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501.
- (29) Lesch, B.; Toräng, J.; Nieger, M.; Bräse, S. *Synthesis* **2005**, *11*, 1888-1900.
- (30) Kinney, W. A.; McDonnell, M. E.; Zhong, H. M.; Liu, C.; Yang, L.; Ling, W.; Qian, T.; Chen, Y.; Cai, Z.; Petkanas, D.; Brenneman, D. E. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 424-428.
- (31) Roberts, J. C.; Pincock, J. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1480-1492.
- (32) Papahatjis, D. P.; Nahmias, V. R.; Nikas, S. P.; Andreou, T.; Alapafuja, S. O.; Tsotinis, A.; Guo, J.; Fan, P.; Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4048-4060.
- (33) Poldy, J.; Peakall, R.; Barrow, R. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4296-4300.

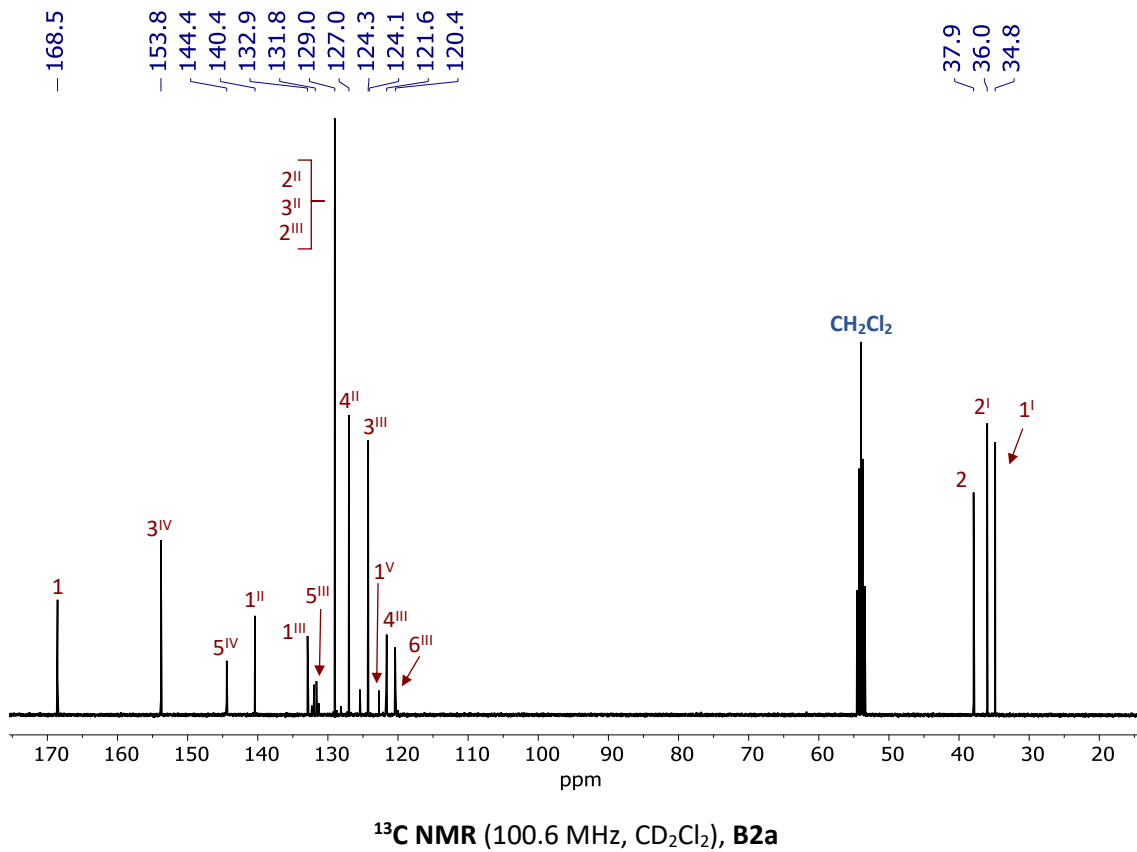
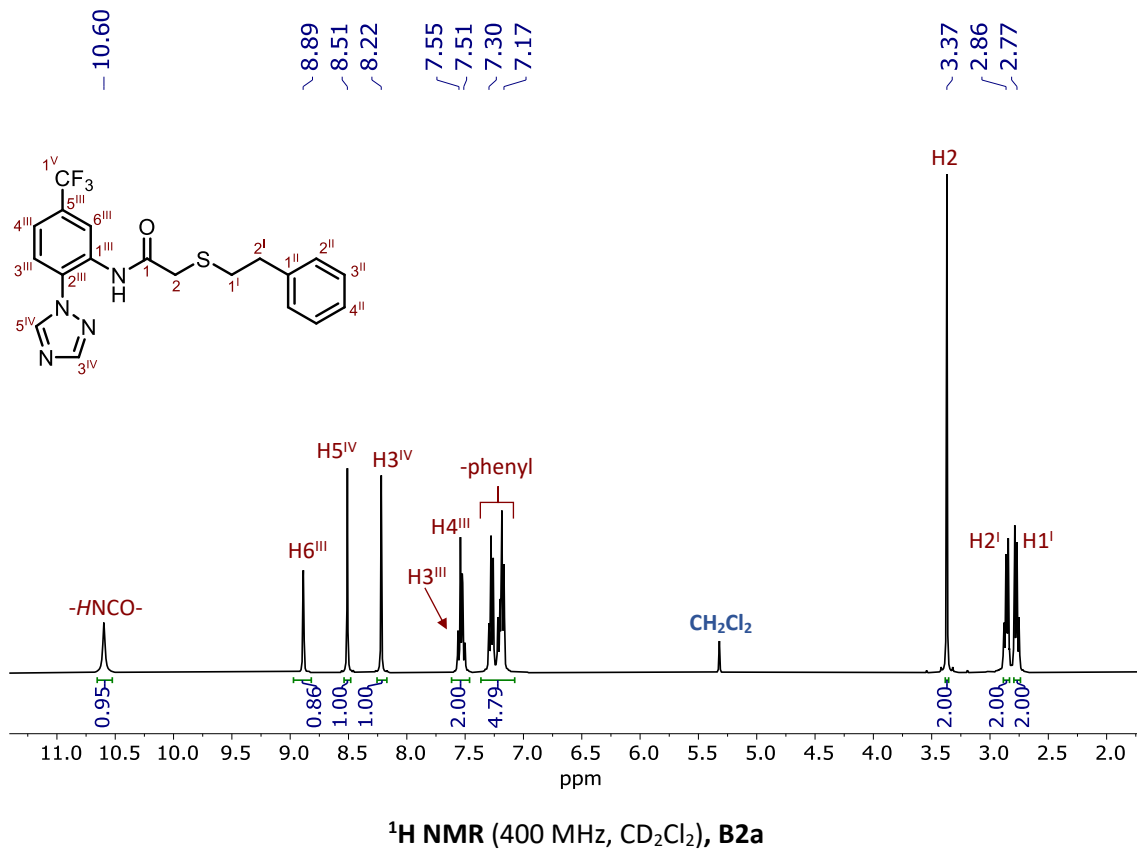
- (34) Dialer, L.; Petrovic, D.; Weigl, U. PCT Int. Appl. WO2017011210A1, 2017.
- (35) Beak, S.-H.; Park, N.-Y. Halogenation of Cannabinoids. *J. Korean Chem. Soc.* **1991**, *35*, 59-63.
- (36) Usami, N.; Okuda, T.; Yoshida, H.; Kimura, T.; Watanabe, K.; Yoshimura, H.; Yamamoto, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1641-1645.
- (37) Choi, Y. H.; Hazekamp, A.; Peltenburg-Looman, A. M. G.; Frédérich, M.; Erkelens, C.; Lefeber, A. W. M.; Verpoorte, R. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 345-354.
- (38) Citti, C.; Linciano, P.; Forni, F.; Vandelli, M. A.; Gigli, G.; Laganà, A.; Cannazza, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *175*, 112752.
- (39) Slavov, N.; Cvengroš, J.; Neudörfl, J. M.; Schmalz, H. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7588-7591.
- (40) Hua, T.; Li, X.; Wu, L.; Iliopoulos-Tsoutsouvas, C.; Wang, Y.; Wu, M.; Shen, L.; Brust, C. A.; Nikas, S. P.; Song, F.; Song, X.; Yuan, S.; Sun, Q.; Wu, Y.; Jiang, S.; Grim, T. W.; Benchama, O.; Stahl, E. L.; Zvonok, N.; Zhao, S.; Bohn, L. M.; Makriyannis, A.; Liu, Z. J. *Cell* **2020**, *180*, 655-665.
- (41) Xing, C.; Zhuang, Y.; Xu, T. H.; Feng, Z.; Zhou, X. E.; Chen, M.; Wang, L.; Meng, X.; Xue, Y.; Wang, J.; Liu, H.; McGuire, T. F.; Zhao, G.; Melcher, K.; Zhang, C.; Xu, H. E.; Xie, X. Q. *Cell* **2020**, *180*, 645-654.
- (42) Schott-Verdugo, S.; Gohlke, H. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 2522-2528.
- (43) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindah, E. Gromacs: *SoftwareX* **2015**, *1-2*, 19-25.

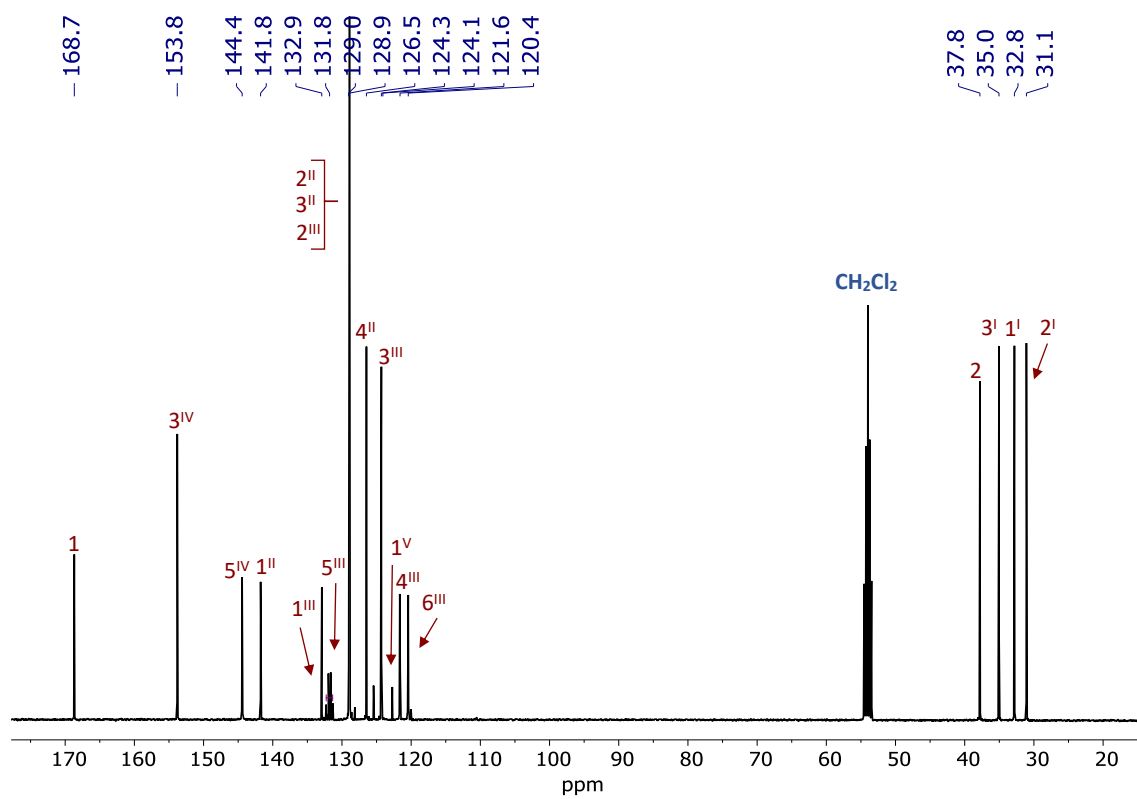
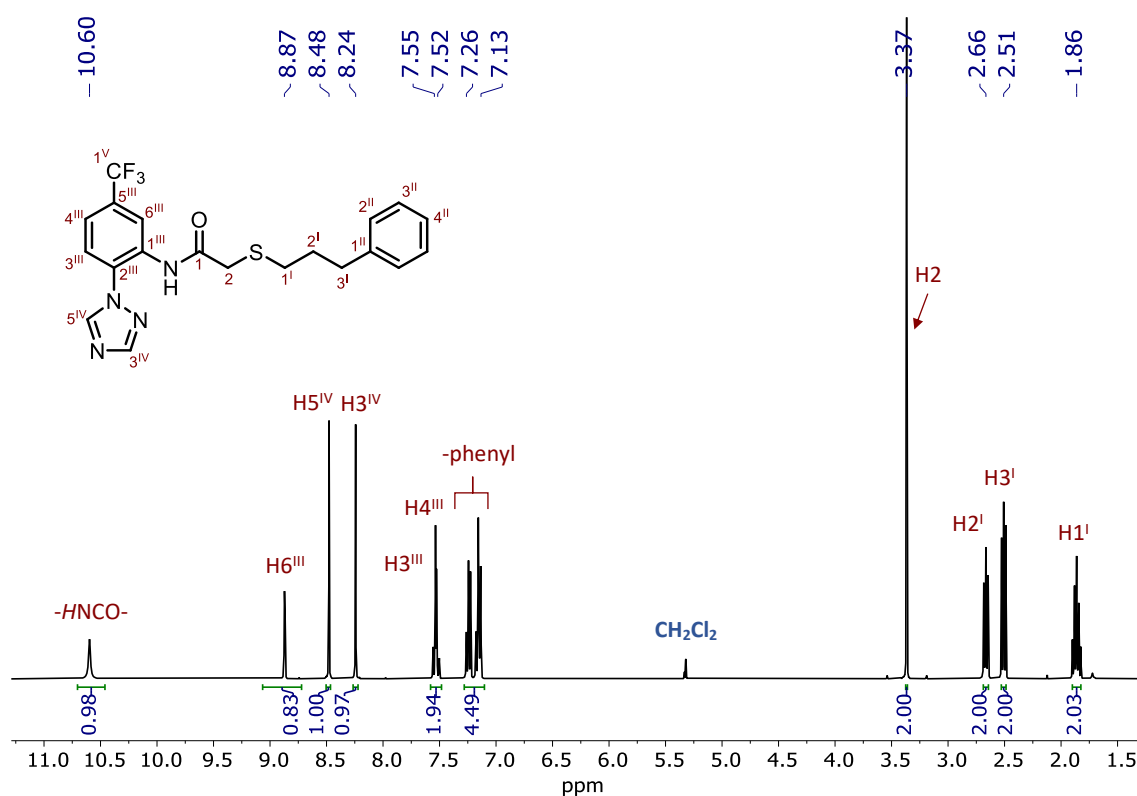
Capítulo VII

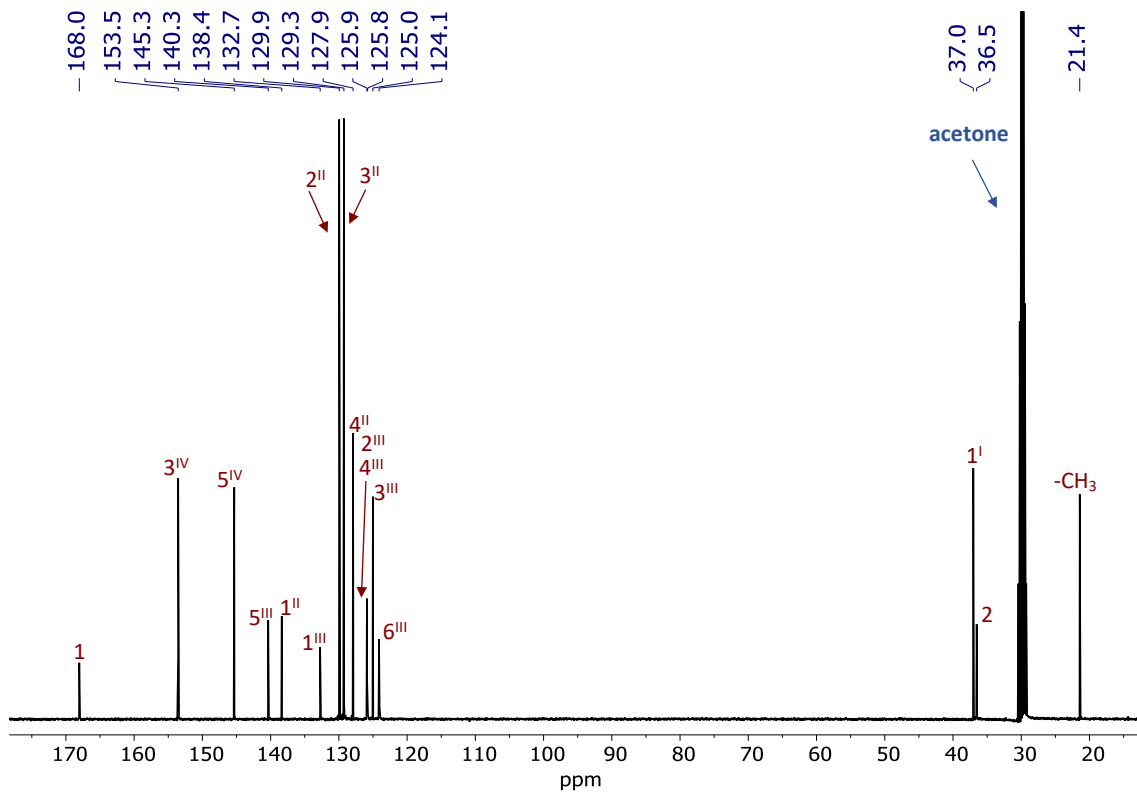
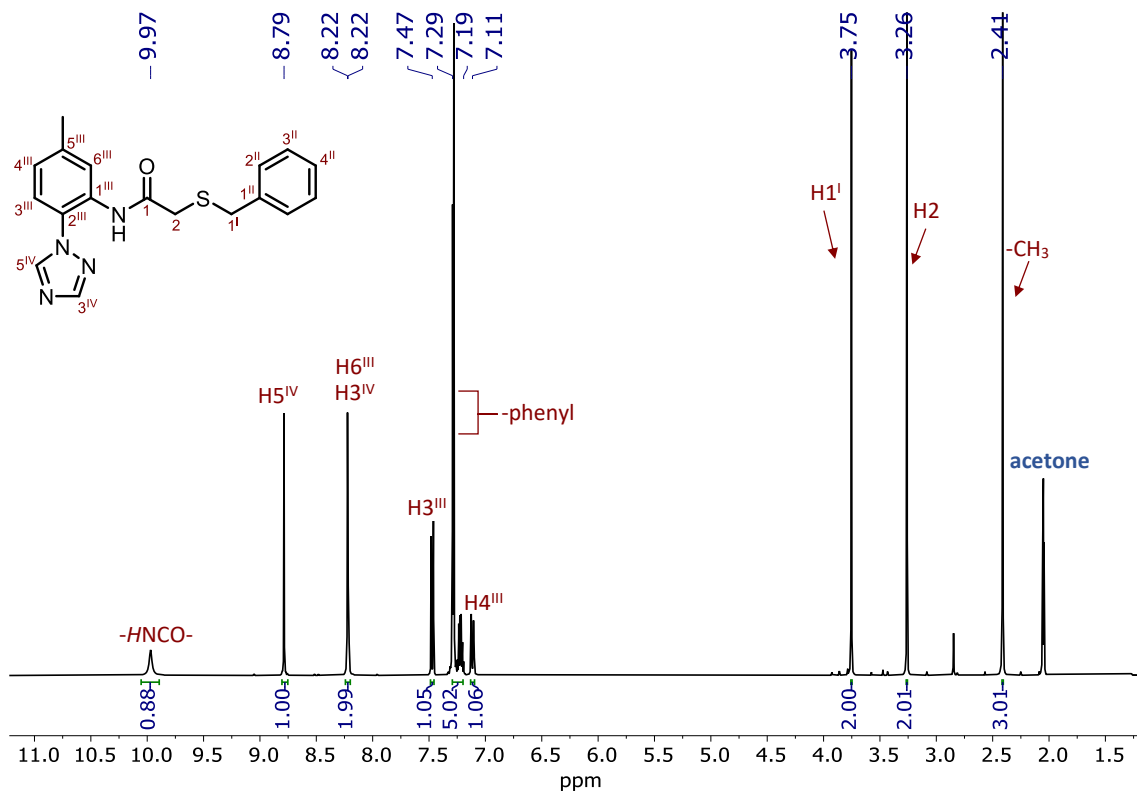
Anexo

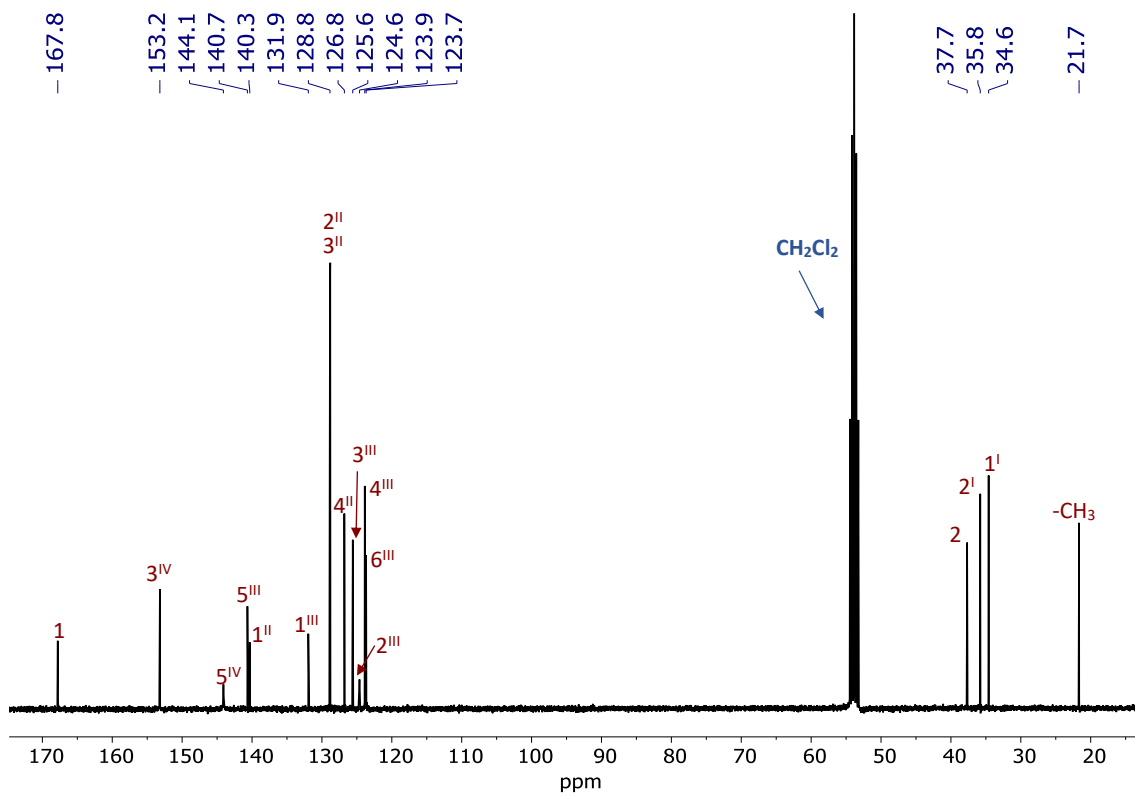
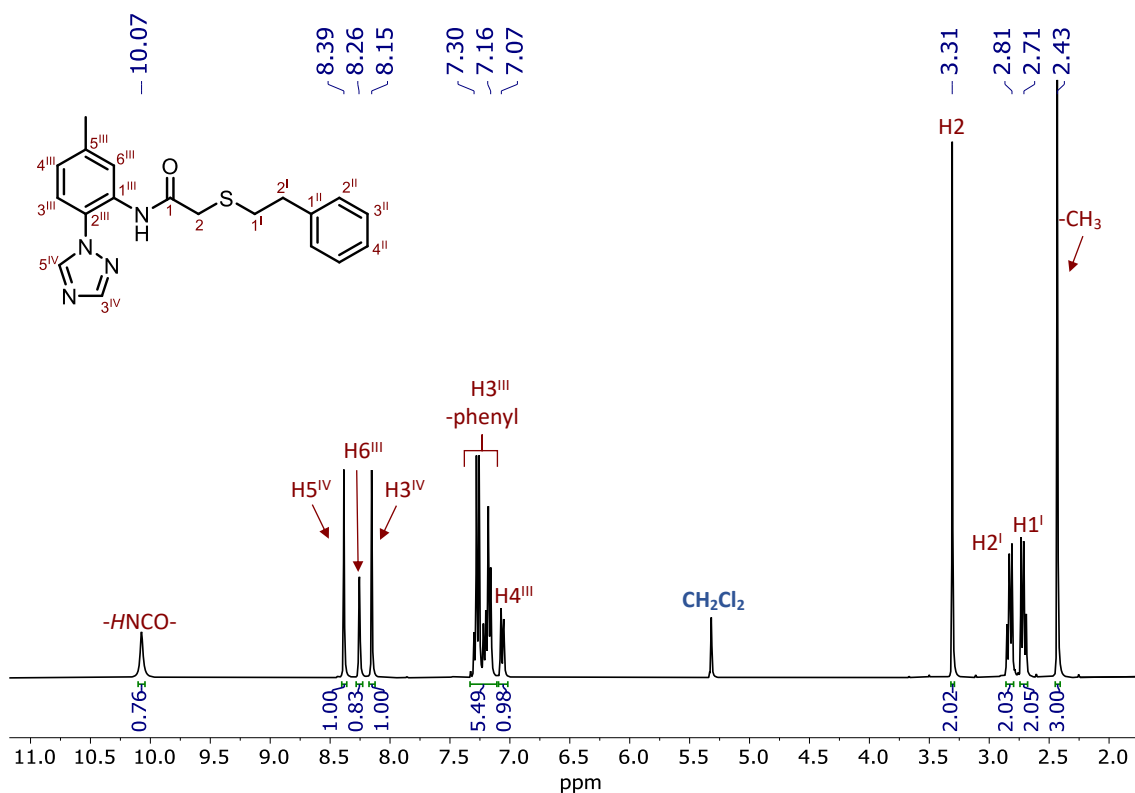
VII. Anexo

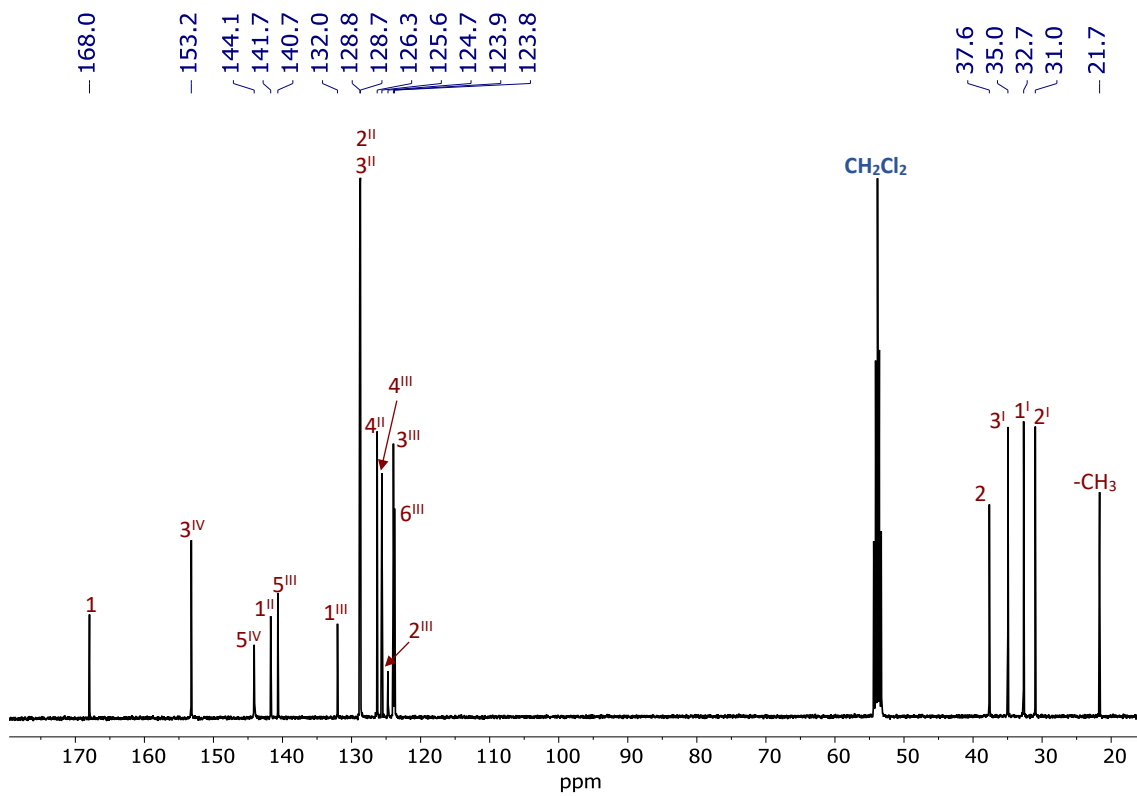
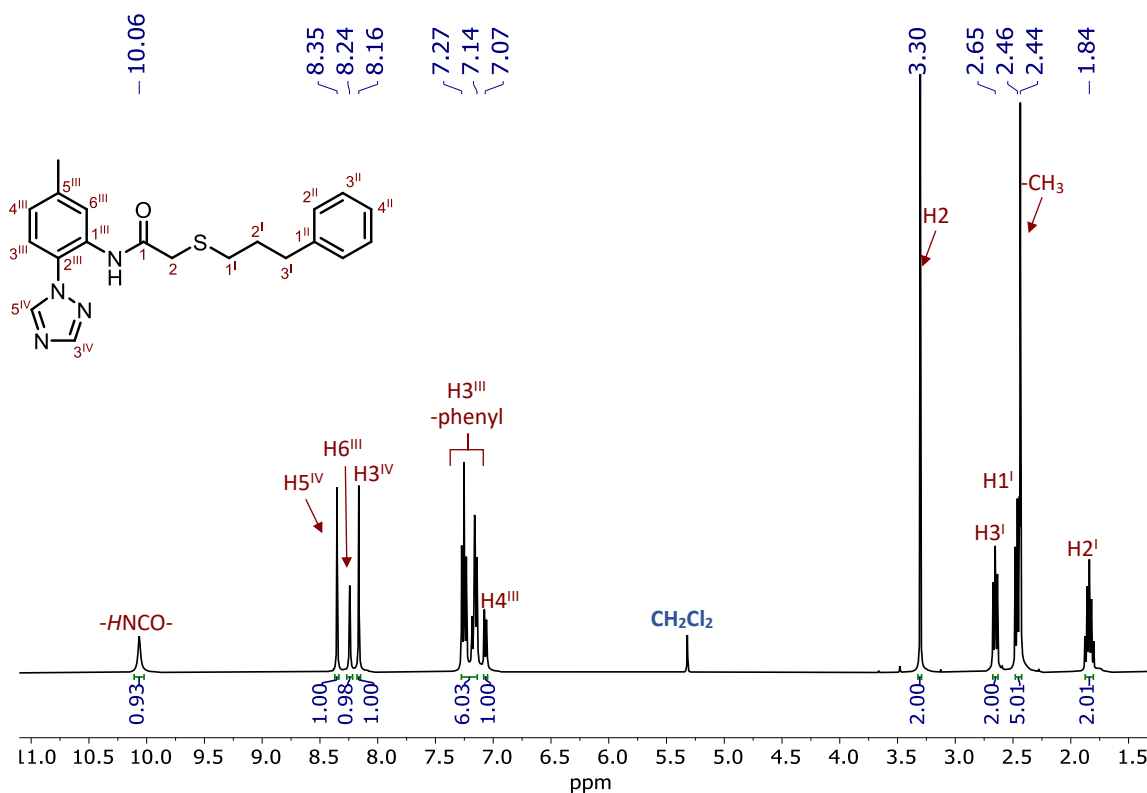
VII.II.1 Espectros de ^1H y ^{13}C de los compuestos finales del capítulo II











VII.II.2. Figuras del capítulo II

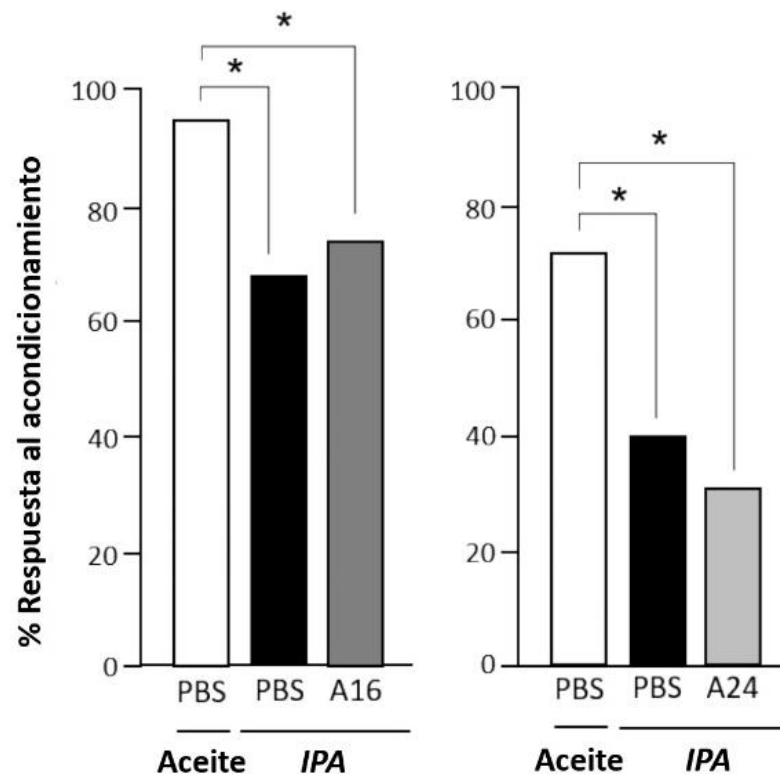


Figura A-II-1. Ausencia de efecto de A16 y A23 en abejas estresadas. Proporciones de los individuos que mostraron una respuesta condicionada al olor emparejado con sacarosa, al final de la sesión de acondicionamiento (3 replicados). Las abejas fueron inyectadas con PBS, **A16** o **A23** (10^{-4} M), luego expuestas a IPA o aceite de parafina (control negativo). La exposición al IPA redujo significativamente el rendimiento de aprendizaje en abejas inyectadas con PBS, pero también en aquellas inyectadas con altas dosis de **A16** o **A23**, que por lo tanto no tuvieron ningún efecto detectable sobre el impacto del estrés en el rendimiento de aprendizaje. *: $p < 0,025$.

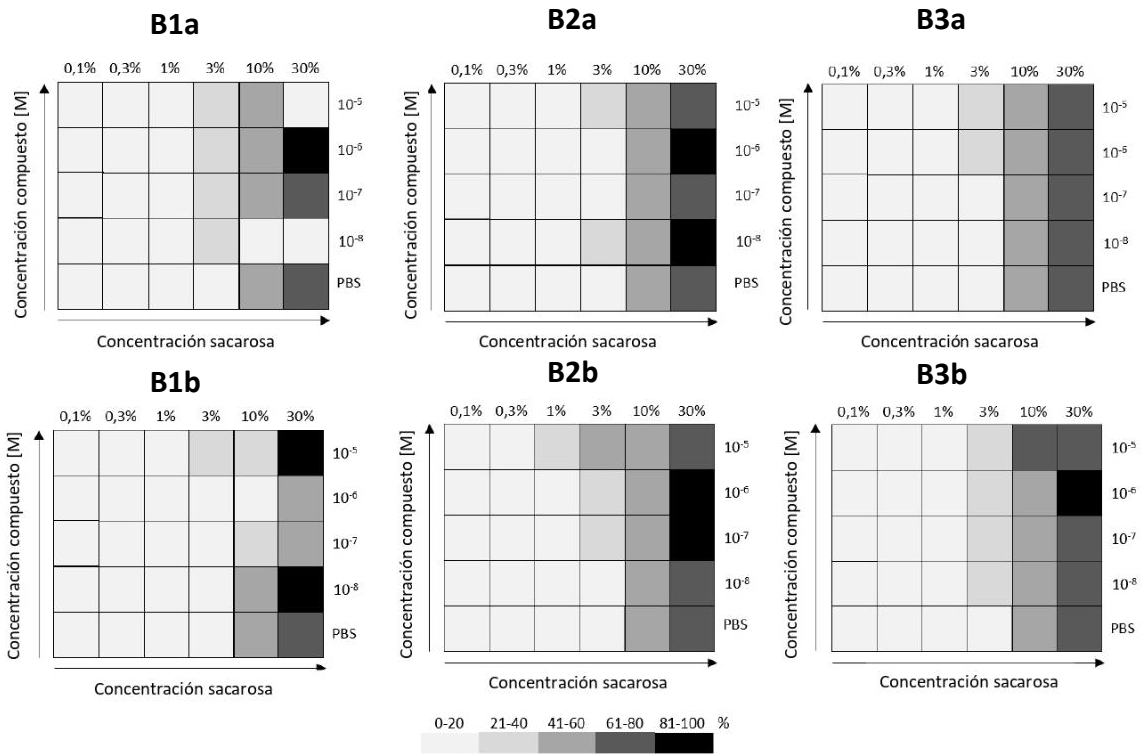
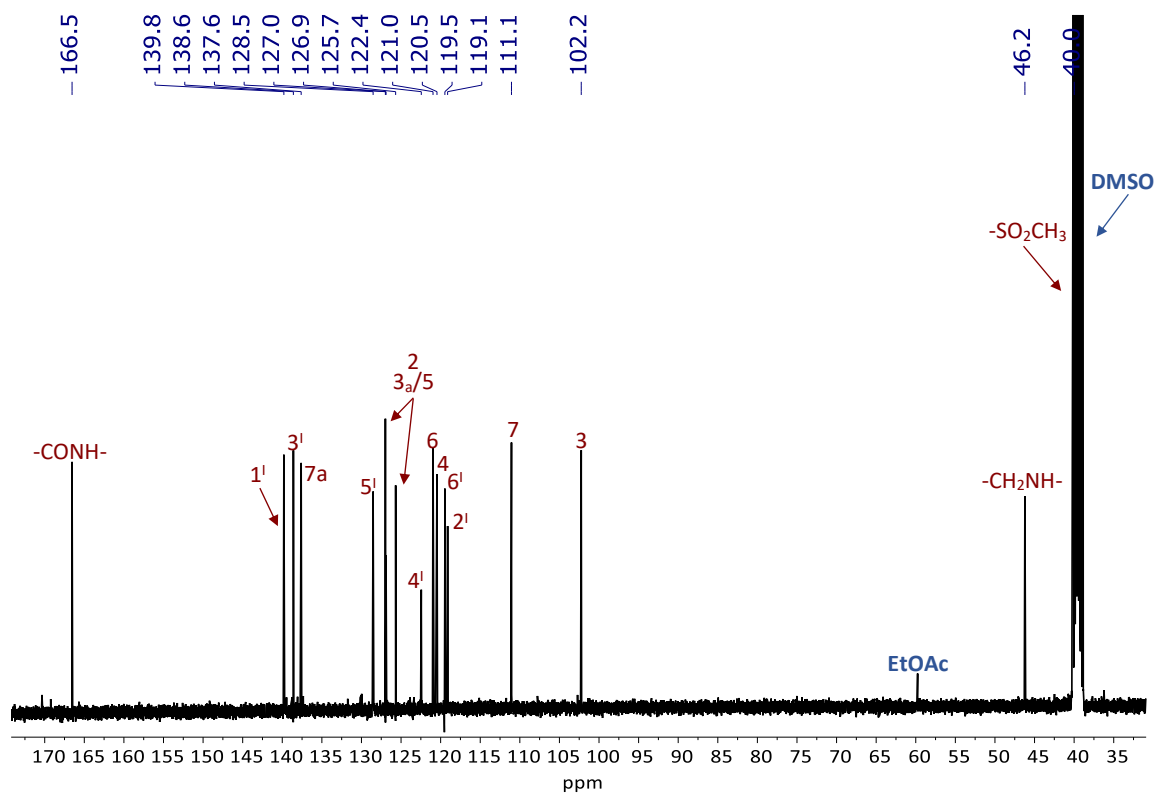
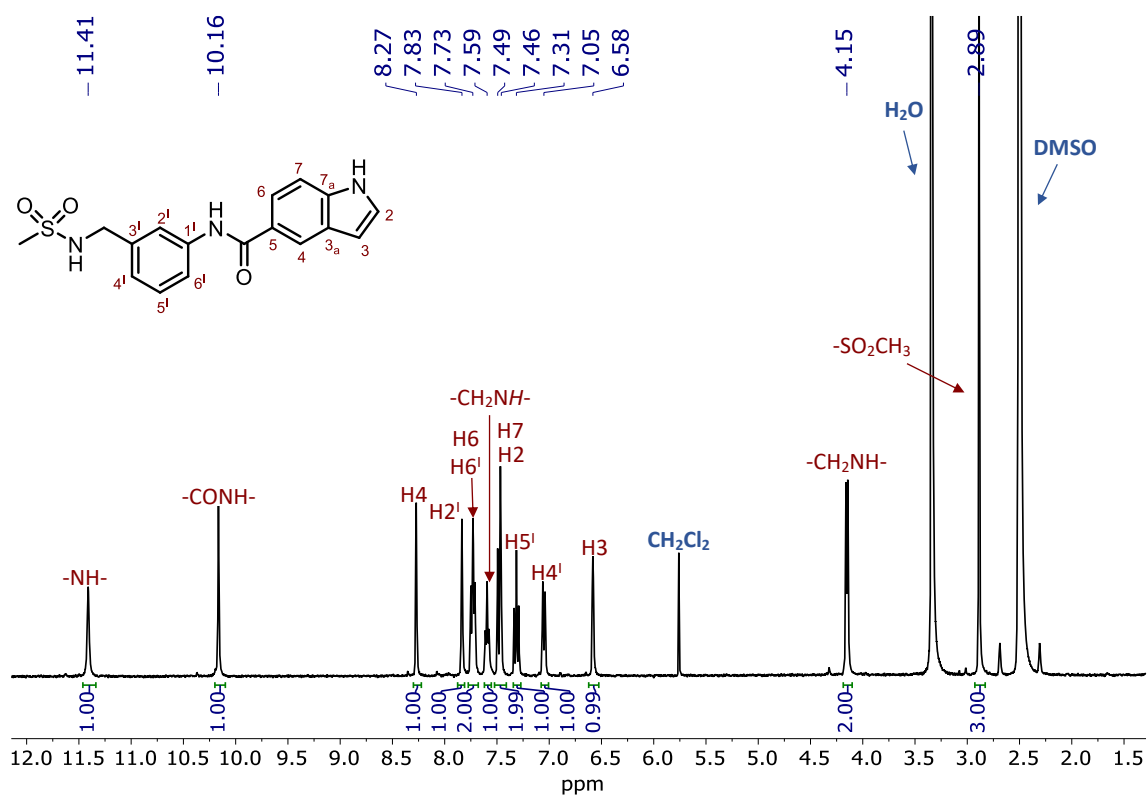
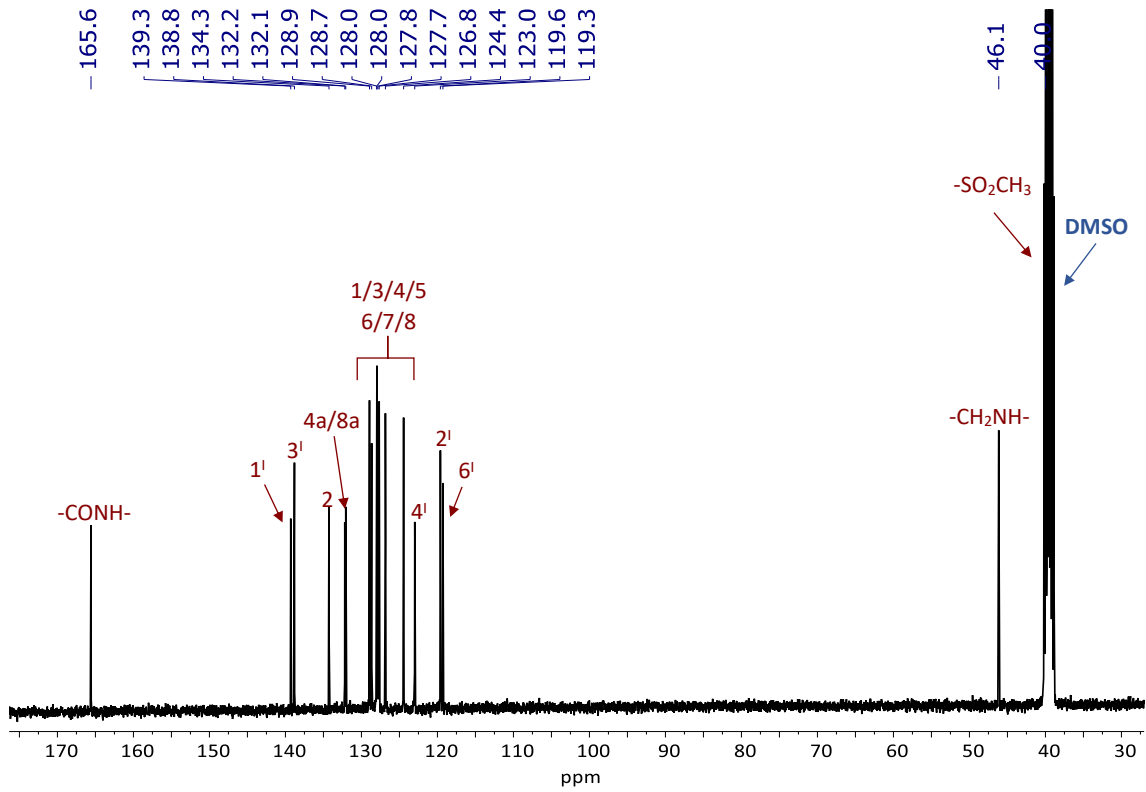
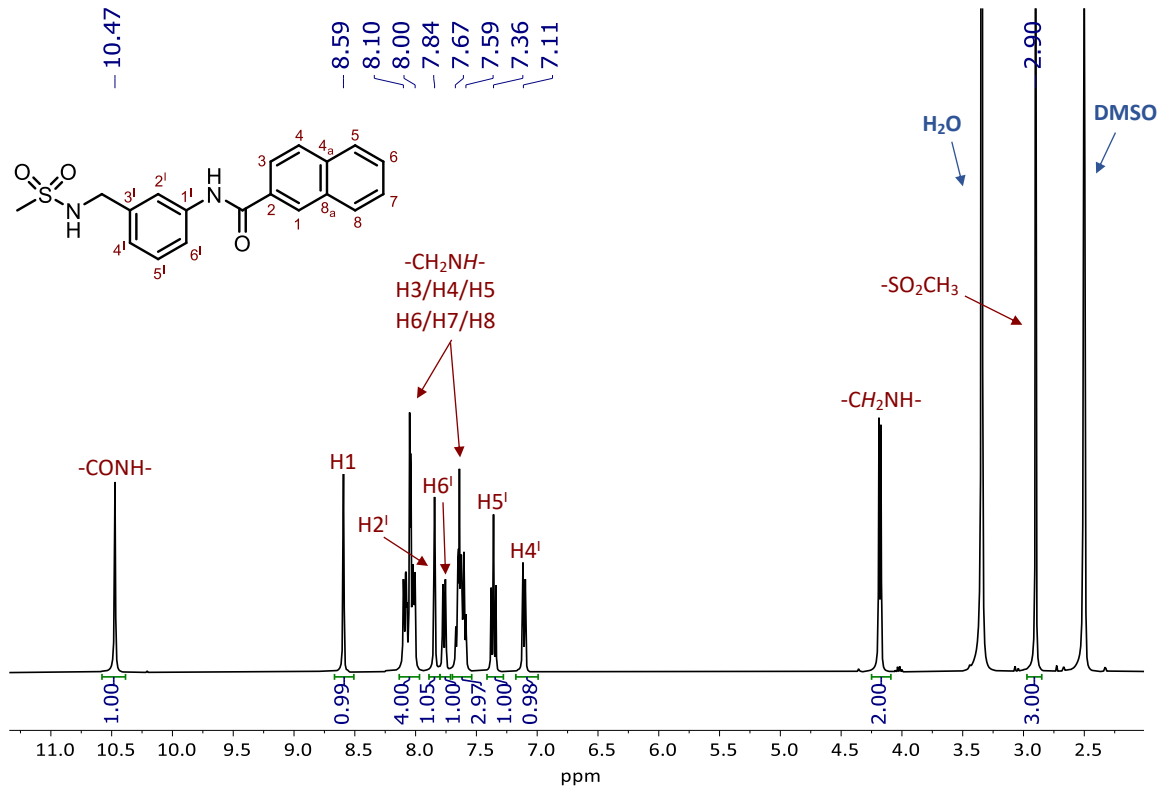
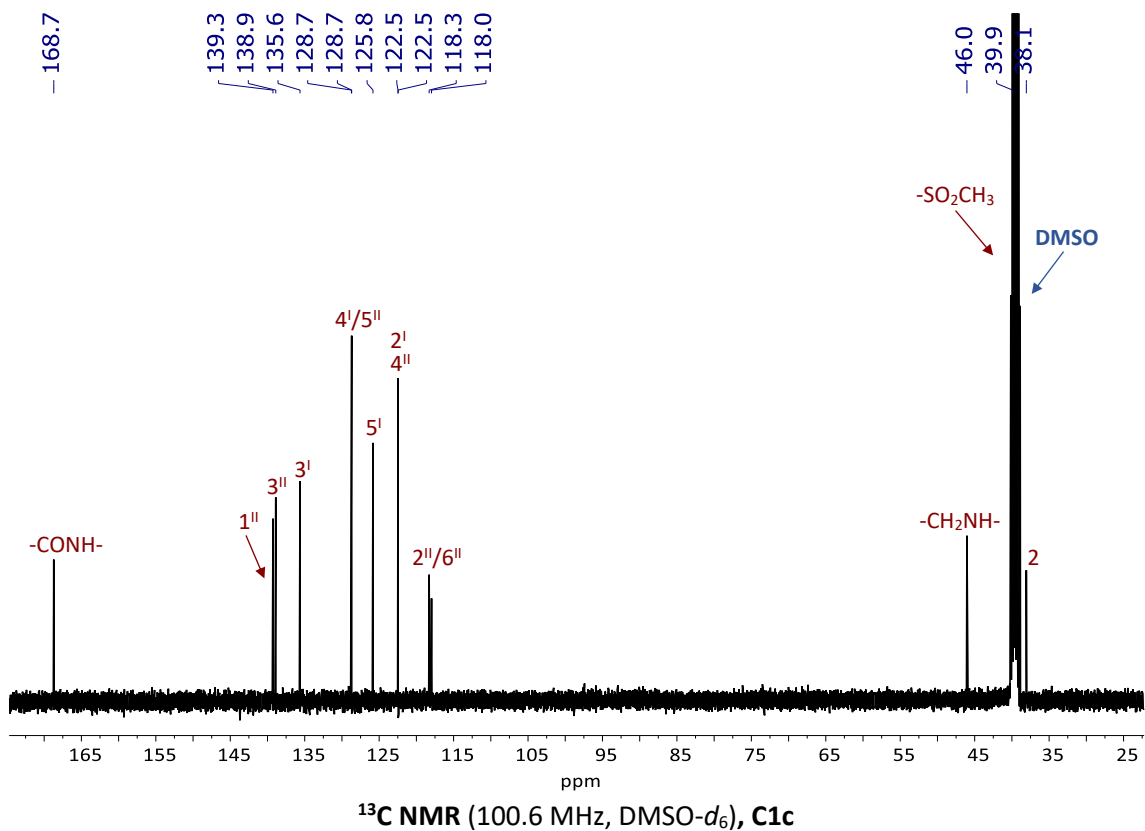
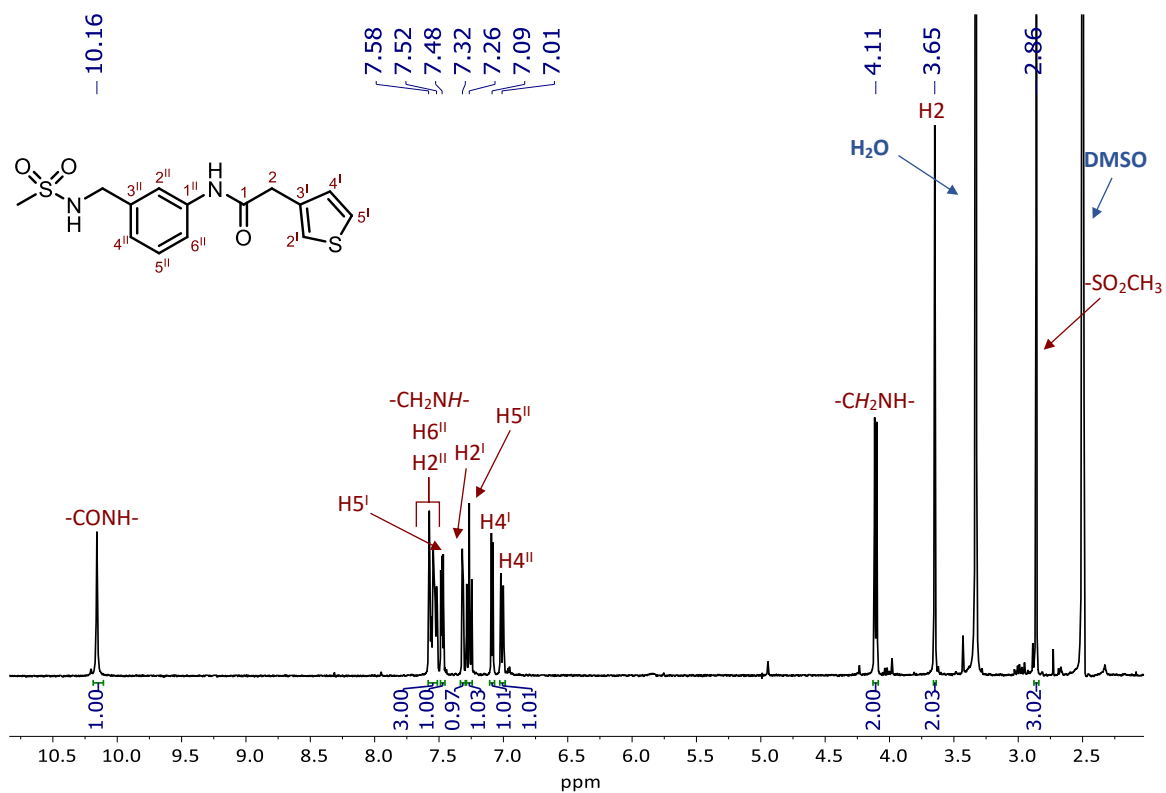
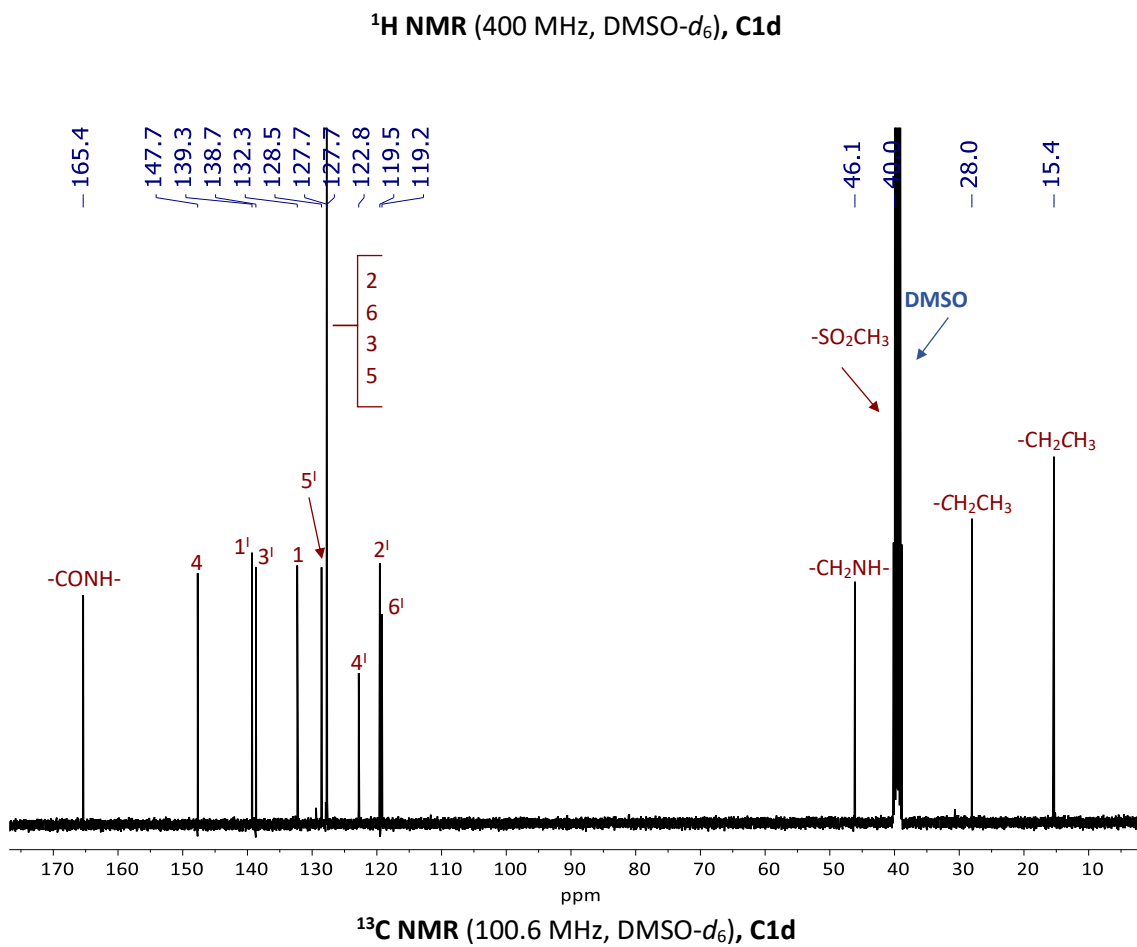
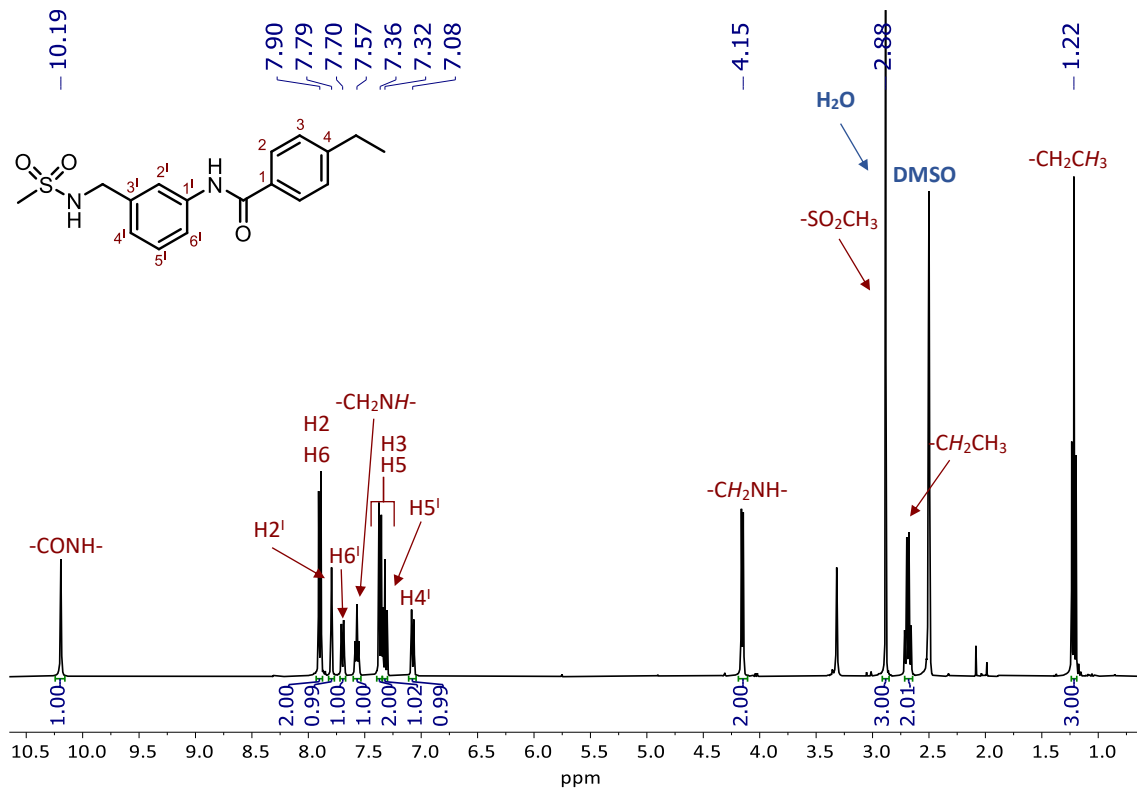


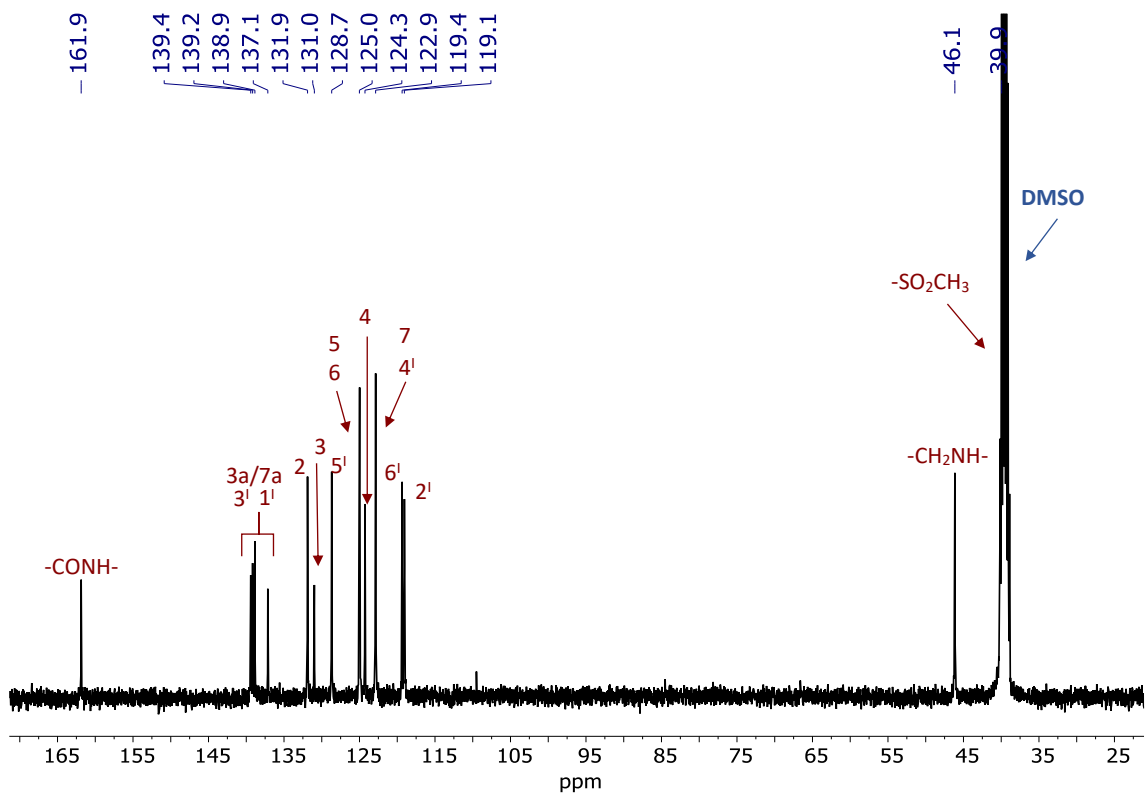
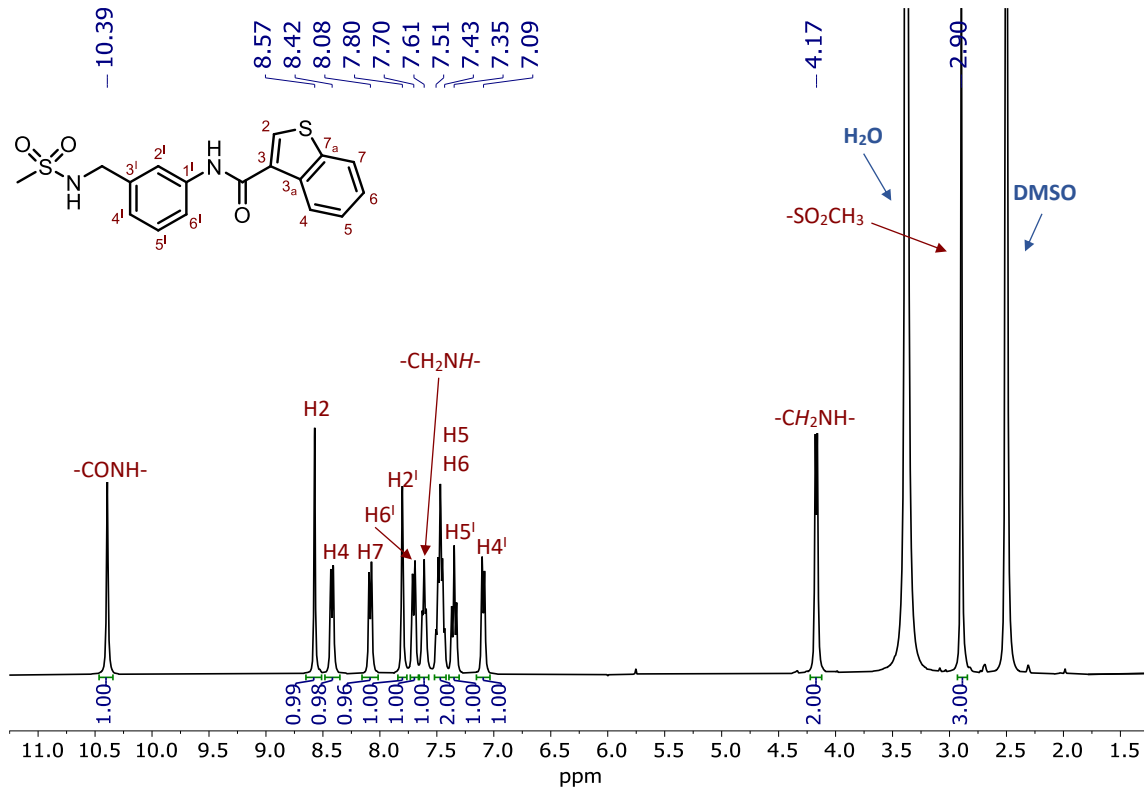
Figura A-II-2. Respuestas al aumento de las concentraciones de sacarosa en abejas estresadas tratadas con la serie B. Para cada tratamiento (molécula/dosis), el porcentaje de respuestas a una determinada concentración de sacarosa está codificado por colores. En general, las abejas respondieron cada vez más al aumento de las concentraciones de sacarosa, esta tendencia fue modulada de manera diferente por las moléculas **B**. Los valores agrupados de todas las abejas tratadas con PBS se usaron para proporcionar una referencia idéntica en todas las matrices. (PBS: n = 114; compuestos **B**: 28-41/grupo).

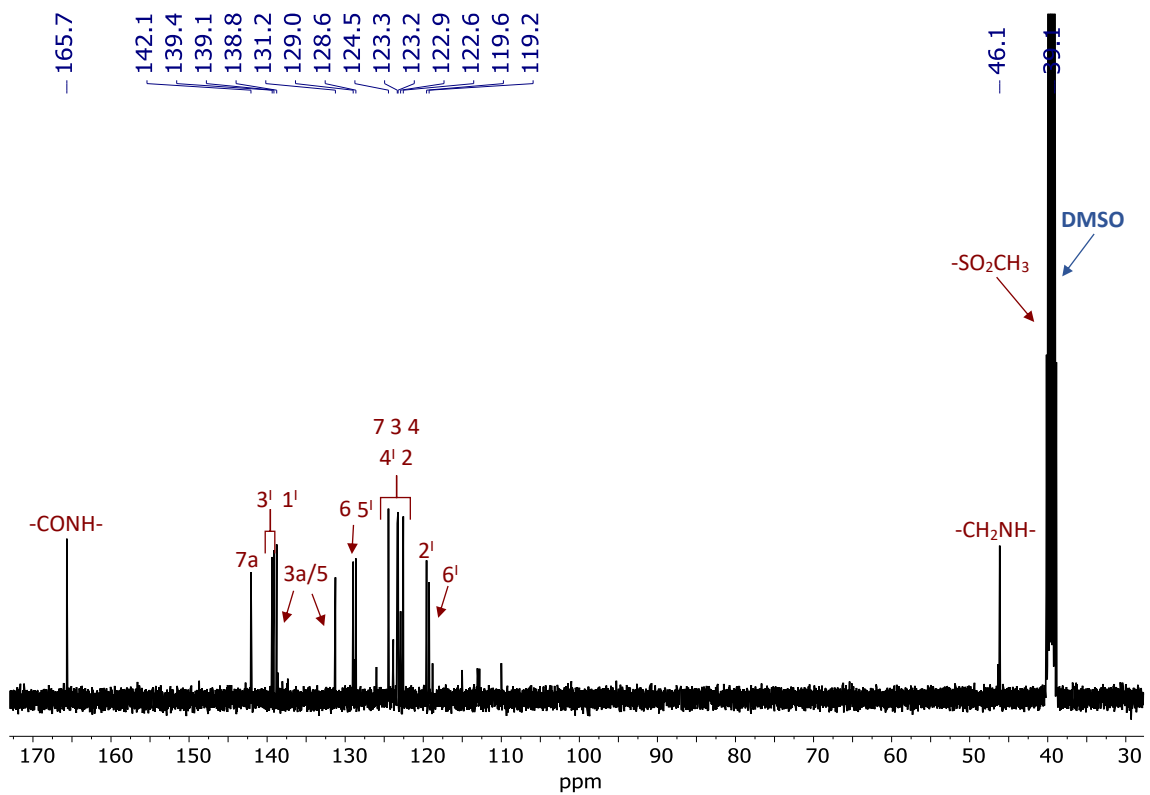
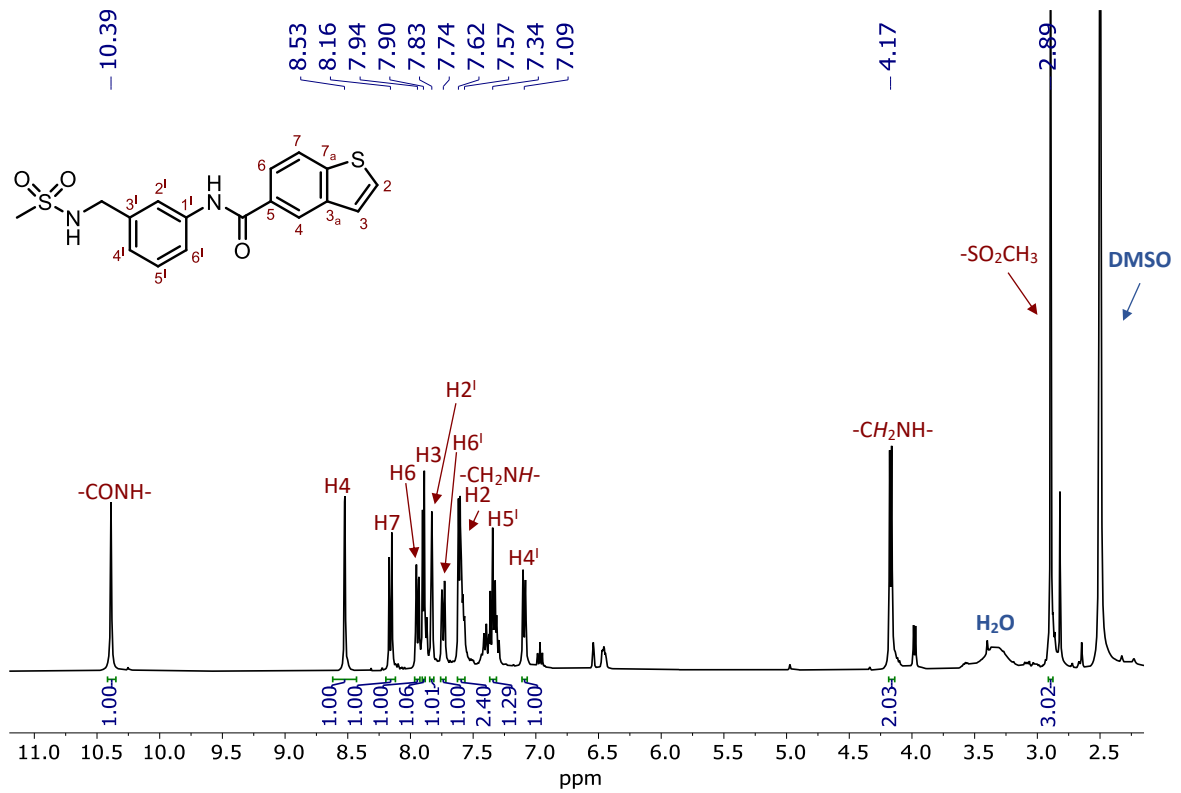
VII.III.1 Espectros de ^1H y ^{13}C los compuestos finales del capítulo III

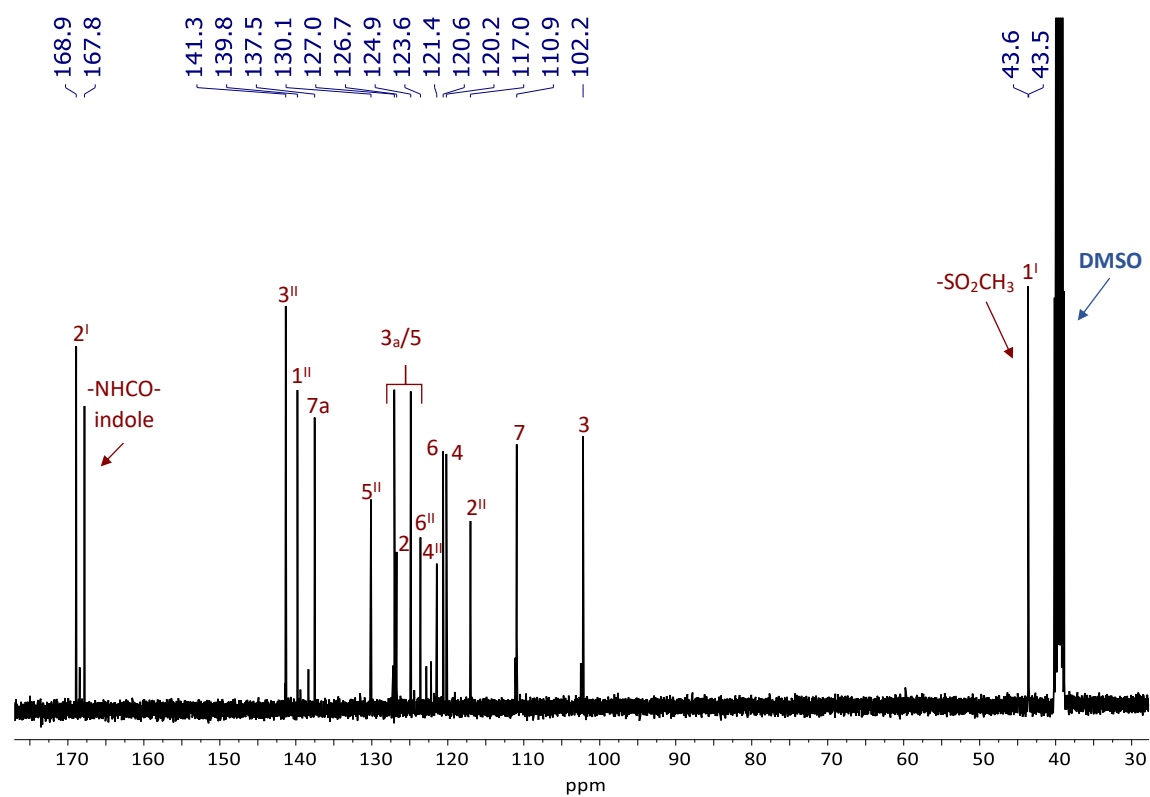
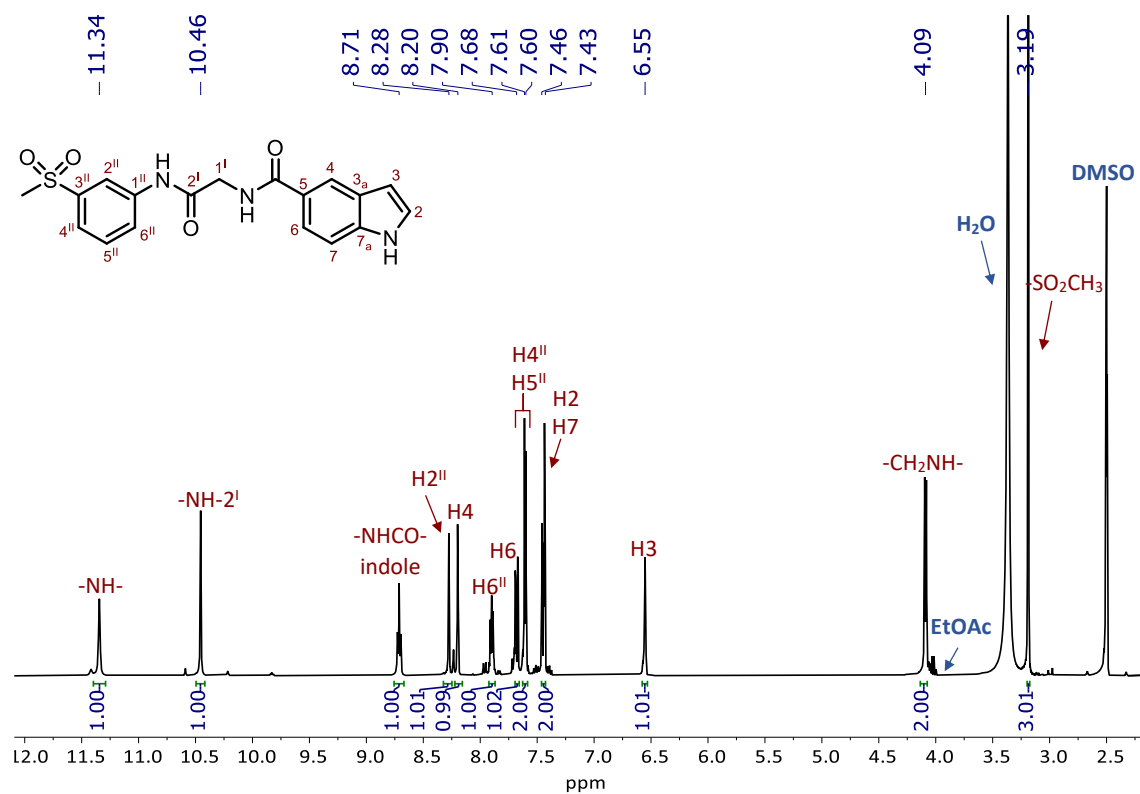


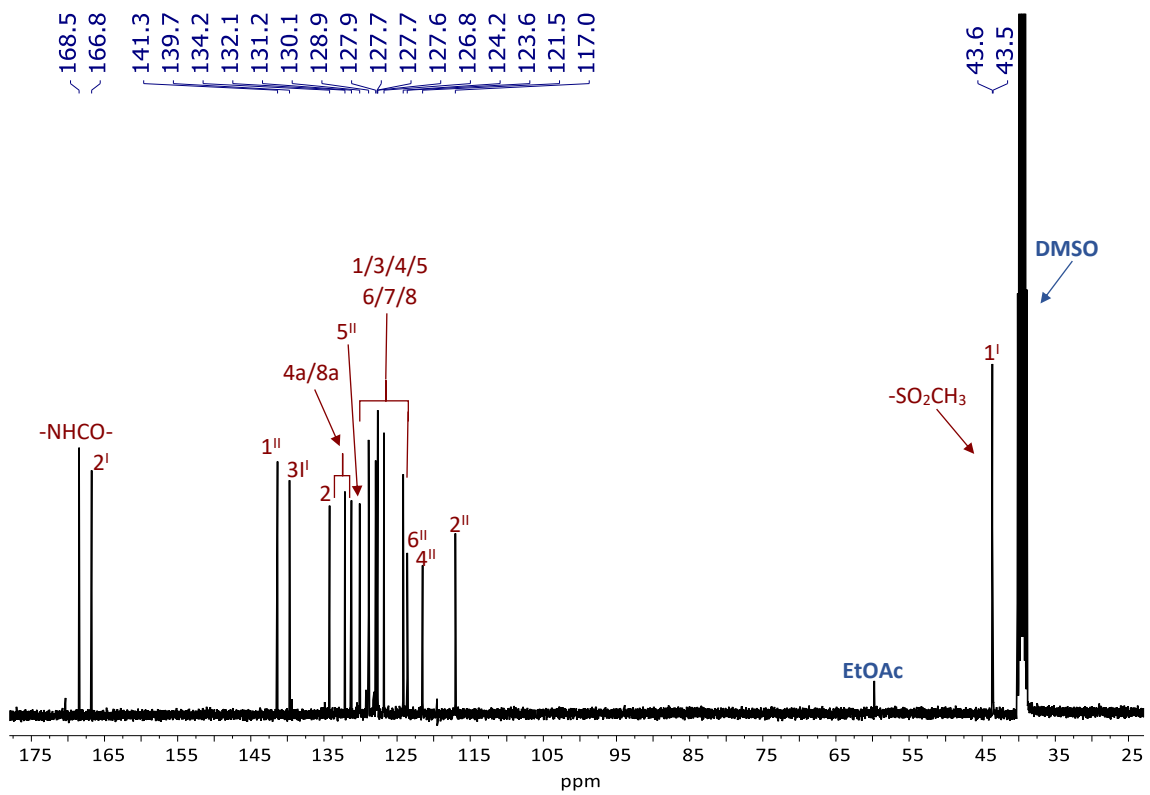
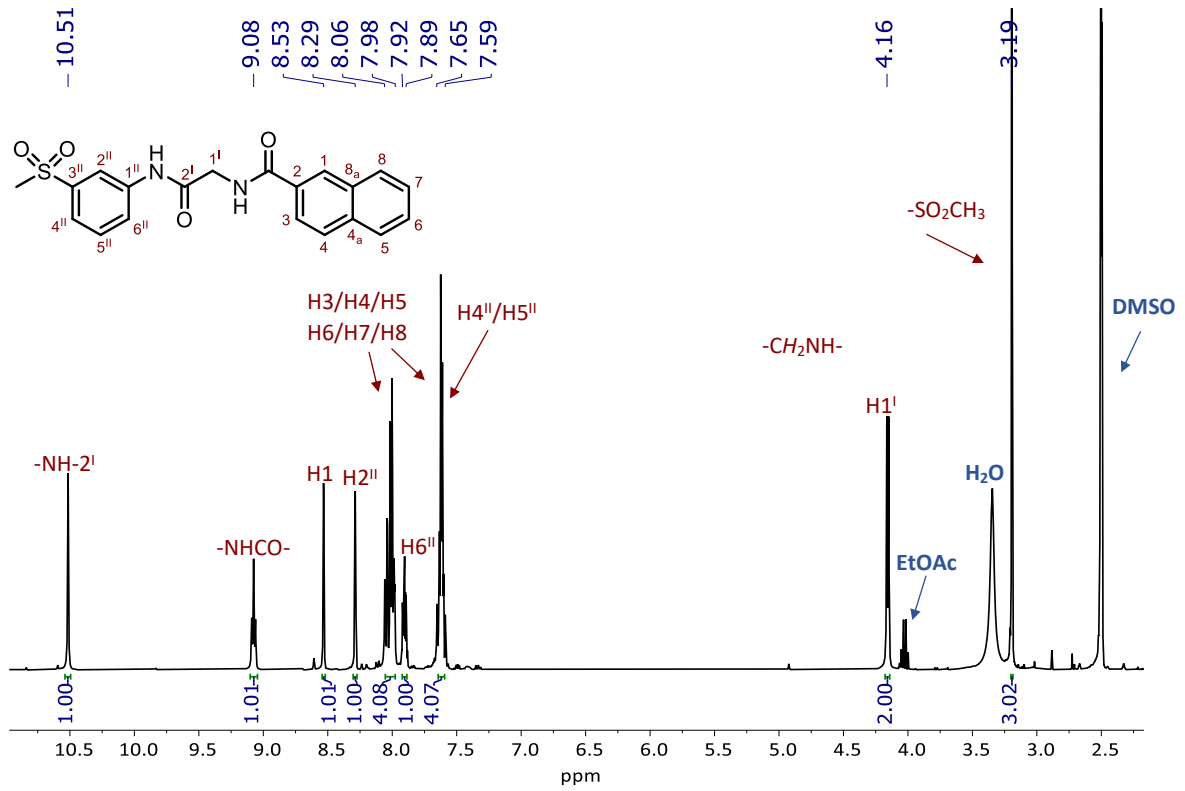


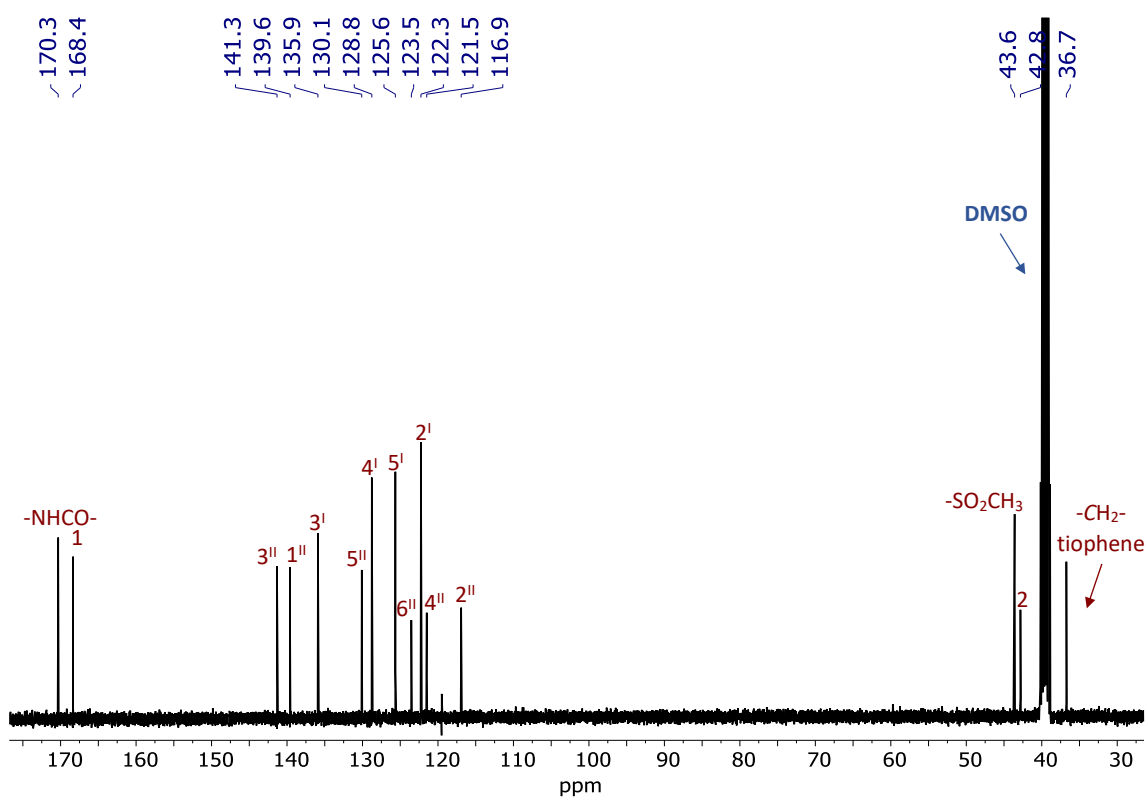
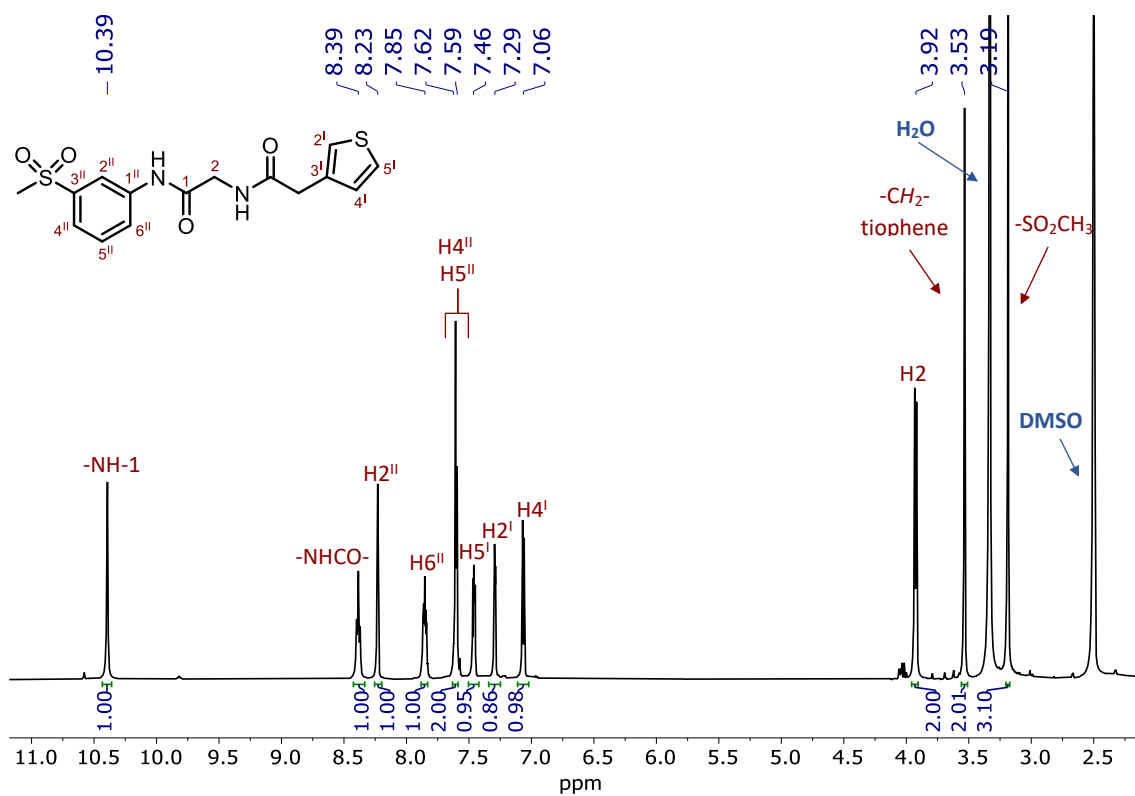


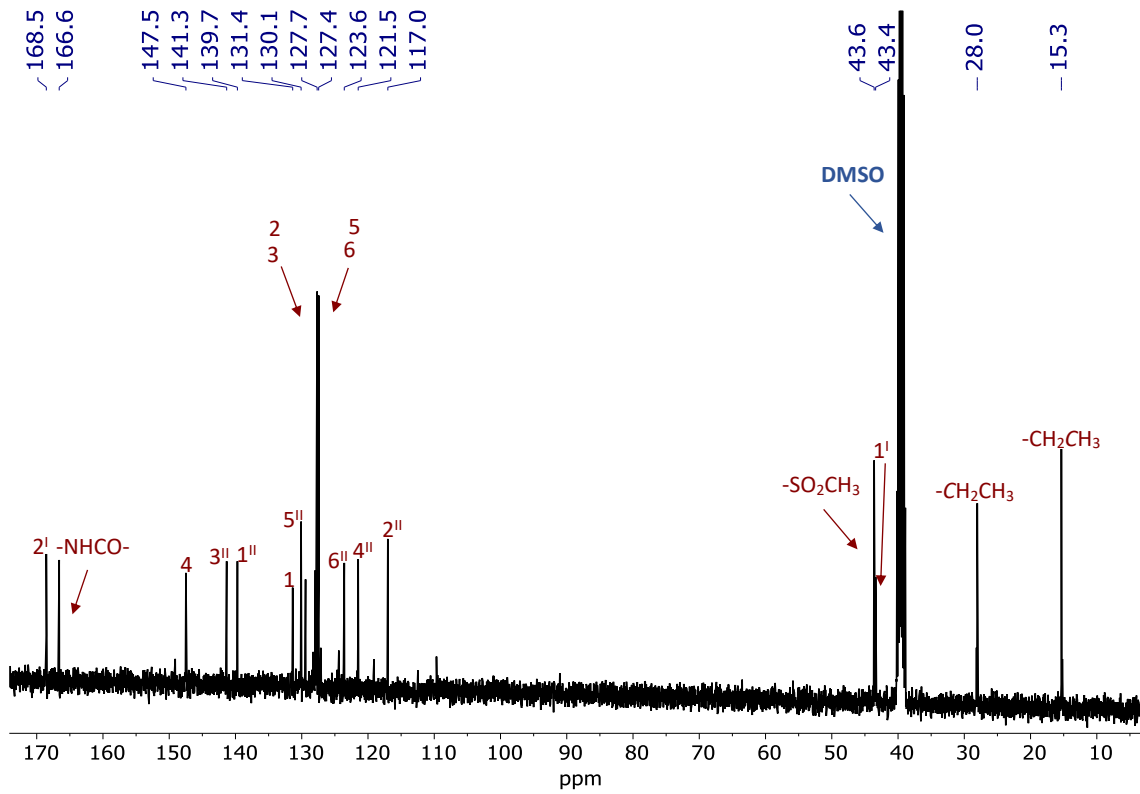
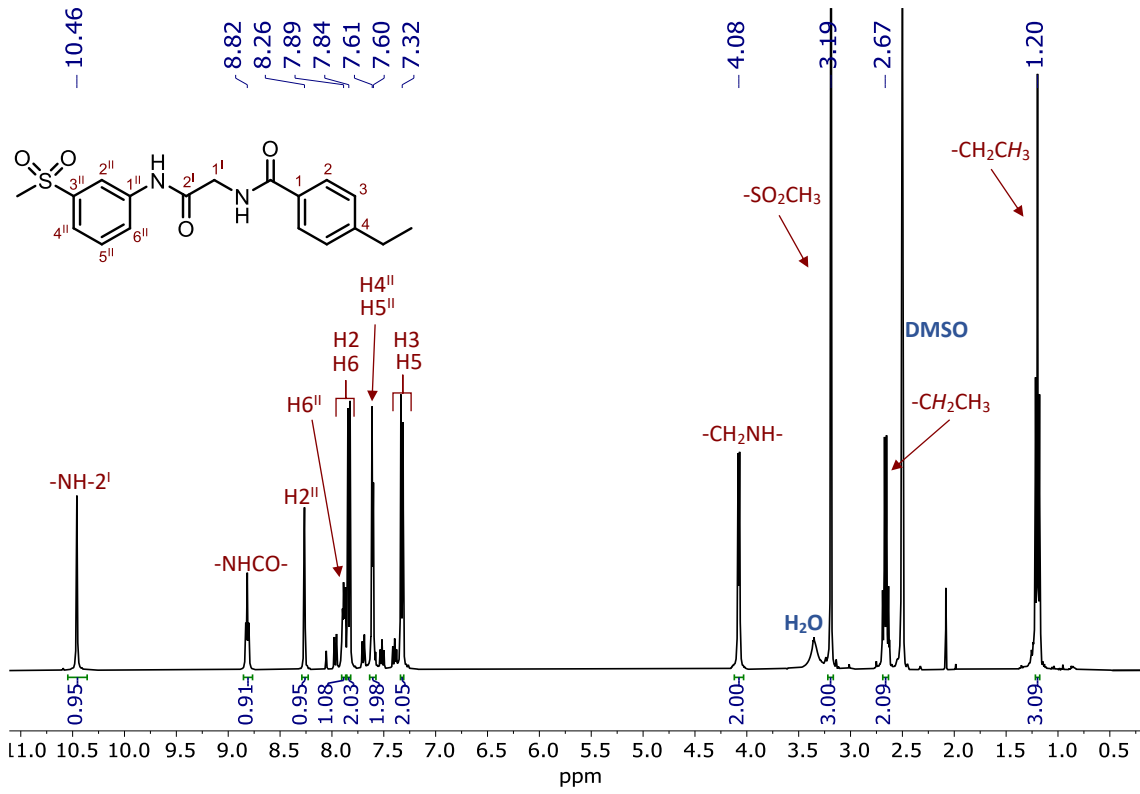


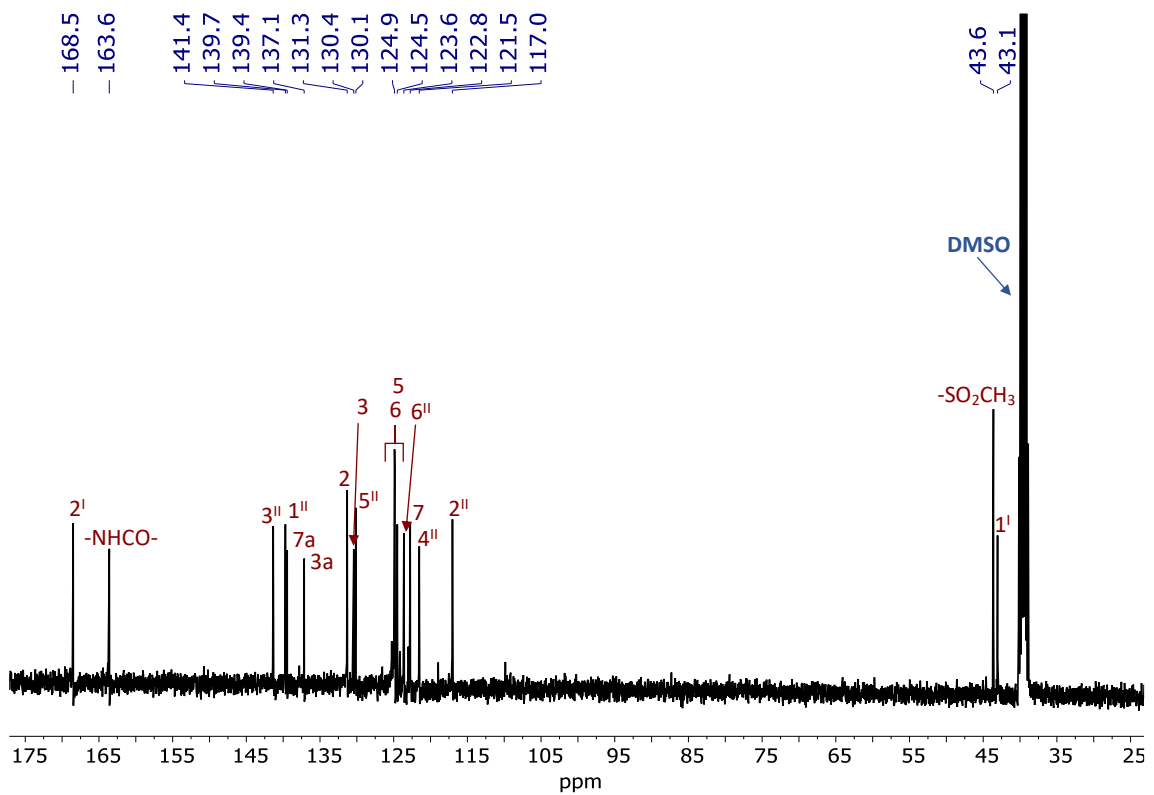
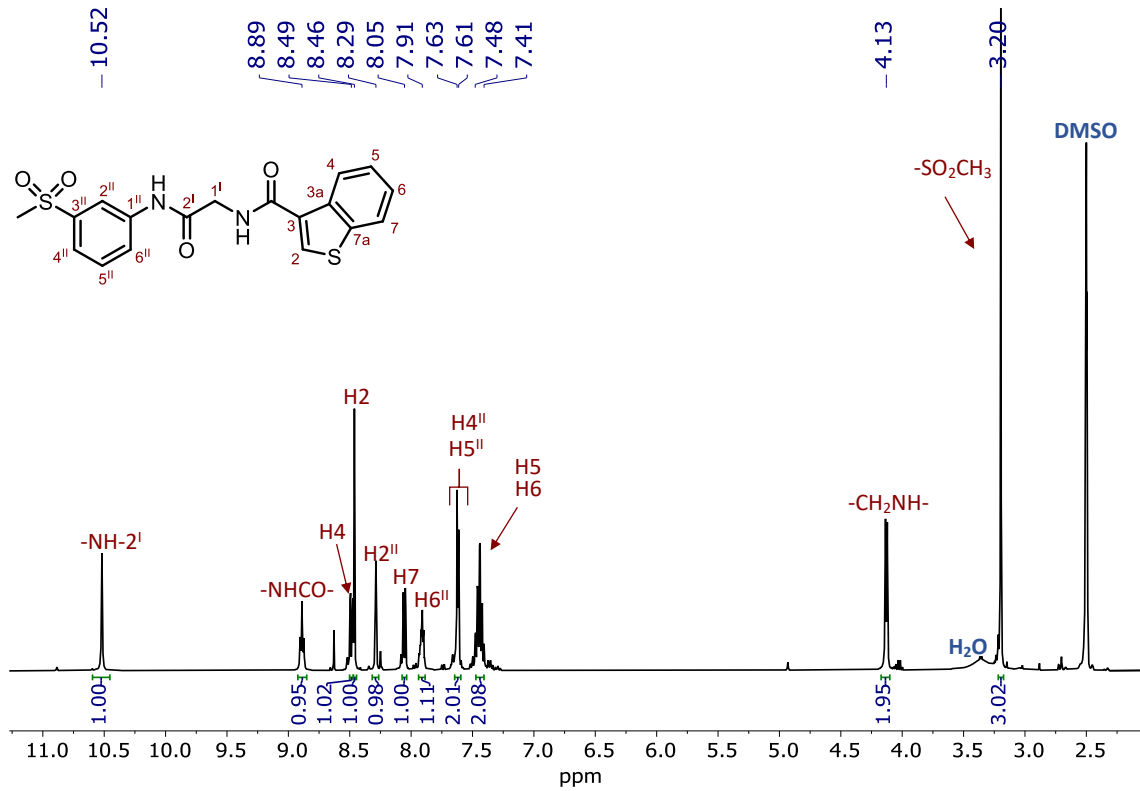


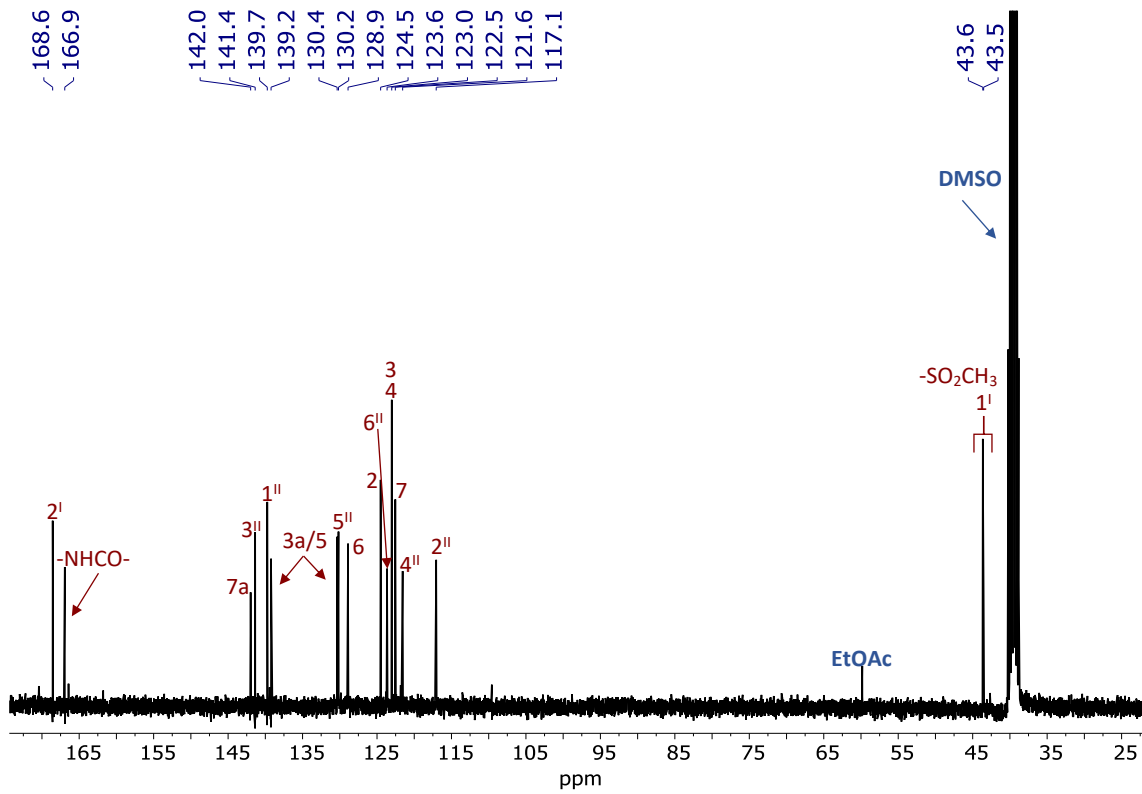
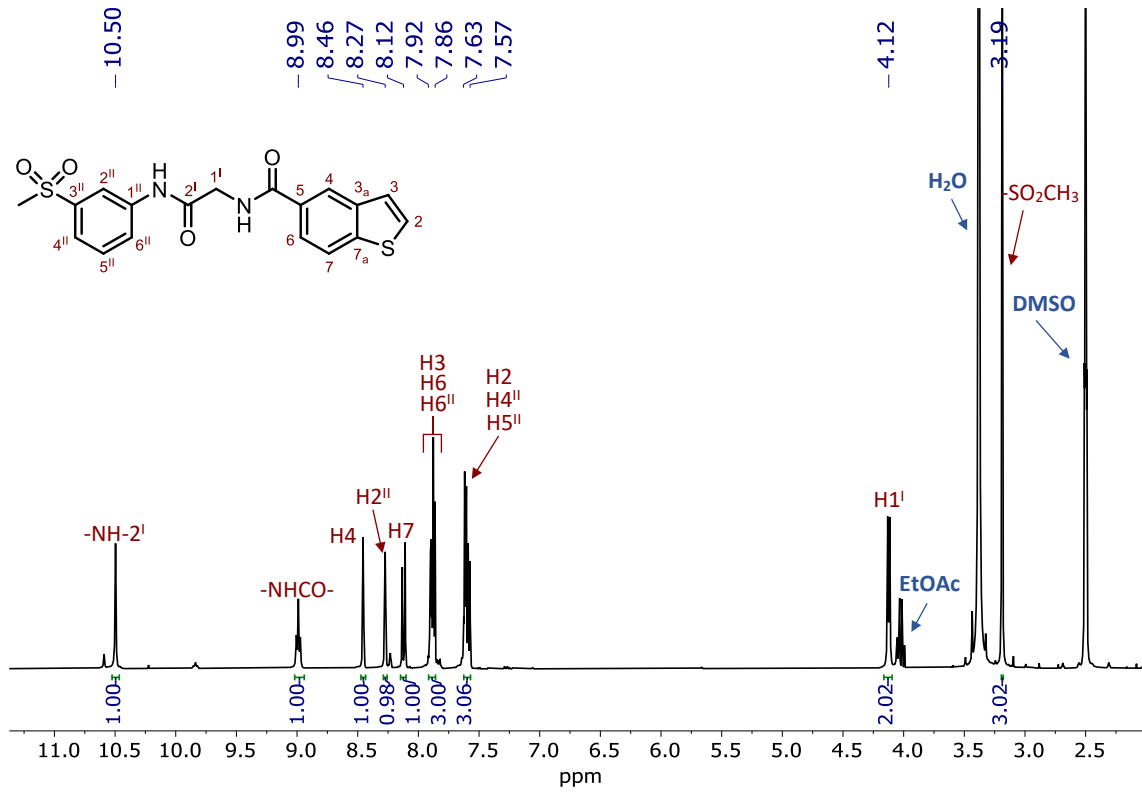


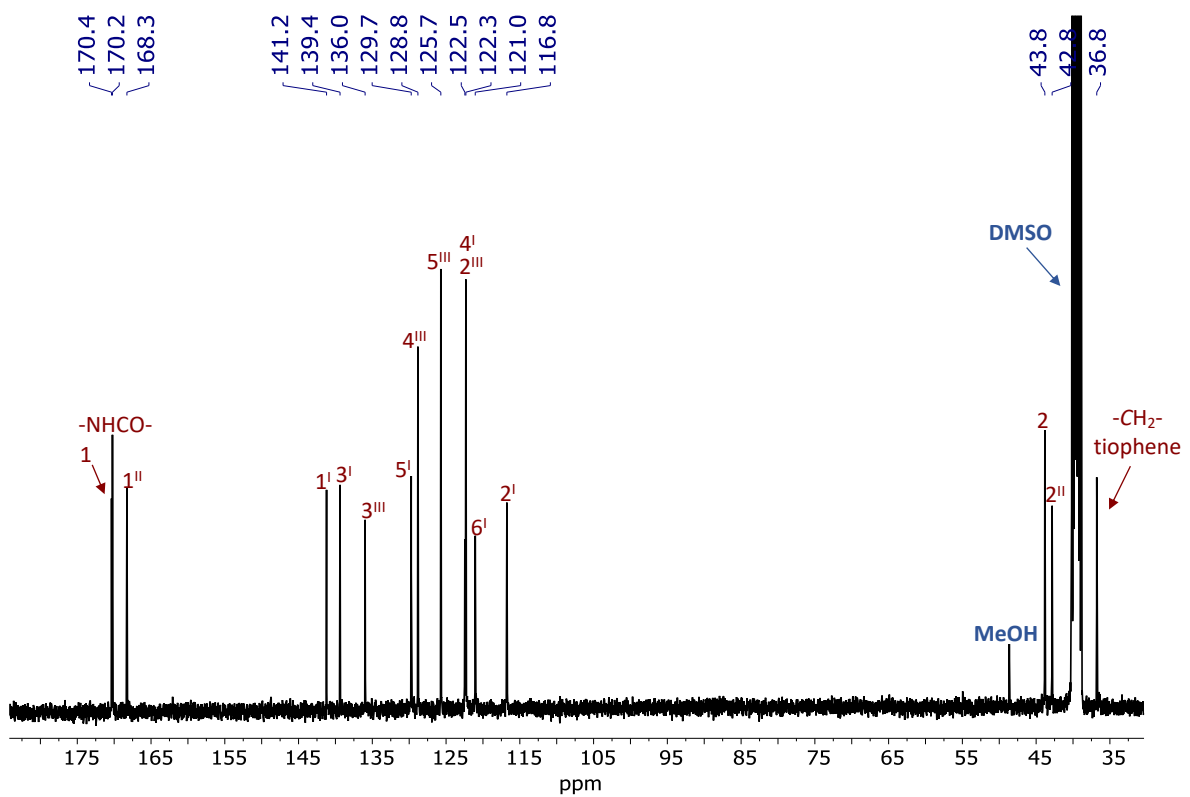
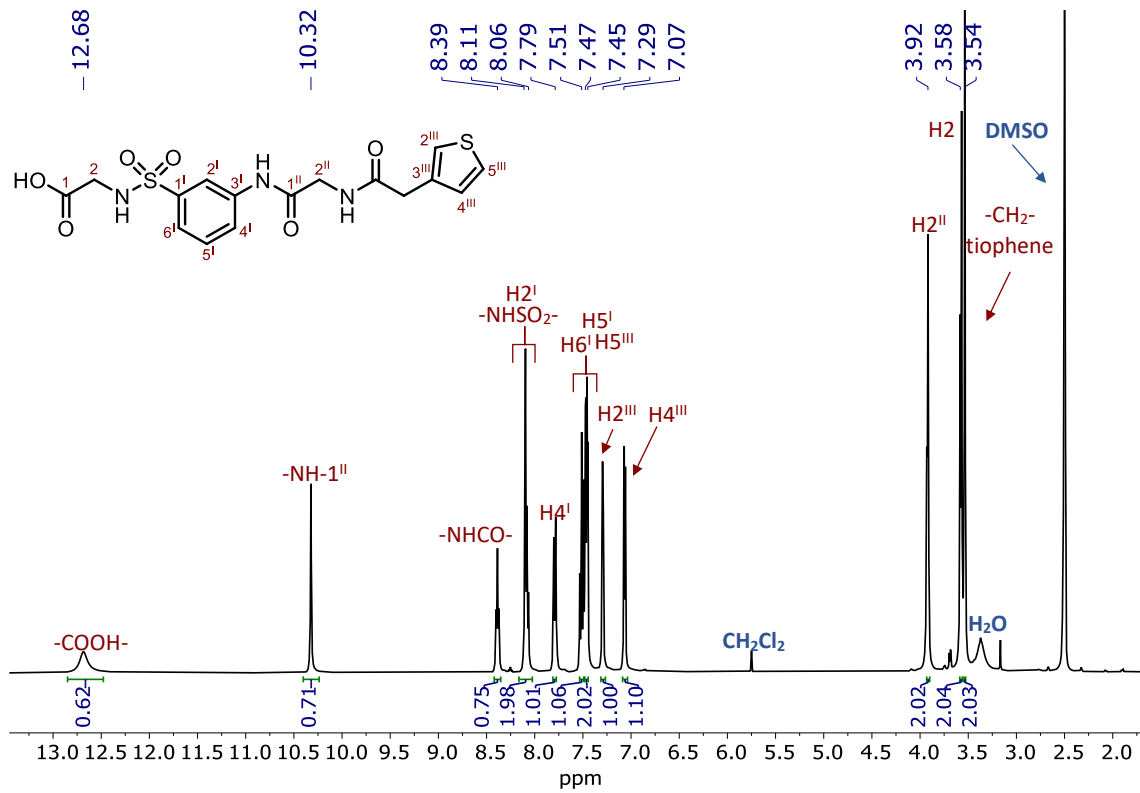


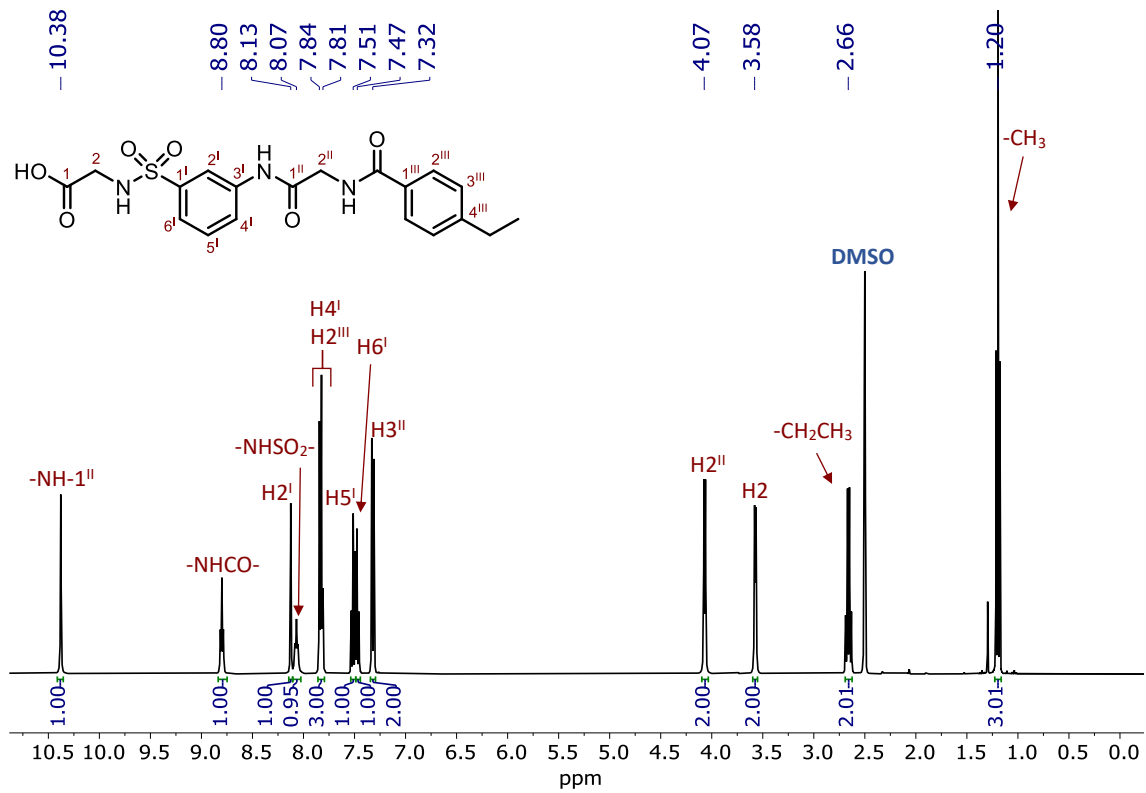




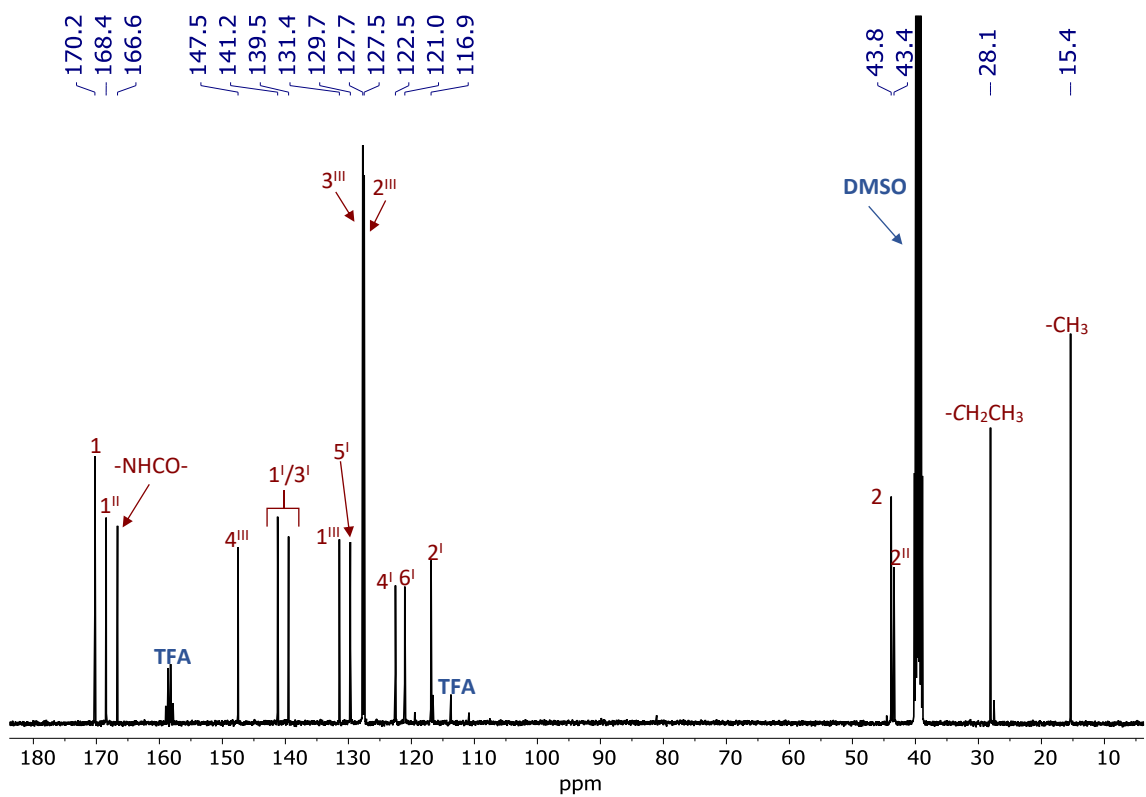




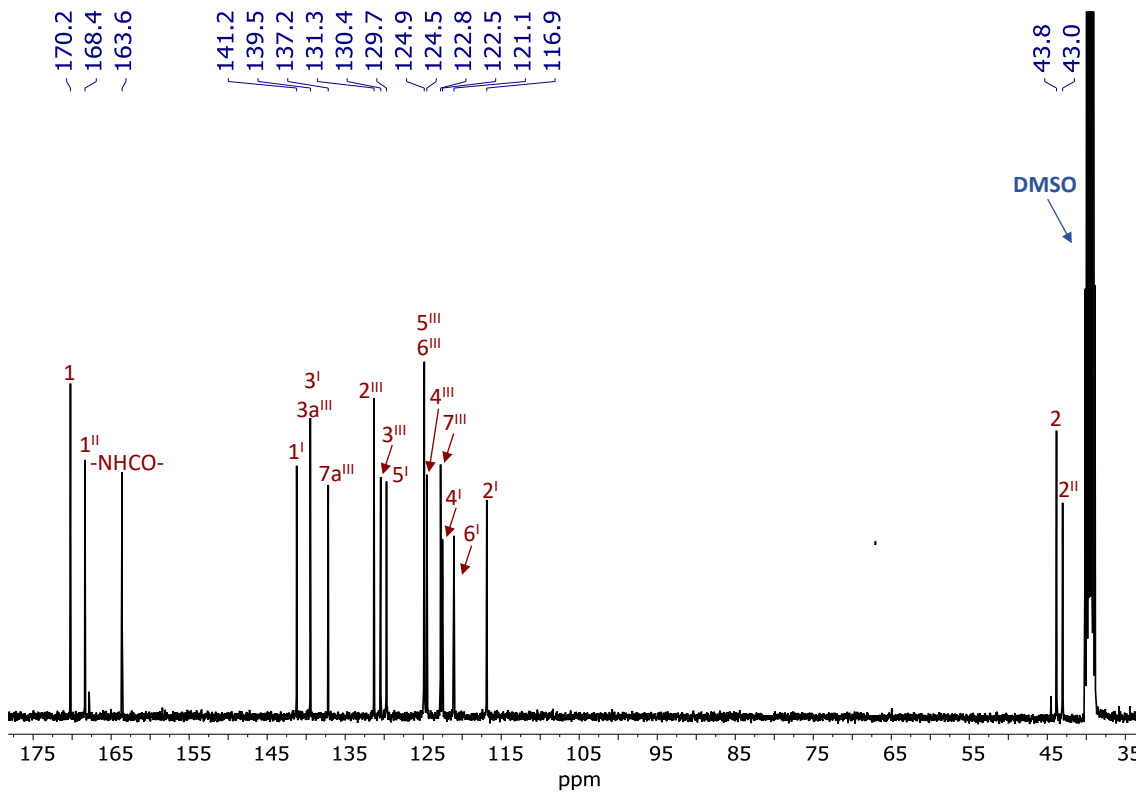
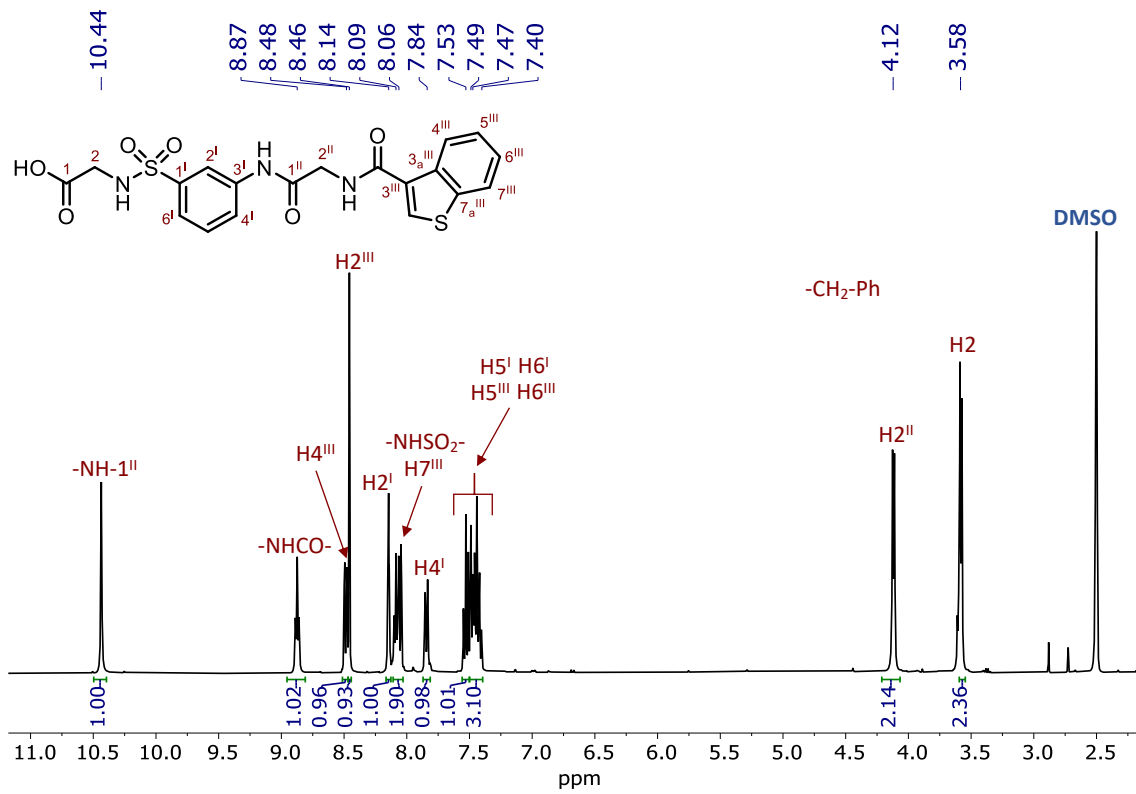


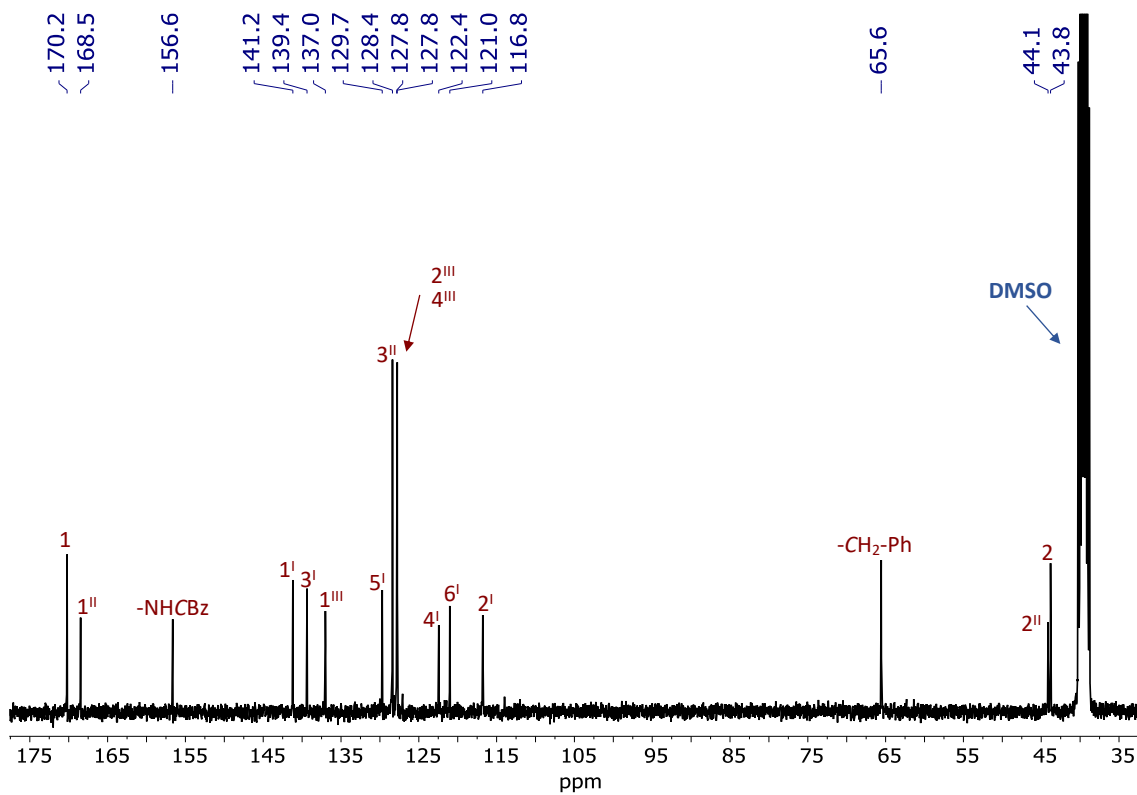
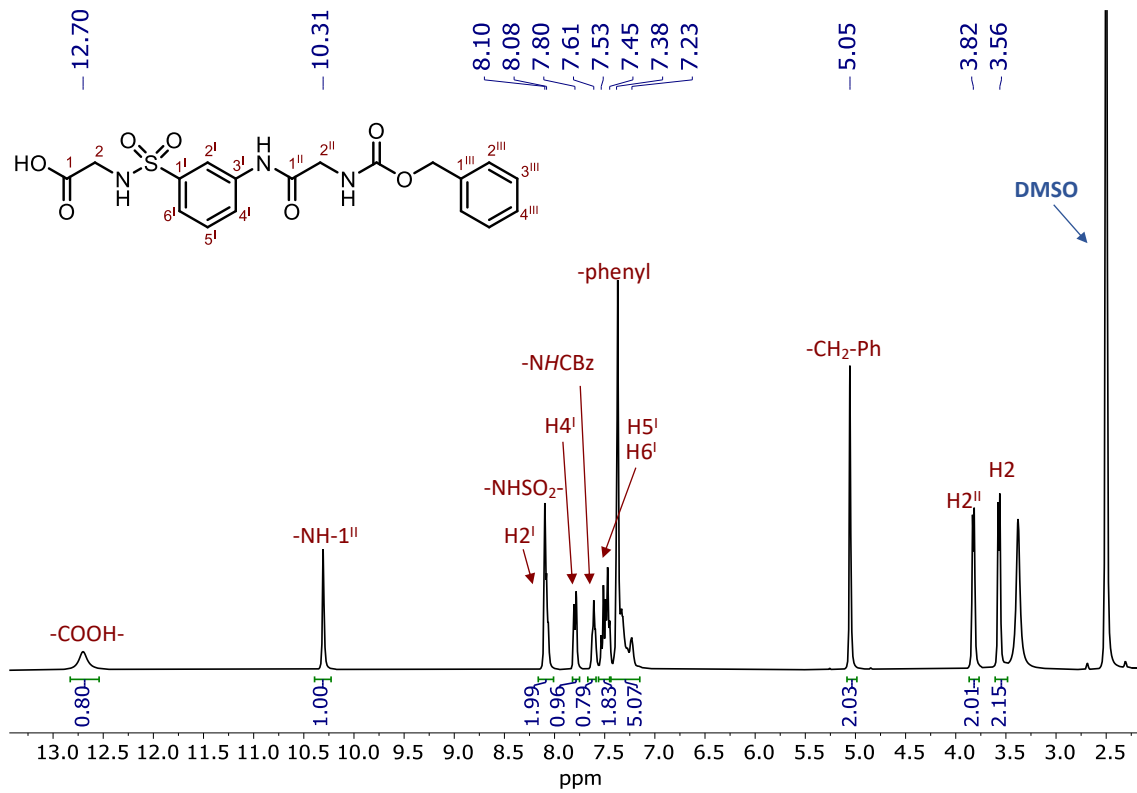


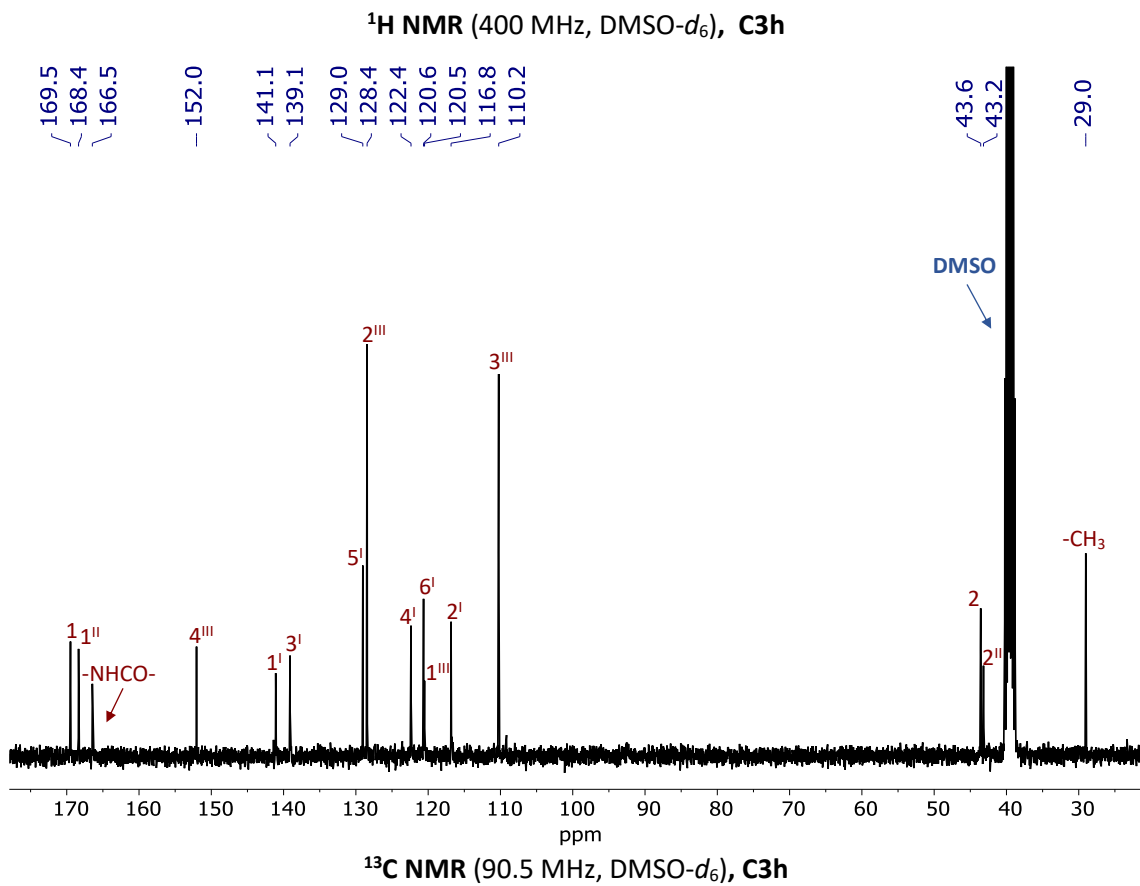
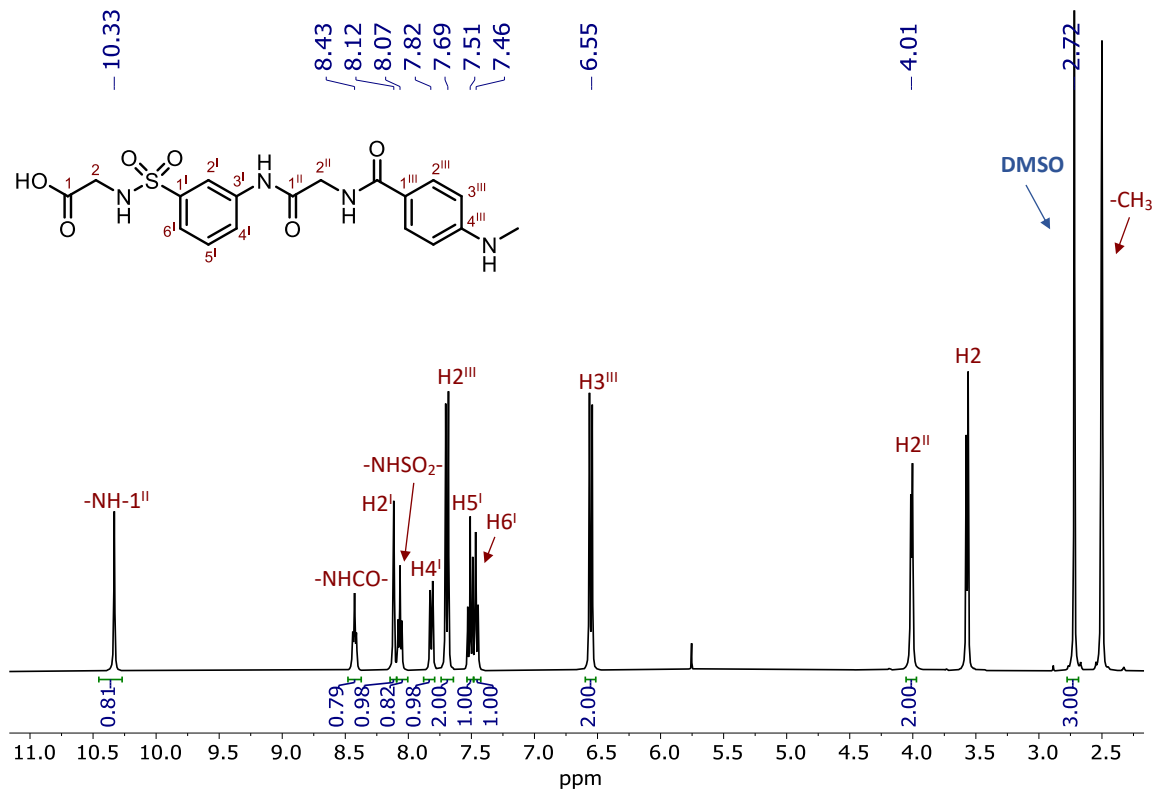
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), C3d

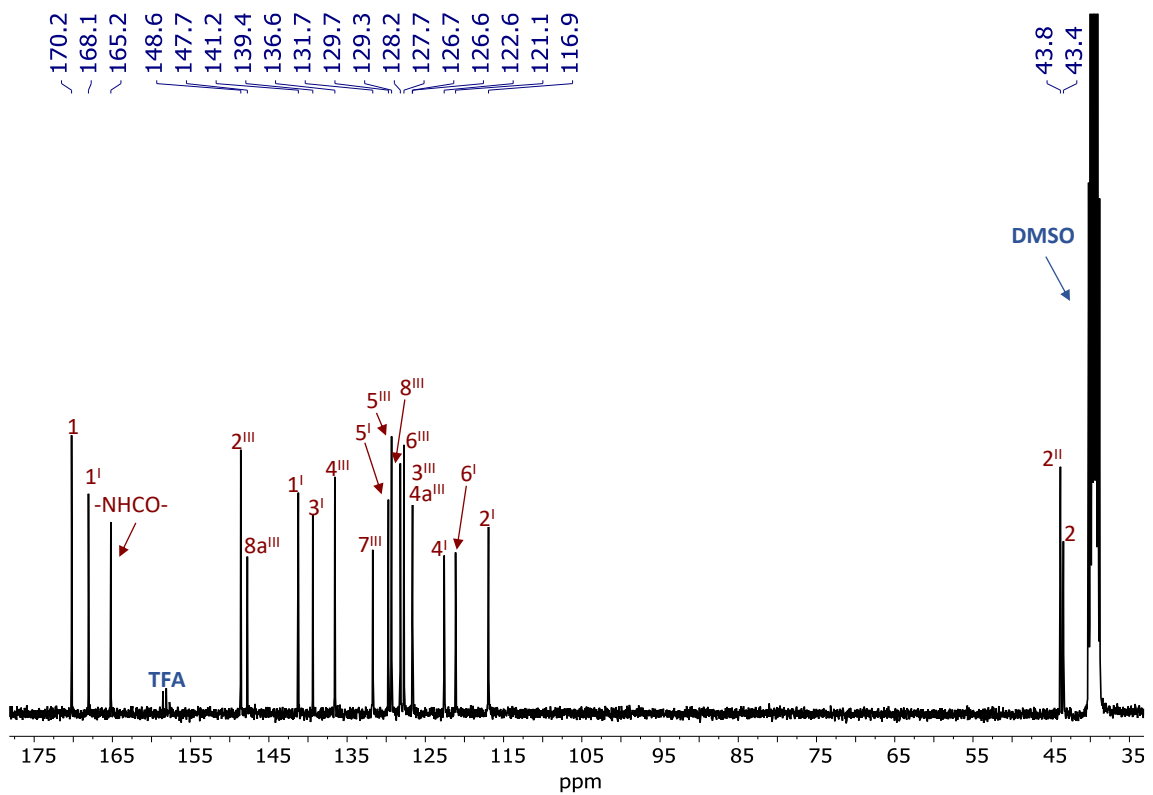
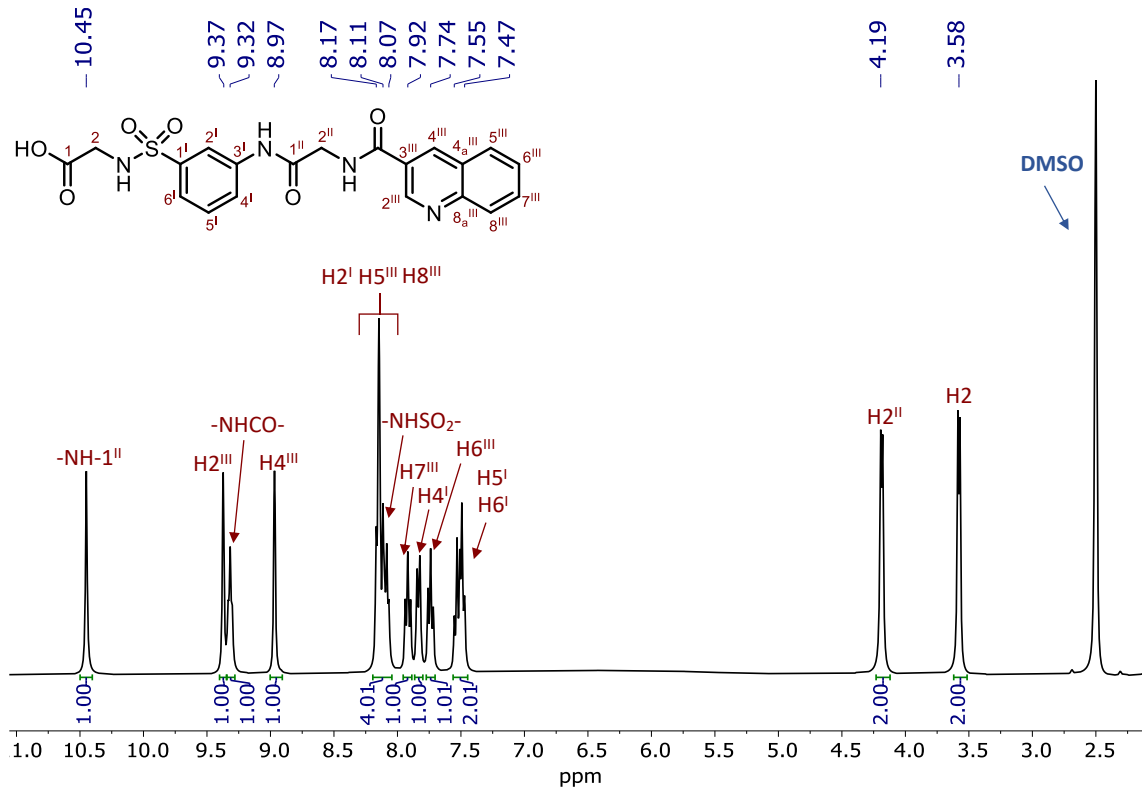


¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆), C3d









VII.III.2. Figuras y tablas del capítulo III

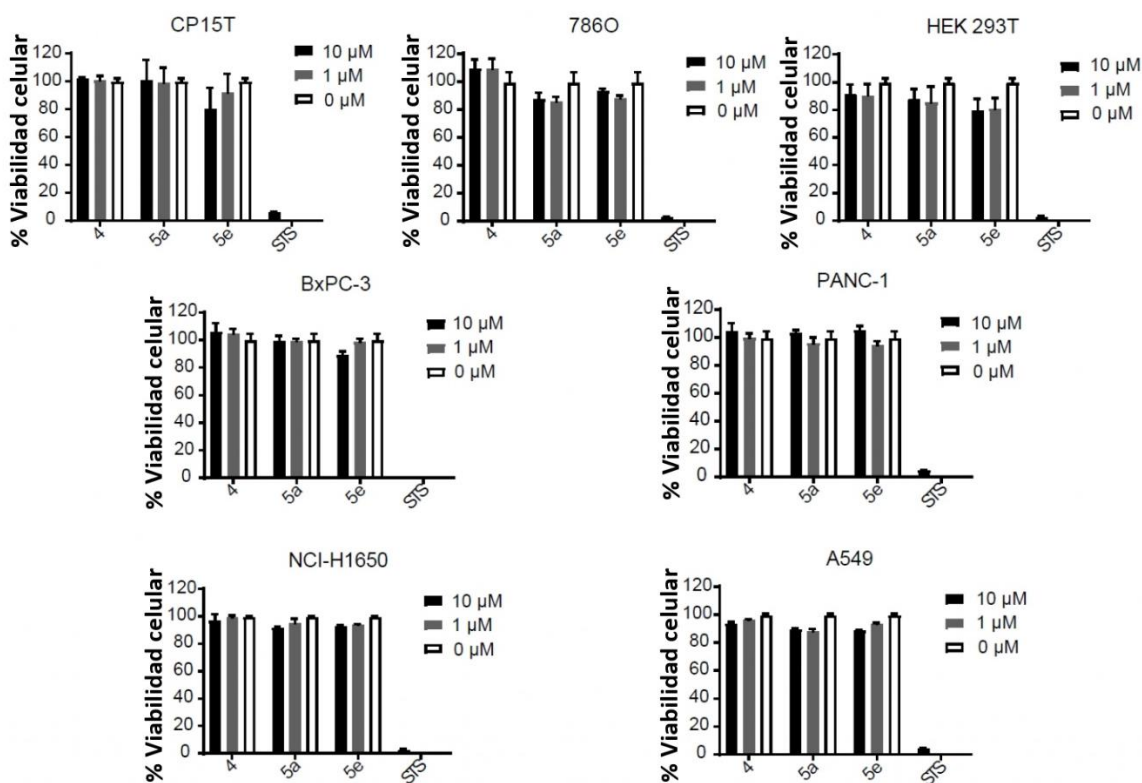


Figura A-III-1. Actividad citotóxica en varias líneas celulares normales y tumorales, humanas y de ratón. Las células se trataron con cada compuesto a 10 y 1 μM durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó utilizando el método de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega). Se usó estaurosporina a 1 μM como control positivo de citotoxicidad. Se consideró que la viabilidad celular en presencia del control era del 100 %. Los datos se dan como media \pm SEM del experimento con triplicados.

Parámetros	Unidades	Estimación 20	Estimación C1a
$t_{1/2}$	h	1.48	0.647
T_{max}	h	0.250	0.500
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	0.0769	32.1
$C_{\text{max_D}}$	$\text{kg} \cdot \mu\text{g/mL/mg}$	0.000769	0.321
AUClast	$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$	0.106	73.3
AUClast_D	$\text{h} \cdot \text{kg} \cdot \mu\text{g/mL/mg}$	0.00106	0.733
AUCINF_obs	$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$	0.108	73.3
AUCINF_D_obs	$\text{h} \cdot \text{kg} \cdot \mu\text{g/mL/mg}$	0.00108	0.733
AUC_%Extrap_obs	%	2.23	0.0215
$V_z_F_obs$	L/kg	1965	1.27
Cl_F_obs	L/h/kg	923	1.36

Tabla A-III-1. Parámetros farmacocinéticos para los compuestos **24a** y **23**.

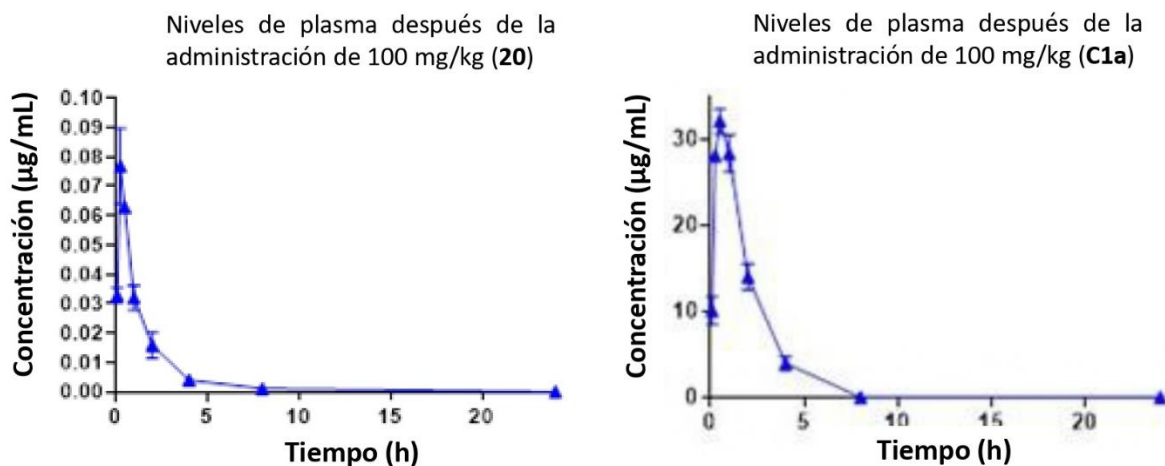
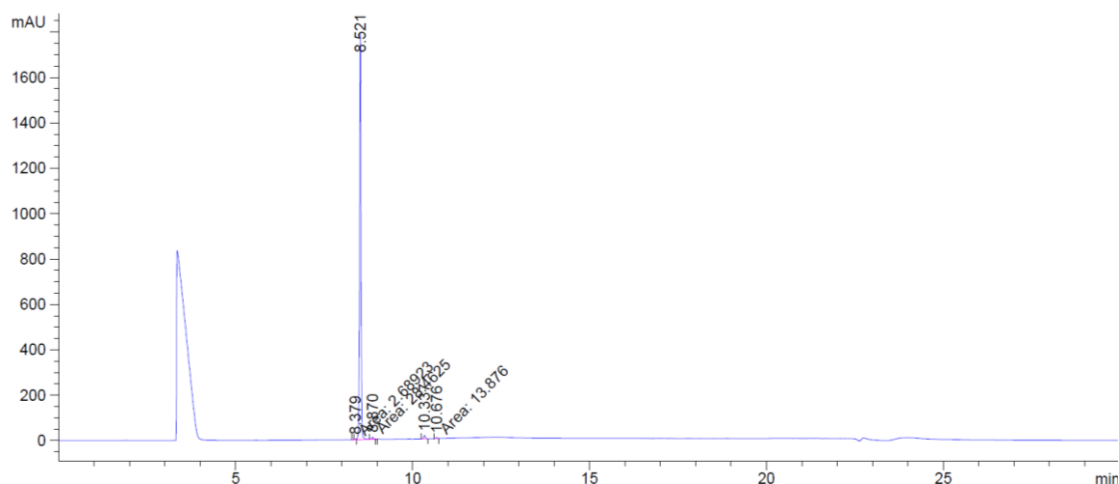


Figura A-III-2. Curva de concentración plasmática-tiempo de los compuestos **C1a** y **20** en plasma de ratón después de la administración intraperitoneal de los compuestos a una dosis de 100 mg/kg (n = 3).

VII.III.3. Espectros de HPLC de los compuestos finales **C1a** y **C1e**

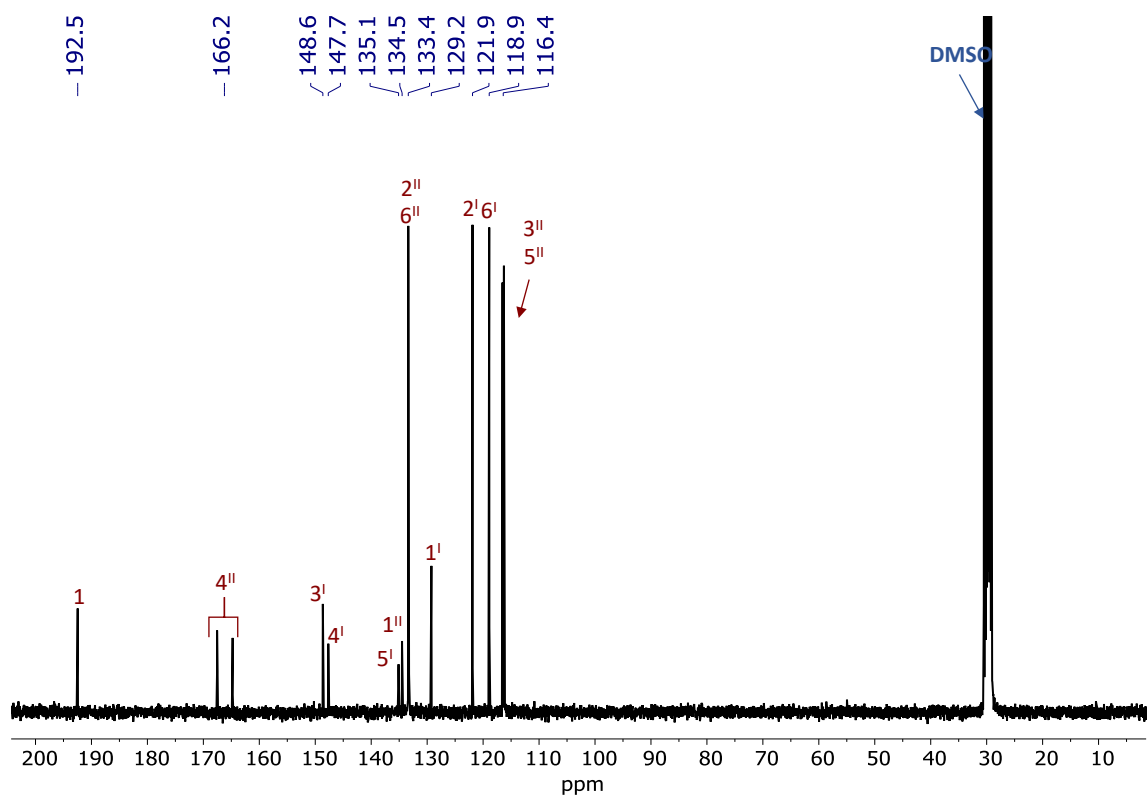
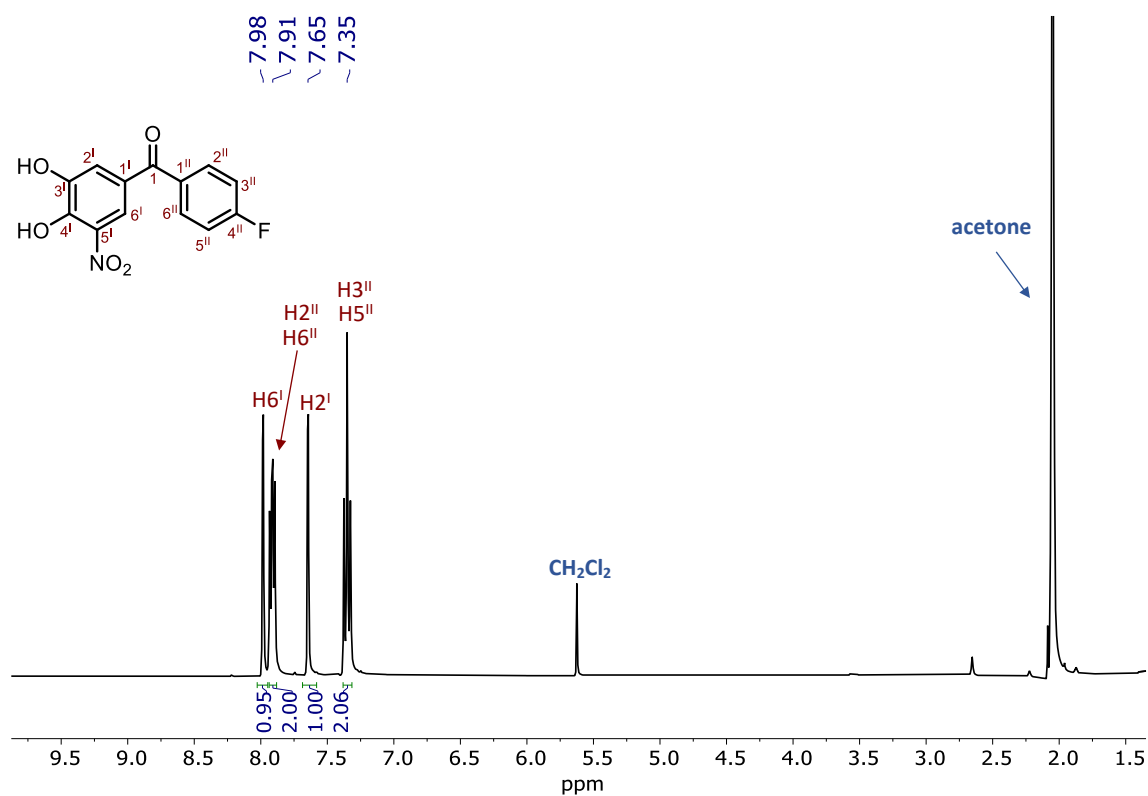
El análisis de HPLC de todos los compuestos finales se realizó en un aparato de HPLC Agilent-1200 con una bomba binaria y un detector de matriz de fotodiodos (DAD), utilizando una columna Phenomenex Luna Omega C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm). La elución en gradiente a una velocidad de flujo de 1 ml/min se realizó mezclando HCOOH al 0.1% en agua/HCOOH al 0.1 % en CH₃CN.

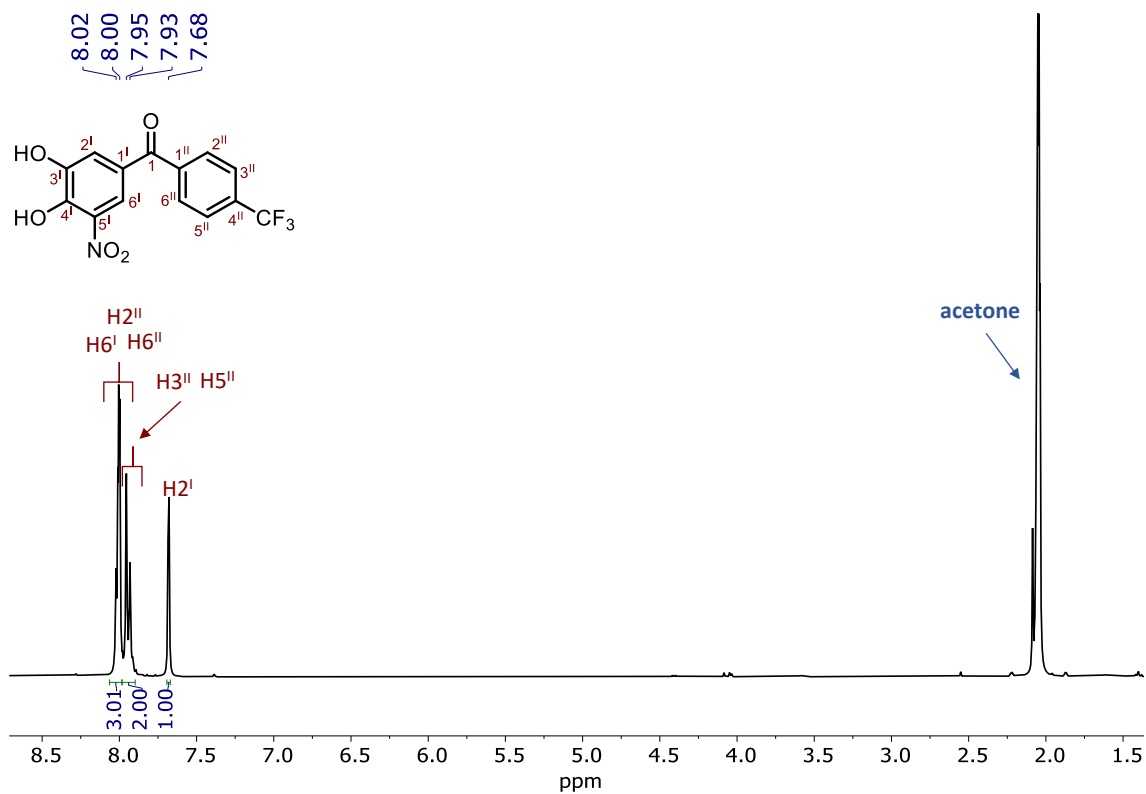
Compuesto **C1a**



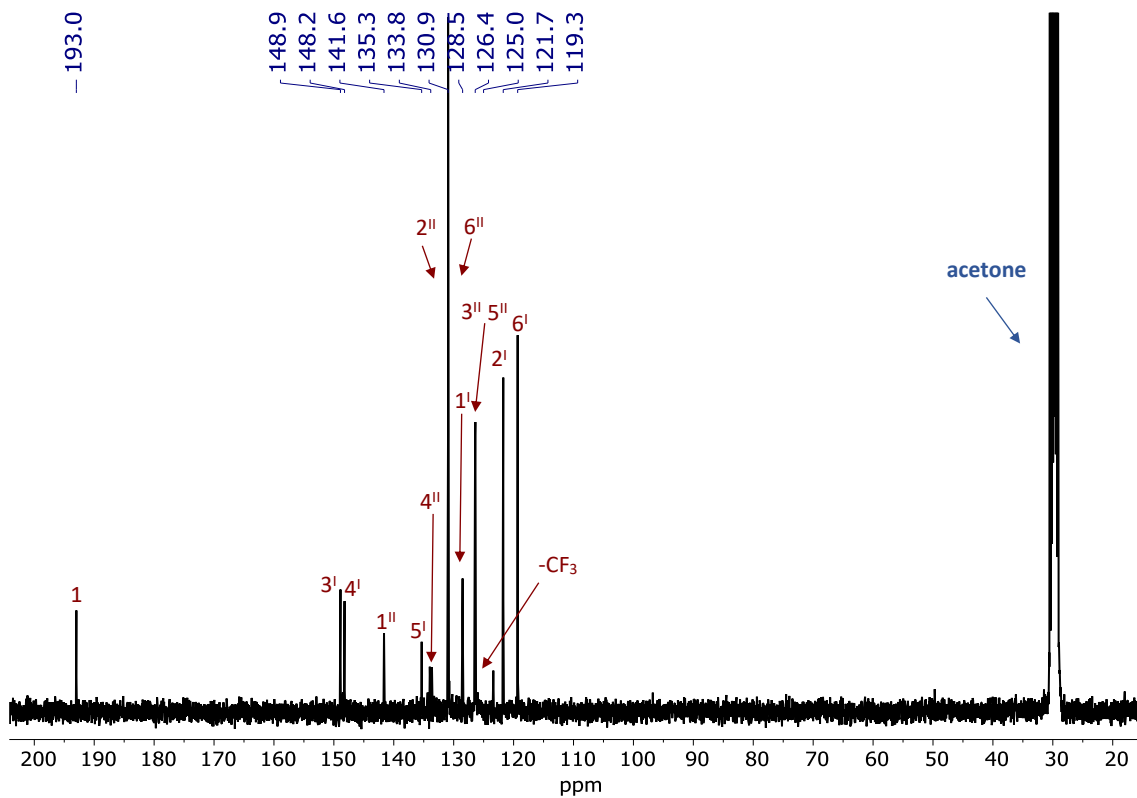
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.379	MM T	0.0337	2.68923	1.32952	0.0517
2	8.521	MM R	0.0475	5110.08105	1791.83691	98.2726
3	8.870	MM T	0.0510	28.46254	9.30061	0.5474
4	10.337	BB	0.0454	44.79670	15.19228	0.8615
5	10.676	MM	0.0436	13.87599	5.30132	0.2669

Totals : 5199.90552 1822.96064

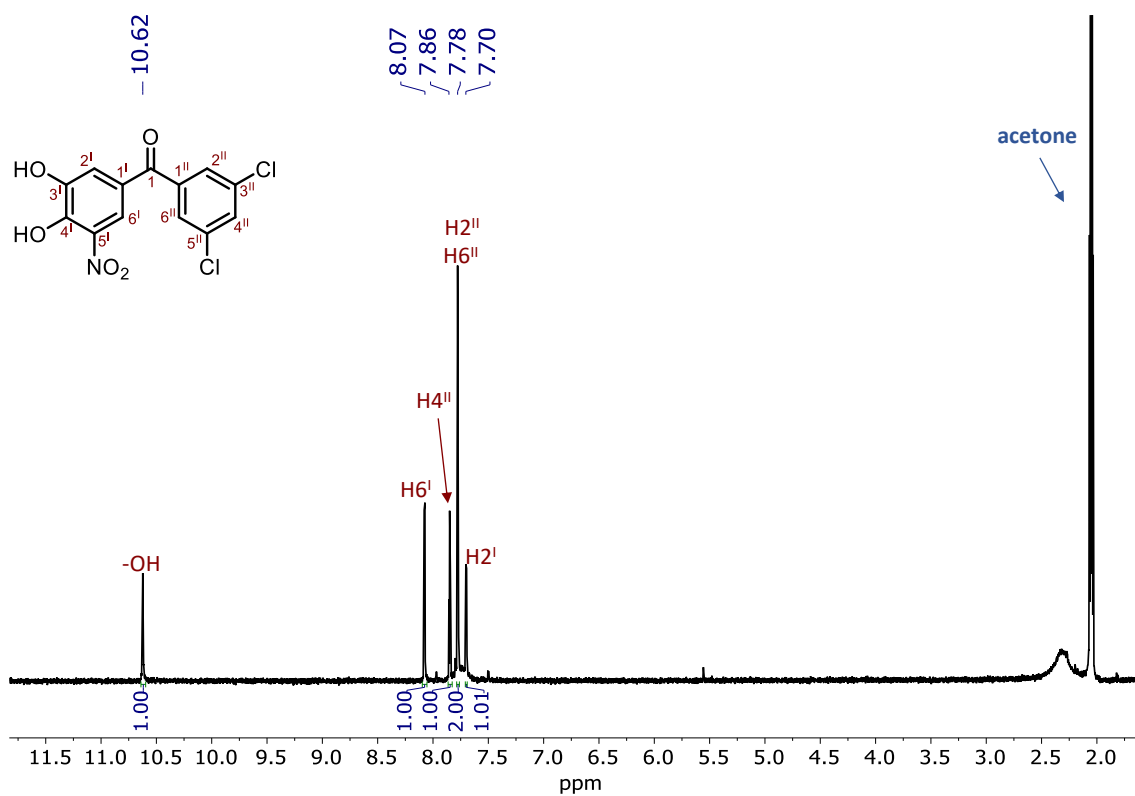
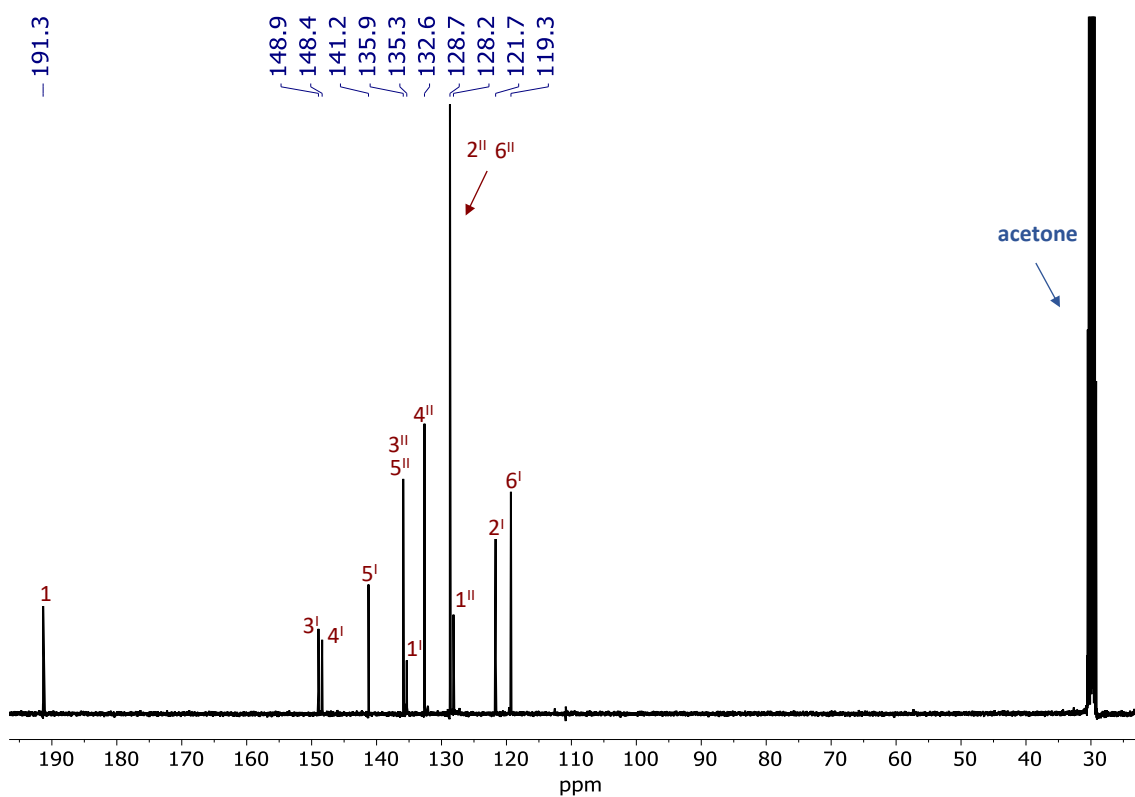
VII.IV.1 Espectros de ^1H y ^{13}C los compuestos finales del capítulo IV

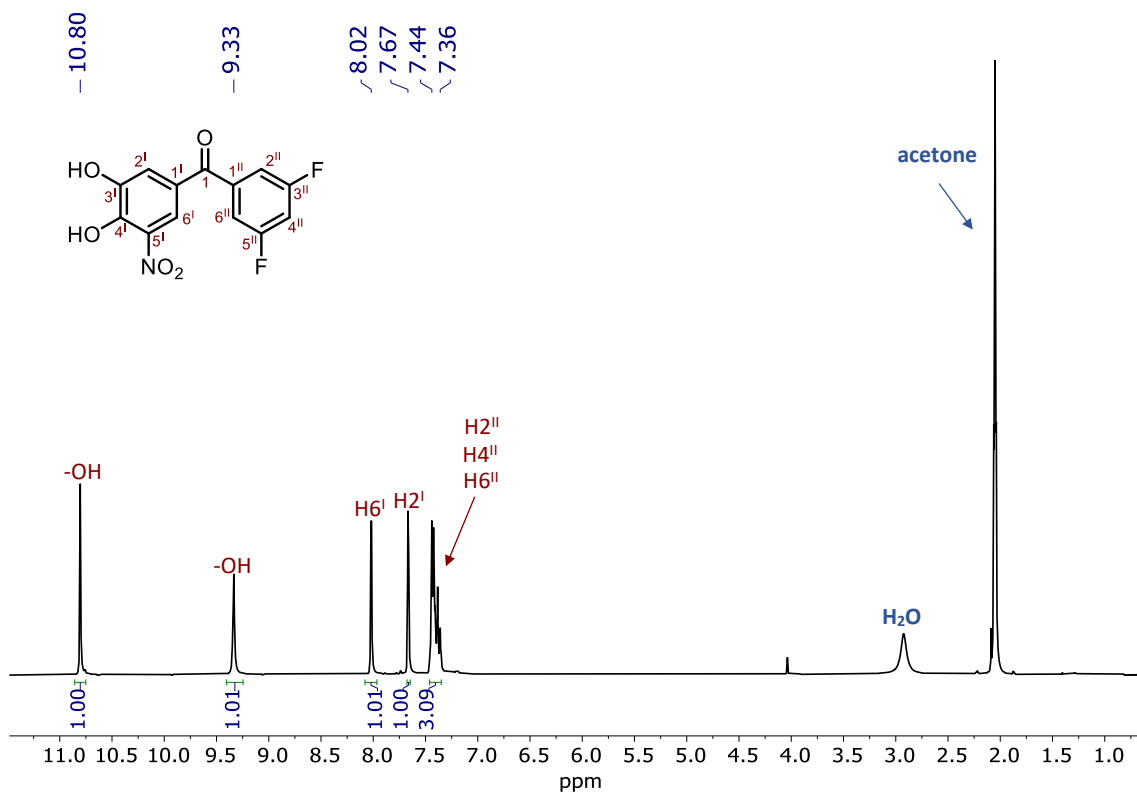


¹H NMR (360 MHz, acetone-*d*₆), TES1b

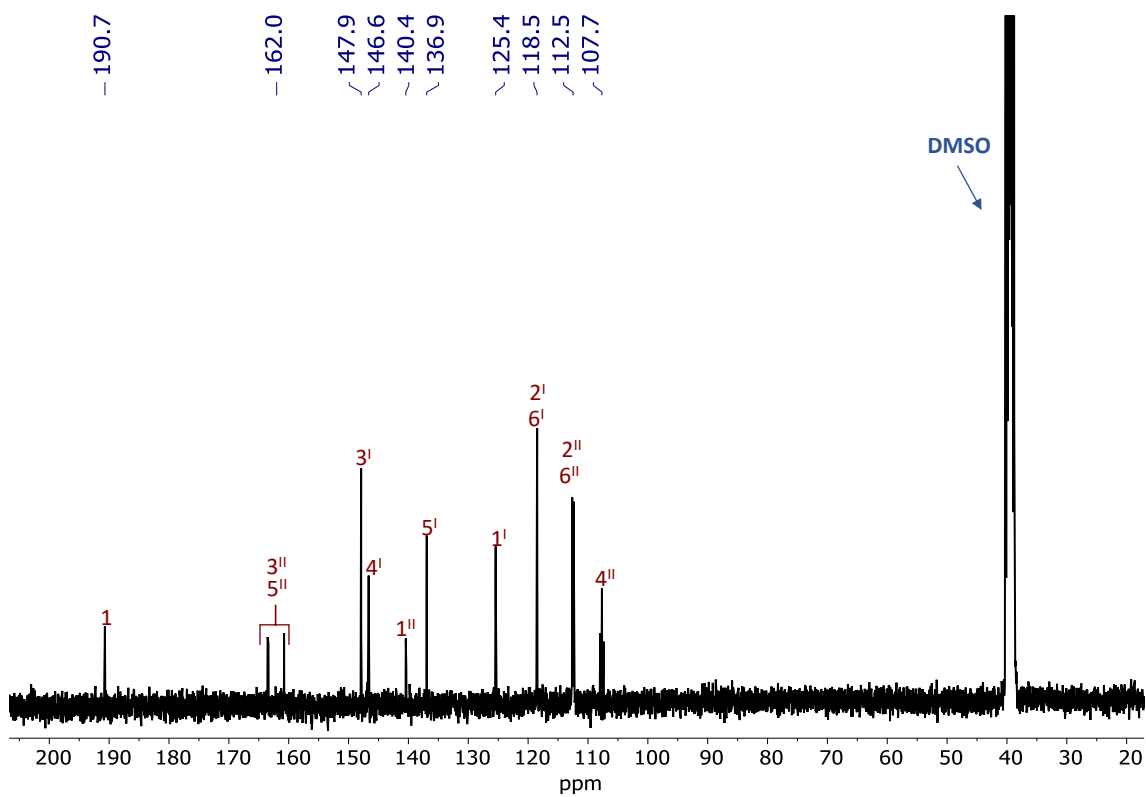


¹³C NMR (90.5 MHz, acetone-*d*₆), TES1b

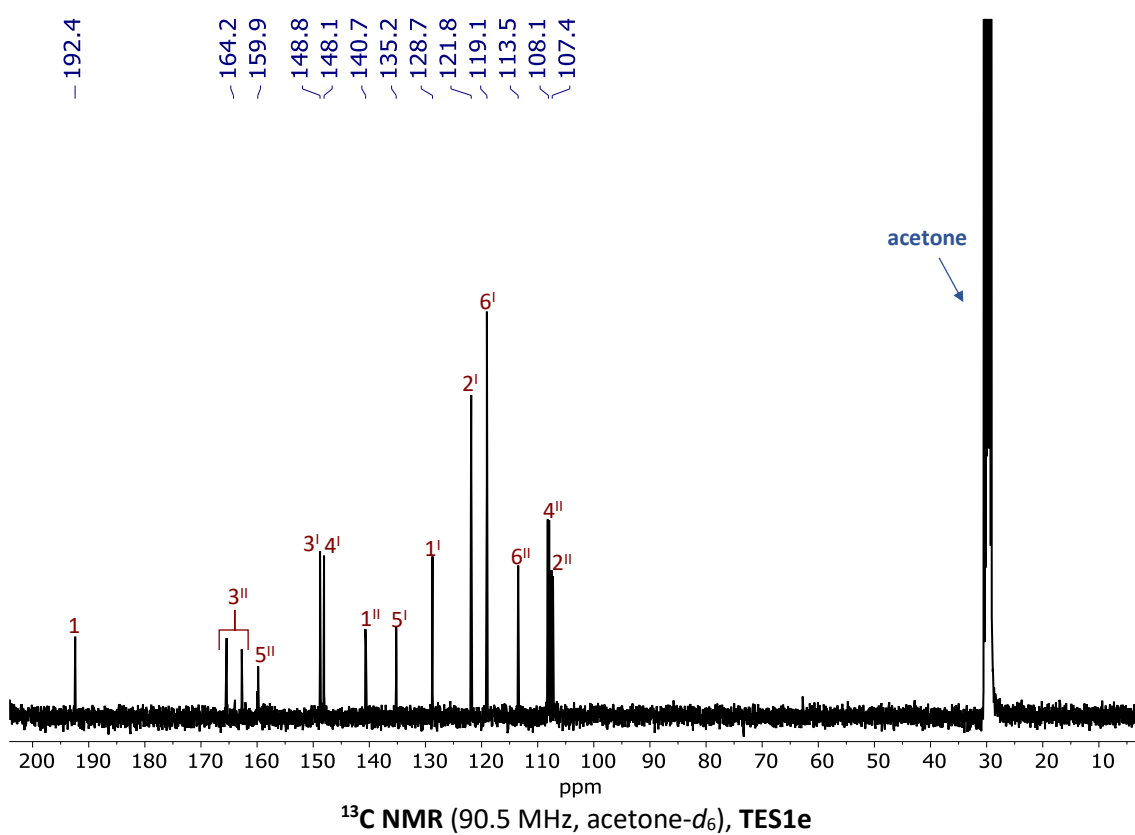
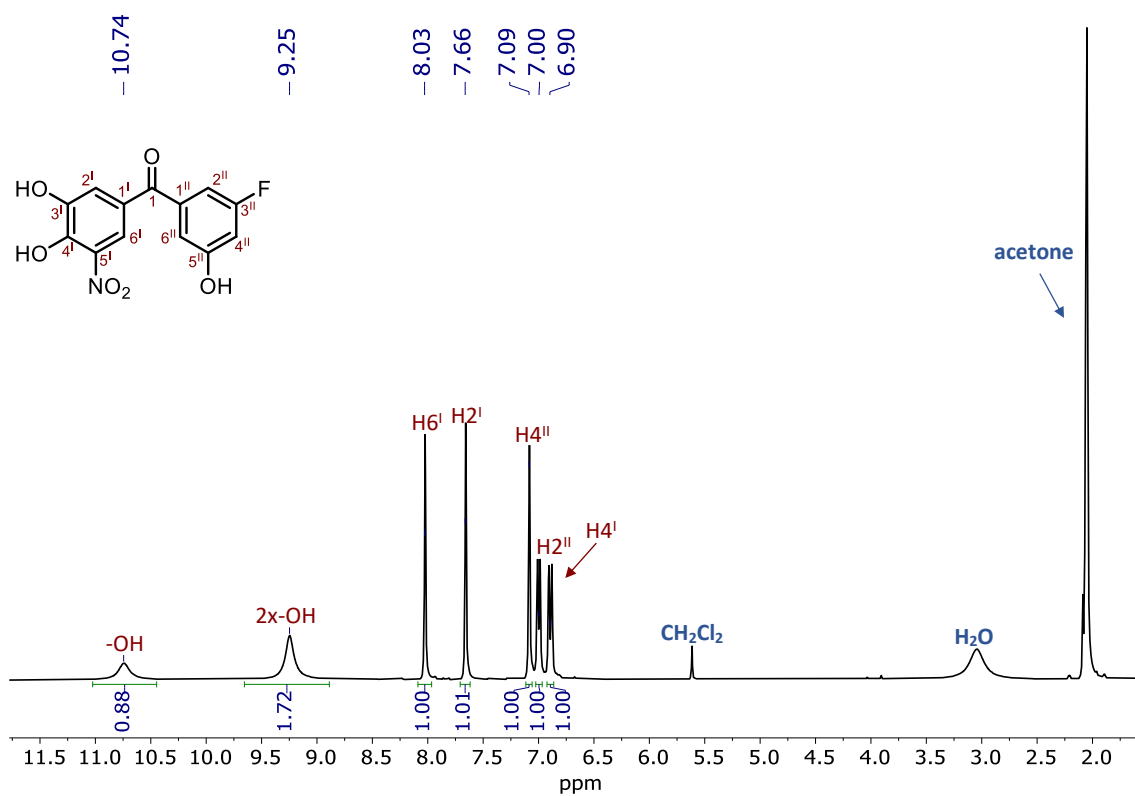
 ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6), TES1c ^{13}C NMR (100.6 MHz, acetone- d_6), TES1c

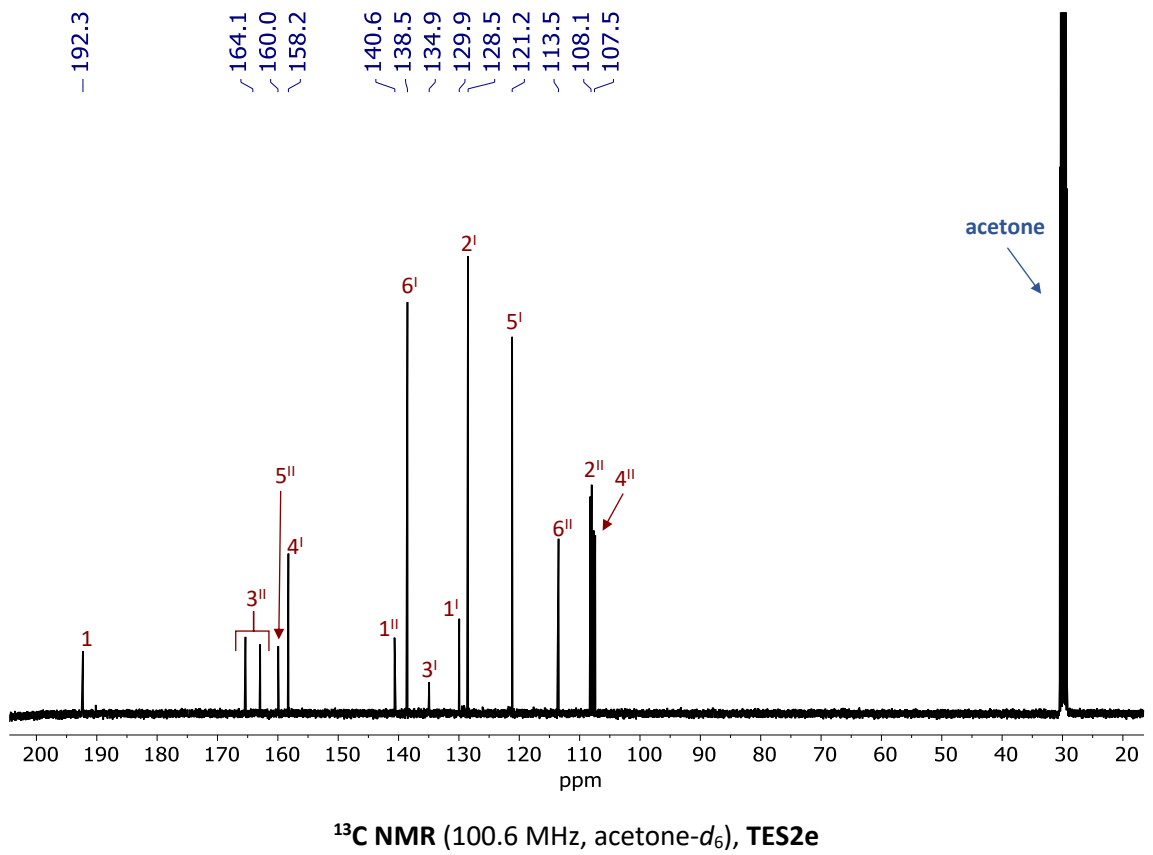
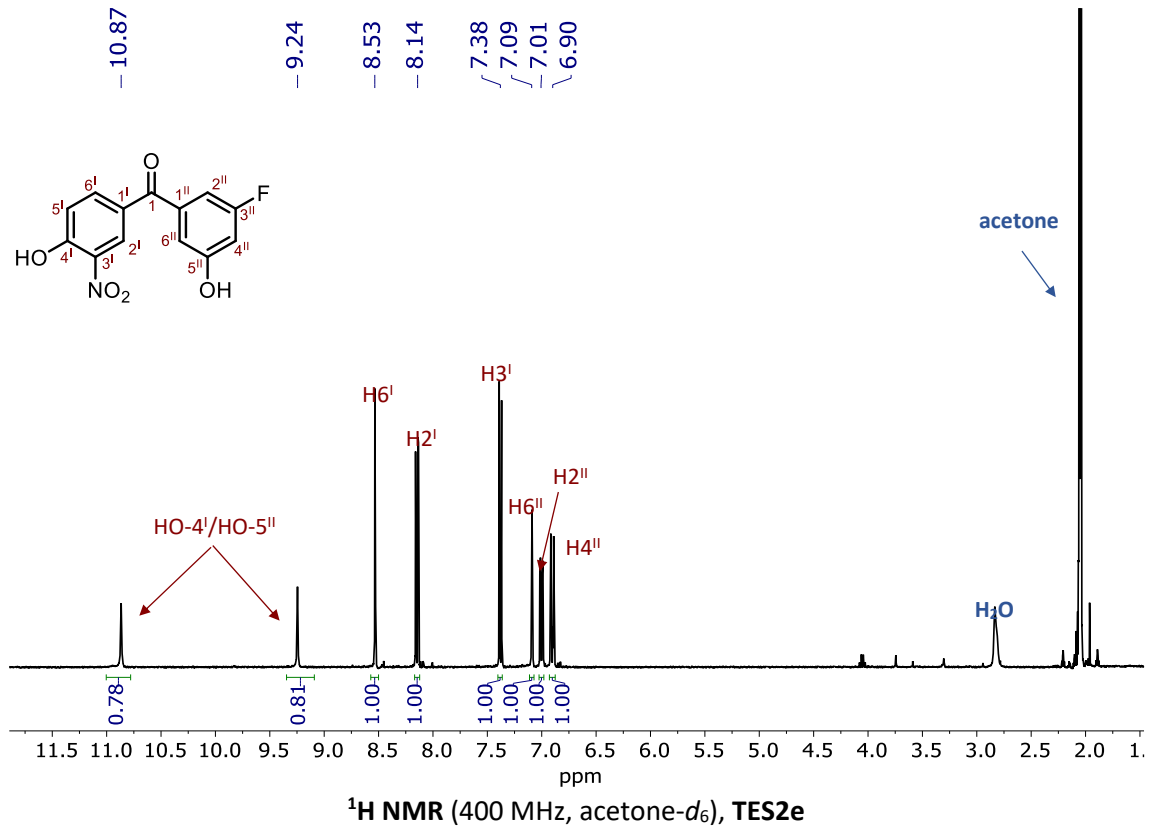


¹H NMR (360 MHz, acetone-*d*₆), TES1d



¹³C NMR (90.5 MHz, DMSO-*d*₆), TES1d





VII.IV.2 Figuras del capítulo IV

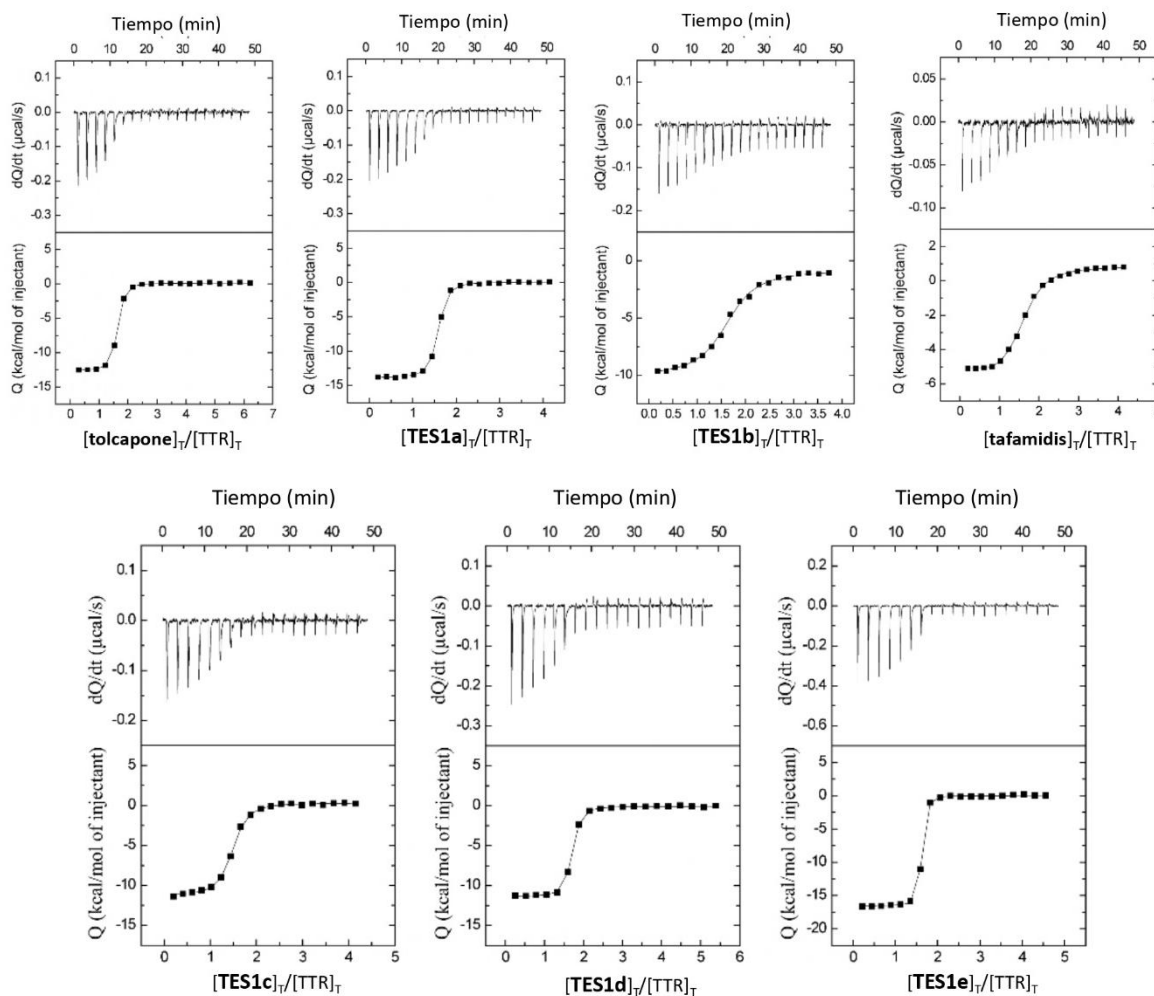


Figura A-IV-2. Interacciones de la WT-TTR con el tolcapone, tafamidis, **TES1b**, **TES1a**, **TES1c**, **TES1** y **TES1e** según la evaluación por ITC. Los paneles superiores representan los datos sin procesar (termograma), mientras que los paneles inferiores corresponden a los cambios de calor integrados tras la unión representados frente a la relación de concentración de ligando/TTR (isoterma de unión). La línea continua representa el mejor ajuste según un modelo de unión de las dos cavidades (con o sin cooperatividad) para cada compuesto.

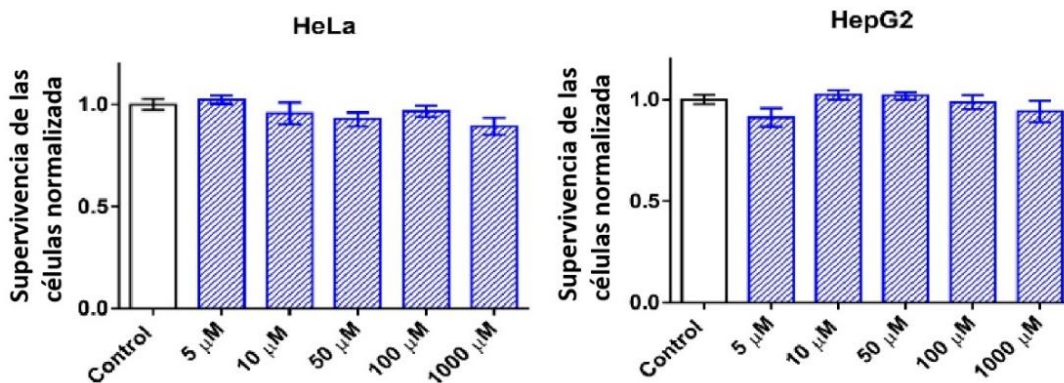


Figura A-IV-2. Estudio de citotoxicidad en células HeLa y HepG2 expuestas a concentraciones crecientes de **TES1e** (azul). Los valores están normalizados respecto a la media de las células control y representan la media \pm SEM (n = 3).

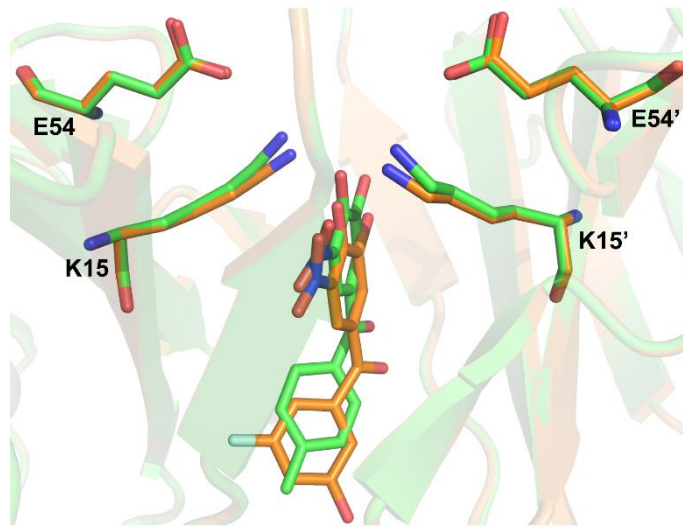
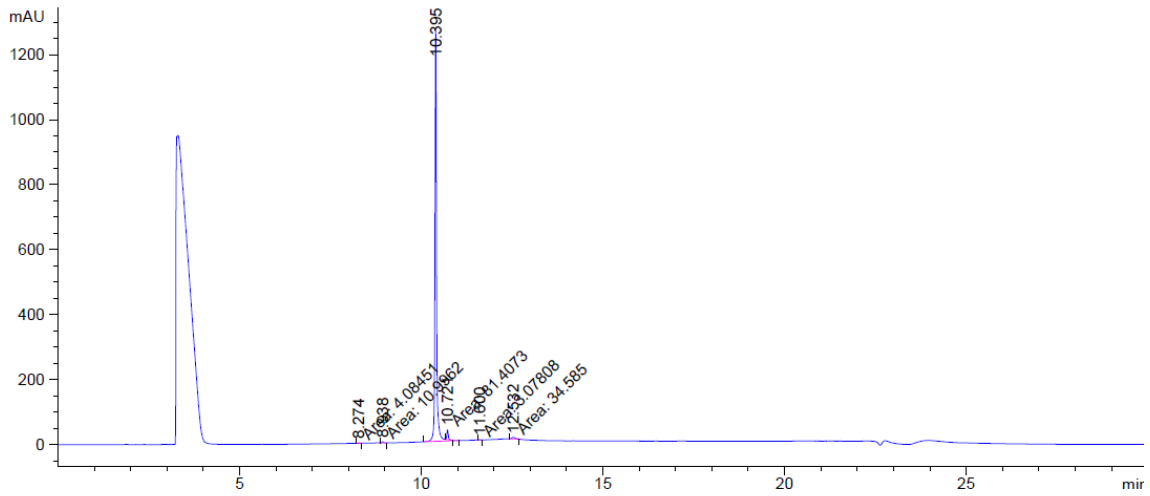


Figura A-IV-3. Superposición de uno de los sitios de unión a T₄ de WT-TTR cuando se une a **TES1e** (PDB: 7QC5) y tolcapone (PDB: 4D7B), destacando el movimiento hacia adentro de la Lys¹⁵ desde ambas cadenas cuando la proteína se une a **TES1e**. Las estructuras WT-TTR/**TES1e** y WT-TTR/tolcapone están coloreadas en naranja y verde, respectivamente. Los ligandos y residuos Lys¹⁵ y Glu⁵⁴ se muestran en barras (E: Glu, K: Lys).

VII.VI.3. Espectros de HPLC de los compuestos finales TES1a-TES1e y TES2e

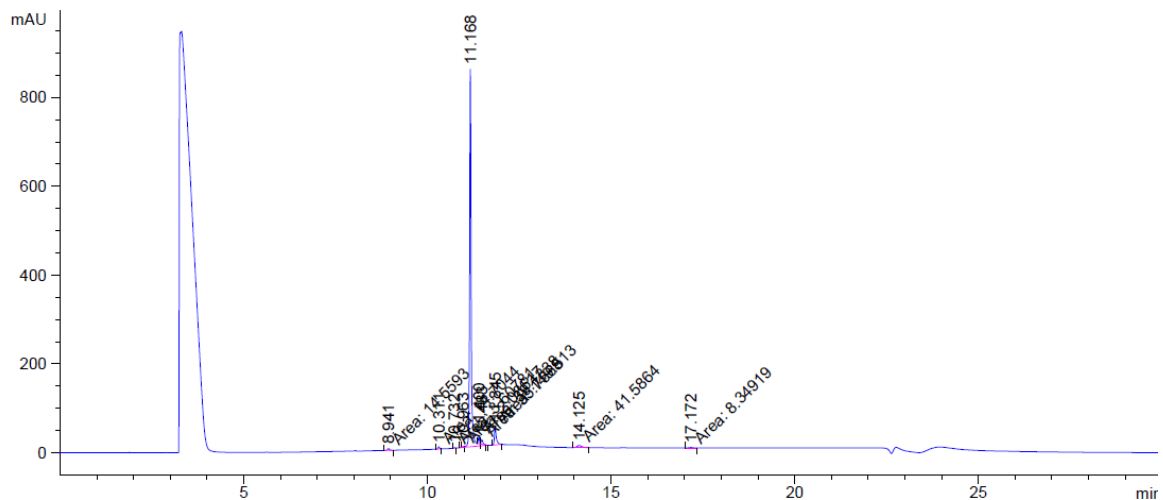
Compuesto TES1a



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.274	MM	0.0507	4.08451	1.34252	0.0983
2	8.938	MM	0.0518	10.99619	3.53849	0.2647
3	10.395	MM R	0.0527	4020.18896	1272.45691	96.7708
4	10.721	MM T	0.0453	81.40733	29.96630	1.9596
5	11.600	MM	0.0498	3.07808	1.02924	0.0741
6	12.532	MM	0.1162	34.58496	4.96011	0.8325

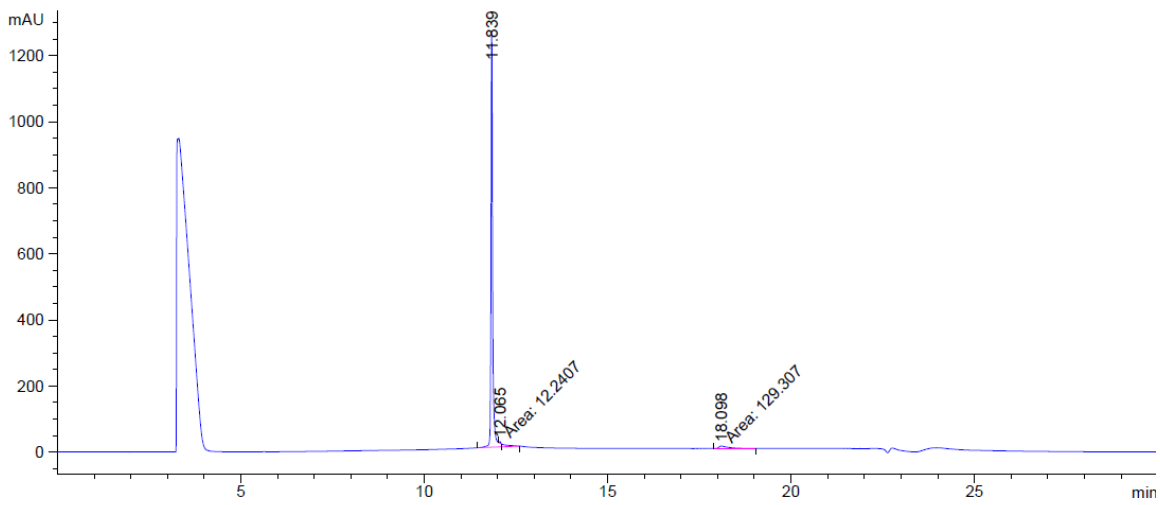
Totals : 4154.34004 1313.29357

Compuesto TES1b



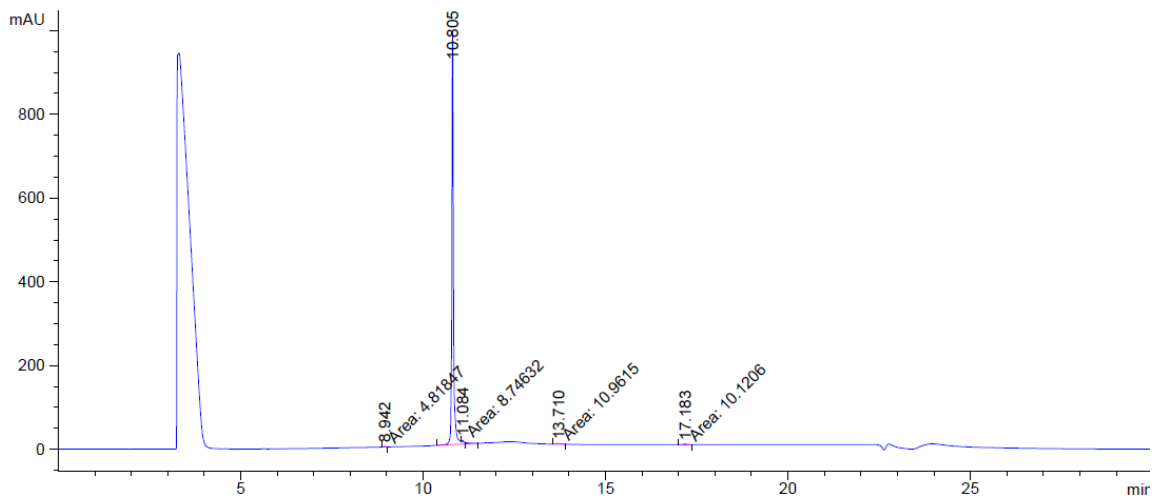
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.941	MM	0.0607	14.55934	4.00063	0.5124
2	10.311	MF	0.0472	14.70440	5.19502	0.5175
3	10.732	MM	0.0443	3.60781	1.35837	0.1270
4	10.963	MM T	0.0393	2.08617	8.85298e-1	0.0734
5	11.168	MM R	0.0496	2532.06885	851.48865	89.1145
6	11.400	MF T	0.0392	39.13383	16.65625	1.3773
7	11.483	FM T	0.0564	35.75682	10.57575	1.2584
8	11.845	MM	0.0579	149.51280	43.01689	5.2620
9	14.125	MM	0.1432	41.58643	4.84098	1.4636
10	17.172	MM	0.1393	8.34919	9.99011e-1	0.2938
Totals :				2841.36565	939.01684	

Compuesto TES1c



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.839	MM R	0.0533	4037.51025	1261.70142	96.6129
2	12.065	MM T	0.0373	12.24067	5.46862	0.2929
3	18.098	MM	0.3013	129.30652	7.15321	3.0942
Totals :				4179.05744	1274.32324	

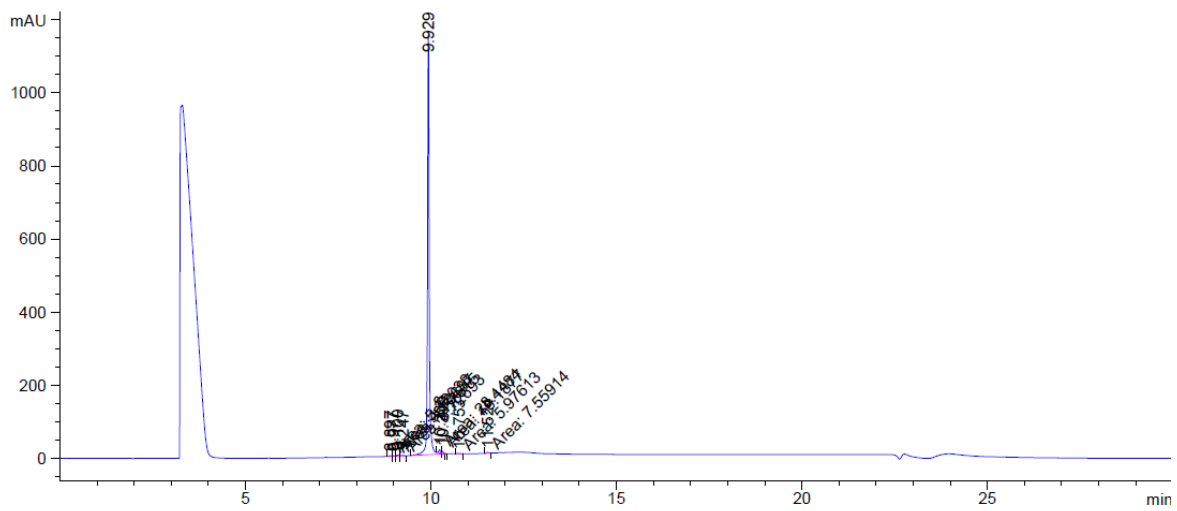
Compuesto TES1d



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.942	MM	0.0508	4.81847	1.58075	0.1492
2	10.805	MM R	0.0538	3194.64185	989.05627	98.9271
3	11.084	MM T	0.0399	8.74632	3.65545	0.2708
4	13.710	MM	0.1271	10.96149	1.43683	0.3394
5	17.183	MM	0.1415	10.12057	1.19178	0.3134

Totals : 3229.28871 996.92109

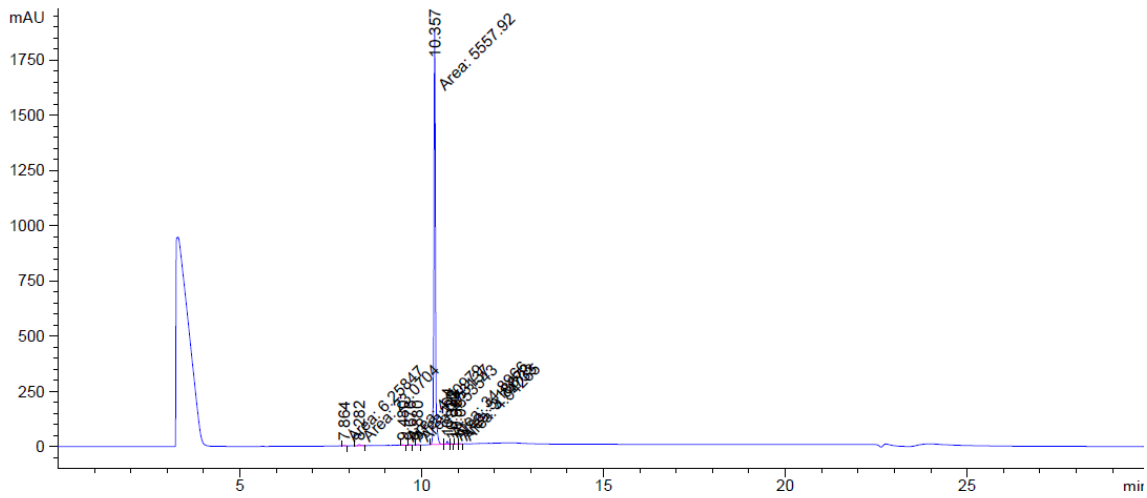
Compuesto TES1e



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.897	MF	0.0803	5.32038	1.10473	0.1368
2	8.977	FM	0.0770	4.98687	1.07999	0.1282
3	9.100	FM	0.0652	11.76150	3.00604	0.3024
4	9.247	FM	0.0938	8.72693	1.55105	0.2244
5	9.929	MM R	0.0548	3799.80054	1154.64966	97.7122
6	10.233	MF T	0.0685	28.44840	8.40367	0.7316
7	10.309	FM T	0.0450	16.18774	5.99999	0.4163
8	10.753	MM	0.0806	5.97613	1.23617	0.1537
9	11.524	MM	0.0619	7.55914	2.03585	0.1944

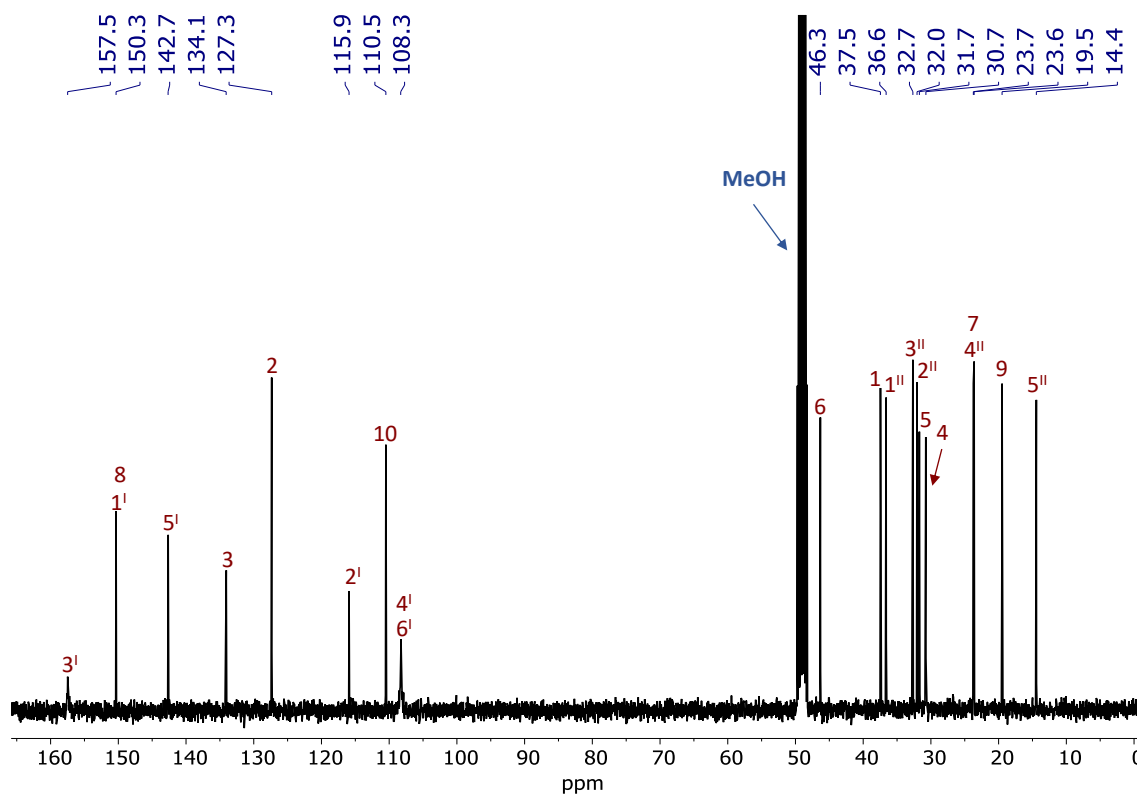
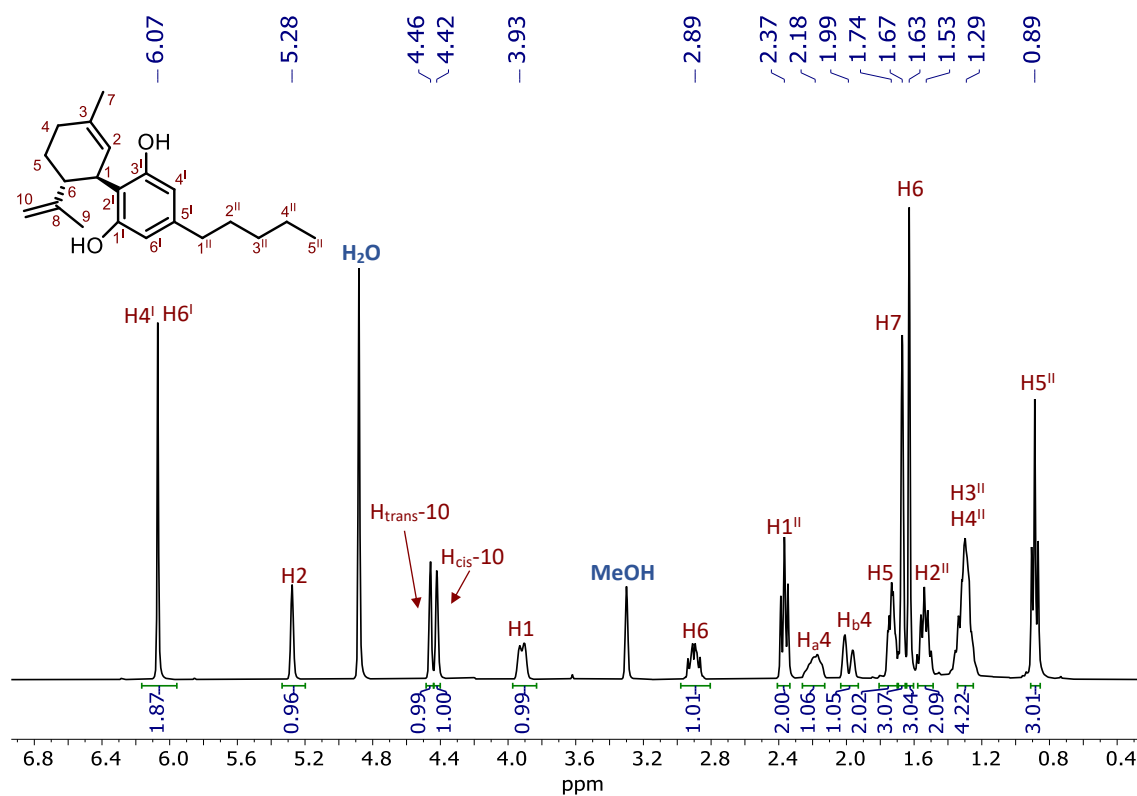
Totals : 3888.76762 1179.06714

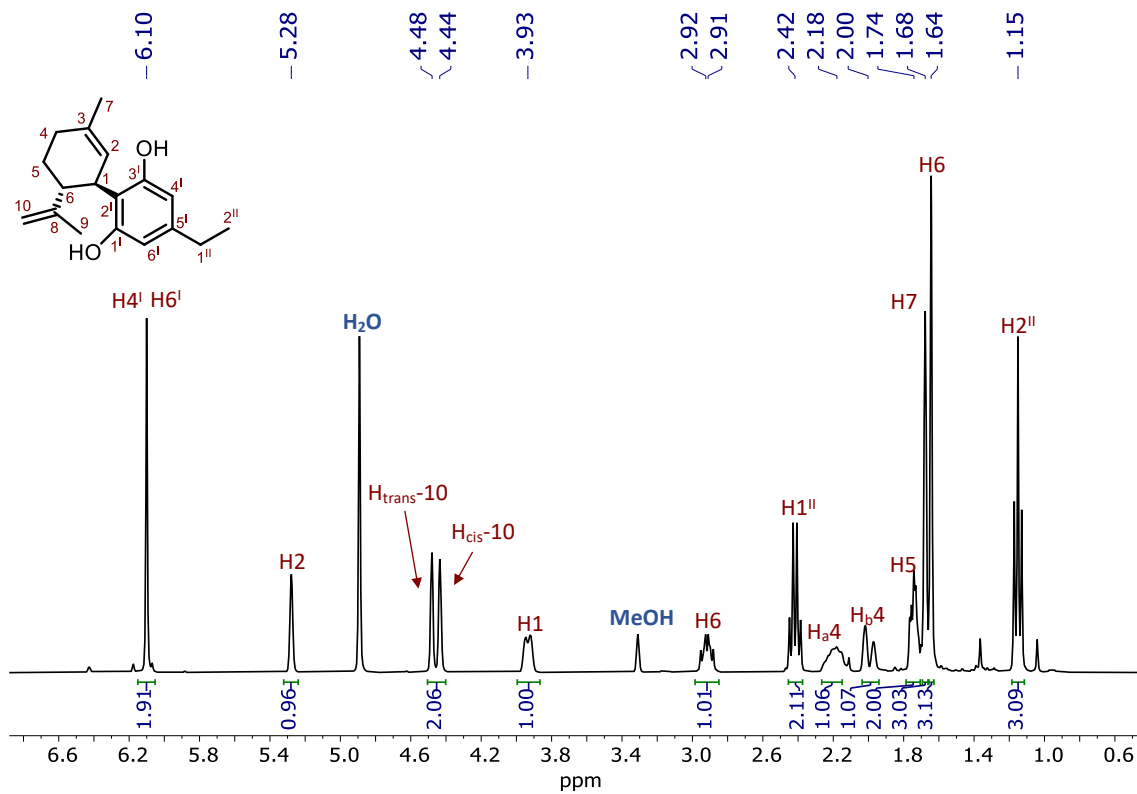
Compuesto TES2e



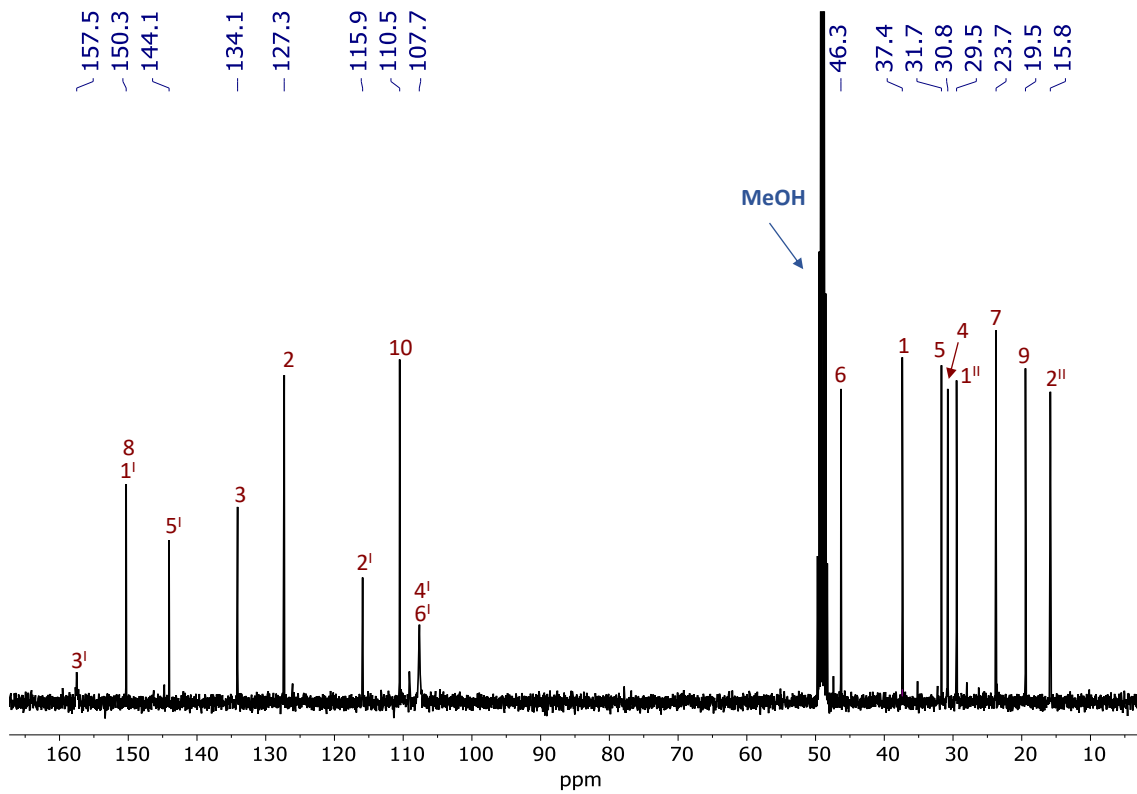
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.864	FM	0.0546	6.25847	1.90918	0.1107
2	8.282	MM	0.0816	23.07037	4.71162	0.4082
3	9.480	MM	0.0498	4.80979	1.60956	0.0851
4	9.676	MF	0.0527	6.73137	2.12961	0.1191
5	9.880	MM	0.0747	4.53543	1.01229	0.0802
6	10.357	MM	0.0492	5557.92188	1881.76782	98.3337
7	10.704	MM	0.0446	34.89664	13.03028	0.6174
8	10.820	MM	0.0444	5.18873	1.94914	0.0918
9	10.954	MF	0.0534	3.74733	1.17045	0.0663
10	11.053	FM	0.0498	4.94265	1.65439	0.0874

Totals : 5652.10265 1910.94434

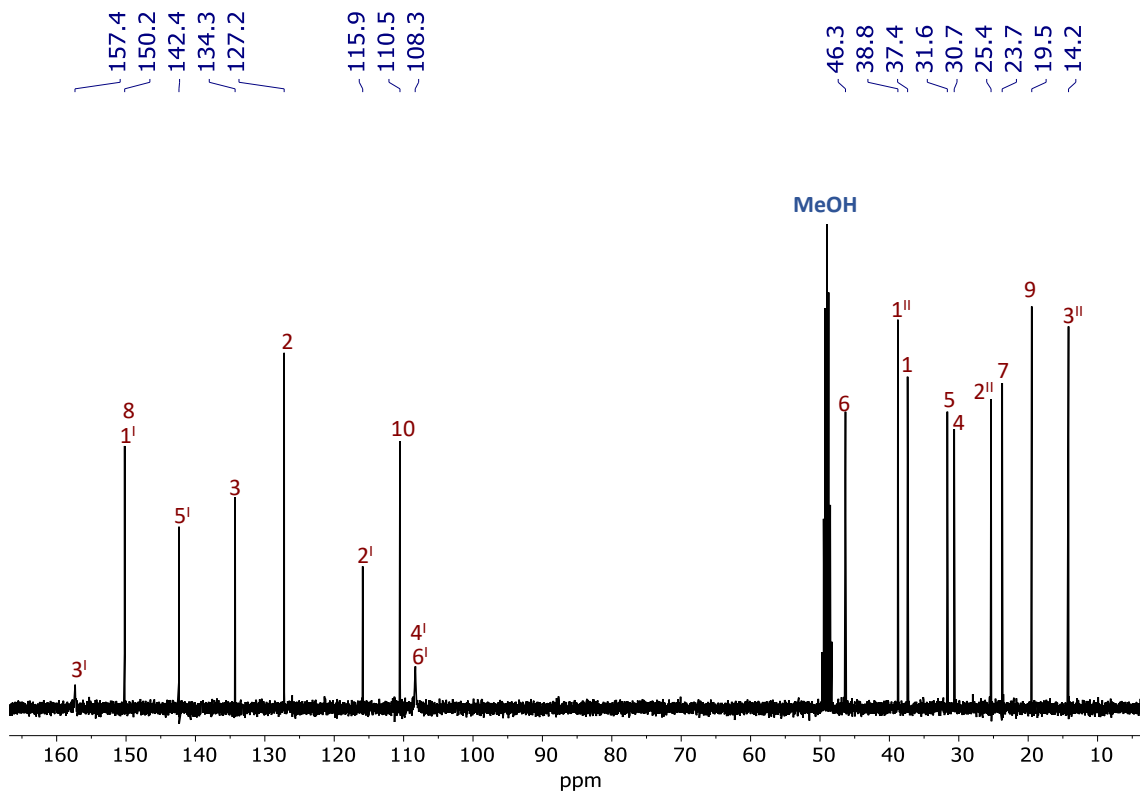
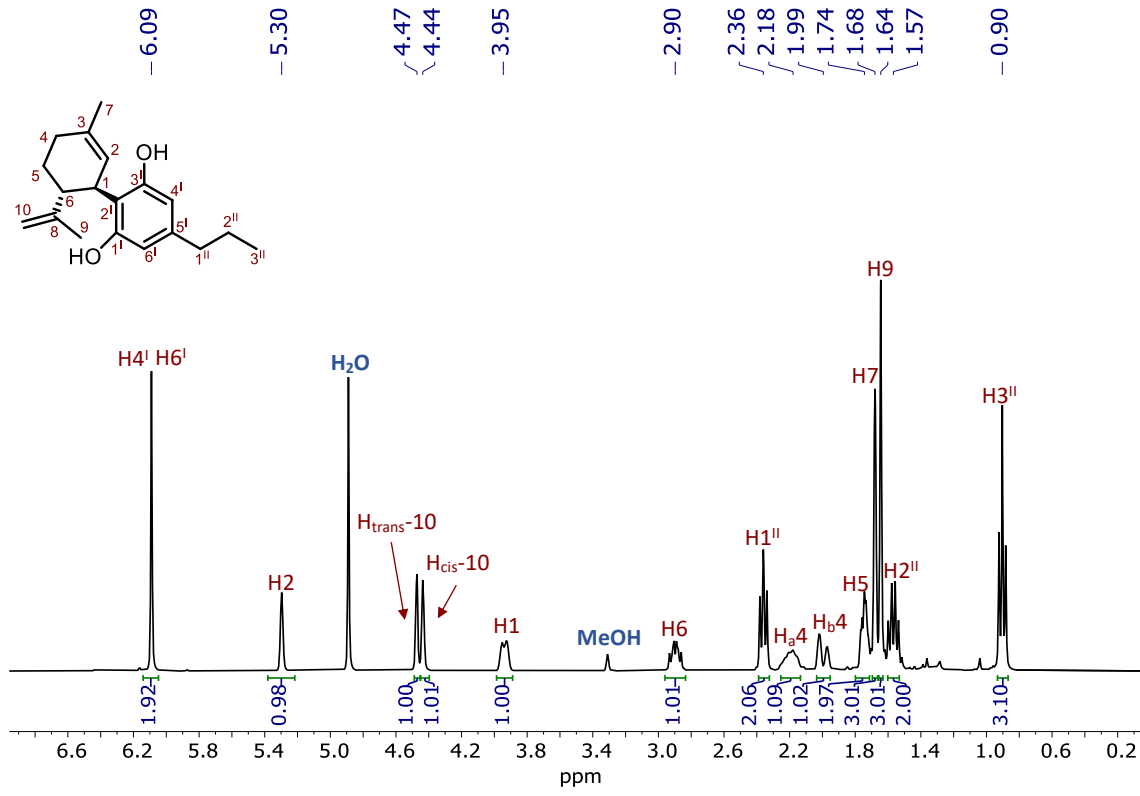
VII.V.1. Espectros de ^1H and ^{13}C NMR de los compuestos finales del capítulo V

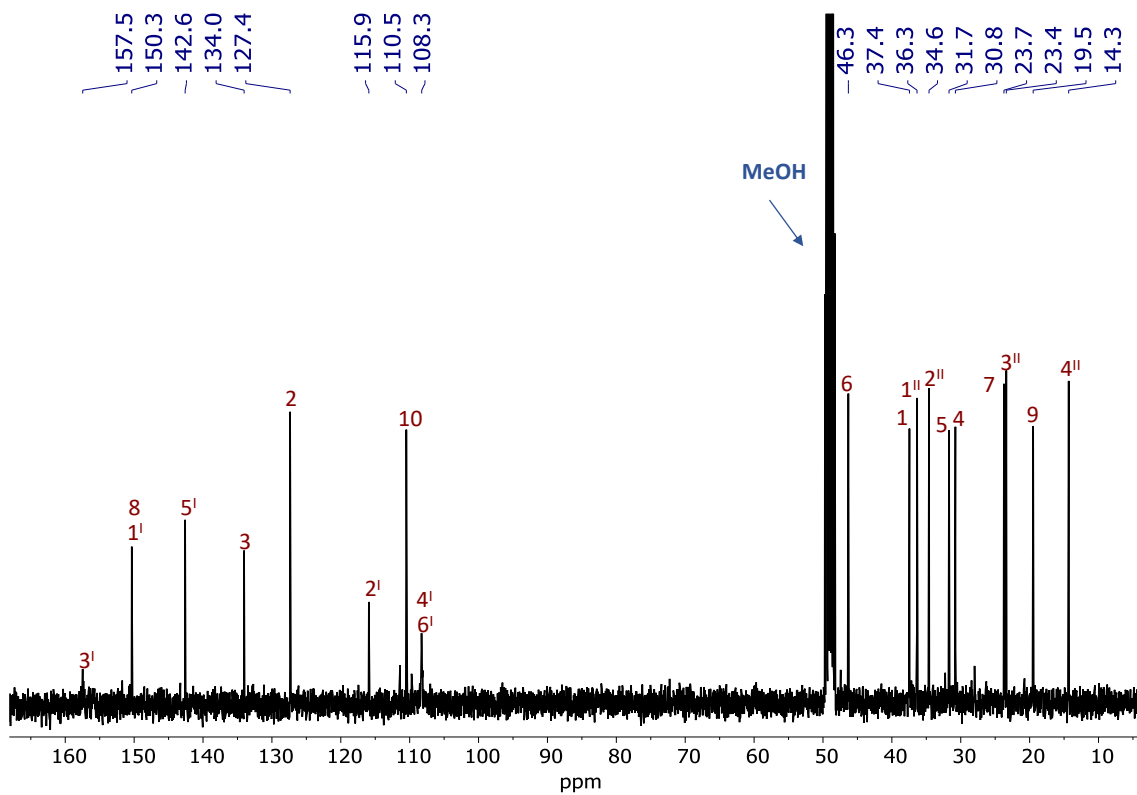
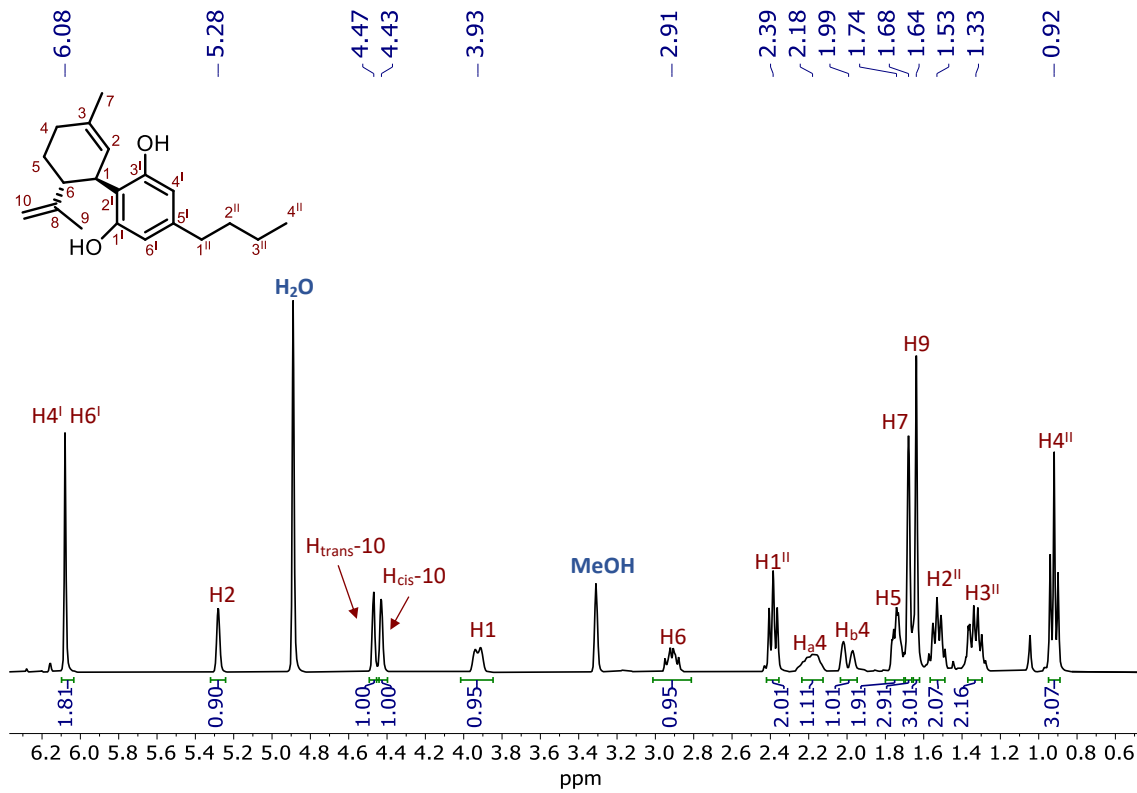


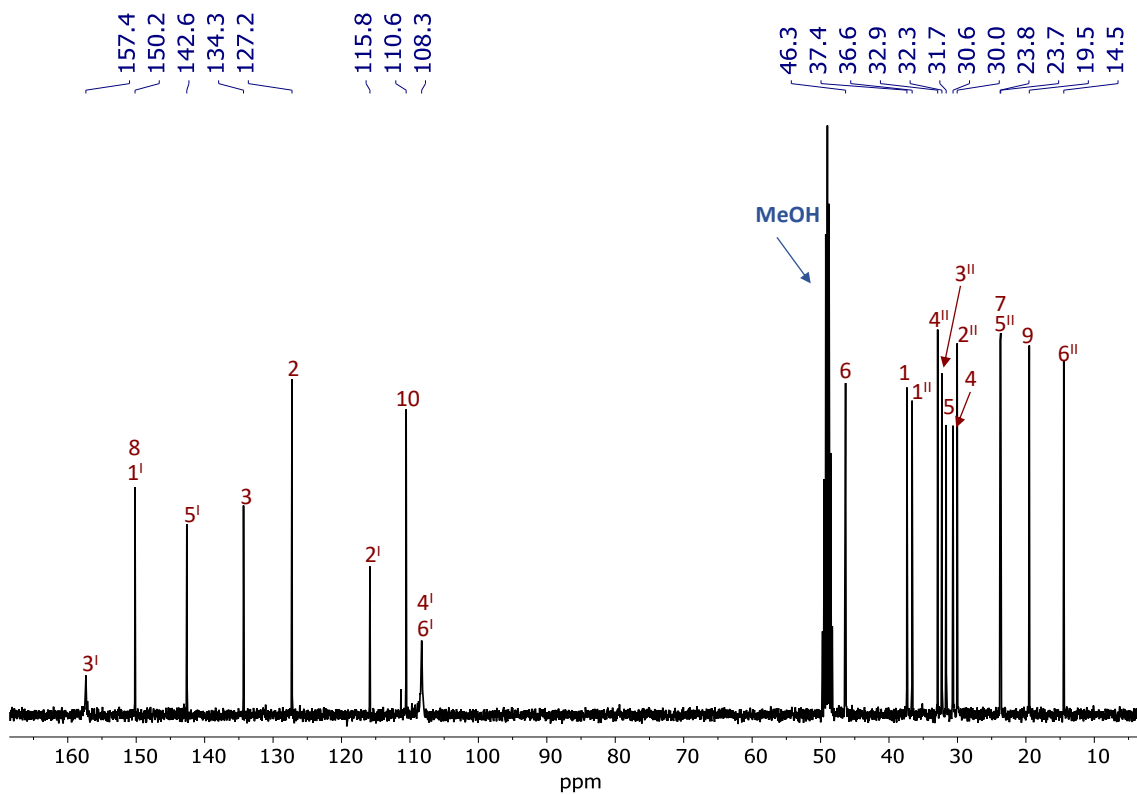
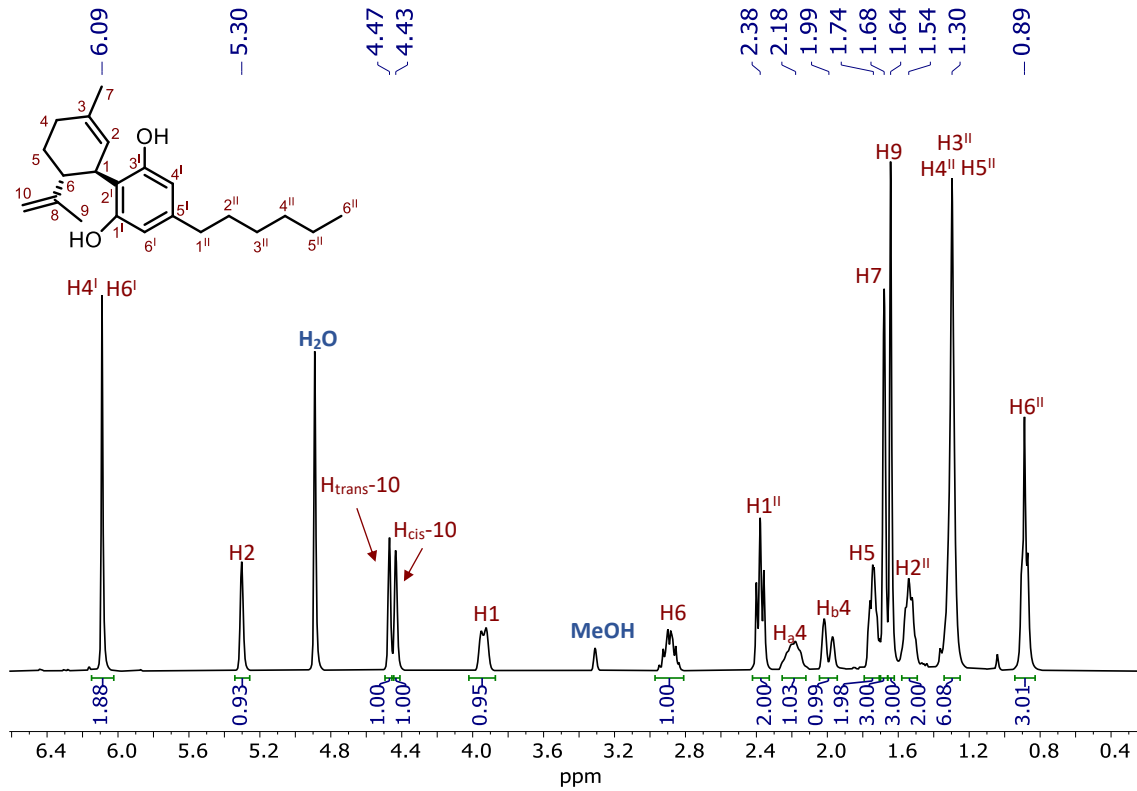
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), $\text{CBD}_{\text{AM}1\text{b}}$

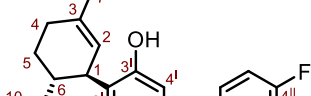
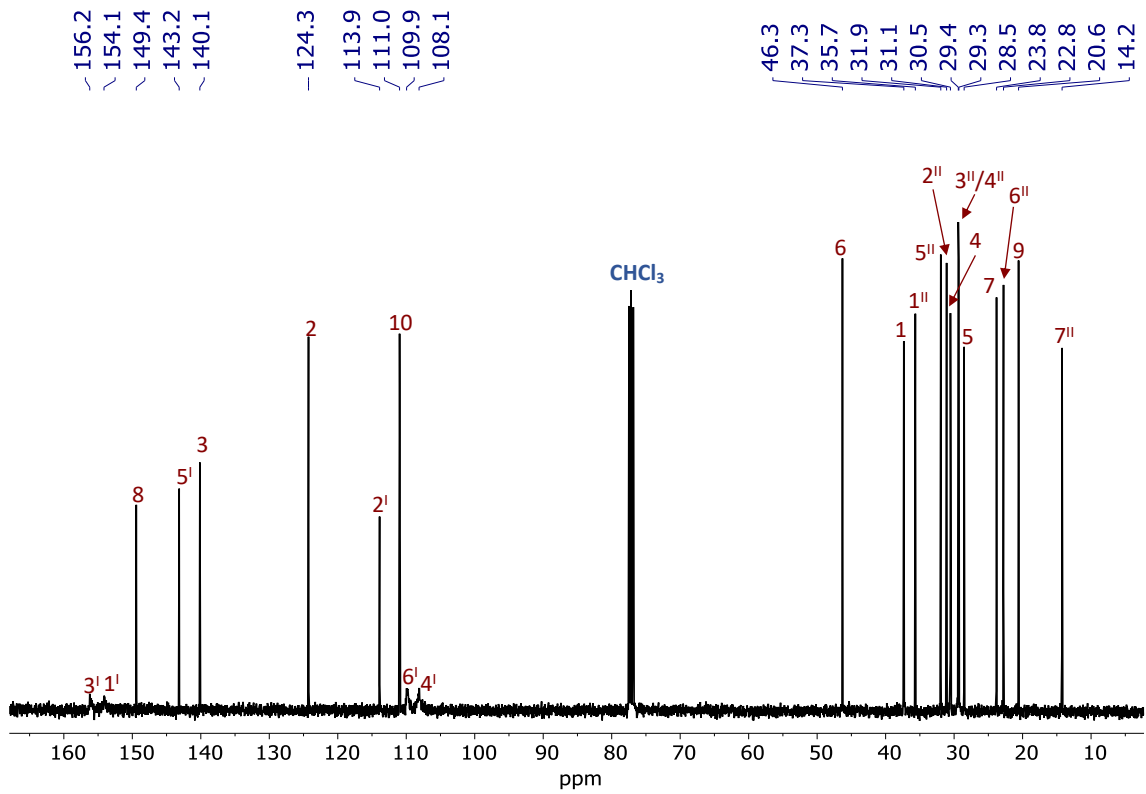
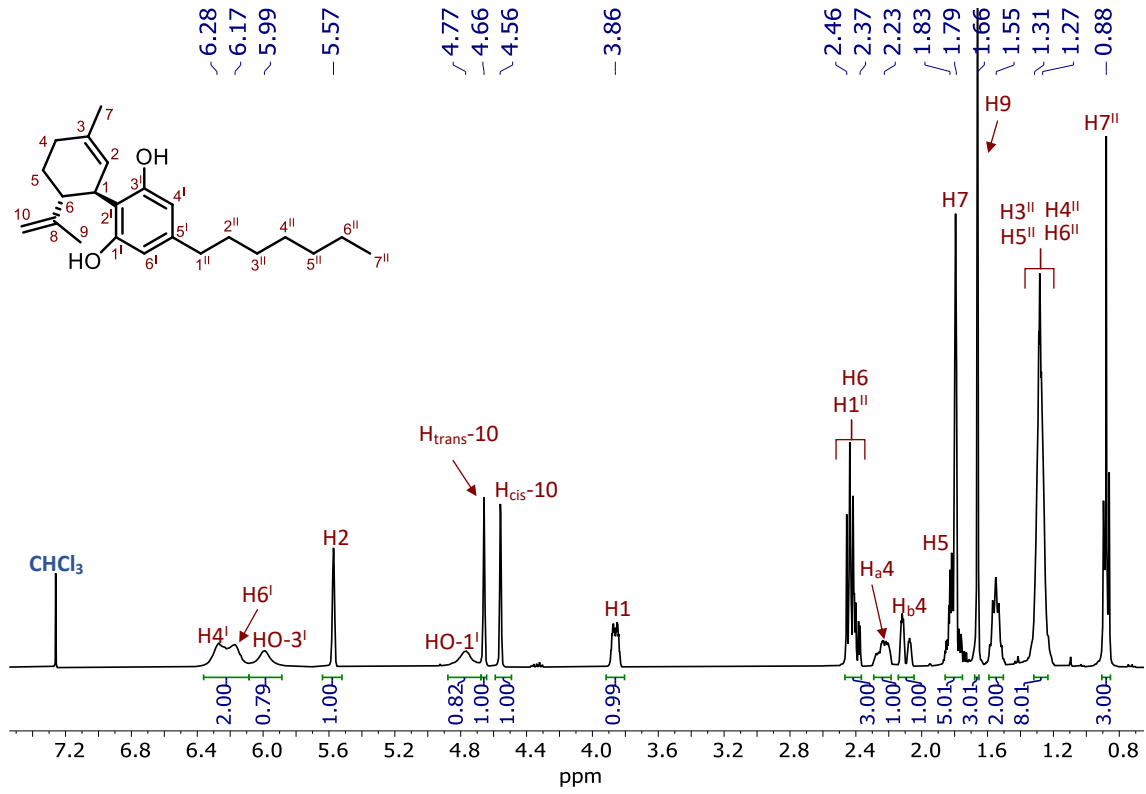


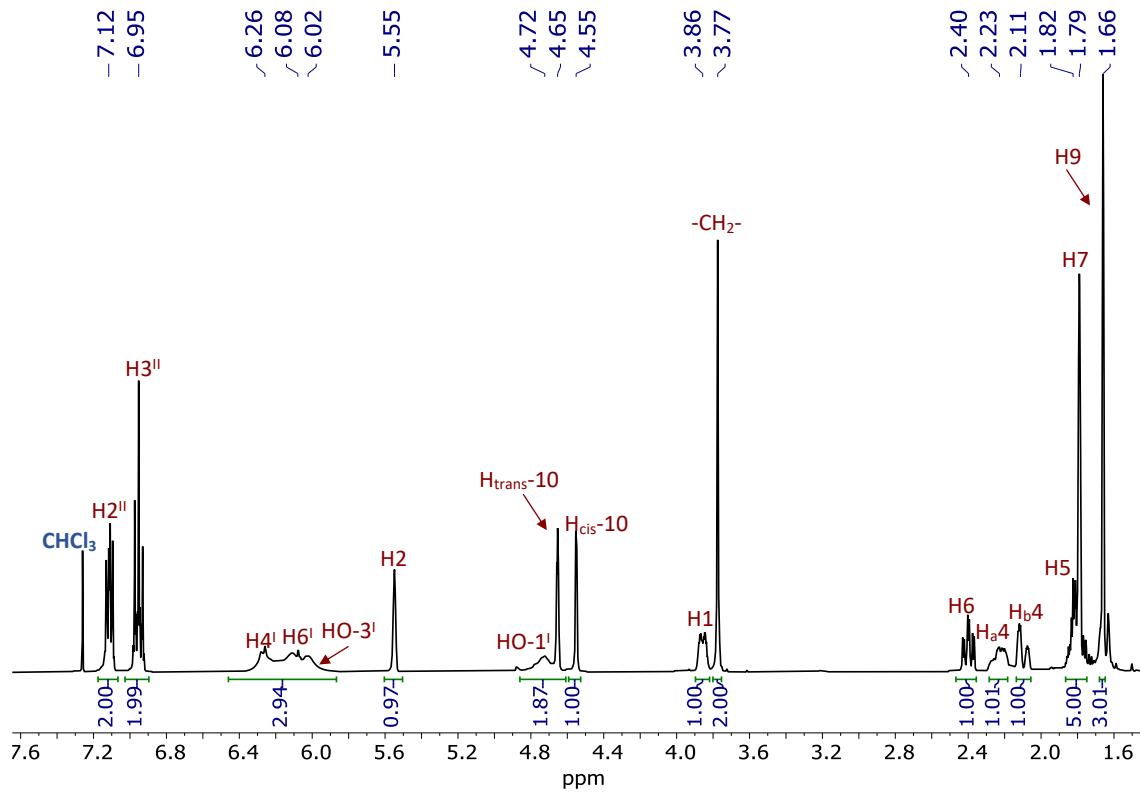
^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD), $\text{CBD}_{\text{AM}1\text{b}}$



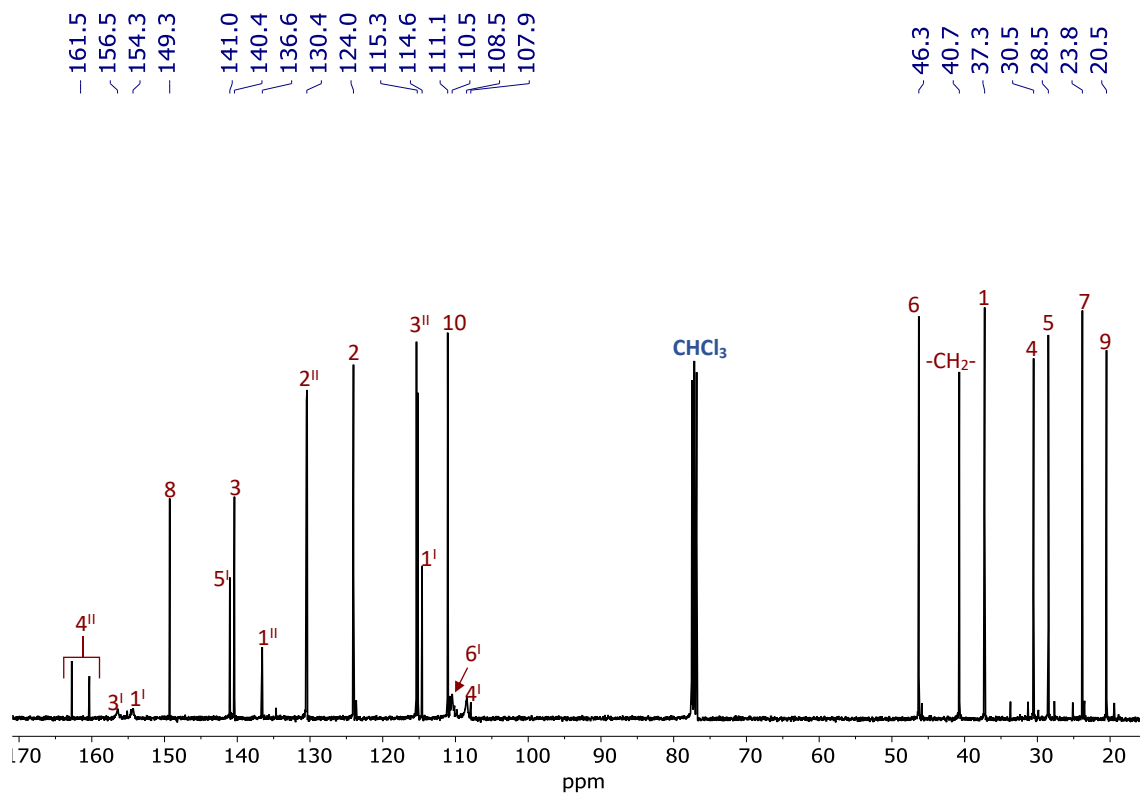






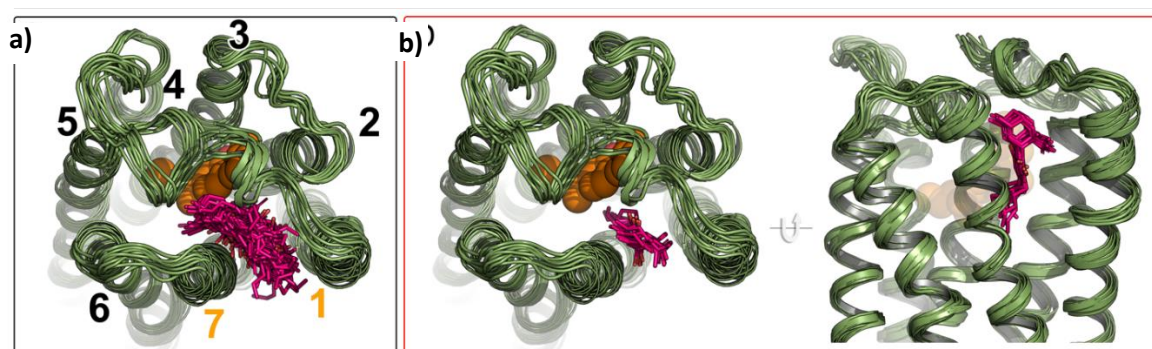
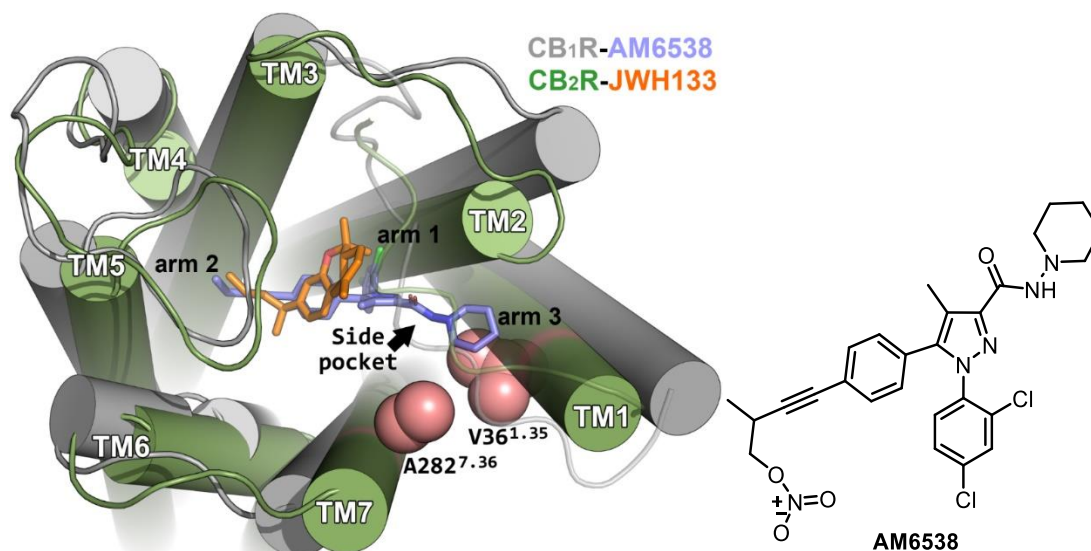


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), CBD_{AM2}



¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃), CBD_{AM2}

VII.V.2 Figuras del capítulo V



VII.V.3. Espectros de 1D ¹H RMN (HRMNC) de los compuestos finales CBD_{AM}1a- CBD_{AM}1e

Los experimentos de 1D ¹H RMN cuantitativo (HRMNC) fueron realizados en un espectrómetro a 400 MHz utilizando dimetilsulfona (DMSO₂, 99.8% puro) como patron interno en CDCl₃ (600 μL).

Información del espectrómetro y los parámetros del software

parámetro	Valor
Instrumento	Bruker Avance-III de 400 MHz (9.4 T)
Pulso del programa	Zg con 90°
Temperatura muestra	298 K
Puntos de los datos	96152
Escaneos ficticios	4
Escaneos (NS)	64
Retraso de relajación (D1)	60 s
Tiempo de adquisición (AQ)	4 s
Ventana del espectro (SW)	30 ppm
Compensación del transmisor	7.5 ppm

Post-Adquisición y Medida de las integrales

Parámetro	Valor
Método de procesado	Ampliación d elínea (LB = 0.1 Hz)
Llenado cero	de 256 K datos reales
Ajuste de fase	manual
Corrección de la línea base	Polinomio de 5to orden

La pureza del compuesto objetivo CBD_{AM}1a- CBD_{AM}1e fue determinada utilizando la siguiente ecuación:

$$P [\%] = \frac{n_{IC} \cdot Int_t \cdot MW_t \cdot m_{IC}}{n_t \cdot Int_{IC} \cdot MW_{IC} m_s} \cdot P_{IC}$$

donde:

m_{IC} = peso (masa) del patron interno (DMSO₂)

m_s = peso (masa) de la muestra (compuestos CBD_{AM}1a- CBD_{AM}1e)

Int_{IC} = área (integral) de la señal del patrón interno en el espectro

Int_t = área (integral) de la señal del compuesto a analizar (t) en el espectro

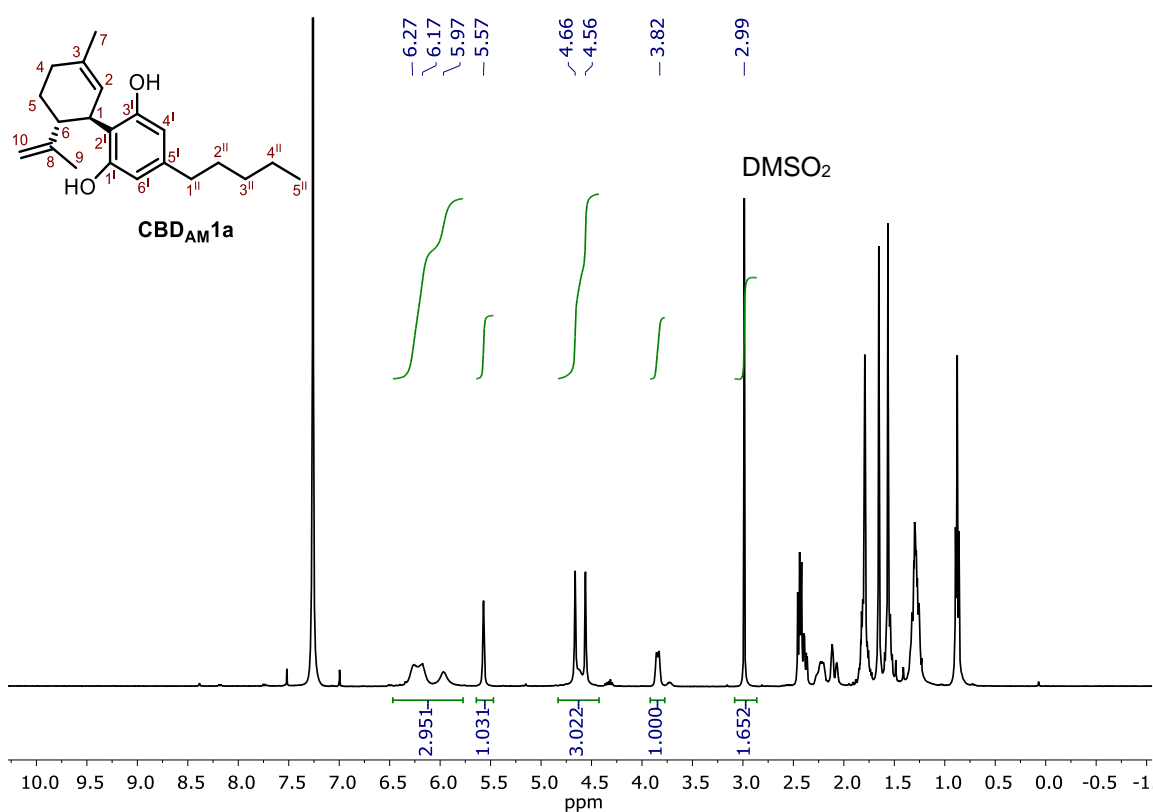
n_{IC} = número de protones del patrón interno que dan lugar a Int_{IC}

n_t = número de protones del compuesto a analizar que dan lugar a Int_t

MW_{IC} = Peso molecular del patrón interno

MW_t = Peso molecular del compuesto objetivo

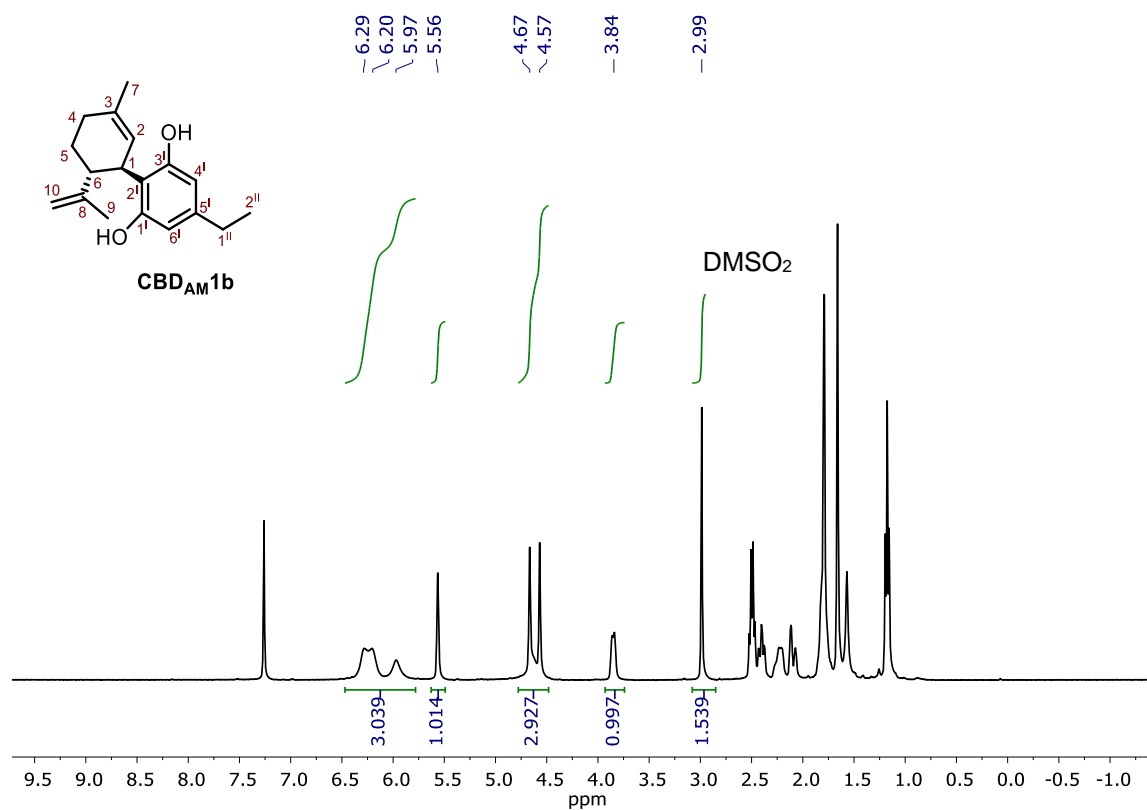
P_{IC} = pureza del patrón, como valor porcentual



Compuesto **CBD_{AM}1a** (7.30 mg/mL) en CDCl₃ con la adición de dimetilsulfona (DMSO₂, 99.8%) como patrón interno.

$m_s = 4.02 \text{ mg}, m_{IC} = 0.32 \text{ mg}, P_{IC} = 99.8\%$
$Int_t = 1.001^a, n_t = 1$
$Int_{IC} = 1.652, n_{IC} = 6$
$MW_t = 314.47 \text{ g/mol}, MW_{IC} = 94.13 \text{ g/mol}$
$P (\%) = 95.1\%$

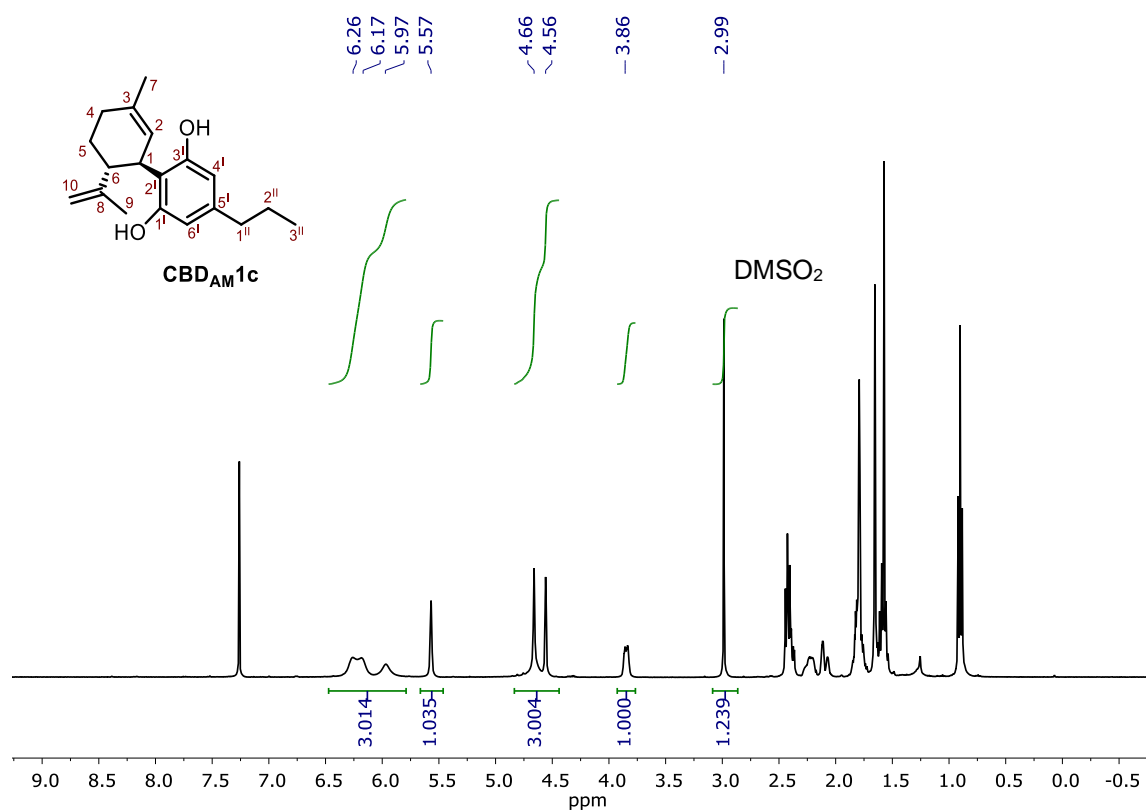
^a La integral del compuesto **CBD_{AM}1a** ha sido calculada como la media de las señales δ 6.27 - 6.17 (2H, H-4', H-6'), 5.97 (1H, OH), 5.57 (1H, H-2), 4.66 - 4.56 (3H, H-10_{trans}, H-10_{cis}, OH), 3.82 (1H, H-1).



Compuesto **CBD_{AM}1b** (6.35 mg/mL) en CDCl₃ con la adición de dimetilsulfona (DMSO₂, 99.8%) como patrón interno.

$m_s = 3.49 \text{ mg}, m_{IC} = 0.31 \text{ mg}, P_{IC} = 99.8\%$
$Int_t = 0.997^a, n_t = 1$
$Int_{IC} = 1.539, n_{IC} = 6$
$MW_t = 272.38 \text{ g/mol}, MW_{IC} = 94.13 \text{ g/mol}$
$P (\%) = 98.1\%$

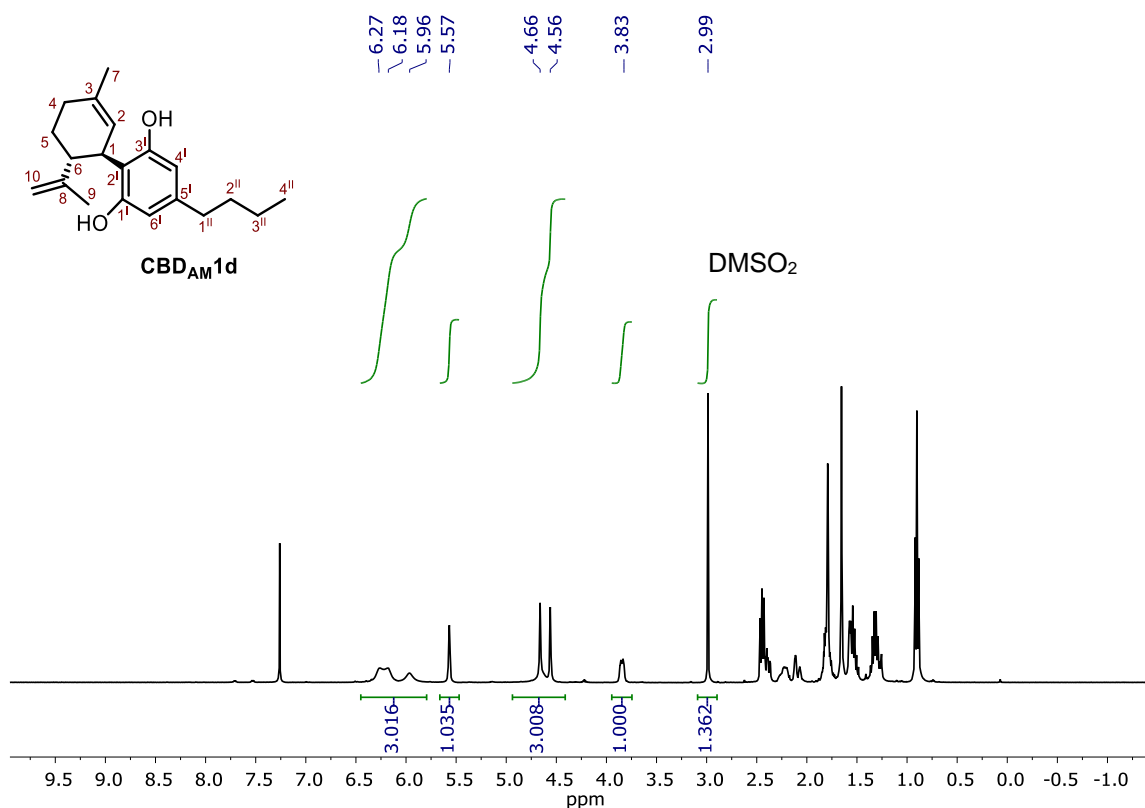
^a La integral del compuesto **CBD_{AM}1b** ha sido calculada como la media de las señales δ 6.29 - 6.20 (2H, H-4^l, H-6^l), 5.97 (1H, OH), 5.56 (1H, H-2), 4.67 - 4.57 (3H, H-10^{trans}, H-10^{cis}, OH), 3.84 (1H, H-1).



Compuesto **CBD_{AM}1c** (8.15 mg/mL) en CDCl_3 con la adición de dimetilsulfona (DMSO_2 , 99.8%) como patrón interno.

$m_s = 4.48 \text{ mg}, m_{IC} = 0.30 \text{ mg}, P_{IC} = 99.8\%$
$Int_t = 1.007^a, n_t = 1$
$Int_{IC} = 1.239, n_{IC} = 6$
$MW_t = 286.42 \text{ g/mol}, MW_{IC} = 94.13 \text{ g/mol}$
$P (\%) = 97.4\%$

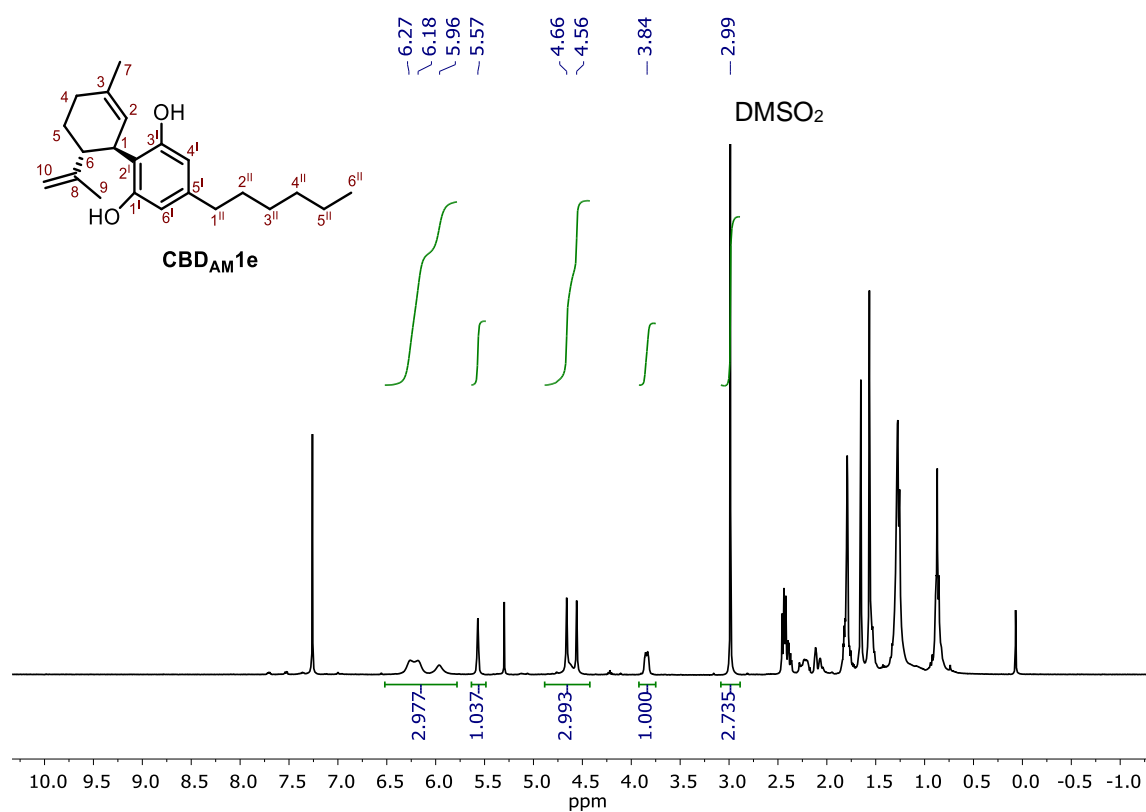
^a La integral del compuesto **CBD_{AM}1c** ha sido calculada como la media de las señales δ 6.26 - 6.17 (2H, H-4', H-6'), 5.97 (1H, OH), 5.56 (1H, H-2), 4.66-4.56 (3H, H-10_{trans}, H-10_{cis}, OH), 3.84 (1H, H-1).



Compuesto **CBD_{AM}1d** (9.00 mg/mL) en CDCl₃ con la adición de dimetilsulfona (DMSO₂, 99.8%) como patrón interno.

$m_s = 4.95 \text{ mg}, m_{IC} = 0.34 \text{ mg}, P_{IC} = 99.8\%$
$Int_t = 1.007^a, n_t = 1$
$Int_{IC} = 1.362, n_{IC} = 6$
$MW_t = 300.44 \text{ g/mol}, MW_{IC} = 94.13 \text{ g/mol}$
$P (\%) = 96.3\%$

^a La integral del compuesto **CBD_{AM}1d** ha sido calculada como la media de las señales δ 6.27-6.18 (2H, H-4^l, H-6^l), 5.96 (1H, OH), 5.57 (1H, H-2), 4.66-4.56 (3H, H-10_{trans}, H-10_{cis}, OH), 3.83 (1H, H-1).



Compuesto **CBD_{AM}1e** (5.25 mg/mL) en CDCl₃ con la adición de dimetilsulfona (DMSO₂, 99.8%) como patrón interno

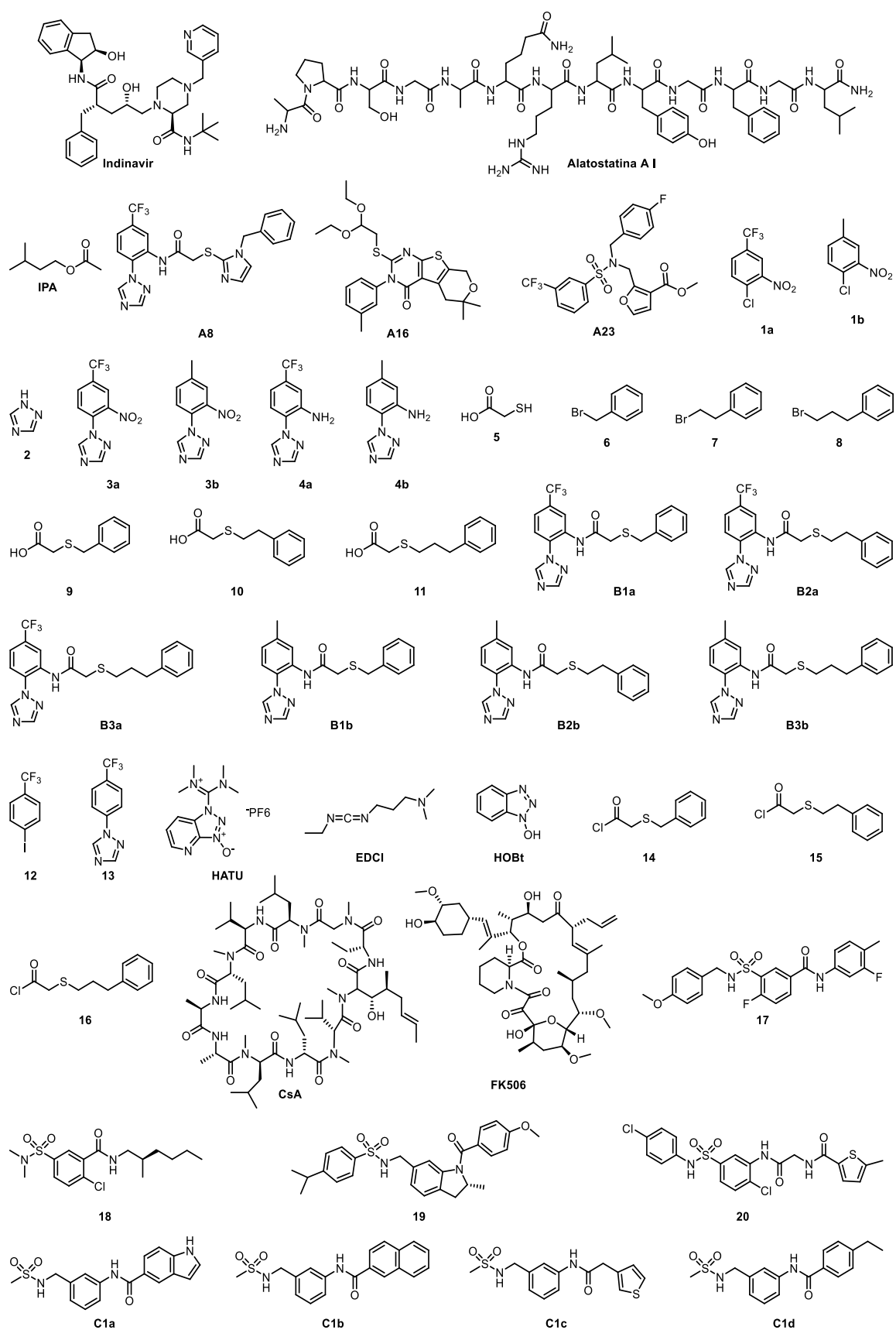
$m_s = 2.89 \text{ mg}, m_{IC} = 0.36 \text{ mg}, P_{IC} = 99.8\%$
$Int_t = 1.001^a, n_t = 1$
$Int_{IC} = 2.375, n_{IC} = 6$
$MW_t = 328.50 \text{ g/mol}, MW_{IC} = 94.13 \text{ g/mol}$
$P (\%) = 95.4\%$

^a La integral del compuesto **CBD_{AM}1e** ha sido calculada como la media de las señales δ 6.27 - 6.18 (2H, H-4', H-6'), 5.96 (1H, OH), 5.57 (1H, H-2), 4.66 - 4.56 (3H, H-10_{trans}, H-10_{cis}, OH), 3.84 (1H, H-1).

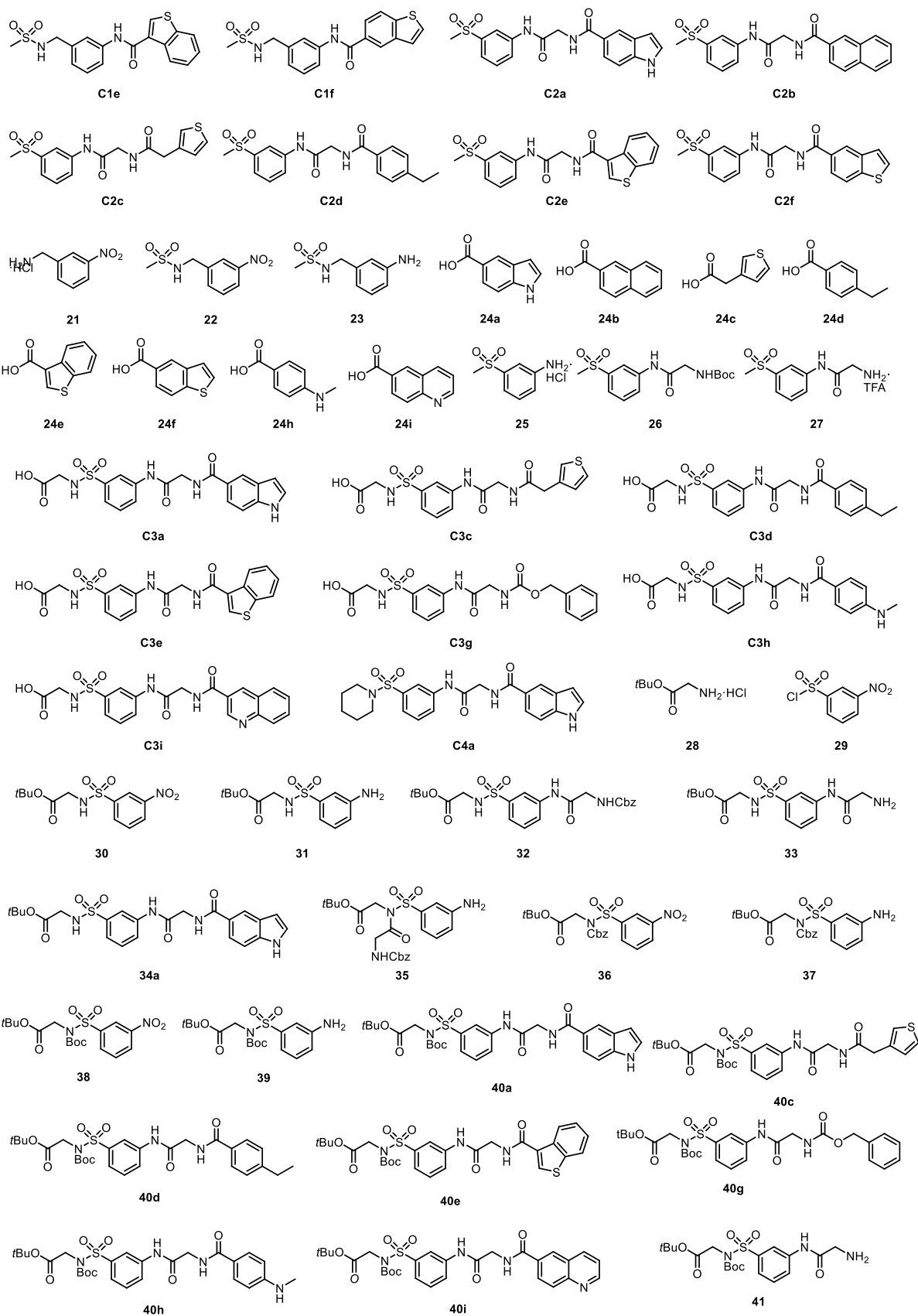
VII. 6. Referencias

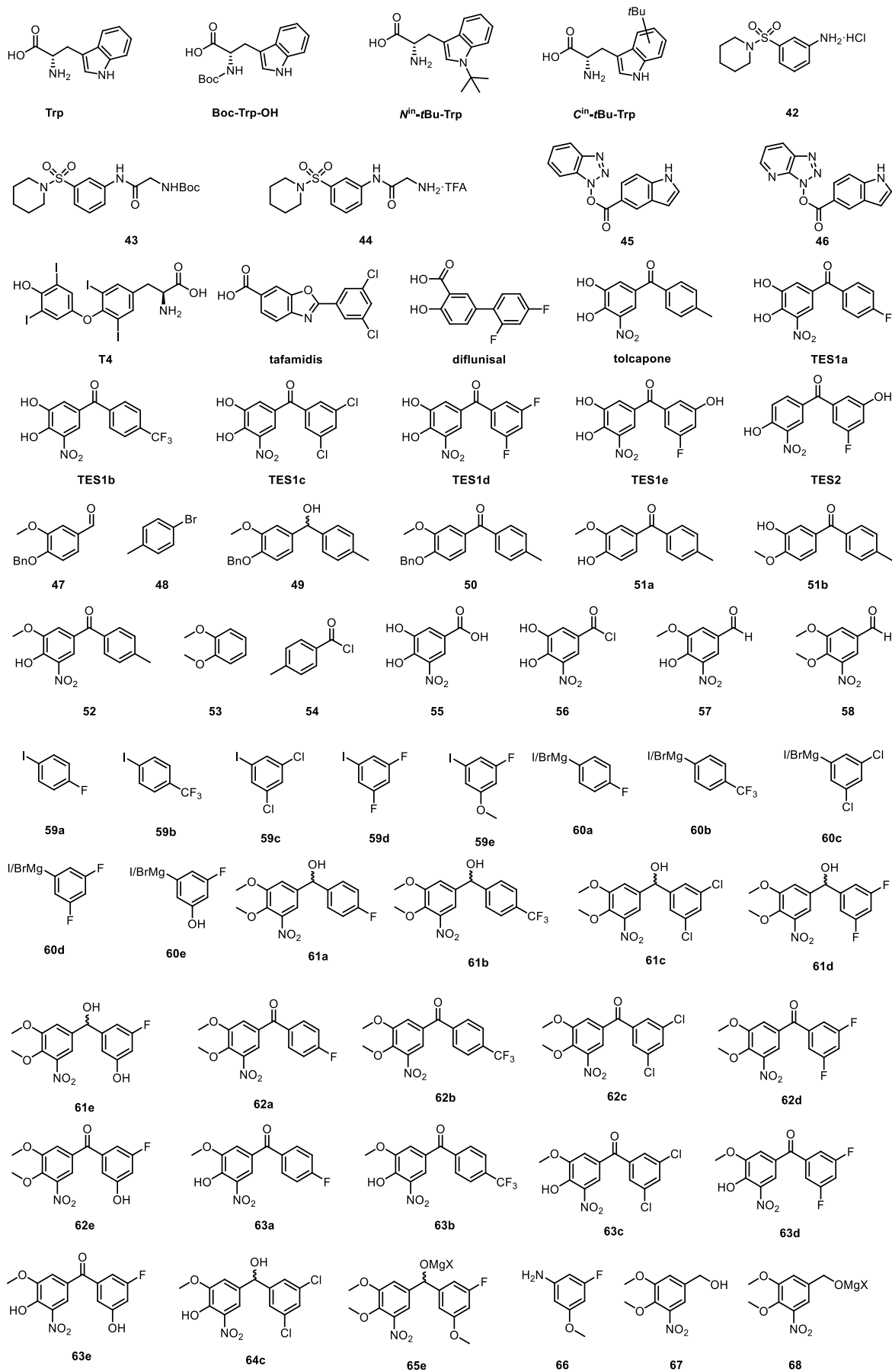
- (1) Hua, T.; Vemuri, K.; Pu, M.; Qu, L.; Han, G. W.; Wu, Y.; Zhao, S.; Shui, W.; Li, S.; Korde, A.; Laprairie, R. B.; Stahl, E. L.; Ho, J. H.; Zvonok, N.; Zhou, H.; Kufareva, I.; Wu, B.; Zhao, Q.; Hanson, M. A.; Bohn, L. M.; Makriyannis, A.; Stevens, R. C.; Liu, Z. J. *Cell* **2016**, *167*, 750-762.

Índice de formulas



Fórmulas





Fórmulas

