

**DESARROLLO DE NUEVOS
ANÁLOGOS NITROGENADOS DE
COMBRETASTATINA A-4. DISEÑO,
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN**



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

YOUNES ELLAHIQUI

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA**

MARZO 2015

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Trabajo Presentado Para Optar al Grado de Doctor en Farmacia por:

Younes Ellahioui

V°B°

Profesor Manuel Medarde Agustín

Director del Departamento de Química Farmacéutica



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

FACULTAD DE FARMACIA

Campus Miguel de Unamuno

37007 Salamanca

Tel.: +34 923 29 45 28

Fax: +34 923 29 45 15

Correo electrónico: medarde@usal.es

<http://www.usal.es>

Negociado de Tercer Ciclo
Universidad de Salamanca
Patio de Escuelas.
SALAMANCA

ADENDA a la Tesis Doctoral de Younes ELLAHIQUI (fecha de defensa 23 de marzo de 2015) titulada "Desarrollo de nuevos análogos nitrogenados de combretastatina A-4. Diseño, síntesis y evaluación".

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación:

- Optimización de antitumorales inhibidores de tubulina por mejora de propiedades farmacocinéticas. Financiado por la Junta de Castilla y León (SA147U13).

esta ADENDA debe completar la información contenida en la página 7 del ejemplar de la tesis depositada en la Universidad de Salamanca, ya que el trabajo ha sido en parte realizado con los fondos procedentes de este proyecto de investigación.

Salamanca a veintitrés de marzo de dos mil quince

Firmado: Younes Ellahioui

VºBº de los directores de la Tesis

Esther Caballero

Rafael Peláez

Raquel Álvarez

Esther Caballero Salvador, Profesora Titular de Química Orgánica, **Rafael Peláez Lamamié de Clairac Arroyo**, Profesor Titular de Química Orgánica y **Raquel Álvarez Lozano**, Profesora Ayudante Doctor, del Departamento de Química Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que el licenciado en Química por la Universidad Abdelmalek Essaâdi de Tetuán, Marruecos, **Younes Ellahioui**, ha realizado en este Departamento, bajo su dirección, el trabajo titulado **“Desarrollo de Nuevos Análogos Nitrogenados de Combretastatina A-4. Diseño, Síntesis y Evaluación”**, para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca. Considerándolo finalizado, autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Salamanca, marzo de 2015

Fdo. Esther Caballero

Fdo. Rafael Peláez

Fdo. Raquel Álvarez

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación:

- Síntesis y evaluación de nuevos agentes antitumorales basados en combretastatinas y fenstatinas: vectorización y modificación del mecanismo de acción. Financiado por el Ministerio de Ciencia e innovación (**SAF 2008-04242**).
- Optimización de la aplicabilidad de fenstatinas mediante la combinación con complejos de platino: Diseño, síntesis de nuevos agentes citotóxicos de acción doble. Financiado por la Junta de Castilla y León (**EDU/940/2009**).
- Aza-Indenofenonas, una nueva familia de agentes antimetabólicos. Financiado por la AECID (**PCI-Mediterráneo A1/037364/11**).
- Mejora de la solubilidad acuosa de agentes antimetabólicos. Conversión de combretastatinas, fenstatinas y compuestos relacionados en fármacos útiles para el tratamiento del cáncer. Financiado por la Universidad de Salamanca (**KAC8/2013**)

Su realización ha sido posible gracias a:

- La beca del proyecto AECID (**PCI-Mediterráneo A1/037364/11**) concedida para mi estancia en Salamanca (2011-2013).

Publicaciones:

- Enviada al Journal of Medicinal Chemistry con el título "Exploring the size adaptability of the B ring binding zone of the colchicine site of tubulin with para-Nitrogen substituted isocombretastatins. Importance for the SAR." Autores: Jiménez, Carmen; Ellahioui, Younes; Aramburu, Laura; Riesco, Alejandra; Dahdouh, Abdelaziz; IbnMansour, Ahmed; Jiménez, Carlos; Martín, Diego; Sarmiento, Rogelio; Medarde, Manuel; Álvarez, Raquel; Caballero, Esther; Pelaez, Rafael.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis. A Esther Caballero por su plena disponibilidad y dedicación en mi aprendizaje, por tener la puerta de su despacho siempre abierta. A Rafa Peláez por todo lo que me ha enseñado, dispuesto a ayudarme en todo lo necesario y por su paciencia. A Raquel Álvarez por su accesibilidad, su ayuda y por su amistad, muchas gracias.

A Manolo por su ayuda, por facilitarme la estancia en el departamento para realizar la Tesis y por su apoyo. Gracias.

Quiero agradecer a mis profesores de la Facultad de Ciencias, Universidad Abdelmalek Essaâdi Tetuán, Marruecos. A Ibnmansour y A. Dahdouh por darme la oportunidad de estar aquí y por animarme siempre.

A la AECID por la financiación concedida para mi estancia en Salamanca.

A mis compañeros del departamento, Laura, Elena, Ángela, Tiago, Myriam, Richi, Alba y los que pasaron por aquí, Carolina, Dina, Luis, Alejandra, Umer, por todos lo que hemos aprendido juntos. A los TFG y TFM por los buenos momentos compartidos en el departamento.

A todos los profesores y compañeros del departamento, por su ayuda, orientarme cuando lo he necesitado y por dejarme sentir como en mi casa.

A Rosa y Consta, por su ayuda y la sonrisa, porque sin ellos el departamento está oscuro.

A todos mis amigos, que estuvieron apoyándome siempre, con especial mención para Kaoutar, Paulo, Marta, Aziz, Mohamed, Nawal, Ali, Omar, Adnan, Bahija, Siham, Imad, Faouzi, Basil, Nourelimane. A mis amigos de Jbel Lahbib y Tetuán.

A mis amigos y compañeros del piso, Sobinson, Tiago y Milton por su paciencia, el cariño y por los buenos momentos que hemos compartido juntos.

A mis tíos y primos de Madrid, de Bélgica y de Marruecos por su ayuda y por recibirme siempre en su casa con brazos abiertos.

También quiero agradecer de forma especial a mis padres, hermanos y hermanas, que han sufrido la distancia como yo y a los que quiero y admiro tanto, que no puedo explicarlo con palabras.

Muchas Gracias a todos.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

ÍNDICE

Lista de símbolos, abreviaturas y acrónimos	17
Resumen	21
Abstract	23
INTRODUCCIÓN	25
I. Compuestos que se unen al sitio de colchicina	31
II. Relación estructura-actividad de los derivados de combretastatina	32
III. Métodos de síntesis de combretastatina	36
1. Por reacción de Wittig	36
2. Reacciones catalizadas por organometálicos	38
2.1 Acoplamiento de Suzuki	38
2.2 Acoplamiento de Kumada-Corriu	39
3. Reacción de Ramberg-Backlund	39
4. Reacciones en Microondas	41
5. Condensación de Perkin	42
6. A partir de fenstatina: Reordenamiento de Colvin	43
7. A partir de alquinos	43
8. Isomerización del doble enlace	44
IV. Métodos de síntesis de fenstatinas	44
1. A partir de combretastatinas	44
2. Reacciones catalizadas por organometálicos	45
2.1 Acoplamiento de Suzuki	45
2.2 Catálisis con cobre	45
2.3 Carbonilación acelerada por irradiación con microondas	46
3. Reacciones de Friedel-Crafts	46
4. A partir de productos naturales	47
5. A partir de una adición nucleofílica	47
V. Métodos de síntesis de isocombretastatinas	48
1. A partir de fenstatinas	48
2. Reacciones catalizadas por organometálicos	49
2.1 Acoplamiento con paladio	49
2.2 Acoplamiento de Stille	50
3. A partir de amida de Weinreb	50
4. A partir de acetofenonas	51
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	53
I. Planteamiento	55
II. Objetivos	57
1. Modificación del anillo B	57
2. Modificación del anillo A	58
MÉTODOS Y RESULTADOS	61

Estructuras de los compuestos sintetizados	63
I. Modificación en el anillo B	69
1. Síntesis de análogos de fenstatina	70
1.1 Síntesis de análogos de dimetilaminofenilo	70
1.2 Síntesis de análogos de piridina	74
1.3 Síntesis de análogos de dimetilaminofenilo sustituidos	77
1.4 Preparación de las sales de amonio de <i>p</i> -dimetilaminofenilo	79
2. Síntesis de análogos de combretastatina	81
2.1 Derivados del dimetilaminofenilo	82
2.2 Derivados de piridina	85
2.3 Sales de amonio de combretastatinas	87
3. Síntesis de fenstatina alifáticas	88
3.1 Derivados de 4-metoxiciclohexano	88
3.2 Derivados de piperidina	89
II. Modificación en el anillo A	92
1. Síntesis de análogos de fenstatina	93
1.1 Síntesis de los derivados del <i>p</i> -metoxifenilo	93
1.2 Síntesis de los derivados 1 <i>H</i> -indol	96
2. Síntesis de análogos de combretastatina	102
2.1 Síntesis de los derivados <i>p</i> -metoxifenilo	102
2.2 Síntesis de los derivados <i>p</i> -dimetilaminofenilo	107
III. Modificación en el puente	108
IV. Solubilidad	114
V. Actividad biológica	117
1. Aislamiento de la proteína	117
2. Ensayos de inhibición de polimerización de tubulina	118
3. Determinación de la IC ₅₀ de inhibición de la polimerización de la tubulina	120
4. Discusión de resultados	122
5. Ensayos de citotoxicidad	126
PARTE EXPERIMENTAL	129
I. Técnicas generales	131
1. Instrumentación	131
2. Técnicas cromatográficas	131
3. Tratamiento de disolventes y reactivos	132
II. Preparación de sales de amonio	133
III. Modificación del anillo B	137
III. 1. Derivados bencénicos	137
A. Análogos de isocombretastatinas	137
B. Análogos de combretastatinas	151
III. 2. Derivados piridínicos	160
A. Análogos de isocombretastatinas	160
B. Análogos de combretastatinas	174
C. Otros análogos de isocombretastatinas	181
IV. Modificación del anillo A	193
A. Análogos de isocombretastatinas	193

B. Análogos de isocombretastatinas	202
C. Compuestos con indol como anillo B	221
V. Otras combretastatinas modificadas	229
<hr/>	
A. Modificación en el puente etilénico	229
B. Derivados de isocombretastatina con anillos alifáticos	232
VI. Determinación de la solubilidad acuosa	239
<hr/>	
VII. Actividad biológica	241
<hr/>	
1. Aislamiento de la proteína	241
2. Ensayos de actividad	242
3. Determinación de la IC ₅₀ de la inhibición de polimerización de la tubulina	243
<hr/>	
CONCLUSIONES	245
<hr/>	
ESPECTROS	249
<hr/>	

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AB	Tampón de ensamblaje
Ac	Acetilo
Ar	Arilo
BSA	Seroalbúmina bovina
<i>c</i>	Cuartete
CA-4	Combretastatina A4
COSY	Espectroscopia de correlación
d	Doblete
dd	Doble doblete
Diglime	Dietilenglicol dimetil éter
DM	Dimetoxifenilo
DME	Dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Tampón de extracción
EM	Espectro de masas
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
Hex	Hexano
HMBC	Correlación heteronuclear de múltiples enlaces
HMQC	Correlación heteronuclear múltiple cuántica
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Hz	Hercios
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IPT	Inhibición de la polimerización de tubulina
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda (lambda)
L	Litros
m	Multiplete
M ⁺	Ion molecular
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
Me	Metilo
MeI	Yoduro de metilo
MTP	Proteína microtubular
NEt ₃	Trietilamina
NMe ₂	Dimetilamino
P	Grupo fosfato
PDB	Banco de datos de proteínas
PDC	Dicromato de piridinio
Pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
ppm	Partes por millón
pyr	Piridina

p-TsOH	Ácido p-toluenosulfónico
REA	Relación estructura actividad
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revolución por minuto
s	Singlete
sa	Singlete ancho
t	Triplete
<i>t</i> -BuOH	<i>terc</i> -butanol
TB	Tampón de transporte
TBAF	Fluoruro de tetra- <i>n</i> -butilamonio
TBDMSCl	Cloruro de <i>terc</i> -butildimetilsililo
THF	Tetrahidrofurano
TM	3,4,5-Trimetoxifenilo
TMG	2,3,4-Trimetoxifenilo
TMSCl	Cloruro de trimetilsililo
t _R	Tiempo de retención
δ	Desplazamiento químico
TsNHNH ₂	Tosilhidrazida
UV	Ultravioleta
XPhos	2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y el número de casos detectados va en aumento. Se considera uno de los temas más destacados en el mundo de la investigación científica y cada año se desarrollan miles de compuestos antitumorales para ver si pueden llegar a frenar esta enfermedad.

Una de las familias de agentes antimetabólicos que tiene una potencia inhibidora importante frente a la polimerización de la tubulina en el sitio de la colchicina son las combretastatinas. La CA-4 presenta una actividad muy interesante por lo cual se puede considerar como molécula base para el desarrollo de análogos más potentes y que puedan mejorar la relación estructura actividad (REA) para este tipo de derivados.

Los principales problemas estructurales de CA-4 son la baja solubilidad acuosa y la rápida isomerización del doble enlace *cis* a *trans*. En nuestro grupo de trabajo, se han realizado numerosas modificaciones dirigidas a paliar esta problemática cambiando la naturaleza de los dos anillos aromáticos o los sustituyentes que contienen y el puente que los une.

En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de nuevos análogos nitrogenados de combretastatina, fenstatina e isocombretastatina en los que se han introducido en los anillos aromáticos grupos nitrogenados con el fin de aumentar la potencia inhibitoria de polimerización de tubulina y la solubilidad acuosa de los mismos.

La estrategia seguida ha sido combinar en los dos anillos aromáticos A y B sustituyentes oxigenados con los nitrogenados, los cuales podrían unirse de forma similar a la tubulina y potenciar la solubilidad. Para ello se han sintetizado derivados de piridina o bencénicos sustituidos con grupos metil- o- dimetilamino, pirrolidino, conjuntamente y utilizando la reactividad de la molécula se han introducido funciones polares adicionales.

Se ha determinado la solubilidad acuosa de los compuestos sintetizados, comprobándose un incremento considerable respecto a las de CA-4. Además, de la mayor parte de los compuestos finales sintetizados se ha determinado la actividad inhibitoria de polimerización de tubulina, observándose que de las modificaciones realizadas en el anillo B solamente la isocombretastatina con anillo de *p*-dimetilaminofenilo posee una actividad similar a la de CA-4. Sin embargo, la sustitución de uno de los metoxilos del anillo A por un grupo amino libre o metilado conduce a compuestos de igual o mayor potencia que la CA-4 y que poseen una

mayor solubilidad acuosa, lo cual hace que estos compuestos sean candidatos para continuar la investigación.

Una serie de compuestos sintetizados en este trabajo han sido evaluados como citotóxicos frente a tres líneas celulares cancerosas (HeLa, HT29, HL60).

ABSTRACT

Cancer is one of principal causes of mortality and the number of detected cases is increasing. It's considered one of the most prominent scientific research subjects and each year thousands of antitumor compounds are developed in an attempt to better treat this disease.

The combretastatins are a family of compounds binding at the colchicine site and having an important anti-mitotic inhibitory activity against tubulin polymerization. The CA-4 has a very interesting activity which sets it as a base molecule to develop more potent analogues and can improve the structure activity relationships (SAR) for such as derivatives.

The main problems of CA-4 are the low aqueous solubility and rapid *cis* isomerization of the double bond to *trans*. In our group, there have been numerous modifications aimed to solve these problems by changing the nature of the two aromatic rings or their substituents and the bridge that connect them.

In this work we have synthesized new nitrogenated analogues of combretastatin, phenstatin and isocombretastatin with nitrogen groups on the aromatic rings, designed in order to increase the inhibitory potency on tubulin polymerization and the aqueous solubility.

The applied has been to combine in the two aromatic A and B rings oxygenated and nitrogen substituents. This has been accomplished with the synthesis of phenyl and pyridine derivatives with methyl- or -dimethylamino and pyrrolidino groups.

We have determined the aqueous solubility of the synthesized compounds and found a significant increase over the CA-4. Furthermore, we have determined the inhibitory activity of tubulin polymerization for most of the final compounds synthesized. For B ring modifications only isocombretastatins with unsubstituted *p*-dimethylaminophenyl rings have a similar potency to that of CA-4. However, replacement of one methoxyl groups of the A ring by a free amino or methylamino group leads to compounds with the same or greater potency than CA-4 and having an improved aqueous solubility, which makes these compounds are good candidates for continuing the investigation.

A series of compounds synthesized in this work have been evaluated by cytotoxicity assay against three cancer cell lines (HeLa, HT29, HL60).

ملخص البحث

يعتبر مرض السرطان من أكبر المعضلات التي تواجه العالم حيث يتسبب في وفاة أكثر من سبعة ملايين شخص سنويا، وعدد الحالات المكتشفة في ازدياد مستمر. لهذا يعتبر أحد أهم مواضيع البحث العلمي في هذا العصر حيث يتم إنتاج وتطوير سنويا آلاف المركبات القادرة على كبح تطور الأورام، في محاولة للحصول على علاج فعال لوقف هذا المرض الخبيث.

تعتبر فصيلة الكومبريتاستاتين (combrestatins) من أهم المركبات المضادة للتفثل والتي لديها قوة كبيرة ضد بلمرة التوبولين (tubulin) في موقع الكولشيسين. الكومبريتاستاتين لديها فعالية جد مهمة، لذلك تعتبر العنصر الأساس والقاعدة لتطوير نظائر أكثر فعالية وقادرة على تحسين العلاقة بين الهيكل والفعالية لهذه المشتقات.

من بين أهم المشاكل التي تواجه هذا الصنف من المركبات هي الذوبان المنخفض في الماء والمماكبة السريعة للرابطة المزدوجة من سيز (cis) إلى ترانس (trans). للتخفيف من حدة هذه المشكلة قام فريق العمل لدينا بإدخال العديد من التعديلات عن طريق تغيير طبيعة الحلقات العطرية أو البدائل الملتصقة بها أو في الجسر الذي يربط بينها.

في هذا العمل تم إنجاز نظائر جديدة للكومبريتاستاتين، فينستاتين (phenstatins) وإيزوكومبريتاستاتين (isocombrestatins) بإدخال عنصر النيتروجين في الحلقات العطرية على أساس الرفع من القوة الكابحة لبلمرة التوبولين و تحسين ذوبانيتها في الماء.

الطريقة المتبعة في هذا البحث هو العمل على إدخال بدائل أوكسيجينية أو نيتروجينية في الحلقتين (أ) أو (ب) والتي يمكن أن تتصل بشكل مماثل مع التوبولين وتعمل على الرفع من قوتها الذوبانية. من أجل هذا تم إنجاز نظائر البيريدين أو مركبات عطرية تحتوي على عنصر ميثيل أمين، ثنائي ميثيل أمين أو البيروليدين أو هما معا وبالإعتماد على تفاعلية الجزيئة تم إدخال وظائف قطبية إضافية.

تم إيجاد على أن ذوبانية المركبات المنجزة في الماء أكبر بكثير بالمقارنة مع الكومبريتاستاتين A-4. بالإضافة إلى ذلك، تم إنجاز إختبار الفعالية الكابحة لبلمرة التوبولين لمعظم المركبات النهائية المنجزة، حيث تبين على أنه من بين كل المركبات التي تم إدخال تغيير في الحلقة (ب) فقط الإزوكومبريتاستاتين ذات الحلقة 4-ثنائي ميثيل أمين فيلين هي التي لها قوة كابحة مماثلة للكومبريتاستاتين A-4. عكس ذلك، إستبدال عنصر الميثوكسي في الحلقة (أ) بعنصر الأمين أو الميثيل أمين يقود إلى مركبات ذات فعالية مماثلة أو أكبر من الكومبريتاستاتين A-4 ضد بلمرة التوبولين وذوبانية جد مهمة في الماء، الأمر الذي يجعل هذه المركبات هي المرشحة لمواصلة الأبحاث مستقبلا.

في هذا العمل تم إنجاز إختبار السمية الخلوية لسلسلة من المركبات على ثلاثة خطوط لخلايا سرطانية (HeLa, HT29, HL60).

INTRODUCCIÓN

El cáncer es actualmente una de las enfermedades humana con mayor índice de mortalidad. Es la segunda causa de muerte en los países occidentales, precedido por las enfermedades cardiovasculares y la primera causa de pérdida de años potenciales de vida. Según la OMS, en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertos en todo el mundo como consecuencia de tumores malignos y se piensa que esta cifra podría aumentar hasta casi 12 millones en el año 2030.

En España, en 2012 se han muerto 102.762, con una predicción para 2015 de 108.390 muertos, según las estadísticas de Sociedad Española de Oncología Médica¹.

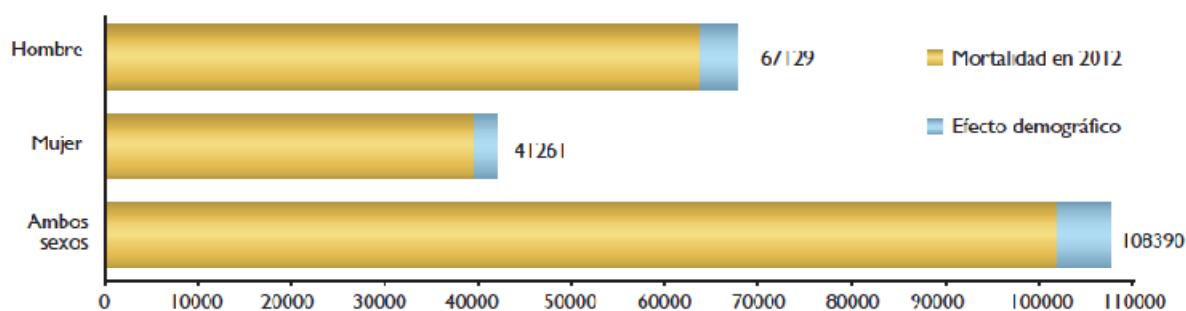


Figura 1: mortalidad de cáncer en España en ambos sexos en **2012** y predicción para **2015**²

Según los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística el 31 de enero de 2014, los tumores fueron la segunda causa de muerte en ambos sexos y responsables de 27,5 de cada 100 defunciones. La primera causa de muerte son las enfermedades del sistema circulatorio. A nivel mundial, el cáncer con mayor mortalidad es el de pulmón (19,4 %).

Bajo la denominación de cáncer se engloba a un grupo numeroso y heterogéneo de enfermedades malignas, caracterizadas por una proliferación celular anormal, anaplásica, autónoma, progresiva y destructiva³. Comienza por una falta de control en el proceso de división celular en un tejido en el que las células se reproducen de forma autónoma, anárquica e irreversible, sin regulación ni finalidad. El comportamiento de las células cancerosas se caracteriza por carecer del control reproductivo que requiere su función original, perdiendo

¹ Las cifras del cáncer en España 2014. Sociedad Española de Oncología Médica. www.SEOM.com.

² Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, DM.; Forman, D.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. *GLOBOCAN*. **2012**, 1.0.

³ Cotran, S. R.; Robbins, S. L.; Kuma, V. Patología estructural y funcional. Editorial McGraw-Hill. **1999**. Madrid.

sus características primitivas y adquiriendo otras que no les corresponden. La pérdida de la capacidad celular de realizar apoptosis se traduce en la aparición del fenómeno de metástasis, que es el rasgo biológico más característico de esta enfermedad. El nuevo tejido patológico, así formado, tiene tendencia a expandirse a través de las vías linfáticas o hemáticas, formando nuevos focos tumorales o metástasis en órganos distantes, donde continúa la expansión³.

Afortunadamente, en los últimos años se ha elevado el número de personas con cáncer en remisión. Este avance se debe, en gran parte, al resultado de un mayor conocimiento y comprensión de los aspectos biológicos de esta enfermedad. El enorme interés desde enfoques muy diferentes, se ha traducido en un extenso y exhaustivo estudio biológico y farmacológico destinado a desarrollar nuevos fármacos que, de forma selectiva, eliminen las células enfermas. Los posibles tratamientos contra el cáncer son hasta el momento, la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y el trasplante de médula.

Actualmente, uno de los tratamientos antitumorales más exitosos, y por tanto más extendidos, se basa en la administración de diversos compuestos químicos con fines terapéuticos. La vía común por la que los agentes quimioterapéuticos ejercen su efecto citotóxico en la célula es la inducción de apoptosis como respuesta a la aparición de daños irreparables en las células.

La tubulina es el componente principal de los microtúbulos. La molécula de tubulina está compuesta por dos monómeros: alfa y beta. Cada monómero contiene alrededor de 450 aminoácidos y un nucleótido de guanina. Los monómeros alfa y beta comparten aproximadamente el 40% de identidad de secuencia y sus estructuras tridimensionales son muy similares⁴. El descubrimiento de la tubulina está relacionado con la identificación del sitio de enlace de la colchicina.

⁴ Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. **1998**, *391*, 199.

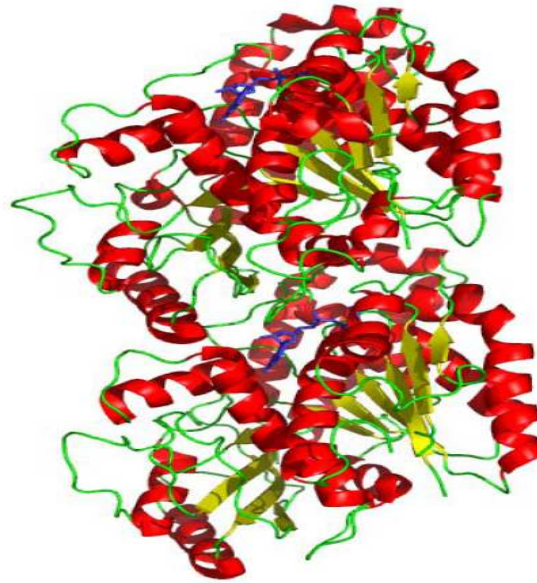


Figura 2. Estructura tridimensional del dímero de tubulina (código PDB 1JFF). Se muestra la subunidad alfa (abajo) unida a GTP y la subunidad beta (arriba) unida a GDP. Las cadenas beta están coloreadas en amarillo y las hélices alfa en rojo. El GTP y el GDP se están coloreados en azul.

La tubulina con su diversidad funcional forma los microtúbulos para server a un papel tanto esencial en la morfogénesis celular como en la polaridad de la célula, migración y la división. Los microtúbulos ocupan también el espacio citoplásmico e interaccionan con las señales de las proteínas y órganos, además tienen un papel importante en la circulación celular, como el transporte de vesículas y mitocondrias⁵. Además los microtúbulos juegan un papel esencial en la división celular durante la mitosis, mantener la estructura de la célula y transportar las proteínas.

La velocidad del crecimiento de microtúbulos, el encogimiento y la frecuencia de transición son las variables que describen la dinámica de los microtúbulos⁶.

Los microtúbulos son polímeros proteicos cilíndricos de longitud variable cuya polimerización y despolimerización depende del nucleótido GTP o GDP unido a la tubulina. Los dímeros de tubulina interaccionan para formar protofilamentos rectos que se asocian de forma paralela, para formar la pared cilíndrica del microtúbulo. El número de protofilamentos que constituyen el microtúbulo no es fijo, varía en función de las condiciones de disolución y de las proteínas o ligandos asociados. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) actúan

⁵ Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs That Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443.

⁶ Hyman, A. A.; Karsenti, E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell.* **1996**, *84*, 401.

estabilizando los microtúbulos contra el desensamblaje y regulan la dinámica de los microtúbulos a lo largo de las diversas etapas del ciclo celular.⁷

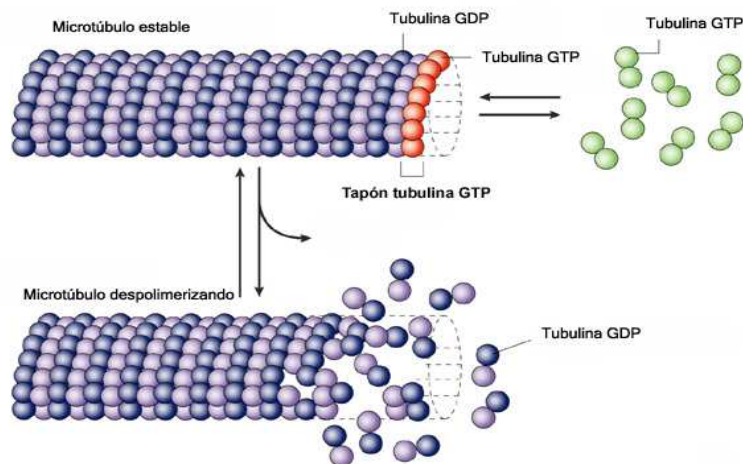


Figura 3. Dinámica de la polimerización de tubulina y modelo del tapón de tubulina-GTP.

Los fármacos que actúan sobre la tubulina (figura 2) se unen al menos en cuatro sitios diferentes, además de los dos sitios donde se unen GTP y GDP: El sitio de la vinblastina y la vincristina, el sitio de la colchicina, el recientemente descrito sitio de laulimalida y pelorusida A⁸, cuyos ligandos inhiben el ensamblaje de los microtúbulos (provocando una despolimerización de la tubulina) y el sitio del taxol[®] que se genera en la cara interior de los microtúbulos al formarse y cuyos ligandos favorecen la polimerización y estabilizan los microtúbulos. El sitio del taxol[®] se encuentra en la β -tubulina en el lumen microtubular, mientras que la vinca tiene un unión específica a la β -tubulina, en una región llamada el dominio vinca y la colchicina se une en la interfaz entre los dímeros de α y β - tubulina.

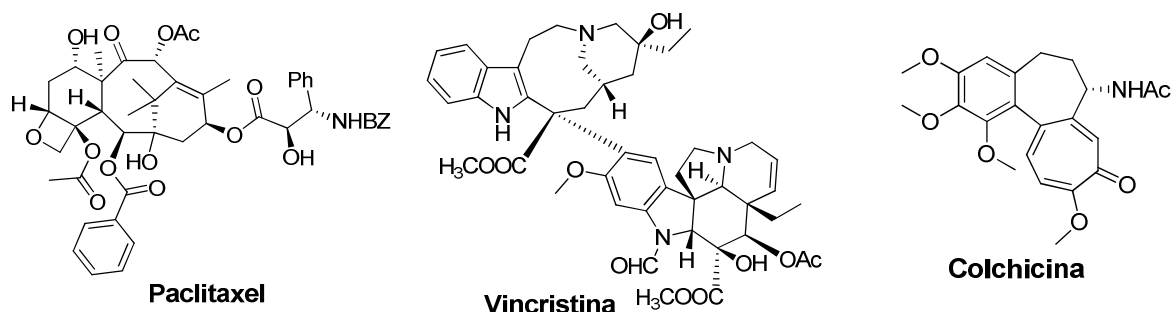


Figura 4. Estructuras de colchicina, vincristina y paclitaxel (taxol[®])

⁷ Heald, R.; Nogales, E. Microtubule dynamics. *J Cell. Sci.* **2002**, *115*, 3.

⁸ Prota, A. E.; Bargsten, K.; Northcote, P. T.; Marsh, M.; Altmann, K. H.; Miller, J. H.; et al. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew. Chem.* **2014**, *53*, 1621.

I. COMPUESTOS QUE SE UNEN AL SITIO DE COLCHICINA

La colchicina se ha aislado de *Colchicum autumnale* L. y es el primer agente desestabilizador de la tubulina. La colchicina se ha utilizado durante muchos años como un fármaco para tratar la gota y la fiebre mediterránea antes de descubrir que se podía tratar varios tipos de cáncer actuando sobre la mitosis. Aunque en el desarrollo clínico falló por su elevada toxicidad, la colchicina ha jugado un papel importante en la determinación de las propiedades de los microtúbulos y las subunidades de tubulina debido a su fuerte unión a la tubulina. Esta unión es seguida por un cambio conformacional que implica una flexión intradímero, en la que los monómeros de tubulina sufren una torsión alrededor de la interfase. Este cambio en la conformación permite la inclusión de complejo colchicina-tubulina en el interior del filamento.

Numerosos ligandos de origen natural o sintéticos se unen a la tubulina en el sitio de unión de la colchicina, algunos de los cuales son las combretastatinas y las fenstatinas, que presentan una actividad muy interesante. La combretastatina A-4 (CA-4) es un producto natural, aislado de un arbusto sudafricano (*Combretum caffrum*)⁹. Las combretastatinas ejercen una actividad citotóxica muy importante frente a muchas líneas celulares de cáncer humano e inhiben la angiogénesis, por lo que se han utilizado para atacar selectivamente la vasculatura del tumor como una alternativa a la quimioterapia convencional.¹⁰ Estos agentes pueden bloquear y eliminar el núcleo del tumor, pero son incapaces de eliminar el borde externo del tumor, a menos que se utilicen en combinación con otros fármacos como paclitaxel.¹¹ CA-4P se considera el profármaco más potente en la polimerización de tubulina y se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos.

⁹ Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Niven, M. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 119.

¹⁰ Ahmed, B.; Van Eijk, L. I.; Steege, B.-T. J. C. A.; Van Der Schaft, D. W. J.; DW, Van Esch, A. M.; Joosten-Achjanie, S. R.; Lambin, P.; Landuyt, W.; Griffioen, A. W. Vascular targeting effect of combretastatin A-4 phosphate dominates the inherent angiogenesis inhibitory activity. *Int. J. Cancer.* **2003**, *105*, 20.

¹¹ Risinger, A. L.; Giles FJ, Mooberry SL. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 255.

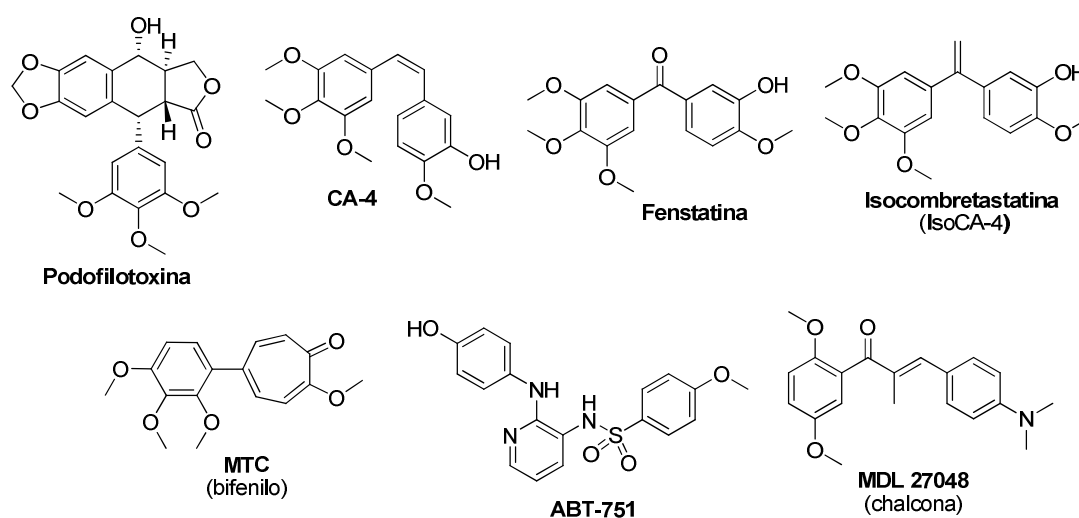


Figura 5. Estructuras de los compuestos que se unen en el sitio de la colchicina.

II. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS DERIVADOS DE COMBRETASTATINA

La combretastatina A-4 tiene dos anillos aromáticos (A y B) y un puente de dos carbonos con un doble enlace de configuración *cis*. Su estructura puede emplearse para resumir de los requerimientos estructurales de los compuestos que se unen al sitio de la colchicina, ya que tiene una eficacia inhibitoria de la polimerización de la tubulina muy elevada. Por isomerización del doble enlace “*in vitro*” e “*in vivo*” de la combretastatina de *cis* a *trans*, isómero más estable termodinámicamente, la combretastatina pierde su eficacia¹². El anillo A de trimetoxifenilo se considera importante para la actividad inhibitoria de la polimerización de la tubulina, su sustitución generalmente conduce a una disminución significativa en la citotoxicidad¹³.

¹² Chaudhary, A.; Pandeya, S. N.; Kumar, P.; Sharma, P. P.; Gupta, S.; Soni, N.; Verma, K. K.; Bhardwaj, G. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1186.

¹³ Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan, S.; McGown, A. T. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3033.

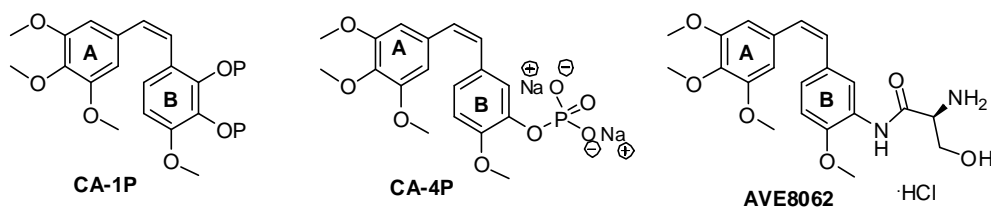


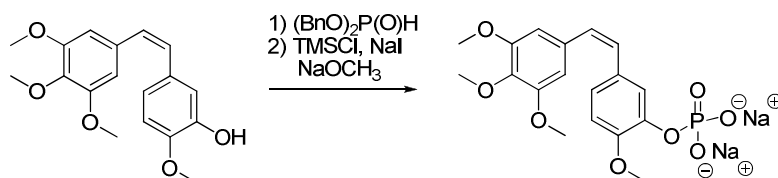
Figura 6: Estructuras de combretastatinas probadas en los ensayos clínicos

Uno de los problemas que presenta la combretastatina A-4 es la baja solubilidad acuosa, por lo cual se han trabajado sobre la manera de mejorar esta solubilidad del compuesto a partir de las modificaciones tanto en los anillos aromáticos como en el puente. CA-4P es una de las combretastatinas modificadas que ha llegado hasta la fase II en los ensayos clínicos en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, cáncer de pulmón, tiroides, anaplásico y ovario¹⁴.

Combretastatina A-1 difosfato también se han utilizado por el tratamiento de tumores sólidos en fase I.

AVE8062 (Ombrabulina) es un análogo de CA-4, que ejerce su actividad contra el cáncer a través de la interrupción de la formación de los vasos sanguíneos en los tumores. En comparación con CA-4, es más soluble en agua y disponible por vía oral. También es eficaz contra un número de células cancerosas que son resistentes a taxanos¹⁵. La combinación de AVE8062 con docetaxel fue bien tolerada y está en la fase I de los ensayos clínicos y un estudio actualmente está en la fase III para el tratamiento de cáncer avanzado¹⁶.

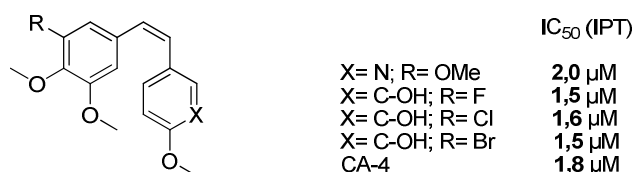
El compuesto CA-4P presenta una alta afinidad por la tubulina en sitio de la unión con la colchicina, ha llegado hasta la fase II en los ensayos clínicos para tratar el cáncer de tiroides anaplásico, usado como agente único o en combinación con otros fármacos como cisplatino o doxorubicina y radiación.



¹⁴ Rustin, GJ.; Shreeves, G.; Nathan, PD.; Gaya, A.; Ganesan, TS.; Wang, D.; Boxall, J.; Poupard, L.; Chaplin, DJ.; Stratford, MRL.; Balkissoon, J.; Zweifel, M. A Phase Ib trial of CA4P (combretastatin A-4 phosphate), carboplatin, and paclitaxel in patients with advanced cancer. *Br. J. Cancer.* **2010**, *102*, 1355.

¹⁵ Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm Res.* **2012**, *29*, 2943.

¹⁶ <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=AVE8062>.



El derivado piridínico de combretastatina A-4 presenta una actividad antitubulina (2 μM) y citotóxica (IC₅₀= 29,2 nM) muy interesante, además presenta una solubilidad en plasma muy alta (3400 μg/ml)¹⁷. La sustitución del grupo metoxilo en posición meta del anillo A de CA-4 por grupos halogenados (F, Cl, Br) mejora la actividad antitubulina del compuesto (IC₅₀= 1,5-1,6 μM) y presentan una potencia inhibidora similar a la de CA-4 (IC₅₀= 1,8 μM). Además, al tratar células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVECs) con halocombretastatinas se observó la pérdida de los microtubulos celulares y la interrupción de la división celular despues de 30 min del tratamiento con una concentración de 1μM.¹⁸

Al cambiar el anillo B por derivados del indol¹⁹ o anillo con piridina²⁰ conlleva a una importante mejora de la actividad.

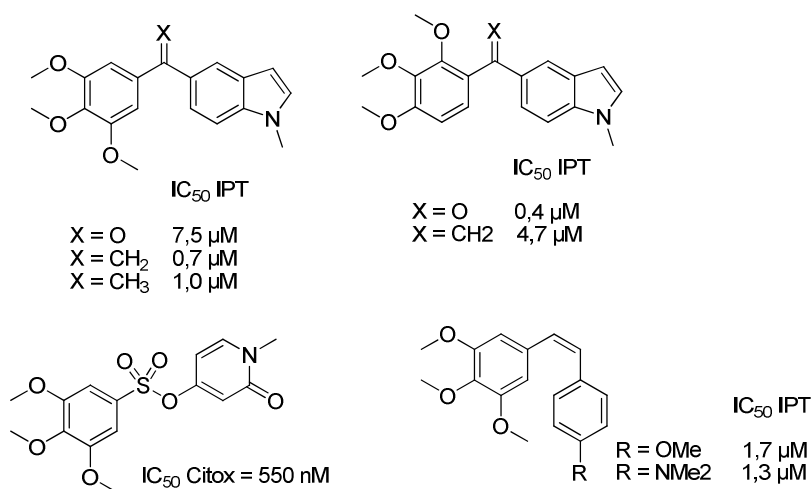


Figura 7: Estructura y actividad de compuestos con piridina ó indol en anillo B

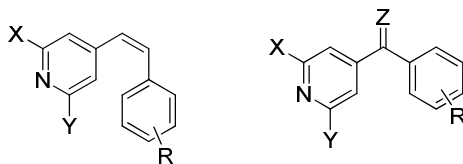
¹⁷ Hatanaka, T.; Fujita, K.; Ohsumi, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. Novel b-ring modified combretastatin analogues : Syntheses and antineoplastic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3371.

¹⁸ Pettit, G. R.; Minardi, M. D.; Rosenberg, H. J.; Hamel, E.; Bibby, M. C.; Martin, S. W.; Jung, M. K.; Pettit, R. K.; Cuthbertson, T. J.; Chapuis, J.-C. Antineoplastic agents. 509. Synthesis of fluorcombretastatin phosphate and related 3-halostilbenes. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1450.

¹⁹ Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Pelàez, R.; Medarde, M. Exploring the effect of 2,3,4-trimethoxy-phenyl moiety as a component of indolephenstatins. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 588.

²⁰ Gwaltney, S. L.; Imade, H. M.; Barr, K. J.; Li, Q.; Gehrke, L.; Credo, R. B.; Warner, R. B.; Lee, J. Y.; Kovar, P.; Wang, J.; Nukkala, M. A.; Zielinski, N. A.; Frost, D.; Ng, S. -C.; Sham, H. L. Novel Sulfonate Analogues of Combretastatin A-4: Potent Antimitotic Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 871.

Recientemente se han sintetizado compuestos sustituyendo el anillo A de 3,4,5-trimetoxifenilo por piridina sustituida con grupos metoxilos y metilsulfanilos que mantienen actividad inhibidora de la polimerización de tubulina y mejoran la solubilidad acuosa de los compuestos²¹.



Las fenstatinas²² son nuevos derivados modificados en el puente con estructura de benzofenona, que mantienen una potencia elevada y mejoran la solubilidad acuosa. En las fenstatinas, la estructura de benzofenona hace que los anillos se dispongan de forma no coplanar, igual que en las combretastatinas. Sin embargo, el carbonilo de las fenstatinas no es esencial para el comportamiento antimitótico, puesto que los análogos 1,1-diarileténicos, llamados isocombretastatinas, muestran una potente inhibición de la tubulina y citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer, similares a las de las combretastatinas correspondientes.²³

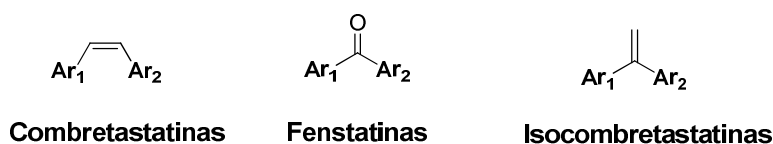


Figura 8: Estructuras modelos de combretastatina, fenstatina e isocombretastatina

A continuación se realiza una exposición de distintas metodologías utilizadas en la preparación de combretastatinas, fenstatinas e isocombretastatinas.

²¹ Aramburu, L. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. **2014**.

²² Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K. Antineoplastic Agents. 379. Synthesis of Phenstatin Phosphate. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1688.

²³ Álvarez, R.; Álvarez, C.; Mollinedo, F.; Sierra, B. G.; Medarde, M.; Pelàez, R. Isocombretastatins A: 1,1-diarylethenes as potent inhibitors of tubulin polymerization and cytotoxic compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6422.

III. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE COMBRETASTATINAS

Existen varios métodos de síntesis de combretastatinas, que se describen a continuación aplicados a la síntesis de combretastatina A-4.

1. Por reacción de Wittig:

Esta es la vía más utilizada en bibliografía. La reacción de Wittig se puede efectuar por condensación de un bromuro de trifenilfosfonio con un aldehído, obteniéndose una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción variable.

La sal de fosfonio **5** se prepara a partir de protección del grupo hidroxilo del aldehído **1** con TBSCl para evitar las reacciones indeseadas, luego se reduce el grupo aldehído al alcohol **3** con NaBH₄, después de la formación de derivado halogenado **4**, éste se trata con trifenilfosfina para obtener la sal correspondiente.

La aplicación de la síntesis de Wittig a CA-4 podría realizarse por dos vías dependiendo de la elección del aldehído y de la sal de fosfonio utilizados como material de partida. La diferencia principal es la proporción de isómeros *Z/E* obtenidos: 1:1,5 para la sal de fosfonio **5** y el aldehído **6** y 1:4 para el aldehído **1**.

Las principales desventajas de este método son su pobre selectividad, su bajo rendimiento y que la separación del isómero por cromatografía a veces resulta difícil.²⁴ Sin embargo, la fácil preparación de los materiales de partida hace que sea una de las rutas sintéticas más utilizadas.

²⁴ Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Schmidt, J. M.; Hogan, F. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5 and A-6. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1666.

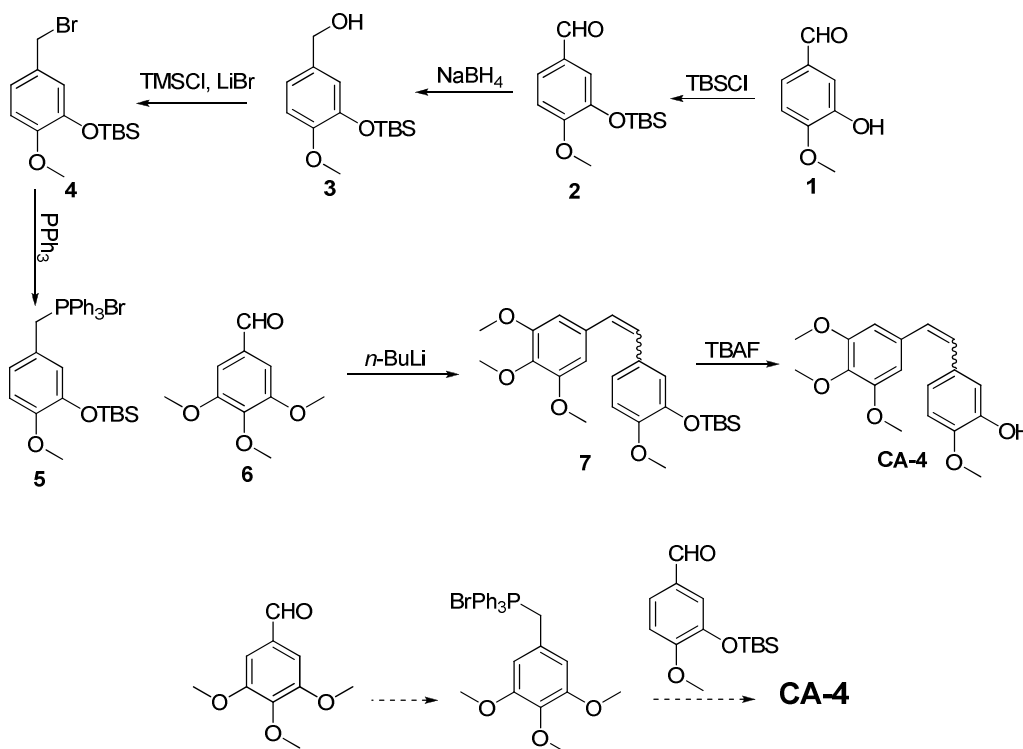


Figura 9: Síntesis de Wittig de la CA-4.

Los estilbenos se pueden formar mediante las reacciones tipo Wittig de un alcohol bencílico con una sal de fosfonio utilizando nano-partículas de Níquel (NiNPs) como catalizador, así se obtienen las olefinas con buenos rendimientos y con poco tiempo de reacción²⁵. Las NiNPs se preparan por tratamiento de NiCl₂ con litio en presencia de DTBB (4,4'-di-*terc*-butilbifenil) como catalizador en THF. El Ni(0) en forma de nanopartículas (NiNPs) se considera como el primer metal usado en la síntesis Wittig a partir de los alcoholes (en lugar de aldehídos) en la que no hay etapa redox estándar.

En primer lugar se probó la reacción de alcoholes bencílicos con el derivado fosforano sin catalizador de NiNPs pero no se observó la evolución de la reacción, lo mismo que cuando se puso la NiNP pocos equivalentes del catalizador. La reacción obtuvo un buen rendimiento cuando se puso en proporción 1:1. Se obtienen mezclas *Z/E* en los cuales predomina el isómero *E*.

²⁵ Alonso, F.; Riente, P.; Yus, M. Wittig-Type Olefination of Alcohols Promoted by Nickel Nanoparticles: Synthesis of Polymethoxylated and Polyhydroxylated Stilbenes. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6034.

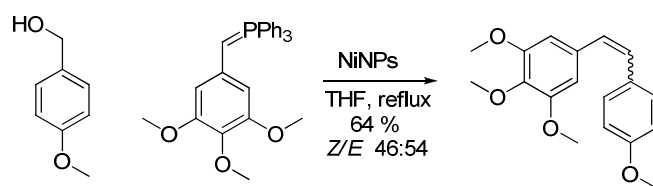


Figura 10: Preparación de estilbenos con NiNPs

2. Reacciones catalizadas por organometálicos

2.1 Acoplamiento de Suzuki:

La combretastatina A-4 se prepara a partir de acoplamiento cruzado de Suzuki de derivados de bromoeteno y ácidos borónicos, utilizando tetrakis(trifenilfosfina)Pd(0) como catalizador, solución acuosa de Na₂CO₃ como base y 1,2-dimetoxietano como disolvente. Esta reacción es estereoselectiva y se obtiene el isómero Z al 70 %.²⁶

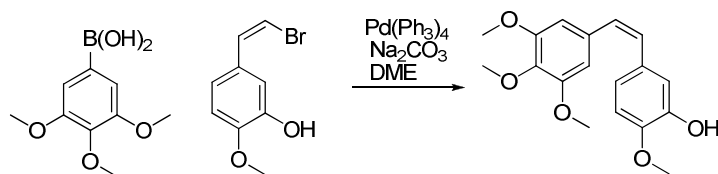


Figura 11: Síntesis de CA-4 por acoplamiento de Suzuki

El bromuro de vinilo se prepara mediante la reacción de Corey-Fuchs²⁷ seguida de una reducción catalizada con paladio. La utilización del hidroxialdehído da bajos rendimientos mientras que si se utiliza protegido en forma de OTMS, éste aumenta considerablemente.

²⁶ Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Hepworth, L. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. Novel Syntheses of Cis and Trans Isomers of Combretastatin A-4. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8135.

²⁷ Gibtner, T.; Hampel, F.; Gisselbrecht, J.-P.; Hirsch, A. End-Cap Stabilized Oligoynes: Model Compounds for the Linear sp Carbon Allotrope Carbyne. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 408.

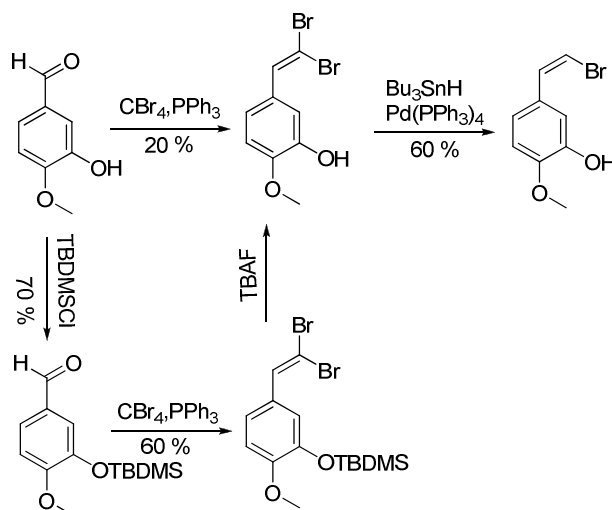


Figura 12: Síntesis del derivado bromuro de vinilo

2.2 Acoplamiento de Kumada-Corriu:

Camacho-Davila²⁸ ha sintetizado la combretastatina CA-4 a partir del acoplamiento de Kumada-Corriu de un magnesiano y el derivado halogenado obtenido en las condiciones de reacción de reducción de Corey-Fuchs, utilizando acetilacetonato férrico ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) como catalizador. Se obtiene el producto con 40 % de rendimiento.

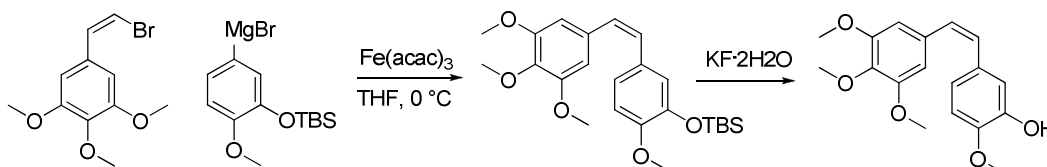


Figura 13: Síntesis de CA-4 con la reacción de acoplamiento de Kumada-Corriu

3. Reacción de Ramberg-Backlund

En el esquema siguiente se explica los pasos de la síntesis de combretastatina A-4 utilizando la reacción de Ramberg-Backlund.²⁹

²⁸ Camacho-Davila, A. A. Kumada–Corriu Cross Coupling Route to the Anti-Cancer Agent Combretastatin A-4. *Synth. Commun.* **2008**, 2823.

²⁹ Robinson, J. E.; Taylor, R. J. K.. A Ramberg–Bäcklund route to the stilbenoid anti-cancer agents combretastatin A-4 and DMU-212. *Chem. Commun.* **2007**, 1617.

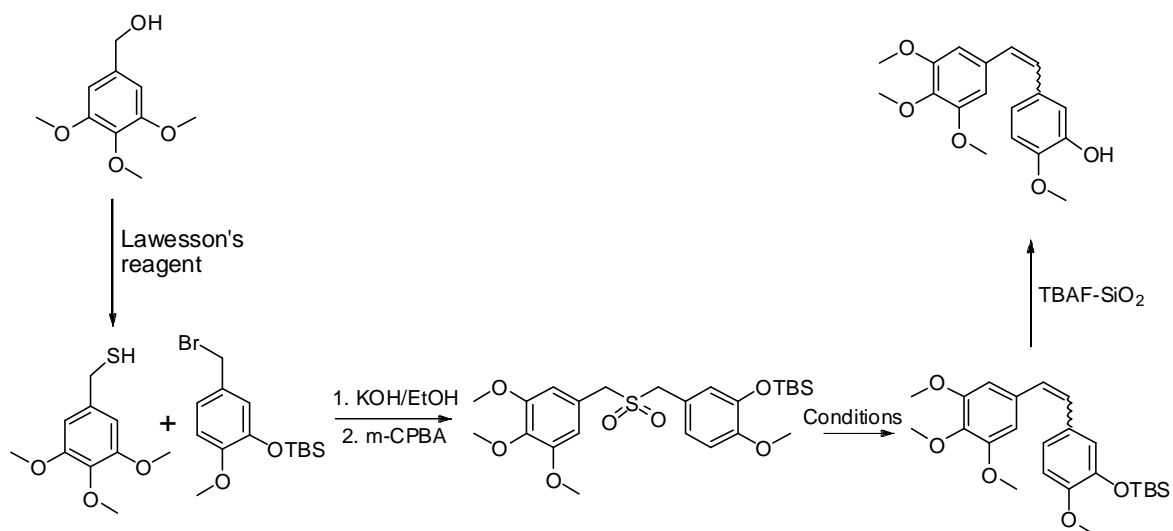


Figura 14: Síntesis de análogos de CA-4 mediante las condiciones de Ramberg-Backlund

La síntesis de CA-4 comienza por acoplamiento de derivado halogenado y el tiol obtenido por el tratamiento de alcohol 3,4,5-trimetoxibencílico con reactivo de Lawesson's, utilizando como base hidróxido potásico y se obtiene el sulfuro que se oxida con el ácido *meta*-cloroperbenzoico para dar la sulfona correspondiente. El derivado sulfonado se ha transformado en el estilbeno en distintas condiciones variando las proporciones de los estereoisómeros formados. Bajo las condiciones de Chan et al³⁰ (CF₂Br₂, KOH-Al₂O₃, t-BuOH, 0°C, 12 h) se obtiene combretastatina A-4 con un rendimiento de 81 % (Z/E = 1:9), en las condiciones de Franck³¹ (C₂F₄Br₂, t-BuOH, KOH-Al₂O₃, Δ, 12 h) se obtiene en 72 % (Z/E 15:85), mientras el rendimiento se disminuye al 69 % (Z/E 53:47) en las condiciones de Meyers et al³² (CCl₄, t-BuOH, KOH, H₂O).

De los tres casos anteriores; se observó que al tratar el compuesto bajo las condiciones de Franck se mejoró el rendimiento, pero en las condiciones de Meyers se obtuvo la mejor estereo-selectividad con el isómero *cis* mayoritario.

³⁰ Chan, T. -L.; Fong, S.; Li, Y.; Man, T. -O.; Poon, C. -D. A New One-flask Ramberg-Backlund Reaction. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1771.

³¹ Yang, G.; Franck, R. W.; Byun, H. -S.; Bittman, R.; Samadder, P.; Arthur, G. Convergent C-Glycolipid Synthesis via the Ramberg-Backlund Reaction: Active Antiproliferative Glycolipids. *Org. Lett.* **1999**, 1, 2149.

³² Meyers, C. Y.; Malte, A. M.; Matthews, W. S. Ionic Reactions of Carbon Tetrachloride. Survey of Reactions with Ketones, Alcohols, and Sulfones. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 7510.

4. Reacciones en microondas:

Se prepara los derivados de combretastatina A-4 mediante las irradiaciones en microondas del bromuro de trietilbenzilfosonio y aldehído y en presencia de carbonato potásico. Se obtienen con excelente rendimiento pero con el isómero *trans* mayoritario³³. Esta reacción se desarrolla en dos partes; se prepara el bromuro de trietilbenzilfosonio a partir de la reacción del alcoholbencílico con la sal de bromuro de trietilfosonio a 100 °C sin disolvente, luego se enfría a temperatura ambiente y se le añade el carbonato potásico a un matraz sellado y el aldehído bencílico correspondiente, después se pone a microondas a 75 °C durante 30 min.

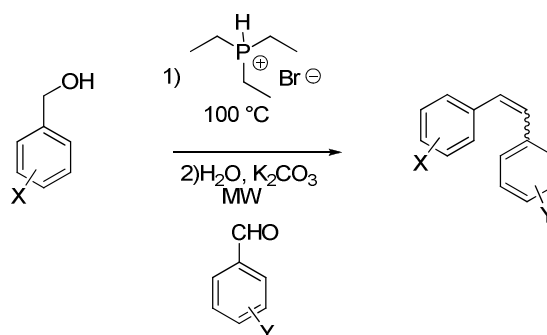


Figura 15: Preparación de estilbenos con radiaciones en microondas

Se preparan los estilbenos también a partir de la escisión oxidativa y la reacción de Horner-Emmons, ambas reacciones se realizan en microondas, utilizando Al₂O₃ como soporte.

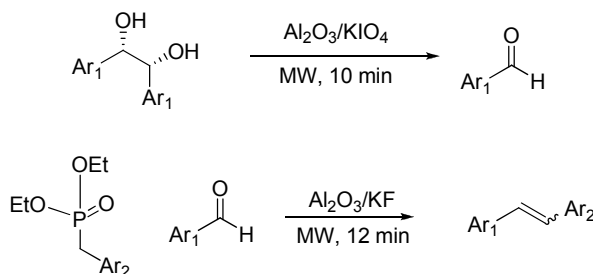


Figura 16: Formación de estilbenos por microondas

³³ McNulty, J.; Das, P.; McLeod, D. Microwave-Assisted, aqueous Wittig reactions: organic-solvent- and Protecting-group-free chemoselective synthesis of functionalized alkenes. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6756.

En primer lugar se prepara el aldehído a partir de la ruptura oxidativa de 1,2-dioles simétricos, la reacción se efectúa en columna y el aldehído se hace pasar a otra columna en la que reacciona con el derivado fosfato mediante las irradiaciones en microondas y se obtienen *trans* estilbenos con buen rendimiento. En esta reacción que se utilizan dioles simétricos para evitar la formación de productos indeseados, necesita corto tiempo y transcurre con un rendimiento de 60-75%.³⁴

5. Condensación de Perkin

Las combretastatinas se sintetizan también por condensación de Perkin entre un aldehído aromático y un ácido carboxílico en presencia de anhídrido acético y trietilamina, obteniéndose el derivado del ácido acrílico en buen rendimiento y con excelente estereoselectividad (*Z/E* 19:1). La reacción genera una función ácido carboxílico en el puente que se puede eliminar por descarboxilación con quinolina y cobre a 220 °C.³⁵

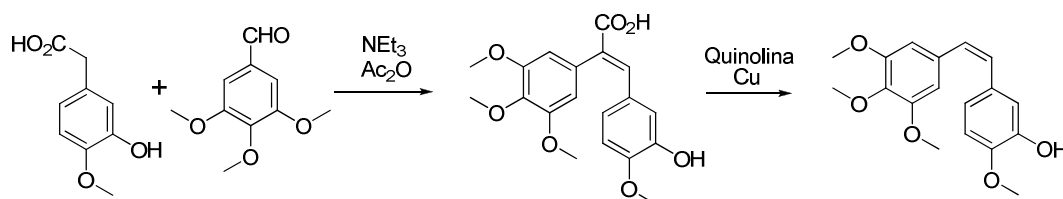


Figura 17: Síntesis de Perkin de CA-4.

A partir de esta reacción de condensación de Perkin se han preparado combretastatinas con función nitrilo en el puente, haciendo reaccionar el aldehído aromático con 3,4,5-trimetoxifenilacetónitrilo, se obtiene con buen rendimiento, además la presencia del grupo nitrilo en la olefina del puente mejora la unión con la tubulina³⁶.

³⁴ Dakdouki, S. C.; Villemin, D.; Bar, N. An Original On-Column Oxidative Cleavage of Vicinal Diols Using Alumina/Potassium Periodate: Application to Sequential Oxidation/Horner–Emmons Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4448.

³⁵ Zou, Y.; Xiao, C. –F.; Zhong, R. –Q.; Wei, W.; Huang, W. –M.; He, S. –J. Synthesis of combretastatin A-4 and erianin. *J. Chem. Res.* **2008**, 354.

³⁶ Jalily, P. H.; Hadfield, J. A.; Hirst, N.; Rossington, S. B. Novel cyanocombretastatins as potent tubulin polymerisation inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 6731.

6. A partir de la fenstatina: Reordenamiento de Colvin

Una síntesis alternativa de combretastatina es a partir de fenstatina, a través de un intermedio de diarilalquilo.³⁷

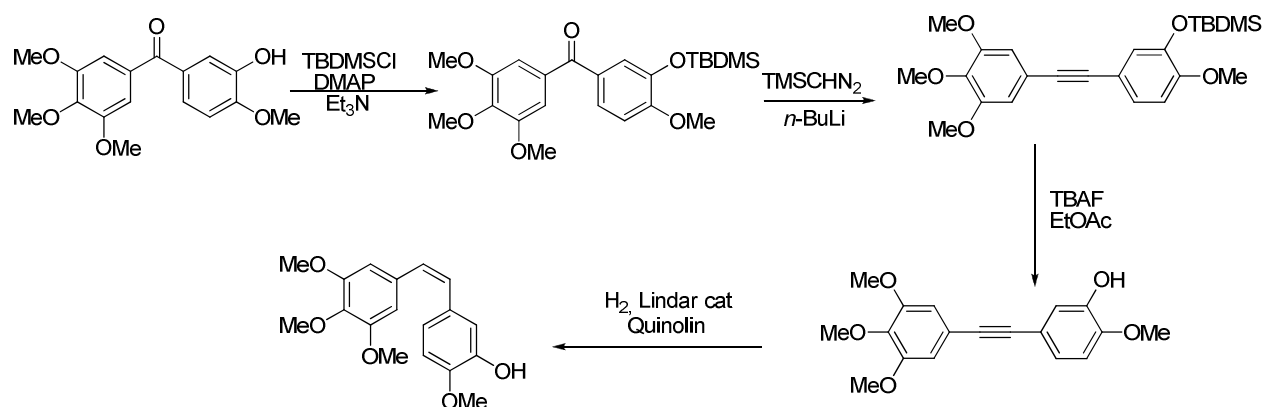


Figura 18: Síntesis de CA-4 a partir de fenstatina

7. A partir de alquinos

Alami et al³⁸ han publicado un nuevo procedimiento para la obtención de los análogos de CA-4 por hidrosilación-protodesilación.

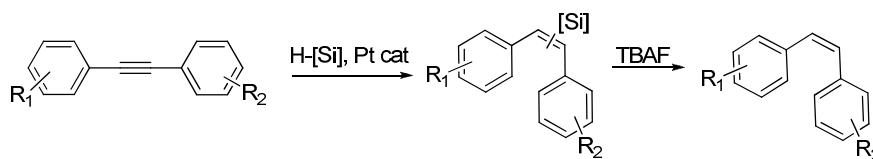


Figura 19: Síntesis de análogos de CA-4 mediante el proceso hidrosilación-protodesilación

³⁷ Pitrov, O. I.; Gerova, M. S.; Chaniv, C. D.; Petrova, K. V. New Efficient Synthesis of Combretastatin A-4 via Colvin Rearrangement. *Synthesis*. **2011**, 3711.

³⁸ Giraud, A.; Provot, O.; Hamzé, A.; Brion, J. -D.; Alami, M. One-pot hydrosilylation-protodesilylation of functionalized diarylalkynes: a highly selective access to Z-stilbenes. Application to the synthesis of combretastatin A-4. *Tetrahedron. Lett.* **2008**, 49 1107.

Este método permite la obtención de (*Z*)-combretastatina mediante una reacción estereoselectiva a partir de la hidrosililación de diarilalquino utilizando óxido de platino como catalizador, seguido de la desililación con fluoruro de tetrabutilamonio. Se obtienen (*Z*)-estilbenos con un buen rendimiento.

8. Isomerización del doble enlace:

Si se desea, se pueden preparar los isómeros *E* a partir de los derivados de bromoetnilo *E* o por tratamiento de *cis*-combretastatinas con yodo.

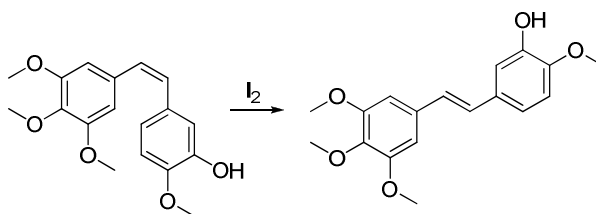


Figura 20: Isomerización CA-4 de *cis* a *trans*

IV. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE FENSTATINAS

1. A partir de combretastatinas:

La fenstatina se preparó por primera vez por Pettit et al¹⁹, durante una investigación dirigida al estudio de la REA de combretastatinas, como un producto inesperado de la oxidación de un silil derivado de combretastatina A-4 con el complejo de Jacobsen.

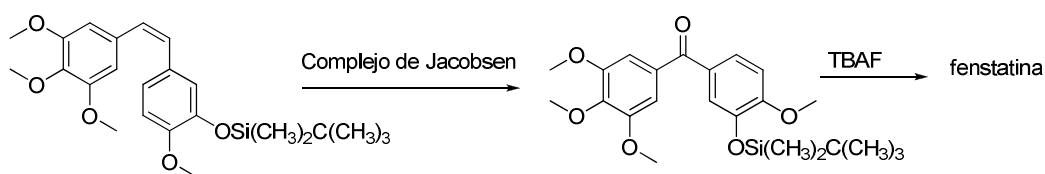


Figura 20: Síntesis de fenstatina a partir de CA-4 protegida

2. Reacciones catalizadas por organometálicos:

2.1 Acoplamiento de Suzuki:

Se pueden preparar derivados de fenstatinas vía carbonilación de Suzuki. Recientemente se ha descrito la preparación de diarilcetonas utilizando nanopartículas de paladio con ácido arilborónico, CO (1 atm), PEG-400 (polietilenglicol con un peso molecular de 400 Da), una base y a temperatura ambiente, con rendimientos de hasta el 96 %.^{39, 40}

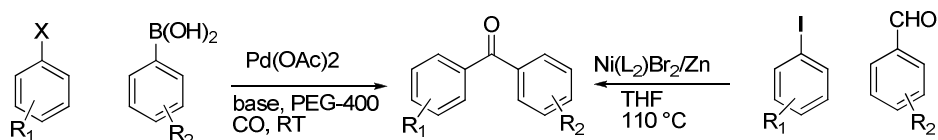


Figura 21: Síntesis de fenstatina a partir de acoplamiento de Suzuki

Otra reacción de acoplamiento entre un aldehído aromático y yoduros de arilo que permite la formación de diarilcetonas es la catalización con Ni(dppe)Br₂ en presencia de Zn como ácido de Lewis y se obtienen buenos rendimientos⁴¹. En esta reacción la elección del disolvente es importante, porque con disolventes menos polares no se observa evolución de esta reacción.

2.2 Catálisis con cobre:

Recientemente se han descrito otra síntesis de diarilcetonas a partir de epóxidos utilizando metales de transición como catalizadores, en concreto Cu(OAc)₂, anilina, atmosfera de O₂ y DMSO como disolvente.

³⁹ Wu, X-F.; Neumann, H.; Matthias Beller. Synthesis of Heterocycles via Palladium-Catalyzed Carbonylations. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1.

⁴⁰ Qing, Z.; Shaohua, W.; Wei, H.; In Situ Generation of Palladium Nanoparticles: Ligand-Free Palladium Catalyzed Pivalic Acid Assisted Carbonylative Suzuki Reactions at Ambient Conditions. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1454.

⁴¹ Huang, Y. -C.; Majumdar, K. K.; Cheng, C. -H. Nickel-Catalyzed Coupling of Aryl Iodides with Aromatic Aldehydes: Chemoselective Synthesis of Ketones. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1682.

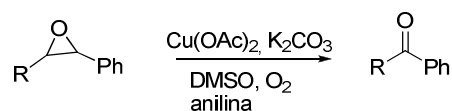


Figura 22: Síntesis de fenstatina a partir de catálisis con cobre

2.3 Carbonilación acelerada por irradiación con microondas:

Para mejorar la reacción de carbonilación, reducir el tiempo de reacción y evitar los problemas de los disolventes, se preparan benzofenonas usando las irradiaciones en el aparato de microondas con complejo de carbonilcobalto. En esta reacción el yoduro de arilo, $\text{Co}(\text{CO})_8$ y acetonitrilo en microondas forma la benzofenona correspondiente⁴².

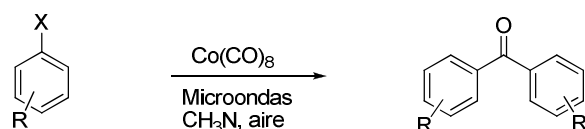


Figura 23: Irradiación en microondas

3. Reacciones de Friedel-Crafts:

Las benzofenonas se pueden preparar mediante la reacción de Friedel-Crafts vía acilación o alquilación y posterior oxidación.

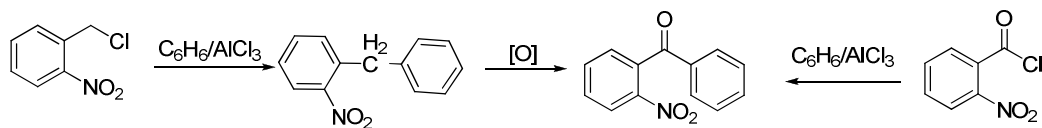


Figura 24: Síntesis de fenstatina a partir de acilación o alquilación de Friedel-Crafts

⁴² Enquist, P-A.; Nilsson, P.; Larhed, M. Ultrafast Chemistry: Cobalt Carbonyl-Mediated Synthesis of Diaryl Ketones under Microwave Irradiation. *Org. Lett.* **2003**, 25, 4875.

4. A partir de productos naturales:

La síntesis de los derivados de la fenstatina se ha realizado a partir de alilpolialcoxibencenos aislados de las plantas, *Petroselinum sativum Hoffm.* cultivada en Rusia y *Anethum graveolens L.* de India. Este compuesto fue utilizado en la síntesis de los análogos de la combretastatina con una actividad muy significativa frente a la polimerización de la tubulina⁴³.

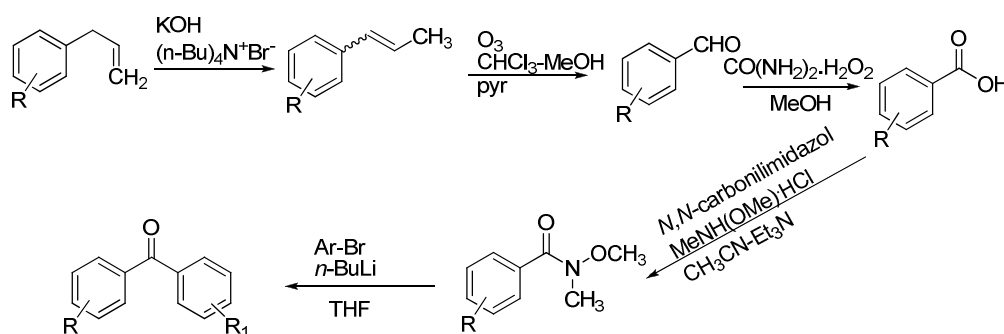


Figura 25: Preparación de la fenstatina a partir de alilpolialcoxibenceno

El aldehído se obtiene por ozonólisis del estireno obtenido de la reacción de isomerización en condiciones de transferencia de fase del alilpolialcoxibenceno. El tratamiento de aldehído con un complejo de urea produce el ácido que reacciona con agente activante para formar la amida de Weinreb, que se condensa con el derivado de litio para formar la fenstatina.

5. A partir de una adición nucleofílica:

Las fenstatinas se sintetizan también a partir de una condensación entre el derivado organometálico y un aldehído o ácido aromático⁴⁴. Este método es el más utilizado por nuestro grupo de trabajo.

⁴³ Titov, I. Y.; Sagamanova, I. K.; Gritsenko, R. T.; Karmanova, I. B.; Atamanenko, O. P.; Semenova, M. N.; Semenov, V. V. Application of plant allylpolyalkoxybenzenes in synthesis of antimetabolic phenstatin analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1578.

⁴⁴ a) Liou, J. -P.; Chang, J. -Y.; Chang, C. -W.; Chang, C. -Y.; Mahindroo, N.; Kuo, F. -M.; Hsieh, H. -P. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 3-Aminobenzophenones as Antimetabolic Agents. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2897. b) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete P.; Pérez-Melero C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis

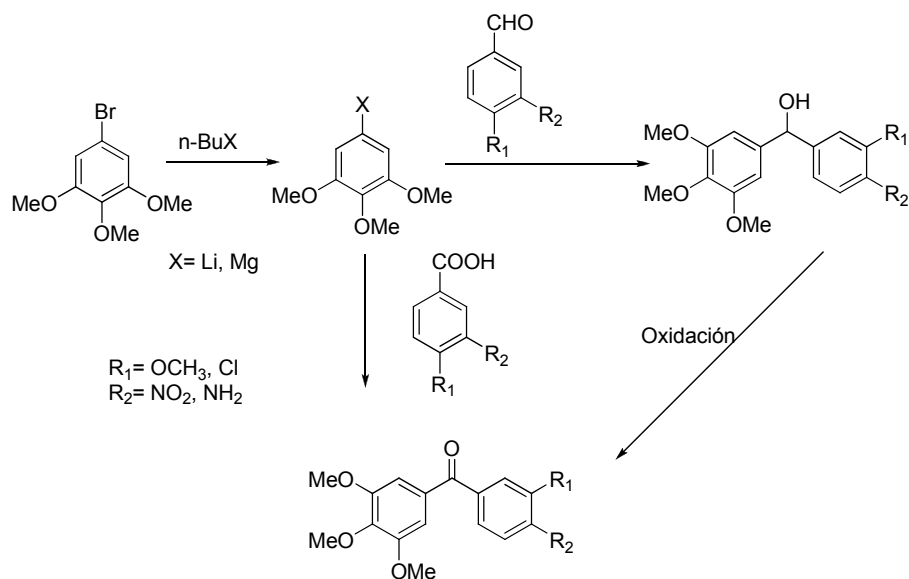


Figura 26: Ruta sintética de fenstatina

V. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE ISOCOMBRETASTATINAS

Las isocombretastatinas son los 1,1-diariletenos isómeros de las combretastatinas (1,2-diariletenos), que tienen un efecto citotóxico más potente que las fenstatinas. Se pueden sintetizar por varias rutas sintéticas.

1. A partir de la fenstatinas

Las isocombretastatinas se preparan a partir de fenstatinas por reacción de Wittig²³. Este procedimiento es el que se usa en el desarrollo de las isocombretastatinas sintetizadas en esta memoria.

and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: Naphthylphenstatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3417. c) Álvarez, R.; Álvarez, C.; Mollinedo, F.; Sierra, G. Beatriz.; Medarde, M.; Peláez, R. Isocombretastatins A: 1,1-Diarylethenes as potent inhibitors of tubulin polymerization and cytotoxic compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6422.

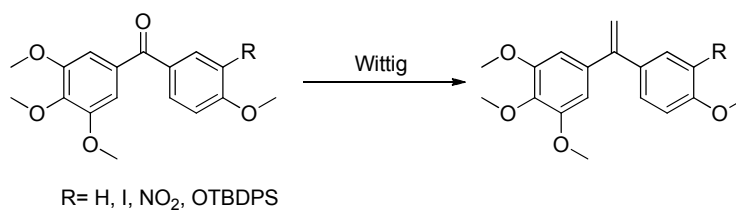


Figura 27: Síntesis de *isoCA-4* por reacción de Wittig

2. Reacciones catalizadas por organometálicos:

2.1 Acoplamiento con paladio

Las isocombretastatinas se preparan por la reacción de acoplamiento de *N*-tosilhidrazonas y yoduros de arilo catalizadas por Pd.⁴⁵ Después de la desprotección del grupo hidroxilo, se obtiene isoCA4 en buen rendimiento.

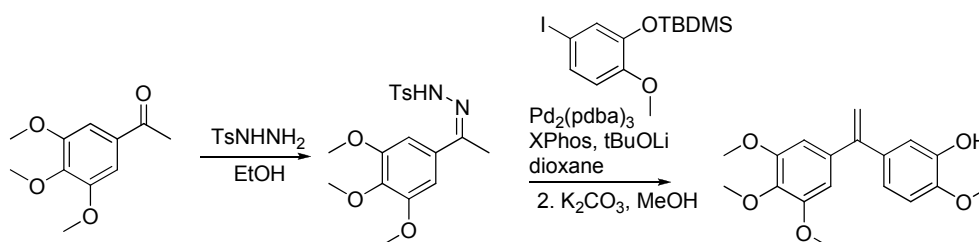


Figura 28: Síntesis de *isoCA-4* por acoplamiento con Pd

Se preparó también la isocombretastatina por reacción de acoplamiento de *N*-tosilhidrazonas con derivados ariltriflato, utilizando Pd(OAc)₂ y PdCl₂(MeCN)₂ como catalizadores, cuya catalítica es similar a Pd₂(dba)₃ y conducen a excelentes rendimientos⁴⁶.

⁴⁵ a) Messaoudi, S.; Treguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J. F.; De Losada, J. R.; Liu, J. M.; Bignon, J.; Bakala, J. W.; Thoret, S.; Dubois, J.; Brion, J. Daniel.; Alami, M. Isocombretastatins A versus Combretastatins A: The Forgotten isoCA-4 Isomer as a Highly Promising Cytotoxic and Antitubulin Agent. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4538. b) Brachet, E.; Hamze, A.; Peyrat, J. -F.; Brion, J. -D.; Alami, M. Pd-Catalyzed Reaction of Sterically Hindered Hydrazones with Aryl Halides: Synthesis of Tetra-Substituted Olefins Related to iso Combretastatin A4. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4042.

⁴⁶ Tréguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Brion, J. -D.; Alami, M. Expedient synthesis of 1,1-diarylethylenes related to isocombretastatin A-4 (isoCA-4) via palladium-catalyzed arylation of *N*-tosylhydrazones with aryl triflates. *Tetrahedron. Lett.* **2009**, *50*, 6549.

2.2 Acoplamiento de Stille

Para el acoplamiento de Stille se prepara el derivado de estaño a partir del alquino correspondiente y posteriormente, en presencia del catalizador de paladio, se hace reaccionar con los haluros de arilo⁴⁷.

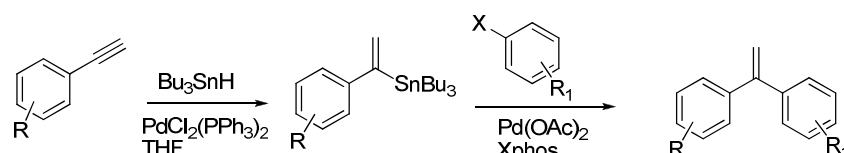


Figura 29: Síntesis de isocombretastatina por acoplamiento de Stille

3. A partir de amida de Weinreb:

En esta síntesis se utiliza como producto de partida el ácido glioxálico susceptible de transformarse en dos etapas en la amida de Weinreb a gran escala⁴⁸.

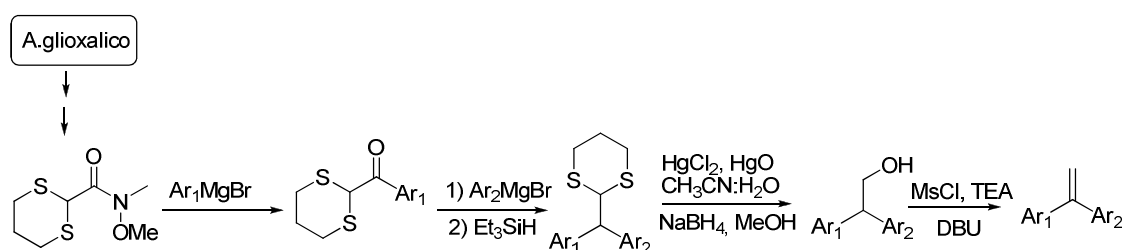


Figura 30: Preparación de isoCA-4 a partir de amida de Weinreb

Los dos anillos aromáticos del compuesto se obtienen después de la adición consecutiva de los dos derivados arilmagnesianos. La desprotección del puente produce un alcohol primario

⁴⁷ Hamze, A.; Veau, D.; Provot, O.; Brion, J. -D.; Alami, M. Palladium-Catalyzed Markovnikov Terminal Arylalkynes Hydrostannation: Application to the Synthesis of 1,1-Diarylethylenes. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1337.

⁴⁸ Balasubramaniam, S.; Kommidi, H.; Aidhen, I. S. Weinreb amide based building blocks for convenient access to 1,1-diarylethylenes and isocombretastatin analogues. *Tetrahedron. Lett.* **2011**, *52*, 2683.

que se elimina como mesilato por tratamiento con DBU, obteniéndose el derivado de la isocombretastatina.

4. A partir de acetofenonas:

Como alternativa de la reacción de acoplamiento con paladio, se ha encontrado otro método de sintetizar derivados de isocombretastatina a partir de la reacción de acetofenona con el derivado magnesiano para formar alcoholes terciarios. La deshidratación de los alcoholes en presencia del ácido *p*-toluensulfónico como catalizador produce la isocombretastatina⁴⁹. Los rendimientos varían dependiendo del grupo R.

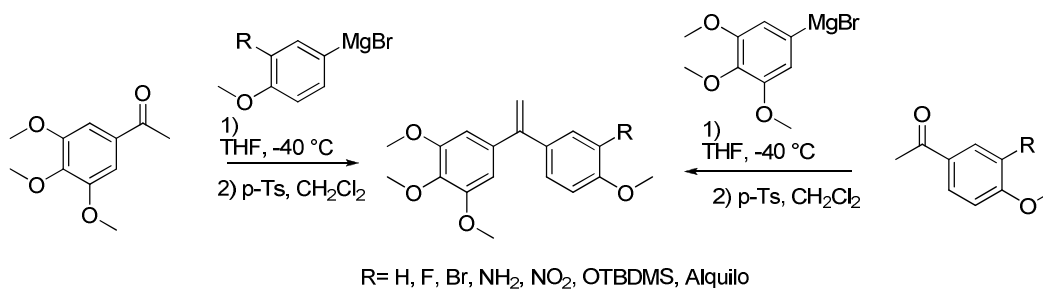


Figura 31: Preparación de isoCA-4 a partir de acetofenonas

⁴⁹ Hamze, A.; Giraud, A.; Messaoudi, S.; Provot O.; Peyrat, J. -F.; Bignon, J.; Liu, J. -M.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; Brion, J. -D.; Alami, M. Synthesis, Biological Evaluation of 1,1-Diarylethylenes as a Novel Class of Antimitotic Agents. *ChemMedChem*. **2009**, *4*, 1912.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

I. PLANTEAMIENTO

El objetivo general de este trabajo es la síntesis y evaluación de nuevos agentes antimitóticos pertenecientes a las familias de combretastatinas, fenstatinas e isocombretastatinas y que contengan agrupaciones nitrogenadas como sustituto de alguno de los grupos hidroxilo ó metoxilo de combretastatina A-4.

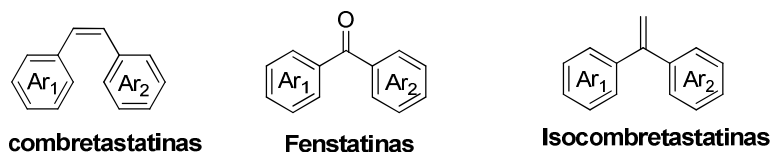


Figura 32. Estructura básica de los compuestos sintetizados

Los estudios de relación estructura-actividad (REA) han mostrado que el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo (anillo A) es importante para la actividad citotóxica, tanto en combretastatinas⁵⁰ como fenstatinas⁴⁰ y, en general, cualquier otra sustitución en el anillo A disminuye la actividad antimitótica del compuesto¹³. En nuestro grupo el anillo B ha sido sustituido con éxito por sistemas heterocíclicos como carbazol o indol, pero las propiedades farmacocinéticas no son muy adecuadas. Con el fin de mejorarlas en la agrupación indólica se han introducido distintos grupos como aldehídos, ácidos o amidas obteniendo resultados prometedores.

Un primer apartado de esta memoria de Tesis doctoral está dirigido a realizar variaciones del anillo B. Estas variaciones incluyen la presencia de un grupo amino situado en posición *para*-del anillo aromático (fenilo o piridilo) que equivale a la posición del átomo de nitrógeno en el indol. Como agrupaciones nitrogenadas se introducirán los grupos dimetilamino y pirrolidina. Teniendo en cuenta la disponibilidad de los materiales de partida y para realizar estudios de REA en ocasiones se preparan compuestos con las agrupaciones nitrogenadas en otras posiciones del anillo.

⁵⁰ Akselsen, Ø. W.; Odlo, K.; Cheng, J. -J.; Maccari, G.; Botta, M.; Hansen, T. V. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of 1,2,3-triazole analogs of combretastatin A-1. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 234.

Con el fin de mejorar sustancialmente la solubilidad de estos compuestos a pH fisiológico se llevará a cabo la preparación de sales de amonio cuaternarias ya que los grupos dimetilamino y pirrolidina se presentan como agrupaciones óptimas a este fin.

Al revisar la bibliografía se ha observado, que a pesar de ser cuantiosos los grupos descritos como sustitutos de los restos metoxilos del anillo A, la presencia de grupos amino en este anillo no está muy explorada. Esto nos sirve para proponer un segundo apartado del trabajo en el cual se sustituye uno de los grupos OMe por NH₂, NHMe, NHAc, NMe₂.

Estos dos apartados u objetivos generales del trabajo se completan con variaciones en el puente que une los dos anillos aromáticos, con la introducción de otras funciones que faciliten la unión a los distintos aminoácidos de la tubulina, con variaciones en los sustituyentes de los anillos A y B ó con la sustitución del anillo B por anillos no aromáticos con el fin de completar en la medida de lo posible estudios de REA.

La ruta de síntesis seleccionada para obtener las fenstatinas (diarilmetanonas), comienza con la adición del compuesto organometálico a un aldehído o un ácido carboxílico. Por su parte, para la síntesis de las combretastatinas se ha optado por la reacción de Wittig entre trifenilbenzilfosforanos y aldehídos adecuadamente sustituidos que aunque origina mezclas de isómeros *Z/E* se pueden separar por métodos cromatográficos. Sobre estos materiales de partida se efectuará la introducción de otras agrupaciones en función de su reactividad química.

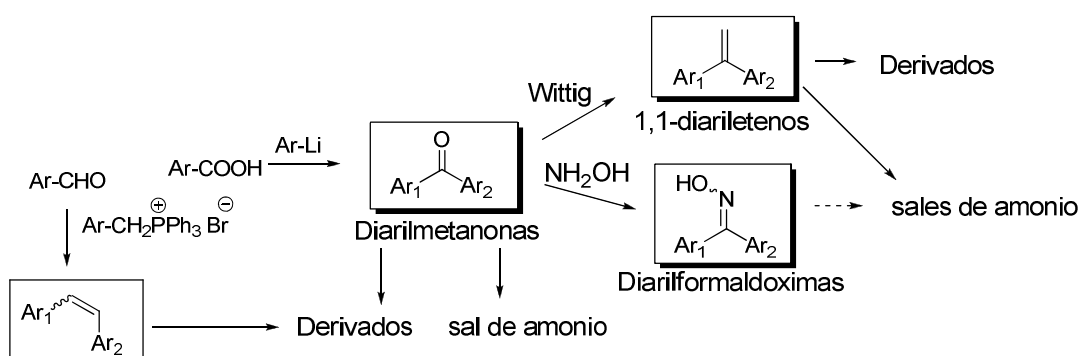


Figura 33: Esquema general de síntesis de los compuestos objetivos

II. OBJETIVOS:

De acuerdo con el planteamiento y siguiendo los antecedentes del grupo de trabajo, los objetivos concretos de esta memoria son los siguientes:

1. Modificaciones del anillo B

El **primer objetivo sintético** del trabajo se resume en la figura siguiente donde se incluyen las variaciones a introducir en el anillo B.

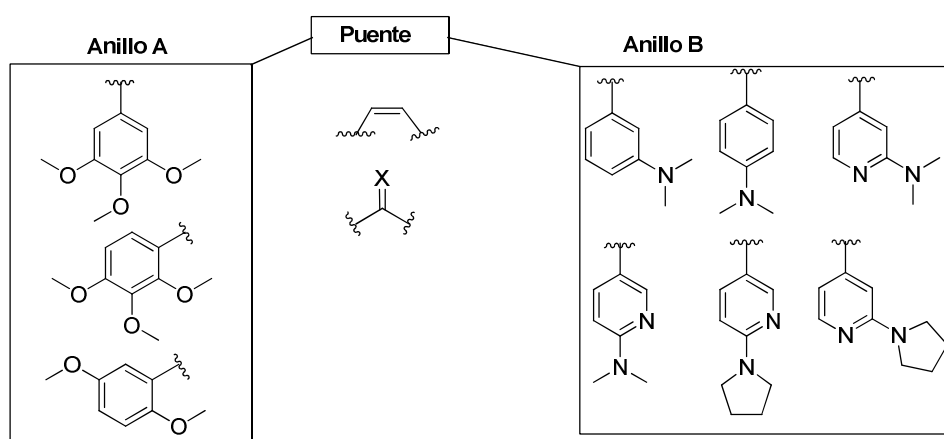


Figura 34: Variaciones en el anillo B

Se combinan los anillos aromáticos A de trimetoxi o dimetoxifenil con anillos bencénicos y piridínicos que se unen con un puente de uno ó dos átomos de carbono. Además se sustituye el anillo aromático B por otros no aromáticos.



El **segundo objetivo** es la introducción de grupos polares en el anillo aromático B, que favorezcan la solubilidad acuosa de los compuestos y que puedan aumentar la interacción con la tubulina por posible formación de un enlace de hidrógeno adicional.

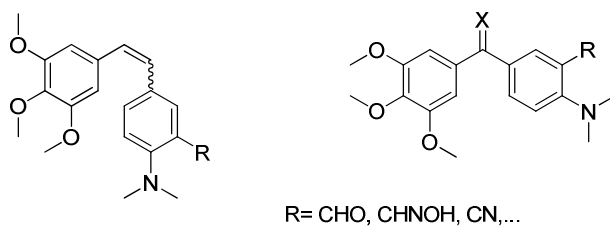


Figura 35: Sustitución en el anillo B

2. Modificaciones del anillo A

Utilizando las agrupaciones del anillo B marcadas en la figura, se modificará el anillo A en la familia de isocombretastatinas y combretastatinas. Se realizarán las siguientes modificaciones:

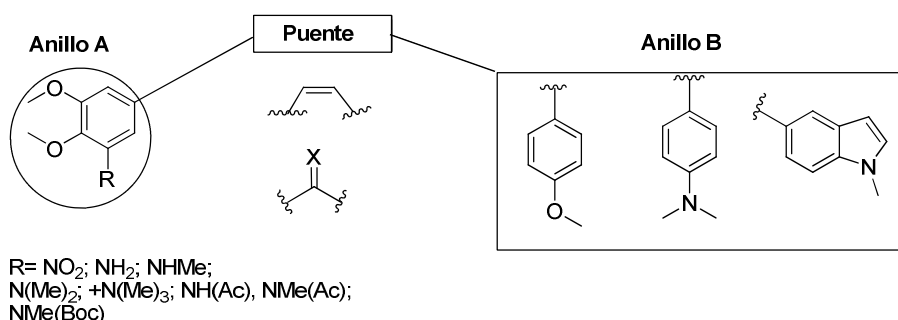


Figura 36: Variaciones introducidas en el anillo A en combinación con las tres agrupaciones elegidas en el anillo B.

El **tercer objetivo** es sustituir el grupo metoxilo de la posición 3 del anillo A con varios grupos polares, y se combina con tres agrupaciones en el anillo aromático B (4-metoxifenilo, 4-dimetilaminofenilo y 1-metilindol), para ver la influencia de cada uno sobre la potencia inhibidora frente a la polimerización de la tubulina.

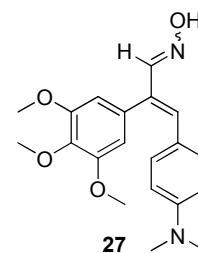
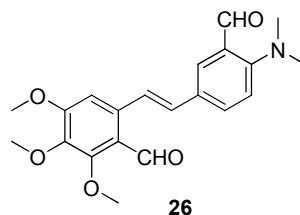
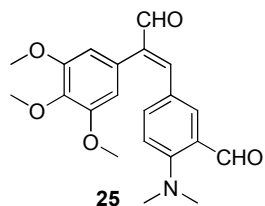
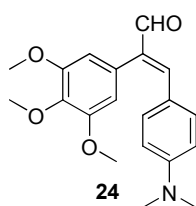
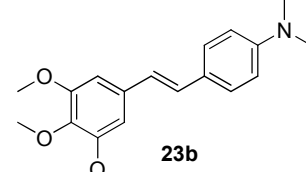
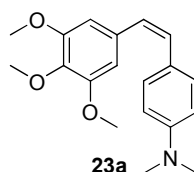
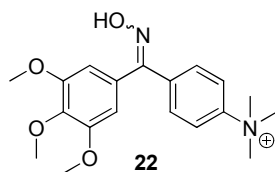
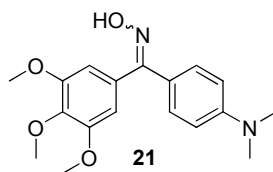
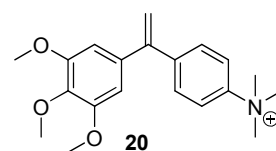
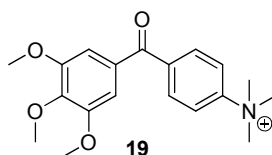
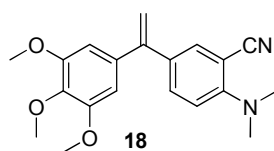
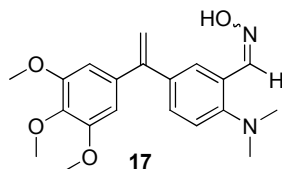
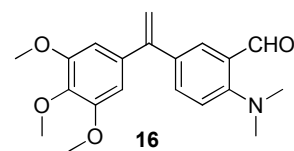
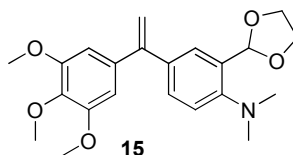
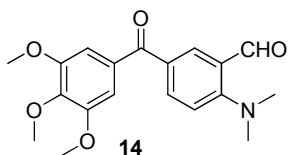
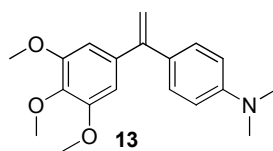
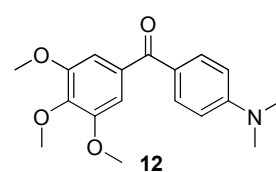
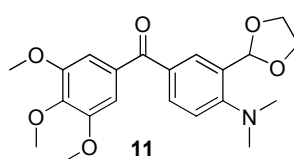
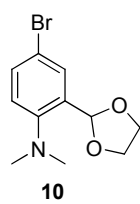
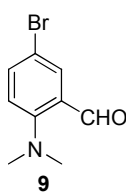
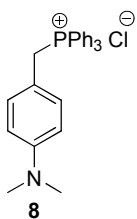
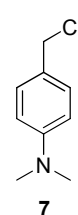
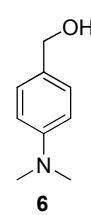
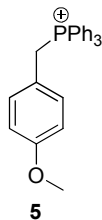
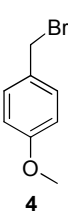
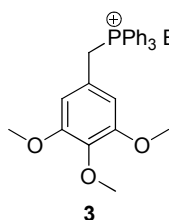
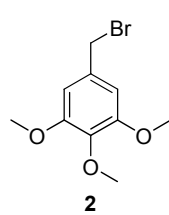
Para aumentar la solubilidad acuosa, se preparan las sales de amonio de los compuestos. La realización de estas sales completaría el **cuarto objetivo**.

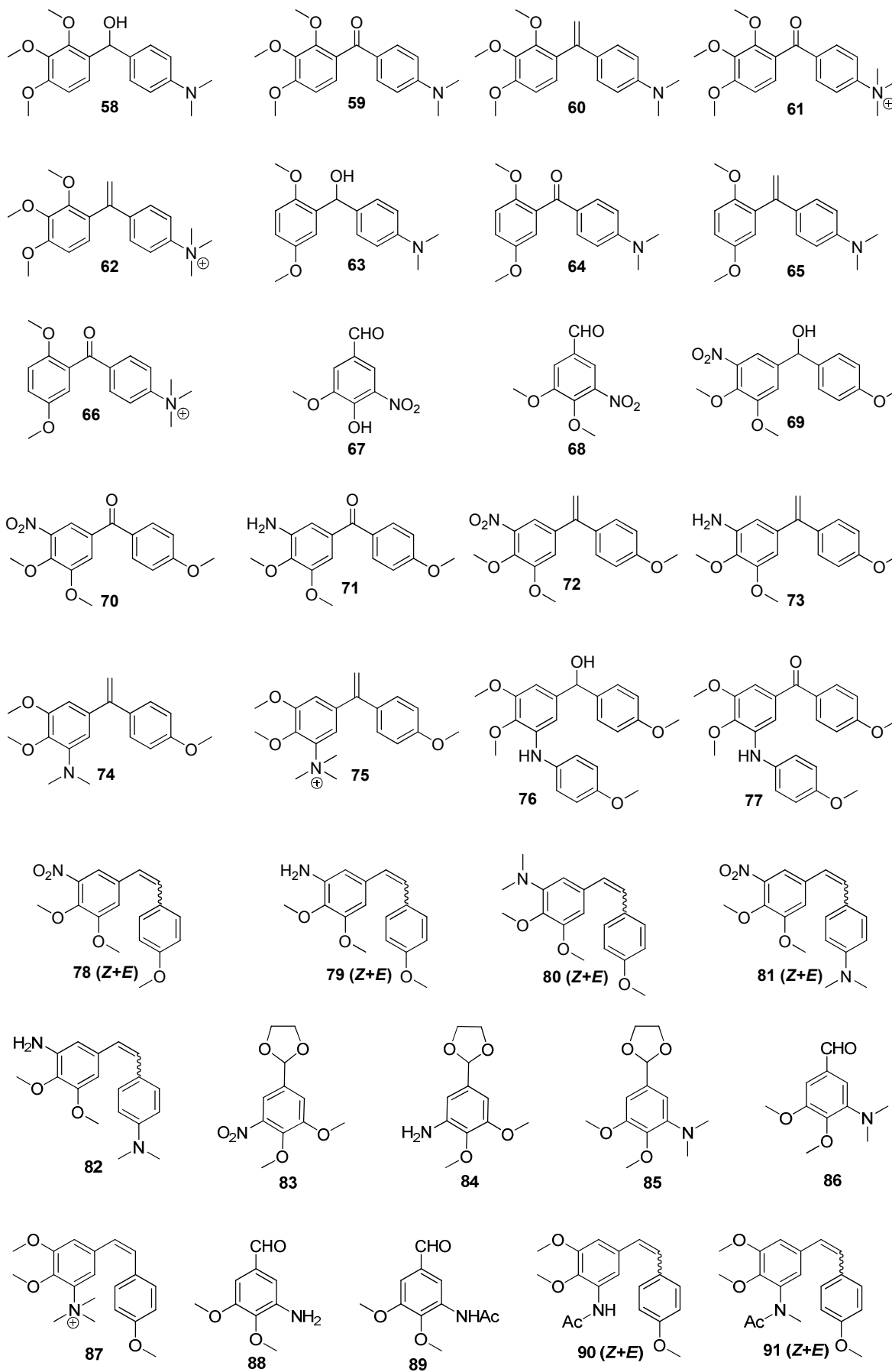
El **quinto objetivo** es la determinación de la solubilidad acuosa de los compuestos finales seleccionados.

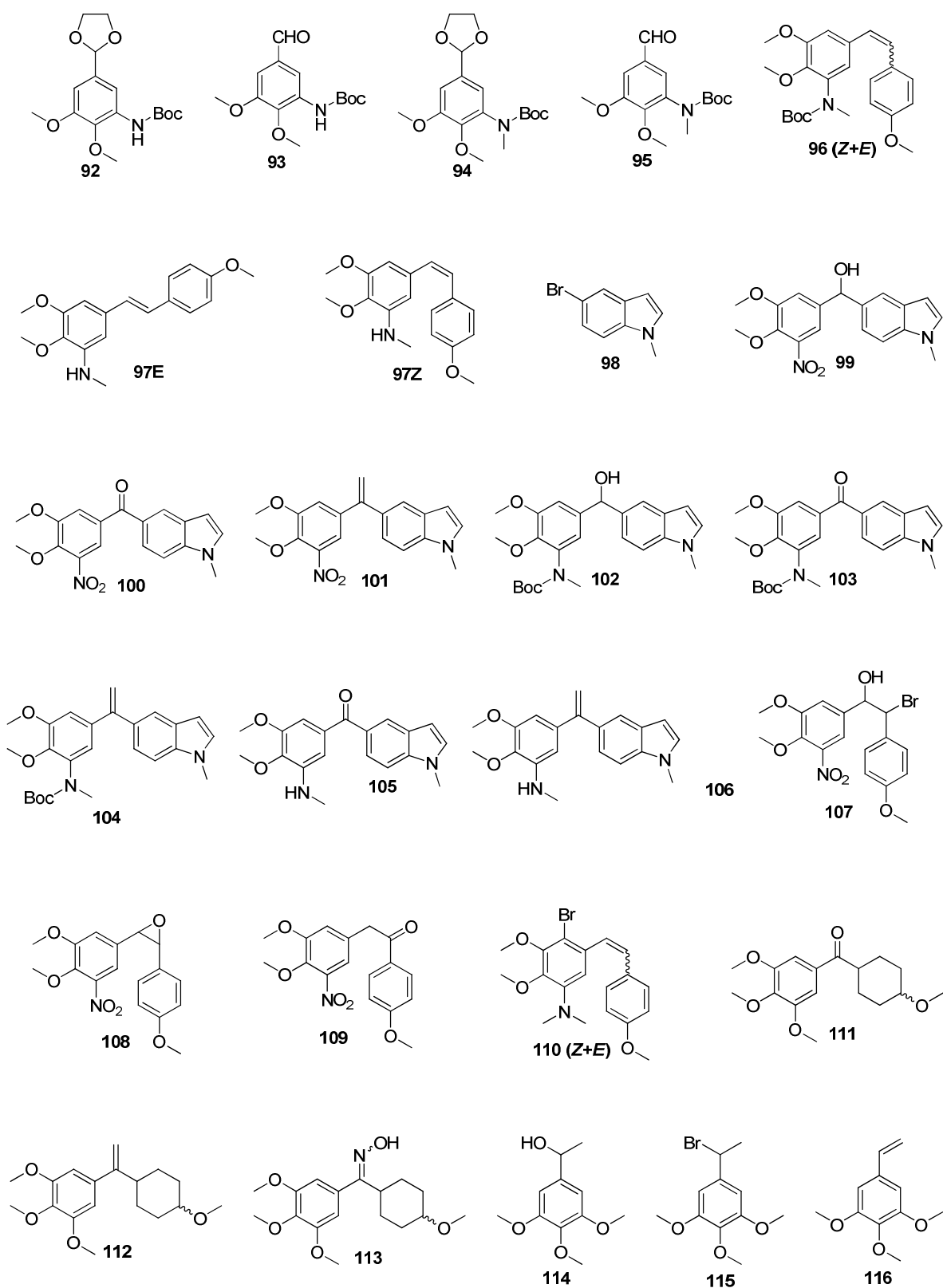
La realización de los ensayos de inhibición de la polimerización de tubulina y de citotoxicidad de los compuestos seleccionados constituye el **sexto objetivo**, que se completará con los estudios de Relación Estructura-Actividad.

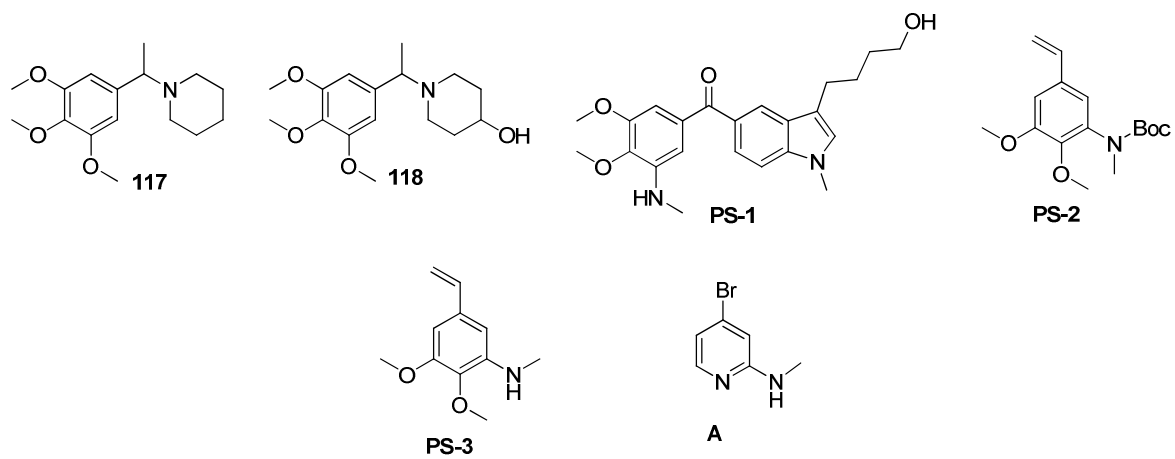
MÉTODOS Y RESULTADOS

Estructuras de los compuestos sintetizados



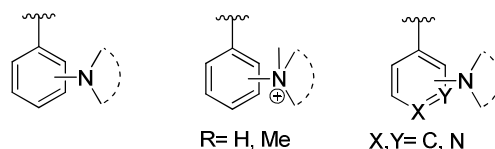






I. Modificaciones en el anillo B

El objetivo de esta parte del trabajo es introducir en el anillo B agrupaciones derivadas de anilina o piridina, cuyas funciones nitrogenadas pueden aumentar la solubilidad acuosa directamente o por la formación de sales de amonio.



Como anillo A se han seleccionado los anillos aromáticos de 3,4,5-trimetoxifenilo (TM), 2,3,4-trimetoxifenilo (TMG) o 2,5-dimetoxifenilo (DM), porque han demostrado previamente que conducen a una potente actividad inhibidora de la polimerización de la tubulina⁵⁰.

Los dos anillos aromáticos se unirán por puentes de 1 ó 2 átomos de carbono. Cuando hay dos átomos de carbono la configuración del doble enlace podría ser *Z* o *E*, aunque como ya se ha dicho anteriormente, lo más interesante será obtener productos con configuración *Z* del doble enlace entre los dos anillos aromáticos.

En esta secuencia se sintetizarán compuestos de las familias de fenstatinas (diarilmetanonas), isocombretastatinas (1,1-diariletilenos) y combretastatinas que de forma general se recogen en la figura 37.

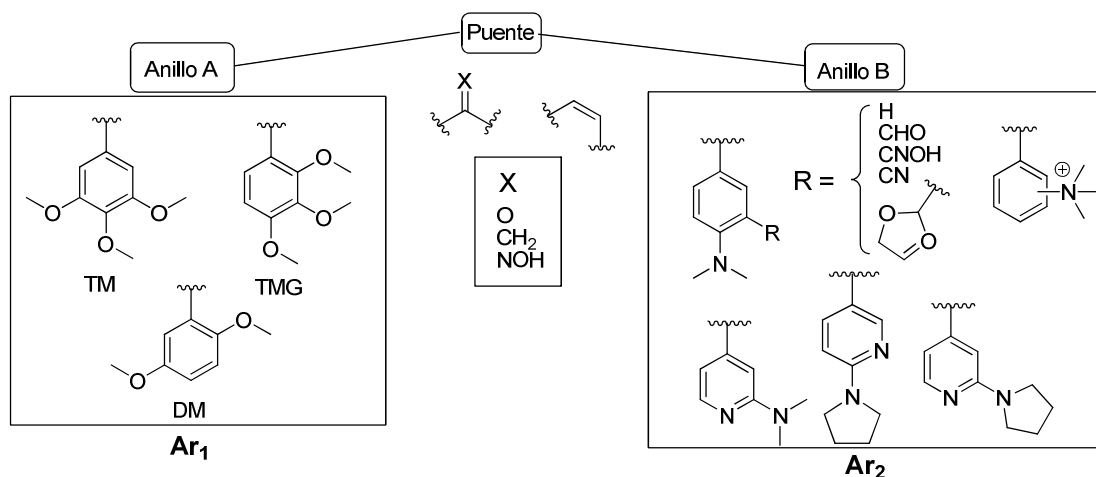


Figura 37: Esquema general de los compuestos sintetizados

⁵⁰(a) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; López, J. L.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Diarylmethoxyamine and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5952. (b) Álvarez, R. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. **2009**. (c) Álvarez, C. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. **2006**.

1. Síntesis de análogos de fenstatina

La síntesis del esqueleto básico de las fenstatinas se realiza por tratamiento del organometálico aromático que contiene los grupos amino con el aldehído ó el ácido carboxílico correspondiente. Cuando se utiliza el ácido carboxílico se obtiene directamente la cetona, pero con aldehído pasa por un intermedio alcohólico (diarilmetanol), que es necesario oxidar para llegar a la fenstatina.

A partir de la fenstatina, que se considera la molécula base en el esquema de síntesis, se sintetizan derivados como las isocombretastatinas, las oximas, las sales de amonio y sus derivados.

En el esquema siguiente se incluyen los pasos seguidos en todas las rutas sintéticas empleadas en esta parte del trabajo:

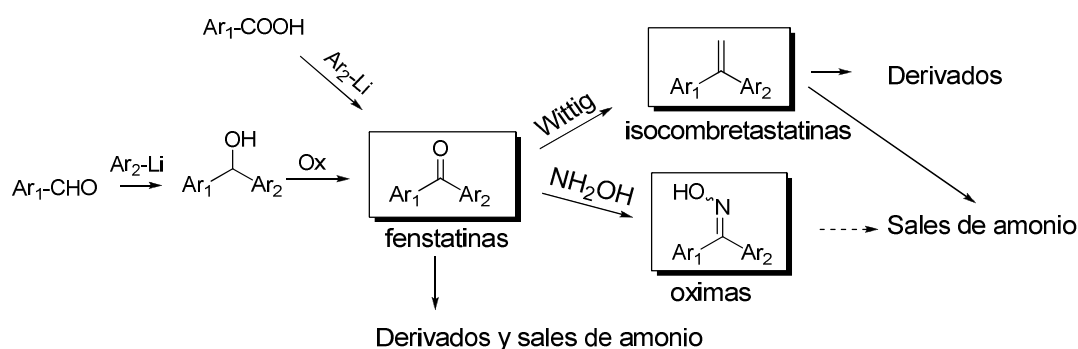


Figura 38: Esquema general de la síntesis de fenstatinas, isocombretastatinas y oximas

1.1 Síntesis de análogos de dimetilaminofenilo

► Anillo A: 3,4,5-trimetoxifenilo:

En primer lugar se describe la síntesis de los compuestos en los que el anillo A corresponde a 3,4,5-trimetoxifenilo (TM) y el anillo B a *meta* y *para*-dimetilaminofenilo.

En el esquema siguiente se explica la síntesis de la fenstatina según una adición nucleofílica del derivado litiado obtenido a partir de la reacción de transmetalación del bromoderivado a la sal del ácido formada por el tratamiento del ácido carboxílico con hidruro de sodio.

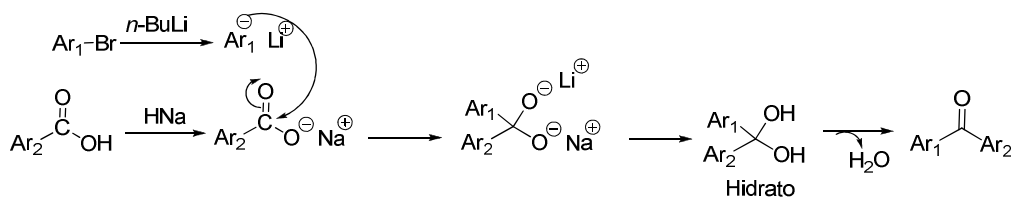


Figura 39: Mecanismo de formación de la fenstatina

La fenstatina **12** se sintetiza a partir de 4-bromodimetilanilina y la sal del ácido en exceso, con un rendimiento del 46 %. El compuesto **54** se prepara en las mismas condiciones utilizando 3-bromodimetilanilina con un rendimiento del 75 %.

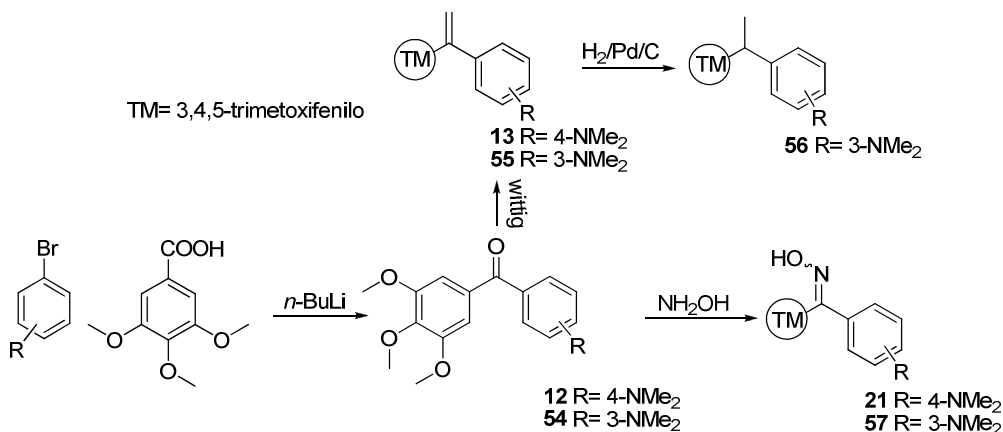


Figura 40: Ruta sintética empleada para la síntesis de los compuestos con la agrupación dimetilaminofenilo.

El compuesto **12** se caracteriza en RMN-¹H por señales de los ¹H aromáticos que resuenan como dobletes a 6,66 y 7,80 ppm y la señal del grupo carbonilo a 194,4 ppm en RMN¹³C. En el IR las cetonas de **12** y **54** presentan la vibración de tensión del grupo carbonilo a 1681 y 1650 cm⁻¹, respectivamente.

La isocombretastatina **13** se sintetiza con un rendimiento del 75% por reacción de Wittig⁵¹ de la fenstatina **12** con el yoduro de metiltrifenilfosfonio (PPh₃CH₃I) y BuLi para formar el iluro de fósforo, y se caracteriza por dos señales dobletes a 5,24 y 5,36 ppm en RMN ¹H que

⁵¹ (a) Wittig, G.; Schöllkopf, U. Über triphenyl-phosphin-methylene als olefinbildende reagenzien (I. Mittel). *Ber.* **1954**, 87, 1318. (b) Wittig, G.; Haag, W. Über triphenyl-phosphin-methylene als olefinbildende reagenzien (II. Mittel). *Ber.* **1955**, 88, 1654.

corresponden a los protones del grupo metileno del puente. **55** se obtiene con un rendimiento del 94 % y se caracteriza por las señales de la olefina a 5,38 y a 5,41 ppm en RMN ^1H .

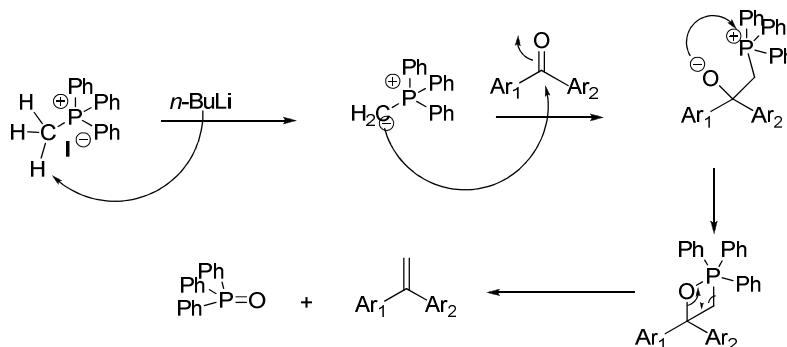


Figura 41: Mecanismo de la reacción de Wittig

El objetivo de la síntesis de las oximas es mejorar la solubilidad del compuesto por la introducción de agrupaciones polares, pudiendo además formar enlaces de hidrógeno con la proteína⁵².

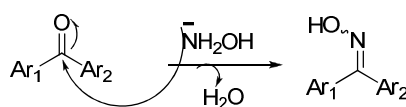


Figura 42: Formación de la oxima

Las oximas **21** y **57** se preparan a reflujo mediante tratamiento de las fenstatinas con clorhidrato de hidroxilamina, piridina y metanol como disolvente. En esta reacción se obtienen dos isómeros *Z/E* en proporción aproximada 1:1.

La asignación estereoquímica de las oximas se ha realizado teniendo en cuenta que cuando el grupo OH de la oxima se dirige hacia un determinado anillo aromático se observa un apantallamiento de los protones de ese anillo, de acuerdo con lo observado para otras oximas parecidas^{50c} cuya estructura ha sido establecida por difracción de rayos X (figura 43). Las oximas se obtienen con buen rendimiento, 57 % para **21** y 91 % para **57**.

⁵² Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Naphthylphenstatins as tubulin ligands: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8999.

Las oximas se caracterizan en RMN ^1H por un apantallamiento de las señales de los protones aromáticos con respecto a los de la cetona (ver figura 43) y por la aparición de la banda del grupo funcional OH en el IR a 3410 cm^{-1} .

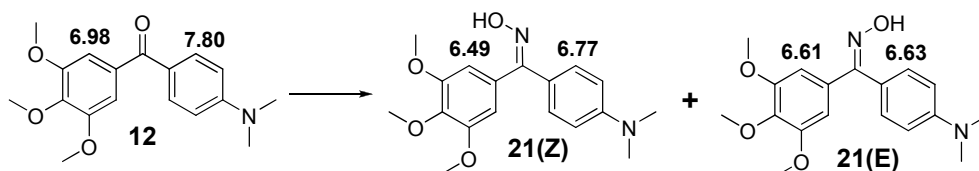


Figura 43: Desplazamientos químicos característicos de **12** y los isómeros *Z/E* de **21**

El compuesto **56** se prepara por hidrogenación catalítica con paladio sobre C de la isocombretastatina **55**, con un rendimiento del 94 %, se caracteriza por la aparición de la señal del metilo a 1,63 ppm que resuena como doblete y la del metino a 4,10 ppm que resuena como cuartete en RMN ^1H .

► Anillo A: 2,3,4-trimetoxifenilo y 2,5-dimetoxifenilo:

La síntesis de los derivados de *p*-dimetilaminilina de las fenstatinas con el anillo A de 2,3,4-trimetoxifenilo (TMG) y 2,5-dimetoxifenilo (DM) se ha realizado siguiendo el esquema de la figura 44.

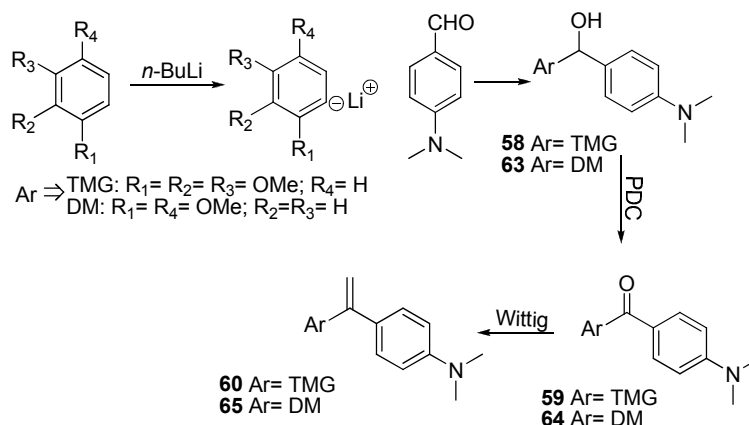


Figura 44: Esquema sintético de las isocombretastatinas **60** y **65**

La síntesis de las fenstatinas **59** y **64** pasa por la formación del intermedio alcohólico, que se prepara a partir de la adición nucleofílica de un derivado de litio a *p*-dimetilaminobenzaldehído. El derivado de litio se genera en la posición más reactiva de la

molécula, posición 4 para 1,2,3-trimetoxibenceno y posición 2 en el caso de 1,4-dimetoxibenceno. Los alcoholes **58** y **63** se oxidan con dicromato de piridinio (PDC)⁵³ para obtener las cetonas correspondientes como indican las señales a 193,6 y 194,0 ppm en RMN ¹³C, para las fenstatinas **59** y **64**, respectivamente.

La etapa de oxidación reduce notablemente el rendimiento global y sólo se obtienen las cetonas con el 20 y el 32 % respectivamente. Por lo tanto es preferible la síntesis de las fenstatinas a partir de los ácidos carboxílicos.

Las isocombretastatinas **60** y **65** se obtienen a partir de las cetonas **59** y **64** por reacción de Wittig, con rendimientos del 70 y 53 %. Se identifican por las señales en la RMN ¹H de los protones olefínicos a 5,15 y 5,60 ppm para **60** y 5,18 y 5,70 ppm para **65**.

1.2 Síntesis de análogos de piridina:

Se han sintetizado cuatro familias derivadas de piridina, sustituidas con agrupaciones dimetilamino o pirrolidina, y en las que se varía la posición de unión del resto piridina al carbono del puente (figura 45).

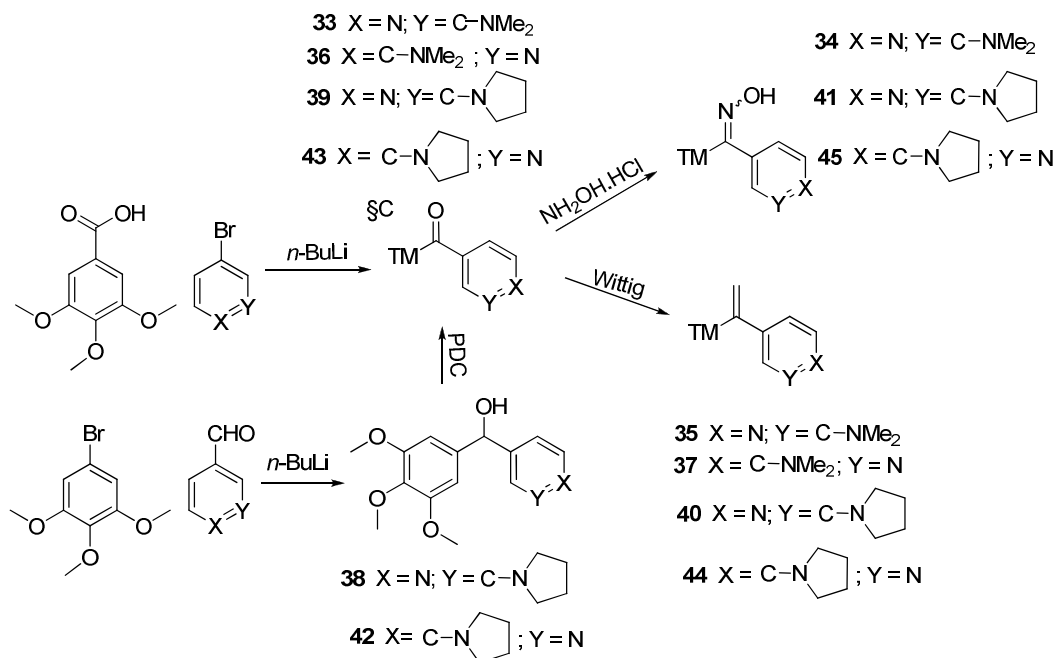


Figura 45: Esquema sintético de los compuestos basados en el anillo de piridina

⁵³ Lee, J.; Kim, S. J.; Choi, H.; Kim, Y. H.; Lim, I. T.; Yang, H.-m.; Lee, C. S.; Kang, H. R.; Ahn, S. K.; Moon, S. K.; Kim, D. -H.; Lee, S.; Choi, N. S.; Lee, K. J. Identification of CKD-516: A Potent Tubulin Polymerization Inhibitor with Marked Antitumor Activity against Murine and Human Solid Tumors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6337.

El compuesto de partida **32** se prepara por aminación reductiva de 2-amino-4-bromopiridina con paraformaldehído y cianoborohidruro sódico. A temperatura ambiente se observó la formación de una mezcla con distinto grado de metilación en proporción 2:1 y a reflujo se transformó todo al compuesto dimetilado **32**, con un rendimiento de 54 %.

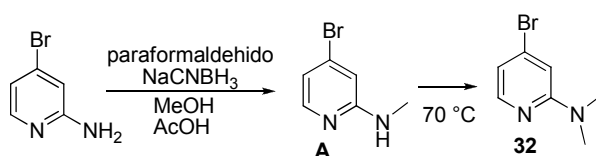


Figura 46: Síntesis del compuesto **32**

En la bibliografía se ha descrito la aminación reductora utilizando Si-CBH (cianoborohidruro modificado por sílice); este reductor mejora el rendimiento en un 25% en comparación con el cianoborohidruro sódico, pero no se usa en este trabajo por el coste de reactivo.⁵⁴

La síntesis de las fenstatinas **33** y **36** se realiza a partir de la adición del derivado litiado de 3- ó 4-bromodimetilaminopiridina con el ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico con un rendimiento de 26 y 84 %, respectivamente. En RMN ¹³C aparecen las señales a 194,9 y a 187,6 ppm indicando la formación de la cetona.

La ruta de síntesis de las cetonas **39** y **43** pasa por la formación de los alcoholes intermedios **38** y **42**, que después se oxidan con dicromato de piridinio para obtener las fenstatinas con rendimientos de 83 y 75 % respectivamente. Las fenstatinas **39** y **43** se caracterizan por desapantallamiento de los protones en RMN ¹H y por aparición de los señales de grupo carbonilo a 195,1 y 193,1 ppm en RMN¹³C.

Las isocombretastatinas **35**, **37**, **40** y **44** se preparan siguiendo el procedimiento habitual de la reacción de Wittig a partir de las fenstatinas correspondientes con rendimientos aceptables. En la tabla siguiente se muestran los datos de las señales de RMN ¹H del grupo metileno, que salen como singletes más o menos distanciados.

⁵⁴ Grenga, P, N.; Sumbler, B, L.; Beland, F.; Priefer, R. Reductive amination agents: comparison of Na(CN)BH₃ and Si-CBH. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6658.

Isocombretastatinas	Rendimiento	Señales de ^1H olefínicos
35	73 %	5,50 (2H, s)
37	41 %	5,25 (1H, s); 5,33 (1H, s)
40	83 %	5,48 (1H, s); 5,50 (1H, s)
44	46 %	5,23 (1H, s); 5,31 (1H, s)

Tabla 1: Rendimiento y desplazamiento químico de las isocombretastatinas

Las oximas se preparan a partir de las fenstatinas utilizando clorhidrato de hidroxilamina y unas gotas de piridina. Las oximas se pueden obtener como mezcla de isómeros *Z/E*, sin embargo, en el caso del compuesto **45** únicamente se ha aislado uno de los isómeros.

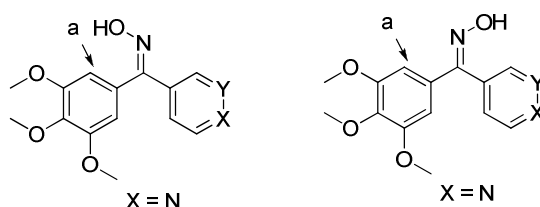


Figura 47: Estereoisómeros de las oximas sintetizadas

Oximas	Rendimiento	δ (ppm) del proton (a)		<i>Z/E</i>
		<i>Z</i>	<i>E</i>	
34	23 %	6,61	6,74	40:60
41	42 %	6,61	6,76	40:60
45	25 %	6,99		<i>Z</i> o <i>E</i>

Tabla 2: Rendimiento y desplazamiento químico de las oximas

Como en los casos anteriores, los desplazamientos químicos de cada isómero dependen de la estereoquímica de la oxima. En la oxima **45** no se dispone de ambos estereoisómeros, por lo cual no se puede realizar la asignación estereoquímica.

1.3 Síntesis de análogos de dimetilaminofenilo sustituidos:

Se pretende funcionalizar el anillo B que contiene el grupo dimetilamino en posición 4 con otros grupos que puedan interaccionar con la diana. Entre ellos se han elegido, aldehídos, oximas y nitrilos. La posición elegida es en *orto* del grupo amino debido a la mayor facilidad sintética. Para ello la primera vía elegida (figura 49) fue preparar el compuesto **10** que contiene el aldehído susceptible de transformación en los grupos mencionados y además está protegido para evitar interferencias con el *n*-BuLi que se debe utilizar a continuación.

En primer lugar se sintetiza el compuesto **9** a partir de 4-bromodimetilanilina por reacción de formilación de Vilsmeier-Haack. El grupo CHO entra en *orto* ya que la posición *para* se encuentra sustituida. La reacción se lleva a cabo con *N,N*-dimetilformamida, que en presencia de oxiclورو de fósforo (POCl₃) produce un catión iminio. Este catión es el encargado de realizar la sustitución electrofílica aromática, generando un intermedio que se hidroliza para dar el aldehído⁵⁵.

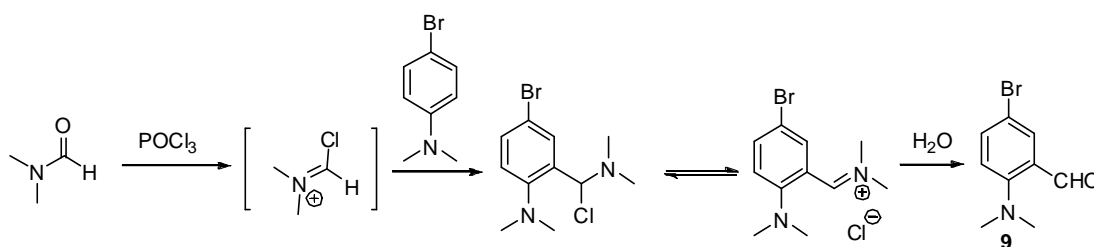


Figura 48: Mecanismo de la reacción de Vilsmeier-Haack

El aldehído **9** se protegió en forma de dioxolano, grupo protector que aguanta las condiciones básicas que se utilizan para la condensación posterior⁵⁶ (figura 49). El compuesto protegido **10** se utiliza para la síntesis de la fenstatina **11**. La reacción se efectúa vía acoplamiento con el ácido trimetoxibenzoico en condiciones análogas a las de otras reacciones similares que se describen en este trabajo; sin embargo, en este caso, la reacción no se produjo.

Por ello se intenta otra ruta sintética a partir de la fenstatina **12** (figura 49). Se realiza la formilación en *orto* de **12** obteniéndose el aldehído **14**, que se caracteriza por la aparición de un singlete a 10,03 ppm en RMN ¹H.

⁵⁵ Campaigne, E.; Archer, W. L. Formylation of dimethylaniline. *Org. Syn. Coll.* **1963**, *4*, 331.

⁵⁶ Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Protective Groups in Organic Synthesis. 4th edition. *Wiley-Interscience*. **2007**. New Jersey.

Como los aldehídos son más reactivos que las cetonas en la reacción de Wittig, porque tienen mayor carácter electrofílico, se necesita proteger el aldehído para que dicha reacción tenga lugar con la cetona y no con el aldehído. En la figura 49 se indican los pasos seguidos.

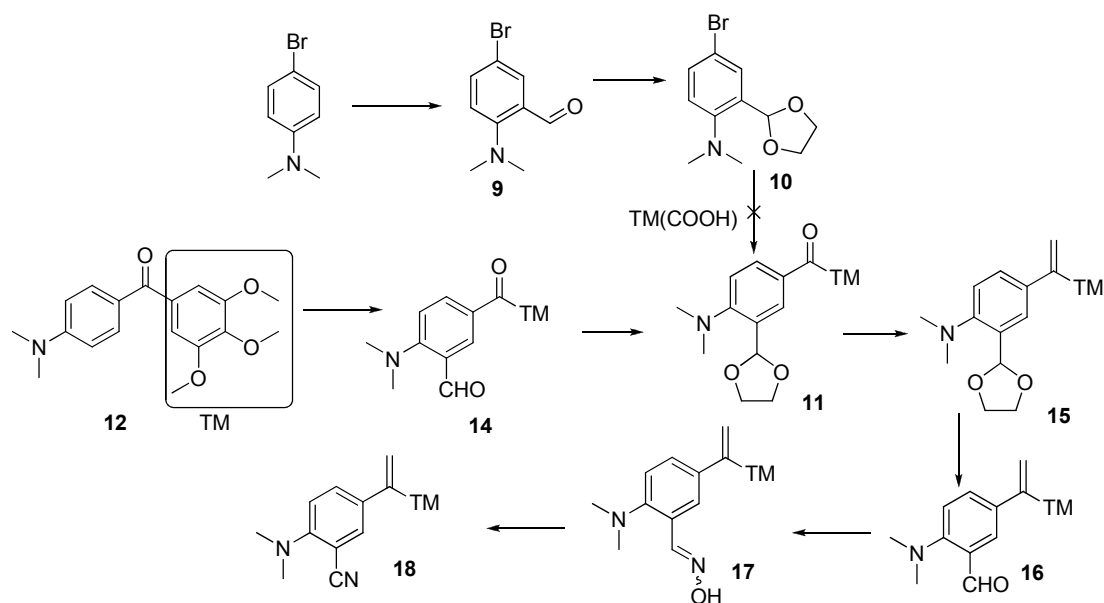


Figura 49: Preparación de los derivados de isocombretastatina sustituidos

El dioxolano **11** se obtiene a partir de la protección del grupo formilo de la fenstatina **14** con etilenglicol en presencia de cloruro de trimetilsililo. En RMN ^1H se observa la desaparición del singlete del aldehído, apareciendo un multiplete a 4,10 ppm de cuatro protones y un singlete a 6,10 ppm correspondiente a un protón.

La reacción de la fenstatina **11** con el iluro de fósforo da la isocombretastatina **15** que se identifica a partir de la aparición de dos singletes anchos a 5,33 y 5,40 ppm de los protones olefínicos. El aldehído se obtiene por desprotección del grupo dioxolano mediante hidrólisis en medio ácido durante 4 h. De la reacción se aísla la isocombretastatina **16**, que se caracteriza por la presencia de los protones olefínicos a 5,34 y 5,41 ppm y la aparición de la señal del aldehído a 10,18 ppm.

La oxima se prepara a partir del aldehído con clorhidrato de hidroxilamina y unas gotas de piridina. Se aísla el compuesto **17** con un rendimiento de 55 %. En la figura 50 se presenta la asignación de los desplazamientos químicos de protones en RMN ^1H .

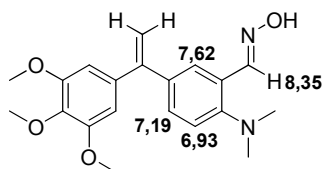


Figura 50: Desplazamientos químicos de RMN ^1H del compuesto **17**

La ruta sintética de esta secuencia se cierra con la síntesis de nitrilo **18**, compuesto que se sintetiza a partir del tratamiento de la mezcla de oximas con anhídrido acético y piridina. Al poner la reacción a temperatura ambiente se observa la formación de dos productos, nitrilo como mayoritario y el derivado acetilado como minoritario. En tolueno a reflujo se transforma todo el derivado acetilado en el nitrilo **18**. Se identifica por la aparición de la señal del grupo nitrilo a 119,8 ppm en RMN ^{13}C y en IR presenta la vibración de tensión del grupo nitrilo a 2214 cm^{-1} .

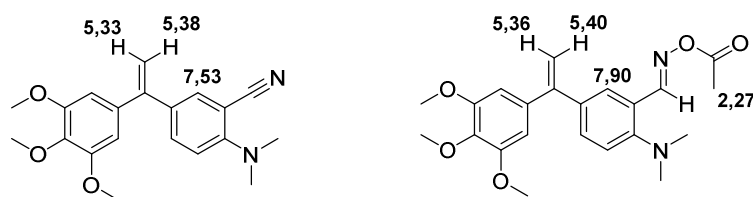


Figura 51: Desplazamientos químicos de RMN ^1H del compuesto **18** y del derivado acetilado.

1.4 Preparación de las sales de amonio de *p*-dimetilaminofenilo:

Habiendo preparado un amplio grupo de compuestos en los cuales el anillo B contiene la agrupación dimetilamino, se tiene una buena oportunidad para aumentar la solubilidad acuosa de los mismos por formación de sus sales y constatar si se modifica la actividad biológica en estos derivados.

Esta reacción se realiza por disolución de cada uno de los derivados de dimetilaminofenilo en acetona y adición de yodometano⁵⁷ calentando en un tubo sellado para evitar la evaporación del MeI. Después de unas horas de agitación aparece un precipitado en el tubo, que se filtra para obtener la sal correspondiente de cada compuesto. La formación de las sales se

⁵⁷Yuan, H.; Zhou, Z.; Xiao, J.; Liang, L.; Dai, L. Preparation of quaternary ammonium salt-tagged ferrocenylphosphine-imine ligands and their application to palladium-catalyzed asymmetric allylic Substitution. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, *21*, 1874.

comprueba por espectrometría de masas y por RMN ^1H , ya que las señales de los metilos de trimetilamonio de la sal de amonio se encuentran más desapantalladas que los del dimetilamino.

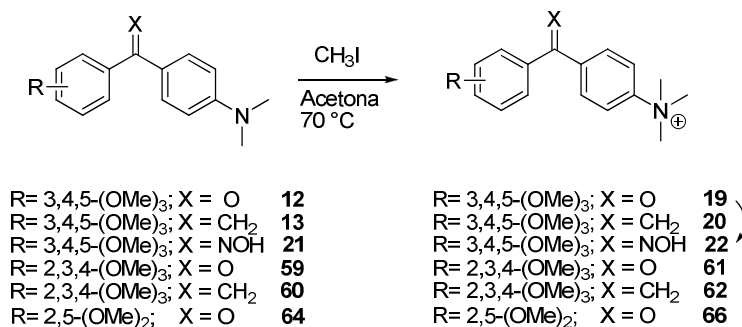


Figura 52: Preparación de sales de amonio de las fenstatinas

El tratamiento de la fenstatina **12** con yodometano genera la sal de amonio **19** con buen rendimiento. Se caracteriza por el desplazamiento químico de los protones de metilos nitrogenados, que pasan de 3,06 ppm de dimetilamino a 3,68 ppm de trimetilamonio. De igual forma ocurre con la sal de amonio **20** a partir de la isocombretastatina **13**. Las variaciones en el desplazamiento químico de los protones se recogen en la figura siguiente.

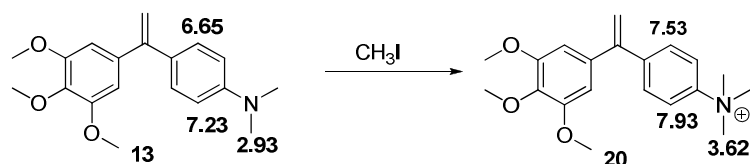


Figura 53: Desplazamiento químico de los protones de **20**

El intento de formación de la sal de amonio de las oximas **21** siguiendo el procedimiento anterior no conduce a la oxima esperada, se hidroliza la oxima del puente a la cetona aunque sí se produce la metilación del grupo amino.

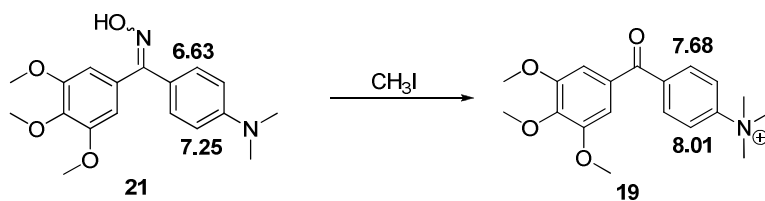


Figura 54: Formación del compuesto **19**

Después de intentar varias veces formar la sal de amonio de la oxima **21** por metilación del grupo amino, siempre conduce a **19**. El compuesto **22** se prepara entonces por tratamiento de la sal de amonio **19** con clorhidrato de hidroxilamina, y se aísla como en los casos anteriores una mezcla de oximas aunque con bajo rendimiento.

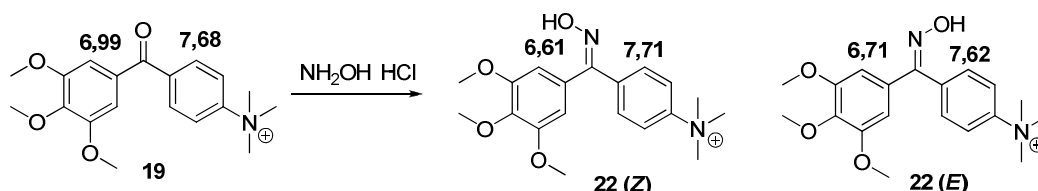


Figura 55: Formación de **22** a partir de **19**

Las sales de amonio **61**, **62** y **66** se preparan con MeI en acetona, añadiendo nitrato de plata para facilitar la eliminación de yoduro como un precipitado de AgI y aumentar el rendimiento de la reacción.

Compuesto	Rendimiento (%)
19	62
20	95
22	15
61	69
62	91
66	52

Tabla 3: Rendimiento de las sales de amonio preparadas.

2. Síntesis de análogos de combretastatina:

Las familias de combretastatinas preparadas son similares a las de isocombretastatina, con el fin de estudiar la influencia de esta modificación en la actividad.

Se ha partido inicialmente del anillo trimetoxifenilo (anillo A) y se ha modificado el anillo B con grupos aminofenilo o aminopiridilo. Posteriormente se han realizado modificaciones en los anillos aromáticos o en el puente etilénico.

2.1 Derivados del dimetilaminofenilo:

El compuesto de partida es la combretastatina **23** que ya ha sido descrito en bibliografía⁵⁸ y presenta una actividad citotóxica ($ED_{50} < 10^{-1} \mu\text{M}$) y una IC_{50} de $3,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ en el ensayo de inhibición de polimerización de tubulina. Sin embargo, no se han descrito las modificaciones realizadas en este trabajo.

La secuencia de reacciones seguida en este apartado de la memoria se representa en la figura 56 y comienza con la preparación de **23**.

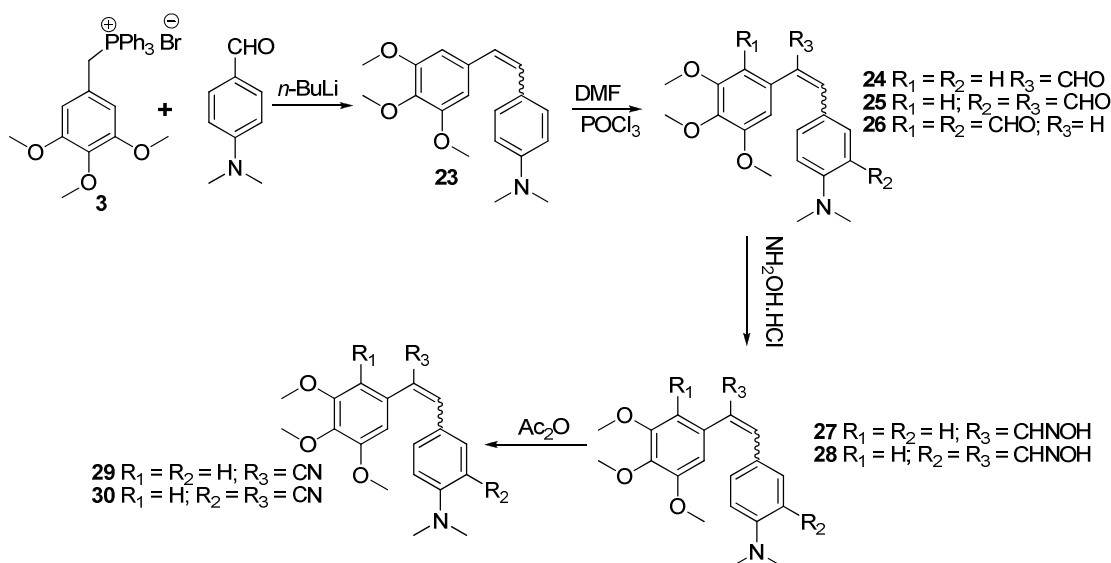


Figura 56: Síntesis de los derivados de combretastatina

Los dos isómeros *Z/E* se obtienen en proporción 6:4 en la reacción de Wittig. Se identifican a partir de las señales de los protones del puente que resuenan como dobletes de $J_{cis} = 12,2 \text{ Hz}$ a 6,32 y 6,46 ppm para el *Z* y $J_{trans} = 15,4 \text{ Hz}$ a 6,82 y 6,92 ppm para el *E*.

⁵⁸ Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A. K.; Lin, C. M.; Hamel, E. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2579.

El siguiente paso de esta secuencia es la formilación de **23** con POCl_3 y DMF, esta reacción se realiza como se ha descrito anteriormente y se obtienen el compuesto monoformilado **24**, y el diformilado **25**.

El compuesto **24** presenta señales de un único protón olefínico en RMN que resuena como s nglete a 7,30 ppm y se mantienen las de los protones de los anillos aromáticos. Aparece una señal adicional de un protón de aldehído que por tanto debe situarse en el puente etilénico. La formilación en la posición 9 del puente se puede interpretar de acuerdo con el mecanismo de la reacción de Vilsmeier-Haak, y es debido a la conjugación del sistema aromático con el doble enlace.

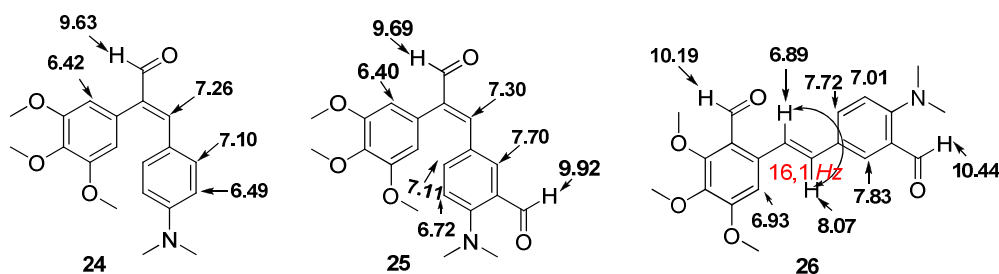
Siguiendo el mecanismo de la reacción de formilación se propone la estructura de **25**, formilado en el puente y en la posición *orto* del dimetilamino (la más reactiva en el anillo aromático). Además de la interpretación de las señales de RMN, se ha identificado **25** por las correlaciones H/C observadas en los experimentos HMBC y HMQC de RMN. Se han detallado los resultados en la tabla 4.

δ (C) (ppm)	C	δ (H) (ppm) HMQC	Correlaciones HMBC	Estructura
189,2	1	9,92	2, 3, 7	
124,1	2	-	-	
154,9	3	-	-	
116,3	4	6,72	2	
135,5	5	7,11	3, 7, 8	
122,2	6	-	-	
137,5	7	7,70	1, 3, 8	
149,6	8	7,30	7, 9, 10, 11	
139,5	9	-	-	
193,4	10	9,69	8, 9, 11	
129,2	11	-	-	
106,1	12, 16	6,40	11, 13 (15), 14	
153,9	13, 15	-	-	
138,0	14	-	-	

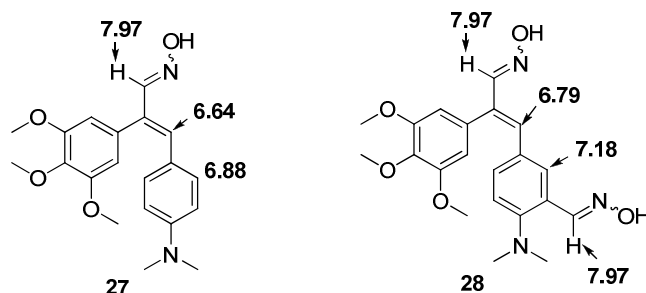
56,1	17, 19	3,79	13 (15)
60,9	18	3,90	14
44,4	20, 21	3,00	3

Tabla 4: Asignación de datos espectroscópicos obtenidos de las correlaciones H/C del compuesto **25**

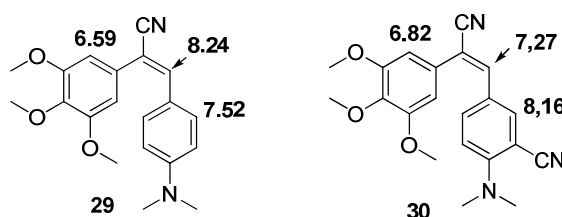
Esta misma reacción de formilación se realizó utilizando diferentes proporciones de moles de DMF y POCl₃ respecto al caso anterior, aislándose los dialdehídos **25** y **26** en proporción 8:2. El aldehído **26** se caracteriza en RMN ¹H por la existencia de dos dobletes de J_{trans} a 6,89 y 8,07 ppm señalando a la presencia del puente olefinico con configuración *trans* del doble enlace, señales de dos protones de grupos CHO y la desaparición de simetría en las señales de los protones aromáticos del material de partida. Teniendo en cuenta el mecanismo de la reacción de Vilsmeier-Haak, deberían situarse uno de ellos en la posición *orto* del grupo amino y el otro en el otro anillo aromático. Esto se confirma por los datos de los protones aromáticos en RMN ¹H.

Figura 57: Estructura y datos de RMN ¹H de los aldehídos **24**, **25** y **26**

Las oximas **27** y **28** se preparan a partir del monoaldehído **24** y dialdehído **25**. La oxima **27** se cristaliza en AcOEt/MeOH y se aísla un 32 % de cristales amarillos, mientras la oxima **28** se aísla por cristalización en éter/CH₂Cl₂ en forma de cristales amarillos, solubles en agua. En la figura siguiente se indican los desplazamientos químicos de los protones en RMN ¹H de las oximas **27** y **28**.

Figura 58: Oximas **27** y **28**

Los derivados del nitrilo **29** y **30** se preparan mediante tratamiento de las oximas **27** y **28** con anhídrido acético a 90 °C⁵⁹ durante 24 h y se obtienen con un rendimiento del 30 y 28 % respectivamente. En el espectro de IR absorben a 2211 y a 2207 cm⁻¹ correspondientes a la función nitrilo (figura 59).

Figura 59: Estructura de **29** y **30** y algunos datos de RMN ¹H

2.2 Derivados de piridina:

Como hemos visto en el caso de las fenstatinas, los compuestos basados en piridina se preparan para mejorar la solubilidad acuosa ya que la existencia del anillo de piridina aumenta la basicidad del compuesto y su polaridad.

Se han utilizado para su preparación derivados nitrogenados de los aldehídos nicotínicos e isonicotínicos.

⁵⁹ Trofimov, A. B.; Vasil'tsov, M. A.; Mikhaleva, I. A.; Ivanov, V. A.; Skital'tseva, V. E.; Schmidt, Y. E.; Senotrusova, Y. E.; Ushakov, A. I.; Petrushenko, B. K. Synthesis of 1-vinylpyrrole-2-carbonitriles. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 97.

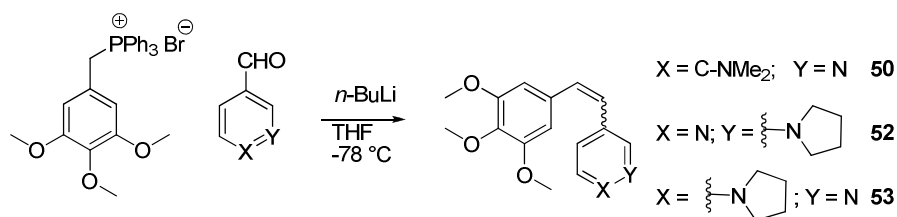


Figura 60: Síntesis de los derivados piridínicos de combretastatina

La combretastatina **50** se prepara mediante la reacción de Wittig entre el 6-(dimetilamino)nicotinaldehído y el iluro de la sal de fosfonio **3** obteniéndose la mezcla de isómeros con un rendimiento global del 58 %. Los protones del puente del isómero *Z* se observan a 6,38 ppm como singlete, mientras los del isómero *E* lo hacen como dobletes de $J_{trans} = 16,4 \text{ Hz}$ a 6,80 y 6,89 ppm.

Las combretastatinas **52** y **53** se preparan de la misma manera que las anteriores, en el caso de la combretastatina **52** se utiliza el 6-(pirrolidin-1-il)nicotinaldehído y se obtiene con un 33 %; la combretastatina **53** se obtiene a partir de (2-pirrolidin-1-il)isonicotinaldehído y se obtiene como una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:1 con un rendimiento global de 38 %. Las señales de los protones de los isómeros de la combretastatina **52** se observan como dos dobletes de $J_{cis} = 12,2 \text{ Hz}$ a 6,40 y 6,54 ppm que corresponden al isómero *Z* y dobletes de $J_{trans} = 16,1 \text{ Hz}$ a 6,88 y 7,08 ppm en RMN ^1H para el *E*. En el caso de **53** no se ha logrado separar los dos isómeros y se han caracterizado a partir de la mezcla.

A partir de los antecedentes del grupo del trabajo y la bibliografía, el isómero que presenta un actividad más interesante frente a la polimerización de la tubulina es el isómero *Z*, por lo cual siempre se intenta aislarlo puro, mientras el isómero *E* en muchos casos se caracteriza a partir de la mezcla de isómeros.

Los rendimientos del producto puro no son muy buenos porque la reacción no transcurre completamente y se obtienen material de partida y productos secundarios. Además existe una gran dificultad para su separación cromatográfica pues los R_f son muy próximos.

2.3 Sales de amonio de combretastatinas:

Las sales de amonio de las combretastatinas se preparan de la misma manera que los de la familia de fenstatina: la combretastatina deseada se disuelve en acetona con yodometano y se calienta a 70 °C, en un tubo sellado. La formación de la sal de amonio se identifica por los datos de RMN ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas.

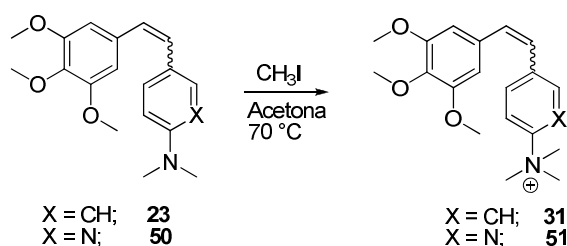


Figura 61: Preparación de sales de amonio de las combretastatinas

Las sales de amonio **31** y **51** se aíslan como mezcla de isómeros *Z/E* y con un rendimiento bajo, por lo que las combretastatinas piridínicas deben ser menos reactivas.

Se intentó preparar el compuesto **31** utilizando la sal de amonio del aldehído y haciéndolo reaccionar con el iluro de fosforo, pero no se detecta la formación de la combretastatina **31** esperada.

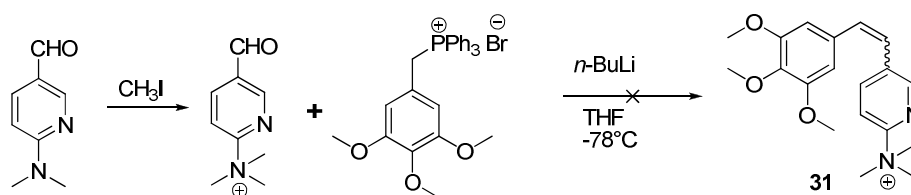
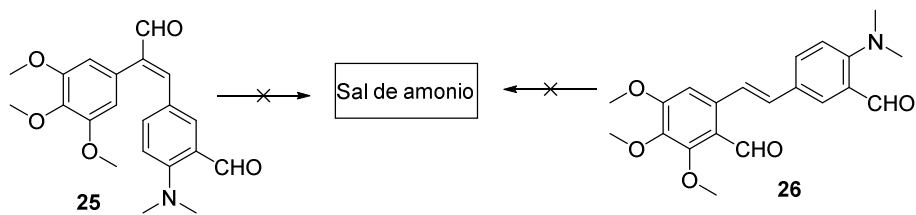


Figura 62: Intento de preparar la sal de amonio **31**

Las sales de amonio de **25** y **26** no han podido obtenerse aunque se aumentó el tiempo de reacción y se variaron los disolventes empleados, pero la reacción no evoluciona y se obtiene material de partida sin reaccionar. Por lo cual el aldehído en *orto* del dimetilamino debe influir desactivando el par de electrones libre del átomo de nitrógeno y disminuyendo su capacidad para alquilarse.

Figura 63: Intento de preparar las sales de amonio **25** y **26**

3. Síntesis de fenstatina alifáticas

3.1 Derivados de 4-metoxiciclohexano:

Siguiendo con los objetivos propuestos se han sintetizado fenstatinas con el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo y en las que se ha sustituido el grupo aromático del anillo B por uno alifático. En la siguiente figura se indican los pasos de la síntesis de los análogos de fenstatina basados en 4-metoxiciclohexano.

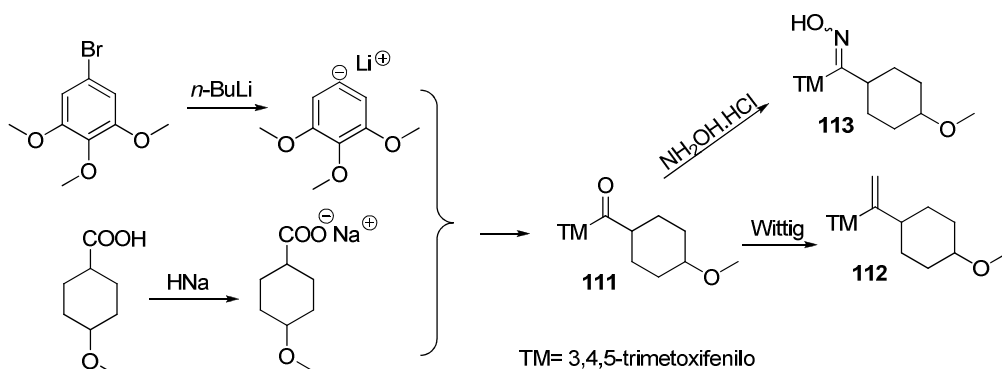


Figura 64: Síntesis de los derivados de fenstatina con ciclohexano

El compuesto **111** se prepara siguiendo el método habitual, a partir del derivado litiado y la mezcla de isómeros *cis* y *trans* del ácido 4-metoxiciclohexanocarboxílico en proporción 2:1, se aísla la cetona como mezcla *cis/trans* en proporción 6:4. El isómero más estable debe ser el *trans* cuando se sitúan los dos sustituyentes en la posición diecuatorial, pero en los datos de RMN ^1H se observa que el isómero mayoritario corresponde al *cis* (protón más apantallado en la posición 4 del ciclohexano).

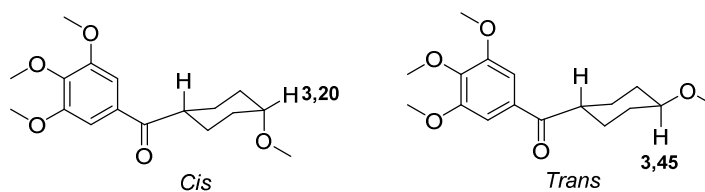
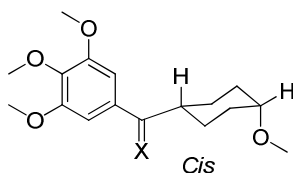


Figura 65: Isómeros geométricos del compuesto **111**

En la reacción de Wittig, la isocombretastatina **112** se aísla como una mezcla de isómeros *cis/trans* en proporción 6:4. Eso significa que ha conservado la estereoquímica del material de partida durante las condiciones básicas de la reacción de Wittig. La formación del metileno olefínico se caracteriza por la aparición de dos señales (5,02 y 5,10 ppm) en RMN ^1H .

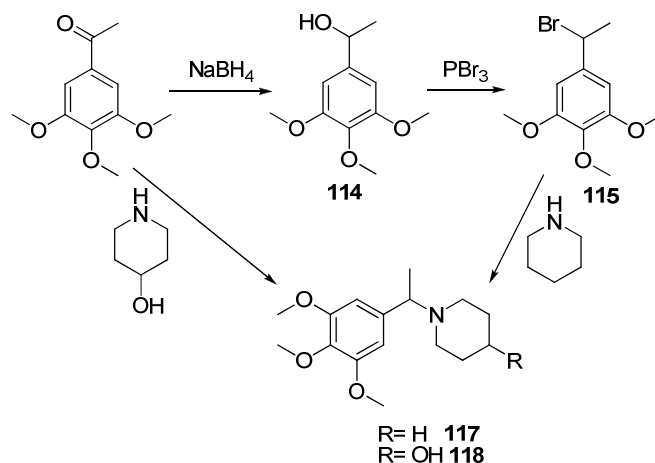
El tratamiento de la fenstatina **111** con el cloruro de hidroxilamina da la oxima **113** como mezcla *cis/trans* en proporción 8:4. En estas condiciones de reacción se favorece la isomerización parcial del *trans* al *cis*.

De todo lo detallado anteriormente se puede concluir, que la estructura más estable para este tipo de compuestos es la siguiente:

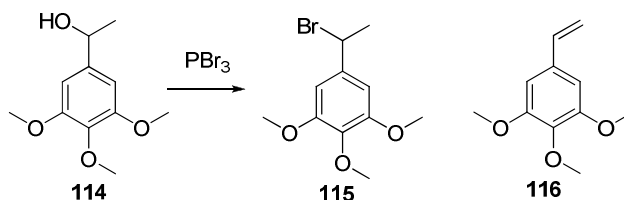


3.2 Derivados de piperidina:

Siguiendo con la síntesis de los compuestos con el anillo B alifático, se prepara el compuesto **117** tras una sustitución nucleofílica del bromo por piperidina con un rendimiento de 62 %. Se caracteriza por la aparición de la señal del protón del puente como cuartete a 3,23 ppm en RMN ^1H .

Figura 66: Síntesis del compuesto **117** y **118**

El derivado halogenado **115** se prepara por reducción de 3,4,5-trimetoxiacetofenona al alcohol, seguida de halogenación con tribromuro de fósforo para formar un buen grupo saliente y favorecer la sustitución nucleofílica por la piperidina. Cuando se trata el alcohol **114** con tribromuro de fósforo, se forma el producto de la sustitución como mayoritario y el de eliminación **116** como minoritario.

Figura 67: Formación de **115** y **116**

Se intentó preparar el compuesto **118** mediante la aminación reductora con cianoborohidruro sódico de piperidinol y 3,4,5-trimetoxiacetofenona a temperatura ambiente y a reflujo pero no se observó ninguna evolución por problemas de disolución del piperidinol en los disolventes orgánicos ensayados (CH_2Cl_2 , MeOH y CH_3CN).

Aunque en la bibliografía⁶⁰ se han preparado aminas terciarias semejantes mediante N-alquilación de las aminas secundarias utilizando $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ como catalizador, N-fenil-2(diciclohexilfosfonil)pirrol como ligando y *terc*-amil alcohol como disolvente con altos rendimientos, se prefirió ensayar la reacción anterior asistida por microondas. Utilizando un

⁶⁰ Tillack, A.; Hollmann, D.; Mevius, K.; Michalik, D.; Bähn, S.; Beller, M. Salt-Free Synthesis of Tertiary Amines by Ruthenium-Catalyzed Amination of Alcohols. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4745.

aparato casero en fase sólida utilizando sílice como soporte y tres minutos de tiempo de reacción, después de extracción y purificación se aisló **118** con un de 41 % de rendimiento.

II. Modificaciones en el anillo A

Siguiendo los objetivos generales del trabajo en este capítulo se aborda la síntesis de compuestos por modificaciones en el anillo aromático A. Para ello se sustituye uno de los grupos metoxilos por derivados nitrogenados que pueden mejorar la solubilidad del compuesto y además formar sales de amonio que la aumentarían notablemente. El anillo B se mantiene sin modificación y en el puente se desarrollan las sustituciones que pueden dar los compuestos habituales de las familias de combretastatina, fenstatina e isocombretastatina. En el esquema general se muestran las modificaciones introducidas en los compuestos sintetizados.

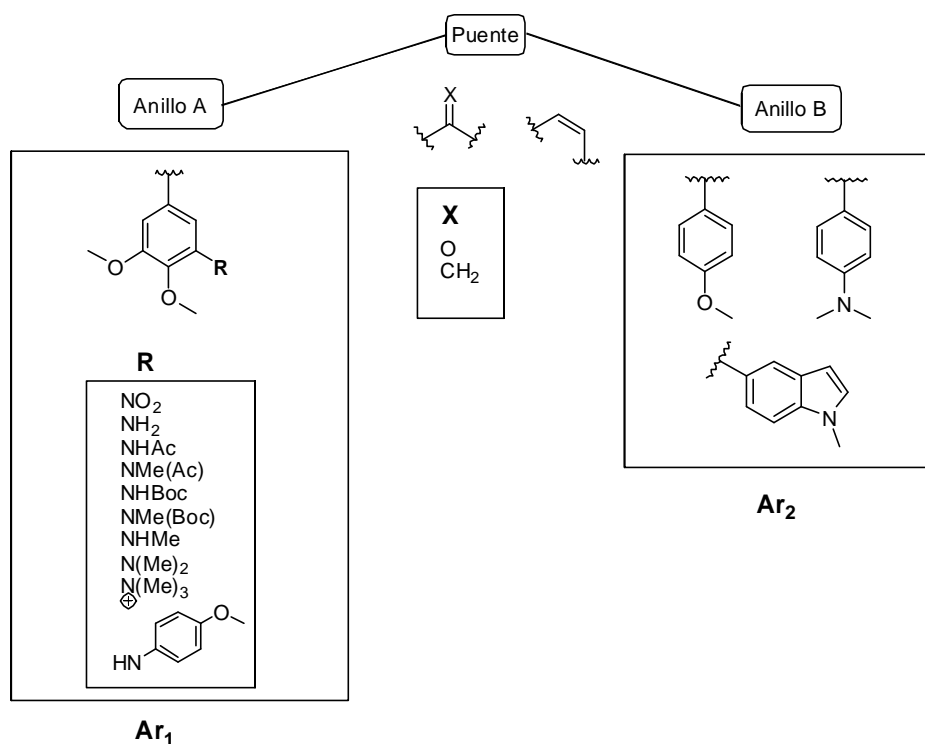


Figura 68: Esquema general de los compuestos sintetizados

1. Síntesis de análogos de fenstatina:

Se sintetizan los compuestos de la familia de fenstatina que mantienen el anillo B como *p*-metoxifenilo o 1-metil-1*H*-indol mientras en anillo A se sustituye un grupo metoxilo de la agrupación 3,4,5-trimetoxifenilo por diferentes sustituyentes nitrogenados para ver la influencia de cada uno sobre la actividad de la molécula.

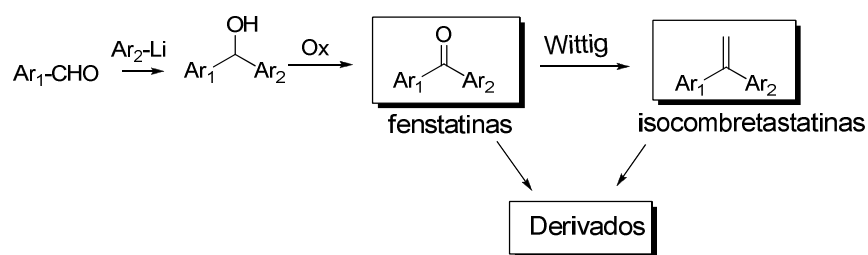


Figura 69: Esquema general de la síntesis de fenstatina

1.1 Síntesis de los derivados del *p*-metoxifenilo:

La síntesis de la fenstatina se realiza siguiendo el procedimiento habitual de la reacción del aldehído con el derivado litiado.

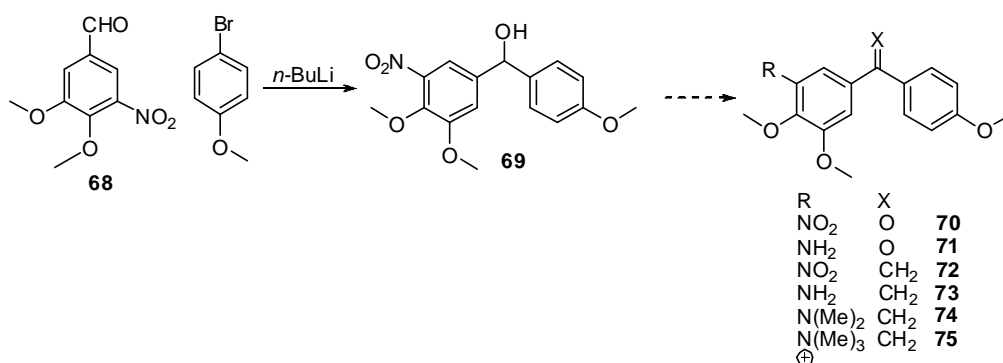


Figura 70: Síntesis de las fenstatinas e isocombretastatinas

Se sintetiza el alcohol **69** mediante la reacción del aldehído **68** con el derivado litiado de 4-bromoanisole, siguiendo el método habitual de este tipo de reacciones, y se utiliza en la reacción de oxidación sin purificar para evitar la pérdida de rendimiento.

El aldehído **68**, que también es utilizado posteriormente en la preparación de otros materiales de partida como **86** y **95**, se sintetiza a partir de vainillina por nitración⁶¹ y metilación.

La metilación se ha realizado de dos formas diferentes, usando sulfato de dimetilo en presencia de una base y acetona o en condiciones de transferencia de fase⁶². El segundo método transcurre a temperatura ambiente y da ligeramente mejor rendimiento (88%) frente al anterior (81%), por lo cual se utiliza en los casos que hemos tenido que repetir la reacción.

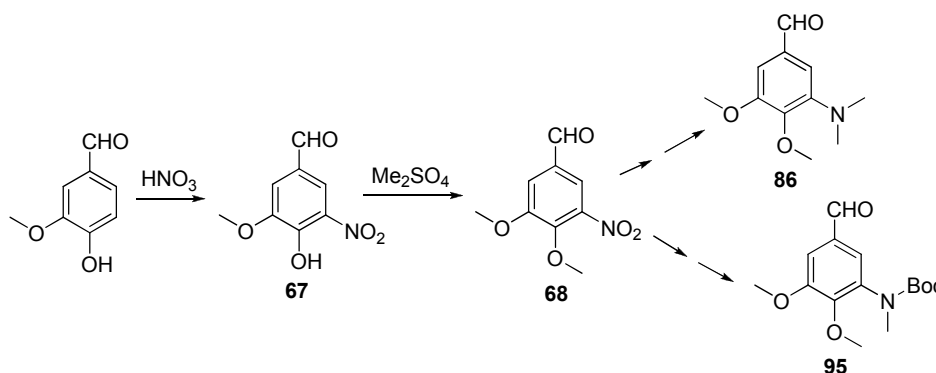


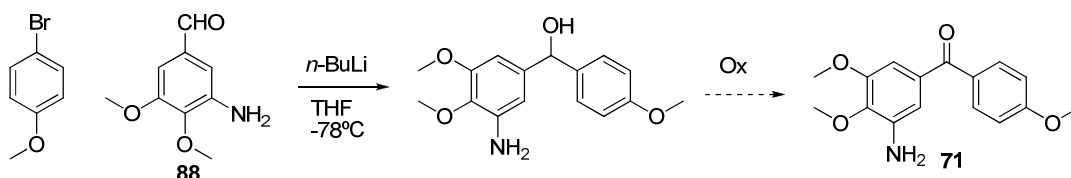
Figura 71: Síntesis del aldehído **68**

En la bibliografía la reducción de NO_2 a NH_2 se ha realizado utilizando hierro^{41b} ó zinc como reductores. Los mejores rendimientos se obtienen con el zinc en ácido acético, por lo cual es el método elegido en nuestro caso para la preparación de **71** y **73**.

El alcohol **69** se oxida con dicromato de piridinio en CH_2Cl_2 para formar la fenstatina **70**, que se identifica por la aparición de la señal en RMN ^{13}C del grupo carbonilo a 192,3 ppm. La aminofenstatina **71** se prepara a partir de la reducción de **70** con zinc y ácido acético.^{48b} También para reducir los pasos de reacciones y aumentar el rendimiento de la reacción, se intentó preparar **71** utilizando el amino-aldehído **88** (figura 72). La reacción de condensación transcurre con muy bajo rendimiento y aunque en el crudo de reacción se detecta una señal en RMN ^1H del protón geminal al grupo hidroxilo no se continúa la secuencia de reacción. Por ello la secuencia final de reacciones se prosigue a partir de la fenstatina **70**.

⁶¹ Kiss, L. E.; Ferreira, H. S.; Torrao, L.; Bonifacio, M. J.; Palma, P. N.; Da Silva, P. S.; Learmonth, D. A. Discovery of a Long-Acting, Peripherally Selective Inhibitor of Catechol-O-methyltransferase. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3396.

⁶² Bailey, K.; Tan, E. T. Synthesis and evaluation of bifunctional nitrocatechol inhibitors of pig liver catechol-O-methyltransferase. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5740.

Figura 72: Intento de preparación de **71**

La isocombretastatina **72** obtenida mediante la reacción de Wittig de **70**, se identifica por las señales de los protones olefínicos a 5,36 y 5,45 ppm. La reducción del compuesto **72** al amino **73** implica un apantallamiento de los protones aromáticos del anillo A. La reacción de alquilación de la amina nos permitió formar el derivado dimetilado **74** por tratamiento con yodometano a 70 °C. A partir de él con más equivalentes de yodometano y AgNO₃ en acetona en un tubo sellado, se obtiene la sal de amonio **75**. Los datos de espectroscopía de masas permiten confirmar la formación de la sal de amonio **75**.

En la tabla siguiente se muestran el rendimiento obtenido de cada compuesto y las variaciones del desplazamiento químico de los protones aromáticos del anillo A en función de la sustitución del mismo.

Compuesto		Rendimiento	Desplazamiento químico de los protones aromáticos 2 y 6	Estructura
70	X = O; R = NO ₂	37 %	7,59 y 7,66 ppm	
71	X = O; R = NH ₂	95 %	6,76 y 6,77 ppm	
72	X = CH ₂ ; R = NO ₂	72 %	7,06 y 7,30 ppm	
73	X = CH ₂ ; R = NH ₂	80 %	6,34 y 6,40 ppm	
74	X = CH ₂ ; R = NMe ₂	97 %	6,89 y 7,15 ppm	
75	X = CH ₂ ; R = NMe ₃ [⊕]	84 %	7,07 y 7,12 ppm	

Tabla 5: Rendimiento y desplazamiento químico de los protones aromáticos del anillo A de **70-75**

En la purificación del compuesto **70** después de las etapas de condensación y oxidación se aisló un subproducto identificado como **77**. Este compuesto resulta de la reacción de condensación de una fracción del aldehído **68** contaminada con el aldehído **88** (ver la página

74) con 4-metoxibromobenceno, seguido de la oxidación de la mezcla con PDC. La cetona **77** se ha identificado por RMN ^1H , ^{13}C y espectrometría de masas 394,1647 ($\text{M}+\text{H}^+$).

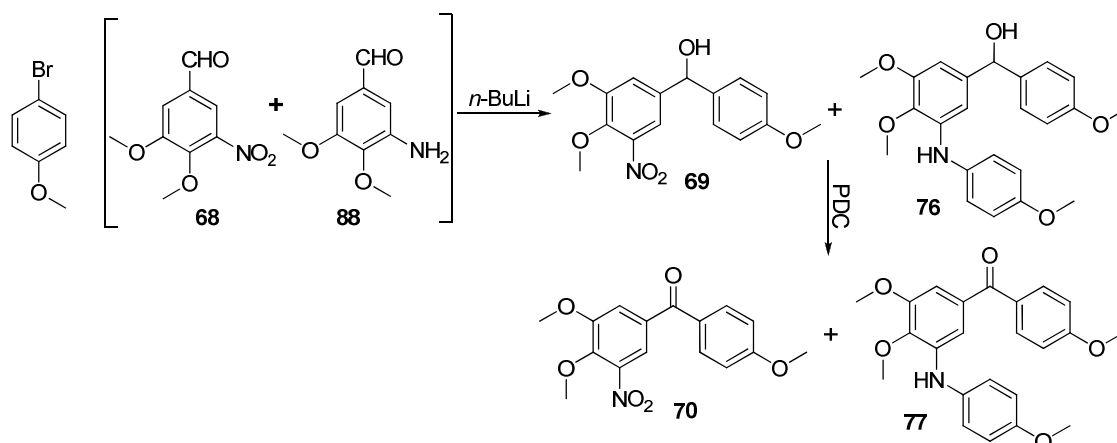


Figura 73: Obtención del compuesto secundario **77**

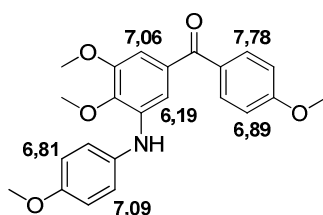


Figura 74: Desplazamiento químico de los protones aromáticos de **77**

1.2 Síntesis de los derivados de 1*H*-indol:

A partir de los antecedentes del grupo del trabajo conocemos que los compuestos que contienen el indol como sustituyente del anillo B mejoran la potencia inhibidora de la polimerización de la tubulina del compuesto¹⁹. Por ello, se decidió incorporar este anillo en la nueva familia de compuestos a preparar. El anillo A será análogo a los del apartado anterior.

La protección del NH del indol es necesaria para evitar las reacciones secundarias que se pueden producir debido al carácter ácido del protón del NH del 5-bromo-1*H*-indol. Hemos comprobado también que la introducción del grupo metilo, *N*-Me, no solo mantiene la actividad biológica y además contribuye a mejorar la actividad y la purificación de los derivados.

El compuesto de partida para la condensación es el 5-bromo-1-metil-1*H*-indol **98**. La alquilación del indol se realiza mediante la reacción con yodometano después de formar el anión por tratamiento con bases, en presencia de un catalizador de transferencia de fase, que facilita la formación de *N*-alquilo⁶³ con buenos rendimientos.

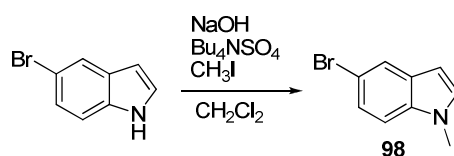


Figura 75: Obtención del compuesto **98**

La secuencia utilizada en primer lugar es la preparación del alcohol **99**, oxidación a la fenstatina **100** y posterior reacción de Wittig a **101**.

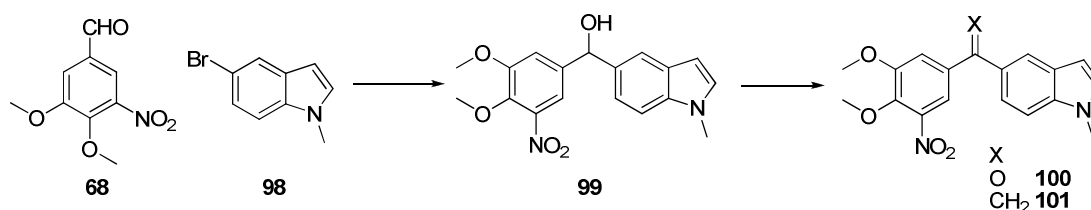
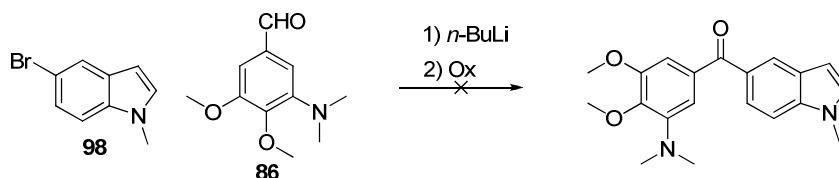


Figura 76: Síntesis de la isocombretastatina **101**

Estos compuestos se han purificado y caracterizado pero los bajos rendimientos de las tres etapas obligan a buscar otra ruta alternativa para preparar los compuestos finales. Se intentó preparar la cetona utilizando como aldehído de partida el dimetilamino derivado **86**, pero no se observó la formación de la cetona correspondiente.



Otra aproximación posible para efectuar la síntesis de la familia de compuestos *N*-Metil sustituidos sería partir con el grupo metilamino en el aldehído de partida. La preparación del

⁶³ Liou, J-P.; Wu, J-Y.; Hsieh, H-P.; Chang, C-Y.; Chen, C-M.; Kuo, C-C.; Chang, J-Y. 4- and 5-Aroylindoles as Novel Classes of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4548.

mismo se utiliza a partir del aldehído **68** obtenido anteriormente. La protección en forma de acetal y reducción origina **84** que se protege en forma de *N*-Boc para evitar la polimetilación del grupo amino.

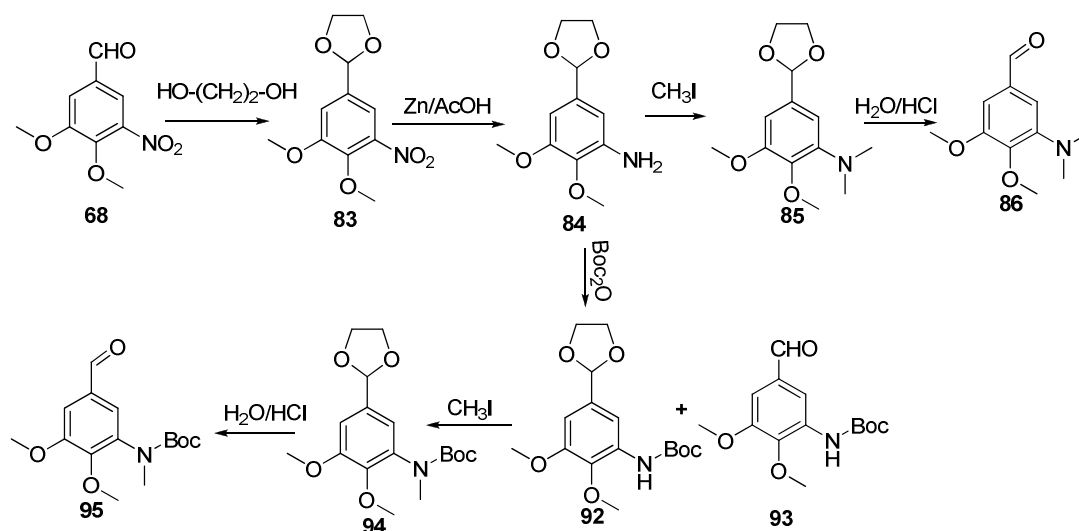


Figura 77: Síntesis del aldehído **95**

La protección del aldehído **68** se realiza de dos maneras diferentes, con etilenglicol y cloruro de trimetilsililo,⁵⁴ obteniéndose el compuesto **83** con un rendimiento de 52 %; se prepara también con etilenglicol y ácido *p*-toluensulfónico, usando un Dean-Stark para eliminar el agua del medio⁶⁴, incrementando el rendimiento hasta el 96 %. Por lo cual es el método que se usa a posteriori. La protección del aldehído se caracteriza por la desaparición de la señal del protón del aldehído y la aparición de las señales de los protones de grupo dioxolano a 4,04 y 5,75 ppm en RMN ¹H.

El aldehído **86** se prepara después de reducción con zinc del grupo nitro al amino **84**. Esta reacción de reducción también se intentó con otros reductores como NaBH₄, LiAlH₄ y reducción catalítica con H₂/Pd-C en etanol o en AcOEt, pero no se observó evolución en ninguna de estas condiciones.

El compuesto **84** se trata con yodometano y trietilamina para obtener el derivado metilado **85**, observándose la parcial desprotección del aldehído ya que se aísla la mezcla de **85/86** en proporción 3:1, esta mezcla se pone a desproteger con H₂O/HCl para transformarlo todo al

⁶⁴ Borhardt, R. T.; Huber, J. A.; Houston, M. Catechol *O*-Methyltransferase. 10. 5-Substituted 3-Hydroxy-4-methoxybenzoic Acids (Isovanillic Acids) and 5-Substituted 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehydes (Isovanillins) as Potential Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 258.

aldehído **86**. La metilación de **84** se intentó realizar con CH₃I utilizando K₂CO₃ como base pero en estas condiciones no se produce la reacción de metilación.

También se intentó preparar el compuesto **86** efectuando en primer lugar la desprotección del aldehído **84** y luego la metilación pero no se detecta evolución de la reacción de metilación.

Para la preparación de derivados monometilados en el grupo amino se procedió a la protección previa del mismo. Se utiliza como protector *tert*-butil dicarbonato⁶⁵, porque es fácil de eliminar en comparación con otros grupos protectores. A la hora de la protección del grupo amino se desprotege una parte del aldehído, por lo cual se obtiene una mezcla de dos compuestos con *N*-Boc, **92** con el aldehído protegido y **93** desprotegido en proporción 3:1. Los derivados protegidos se identifican por la aparición de la señal del grupo Boc a 1,52 ppm en RMN ¹H.

La metilación del grupo -NH-Boc de la mezcla obtenida anteriormente (**92+93**) se realiza con yodometano, hidruro sódico como base y THF como disolvente.⁶⁶ La reacción de metilación se produce con desprotección parcial del aldehído que se completa por hidrólisis ácida. El aldehído **95** se caracteriza por las señales del metilamino a 3,16 y del aldehído a 9,85 ppm en RMN ¹H.

Al cambiar el THF por DMF en la reacción de metilación se obtiene el compuesto protegido **94**⁶⁷ al 90 %, y cuando se prepara mediante la transferencia de fase no se observa ninguna evolución.

De todas formas, como es necesario desproteger el aldehído para continuar la secuencia, se utiliza el primer método donde se obtiene con una mayor parte desprotegida para reducir las etapas de reacción. El aldehído **95** se considera como la molécula base de esta secuencia, por lo cual se prepara en mayor cantidad.

⁶⁵ a) Chelucci, G.; Manca, I.; Pinna, A. G. Synthesis of regiospecifically substituted quinolines from anilines. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 767. b) Muchowski, J. A.; Venuti, M. C. Ortho Functionalization of *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)aniline. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4798.

⁶⁶ Wang, X-F.; Wang, S-B.; Ohkoshi, E.; Wang, L-T.; Hamel, E.; Qian, K.; Susan L. M-N.; Lee, K-H.; Xie, L. *N*-Aryl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: A novel class of antitumor agents targeting the colchicine site on tubulin. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 196.

⁶⁷ Pinto, A.; Neuville, L.; Retailleau, P.; Zhu, J. Synthesis of 3-(Diarylmethylenyl)oxindole by a Palladium-Catalyzed Domino Carbopalladation/C-H Activation/C-C Bond-Forming Process. *Org. Lett.* **2006**, *21*, 4927.

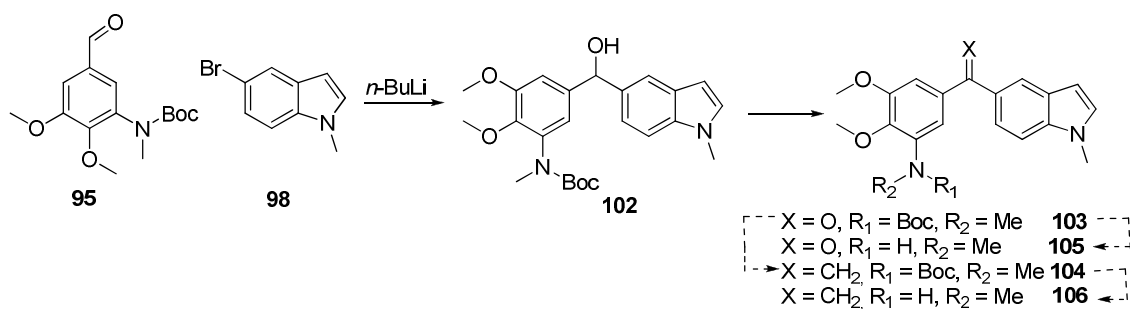


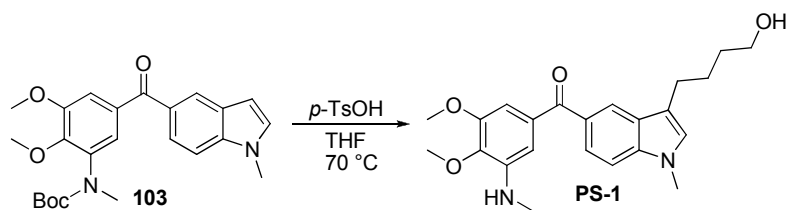
Figura 78: Esquema de síntesis de la fenstatina **105** y de la isocombretastatina **106**

El alcohol **102** (figura 78) se sintetiza a partir de la condensación del derivado litiado del bromo metil indol **98** con el aldehído **95**. La oxidación del alcohol **102** con PDC da la fenstatina **103** con un 83 %. Al contrario que en la secuencia anterior de la síntesis de las fenstatinas a partir del derivado nitrado **68** se obtiene un rendimiento muy aceptable, que indica que los productos con grupo nitro en la reacción de adición nucleofílica en presencia de *n*-BuLi se degradan con mayor facilidad. Por lo cual es conveniente sustituir el grupo nitro por otros grupos que favorecen la reacción en estas condiciones. Siguiendo el proceso habitual del trabajo, se prepara la isocombretastatina **104** a partir de **103**.

Para buscar las condiciones óptimas de desprotección del grupo Boc se realizó una prueba de desprotección del aldehído de partida **95**. Con *p*-TsOH en CH₂Cl₂ se observó la desprotección del grupo amino. Sin embargo, al realizar la desprotección de **103** en estas condiciones no se produce la desprotección.

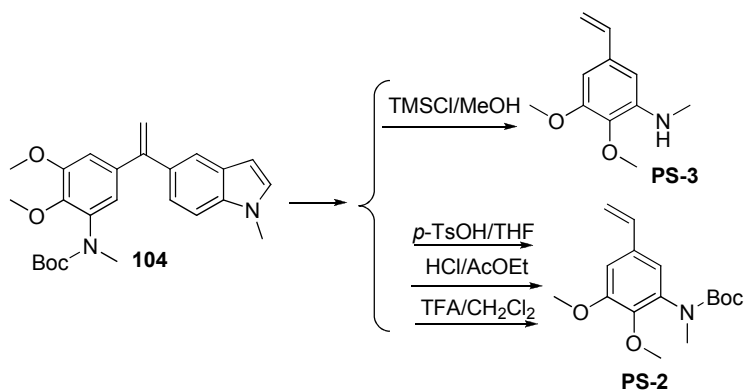
La desprotección del grupo *N*-Boc de la fenstatina **103** se consigue mediante su tratamiento con cloruro de trimetilsililo en MeOH⁶⁸ y se obtiene la fenstatina **105**. Cuando se utiliza ácido *p*-toluensulfónico en THF a reflujo se obtiene el compuesto desprotegido **PS-1**, producido porque la posición 3 del indol reacciona con apertura del THF en las condiciones ácidas de la reacción.

⁶⁸ Chen, B.-C.; Skoumbourdis, A. P.; Guo, P.; Bednarz, M. S.; Kocy, O. R.; Sundeen, J. E.; Vite, G. D. A Facile Method for the Transformation of *N*-(tert-Butoxycarbonyl) α -Amino Acids to *N*-Unprotected α -Amino Methyl Esters. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9294.

Figura 79: Formación del compuesto secundario **PS-1**

La isocombretastatina **104** se intentó desproteger con TMSCl/MeOH como en el caso de la fenstatina **103** pero la molécula se rompe y se aísla el producto de degradación y desprotección **PS-3**. Luego se probó también $p\text{-TsOH}/\text{THF}$ a temperatura ambiente y a reflujo, $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ⁶⁹ y HCl/AcOEt , en estos casos se identifica el mismo producto de degradación pero con el grupo amino todavía protegido en forma de Boc. Por lo cual es necesario buscar otra alternativa para preparar la isocombretastatina monometilada **106**.

El compuesto secundario **PS-2** se identifica por RMN^1H , donde se muestra que la molécula sigue manteniendo el grupo Boc y se ha roto en el puente, apareciendo las señales características del grupo vinilo. En el compuesto **PS-3** no se aparece la señal de grupo Boc.

Figura 80: Formación del compuesto secundario **PS-2**

Ante la imposibilidad de conseguir la desprotección de **104**, la isocombretastatina **106** se prepara a partir de la fenstatina desprotegida **105**. Esta reacción se produce con un rendimiento bajo que se puede atribuir a la reacción del protón ácido del grupo amino con el $n\text{-BuLi}$ empleado como base.

⁶⁹ Mitsunaga, S.; Ohbayashi, T.; Sugiyama, Shimpei.; Saitou, T.; Tadokoro M.; Satoh, T. Asymmetric synthesis of cyclic α -amino acid derivatives by the intramolecular reaction of magnesium carbenoid with an N-magnesiarylamine. *Tetrahedron. Asym.* **2009**, 20, 1697.

Compuestos	Rendimiento	Desplazamiento químico	Estructuras
103	83 %	4,6 : 7,23 y 7,28 ppm; 4' : 8,11 ppm	
104	56 %	4,6 : 6,76 y 6,81 ppm; 4' : 8,17 ppm	
105	47 %	Puente: singletes a 5,36 y 5,42 ppm; 6,4 : 6,78 y 7,27 ppm; 4' : 7,60 ppm	
106	27 %	Puente: singletes a 5,17 y 5,21 ppm; 6,4 : 6,19 y 6,23 ppm; 4' : 7,63 ppm	

Tabla 6: Rendimiento y desplazamiento químico de los protones aromáticos de **103-106**

En esta serie de compuestos, las fenstatina se obtienen con buen rendimiento, en comparación con los índoles partidos del derivado nitro, que se obtienen con un rendimiento muy pobre, mientras en el caso de las isocombretastatinas, el rendimiento se disminuye porque se obtienen productos secundarios, como consecuencia de la degradación de la molécula.

2. Síntesis de análogos de combretastatina:

El objetivo del trabajo se completa con la serie de combretastatinas con los mismos sustituyentes del anillo A introducidos en fenstatinas.

2.1 Síntesis de los derivados *p*-metoxifenilo:

Se inicia la síntesis por reacción del aldehído **68** con el iluro de fósforo preparado a partir de la sal de fosfonio **5**. Mediante la reacción de Wittig se forma la combretastatina **78** como mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:2 con un rendimiento global de 94 %. Se identifican por la aparición de las señales de los protones del puente en RMN ¹H de ambos isómeros, el isómero *Z* a 6,35 y 6,61 ppm y el isómero *E* a 6,82 y 6,99 ppm.

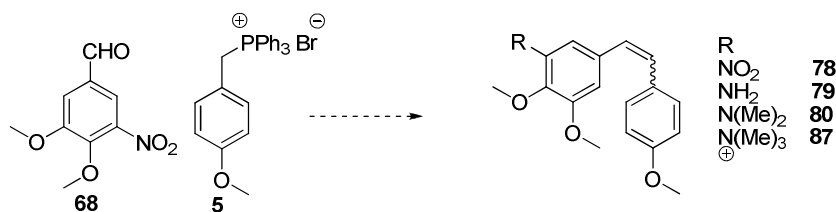


Figura 81: Síntesis de las combretastatinas

La reducción del grupo nitro a amino en la mezcla *Z/E* 1:2 de **78** se efectúa con zinc y ácido acético dando **79** una mezcla de isómeros *Z/E* 1:3 con un rendimiento del 98 %. **79** se caracteriza por el apantallamiento en RMN ^1H de los protones aromáticos del anillo A por el grupo amino (6,32 y 6,38 ppm del isómero *Z*) en relación al anillo A sustituido por un grupo nitro.

La metilación del grupo amino de la combretastatina **79** con yodometano en acetona produce la dimetilamino-combretastatina **80** como una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:3 y con un rendimiento de 88 %. Se identifica por la aparición de los protones del dimetilamino a 2,86 ppm en RMN ^1H .

Con el fin de mejorar la proporción del isómero con configuración *Z* se probó la reacción de Wittig con el aldehído **86** que contiene el grupo dimetilamino y en este caso la proporción *Z/E* obtenida es 1:1 y con un rendimiento similar a la preparación de **78**. La igualdad en la proporción de los isómeros permite el aislamiento de cada uno de ellos.

Figura 82: Preparación de la combretastatina **80**

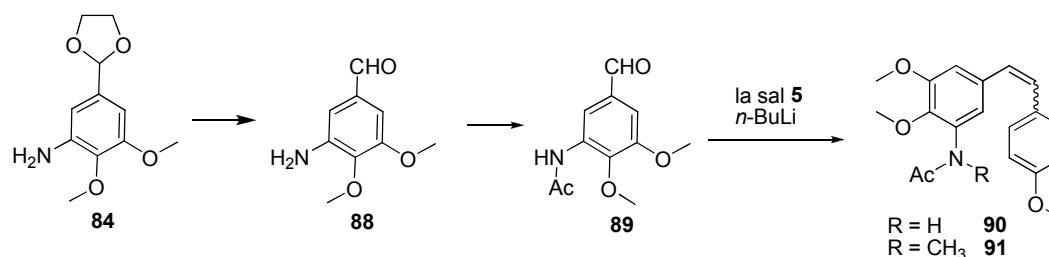
A partir del isómero *Z* de combretastatina **80** se prepara la sal de amonio **87**, que se obtiene como isómero *Z* puro. La reacción de metilación conserva la configuración del doble enlace.

Compuestos	Rendimiento	Proporción	Desplazamiento químico (<i>Z</i> y <i>E</i>)
78	94 %	<i>Z/E</i> 1:2	(<i>Z</i>): 6,24 y 6,55 ppm; $J= 12,0$ Hz (<i>E</i>): 6,78 y 6,96 ppm; $J= 16,4$ Hz
79	98 %	<i>Z/E</i> 1:3	(<i>Z</i>): 6,27 y 6,39 ppm; $J= 12,0$ Hz (<i>E</i>): 6,76 y 6,89 ppm; $J= 16,0$ Hz
80	88 %	<i>Z/E</i> 1:1	(<i>Z</i>): 6,40 y 6,48 ppm; $J= 12,0$ Hz (<i>E</i>): 6,48 y 6,85 ppm; $J= 16,4$ Hz
87	49 %	<i>Z</i> solo	2 dobletes a 6,50 y 6,70 ppm; $J= 12,0$ Hz

Tabla 7: Rendimiento y desplazamiento químico de los protones olefínicos de **78-80** y **87**

Además de esta secuencia que permitió obtener las agrupaciones (NMe_2) y ($^+\text{NMe}_3$) en el anillo A de la combretastatinas se decidió introducir las agrupaciones (NHAc) y (NMeAc).

Por ello se empieza la síntesis por la desprotección del aldehído **84** por hidrólisis para obtener **88**, luego el grupo amino para formar la amida **89** con un rendimiento del 72 %. Se identifican por la aparición de la señal del metilo del grupo acetato a 2,21 ppm en RMN ^1H .

Figura 83: Preparación de la combretastatina **91**

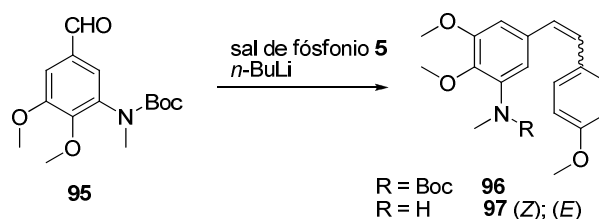
La combretastatina **90** se obtiene a partir de la reacción de Wittig de **89** con la sal de fosonio **5**. En esta reacción se obtiene mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:3. El producto *Z* se purifica por cromatografía de columna y una de las fracciones de la mezcla de isómeros *Z/E* (1:1) se trata con yodometano en presencia de la base de hidruro sódico formándose el producto metilado **91** como isómeros *Z/E* 2:1. Eso significa que la metilación en estas condiciones favorece la isomerización de *E* a *Z*. La formación del compuesto **91** se identifica por la aparición de la señal de los protones de *N*-Me a 3,13 ppm en RMN ^1H . En la tabla siguiente se muestran los desplazamientos químicos de los protones olefínicos *Z/E* de **90** y **91**.

compuesto	Rendimiento	Desplazamiento químico de los protones del puente de los isómeros	<i>J</i> en Hz
90	55 %	(<i>Z</i>): 6,45; 6,49 ppm	12,0
		(<i>E</i>): 6,89; 6,97 ppm	16,4
91	72 %	(<i>Z</i>): 6,38; 6,54 ppm	12,0
		(<i>E</i>): 6,85; 6,94 ppm	16,0

Tabla 8: Rendimiento y desplazamiento químico de los protones olefínicos de **90-91**

El objetivo siguiente era obtener el grupo metilamino de la combretastatina de esta familia para comparar su actividad biológica con otros derivados. Como no ha sido posible obtenerlo a partir de una monometilación se protege el grupo amino y metila para obtener el aldehído **95** descrito anteriormente.

La combretastatina **96** se prepara a partir de la reacción de Wittig del aldehído **95** y el iluro de la sal de fosfonio **5**. Esta reacción se obtiene como mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:2. En este caso la proporción del isómero *cis* es relativamente mayor que las veces anteriores (1:3), por lo cual, el grupo Boc afecta a la proporción de los estereoisómeros.

Figura 84: Síntesis de las combretastatinas **97**

La desprotección del grupo *tert*-butil carbamato hay que realizarla en condiciones que no se produzca isomerización *Z/E*, por lo que se hicieron varios intentos con diferentes reactivos. Al principio se desprotegió el isómero *E* con *p*-TsOH en THF a reflujo, y se obtuvo el compuesto **97** manteniendo la configuración *E*. La desprotección del isómero *Z* con el mismo procedimiento transforma todo al isómero *E*. Se realizó a temperatura ambiente, pero no se observó ninguna evolución, por lo cual fue necesario buscar otras condiciones.

En la tabla siguiente se muestran las condiciones ensayadas para la desprotección de los isómeros *Z* y *E* de la combretastatina **96**, que se realizaron en tubo de RMN para poder hacer el seguimiento de la reacción.

Condiciones de reacción	Compuesto	Resultados obtenidos
p-TsOH/THF/ Δ	Isómero <i>E</i>	El isómero <i>E</i> desprotegido
p-TsOH/THF/ Δ	Isómero <i>Z</i>	El isómero <i>E</i> desprotegido
TFA/CH ₂ Cl ₂	Isómero <i>Z</i>	No reacciona
TFA/Acetona	Isómero <i>Z</i>	No reacciona
HCl (3M)/AcOEt	Isómero <i>Z</i>	Isómero <i>Z</i> mayoritario
TMSCl/MeOH y MeOD	Isómero <i>Z</i>	Isómero <i>Z</i> mayoritario

Tabla 9: Condiciones probadas para desprotección de los isómeros de **96**

Por ello, la desprotección del isómero *Z* se realizó con (TMSCl/MeOH), obteniéndose el isómero *Z* como mayoritario (*Z/E* en proporción 6:4), purificándose por cromatografía de columna.

Las combretastatinas obtenidas se caracterizan por la desaparición de las señales de los protones del grupo Boc en RMN ¹H. En la tabla siguiente se muestra los rendimientos y los desplazamientos químicos de las señales de **96** y **97**.

compuesto	Rendimiento	Desplazamiento químico de los protones del puente de los isómeros	<i>J</i> en Hz
96	96 %	(<i>Z</i>): 6,36; 6,46 ppm	12,0
		(<i>E</i>): 6,85; 6,93 ppm	16,4
97 (<i>Z</i>)	49 %	(<i>Z</i>): 6,33; 6,37 ppm	12,0
97 (<i>E</i>)	57 %	(<i>E</i>): 6,92; 6,95 ppm	16,0

Tabla 10: Rendimiento y desplazamiento químico de los protones olefínicos de **96** y **97**

2.2 Síntesis de los derivados *p*-dimetilaminofenilo:

En esta parte se sintetiza los derivados de combretastatina con dimetilaminofenilo en anillo B y en el anillo A, 3-amino-4,5-dimetoxifenilo.

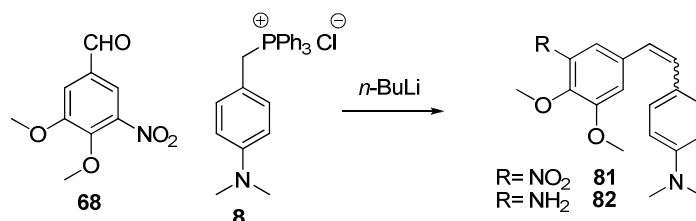


Figura 85: Preparación de la combretastatina **82**

La reacción de Wittig entre el aldehído **68** y el iluro de la sal de fosfonio **8** produce la combretastatina **81** como mezcla *Z/E* en proporción 1:3, que se separan por cromatografía de columna.

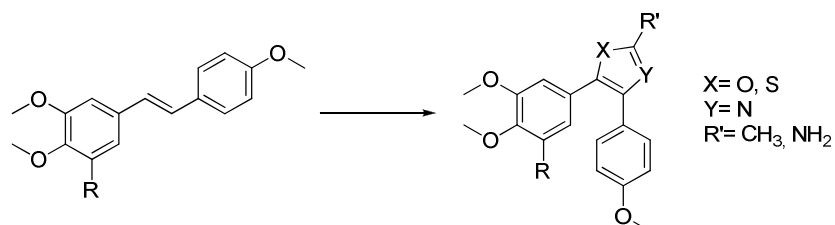
La reducción del isómero *Z* de **81** con zinc y ácido acético produce **82** como una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 3:1, que se separan por cromatografía de columna.

compuesto	Rendimiento	Desplazamiento químico de los protones aromáticos del anillo A
81	47 %	(<i>Z</i>): dobletes : 7,09; 7,26 ppm
		(<i>E</i>): singletes: 7,16; 7,40 ppm
82	69 %	(<i>Z</i>): dobletes: 6,34; 6,38 ppm
		(<i>E</i>): dobletes: 6,48; 6,53 ppm

Tabla 11: Rendimiento y desplazamiento químico de los protones olefínicos de **81** y **82**

III. Modificación en el puente

El objetivo de esta parte del trabajo es intentar mejorar la actividad y la solubilidad de las combretastatinas sintetizadas, a partir de la formación de heterociclos pentagonales como oxazoles, tiazoles, imidazoles,...



Nuestro grupo de trabajo ha preparado anteriormente, a partir de diversos análogos de combretastatinas, derivados heterocíclicos aromáticos pentagonales (pirazoles, oxazoles y isoxazoles) y hexagonales (pirimidinas, pirazinas)⁷⁰.

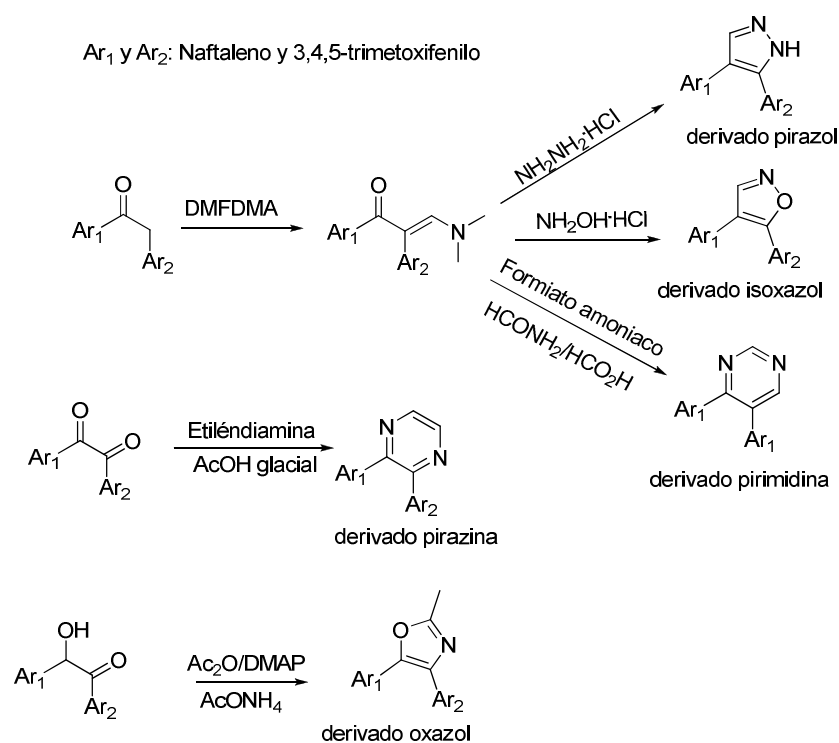


Figura 86: Síntesis de puentes heterocíclicos pentagonales y hexagonales

⁷⁰ Maya, A. B. S.; Pérez, C. M.; Salvador, N.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. New naphthylcombretastatins. Modifications on the ethylene bridge. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2097.

Las enaminonas se preparan por la reacción de diariletanona con DMFDMA (dimetilacetal de la *N,N*-dimetilformamida) en tolueno seco.

Los anillos de pirazol se han obtenido por el tratamiento de enaminonas con clorohidrato de hidracina en EtOH seco. Los isoxazoles se obtienen tras su tratamiento con clorohidrato de hidroxilamina en MeOH. Los oxazoles se preparan por reacción de hidroxi-etanonas con anhídrido acético, DMAP y AcONH₄.

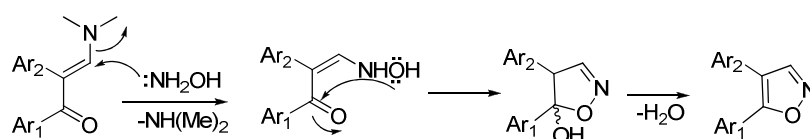


Figura 87: Mecanismo de formación de diarilisoaxoles

Se observó que en este caso la reacción es regioselectiva, se obtiene solo el producto del ataque nucleofílico del nitrógeno de hidroxilamina a la posición β de la enaminona y no al grupo carbonilo, de acuerdo con lo que está descrito en la bibliografía para esta reacción⁷¹.

A partir de las aminación reductiva de Leuckart con formiato amónico de las enaminonas se puede obtener los heterocíclicos hexagonales de una forma regioselectiva según el mecanismo⁷² descrito en el esquema siguiente:

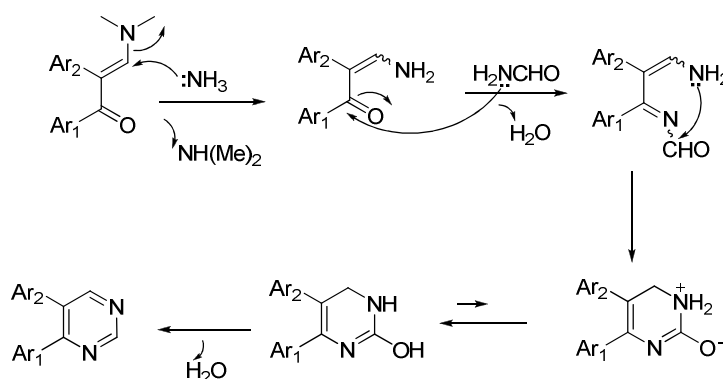


Figura 88: Mecanismo de formación de diarilpirimidinas

⁷¹ Dominguez, E.; Ibeas, E.; de Marigorta, E. M.; Palacios, J. Kepa.; SanMartin, R. A convenient one-pot preparative method for 4,5-diarylisoaxazoles involving amine exchange reactions. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5436.

⁷² a) Dominguez, E.; de Marigorta, E. M.; Olivera, R.; SanMartin, R. A short and efficient synthesis of 4,5-diarylpyrimidines. *Synlett.* **1995**, 9, 955. b) Olivera, R.; SanMartin, R.; Tellitu, I.; Dominguez, E. The amine exchange/biaryl coupling sequence: a direct entry to the phenanthro[9,10-*d*]heterocyclic framework. *Tetrahedron.* **2002**, 58, 3021.

Se han observado que al formar puentes heterocíclicos pentagonales se mejora notablemente la actividad citotóxica de los compuestos en comparación con el puente etileno, mientras los puentes más voluminosos como hexagonales ó bicíclicos no son adecuados para generar compuestos activos de esta familia.

La síntesis más frecuente de tiazoles es a partir de la halocetona^{16,73}. Para obtenerla se trata el compuesto con NBS y DMSO-H₂O para formar la halohidrina luego se oxida con anhídrido trifluoroacético (TFAA) en DMSO para formar bromocetona, ó a partir de oxidación de la olefina con acido peryódico y alumina para formar el derivado bencilfenilcetona⁷⁴, que se trata con el bromo en cloroformo para formar bromocetona. Este último se condensa con tiourea ó sus derivados (tioacetamida, tiosemicarbazida) y Na₂CO₃ en DMF para obtener los derivados tiazoles correspondiente⁷⁵.

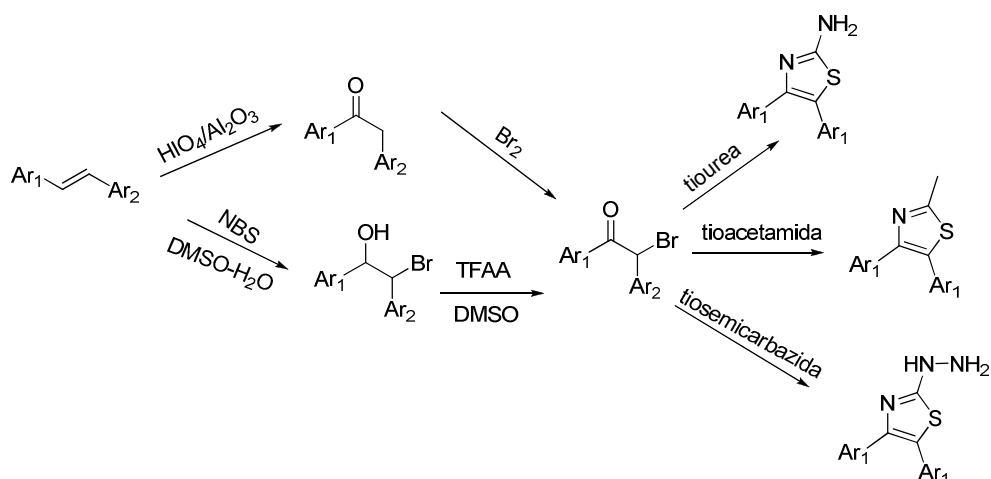


Figura 89: Síntesis de derivados tiazoles

⁷³ Aberle, N.; Catimel, J.; Nice, E. C.; Watson, K. G. Synthesis and biological evaluation of analogues of the anti-tumor alkaloid naamidine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *20*, 5879.

⁷⁴ Khalilzadeh, M. A.; Hosseini, A.; Shokrollahzadeh, M.; Halvagar, M. R.; Ahmadi, D.; Mohannazadeh, F.; Tajbakhsh, M. HIO₄/Al₂O₃ as a new system for iodination of activated aromatics and 1,3-dicarbonyl compounds. *Tetrahedron. Lett.* **2006**, *47*, 3525.

⁷⁵ Walter, M.; von Coburg, Y.; Isensee, K.; Sander, K.; Ligneau, X.; Camelin, J. -C.; Schwartz, J. -C.; Stark, H. Azole derivatives as histamine H₃ receptor antagonists, Part I: Thiazol-2-yl ethers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5879.

➤ Funcionalización del puente oléfinico en las combretastatinas **80** y **78**:

Siguiendo el objetivo del trabajo y tomando como base los trabajos bibliográficos detallados anteriormente para formar heterociclos en el puente, en esta memoria se intentó la preparación de análogos pentagonales.

En primer lugar se intentó preparar el anillo de dihidro-oxazol mediante la formación de un bromo-amida en el puente y posterior ciclación y oxidación.⁷⁶ Para ello se siguieron las condiciones descritas en bibliografía aplicable a doble enlaces conjugados con anillos aromáticos o aislados y que consisten en el tratamiento con NBS, NaHCO₃, H₂O, CH₃CN y un ácido de Lewis Zn(OTf)₂ o Cu(OTf)₂. Se utiliza una pequeña cantidad de agua para evitar la posible formación de una halohidrina.

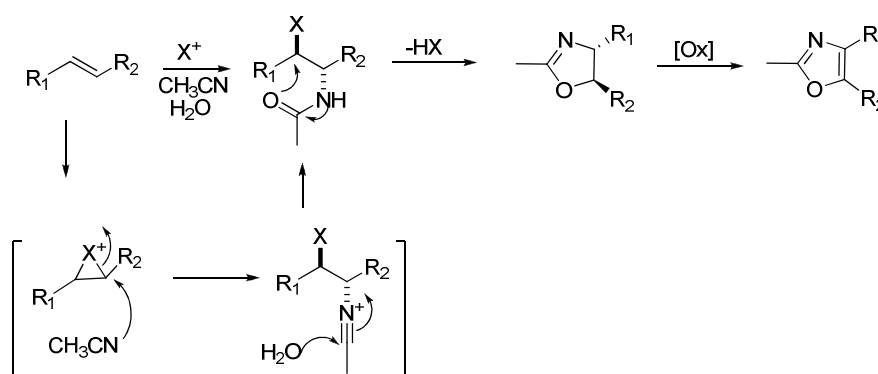
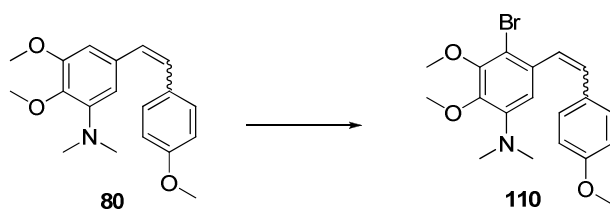


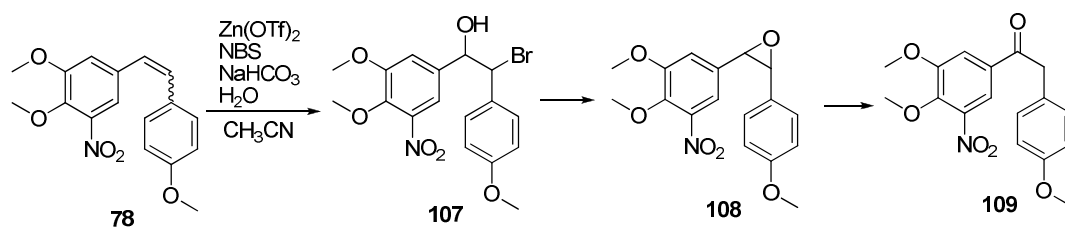
Figura 90: Mecanismo para la formación del dihidro-oxazol precursor del oxazol

Siguiendo el procedimiento detallado por Saumen et al, se utilizala mezcla de isómeros *Z/E* de combretastatina **80** controlando la reacción por cromatografía de capa fina durante 72 h. No se forma el compuesto esperado y en su lugar se identifica el compuesto de bromación en el anillo más activado, **110**, como mezcla *Z/E* 1:1. Se caracteriza por la aparición de una sola señal de protón del anillo A a 6,58 ppm como sínglete en RMN ¹H, y por espectrometría de masas que indica la presencia del átomo de bromo.

⁷⁶ Saumen, H.; Sukanta, B.; Derarshi, S.; Biswajit, M. Stereoselective One-Pot Synthesis of Oxazolines. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4320.

Figura 91: formación de **110**

En el caso de **78** cuando se trata en las mismas condiciones que **80**, se observa la evolución de la reacción con el tiempo, controlándose por RMN ^1H . Después de 48 h de reacción se observó la formación de la halohidrina **107**, y al cabo de dos días se transforma en el epóxido **108**. Durante el proceso de extracción de la reacción el epóxido se transforma en la cetona **109** que se caracteriza por los datos de RMN, IR y masas.

Figura 92: Modificación en el puente de la combretastatina **78**

La formación de estos intermedios de reacción se identifica por el desplazamiento químico de los protones del puente. En la tabla siguiente se muestra las variaciones de los valores del desplazamiento químico de los protones observados durante la evolución de esta reacción.

compuesto	Desplazamiento químico en ppm		
	Anillo A	Anillo B	Puente
107	7,08 y 7,32	6,83 y 7,16	5,02 y 5,15
108	7,03 y 7,30	6,88 y 7,22	4,20
109	7,72 y 7,98	6,86 y 7,15	4,18

Tabla12: Desplazamiento químico de los compuestos **107**, **108** y **109**

Los desplazamientos químicos de los protones del anillo aromático A son los más afectados y su desapantallamiento permite identificar la posición de la cetona en los dos carbonos del puente.

Se observa que en el caso de **80** el grupo dimetilamino favorece la sustitución en el anillo A, mientras en el caso de **78** el grupo nitro desactiva la posible reacción en el anillo A y se dirige la reacción al etileno del puente.

Utilizando también los compuestos **78** y **80**, se intentó la preparación de oxazoles y tiazoles en el puente utilizando tiourea y urea con Zn(OTf)₂, NBS, NaHCO₃, H₂O en CH₂Cl₂ y en CH₃CN a temperatura ambiente y a reflujo. En el caso de **80** se forma nuevamente el compuesto bromado **110** y en el caso de **78** se recupera el material de partida. En la tabla siguiente se muestra el resumen de las reacciones de tiourea y la urea realizadas.

Compuestos	Reactivos	Resultados
80	Zn(OTf) ₂ , NBS, p-TsOH, tiourea, CH ₂ Cl ₂	110
	Zn(OTf) ₂ , NBS, NaHCO ₃ , H ₂ O, tiourea, CH ₂ Cl ₂	110
	Zn(OTf) ₂ , I ₂ , NaHCO ₃ , H ₂ O, tiourea, CH ₂ Cl ₂	80
78	Zn(OTf) ₂ , NBS, NaHCO ₃ , H ₂ O, tiourea, CH ₂ Cl ₂	78
	Zn(OTf) ₂ , NBS, NaHCO ₃ , urea, CH ₃ CN	78

Tabla13: condiciones de reacción de **80** y **78**

En el caso de sustituir NBS por I₂, no se observa la evolución de reacción y se obtiene el material de partida **80** sin reaccionar.

En este trabajo no se logró formar puentes pentagonales a partir de puentes etilénicos (combretastatinas) empleando las metodologías ensayadas. La formación de este tipo de derivados pentagonales con agrupaciones 2,3-dimetoxi-4-aminofenilo como anillo A son de gran interés y serán objetivo de trabajos futuros.

IV. SOLUBILIDAD

La baja solubilidad acuosa es uno de los problemas que presentan los análogos de combretastatina A-4, por lo cual uno de los objetivos de este trabajo es determinar la solubilidad de los compuestos sintetizados para comprobar si las modificaciones introducidas en el esqueleto de la molécula conducen a compuestos más solubles en agua.

La determinación de la solubilidad acuosa se ha llevado a cabo en un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia de la muestra problema a una longitud de onda y comprobando con una recta de calibrado realizada previamente.

En la determinación de la solubilidad de los compuestos se ha seguido la metodología siguiente:

- Determinación de las longitudes de onda de absorción máxima en el espectrofotómetro para cada compuesto.
- Realización de la recta de calibrado a partir de disoluciones de concentración conocida (0,1 mg/ml). Las medidas se realizan en una mezcla DMSO/tampón fosfato a pH 7 en relación 9/1.
- Preparación de las muestras problema. Se pesa entre 1 y 2 mg de compuesto y se añaden 300 μ L de tampón fosfato 10 mM a pH= 7, que se mantienen un mínimo de 48 horas agitando para después filtrar el contenido a través de un filtro de 22 μ m, de manera que se retira todo el compuesto que no se haya solubilizado en el tampón. Se preparan tres cubetas con 30 μ L de filtrado y 270 μ L de DMSO y se mide la absorbancia a la longitud de onda escogida, obteniendo de esta manera tres valores de solubilidad, con los que hace la media aritmética.

En la tabla siguiente se muestran los resultados obtenidos:

N°	λ seleccionada (nm)	Solubilidad ($\mu\text{g/ml}$)	N°	λ seleccionada (nm)	Solubilidad ($\mu\text{g/ml}$)
12	360	48	51	330	679
13	360	30	52	290	65
14	340	9	54	290	11
15	280	11	55	275	21
16	305	107	57	275	153
17	280	123	61	280	4,4 mg/ml
18	300	84	62	285	1,0 mg/ml
20	285	$\approx 2,5$ mg/ml	66	350	>5 mg/ml
21	308	74	71	290	110
22	295	$\approx 1,5$ mg/ml	73	275	102
33	305	33,8	80	295	71
34	275	583	82	330	6,7
35	285	136	87	310	1,0 mg/ml
36	340	10,5	90	295	48
37	290	13,5	91	290	44
40	275	62	97	285	52
50	320	44	104	280	6,3
CA-4 ⁷⁷	-	1,0	105	290	10

Tabla 14: Valores de solubilidad de los compuestos sintetizados. Se han sombreado los valores de las sales de amonio

En la gráfica siguiente se muestra la esperada diferencia de solubilidad entre los derivados de la combretastatina sintetizados y sus sales de amonio correspondiente.

⁷⁷ Chen, J.; Wang, Z.; Li, C. M.; Lu, Y.; Vaddady, Pavan. K.; Meibohm, B.; Dalton, J. T.; Miller, D. D.; Li, W. Discovery of Novel 2-Aryl-4-benzoyl-imidazoles Targeting the Colchicines Binding Site in Tubulin As Potential Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7414.

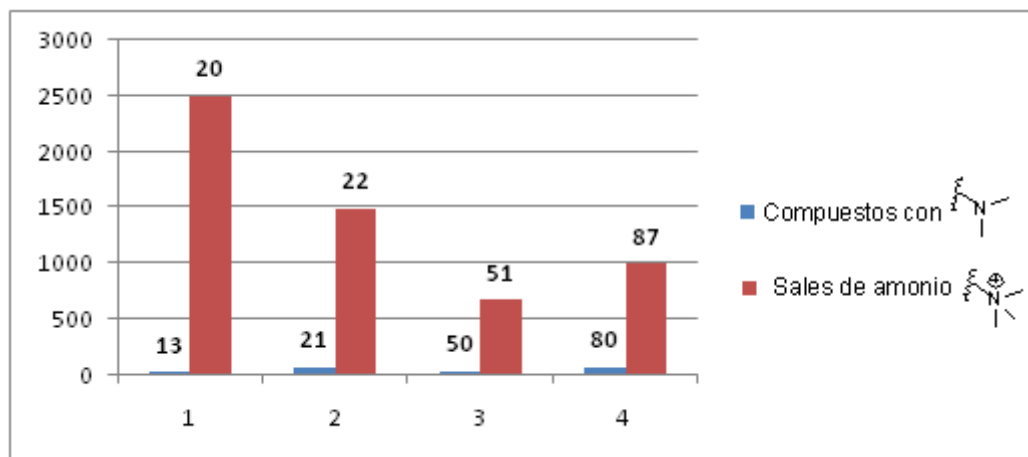


Figura 93: La diferencia de solubilidad en ($\mu\text{g/ml}$) de los derivados nitrogenados y sus sales de amonio

De la tabla anterior se observa que la mayoría de los compuestos no cargados ensayados presentan un valor muy superior a la de la combretastatina A-4, y en muchos casos (**16**, **17**, **35**, **57**, **71**, **73**) más de cien veces mayor o incluso quinientas veces más mayor como en el caso del compuesto **34**. Aparte de las sales de amonio, los compuestos con oximas en el puente y que en el anillo B tienen un grupo nitrogenado presentan las solubilidades más elevadas, además la sustitución del grupo metoxilo por grupo amino aumenta notablemente la solubilidad del compuesto.

Como cabía esperar y se observa en el histograma las sales de amonio aumentan considerablemente la solubilidad acuosa de sus homólogos neutros. En comparación con la combretastatina A-4 los compuestos sustituidos con grupos nitrogenados mejoran apreciablemente la solubilidad acuosa del compuesto, cumpliéndose uno de los objetivos de este trabajo.

En el siguiente apartado se muestran los resultados de actividad biológica de estos compuestos, de manera que será posible determinar si los compuestos propuestos y sintetizados cumplen con los dos objetivos planteados: aumentar la solubilidad acuosa y la potencia antimetabólica.

V. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Otro de los objetivos de este trabajo es la realización de los ensayos *in vitro* de inhibición de la polimerización de tubulina para evaluar si los compuestos sintetizados poseen la actividad biológica que se pretende. Para ello, se utiliza proteína microtubular aislada y purificada a partir de cerebros de ternero.

1. Aislamiento de la proteína

El método seguido en nuestro laboratorio para el aislamiento y la purificación de la proteína microtubular es el método de Shelanski⁷⁸, con algunas modificaciones.

La proteína se aísla de cerebro de ternero recién sacrificado mediante dos ciclos de polimerización/despolimerización, dependiente de la temperatura. A 37 °C se forman los microtúbulos (polimerización) y por el contrario se despolimeriza a 4 °C. Mediante centrifugaciones después de cada polimerización/despolimerización y seleccionando precipitado (a 37 °C) o sobrenadante (a 4 °C) se va purificando la proteína.

El esquema siguiente representa el proceso del aislamiento desde los cerebros hasta la separación de la proteína que se utiliza en los ensayos de inhibición de polimerización de tubulina (IPT).

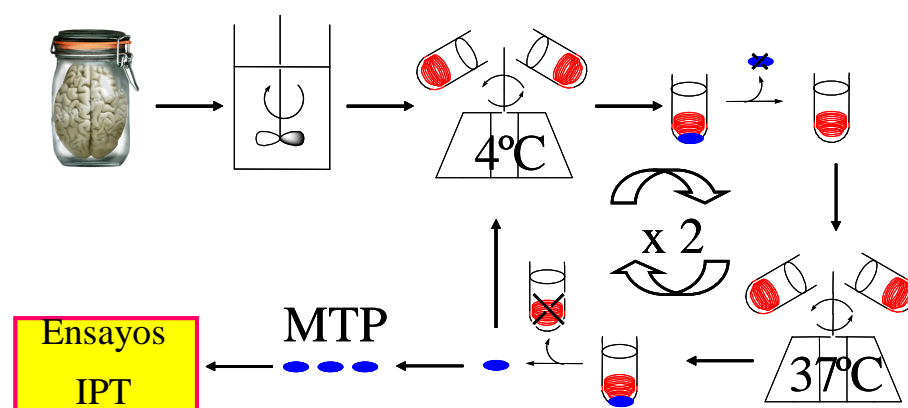


Figura 94. Proceso de aislamiento de tubulina

⁷⁸ Shelanski, M. L.; Gaskin, F.; Cantor, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1973**, 70, 765.

La proteína microtubular (MTP) aislada mediante este proceso está formada por subunidades α y β tubulina en un 70 % y por proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) en un 30 %.

2. Ensayos de inhibición de polimerización de tubulina

Los ensayos se realizan en cubetas de cuarzo que contienen 1,0 mg/mL de proteína microtubular (MTP) en un tampón a pH 6,7 que contiene el GTP y Mg^{2+} necesario para la polimerización de la tubulina, y los ligandos a una concentración de 5, 10 ó 20 μ M. Los ensayos se realizan en un espectrofotómetro y se mide la turbidez generada por la formación de microtúbulos a 450 nm, longitud de onda a la que los ligandos sintetizados no absorben. En cada ensayo se utiliza como referencia una cubeta control sin ligando.

Para evitar problemas de solubilidad, todos los compuestos utilizados se disuelven en DMSO, siendo la concentración máxima de DMSO en la cubeta de un 4 %, concentración que no afecta a los ensayos de polimerización de la tubulina⁷⁹.

El ensayo se inicia a 4 °C. A esta temperatura la proteína se encuentra despolimerizada por lo que se registra una absorbancia mínima. Posteriormente se aumenta la temperatura a 37 °C, la proteína polimeriza y se observa un incremento en la absorbancia debido a la turbidez que generan los microtúbulos. El incremento de absorbancia registrado para la cubeta control, sin ligando, se considera el 100 % de polimerización y se calcula el porcentaje de inhibición de los ligandos ensayados comparando su incremento en la absorbancia con el de la cubeta control.

Los ensayos se realizan inicialmente a una concentración de 5, 10 ó 20 μ M. Los compuestos que a estas concentraciones presentan un elevado porcentaje de inhibición se seleccionan para calcular su IC_{50} (concentración a la que el ligando inhibe la polimerización en un 50 %).

La elección de estas concentraciones viene determinada por la IC_{50} de la CA-4, compuesto de referencia de este trabajo. Para que los compuestos sintetizados presenten una potencia similar o mejor que la CA-4^{20,80} deben inhibir la polimerización de la tubulina en más de 50 % a una concentración de 5 μ M.

⁷⁹ Durmotier, C.; Gorbunoff, M.; Andreu, J. M.; Engelborghs, Y. Different kinetic pathway of the binding of two biphenyl analogues colchicines to tubulin. *Biochemistry*. **1996**, *35*, 4387.

⁸⁰ Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A.; Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033.

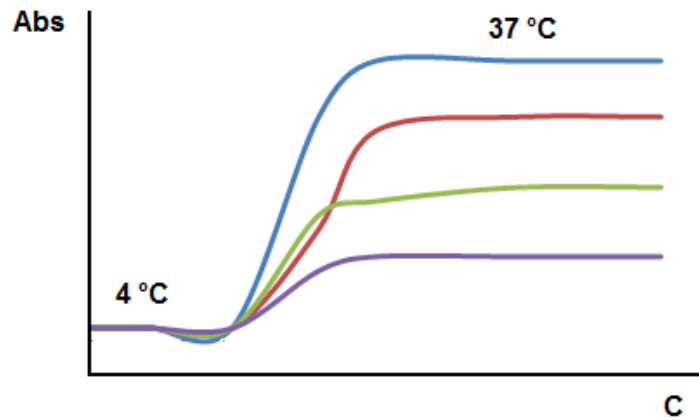


Figura 95. Ejemplo de grafica de un ensayo de inhibición de polimerización de tubulina. La diferencia entre la línea roja que representa el 100% de polimerización y cada una de las muestras (resto de líneas de colores) se corresponde con la inhibición que ejerce ese compuesto (%) a la concentración ensayada.

En la tabla siguiente se muestran los resultados de los compuestos ensayados en las concentraciones de 5, 10 y/o 20 μM .

COMP	CONC (μM)	INHIB %	COMP	CONC (μM)	INHIB %	COMP	CONC (μM)	% INHIB	COMP	CONC (μM)	INHIB %
12	5	25	33	5	0	54	10	16	79	5	74
13	5 20	90 100	34	5	26	55	5	5	80	5	92
14	5 20	4 20	35	5	0	56	5	12	82	5	25
15	5	43	36	10	0	57	5	0	87	5 20	16 32
16	5 10	14 19	37	10	11	59	5 20	0 30	90	5	3
17	5	15	39	5 20	35 57	60	5	0	91	5	23
18	5	35	40	5	16	61	5	12	96	5 10	14 43
19	5	2	43	5	23	62	5	11	97Z	5	85

20	5	22	44	5 10	25 32	64	5 20	0 5	104	5	3
21	5 10	7 23	45	5	12	65	5 20	0 50	105	5	97
22	5	22	50	5 10	55 65	66	5	12	111	5	0
25	5	31	51	5	0	71	5	28	112a	5	25
26	5	35	52	5	7	73	5	63	112b	5	0
28	5	73	53	5	23	74	5 10	47 64	113	5	0

Tabla 15: Resultados de los ensayos de inhibición de la polimerización de tubulina. Se han sombreado los compuestos seleccionados para calcular su IC₅₀.

3. Determinación de la IC₅₀ de inhibición de la polimerización de la tubulina:

En este trabajo se ha realizado los ensayos de inhibición de polimerización de tubulina de 56 compuestos, a una concentración de 5, 10 ó 20 μM . Los resultados que se muestran en la tabla 15 constituyen una media de los valores obtenidos en los ensayos, los cuales se han hecho por duplicado o triplicado. Teniendo en cuenta estos resultados iniciales, los compuestos **13**, **73**, **74**, **79**, **80**, **97Z** y **105** se seleccionan para calcular su IC₅₀ ya que presentan una inhibición de la polimerización de la tubulina superior al 50 % cuando se emplean a una concentración de 5 μM .

Para calcular la IC₅₀ de los diferentes ligandos inhibidores de polimerización de tubulina se ensaya cada compuesto a diferentes concentraciones (generalmente 0,5, 1, 2, 4, 5, 10 y 20 μM) y se representa el porcentaje de polimerización frente a cada concentración ensayada. Los datos así representados se ajustan a una ecuación monoexponencial decreciente, de manera que es posible calcular la concentración a la que el compuesto inhibe la

polimerización de la proteína en un 50 %. El ajuste de los datos y el cálculo de la IC_{50} se ha llevado a cabo con el programa OriginPro 8⁸¹.

En la tabla siguiente se muestran los resultados de los compuestos que han sido seleccionados para calcular la IC_{50} .

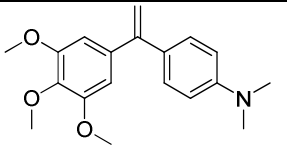
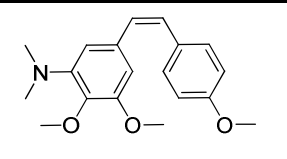
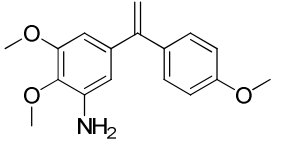
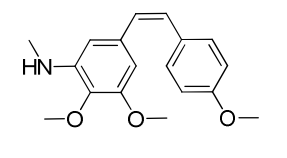
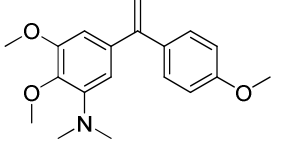
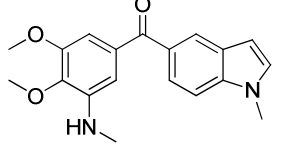
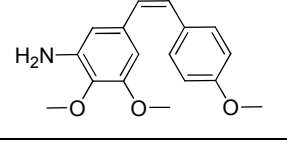
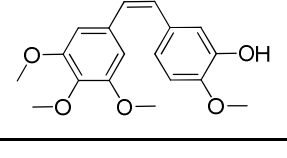
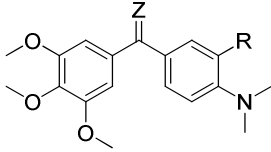
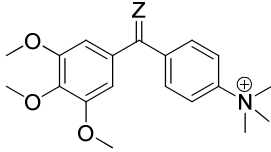
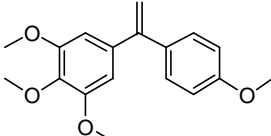
COMP	Estructura	IC_{50} (μ M)	COMP	Estructura	IC_{50} (μ M)
13		1,9	80		1,1
73		2,5	97 (Z)		0,8
74		6,0	105		1,2
79		6,2	CA-4		2,0

Tabla 16: Valores de IC_{50} calculados.

⁸¹ Origin® Pro 8.0: <http://originlab.com/>

4. Discusión de resultados:

A continuación se van a analizar los resultados en función de las modificaciones en el anillo B. En la tabla siguiente se presentan los valores de IPT de los compuestos modificados en el anillo B.

						
N°	R	Z	IPT (%)	N°	Z	IPT (%)
12	H	O	25	19	O	2
13	H	CH ₂	90*	20	CH ₂	22
14	CHO	O	4	22	NOH	22
15	Diox	CH ₂	43	 IC ₅₀ : 2 μM ^{48,82} , 25,7 μM ²²		
16	CHO	CH ₂	14			
17	CHNOH	CH ₂	15			
18	CN	CH ₂	35			
21	H	NOH	7			

(*): IC₅₀ de **13** = 1,9 μM

Tabla 17: valores de IPT (%) de los derivados de fenstatina a 5 μM

Cuando se sustituye el anillo 3-hidroxi-4-metoxifenilo de la CA-4 por un anillo *p*-dimetilaminofenilo, solamente se mantiene la potencia inhibidora de la polimerización de tubulina cuando el puente es 1,1-diarileno (la isocombretastatina **13**). Sin embargo, cuando el puente está formado por un grupo carbonilo o por una oxima la inhibición disminuye considerablemente. A pesar de que el puente de fenstatinas y oximas, de acuerdo con el farmacóforo propuesto por Nguyen e al⁸³, deberían conferir mayor potencia ya que pueden formar enlaces de H con la proteína, el hecho de que sean menor potentes que la isocombretastatina, conduce a pensar que tiene mayor importancia en la unión ligando-

⁸² Hamze, A.; Brion, J. D.; Alami, M. Synthesis of 1,1-Diarylethylenes via Efficient Iron/Copper Co Catalyzed Coupling of 1-Arylviny Halides with Grignard Reagents. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2782.

⁸³ Nguyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Zaharevitz, D. W.; Day, B. W.; Wip, Peter.; Hamel, E.; Gussio, R. A Common Pharmacophore for a Diverse Set of Colchicine Site Inhibitors Using a Structure-Based Approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107.

proteína, la disposición de los anillos en un ángulo aproximado de 45°, posible en el compuesto **13** ya que la conjugación de los anillos aromáticos con el puente es menor que en los compuestos **12** y **21**.

Del mismo modo cuando se introduce un sustituyente en posición *orto* del DMA se produce una pérdida de la capacidad inhibidora, no presentando ninguno de estos compuestos una IC₅₀ inferior a 5 µM. Esta pérdida de actividad es independiente de que los sustituyentes aporten dadores o aceptores de enlaces de H y puede deberse a que la presencia de los sustituyentes obliga al grupo dimetilamino a colocarse fuera del plano del anillo aromático modificando la interacción con el sitio de unión en la proteína.

La formación de la sal de amonio de estos derivados, aunque como hemos visto en el anterior apartado presenten la ventaja del elevado incremento en la solubilidad acuosa, conduce a inhibidores poco potentes.

A pesar de que los valores de inhibición de polimerización son muy modestos, el mero hecho de que inhiban resulta interesante, pues estos compuestos deben presentar una solubilidad acuosa mejorada y es posible que combinadas con otras modificaciones conduzcan a compuestos potentes y solubles en agua.

En la siguiente tabla se muestran los compuestos con anillo A modificado que presentan mejor perfil como inhibidores de la polimerización de tubulina.

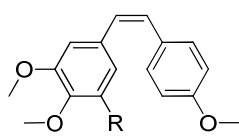
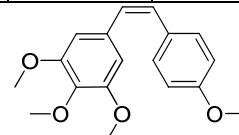
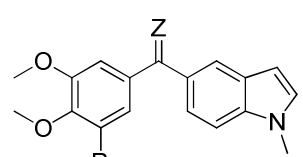
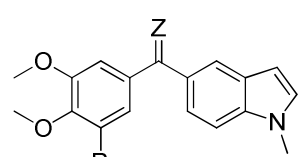
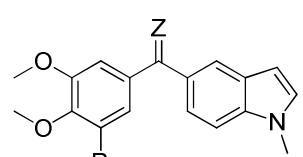
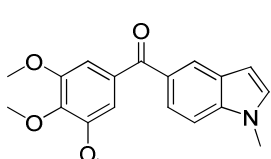
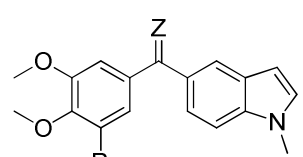
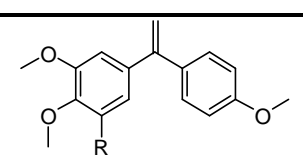
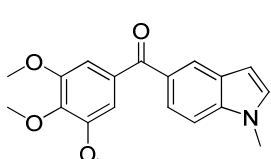
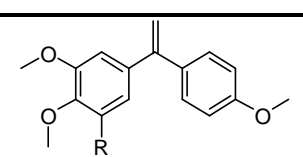
Estructura	N°	R	IPT (%)	IC ₅₀ (μM)	N°	R	IPT (%)	IC ₅₀ (μM)
	79	NH ₂	74	6,2	91	NMeAc	23	-
	80	NMe ₂	92	1,1	96	NMeBoc	14	-
	87	+NMe ₃	16	-	97Z	NHMe	85	0,8
	90	NHAc	3	-	 IPT (%) = 95; IC ₅₀ = 2,2 μM ⁵⁸			
				104				
				Z= CH ₂				
				105	NHMe	97	1,2	 IPT (%) = 30 ^{50c} ; IC ₅₀ = 7,9 μM ⁸⁴
				Z= O				
				73	NH ₂	63	2,5	 IPT (%) = 30 ^{50c} ; IC ₅₀ = 7,9 μM ⁸⁴
				74	NMe ₂	64	6,0	

Tabla 18: valores de IPT (%) de los derivados de combretastatina y fenstatina de metilindol a 5 μM e IC₅₀

Si observamos los resultados obtenidos para las combretastatinas en las que se ha sustituido un grupo metoxilo del anillo de TM por un grupo amino libre o metilado, vemos como se mantiene e incluso se mejora la capacidad de inhibir la formación de microtúbulos en comparación con la CA-4 y desoxicombretastatina, siendo el grupo metilamino (**97Z**) el mejor remplazo seguido del grupo dimetilamino (**80**) y por último el amino libre (**79**).

Del mismo modo en la familia de isocombretastatinas con anillo B de *p*-metoxifenilo y fenstatinas con anillo B indólico, también se ha podido obtener compuestos que mantienen o mejoran la actividad antimetabólica.

A diferencia de las combretastatinas, en las isocombretastatinas ha resultado ser más potente el compuesto con el grupo amino libre que con el dimetilamino, lo cual puede implicar que debido a la diferencia en la longitud del puente los anillos A se disponen ligeramente diferentes en el sitio de unión.

⁸⁴ Álvarez, R.; Puebla, P.; Díaz, J. F.; Bento, A. C.; García-Navas, R.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Andreu, J. M.; Medarde, M.; Peláez, R. Endowing Indole-Based Tubulin Inhibitors with an Anchor for Derivatization: Highly Potent 3-Substituted Indolephenstatins and Indoleisocombretastatins. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2813.

En el caso del derivado indólico, solo se ha podido obtener el análogo de fenstatina y cabe destacar que presente una IC_{50} de 1,2 μM , similar a las de isocombretastatinas más potentes, lo cual hace pensar que a pesar de las dificultades sintéticas se debe intentar conseguir suficiente cantidad de las correspondientes isocombretastatinas ya que si sigue el mismo patrón observado en las otras familias deberían tener una actividad antimitótica submicromolar.

En la tabla siguiente se muestra los valores de IC_{50} y de solubilidad acuosa de los compuestos los más potentes.

Comp	IC_{50} (μM)	Solub ($\mu g/mL$)	Comp	IC_{50} (μM)	Solub ($\mu g/mL$)
13	1,9	30	50	5,1	48
73	2,5	102	74	6,0	-
79	6,2	-	80	1,1	71
97Z	0,8	52	105	1,2	10
CA-4	2,0	1,0			

Tabla 19: valores de IC_{50} solubilidad acuosa de los compuestos seleccionados.

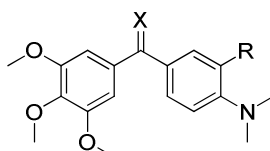
De la tabla anterior se observa que los compuestos que tienen una potencia antimitótica elevada también presentan un valor de solubilidad acuosa muy importante. En comparación con la molécula base (CA-4), se observa que los compuestos **73**, **80** y **97Z** presentan un valor de IC_{50} mejor o similar que CA-4 y una solubilidad hasta cien veces mayor como en el caso del compuesto **73**, resultando los más prometedores para investigaciones posteriores. Estos tres compuestos tienen en común la sustitución del grupo 3-metoxi del anillo A por grupo nitrogenado que varía de amino en **73**, metilamnio en **97Z** a dimetilamino en **80**.

5. Ensayos de citotoxicidad:

Los ensayos de citotoxicidad frente las líneas de células cancerígenas representativa de los compuestos sintetizados en este trabajo han sido realizados en el Departamento de Química Farmacéutica por la Dra. Raquel Álvarez y Dra. Laura Aramburu. Los ensayos han sido frente distintas líneas celulares para determinar la citotoxicidad⁸⁵. Con este fin se han utilizado los siguientes tipos de células:

- HL-60: Leucemia mieloide humana.
- HeLa: Carcinoma cervical humano.
- HT-29: Carcinoma de colon humano.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla siguiente y expresan la concentración que produce un 50 % de inhibición de proliferación celular (IC₅₀).



X	R	Compuesto	IPT IC ₅₀ (μM)	HeLa (μM)	HT-29 (μM)	HL-60 (μM)
O	H	12	>20	0,09	0,4	0,2
CH ₂	H	13	1,9	0,04	0,07	0,01
NOH	H	21	>10	0,8	10	0,6
O	CHO	14	>20	>1	>1	>1
CH ₂		15	>5	0,6	>1	0,8

⁸⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107.

CH ₂	CHO	16	>10	0,8	>1	0,9
CH ₂	NOH	17	>5	0,9	>1	1
CH ₂	CN	18	>5	0,4	0,96	0,8

Tabla 20: Resultados de actividad en citotoxicidad y en IPT de los compuestos ensayados.

De los resultados obtenidos en la tabla arriba se observa que la potencia citotóxica frente a las diferentes líneas celulares es variable, HeLa y HL-60 son más sensible que HT-29 que se muestra una resistencia. El compuesto **13** presenta tanto la potencia inhibitoria de la polimerización de la tubulina como una actividad citotóxica elevada frente las 3 líneas celulares ensayadas, mientras los otros compuestos probados no son activos frente esta línea celular.

PARTE EXPERIMENTAL

I. TÉCNICAS GENERALES:

1. INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación utilizada en este trabajo se indica a continuación:

- **Puntos de fusión:** Se determinaron de forma automática en los aparatos MPM-HV2 y GALLENCAMP, no fueron corregidos.
- **Espectros IR:** Espectrofotómetro FT-IR, en pastillas de KBr al 1 % ó en película. Los valores de la frecuencia de absorción se expresan en cm^{-1} .
- **Lampara UV:** Se determina la evolución de las reacciones en cromatografía en capa fina en una longitud de onda 254-366 nm.
- **Espectros de RMN ^1H y de RMN ^{13}C :** Espectrómetros BRUKER AC 200 (200 MHz), Varian Mercury (200 MHz), Varian Mercury (400 MHz) y BRUKER DRX 400 (400 MHz), utilizando CDCl_3 como disolvente, salvo indicación contraria y TMS como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y los de las constantes de acoplamiento (J) en Hz.
- **Espectros masas (IE):** Se determinaron en un Espectrómetro QSTAR XL, acoplada a un HPLC, determinándose la masa exacta.

2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

- **Cromatografía flash.** Se utilizó gel de sílice MERCK 60 (0,040-0,063 mm) en proporción 30-40 g de sílice por gramo de sustancia.
- **Cromatografía de capa fina (CCF).** Se utilizaron láminas de poliéster prefabricadas POLYCHROM de 0,25 mm de espesor, con recubrimiento de gel de sílice con indicador fluorescente UV-254. Para el revelado se pulveriza con una disolución de ácido sulfúrico al 10% en etanol, o ácido fosfomolibdico al 10% en etanol, calentando a continuación a 110 °C durante unos minutos.

- **Cromatografía de capa fina preparativa (CCP).** Se utilizaron placas PLC Silica gel 60 F₂₅₄ MERCK® con 1 mm de espesor.
- **HPLC.** Se utilizó equipo de Agilent HP Series 1100, equipado con columnas Waters X-Terra®MS C₈ (5 μM, 4,6x150 mm), Waters Waters X-Terra®MS C₁₈ (5 μM, 4,6x150 mm)

3. TRATAMIENTO DE DISOLVENTES Y REACTIVOS

- **Tolueno.** El tolueno comercial se seca sobre láminas de Na.
- **Cloruro de metileno.** El CH₂Cl₂ comercial se seca sobre tamiz molecular.
- **Hexano.** El hexano comercial se destila en columna de rectificación y se recoge sobre CaCl₂.
- **DMF seca.** La DMF comercial se seca sobre Tamiz molecular.
- **Tetrahidrofurano.** El THF comercial se destila, inmediatamente antes de su uso, sobre láminas de sodio, bajo atmósfera de argón, usando benzofenona como indicador.

RMN ¹H: 3,86 (3H, s); 3,89 (6H, s); 4,48 (2H, s); 6,64 (2H, s).

RMN ¹³C: 33,9 (CH₂); 55,7 (2) (CH₃); 60,4 (CH₃); 105,8 (2) (CH); 132,9 (C); 137,8 (C); 152,9 (2) (C).

Pf (Hex): 68 °C

b) Sal de fosfonio 3

Sobre una disolución de 4,72 g (18,1 mmol) del compuesto **2** en 12 ml de tolueno seco y en agitación se le añaden 7,11 g (27,1 mmol) de trifenilfosfina disueltos en 20 ml de tolueno seco, se continúa la agitación durante 24 h a temperatura ambiente, observándose la formación de un sólido blanco, se filtra y se obtienen 8,86 g (16,9 mmol, 94 %) de la sal **3**.

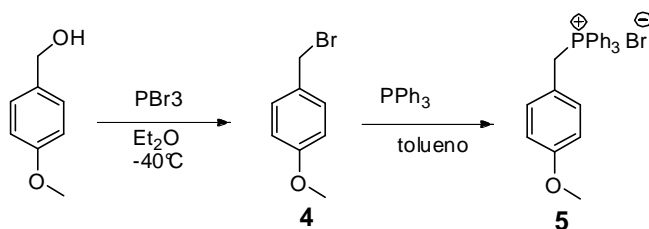
Bromuro de 3,4,5-trimetoxibenciltrifenilfosfonio (3):

RMN ¹H: 3,50 (6H, s); 3,76 (3H, s); 5,39 (2H, d, 14,2); 6,50 (2H, s); 7,10-7,90 (15H, m).

RMN ¹³C: 30,5 (CH₂, d, 45); 55,9 (2) (CH₃); 60,5 (CH₃); 108,5 (2) (CH); 117,4 (3) (C, d, 85); 122,1 (C, d, 9); 129,6 (6) (CH, d, 11); 134,4 (6) (CH, d, 11); 134,3 (C); 137,3 (C); 152,6 (2) (C).

Pf (benceno): 214 °C

3. Preparación de la sal de fosfonio 5



a) Bromuro de bencilo 4

Sobre una disolución de 4,9 ml (39 mmol) de (4-metoxifenil)metanol en 30 ml de Et₂O seco a -40 °C se añaden 3,7 ml (39 mmol) de PBr₃, en atmosfera de nitrógeno y agitación constante.

Después de 4 h de agitación a temperatura ambiente, se neutraliza con NaHCO_3 , se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente y se obtiene 7,79 g (38,7 mmol, 98 %) del compuesto **4**.

1-bromometil-4-metoxibenceno (4):

RMN ^1H : 3,81 (3H, s); 4,51 (2H, s); 6,86 (2H, d, 8,8); 7,32 (2H, d, 8,8).

b) Sal de fosfonio **5**

Sobre una disolución de 7,79 g (38,7 mmol) del compuesto **4** en 30 ml de tolueno seco y en agitación se le añaden 10,2 g (38,7 mmol) de trifetilfosfina disuelta en 20 ml de tolueno seco, se continúa la agitación durante 15 h a temperatura ambiente, observándose la formación de un sólido blanco que se filtra obteniéndose 13,3 g (28,7 mmol, 75 %) de la sal **5**.

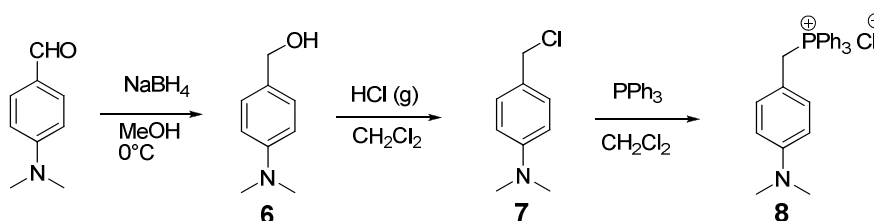
Bromuro de 4-metoxibenciltrifenilfosfonio (5):

RMN ^1H : 3,73 (3H, s); 5,33 (2H, d, 13,9); 6,65 (2H, d, 8,8); 7,02 (2H, d, 8,8); 7,50-7,80 (15H, m).

RMN ^{13}C : 29,9 (CH_2 , d, 45); 54,9 (CH_3); 114,0 (2) (CH); 117,5 (3) (C, d, 85); 118,2 (C, d, 9); 129,9 (6) (CH, d, 11); 132,3 (2) (CH).

Pf (benceno): 240 °C

4. Preparación de la sal de fosfonio **8**



a) Alcohol 6

Se disuelven 3,00 g (20,1 mmol) de 4-dimetilaminobenzaldehído en 20 ml de MeOH y se le añaden 761 mg (20,1 mmol) de NaBH₄ a 0°C. La reacción se agita durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se evapora el MeOH y se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente, obteniéndose 2,90 g (19,2 mmol, 95 %) del compuesto **6**, en forma de un aceite transparente.

(4-dimetilaminofenil)metanol (6):

RMN ¹H: 2,95 (6H, s); 4,53 (2H, s); 6,77 (2H, d, 8,8); 7,26 (2H, d, 8,8).

RMN ¹³C: 41,3 (2)(CH₃); 65,0 (CH₂); 113,4 (2) (CH); 129,1 (2) (CH); 130,0 (C); 150,6 (C).

IR (película): 3385; 2870; 1521; 1225 cm⁻¹.

b) Sal de fósforo 8

Se disuelven 1,60 g (10,6 mmol) de (4-dimetilaminofenil)metanol en 20 ml de CH₂Cl₂ y se borbotea una corriente de HCl(g), generada a partir del tratamiento de NaCl con H₂SO₄, aparece color amarillo indicando la formación del compuesto **7**. Posteriormente se le añade 3,40 g (12,7 mmol) de trifenilfosfina disuelta en 15 ml de CH₂Cl₂, la mezcla se agita durante 24h a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno, después se evapora el CH₂Cl₂ y se cristaliza en tolueno, se obtiene 2,72 g (6,30 mmol, 60 %) de cristales blancos de la sal **8**.

Cloruro de (4-dimetilaminobencil)trifenilfosfonio (8):

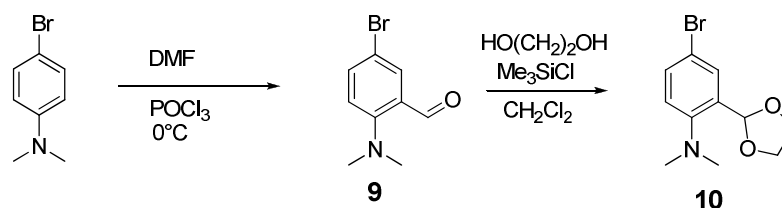
RMN ¹H: 3,14 (6H, s); 5,57 (1H, s); 5,65 (1H, s); 7,33-7,78 (19H, m).

III. Modificaciones del anillo B

III. 1. Derivados bencénicos

A. Análogos de isocombretastatinas

1. Preparación del aldehído protegido 10



a) Formilación de 4-bromo-*N,N*-dimetilanilina

Se ponen en un matraz 11,5 ml (150 mmol) de DMF y 4,1 ml (45 mmol) de oxiclorigo de fósforo a 0°C. Después de una hora se añaden 3,00 g (15,0 mmol) de 4-bromo-*N,N*-dimetilanilina disuelta en 20 ml de CH₂Cl₂, apareciendo un color amarillo. La mezcla se agita durante 24 horas a 70°C, posteriormente se trata con AcOEt y se lava con agua. La fase orgánica se seca y se evapora el disolvente, obteniéndose 3,19 g de un aceite amarillo.

El crudo se cromatografía flash con Hex/AcOEt 8:2 obteniéndose 2,20 g (4,45 mmol; 64 %) de aldehído **9**, que se cristaliza en Hex/CH₂Cl₂, obteniéndose 652 mg de cristales amarillos.

5-bromo-2-dimetilaminobenzaldehído (9):

RMN ¹H: 2,93 (6H, s); 6,98 (1H, d, 9,0); 7,53 (1H, dd, 9,0; 2,6); 7,86 (1H, d, 2,6); 10,14 (1H, s).

RMN ¹³C: 45,5 (2) (CH₃); 113,0 (C); 119,6 (CH); 128,0 (C); 132,8 (CH); 137,0 (CH); 154,5 (C); 189,5 (CH).

IR (película): 2949; 1667; 1589; 1495, 804 cm⁻¹.

Pf (Hexano/CH₂Cl₂): 45-47 °C

b) Protección del aldehído 9

Una disolución de 1,50 g (6,58 mmol) de 5-bromo-2-dimetilaminobenzaldehído, 1,0 ml (18 mmol) de etilenglicol y 0,84 ml (6,58 mmol) de cloruro de trimetilsililo en CH₂Cl₂ se deja en agitación durante 24h a temperatura ambiente. Se extrae con agua saturada con NaCl y se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente, obteniéndose 1,05 g (3,86 mmol, 59 %) de **10**. Mediante cristalización en Hex/CH₂Cl₂ se aíslan 436 mg de cristales amarillos.

N,N-dimetil-4-bromo-2-(1,3-dioxolan-2-il)anilina (10):

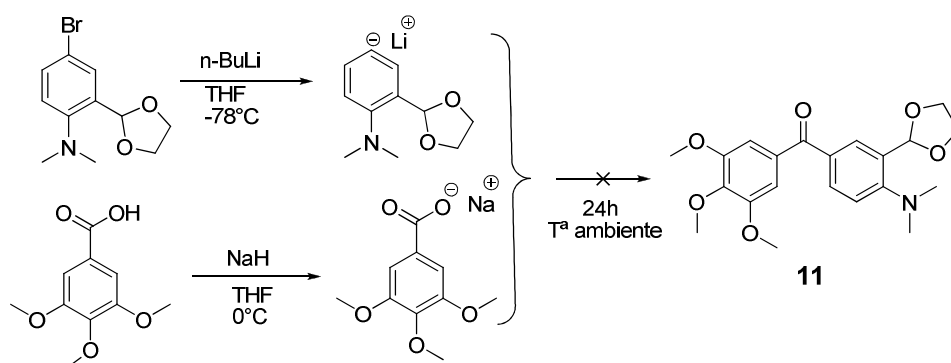
RMN ¹H: 2,68 (6H, s); 3,75 (4H, m); 5,86 (1H, s); 7,05 (1H, d, 8,7); 7,42 (1H, dd, 8,7; 2,5); 7,68 (1H, d, 2,5).

RMN ¹³C: 45,6 (2) (CH₃); 62,0 (2) (CH₂); 99,4 (CH); 117,1 (C); 121,9 (CH); 130,3 (C); 132,5 (CH); 134,9 (CH); 151,5 (C).

IR (película): 1595; 1488; 1386; 1065; 817 cm⁻¹.

Pf (Hexano/CH₂Cl₂): 87-88 °C

2. Intento de preparación de la fenstatina 11 por reacción entre los derivados litiado y carboxílico

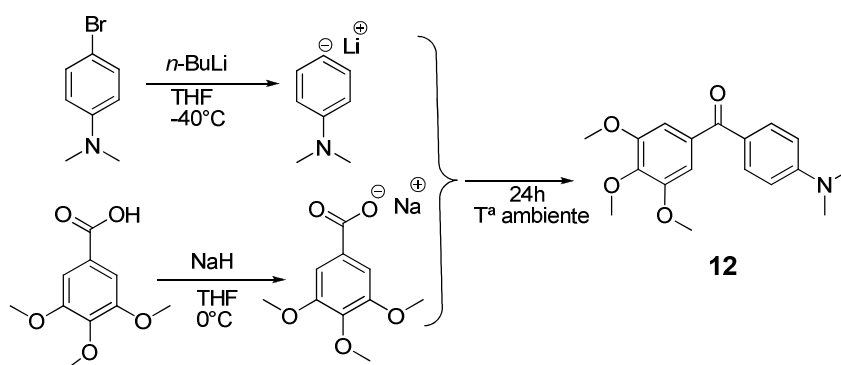


Se disuelven 540 mg (1,98 mmol) del compuesto **10** en 30 ml de THF seco y se le añaden 1,5 ml (2,4 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78°C con agitación y atmósfera de nitrógeno. La mezcla se pone de coloración amarilla.

En otro matraz se ponen a reaccionar 840 mg (3,96 mmol) de ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico disuelto también en THF seco y a 0 °C, con 180 mg (7,50 mmol) de hidruro sodio al 60 %. La mezcla se pone de coloración blanca.

Al cabo de una hora de agitación de las dos reacciones se añade el contenido de la primera reacción sobre la segunda y se deja a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se añade sobre una disolución de NH₄Cl, se evapora el THF y extrae con AcOEt, obteniéndose 555 mg de crudo de reacción de coloración amarilla. Después de varias pruebas se ve que esta reacción no ha ido, por eso se busca otra vía de preparación del compuesto **11**.

3. Preparación de la fenstatina **12**



Se disuelven 3,50 g (17,5 mmol) de 4-bromodimetilanilina en 60 ml de THF, después se le añaden 16,4 ml (26,2 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78°C con agitación y atmósfera de nitrógeno. La mezcla se pone de coloración amarilla.

En otro matraz se prepara una disolución de 7,42 g (35,0 mmol) de ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico en THF y a 0 °C, se le añaden lentamente 1,25 g (52,50 mmol) de hidruro sodio al 60 % con agitación. La mezcla se vuelve de coloración blanca.

Al cabo de una hora de reacción se añade el contenido de la primera reacción sobre la segunda y se deja a temperatura ambiente durante 24h. Posteriormente se añade sobre una disolución de NH₄Cl, se evapora el THF y extrae con AcOEt, obteniéndose 4,22 g de crudo.

La reacción se purifica por cromatografía flash Hex/AcOEt 1:1, aislándose 2,50 g (7,93 mmol, 46 %) del compuesto **12**.

(4-dimetilaminofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12):

RMN ¹H: 3,06 (6H, s); 3,85 (6H, s); 3,90 (3H, s); 6,66 (2H, d, 8,6); 6,98 (2H, s); 7,80 (2H, d, 8,6).

RMN ¹³C: 40,1 (2) (CH₃); 56,3 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 107,1 (2)(CH); 110,6 (2) (CH); 124,8 (C); 132,7 (2) (CH); 134,5 (C); 140,8 (C); 152,8 (2) (C); 153,3 (C); 194,4 (C).

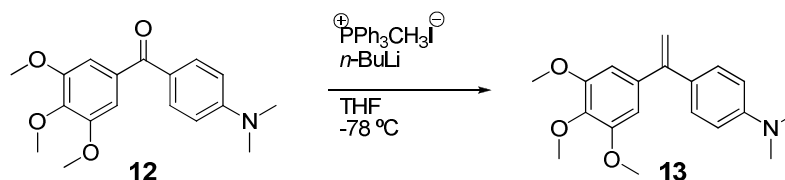
IR (película): 1681; 1583; 1411; 1328; 1121 cm⁻¹.

Pf (Diisopropileter): 107-109 °C

HMRS (m/z): Obtenido 338,1368 (M+Na⁺); esperado 338,1363 (C₁₈H₂₁NO₄Na⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 15,1 min.

4. Síntesis de la isocombretastatina 13



Se suspenden 5,40 g (13,3 mmol) de la sal de fosfonio **1** en 50 ml de THF y se añaden 6,90 ml (11,0 mmol) de $n\text{-BuLi}$ 1,6 M en hexano a -78°C , apareciendo una coloración amarilla. La mezcla se agita durante 1h en atmósfera de nitrógeno y se añaden 1,40 g (4,44 mmol) de la cetona **12** disuelta en THF. Se observa que el color cambia de amarillo a naranja. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se añade sobre una disolución de NH_4Cl al 5 % y se extrae con AcOEt, se seca la fase orgánica y se evapora el disolvente obteniéndose 3,78 g. El crudo se purifica por una cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4) y se aíslan 1,05 g (3,35 mmol, 75 %) del metilén derivado **13**.

N,N-dimetil-4-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)anilina (13):

RMN ¹H: 2,93 (6H, s); 3,80 (6H, s); 3,90 (3H, s); 5,24 (1H, d, 1,4); 5,36 (1H, d, 1,4); 6,62 (2H, s); 6,65 (2H, d, 8,6); 7,23 (2H, d, 8,6).

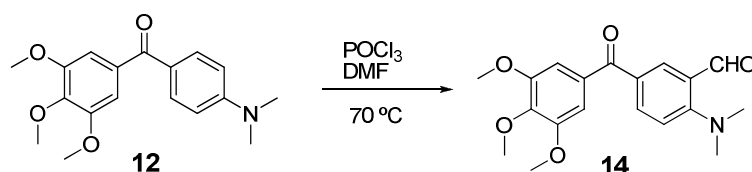
RMN ¹³C: 40,4 (2) (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 105,8 (2) (CH); 110,9 (CH₂); 111,9 (2) (CH); 129,1 (2) (CH); 137,6 (C); 138,1 (2) (C); 149,9 (C); 150,3(C); 152,9 (2) (C).

IR (película): 1605; 1579; 1516; 1350; 1126; 1008 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 314,1755 (M+H⁺); esperado 314,1751 (C₁₉H₂₄NO₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 20,8 min.

5. Formilación del compuesto 12



A una mezcla de 4,0 ml (42 mmol) de DMF y 1,2 ml (12,6 mmol) de oxicluro de fósforo a 0°C, después de una hora de reacción se le añaden 1,32 g (4,20 mmol) de **12** disueltos en 20 ml CH₂Cl₂. La mezcla se agita durante 4 h a 0°C, luego se aumenta la temperatura a 70°C y se deja 20 h. El color pasa de naranja a amarillo, se disuelve en CH₂Cl₂ y se lava con agua, la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora. Se aíslan 940 mg (2,74 mmol, 65%) del compuesto formilado **14**.

2-dimetilamino-5-(3,4,5-trimetoxibenzoil)benzaldehído (14):

RMN ¹H: 3,11 (6H, s); 3,88 (6H, s); 3,94 (3H, s); 6,99 (1H, d, 9,0); 7,00 (2H, s); 7,94 (1H, dd, 9,0, 2,2); 8,21 (1H, d, 2,2); 10,03 (1H, s).

RMN ¹³C: 44,4 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,8 (CH₃); 107,1 (2) (CH); 115,8 (CH); 123,2 (C); 127,0 (C); 133,1 (C); 135,6 (CH); 136,8 (CH); 141,5 (C); 152,8 (2) (C); 156,3 (C); 189,3 (CH); 193,4 (C).

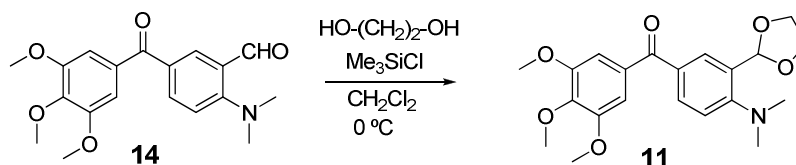
IR (película): 2833; 1674; 1652; 1589; 1409; 1336; 1129 cm⁻¹.

Pf (Hex/CH₂Cl₂): 113-115 °C

HMRS (m/z): Obtenido 344,1505 (M+H⁺); esperado 344,1492 (C₁₉H₂₂NO₅⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 8,9 min.

6. Protección del aldehído **14**



Se disuelven 250 mg (0,73 mmol) del aldehído **14** en 20 ml de CH₂Cl₂, se añaden 81 µl (1,5 mmol) de etano-1,2-diol al 30% en metanol y 93 µl (0,73 mmol) de cloruro de trimetilsililo a 0 °C con agitación. El color pasa de rosa a violeta. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se disuelve en CH₂Cl₂ y se extrae con agua saturada con NaCl, la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora, recuperándose 265 mg. Se purifica el producto por cromatografía flash (Hex/AcOEt 1:1), aislándose 235 mg (0,61mmol, 84 %) del compuesto **11**.

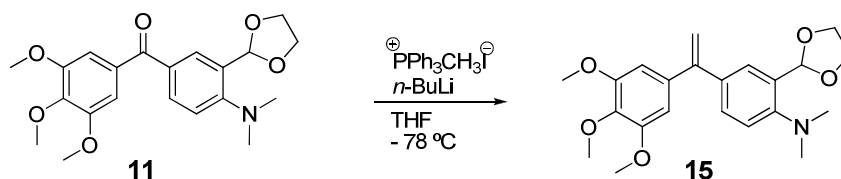
(4-dimetilamino-3-(1,3-dioxolan-2-il)fenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11):

RMN ¹H: 2,90 (6H, s); 3,93 (6H, s); 3,97 (3H, s); 4,10 (4H, m); 6,10 (1H, s); 7,04 (2H, s); 7,06 (1H, d, 8,2); 7,78 (1H, dd, 8,2, 2,1); 8,07 (1H, d, 2,1).

RMN ¹³C: 44,8 (2) (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,8 (CH₃); 65,4 (2) (CH₂); 99,7 (CH); 107,4 (2) (CH); 117,5 (CH); 128,8 (C); 130,4 (CH); 130,9 (CH); 131,2 (C); 141,3 (C); 152,7 (C); 152,8 (2) (C); 156,8 (C); 194,2 (C).

IR (película): 1647; 1592; 1503; 1411; 1332; 1234; 1126 cm⁻¹.

7. Reacción de Wittig de la fenstatina 11



Se disuelven 563 mg (1,39 mmol) de sal de fosfonio **1** en 30 ml de THF y a -78°C se le añaden 726 μl (1,16 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano en atmósfera de nitrógeno, tomando coloración amarilla. La mezcla se agita durante 1h, luego se añaden 180 mg (0,46 mmol) de la cetona **11** disuelta en THF, el color pasa de amarillo a naranja.

La reacción se agita durante 24h a temperatura ambiente, luego se extrae siguiendo la metodología descrita en casos similares y se obtienen 359 mg de crudo.

El crudo se purifica por cromatografía flash eluyéndose con Hex/AcOEt 7:3, 125 mg (0,32 mmol, 70 %) del compuesto **15**.

N,N-dimetil-2-(1,3-dioxolan-2-il)-4-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)anilina (15):

RMN ^1H : 2,77 (6H, s); 3,80 (6H, s); 3,89 (3H, s); 4,00-4,20 (4H, m); 5,34 (1H, sa); 5,42 (1H, sa); 6,18 (1H, s); 6,56 (2H, s); 7,00 (1H, d, 8,6); 7,22 (1H, dd, 8,6, 2,1); 7,64 (1H, d, 2,1).

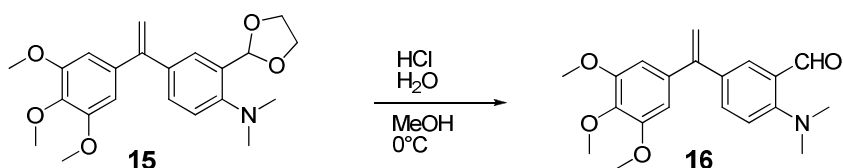
RMN ^{13}C : 45,6 (2) (CH_3); 56,1 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 65,3 (2) (CH_2); 99,8 (CH); 105,7 (2) (CH); 113,1 (CH_2); 118,5 (CH); 127,4 (CH); 129,9 (CH); 130,6 (C); 135,6 (C); 137,3 (C); 137,6 (C); 149,5 (C); 152,8 (2) (C); 153,3 (C).

IR (película): 1578; 1502; 1345; 1235; 1126; 1064 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 386,1958 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 386,1962 ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_5^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 19,5 min.

8. Obtención de la isocombretastatina 16



Se disuelven 328 mg (0,85 mmol) del dioxolano **15** en 6 ml de metanol, después se añade un poco de agua y dos gotas de HCl concentrado a 0°C, aparece coloración amarilla. La mezcla se agita durante 4 h, luego se extrae con AcOEt, se obtiene 250 mg (0,73 mmol; 86 %) de un aceite naranja del compuesto desprotegido **16**.

2-dimetilamino-5-(1-(3,4,5 trimetoxifenil)etenil)benzaldehído (16):

RMN ¹H: 2,96 (6H, s); 3,81 (6H, s); 3,87 (3H, s); 5,34 (1H, s); 5,41 (1H, s); 6,52 (2H, s); 6,96 (1H, d, 8.2); 7,41 (1H, dd, 8.2, 2.2); 7,77 (1H, d, 2.2); 10,18 (1H, s).

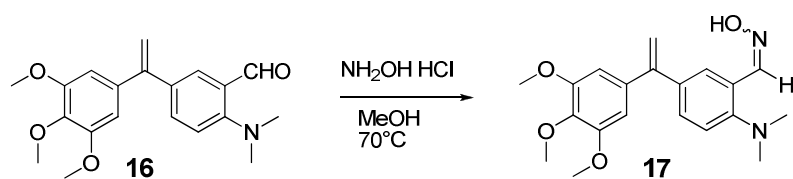
RMN ¹³C: 45,4 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 105,6 (2) (CH); 113,2 (CH₂); 117,1 (CH); 126,1 (C); 131,0 (CH); 133,1 (C); 134,3 (CH); 137,1 (C); 137,9 (C); 148,8 (C); 153,0 (2) (C); 155,1 (C); 191,0 (CH).

IR (película): 2837; 1679; 1602; 1579; 1504; 1235; 1126 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 364,1521 (M+Na⁺); esperado 364,1520 (C₂₀H₂₃NO₄Na⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 19,2 min.

9. Preparación de la oxima 17



Se disuelven 100 mg (0,29 mmol) del compuesto **16** en 10 ml de metanol, después se añaden 205 mg (2,93 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y tres gotas de piridina apareciendo coloración naranja. La reacción se deja a 70°C 24 h, luego se evapora el metanol, se extrae con agua/CH₂Cl₂ y se aíslan 56 mg (0,16 mmol, 55 %) de un aceite amarillo corresponde al compuesto **17**.

Oxima de 2-dimetilamino-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)benzaldehído (17):

RMN ¹H: 2,75 (6H, s); 3,73 (6H, s); 3,80 (3H, s); 5,27 (1H, s); 5,34 (1H, s); 6,46 (2H, s); 6,93 (1H, d, 8,4); 7,19 (1H, dd, 8,4, 2,0); 7,62 (1H, d, 2,4); 8,35 (1H, s).

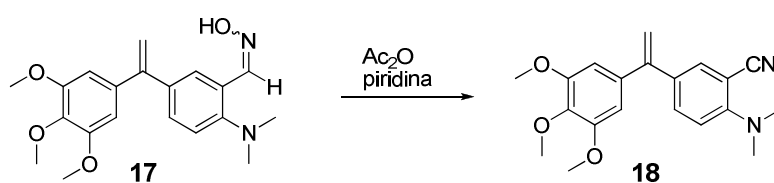
RMN ¹³C: 45,0 (2) (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,8 (CH₃); 105,5 (2) (CH); 113,3 (CH₂); 118,0 (CH); 124,7 (C); 127,3 (CH); 130,3 (CH); 131,9 (C); 135,2 (C); 137,1 (C); 137,6 (C); 148,8 (CH); 149,1 (C); 152,8 (2) (C).

IR (película): 3439; 1580; 1503; 1410; 1236; 1126 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 357,1816 (M+H⁺); esperado 357,1814 (C₂₀H₂₅N₂O₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 17,9 min; t_R: 18,5 min.

10. Preparación de la isocombretastatina **18**



Se disuelven 66 mg (0,18 mmol) de la oxima **17** en 300 µL de piridina y 300 µL de anhídrido acético. La reacción se agita durante 4 h a temperatura ambiente, apareciendo un color marrón. Al crudo de reacción se le añade hielo y extrae con AcOEt, obteniéndose 45 mg de un producto cuyo espectro de RMN ¹H indica la presencia de una mezcla en la que coexisten el nitrilo y el derivado acetilado.

Esta mezcla se vuelve a poner otra vez en tolueno, tamiz molecular y unas gotas de HCl(c) a reflujo durante 2h. Evaporando el tolueno, se extrae con CH₂Cl₂, lleva a pH neutro, se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora, se aíslan 35 mg (0,10 mmol, 56 %) del nitrilo **18**.

2-dimetilamino-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)benzonitrilo (18):

RMN ¹H: 3,11 (6H, s); 3,82 (6H, s); 3,89 (3H, s); 5,33 (1H, sa); 5,38 (1H, sa); 6,51 (2H, s); 6,81 (1H, d, 8,9); 7,42 (1H, dd, 8,9; 2,2); 7,53 (1H, d, 2,2).

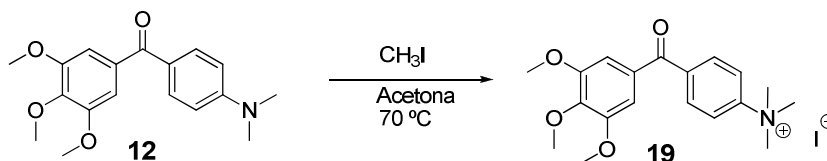
RMN ¹³C: 42,9 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 105,8 (2) (CH); 113,2 (CH₂); 116,2 (CH); 119,8 (C); 131,8 (C); 133,2 (CH); 134,6 (CH); 136,7 (C); 137,6 (C); 138,0 (C); 148,0 (C); 153,0 (2) (C); 154,4 (C).

IR (película): 2214; 1581; 1505; 1410; 1235; 1112 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 339,1724 (M+H⁺); esperado 339,1704 (C₂₀H₂₃N₂O₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 19,5 min.

11. Preparación de la sal de amonio de la fenstatina 12



Se disuelven 200 mg (0,63 mmol) de la cetona **12** en 20 ml de acetona, después se añaden 237 μL (3,81 mmol) de yodometano y aparece color amarillo. La mezcla se agita durante 24 h a 70°C en tubo sellado, se forma un precipitado que se aísla por filtración. Se aíslan 130 mg (0,39 mmol, 62 %) de compuesto **19** sólido.

Yoduro de N,N,N-trimetil-4-(3,4,5-trimetoxibenzoil)benzenamonio (19):

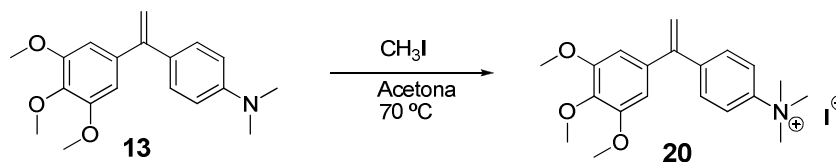
RMN ¹H (CD₃OD): 3,68 (9H, s); 3,75 (6H, s); 3,77 (3H, s); 6,99 (2H, s); 7,88 (2H, d, 6,8); 8,01 (2H, d, 6,8).

RMN ¹³C (CD₃OD): 56,9 (3) (CH₃); 57,3 (2) (CH₃); 64,5 (CH₃); 109,1 (2) (CH); 121,5 (2) (CH); 132,7 (2) (CH); 141,0 (C); 147,8 (C); 150,8 (C); 153,8 (C); 154,5 (2) (C); 190,0 (C).

IR (KBr): 3002; 1661; 1582; 1332; 1125 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 330,1690 (M⁺); esperado 330,1700 (C₁₉H₂₄NO₄⁺).

12. Preparación de la sal de amonio de la isocombretastatina 13



Se disuelven 250 mg (0,83 mmol) de la olefina **13** en 25 ml de acetona, y se le añaden 2 ml (25 mmol) de yodometano, aparece color amarillo. La mezcla se agita durante 4 h a 70°C en tubo sellado apareciendo un precipitado que se filtra y se obtienen 260 mg (0,79 mmol, 95 %) del compuesto **20**.

Yoduro de *N,N,N*-trimetil-4-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil)bencenamonio (20):

RMN ¹H (CD₃OD): 3,62 (9H, s); 3,68 (6H, s); 3,73 (3H, s); 5,59 (1H, s); 5,63 (1H, s); 6,53 (2H, s); 7,53 (2H, d, 8,3); 7,93 (2H, d, 8,3).

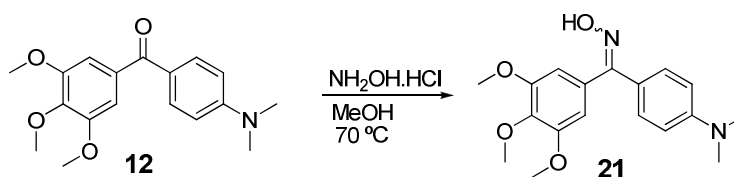
RMN ¹³C (CD₃OD): 56,7 (3) (CH₃); 57,8 (2) (CH₃); 61,1 (CH₃); 106,8 (2) (CH); 116,9 (CH₂); 121,2 (2) (CH); 131,0 (2) (CH); 137,7 (C); 144,8 (C); 145,9 (C); 147,7 (C); 149,5 (C); 154,4 (2) (C).

IR (KBr): 3000; 1580; 1505; 1351; 1130 cm⁻¹.

Pf (Acetona): 176-177 °C

HMRS (m/z): Obtenido 328,1899 (M⁺); esperado 328,1913 (C₂₀H₂₆NO₃⁺).

13. Preparación de la oxima 21



Se disuelven 500 mg (1,59 mmol) de la cetona **12** en 10 ml de metanol, después se añaden 560 mg (7,93 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y tres gotas de piridina apareciendo color amarillo. La mezcla se agita a 70°C durante 20h, luego se evapora el metanol y se obtiene 620 mg del crudo de reacción.

El crudo se purifica por cristalización en MeOH/AcOEt aislándose 300 mg (0,91 mmol, 57 %) de la mezcla *Z/E* en proporción 45:55. Se observa la formación de dos tipos de cristales que se logran separar manualmente, cristales amarillos que contienen el isómero *E* y verdes que corresponden a la mezcla *Z/E*.

(E) oxima de (4-dimetilaminofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (21):

RMN ¹H (CD₃OD): 2,89 (6H, s); 3,65 (6H, s); 3,67 (3H, s); 6,61 (2H, s); 6,63 (2H, d, 8,9); 7,25 (2H, d, 8,9).

RMN ¹³C (CD₃OD): 40,5 (2) (CH₃); 56,4 (2) (CH₃); 61,1 (CH₃); 107,0 (2) (CH); 111,7 (2) (CH); 121,6 (C); 132,4 (2) (CH); 135,0 (C); 139,8 (C); 152,1 (C); 154,1 (2) (C); 158,1 (C).

Pf (MeOH/AcOEt): 148-149 °C

(Z) oxima de (4-dimetilaminofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (21):

Datos espectroscópicos obtenidos de la mezcla *Z/E*

RMN ¹H (CD₃OD): 2,90 (6H, s); 3,68 (6H, s); 3,71 (3H, s); 6,49 (2H, s); 6,77 (2H, d, 8,9); 7,24 (2H, d, 8,9).

RMN ¹³C (CD₃OD): 40,5 (2) (CH₃); 56,4 (2) (CH₃); 61,1 (CH₃); 107,8 (2) (CH); 112,3 (2) (CH); 121,6 (C); 129,7 (2) (CH); 135,0 (C); 139,8 (C); 152,1 (C); 154,1 (2) (C); 158,1 (C).

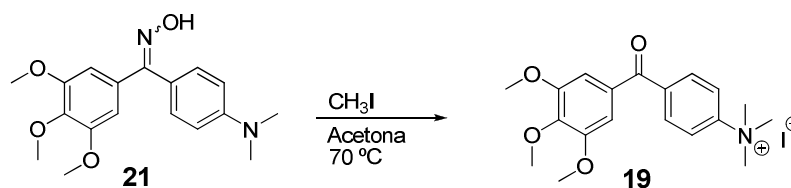
IR (KBr): 3410; 1604; 1527; 1126 cm⁻¹.

Pf (MeOH/AcOEt): 163-164 °C

HMRS (m/z): Obtenido 353,1470 (M+Na⁺); esperado 353,1472 (C₁₈H₂₂N₂O₄Na⁺).

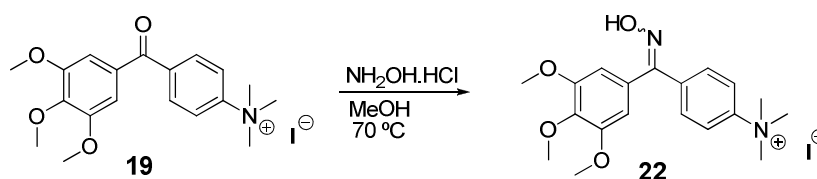
HPLC: Columna C₁₈ t_R: 9,8 min; t_R: 10,4 min.

14. Metilación de la oxima 21



Se disuelven 100 mg (0,30 mmol) de **21** en 20 ml de acetona, después se añaden 600 μ L (9,08 mmol) de yodometano, volviéndose la disolución de color amarillo. La mezcla se agita durante 24 h a 70°C, luego se evapora la acetona y se purifica por cristalización en MeOH/éter/acetona. Se obtienen 96 mg (0,29 mmol, 97 %) de la sal de amonio **19**.

15. Formación de la oxima 22



Se disuelve 200 mg (0,60 mmol) de la sal de amonio **19** en 10 ml de metanol, después se le añaden 250 mg (3,60 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y tres gotas de piridina apareciendo coloración naranja. La mezcla se agita durante 20 h a 70°C, luego se evapora el metanol y se obtienen 419 mg de crudo.

El producto se purifica por cristalización en MeOH/AcOEt, obteniéndose 31 mg (0,09 mmol, 15 %) de cristales amarillos de la mezcla de isómeros (*Z/E*) del compuesto **22** en proporción 8:2.

4-((hidroxiimino)(3,4,5-trimetoxifenil)metil)-*N,N,N*-trimetilbencenamonio (22):

Isómero (*Z*):

RMN ^1H (CD_3OD): 3,28 (9H, s); 3,73 (6H, s); 3,78 (3H, s); 6,71 (2H, s); 7,62 (2H, d, 8,8); 8,01 (2H, d, 8,8).

Isómero (*E*):

RMN ¹H (CD₃OD): 3,30 (9H, s); 3,68 (6H, s); 3,78 (3H, s); 6,60 (2H, s); 7,71 (2H, d, 8,8); 7,88 (2H, d, 8,8).

IR (KBr): 3470; 1582; 1505; 1344; 1130 cm⁻¹.

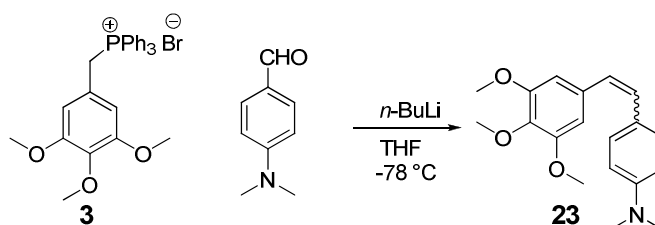
Pf (AcOEt/MeOH): 179-180 °C

HMRS (m/z): Obtenido 345,1806 (M⁺); esperado 345,1814 (C₁₉H₂₅N₂O₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 9,8 min; t_R: 10,5 min.

B. Análogos de combretastatinas

1. Obtención de la combretastatina 23



Sobre una suspensión de 4,20 g (8,04 mmol) de la sal de fosfonio **3** en THF seco, a una temperatura de -78°C , en agitación y atmósfera de nitrógeno, se añade 6,1 ml (9,65 mmol) de $n\text{-BuLi}$ 1,6 M en hexano. A la suspensión naranja obtenida se añaden, transcurrida 1 hora, 1,00 g (6,70 mmol) de 4-dimetilaminobenzaldehído disuelto en THF seco y se lleva progresivamente hasta temperatura ambiente. Se forma una disolución naranja en la que aparece un precipitado blanco. Tras 24 horas, se detiene la reacción con una disolución de cloruro de amonio y extrae con acetato de etilo, y se recupera la fase orgánica lavando con agua hasta neutralidad. Finalmente se seca la disolución con Na_2SO_4 anhidro y se filtra y evapora el disolvente, hasta obtener el crudo de reacción, cuyo peso es de 4,00 g de la mezcla *Z/E* en proporción 6:4.

El producto obtenido se purifica mediante cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3). Tras la cromatografía en columna, y tras realizar sucesivas cristalizaciones y una cromatografía en capa fina preparativa, se obtienen 290 mg (0,92 mmol, 14 %) del isómero *Z* como un aceite incoloro, 113 mg (0,36 mmol, 5 %) del isómero *E* y 1,20 g de mezcla de ambos isómeros.

(Z)-N,N-dimetil-4-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil)anilina (23a):

RMN ^1H : 2,93 (6H, s); 3,71 (6H, s); 3,85 (3H, s); 6,32 (1H, d, 12,2); 6,46 (1H, d, 12,2); 6,57 (2H, s); 6,60 (2H, d; 8,6); 7,20 (2H, d, 8,6).

RMN ^{13}C : 40,5 (2) (CH_3); 55,9 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 105,8 (2) (CH); 112,0 (2) (CH); 125,1 (C); 126,8 (CH); 130,1 (3) (CH); 133,6 (C); 136,7 (C); 149,7 (C); 152,9 (2) (C).

IR (película): 1606, 1585, 1516, 1236, 1126, 767 cm^{-1} .

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 22,3 min.

(E)-N,N-dimetil-4-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil)anilina (23b):

RMN ¹H: 2,99 (6H, s); 3,87 (3H, s); 3,92 (6H, s); 6,74 (2H, s); 6,76 (2H, d, 8,8); 6,82 (1H, d, 15,4); 6,96 (1H, d, 15,4); 7,40 (2H, d, 8,8).

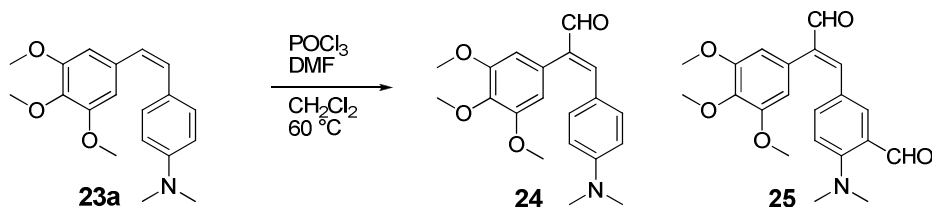
RMN ¹³C: 40,6 (2) (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 103,0 (2) (CH); 112,6 (2) (CH); 124,4 (CH); 125,8 (C); 127,6 (2) (CH); 128,4 (CH); 134,0 (C); 137,2 (C); 150,0 (C); 153,4 (2) (C).

IR (película): 1583, 1520, 1234, 1126, 816 cm⁻¹.

Pf (éter): 94-95 °C

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 5,3 min.

2. Reacción de formilación de 23a



Se ponen en un matraz 1,93 ml (25,1 mmol) de DMF con 1,35 ml (14,7 mmol) de oxiclورو de fósforo a 0 °C, después de una hora de agitación se añaden 920 mg (2,93 mmol) de **23a** disuelto en CH₂Cl₂. La mezcla mantiene en agitación durante 4 h a 0 °C, luego 20 h a 60 °C en presencia de atmósfera de nitrógeno, el color pasa de naranja a amarillo. A continuación se disuelve en CH₂Cl₂ y se extrae con agua, se seca con sulfato sódico anhidro, se aíslan 1,42 g de crudo, que contiene una mezcla de **24** y **25** en proporción de 1:3.

El crudo se purifica por una cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4), obteniéndose 200 mg (0,59 mmol, 20 %) del aldehído **24** y 420 mg (1,37 mmol, 47 %) del aldehído **25**.

3-(4-dimetilaminofenil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilaldehído (24):

RMN ^1H : 3,00 (6H, s); 3,80 (6H, s); 3,90 (3H, s); 6,42 (2H, s); 6,49 (2H, d, 9,4); 7,10 (2H, d, 9,4); 7,26 (1H, s); 9,63 (1H, s).

RMN ^{13}C : 40,1 (2) (CH_3); 56,1 (CH_3); 61,0 (2) (CH_3); 106,2 (2) (CH); 110,0 (C); 111,4 (2) (CH); 121,5 (C); 130,4 (C); 133,2 (2) (CH); 137,3 (C); 151,8 (C); 152,0 (CH); 153,9 (2) (C); 193,9 (CH).

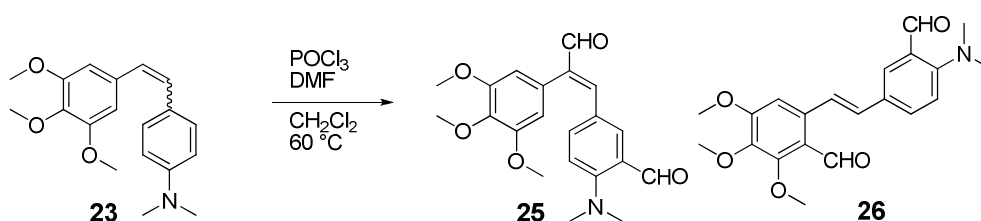
IR (película): 2715; 1666; 1587; 1525; 1366; 1125 cm^{-1} .

Pf (éter/ CH_2Cl_2): 155 °C

HMRS (m/z): Obtenido 364,1528 ($\text{M}+\text{Na}^+$); esperado 364,1525 ($\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NNaO}_4^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 14,6 min.

3. Reacción de formilación de **23**



Se ponen en un matraz 1,5 ml (18,5 mmol) de DMF con 0,52 ml (5,55 mmol) de oxiclورو de fósforo a 0°C, después de una hora de agitación se añaden 580 mg (1,85 mmol) de **23** como mezcla *Z/E* en proporción 7:3 disueltos en CH_2Cl_2 . La mezcla se agita durante 4 h a 0°C, luego 20 h a 60 °C, el color cambia de naranja a amarillo. A continuación se disuelve en CH_2Cl_2 y se extrae con agua saturada con NaCl, se seca con sulfato sódico anhidro, se aíslan 500 mg de crudo, que contiene una mezcla de **25** y **26** en proporción de 8:2.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4) obteniéndose 231 mg (0,58 mmol, 31 %) del aldehído **25**, 74 mg (0,30 mmol, 11 %) del aldehído **26** y 150 mg de la mezcla de ambos.

(E)-2-dimetilamino-5-(2-(2-formil-3,4,5-trimetoxifenil)etenil)benzaldehído (25):

RMN ¹H: 3,00 (6H, s); 3,79 (6H, s); 3,90 (3H, s); 6,40 (2H, s); 6,72 (1H, d, 8,6); 7,11 (1H, dd, 2,1; 8,6); 7,30 (1H, s); 7,70 (1H, d, 2,1); 9,69 (1H, s); 9,92 (1H, s).

RMN ¹³C: 44,5 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 106,1 (2) (CH); 116,4 (CH); 124,1 (2) (C); 129,3 (C); 135,6 (CH); 137,8 (CH); 138,0 (C); 139,5 (C); 149,6 (CH); 154,0 (2) (C); 155,0 (C); 189,4 (CH); 193,6 (CH).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 7,7 min.

(E)-2-dimetilamino-5-(2-formil-3,4,5-(trimetoxifenil)etenil)benzaldehído (26):

RMN ¹H: 2,97 (6H, s); 3,90 (3H, s); 3,99 (6H, s); 6,89 (1H, d, 16,1); 6,93 (1H, s); 7,01 (1H, d, 8,6); 7,72 (1H, dd, 8,6; 2,1); 7,83 (1H, d, 2,1); 8,07 (1H, d, 16,1); 10,19 (1H, s); 10,44 (1H, s).

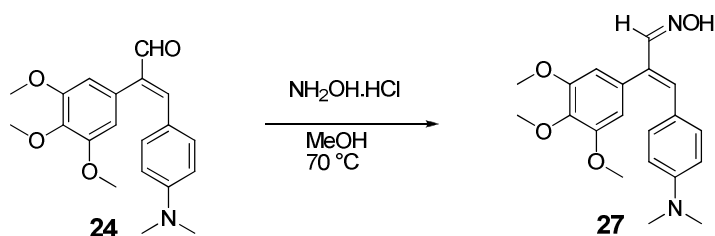
RMN ¹³C: 45,3 (2) (CH₃); 56,2 (CH₃); 61,1 (CH₃); 62,5 (CH₃); 105,1 (CH); 117,8 (CH); 120,3 (C); 125,7 (CH); 126,1 (C); 129,3 (C); 130,8 (2) (CH); 132,1 (CH); 136,7 (C); 141,0 (C); 155,1 (C); 158,0 (2) (C); 190,8 (CH); 191,2 (CH).

IR (película): 2940; 2846; 1677; 1550; 1127 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 370,1657 (M+H⁺); esperado 370,1654 (C₂₁H₂₃NO₅⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 16,6 min; t_R: 18,9 min.

4. Preparación la oxima del aldehído 24



Se disuelven 250 mg (0,73 mmol) del aldehído **24** en 20 ml de metanol, después se añaden 205 mg (2,93 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina, apareciendo color naranja. La mezcla se agita durante 24 h a 70°C , luego se evapora el metanol y se extrae con agua/AcOEt y se

obtienen 500 mg. El crudo se cristaliza en AcOEt/MeOH, aislándose 80 mg (0,23 mmol, 32 %) de cristales de la oxima **27**.

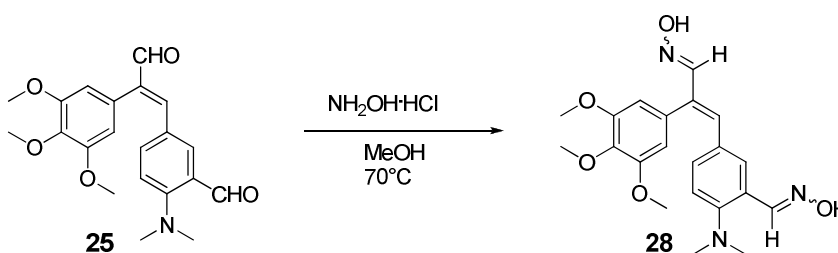
Oxima de 3-(4-(dimetilamino)fenil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilaldehído (27):

RMN ¹H: 2,93 (6H, s); 3,79 (6H, s); 3,91 (3H, s); 6,44 (2H, s); 6,47 (2H, d, 9,0); 6,64 (1H, s); 6,88 (2H, d, 9,0); 7,97 (1H, s).

IR (KBr): 3480; 1598; 1521; 1363; 1235; 1126 cm⁻¹.

Pf (CH₂Cl₂): 144-145 °C

5. Preparación de la oxima **28**



Se disuelven 338 mg (0,91 mmol) del dialdehído **25** en 10 ml de metanol, después se añaden 318 mg (4,57 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y tres gotas de piridina apareciendo coloración naranja. La mezcla se agita durante 24 h a 70°C , luego se evapora el metanol. El crudo se cristaliza en éter/ CH_2Cl_2 y se aíslan 173 mg (0,43 mmol, 48 %) de cristales amarillos de **28**.

Dioxima de 2-dimetilamino-5-[-2-formil-2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil]benzaldehído (28):

RMN ¹H (CD₃OD): 3,18 (6H, s); 3,62 (3H, s); 3,70 (6H, s); 6,40 (2H, s); 6,79 (1H, s); 7,06 (1H, d, 8,6); 7,18 (1H, s); 7,59 (1H, d, 8,6); 7,97 (2H, s).

RMN ¹³C (DMSO-D₆): 44,6 (2) (CH₃); 56,0 (2) (CH₃); 61,2 (CH₃); 106,4 (2) (CH); 109,1 (C); 119,8 (CH); 125,0 (C); 129,8 (CH); 130,0 (CH); 131,9 (CH); 132,6 (C); 137,1 (2) (C); 145,9 (CH); 148,0 (C); 153,0 (CH); 153,2 (2) (C).

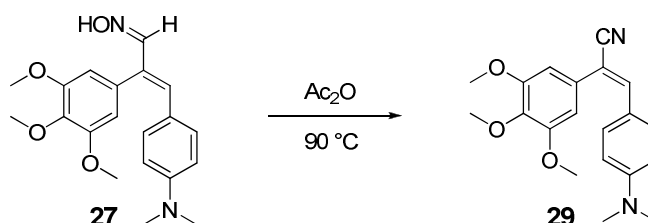
IR (KBr): 3206; 1581; 1460; 1124 cm⁻¹.

Pf (Eter/CH₂Cl₂): 131-132 °C

HMRS (m/z): Obtenido 400,1865 (M+H⁺); esperado 400,1867 (C₂₁H₂₆N₃O₅⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 10,0 min; t_R: 15,8 min.

6. Preparación del nitrilo **29**



Se disuelven 400 mg (1,22 mmol) de las aguas madres de la oxima **27** en 10 ml (80 mmol) de anhídrido acético, la mezcla pone color marrón. La reacción se agita durante 24h a 90 °C. Posteriormente se quita la reacción diluyéndose en CH₂Cl₂, se lava con NaHCO₃ al 5%, se extrae con agua y CH₂Cl₂, se evapora el disolvente y se obtienen 305 mg.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se aíslan 125 mg (0,37 mmol, 30 %) del compuesto **29**.

3-(4-dimetilaminofenil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil) acrilonitrilo (**29**):

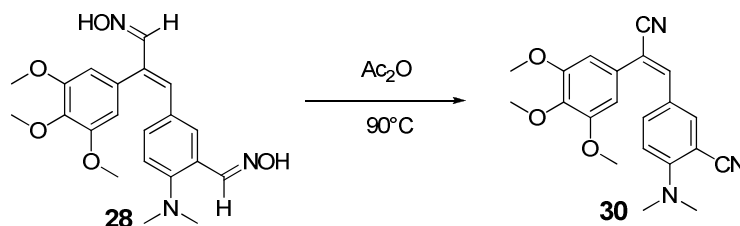
RMN ¹H (CD₃OD): 2,97 (6H, s); 3,76 (6H, s); 3,85 (3H, s); 6,59 (2H, s); 6,61 (2H, d, 9,2); 7,52 (2H, d, 9,2); 8,24 (1H, s).

RMN ¹³C (CD₃OD): 40,3 (2) (CH₃); 56,4 (2) (CH₃); 61,2 (CH₃); 95,1 (C); 106,1 (2) (CH); 111,8 (2) (CH); 114,0 (C); 115,2 (C); 126,7 (C); 128,5 (2) (CH); 137,8 (C); 151,4 (CH); 152,0 (2) (C); 153,7 (C).

IR (película): 2211; 1728; 1609; 1232; 1126 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 339,1708 (M+H⁺); esperado 339,1709 (C₂₀H₂₃N₂O₃⁺).

7. Preparación del dinitrilo **30**



Se disuelven 400 mg (1,00 mmol) de la dioxima **28** en 5,0 ml (53 mmol) de anhídrido acético, la mezcla se pone de color marrón. La reacción se agita durante 24 h a 90 °C. Posteriormente se extrae con CH₂Cl₂ y se lava con NaHCO₃ y se evapora el disolvente, se obtiene 307 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 8:2), aislándose 100 mg (0,27 mmol, 28 %) del compuesto **30**, que se cristaliza en (hexano/CH₂Cl₂) y se obtiene unos cristales amarillos.

5-(2-ciano-2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)-2-(dimetilamino)benzonitrilo (**30**):

RMN ¹H: 3,24 (6H, s); 3,88 (3H, s); 3,93 (6H, s); 6,82 (2H, s); 6,88 (1H, d, 8,8); 7,27 (1H, s); 7,81 (1H, d, 2,4); 8,16 (1H, dd, 8,8, 2,4).

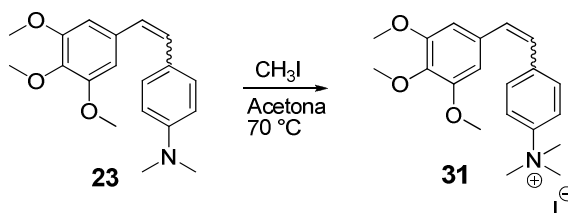
RMN ¹³C: 42,4 (2) (CH₃); 56,3 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 97,8 (C); 103,0 (2) (CH); 108,6 (C); 115,9 (CH); 118,3 (C); 119,4 (C); 123,3 (C); 130,1 (CH); 132,8 (CH); 134,1 (C); 138,2 (C); 139,2 (CH); 153,6 (2) (C); 154,4 (C).

IR (KBr): 2207; 1603; 1505; 1454; 1413; 1411; 1239; 1127 cm⁻¹.

Pf (Hexano/CH₂Cl₂): 190-191 °C

HMRS (m/z): Obtenido 364,1658 (M+H⁺); esperado 364,1661 (C₂₁H₂₄N₃O₃⁺).

8. Metilación de las combretastatinas (*Z/E*) **23**



Se disuelven 290 mg (0,92 mmol) de la mezcla *Z/E* en proporción 1:1 de combretastatina **23** en 10 ml de acetona, después se añaden 1,7 ml (27,5 mmol) de yodometano y aparece un color amarillo. La mezcla se agita durante 48 h a 70°C en un tubo sellado, luego se evapora la acetona y se obtienen 260 mg de crudo de reacción como mezcla de isómeros en proporción 7:3, se purifica mediante sucesivas cristalizaciones en acetona/AcOEt. Finalmente, por cristalización en acetona/AcOEt, se obtienen 61 mg (0,19 mmol, 21 %) de una mezcla enriquecida en el isómero *Z* (9:1) de **31**.

Yoduro de (*Z*)-*N,N,N*-trimetil-4-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)bencenamonio (**31**):

RMN ¹H: 3,65 (6H, s); 3,79 (3H, s); 3,95 (9H, s); 6,37 (2H, s); 6,48 (1H, d; 12,2); 6,64 (1H, d; 12,2); 7,45 (2H, d; 8,6); 7,84 (2H, d; 8,6).

RMN ¹³C: 56,2 (2) (CH₃); 57,9 (3) (CH₃); 60,9 (CH₃); 105,8 (2) (CH); 120,0 (2) (CH); 127,2 (CH); 131,0 (2) (CH), 132,9 (CH); 138,4 (C); 139,6 (C); 139,8 (C); 145,4 (C); 153,4 (2) (C).

Yoduro de (*E*)-*N,N,N*-trimetil-4-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)bencenamonio (**31**):

Datos sacados de la mezcla *Z/E*

RMN ¹H: 3,80 (3H, s); 3,90 (6H, s); 3,97 (9H, s); 6,75 (2H, s); 7,00 (1H, d; 16,2); 7,15 (1H, d; 16,2); 7,67 (2H, d; 8,8); 7,96 (2H, d; 8,8).

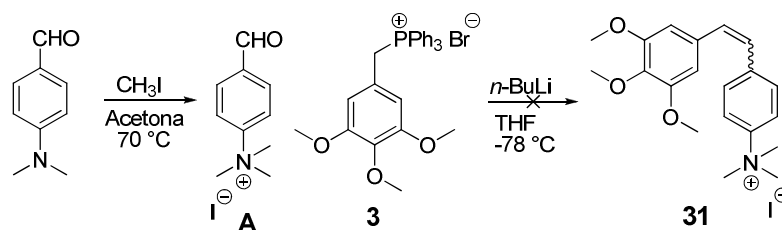
RMN ¹³C (señales diferenciales): 60,3 (CH₃); 104,0 (CH); 120,6 (CH); 125,2 (CH); 128,0 (CH), 131,7 (CH); 137,5 (C).

IR (KBr): 1581, 1240, 1125, 844 cm⁻¹.

Pf (Acetona/AcOEt): 75 °C

HRMS (m/z): Obtenido 328,1916 (M⁺); esperado 328,1913 (C₂₀H₂₆NO₃⁺).

9. Intento de preparación de la sal de amonio 31



Se disuelven 1,50 g (10,1 mmol) de 4-dimetilaminobenzaldehído en 10 ml de acetona, después se le añaden 1,9 ml (30 mmol) de yodometano, aparece un color amarillo. La reacción se agita durante 12 h a $70\text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se le añade el éter y se forma un sólido amarillo que se filtra para obtener 1,60 g (9,74 mmol, 97 %) de **A**.

Siguiendo el procedimiento habitual de la preparación de las combretastatinas se disuelven 3,35 g (6,39 mmol) de la sal de fosfonio **3** en 30 ml de THF y se le añaden 4,0 ml (6,4 mmol) de $n\text{-BuLi}$ 1,6 M en hexano a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ en presencia de atmósfera de nitrógeno, aparece un color naranja, después de 1 h de agitación, se le añaden 750 mg (4,75 mmol) del compuesto **A** disuelto en THF, el color pasa de naranja a amarillo. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH_4Cl , se evapora el THF y se extrae con AcOEt, obteniéndose 2,01 g del crudo de reacción, del que no se aísla el compuesto **31** ni se identifican otros productos de reacción.

Datos del compuesto A

Yoduro de 4-formil-*N,N,N*-trimetilbencenamónio (A):

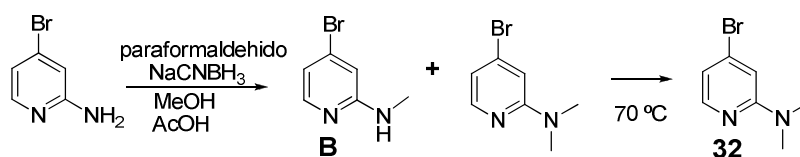
RMN ^1H : 3,72 (9H, s); 7,39 (2H, d, 8,6); 7,85 (2H, d, 8,6); 9,91 (1H, s).

RMN ^{13}C : 57,2 (3) (CH_3); 122,0 (2) (CH); 128,8 (2) (CH); 131,5 (C); 146,5 (C); 190,7 (CH).

III. 2. Derivados piridínicos

A. Análogos de isocombretastatinas

1. Preparación del dimetilaminoderivado **32**



Sobre una disolución de 1,50 g (8,67 mmol) de 2-amino-4-bromopiridina en 10 ml de MeOH y en agitación, se añaden 2,80 g (44,5 mmol) de cianoborohidruro sódico y 1,07 g (35,6 mmol) de paraformaldehído. Se continúa en agitación durante 24 h a temperatura ambiente observándose una coloración amarilla. Después de la evaporación del disolvente, se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na₂SO₄ y se obtienen 1,43 g (7,11 mmol) de aceite amarillo, en el que se ve que han formado dos productos **B** y **32**. La reacción se vuelve a poner a reflujo y se transforma todo a **32**.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt; 6:4), obteniéndose 946 mg (4,70 mmol; 54 %) del compuesto **32**.

4-bromo-N-metilamino piridina (B): (datos sacados de la mezcla)

RMN ¹H: 2,89 (3H, s); 6,31 (1H, d, 8,8); 7,53 (1H, dd, 8,8, 2,4); 8,06 (1H, d, 2,4).

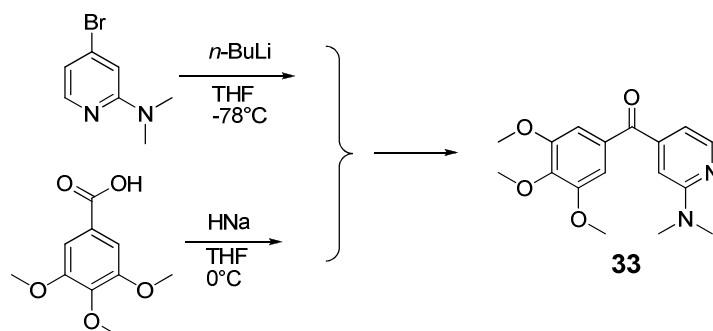
4-bromo-N,N-dimetilamino piridina (32):

RMN ¹H: 2,97 (6H, s); 6,30 (1H, d, 8,8); 6,70 (1H, dd, 8,8, 2,4); 7,95 (1H, d, 2,4).

RMN ¹³C: 38,2 (2) (CH₃); 105,9 (CH); 107,2 (C); 139,3 (CH); 148,3 (CH); 157,8 (C).

IR (película): 1588; 1545; 1508; 1319; 1213; 807 cm⁻¹.

2. Síntesis de la fenstatina **33**



Se disuelven 713 mg (3,54 mmol) de **32** en 30 ml de THF y se le añaden 2,9 ml (4,6 mmol) de *n*-BuLi a -78 °C en atmósfera de nitrógeno, la coloración pasa de amarillo a marrón. En paralelo se prepara una disolución de 1,50 g (7,07 mmol) del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico en 60 ml de THF y se trata con 425 mg (17,7 mmol) de HNa a 0 °C en presencia de N₂, apareciendo un color amarillo. Después de una hora en agitación, se adiciona la primera reacción sobre la segunda permaneciendo el color amarillo. La reacción se deja 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se evapora el THF y se trata con NH₄Cl, se extrae con AcOEt, se seca con Na₂SO₄ y evapora el disolvente, obteniéndose 874 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica con cromatografía flash (Hex/AcOEt, 7:3), aislándose 282 mg (0,90 mmol, 26 %) del compuesto **33**. Esta fracción se cristaliza en Hex/AcOEt aislándose 81 mg de cristales amarillos.

(2-dimetilaminopiridin-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (33):

RMN ¹H: 3,13 (6H, s); 3,86 (6H, s); 3,93 (3H, s); 6,72 (1H, d, 9,4); 6,75 (1H, d, 2,2); 7,10 (2H, s); 8,27 (1H, dd, 9,4, 2,2).

RMN ¹³C: 37,9 (2) (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,7 (CH₃); 105,0 (CH); 107,6 (2) (CH); 110,4 (CH); 131,2 (C); 142,5 (C); 146,1 (C); 148,1 (CH); 152,8 (2) (C); 159,3 (C); 194,9 (C).

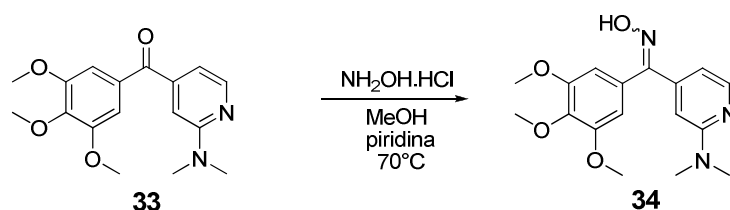
IR (película): 1659; 1595, 1411; 1328; 1125 cm⁻¹.

Pf (Hexano/AcOEt): 101-102 °C

HMRS (m/z): Obtenido 317,1498 (M+H⁺); esperado 317,1501 (C₁₇H₂₀N₂O₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 11,7 min.

3. Preparación de la oxima 34



Se disuelve 55 mg (0,17 mmol) del compuesto 33 en 5 ml de metanol, después se le añaden 40 mg (0,54 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y tres gotas de piridina. La reacción se agita durante 22 h a 70°C. Posteriormente se evapora el metanol y se extrae con agua y AcOEt, obteniéndose 48 mg de un aceite amarillo.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 1:1) y se aíslan 12 mg (0,04 mmol, 23 %) de la mezcla *Z/E* del compuesto 34 en proporción 4:6.

Oximas de (2-dimetilaminopirid-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (34):

Datos de la mezcla

Isómero (Z):

RMN ¹H: 3,11 (6H, s); 3,86 (6H, s); 3,91 (3H, s); 6,61 (2H, s); 6,66 (1H, s); 8,13 (1H, d, 5,4); 8,25 (1H, d, 5,4).

Isómero (E):

RMN ¹H: 3,16 (6H, s); 3,79 (6H, s); 3,83 (3H, s); 6,47 (1H, s); 6,50 (1H, d, 5,4); 6,74 (2H, s); 8,22 (1H, d, 5,4).

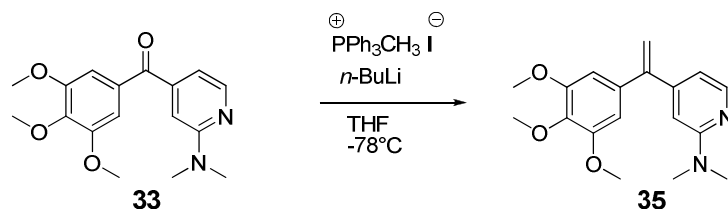
RMN ¹³C: 38,6 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 104,1 (CH); 104,8 (2) (CH); 110,0 (CH); 126,7 (C); 130,4 (C); 146,1 (C); 142,3 (CH); 153,1 (2) (C); 156,3 (C); 158,9 (C).

IR (película): 3205; 1650; 1586; 1458; 1236; 1125 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 332,1609 (M+H⁺); esperado 332,1610 (C₁₇H₂₂N₃O₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 20,3 min; t_R: 21,4 min.

4. Obtención de la isocombretastatina 35



510 mg (1,26 mmol) de la sal de fosfonio **1** se disuelven en 50 ml de THF y después se le añaden 1,0 ml (1,5 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano. La reacción se agita durante 1h a -78 °C en presencia de atmósfera de nitrógeno, posteriormente se añade 141 mg (0,44 mmol) del compuesto **33** disuelto también en THF, se pone de color amarillo. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente y luego se extrae con agua y AcOEt, obteniéndose 147 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (CH₂Cl₂/AcOEt 9:1), se aíslan 102 mg (0,32 mmol; 73 %) del compuesto **35**.

2-dimetilamino-4-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil)piridina (35):

RMN ¹H: 3,10 (6H, s); 3,82 (6H, s); 3,88 (3H, s); 5,51 (1H, s); 5,53 (1H, s); 6,49 (1H, d, 8,2); 6,52 (1H, s); 6,53 (2H, s); 8,12 (1H, d, 8,2);

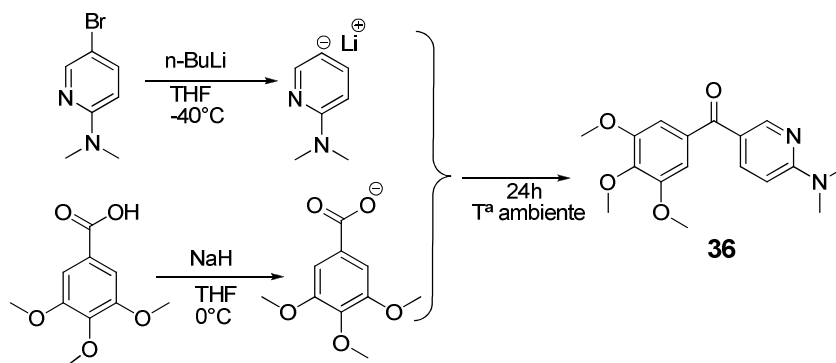
RMN ¹³C (CD₃OD): 37,1 (2) (CH₃); 55,0 (2) (CH₃); 59,5 (CH₃); 105,1 (2) (CH); 110,9 (CH); 111,9 (CH); 114,9 (CH₂); 135,8 (C); 137,6 (C); 146,5 (CH); 148,6 (C); 150,3 (C); 152,6 (2) (C); 159,3 (C).

IR (película): 1594; 1541; 1502; 1409; 1234; 1127 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 315,1718 (M+H⁺); esperado 315,1704 (C₁₈H₂₃N₂O₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 16,1 min.

5. Síntesis de la fenstatina 36



Se disuelven 627 mg (3,12 mmol) de 5-bromo-*N,N*-dimetilpiridin-2-amina en 30 ml de THF y se le añaden 1,9 ml (3,1 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de nitrógeno, la coloración pasa de amarillo a naranja. En paralelo se prepara una disolución de 1,32 g (6,22 mmol) del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico en 60 ml de THF y se trata con 370 mg (15,41 mmol) de HNa al 60 % a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, apareciendo un color amarillo. Después de una hora en agitación, se adiciona la primera reacción sobre la segunda permaneciendo el color amarillo. La reacción se deja 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se evapora el THF y se trata con NH_4Cl , se extrae con AcOEt, se seca con Na_2SO_4 y evapora el disolvente, obteniéndose 1,25 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica con cromatografía flash (Hex/AcOEt, 9:1), aislándose 833 mg (2,63 mmol, 84 %) del compuesto **36**. Esta fracción se cristaliza en diisopropiléter aislándose 254 mg de cristales amarillos.

(2-dimetilaminopirid-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (36):

RMN ^1H : 3,20 (6H, s); 3,88 (6H,s); 3,91 (3H,s); 6,56 (1H, d, 9,2); 6,99 (2H, s); 8,01 (1H, dd, 9,2, 2,4); 8,63 (1H, d, 2,4).

RMN ^{13}C : 38,2 (2) (CH_3); 56,3 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 105,1 (CH); 107,0 (2) (CH); 121,2 (C); 133,7 (C); 138,8 (CH); 143,4 (C); 152,4 (CH); 152,8 (2) (C); 160,4 (C); 187,6 (C).

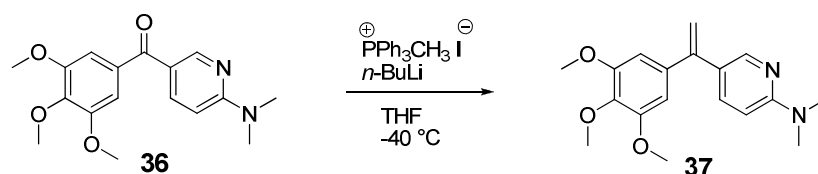
IR (KBr): 1686; 1608; 1584; 1508; 1403; 1337; 1132 cm^{-1} .

Pf (diisopropiléter): 119-120 $^{\circ}\text{C}$

HMRS (m/z): Obtenido 317,1507 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 317,1501 ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4^+$).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 7,4 min.

6. Síntesis de la isocombretastatina 37



Se disuelven 485 mg (1,20 mmol) de yoduro de metiltrifenilfosfonio en 40 ml de THF, después se le añaden 226 μ l (1,0 mmol) de *n*-BuLi a -40 °C, aparece color amarillo. La mezcla se agita durante 1 h a -40 °C en presencia de atmósfera de nitrógeno, luego se añaden 127 mg (0,40 mmol) de la cetona **36** disuelta en 10 ml de THF, el color pasa de amarillo a naranja. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH₄Cl y se extrae con AcOEt, obteniéndose 168 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash con Hex/AcOEt, 7:3 y se aíslan 51 mg (0,2 mmol; 41 %) del compuesto **37** que se cristaliza en Hex/AcOEt para obtener unos cristales amarillos.

N,N-dimetil-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridin-2-amina (37):

RMN ¹H: 3,12 (6H, s); 3,82 (6H, s); 3,86 (3H, s); 5,25 (1H, s); 5,33 (1H, s); 6,47 (1H, d, 8,8); 6,55 (2H, s); 7,40 (1H, dd, 8,8, 2,4); 8,20 (1H, d, 2,4).

RMN ¹³C: 38,3 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 105,2 (CH); 105,4 (2) (CH); 111,6 (C); 111,8 (CH₂); 124,7 (C); 137,2 (C); 137,6 (CH); 146,5 (C); 147,0 (CH); 153,0 (2) (C); 158,3 (C).

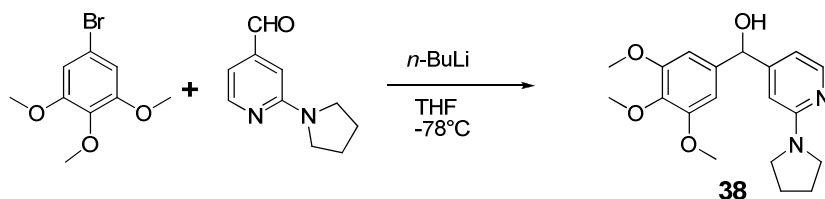
IR (KBr): 1603; 1577; 1510; 1454; 1388; 1125 cm⁻¹.

Pf (Hex/AcOEt): 92-93 °C.

HMRS (m/z): Obtenido 315,1524 (M+Na⁺); esperado 315,1528 (C₁₈H₂₂N₂O₃Na⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 16,4 min.

7. Preparación del alcohol 38



Se disuelven 2,15 g (8,51 mmol) de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno en 50 ml de THF, después se le añaden 6,4 ml (10,2 mmol) de *n*-BuLi a -78 °C y aparece un color amarillo. La mezcla se agita durante 1 h, después se añade 1,00 g (5,67 mmol) de 2-(pirrolid-1-il)isonicotinaldehído disuelto en THF y la coloración pasa de rosa al amarillo.

La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se extrae con AcOEt, obteniéndose otros 2,56 g de sólido amarillo.

El crudo se cristaliza en éter/CH₂Cl₂ se aíslan 510 mg (1,48 mmol, 17%) de cristales blancos de **38**. Las aguas madres se cromatografían en gel de sílice flash con Hex/AcOEt, aislándose 553 mg (1,61 mmol, 19 %) de **38**.

(2-(pirrolid-1-il)piridin-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (38):

RMN ¹H: 1,96 (4H, m); 3,30 (4H, m); 3,72 (6H, s); 3,76 (3H, s); 5,48 (1H, s); 6,41 (1H, d, 5,8); 6,42 (1H, s); 6,58 (2H, s); 7,83 (1H, d, 5,8).

RMN ¹³C: 25,5 (2) (CH₂); 46,9 (2) (CH₂); 56,2 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 75,6 (CH); 103,7 (2) (CH); 109,2 (2) (CH); 137,5 (C); 138,7 (2) (C); 147,8 (CH); 153,3 (2) (C); 157,36 (C).

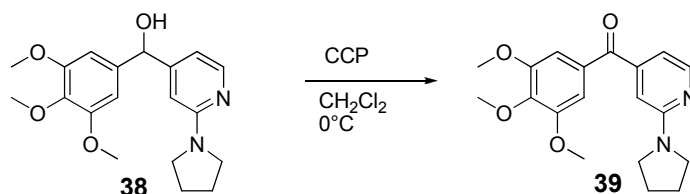
IR (película): 3158; 1607; 1460; 1232; 1124 cm⁻¹.

Pf (Hex/AcOEt): 140-141 °C

HMRS (m/z): Obtenido 345,1819 (M+H⁺); esperado 345,1814 (C₁₉H₂₅N₂O₄⁺).

8. Obtención de la fenstatina **39**

a) Oxidación con CCP



Se disuelve 895 mg (2,60 mmol) de alcohol **38** en 20 ml de CH_2Cl_2 a 0 °C, después se le añaden 782 mg (14,2 mmol) de clorocromato de piridinio, el color pasa de naranja a marrón. La reacción se agita durante 4 h a temperatura ambiente, luego se extrae con CH_2Cl_2 , obteniéndose 1,40 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2) y se aíslan 735 mg (2,15 mmol; 83 %) de la cetona **39**.

(2-(pirrolidin-1-il)pirid-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (**39**):

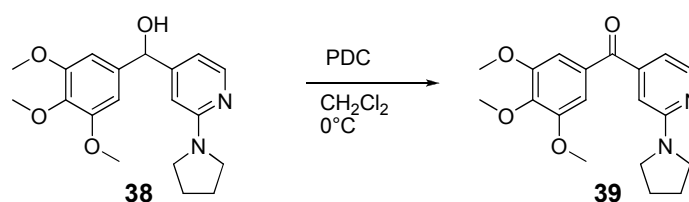
RMN ^1H : 1,98 (4H, m); 3,43 (4H, m); 3,82 (6H, s); 3,89 (3H, s); 6,55 (1H, s); 6,60 (1H, d, 5,6); 7,07 (2H, s); 8,20 (1H, d, 5,6).

RMN ^{13}C : 25,4 (2) (CH_2); 46,8 (2) (CH_2); 56,2 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 106,0 (CH); 107,7 (2) (CH); 110,1 (CH); 131,2 (C); 146,1 (C); 148,1 (CH); 152,9 (2) (C); 155,0 (C); 157,1 (C); 195,1 (C).

IR (película): 1650; 1598; 1538; 1456; 1328; 1127 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 343,1162 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 343,1658 ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$).

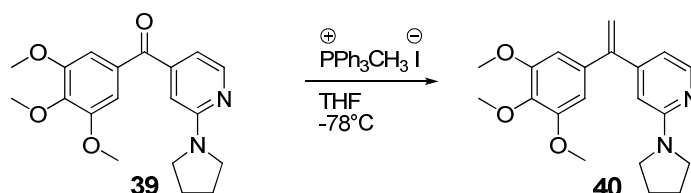
b) Oxidación con PDC



Se disuelven en un matraz 680 mg (1,97 mmol) de alcohol **38** en 20 ml de CH₂Cl₂ a 0 °C, después se le añaden 1,06 g (2,83 mmol) de dicromato de piridinio, el color pasa de naranja a marrón. La reacción se agita durante 4h a temperatura ambiente, luego se extrae con agua y CH₂Cl₂, obteniéndose 1,44 g.

El crudo se purifica por cromatografía flash (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) y se aíslan 278 mg (0,82 mmol; 42 %) de la cetona **39**.

9. Síntesis de la isocombretastatina **40**



Se disuelven 1,27 g (3,15 mmol) de la sal de fosfonio **1** en 40 ml de THF, después se le añaden 1,6 ml (2,6 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78 °C, aparece color naranja. La mezcla se agita durante 1 h, luego se añade 360 mg (1,05 mmol) de la cetona **39**, el color pasa de naranja a amarillo. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH₄Cl y se extrae con AcOEt y se obtienen 624 mg siguiendo el procedimiento habitual.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt, 8:2) y se aíslan 295 mg (0,87 mmol; 83 %) del compuesto **40**.

2-(pirrolidin-1-il)-4-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridina (**40**):

RMN ¹H: 1,98 (4H, m); 3,43 (4H, m); 3,80 (6H, s); 3,86 (3H, s); 5,47 (1H, s); 5,50 (1H, s); 6,31 (2H, s); 6,46 (1H, d, 5,0); 6,53 (1H, s); 8,10 (1H, d, 5,0).

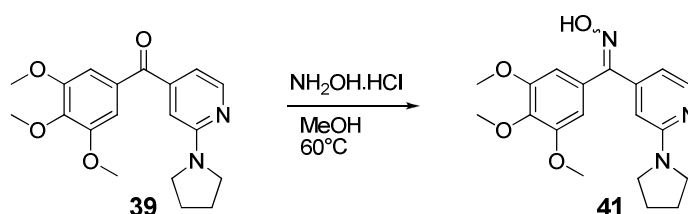
RMN ¹³C: 25,5 (2) (CH₂); 46,8 (2) (CH₂); 56,1 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 105,5 (2) (CH); 105,8 (CH); 111,1 (CH); 115,3 (CH₂); 135,9 (C); 137,9 (C); 147,9 (C); 149 (CH); 149,7 (C); 152,9 (2) (C); 157,6 (C).

IR (película): 1593; 1535; 1492; 1454; 1236; 1126 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 341,1862 (M+H⁺); esperado 341,1860 (C₂₀H₂₅N₂O₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 17,1 min.

10. Preparación de la oxima 41



Se disuelven 275 mg (0,80 mmol) de la cetona 39 en 10 ml de metanol y se le añade 167 mg (2,41 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina, la reacción se agita durante 22 h a 60 °C, después se extrae con agua y CH₂Cl₂, se seca con Na₂SO₄ y se obtienen 390 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt, 6:4), aislándose 120 mg (0,34 mmol, 42 %) de una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 40:60 del compuesto 41.

Oxima de (2-(pirrolidin-1-il)piridin-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (41):

Datos sacados de la mezcla

Isómero minoritario (*Z*):

RMN ¹H: 1,60 (4H, m); 3,43 (4H, m); 3,83 (6H, s); 3,91 (3H, s); 6,46 (1H, d, 4,6); 6,60 (1H, s); 6,61 (2H, s); 8,14 (1H, d, 4,6).

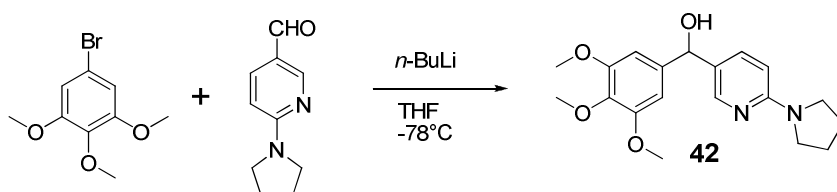
Isómero mayoritario (*E*):

RMN ¹H: 2,02 (4H, m); 3,47 (4H, m); 3,80 (6H, s); 3,87 (3H, s); 6,30 (1H, s); 6,42 (1H, d, 4,6); 6,76 (2H, s); 8,26 (1H, d, 4,6).

RMN ¹³C: 25,5 (2) (CH₂); 46,9 (2) (CH₂); 56,2 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 104,9 (2) (CH); 114,6 (CH); 119,5 (CH); 130,2 (C); 139,6 (C); 142,7 (C); 147,7 (CH); 153,0 (2) (C); 155,4 (C); 155,4 (C).

IR (KBr): 3433; 1605; 1542; 1238; 1127 cm⁻¹.

11. Preparación del alcohol 42



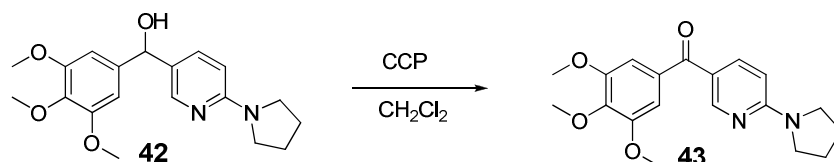
Una suspensión de 840 mg (3,40 mmol) de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilo en 40 ml de THF seco de color amarillo claro, se pone en agitación y atmósfera de nitrógeno a -78°C . Se añaden 2,6 ml (4,2 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano sin observarse cambio de coloración y tras 1 hora se adiciona una disolución de 500 mg (2,84 mmol) del aldehído 6-pirrolidinil-nicotínico en 10 ml de THF, gota a gota. Se observa que la disolución cambia a un color marrón anaranjado. Se deja alcanzar la temperatura ambiente espontáneamente y después de 20 horas de reacción, se añade agua y extrae con AcOEt. Se obtienen 870 mg del compuesto 42 como un sólido amarillo que se utiliza sin purificar en la siguiente reacción.

(6-(pirrolidin-1-il)piridin-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (42):

RMN ^1H : 1,87 (4H, m); 3,35 (4H, m), 3,71 (3H, s), 3,72 (6H, s); 5,50 (1H, s), 6,18 (1H, d, 8,4), 6,52 (2H, s), 7,28 (1H, dd, 8,4, 2,6), 7,87 (1H, d, 2,6).

IR (película): 3386, 1604, 1502, 1460, 1418, 1126 cm^{-1} .

12. Obtención de la fenstatina 43



A una disolución de 600 mg (1,74 mmol) del alcohol 42 en 5 ml de CH_2Cl_2 , se le añaden 393 mg (1,76 mmol) de CCP a temperatura ambiente. Al añadirlo la solución pasa a un color marrón oscuro. La reacción se controla por cromatografía de capa fina comprobándose la total desaparición del producto de partida al cabo de diez minutos. La reacción se pasa por una

columna de gel de sílice eluyéndose con CH₂Cl₂ y AcOEt, obteniéndose 450 mg (1,31 mmol, 75%) de cetona **43** en forma de un sólido blanco.

(6-(pirrolidin-1-il)piridin-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (43):

RMN ¹H: 2,03 (4H, m); 3,54 (4H, m); 3,86 (6H, s); 3,89 (3H, s); 6,40 (1H, d, 8,8); 6,98 (2H, s); 7,98 (1H, d, 8,8); 8,62 (1H, s).

RMN ¹³C: 25,4 (2) (CH₂); 47,0 (2) (CH₂); 56,2 (2) (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 106,0 (CH); 107,0 (2) (CH); 121,1 (C); 133,7 (C); 138,5 (CH); 141,0 (C); 152,8 (2) (C); 152,9 (CH); 158,3 (C); 193,1 (C).

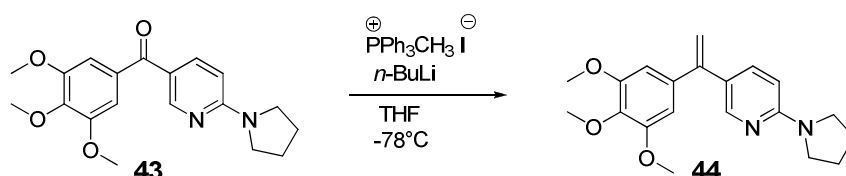
IR (KBr): 1640; 1548; 1330; 1127 cm⁻¹.

Pf (éter): 140-141 °C

HRMS (m/z): Obtenido 343,1651 (M+H⁺); esperado 343,1652 (C₁₉H₂₃N₂O₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 11,6 min.

13. Obtención de la isocombretastatina **44**



Una suspensión de color blanco de 623 mg (1,54 mmol) de sal de fosfonio **1** en 30 ml de THF seco, se pone en agitación y atmósfera de nitrógeno a -78°C. Se añade 1,0 ml (1,6 mmol) de n-BuLi 1,6 M en hexano, se forma una disolución amarilla en la que aparece algo de precipitado. Tras 1 hora se adicionan lentamente 176 mg (0,51 mmol) de una solución amarilla de la cetona **43** en 10 ml de THF seco. Al realizar la adición la disolución no cambia de color y se forma un pequeño precipitado. La mezcla se deja agitando 24 h a temperatura ambiente. Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente se aíslan 230 mg de crudo de reacción.

El producto obtenido se purifica por cromatografía flash con Hex/AcOEt 1:1, aislándose 80 mg (0,23 mmol, 46 %) del compuesto **44** en forma de un sólido amarillo pálido.

2-(pirrolidin-1-il)-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridina (44):

RMN ¹H: 2,00 (4H, m); 3,47 (4H, m); 3,79 (6H, s); 3,85 (3H, s); 5,23 (1H, s); 5,31 (1H, s); 6,33 (1H, d, 8,8); 6,54 (2H, s); 7,41 (1H, dd, 8,8, 2,2); 8,18 (1H, d, 2,2).

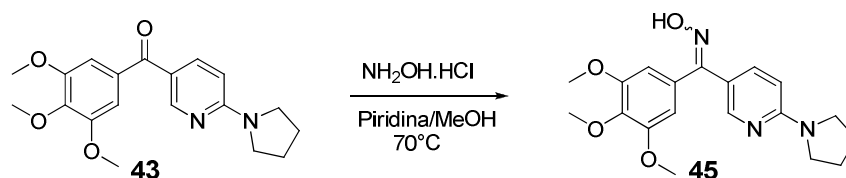
RMN ¹³C: 25,5 (2) (CH₂); 46,9 (2) (CH₂); 56,1 (2) (OCH₃); 60,8 (OCH₃); 105,5 (2) (CH); 106,0 (CH); 111,2 (CH₂); 124,3 (C); 137,1 (CH); 134,5 (C); 137,8 (C); 147,0 (CH); 147,2 (C); 152,8 (2) (C); 156,3 (C).

IR (KBr): 1600; 1506; 1235; 1126; 1006 cm⁻¹.

HRMS (m/z): Obtenido 341,1870 (M+H⁺); esperado 341,1859 (C₂₀H₂₅N₂O₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 18,2 min.

14. Preparación de la oxima **45**



A una disolución de 56 mg (0,16 mmol) de la cetona **43** en MeOH (10 mL), se añaden 170 mg (2,46 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y 4 gotas de piridina. La reacción se mantiene en agitación durante 24 h a 70 °C. Tras este tiempo se evapora el metanol, se añade agua y extrae con AcOEt, siguiendo el procedimiento habitual las fases orgánicas se secan y evaporan, obteniéndose 68 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cristalización en MeOH aislándose 15 mg (0,04 mmol, 25%) de la oxima **45**.

Oxima de (6-(pirrolidin-1-il)piridin-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (45):

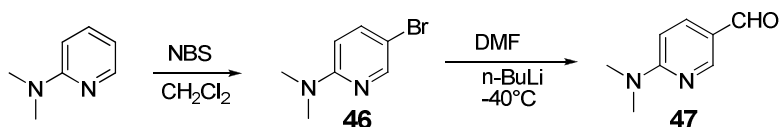
RMN ¹H: 2,13 (4H, m); 3,80 (4H, m); 3,88 (6H, s); 3,92 (3H, s); 6,68 (1H, d, 8,8); 6,99 (2H, s); 8,22 (1H, dd, 8,8, 2,0); 8,65 (1H, d, 2,0).

IR (KBr): 3490; 1610; 1590; 1430; 1380; 1210 cm⁻¹.

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 11,6 min; t_R: 27,8 min.

B. Análogos de combretastatinas

1. Obtención del aldehído 47:



a) Preparación del compuesto 46:

Se disuelven 209 mg (1,71 mmol) de *N,N*-dimetilpiridin-2-amina en 20 ml de CH_2Cl_2 y se añaden 365 mg (2,05 mmol) de NBS, apareciendo un color amarillo oscuro. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente, después se extrae con CH_2Cl_2 y se lava con agua saturada con NaCl, se obtienen 380 mg del crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/ CH_2Cl_2 4:6), aislándose 218 mg (1,08 mmol, 63 %) del compuesto 46.

4-bromo-*N,N*-dimetilpiridin-2-amina (46):

RMN ^1H : 3,06 (6H, s); 6,38 (1H, d, 9,2); 7,45 (1H, dd, 9,2, 2,4); 8,16 (1H, d, 2,4).

IR (KBr): 1594; 1338; 1211; 805 cm^{-1} .

b) Preparación del compuesto 47:

Se disuelven 720 mg (3,85 mmol) de 46 en 20 ml de THF, después se añaden 2,5 ml (4,00 mmol) de *n*-BuLi a -40°C . La mezcla se agita durante 1 h luego se añade 2,8 ml (36 mmol) DMF, la reacción se deja agitando durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se extrae con AcOEt y agua, se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora el disolvente, se obtienen 393 mg.

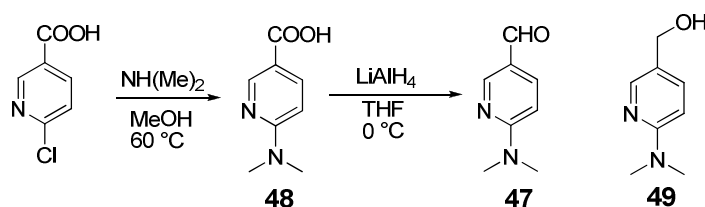
El crudo se purifica por cromatografía de columna con Hex/AcOEt (8:2), obteniéndose 116 mg (0,77 mmol, 20 %) de 47.

6-dimetilaminonicotinaldehído (47):

RMN ^1H : 3,21 (6H, s); 6,53 (1H, d, 8,8); 7,89 (1H, dd, 8,8, 2,2); 8,55 (1H, d, 2,2); 9,77 (1H, s).

RMN ^{13}C : 38,2 (2) (CH_3); 105,7 (CH); 121,5 (C); 136,0 (CH); 154,5 (CH); 161,2 (C); 189,1 (CH).

IR (película): 1681; 1600; 1531; 1498; 1395; 1131 cm^{-1} .

2. Otro metodo de obtención de 47**a) Preparación de 48:**

Se disuelven 200 mg (1,27 mmol) de ácido 6-cloronicotínico en 10 ml de MeOH y se le añaden 5 ml de *N,N*-dimetilamina disuelto en metanol al 30%, la reacción se agita durante 24h a 60 °C, mantenido color marrón. Luego se evapora el metanol y se obtienen 220 del crudo de reacción.

A continuación se cristaliza en ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) y se aíslan 157 mg (0,94 mmol, 78 %) del compuesto **48**.

Ácido 6-dimetilaminonicotínico (48):

RMN ^1H (CD_3OD): 3,06 (6H, s); 6,55 (1H, d, 9,4); 7,90 (1H, dd, 9,4, 2,2); 8,57 (1H, d, 2,2).

RMN ^{13}C (CD_3OD): 38,4 (2) (CH_3); 106,3 (CH); 114,9 (C); 139,5 (CH); 151,6 (CH); 162,04 (C); 169,3 (C).

IR (película): 3500, 1675, 1284 cm^{-1} .

b) Preparación de 47:

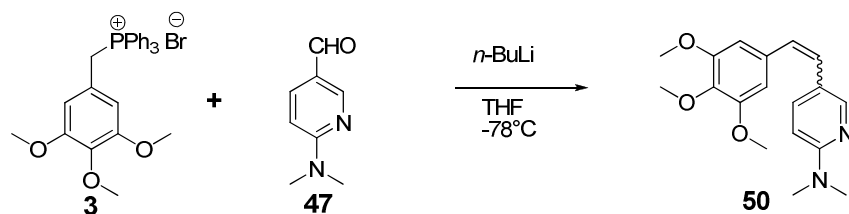
Se disuelven 2,00 g (12,1 mmol) del compuesto **48** en 30 ml de THF y se le añade 500 mg (13,3 mmol) de LiAlH₄ a 0°C, aparece color marrón. La mezcla se agita durante 20 h a temperatura ambiente controlándose por cromatografía de capa fina, después se evapora el THF y se extrae con AcOEt, se obtiene 1,65 g de una mezcla de **47** y **49** en proporción 1:2.

El crudo se purifica por cromatografía de columna, se aíslan 262 mg (1,75 mmol, 15 %) del aldehído **47** y 525 mg (3,45 mmol, 29 %) de **49**.

(6-dimetilaminopiridin-3-il)metanol (49):

RMN ¹H: 3,10 (6H, s); 4,53 (2H, s); 6,46 (1H, d, 8,6); 7,45 (1H, dd, 8,6, 2,2); 8,02 (1H, d, 2,2).

3. Obtención de la combretastatina 50



A una suspensión de 1,30 g (2,14 mmol) de la sal de fosfonio **3** en 40 ml de THF seco, se le añaden 1,5 ml (2,1 mmol) de *n*-BuLi a -78 °C, apareciendo color naranja. La mezcla se agita durante 1 h, después se añaden 230 mg (1,53 mmol) de aldehído **47** disuelto en THF. La reacción se deja agitar durante 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH₄Cl y se extrae con AcOEt, obteniéndose 848 mg del compuesto **50** como una mezcla *Z/E* en proporción 1:2.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 1:1), obteniéndose 65 mg (0,21 mmol, 14 %) del isómero *Z* y 213 mg (0,68 mmol, 44 %) de la mezcla *Z/E*.

(Z)-2-dimetilamino-5-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridina (50):

RMN ^1H : 3,05 (6H, s); 3,72 (6H, s); 3,83 (3H, s); 6,32 (1H, d, 8,8); 6,38 (2H, s); 6,51 (2H, s); 7,38 (1H, dd, 8,8, 2,2); 8,09 (1H, d, 2,2).

RMN ^{13}C : 38,1 (2) (CH_3); 56,0 (2) (CH_3); 60,8 (CH_3); 104,7 (CH); 105,7 (2) (CH); 109,5 (C); 120,4 (C); 126,9 (CH); 127,8 (CH); 133,2 (C); 133,6 (C); 137,2 (CH); 148,9 (CH); 153,3 (2) (C); 158,5 (C).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 16,4 min.

Datos obtenidos del espectro de la mezcla *Z/E*

(*E*)-2-dimetilamino-5-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridina (50):

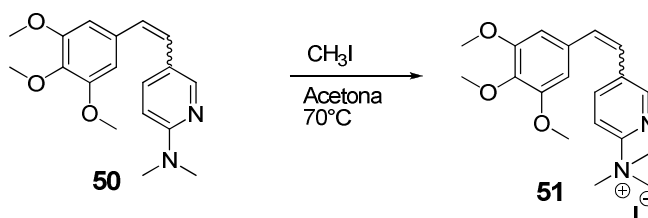
RMN ^1H : 3,11 (6H, s); 3,86 (3H, s); 3,92 (6H, s); 6,52 (1H, d, 8,8); 6,69 (2H, s); 6,80 (1H, d, 16,4); 6,89 (1H, d, 16,4); 7,67 (1H, dd, 8,8, 2,2); 8,22 (1H, d, 2,2).

RMN ^{13}C : 38,5 (2) (CH_3); 56,4 (2) (CH_3); 61,2 (CH_3); 103,2 (2) (CH); 106,2 (CH); 121,3 (C); 125,5 (CH); 128,1 (CH); 133,8 (C); 134,1 (CH); 137,6 (CH); 147,5 (C); 153,6 (2) (C); 158,8 (C).

IR (película): 1600; 1508; 1457; 1389; 1236; 1126 cm^{-1} .

HRMS (m/z): Obtenido 315,1708 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 315,1707 ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3^+$).

4. Metilación de la combretastatina 51



Se disuelven 160 mg (0,51 mmol) de la mezcla *Z/E* de la aminocombretastatina **50** en 15 ml de acetona, después se añaden 320 μL (5,09 mmol) de yodometano y aparece un color amarillo. La mezcla se agita durante 24 h a 70°C en un tubo sellado, luego se evapora la acetona y se obtienen 213 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cristalización en AcOEt/MeOH, se aíslan 35 mg (0,11 mmol, 22 %) del isómero *E* del compuesto **51**.

Yoduro de (*E*)-*N,N,N*-trimetil-5-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridinio (51):

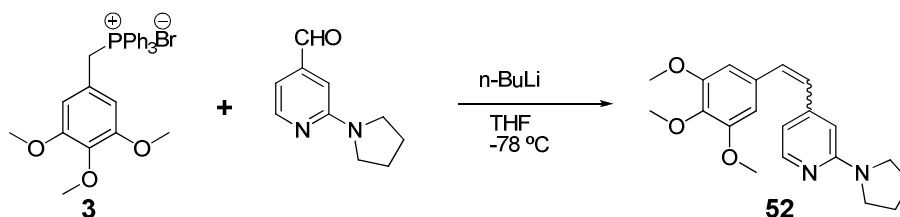
RMN ¹H (CD₃OD): 3,56 (9H, s); 3,75 (3H, s); 3,79 (6H, s); 6,84 (2H, s); 7,18 (1H, d, 16,0); 7,34 (1H, d, 16,0); 7,79 (1H, d, 8,6); 8,17 (1H, dd, 8,6, 2,2); 8,64 (1H, d, 2,2).

IR (película): 1579; 1462; 1244; 1122 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 329,1850 (M⁺); esperado 329,1860 (C₁₉H₂₅N₂O₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 5,2 min.

5. Preparación de la combretastatina **52**



Se disuelven en un matraz 1,66 g (3,18 mmol) de la sal de fosfonio **3** en 40 ml de THF, después se le añaden 2,0 ml (3,18 mmol) de *n*-BuLi a -78 °C, apareciendo un color amarillo. La mezcla se agita durante 1 h, luego se añaden 400 mg (2,27 mmol) del aldehído, el color pasa de amarillo a naranja. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH₄Cl y se extrae con AcOEt, obteniéndose 1,09 g del compuesto **52** como una mezcla que tiene los isómeros *Z/E* en proporción 1:3.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4), obteniéndose 123 mg (0,23 mmol; 16 %) del isómero *Z* y 181 mg (0,53 mmol; 17 %) de la mezcla *Z/E*.

(*Z*)-2-(pirrolidin-1-il)-4-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridina (52):

RMN ¹H: 1,95 (4H, m); 3,35 (4H, m); 3,68 (6H, s); 3,82 (3H, s); 6,24 (1H, d, 1,4); 6,40 (1H, d, 12,2); 6,41 (1H, dd, 5,2, 1,4); 6,50 (2H, s); 6,54 (1H, d, 12,2); 8,02 (1H, d, 5,2).

RMN ^{13}C : 25,5 (2) (CH_2); 46,6 (2) (CH_2); 56,0 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 106,1 (2) (CH); 106,1 (CH); 111,3 (CH); 128,5 (CH); 132,2 (C); 132,3 (CH); 137,5 (C); 145,9 (C); 147,9 (2) (C); 152,9 (CH); 157,6 (C).

Datos del isómero *E* sacados de la mezcla *Z/E*:

RMN ^1H : 1,98 (4H, m); 3,45 (4H, m); 3,80 (6H, s); 3,84 (3H, s); 6,48 (1H, s); 6,66 (1H, d, 5,4); 6,88 (1H, d, 16,1); 6,72 (2H, s); 7,08 (1H, d, 16,1); 8,07 (1H, d, 5,4).

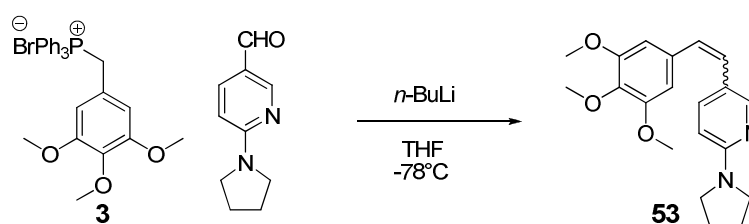
RMN ^{13}C : 25,6 (2) (CH_2); 46,8 (2) (CH_2); 56,1 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 104,0 (2) (CH); 104,5 (CH); 106,2 (CH); 126,6 (C); 126,7 (CH); 131,8 (C); 132,0 (CH); 137,5 (CH); 145,6 (C); 152,8 (2) (C); 155,2 (C).

IR (película): 1650; 1598; 1538; 1329; 1229; 1127 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 341,1886 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 341,1860 ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 15,6 min; t_{R} : 20,1 min.

6. Preparación de la combretastatina 53



A 156 mg (0,27 mmol) de la sal de fosfonio **3** en THF seco (10 ml) y en atmósfera de nitrógeno, se añaden 0,2 ml (0,12 mmol) de $n\text{-BuLi}$ y se mantiene 1 h en agitación a -78°C . A continuación se añaden lentamente una disolución de 57 mg (0,32 mmol) del aldehído de 6-pirrolidinilnicotínico en 10 ml de THF, formándose una solución naranja oscura y se deja que alcance progresivamente la temperatura ambiente. Transcurridas 24 h, se añade agua y se realiza la extracción con AcOEt.

Las fases orgánicas se reúnen y se secan con Na_2SO_4 , se filtran y se evaporan, obteniéndose un aceite amarillo, se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 1:1), obteniéndose 40 mg (0,12 mmol, 38 %) de una mezcla que contiene los isómeros *Z/E* en proporción 1:1.

(Z/E)-2-(pirrolidin-1-il)-5-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)piridina (53):

Datos sacados de la mezcla

Isómero Z:

RMN ¹H : 2,04 (4H, m); 3,50 (4H, m); 3,78 (6H, s); 3,92 (3H, s); 6,23 (1H, d, 8,8); 6,33 (1H, d, 12,0); 6,43 (1H, d, 12,0); 6,49 (2H, s); 7,40 (1H, dd, 8,8, 2,2); 8,11 (1H, d, 2,2).

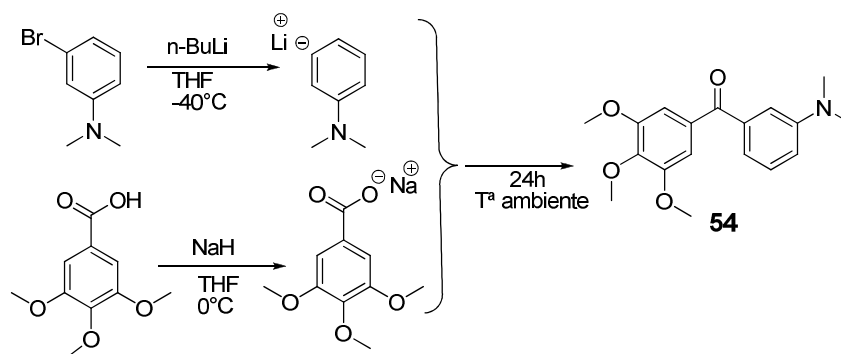
Isómero E:

RMN ¹H : 2,02 (4H, m); 3,50 (4H, m); 3,85 (6H, s); 3,93 (3H, s); 6,36 (1H, s); 6,70 (2H, s); 6,71 (1H, d, 4,4); 6,84 (1H, d, 2,2); 6,94 (1H, s); 8,22 (1H, d, 2,2).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 17,8 min; t_R: 18,6 min.

C. Otros análogos de isocombretastatinas

1. Obtención de la fenstatina 54



Se disuelven 2,78 g (13,9 mmol) de 3-bromodimetilanilina en 70 ml de THF seco, después se le añaden 9,5 ml (15 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -40°C con agitación y atmósfera de nitrógeno. La mezcla se pone de coloración amarilla.

En otro matraz se disuelven 4,42 g (20,8 mmol) del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico en 150 ml de THF seco y se le añaden lentamente 1,11 g (27,8 mmol) de hidruro sodio al 60 % a 0°C . La mezcla se pone de coloración blanca. Al cabo de una hora de reacción se añade el contenido de la primera reacción sobre la segunda y se deja agitando a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se añade sobre una disolución de NH_4Cl , se evapora el THF y extrae con AcOEt, obteniéndose 3,27 g de crudo.

La reacción se purifica por cromatografía flash (Hex/AcEt 7:3), aislándose 3,27 g (10,4 mmol, 75 %) del compuesto **54**, que se cristaliza en MeOH aislándose en forma de cristales amarillos.

(3-(dimetilamino)fenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (54):

RMN ^1H : 2,89 (6H, s); 3,76 (6H, s); 3,83 (3H, s); 6,82 (1H, dd, 8,0, 2,8); 6,95 (1H, da, 8,0); 6,99 (2H, s); 7,04 (1H, sa); 7,29 (1H; t, 8,0).

RMN ^{13}C : 40,5 (2) (CH_3); 56,3 (2) (CH_3); 61,0 (CH_3); 107,8 (2) (CH); 113,2 (CH); 116,2 (CH); 118,3 (CH); 128,8 (CH); 133,0 (C); 138,5 (C); 141,8 (C); 150,4 (C); 152,8 (2) (C); 196,4 (C).

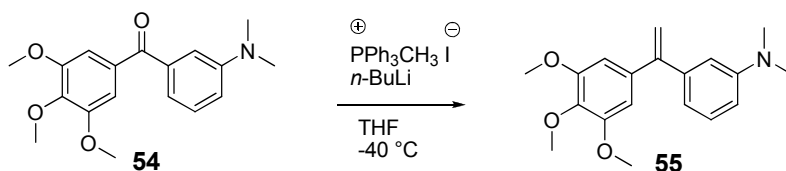
IR (KBr): 1650; 1589; 1412; 1334; 1230; 1124 cm^{-1} .

Pf (MeOH): 77-78 °C

HMRS (m/z): Obtenido 338,1361 ($\text{M}+\text{Na}^+$); esperado 338,1368 ($\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Na}^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 15,8 min.

2. Obtención de la isocombretastatina 55



Se disuelven 1,15 g (2,85 mmol) de la sal de fosfonio **1** en 50 ml de THF, después se le añaden 1,2 ml (2,0 mmol) de *n*-BuLi a -40 °C, apareciendo color amarillo. La mezcla se agita durante 1 h a -40 ° en atmósfera de nitrógeno, luego se añade 300 mg (0,95 mmol) de la cetona **54** disuelta en 10 ml de THF, el color pasa de amarillo a naranja. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH_4Cl y se extrae con AcOEt, obteniéndose 800 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt, 7:3), aislándose 280 mg (0,89 mmol; 94 %) del compuesto **55**.

***N,N*-dimetil-3-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil)anilina (55):**

RMN ^1H (CD_3OD): 2,90 (6H, s); 3,75 (6H, s); 3,78 (3H, s); 5,38 (1H, d, 1,2); 5,41 (1H, d, 1,2); 6,61 (2H, s); 6,65 (1H, d, 8,0); 6,73 (1H, s); 6,75 (1H, dd, 8,0); 7,16 (1H, t, 8,0)

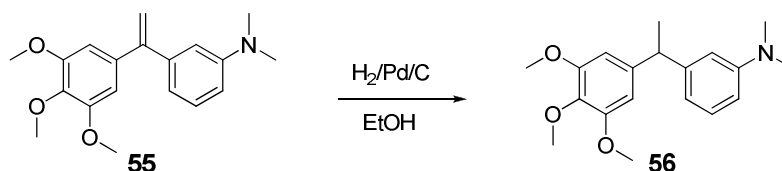
RMN ^{13}C : 40,8 (2) (CH_3); 56,2 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 105,7 (2) (CH); 112,3 (CH); 112,8 (CH); 113,6 (CH_2); 117,3 (CH); 128,8 (CH); 137,5 (C); 137,7 (C); 142,1 (C); 150,5 (C); 150,8 (C); 152,8 (2) (C).

IR (película): 1596; 1578; 1503; 1411; 1353; 1235; 1127; 898 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 314,1750 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 314,1756 ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_3^+$).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 19,4 min.

3. Reducción de la isocombretastatina **55**



Se disuelven 50 mg (0,16 mmol) de **55** en 10 ml de EtOH y se le añaden 10 mg del catalizador de paladio. La reacción se agita fuertemente durante 4 h a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno, después se filtra sobre celita, se evapora el disolvente y se obtienen 47 mg (0,15 mmol; 94 %) de producto reducido.

N,N-dimetil-3-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil)anilina (56):

RMN ¹H: 1,63 (3H, d, 7,5); 2,93 (6H, s); 3,99 (9H, s); 4,10 (1H, c, 7,5); 6,48 (2H, s); 6,60 (1H, d, 6,5); 6,62 (1H, d, 6,5); 6,66 (1H, sa); 7,22 (1H, t, 6,5).

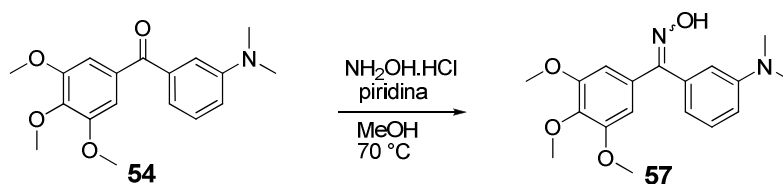
RMN ¹³C: 22,2 (CH₃); 41,1 (2) (CH₃); 45,5 (CH); 56,1 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 104,7 (2) (CH); 111,1 (CH); 112,7 (CH); 129,2 (2) (CH); 136,2 (C); 142,2 (C); 147,2 (C); 150,2 (C); 153,0 (2) (C).

IR (película): 1589; 1499; 1458; 1327; 1233; 1126 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 316,1909 (M+H⁺); esperado 316,1913 (C₁₉H₂₆NO₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 18,6 min.

4. Preparación de la oxima 57



Se disuelven 100 mg (0,32 mmol) de **54** en 15 ml de MeOH, después se le añaden 220 mg (3,17 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y 4 gotas de piridina. La mezcla se agita durante 24 h a 70 °C, posteriormente se evapora el MeOH y se extrae con agua/AcOEt, obteniéndose 96 mg (0,29 mmol, 91 %) de una mezcla de isómeros en proporción 1:1.

Oxima de (3-(dimetilamino)fenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (57):

Datos sacados del espectro de la mezcla

Isómero *Z*:

RMN ¹H: 2,87 (6H, s); 3,72 (6H, s); 3,80 (3H, s); 6,55 (2H, s); 6,61 (1H, d, 8,0); 6,65 (1H, d, 8,0); 6,72 (1H, s); 7,26 (1H; t, 8,0).

RMN ¹³C: 40,6 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 106,7 (2) (CH); 113,1 (CH); 114,0 (CH); 117,3 (CH); 128,3 (C); 128,9 (CH); 133,3 (C); 136,9 (C); 150,3 (C); 152,9 (2) (C); 158,5 (C).

Isómero *E*:

RMN ¹H: 2,90 (6H, s); 3,76 (6H, s); 3,84 (3H, s); 6,62 (1H, s); 6,71 (2H, s); 6,74 (1H, d, 8,0); 6,90 (1H, d, 8,0); 7,13 (1H; t, 8,0).

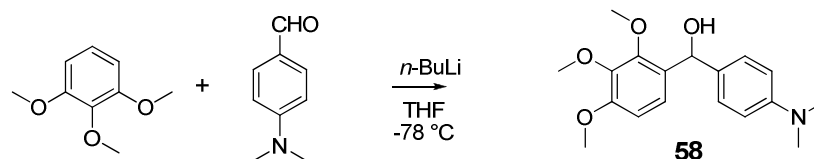
RMN ¹³C : 40,6 (2) (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 105,3 (2) (CH); 111,8 (CH); 113,4 (CH); 117,1 (CH); 128,3 (C); 128,9 (CH); 133,3 (C); 136,9 (C); 150,3 (C); 152,9 (2) (C); 158,1 (C).

IR (película): 3428; 1582; 1503; 1411; 1344; 1236; 1127 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 331,1658 (M+H⁺); esperado 331,1658 (C₁₈H₂₃N₂O₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 9,0 min.

5. Preparación del alcohol 58

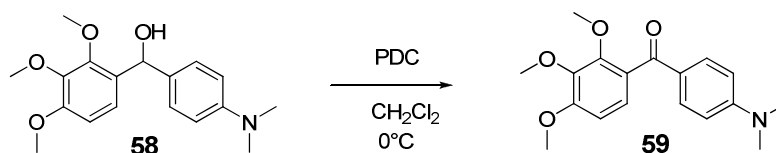


A 5,00 g (29,7 mmol) de 2,3,4-trimetoxibenceno disueltos en 30 ml de THF seco a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, en atmósfera de nitrógeno y con agitación magnética, se le adicionan lentamente 18,6 ml (29,73 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano. Tras 1 h se añade gota a gota a esa temperatura 4,43 g (29,7 mmol) de 4-(dimetilamino)benzaldehído disueltos en 30 ml de THF. La mezcla se mantiene en agitación y atmósfera de nitrógeno durante 24 h a temperatura ambiente. La reacción se vierte sobre una disolución de NH_4Cl al 4% y AcOEt, se evapora el THF y se extrae con AcOEt. Se lava hasta pH neutro con una disolución saturada de NaCl, se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora, obteniéndose 9,44 g, que se utilizarán sin purificar en la siguiente reacción.

(4-dimetilaminofenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (58):

RMN¹H: 2,93 (6H, s); 3,67 (3H, s); 3,89 (6H, s); 5,87 (CH); 6,56 (2H, d, 8,6); 6,63 (1H, s); 6,67 (1H, d, 6,4); 6,71 (1H, d, 6,4); 7,00 (2H, d, 8,6).

6. Obtención de la fenstatina 59



A los 9,44 g (29,7 mmol) del crudo de **58** disueltos en 15 ml de CH_2Cl_2 seco a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ se le añaden 16,8 g (44,7 mmol) de dicromato de piridinio, en atmósfera de nitrógeno y con agitación. La reacción se mantiene 24 h permitiendo que alcance la temperatura ambiente. Se filtra con celita y se extrae, obteniéndose 8,09 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía de columna flash (Hex/AcOEt 8:2), obteniéndose 1,86 g (5,90 mmol, 20 %) de **59**.

(4-dimetilaminofenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanona (59):

RMN ¹H: 3,02 (6H, s); 3,76 (3H, s); 3,87 (6H, s); 6,60 (2H, d, 9,0); 6,67 (1H, d, 8,6); 7,01 (1H, d, 8,6); 7,72 (2H, d, 9,0).

RMN ¹³C: 40,1 (2) (CH₃); 56,1 (CH₃); 61,1 (CH₃); 61,9 (CH₃); 106,8 (CH); 110,5 (2) (CH); 124,2 (CH); 125,5 (C); 127,7 (C); 132,4 (2) (CH); 142,0 (C); 152,0 (C); 153,5 (C); 155,0 (C); 193,6 (C).

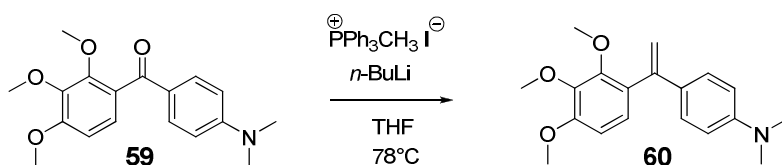
IR (KBr): 1636; 1588 cm⁻¹.

Pf (Hexano/CH₂Cl₂): 205-207 °C

HMRS (m/z): Obtenido 316,1560 (M+Na⁺); esperado 316,1549 (C₁₈H₂₂NO₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 12,9 min.

7. Obtención de la isocombretastatina **60**



A 1,93 mg (4,80 mmol) de la sal de fosfonio **1** suspendidos en 30 mL de THF seco a -78 °C en atmósfera de nitrógeno se le añaden 2,5 ml (4,0 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano y se mantiene 1 h en agitación, después se añaden 500 mg (1,58 mmol) de la cetona **59** disueltos en 15 ml de THF seco. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente según el procedimiento habitual, se obtienen 408 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica mediante cromatografía flash (Hex/AcOEt 9:1), se obtienen 349 mg (1,11 mmol, 70 %) de **60**, que se cristaliza en *t*-butilmetiléter para obtener 293 mg de cristales amarillos.

N,N-dimetil-4-(1-(2,3,4-trimetoxifenil)etenil)anilina (60):

RMN ¹H: 2,95 (6H, s); 3,59 (3H, s); 3,87 (3H, s); 3,89 (3H, s); 5,09 (1H, d, 1,6); 5,54 (1H, d, 1,6); 6,64 (2H, d, 8,8); 6,67 (1H, d, 8,4); 6,92 (1H, d, 8,4); 7,19 (2H, d, 8,8).

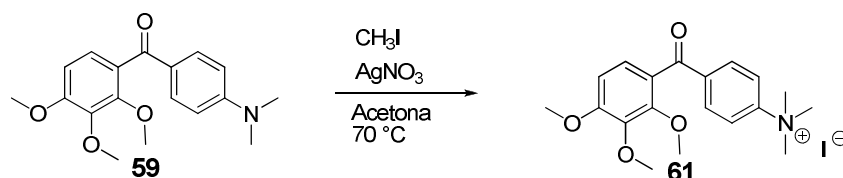
RMN ¹³C: 40,5 (2) (CH₃); 56,0 (CH₃); 60,8 (CH₃); 60,9 (CH₃); 106,9 (CH); 111,8 (CH₂); 112,1 (2) (CH); 125,4 (CH); 127,6 (2) (CH); 129,8 (C); 129,9 (C); 142,4 (C); 146,5 (C); 150,1 (C); 151,8 (C); 153,3 (C).

IR (KBr): 1602; 1521 cm⁻¹.

Pf (t-butilmetiléter): 63-65°C

HMRS (m/z): Obtenido 314,1738 (M+H⁺); esperado 314,1756 (C₁₉H₂₄NO₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 19,7 min.

8. Metilación de la fenstatina 59

En un tubo sellado se disuelven 250 mg (0,79 mmol) de la cetona **59** en 15 ml de acetona, después se añaden 494 µl (7,9 mmol) de yodometano y 269 mg (1,58 mmol) de nitrato de plata, apareciendo un precipitado blanco. La mezcla se agita durante 24 h a 70 °C, luego se filtra y se aísla 330 mg de crudo de reacción.

El crudo se cristaliza en metanol aislándose 180 mg (0,54 mmol, 69 %) de **61** en forma de cristales blancos y 140 mg de aguas madres.

Yoduro de N,N,N-trimetil-4-(2,3,4-trimetoxibenzoil)bencenamionio (61):

RMN ¹H (piridina): 3,35 (3H, s); 3,40 (3H, s); 3,45 (3H, s); 3,74 (9H, s); 6,47 (1H, d, 8,8); 7,02 (1H, d, 8,8); 7,70 (2H, d, 8,4); 7,72 (2H, d, 8,4).

RMN ¹³C (piridina): 54,8 (CH₃); 56,8 (3) (CH₃); 59,4 (CH₃); 60,6 (CH₃); 106,6 (CH); 119,6 (2) (CH); 124,1 (CH); 124,6 (C); 130,2 (2) (CH); 139,4 (C); 141,0 (C); 148,7 (C); 151,9 (C); 156,2 (C); 192,2 (C).

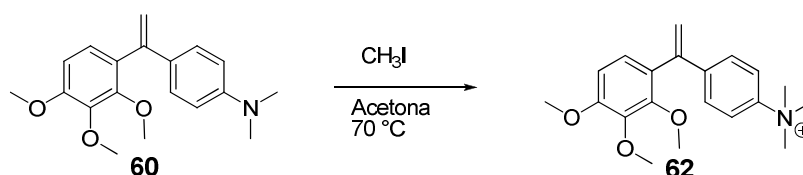
IR (KBr): 1648; 1592; 1461; 1412; 1296; 1094 cm⁻¹.

Pf (Acetona/MeOH): 172-173 °C

HMRS (m/z): Obtenido 330,1698 (M⁺); esperado 330,1705 (C₁₉H₂₄NO₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 6,8 min.

9. Metilación de la isocombretastatina **60**



Se disuelve en un matraz 170 mg (0,54 mmol) de la olefina **60** en 10 ml de acetona, después se añaden 170 μL de CH₃I a 60°C, apareciendo coloración naranja. La mezcla se agita durante 24 h, apareciendo un precipitado de color amarillo que se filtra y lava con éter aislándose 220 mg de crudo de reacción.

El crudo se cristaliza en metanol obteniéndose 160 mg (0,49 mmol, 91 %) de **62** como un sólido amarillo.

Yoduro de *N,N,N*-trimetil-4-(1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil)bencenamonio (62):

RMN ¹H (DMSO): 3,35 (3H, s); 3,51 (9H, s); 3,66 (3H, s); 3,76 (3H, s); 5,32 (1H, s); 5,70 (1H, s); 6,79 (1H, d, 8,2); 6,89 (1H, d, 8,2); 7,37 (2H, d, 8,6); 7,76 (2H, d, 8,6).

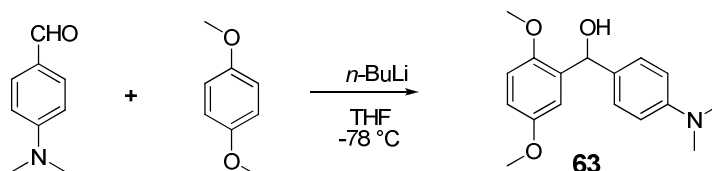
RMN ¹³C (DMSO): 55,9 (CH₃); 56,4 (3) (CH₃); 60,4 (2) (CH₃); 107,9 (CH); 117,7 (CH₂); 120,3 (2) (CH); 124,8 (CH); 127,2 (C); 127,4 (2) (CH); 141,8 (C); 142,6 (C); 144,6 (C); 146,1 (C); 150,9 (C); 153,6 (C).

IR (KBr): 1594; 1496; 1459; 1406; 1295; 1090 cm⁻¹.

Pf (MeOH):168-169 °C

HMRS (m/z): Obtenido 328,1907 (M⁺); esperado 328,1913 (C₂₀H₂₆NO₃⁺).

10. Preparación del alcohol 63



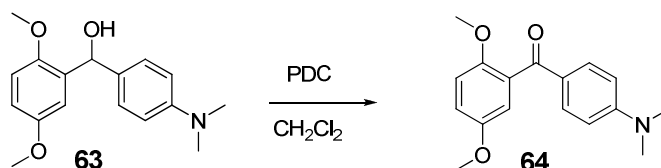
A 5,02 g (36,2 mmol) de 1,4-dimetoxibenceno disueltos en 30 ml de THF seco a -78 °C, en atmósfera de nitrógeno y con agitación magnética se le adicionan lentamente 22,6 ml (36,2 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano. Tras 1 h de reacción se añaden gota a gota a esa temperatura 5,40 g (36,2 mmol) de 4-(dimetilamino)benzaldehído disueltos en 20 ml de THF seco. La reacción se mantiene en agitación y atmósfera de nitrógeno durante 24 h a temperatura ambiente. La reacción se vierte sobre una disolución de NH₄Cl al 4% y AcOEt, se evapora el THF y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava hasta pH neutro con una disolución saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora, obteniéndose 11,20 g, que se utilizarán sin purificar en la siguiente reacción.

(4-dimetilaminofenil)(2,5-dimetoxifenil)metanol (63):

RMN ¹H: 2,93 (6H, s); 3,75 (3H, s); 3,76 (3H, s); 5,96 (1H, s); 6,68 (2H, d, 8,6); 6,77 (1H, s); 6,79 (1H, d, 2,6); 6,94 (1H, d, 2,6); 7,23 (2H, d, 8,8).

RMN ¹³C: 40,5 (2) (CH₃); 55,4 (CH₃); 55,8 (CH₃); 70,9 (CH); 111,6 (CH); 112,3 (3) (CH); 113,3 (CH); 127,5 (2) (CH); 131,7 (C); 134,1 (C); 149,8 (C); 150,6 (C); 153,7 (C).

11. Preparación de la fenstatina 64



A los 11,20 g (39,0 mmol) del crudo de **63** disueltos en 15 ml de CH₂Cl₂ seco a 0 °C, se le añaden 22,05 g de PDC (58,6 mmol), en atmósfera de nitrógeno y con agitación. La reacción se mantiene 24 h a temperatura ambiente. Se filtra a través de celita y se extrae con CH₂Cl₂, lavando la fase orgánica primero con HCl y después con NaHCO₃ al 5%, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora, obteniéndose 8,52 g (29,9 mmol) de crudo de reacción. Se purifica mediante cromatografía flash (Hex/AcOEt 8:2), se aíslan 3,52 g (12,4 mmol, 32 %). Se cristaliza con *t*-butilmetiléter y se obtienen 1,14 g de cristales de **64**.

(4-dimetilaminofenil)(2,5-dimetoxifenil)metanona (64):

RMN ¹H: 3,03 (6H, s); 3,68 (3H, s); 3,75 (3H, s); 6,61 (2H, d, 8,8); 6,85 (1H, d, 2,5); 6,90 (1H, dd, 8,8, 2,5); 6,92 (1H, d, 8,8); 7,74 (2H, d, 8,8).

RMN ¹³C: 40,0 (2) (CH₃); 55,8 (CH₃); 56,5 (CH₃); 110,4 (2) (CH); 113,0 (CH); 114,1 (CH); 115,9 (CH); 125,1 (C); 130,9 (C); 132,3 (2) (CH); 150,9 (C); 153,3 (C); 153,5 (C); 194,0 (C).

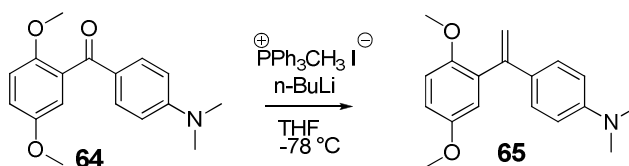
IR (KBr): 1637; 1588; 1544 cm⁻¹.

Pf (Hexano/CH₂Cl₂): 78-80 °C

HMRS (m/z): Obtenido 286,1420 (M+H⁺); esperado 286,1443 (C₁₇H₂₀NO₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 13,1 min.

12. Obtención de la isocombretastatina 65



A 2,12 g (5,24 mmol) de la sal de fosfonio **1** suspendidos en 30 mL de THF seco a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera de nitrógeno, se le añaden 2,7 ml (4,38 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano y se mantiene 1 h en agitación. En estas condiciones se añaden, desde un embudo de adición, gota a gota, 500 mg (1,75 mmol) de **64** disueltos en 20 ml de THF seco, permitiendo que alcance espontáneamente la temperatura ambiente y con agitación. Tras 24 horas se vierte la reacción sobre una mezcla de NH_4Cl al 4% y AcOEt, después se evapora el THF y se extrae con AcOEt. La reunión de las fases orgánicas se lava hasta pH neutro con una disolución saturada de NaCl, se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora, obteniéndose 411 mg (1,45 mmol) de crudo de reacción.

El crudo se purifica mediante cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4), obteniéndose 245 mg (0,87 mmol, 50%) del compuesto **65** en forma de aceite amarillo, que se cristaliza utilizando como disolvente *t*-butilmetiléter para obtener 151 mg de cristales de color amarillo.

4-(1-(2,5-dimetoxifenil)vinil)-N,N-dimetilbencenamina (65):

RMN ^1H : 2,99 (6H, s); 3,68 (3H, s); 3,82 (3H, s); 5,18 (1H, s); 5,70 (1H, s); 6,70 (2H, d, 9,0); 6,90 (3H, s); 7,28 (2H, d, 9,0).

RMN ^{13}C : 40,6 (2)(CH_3); 55,8 (CH_3); 56,7 (CH_3); 111,7 (CH_2); 112,1 (2) (CH); 112,8 (CH); 113,2 (CH); 117,1 (CH); 127,3 (2) (CH); 128,8 (C); 133,0 (C); 146,4 (C); 150,1 (C); 151,6 (C); 153,7 (C).

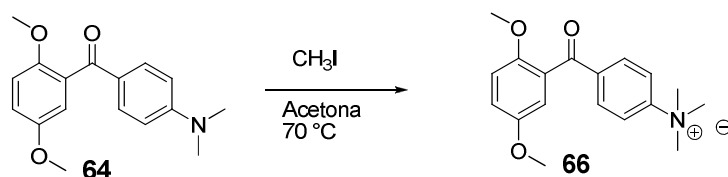
IR (KBr): 1525, 1605 cm^{-1} .

Pf (*t*-butilmetiléter): 68-70 $^\circ\text{C}$

HMRS (m/z): Obtenido 284,1635 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 284,1651 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_2^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 19,5 min.

13. Metilación de la fenstatina **64**



En un tubo sellado se disuelven 260 mg (0,91 mmol) de la cetona **64** en 10 ml de acetona y se le añaden 170 μl de yodometano y se calienta a 70°C , apareciendo un color naranja. La mezcla se agita durante 24 h, luego se trata con éter y se filtra, aislándose 135 mg (0,47 mmol, 52 %) de sólido amarillo del compuesto **66**.

Yoduro de *N,N,N*-trimetil-4-(2,5-dimetoxibenzoil)benzenamonio (66):

RMN ^1H (DMSO): 3,60 (3H, s); 3,63 (9H, s); 3,73 (3H, s); 6,93 (1H, t, 1,8); 7,15 (2H, d, 1,8); 7,84 (2H, d, 9,0); 8,08 (2H, d, 9,0).

RMN ^{13}C (DMSO): 40,4 (3) (CH_3); 56,3 (CH_3); 56,4 (CH_3); 113,6 (CH); 114,0 (CH); 117,8 (CH); 121,3 (2) (CH); 127,9 (C); 130,6 (2) (CH); 138,0 (C); 150,2 (C); 150,8 (C); 153,1 (C); 194,1 (C).

IR (KBr): 1662; 1600; 1496; 1413; 1226; 1035 cm^{-1} .

Pf (éter): 162°C

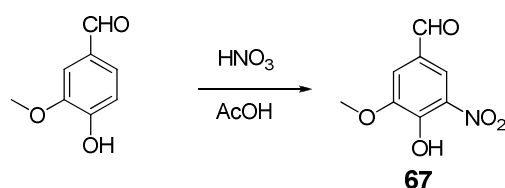
HMRS (m/z): Obtenido 300,1593 (M^+); esperado 300,1600 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 4,2 min.

IV. Modificaciones en el anillo A

A. Análogos de isocombretastatinas

1. Nitración de vainillina



Se disuelven 11,50 g (75,66 mmol) de vainillina en 150 ml de ácido acético y se le añaden 4,7 ml (98 mmol) de ácido nítrico, el color pasa de blanco a amarillo. La reacción se deja agitando durante 2 h a temperatura ambiente, luego se trata con agua apareciendo un precipitado que se filtra, obteniéndose 11,90 g (60,40 mmol, 80 %) de 5-nitrovainillina.

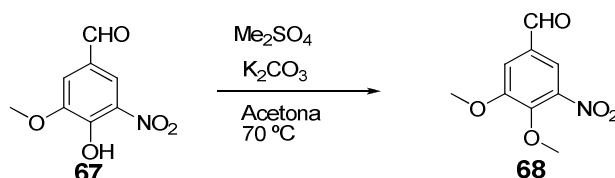
4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrobenzaldehído (67):

RMN ¹H: 4,02 (3H, s); 7,64 (1H, d, 2,0); 8,22 (1H, d, 2,0); 9,89 (1H, s).

IR (KBr): 3206; 1681; 1548; 1336; 1232; 1104 cm⁻¹.

Pf (AcOH/H₂O): 176-177 °C

2. Metilación del compuesto 67



Se disuelven 5,00 g (25,36 mmol) de **67** en 40 ml de acetona, después se le añaden 12,30 g (89,0 mmol) de carbonato potásico y 12 ml (127 mmol) de sulfato de dimetilo. La reacción se

agita durante 48 h a temperatura ambiente y 8 h a 70°C, posteriormente se filtra sobre Celita y se evapora el disolvente, obteniéndose 5,8 g del crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash con CH₂Cl₂/Hex 8:2 para quitar el sulfato de dimetilo y se aíslan 4,36 g (20,65 mmol, 81 %) de compuesto **68**, que se cristaliza en 2-propanol.

3,4-dimetoxi-5-nitrobenzaldehído (68):

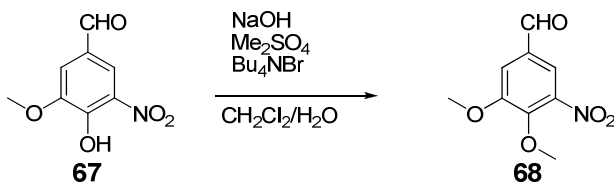
RMN ¹H: 4,00 (3H, s); 4,08 (3H, s); 7,62 (1H, d, 2,0); 7,84 (1H, d, 2,0); 9,92 (1H, s).

RMN ¹³C: 56,6 (CH₃); 62,2 (CH₃); 113,5 (CH); 119,3 (CH); 131,3 (C); 147,6 (C); 154,6 (C); 155,2 (C); 189,0 (CH).

IR (KBr): 2955; 1699; 1539; 1363; 1287; 1139; 980 cm⁻¹.

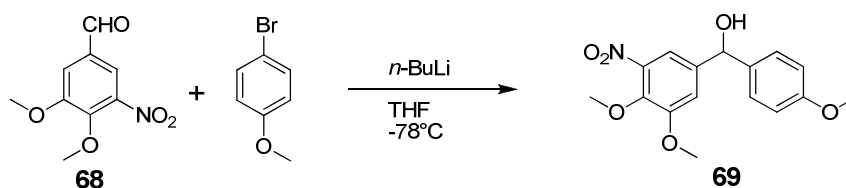
Pf (2-propanol): 91-92 °C

3. Metilación del compuesto 63 en condiciones de transferencia de fase



Se disuelven 6,60 g (33,47 mmol) de **67** en 75 ml de CH₂Cl₂ y 75 ml de H₂O, después se le añaden 2,70 g (67,5 mmol) de hidróxido sódico en polvo, 1,00 g (3,55 mmol) de bromuro de tetrabutil amonio y 16 ml (167 mmol) de sulfato de dimetilo, la reacción se pone naranja. La mezcla se agita fuertemente durante 24 h a temperatura ambiente, luego se extrae con CH₂Cl₂, se obtiene un aceite amarillo que se disuelve en éter y se extrae con H₂O, NH₃ (2M) y NaOH (2M), después se evapora el disolvente, obteniéndose 13,30 g de un aceite naranja que solidifica al frío. Este sólido se recrystaliza en acetona/H₂O para obtener 6,20 g (29,36 mmol, 88 %) del compuesto **68** como un aceite amarillo.

4. Preparación del alcohol 69



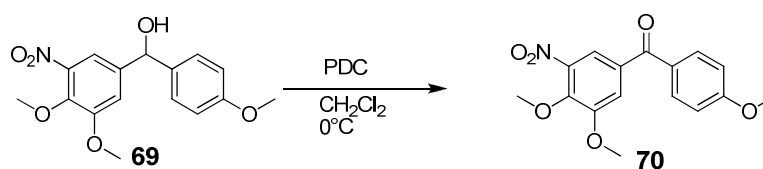
Se disuelven 4,25 g (22,73 mmol) de 4-bromoanisol en 30 ml de THF seco, después se le añaden 9,5 ml (15,2 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78 °C apareciendo un color amarillo. La mezcla se agita durante 1 h a -78°C en atmósfera de nitrógeno, luego se añaden 1,60 g (7,58 mmol) del aldehído **68**, el color cambia de amarillo a marrón. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH₄Cl y AcOEt, se evapora el THF y se extrae con AcOEt obteniéndose 3,50 g del compuesto **69** que se utiliza sin purificar para la siguiente reacción.

(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)(4-metoxifenil)metanol (69):

RMN ¹H: 3,70 (6H, s); 3,76 (3H, s); 5,74 (1H, s); 6,90 (2H, d, 9,0); 7,15 (1H, s); 7,30 (2H, d, 9,0); 7,77 (1H, s).

IR (película): 3407; 1595; 1512; 1455; 1352; 1244; 1173; 832; cm⁻¹.

5. Obtención de la fenstatina 70



Se disuelven 3,50 g (10,96 mmol) de **69** en 30 ml de CH₂Cl₂ y se le añaden 6,20 g (16,44 mmol) de dicromato de piridinio a 0°C apareciendo un color marrón. La reacción se agita durante 4 h a temperatura ambiente, posteriormente se filtra sobre Celita, se eluye con CH₂Cl₂ y se evapora el disolvente obteniéndose 2,40 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se obtienen 895 mg (1,73 mmol, 37 %) del compuesto **70** en forma de sólido blanco.

(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)(4-metoxifenil)metanona (70):

RMN ¹H: 3,90 (3H, s); 3,98 (3H, s); 4,07 (3H, s); 6,97 (2H, d, 9,0); 7,59 (1H, d, 2,0); 7,66 (1H, d, 2,0); 7,78 (2H, d, 9,0).

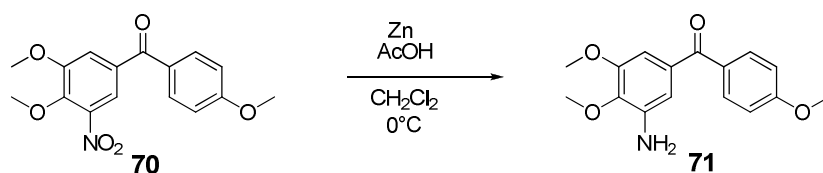
RMN ¹³C: 55,5 (CH₃); 56,6 (CH₃); 62,1 (CH₃); 113,9 (2) (CH); 116,3 (CH); 118,1 (CH); 129,0 (C); 132,3 (2) (CH); 133,3 (C); 143,9 (C); 145,7 (C); 154,1 (C); 163,6 (C); 192,3 (C).

IR (KBr): 1653; 1605; 1533; 1362; 1298; 1172; 844 cm⁻¹.

Pf (Hexano/CH₂Cl₂): 117-118 °C.

HMRS (m/z): Obtenido 318,0974 (M+H⁺); esperado 318,0978 (C₁₆H₁₆NO₆⁺).

6. Obtención de la fenstatina **71**



Se disuelven 55 mg (0,17 mmol) de **70** en 5 ml de CH₂Cl₂ y se le añaden 70 mg (1,05 mmol) de zinc en polvo y 2 gotas de ácido acético a 0°C, aparece un color verde que luego pasa a amarillo. La mezcla se deja agitando 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se filtra sobre celita y se extrae con agua/CH₂Cl₂ obteniéndose 47 mg (0,16 mmol, 95 %) de crudo de reacción.

(3-amino-4,5-dimetoxifenil)(4-metoxifenil)metanona (71):

RMN ¹H: 3,85 (3H, s); 3,87 (3H, s); 3,88 (3H, s); 6,76 (1H, s); 6,77 (1H, s); 7,93 (2H, d, 8,8); 7,81 (2H, d, 8,8).

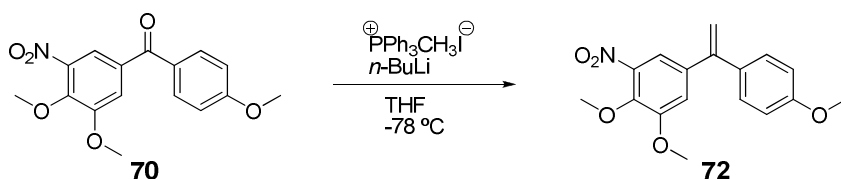
RMN ¹³C: 56,3 (CH₃); 56,7 (CH₃); 60,8 (CH₃); 104,8 (CH); 111,9 (CH); 114,2 (2) (CH); 131,3 (C); 133,2 (2) (CH); 134,8 (C); 139,7 (C); 140,8 (C); 153,4 (C); 163,8 (C); 195,9 (C).

IR (KBr): 3364; 1640; 1594; 1353; 1250; 1172; 1126; 847 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 288,1234 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 288,1238 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 6,3 min.

7. Obtención de la isocombretastatina 72



Se disuelven 1,80 g (4,35 mmol) de la sal **1** en 30 ml de THF seco y se le añaden 2,3 ml (3,62 mmol) de $n\text{-BuLi}$ 1,6 M en hexano a -78°C apareciendo un color amarillo. La mezcla se mantiene agitando durante 1 h a -78°C en atmósfera de nitrógeno, después se añaden 460 mg (1,45 mmol) de la cetona **70** disuelta en THF. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH_4Cl y AcOEt , se evapora el THF y después de extracción líquido-líquido, se obtienen 1,25 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/ AcOEt 8:2), se aíslan 327 mg (1,04 mmol, 72%) del compuesto **72** en forma de un aceite amarillo.

1,2-dimetoxi-5-(1-(4-metoxifenil)vinil)-3-nitrobenceno (72):

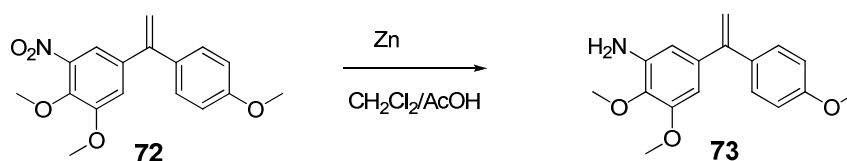
RMN ^1H : 3,82 (3H,s); 3,85 (3H, s); 3,99 (3H, s); 5,36 (1H, s); 5,44 (1H, s); 6,87 (2H, d, 8,4); 7,04 (1H, d, 2,4); 7,24 (2H, d, 8,4); 7,30 (1H, d, 2,4).

RMN ^{13}C : 55,3 (CH_3); 56,4 (CH_3); 62,0 (CH_3); 113,8 (2) (CH); 114,3 (CH_2); 115,7 (CH); 115,8 (CH); 128,4 (C); 129,3 (2) (CH); 132,1 (C); 138,0 (C); 142,2 (C); 147,6 (C); 153,6 (C); 159,7 (C).

IR (película): 1606; 1531; 1458; 1361; 1253; 1179; 838 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 338,0999 ($\text{M}+\text{Na}^+$); esperado 338,1004 ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NNaO}_5^+$).

8. Obtención de la isocombretastatina 73



A 300 mg (0,95 mmol) del compuesto **72** en 30 ml de CH_2Cl_2 se le añaden 600 μl (10,47 mmol) de AcOH y 375 mg (5,71 mmol) de zinc en polvo lentamente, apareciendo un color verde. La reacción se agita durante 16 h a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno, posteriormente se filtra sobre Celita, se evapora el disolvente y se obtienen 360 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3), se aíslan 210 mg (0,74 mmol; 80 %) del compuesto **73** en forma de un aceite naranja.

2,3-dimetoxi-5-(1-(4-metoxifenil)vinil)anilina (73):

RMN ^1H : 4,10 (3H, s); 4,13 (3H, s); 4,18 (3H, s); 5,62 (1H, d, 1,2); 5,64 (1H, d, 1,2); 6,66 (1H, d, 2,0); 6,72 (1H, d, 2,0); 7,18 (2H, d, 6,4); 7,61 (2H, d, 6,4).

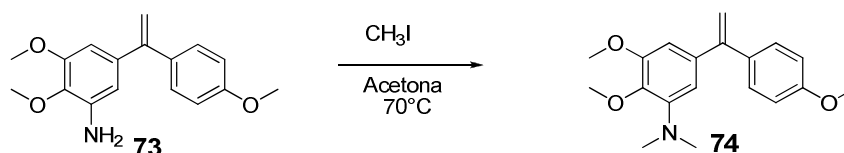
RMN ^{13}C : 55,3 (CH_3); 55,7 (CH_3); 59,9 (CH_3); 103,1 (CH); 109,3 (CH_2); 112,2 (CH); 113,4 (2) (CH); 129,5 (2) (CH); 133,9 (C); 135,8 (C); 137,9 (C); 139,5 (C); 149,5 (C); 152,4 (C); 159,3 (C).

IR (película): 3370; 1607; 1508; 1243; 1126; 839 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 286,1440 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 286,1443 ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_3^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 14,6 min.

9. Obtención de la isocombretastatina 74



Se disuelven 90 mg (0,32 mmol) de **74** en 5 mL de acetona y se le añade 200 μ L (3,15 mmol) de yodometano. La reacción se agita durante 24 h a 70 °C en tubo sellado, posteriormente se evapora el disolvente y se obtiene 98 mg (0,31 mmol, 97 %) del compuesto **74**.

N,N-dimetil-2,3-dimetoxi-5-(1-(4-metoxifenil)etenil)anilina (74):

RMN ^1H : (CD₃OD): 3,23 (6H, s); 3,76 (3H, s); 3,79 (3H, s); 4,12 (3H, s); 5,34 (1H, s); 5,38 (1H, s); 6,81 (2H, d, 8,4); 6,89 (1H, s); 7,15 (1H, s); 7,18 (2H, d, 8,4).

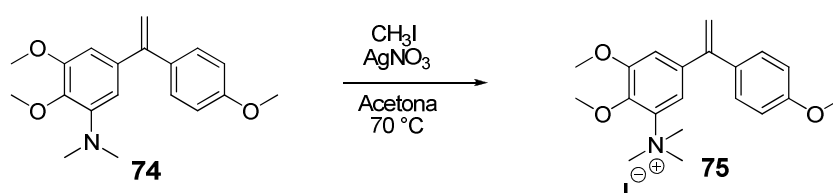
RMN ^{13}C : (CD₃OD): 47,3 (2) (CH₃); 55,4 (CH₃); 56,4 (CH₃); 62,9 (CH₃); 111,4 (CH); 113,8 (CH); 129,3 (CH₂); 132,4 (C); 133,5 (2) (CH); 138,9 (2) (C); 140,4 (C); 147,3 (2) (CH); 152,5 (2) (C); 159,6 (C).

IR (película): 1606; 1510; 1343; 1247; 1177; 838 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 314,1746 (M+H⁺); esperado 314,1756 (C₁₉H₂₄NO₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 20,1 min.

10. Preparación de la sal de amonio **75**



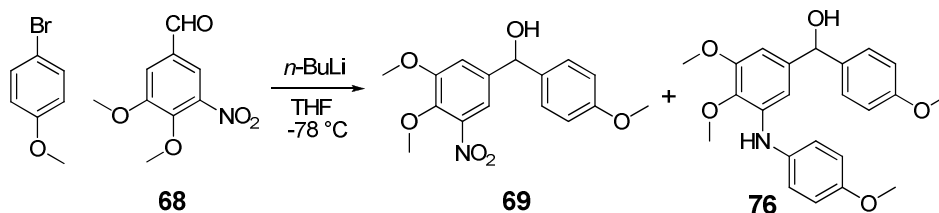
Se ponen en un tubo sellado 100 mg (0,32 mmol) de **74** en 5 ml de acetona y se le añaden 108 mg (0,64 mmol) de AgNO₃ y 400 μ l (6,38 mmol) de yodometano, apareciendo un precipitado blanco. La reacción se agita durante 24 h a 70 °C, luego se filtra, se evapora el disolvente y se obtiene 90 mg (0,27 mmol, 84%) del compuesto **75**.

Yoduro de N,N-dimetil-2,3-dimetoxi-5-(1-(4-metoxifenil)vinil)bencenamonio (75):

RMN ^1H : 3,85 (3H,s); 3,92 (9H, s); 4,21 (3H, s); 5,45 (1H, s); 5,51 (1H, s); 6,90 (2H, d, 8,8); 7,07 (1H, d, 1,6); 7,12 (1H, 1,6); 7,22 (2H, d, 8,8).

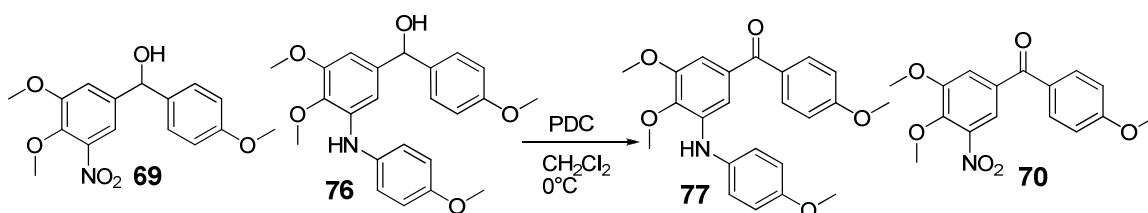
HMRS (m/z): obtenido 328,1914 (M⁺); esperado 328,1913 (C₂₀H₂₆NO₃⁺).

11. Obtención del compuesto secundario 76



Se disuelven 4,00 g (21,39 mmol) de 4-bromoanisol en 30 ml de THF seco, después se le añaden 8,9 ml (14,24 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78 °C, apareciendo un color amarillo. La mezcla se agita durante 1 h a -78°C en atmósfera de nitrógeno, luego se añaden 1,5 g (7,10 mmol) del aldehído **68**, el color cambia de amarillo a marrón. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH₄Cl y AcOEt, se evapora el THF y se extrae con AcOEt obteniéndose 3,80 g de una mezcla del compuesto **69** y del compuesto **76**, que se utiliza directamente para la siguiente reacción de oxidación.

12. Obtención de la fenstatina 77



Se disuelven 3,80 g (11,90 mmol) de la mezcla **69+76** en 30 ml de CH₂Cl₂ y se le añaden 4,50 g (11,96 mmol) de dicromato de piridinio a 0°C apareciendo un color marrón. La reacción se agita durante 6 h a temperatura ambiente, posteriormente se filtra sobre Celita, se eluye con CH₂Cl₂ y se evapora el disolvente obteniéndose 2,85 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se obtienen 260 mg (1,73 mmol, 37 %) del compuesto **70** y 170 mg (0,43 mmol, 4%) del compuesto **77** en forma de aceite naranja.

(3,4-dimetoxi-5-(4-metoxifenilamino)fenil)(4-metoxifenil)metanona (77):

RMN ¹H: 3,74 (3H, s); 3,83 (3H, s); 3,90 (3H, s); 3,94 (3H, s); 6,19 (1H, s); 6,81 (2H, d, 8,8); 6,89 (2H, d, 8,8); 7,06 (1H, s); 7,09 (2H, d, 8,4); 7,78 (2H, d, 8,4).

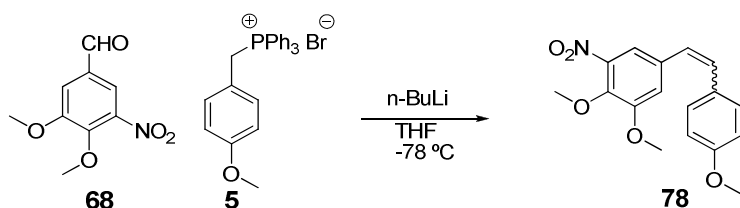
RMN ¹³C: 55,4 (CH₃); 55,5 (CH₃); 55,9 (CH₃); 60,3 (CH₃); 104,3 (CH); 108,7 (CH); 113,4 (2) (CH); 114,6 (2) (CH); 123,1 (2) (CH); 130,3 (C); 132,4 (2) (CH); 133,8 (C); 134,5 (C); 138,9 (C); 139,1 (C); 152,3 (C); 155,7 (C); 163,0 (C); 195,0 (C).

IR (KBr): 3371; 1647; 1594; 1508; 1349; 1253; 1169; 1033 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 394,1647 (M+H⁺); esperado 394,1654 (C₂₃H₂₄NO₅⁺).

B. Análogos de combretastatina

1. Preparación de la nitrocombretastatina **78**



Se disuelven 4,80 g (10,36 mmol) de la sal de fosfonio **5** en 40 ml de THF seco, después se le añaden 5,3 ml (8,52 mmol) de *n*-BuLi a -78 °C y aparece un color naranja. La mezcla se agita durante 1 h, después se añaden 1,20 g (5,68 mmol) de aldehído **68** disueltos en THF seco. La reacción se deja agitar durante 24 h a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno, luego se trata con NH₄Cl y se extrae con AcOEt obteniéndose 4,85 g de **78** como una mezcla que contiene isómeros *Z/E* en proporción 1:2.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3), separándose 90 mg (0,28 mmol, 5%) del isómero *Z*, 950 mg (3,01 mmol, 53%) del isómero *E* y 650 mg de la mezcla de ambos.

(Z)-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)nitrobenceno (78):

RMN ¹H: 3,65 (3H, s); 3,82 (3H, s); 3,83 (3H, s); 6,35 (1H, d, 12,2); 6,61 (1H, d, 12,2); 6,80 (2H, d, 6,6); 6,99 (1H, d, 2,4); 7,17 (2H, d, 6,6); 7,20 (1H, d, 2,4).

RMN ¹³C: 55,3 (CH₃); 56,1 (CH₃); 62,1 (CH₃); 113,8 (2) (CH); 116,2 (2) (CH); 116,4 (C); 126,3 (CH); 130,1 (2) (CH); 130,5 (C); 131,5 (CH); 141,4 (C); 153,4 (2) (C); 159,1 (C).

(E)-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)nitrobenceno (78):

RMN ¹H: 3,84 (3H, s); 3,97 (3H, s); 3,98 (3H, s); 6,82 (1H, d, 16,0); 6,89 (2H, d, 7); 6,99 (1H, d, 16,0); 7,17 (1H, d, 2,0); 7,42 (2H, d, 7,0); 7,46 (1H, d, 2,0).

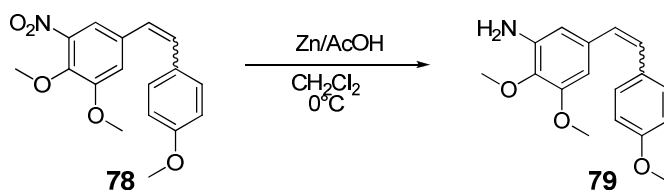
RMN ^{13}C : 55,3 (CH_3); 56,4 (CH_3); 62,0 (CH_3); 113,2 (CH); 113,5 (C); 114,0 (CH); 114,5 (2) (CH); 123,9 (CH); 127,9 (2) (CH); 127,9 (C); 130,2 (CH); 133,0 (C); 141,7 (C); 154,1 (C); 159,8 (C).

IR (película): 1600; 1508; 1236; 1127 cm^{-1} .

Pf (Hexano/ CH_2Cl_2): 139-140 $^\circ\text{C}$

HMRS (m/z): Obtenido 316,1184 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 316,1185 ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_5^+$).

2. Preparación de la combretastatina 79



Se disuelven 500 mg (1,58 mmol) de la mezcla de isómeros del compuesto **78** en 15 ml de CH_2Cl_2 y se le añaden 630 mg (9,51 mmol) de Zinc y 2,0 ml de ácido acético a 0°C , apareciendo un color marrón. La mezcla se agita durante 4 h a temperatura ambiente, luego se filtra sobre celita y se obtienen 836 mg de una mezcla *Z/E* del compuesto **79** en proporción 1:3.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/ AcOEt 1:1) y se aíslan 88 mg (0,31 mmol, 20 %) del isómero *Z*, 154 mg (0,54 mmol, 34 %) del isómero *E* y se recuperan 200 mg de mezcla.

(Z)-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)anilina (79):

RMN ^1H : 3,64 (3H, s); 3,78 (3H, s); 3,81 (3H, s); 6,30 (1H, d, 12,0); 6,32 (1H, s); 6,38 (1H, s); 6,44 (1H, d, 12,0); 6,77 (2H, d, 8,6); 7,24 (2H, d, 8,6).

RMN ^{13}C : 54,7 (CH_3); 55,2 (CH_3); 59,5 (CH_3); 100,0 (CH); 106,4 (CH); 113,6 (2) (CH); 126,2 (CH); 126,8 (CH); 127,1 (2) (CH); 129,7 (C); 133,3 (C); 135,1 (C); 140,1 (C); 152,5 (C); 158,7 (C).

(E)-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)anilina (79):

RMN ¹H: 3,82 (3H, s); 3,84 (3H, s); 3,89 (3H, s); 6,49 (1H, d, 2,0); 6,55 (1H, d, 2,0); 6,80 (1H, d, 16,2); 6,88 (2H, d, 8,6); 6,98 (1H, d, 16,2); 7,41 (1H, d, 8,6).

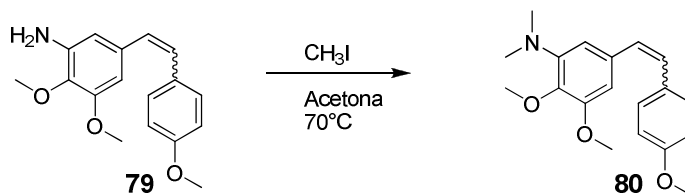
RMN ¹³C: 55,6 (2) (CH₃); 60,0 (CH₃); 100,5 (CH); 106,8 (CH); 114,1 (2) (CH); 127,0 (2) (CH); 127,5 (2) (CH); 130,2 (C); 135,5 (2) (C); 152,9 (C); 159,1 (2) (C).

IR (película): 3470; 1604; 1507; 1245; 1125 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 286,1427 (M+H⁺); esperado 286,1443 (C₁₇H₂₀NO₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,9 min; t_R: 15,6 min.

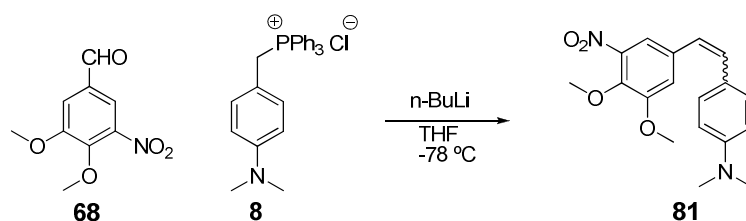
3. Preparación de la combretastatina 80 por metilación de 79



Se disuelven 110 mg (0,39 mmol) de **79** en 10 ml de acetona y se le añaden 1,2 ml (19 mmol) de yodometano, apareciendo un color marrón. La reacción se agita durante 24 h a 70 °C en un tubo sellado, posteriormente se evapora la acetona y se obtienen 172 mg de una mezcla *Z/E* del compuesto **80** en proporción 1:3.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 1:1), se aíslan 15 mg (0,05 mmol, 13%) del isómero *Z* puro, 17 mg (0,06 mmol, 14 %) del isómero *E* y 74 mg (0,24 mmol, 61 %) de la mezcla *Z/E* en proporción 1:1.

4. Preparación de la combretastatina **81**



Se disuelven 2,70 g (5,64 mmol) de la sal de fosfonio **8** en 50 ml de THF seco y se le añaden 3,3 ml (5,23 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano apareciendo un color naranja. La mezcla se agita durante 1 h a -78°C en atmósfera de nitrógeno, después se añaden 850 mg (4,03 mmol) del aldehído **68** disuelto en THF seco también y el color pasa de naranja a amarillo. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH_4Cl y AcOEt, y por el procedimiento habitual se obtienen 1,80 g como mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:3.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 9:1) aislándose 163 mg (0,50 mol, 12 %) del isómero *Z* como aceite naranja y 464 mg (1,41 mmol, 35 %) del isómero *E* como un sólido de color naranja, que se cristaliza en Hex/ CH_2Cl_2 .

(Z)-N,N-dimetil-4-(2-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)etenil)anilina (81):

RMN ^1H : 2,92 (6H, s); 3,67 (3H, s); 3,94 (3H, s); 6,24 (1H, d, 12,4); 6,55 (1H, d, 12,4); 6,59 (2H, d, 8,8); 7,08 (1H, d, 2,0); 7,13 (2H, d, 8,8); 7,26 (1H, d, 2,0).

RMN ^{13}C : 40,3 (2) (CH_3); 56,1 (CH_3); 62,0 (CH_3); 111,9 (2) (CH); 116,2 (2) (CH); 123,9 (C); 124,1 (CH); 129,9 (2) (CH); 132,2 (CH); 134,2 (C); 141,2 (C); 144,8 (C); 149,9 (C); 153,4 (C).

(E)-N,N-dimetil-4-(2-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)etenil)anilina (81):

RMN ^1H : 2,95 (6H, s); 3,69 (3H, s); 3,97 (3H, s); 6,70 (2H, d, 8,8); 6,78 (1H, d, 16,0); 6,98 (1H, d, 16,0); 7,16 (1H, s); 7,39 (2H, d, 8,8); 7,42 (1H, s).

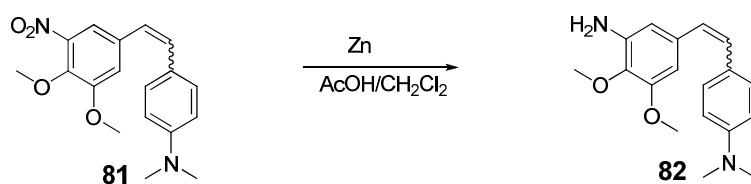
RMN ^{13}C : 39,5 (2) (CH_3); 55,6 (CH_3); 61,2 (CH_3); 111,5 (2) (CH); 112,1 (CH); 120,7 (2) (CH); 123,7 (C); 127,1 (2) (CH); 130,0 (CH); 133,9 (C); 140,3 (C); 144,2 (C); 149,7 (C); 153,3 (C).

IR (película): 1604; 1532; 1453; 1358; 1287; 1167 cm^{-1} .

Pf (Hexano/ CH_2Cl_2): 84-85 $^\circ\text{C}$

HMRS (m/z): Obtenido 329,1499 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 329,1501 ($\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4^+$).

5. Preparación de la combretastatina **82**



Se disuelven 120 mg (0,36 mmol) del compuesto **81** en 15 ml de CH_2Cl_2 , después se le añaden 145 mg (2,22 mmol) de zinc y 4 gotas de AcOH apareciendo un color verde. La mezcla se agita durante 16 h a temperatura ambiente, posteriormente se evapora el disolvente obteniéndose 120 mg de una mezcla de isómeros *Z/E* del compuesto **82** en proporción 3:1.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se aíslan 63 mg (0,21 mmol, 59 %) del compuesto **82** de configuración *Z* y 11 mg de isómero *E*.

(Z)-N,N-dimetil-4-(2-(3-amino-4,5-dimetoxifenil)etenil)anilina (**82**):

RMN ^1H : 2,93 (6H, s); 3,68 (3H, s); 3,83 (3H, s); 6,27 (1H, d, 12,0); 6,34 (1H, d, 2,0); 6,38 (1H, d, 2,0); 6,39 (1H, d, 12,0); 6,63 (2H, d, 8,8); 7,22 (2H, d, 8,8).

RMN ^{13}C : 40,7 (2) (CH_3); 55,6 (CH_3); 59,9 (CH_3); 100,3 (CH); 106,6 (CH); 112,8 (2) (CH); 124,8 (C); 127,2 (2) (CH); 127,4 (2) (CH); 134,3 (C); 135,0 (C); 140,5 (C); 149,3 (C); 153,0 (C).

(E)-N,N-dimetil-4-(2-(3-amino-4,5-dimetoxifenil)etenil)anilina (**82**):

RMN ^1H : 2,98 (6H, s); 3,68 (3H, s); 3,89 (3H, s); 6,48 (1H, d, 2,0); 6,53 (1H, d, 2,0); 6,74 (2H, d, 6,8); 6,76 (1H, d, 16,0); 6,89 (1H, d, 16,0); 7,38 (2H, d, 6,8).

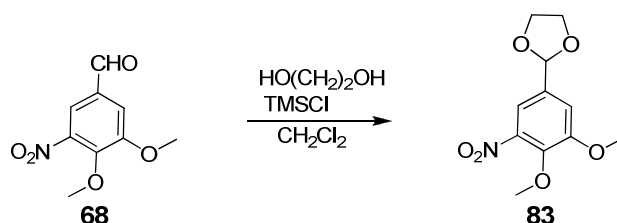
RMN ¹³C: 40,7 (2) (CH₃); 55,7 (CH₃); 60,0 (CH₃); 103,1 (CH); 109,2 (CH); 112,7 (2) (CH); 127,8 (C); 129,5 (2) (CH); 130,1 (2) (CH); 134,0 (C); 134,8 (C); 140,1 (C); 149,2 (C); 152,5 (C).

IR (película): 3365; 1607; 1517; 1231; 1128 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 299,1758 (M+H⁺); esperado 299,1760 (C₁₈H₂₃N₂O₂⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 15,9 min.

6. Protección del aldehído **68** en diclorometano



Se disuelven 800 mg (3,79 mmol) de aldehído **68** en 20 ml de CH₂Cl₂, después se le añade 1 ml (7,6 mmol) de cloruro de trimetilsililo y 700 µl (11,4 mmol) de etilenglicol. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, después se extrae con agua y CH₂Cl₂, se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente obteniéndose 1,20 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se aíslan 505 mg (1,98 mmol, 52 %) del compuesto **83** como un aceite naranja.

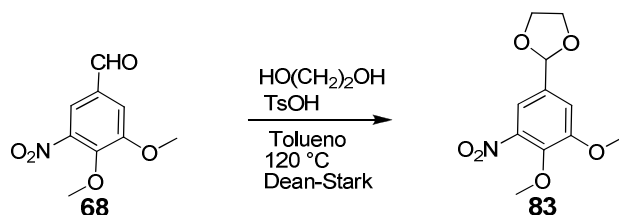
2-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)-1,3-dioxolano (**83**):

RMN ¹H: 3,92 (3H, s); 3,97 (3H, s); 4,02 (2H, m); 4,08 (2H, m); 5,75 (1H, s); 7,20 (1H, d, 2,0); 7,42 (1H, d, 2,0).

RMN ¹³C: 56,4 (CH₃); 62,2 (CH₃); 65,3 (2) (CH₂); 102,1 (CH); 113,7 (CH); 114,0 (CH); 119,3 (C); 134,2 (C); 143,1 (C); 154,1 (C).

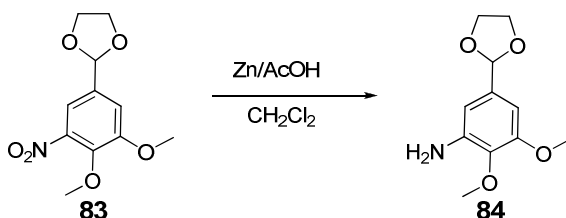
IR (película): 1608; 1537; 1287; 1149 cm⁻¹.

7. Protección del aldehído **68** en tolueno



Se disuelven 8,50 g (40,2 mmol) de aldehído **68** en 200 ml de tolueno seco y se le añaden 7,0 ml (125 mmol) de etilén-glicol y 1,10 g (6,40 mmol) del ácido *p*-toluensulfónico. La reacción se agita durante 24 h a reflujo, después se trata con NaHCO₃ anhidro, se evapora el tolueno y se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente obteniéndose 9,88 g (38,7 mmol, 96 %) del compuesto **83** en forma de aceite naranja.

8. Reducción del nitroderivado **8**



Se disuelven 500 mg (1,96 mmol) de **83** en 20 ml de CH₂Cl₂ y se le añaden 770 mg (11,75 mmol) de zinc en polvo y 4 gotas de ácido acético apareciendo un color marrón. La reacción se agita durante 15 h a temperatura ambiente, luego se extrae con agua/CH₂Cl₂, se seca con Na₂SO₄ y se evapora el disolvente obteniéndose 404 mg (1,79 mmol; 92 %) del compuesto **84**.

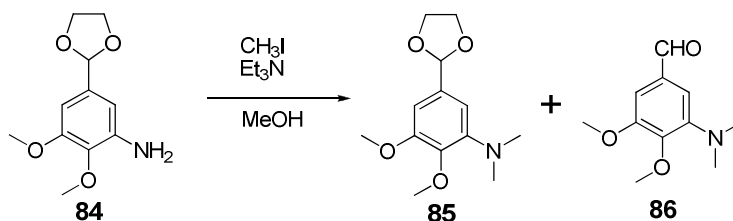
5-(1,3-dioxolan-2-il)-2,3-dimetoxianilina (**84**):

RMN ¹H: 3,79 (3H, s); 3,84 (3H, s); 4,00 (2H, m); 4,09 (2H, m); 5,72 (1H, s); 6,46 (1H, d, 2,0); 6,51 (1H, d, 2,0).

RMN ¹³C: 56,4 (CH₃); 60,5 (CH₃); 65,9 (2) (CH₂); 100,7 (CH); 104,4 (CH); 107,7 (CH); 130,7 (C); 134,5 (C); 141,4 (C); 153,6 (C).

IR (película): 3368; 1597; 1457; 1350; 1232; 1143 cm^{-1} .

9. Metilación del compuesto 84



Se disuelven 1,70 g (7,55 mmol) de **84** en 30 ml de MeOH y se le añaden 7,0 ml (113 mmol) de yodometano y 2,7 ml (19 mmol) de trietilamina, adquiriendo un color marrón. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente en atmosfera de nitrógeno. Posteriormente se evapora el metanol y se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente, obteniéndose 1,80 g (7,11 mmol; 94 %) de una mezcla de **85** y **86**. El crudo de esta reacción se pone a hidrolizar en medio ácido.

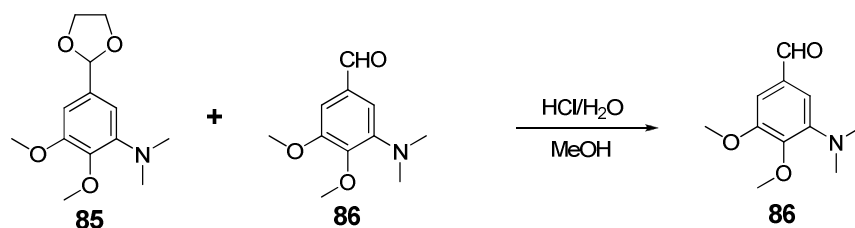
5-(1,3-dioxolan-2-il)-2,3-dimetoxi-N,N-dimetilanilina (85):

Datos obtenidos de la mezcla:

RMN ^1H : 2,84 (6H, s); 3,75 (3H, s); 3,82 (3H, s); 4,00-4,10 (4H, m); 5,65 (1H, s); 6,75 (1H, d, 2,0); 6,81 (1H, d, 2,0).

IR (película): 1599; 1458; 1144; 1006 cm^{-1} .

10. Desprotección del dioxolano 85:



Se disuelven 1,8 g (7,11 mmol) de la mezcla **85+86** en 20 ml de MeOH y se le añaden 4 ml de agua y 6 gotas de ácido clorhídrico concentrado a 0°C. La mezcla se agita durante 8 h a temperatura ambiente, luego se evapora el metanol, se extrae con agua/CH₂Cl₂ y después de la evaporación del disolvente se obtienen 980 mg (4,68 mmol, 66%) del compuesto **86** puro.

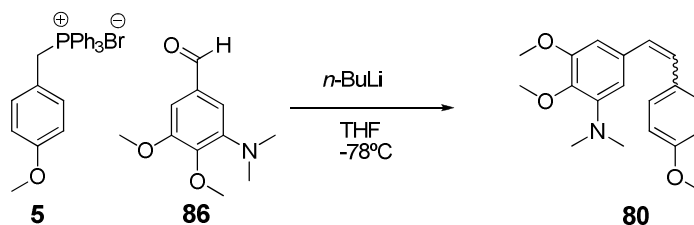
3-(dimetilamino)-4,5-dimetoxibenzaldehído (86):

RMN ¹H: 2,90 (6H, s); 3,87 (3H, s); 3,90 (3H, s); 6,81 (1H, d, 2,0); 6,86 (1H, d, 2,0); 9,84 (1H, s).

RMN ¹³C: 42,5 (2) (CH₃); 55,8 (CH₃); 59,9 (CH₃); 102,4 (CH); 105,3 (CH); 123,9 (C); 132,4 (C); 143,7 (C); 152,3 (C); 192,0 (CH).

IR (película): 1679; 1602; 1509; 1245; 1140 cm⁻¹.

11. Preparación de la combretastatina **80 por reacción de Wittig**



A una suspensión de 3,58 g (7,74 mmol) de la sal de fosfonio **5** en 40 ml de THF seco, se le añaden 4,1 ml (6,5 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M de hexano a -78°C en atmósfera de nitrógeno. La reacción se agita durante 1 h y luego se le añade 900 mg (4,30 mmol) del aldehído **86** disuelto en 10 ml de THF, pasando de color naranja a marrón. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH₄Cl/AcOEt, se evapora el THF y se extrae con agua/AcOEt y se obtienen 3,30 g del compuesto **80** como una mezcla de los isómeros *Z/E* en proporción 1:1.

La mezcla se separa por cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4) y se aíslan 150 mg (0,48 mmol, 11 %) del isómero *Z* y 700 mg de la mezcla *Z/E* en proporción 1:1.

(Z)-N,N-dimetil-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)anilina (80):

RMN ^1H : 2,72 (6H, s); 3,65 (3H, s); 3,84 (3H, s); 3,90 (3H, s); 6,40 (1H, d, 12,0); 6,48 (1H, d, 12,0); 6,51 (2H, s); 6,79 (2H, d, 8,8); 7,24 (2H, d, 8,8).

RMN ^{13}C : 42,9 (2) (CH_3); 55,2 (CH_3); 55,7 (CH_3); 59,5 (CH_3); 106,4 (CH); 111,7 (CH); 113,5 (2) (CH); 128,8 (C); 129,1 (2) (CH); 129,9 (C); 130,2 (2) (CH); 132,5 (C); 140,2 (C); 152,9 (C); 158,6 (C).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 19,8 min.

(E)-N,N-dimetil-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)anilina (80):

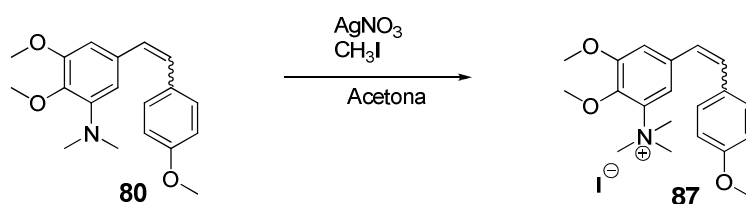
RMN ^1H : 2,88 (6H, s); 3,80 (3H, s); 3,85 (3H, s); 3,91 (3H, s); 6,27 (1H, d, 16,4); 6,38 (1H, d, 16,4); 6,48 (1H, d, 16,4); 6,75 (2H, d, 8,6); 6,85 (1H, d, 16,4); 7,47 (2H, d, 8,6).

RMN ^{13}C : 43,0 (2) (CH_3); 55,3 (CH_3); 56,1 (CH_3); 59,5 (CH_3); 103,3 (CH); 109,2 (CH); 114,1 (2) (CH); 126,9 (C); 129,1 (2) (CH); 127,6 (2) (CH); 130 (C); 133,1 (C); 140,6 (C); 153,5 (C); 159,2 (C).

IR (película): 1576; 1458; 1253; 1175; 1086 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 336,1564 ($\text{M}+\text{Na}^+$); esperado 336,1576 ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NNaO}_3^+$).

12. Preparación de la sal de amonio de la combretastatina 80



Se disuelven 200 mg (0,63 mmol) de una mezcla de isómeros *Z/E* del compuesto **80** en 15 ml de acetona, después se le añaden 320 mg (1,85 mmol) de AgNO_3 y 600 μl (9,25 mmol) de yodometano, apareciendo un precipitado amarillo. La mezcla se deja agitando en un tubo sellado 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se filtra sobre celita y se evapora el disolvente, obteniéndose 100 mg (0,31 mmol, 49 %) del isómero *Z* del compuesto **87**.

Yoduro de (Z)-N,N-dimetil-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)benzenamonio (87):

RMN ¹H: 3,59 (9H, s); 3,67 (3H, s); 3,70 (3H, s); 3,74 (3H, s); 6,50 (1H, d, 12,0); 6,70 (1H, d, 12,0); 6,87 (2H, d, 8,4); 7,15 (1H, s); 7,18 (1H, s); 7,21 (2H, d, 8,4).

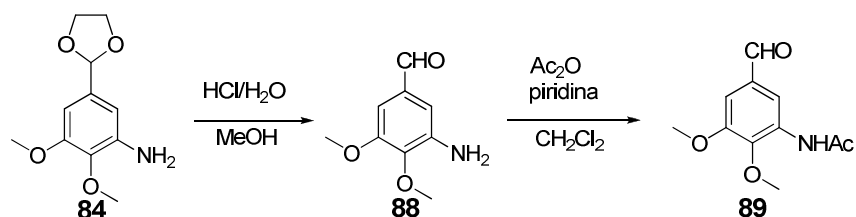
RMN ¹³C: 55,5 (CH₃); 57,6 (CH₃); 58,0 (3) (CH₃); 61,8 (CH₃); 113,4 (CH); 113,9 (2) (CH); 115,2 (CH); 127,1 (CH); 128,8 (C); 130,1 (2) (CH); 131,7 (CH); 133,5 (C); 137,8 (C); 140,8 (C); 153,7 (C); 159,0 (C).

IR (película): 1603; 1508; 1459; 1252; 1177; 1060 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 328,1911 (M⁺); esperado 328,1913 (C₂₀H₂₆NO₃⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 7,1 min.

13. Obtención de 89



La desprotección de 320 mg (1,42 mmol) del compuesto **84** siguiendo el método de la reacción **10** produce 250 mg (1,38 mmol, 97 %) de 3-amino-4,5-dimetoxibenzaldehído (**88**), que se disuelven en 20 ml de CH₂Cl₂, se le añaden 260 µl (2,76 mmol) de anhídrido acético y 230 µl (2,77 mmol) de piridina. La mezcla se deja 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se añade agua y extrae con CH₂Cl₂. Se obtienen 223 mg (1,00 mmol, 72 %) del compuesto acetilado **89**.

3-amino-4,5-dimetoxibenzaldehído (88):

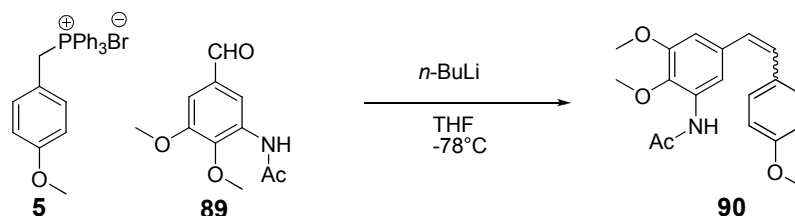
RMN ¹H: 3,87 (3H, s); 3,89 (3H, s); 6,92 (1H, d, 2,0); 6,97 (1H, d, 2,0); 9,78 (1H, s).

IR (película): 3362; 1688; 1582; 1458; 1088 cm⁻¹.

N-(5-formil-2,3-dimetoxifenil)acetamida (89):

RMN ¹H: 2,21 (3H, s); 3,85 (3H, s); 3,95 (3H, s); 7,20 (1H, s); 8,52 (1H, s); 9,84 (1H, s).

14. Preparación de la combretastatina 90



A 950 mg (2,04 mmol) de la sal de fosfonio **5** en 30 ml de THF seco se le añaden 1,1 ml (1,61 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78 °C en atmósfera de nitrógeno, apareciendo un color naranja, la mezcla se agita 1 h a -78 °C, después se añaden 240 mg (1,07 mmol) del aldehído **89** disuelto en 10 ml de THF y el color pasa de naranja a marrón. La reacción se deja agitando 24 h a temperatura ambiente y siguiendo el procedimiento habitual se obtienen 926 mg de una mezcla de isómeros *Z/E* del compuesto **90** en proporción 1:3.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se separan 20 mg (0,06 mmol, 6 %) del isómero *Z*, 33 mg (0,1 mmol, 10 %) del isómero *E* y 137 mg (0,42 mmol, 39 %) de la mezcla *Z/E* en proporción 1:1

(Z)-N-(2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)acetamida (90):

RMN ¹H: 2,19 (3H, s); 3,55 (3H, s); 3,78 (3H, s); 3,89 (3H, s); 6,45 (1H, d, 12,0); 6,49 (1H, d, 12,0); 6,59 (1H, d, 1,6); 6,78 (2H, d, 9,2); 7,21 (2H, d, 9,2); 7,90 (1H, d, 1,6).

RMN ¹³C: 25,0 (CH₃); 55,2 (CH₃); 55,5 (CH₃); 60,8 (CH₃); 107,7 (CH); 113,5 (2) (CH); 114,1 (CH); 127,6 (C); 128,8 (CH); 129,5 (CH); 129,7 (C); 130,2 (2) (CH); 131,7 (C); 133,5 (C); 151,1 (C); 158,6 (C); 168,2 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,8 min.

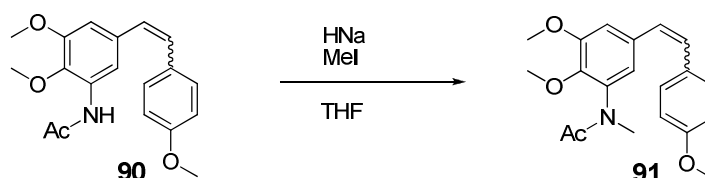
(E)-N-(2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)acetamida (90)

RMN ¹H: 2,22 (3H, s); 3,84 (3H, s); 3,87 (3H, s); 3,91 (3H, s); 6,78 (1H, d, 1,6); 6,87 (2H, d, 8,8); 6,89 (1H, d, 16,0); 6,97 (1H, d, 16,0); 7,42 (2H, d, 8,8); 8,17 (1H, d, 1,6).

IR (película): 3326; 1684; 1591; 1248; 1105 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 328,1543 (M+H⁺); esperado 328,1549 (C₁₉H₂₂NO₄⁺).

15. Obtención de la combretastatina 91



Se disuelven 140 mg (0,42 mmol) de una mezcla de isómeros *Z/E* del compuesto **90** en 10 ml de THF y se le añaden poco a poco 31 mg (1,28 mmol) de hidruro sodio y 140 μ l (2,13 mmol) de yodometano a 0°C. La mezcla se deja agitando 15 h a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno, posteriormente se evapora el THF y se extrae con agua/AcOEt, obteniéndose 145 mg del compuesto **91** como una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 2:1.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4), se aíslan 60 mg (0,18 mmol, 43 %) del isómero *Z* y 44 mg de la mezcla de los dos isómeros.

(Z)-N-metil-[2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)]acetamida (91):

RMN ¹H: 1,81 (3H, s); 3,13 (3H, s); 3,72 (3H, s); 3,78 (3H, s); 3,81 (3H, s); 6,38 (1H, d, 12,0); 6,54 (1H, d, 12,0); 6,64 (1H, d, 2,0); 6,75 (2H, d, 8,8); 6,81 (1H, d, 2,0); 7,17 (2H, d, 8,8).

RMN ¹³C: 21,4 (CH₃); 36,1 (CH₃); 54,8 (CH₃); 55,4 (CH₃); 60,6 (CH₃); 111,9 (CH); 113,3 (2) (CH); 120,6 (CH); 127,0 (CH); 128,8 (C); 129,7 (2) (CH); 130,0 (CH); 133,3 (C); 137,2 (C); 143,3 (C); 152,7 (C); 158,5 (C); 170,6 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 17,4 min.

(E)-N-metil-[2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)]acetamida (91):

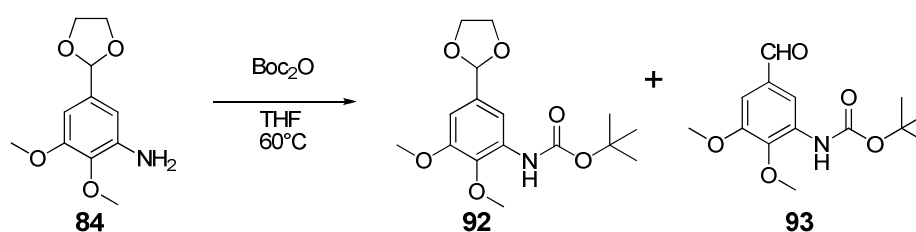
RMN ¹H: 1,87 (3H, s); 3,21 (3H, s); 3,72 (3H, s); 3,78 (3H, s); 3,81 (3H, s); 6,85 (1H, d, 16,0); 6,86 (2H, d, 8,8); 6,87 (1H, d, 2,4); 6,94 (1H, d, 16,0) 7,00 (1H, d, 2,4); 7,40 (2H, d, 8,8).

RMN ^{13}C : 21,8 (CH_3); 36,6 (CH_3); 55,3 (CH_3); 56,0 (CH_3); 61,1 (CH_3); 109,3 (CH); 114,2 (2) (CH); 125,1 (CH); 127,4 (2) (CH); 129,5 (C); 130,4 (2) (CH); 134,2 (C); 138,0 (C); 143,7 (C); 153,1 (C); 159,5 (C); 171,0 (C).

IR (película): 1661; 1596; 1572; 1511; 1254; 1063 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 364,1522 ($\text{M}+\text{Na}^+$); esperado 364,1525 ($\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NNaO}_4^+$).

16. Protección de **84** como *N*-Boc



Se disuelven 2,80 g (12,43 mmol) del compuesto **84** en 60 ml THF seco, después se le añaden 4,10 g (18,65 mmol) de Boc_2O . La reacción se deja agitando 48 h a 60°C en atmósfera de nitrógeno, posteriormente se evapora el THF y se extrae con agua y AcOEt, después de secar con Na_2SO_4 , filtrar y evaporar el disolvente, se obtienen 3,20 g (9,85 mmol, 80 %) de un aceite naranja de una mezcla de **92** y **93** en proporción 3:1. Por cristalización en CH_2Cl_2 se aísla **92** en forma cristales amarillos.

(5-(1,3-dioxolan-2-il)-2,3-dimetoxifenil)carbamato de *tert*-butilo (**92**):

RMN ^1H : 1,52 (9H, s); 3,84 (3H, s); 3,88 (3H, s); 4,01 (2H, m); 4,13 (2H, m); 5,72 (1H, s); 6,75 (1H, d, 2,0); 7,17 (1H, d, 2,0).

RMN ^{13}C : 28,2 (3) (CH_3); 55,7 (CH_3); 60,5 (CH_3); 65,2 (2) (CH_2); 80,4 (C); 103,6 (CH); 103,7 (CH); 109,2 (CH); 132,4 (C); 133,7 (C); 137,1 (C); 151,9 (C); 152,4 (C).

IR (película): 3425; 1731; 1533; 1240; 1152; 1002 cm^{-1} .

Pf (CH_2Cl_2): 97-98 $^\circ\text{C}$

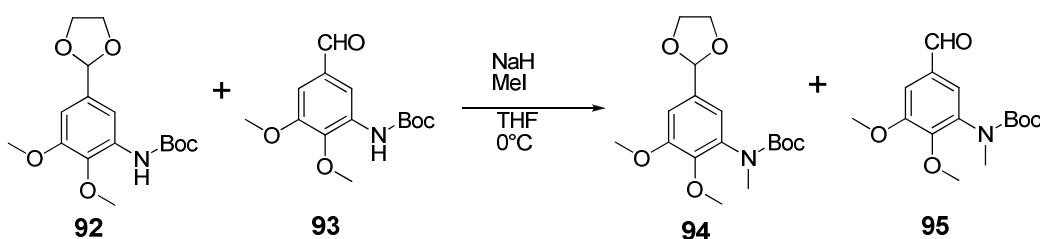
(5-formil-2,3-dimetoxifenil)carbamato de *tert*-butilo (**93**):

RMN ¹H: 1,54 (9H, s); 3,92 (3H, s); 3,95 (3H, s); 7,17 (1H, d, 1,6); 7,20 (1H, d, 1,6); 9,88 (1H, s).

RMN ¹³C: 28,8 (3) (CH₃); 56,4 (CH₃); 61,3 (CH₃); 81,6 (C); 104,4 (CH); 116,4 (CH); 132,7 (C); 133,9 (C); 141,9 (C); 152,9 (C); 153,0 (C); 192,2 (CH).

IR (película): 3432; 1727; 1604; 1534; 1242; 1156; 1048 cm⁻¹.

17. Metilación de **92** y **93**



Se disuelven 1,70 g (5,23 mmol) de la mezcla de **92** y **93** en 30 ml THF seco, después se le añaden 380 mg (15,70 mmol) de hidruro sódico a 0 °C, la mezcla se agita durante 30 min y se le añaden 1,7 ml (26 mmol) de yodometano. La reacción se agita 15 h a temperatura ambiente en presencia de atmósfera de nitrógeno, posteriormente se evapora el THF y se extrae con agua y AcOEt, después de secar con Na₂SO₄, filtrar y evaporar el disolvente, se obtiene 1,60 g de la mezcla **94**+**95** en proporción 6:4.

El crudo se cromatografía flash eluyendole con Hex/AcOEt 8:2, se aíslan 800 mg (2,36 mmol, 45 %) del compuesto **94** como aceite amarillo y 600 mg (2,03 mmol, 39 %) del compuesto **95** como aceite naranja.

(5-(1,3-dioxolan-2-il)-2,3-dimetoxifenil)(metil)carbamato de *terc*-butilo (**94**):

RMN ¹H: 1,47 (9H, s); 3,14 (3H, s); 3,82 (3H, s); 3,88 (3H, s); 4,01 (2H, m); 4,13 (2H, m); 5,73 (1H, s); 6,84 (1H, d, 2,0); 6,95 (1H, d, 2,0).

RMN ¹³C: 27,8 (CH₃); 28,3 (3) (CH₃); 55,9 (CH₃); 60,5 (CH₃); 65,2 (2) (CH₂); 79,9 (C); 103,2 (CH); 108,6 (CH); 119,2 (CH); 133,0 (C); 137,1 (C); 145,8 (C); 153,3 (C); 155,1 (C).

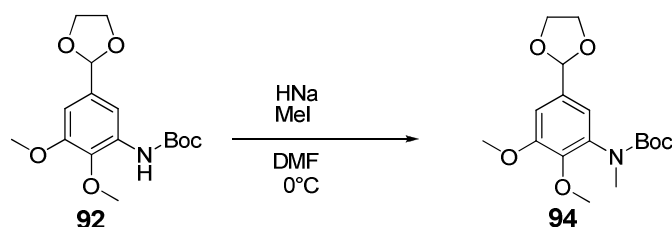
IR (película): 1786; 1591; 1256; 1152; 1074 cm⁻¹.

(5-formil-2,3-dimetoxifenil)(metil)carbamato de *tert*-butilo (95):

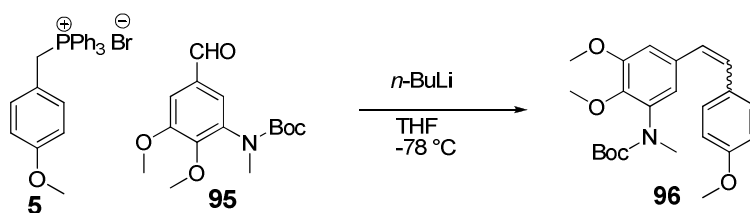
RMN ^1H : 1,25 (9H, s); 2,91 (3H, s); 3,88 (3H, s); 3,91 (3H, s); 6,81 (1H, d, 1,6); 6,87 (1H, d, 1,6); 9,85 (1H, s).

RMN ^{13}C : 28,1 (CH_3); 28,6 (3) (CH_3); 56,5 (CH_3); 61,1 (CH_3); 80,7 (C); 109,6 (CH); 125,7 (CH); 130,0 (C); 132,1 (C); 137,8 (C); 154,2 (C); 156,0 (C); 190,9 (CH).

IR (película): 1730; 1697; 1582; 1256; 1152; 1073 cm^{-1} .

18. Metilación de 92

Se disuelven 6,60 g (20,30 mmol) del compuesto **92** en 100 ml de DMF, después se le añaden 975 mg (40,6 mmol) de hidruro sódico a 0 °C, la mezcla se agita durante 30 min y se le añade 4,0 ml (64 mmol) de yodometano. La reacción se mantiene 4 h a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno, luego se trata con agua y hielo y se extrae con AcOEt, se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora, obteniéndose 6,20 g (18,27 mmol, 90 %) de **94** como un aceite de color naranja.

19. Preparación de la combretastatina 96

Se disuelven 630 mg (1,36 mmol) de la sal de fosfonio **5** en 20 ml de THF seco y se le añaden 640 μ l (1,02 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78 °C en atmósfera de nitrógeno, el color pasa de blanco a naranja, la mezcla se agita 1 h a -78 °C, después se añaden 200 mg (0,67 mmol) del aldehído **95** disuelto en 10 ml de THF seco y el color pasa de naranja a amarillo. La reacción se deja agitando 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH₄Cl y AcOEt, se evapora el THF, se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente, obteniéndose 930 mg del compuesto **96** como una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:2.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 8:2) separándose 76 mg (0,19 mmol, 28 %) del isómero *Z*, 142 mg (0,35 mmol, 53 %) del isómero *E* y 42 mg de la mezcla *Z/E* en proporción 3:1

(Z)-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)(N-metil)carbamato de *terc*-butilo (96):

RMN ¹H: 1,43 (9H, s); 3,07 (3H, s); 3,64 (3H, s); 3,76 (3H, s); 3,80 (3H, s); 6,36 (1H, d, 12,0); 6,46 (1H, d, 12,0); 6,72 (1H, d, 2,0); 6,75 (2H, d, 8,0); 7,77 (1H, d, 2,0); 7,21 (2H, d, 8,0).

RMN ¹³C: 27,9 (CH₃); 28,3 (3) (CH₃); 55,2 (CH₃); 55,7 (CH₃); 60,6 (CH₃); 79,8 (C); 111,4 (CH); 113,5 (2) (CH); 114,3 (CH); 127,8 (C); 128,0 (CH); 129,4 (CH); 129,6 (C); 130,1 (2) (CH); 132,8 (C); 137,0 (C); 152,7 (C); 155,1 (C); 158,7 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 21,1 min.

(E)-2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)(N-metil)carbamato de *terc*-butilo (96):

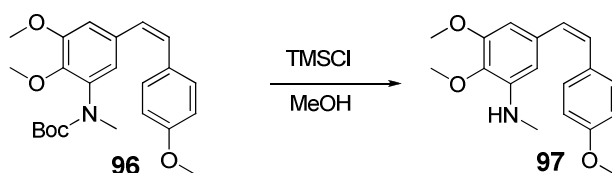
RMN ¹H: 1,40 (9H, s); 3,15 (3H, s); 3,81 (6H, s); 3,89 (3H, s); 6,85 (1H, d, 16,4); 6,88 (2H, d, 8,4); 6,90 (1H, d, 2,0); 6,93 (1H, d, 16,4); 6,65 (1H, d, 2,0); 7,42 (2H, d, 8,4).

RMN ¹³C: 28,1 (CH₃); 28,1 (3) (CH₃); 55,1 (CH₃); 55,7 (CH₃); 60,5 (CH₃); 79,7 (C); 108,1 (CH); 113,3 (CH); 113,9 (2) (CH); 118,8 (C); 125,6 (CH); 127,4 (2) (CH); 127,6 (CH); 129,7 (C); 130,0 (C); 137,2 (C); 152,7 (C); 155,0 (C); 159,1 (C).

IR (película): 1700; 1606; 1511; 1367; 1254; 1153 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 400,2123 (M+H⁺); esperado 400,2124 (C₂₃H₃₀NO₅⁺).

20. Desprotección del grupo *N*-Boc del isómero *Z* de **96**



Se disuelven 70 mg (0,17 mmol) la (*Z*)-combretastatina **96** en 3 ml de MeOH seco y se le añaden 67 μ l (0,53 mmol) del cloruro de trimetilsililo, pasando el color de amarillo a violeta. La mezcla se mantiene agitando durante 24 h a temperatura ambiente, luego se evapora el MeOH y se extrae con $\text{NaHCO}_3/\text{AcOEt}$ y se obtiene 100 mg de la mezcla *Z/E* en proporción 6:4. El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 8:2), se aíslan 25 mg (0,08 mmol, 49 %) del isómero *Z* y 30 mg de la mezcla *Z/E* en proporción 3:1.

(*Z*)-*N*-metil-[2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)]anilina (**97**):

RMN ^1H : 2,61 (3H, s); 3,55 (3H, s); 3,68 (6H, s); 6,15 (1H, d, 2,8); 6,33 (1H, d, 12,0); 6,35 (1H, d, 2,8); 6,37 (1H, d, 12,0); 6,67 (2H, d, 8,4); 7,16 (2H, d, 8,4).

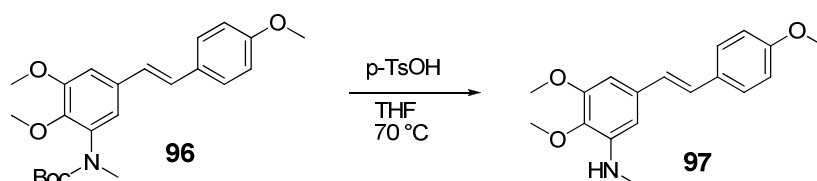
RMN ^{13}C : 30,4 (CH_3); 55,2 (CH_3); 55,7 (CH_3); 60,0 (CH_3); 102,0 (CH); 104,5 (CH); 113,4 (2) (CH); 128,8 (CH); 129,4 (CH); 130,0 (C); 130,3 (2) (CH); 133,5 (C); 134,3 (C); 143,0 (C); 151,7 (C); 158,5 (C).

IR (KBr): 3387; 1590; 1512; 1459; 1254; 1176 cm^{-1} .

HMRS (*m/z*): Obtenido 300,1583 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 300,1600 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 18,2 min.

21. Desprotección del grupo *N*-Boc del isómero *E* de **96**



Se disuelven 140 mg (0,35 mmol) la (*E*)-combretastatina **96** en 5 ml de THF seco y se le añaden 121 mg (0,70 mmol) de ácido p-toluensulfónico, pasando el color de amarillo a violeta. La mezcla se mantiene agitando durante 24 h a 70 °C, luego se evapora el THF y se extrae con NaHCO₃/CH₂Cl₂ y se obtiene 120 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 9:1), se aíslan 60 mg (0,20 mmol, 57 %) del compuesto **97** como isómero *trans* en forma de un sólido amarillo

(*E*)-N-metil-[2,3-dimetoxi-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)]anilina (97):

RMN ¹H: 2,90 (3H, s); 3,80 (3H, s); 3,83 (3H, s); 3,90 (3H, s); 6,44 (1H, d, 2,0); 6,47 (1H, d, 2,0); 6,88 (2H, d, 8,4); 6,92 (1H, d, 16,4); 6,95 (1H, d, 16,4); 7,43 (2H, d, 8,4).

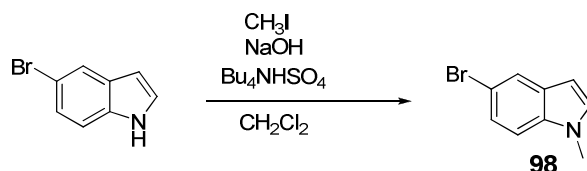
RMN ¹³C: 29,6 (CH₃); 54,4 (CH₃); 54,9 (CH₃); 59,1 (CH₃); 98,5 (CH); 100,8 (CH); 113,2 (2) (CH); 126,4 (CH); 126,6 (CH); 127,3 (2) (CH); 129,4 (C); 133,1 (C); 134,0 (C); 142,5 (C); 151,3 (C); 158,2 (C).

IR (KBr): 3387; 1590; 1512; 1459; 1254; 1176 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 300,1583 (M+Na⁺); esperado 300,1600 (C₁₈H₂₁NNaO₃⁺).

C. Compuestos con indol como anillo B

1. Metilación de 5-bromo-1*H*-indol



Se disuelven 2,00 g (10,2 mmol) de 5-bromo-1*H*-indol en 50 ml de CH₂Cl₂ y se le añaden 820 mg de NaOH triturada, 35 mg (0,10 mmol) de bisulfato de tetrabutilamonio y 2 ml (30 mmol) de yodometano. La mezcla se pone de color rosa, la reacción se agita durante 72 h a temperatura ambiente controlándose por capa fina.

Al final se extrae con una disolución saturada de NaCl hasta pH neutro y se obtienen 2,10 g (10,00 mmol, 98 %) de producto **98**.

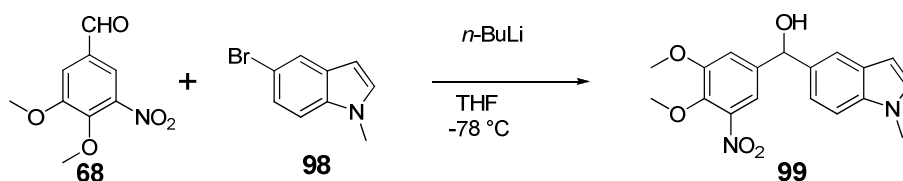
5-bromo-1-metil-1*H*-indol (98)

RMN ¹H: 3,67 (3H, s); 6,58 (1H, d, 3,2); 7,09 (1H, d, 3,2); 7,16 (1H, d, 8,4); 7,45 (1H, dd, 8,4, 2,0); 7,95 (1H, d, 2,0).

RMN ¹³C: 33,0 (CH₃); 100,7 (CH); 111,1 (CH); 112,8 (C); 123,4 (CH); 124,3 (CH); 130,3 (CH); 130,4 (C); 135,5 (C).

IR (película): 1607; 1561; 1511; 1276; 896 cm⁻¹.

2. Preparación del alcohol 99

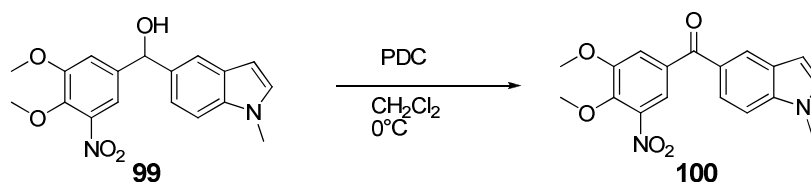


Se disuelven 4,20 g (19,90 mmol) de **98** en 50 ml de THF seco y se le añaden 12,8 ml (20,5 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78 °C, apareciendo un color naranja. Después de una hora de reacción a -78°C en atmósfera de nitrógeno, se añaden 1,50 g (7,11 mmol) de aldehído **68** disuelto en 10 ml de THF y el color pasa de naranja a marrón. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente, luego se trata con NH₄Cl/AcOEt, se evapora el THF y se extrae con agua/AcOEt y se obtienen 4,20 g de producto de reacción, que se utiliza en la oxidación sin purificar.

(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)(1-metil-1*H*-indol-5-il)metanol (99):

RMN ¹H: 3,63 (3H, s); 3,68 (3H, s); 3,73 (3H, s); 5,76 (1H, s); 6,32 (1H, d, 3,2); 6,78 (1H, d, 8,8); 7,03 (1H, s); 7,06 (1H, d, 3,2); 7,60 (1H, d, 8,8); 7,75 (1H, s); 8,11 (1H, s).

3. Obtencion de la fenstatina 100



Se disuelven 4,00 g (11,68 mmol) de la mezcla que contiene el alcohol **99** en 100 ml de CH₂Cl₂ y se le añaden 4,50 g (11,68 mmol) de dicromato de piridinio a 0 °C. La mezcla se agita 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se extrae con agua/CH₂Cl₂ y se obtienen 2,00 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) obteniéndose 50 mg (0,15 mmol, 2%) de **100**.

(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)(1-metil-1*H*-indol-5-il)metanona (100):

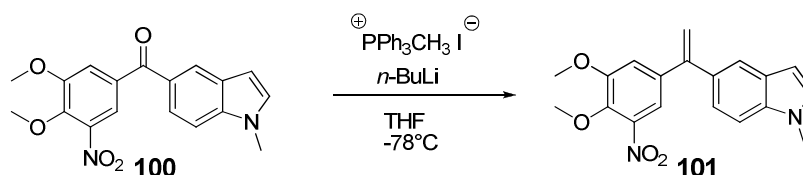
RMN ¹H: 3,83 (3H, s); 3,96 (3H, s); 4,06 (3H, s); 6,60 (1H, d, 3,2); 7,14 (1H, d, 3,2); 7,38 (1H, d, 8,8); 7,63 (1H, s); 7,71 (1H, s); 7,73 (1H, d, 8,8); 8,09 (1H, s).

RMN ¹³C: 33,1 (CH₃); 56,6 (CH₃); 62,2 (CH₃); 103,1 (CH); 109,4 (CH); 116,6 (CH); 118,2 (CH); 123,5 (CH); 125,1 (CH); 128,0 (C); 130,8 (CH); 134,3 (C); 138,6 (C); 143,9 (C); 145,5 (C); 154,0 (2) (C); 194,1 (C).

IR (película): 1647; 1603; 1535; 1288; 1164 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 341,1131 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 341,1137 ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5^+$).

4. Obtención de la isocombretastatina 101



Se disuelven 150 mg (0,35 mmol) de la sal de fosfonio **1** en 15 ml de THF seco y se le añaden 200 μl (0,29 mmol) de $n\text{-BuLi}$ 1,6 M en hexano a -78°C , apareciendo un color amarillo. La mezcla se mantiene en agitación durante 1 h a la misma temperatura, luego se le añaden 40 mg (0,11 mmol) de cetona **100** disuelta en 10 ml de THF. La reacción se deja agitando 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{AcOEt}$, se evapora el THF y se extrae con agua/ AcOEt , obteniéndose 70 mg de crudo de reacción.

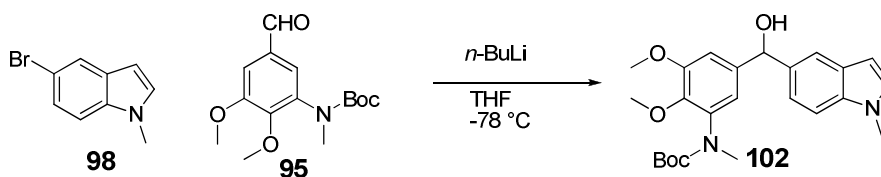
El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/ AcOEt 8:2) y se aíslan 10 mg (0,03 mmol, 27 %) del compuesto **101**.

5-(1-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)etenil)-1-metil-1H-indol (101):

RMN ^1H : 3,74 (3H, s); 3,77 (3H, s); 3,94 (3H, s); 5,34 (1H, s); 5,44 (1H, s); 6,41 (1H, d, 3,2); 7,02 (1H, d, 3,2); 7,03 (1H, d, 2,0); 7,10 (1H, d, 8,4); 7,22 (1H, d, 8,4); 7,29 (1H, d, 2,0); 7,50 (1H, s).

IR (película): 1605; 1534; 1340; 1259; 1061; 870 cm^{-1} .

5. Preparación del alcohol 102



Se disuelven 1,30 g (5,72 mmol) del compuesto **98** en 30 ml de THF seco, después se le añaden 3,1 ml (4,85 mmol) de *n*-BuLi a -78 °C, apareciendo un color naranja. La mezcla se agita durante 1 h a -78°C y en atmósfera de nitrógeno, luego se añade 1,20 g (4,40 mmol) de aldehído **95** disuelto en 10 ml de THF y de color pasa de naranja a marrón. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH₄Cl y AcOEt, se evapora el THF y se extrae con AcOEt obteniéndose 2,02 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se aíslan 420 mg (0,98 mmol, 22 %) del compuesto **102** como un aceite naranja.

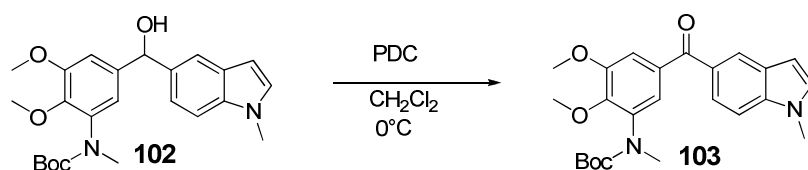
(5-(hidroxi(1-metil-1*H*-indol-5-il)metil)-2,3-dimetoxifenil)(metil) carbamato de *terc*-butilo (**102**)

RMN ¹H: 1,47 (9H, s); 3,16 (3H, s); 3,76 (3H, s); 3,82 (6H, s); 5,73 (1H, s); 6,58 (1H, d, 3,2); 6,96 (1H, d, 2,0); 7,14 (1H, d, 3,2); 7,38 (1H, d, 2,0); 7,39 (1H, d, 8,4); 7,77 (1H, d, 8,4); 8,11 (1H, s).

RMN ¹³C: 28,7 (3) (CH₃); 33,4 (CH₃); 37,1 (CH₃); 56,5 (CH₃); 61,1 (CH₃); 65,7 (CH); 80,4 (C); 103,2 (CH); 108,9 (CH); 113,8 (CH); 119,5 (CH); 124,1 (C); 124,5 (CH); 125,4 (CH); 127,9 (C); 129,5 (C); 130,3 (C); 130,8 (CH); 132,1 (C); 137,5 (C); 153,4 (C); 155,4 (C).

IR (película): 3419; 1697; 1590; 1367; 1256; 1152 cm⁻¹.

6. Oxidación del alcohol **102**



Se disuelven 300 mg (0,71 mmol) del compuesto **102** en 20 ml de CH_2Cl_2 y se le añade 318 mg (0,84 mmol) de dicromato piridinio a 0°C . La mezcla se agita 4 h a temperatura ambiente, posteriormente se extrae con agua/ CH_2Cl_2 y se obtienen 352 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se aíslan 250 mg (0,59 mmol, 83 %) del compuesto **103**.

(2,3-dimetoxi-5-(1-metil-1H-indol-5-carbonil)fenil)(metil)carbamato de *terc*-butilo (**103**):

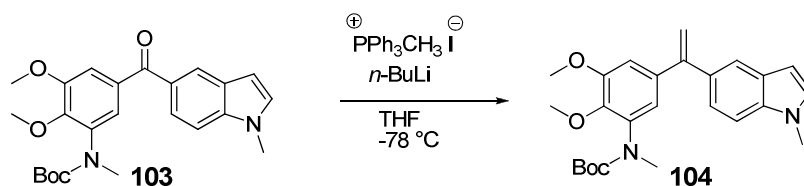
RMN ^1H : 1,43 (9H, s); 3,13 (3H, s); 3,74 (3H, s); 3,84 (6H, s); 6,57 (1H, d, 3,2); 7,14 (1H, d, 3,2); 7,24 (1H, d, 2,0); 7,38 (1H, d, 8,8); 7,39 (1H, d, 2,0); 7,76 (1H, d, 8,8); 8,11 (1H, s).

RMN ^{13}C : 28,3 (3) (CH_3); 30,2 (CH_3); 33,1 (CH_3); 56,1 (CH_3); 60,7 (CH_3); 80,1 (C); 102,8 (CH); 108,8 (CH); 112,1 (CH); 123,7 (CH); 123,9 (C); 124,2 (CH); 125,2 (CH); 127,6 (C); 129,1 (C); 130,3 (C); 130,5 (CH); 133,9 (C); 138,8 (C); 153,1 (C); 154,9 (C); 195,8 (C).

IR (KBr): 1694; 1644; 1581; 1253; 1154; 1073 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 425,2076 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 425,2076 ($\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5^+$).

7. Obtención de la isocombretastatina **104**



Se disuelven 1,70 g (4,24 mmol) de la sal de fosfonio **1** en 30 ml de THF seco y se le añaden 2,2 ml (3,53 mmol) de *n*-BuLi 1,6 M en hexano a -78°C , apareciendo un color amarillo. La

mezcla se mantiene agitando durante 1 h a -78°C en atmósfera de nitrógeno, después se añaden 600 mg (1,41 mmol) de la cetona **103** disuelta en 10 ml de THF. La reacción se agita durante 24h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH_4Cl y AcOEt, se evapora el THF y después de extracción líquido-líquido con agua/AcOEt se obtienen 1,10 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se aíslan 278 mg (0,66 mmol, 47 %) del compuesto **104** en forma de aceite naranja.

(2,3-dimetoxi-5-(1-(1-metil-1H-indol-5-il)etenil)fenil)(metil) carbamato de terc-butilo (104):

RMN ^1H : 1,40 (9H, s); 3,14 (3H, s); 3,81 (6H,s); 3,85 (3H, s); 5,36 (1H, s); 5,42 (1H, s); 6,46 (1H, d, 3,2); 6,78 (1H, d, 2,0); 6,86 (1H, d, 2,0); 7,06 (1H, d, 3,2); 7,22 (1H, d, 8,4); 7,27 (1H, d, 8,4); 7,60 (1H, s).

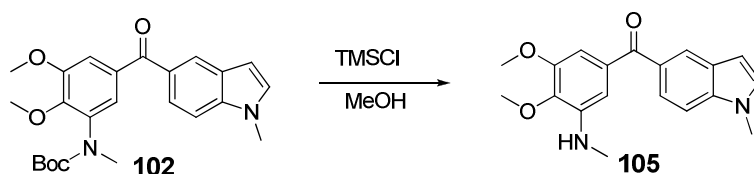
RMN ^{13}C : 28,7 (3) (CH_3); 30,8 (CH_3); 33,1 (CH_3); 56,3 (CH_3); 60,7 (CH_3); 80,1 (C); 101,7 (CH); 109,1 (CH); 111,4 (CH); 112,9 (CH_2); 121,2 (CH); 121,6 (CH); 122,7 (CH); 128,7 (2) (C); 129,6 (C); 129,8 (CH); 132,9 (C); 136,8 (C); 137,2 (C); 150,7 (C); 153,1 (C); 155,5 (C).

IR (película): 1699; 1577; 1495; 1246; 1153; 1075 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 423,2274 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 423,2284 ($\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 21,6 min.

8. Obtención de la fenstatina **105**



Se disuelven 45 mg (0,11 mmol) de la cetona **102** en 4 ml de MeOH y se le añaden 41 μl (0,33 mmol) de cloruro de trimetilsililo, pasando el color de amarillo a rojo. La mezcla se

mantiene agitando durante 24 h a temperatura ambiente, luego se evapora el MeOH y se extrae con $\text{NaHCO}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, obteniéndose 48 mg de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4) y se aíslan 20 mg (0,06 mmol, 56 %) del compuesto **105** en forma de aceite amarillo.

(3,4-dimetoxi-5-(metilamino)fenil)(1-metil-1H-indol-5-il)metanona (105):

RMN ^1H : 2,84 (3H, s); 3,85 (2) (3H, s); 3,88 (3H, s); 6,59 (1H, d, 3,2); 6,76 (1H, d, 1,6); 6,81 (1H, d, 1,6); 7,13 (1H, d, 3,2); 7,38 (1H, dd, 8,4); 7,82 (1H, dd, 8,4, 1,6); 8,17 (1H, d, 1,6).

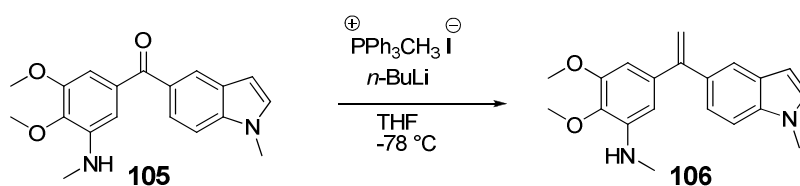
RMN ^{13}C : 30,9 (CH_3); 33,3 (CH_3); 56,3 (CH_3); 60,7 (CH_3); 101,7 (CH); 104,1 (CH); 106,7 (CH); 109,2 (CH); 120,4 (C); 124,2 (CH); 124,5 (CH); 126,8 (C); 128,2 (CH); 129,3 (C); 135,4 (C); 139,9 (C); 143,2 (C); 151,9 (C); 197,5 (C).

IR (película): 3416; 1642; 1590; 1168; 1129 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 325,1552 ($\text{M}+\text{H}^+$); esperado 325,1552 ($\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 15,1 min.

9. Obtención de la isocombretastatina 106



Se disuelven 675 mg (1,67 mmol) de la sal de fosfonio **1** en 20 ml de THF seco y se le añaden 870 μL (1,39 mmol) de $n\text{-BuLi}$ a -78°C , apareciendo un color amarillo. La mezcla se mantiene agitando durante 1 h a -78°C en atmósfera de nitrógeno, después se añaden 180 mg (0,55 mmol) del crudo de reacción de **105** disuelto en 10 ml de el THF. La reacción se agita durante 24h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH_4Cl y AcOEt, se evapora el THF, después se extrae con agua/AcOEt y se obtienen 320 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 7:3) y se aíslan 50 mg (0,15 mmol, 27 %) del compuesto **106** en forma sólida blanca.

N-metil-2,3-dimetoxi-5-(1-(1-metil-1*H*-indol-5-il)etenil)anilina (106):

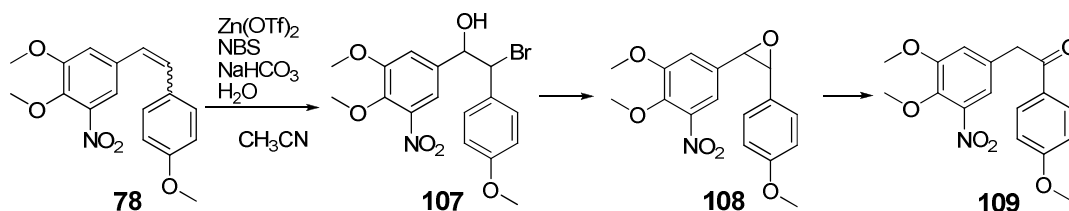
RMN ¹H: 2,66 (3H, s); 3,65 (3H, s); 3,69 (3H, s); 3,73 (3H, s); 5,17 (1H, s); 5,21 (1H, s); 5,66 (1H, s); 6,19 (1H, d, 2,0); 6,23 (1H, d, 2,0); 7,10 (1H, d, 3,2); 7,37 (1H, d, 3,2); 7,40 (1H, dd, 8,8, 1,6); 7,58 (1H, dd, 8,4; 1,6); 7,63 (1H, d, 1,6).

IR (película): 3416; 1586; 1519; 1166; 1119; 1000; 910 cm⁻¹.

V. Otras combretastatinas modificadas

A. Modificación en el puente etilénico

1. Modificaciones en el puente de la combretastatina 78



Se disuelven 70 mg (0,22 mmol) de una mezcla de isómeros Z/E del compuesto **78** en 4 mL de acetonitrilo y se añaden 5 mg (0,01 mmol) de triflato de zinc, 52 mg (0,29 mmol) de N-bromosuccinimida, 25 mg (0,29 mmol) de bicarbonato sódico y 2 gotas de agua, la reacción se pone de color verde claro. La mezcla se deja agitando 48 h controlándose por RMN ^1H , viéndose la formación inicial de la halohidrina **107**.

La reacción se deja agitando controlándose día a día por RMN ^1H y se observa la transformación de **107** en el epóxido **108** y finalmente la cetona **109**.

2-bromo-1-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)-2-(4-metoxifenil)etanol (107):

RMN ^1H : 3,79 (3H, s); 3,85 (3H, s); 3,97 (3H, s); 5,02 (1H, d, 5,6); 5,15 (1H, d, 5,6); 6,83 (2H, d, 8,4); 7,08 (1H, d, 2,4); 7,16 (2H, d, 8,4); 7,32 (1H, d, 2,4).

2-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)-3-(4-metoxifenil)oxirano (108):

RMN ^1H : 3,80 (3H, s); 3,91 (3H, s); 3,96 (3H, s); 4,20 (2H, s); 6,88 (2H, d, 8,8); 7,03 (1H, d, 2,0); 7,22 (2H, d, 8,8); 7,30 (1H, d, 2,0).

2-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)-1-(4-metoxifenil)etanona (109):

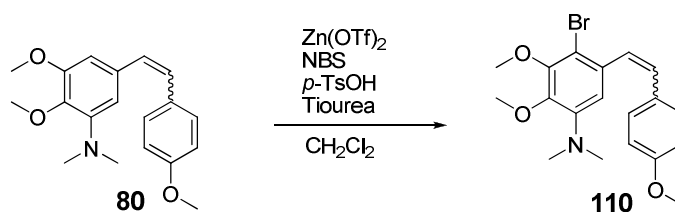
RMN ^1H : 3,78 (3H, s); 3,90 (3H, s); 3,97 (3H, s); 4,18 (2H, s); 6,86 (2H, d, 6,8); 7,15 (2H, d, 6,8); 7,72 (1H, d, 2,4); 7,98 (1H, d, 2,4).

RMN ¹³C: 44,4 (CH₂); 55,2 (CH₃); 56,5 (CH₃); 62,1 (CH₃); 114,2 (2) (CH); 114,9 (CH); 117,1 (CH); 125,6 (C); 130,4 (2) (CH); 131,5 (C); 146,6 (C); 154,1 (C); 158,7 (C); 177,9 (C); 195,1 (C).

IR (película): 3260; 2945; 1710; 1535; 1288; 1178 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 332,1129 (M+H⁺); esperado 332,1134 (C₁₇H₁₈NO₆⁺).

2. Obtención del compuesto 110:



Se disuelven 100 mg (0,32 mmol) de una mezcla de isómeros (*Z/E*) de **80** en 5 mL de CH₂Cl₂ y se le añade 6 mg (0,02 mmol) de Zn(OTf)₂, 70 mg (0,39 mmol) de NBS, 34 mg (0,39 mmol) de NaHCO₃ y 30 mg (0,39 mmol) de tiourea y el color pasa de amarillo a violeta. La reacción se agita durante 18 h a temperatura ambiente, después se extrae con agua/CH₂Cl₂, se obtienen 120 mg (0,30 mmol, 93 %) del compuesto **110** como un aceite naranja constituido por una mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 1:1.

Datos sacados del espectro de la mezcla *Z/E*

(*Z*)-*N,N*-dimetil-2,3-dimetoxi-4-bromo-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)anilina (110):

RMN ¹H: 2,57 (6H, s); 3,76 (3H, s); 3,88 (6H, s); 6,45 (1H, d, 12,0); 6,54 (1H, d, 12,0); 6,58 (1H, s); 6,72 (2H, d, 7,6); 7,12 (2H, d, 7,6).

RMN ¹³C: 42,7 (2) (CH₃); 55,2 (CH₃); 59,7 (CH₃); 60,7 (CH₃); 110,6 (CH); 110,7 (C); 113,5 (2) (CH); 127,9 (2) (CH); 129,1 (C); 130,0 (C); 130,3 (2) (CH); 133,2 (C); 145,6 (C); 151,0 (C); 158,7 (C).

(*E*)-*N,N*-dimetil-2,3-dimetoxi-4-bromo-5-(2-(4-metoxifenil)etenil)anilina (110):

RMN ¹H: 2,86 (6H, s); 3,81 (3H, s); 3,88 (6H, s); 6,89 (2H, d, 7,2); 6,91 (1H, d, 15,2); 7,25 (1H, s); 7,27 (1H, d, 15,2); 7,47 (2H, d, 7,2).

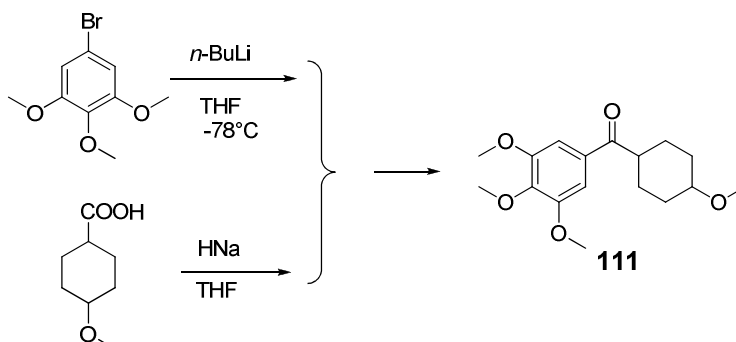
RMN ¹³C: 42,9 (2) (CH₃); 55,3 (CH₃); 59,8 (CH₃); 60,8 (CH₃); 110,7 (C); 114,1 (2) (CH); 115,3 (CH); 125,8 (2) (CH); 129,1 (C); 129,8 (2) (CH); 130,0 (C); 133,0 (C); 145,4 (C); 146,1 (C); 159,5 (C).

IR (película): 1606; 1574; 1252; 1066; 948 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 392,0850 (M+H⁺); esperado 392,0861 (C₁₉H₂₃BrNO₃⁺).

B. Derivados de isocombretastatina con anillos alifáticos

1. Obtención de la fenstatina **111**



Se disuelven 11,7 g (47,4 mmol) de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno en 60 ml de THF seco y después se le añaden 27,3 mL (43,6 mmol) de *n*-BuLi a -78 °C apareciendo un color amarillo. La reacción se deja agitando durante 1 h a baja temperatura. En paralelo se disuelven en otro matraz 3,00 g (18,9 mmol) de una mezcla *cis/trans* en proporción 2:1 del ácido 4-metoxiciclohexanocarboxílico en 60 ml de THF seco y se le añaden poco a poco 2,30 g (95,9 mmol) de hidruro sodio a 0 °C. Tras una hora de reacción se mezclan las dos reacciones y se deja agitando 24 h a temperatura ambiente. Se trata con NH₄Cl y AcOEt, se evapora el THF, después se extrae con AcOEt, se seca con Na₂SO₄, se evapora el disolvente y se obtienen 12,5 g del crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 1:1) y se aíslan 5,40 g (17,51 mmol, 92 %) del compuesto **111** como mezcla *cis/trans* en proporción 6:4.

(4-metoxiciclohexil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (**111**):

Isómero mayoritario:

RMN ¹H: 1,25-2,12 (9H, m); 3,20 (1H, m); 3,28 (3H, s); 3,81 (3H, s); 3,85 (6H, s); 7,16 (2H, s).

RMN ¹³C: 23,8 (2) (CH₂); 28,7 (2) (CH₂); 44,3 (CH); 55,4 (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,8 (CH₃); 74,4 (CH); 104,6 (2) (CH); 131,5 (C); 137,7 (C); 153,3 (2) (C); 202,0 (C).

Isómero minoritario:

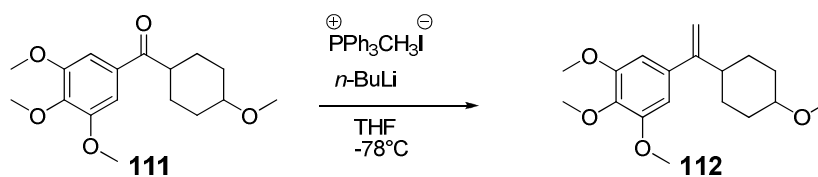
RMN ^1H : 1,25-2,12 (9H, m); 3,34 (3H, s); 3,45 (1H, m); 3,85 (3H, s); 3,87 (6H, s); 7,16 (2H, s).

RMN ^{13}C : 27,7 (2) (CH_2); 31,1 (2) (CH_2); 44,4 (CH); 56,7 (CH_3); 56,3 (2) (CH_3); 60,8 (CH_3); 78,5 (CH); 105,8 (2) (CH); 131,4 (C); 137,5 (C); 153,3 (2) (C); 202,0 (C).

IR (película): 1672; 1580; 1236; 1126; 1005 cm^{-1} .

HMRS (m/z): Obtenido 331,1516 ($\text{M}+\text{Na}^+$); esperado 331,1521 ($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NaO}_5^+$).

HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 14,4 min; t_{R} : 16,2 min.

2. Preparación de la isocombretastatina 112

Se disuelven 670 mg (1,66 mmol) de la sal de fosfonio **1** en 40 ml de THF seco y se le añaden 1,2 ml (1,33 mmol) de $n\text{-BuLi}$ a -78°C y aparece un color amarillo. La mezcla se mantiene agitando durante 1 h a -78°C en atmósfera de nitrógeno y después se añaden 170 mg (0,55 mmol) de la mezcla *cis/trans* de la cetona **111** disuelta en 10 ml de THF. La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se trata con NH_4Cl y AcOEt , se evapora el THF, se extrae con agua/ AcOEt y se obtienen 453 mg de crudo de reacción como una mezcla *cis/trans* en proporción 6:4.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/ AcOEt 8:2) y se aíslan 64 mg (0,21 mmol, 38 %) del isómero *trans* y 35 mg (0,11 mmol, 21 %) del isómero *cis* del compuesto **112** como un sólido blanco.

1,2,3-trimetoxi-5-(1-(4-metoxiciclohexil)etenil)benceno (112):**Isómero *cis*:**

RMN ¹H: 1,43 (4H, m); 1,90 (4H,m); 2,38 (1H, m); 3,29 (3H, s); 3,43 (1H, m); 3,83 (3H, s); 3,85 (6H, s); 5,02 (1H, s); 5,10 (1H, s); 6,51 (2H, s).

RMN ¹³C: 30,4 (2) (CH₂); 32,0 (2) (CH₂); 42,1 (CH); 55,7 (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 79,3 (CH); 103,8 (2) (CH); 110,3 (CH₂); 137,3 (C); 138,7 (C); 152,9 (2) (C); 154,0 (C).

IR (película): 1617; 1578; 1456; 1236; 1123; 1008 cm⁻¹.

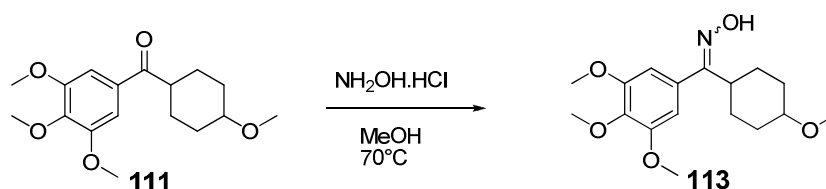
HMRS (m/z): Obtenido 307,1908 (M+H⁺); esperado 307,1909 (C₁₈H₂₇O₄⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 18,6 min.

Isómero *trans*:

RMN ¹H: 1,25 (4H, m); 1,90 (2H, m); 2,14 (2H, m); 2,35 (1H, m); 3,18 (1H, m); 3,36 (3H, s); 3,85 (3H, s); 3,87 (6H, s); 4,97 (1H, s); 5,10 (1H, s); 6,51 (2H, s).

3. Preparación de la oxima **113**



Se disuelven 50 mg (0,16 mmol) de la cetona **111** en 5 ml de MeOH y se le añaden 113 mg (1,62 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina. La reacción se agita durante 24 h a 70 °C. Se evapora el metanol y se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na₂SO₄ y se evapora el disolvente obteniéndose 143 mg del crudo de reacción como mezcla *cis/trans* 2:1.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 8:2) y se aíslan 13 mg (0,04 mmol, 25 %) del isómero *trans* del compuesto **113** como un aceite transparente.

Oxima de (4-metoxiciclohexil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (113):

Isómero mayoritario: datos sacados de la mezcla

RMN ¹H: 1,24-2,15 (8H, m); 2,45 (1H, m); 3,20 (1H, m); 3,38 (3H, s); 3,85 (3H, s); 3,87 (6H, s); 6,61 (2H, s).

Isómero minoritario:

RMN ¹H: 1,14 (2H, m); 1,28 (2H, m); 1,87 (2H,m); 2,05 (2H, m); 2,37 (1H, m); 3,03 (1H, m); 3,30 (3H, s); 3,80 (3H, s); 3,82 (6H, s); 6,42 (2H, s).

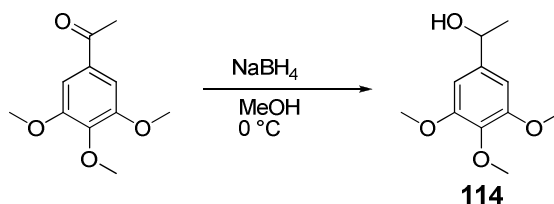
RMN ¹³C: 28,4 (2) (CH₂); 31,4 (2) (CH₂); 43,5 (CH); 55,6 (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 60,8 (CH₃); 78,8 (CH); 104,6 (2) (CH); 128,9 (C); 138,0 (C); 153,2 (2) (C); 162,0 (C).

IR (película): 3442; 1576; 1398; 1236; 1125; 1005 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 324,1812 (M+H⁺); esperado 324,1811 (C₁₇H₂₆NO₅⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 4,3 min; t_R: 5,3 min.

4. Obtención del alcohol 114



Se disuelven 2,00 g (9,51 mmol) de 3,4,5-trimetoxiacetofenona en 30 ml de MeOH y se le añaden poco a poco 440 mg (11,63 mmol) de borohidruro sódico a 0 °C. La mezcla se mantiene en agitación 4 h, luego se evapora el metanol, se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na₂SO₄, se evapora el disolvente y se obtienen 1,92 g (9,04 mmol, 95 %) del compuesto **114** como un aceite transparente.

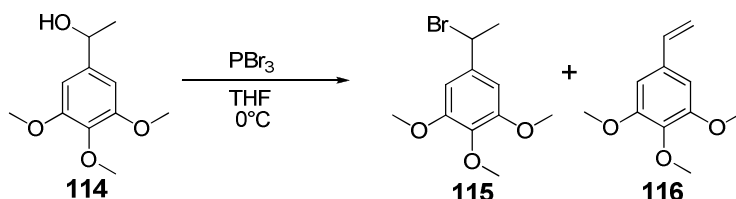
1-(3,4,5-trimetoxifenil)etanol (114):

RMN ¹H: 1,48 (3H, d, 6,4); 3,81 (3H, s); 3,86 (6H, s); 4,84 (1H, c, 6,4); 6,61 (2H, s).

RMN ¹³C: 25,2 (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,7 (CH₃); 70,4 (CH); 102,1 (2) (CH); 136,9 (C); 141,8 (C); 153,2 (2) (C).

IR (película): 3470; 1592; 1234; 1127; 1007 cm^{-1} .

5. Bromación del alcohol **114**



Se disuelven 1,92 g (8,95 mmol) de **114** en 30 mL de THF y después se añaden 950 μL (10,10 mmol) de tribromuro de fósforo a 0 °C. La reacción se agita durante 2 h, luego se evapora el THF, se extrae con agua/AcOEt, se seca con Na₂SO₄, se evapora el disolvente y se obtienen 2,40 g de crudo de reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 8:2) separándose 2,00 g (7,27 mmol, 81 %) del compuesto **115** y 150 mg (0,77 mmol, 9 %) del compuesto **116**.

5-(1-bromoetil)-1,2,3-trimetoxibenceno (115):

RMN ¹H: 2,01 (3H, d, 6,8); 3,83 (3H, s); 3,87 (6H, s); 5,11 (1H, c, 6,8); 6,64 (2H, s).

RMN ¹³C: 25,0 (CH₃); 55,6 (2) (CH₃); 60,4 (CH₃); 70,1 (CH); 101,9 (2) (CH); 102,8 (C); 141,6 (C); 152,8 (2) (C).

IR (película): 1591; 1461; 1327; 1235; 1127; 833 cm^{-1} .

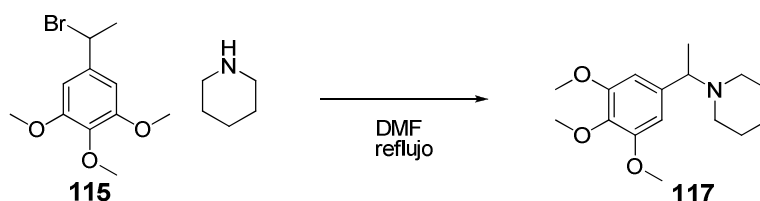
1,2,3-trimetoxi-5-vinilbenceno (116):

RMN ¹H: 3,84 (3H, s); 3,88 (6H, s); 5,20 (1H, d, 11,2); 5,64 (1H, d, 17,6); 6,60 (1H, dd, 11,2, 17,6); 6,63 (2H, s).

RMN ¹³C: 56,0 (2) (CH₃); 60,8 (CH₃); 103,2 (2) (CH); 113,2 (CH₂); 133,3 (C); 136,7 (CH); 139,8 (C); 153,2 (2) (C).

IR (película): 1583; 1505; 1462; 1326; 1238; 1128 cm^{-1} .

6. Preparación del compuesto 117



Se disuelven 1,00 g (3,63 mmol) de **115** en 15 ml de DMF y después se le añaden 450 μ l (4,55 mmol) de piperidina. La reacción se agita durante 48 h a temperatura ambiente controlándose por cromatografía de capa fina, luego se calienta a 90 °C, posteriormente se trata con hielo y agua, se extrae con AcOEt, se seca con Na₂SO₄, se evapora el disolvente y se obtienen 631 mg (2,26 mmol, 62 %) del compuesto **117** como un aceite naranja.

1-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil)piperidina (117)

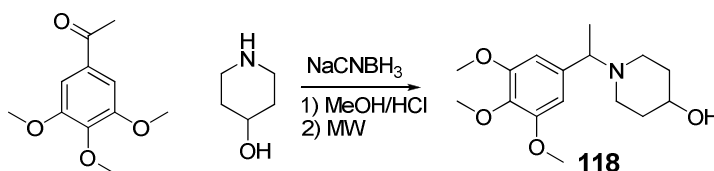
RMN ¹H (MeOD): 1,33 (3H, d, 6,6); 1,39 (4H, m); 1,54 (2H, m); 2,33 (4H, m); 3,23 (1H, c, 6,6); 3,73 (3H, s); 3,81 (6H, s); 6,61 (2H, s).

RMN ¹³C (MeOD): 20,2 (CH₃); 25,4 (CH₂); 26,8 (2) (CH₂); 53,0 (2) (CH₂); 56,7 (2) (CH₃); 61,1 (CH₃); 67,4 (CH); 106,2 (2) (CH); 138,2 (C); 140,6 (C); 154,4 (2) (C).

IR (película): 1590; 1503; 1125; 1012 cm⁻¹.

HMRS (m/z): Obtenido 280,1894 (M+H⁺); esperado 280,1913 (C₁₆H₂₆NO₃⁺).

7. Obtención del compuesto 118



Se disuelven 400 mg (1,90 mmol) de 3,4,5-trimetoxiacetofenona en 20 ml de MeOH y se le añaden 290 mg (2,86 mmol) de 4-piperidinol, 155 mg (0,73 mmol) de cianoborohidruro sódico y 3 gotas de ácido clorhídrico. La reacción se agita durante 1 h a 0 °C y mantiene la

agitación durante 24 h a de temperatura ambiente, posteriormente se evapora el MeOH y se obtiene 420 mg del crudo de reacción. En la RMN ^1H no se observó evolución de la reacción. El mismo crudo se vuelve a poner en el microondas casero durante 3 min utilizando la sílice como soporte y se observó la evolución de esta reacción.

El crudo se purifica por cromatografía flash (Hex/AcOEt 6:4) aislándose 230 mg (0,78 mmol, 41 %) del compuesto **118** en forma de aceite amarillo.

1-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil)piperidin-4-ol (118):

RMN ^1H : 1,23 (3H, d, 6,4); 1,41 (2H, m); 1,73 (2H, m); 1,99 (1H, m); 2,58 (2H, m); 2,78 (2H, m); 3,18 (1H, m); 3,50 (1H, sa); 3,69 (3H, s); 3,72 (6H, s); 6,42 (2H, s).

RMN ^{13}C : 20,5 (CH₃); 34,7 (2) (CH₂); 48,9 (CH); 56,6 (2) (CH₃); 61,3 (CH); 65,7 (2) (CH₂); 68,1 (CH); 104,9 (2) (CH); 137,1 (C); 140,0 (C); 153,5 (2) (C).

VI. Determinación de la solubilidad acuosa:

Una vez sintetizados los compuestos se han realizado los ensayos de la solubilidad acuosa para completar los objetivos de este trabajo. Para ello se decidió medir la solubilidad en un tampón fosfato a pH 7, ya que es el pH fisiológico y son las condiciones en las que se realizan los ensayos biológicos de estos compuestos.

Para la realización de los ensayos de la solubilidad se utilizó espectrofotómetro Helios Alpha Thermo Spectronic para medir la absorbancia de los compuestos.

En primer lugar se realiza un barrido en el espectrofotómetro desde 270 a 400 nm para determinar la λ de absorbancia máxima de cada compuesto. A continuación se realizan las rectas de calibrado para cada compuesto.

Para la realización de la recta de calibrado se prepara una disolución del compuesto en DMSO con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, a partir de la cual se preparan 6 cubetas de concentraciones que van desde 1 hasta 15 $\mu\text{g/mL}$. Las cubetas se preparan con un volumen final de 300 μL , de los cuáles 270 serán de DMSO, disolvente orgánico muy polar utilizado por ser miscible con agua además de por su elevada capacidad para disolver compuestos orgánicos, y 30 μL de tampón fosfato que va a mantener el pH de la disolución entorno a 7, a pH fisiológico.

Una vez preparadas las cubetas, se toma la muestra con menor concentración (1 $\mu\text{g/mL}$) y se lleva a cabo un scan o barrido entre los 270 y 400 nm para conocer la longitud de onda a la que el compuesto presenta un máximo de absorbancia y que será la longitud de onda a la que se realizarán el resto de medidas. En la mayoría de los casos ésta suele estar entorno a los 300 nm, característica de compuestos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Después, a la longitud seleccionada, se mide la absorbancia de cada una de las cubetas, la cual se representa frente a la concentración de cada una. Los puntos obtenidos se ajustan a una recta, que es la recta patrón o de calibrado que posteriormente servirá para determinar la concentración de las muestras de estudio.

Para los ensayos de solubilidad se pesaron muestras de entre uno y dos miligramos de cada compuesto y se le añade 300 μL del tampón fosfato y se pone en agitación 48 horas. Para saber la cantidad de compuesto que se ha disuelto en el tampón, se mide la absorbancia a una determinada longitud de onda que presenta el compuesto disuelto en el tampón y se compara con las absorbancias de una recta patrón o recta de calibrado realizada previamente.

Se han determinado la solubilidad acuosa de varios compuestos sintetizados, familia de combretastatinas, fenstatinas e isocombretastatinas. Se han detallado los resultados obtenidos en la tabla siguiente:

Compuesto	Solubilidad (µg/ml)	Compuesto	Solubilidad (µg/ml)
12	48	52	65
13	30	54	11
14	9	55	21
15	11	57	153
16	107	61	4,4 mg/ml
17	123	62	1,0 mg/ml
18	84	66	>5 mg/ml
20	2,5 mg/ml	71	110
21	74	73	102
22	1,5 mg/ml	80	71
33	34	82	7
34	583	87	1,0 mg/ml
35	136	90	48
36	10	91	44
37	13	97	52
40	62	104	6
50	44	105	10
51	679		

Tabla 21: valores de solubilidad en un tampón de 10 mM NaPi a pH 7 de los compuestos sintetizados.

VII. Actividad biológica

Para realizar los ensayos de inhibición de la polimerización de la tubulina se han seguido los tres pasos siguientes:

- **Aislamiento de la proteína microtubular** a partir de cerebros de ternero.
- **Ensayos de inhibición de polimerización de la tubulina**, en el cual se hace un cribado con el fin de seleccionar los compuestos que den mejores resultados.
- **Determinación de la IC₅₀**, de los compuestos que presentan una inhibición de polimerización de la tubulina mayor del 50 % a una concentración de 5 μ M.

1. Aislamiento de la proteína:

Partiendo de cerebros de ternero sacrificados el mismo día del aislamiento, se extrae en una cámara fría a 4 °C la sustancia gris, rica en proteína microtubular o tubulina, evitando en la medida de lo posible tomar restos de otros tejidos. Se añade tampón de extracción (EB) en una relación de 1 mL por gramo de córtex pesado (unos 260 g) y se homogeniza con mucho cuidado con el potter, aún en la cámara fría.

A partir de este punto, se realizan una serie de incubaciones y centrifugaciones a 4 °C y 37 °C, alternativamente, que permiten aislar la proteína deseada, gracias a su capacidad de polimerizar y formar microtúbulos a 37 °C y despolimerizar a 4 °C. Así, cuando se lleva a cabo la centrifugación a 4 °C la proteína se encuentra despolimerizada y permanece en el sobrenadante, mientras que a 37 °C, la tubulina se encuentra en forma de microtúbulos y forma parte del precipitado resultante.

En primer lugar, se centrifuga a 4 °C y 31k rpm durante una hora. Después de este primer centrifugado el resultado es un precipitado muy abundante, homogéneo y de color crema que contiene restos celulares y de tejido, pero solo se utilizará el sobrenadante, que contiene la tubulina en forma de subunidades. A este sobrenadante se le añade lo necesario para que en el siguiente paso la tubulina sea capaz de formar los microtúbulos:

- Tampón de ensamblaje (que contiene iones magnesio y β -mercaptoetanol).
- Glicerol hasta una concentración de 3,5 M
- GTP (hasta una concentración de 0,5 mM)
- PMSF (hasta una concentración de 1 mM)

El volumen resultante se mantiene a una temperatura de 37 °C durante 45 minutos para que la proteína polimerice durante 45 minutos y después se centrifuga a 37 °C durante 90 minutos a 31k rpm.

Después de este segundo centrifugado, al contrario que antes, se escoge el precipitado (gelatinoso) que contiene la proteína polimerizada y se resuspende en:

- Tampón de ensamblaje
- 1mM GTP (200 µL de 0,1 M stock por cada 20 mL de volumen añadido)

Esta suspensión se homogeniza, se enfría en hielo para que despolimerice durante 30 minutos y, posteriormente, se centrifuga a 32k rpm durante 30 minutos a 4 °C.

Al igual que antes, al sobrenadante obtenido (bastante claro), se le añade lo necesario para una nueva formación de microtúbulos:

- GTP (hasta 0,5 mM)
- PMSF (hasta 1 mM)

Se polimeriza a 37 °C durante 30 minutos y se centrifuga a 32k rpm durante 45 minutos y a 37 °C.

Se recoge el precipitado de aspecto gelatinoso y se deja enfriar en hielo durante 5 minutos para después añadir el tampón 1XAB y el GTP (0,5 mM). Este precipitado resuspendido proveniente del segundo ciclo de polimerización/despolimerización se alicuota en volúmenes de 250 µL (obteniendo un volumen total entre 2,5 y 3 mL), que se congelan rápidamente en nitrógeno líquido y se guardan en un congelador a -80 °C, hasta su posterior uso.

De esta forma, se obtiene MTP o proteína microtubular, constituida por tubulina α , tubulina β y MAPs o proteínas asociadas a microtúbulos. El rendimiento promedio de cada purificación (utilizando como material de partida 300 g de tejido) fue de 0,3-0,5 mg de proteína microtubular (MTP) por gramo de tejido.

2. Ensayo de actividad:

Las alícuotas de proteína microtubular (MTP) se descongelan rápidamente en un baño de agua a 20 °C y se resuspenden en 1 mL de tampón de ensamblaje por alícuota. La suspensión se somete, cuidadosamente, a agitación magnética suave en hielo durante 30 minutos, se centrifuga 30 minutos a 4 °C y 50000 rpm (para completar el segundo ciclo de polimerización/despolimerización). Se recoge el sobrenadante y se realiza el ensayo de Bradford para determinar la concentración de proteína total; típicamente 4,0 mg/mL (valor

medio por preparación). Para esta concentración de proteína, se toma 125 μL de MTP, 5 μl de disolución 2 mM de los ligandos en DMSO (para una concentración de compuesto 20 μM), 15 μL de DMSO y 355 μl de tampón (ensamblaje + 1,5 mM GTP), hasta completar los 500 μL del volumen final.

Las muestras se incuban a 20 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, permitiendo la interacción de los ligandos con la proteína microtubular. A continuación, se enfrían en un baño de hielo durante 10 minutos y se introducen en el espectrofotómetro. La absorbancia se registra a 450 nm durante todo el proceso. Tras un periodo de estabilización a 4 $^{\circ}\text{C}$, aproximadamente 5 minutos, la temperatura se eleva a 37 $^{\circ}\text{C}$. Cuando la absorbancia se estabiliza, se vuelve a cambiar la temperatura a 4 $^{\circ}\text{C}$ y la absorbancia vuelve a disminuir.

3. Determinación de la IC_{50} de la inhibición de la polimerización de la tubulina:

La IC_{50} es la concentración a la cual el compuesto inhibe la polimerización de la proteína en un 50 %.

El procedimiento seguido en el ensayo de IPT es exactamente igual al explicado anteriormente, variando únicamente la concentración del ligando para el que se quiere calcular la IC_{50} . Generalmente cada ligando se ensaya al menos a las concentraciones 0,5, 2, 4, 6 y 10 μM , aunque pueden variar en función del comportamiento de cada compuesto.

En la tabla siguiente se resumen los ensayos de inhibición de la polimerización de la tubulina y se indican la concentración probada y el porcentaje de inhibición producida. Todos los resultados son para una concentración final de proteína 1 mg/mL.

COMP	CONC (μM)	% INHIB	IC ₅₀	COMP	CONC (μM)	% INHIB	IC ₅₀
13	0,5	16	1,9	79	2	20	6,2
	1	28			4	36	
	2	52			5	40	
	4	84			6	40	
	5	90			10	74	
	20	100			20	83	
50	2	22	5,1	80	0,5	20	1,1
	4	45			1	43	
	5	55			2	79	
	10	65			5	92	
	15	85		97Z	0,5	43	0,8
	20	92			1	49	
73	2	39	2,5	2	79	1,2	
	4	70		4	84		
	5	63,5		5	85		
	10	76		105	0,5		20
	20	80			1		36
74	2	9	6,0	2	37	1,2	
	4	36		4	78		
	5	47		5	97		
	10	64					
	20	78					

Tabla 22: Valores de inhibición de la polimerización de la tubulina de los compuestos seleccionados a distintas concentraciones e IC₅₀ obtenidas.

CONCLUSIONES

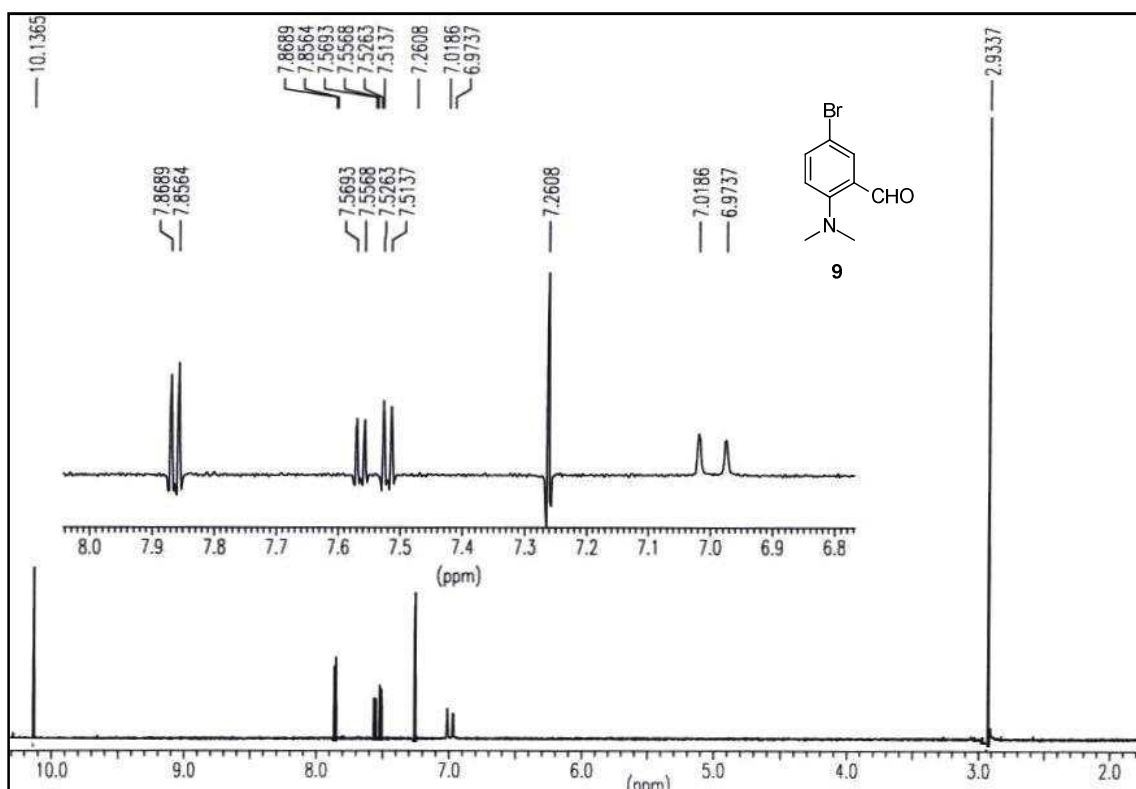
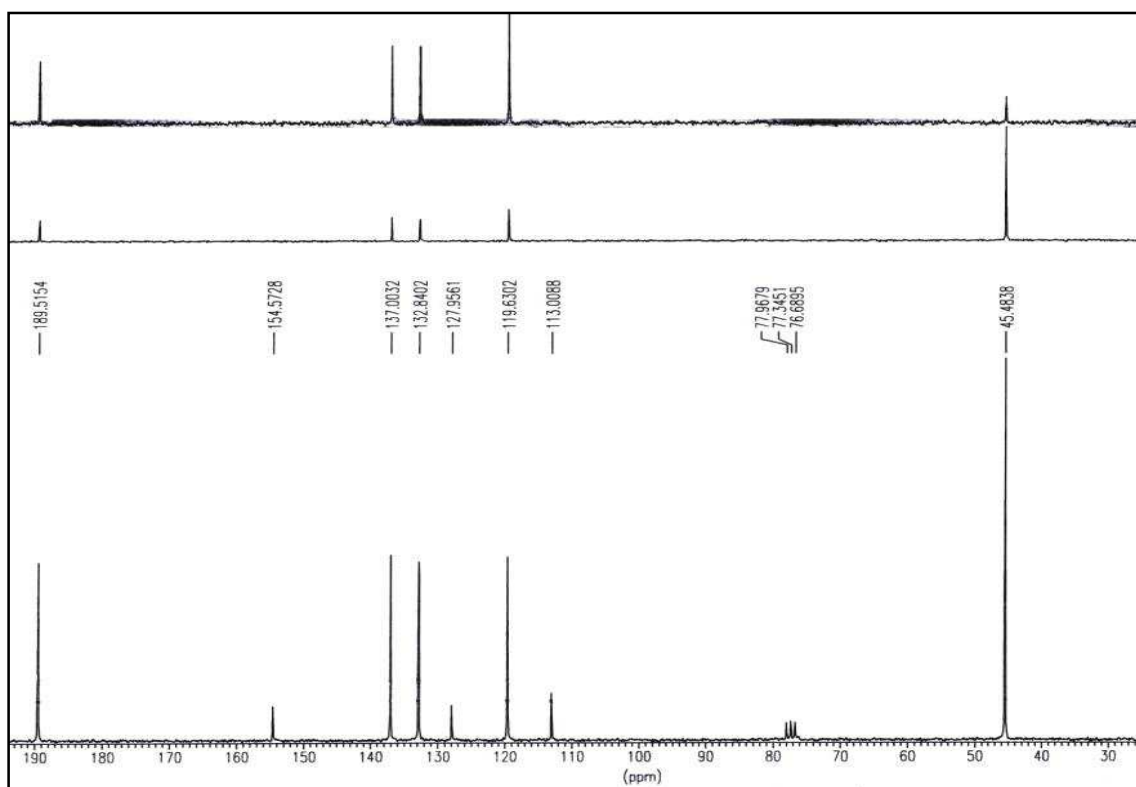
CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación de nuevos análogos nitrogenados de combretastatinas. Así se han obtenido y evaluado compuestos que incorporan modificaciones tanto en el anillo A como en el anillo B como en el puente.

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes conclusiones:

- La reacción de Wittig y el empleo de derivados organometálicos constituyen la metodología sintética empleada para la obtención con buenos rendimientos de los derivados de combretastatina, fenstatina e isocombretastatina.
- Se han sintetizado 52 compuestos que incorporan un grupo nitrogenado en el anillo B y 30 compuestos que lo hacen en el anillo A.
- Los resultados de los ensayos de solubilidad acuosa muestran que, en general, los compuestos sintetizados son más solubles que el compuesto de referencia, Combretastatina A-4.
- Los compuestos en forma de sal de amonio han resultado ser los más solubles que se han obtenido. Sin embargo, estos compuestos no han mostrado una elevada inhibición de la polimerización de tubulina a las concentraciones ensayadas.
- De las modificaciones llevadas a cabo en el anillo B, solamente la isocombretastatina con un anillo de p-dimetilaminofenilo tiene una actividad comparable a la de la CA-4.
- La sustitución de uno de los metoxilos del anillo A por un grupo amino, metilamino o dimetilamino, ha dado lugar a compuestos que inhiben la polimerización de tubulina con una potencia semejante a la de CA-4. Esto implica que, a pesar de la importancia que tiene el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo para la actividad, es posible introducir algunas modificaciones.
- Se han combinado el anillo A de 3,4,5-trimetoxifenilo y el anillo B de piridina sustituida con dimetilamino, pirrolidina o sin sustituyentes, unidos por puentes de combretastatina, fenstatina o isocombretastatina. Se han obtenido compuestos menos potentes pero muy solubles en agua.

ESPECTROS

Figura Ia: Espectro de RMN ^1H del compuesto **9**.Figura Ib: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9**.

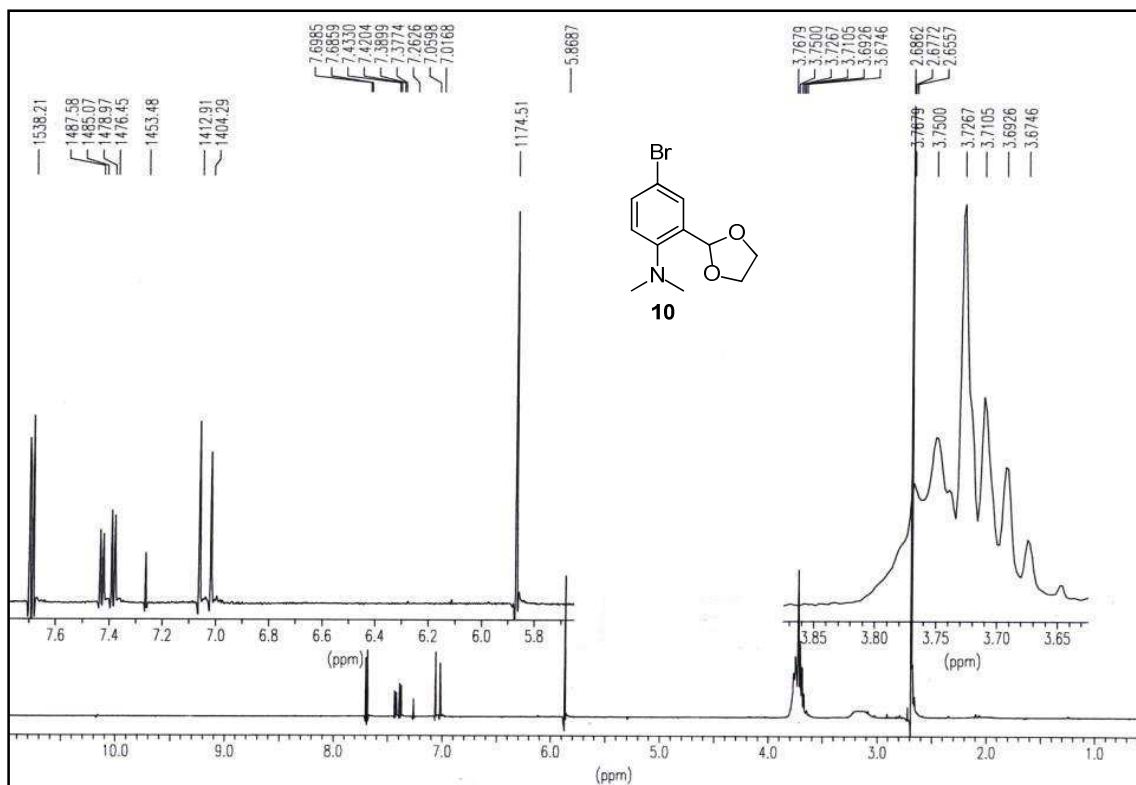


Figura IIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **10**.

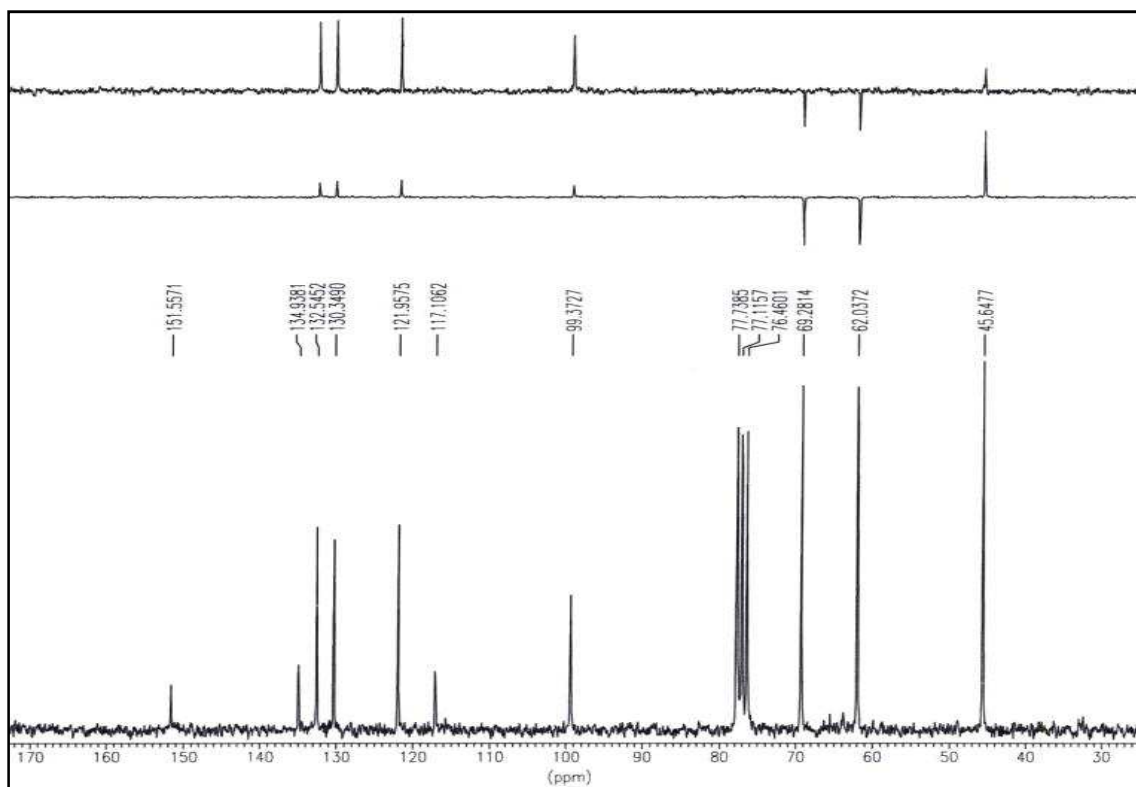
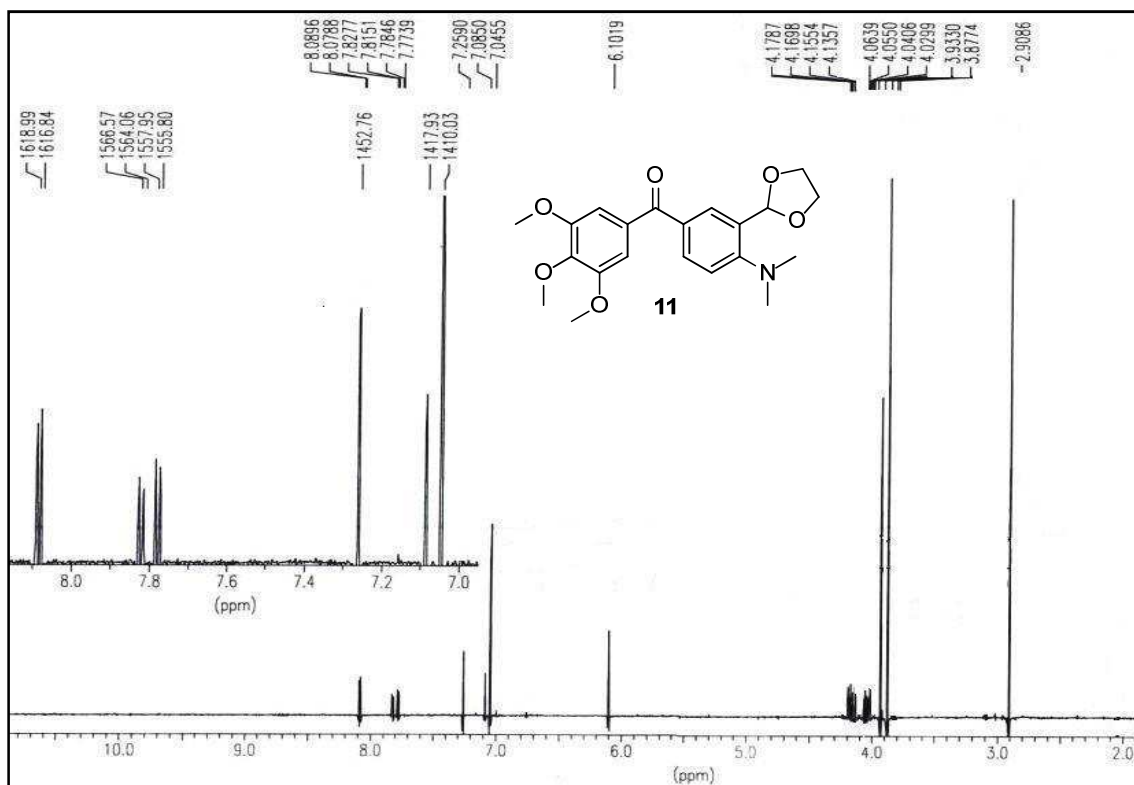
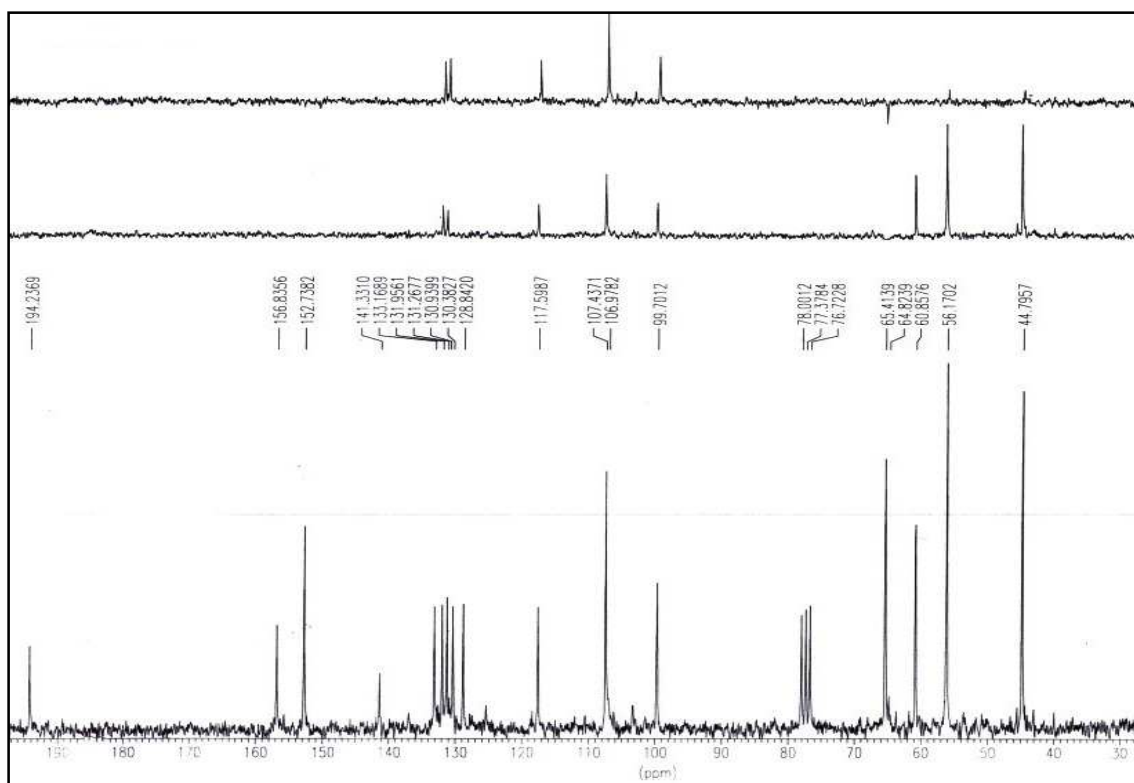


Figura IIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **10**.

Figura IIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **11**.Figura IIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **11**.

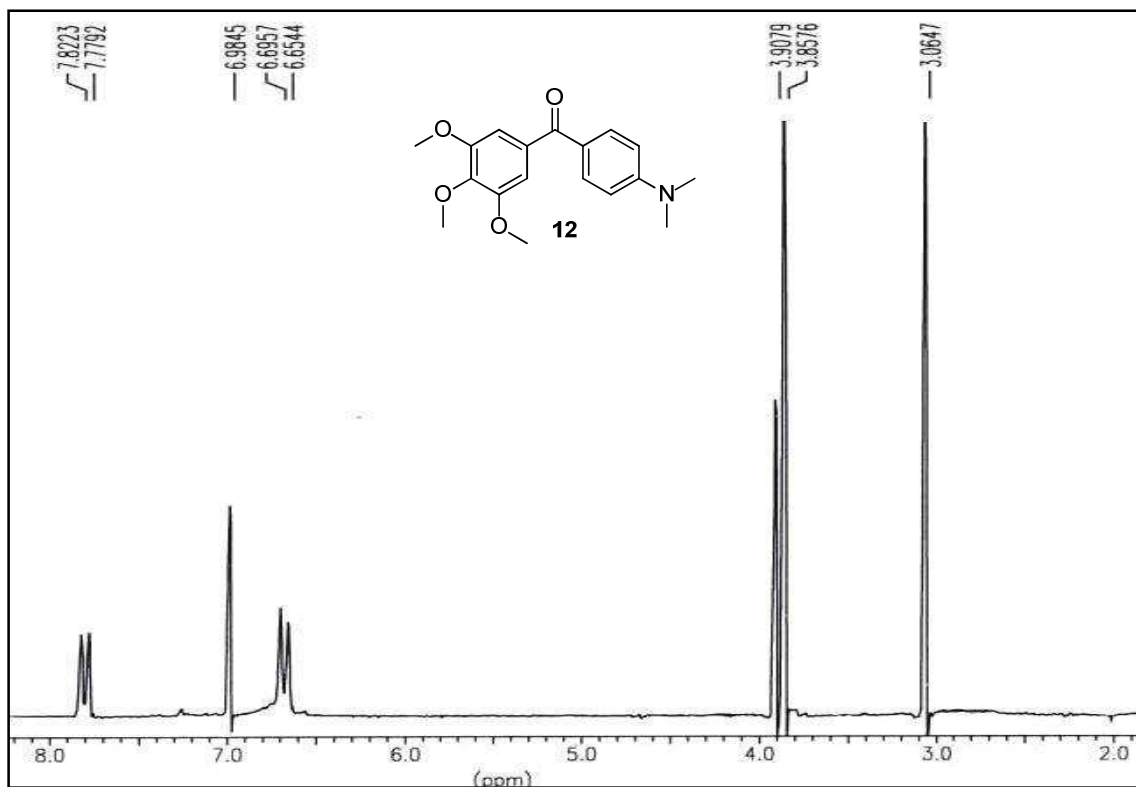


Figura IVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **12**.

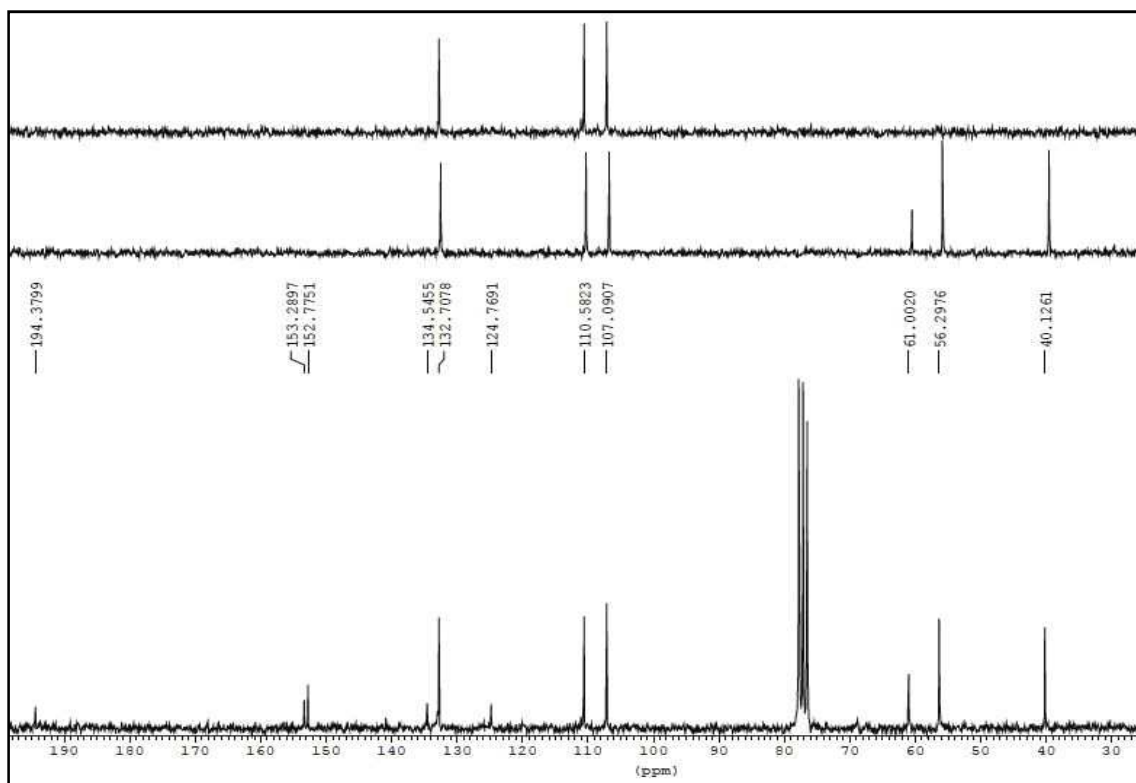
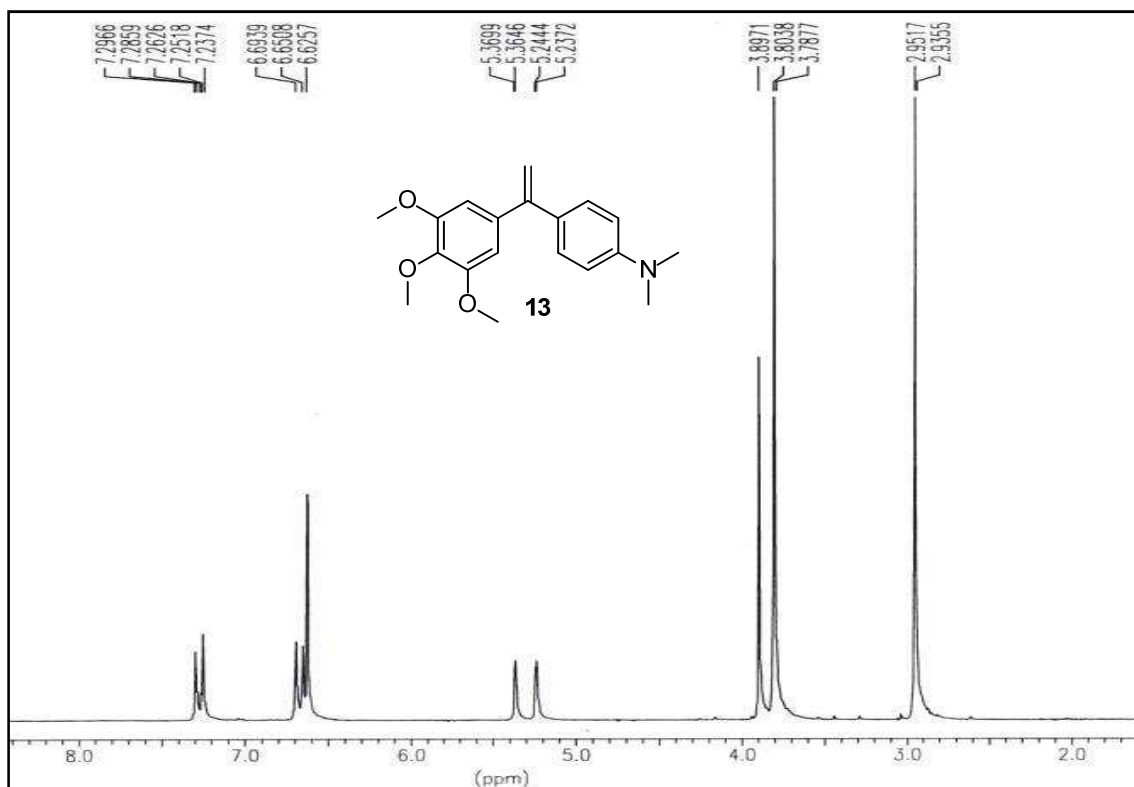
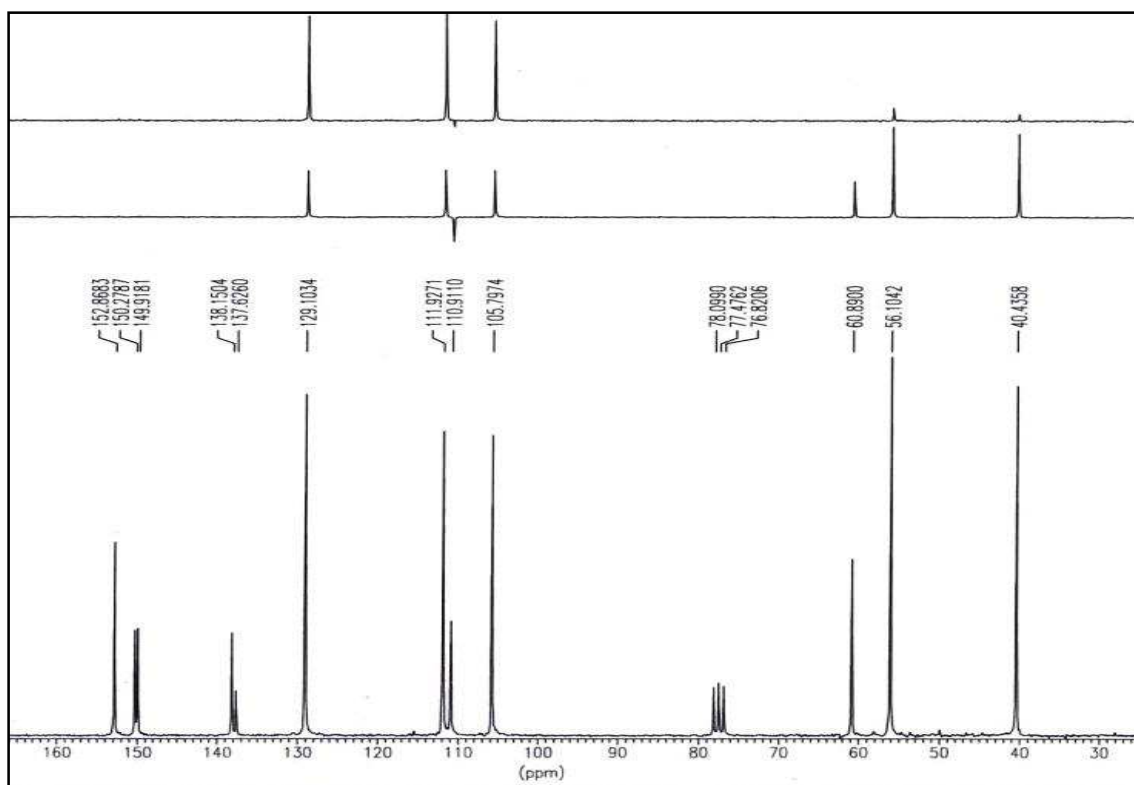


Figura IVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **12**.

Figura Va: Espectro de RMN ^1H del compuesto **13**.Figura Vb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **13**.

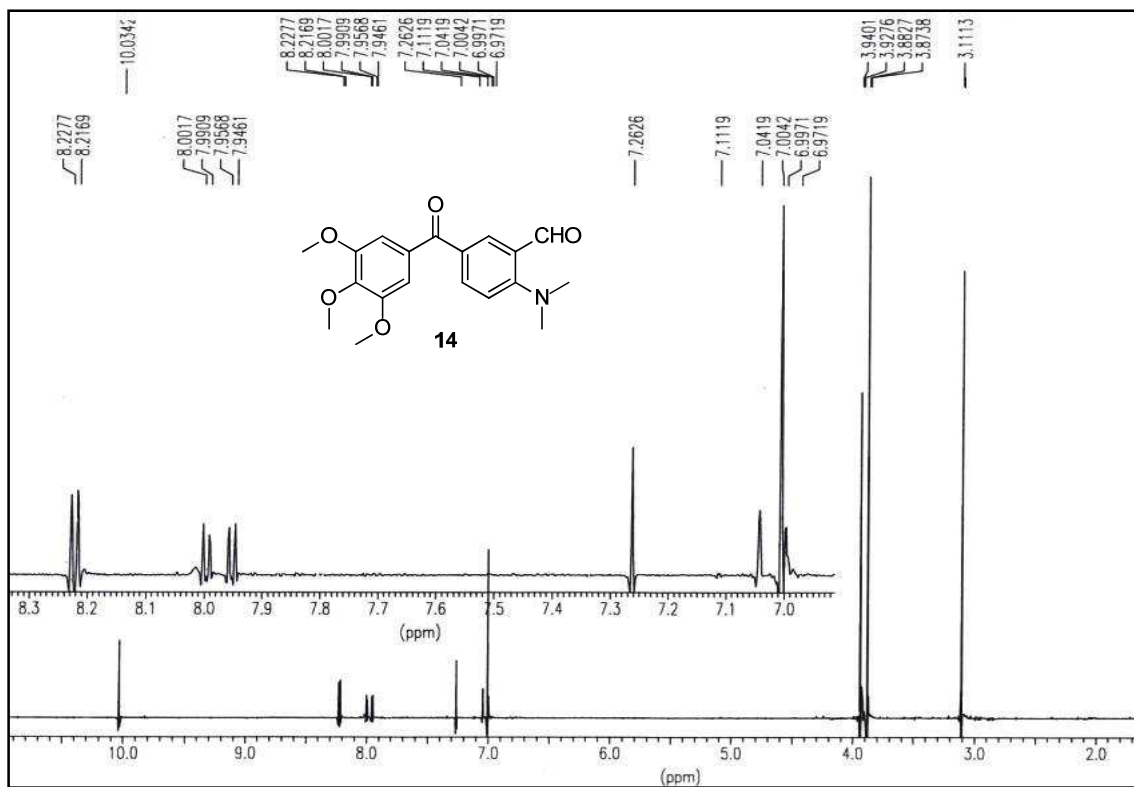


Figura VIa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **14**.

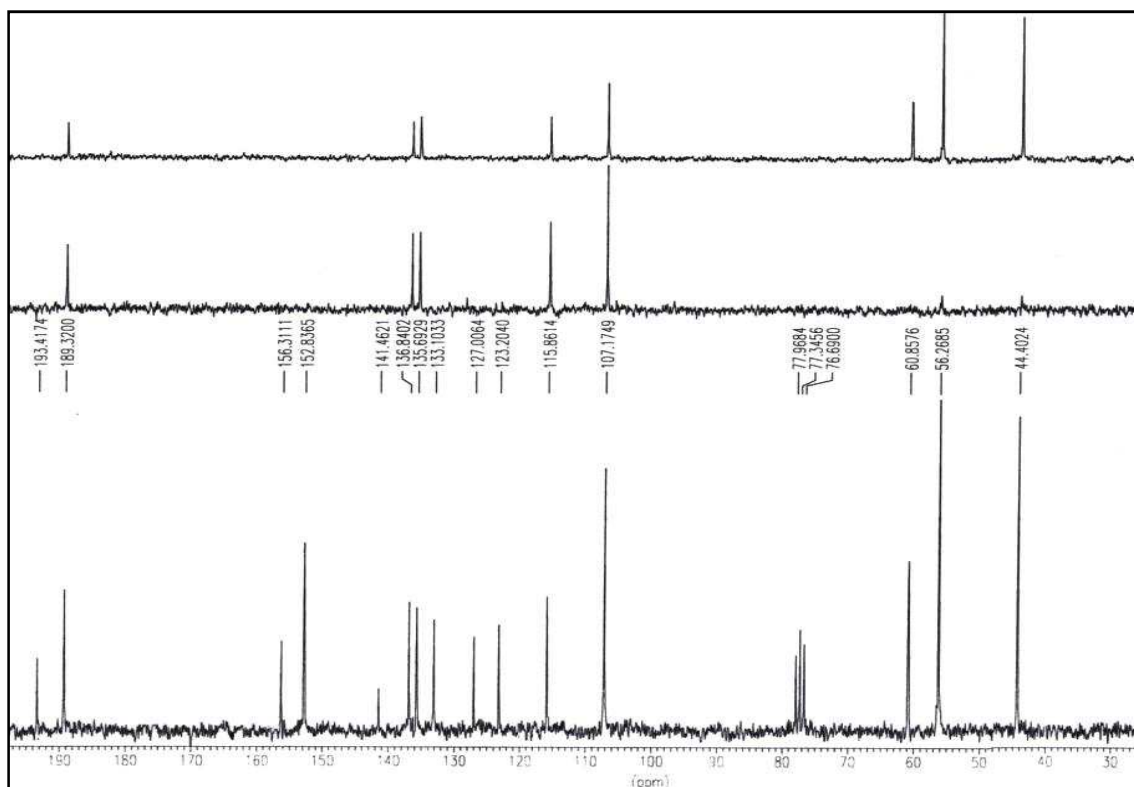
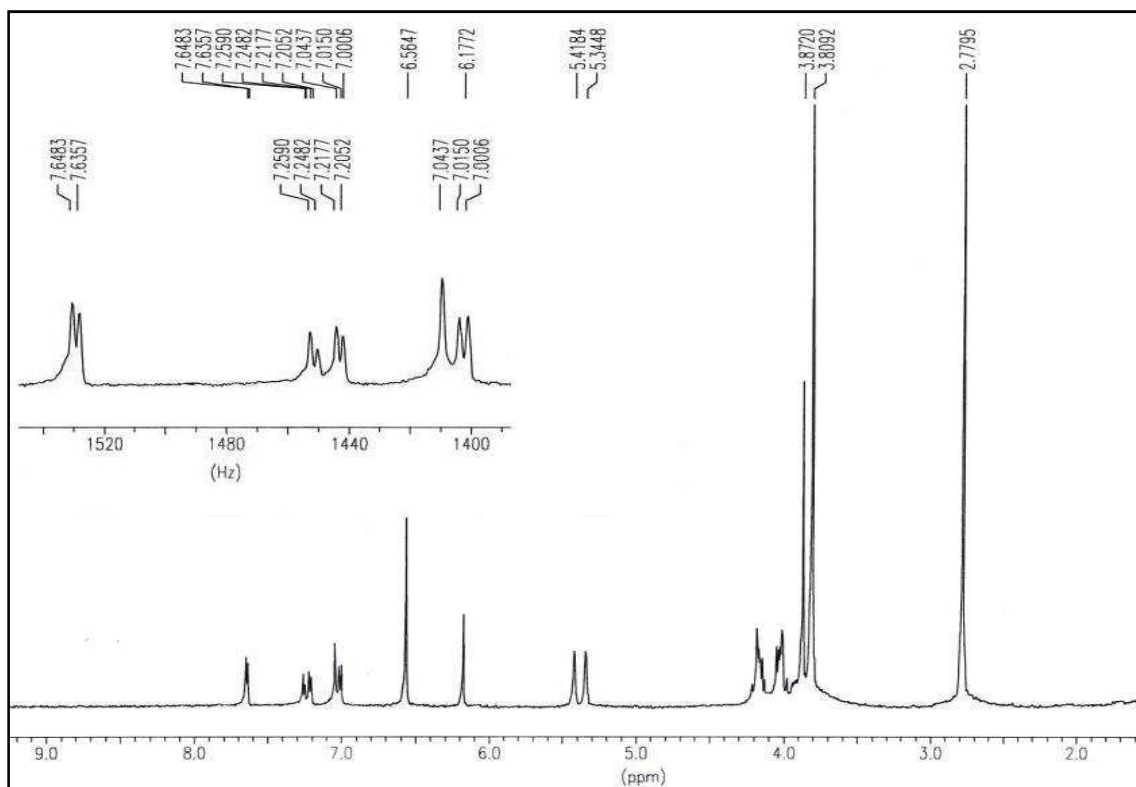
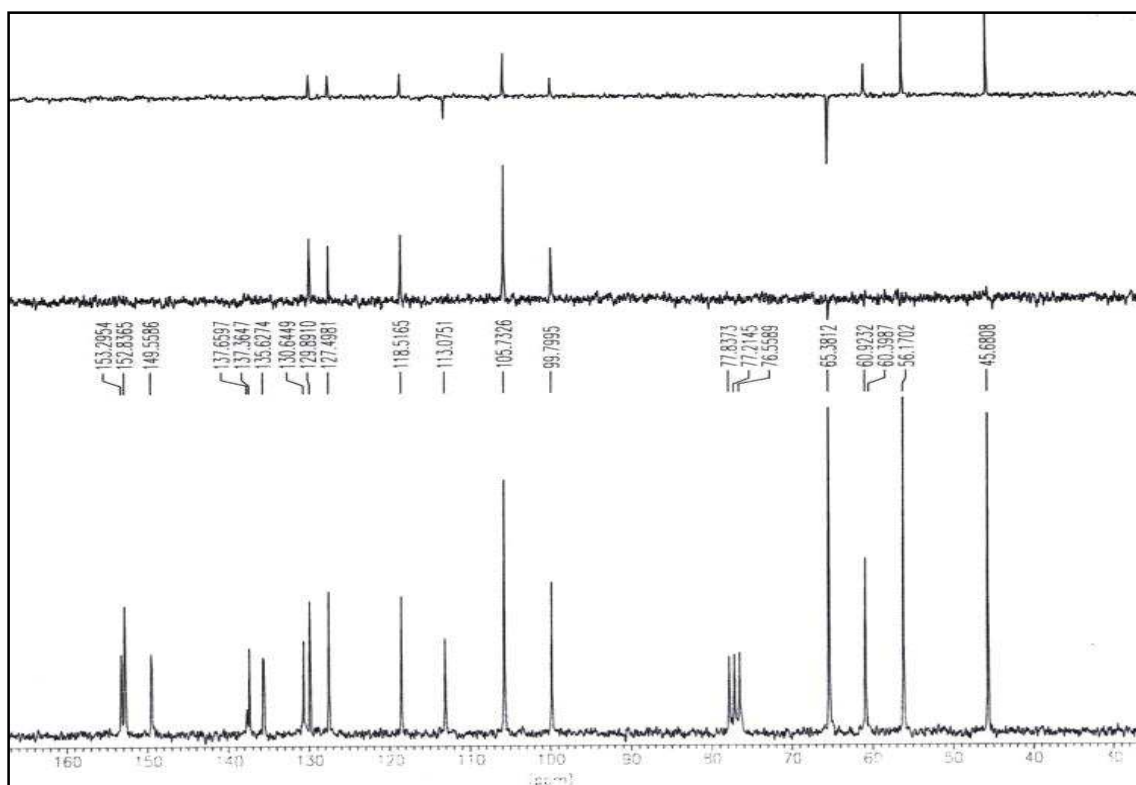


Figura VIb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **14**.

Figura VIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **15**.Figura VIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **15**.

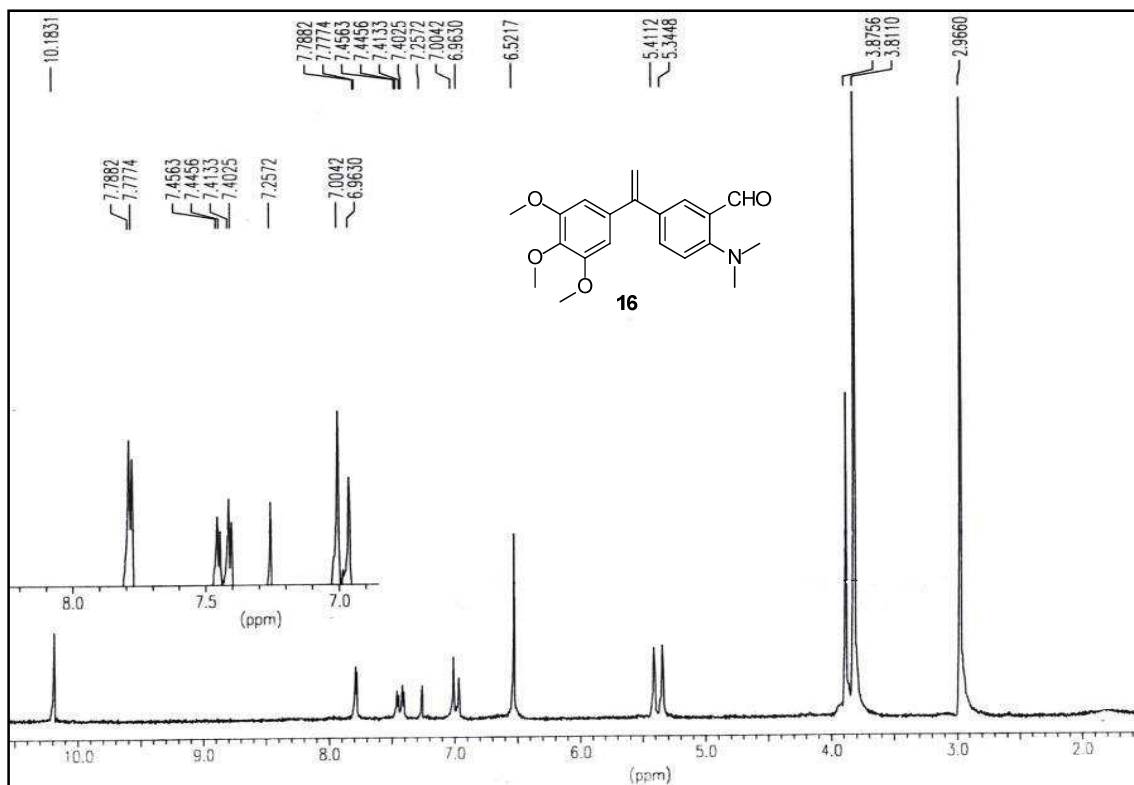


Figura VIIIa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **16**.

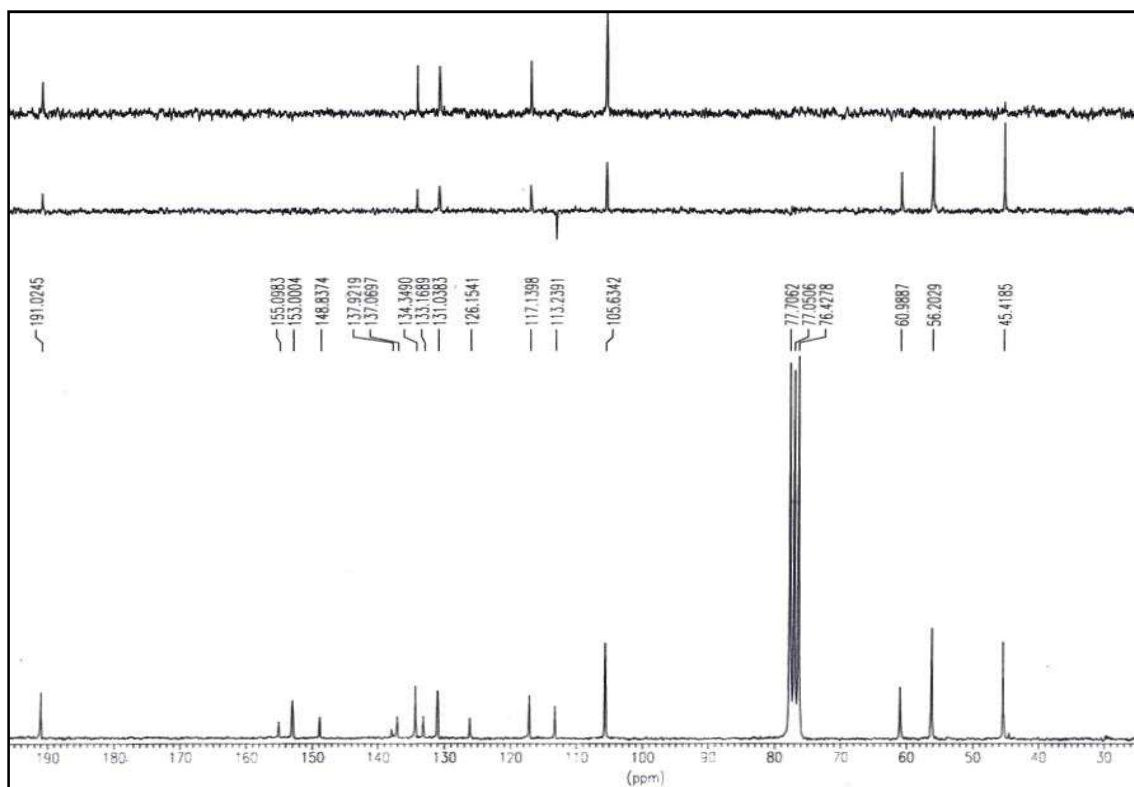
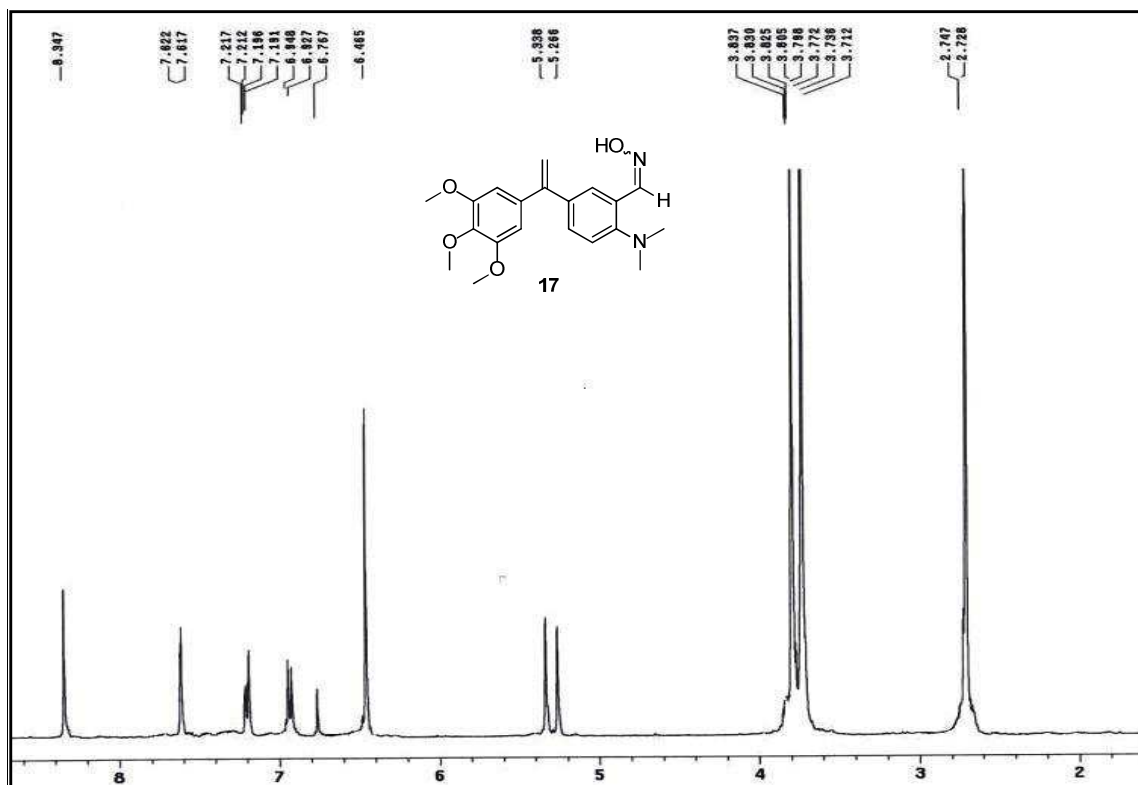
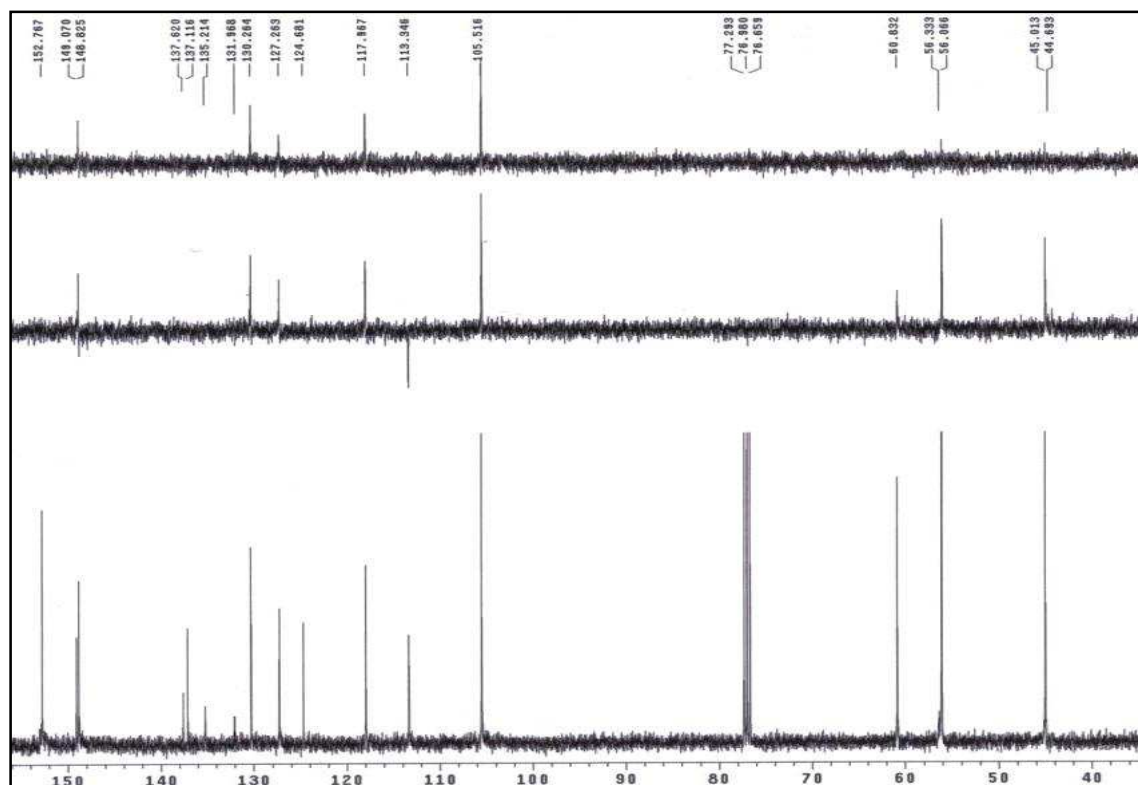


Figura VIIIb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **16**.

Figura IXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto 17.Figura IXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 17.

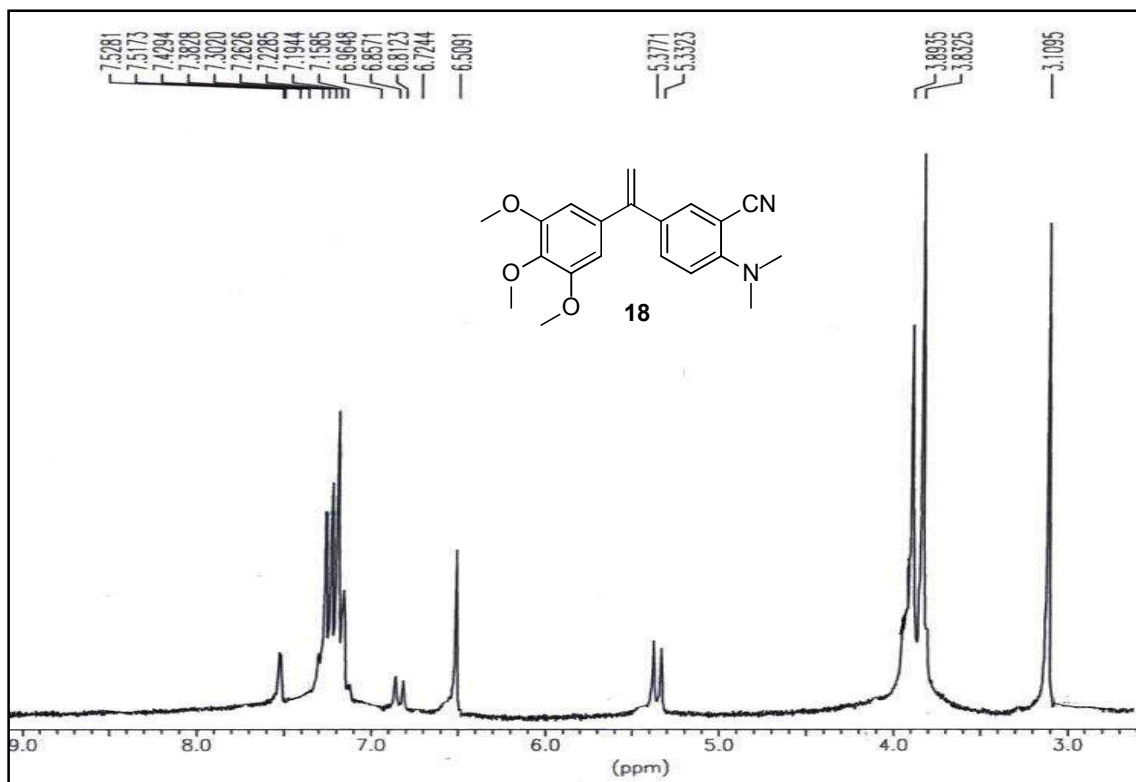


Figura Xa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **18**.

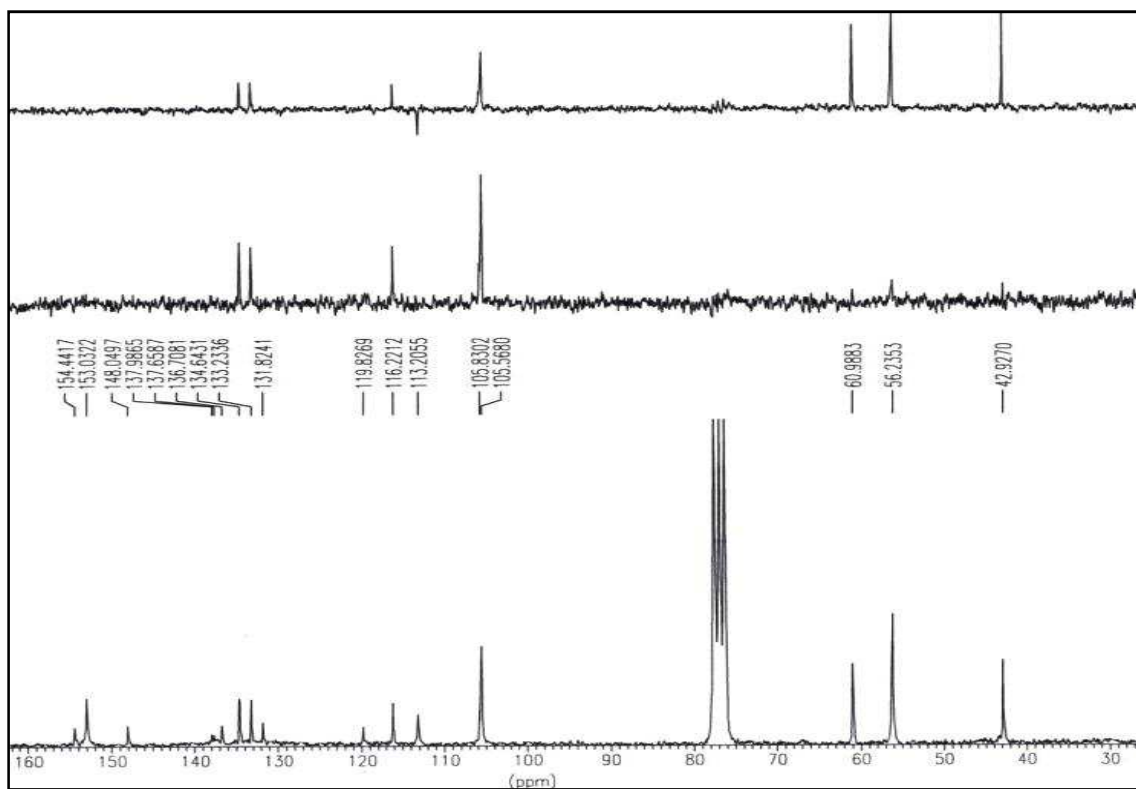
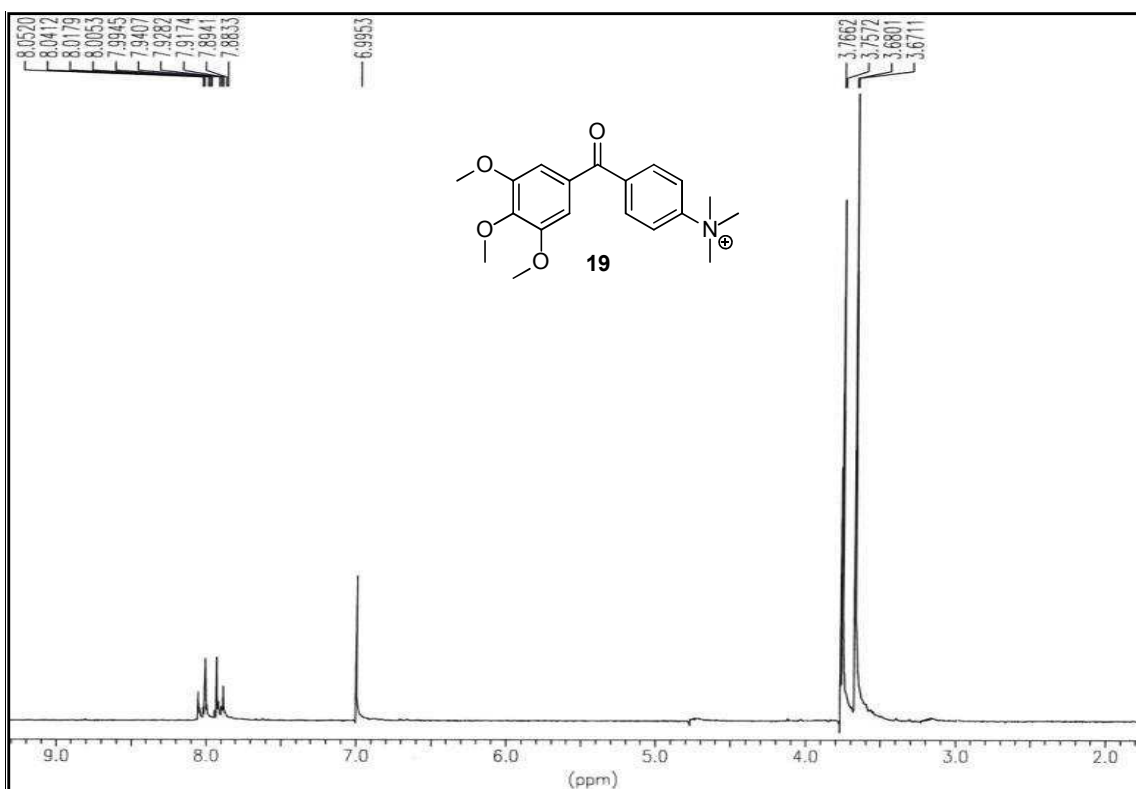
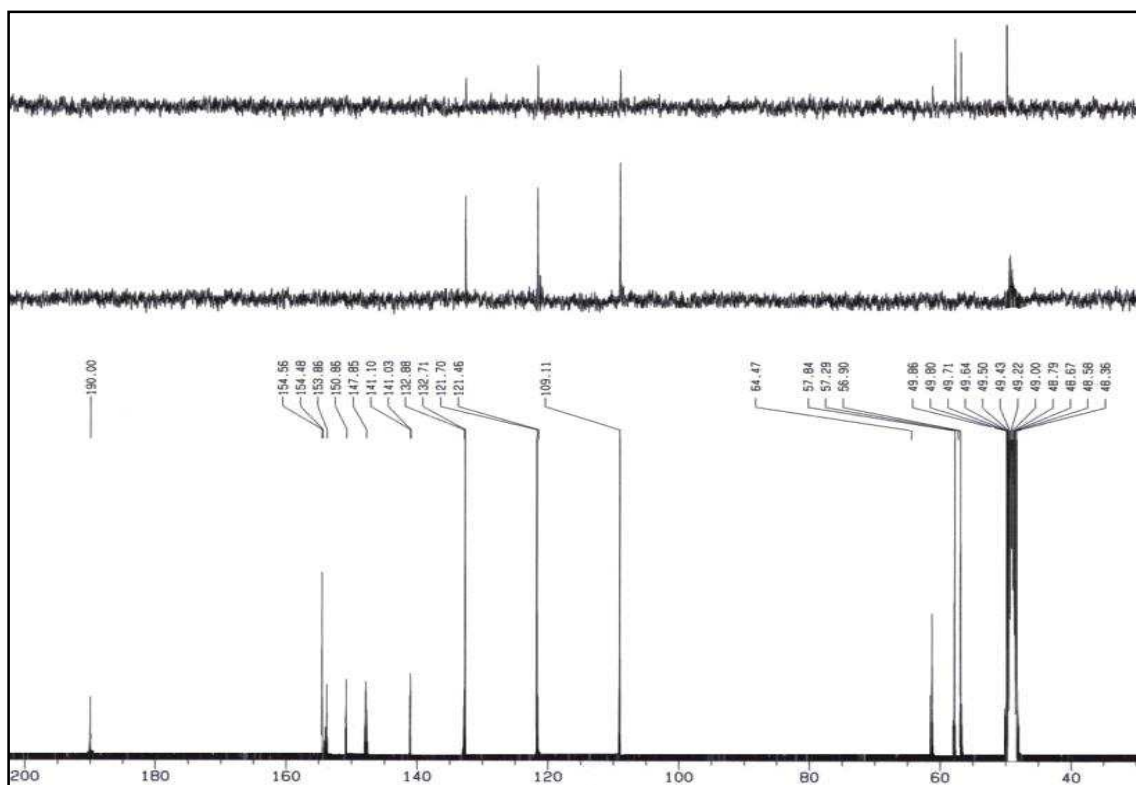


Figura Xb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **18**.

Figura XIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **19**.Figura XIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **19**.

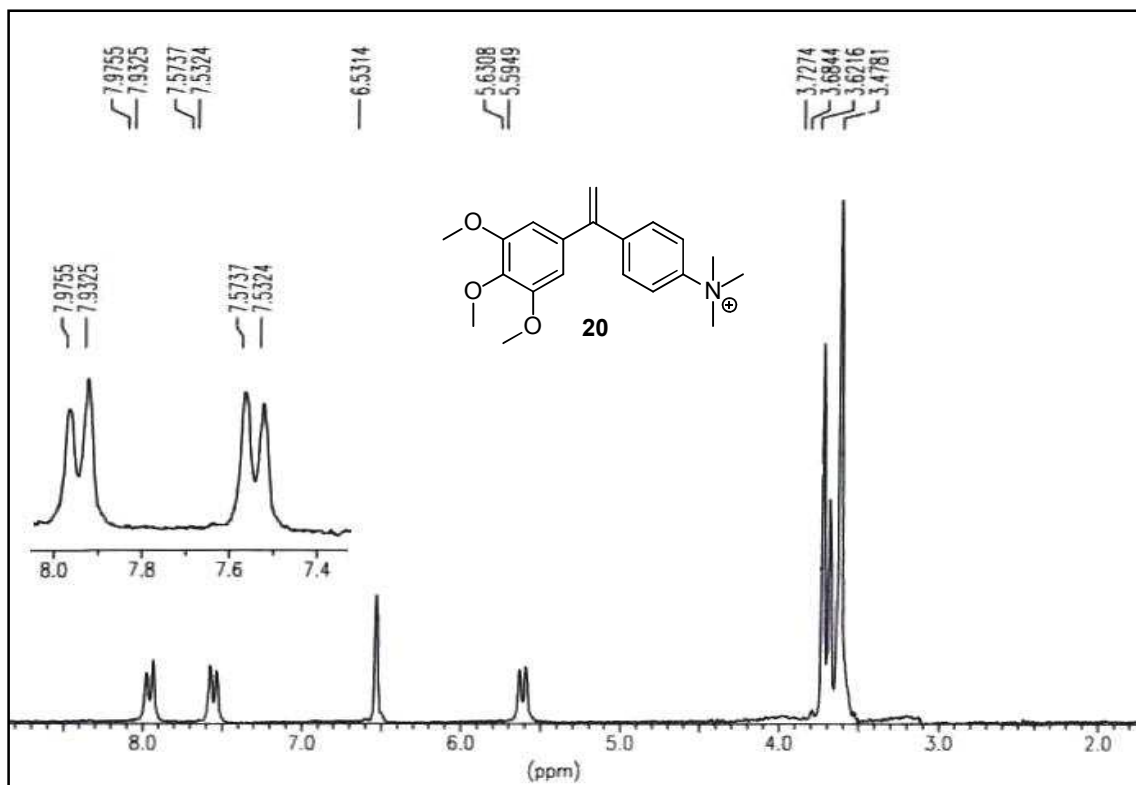


Figura XIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **20**.

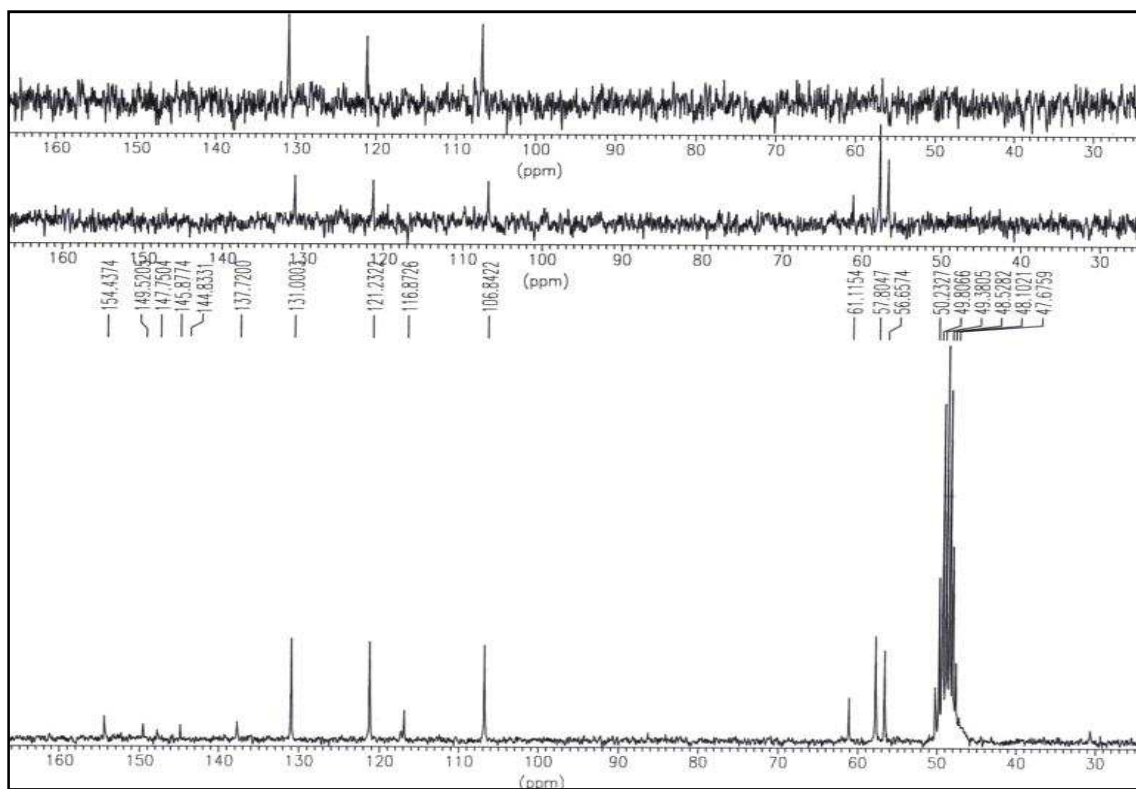
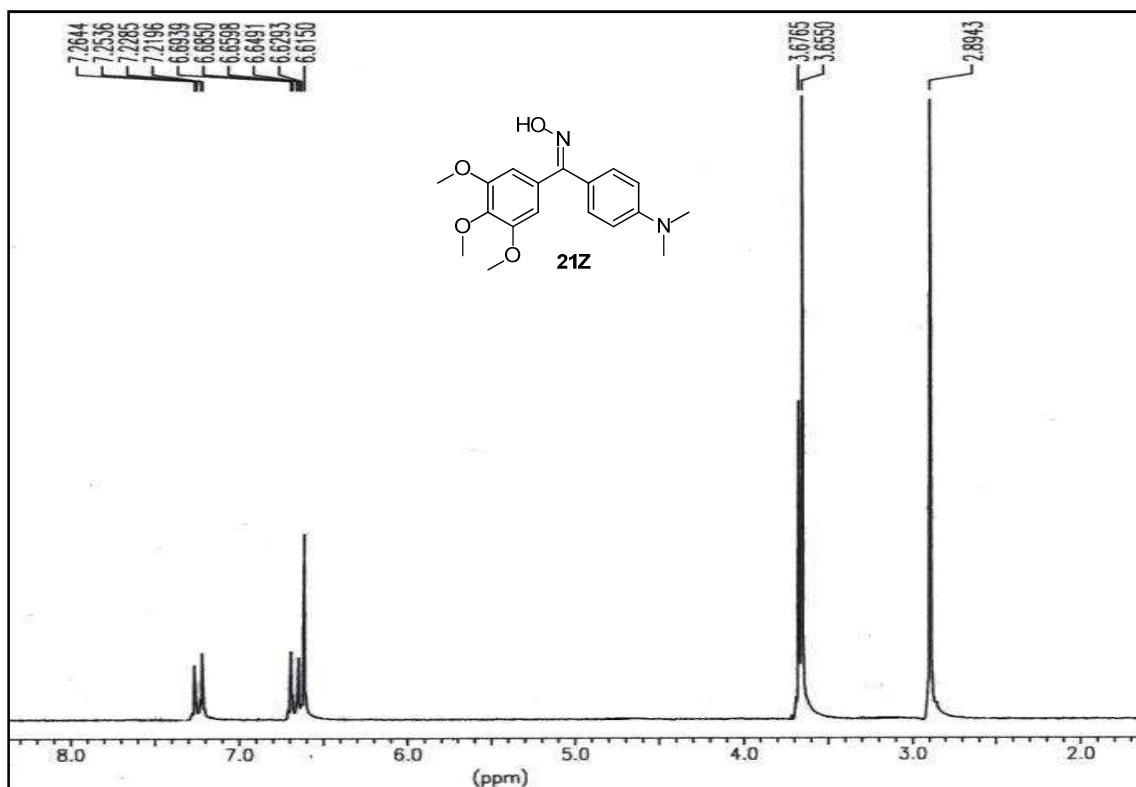
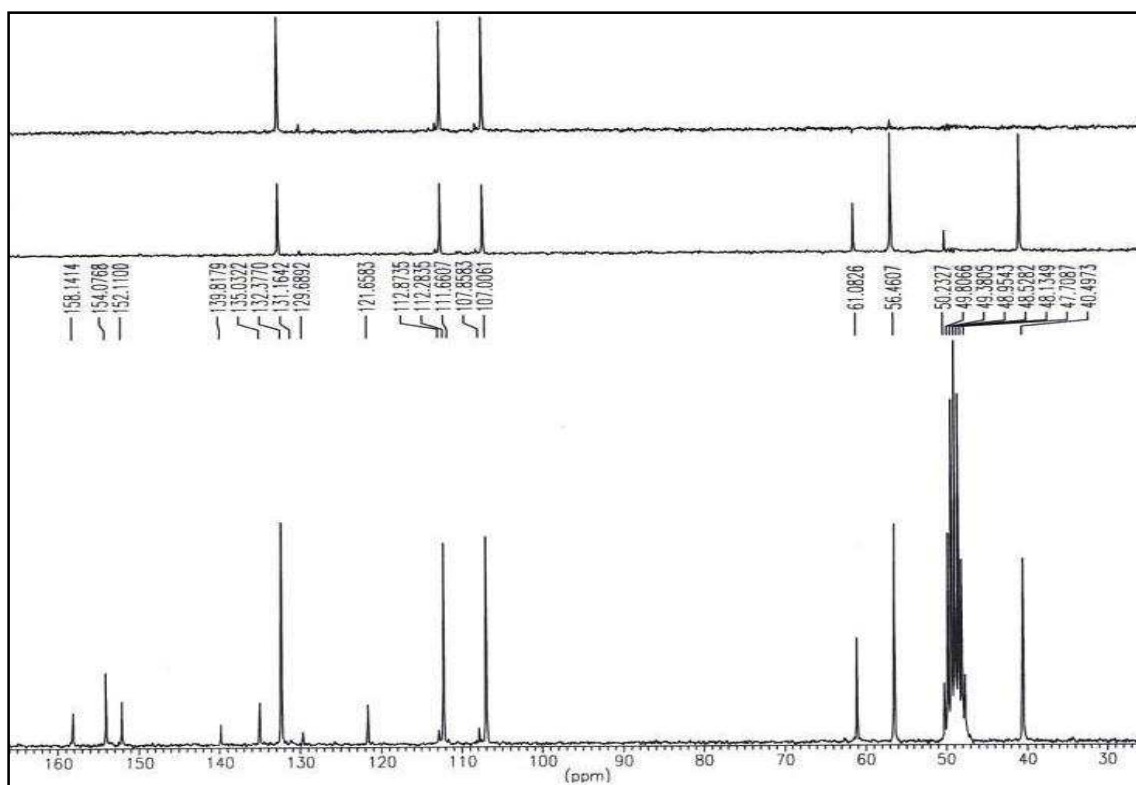


Figura XIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **20**.

Figura XIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **21Z**.Figura XIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **21Z**.

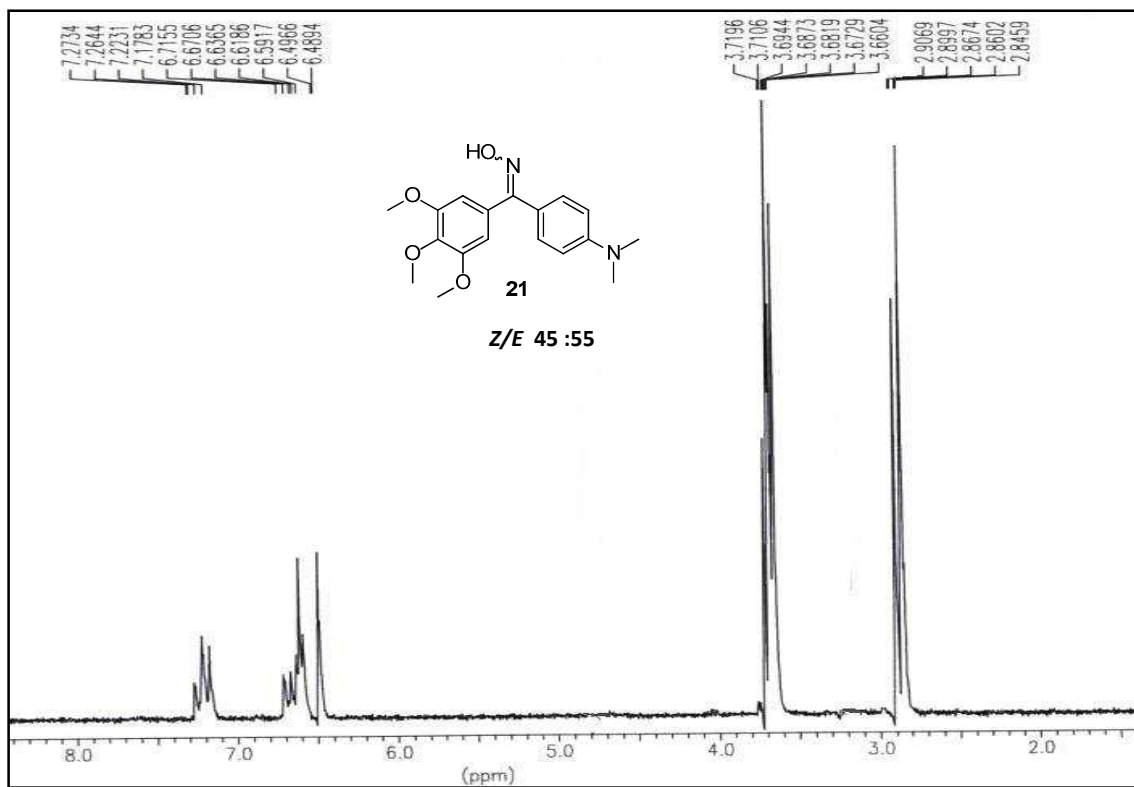


Figura XIIIc: Espectro de RMN ¹H del compuesto **21**(Z/E).

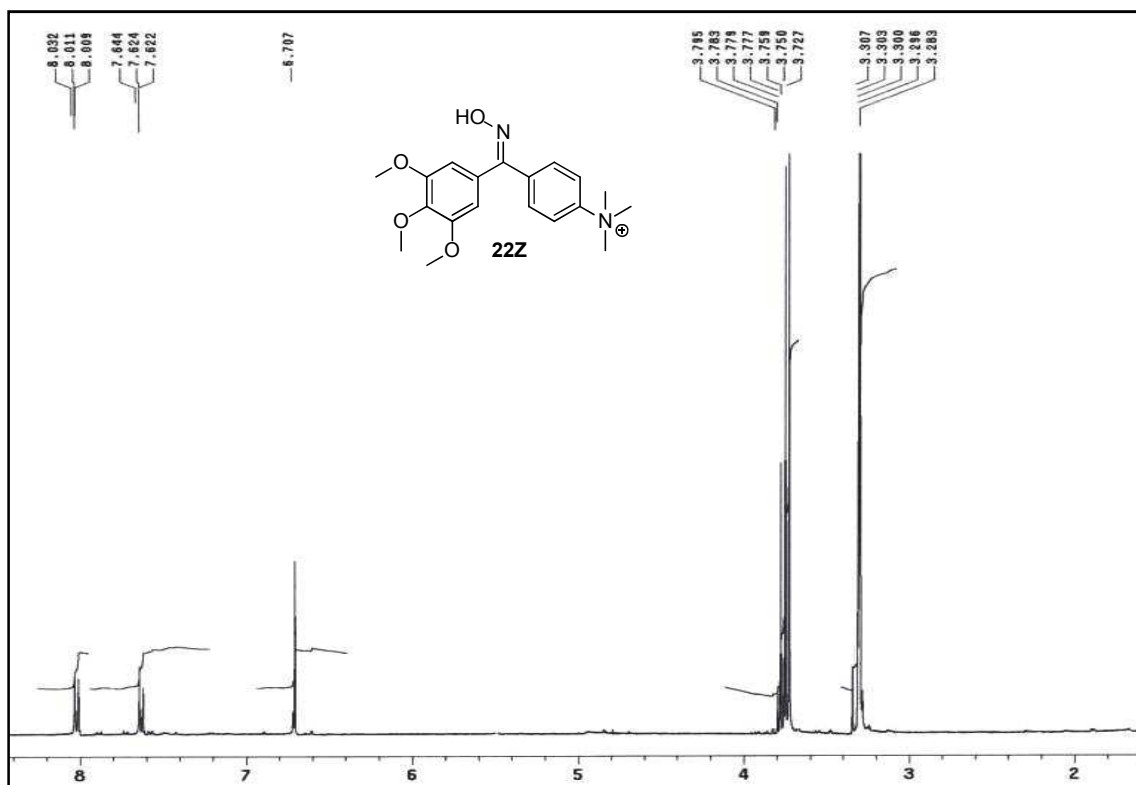


Figura XIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **22Z**.

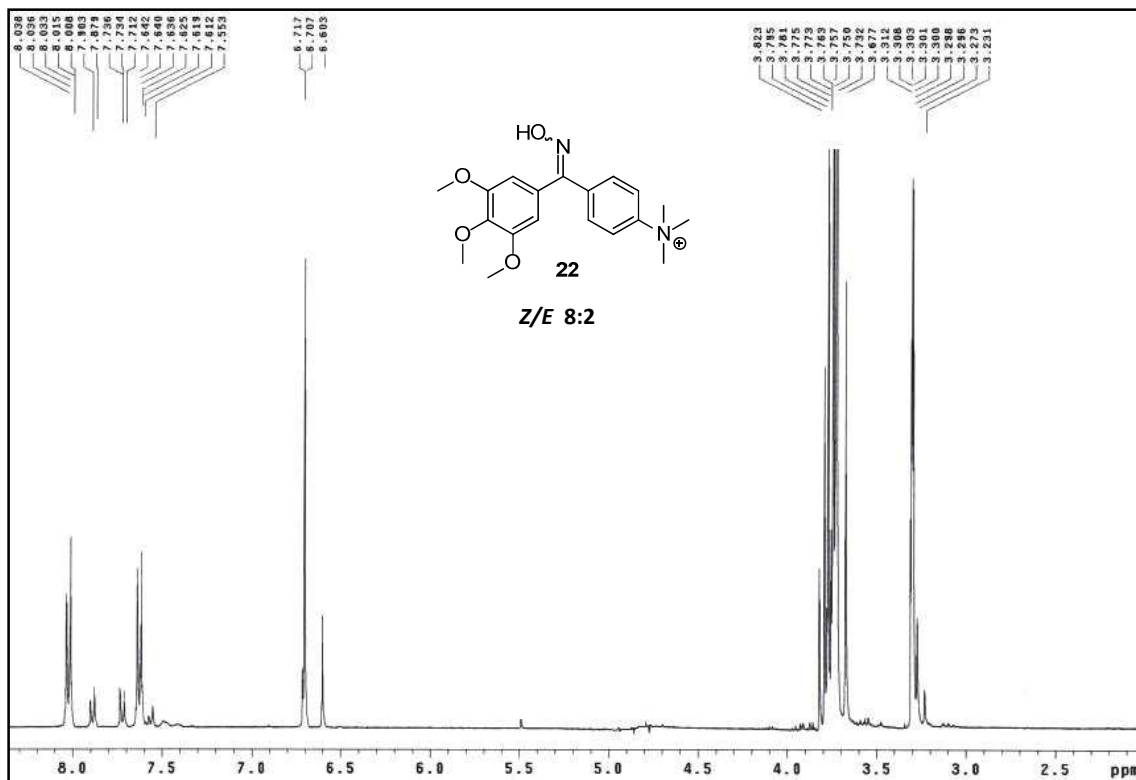


Figura XIVb: Espectro de RMN ^1H del compuesto (**22Z/E**).

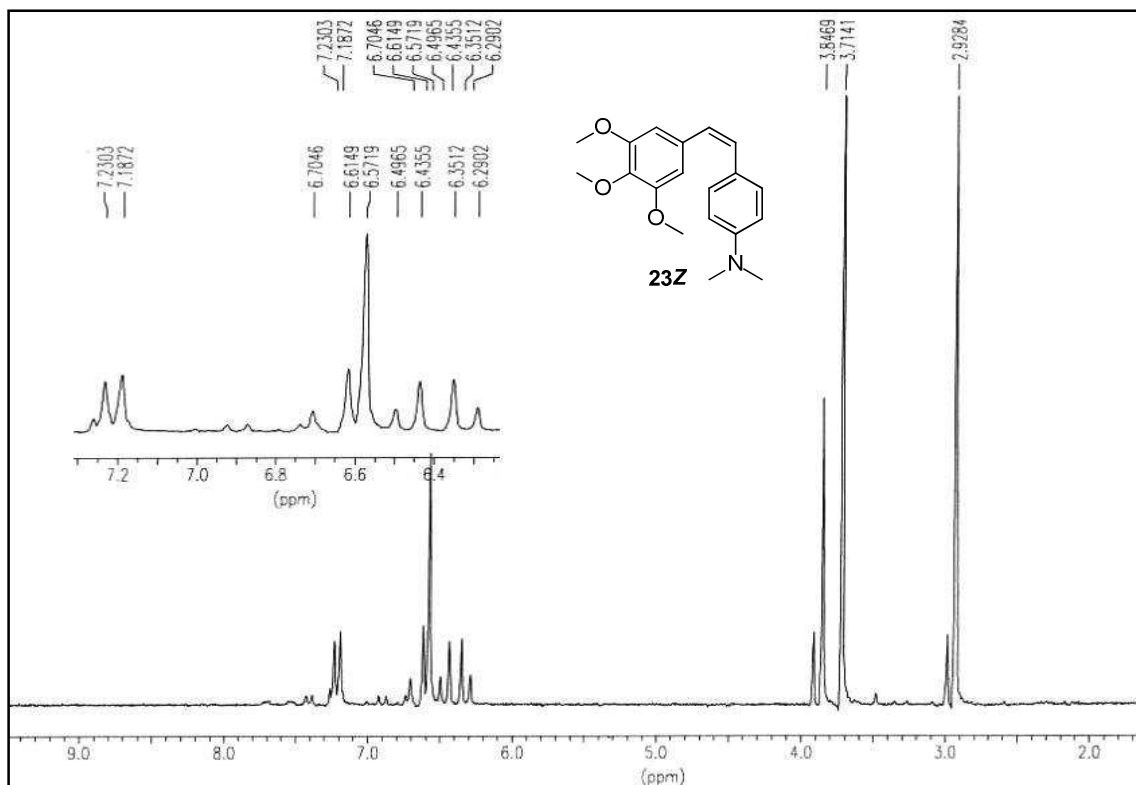


Figura XVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **23Z**.

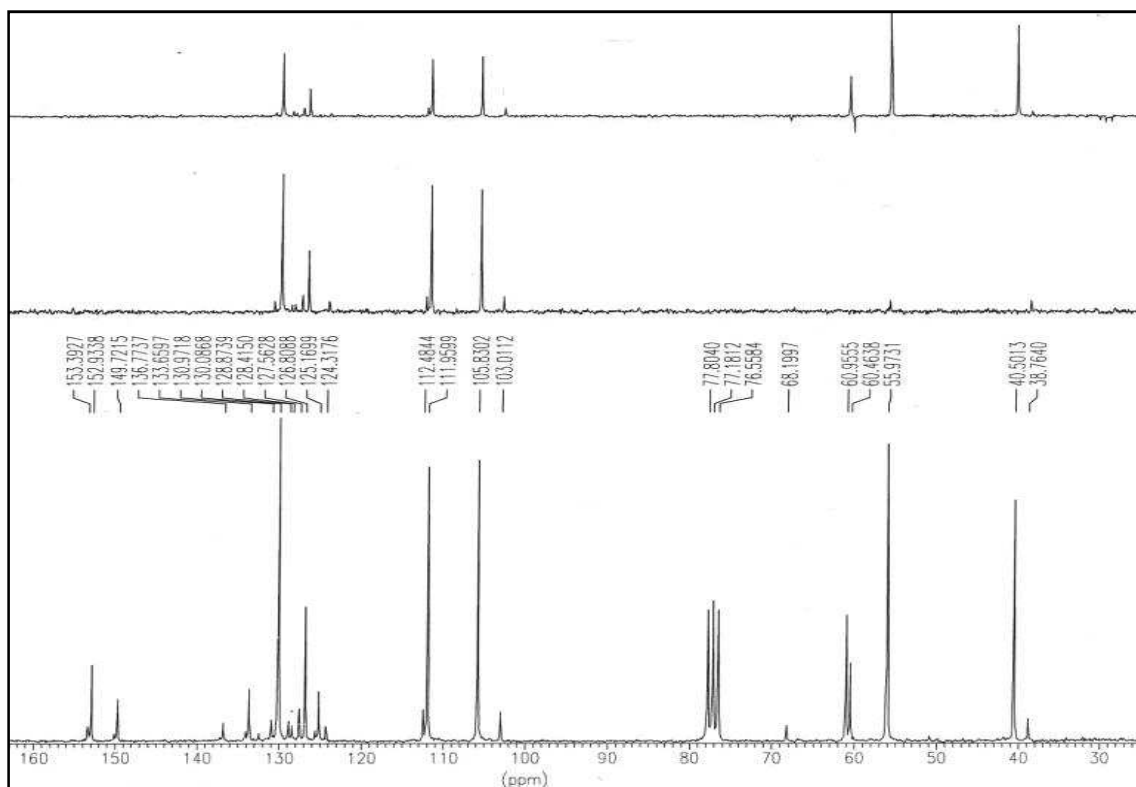
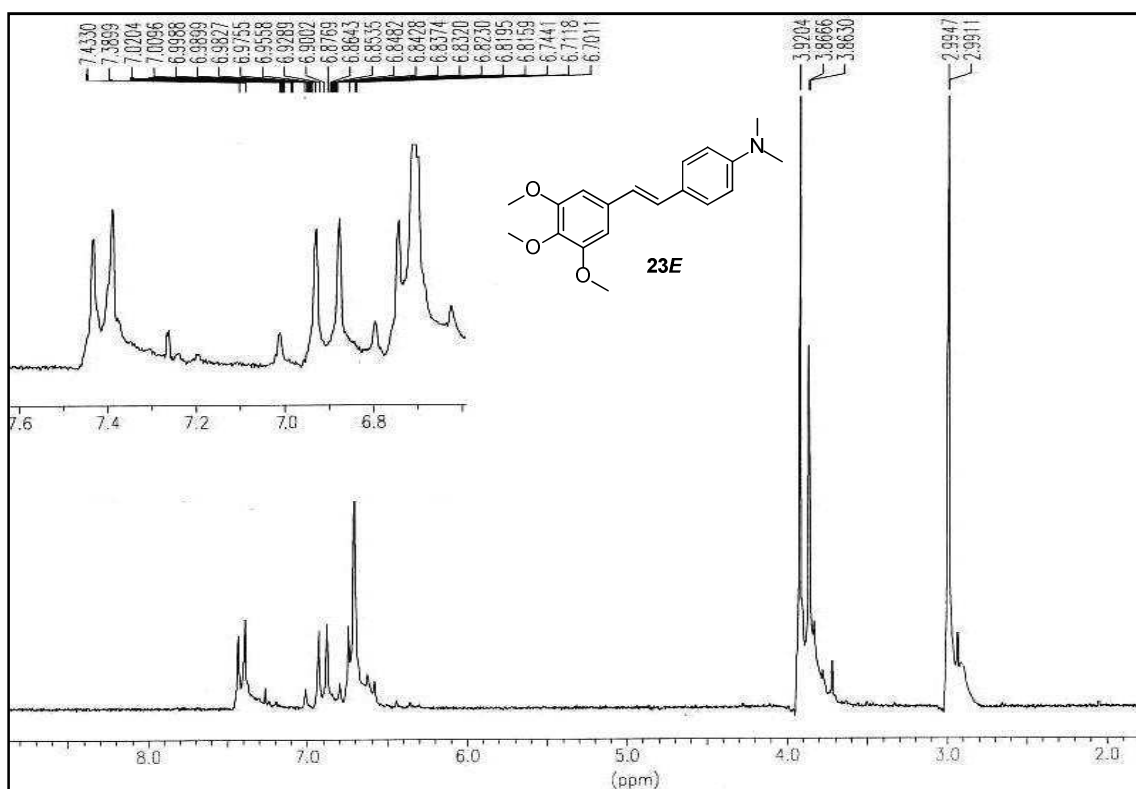
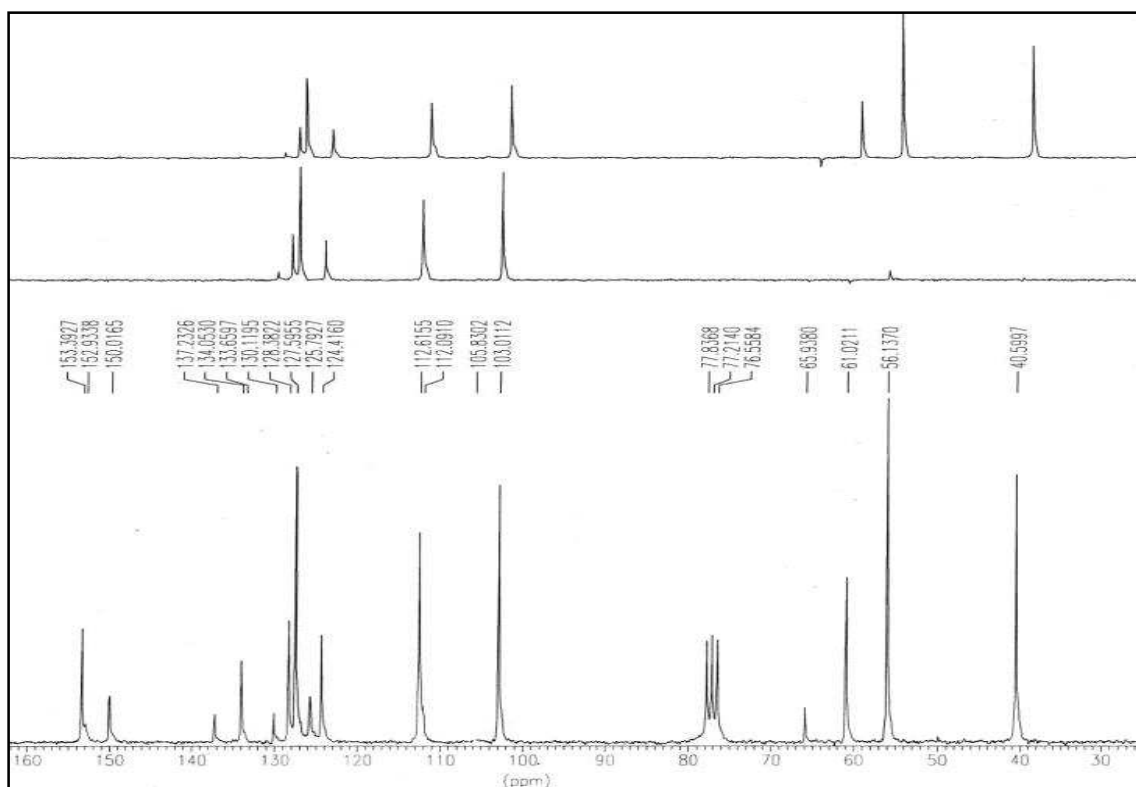


Figura XVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **23Z**.

Figura XVIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **23E**.Figura XVIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **23E**.

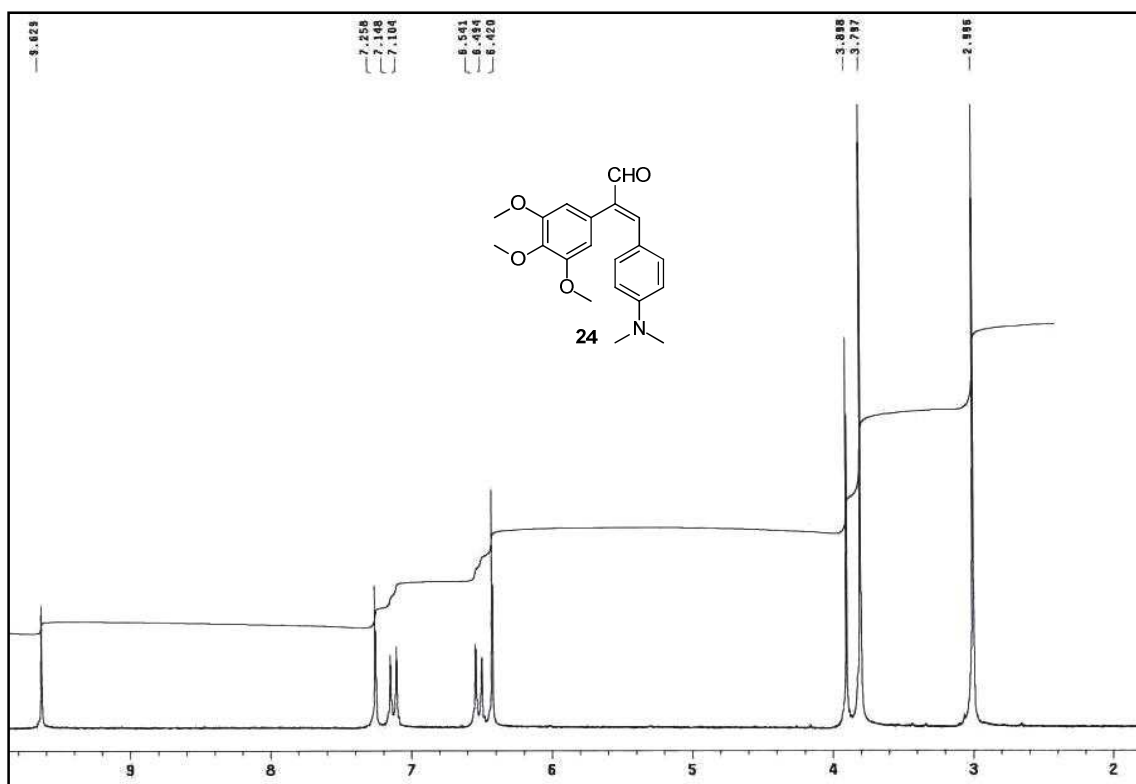


Figura XVIIa: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **24**.

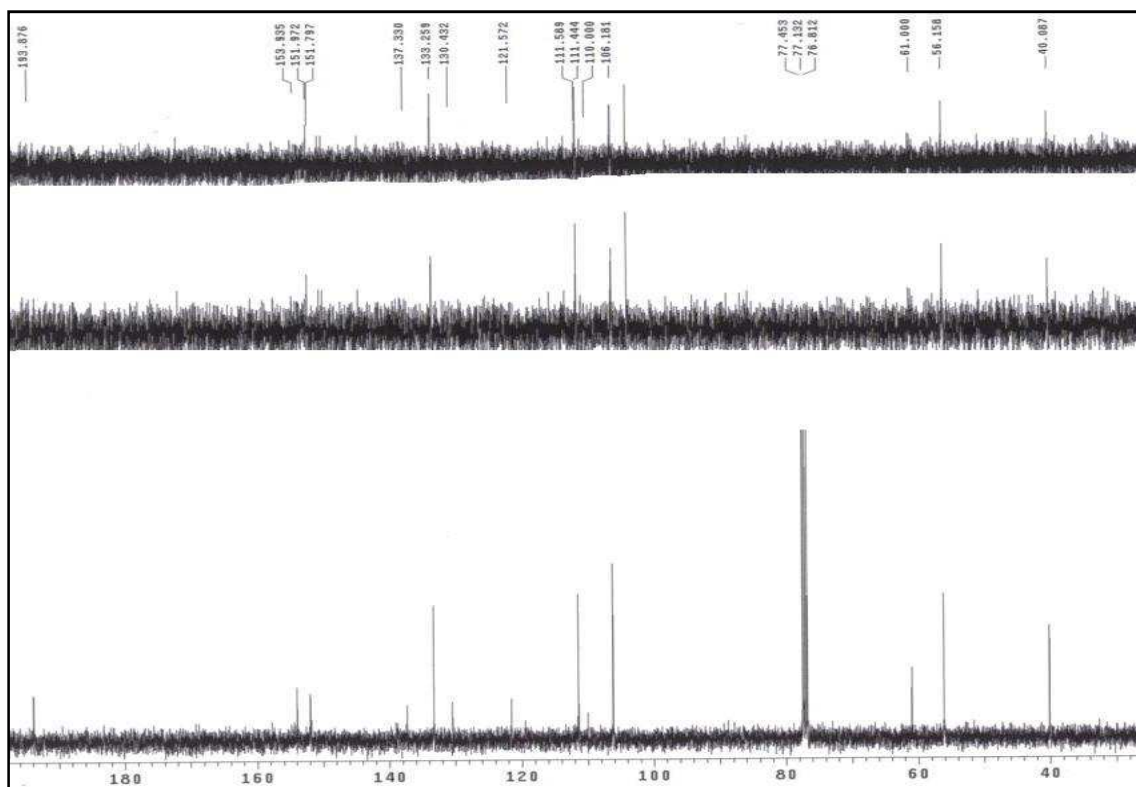
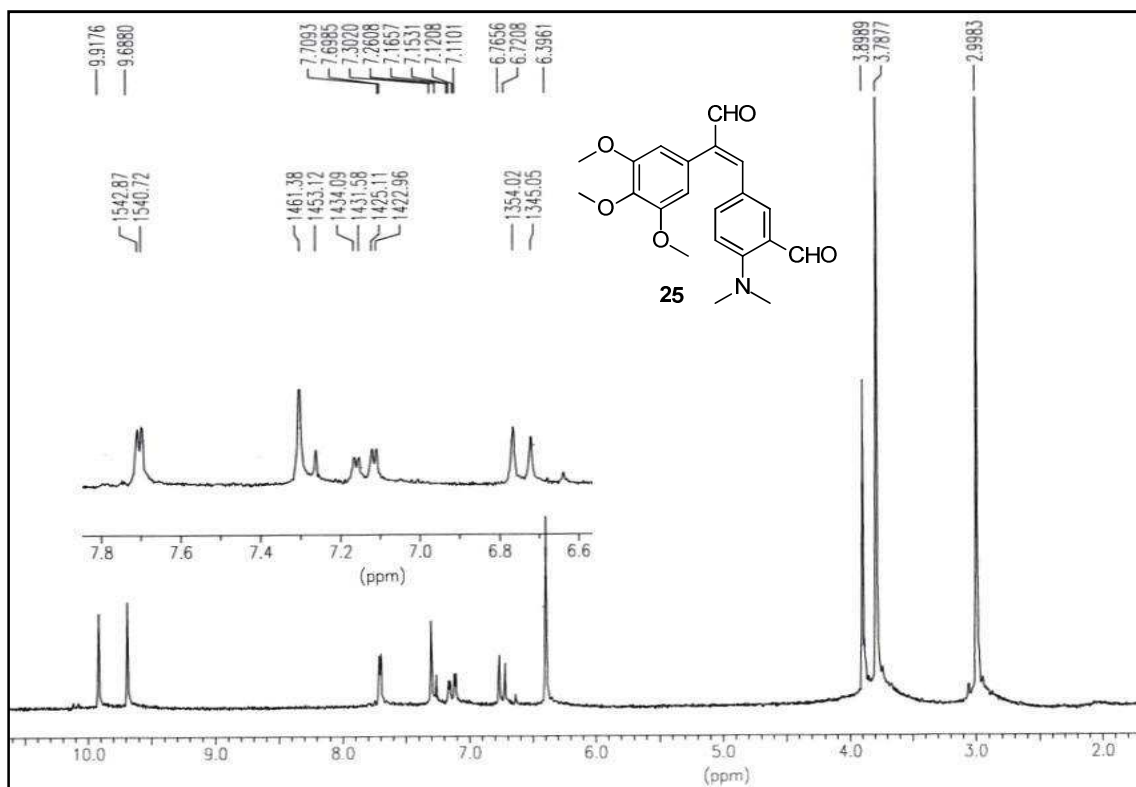
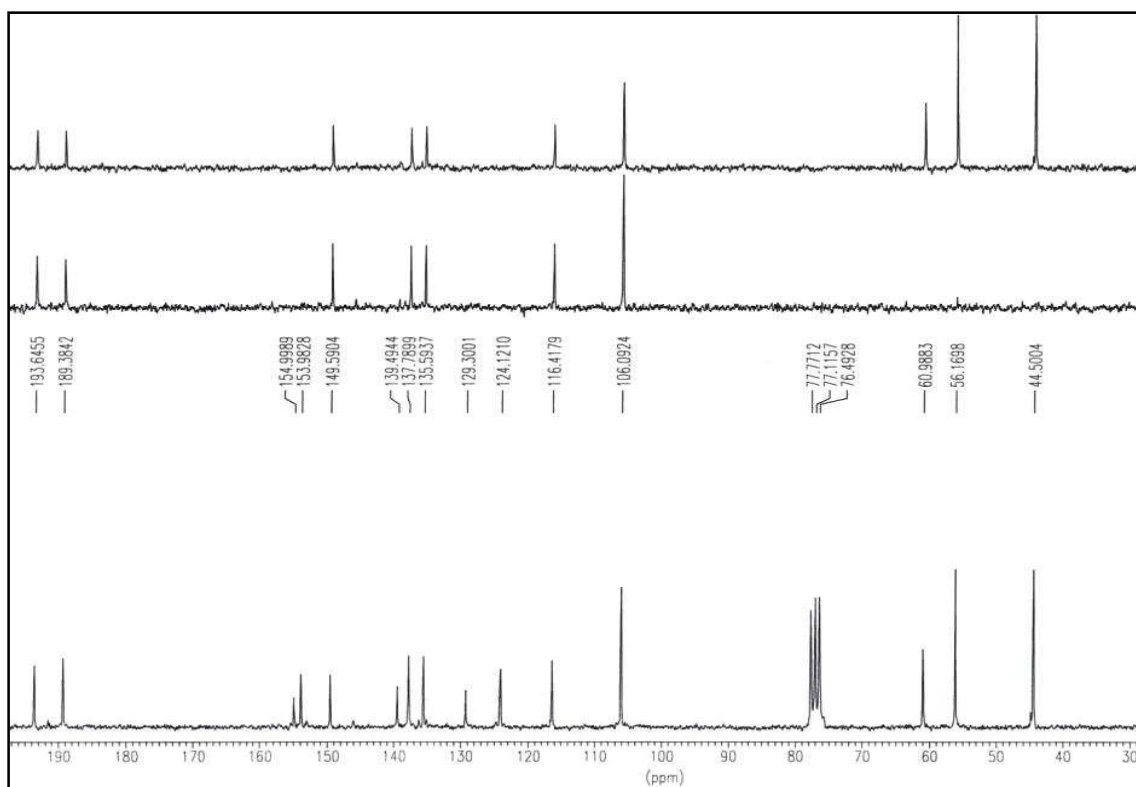


Figura XVIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **24**.

Figura XVIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **25**.Figura XVIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **25**

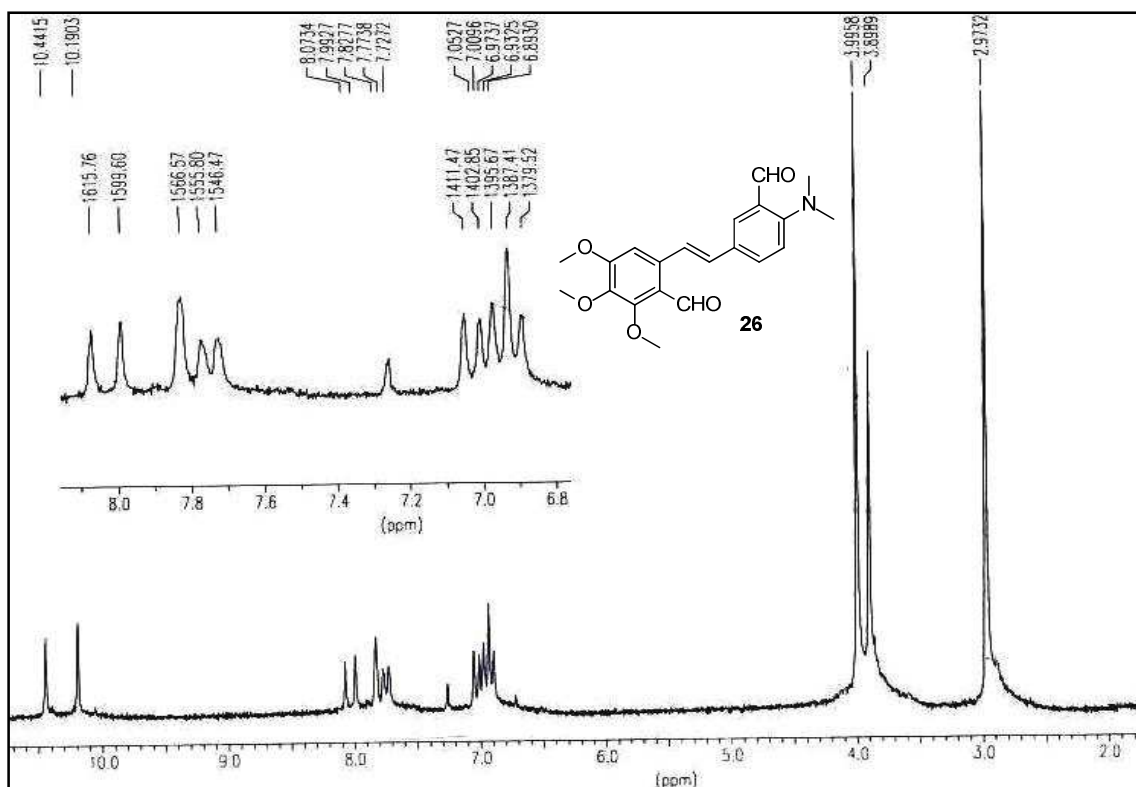


Figura XIXa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **26**.

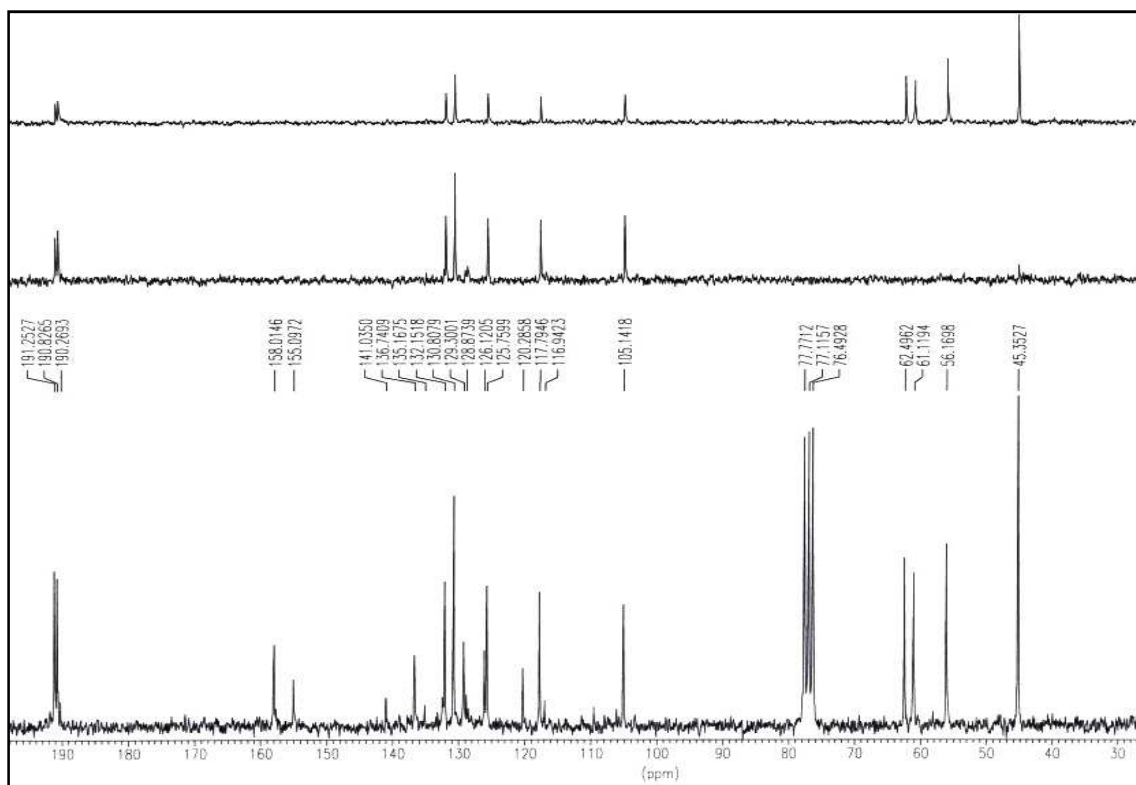
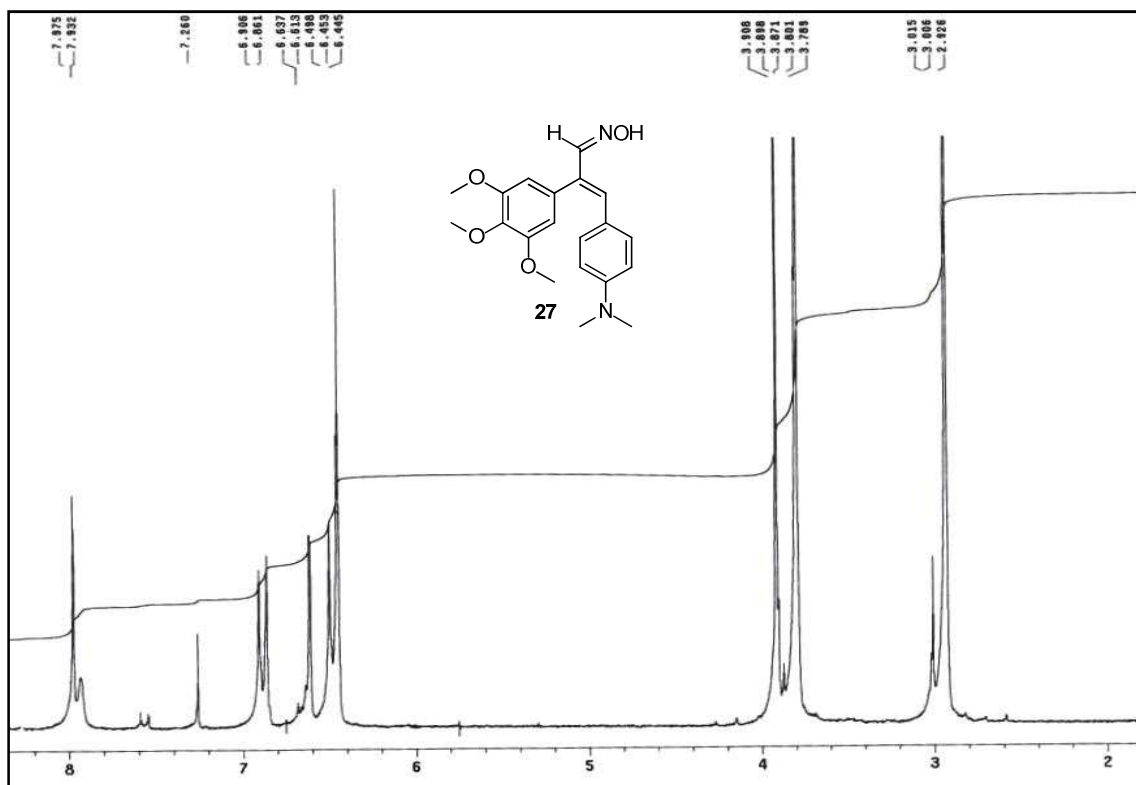


Figura XIXb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **26**.

Figura XX: Espectro de RMN ^1H del compuesto **27**.

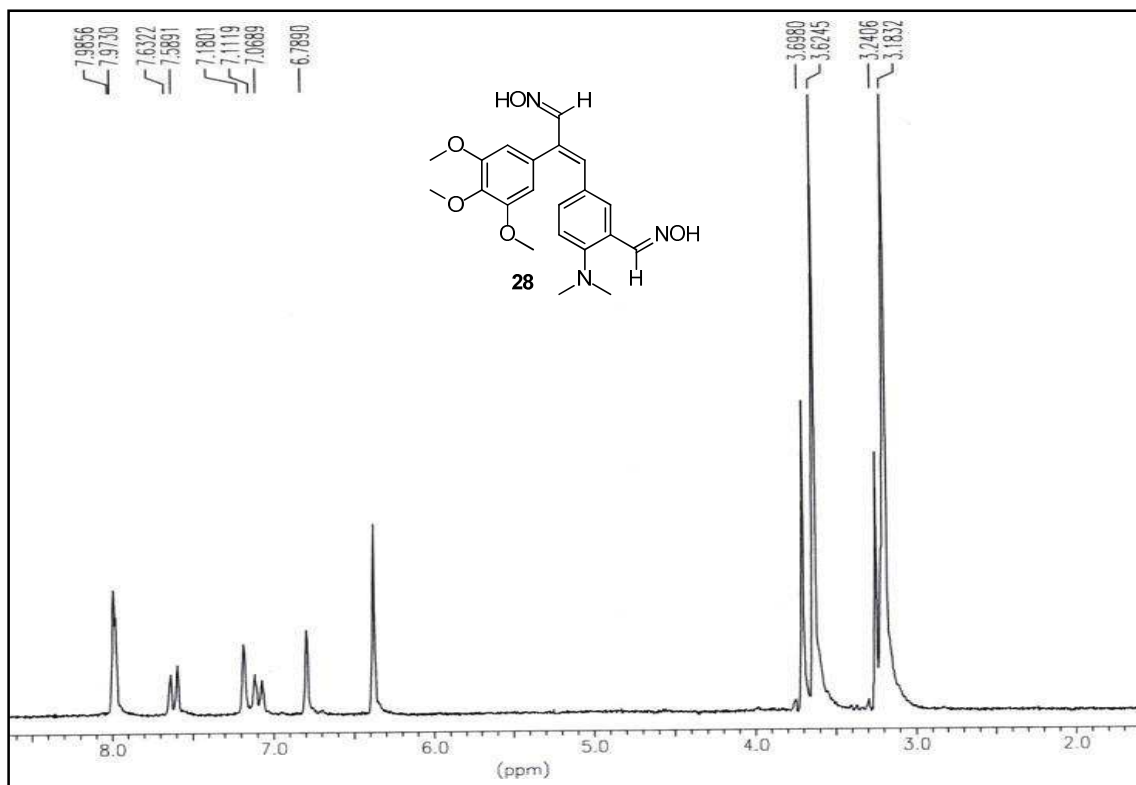


Figura XXIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **28**.

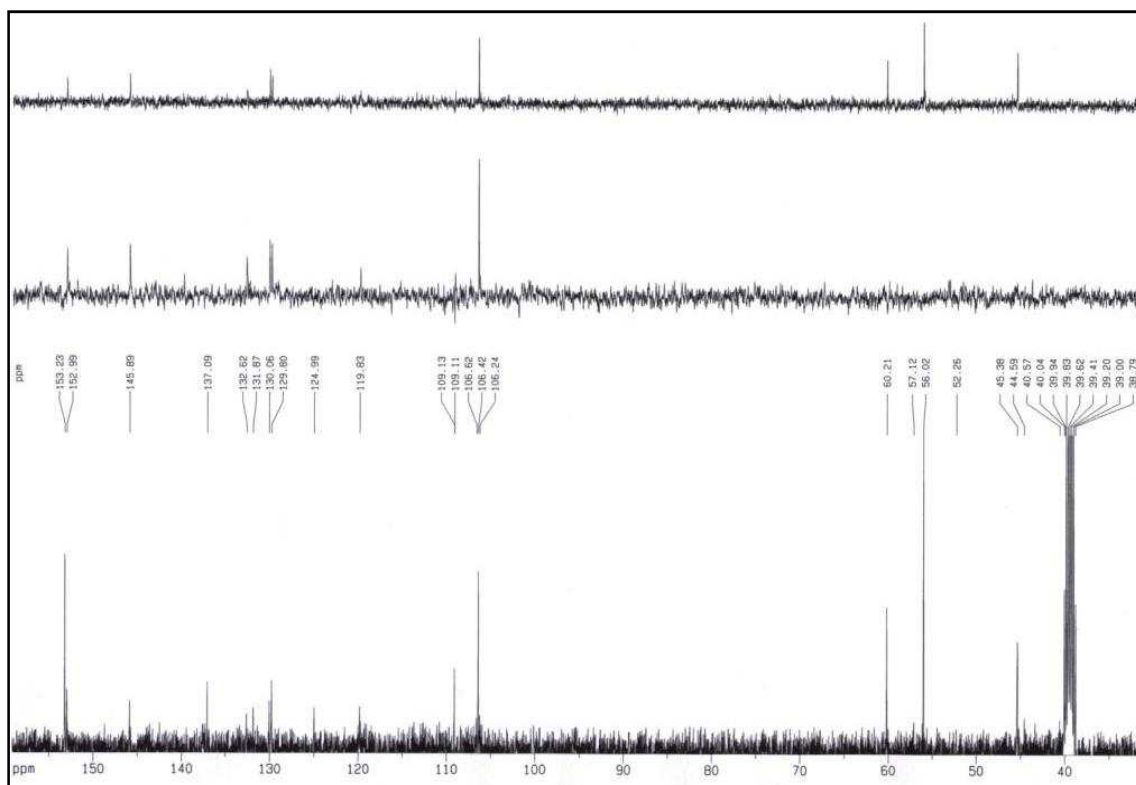
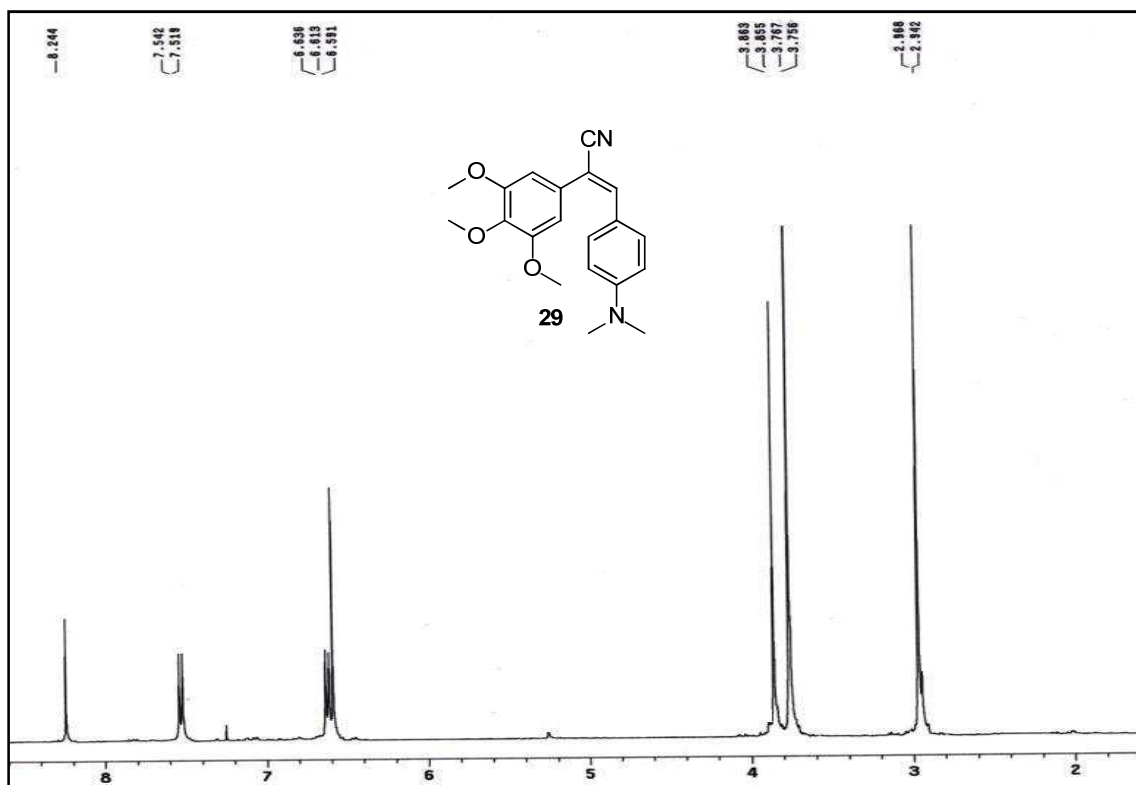
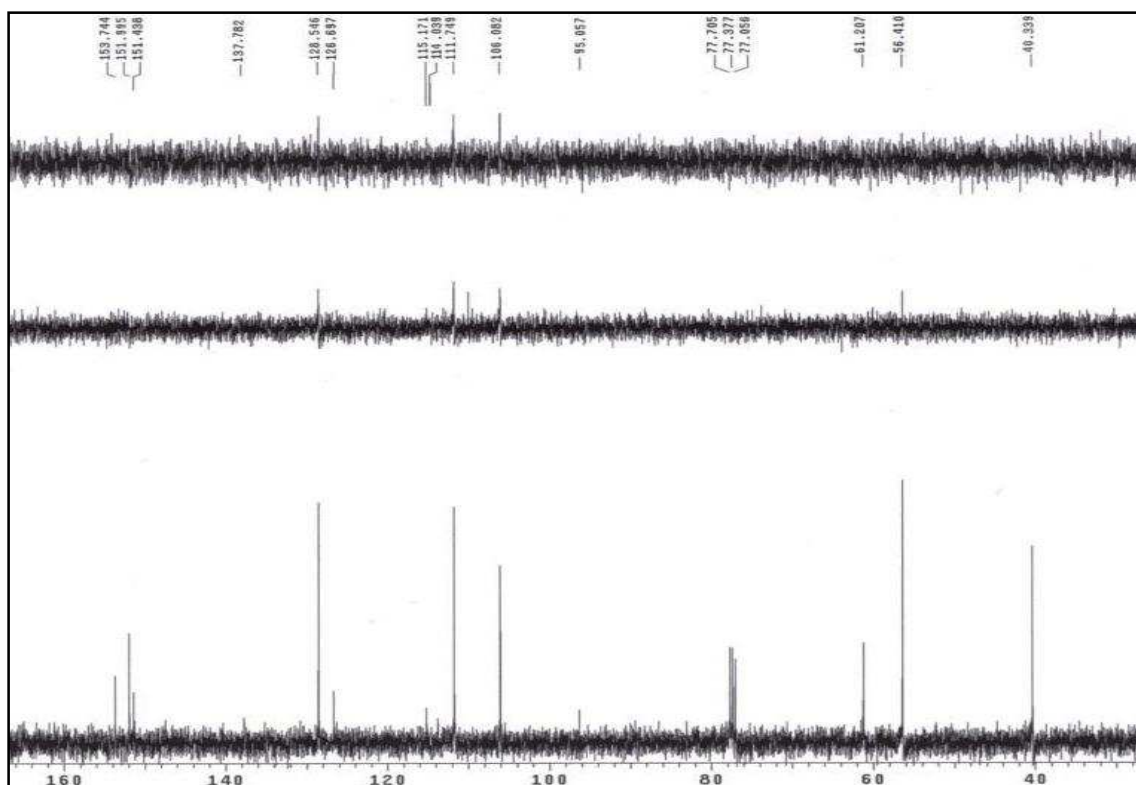


Figura XXIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **28**.

Figura XXIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto 29.Figura XXIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 29.

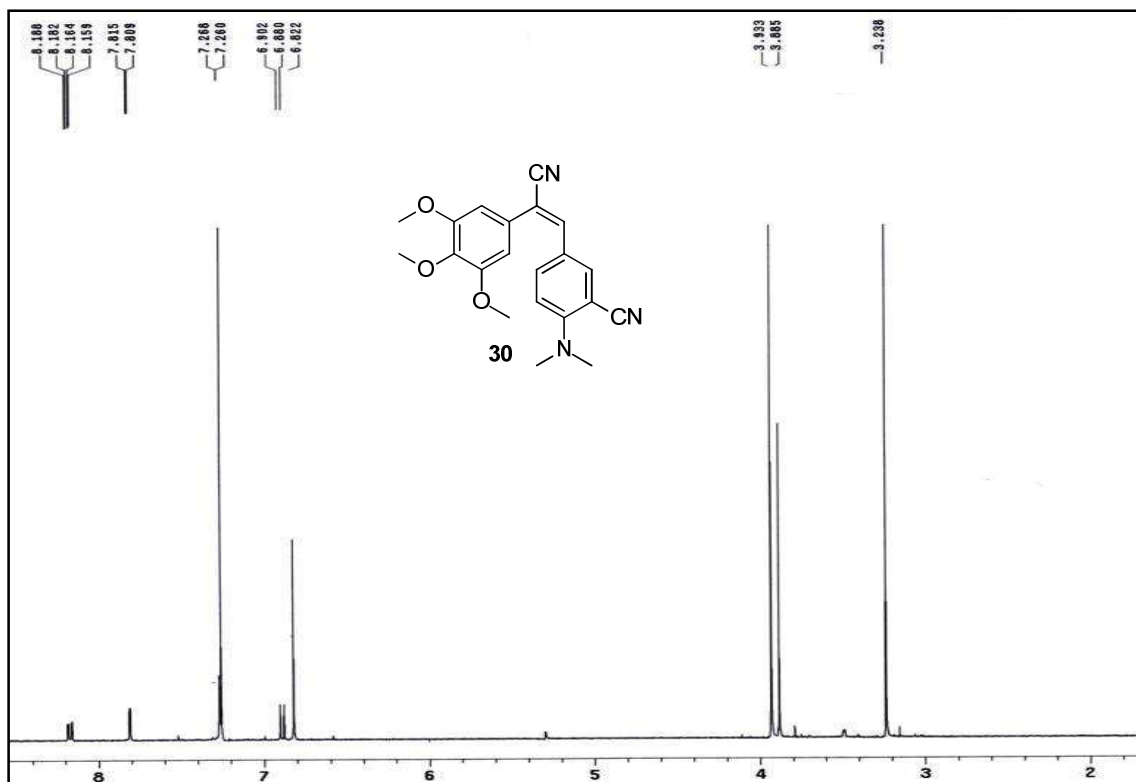


Figura XXIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **30**.

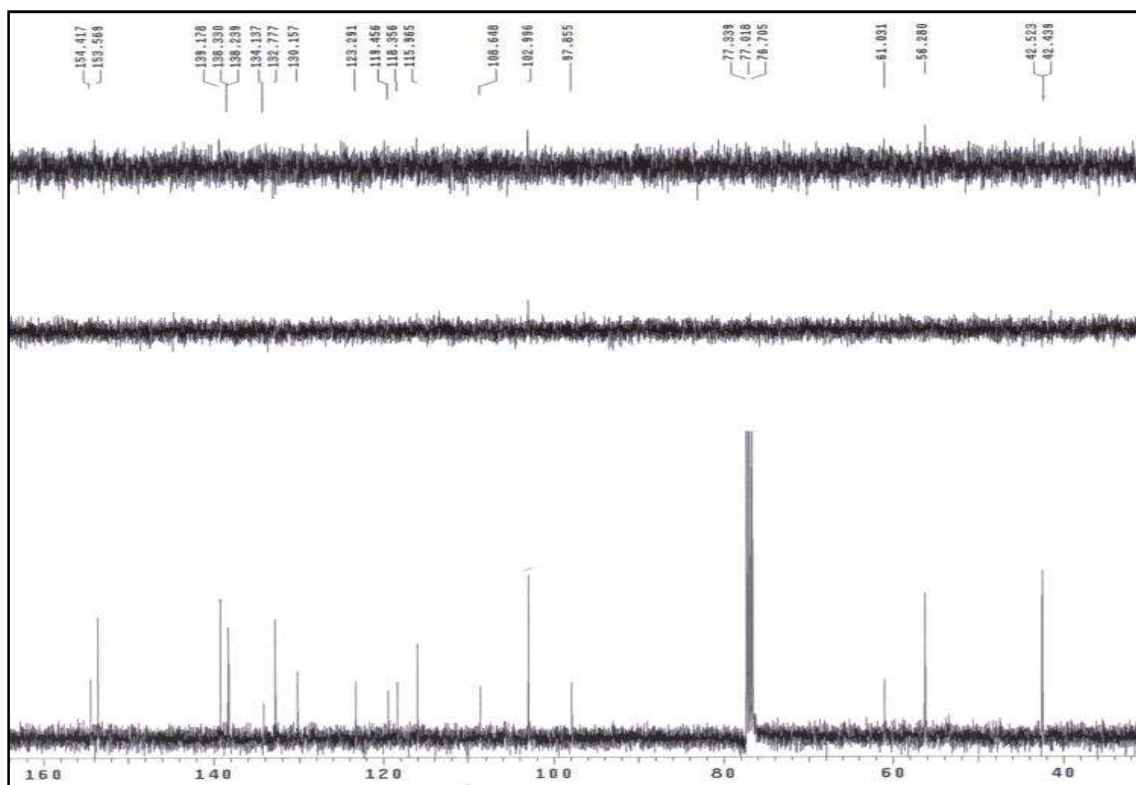
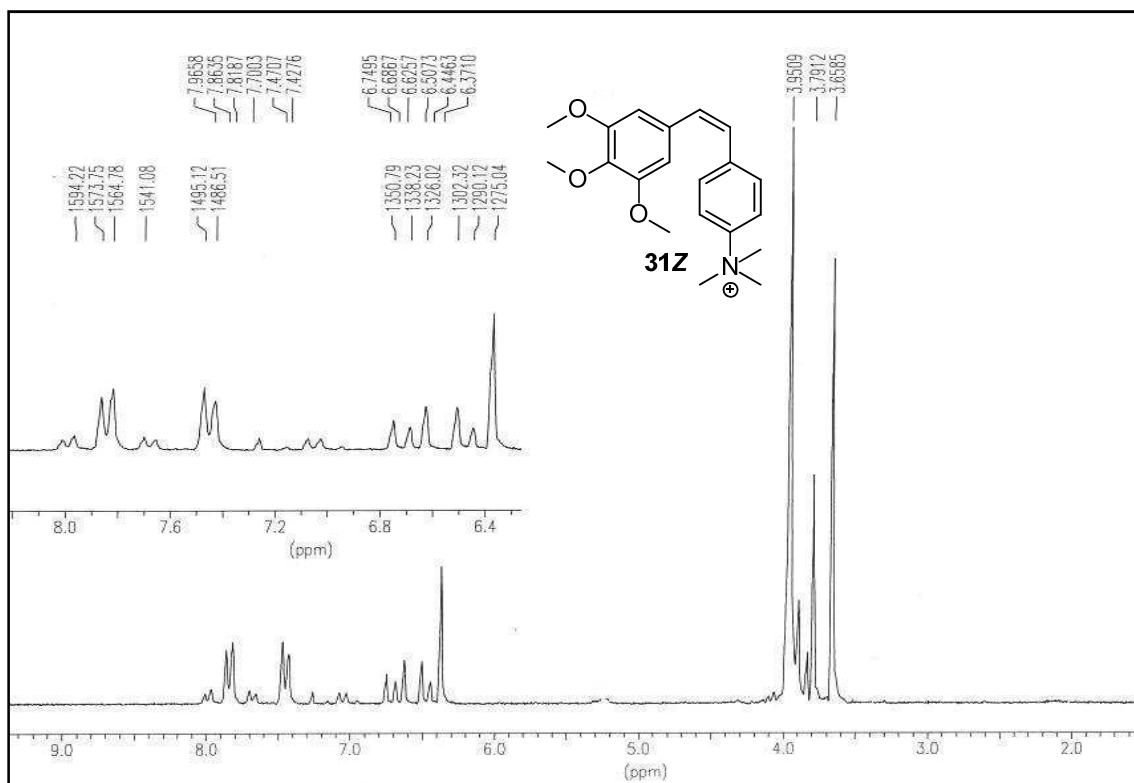
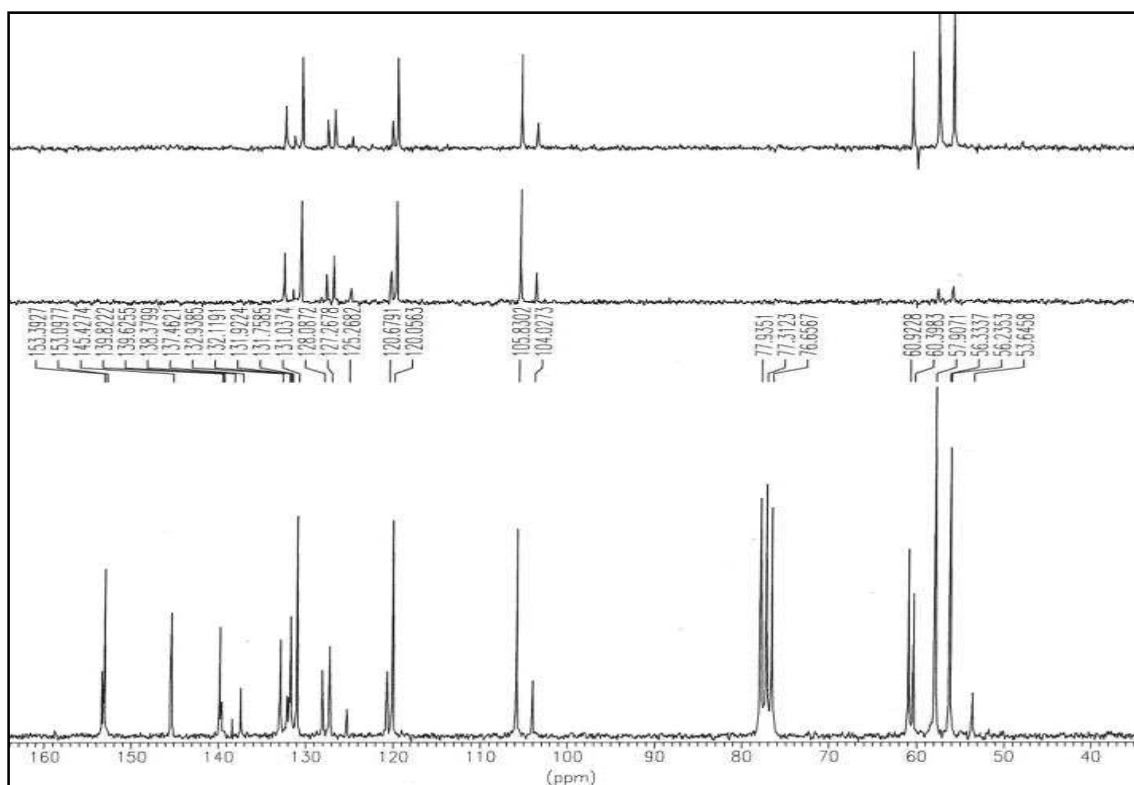


Figura XXIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **30**.

Figura XXIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **31Z**.Figura XXIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **31Z**.

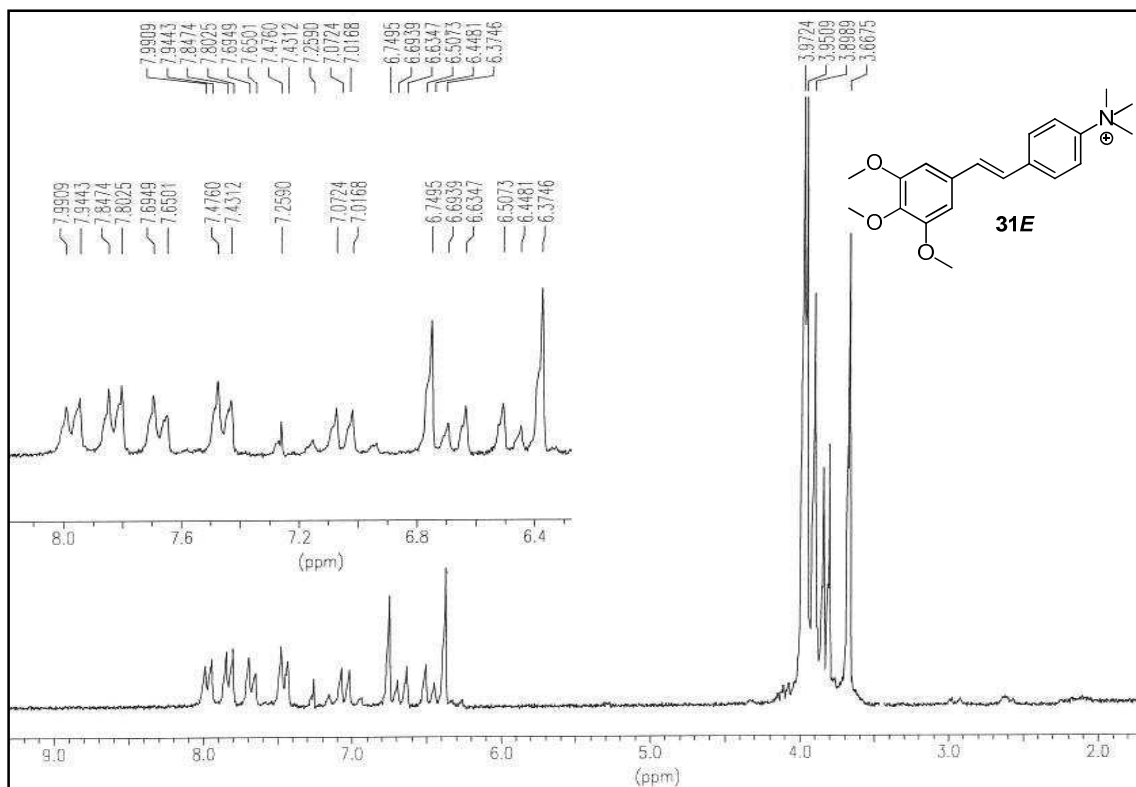
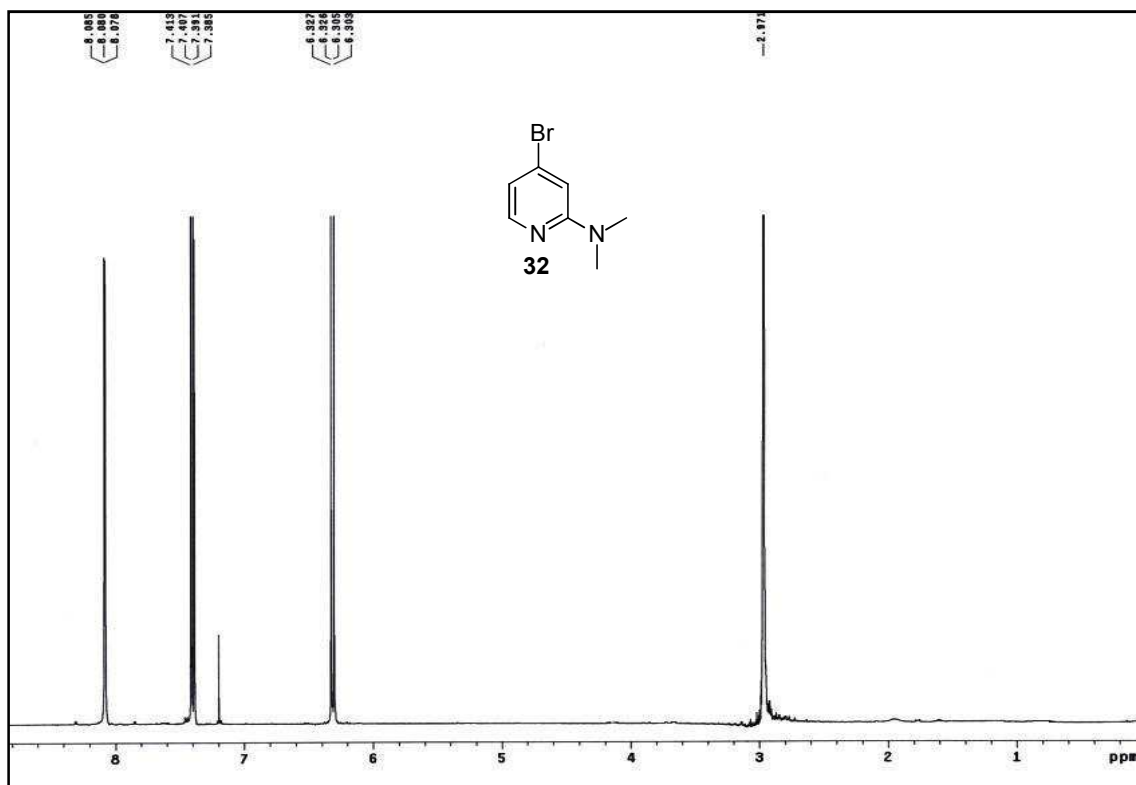
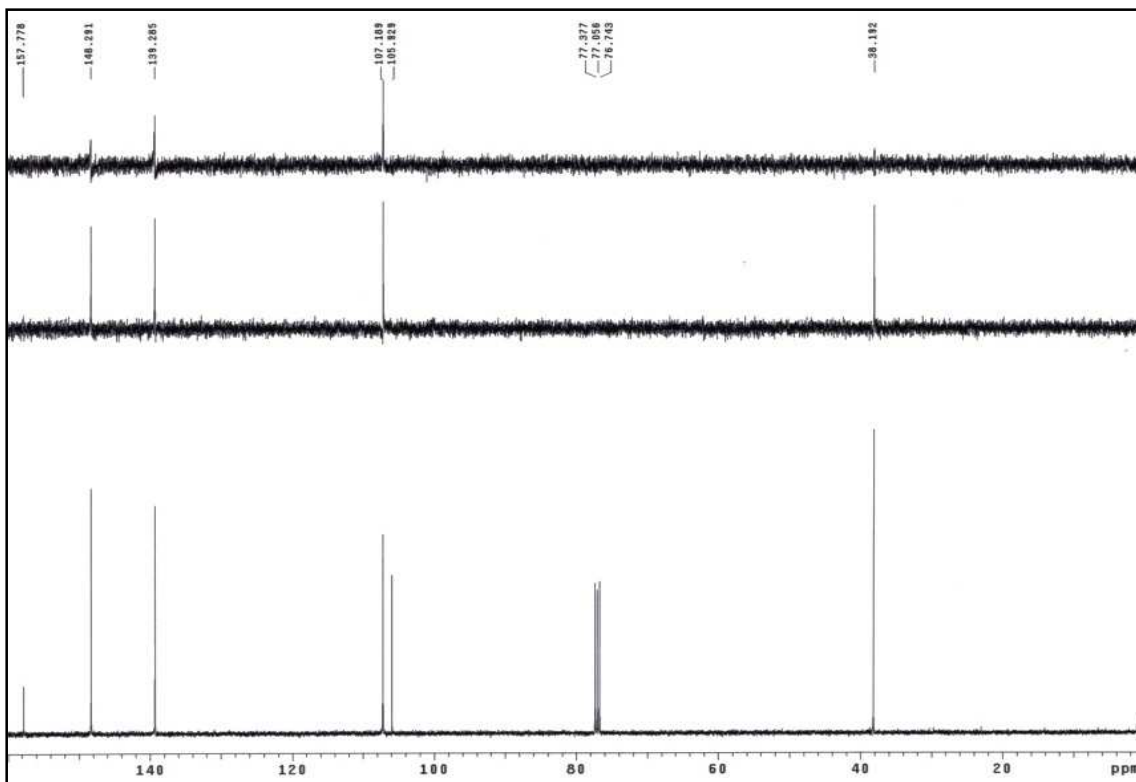


Figura XXIVc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **31E**.

Figura XXVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **32**.Figura XXVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **32**.

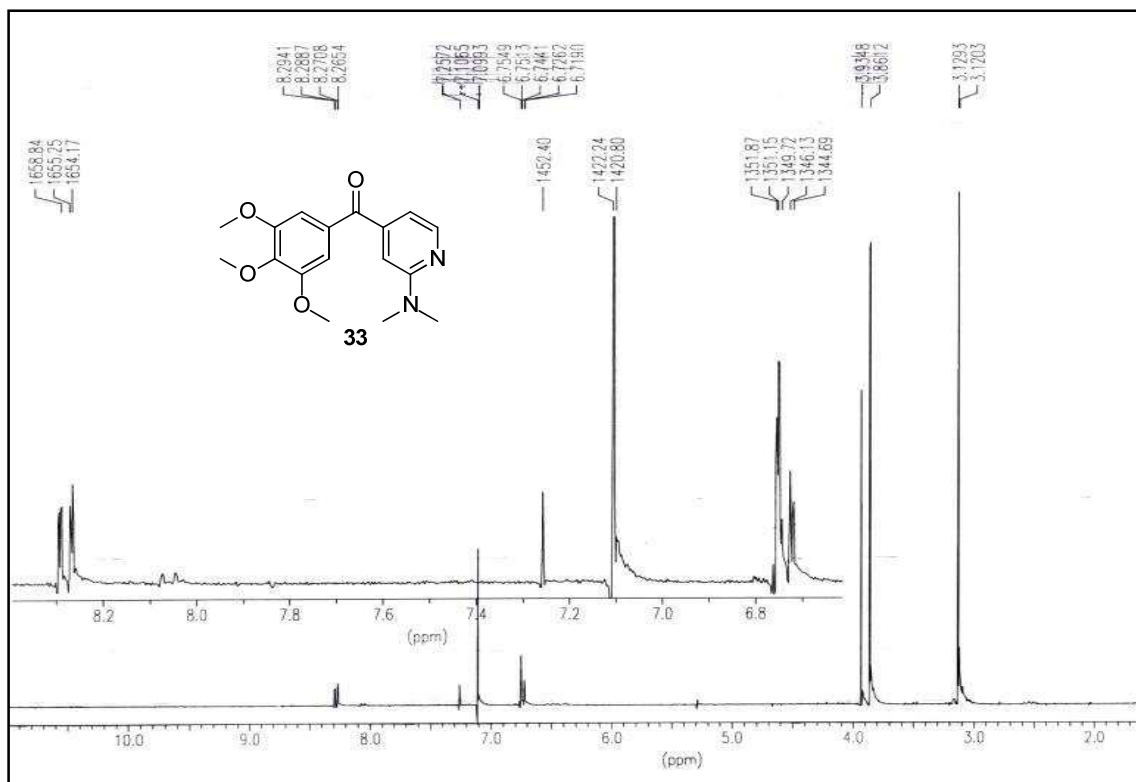


Figura XXVIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **33**.

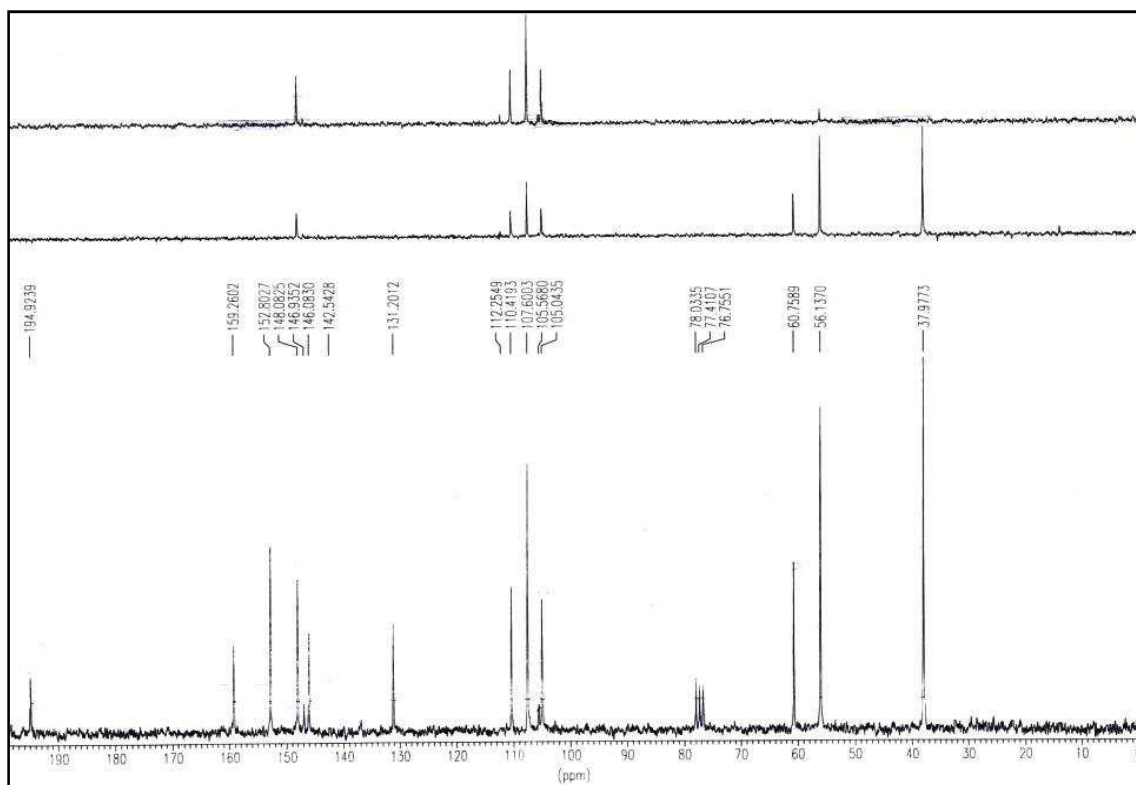


Figura XXVIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **33**.

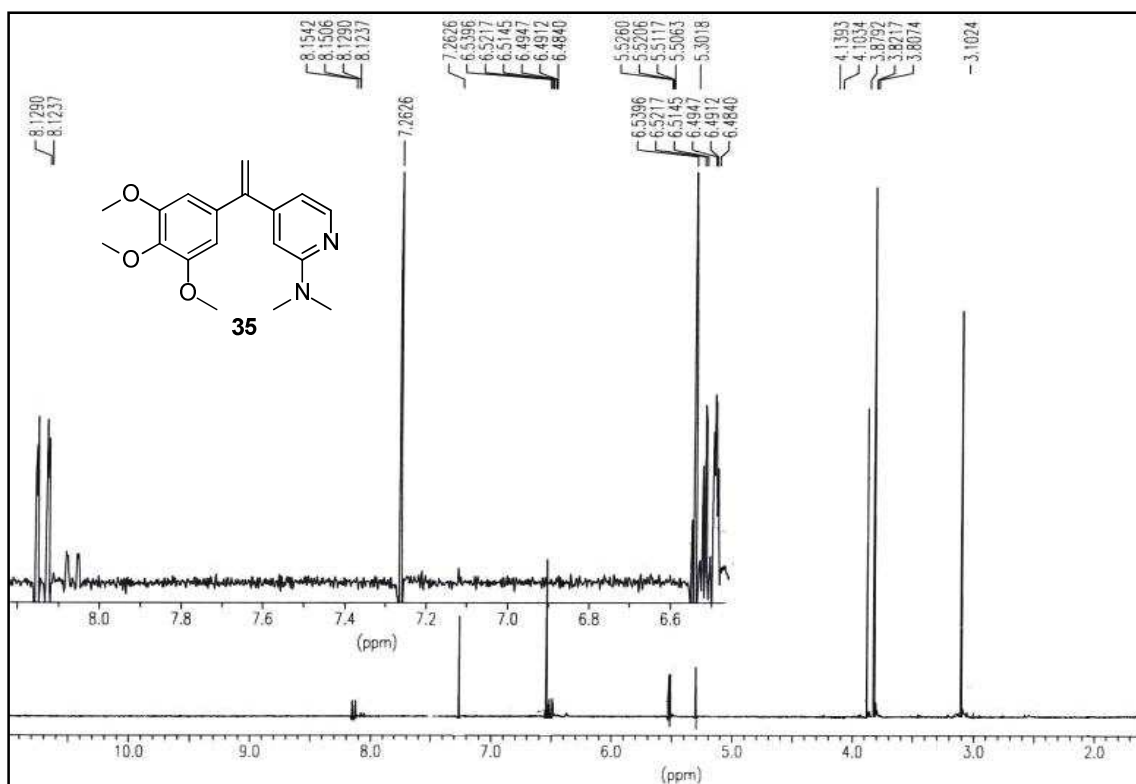


Figura XXVIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **35**.

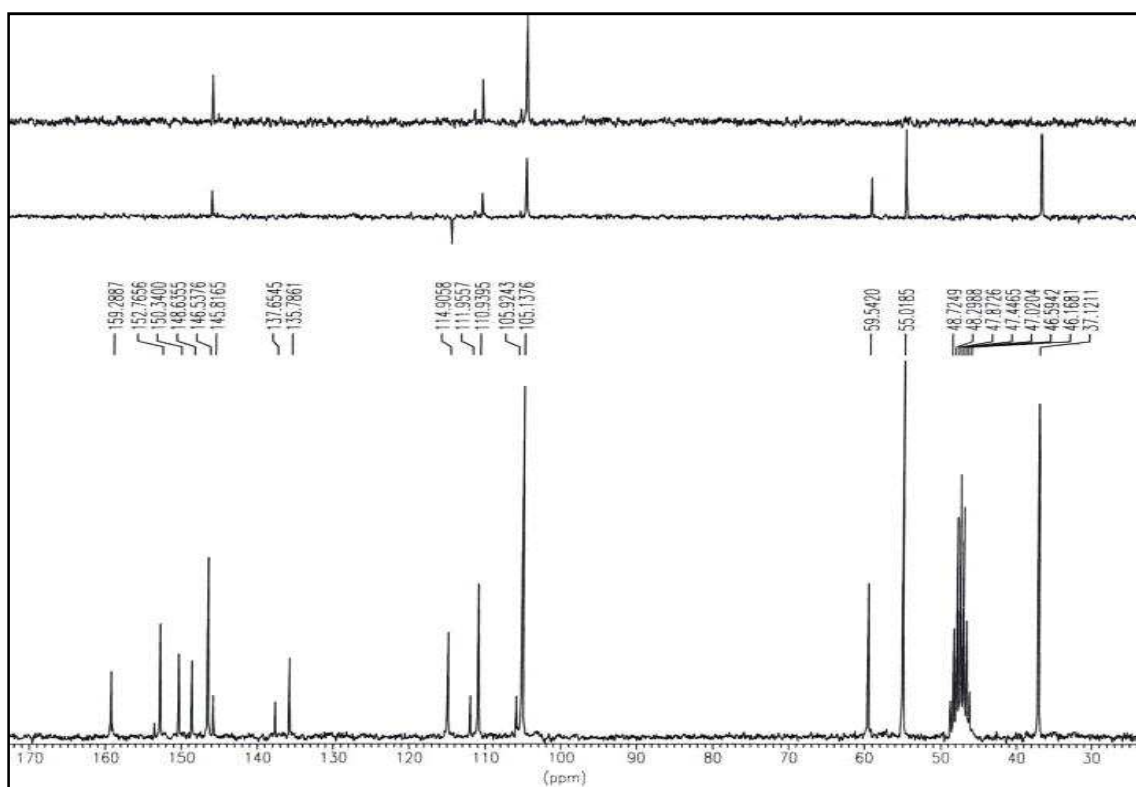
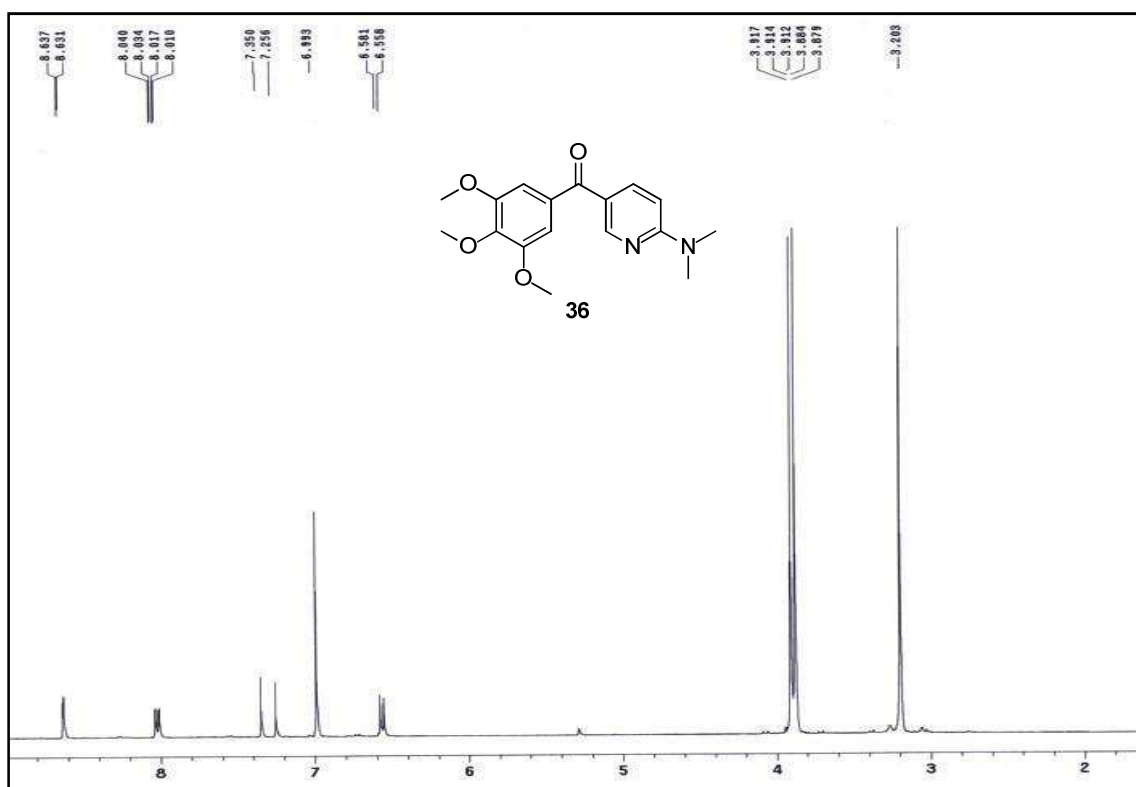
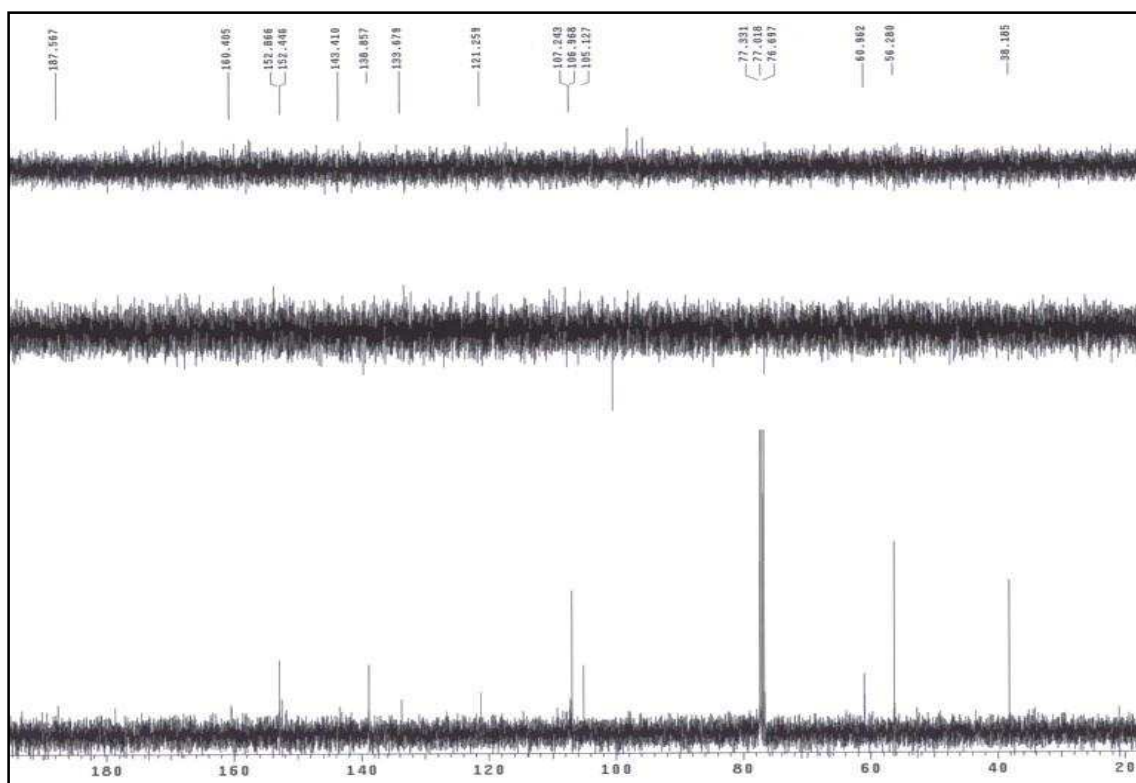


Figura XXVIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **35**.

Figura XXIXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **36**.Figura XXIXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **36**.

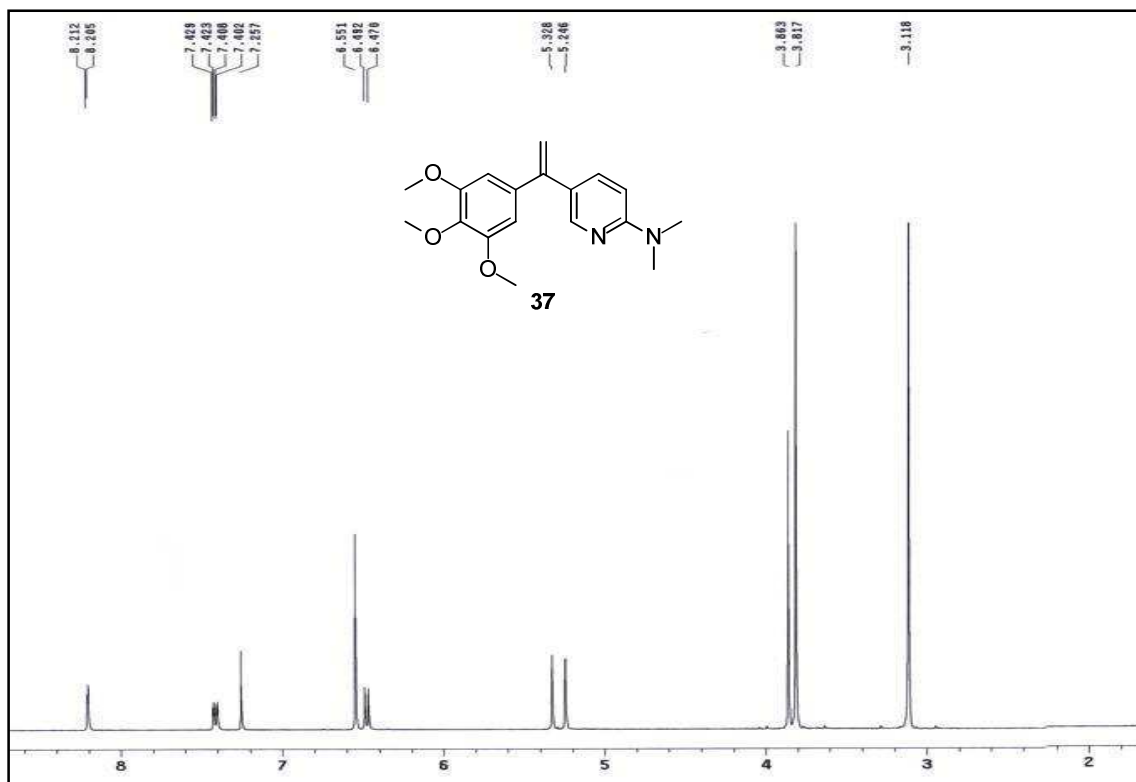


Figura XXXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **37**.

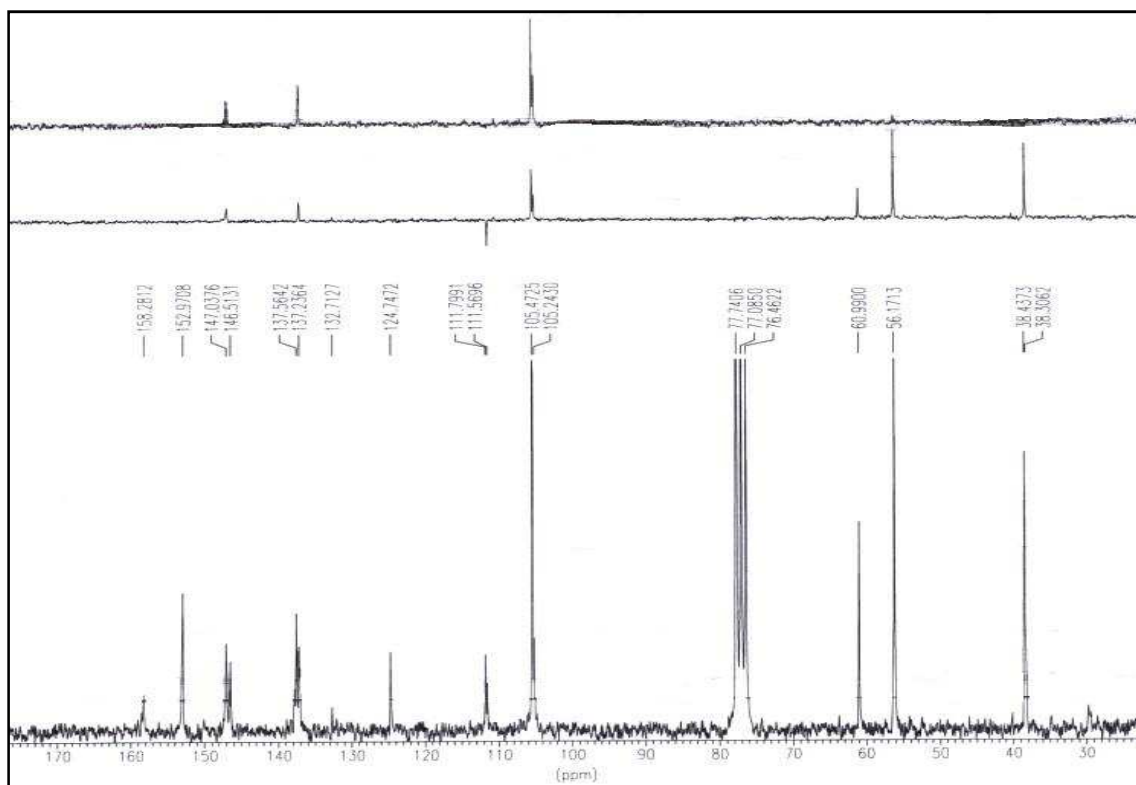
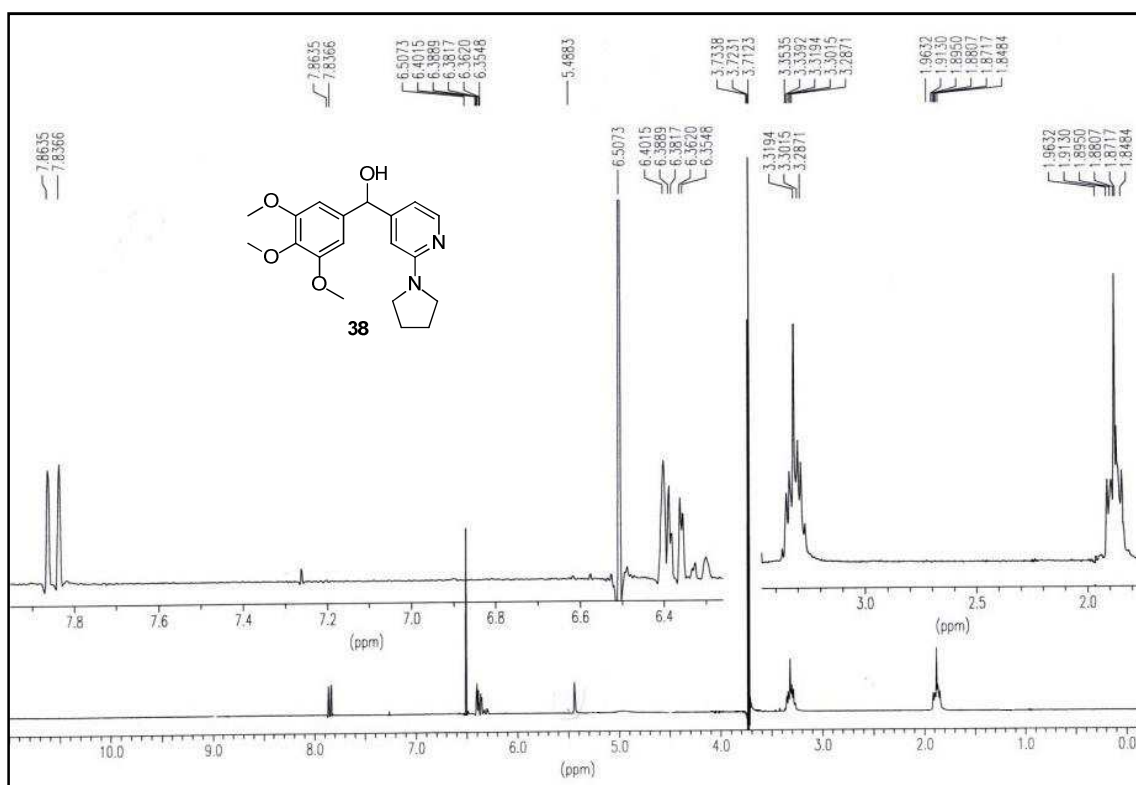
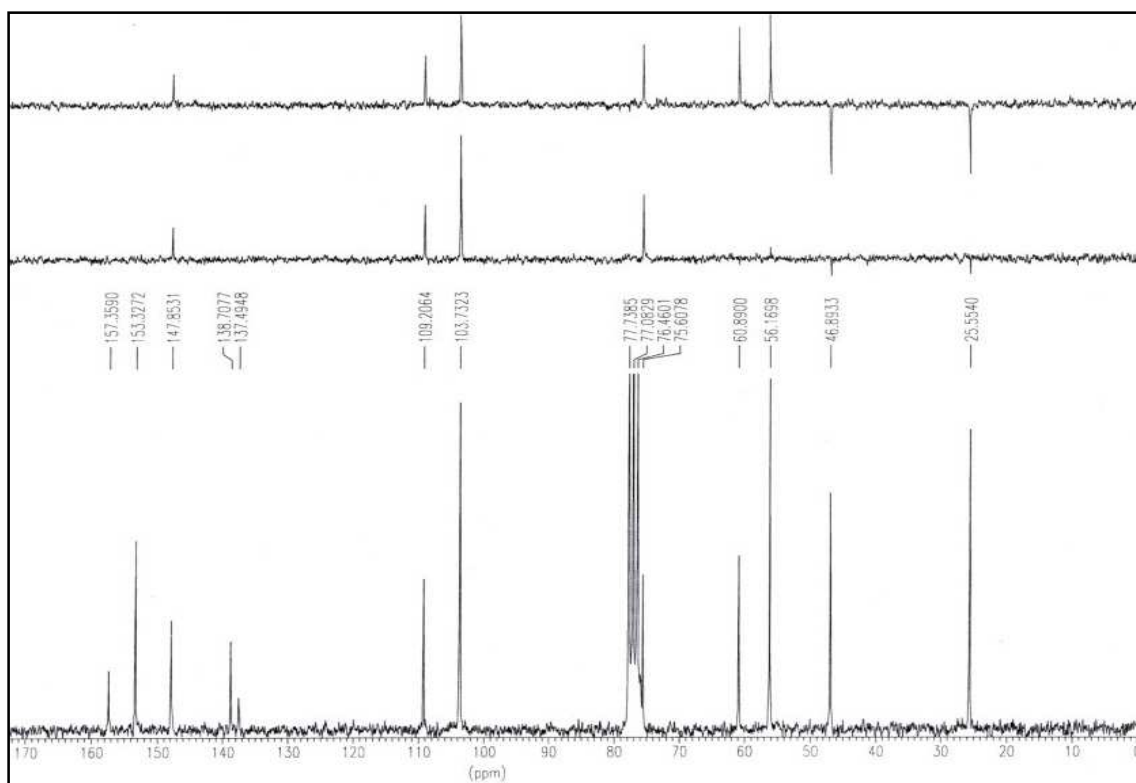


Figura XXXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **37**.

Figura XXXIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **38**.Figura XXXIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **38**.

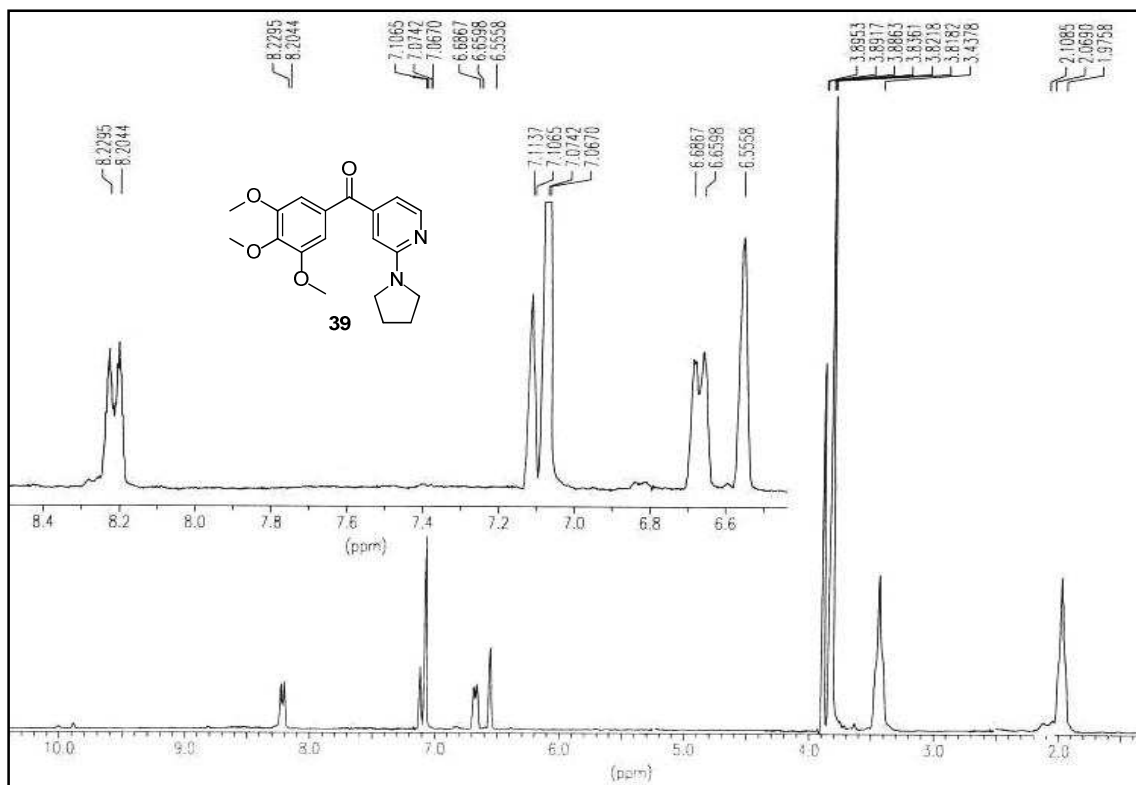


Figura XXXIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **39**.

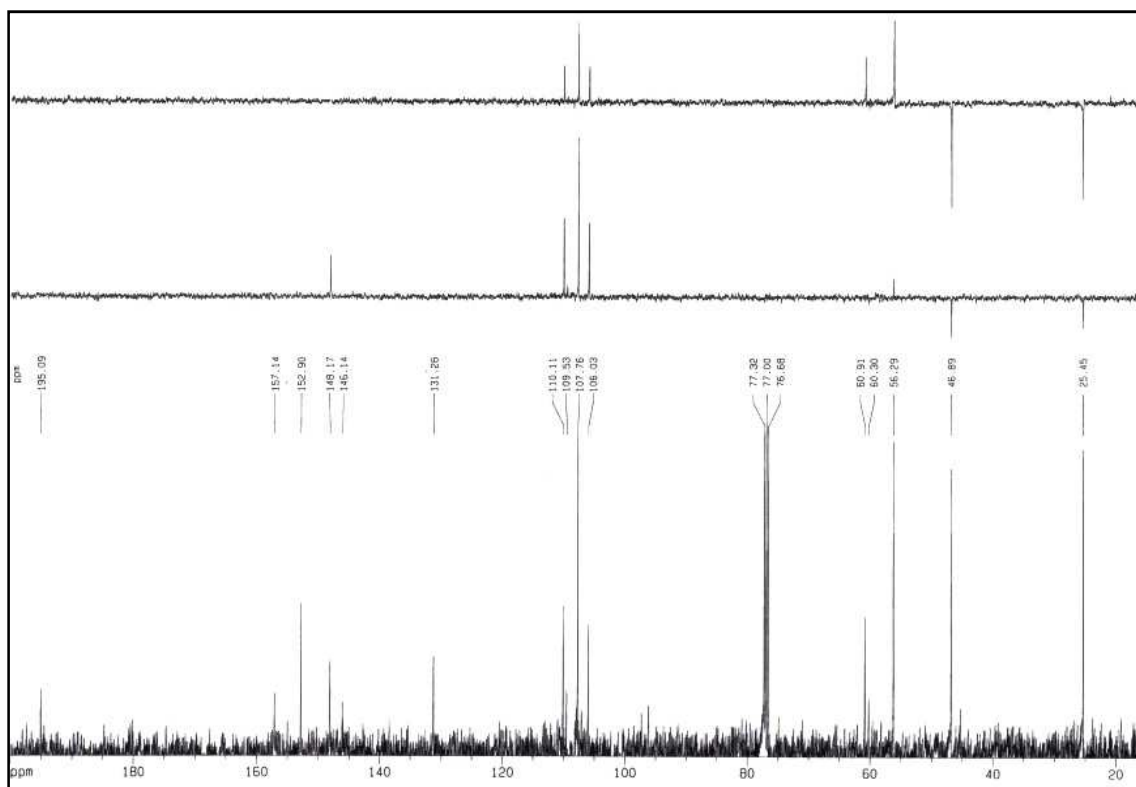
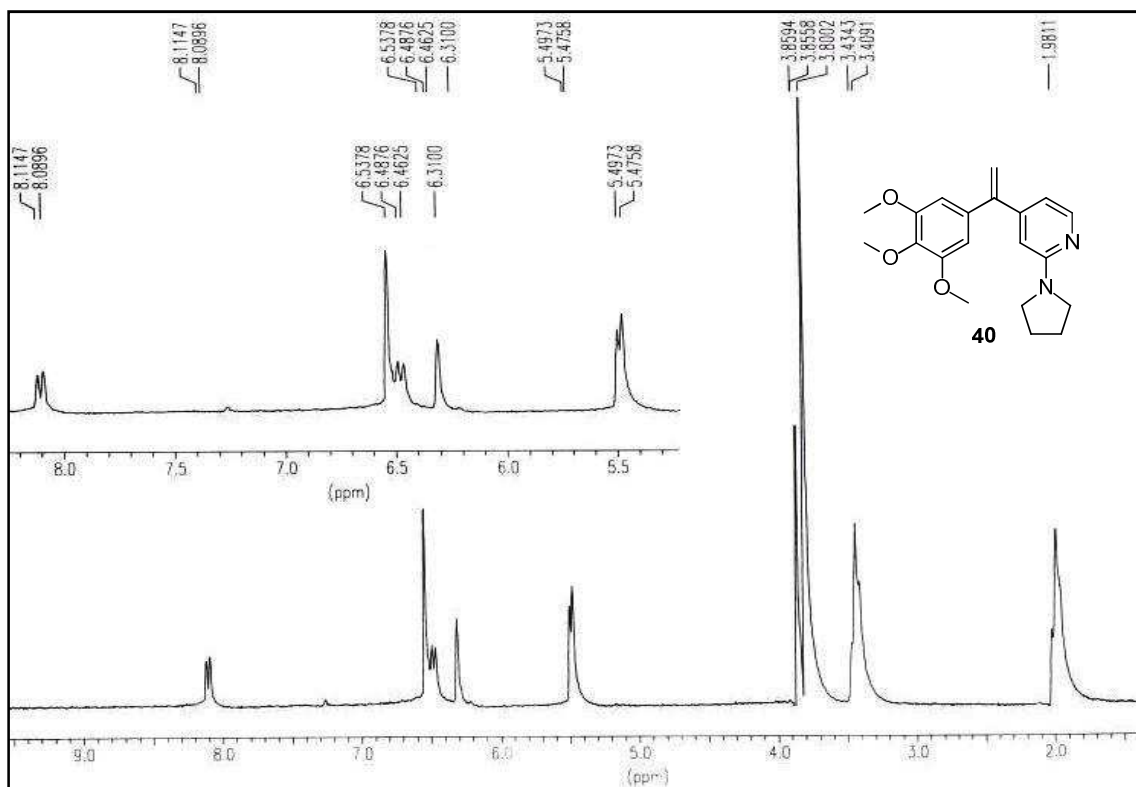
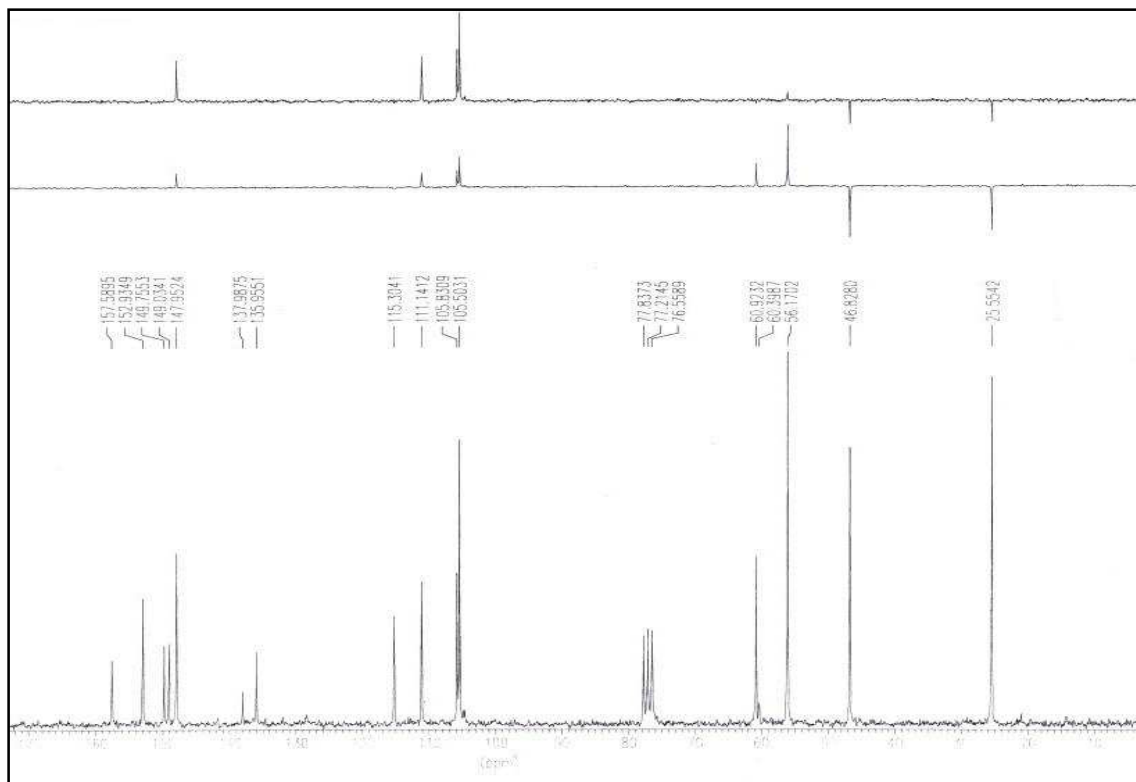


Figura XXXIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **39**.

Figura XXXIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto 40.Figura XXXIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 40.

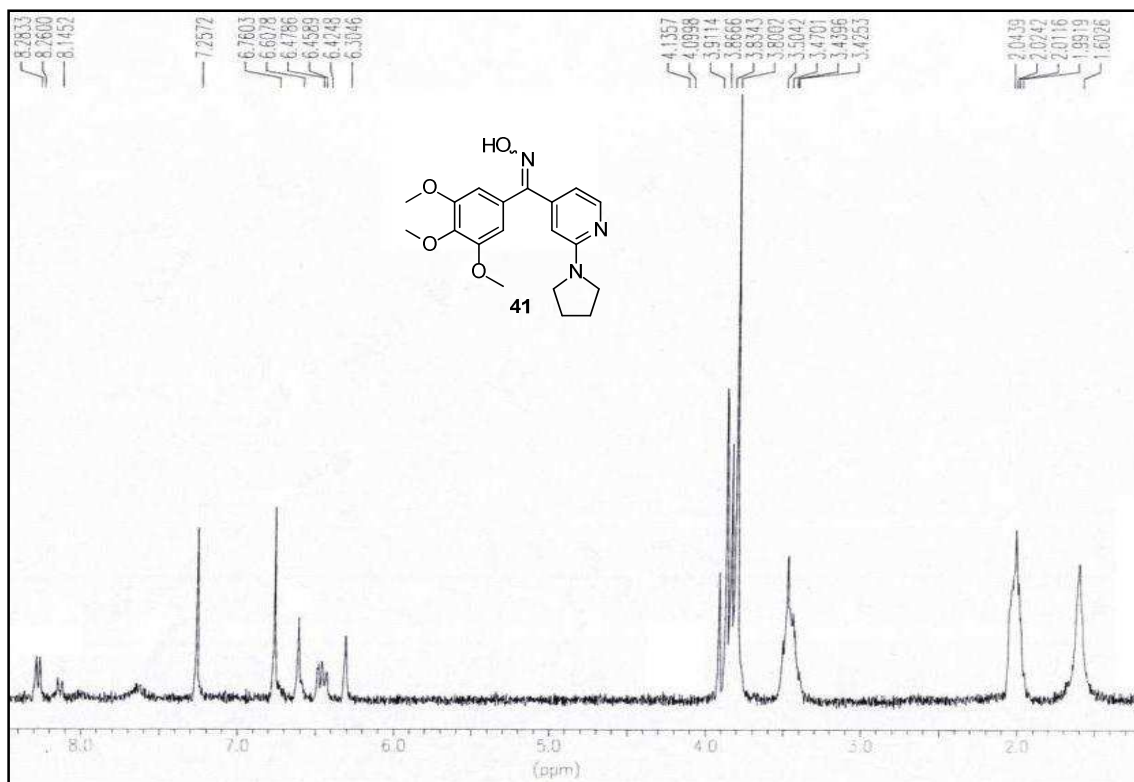


Figura XXXIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **41**.

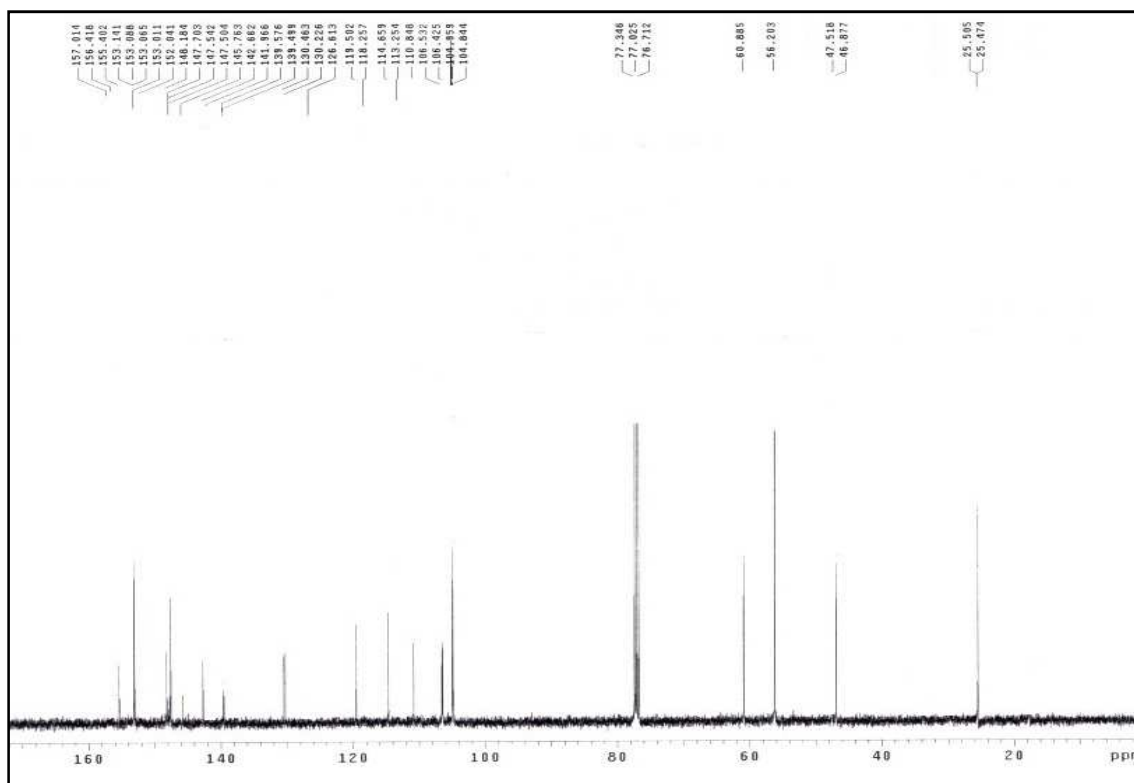
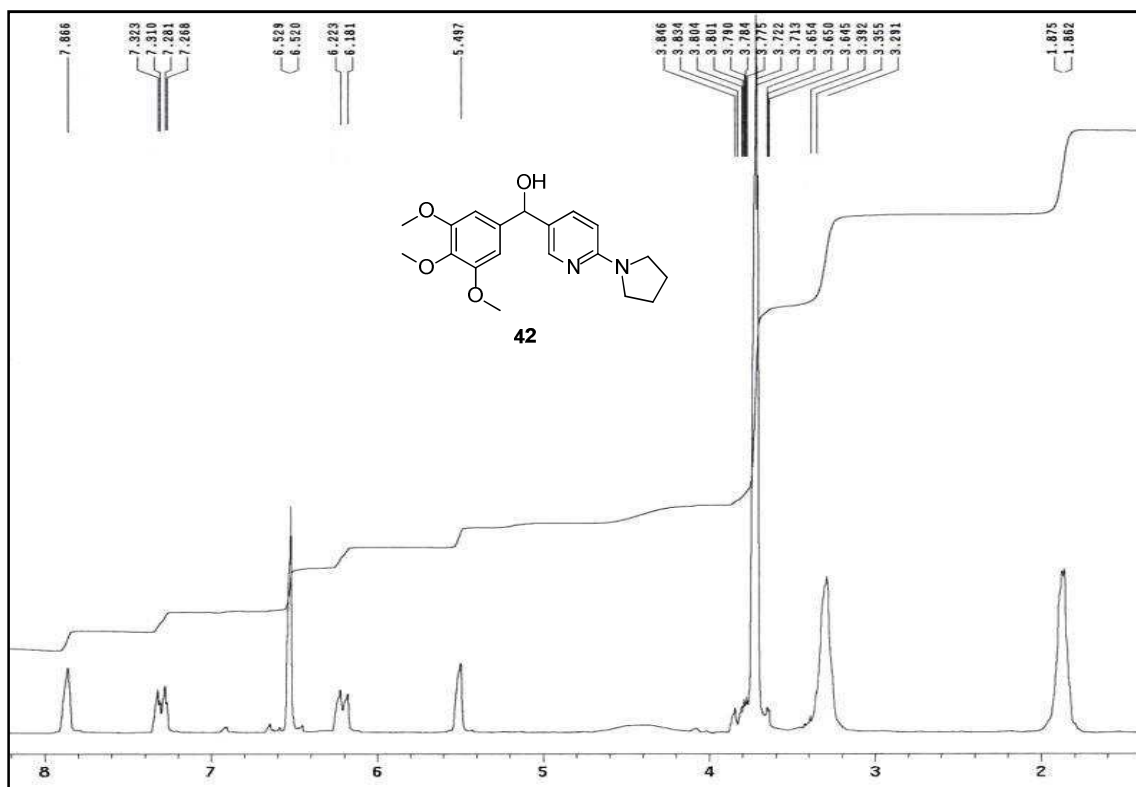


Figura XXXIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **41**.

Figura XXXV: Espectro de RMN ^1H del compuesto 42.

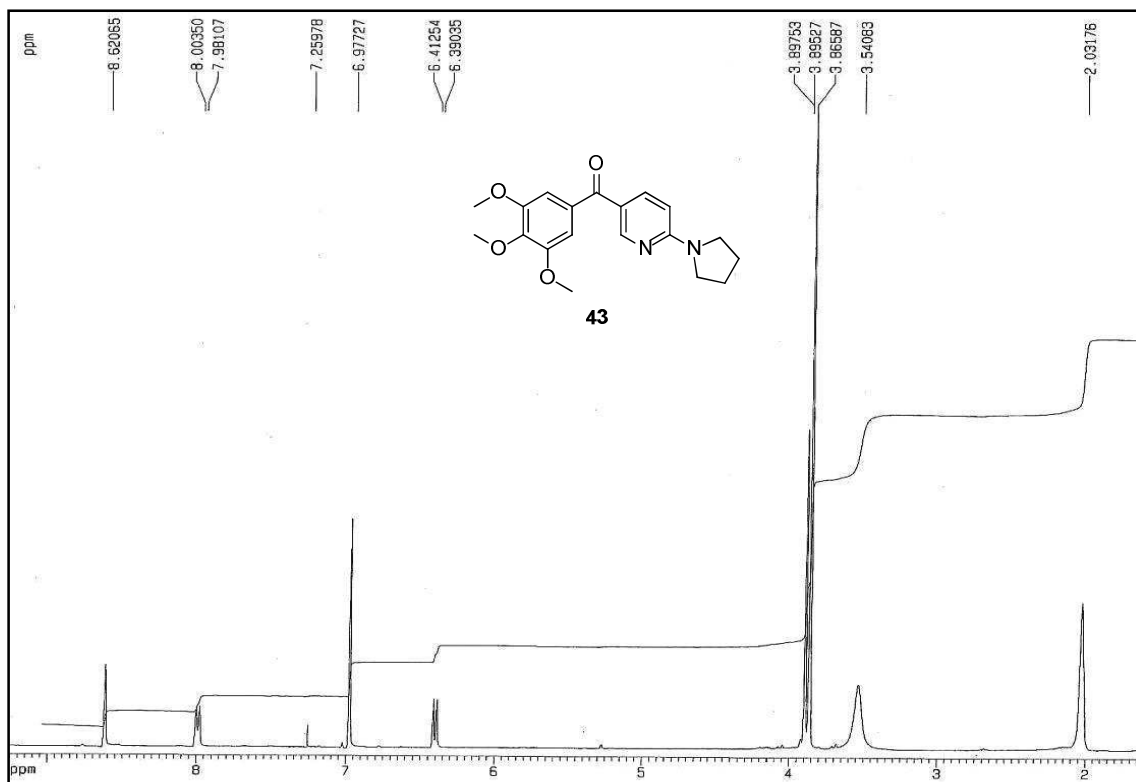


Figura XXXVIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **43**.

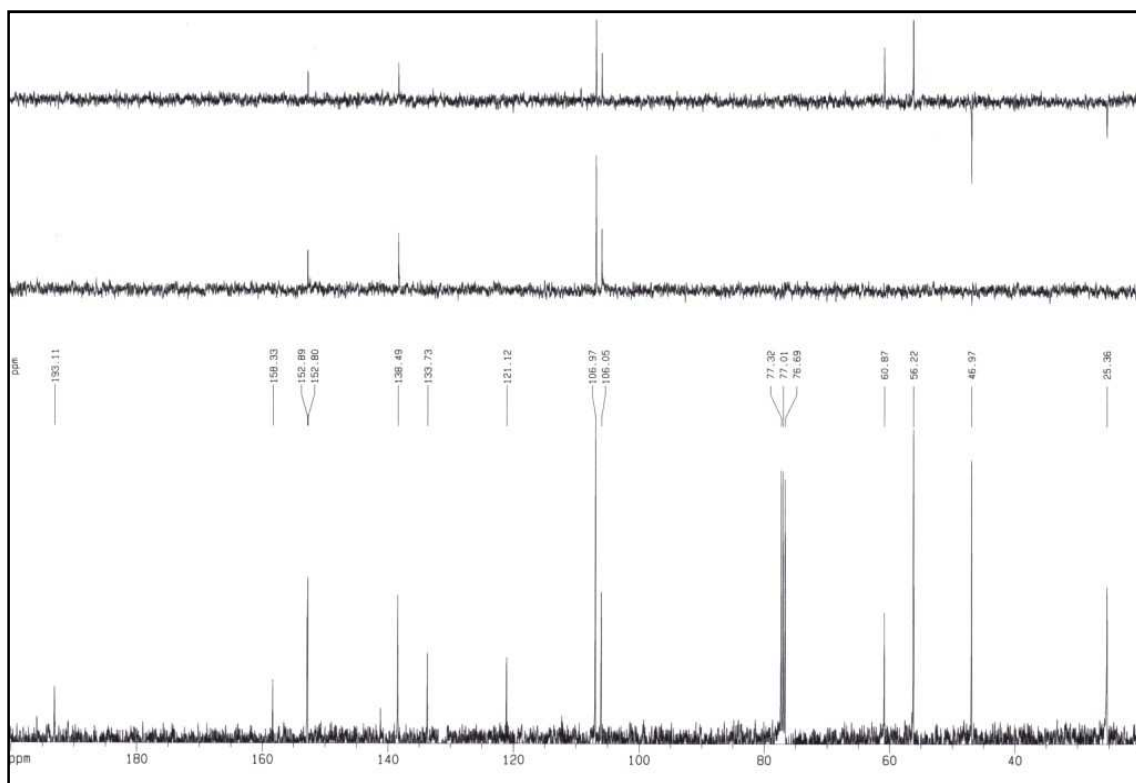
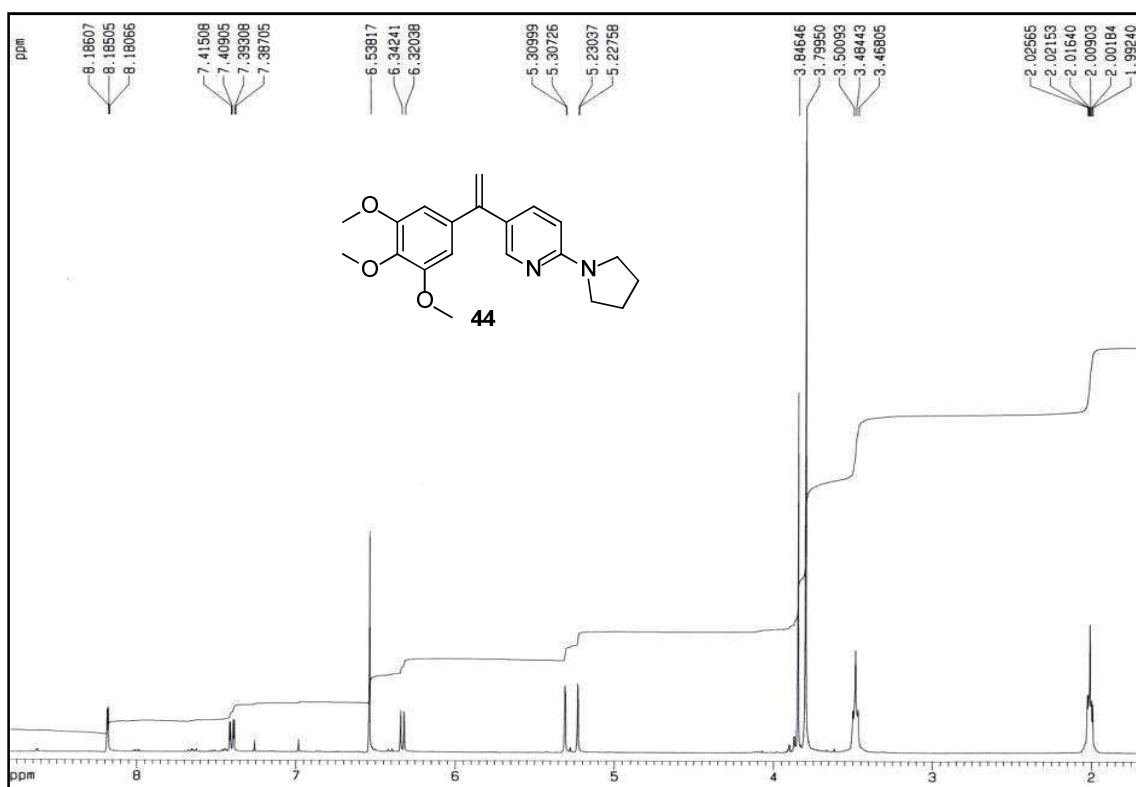
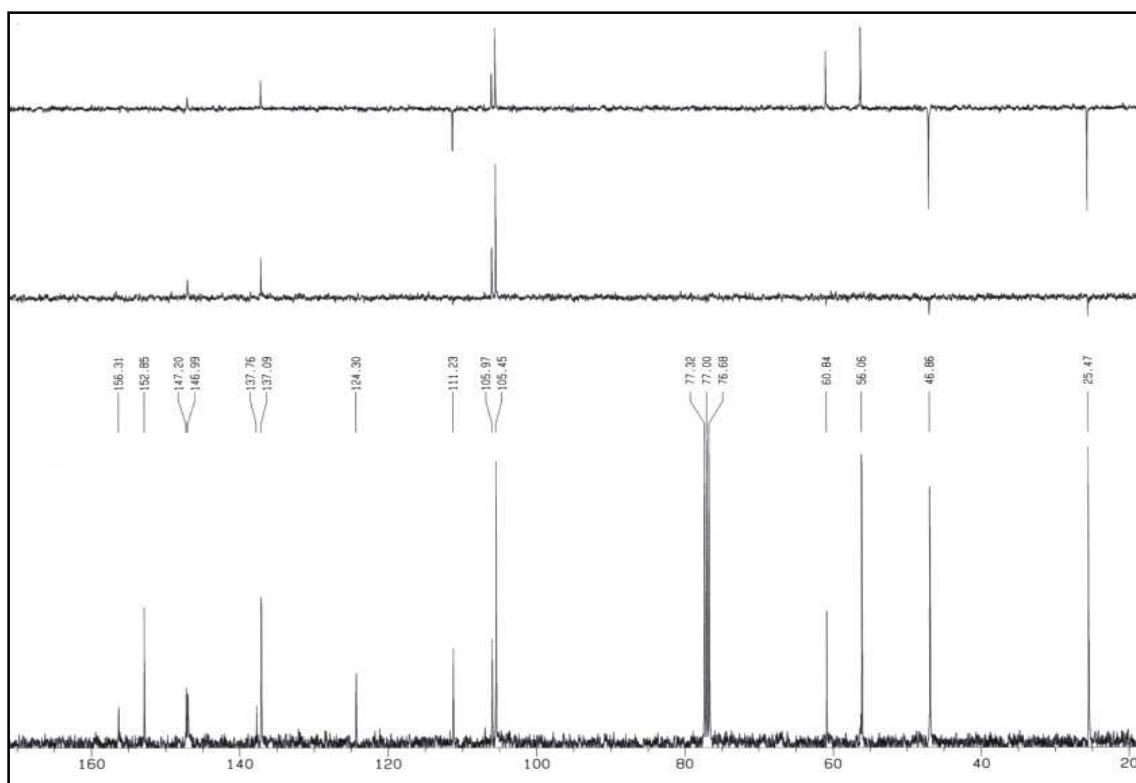


Figura XXXVIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **43**.

Figura XXXVIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **44**.Figura XXXVIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **44**.

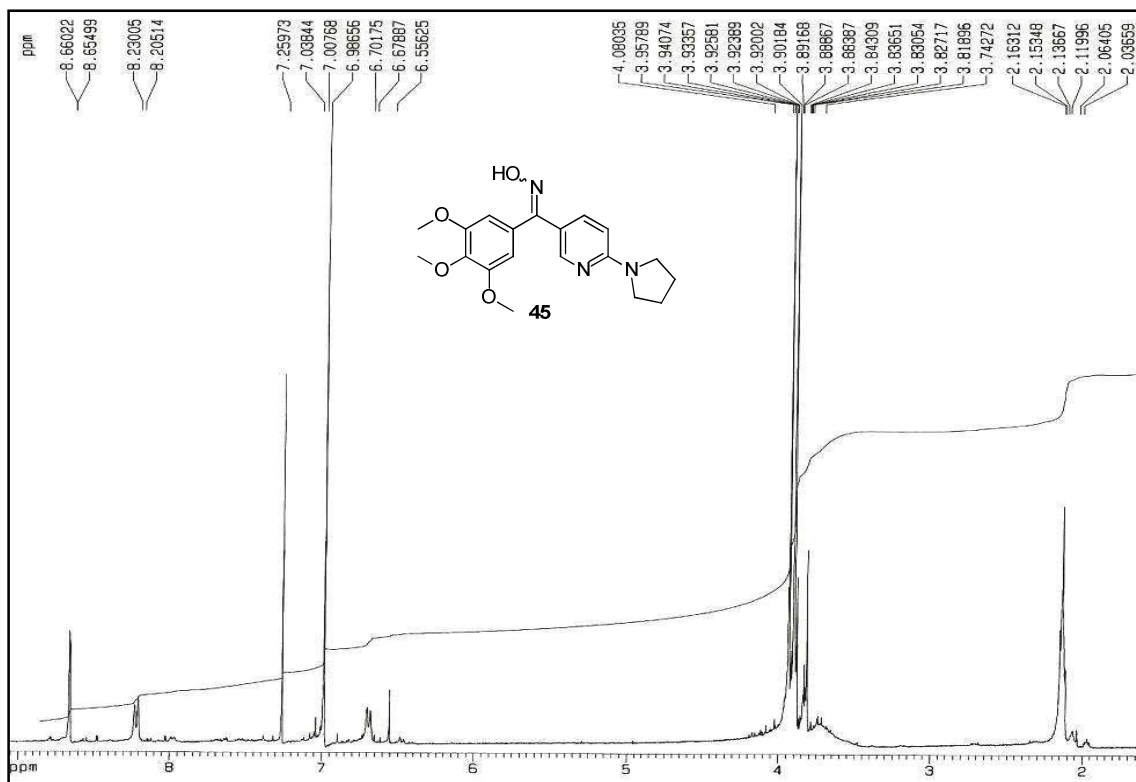


Figura XXXVIII: Espectro de RMN ^1H del compuesto **45**.

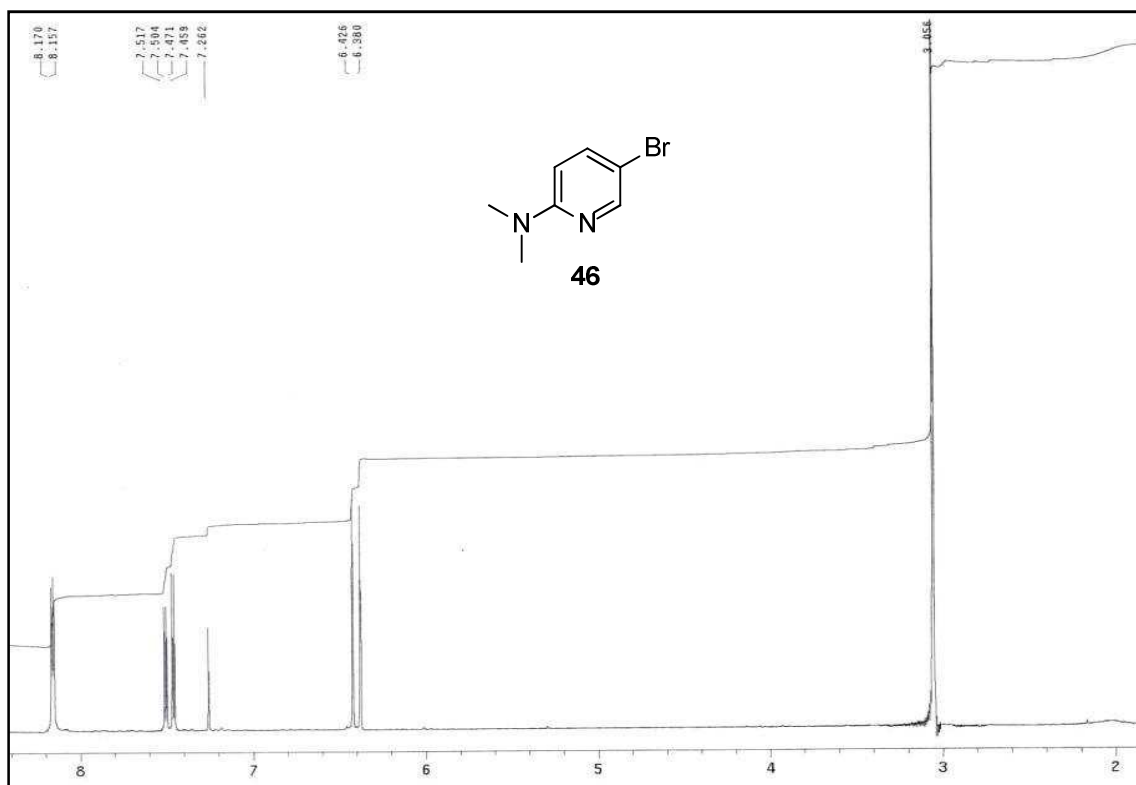
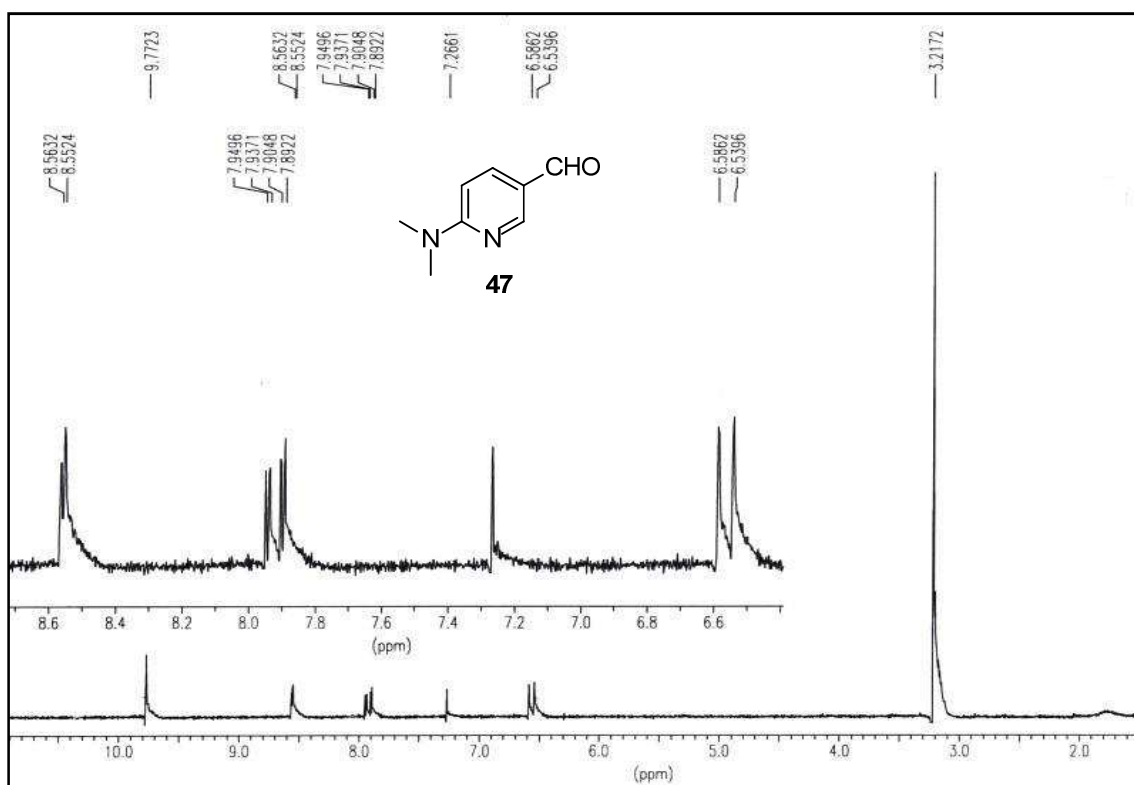
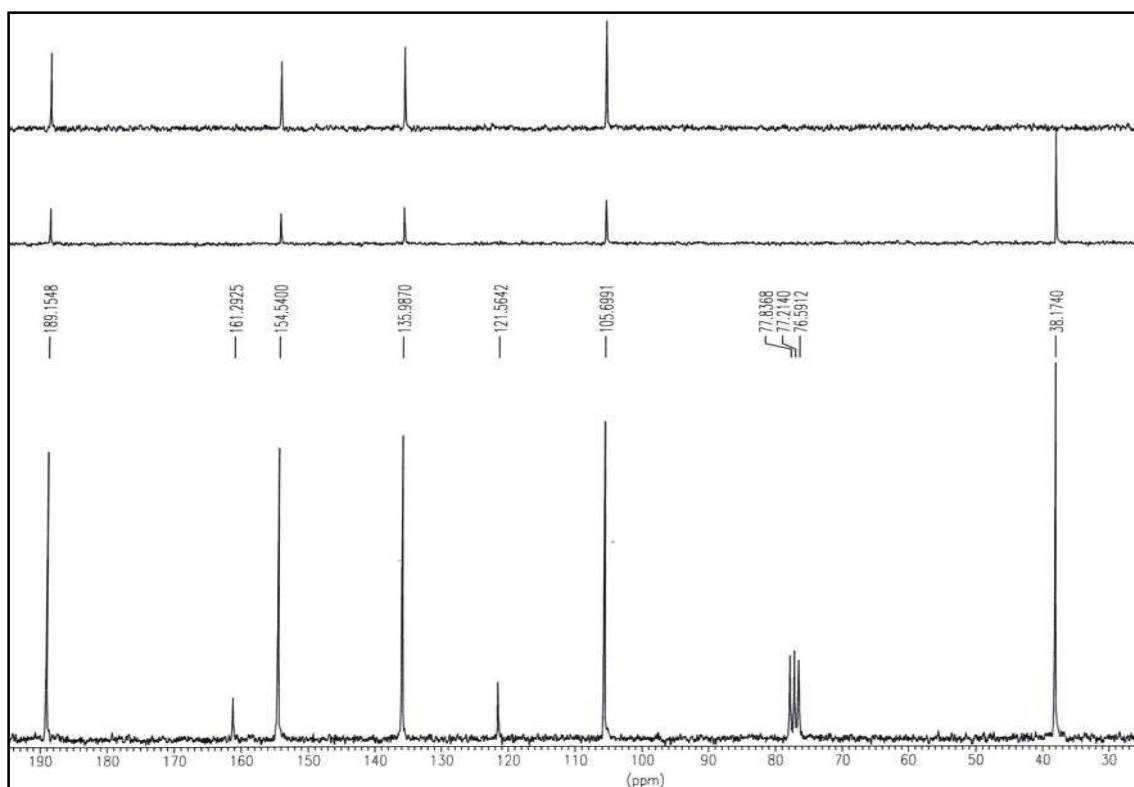


Figura XXXIX: Espectro de RMN ^1H del compuesto **46**.

Figura XLa: Espectro de RMN ^1H del compuesto 47.Figura XLb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 47.

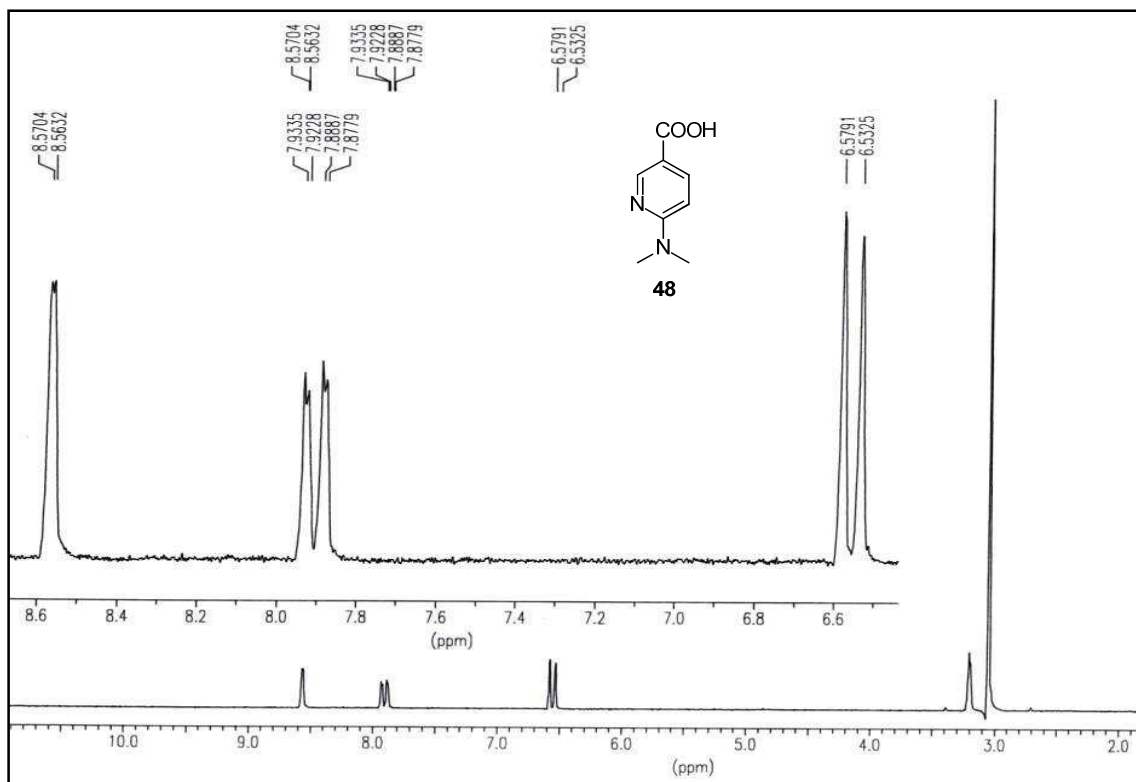


Figura XLIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **48**.

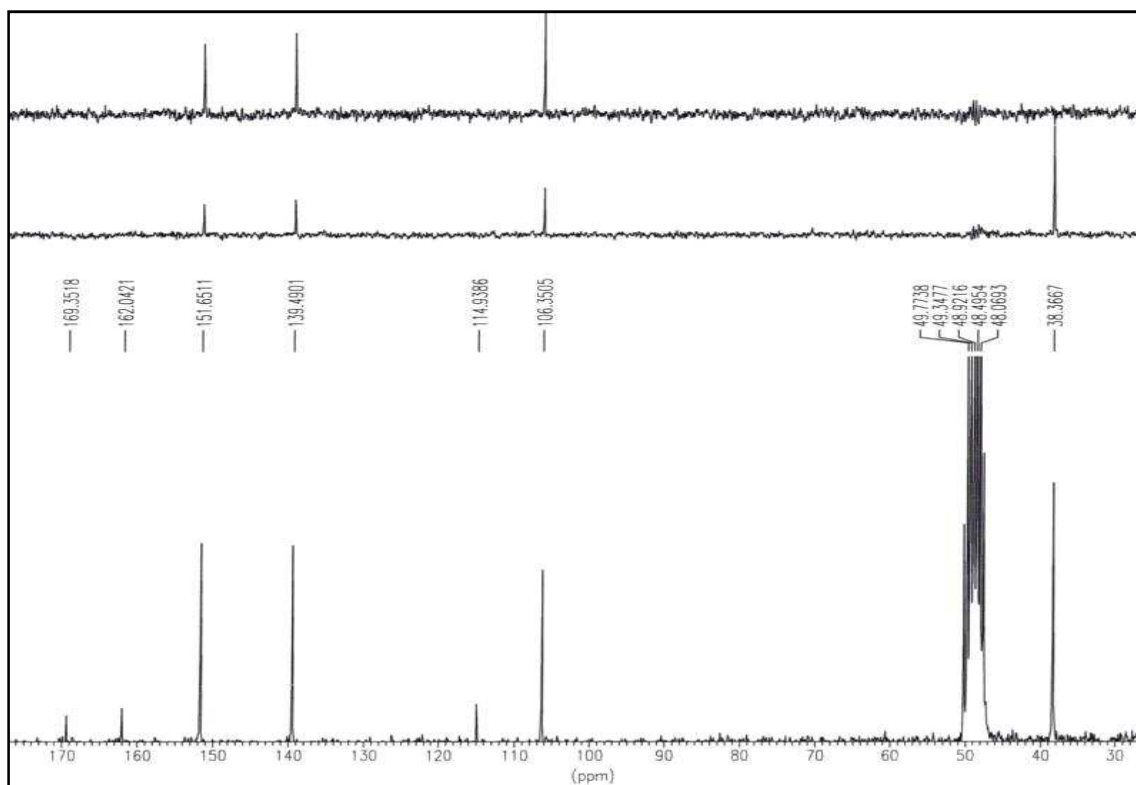
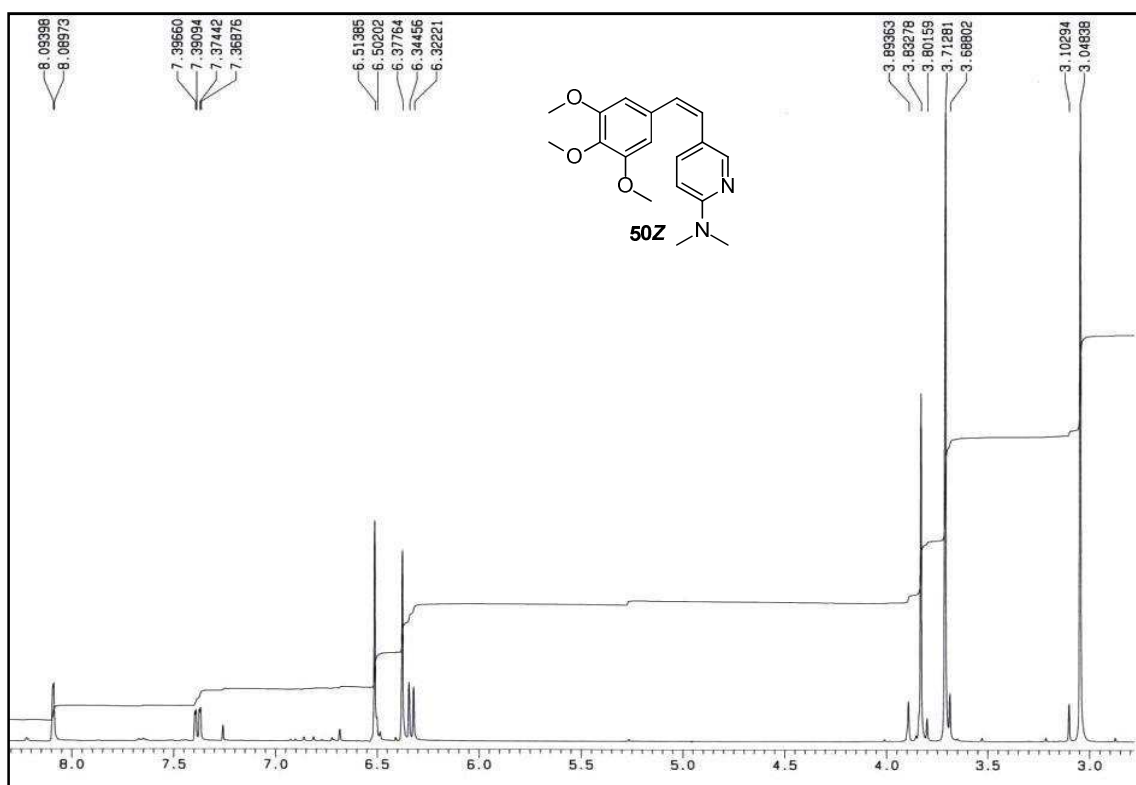
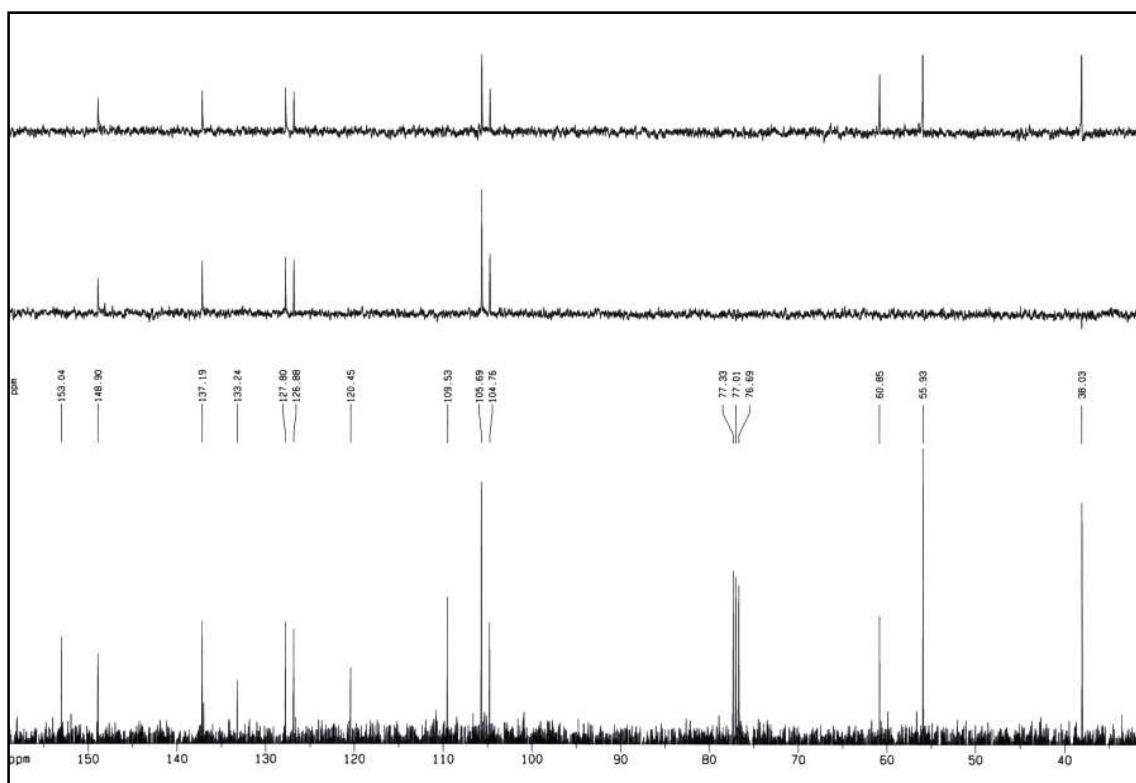


Figura XLIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **48**.

Figura XLIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **50Z**.Figura XLIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **50Z**.

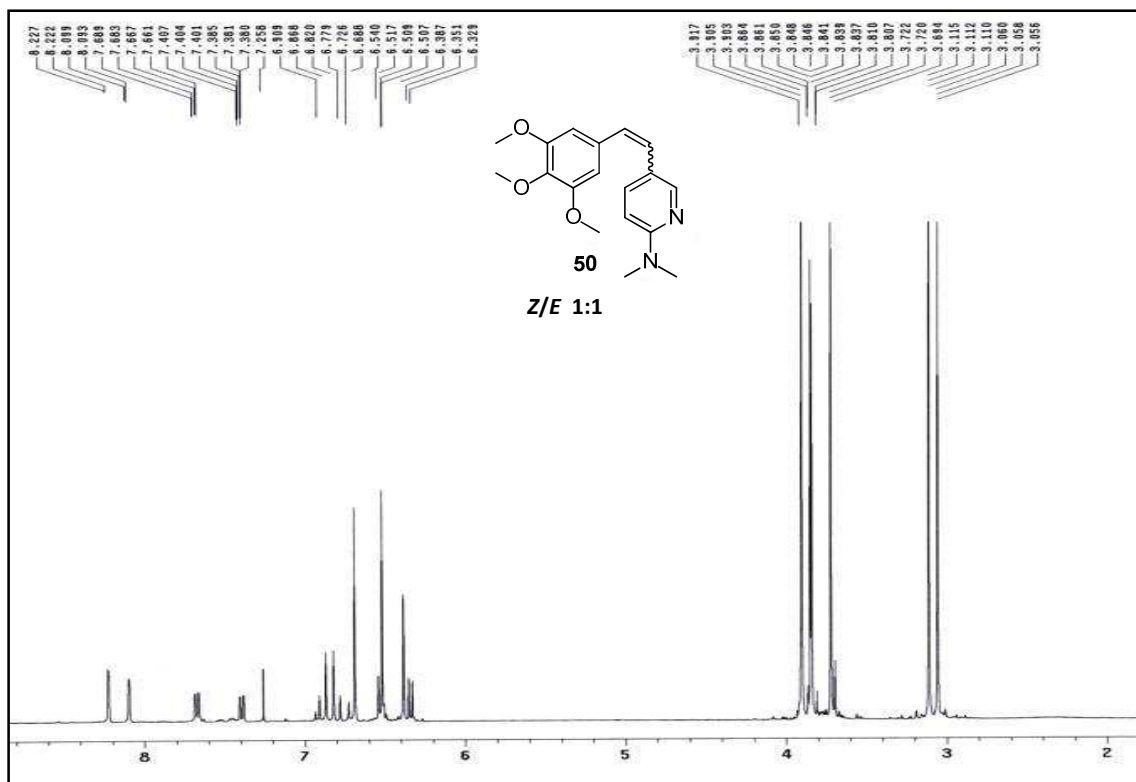


Figura XLIIc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **50**.

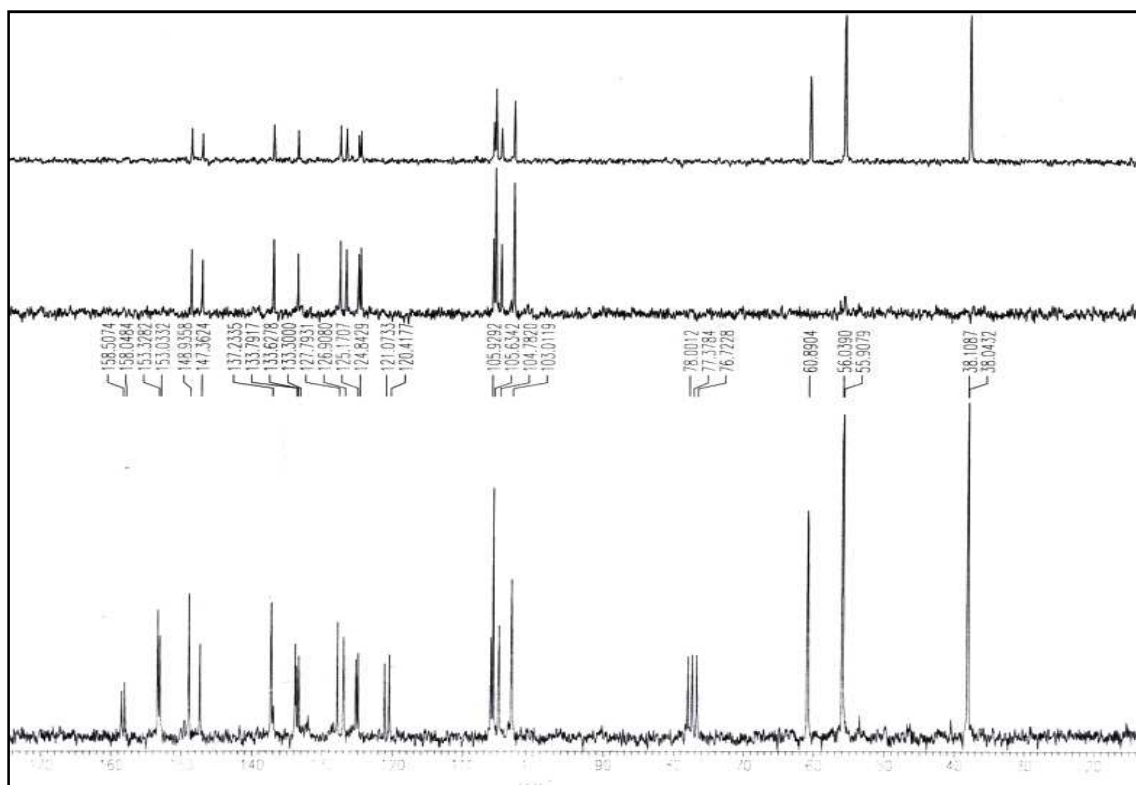


Figura XLIIId: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **50**.

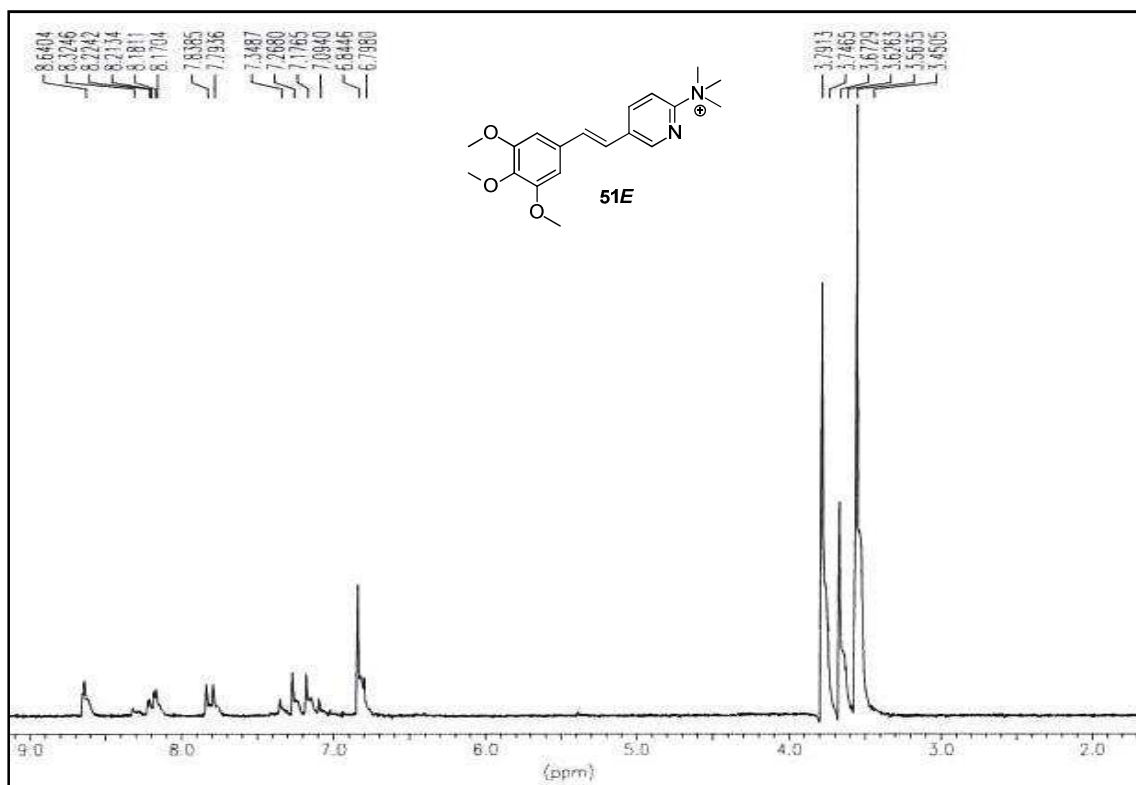
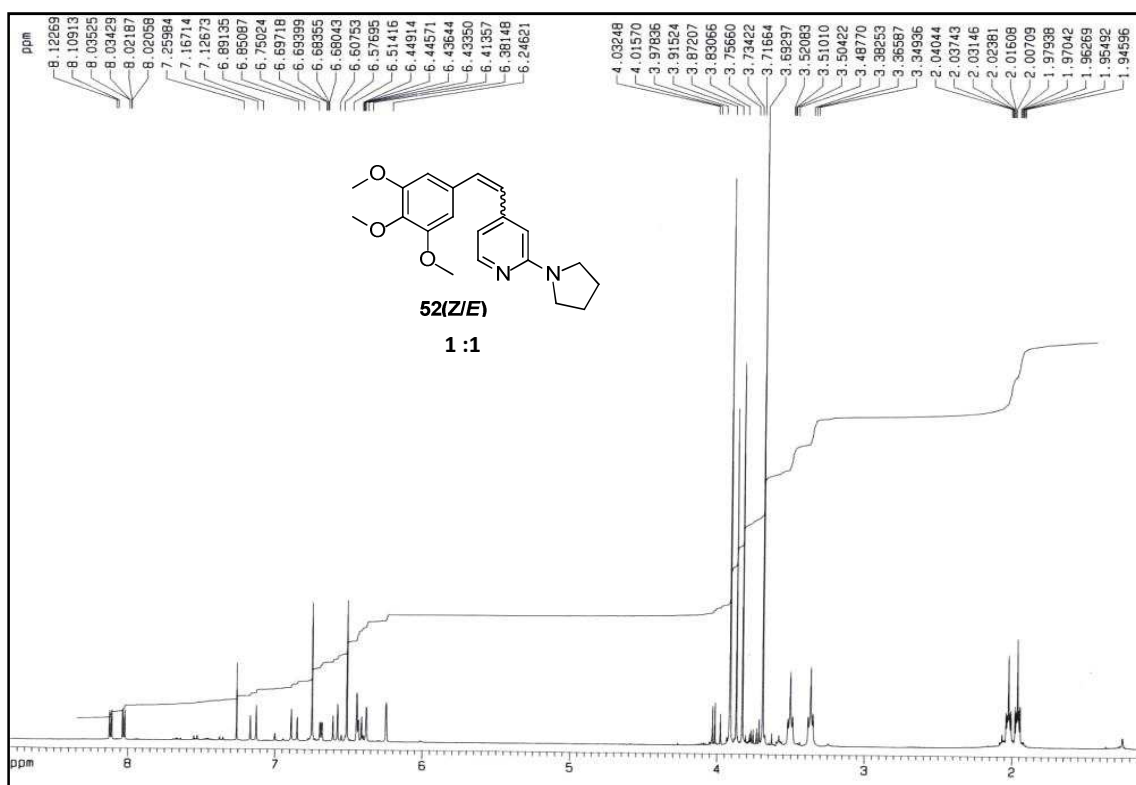
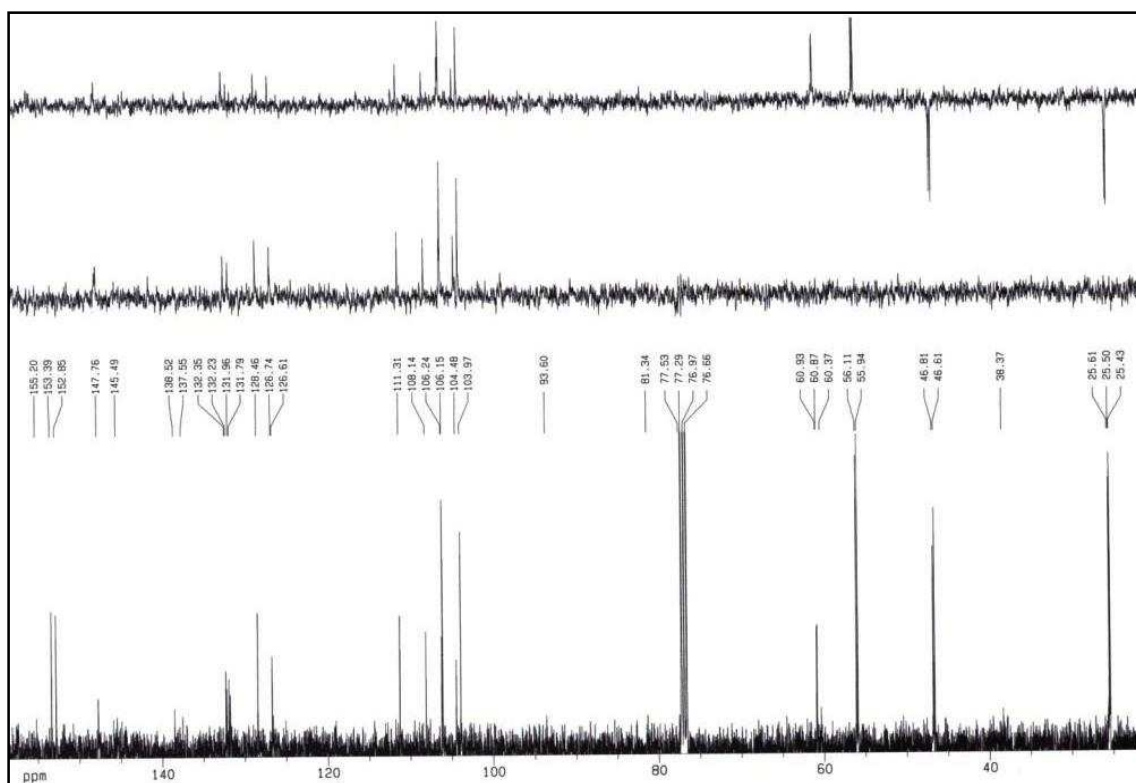


Figura XLIII: Espectro de RMN ^1H del compuesto **51E**.

Figura XLIVc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **52(Z/E)**.Figura XLIVd: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **52(Z/E)**.

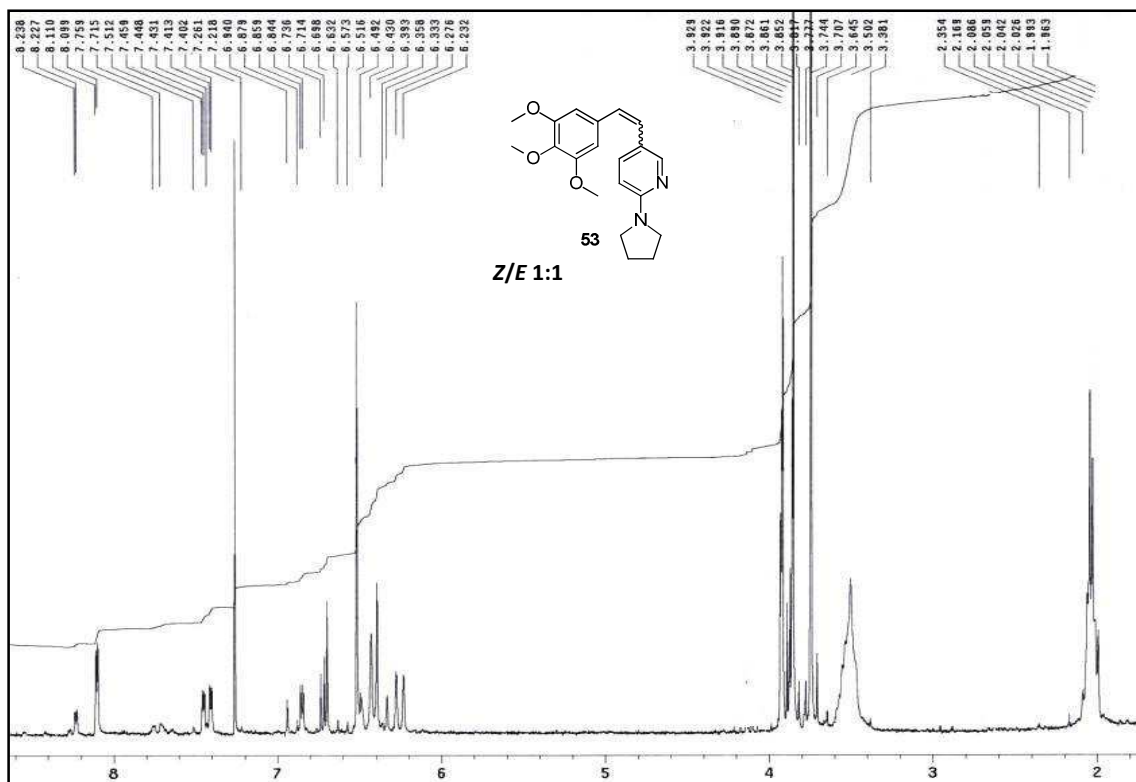
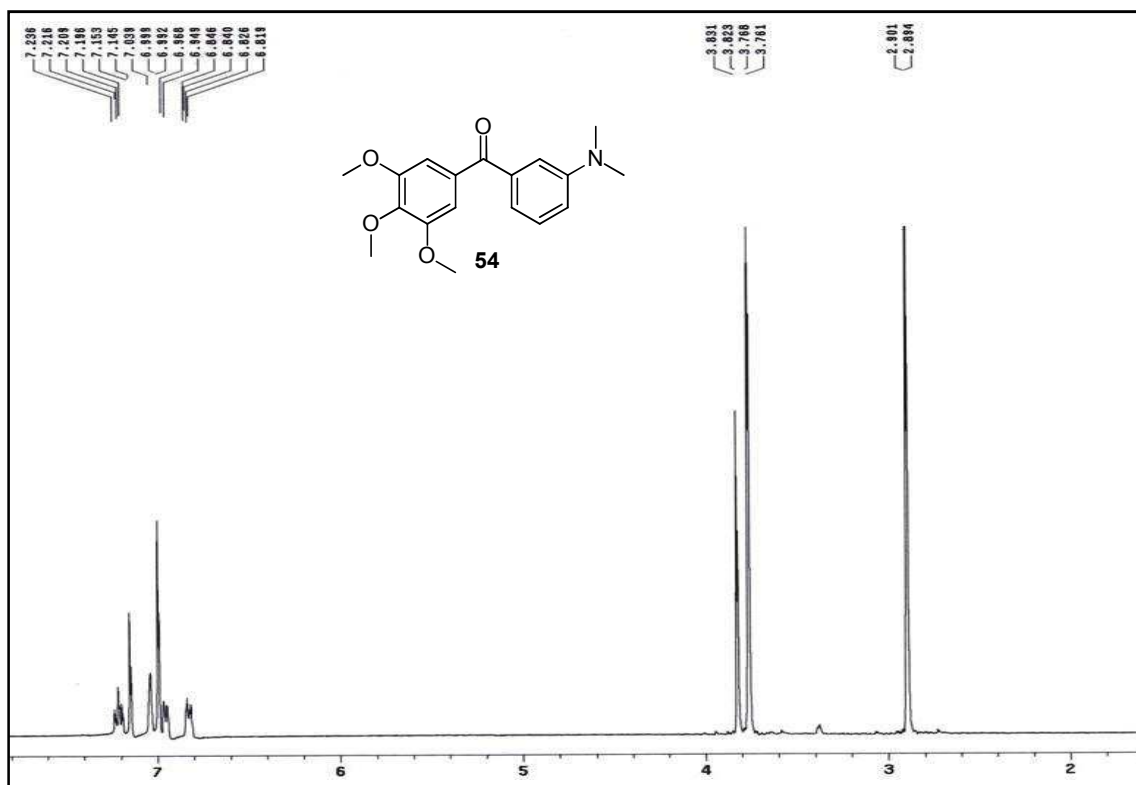
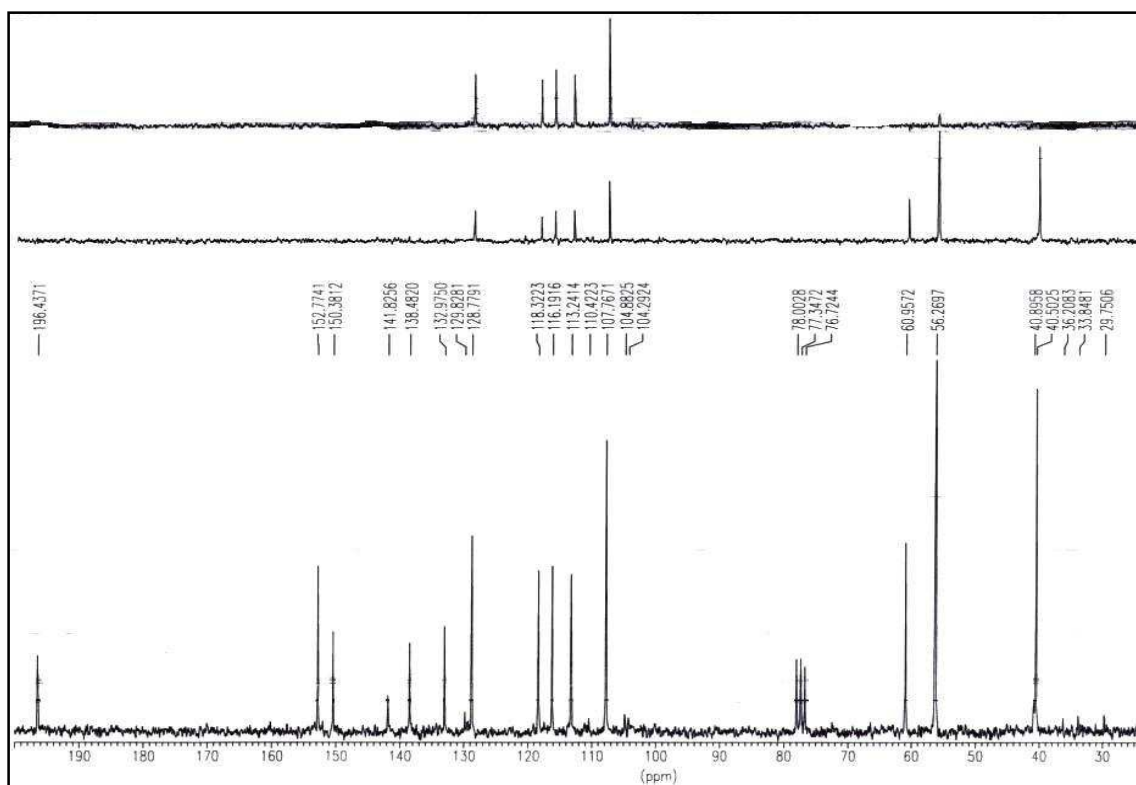


Figura XLV: Espectro de RMN ¹H del compuesto **53**(Z/E).

Figura XLVIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **54**.Figura XLVIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **54**.

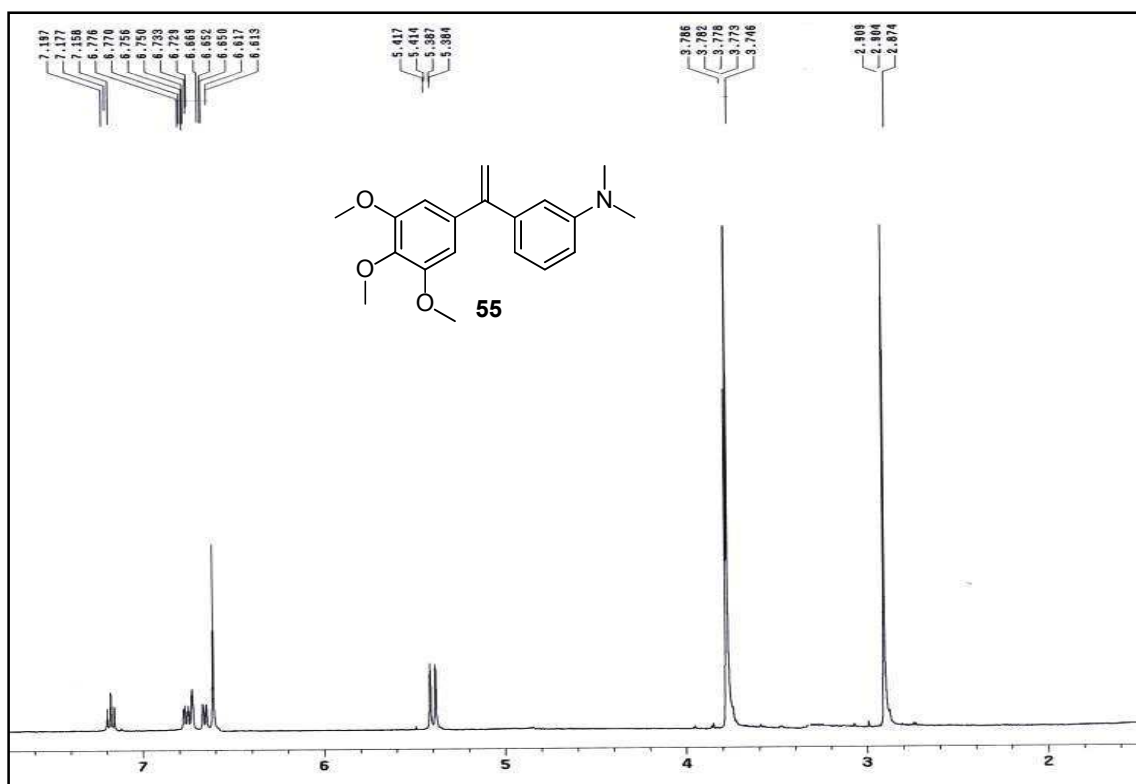


Figura XLVIIa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **55**.

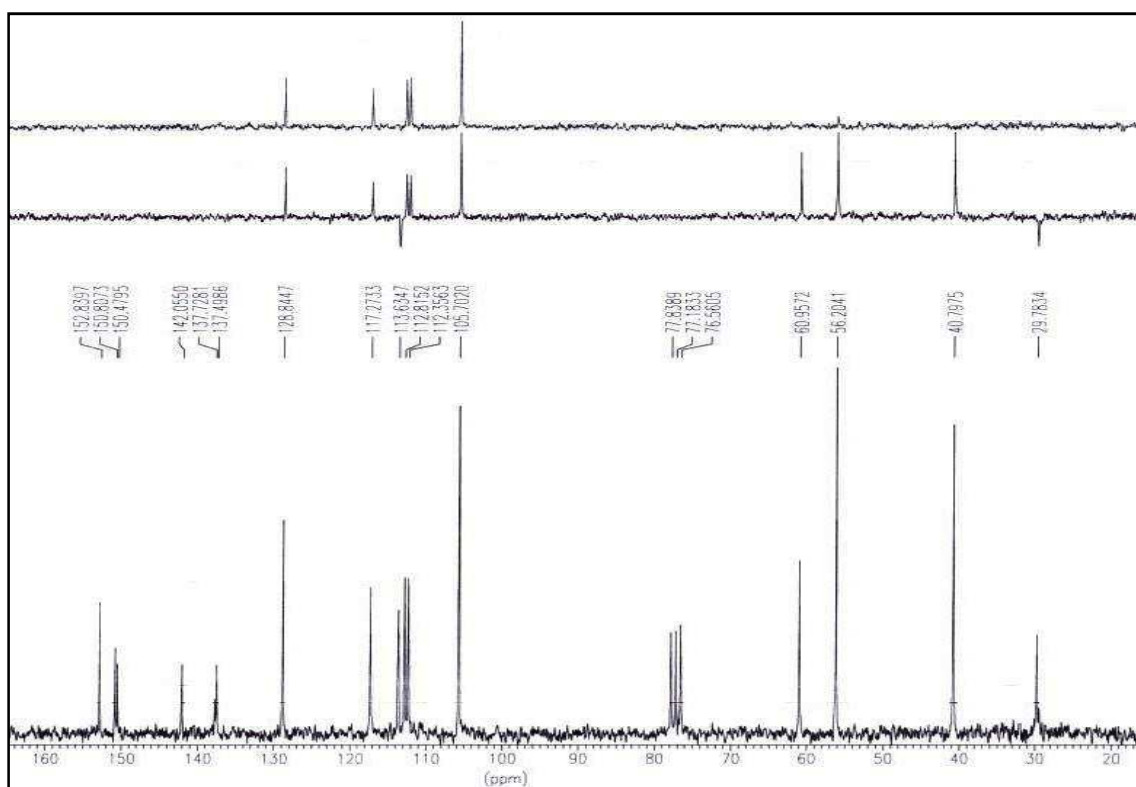
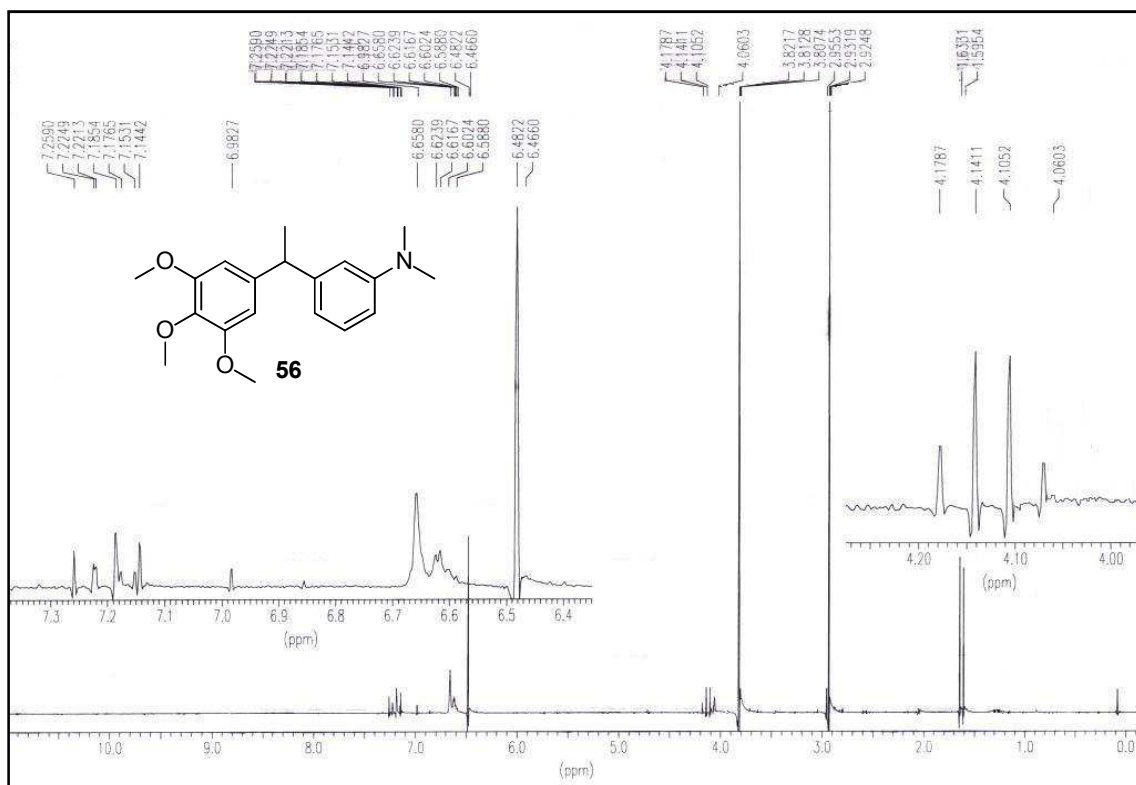
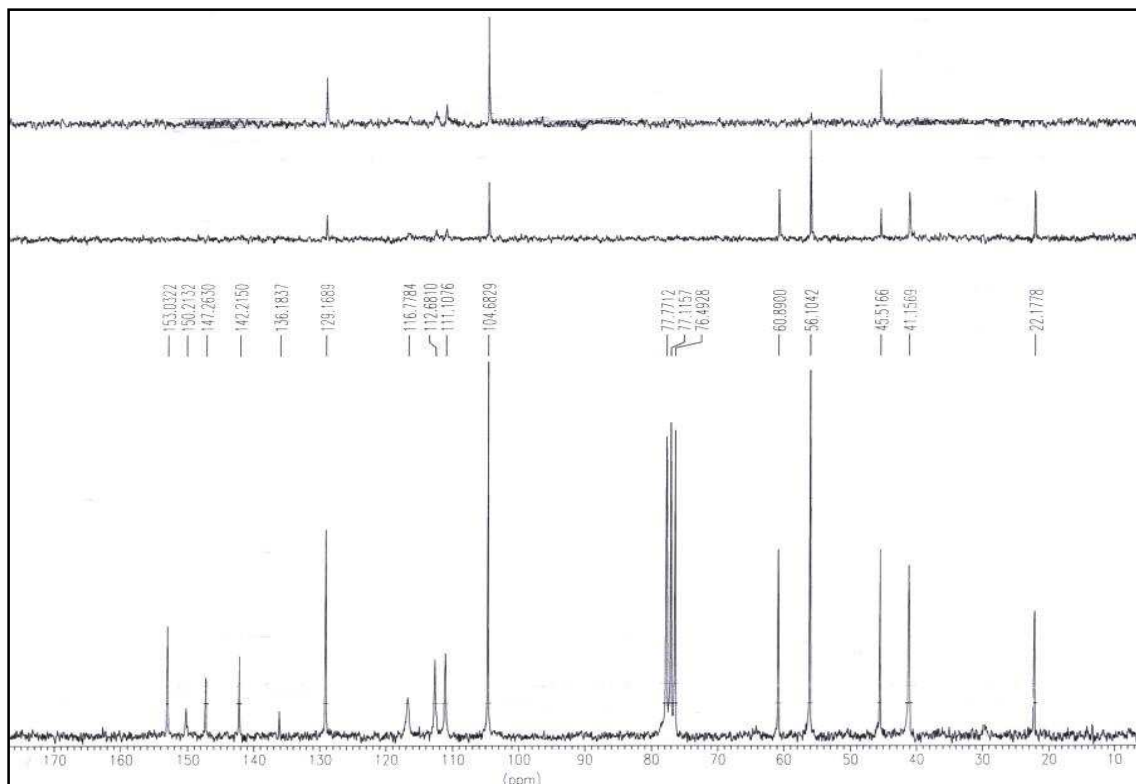


Figura XLVIIb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **55**.

Figura XLVIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **56**.Figura XLVIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **56**.

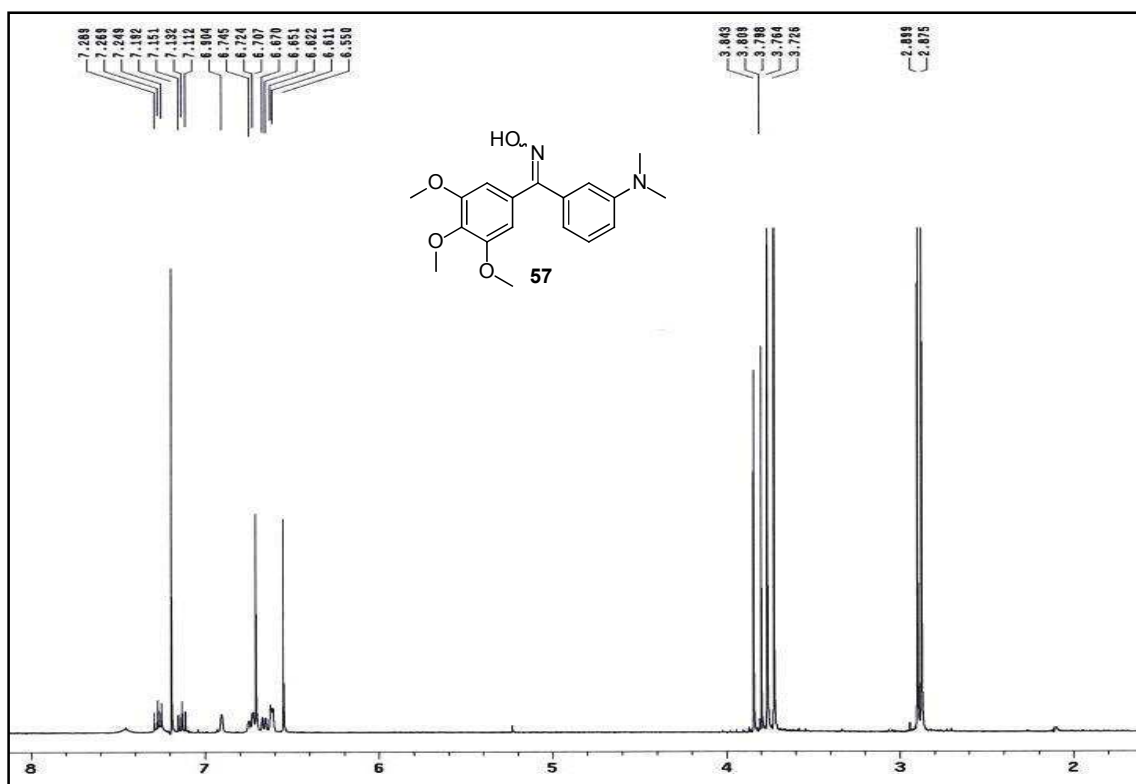


Figura XLIXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **57**.

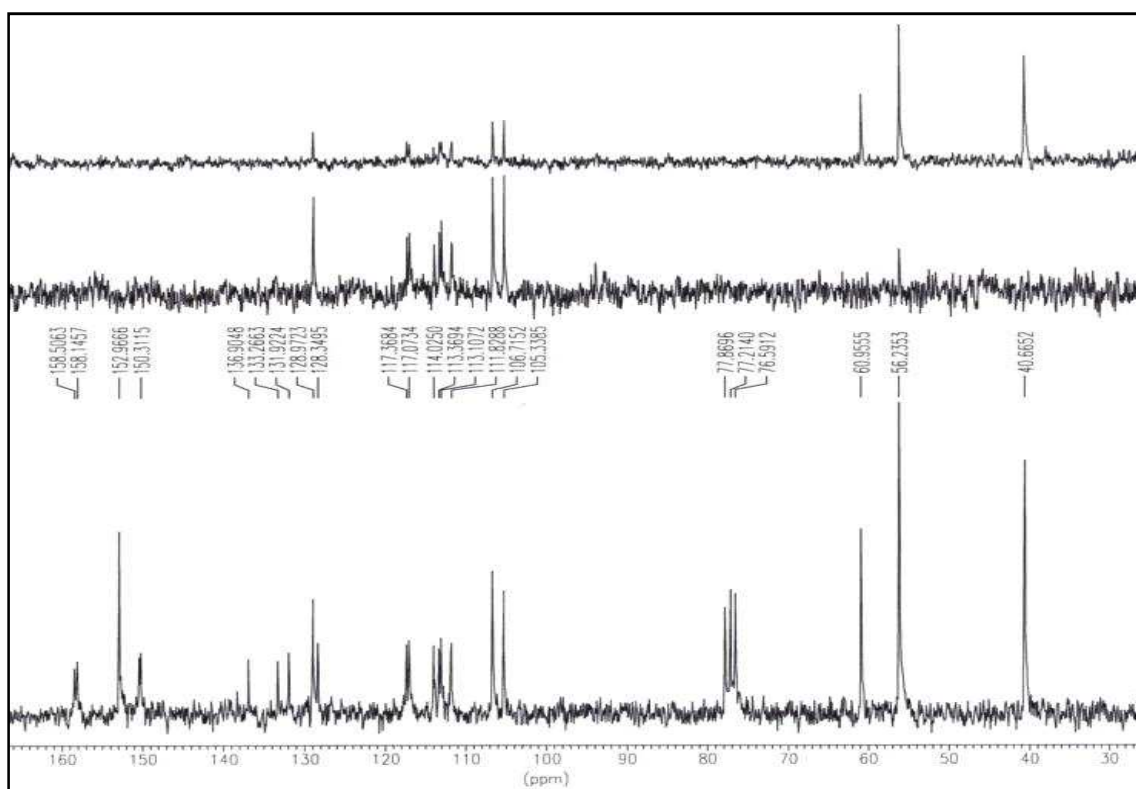
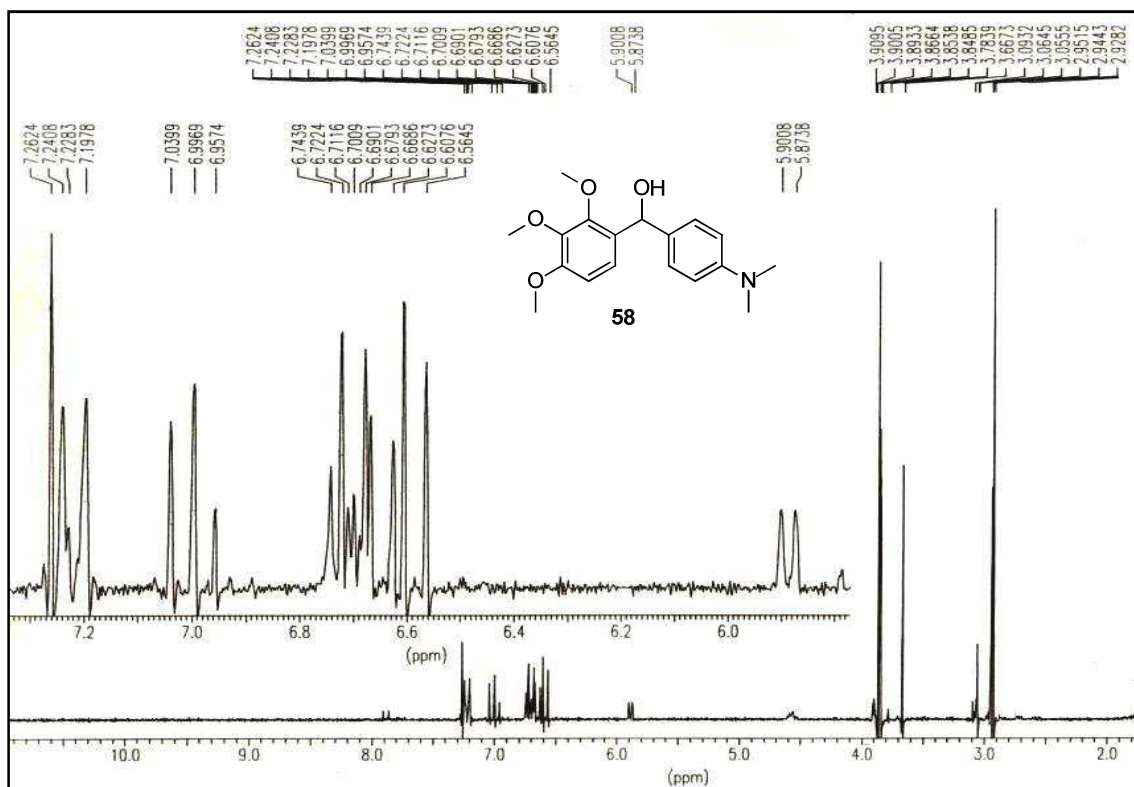


Figura XLIXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **57**.

Figura L: Espectro de RMN ^1H del compuesto **58**.

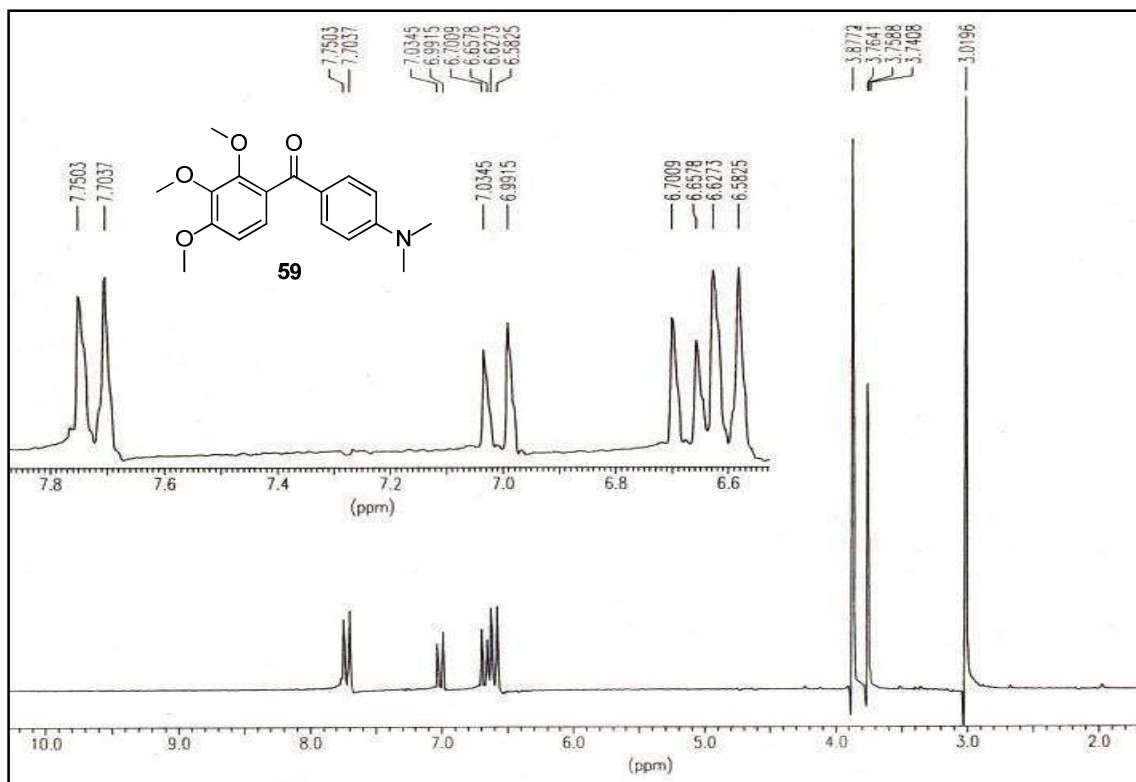


Figura LIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **59**.

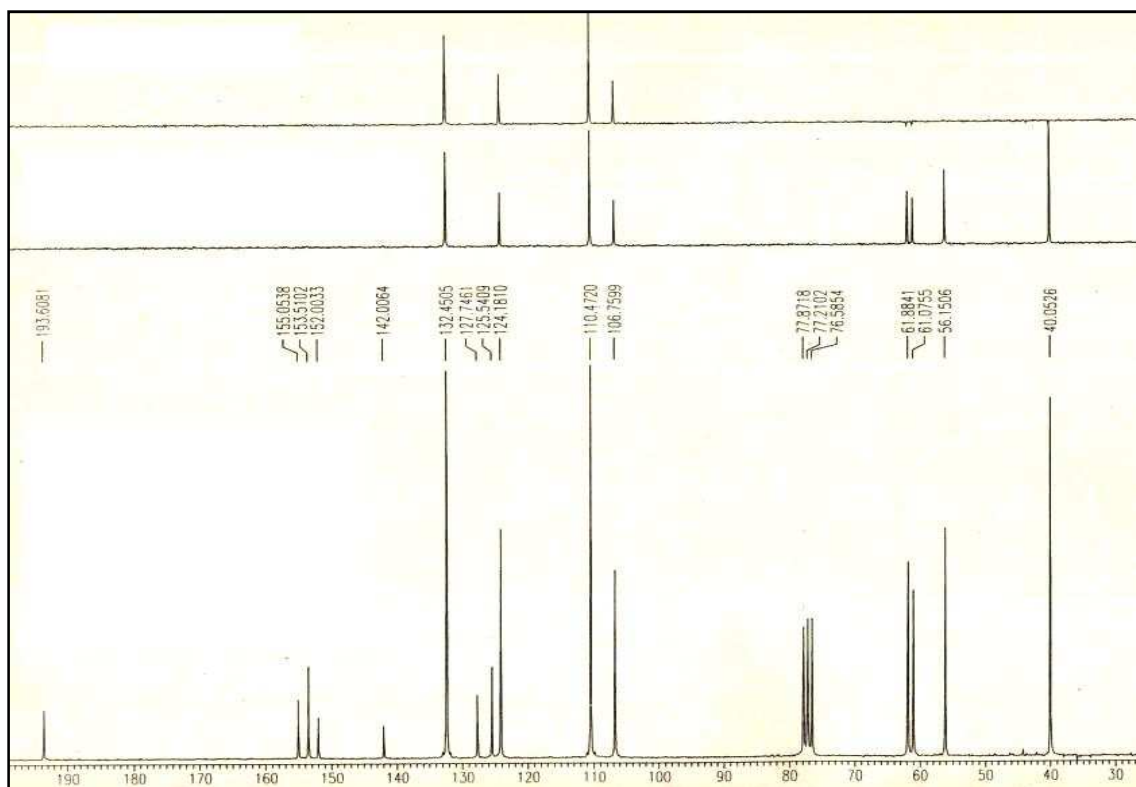
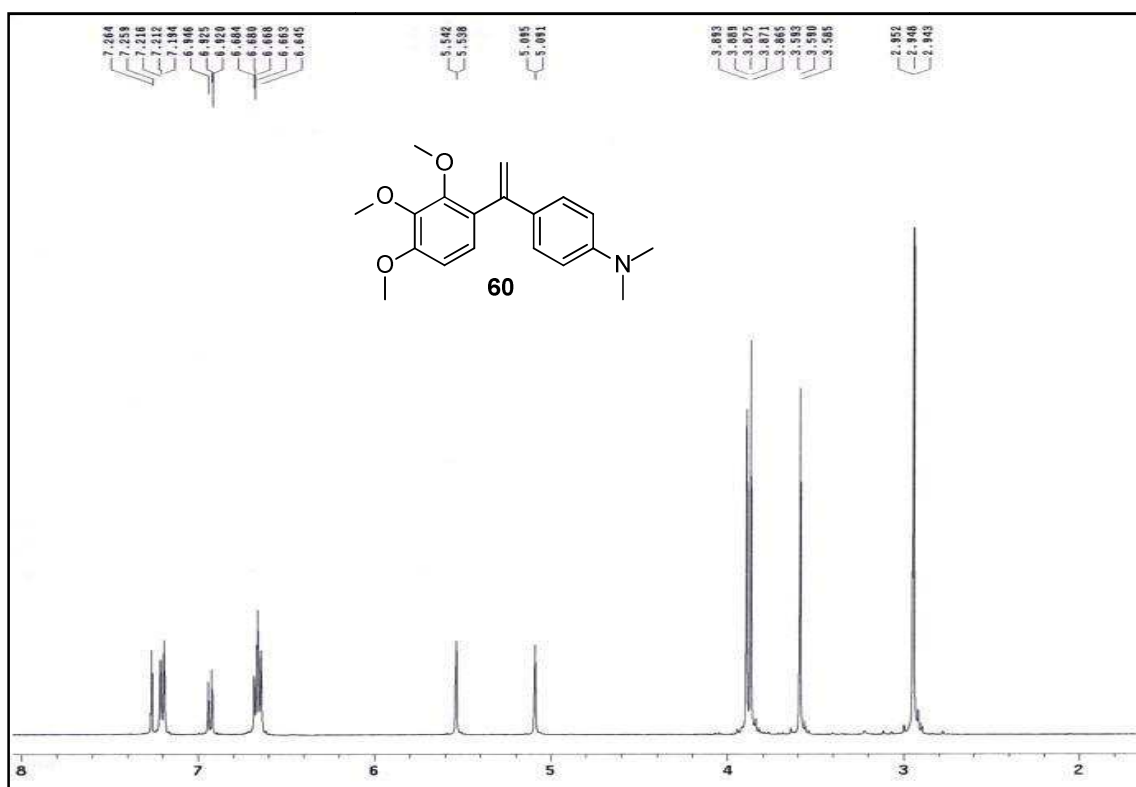
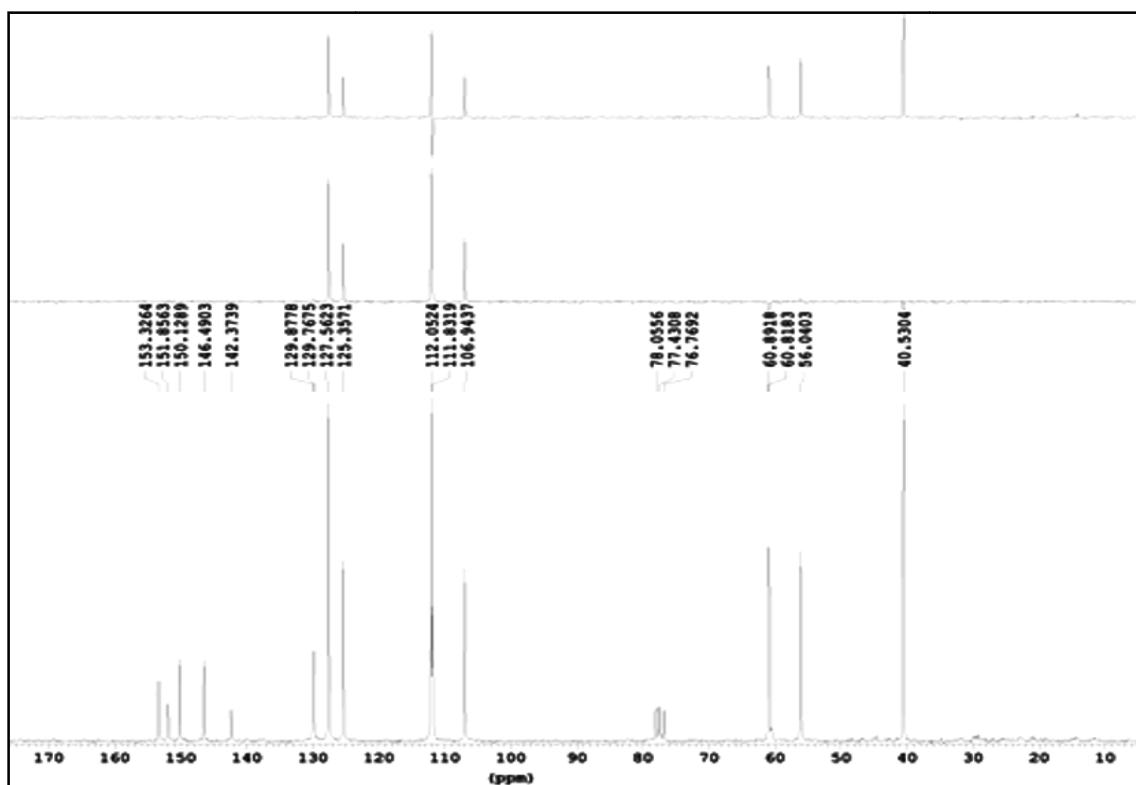


Figura LIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **59**.

Figura LIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **60**.Figura LIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **60**.

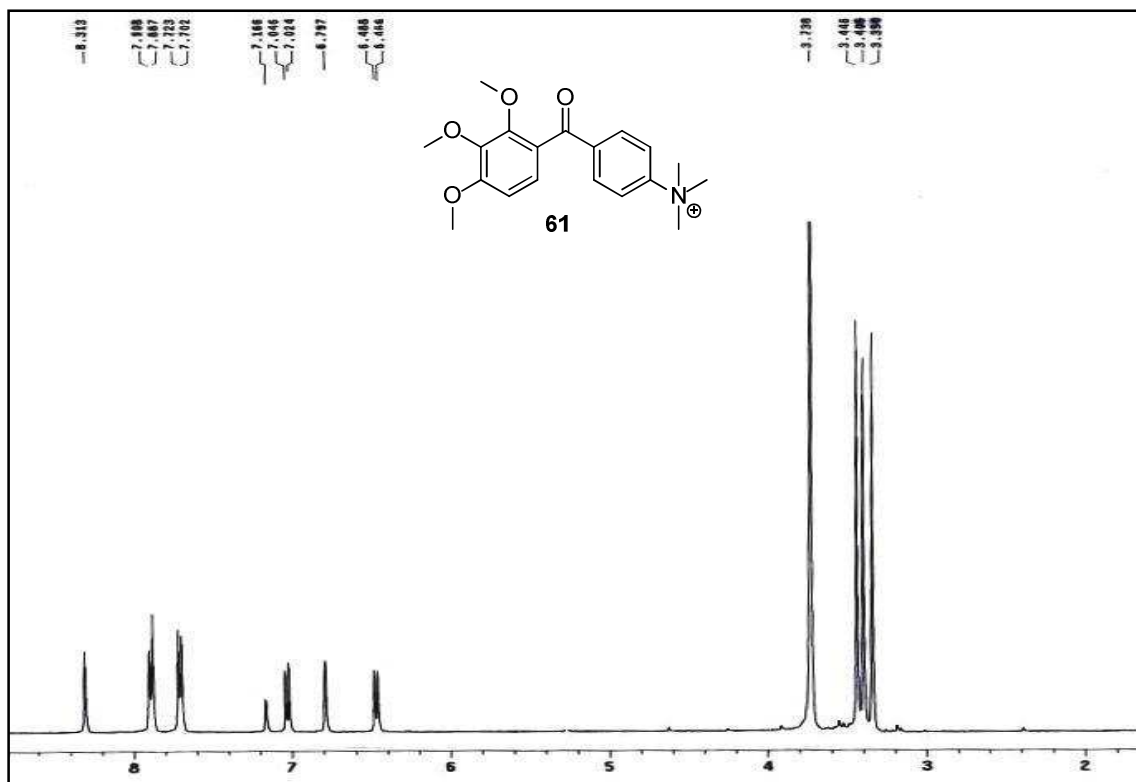


Figura LIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **61**.

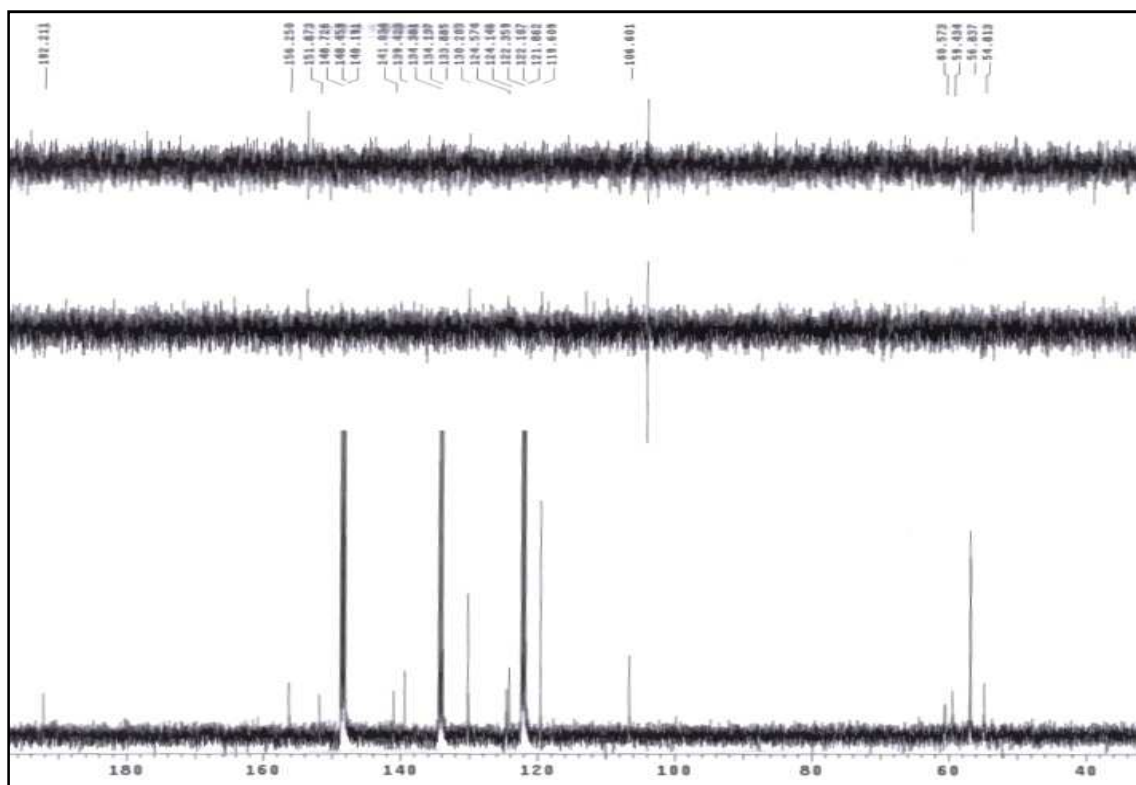
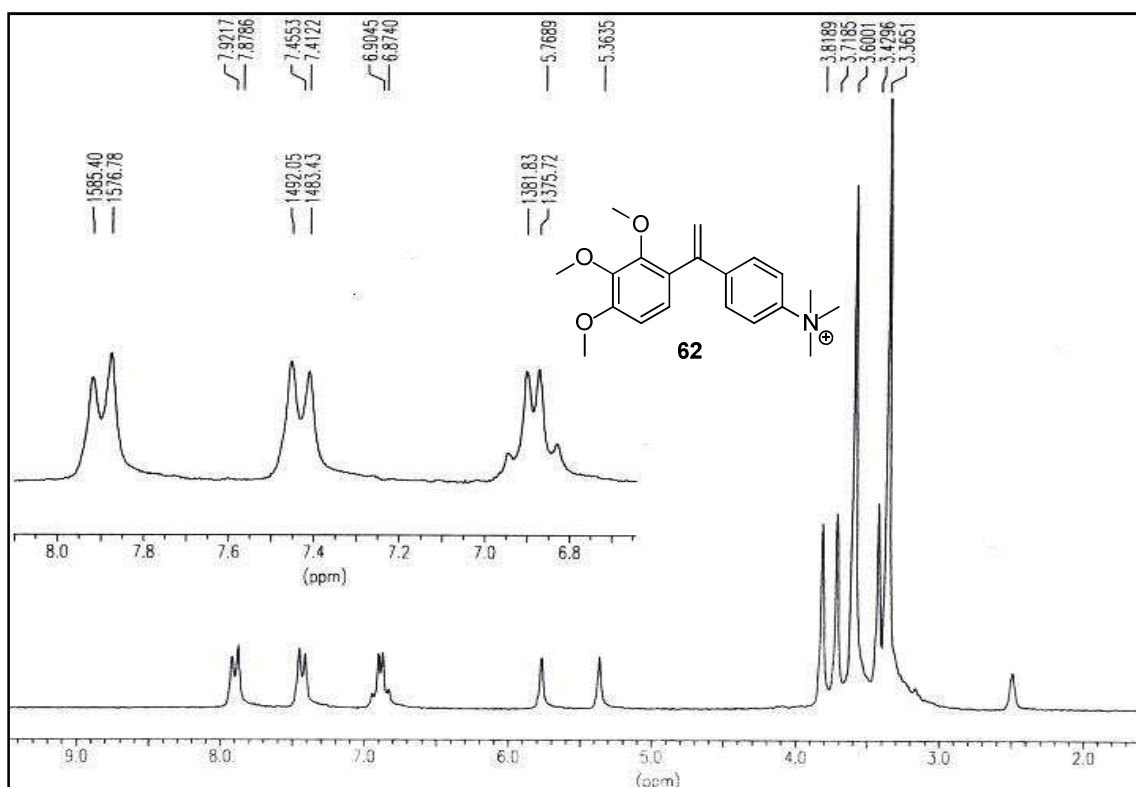
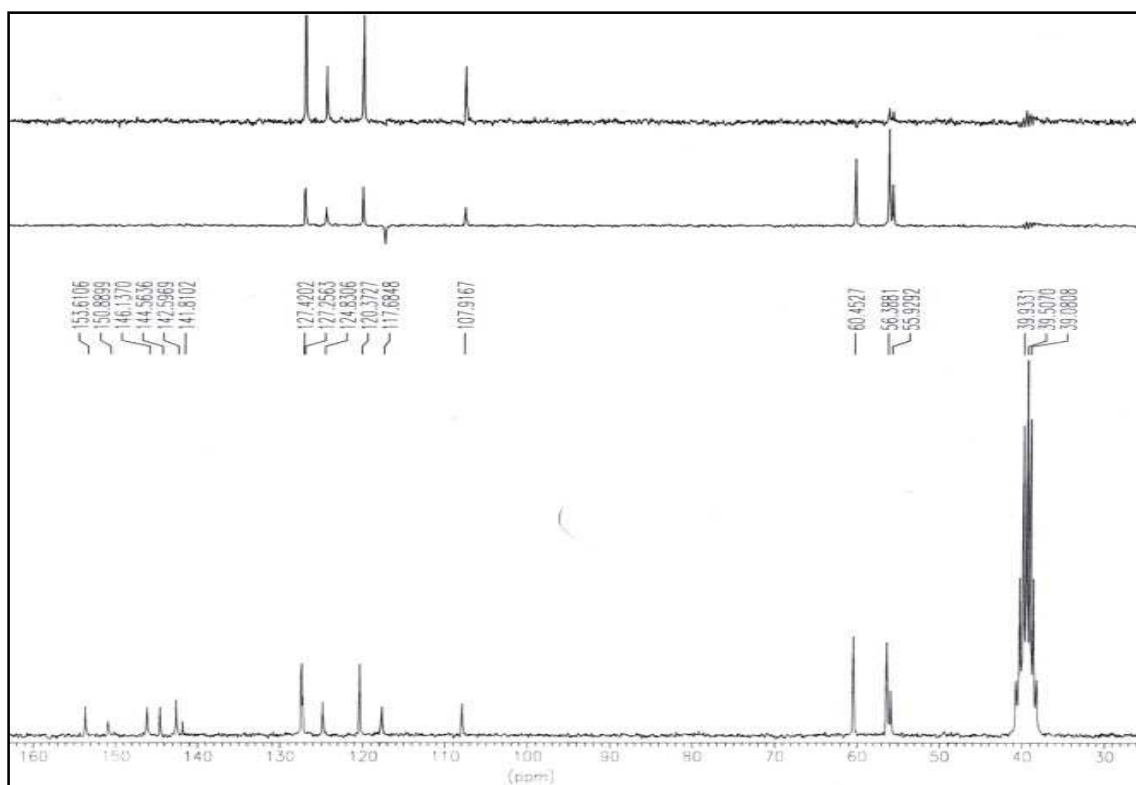


Figura LIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **61**.

Figura LIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **62**.Figura LIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **62**.

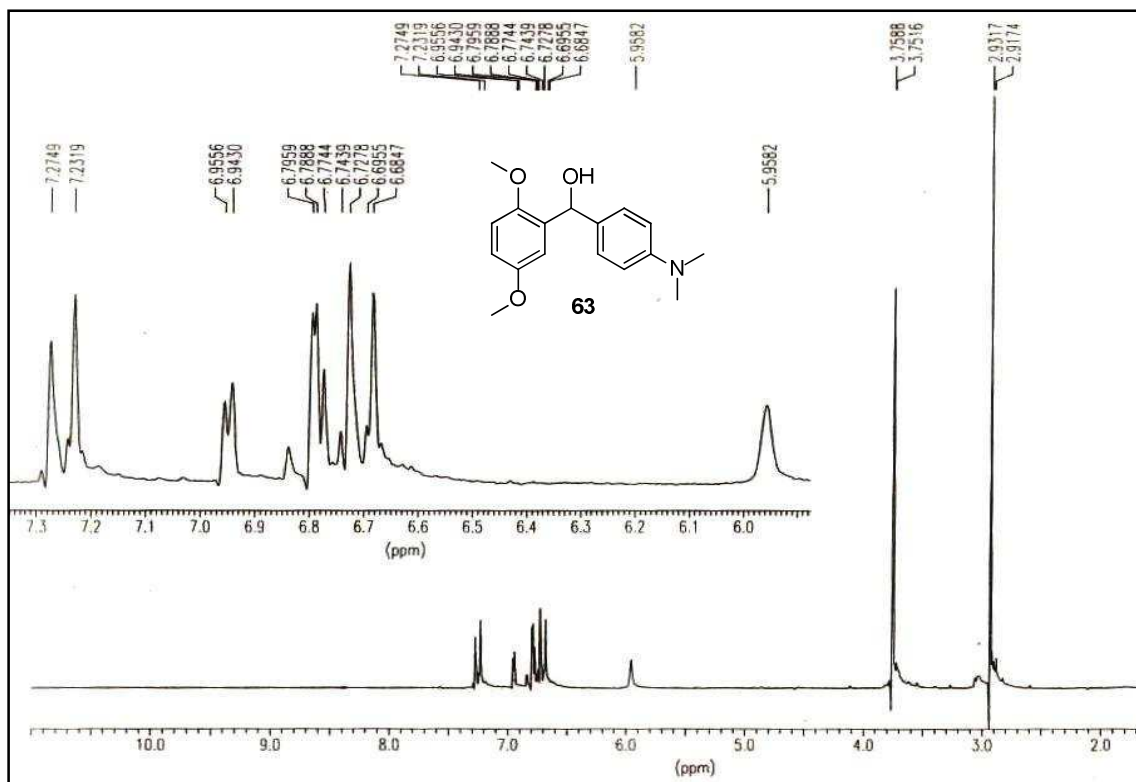


Figura LVa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **63**.

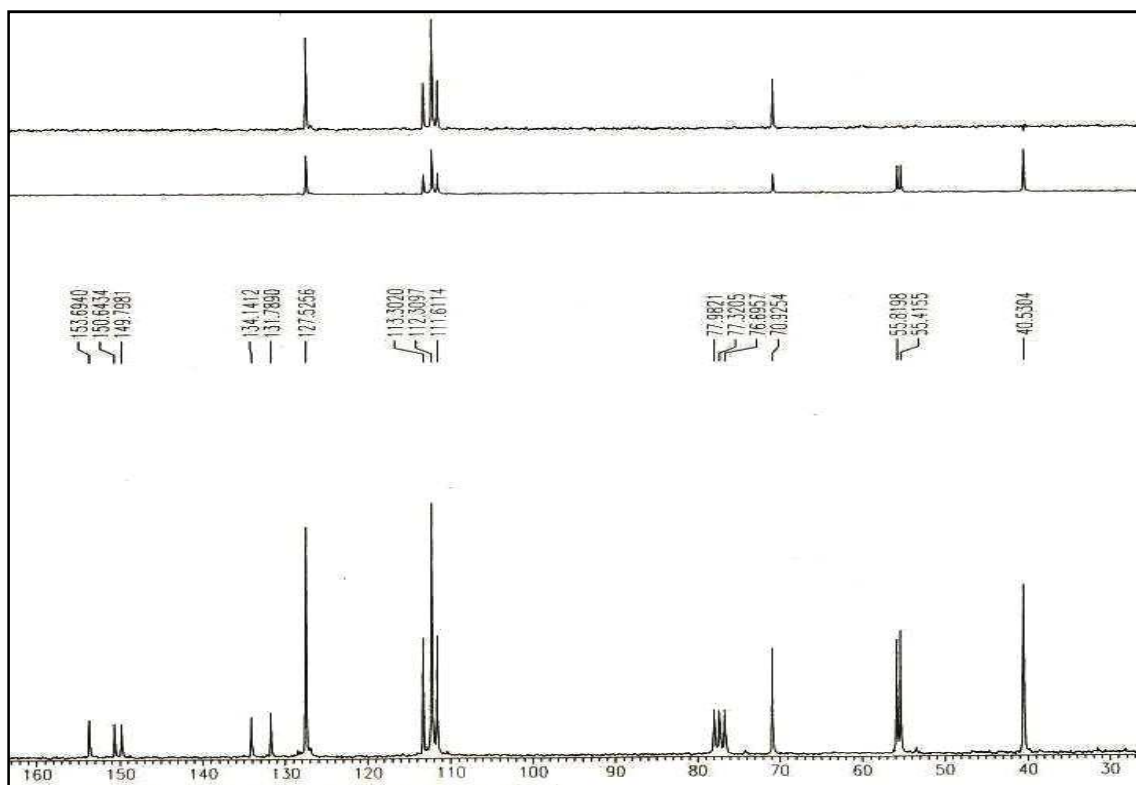
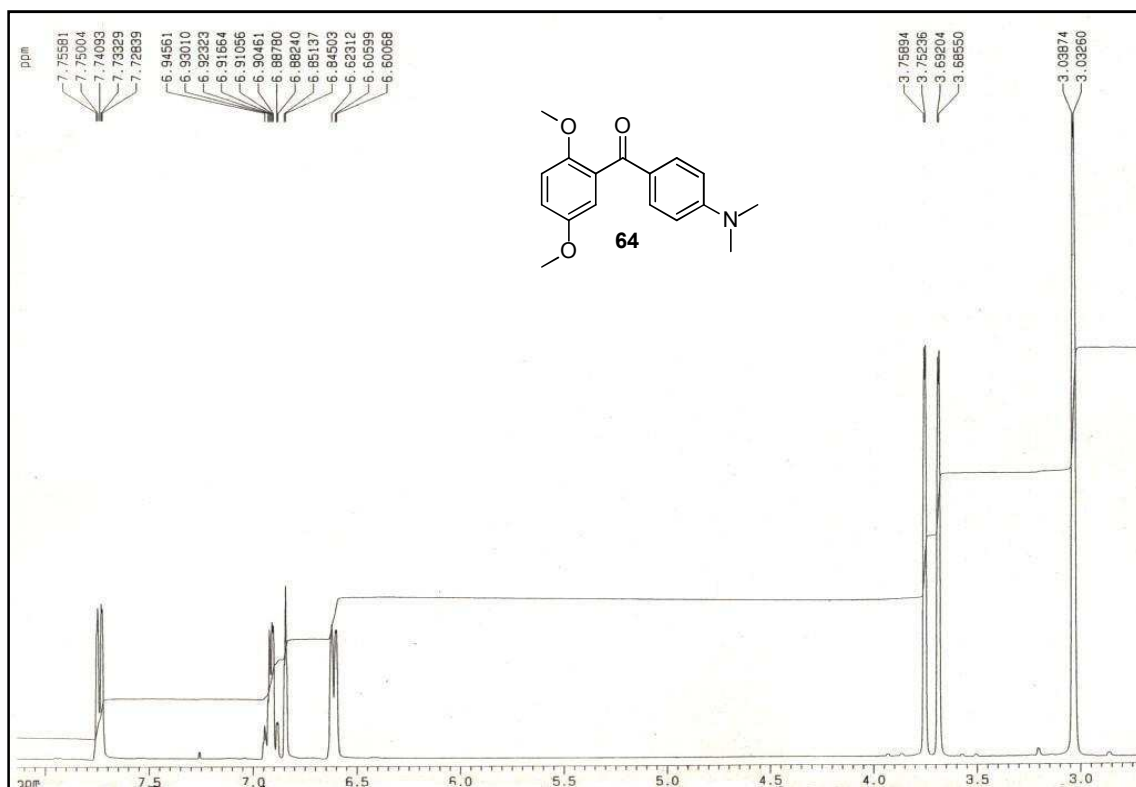
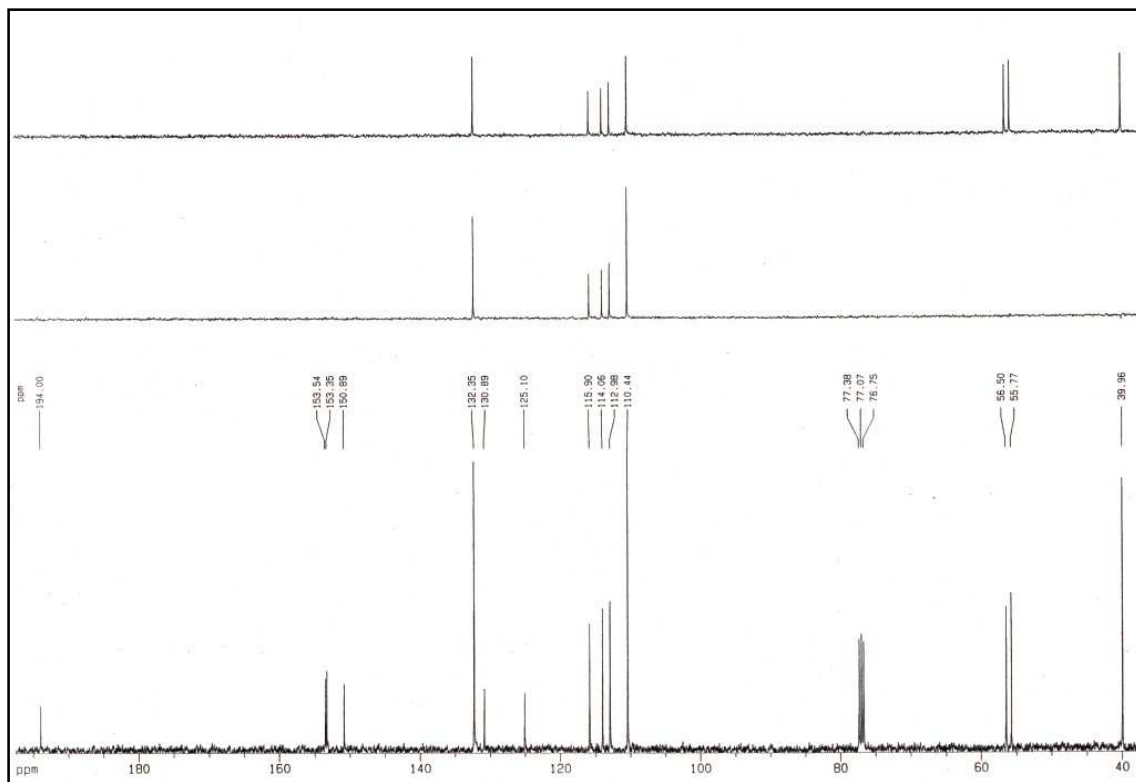


Figura LVb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **63**.

Figura LVia: Espectro de RMN ^1H del compuesto **64**.Figura LVib: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **64**.

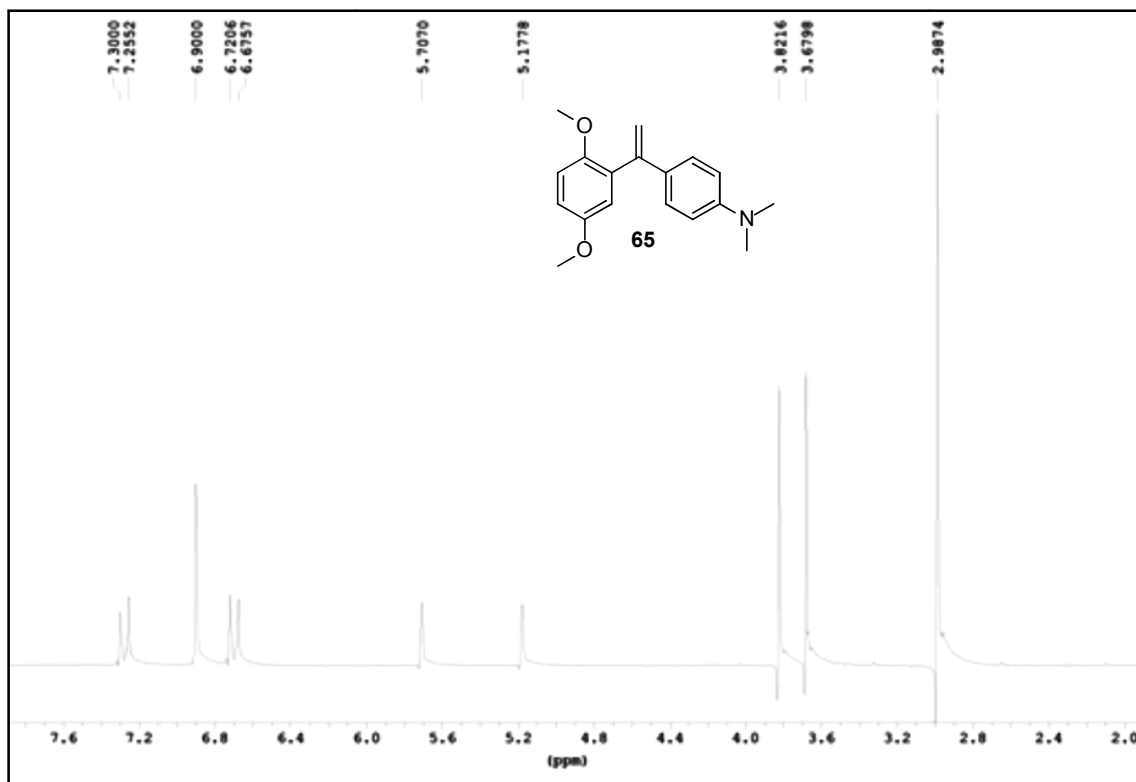


Figura LVIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **65**.

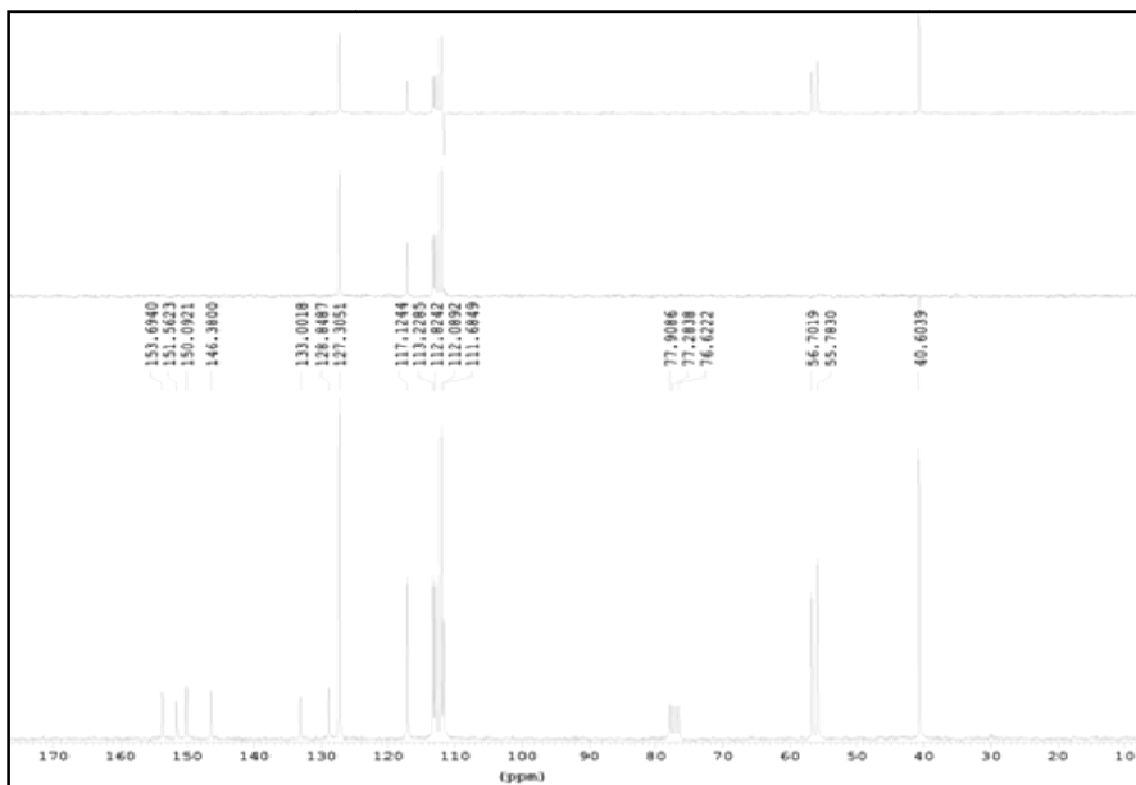


Figura LVIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **65**.

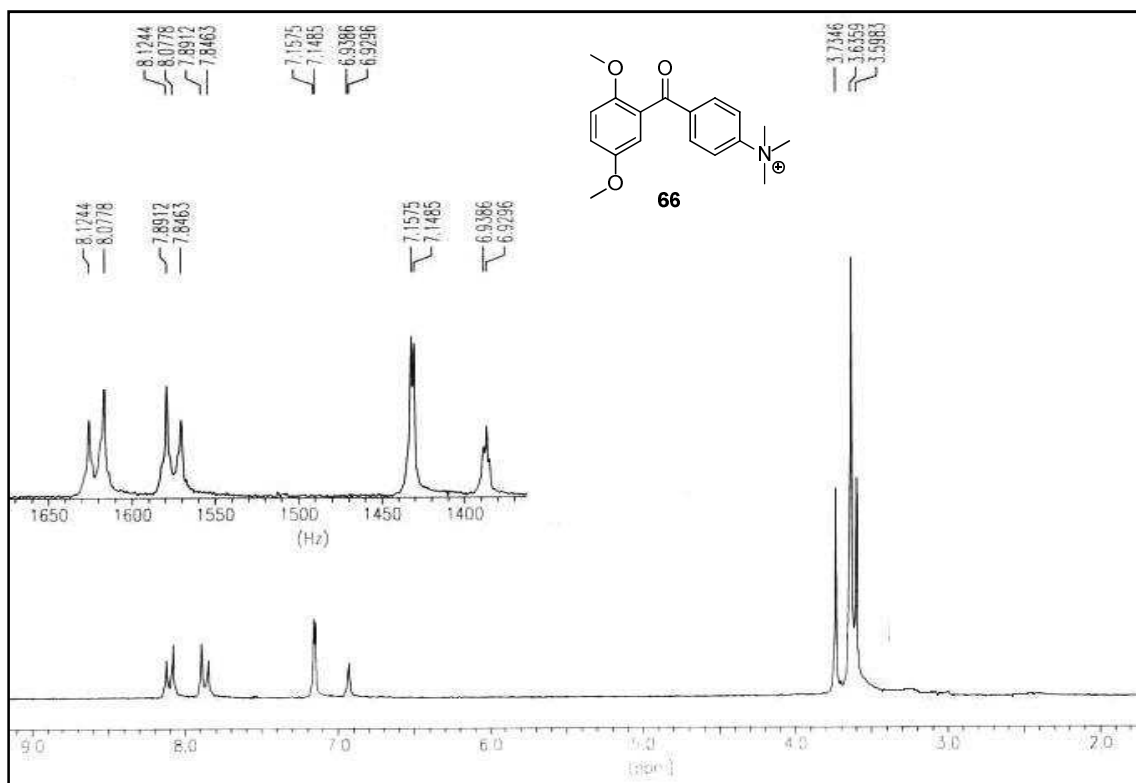


Figura LVIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **66**.

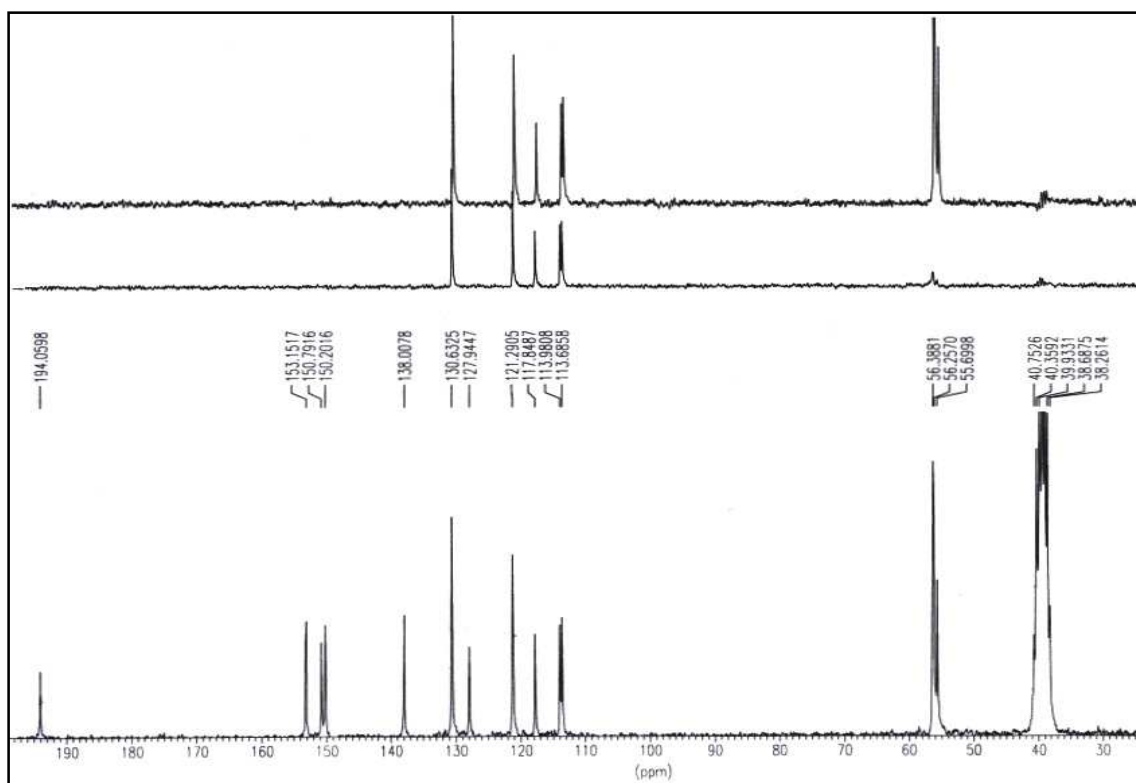


Figura LVIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **66**.

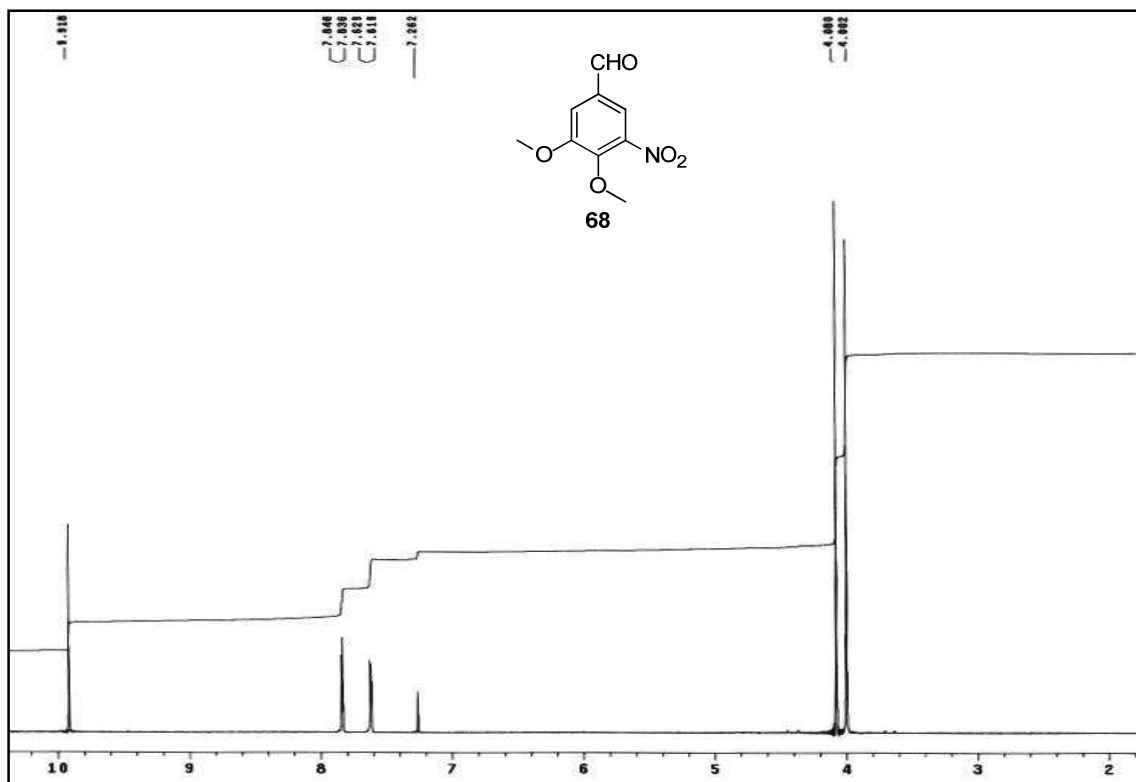


Figura LIXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **68**.

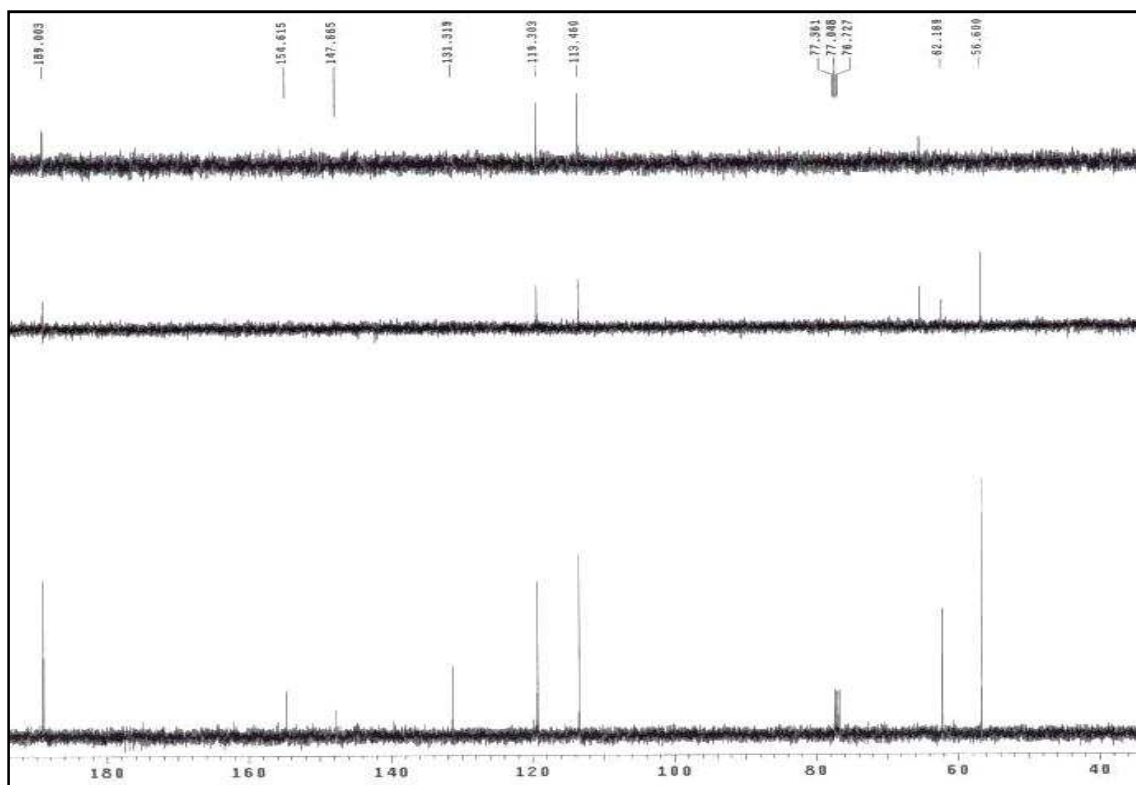
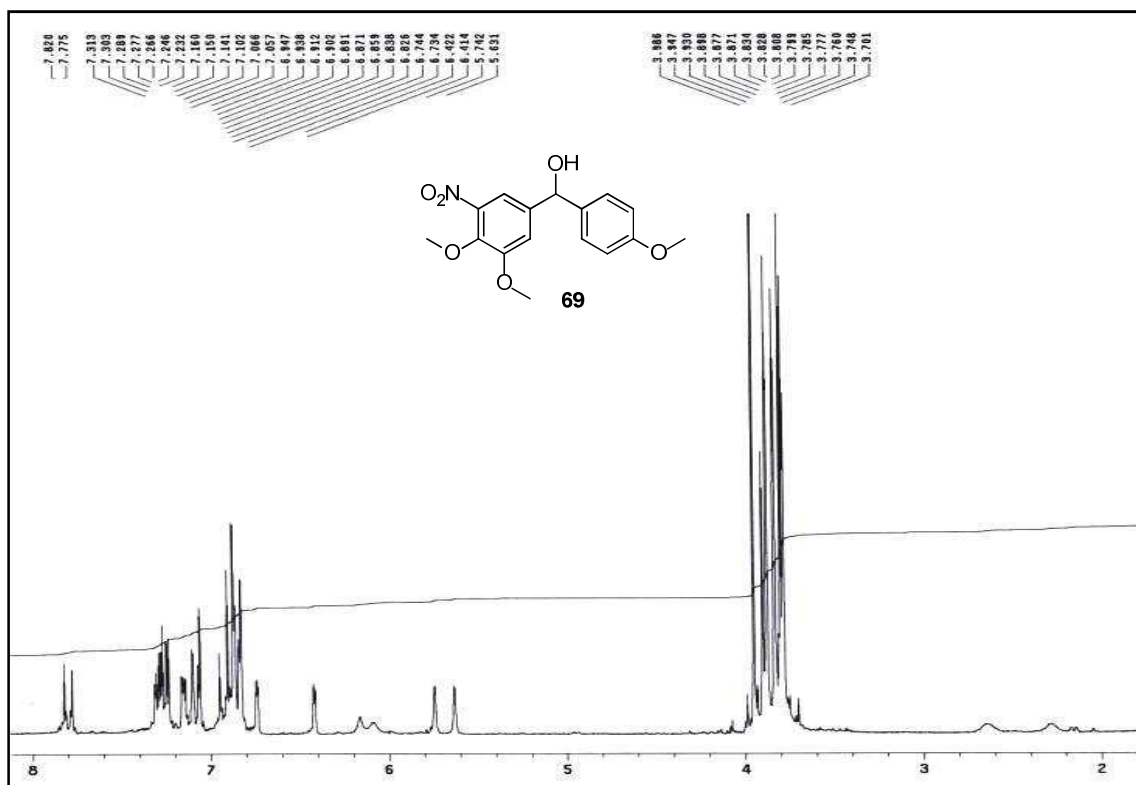


Figura LIXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **68**.

Figura LX: Espectro de RMN ^1H del compuesto **69**.

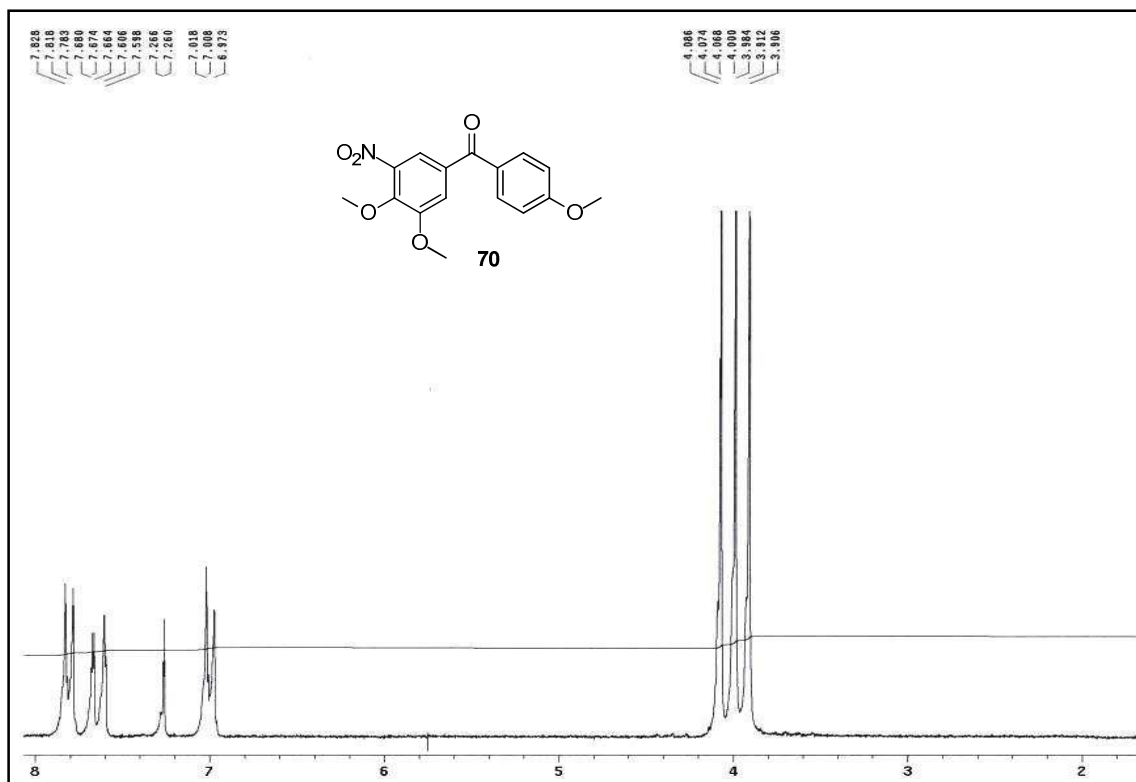


Figura LXIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **70**.

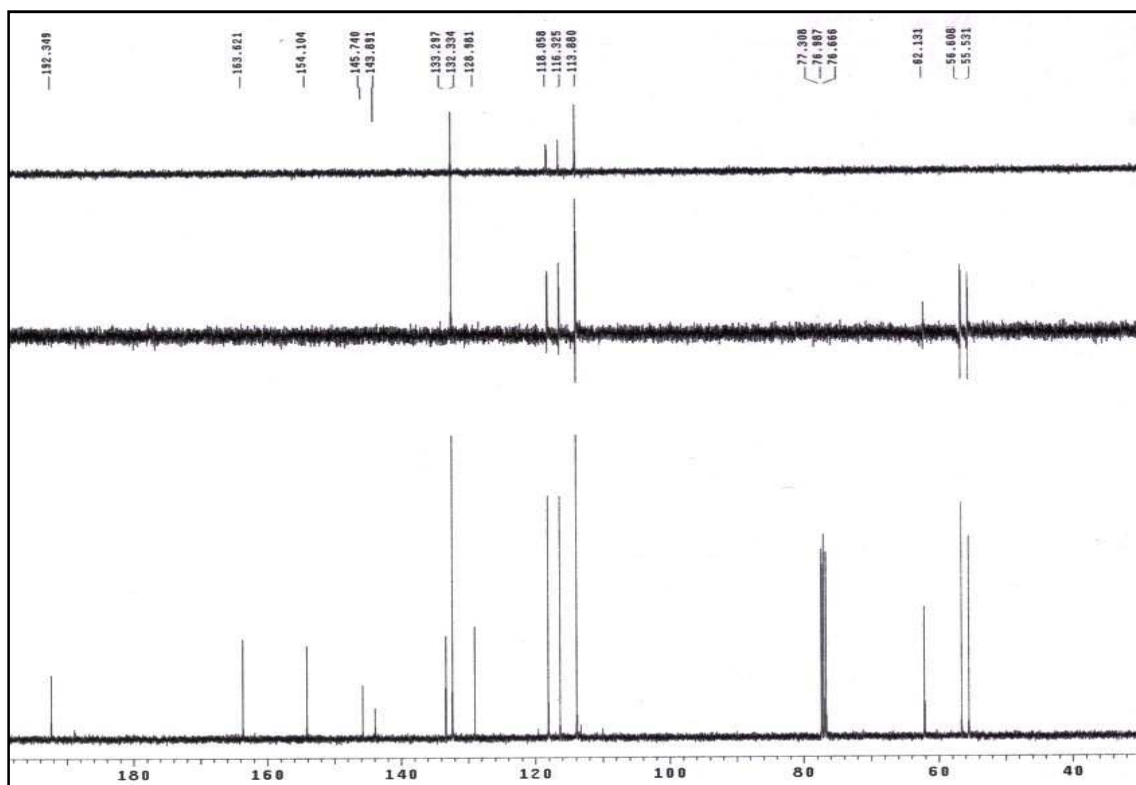
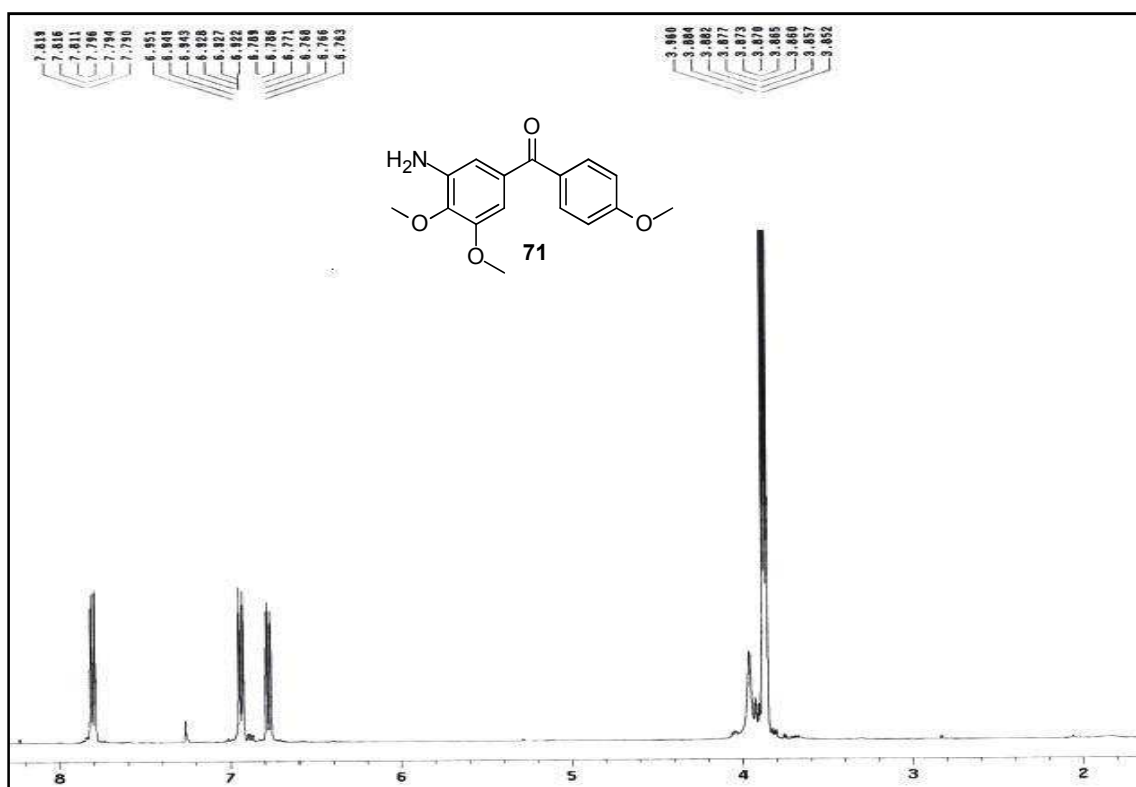
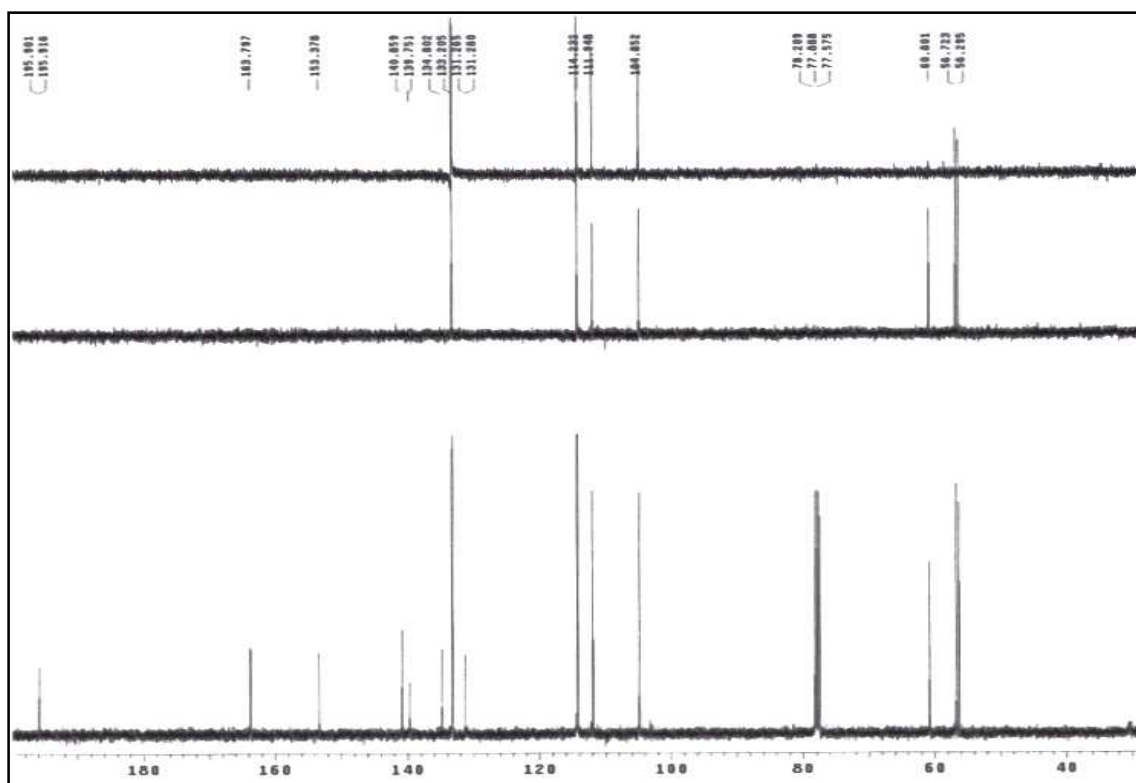


Figura LXIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **70**.

Figura LXIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **71**.Figura LXIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **71**.

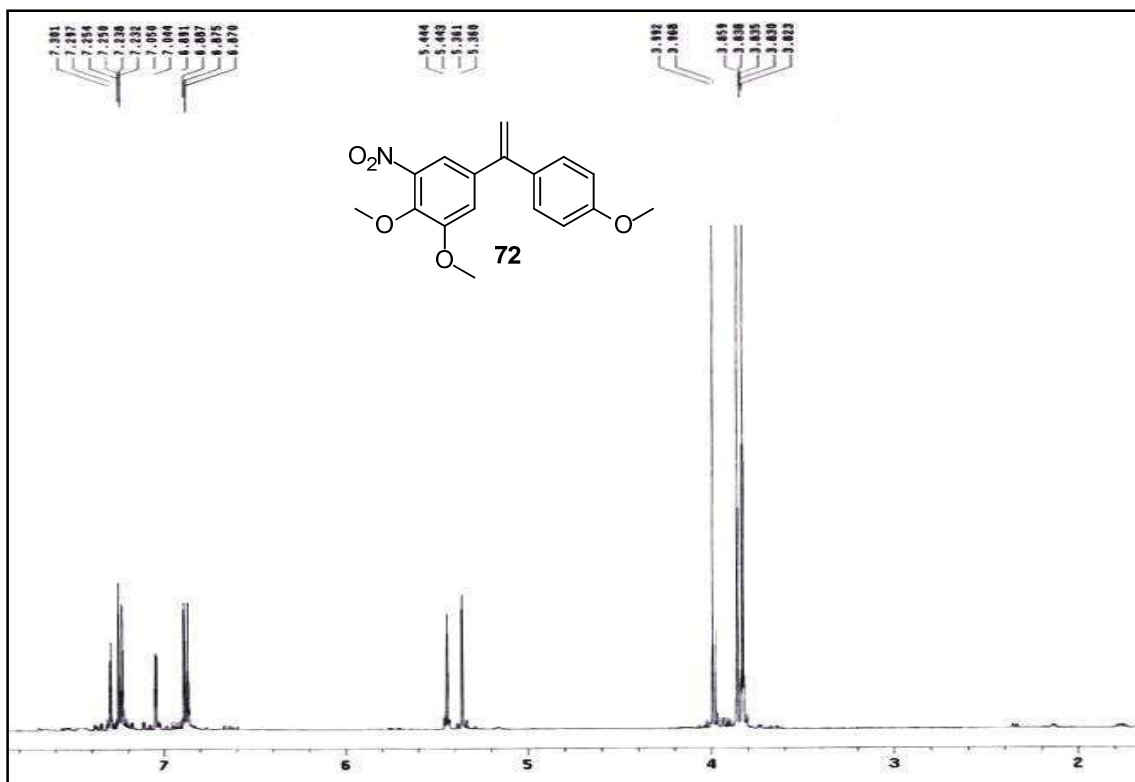


Figura LXIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **72**.

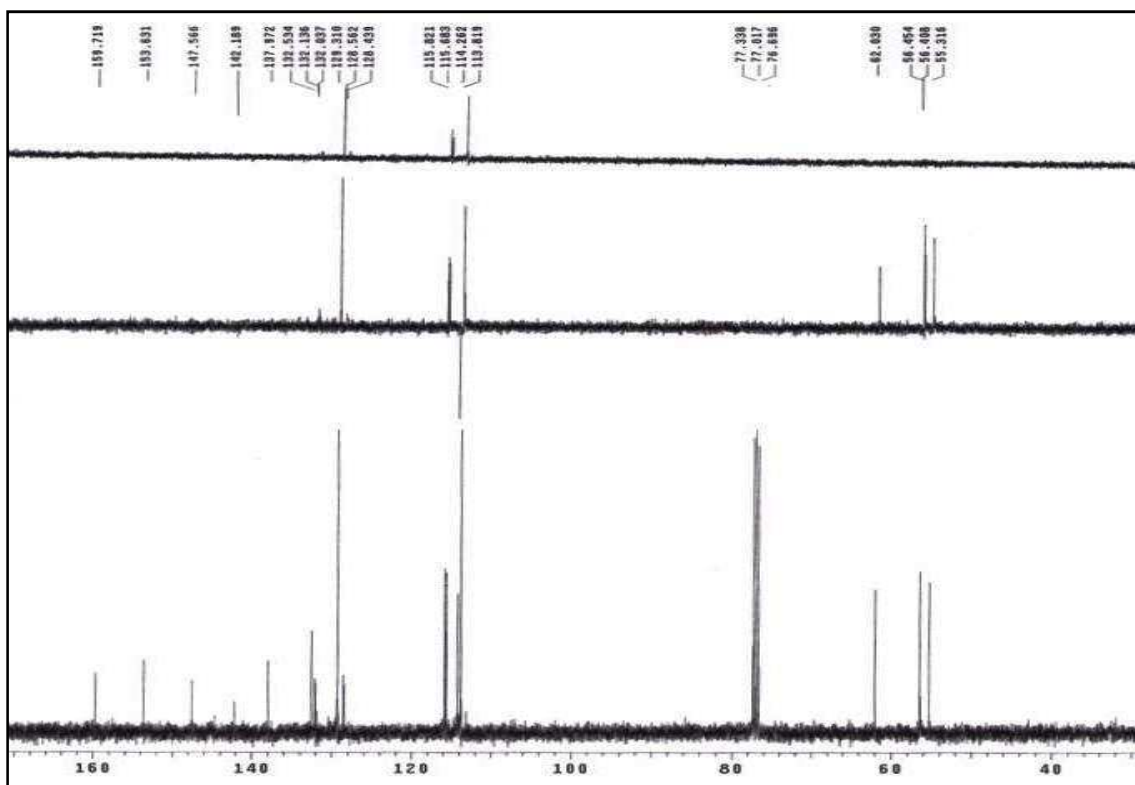
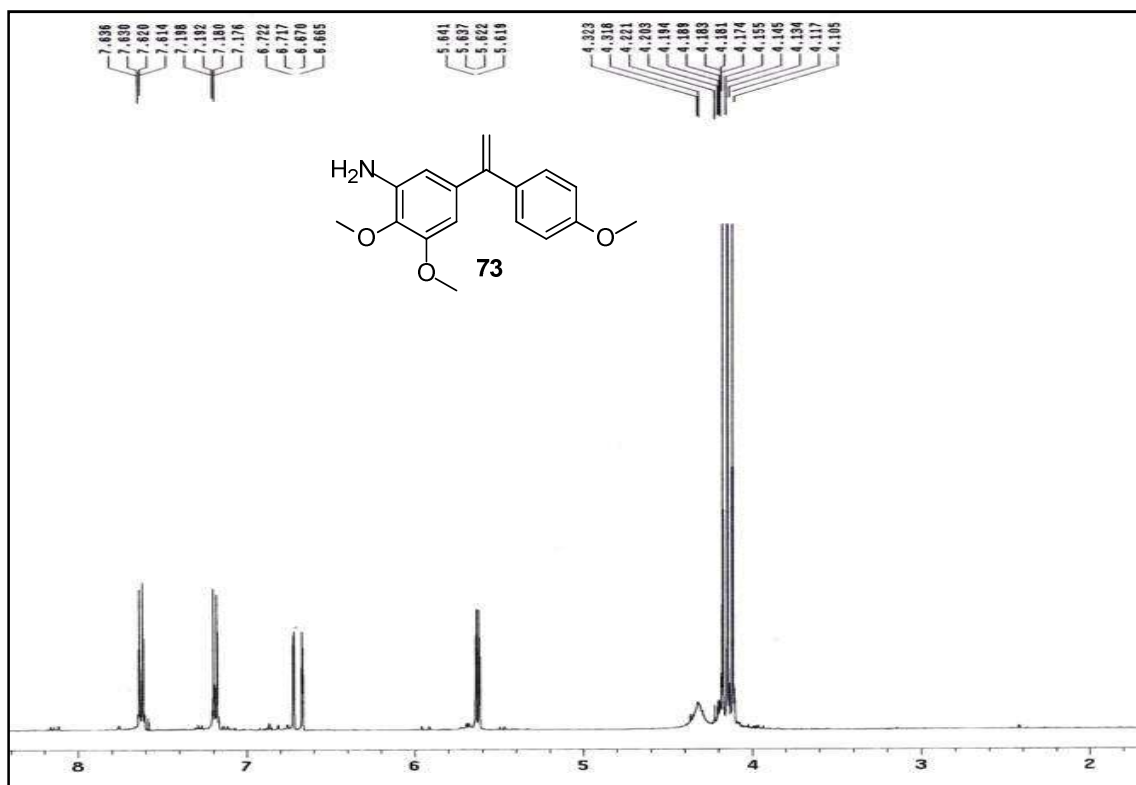
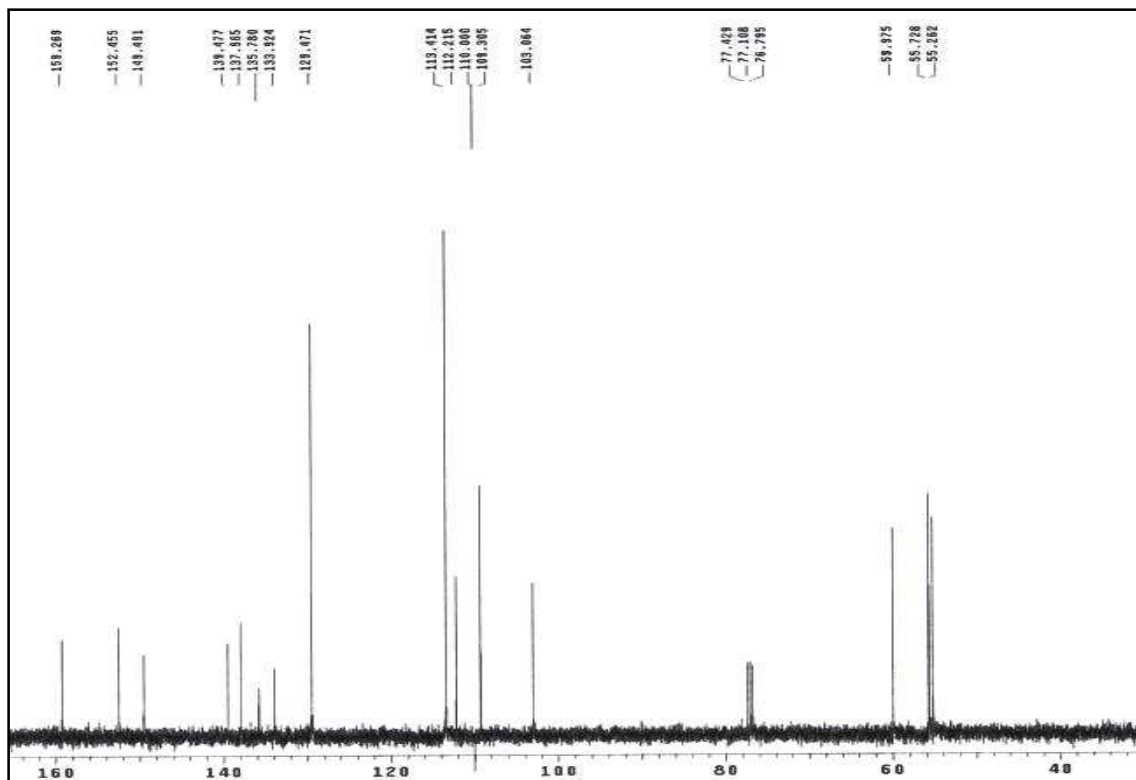


Figura LXIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **72**.

Figura LXIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **73**.Figura LXIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **73**.

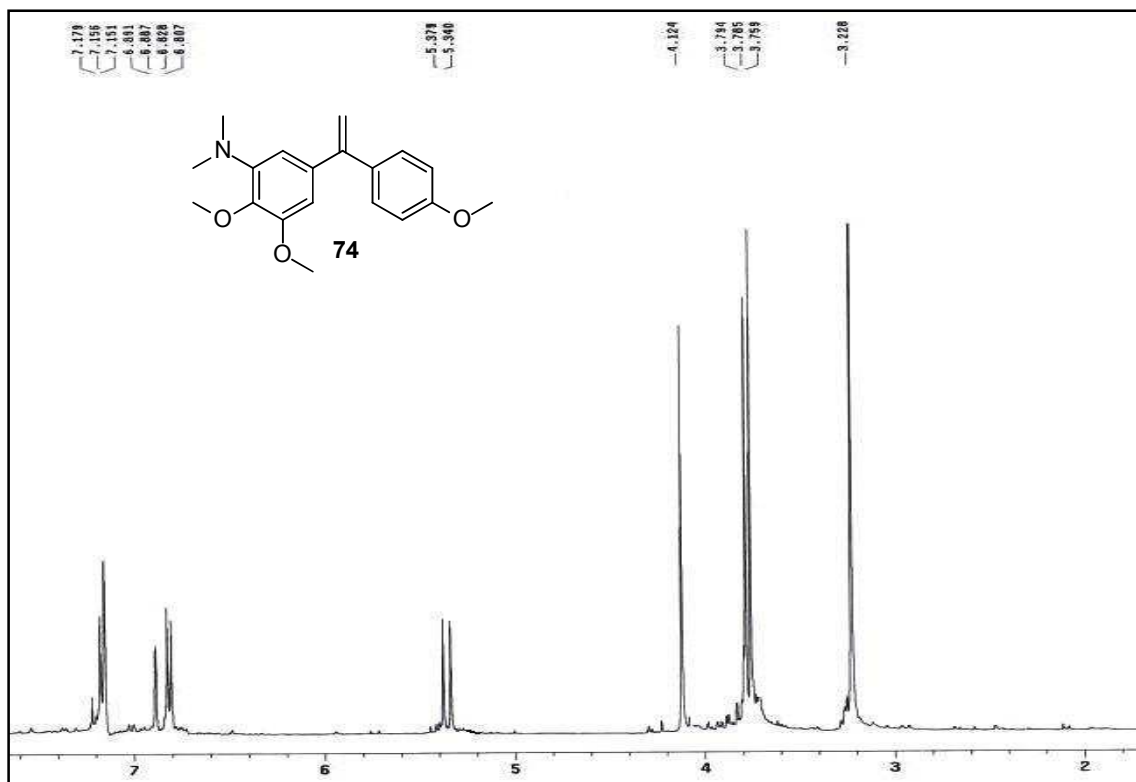


Figura LXVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **74**.

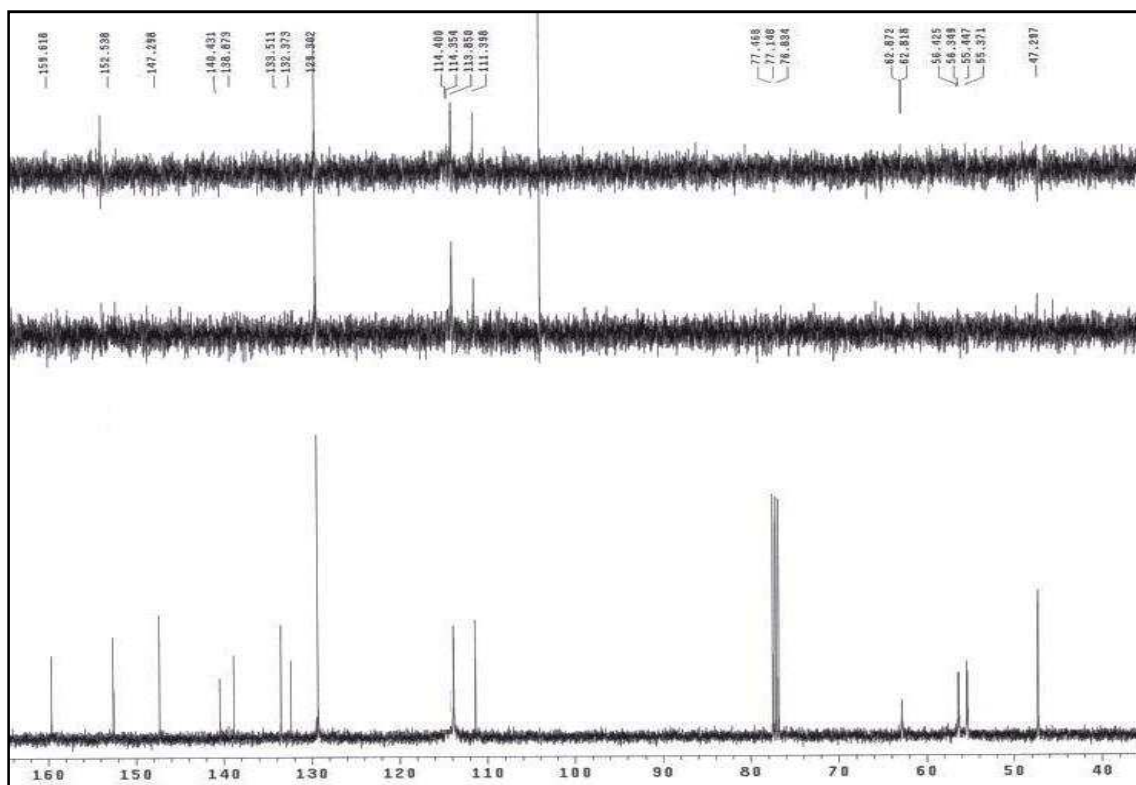
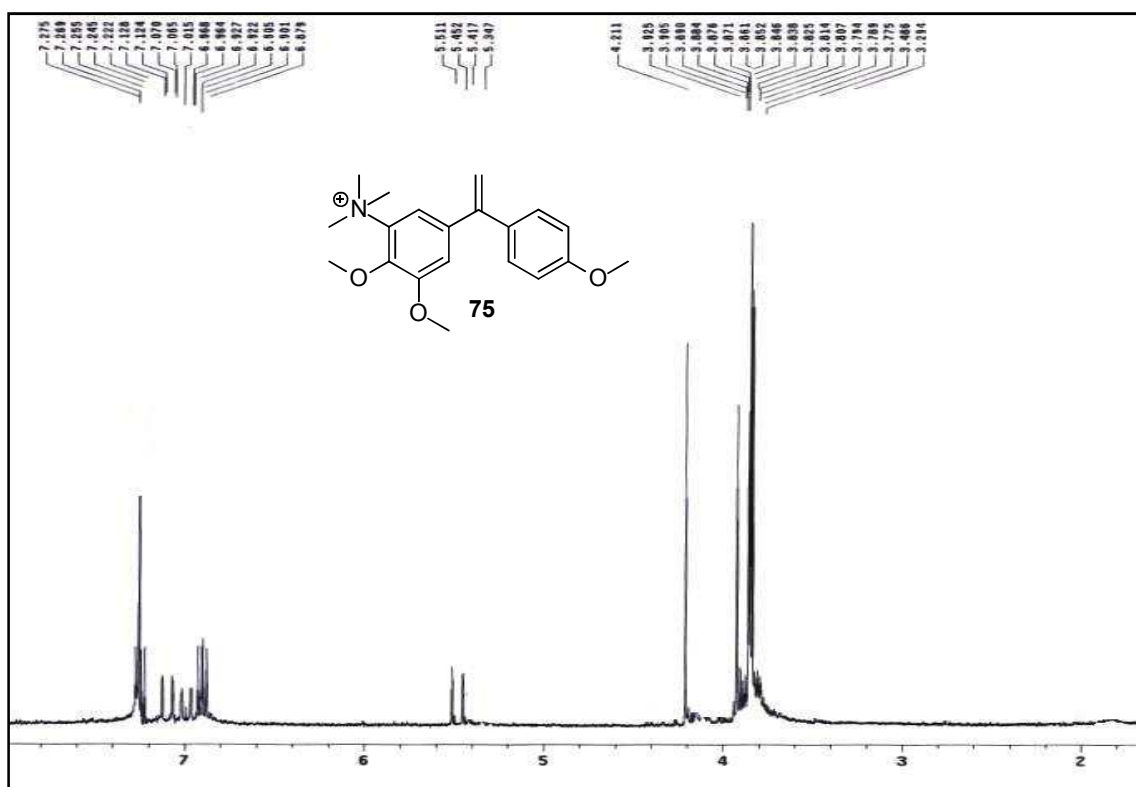


Figura LXVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **74**.

Figura LXVI: Espectro de RMN ^1H del compuesto **75**.

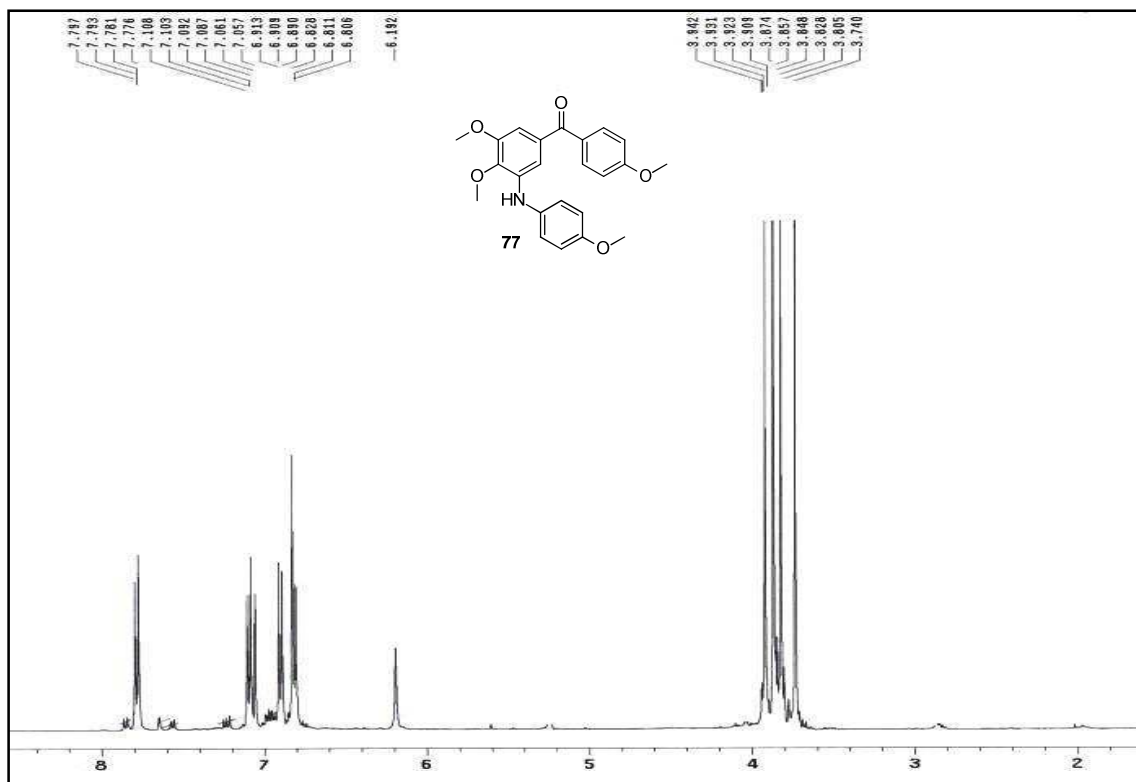


Figura LXVIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto 77.

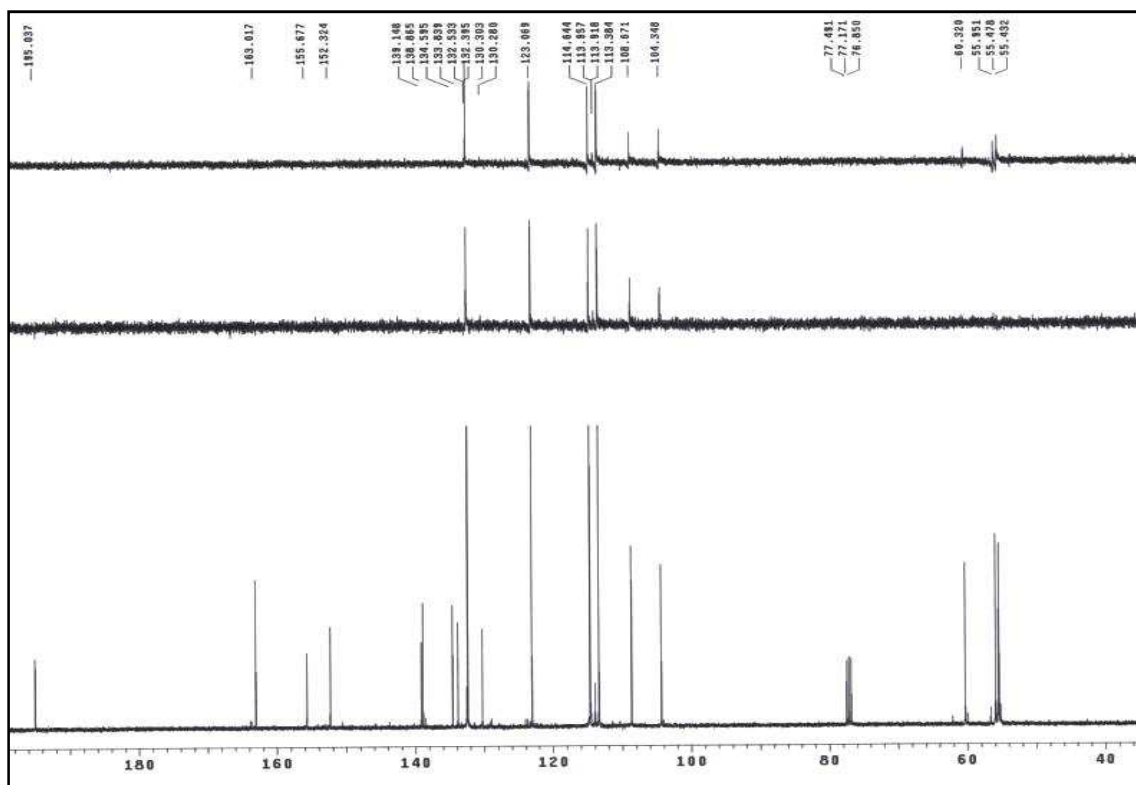
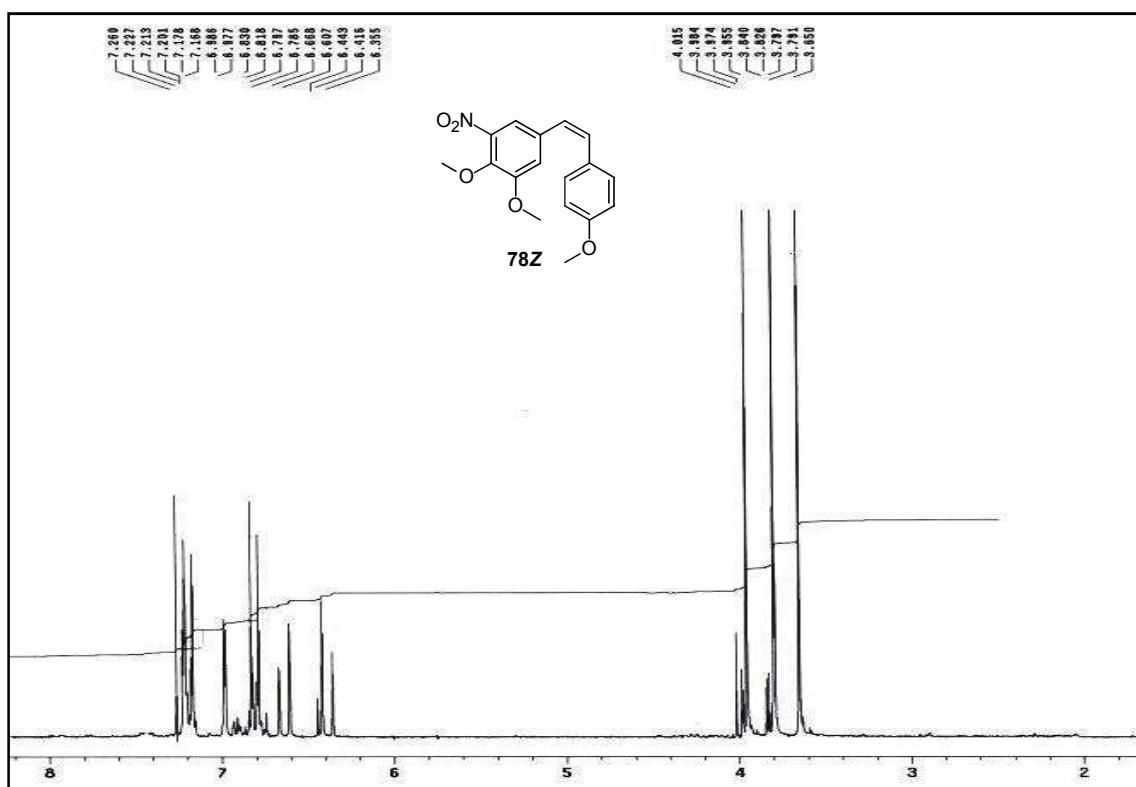
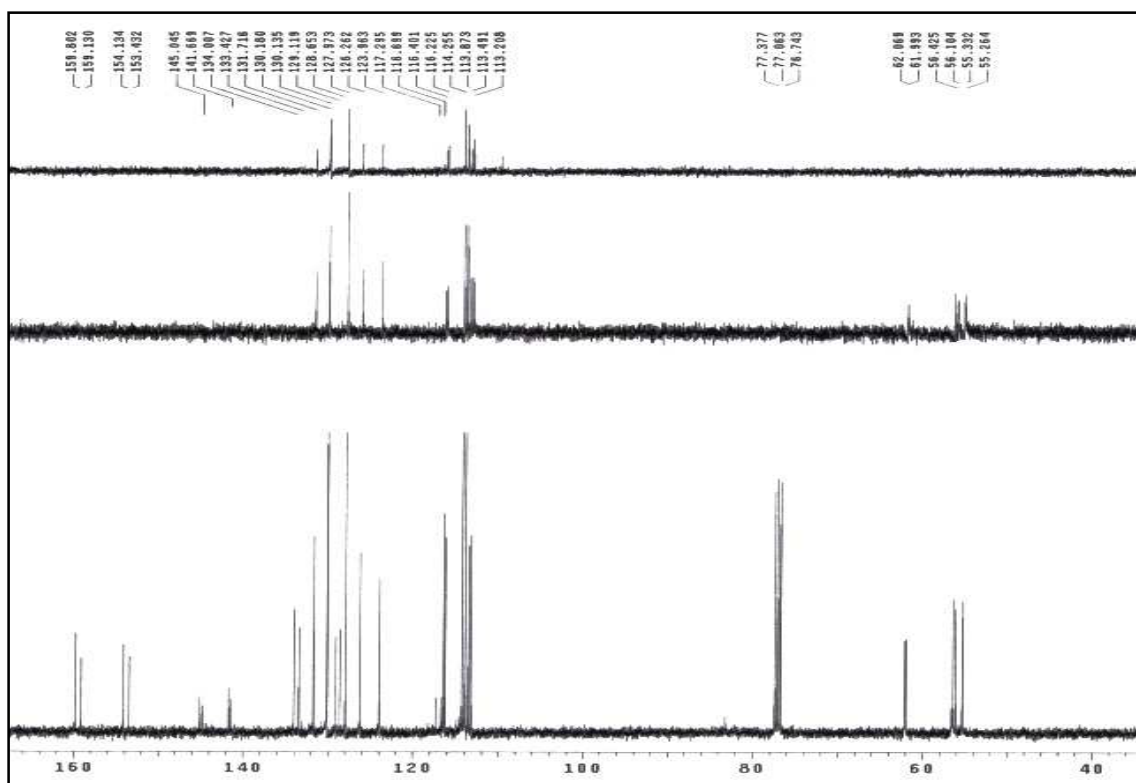


Figura LXVIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 77.

Figura LXVIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **78Z**.Figura LXVIIIa: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **78Z**.

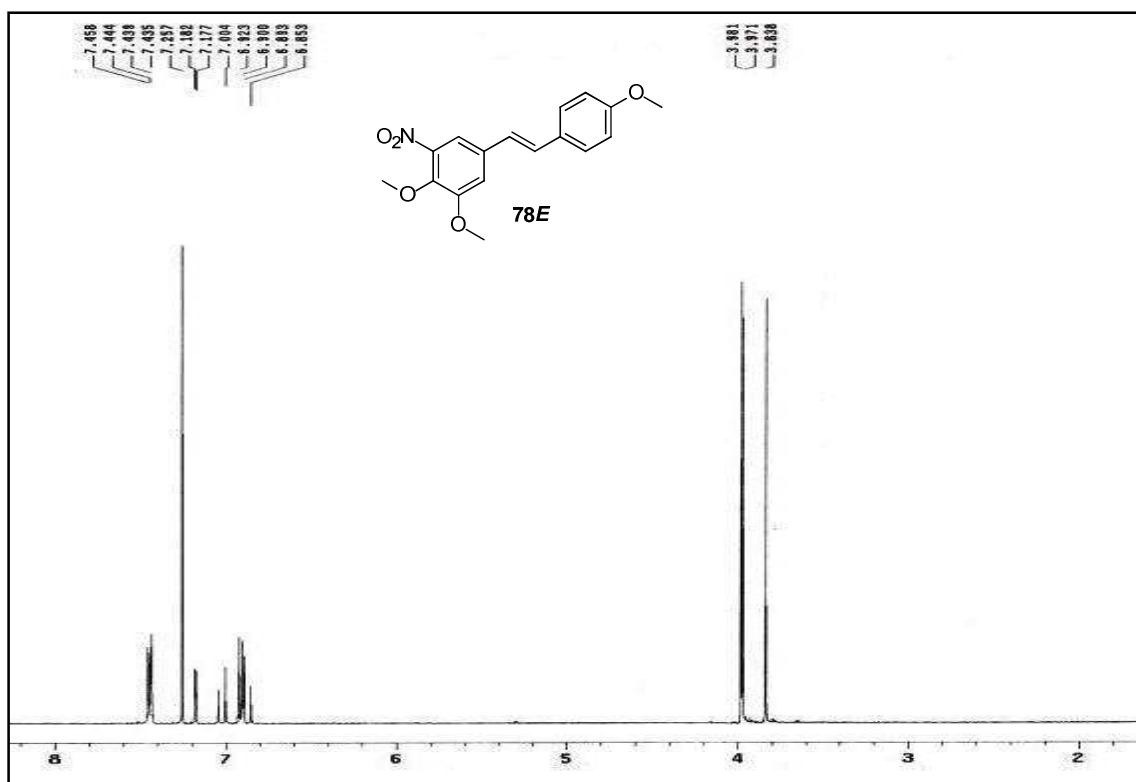


Figura LXVIIIc: Espectro de RMN ¹H del compuesto **78E**.

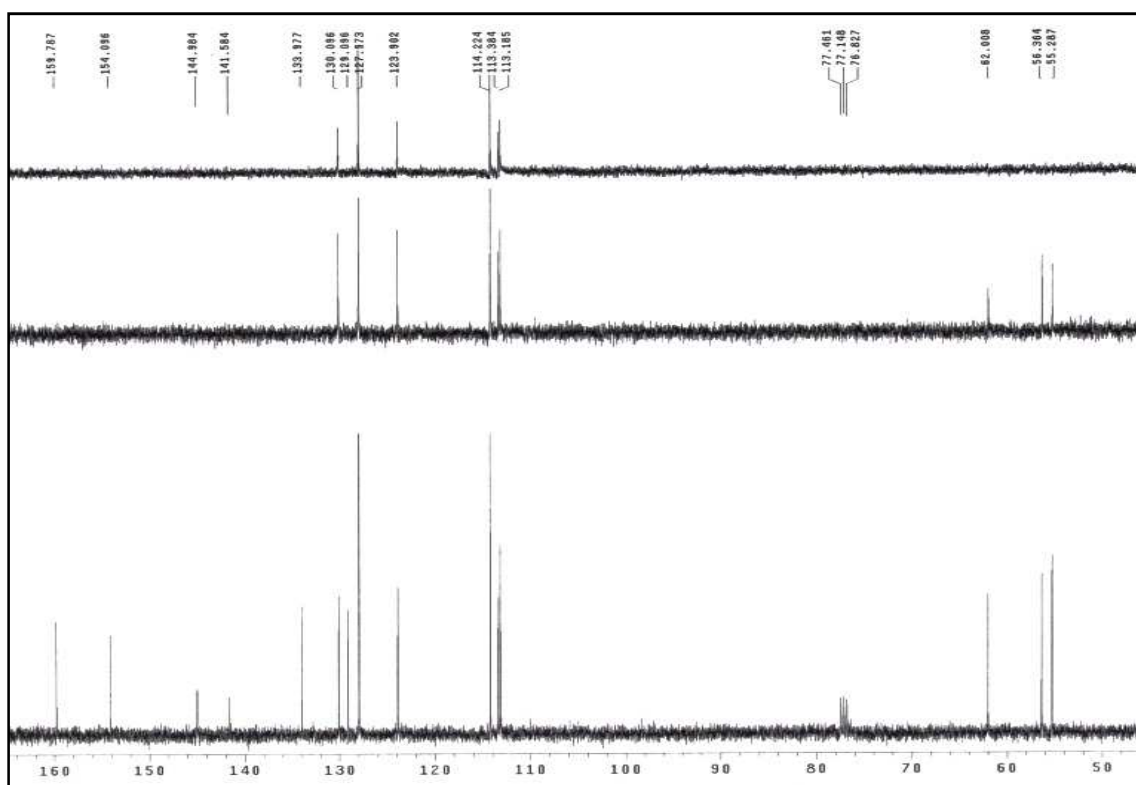
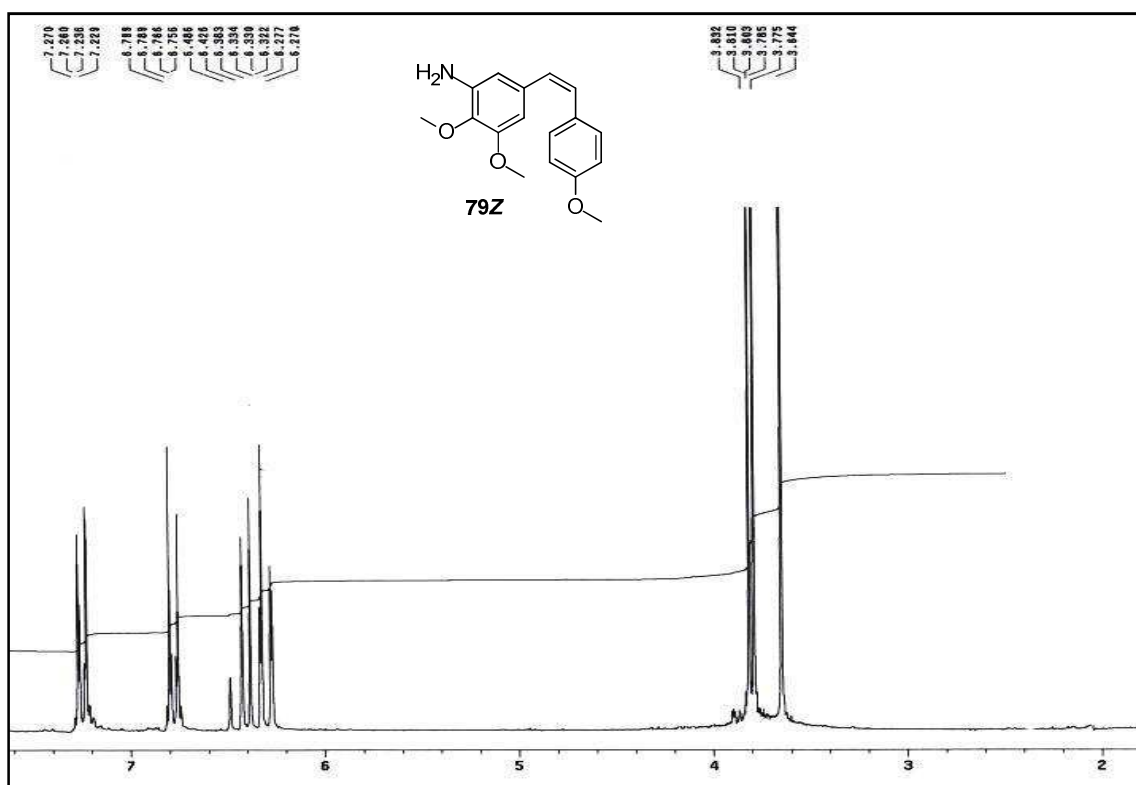
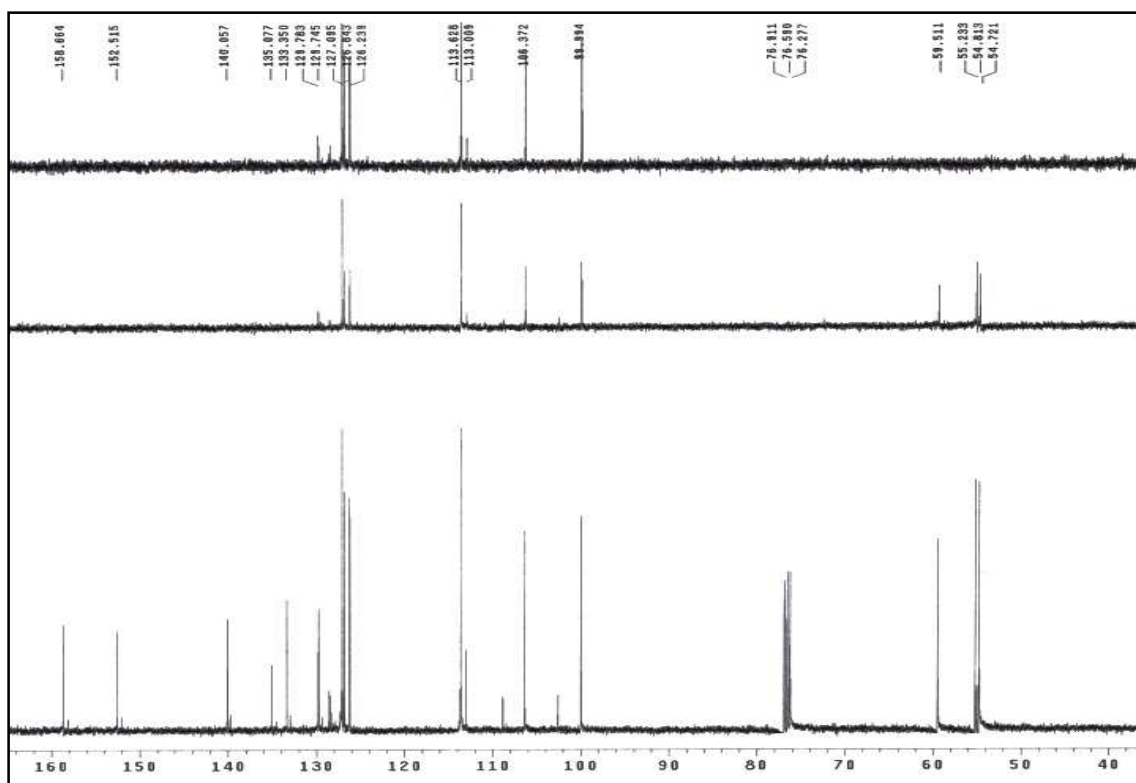


Figura LXVIIId: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **78E**.

Figura LXIXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **79Z**.Figura LXIXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **79Z**.

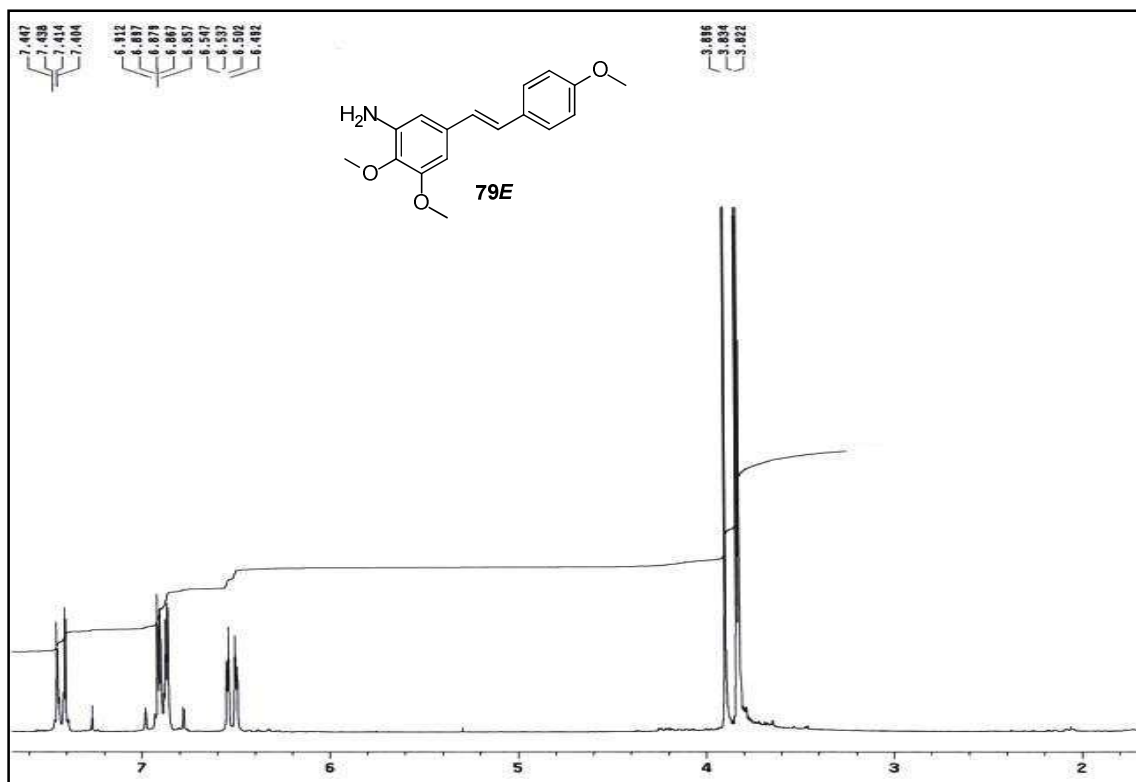
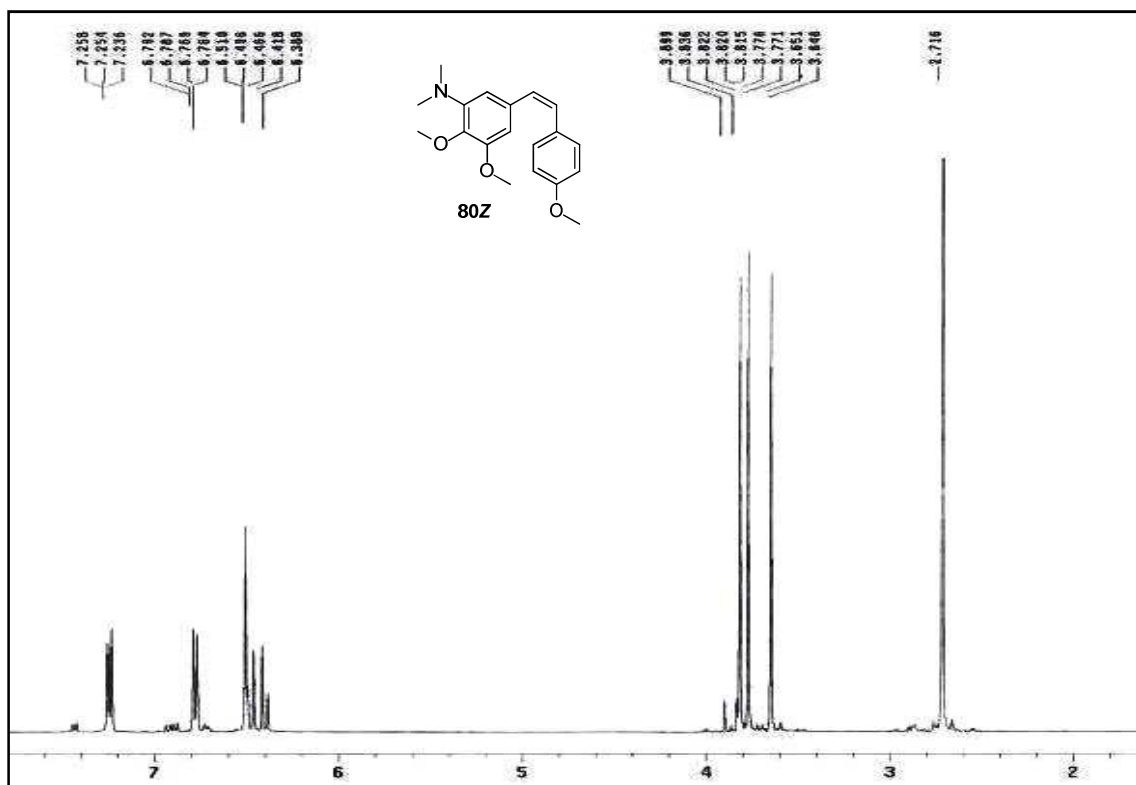
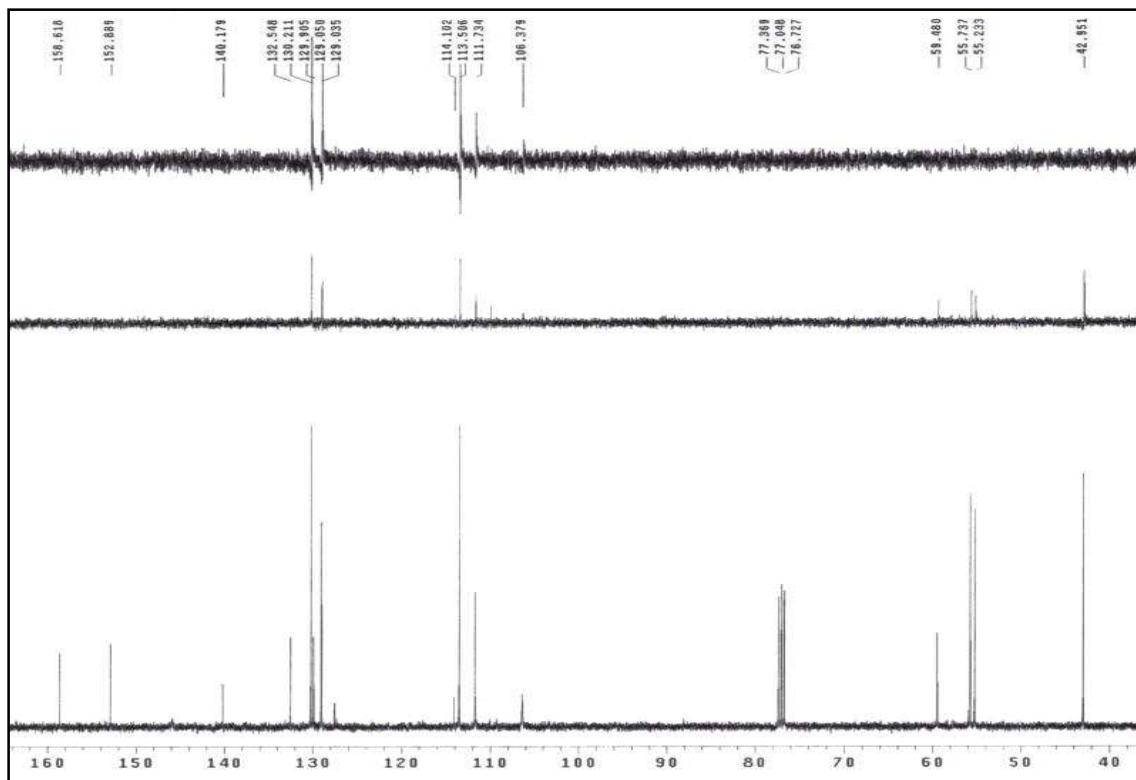


Figura LXIXc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **79E**.

Figura LXXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **80Z**.Figura LXXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **80Z**.

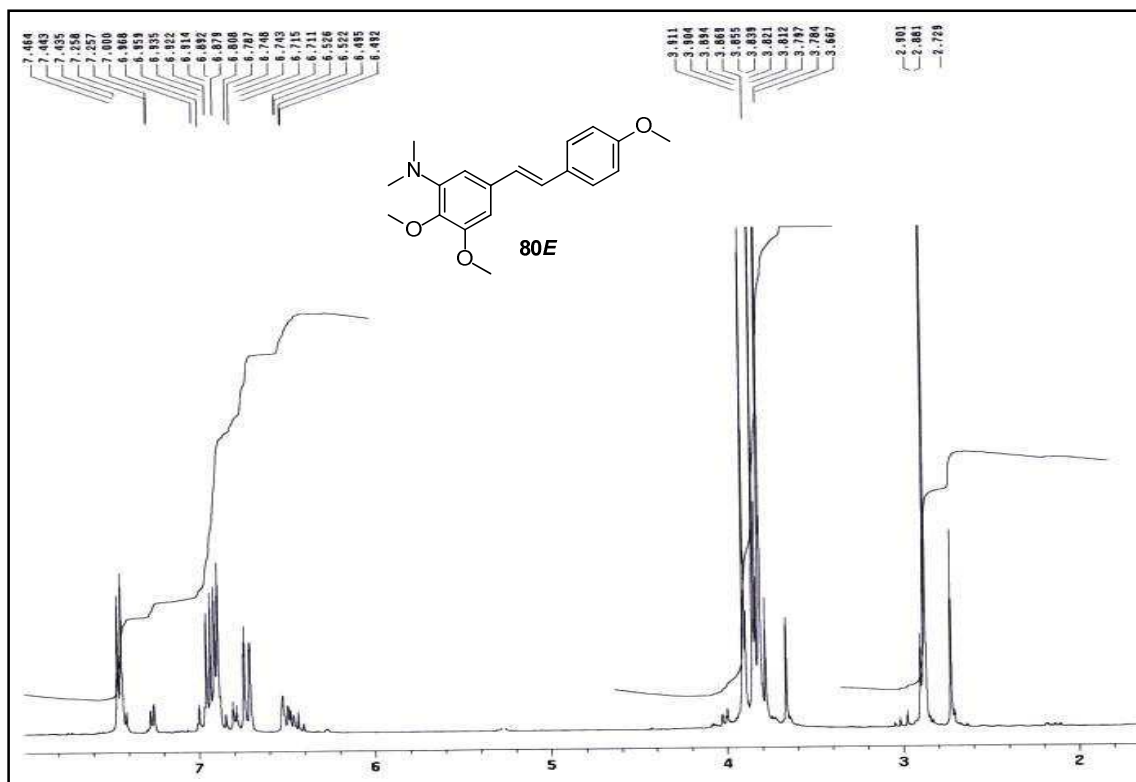


Figura LXXc: Espectro de RMN ¹H del compuesto **80E**.

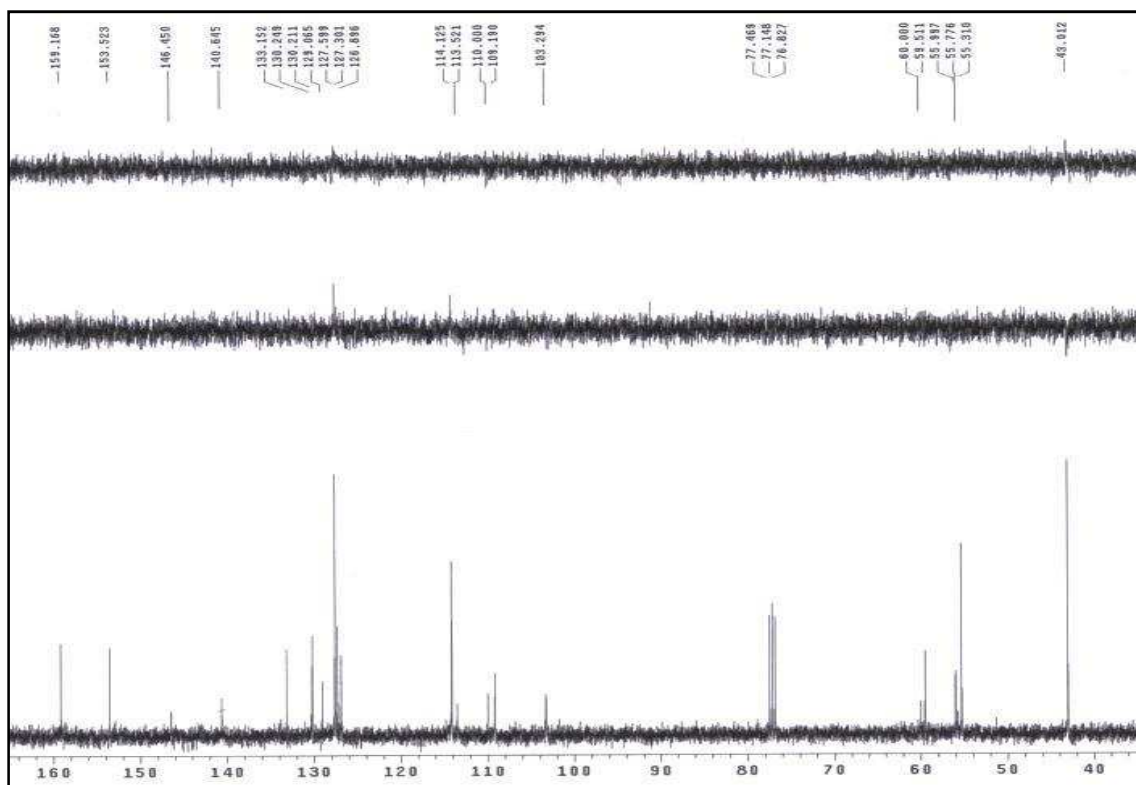
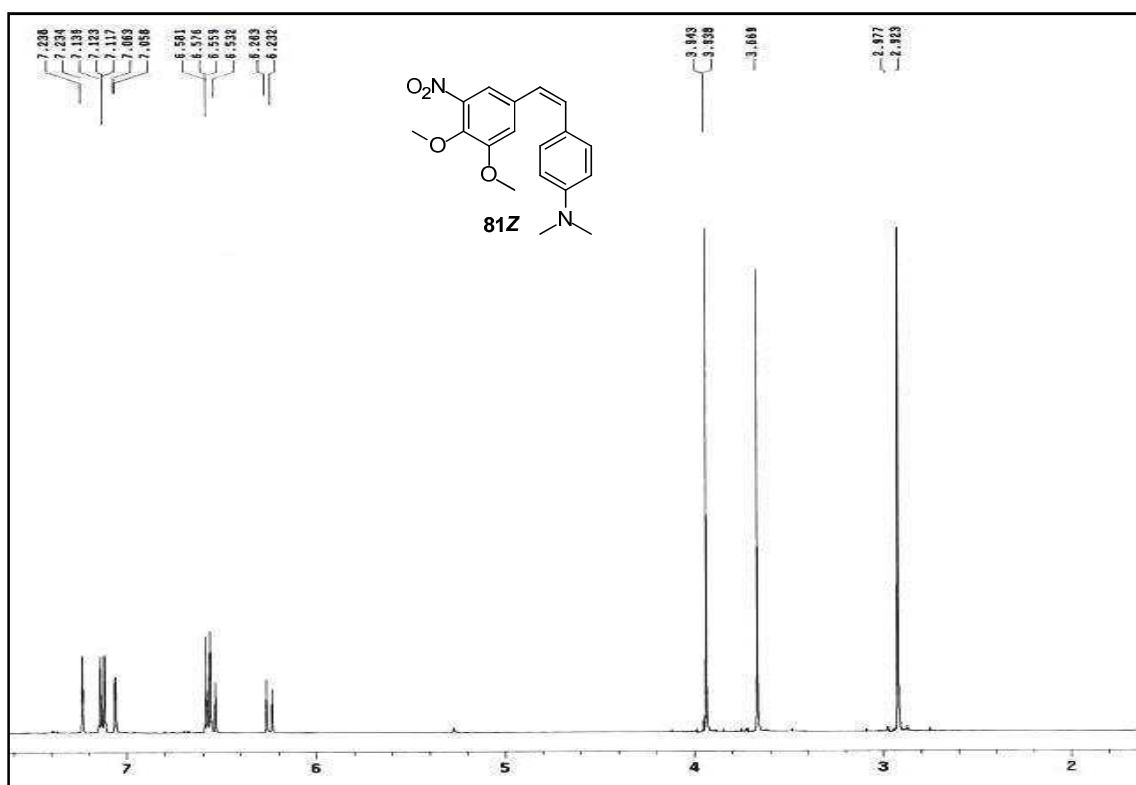
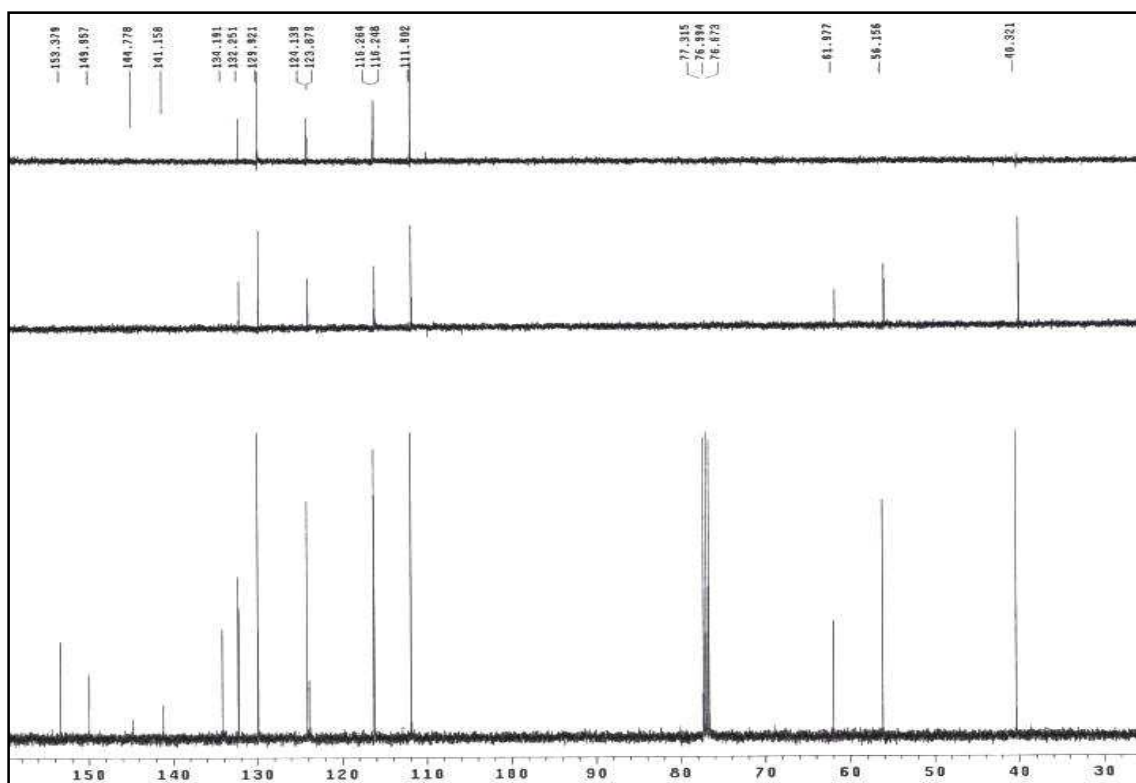


Figura LXXd: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **80E**.

Figura LXXIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **81Z**.Figura LXXIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **81Z**.

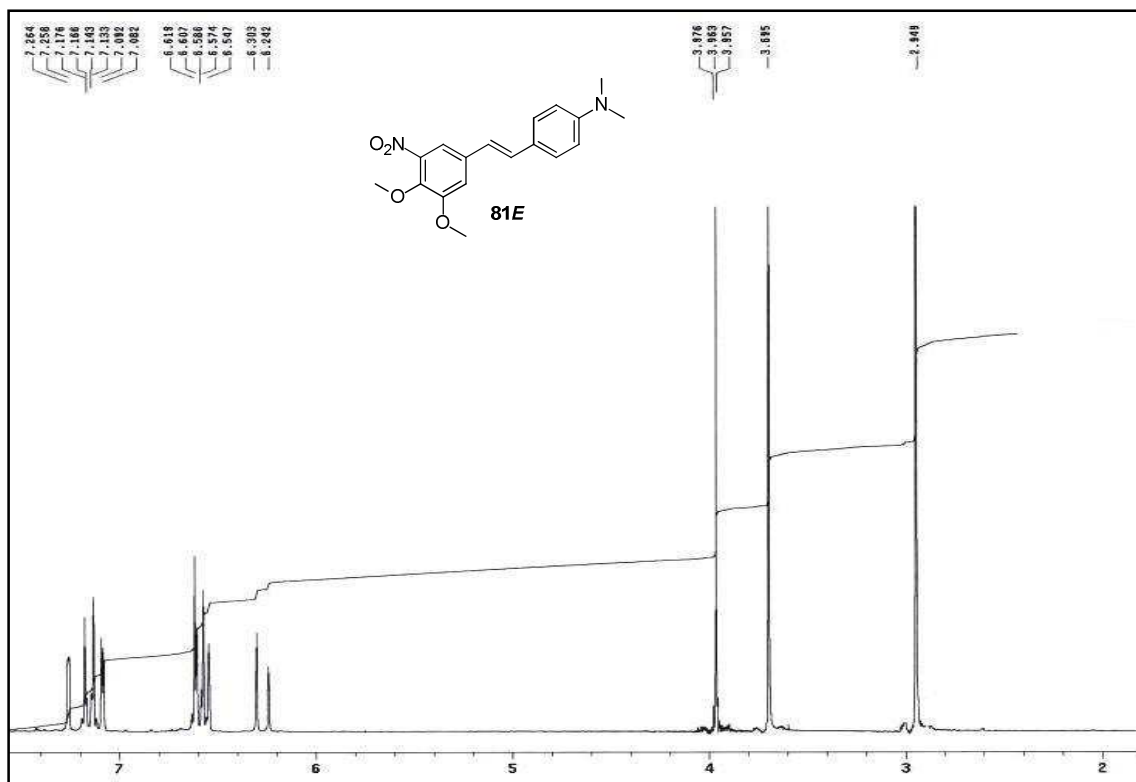


Figura LXXIc: Espectro de RMN ¹H del compuesto **81E**.

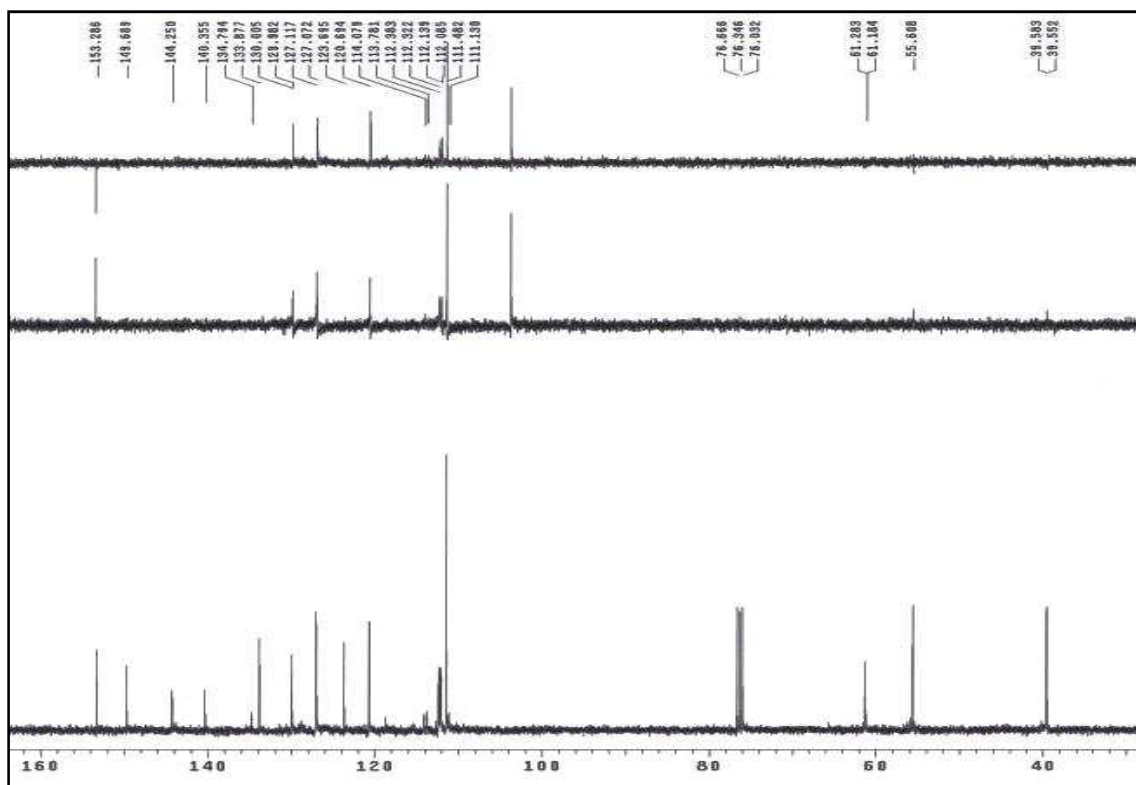
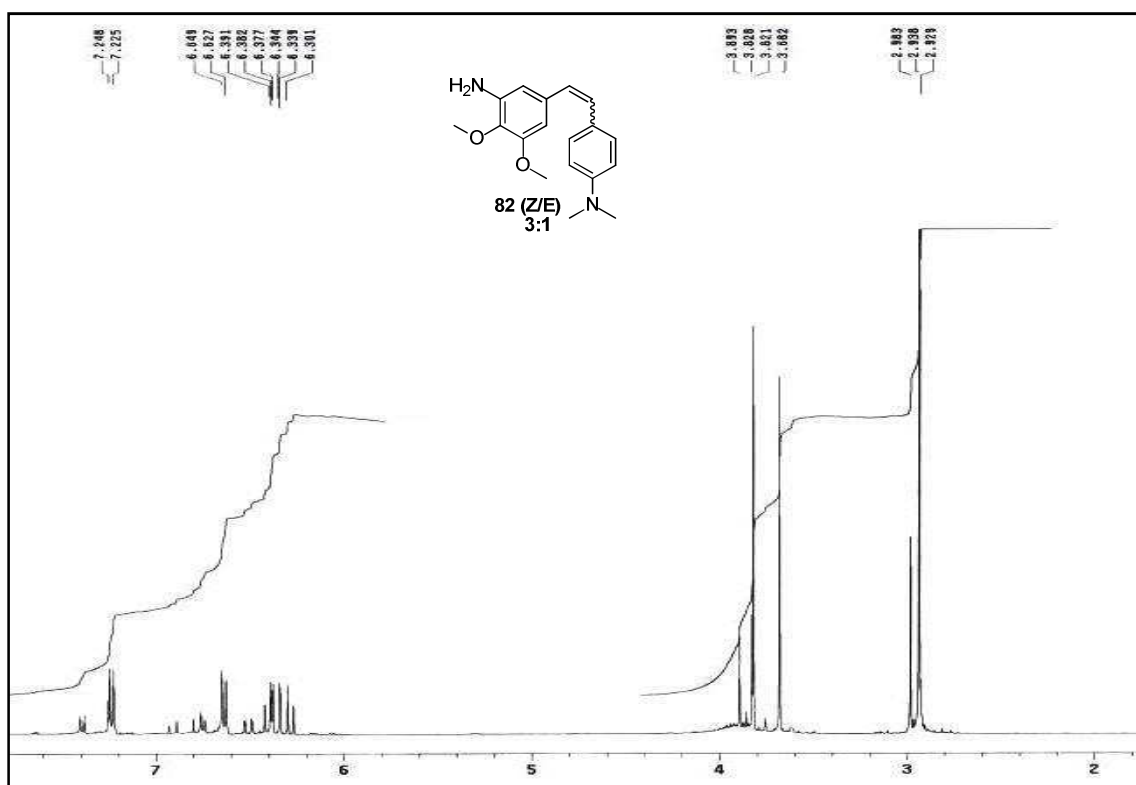
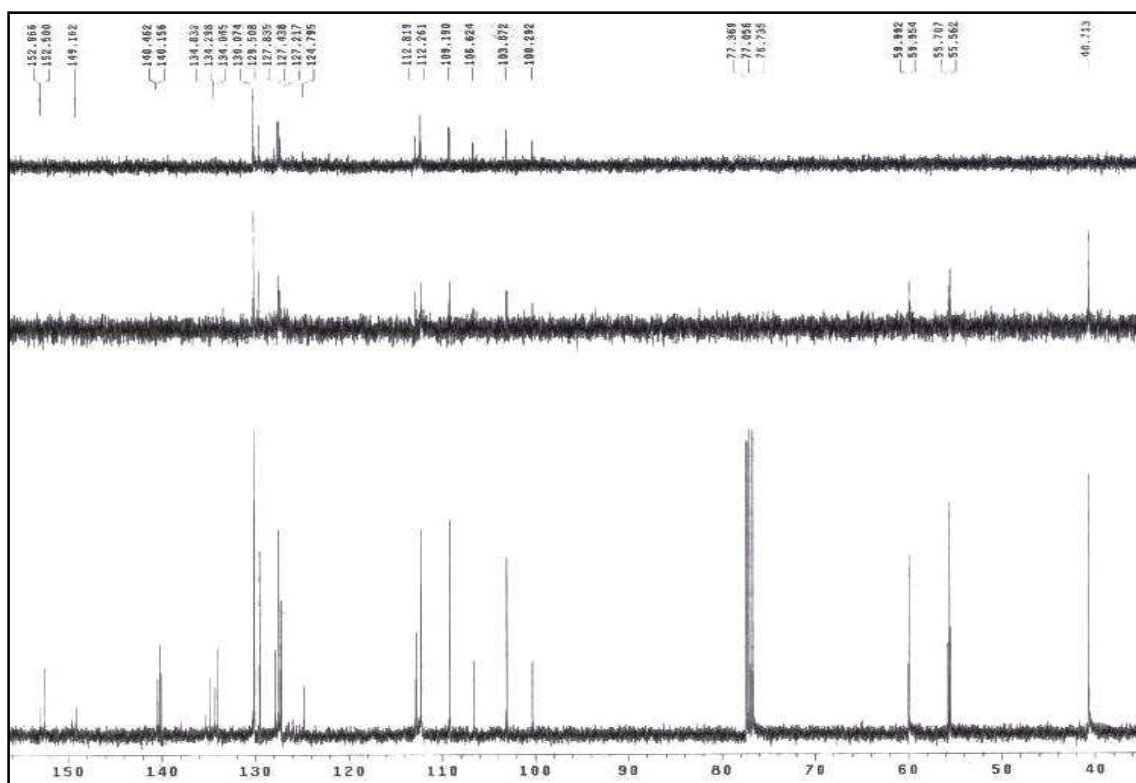


Figura LXXId: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **81E**.

Figura LXXIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **82(Z/E)**.Figura LXXIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **82(Z/E)**.

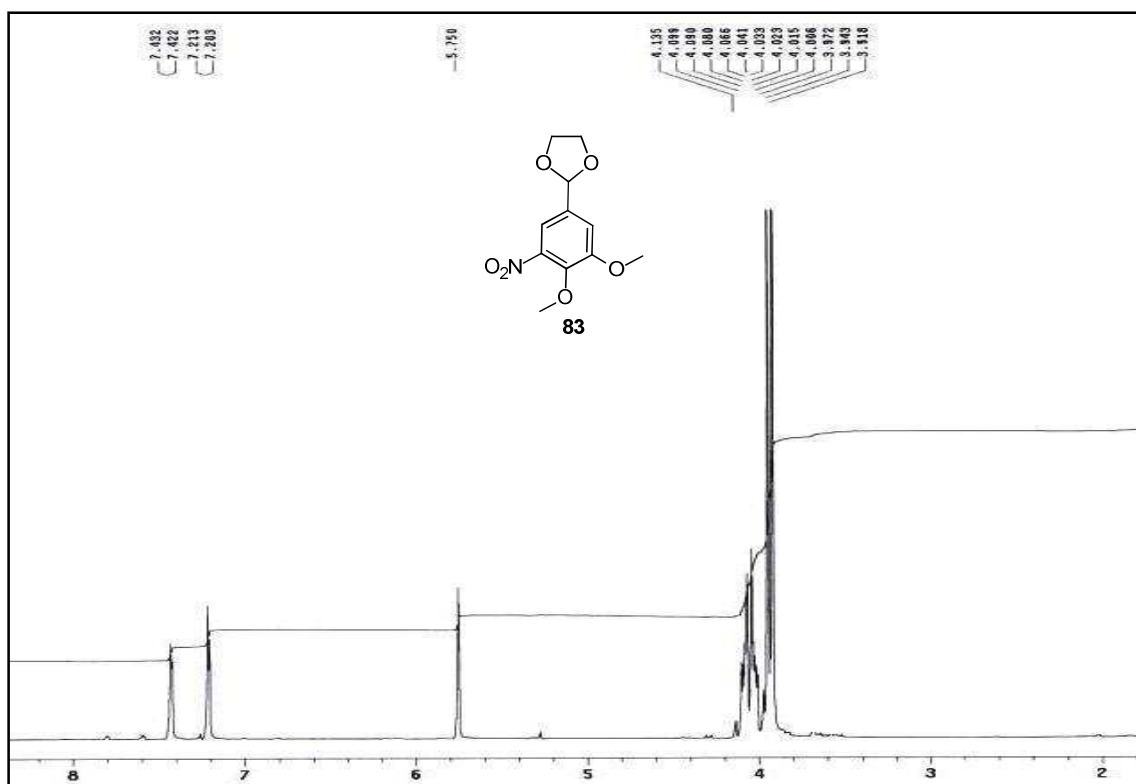


Figura LXXIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **83**.

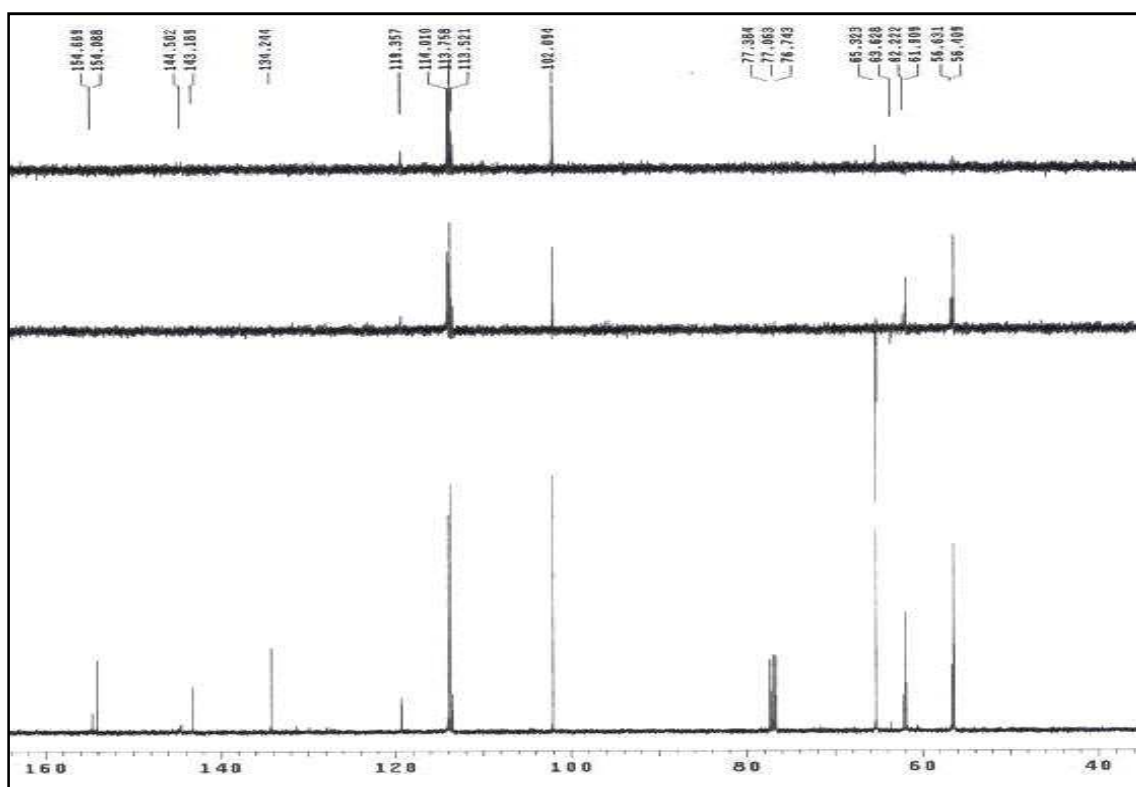
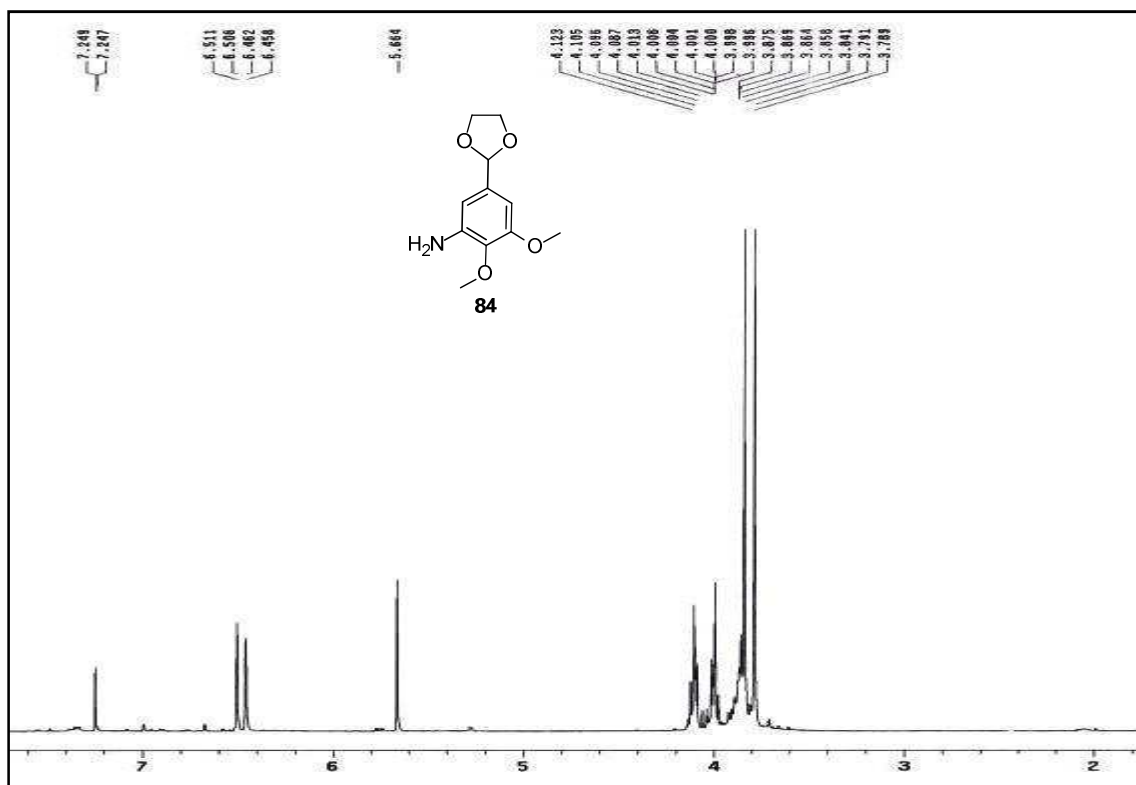
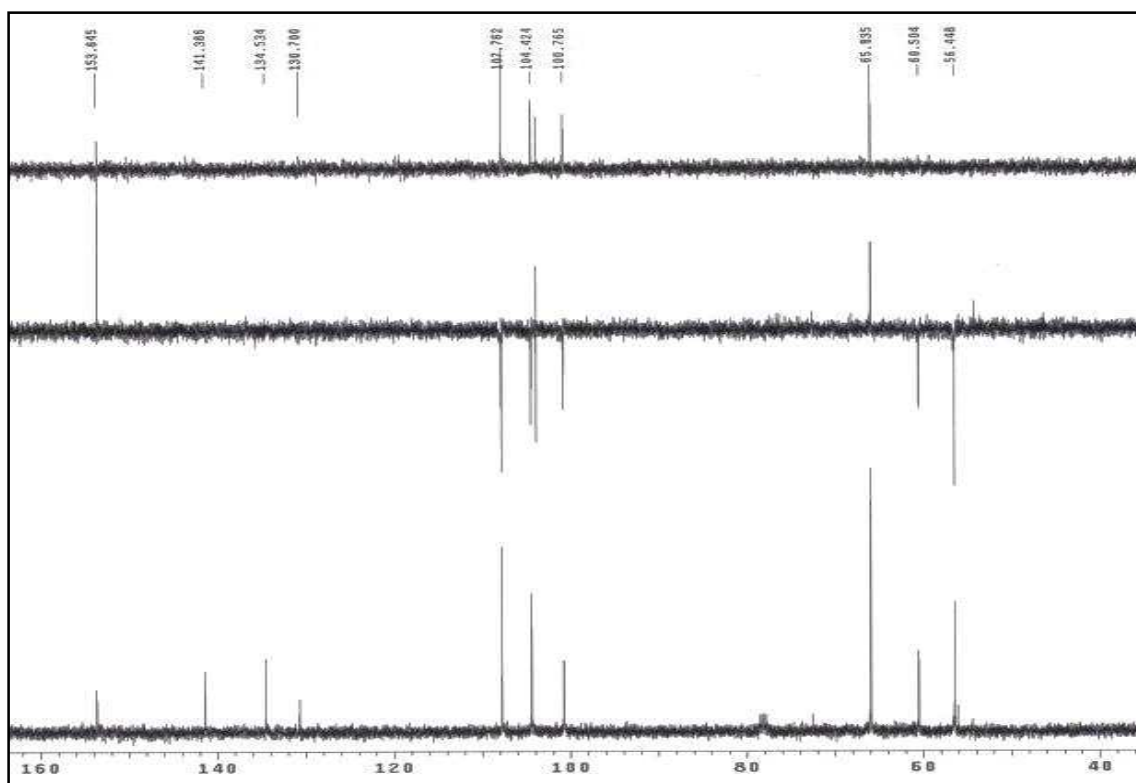


Figura LXXIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **83**.

Figura LXXIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **84**.Figura LXXIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **84**.

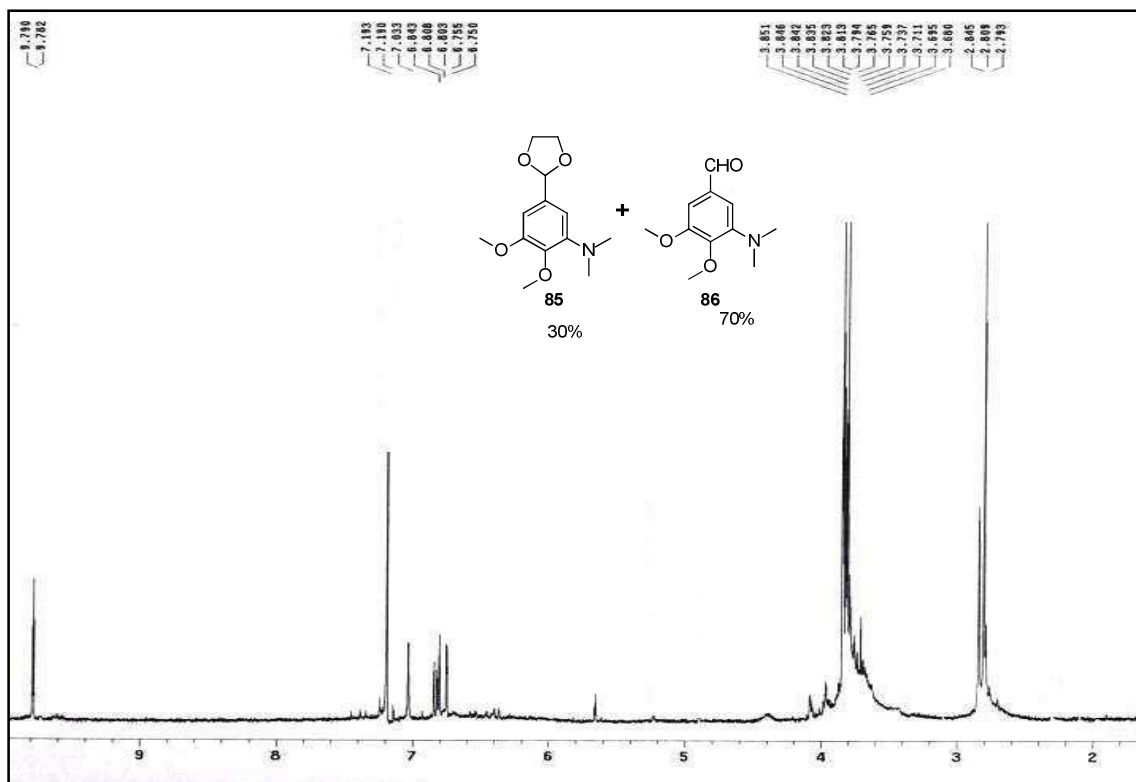
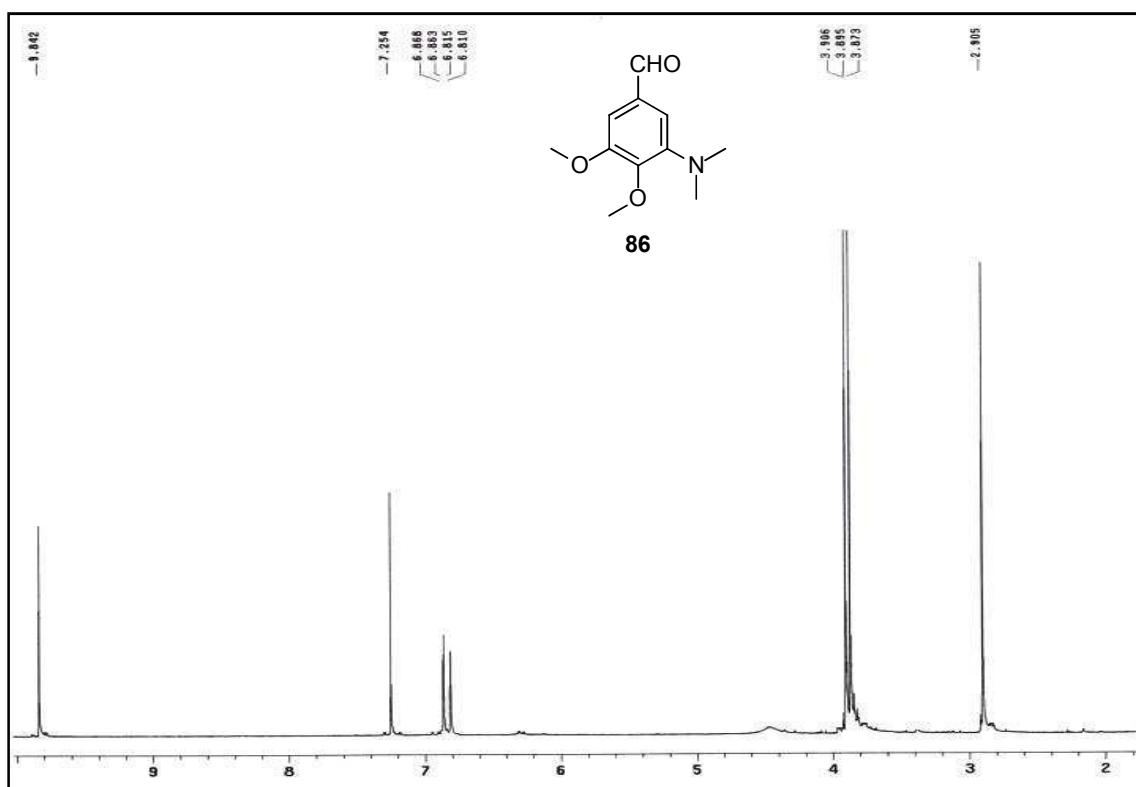
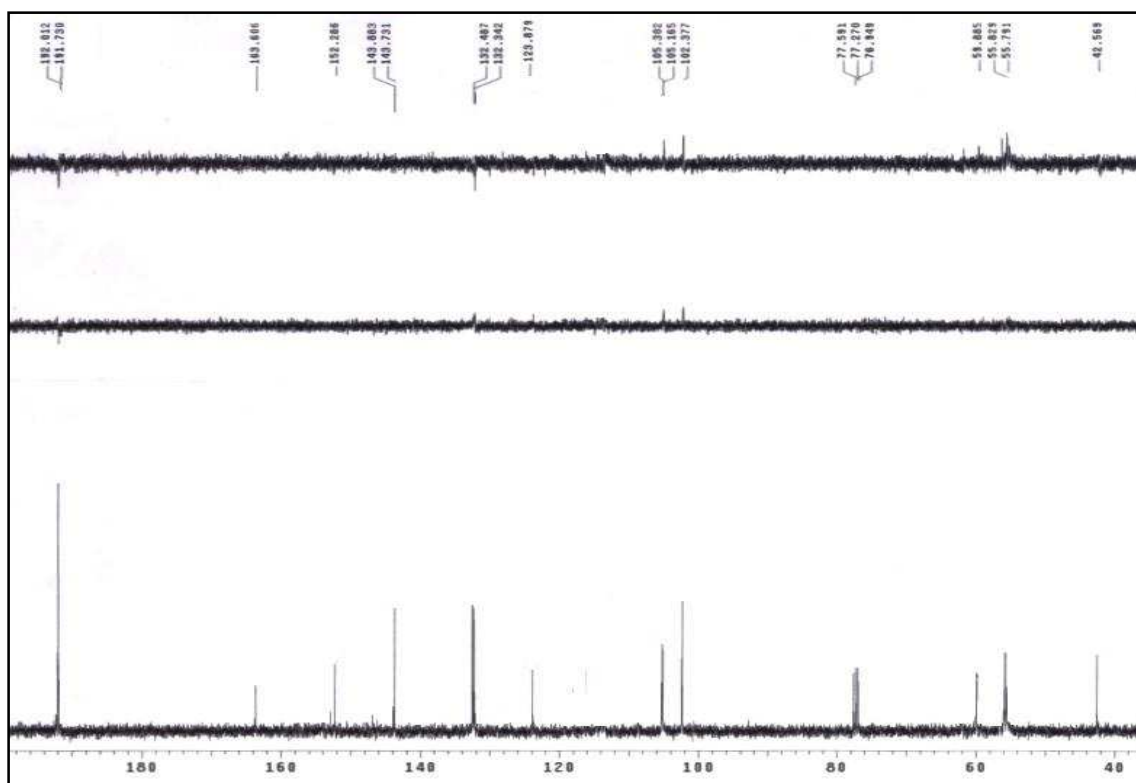


Figura LXXV: Espectro de RMN ^1H del compuesto **85**.

Figura LXXVIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **86**.Figura LXXVIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **86**.

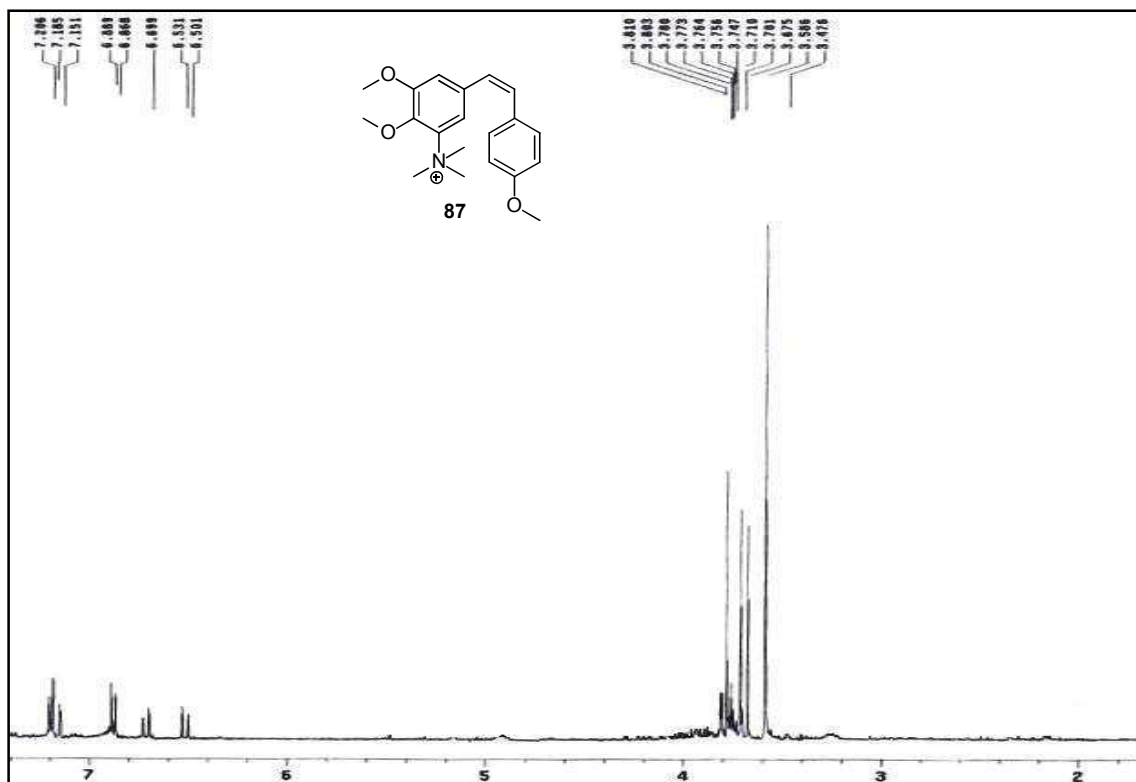


Figura LXXVIIa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **87**.

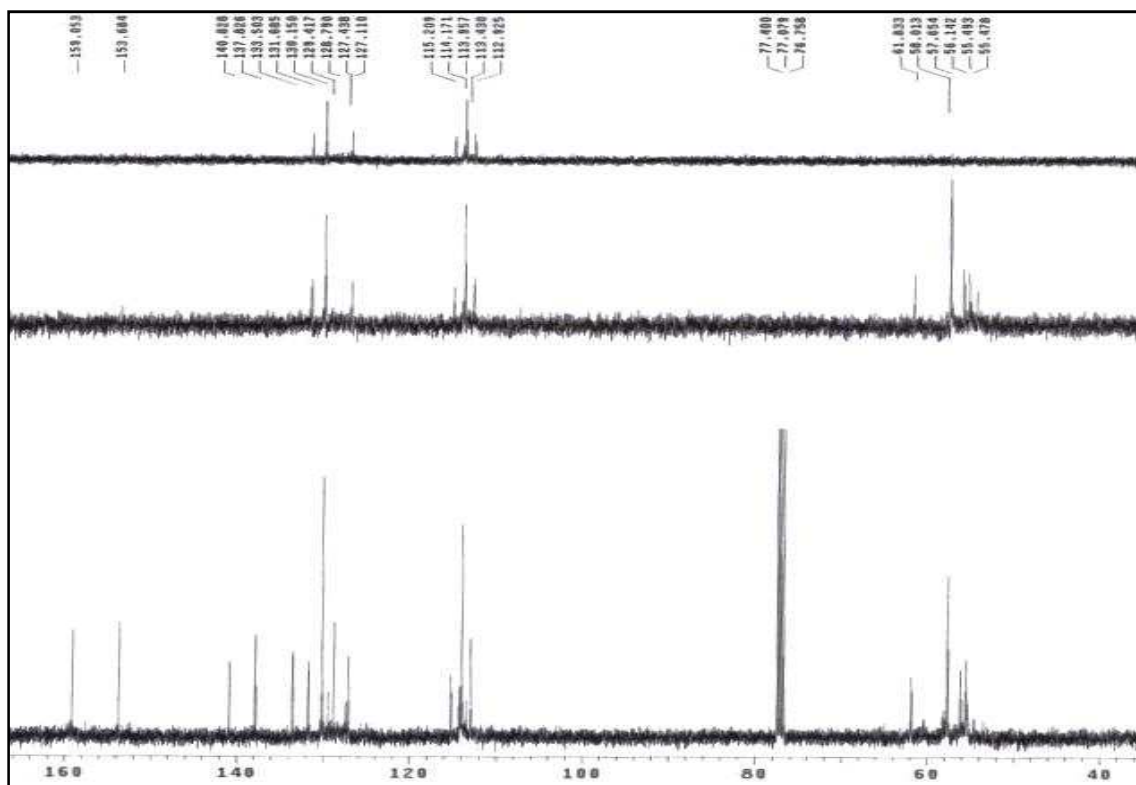
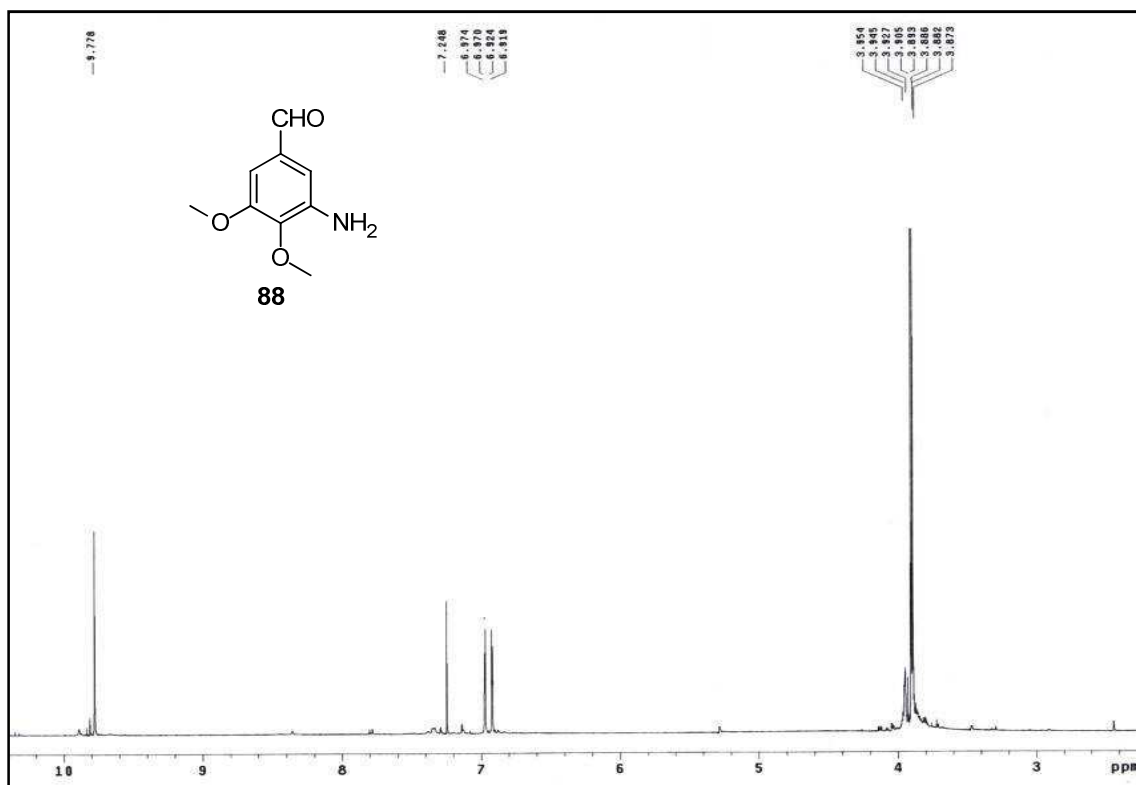
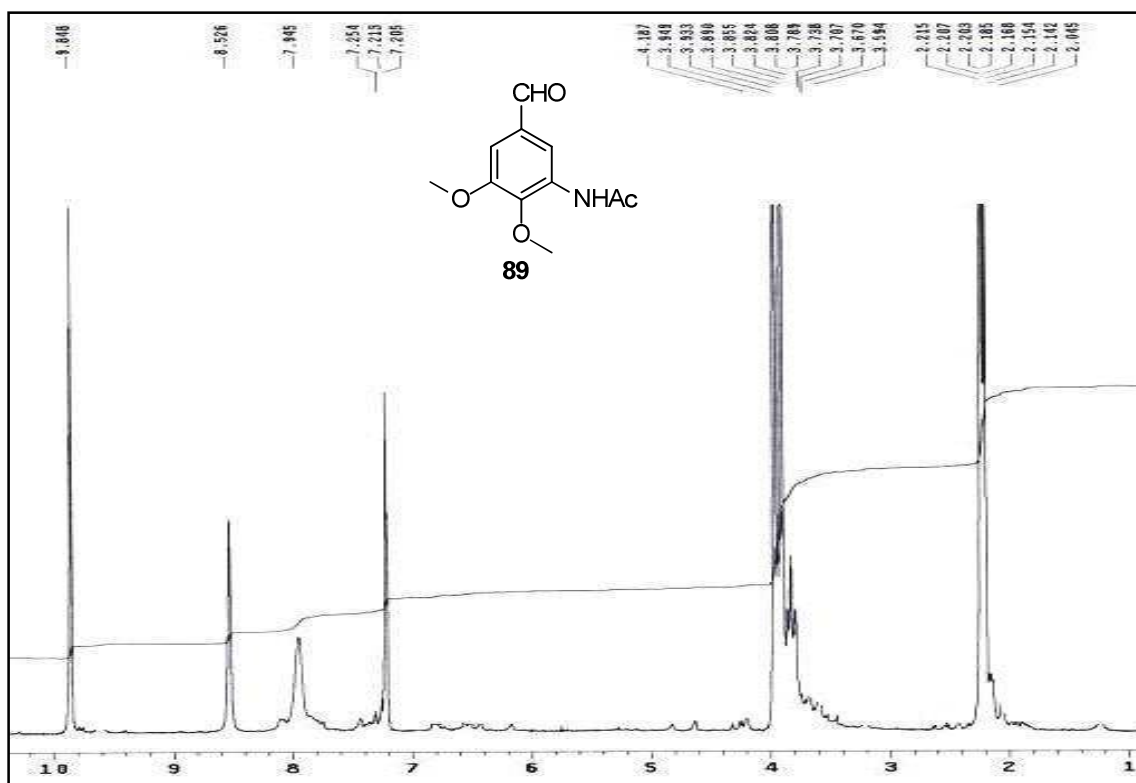
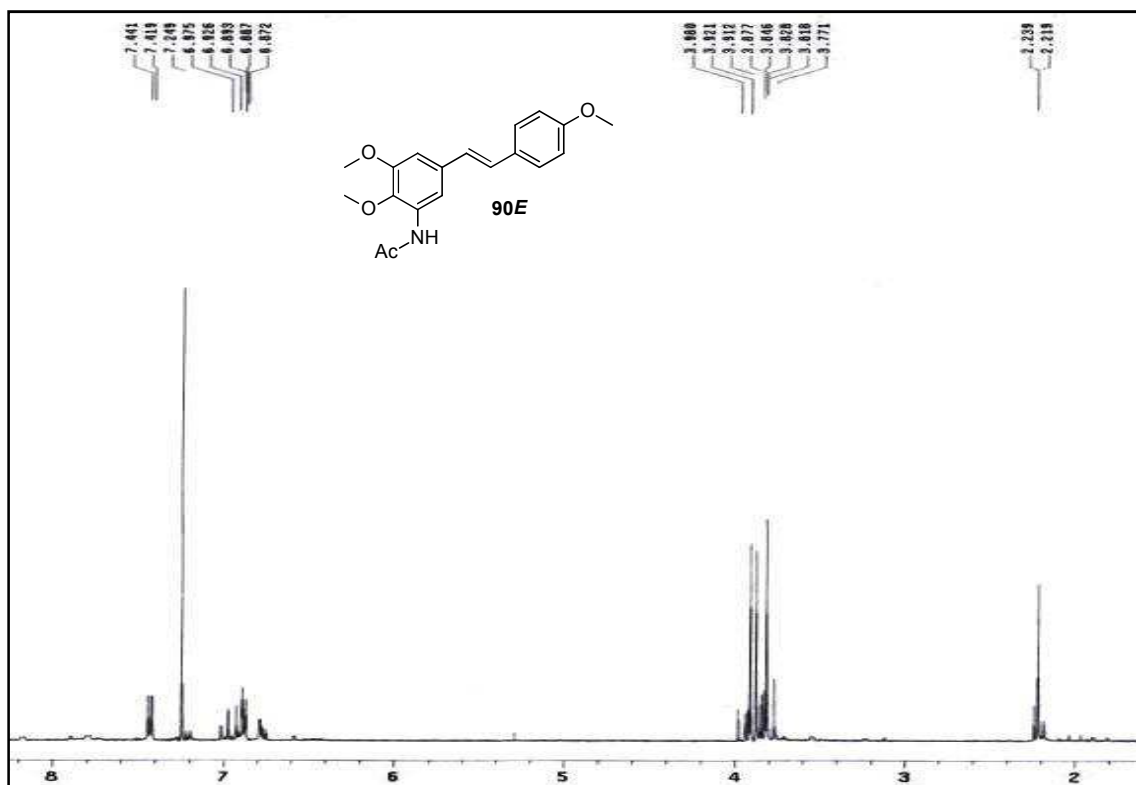


Figura LXXVIIb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **87**.

Figura LXXVIII: Espectro de RMN ¹H del compuesto **88**.Figura LXXIX: Espectro de RMN ¹H del compuesto **89**.

Figura LXXXc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **90E**.

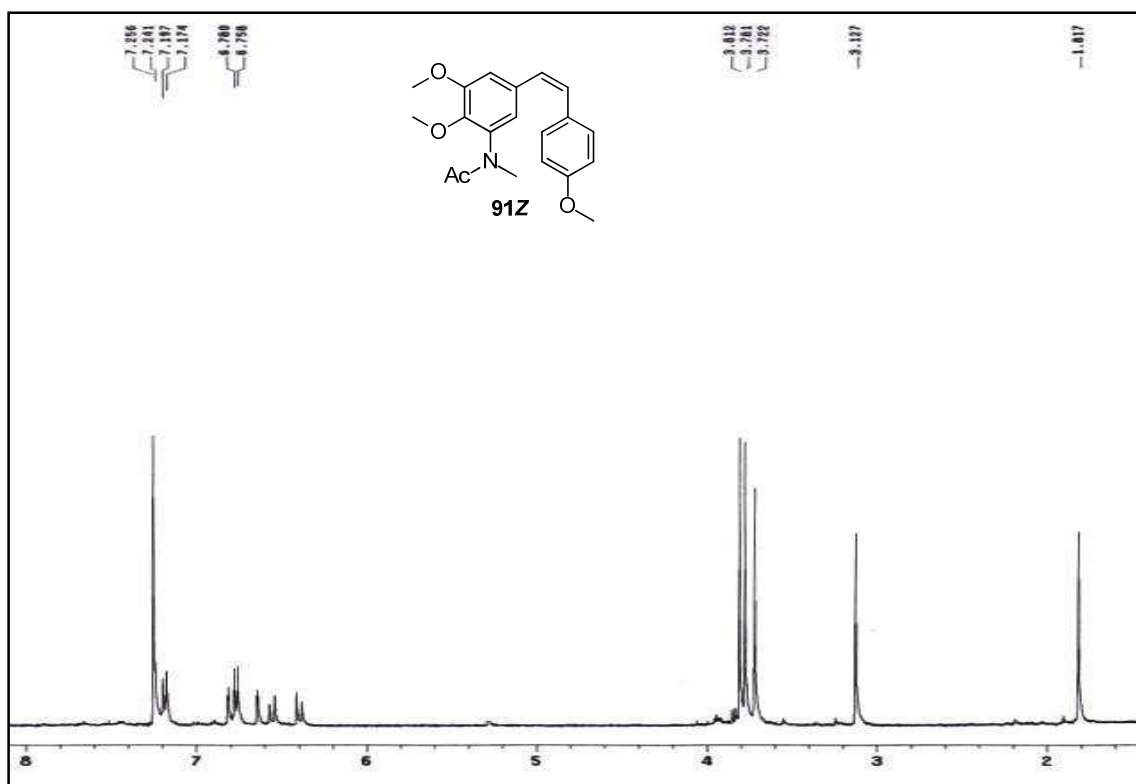


Figura LXXXIa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **91Z**.

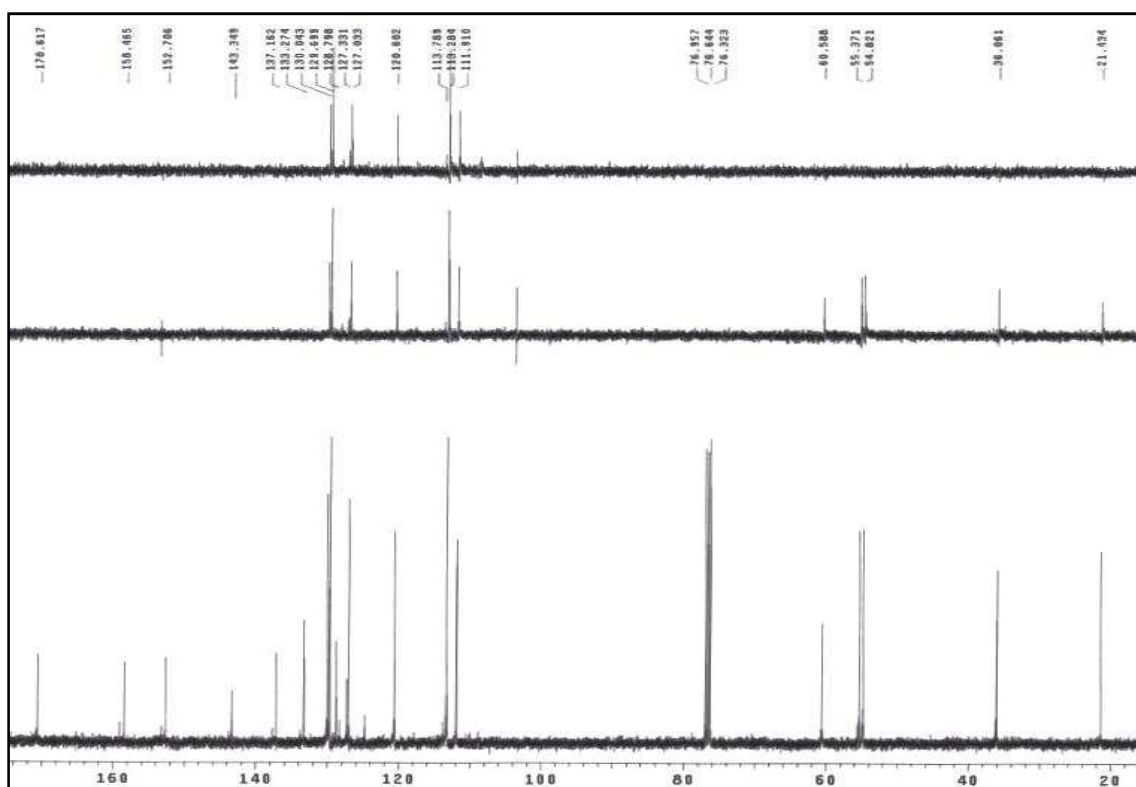
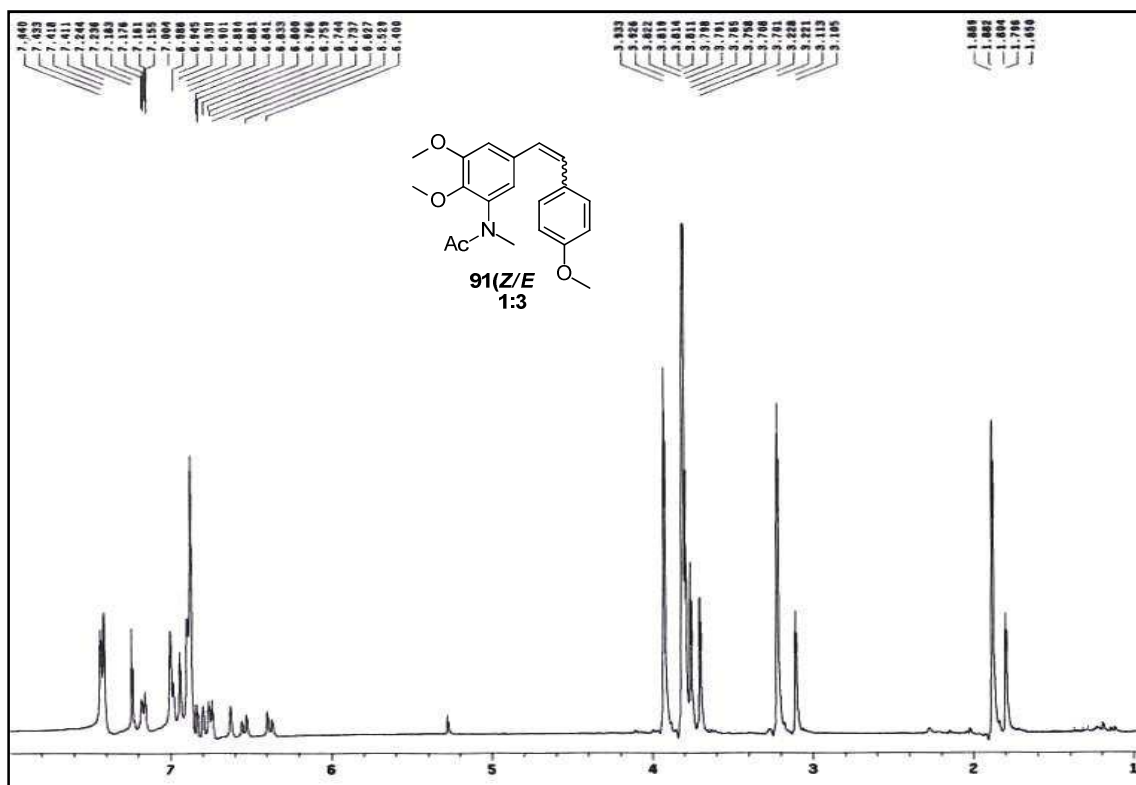
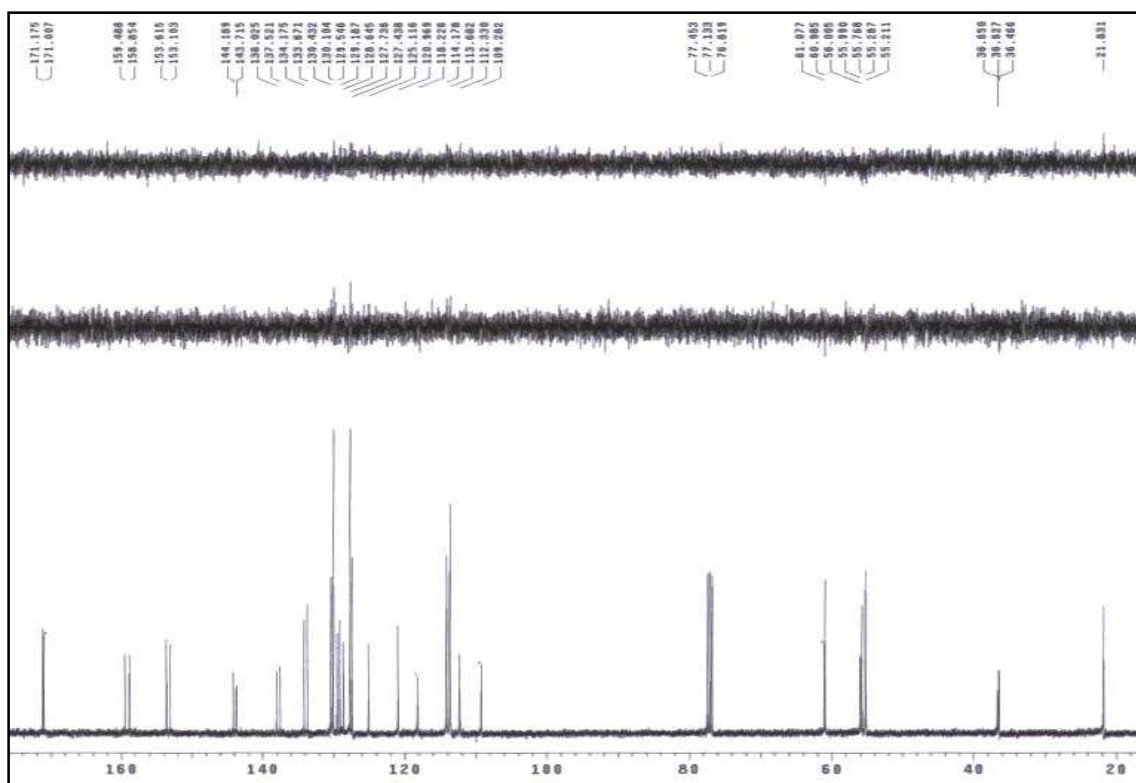


Figura LXXXIb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **91Z**.

Figura LXXXIc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **91(Z/E)**.Figura LXXXId: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **91(Z/E)**.

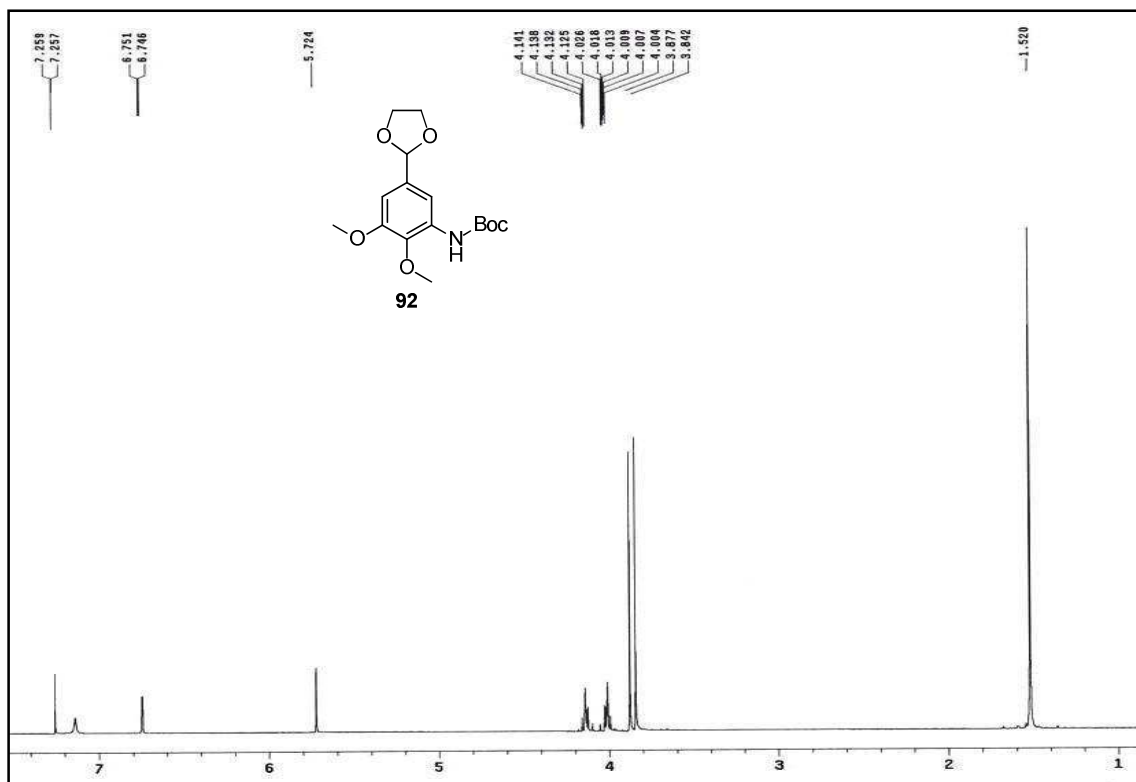


Figura LXXXIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **92**.

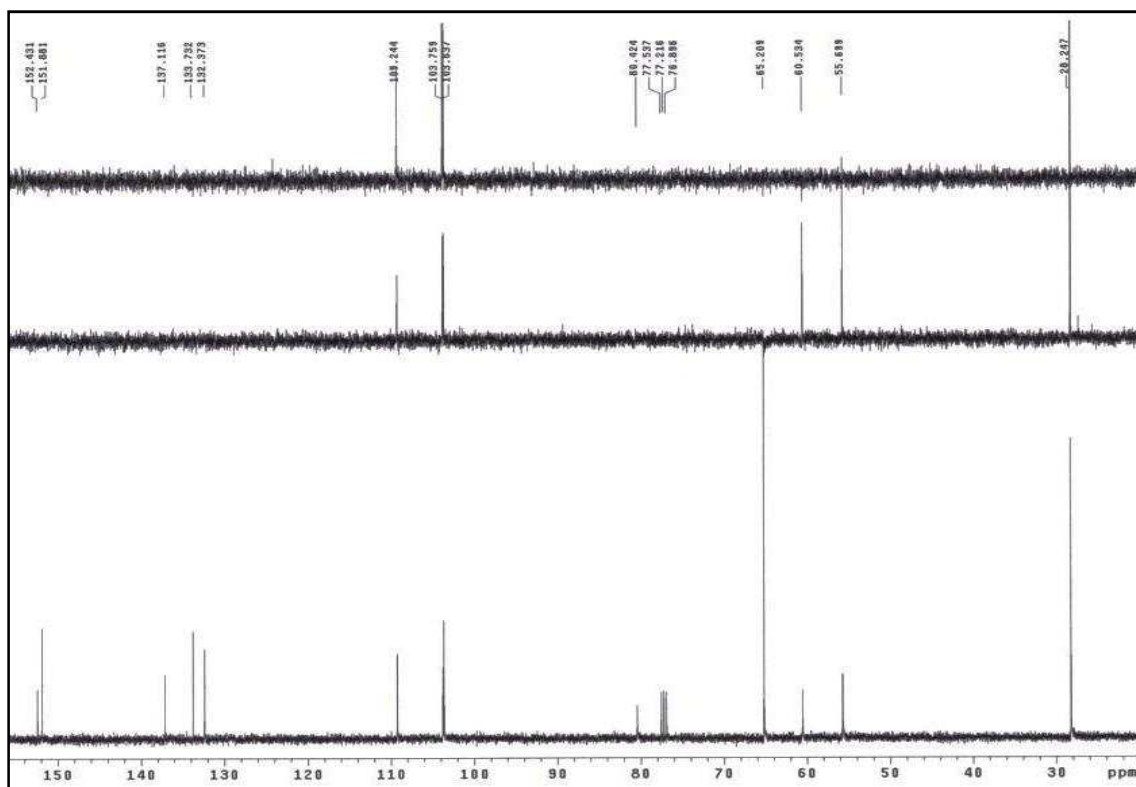
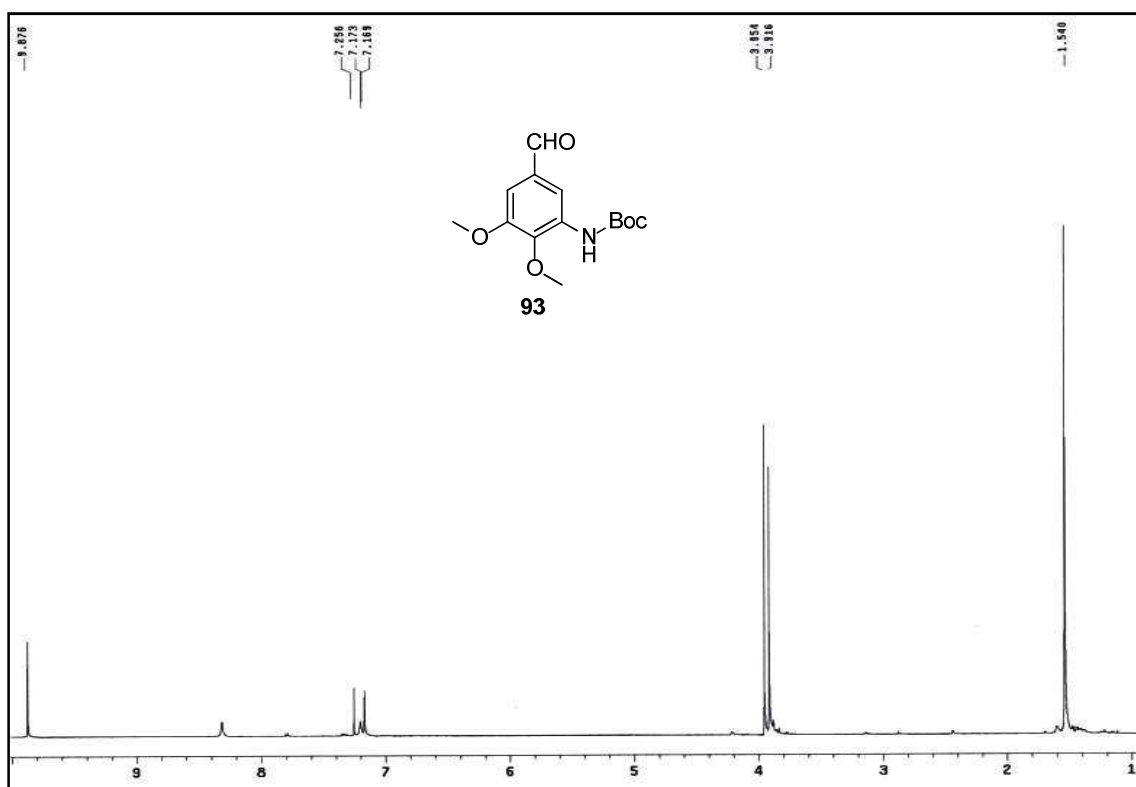
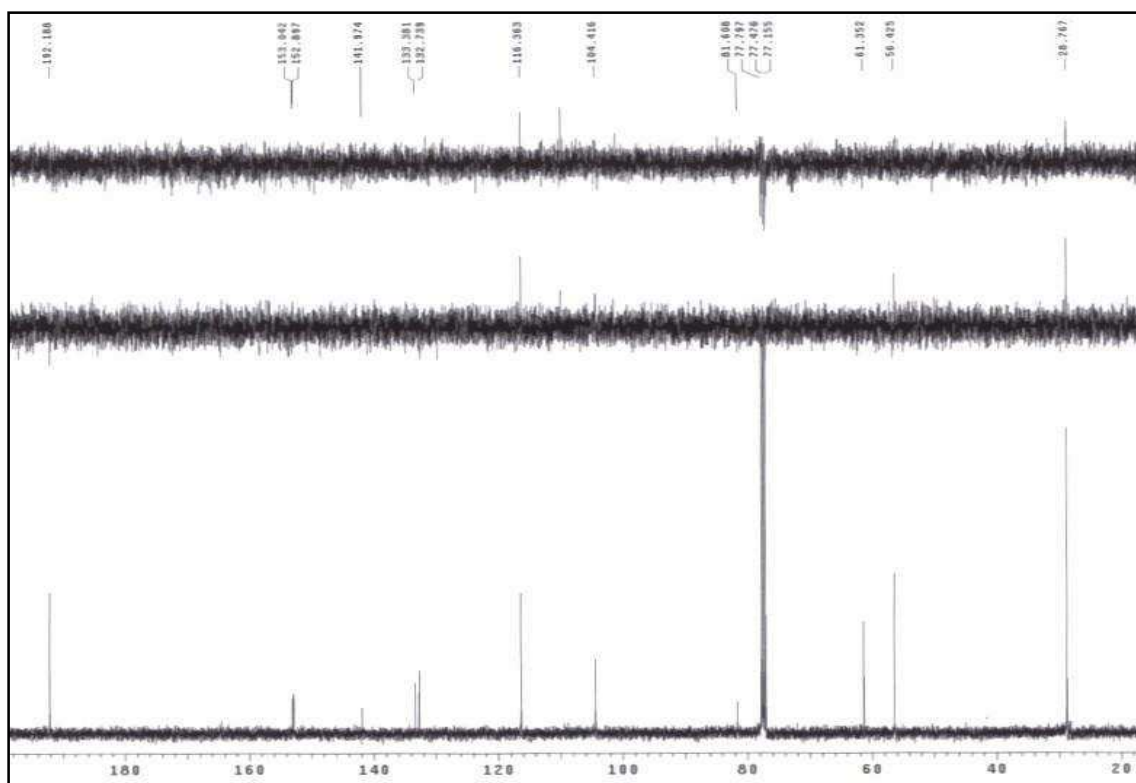


Figura LXXXIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **92**.

Figura LXXXIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **93**.Figura LXXXIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **93**.

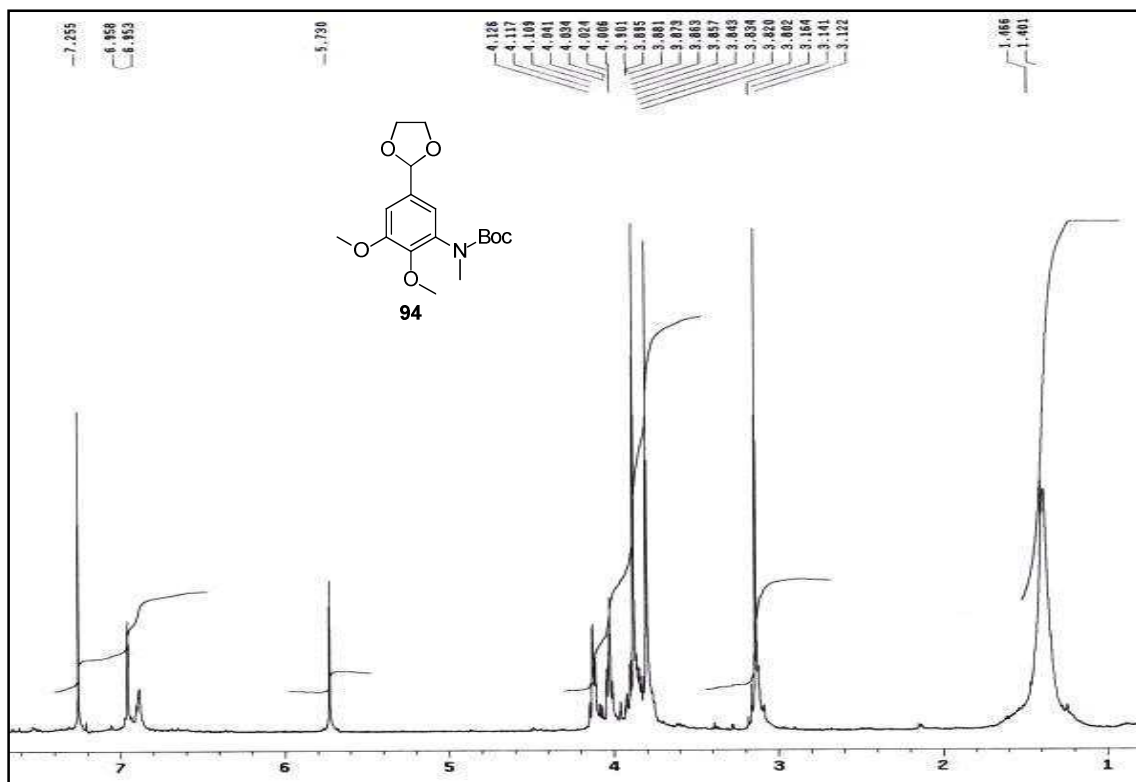


Figura LXXXIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **94**.

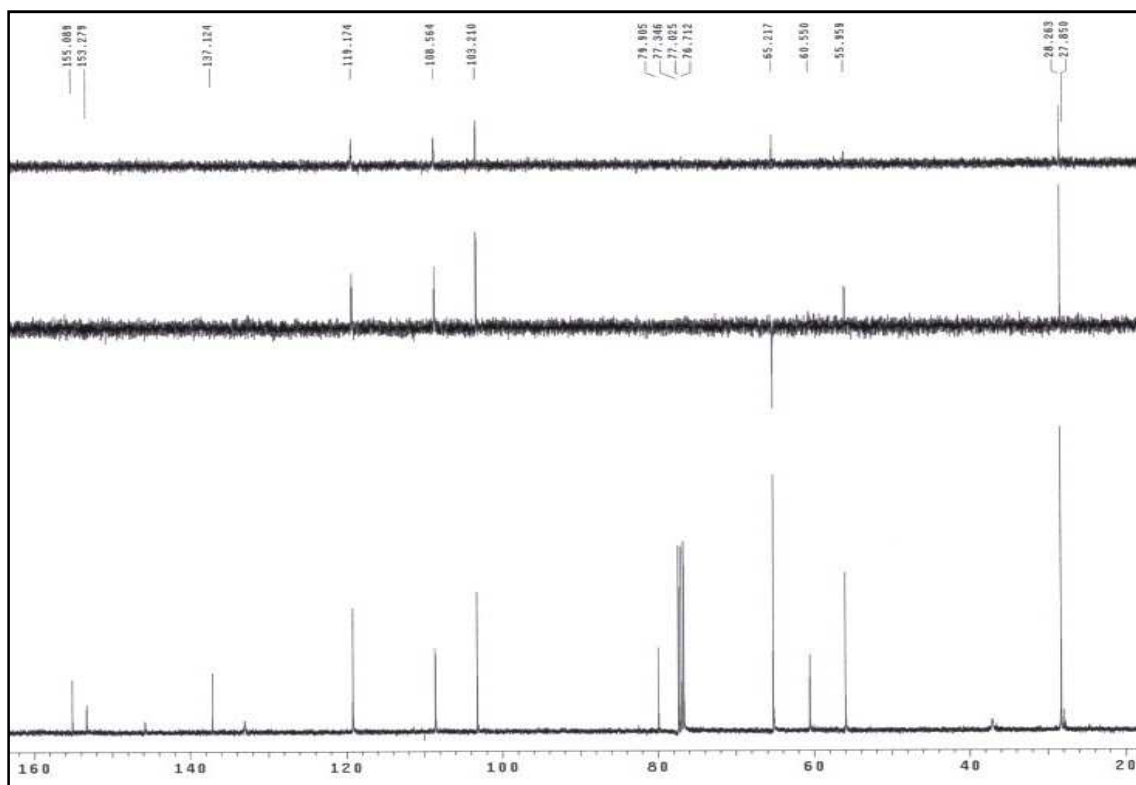
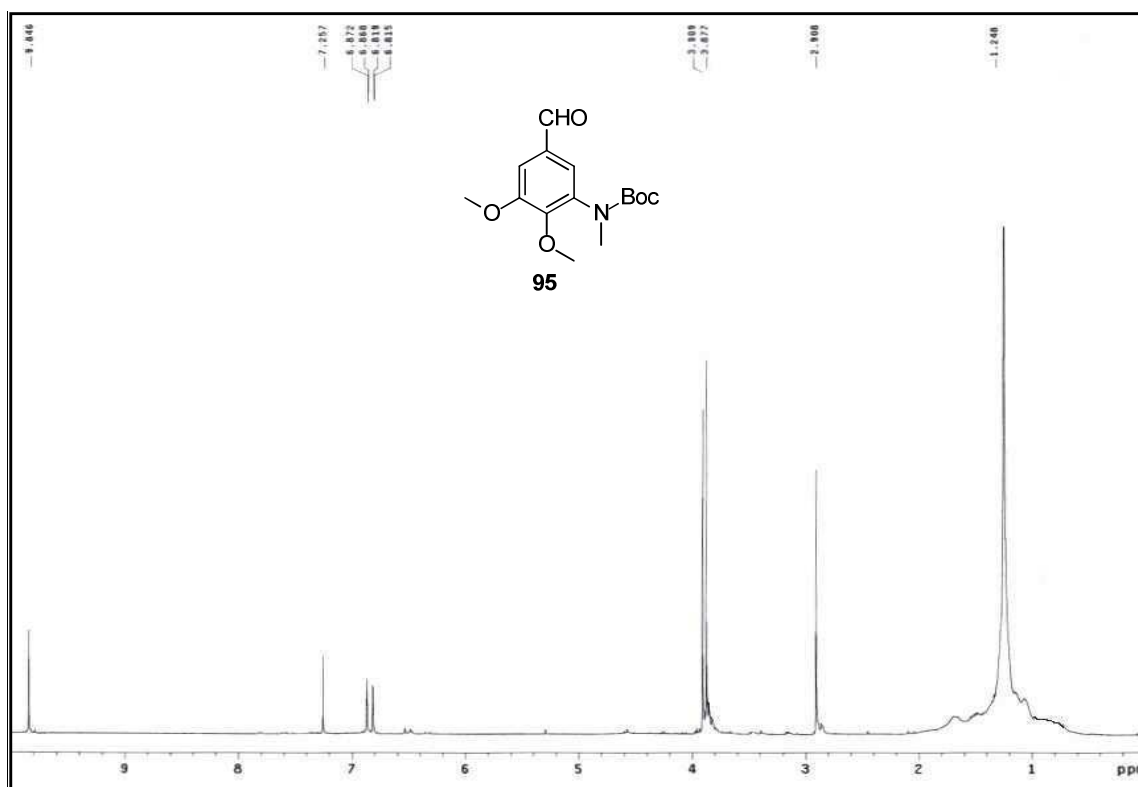
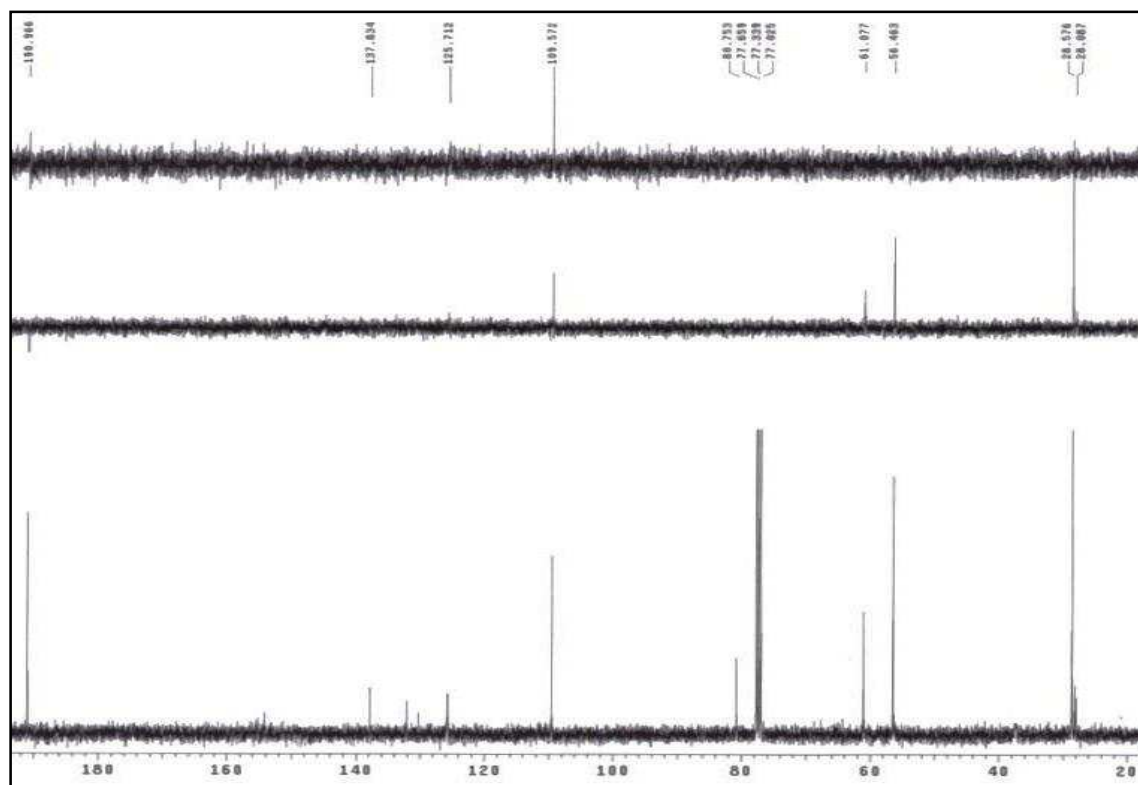


Figura LXXXIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **94**.

Figura LXXXVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **95**.Figura LXXXVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **95**.

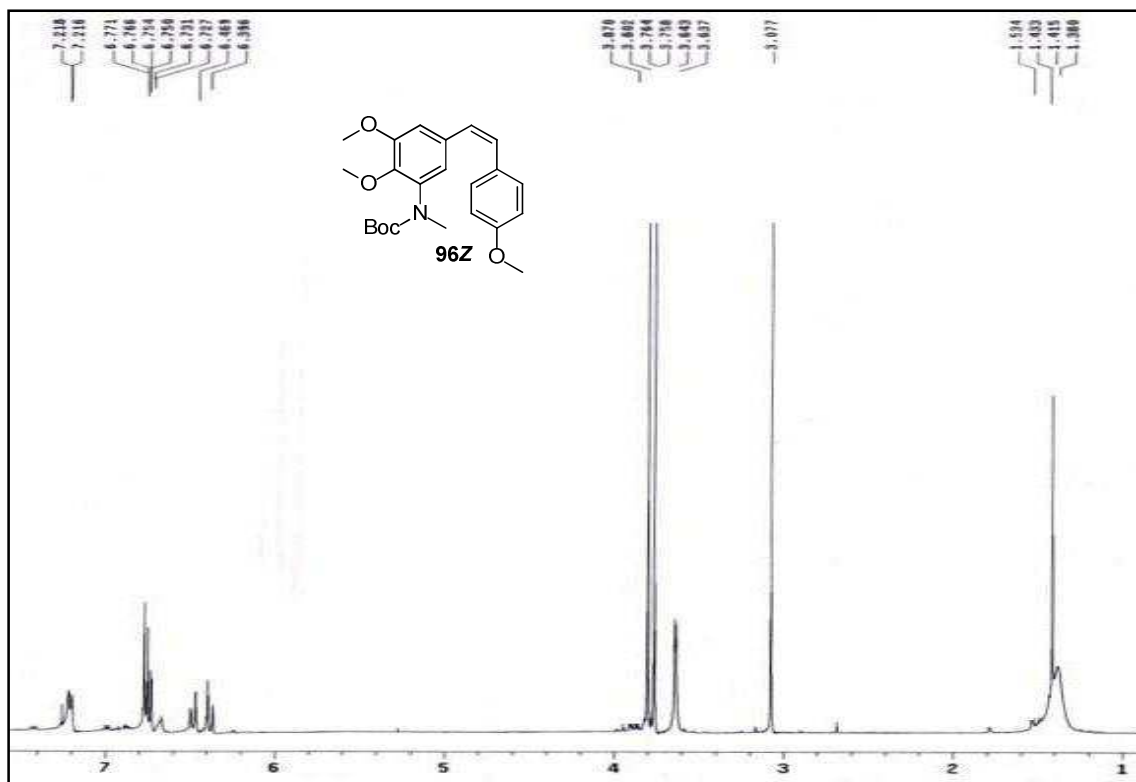


Figura LXXXVIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **96Z**.

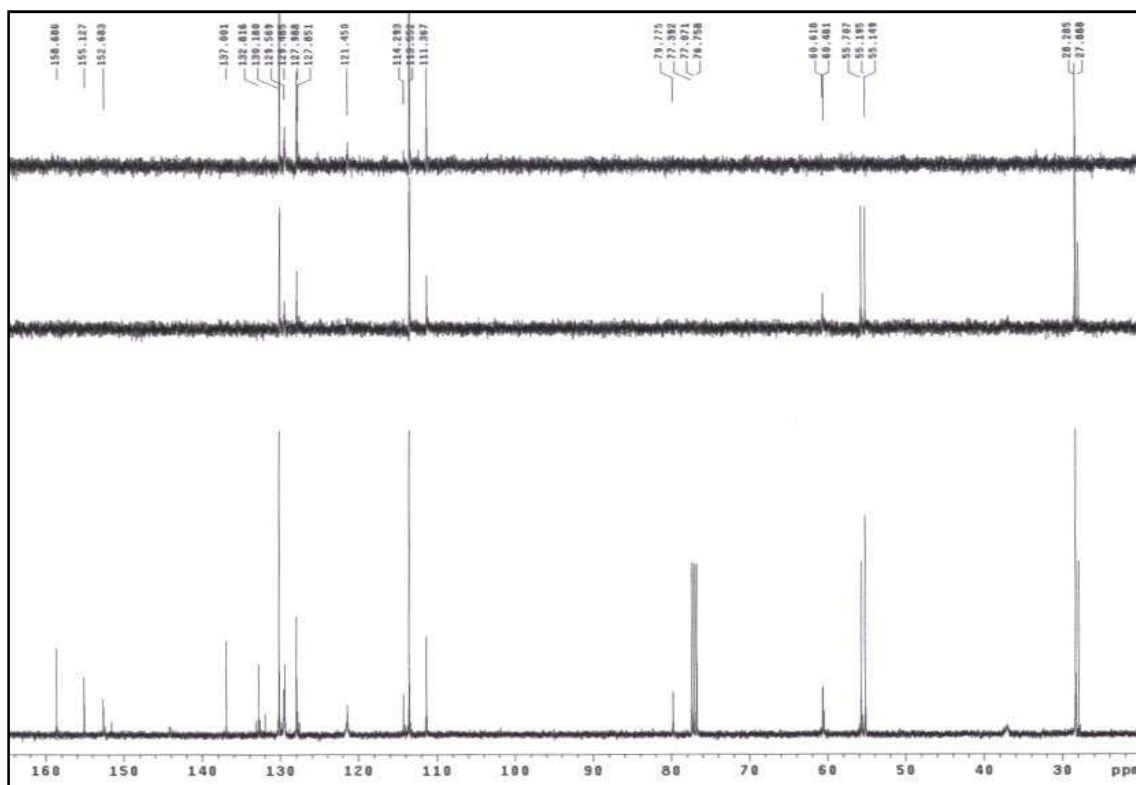
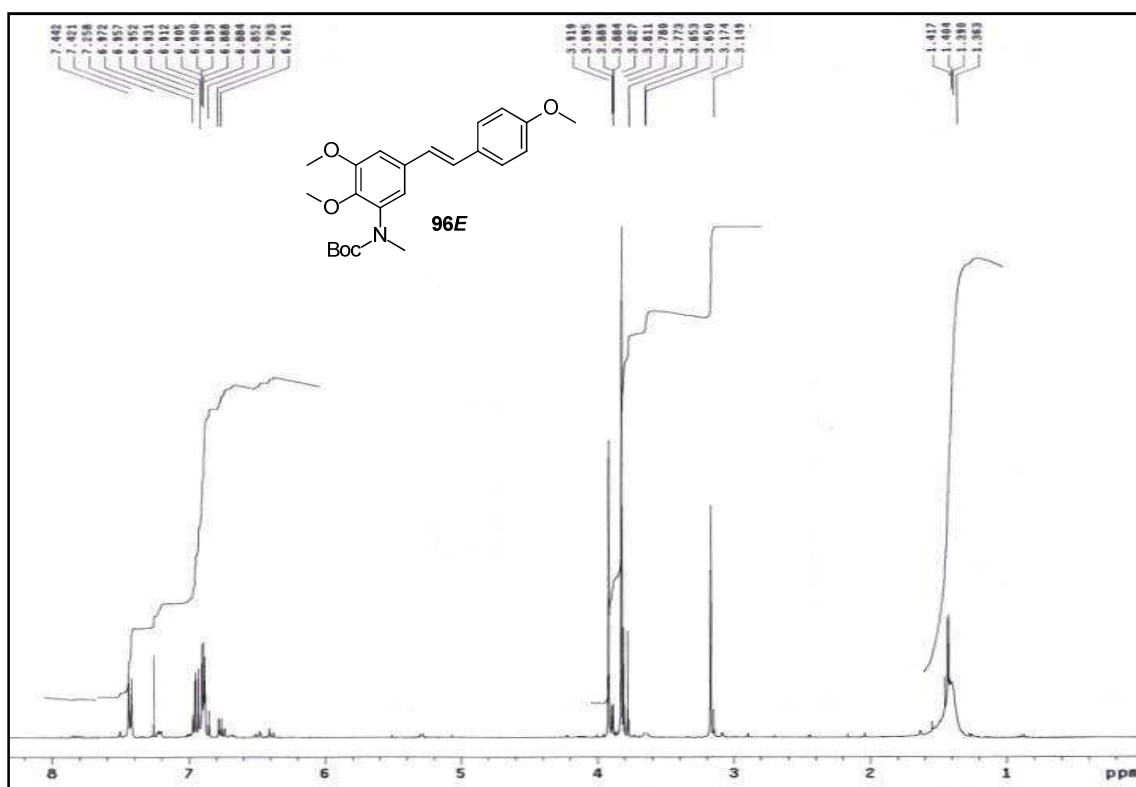
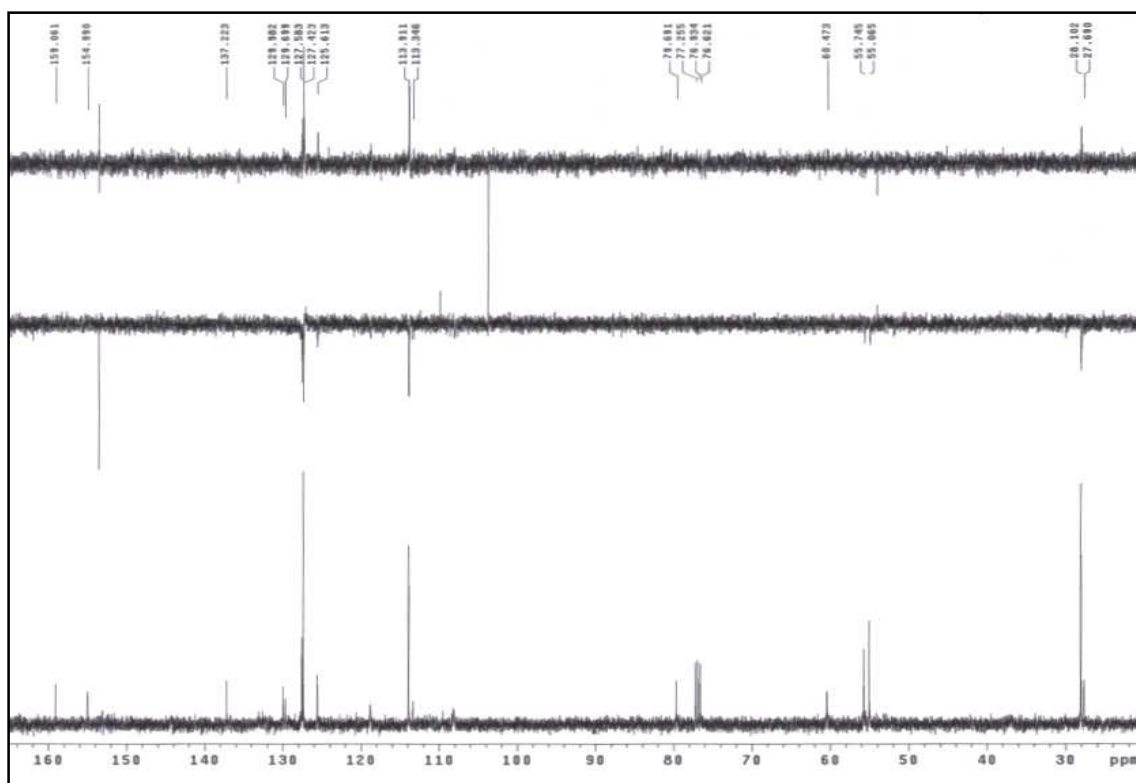


Figura LXXXVIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **96Z**.

Figura LXXXVIc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **96E**.Figura LXXXVIId: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **96E**.

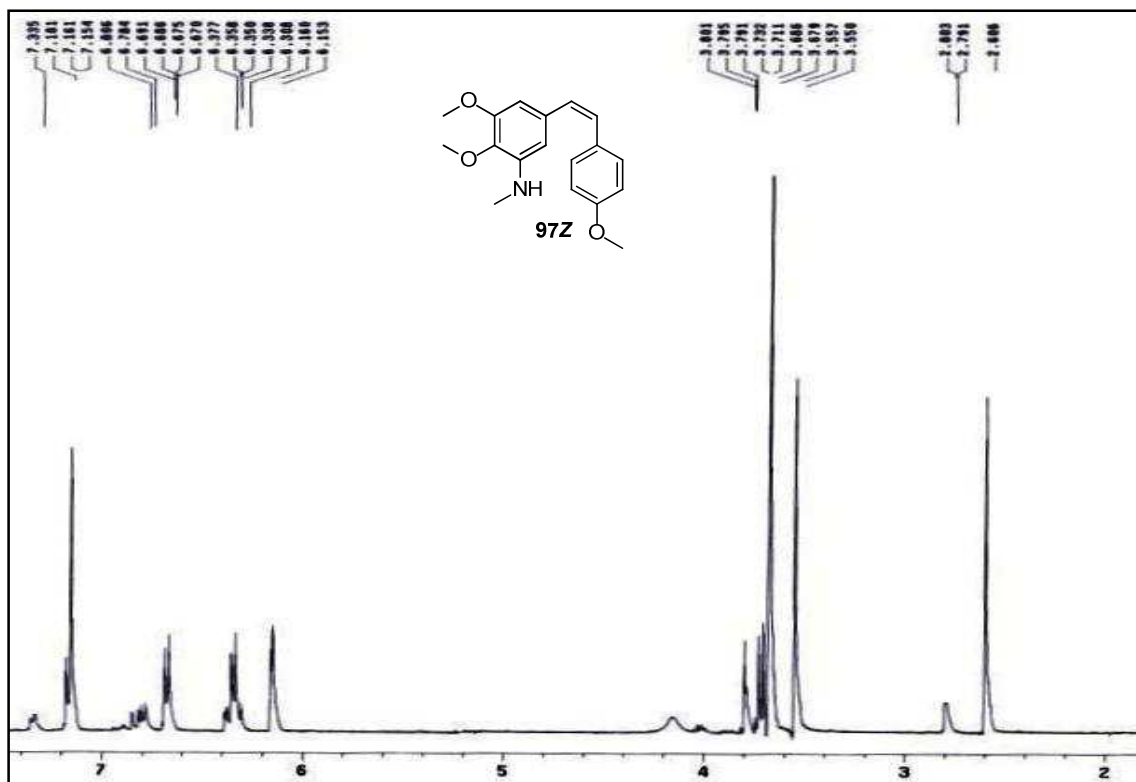


Figura LXXXVIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **97Z**.

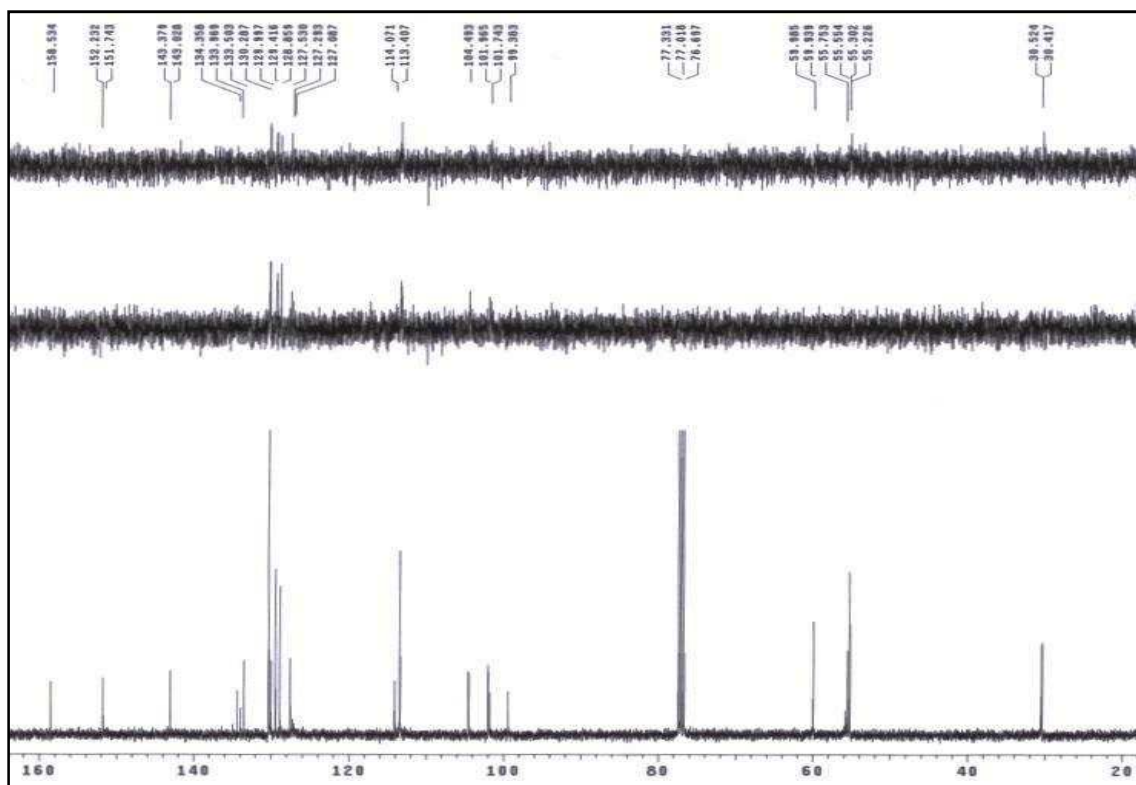
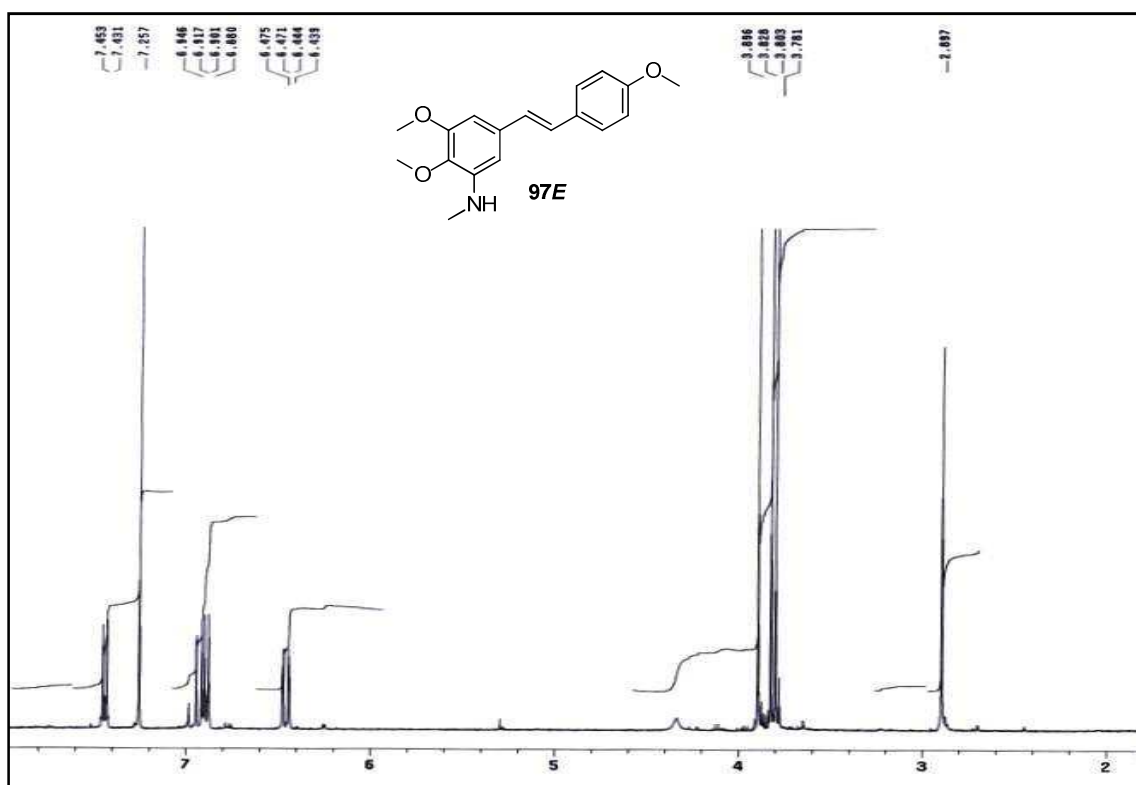
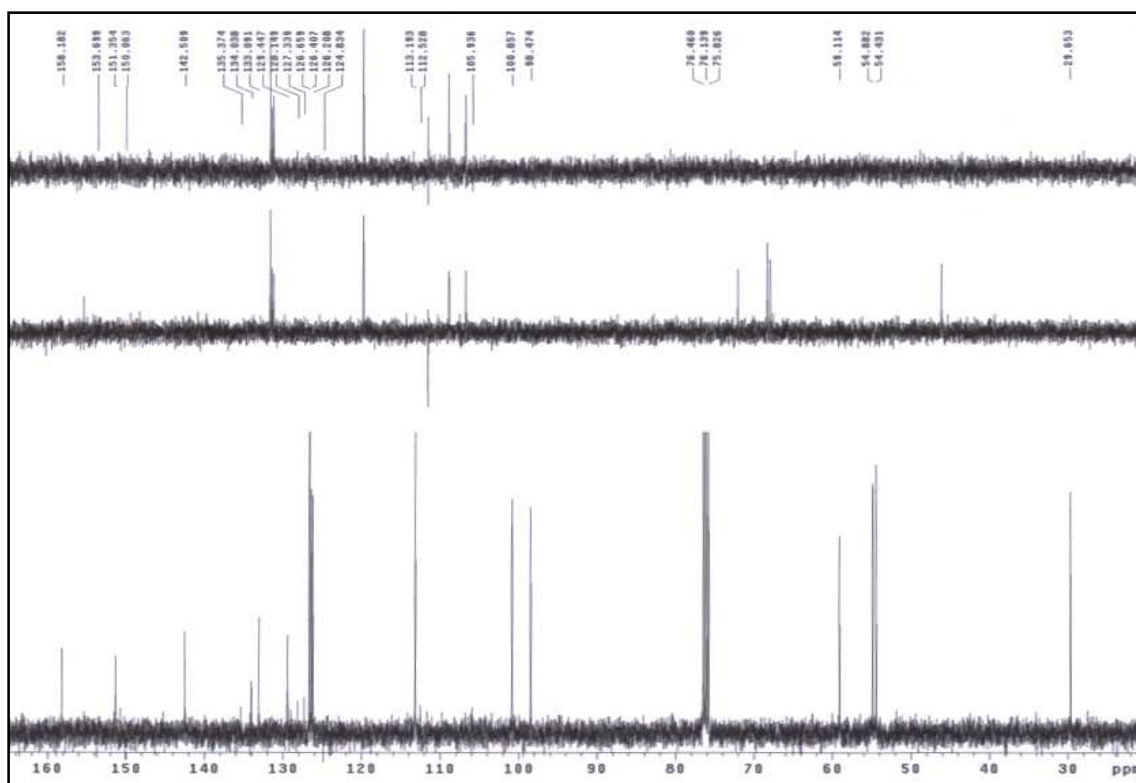


Figura LXXXVIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **97Z**.

Figura LXXXVIIc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **97E**.Figura LXXXVIIId: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **97E**.

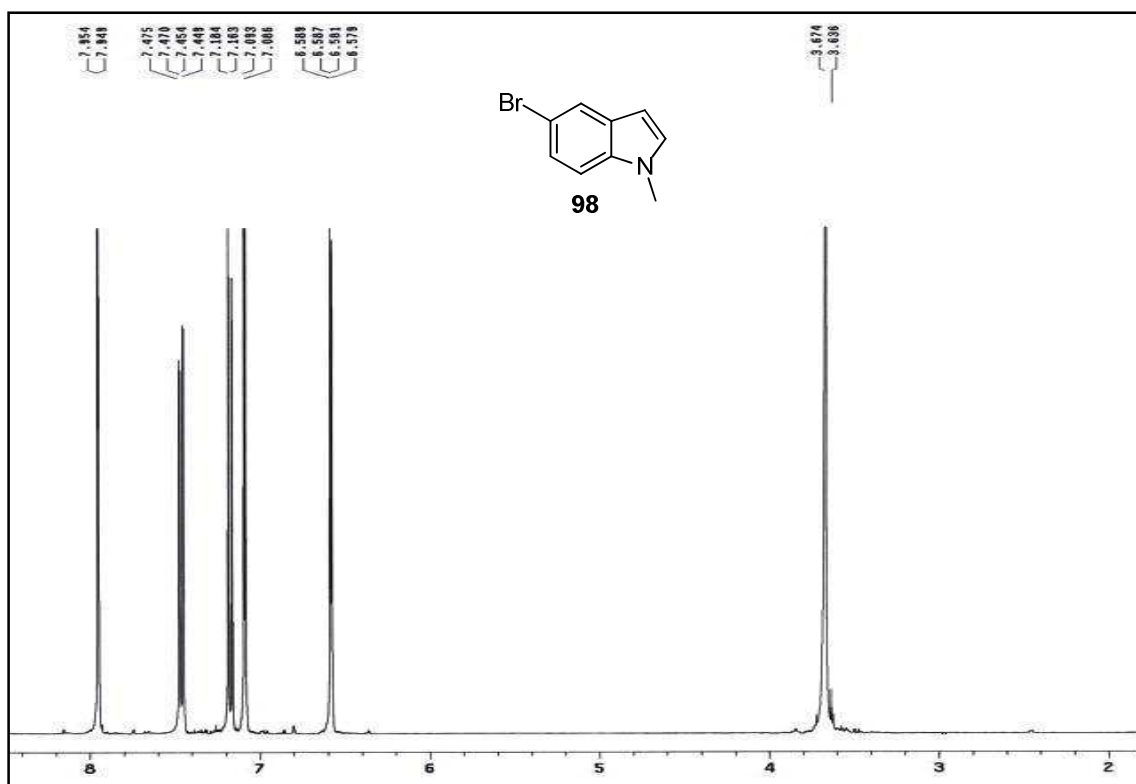


Figura LXXXVIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **98**.

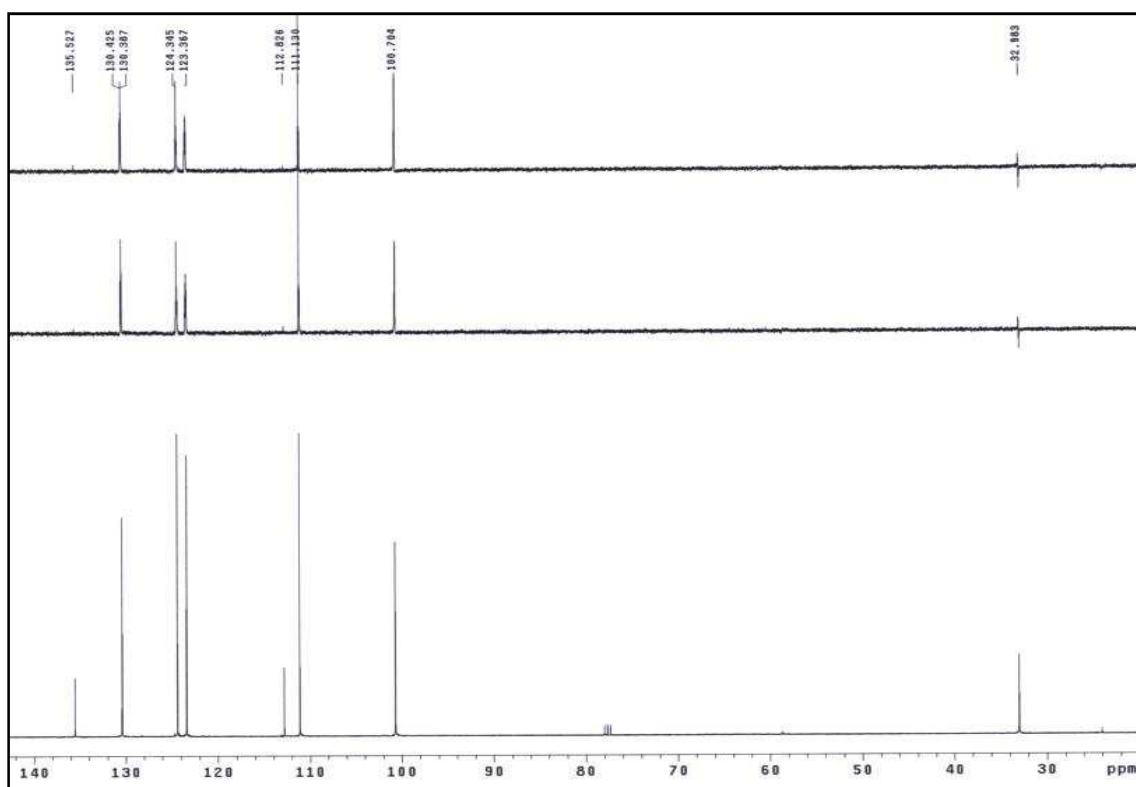
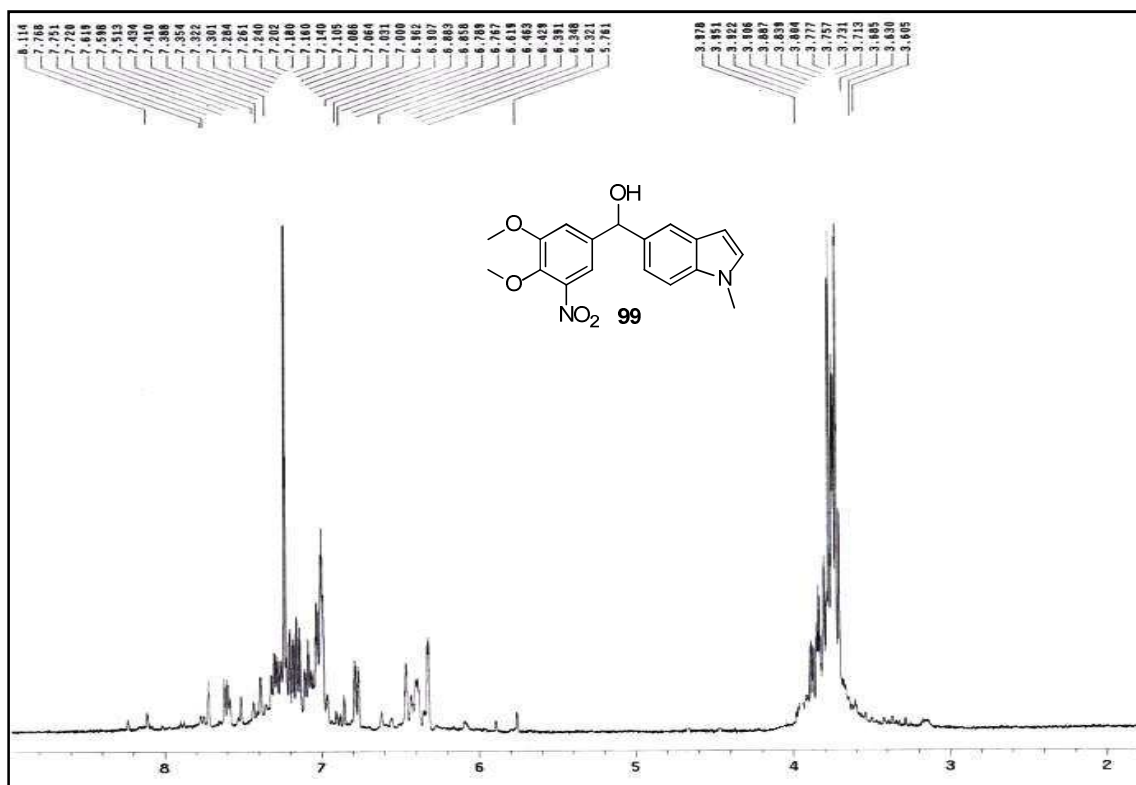


Figura LXXXVIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **98**.

Figura LXXXIX: Espectro de RMN ^1H del compuesto **99**.

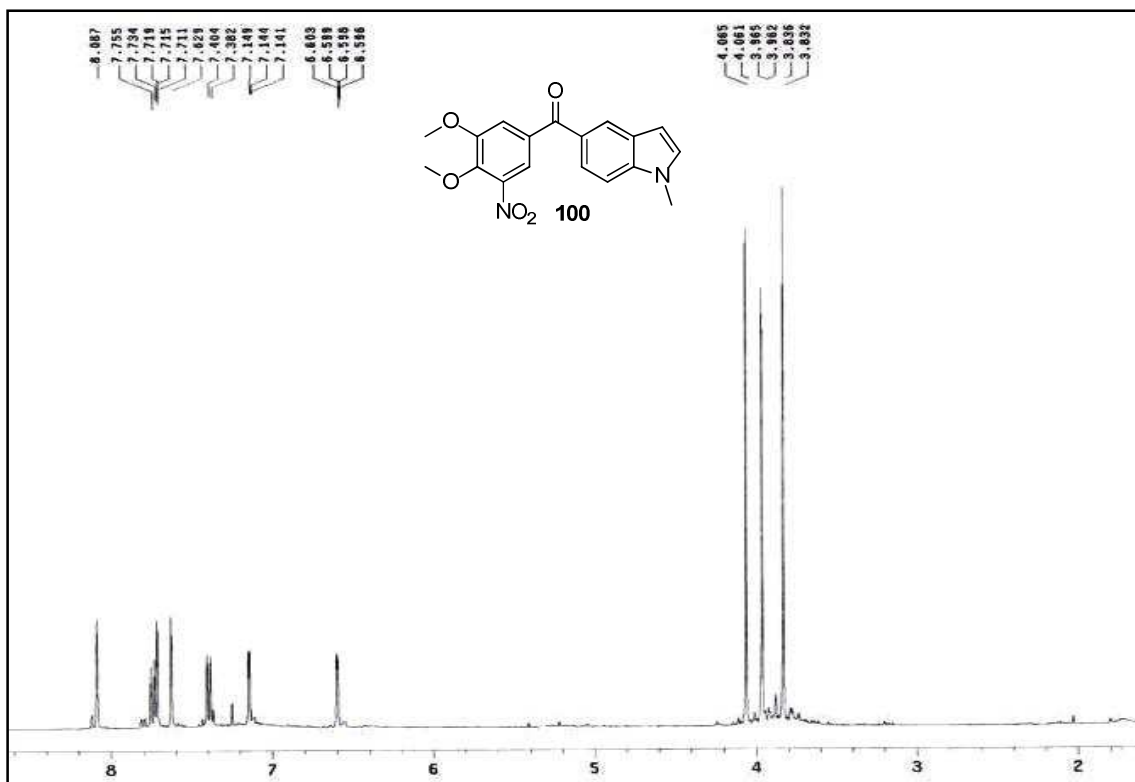


Figura XCa: Espectro de RMN ¹H del compuesto **100**.

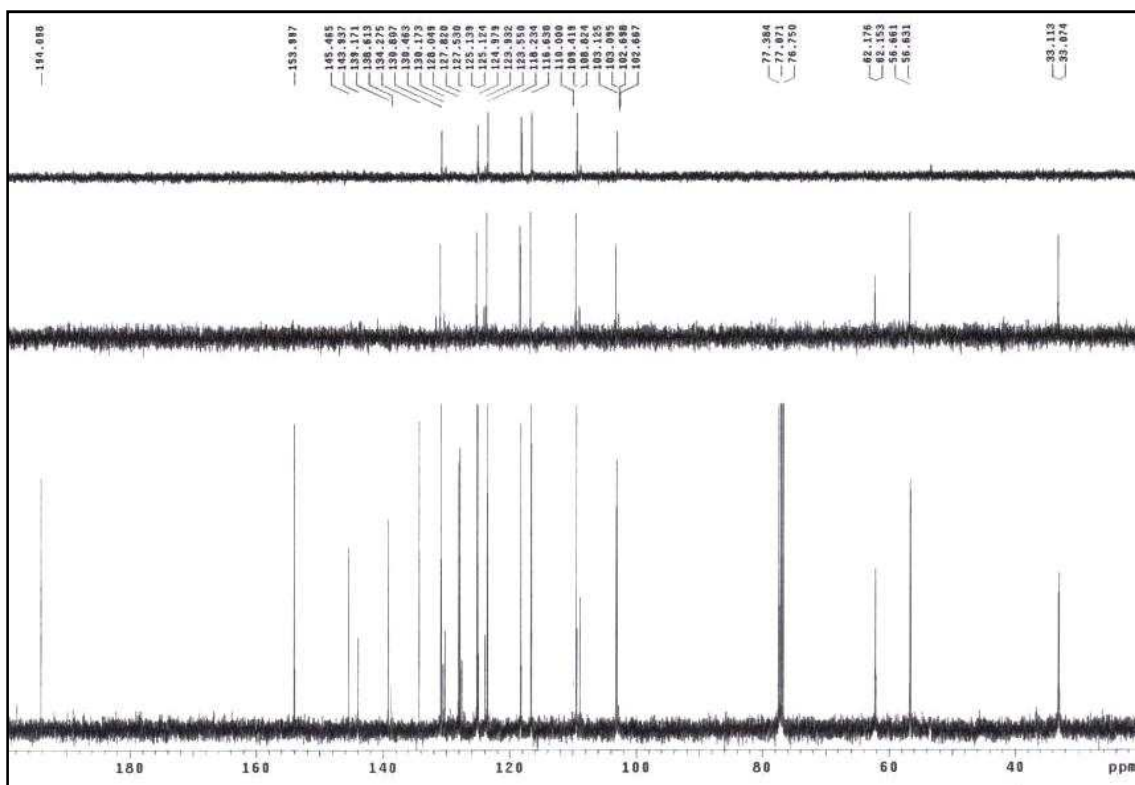


Figura XCb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **100**.

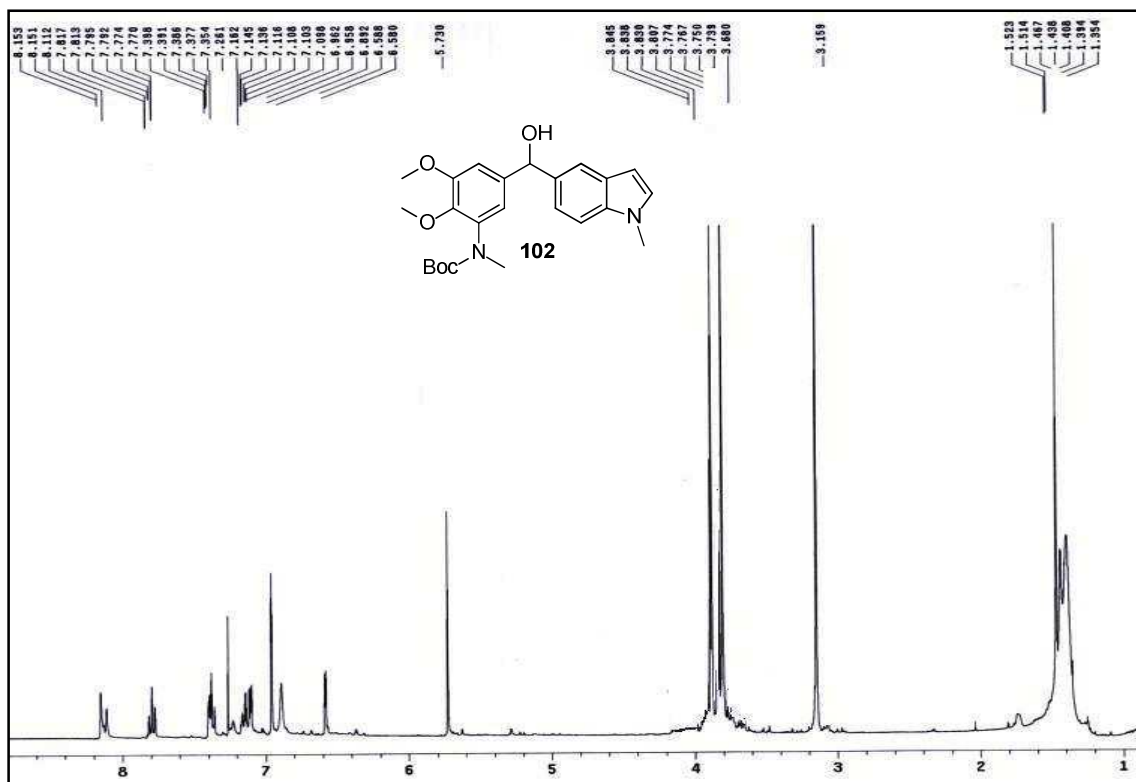


Figura XCIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **102**.

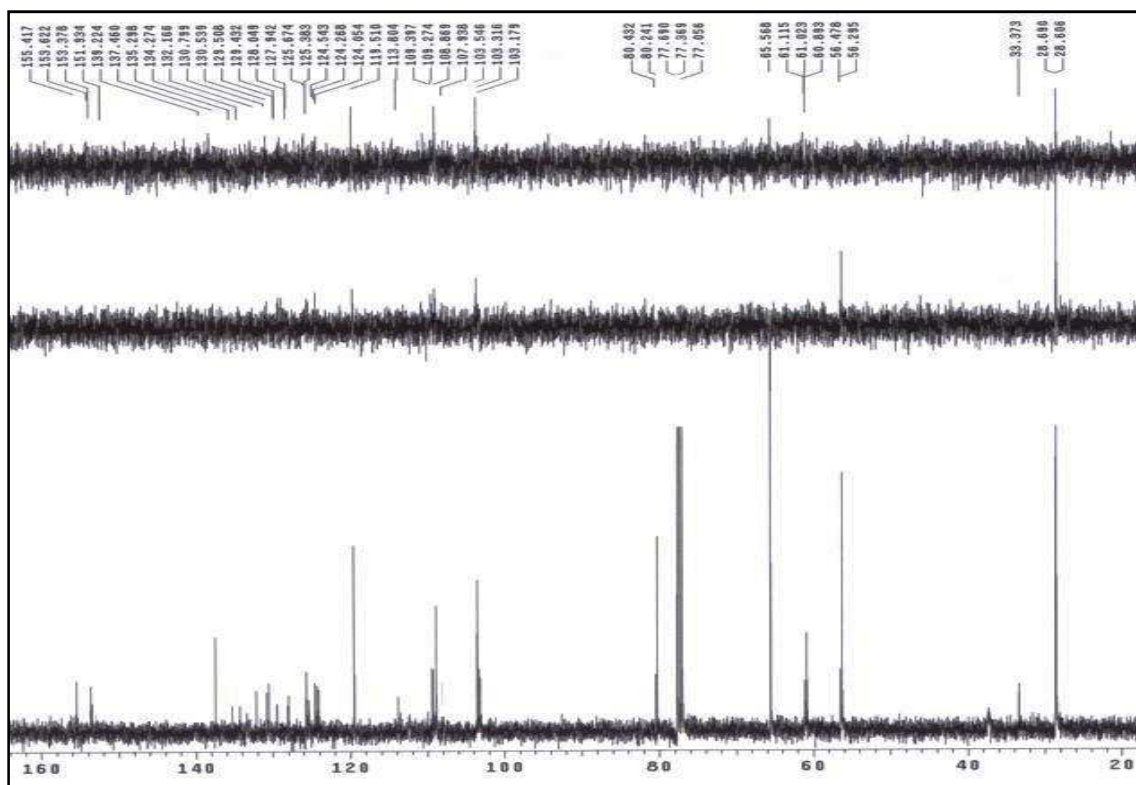
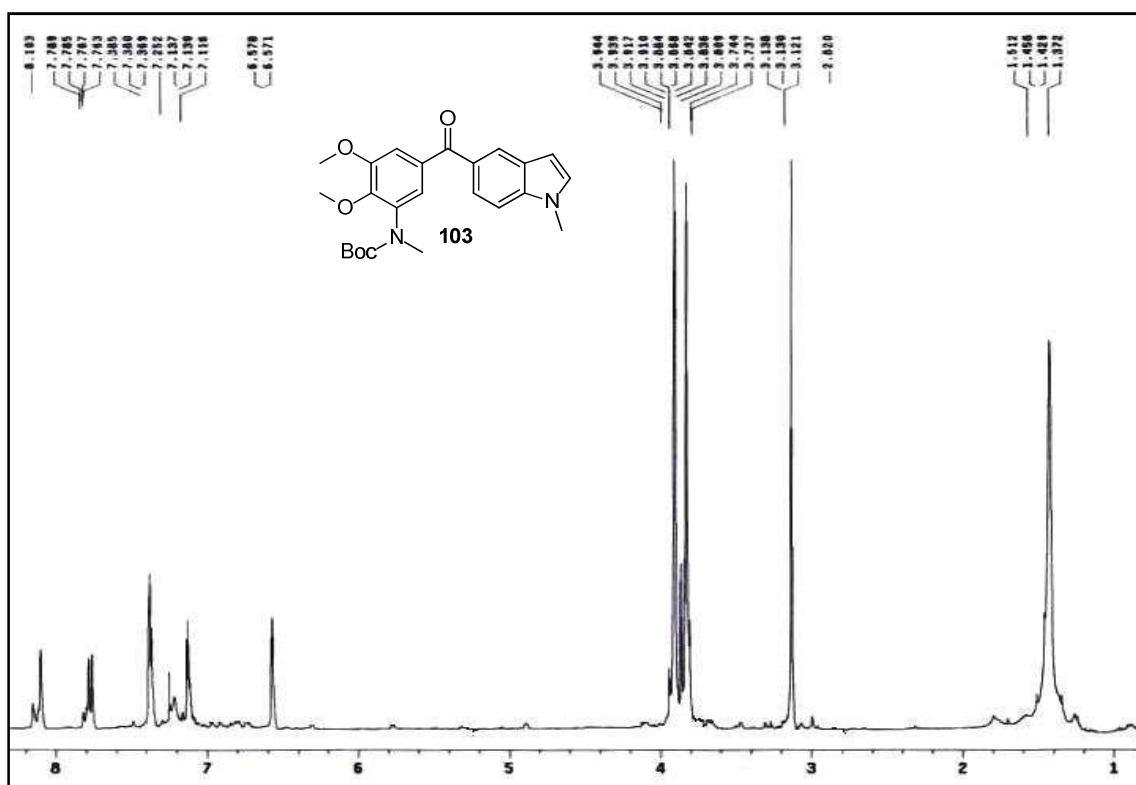
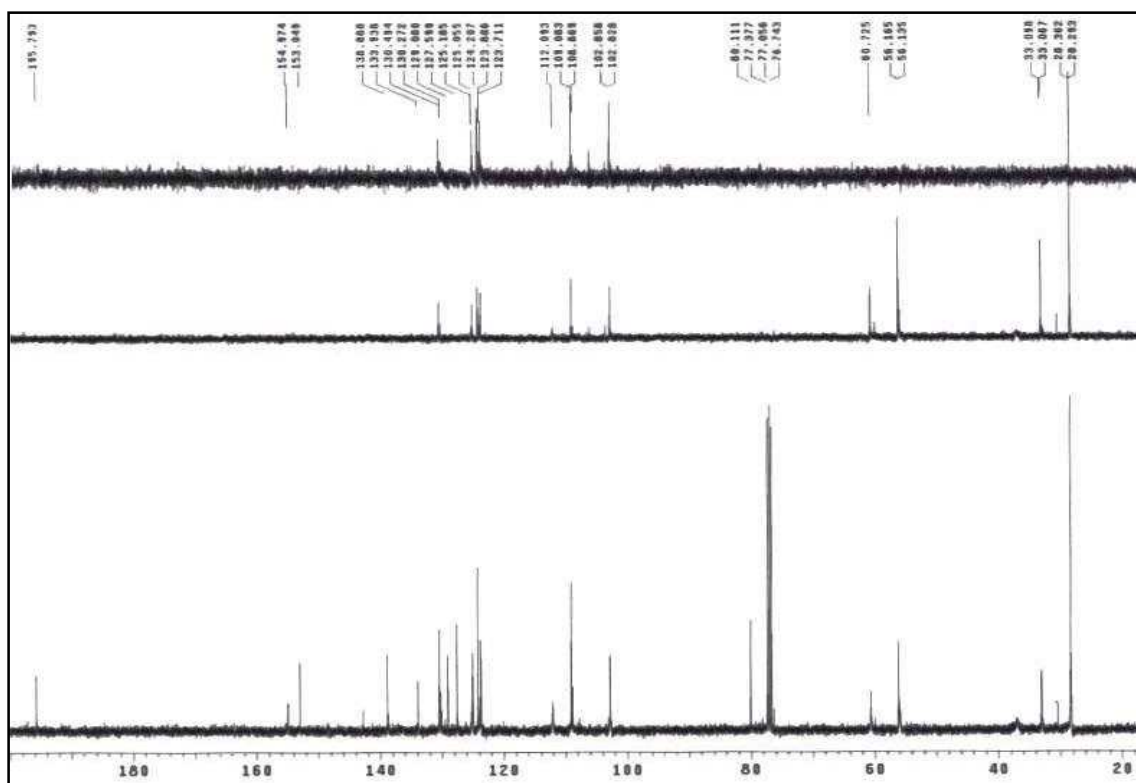


Figura XCIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **102**.

Figura XCIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **103**.Figura XCIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **103**.

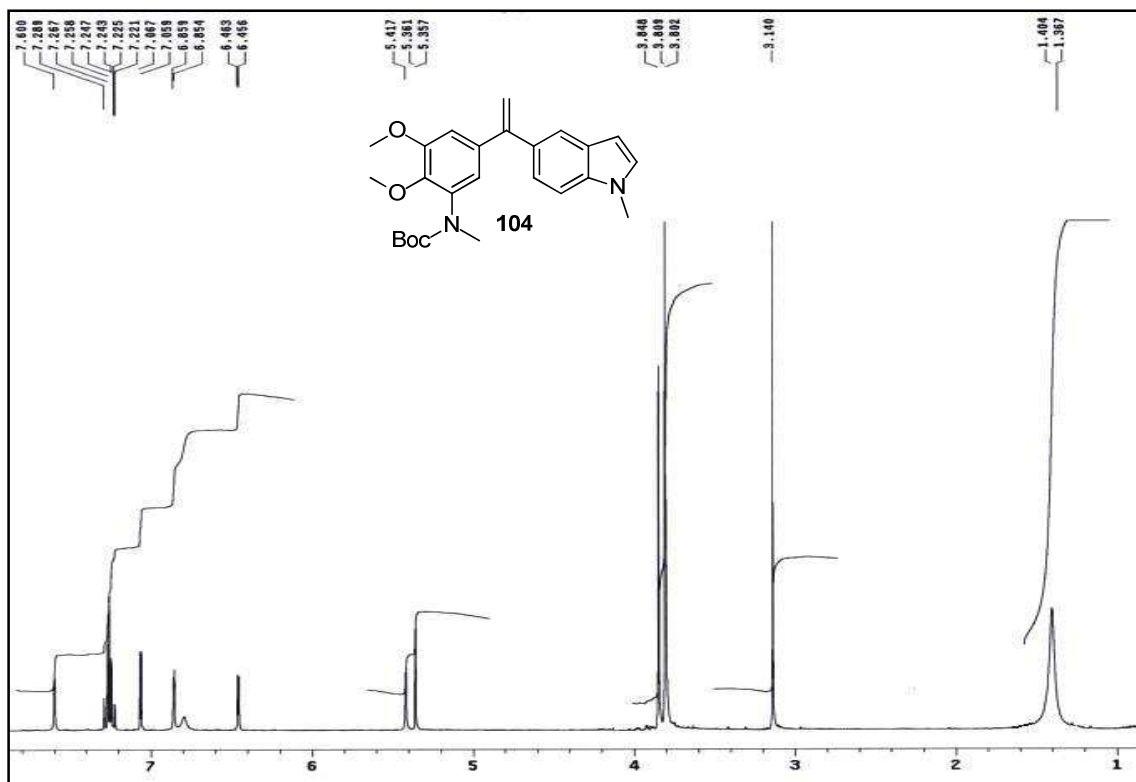


Figura XCIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **104**.

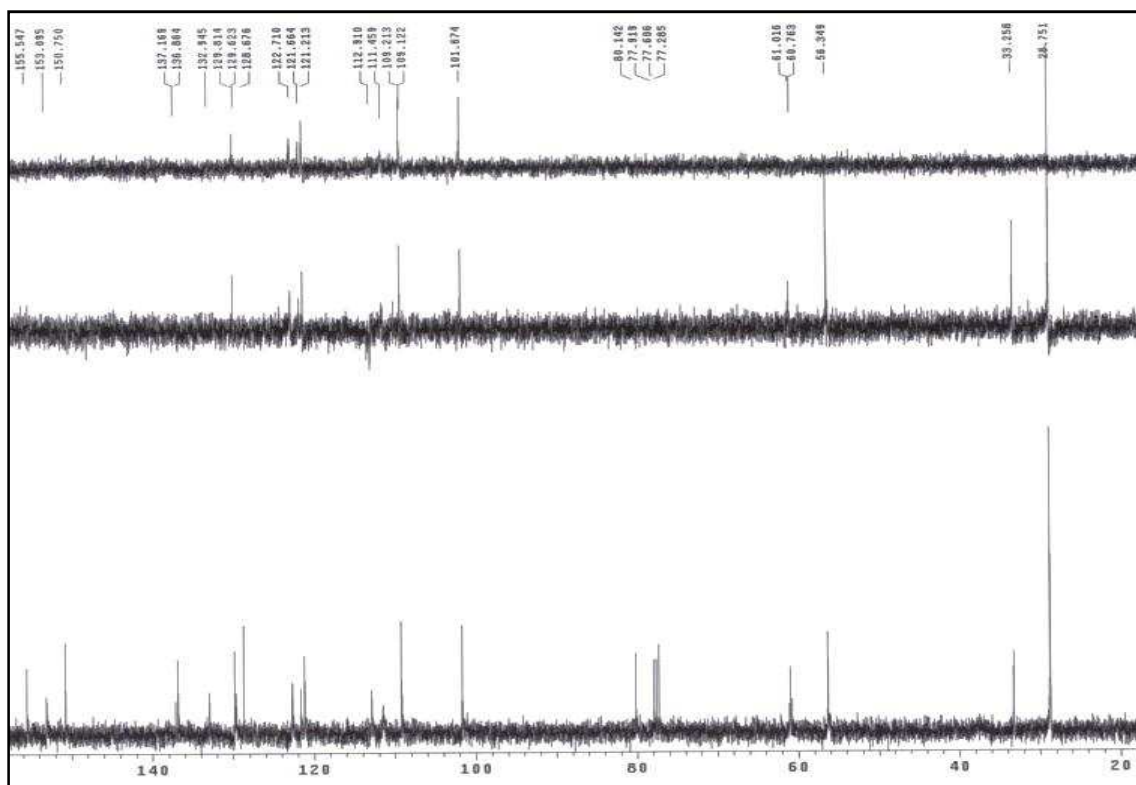
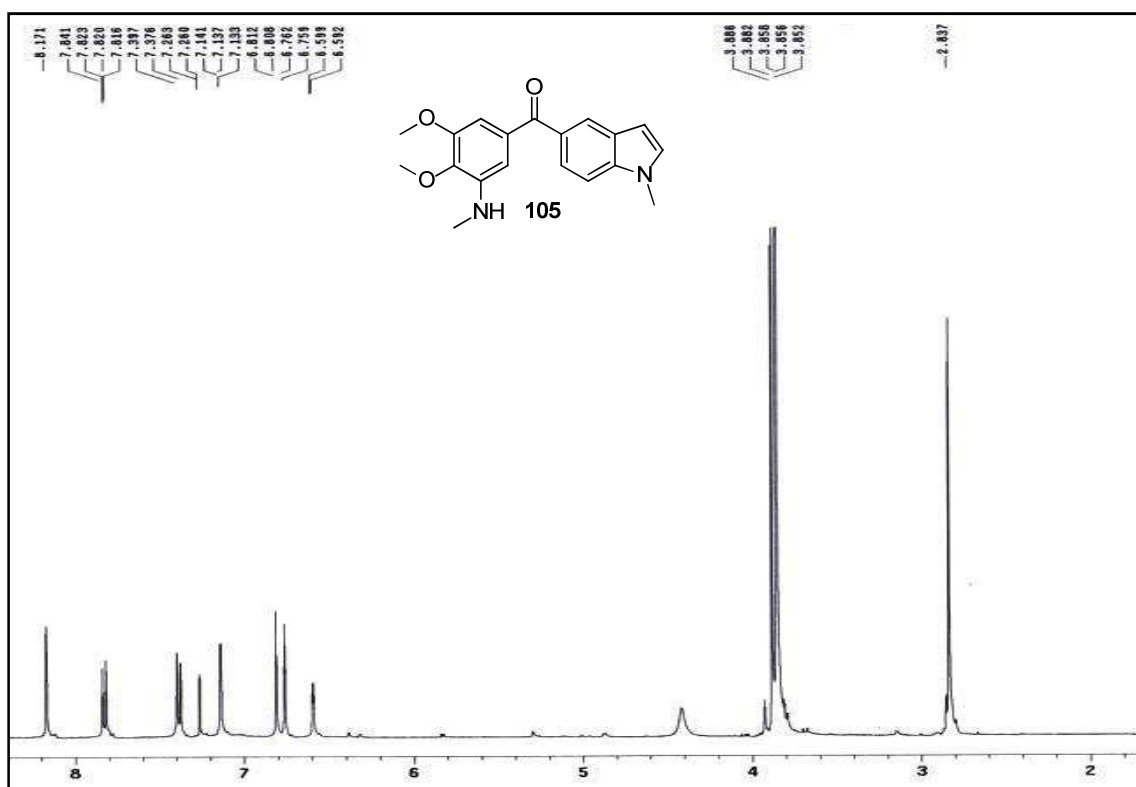
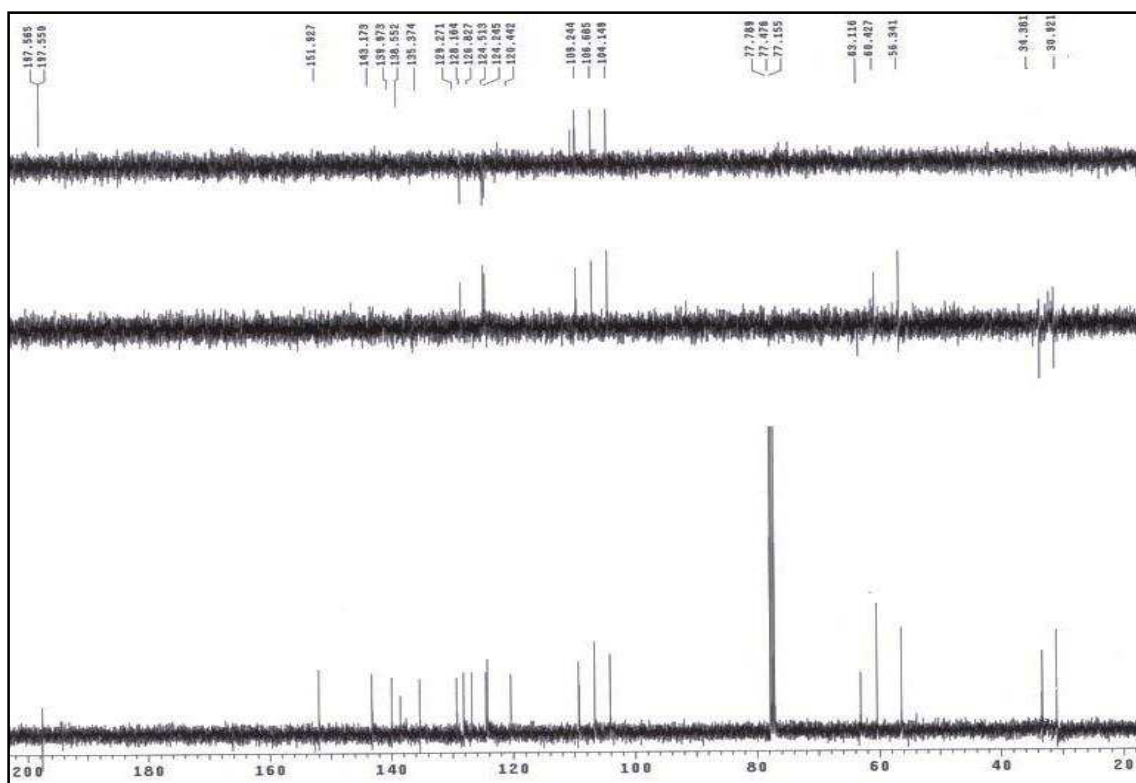


Figura XCIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **104**.

Figura XCVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **105**.Figura XCVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **105**.

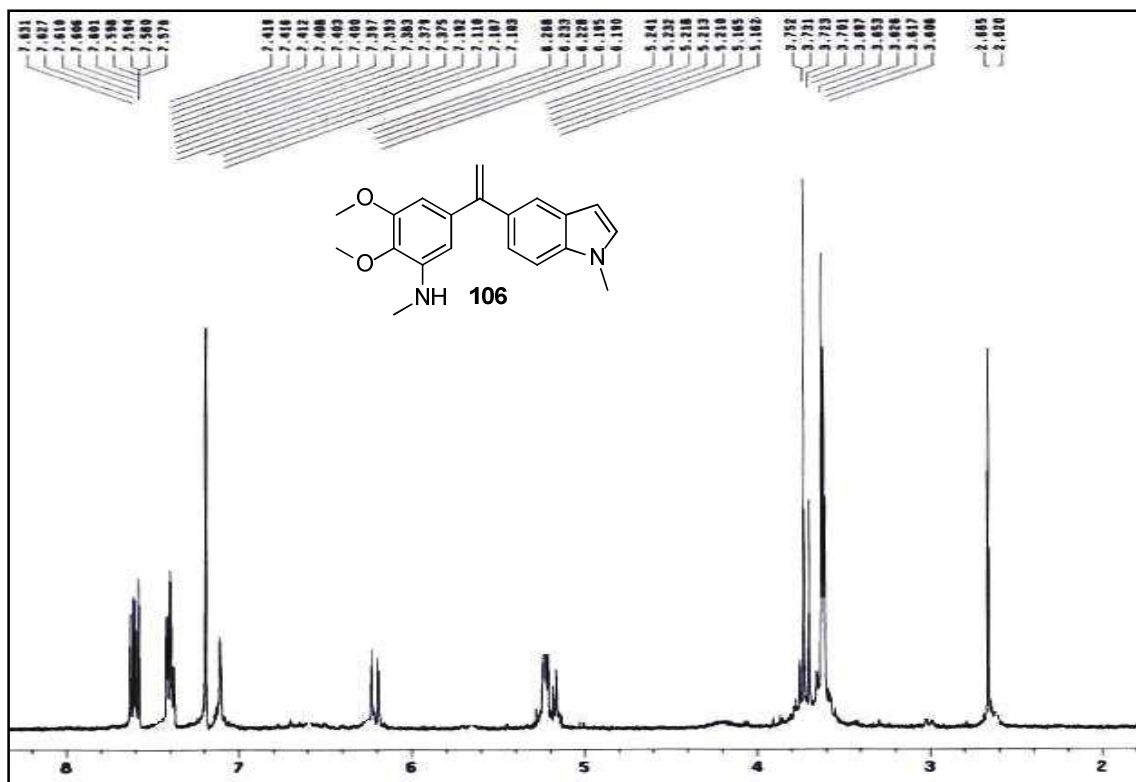
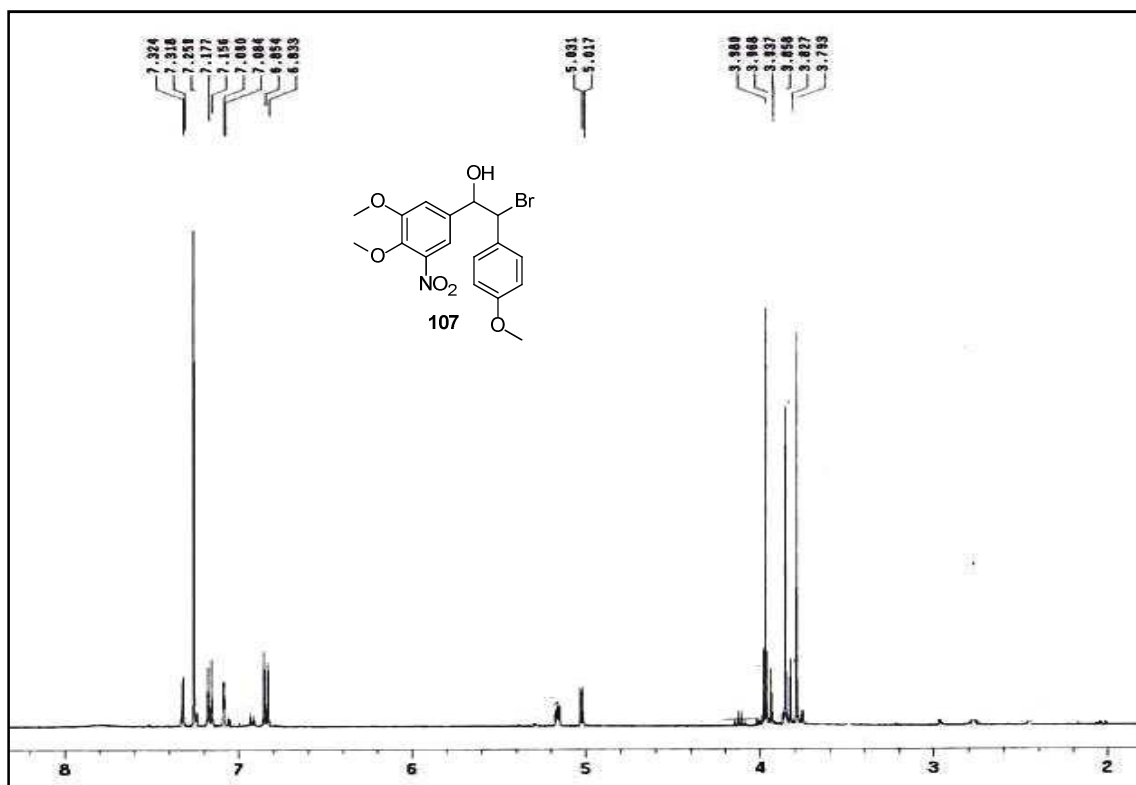
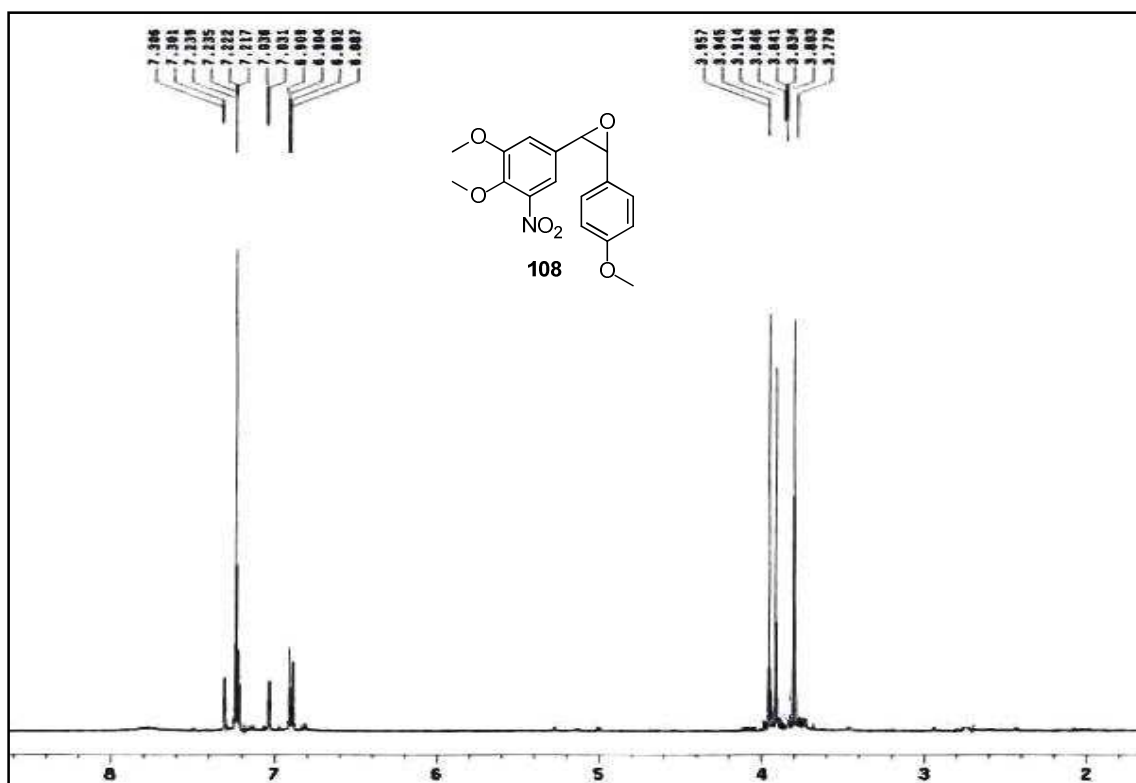


Figura XCVI: Espectro de RMN ^1H del compuesto **106**.

Figura XCVII: Espectro de RMN ^1H del compuesto **107**.Figura XCVIII: Espectro de RMN ^1H del compuesto **108**.

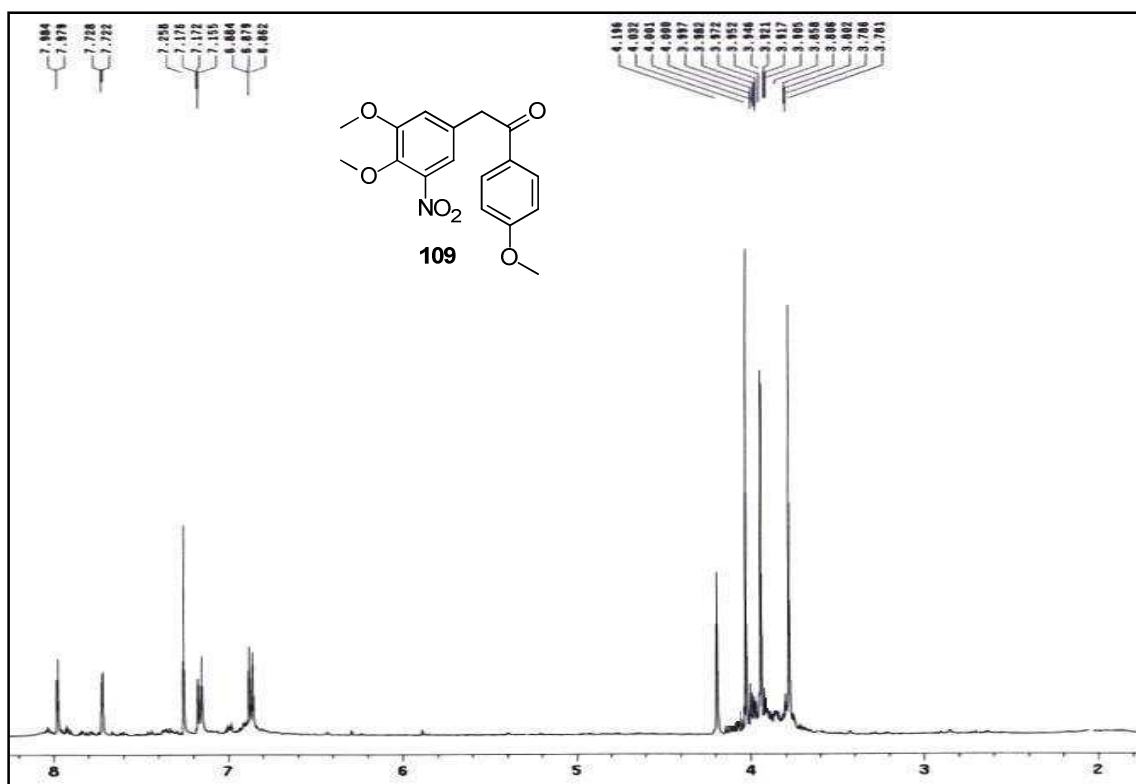


Figura XCIXa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **109**.

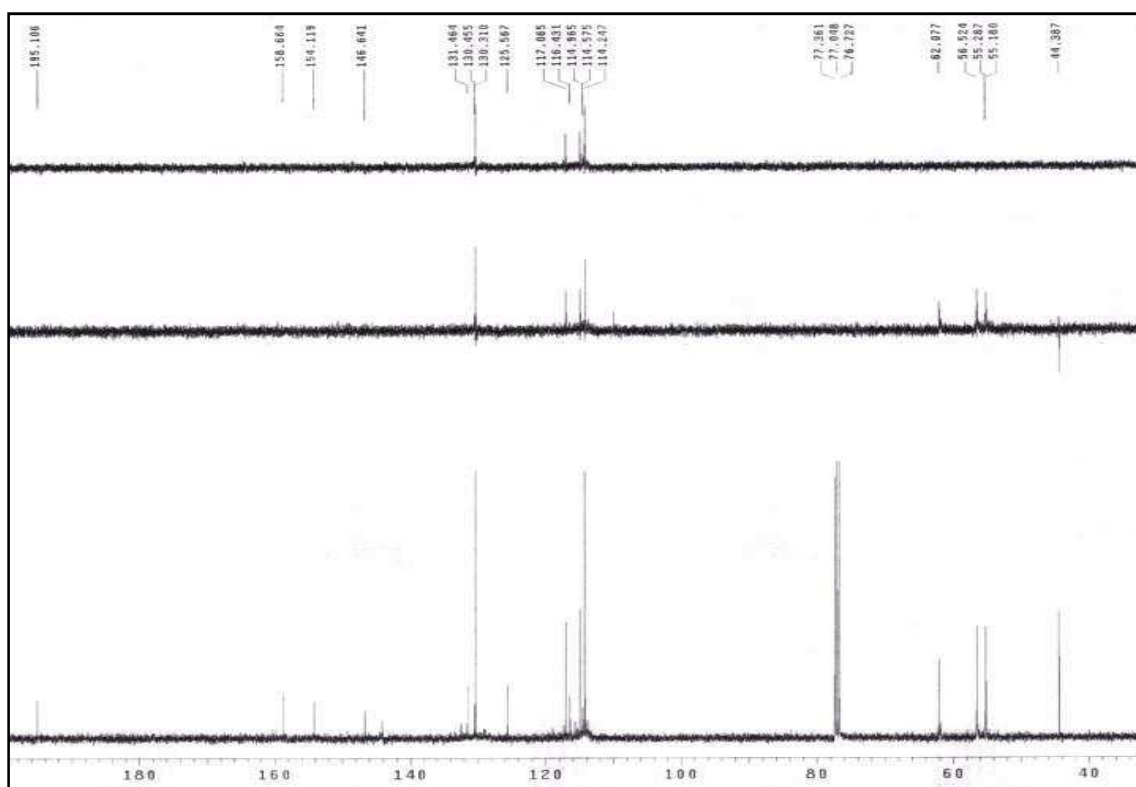
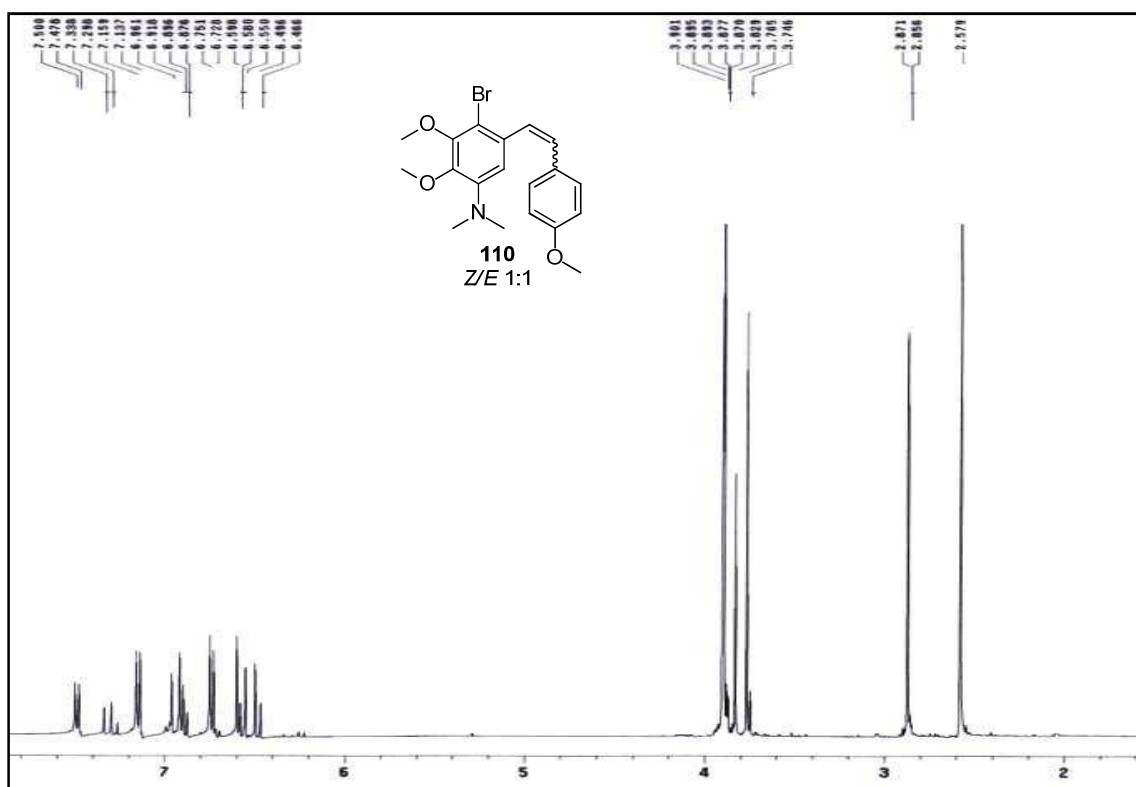
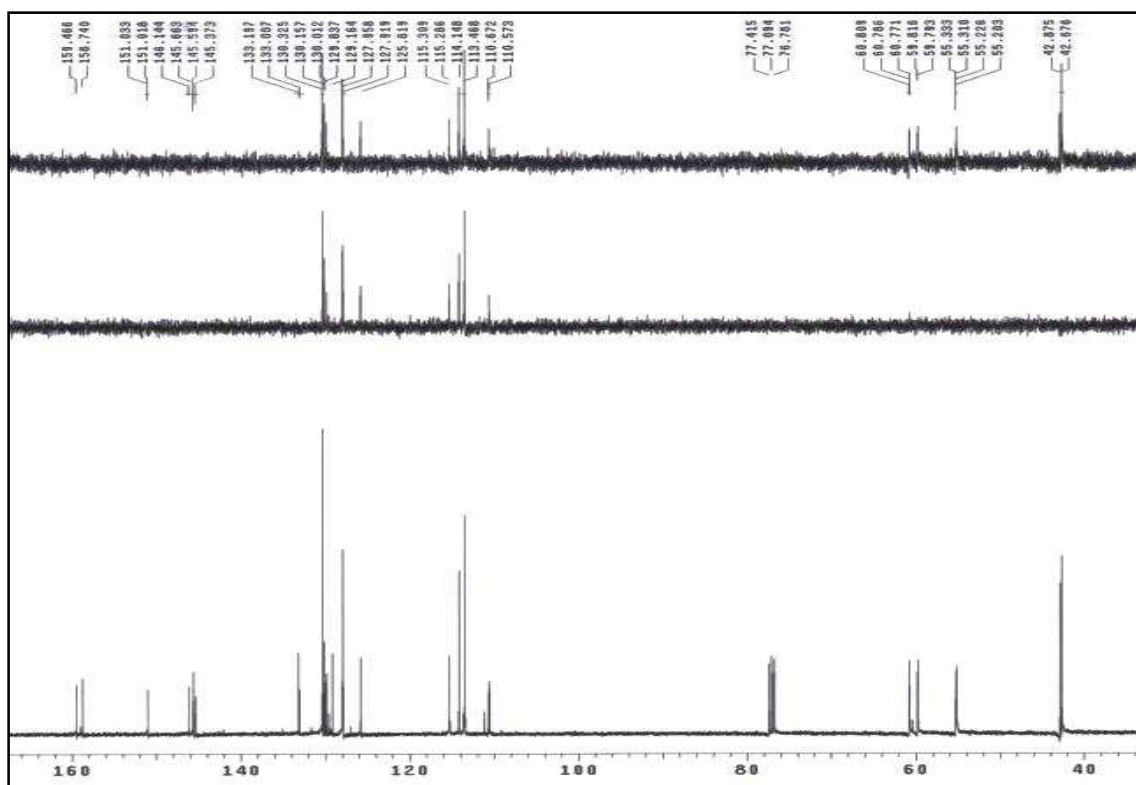


Figura XCIXb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **109**.

Figura Ca: Espectro de RMN ¹H del compuesto 110.Figura Cb: Espectro de RMN ¹³C del compuesto 110.

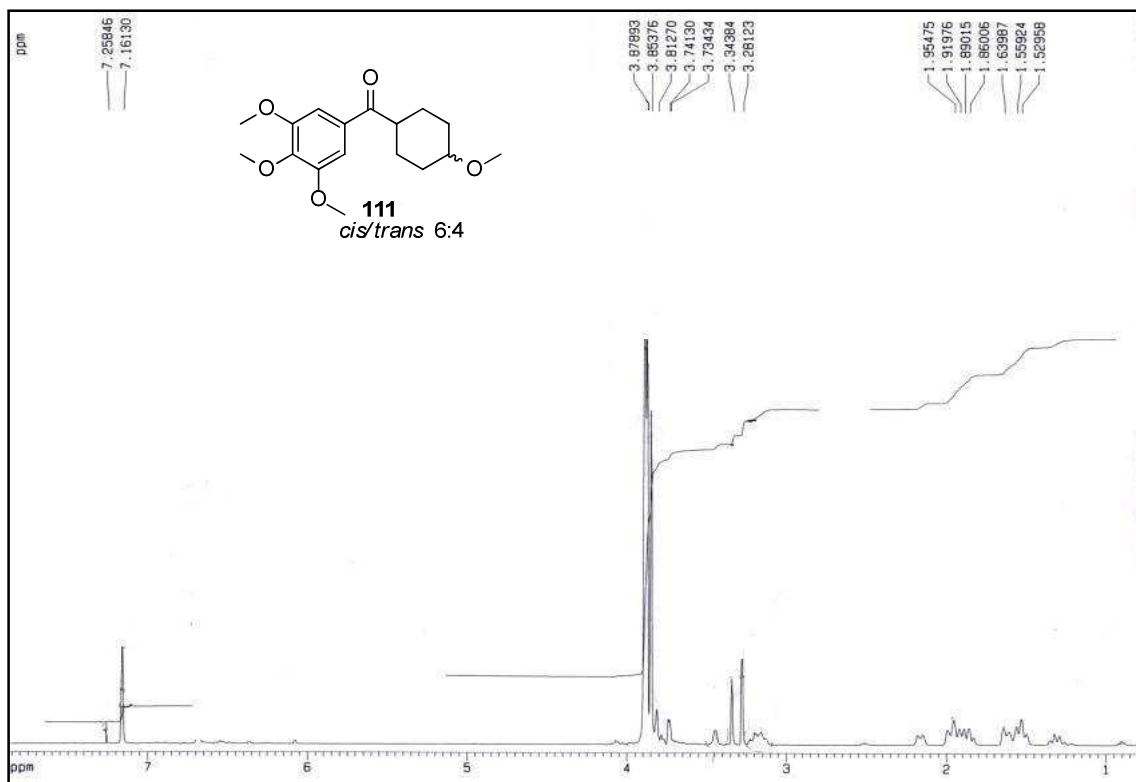


Figura CIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **111**.

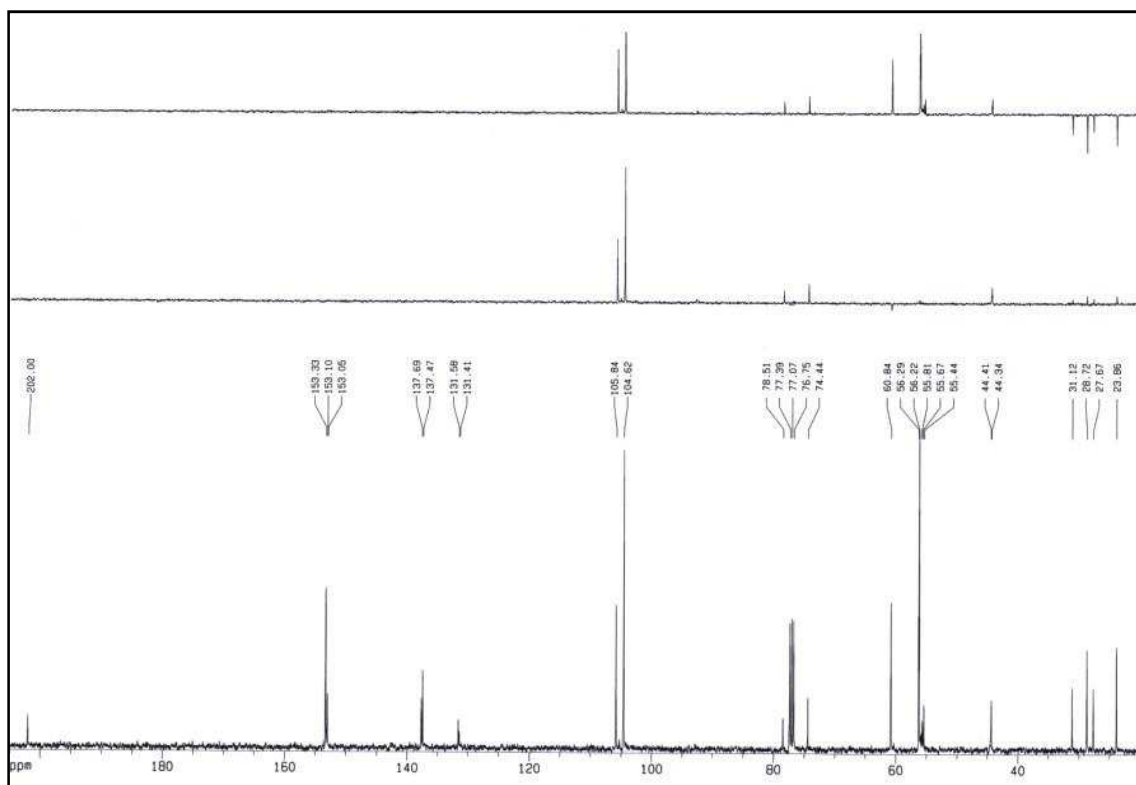
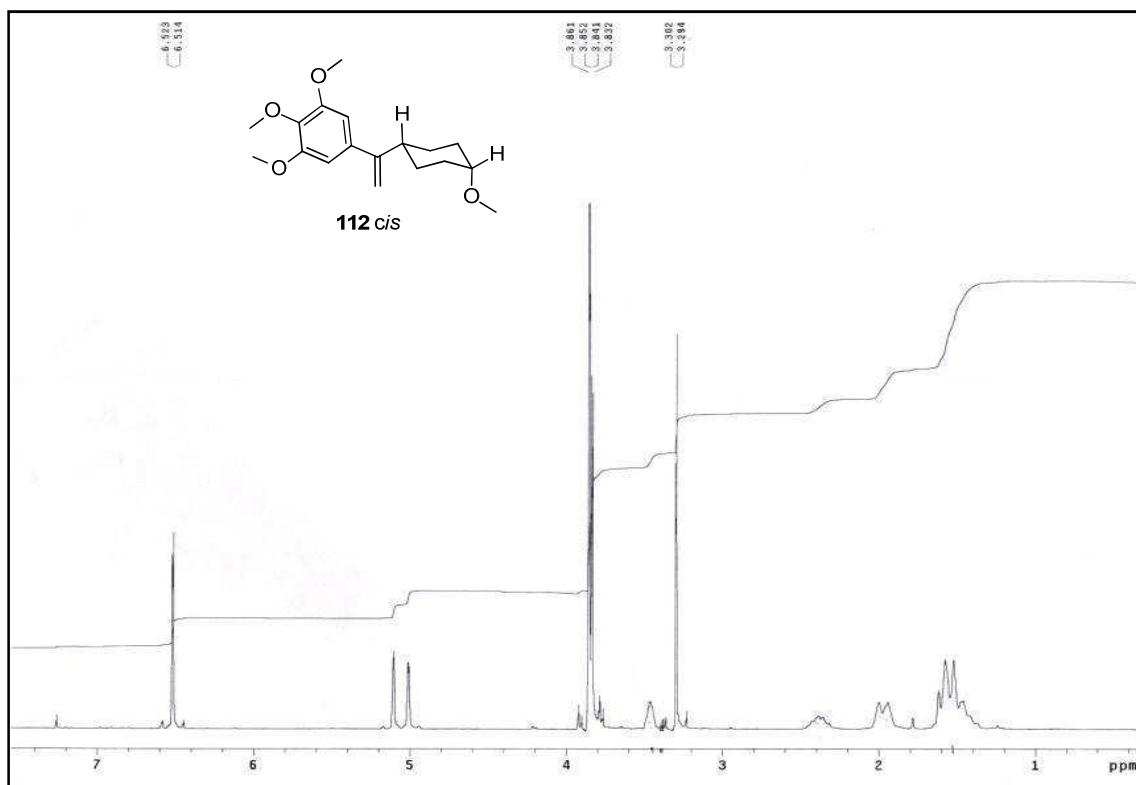
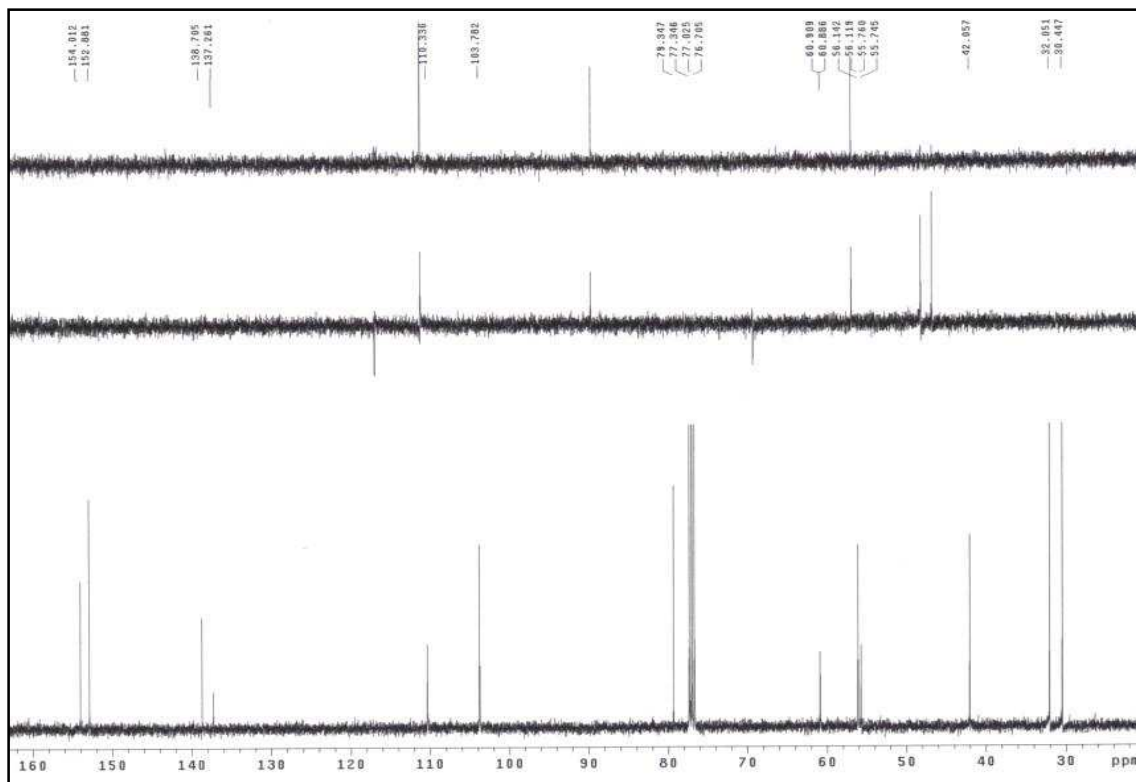


Figura CIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **111**.

Figura CIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **112(cis)**.Figura CIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **112(cis)**.

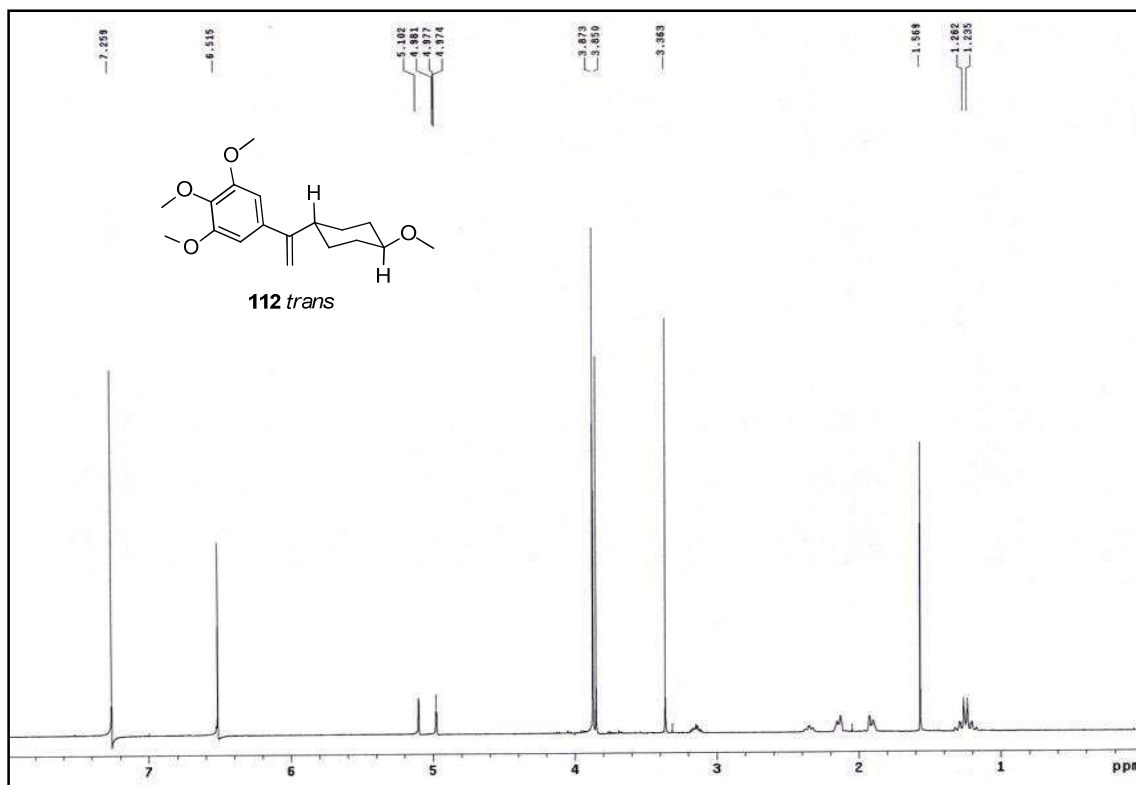
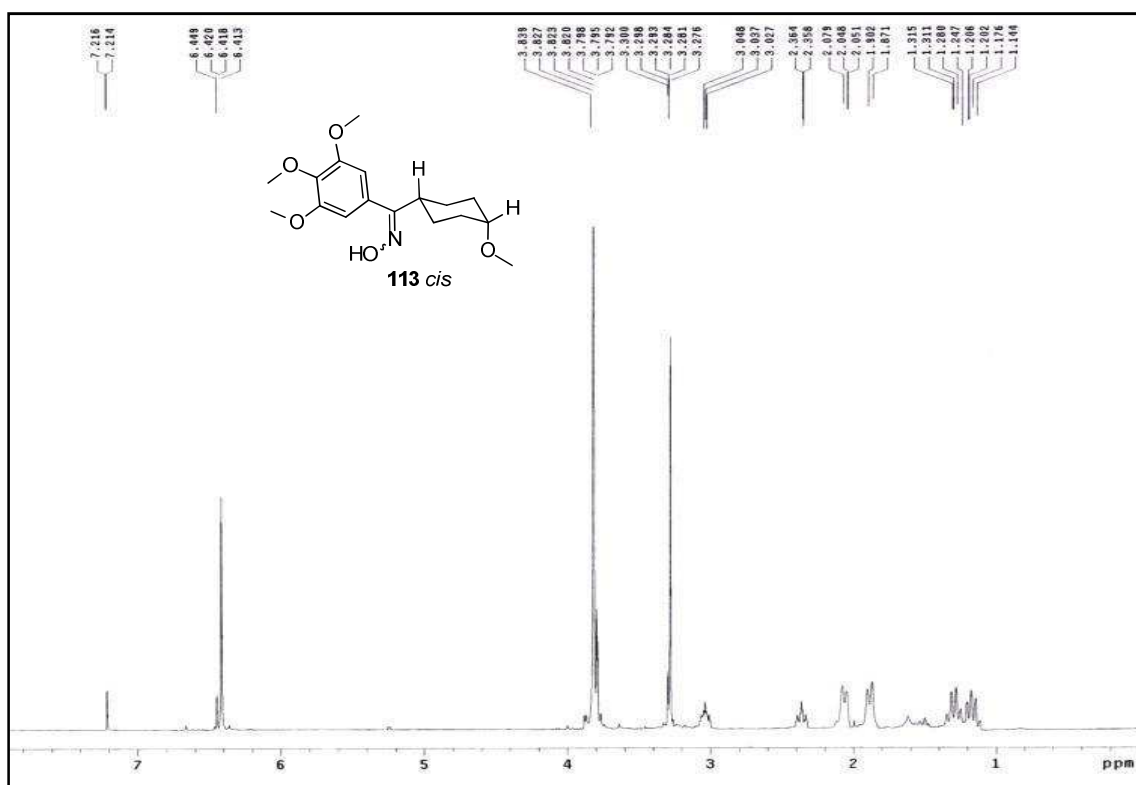
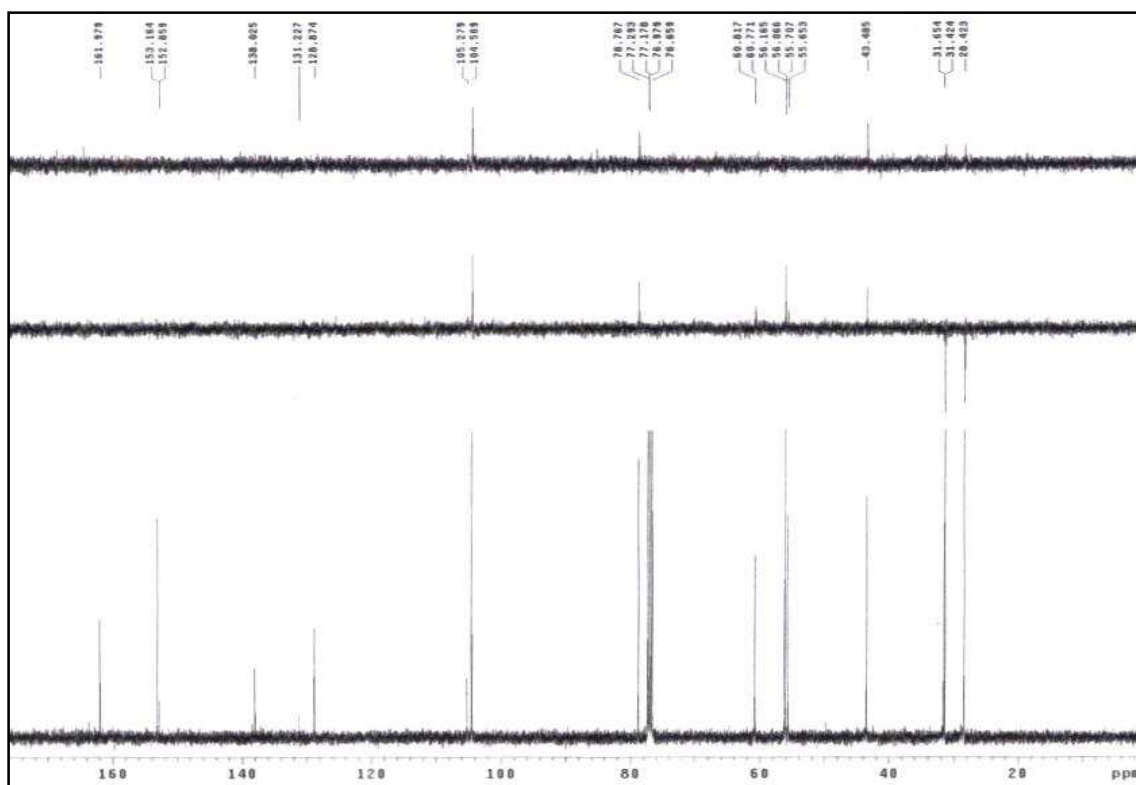


Figura CIIc: Espectro de RMN ¹H del compuesto **112(trans)**.

Figura CIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **113(cis)**.Figura CIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **113(cis)**.

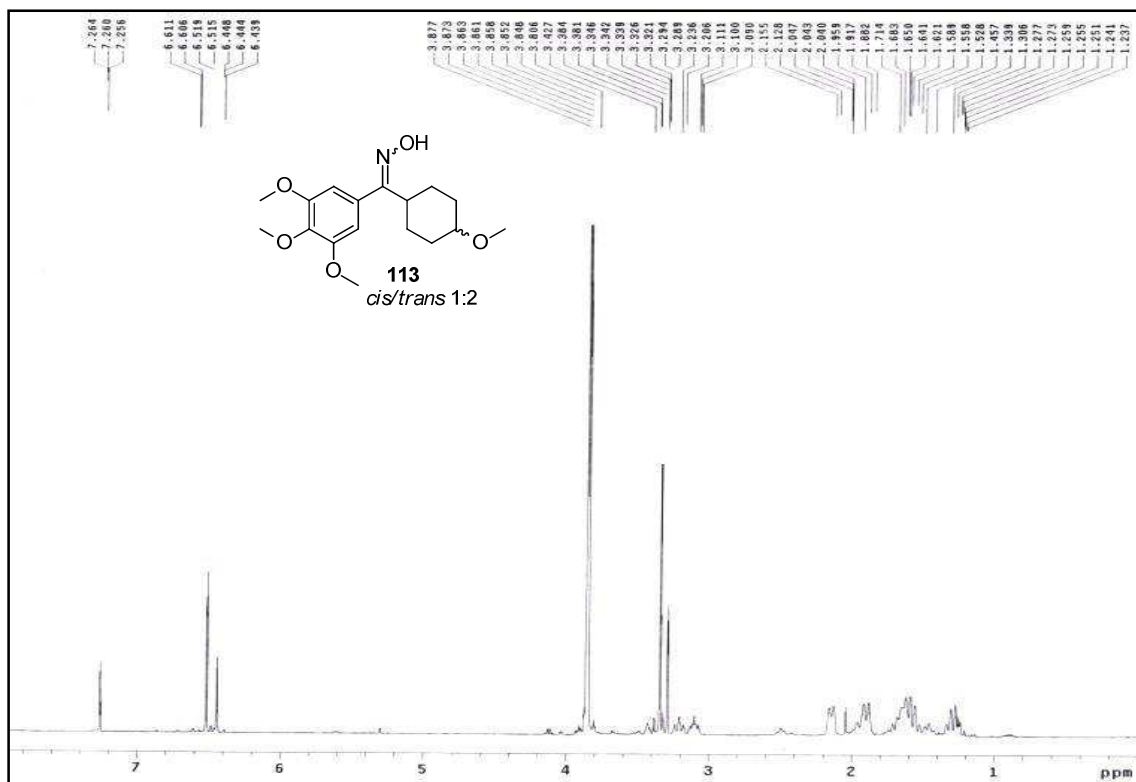
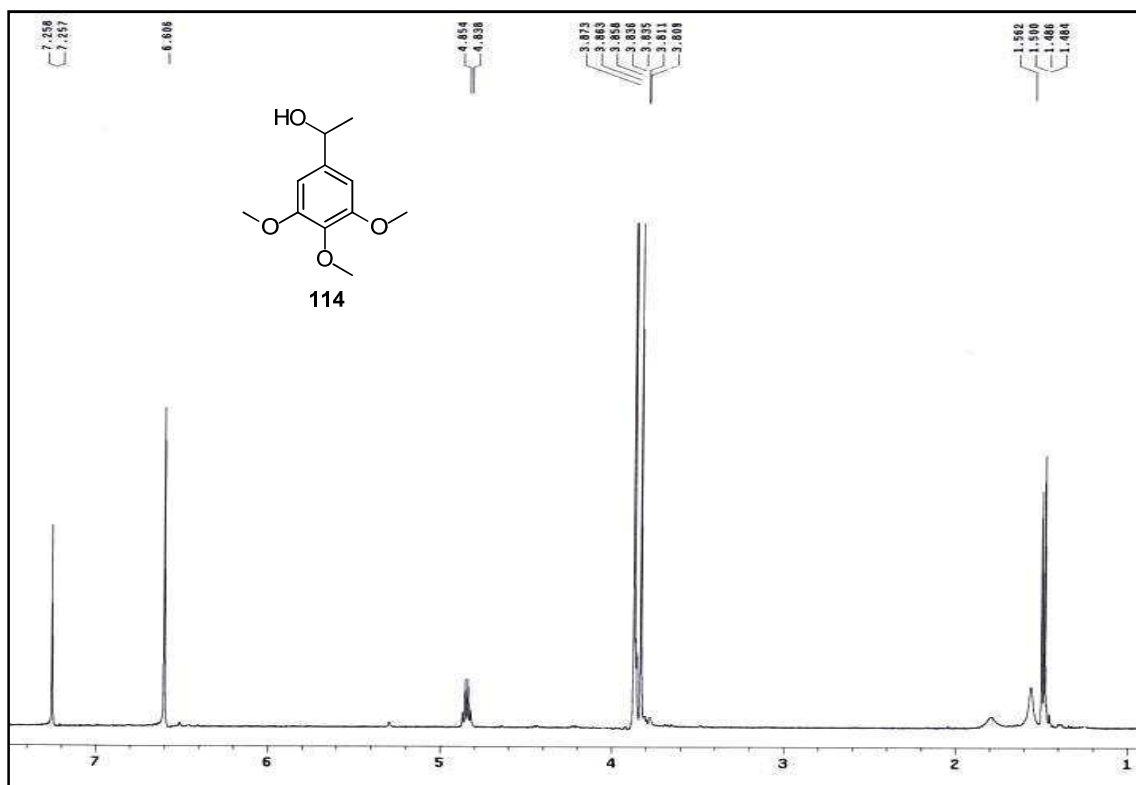
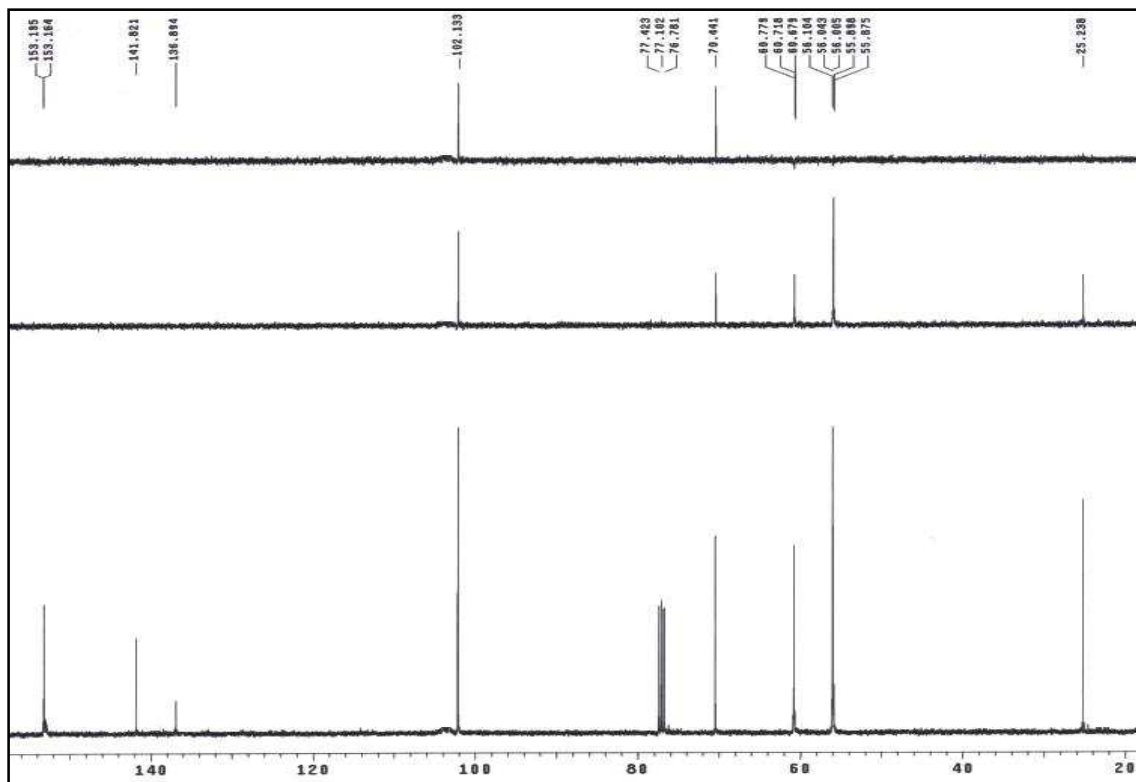


Figura CIIIc: Espectro de RMN ^1H del compuesto **113**(*cis/trans*).

Figura CIVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto 114.Figura CIVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 114.

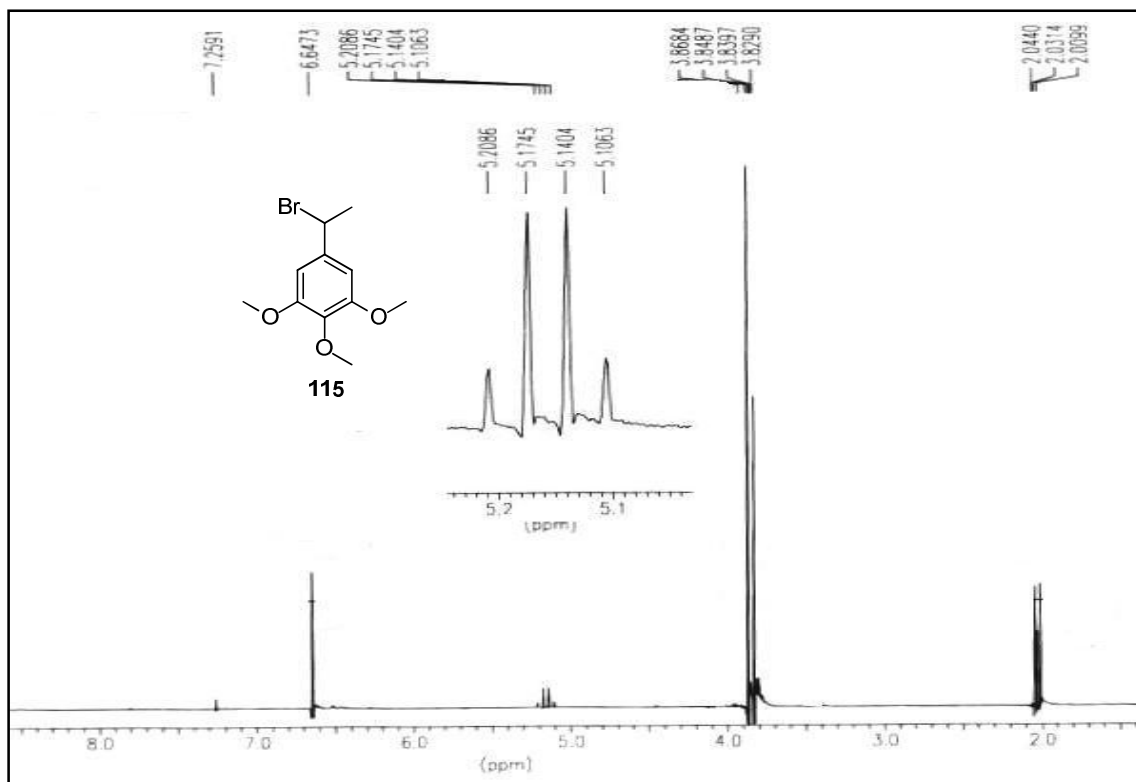


Figura CVa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **115**.

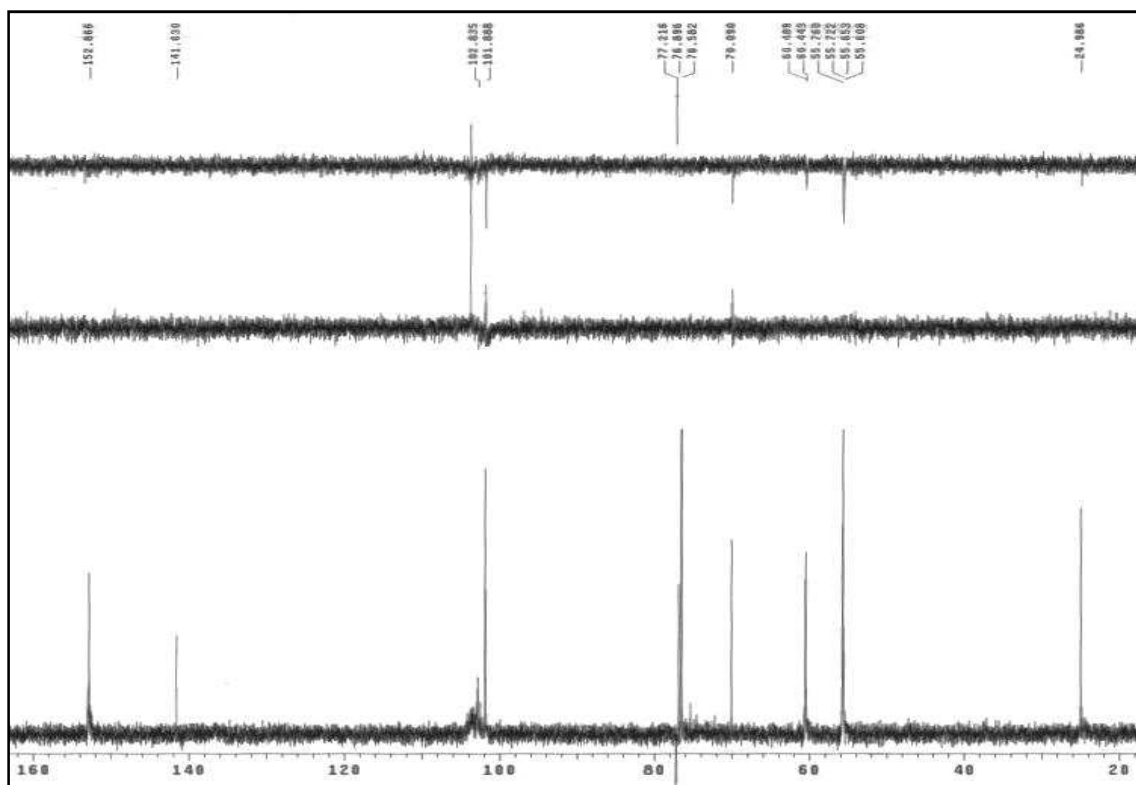
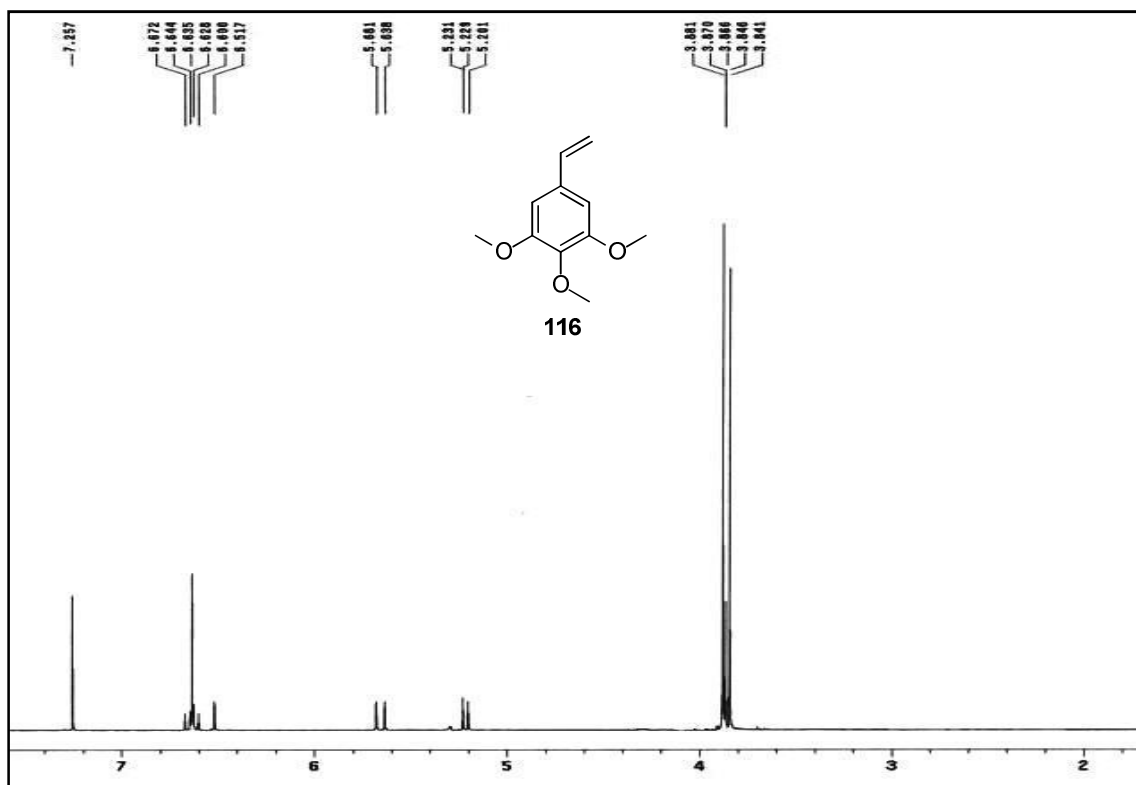
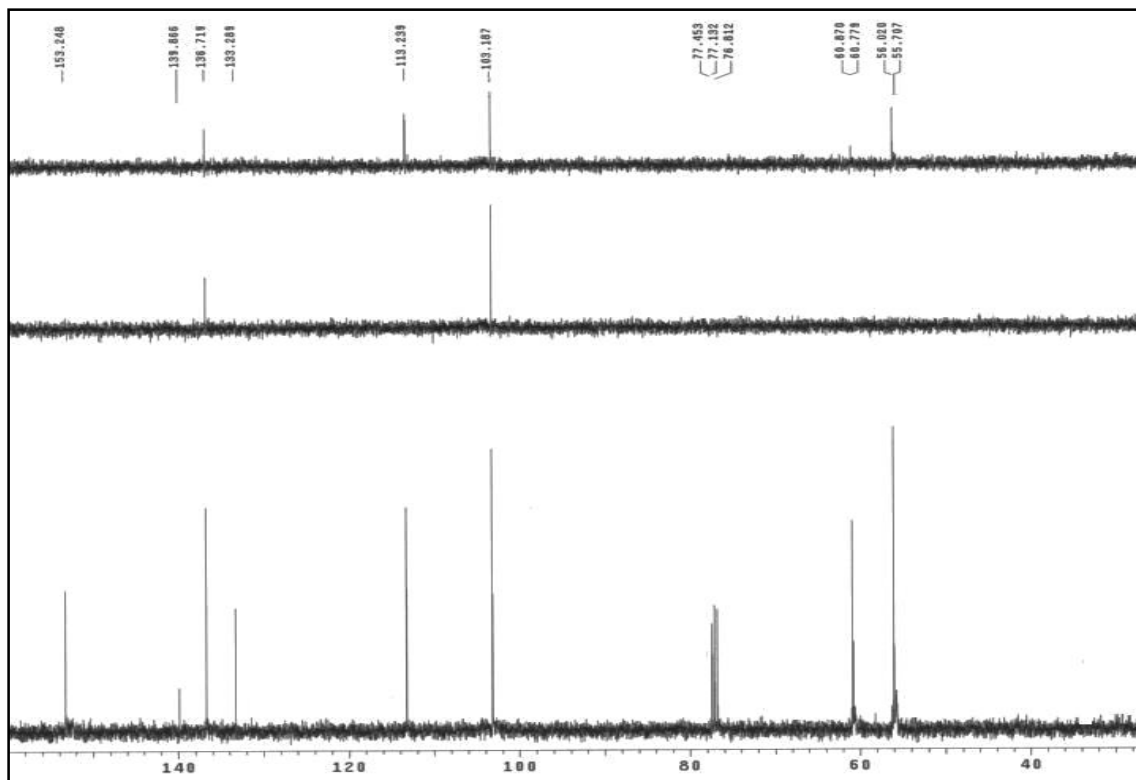


Figura CVb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **115**.

Figura CVIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **116**.Figura CVIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **116**.

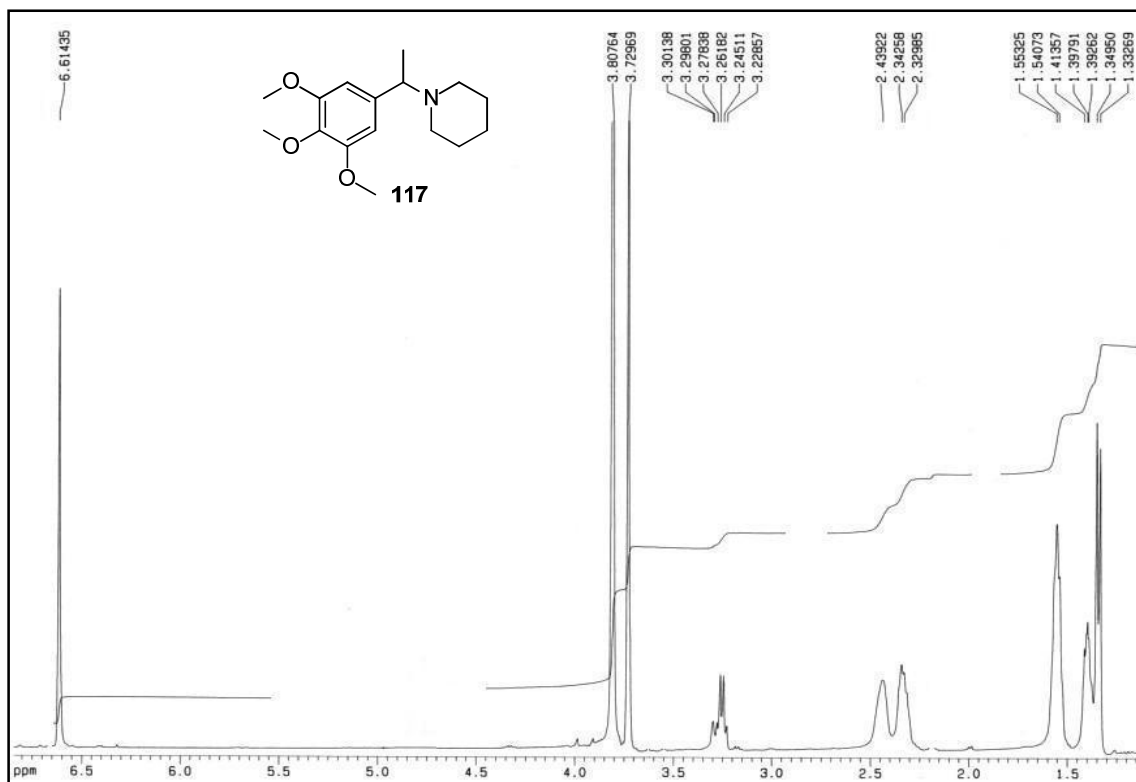


Figura CVIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **117**.

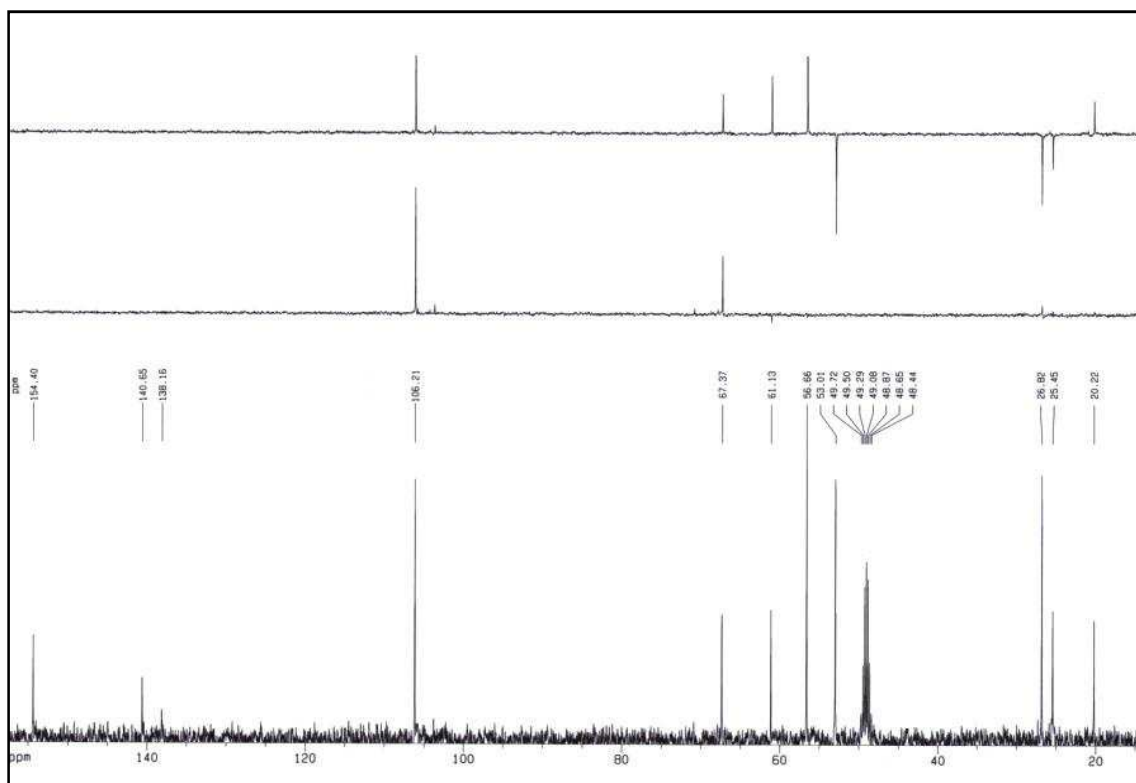
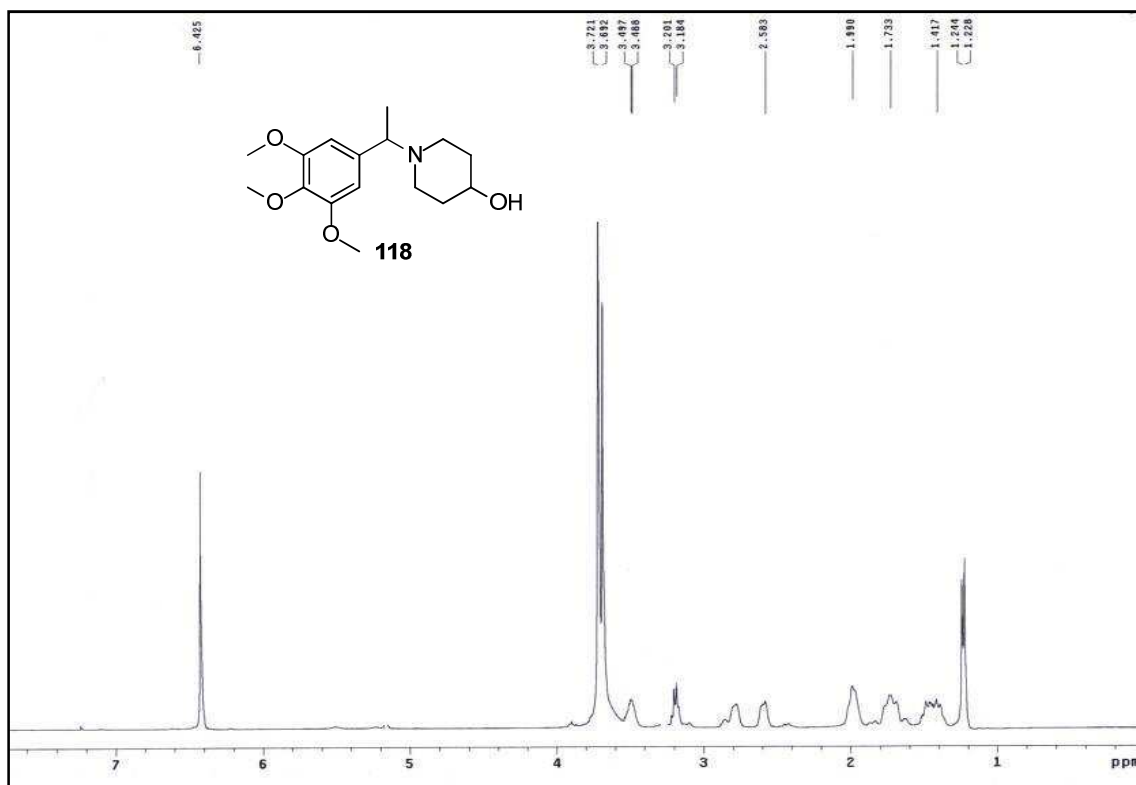
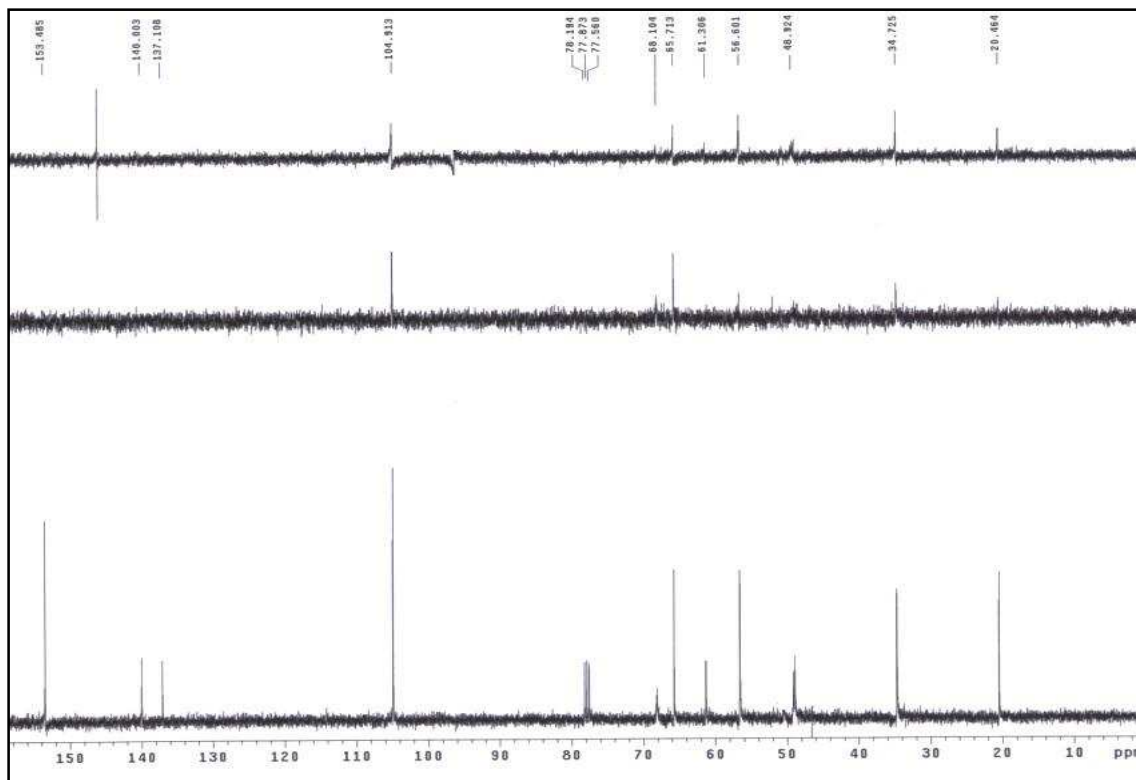


Figura CVIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **117**.

Figura CVIIIa: Espectro de RMN ^1H del compuesto **118**.Figura CVIIIb: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **118**.

