

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica



TESIS DOCTORAL

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ÁCIDO
HIDROXÁMICO COMO NUEVOS INHIBIDORES DE LAS
HISTONAS DESACETILASAS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

Mavys Tabraue Chávez

GRANADA 2006

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Lda. **Mavys Tabraue Chávez** con objeto de obtener el grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada.

Granada, julio de 2006.

DIRECTORES:

Fdo. José Antonio Gómez Vidal
Prof. Titular de Química Farmacéutica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

Fdo. José Francisco Domínguez Seglar
Prof. Titular de Química Farmacéutica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

Fdo. Mavys Tabraue Chávez

*A mis padres.
A Paco y Ana.*

*“No intentarlo por miedo al fracaso
es como suicidarse por miedo a morir”
Anónimo*

Agradecimientos

Es indudable que el camino ha sido duro, pero el sacrificio no ha sido en vano, porque además de conseguir experiencia profesional, he conocido a gente maravillosa que más que ser compañeros de trabajo han sido unos amigos incondicionales.

A mis Directores, Prof. D. José Antonio Gómez Vidal y Prof. D. José Francisco Domínguez Seglar. Gracias por guiarme en el mundo de la investigación, por abrirme los ojos cuando estaba equivocada, por aguantar mis cabezonerías. A ti, Pepe, por los buenos momentos arreglando todo aquello que se rompía...y a ti Jose, por luchar tanto por mí, gracias por el ánimo en esta última etapa, eres un gran amigo.

A la Prof. D^a María José Pineda de las Infantas y Villatoro, que más que un nombre grande tiene un corazón gigante, gracias por tu amistad. A la Prof. D^a Encarnación Camacho Quesada, gracias por la cercanía. A los Prof. D. Joaquín Campos Rosa, D. Antonio Entrena Guadix, D. Miguel Ángel Gallo Mezo y D. Antonio Espinosa Úbeda, porque de todos he aprendido algo.

A mis compañeros, a los que tanto he dado la lata con mis inacabables historias, a esos que más de una vez me han sorprendido con tanto cariño. A Carlota y Dori, con ustedes empecé, y gracias a Uds. conocí lo básico, fueron buenos tiempos. A Guille, no hubo más discusiones de fútbol sin ti, un "tin" más aburrido todo. Al Asi, dueño de una sonrisa permanente, tu gracia y tu sonrisa se echan de menos; a Juanjo y Rosi, la sensibilidad y la dulzura, respectivamente, ya saben lo que significan para mí, los admiro en todos los aspectos, gracias por todo. A Mónica, la sencillez hecha mujer, gracias por todos los momentos compartidos, por tu disposición ante todo lo que fuera ayudar. A Manme aunque yo me empeñe en decirle Mamen, da igual, ha valido la pena conocerte, gracias por los consejos, las confidencias, las locuras, espero verte con rastas, no digo más. A mi Olguita, juntas en la Resi, juntas en el Doctorado y espero que juntas en la vida, gracias por saber compartir, por saber escuchar, por estar siempre dispuesta a ayudar, gracias por todo. Anita, es todo un privilegio para mí que seas mi amiga, eres la energía, la simpatía y la voluntad, te debo muchas cosas, mil gracias. A Javi y Ana María, ha sido un placer trabajar juntos, siempre dispuestos a ayudar al otro. A los que tuvieron un paso más corto por el laboratorio y los que se están incorporando, a Charo, Paquito, Samira, Beti, Gonzalo.

A los compañeros de Orgánica. En especial a los Prof. D^a María Teresa Plaza y Prof. D. Miguel Rodríguez Alonso, a Paco, Víctor, Daniel, Alicia y Juan.

A Magda, de Microbiología, gracias por regalarme un poco de tu tiempo y por compartir conmigo la ansiedad esperando los resultados de inhibición enzimática, tu ayuda ha sido muy importante.

Al Prof. D. Juan Niclós, por su simpatía y porque su mano hizo que la moneda cayera en la mejor posición.

A los Doctores Roberto Abdala y Mariana Chabrilón, por su imprescindible colaboración en la determinación de la importancia biológica de los inhibidores descritos.

A mis amigos de Cuba, en especial a Naiví, Lorna e Ibis, mis mejores amigas de siempre, que a pesar de la distancia siempre me han animado a seguir. A los de aquí, especialmente a Margot y Yolanda. A Jorge, William, y al Alfre, evidente, tanto hemos pasado que no puedo olvidar ponerte en estas páginas, gracias por los buenos momentos que me has dado y por decorarme la casa ☺. A Rafa (la piscina muy limpia siempre) y a Paco por implicarse tanto en ayudarme. A Enma, por su enorme paciencia al "prestarme" tantas horas a Jose. A Henry, porque su ayuda ha sido imprescindible en esta última etapa, gracias mi pequeño hermanito. Y a Osmay, siempre pendiente desde la distancia. A Pepi que me enseñó tanto, a Made y Daniela, que me regalaron su compañía.

A todos los amigos que me han ayudado de una forma u otra a establecerme en España y hacerla mi casa. A Carmen y Antonio, Cristóbal y Bernarda, Jordi Castro, Santi y muchos más. De forma especial le agradezco a Grego y a la Cris, así como a su familia, para mí han sido muy importantes, hicieron que nunca me sintiera sola, gracias por el cariño que me han dado.

A las Religiosas de María Inmaculada, por su acogida, cariño y apoyo, en especial a la Hna. María Luisa. También quiero agradecer a las Religiosas de la Presentación, que me ayudaron a que el sacrificio fuera un poco menor.

A Emil y Benito, porque se han desprendido de lo que más querían y lo han compartido conmigo sin guardarme rencor.

A los más importantes de mi vida: mis padres, han sido y siguen siendo un ejemplo y un orgullo para mí, les agradezco la vida y la educación que me han dado, los valores que me han inculcado y sobre todo el cariño que he recibido. Gracias por el apoyo ante las decisiones que he tomado en mi vida. Son indispensables también los valores que me ha transmitido mi familia, y el amor con mayúsculas que me han dado siempre aún desde la distancia, pendientes de mí en cada momento. Gracias a mis tías y a mi tío, también a ti Cacun, responsables de que sea tan malcriada, gracias también a mis primos y por supuesto a mis abuelos, en especial a los que ya no están.

A mis otros padres, los de aquí, Ana y Paco, no puedo hacer más que agradecerles todo el cariño, los consejos y la confianza que han depositado en mí. Me he sentido como en casa gracias a Uds. Este trabajo está también dedicado a Uds., porque han sido mi mayor apoyo y mi mayor tesoro. Por supuesto también le agradezco a Iván y Rubén, y a toda la familia por ambos lados. Poca gente puede presumir de tener dos familias, yo me siento orgullosa de ello.

A mi hermano, por su apoyo en todo momento y frente a cualquier problema, por mantener siempre unida a nuestra pequeña familia en España y por saber siempre cómo hacerme reír. A Marcia, gracias por los momentos de complicidad, eres para mí, amiga y hermana. Y a ti, mi pequeñín, porque tu sonrisa alivió estos momentos de estrés, para que te enteres cuando sepas leer que tu tía te adora.

A Emmanuel, por su gran paciencia, porque ha dejado por mí a lo que más quería en el mundo, porque me ha mimado desde el primer día, y porque ni en los peores momentos me ha animado a abandonar en mi empeño aún sabiendo que la vida hubiera sido más fácil si lo hubiera dejado todo. Soy afortunada en tenerte. Gracias.

ÍNDICE

2.5.2. Síntesis de derivados del ácido hidroxámico en solución.....	44
2.5.3. Síntesis de derivados del ácido hidroxámico en fase sólida.....	50
3. OBJETIVOS	59
4. PARTE TEÓRICA.....	63
4.1. Generalidades	63
4.2. Síntesis de los compuestos utilizados como pseudotipos	65
4.3. Síntesis de imidas aromáticas	68
4.3.1. Síntesis de derivados de la ftalimida	68
4.3.2. Síntesis de derivados de la 1,8-naftalimida	75
4.4. Síntesis de benzo[d]isotiazoles.....	79
4.4.1. Síntesis de derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol	79
4.4.2. Síntesis de derivados del 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol.....	84
4.5. Síntesis de ácidos hidroxámicos mediada por reactivos unidos a fase sólida	86
4.6. Análisis espectroscópico	90
4.7. Evaluación biológica	107
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	115
5.1. Condiciones generales	115
5.2. Síntesis de productos intermedios.....	116
5.2.1. Procedimiento general de síntesis de compuestos derivados de la N-ftalimida	116
5.2.1.1. Síntesis del ácido (1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) acético (72)...	116

5.2.1.2. Síntesis del ácido 3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) propiónico (73)	117
5.2.1.3. Síntesis del ácido 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) hexanoico (74)	117
5.2.1.4. Síntesis de ácido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il-metil) benzoico (75)	118
5.2.2. Síntesis de compuestos derivados de 5-metil-ftalimida	118
5.2.2.1. Procedimiento general para la síntesis de ésteres derivados de la 5-metil-ftalimida	118
5.2.2.1.1. Síntesis de 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acetato de etilo (76)	118
5.2.2.1.2. Síntesis de 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propionato de etilo (77)	119
5.2.2.1.3. Síntesis de 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoato de etilo (78)	119
5.2.2.1.4. Síntesis de 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoato de etilo (79)	120
5.2.2.2. Procedimiento general para la síntesis de ácidos derivados de la 4-metil-ftalimida	121
5.2.2.2.1. Síntesis del ácido 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acético (80)	121
5.2.2.2.2. Síntesis del ácido 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propionico (81)	121
5.2.2.2.3. Síntesis del ácido 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoico (82)	122

5.2.2.2.4. Síntesis del ácido 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoico (83).....	122
5.2.3. Procedimiento general de síntesis de compuestos derivados de la 1,8- naftalimida	123
5.2.3.1. Síntesis del ácido 2-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) acético (93).....	123
5.2.3.2. Síntesis del ácido 3-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) propiónico (94).....	123
5.2.3.3. Síntesis del ácido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) hexanoico (95).....	124
5.2.4. Síntesis de compuestos derivados derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H- benzo[d]isotiazol.....	124
5.2.4.1. Procedimiento general para la síntesis de ésteres derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol	124
5.2.4.1.1. Síntesis de 2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) acetato de etilo (97).....	125
5.2.4.1.2. Síntesis de 3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) propionato de etilo (98).....	125
5.2.4.1.3. Síntesis de 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) pentanoato de etilo (99).....	126
5.2.4.1.4. Síntesis de 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) hexanoato de etilo (100).....	126
5.2.4.1.5. Síntesis de 7-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) heptanoato de etilo (101).....	127
5.2.4.2. Procedimiento general para la síntesis de ácidos derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol	127

5.2.4.2.1. Síntesis del ácido 2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) acético (102)	128
5.2.4.2.2. Síntesis del ácido 3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) propionico (103)	128
5.2.4.2.3. Síntesis del ácido 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) pentanoico (104)	128
5.2.4.2.4. Síntesis del ácido 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) hexanoico (105)	129
5.2.4.2.5. Síntesis del ácido 7-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) heptanoico (106)	129
5.2.5. Síntesis de compuestos derivados de 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol	130
5.2.5.1. Síntesis de ésteres derivados de 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol	130
5.2.5.1.1. Síntesis de 6-[(benzo[d]isotiazol-3-il)oxa] hexanoato de etilo (110) y 6-(3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) hexanoato de etilo (111).....	130
5.2.5.2. Síntesis de ácidos derivados de benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona	131
5.2.5.2.1. Síntesis del ácido 6-[(benzo[d]isotiazol-3-il)oxa] hexanoico (112).....	131
5.2.5.2.2. Síntesis del ácido 6-(benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona-2-il)hexanoico (113).....	132
5.3. Síntesis de compuestos finales	132
5.3.1. Síntesis de 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) -N-hidroxihexanamida (69).....	132
5.3.2. Síntesis en fase sólida de derivados del ácido hidroxámico	133
5.3.2.1. Síntesis de derivados de imidas aromáticas: ftalimidas.....	135

5.3.2.1.1. Síntesis de 3-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-26)	135
5.3.2.1.2. Síntesis de 2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-30)	135
5.3.2.1.3. Síntesis de 2S-2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-33).....	136
5.3.2.1.4. Síntesis de 2R-2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-34).....	136
5.3.2.1.5. Síntesis de 3-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-32)	137
5.3.2.1.6. Síntesis de 4-[(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-metil]-N-hidroxibenzamida (MTC-126)	137
5.3.2.1.7. Síntesis de 6-(5-metil-1,3-dioxoisoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-141)	137
5.3.2.1.8. Síntesis de 3-[2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-86)	138
5.3.2.1.9. Síntesis de 2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-106).....	138
5.3.2.1.10. Síntesis de 2S-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-107).....	139
5.3.2.1.11. Síntesis de 2R-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-108).....	139
5.3.2.1.12. Síntesis de 3-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-85)	140
5.3.2.1.13. Síntesis de 6-(5-nitro-1,3-dioxo-isoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-127)	140

5.3.2.2. Síntesis de derivados de imidas aromáticas: 1,8-naftalimidias	141
5.3.2.2.1. Síntesis de 3-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[<i>de</i>]isoquinolin-2-il)-acetamido]- <i>N</i> -hidroxipropanamida (MTC-40)	141
5.3.2.2.2. Síntesis de 2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[<i>de</i>]isoquinolin-2-il)-propanamido]- <i>N</i> -hidroxiacetamida (MTC-38)	142
5.3.2.2.3. Síntesis de 2 <i>S</i> -2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[<i>de</i>]isoquinolin-2-il)-propanamido]- <i>N</i> -hidroxi-2-propanamida (MTC-45)	142
5.3.2.2.4. Síntesis de 2 <i>R</i> -2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[<i>de</i>]isoquinolin-2-il)-propanamido]- <i>N</i> -hidroxi-2-propanamida (MTC-46)	143
5.3.2.2.5. Síntesis de 3-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[<i>de</i>]isoquinolin-2-il)-propanamido]- <i>N</i> -hidroxipropanamida (MTC-39).....	143
5.3.2.3. Síntesis de derivados de benzo[<i>d</i>]isotiazoles: 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazoles	144
5.3.2.3.1. Síntesis de 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)- <i>N</i> -hidroxipentanamida (MTC-123).....	144
5.3.2.3.2. Síntesis de 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)- <i>N</i> -hidroxihexanamida (MTC-97).....	144
5.3.2.3.3. Síntesis de 7-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)- <i>N</i> -hidroxiheptanamida (MTC-124).....	145
5.3.2.3.4. Síntesis de 3-[2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)-acetamido]- <i>N</i> -hidroxipropanamida (MTC-79).....	145
5.3.2.3.5. Síntesis de 2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)-propanamido]- <i>N</i> -hidroxiacetamida (MTC-103)	146
5.3.2.3.6. Síntesis de 2 <i>S</i> -2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)propanamido]- <i>N</i> -hidroxi-2-propanamida (MTC-104)	146

5.3.2.3.7. Síntesis de (<i>R</i>)-2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)propanamido]- <i>N</i> -hidroxi-2-propanamida (MTC-105).....	147
5.3.2.3.8. Síntesis de 3-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)-propanamido]- <i>N</i> -hidroxipropanamida (MTC-66).....	147
5.3.2.3.9. Síntesis de 4-[(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)metil]- <i>N</i> -hidroxibenzamida (MTC-128).....	148
5.3.2.3.10. Síntesis de 2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> -2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)-propanamido]-3-metil- <i>N</i> -hidroxipentanamida (MTC-94).....	148
5.3.2.3.11. Síntesis de 2 <i>S</i> , 2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)-propanamido]-4-metil- <i>N</i> -hidroxipentanamida (MTC-95).....	149
5.3.2.3.12. Síntesis de 2 <i>S</i> , 2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)-propanamido]-3-fenil- <i>N</i> -hidroxipropanamida (MTC-96).....	150
5.3.2.4. Síntesis de derivados de benzo[<i>d</i>]isotiazoles: 3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazoles	150
5.3.2.4.1. Síntesis de 6-(3-oxo-2H-benzo[<i>d</i>]isotiazol-2-il)- <i>N</i> -hidroxihexanamida (MTC-136)	150
5.3.2.4.2. Síntesis de 6-[(benzo[<i>d</i>]isotiazol-3-il)oxa]- <i>N</i> -hidroxihexanamida (MTC-144)	151
5.4. Método general de obtención de ácidos hidroxámicos utilizando el reactivo unido a fase sólida PSIIDQ.....	151
5.5. Ensayos biológicos de los compuestos sintetizados	152
5.5.1. Ensayos de inhibición sobre la enzima aislada	152

6. CONCLUSIONES	157
7. APÉNDICE	163
8. INDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	287

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

El cáncer es la tercera causa de muerte en el mundo, tras las enfermedades cardiovasculares y las infecciosas (Figura 1.1). Considerando ambos sexos, el cáncer que más muertes causa a nivel mundial es el de pulmón, seguido del de estómago, hígado y los colorrectales.

En el año 2002, 5.8 millones de hombres y 5 millones de mujeres, sufrieron un tumor maligno en todo el mundo, y 6.7 millones de personas murieron por esa causa. Si continúa la tendencia actual en cuanto a hábitos de vida, se espera que el número de nuevos casos aumente en un 50% en los próximos 20 años, alcanzando los 15 millones en el año 2020. En los países industrializados una de cada 4 personas morirán por un cáncer¹.

¹ Según informe de la Asociación Española Contra el Cáncer.

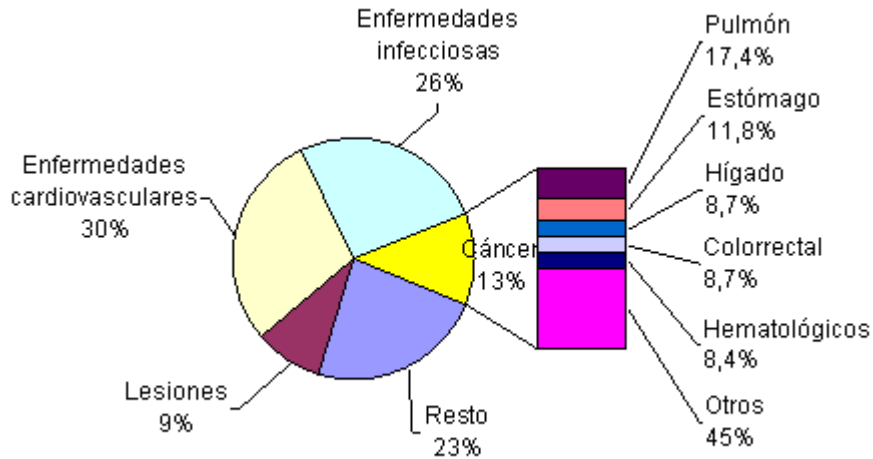


Figura 1.1. Causas de muerte en el mundo y tipos de cáncer más frecuentes

En España, el cáncer ya es la primera causa de mortalidad entre los hombres, y la segunda entre las mujeres, tras las enfermedades cardiovasculares. Uno de cada tres hombres y una de cada 5 mujeres que fallecen en España lo hacen por un cáncer. Considerando ambos sexos, el cáncer más frecuente es el colorrectal, seguido del de pulmón, mama, vejiga y próstata. Dentro del contexto europeo, la supervivencia del cáncer en España es comparable a la de los países más desarrollados, situándose en casi todas las localizaciones por encima de la media europea.

Desde el punto de vista del tratamiento de pacientes con cáncer, el conocimiento de la bioquímica de las células tumorales ha permitido el desarrollo de fármacos con capacidad de interferir en el crecimiento de las células transformadas frente a otras no tumorales. Así, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de la epigenética en la búsqueda de nuevas dianas a modular, útiles en un tratamiento antitumoral². Este término se refiere a la información que afecta a la actividad de nuestros genes pero que no afecta a la secuencia del ADN. La epigenética es lo que causaría que dos gemelos idénticos desarrollen dos fenotipos diferentes con el paso de los años debido a influencias medio ambientales. Dicho de otra forma, la secuencia del genoma humano es la misma para todas nuestras células, mientras que el epigenoma difiere entre tejidos y cambia en respuesta a modificaciones en el ambiente celular³.

² Yoo, C. B.; Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 37-50.

³ Qiu, J. Epigenetics: Unfinished symphony. *Nature* **2006**, 441(7090), 143-145.

El control epigenético de la expresión de nuestros genes se produce de dos formas: a) por modificación química del ADN, y b) por modificación de las proteínas que organizan al ADN en la cromatina (el componente principal de los cromosomas). En el primer caso, una citosina inmediatamente seguida de una guanina es metilada en la posición 5, lo que se conoce como el proceso de metilación del ADN. Esta metilación activa o desactiva la expresión génica a través de proteínas que regulan la estructura de la cromatina⁴.

En el segundo caso, las proteínas denominadas histonas determinan el grado de empaquetamiento de la cromatina. Para ello, el ADN cromosómico se dispone alrededor de las histonas, de forma que si el grado de empaquetamiento es alto no se permite la expresión génica, pero si es bajo, la expresión génica es activa. Cada histona posee un extremo en el que se han identificado hasta 20 diferentes modificaciones químicas (a modo de marcadores, del tipo metilación, acetilación y fosforilación). Algunas de estas modificaciones, o combinaciones de las mismas (lo que constituye un código), dan lugar a una cromatina relajada, otras sin embargo desencadenan el efecto contrario⁵.

Todo ello ha llevado tras la finalización del Proyecto Genoma Humano al desarrollo de la epigenómica como un esfuerzo a nivel mundial para la identificación de todas las modificaciones químicas del ADN y de las histonas que se producen en todos los cromosomas de todas las células normales de tejidos humanos.

La enorme ventaja de actuar con fármacos a este nivel está basada en que los cambios epigenéticos son reversibles y, por tanto, más fáciles de modular que las mutaciones genéticas, mediante la adición o eliminación de los marcadores químicos involucrados. Un ejemplo de ello es el fármaco Vidaza (azacitidine)⁶, aprobado por la FDA en Mayo de 2004 para el tratamiento del síndrome mielodisplasia o preleucemia. Este fármaco evita la hipermetilación de células cancerígenas y estimula la expresión de diferentes genes, incluidos aquellos que suprimen el desarrollo tumoral.

⁴ Jones, P. A. Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, 3, 415-428.

⁵ Biel, M.; Wascholowski, V.; Giannis, A. Epigenetics-An epicenter of gene regulation: Histones and histone-modifying enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3186-3216.

⁶ Issa, J. J.; Kantarjian, H. M.; Kirkpatrick, P. Fresh from the pipeline: Azacitidine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4(4), 275-276.

Esta Memoria de Tesis doctoral se enmarca en el campo de la epigenética. Uno de los marcadores químicos que se encuentran en las histonas son los grupos acetilo presentes en los grupos amino de las cadenas laterales del aminoácido lisina. La introducción de los mismos evita la protonación de dichos grupos amino y, por tanto, el establecimiento de enlaces de tipo iónico con el ADN. Como consecuencia el grado de empaquetamiento del mismo es menor, se produce la expresión génica y se evita la división celular. La pérdida de estos grupos acetilo catalizada por las enzimas denominadas histonas desacetilasas conduce al establecimiento de enlaces de tipo iónico con el ADN, a un mayor grado de empaquetamiento y a la división celular. Se ha demostrado que los fármacos con capacidad para inhibir este tipo de enzimas poseen actividad antitumoral⁷.

Basándonos en esta hipótesis de trabajo y en la información estructural disponible sobre las histonas desacetilasas, se han diseñado y sintetizado nuevos inhibidores con actividad submicromolar sobre histonas desacetilasas *in vitro*. Por último, se propone una nueva síntesis de derivados del ácido hidroxámico utilizando un reactivo de acoplamiento unido a fase sólida. Las relaciones estructura-actividad encontradas y un protocolo de síntesis en paralelo basado en este tipo de química deberán proporcionar nuevos fármacos con una actividad antitumoral óptima.

⁷ Acharya, M. R.; Sparreboom, A.; Venitz, J.; Figg, W. D. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: A review. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 917-932.

2. ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1. El Cáncer

El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) define el cáncer como el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales en el organismo, dañando y alterando la función normal de tejidos y órganos.

La carcinogénesis o aparición de un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células que da lugar a un tumor o neoplasia, y la posterior adquisición por estas células de capacidad invasiva, que les permite diseminarse desde su localización original en el organismo y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (proceso conocido como metástasis).

La invasividad incluye a su vez varios procesos: pérdida de la adhesión celular, degradación de la matriz extracelular y movilidad. Todo ello permite a las células infiltrarse en el tejido que las rodea al mismo tiempo que conservan una elevada capacidad para multiplicarse. Este proceso de invasión ocasiona, por tanto, la diseminación local de las células tumorales. Hoy se cree que el proceso de aparición de células invasivas comienza

en una fase relativamente temprana del crecimiento del tumor primario. Es decir, que la metástasis requiere tumorigenicidad e invasividad, procesos que se inician en este orden pero que se solapan parcialmente, de modo que mutaciones que proporcionan a las células tumorales la capacidad de invadir y formar posteriormente metástasis se comienzan a acumular ya durante la fase de crecimiento del tumor primario.

El crecimiento de un tumor, tanto primario como secundario, mayor de 5-10 mm de diámetro requiere su vascularización. Sin la cercanía de vasos sanguíneos, las células tumorales no sólo no pueden diseminarse, sino que mueren por deficiencia de nutrientes y oxígeno, y falta de eliminación de anhídrido carbónico, ácido láctico y otras sustancias de desecho, debido a que los intercambios por simple difusión no alcanzan a las células internas del tumor. La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes, es fundamental tanto al comienzo como al final del proceso de carcinogénesis. Al principio, para el aumento del tamaño del tumor primario y para el acceso al torrente circulatorio de las células tumorales, lo que permitirá su diseminación. Y al final, cuando alguna célula ha sobrevivido a la extravasación y coloniza tejidos distantes, para poder reiniciar el crecimiento de nuevos tumores secundarios.

Todas las células de un tumor, benigno o maligno, derivan de una sola célula, es decir, los tumores son monoclonales. El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica la acumulación sucesiva de alteraciones en las células durante un largo período de tiempo. Hoy se piensa que desde el inicio del proceso hasta que un cáncer puede ser diagnosticado transcurren una o más décadas. Este es el proceso de progresión tumoral, que se compone de cambios genéticos (mutaciones) y selección progresiva de células cada vez más anormales en su crecimiento y comportamiento, adquiriendo la capacidad de invadir el tejido circundante y, posteriormente, de originar metástasis, responsables de la gran mayoría de fallos en los tratamientos y, por tanto, de las muertes por cáncer⁸.

Las mutaciones que resultan en la activación constitutiva de los oncogenes o en la inactivación de genes supresores tumorales, son importantes eventos carcinogénicos, aunque no los únicos. Una expresión genética aberrante también juega un papel importante en el inicio y progresión del tumor. Además, las mutaciones dentro del promotor genético o los cambios epigenéticos, pueden inducir una expresión anormal de

⁸ www.cnio.com

los genes que regulan la diferenciación celular, el ciclo celular y la apoptosis, aumentando así el potencial para la transformación celular⁹.

2.2. Terapia antitumoral

En la actualidad, la investigación sobre la terapia antitumoral incluye, de forma general, las siguientes estrategias para la supresión farmacológica de fenotipos celulares malignos:

- a) Terapias de inhibición de la síntesis de ADN. Provocan la muerte celular debido a la detención del metabolismo, crecimiento y proliferación celular (terapias citotóxicas).
- b) Terapias que producen lesiones en el ADN, capaces de activar los procesos fisiológicos que conducen a la apoptosis.
- c) Terapias que actúan en el ciclo celular, sobre proteínas reguladoras o efectoras. Esta aproximación busca la detención del ciclo, principalmente en su fase G₁, desde donde la célula puede proceder a su diferenciación. No se trata de producir la muerte celular, sino la reversión del fenotipo maligno.

Para el éxito de la terapia anticancerosa son necesarios estudios genómicos y proteómicos de los pacientes, de modo que queden establecidos los marcadores predictivos del tipo de terapia a seguir. Por tanto, las características moleculares de los diferentes fenotipos malignos determinarán la respuesta al tratamiento¹⁰.

2.3. Epigenética

La epigenética puede definirse como cualquier actividad de regulación genética que no involucra cambios en el ADN y que puede transmitirse a través de una o más generaciones.

⁹ Johnstone, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: Novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Rev. Drug Disc.* **2002**, *1*, 287-299.

¹⁰ Campos J., Saniger, E., Marchal, J. A.; Aiello, S.; Suárez, I.; Boulaiz, H.; Aránega, A.; Gallo, M.A.; Espinosa, A. New medium oxacyclic O,N-acetals and related open analogues: biological activities. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887-916.

Una interpretación más acertada y reciente describe la epigenética como el estudio de cambios en la función genética, que se transmiten de una generación a otra por herencia meiótica y mitótica y que no implican un cambio en la secuencia del ADN.

La diferencia más importante entre el mecanismo epigenético y el mecanismo genético es que los cambios epigenéticos pueden ser reversibles mediante el uso de agentes químicos.

Los dos mayores mecanismos en la regulación epigenética (algunas veces estrechamente interdependientes) involucran cambios en la estructura de la cromatina (remodelación de la cromatina) a través de modificaciones covalentes de las histonas y la metilación del ADN¹¹.

Los tres principales tipos de información epigenética son:

- a) Metilación de la citosina del ADN: es una modificación del ADN, en la que un grupo metilo es transferido desde S-adenosilmetionina a una posición C-5 de citosina por una ADN-5 metiltransferasa. La metilación del ADN ocurre, casi exclusivamente, en dinucleótidos CpG, teniendo un importante papel en la regulación de la expresión del gen.
- b) *Impronta genómica*, en inglés genomic imprinting.
- c) Modificación de histonas: incluyendo metilación¹², fosforilación y acetilación.

En la actualidad se está llevando a cabo un esfuerzo importante para el desarrollo de nuevas terapias frente al cáncer basadas en la modificación de las histonas. Debido a la importancia que esta estrategia posee en esta Memoria, se describe en mayor profundidad este tipo de modificaciones.

¹¹ Mai, Antonello; Massa, Silvio; Rotili, Dante. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med. Res. Reviews*, **2005**, 25 (3), 261-309.

¹² Biel, M.; Wascholowski, V.; Giannis, A. Epigenetics, an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3186-3216.

2.4. Antecedentes biológicos

2.4.1. Histonas. Metilación y desmetilación

El genoma humano se localiza dentro del núcleo celular en la cromatina, que es un complejo macromolecular dinámico formado por nucleosomas. Un único nucleosoma (Figura 2.2) se compone de un fragmento de ADN (146 pares de bases) enrollado alrededor de un octámero de histona formado por cuatro núcleos de histona: un tetrámero H3-H4 y dos dímeros H2A- H2B.

Las histonas son pequeñas proteínas básicas ricas en los aminoácidos lisina y arginina. Las cuatro histonas nucleosómicas contienen dos dominios: el dominio C-terminal, localizado dentro del nucleosoma y el dominio N-terminal con residuos lisina extendidos fuera del mismo¹³.

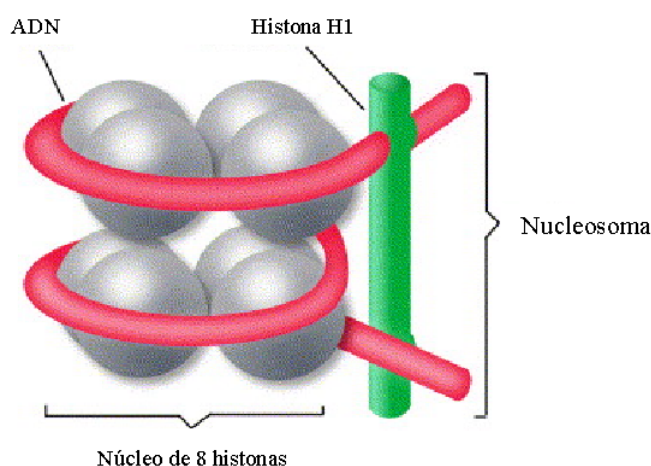


Figura 2.2. Esquema del nucleosoma.

Aunque la metilación de las histonas se conoce desde hace 30 años¹⁴, no es hasta la actualidad cuando se ha puesto en el centro de atención como una parte importante de la regulación genética. En los últimos cinco años se han identificado diferentes enzimas denominadas histona metil transferasas (HMT) y se han caracterizado las interacciones entre las diferentes modificaciones de las histonas¹⁵.

¹³ Monneret, Claude. Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*, 1-13.

¹⁴ Murray, K. The occurrence of ϵ -N-methyllysine in histones. *Biochemistry*.**1964**, *3*, 10-15.

¹⁵ Sims, R.J.; Nishioka, K.; Reingberg, D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* **2003**, *19*, 629-639.

Este proceso epigenético es estable y no altera la carga general de los extremos de las histonas. Sin embargo, un incremento en la metilación conlleva a un aumento de la basicidad, en la hidrofobia e influye en la afinidad por moléculas con carga aniónica como el ADN. (Figura 2.1). Las HMT presentan una gran especificidad al nivel de la metilación que catalizan, y los últimos estudios sugieren que podrían tener una relevancia funcional en la transcripción¹⁶.

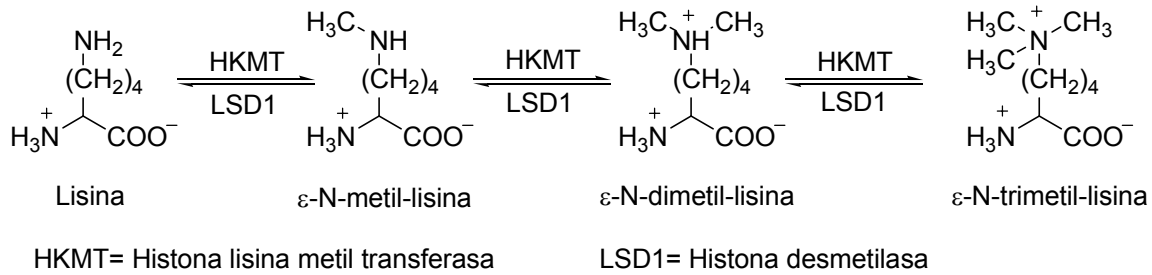


Figura 2.1

De forma similar a como se verá en la acetilación de las histonas, la metilación puede modular la interacción de las histonas con el ADN y las proteínas asociadas a la cromatina, lo cual resulta en una alteración de las estructuras y funciones nucleosómicas y contribuye al control de diferentes procesos biológicos¹⁷.

La histona desmetilasa LSD1, también conocida como KIAA0601, es una amino oxidasa FAD dependiente, que actúa asociada al complejo represor CoREST y que reprime la transcripción¹⁸.

2.4.2. Histonas. Fosforilación

Recientemente se ha demostrado que la fosforilación es un fenómeno que se produce en todas las histonas, aunque este tipo de modificación se conoce desde los años 60¹⁹. Dicho proceso está involucrado en el ciclo celular durante la mitosis y la

¹⁶ Turner, B.M. Memorable transcription. *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, 390-393.

¹⁷ Rice, J. C.; Allis, C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, 13, 263-273.

¹⁸ a) Kubicek, S.; Jenuwein, A. A crack in histone lysine methylation. *Cell.* **2004**, 119, 903-906; b) Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, J.; Whetstone, R.; Cole, P. A.; Casero, R. A.; Shi, Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* **2004**, 119, 941-953.

¹⁹ Gutiérrez, R. M.; Hnilica, L. S. Tissue specificity of histone phosphorylation. *Science.* **1967**, 157, 1324-1325.

meiosis²⁰, así como en la activación genética transcripcional durante la interfase. Todos los residuos de serina fosforilados están localizados dentro de la secuencia aminoacídica altamente conservada Ala-Arg-Lys-Ser²¹.

2.4.3. Histonas. Acetilación y desacetilación

El extremo N-terminal de las histonas pasa a través y alrededor de la doble hélice del ADN, y su modificación, mediante acetilación-desacetilación es crucial en la modulación de la expresión genética, al afectar ésta a la interacción del ADN con los complejos proteicos no nucleosomales reguladores de la transcripción²².

La acetilación de residuos de lisina en estas secuencias N-terminales está mediada por las enzimas denominadas histona acetiltransferasas (HAT). Los grupos acetilo son eliminados de las ϵ -N-acetil-lisinas por la actividad de las histonas desacetilasas (HDAC). Las actividades de las HAT y las HDAC se asocian a los genes diana a través de complejos constituidos por factores de transcripción específicos para ciertas secuencias y sus respectivos cofactores. El balance entre las actividades opuestas de las HAT y las HDAC regula el estado de acetilación de las histonas²³. (Figura 2.3)

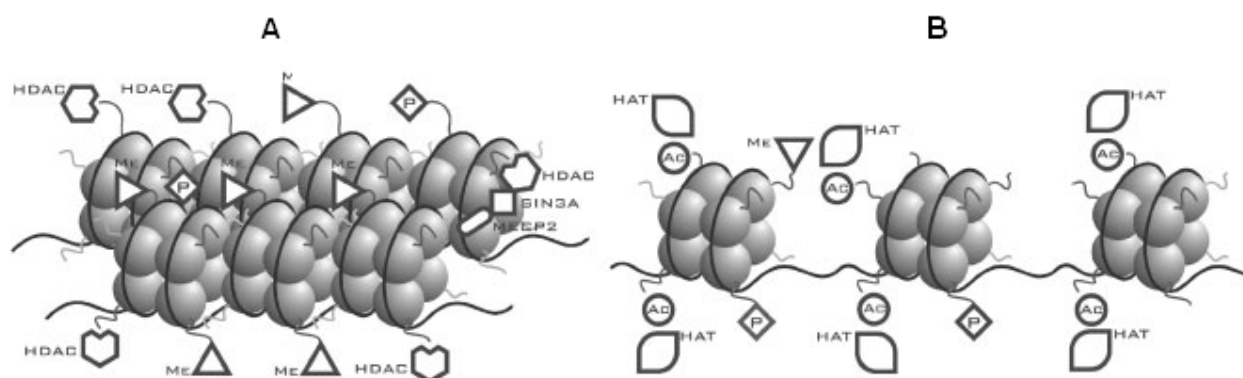


Figura 2.3. Actividad de las HDAC y las HAT. A) Configuración cerrada de la cromatina: represión transcripcional. B) Configuración abierta de la cromatina: activación transcripcional

²⁰ Wei, Y.; Mizzen, C.A.; Cook, R.G.; Gorovsky, M. A.; Allis, C.D. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1998**, *95*, 7480-7484.

²¹ Clayton, A.L.; Mahadevan, L. C. MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* **2003**, *546*, 51-58.

²² a) Marks, P. A.; Rifkind, R. A.; Richon, V. M.; Breslow, R.; Miller, T.; Kelly, W. K. Histone deacetylase and cancer: causes and therapies. *Nature Rev. Cancer*, **2001**, *1*, 194-202. b) Strahl, B. D.; Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature*, **2000**, *403*, 41-45. c) Cheung, P.; Allis, C. D.; Sassone-Corsi, P. Signalling to chromatin through histone modifications. *Cell*, **2000**, *103*, 263-271.

²³ Marks, P. A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1210-1216.

En general, altos niveles de acetilación (hiperacetilación) se asocian a un incremento de la actividad transcripcional, mientras que bajos niveles de acetilación (hipoacetilación) se asocian a la represión de la expresión genética. Esto es debido a que al disminuir el espacio entre el nucleosoma y el ADN enrollado a su alrededor, se dificulta el acceso de los factores de transcripción, lo que conduce a una represión transcripcional²⁴.

Los receptores del ácido retinoico y de la hormona tiroide, constituyen receptores nucleares de la gran familia de receptores esteroide/retinoide y son ejemplos prototipo de factores de transcripción que dependen de una activación por parte de un ligando apropiado, para el acoplamiento de los cofactores asociados a HAT-HDAC. En ausencia de ligandos, estos receptores nucleares interactúan con los corepresores, los cuales forman grandes complejos proteicos que contienen HDAC y que, por ende, inhiben la transcripción. Durante la unión del ligando, el corepresor se disocia y es reemplazado por proteínas coactivadoras que existen en complejos multiproteicos, rescatando la actividad de la HAT. El ligando induce un intercambio en la forma de receptor nuclear de represión a activación, lo que refleja un intercambio de los complejos corepresor y coactivador con actividades enzimáticas antagonistas.

La acetilación ha sido comparada con la fosforilación como mecanismo de control celular observándose la equivalencia de las HAT a las kinasas y de las HDAC a las fosfatasas. Al igual que en la fosforilación, se conoce que la acetilación modifica una amplia variedad de proteínas celulares y regula funciones moleculares que incluyen el reconocimiento del ADN, interacciones proteína-proteína y la estabilidad proteica. También existen notables diferencias entre la fosforilación y la acetilación: a) No hay evidencia directa de una cascada de acetilación, por lo que la señal biológica es transmitida a través de una activación, por acetilación, de un sustrato que es en sí mismo una acetilasa y b) las acetilasas tienen una mayor presencia en los grandes complejos nucleares. A pesar de estas diferencias, el hecho fundamental recae en que, tanto la

²⁴ Ruijter, A.J.M.; Gennip, A.H.; Caron, H.N. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.*, **2003**, 370, 737-749.

acetilación como la fosforilación, pueden regular procesos fundamentales clave en respuesta a señales extracelulares²⁵.

2.4.3.1. Las histonas desacetilasas (HDAC)

La familia de las HDAC en mamíferos incluye tres subclases²⁶. La clase I engloba las isoformas HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8. Dentro de la clase II se encuentran las isoenzimas HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9^{27,28} y HDAC10²⁹ y son proteínas de mayor tamaño. Por último, la clase III es homóloga a la proteína de levadura sir2 e incluye las isoenzimas SIRT1-7 NAD⁺ dependientes y se conocen como sirtuinas. Recientemente ha sido identificada HDAC11 como un nuevo miembro de la familia de las HDAC, pero dada la poca similitud secuencial con el resto, no se clasifica dentro de las clases anteriores. El gran número de isoenzimas HDAC y de proteínas que interactúan, permite modular la especificidad del sustrato e incluso modificar la selectividad hacia dianas de tipo no histona³⁰.

El sitio activo de las HDAC consiste en un “bolsillo” tubular hidrofóbico con una amplia curvatura en cuyo extremo se encuentra un átomo de zinc (Zn²⁺)²⁴, crucial para su actividad. En base a dicha estructura y al mecanismo de acción se diseñan inhibidores de HDAC con un grupo capaz de coordinarse al Zn²⁺, un grupo voluminoso lipófilo y un linker

²⁵ a) Kouzarides, T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* **2000**, *19*, 1176-1179. b) Workman, P. Scoring a bull's-eye against cancer genome targets. *Curr. Op. Pharmacol.* **2001**, *1*, 342-352.

²⁶ Gray, S. G. Ekström, T. J. The human histone deacetylase family. *Exp. Cell Res.* **2001**, *262*, 75-83.

²⁷ Bertos, N. R.; Wang, A. H.; Yang, X-J. Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem. Cell Biol.* **2001**, *79*, 243-252.

²⁸ a) Zhou, X.; Marks, P. A.; Rifking, R. A.; Richon, V. M. Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10572-10577. b) Mählknecht, U.; Schnittger, S.; Will, J.; Cicek, N.; Hoelzer, D. Chromosomal organization and localization of the human histone deacetylase 9 gene (HDAC9). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 182-191.

²⁹ a) Tong, J.J.; Liu, J.; Bertos, N. R.; Yang, X-J. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Research*, **2002**, *30*, 1114-1123. b) Kao, H-Y.; Lee, C-H.; Komarov, A. Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 187-193. c) Guardiola, A. R.; Yao, T-P. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3350-3356. d) Fischer, D. D.; Cai, R.; Bathia, U. Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6656-6666.

³⁰ Gao, L.; Cueto, M.; Asselbergs, F.; Atadja, P.; Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25748-25755.

o espaciador que los una. La longitud del espaciador debe permitir la inserción en el bolsillo activo y la coordinación al Zn^{2+} catalítico³¹.

2.4.3.1.1. Mecanismo catalítico de las HDAC pertenecientes a las clases I y II

De forma general, el átomo de Zn^{2+} situado en el bolsillo polar dentro del sitio activo enzimático se coordina con el resto de la lisina acetilada procedente de la histona, lo que debilita el enlace amida y favorece el ataque hidrolítico de una molécula de agua³³ (Figura 2.4).

Así, el resto de lisina acetilada es orientado y activado por la formación de un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Tyr297. Dentro del sitio catalítico enzimático también se sitúa la molécula de agua ordenada y estabilizada por la interacción con el Zn^{2+} catalítico y el sistema His131-Asp166 (Figura 2.4, A). Debido a ello, se favorece el ataque nucleofílico de la molécula de agua y la formación de un oxianión estabilizado por coordinación con el Zn^{2+} catalítico (Figura 2.4, B). El protón requerido para la descomposición de dicho estado de transición es aportado por el sistema His132-Asp173 (Figura 2.4, C)³².

³¹ Lu, Q.; Yang, Y.-T.; Chen, C.-S.; Davis, M.; Byrd, J. C.; Etherton, M. R.; Umar, A.; Chen, C.-S. Zn^{2+} -chelating motif-tethered short-chain fatty acids as a novel class of histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 467-474.

³² Grozinger, C.M.; Shreiber, S.L. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small molecules inhibitors. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 3-16.

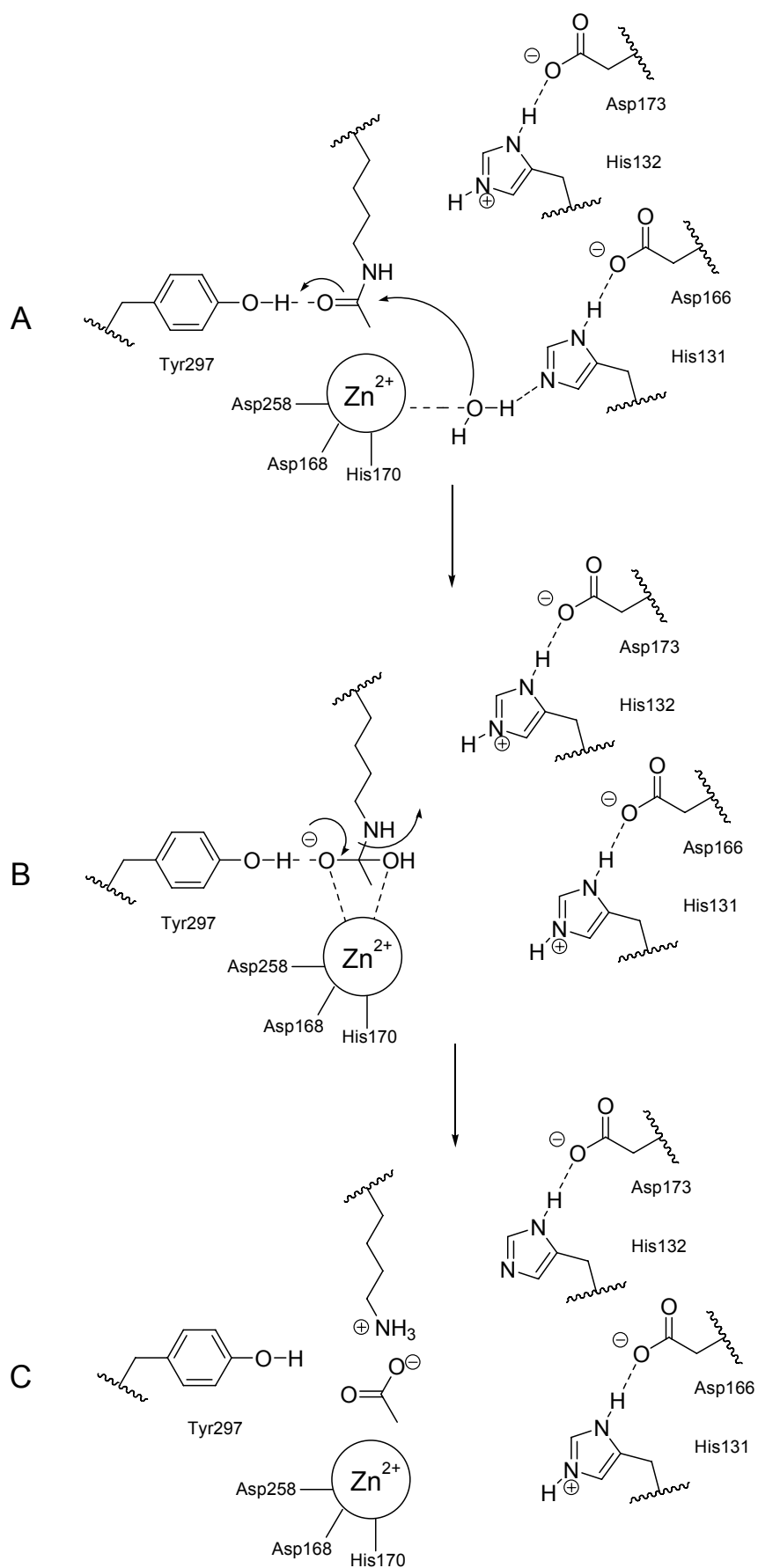


Figura 2.4. Mecanismo catalítico de las HDAC de clase I y II

2.4.3.1.2. Mecanismo catalítico de las HDAC pertenecientes a la clase III (sirtuinas)

Las HDAC pertenecientes a esta clase no solo actúan sobre las histonas, también están involucradas en el control de otras proteínas celulares, entre las que se incluyen las implicadas en la regulación del ciclo celular y en la respuesta al daño del ADN. Sin embargo, a diferencia de las histonas zinc-dependientes, las sirtuinas utilizan como cofactor el NAD durante la desacetilación de los restos de lisina, obteniéndose un residuo de lisina desacetilado, nicotinamida y 2'-O-acetil-ADP-ribosa³³.

Tras el establecimiento de dos enlaces de hidrógeno entre el resto acetilo de la lisina y los grupos hidroxilo del cofactor (Figura 2.5, A), se produce la liberación de nicotinamida asistida por una molécula de agua ordenada (Figura 2.5, B). De esta forma se obtiene un intermedio altamente reactivo constituido por el fragmento de ribosa activado. A continuación se establece un enlace covalente entre el ión oxocarbonio del fragmento de ribosa y el resto acetilo de la lisina (Figura 2.5, B y C). Este intermedio experimenta una reorganización promovida por la captación de un protón por la His135 (Figura 2.5, C) y que da lugar a la formación de otro intermedio de tipo acetálico (Figura 2.5, D). Por último, la molécula de agua media la transferencia del resto acetilo entre el fragmento de lisina y el grupo ribosa³⁴.

³³ Yarnell, A. Blocking genome gatekeepers. *Science & thecnology*. **2006**, 43-44.

³⁴ Zhao, K.; Harshaw, X.; Chai, X.; Marmostein, R. Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD(+)-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2004**, *101*, 8563-8568.

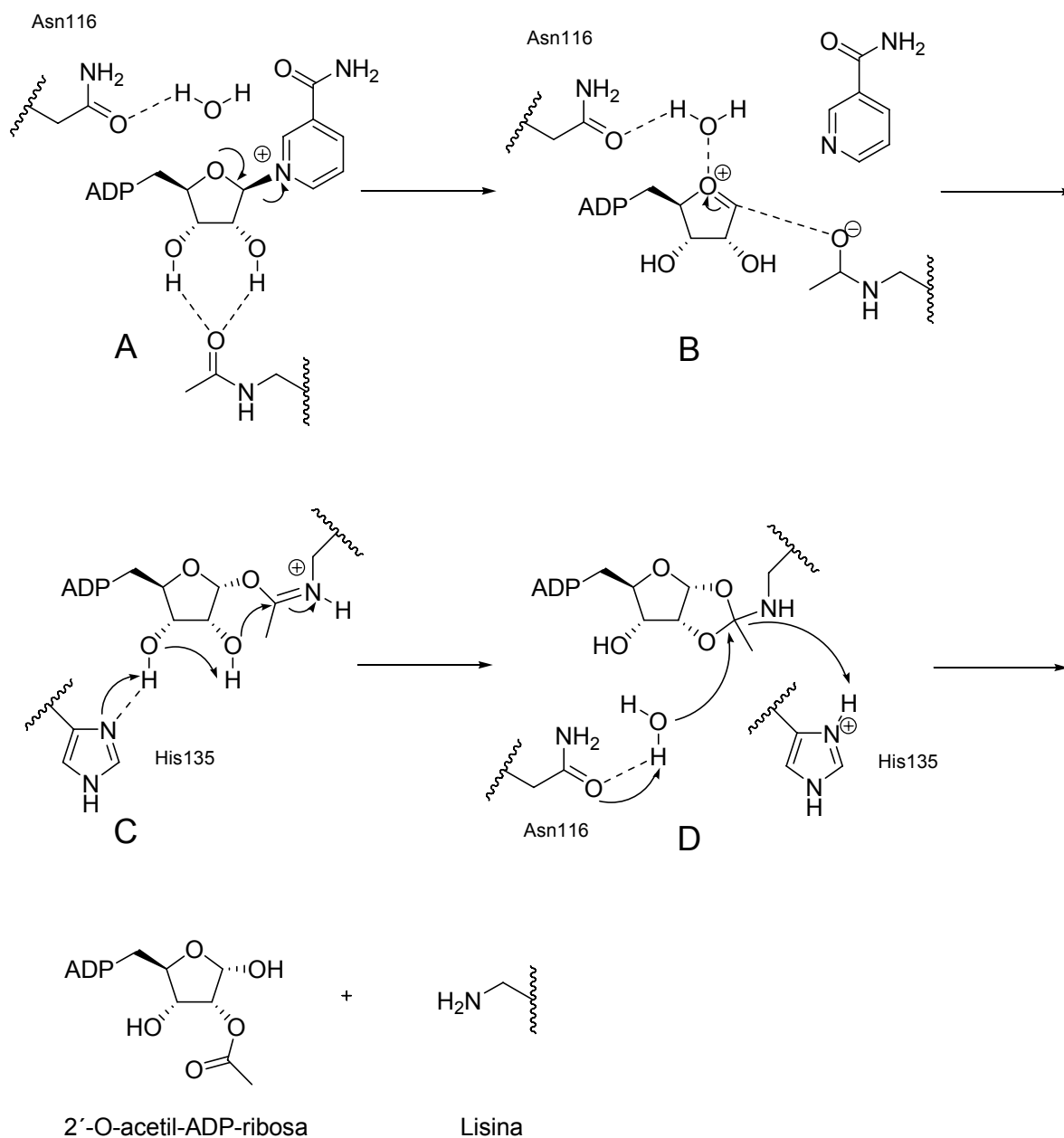


Figura 2.5. Mecanismo catalítico de las sirtuinas

2.4.3.1.3. Inhibidores de las histonas desacetilasas

El diseño de inhibidores de las histonas desacetilasas de las clases I y II, está basado en la existencia de un átomo de Zn^{2+} catalítico coordinado con dos residuos de aspártico 168 y 258, a la His170, a dos pares de His-Asp y a un resto de tirosina. Todo ello constituye un bolsillo polar dentro del sitio catalítico enzimático de naturaleza apolar³⁵ (Figura 2.6)

³⁵ Van Ommeslaeghe, K.; Loverix, S.; Geerlings, P.; Tourwe, D. DFT-based ranking of zinc-binding groups in histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem.* **2005**, 13(21), 6070-6082.

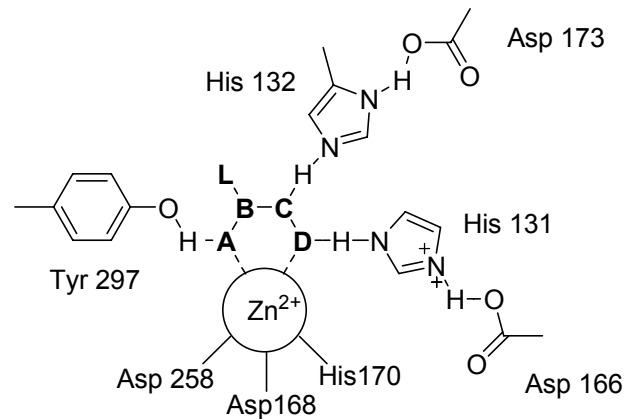


Figura 2.6

Por tanto, un fragmento con capacidad para situarse dentro del sitio activo enzimático y coordinarse con el átomo de Zn^{2+} debería poseer las siguientes características:

- El fragmento **A** (Figura 2.6) debería ser una base blanda con capacidad para donar electrones y coordinarse con el átomo de Zn^{2+} catalítico. Además debe ser un aceptor de enlaces de hidrógeno que permita establecer un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Tyr297. Sin embargo, también sería válido un dador de enlaces de hidrógeno, capaz de establecer dicho enlace con el oxígeno de la Tyr297.
- El fragmento **B** (Figura 2.6) debe ser un grupo trivalente que permita unir el fragmento quelante del Zn^{2+} con el fragmento espaciador.
- El fragmento **C** (Figura 2.6) debe ser un grupo trivalente donador de enlaces de hidrógeno con capacidad para establecer este tipo de enlaces con el resto de His132.
- El fragmento **D** (Figura 2.6) debe ser un grupo con capacidad para coordinarse al átomo de Zn^{2+} y también establecer un enlace de hidrógeno con el resto de His131.
- El fragmento **L** (Figura 2.6) permite la unión del grupo quelante del átomo de Zn^{2+} con la cabeza lipófila.

Debido a que los inhibidores más recientemente descritos de las HDAC parecen superar muchos de los aspectos más negativos de los inhibidores de primera generación en uso clínico, se puede establecer el valor terapéutico derivado de la inhibición de las HDAC en leucemias y otras enfermedades, incluyendo tumores sólidos y dependientes de señales hormonales alteradas³⁶.

La no resolución por rayos X de la estructura de las isoenzimas HDAC humanas complica el diseño de inhibidores selectivos frente a las diferentes isoformas. Estudios cristalográficos realizados sobre una enzima bacteriana relacionada con las HDAC o proteína parecida a la histona desacetilasa (HDLP)³⁷, ha permitido establecer el mecanismo de reacción para la rotura dependiente de zinc del grupo acetamida. De esta forma, se ha utilizado la estructura cristalina de la HDLP de *Aquifex aeolicus*, con un 35% de homología con la HDAC1 humana, como modelo para el desarrollo de nuevos inhibidores.

La cocrystalización de esta enzima con TSA o ácido suberoilánilido hidroxámico, demostró que estos inhibidores mimetizan el sustrato y que la quelación del zinc en el bolsillo catalítico por el ácido hidroxámico es el principal mecanismo de inhibición. El mantenimiento de la secuencia aminoacídica del loop proteico que forma el sitio activo, entre la HDLP y las clases I y II de las HDAC, sugiere que las HDAC llevan a cabo la misma reacción catalítica y experimentan la misma inhibición frente al TSA que la HDLP. Por otro lado, la estructura de la HDLP es útil solo en la región que rodea al espaciador de los inhibidores y el sitio catalítico, pero no en otras zonas, por lo que el desarrollo de nuevos inhibidores se lleva a cabo por modificación de ligandos³².

Se han descrito varias clases de inhibidores de las HDAC³⁸: ácidos alifáticos de cadena corta, ácidos hidroxámicos, benzamidas y tetrapéptidos cíclicos. Los ácidos alifáticos de cadena corta como el butirato³⁹, fenilbutirato⁴⁰ o ácido valproico⁴¹ son menos

³⁶ Krämer, O. H.; Göttlicher, M.; Heinzel, T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol. Metabol.* **2001**, *12*, 294-300.

³⁷ Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, **1999**, *401*, 188-193.

³⁸ Jung, M. Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1505-1511. b) Kouraklis, G.; Theocharis, S. Histone deacetylase inhibitors and anticancer therapy. *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents.* **2002**, *2*, 477-484.

³⁹ Newmark, H. L.; Lupton, J. R.; Young, C. W. Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogs and current status. *Cancer Lett.* **1994**, *78*, 1-5.

potentes que otros inhibidores y muestran su actividad *in vivo* solo a concentraciones milimolares.

Los híbridos polares derivados del ácido hidroxámico y la benzamida son inhibidores de las HDAC⁴² y potentes inductores de diferenciación. Tienen en común dos grupos polares separados por una cadena apolar metilénica de 5 o 6 miembros. Entre ellos, el ácido suberoilánilido hidroxámico (SAHA, **1**) y el ácido bis-(*m*-carboxicinamil) hidroxámico (CBHA, **2**) fueron sintetizados para probar la posibilidad de que un grupo hidrofóbico, en este caso el fenilo, en un extremo de la molécula podría aumentar la actividad⁴³ (Figura 2.7). Este tipo de inhibidores son activos frente a HDAC1 y HDAC3 a concentraciones submicromolares [Cl_{50} (HDAC1)= 0.01 μ M para ambos compuestos; Cl_{50} (HDAC3)= 0.02 μ M y 0.07 μ M, respectivamente]⁴⁰.

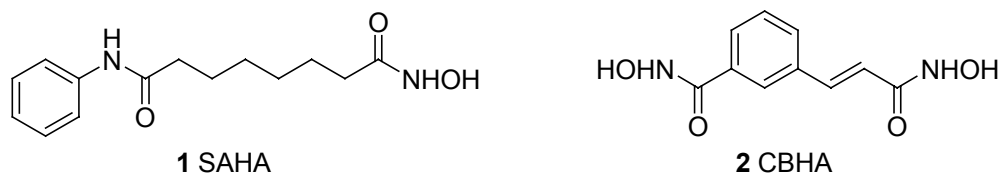


Figura 2.7

Manfred Jung y colaboradores han obtenido potentes inhibidores de las HDAC con estructura general **3** (Figura 2.8), donde la región responsable de la especificidad de la enzima está separada por un espaciador, de la zona responsable de su inactivación⁴⁴. Esta serie de compuestos **4** y **5** está relacionada estructuralmente a compuestos como el SAHA (**1**) y deriva de los potentes inhibidores Trapoxin B y Trichostatin A.

⁴⁰ DiGiuseppe, J. A.; Weng, L. J.; Yu, K. H.; Fu, S.; Kastan, M. B.; Samid, D.; Gore, S. D. Phenylbutyrate-induced G1 arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells: structure-function analysis. *Leukemia*, **1999**, *13*, 1243-1253.

⁴¹ a) Göttlicher, M.; Minucci, S.; Zhu, P.; Krämer, O. H.; Schimpf, A.; Giavara, S.; Sleeman, J. P.; Lo Coco, F.; Nervi, C.; Pelicci, P. G.; Heinzl, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6969-6978. b) Piel, C. J.; Zhang, F.; Huang, E. Y.; Guenther, M. G.; Lazar, M. A.; Klein, P. S. Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36734-36741.

⁴² Richon, V. M.; Emiliani, S.; Verdin, E.; Webb, Y.; Breslow, R.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3003-3007.

⁴³ Richon, V. M.; Webb, Y.; Merger, R.; Sheppard, T.; Jursic, B.; Ngo, L.; Civoli, F.; Breslow, R.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5705-5708.

⁴⁴ Jung, M.; Hoffmann, K.; Brosch, G.; Loidl, P. Analogues of Trichostatin A and Trapoxin B as histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1655-1658.

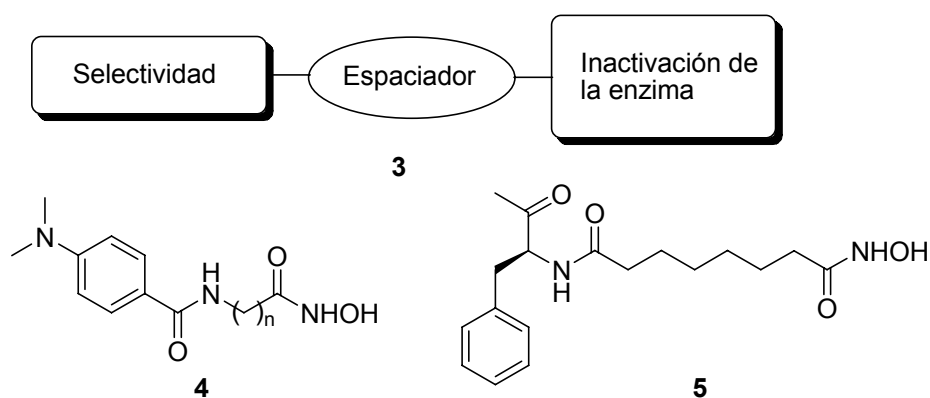


Figura 2.8

Las relaciones estructura-actividad para los análogos tipo **4** fue investigada posteriormente sobre las HDAC HD-2 de origen vegetal⁴⁵. En este trabajo se observó el requerimiento de un espaciador de grupos metileno de cinco o seis miembros para obtener la máxima actividad inhibitoria. La modificación de los sustituyentes con diferentes valores de lipofilia y constantes σ sobre el anillo aromático no fue significativa, manteniéndose la actividad inhibitoria de los compuestos en un rango de 0.1 a 1 μM . El compuesto más potente de la serie fue **6** (Figura 2.9) con una CI_{50} de 0.1 μM , y el compuesto **7**, con un espaciador más rígido, con una CI_{50} de 0.18 μM .

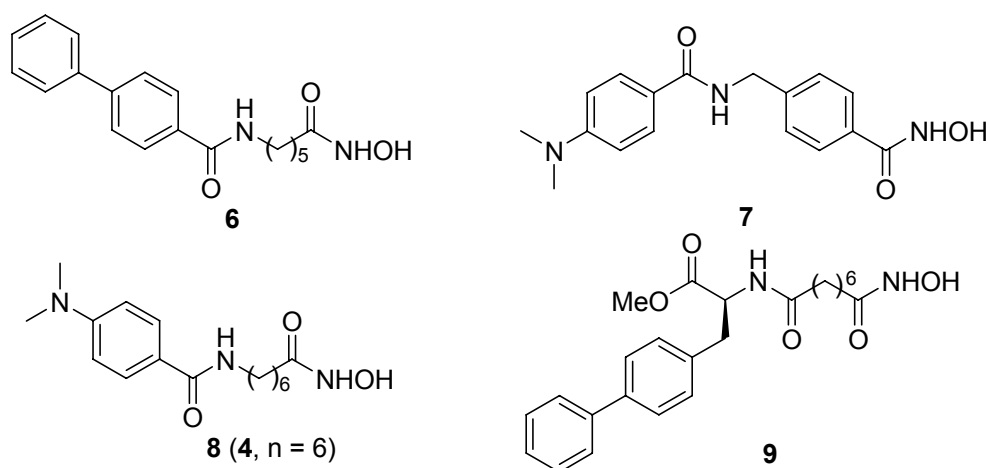


Figura 2.9

⁴⁵ Jung, M.; Brosch, G.; Kölle, D.; Scherf, H.; Gerhäuser, C.; Loidl, P. Amide analogues of trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4669-4679.

En un estudio posterior, se evaluaron otros análogos del SAHA similares a **4**, sobre HDAC humanas purificadas a partir de un lisado de células H1299⁴⁶. El compuesto **6** fue reevaluado encontrándose en este ensayo un valor de CI_{50} de 0.26 μ M. El compuesto más potente fue **8** (Figura 2.9) con CI_{50} de 46 nM. El anillo aromático tolera un amplio patrón de sustitución excepto con el grupo NO_2 , el cual provoca un descenso de la actividad inhibitoria. Estos resultados se oponen a los descritos con anterioridad, lo que destaca la importancia del ensayo enzimático cuando se trabaja con este tipo de inhibidores. Además, estudios recientes sobre este tipo de compuestos han demostrado que la introducción de insaturaciones y grupos (*R*)-metilo en el espaciador tiene efectos negativos en la potencia⁴⁷.

También se han obtenido derivados del compuesto **5** evaluados frente a HDAC de diferente procedencia, (HD-2, HD-1, de origen vegetal y una preparación de HDAC hepáticas de origen animal parcialmente purificadas)⁴⁸. Este estudio condujo a **9** (Figura 2.9), con un resto de bifenilalanina y que presenta una CI_{50} de 0.29 μ M frente a las HDAC de origen animal. Los resultados indicaron una relación estructura-actividad inversa si se compara la inhibición sobre HDAC HD-1 y HD-2, ambas de origen vegetal, y un comportamiento similar en la inhibición sobre HDAC HD-1 y HDAC hepáticas de origen animal. Los compuestos con estereoquímica opuesta mostraron similares propiedades inhibitorias.

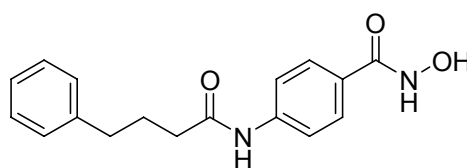
En un estudio basado en la búsqueda de nuevos inhibidores con mayor facilidad para acceder al Zn^{2+} catalítico, se halló el compuesto HTPB (**10**, Figura 2.10) con CI_{50} = 44 nM frente a las HDAC aisladas y CI_{50} = 0.5 μ M -1 μ M sobre líneas tumorales de próstata, endometrio y colon³¹. Aunque el fragmento unido al ácido hidroxámico es similar al compuesto **7** (Figura 2.4), la diferencia estructural entre el HTPB y el resto de los inhibidores conocidos, la mayoría de los cuales posee cabezas lipófilas con estructuras planas y polares, sugiere que el sitio activo de las HDAC posee un amplio grado de

⁴⁶ Remiszewski, S. W.; Sambucetti, L. C.; Atadja, P.; Bair, K. W.; Cornell, W. D.; Green, M. A.; Howell, K. L.; Jung, M.; Kwon, P.; Trogani, N.; Walker, H. Inhibitors of human histone deacetylase: Synthesis and enzyme and cellular activity of straight chain hydroxamates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 753-757.

⁴⁷ Van Ommeslaeghe, K.; Elaut, G.; Brex, V.; Papeleu, P.; Iterbeke, K.; Geerlings, P.; Tourwé, D.; Rogiers, V. Amide analogues of TSA: Synthesis, binding mode analysis and HDAC inhibition. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1861-1864.

⁴⁸ Wittich, S.; Scherf, H.; Xie, C.; Brosch, G.; Loidl, P.; Gerhäuser, C.; Jung, M. Structure-activity relationships on phenylalanine-containing inhibitors of histone deacetylase: In vitro enzyme inhibition, induction of differentiation, and inhibition of proliferation in Friend leukemic cells. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3296-3309.

flexibilidad para acomodar dichas cabezas lipófilas con diferentes propiedades estereoelectrónicas.



10 HTPB

Figura 2.10

El Trichostatin A (**11**, Figura 2.11)⁴⁹ fue aislado inicialmente como un agente antifúngico y luego fue descubierto como un potente inhibidor de las HDAC en el rango nanomolar e inductor de la diferenciación celular. Se han sintetizado ácidos hidroxámicos tipo **12** similares a **11**, con diferentes longitudes de cadena, sustituciones arílicas y conexiones aril-alifáticas⁵⁰, y han sido evaluados frente a HDAC1 humana recombinante. Los compuestos **12a** y **12b** fueron los inhibidores más potentes de estas series con valores de CI_{50} de 2 nM y 4 nM, respectivamente. Los ácidos hidroxámicos con una longitud de cadena de seis átomos de carbono, un grupo arilo hidrofóbico adicional y un centro sp^2 en la conexión aril-alifática fueron los inhibidores más efectivos.

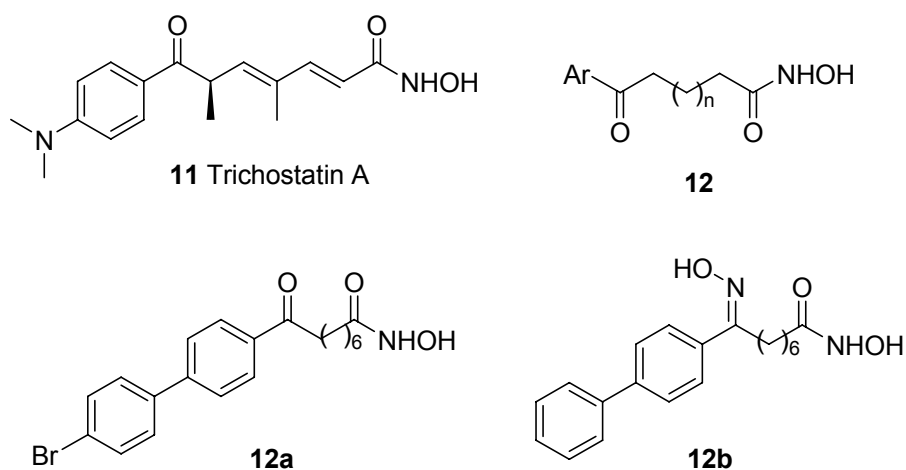


Figura 2.11

⁴⁹ Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17174-17179.

⁵⁰ Woo, S. H.; Frechette, S.; Khalil, E. A.; Bouchain, G.; Vaisburg, A.; Bernstein, N.; Moradel, O.; Leit, S.; Allan, M.; Fournel, M.; Trachy-Bourget, M-C.; Li, Z.; Besterman, J. M.; Delorme, D. Structurally simple trichostatin A-like straight chain hydroxamates as potent histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2877-2885.

También se han sintetizado ácidos hidroxámicos con grupos *trans*-1,4-ciclohexileno o grupos 1,4-fenileno como espaciadores y han sido ensayados frente a HDAC parcialmente purificadas a partir de células T humanas de leucemia Jurkat⁵¹. Los compuestos más potentes fueron aquellos que contenían un grupo naftilamido (**13a-b**, Figura 2.12) con valores de CI_{50} de 44 nM y 39 nM, respectivamente. Las sulfonamidas también fueron evaluadas en estas series, encontrándose que eran menos potentes que las amidas y siendo **13c** el compuesto más potente (CI_{50} =1.1 μ M). La sustitución de un espaciador urea en lugar de la amida o la sulfonamida dio lugar a una disminución de la potencia.

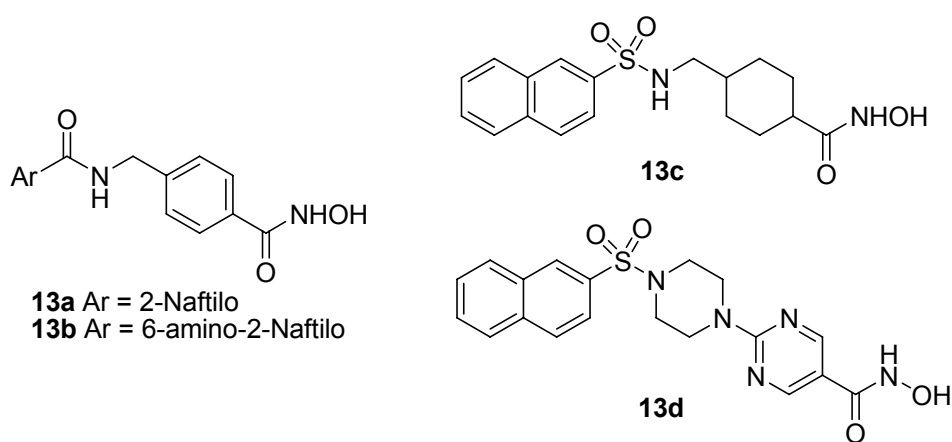


Figura 2.12

Los ácidos 5-pirimidil hidroxámicos con sulfonamida en su estructura, han sido ensayados como inhibidores de las HDAC, siendo **13d** el inhibidor más potente de esta serie, con CI_{50} de 8 nM frente a un extracto de HeLa y CI_{50} = 50 nM frente a carcinoma humano de ovario. Se llevaron a cabo diferentes modificaciones sobre el espaciador, lo que en todos los casos mantuvo la actividad inhibitoria en el rango nanomolar sobre el extracto de HeLa, y micromolar sobre carcinoma humano de ovario⁵².

⁵¹ Uesato, S.; Kitagawa, M.; Nagaoka, Y.; Maeda, T.; Kuwajima, H.; Yamori, T. Novel histone deacetylase inhibitors: N-hydroxycarboxamides possessing a terminal bicyclic aryl group. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1347-1349.

⁵² Angibaud, P. et al. Discovery of pyrimidyl-5-hydroxamic acids as new potent histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*(6), 697-606.

Otra nueva clase de inhibidores de las HDAC es la de los derivados del ácido hidroxámico **14** (Figura 2.13)⁵³. El compuesto más potente frente a las HDAC humanas recombinantes fue **15** con una CI_{50} de 0.06 μ M. La cadena insaturada no es esencial para la potencia; sin embargo un grupo electrón atractor en la posición *para* del fragmento fenilsulfonamida dio lugar a una disminución de la potencia.

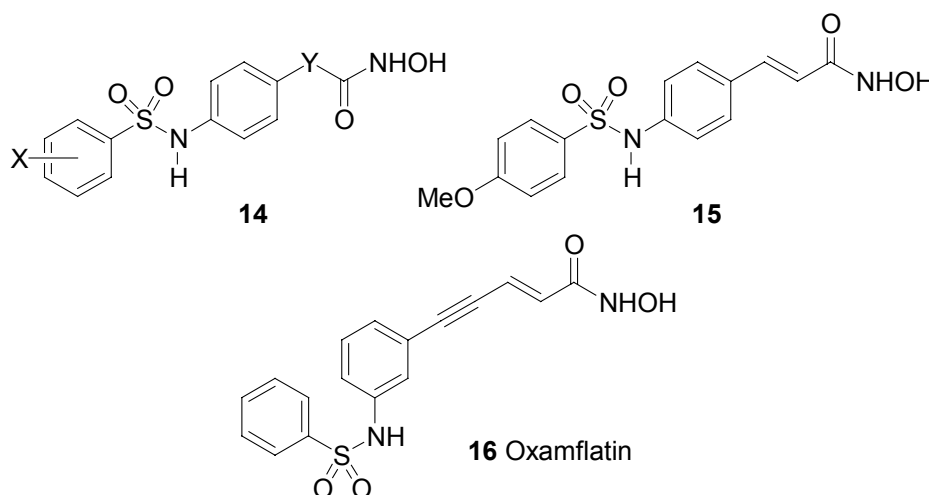


Figura 2.13

Dentro de esta familia de compuestos también se encuentra el Oxamflatin (**16**)⁵⁴, inicialmente descrito como un potente inhibidor de la transformación *ras* con capacidad para inhibir las HDAC de mamíferos⁵⁵.

Se ha descrito un nuevo grupo de inhibidores 3-(4-aroil-1-metil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamidas (APHAs, Figura 2.14)^{56,57}, siendo los derivados más potentes **17a-c**, con actividades en el rango micromolar frente a HDAC de ratón (CI_{50} = 4.2 μ M - 4.9 μ M). La influencia de un sustituyente en posición 4' benzoílica no fue significativa para el

⁵³ Lavoie, R.; Bouchain, G.; Frechette, S.; Woo, S. H.; Khalil, E. A.; Leit, S.; Fournel, M.; Yan, P. T. Trachy-Bourget, M-C.; Beaulieu, C.; Li, Z.; Besterman, J.; Delorme, D. Design and synthesis of a novel class of histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2847-2850.

⁵⁴ Ohtani, M.; Matsuura, T.; Shirahase, K.; Sugita, K. (2E)-5-[3-[(Phenylsulfonyl)amino]phenyl]pent-2-en-4-ynohydroxamic acid and its derivatives as novel and potent inhibitors of ras transformation. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2871-2873.

⁵⁵ Bae, K. Y.; Kun-Hyung, L.; Kenji, S.; Minoru, Y.; Sueharu, H. Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene*. **1999**, *18*, 2461-2470.

⁵⁶ Massa, S.; Mai, A.; Sbardella, G.; Esposito, M.; Ragno, R.; Loidl, P.; Brosch, G. 3-(4-aroil-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-propenamides, a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2069-2072.

⁵⁷ Mai, A.; Massa, S.; Ragno, R.; Esposito, M. Binding mode analysis of 3-(4-benzoyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-propenamide: A new synthetic histone deacetylase inhibitor inducing histone hyperacetylation, growth inhibition, and terminal cell differentiation. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1778-1784.

efecto bioquímico, sin embargo, la cadena insaturada que une al pirrol con el residuo de ácido hidroxámico es importante para la actividad inhibitoria⁶². Por otro lado, la introducción de una cadena metilénica entre el anillo bencénico y el grupo carbonilo condujo a los potentes inhibidores **17d**⁵⁸ ($CI_{50} = 0.1 \mu\text{M}$ frente a HD2 vegetal y $CI_{50} = 0.51 \mu\text{M}$ frente a HDAC1 de ratón) y **17e**⁵⁹ ($CI_{50} = 0.043 \mu\text{M}$ frente a HD2 vegetal).

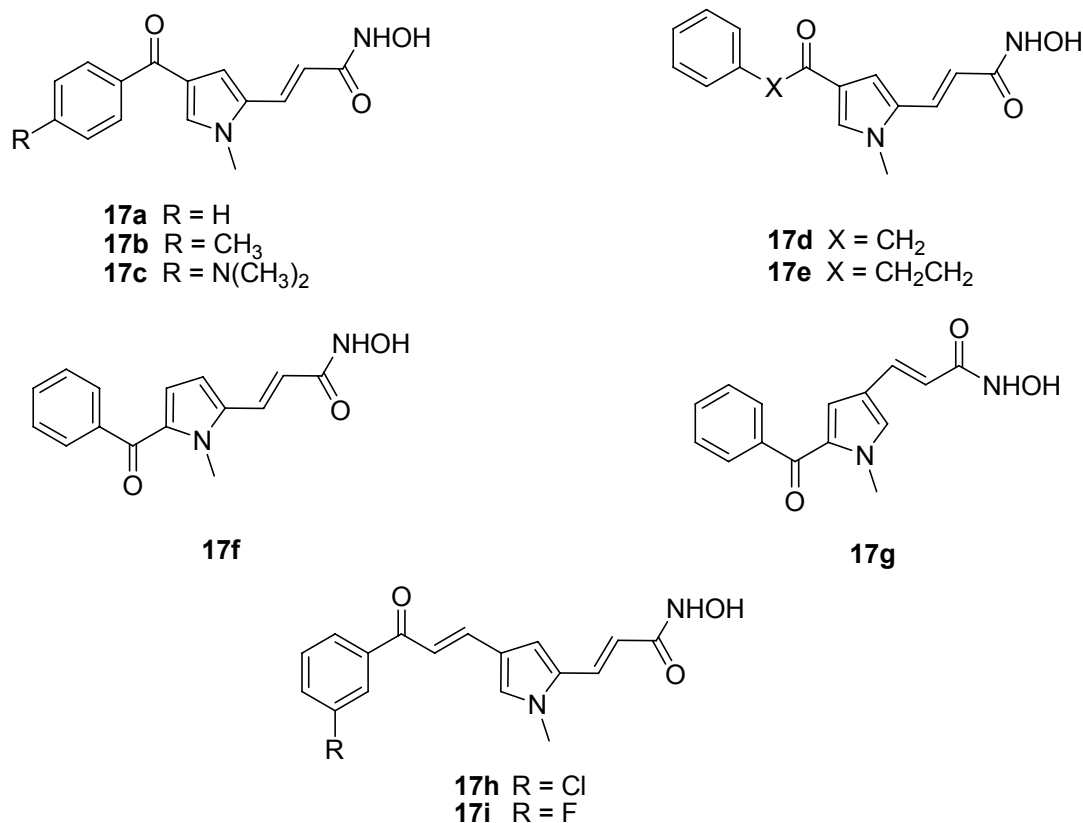


Figura 2.14

También se ha estudiado el efecto de sustituciones en la posición N₁ del pirrol, observándose que se mantiene la actividad inhibitoria excepto para sustituyentes voluminosos. La sustitución del fragmento de ácido hidroxámico provocó un descenso en la capacidad inhibitoria e incluso la total desaparición de la misma. Los compuestos más activos de esta serie se obtuvieron por modificación del patrón de sustitución del ácido del

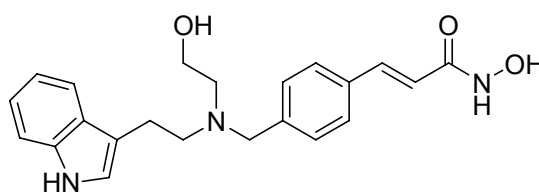
⁵⁸ Mai, A.; Massa, S.; Ragno, R.; Cerbara, I.; Jesacher, F.; Loidl, P.; Brosch, G. 3-(4-aryl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-alkylamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 1. Design, synthesis, biological evaluation and binding mode studies performed through three different docking procedures. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 512-524.

⁵⁹ Mai, A.; Massa, S.; Cerbara, I.; Valente, S.; Ragno, R.; Bottoni, P.; Scatena, R.; Loidl, P.; Brosch, G. 3-(4-aryl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-propenamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 2. Effect of pyrrole-C₂ and/or -C₄ substitutions on biological activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*(5), 1098-1109.

pirrol. Así, **17f** posee una CI_{50} = 0.28 μ M y 0.25 μ M frente a HD2 vegetal y HDAC1 de ratón, respectivamente y **17g**⁶⁰ posee una CI_{50} = 0.05 μ M y 0.78 μ M frente a HD2 vegetal y HDAC1 de ratón, respectivamente.

Por último, la sustitución del anillo de benceno condujo a compuestos con una alta selectividad por la clase II de las HDAC⁶¹. En particular, los compuestos más selectivos fueron los 3-cloro y 3-fluoro sustituidos (**17h** y **17i**, Figura 2.14). Concretamente el **17i**, presenta un índice de selectividad de 176,4 sobre HDAC de tipo II.

El compuesto NVP-LAQ824⁶² (**18**, Figura 2.15), es un potente inhibidor sintetizado por los laboratorios Novartis, con una CI_{50} = 32 nM frente a HDAC aislada y CI_{50} = 10 nM - 150 nM sobre diferentes líneas tumorales de colon, pulmón, mama y próstata. El NVP-LAQ824 induce apoptosis en las líneas tumorales tratadas y solo detiene el ciclo celular en los fibroblastos normales, lo que demuestra la selectividad del mismo⁶³.



18 NVP-LAQ824

Figura 2.15

Estructuralmente este compuesto presenta un fragmento espaciador similar al comentado para el compuesto **15** en la Figura 2.13.

Scriptaid (**19**, Figura 2.16) es un inhibidor de las HDAC identificado a partir de una biblioteca de 16.320 compuestos y pertenece al grupo de los inhibidores derivados del

⁶⁰ Ragno, R.; Mai, A.; Massa, S.; Cerbara, I.; Valente, S.; Bottoni, P.; Scatena, R.; Jesacher, F.; Loidl, P.; Brosch, G. 3-(4-aryloxy-1-methyl-1H-2-pyrrol-2-yl)-N-hydroxy-2-propenamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 3. Discovery of novel lead compounds through structure-based drug design and docking studies. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*(6), 1351-1359.

⁶¹ Mai, A.; Massa, S.; Pezzi, R.; Simeone, S.; Rotili, D.; Nebbioso, A.; Scognamiglio, A.; Altucci, L.; Loidl, P.; Brosch, G. Class II (IIa)-selective histone deacetylase inhibitors. 1. Synthesis and biological evaluation of novel (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3344-3353.

⁶² Remiszewski, S. W. et al. (31 autores). N-hydroxy-3-phenyl-2-propenamides as novel inhibitors of human histone deacetylase with in vivo antitumor activity: discovery of (2E)-N-hydroxy-3-[4-[[[(2-hydroxyethyl)[2-1H-indol-3-yl]ethyl]amino]methyl]-phenyl]-2-propenamido (NVP-LAQ824) *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4609-4624.

⁶³ Atadja, P.; Gao, L.; Kwon, P.; Trogani, N.; Walter, H.; Hsu, M.; Yeleswarapu, L.; Chandramouli, N.; Pérez, L.; Versace, R.; Wu, A.; Sambucetti, L.; Lassota, P.; Cohen, D.; Bair, K.; Wood, A.; Remiszewski. Selective growth inhibition of tumor cells by a novel histone deacetylase inhibitor, NVP-LAQ824. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 689-695.

ácido hidroxámico⁶⁴. Posee una cadena a modo de espaciador entre un grupo voluminoso terminal y el fragmento ácido hidroxámico. Su administración incrementó 100 veces la acetilación de histonas en la línea celular estudiada. La concentración óptima de Scriptaid (6-8 μM) fue similar a la publicada para el compuesto SAHA (**1**) y superior a la publicada para Trichostatin A (**11**).

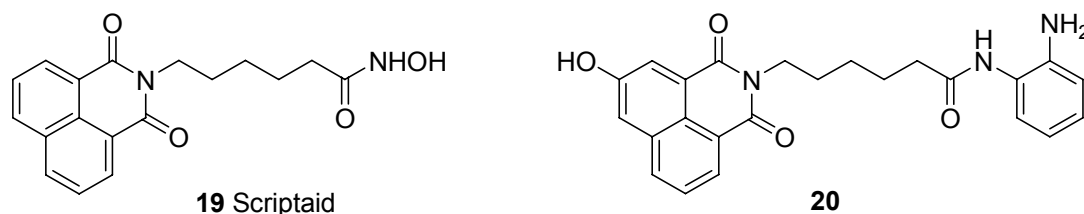


Figura 2.16

Se han evaluado diferentes derivados del Scriptaid del tipo benzoisoquinolindionas. Entre ellos, el compuesto **20** (Figura 2.16) presenta una $\text{CI}_{50} = 1 \mu\text{M}$ frente a HDAC1 y $\text{CI}_{50} = 0.9 \mu\text{M}$ frente a la línea tumoral HCT116. Las sustituciones en el anillo derivaron en rangos de inhibición micromolar⁶⁵.

En 1999 fue descrito un nuevo derivado de benzamida, MS-275 (**21**, Figura 2.17) que posee una estructura no relacionada con otros inhibidores de las HDAC conocidos⁶⁶ y que mostró una importante actividad antitumoral frente a varios tumores humanos *in vivo*. También se han publicado los requerimientos estructurales para la inhibición de las HDAC de este tipo de derivados⁶⁷ usando HDAC purificadas a partir de leucemia K562 humana. El sustituyente amino de la posición 2' de la benzanilida en **21** ($\text{CI}_{50} = 4.8 \mu\text{M}$) actúa como quelante del átomo de Zn^{2+} catalítico y como bioisómero del ácido hidroxámico. Existe una pequeña limitación de naturaleza estérica o electrónica para la sustitución de la benzanilida en posición 5'. Los compuestos con sustituyentes en 3' y 4' en este fragmento de la estructura disminuyen su actividad inhibitoria.

⁶⁴ Su, G. H.; Sohn, T. A.; Ryu, B.; Kern, S. E. A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3137-3142.

⁶⁵ Vaisburg, A. et al. (2-amino-phenyl)-amides of ω -substituted alcanoic acids as new histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. & Med.Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1861-1864.

⁶⁶ Saito, A.; Yamashita, T.; Mariko, Y.; Tsuchiya, K.; Ando, T.; Suzuki, T.; Tsuruo, T.; Nakanishi, O. A novel synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked *in vivo* antitumor activity against human tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4592-4597.

⁶⁷ Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Fukazawa, N.; Saito, A.; Mariko, Y.; Yamashita, T.; Nakanishi, O. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3001-3003.

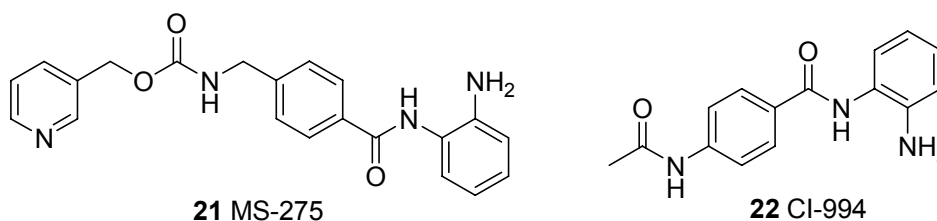


Figura 2.17

Dentro de esta familia de inhibidores que contienen un resto de benzamida, se encuentra la N-acetildinalina (CI-994, **22**)⁶⁸, con actividad antitumoral preclínica.

Se han preparado trifluorometilcetonas con el objetivo de mejorar las propiedades farmacocinéticas de los ácidos hidroxámicos. Estos compuestos exhibieron actividades de rango micromolar *in vitro*; sin embargo, mostraron poca estabilidad metabólica y debido a ello una pobre actividad antiproliferativa, excepto el compuesto **23** (Figura 2.18) con CI_{50} = 3.4 - 4.2 μ M frente a MDA 435 y HT 1080, respectivamente⁶⁹.

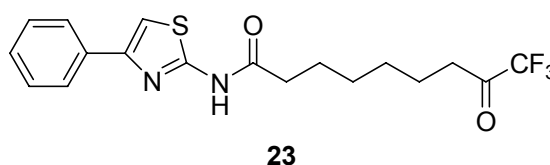


Figura 2.18

Otros intentos para mejorar la farmacocinética de los ácidos hidroxámicos han conducido a compuestos con características inhibitorias similares a las de los ácidos hidroxámicos. Siguiendo este estudio, se evaluaron tioles, en los que el tamaño óptimo del espaciador resultó ser el de una cadena de 5 y 6 miembros. La modificación del fragmento aromático en la zona lipófila dio lugar a compuestos como **24**, **25**, **26** y **27** (Figura 2.19) con CI_{50} frente a HDAC de 75 nM, 72 nM, 85 nM y 79 nM, respectivamente. La actividad de estos compuestos *in vivo* no fue la esperada, lo cual se puede explicar

⁶⁸ Prakash, S.; Foster, B. J.; Meyer, M.; Wozniak, A.; Heilbrun, L. K.; Flaherty, L.; Zalupski, M.; Radulovic, L.; Valdivieso, M.; LoRusso, P. M. Chronic oral administration of CI-994: a Phase I study. *Invest. New Drugs* **2001**, *19*, 1-11. Ver en la ref. 3 el mecanismo de acción de CI-994.

⁶⁹ Frey, R.R. et al. Trifluoromethyl ketones as inhibitors of histone deacetylase. *Bioorg. & Med.Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1861-1864.

asumiendo que el carácter polar del grupo tiol resulta en una pobre absorción a través de la membrana, con independencia de la inestabilidad química⁷⁰.

Por ello se sintetizaron profármacos de grupos tioles, siendo los disulfuros los más atractivos por su papel en compuestos macrocíclicos con buena actividad inhibitoria. Los resultados no fueron los esperados, por lo que se sintetizaron profármacos S-acilados y entre ellos el más potente fue el compuesto **28** (Figura 2.19) con una EC_{50} = 1 μ M – 10 μ M frente a varias líneas tumorales humanas⁷⁰.

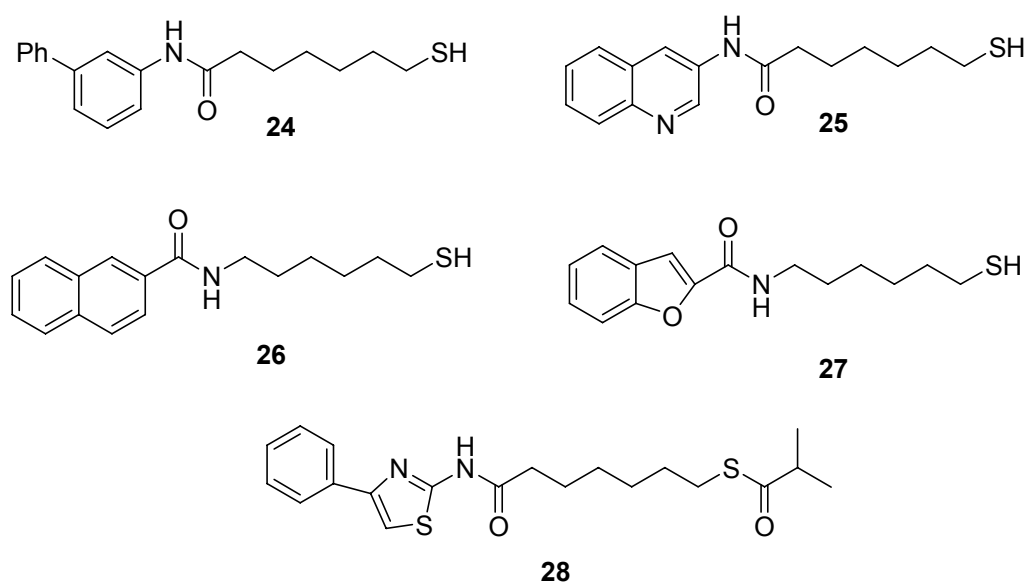


Figura 2.19

Dentro de los cambios introducidos para modificar la función ácido hidroxámico por un grupo bioisómero, los derivados de mercaptoamida (Figura 2.20) dan lugar a compuestos con actividad inhibitoria micromolar sobre las HDAC, como es el caso de **29**, **30** y **31** con Cl_{50} de 1.5 μ M, 0.66 μ M y 1.10 μ M, respectivamente⁷¹.

⁷⁰ Susuki, T.; Pagano, Y.; Kouketsu, A.; Matsuura, A.; Maruyama, S.; Kurotaki, M.; Nakagawa, H.; Miyata, N. Novel inhibitors of human histone deacetylase: design, synthesis, enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1019-1032.

⁷¹ Anandan, S-K.; Ward, J. S.; Brox, R. D.; Bray, M. R.; Patel, D. V.; Xiao, X-X. Mercaptoamide-based non-hydroxamic acid type histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*(8), 1969-1972.

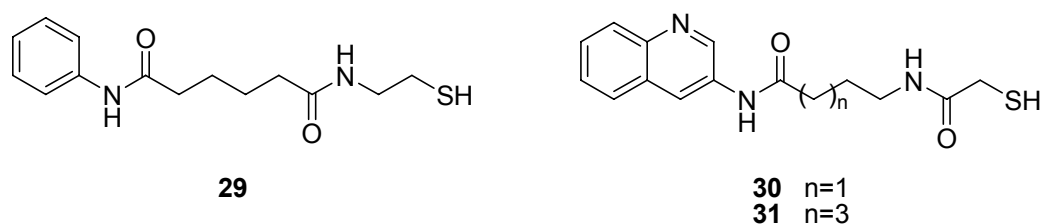


Figura 2.20

El apicidin (**32**, Figura 2.21) es un inhibidor de las HDAC aislado por los laboratorios Merck⁷² que induce hiperacetilación de histonas parasitarias y de mamíferos⁷³. El apicidin es un inhibidor reversible no selectivo de eficacia comparable frente a las HDAC protozoarias y las de mamíferos. Está estructuralmente relacionado a una familia de tetrapéptidos cíclicos de α -epoxicetona, de conocida actividad antineoplásica. El compuesto **32** es el único que posee la cadena secundaria ácido 8-oxo-2-aminodecanoico (OAD) sin sustituir. El fragmento triptófano es esencial en la unión a las HDAC⁷⁴.

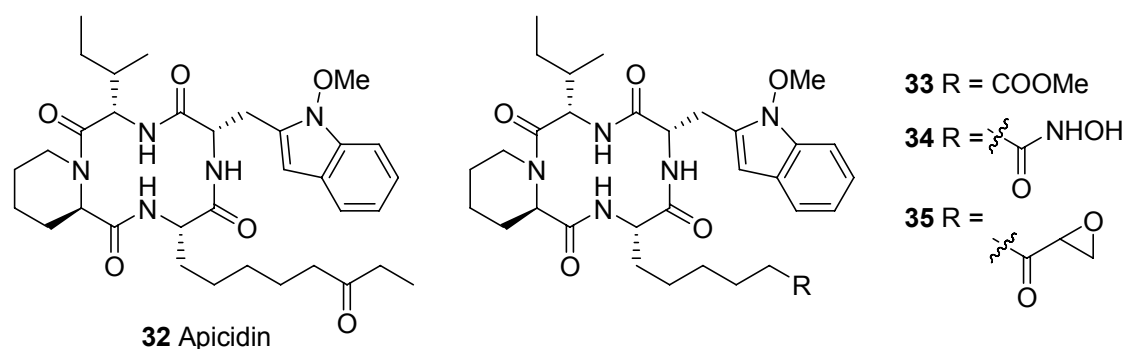


Figura 2.21

La similitud estructural de la cadena OAD sugiere que ésta mimetiza una lisina acetilada del extremo N terminal de las histonas. Basados en esta hipótesis se prepararon diferentes análogos del OAD con el objetivo de estudiar las relaciones estructura-actividad

⁷² Singh, S. B.; Zink, D. L.; Polishook, J. D.; Dombrowski, A. W.; Darkin-Rattray, S. J.; Schmatz, D. M.; Goetz, M. A.; Apicidins: Novel cyclic tetrapeptides as coccidiostats and antimalarial agents from *Fusarium pallidoroseum*. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8077-8080.

⁷³ Darkin-Rattray, S. J.; Gurnett, A. M.; Myers, R. W.; Dulski, P. M.; Crumley, T. M.; Allocco, J. J.; Cannova, C.; Meinke, P. T.; Colletti, S. L.; Bednarik, M. A.; Singh, S. B.; Goetz, M. A.; Dombrowski, A. W.; Polishook, J. D.; Schmatz, D. M. Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 13143-13147.

⁷⁴ Meinke, P. T.; Colletti, S. L.; Doss, G.; Myers, R. W.; Gurnett, A. M.; Dulski, P.; Darkin-Rattray, S. J.; Allocco, J. J.; Galuska, S.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H. Synthesis of apicidin-derived quinolone derivatives: Parasite-selective histone deacetylase inhibitors and antiproliferative agents. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4919-4922.

en **32**^{75, 76}. Así, se identificaron numerosos inhibidores derivados del apicidin con actividad picomolar sobre HDAC derivadas de extractos parcialmente purificados de células HeLa y del protozoo *Eimeria tenella*. A partir de estos estudios se estableció: a) el requerimiento de una conformación rígida del apicidin, para la afinidad hacia las HDAC; b) el grupo oxo del fragmento OAD participa como quelante del zinc; y c) se permite la sustitución por otros grupos quelantes. Ejemplos representativos de esta serie son los inhibidores **33** (CI₅₀=0.4 nM y 0.8 nM frente a las HDAC de HeLa y *E. tenella*, respectivamente), **34** (CI₅₀=0.2 nM y 4.0 nM frente a las HDAC de HeLa y *E. tenella*, respectivamente) y **35** (CI₅₀<0.1 nM y 1.0 nM frente a las HDAC de HeLa y *E. tenella*, respectivamente). (Figura 2.21)

También se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación de derivados del apicidin con modificaciones en el indol y reemplazamiento del triptófano^{74,77,78} (Figura 2.22). Como resultado se observó que el triptófano es susceptible a ser reemplazado, lo que conduce a un aumento de 20 a 100 veces en la selectividad del apicidin frente a las HDAC de *E. tenella*. La introducción de un grupo básico, como es el caso de **36** (CI₅₀ = 0.2 nM frente HDAC de HeLa), da como resultado un inhibidor que mimetiza la naturaleza básica de las histonas, lo que mejora la actividad biológica respecto al apicidin. Las sustituciones en la posición 2 del indol son toleradas desde el punto de vista estérico, como en el caso de **37** con una CI₅₀ de 0.2 nM frente HDAC de HeLa y de *E. tenella*⁷⁷. Los análogos del apicidin con el grupo triptófano reemplazado constituyen agentes con actividad antiprotozoaria mejorada respecto al apicidin^{74,77}, siendo los más potentes **38** (CI₅₀ = 67 nM y 2 nM frente HDAC de HeLa y de *E. tenella*, respectivamente) y **39** (CI₅₀ = 13 nM y 0.8 nM frente HDAC de HeLa y de *E. tenella*, respectivamente).

⁷⁵ Colletti, S. L.; Myers, R. W.; Darkin-Rattray, S. J.; Gurnett, A. M.; Dulski, P.; Galuska, S.; Allocco, J. J.; Ayer, M. B.; Li, C.; Lim, J.; Crumley, T. M.; Cannova, C.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H.; Meinke, P. T. Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase: Structure-activity relationships of apicidin. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 107-111.

⁷⁶ a) Meinke, P. T.; Colletti, S. L.; Ayer, M. B.; Darkin-Rattray, S. J.; Myers, R. W.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H. Synthesis of side chain modified apicidin derivatives: potent mechanism-based histone deacetylase inhibitors. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7831-7835. b) Colletti, S. L.; Myers, R. W.; Darkin-Rattray, S. J.; Schmatz, D. M.; Fisher, M. H.; Wyvratt, M. J.; Meinke, P. T. Design and synthesis of histone deacetylase inhibitors: the development of apicidin transition state analogs. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7837-7841.

⁷⁷ Colletti, S. L.; Myers, R. W.; Darkin-Rattray, S. J.; Gurnett, A. M.; Dulski, P.; Galuska, S.; Allocco, J. J.; Ayer, M. B.; Li, C.; Lim, J.; Crumley, T. M.; Cannova, C.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H.; Meinke, P. T. Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase: structure-activity relationships of apicidin. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 113-117.

⁷⁸ Colletti, S. L.; Li, C.; Fisher, M. H.; Wyvratt, M. J.; Meinke, P. T. Tryptophan-replacement and indole-modified apicidins: synthesis of potent and selective antiprotozoal agents. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7825-7829.

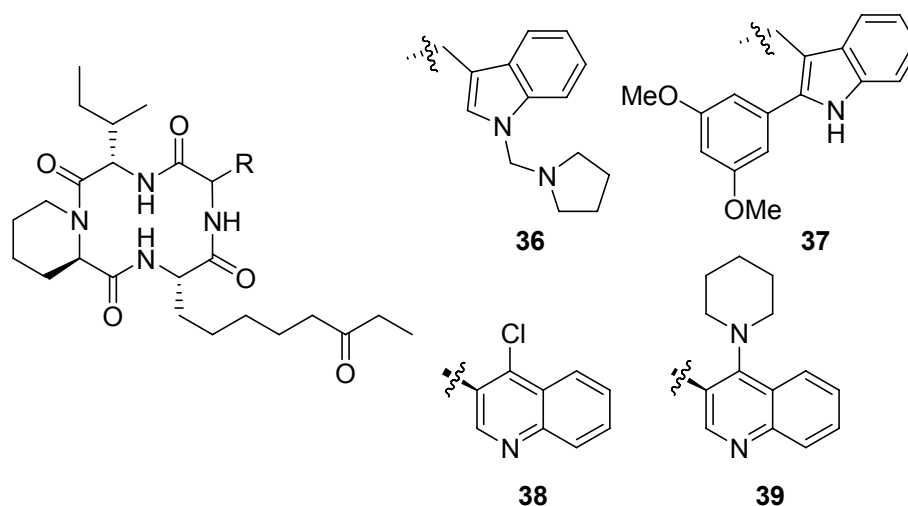
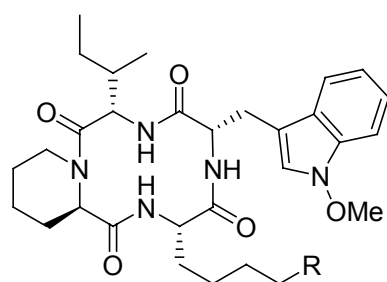


Figura 2.22

Se han descrito varios análogos del apicidin, denominados apicidin B, C y D₁₋₃, con sustituciones aminoacídicas obtenidos a partir de un screening de extractos de fermentación⁷⁹. El compuesto **40** (Figura 2.23) fue más selectivo frente a las HDAC parcialmente purificada de HeLa humana ($CI_{50} = 0.3$ nM) que frente a la HDAC de *E. tenella* ($CI_{50} = 4$ nM). El compuesto **41** sin el grupo ceto muestra una disminución de 1000 veces en la actividad inhibitoria frente a HDAC humanas, lo que evidencia que este grupo es crítico para la actividad de este tipo de compuestos. Se concluye que el grupo α -hidroxi ceto en el apicidin D₁ (**40**) es un mejor grupo quelante de los iones metálicos bivalentes requeridos para la función de las HDAC.



40 Apicidin D₁ R = CH₂COCH(OH)CH₃
41 Apicidin D₂ R = CH₂CH(S-OH)CH₂CH₃

Figura 2.23

⁷⁹ a) Singh, S. B.; Zink, D. L.; Liesch, J. M.; Dombrowski, A. W.; Darkin-Rattray, S. L.; Schmatz, D. M.; Goetz, M. A. Structure, histone deacetylase, and antiprotozoal activities of apicidin B and C, congeners of apicidin with proline and valine substitutions. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2815-2818. b) Singh, S. B.; Zink, D. L.; Liesch, J. M.; Mosley, R. T.; Dombrowski, A. W.; Bills, G. F.; Darkin-Rattray, S.; Schmatz, D. M.; Goetz, M. A. Structure and chemistry of apicidins, a class of novel cyclic tetrapeptides without a terminal α -keto epoxide as inhibitors of histone deacetylase with potent antiprotozoal activities. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 815-825.

El depsipéptido bicíclico (FR901228, FK-288, **42**, Figura 2.24) es un producto natural sometido a investigación clínica que inhibe las HDAC a concentraciones nanomolares⁸⁰. La reducción del disulfuro bicíclico **42** en el medio reductor celular podría dar lugar a un tiol monocíclico con capacidad para interactuar con el átomo de zinc del sitio activo de las HDAC⁸¹.

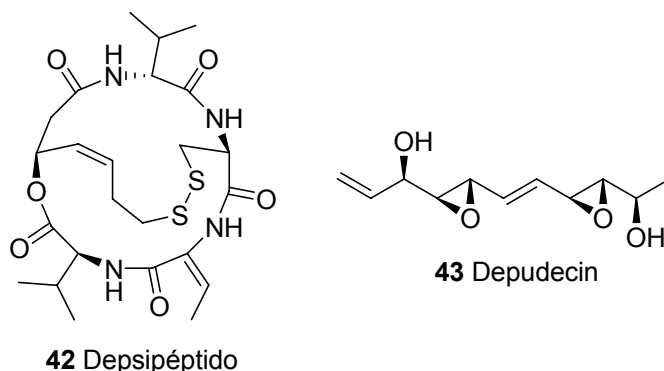


Figura 2.24

El depudecin (**43**, Figura 2.24) es un metabolito fúngico que inhibe la actividad de las HDAC *in vivo* e *in vitro*⁸², y que presenta una CI_{50} de 4.7 μ M frente a HDAC1 purificada recombinante. Los grupos epoxi del depudecin permitirían una unión covalente a determinados grupos nucleofílicos en el sitio activo de las HDAC.

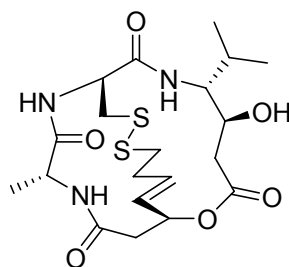
El spiruchostatin A, (**44**, Figura 2.25) es un producto aislado de un extracto de *Pseudomonas*. Su similitud estructural con el depsipéptido **42**, sugirió su posible actividad inhibitoria frente a las HDAC. Frente a células de cáncer de mama, **44** mostró una CI_{50} = 10 nM, experimentando presumiblemente la bioactivación como profármaco que ha sido descrita para el FK228. En este caso, la estereoquímica juega un papel muy importante, ya que el *epi*-spiruchostatin es inactivo a 10 μ M⁸³.

⁸⁰ Hidenori, N.; Bae, K. Y.; Hiroshi, T.; Minoru, Y.; Sueharu, H. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp. Cell Res.* **1998**, *241*, 126-133.

⁸¹ Meinke, P. T.; Liberator, P. Histone deacetylase: A target for antiproliferative and antiprotozoal agents. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 211-235.

⁸² Kwon, H. J.; Owa, T.; Hassig, C. A.; Shimada, J.; Schreiber, S. L. Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1998**, *95*, 3356-3361.

⁸³ Yurek-George, A.; Habens, F.; Brimmel, M.; Packham, G.; Ganesan, A. Total synthesis of Spiruchostatin A, a potent histone deacetylase inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1030-1031.



44 Spiruchostatin A

Figura 2.25

El ciclotetrapéptido Trapoxin (**45**, Figura 2.26) es un inhibidor potente e irreversible de las HDAC que induce hiperacetilación, diferenciación celular y detención del ciclo celular en varios tipos de células de mamíferos^{84, 85}. El grupo epoxicetona del extremo de la cadena secundaria del ácido (2S, 9S)-2-amino-9,10-epoxi-8-oxodecanoico (AEO) es el causante de la inhibición de la enzima, actuando la cadena alifática del AEO como análogo del sustrato⁸⁴. Se ha mostrado que la sustitución del grupo epoxicetona del trapoxin por el ácido hidroxámico lo convierte en un inhibidor reversible de la HDAC1 (CHAP1, **46**) mediante la quelación del zinc en el centro catalítico⁸⁶. Se siguió el mismo procedimiento con el tetrapéptido chlamydocin (**47**)⁸⁷ para obtener CHAP15 (**48**). El fragmento constituido por el tetrapéptido cíclico en la estructura denominada como CHAP (péptido cíclico que contiene ácido hidroxámico) afecta tanto a la potencia inhibitoria como a la especificidad.

⁸⁴ Kijima, M.; Yoshida, M.; Sugita, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T. Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22429-22435.

⁸⁵ Taunton, J.; Collins, J. L.; Schreiber, S. L. Synthesis of natural and modified trapoxins, useful reagents for exploring histone deacetylase function. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10412-10422.

⁸⁶ Furumai, R.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **2001**, *98*, 87-92.

⁸⁷ Baldwin, J. E.; Adlington, R. M.; Godfrey, C. R. A.; Patel, V. K. Stereospecific synthesis of chlamydocin. *Tetrahedron.* **1993**, *49*, 7837.

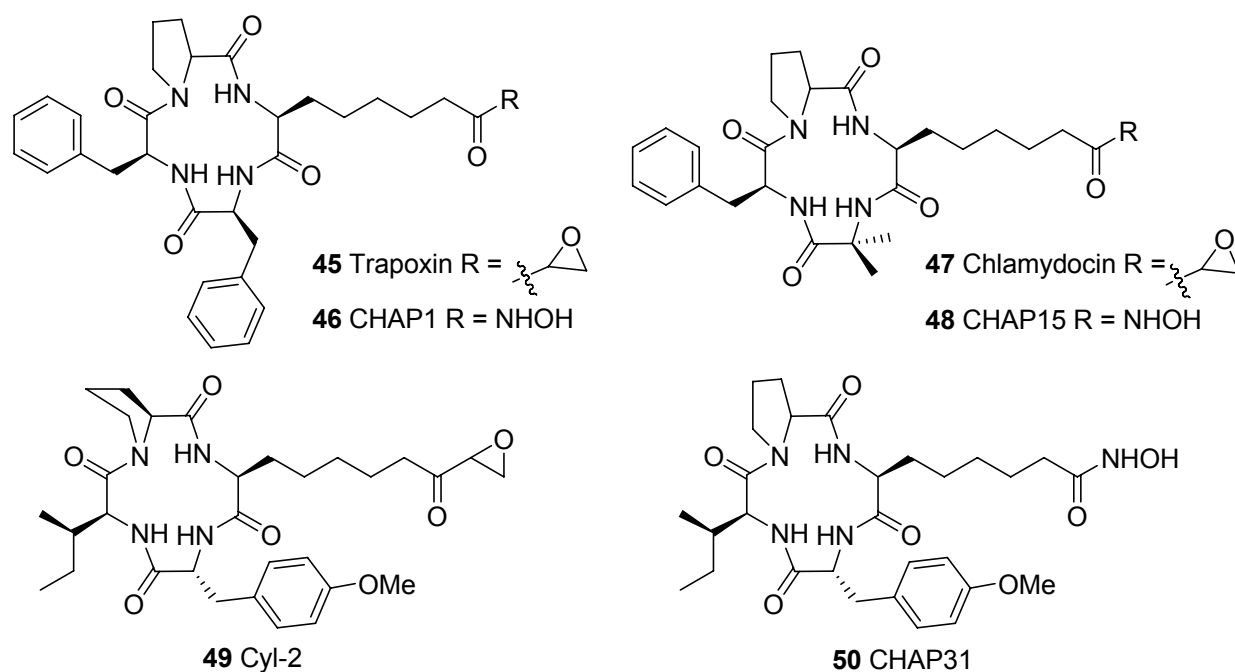


Figura 2.26

Se encontró que los compuestos **46** y **48** son potentes inhibidores reversibles frente a la HDAC1 humana purificada, con $Cl_{50} = 1.9$ nM y 0.44 nM, respectivamente. La HDAC6 purificada de ratón fue 10 veces más resistente a estos CHAPs [$Cl_{50}(\mathbf{46}) = 19$ nM ; $Cl_{50}(\mathbf{33}) = 38$ nM]. Los inhibidores **45**, **47** y **49**⁸⁸ también mostraron mayores valores de Cl_{50} frente a la HDAC6 ($Cl_{50} = 0.36$ μ M, 1.1 μ M y 40 μ M, respectivamente) que frente a la HDAC1 ($Cl_{50} = 0.11$ nM, 0.15 nM y 0.70 nM, respectivamente)⁸⁶.

Un estudio llevado a cabo sobre el compuesto líder **46** usando HDAC de células B16/BL6 de melanoma de ratón parcialmente purificadas, reveló que CHAP31 (**50**) es el compuesto más potente de estas series con una $Cl_{50} = 3.32$ nM y activo frente a líneas tumorales humanas implantadas en ratones desnudos⁸⁹.

Se han sintetizado también nuevos tetrapéptidos cíclicos con azufre en su estructura, tomando como modelo las estructuras del depsipéptido (**42**) y el CHAP31 (**50**). Se diseñaron como homodímeros y heterodisulfuros precursores de inhibidores con un grupo quelante del zinc del tipo tiol, basándose en su posible reducción a nivel celular

⁸⁸ Hirota, A.; Suzuki, A.; Suzuki, H.; Saburo, T. Isolation and biological activity of Cyl-2, a metabolite of *cylindrocladium scoparium*. *Agr. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 643-647.

⁸⁹ Komatsu, Y.; Tomizaki, K-Y.; Tsukamoto, M.; Kato, T.; Nishino, N.; Sato, S.; Yamori, T.; Tsuruo, T.; Furumai, R.; Yoshida, M.; Horinouchi, S.; Hayashi, H. Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4459-4466.

mediada por glutatión. Los compuestos más activos de esta serie fueron **51** y **52** (Figura 2.27) con actividades inhibitorias comparables al depsipéptido⁹⁰.

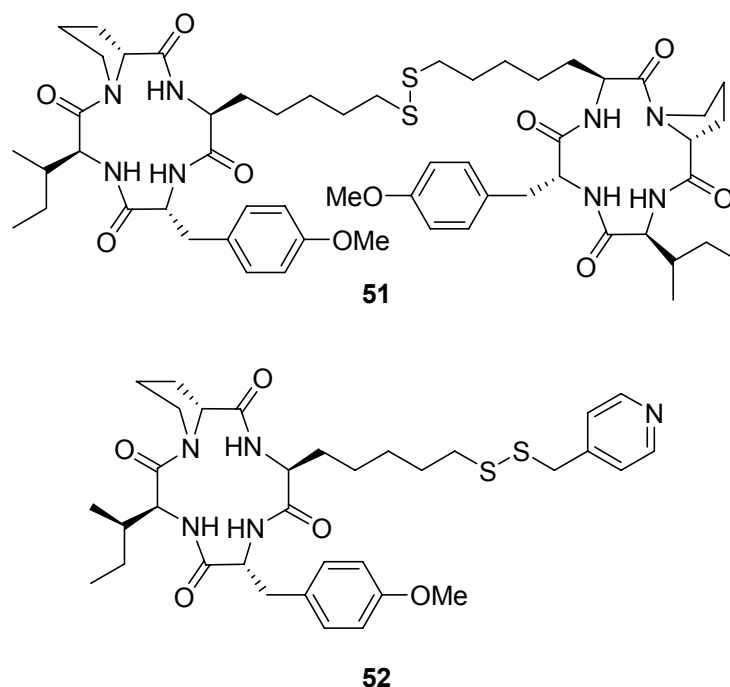


Figura 2.27

Se ha publicado que el núcleo rígido de 1,3-dioxolano interactúa con los aminoácidos situados en la entrada del canal de unión para la N-acetil lisina de las HDAC⁹¹. Como resultado, se sintetizaron 7200 moléculas basadas en las estructuras del trichostatin y el trapoxin, dentro de las cuales **53** y **54** (Figura 2.28) mostraron actividad inhibitoria frente a HDAC1 y HDAC6 [Cl_{50} (**53**)= 1.2 μ M y 0.9 μ M, respectivamente; Cl_{50} (**54**)= 1.7 μ M y 1.1 μ M, respectivamente].

⁹⁰ Nishino, N.; Jose, B.; Okamura, S.; Ebisusaki, S.; Kato, T.; Sumida, Y.; Yoshida, M. Cyclic tetrapeptides bearing a sulfhydryl group potently inhibit histone deacetylases. *Org. Lett.* **2003**, 5(26), 5079-5082.

⁹¹ Sternson, S. M.; Wong, J. C.; Grozinger, C. M.; Schreiber, S. L. Synthesis of 7200 small molecules based on a substructural analysis of the histone deacetylase inhibitors trichostatin and trapoxin. *Org. Lett.* **2001**, 3, 4239-3242.

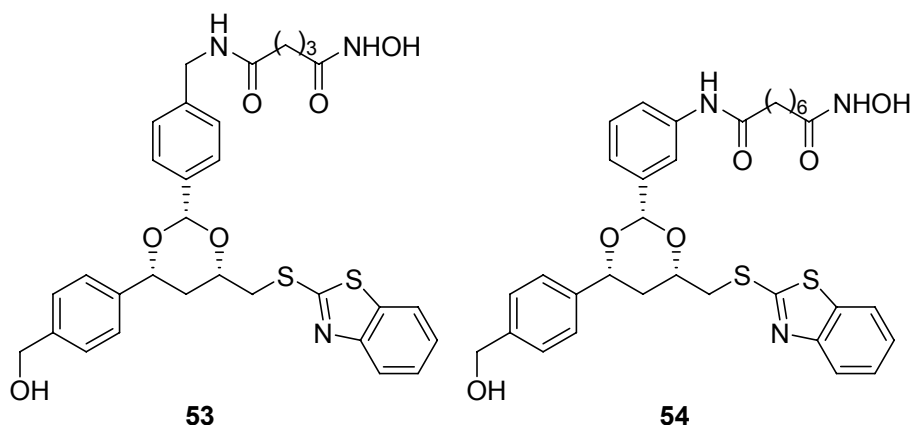


Figura 2.28

A partir de bibliotecas de compuestos se han identificado pequeñas moléculas con capacidad para inhibir de forma selectiva las HDAC de clase III. Los miembros de esta clase de desacetilasas NAD⁺ dependientes o sirtuinas no son sensibles al trichostatin A (**11**). El sirtinol (**55**, Figura 2.29) es un compuesto aromático plano derivado de la imida del 2-hidroxi-1-naftaldehído que inhibe tanto la Sir2p de levadura como la SIRT2 humana *in vitro* con valores de CI₅₀ de 70 μM y 40 μM, respectivamente, sin afectar a la actividad de HDAC1 a concentraciones de hasta 100 μM. La imida del 2-hidroxi-1-naftaldehído inhibe la actividad de la sirtuina desacetilasa *in vitro* a mayores concentraciones que las requeridas para **55**⁹². Esto sugiere que este tipo de compuestos podría mimetizar a los grupos adenina y nicotinamida del cofactor NAD⁺ durante la interacción con la enzima SIRT2.

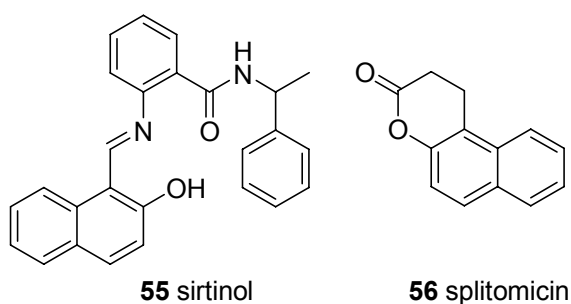


Figura 2.29

⁹² Grozinger, C. M.; Chao, E. D.; Blackwell, H. E.; Moazed, D.; Schreiber, S. L. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 38837-38843.

El splitomicin (**56**, Figura 2.29) es un inhibidor de la actividad de las HDAC de extracto de levadura con un valor de Cl_{50} de $60 \mu M$ ⁹³. Este compuesto contiene en su estructura un β -naftol α sustituido con capacidad para inhibir la actividad de Sir2p siguiendo el mismo mecanismo que el sirtinol.

Los inhibidores anteriormente descritos se han investigado también desde el punto de vista de la diferenciación y/o actividad anticancerígena frente a una gran diversidad de líneas tumorales. Según los datos publicados para este tipo de inhibidores, existe una correlación directa entre la potencia inhibitoria, la inducción de diferenciación y la actividad antiproliferativa, encontrándose inducción de la expresión de la proteína p21, acetilación de las histonas y detención del ciclo celular en G1, G2 y M.

2.5. Antecedentes químicos

2.5.1. Importancia de los derivados del ácido hidroxámico

Los derivados del ácido hidroxámico se conocen desde 1869 con el descubrimiento del ácido oxalohidroxámico por Lossen⁹⁴. Sin embargo, hasta 1980 no empezó a acumularse gran cantidad de información respecto a sus aplicaciones en biomedicina, con lo que aumentó el interés por su síntesis, además del estudio de la estructura de los correspondientes complejos metálicos, llegando a constituir una de las familias más importantes de bioligandos orgánicos⁹⁵.

Este tipo de compuestos son capaces de inhibir una amplia variedad de enzimas, incluyendo ureasas, peroxidasas y metaloproteinasas; también pueden competir como sideróforos por el Fe (III). En las ciencias biomédicas son utilizados en el diseño de fármacos contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares, el Alzheimer, la malaria, enfermedades alérgicas, etc⁹⁶.

⁹³ Bedalov, A.; Gatbonton, T.; Irvine, W. P.; Gottschling, D. E.; Simon, J. A. Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **2001**, *98*, 15113-15118.

⁹⁴ Lossen, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1869**, *150*, 314.

⁹⁵ Marmion, C.J.; Griffith, D., Nolan, K.B. Hydroxamic acids - an intriguing family of enzyme inhibitors and biomedical ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 3003-3016.

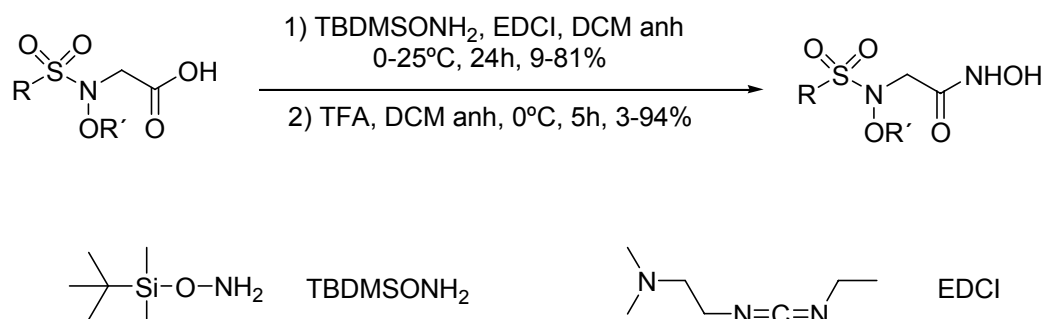
⁹⁶ Muri, E.M.F.; Nieto, M.J.; Sindelar, R.D. Hydroxamic acids as pharmacological agents. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1631-1653.

2.5.2. Síntesis de derivados del ácido hidroxámico en solución

Las estrategias sintéticas en solución están basadas en la activación de ácidos siguiendo diferentes metodologías.

Existen dos grandes grupos de métodos, unos engloban el uso de reactivos de acoplamiento y otros la formación de cloruros de ácido. Con independencia de esta clasificación, se observa la necesidad de proteger la hidroxilamina con diferentes grupos, entre los cuales se encuentran derivados del silicio, el grupo bencilo y el tetrahidropiraniolo (THP). Aunque se ha publicado la formación de derivados del ácido hidroxámico en un solo paso partiendo del clorhidrato de la hidroxilamina, normalmente se obtienen mejores resultados con derivados de hidroxilamina convenientemente protegidos.

En el grupo de métodos que emplean agentes de acoplamiento, encontramos que para la síntesis de ácidos hidroxámicos derivados del ácido N-arilsulfonil-N-alcoxi-aminoacético, se parte del correspondiente ácido carboxílico, que se trata con O-(*tert*-butil-dimetilsilil)hidroxilamina en presencia de EDCI⁹⁷. El hidroxamato O-sililado obtenido (Esquema 2.1) se desprotege en presencia de ácido trifluoroacético (TFA).

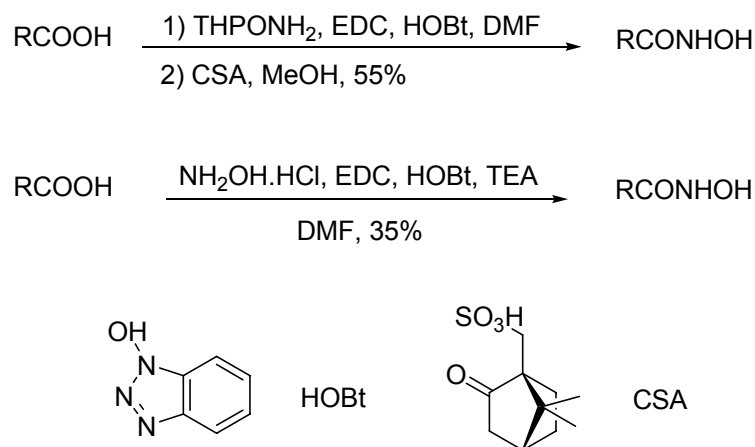


Esquema 2.1

Otras estrategias sintéticas recogen el uso del N-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agente de acoplamiento. Bajo estas condiciones se tratan los ácidos carboxílicos con THPONH₂ y luego se elimina el grupo protector bajo condiciones ácidas obteniéndose los

⁹⁷ Rossello, A.; Nuti, E.; Orlandini, E. New N-arylsulfonyl-N-alkoxyaminoacetohydroxamic acids as selective inhibitors of gelatinase A (MMP-2). *Bioorg. & Med. Chem.* **2004**, *12*, 2441-2450.

ácidos hidroxámicos deseados⁹⁸ (Esquema 2.2). El uso de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en lugar de la hidroxilamina protegida disminuye el rendimiento hasta un 35%.

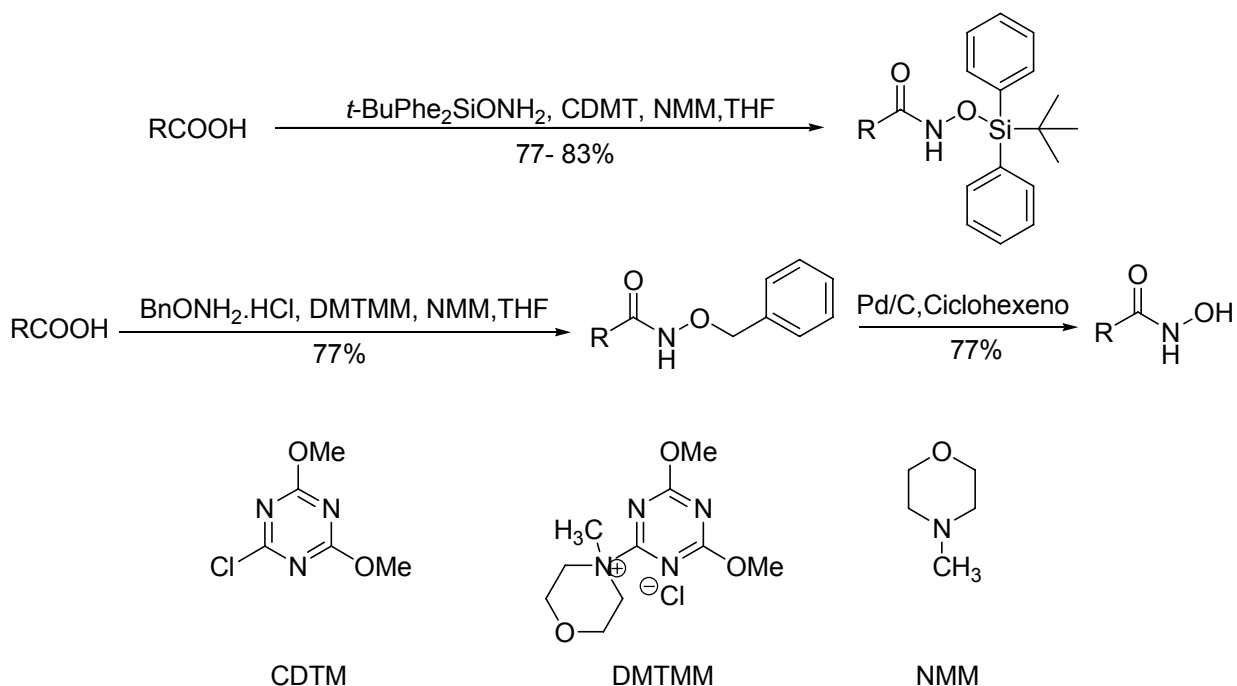


Esquema 2.2

La síntesis de O-silil y O-bencil hidroxamatos también se puede llevar a cabo como se observa en el Esquema 2.3, partiendo de $t\text{-BuPhe}_2\text{SiONH}_2$ y BnONH_2 , respectivamente⁹⁹. En este caso los agentes de acoplamiento descritos fueron la 2-cloro-4,6-dimetoxi[1,3,5] triazina (CDMT) o el cloruro de 4-(4,6-dimetoxi[1,3,5] triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM).

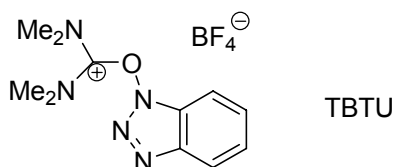
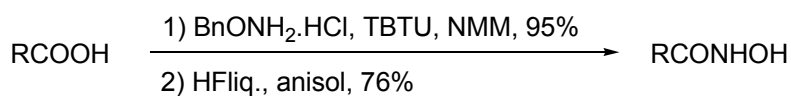
⁹⁸ Bouchain, G.; Leit, S.; Frechette, S. Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 820-830.

⁹⁹ De Luca, L.; Giacomelli, G.; Taddei, M. An easy and convenient synthesis of Weinreb amides and hydroxamates. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2534-2537.



Esquema 2.3

El reactivo de acoplamiento TBTU (Esquema 2.4) permite la obtención de derivados de *O*-bencil hidroxamatos⁴⁷ partiendo del clorhidrato de *O*-bencilhidroxilamina (BnONH₂·HCl). Durante la etapa de desprotección del grupo bencilo con H₂-Pd/C se puede producir una reducción completa. Este hecho se ha evitado con el uso de HF anhidro.

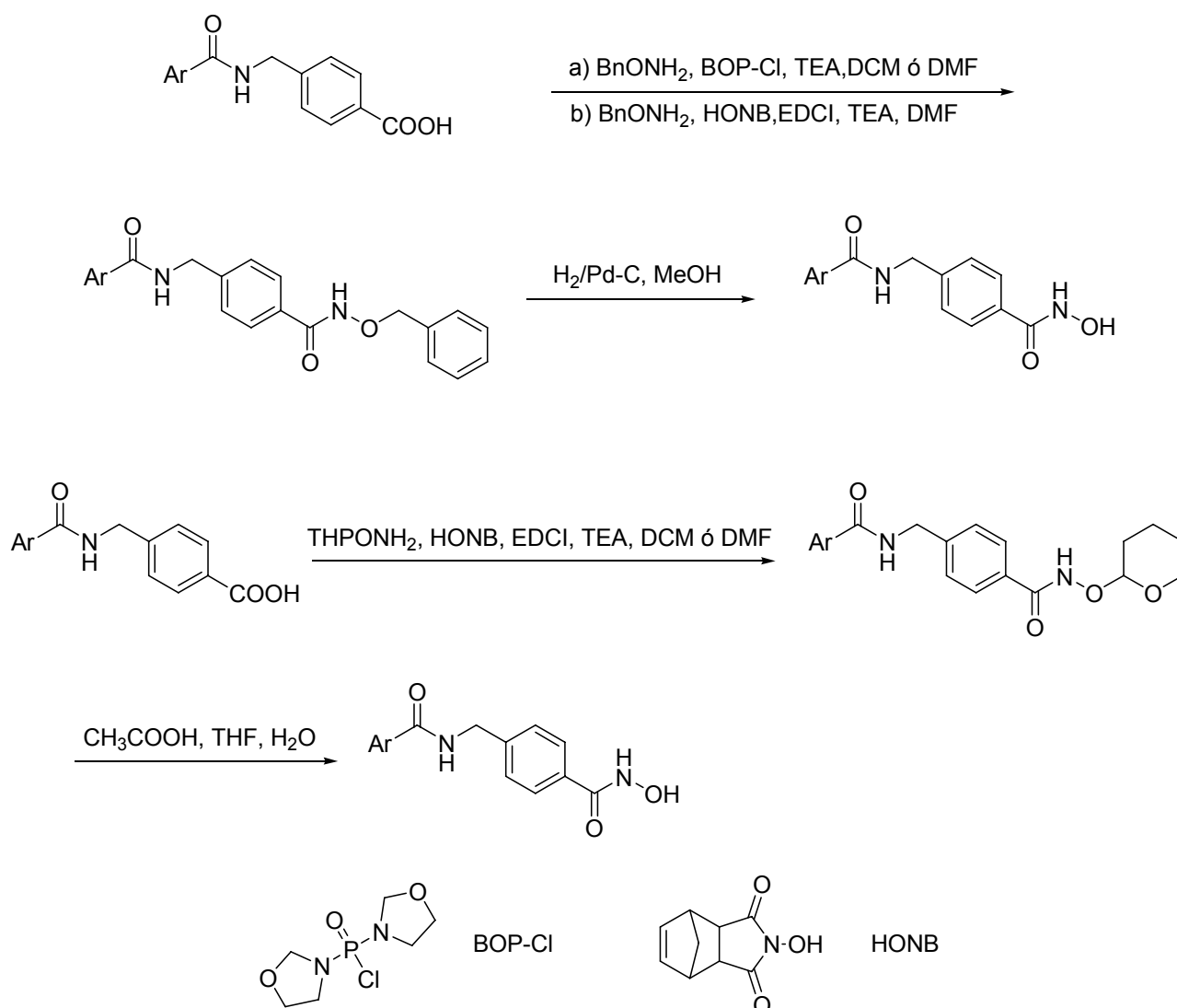


Esquema 2.4

En la preparación de otra serie de *N*-hidroxibenzamidas¹⁰⁰ se han utilizado los derivados de hidroxilamina protegida BnONH₂ y THPONH₂ junto a otro tipo de agentes de

¹⁰⁰ Maeda, T.; Nagaoka, Y.; Kuwajima, H.; Seno, C.; Maruyama, S.; Kurotaki, M.; Uesato, S. Potent histone deacetylase inhibitors: *N*-hydroxybenzamides with antitumor activities. *Bioorg. & Med. Chem.* **2004**, *12*, 4351-4360.

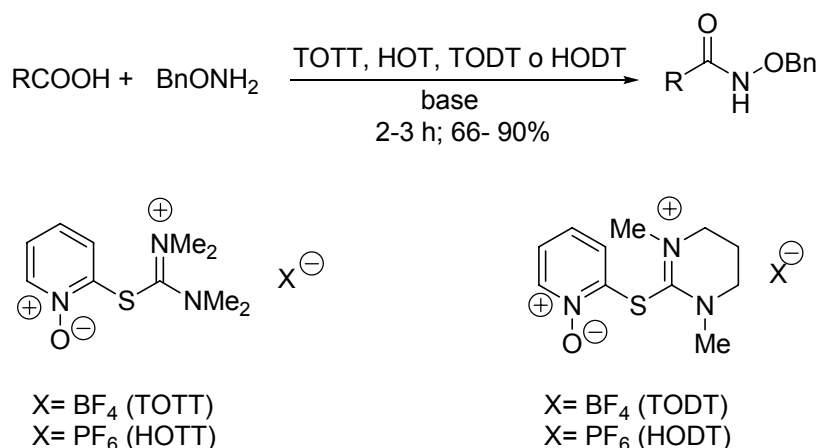
acoplamiento, tras la reacción con los correspondientes ácidos carboxílicos y la desprotección mediante hidrogenación catalítica en condiciones ácidas, dieron lugar a los ácidos hidroxámicos deseados (Esquema 2.5).



Esquema 2.5

Uno de los métodos de preparación de amidas Weinreb (N-metoxi-N-metil amidas) y O-alcoihidroxamatos¹⁰¹, recoge el uso de sales de tiuronio para acoplar ácidos carboxílicos y aminoácidos N-protegidos con hidroclouros de O-alquilhidroxilamina (Esquema 2.6).

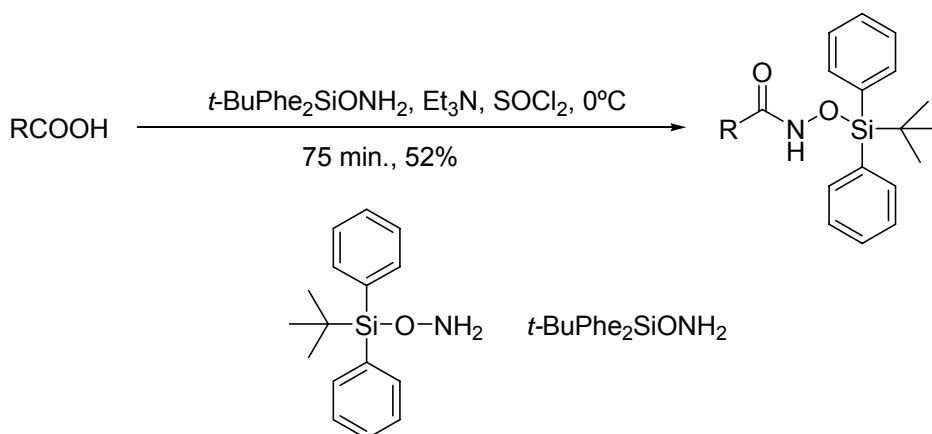
¹⁰¹ Bailén, M. A.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D.J. Direct síntesis of hydroxamates from carboxylic acids using 2-mercaptopyridone-1-oxide-based thiuronium salts. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5013- 5016.



Esquema 2.6

Las reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente y se obtienen buenos rendimientos. En todos los casos, los grupos protectores de los α -aminoácidos, fueron estables en las condiciones empleadas. Los hexafluorofosfatos HOTT y HODT proporcionaron rendimientos ligeramente mayores que los obtenidos con el uso de los tetrafluoroboratos TOTT y TODT (Esquema 2.6).

Una estrategia parecida a la representada en el Esquema 2.1, lleva al uso de hidroxilamina protegida como *O-tert*-butildifenilsilil hidroxilamina¹⁰² (Esquema 2.7). Los hidroxamatos formados con rendimientos próximos al 50% son cristalinos y estables.

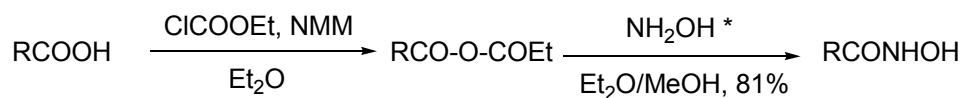


Esquema 2.7

En el Esquema 2.8 se presenta la otra alternativa para la obtención de ácidos hidroxámicos a partir de ácidos carboxílicos. En este caso el ácido carboxílico se activa en

¹⁰² Muri, D.; Bode, J.W.; Carreira, E.M. A novel, general method for the synthesis of nitrile oxides: dehydration of *O*-silylated hydroxamic acids. *Org. Lett.* **2000**, 2 (4), 539-541.

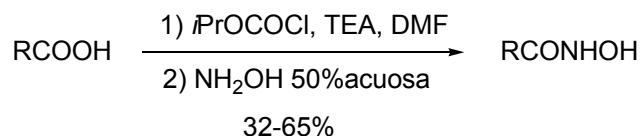
presencia de cloroformiato de etilo en éter y *N*-metil morfolina (NMM). Se debe destacar que el tiempo de reacción es de 25 minutos con un 81% rendimiento¹⁰³.



* Recién preparada a partir del clorhidrato.

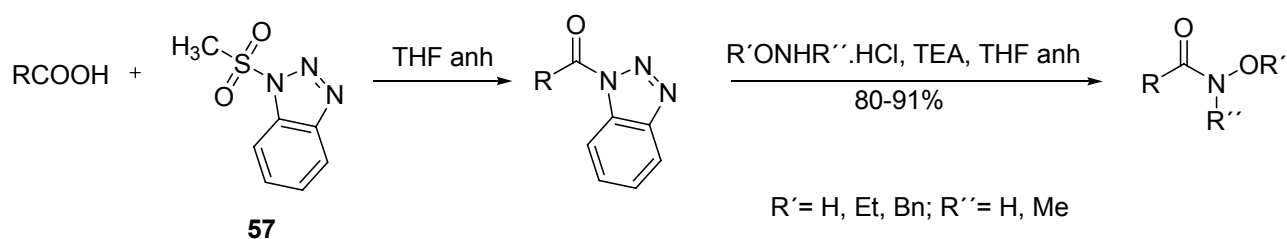
Esquema 2.8

Otra metodología que implica la formación de cloruros de ácido, parte de cloroformiato de isopropilo¹⁰⁴ (*i*-PrOCOCI) y se representa en el Esquema 2.9. El cloruro de ácido obtenido se hace reaccionar en este caso con hidroxilamina acuosa al 50% y los rendimientos oscilan entre el 32 y el 65%.



Esquema 2.9

Los acilbenzotriazoles, preparados a partir de diferentes ácidos carboxílicos y 1-metanosulfonyl-1-H-benzotriazol (**57**, Esquema 2.10), se han utilizado en la síntesis de ácidos *O*-alquil, *N*-alquil y *O*, *N*-dialquil hidroxámicos, tras el tratamiento en medio básico con los derivados de hidroxilamina convenientemente protegidos¹⁰⁵.



Esquema 2.10

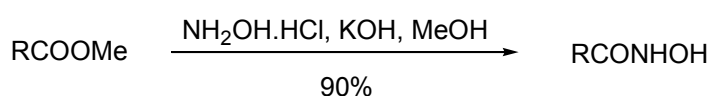
¹⁰³ Sekar, A.; Surech, M.; Ravindra, G. A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6285-6288.

¹⁰⁴ Dai, Y.; Guo, Y.; Guo, J. Indole amide hydroxamic acids as potent inhibitors of histone deacetylases. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1897-1901.

¹⁰⁵ Katritzky, A.R.; Kirichenko, N.; Rogovoy, B. Efficient conversions of carboxylic acid into *O*-alkyl, *N*-alkyl and *O*, *N*-dialkylhydroxamic acids. *Synthesis*, **2003**, *18*, 2777 - 2780.

La base utilizada juega un papel importante en el rendimiento de la reacción. El uso de *tert*-butóxido potásico en THF resultó en una disminución del rendimiento, y aumentó la presencia de productos secundarios. Sin embargo, el uso de TEA, además de una mejora en el rendimiento, sólo dio lugar a benzotriazol como subproducto, que se elimina fácilmente tras el lavado con carbonato sódico acuoso.

También se ha publicado la síntesis de ácidos hidroxámicos a partir de ésteres¹⁰⁶, tal y como se muestra en el Esquema 2.11. En este caso, el uso de hidroxilamina como base libre recién preparada bajo las condiciones indicadas, permite el desarrollo de la reacción en una hora y con un 90% de rendimiento.



Esquema 2.11

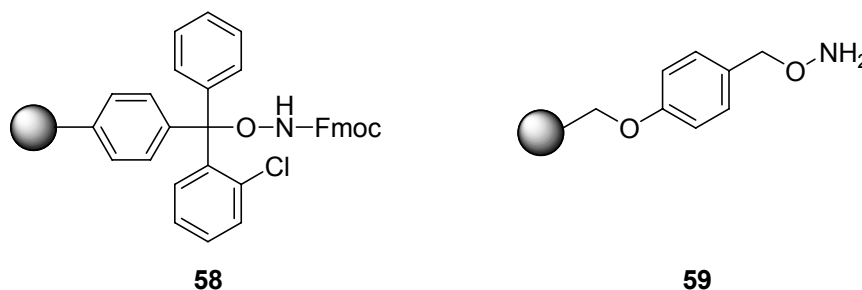
2.5.3. Síntesis de derivados del ácido hidroxámico en fase sólida

Al ser los ácidos hidroxámicos potenciales agentes terapéuticos y la química combinatoria una herramienta fundamental en nuestros días para el descubrimiento de nuevos fármacos, ha surgido la necesidad de crear vías sintéticas en fase sólida para preparar este tipo de compuestos.

La principal ventaja del uso de esta técnica es la no purificación de los intermediarios de reacción y la obtención del producto final con una alta pureza. El inconveniente es la obligatoriedad de que todas las reacciones transcurran con muy altos rendimientos y la imposibilidad de estudiar la reacción por métodos clásicos.

¹⁰⁶ Gediya, L.K.; Chopra, P.; Purushottamachar, P. A new simple and high-yield synthesis of suberoylanilide hydroxamic acid and its inhibitory effect alone or in combination with retinoids on proliferation of human prostate cancer cells. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5047-5051.

Las estrategias sintéticas descritas para este tipo de compuestos en fase sólida se basan en la unión de la hidroxilamina, protegida con Fmoc, a las diferentes resinas de síntesis en fase sólida: N-Fmoc hidroxilamino 2-clorotritilo (**58**) y la resina de Wang funcionalizada con hidroxilamina (**59**, Esquema 2.12)



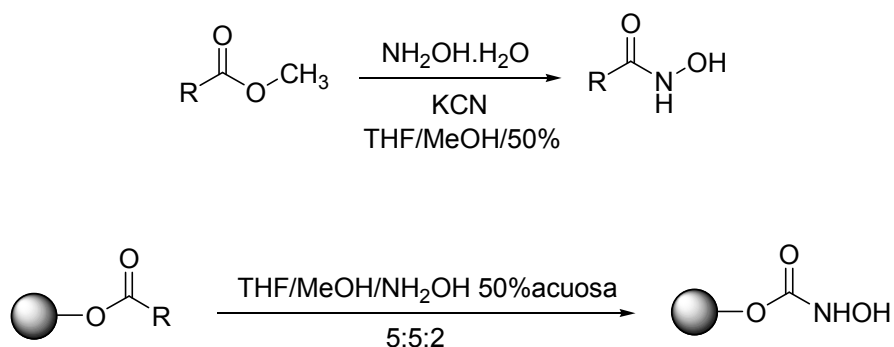
Esquema 2.12

En el caso de **58**, una vez desprotegido el nitrógeno, la resina útil para la síntesis en fase sólida queda funcionalizada con un resto de hidroxilamina. En este caso, es la propia resina la que actúa como grupo protector de la hidroxilamina.

En las reacciones en solución, el uso de cantidades catalíticas de KCN en THF/MeOH, acelera la formación de los ácidos hidroxámicos deseados a temperatura ambiente (Esquema 2.13)¹⁰⁷, y resultó ser igualmente eficaz en la síntesis de este tipo de compuestos.

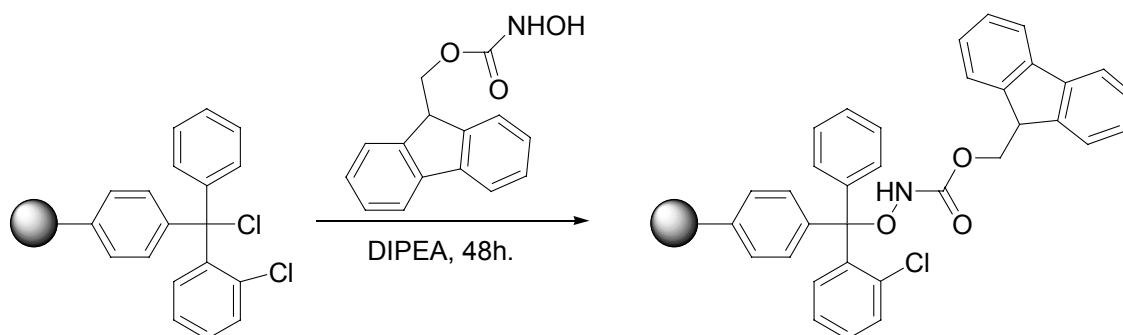
También se ha estudiado la síntesis directa de ácidos hidroxámicos durante la etapa de liberación desde la resina en fase sólida, en presencia de cantidades catalíticas de KCN (Esquema 2.13). Los ésteres acoplados a la resina se separaron de ésta tras el tratamiento durante 2-3 horas con una mezcla 5:5:2 de THF/MeOH/NH₂OH y 5 mg de KCN, por cada 100-200 mg de resina cargada. El aumento del tiempo de exposición a la solución de hidroxilamina resulta en la descomposición de los productos. Se demostró que el uso del KCN incrementa el rendimiento en algunos casos y acorta el tiempo de reacción en todos.

¹⁰⁷ Ho, C. Y.; Strobel, E.; Ralbovsky, J.; Galemno, R.A. Improved solution and solid phase preparation of hydroxamic acids from esters. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4873-4875.



Esquema 2.13

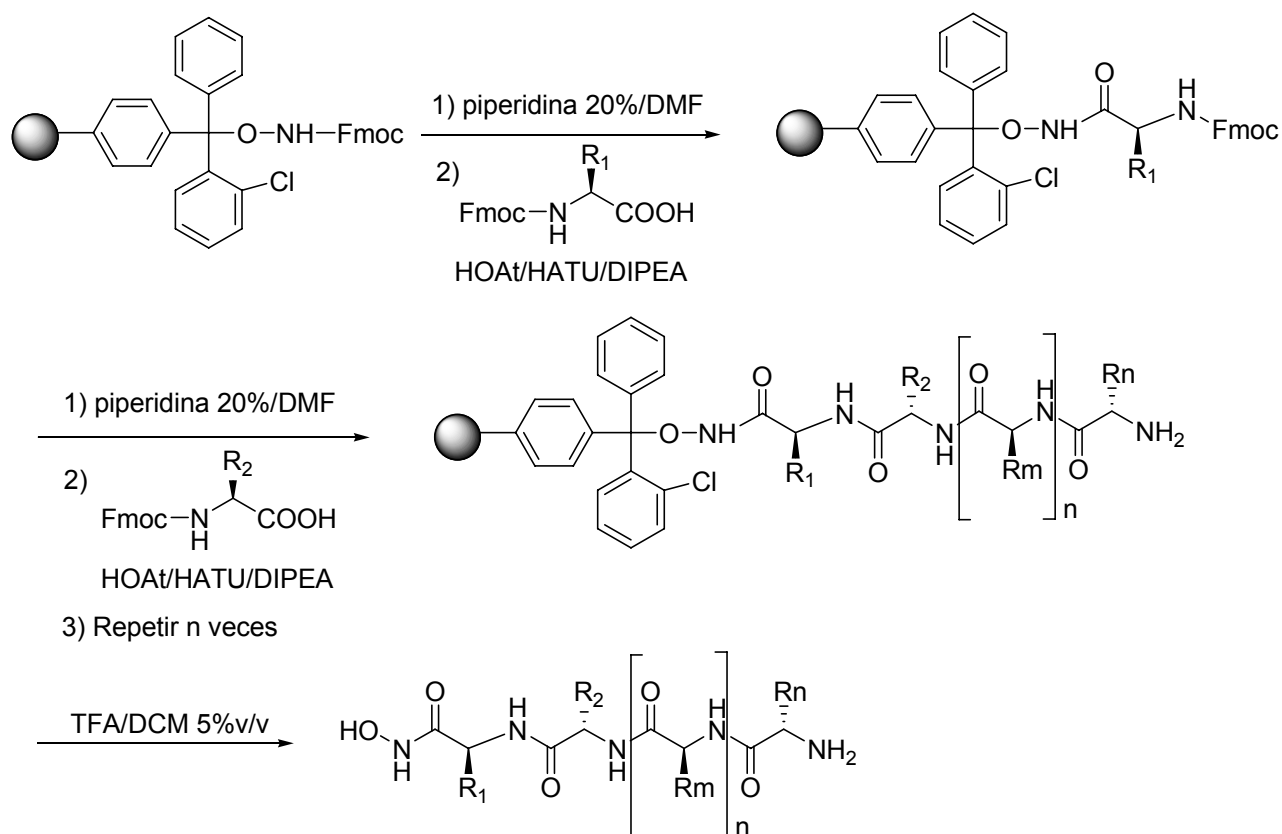
En una de las síntesis publicadas se parte de la resina N-Fmoc-aminoxil-2-clorotritil poliestireno (Esquema 2.14), preparada a partir de la resina denominada cloruro de 2-clorotritil poliestireno. Tras el tratamiento con N-Fmoc-hidroxilamina, en presencia de 2 equivalentes de DIPEA en DCM durante 48 horas, se consigue funcionalizar la resina con una eficiencia que sobrepasa el 80%¹⁰⁸.



Esquema 2.14

Una vez obtenida la resina deseada, se elimina el grupo protector Fmoc con una solución de piperidina al 20% en DMF y se acopla el primer aminoácido utilizando un exceso de 4 equivalentes de la mezcla acilante RCOOH/HOAt/HATU/DIPEA. Siguiendo la metodología cíclica de síntesis/desprotección desarrollada en el Esquema 2.15, se continúan añadiendo los aminoácidos deseados y seguido de la desprotección del Fmoc se obtiene el producto final unido a la resina de partida. Para la hidrólisis de la resina se utiliza una solución al 5% v/v de TFA en DCM. Una solución de mayor concentración afecta la pureza del compuesto final.

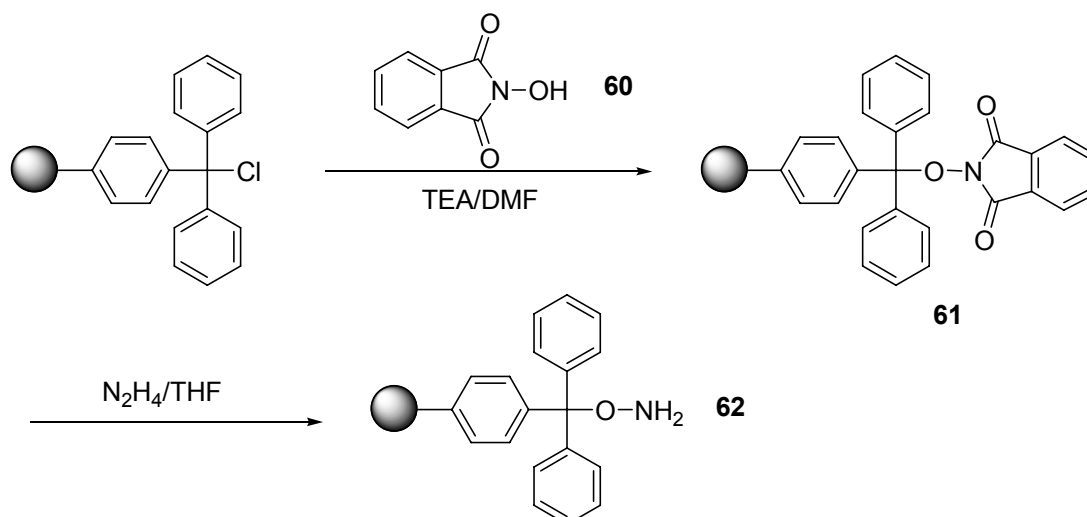
¹⁰⁸ Mellor, S.; McGuire, C.; Chan, W. N-Fmoc-aminooxy-2-chlorotrityl polystyrene resin: A facile solid-phase methodology for the synthesis of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (18), 3311-3314.



Esquema 2.15

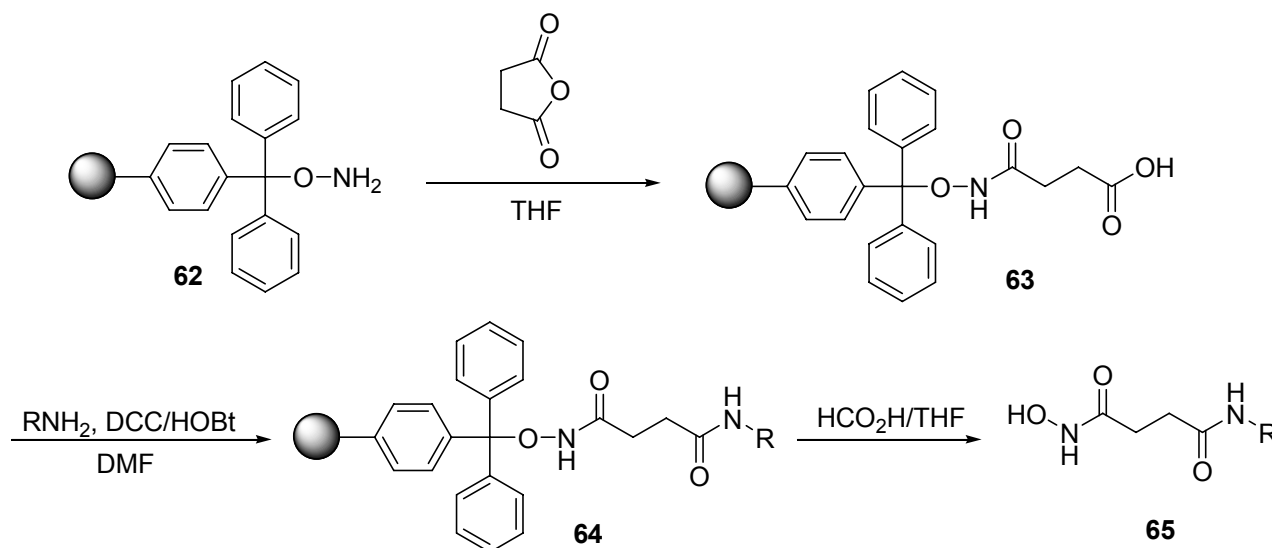
Se han utilizado otros grupos protectores para el nitrógeno de la hidroxilamina que permiten una carga eficaz de la resina cloruro de tritilo (Esquema 2.16). Así, la N-hidroxiftalimida **60**, como fuente de hidroxilamina, en presencia de TEA, permite la obtención del intermediario **61**. Tras el tratamiento con hidrazina a temperatura ambiente durante 12 horas, se obtiene la resina convenientemente funcionalizada **62**¹⁰⁹.

¹⁰⁹ Bauer, U.; Ho, W.; Koskinen, A.M.P.; A novel linkage for the solid-phase synthesis of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (41), 7233-7236.

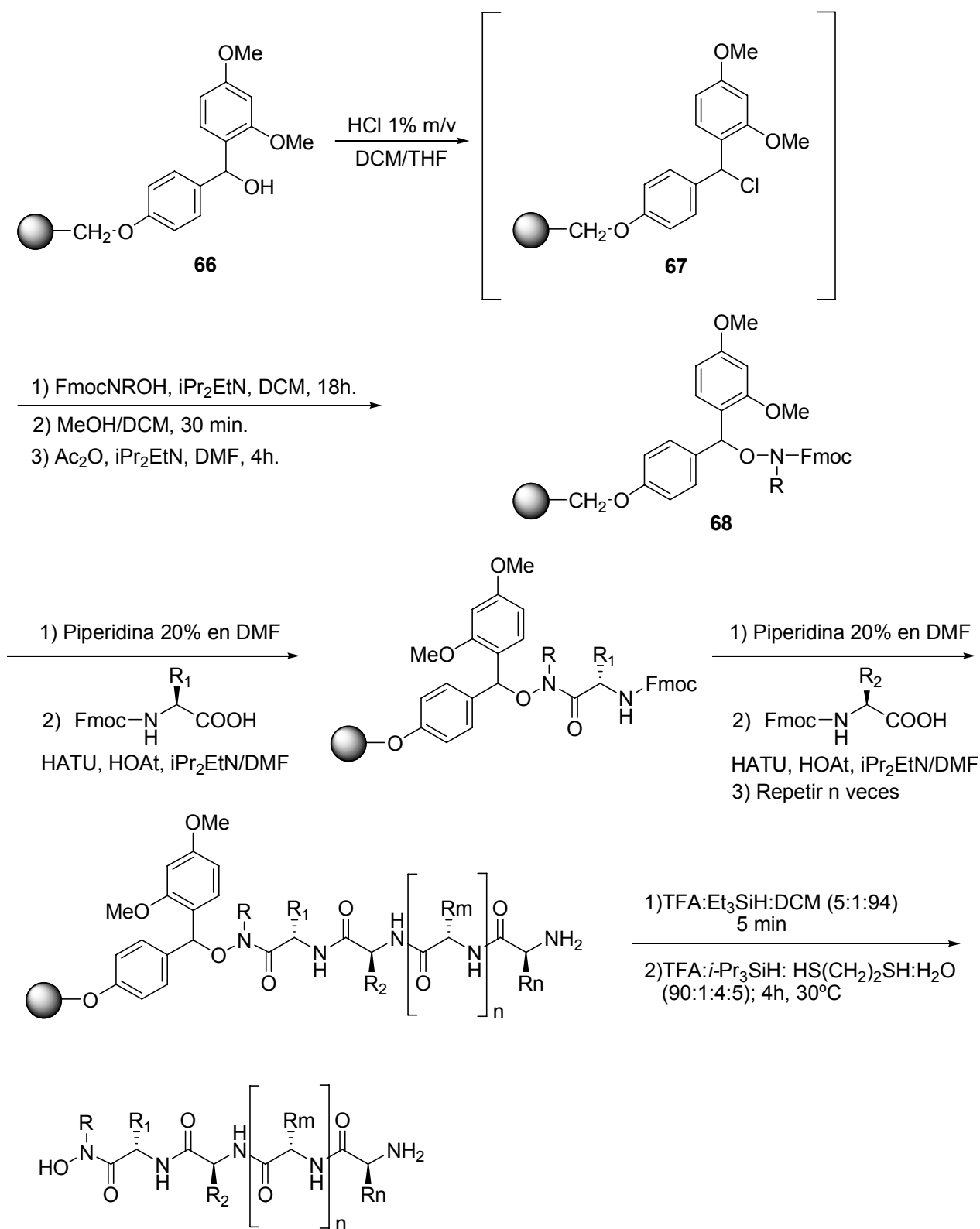


Como ejemplo de los diferentes usos de esta resina, el tratamiento con anhídrido succínico en THF, permite la obtención del ácido **63**, Esquema 2.17. La adición de 5 equivalentes de la amina deseada en medio básico con TEA, tras la activación del ácido unido a la resina con DCC y HOBT, permite la obtención de la amida **64**.

Para la hidrólisis de este compuesto desde la resina se utiliza en este caso ácido fórmico en THF (1:3, 1h.), obteniéndose el ácido hidroxámico deseado (**65**) con rendimientos que oscilan entre 50-78%.



La síntesis de ácidos N-alkilhidroxámicos también se ha desarrollado a partir de la resina 4-[2,4-dimetoxifenil(hidroxi)metil]-fenoximetil poliestireno (**66**, Esquema 2.18).



Esquema 2.18

Con el objetivo de formar una resina con un impedimento estérico similar al que muestra la resina cloruro de tritilo y activarla se trata con HCl. La resina **67** se funcionaliza en este caso con hidroxilamina protegida con el grupo Fmoc para obtener el intermediario **68**. La desprotección del grupo amino en las condiciones usuales permite la obtención de una nueva resina cargada de forma adecuada para la síntesis de derivados del ácido hidroxámico¹¹⁰.

¹¹⁰ Mellor, S.L.; Chan, W.C. 4-[2,4-dimetoxifenil(N-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-N-alquil-aminoxi)methyl]-phenoxymethyl poliestiren: a multiple solid phase approach to N-alkylhydroxamic acids. *Chem. Commun.* **1997**, 2005-2006.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

El objetivo de la investigación expuesta en esta Memoria es la síntesis de nuevos inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC), lo que podría conducir al desarrollo de nuevos fármacos antiproliferativos.

Los compuestos objeto de esta Memoria se han diseñado por farmacomodulación de las estructuras I y II representadas en la Figura 3.1. Estos inhibidores de las HDAC han sido publicados previamente¹¹¹ y constituyen dos estructuras líder debido a la similitud entre ambas y a que poseen los requerimientos establecidos en literatura para este tipo de inhibidores: a) un grupo quelante del Zn^{2+} , b) un espaciador, y c) una cabeza lipófila.

Específicamente, se investiga la influencia en la actividad biológica tras los cambios en el espaciador (C), debido a la introducción de un grupo amida, un bencilo, y aumentando o disminuyendo la longitud de la cadena metilénica. También se ha modificado la cabeza lipófila (A) de estos productos, mediante la introducción de sustituyentes, y el nexo de unión (B), con el cambio de la ftalimida por 1,1-dióxido-3-oxo-

¹¹¹ a) Remiszewski, S. W.; Sambucetti, L. C.; Atadja, P.; Bair, K. W.; Cornell, W. D.; Green, M. A.; Howell, K. L.; Jung, M.; Kwon, P.; Trogani, N.; Walker, H. Inhibitors of Human Histone Deacetylase: Synthesis and Enzyme and Cellular Activity of Straight Chain Hydroxamates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 753-757; b) Su, G. H.; Sohn, T. A.; Ryu, B.; Kern, S. E. A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3137-3142.

2H-benzo[d]isotiazol y 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol. Los compuestos finales se agruparán en familias de acuerdo a sus características estructurales, pero todos los compuestos obtenidos presentan el ácido hidroxámico como quelante del Zn^{2+} catalítico de las HDAC.

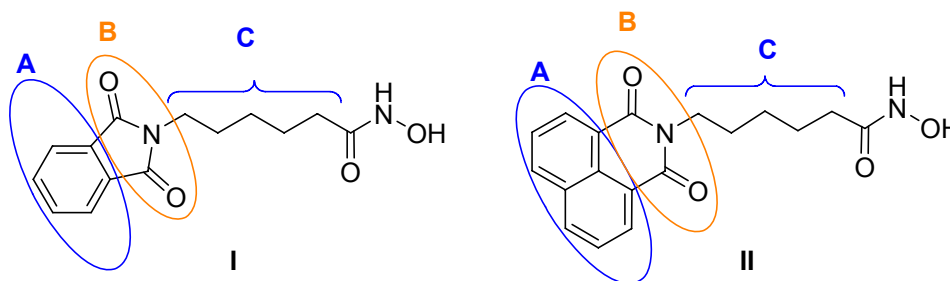


Figura 3.1

Así, en esta Memoria se pretende lograr los siguientes objetivos:

1. Optimización de una ruta sintética de los productos finales.
2. Síntesis, purificación y caracterización de nuevos inhibidores de las HDAC.
3. Valoración de la actividad de los productos obtenidos sobre la enzima aislada.
4. Valoración de la actividad antiproliferativa sobre diferentes líneas tumorales de los productos finales sintetizados.
5. Establecimiento de las relaciones estructura-actividad que permitan orientar el diseño y la síntesis de nuevos inhibidores más potentes.

4. PARTE TEÓRICA

4. Parte teórica

4.1. Generalidades

La estructura de las HDAC (Figura 4.1), permite el diseño de nuevos inhibidores por modificación de pseudotipos previamente descritos y en los que se establecen tres zonas estructurales susceptibles de mejora desde el punto de vista de la Química Farmacéutica: a) un grupo voluminoso, con afinidad hacia la zona situada al comienzo del canal hidrofóbico, b) un espaciador, que ha de presentar una longitud adecuada y c) un grupo quelante del Zn^{2+} situado en el sitio catalítico propiamente dicho. En nuestro caso mantenemos el resto de ácido hidroxámico como quelante del Zn^{2+} catalítico, por lo que las modificaciones se centran en el grupo lipófilo y el espaciador.

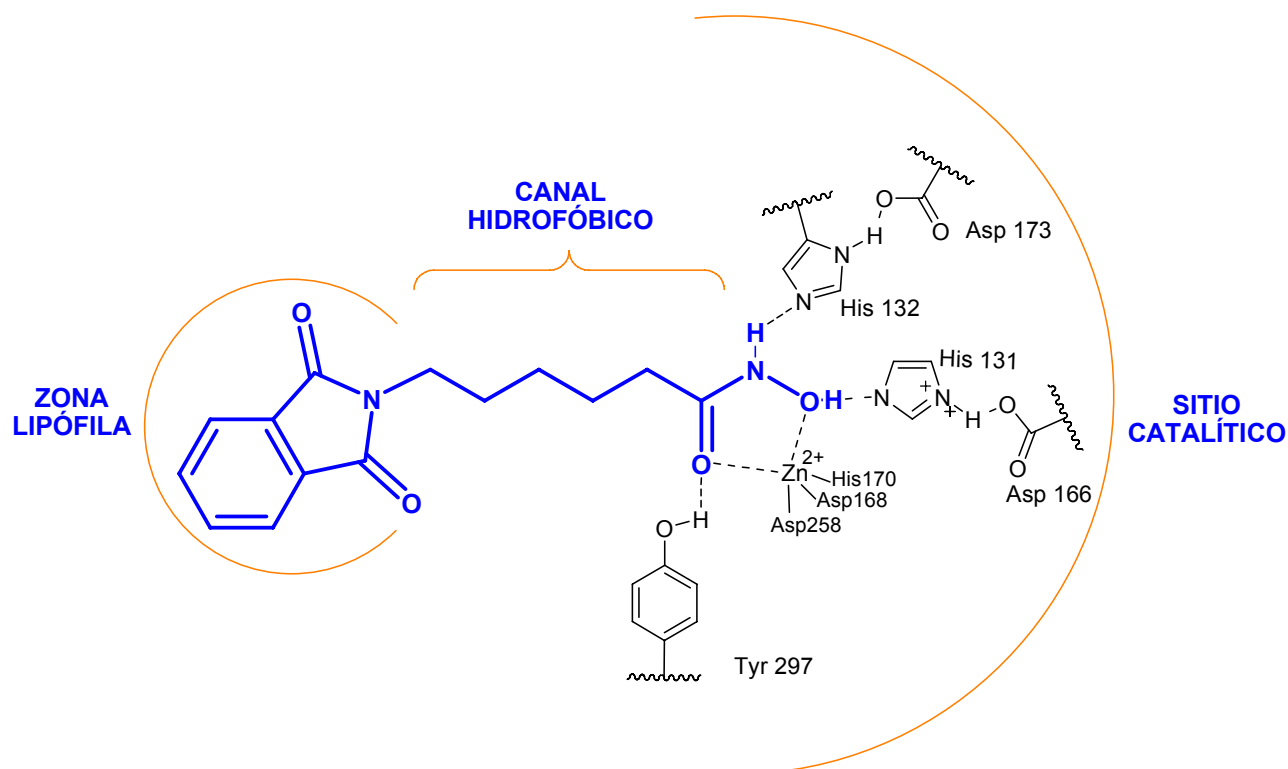


Figura 4.1. Estructura de las HDAC-69

Se han preparado treinta y dos productos finales designados con las siglas **MTC**¹¹² englobados en dos familias, a su vez divididas en dos subfamilias como se muestra en el diagrama de la Figura 4.2. Todos los compuestos se detallan en las Tablas 4.1 - 4.3. A continuación se describe la síntesis de cada uno de los grupos de compuestos que constituyen las familias descritas y se hace un análisis estructural de los mismos. Por último se discute de forma razonada las actividades biológicas encontradas.

¹¹² **Nota aclaratoria:** La identificación de los compuestos finales en esta tesis figuran como **MTC**, que son las siglas del autor, y el número corresponde a la página del cuaderno de trabajo. Para simplificar la lectura de esta memoria se ha decidido asignar números correlativos a los compuestos intermedios aunque estos no coincidan con la página del cuaderno.

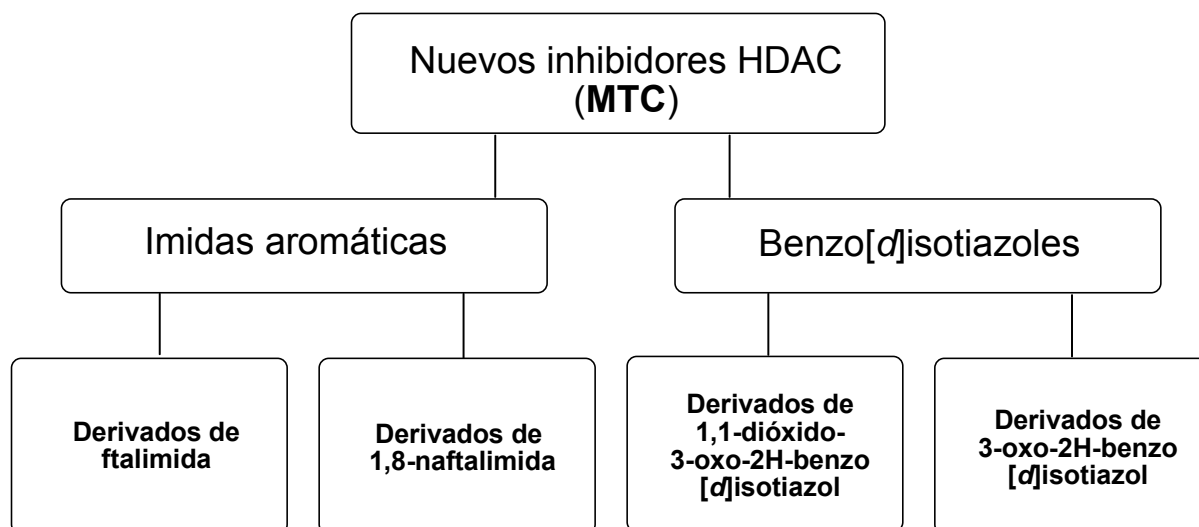


Figura 4.2. Diagrama de las familias de los productos finales

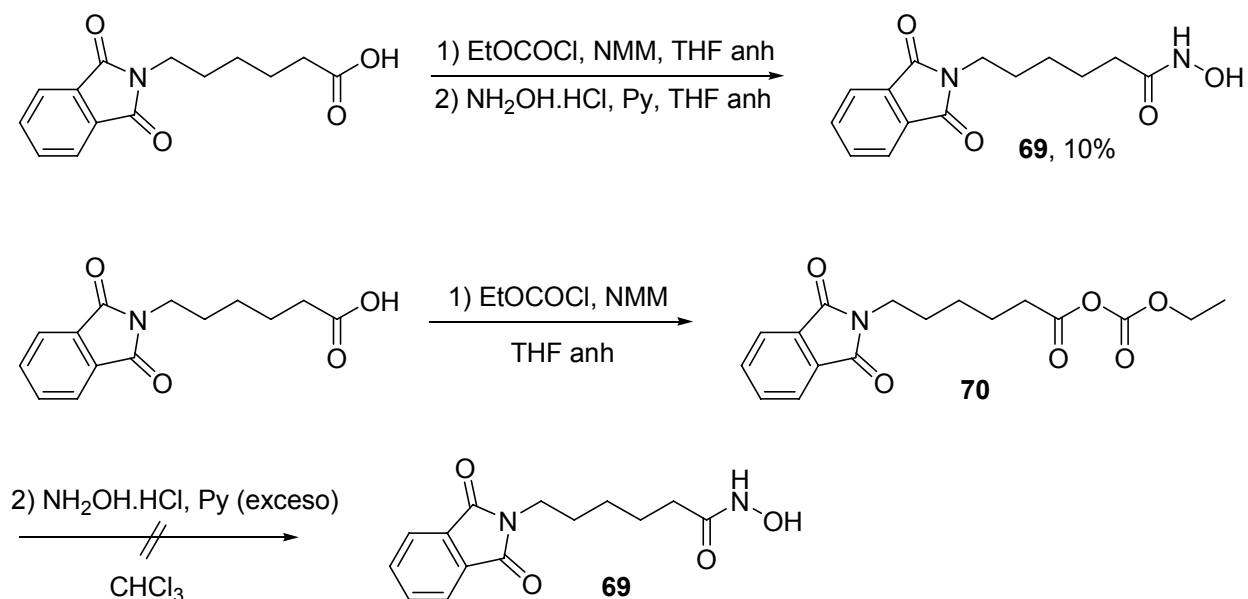
Síntesis de los compuestos utilizados como pseudotipos

Aunque la síntesis de los compuestos cabeza de serie ha sido descrita previamente en solución siguiendo una metodología, en principio general para la obtención de otros análogos derivados del ácido hidroxámico, la experiencia durante el desarrollo de esta memoria ha demostrado la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la síntesis de este tipo de compuestos.

Así, se observará cómo los inhibidores obtenidos se han sintetizado en solución o en fase sólida y, por último, se ha puesto a punto una técnica basada en el uso de reactivos unidos a fase sólida.

El compuesto **69** es uno de los compuestos cabeza de serie sintetizados en esta memoria. Para su obtención se siguió el procedimiento descrito en bibliografía¹¹³ representado en el Esquema 4.1, aunque el rendimiento hallado fue inferior al publicado (15%). En un segundo experimento bajo las mismas condiciones, se aisló el intermediario **70**.

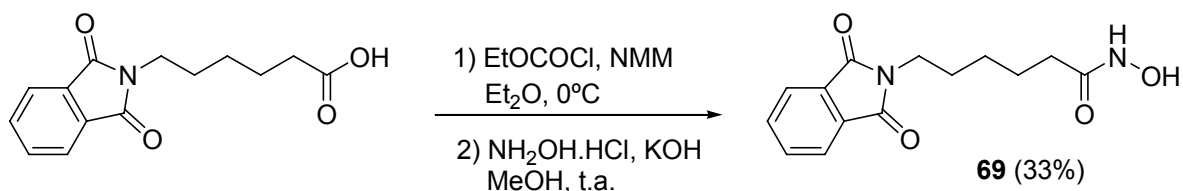
¹¹³ Remiszewski, S. W.; Sambucetti, L. C.; Atadja, P.; Bair, K. W.; Cornell, W. D.; Green, M. A.; Howell, K. L.; Jung, M.; Kwon, P.; Trogani, N.; Walker, H. Inhibitors of human histone deacetylase: Synthesis and enzyme and cellular activity of straight chain hydroxamates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 753-757.



Esquema 4.1

Con el objetivo de conseguir una ruta sintética adecuada para la obtención de los derivados del ácido hidroxámico sin un grupo amida en el espaciador (para los cuales se ha utilizado una metodología en fase sólida), se exploraron otras vías sintéticas en solución.

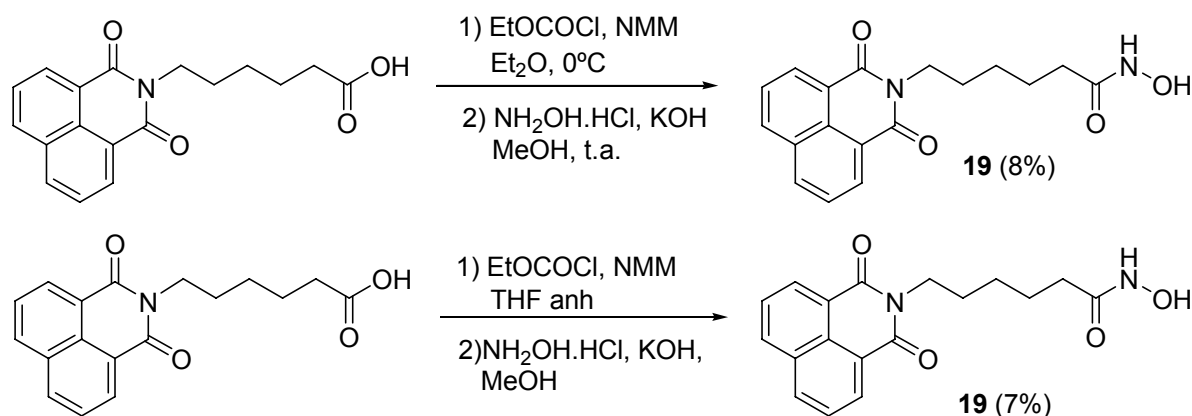
Uno de los procedimientos realizados se muestra en el Esquema 4.2¹¹⁴, donde a diferencia del método anterior: a) se sustituye el disolvente de la reacción, THF por éter etílico, b) se utiliza hidróxido potásico en presencia de metanol para liberar la hidroxilamina in situ y c) se modifica la temperatura empleada para la adición del cloroformiato de etilo y la N-metilmorfolina. Se debe destacar que con este método se aumenta el rendimiento de la reacción (33%), y se disminuye el tiempo de reacción (25 minutos).



Esquema 4.2

¹¹⁴ Sekar, A.; Surech, M.; Ravindra, G. A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6285-6288.

Esta metodología mejorada fue probada también durante la síntesis del Scriptaid **19** (Esquema 4.3), aunque el rendimiento obtenido fue pobre (8%), probablemente debido a problemas de solubilidad o por descomposición del producto final.

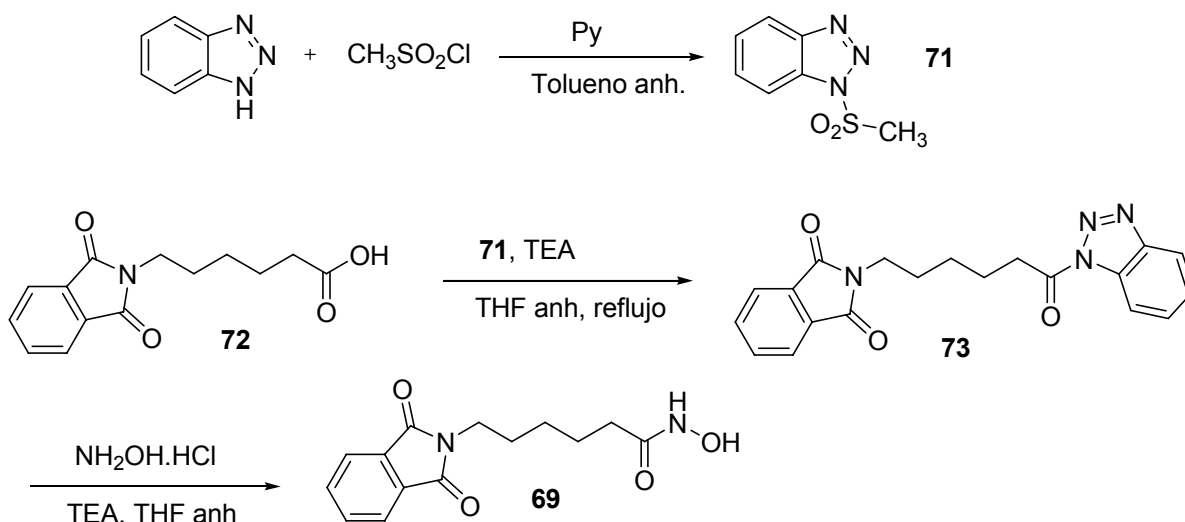


Esquema 4.3

La síntesis del Scriptaid bajo estas condiciones pero utilizando como disolvente de la reacción THF anhidro (Esquema 4.3) no dio lugar a los resultados esperados, y aunque permitió aislar el producto deseado, también se aisló un segundo compuesto con estructura desconocida.

Uno de los métodos alternativos utilizados ha sido el descrito por el grupo de Katritzky (Esquema 4.4). El agente activante utilizado N-(1-metanosulfonyl)benzotriazol, **71**, se sintetizó a partir de una solución de benzotriazol y piridina a 0 °C, a la que se adiciona una solución de cloruro de metilsulfonylo en tolueno. El reactivo **71** obtenido permite la activación del ácido **72** en forma de derivado de benzotriazol (**73**) en presencia de TEA¹¹⁵.

¹¹⁵ Katritzky, A.R.; He, H-Y; Susuki, K. N-acylbenzotriazoles: neutral acylating reagents for the preparation of primary, secondary, and tertiary amides. *J. Org. Chem.* **2000**, 65(24), 8210-8213.



Esquema 4.4

El acilbenzotriazol formado (**73**) se disuelve en THF anhidro, y se adiciona el clorhidrato de hidroxilamina en presencia de trietilamina¹¹⁶, formándose el ácido hidroxámico. Sin embargo, bajo estas condiciones no se consigue una mejora del rendimiento, posiblemente debido a la inestabilidad del intermedio **73**.

Debido a los problemas encontrados durante la síntesis de los productos de referencia en solución, se ha planteado llevar a cabo la síntesis en fase sólida de los inhibidores de las HDAC objeto de esta memoria. Además, el uso de esta metodología una vez optimizada, permite llevar a cabo la síntesis en paralelo de derivados del ácido hidroxámico con una gran diversidad estructural.

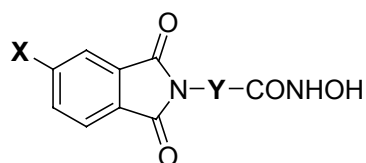
4.3. Síntesis de imidas aromáticas

4.3.1. Síntesis de derivados de la ftalimida

La síntesis de este tipo de derivados del ácido hidroxámico se ha llevado a cabo en fase sólida (Esquemas 4.7 y 4.8). Para ello se han obtenido previamente los ácidos correspondientes según la metodología descrita en los Esquemas 4.5 y 4.6. En la Tabla 4.1 se muestran los compuestos finales de esta familia.

¹¹⁶ Katritzky, A.R.; Kirichenko, N.; Rogovoy, B. Efficient conversions of carboxylic acid into O-alkyl, N-alkyl and O, N-dialkylhydroxamic acids. *Synthesis*, **2003**, 18, 2777 - 2780.

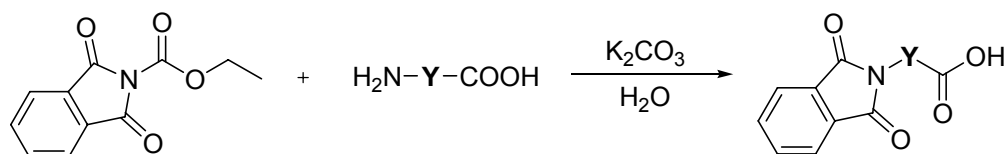
Tabla 4.1. Derivados de imidas aromáticas: ftalimidas.



Compuesto	X	Y
69(a)	H	-(CH ₂) ₅ -
MTC-26	H	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-30	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -
MTC-33	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ↓
MTC-34	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ⋮
MTC-32	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-126	H	-H ₂ C--
MTC-141	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
MTC-86	CH ₃	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-106	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -
MTC-107	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ↓
MTC-108	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ⋮
MTC-85	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-127	NO ₂	-(CH ₂) ₅ -

(a) Estructura de referencia¹¹³

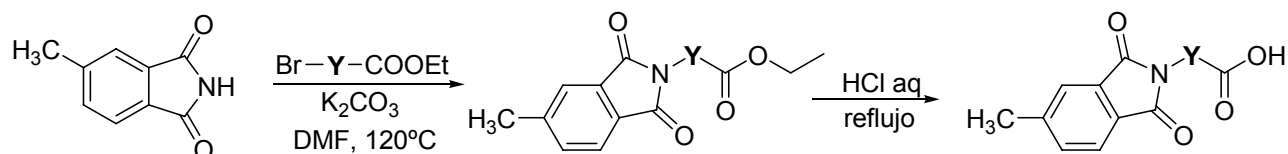
Así, para el caso de los derivados de la ftalimida sin sustituir se ha partido de la N-etoxicarbonilftalimida, a la que se hace reaccionar con los diferentes aminoácidos según las condiciones descritas en el Esquema 4.5.



No	Y	Rendim.
72	-CH ₂ -	78%
73	-(CH ₂) ₂ -	62%
74	-(CH ₂) ₅ -	79%
75	-CH ₂ (C ₆ H ₄)-	50%

Esquema 4.5

Los derivados de la ftalimida con un sustituyente metilo en posición 4, se obtienen en medio básico y en presencia del correspondiente bromoácido protegido en forma de éster. Los correspondientes ácidos se obtienen por tratamiento con HCl concentrado de los ésteres sintetizados¹¹⁷ (Esquema 4.6).



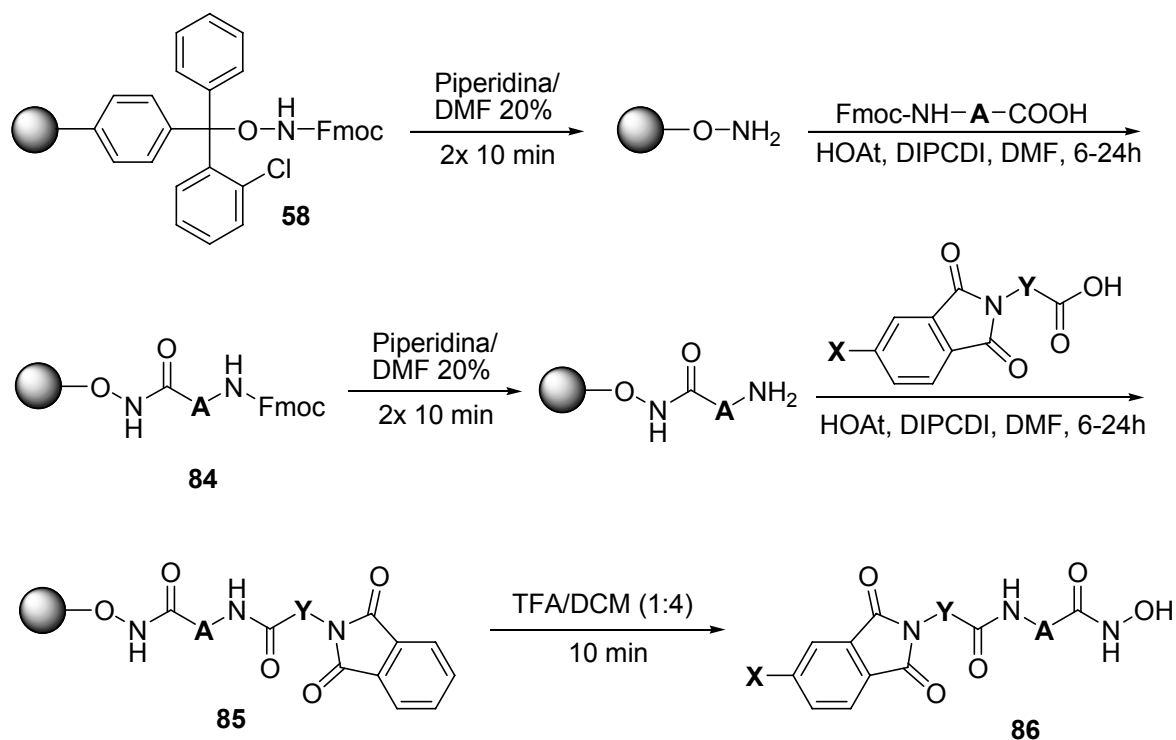
Y	Ésteres	Rendim.	Ácidos	Rendim.
-CH ₂ -	76	100%	80	43%
-(CH ₂) ₂ -	77	100%	81	75%
-(CH ₂) ₅ -	78	100%	82	73%
-(CH ₂) ₆ -	79	100%	83	76%

Esquema 4.6

Para la síntesis en fase sólida de los derivados del ácido hidroxámico se utiliza la resina funcionalizada con restos de hidroxilamina y 2-clorotritilo **58** (Esquema 4.7). Tras el acondicionamiento riguroso de la resina **58**, se procede a la desprotección del grupo

¹¹⁷ Da Settimo, A.; Primofiore, G.; La Motta, C. Acid derivatives of benzisothiazole-1,1-dioxide as inhibitors of rat lens aldose reductase. *Il farmaco*.1996, 51(4), 261 - 267.

amino de la hidroxilamina por tratamiento con piperidina al 20% en DMF. El acoplamiento del aminoácido a la resina requiere de condiciones especialmente optimizadas para esta resina. Así, la activación del ácido se produce en presencia de diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt). La posterior desprotección del grupo amino de **84** y el segundo acoplamiento con los ácidos derivados de la ftalimida permite la síntesis del compuesto final fijado a la resina de síntesis en fase sólida **85**.

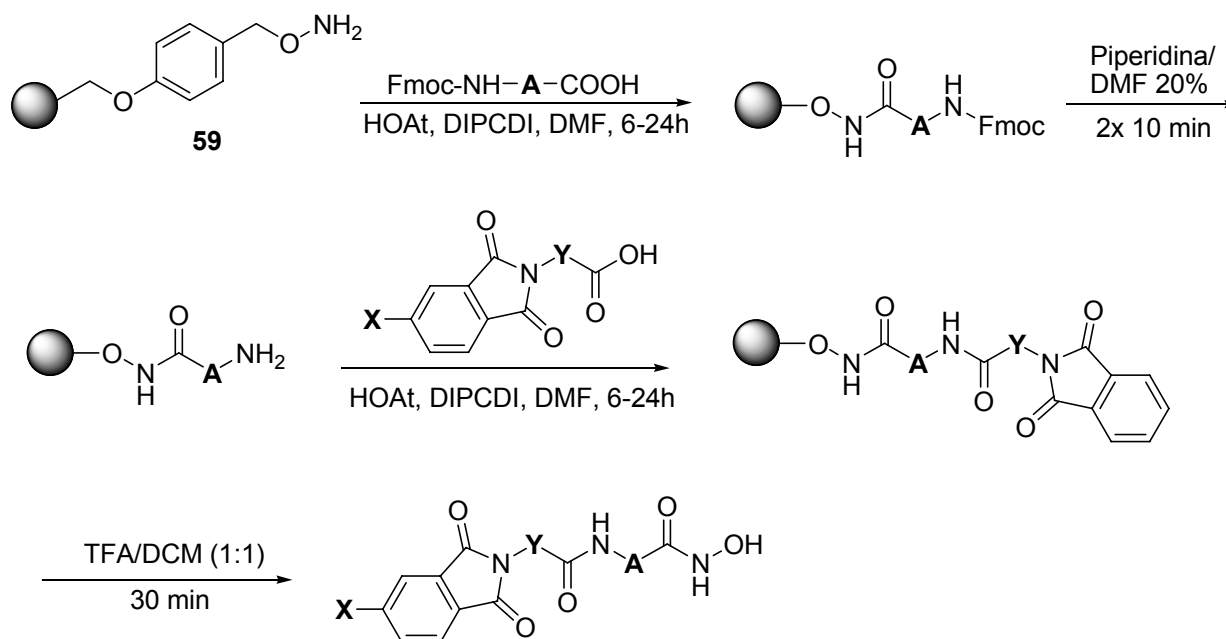


MTC	X	Y	A	Rendim.
MTC-26	H	-CH ₂ -	-(CH ₂) ₂ -	94%
MTC-30	H	-(CH ₂) ₂ -	-CH ₂ -	90%
MTC-33	H	-(CH ₂) ₂ -	!-CH-	26%
MTC-34	H	-(CH ₂) ₂ -	≡-CH-	46%
MTC-32	H	-(CH ₂) ₂ -	-(CH ₂) ₂ -	76%
MTC-107	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	!-CH-	64%
MTC-108	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	≡-CH-	58%

Esquema 4.7

La liberación y obtención de los productos finales **86** se produce en presencia de TFA a baja concentración debido a la sensibilidad de la resina utilizada hacia los ácidos.

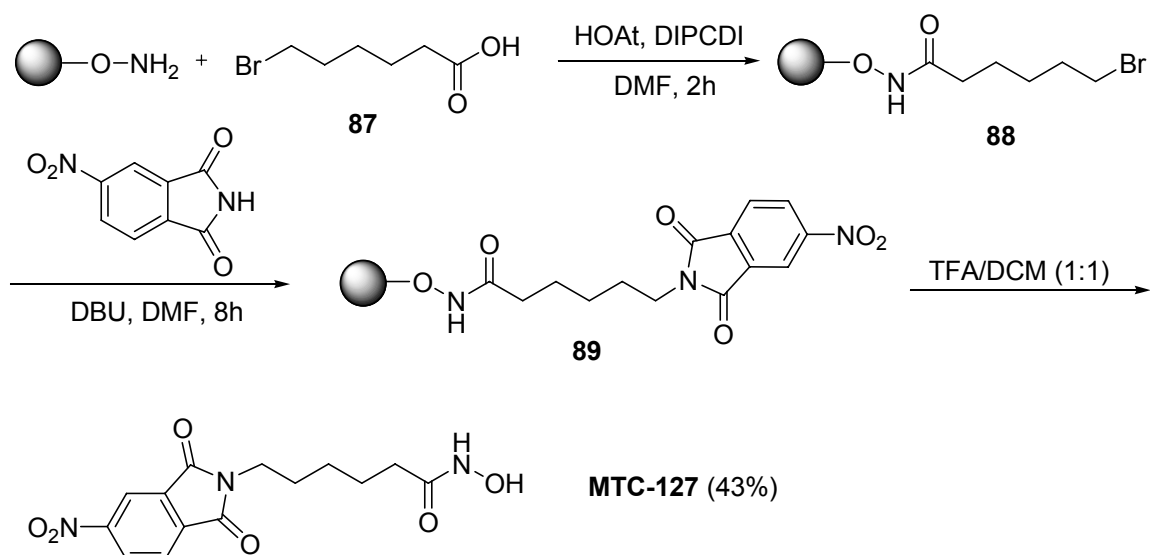
De forma paralela, también se ha utilizado la resina de Wang igualmente funcionalizada **59** (Esquema 4.8), sin embargo, aunque la química desarrollada es similar a la descrita en el esquema anterior, la liberación del producto final desde la resina requiere una mayor concentración de TFA, por la menor sensibilidad de esta resina.



MTC	X	Y	A	Rendim.
MTC-86	CH ₃	-CH ₂ -	-(CH ₂) ₂ -	33%
MTC-106	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	-CH ₂ -	58%
MTC-85	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -	-(CH ₂) ₂ -	52%

Esquema 4.8

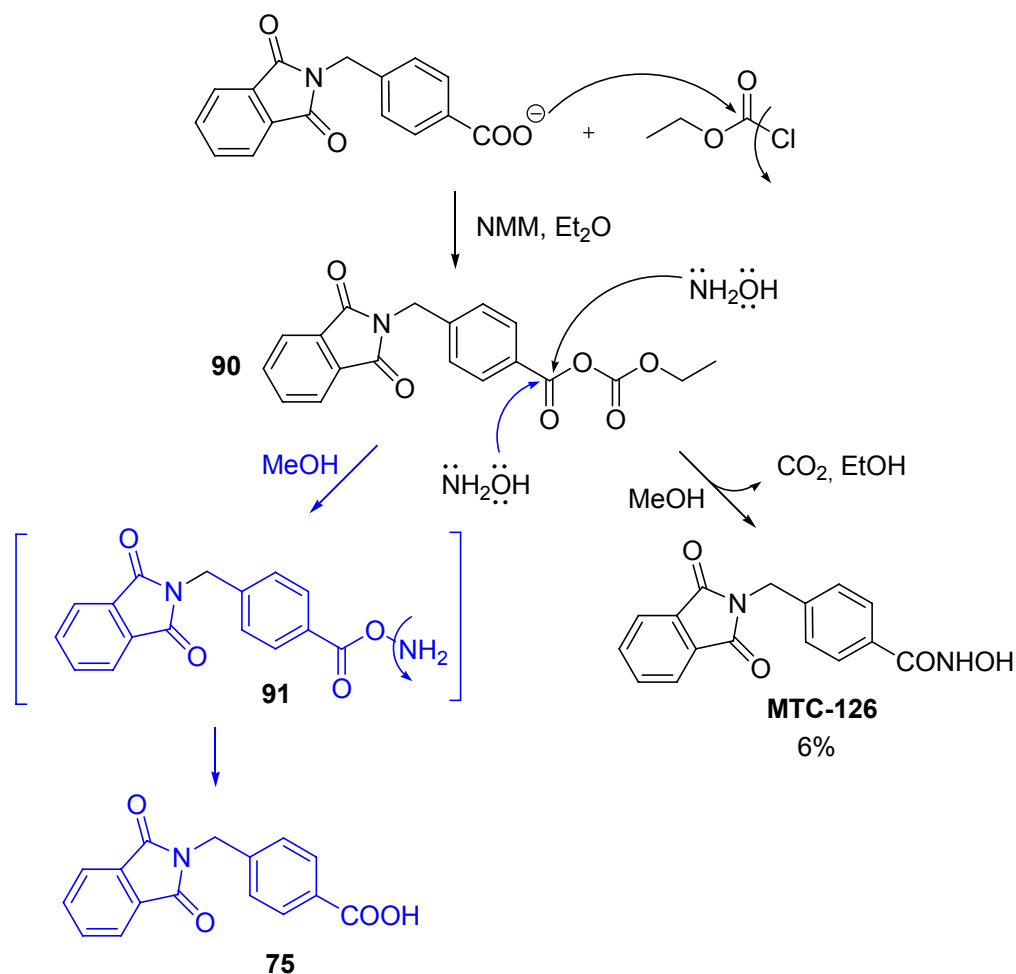
Para la obtención de **MTC-127** se siguió el procedimiento que se muestra en el Esquema 4.9. Tras el acoplamiento del bromo derivado **87** se obtiene el intermedio **88** unido a la resina. A continuación se produce un desplazamiento nucleófilo por la 5-nitroftalimida en presencia de DBU para obtener el producto final **89** unido a la resina de síntesis en fase sólida. La liberación del mismo se efectúa tras el tratamiento con TFA. En la reacción de acoplamiento el tiempo inferior a 2 horas es crítico para evitar una disminución significativa del rendimiento de la reacción.



Esquema 4.9

La síntesis de **MTC-126** y **MTC-141**, sin grupos amida en el espaciador, se probó en solución, sin embargo se observaron una serie de inconvenientes.

Para la obtención de **MTC-126** (Esquema 4.10), inicialmente se siguió la metodología expuesta en el Esquema 4.2 para la molécula **69**. Así, tras la activación del ácido en forma de carbonato mixto **90**, el nitrógeno de la hidroxilamina preparada in situ da lugar a un desplazamiento nucleófilo, la pérdida de CO₂ y salida de etanol. De esta forma, el mecanismo normal de la reacción da lugar al producto **MTC-126** con sólo un 6 % de rendimiento. Sin embargo, el grupo hidroxilo de la hidroxilamina puede competir con el desplazamiento nucleófilo anterior aunque con menor eficacia. Así, se llegaría al intermediario inestable **91**, que permitiría explicar el aislamiento del producto de partida **75**, aunque no se observara su presencia tras la etapa de activación y obtención de **90**.

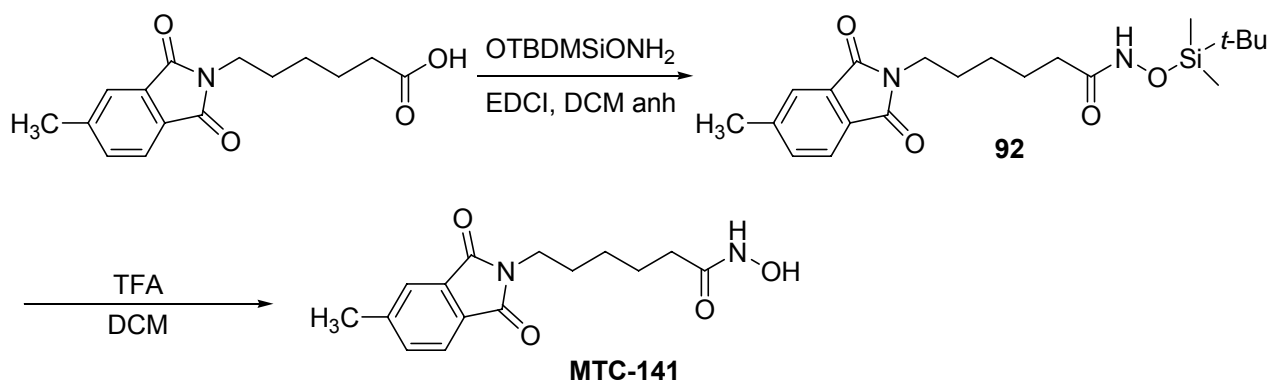


Esquema 4.10

Al objeto de evitar la competencia durante el desplazamiento nucleófilo, se procedió a la utilización de diferentes hidroxilaminas protegidas en el grupo hidroxilo. Así, el uso de la *O*-(*t*-butildimetilsilil) hidroxilamina (TBDMSiONH₂)¹¹⁸, en las condiciones de acoplamiento descritas en el Esquema 4.11, permitió la obtención del intermediario protegido **92**. El tratamiento de éste con TFA da lugar al producto final **MTC-141**, con un rendimiento menor del 10%.

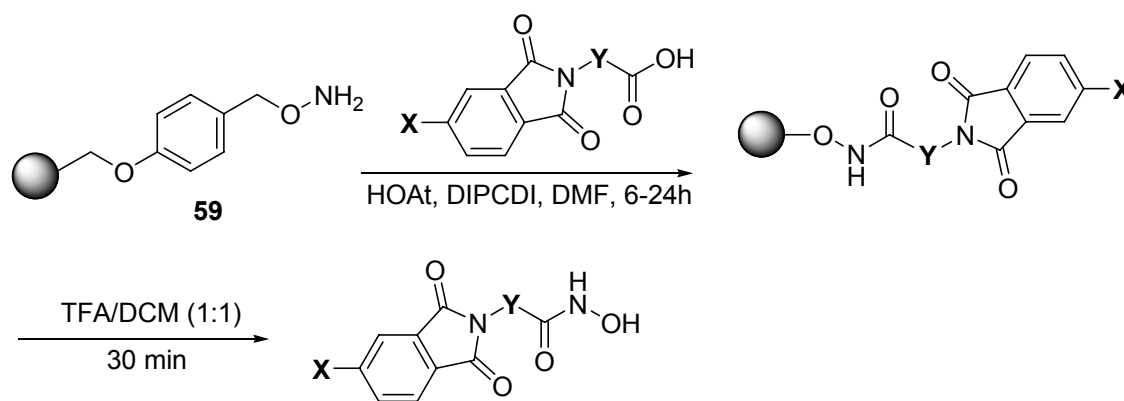
El inconveniente que presenta esta estrategia es la escasa estabilidad del intermedio **92** durante su purificación, lo que obliga a llevar a cabo las dos reacciones sin aislar el intermedio protegido.

¹¹⁸ Rossello, A.; Nuti, E.; Orlandini, E. New *N*-arylsulfonyl-*N*-alkoxyaminoacetohydroxamic acids as selective inhibitors of gelatinase A (MMP-2). *Bioorg. & Med. Chem.* **2004**, *12*, 2441-2450.



Esquema 4.11

Para evitar este tipo de problemas y aumentar el rendimiento, se decidió seguir con la ruta sintética en fase sólida, tal y como muestra el Esquema 4.12.



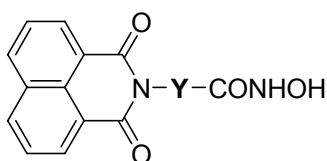
MTC	X	Y	Rendim.
MTC-126	H	-CH ₂ -C ₆ H ₄ -	60%
MTC-141	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -	39%

Esquema 4.12

4.3.2. Síntesis de derivados de la 1,8-naftalimida

Los productos finales pertenecientes a esta familia se muestran en la Tabla 4.2.

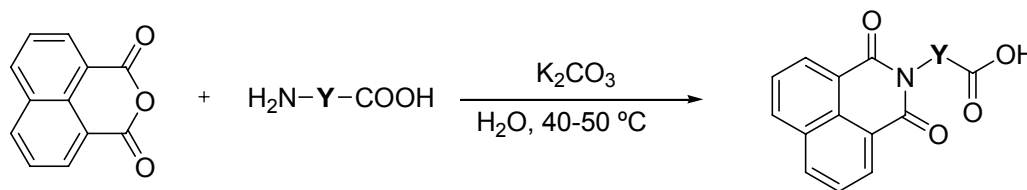
Tabla 4.2. Derivados de imidas aromáticas: 1,8-naftalimidias.



Compuesto	Y
19(a)	-(CH ₂) ₅ -
MTC-40	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-38	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -
MTC-45	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ↓
MTC-46	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ⋮
MTC-39	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -

(a) Estructura de referencia: Scriptaid (19)¹¹⁹

La estrategia seguida para este grupo de compuestos es similar a la anterior para derivados de ftalimida. Los correspondientes ácidos derivados del anhídrido 1,8-naftálico se prepararon en medio básico en solución acuosa, según se expone en el Esquema 4.13.



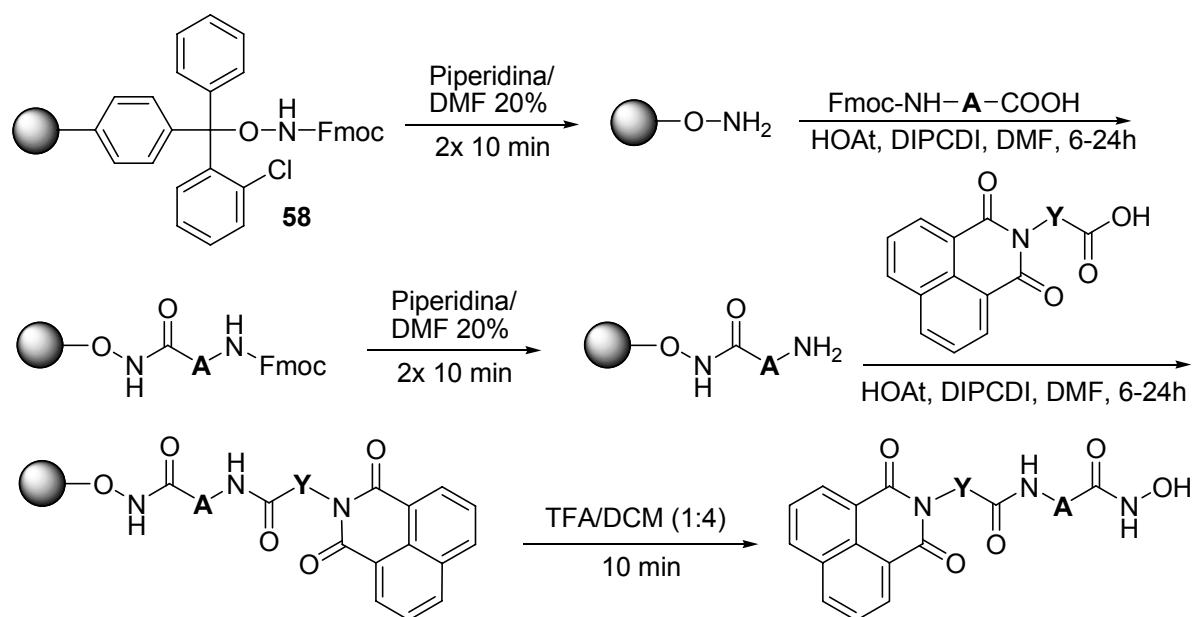
No	Y	Rendim.
93	-CH ₂ -	72%
94	-(CH ₂) ₂ -	61%
95	-(CH ₂) ₅ -	98%

Esquema 4.13

¹¹⁹ Su, G. H.; Sohn, T. A.; Ryu, B.; Kern, S. E. A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3137-3142.

En este caso es necesario destacar la importancia de la temperatura para aumentar la solubilidad y con ello el rendimiento.

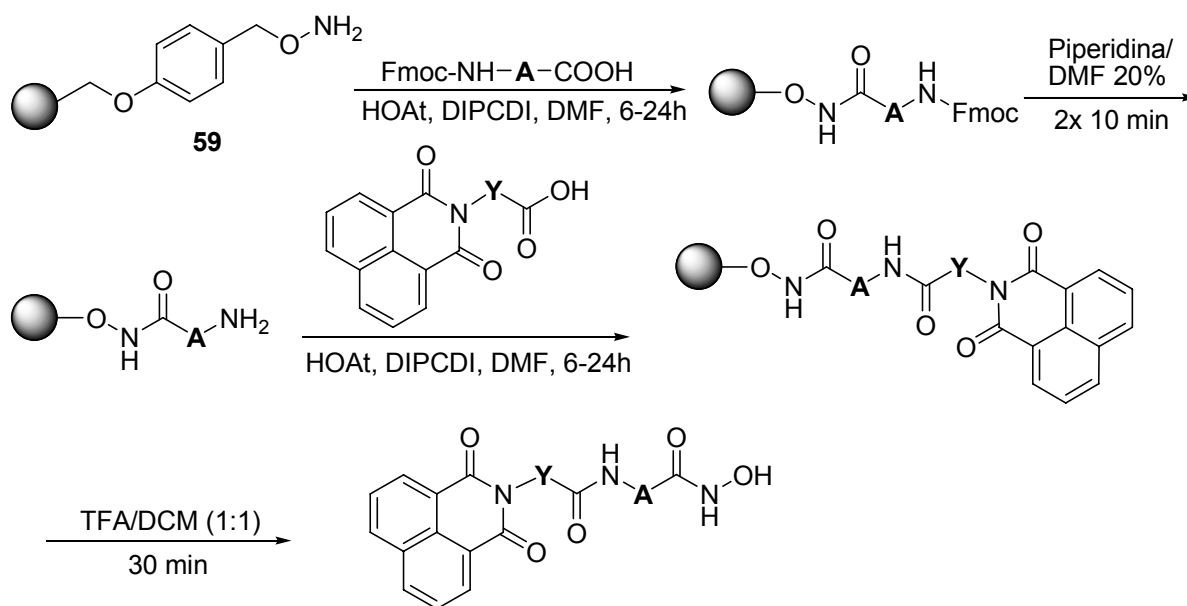
Los ácidos así obtenidos fueron utilizados para la síntesis en fase sólida de los ácidos hidroxámicos pertenecientes a esta familia. Los compuestos **MTC-38**, **MTC-39** y **MTC-40** se sintetizan partiendo de la resina funcionalizada con restos de N-Fmoc-hidroxilamina y 2-clorotritilo **58** (Esquema 4.14) y los compuestos **MTC-45** y **MTC-46** a partir de la resina de Wang funcionalizada con restos de hidroxilamina **59** (Esquema 4.15).



MTC	Y	A	Rendim.
MTC-40	-CH ₂ -	-(CH ₂) ₂ -	83%
MTC-38	-(CH ₂) ₂ -	-CH ₂ -	73%
MTC-39	-(CH ₂) ₂ -	-(CH ₂) ₂ -	94%

Esquema 4.14

Al igual que para el caso de los derivados de ftalimida, el acoplamiento del primer aminoácido exige el uso de HOAt y DIPCDI para conseguir una carga óptima de la resina. La hidrólisis del compuesto final se realiza en presencia de TFA, a concentraciones inferiores para el caso de la resina con restos de clorotritilo.



MTC	Y	A	Rendim.
MTC-45	-(CH ₂) ₂ -	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{-CH-} \end{array}$	67%
MTC-46	-(CH ₂) ₂ -	$\begin{array}{c} \vdots \\ \text{-CH-} \end{array}$	81%

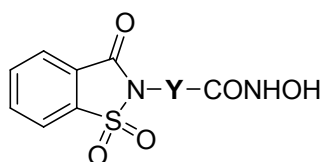
Esquema 4.15

4.4. Síntesis de benzo[d]isotiazoles

4.4.1. Síntesis de derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

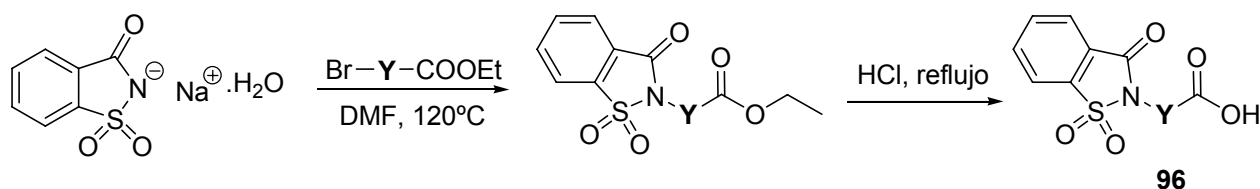
Los compuestos pertenecientes a esta familia se representan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Derivados de benzo[d]isotiazoles: 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazoles



Compuesto	Y
MTC-123	-(CH ₂) ₄ -
MTC-97	-(CH ₂) ₅ -
MTC-124	-(CH ₂) ₆ -
MTC-79	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-103	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -
MTC-104	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-
MTC-105	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-
MTC-66	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-128	-H ₂ C--
MTC-94	-CH ₂ CH ₂ CONH-
MTC-95	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-
MTC-96	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-

Para la síntesis de este tipo de inhibidores derivados del ácido hidroxámico se han de obtener los derivados **96** que presentan en su estructura el heterociclo 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol y una función carboxilo en su extremo terminal Esquema 4.16. La sal sódica del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol se hace reaccionar con el correspondiente ácido protegido en forma de éster. Por último, el ácido se desprotege en medio ácido a reflujo¹²⁰.

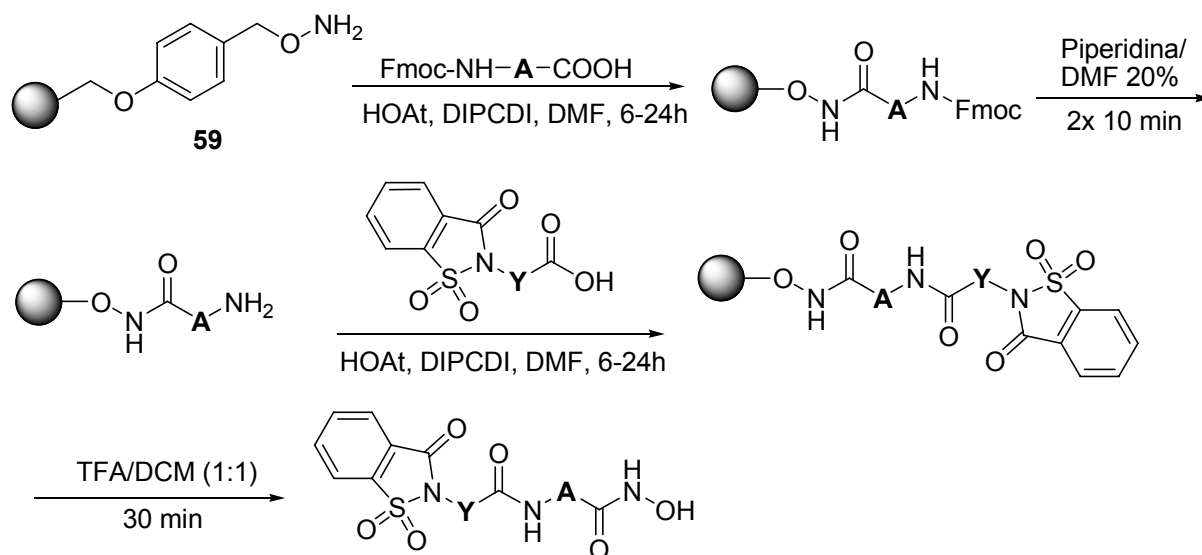


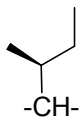
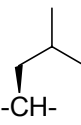
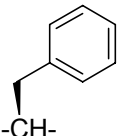
Y	Ésteres	Rendim.	Ácidos	Rendim.
-CH ₂ -	97	99%	102	76%
-(CH ₂) ₂ -	98	97%	103	82%
-(CH ₂) ₄ -	99	94%	104	89%
-(CH ₂) ₅ -	100	100%	105	68%
-(CH ₂) ₆ -	101	91%	106	94%

Esquema 4.16

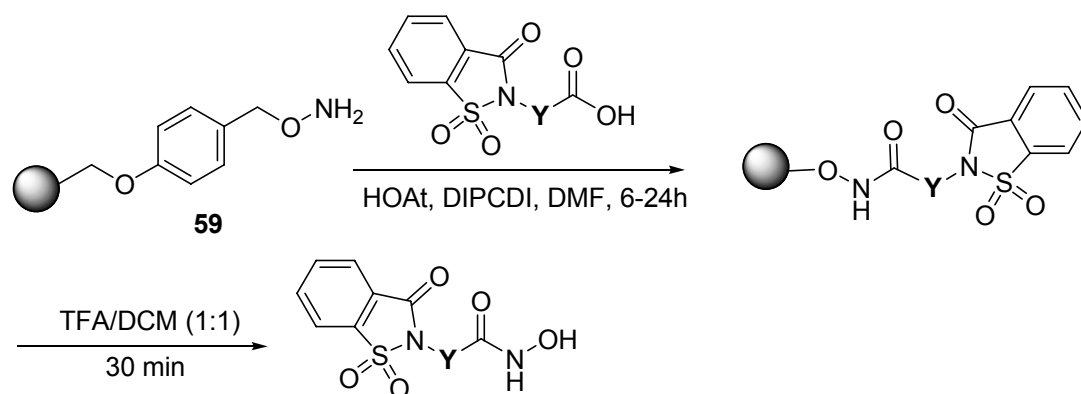
Los ácidos previamente sintetizados se utilizan en la síntesis en fase sólida de los derivados del ácido hidroxámico (Esquemas 4.17, 4.18 y 4.20). Dependiendo de la estructura del compuesto final se ha utilizado la resina de Wang **59** o la resina de poliestireno funcionalizada con restos de clorotritilo **58**. Como ya se ha descrito con anterioridad, el acoplamiento de los distintos intermedios a la resina se ha realizado utilizando HOAt y DIPCDI como agentes de acoplamiento, lo que garantiza rendimientos próximos al 100%.

¹²⁰ Da Settimo, A.; Primofiore, G.; La Motta, C. Acid derivatives of benzisothiazole-1,1-dioxide as inhibitors of rat lens aldose reductase. *Il farmaco*.**1996**, 51(4), 261 - 267.



MTC	Y	A	Rendim.
MTC-79	$-\text{CH}_2-$	$-(\text{CH}_2)_2-$	51%
MTC-66	$-(\text{CH}_2)_2-$	$-(\text{CH}_2)_2-$	21%
MTC-94	$-(\text{CH}_2)_2-$	 $-\text{CH}-$	47%
MTC-95	$-(\text{CH}_2)_2-$	 $-\text{CH}-$	57%
MTC-96	$-(\text{CH}_2)_2-$	 $-\text{CH}-$	71%

Esquema 4.17

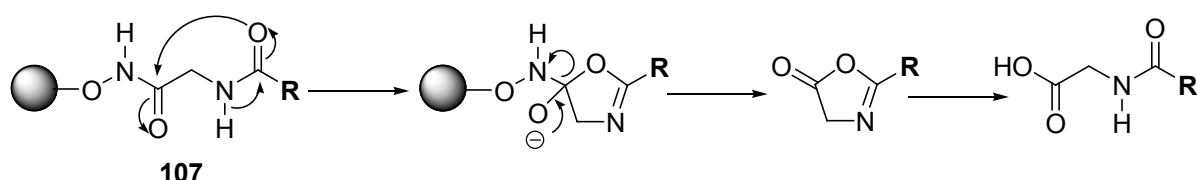


MTC	Y	Rendim.
MTC-123	-(CH ₂) ₄ -	59%
MTC-97	-(CH ₂) ₅ -	46%
MTC-124	-(CH ₂) ₆ -	42%

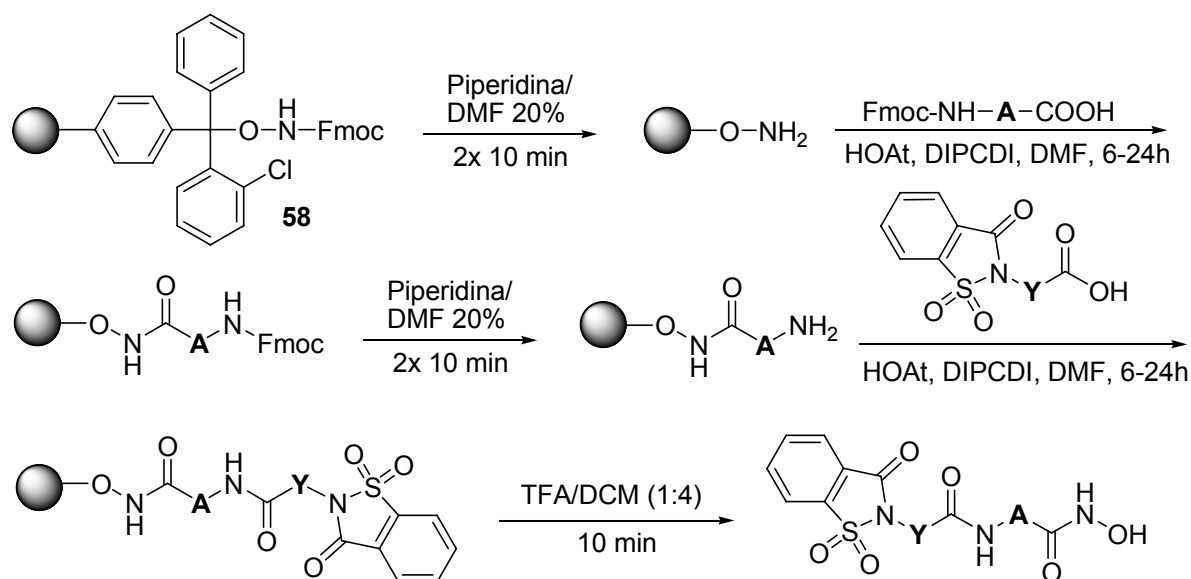
Esquema 4.18

Aunque este tipo de compuestos inicialmente se sintetizaron partiendo de la resina de Wang, para la preparación de inhibidores con un solo grupo metileno entre el grupo amida del linker y el resto de ácido hidroxámico (**107**, Esquema 4.19), no se obtuvieron los ácidos hidroxámicos deseados.

El análisis de los espectros de RMN conducen a la observación de que bajo estas condiciones, se produce una ciclación y una apertura que lleva nuevamente a los ácidos carboxílicos de partida. (Esquema 4.19). Esto se evitó con el uso de la resina Fmoc-hidroxi-amino-2-clorotritilo que presenta un mayor impedimento estérico, y dificulta este tipo de ciclaciones no deseadas.



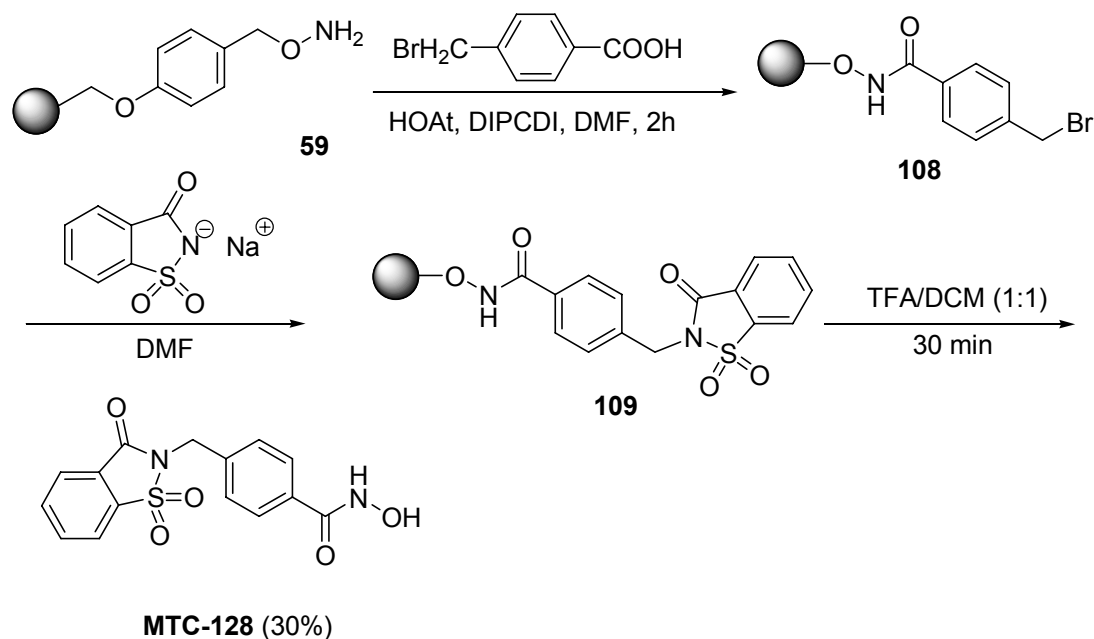
Esquema 4.19



MTC	Y	A	Rendim.
MTC-103	-(CH ₂) ₂ -	-CH ₂ -	95%
MTC-104	-(CH ₂) ₂ -	! -CH-	69%
MTC-105	-(CH ₂) ₂ -	≡ -CH-	62%

Esquema 4.20

Para la síntesis en fase sólida del compuesto **MTC-128** se ha seguido un esquema diferente a los anteriores (Esquema 4.21). En este caso la resina de Wang funcionalizada con hidroxilamina se hace reaccionar con el derivado del ácido benzoico utilizando los reactivos de acoplamiento ya comentados anteriormente. El intermedio **108** se hace reaccionar con la sal sódica del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol en DMF para obtener el producto final unido a la resina **109**. La liberación del mismo se realiza con una solución 1:1 de TFA en DCM. Es importante añadir un exceso de la sal sódica de 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol para que la reacción transcurra con un rendimiento elevado.



Esquema 4.21

4.4.2. Síntesis de derivados del 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

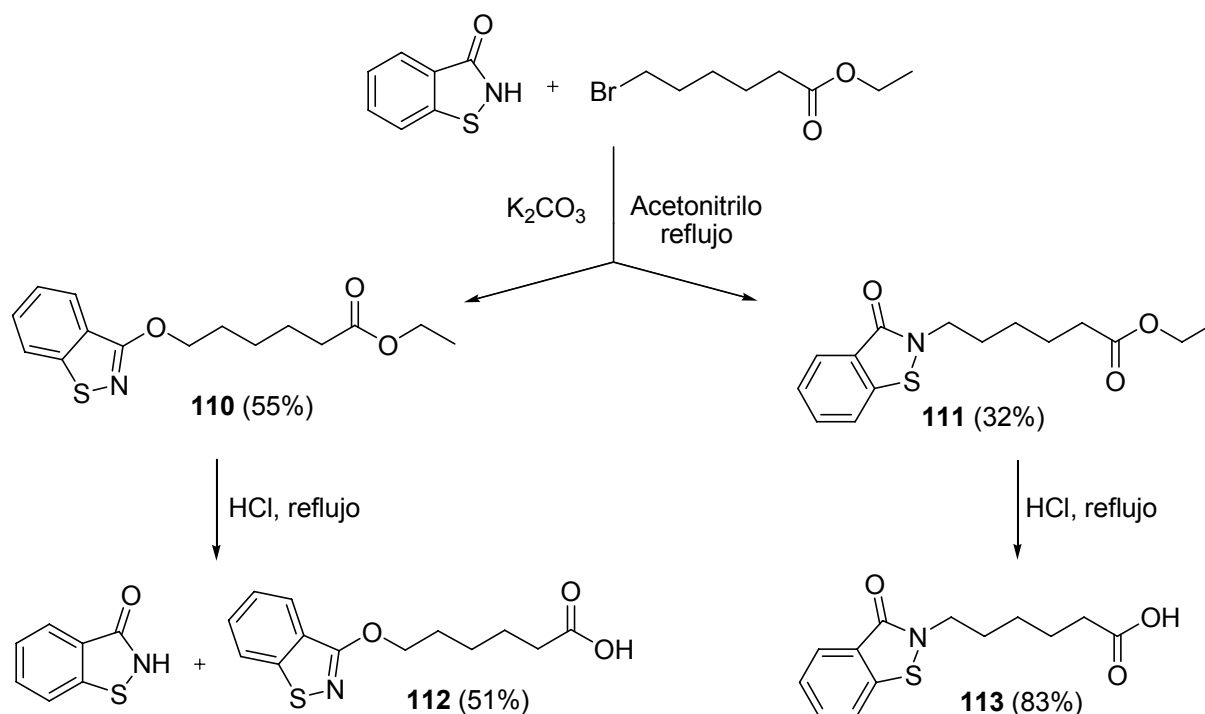
Los compuestos pertenecientes a esta familia se representan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Derivados de benzo[d]isotiazoles: 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazoles

Compuesto	
MTC-136	 O-(CH ₂) ₅ -CONHOH
MTC-144	 N-(CH ₂) ₅ -CONHOH

Para la obtención de estos compuestos, se ha seguido la misma estrategia sintética utilizada para la síntesis de los derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol (Esquema 4.22). Al objeto de obtener el producto de N-alkilación se hace reaccionar el 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol con bromohexanoato de etilo, en presencia de carbonato potásico. Sin embargo, se obtienen dos productos de igual peso molecular y ligeras

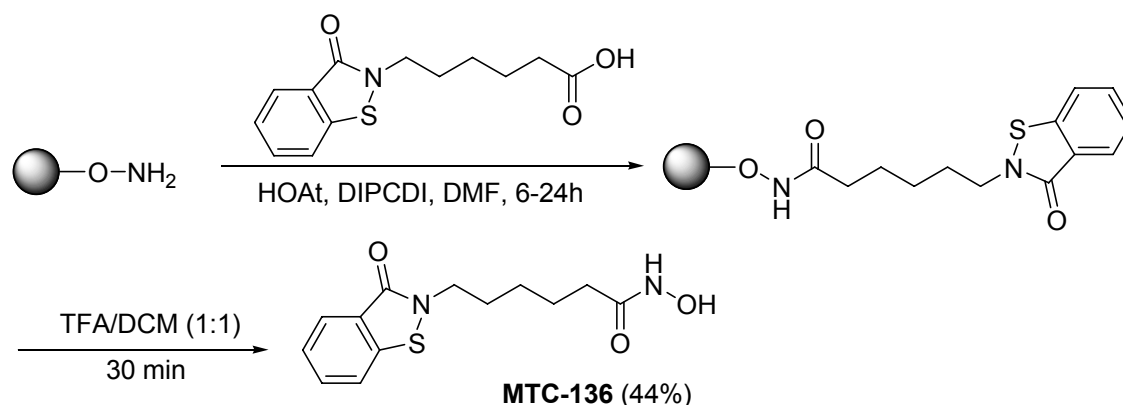
diferencias en los espectros $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ y que se corresponden con los compuestos de O-alkilación (**110**), de menor polaridad y con mayor rendimiento, y de N-alkilación (**111**) de mayor polaridad y con menor rendimiento.



Esquema 4.22

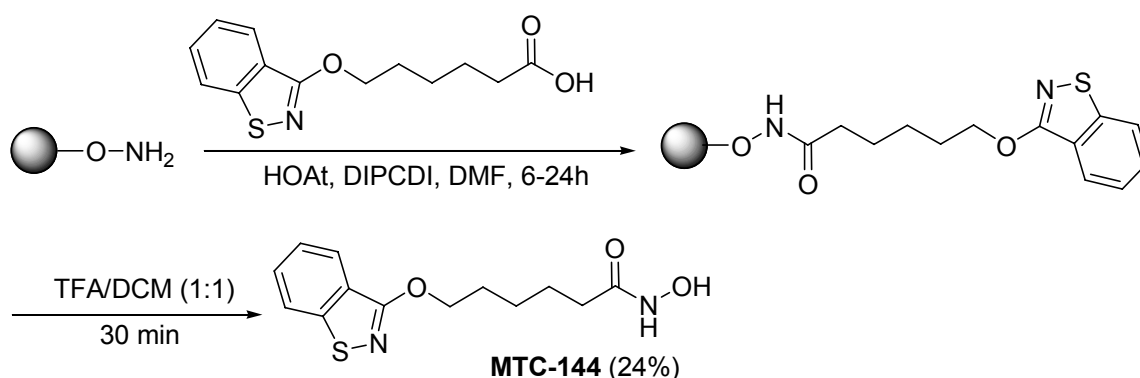
Tras el tratamiento con HCl concentrado a reflujo para la obtención de los correspondientes ácidos carboxílicos, el derivado **110** da lugar al correspondiente ácido carboxílico O-alkilado (**112**) y al producto de O-desalkilación 3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol. Debido a la similitud estructural de los ácidos **112** y **113**, se decidió obtener también el correspondiente derivado de ácido hidroxámico a partir de **112**.

La reacción de acoplamiento de los ácidos descritos anteriormente a la resina de Wang, convenientemente funcionalizada con restos de hidroxilamina se ha llevado a cabo utilizando HOAt y DIPCDI (Esquemas 4.23 y 4.24).



Esquema 4.23

En este caso la resina de Wang se puede considerar como un grupo protector de la función hidroxilo de la hidroxilamina. Tras la formación del ácido hidroxámico se desprotege en condiciones ácidas con TFA, obteniéndose **MTC-136** y **MTC-144**.

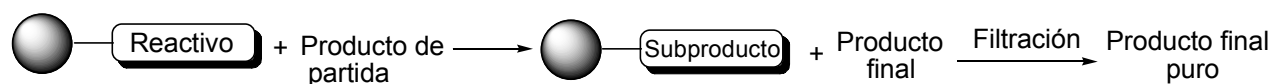


Esquema 4.24

4.5. Síntesis de ácidos hidroxámicos mediada por reactivos unidos a fase sólida

Los reactivos unidos a una fase sólida, como por ejemplo un polímero, han sido diseñados para llevar a cabo transformaciones sintéticas siguiendo los mismos mecanismos que sus análogos en solución¹²¹. Sin embargo, en este caso el exceso de reactivo y sus subproductos permanecen unidos a la resina y los productos de la reacción que permanecen en solución son purificados mediante filtración simple (Esquema 4.25).

¹²¹ Toy, P. H.; Shi, M. Polymer-supported reagents and catalysts: increasingly important tools for organic synthesis. *Tetrahedron*. **2005**, 61(51), 12025.



Esquema 4.25

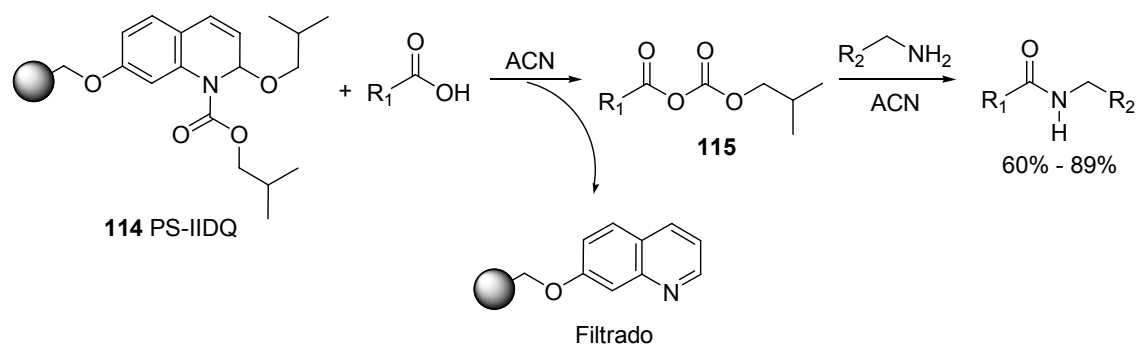
El hecho de que el exceso utilizado se pueda aislar del medio de reacción mediante filtración hace especialmente atractivos a este tipo de reactivos, ya que se obtiene el producto final en solución con un alto grado de pureza. Ello explica que esta tecnología se utilice en la síntesis en paralelo de bibliotecas de compuestos en la búsqueda de nuevos fármacos¹²². Por tanto, es una estrategia en auge que combina las ventajas de la síntesis orgánica en fase sólida (al permitir el uso de un exceso de reactivo sin la necesidad de etapas de purificación adicionales) y la química en solución (por ejemplo, la facilidad para monitorizar el avance de la reacción mediante HPLC, CCF o RMN). Sin embargo, uno de los inconvenientes que presenta es que la velocidad de la reacción se vea afectada por problemas de difusión e interacción con el polímero¹²³.

Recientemente, el Grupo de Investigación dirigido por el Profesor Mark Bradley ha desarrollado un nuevo reactivo unido a fase sólida basado en el agente de acoplamiento 2-isobutoxi-1-isobutoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (**114**, IIDQ, Esquema 4.26)¹²⁴. En este caso el polímero utilizado es el conocido como resina de Merrifield y esta metodología permite la obtención de amidas con un alto rendimiento (60%-89%), aislándose los productos con una alta pureza (Esquema 4.26). El mecanismo de la reacción cursa a través del intermedio activado **115**, obtenido por reacción del ácido de partida con el reactivo unido a fase sólida.

¹²² Cano, M.; Balasubramanian, S. From the combinatorial chemistry boom to polymer-supported parallel chemistry: established technologies for drug discovery. *Drugs of the Future* **2003**, 28(7), 659-678.

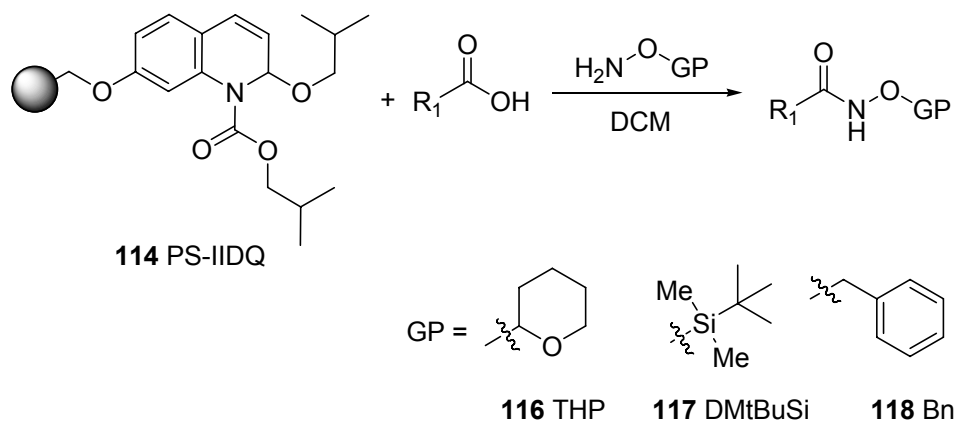
¹²³ Ley, S. V.; Baxendale, I. R.; B., G.; Caldarelli, M.; Massi, A.; Nesi, M. Solid-supported reagents for multi-step organic synthesis: preparation and application. *Farmaco* **2002**, 57(4), 321-330.

¹²⁴ Valeur, E.; Bradley, M. PS-IIDQ: an efficient polymer-supported amide coupling reagent. *Chemical Communications* **2005**, (9), 1164-1166.



Esquema 4.26. Síntesis de amidas y mecanismo de reacción con PS-IIDQ

Partiendo de esta metodología se ha puesto a punto una nueva síntesis de ácidos hidroxámicos en donde el reactivo PS-IIDQ (**114**) actúa como agente de acoplamiento entre el ácido de partida y la hidroxilamina convenientemente protegida en el grupo hidroxilo por un grupo bencilo (**118**, Esquema 4.27). El ácido hidroxámico obtenido se desprotege en presencia de hidrógeno bajo catálisis con paladio.

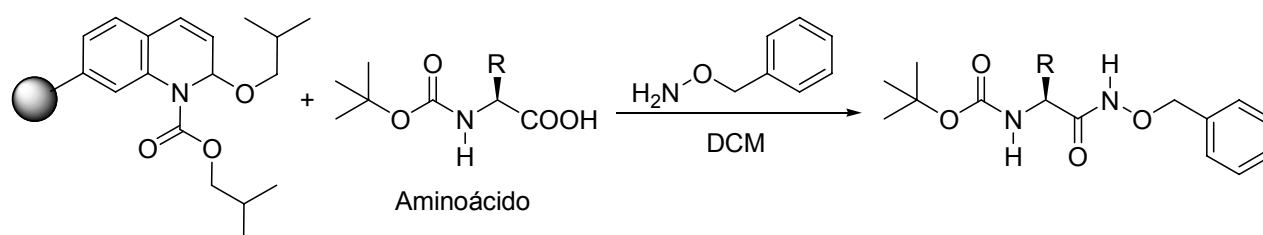


Esquema 4.27. Síntesis de ácidos hidroxámicos con PS-IIDQ.

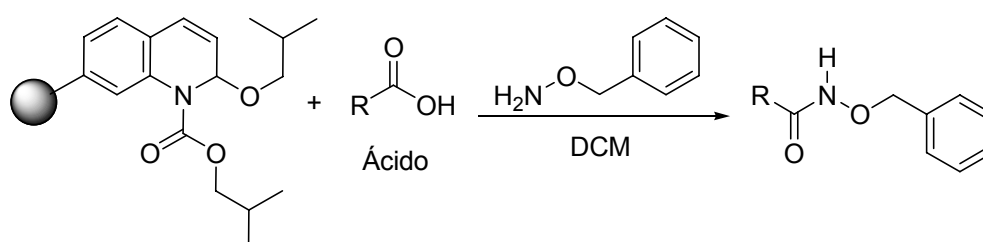
Aunque las condiciones de reacción se han optimizado para ácidos de partida de diferente naturaleza, inicialmente también se utilizó la hidroxilamina con otros grupos protectores. Así, la obtención de los derivados del ácido hidroxámico resultó menos satisfactoria cuando se partió de los derivados con dimetil-*t*-butil sililo (**117**) o con el grupo tetrahidropiraniilo (**116**, Esquema 4.27). El disolvente que mejor se ajusta a las necesidades de acondicionamiento del reactivo PS-IIDQ y la cinética de la reacción es el diclorometano.

Los resultados obtenidos para diferentes ácidos de partida se muestran en la Tabla 4.5. Los rendimientos obtenidos fueron en general buenos y los productos se aislaron con una elevada pureza. Se debe resaltar el hecho de que los rendimientos disminuyen en el caso de productos de partida con pKa bajos. El único inconveniente encontrado es la presencia de una impureza ocasional de tipo lipófilo que fue finalmente eliminada mediante purificación por cromatografía flash.

Tabla 4.5. Resultados obtenidos con el reactivo PS-IIDQ



Compuesto	Aminoácido	Rendimiento
119	β -Alanina	95%
120	L-Prolina	69%
121	L-Triptófano	40%
122	L-Fenilalanina	74%



Compuesto	Ácido	Rendimiento
123	Fenilacético	70%
124	Dinitrobenzoico	35%
125	Cinámico	71%
126	Benzoico	70%

Por último, esta metodología permite la síntesis en paralelo de ácidos hidroxámicos convenientemente protegidos y, por tanto, el desarrollo de pequeñas bibliotecas de este tipo de compuestos para el estudio de relaciones estructura-actividad.

4.6. Análisis espectroscópico

La totalidad de los treinta y dos compuestos finales sintetizados en la presente Memoria se han caracterizado estructuralmente mediante espectroscopía de RMN, tanto de ^1H (300 MHz) como de ^{13}C (75 MHz), y espectrometría de masas de alta resolución (LSIMS, acrónimo de *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*). Todos los espectros de los compuestos finales se detallan en la Parte Experimental, y los de RMN aparecen en el Apéndice.

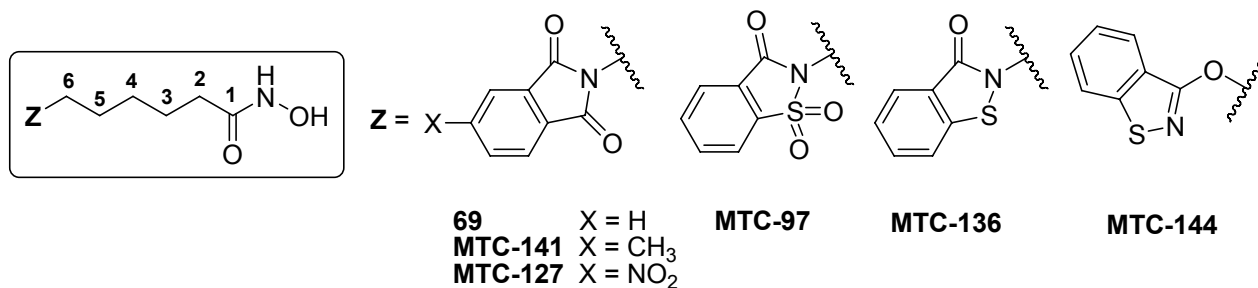
La división de los productos, para facilitar su análisis espectroscópico, se ha realizado con productos de diferentes familias con espaciador común, para estudiar la influencia que tiene dicho espaciador en el resto de átomos de las diferentes cabezas lipófilas.

Los espectros, que se detallan en la parte Experimental, son concordantes con las estructuras propuestas tanto en lo concerniente a los desplazamientos químicos de hidrógeno y carbono como en la multiplicidad de las señales y las constantes de protón-protón encontradas. Los datos de desplazamiento químico (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de ^1H -RMN correspondientes a los compuestos **69**, **MTC-141**, **MTC-127**, **MTC-97**, **MTC-136** y **MTC-144** se resumen y comparan en la Tabla 4.6.

En este caso se contrastan los datos de los compuestos con diferentes cabezas lipófilas y una cadena metilénica de cinco miembros como espaciador para estudiar la influencia de los diferentes anillos aromáticos sobre el mismo.

Los protones correspondientes a H-6 del espaciador en los compuestos **69**, **MTC-141** y **MTC-127** no presentan diferencias significativas, con un desplazamiento medio de 3.5 ppm. En **MTC-97** se observa la señal del protón H-6 a un campo ligeramente menor (3.67 ppm), debido a la cercanía del grupo sulfóxido. En **MTC-144**, donde H-6 está unido a un átomo de oxígeno, en lugar de un nitrógeno, se produce un mayor desplazamiento a campo menor (4.45 ppm).

Tabla 4.6. Desplazamientos químicos (δ , ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) de ^1H -RMN de los productos finales con espaciador de cinco cadenas metilénicas.



^1H -RMN (DMSO- d_6)	69		MTC-141		MTC-127		MTC-97		MTC-136		MTC-144	
	X=H		X=CH ₃		X=NO ₂							
	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>
CON <u>H</u> OH	10.29		10.28		10.28		10.31		10.30		10.32	
CONHO <u>H</u>	8.63		8.62		8.60		8.65				8.65	
H _{arom}	7.87 - 7.80 m		7.73 - 7.59 m		8.59 dd ;	1.9 ^a <i>8.1</i>	8.28 d	7.2	7.94 d	8.1	8.04 d	8.2
					8.45 d	1.8			7.83 d	7.8	7.87 d	8.0
					8.09 d	8.1	8.10 - 7.95 m		7.65 t	7.2	7.59 dt	1.1 7.0 8.1
									7.41 t	7.4	7.44 dt	0.8 7.6 8.1
H-6	3.54	7.1	3.50	7.3	3.57	7.0	3.67	7.3	3.78	7.0	4.45	6.6
Ar-CH ₃	-		2.45		-		-		-		-	
H-2	1.91	7.3	1.89	7.4	1.90	7.3	1.92	7.3	1.90	7.3	1.95	7.2
H-3,5	1.61 - 1.44 m		1.58 - 1.42 m		1.62 - 1.43 m		1.70 q		1.68 - 1.44 m		1.79 q	
							1.50 q				1.55 q	
H-4	1.28 - 1.13 m		1.24 - 1.14 m		1.28 - 1.23 m		1.34 - 1.27 m		1.28 - 1.20 m		1.44 - 1.34 m	

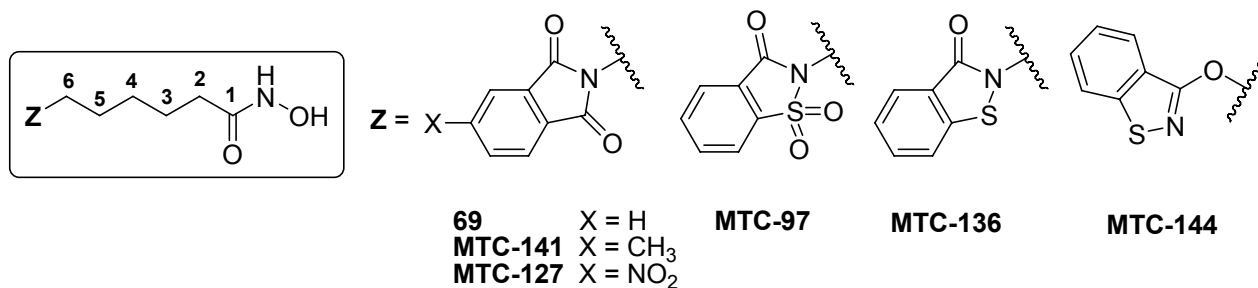
^a La multiplicidad de las señales se indica en negrita y las constantes de acoplamiento en cursiva.

Los compuestos **MTC-127** y **MTC-97** presentan sus hidrógenos aromáticos mucho más desapantallados que el resto de los compuestos de la Tabla 4.6. Sin embargo, las razones para estos desplazamientos son diferentes en estos dos productos finales. En **MTC-127** se encuentra un grupo nitro electrón atractor en posición 5 del anillo aromático. En **MTC-97**, el átomo de azufre se encuentra oxidado como sulfona. Los compuestos **MTC-136** y **MTC-144** poseen dos hidrógenos aromáticos que aparecen con una multiplicidad correspondiente a un triplete y doble triplete, respectivamente. Aunque la multiplicidad teórica debiera ser de doble doblete, en **MTC-136** se produce un solapamiento de señales y en **MTC-144** se produce, además, un acoplamiento a larga distancia.

En la tabla 4.7 se resumen y comparan los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **69**, **MTC-141**, **MTC-127**, **MTC-97**, **MTC-136** y **MTC-144**.

En el compuesto **MTC-144** no existe un carbonilo, aunque el carbono aromático correspondiente queda unido a un oxígeno y está cuaternizado, razón por la que tiene un desplazamiento químico similar ($\delta = 162.4$ ppm). Además, el carbono C-6 en **MTC-144**, debido a su unión al átomo de oxígeno aparece con un desplazamiento químico mayor que el resto de compuestos de la tabla 4.7 ($\delta = 68.3$ ppm).

Tabla 4.7. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de los productos finales con espaciador de cinco cadenas metilénicas.



^{13}C -RMN (DMSO- <i>d</i> ₆)	69*	MTC-141	MTC-127	MTC-97	MTC-136	MTC-144
	X=H	X=CH ₃	X=NO ₂			
	δ	δ	δ			
<u>CONHOH</u>	169.5	168.8	168.8	168.8	168.8	168.9
CO	168.4	167.9	166.2	158.4	164.2	162.4
CO	168.4	167.8	165.9	-	-	-
C y CH_{arom}	134.9 CH 132.1 C 123.5 CH	145.2 C 134.5 CH 131.8 C 128.8 C 123.3 CH 122.8 CH	151.2 C 136.2 C 132.9 C 129.4 CH 124.3 CH 117.6 CH	136.7 C 135.6 CH 135.1 CH 126.2 C 124.9 CH 121.3 CH	140.2 C 131.6 CH 125.5 CH 125.4 CH 124.1 C 121.6 CH	150.9 C 128.9 CH 124.8 CH 124.5 C 122.4 CH 120.9 CH
C-6	37.8	37.1	37.8	38.4	42.7	68.3
C-2	32.5	31.9	31.9	31.9	32.0	32.0
C-5^a	28.2	27.6	27.4	27.5	28.6	28.0
C-3^a	26.3	25.7	25.7	25.6	25.5	25.0
C-4^a	25.2	24.5	24.5	24.4	24.6	24.7
Ar-CH₃	-	21.2	-	-	-	-

^a C-5, C-3 y C-4 pueden estar intercambiados.

Los compuestos comparados anteriormente, presentan concordancia en el HRMS entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M + Na)⁺ o (M + H)⁺ y los correspondientes valores encontrados.

69: Calculado para $C_{14}H_{16}N_2O_4Na$ $(M+Na)^+$ 299.1008; encontrado 299.1010 (desviación -0.8 ppm).

MTC-141: Calculado para $C_{15}H_{18}N_2O_4Na$ $(M+Na)^+$ 313.1164; encontrado 313.1160 (desviación 1.4 ppm).

MTC-127: Calculado para $C_{14}H_{15}N_3O_6Na$ $(M+Na)^+$ 344.0859; encontrado 344.0856 (desviación 0.7 ppm).

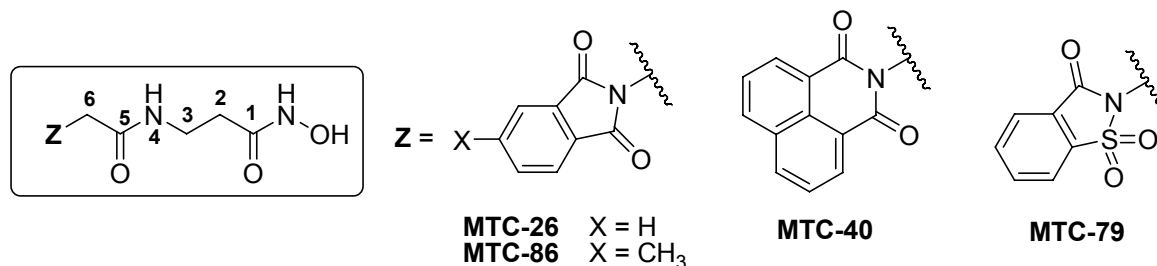
MTC-97: Calculado para $C_{13}H_{16}N_2O_5SNa$ $(M+Na)^+$ 335.0678; encontrado 335.0676 (desviación 0.4 ppm).

MTC-144: Calculado para $C_{13}H_{17}N_2O_3S$ $(M+H)^+$ 281.0960; encontrado 281.0967 (desviación -2.6 ppm).

Los datos de desplazamiento químico (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de 1H -RMN correspondientes a los compuestos **MTC-26**, **MTC-86**, **MTC-40** y **MTC-79** se resumen y comparan en la Tabla 4.8.

En **MTC-26** y en **MTC-86**, el H-6 se mantiene con un desplazamiento similar (4.14 y 4.11 ppm, respectivamente); sin embargo, en **MTC-79**, con un azufre tipo sulfona en su estructura, la señal correspondiente a H-6 se desapantalla hasta 4.25 ppm y en **MTC-40**, con un grupo naftalimida unido al espaciador, la señal de H-6 se muestra aún más desplazada hacia un campo menor (4.59 ppm). El H-3 en todos los compuestos comparados resuena de forma similar aunque las señales pueden presentarse como multiplote o cuadruplete.

Tabla 4.8. Desplazamientos químicos (δ , ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) de ^1H -RMN de **MTC-26**, **MTC-86**, **MTC-40** y **MTC-79**.



^1H -RMN (DMSO- d_6)	MTC-26		MTC-86		MTC-40		MTC-79	
	X=H		X=CH ₃					
	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>
CON <u>H</u> OH	10.40		10.40		10.41		10.41	
CONHO <u>H</u>	8.70		8.72		8.72		8.71	
CON <u>H</u> CH ₂	8.29		8.28	5.6	8.27	5.6	8.29	
H _{arom}	7.89 - 7.82		7.77 - 7.62		8.46	7.3	8.29	7.0
					8.46	8.4	8.11 - 7.96	
					7.86	7.8		
H-6	4.14		4.11		4.59		4.25	
H-3	3.26 - 3.20		3.22		3.24	5.6	3.26 - 3.21	
						7.2		
Ar-CH ₃	-		2.48		-		-	
H-2	2.10	7.1	2.10	7.3	2.11	7.2	2.12	7.3
	<i>t</i>		<i>t</i>		<i>t</i>		<i>t</i>	

^a La multiplicidad de las señales se indica en negrita y las constantes de acoplamiento en cursiva.

En **MTC-40** la cadena lipófila derivada de un anillo de naftalimida presenta simetría, por lo que solo se observan tres tipos de hidrógenos aromáticos. En teoría el patrón de acoplamiento de los mismos debiera ser doblete, doble doblete y doblete. El protón aromático que aparece con un desplazamiento químico a 7.86 ppm (Tabla 4.8) y que presenta una multiplicidad como triplete es en realidad un doble doblete donde han

solapado las dos señales centrales. Además, en el espectro de ^1H -RMN los dos dobletes correspondientes a los otros dos hidrógenos aromáticos solapa parcialmente en uno de los picos.

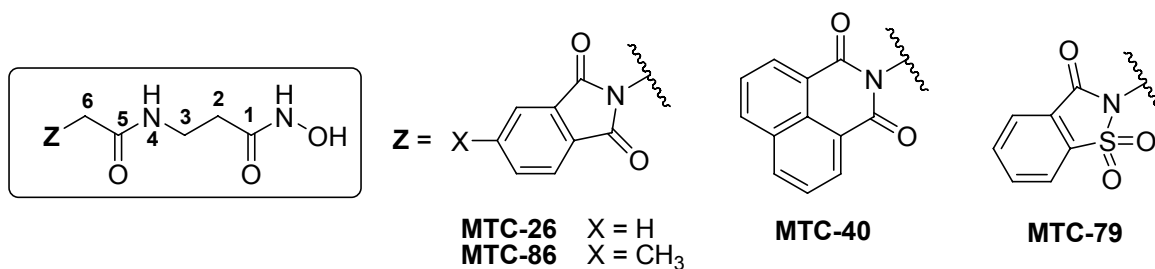
El compuesto **MTC-79** posee cuatro hidrógenos aromáticos diferentes en la cabeza lipófila. El protón más desapantallado ($\delta = 8.46$ ppm, d, ver Tabla 4.8) se asigna al hidrógeno más próximo espacialmente al azufre de tipo sulfota del heterociclo. En el espectro de ^1H -RMN, junto a este protón aparece la señal del hidrógeno amida ($\delta = 8.46$ ppm, s).

En la Tabla 4.9 se resumen y comparan los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **MTC-26**, **MTC-86**, **MTC-40** y **MTC-79**.

En este caso, las señales de los compuestos con diferentes cabezas lipófilas aparecen con desplazamientos químicos parecidos. Se producen dos excepciones en **MTC-26** y **MTC-40**. En el primer caso, las señales de los carbonos C-2 y C-3 son muy próximas ($\delta = 35.7$ ppm y 35.9 ppm, respectivamente). Sin embargo, en el resto de compuestos estos carbonos aparecen con desplazamientos próximos a 32 y 35 ppm, respectivamente. Esta diferencia en el desplazamiento pudiera deberse a un diferente comportamiento conformacional de la cadena en **MTC-26**.

En el segundo caso (**MTC-40**), la señal del carbono C-6 aparece en el espectro con un desplazamiento de 42.9 ppm. En el resto de compuestos este carbono presenta un desplazamiento próximo a 40 ppm. Debido a la cercanía de la cabeza lipófila se podría argumentar el distinto comportamiento de la cabeza lipófila de tipo naftalimida respecto de los otros tipos.

Tabla 4.9. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de C-RMN **MTC-26**, **MTC-86**, **MTC-40** y **MTC-79**.



¹³ C-RMN (DMSO- <i>d</i> ₆)	MTC-26	MTC-86	MTC-40		MTC-79	
	X=H	X=CH ₃				
	δ	δ	δ		δ	
<u>CONHOH</u> ^a	168.1	167.5	167.6		166.9	
CO ^a	167.6	167.4	167.2		164.4	
CO ^a	166.6	165.9	163.9		158.4	
C y CH _{arom}	135.1 CH 132.3 C 123.7 CH	145.3 C 134.7 CH 132.0 C 129.0 C 123.5 CH 122.9 CH	135.1 CH 131.9 C 131.4 CH 128.1 C 127.8 CH 122.5 C	136.8 C 135.7 CH 135.1 CH 126.4 C 124.9 CH 121.5 CH		
C-6	40.3	39.6	42.9		39.8	
C-3 ^b	35.9	35.3	35.9		35.3	
C-2 ^b	35.7	32.1	33.0		32.1	
Ar-CH ₃	-	21.2	-		-	

^a y ^b Estas señales pueden estar intercambiadas

Los compuestos anteriores, presentan concordancia en el HRMS entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M + Na)⁺ o (M + H)⁺ y los correspondientes valores encontrados.

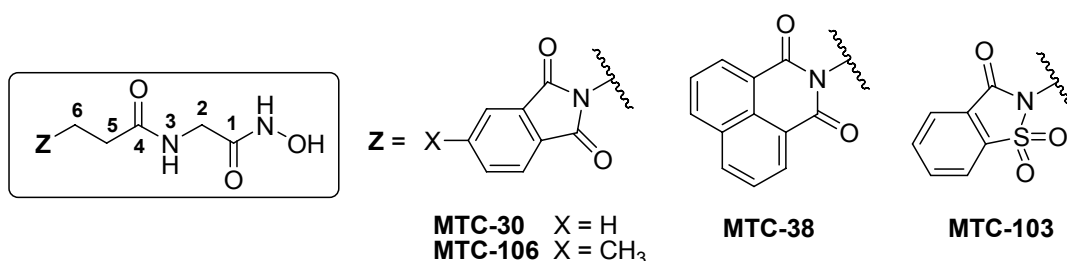
MTC-26: Calculado para C₁₃H₁₃N₃O₅Na (M+Na)⁺ 314.0753; encontrado 314.0749 (desviación 1.3 ppm).

MTC-40: Calculado para $C_{17}H_{15}N_3O_5Na$ ($M+Na$)⁺ 364.0909; encontrado 364.0906 (desviación 0.9 ppm).

MTC-79: Calculado para $C_{12}H_{13}N_3O_6SNa$ ($M+Na$)⁺ 350.0423; encontrado 350.0426 (desviación - 1.0 ppm).

Los datos de desplazamiento químico (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de 1H -RMN correspondientes a los compuestos **MTC-30**, **MTC-106**, **MTC-38** y **MTC-103** se resumen y comparan en la Tabla 4.10.

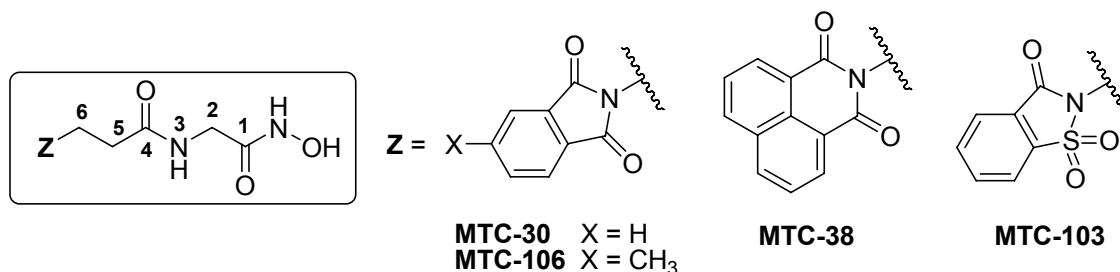
Tabla 4.10. Desplazamientos químicos (δ , ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) de 1H -RMN de los productos finales **MTC-30**, **MTC-106**, **MTC-38** y **MTC-103**.



1H -RMN (DMSO- <i>d</i> ₆)	MTC-30		MTC-106		MTC-38		MTC-103	
	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>
CON <u>H</u> OH	10.46 s ^a		10.48 s		10.47 s		10.51 s	
CONHO <u>H</u>	8.74 s		7.66 s		8.78 s		8.79 s	
CON <u>H</u> CH ₂	8.21 t	5.8	8.23 t	5.6	8.22 t	5.8	8.32 t	5.7
H _{arom}	7.86 - 7.78 m		7.72 d	7.6	8.46 dd	1.0 7.3	8.28 d	7.3
			7.66 s		8.43 dd	1.0 8.3	8.10 - 7.95 m	
			7.60 d	7.5	7.84 dd	7.4 8.1		
H-6	3.75 t	7.5	3.73 t	7.5	4.23 t	7.8	3.90 dd	7.9
H-2	3.54 d	5.8	3.54 d	5.7	3.57 d	5.8	3.59 d	5.7
H-5	2.50 t	7.5	2.48		2.50 t	7.8	2.63 dd	7.9
Ar-CH ₃	-		2.46 s		-		-	

En la Tabla 4.11 se resumen y comparan los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **MTC-30**, **MTC-106**, **MTC-38** y **MTC-103**.

Tabla 4.11. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de **MTC-30**, **MTC-106**, **MTC-38** y **MTC-103**.



^{13}C -RMN (DMSO- <i>d</i> ₆)	MTC-30	MTC-106	MTC-38	MTC-103
	X=H	X=CH ₃		
	δ	δ	δ	δ
CONHOH	170.4	169.7	170.9	169.1
CO^a	168.2	167.6 167.5	166.4	165.5
CO^a	166.3	165.6	163.9	158.2
C y CH_{arom}	134.9 CH 132.3 C 123.5 CH	145.1 C 134.5 CH 131.9 C 129.0 C 123.3 CH 122.7 CH	134.9 CH 131.8 C 131.3 CH 127.9 C 127.8 CH 122.7 C	136.6 C 135.6 CH 135.1 CH 126.2 C 124.9 CH 121.4 CH
C-6	40.5	39.8	40.6	40.0
C-2^b	34.7	33.9	36.9	34.8
C-5^b	34.1	33.5	33.8	33.5
Ar-CH₃	-	21.2	-	-

^{a, b} Estas señales pueden estar intercambiadas

Los compuestos comparados anteriormente, presentan concordancia en el HRMS entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M + Na)⁺ o (M + H)⁺ y los correspondientes valores encontrados.

MTC-30: Calculado para $C_{13}H_{13}N_3O_5Na$ (M+Na)⁺ 314.0752; encontrado 314.0758 (desviación -1.7 ppm).

MTC-106: Calculado para $C_{14}H_{15}N_3O_5Na$ (M+Na)⁺ 328.0909; encontrado 328.0909 (desviación 0.2 ppm).

MTC-38: Calculado para $C_{17}H_{15}N_3O_5Na$ (M+Na)⁺ 364.0909; encontrado 364.0908 (desviación 0.4 ppm).

MTC-103: Calculado para $C_{12}H_{13}N_3O_6NaS$ (M+Na)⁺ 350.0423; encontrado 350.0425 (desviación -0.8 ppm).

Los datos de desplazamiento químico (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de 1H -RMN correspondientes a los compuestos **MTC-33/34**, **MTC-107/108**, **MTC-45/46** y **MTC-104/105** se resumen y comparan en la Tabla 4.12.

Los compuestos **MTC-33/34**, **MTC-107/108**, **MTC-45/46**, **MTC-104/105** son pares enantiómeros, por lo que sus espectros de 1H -RMN y ^{13}C -RMN son idénticos. Por esta razón cada par de enantiómeros se ha agrupado en una sola columna.espectro de

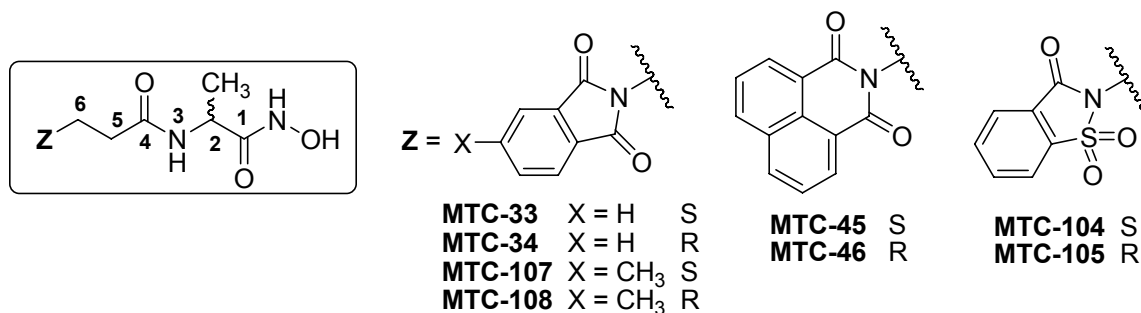
El hidrógeno NH de la amida que forma parte del espaciador aparece como doblete en la mayoría de estos compuestos, debido al acoplamiento con el hidrógeno H-2 sobre el carbono asimétrico. Este hidrógeno H-2 debería ser un doble cuádruplete por acoplamiento con el metilo y con el NH de la amida, sin embargo, la multiplicidad observada es de quintuplete al quedar solapadas las señales centrales.

Por otro lado, y debido a la existencia de un centro asimétrico en C-2, los hidrógenos H-5 de los compuestos **MTC-45/46** y **MTC-104/105** son diastereotópicos. En el espectro de 1H -RMN del primer par de enantiómeros se observa un multiplete, pero en el espectro de 1H -RMN del segundo par de enantiómeros (**MTC-104/105**) estos hidrógenos diastereotópicos H-5 aparecen como doble doblete, una multiplicidad con una complejidad que solo se puede explicar asumiendo la existencia de dos hidrógenos diastereotópicos que solapan parcialmente.

En **MTC-45/46** el patrón de acoplamiento de los hidrógenos aromáticos debiera ser doblete, doble doblete y doblete. Sin embargo, en el espectro de 1H -RMN se han identificado tres dobles dobletes debido al acoplamiento a larga distancia. Por último, en

este tipo de compuestos con una cabeza naftalimida, los hidrógenos H-6 experimentan un desplazamiento a campo bajo debido al efecto atractor de dicho grupo.

Tabla 4.12. Desplazamientos químicos (δ , ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) de $^1\text{H-RMN}$ de **MTC-33/34**, **MTC-107/108**, **MTC-45/46** y **MTC-104/105**.

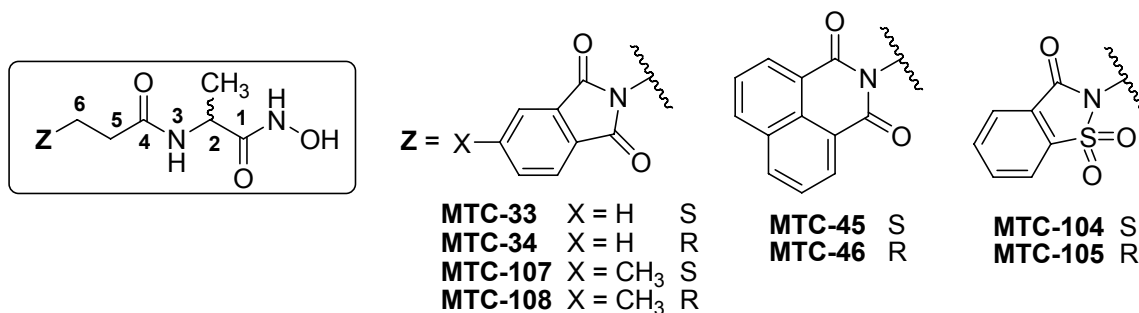


$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6)	MTC-33/34		MTC-107/108		MTC-45/46		MTC-104/105	
	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>
CON <u>H</u> OH	10.54 s ^a		10.60 s		10.54 d	1.4	10.58 s	
CON <u>H</u> OH	8.76 s				8.77 d	1.5	8.80 s	
CON <u>H</u> CH	8.18 d	7.7	8.19 d	7.7	8.16 d	7.7	8.29-8.25 m	
H _{arom}	7.85 - 7.78 m		7.72 d	7.6	8.46 dd	1.1 7.3	8.29-8.25 m	
			7.67 s		8.43 dd	1.1 8.3	8.11-7.95 m	
			7.60 d	7.6	7.84 dd	7.4 8.2		
H-6	3.73 t	7.4	3.72 t	7.4	4.24 - 4.18 m		3.88 t	7.8
H-2	4.12 q	7.3	4.12 q	7.3	4.13 q	7.3	4.17 q	7.2
Ar-CH ₃	-		2.45 s		-		-	
H-5	2.44 t	7.4	2.43 t	7.4	2.49 - 2.46 m		2.61 ddd	
H-3	1.10 d	7.0	1.10 d	7.0	1.12 d	7.0	1.15 d	7.0

^a La multiplicidad de las señales se indica en negrita y las constantes de acoplamiento en cursiva.

En la Tabla 4.13 se resumen y comparan los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **MTC-33/34**, **MTC-107/108**, **MTC-45/46**, **MTC-104/105**.

Tabla 4.13. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de **MTC-33/34**, **MTC-107/108**, **MTC-45/46**, **MTC-104/105**.



^{13}C -RMN (DMSO- d_6)	MTC-33/34	MTC-107/108	MTC-45/46	MTC-104/105
	δ	δ	δ	δ
CONHOH	169.7	169.0	170.1	168.8
CO	169.5	168.8	169.6	168.4
CO	168.2	167.6 167.5	163.9	158.2
C y CH_{arom}	134.9 CH 132.3 C 123.5 CH	145.1 C 134.5 CH 132.0 C 129.0 C 123.3 CH 122.7 CH	134.9 CH 131.9 C 131.2 CH 127.9 C 127.8 CH 122.7 C	136.7 C 135.6 CH 135.1 CH 126.2 C 124.9 CH 121.4 CH
C-2	46.5	45.8	46.4	46.0
C-6	34.8	34.0	37.0	34.8
C-5	34.2	33.5	33.9	33.5
Ar-CH₃	-	21.2	-	-
CH₃	18.8	18.1	18.8	18.1

En este tipo de compuestos los desplazamientos químicos de los diferentes carbonos son constantes, excepto para el caso de C-6 en **MTC-45/46** ($\delta = 37$ ppm) que aparece a campo más bajo debido a la influencia del anillo de naftalimida.

Los compuestos comparados anteriormente, presentan concordancia en el HRMS entre los valores calculados para las fórmulas empíricas $(M + Na)^+$ o $(M + H)^+$ y los correspondientes valores encontrados.

MTC-33: Calculado para $C_{14}H_{15}N_3O_5Na$ $(M+Na)^+$ 328.0909; encontrado 328.0908 (desviación 0.3 ppm).

MTC-34: Calculado para $C_{14}H_{15}N_3O_5Na$ $(M+Na)^+$ 328.0909; encontrado 328.0906 (desviación 1.0 ppm).

MTC-107: Calculado para $C_{15}H_{17}N_3O_5$ 319.1168; encontrado 319.1170 (desviación -0.7 ppm).

MTC-108: Calculado para $C_{15}H_{17}N_3O_5$ 319.1168; encontrado 319.1162 (desviación 1.9 ppm).

MTC-45: Calculado para $C_{18}H_{17}N_3O_5Na$ $(M+Na)^+$ 378.1066; encontrado 378.1061 (desviación 1.3 ppm).

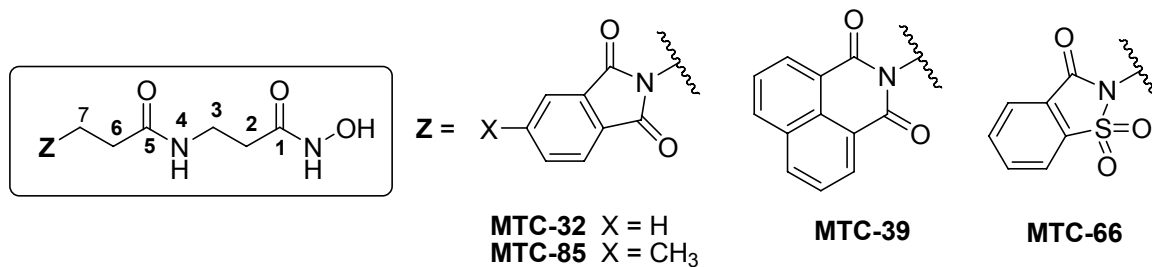
MTC-46: Calculado para $C_{18}H_{17}N_3O_5Na$ $(M+Na)^+$ 378.1066; encontrado 378.1068 (desviación -0.6 ppm)

MTC-104: Calculado para $C_{13}H_{15}N_3O_6SNa$ $(M+Na)^+$ 364.0579; encontrado 364.0570 (desviación 2.7 ppm).

MTC-105: Calculado para $C_{13}H_{15}N_3O_6SNa$ $(M+Na)^+$ 364.0579; encontrado 364.0580 (desviación -0.2 ppm).

Los datos de desplazamiento químico (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de 1H -RMN correspondientes a los compuestos **MTC-32**, **MTC-85**, **MTC-39** y **MTC-66** se resumen y comparan en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Desplazamientos químicos (δ , ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) de $^1\text{H-RMN}$ **MTC-32**, **MTC-85**, **MTC-39** y **MTC-66**.



$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6)	MTC-32		MTC-85		MTC-39		MTC-66	
	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>	δ	<i>J</i>
CON <u>H</u> OH	10.36 s ^a		10.37 s		10.39 s		10.38 s	
CON <u>H</u> OH	8.65 s		8.68 s		8.69 s		8.69 s	
CON <u>H</u> CH ₂	8.02 t	5.6	8.02 t	5.6	8.01 t	5.6	8.12 - 7.94 m	
H _{arom}	7.86 - 7.77 m		7.73 - 7.59 m		8.45 d 8.43 d 7.84 t	7.6 7.0 7.8	8.27 d 8.12 - 7.94 m	7.0
H-7	3.73 t	7.4	3.70 t	7.5	4.21 t	7.6	3.87 q	7.7 6.1
H-3	3.16 c	6.9	3.18 - 3.12 m		3.19 c	6.9	3.20 c	7.0
CH ₃	-		2.45 s		-		-	
H-2	2.38 t	7.4	2.36 t	7.4	2.41 t	7.6	2.51 t	7.8
H-6	2.06 t	7.2	2.05 t	7.2	2.09 t	7.2	2.08 t	7.2

^a La multiplicidad de las señales se indica en **negrita** y las constantes de acoplamiento en *cursiva*.

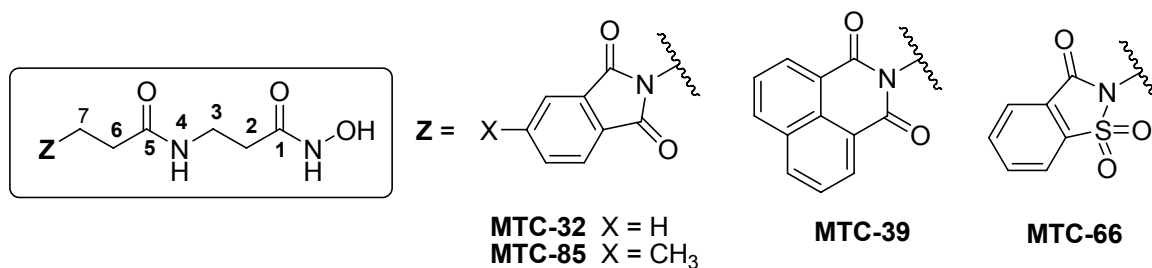
De una forma parecida a compuestos anteriores que presentan en su estructura el anillo de naftalimida, los hidrógenos aromáticos no aparecen con una multiplicidad d, dd, d, sino que se produce un solapamiento de las señales centrales en el dd, lo que explica el triplete para este protón aromático. Los dobletes correspondientes a los otros dos hidrógenos aromáticos aparecen con un desplazamiento químico similar, quedando estas dos señales parcialmente solapadas.

Los hidrógenos H-3 de estos compuestos deberían presentar una multiplicidad de doble triplete por acoplamiento con los dos hidrógenos H-2 y el NH de la amida, sin embargo, el solapamiento de las dos señales centrales conduce a que se observe un cuadruplete ($\delta = 3.10 - 3.20$ ppm).

En la Tabla 4.15 se resumen y comparan los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **MTC-32**, **MTC-85**, **MTC-39** y **MTC-66**.

En este caso también se observa el desplazamiento a campo bajo de los carbonos C-6 y C-7 inmediatamente unidos al anillo de naftalimida en **MTC-39**. El resto de carbonos experimentan desplazamientos químicos similares entre los diferentes compuestos.

Tabla 4.15. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN **MTC-32**, **MTC-85**, **MTC-39** y **MTC-66**.



^{13}C -RMN (DMSO- <i>d</i> ₆)	MTC-30	MTC-106	MTC-39		MTC-103	
	X=H	X=CH ₃				
	δ	δ	δ	δ		
<u>CONHOH</u>	169.2	169.3	170.4		168.6	
CO	167.4	167.6 167.5	167.8		167.1	
CO	166.9	167.1	163.9		158.2	
C y CH _{arom}	134.1 CH 131.4 C 122.7 CH	145.1 C 134.5 CH 131.9 C 129.0 C 123.3 CH 122.8 CH	134.8 CH 131.9 C 131.2 CH 127.9 C 127.8 CH 122.7 C	136.7 C 135.6 CH 135.1 CH 126.2 C 124.9 CH 121.4 CH		
C-7 ^a	35.0	35.1	37.1		35.2	
C-3 ^a	34.1	34.1	34.1		35.0	
C-2 ^a	33.6	33.8	33.0		33.7	
C-6 ^a	32.1	32.2	35.8		32.2	
Ar-CH ₃	-	21.2	-		-	

^a Estas señales pueden estar intercambiadas

Los compuestos comparados anteriormente, presentan concordancia en el HRMS entre los valores calculados para las fórmulas empíricas $(M + Na)^+$ o $(M + H)^+$ y los correspondientes valores encontrados.

MTC-32: Calculado para $C_{14}H_{15}N_3O_5Na$ $(M+Na)^+$ 328.0909; encontrado 328.0911 (desviación -0.4 ppm).

MTC-85: Calculado para $(M+Na)^+$ $C_{15}H_{17}N_3O_5Na$ 342.1066; encontrado 342.1067 (desviación -0.3 ppm).

MTC-39: Calculado para $C_{18}H_{17}N_3O_5Na$ $(M+Na)^+$ 378.1066; encontrado 378.1063 (desviación 0.8 ppm).

MTC-66: Calculado para $C_{13}H_{15}N_3O_6SNa$ $(M+Na)^+$ 364.0579; encontrado 364.0585 (desviación - 0.5 ppm).

4.7. Evaluación biológica

La evaluación de la capacidad inhibitoria de los compuestos descritos se llevó a cabo mediante valoración colorimétrica con un kit comercial para inhibición de HDAC procedente de células HeLa. La metodología seguida se detalla en la parte experimental.

Para un primer ensayo, se prepararon soluciones con una concentración 100 μ M que permitieran discriminar aquellos compuestos con una mayor potencia inhibitoria. Para una mayor claridad, se discuten los resultados en base a concentraciones finales ensayadas con independencia de las concentraciones de partida. Los compuestos ensayados se muestran en la Tabla 4.16. A continuación se ha determinado el valor de Cl_{50} a aquellos derivados del ácido hidroxámico que presentaron un % de inhibición enzimática superior al 70% a una concentración final de 100 μ M.

Tabla 4.16. Resultados de inhibición enzimática a 100 μ M

CLAVE	% Actividad enzimática	% Inhibición enzimática
MTC-26	> 70	< 30
MTC-30	> 70	< 30
MTC-32	38	62
MTC-33	> 70	< 30
MTC-34	> 70	< 30
MTC-38	> 70	< 30
MTC-39	9	92
MTC-40	18	82
MTC-45	> 70	< 30
MTC-46	> 70	< 30
MTC-66	27	73
MTC-79	> 70	< 30
MTC-85	33	67
MTC-86	33	67
MTC-94	> 70	< 30
MTC-95	> 70	< 30
MTC-96	> 70	< 30
MTC-97	21	79
MTC-103	27	73
MTC-104	> 70	< 30
MTC-105	> 70	< 30
MTC-106	> 70	< 30
MTC-107	> 70	< 30
MTC-108	36	64

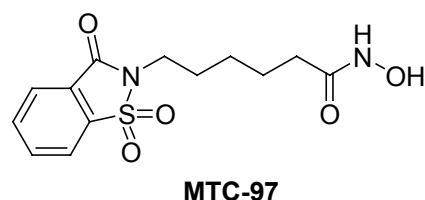
Aunque no se procedió a la determinación de la CI_{50} , 4 compuestos presentaron un % de inhibición enzimática con valores comprendidos entre el 60% y el 70% (**MTC-32**, **MTC-85**, **MTC-86** y **MTC-108**). Todos ellos poseen una cabeza lipófila derivada del anillo de ftalimida y en la mayoría de los casos con un sustituyente metilo. Una posible explicación a su baja actividad es la naturaleza peptídica del espaciador en estas estructuras. Sin embargo, el hecho de que tengan un sustituyente metilo concuerda con el hecho que se discutirá con posterioridad, de que este tipo de sustitución en la cabeza lipófila es positivo para la actividad como inhibidores de las HDAC. Se debe también

resaltar el hecho de que el compuesto de referencia **69** resultó ser menos potente como inhibidor de las HDAC, en el ensayo de valoración utilizado, que los compuestos seleccionados para el cálculo de la CI_{50} y los derivados con un metilo como sustituyente en la cabeza lipófila.

Los resultados obtenidos de CI_{50} para los compuestos **MTC-39**, **MTC-40**, **MTC-66**, **MTC-97** y **MTC-103** están representados en la Tabla 4.17. Se observa con claridad que el compuesto más activo de esta primera serie ensayada fue **MTC-97**, con una $CI_{50} = 1.5 \mu\text{M}$.

Tabla 4.17. Valores de CI_{50} para **MTC-39**, **MTC-40**, **MTC-66**, **MTC-97** y **MTC-103**

CLAVE	CI_{50} (μM)
MTC-39	10
MTC-40	40
MTC-66	> 50
MTC-97	1.5
MTC-93	> 50



Por tanto, el inhibidor **MTC-97** [CI_{50} (HDAC) = $1.5 \mu\text{M}$] representa una nueva estructura de referencia para el desarrollo de inhibidores más potentes de las HDAC. Desde el punto de vista estructural este inhibidor presenta un fragmento de 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol (DOBI) en la zona de interacción con la entrada al canal lipófilo del sitio activo enzimático. Análogamente existen otros fármacos con un fragmento DOBI y que ya han sido valorados en ensayos clínicos (Figura 4.2). Algunos ejemplos son el ansiolítico agonista de receptores $5HT_{1A}$ ipsapirona (**127**)¹²⁵, el fármaco para el tratamiento de la isquemia cerebral agonista de los receptores $5HT_{1A}$ repinotan (**128**)¹²⁶,

¹²⁵ a) De Vry, J.; Schreiber, R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **2000**, 24(3), 341-353; b) Fanelli, R. J.; Schuurman, T.; Glaser, T.; Traber, J. Ipsapirone: a novel anxiolytic and selective 5-HT_{1A} receptor ligand. *Progress in Clinical and Biological Research* **1990**, 361 (Curr. Future Trends Anticonvulsant, Anxiety, Stroke Ther.), 461-467.

¹²⁶ a) Lutsep, H. L. Repinotan, A 5-HT_{1A} agonist, in the treatment of acute ischemic stroke. *Current Drug Targets: CNS & Neurological Disorders* **2005**, 4(2), 119-120; b) Lutsep, Helmi L. Repinotan(Bayer). *Current Opinion in Investigational Drugs* **2002**, 3(6), 924-927.

el inhibidor de la agregación plaquetaria trombodipine (**129**)¹²⁷, y el análogo no teratogénico de la talidomida denominado supidimide (**130**)¹²⁸.

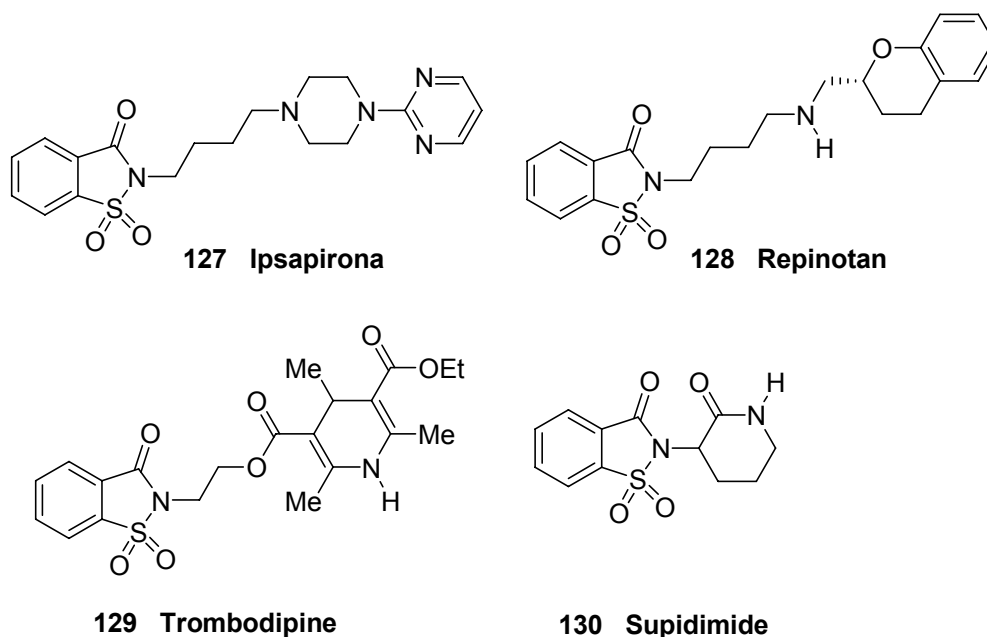


Figura 4.2. Fármacos que contienen el fragmento DOBI

A la vista de los resultados obtenidos, se descartan ciertos aspectos estructurales para el desarrollo de nuevos inhibidores de las HDAC como la presencia de grupos amida en el espaciador y la síntesis de nuevos inhibidores se centra en derivados con una cabeza lipófila derivada de la ftalimida sustituida o derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol con una cadena metilénica de diferente longitud. También se exploran pequeñas modificaciones sobre el anillo del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol.

Los valores de CI_{50} obtenidos para los nuevos inhibidores sintetizados atendiendo a los anteriores criterios se representan en la Tabla 4.18. Como se puede observar solo dos de los nuevos inhibidores sintetizados presentan valores de CI_{50} superiores a 2 μM . Así, el compuesto **MTC-136** ($CI_{50} = 50 \mu M$) es un análogo reducido del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol, y pone de manifiesto la importancia del fragmento sulfona para la actividad inhibitoria. El derivado **MTC-123** ($CI_{50} > 2 \mu M$) posee un espaciador con 4

¹²⁷ Apitz-Castro, R. Trombodipine (Alter). *Current Opinion in Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Investigational Drugs* **1999**, 1(3), 295-297.

¹²⁸ Avramovich, Y.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. Non-steroidal anti-inflammatory drugs stimulate secretion of non-amyloidogenic precursor protein. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277(35), 31466-31473.

unidades metilénicas lo que también puede explicar su menor potencia como inhibidor de las HDAC.

Tabla 4.18. Valores de CI_{50} para **MTC-123**, **MTC-124**, **MTC-126**, **MTC-127**, **MTC-128**, **MTC-136**, **MTC-141** y **MTC-144**

CLAVE	CI_{50} (μ M)
MTC-123	> 2
MTC-124	0.25
MTC-126	0.85
MTC-127	0.35
MTC-128	1.15
MTC-136	~ 50
MTC-141	0.18
MTC-144	0.21

Sin embargo, el derivado **MTC-124** ($CI_{50} = 0.25 \mu$ M) con un espaciador constituido por 6 unidades metilénicas es 6 veces más potente como inhibidor de las HDAC que el homólogo inferior de referencia **MTC-97**. Por tanto, parece observarse que la distancia óptima entre el grupo quelante del Zn^{2+} catalítico y la cabeza lipófila, para esta familia de compuestos derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol, es la correspondiente a 6 unidades metilénicas.

La introducción en este tipo de derivados de un espaciador de naturaleza mas lipófila (**MTC-128**, $CI_{50} = 1.15 \mu$ M) no afecta a la actividad inhibitoria sobre enzima aislado. Resulta interesante el hecho de que este espaciador de tipo bencilo en los derivados de ftalimida da lugar a un incremento considerable en la inhibición sobre las HDAC (**MTC-126**, $CI_{50} = 0.85 \mu$ M).

Entre los inhibidores más potentes obtenidos se encuentran aquellos que contienen en su estructura una cabeza lipófila derivada de la ftalimida sustituida [CI_{50} (**MTC-141**) = 0.18μ M; CI_{50} (**MTC-127**) = 0.35μ M]. Esto refleja la importancia de la sustitución en los derivados de ftalimida para la actividad inhibitoria sobre las HDAC, como se ha discutido con anterioridad. Además, el compuesto **MTC-127** resultó ser 2 veces menos potente sobre enzima aislada que el derivado **MTC-141**, lo que implicaría una preferencia hacia sustituyentes de naturaleza lipófila no polar.

Por último, el derivado **MTC-144** ($Cl_{50} = 0.21 \mu\text{M}$), con una cabeza lipófila diferente a todos los anteriores inhibidores descritos, pone de manifiesto la variabilidad permitida en el diseño de inhibidores de las HDAC en la zona de interacción situada a la entrada del canal lipófilo en el sitio catalítico. Esta nueva estructura representa una alternativa desde este punto de vista del diseño de nuevos inhibidores de las HDAC.

La estructura de los compuestos más activos obtenidos se muestra en la Figura 4.3, para facilitar la observación de las relaciones estructura actividad.

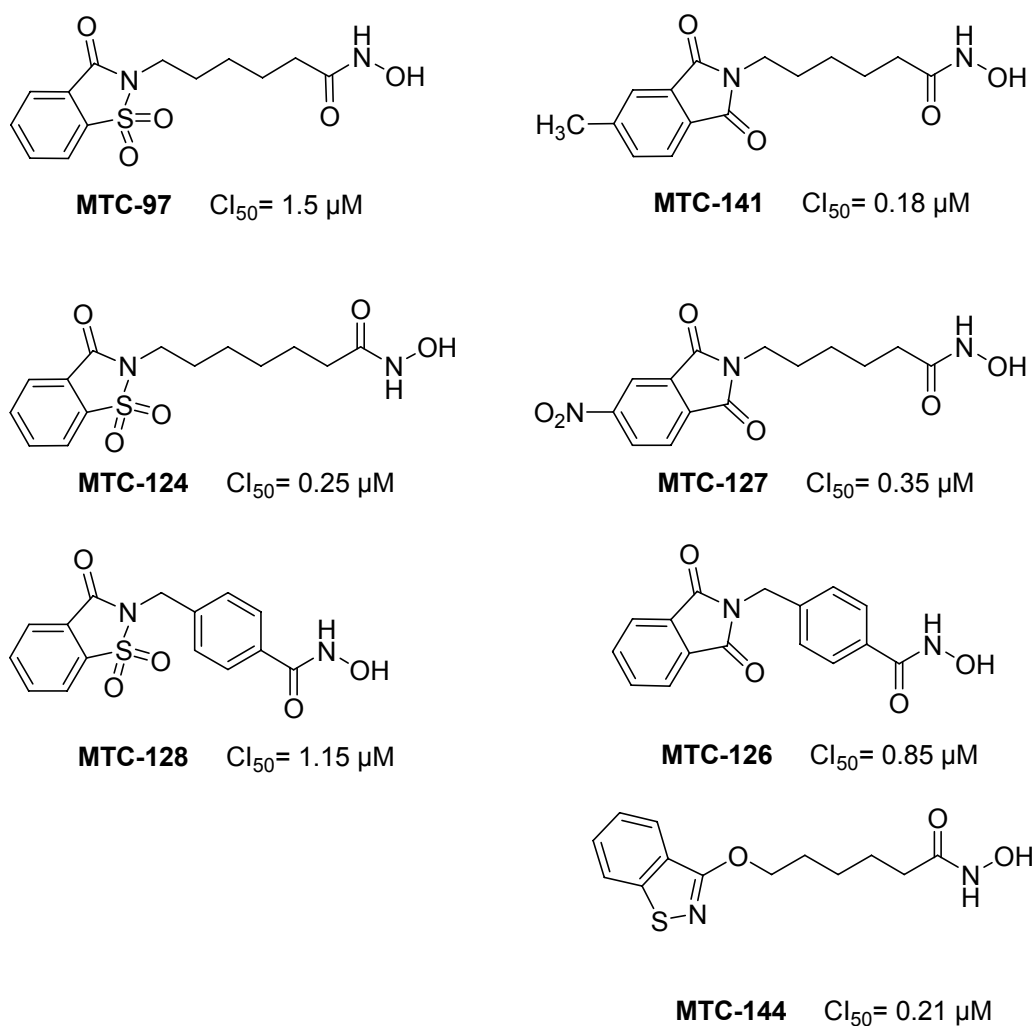


Figura 4.3

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. Parte experimental

5.1. Condiciones generales

Los procesos de reacción se controlaron de forma rutinaria mediante cromatografía en capa fina en cromatofolios Merck AL de silicagel 60 F₂₅₄ y para el revelado se utilizó luz ultravioleta, yodo y ninhidrina (solución al 0.2% en EtOH) según las características de cada compuesto.

Los puntos de fusión se han medido en un aparato Electrothermal Melting Point Apparatus y están sin corregir.

Los espectros RMN de ¹H se han realizado en un aparato Bruker AM-300. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. El aspecto y la multiplicidad de señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: s, singlete; sa, singlete ancho; d, doblete; dd, doble doblete; ddd, doble doblete; t, triplete; c, cuadruplete; q, quintuplete; m, multiplete. Los espectros RMN de ¹³C se han realizado en un aparato Bruker AM-300 (75 MHz) y Bruker AM-400 (100 MHz).

Los espectros de masas de alta (HR) y baja resolución (LR) se realizaron mediante ionización secundaria en fase líquida LSIMS (Liquid Secondary Ionization Mass Spectrum) en matrices de tioglicerol o NOBA, o bien mediante ionización química por impacto electrónico (EI, 70 eV). Se utilizaron equipos Micromass modelos Autospec Q y Platform II.

Los espectros han sido realizados por el Centro de Instrumentación Científica (C.I.C.) de la Universidad de Granada.

5.2. Síntesis de productos intermedios

5.2.1. Procedimiento general de síntesis de compuestos derivados de la N-ftalimida:

A una solución del aminoácido correspondiente (1 mmol) en agua y K_2CO_3 (1 mmol) se adiciona N-etoxicarbonilftalimida (1 mmol) y se agita hasta la total disolución. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y se controla el final de la misma por CCF. Una vez finalizada, se acidifica con una solución 6 M de HCl hasta pH 4. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío.

5.2.1.1. Síntesis del ácido 2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) acético (72)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de una solución de glicina (342.32 mg, 4.56 mmol), K_2CO_3 (630.2 mg, 4.56 mmol) y N-etoxicarbonilftalimida (1g, 4.56 mmol) en 18 mL de agua. Tras la filtración se recristaliza de AcOEt/Hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 195-197 °C. Rendimiento: 726.20 mg (78%).

1H -RMN (MeOD): δ 7.91 - 7.82 (m, 4H, H_{arom}); 4.40 (s, 2H, CH_2).

^{13}C -RMN (MeOD): 169.5 ($\underline{C}OOH$); 167.7 ($\underline{C}O$); 134.3 ($\underline{C}H_{arom}$); 132.0 (C_{arom}); 123.1 ($\underline{C}H_{arom}$); 38.2 ($\underline{C}H_2$).

HR LSIMS: Calculado para $C_{10}H_7NO_4Na$ ($M+Na$)⁺ 228.0273; encontrado 228.0271 (desviación 0.8 ppm).

5.2.1.4. Síntesis del ácido 3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) propiónico (73)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de β -Ala (409.94 mg, 4.56 mmol), K_2CO_3 (630.24 mg, 4.56 mmol) y N-etoxicarbonilftalimida (1 g, 4.56 mmol) en 20 mL de agua. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 157-159 °C. Rendimiento: 622 mg (62%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ 7.84 - 7.82 (m, 2H, H_{arom}); 7.72 - 7.69 (m, 2H, H_{arom}); 3.99 (t, 2H, N- \underline{CH}_2 , $J=7.4$ Hz); 2.78 (t, 2H, \underline{CH}_2 -CO; $J = 7.4$ Hz).

^{13}C -RMN ($CDCl_3$): 176.4 (\underline{COOH}); 168.1 (\underline{CO}); 134.2 (\underline{CH}_{arom}); 132.1 (C_{arom}); 123.5 (\underline{CH}_{arom}); 33.5 (N- \underline{CH}_2); 32.7 (\underline{CH}_2 -CO).

HR LSIMS: Calculado para $C_{11}H_9NO_4Na$ ($M+Na$)⁺ 242.0429; encontrado 242.0426 (desviación 1.2 ppm).

5.2.1.3. Síntesis del ácido 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) hexanoico¹²⁹ (74).

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de ácido 6-aminocaproico (119.64 mg, 0.912 mmol), K_2CO_3 (126.05 mg, 0.912 mmol) y N-etoxicarbonilftalimida (200 mg, 0.912 mmol) en 4 mL de agua. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 107-108 °C. Rendimiento: 188 mg (79%, publicado: 83%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ 7.83 - 7.67 (m, 4H, H_{arom}); 3.66 (t, 2H, N- \underline{CH}_2 , $J=7.2$ Hz); 2.33 (t, 2H, \underline{CH}_2 -CO; $J = 7.4$ Hz); 1.71 - 1.64 (m, 4H, \underline{CH}_2); 1.41 - 1.35 (m, 2H, \underline{CH}_2).

^{13}C -RMN ($CDCl_3$): 179.5 (\underline{COOH}); 168.5 (\underline{CO}); 134.0 (\underline{CH}_{arom}); 132.2 (C_{arom}); 123.3 (\underline{CH}_{arom}); 37.8 (N- \underline{CH}_2); 33.8 (\underline{CH}_2 -CO); 28.3 (\underline{CH}_2); 26.3 (\underline{CH}_2); 24.2 (\underline{CH}_2).

HR LSIMS: Calculado para $C_{14}H_{15}NO_4Na$ ($M+Na$)⁺ 284.0899; encontrado 284.0894 (desviación 1.5 ppm).

¹²⁹ Gademann, K.; Kimmerlin, T.; Hoyer, D.; Seebach, D. Peptide folding induces high and selective affinity of a linear and small β -peptide to the human somatostatin receptor 4. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2460 - 2468.

5.2.1.4. Síntesis de ácido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il-metil) benzoico (75)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de ácido 4-(aminometil)-benzoico (137.87 mg, 0.912 mmol), K_2CO_3 (126.05 mg, 0.912 mmol) y N-etoxicarbonilftalimida (200 mg, 0.912 mmol) en 5 mL de agua. La reacción se lleva a cabo a 40 °C y el precipitado obtenido se purifica mediante cromatografía flash, usando como eluyente DCM:MeOH (10:1). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 258-259 °C. Rendimiento: 129 mg (50%).

1H -RMN (DMSO- d_6): δ 7.90 - 7.82 (m, 6H, H_{arom}); 7.38 (d, 2H, H_{arom} , J = 8.3 Hz); 4.81 (s, 2H, CH_2).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6): 168.2 (\underline{CO}); 167.8 (\underline{COOH}); 141.8 (C_{arom}); 135.1 (\underline{CH}_{arom}); 132.1 (C_{arom}); 131.0 (C_{arom}); 130.1 (\underline{CH}_{arom}); 127.9 (\underline{CH}_{arom}); 123.8 (\underline{CH}_{arom}); 41.2 ($\underline{CH_2}$).

HR LSIMS: Calculado para $C_{16}H_{11}NO_4Na$ ($M+Na$) $^+$ 304.0586; encontrado 304.0583 (desviación 1.0 ppm).

5.2.2. Síntesis de compuestos derivados de 5-metil-ftalimida

5.2.2.1. Procedimiento general para la síntesis de ésteres derivados de la 5-metil-ftalimida

Una solución de la 5-metil-ftalimida (1 mmol), K_2CO_3 (1 mmol) y el correspondiente bromoéster de etilo (1 mmol) en DMF (1mL), se calienta a 120°C durante 24 horas. Finalizada la reacción se precipita el compuesto formado por adición de agua-hielo y se filtra. El sólido recogido se seca a vacío.

5.2.2.1.1. Síntesis de 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acetato de etilo (76)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de 5-metil-ftalimida (400 mg, 2.48 mmol), K_2CO_3 (343.04 mg, 2.48 mmol) y 2-Bromoetanoato de etilo (0.28 mL, 2.48 mmol) en 2.5 mL de DMF. Se obtiene un sólido blanco (612 mg) con p.f. = 98-100 °C. Rendimiento cuantitativo.

1H -RMN (C_3D_6O): δ 7.78 - 7.67 (m, 3H, H_{arom}); 4.38 (s, 2H, CH_2); 4.18 (c, 2H, $O-CH_2CH_3$, J = 7.1 Hz); 2.53 (s, 3H, $Ar-CH_3$); 1.23 (t, 3H, $O-CH_2CH_3$, J = 7.2 Hz).

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 167.5 ($\underline{\text{C}}\text{OOEt}$); 167.3 ($\underline{\text{C}}\text{O}$); 167.1 ($\underline{\text{C}}\text{O}$); 146.0 (C_{arom}); 135.0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom}}$); 132.6 (C_{arom}); 129.6 (C_{arom}); 123.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom}}$); 123.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom}}$); 61.4 ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 38.7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 21.0 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 13.6 ($\text{O}-\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

HR LSIMS: Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 270.0742; encontrado 270.0750 (desviación -2.8 ppm).

5.2.2.1.2. Síntesis de 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propionato de etilo (77)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de 5-metil-ftalimida (1 g, 6.20 mmol), K_2CO_3 (856.90 mg, 6.20 mmol) y 3-Bromopropionato de etilo (0.79 mL, 6.20 mmol) en 5 mL de DMF. El producto formado no precipita por adición de agua-hielo, por lo que se hace una extracción con AcOEt (3x5mL), se seca la fase orgánica con MgSO_4 , se filtra, se concentra en el rotavapor y se seca a vacío. Se obtiene un líquido amarillo (1.618 g, rendimiento cuantitativo).

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): δ 7.70 (d, 1H, H_{arom} , $J = 7.5$ Hz); 7.62 (d, 2H, H_{arom} , $J = 8.1$ Hz); 4.05 (c, 2H, $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 3.88 (t, 2H, $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J = 7.3$ Hz); 2.68 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CO}$, $J = 7.3$ Hz); 2.50 (s, 3H, $\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1.15 (t, 3H, $\text{O}-\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $J = 7.1$ Hz).

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 170.5 ($\underline{\text{C}}\text{OOEt}$); 167.7 ($\underline{\text{C}}\text{O}$); 167.6 ($\underline{\text{C}}\text{O}$); 145.5 (C_{arom}); 134.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom}}$); 132.7 (C_{arom}); 129.7 (C_{arom}); 123.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom}}$); 122.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom}}$); 60.2 ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 33.7 ($\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 32.7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CO}$); 21.0 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 13.6 ($\text{O}-\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

HR LSIMS: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 284.0899; encontrado 284.0897 (desviación 0.7 ppm).

5.2.2.1.3. Síntesis de 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoato de etilo (78)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de 5-metil-ftalimida (300 mg, 1.86 mmol), K_2CO_3 (257.39 mg, 1.86 mmol) y 6-Bromohexanoato de etilo (0.33 mL, 1.86 mmol) en 2 mL de DMF. El producto formado no precipita por adición de agua-hielo, por lo que se hace una extracción con AcOEt (3x5mL), se seca la fase orgánica con MgSO_4 , se filtra, se concentra en el rotavapor y se seca a vacío. Se obtiene un líquido amarillo (563.60 mg, rendimiento cuantitativo).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 7.70 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.8 Hz); 7.61 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 8.4 Hz); 4.03 (c, 2H, O-CH₂CH₃, *J* = 7.1 Hz); 3.61 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.1 Hz); 2.50 (s, 3H, Ar-CH₃); 2.26 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.4 Hz); 1.70 - 1.57 (m, 4H, CH₂); 1.40 - 1.32 (m, 2H, CH₂); 1.16 (t, 3H, O-CH₂CH₃, *J* = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 172.7 (C=OOEt); 168.1 (C=O); 168.0 (C=O); 145.4 (C_{arom}); 134.5 (CH_{arom}); 132.8 (C_{arom}); 129.8 (C_{arom}); 123.4 (CH_{arom}); 122.8 (CH_{arom}); 59.6 (O-CH₂CH₃); 37.4 (N-CH₂); 33.6 (CH₂-CO); 28.1 (CH₂); 26.1 (CH₂); 24.4 (CH₂); 21.0 (Ar-CH₃); 13.7 (O-CH₂CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₇H₂₁NO₄Na (M+Na)⁺ 326.1368; encontrado 326.1371 (desviación -0.9 ppm).

5.2.2.1.4. Síntesis de 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoato de etilo (79)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de 5-metil-ftalimida (300 mg, 1.86 mmol), K₂CO₃ (257.39 mg, 1.86 mmol) y 7-Bromoheptanoato de etilo (0.36 mL, 1.86 mmol) en 2 mL de DMF. El producto formado no precipita por adición de agua-hielo, por lo que se hace una extracción con AcOEt (3x5mL), se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra, se concentra al rotavapor y se seca a vacío. Se obtiene un líquido amarillo (589.75 mg, rendimiento cuantitativo).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 7.70 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.5 Hz); 7.61 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 8.5 Hz); 4.04 (c, 2H, O-CH₂CH₃, *J* = 7.1 Hz); 3.60 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.1 Hz); 2.50 (s, 3H, Ar-CH₃); 2.24 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.4 Hz); 1.66 - 1.52 (m, 4H, CH₂); 1.38 - 1.33 (m, 4H, CH₂); 1.17 (t, 3H, O-CH₂CH₃, *J* = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 173.5 (C=OOEt); 168.9 (C=O); 168.8 (C=O); 146.2 (C_{arom}); 135.3 (CH_{arom}); 133.6 (C_{arom}); 130.6 (C_{arom}); 124.1 (CH_{arom}); 123.6 (CH_{arom}); 60.4 (O-CH₂CH₃); 38.2 (N-CH₂); 34.5 (CH₂-CO); 29.3 (CH₂); 29.1 (CH₂); 27.2 (CH₂); 25.5 (CH₂); 21.8 (Ar-CH₃); 14.5 (O-CH₂CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₈H₂₃NO₄Na (M+Na)⁺ 340.1525; encontrado 340.1525 (desviación 0.1 ppm).

5.2.2.2. Procedimiento general para la síntesis de ácidos derivados de la 5-metil-ftalimida

El éster etílico obtenido partiendo de la 5-metil-ftalimida (1 mmol) según el procedimiento general 5.2.2.1 se hidroliza por tratamiento con una solución de HCl concentrada a reflujo durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción, el producto formado se precipita por adición de agua, se filtra y se seca a vacío.

5.2.2.2.1. Síntesis del ácido 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acético (80)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **76** (600 mg, 2.43 mmol) y 6 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 146-148 °C. Rendimiento: 228 mg (43%).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 11.50 (sa, 1H, COOH); 7.78 - 7.66 (m, 3H, H_{arom}); 4.39 (s, 2H, CH₂); 2.53 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 168.1 (COOH); 167.4 (CO); 167.2 (CO); 146.0 (C_{arom}); 135.0 (CH_{arom}); 132.6 (C_{arom}); 129.6 (C_{arom}); 123.7 (CH_{arom}); 123.2 (CH_{arom}); 38.3 (CH₂); 21.0 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₁H₉NO₄Na (M+Na)⁺ 242.0429; encontrado 242.0424 (desviación 2.2 ppm).

5.2.2.2.2. Síntesis del ácido 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propiónico (81)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **77** (1.6 g, 6.13 mmol) y 10 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 171-173 °C. Rendimiento: 1.08 g (75%).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 10.80 (sa, 1H, COOH); 7.70 (d, 1H, H_{arom}, J = 7.7 Hz); 7.62 (d, 1H, H_{arom}, J = 8.7 Hz); 3.89 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.5 Hz); 2.72 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.5 Hz); 2.50 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 172.2 (COOH); 168.6 (CO); 168.4 (CO); 146.3 (C_{arom}); 135.4 (CH_{arom}); 133.5 (C_{arom}); 130.6 (C_{arom}); 124.2 (CH_{arom}); 123.6 (CH_{arom}); 34.4 (N-CH₂); 32.9 (CH₂-CO); 21.8 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para $C_{12}H_{11}NO_4Na$ ($M+Na$)⁺ 256.0586; encontrado 256.0587 (desviación -0.5 ppm).

5.2.2.2.3. Síntesis del ácido 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoico (82)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **78** (500 mg, 1.85 mmol) y 4.5 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 110-112 °C. Rendimiento: 371 mg (73 %).

¹H-RMN (C_3D_6O): δ 10.40 (sa, 1H, COOH); 7.70 (d, 1H, H_{arom} , $J = 7.7$ Hz); 7.61 (d, 1H, H_{arom} , $J = 8.4$ Hz); 3.61 (t, 2H, N-CH₂, $J = 7.2$ Hz); 2.50 (s, 3H, CH₃); 2.28 (t, 2H, CH₂-CO, $J = 7.4$ Hz); 1.71 - 1.57 (m, 4H, CH₂); 1.42 - 1.31 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (C_3D_6O): 174.5 (COOH); 168.9 (CO); 168.8 (CO); 146.2 (C_{arom}); 135.3 (CH_{arom}); 133.5 (C_{arom}); 130.6 (C_{arom}); 124.1 (CH_{arom}); 123.6 (CH_{arom}); 38.2 (N-CH₂); 34.0 (CH₂-CO); 29.0 (CH₂); 27.0 (CH₂); 25.2 (CH₂); 21.7 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para $C_{15}H_{17}NO_4Na$ ($M+Na$)⁺ 298.1055; encontrado 298.1057 (desviación -0.5 ppm).

5.2.2.2.4. Síntesis del ácido 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoico (83)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **79** (580 mg, 1.83 mmol) y 5 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 93-95 °C. Rendimiento: 402 mg (76%).

¹H-RMN (C_3D_6O): δ 10.40 (sa, 1H, COOH); 7.69 (d, 1H, H_{arom} , $J = 7.6$ Hz); 7.61 (d, 1H, H_{arom} , $J = 8.6$ Hz); 3.61 (t, 2H, N-CH₂, $J = 7.1$ Hz); 2.50 (s, 3H, CH₃); 2.26 (t, 2H, CH₂-CO, $J = 7.4$ Hz); 1.69 - 1.52 (m, 4H, CH₂); 1.40 - 1.31 (m, 4H, CH₂).

¹³C-RMN (C_3D_6O): 174.5 (COOH); 168.9 (CO); 168.8 (CO); 146.2 (C_{arom}); 135.3 (CH_{arom}); 133.6 (C_{arom}); 130.6 (C_{arom}); 124.1 (CH_{arom}); 123.6 (CH_{arom}); 38.3 (N-CH₂); 34.1 (CH₂-CO); 29.3 (CH₂); 29.1 (CH₂); 27.2 (CH₂); 25.5 (CH₂); 21.8 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para $C_{16}H_{19}NO_4Na$ ($M+Na$)⁺ 312.1212; encontrado 312.1212 (desviación 0.0 ppm).

5.2.3. Procedimiento general de síntesis de compuestos derivados de la 1,8-naftalimida

A una solución del aminoácido correspondiente (1 mmol) y K_2CO_3 (1 mmol) en agua, se adiciona anhídrido 1,8-naftálico (1 mmol) y se agita hasta la total disolución, controlando el final de la reacción por CCF. La reacción se lleva a cabo entre 35 y 40°C. Una vez finalizada la reacción, se acidifica con una solución 6 M de HCl hasta pH 4. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío.

5.2.3.1. Síntesis del ácido 2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)acético (93)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de glicina (379.10 mg, 5.05 mmol), K_2CO_3 (697.96 mg, 5.05 mmol) y anhídrido 1,8-naftálico (1 g, 5.05 mmol) en 20 mL de agua. El precipitado formado se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:1). Se obtiene un sólido beige con p.f. 269-271 °C. Rendimiento: 928 mg (72%).

1H -RMN (DMSO- d_6): δ 8.45 (t, 4H, H_{arom}); 7.85 (t, 2H, H_{arom}); 4.60 (s, 2H, CH_2).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6): 169.2 (C_{COOH}); 162.9 (C_{CO}); 134.3 ($C_{H_{arom}}$); 131.1 (C_{arom}); 130.6 ($C_{H_{arom}}$); 127.1 (C_{arom}); 127.0 ($C_{H_{arom}}$); 121.6 (C_{arom}); 42.0 (CH_2).

HR LSIMS: Calculado para $C_{14}H_9NO_4Na$ ($M+Na$)⁺ 278.0429; encontrado 278.0427 (desviación 0.9 ppm).

5.2.3.2. Síntesis del ácido 3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)propiónico (94)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de β -alanina (449.90 mg, 5.05 mmol), K_2CO_3 (697.96 mg, 5.05 mmol) y anhídrido 1,8-naftálico (1 g, 5.05 mmol) en 20 mL de agua. El precipitado formado se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 230-232 °C. Rendimiento: 828.70 mg (61%).

1H -RMN (DMSO- d_6): δ 8.42 (t, 4H, H_{arom} , $J = 8.6$ Hz); 7.82 (t, 2H, H_{arom} , $J = 7.8$ Hz); (t, 2H, N- CH_2 , $J = 7.8$ Hz); (t, 2H, CH_2 -CO, $J = 7.8$ Hz)

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 173.3 (COOH); 163.8 (CO); 134.8 (CH_{arom}); 131.8 (C_{arom}); 131.2 (CH_{arom}); 127.9 (C_{arom}); 127.7 (CH_{arom}); 122.6 (C_{arom}); 36.4 (N-CH₂); 33.0 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₅H₁₁NO₄Na (M+Na)⁺ 292.0586; encontrado 292.0590 (desviación -1.5 ppm).

5.2.3.3. Síntesis del ácido 6-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il) hexanoico (95)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de ácido 6-aminocaproico (661.92 mg, 5.05 mmol), K₂CO₃ (697.40 mg, 5.05 mmol) y anhídrido 1,8-naftálico (1g, 5.05 mmol) en 23 mL de agua. El precipitado formado se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 137-139 °C. Rendimiento: 674.7 mg (98%).

¹H-RMN (CDCl₃): δ 8.57 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 7.3 Hz; *J* = 0.8 Hz); 8.18 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 8.2 Hz; *J* = 0.7 Hz); 7.73 (t, 2H, H_{arom}, *J* = 7.8 Hz); 4.17 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.5 Hz); 2.36 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.5 Hz); 1.80 - 1.66 (m, 4H, CH₂); 1.52 - 1.42 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (CDCl₃): 179.4 (COOH); 164.3 (CO); 134.0 (CH_{arom}); 131.6 (C_{arom}); 131.3 (CH_{arom}); 128.2 (C_{arom}); 127.0 (CH_{arom}); 122.7 (C_{arom}); 40.2 (N-CH₂); 33.9 (CH₂-CO); 27.8 (CH₂); 26.6 (CH₂); 24.4 (CH₂).

HR LSIMS: Calculado para C₁₈H₁₇NO₄Na (M+Na)⁺ 334.1055; encontrado 334.1058 (desviación - 1.0 ppm).

5.2.4. Síntesis de compuestos derivados derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

5.2.4.1. Procedimiento general para la síntesis de ésteres derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

Una solución de la sal sódica del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol (1 mmol) y el correspondiente bromo ester de etilo (1 mmol) en DMF (0.5 mL) se calienta a 120°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, el producto formado se precipita tras agregar agua-hielo y se recoge por filtración.

5.2.4.1.1. Síntesis de 2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) acetato de etilo (97).

La síntesis de este compuesto se realiza según el procedimiento general descrito. Este producto ha sido referenciado con anterioridad, purificándose por recristalización en etanol, y con un 41% de rendimiento. En nuestro caso, tras recristalización en DCM/hexano, se obtiene con un mayor rendimiento (99%).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 8.21 - 8.02 (m, 4H, H_{arom}); 4.50 (s, 2H, CH₂); 4.24 - 4.17 (c, 2H, O-CH₂CH₃); 1.24 (t, 3H, CH₃, J = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 166.0 (C=OEt); 158.7 (C=O); 138.1 (C_{arom}); 135.8 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.9 (C_{arom}); 125.2 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 61.6 (O-CH₂CH₃); 38.9 (CH₂); 13.5 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₁H₁₁NO₅SNa (M+Na)⁺ 292.0256; encontrado 292.0253 (desviación 0.8 ppm).

5.2.4.1.2. Síntesis de 3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) propionato de etilo (98)¹³⁰.

La síntesis de este compuesto se realiza según el procedimiento general descrito. El rendimiento publicado es del 41%, tras recristalización en metanol. En nuestro caso no fue necesaria la recristalización y el producto final (p.f. = 94-96 °C) se obtuvo con un rendimiento del 77%.

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 8.16 - 7.98 (m, 4H, H_{arom}); 4.15 (c, 2H, O-CH₂CH₃, J = 7.1 Hz); 4.04 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.4 Hz); 2.82 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.4 Hz); 1.21 (t, 3H, CH₃, J = 7.1 Hz).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 169.9 (C=OEt); 158.5 (C=O); 137.9 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 134.9 (CH_{arom}); 127.1 (C_{arom}); 125.1 (CH_{arom}); 121.1 (CH_{arom}); 60.4 (O-CH₂CH₃); 34.6 (N-CH₂); 32.9 (CH₂-CO); 13.6 (CH₃).

¹³⁰ Da Settimo, A.; Primofiore, G.; La Motta, C. Acid derivatives of benzisothiazole-1,1-dioxide as inhibitors of rat lens aldose reductase. *Il farmaco*. **1996**, 51(4), 261 - 267.

HR LSIMS: Calculado para $C_{12}H_{13}NO_5SNa$ ($M+Na$)⁺ 306.0412; encontrado 306.0414 (desviación -0.7 ppm).

5.2.4.1.3. Síntesis de 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) pentanoato de etilo (99)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol (400 mg, 1.95 mmol) y 5-bromovalerato de etilo (0.30 mL, 1.95 mmol) en 1 mL de DMF. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 56-58 °C. Rendimiento: 570 mg (94%).

¹H-RMN (C_3D_6O): δ 8.15 - 7.97 (m, 4H, H_{arom}); 4.07 (c, 2H, $O-CH_2CH_3$, $J = 7.1$ Hz); 3.77 (t, 2H, $N-CH_2$, $J = 7.1$ Hz); 2.37 (t, 2H, CH_2-CO , $J = 7.3$ Hz); 1.90 - 1.66 (m, 4H, CH_2); 1.18 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.1$ Hz).

¹³C-RMN (C_3D_6O): 172.4 ($\underline{C}OOEt$); 158.8 (CON); 137.9 (C_{arom}); 135.4 ($\underline{C}H_{arom}$); 134.9 ($\underline{C}H_{arom}$); 127.2 (C_{arom}); 125.0 ($\underline{C}H_{arom}$); 121.0 ($\underline{C}H_{arom}$); 59.7 ($O-\underline{C}H_2CH_3$); 38.5 ($N-\underline{C}H_2$); 33.1 ($\underline{C}H_2-CO$); 27.9 ($\underline{C}H_2$); 22.0 ($\underline{C}H_2$); 13.7 ($\underline{C}H_3$).

HR LSIMS: Calculado para $C_{14}H_{17}NO_5SNa$ ($M+Na$)⁺ 334.0725; encontrado 334.0723 (desviación 0.7 ppm).

5.2.4.1.4. Síntesis de 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) hexanoato de etilo (100)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol (400 mg, 1.95 mmol) y 6-bromohexanoato de etilo (0.35 mL, 1.95 mmol) en 1 mL de DMF. El producto final no precipita en agua-hielo, por lo que se hace una extracción con AcOEt (3x 5 mL), se seca la fase orgánica con $MgSO_4$, se filtra, se concentra en el rotavapor y se seca a vacío. Se obtiene un líquido amarillo (633 mg). Rendimiento cuantitativo.

¹H-RMN ($CDCl_3$): δ 8.05 - 8.02 (m, 1H, H_{arom}) 7.97 - 7.78 (m, 3H, H_{arom}); 4.11 (c, 2H, $O-CH_2CH_3$, $J = 7.1$ Hz); 3.76 (t, 2H, $N-CH_2$, $J = 7.5$ Hz); 2.30 (t, 2H, CH_2-CO , $J = 7.5$ Hz); 1.86 (q, 2H, CH_2); 1.69 (q, 2H, CH_2); 1.49 - 1.39 (m, 2H, CH_2); 1.23 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.4$ Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3): 173.5 (C_{COOEt}); 159.0 (C_{CON}); 137.9 (C_{arom}); 134.8 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 134.4 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 127.5 (C_{arom}); 125.2 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 121.0 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 60.3 ($\text{O}-\text{C}_{\text{H}_2\text{CH}_3}$); 39.3 ($\text{N}-\text{C}_{\text{H}_2}$); 34.2 ($\text{C}_{\text{H}_2-\text{CO}}$); 28.2 (C_{H_2}); 26.4 (C_{H_2}); 24.5 (C_{H_2}); 14.3 (C_{H_3}).

HR LSIMS: Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{SNa}$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 348.0882; encontrado 348.0875 (desviación 1.8 ppm).

5.2.4.1.5. Síntesis de 7-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) heptanoato de etilo (101)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol (400 mg, 1.95 mmol) y 7-bromoheptanoato de etilo (0.38 mL, 1.95 mmol) en 1 mL de DMF. El producto final no precipita en agua-hielo, por lo que se hace una extracción con AcOEt (3x5mL), se seca la fase orgánica con MgSO_4 , se filtra, se concentra en el rotavapor y se seca a vacío. Se obtiene un líquido amarillo. Rendimiento: 600 mg (91%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ 8.04 (dd, 1H, H_{arom} , $J = 2.2$ Hz, $J = 6.5$ Hz) 7.92 - 7.78 (m, 3H, H_{arom}); 4.12 (c, 2H, $\text{O}-\text{C}_{\text{H}_2\text{CH}_3}$, $J = 7.1$ Hz); 3.75 (t, 2H, $\text{N}-\text{C}_{\text{H}_2}$, $J = 7.5$ Hz); 2.28 (t, 2H, $\text{C}_{\text{H}_2-\text{CO}}$, $J = 7.5$ Hz); 1.84 (q, 2H, C_{H_2}); 1.63 (q, 2H, C_{H_2}); 1.44 - 1.36 (m, 4H, C_{H_2}); 1.23 (t, 3H, C_{H_3} , $J = 7.2$ Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3): 173.7 (C_{COOEt}); 159.1 (C_{CON}); 137.9 (C_{arom}); 134.7 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 134.3 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 127.6 (C_{arom}); 125.2 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 121.0 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{arom}}}$); 60.3 ($\text{O}-\text{C}_{\text{H}_2\text{CH}_3}$); 39.4 ($\text{N}-\text{C}_{\text{H}_2}$); 34.3 ($\text{C}_{\text{H}_2-\text{CO}}$); 28.6 (C_{H_2}); 28.3 (C_{H_2}); 26.5 (C_{H_2}); 24.9 (C_{H_2}); 14.3 (C_{H_3}).

HR LSIMS: Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{SNa}$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 362.1038; encontrado 362.1031 (desviación 1.9 ppm).

5.2.4.2. Procedimiento general para la síntesis de ácidos derivados del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

El éster etílico derivado del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol (1 mmol) según el procedimiento general 5.2.4.1, se hidroliza por tratamiento con una solución de HCl concentrada a reflujo durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción, el producto formado se precipita por adición de agua, se filtra y se seca a vacío

5.2.4.2.1. Síntesis del ácido 2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) acético (102)^{130, 131}.

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **97** (500 mg, 1.86 mmol) y 6 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 213-215 °C. Rendimiento: 310 mg (69%; publicado: 76%).

5.2.4.2.2. Síntesis del ácido 3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) propiónico (103)^{130, 131}.

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **98** (1 g, 3.53 mmol) y 9 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 166-168 °C. Rendimiento: 720 mg (80%; publicado: 82%)

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 11.00 (sa, 1H, COOH); 8.16 - 7.98 (m, 4H, H_{arom}); 4.04 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.6 Hz); 2.86 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.6 Hz).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 170.9 (COOH); 158.5 (CO); 137.9 (C_{arom}); 135.5 (CH_{arom}); 134.9 (CH_{arom}); 127.2 (C_{arom}); 125.1 (CH_{arom}); 121.1 (CH_{arom}); 34.5 (N-CH₂); 32.3 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₀H₉NO₅SNa (M+Na)⁺ 278.0099; encontrado 278.0098 (desviación 0.3 ppm).

5.2.4.2.3. Síntesis del ácido 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) pentanoico (104)¹³¹.

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **99** (500 mg, 1.61 mmol) y 4.5 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 119-121 °C. Rendimiento: 405 mg (89%).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 10.45 (sa, 1H, COOH); 8.15 - 7.97 (m, 4H, H_{arom}); 3.78 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.1 Hz); 2.38 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.3 Hz); 1.93 - 1.82 (m, 2H, CH₂); 1.76 - 1.66 (m, 2H, CH₂).

¹³¹ Feeder, N.; Jones, W. Four N-saccharinaliphatic acids. *Acta Crystallographica*. **1994**, c50, 1118-1122.

¹³C-RMN (C₃D₆O): 173.5 (C_{OOH}); 158.8 (C_{ON}); 138.0 (C_{arom}); 135.5 (C_{H_{arom}}); 134.9 (C_{H_{arom}}); 127.2 (C_{arom}); 125.0 (C_{H_{arom}}); 121.1 (C_{H_{arom}}); 38.6 (N-C_{H₂}); 32.7 (C_{H₂-CO}); 27.8 (C_{H₂}); 22.0 (C_{H₂}).

HR LSIMS: Calculado para C₁₂H₁₃NO₅SNa (M+Na)⁺ 306.0412; encontrado 306.0412 (desviación - 0.1 ppm).

5.2.4.2.4. Síntesis del ácido 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) hexanoico (105)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **100** (625 mg, 1.92 mmol) y 6 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 98-100 °C. Rendimiento: 387.60 mg (68%).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 10.45 (sa, 1H, COOH); 8.15 - 7.97 (m, 4H, H_{arom}); 3.76 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.3 Hz); 2.31 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.4 Hz); 1.84 (q, 2H, CH₂); 1.66 (q, 2H, CH₂); 1.52 - 1.42 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 173.6 (C_{OOH}); 158.8 (CON); 138.0 (C_{arom}); 135.4 (C_{H_{arom}}); 134.9 (C_{H_{arom}}); 127.3 (C_{arom}); 125.0 (C_{H_{arom}}); 121.1 (C_{H_{arom}}); 38.8 (N-C_{H₂}); 33.2 (C_{H₂-CO}); 28.1 (C_{H₂}); 26.1 (C_{H₂}); 24.3 (C_{H₂}).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₅NO₅SNa (M+Na)⁺ 320.0569; encontrado 320.0571 (desviación -0.8 ppm).

5.2.4.2.5. Síntesis del ácido 7-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) heptanoico (106)

Se sigue el procedimiento general descrito partiendo de **101** (590 mg, 1.74 mmol) y 6 mL de HCl concentrado. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 100-102 °C. Rendimiento: 508.77 mg (94%).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 8.15 - 7.95 (m, 4H, H_{arom}); 3.75 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.4 Hz); 2.28 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.4 Hz); 1.81 (q, 2H, CH₂, J = 7.3 Hz); 1.60 (q, 2H, CH₂, J = 7.3 Hz); 1.47 - 1.38 (m, 4H, CH₂).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 173.7 (C_{OOH}); 158.8 (CON); 138.0 (C_{arom}); 135.4 (C_{H_{arom}}); 134.9 (C_{H_{arom}}); 127.2 (C_{arom}); 125.0 (C_{H_{arom}}); 121.0 (C_{H_{arom}}); 38.9 (N-C_{H₂}); 33.2 (C_{H₂-CO}); 28.4 (C_{H₂}); 28.2 (C_{H₂}); 26.3 (C_{H₂}); 24.6 (C_{H₂}).

HR LSIMS: Calculado para C₁₄H₁₇NO₅SNa (M+Na)⁺ 334.0725; encontrado 334.0728 (desviación -0.8 ppm).

5.2.5. Síntesis de compuestos derivados de 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

5.2.5.1. Síntesis de ésteres derivados de 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

5.2.5.1.1. Síntesis de 6-[(benzo[d]isotiazol-3-il)oxa] hexanoato de etilo (**110**) y 6-(3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) hexanoato de etilo (**111**)

A una disolución de benzo-[d]-isotiazol-3-(2H)-ona (400 mg, 2.65 mmol) y K₂CO₃ (366.26 mg, 2.65 mmol) en acetonitrilo (7 mL), se adiciona 6-bromohexanoato de etilo (0.47 mL, 2.65 mmol). Se lleva a ebullición durante 24 horas. Se concentra en el rotavapor, se diluye en agua, y se hace una extracción con acetato de etilo (3x5mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, se filtra y se concentra en el rotavapor. Los dos productos formados se purifican mediante cromatografía flash usando como eluyente hexano:acetato de etilo (3:1). Se obtienen dos líquidos amarillos: **110** (rendimiento: 426.2 mg, 55%) y **111** (rendimiento: 245.3 mg, 32%).

Datos espectroscópicos del 6-[(benzo[d]isotiazol-3-il)oxa] hexanoato de etilo (**110**):

¹H-RMN (CDCl₃): δ 7.89 (d, 1H, H_{arom}, J = 8.0 Hz); 7.75 (d, 1H, H_{arom}, J = 8.2 Hz); 7.49 (ddd, 1H, H_{arom}, J = 1.1 Hz, J = 7.0 Hz); 7.36 (ddd, 1H, H_{arom}, J = 0.8 Hz, J = 7.1 Hz); 4.53 (t, 2H, O-CH₂, J = 6.6 Hz); 4.12 (c, 2H, O-CH₂CH₃, J = 7.1 Hz); 2.34 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.5 Hz); 1.90 (q, 2H, CH₂); 1.78 - 1.51 (m, 4H, CH₂); 1.24 (t, 3H, CH₃, J = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (CDCl₃): 173.7 (C_{OOEt}); 163.3 (C_O); 151.6 (C_{arom}); 128.7 (C_{H_{arom}}); 125.6 (C_{arom}); 124.4 (C_{H_{arom}}); 123.2 (C_{H_{arom}}); 120.2 (C_{H_{arom}}); 68.6 (O-C_{H₂}); 60.3 (O-C_{H₂}CH₃); 34.4 (C_{H₂-CO}); 28.8 (C_{H₂}); 25.7 (C_{H₂}); 24.8 (C_{H₂}); 14.3 (C_{H₃}).

HR LSIMS: Calculado para C₁₅H₁₉NO₃SNa (M+Na)⁺ 316.0983; encontrado 316.0979 (desviación 1.4 ppm).

Datos espectroscópicos del 6-(3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) hexanoato de etilo (**111**):

¹H-RMN (CDCl₃): δ 8.01 (d, 1H, H_{arom}, J = 7.9 Hz); 7.61 - 7.51 (m, 2H, H_{arom}); 7.38 (m, 1H, H_{arom}); 4.09 (c, 2H, O-CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); 3.88 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.2 Hz); 2.28 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.4 Hz); 1.82 - 1.62 (m, 4H, CH₂); 1.45 - 1.37 (m, 2H, CH₂); 1.21 (t, 3H, CH₃, J = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (CDCl₃): 173.5 (C=OOEt); 165.4 (C=O); 140.2 (C_{arom}); 131.7 (CH_{arom}); 126.7 (CH_{arom}); 125.5 (CH_{arom}); 124.8 (C_{arom}); 120.4 (CH_{arom}); 60.3 (O-CH₂CH₃); 43.8 (N-CH₂); 34.2 (CH₂-CO); 29.3 (CH₂); 26.2 (CH₂); 24.6 (CH₂); 14.3 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₅H₁₉NO₃SNa (M+Na)⁺ 316.0983; encontrado 316.0986 (desviación -0.9 ppm).

5.2.5.2. Síntesis de ácidos derivados de benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona

5.2.5.2.1. Síntesis del ácido 6-[(benzo[d]isotiazol-3-il)oxa] hexanoico (**112**)

El éster **110** (405 mg, 1.38 mmol) se trata con 3.5 mL de HCl concentrado a reflujo. Se concentra en el rotavapor, se adiciona agua, y se realiza una extracción con acetato de etilo (3x5mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, se filtra, y se concentra en el rotavapor. Se purifica mediante cromatografía flash usando como eluyente hexano:acetato de etilo (3:1). El producto **112** (187.3 mg) se aísla con un rendimiento del 51%. Además, se consigue caracterizar un segundo producto (88.6 mg) como la benzo-[d]-isotiazol-3-(2H)-ona.

¹H-RMN (CDCl₃): δ 7.90 (d, 1H, H_{arom}, J = 8.0 Hz); 7.75 (d, 1H, H_{arom}, J = 8.2 Hz); 7.50 (t, 1H, H_{arom}); 7.36 (t, 1H, H_{arom}, J = 7.5 Hz); 4.53 (t, 2H, O-CH₂, J = 6.5 Hz); 2.41 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.4 Hz); 1.95 - 1.86 (m, 2H, CH₂); 1.82 - 1.70 (m, 2H, CH₂); 1.61-1.52 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (CDCl₃): 179.4 (C=OOH); 163.3 (C=O); 151.6 (C_{arom}); 128.7 (CH_{arom}); 125.5 (C_{arom}); 124.4 (CH_{arom}); 123.2 (CH_{arom}); 120.2 (CH_{arom}); 68.5 (O-CH₂); 39.9 (CH₂-CO); 28.8 (CH₂); 25.7 (CH₂); 24.5 (CH₂).

5.2.5.2.2. Síntesis del ácido 6-(benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona-2-il)hexanoico (113)

El éster **111** (234 mg, 0.80 mmol) se trata con 3.5 mL de HCl concentrado a reflujo. Transcurrido el tiempo de reacción se diluye con agua y el producto final precipitado se filtra, obteniéndose un sólido blanco con p.f. = 59-61 °C. Rendimiento: 176.70 mg (83%).

¹H-RMN (C₃D₆O): δ 10.47 (d, 1H, COOH); 7.87 (c, 2H, H_{arom}); 7.67 (ddd, 1H, H_{arom}); 7.44 (ddd, 1H, H_{arom}); 3.87 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.1 Hz); 2.29 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.4 Hz); 1.81 - 1.59 (m, 4H, CH₂); 1.43-1.35 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (C₃D₆O): 174.5 (COOH); 165.5 (CO); 141.4 (C_{arom}); 132.6 (CH_{arom}); 126.8 (CH_{arom}); 126.3 (CH_{arom}); 125.6 (C_{arom}); 122.0 (CH_{arom}); 43.9 (N-CH₂); 34.0 (CH₂-CO); 29.9 (CH₂); 26.7 (CH₂); 25.2 (CH₂).

5.3. Síntesis de compuestos finales

5.3.1. Síntesis de 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (69)¹³².

Este producto se sintetizó a partir de una vía sintética diferente a la citada y que se describe a continuación¹³³. A una solución de 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)hexanoico (**74**) (200 mg, 0.766 mmol) en Et₂O (5 mL) a 0°C, se le adiciona cloroformiato de etilo (0.09 mL, 0.919 mmol) y N-metilmorfolina (0.11 mL, 0.996 mmol). Tras un tiempo de agitación de 10 minutos, el sólido obtenido se retira por filtración y el filtrado se adiciona a una solución preparada in situ de hidroxilamina en MeOH. Se deja en agitación a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación se concentra en el rotavapor y se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:1). Se obtiene un sólido blanco con un p.f. = 123-125°C. Rendimiento: 69.8 mg (33%; publicado¹³³: 15%).

La solución de hidroxilamina se prepara adicionando NH₂OH.HCl (80 mg, 1.149 mmol) disuelta en MeOH (1 mL) a una solución de KOH (64.53 mg, 1.149 mmol) en MeOH (0.5 mL) a 0°C con agitación. La mezcla se mantiene agitando 15 min., se elimina por filtración la sal formada y el filtrado se usa tal y como describe el párrafo anterior.

¹³² Remiszewski, S. W.; Sambucetti, L. C.; Atadja, P.; Bair, K. W.; Cornell, W. D.; Green, M. A.; Howell, K. L.; Jung, M.; Kwon, P.; Trogani, N.; Walker, H. Inhibitors of human histone deacetylase: Synthesis and enzyme and cellular activity of straight chain hydroxamates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 753-757.

¹³³ Sekar, A.; Surech, M.; Ravindra, G. A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6285-6288.

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6): δ 10.29 (s, 1H, NH_2); 8.63 (s, 1H, OH); 7.87 - 7.80 (m, 4H, H_{arom}); 3.54 (t, 2H, N-CH_2 , $J=7.1$ Hz); 1.91 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$; $J = 7.3$ Hz); 1.61 - 1.44 (m, 4H, CH_2); 1.28 - 1.13 (m, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6): 169.5 (CONHOH); 168.4 (CO); 134.9 (CH_{arom}); 132.1 (C_{arom}); 123.5 (CH_{arom}); 37.8 (N-CH_2); 32.5 ($\text{CH}_2\text{-CO}$); 28.2 (CH_2); 26.3 (CH_2); 25.2 (CH_2).

HR LSIMS: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 299.1008; encontrado 299.1010 (desviación -0.8 ppm).

5.3.2. Síntesis en fase sólida de derivados del ácido hidroxámico

Procedimiento A: Uso de la resina Fmoc-hidroxi-amino-2-clorotritilo (58)

La resina Fmoc-hidroxi-amino-2-clorotritilo (400 mg, 0.18 mmol) se acondiciona en DMF durante 24 h. Se trata con una solución de piperidina al 20% en DMF (2x10 min). A continuación se lava con DMF (3x4 mL), DCM (3x4 mL), DMA (3x4 mL). Se adiciona una solución de HOAt (98 mg, 0.72 mmol), DIPCDI (0.11 mL, 0.72 mmol) y el correspondiente aminoácido protegido con Fmoc (0.72 mmol), en DMA. Transcurridas 24 h. de reacción, tras el lavado de la resina, la resina se trata con una solución de piperidina al 20% en DMF (2x10 min.), y a continuación se acondiciona con DMF (3x4 mL), DCM (3x4 mL) y DMF (3x4 mL). Para llevar a cabo la siguiente reacción de acoplamiento, se adiciona una solución de HOAt (0.72 mmol), DIPCDI (0.72 mmol) y el correspondiente ácido carboxílico (0.72 mmol), en DMF. Transcurridas 24 h. de reacción la resina se lava con DMF y se adicionan 10 mL de una solución de TFA: DCM (1:4) durante 10 min. A continuación se lava con DCM y las fases orgánicas se concentran en el rotavapor. El producto final se purifica, en caso necesario, mediante cromatografía flash y se seca a vacío.

Procedimiento B: uso de la resina de Wang funcionalizada con hidroxilamina (59)

La resina de Wang funcionalizada con hidroxilamina (100 mg, 0.18 mmol) se acondiciona en DCM durante 6 h. A continuación se lava con DMF (2x4 mL) y se adiciona una solución de HOAt (98 mg, 0.72 mmol), DIPCDI (0.11 mL, 0.72 mmol) y el correspondiente derivado del ácido carboxílico (0.72 mmol), en DMF. Transcurridas 24 h. de reacción, el protocolo de síntesis continúa dependiendo del derivado de ácido carboxílico unido a la resina:

a) *Si la estructura unida a la resina es el producto final*, la resina se lava con DMF (3x4 mL) y se acondiciona con DCM (3x4 mL). El producto final se libera de la resina mediante la adición de 10 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) en DCM al 50% durante 30 min. Por último, la resina se lava con DCM y las fases orgánicas se concentran en el rotavapor. El producto final se purifica, en caso necesario, mediante cromatografía flash.

b) *Si el derivado de ácido carboxílico unido a la resina es un bromo derivado*, la resina se lava con DMF (3x4 mL), DCM (3x4 mL) y DMF (3x4 mL) y se trata con una solución de 4-nitroftalimida y DBU o la sal sódica del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol en DMF, dependiendo del producto a sintetizar. Transcurrido el tiempo de reacción, la resina se lava con DMF (3x4 mL), y se acondiciona con DCM (3x4 mL). El producto final se libera de la resina mediante la adición de 10 mL de una solución de TFA en DCM al 50% durante 30 min. Por último, la resina se lava con DCM y las fases orgánicas se concentran en el rotavapor. El producto final se purifica, en caso necesario, mediante cromatografía flash.

c) *Si el derivado de ácido carboxílico unido a la resina es un aminoácido protegido en el grupo amino con Fmoc*, la resina se lava con DMF (3x4 mL), DCM (3x4 mL) y DMF (3x4 mL) y se trata con una solución de piperidina al 20% en DMF (2x10 min.). A continuación se lava con DMF (3x4 mL), DCM (3x4 mL) y DMF (3x4 mL). El acoplamiento del grupo amino libre con el correspondiente derivado de ácido carboxílico se realiza en las mismas condiciones arriba indicadas. Transcurridas 24 h. de reacción, la resina se lava con DMF (3x4 mL), y se acondiciona con DCM (3x4 mL). El producto final se libera de la resina mediante la adición de 10 mL de una solución de TFA en DCM al 50% durante 30 min. Por último, la resina se lava con DCM y las fases orgánicas se concentran en el rotavapor. El producto final se purifica, en caso necesario, mediante cromatografía flash.

5.3.2.1. Síntesis de derivados de imidas aromáticas: ftalimidas

5.3.2.1.1. Síntesis de 3-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-26)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-β-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **72** (73.86 mg, 0.72 mmol). Se recristaliza de DCM/hexano, obteniéndose un sólido blanco con p.f. = 185-187 °C. Rendimiento; 49 mg (94%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.40 (s, 1H, NHOH); 8.71 (s, 1H, OH); 8.29 (s, 1H, NH); 7.89 - 7.82 (m, 4H, H_{arom}); 4.14 (s, 2H, N-CH₂-CO); 3.26 - 3.20 (m, 2H, NH-CH₂CH₂); 2.10 (t, 2H, CH₂CH₂-CO, *J* = 7.1 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.1 (CONHOH); 167.6 (CO); 166.6 (CO); 135.1 (CH_{arom}); 132.3 (C_{arom}); 123.7 (CH_{arom}); 40.3 (N-CH₂-CO); 35.9 (NH-CH₂CH₂); 35.7 (CH₂CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₃N₃O₅Na (M+Na)⁺ 314.0753; encontrado 314.0749 (desviación 1.3 ppm).

5.3.2.1.2. Síntesis de 2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-30)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-Gly (214.10 mg, 0.72 mmol) y **73** (157.80 mg, 0.72 mmol). Se recristaliza de DCM/hexano, obteniéndose un sólido blanco con p.f. = 167-169 °C. Rendimiento: 47 mg (90%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.46 (s, 1H, NHOH); 8.74 (s, 1H, OH); 8.21 (t, 1H, NH, *J* = 5.8 Hz); 7.86 - 7.78 (m, 4H, H_{arom}); 3.75 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.5 Hz); 3.54 (d, 2H, NH-CH₂-CO, *J* = 5.8 Hz); 2.50 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.5 Hz)

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 170.4 (CONHOH); 168.2 (CO); 166.3 (CO); 134.9 (CH_{arom}); 132.3 (C_{arom}); 123.5 (CH_{arom}); 40.5 (N-CH₂); 34.7 (CH₂-CO); 34.1 (NH-CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₃N₃O₅Na (M+Na)⁺ 314.0753; encontrado 314.0758 (desviación -1.7 ppm).

5.3.2.1.3. Síntesis de 2S-2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-33)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-L-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **73** (157.80 mg, 0.72 mmol). Se purifica mediante cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtienen 14 mg de un sólido beige (26%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.54 (s, 1H, NHOH); 8.76 (s, 1H, OH); 8.18 (d, 1H, NH, J = 7.7 Hz); 7.85 - 7.78 (m, 4H, H_{arom}); 4.12 (q, 1H, CH, J = 7.3 Hz); 3.73 (t, 2H, N-CH2, J = 7.4 Hz); 2.44 (t, 2H, CH₂-CO; J = 7.4 Hz); 1.10 (d, 3H, CH₃, J = 7.0 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.7 (CONHOH); 169.5 (CO); 168.2 (CO); 134.9 (CH_{arom}); 132.3 (C_{arom}); 123.5 (CH_{arom}); 46.5 (CH); 34.8 (N-CH2); 34.2 (CH₂-CO); 18.8 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₄H₁₅N₃O₅Na (M+Na)⁺ 328.0909; encontrado 328.0908 (desviación 0.3 ppm).

5.3.2.1.4. Síntesis de 2R-2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-34)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-D-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **73** (157.80 mg, 0.72 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido beige con p.f. 158-160 °C. Rendimiento: 25.10 mg (46%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.54 (s, 1H, NHOH); 8.76 (s, 1H, OH); 8.18 (d, 1H, NH, J = 7.7 Hz); 7.85 - 7.78 (m, 4H, H_{arom}); 4.12 (q, 1H, CH, J = 7.3 Hz); 3.73 (t, 2H, N-CH2, J = 7.4 Hz); 2.44 (t, 2H, CH₂-CO; J = 7.4 Hz); 1.10 (d, 3H, CH₃, J = 7.0 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.7 (CONHOH); 169.5 (CO); 168.2 (CO); 134.9 (CH_{arom}); 132.3 (C_{arom}); 123.5 (CH_{arom}); 46.5 (CH); 34.8 (N-CH2); 34.2 (CH₂-CO); 18.8 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₄H₁₅N₃O₅Na (M+Na)⁺ 328.0909; encontrado 328.0906 (desviación 1.0 ppm).

5.3.2.1.5. Síntesis de 3-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-32)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-β-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **73** (157.80 mg, 0.72 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 190-192 °C. Rendimiento: 41.5 mg (76%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.36 (s, 1H, NH₂OH); 8.65 (s, 1H, OH); 8.02 (t, 1H, NH, J = 5.6 Hz); 7.86 - 7.77 (m, 4H, H_{arom}); 3.73 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.4 Hz); 3.16 (c, 2H, N-CH₂, J = 6.9 Hz); 2.38 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.4 Hz); 2.06 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.2 (C_{ONHOH}); 167.4 (C_O); 166.9 (C_O); 134.1 (C_{H_{arom}}); 131.4 (C_{arom}); 122.7 (C_{H_{arom}}); 35.0 (N-CH₂); 34.1 (N-CH₂); 33.6 (CH₂-CO); 32.1 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₄H₁₅N₃O₅Na (M+Na)⁺ 328.0909; encontrado 328.0911 (desviación -0.4 ppm).

5.3.2.1.6. Síntesis de 4-[(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-metil]-N-hidroxibenzamida (MTC-126)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol) y **75** (151.77 mg, 0.54 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.3). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 190-192 °C. Rendimiento: 32 mg (60%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 11.15 (s, 1H, NH₂OH); 8.98 (s, 1H, OH); 7.90 - 7.80 (m, 4H, H_{arom}); 7.67 (d, 2H, H_{arom}, J = 8.2 Hz); 7.34 (d, 2H, H_{arom}, J = 8.3 Hz); 4.79 (s, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 167.5 (C_{ONHOH}); 163.8 (C_O); 139.5 (C_{arom}); 134.4 (C_{H_{arom}}); 131.8 (C_{arom}); 131.4 (C_{arom}); 127.1 (C_{H_{arom}}); 123.1 (C_{H_{arom}}); 40.4 (CH₂).

5.3.2.1.7. Síntesis de 6-(5-metil-1,3-dioxoisoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-141)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de **82** (198.11 mg, 0.72 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.3). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 109-111 °C. Rendimiento: 20,30 mg (39%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.28 (s, 1H, NHOH); 8.62 (s, 2H, OH); 7.73 - 7.59 (m, 3H, H_{arom}); 3.50 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.3 Hz); 2.45 (s, 3H, CH₃); 1.89 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.4 Hz); 1.58 - 1.42 (m, 4H, CH₂); 1.24 - 1.14 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.8 (CONHOH); 167.9 (CO); 167.8 (CO); 145.2 (C_{arom}); 134.5 (CH_{arom}); 131.8 (C_{arom}); 128.8 (C_{arom}); 123.3 (CH_{arom}); 122.8 (CH_{arom}); 37.1 (N-CH₂); 31.9 (CH₂-CO); 27.6 (CH₂); 25.7 (CH₂); 24.5 (CH₂); 21.2 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₅H₁₈N₂O₄Na (M+Na)⁺ 313.1164; encontrado 313.1160 (desviación 1.4 ppm).

5.3.2.1.8. Síntesis de 3-[2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)acetamido]-*N*-hidroxipropanamida (MTC-86)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (49 mg, 0.36 mmol), DIPCDI (0.06 mL, 0.36 mmol), Fmoc-β-Ala (112.07 mg, 0.36 mmol) y **80** (78.86 mg, 0.36 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.2). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 156-158 °C. Rendimiento: 18 mg (33 %).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.40 (s, 1H, NHOH); 8.72 (s, 1H, OH); 8.28 (t, 1H, NH, *J* = 5.6 Hz); 7.77 - 7.62 (m, H_{arom}); 4.11 (s, 2H, N-CH₂-CO); 3.22 (c, 2H, NH-CH₂); 2.48 (s, 3H, CH₃); 2.10 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.3 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 167.5 (CONHOH); 167.4 (CO); 165.9 (CO); 145.3 (C_{arom}); 134.7 (CH_{arom}); 132.0 (C_{arom}); 129.0 (C_{arom}); 123.5 (CH_{arom}); 122.9 (CH_{arom}); 39.6 (N-CH₂-CO); 35.3 (N-CH₂); 32.1 (CH₂-CO); 21.2 (CH₃).

5.3.2.1.9. Síntesis de 2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-*N*-hidroxiacetamida (MTC-106)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de 0.22 mmol de resina, HOAt (119.78 mg, 0.88 mmol), DIPCDI (0.14 mL, 0.88 mmol), Fmoc-Gly (261.62 mg, 0.88 mmol) y **81** (102.52 mg, 0.88 mmol). Se recristaliza de acetato de etilo/hexano. Se obtiene un sólido beige con p.f. = 165-167 °C. Rendimiento: 38.70 mg (58%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.48 (s, 1H, NHOH); 8.23 (t, 1H, NH, *J* = 5.6 Hz); 7.72 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz); 7.66 (s, 1H, OH); 7.66 (s, 1H, H_{arom}); 7.60 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.5 Hz);

3.73 (t, 4H, N-CH₂, *J* = 7.5 Hz); 3.54 (d, 2H, NH-CH₂-CO, *J* = 5.7 Hz); 2.49 (s, 3H, CH₃); 2.48 (CH₂CO).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.7 (CONHOH); 167.6 (CO); 167.5 (CO); 165.6 (CO); 145.1 (C_{arom}); 134.5 (CH_{arom}); 131.9 (C_{arom}); 129.0 (C_{arom}); 123.3 (CH_{arom}); 122.7 (CH_{arom}); 39.8 (CH₂); 33.9 (CH₂); 33.5 (CH₂); 21.2 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₄H₁₅N₃O₅Na (M+Na)⁺ 328.0909; encontrado 328.0909 (desviación 0.2 ppm).

5.3.2.1.10. Síntesis de 2S-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-107)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de 0.22 mmol de resina, HOAt (119.78 mg, 0.88 mmol), DIPCDI (0.14 mL, 0.88 mmol), Fmoc-L-Ala (273.94 mg, 0.88 mmol) y **81** (102.52 mg, 0.44 mmol). Se recristaliza de acetato de etilo/hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 204-205°C. Rendimiento: 44.70 mg (64%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.60 (s, 1H, NHOH); 8.19 (d, 1H, NH, *J* = 7.7 Hz); 7.72 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz); 7.67 (s, 1H, H_{arom}); 7.60 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz); 4.12 (q, 1H, CH, *J* = 7.3 Hz); 3.72 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.4 Hz); 2.45 (s, 3H, Ar-CH₃); 2.43 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.4 Hz); 1.10 (d, 3H, CHCH₃, *J* = 7.0 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.0 (CONHOH); 168.8 (CO); 167.6 (CO); 167.5 (CO); 145.1 (C_{arom}); 134.5 (CH_{arom}); 131.9 (C_{arom}); 129.0 (C_{arom}); 123.3 (CH_{arom}); 122.7 (CH_{arom}); 45.8 (CH); 34.0 (N-CH₂); 33.5 (CH₂-CO); 21.2 (Ar-CH₃); 18.1 (CHCH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₅H₁₇N₃O₅ 319.1168; encontrado 319.1171 (desviación -0.7 ppm).

5.3.2.1.11. Síntesis de 2R-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-108)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de 0.22 mmol de resina, HOAt (119.78 mg, 0.88 mmol), DIPCDI (0.14 mL, 0.88 mmol), Fmoc-D-Ala (273.94 mg, 0.88 mmol) y **81** (102.52 mg, 0.44 mmol). Se recristaliza de acetato de etilo/hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 203 - 204 °C. Rendimiento: 40.80 mg (58%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.60 (s, 1H, NHOH); 8.19 (d, 1H, NH, *J* = 7.7 Hz); 7.72 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz); 7.67 (s, 1H, H_{arom}); 7.60 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz); 4.12 (q, 1H, CH, *J* = 7.3 Hz); 3.72 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.4 Hz); 2.45 (s, 3H, Ar-CH₃); 2.43 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.4 Hz); 1.10 (d, 3H, CHCH₃, *J* = 7.0 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.0 (CONHOH); 168.8 (CO); 167.6 (CO); 167.5 (CO); 145.1 (C_{arom}); 134.5 (CH_{arom}); 132.0 (C_{arom}); 129.0 (C_{arom}); 123.3 (CH_{arom}); 122.7 (CH_{arom}); 45.8 (CH); 34.0 (N-CH₂); 33.5 (CH₂-CO); 21.2 (Ar-CH₃); 18.1 (CHCH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₅H₁₇N₃O₅ 319.1168; encontrado 319.1162 (desviación 1.9 ppm).

5.3.2.1.12. Síntesis de 3-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-*N*-hidroxipropanamida (MTC-85)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de Fmoc-β-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **81** (167.81 mg, 0.72 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.2). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 179-181 °C. Rendimiento: 30 mg (52 %).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.37 (s, 1H, NHOH); 8.68 (s, 1H, OH); 8.02 (t, 1H, NH, *J* = 5.6 Hz); 7.73 - 7.59 (m, H_{arom}); 3.70 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.5 Hz); 3.18 - 3.12 (m, 2H, N-CH₂); 2.45 (s, 3H, CH₃); 2.36 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.4 Hz); 2.05 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.3 (CONHOH); 167.6 (CO); 167.5 (CO); 167.1 (CO); 145.1 (C_{arom}); 134.5 (CH_{arom}); 131.9 (C_{arom}); 129.0 (C_{arom}); 123.3 (CH_{arom}); 122.8 (CH_{arom}); 35.1 (N-CH₂); 34.1 (N-CH₂); 33.8 (CH₂-CO); 32.2 (CH₂-CO); 21.2 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para (M+Na)⁺ C₁₅H₁₇N₃O₅Na 342.1066; encontrado 342.1067 (desviación -0.3 ppm).

5.3.2.1.13. Síntesis de 6-(5-nitro-1,3-dioxo-isoindol-2-il)-*N*-hidroxihexanamida (MTC-127)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.5 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol) y ácido 6-bromohexanoico (105.3 mg, 0.54 mmol); tiempo de reacción 2 h. Tras sucesivos lavados con DMF, DCM y DMF, se adiciona 5-

nitroftalimida (276.7 mg, 1.44 mmol) y DBU (0.2 mL, 1.44 mmol) en DMF. Se recristaliza de DCM/hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 130-132 °C. Rendimiento: 25 mg (43%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.28 (s, 1H, NHOH); 8.60 (s, 1H, OH); 8.59 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 1.9 Hz, *J* = 8.1 Hz); 8.45 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 1.8 Hz); 8.09 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.1 Hz); 3.57 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.0 Hz); 1.90 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.3 Hz); 1.62 - 1.43 (m, 4H, CH₂); 1.28-1.23 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.8 (CONHOH); 166.2 (CO); 165.9 (CO); 151.2 (NO₂-C_{arom}); 136.2 (C_{arom}); 132.9 (C_{arom}); 129.4 (CH_{arom}); 124.3 (CH_{arom}); 117.6 (CH_{arom}); 37.8 (N-CH₂); 31.9 (CH₂-CO); 27.4 (CH₂); 25.7 (CH₂); 24.5 (CH₂).

HR LSIMS: Calculado para C₁₄H₁₅N₃O₆Na (M+Na)⁺ 344.0859; encontrado 344.0856 (desviación 0.7 ppm).

5.3.2.2. Síntesis de derivados de imidas aromáticas: 1,8-naftalimidias

5.3.2.2.1. Síntesis de 3-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-acetamido]-N-hidroxipropanamida (MTC-40)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-β-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **93** (183.77 mg, 0.72 mmol). Se recristaliza de DCM/hexano. Se obtiene un sólido beige con p.f. = 263 °C (dec). Rendimiento: 51 mg (83%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.41 (s, 1H, NHOH); 8.72 (s, 1H, OH); 8.46 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.3 Hz); 8.46 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.4 Hz); 8.27 (t, 1H, NH, *J* = 5.6 Hz); 7.86 (t, 2H, H_{arom}, *J* = 7.8 Hz); 4.59 (s, 2H, N-CH₂CO); 3.24 (c, 2H, N-CH₂, *J* = 5.6 Hz, *J* = 7.2 Hz); 2.11 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 167.6 (CONHOH); 167.2 (CO); 163.9 (CO); 135.1 (CH_{arom}); 131.9 (C_{arom}); 131.4 (CH_{arom}); 128.1 (C_{arom}); 127.8 (CH_{arom}); 122.5 (C_{arom}); 42.9 (N-CH₂-CO); 35.9 (N-CH₂); 33.0 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₇H₁₅N₃O₅Na (M+Na)⁺ 364.0909; encontrado 364.0906 (desviación 0.9 ppm).

5.3.2.2.2. Síntesis de 2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-38)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-Gly (214.10 mg, 0.72 mmol) y **94** (193.86 mg, 0.72 mmol). Se recristaliza de DCM/hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 200-202 °C. Rendimiento: 45 mg (73%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.47 (s, 1H, NHOH); 8.78 (s, 1H, OH); 8.46 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 1.0 Hz, *J* = 7.3 Hz); 8.43 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.3 Hz); 8.22 (t, 1H, NH, *J* = 5.8 Hz); 7.84 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 7.4 Hz, *J* = 8.1 Hz); 4.23 (t, 2H, NH-CH₂-CO, *J* = 7.8 Hz); 3.57 (d, 2H, N-CH₂, *J* = 5.8 Hz); 2.50 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.8 Hz)

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 170.9 (CONHOH); 166.4 (CO); 163.9 (CO); 134.9 (CH_{arom}); 131.8 (C_{arom}); 131.3 (CH_{arom}); 127.9 (C_{arom}); 127.8 (CH_{arom}); 122.7 (C_{arom}); 40.6 (NH-CH₂-CO); 36.9 (N-CH₂); 33.8 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₇H₁₅N₃O₅Na (M+Na)⁺ 364.0909; encontrado 364.0908 (desviación 0.4 ppm).

5.3.2.2.3. Síntesis de 2S-2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-45)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de Fmoc-L-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **94** (193.86 mg, 0.72 mmol). Se purifica por columna con sílica gel flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.3). Se obtiene un sólido beige con p.f. = 184-186 °C. Rendimiento: 43 mg (67%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.54 (d, 1H, NHOH, *J* = 1.4 Hz); 8.77 (d, 1H, OH, *J* = 1.5 Hz); 8.46 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 1.1 Hz, *J* = 7.3 Hz); 8.43 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 1.1 Hz, *J* = 8.3 Hz); 8.16 (d, 1H, NH, *J* = 7.7 Hz); 7.84 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 7.4 Hz, *J* = 8.2 Hz); 4.24 – 4.18 (m, 2H, N-CH₂); 4.13 (q, 1H, CH, *J* = 7.3 Hz); 2.49-2.46 (m, 2H, CH₂-CO); 1.12 (d, 3H, CH₃, *J* = 7.0 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 170.1 (CONHOH); 169.6 (CO); 163.9 (CO); 134.9 (CH_{arom}); 131.9 (C_{arom}); 131.2 (CH_{arom}); 127.9 (C_{arom}); 127.8 (CH_{arom}); 122.7 (C_{arom}); 46.4 (CH); 37.0 (N-CH₂); 33.9 (CH₂-CO); 18.8 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para $C_{18}H_{17}N_3O_5Na$ ($M+Na$)⁺ 378.1066; encontrado 378.1061 (desviación 1.3 ppm).

5.3.2.2.4. Síntesis de 2R-2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-46)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de Fmoc-D-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **94** (193.86 mg, 0.72 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.3). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 183 -185 °C. Rendimiento: 52 mg (81%).

¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ 10.54 (d, 1H, NH_{OH}, *J* = 1.4 Hz); 8.77 (d, 1H, OH, *J* = 1.5 Hz); 8.46 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 1.1 Hz, *J* = 7.3 Hz); 8.43 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 1.1 Hz, *J* = 8.3 Hz); 8.16 (d, 1H, NH, *J* = 7.7 Hz); 7.84 (dd, 2H, H_{arom}, *J* = 7.4 Hz, *J* = 8.2 Hz); 4.24 – 4.18 (m, 2H, N-CH₂); 4.13 (q, 1H, CH, *J* = 7.3 Hz); 2.49-2.46 (m, 2H, CH₂-CO); 1.12 (d, 3H, CH₃, *J* = 7.0 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆): 170.1 (CONHOH); 169.6 (CO); 163.9 (CO); 134.9 (CH_{arom}); 131.9 (C_{arom}); 131.2 (CH_{arom}); 127.9 (C_{arom}); 127.8 (CH_{arom}); 122.7 (C_{arom}); 46.4 (CH); 37.0 (N-CH₂); 33.9 (CH₂-CO); 18.8 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para $C_{18}H_{17}N_3O_5Na$ ($M+Na$)⁺ 378.1066; encontrado 378.1068 (desviación -0.6 ppm)

5.3.2.2.5. Síntesis de 3-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-39)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-β-Ala (224.12 mg, 0.72 mmol) y **94** (193.86 mg, 0.72 mmol). Se recristaliza de DCM/hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 230-232 °C. Rendimiento: 60 mg (94%).

¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ 10.39 (s, 1H, NH_{OH}); 8.69 (s, 1H, OH); 8.45 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz); 8.43 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 7.0 Hz); 8.01 (t, 1H, NH, *J* = 5.6 Hz); 7.84 (t, 2H, H_{arom}, *J* = 7.8 Hz); 4.21 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.6 Hz); 3.19 (c, 2H, N-CH₂, *J* = 6.9 Hz); 2.41 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.6 Hz); 2.09 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 170.4 (CONHOH); 167.8 (CO); 163.9 (CO); 134.8 (CH_{arom}); 131.9 (C_{arom}); 131.2 (CH_{arom}); 127.9 (C_{arom}); 127.8 (CH_{arom}); 122.7 (C_{arom}); 37.1 (N-CH₂); 35.8 (N-CH₂); 34.1 (CH₂-CO); 33.0 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₈H₁₇N₃O₅Na (M+Na)⁺ 378.1066; encontrado 378.1063 (desviación 0.8 ppm).

5.3.2.3. Síntesis de derivados de benzo[d]isotiazoles: 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazoles

5.3.2.3.1. Síntesis de 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-N-hidroxipentanamida (MTC-123)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol), y **104** (152.82 mg, 0.54 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.2). Se obtiene un sirupo de color marrón claro. Rendimiento: 31.80 mg (59%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.33 (d, 1H, NHOH, *J* = 1.4 Hz); 8.66 (d, 1H, OH, *J* = 1.7 Hz); 8.28 (dd, 1H, H_{arom}, *J* = 1.0 Hz, *J* = 6.9 Hz); 8.09 - 7.94 (m, 3H, H_{arom}); 3.68 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.3 Hz); 1.97 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.3 Hz); 1.73 - 1.63 (m, 2H, CH₂); 1.59 - 1.51 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.5 (CONHOH); 158.4 (CO); 136.6 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 38.3 (N-CH₂); 31.6 (CH₂); 27.4 (CH₂); 22.3 (CH₂).

HR LSIMS: Calculado para C₁₂H₁₄N₂O₅SNa (M+Na)⁺ 321.0521; encontrado 321.0518 (desviación 0.8 ppm).

5.3.2.3.2. Síntesis de 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-97)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol), y **105** (160.42 mg, 0.54 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido beige con p.f. = 139-141 °C. Rendimiento: 26 mg (46 %).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.31 (s, 1H, NHOH); 8.65 (s, 1H, OH); 8.28 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.2 Hz); 8.10 - 7.95 (m, 3H, H_{arom}); 3.67 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.3 Hz); 1.92 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.3 Hz); 1.70 (q, 2H, CH₂); 1.50 (q, 2H, CH₂); 1.34 - 1.27 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.8 (CONHOH); 158.4 (CO); 136.7 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.3 (CH_{arom}); 38.4 (N-CH₂); 31.9 (CH₂-CO); 27.5 (CH₂); 25.6 (CH₂); 24.4 (CH₂).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₆N₂O₅SNa (M+Na)⁺ 335.0677; encontrado 335.0676 (desviación 0.4 ppm).

5.3.2.3.3. Síntesis de 7-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-N-hidroxiheptanamida (MTC-124)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol) y **106** (167.98 mg, 0.54 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sirupo de color marrón claro. Rendimiento: 24.60 mg (42%).

¹H-RMN (CDCl₃): δ 8.04 (dd, 1H, H_{arom}, *J* = 2.1 Hz, *J* = 6.6 Hz); 7.92 - 7.79 (m, 3H, H_{arom}); 3.75 (t, 2H, N-CH₂, *J* = 7.3 Hz); 2.14 (m, 2H, CH₂); 2.14 (m, 2H, CH₂); 1.82 (m, 2H, CH₂); 1.63 (m, 2H, CH₂); 1.40 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (CDCl₃): 159.2 (CONHOH); 137.7 (CO); 134.8 (C_{arom}); 134.8 (CH_{arom}); 134.4 (CH_{arom}); 127.4 (C_{arom}); 125.2 (CH_{arom}); 121.0 (CH_{arom}); 39.3 (N-CH₂); 29.8 (CH₂-CO); 28.3 (CH₂); 28.1 (CH₂); 26.2 (CH₂); 25.0 (CH₂).

HR LSIMS: Calculado para C₁₄H₁₈N₂O₅SNa (M+Na)⁺ 349.0834; encontrado 349.0830 (desviación 1.1 ppm).

5.3.2.3.4. Síntesis de 3-[2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-79)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (49 mg, 0.36 mmol), DIPCDI (0.06 mL, 0.36 mmol), Fmoc-β-Ala (112.07 mg, 0.36 mmol) y **102** (86.76 mg, 0.36 mmol). Se recristaliza de DCM. Se obtiene un sólido blanco con p.f. 191-193 °C. Rendimiento: 30 mg (51%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.41 (s, 1H, NHOH); 8.71 (s, 1H, OH); 8.29 (s, 1H, NH); 8.29 (d, 1H, H_{arom}, J = 7.0 Hz); 8.11 -7.96 (m, 3H, H_{arom}); 4.25 (s, 2H, N-CH₂-CO); 3.26 - 3.21 (m, 2H, N-CH₂); 2.12 (t, 2H, CH₂-CO, J = 7.3 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 166.9 (CONHOH); 164.4 (CO); 158.4 (CO); 136.8 (C_{arom}); 135.7 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.4 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.5 (CH_{arom}); 39.8 (N-CH₂-CO); 35.3 (N-CH₂); 32.1 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₂H₁₃N₃O₆SNa (M+Na)⁺ 350.0423; encontrado 350.0426 (desviación - 1.0 ppm).

5.3.2.3.5. Síntesis de 2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-103).

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de Fmoc-Gly (214.10 mg, 0.72 mmol) y **103** (183.60 mg, 0.72 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.3). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 152-154 °C. Rendimiento: 56 mg (95%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.51 (s, 1H, NHOH); 8.79 (s, 1H, OH); 8.32 (t, 1H, NH, J = 5.7 Hz); 8.28 (d, 1H, H_{arom}, J = 7.3 Hz); 8.10 - 7.95 (m, 3H, H_{arom}); 3.90 (dd, 2H, N-CH₂, J = 7.9 Hz); 3.59 (d, 2H, NH-CH₂-CO, J = 5.7 Hz); 2.63 (dd, 2H, CH₂-CO, J = 7.9 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 169.1 (CONHOH); 165.5 (CO); 158.2 (CO); 136.7 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 40.0 (N-CH₂); 34.8 (NH-CH₂-CO); 33.5 (CH₂-CO).

HR LSIMS: Calculado para C₁₂H₁₃N₃O₆NaS (M+Na)⁺ 350.0423; encontrado 350.0425 (desviación -0.8 ppm).

5.3.2.3.6. Síntesis de 2S-2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-104)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de 0.22 mmol de resina, HOAt (59.89 mg, 0.44 mmol), DIPCDI (0.07 mL, 0.44 mmol), Fmoc-L-Ala (136.97 mg, 0.44 mmol) y **103** (112.20 mg, 0.44 mmol). Se recristaliza de acetato de etilo/hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 167-169 °C. Rendimiento: 52 mg (69 %).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.58 (s, 1H, NHOH); 8.80 (sa, 1H, OH); 8.29 - 8.25 (m, 2H, NH, H_{arom}); 8.11 - 7.95 (m, 3H, H_{arom}); 4.17 (q, 1H, CH, J = 7.2 Hz); 3.88 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.7 Hz); 2.61 (ddd, 2H, CH₂-CO); 1.15 (d, 3H, CH₃, J = 7.1 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.8 (CONHOH); 168.4 (CO); 158.2 (CO); 136.7 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 46.0 (CH); 34.8 (N-CH₂); 33.5 (CH₂-CO); 18.1 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₅N₃O₆SNa (M+Na)⁺ 364.0579; encontrado 364.0570 (desviación 2.7 ppm).

5.3.2.3.7. Síntesis de 2R-2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-105)

Se sigue el procedimiento A descrito partiendo de 0.22 mmol de resina, HOAt (119.78 mg, 0.88 mmol), DIPCDI (0.14 mL, 0.88 mmol), Fmoc-D-Ala (273.94 mg, 0.88 mmol) y **103** (224.40 mg, 0.88 mmol). Se recristaliza de acetato de etilo/hexano. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 171-173 °C. Rendimiento: 46.50 mg (62%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.58 (s, 1H, NHOH); 8.80 (sa, 1H, OH); 8.29 - 8.25 (m, 2H, NH, H_{arom}); 8.11 - 7.95 (m, 3H, H_{arom}); 4.17 (q, 1H, CH, J = 7.2 Hz); 3.88 (t, 2H, N-CH₂, J = 7.7 Hz); 2.61 (ddd, 2H, CH₂-CO); 1.15 (d, 3H, CH₃, J = 7.1 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.8 (CONHOH); 168.4 (CO); 158.19 (CO); 136.7 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 46.0 (CH); 34.8 (N-CH₂); 33.5 (CH₂-CO); 18.1 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₅N₃O₆SNa (M+Na)⁺ 364.0580; encontrado 364.0580 (desviación -0.2 ppm).

5.3.2.3.8. Síntesis de 3-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-propanamida (MTC-66)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (49 mg, 0.36 mmol), DIPCDI (0.06 mL, 0.36 mmol), Fmoc-β-Ala (112.07 mg, 0.36 mmol) y **103** (91.80 mg, 0.36 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.2). Se obtiene un sólido beige con p.f. = 155 -157 °C. Rendimiento: 13 mg (21 %).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.38 (s, 1H, NHOH); 8.69 (s, 1H, OH); 8.27 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.0 Hz); 8.12 -7.94 (m, 4H, H_{arom}, NH); 3.87 (q, 2H, N-CH₂, *J* = 6.1 Hz, *J* = 7.7 Hz); 3.20 (c, 2H, NH-CH₂, *J* = 7.0 Hz); 2.51 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.8 Hz); 2.08 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.2 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.6 (CONHOH); 167.1 (CO); 158.2 (CO); 136.7 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 35.2 (CH₂); 35.0 (CH₂); 33.7 (CH₂); 32.2 (CH₂).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₅N₃O₆SNa (M+Na)⁺ 364.0579; encontrado 364.0585 (desviación - 0.5 ppm).

5.3.2.3.9. Síntesis de 4-[(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol-2-il)metil]-*N*-hidroxibenzamida (MTC-128)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol) y del ácido 4-(bromometil) benzoico (105.33 mg, 0.54 mmol); tiempo de reacción de 2 h. Después de sucesivos lavados con DMF, DCM, DMF, se adiciona la sal sódica del 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol (276.67 mg, 1.44 mmol) en DMF. Se recristaliza de DCM/hexano y se obtiene un sólido beige. Rendimiento: 18 mg (30%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 11.20 (s, 1H, NHOH); 9.01 (s, 1H, OH); 8.33 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 6.0 Hz); 8.13 - 7.98 (m, 3H, H_{arom}); 7.71 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.4 Hz); 7.47 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.4 Hz); 4.95 (s, 1H, CH₂).

5.3.2.3.10. Síntesis de 2S, 3S-2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol-2-il)-propanamido]-3-metil-*N*-hidroxipentanamida (MTC-94)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol), Fmoc-L-Ile (190.84 mg, 0.54 mmol) y **103** (137.70 mg, 0.54 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 172-174°C. Rendimiento: 32.20 mg (47%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.63 (s, 1H, NHOH); 8.82 (s, 1H, OH); 8.28 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.3 Hz); 8.19 (d, 1H, NH, *J* = 8.8 Hz); 8.10 - 7.95 (m, 3H, H_{arom}); 4.00 (d, 1H, N-CH, *J* = 8.7 Hz); 3.86 (ddd, 2H, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.6 Hz, *J* = 8.0 Hz); 2.65 (dd, 2H, CH₂, *J* = 7.7 Hz, *J* = 8.0 Hz); 1.70-1.60 (m, 1H, CH); 1.44 - 1.33 (m, 1H, CH); 1.08 - 0.95 (m, 1H, CH); 0.76 (d, 3H, CH₃, *J* = 7.1 Hz); 0.74 (t, 3H, CH₃, *J* = 7.5 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.5 (CONHOH); 167.4 (CO); 158.2 (CO); 136.7 (C_{arom}); 135.7 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 54.4 (CH); 36.0 (CH); 34.8 (CH₂); 33.4 (CH₂); 24.3 (CH₂); 15.1 (CH₃); 10.7 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₆H₂₁N₃O₆SNa (M+Na)⁺ 406.1049; encontrado 406.1036 (desviación 3.1 ppm).

5.3.2.3.11. Síntesis de **2S**, 2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[*d*]isotiazol-2-il)-propanamido]-4-metil-N-hidroxipentanamida (MTC-95)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol), Fmoc-L-Leu (190.84 mg, 0.54 mmol) y **103** (137.70 mg, 0.54 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 163-164 °C. Rendimiento: 34 mg (57%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.65 (s, 1H, NHOH); 8.80 (sa, 1H, OH); 8.29 (d, 1H, CO-NH-CH, *J* = 7.2 Hz); 8.20 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.8 Hz); 8.10 - 7.95 (m, 3H, H_{arom}); 4.17 (c, 1H, NH-CH-CO, *J* = 7.4 Hz); 3.96 - 3.80 (m, 2H, N-CH₂); 2.62 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.7 Hz); 1.54 - 1.46 (m, 1H, CH₂-CH(CH₃)-CH₃); 1.39 (t, 2H, CH-CH₂-CH, *J* = 7.4 Hz); 0.80 (c, 6H, CH₃, *J* = 6.3 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.4 (CONHOH); 158.2 (CO); 136.7 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 48.7 (CH-CO); 40.8 (N-CH₂); 34.8 (CH₂-CO); 33.5 (CH-CH₂-CH); 24.0 (CH₂-CH(CH₃)-CH₃); 22.6 (CH₃); 21.6 (CH₃).

HR LSIMS: Calculado para C₁₆H₂₁N₃O₆SNa (M+Na)⁺ 406.1049; encontrado 406.1046 (desviación 0.8 ppm).

5.3.2.3.12. Síntesis de 2S, 2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-propanamido]-3-fenil-N-hidroxiopropanamida (MTC-96)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (73.50 mg, 0.54 mmol), DIPCDI (0.08 mL, 0.54 mmol), Fmoc-L-Phe (209.20 mg, 0.54 mmol) y **103** (137.70 mg, 0.54 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.1). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 191-193 °C. Rendimiento: 52.90 mg (71%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.68 (s, 1H, NHOH); 8.86 (d, 1H, OH, *J* = 1.3 Hz); 8.42 (d, 1H, CO-NH-CH, *J* = 8.5 Hz); 8.27 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.1 Hz); 8.09 - 7.94 (m, 3H, H_{arom}); 7.24 - 7.10 (m, 5H, H_{arom Bn}); 4.41 - 4.34 (ddd, 1H, CH, *J* = 5.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, *J* = 9.0 Hz); 3.77 (dt, 2H, N-CH2, *J* = 8.2 Hz, *J* = 15.8 Hz); 2.92 (dd, 1H, *J* = 13.6 Hz, *J* = 5.5 Hz); 2.73 (dd, 1H, *J* = 9.4 Hz, *J* = 13.6 Hz); 2.65 - 2.52 (ddd, 2H, CH-CH2-Bn, *J* = 8.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, *J* = 15.6 Hz).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.4 (CONHOH); 167.4 (CO); 158.1 (CO); 137.6 (C_{arom}); 136.6 (C_{arom}); 135.6 (CH_{arom}); 135.1 (CH_{arom}); 128.9 (CH_{arom}); 127.9 (CH_{arom}); 126.2 (C_{arom}); 126.1 (CH_{arom}); 124.9 (CH_{arom}); 121.4 (CH_{arom}); 51.7 (CH); 37.6 (N-CH2); 34.7 (CH2-CO); 33.9 (CH-CH₂-Bn).

HR LSIMS: Calculado para C₁₉H₁₉N₃O₆SNa (M+Na)⁺ 440.0892; encontrado 440.0898 (desviación -1.3 ppm).

5.3.2.4. Síntesis de derivados de benzo[d]isotiazoles: 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazoles

5.3.2.4.1. Síntesis de 6-(3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-136)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (49 mg, 0.36 mmol), DIPCDI (0.06 mL, 0.36 mmol) y **113** (105.33 mg, 0.36 mmol). Se recristaliza de DCM. Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 153-155 °C. Rendimiento: 22 mg (44%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.30 (s, 1H, NHOH); 7.94 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.1 Hz); 7.83 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.8 Hz); 7.65 (t, 1H, H_{arom}, *J* = 7.2 Hz); 7.41 (t, 1H, H_{arom}, *J* = 7.4 Hz); 3.78 (t, 2H, N-CH2, *J* = 7.0 Hz); 1.90 (t, 2H, CH2-CO, *J* = 7.3 Hz); 1.68 - 1.44 (m, 4H, CH2); 1.28 - 1.20 (m, 2H, CH2).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.8 (C_{ONHOH}); 164.2 (C_O); 140.2 (C_{arom}); 131.6 (C_H_{arom}); 125.5 (C_H_{arom}); 125.4 (C_H_{arom}); 124.1 (C_{arom}); 121.8 (C_H_{arom}); 42.7 (N-C_H₂); 32.0 (C_H₂-CO); 28.6 (C_H₂); 25.5 (C_H₂); 24.6 (C_H₂).

5.3.2.4.2. Síntesis de 6-[(benzo[*d*]isotiazol-3-il)oxa]-*N*-hidroxihexanamida (MTC-144)

Se sigue el procedimiento B descrito partiendo de HOAt (49 mg, 0.36 mmol), DIPCDI (0.06 mL, 0.36 mmol) y **112** (95.43 mg, 0.36 mmol). Se purifica por cromatografía flash usando como eluyente DCM:MeOH (10:0.3). Se obtiene un sólido blanco con p.f. = 105-107 °C. Rendimiento: 12 mg (24%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 10.32 (s, 1H, N_HOH); 8.65 (s, 1H, OH); 8.04 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.2 Hz); 7.87 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 8.0 Hz); 7.59 (dt, 1H, H_{arom}, *J* = 1.1 Hz, *J* = 7.0 Hz, *J* = 8.1 Hz); 7.44 (dt, 1H, H_{arom}, *J* = 0.8 Hz, *J* = 7.6 Hz, *J* = 8.1 Hz); 4.45 (t, 2H, O-CH₂, *J* = 6.6 Hz); 1.95 (t, 2H, CH₂-CO, *J* = 7.2 Hz); 1.79 (q, 2H, CH₂); 1.55 (q, 2H, CH₂); 1.44-1.34 (m, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): 168.9 (C_{ONHOH}); 162.4 (C_O); 150.9 (C_{arom}); 128.9 (C_H_{arom}); 124.8 (C_H_{arom}); 124.5 (C_{arom}); 122.4 (C_H_{arom}); 120.9 (C_H_{arom}); 68.3 (O-C_H₂); 32.0 (C_H₂-CO); 28.0 (C_H₂); 25.0 (C_H₂); 24.7 (C_H₂).

HR LSIMS: Calculado para C₁₃H₁₇N₂O₃S (M+H)⁺ 281.0960; encontrado 281.0967 (desviación -2.6 ppm).

5.4. Método general de obtención de ácidos hidroxámicos utilizando el reactivo unido a fase sólida PS-IIDQ

A 93.75 mg (0.15 mmoles) de resina PS-IIDQ (carga 1.6 mmoles/g) se adiciona 1 mL de DCM anhidro y se deja en agitación durante 18 h. A continuación se le adiciona una solución de 0.1 mmol del ácido ó el aminoácido correspondiente disueltos en 0.5 mL de DCM (si el ácido no es soluble se usa acetonitrilo anhidro) y se mantiene la agitación durante 2 h. Transcurrido este tiempo se adiciona una solución de 16 mg (0.1 mmol) de *O*-bencil hidroxilamina y 34 µL (0.2 mmoles) de DIPEA en 0.5 mL de DCM anhidro. Tras un tiempo de reacción de 1h 30 min., la suspensión se filtra, para eliminar los restos de resina y se lava con DCM. El filtrado se lava con 2 x 5 mL de HCl 0.5 M, 1 x 5 mL de agua destilada, 2 x 5 mL de NaHCO₃ al 10 % y finalmente con 1 x 5 mL de agua destilada. La

fase orgánica se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se concentra a vacío. Se obtiene un crudo que se analiza por HPLC y se determinan sus propiedades espectroscópicas de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

Condiciones de análisis por HPLC:

Flujo 0.8 mL/min.; columna XTerra RP C18 4.7x250 mm; detector $\lambda = 214$ nm; Disolvente A (agua:ACN 80:20 +0.1% TFA), Disolvente B (agua:ACN 20:80 +0.1% TFA); isocrática disolvente A 5 min.; gradiente de A a B 20 min.

5.5. Ensayos biológicos de los compuestos sintetizados.

5.5.1. Ensayos de inhibición sobre la enzima aislada.

Todos los compuestos finales sintetizados descritos en la sección anterior, han sido estudiados como inhibidores de las HDAC. Para ello se utilizó el kit de valoración colorimétrico para inhibición de HDAC denominado AK-501, suministrado por la empresa Biomol.

El procedimiento del ensayo se realiza en dos pasos. (Figura 5.1) En el primero, *el sustrato Color de Lys[®]*, que contiene un grupo lisina acetilado, es incubado con una muestra de extracto nuclear de HeLa (línea celular de cáncer cervical humano), rico en actividad HDAC. En el segundo paso la mezcla anterior, se trata con *el revelador Color de Lys[®]*, con capacidad para reaccionar con los grupos amino libres, lo que causa un incremento en la intensidad del color cuantificable a 405 nm. Existe una correlación lineal entre la absorción y la desacetilación de la lisina dentro de los límites instrumentales. Si se adiciona un inhibidor de las enzimas HDAC se producirá una disminución de la desacetilación del sustrato y, por tanto, una disminución de la intensidad del color observada a 405 nm.

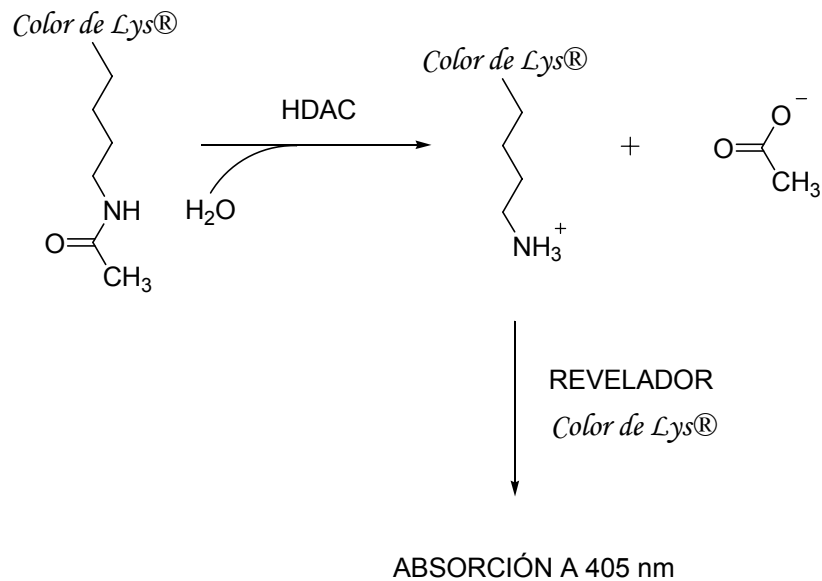


Figura 5.1. Esquema de reacción del kit de valoración colorimétrico para inhibición de HDAC

El procedimiento de trabajo es como sigue:

1. Se adiciona el buffer, el TSA diluido (250 nM) y el inhibidor a ensayar a las concentraciones deseadas en los pozos apropiados de la placa (Véase Tabla 5.1).
2. Se adiciona el extracto de Hela, excepto al control sin enzima.
3. Las placa y *el sustrato Color de Lys[®]* se termostatan a 37 °C.
4. Se inician las reacciones adicionando el sustrato 0.4 mM (concentración final del sustrato 0.2 mM) en cada pozo y se agita.
5. Se deja un tiempo de reacción de 20 minutos a 37 °C.
6. Se añade *el revelador Color de Lys[®]*, preparado aproximadamente 30 minutos antes de su utilización (se utiliza el revelador diluido 20 veces con una cantidad de TSA que resulte en una concentración final de 1µM en el ensayo). Se deja reaccionar 15 minutos a 37 °C.
7. Se realiza la lectura a 405 nm.

Tabla 5.1

Pozos	Buffer	HeLa	Inhibidor (x5)	Sustrato (x2)	Revelador
Blanco	25 µL	0	0	25 µL	50 µL
Control	20 µL	5 µL	0	25 µL	50 µL
TSA	10 µL	5 µL	10 µL	25 µL	50 µL
Inhibidor	10 µL	5 µL	10 µL	25 µL	50 µL

Para la determinación las constantes de inhibición 50% (CI_{50}) se procedió a la determinación de la inhibición enzimática utilizando 5 concentraciones diferentes y progresivas de cada inhibidor. A continuación se llevó a cabo un análisis de regresión lineal de % de inhibición enzimática frente a concentración de inhibidor y la ecuación obtenida se utilizó para el cálculo de la CI_{50} . Todos los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces y los datos utilizados estuvieron dentro del 95% de concordancia.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

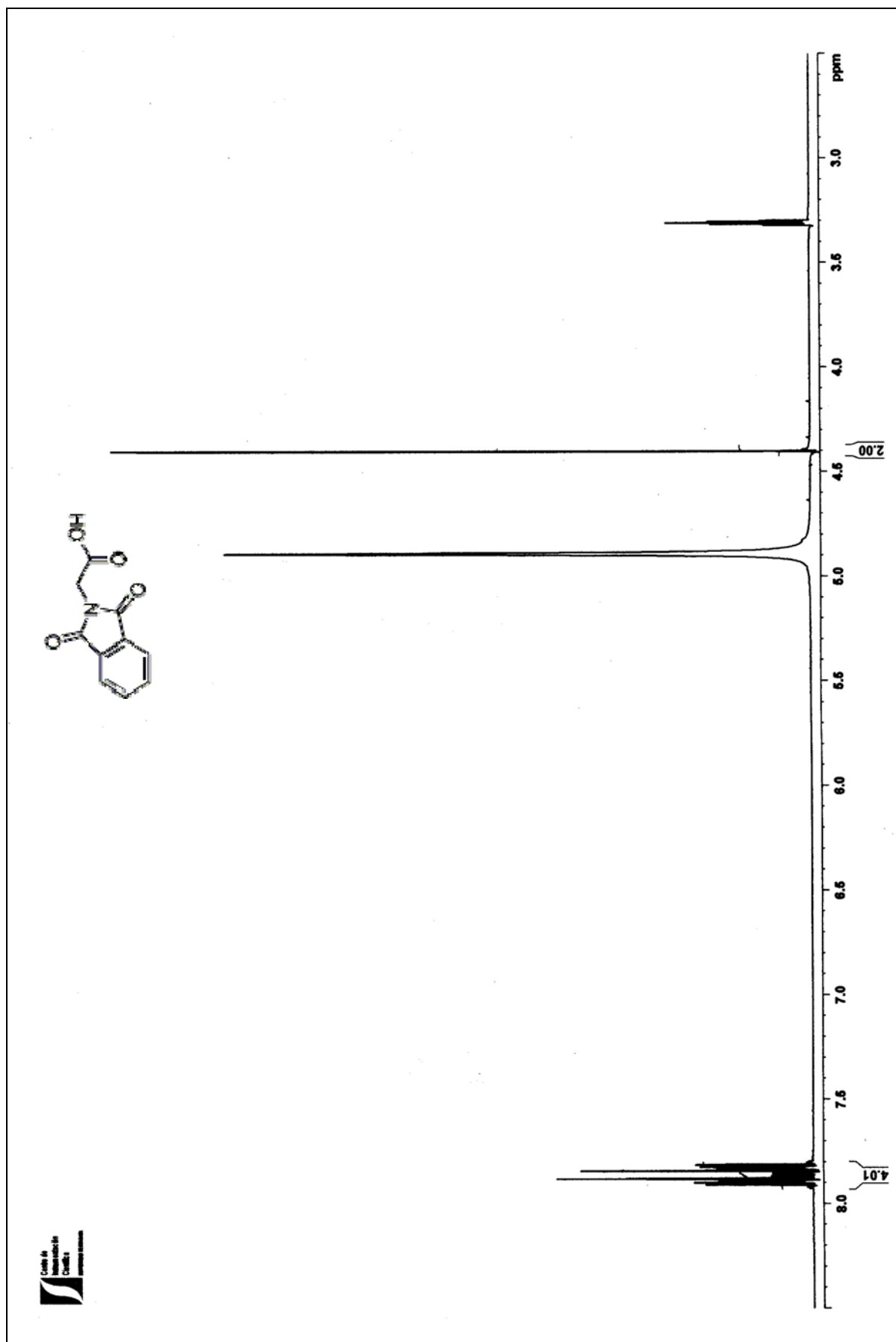
1. La síntesis de derivados del ácido hidroxámico en solución partiendo de hidroxilamina en forma de clorhidrato presenta una serie de inconvenientes derivados de la presencia del grupo hidroxilo sin proteger. Normalmente se obtienen mejores resultados partiendo de hidroxilaminas O-protegidas.
2. La síntesis de derivados del ácido hidroxámico en fase sólida evita los problemas encontrados en solución debido a que la resina actúa como grupo protector del grupo hidroxilo de la hidroxilamina. Estos resultados se confirman partiendo de dos resinas de síntesis en fase sólida diferentes: a) la resina N-Fmoc hidroxilamina clorotritilo, y b) la resina de Wang funcionalizada con hidroxilamina a través del grupo hidroxilo.
3. El uso de la resina de Wang funcionalizada con hidroxilamina para la síntesis de derivados con un grupo amida en el espaciador no es adecuado. En los intermedios de síntesis unidos a esta resina y que presentan estas características se produce una ciclación intramolecular y la pérdida del derivado de ácido

hidroxámico. Esta reacción secundaria no se ha observado en el caso de la resina N-Fmoc hidroxilamina clorotritilo.

4. El reactivo de acoplamiento unido a fase sólida 1-isobutoxicarbonil-2-isobutoxi-1,2-dihidroquinolina (IIDQ) permite la síntesis de derivados del ácido hidroxámico de forma eficaz y con una alta pureza. Esta metodología se puede desarrollar en paralelo para la obtención de bibliotecas de compuestos.
5. Los datos de inhibición enzimática sobre las HDAC obtenidos permiten el establecimiento de las siguientes relaciones estructura-actividad:
 - a) La introducción de sustituyentes (-CH₃ y -NO₂) en la posición 5 de la ftalimida permite un aumento de la potencia inhibitoria sobre las HDAC
 - b) La sustitución de la cadena metilénica del espaciador por un grupo bencilo está permitida.
 - c) El reemplazo de una cadena metilénica de cinco miembros por una de seis permite un aumento de la actividad inhibitoria para el caso de las cabezas lipófilas descritas en esta memoria. Una cadena metilénica inferior a cinco unidades da lugar a una disminución de la actividad inhibitoria.
 - d) La cabeza lipófila en el compuesto de referencia tipo ftalimida se puede sustituir por un derivado de 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol, dando lugar a un aumento de la inhibición enzimática.
 - e) La reducción del derivado 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol hasta 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol donde el espaciador queda unido al nitrógeno del heterociclo da lugar a la pérdida de actividad inhibitoria.
 - f) Se puede sustituir la cabeza lipófila de los derivados tipo ftalimida por compuestos 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol O-alquilados.
6. Los derivados del tipo 3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol O-alquilado constituyen un nuevo tipo estructural para el desarrollo de nuevos inhibidores de las HDAC.

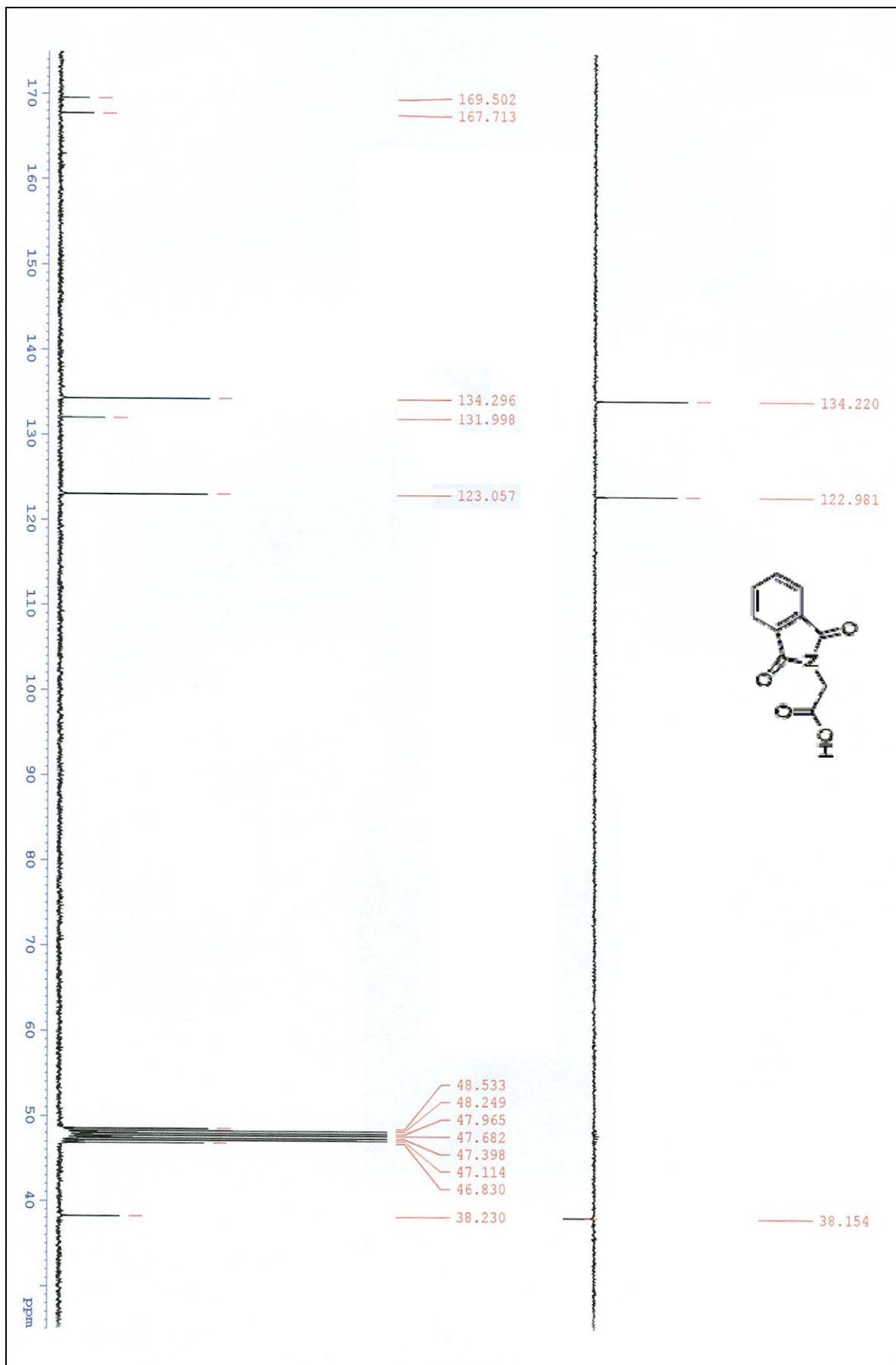
7. La variabilidad permitida en la zona correspondiente a la cabeza lipófila en este tipo de compuestos se explica en base a la existencia de un bolsillo voluminoso a la entrada del canal hidrofóbico en el sitio activo enzimático de las HDAC.
8. Se han obtenido siete compuestos con valores de CI_{50} inferiores a 2 μM frente a la enzima aislada. Entre ellos, los compuestos más potentes son **MTC-124**, **MTC-141** y **MTC-144** con CI_{50} de 0.25, 0.18 y 0.21 μM , respectivamente.

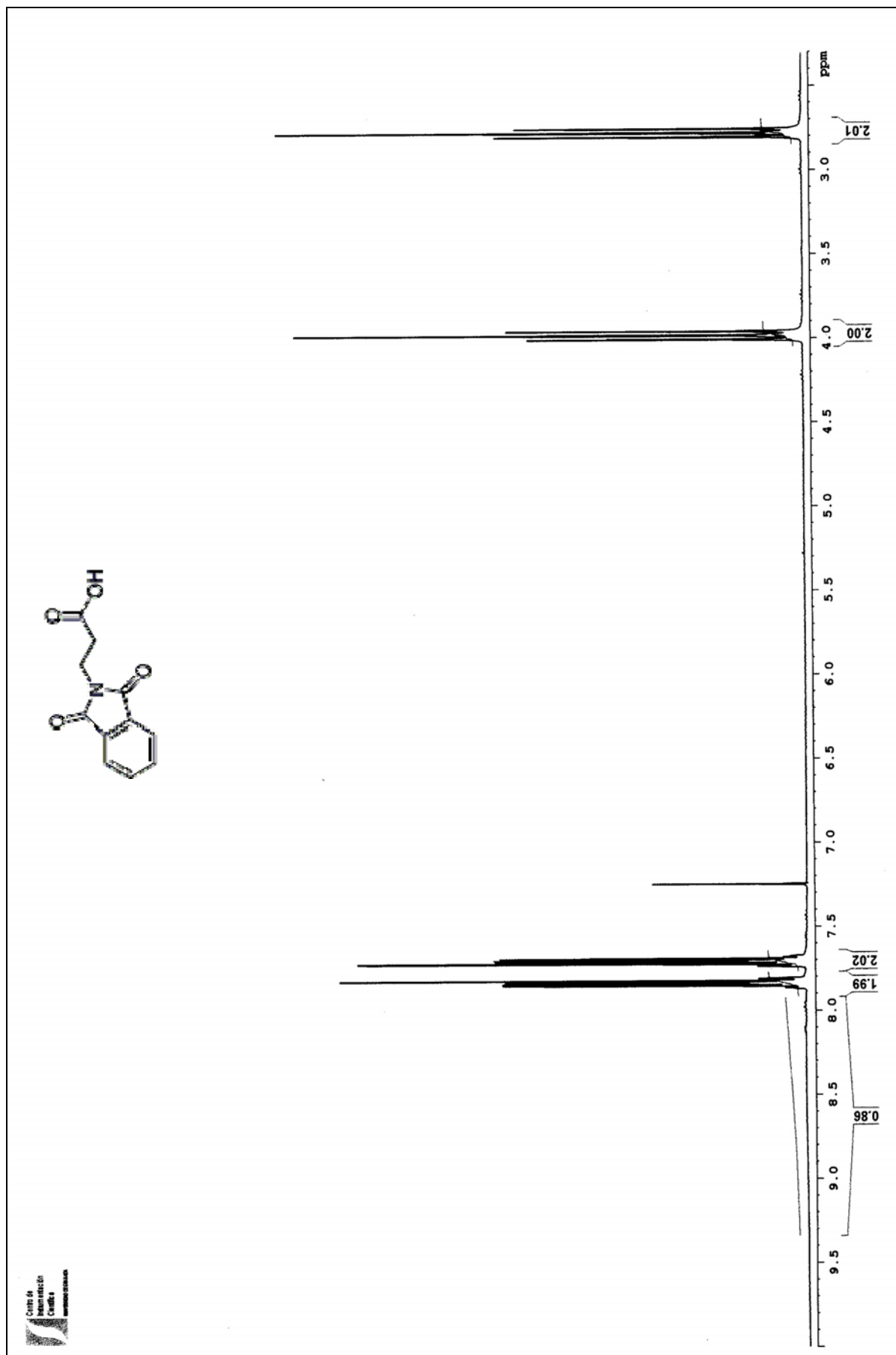
7. APÉNDICE



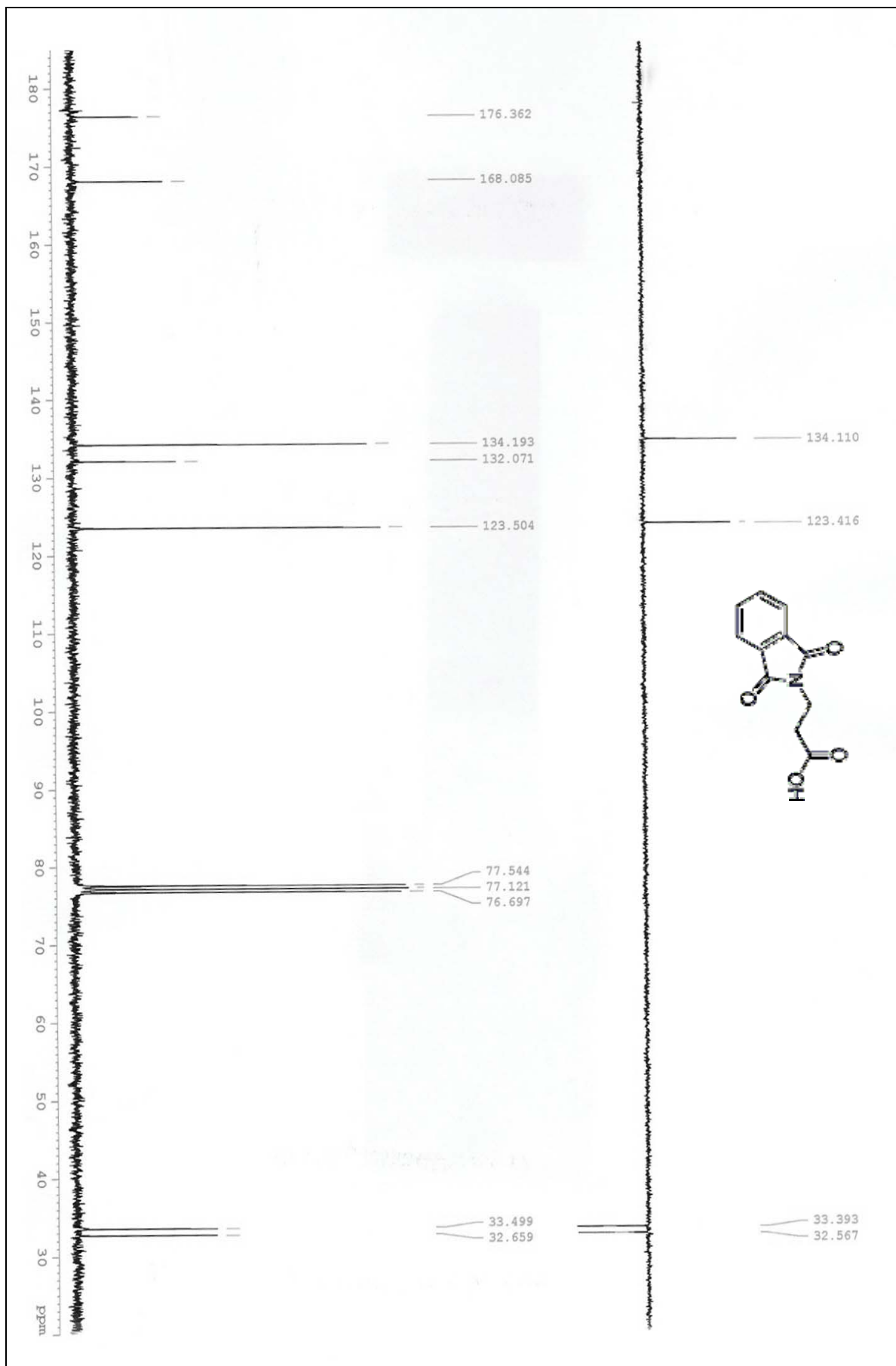
¹H-RMN: Ácido (1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) acético (72)

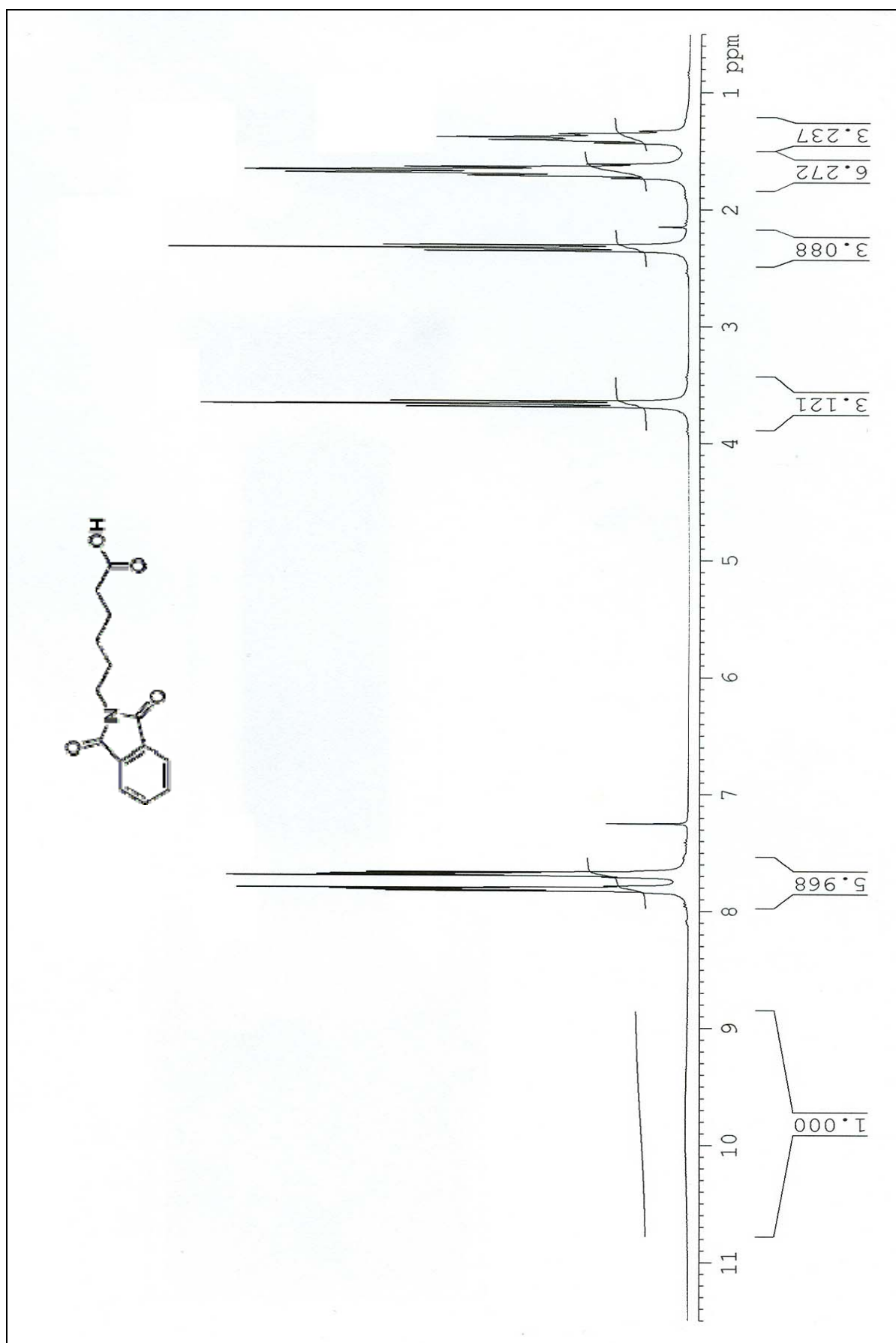
¹³C-RMN: Acido (1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) acético (72)





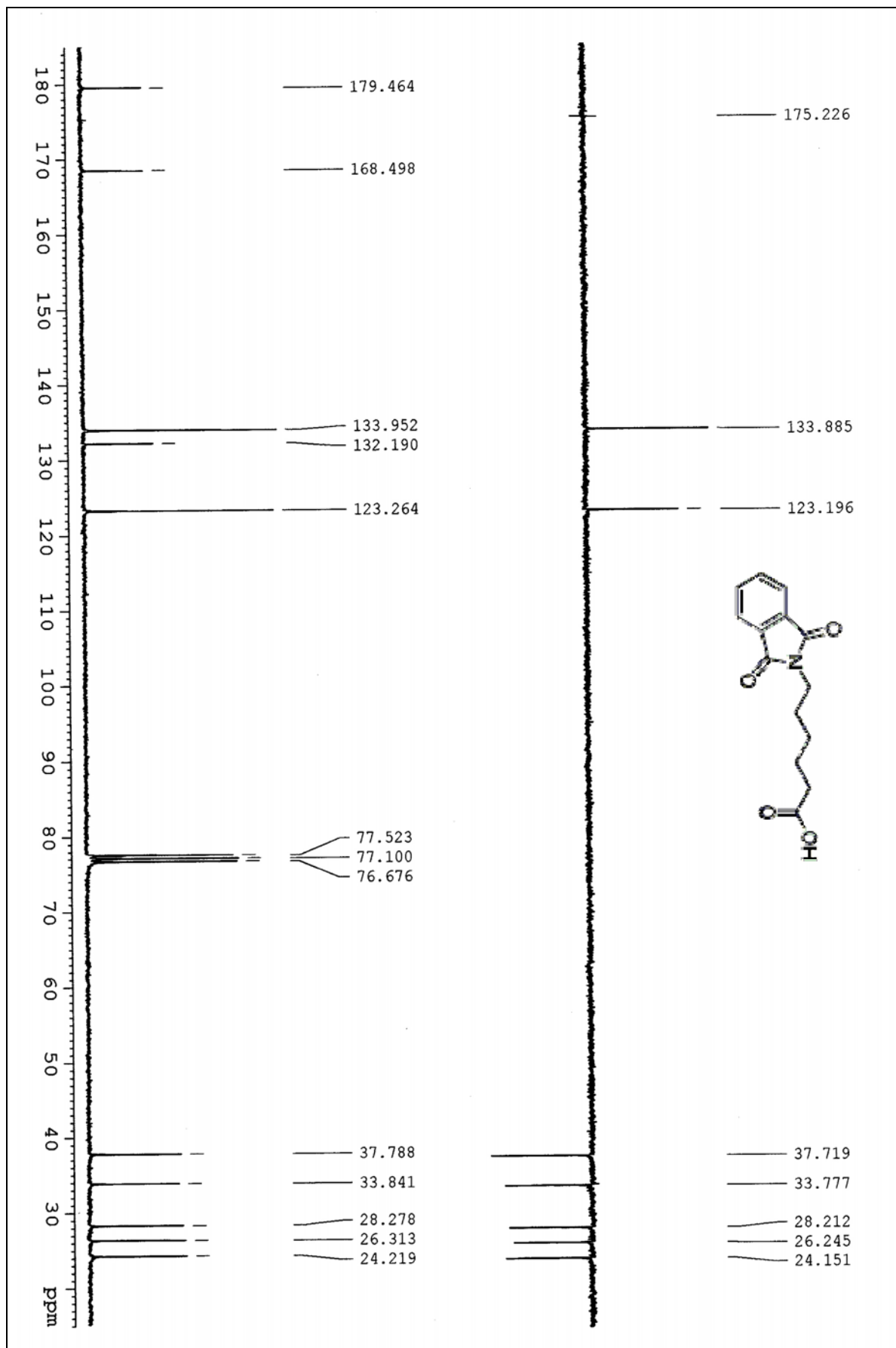
¹³C-RMN: Acido 3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) propiónico (73)

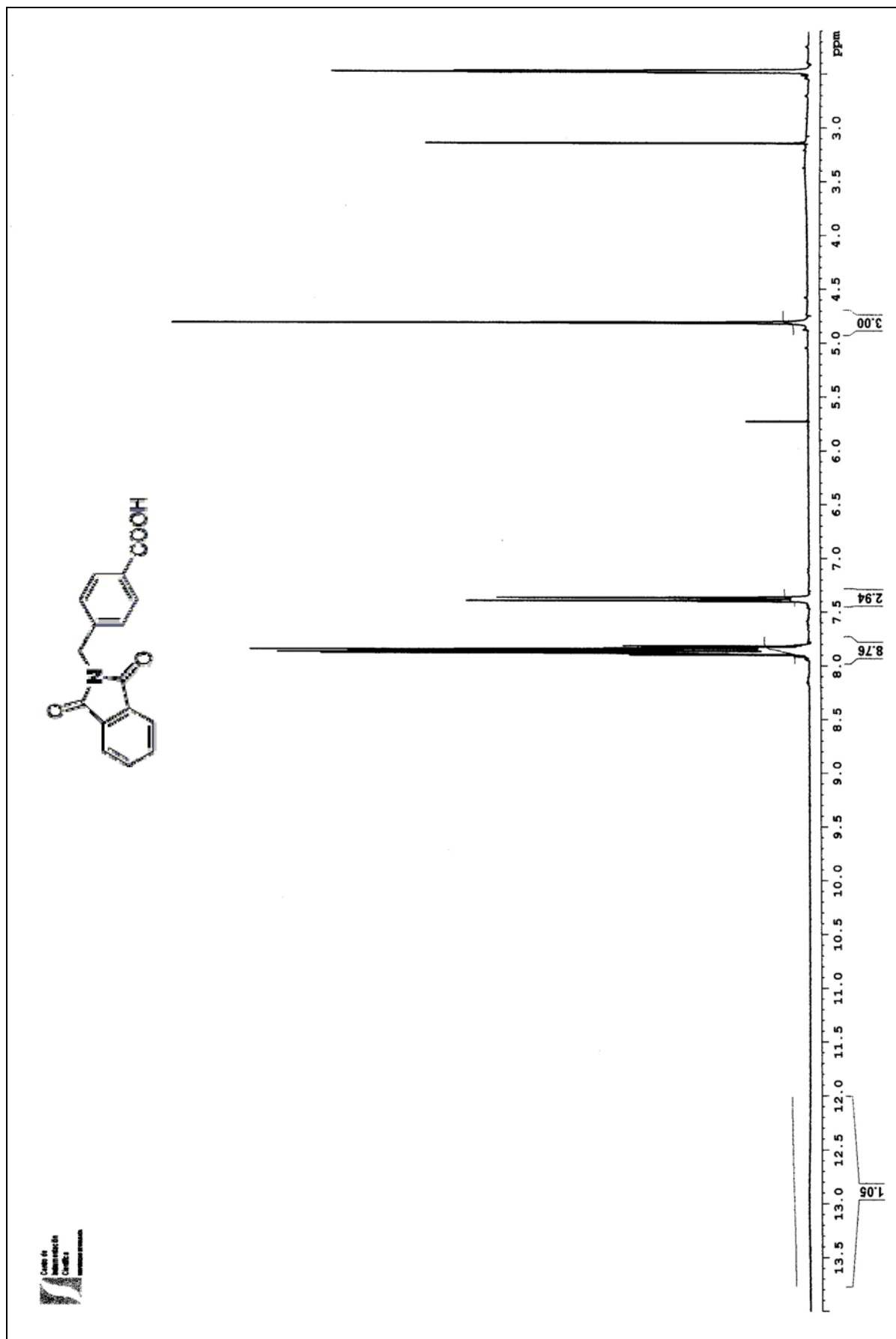




¹H-RMN: Ácido 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isindol-2-il) hexanoico (74)

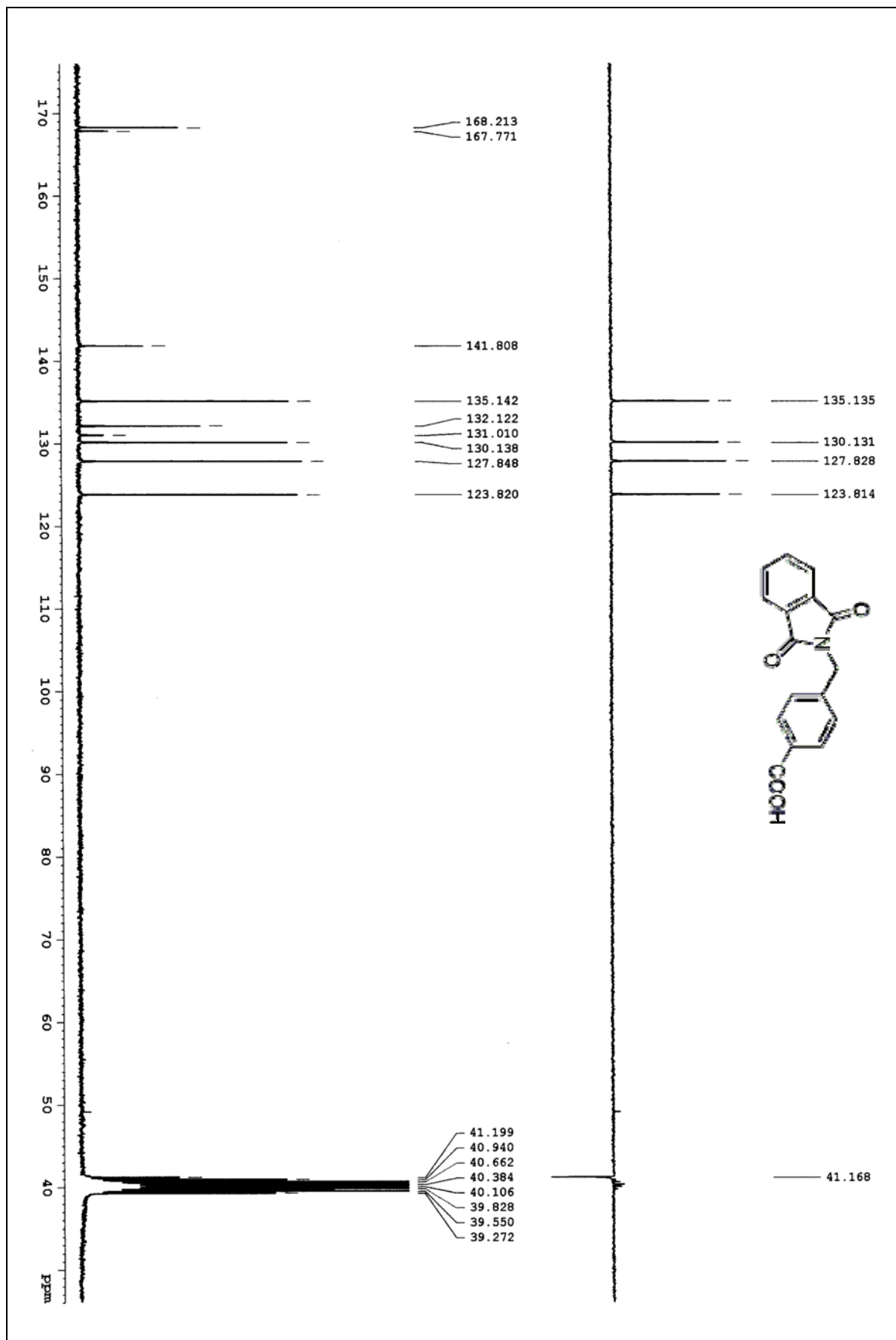
¹³C-RMN: Acido 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il) hexanoico (74)

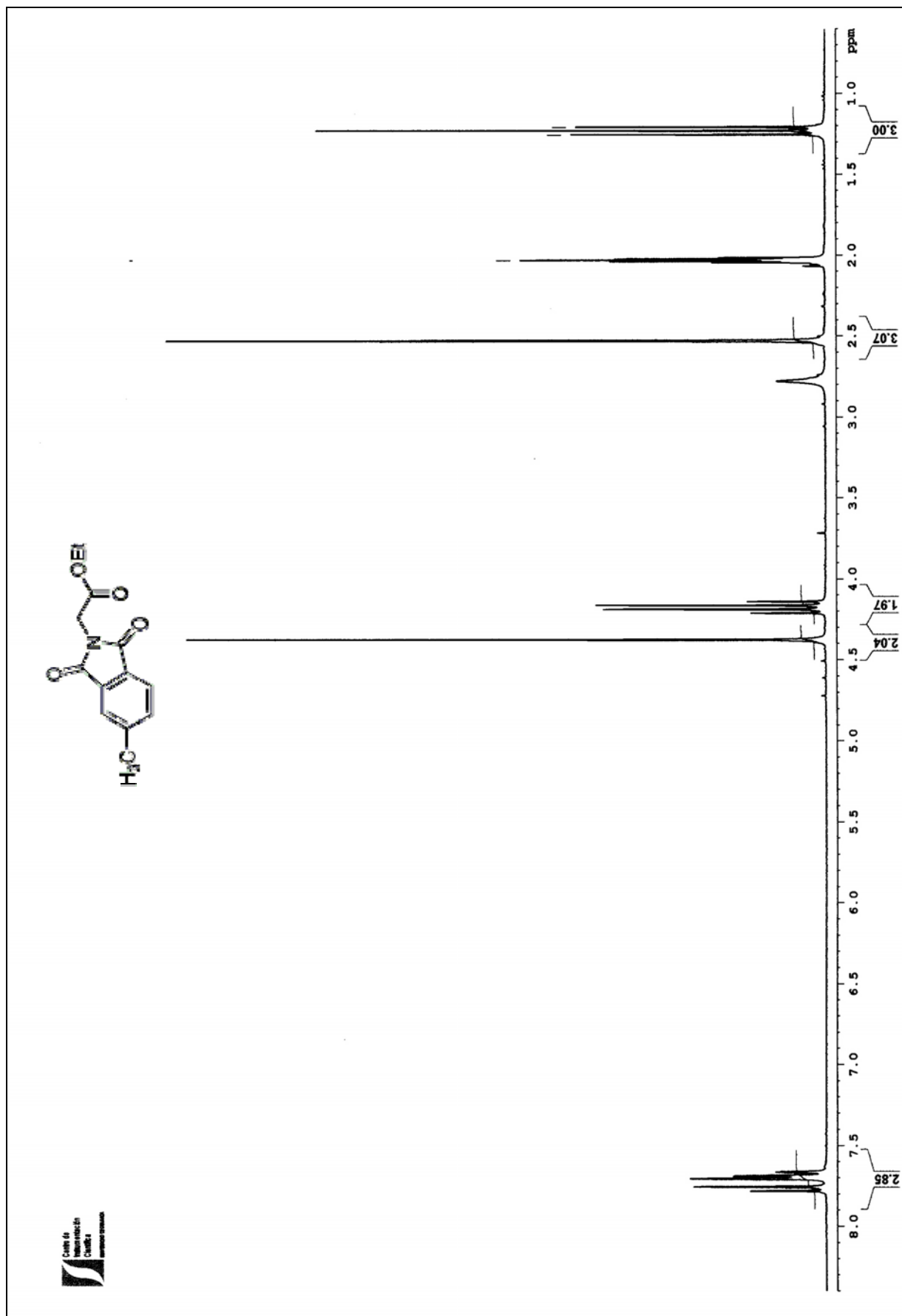




¹H-RMN: Ácido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il-metil) benzoico (75)

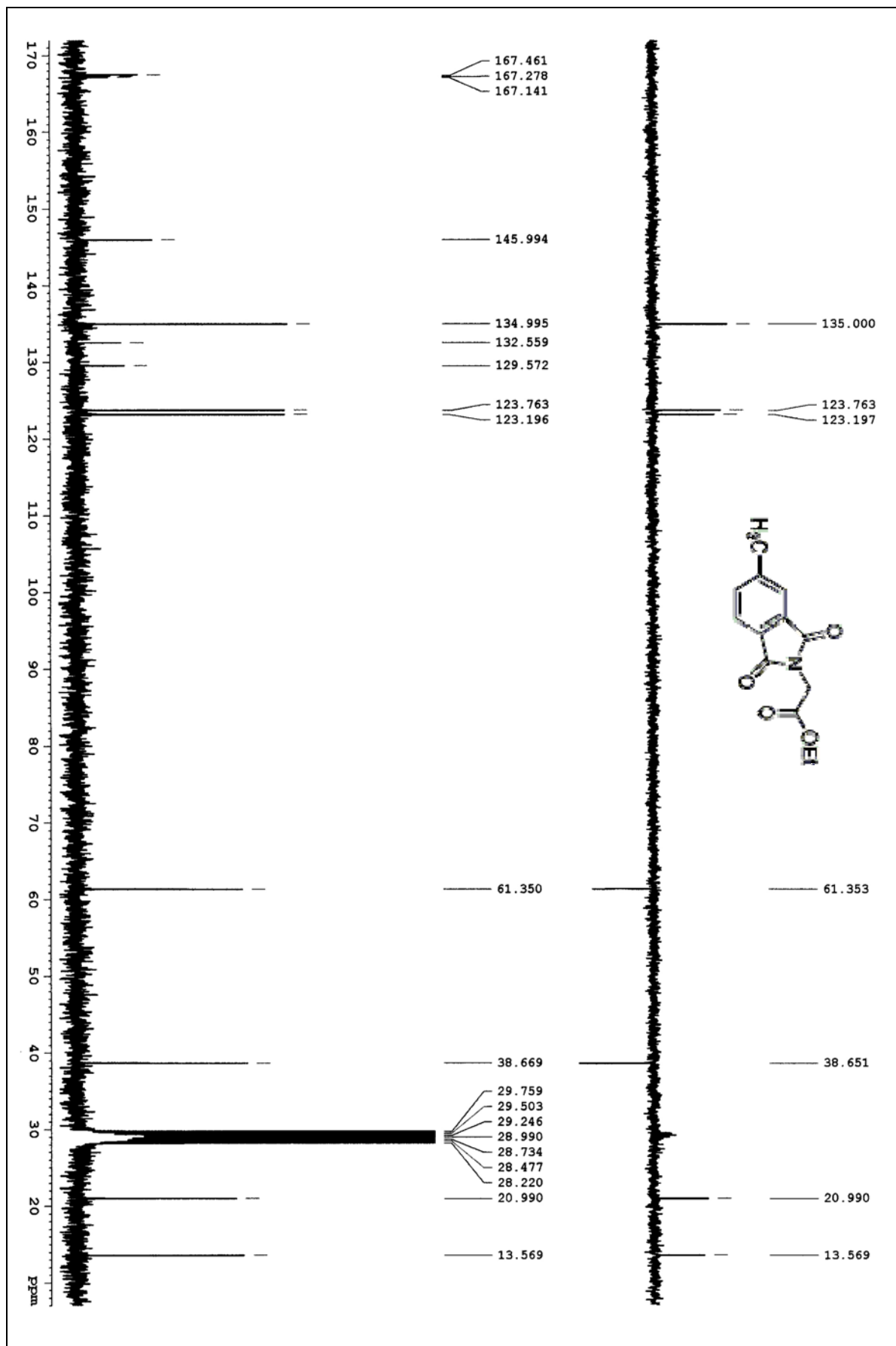
¹³C-RMN: Acido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il-metil) benzoico (75)

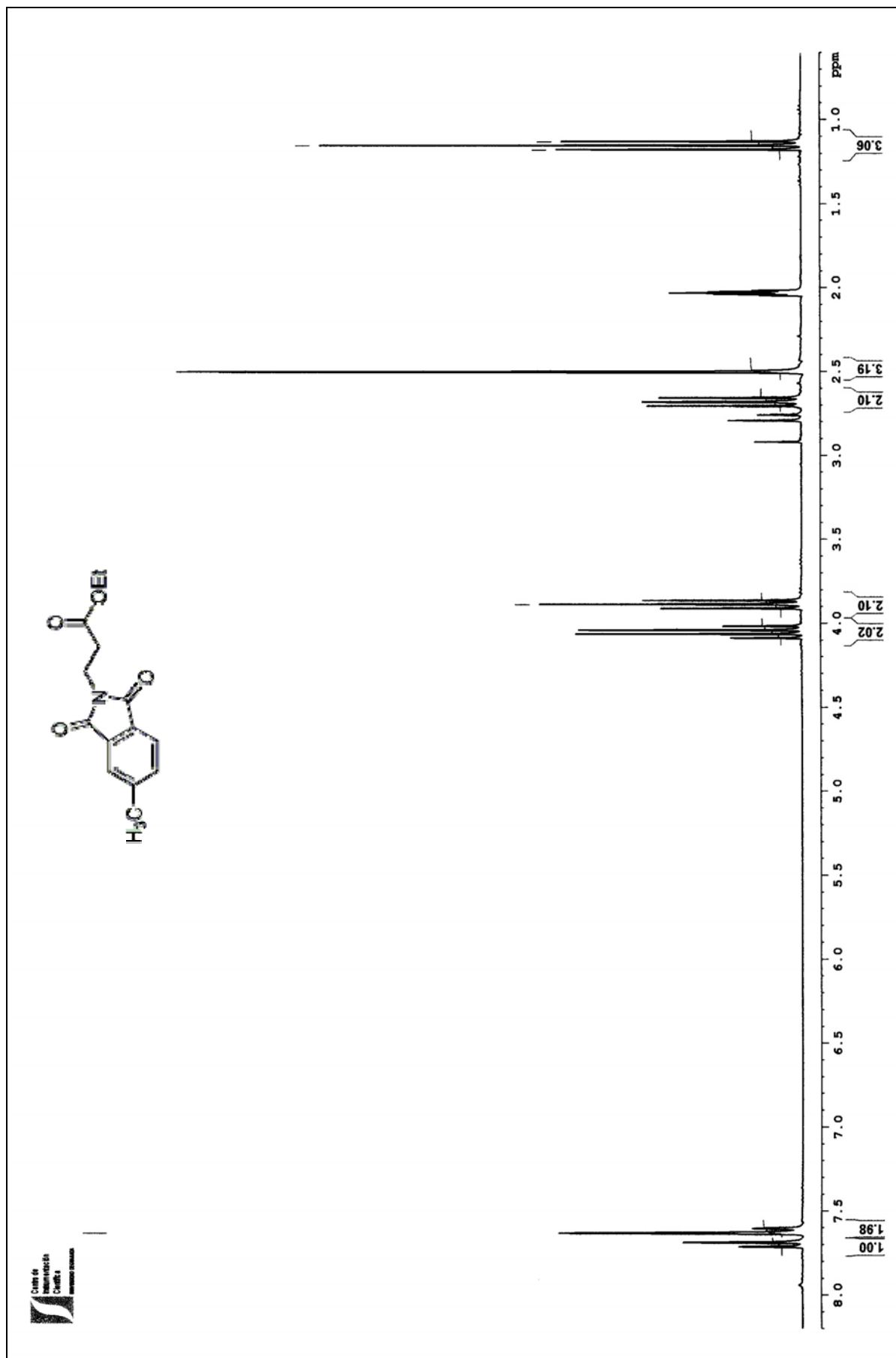




¹H-RMN: 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acetato de etilo (76)

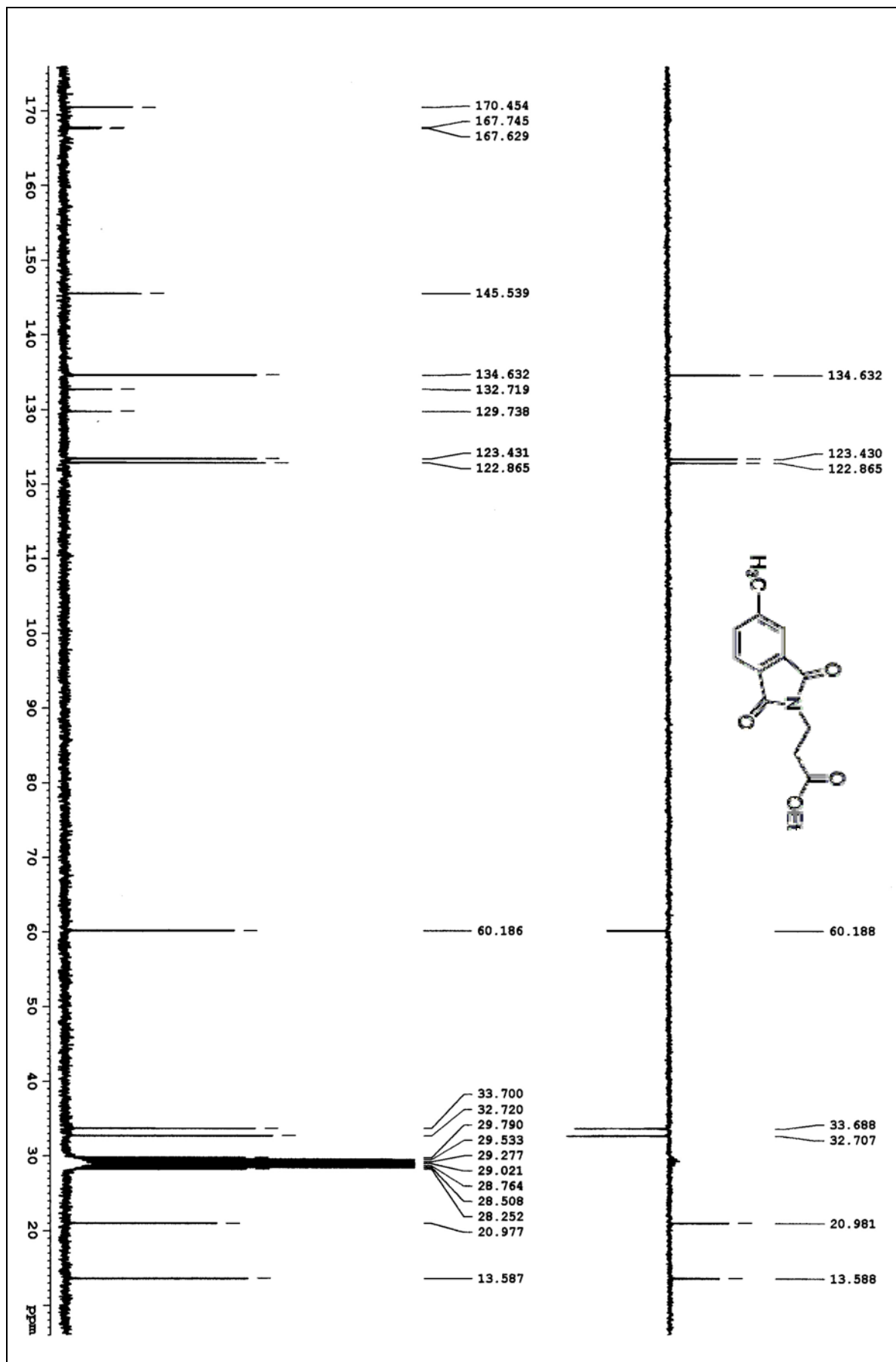
¹³C-RMN : 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acetato de etilo (76)

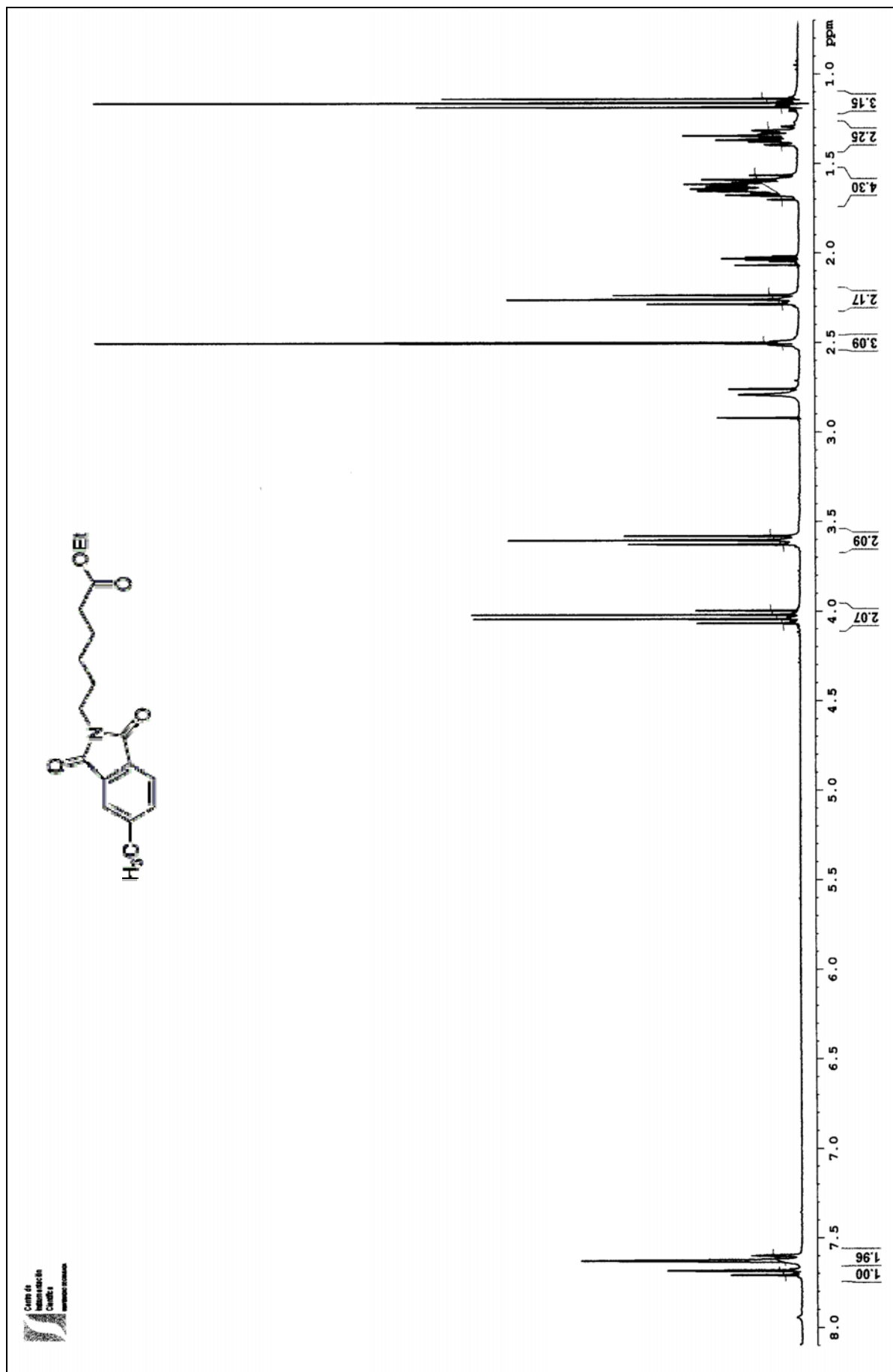




¹H-RMN: 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propionato de etilo (77)

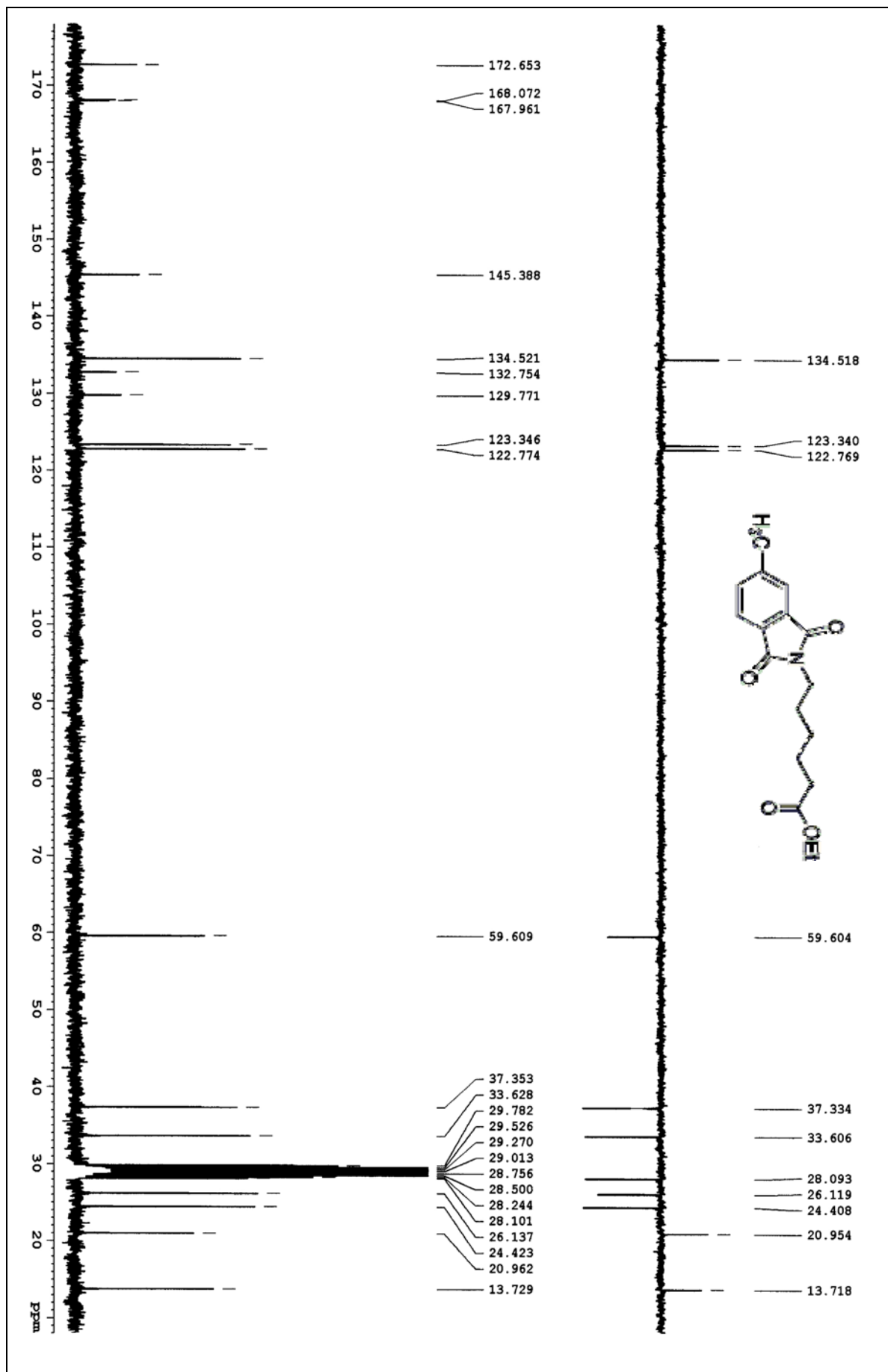
¹³C-RMN : 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propionato de etilo (77)

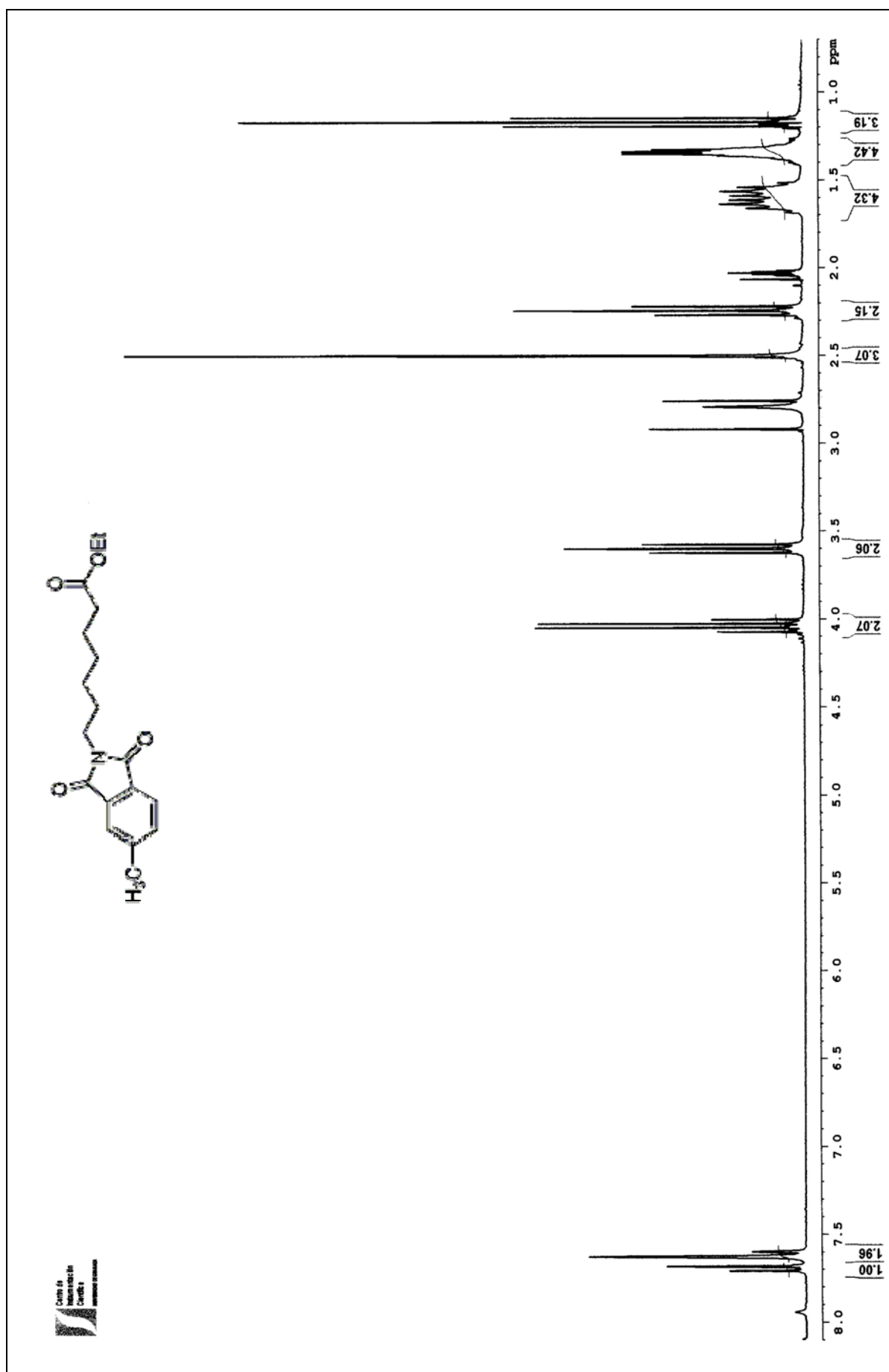




¹H-RMN: 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoato de etilo (78)

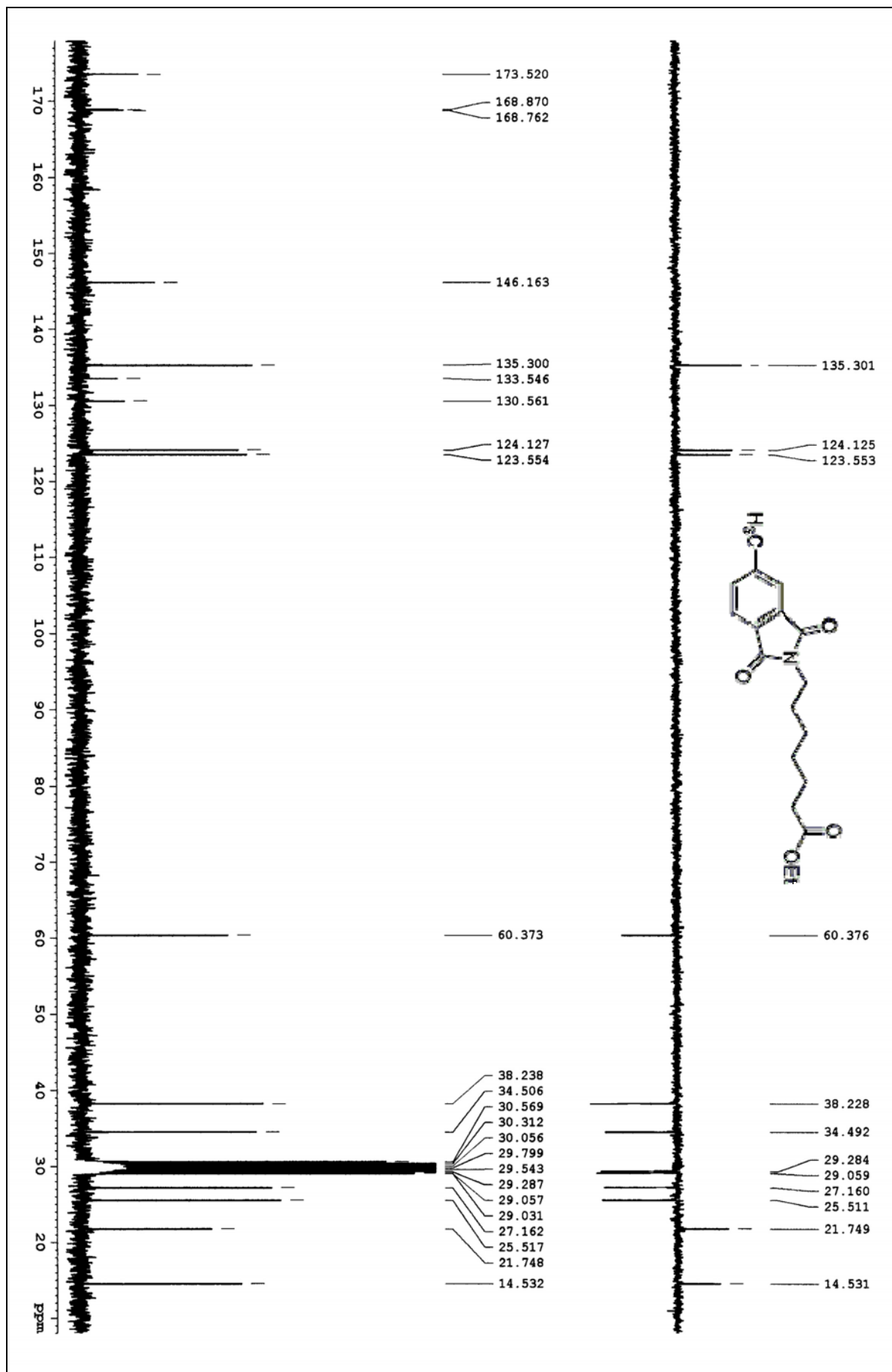
¹³C-RMN : 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoato de etilo (78)

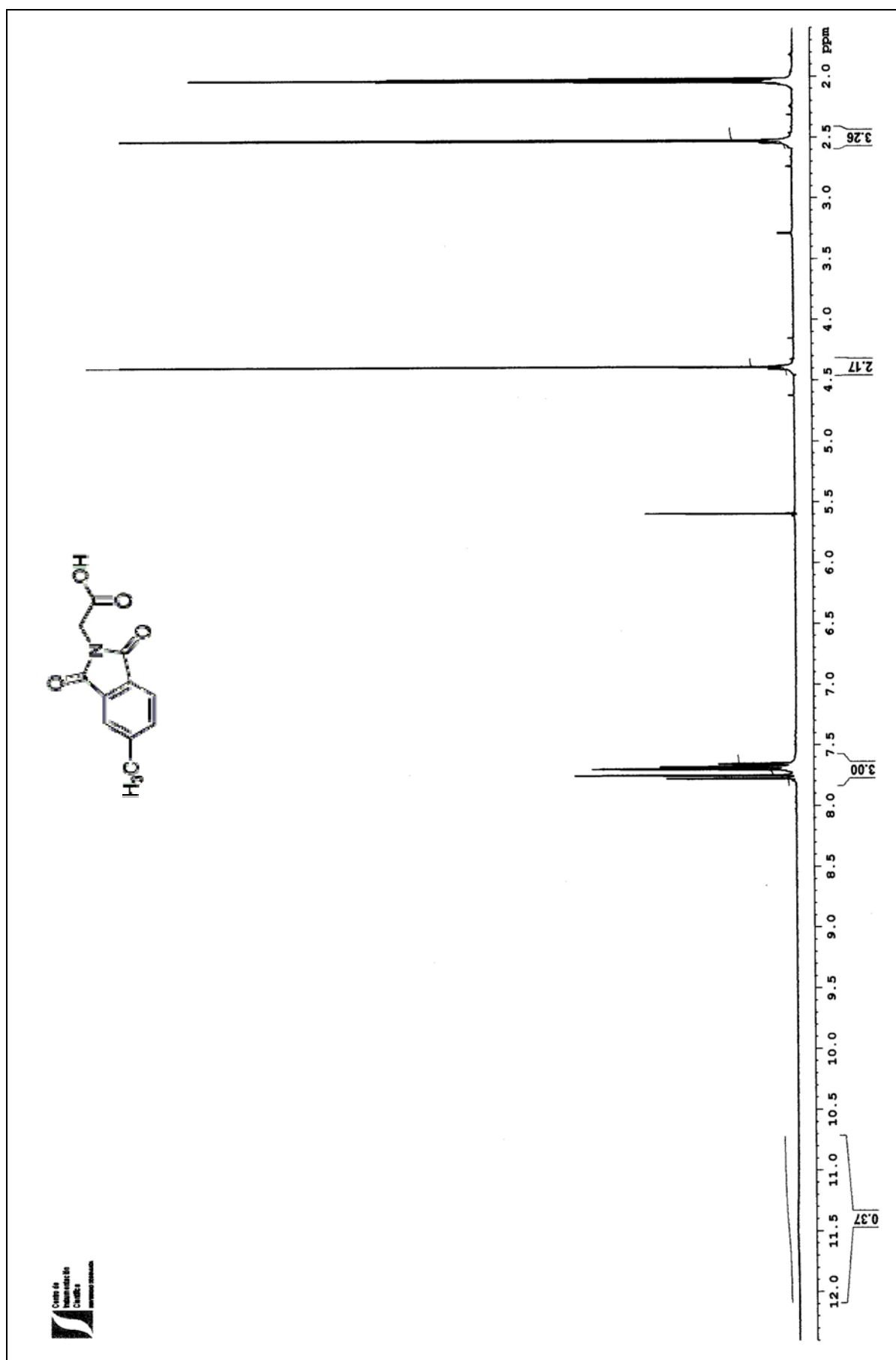




¹H-RMN: 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoato de etilo (79)

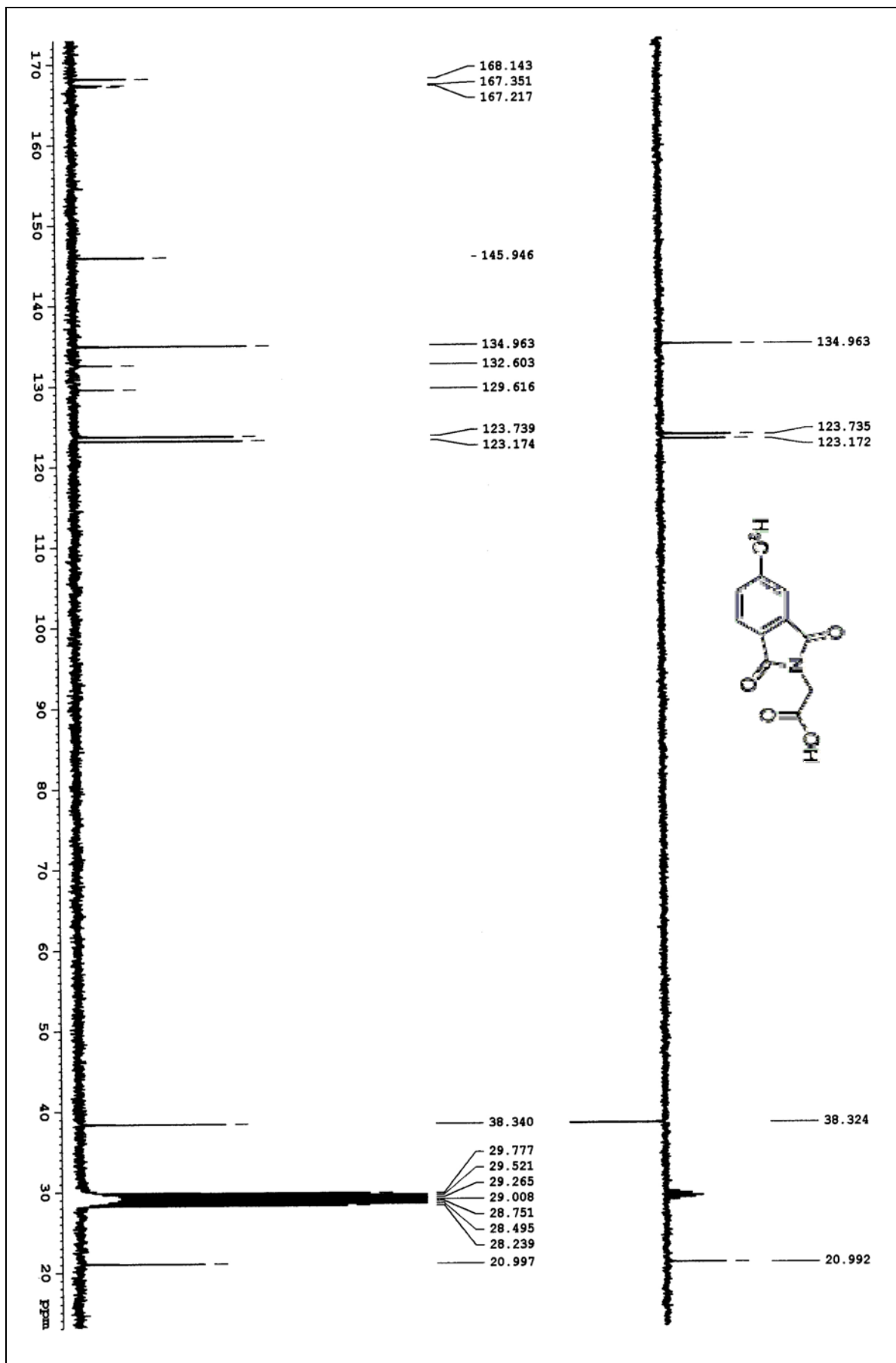
¹³C-RMN: 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoato de etilo (79)

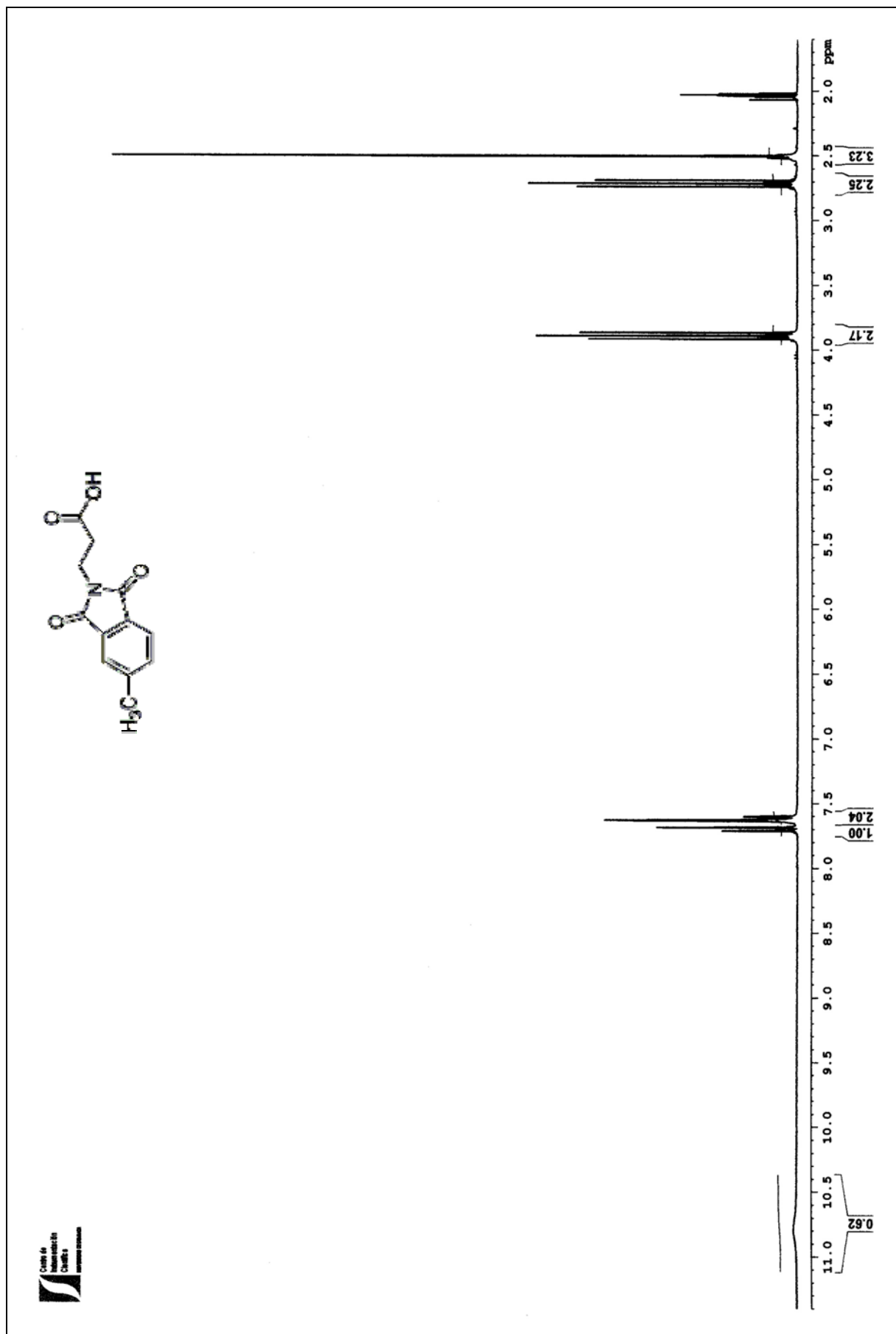




¹H-RMN: Acido 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acético (80)

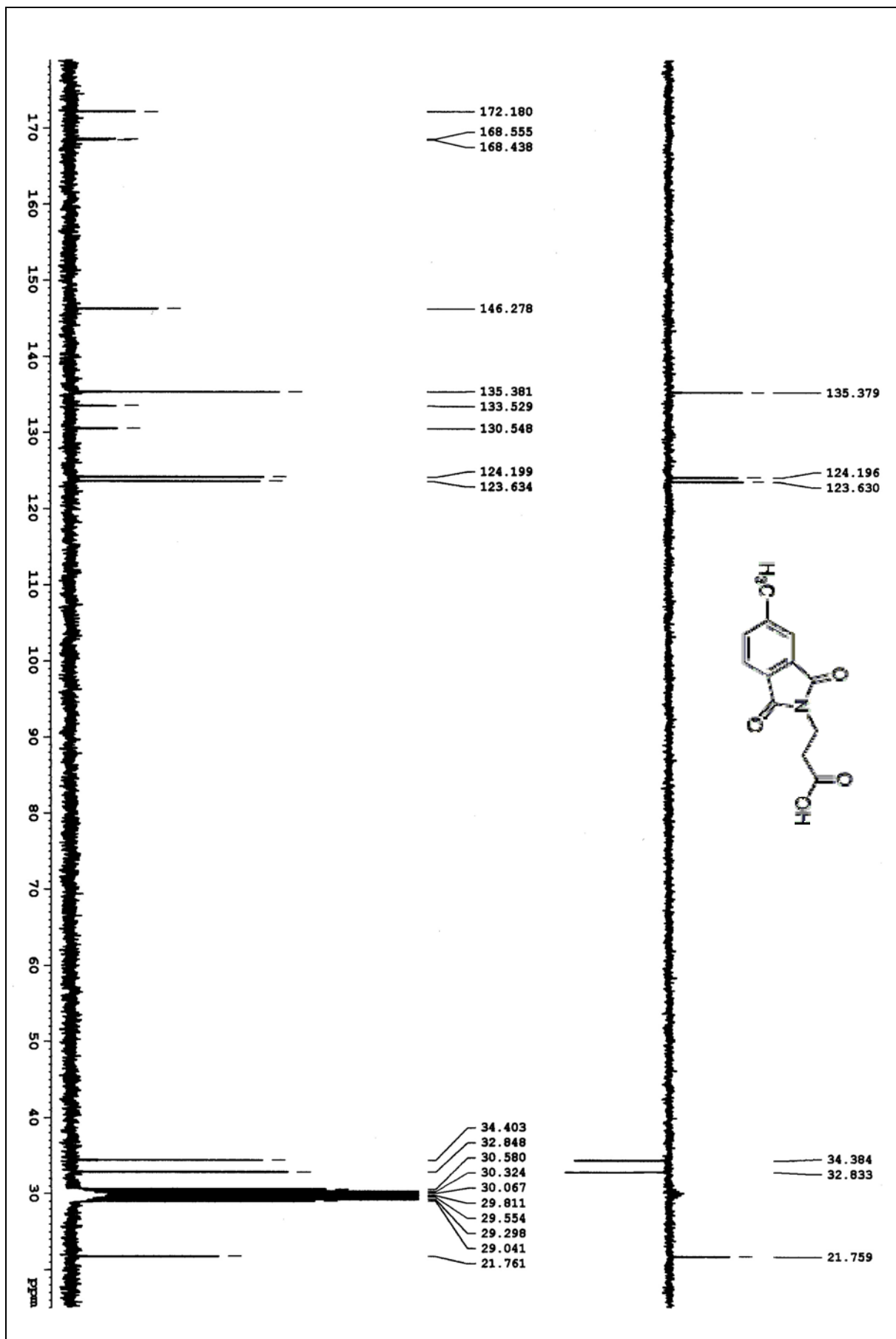
¹³C-RMN: Acido 2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) acético (80)

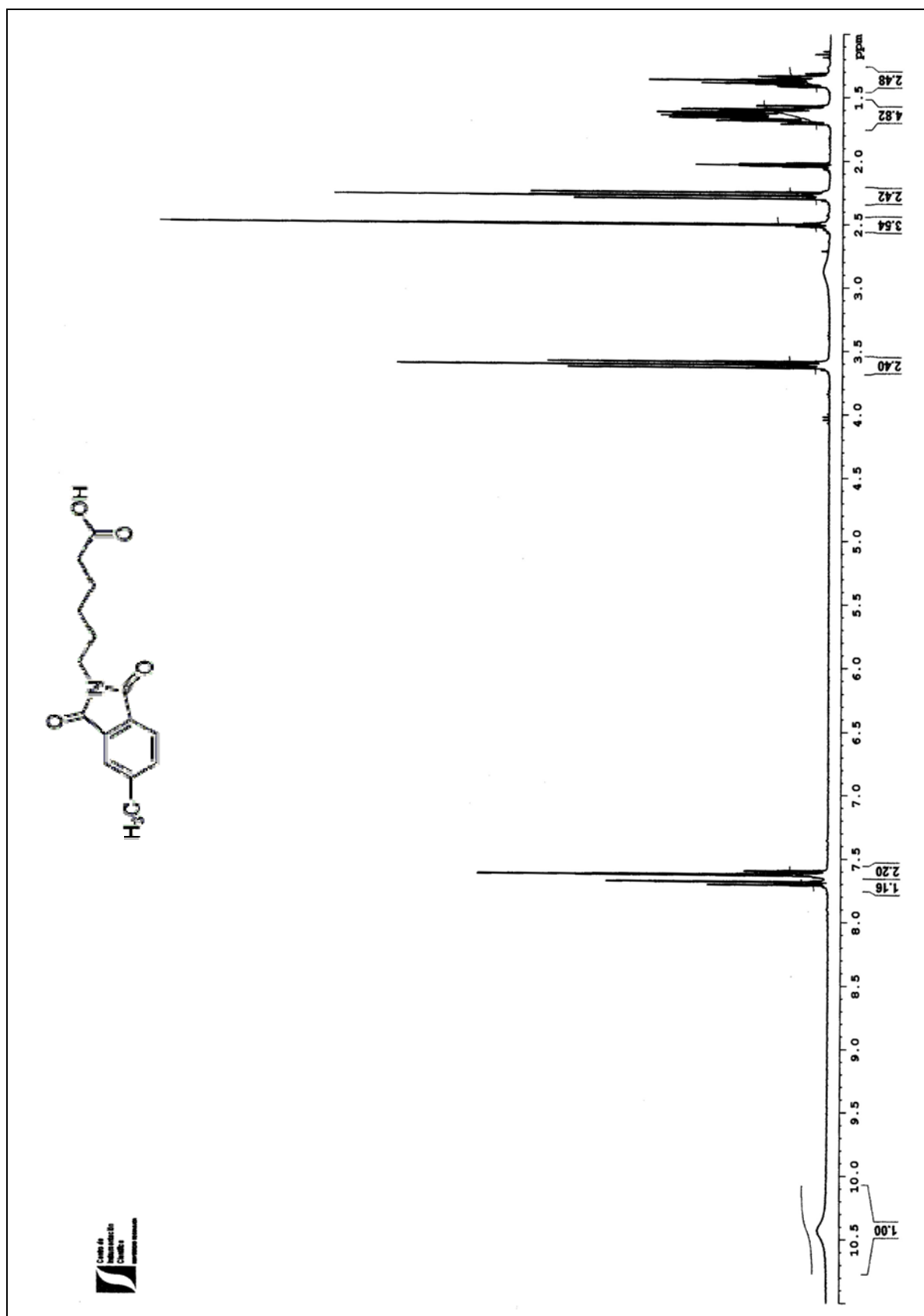




¹H-RMN: Ácido 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propiónico (81)

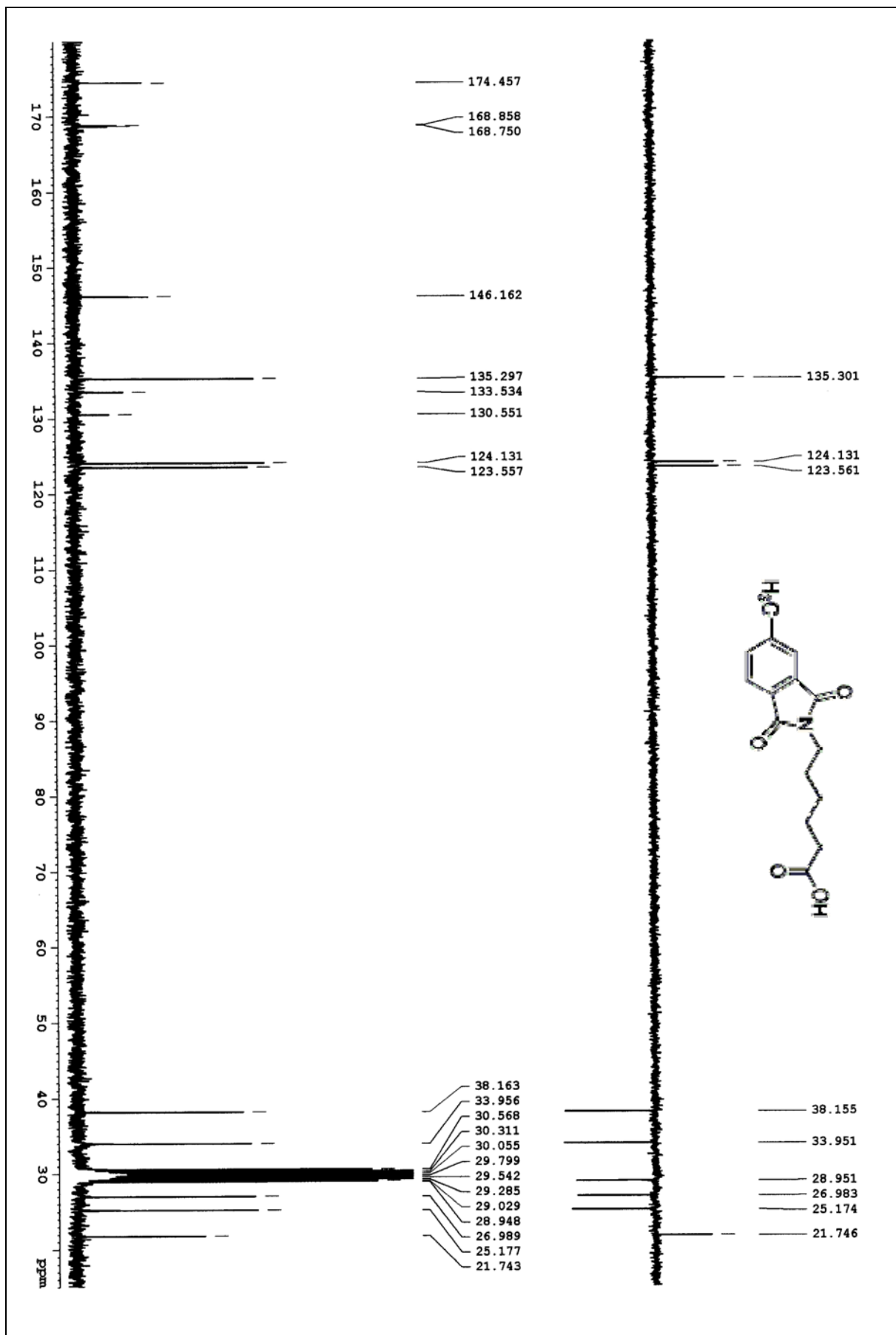
¹³C-RMN: Acido 3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) propiónico (81)

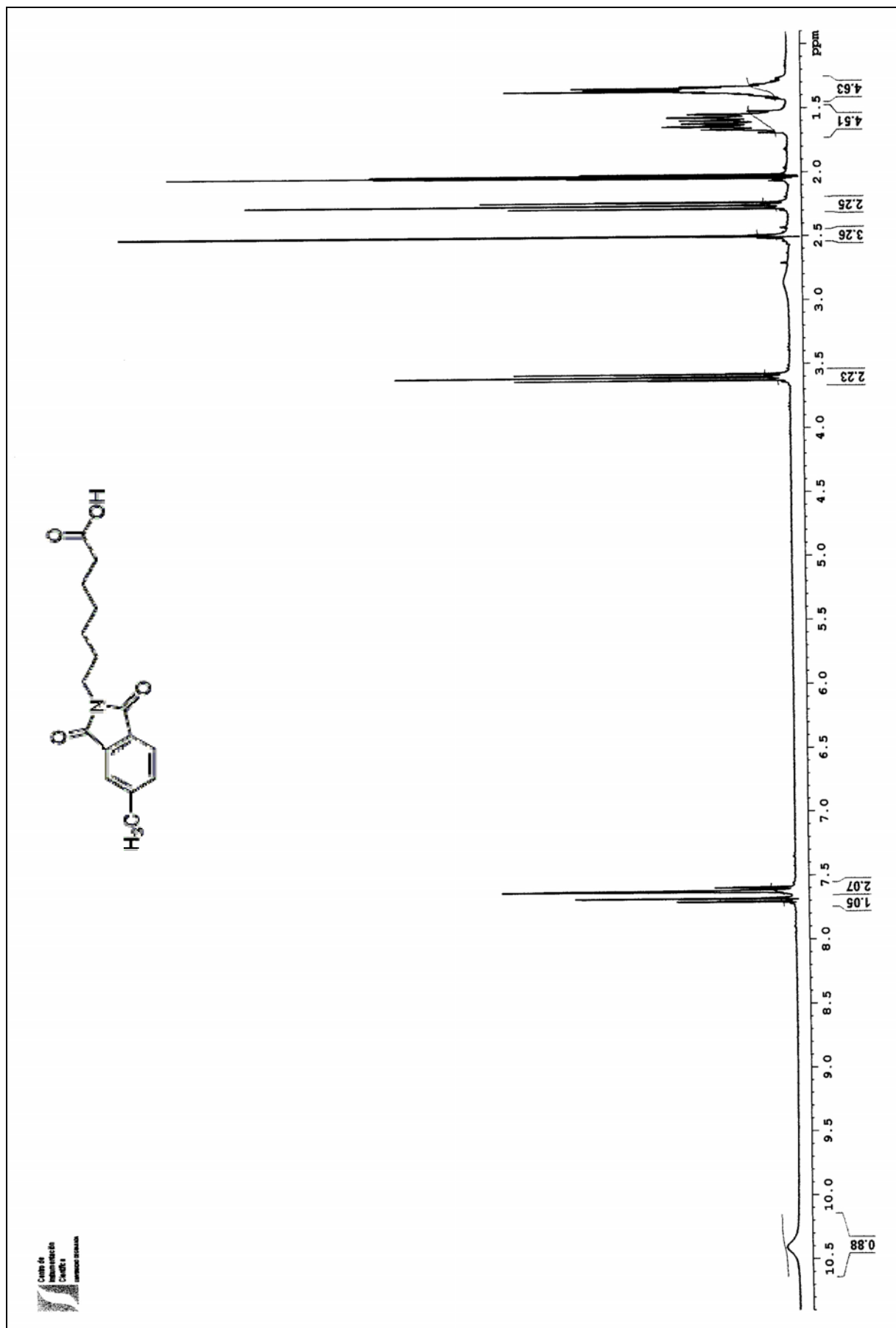




¹H-RMN: Acido 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoico (**82**)

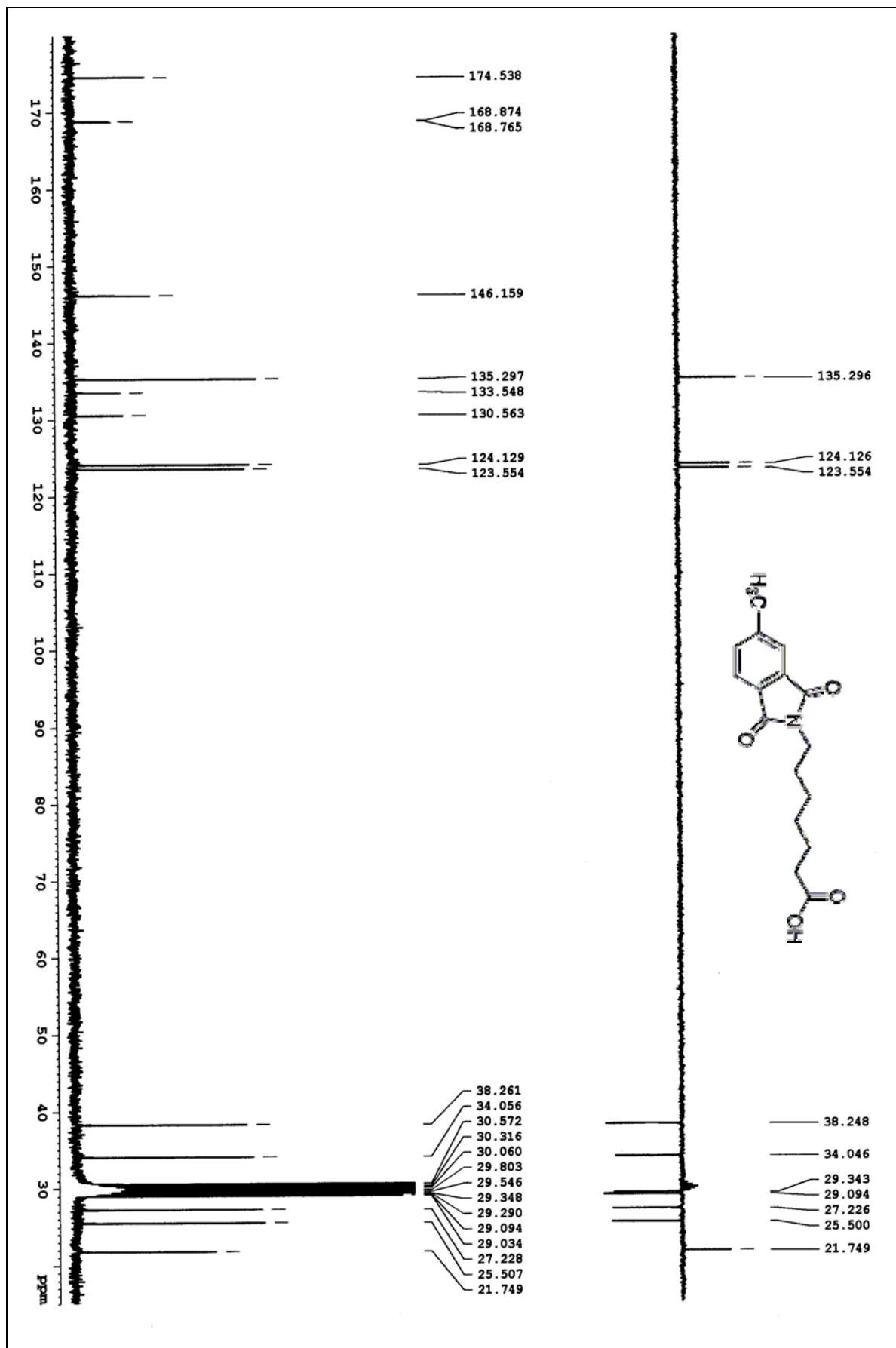
¹³C-RMN: Acido 6-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) hexanoico (82)

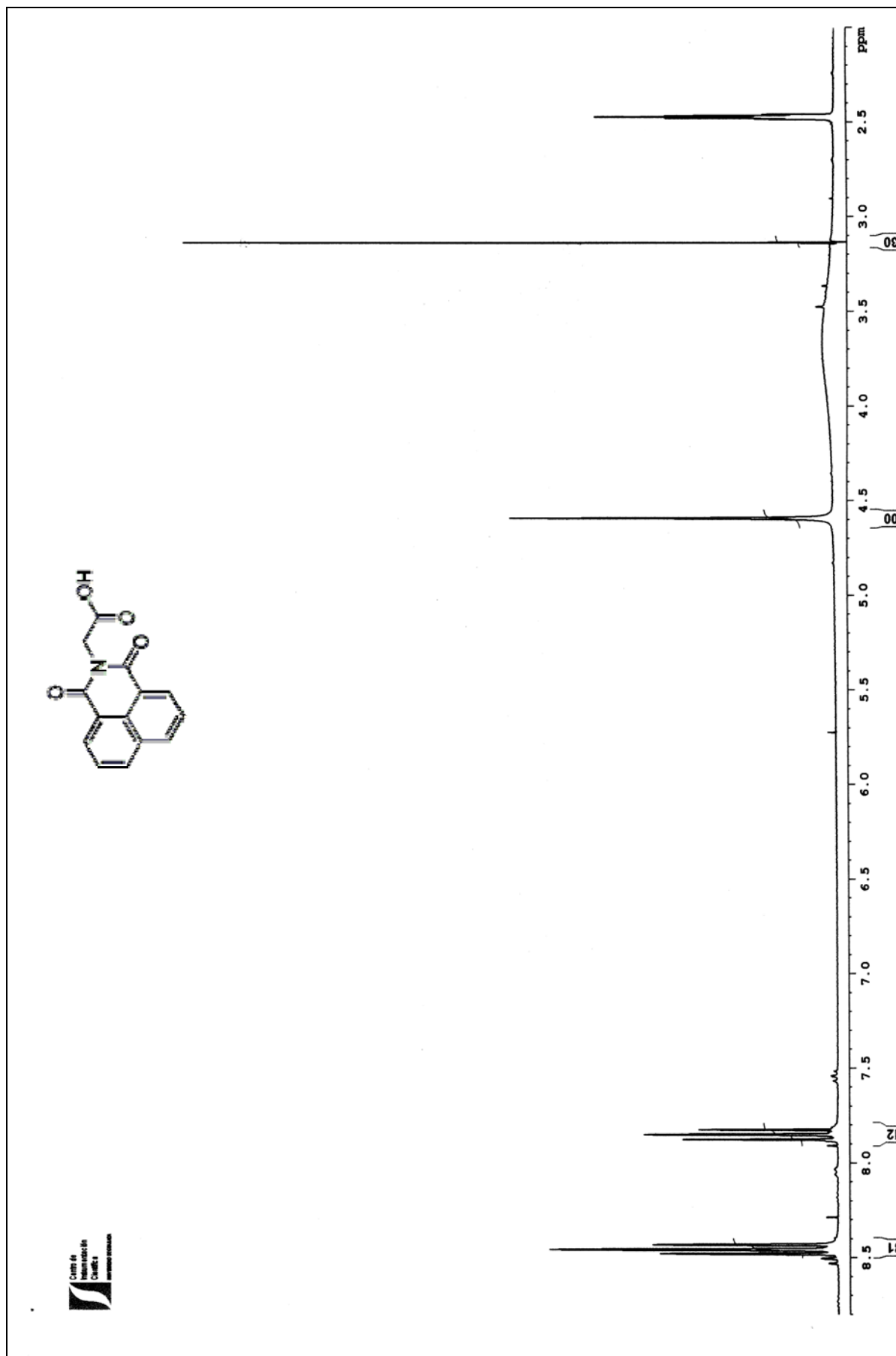




¹H-RMN: Ácido 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoico (83)

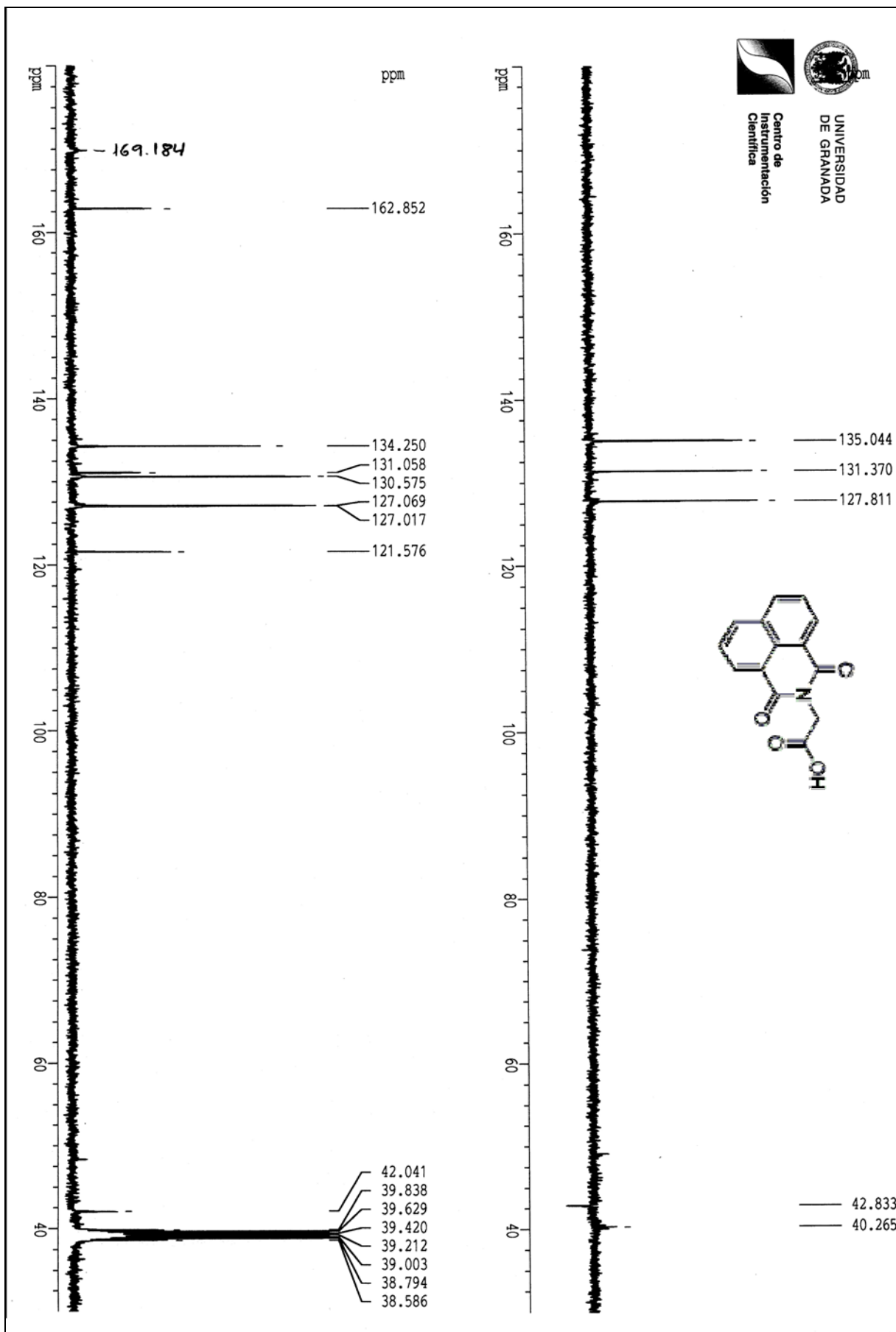
¹³C-RMN: Acido 7-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il) heptanoico (83)

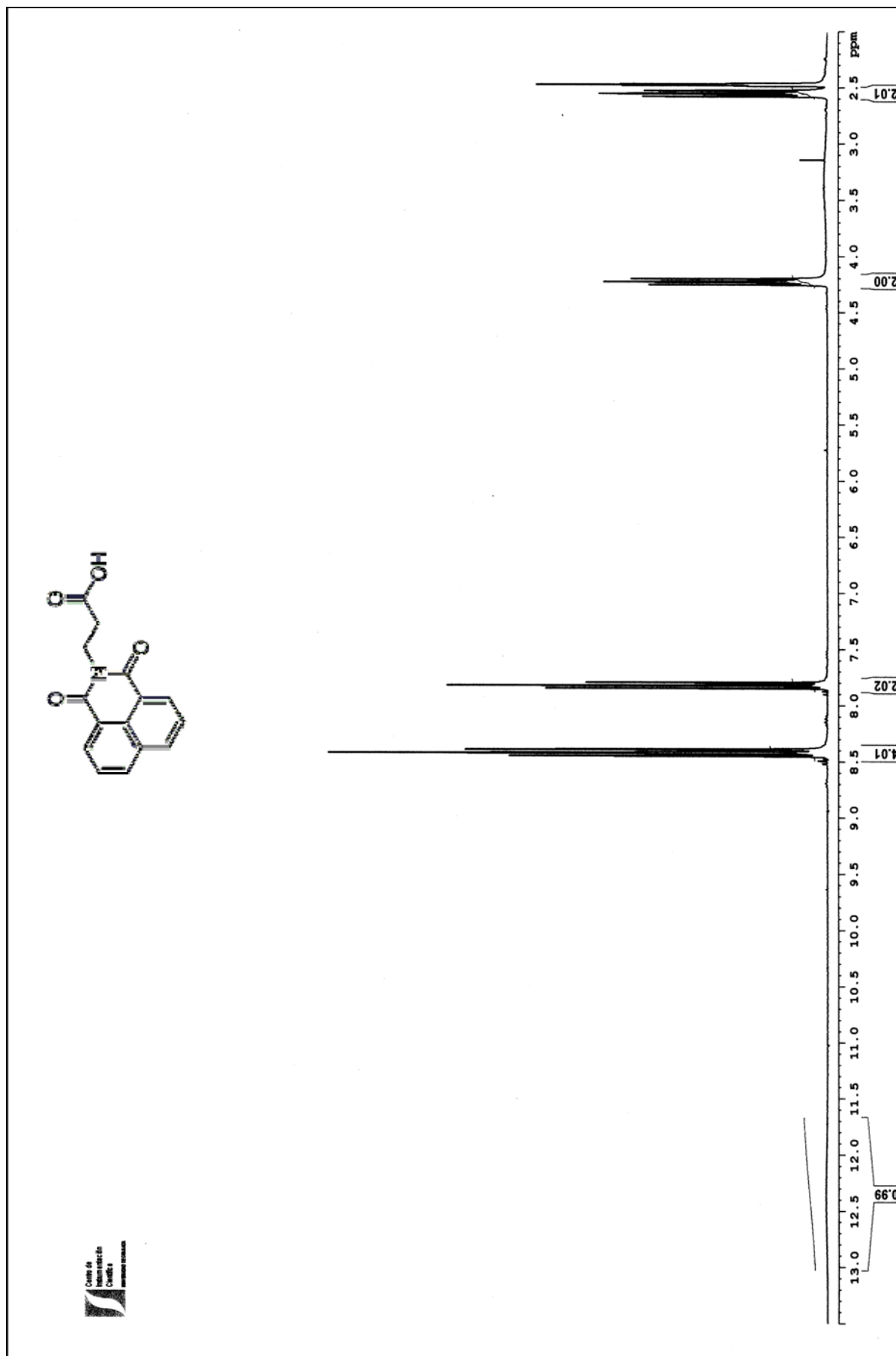




¹H-RMN: Acido 2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)acético (93)

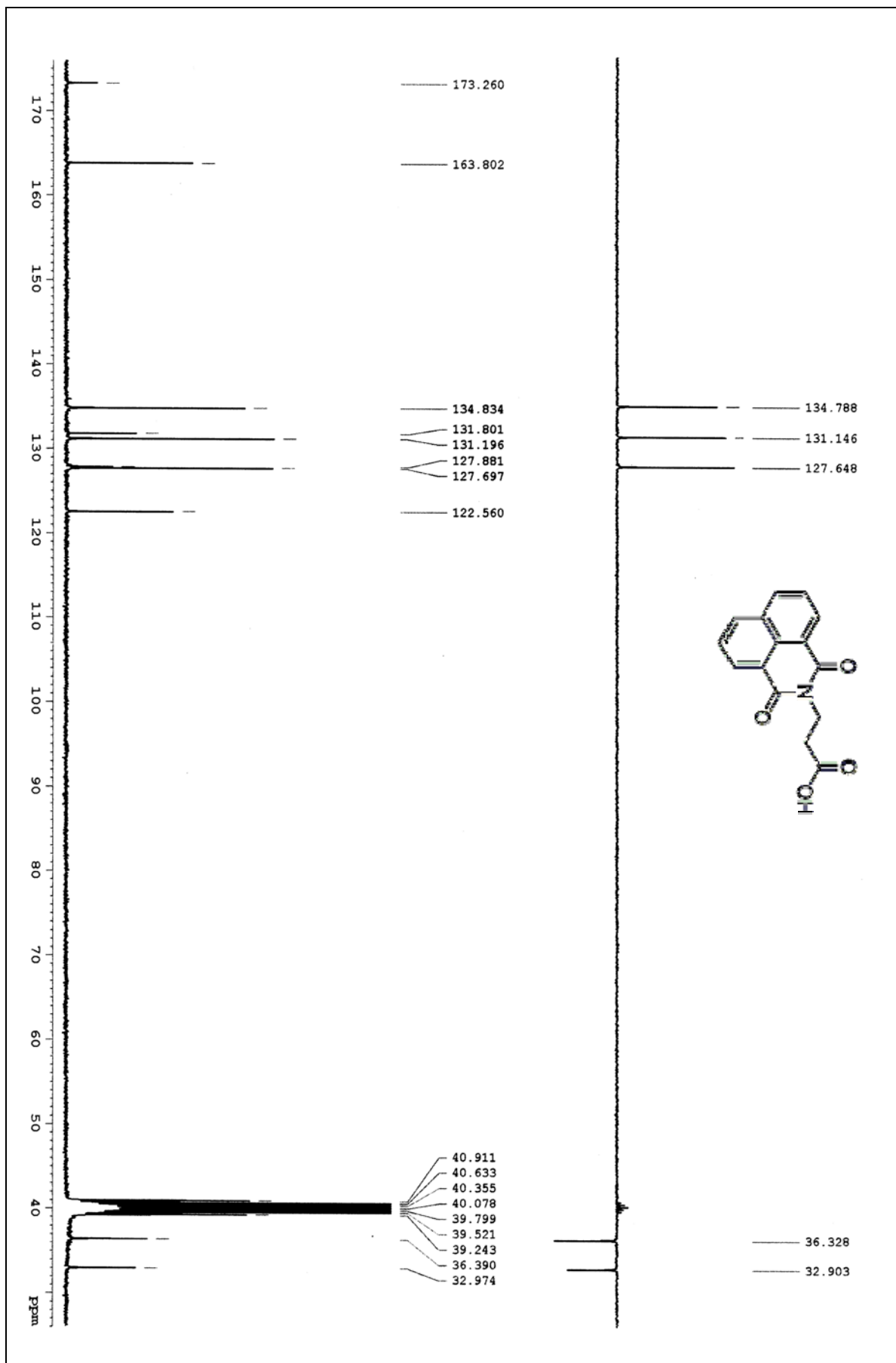
¹³C-RMN: Ácido 2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzol[delisoquinolin-2-il) acético (93)

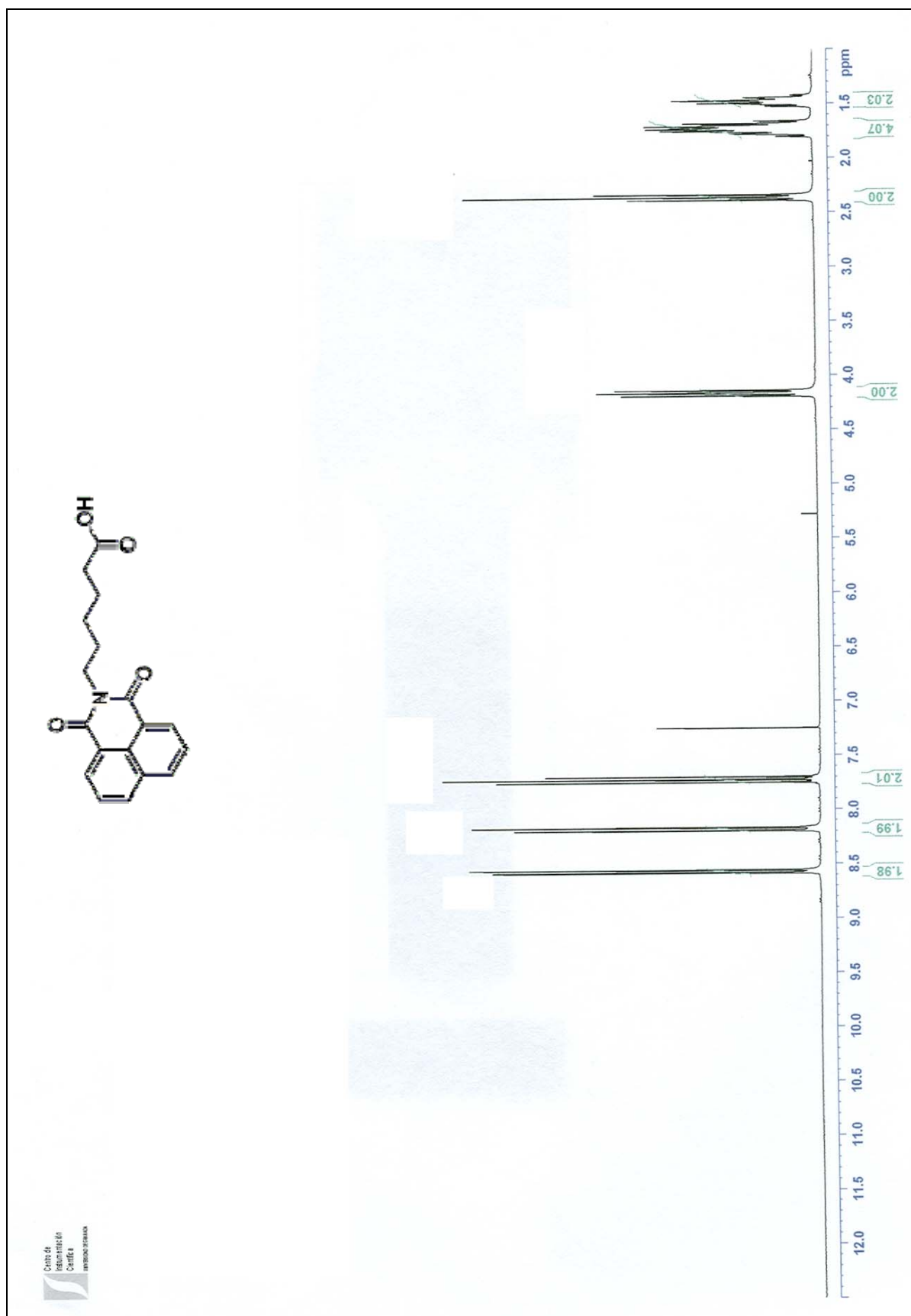




¹H-RMN: Ácido 3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzofelisquinolin-2-yl) propiónico (94)

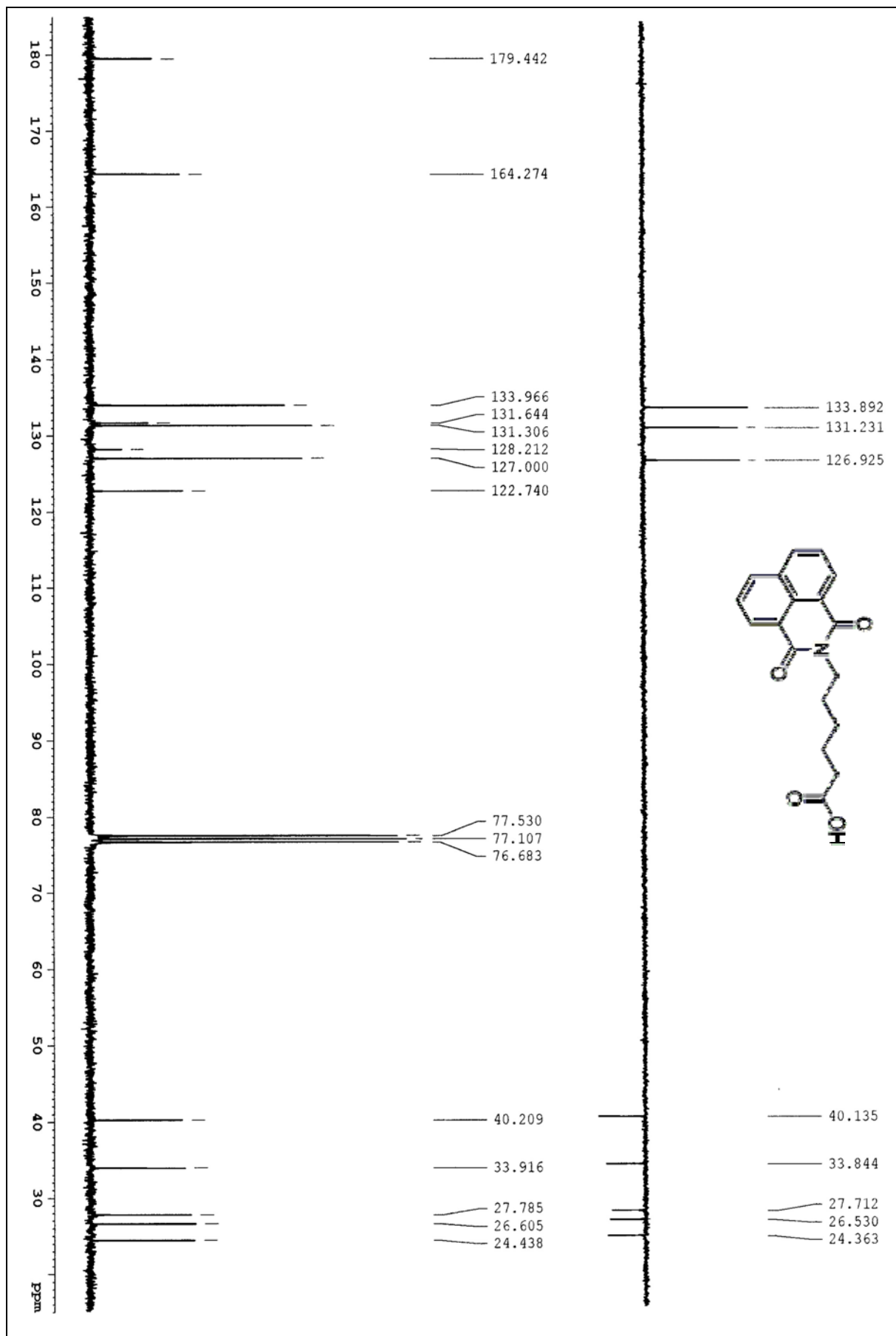
¹³C-RMN: Acido 3-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzofelisquinolin-2-il) propiónico (94)

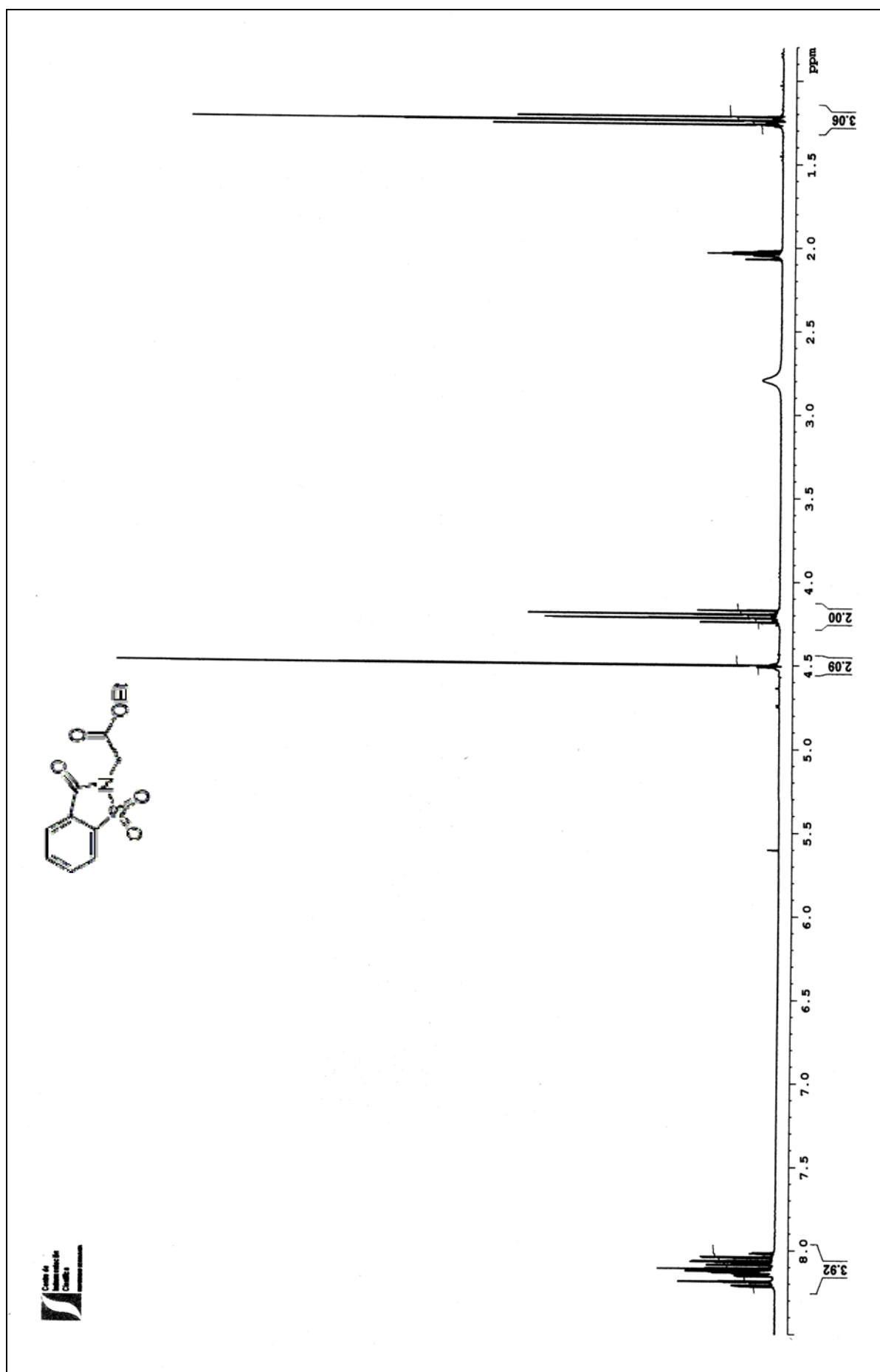




¹H-RMN: Ácido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[*de*]isoquinolin-2-il) hexanoico (95)

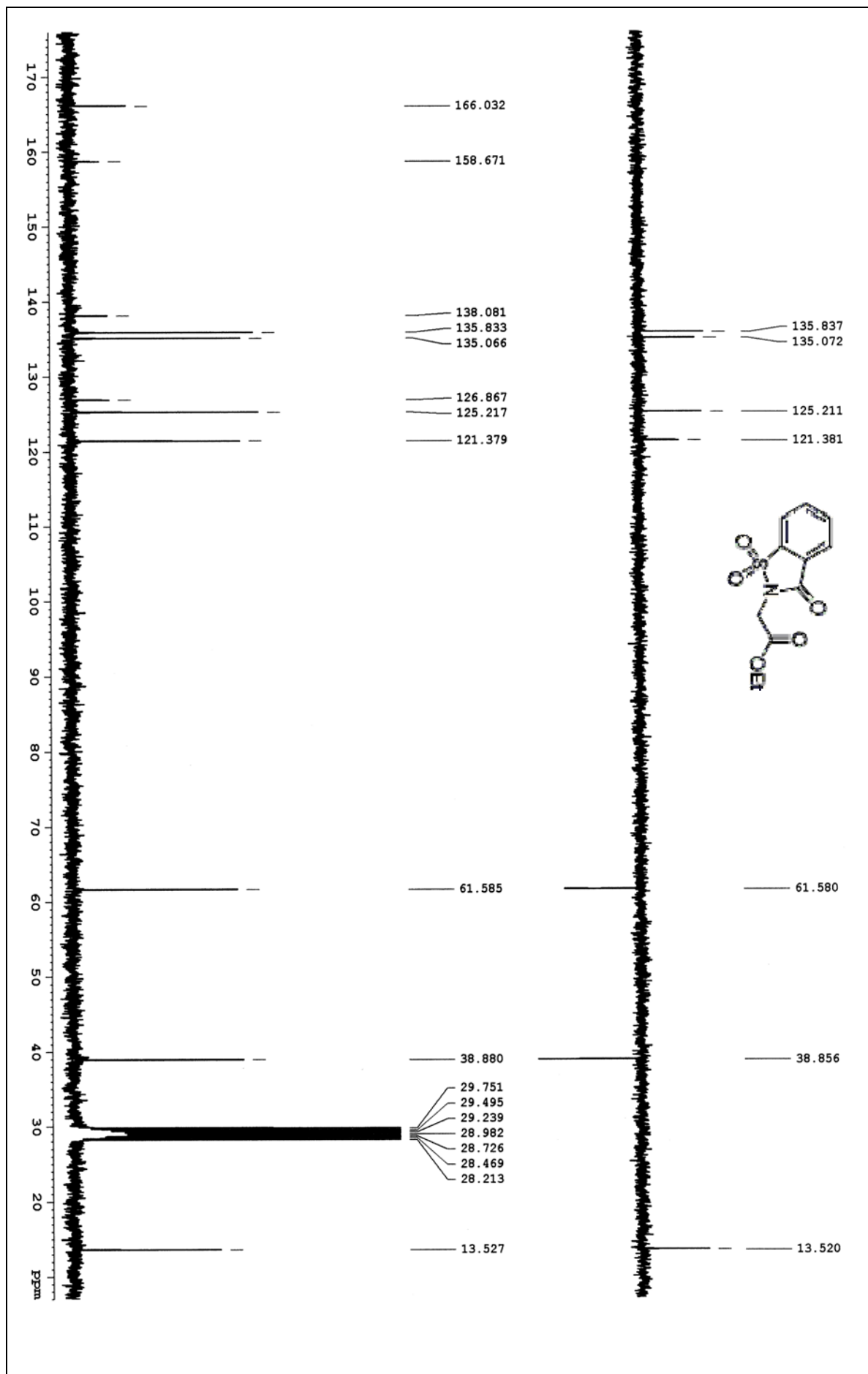
¹³C-RMN: Acido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzof[delisoquinolin-2-il) hexanico (95)

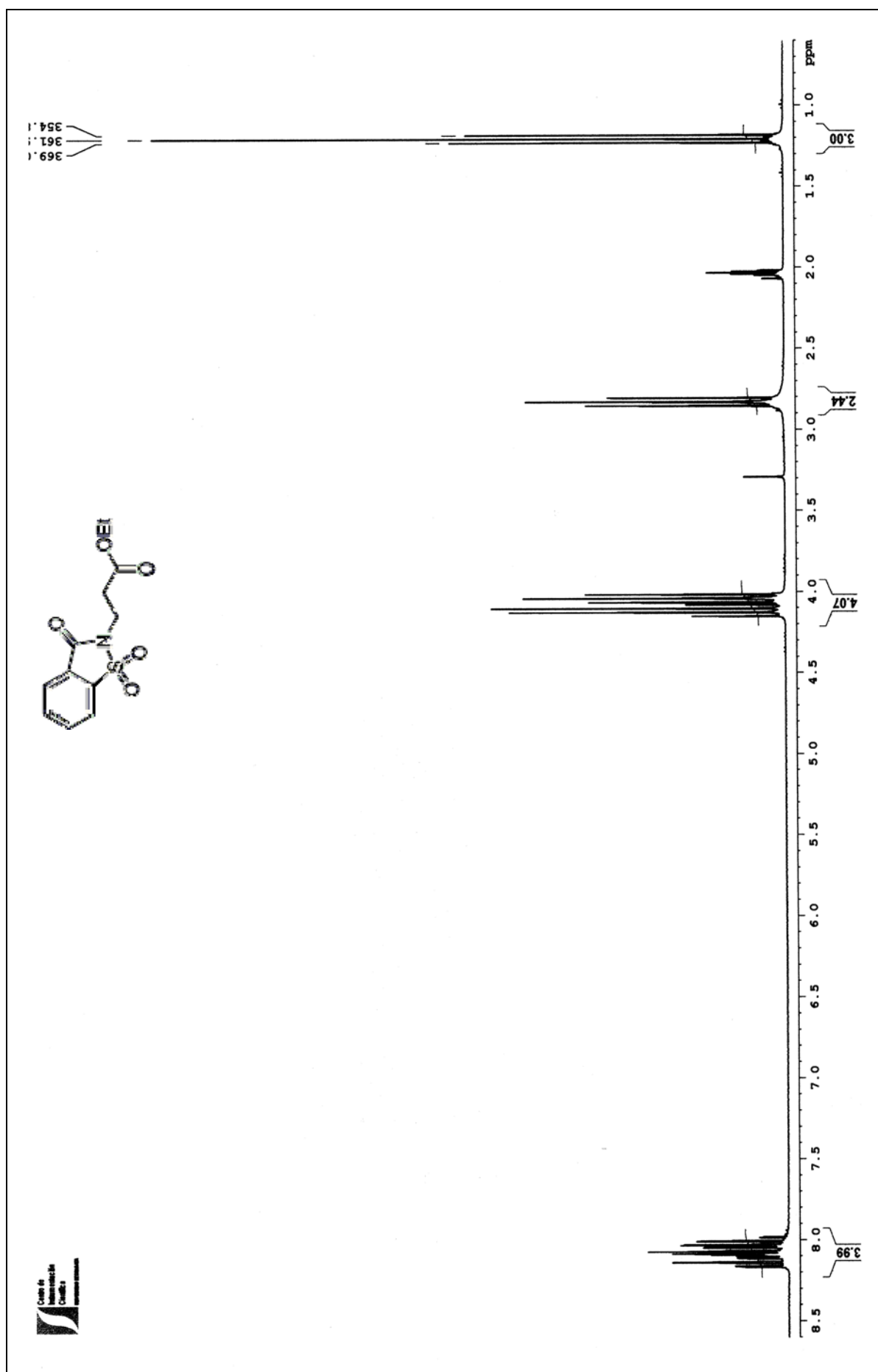




¹H-RMN: 2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) acetato de etilo (97)

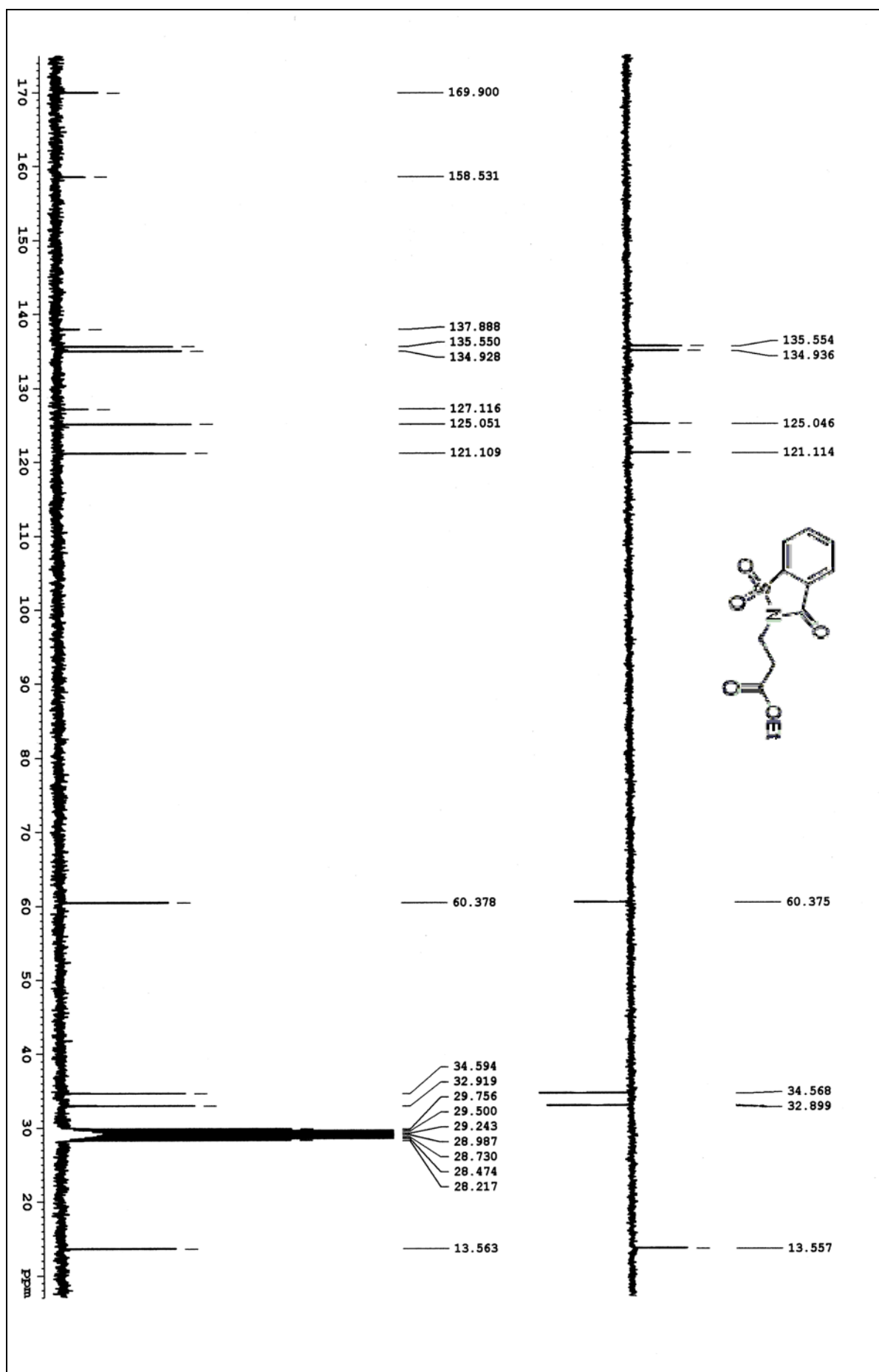
¹³C-RMN: 2-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[*d*]isotiazol) acetato de etilo (97)

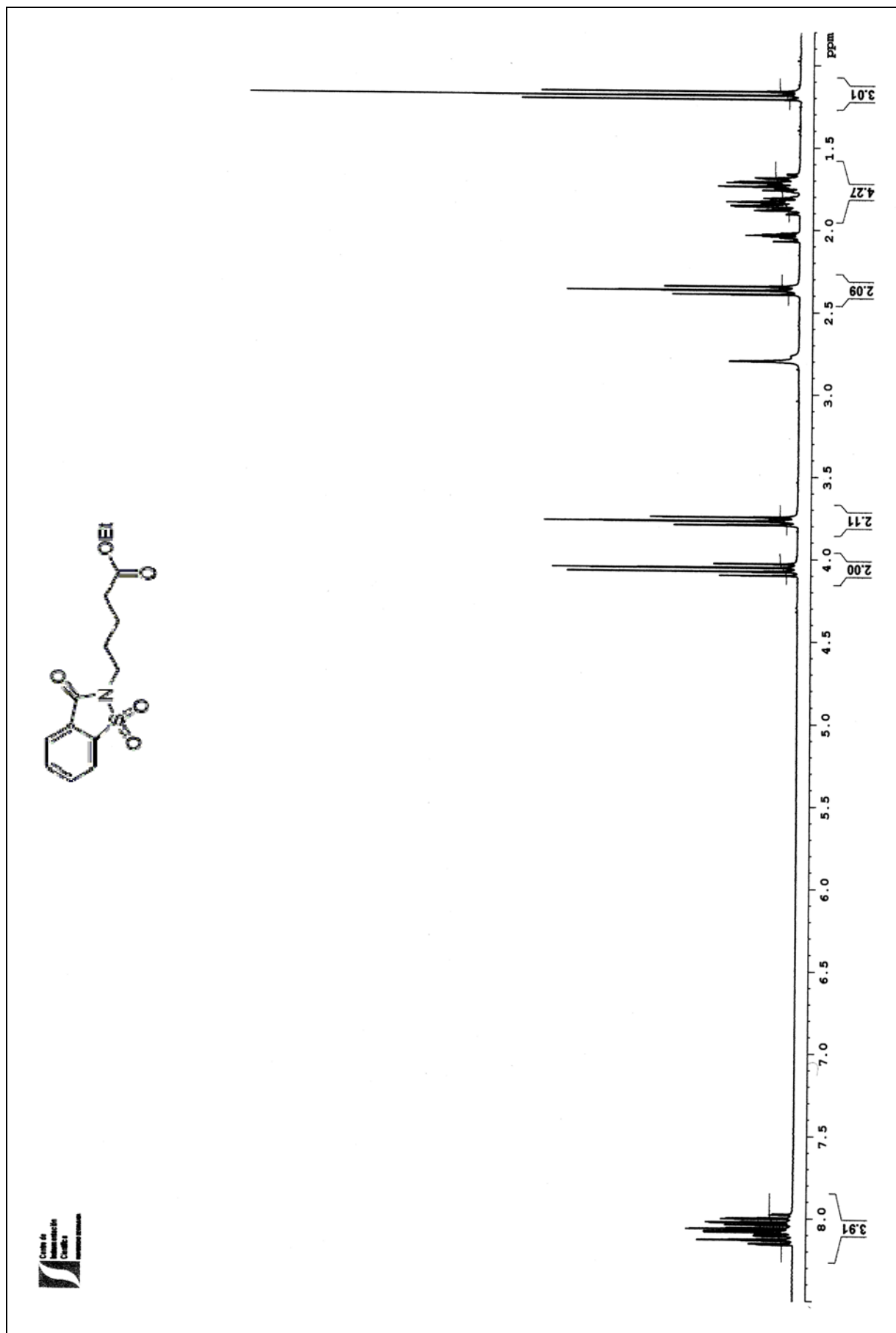




¹H-RMN: 3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) propionato de etilo (98)

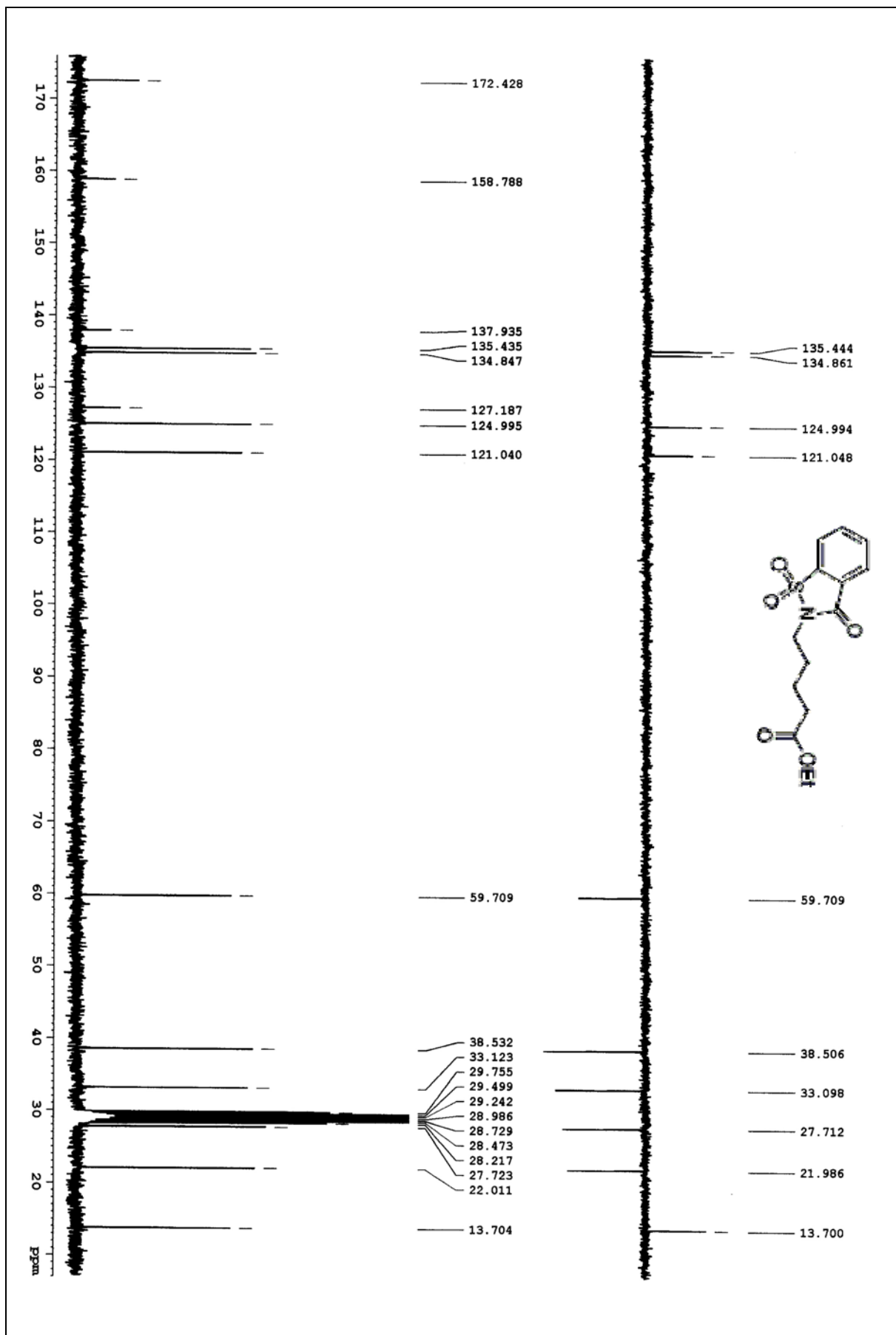
¹³C-RMN : 3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[*l*isotiazol) propionato de etilo (98)

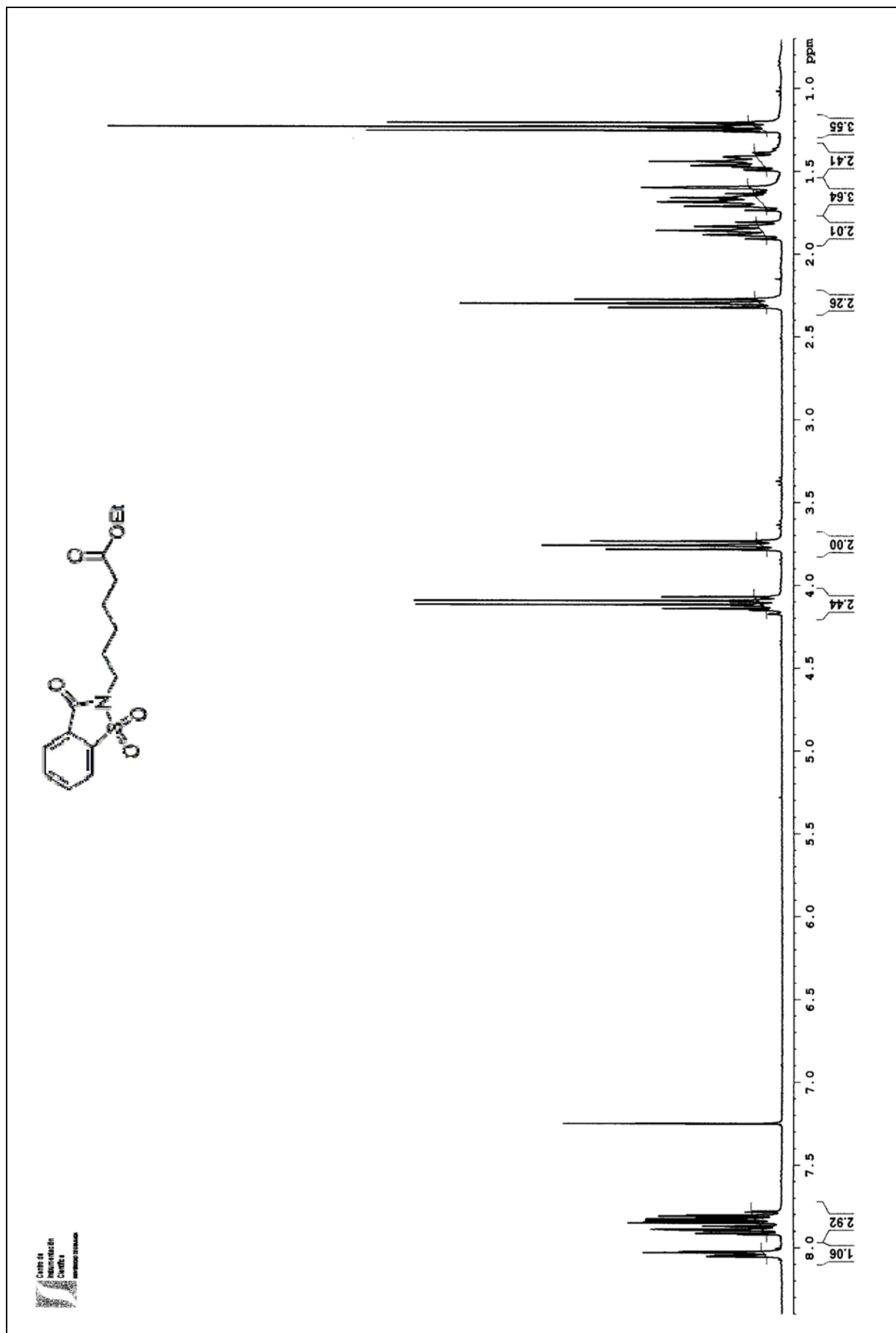




¹H-RMN: 5-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzotriazol) pentanoato de etilo (99)

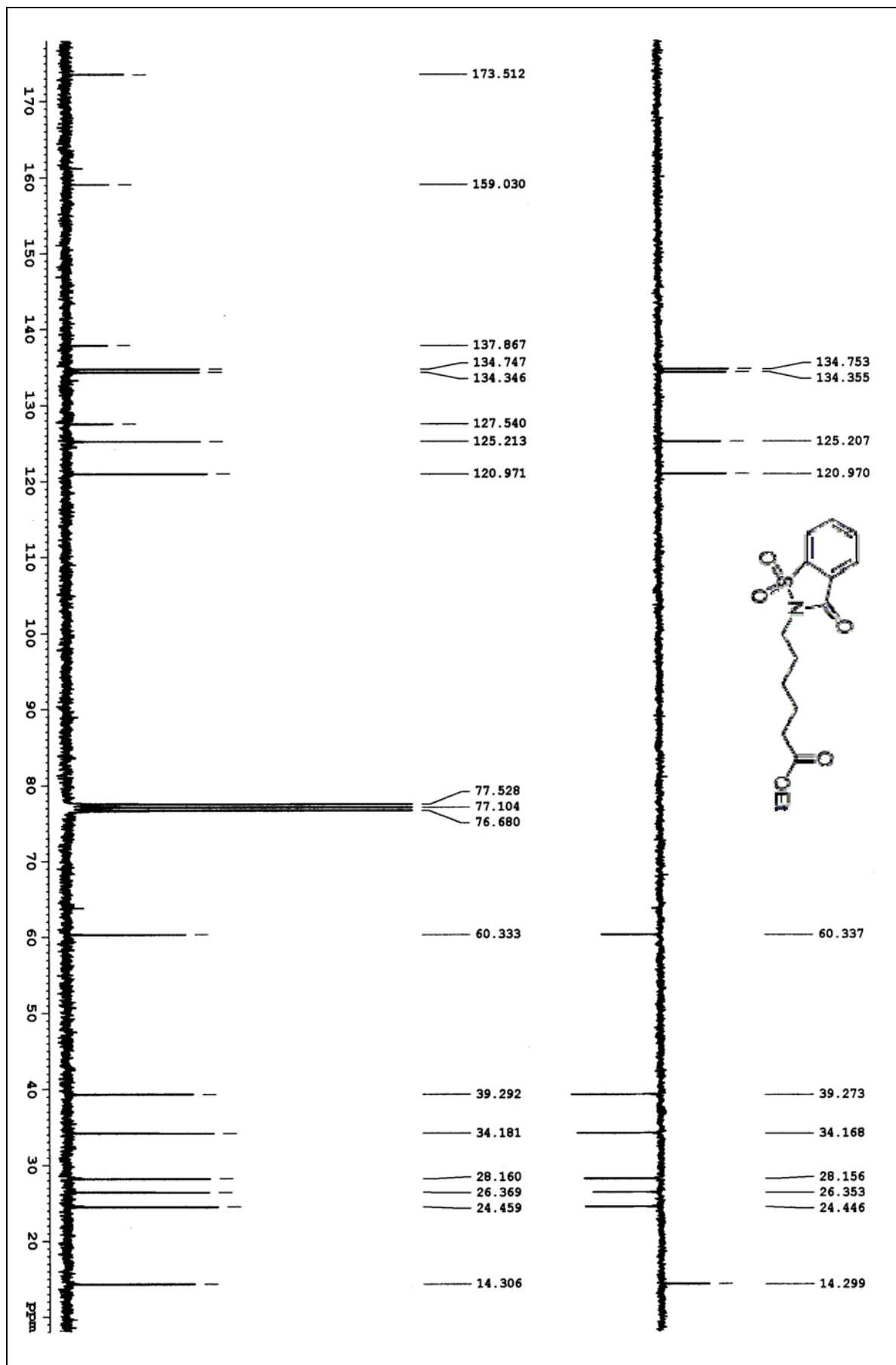
¹³C-RMN : 5-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[*d*]isotiazol) pentanoato de etilo (99)

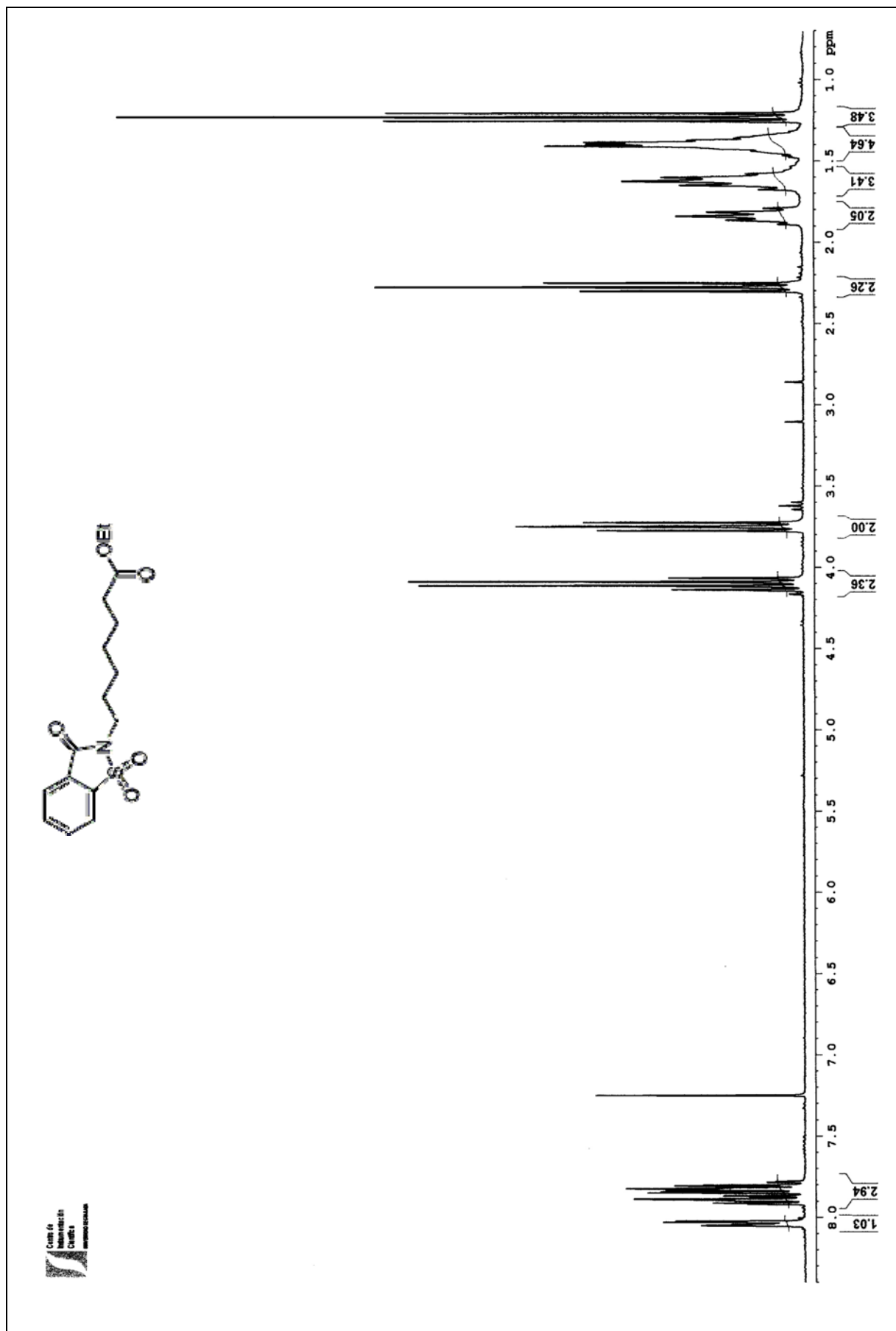




¹H-RMN: 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) hexanoato de etilo (100)

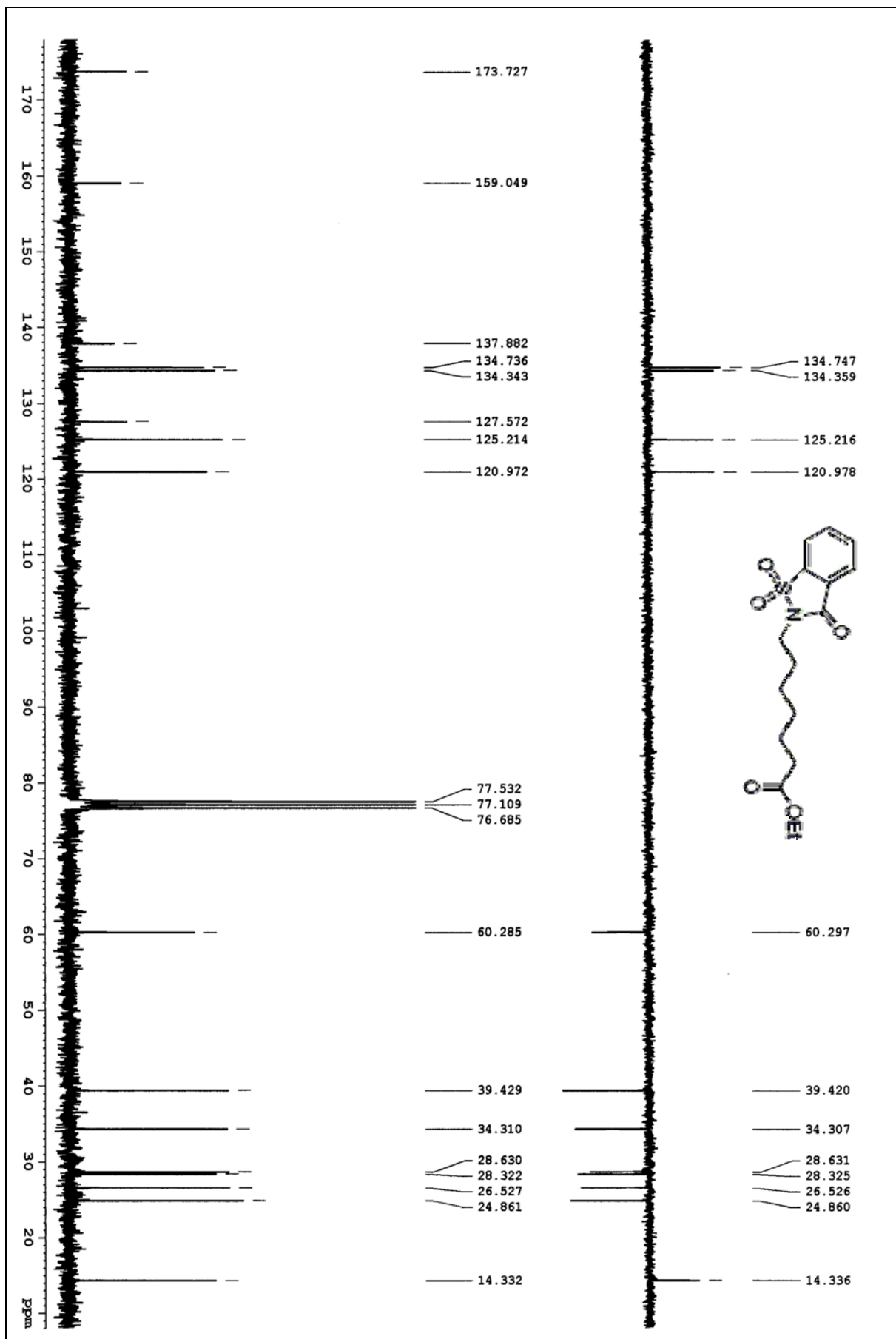
¹³C-RMN: 6-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzotiazol) hexanoato de etilo (100)

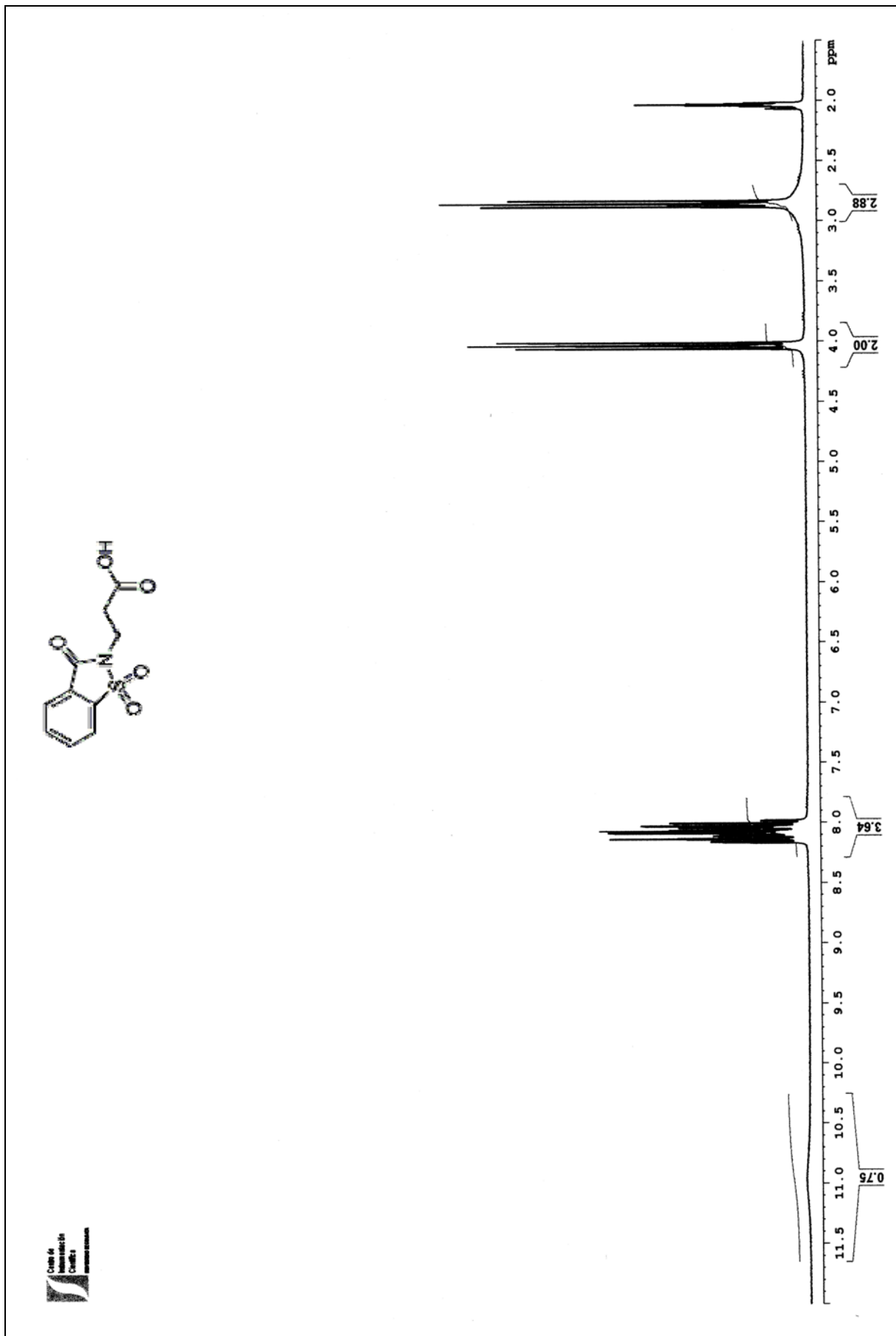




¹H-RMN: 7-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol) heptanoato de etilo (101)

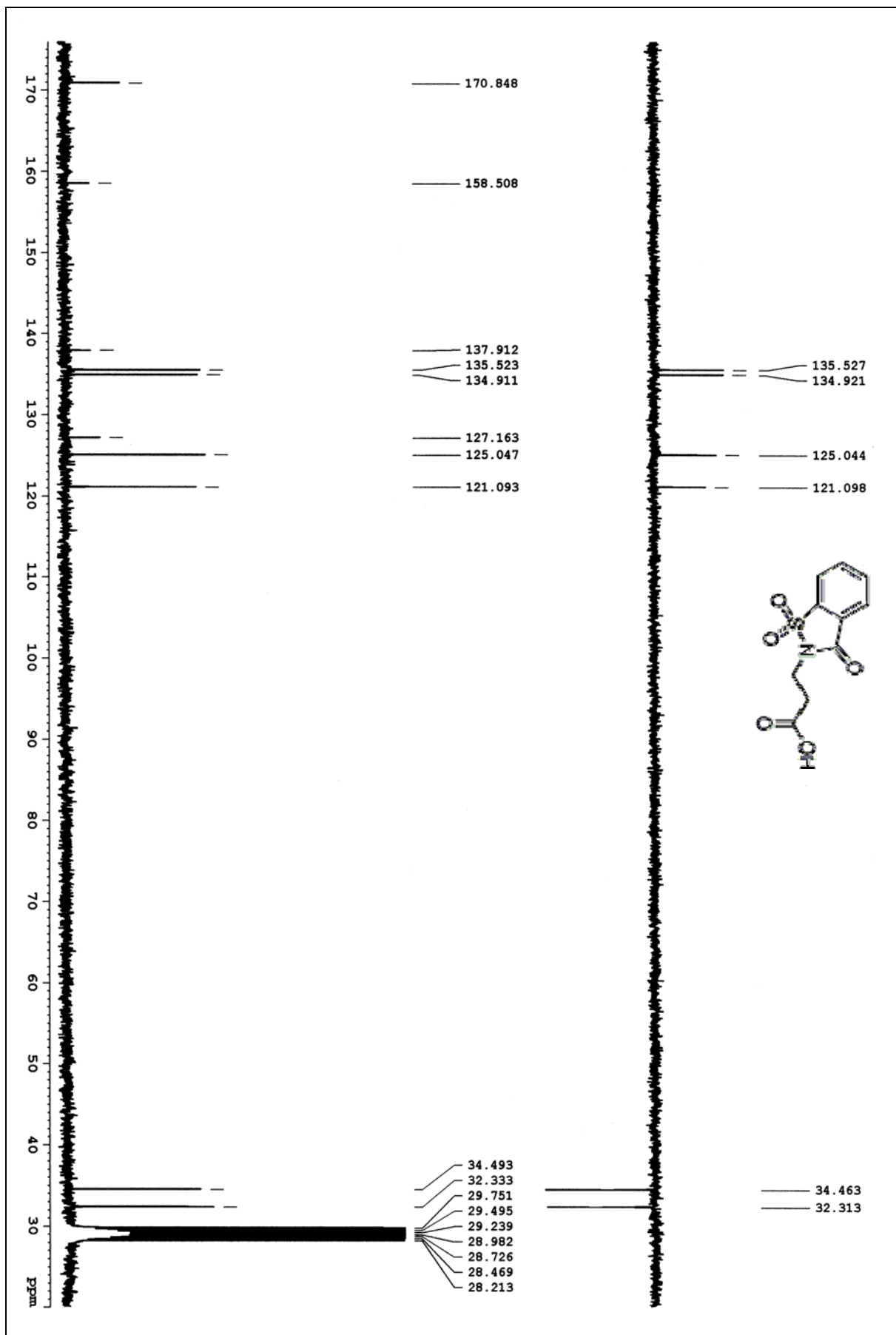
¹³C-RMN: 7-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[*d*]isotiazol) heptanoato de etilo (101)

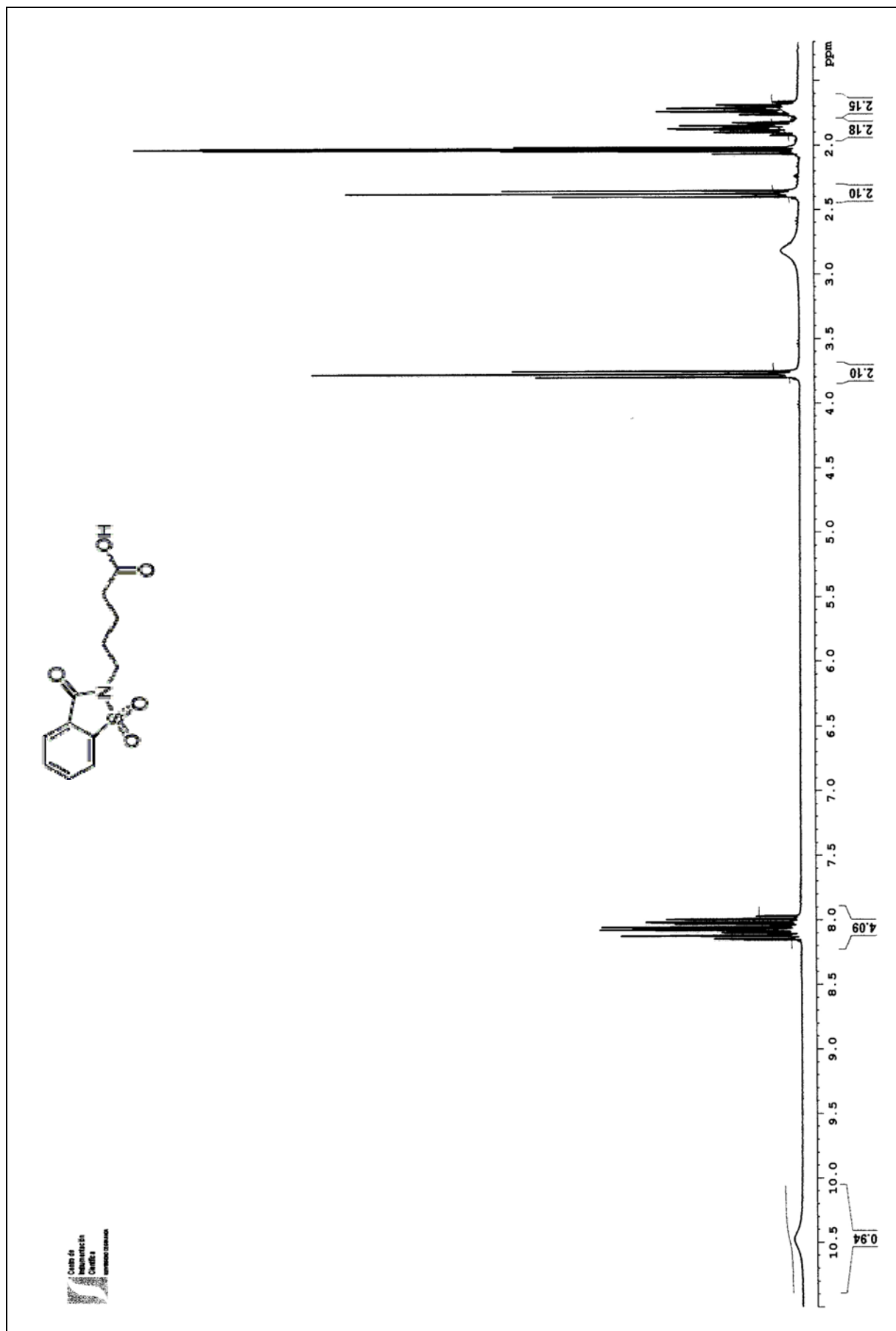




¹H-RMN: ácido 3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzotriazol-2-il) propiónico (103)

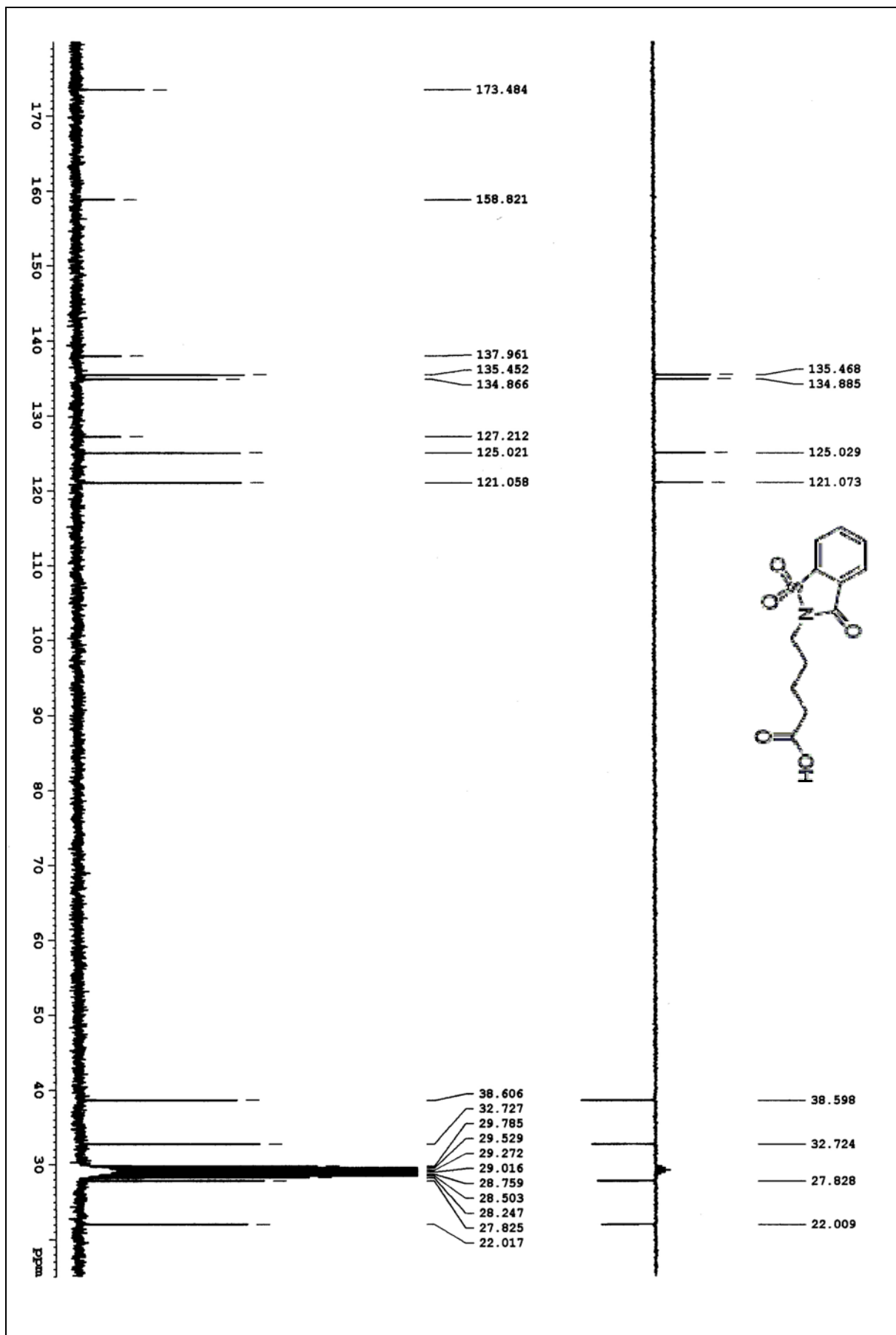
¹³C-RMN: ácido 3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof diisotiazol-2-il) propionico (103)

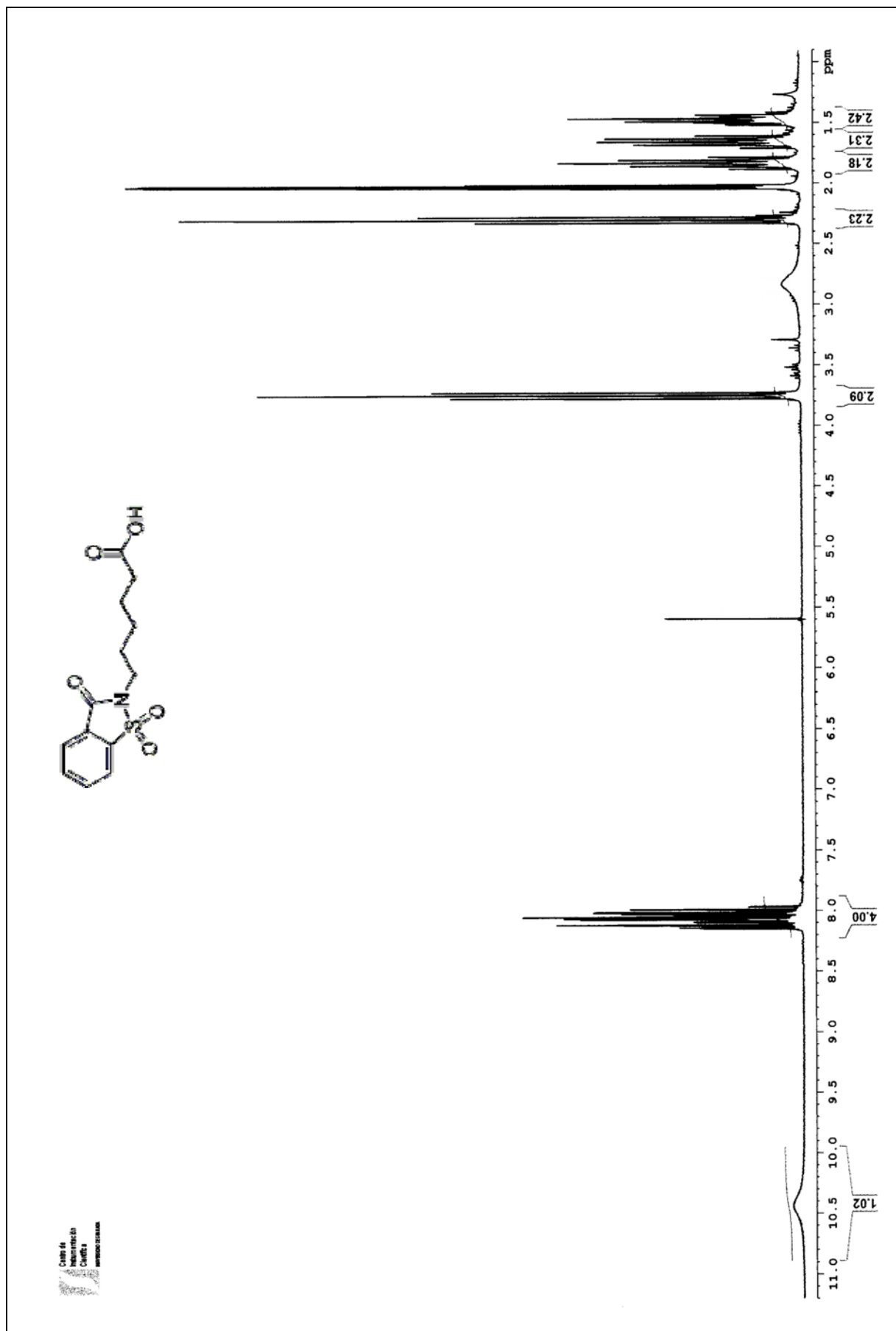




¹H-RMN: ácido 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il) pentanoico (104)

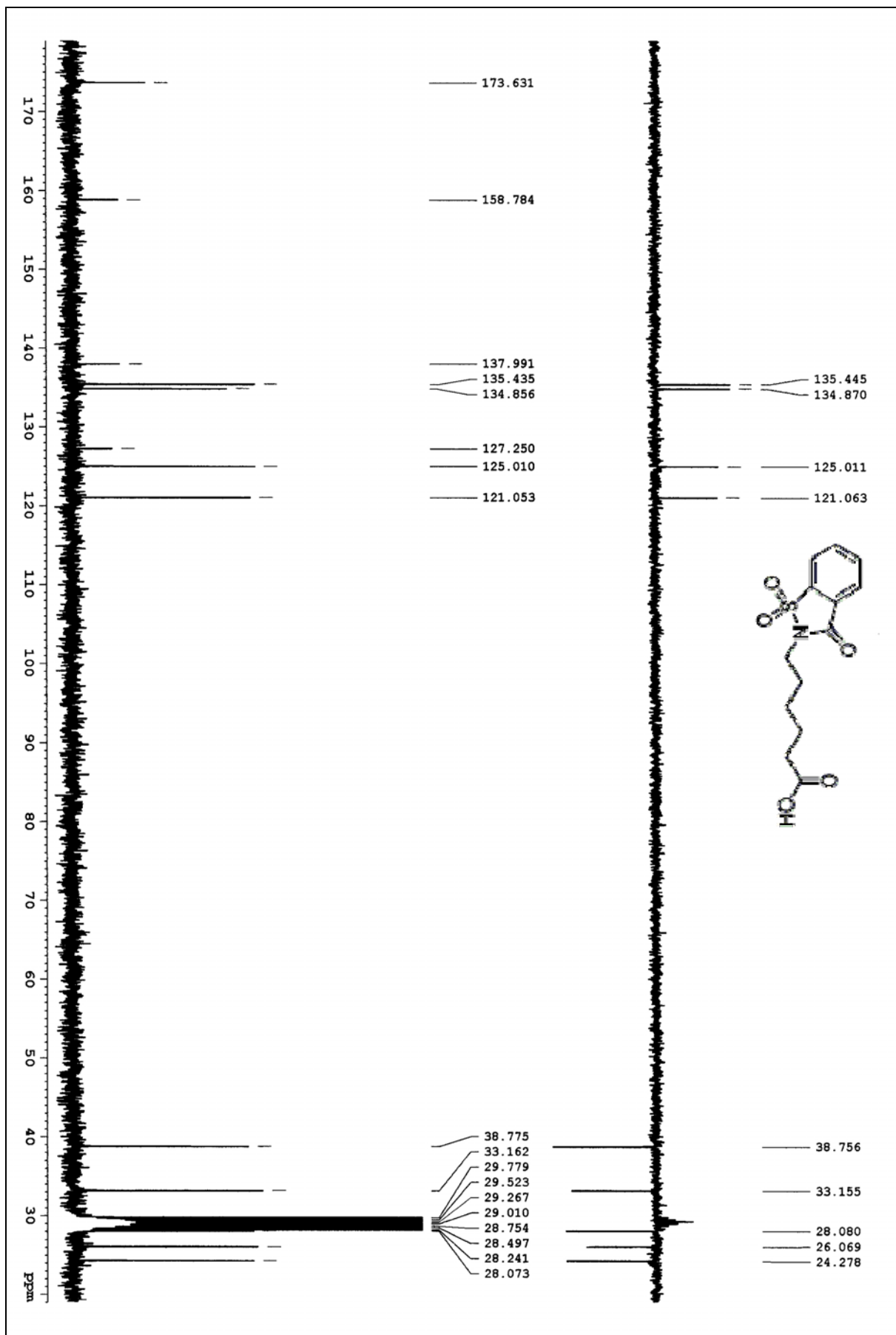
¹³C-RMN : ácido 5-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof diisotiazol-2-il) pentanoico (104)

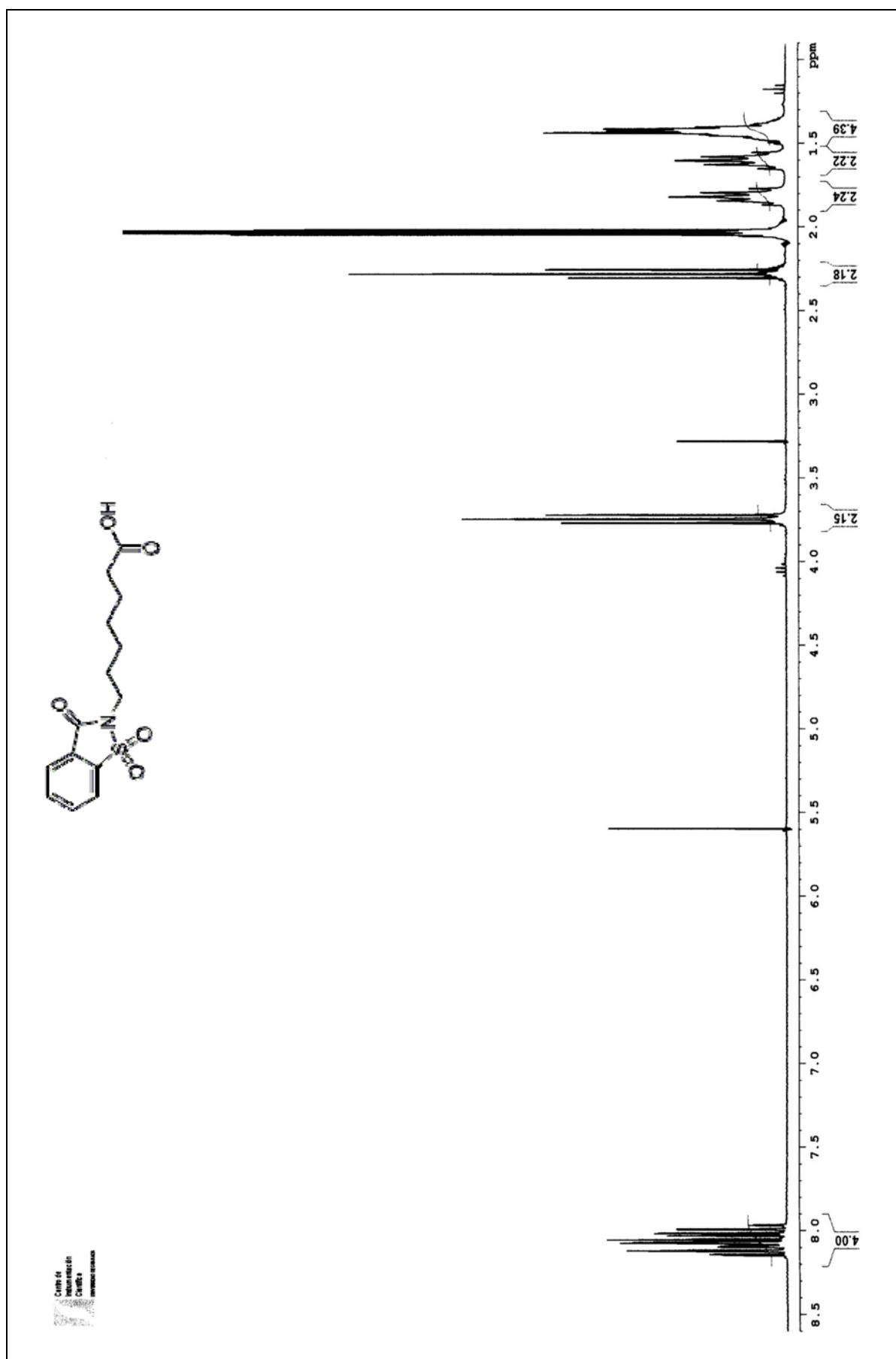




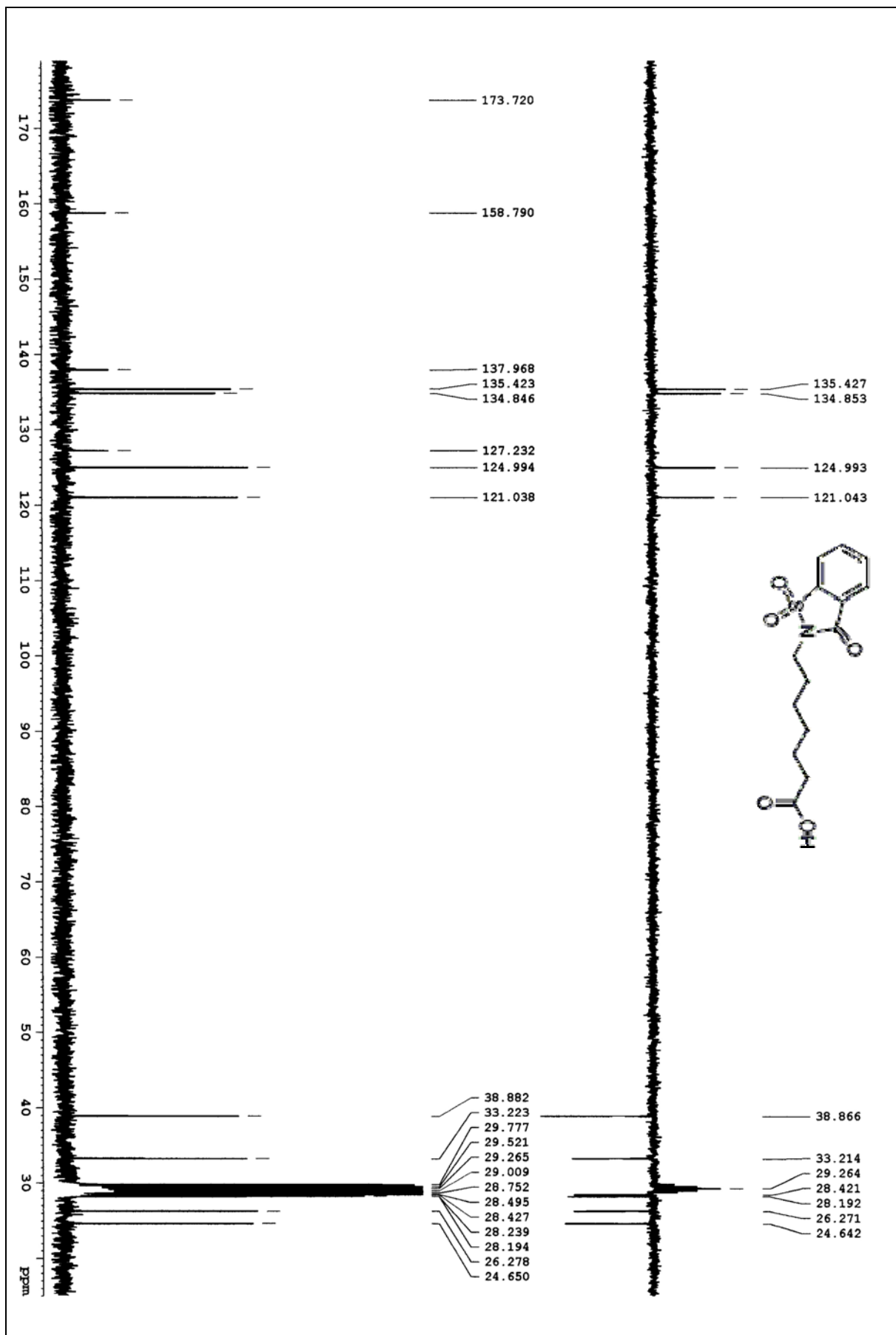
¹H-RMN: ácido 6-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzotriazol-2-il) hexanoico (105)

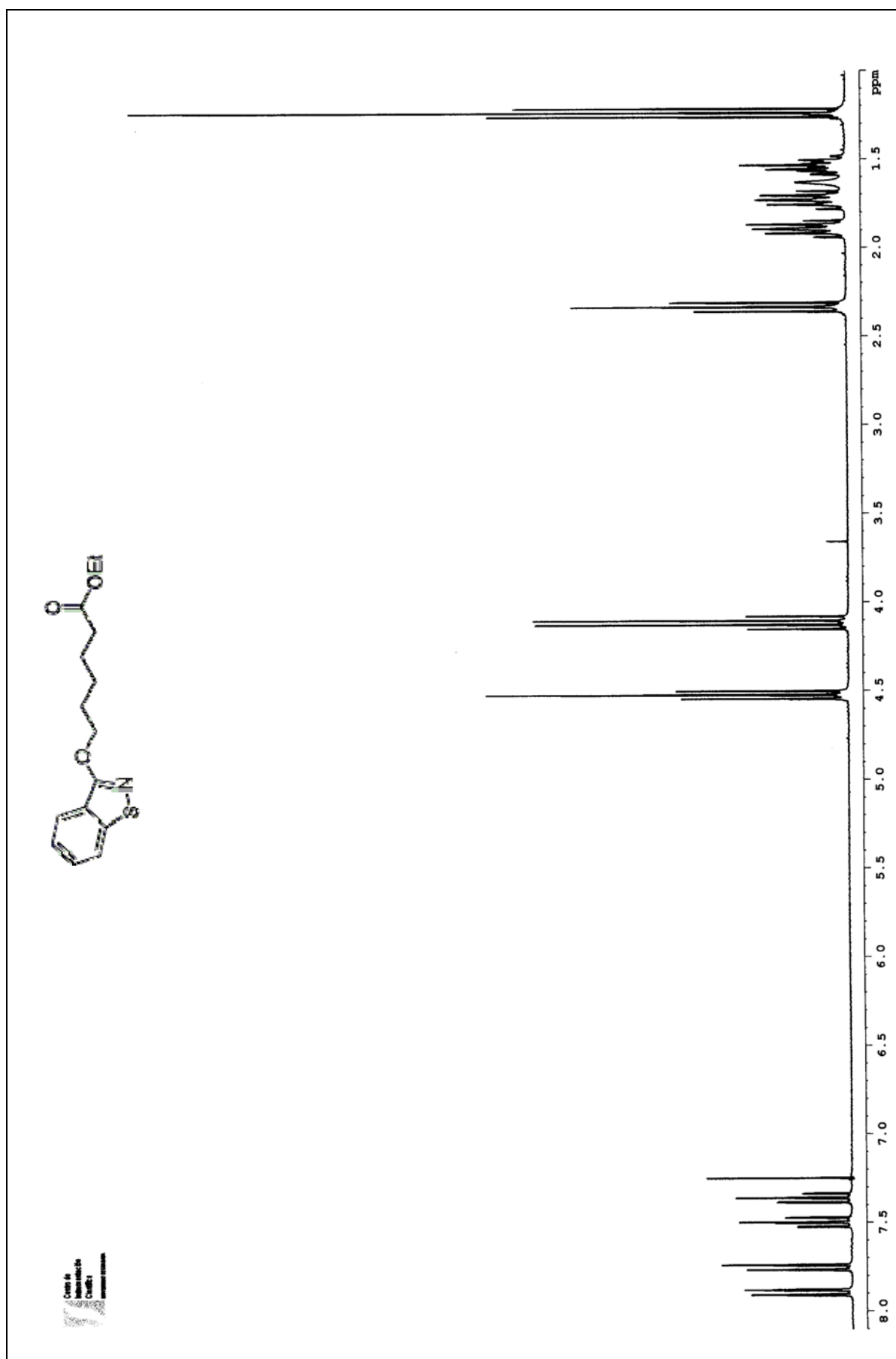
¹³C-RMN : ácido 6-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[liisotiazol-2-il]) hexanóico (105)





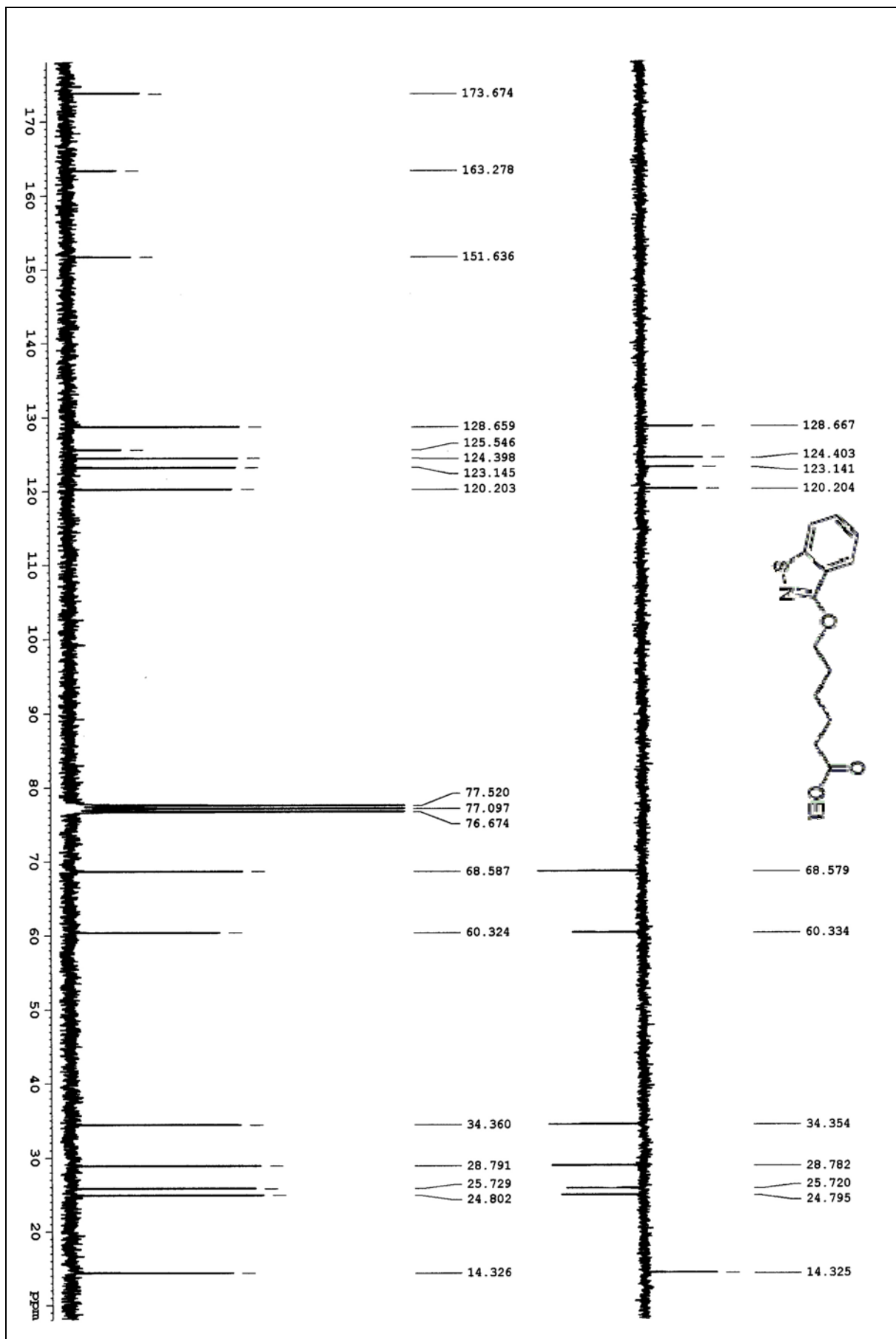
¹³C-RMN: ácido 7-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[1,2-b]isotiazol-2-il) heptanoico (106)

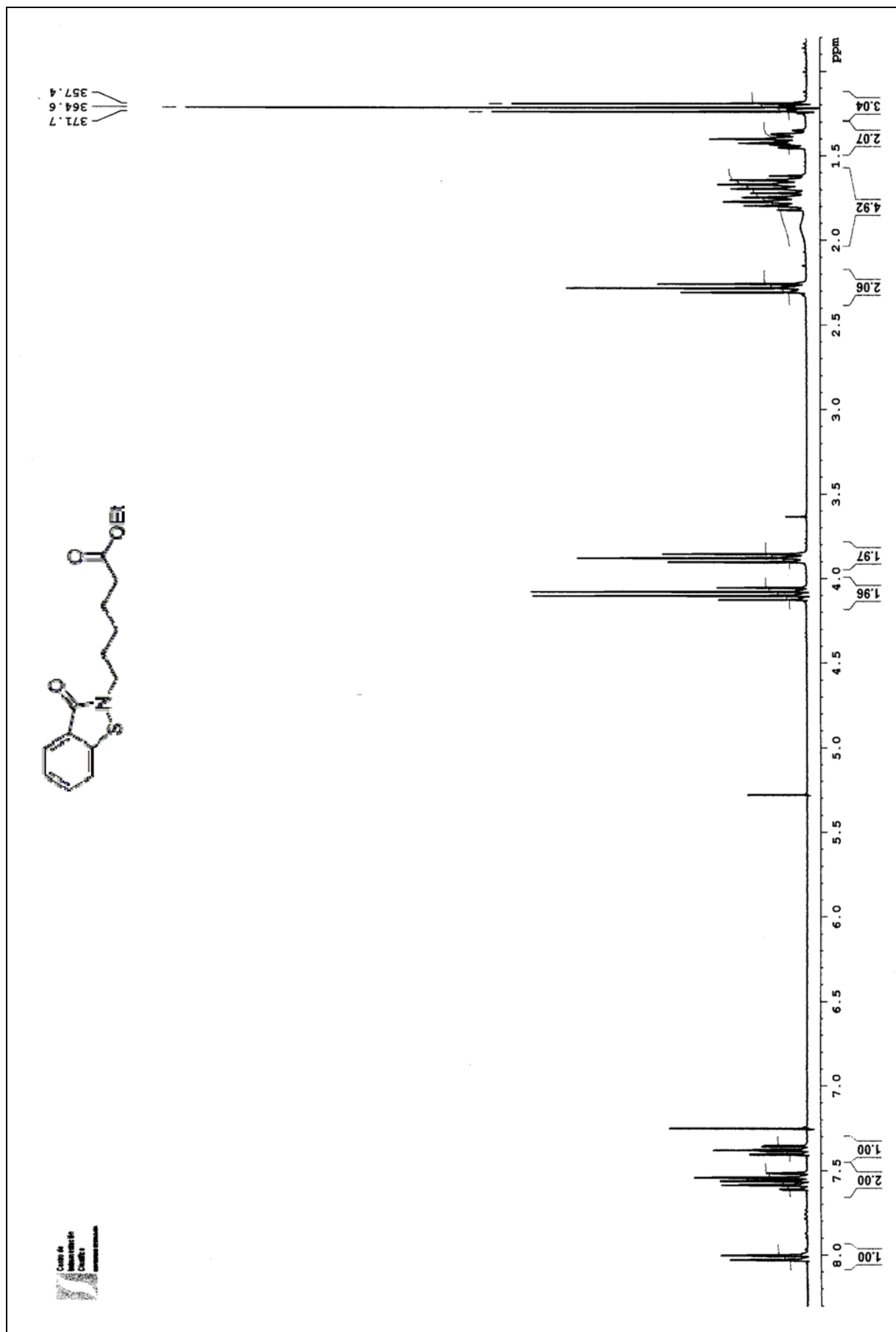




¹H-RMN: 6-[(benzo[d]isotiazol-3-yl)oxa] hexanoato de etilo (110)

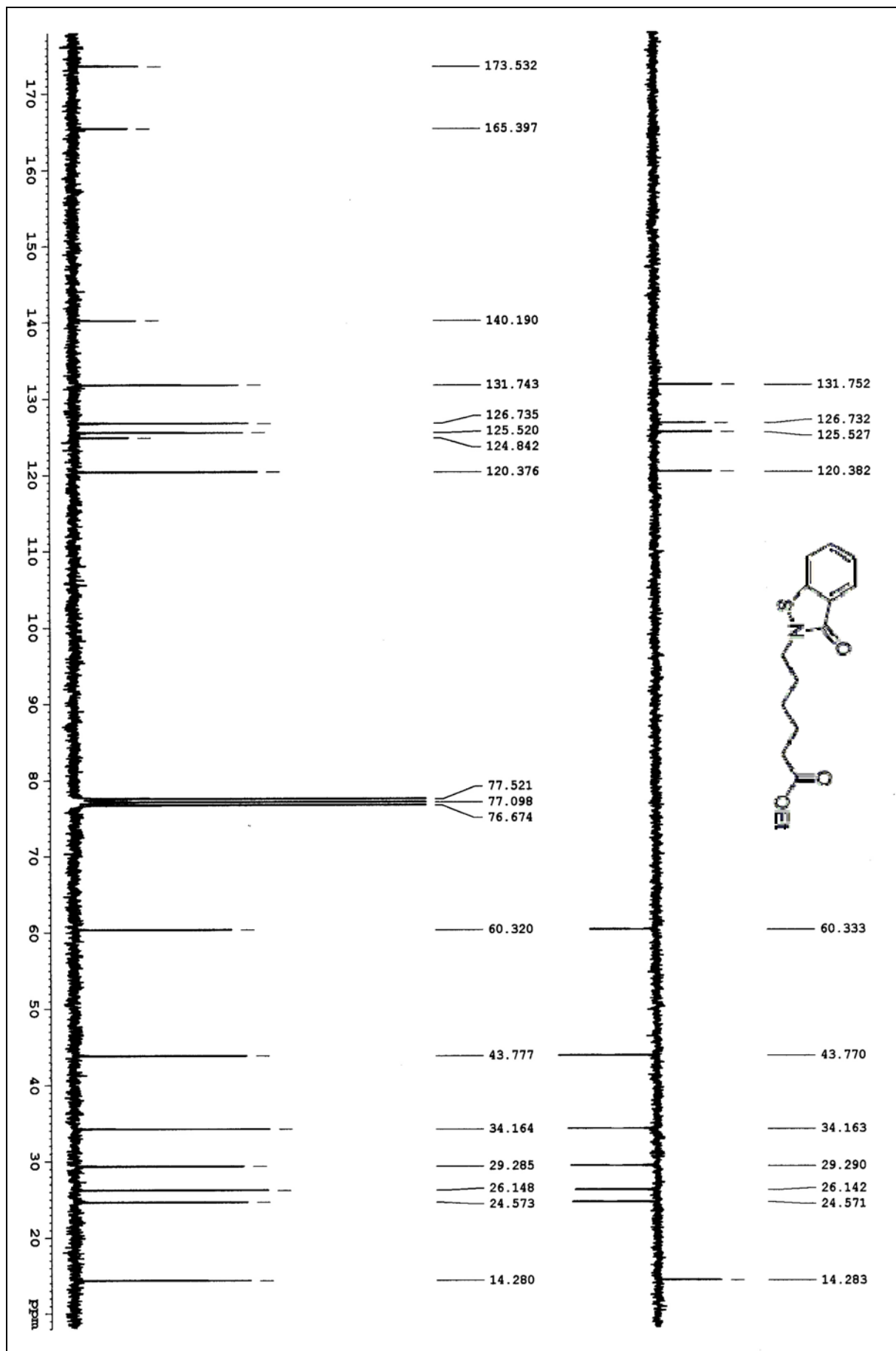
¹³C-RMN : 6-[1(benzof[1,2-b]isotiazol-3-il)oxal hexanoato de etilo (110)

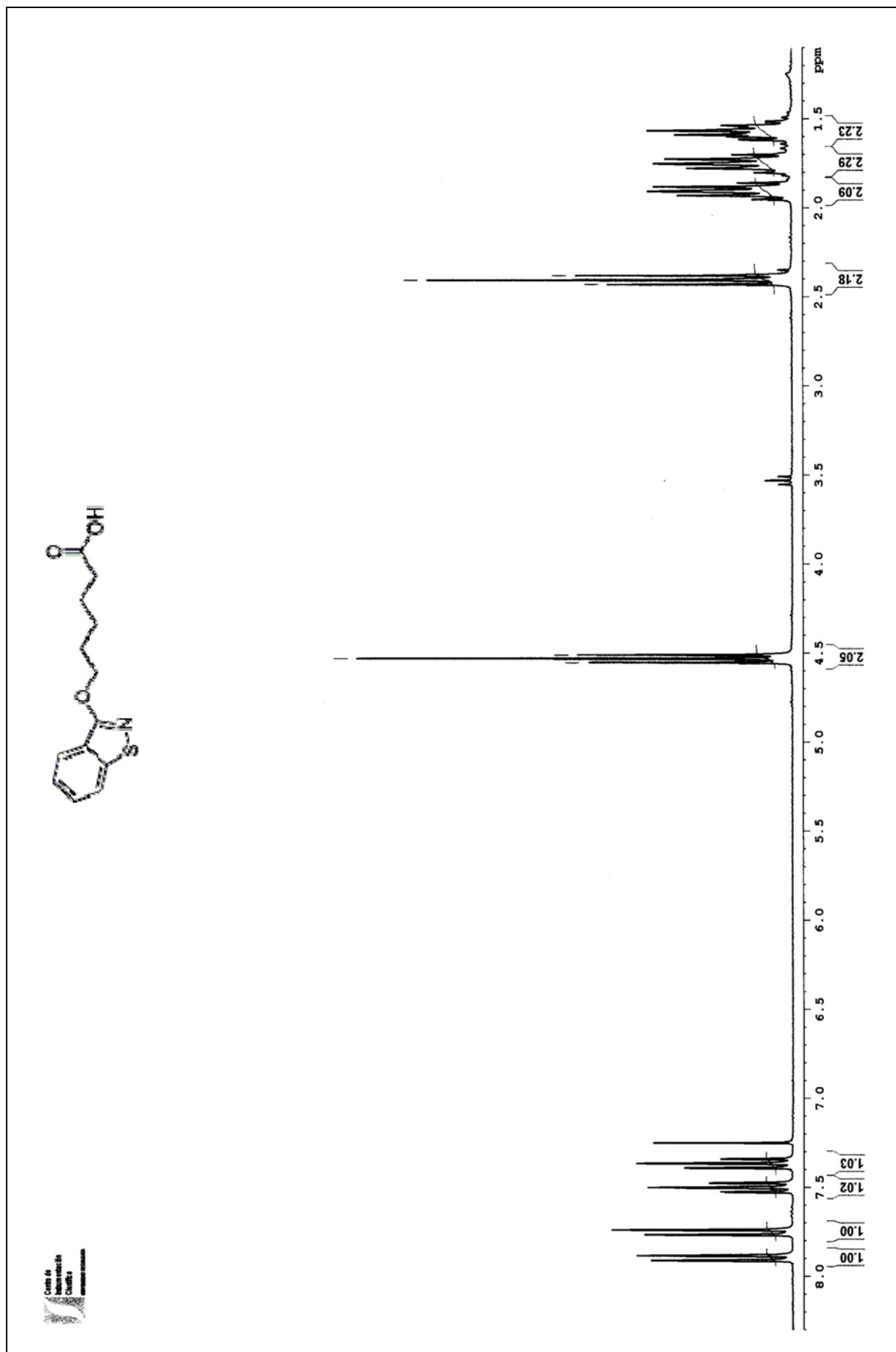




¹H-RMN: 6-(3-oxo-2H-benzothiazol-2-yl) hexanoato de etilo (111)

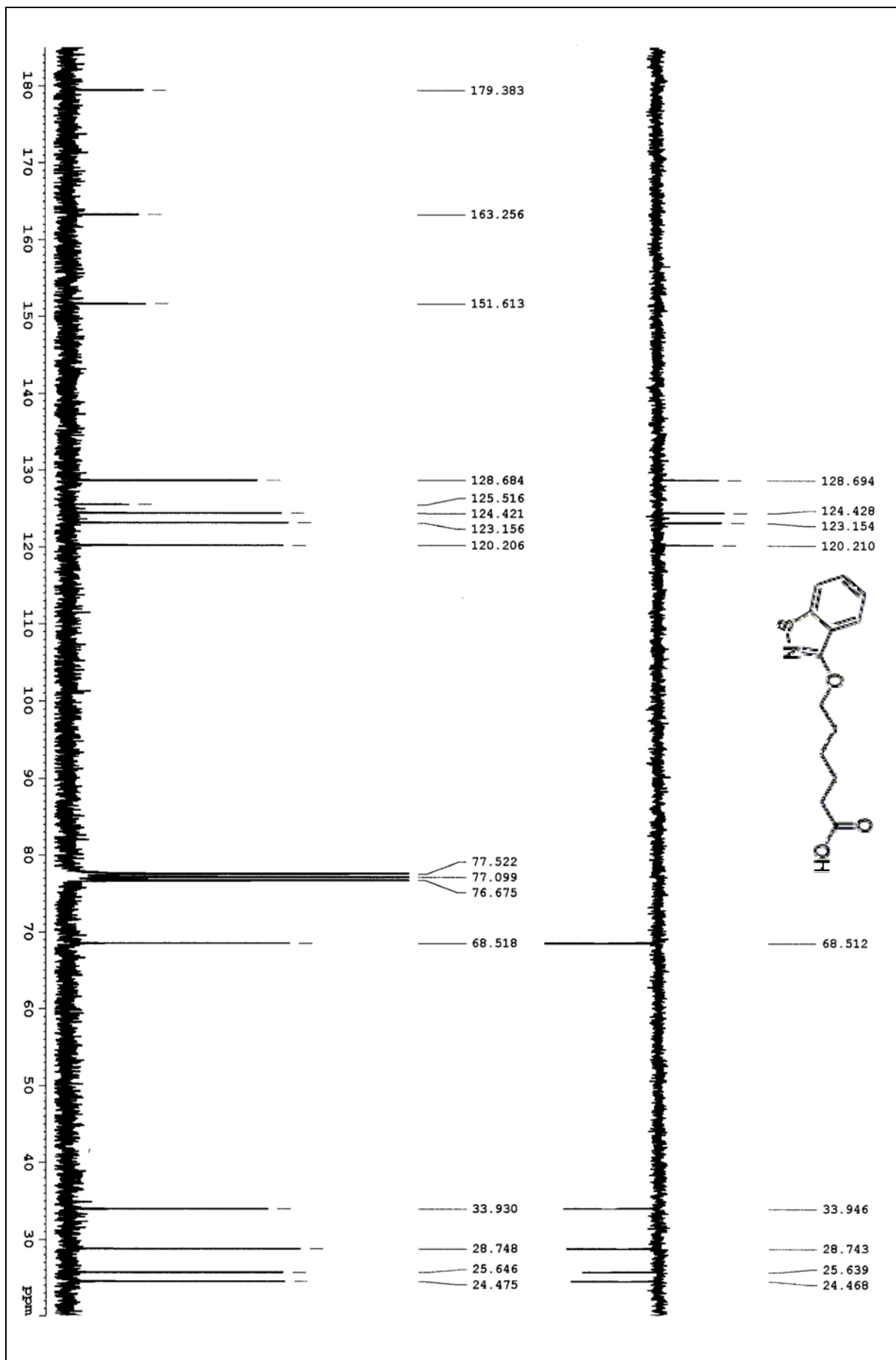
¹³C-RMN : 6-(3-oxo-2H-benzof[*l*isotiazol-2-il) hexanoato de etilo (111)

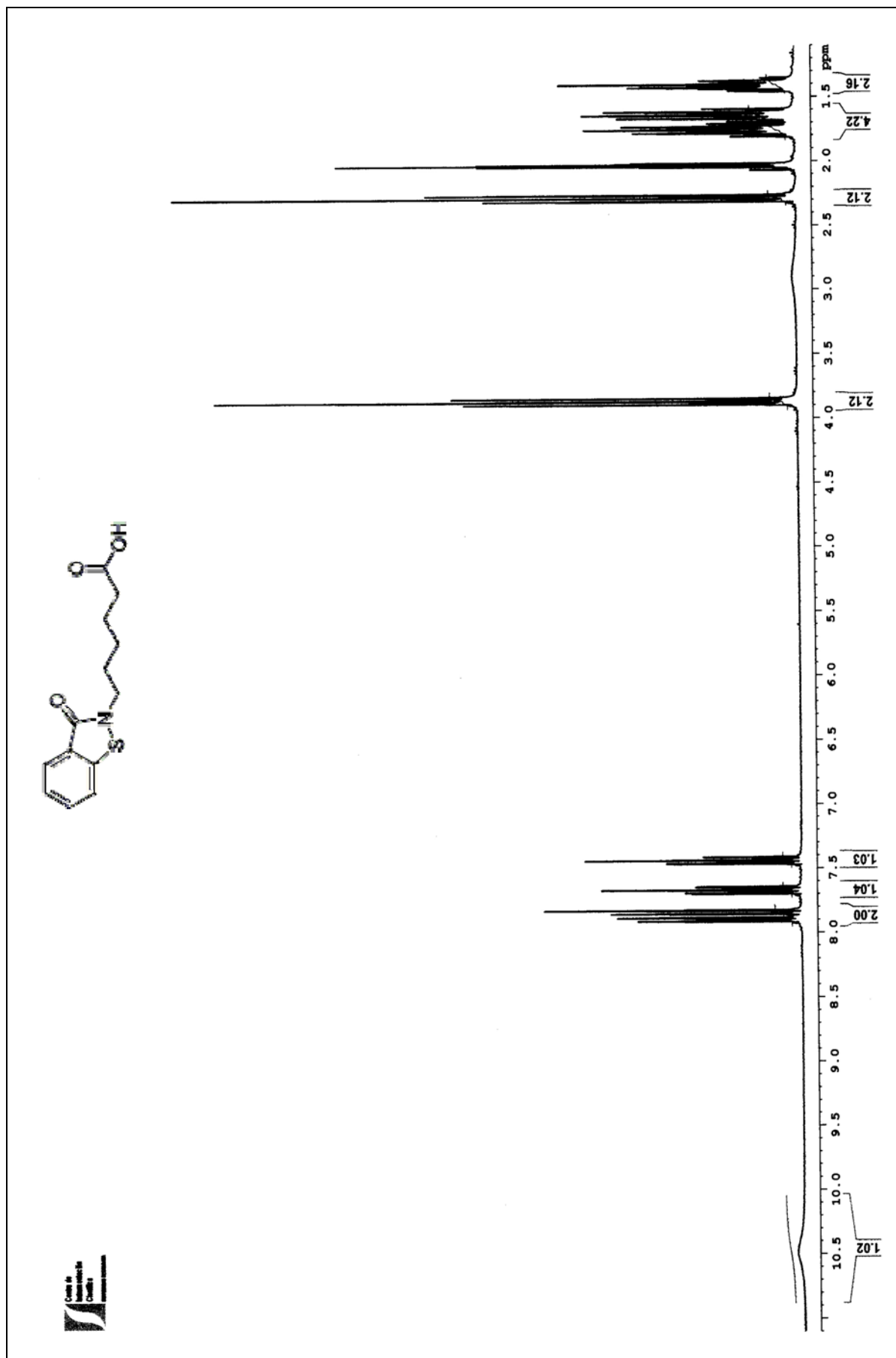




¹H-RMN: ácido 6-[benzo[d]isotiazol-3-il] oxal hexanoico (112)

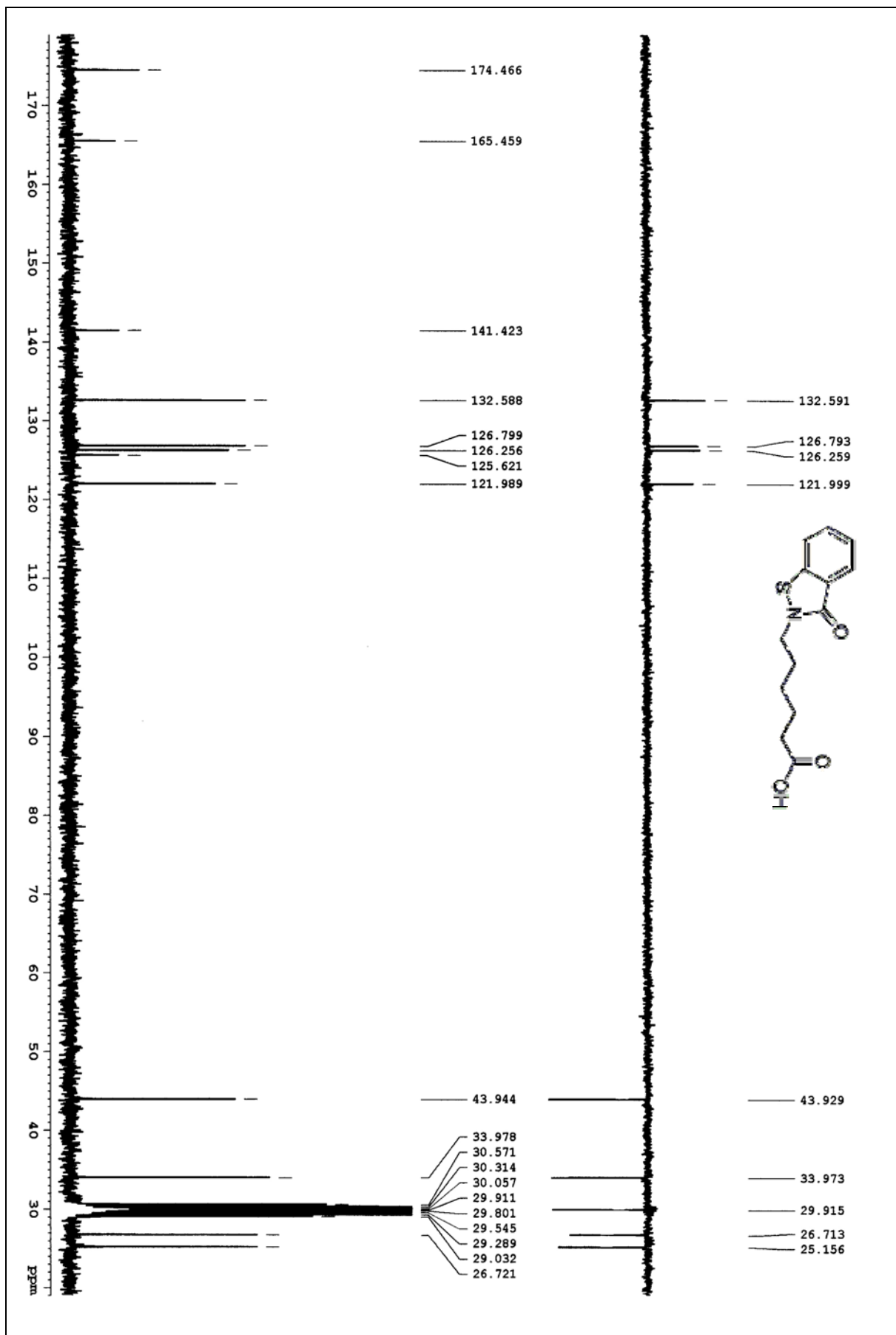
¹³C-RMN : ácido 6-[1(benzof[isotiazol-3-il]oxal) hexanico (112)

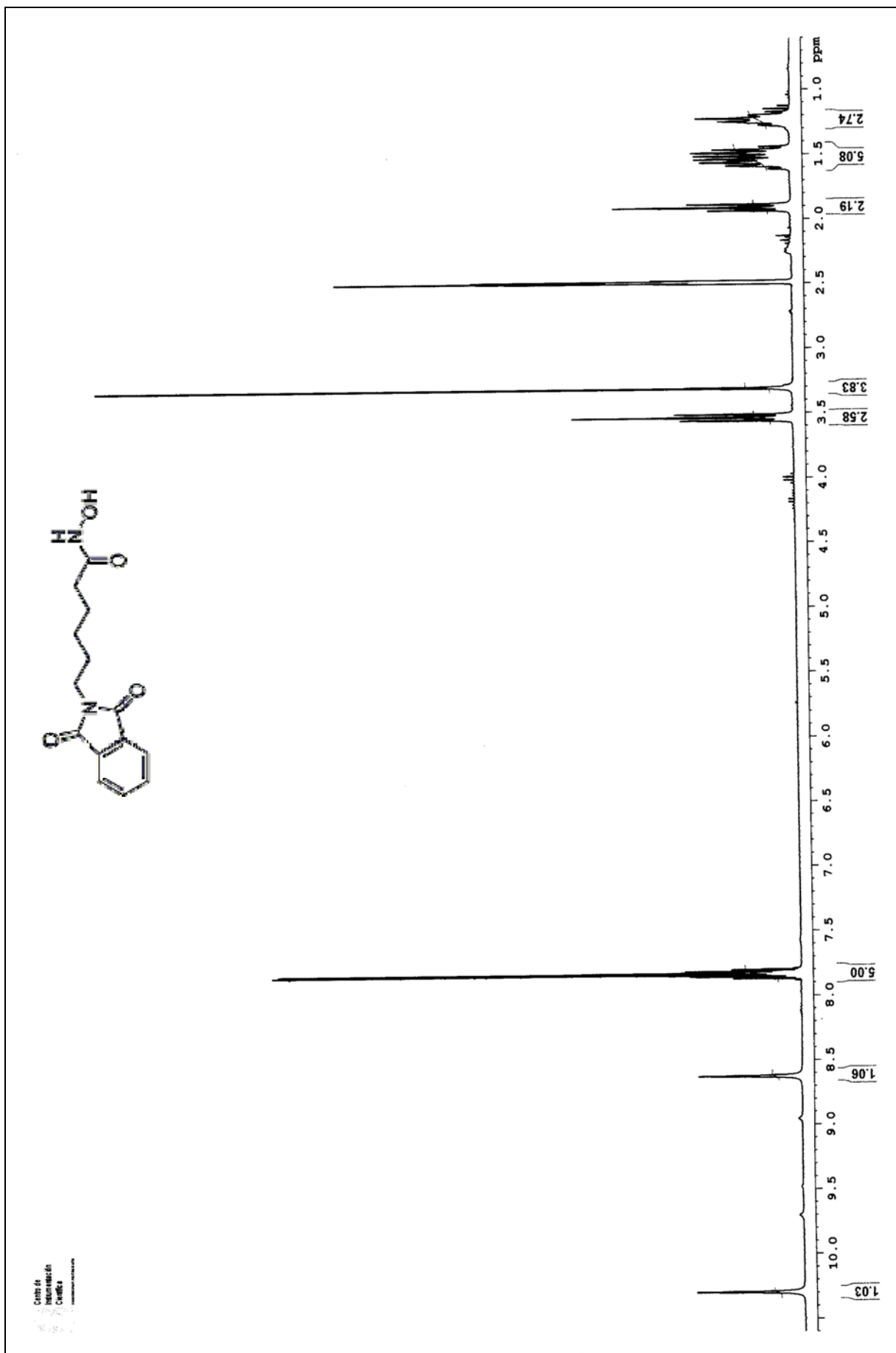




¹H-RMN: ácido 6-(benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona-2-yl)hexanoico (113)

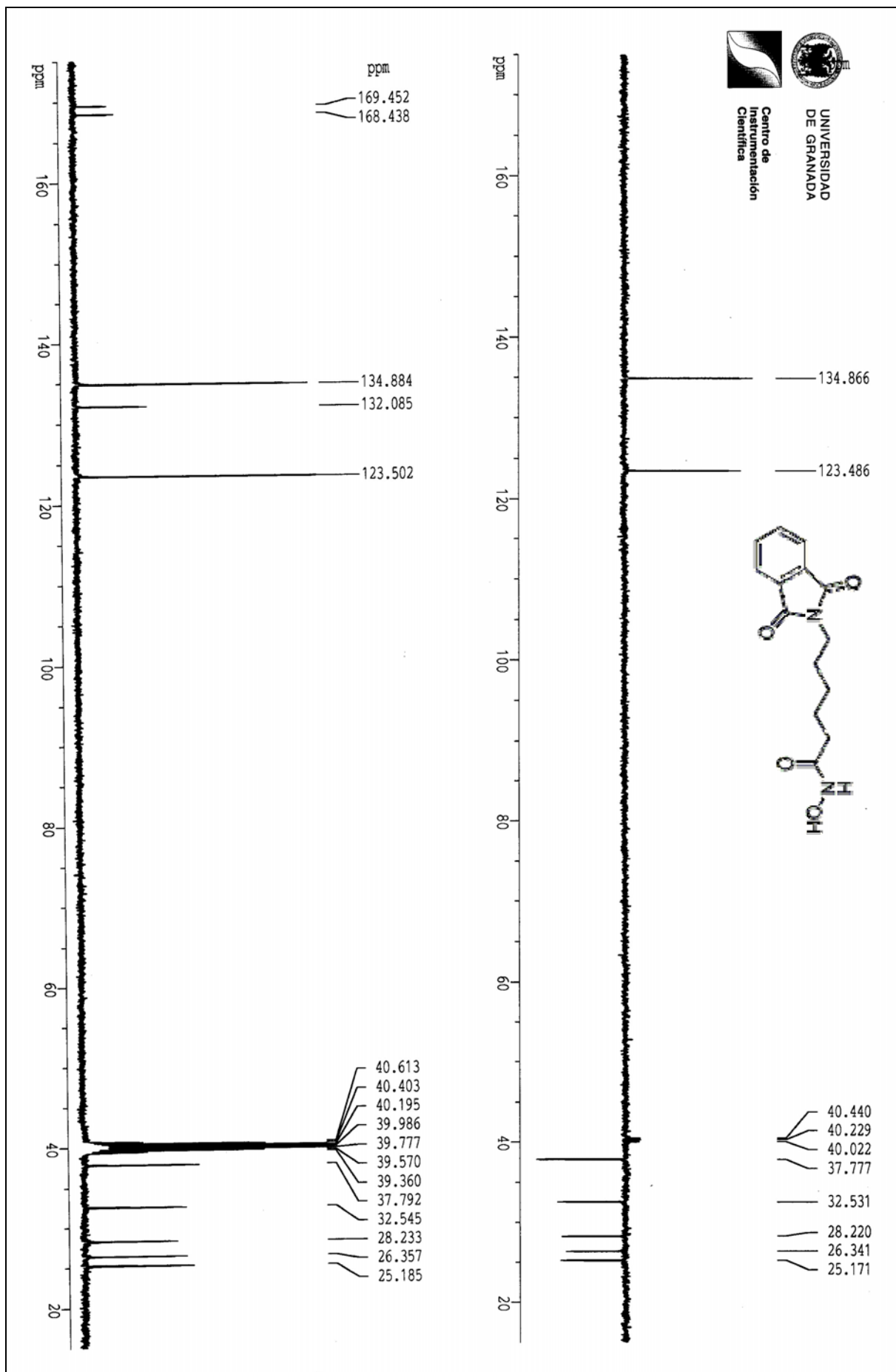
¹³C-RMN : ácido 6-(benzof[*l*]isotiazol-3(2H)-ona-2-il)hexanoico (113)

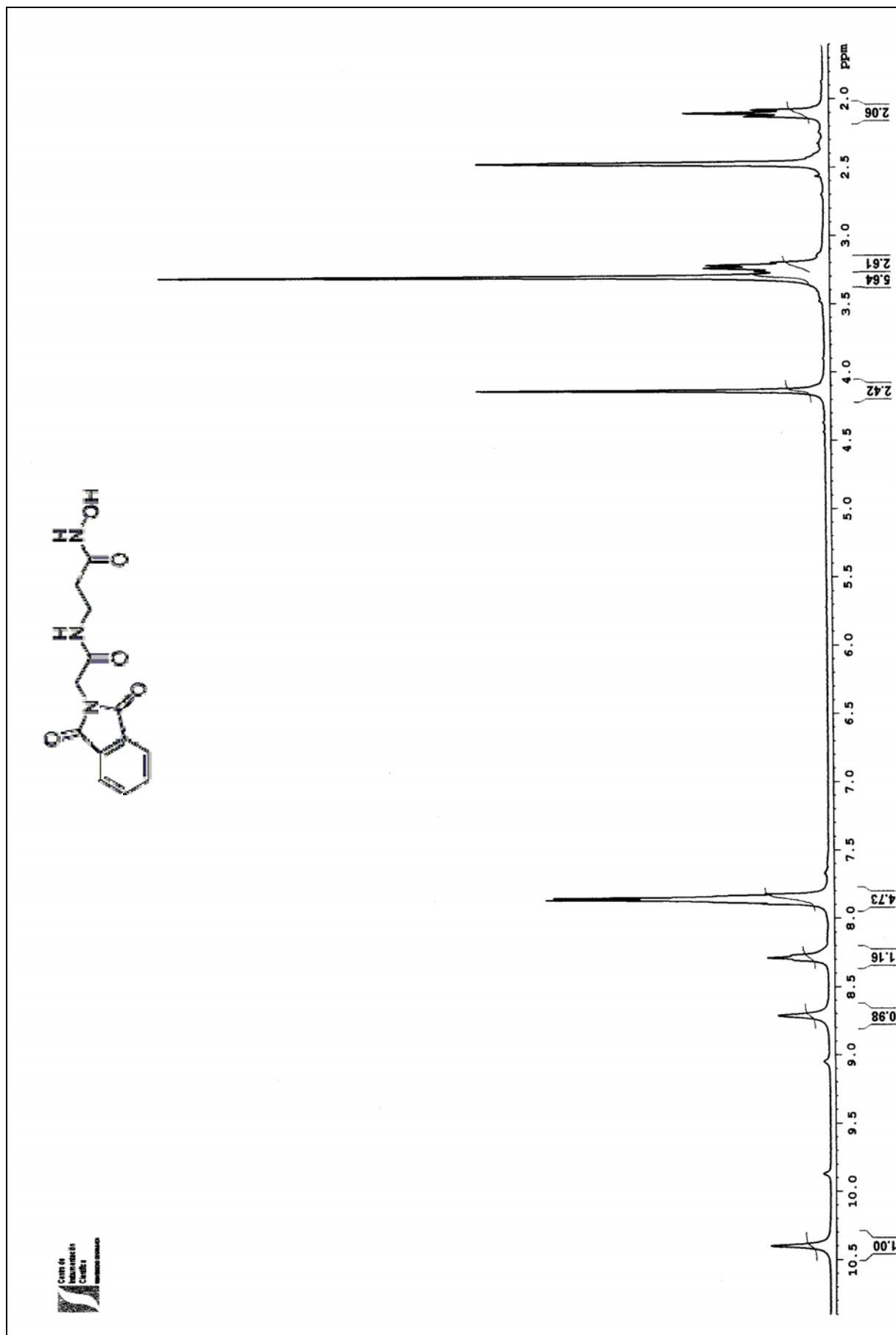




¹H-RMN: 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-20)

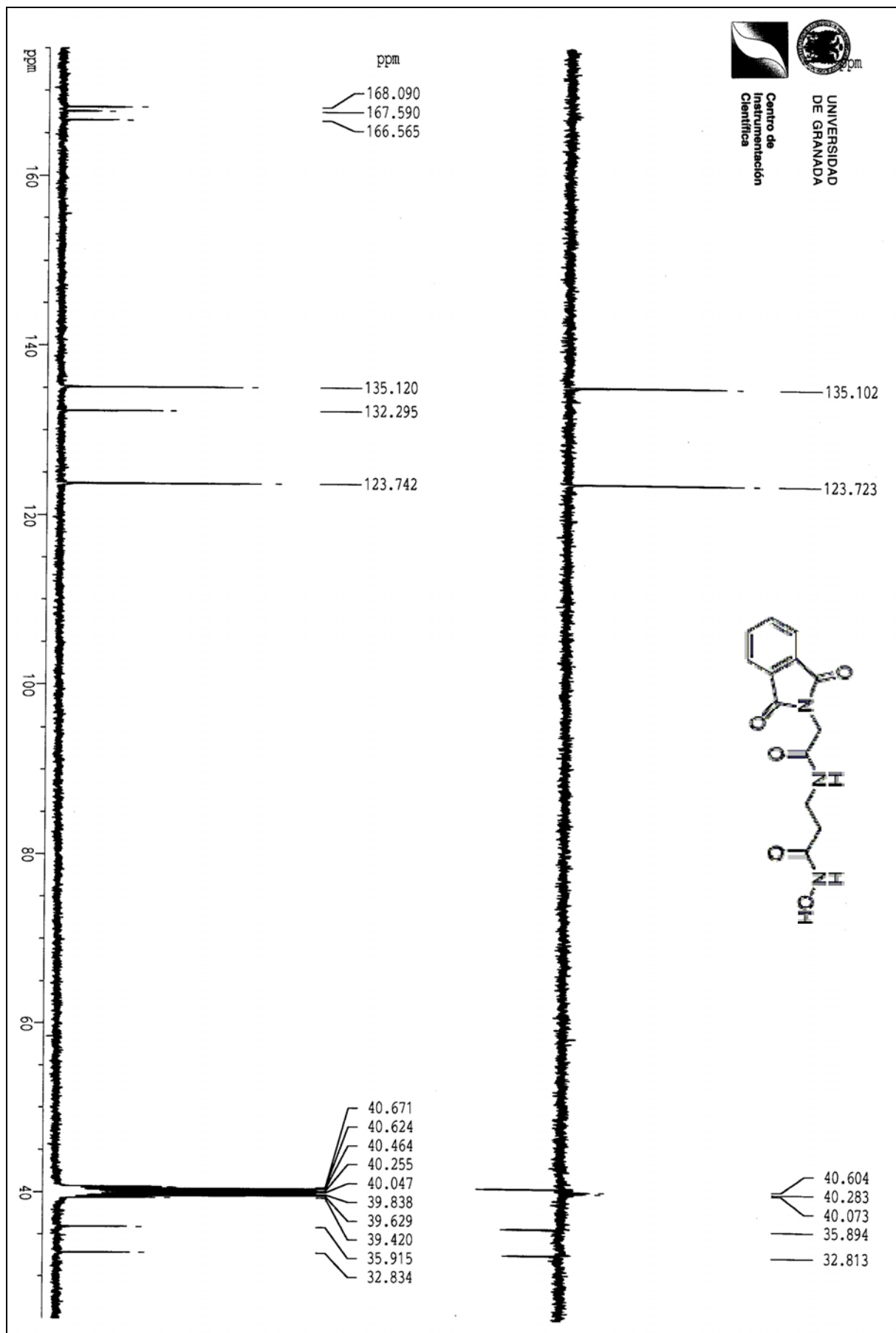
¹³C-RMN: 6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-20)

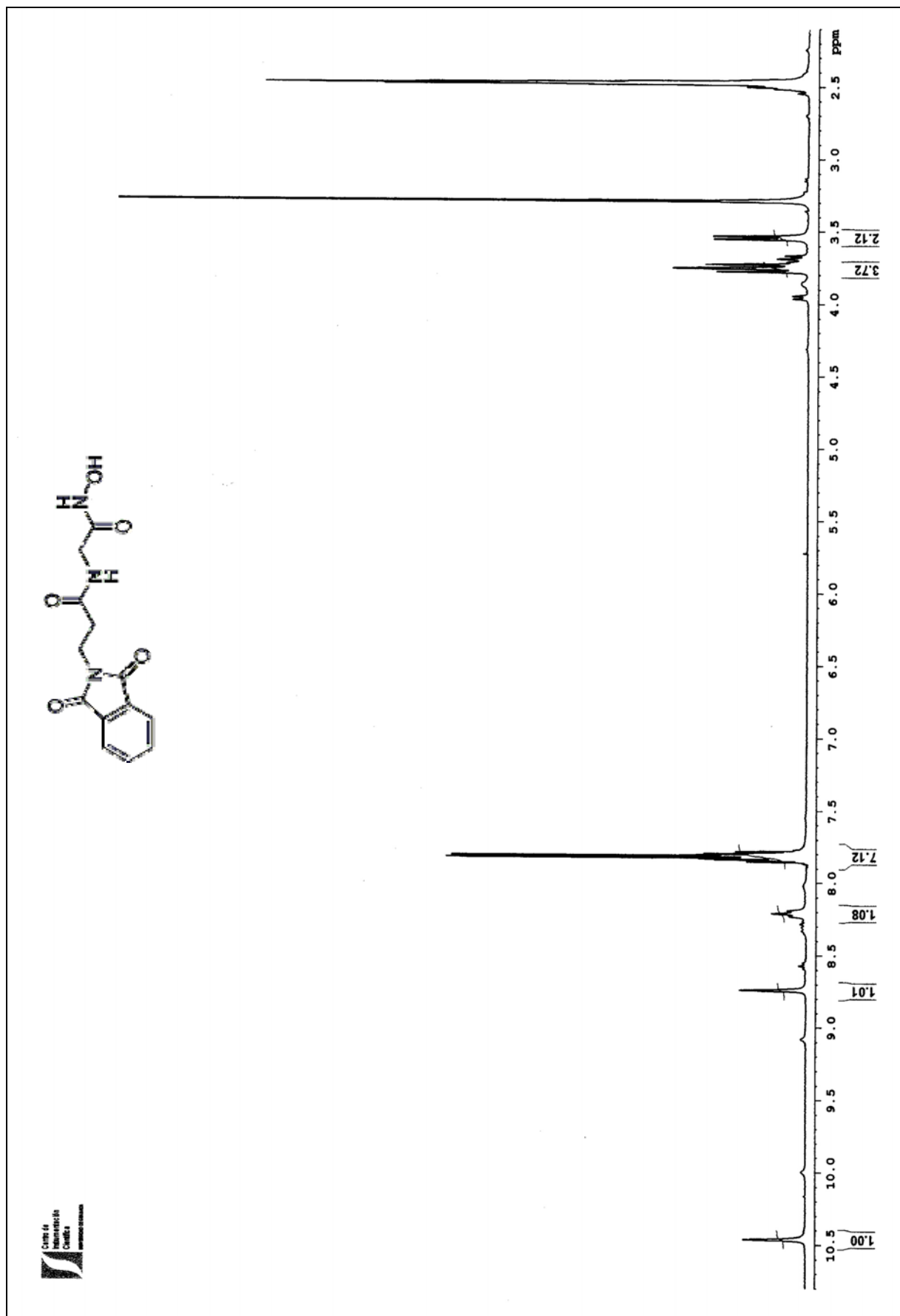




¹H-RMN: 3-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-26)

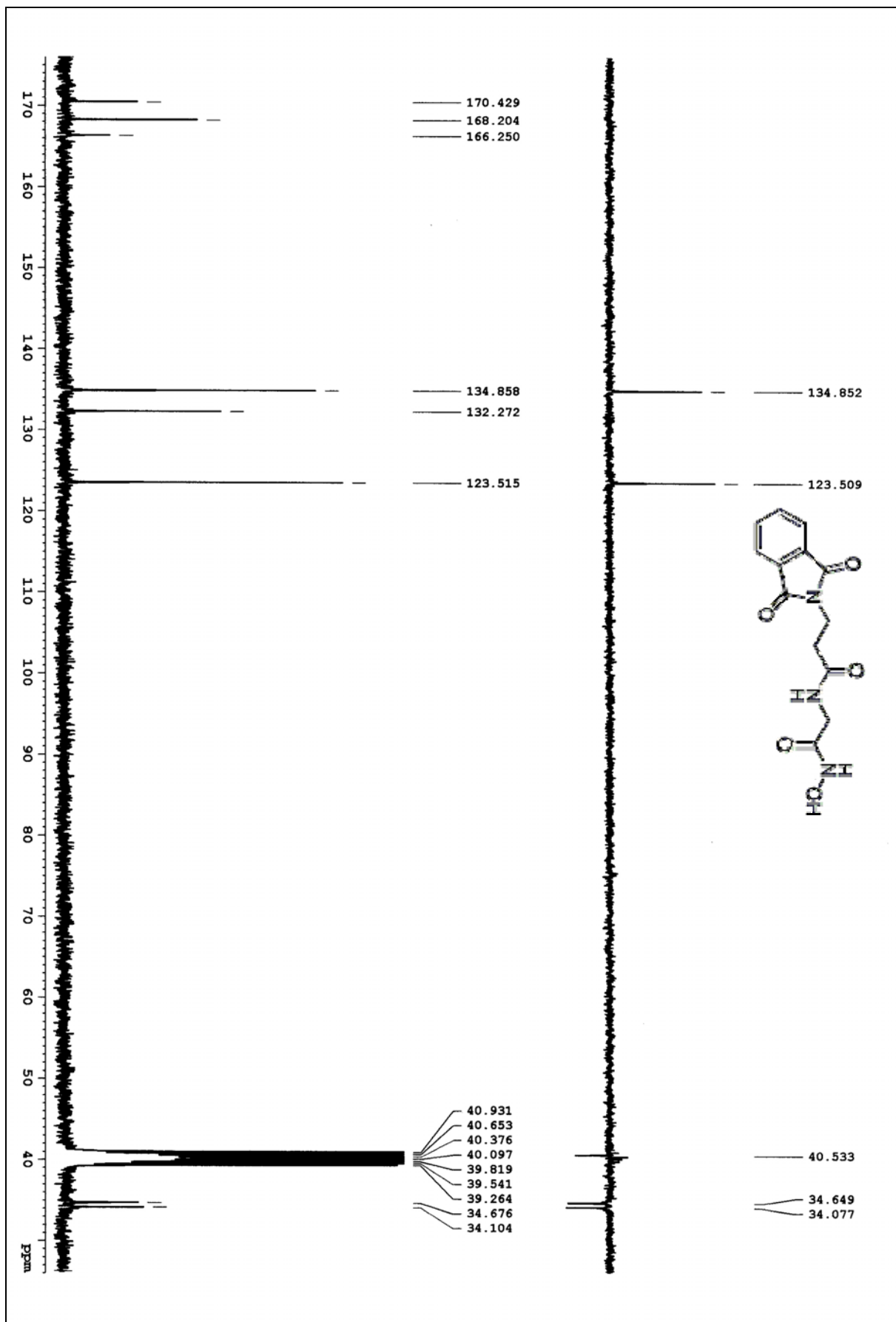
¹³C-RMN : 3-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-26)

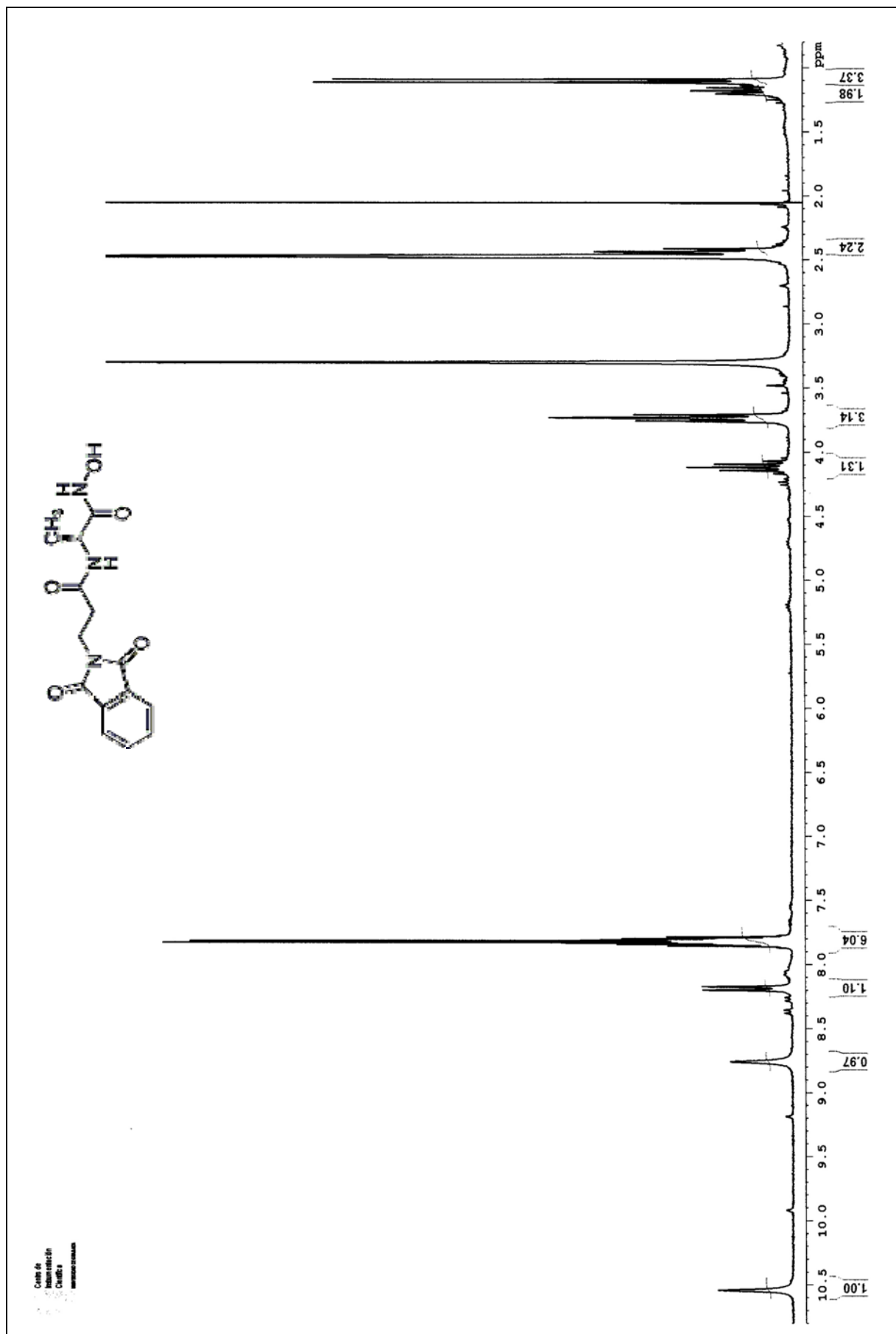




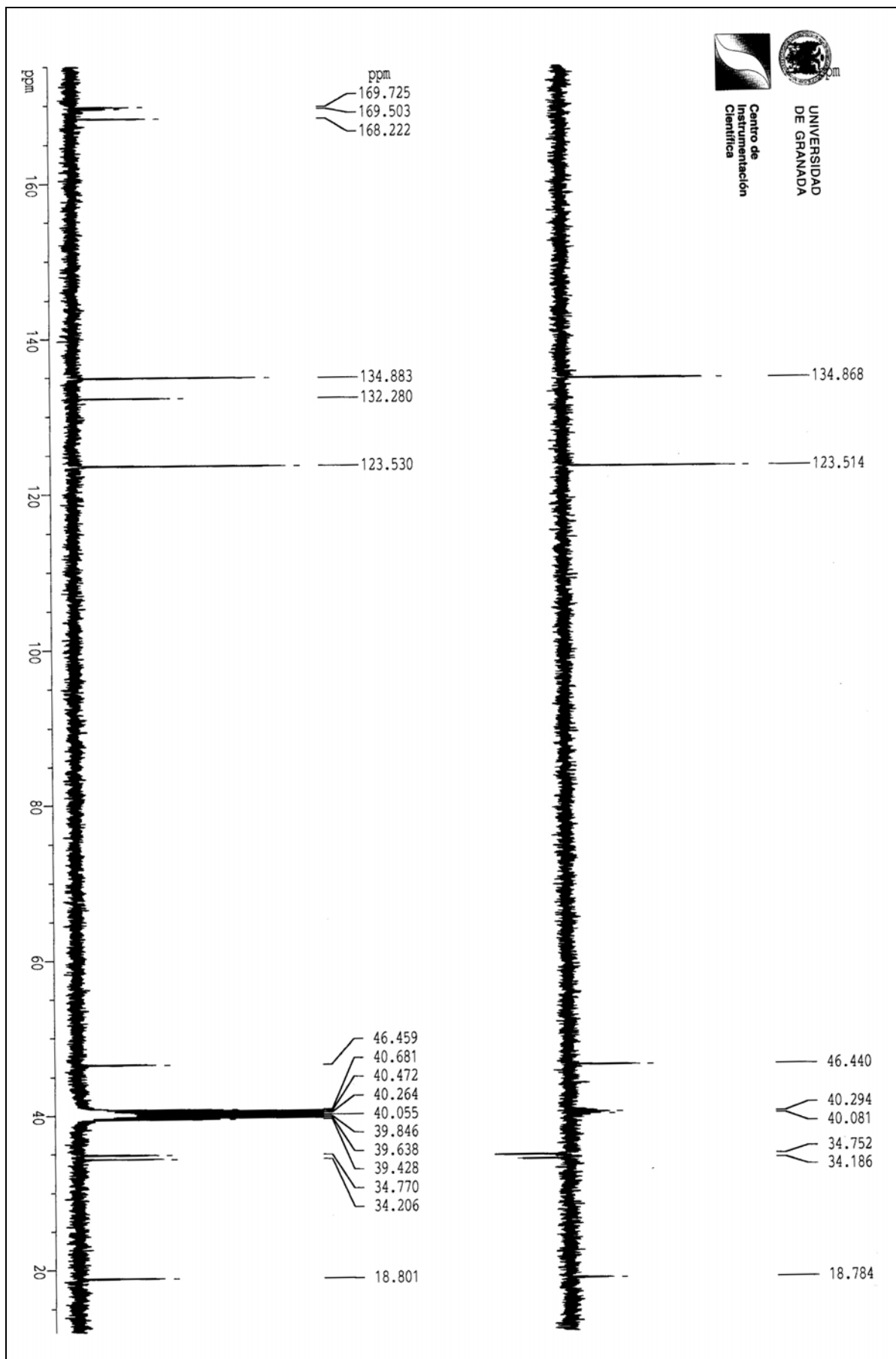
¹H-RMN: 2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-30)

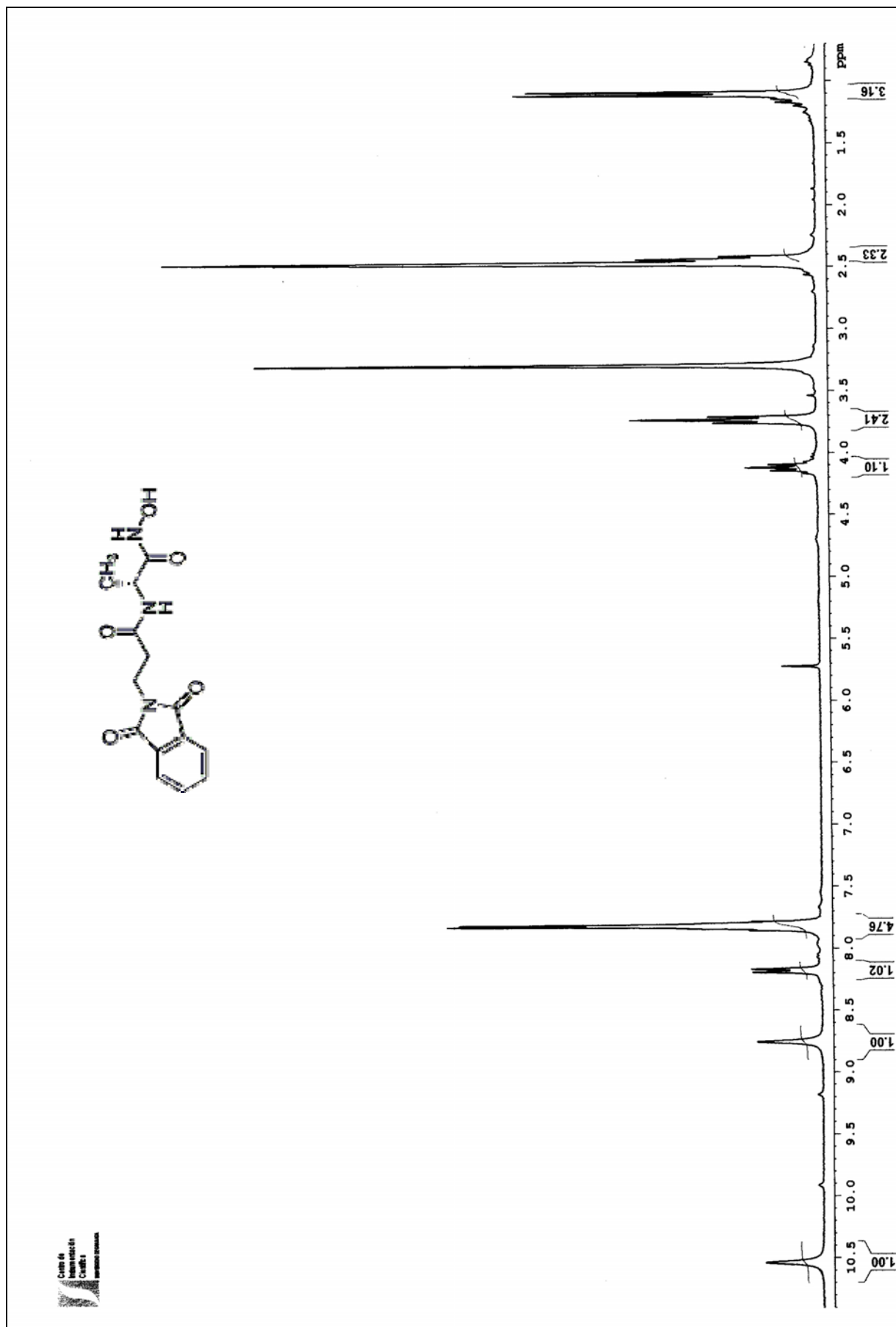
¹³C-RMN : 2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-30)





¹³C-RMN: 2S-2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-33)

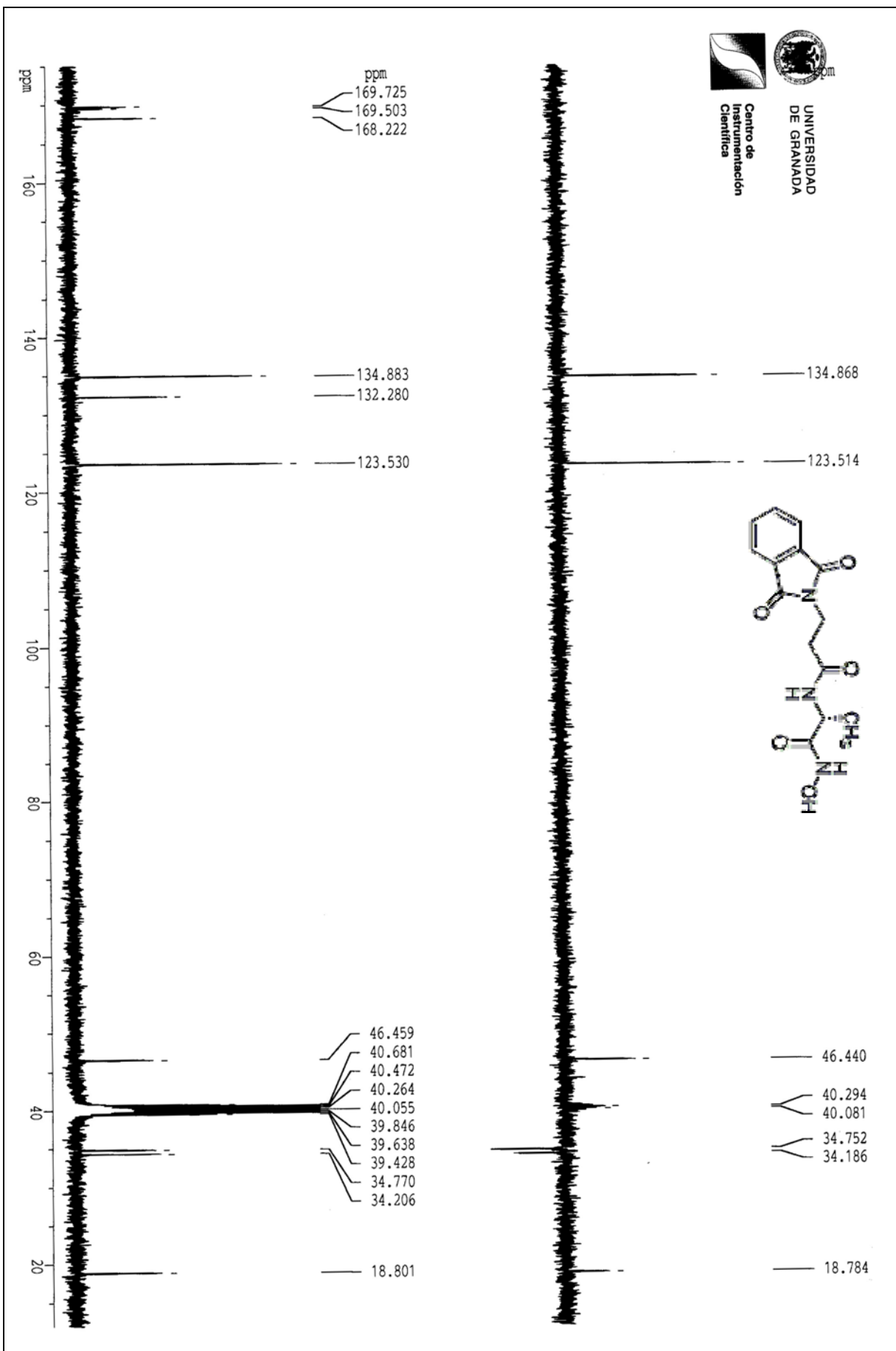


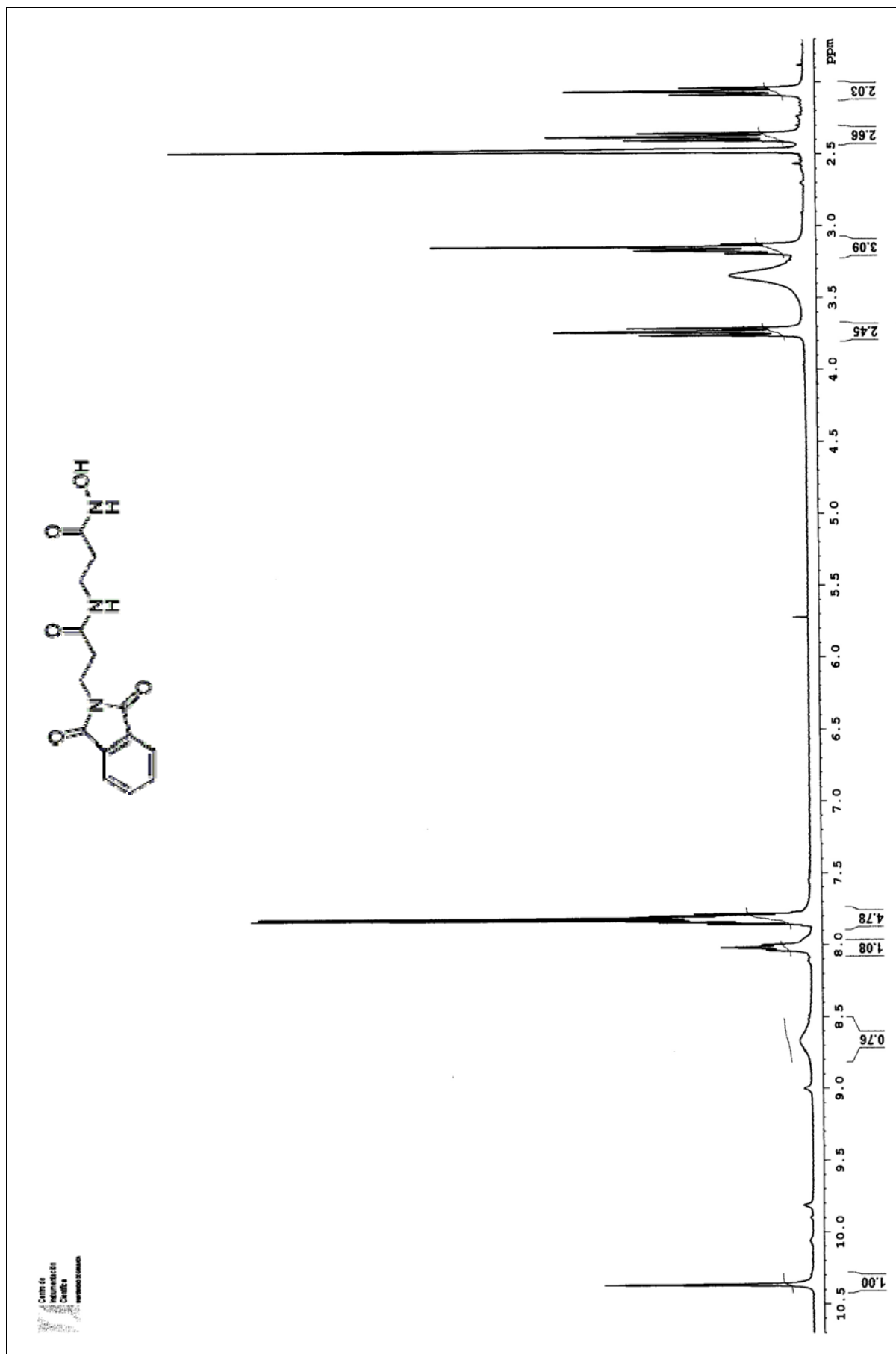


¹H-RMN: 2R-2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-34)

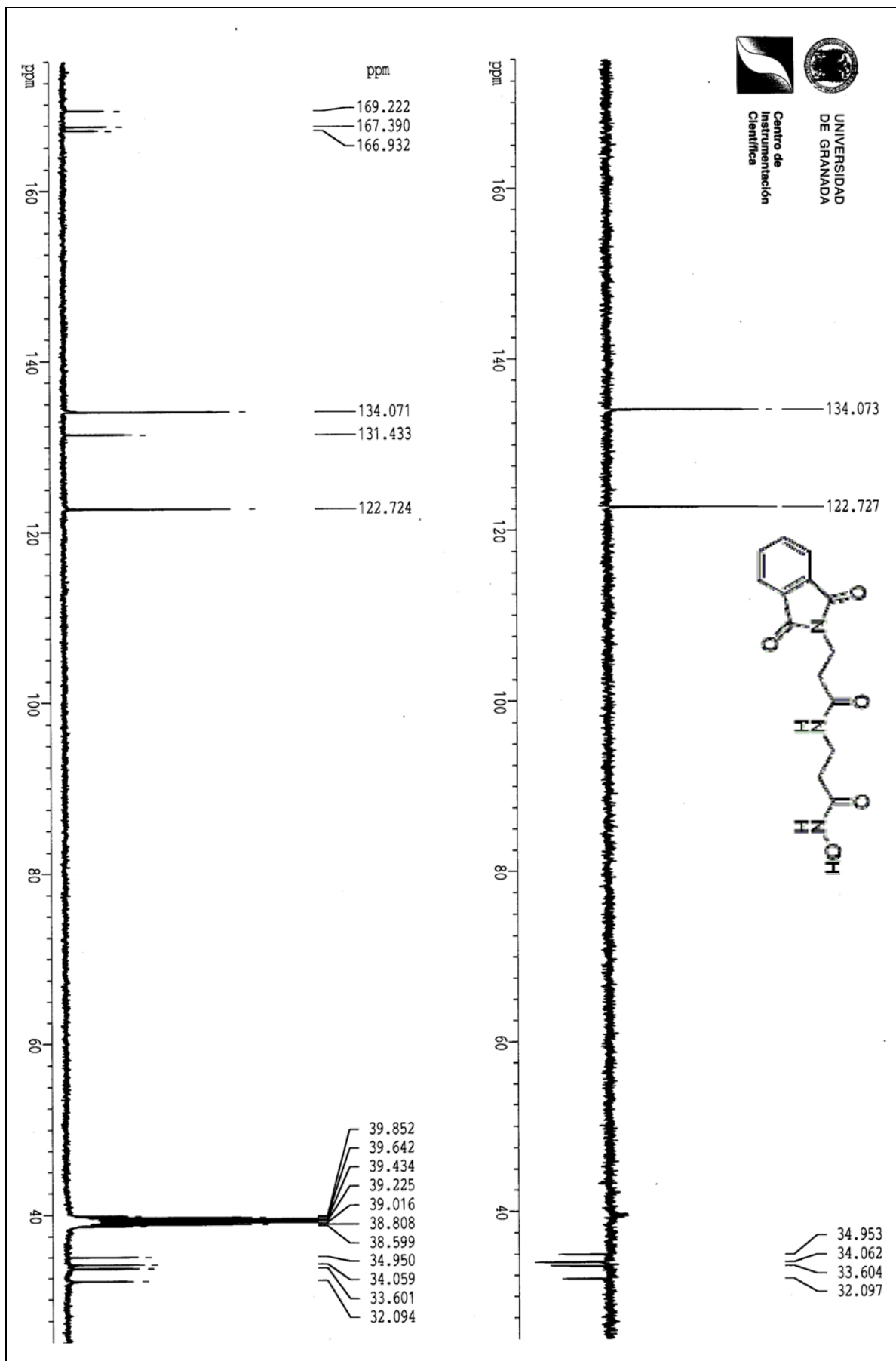


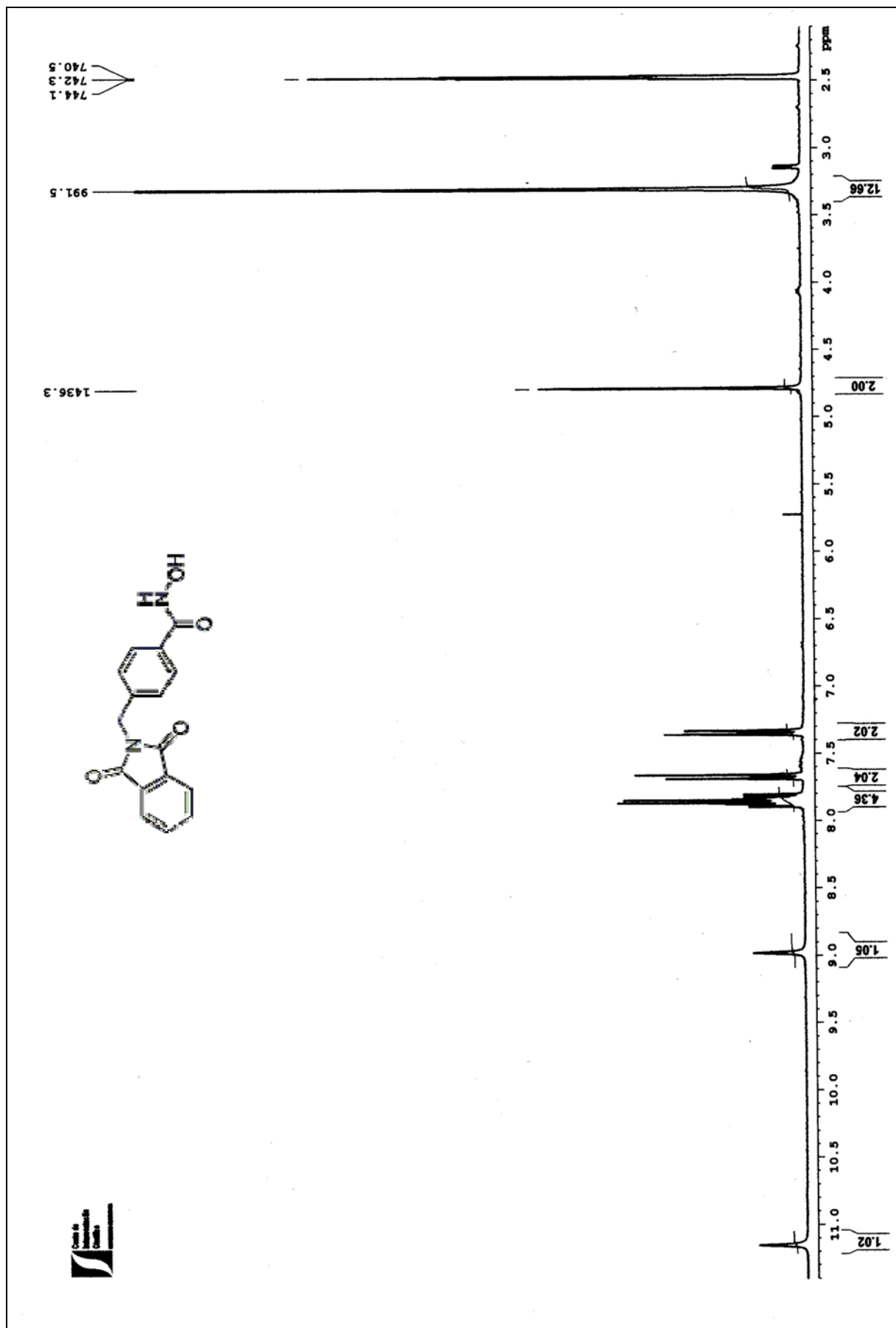
¹³C-RMN: 2-R-2-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-34)



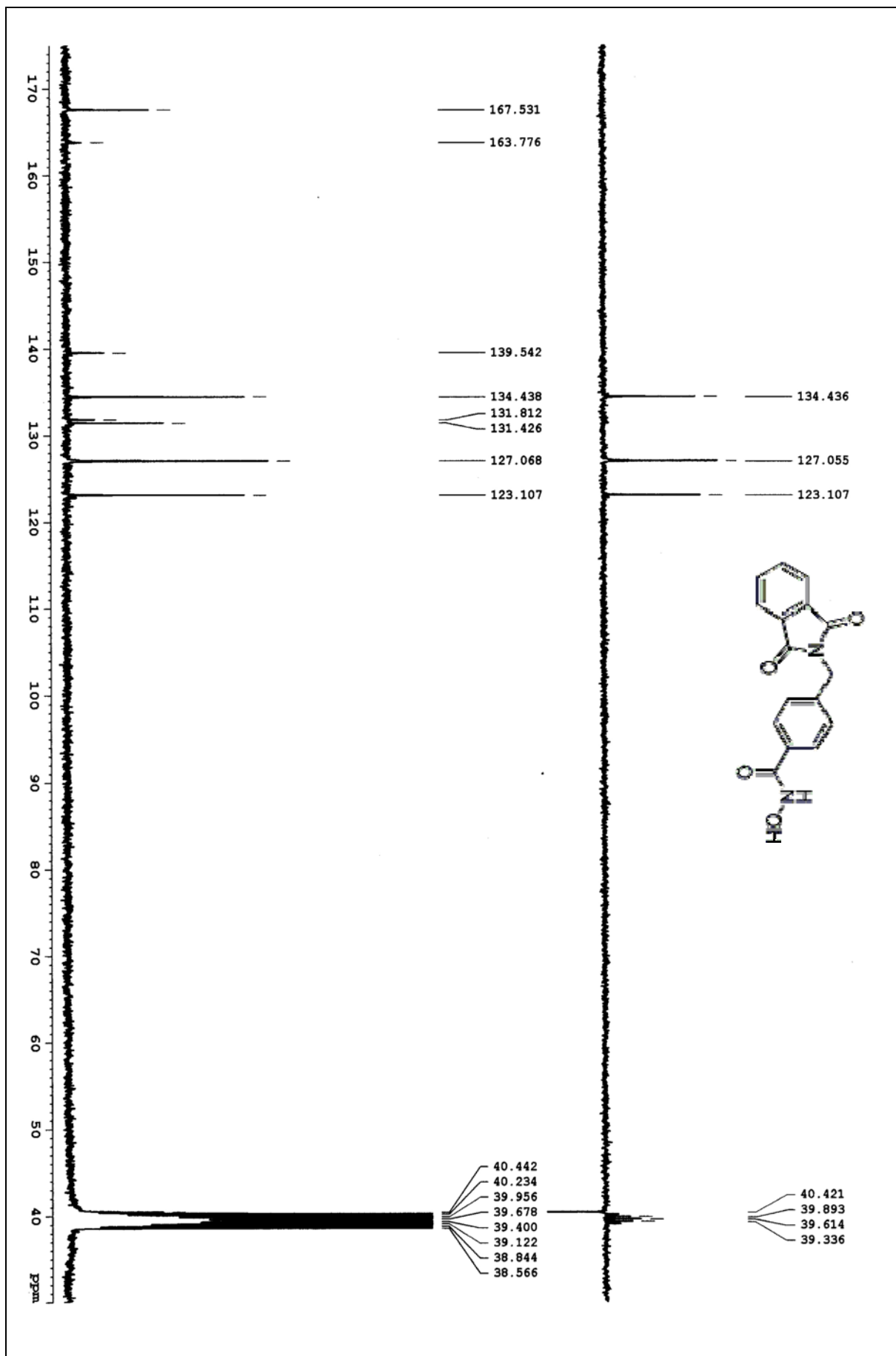


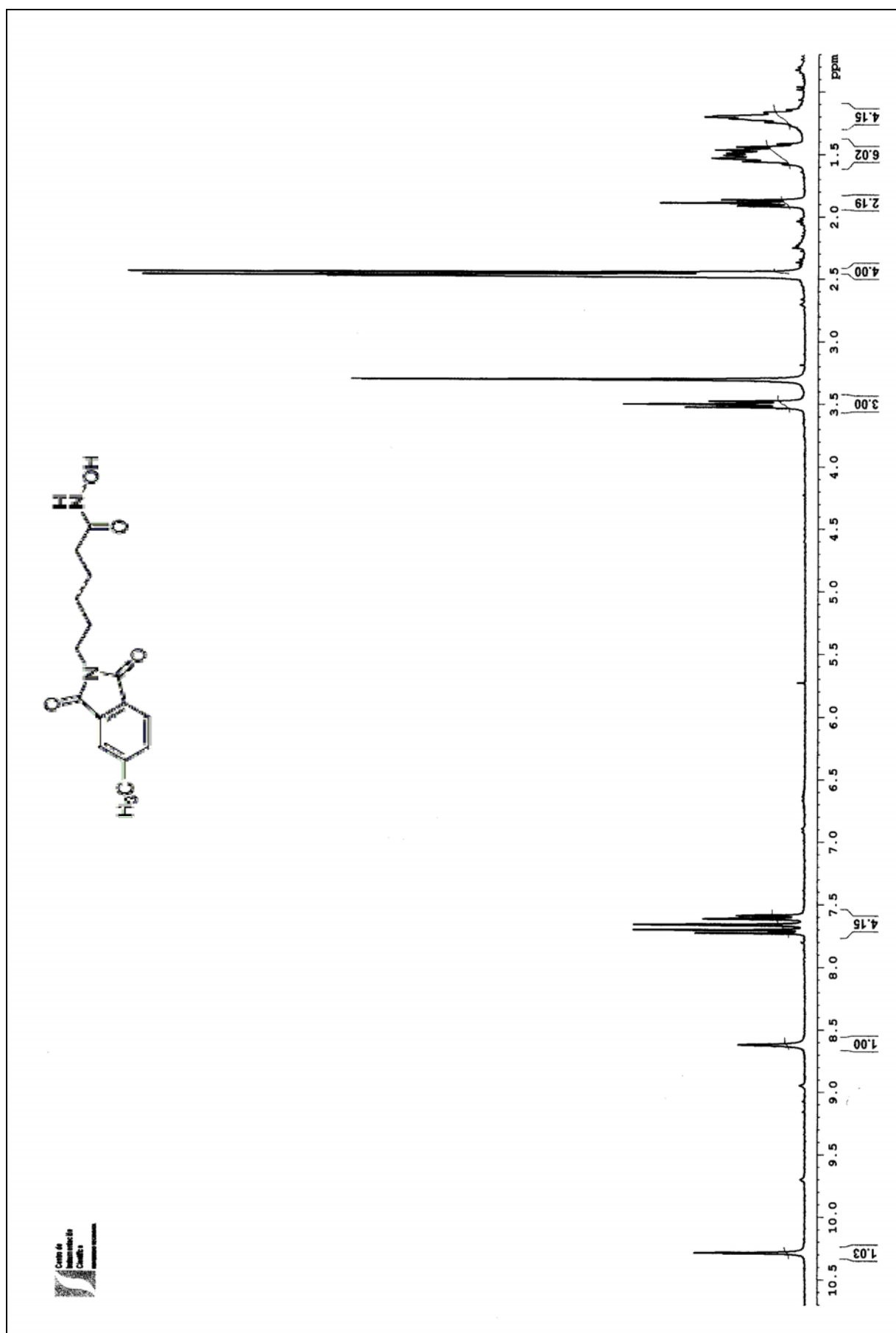
¹³C-RMN : 3-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-32)





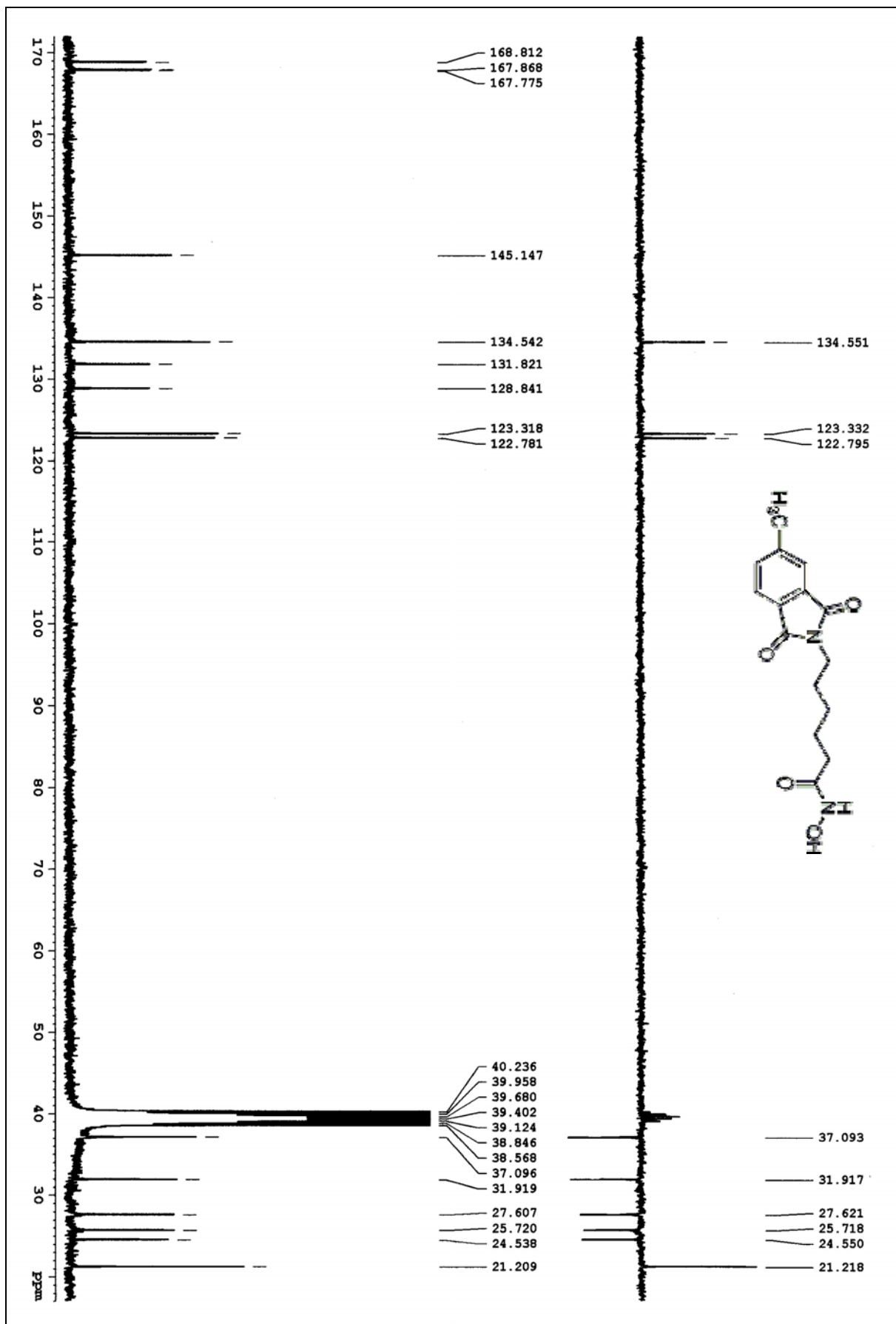
¹³C-RMN : 4-[(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-metil]-N-hidroxi benzamida (MTC-126)

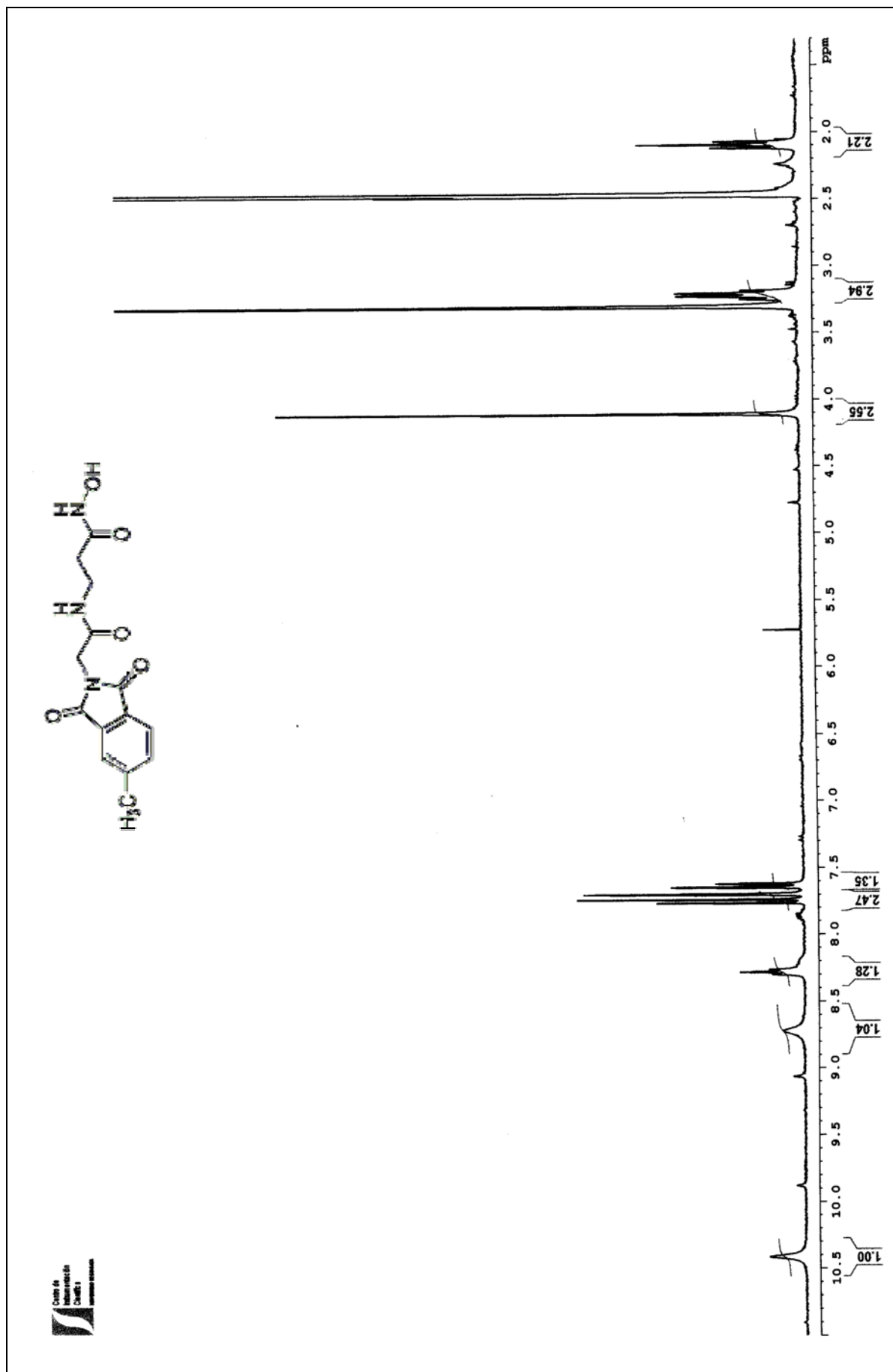




¹H-RMN: 6-(5-metil-1,3-dioxoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-141)

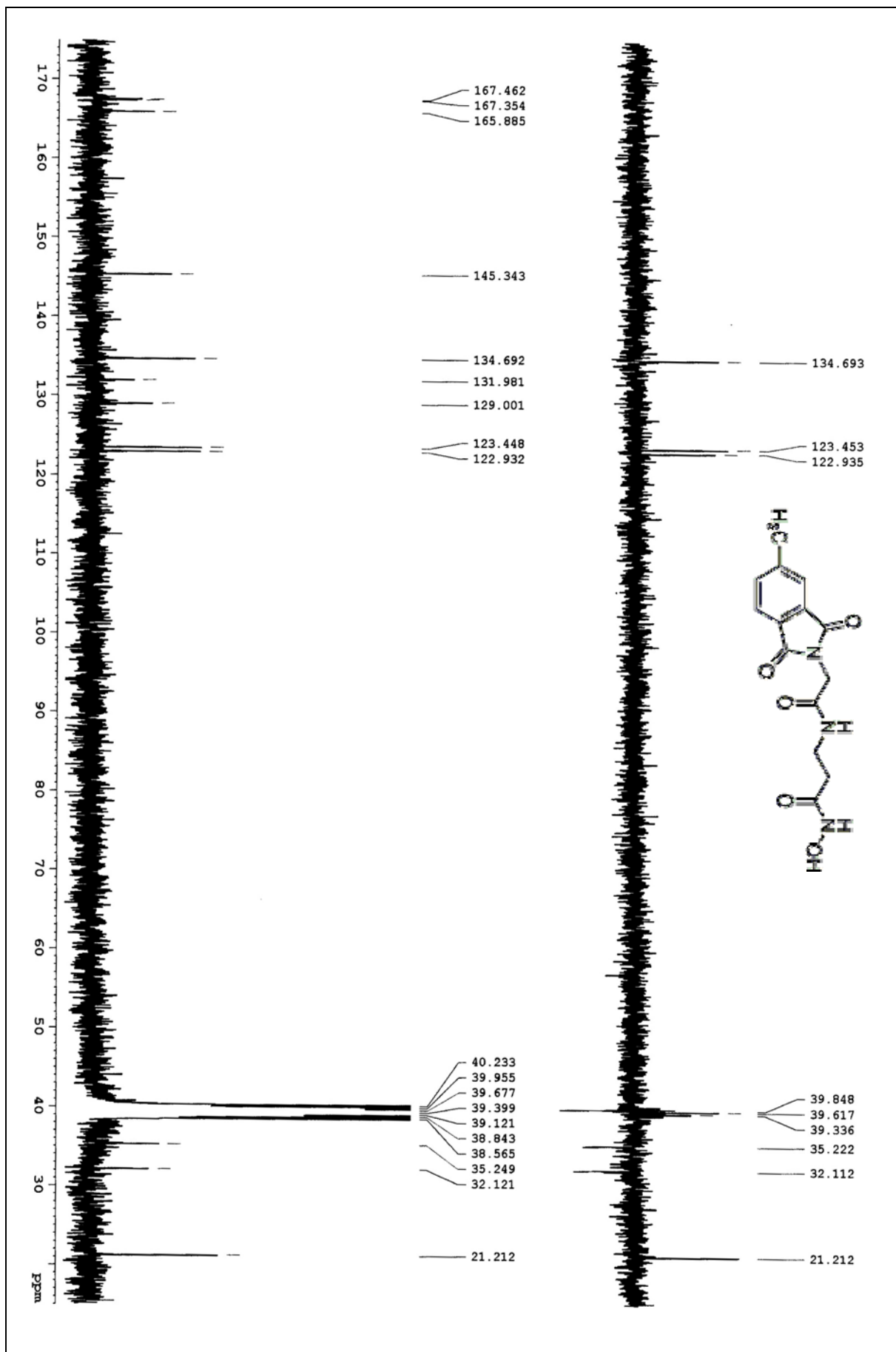
¹³C-RMN: 6-(5-metil-1,3-dioxoisindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-141)

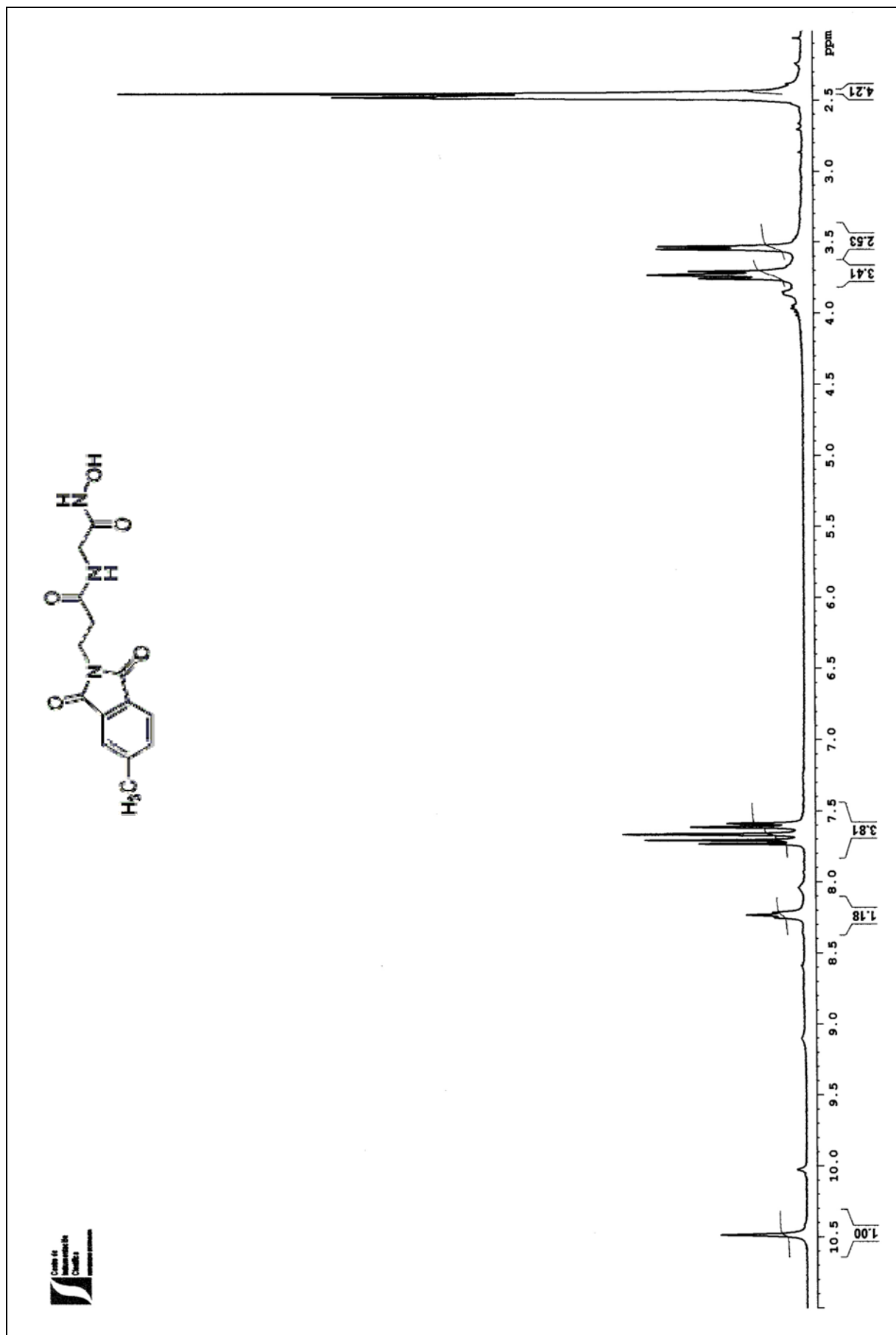




¹H-RMN: 3-[2-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-86)

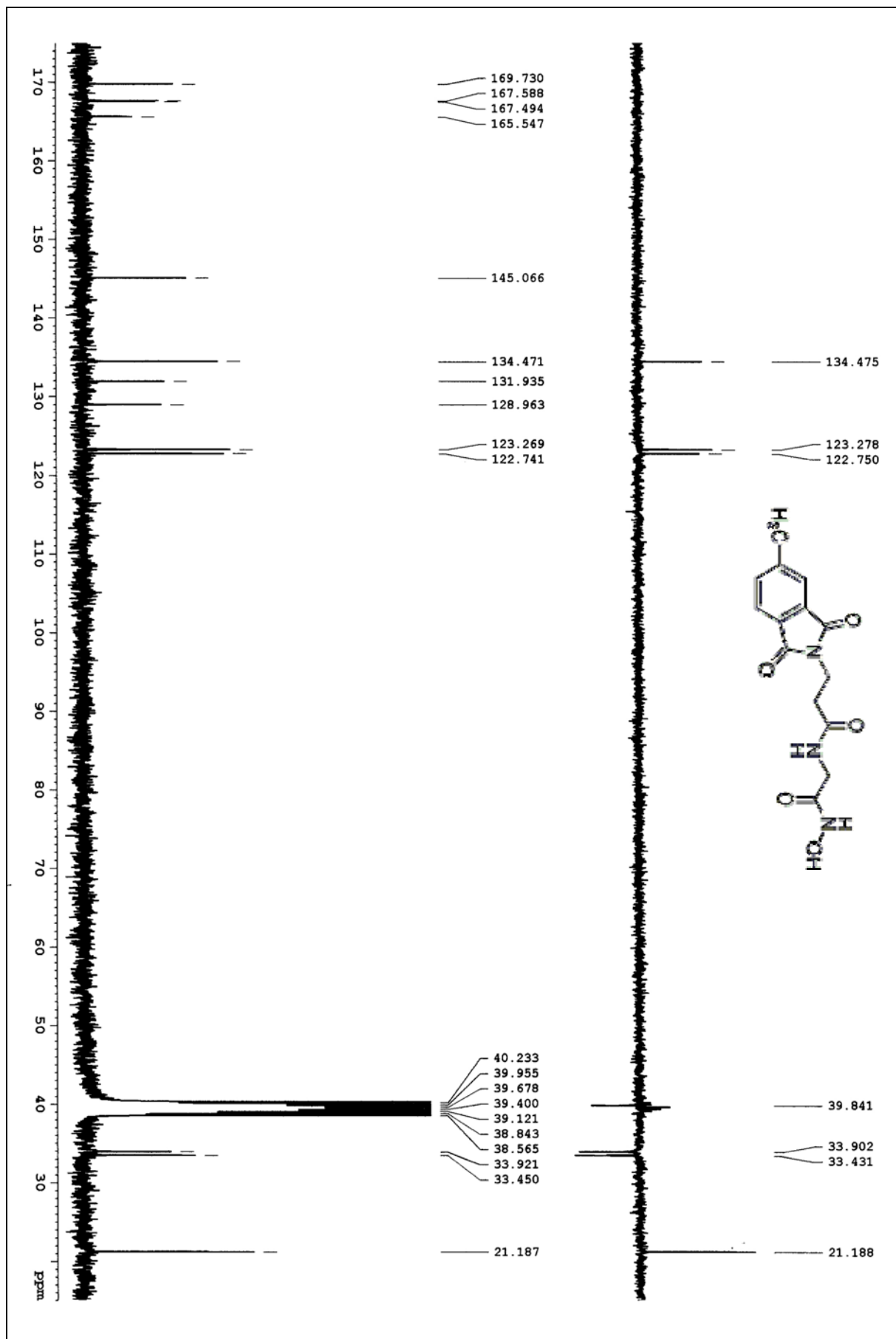
¹³C-RMN : 3-[2-(5-metil-1,3-dioxo-isolindol-2-il)acetamidol-N-hidroxiopropanamida (MTC-86)

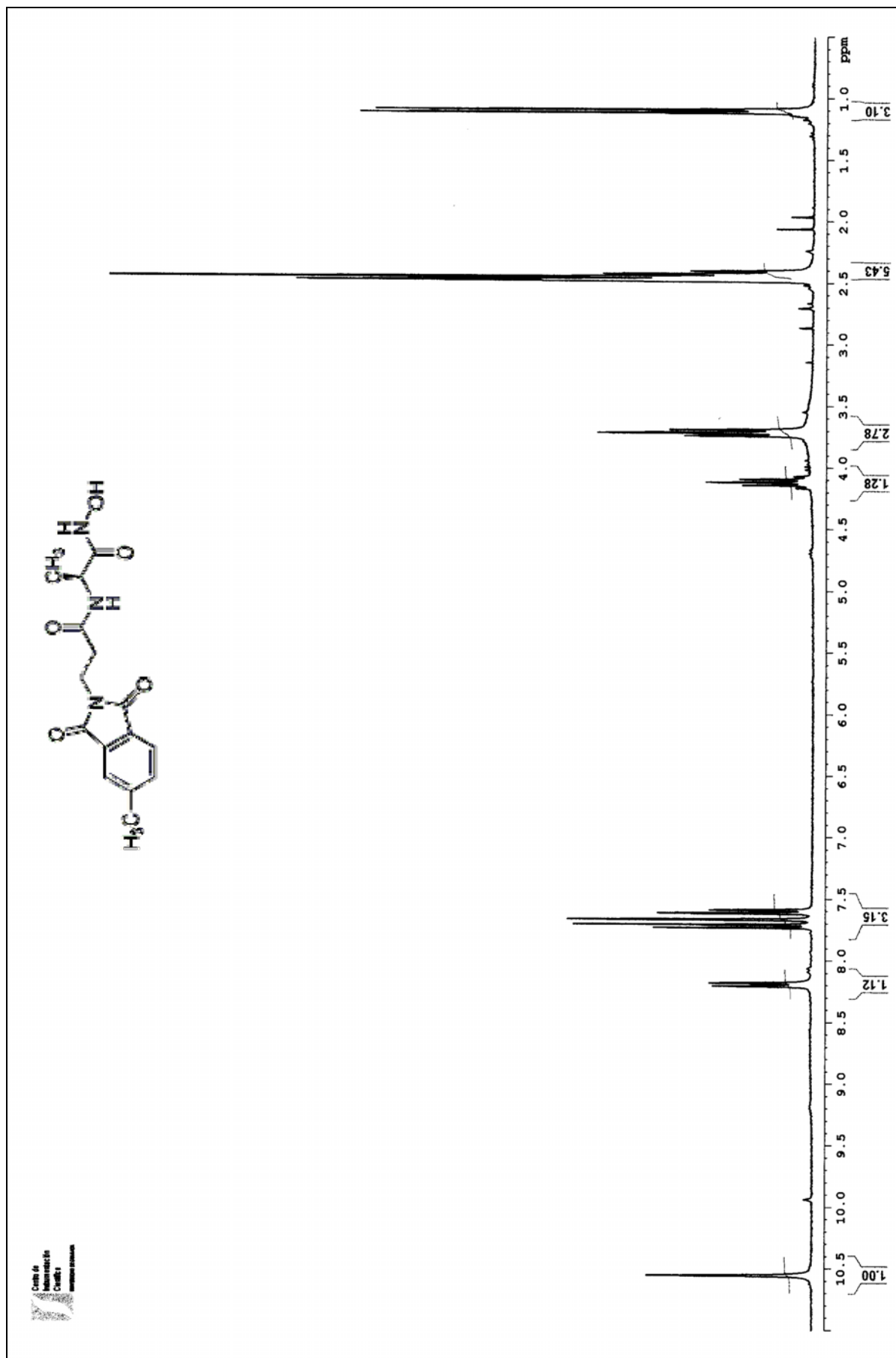




¹H-RMN: 2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-106)

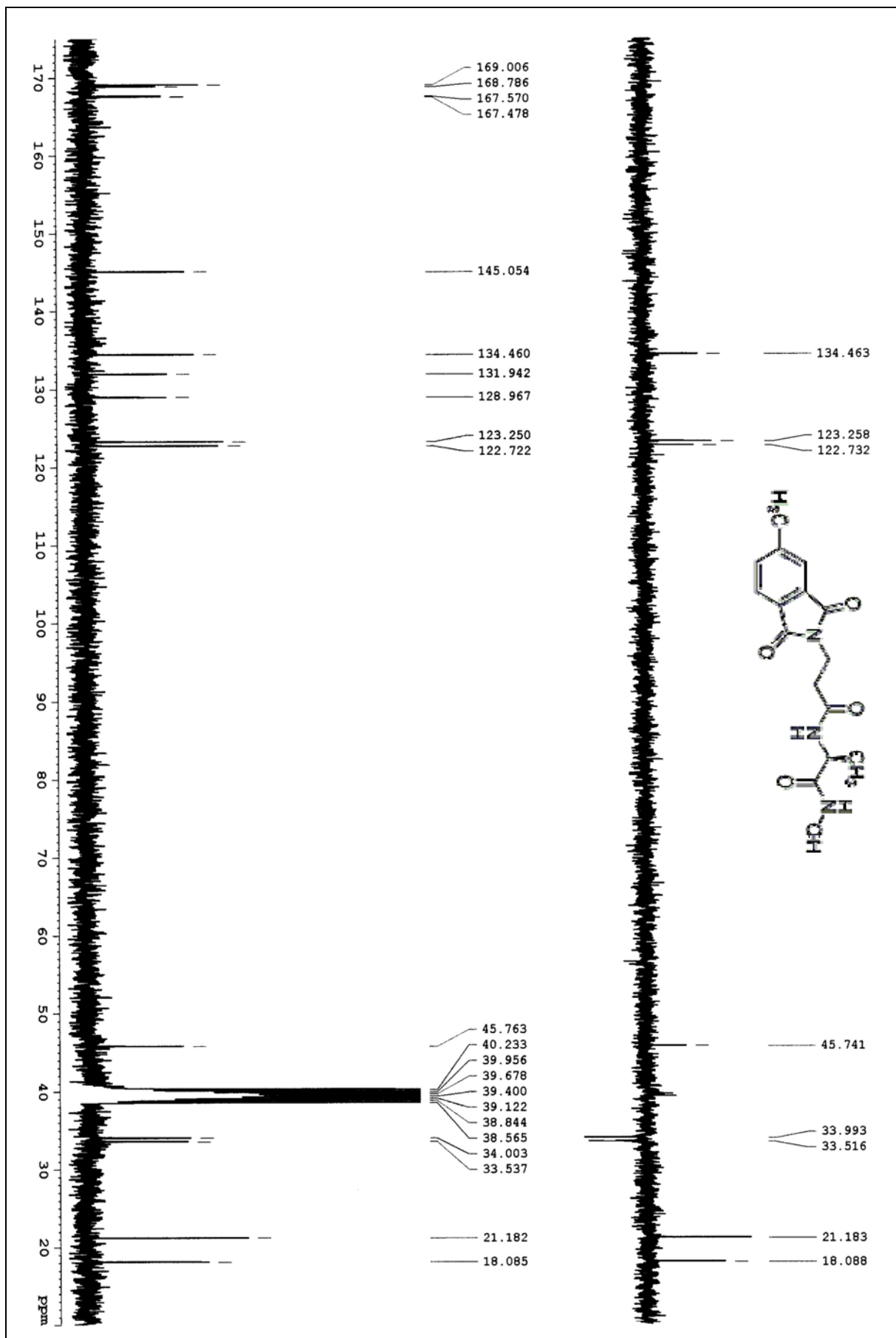
¹³C-RMN: 2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isolindol-2-il)propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-106)

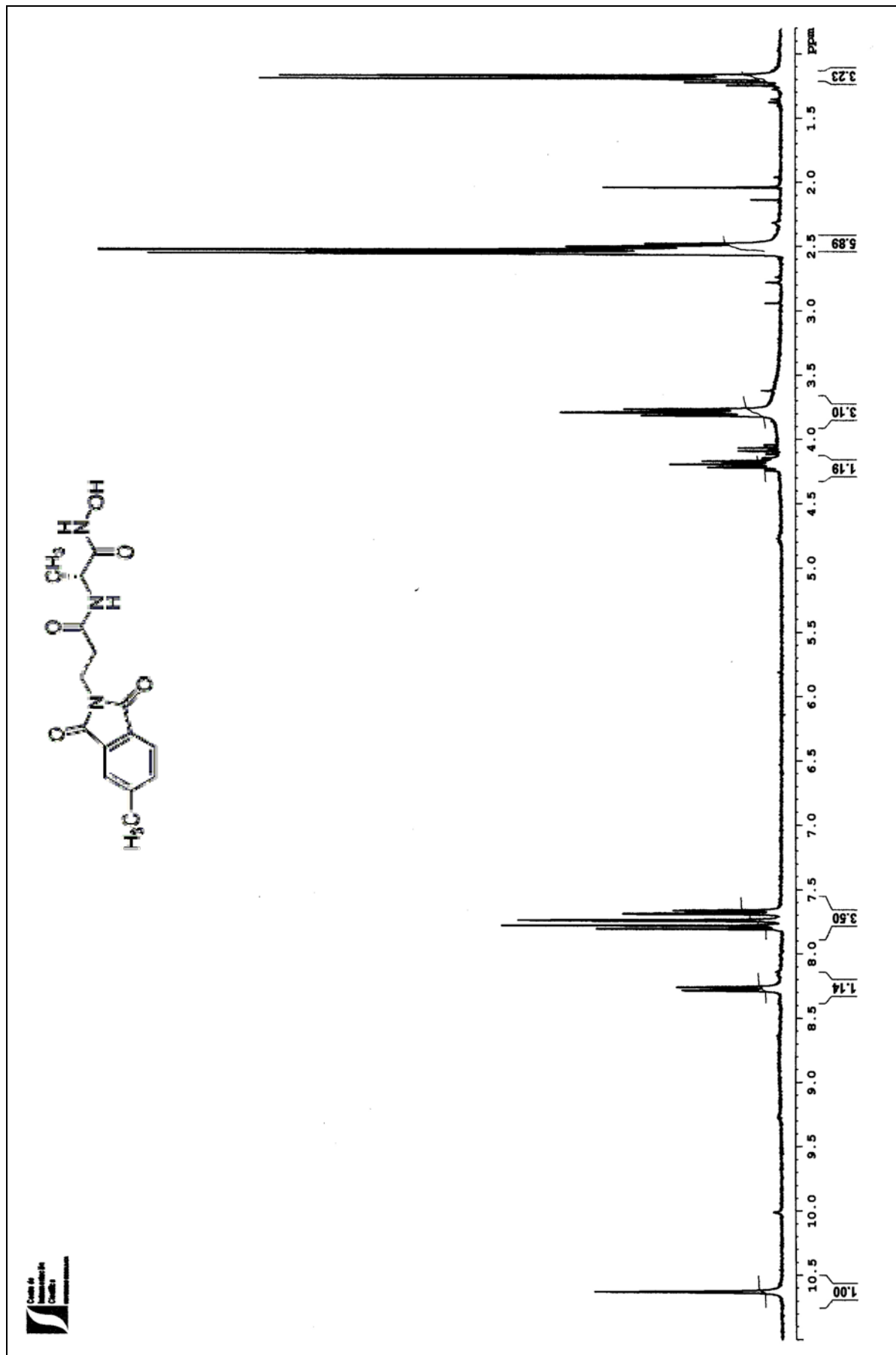




¹H-RMN: 2S-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-107)

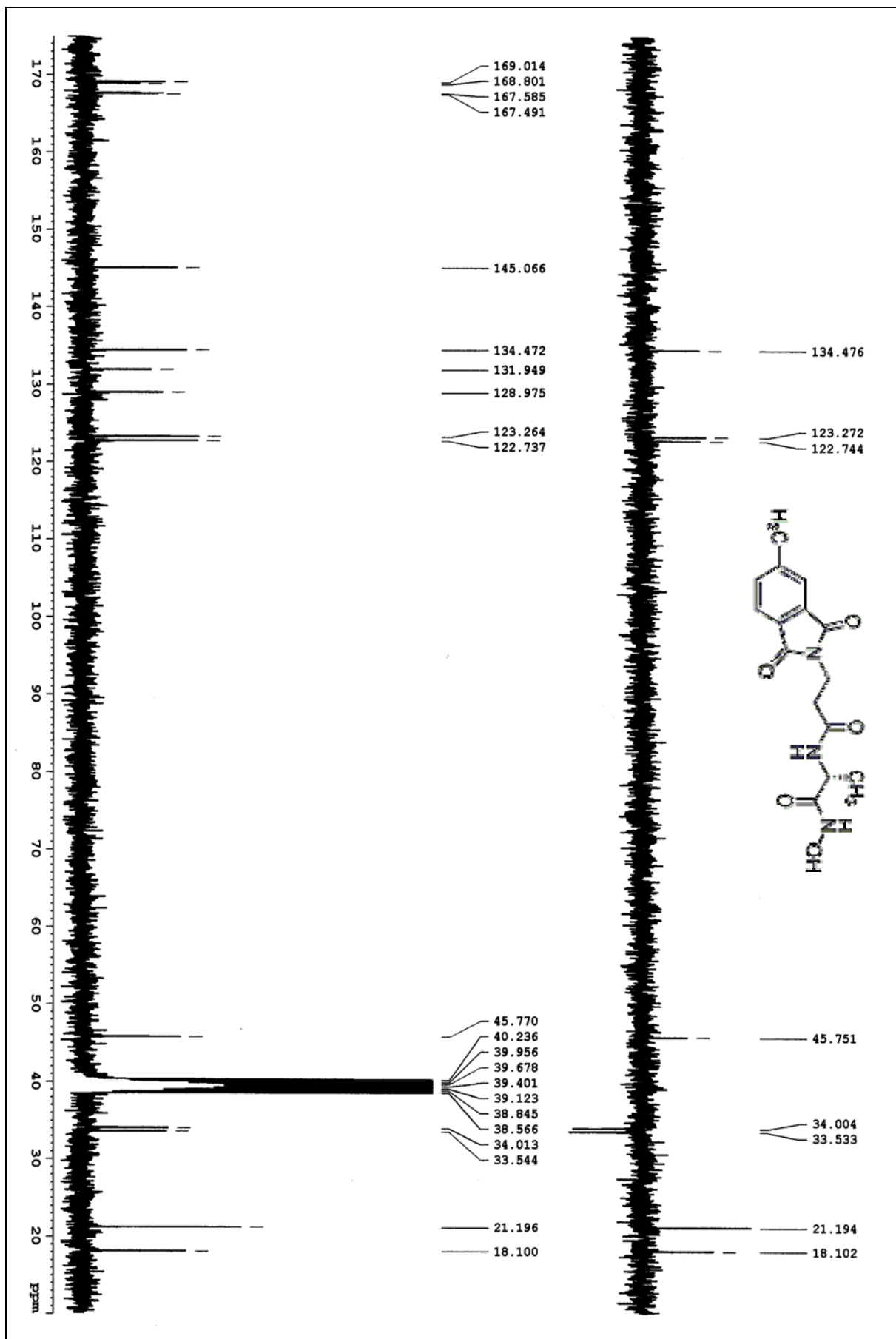
¹³C-RMN : 2S-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-107)

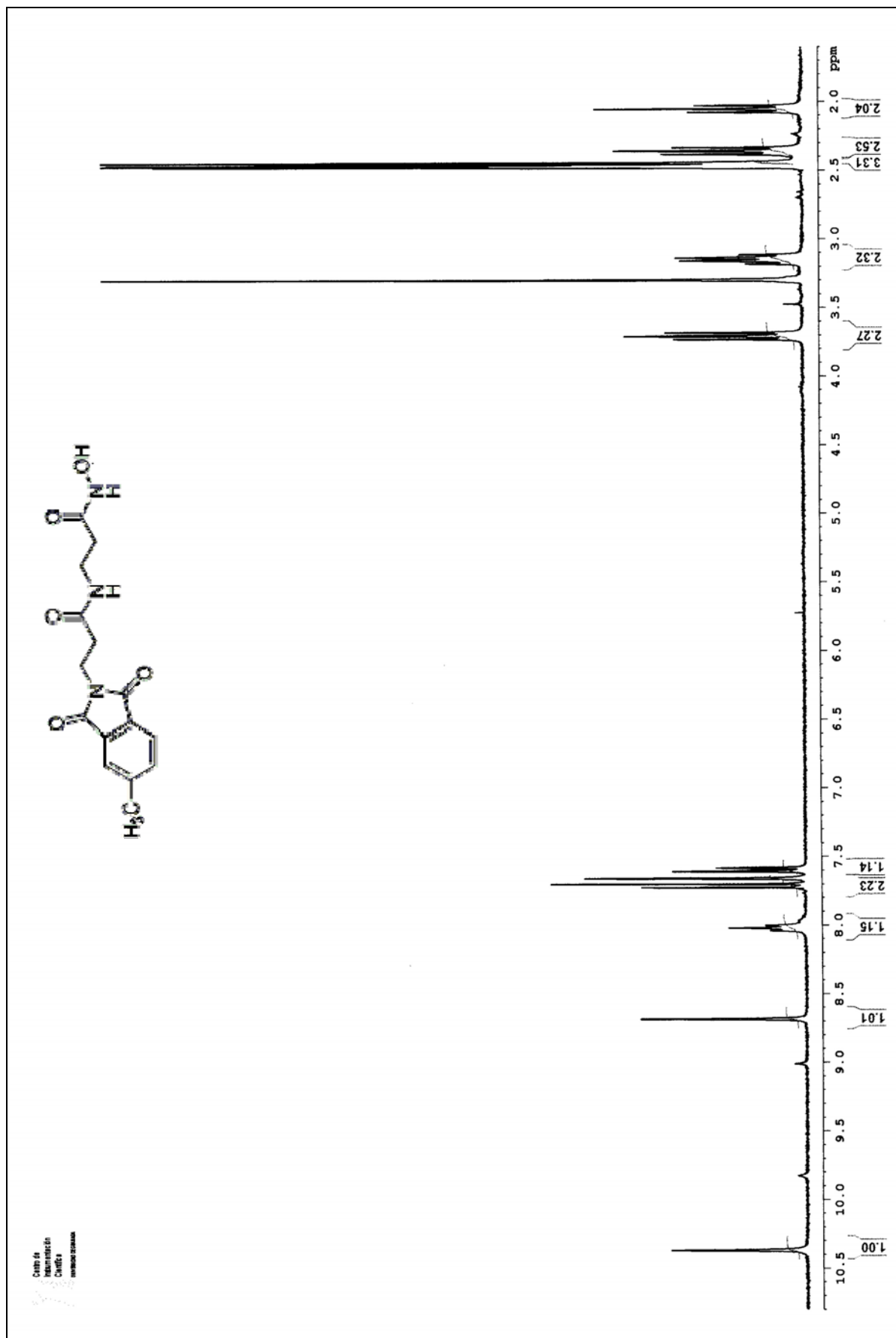




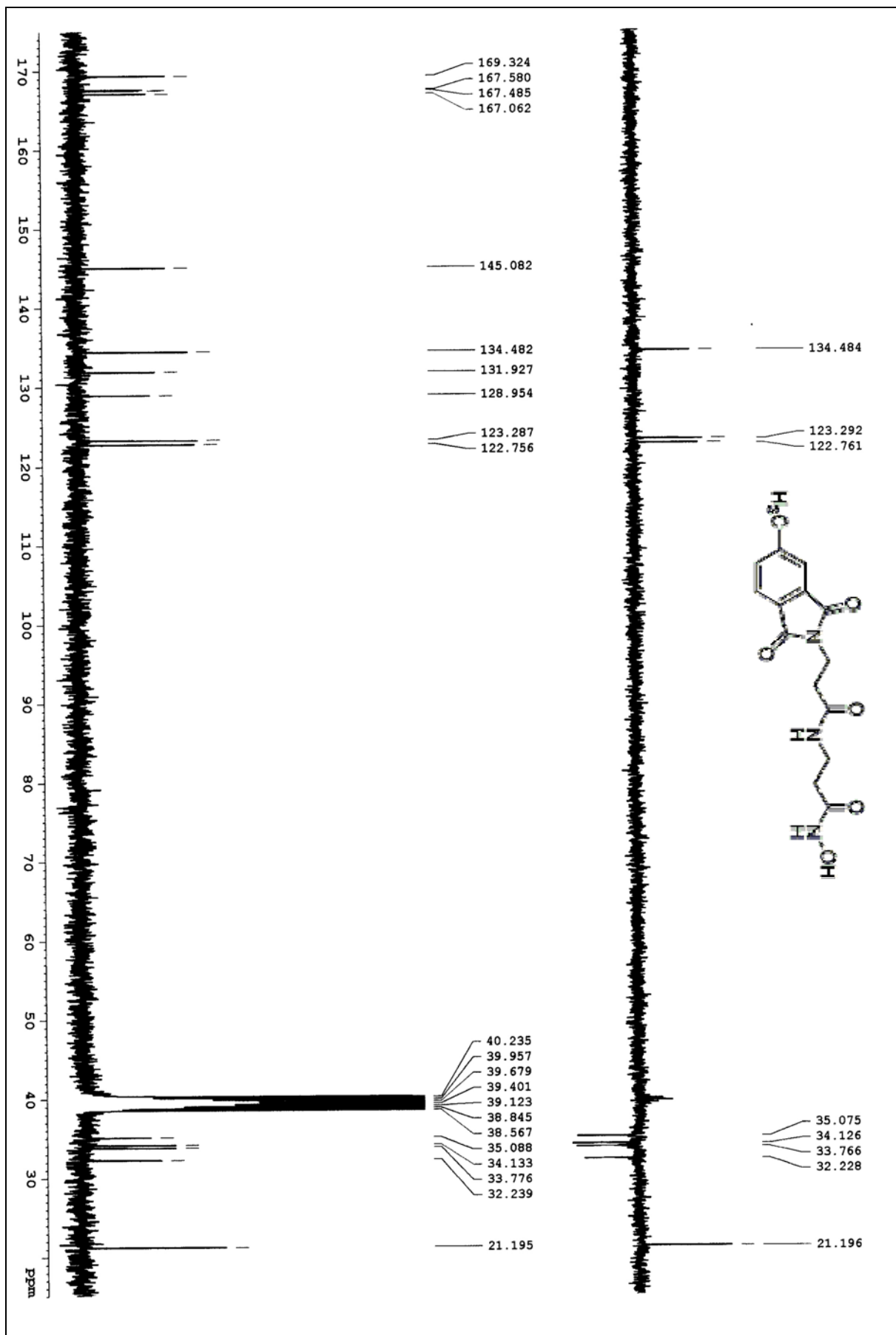
¹H-RMN: 2R-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isoindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-108)

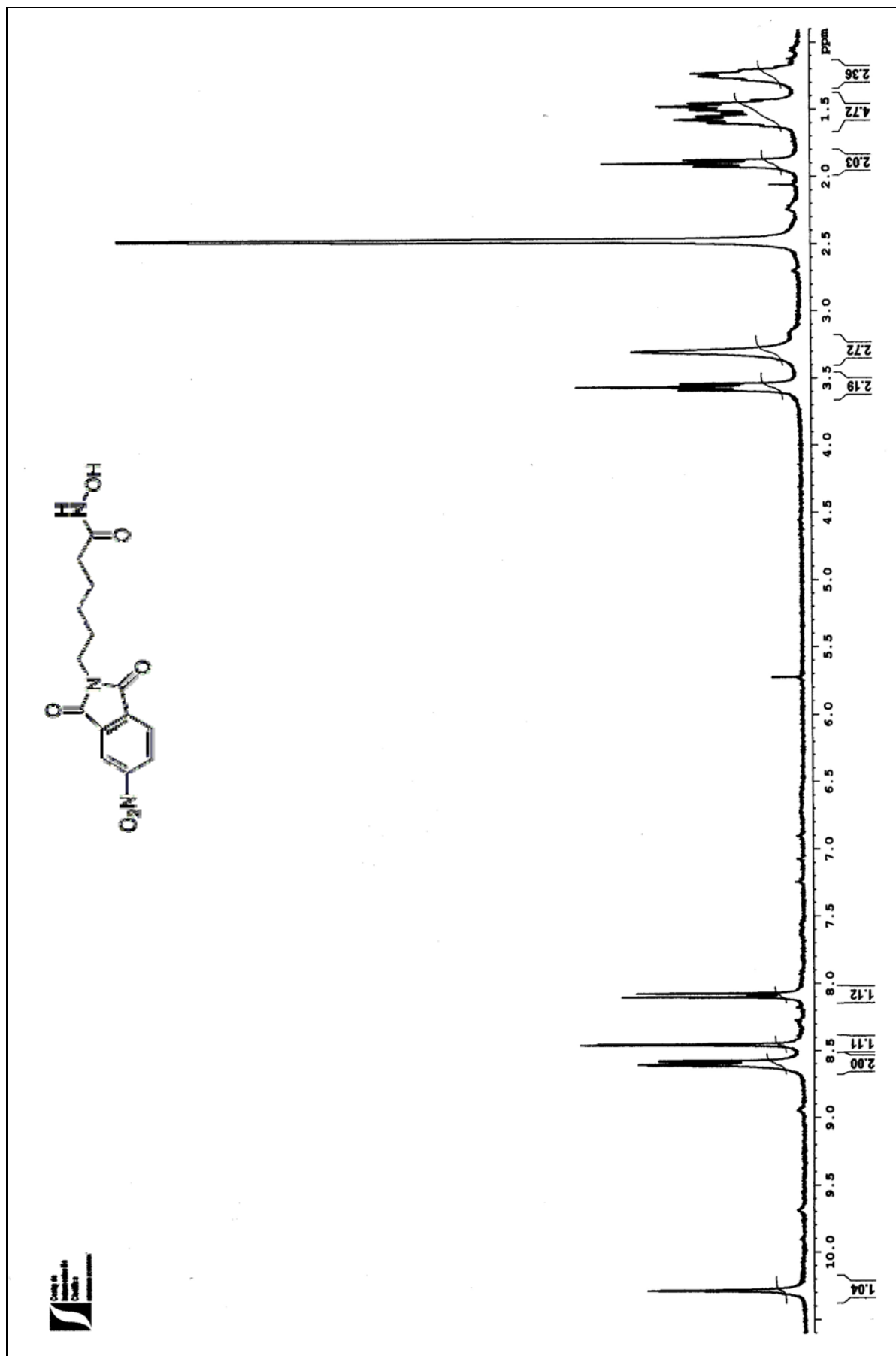
¹³C-RMN: 2R-2-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isolindol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-108)



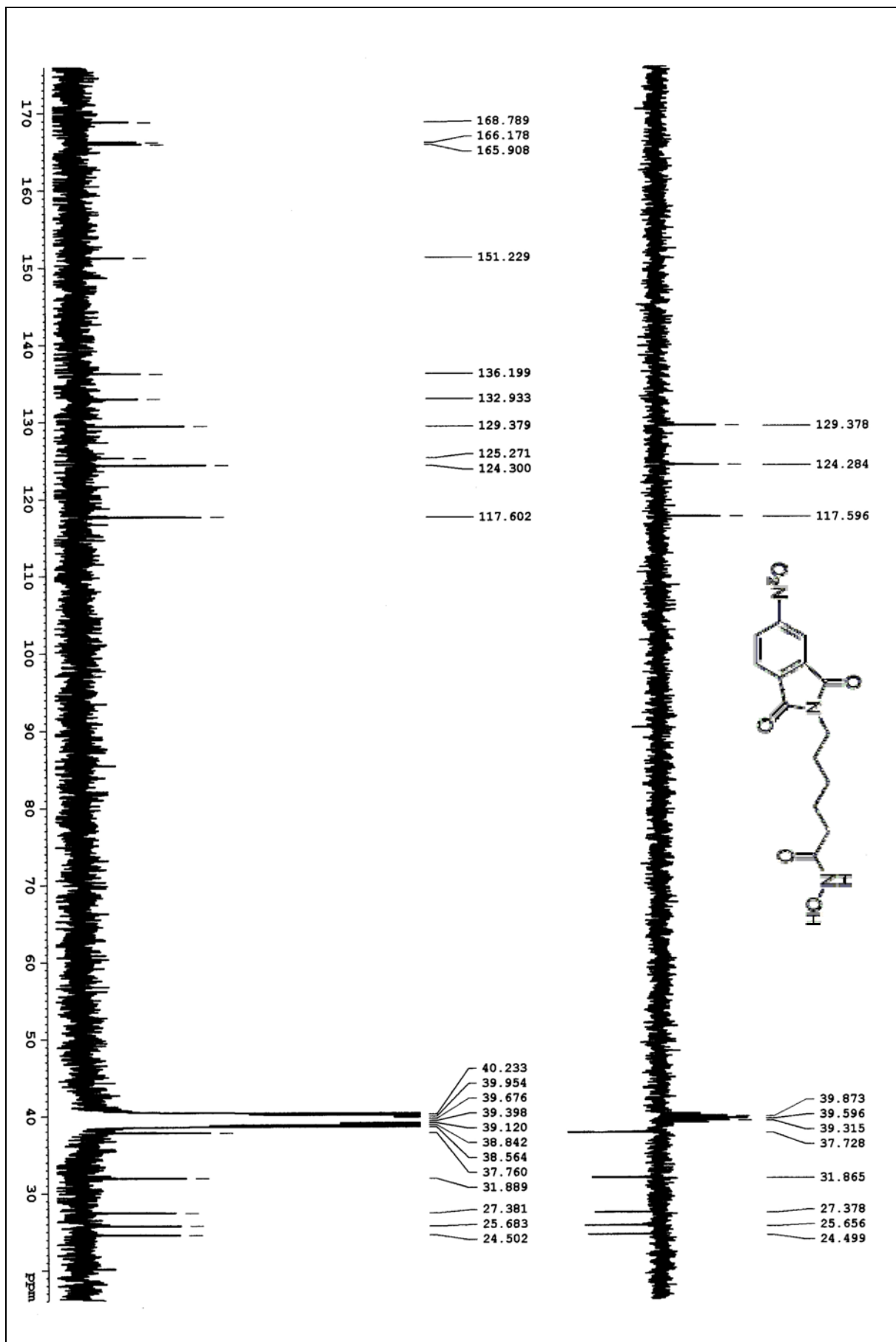


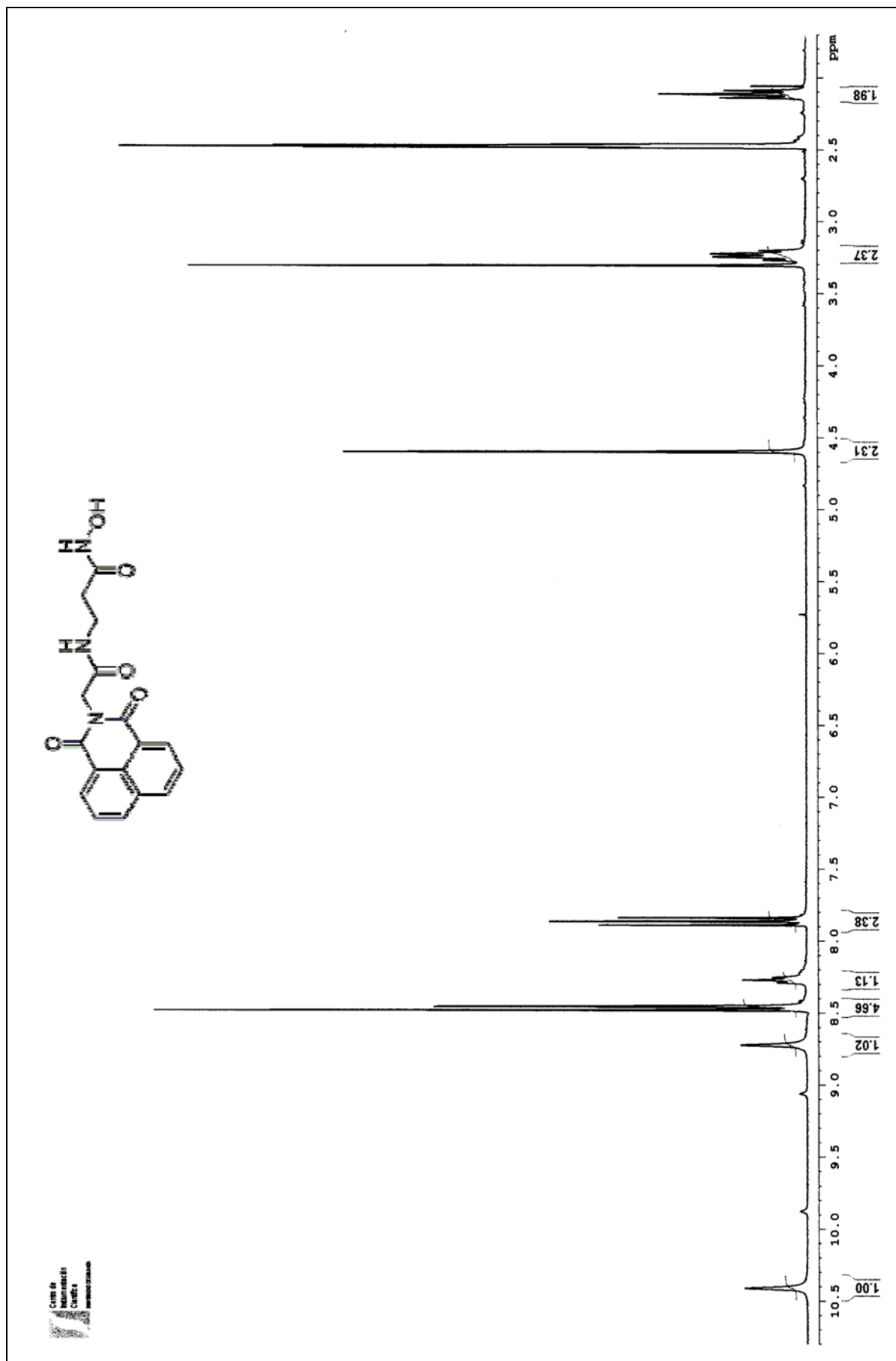
¹³C-RMN : 3-[3-(5-metil-1,3-dioxo-isolindol-2-il)propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-85)



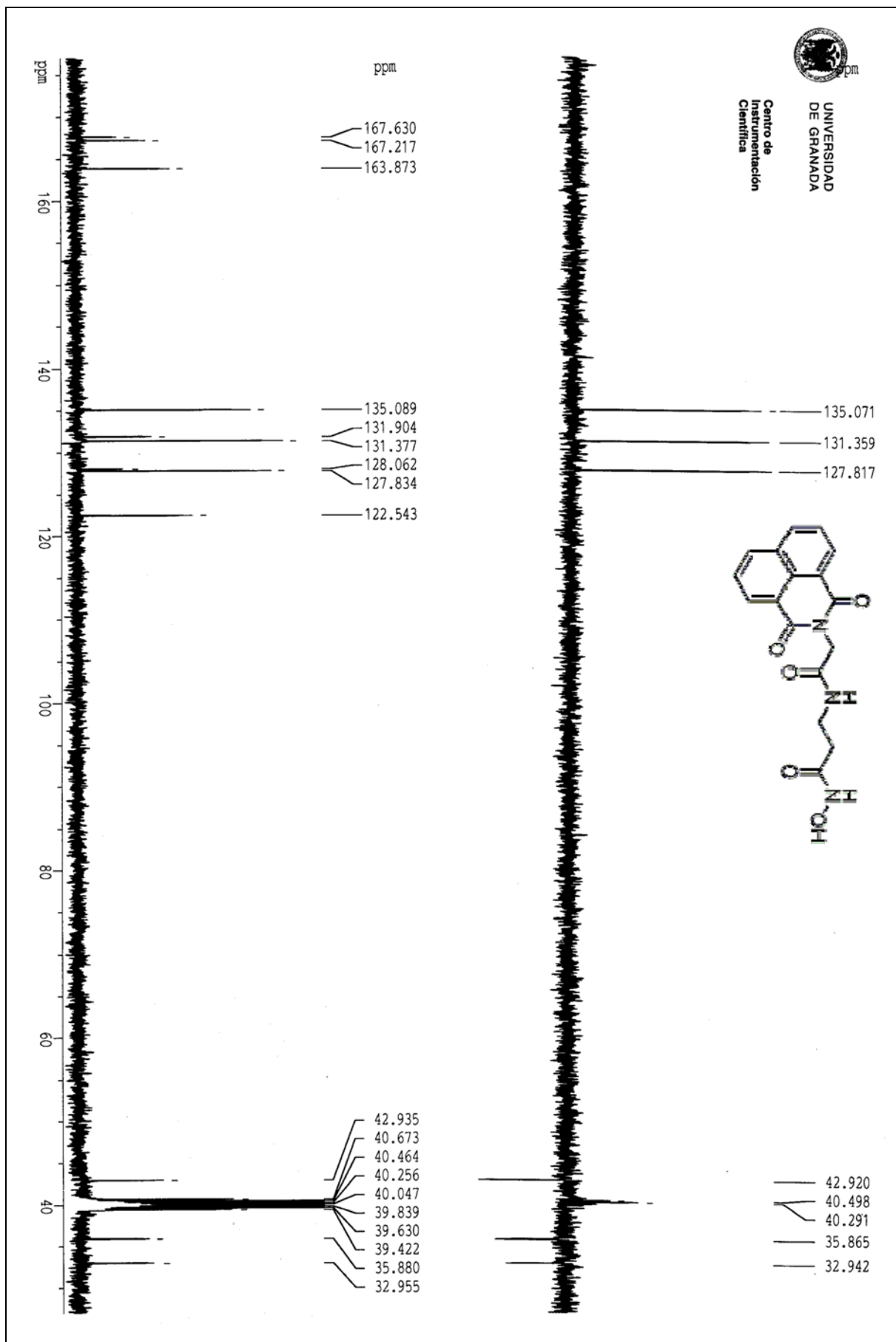


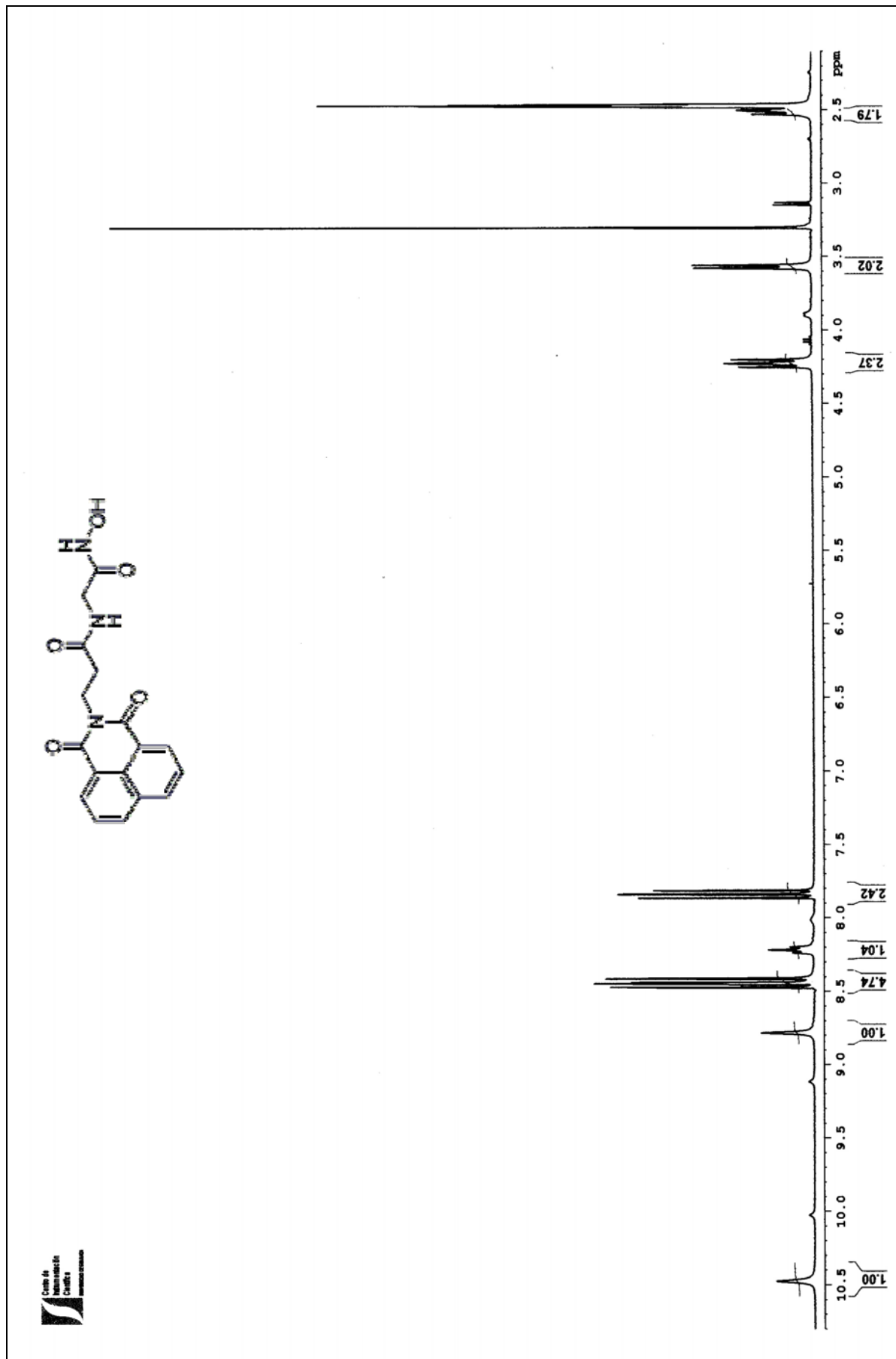
¹³C-RMN : 6-(5-nitro-1,3-dioxo-isoindol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-127)





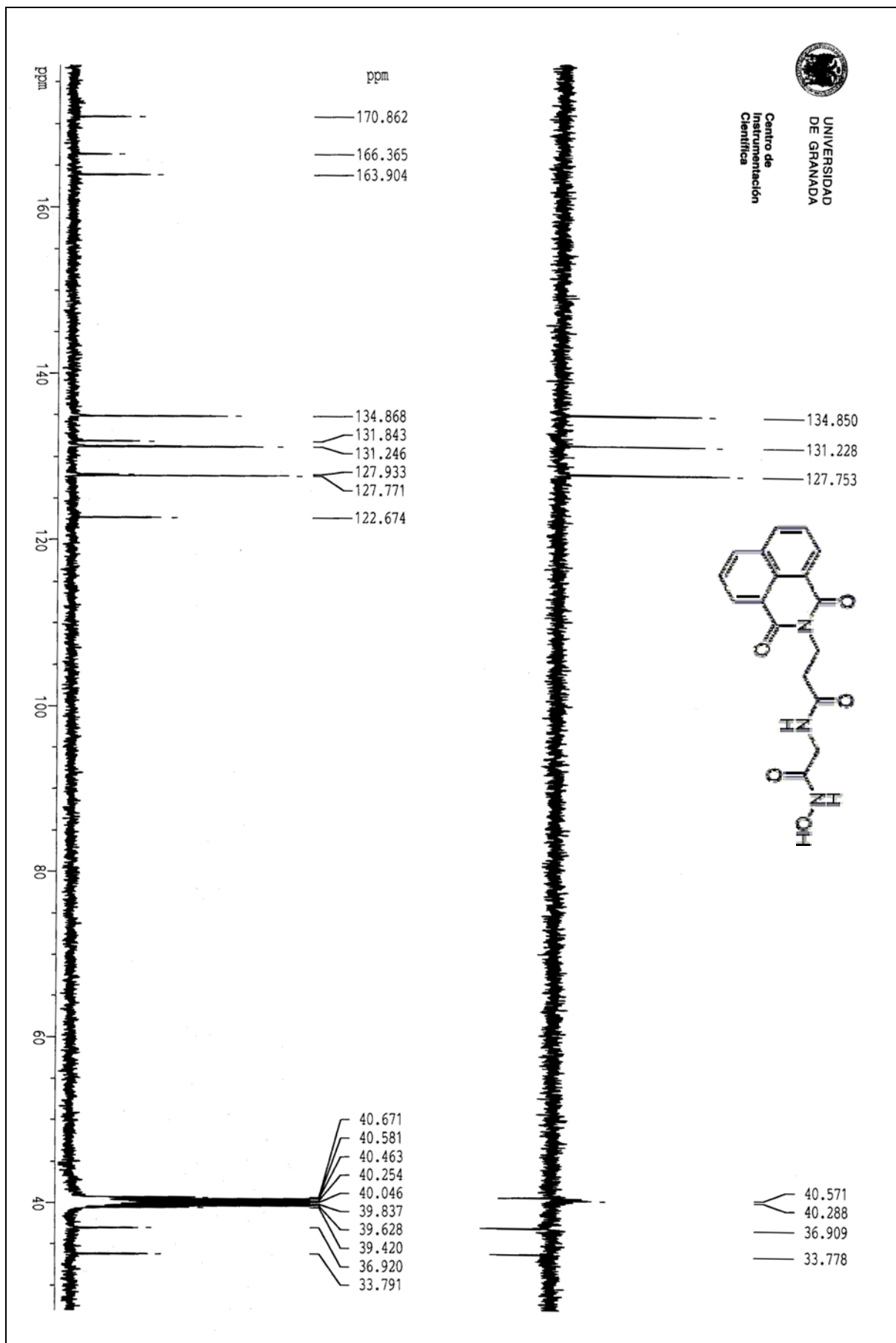
¹³C-RMN: 3-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzol[delisoquinolin-2-il]-acetamido]-N-hidroxipropanamida (MTC-40)

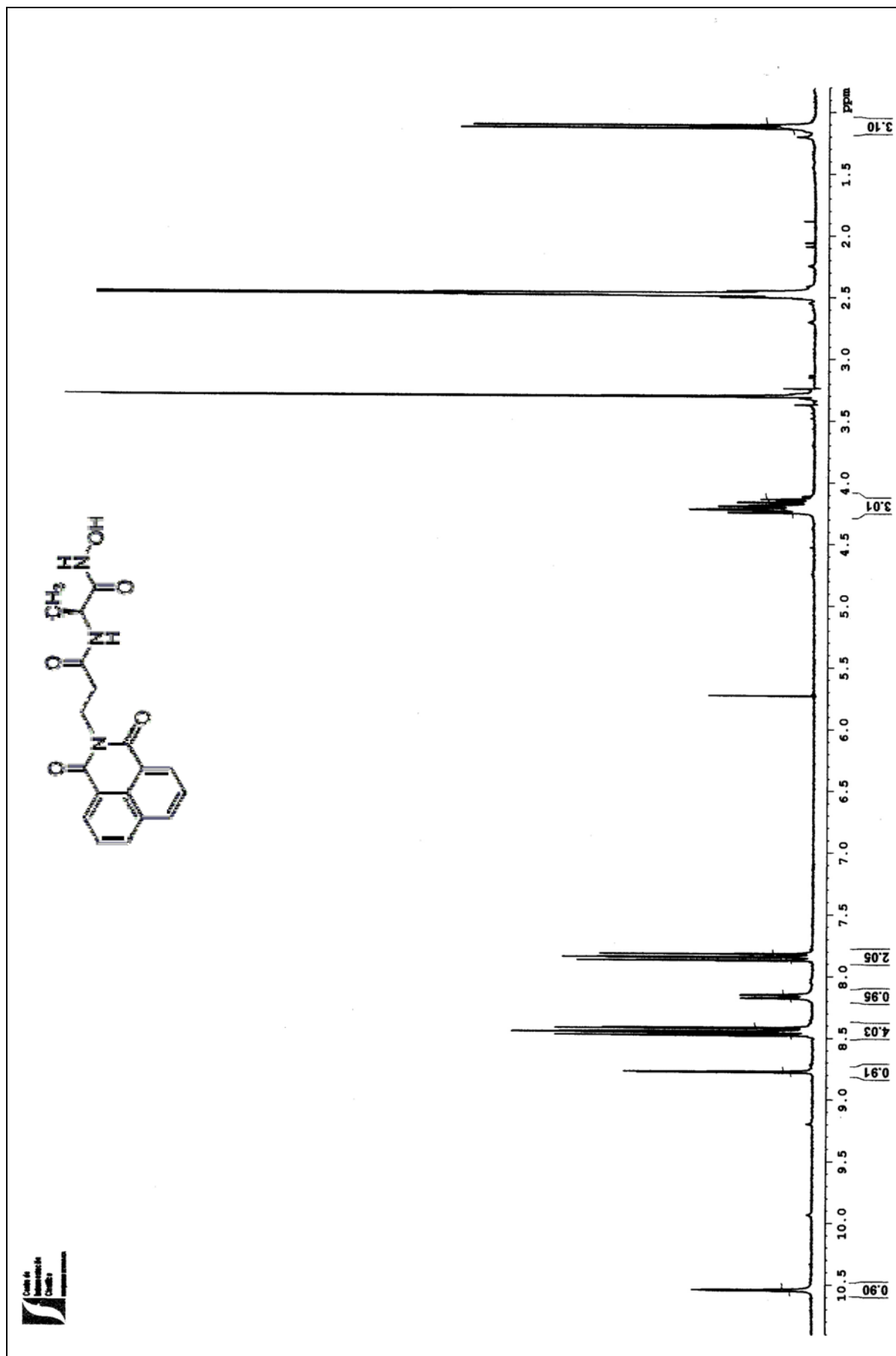




¹H-RMN: 2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-propanamido]-M-hidroxiacetamida (MTC-38)

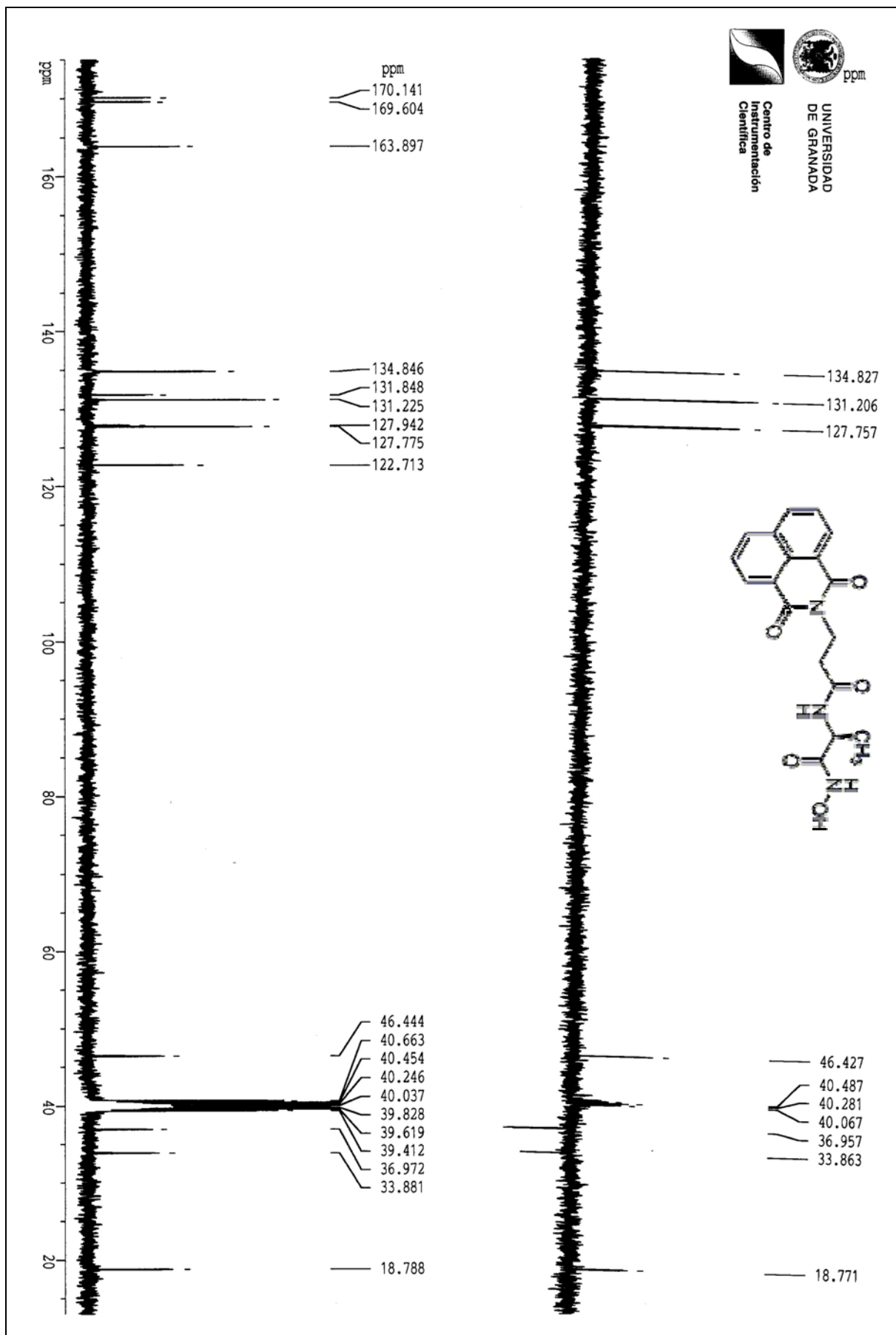
¹³C-RMN: 2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzol[delisoquinolin-2-il])-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-38)

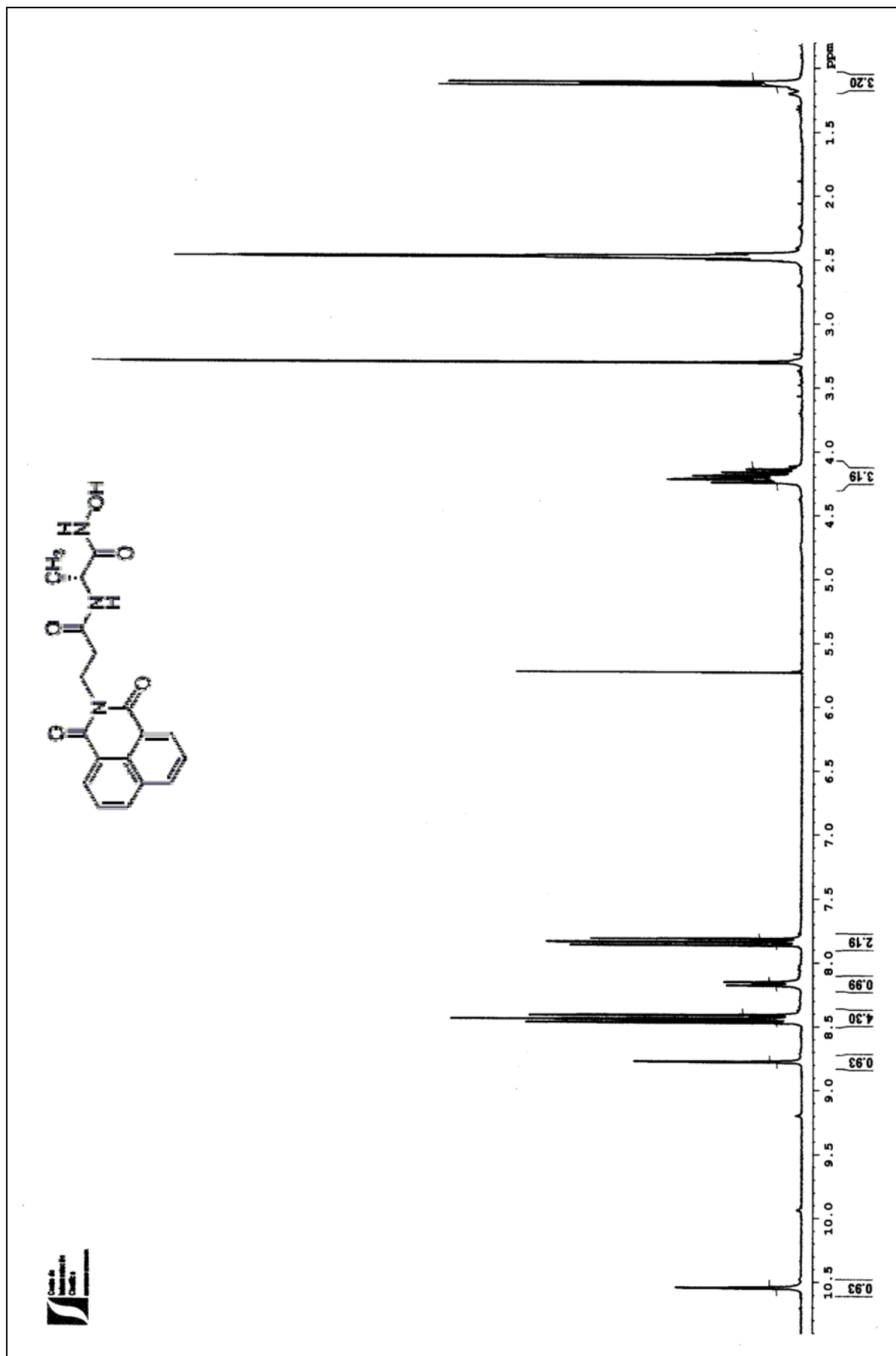




¹H-RMN: 2S-2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-propanamido]-M-hidroxi-2-propanamida (MTC-45)

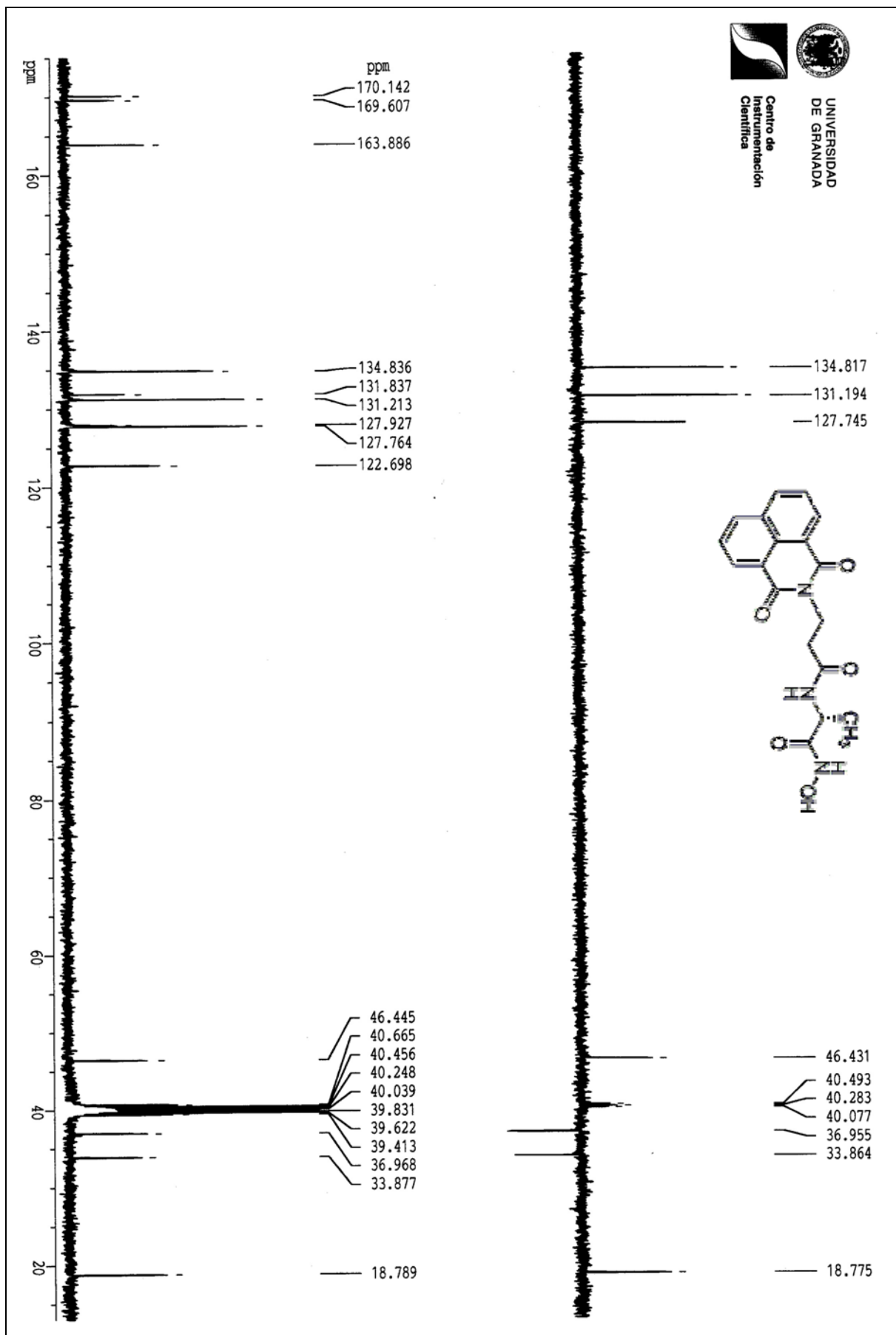
¹³C-RMN: 2S-2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-45)

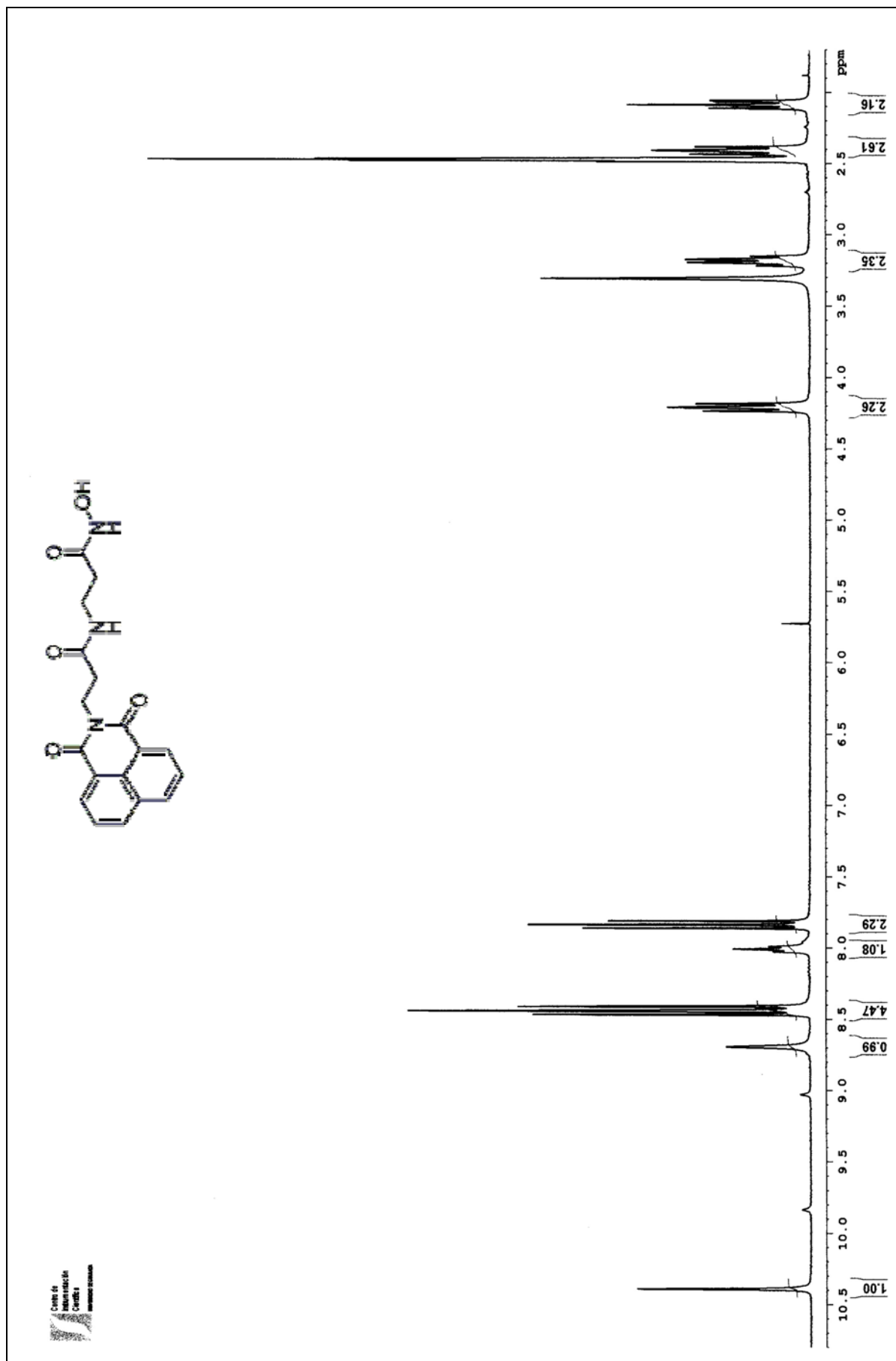




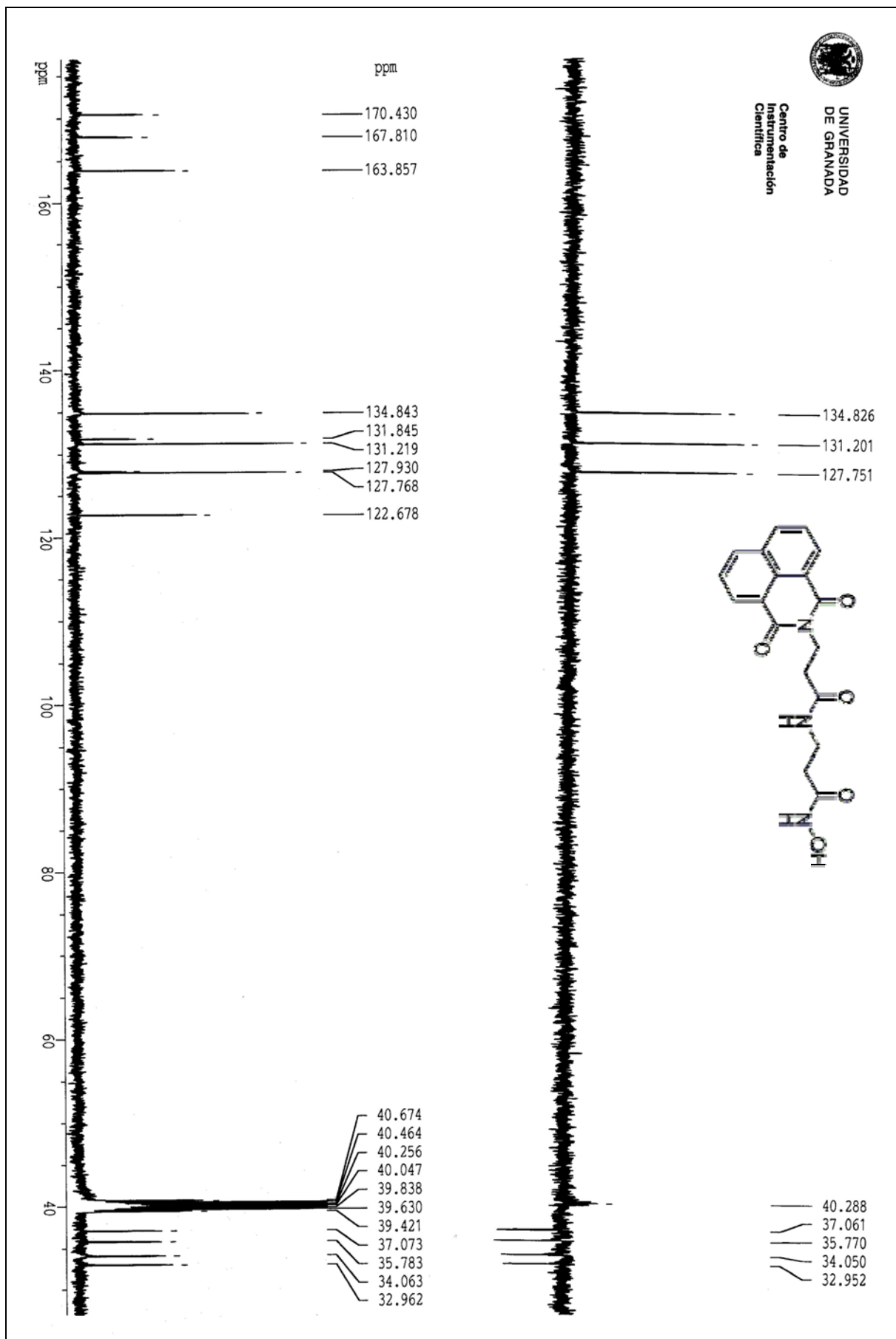
¹H-RMN: 2R-2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-46)

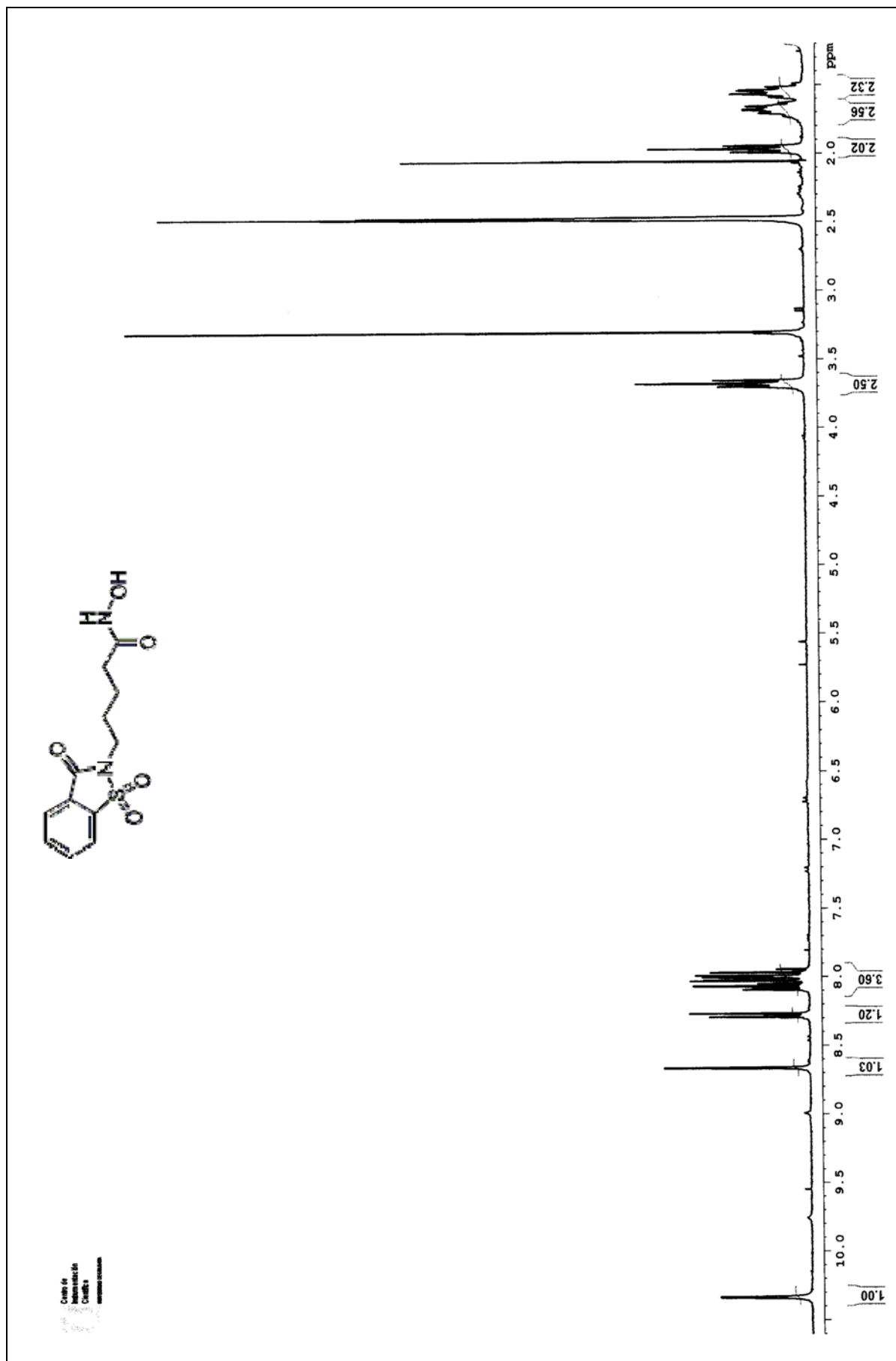
¹³C-RMN: 2R-2-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-46)





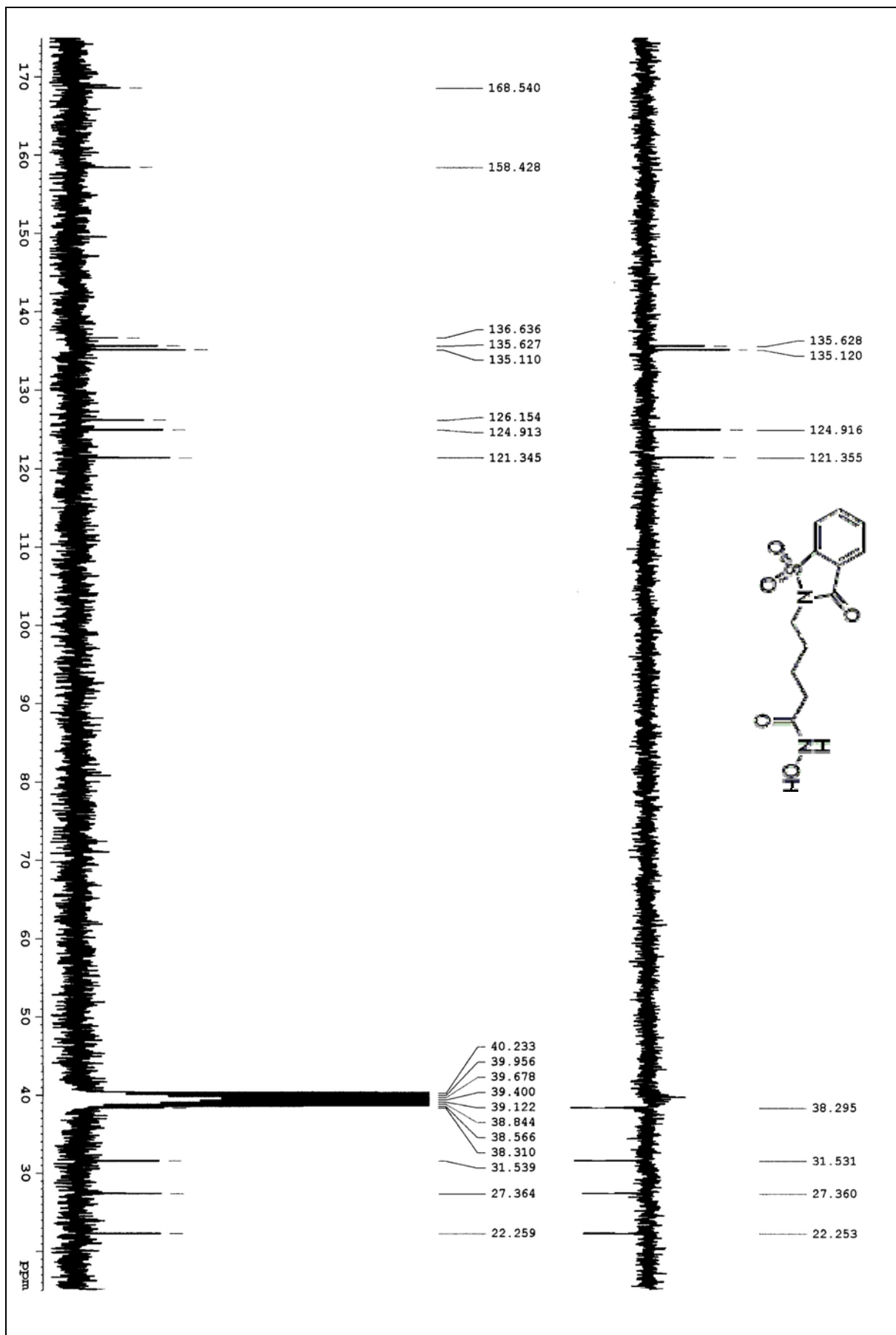
¹³C-RMN: 3-[3-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-propanamido]-N-hidroxipropanamida (MTC-39)

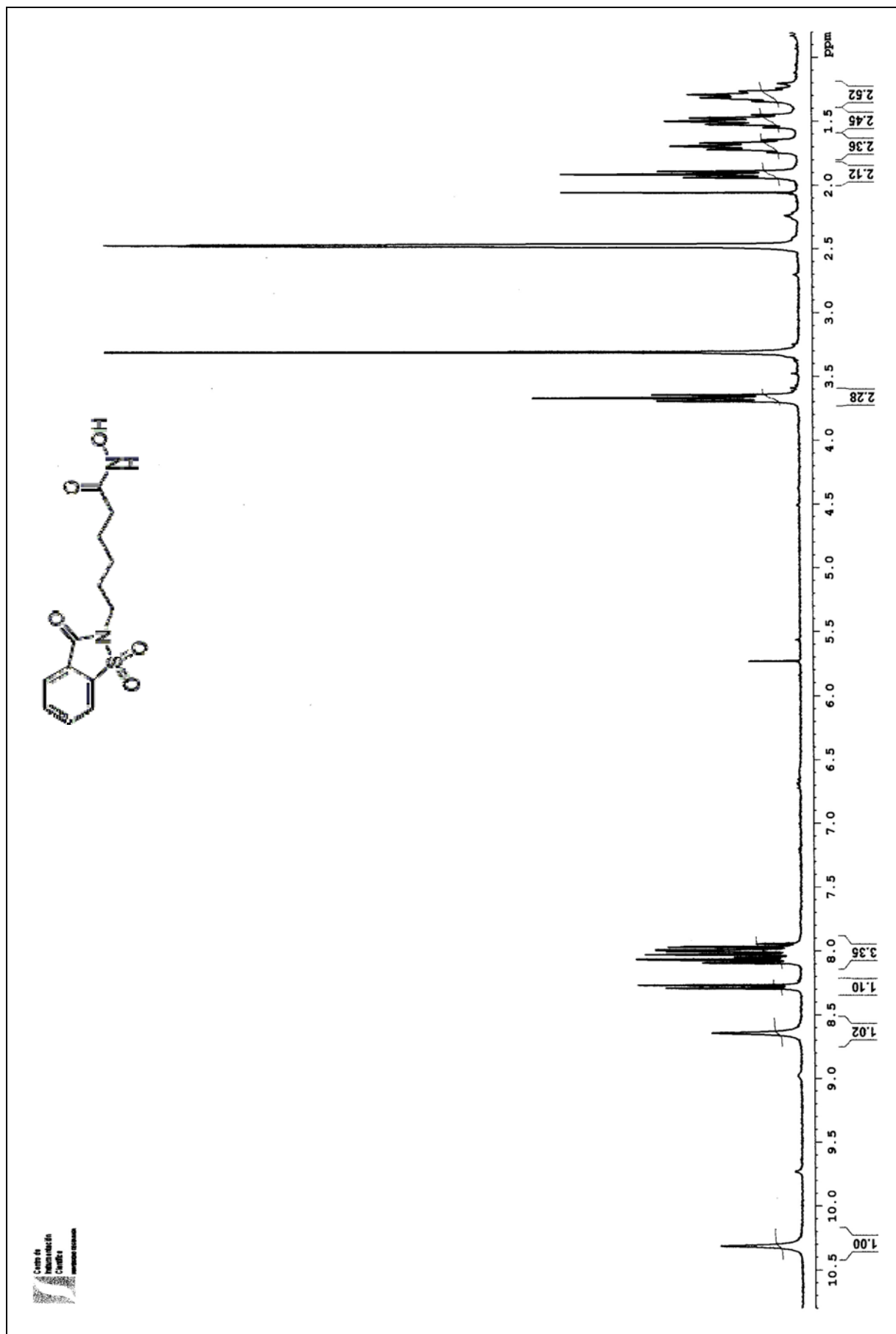




¹H-RMN: 5-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-N-hidroxipentanamida (MTC-123)

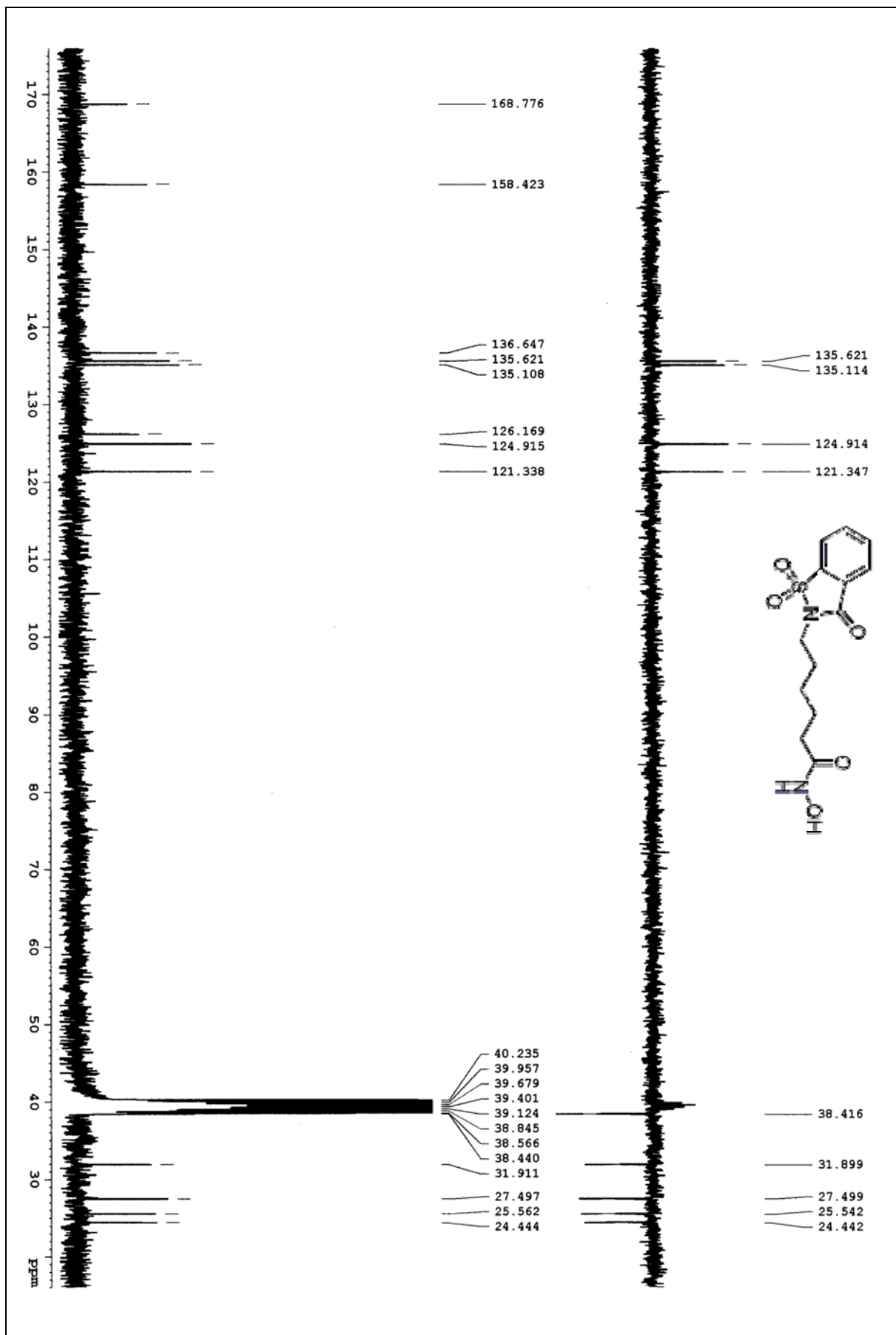
¹³C-RMN : 5-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[isotiazol-2-il]-N-hidroxipentanamida (MTC-123)

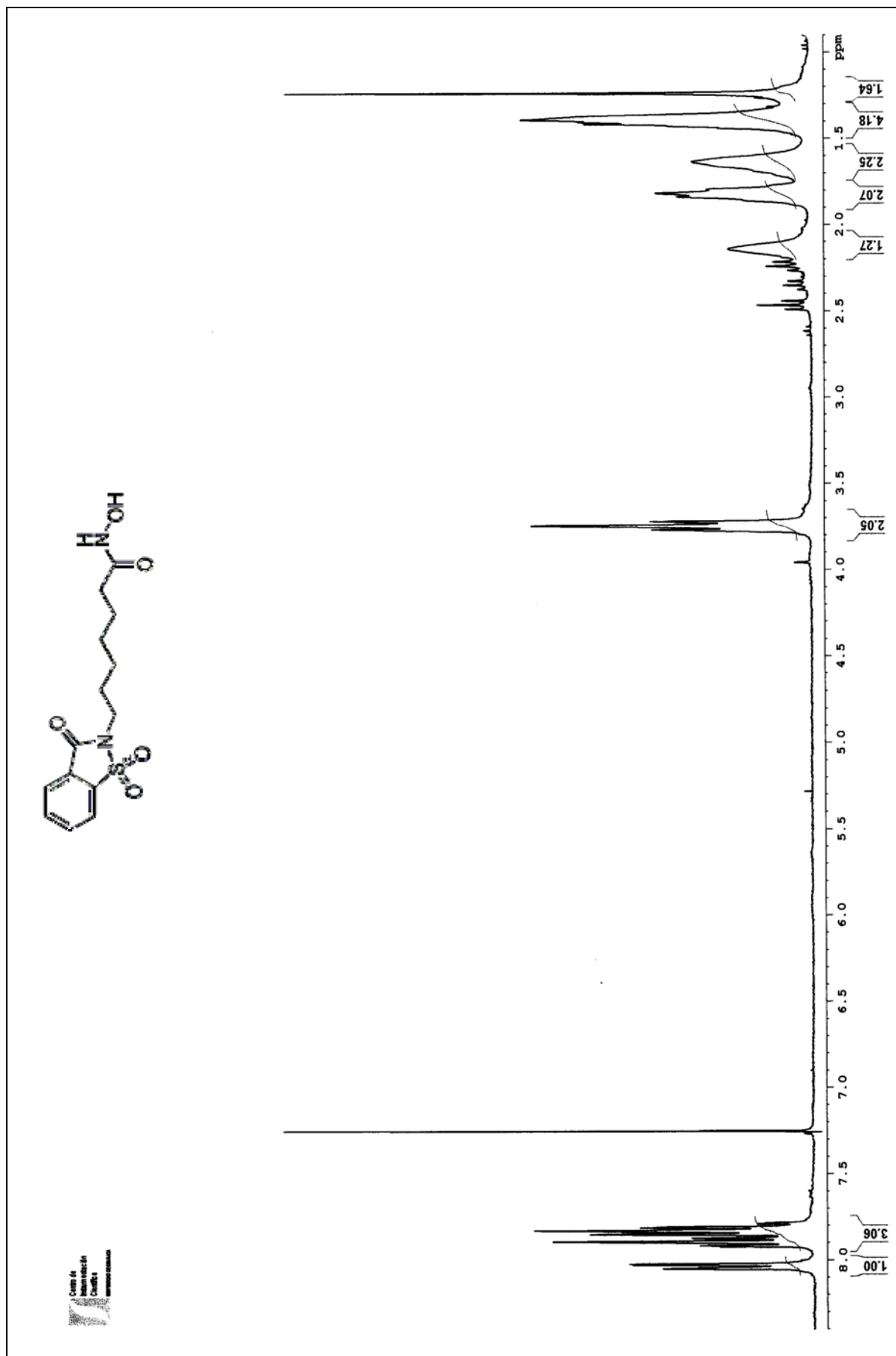




¹H-RMN: 6-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-yl)-N-hidroxihexanamida (MTC-97)

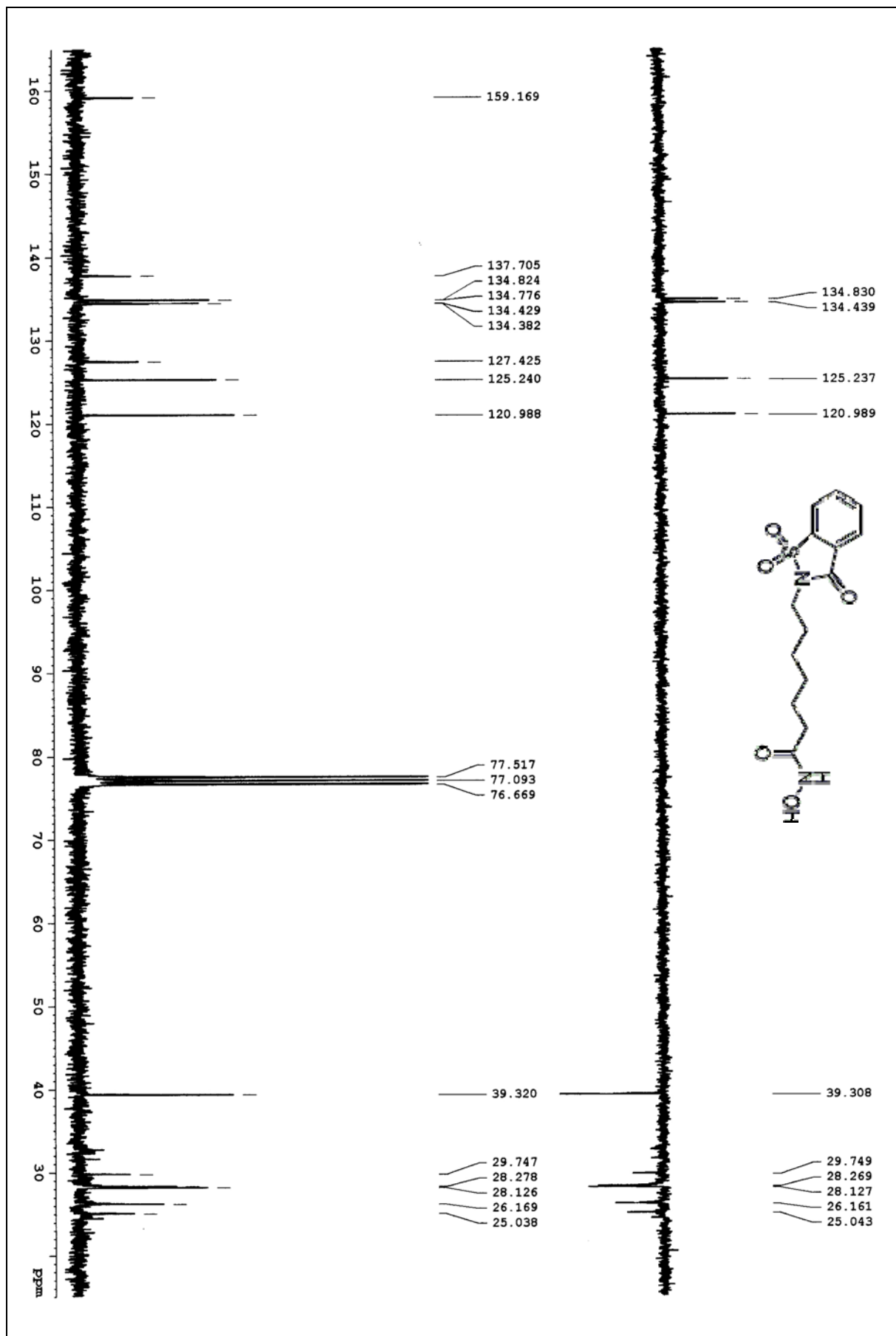
¹³C-RMN : 6-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[isotiazol-2-il]-N-hidroxihexanamida (MTC-97)

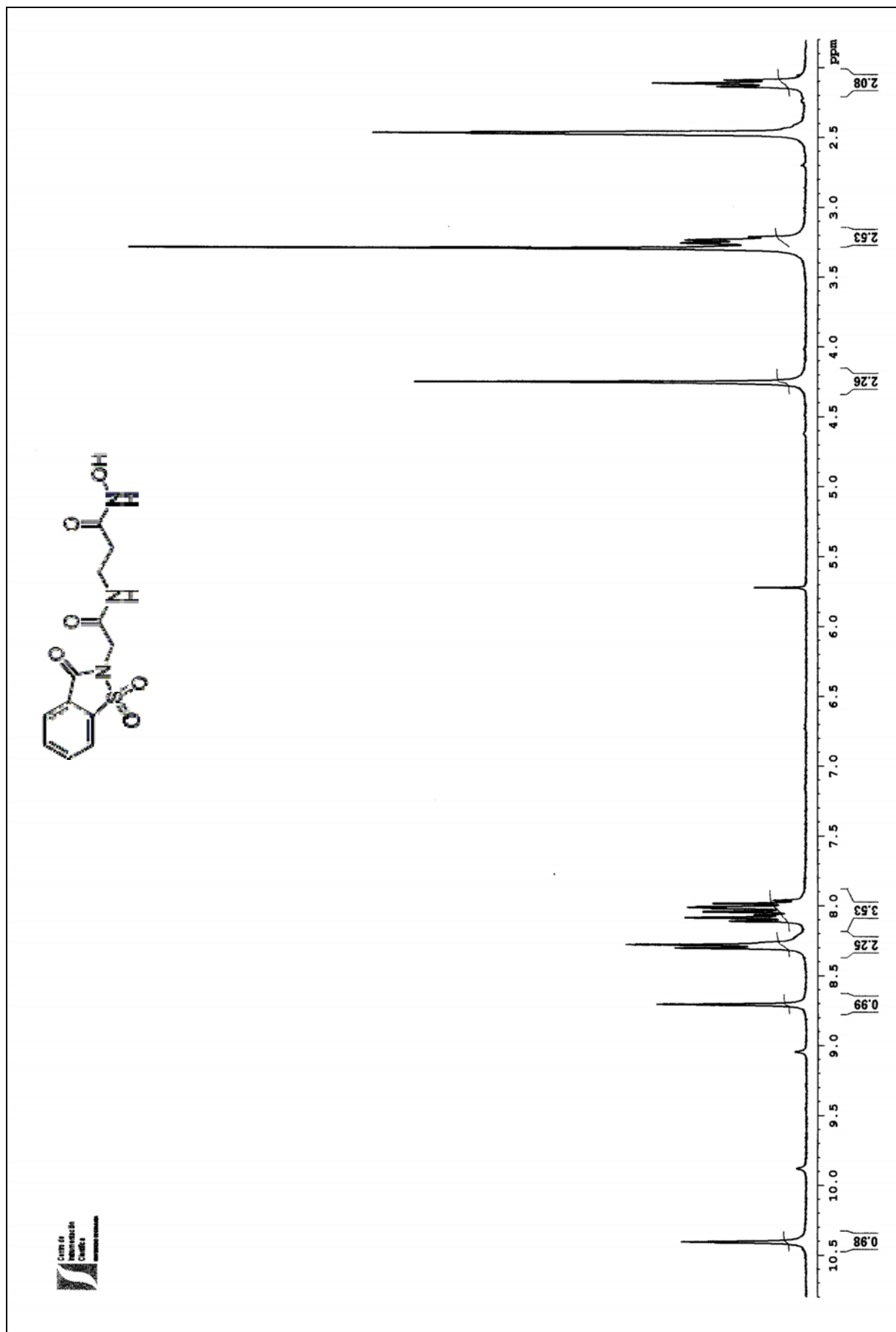




¹H-RMN: 7-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-yl)-N-hidroxiheptanamida (MTC-124)

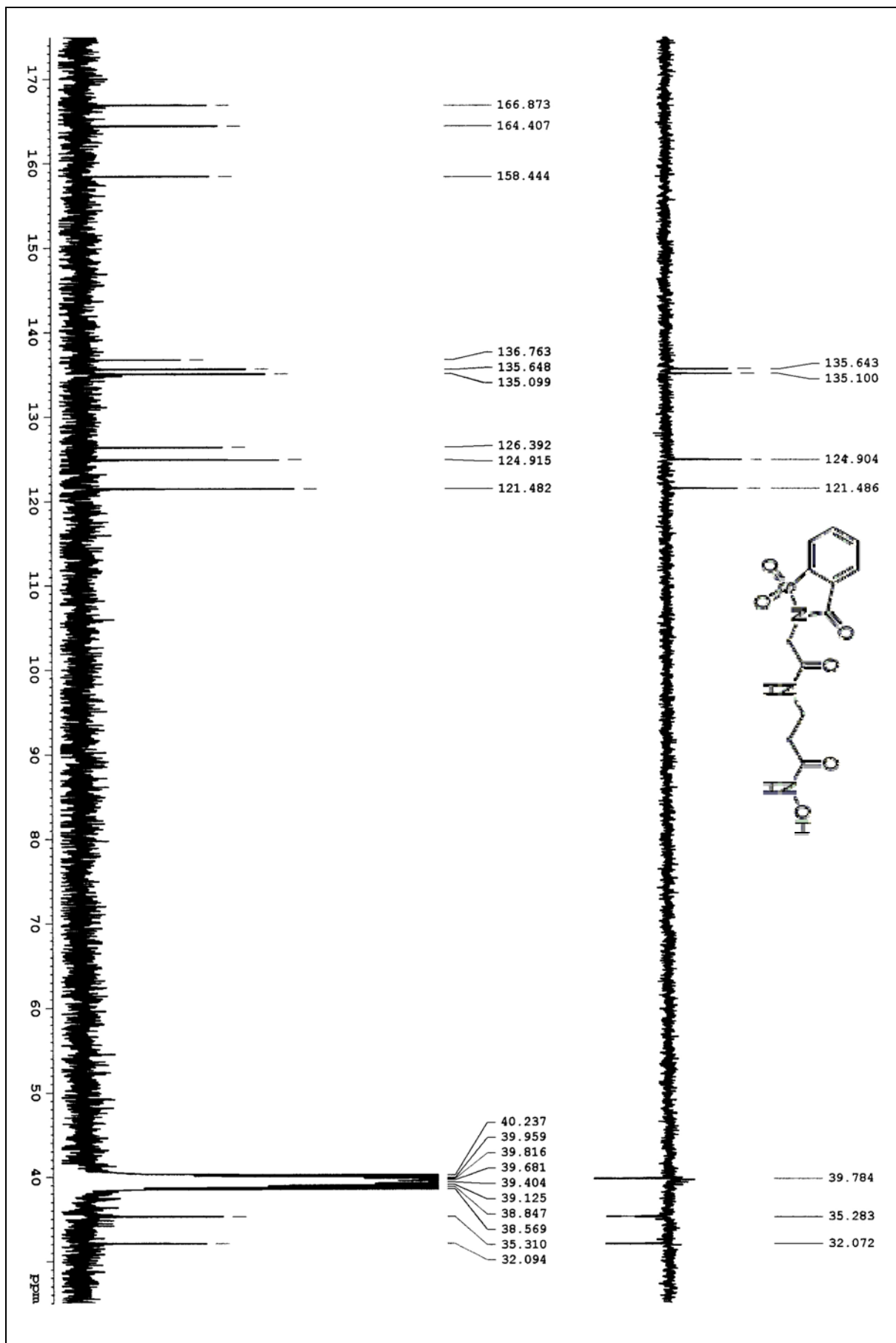
¹³C-RMN: 7-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[*l*isotiazol-2-il)-N-hidroxiheptanamida (MTC-124)

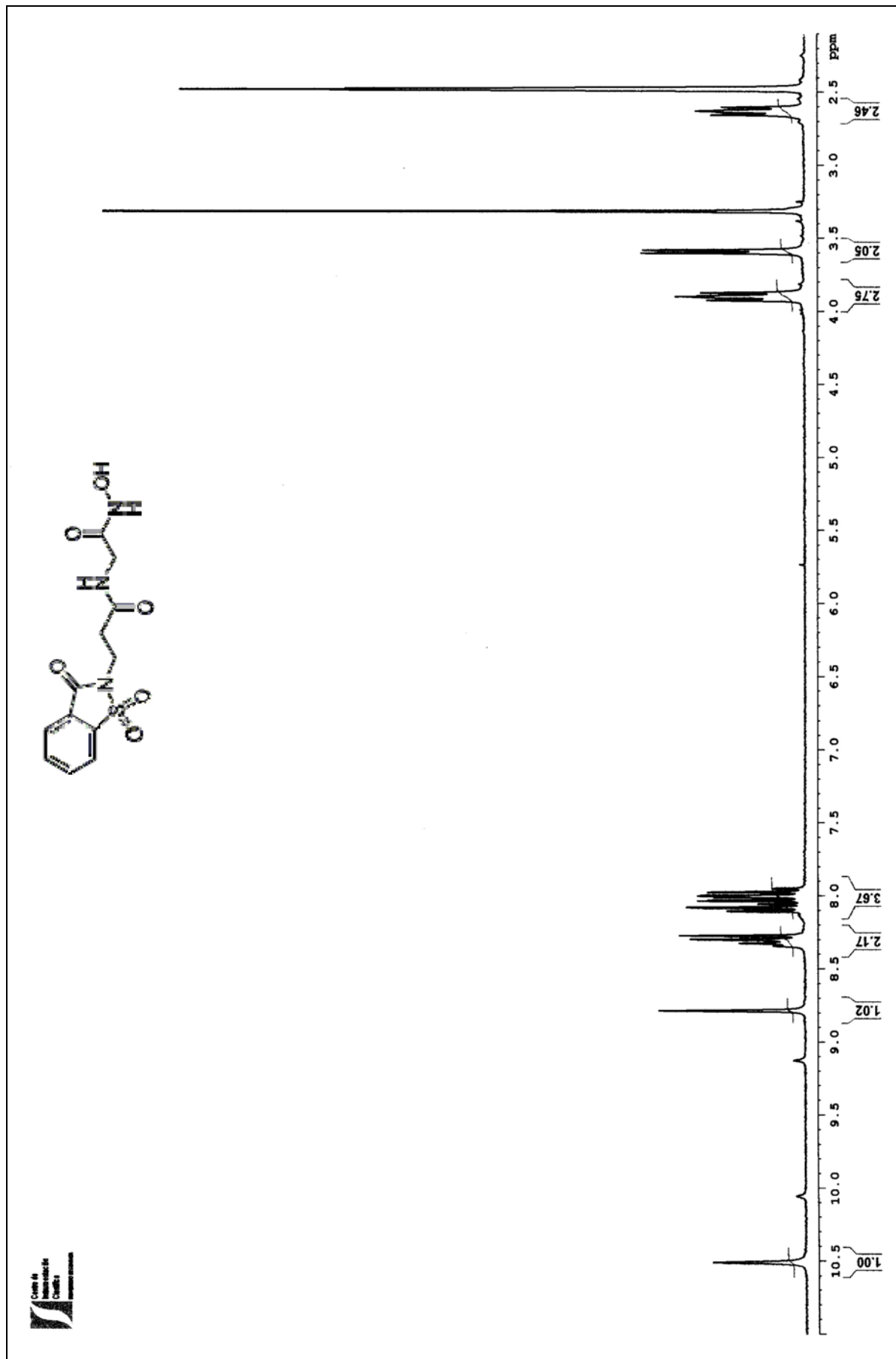




¹H-RMN: 3-[2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-79)

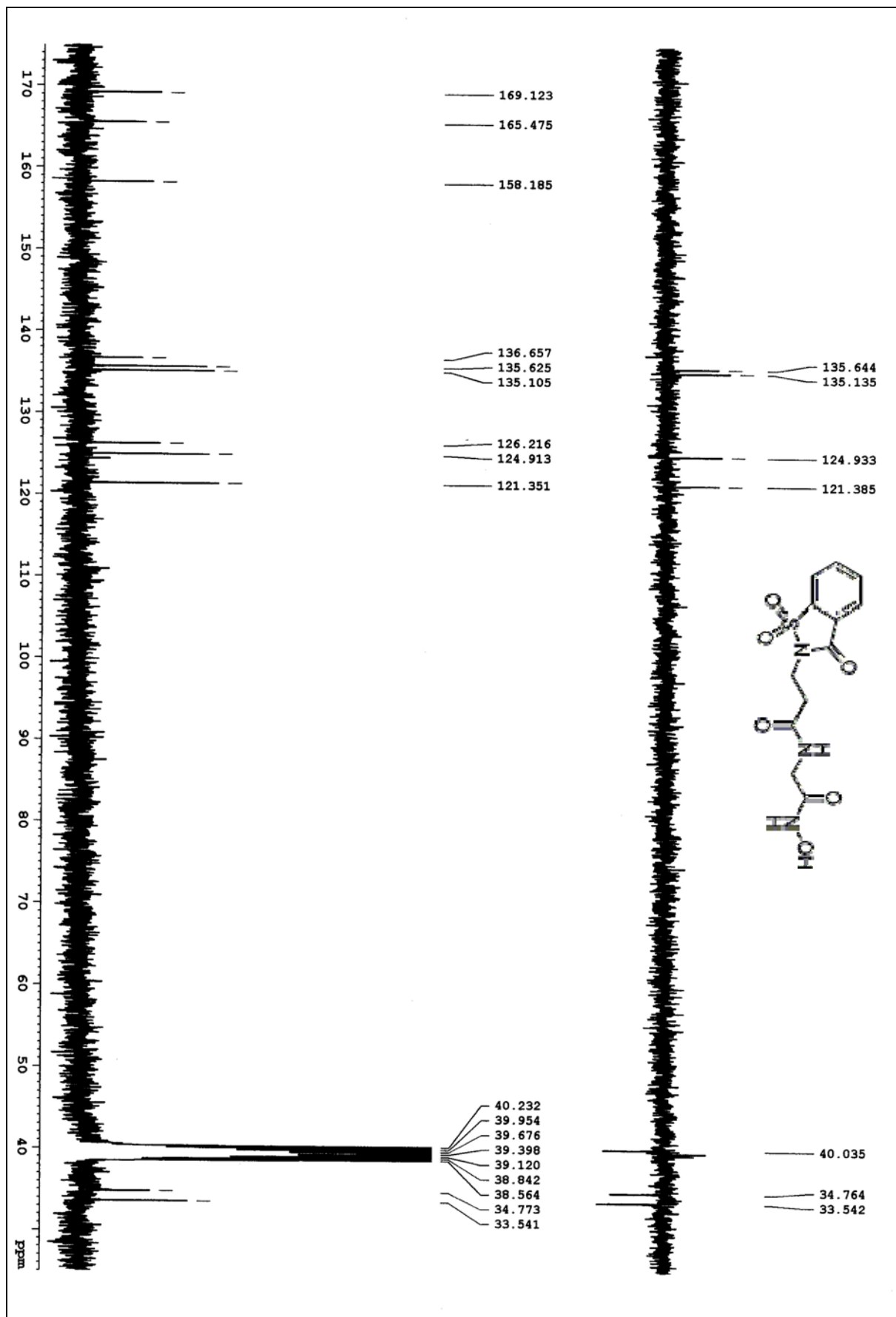
¹³C-RMN : 3-[2-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzotiazol-2-il)-acetamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-79)

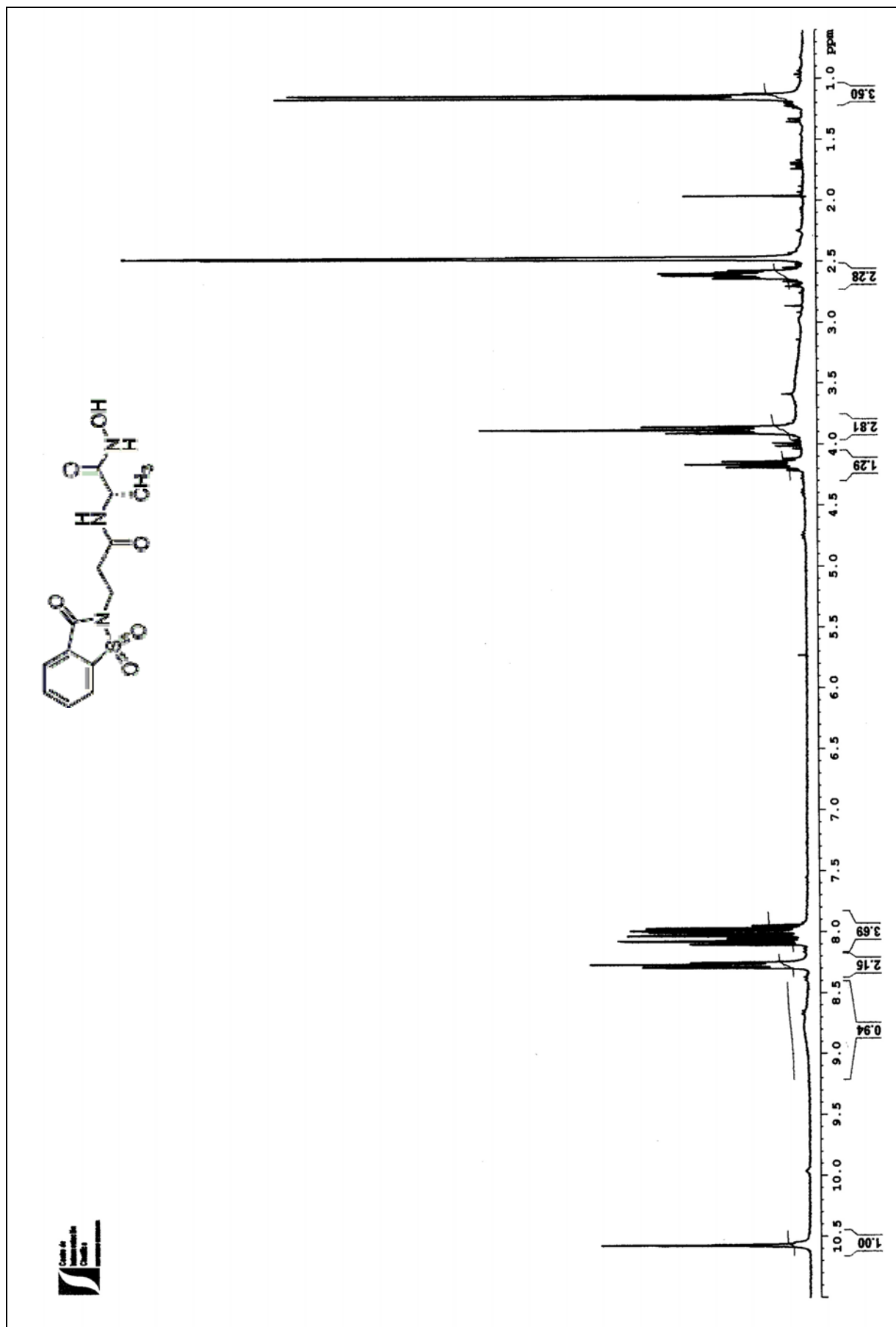




¹H-RMN: 2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-103)

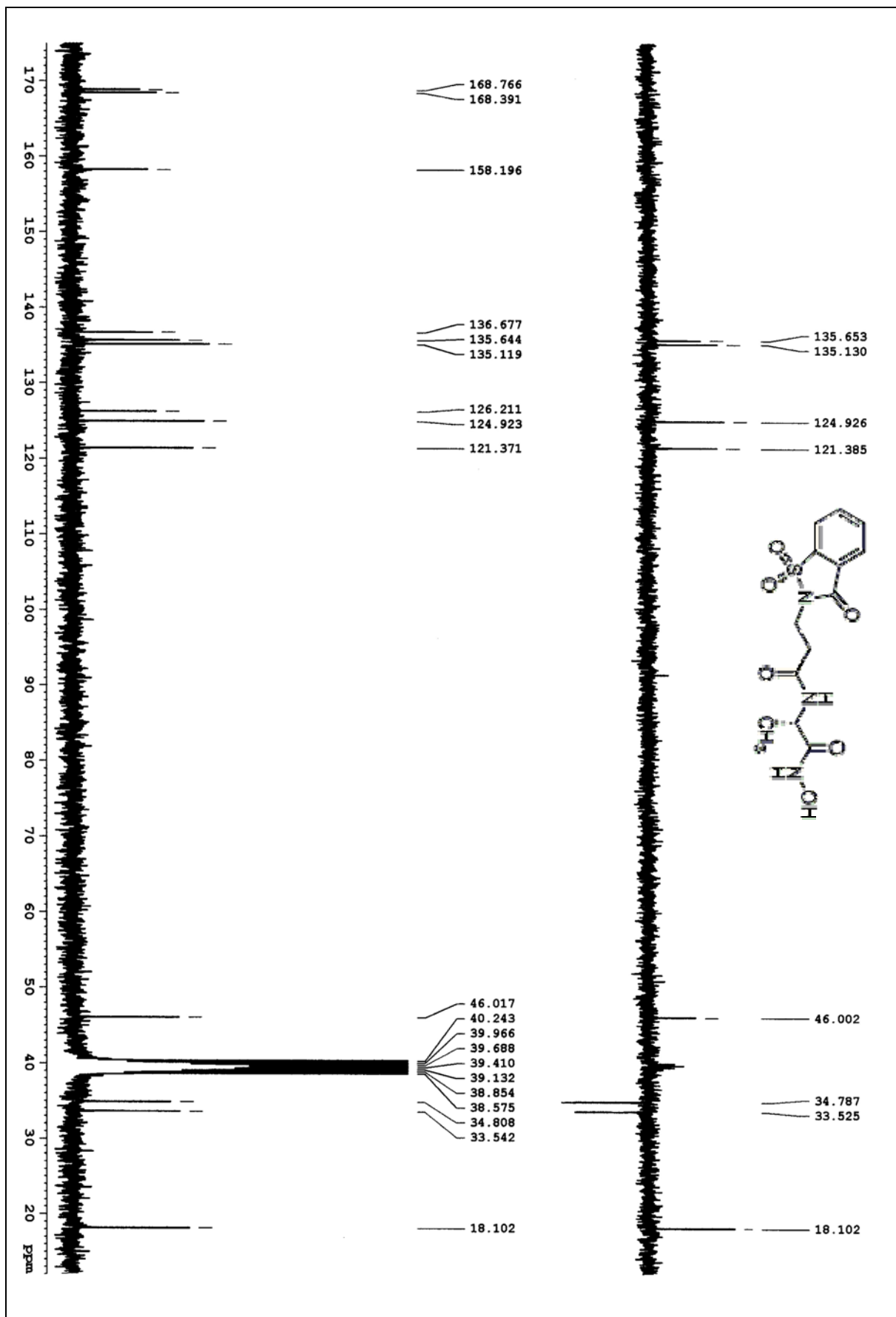
¹³C-RMN : 2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzol[*d*]isotiazol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiacetamida (MTC-103)

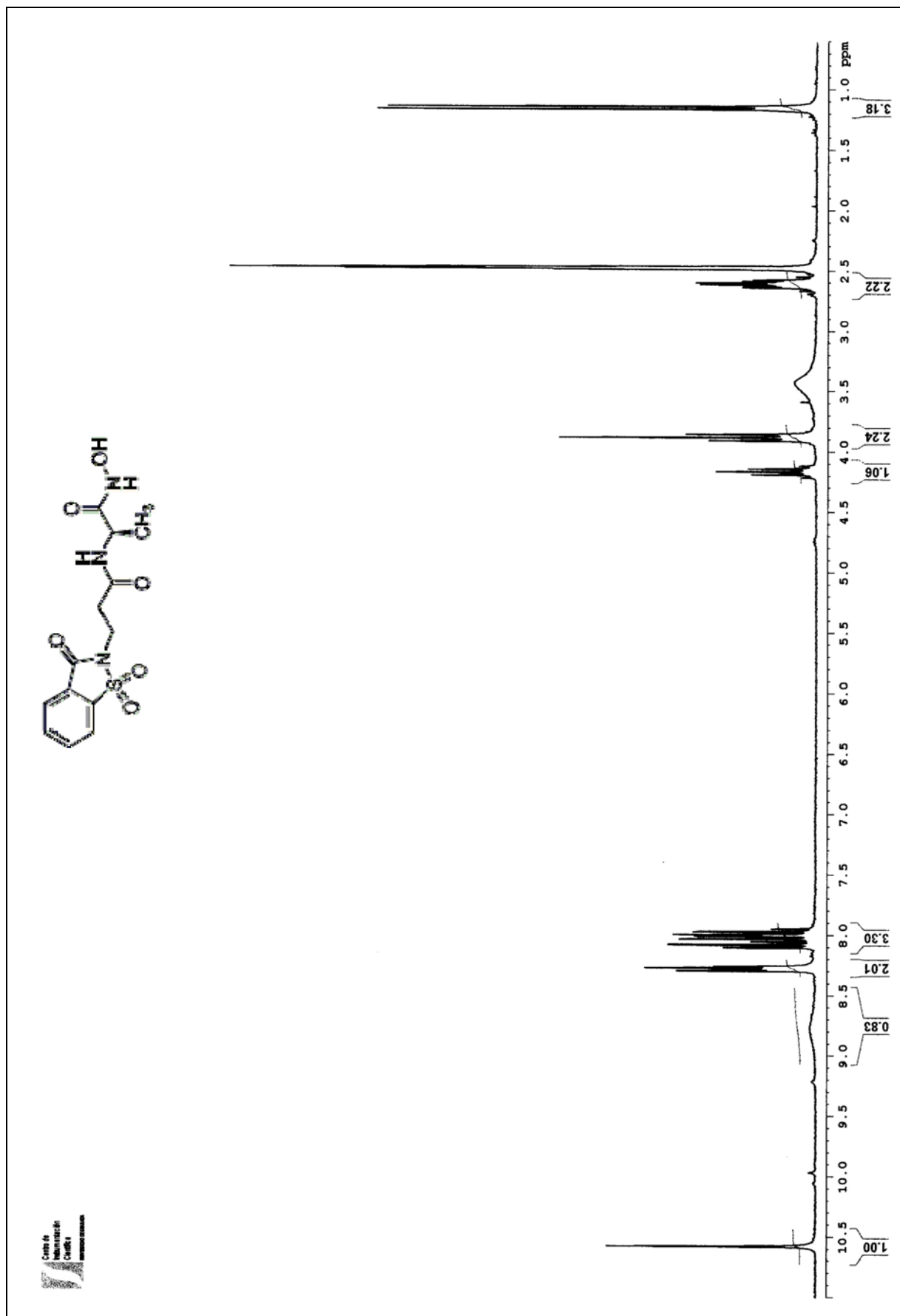




¹H-RMN: 2S-2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-yl)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-104)

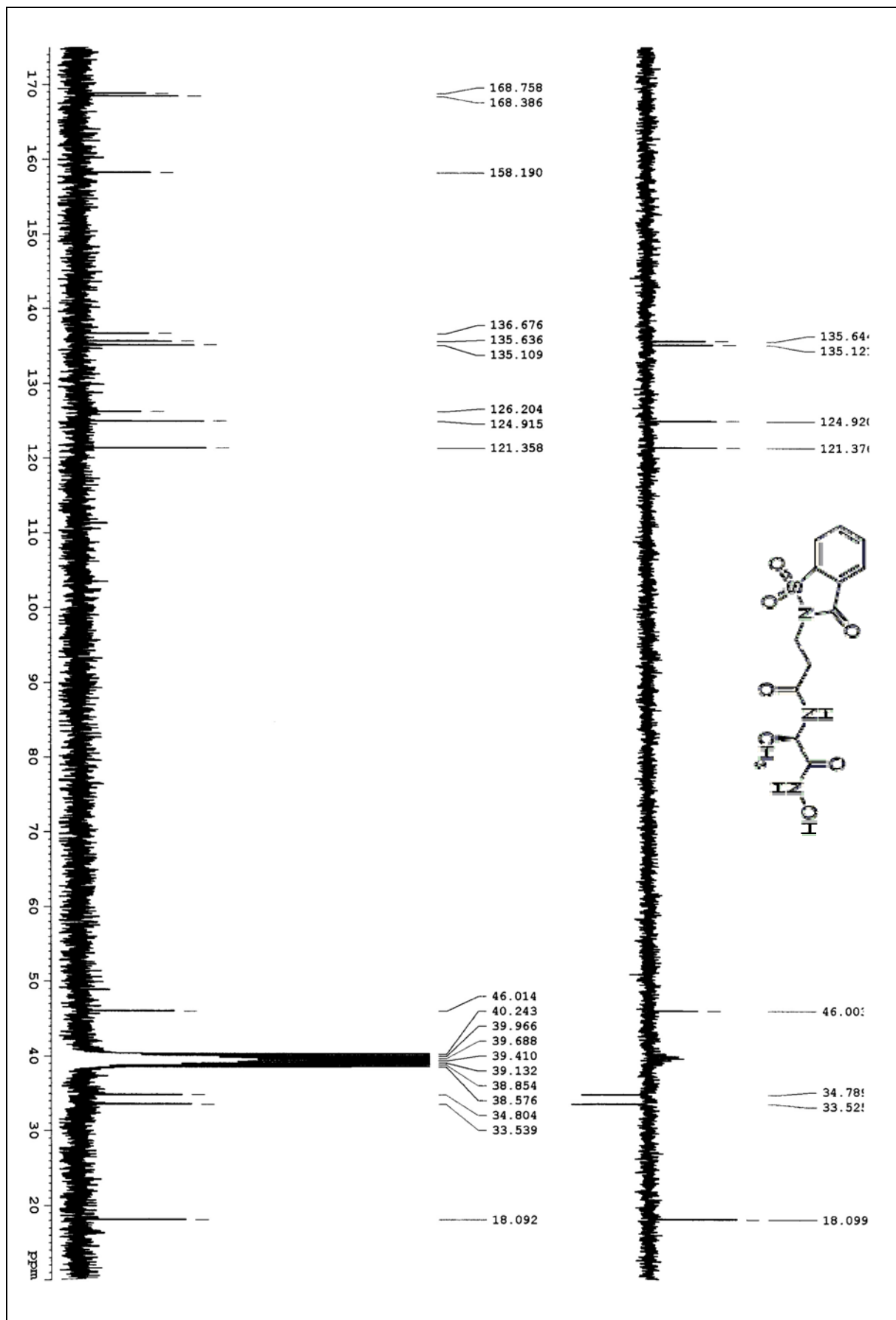
¹³C-RMN: 2S-2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzof[*d*]isotiazol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-104)

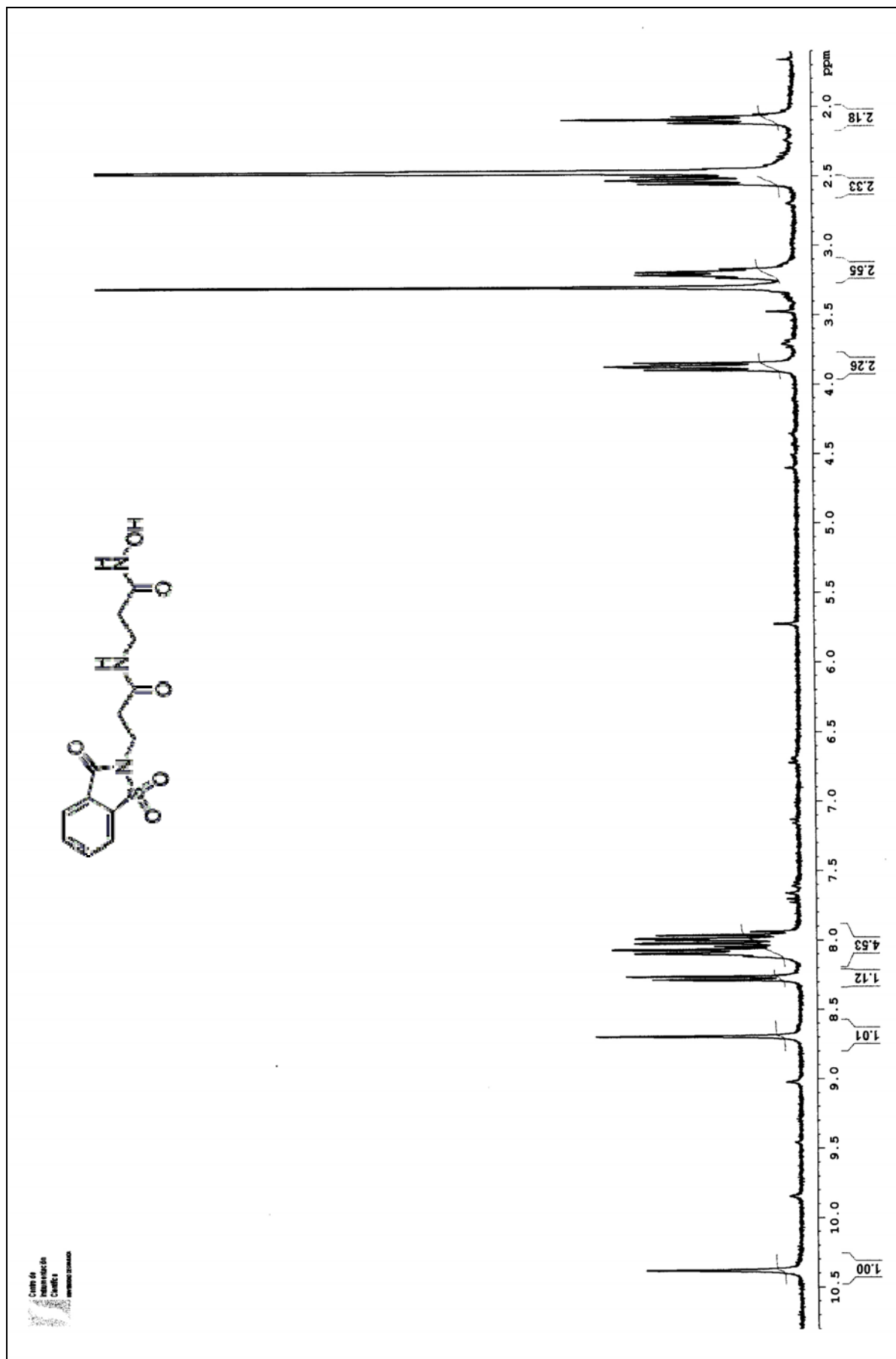




¹H-RMN: 2R-2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-il)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-105)

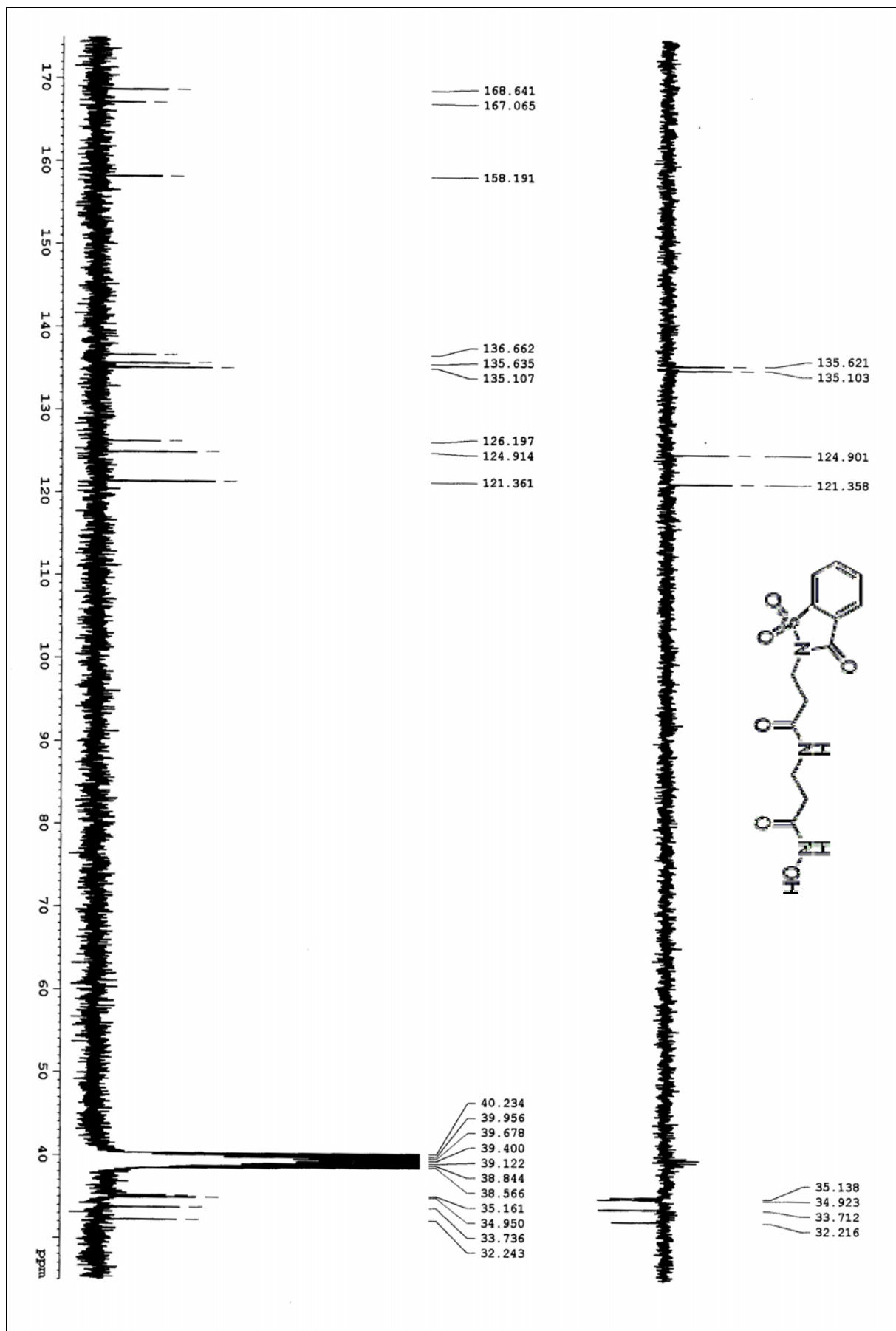
¹³C-RMN: 2R-2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-yl)propanamido]-N-hidroxi-2-propanamida (MTC-105)

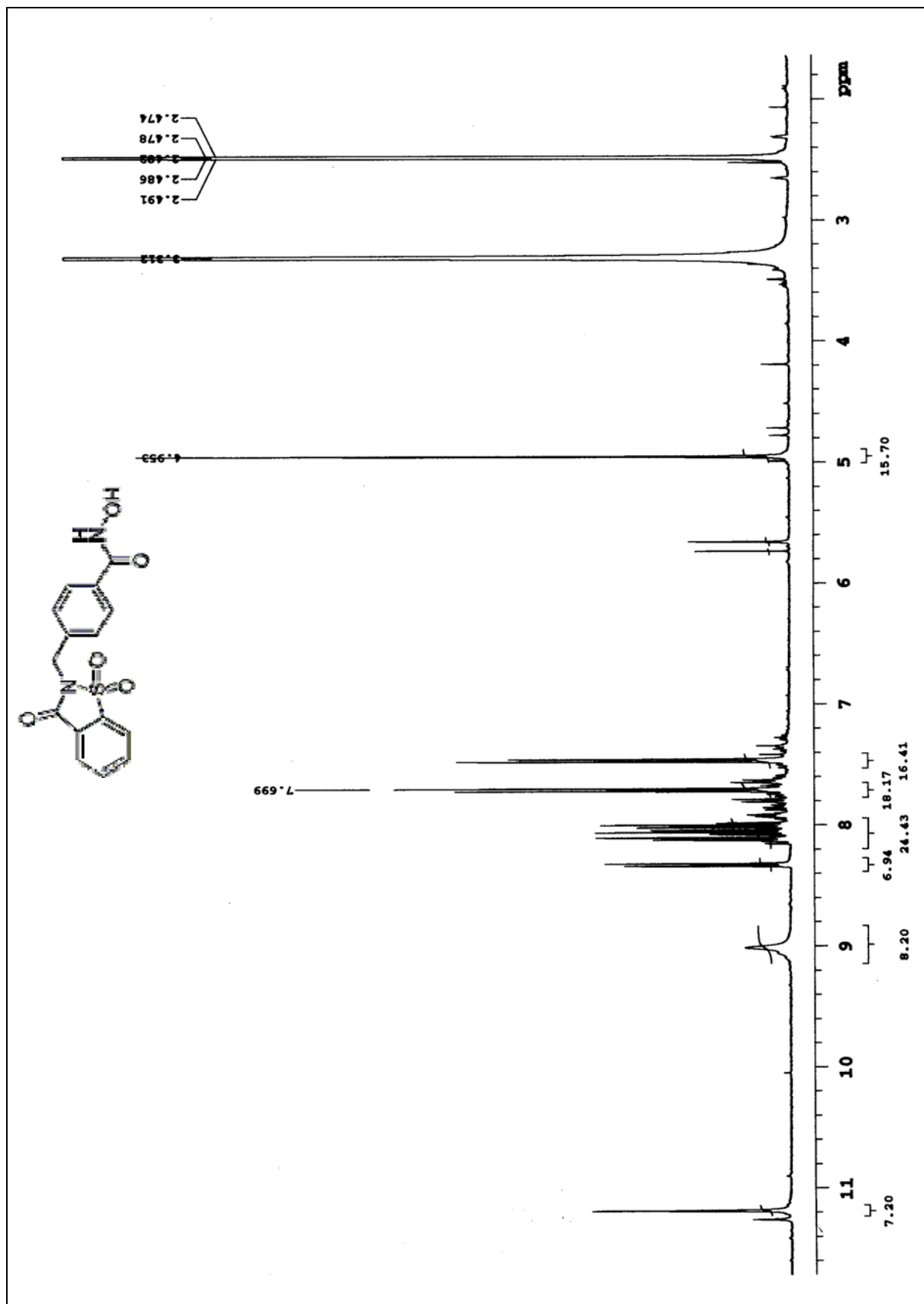




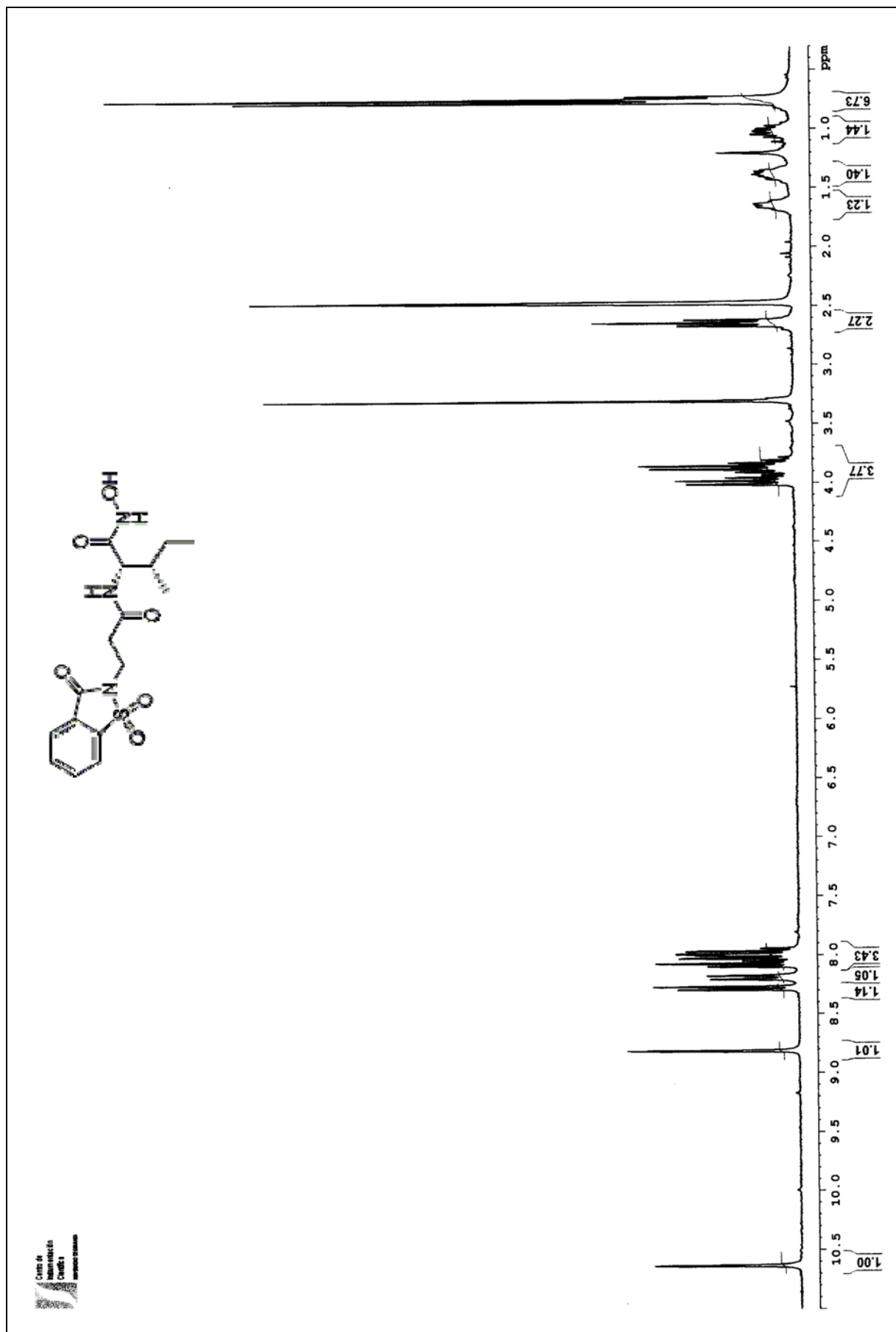
¹H-RMN: 3-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-yl)propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-66)

¹³C-RMN : 3-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzol[*d*]isotiazol-2-il)-propanamido]-N-hidroxiopropanamida (MTC-66)



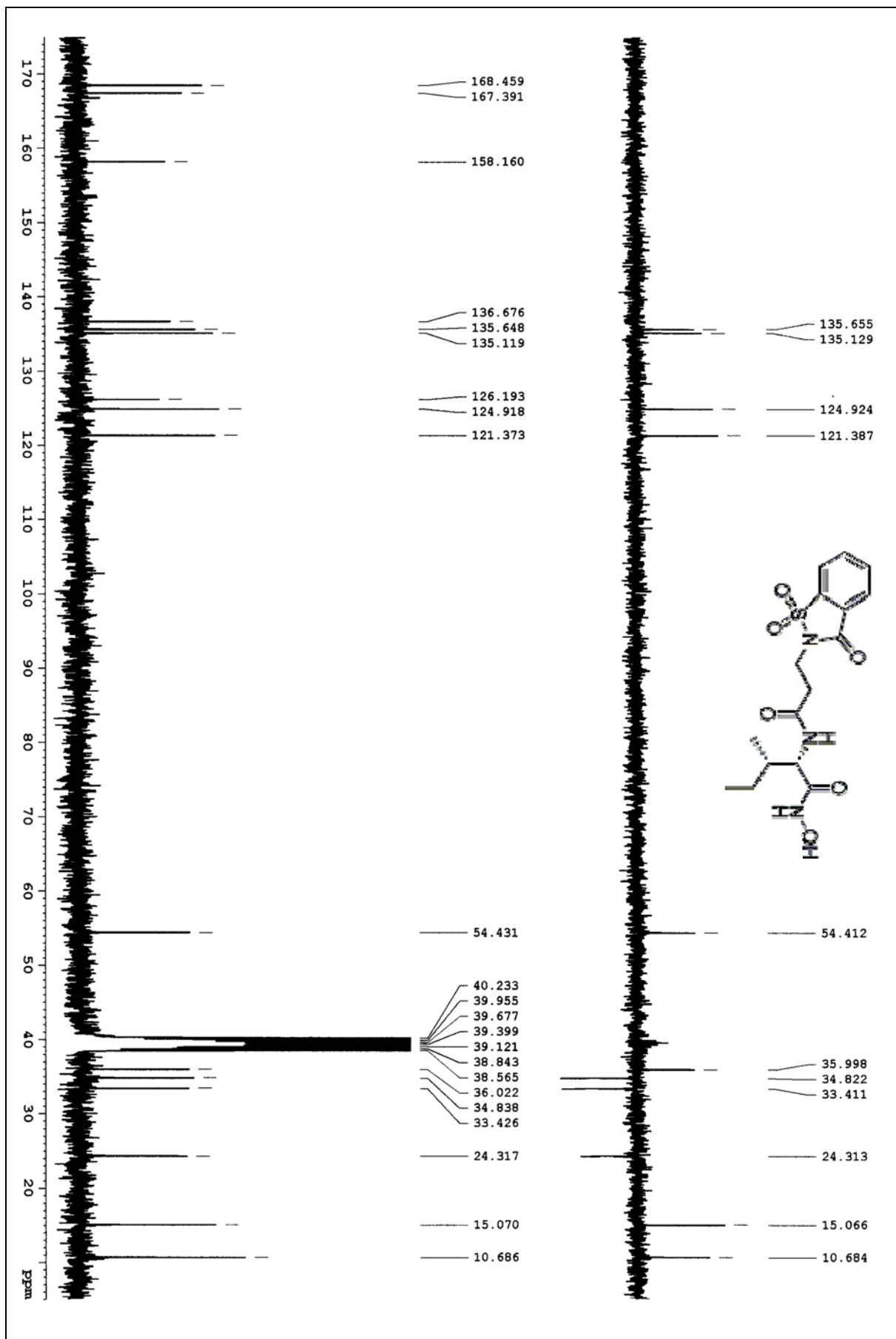


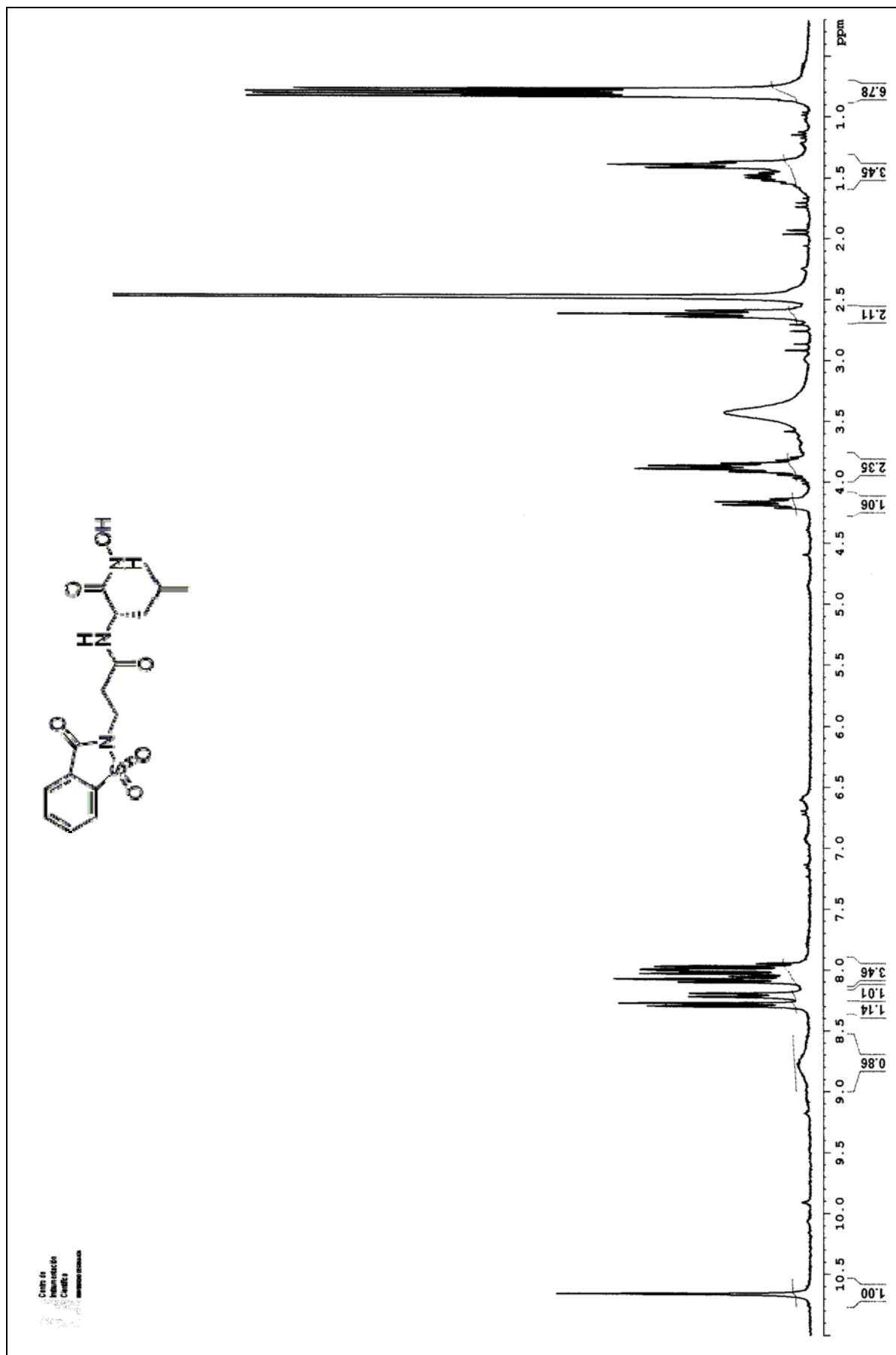
¹H-RMN: 4-[(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[isotiazol-2-il)metil]-N-hidroxi benzamida (MTC-128)



¹H-RMN: 2S, 3S-2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-yl)-propanamido]-3-metil-N-hidroxipentanamida (MTC-94)

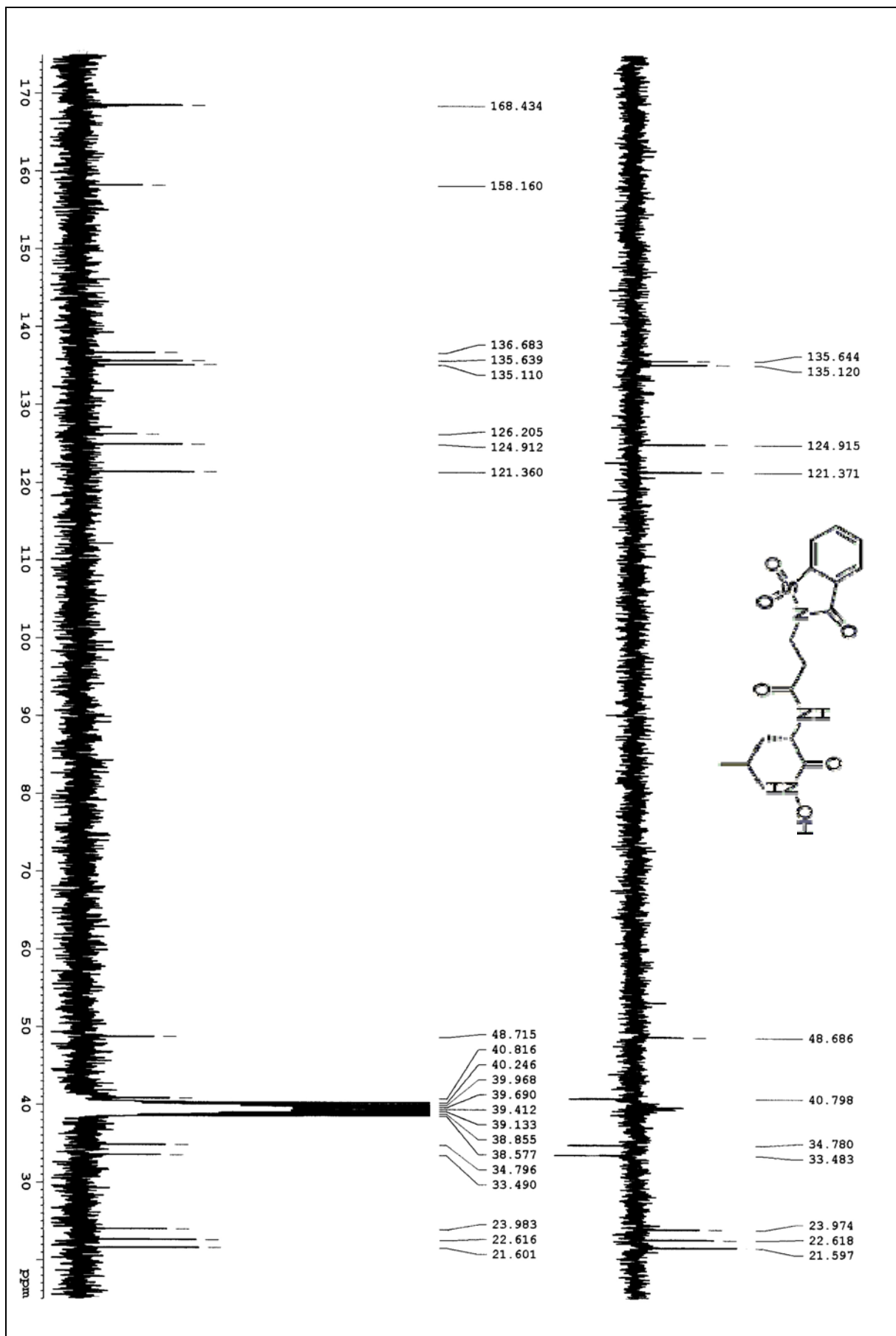
¹³C-RMN: 2S, 3S-2-[3-(1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzol[*d*]isotiazol-2-il)-propanamido]-3-metil-N-hidroxipentanamida (MTC-94)

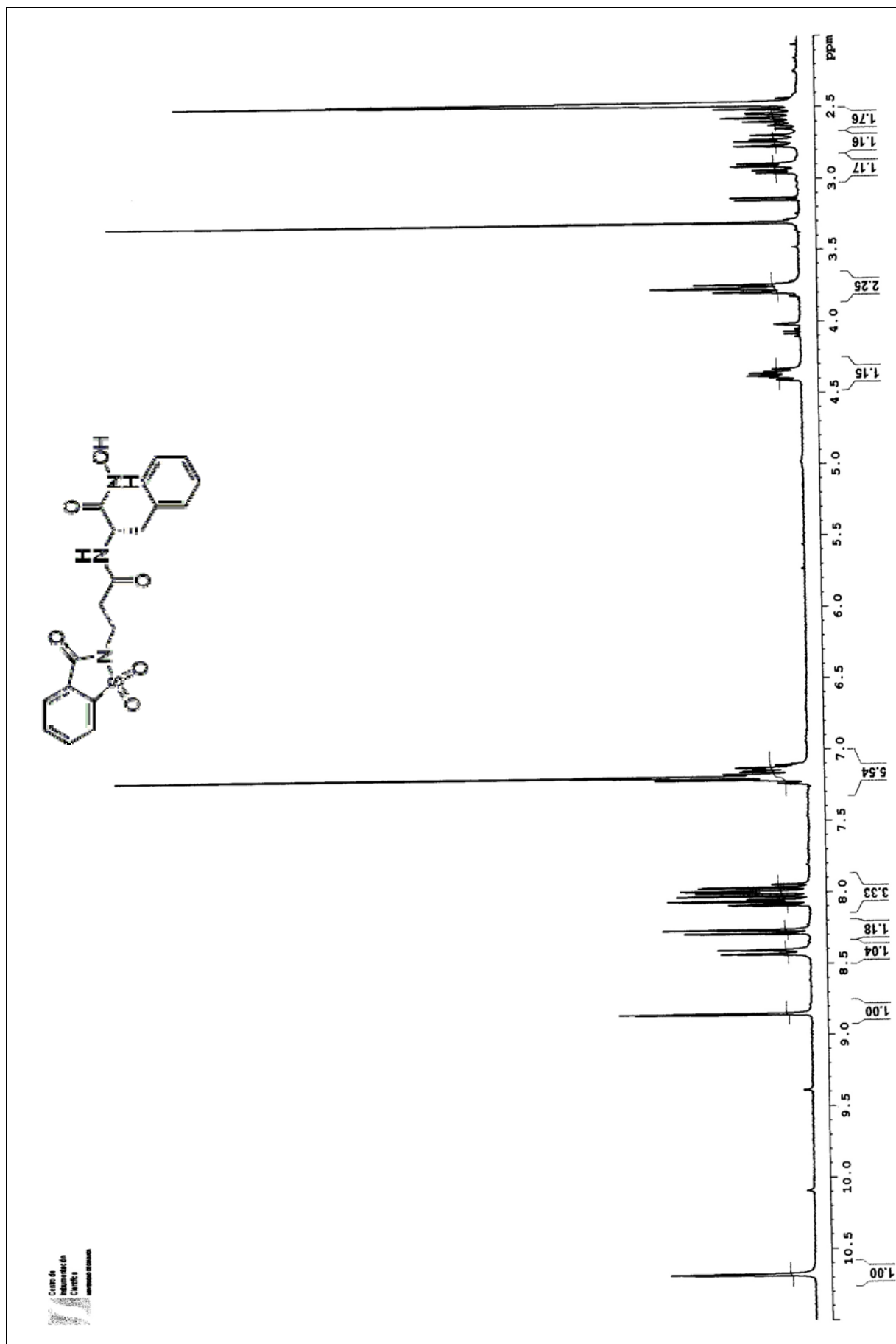




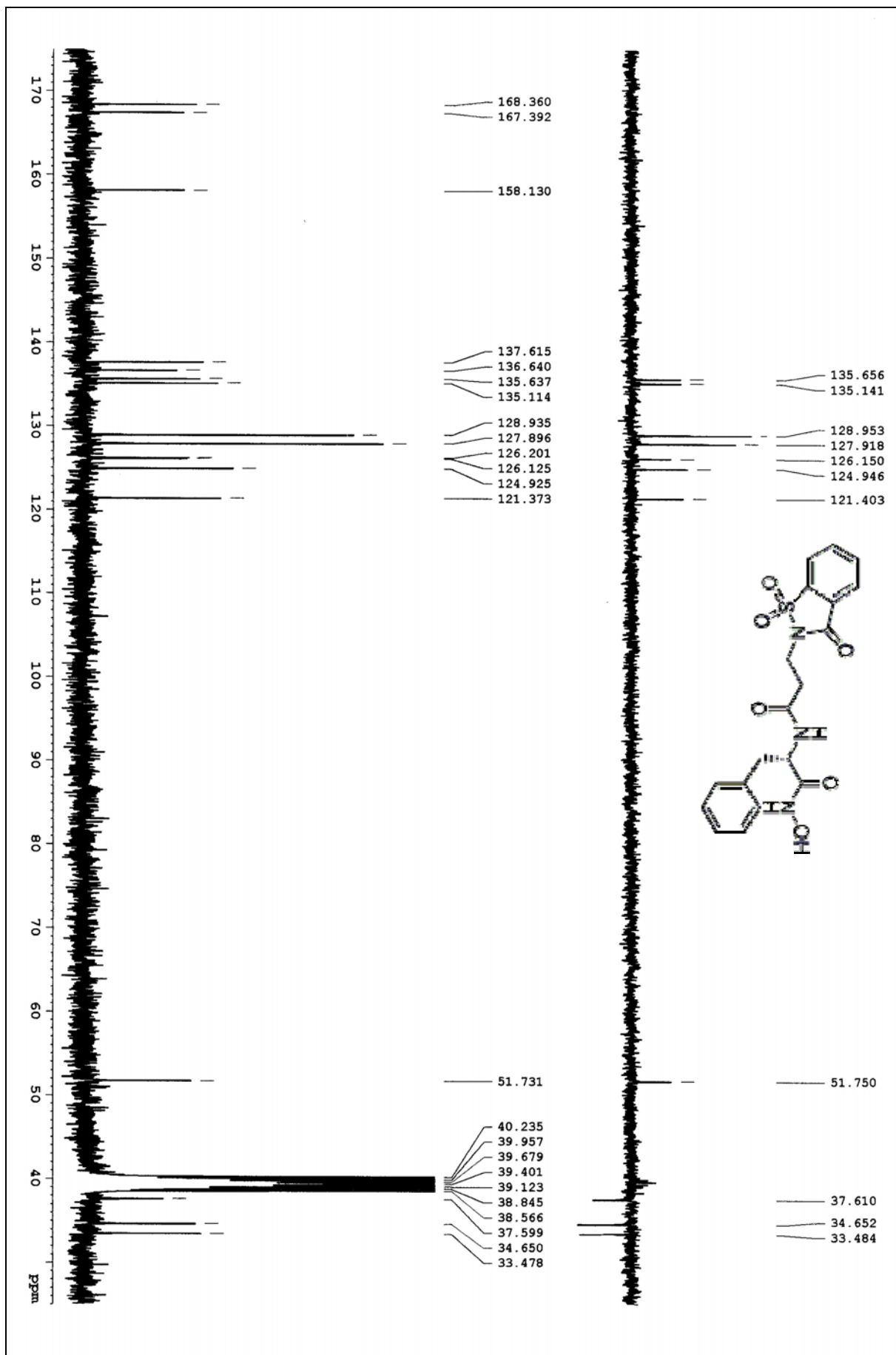
¹H-RMN: 2S, 2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol-2-yl)-propanamido]-4-metil-N-hidroxipentanamida (MTC-95)

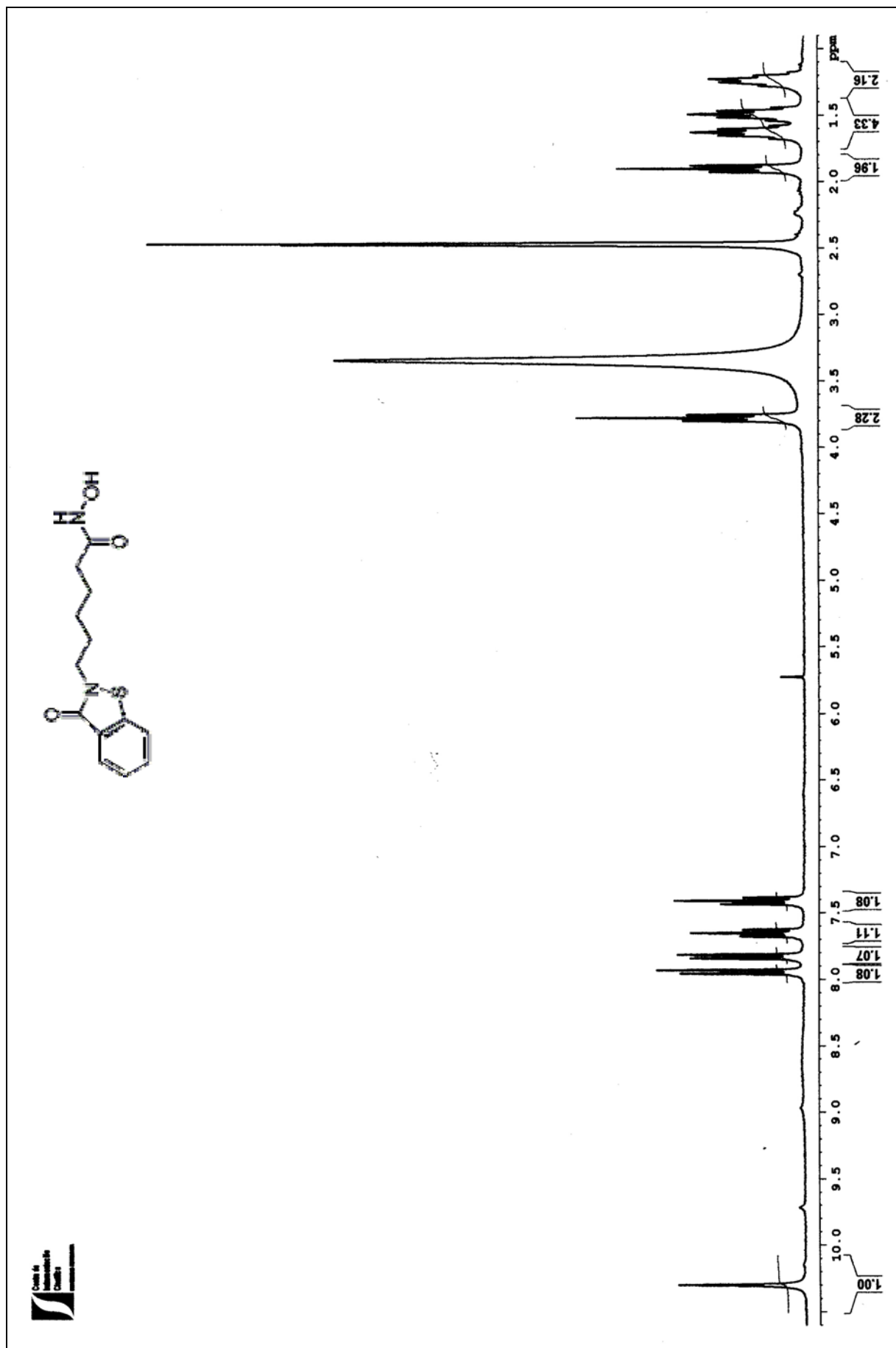
¹³C-RMN: 2S, 2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzotriazol-2-yl)-propanamido]-4-metil-N-hidroxipentanamida (MTC-95)





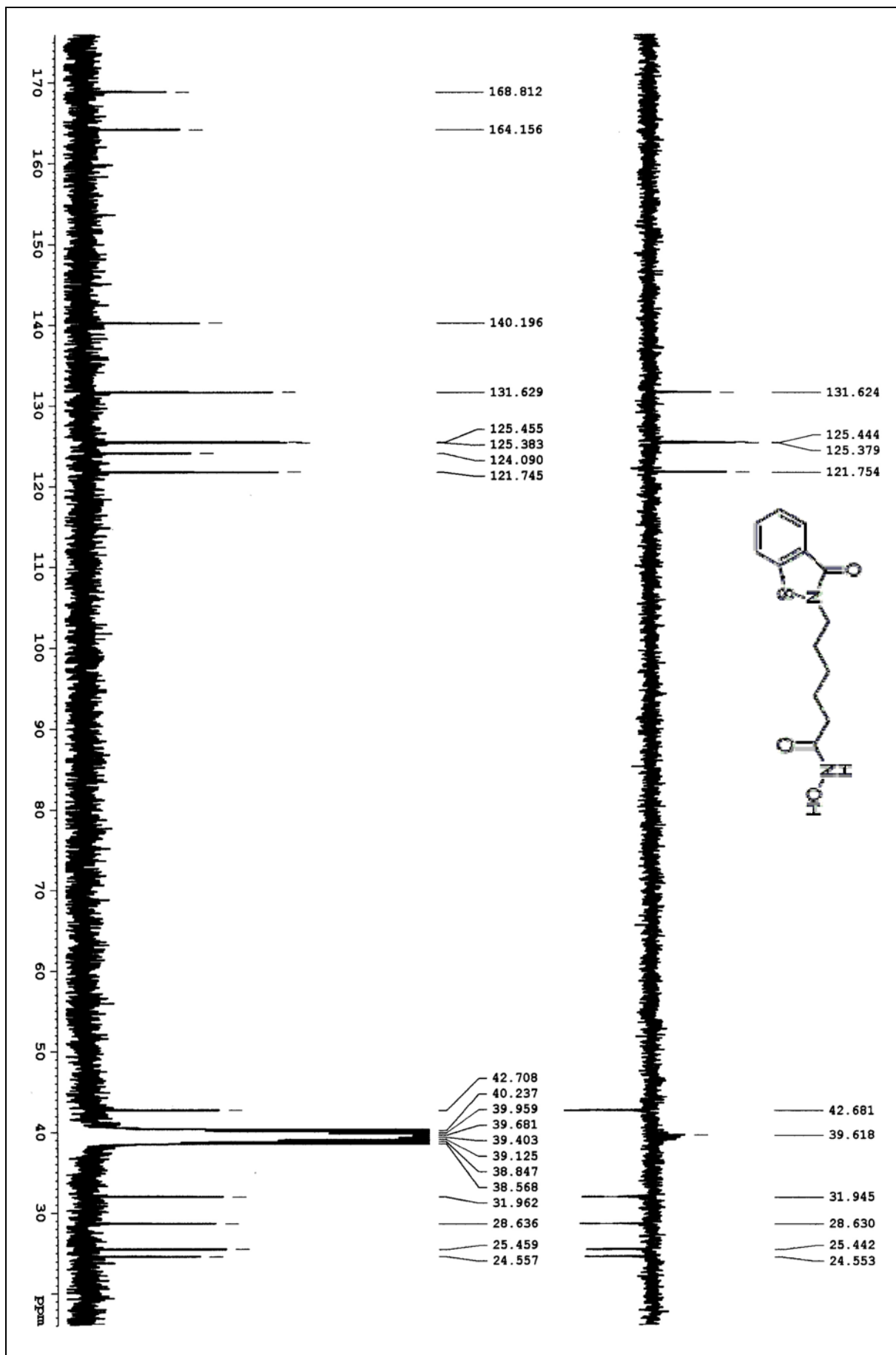
¹³C-RMN: 2S, 2-[3-(1,1-dioxido-3-oxo-2H-benzotriazol-2-yl)-propanamido]-3-fenil-N-hidroxiopropanamida (MTC-96)

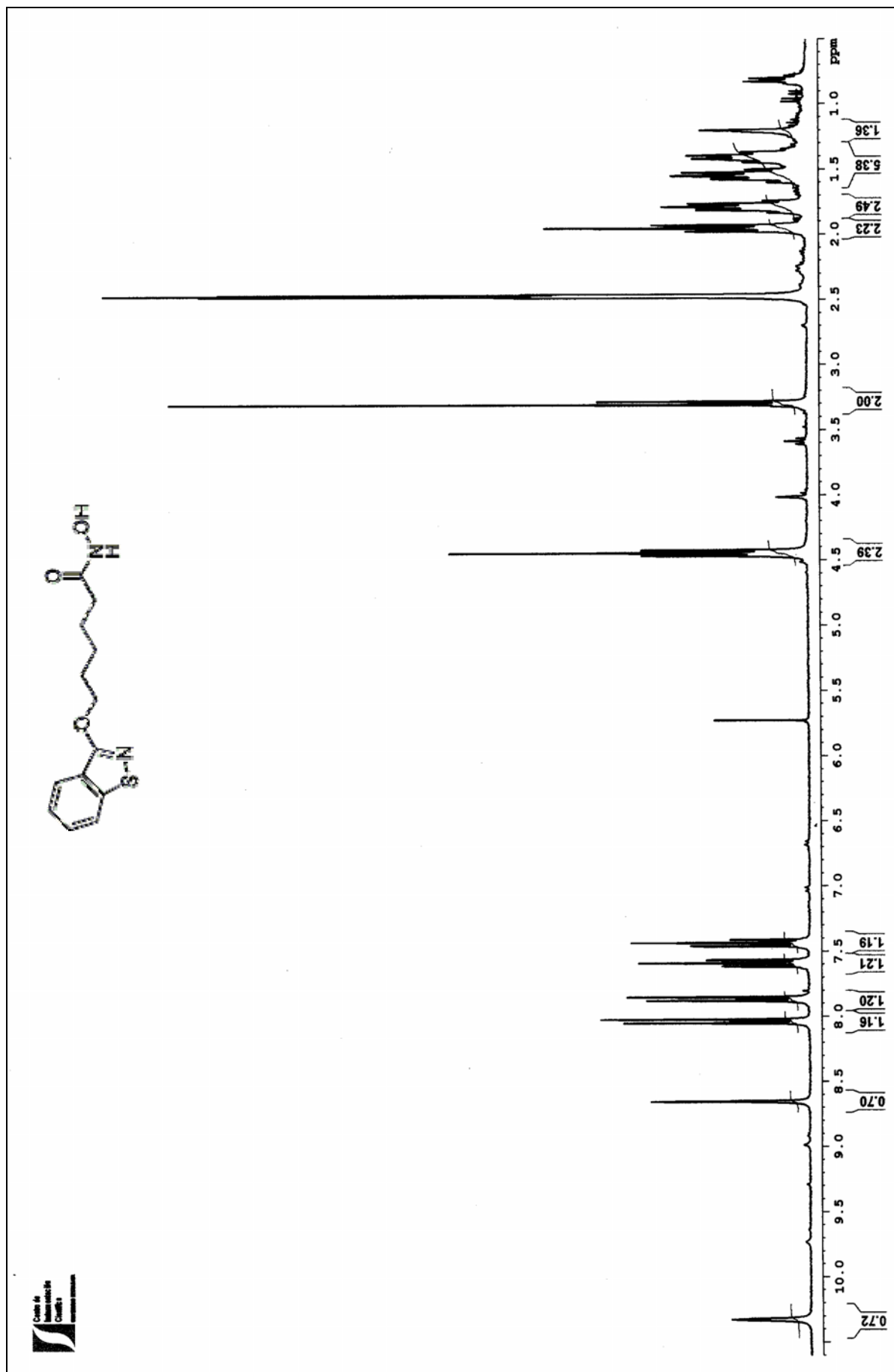




¹H-RMN: 6-(3-oxo-2H-benzotriazol-2-yl)-N-hydroxyhexanamida (MTC-136)

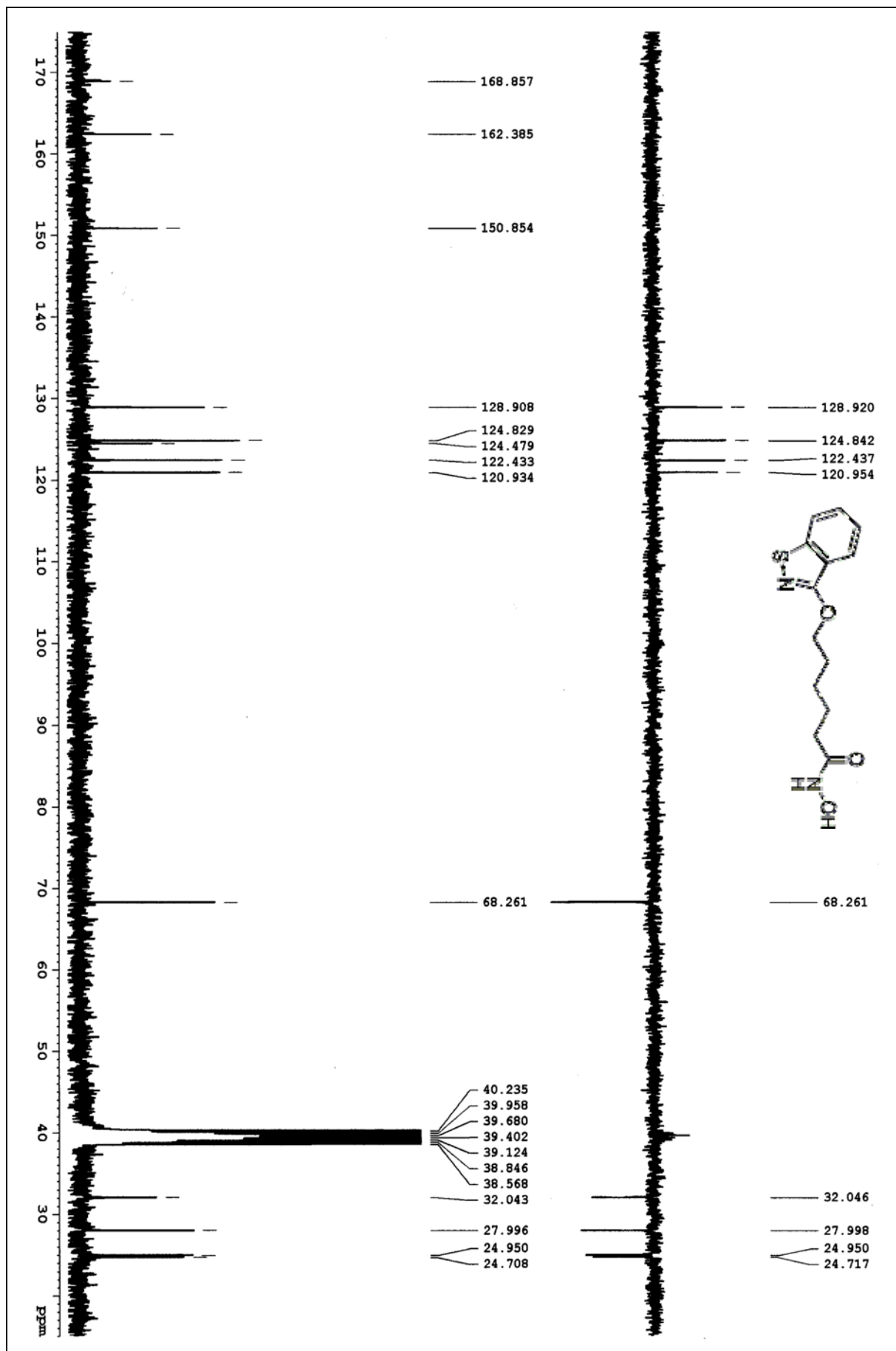
¹³C-RMN : 6-(3-oxo-2H-benzof[*d*]isotiazol-2-il)-N-hidroxihexanamida (MTC-136)





¹H-RMN: 6-[(benzo[d]isotiazol-3-il)oxa]-N-hidroxihexanamida (MTC-144)

¹³C-RMN: 6-[1-(benzol[*d*isotiazol-3-*il*)oxal]-*M*-hidroxihexanamida (MTC-144)



8. ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

A

ADN	Ácido desoxiribonucléico
Ala	Alanina
β-Ala	β Alanina
APHAs	3-(4-aroil-1-metil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamidas

B

BOP-Cl	Cloruro de Bis (2-oxo-3-oxazolidinilo) fosfínico
--------	--

C

c	Cuadruplete
CBHA	Ácido bis (m-carboxicinamil) hidroxámico
CCF	Cromatografía en capa fina
CDMT	2-cloro-4,6-dimetoxi [1,3,5] triazina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CSA	Ácido canforsulfónico

D

d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doble doblete
DBU	1,8-diazabicyclo [5.4.0] undecan-7-eno
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPCDI	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMA	N,N-dimetilacetamida
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTMM	Cloruro de 4-(4,6-dimetoxi[1,3,5] triazin-2-il)-4-metilmorfolinio
DOBI	1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazol

E

EDCI	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EI	Impacto electrónico
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol

F

FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	Fluorenilmetoxicarbonilo

G

Gly Glicina

H

HAT Histona Acetil Transferasa
HATU Hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetileno] N-óxido N-metilmetanaminium
HDAC Histona Desacetilasa
HDLP Proteína parecida a la histona desacetilasa
HKMT Histona Lisina Metil Transferasa
HMT Histona Metil Transferasa
HOAt 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt N-hidroxibenzotriazol
HODT Hexafluorofosfato de S-(1-óxido-2-piridinil)1,3-dimetilpropilenuonio
HONB Ácido imido N-Hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico
HOTT Hexafluorofosfato de S-(1-óxido-2-piridinil)1,1,3,3-tetrametiluronio
HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HRMS Espectroscopía de masas de alta resolución

I

IIDQ 2-isobutoxi-1-isobutoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina

L

LSIMS Liquid Secondary Ionization Mass Spectrum

M

m Multiplete
MeOH Metanol

N

NMM *N*-metil-morfolina

Q

q Quintuplete

R

REA Relaciones Estructura Actividad
RMN Resonancia Magnética Nuclear

S

s Singlete
sa Singlete ancho
SAH Ácido suberoilánilido hidroxámico

T

t Triplete
TBTU Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametiluronio
TEA Trietilamina
TES Trietilsilano
THF Tetrahidrofurano
THP Tetrahidropiraniolo
TFA Ácido trifluoroacético
TODT Tetrafluoroborato de S-(1-óxido-2-piridinil)1,3-dimetilpropilenuonio
TOTT Tetrafluoroborato de S-(1-óxido-2-piridinil)1,1,3,3-tetrametiluronio