

UNIVERSIDAD  DE ALCALÁ

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica



TESIS DOCTORAL

Síntesis y Estudio de Derivados de FMISO

Elena Nieto Alonso
Alcalá de Henares, Mayo de 2013

UNIVERSIDAD  DE ALCALÁ

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica



TESIS DOCTORAL

Síntesis y Estudio de Derivados de FMISO

MEMORIA

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

Elena Nieto Alonso
Alcalá de Henares, Mayo de 2013

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

DPTO. DE QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA

Los abajo firmantes, **Dr. Ramón Alajarín Ferrández**, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y **Prof. Dr. Julio Álvarez-Builla Gómez**, Catedrático del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá.

CERTIFICAN: Que la Memoria presentada por **Dña. Elena Nieto Alonso**, con el título: “**SÍNTESIS Y ESTUDIO DE DERIVADOS DE FMISO**” ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Alcalá de Henares, Mayo de 2013

Fdo. Julio Álvarez-Builla Gómez

Fdo. Ramón Alajarín Ferrández

Campus Universitario

Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600

28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Tel. (91) 885 46 49

Fax (91) 885 46 86

DPTO. DE QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA

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

CERTIFICA: Que **Dña. Elena Nieto Alonso**, Licenciada en Química por la Universidad Nacional de Educación a Distancia, ha realizado en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del **Prof. Dr. Julio Álvarez-Builla Gómez** y del **Dr. Ramón Alajarín Ferrández** el trabajo experimental recogido en la presente Memoria y titulado: “**SÍNTESIS Y ESTUDIO DE DERIVADOS DE FMISO**” y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Mayo de 2013

Fdo. Antonio Lorente Pérez

A mis padres

Después de un largo recorrido dedicado al trabajo recogido en esta Memoria, lo primero que deseo es agradecer a todos aquellos que de alguna manera han participado y permitido que esto fuera posible.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, el Dr. Julio Álvarez-Builla Gómez, por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo, su dirección y apoyo, al Dr. Ramón Alajarín Ferrández, por orientarme constantemente, además de ayudarme y aconsejarme en todas aquellas dificultades encontradas en este camino, por toda su atención, paciencia y confianza durante estos años, sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

Hago extensivo mi agradecimiento al Dr. Juan José Vaquero y los demás profesores del departamento, en especial a Ana, Marisa y David por su interés, consejos y buena disposición en todo momento, y a Carolina, a la que deseo agradecer por sus palabras y ánimos para que empezara este viaje.

Al Dr. Mijail Galakhov por su colaboración en los estudios de RMN, a Chema, con las masas, a Esther con el análisis elemental, a los técnicos de laboratorio Eugenia y Desi, a Gloria porque gracias a su trabajo yo he podido realizar el mío, a los conserjes, Jose Ramón, Moncho y Bego y a los miembros de la Planta Piloto de Química Fina de la Universidad de Alcalá.

A los doctores Miguel A. del Pozo, Maria L. de Ceballos, Ignacio Lizasoain, Elena Gorospe, Mercedes Delgado, Luis García, Maria Belen Batanero, Adrián Pérez por su colaboración en los estudios realizados con mis compuestos y en especial a Mónica Sobrado y James Kelly por toda su paciencia, colaboración y ayuda que me han aportado durante este tiempo.

En especial quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio, con los que he aprendido y disfrutado en este largo camino. Gracias a Patricia quien me enseñó a poner las primeras reacciones y empezar con este trabajo, a Gonzalo, por todos los consejos y por la ayuda que me ha

brindado cada vez que he tenido un problema, a Patri, que voy a decir de ti, que no sepas, gracias por estar ahí en los buenos y malos momentos que he pasado durante este duro periodo, por aguantarme cada momento en mis bajones y subidones, gracias por apoyarme y por animarme cada vez que lo he necesitado, y por esas risas y llantos que hemos compartido, gracias por haberte conocido. A mis antiguas compis, chicas, que os he echado muchíiiiisimo de menos este último año, tardamos en conocernos, pero mereció la pena, Bea, aunque tenga que pelearme contigo a ver quién habla mas, lo seguiré haciendo, porque sabes que me encantan las charlas que tenemos. Martita, a ti si te conocí tarde, pero mejor tarde que nunca, porque eres genial, siempre aportando esa sonrisa y esas ganas de vivir y disfrutar que contagias, gracias por los momentazos que me has hecho pasar en los congresos. María, cuanto echo de menos esas largas conversaciones que teníamos de vez en cuando, las horas no pasaban contigo. Tati, gracias por la ayuda y consejos que me has dado en todo momento, María Rosa, que aunque fue muy corta tu estancia en la Universidad, me dejaste conocerte, disfrutar de tu alegría, porque nunca te faltaba una sonrisa y pasar grandes momentos juntas. Chicas, me ha encantado poderos conocer.

De manera muy especial, quiero agradecer al resto de mis compañeros, a Roberto por aguantarme mis buenos y malos momentos de vez en cuando, a Anna, Fabiana, Raúl, Sara, Idoia, Rafa, Juanpe y Álvaro por sus consejos en el terreno profesional y personal, haciendo extensivo mi agradecimiento al resto de compañeros.

A mis compis de Inorgánica, María G., Edwin, Carlos, María V., Jorge, Alberto y Jimmy con los que he desconectado, me he desahogado y me he echado una risas en la hora de la comida.

A mis compis de inglés, Carmen, Isabel, Oscar M., Raúl y Sara y en especial a Oscar L. por todos los ánimos recibidos cuando los he necesitado y a Enrique por aguantarme en mi peor época del doctorado, por todos los ánimos que me ha dado, porque contigo es muy fácil hablar, gracias por hacerme reír en mis peores momentos.

A Verónica, Claudia, Álvaro S. y todas aquellas personas que gracias a la química he tenido la oportunidad de conocer.

Gracias a estos años dedicada al mundo de la química he podido conocerlos y pasar un periodo de mi vida supongo que inolvidable.

Quiero expresar con especial cariño mi agradecimiento a mis amigos, por estar ahí siempre que os he necesitado, por dejarme disfrutar de vuestra compañía en cada momento, gracias Sonia, por ser como eres, porque es muy fácil ser tu amiga, gracias por todos esos consejos que me has dado desde que nos conocimos, por tus conversaciones, por los buenos y malos momentos que hemos podido disfrutar, a María José, Isa, Juan, Alberto, María, Pilar, Antxon, mis compis de yoga, en especial a mi compi de piso, Xabi, por animarme y darme fuerzas todos los días y por supuesto, a todos aquellos que en algún momento han formado parte de mi vida, que se han subido a mi tren y por alguna razón han bajado en otra estación, porque gracias a todos vosotros soy como soy.

Y a mi familia, porque sois lo más importante de mi vida.

A mis abuelos León, Hilaria y Rufino, que aunque no estéis ya con nosotros, siempre os llevo a mi lado, gracias a todos por dejarme disfrutar de vuestra compañía, por poderos recordar de la forma que os recuerdo. A mi abuela Rosina, por cuidarnos, ayudarnos y darnos todo lo que has podido. Porque siempre ha estado ahí.

A mis padres, porque me lo habéis dado todo, porque siempre me habéis ayudado y apoyado para que siguiera el camino que he querido seguir, porque siempre habéis hecho lo que habéis podido para que este proyecto haya podido ser realidad, porque me habéis ayudado a levantarme cuando me he caído, porque gracias a vosotros sé valorar todo lo que tengo, porque gracias a vosotros soy lo que soy. Gracias por ser mis padres, os quiero.

A mis hermanos, sin todos vosotros, mi vida no hubiera sido tan divertida. Germán, gracias por tus consejos de hermano mayor, gracias por cuidarnos y protegernos. Natalia, que hubiera hecho yo sin tu ayuda, sin tus

apuntes, y sin tus consejos, gracias por ayudarme tanto a lo largo de mi vida, sabes que aunque a veces me meta contigo, siempre vuelva a recurrir a ti. Gracias también, por dejarme disfrutar de ti, por darme muy buenos momentos en mi vida, y por ser mi amiga. Marta, Martita, que voy a decir de ti, siempre unidas, siempre inseparables, siempre amigas, gracias por haberme hecho tanto reír, porque contigo he tenido grandes momentos, de llanto y de risa, gracias por estar siempre que te necesito, por cuidarme y ayudarme. Por todos tus sabios consejos y por las grandes conversaciones que tenemos. Gracias por estar siempre a mi lado. Juan, gracias por haber compartido tanto tiempo de nuestra infancia, por estar ahí siempre que te necesito, por enseñarme tanto de la vida, por ser como eres. Berta, gracias por tu dulzura, por tu inocencia, por tu forma de disfrutar la vida, gracias por enseñarme que hay veces en la vida que esto no es malo, que si lo hiciéramos mas a menudo todo iría mejor, gracias por ser un amor. Ana, mi niña, mi cari, gracias por todas las alegrías que me has dado durante mi vida, por tus conversaciones, consejos y apoyo en los buenos y malos momentos, gracias por aguantarme mis días malos y disfrutar conmigo los buenos. Gracias por ser como eres, siempre tan detallista, tan atenta y tan natural.

A mis sobrinos, Nerea, Izan, Paula, Leire, Arnau y Alba, gracias a todos por sacarme una sonrisa cada vez que os veo, porque con vosotros soy feliz, a vuestro lado todos los problemas tienen solución, lo oscuro lo veo claro, y la tristeza se vuelve alegría, gracias a los papis por dejarme disfrutar de ellos, porque indudablemente son la alegría de la casa.

A mis cuñados, Eva, Mar, Pablo y en especial a Dani a los que deseo agradecer toda su ayuda y sus consejos tanto en el terreno profesional como personal.

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento al resto de mi familia, en especial a mi primo Raúl por tu apoyo, tu alegría, tu optimismo y porque eres genial.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico en ppm
μm	Micromolar
μmol	Micromol
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
^{13}C -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
^1H -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
4-Br-FPN	4-bromo-1-(3-fluoropropil)-2-nitroimidazol
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Isótopo 99 metaestable radiactivo de tecnecio
Å	Angström
α	Partículas alfa
$\beta+$	Positrón
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ABX	Advanced Biochemical Compounds Co.
Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOF	Hipofluorito de acetilo
BBB	Barrera Hematoencefálica
Bi(OTf) ₃	Trifluorometanosulfonato de bismuto (III)
BOLD	Dependiente del nivel de oxígeno de sangre
Bu ₄ NBF ₄	Tetrafluoruroborato de tetrabutilamonio
c.a.	Adición del portador
C18	Columna de octadecilsilano
Cromat.	Cromatografía en columna
Cu-ATSM	Diacetil-bis(<i>N</i> -4-metiltiosemicarbazona) de cobre (II)

Cu-PTSM	Pirualdehido-bis(<i>N</i> -4-metiltiosemicarbazona) de cobre (II)
DCM	Cloruro de metileno
DHP	3,4-Dihidro-2- <i>H</i> -pirano
DMA	<i>N,N</i> -Dimetilacetamida
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
DME	Dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DOTA	Quelato iónico macrocíclico derivado de 1,4,7,10-tetrazaciclododecano
e ⁻	Electrón
E _{1/2}	Potencial de reducción
Ec.	Ecuación
EF1	2-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-yl)- <i>N</i> -(3-fluoropropil)acetamida
EF3	2-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-yl)- <i>N</i> -(3,3,3-trifluoropropil)acetamida
EF5	2-(2-Nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)- <i>N</i> -(2,2,3,3,3-pentafluoropropil)acetamida
EM	Espectroscopía de masas
Epa	Potencial anódico
Epc1	Potencial catódico en el pico 1
Epc2	Potencial catódico en el pico 2
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
EPRI	Resonancia de espín electrónico por imagen
ESR	Resonancia de espín electrónico
FAZA	1-(6-desoxi-6-]-fluor- α -D-arabinosil)-2-nitroimidazol
FDG	2-deoxy-2-fluoro-D-glucosa
FETA	<i>N</i> -(2-fluoroetil)-(2-nitroimidazol-1-il)-etanamida

FETNIM	Fluoroeritronitroimidazol
FID	Detector de ionización de llama
FMISO	Fluoromisonidazol
FON	1-(8-fluorooctil)-2-nitroimidazol
FPN	1-(3-fluoropropil)-2-nitroimidazol
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GBq	Gigabecquerel
HIF-1	Factor inducible de hipoxia
HMDSO	Hexametildisilosano
HMPAO	hexametil propilen amino oxima
HPAs	Heteropoliácidos
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HRE	Elemento de respuesta de hipoxia
IAZA	1-(1-(5-desoxi-5-yodo- α -D-arabinosil)-2-nitroimidazol
IAZA	1-(6-desoxi-6-yodo- α -D-arabinosil)-2-nitro-imidazol
Kev	Kiloelectronvoltio
Kg	Kilogramo
LDH	Lactato deshidrogenasa
Ln	Ligando
$\log P$ o P	Coefficiente de reparto octanol/agua
M	Masa
MBq	Megabecquerel
MEM	Medio esencial mínimo con sales de Eagle
Met.	Método
mGy	Miligray
min	Minutos
mmHg	Milímetros de mercurio

MO	Microondas
MR	Resonancia magnética
MRI	Espectroscopía de resonancia magnética de imagen
MRS	Espectroscopía de resonancia magnética
mSv	Milisievert
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
n	Neutrón
n.c.a.	Sin adición del portador
NaBH ₄	Borohidruro sódico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nd	No determinado
NEFA	<i>N</i> -(2-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)etil)-fluoroacetamida
NEFT	Fluoracetato de 2-(2-nitroimidazol-1-il)etilo
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimida
nm	Nanometro
NO ⁺	Ión nitrosonio
Nu	Nucleófilo
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OTf	Trifluorometanosulfonato (Triflato)
p	Protón
PAT	Tomografía fotoacústica
PEG	Polietilenglicol
PET	Tomografía de emisión de positrones
PFCs	Perfluorocarbonos
PHDs	Protil hidroxilasas
pO ₂	Tensión de oxígeno
PPA	Ácido polifosfórico

PPTS	<i>p</i> -Toluensulfonato de piridinio
PrONO ₂	Nitrato de propilo
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
Ref.	Referencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales
SSE	Sistema disolvente-electrolito soporte
t _{1/2}	Tiempo de vida media (para un radioisótopo)
TBAB	Bromuro de tetrabutilamonio
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBHP	Hidroperóxido de <i>terc</i> -butilo
TC	Tomografía computarizada
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
THP	Tetrahidropiran-2-ilo
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
tr	Tiempo de retención
Ts	Tosilo
Ts ₂ O	Anhídrido toluensulfónico
TsCl	Cloruro de tosilo
UV	Espectroscopía ultravioleta
V	Voltio
W	Wattios

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Actividad del radiofármaco: Se define como la "radiactividad total" del radionucléido expresada en Ci o Bq.

Actividad específica: Es la actividad referida a la masa total del elemento o compuesto químico considerado (Ci/mol, mCi/mg, etc.).

Actividad: Mide la velocidad de desintegración de un radioisótopo y se define como el número de desintegraciones por unidad de tiempo que ocurren en una fuente radiactiva. Es proporcional al número de partículas que emite en la unidad de tiempo, es decir, a las desintegraciones que tienen lugar durante ese tiempo.

1 Curio (Ci) = $3,7 \times 10^{10}$ desintegraciones / segundo

1 Becquerel (Bq) = 1 desintegración / segundo

1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq

Activímetro: Calibrador de datos.

Angiogénesis: Es el mecanismo utilizado para responder a las necesidades metabólicas de crecimiento de un tumor, siendo su ausencia una etapa limitante de la progresión tumoral y la metástasis. La angiogénesis es así un proceso capital para el crecimiento del tumor cuando éste, en su desarrollo va más allá de unos pocos mm de diámetro, lo cual dificulta la difusión de oxígeno y nutrientes celulares.

Anoxia: Estado en el cual hay una falta casi total de oxígeno.

Apoptosis: Es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente. En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido resultando un proceso "silencioso" sin inflamación.

Becquerel o becquerelio: Es una unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades que mide la actividad radiactiva. Un becquerel se define como la actividad de

una cantidad de material radioactivo con decaimiento de un núcleo por segundo. Equivale a una desintegración nuclear por segundo. La unidad de Bq es por consiguiente inversa al segundo.

Ciclotrón: Es un tipo de acelerador de partículas cargadas que combina la acción de un campo eléctrico alterno, que les proporciona sucesivos impulsos, con un campo magnético uniforme que curva su trayectoria y las redirige una y otra vez hacia el campo eléctrico.

Citotoxina: Sustancia que tiene efectos tóxicos sobre ciertas células.

Coefficiente de reparto octanol-agua: Es el cociente o razón entre las concentraciones de esa sustancia en una mezcla bifásica formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio: octanol y agua.

Concentración radiactiva: Es la radiactividad referida a la unidad de volumen de la solución en que se encuentra disuelto, expresada en mCi/mL, MBq/mL.

Condiciones aerobias: Rico en oxígeno.

Condiciones Anaerobias: En ausencia de oxígeno.

Dosimetría: Es la dosis absorbida en tejidos y materia como resultado de la exposición a la radiación ionizante, tanto de manera directa como indirecta. Es una subespecialidad científica, en el campo de la física de la salud y la física médica, la cual se enfoca en el cálculo de las dosis internas y externas de la radiación ionizante.

Electronvoltio: Es una unidad de energía que representa la energía cinética que adquiere un electrón cuando es acelerado por una diferencia de potencial de 1 voltio.

Especies reactivas de oxígeno: Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada.

Enzimas nitroreductasas: Son moléculas de naturaleza proteica que catalizan las reacciones químicas, reduciendo selectivamente grupos nitroaromáticos en las células.

Factor inducible de hipoxia (HIF-1): Es una proteína compuesta por 2 subunidades:

HIF-1a y HIF-1b. En una situación de normoxia, la HIF-1a se degrada por hidroxilación y es destruida, mientras que cuando se encuentra en una situación de falta de oxígeno como es el caso de la hipoxia, la HIF-1a no se degrada, sino que uniéndose a la HIF-1b da lugar a la HIF-1 y es cuando realmente da lugar a la activación y estimulación de diferentes genes.

Ftalocianina: Es un compuesto de color verde azulado formado por la unión de cuatro grupos isoindoles mediante cuatro átomos de nitrógeno, dando lugar a un anillo de 16 átomos (ocho de nitrógeno y ocho de carbono), alternados con dobles enlaces conjugados.

Gd-DOTA. Es un quelato iónico macrocíclico de gadolinio, con una alta estabilidad termodinámica y una cinética rápida.

Gen supresor p53: Es un gen tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular. Un p53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer.

Gray: Es una unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades que mide la dosis absorbida de radiaciones ionizantes por un determinado material. Un gray es equivalente a la absorción de un julio de energía ionizante por un kilogramo de material irradiado.

Hipoxia: Estado en el cual el cuerpo completo (hipoxia generalizada), o una región del cuerpo (hipoxia de tejido), se ve privado oxígeno.

Isquemia: Sufrimiento celular causado por la disminución transitoria o permanente de riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno de un tejido biológico.

Kryptofix[®] [2.2.2]: 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosano.

Lipofilia: Medida de cada uno de los compuestos para atravesar la bicapa lipídica de la célula por difusión pasiva, y se cuantifica a través del coeficiente de partición en

octanol/agua.

Marcador endógeno: Interno a la célula.

Marcador exógeno: Externo a la célula.

Metástasis: Es la capacidad de las células del cáncer de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través de la circulación sanguínea, y después crecer en un nuevo foco (metástasis) en tejidos normales de otra parte del cuerpo.

Necrosis: Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

Neovascularización: Formación de nuevos vasos sanguíneos.

Normoxia: Estado en el cual las concentraciones de oxígeno se encuentran entre los niveles fisiológicos normales de oxigenación.

Perfluorocarbonos: Son una familia de compuestos derivados de un hidrocarburo donde los átomos de hidrógeno se reemplazan por átomos de flúor.

Perfusión miocárdica: Es la prueba de imagen médica con la que se valora el riego sanguíneo y el metabolismo del miocardio izquierdo, que es el músculo cardíaco que bombea la sangre a todo el cuerpo.

Periodo de semidesintegración: Tiempo necesario para que se desintegre la mitad de los átomos radiactivos.

Positrón o **antielectrón:** Es una partícula elemental, antipartícula del electrón que posee la misma cantidad de masa y carga eléctrica; sin embargo, esta es positiva. No forma parte de la materia ordinaria, sino de la antimateria, aunque se producen en numerosos procesos radioquímicos como parte de transformaciones nucleares.

Precursor: Toda sustancia producida industrialmente o en el laboratorio para la preparación de radiomarcadores.

Profármaco: Es una sustancia farmacológica que se administra de forma inactiva o

poco activa. Posteriormente, el profármaco es metabolizado *in vivo* hasta un metabolito activo.

Proliferación: Crecimiento o multiplicación de células de tejidos.

Pureza Radionucleídica: Se define como la relación existente entre la actividad correspondiente a un determinado radionucléido y la actividad total del compuesto.

Pureza Radioquímica: Constituye la proporción de la actividad total que está presente en la forma química deseada. $P.R.Q. = (A_{\text{compuesto}} / A_{\text{total}}) \times 100$

Radioactividad específica: Se define como la cantidad de radioactividad por unidad de masa (o de volumen) del compuesto (tanto radioactivo como no radioactivo). Se puede expresar como Ci/g, mCi/mg, Bc ...

Radiofármaco o radiotrazador: Cualquier producto que cuando este preparado para su uso con finalidad terapéutica o diagnóstica contenga uno o más radionucléidos (isótopos radiactivos).

Radioisótopos: Son átomos radiactivos que tienen igual número atómico (número de protones en el núcleo), pero diferente número másico (suma del número de neutrones y el de protones en el núcleo).

Reacción nuclear: Proceso de transformación que sufre un determinado núcleo al ser bombardeado por partículas o por radiaciones electromagnéticas.

Rendimiento radioquímico: $R = (A_{\text{compuesto}} / A_{\text{18F-inicial}}) \times 100$.

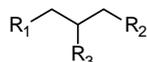
Sievert: Es una unidad derivada del SI que mide la dosis de radiación absorbida por la materia viva, corregida por los posibles efectos biológicos producidos. 1 Sv es equivalente a un julio por kilogramo (J kg^{-1}). Esta unidad da un valor numérico con el que se pueden cuantificar los efectos estocásticos producidos por las radiaciones ionizantes. (1 Sv = 100 rem; 1 Sv = 1 Gy).

Test de Bonferroni: Es un análisis de varianza, para ajustar el nuevo nivel de confianza.

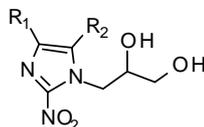
Vida media: Es el valor promedio de la vida de los átomos de una especie radiactiva. La “vida media” de un átomo radiactivo es, la recíproca de la constante de desintegración ($t = 1/\lambda$), siendo por lo tanto ambas variables proporcionales ($T = 0,693 \times t$).

Voltimetría cíclica o voltamperometría cíclica: Es una técnica electroquímica en la que se aplica un determinado potencial eléctrico a un electrodo (denominado electrodo de trabajo) sumergido en una disolución que contiene una especie electroactiva y se mide la intensidad eléctrica que circula por este electrodo. La intensidad medida es función del potencial aplicado y de la concentración de la especie electroactiva presente.

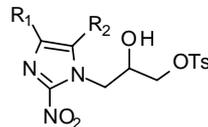
^{99m}Tc: Es el isótopo 99 metaestable de tecnecio.



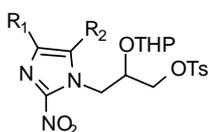
- 78, R₁ = OTs, R₂ = R₃ = OH
 21, R₁ = R₂ = OTs, R₃ = OH
 77, R₁ = R₂ = R₃ = OTs
 17, R₁ = R₂ = OTs, R₃ = OTHP



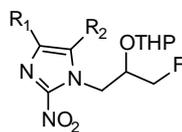
- 25, R₁ = H, R₂ = H
 33b, R₁ = Br, R₂ = H
 34, R₁ = Br, R₂ = Br
 37d, R₁ = C₆H₄, R₂ = H
 37e, R₁ = 3-ClC₆H₄, R₂ = H
 37h, R₁ = bifenilo, R₂ = H



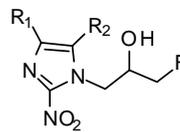
- 26, R₁ = H, R₂ = H
 30, R₁ = Br, R₂ = H
 35, R₁ = Br, R₂ = Br



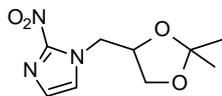
- 7a, R₁ = H, R₂ = H
 7b, R₁ = Br, R₂ = H
 7c, R₁ = Br, R₂ = Br
 7d, R₁ = C₆H₄, R₂ = H
 7e, R₁ = 3-ClC₆H₄, R₂ = H
 7f, R₁ = 4-CH₃C₆H₄, R₂ = H
 7g, R₁ = 4-CH₃OC₆H₄, R₂ = H
 7h, R₁ = bifenilo, R₂ = H
 7i, R₁ = naftilo, R₂ = H
 7j, R₁ = 3,4-Cl₂C₆H₄, R₂ = H
 7k, R₁ = 5-indolilo, R₂ = H
 7l, R₁ = estirilo, R₂ = H
 7m, R₁ = *p*-CH₃-estirilo, R₂ = H
 7n, R₁ = *p*-CH₃O-estirilo, R₂ = H
 7o, R₁ = *p*-F-estirilo, R₂ = H



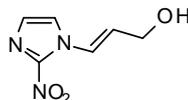
- 45a, R₁ = H, R₂ = H
 45b, R₁ = Br, R₂ = H
 45c, R₁ = Br, R₂ = Br
 45h, R₁ = bifenilo, R₂ = H



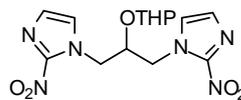
- 1a, R₁ = H, R₂ = H
 1b, R₁ = Br, R₂ = H
 1c, R₁ = Br, R₂ = Br
 1d, R₁ = C₆H₄, R₂ = H
 1e, R₁ = 3-ClC₆H₄, R₂ = H
 1f, R₁ = 4-CH₃C₆H₄, R₂ = H
 1g, R₁ = 4-CH₃OC₆H₄, R₂ = H
 1h, R₁ = bifenilo, R₂ = H
 1i, R₁ = naftilo, R₂ = H
 1j, R₁ = 3,4-Cl₂C₆H₄, R₂ = H



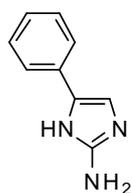
24



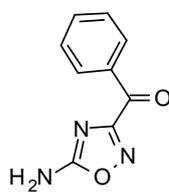
80



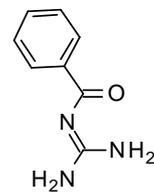
79



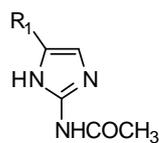
51a



57



72



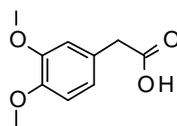
48a, $R_1 = C_6H_4$

48c, $R_1 = MeC_6H_4$

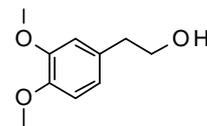
48d, $R_1 = MeOC_6H_4$

48e, $R_1 = 4-ClC_6H_4$

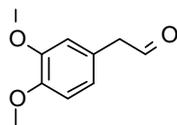
48f, $R_1 = C_6H_5C_6H_4$



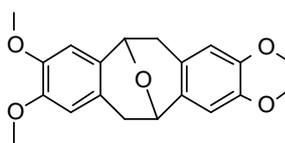
93



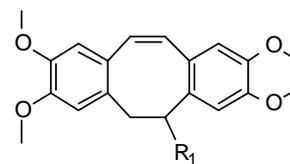
94



95

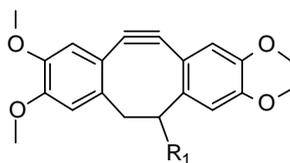


96



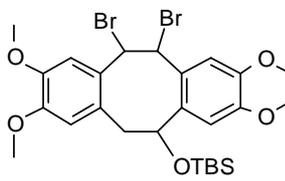
97, $R_1 = OH$

98, $R_1 = OTBS$

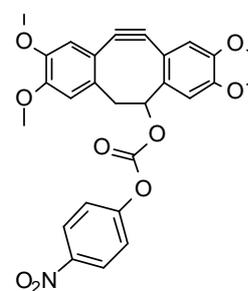


92, $R_1 = OH$

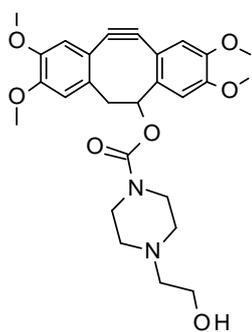
100, $R_1 = OTBS$



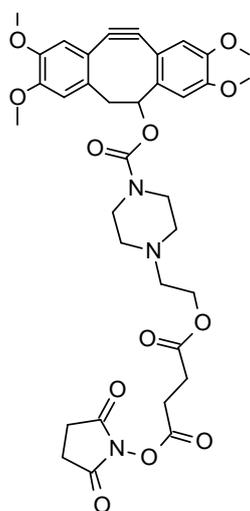
99



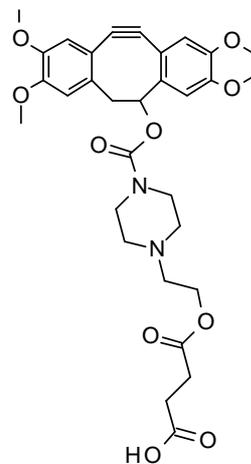
101



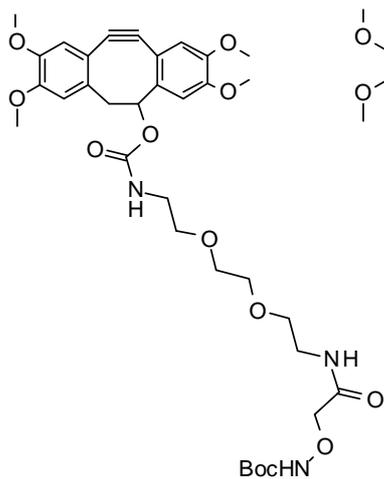
102



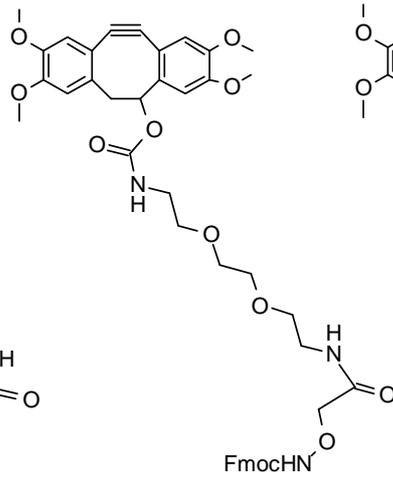
105



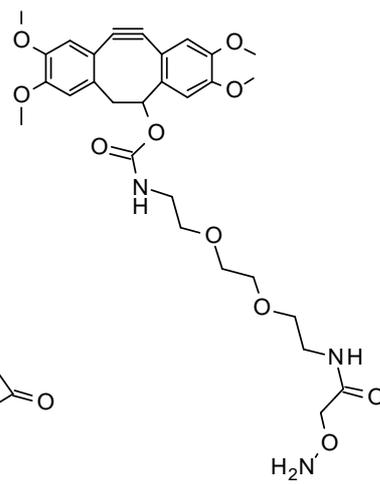
104



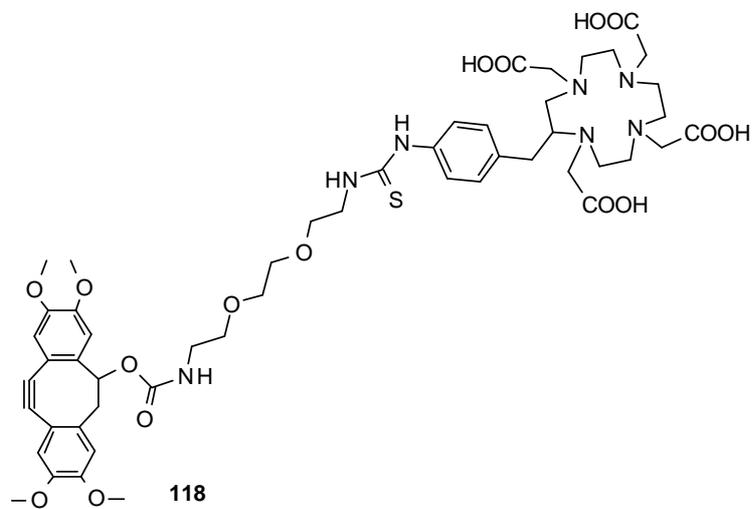
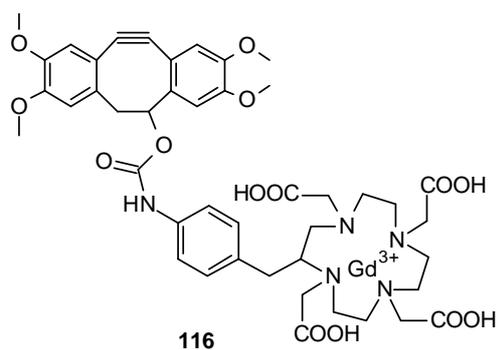
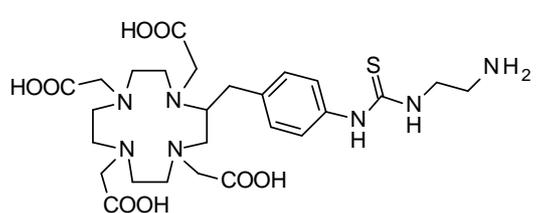
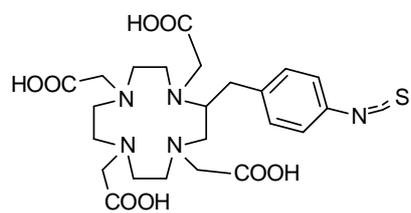
107



109



110



1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. HIPOXIA EN LOS TEJIDOS	9
2.1.1. Hipoxia cerebral	9
2.1.2. Hipoxia tumoral	10
2.1.3. El factor inducible de hipoxia (HIF-1)	12
2.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE HIPOXIA	15
2.2.1. Métodos invasivos	16
2.2.1.1. Microelectrodo polarográfico de oxígeno (aguja Eppendorf)	16
2.2.1.2. Métodos inmunohistoquímicos	17
2.2.2. Métodos no invasivos	18
2.2.2.1. Tomografía de Emisión de Positrones (PET)	19
2.2.2.2. Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Individuales (SPECT)	21
2.2.2.3. Imagen de Resonancia Magnética (MRI)	23
2.2.2.3.1. Moléculas utilizadas para oximetría por MR	25
2.2.2.3.2. Otros métodos para la imagen de hipoxia por MR	26
2.2.2.4. Resonancia de Espín Electrónico (ESR)	27
2.2.2.5. Métodos ópticos de imagen para medidas de hipoxia	28
2.3. RADIOFÁRMACOS NITROIMIDAZOLES PARA IMAGEN DE HIPOXIA	30
2.3.1. Metabolismo de nitroimidazoles	32
2.3.2. Derivados de 2-nitroimidazol como radiomarcadores de hipoxia	35
2.3.2.1. [¹⁸ F]-FMISO	35
2.3.2.2. [¹⁸ F]-FETNIM	36
2.3.2.3. [¹⁸ F]-EF5, [¹⁸ F]-EF3 y [¹⁸ F]-EF1	37

2.3.2.4. [¹⁸ F]-FAZA y [¹²⁴ I]-IAZA	38
2.3.2.5. [¹⁸ F]-FETA	39
2.3.2.6. [¹⁸ F]-NEFT y [¹⁸ F]-NEFA	39
2.3.2.7. [¹⁸ F]-FON y [¹⁸ F]-FPN	40
2.3.3. Nuevos radiomarcadores de hipoxia con un segundo grupo nitroimidazol	41
2.4. RADIOMARCADORES DE HIPOXIA NO RELACIONADOS CON NITROIMIDAZOLES	43
2.4.1. [¹⁸ F]-FDG (2-deoxy-2-[¹⁸ F]-fluoro-D-glucosa)	44
2.4.2. Cu-ATSM	45
2.5. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE RADIOFÁRMACOS FLUORADOS	46
2.5.1. Fluoración electrófila	48
2.5.2. Fluoración nucleófila	50
2.6. PROPIEDADES DE [¹⁸ F]-FMISO	51
2.6.1. Biodistribución	51
2.6.2. Dosimetría	53
2.6.3. Aplicaciones de [¹⁸ F]-FMISO en oncología	54
2.6.4. Aplicaciones de [¹⁸ F]-FMISO en indicaciones no oncológicas	55
2.7. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE [¹⁸ F]-FMISO	56
2.8. MÉTODOS DE SÍNTESIS DEL PRECURSOR DE [¹⁸ F]-FMISO	61
2.9. REACTIVIDAD Y SÍNTESIS DE 2-NITROIMIDAZOL	63
2.9.1. Introducción	63
2.9.2. Reactividad	64
2.9.2.1. Alquilación	64
2.9.2.2. Bromación	66
2.9.2.3. Reducción de 2-nitroimidazol	67
2.9.2.4. Reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio	67

2.9.2.4.1. La química del paladio	67
2.9.2.4.2. Reacciones de Suzuki-Miyaura	70
2.9.3. Síntesis de 2-nitroimidazoles	78
2.9.3.1. A partir de 1-tritilimidazoles	78
2.9.3.2. Por diazotación-nitración u oxidación de 2-aminoimidazoles	79
2.9.3.2.1. Síntesis de 2-aminoimidazoles	79
2.9.3.2.2. Nitración de 2-aminoimidazoles vía Diazotación	82
2.9.3.2.3. Aislamiento de la sal de diazonio	85
2.9.3.3. Oxidación de aminoimidazoles	87
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	91
3.1. INTRODUCCIÓN	93
3.2. OBJETIVOS	94
3.3. SÍNTESIS DEL PRECURSOR DE FMISO (7a)	97
3.4. SÍNTESIS ALTERNATIVA DEL PRECURSOR DE FMISO (7a)	98
3.5. ELECCIÓN DE LOS GRUPOS PARA LA PREPARACIÓN DE DERIVADOS MAS LIPÓFILOS	104
3.6. SÍNTESIS DE DERIVADOS LIPÓFILOS DEL PRECURSOR DE FMISO	106
3.6.1. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO mediante bromación de 7a	107
3.6.1.1. Síntesis de 7b	107
3.6.1.2. Síntesis de 7c	109
3.6.2. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO a partir de 3-(2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (25)	110
3.6.2.1. Síntesis de 7b	110

3.6.2.2. Síntesis de 7c	112
3.6.3. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO por reacción de Suzuki-Miyaura	112
3.6.4. Síntesis de 7d por arilación directa con bromoarenos	118
3.6.5. Reacciones de Suzuki por acoplamiento del bromodiol 33b	119
3.7. FLUORACIÓN DE LOS PRECURSORES DE FMISO	124
3.8. HIDRÓLISIS DE LOS PRECURSORES DE FMISO	127
3.9. OTRAS ALTERNATIVAS PARA LA SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 7a	131
3.9.1. Síntesis de 2-aminoimidazoles sustituidos	133
3.9.2. Estudio de la reactividad de 2-aminoimidazoles 4(5)-arilsustituidos	136
3.9.2.1. Reacción tipo Sandmeyer	136
3.9.2.2. Oxidación	152
3.10. ESTUDIO DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE LOS DERIVADOS DE FMISO	158
3.11. TOXICIDAD DE LOS DERIVADOS DE FMISO	164
3.12. RADIOSÍNTESIS DE FMISO Y SUS DERIVADOS	171
3.12.1. Radiosíntesis de FMISO sintetizado en nuestro grupo de investigación	174
3.12.2. Estudio comparativo de radiosíntesis	176
3.12.3. Síntesis de [¹⁸ F]-FMISO con purificación en fase sólida	180
3.12.4. Radiosíntesis del análogo [¹⁸ F]-BrFMISO ([¹⁸ F]- 1b)	181
3.12.5. Radiosíntesis de los análogos [¹⁸ F]-ArFMISO ([¹⁸ F]- 1d-j)	183
3.13. Ensayos de marcaje de hipoxia <i>in vivo</i> con [¹⁸ F]- 1b mediante MicroPET	190
3.14. Estudios de permeación <i>in vitro</i> de FMISO (7a), BrFMISO (7b) y PhFMISO (7d)	196

3.14.1. Preparación de células <i>in vitro</i>	196
3.14.2. Cuantificación de FMISO por HPLC-UV	197
3.14.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas	198
3.14.2.2. Estudio de linealidad	199
3.14.2.3. Análisis de las muestras	200
4. PARTE EXPERIMENTAL	205
4.1 SÍNTESIS DEL PRECURSOR DE FMISO	209
4.1.1. Optimización de la síntesis de Oh y <i>col.</i>	209
4.1.1.1 Tosilato de 2-hidroxi-3-tosiloxipropilo (21), tosilato de 2,3-ditosiloxipropilo (77) y tosilato de 2,3-dihidroxi-3-tosiloxipropilo (78)	209
4.1.1.2. Tosilato de 2-(oxan-2-iloxi)-3-tosiloxipropilo (17)	211
4.1.1.3. Tosilato de 3-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxan-2-iloxi)propilo (7a) y 1,3-bis-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxan-2-iloxi)propano (79)	211
4.1.2. Síntesis alternativa	213
4.1.2.1. 1-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilmetil)-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol (24)	213
4.1.2.2. 3-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (25) y 3-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)prop-2-en-1-ol (80)	215
4.1.2.3. Tosilato de 2-hidroxi-3-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propilo (26)	216
4.1.2.4. Tosilato de 3-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-2-iloxi)propilo (7a)	218
4.2. SÍNTESIS DEL PRECURSOR DE FMISO MONOBROMADO	219
4.2.1. A partir del precursor 7a de FMISO	219
4.2.1.1. Tosilato de 3-(4-bromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-2-iloxi)propilo (7b)	219
4.2.2. A partir del diol 25	221

4.2.2.1. 3-(4-bromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (33b)	221
4.2.2.2. Tosilato de 3-(4-bromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-hidroxi propilo (30)	222
4.2.2.3. Tosilato de 3-(4-bromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi) propilo (7b)	223
4.3. Síntesis del precursor de FMISO dibromado 34 a partir del diol 25	224
4.3.1. 3-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (34)	224
4.3.2. Tosilato de 3-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-hidroxi propilo (35)	225
4.3.3. Tosilato de 3-(4-bromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi) propilo (7c)	226
4.4. REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO C-C DE SUZUKI-MIYAUURA	227
4.4.1. A partir del diol 33b	227
4.4.1.1. Procedimiento General	227
4.4.1.1.1. 3-(4-fenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (33d)	228
4.4.1.1.2. 3-(3-clorofenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (33e)	229
4.4.1.1.3. 3-(4-4'-bifenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (33h)	230
4.4.2. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO mediante reacción Suzuki-Miyaura a partir del bromoderivado 7b	231
4.4.2.1. Procedimiento General	231
4.4.2.1.1. Tosilato de 3-(4-fenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi) propilo (7d) y 81	232
4.4.2.1.2. Tosilato de 3-(4-3'-clorofenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi) propilo (7e) y 82	234
4.4.2.1.3. Tosilato de 3-(4-4'-metilfenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi) propilo (7f) y 83	236

4.4.2.1.4. Tosilato de 3-(4-4'-metoxifenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7g) y 84	238
4.4.2.1.5. Tosilato de 3-(4-bifenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7h) y 85	239
4.4.2.1.6. Tosilato de 3-(4-2'-naftil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7i) y 86	241
4.4.2.1.7. Tosilato de 3-(4-3',4'-diclorofenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7j) y 87	243
4.4.2.1.8. Tosilato de 3-(4-2'-fenilvinil-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7l) y 88	245
4.4.2.1.9. Tosilato de 3-(4-2'-4''-metilfenilvinil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7m) y 89	247
4.4.2.1.10. Tosilato de 3-(4-2'-4''-metoxifenilvinil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7n) y 90	249
4.4.2.1.11. Tosilato de 3-(4-2'-4''-fluorofenilvinil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7o) y 91	251
4.5. FLUORACIÓN DE LOS PRECURSORES DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE FMISO	253
4.5.1. Procedimiento General	253
4.5.1.1. 1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)propil)-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol (45a)	253
4.5.1.2. 4-bromo-1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)propil)-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol (45b)	254
4.5.1.3. 4,5-dibromo-1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)-propil)-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol (7c)	255
4.5.1.4. 4-4'-bifenil-1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)-propil)-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol (45h)	256
4.6. DESPROTECCIÓN DE LOS PRECURSORES FLUORADOS DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE FMISO	257
4.6.1. Procedimiento General	257
4.6.1.1. 1-fluoro-3-(1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (1a)	257

4.6.1.2. 3-(4-bromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1b)	258
4.6.1.3. 3-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1c)	259
4.6.1.4. 3-(4-bifenil-2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1h)	260
4.7. FLUORACIÓN-DESPROTECCIÓN SECUENCIAL DE LOS PRECURSORES DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE FMISO	261
4.7.1. Procedimiento General	261
4.7.1.1. 3-(4-fenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1d)	262
4.7.1.2. 3-(4-3'-clorofenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1e)	263
4.7.1.3. 1-fluoro-3-(4-4'-metilfenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (1f)	264
4.7.1.4. 1-fluoro-3-(4-4'-metoxifenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (1g)	265
4.7.1.5. 1-fluoro-3-(4-2'-naftil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (1i)	266
4.7.1.6. 3-(4-3',4'-diclorofenil-1 <i>H</i> -2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1j)	267
4.8. SÍNTESIS DE 2-ACETILAMINOIMIDAZOLES 4(5)-SUSTITUIDOS	268
4.8.1. Procedimiento general	268
4.8.1.1. 4(5)-fenil-2-acetilamino-1 <i>H</i> -imidazol (48a)	268
4.8.1.2. 4(5)- <i>p</i> -Tolil-2-acetilamino-1 <i>H</i> -imidazol (48c)	269
4.8.1.3. 4(5)- <i>p</i> -metoxifenil-2-acetilaminoimidazol (48d)	270
4.8.1.4. 4(5)- <i>p</i> -clorofenil-2-acetilamino-1 <i>H</i> -imidazol (48e)	270
4.8.1.5. 4(5)- <i>p</i> -bifenil-2-acetilamino-1 <i>H</i> -imidazol (48f)	271
4.9. HIDRÓLISIS DE 4(5)-FENIL-2-ACETILAMINO-1 <i>H</i> -IMIDAZOL (51a)	271
4.10. DIAZOTACIÓN DE 2-AMINO-5-FENIL-1 <i>H</i> -IMIDAZOL (57)	272

4.11. OXIDACIÓN DE 4(5)-FENIL-2-AMINO-1 <i>H</i> -IMIDAZOL (72)	273
5. CONCLUSIONES	277
6. SUMMARY	287
7. ANEXO: Trabajo realizado durante la estancia predoctoral en la universidad de cambridge (Reino Unido)	295
7.1. INTRODUCCIÓN	297
7.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	300
7.2.1. Síntesis del ciclooctino 92 (TMDIBO)	300
7.2.2. Síntesis de posibles candidatos a nuevos radiotrazadores por acoplamiento con DOTA	303
7.2.3. Acoplamiento de moléculas precursoras con DOTA	306
7.3. PARTE EXPERIMENTAL	311
7.3.1. Síntesis del ciclooctino TMDIBO (92)	311
7.3.1.1. 3,4-dimetoxibenzaldehido (95)	311
7.3.1.2. 5,11-epoxi-5,6,11,12 tetrahidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocteno (96)	312
7.3.1.3. 5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-ol (97)	313
7.3.1.4. 5- <i>terc</i> -butildimetilsililoxi-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocteno (98)	314
7.3.1.5. 11,12-dideshidro-5,6,-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-ol (92)	315
7.3.2. Derivados del ciclooctino TMDIBO (92)	316
7.3.2.1. Carbonato de 11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-ilo y 4'-nitrofenilo (101)	316

7.3.2.2. 2-{4-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo [a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil)piperazin-1-il}etanol (102)	317
7.3.2.3. Succinato de 2-{4-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil) piperazin-1-il}etilo e hidrógeno (104)	318
7.3.2.4. Succinato 2-{4-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil) piperazin-1-il}etilo y <i>N</i> -succinimidilo (105)	319
7.3.2.5. <i>N</i> -(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo [a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil)-3,6-dioxaoctan-1,8-diamina (106)	320
7.3.2.6. <i>Terc</i> -butiloxicarbonilaminooxi- <i>N</i> -(11,12-dideshidro-5,6-dihidro -2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil) -8-amino-3,6-dioxaoctil)acetamida (107)	320
7.3.2.7 9- <i>H</i> -fluoren-9-ilmtoxycarbonil)aminooxi- <i>N</i> -(11,12-dideshidro -5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5- iloxicarbonil)-8-amino-3,6-dioxaoctil)acetamida (109)	321
7.3.2.8. Aminooxi- <i>N</i> -(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil) -8-amino-3,6-dioxaoctil)acetamida (110)	322
7.3.3. Síntesis de precursores de agentes de contraste	323
7.3.3.1. <i>p</i> -3-(2-aminoetil)-tiourea-Bn-DOTA (115)	324
7.3.4. Acoplamiento de los derivados ciclooctinos con los ligandos DOTA	324
7.3.4.1. Síntesis del compuesto 116	324
7.3.4.2. Síntesis del compuesto 118	325

1. Introducción

Se llama imagen médica al conjunto de técnicas y procesos usados para crear imágenes del cuerpo humano, o partes de él con propósitos clínicos (procedimientos médicos que buscan revelar, diagnosticar o examinar enfermedades) o para la ciencia médica (incluyendo el estudio de la anatomía normal y función). Como disciplina en su sentido más amplio, es parte de la imagen biológica, incluyendo los avances más recientes en imagen biomolecular, proteómica y genómica. En 1895 Röntgen obtuvo la primera imagen 2D cuando aplicó por primera vez los rayos X a la imagen médica y en 1977 Damadian realizó el primer escáner de RMN completo de un cuerpo humano. Sin embargo, no fue hasta el principio de la década de 1980 que la imagen médica dio un paso más allá con la tomografía computarizada al proporcionar estas imágenes 3D. Posteriormente, la combinación de estas técnicas entre sí TC/RMN y con estudios de medicina nuclear (PET/CT, PET/RMN, SPECT) y ecografías, ha proporcionado una mayor sensibilidad y un conocimiento más profundo del proceso patológico. La imagen de medicina nuclear se diferencia del resto de técnicas en que en la primera la radiación procede desde el interior del cuerpo del paciente.

Nuestro grupo de investigación forma parte del grupo de estudios MULTIMAG, una red multidisciplinar de investigación donde grupos de médicos, biólogos, farmacólogos y químicos de institutos y universidades de la Comunidad de Madrid pretenden desarrollar y evaluar métodos multiparamétricos de imagen por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Tomografía de Emisión de Positrones (PET) para caracterizar no invasivamente la competencia vascular en modelos de patologías del sistema nervioso central con gran prevalencia, trasladando los resultados obtenidos a la clínica. Nuestro grupo de trabajo está implicado en el desarrollo de nuevos radiomarcadores para el estudio y el diagnóstico mediante imagen funcional de

enfermedades relacionadas con procesos de neurodegeneración y neuroinflamación, como la enfermedad de Alzheimer, tumores e infarto cerebrales. Mas concretamente, y en el marco de esta Memoria, nuestro grupo ha trabajado en el desarrollo de nuevos marcadores de hipoxia cerebral.

La hipoxia es un estado celular que ocurre en respuesta a una baja oxigenación del tejido. Un número diverso de enfermedades están relacionadas con estados hipóxicos como anemia, hemorragias, neumonías y otras están relacionadas con el estilo de vida actual de países del primer mundo, como enfermedades cardio o cerebrovasculares, pulmonares o cáncer. Como consecuencia de los riesgos implícitos que tiene el acceso físico al tejido cerebral, la hipoxia cerebral necesita de métodos no invasivos, sensibles y eficientes de valoración del estado de oxigenación de este tejido aplicables en la clínica. Los métodos de imagen médica que actualmente tienen mas aplicación por ser, además, métodos de imagen funcional y molecular son la imagen de resonancia magnética (MRI), PET y SPECT.

La técnica PET es una técnica especialmente sensible ya que utiliza cantidades extraordinariamente pequeñas de un compuesto radiactivo que puede unirse a un receptor molecular o participar en un proceso metabólico del tejido. Entre el diverso catálogo disponible de radiomarcadores de hipoxia, [¹⁸F]-fluoromisonidazol ([¹⁸F]-FMISO) es el más utilizado en clínica. Sin embargo, presenta algunas limitaciones como su baja acumulación en tejido hipóxico y su aclaramiento lento en tejido normóxico.

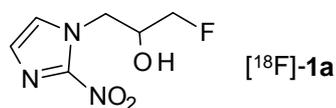


Figura 1.1. [^{18}F]-FMISO (**1a**)

El desarrollo de marcadores de hipoxia se ha centrado en derivados de 2-nitroimidazol, los cuales se reducen fácilmente por nitroreductasas citoplasmáticas, quedando atrapados en las células hipóxicas. Así, [^{18}F]-FMISO entra en las células por difusión pasiva y se distribuye de forma homogénea en el cuerpo, reduciéndose posteriormente al correspondiente anión radical nitro que, en condiciones normóxicas, se reoxida de manera que el marcador puede abandonar la célula. Sin embargo, en condiciones hipóxicas, el anión radical nitro se reduce luego de forma irreversible a probablemente un grupo amino o hidroxilamino que puede reaccionar indiscriminadamente con macromoléculas intracelulares, quedando atrapado en el interior de la célula. Así, y una vez que se ha producido el aclaramiento del radiofármaco de las células normóxicas, el radiomarcador emite únicamente desde las zonas hipóxicas del tejido.

El proyecto de Tesis Doctoral presentado en esta Memoria ha abordado una investigación que tiene como objetivo la síntesis y el estudio de nuevos derivados lipófilos de [^{18}F]-FMISO.

2.1. Hipoxia en los tejidos

La hipoxia define un estado metabólico en el cual las concentraciones de oxígeno se encuentran entre los niveles fisiológicos normales de oxigenación (normoxia) y la falta completa de oxígeno (anoxia). Se habla de hipoxia generalizada cuando el organismo completo se ve privado del suministro adecuado de oxígeno e hipoxia de tejido cuando se trata de una región del cuerpo. También, conviene diferenciar entre hipoxia e isquemia, ya que alguna vez son intercambiables. Se denomina isquemia al estrés celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo en un órgano o tejido, una condición que puede causar o no hipoxia. Existen diferentes patologías relacionadas con la hipoxia, entre las que se encuentran: anemias, hemorragias, y neumonías, así como enfermedades pulmonares, oncológicas, enfermedades cardio y cerebrovasculares, diabetes, infecciones, trasplante de órganos, cicatrización de heridas y otras patologías mucosas y cutáneas.¹

2.2. Hipoxia cerebral

El órgano mas sensible a la hipoxia es el cerebro que consume el 20-25% de los requerimientos totales de Oxígeno del organismo y el 7-20% de la glucosa. El cerebro gasta entre 3 y 33 mL de oxígeno por 100 g de tejido cerebral y por minuto, lo que equivale a 40–50 mL por minuto para el conjunto del cerebro.² La hipoxia cerebral se refiere a un suministro reducido de oxígeno al cerebro debido a causas extracerebrales o intracerebrales. Entre las extracerebrales figuran las hipoxias respiratorias, ya sean prealveolares (disminución de la concentración de Oxígeno en el aire inspirado, de las vías aéreas, etc.) o alveolares. La hipoxia puede depender de un transporte inadecuado

¹ Semenza, L. G. *Physiology* **2009**, 24, 97-106.

² Allen, N. *The Chemical Basis of Neurological Disorders in Clinical Neurosurgery*; Williams and Wilkins, Co. Eds.; Baltimore, 1967; Vol. 14.

de oxígeno por la sangre (anemia, intoxicación por monóxido de carbono, shock, insuficiencia cardíaca, etc.) o puede derivar de una obstrucción de los grandes vasos cervicales. Entre las causas cerebrales pueden señalarse los tumores, los traumatismos de cráneo, embolia y hemorragia cerebral.³

2.1.2. Hipoxia tumoral

El microambiente tumoral lo constituyen el flujo sanguíneo, la microcirculación, el aporte de oxígeno y nutrientes, el pH residual y el estado bioenergético y metabólico de un tumor. Este microambiente influye en las características biológicas de los tumores como la tasa de proliferación celular, la capacidad de reparación de la lesión letal o potencialmente letal, la inducción de la apoptosis o el potencial de invasión metastático y angiogénico, así como la expresión de genes responsables de la resistencia a fármacos. Así, niveles bajos de hemoglobina influyen en los resultados de la radioterapia tanto en el control local del tumor como en la supervivencia.⁴ Hay estudios que demuestran que ante un mismo estado y tamaño tumoral, pacientes con niveles elevados de hipoxia intratumoral presentan un peor control de la enfermedad y supervivencia que pacientes con tumores mejor oxigenados.⁵

La hipoxia tumoral ocurre cuando el tamaño del tumor supera la capacidad de la microcirculación para aportar el oxígeno necesario a las células tumorales. Depende de factores como el tamaño del tumor, su tipo histológico, su estado, el aporte de

³ Lee, E. J.; Hung, Y. C.; Lee, M. Y. *J. Neurol. Sci.* **1999**, *164*, 117-123.

⁴ Lavey, R.; Dempsey, H. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1993**, *27*, 1147-1152.

⁵ Lartigau, E. *Bull. Cancer* **2007**, *97*, S 197-202.

hemoglobina y la extensión de la necrosis. Varios estudios muestran que el grado de hipoxia es mayor en el área tumoral que en los tejidos adyacentes normales.^{6,7}

La relación entre hipoxia tumoral y evolución o gravedad del proceso neoplásico se ha explicado mediante tres hipótesis: 1) La hipoxia puede inducir cambios en la expresión de las proteínas del tumor dependientes de oxígeno, estimulando la angiogénesis y de esa forma aumentando el potencial de crecimiento del tumor y de la metastatización o de aparición de metastatización o de aparición de las metástasis. 2) La hipoxia impide la formación de moléculas reactivas de oxígeno que cuando están sometidas a la radioterapia causan daños en el ADN de las células tumorales. De esta manera, la reducción de los niveles de oxígeno contribuye a la resistencia frente a la radioterapia. 3) La hipoxia puede producir un crecimiento acelerado de células tumorales que son resistentes a la apoptosis, dificultando el proceso de curación y control de la enfermedad.⁶ La hipoxia tumoral puede aumentar la expresión del gen supresor p53, un fenotipo celular que presenta un mayor potencial de malignidad.⁸

El grado de hipoxia es sumamente relevante en la recuperación funcional en acontecimientos como el infarto y miocardio isquémico, y en particular, el grado de hipoxia en tumores es un importante determinante de respuesta al tratamiento, la supervivencia sin recaída, y el pronóstico total que es independiente de la modalidad de tratamiento usado en el cáncer de los pacientes.^{9,10,11} La hipoxia activa *el factor inducible de hipoxia* (HIF-1, en inglés Hipoxia Inducible Factor) y éste a su vez pone en

⁶ Clarke, H.; Pallister, C. J. *Clin. Lab. Haematol.* **2005**, 27, 1-13.

⁷ Varlotto, J.; Stevenson, M. A. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, 63, 25-36.

⁸ Littlewood, T. J. *Hematol. Oncol.* **2001**, 19, 19-30.

⁹ Tatum, J. L.; Kelloff, G. J.; Gillies, R. J.; Arbeit, J. M.; Brown, J. M.; Chao, K. S. C.; Chapman, J. D.; Eckelman, W. C.; Fyles, A. W.; Giaccia, A. J. *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, 82, 699-757.

¹⁰ Foo, S. S.; Abbott, D. F.; Lawrentschuk, N.; Scott A. M. *Mol. Imaging Biol.* **2004**, 6, 291-305.

¹¹ Lee, S.T.; Scott, A. M. *Nuc. Med.* **2007**, 37, 451-461.

marcha toda la familia de genes angiogénicos, aumentando la densidad y permeabilidad vascular, y por tanto el crecimiento y propagación del tumor.¹² El factor de inducción de hipoxia, HIF-1, es el mayor regulador de la adaptación del tumor a la hipoxia, induciendo la expresión de muchos genes que permiten a las células sobrevivir en estas condiciones.

2.1.3. El factor inducible de hipoxia (HIF-1)

El HIF-1 es un heterodímero constituido por tres subunidades α , HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , mas una subunidad β .¹³ Existen evidencias crecientes de que el comportamiento agresivo del tumor mediado por la hipoxia y la resistencia a la terapia están controlados por HIF-1. El principal mecanismo de percepción de oxígeno celular parece mediado por la proteína HIF-1 α . En presencia de suficiente oxígeno, HIF-1 α es hidroxilada en los residuos de prolina mediante las enzimas prolin hidroxilasas 1-3. Estas enzimas utilizan oxígeno, hierro y α -cetoglutarato (del ciclo de Krebs) como sustratos, luego se une covalentemente a ubiquitina y se degrada por los proteasomas. Sin embargo, en periodos de hipoxia, la baja concentración de oxígeno impide la degradación de HIF-1 α , acumulándose rápidamente. La proteína HIF-1 α pasa al núcleo, donde forma un heterodímero (HIF-1) con HIF-1 β , formando un complejo que se une al ADN en una secuencia conocida con el nombre de elemento de respuesta a la hipoxia (HRE, en inglés Hipoxia Response Element). HIF-1 es reconocido por mas de 100 lugares en los cromosomas que conducen a la expresión de otras tantas proteínas de respuesta a hipoxia. Estas proteínas pueden promover la expresión de genes relacionados con el crecimiento y la supervivencia de células hipóxicas tumorales a través de sucesos moleculares tales como la desregulación de la glicólisis, angiogénesis

¹² Quintero, M.; Mackenzie, N.; Brennan, P. A. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2004**, *30*, 465-468.

¹³ Wang, G. L.; Semenza, G. L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *1*, 1230-1237.

y mutación p53, que permiten la adaptación de las células tumorales a la hipoxia (Figura 2.1).^{14,15,16,17,18,19} La proteína HIF-1 está sobreexpresada en múltiples tipos de cáncer y en la metástasis regional y distante, mientras que no aparece en tumores benignos no invasivos. HIF-1 ayuda a prevenir la apoptosis y muerte por la expresión de genes que inducen mutaciones. Al mismo tiempo, la hipoxia induce la expresión de genes que están involucrados en metástasis e invasión. Esta cadena de supervivencia está unida a alteraciones malignas del tumor, por lo que HIF-1 es un excelente marcador endógeno para tumores malignos así como para hipoxia.¹¹ Existen varios modelos que involucran a diferentes moléculas como sensores de oxígeno. Entre ellas es fundamental un tipo especial de hidroxilasas, las prolil hidroxilasas (PHDs) que contienen Fe(II) en su centro catalítico, el cual es oxidado a Fe(III) por interacción de oxígeno molecular durante la reacción de hidroxilación.²⁰ Un segundo tipo de regulación se atribuye a las especies reactivas de oxígeno (ROS, en inglés Reactive Oxygen Species), principalmente el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son moléculas derivadas del oxígeno con gran capacidad de reacción por su alta inestabilidad química. Se generan durante la reducción completa del oxígeno molecular a agua, en la cual se incorporan cuatro electrones al oxígeno en diversas etapas, generándose los radicales libres como moléculas intermedias (Figura 2.1). Durante períodos de hipoxia, la baja concentración de oxígeno impide que HIF-1 α se degrade y se acumule rápidamente. Por otro lado, concentraciones fisiológicas de especies reactivas de oxígeno pueden también

¹⁴ Brizel, D. M.; Scully, S. P.; Harrelson, J. M.; Layfield, L. J.; Bean, J. M.; Prosnitz, L. R.; Dewhirst, M. W. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 941-943.

¹⁵ Hockel, M.; Schlenger, K.; Aral, B.; Mitze, M.; Schaeffer, U.; Vaupel, P. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4509-4515.

¹⁶ Hockel, M.; Schlenger, K.; Hockel, S.; Aral, B.; Schaeffer, U.; Vaupel, P. *Int. J. Cancer* **1998**, *79*, 365-369.

¹⁷ Sundfor, K.; Lyng, H.; Rofstad, E. K. *Br. J. Cancer* **1998**, *78*, 822-827.

¹⁸ Walenta, S.; Wetterling, M.; Lehrke, M.; Schwickert, G.; Sundfor, K.; Rofstad, E. K.; Mueller-Klieser, W. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 916-921.

¹⁹ Powis, G.; Kirkpatrick, L. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 647-654.

²⁰ Kizaka-Kondoh, S.; Konse-Nagasawa, H. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1366-1373.

oxidar las proliil hidroxilasas y favorecer la acumulación de HIF-1 α .²¹ Las células que no poseen HIF-1 α y que están expuestas a un ambiente hipóxico, aumentan rápidamente su contenido en estas especies conduciendo a la muerte celular.

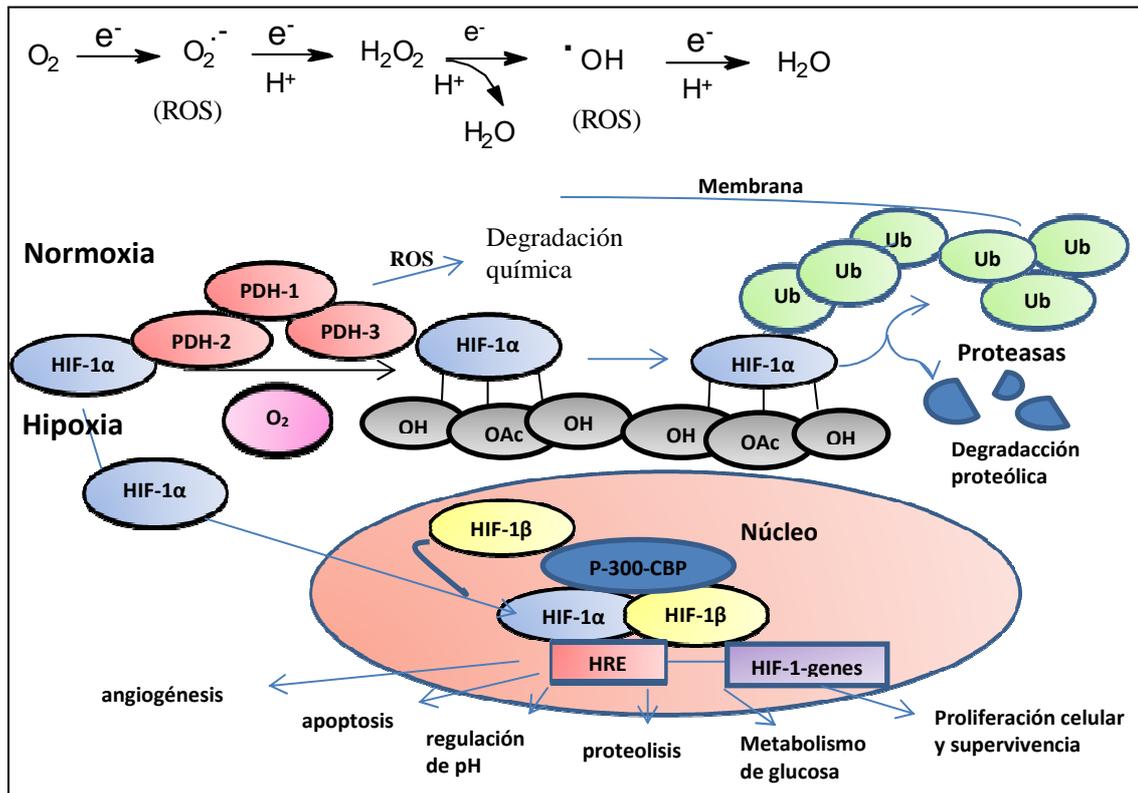


Figura 2.1. Mecanismo de actuación de HIF-1 α y formación de ROS. HIF-1 α es hidroxilada y degradada en condiciones normóxicas. En condiciones hipóxicas heterodimeriza y se une a los dominios de elementos de respuesta a hipoxia para transcribir numerosas proteínas. (Ub: ubiquitina; P-300-CBP: K acetiltransferasa 2B (KAT2B), es un coactivador transcripcional asociado con p53).

²¹ Mansfield, K. D.; Guzy, R. D.; Pan, Y.; Young, R. M.; Cash, T. P.; Schumacker, P. T.; Simon, M. C. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 393-399.

2.2. Métodos de detección de hipoxia

Hay algunos requisitos que un marcador necesita cumplir para ser ideal en la detección de tumores hipóxicos: 1) Debe de ser específico para hipoxia y distinguir entre normoxia, hipoxia y anoxia o necrosis; 2) Debe diferenciar entre hipoxia aguda o crónica; 3) Debe ser simple, no tóxico, rápido, fácil de preparar y reproducible; 4) Debe ser lipófilo para tener una biodistribución homogénea en todos los tejidos, incluyendo los tumorales, pero a su vez hidrófilo para tener una rápida eliminación, lo que permite una mayor relación de marcador entre el tumor y el tejido normal; 5) Debe tener una baja degradación *in vivo*, dando lugar a metabolitos no específicos y/o unidos a tejidos inespecíficos de manera que solo los mecanismos de retención específicos de oxígeno determinen la cantidad de marcador que es temporalmente atrapado; 6) Debe reflejar mas la tensión de oxígeno (pO_2) intracelular que la presión sanguínea o que alguna consecuencia bioquímica; 7) Debe ser sensible a los niveles de pO_2 relevantes a la terapia tumoral; 8) Debe ofrecer la capacidad de ser cuantificado. Desafortunadamente, ninguno de los marcadores disponibles en la actualidad cumplen todos estos requisitos.²² Esto ha llevado al desarrollo de una variedad de métodos tanto invasivos como no invasivos para medir la oxigenación en tumores.

²² Mees, G.; Dierckx, R.; Vangestel, C.; Van de Wiele, C. *J. Nucl. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 1674-1686.

2.2.1. Métodos invasivos

2.2.1.1. Microelectrodo polarográfico de oxígeno (aguja Eppendorf)

La medida de la pO_2 es el método estándar de referencia para la evaluación del grado de hipoxia en tejidos. Se determina con un microelectrodo polarográfico de oxígeno (Figura 2.2), una aguja muy fina de 300 μm que se inserta en el tumor y genera una corriente por ionización dando una concentración estimada de oxígeno en el lugar de la inserción. Las medidas realizadas según este método están en una buena correlación con ensayos radiobiológicos de hipoxia, permitiendo predecir el potencial de metástasis en tumores.^{23,24,14} Sin embargo, este método es invasivo y restringido a tumores fácilmente accesibles. El valor típico del rango de pO_2 en un tejido normal es de 20 a 80 mmHg, mientras que en algunos tumores sólidos aparecen valores mucho mas bajos (<10 mmHg) en los que empieza a desarrollarse el punto de resistencia a la radiación ionizante y la quimioterapia, ya que la citotoxicidad de la radiación ionizante depende en gran medida de la presencia de O_2 .^{25,26}

²³ Gatenby, R. A.; Kessler, H.B.; Rosenblum, J. S.; Coia, L. R.; Moldofsky, P. J.; Hartz, W. H.; Broder, G. J. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1988**, *14*, 831-838.

²⁴ Rofstad, E. K.; Sundfor, K.; Lyng, H.; Trope, C. G. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 354-359.

¹⁴ Brizel, D. M.; Scully, S. P.; Harrelson, J. M.; Layfield, L. J.; Bean, J. M.; Prosnitz, L. R.; Dewhirst, M. W. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 941-943.

²⁵ Bejot, R.; Dersemans, V.; Kelly, C.; Carrol, L.; King, R. C.; Gouverneur, V. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 565-575.

²⁶ Marín-Caballos, A. J.; Murillo-Cabezas, F.; Domínguez-Roldan, J. M.; Leal-Noval, S. R.; Rincón-Ferrari, M. D.; Muñoz-Sánchez, M. A. *Med. Intensiva* **2008**, *32*, 81-90.

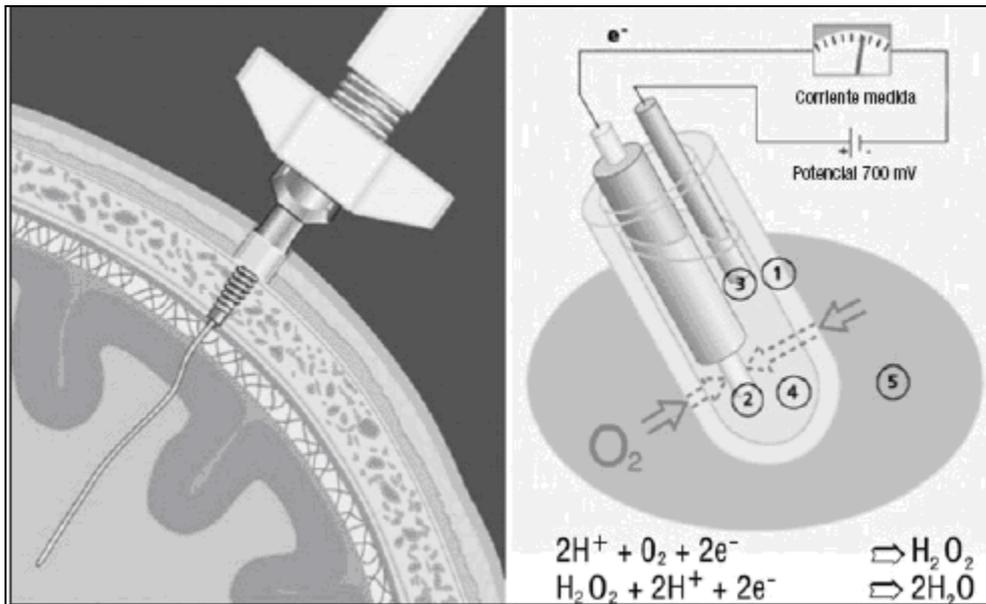


Figura 2.2. Monitorización de la presión tisular cerebral de oxígeno con electrodo de Clark modificado. El sensor va insertado en la sustancia blanca del lóbulo frontal a través de un trépano y guiado por un introductor específico colocado en una posición y a una profundidad estándar. El electrodo Clark consta de una membrana semipermeable al oxígeno (1) que recubre un cátodo (2) y un ánodo (3) bañados en una solución electrolítica (4) que a un potencial determinado genera una corriente eléctrica proporcional a la presión parcial de oxígeno en el tejido (5). Figura tomada de ref. 26.

2.2.1.2. Métodos inmunohistoquímicos

Estos métodos se utilizan para detectar y cuantificar hipoxia en biopsias de pacientes. Se basan en la utilización de un anticuerpo específico unido a compuestos de tipo nitroimidazol, biológicamente reducibles (ej. pimonidazol, Figura 2.3), que son administrados previamente a la biopsia. Este método permite valorar si las áreas hipóxicas corresponden a necrosis o a células viables. Las principales desventajas de esta técnica son su invasividad, la limitación del tamaño de la muestra, y la inhabilidad para realizar medidas repetidas en un paciente para monitorizar los cambios en la oxigenación después de las terapias.²⁷ Actualmente pimonidazol se considera el

²⁷ Chitneni, K. S.; Palmer, M. G.; Zalutsky, R. M.; Dewhirst, W. M. *J. Nucl. Med.* **2011**, 52, 165-168.

marcador exógeno estándar de hipoxia, un indicador para hipoxia crónica que permite la medida de valores de pO₂ por debajo de 10 mmHg.²⁰

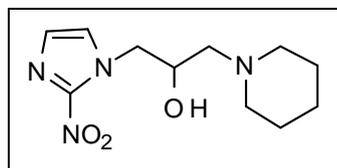


Figura 2.3. Pimonidazol.

2.2.2. Métodos no invasivos

Existen otros métodos no invasivos para detectar hipoxia como la tomografía de emisión de positrones (PET, en inglés Positron Emission Tomography), la tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT, en inglés Single-Photon Emission Computed Tomography), la espectroscopía de resonancia magnética y la imagen de resonancia magnética (MRS/MRI, en inglés Magnetic Resonance Spectroscopy/Magnetic Resonance Imaging). Los métodos mas atractivos por repetidas y exhaustivas medidas del estado de oxigenación en la clínica son PET y MRI.²⁸

²⁸ Minn, H.; Gronroos, T. J.; Komar, G.; Eskola, O.; Lehtio, K.; Tuomela, J.; Seppanen, M.; Solin, O. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 2932-2942.

2.2.2.1. Tomografía de Emisión de Positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones es una técnica no invasiva de diagnóstico e investigación *in vivo* por imagen capaz de medir la actividad metabólica del cuerpo humano. Esta técnica se basa en detectar y analizar la distribución tridimensional que adopta en el interior del cuerpo un radiofármaco de vida media corta administrado a través de una inyección intravenosa. La imagen se obtiene gracias a que los tomógrafos son capaces de detectar los fotones gamma emitidos por el radiofármaco. Estos fotones gamma de 511 Kev son el producto de una aniquilación entre un positrón, emitido por el radiofármaco, y un electrón cortical de las moléculas del cuerpo del paciente. Esta aniquilación da lugar a la emisión de dos fotones (Figura 2.4). Para que estos fotones acaben por conformar la imagen deben detectarse simultáneamente en una ventana de tiempo adecuada (nanosegundos), deben provenir de la misma dirección y sentidos opuestos, y su energía debe superar un umbral mínimo que certifique que no ha sufrido dispersiones energéticas de importancia en su trayecto hasta los detectores. Los detectores de un tomógrafo PET están dispuestos en anillo alrededor del paciente y gracias a que detectan simultáneamente a los fotones generados en cada aniquilación permiten formar la imagen. Para la obtención de la imagen estos fotones detectados son convertidos en señales eléctricas. Esta información posteriormente se somete a procesos de filtrado y reconstrucción gracias a los cuales se obtiene la imagen. A diferencia de la tomografía convencional, en la cual se obtienen únicamente imágenes anatómicas de los órganos internos, el estudio por emisión de positrones permite además el estudio de funciones fisiológicas básicas como el flujo sanguíneo, el transporte de membrana, la farmacocinética de los fármacos y las interacciones ligando-receptor en humanos y animales de experimentación.²⁹ Mediante

²⁹ Czernin, J.; Weber, W. A.; Herschman, H. R. *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 99-118.

esta técnica se pueden marcar substratos naturales, gases, análogos de substratos y fármacos con radioisótopos emisores de positrones (β^+) que se usan en concentración picomolar para identificar los tejidos de interés.

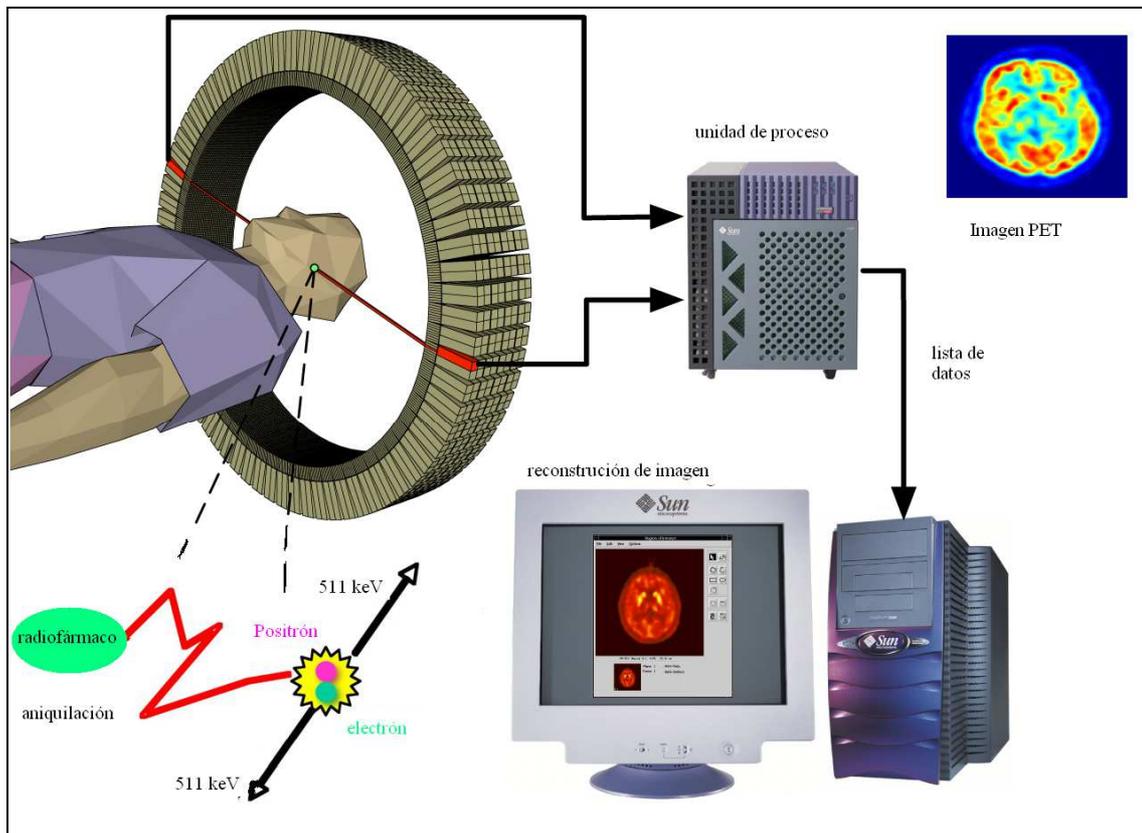


Figura 2.4. Técnica PET (tomada de <http://es.wikipedia.org>).

Los isótopos más utilizados son ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O y ^{13}N . Todos ellos comparten una vida media corta de menos de 2 horas. Sin embargo el más utilizado para la detección de hipoxia por PET es el ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ minutos), siendo un radioisótopo muy atractivo para el marcaje de moléculas orgánicas debido a sus características: tamaño estérico pequeño, enlace estable con el carbono, tiempo de vida media bueno, baja energía de

positrón y fácil producción. El flúor es un átomo que habitualmente se utiliza como un sustituyente en química médica para incrementar la actividad, potencia y la estabilidad de compuestos biológicamente activos.^{30,31}

La primera autorradiografía para detección de hipoxia con radioisótopos fue tomada en 1981 con [¹⁴C]-misonidazol. Posteriormente, [¹⁸F]-fluoromisonidazol fue propuesto como el radiotrazador no invasivo para imagen PET de tumores hipóxicos (Figura 2.5). Desde entonces, muchos otros radiotrazadores han sido evaluados para este propósito.

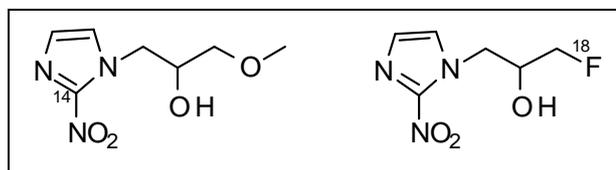


Figura 2.5. [¹⁴C]-misonidazol y [¹⁸F]-fluoromisonidazol.

2.2.2.2. Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Individuales (SPECT)

Es una técnica de tomografía que utiliza rayos gamma. Las imágenes obtenidas son bidimensionales, pero pueden combinarse muchas imágenes tomadas desde diferentes posiciones alrededor del paciente para obtener una tridimensional. El SPECT utiliza los rayos gamma que producen isótopos radioactivos como el ^{99m}Tc (Tecnecio metaestable), o el ¹²³I. Estos isótopos se introducen en el cuerpo humano como parte de moléculas biológicamente activas. El procedimiento es similar a PET, pero en SPECT es el isótopo el que produce directamente el rayo gamma, mientras que en PET el

³⁰ Seebach, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1320-1367.

³¹ Filler, R. *In Organofluorine Compounds in Medicinal Chemistry and Biomedical Applications*; Filler, R.; Ed.; Studies in Organic Chemistry; Elsevier; New York, 1993, Vol. 48, pag.1-23.

isótopo produce un positrón que después se aniquila con un electrón para producir los dos rayos gamma. Estos dos rayos gamma salen en direcciones opuestas y su detección simultánea permite localizar el isótopo de forma mas precisa que en SPECT. La SPECT es una técnica mas simple y mas utilizada que PET porque pueden usarse isótopos mas fáciles de obtener, con un menor coste y de vida media mas larga. Sin embargo, la mayor resolución y la mejor precisión obtenida con marcadores PET le hace a esta técnica ser mas adecuada para la detección de hipoxia.²² En los años 90, Chapman y *col.* describieron una síntesis de un nuevo análogo de misonidazol, 1-(1-(5-desoxi-5-[¹²³I]yodo- α -D-arabinosil)-2-nitroimidazol (IAZA) (Figura 2.6).^{32,33} La unión de este compuesto a las células tumorales ha mostrado ser muy dependiente del grado de hipoxia. ¹²³I puede detectarse tanto por gammagrafía (imagen planar) como por SPECT. El tiempo de vida media de 13 horas del ¹²³I frente a los 110 minutos del ¹⁸F permite la obtención de imágenes a tiempos mayores.³⁴ Otro de los radioisótopos utilizados en SPECT es el ^{99m}Tc, que ofrece unas características físicas óptimas, como es la vida media mas corta (6 horas) o la baja energía de sus fotones monoenergéticos (140 KeV). El mas utilizado actualmente para el estudio de la perfusión cerebral es el ^{99m}Tc-HMPAO (^{99m}Tc-hexametil propilen amino oxima) que se acumula en el cerebro tras un corto período de tiempo después de su administración intravenosa. Se han hecho estudios comparativos con HMPAO utilizado en el estudio del flujo sanguíneo cerebral (FSC) con IAZA.³⁵ La desventaja del marcaje con ^{99m}Tc-HMPAO es que este se queda almacenado tanto en tejido hipóxico como necrótico sin ninguna distinción.

³² Mannan, R. H.; Somayaji, V. V.; Lee, J.; Mercer, J. R.; Chapman, J. D.; Wibe, L. I. *J. Nucl. Med.* **1989**, *30*, 351-358.

³³ Parliament, M. B.; Chapman, J. D.; Urtasun, R. C.; McEwan, A. J.; Golberg, L.; Mercer, J. R.; Mannan, R. H.; Wiebe, L. I. *Br. J. Cancer* **1992**, *65*, 90-95.

³⁴ Groshar, D.; McEwan, A. J. B.; Parliament, M. B.; Urtasun, R. C.; Golberg, L. E.; Hoskinson, M.; Mercer, J. R.; Mannan, R. H.; Wiebe, L. I.; Chapman, D. *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, 885-888.

³⁵ *New Trends in Nuclear Neurology and Psychiatry*. Podreka, I. Brucke, T.H.; Asembaum, S.; Costa, D. C., Morgan, D. F., Lassen, N. A., Eds.; John Libbey, London, 1993, p 103-17.

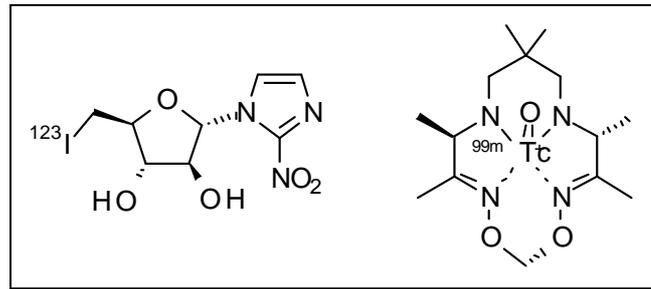


Figura 2.6. [^{123}I]-IAZA y [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-HMPAO.

2.2.2.3. Imagen de Resonancia Magnética (MRI)

La espectroscopía de resonancia magnética (MRS) es un método no invasivo que puede examinar un órgano *in vivo*, el metabolismo del órgano y de la célula y el cambio bioquímico que se produzca. La MRS proporciona información bioquímica que nos ayuda a predecir el diagnóstico de tumores o diferenciar los tumores malignos de los benignos.³⁶ La MRI proporciona un buen contraste entre los diferentes tejidos blandos del cuerpo, lo que le hace especialmente útil para obtener imágenes del cerebro, los músculos, el corazón y el cáncer en comparación con otras técnicas de imagen médica como la tomografía computarizada (TC) o rayos-X. A diferencia de estas, la MRI no utiliza radiación ionizante. Utiliza un campo magnético potente para alinear la magnetización de algunos núcleos atómicos en el cuerpo y los campos de radiofrecuencia para alterar sistemáticamente la alineación de esta magnetización. Esto hace que los núcleos produzcan un campo magnético giratorio detectable por el escáner, y esta información se registra para construir una imagen de la zona explorada del cuerpo.

³⁶ Zi-Hua, Q. I.; Chuan-Fu, L. I.; Zhen-Feng, L. I.; Kai, Z.; Quian, W.; and De-Xin, Y. *Chin. Med. J.* **2009**, *122*, 39-43.

La MRI se utiliza para registrar cambios en el nivel de oxígeno de la sangre. Este principio se basa en la obtención de imágenes con contraste dependiente del nivel de oxígeno de la sangre BOLD (del inglés Blood Oxygen Level Dependent) donde la señal de BOLD MRI está relacionada con la oxigenación vascular y permite estimaciones directas de pO_2 .³⁷ Sin embargo, la correlación se vuelve difícil para los vasos sanguíneos pequeños. BOLD puede confundirse con los efectos de flujo, aunque se pueden utilizar secuencias de pulsos apropiadas para minimizar estos efectos.³⁸ Baudelet y Gallez han investigado rigurosamente las correlaciones entre la pO_2 estimada usando sondas de fibra óptica y los cambios en la señal BOLD, donde se han encontrado cambios de pO_2 .³⁹ La ventaja de la técnica BOLD MRI es que ofrece una resolución espacial y temporal alta y reproducible siendo particularmente atractiva para los pacientes.

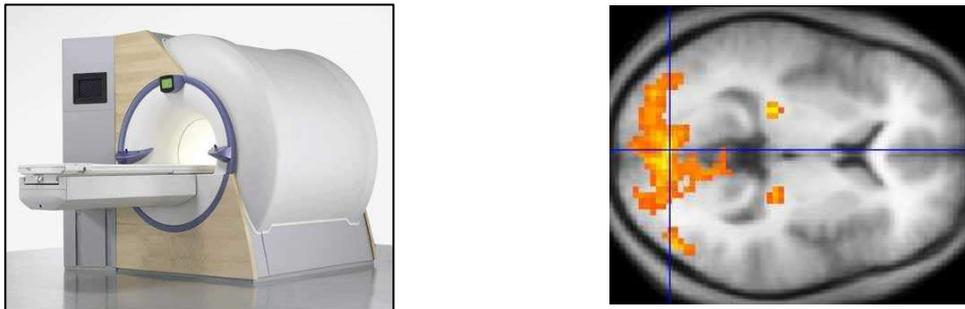


Figura 2.7. Equipo MRI e imagen de MR que muestra una región de actividad incluyendo la corteza visual primaria (tomado de <http://es.wikipedia.org>).

³⁷ Nield, L. E.; Qi, X. L.; Valsangiacomo, E.R.; Macgowan, C. K.; Wright, G. A.; Hornberger, L. K.; Yoo, S. *Pediatr. Radiol.* **2005**, *35*, 179-185.

³⁸ Al-Hallaq, H. A.; River, J. N.; Zamora, M.; Oikawa, H.; Karczma, G. S. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1998**, *41*, 151-159.

³⁹ Baudelet, C.; Gallez, B. *Magn. Reson. Med.* **2002**, *48*, 980-986.

2.2.2.3.1. Moléculas utilizadas para oximetría por MR

Algunos perfluorocarbonos (PFCs) se han desarrollado como moléculas sensibles al oxígeno para medidas por MR (Figura 2.8). En este método hay una relación lineal entre la señal de ^{19}F y pO_2 . Su alta hidrofobicidad garantiza la alta solubilidad de los gases en dichos compuestos, mientras que los iones son repelidos sin modificar la relación con la pO_2 . Los PFCs tradicionales se quedan retenidos en el tejido durante un largo periodo de tiempo, siendo la vida media en el hígado de unos cuarenta días, lo que permite que se hagan investigaciones de cambios crónicos de pO_2 durante unas semanas sin readministrar mas producto, pudiendo observar la progresión de hipoxia durante el crecimiento del tumor en el periodo de unas semanas. Se ha llevado a cabo un estudio en el que las medidas de pO_2 obtenidas mediante esta técnica son similares a las obtenidas usando histografía Eppendorf.⁴⁰ Otros compuestos como HMDSO (hexametildisiloxano) también se han utilizado como moléculas sensibles para oximetría por MR (^1H -MRI) (Figura 2.8).³³

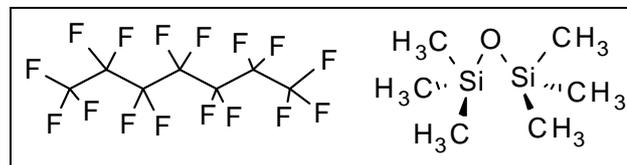


Figura 2.8. PFCs y HMDSO.

⁴⁰ Mason, R. P.; Costantinescu, A.; Hunjan, S.; Le, D.; Hahn, E. W.; Antich, P. P.; Blum, C.; Peschke, P. *Radiat. Res.* **1999**, *152*, 239-249.

³³ Parliament, M. B.; Chapman, J. D.; Urtasun, R. C.; McEwan, A. J.; Golberg, L.; Mercer, J. R.; Mannan, R. H.; Wiebe, L. I. *Br. J. Cancer* **1992**, *65*, 90-95.

2.2.2.3.2. Otros métodos para la imagen de hipoxia por MR

La técnica de ^{19}F -RMN tiene una sensibilidad similar a la de ^1H -RMN y tiene la ventaja de que no tiene ruido en la señal. Este método se basa en la formación de intermedios que pueden reaccionar con diversos componentes celulares quedando atrapados dentro de la célula, permitiendo así la comparación de tejido normal con tejido hipóxico. En 2006, Sykes y *col.* demostraron que es factible utilizar una sonda miniespiral de estado sólido para experimentos ^{19}F -RMN (Figura 2.9). La frecuencias similares de resonancia de ^1H y ^{19}F y el uso omnipresente de flúor en los plásticos y componentes electrónicos modernos presentan dos grandes desafíos en el diseño de una sonda con alta sensibilidad para medidas $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -RMN.⁴¹

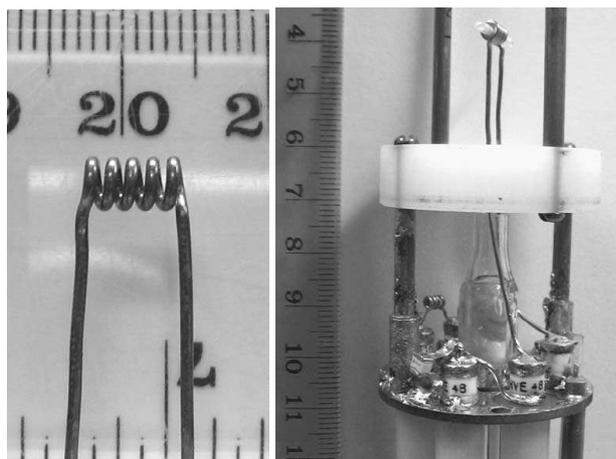


Figura 2.9. (A) Vista de la muestra miniespiral. (B) diseño del circuito y la disposición que muestra una vista de los componentes dentro de la sonda. Todas las divisiones están en milímetros (tomada de ref.41).

⁴¹ Graether, S. P.; DeVries, J. S.; McDonald, R.; Rakowszky, M. L.; Sykes, B. D. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 65-71.

2.2.2.4. Resonancia de Espín Electrónico (ESR)

La resonancia de spin electrónico (ESR, en inglés Electron Spin Resonance) también llamada resonancia paramagnética electrónica, (EPR, en inglés Electron Paramagnetic Resonance) es un método para detectar, caracterizar y cuantificar radicales libres en sistemas biológicos. El desarrollo de la baja frecuencia de instrumentos EPR hace posible la obtención de medidas en muestras biológicas *in vivo*. Estudios que requieren medidas de distribución espacial de radicales libres de la muestra pueden llevarse a cabo por imagen EPR (EPRI) usando campos apropiados. Esta técnica requiere la administración de agentes de contraste paramagnéticos como son nitróxidos y radicales triarilmefílicos (Figura 2.10). Las aplicaciones mas importantes de EPRI son las medidas de pO₂, pH y estados redox.⁴² El principal objetivo para continuar desarrollando esta técnica es conseguir las siguientes características: sensibilidad, localización, reproducibilidad, rapidez, no invasividad y biocompatibilidad del método. Se usan dos técnicas diferentes: 1) Inyección directa de materiales paramagnéticos con propiedades espectroscópicas óptimas (con señales únicas y una gran capacidad de respuesta a cambios de pO₂). Algunos de estos materiales pueden presentar interacciones indeseables con los tejidos, causando reacciones y perdiendo la capacidad de respuesta del oxígeno. Ejemplos de dichos materiales son ftalocianinas e India Ink (suspensiones de nanopartículas de negro de carbono en disoluciones acuosas). Esta técnica se ha estudiado en tejido tumoral de cerebro, corazón y del músculo esquelético; 2) Infusión intravenosa de agentes solubles en agua, los cuales atraviesan hasta el tumor.

⁴² Charlier, N.; Neyrinck, A. M.; Beghein, N.; Delzeme, N. M.; Gallez, B. *Mag. Reson. Imag.* **2009**, *27*, 565-569.

Se han descrito imágenes tridimensionales de la distribución de oxígeno en el tumor mediante ESR.⁴³ Actualmente se han hecho estudios en células tumorales en cultivo con complejos de litio, permitiendo medidas de pO₂ durante unos días. Esta técnica se puede combinar con RMN (ESR/RMN) dando la señal de protón que ocurre por transferencia de polarización por radicales libres después de la irradiación electromagnética. La ESR es prometedora pero en la actualidad carece de una instrumentación apropiada.⁴⁴

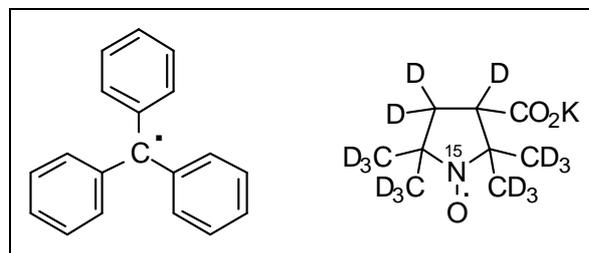


Figura 2.10. Sondas para ESR.

2.2.2.5. Métodos ópticos de imagen para medidas de hipoxia

La tomografía fotoacústica (PAT, en inglés Photoacoustic Tomography) se basa en procesos no invasivos tanto en la detección (por técnicas de ultrasonido) como en la excitación (radiación no ionizante). La calidad de las imágenes compite con rayos X o ultrasonido. Esta técnica se basa en el uso de pulsos láser en el infrarrojo cercano (1064 nm) que se hacen incidir sobre el tejido (Figura 2.11). A esa longitud de onda el tejido presenta mayor esparcimiento óptico que absorción de radiación, es decir, los pulsos de

⁴³ Elas, M.; Williams, B. B.; Parasca, A.; Mailer, C.; Pelizzari, C. A.; Lewis, M. A.; River, J. N.; Karczmar, G. S.; Barth, E. D.; Halpern, H. *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 682-691.

⁴⁴ Drishna, M. C.; English, S.; Yamada, K.; Yoo, J.; Murugesan, R.; Devasahayam, N.; Cook, J. A.; Golman, K.; Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Subramanian, S.; Mitchell, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 2216-2221.

radiación a 1064 nm penetran en el tejido una distancia de varios centímetros antes de decaer por completo. A pesar de ello, dicha penetración es suficiente para incidir sobre posibles lesiones que pudiesen estar presentes en el tejido. Cuando dichas lesiones son promotoras del proceso de neovascularización como consecuencia de la proliferación de células cancerígenas, entonces existe un aumento degenerado de tejido vascular y por lo tanto de flujo sanguíneo rico en hemoglobina, oxi-hemoglobina, glucosa y agua. En comparación con el tejido sano, todos estos constituyentes presentan alta absorción óptica en el infrarrojo y en particular a 1064 nm. De este modo, se establecen condiciones de contraste óptico entre la zona patológica (alta absorción óptica) y el tejido sano (baja absorción óptica), el cual puede llegar a ser de hasta 100 veces el uno respecto del otro. La radiación láser en el infrarrojo cercano es no ionizante y en general no presenta un riesgo de salud en humanos y en particular para el tejido.^{45,46,47} PAT es una nueva tecnología muy prometedora que todavía no ha sido evaluada en humanos aunque los estudios en animales muestran buenos resultados.⁴⁸

⁴⁵ Xu, M.; Wang L. V. *Rev. Sci. Instrum.* **2006**, *77*, 41101.

⁴⁶ Zhang, h. F.; maslow, K.; Stoica, G.; Wang, L. V. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 848-851.

⁴⁷ Moock, V.; Quispe-Siccha, R. M.; Reyes-Rámirez, B.; García-Segundo, C.; Arámbula-Cosío, F.; Garduño-Ángeles, E. *XII Simposio Mexicano en Cirugía Asistida por Computadora y Procesamiento de Imágenes Médicas MEXCAS*, **2011**.

⁴⁸ Lungu, G. F.; Li, M. L.; Xie, X.; Wang, L. V.; Stoica, G. *Int. J. Oncol.* **2007**, *30*, 45-54.

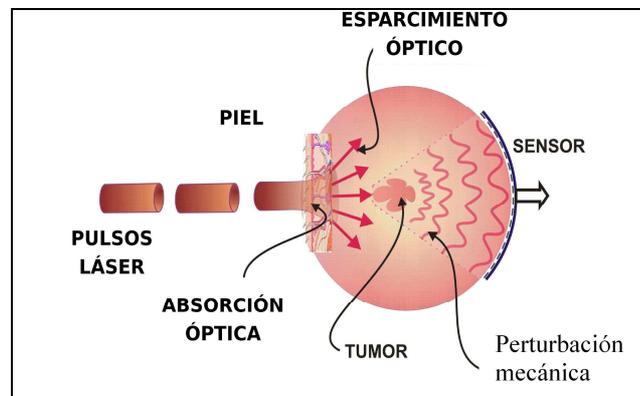


Figura 2.11. Representación del proceso físico de esparcimiento y absorción óptica, formación de la fuente de calor y propagación de pulso ultrasónico hasta la zona de detección (tomada de ref. 45).

2.2. Radiofármacos nitroimidazoles para imagen de hipoxia

Los compuestos derivados de nitroimidazol han recibido una atención especial como nuevas sondas de imagen para la detección de hipoxia debido a su fácil reducción biológica en condiciones hipóxicas gracias a su alta afinidad electrónica. Algunos derivados de 2-nitroimidazol se han aplicado para imagen de regiones hipóxicas tanto en tumores sólidos como en miocardio e isquemia cerebral. En 1953 se describió que el 2-nitroimidazol (azomicina) tenía propiedades como antibiótico contra bacterias anaerobias y protozoos.⁴⁹ Esta toxicidad selectiva fue determinada por su reducción biológica a especies reactivas en ausencia de oxígeno. A finales del siglo XX se investigaron compuestos nitroaromáticos deficientes en electrones para su uso en el tratamiento del cáncer como modificadores químicos que incrementan la sensibilidad del tejido hipóxico a la radiación o a agentes quimioterapéuticos, así como profármacos bioreductores o citotoxinas selectivas para hipoxia.²⁰

⁴⁹ Maeda, K.; Osato, T.; Umezawa, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **1953**, *6*, 182.

²⁰ Kizaka-Kondoh, S.; Konse-Nagasawa, H. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1366-1373.

Los requisitos que debe cumplir un marcador ideal de hipoxia para el cerebro son: 1) Que atraviese libremente la barrera hematoencefálica (BBB) y que tenga una alta especificidad. 2) Que tenga una relación conocida de pO_2 permitiendo una estimación directa. 3) Que tenga una dosificación favorable y que sea saludable para el uso humano, no tóxico.⁵⁰ Los derivados de nitroimidazoles más comunes usados como marcadores para hipoxia son los recogidos en la Figura 2.12.

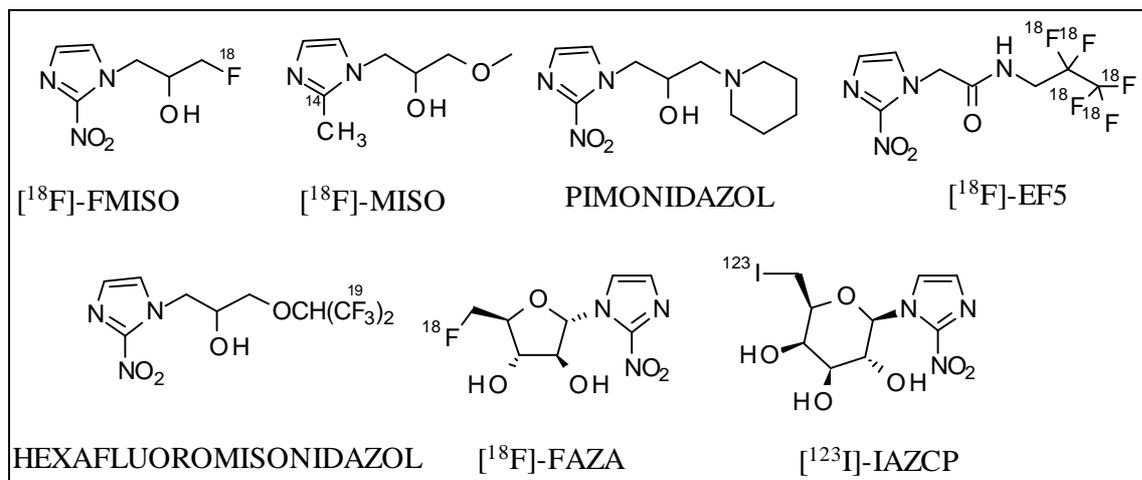


Figura 2.12. Marcadores más utilizados para la detección de hipoxia

⁵⁰ Takasawa, M.; Moustafa, R. R.; Baron, J. C. *Stroke* **2008**, *39*, 1629-1637.

2.3.1. Metabolismo de nitroimidazoles

En todas las estructuras de nitroimidazoles como marcadores de hipoxia el grupo nitroarilo es un fragmento esencial para su funcionamiento como agente bioreductor, uniéndose selectivamente a moléculas del tejido hipóxico. Los compuestos nitroaromáticos son selectivamente reducidos por enzimas nitroreductasas, como xantina oxidasa, lipoxigenasas y oxidasas dependientes de NADPH, bajo condiciones hipóxicas para formar productos reactivos que pueden unirse irreversiblemente con nucleófilos de macromoléculas celulares. El derivado de 2-nitroimidazol entra a las células por difusión pasiva, quedando distribuido de forma homogénea en el cuerpo. El grupo nitro tiene una gran afinidad por los electrones, aunque menos que el O₂ y puede aceptar un electrón reduciéndose en el medio al anión radical $-\text{NO}_2^{\cdot-}$. En presencia de O₂, el anión radical nitro es reoxidado y el marcador puede abandonar la célula. Sin embargo, en condiciones hipóxicas donde los niveles de oxígeno son bajos, el anión radical nitro se reduce en una segunda etapa donde ya no es posible invertir el proceso. El radioligando se convierte en un agente alquilante que reacciona indiscriminadamente con macromoléculas intracelulares, quedando irreversiblemente atrapado (Figura 2.13).^{51,52,53,54,55}

La única propiedad biológica de los compuestos de tipo nitroarilo es su fácil reducción, la cual se estima por su potencial de reducción.⁵⁶ Los compuestos

⁵¹ McClelland, R. A. *In Advanced Research Workshop on Selective Activation of Drugs by Redox Processes*. Adams, G. E.; Breccia, A.; Fiedlen, E. N.; Wardman, P. Eds. NATO, Plenum Press, New York, 1990, 125-136.

⁵² McClelland, R. A.; Panicucci, R.; Rauth, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4308-4314.

⁵³ Brezden, C. B.; Horn, L.; McClelland, R. A.; Rauth, A. M. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 335-344.

⁵⁴ Brezden, C. B.; McClelland, R. A.; Rauth, A. M. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 361-370.

⁵⁵ Bolton, J. L.; McClelland, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8172-8181.

⁵⁶ Adams, G. E.; Flockhart, I. R.; Smithen, C. E.; Stratford, I. J.; Wardman, P.; Watts, M. E. *Radiat. Res.* **1976**, *67*, 9-20.

nitroaromáticos mas investigados contienen 2-nitroimidazol, el cual tiene un potencial de reducción de $-0,39\text{ V}$ ($E[\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-]$) con referencia al electrodo normal de hidrógeno en agua a pH 7, mas alto que el 4-nitroimidazol ($-0,56\text{ V}$) y que el 5-nitroimidazol ($-0,47\text{ V}$).⁵⁷

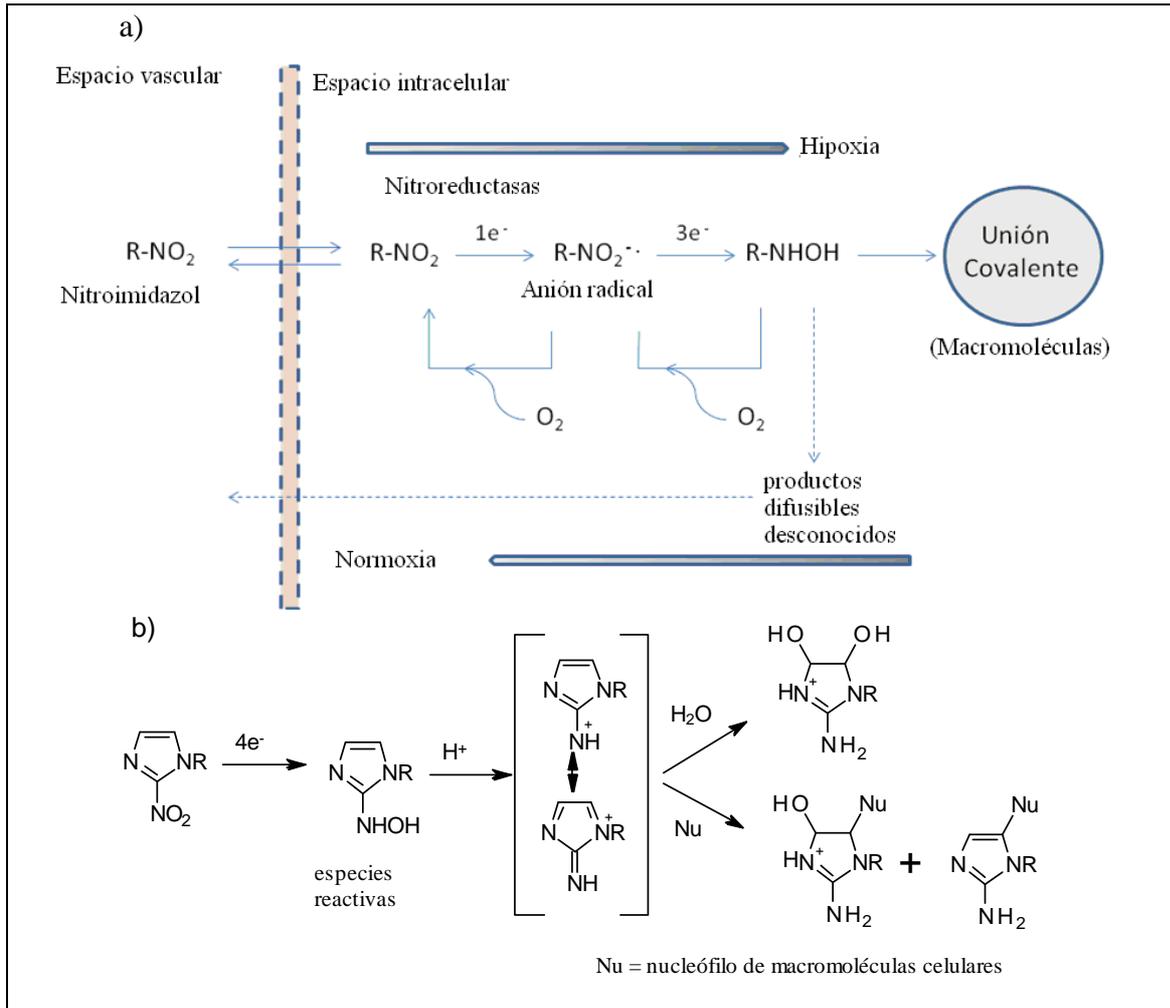


Figura 2.13. Reducción de [^{18}F]-FMISO en las diferentes células y su unión a macromoléculas. a) tomado de ref. 50, b) tomado de ref. 55.

⁵⁷ Wardman, P. *Environ. Health Perspect.* **1985**, 64, 309-320.

Sin embargo, no solo el grupo nitroarilo es importante en el compuesto, ya que el tamaño de la cadena lateral y los diferentes grupos funcionales que ésta contenga son necesarios para el control de otras propiedades farmacocinéticas, así como su toxicidad, distribución, acumulación, duración de retención del marcador en el sitio hipóxico y la rapidez de aclaramiento de las células normóxicas. La farmacocinética y las tasas de acumulación dependen de la presencia o ausencia de grupos disociables y de la lipofilia. La lipofilia de una molécula es la capacidad de la misma para atravesar la bicapa lipídica de la célula por difusión pasiva, y se cuantifica a través del coeficiente de partición en octanol/agua (P o $\log P$).⁵⁸ En general cuando mas alto sea el valor de P , mayor cantidad de radiotrazador se quedará retenido. Cuando el valor de $\log P$ es negativo indica hidrofília, mientras que cuando es positivo hablamos de lipofília.²⁰ Una de las limitaciones y características comunes de los marcadores tipo 2-nitroimidazol es su acumulación lenta en el tejido hipóxico, mostrando señales de hipoxia no especifica hasta 1,5-2 horas después de la inyección, y en algunos modelos animales el tiempo óptimo puede ser de hasta 4-18 horas.²⁸

⁵⁸ Workman, P.; Brown, J. M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1981**, *6*, 39-49.

²⁰ Kizaka-Kondoh, S.; Konse-Nagasawa, H. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1366-1373.

²⁸ Minn, H.; Gronroos, T. J.; Komar, G.; Eskola, O.; Lehtio, K.; Tuomela, J.; Seppanen, M.; Solin, O. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 2932-2942.

2.3.2. Derivados de 2-nitroimidazol como radiomarcadores de hipoxia

2.3.2.1. [¹⁸F]-FMISO

[¹⁸F]-FMISO es actualmente el radiotrazador mas utilizado en la técnica de imagen por PET como marcador *in vivo* que permite evaluar de forma no invasiva la hipoxia. La importancia creciente que se le ha dado es debida a su potencial para predecir la respuesta al tratamiento y proporcionar el pronóstico de una amplia gama de procesos patológicos. FMISO es fácil de sintetizar⁵⁹ y su uso es seguro en humanos,²⁹ aunque las propiedades farmacocinéticas no son óptimas para la obtención de imágenes hipóxicas. FMISO tiene un valor de $\log P = 0,40$ (coeficiente de partición en octanol/agua),⁶⁰ observándose una acumulación de radioactividad en tejido hipóxico y un aclaramiento lento de radioactividad en tejido normóxico. Este valor indica que su utilidad como agente marcador de hipoxia en cerebro sea reducida, limitando su aplicación en la obtención de imágenes de tejido cerebral isquémico por infarto o tumor, aunque se ha observado una acumulación de FMISO en el cerebro, pequeña y cuantitativa, lo que indica que FMISO es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Para solucionar algunas de las propiedades farmacocinéticas, se han descrito diferentes análogos de FMISO con el que se han comparado (Figura 2.14).

⁵⁹ Lim, J. L.; Berridge, M. S. *Appl. Radiat. Isot.* **1993**, *44*, 1085-1091.

⁶⁰ Yang, D. J.; Wallace, S.; Cherif, A.; Li, C.; Gretzer, M. B.; Kim, E. E.; Podoloff, D. A. *Radiology* **1995**, *194*, 755-760.

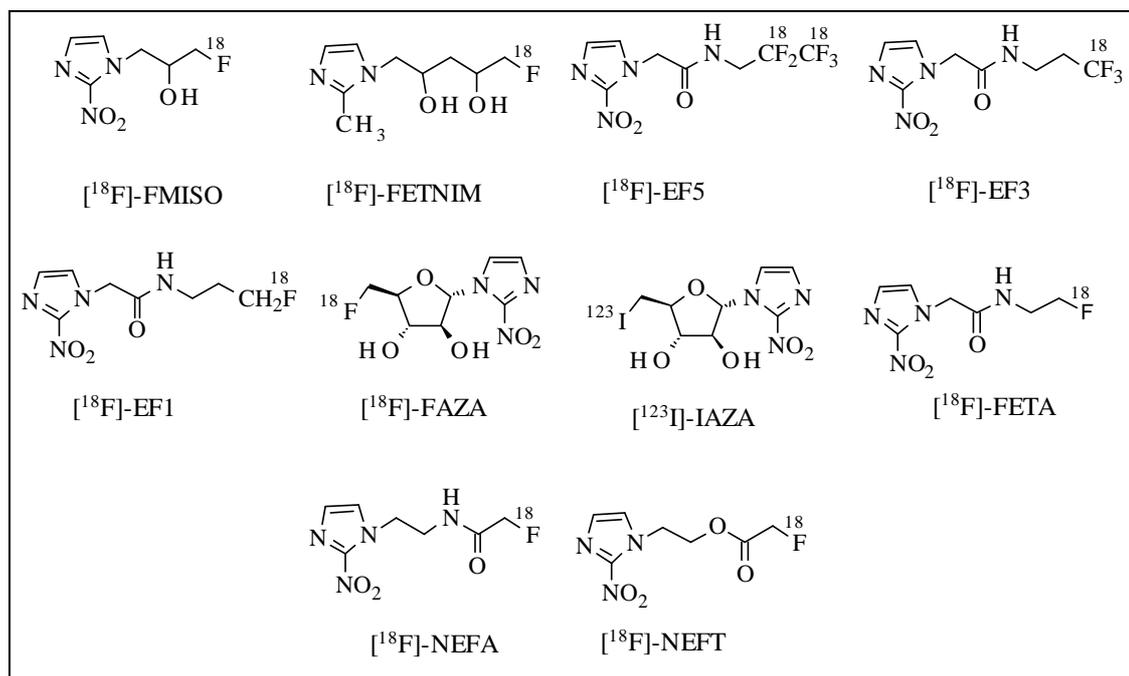


Figura 2.14. [^{18}F]-FMISO y análogos.

2.3.2.2. [^{18}F]-FETNIM

La mayor diferencia entre [^{18}F]-FMISO y [^{18}F]-FETNIM ([^{18}F]-fluoroeritronitroimidazol) es su lipofilia. El valor de coeficiente de partición octanol/agua de cada uno de ellos es 0,40 y 0,17 respectivamente, donde el mas hidrófilo es [^{18}F]-FETNIM y el mas lipófilo [^{18}F]-FMISO.⁶⁰ La acumulación de ambos marcadores correlaciona con el estado de oxígeno en los tumores pero [^{18}F]-FETNIM mostró una señal mas baja en tejidos normales comparada con [^{18}F]-FMISO.⁶¹ En otro estudio se evaluó la respuesta a la radioterapia en 21 pacientes con cáncer de cabeza y

⁶⁰ Yang, D. J.; Wallace, S.; Cherif, A.; Li, C.; Gretzer, M. B.; Kim, E. E.; Podoloff, D. A. *Radiology* **1995**, *194*, 755-760.

⁶¹ Gronroos, T.; Bentzen, L.; Marjamaki, P.; Murata, R.; Horsman, M. T.; Keiding, S.; Eskola, O.; Haaparanta, M.; Minn, H.; Solin, O. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, *31*, 513-520.

cuello por imagen PET con [¹⁸F]-FETNIM. La alta captación de [¹⁸F]-FETNIM antes de la radioterapia se asoció con la tendencia hacia una supervivencia global pobre.⁶²

2.3.2.3. [¹⁸F]-EF5, [¹⁸F]-EF3 y [¹⁸F]-EF1

[¹⁸F]-EF5(2-(2-Nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N*-(2,2,3,3,3-pentafluoropropil)acetamida) se distribuye rápida y uniformemente en todos los tejidos. Esto junto con su alta estabilidad como fármaco *in vivo* le hace ser un agente prometedor para la evaluación de tumores de hipoxia de forma no invasiva.⁶³

Se ha comparado la farmacocinética, la biodistribución y el metabolismo de EF3 (2-(2-Nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N*-(3,3,3-trifluoropropil)acetamida) con FMISO en modelos de tumor en roedores, concluyendo que ambos exhiben propiedades similares y son capaces de detectar hipoxia, aunque parece que este último es menos específico.⁶⁴

En otro estudio con tumores inyectados en ratas, se mostró que el aclaramiento en sangre es más rápido para [¹⁸F]-EF3 que para [¹⁸F]-FMISO. Ambos presentan un almacenamiento similar en el tumor después de 4 horas desde la inyección, una distribución uniforme y rápida similar en tejidos normales y una distribución intratumoral comparable indicando que [¹⁸F]-EF3 no es superior a [¹⁸F]-FMISO.⁶⁵

⁶² Lehtio, K.; Eskola, O.; Wiljanen, T.; Oikinen, V.; Gronroos, T. ; Sillanmaki, L.; Grenman, R.; Minn H. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *59*, 971-982.

⁶³ Ziemer, L. S.; Evans, S. M.; Kachur, A. V.; Shuman, A. L.; Cardi, C. A.; Jenkins, W. T.; Karp, J. S.; Alavi, A.; Dolbier, W. R.; Koch, C. J. *Eur. J. Nucl. Med.* **2003**, *30*, 259-266.

⁶⁴ Mahy, P.; De Bast, M.; De Groot, T.; Chequillaume, A.; Gillart, J.; Haustermans, K.; Labar, D.; Gregoire, V. *Radiother. Oncol.* **2008**, *89*, 353-360.

⁶⁵ Dubois, L.; Landuyt, W.; Cloetens, L.; Bol, A. ; Bormans, G. ; Haustermans, D. ; Labar, D.; Nuyts, J.; Gregoire, V.; Mortelmans, L. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 209-218.

[¹⁸F]-EF1 (2-(2-Nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N*-(3-fluoropropil)acetamida) se estudió en dos tipos de tumores de rata, donde se evaluó y optimizó la biodistribución del fármaco, demostrando que es un marcador excelente para la determinación de hipoxia en el tumor de forma no invasiva.⁶⁶

2.3.2.4. [¹⁸F]-FAZA y [¹²⁴I]-IAZA

Sorger y *col.* han comparado la acumulación selectiva de [¹⁸F]-FMISO y [¹⁸F]-FAZA (1-(6-desoxi-6-[¹⁸F]-fluor- α -D-arabinosil)-2-nitroimidazol) en un estudio *in vitro* en células hipóxicas, mostrando que [¹⁸F]-FAZA es capaz de determinar la pO₂ en el mismo orden de magnitud que [¹⁸F]-FMISO. En el estudio *in vivo*, se ha demostrado que [¹⁸F]-FMISO conduce a valores de acumulación ligeramente superiores a los de [¹⁸F]-FAZA, aunque la eliminación de este último es mucho más rápida.⁶⁷ Existen otros estudios en los que se compara [¹⁸F]-FMISO y [¹⁸F]-FAZA en varios tumores en ratones donde [¹⁸F]-FAZA tiene mejores propiedades biocinéticas que [¹⁸F]-FMISO.^{68,69}

Respecto de [¹²⁴I]-IAZA (1-(6-desoxi-6-[¹²⁴I]-yodo- α -D-arabinosil)-2-nitroimidazol), aunque frecuentemente ha sido marcado con los isótopos ¹²³I y ¹²⁵I, algunos estudios utilizan IAZA marcado con ¹²⁴I. En un estudio reciente publicado por Reischl y *col.* se comparó la imagen de hipoxia entre [¹²⁴I]-IAZA, [¹⁸F]-FMISO y [¹⁸F]-FAZA resultando que FAZA muestra una mayor relación de acumulación en el tumor. Aunque la proporción de IAZA se incrementó con el tiempo, ésta era más baja que con [¹⁸F]-

⁶⁶ Evans, S.M.; Kachur, A.V.; Shiue, Co Y.; Hustinx, R.; Jenkins, W. T.; Shive, G. G.; Alavi, A.; Lord, E. M.; Dolbier, W. R. Jr. *J. Nucl. Med.* **2000**, *41*, 327-336.

⁶⁷ Sorger, D.; Patt, M.; Kumar, P.; wiebe, L. I.; Barthel, H.; Seese, A.; Dannenberg, C.; Tannapfel, A.; Kluge, R.; Sabri, O. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 317-326.

⁶⁸ Piert, M.; Machulla, H. J.; Picchio, M.; Reischl, G.; Ziegler, S.; Kumar, P.; Reischl, G.; Ziegler, S.; Kumar, P.; Wester, H-J.; Beck, R.; McEwan, A. J. B.; Wiebe, L. I. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 106-113.

⁶⁹ Reischl, G.; Dorow, D. S.; Cullinane, C.; Datsifis, A.; Roselt, P.; Binns, D.; Hicks, R. J. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2007**, *10*, 203-211.

FAZA a tiempos mas cortos. Además, el estudio demostró que [¹⁸F]-FAZA presenta una biocinética mejor que [¹²⁴I]-IAZA y [¹⁸F]-FMISO.

2.3.2.5. [¹⁸F]-FETA

Rasey y *col.* han llevado a cabo un estudio donde incubaron diferentes líneas celulares tumorales con [¹⁸F]-FETA (*N*-(2-[¹⁸F]-fluoroetil)-(2-nitroimidazol-1-il)-etanamida) a varios tiempos bajo diferentes concentraciones de O₂. [¹⁸F]-FETA y [¹⁸F]-FMISO mostraron dependencias similares de oxígeno, sin embargo, [¹⁸F]-FETA presenta ventajas frente a [¹⁸F]-FMISO porque parece metabolizarse menos *in vivo*.⁷⁰ En otros estudios *in vitro*, se determinó la biodistribución y el metabolismo de [¹⁸F]-FETA, concluyendo que tiene propiedades fisicoquímicas adecuadas y es estable a la degradación no hipóxica *in vivo*. También se demostró que hay una relación entre la hipoxia y la retención de radiotrazador en el tumor, y que esta relación estaba validada por los datos determinados con el electrodo polarográfico de oxígeno.⁷¹

2.3.2.6. [¹⁸F]-NEFT y [¹⁸F]-NEFA

En 2011, Zha y *col.* sintetizaron y evaluaron dos nuevos derivados de 2-nitroimidazol como radioligandos para tumores: [¹⁸F]-NEFA (*N*-(2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-[¹⁸F]-fluoroacetamida) y [¹⁸F]-NEFT ([¹⁸F]-fluoracetato de 2-(2-nitroimidazol-1-il)etilo). Ambos se prepararon con rendimientos de 7% y 10% (decaimiento no corregido) respectivamente, con purezas radioquímicas superiores al 98%. Los estudios de biodistribución en tumores inyectados en ratones indicaban una

⁷⁰ Rasey, J. S.; Hofstrand, P. D.; Chin, L. K.; Tewson, T. J. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 1072-1079.

⁷¹ Barthel, H.; Wilson, H.; Collingridge, D. R.; Brown, G.; Osman, S.; Luthra, S. K.; Brady, F.; Workman, P.; Price, P. M.; Aboagye, E. O. *Br. J. Cancer* **2004**, *90*, 2232-2242.

relación para la biodistribución en tumor/sangre y tumor/hígado de 0,96 y 0,61 para NEFA, y 0,98 y 1,10 para NEFT a los 30 minutos respectivamente. Estos valores son mas altos que los observados para FMISO (0,91 y 0,59). El bajo almacenamiento en tejidos normales es probablemente debido a la rápida descomposición *in vivo* de dichos radiofármacos, ya que contienen grupos éster y amida muy lábiles tanto química como enzimáticamente. El ión fluoroacetato fue el principal metabolito *in vivo* encontrado para ambos radioligandos.⁷²

2.3.2.7. [¹⁸F]-FON y [¹⁸F]-FPN

El valor deseable del coeficiente de partición en octanol/agua ($\log P$) para que un radiofármaco atraviese la BBB por difusión y se pueda aplicar en neurociencia es $1,5 < \log P < 3$.⁷³ Esto llevó a sintetizar compuestos análogos de FMISO ($\log P = -0,40$)⁷⁴ pero mas lipófilos modificando tanto la cadena alquílica como el anillo del imidazol. En 1999, Yamamoto y *col.* sintetizaron [¹⁸F]-FPN (1-(3-[¹⁸F]-fluoropropil)-2-nitroimidazol) y [¹⁸F]-FON (1-(8-[¹⁸F]-fluorooctil)-2-nitroimidazol) cuyos valores de $\log P$ son 0,28 y 2,72 respectivamente (Figura 2.15). Por otro lado, los potenciales de reducción de estos análogos lipófilos fueron similares a FMISO y MISO. Su alta lipofilia incrementó el almacenamiento inicial del fármaco en el cerebro normal de rata, comparado con FMISO, seguido por un aclaramiento rápido del mismo. Ambos análogos tuvieron una absorción significativamente menor en el tumor y una menor relación tumor/sangre que FMISO. FPN y FON no mejoraron las propiedades biológicas de FMISO como agente potencial para imagen de hipoxia en cerebro.⁷⁴ En

⁷² Zha, Z.; Zhu, L.; Liu, Y.; Du, F.; Gan, H. ; Qiao, J. ; Dung, H. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, 38, 501-508.

⁷³ Aboagye, E. O. *Design and development of probes for in vivo molecular and functional Imaging of cancer and cancer therapies by positron emission tomography (PET)*; Knäblein, J., Ed.; WILEY-VCH, Weinheim, 2005.

⁷⁴ Yamamoto, F.; Oka, H.; Antoku, S.; Ichiya, Y.; Masuda, K.; Maeda, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, 22, 590-597.

2002, este mismo grupo de investigación describió un nuevo agente como marcador de hipoxia cerebral, $[^{18}\text{F}]$ -4-Br-FPN (4-bromo-1-(3- $[^{18}\text{F}]$ -fluoropropil)-2-nitroimidazol) ($\log P = 1,09$). La absorción inicial en el cerebro de rata fue significativamente mas alta comparada con FMISO, seguida de un rápido lavado en el cerebro. La absorción en el tumor también mejoró con respecto a FMISO y FPN, aunque con baja selectividad. Ni FON ni FPN mejoraron las propiedades biológicas que ofrece FMISO como marcador para detectar hipoxia en cerebro por imagen.⁷⁵

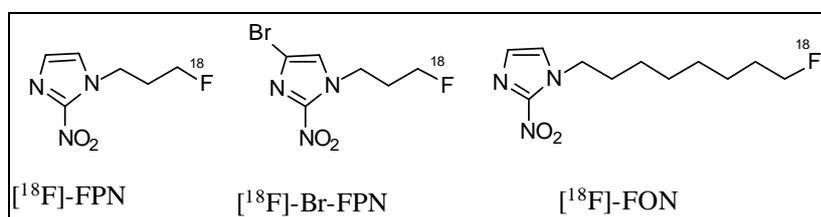


Figura 2.15. FPN, Br-FPN y FON.

2.3.3. Nuevos radiomarcadores de hipoxia con un segundo grupo nitroimidazol

La mayoría de marcadores de hipoxia contienen un solo centro redox nitroimidazol. En 2009, Mukai y *col.* sintetizaron ^{67}Ga -DOTA-MN2, un compuesto que contiene dos fragmentos de 5-nitroimidazol como región de reconocimiento de la lesión hipóxica (Figura 2.16). Los experimentos de biodistribución mostraron una captación significativa del marcador en el tumor, una rápida eliminación de la sangre y pequeñas acumulaciones en otros tejidos, resultando un buen candidato como marcador.⁷⁶

⁷⁵ Yamamoto, F.; Aoki, M.; Furusawa, Y.; Ando, K.; Kuwabara, Y.; Masuda, K.; Sasaki, S.; Maeda, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 616-621.

⁷⁶ Mukai, T. ; Suwada, J. ; Sano, K.; Okada, M.; Yamamoto, F.; Maeda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4285-4289.

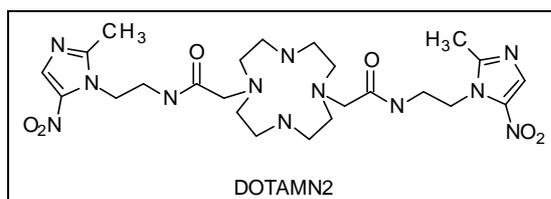


Figura 2.16. DOTAMN2.

En 2012, Huang y *col.* estudiaron la influencia de mas de un centro redox nitroimidazol en la molécula (Figura 2.17). Sintetizaron compuestos que contienen un solo grupo 2-nitroimidazol **I** ($\log P = 1,59$), dos grupos 2-nitroimidazol **II** ($\log P = 1,10$), un grupo 4-nitroimidazol **III** ($\log P = 1,54$), dos grupos 4-nitroimidazol **IV** ($\log P = 1,23$) y un grupo 2-nitroimidazol junto con un grupo 4-nitroimidazol **V** ($\log P = 1,29$). Estos compuestos se complejaron con ^{99m}Tc y se evaluaron como marcadores de hipoxia *in vitro*. Los complejos obtenidos con **III** y **IV** no mostraron diferencias entre células anóxicas y normóxicas, sin embargo, el complejo obtenido con **I** mostró buena acumulación, que se incrementó en 1,3 veces al introducir un fragmento de 4-nitroimidazol **V** y 2,4 veces mas cuando se introdujo un 2-nitroimidazol **II**. La diferencia puede atribuirse a un potencial de reducción menor para el 4-nitroimidazol (-0,56 V) que para el 2-nitroimidazol (-0,39 V).⁷⁷

⁷⁷ Huang, H.; Zhou, H.; Li, Z.; Wang, X. ; Chu, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 172-177.

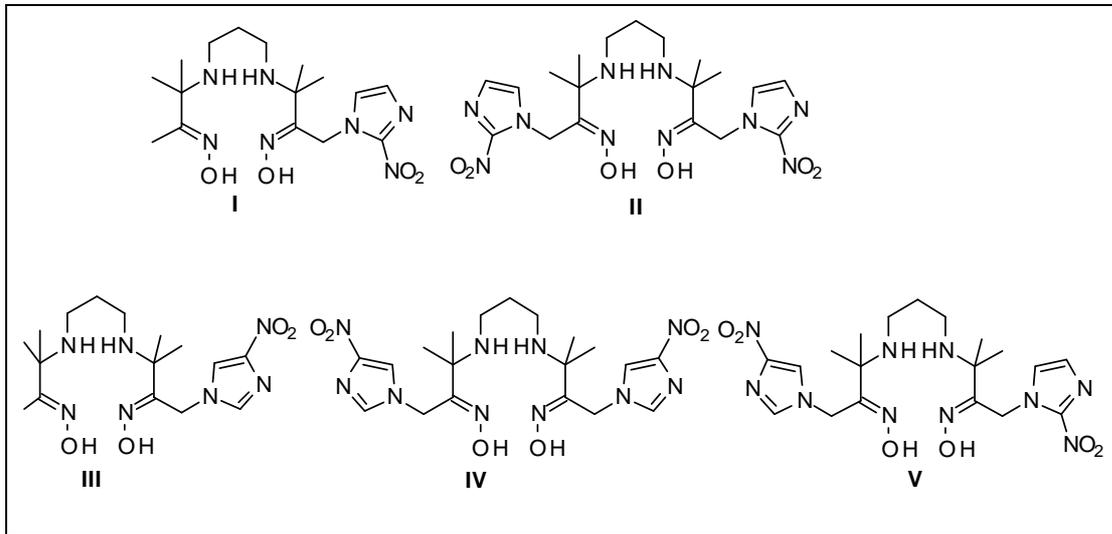


Figura 2.17. Influencia de los centros redox en los derivados de nitroimidazol.

2.4. Radiomarcadores de hipoxia no relacionados con nitroimidazoles

Se han usado otros agentes de imagen para PET que no contienen un anillo de nitroimidazol, como son [^{18}F]-FDG y Cu-ATSM (Figura 2.18).

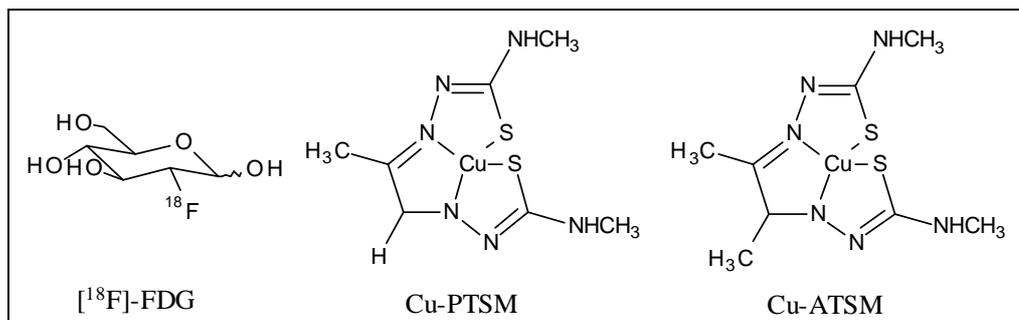


Figura 2.18. Marcadores PET de hipoxia (FDG, Cu-PTSM, Cu-ATSM).

2.4.1. [¹⁸F]-FDG (2-deoxy-2-[¹⁸F]-fluoro-D-glucosa)

[¹⁸F]-FDG es sin duda el radiofármaco PET mas importante debido no solo a su aplicación al estudio de patologías muy diversas, sino también a sus características metabólicas y a la rapidez de su síntesis. FDG al igual que la glucosa atraviesan la barrera hematoencefálica y entran fácilmente a las células, inician la vía glicolítica donde la fosforilación de la misma impide que sea liberada al medio. El oxígeno 2 de la molécula es necesario para continuar el proceso de glucólisis, la FDG no puede ser metabolizada en las células y por ello la FDG-6-fosfato formada no entra en la ruta glicolítica antes de que decaiga la radiactividad. Como resultado, la distribución de [¹⁸F]-FDG es un buen reflejo de la distribución en el consumo y fosforilación de glucosa en las células del cuerpo. [¹⁸F]-FDG-PET es un método funcional no invasivo que se usa para la detección de cáncer, así como para su seguimiento y estado de respuesta al tratamiento en diferentes tumores. Aunque el almacenamiento de este radiofármaco durante su estudio PET depende de la expresión de proteínas que están controladas por HIF-1, el grado de retención en tumores puede estar relacionado indirectamente con el nivel de hipoxia. Sin embargo, cuando se trata de relacionar el consumo de [¹⁸F]-FDG en hipoxia tumoral se obtienen resultados contradictorios. Estudios *in vitro*, sugieren que FDG podría acumularse en células hipóxicas cancerígenas comparadas con células normóxicas cancerígenas, debido al distinto metabolismo, aunque experimentos *in vivo* muestran resultados contradictorios cuando expresan la correlación entre su consumo y la existencia de hipoxia en tumores.^{78,79,80}

⁷⁸ Hara, T.; Bansal, A.; DeGrado, T. R. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33*, 977-984.

⁷⁹ Busk, M.; Horsman, M. R.; Jakobsen, S.; Bussink, J.; Van Der Kogel, A.; Overgaard, J. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 2294-2303.

⁸⁰ Dearling, J.; Flynn, A.; Sutcliffe-Goulden, J.; Petrie, L.; Boden, R.; Green, A.; Boxer, G. M.; Begent, R. H. J.; Pedley, R. B. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45*, 101-107.

2.4.2. Cu-ATSM

Otra alternativa como radiotrazador para detectar hipoxia por imagen PET es el Cu-ATSM, un complejo de cobre radiactivo con ATSM (Diacetil-bis (N4-metiltiosemicarbazona)). Cu(II)-ATSM es un complejo neutro lipófilo, altamente permeable a la membrana. Las ditiosemicarbazonas tienen propiedades antitumorales que se incrementan cuando forman un complejo con el Cu, lo que hace que varios laboratorios desarrollen ligandos sustituidos de ditiosemicarbazonas como potenciales agentes PET.⁸¹ El primer complejo descrito fue Cu-PTSM (Pirivaldehido-bis (N4-metiltiosemicarbazona) de cobre (II)) que se promovió como agente para el flujo sanguíneo. Poco después se describió el Cu-ASTM con un grupo metilo añadido como un buen agente para detección de hipoxia en miocardio. En este caso, el grupo metilo adicional tiene un efecto pequeño en el log P , pero influye de forma importante en el potencial de reducción ($E_{1/2}$), para la reducción Cu(II)→Cu(I). Las pruebas en varias líneas de células tumorales mostraron un incremento del almacenamiento en el tumor de tres veces respecto de Cu-PSTM. Desafortunadamente, el efecto hipóxico no se mostró en todas las líneas celulares y algunas de estas no mostraron selectividad hipóxica. El mecanismo de reducción de Cu(II)-ATSM a [Cu(I)-ATSM]⁻ tiene lugar en células tanto hipóxicas como normóxicas, pero en presencia de oxígeno intracelular el cobre es rápidamente reoxidado a Cu(II)-ATSM. En condiciones hipóxicas, la reoxidación es lenta por lo que el complejo de [Cu(I)-ATSM]⁻ se cree que se protona, el Cu marcado isotópicamente puede disociarse y transferirse a otras macromoléculas intracelulares quedando retenido en las células. Aunque este es un mecanismo atractivo químicamente, sin embargo, no hay variabilidad con diferentes tipos tumorales.⁸²

⁸¹ Vavere, A. L.; Lewis, J. S. *Dalton Trans.* **2007**, 43, 4893-4902.

⁸² Nunn, A.; Linder, K.; Strauss, H. W. *Eur. J. Nucl. Med.* **1995**, 22, 265-280.

Hay cuatro isótopos de cobre diferentes, emisores de positrones, cuyos tiempos de vida media son: ^{60}Cu ($t_{1/2} = 0,40$ horas), ^{61}Cu ($t_{1/2} = 3,32$ horas), ^{63}Cu ($t_{1/2} = 0,16$ horas) y ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12,7$ horas). Yuan y *col.* han demostrado la validez de ^{64}Cu -ATSM como marcador de hipoxia en la mayoría de los tumores, pero no en todos, lo que plantea preocupaciones con respecto a su utilización para identificar hipoxia con gran certeza.⁸³ Además Lewis y *col.* llevaron a cabo un estudio de comparación entre imágenes obtenidas con ^{60}Cu -ATSM y ^{64}Cu -ATSM en cáncer de cuello de útero, donde observaron que la calidad con ^{64}Cu era superior a la de ^{60}Cu debido al menor ruido de la señal, siendo la magnitud de la absorción en el tumor similar para ambos. La utilización de ^{64}Cu -ATSM tiene algunas ventajas conocidas para otros radiofármacos usados por PET para hipoxia, incluyendo ser un método más simple de síntesis, tener una velocidad de eliminación más rápida en tejidos normóxicos permitiendo un tiempo corto entre la inyección y la imagen, y ser un método simple de cuantificación. Esto hace que tenga cualidades para ser un marcador muy atractivo para hipoxia tumoral.⁸⁴

2.5. Métodos de síntesis de radiofármacos fluorados

Desde el punto de vista químico, los métodos de introducción de un átomo de [^{18}F]-flúor en una estructura química pueden ser mediante reacción de fluoración electrófila, utilizando flúor molecular [^{18}F]- F_2 , o mediante reacción de fluoración nucleófila utilizando ión fluoruro [^{18}F]- F^- .⁸⁵ El reactivo marcado isotópicamente reacciona con el precursor de forma que en uno o pocos pasos sintéticos se forma el

⁸³ Yuan, H.; Schroeder, T.; Bowsher, J. E.; Hedlund, L. W.; Wong, T.; Dewhirst, M. W. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 989-998.

⁸⁴ Lewis, J. S.; Laforest, R.; Dehdashti, F.; Grigsby, P. W.; Welch, M. J.; Siegel, B. A. *Soc. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 1177-82.

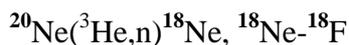
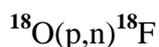
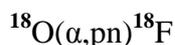
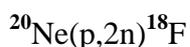
⁸⁵ Lasne, M. C.; Perrio, C.; Rouden, J.; Barré, L.; Roeda, D.; Dollé, F.; Crouzel, C. *Chemistry of β^+ Emitting Compounds Based on Fluorine-18*, W. Krause Ed.; Topics in Current Chemistry, **222**, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002, p. 201.

radiofármaco, se purifica y se inyecta. En el campo de la radioquímica, la síntesis se lleva a cabo con un gran exceso de precursor y reactivos respecto del radioligando. Por esta razón la eficiencia de las reacciones se da generalmente en rendimiento radioquímico en lugar de químico y pueden expresarse con decaimiento corregido o sin corregir.

En la síntesis de compuestos marcados con [^{18}F]-flúor una de las características más importantes para el producto final es la medida de la actividad específica (definida como la radioactividad por unidad de masa). Esta medida se analiza a partir de diferentes técnicas como son cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta presión (HPLC, en inglés High-Pressure Liquid Chromatography), espectroscopía ultravioleta (UV) o espectroscopía de masas (EM). Estas medidas pueden variar por razones relacionadas con la calidad del reactivo marcado utilizado en la síntesis y por la precisión y exactitud de los análisis cromatográficos.

Puede producirse [^{18}F]-flúor por diferentes reacciones nucleares (Tabla 2.1), sin embargo, las dos más utilizadas son $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ y $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ ya que ambas requieren energías moderadas de partículas y un bombardeo a corriente baja para obtener rendimientos aceptables.

Tabla 2.1. Reacciones nucleares para la producción de ^{18}F



2.5.1. Fluoración electrófila

Aunque la mayoría de radiofármacos marcados con [^{18}F]-flúor han sido preparados mediante reacciones de sustitución nucleófila, en algunos casos la radiosíntesis por sustitución electrófila es más adecuada. La limitación más significativa de las [^{18}F]-fluoraciones electrófilas es la baja actividad específica (menos de 10 Ci/mmol) que se obtiene en los productos finales. Un segundo inconveniente de este tipo de reacción es que el máximo rendimiento radioquímico que se puede obtener es del 50% ya que tan solo uno de los dos átomos de flúor gas puede introducirse en el producto.

La obtención de [^{18}F]- F_2 se puede lograr de dos maneras: a) mediante reacciones nucleares $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ con adición de pequeñas cantidades de gas portador ($^{19}\text{F}_2$) (c.a. en inglés, carrier added). Por lo tanto, del flúor obtenido inicialmente en el blanco, solo una parte será ^{18}F , puesto que el ^{18}F y el ^{19}F son químicamente indistinguibles;⁸⁶ b) mediante reacciones nucleares $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ (un método con mayor rendimiento para la producción de [^{18}F]-flúor) seguido de una segunda irradiación de una mezcla de gas con adición de gas portador (c.a) para iniciar el intercambio de átomos de flúor.⁸⁷ La razón de la adición de flúor molecular no radiactivo en el contenedor donde se introduce el material para ser irradiado es debido a que el [^{18}F]- F_2 es muy reactivo y puede ser adsorbido en las paredes del contenedor y en las líneas de transferencia. Este paso recibe el nombre de pasivación y es crítico para obtener buenos rendimientos. El reactivo generalmente se usa en la forma de [^{18}F] F_2 (reactivo ligeramente regioselectivo), o se transforma en [^{18}F]hipofluorito de acetilo ($\text{CH}_3\text{CO}[^{18}\text{F}]\text{F}$), el cual

⁸⁶ Casela, V.; Ido, T.; Wolf, A. P.; Fowler, J. S.; MacGregor, R. R.; Ruth, T. J. *J. Nucl. Med.* **1980**, *21*, 750-757.

⁸⁷ Nickels, R. J.; Daube, M. E.; Ruth, T. J. *Int. J. Appl. Rad. Isot.* **1984**, *35*, 117-122.

es menos reactivo.^{88,89} Las radiofluoraciones electrófilas requieren estructuras electrónicamente enriquecidas, como grupos vinilo o derivados aromáticos. En la Figura 2.19 se describen ejemplos de radiosíntesis por sustitución electrófila.^{90,91}

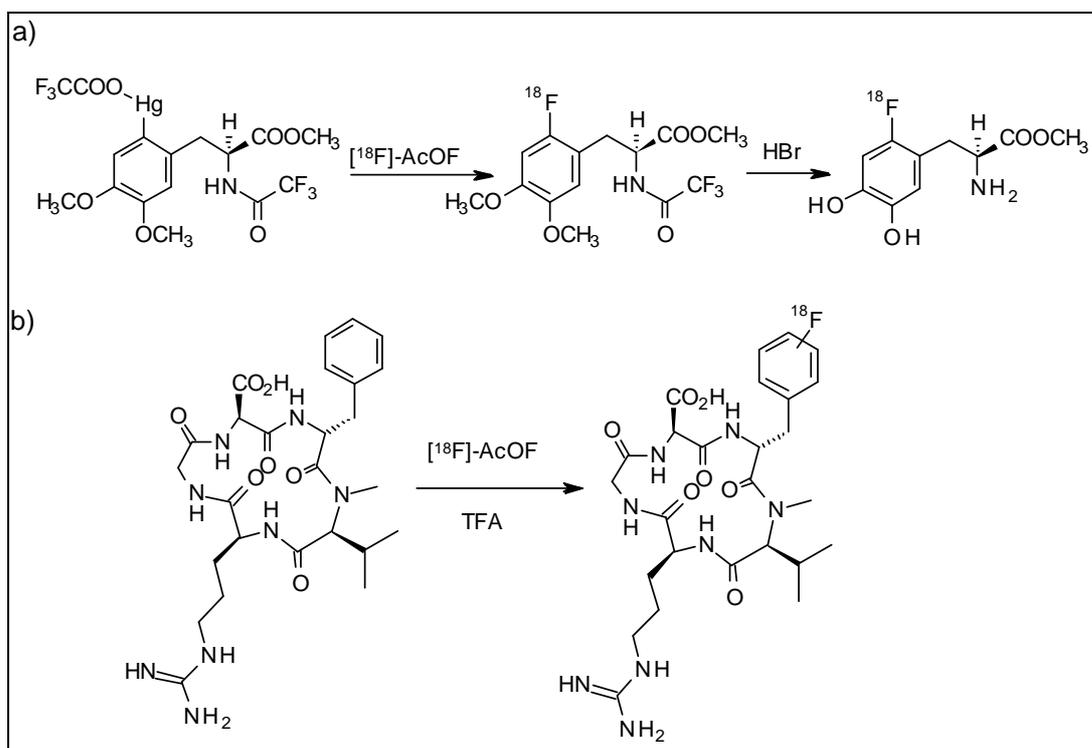


Figura 2.19. Esquema radiosintético de fluoración electrófila directa con $[^{18}\text{F}]\text{-AcOF}$: a) $[^{18}\text{F}]\text{-FDOPA}$
b) Ciclopéptido con $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$.

⁸⁸ *Handbook of Radiopharmaceuticals-Radiochemistry and Applications*, Welch, M. J.; Redvanly, C. S. Eds.; Wiley-Interscience Publishers, New York, 2003.

⁸⁹ Ogawa, M.; Hatano, K.; Oishi, S.; Kawasumi, Y.; Fujii, N.; Kawaguchi, M.; Doi, M.; Imamura, M.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Mukai, T.; Saji, H.; Ito, K. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 1-9.

⁹⁰ Malik, N.; Solbach, C.; Voelter, W.; Machulla, H. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2010**, *283*, 757-764.

⁹¹ Kilbourn, M. R.; Shao, X. *Fluorine-18 Radiopharmaceuticals*; Ojima, I.; Ed.; Blackwell publishing, Ltd, 2009, chapter 14.

2.5.2. Fluoración nucleófila

La mayoría de los [^{18}F]-fluoro trazadores se sintetizan mediante reacciones de fluoración nucleófilas. Este es el método más usual de introducir flúor en una cadena alifática por desplazamiento nucleófilo del correspondiente sulfonato o haluro por ión flúor. Aunque para este propósito se han utilizado fluoruros de metales alcalinos, la fluoración con estos compuestos solo se consigue bajo condiciones vigorosas debido a su solubilidad limitada en disolventes orgánicos y a su baja nucleofilia.⁹² La generación de [^{18}F]-flúor se lleva a cabo por bombardeo de [^{18}O]- H_2O con protones, según la reacción nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ en disolución acuosa con una radioactividad específica alta ($185 \text{ GBq } \mu\text{mol}^{-1}$) y sin adición de flúor molecular (n.c.a. en inglés, no carrier added). Se trata de un método de preparación de radioisótopos libre de isótopos estables del elemento, lo que no significa que estén libres de la presencia de ^{19}F -flúor sino simplemente que ningún ^{19}F -flúor ha sido deliberadamente añadido ya sea durante la generación del radionúclido o durante la radiosíntesis.

El anión [^{18}F]-fluoruro obtenido (el catión se adiciona al hacer pasar la disolución a través de un cartucho de carbonato potásico) se transforma en especies nucleófilas por eliminación del H_2O . Un criptando (Kryptofix[®] [2.2.2]) es añadido con el fin de reforzar la nucleofilia del flúor. La etapa de secado se puede evitar añadiendo un líquido iónico como reactivo en el medio.⁹³ La sustitución nucleófila se suele llevar a cabo en disolventes polares apróticos como DMSO o acetonitrilo, bajo calentamiento convencional a $120\text{-}150 \text{ }^\circ\text{C}$ o mediante microondas (100 W) durante un corto tiempo (1-2 minutos). Los rendimientos radioquímicos dependen de los sustratos de partida pero

⁹² Wook, D. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16394-16397.

⁹³ Kim, H. W.; Jeong, J. M.; Lee, Y. S.; Chi, D. Y.; Chung, K. H.; Lee, D. S.; Chung, J. K.; Lee, M. C. *Appl. Radiat. Isot.* **2004**, *61*, 1241-1246.

pueden llegar al 70%. La mayoría de radiofármacos marcados con [^{18}F]-flúor suelen sintetizarse por sustitución nucleófila en series alifáticas o homoaromáticas. En las series alifáticas normalmente se utilizan derivados halogenados o sulfonatos (mesilato, tosilato, nosilato o triflato). La radiosíntesis de [^{18}F]-FDG y [^{18}F]-FMISO son ejemplos bien conocidos (Figura 2.20).

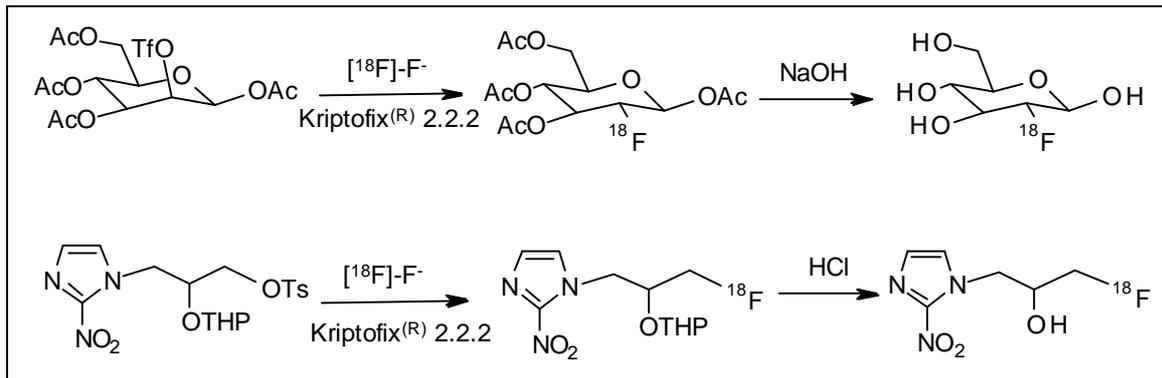


Figura 2.20. Radiosíntesis de [^{18}F]FDG y [^{18}F]FMISO por sustitución nucleófila.

2.6. Propiedades de [^{18}F]-FMISO

2.6.1. Biodistribución

[^{18}F]-FMISO se metaboliza por el hígado y se excreta por el riñón y la vejiga.⁹⁴ Los datos de biodistribución en estudios preclínicos con ratas han mostrado una mayor concentración de actividad en la orina, además de en el intestino, hígado y riñón, observando una menor concentración en la sangre, bazo, corazón, pulmón, músculos, huesos y cerebro.⁹⁵ Resultados similares se han mostrado en humanos (Figura 2.21).

⁹⁴ Flockhart, I. R.; Large, P.; Troup, D.; Malcolm, S. L.; Marten, T. R. *Xenobiotica* **1978**, 8, 97-105.

⁹⁵ Tochon-Danguy, H. J.; Sachinidis, J. I.; Chan, F.; Hall, C.; Cher, L.; Stylli, S.; Hill, J.; Kaye, A.; Scott, A. M. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, 29, 191-197.

Las curvas de actividad-tiempo han mostrado que los niveles de [¹⁸F]-FMISO en músculo normóxico y en plasma se igualan en los 30 primeros minutos después de la inyección, pero una hora después se observa una retención selectiva de [¹⁸F]-FMISO en tejido hipóxico que persiste hasta las 2,5 horas. Así, la cuantificación de la proporción plasma/tumor de [¹⁸F]-FMISO es óptima a las 2 horas de la inyección, cuando los tejidos normóxicos se han equilibrado con el plasma y el tejido hipóxico continúa reteniendo [¹⁸F]-FMISO selectivamente, lo que se traduce en una mejor medida del volumen de hipoxia. Un histograma completo de las proporciones tejido/plasma de [¹⁸F]-FMISO *in vivo* elaborado a partir de estudios sobre animales ha permitido definir que la proporción normal es menor de 1,3. Por tanto, puede considerarse un valor para la proporción tumor/plasma de [¹⁸F]-FMISO igual o superior de 1,4 a las 2 horas después de la inyección como valor indicativo de una hipoxia significativa.^{96,97} En un estudio reciente, la proporción tumor/plasma en pacientes con sarcoma en tejido blando fue modificada a un valor de 1,2.⁹⁸

⁹⁶ Koh, W. J.; Rasey, J. S.; Evans, M. L.; Grierson, J. R.; Lewellen, T. K.; Graham, M. M.; Krohn, K. A.; Griffin, T. W. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1992**, *22*, 199-212.

⁹⁷ Rasey, J. S.; Koh, W. J.; Evans, M. L.; Peterson, L. M.; Lewellen, T. K.; Graham, M. M.; Krohn, K. A. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1996**, *36*, 417-428.

⁹⁸ Rajendran, J. G.; Wilson, D. C.; Conrad, E. U.; Peterson, L. M.; Bruckner, J. D.; Rasey, J. S.; Chin, L. K.; Hofstrand, P. D.; Grierson, J. R.; Eary, J. F.; Krohn, K. A. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 95-704.



Figura 2.21. Biodistribución de $[^{18}\text{F}]$ -FMISO dos horas después de la inyección. Se nota menor actividad en el cerebro, hígado e intestino. Se excreta por el sistema renal y la vejiga (tomada de www.montoyanuclear.com).

2.6.2. Dosimetría

La dosis efectiva de $[^{18}\text{F}]$ -FMISO para un scan por PET es de 0,013 mSv/MBq en hombres y 0,014 mSv/MBq en mujeres, con una dosis estándar de 3,7 MBq/Kg (0,1 mCi/Kg). La dosis efectiva individual en órganos es igual en hombres que en mujeres. Asumiendo que la vejiga se vacía en un intervalo de 2-4 horas, el órgano crítico de recibir la dosis mas alta es la pared de la vejiga (0,021 mGy/MBq en intervalos de 2 horas y 0,029 mGy/MBq en 4 horas). Las dosis de $[^{18}\text{F}]$ -FMISO en el órgano son comparables con otros test comunes en medicina nuclear e indican que los límites de riesgo potencial de radiación asociada a estudios PET con $[^{18}\text{F}]$ -FMISO son aceptables.⁹⁹

⁹⁹ Grahan, M. M.; Peterson, L. M.; Link, J. M.; Jeanne, M.; Evans, M. L.; Rasey, J. S.; Koh, W.; Caldwell, J. H.; Krohn, K. A. *J. Nucl. Med.* **1997**, 38, 1631-1636.

2.6.3. Aplicaciones de [¹⁸F]-FMISO en oncología

La principal aplicación de [¹⁸F]-FMISO es en el área de la oncología. Cada día está mas aceptado que la presencia de tejido hipóxico produce resistencia a la quimio y radioterapia tanto *in vivo* como *in vitro* y acelera tumores en progresión. Estudios *in vivo* sobre animales han mostrado que la retención intracelular de [¹⁸F]-FMISO es dependiente de la concentración de oxígeno, confirmando así estudios *in vitro*, los cuales muestran que la proporción de [¹⁸F]-FMISO es 28 veces mayor en condiciones hipóxicas que en condiciones normóxicas.

Zimmy y *col.* demostraron que hay una relación entre la acumulación de [¹⁸F]-FMISO con la medida histográfica directa de pO₂ en células cancerígenas renales. En cáncer metastático de cuello y cabeza, la retención de [¹⁸F]-FMISO es significativamente mas grande en tumores hipóxicos que en tumores normóxicos, con una fuerte relación entre los valores de acumulación de [¹⁸F]-FMISO y una pO₂ < 5 mmHg.¹⁰⁰ En sarcoma de tejido blando no es viable la detección de hipoxia en el tumor ya que no se encontró ninguna relación entre las medidas de pO₂ con la acumulación de [¹⁸F]-FMISO observada.¹⁰¹ Así, [¹⁸F]-FMISO se ha estudiado para predecir la respuesta del tratamiento y la evaluación del pronóstico. En 2006 se llevaron a cabo estudios clínicos en fase I, con pacientes con cáncer en cabeza y cuello, donde se comprobó que [¹⁸F]-FMISO es capaz de predecir pronósticos.¹⁰²

¹⁰⁰ Zimmy, M.; Gagel, B.; Dimartino, E.; Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Westhofen, M.; Eble, M.; Buell, U.; Reinartz, P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33*, 1426-1431.

¹⁰¹ Bentzen, L.; Keiding, S.; Nordmark, M.; Falborg, L.; Hansen, S.B.; Keller, J.; Nielsen, O. S.; Overgaard, J. *Radiother. Oncol.* **2003**, *67*, 339-344.

¹⁰² Rischin, D.; Hicks, R.J.; Fisher, R.; Binns, D.; Corry, J.; Porceddu, S.; Peters, L. J. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 2098-2104.

2.6.4. Aplicaciones de [¹⁸F]-FMISO en indicaciones no oncológicas

[¹⁸F]-FMISO también tiene otras aplicaciones no oncológicas, como es la evaluación de hipoxia cerebral, infarto, miocardio isquémico o infecciones anaeróbicas. En un estudio en pacientes con infarto isquémico agudo [¹⁸F]-FMISO permitió observar la penumbra isquémica (tejido cerebral viable pero isquémico). Otro estudio muestra que el tejido hipóxico, observado por la acumulación de [¹⁸F]-FMISO, está presente después de las 42 horas de un infarto isquémico. La extensión espacial de la penumbra isquémica también se ha caracterizado usando PET con [¹⁸F]-FMISO a las 48 horas desde el comienzo del infarto. Se ha observado una relación positiva entre la acumulación de [¹⁸F]-FMISO en el tejido isquémico y el tiempo transcurrido desde el comienzo del infarto en las zonas externas del mismo pero no en la zona central (Figura 2.22).¹⁰³

[¹⁸F]-FMISO no ha mostrado tener una absorción significativa en el tejido adyacente al infartado en una hemorragia intracerebral.¹⁰⁴ Además de en enfermedades cerebrales, hace más de una década que se ha evaluado el uso de [¹⁸F]-FMISO en miocardio isquémico. Estudios con perros han demostrado la relación existente entre la retención de [¹⁸F]-FMISO en miocardio isquémico *in vivo* con la dependencia del oxígeno.¹⁰⁵

¹⁰³ Markus, R.; Donnan, G. A.; Kazui, S.; Read, S.; Hirano, T.; Scott, A. M.; O'Keefe, G. J.; Tochon-Danguy, H. J.; Sachinidis, J. I.; Reutens, D. C. *Neuroimage* **2002**, *16*, 425-433.

¹⁰⁴ Hirano, T.; Read, S. J.; Abbott, D. F.; Sachinidis, J. I.; Tochon-Danguy, H. J.; Egan, G. F.; Bladin, C. F.; Scott, A. M.; McKay, W. J.; Donnan, G. A. *Neurology* **1999**, *53*, 2179-2182.

¹⁰⁵ Shelton, M. E.; Dence, C. S.; Hwang, D. R.; Welch, M. J.; Bergmann, S. R. *J. Nucl. Med.* **1989**, *30*, 351-358.

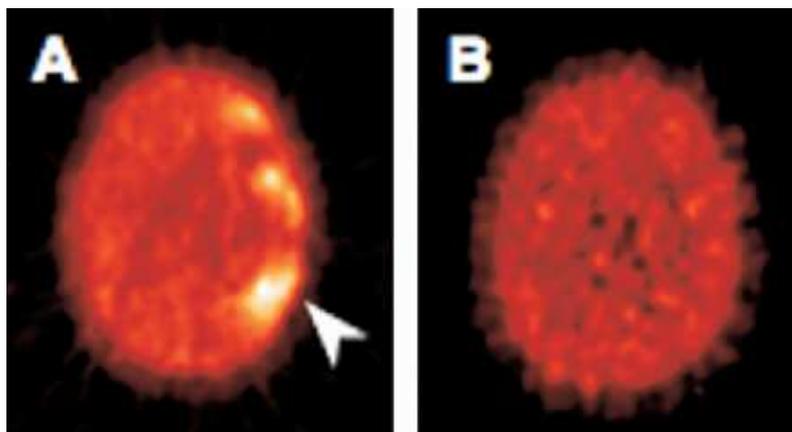


Figura 2.22. (A) [^{18}F]-FMISO marca la penumbra isquémica en el hemisferio izquierdo del cerebro (flecha) 22 horas después de los síntomas. (B) Área de infarto cerebral agudo. No hay hipoxia evidente con [^{18}F]-FMISO PET 10 días después del infarto. Tomada de ref. 11.

2.6. Métodos de síntesis de [^{18}F]-FMISO

[^{18}F]-FMISO se prepara por fluoración e hidrólisis del precursor tosilato de 3-(2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxan-2-iloxi)propilo (Figura 2.23).

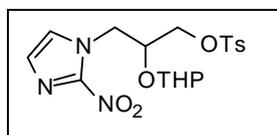


Figura 2.23. Precursor de FMISO.

El isótopo radiactivo ión [^{18}F]-fluoruro se produce en el ciclotrón por bombardeo de H_2^{18}O con protones, según la reacción nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ en disolución acuosa y es transferido desde el ciclotrón al módulo de síntesis TRACERLab Mx diseñado para la síntesis de [^{18}F]-FDG y adaptado para la síntesis de [^{18}F]-FMISO. El ión [^{18}F]-fluoruro se queda retenido en un cartucho de intercambio aniónico QMA, y se eluye con una mezcla de Kryptofix[®] 2.2.2/ K_2CO_3 en MeCN/ H_2O . El resto de agua enriquecida se

recupera en el vial a través del tubo conector (Figura 2.24). Tras la evaporación de los disolventes a sequedad, el precursor disuelto en acetonitrilo se envía al reactor donde se encuentra el complejo [^{18}F]-fluoruro/Kryptofix[®] 2.2.2. La sustitución nucleófila con $^{18}\text{F}^-$ se lleva a cabo a 100 °C durante 6 minutos para posteriormente ir reduciendo progresivamente la temperatura hasta los 70 °C durante 3 minutos. A continuación, el precursor marcado con [^{18}F]-flúor se transfiere a la jeringa (bomba 1) y se disuelve en agua, se purifica mediante extracción en fase sólida utilizando un cartucho de fase reversa (C18) colocado entre los conectores 2 y 3. Después de lavar el cartucho con agua, el compuesto marcado se eluye con etanol al reactor. El etanol se evapora a 85 °C durante 5 minutos. El precursor marcado con [^{18}F]-flúor se hidroliza con ácido clorhídrico 1N a 105 °C durante 5 minutos en un vial cerrado y se neutraliza con la solución neutralizante (hidróxido de sodio y tampón citrato). Finalmente la preparación se purifica empleando un cartucho de fase reversa (C18) y un cartucho de alúmina neutra. El rendimiento radioquímico de la síntesis es alrededor del 50 % (corregido por decaimiento) empleando 5-20 mg de precursor, la duración de la síntesis es alrededor de 55 minutos y el volumen de la preparación final de 15 mL.^{106,107,59,108,109}

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 899–905.

¹⁰⁷ Tang, G.; Wang, M.; Tang, X.; Gan, M.; Luo, L. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 553-558.

⁵⁹ Lim, J. L.; Berridge, M. S. *Appl. Radiat. Isot.* **1993**, *44*, 1085-1091.

¹⁰⁸ Adamsen, T. C. H.; Grierson, J. R.; Krohn, K. A. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2005**, *48*, 923-927.

¹⁰⁹ Patt, M.; Kuntzsch, M.; Machlla, H. J. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1999**, *240*, 925-927.



Figura 2.24. Casete desechable para la síntesis de $[^{18}\text{F}]$ -FMISO. Presenta 3 colectores con 5 válvulas cada uno de ellos. Los colectores 1 y 2 están conectados entre sí por un tubo de silicona y el colector 2 y 3 por un cartucho de fase reversa C18. La disposición de los elementos y reactivos en el casete, de izquierda a derecha son: 1. Tubo conectado al vial de recuperación de agua enriquecida; 2. Reservorio cónico unido a un cartucho de intercambio aniónico (QMA); 3. Vial (10 mL) con 7 mL de MeCN (precinto azul); 4. Jeringa (30 mL) con conexión Luer; 5. Vial (10 mL) con 10 mg precursor disueltos en 2 mL de MeCN (precinto rojo); 6. Tubo de entrada al reactor; 7. Bolsa de agua (250 mL); 8. Vial (10 mL) con 3 mL de ácido clorhídrico 1 N (precinto dorado); 9. Vial (10 mL) con 0,85 mL de NaOH 2N y 5 mL de tampón citrato (precinto verde); 10. Jeringa (3 mL) con conexión Luer con 2 mL de EtOH; 11. Cartucho de alúmina neutra conectado al tubo de salida de la mezcla de reacción; 12. Cartucho de fase reversa C18; 13. Tubo de conexión del cartucho de fase reversa C18 y el casete; 14. Jeringa (30 mL) con conexión Luer; 15. Tubo de salida. (tomada de Rotem industries Ltd.)

[¹⁸F]-FMISO se ha preparado por sustitución nucleófila a partir de diferentes precursores (Esquema 2.1). En 1986 Jerabek y *col.* describieron la radiosíntesis para [¹⁸F]-FMISO **1a** a partir de **2** por apertura nucleófila del epóxido usando [¹⁸F]-TBAF. Esta radiosíntesis estaba propuesta para que transcurriera en un solo paso sin una posterior eliminación de grupos protectores. Aunque el tiempo de síntesis fue razonable (1 hora), el rendimiento radioquímico global fue demasiado bajo (< 1%).¹¹⁰ En 2010, Gouverneur y *col.* justificaron este bajo rendimiento aislando como producto principal marcado el biciclo **3**, resultado de la ciclación intramolecular (vía sustitución nucleófila del grupo nitro) inducido por la apertura nucleófila del epóxido por el ión [¹⁸F]-fluoruro.²⁵ Poco mas tarde, Grierson y *col.* describen una nueva radiosíntesis donde **1a** fue preparado por reacción del tosilato de (*R*)-glicidilo (**4**) con [¹⁸F]-fluoruro seguido de la apertura de **5** con 2-nitroimidazol (**6**), con un rendimiento de 13±4% y un tiempo de síntesis de 128±17 minutos (n = 50).^{111,112,113} En la actualidad, el procedimiento ha sido reemplazado por otro método mas fiable y eficiente.¹¹⁴ De este modo, **1a** se sintetiza a partir del precursor **7a** por sustitución nucleófila del grupo tosilato con [¹⁸F]-fluoruro, seguido de la desprotección de **8** por tratamiento con ácido clorhídrico y dando [¹⁸F]-FMISO con un rendimiento del 40-65% en un tiempo de síntesis de 40-50 minutos.^{106,107,59,25} El derivado **9** también se ha estudiado como precursor pero a pesar

¹¹⁰ Jerabek, P.A.; Patrick, T. B.; Kilbourn, M. R.; Dischino, D. D.; Welch, M. J. *Appl. Radiat. Isot.* **1986**, *37*, 599-605.

²⁵ Bejot, R.; Kersemans, V.; Kelly, C.; Carroll, L.; King, R. C.; Gouverneur, V. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 565-575.

¹¹¹ Grierson, J. R.; Link, J. M.; Mathis, C. A.; Rasey, J. S.; Krohn, K. A. *J. Nucl. Med.* **1989**, *30*, 343-350.

¹¹² McCarthy, T. J.; Dence, C. S.; Welch, M. J. *Appl. Radiat. Isot.* **1993**, *44*, 1129-1132.

¹¹³ Tada, M.; Iwata, R.; Sugiyama, H.; Sato, K.; Kubota, K.; Kubota, R.; Takahashi, H.; Fukuda, H.; Ido, T. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1996**, *38*, 771-774.

¹¹⁴ Kämäräinen, E. L.; Kyllönen, T.; Nihtilä, O.; Björk, H.; Solin, O. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 37-45.

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 899-905.

¹⁰⁷ Tang, G.; Wang, M.; Tang, X.; Gan, M.; Luo, L. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 553-558.

⁵⁹ Lim, J. L.; Berridge, M. S. *Appl. Radiat. Isot.* **1993**, *44*, 1085-1091.

de que solo difiere de **7a** en el grupo protector, el proceso fue menos eficiente (12-18%) y necesitó un mayor tiempo de síntesis.^{115,116,117} También se han estudiado otras alternativas de síntesis. Hwang y *col.* prepararon el bistosilato **10** y la bromocetona **11**. En el primer caso la incorporación de flúor condujo a rendimientos del 10-35% con tiempos de síntesis de 30 minutos, pero desafortunadamente el grupo tosilato no sustituido no pudo ser hidrolizado para dar FMISO. En el caso de la bromocetona (**11**) la incorporación de flúor se hizo por intercambio de halógeno con [¹⁸F]-TBAF pero **11** descompuso en contacto con el reactivo sin observarse incorporación de flúor por lo que no pudo aplicarse la reducción posterior del grupo cetona y esta ruta se abandonó (Esquema 2.1).¹¹⁸

Peterson y *col.* llevaron a cabo el estudio farmacocinético de FMISO racémico comparándolo con el enantiomero puro (sintetizados a partir de **7a** y **4** respectivamente), concluyendo que los niveles de [¹⁸F]-FMISO en músculo/sangre y cerebro/sangre son similares después de la inyección en todos los casos. Los autores consideran que la naturaleza del estereoisómero no debería afectar las características de biodistribución ni la afinidad electrónica, o la retención en células hipóxicas, debido a la distancia que separa el grupo nitro del centro estereogénico, aunque esta hipótesis no se ha validado.¹¹⁹

²⁵ Bejot, R.; Kersemans, V.; Kelly, C.; Carroll, L.; King, R. C.; Gouverneur, V. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 565-575.

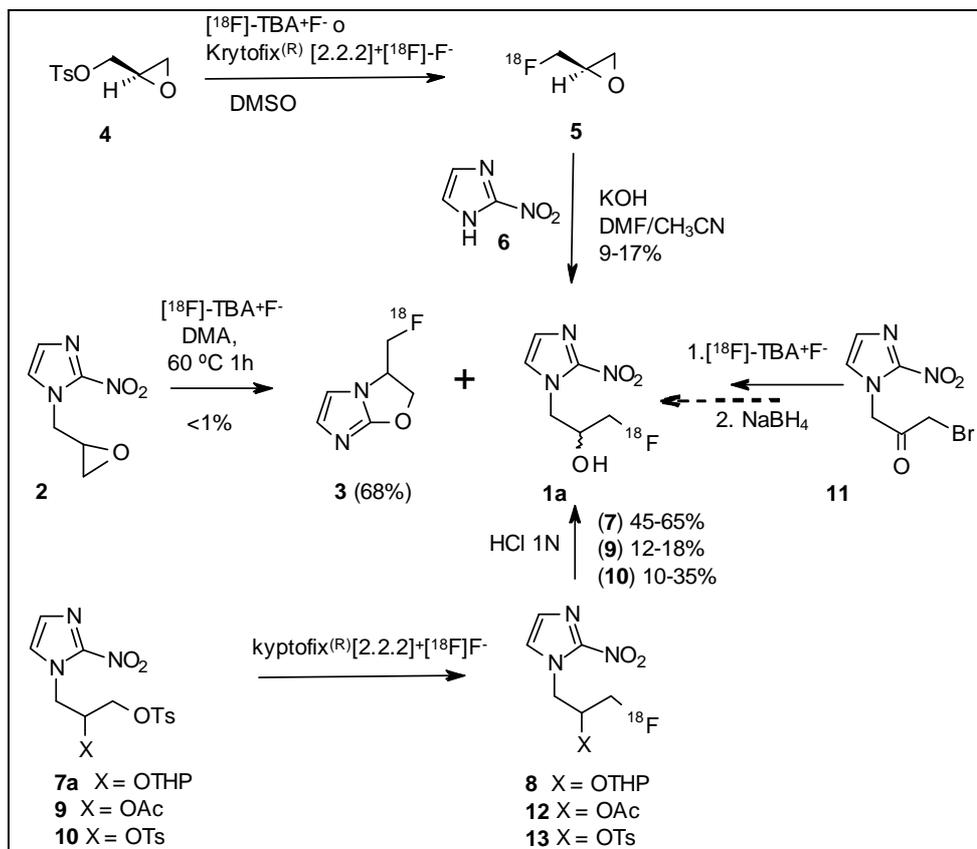
¹¹⁵ Wallace, S.; Yang, D. J.; Cherif, A. US Patent WO 95/09844, 1995.

¹¹⁶ Cherif, A.; Yang, J. D.; Tansey, W.; Kim, E. E.; Wallace, S. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 466-469.

¹¹⁷ Ishikawa, Y.; Iwata, R.; Furumoto, S.; Takai, Y. *Appl. Radiat. Iso.* **2005**, *62*, 705-710.

¹¹⁸ Hwang, D. R.; Dence, C. S.; Bonasera, R. A.; Welch, M. J. *Appl. Radiat. Isot.* **1989**, *40*, 117-126.

¹¹⁹ Peterson, L. M.; Muzi, M.; Adamsen, T. C. H.; Link, J. M.; Rajendran, J. G.; Spence, A. M.; Sharnhorst, J.; Ronhn, K. A. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2007**, *50*, S423.



Esquema 2.1. Síntesis de $[\text{18F}]\text{-FMISO}$ (se indican los rendimientos radioquímicos).

2.8. Métodos de síntesis del precursor de $[\text{18F}]\text{-FMISO}$

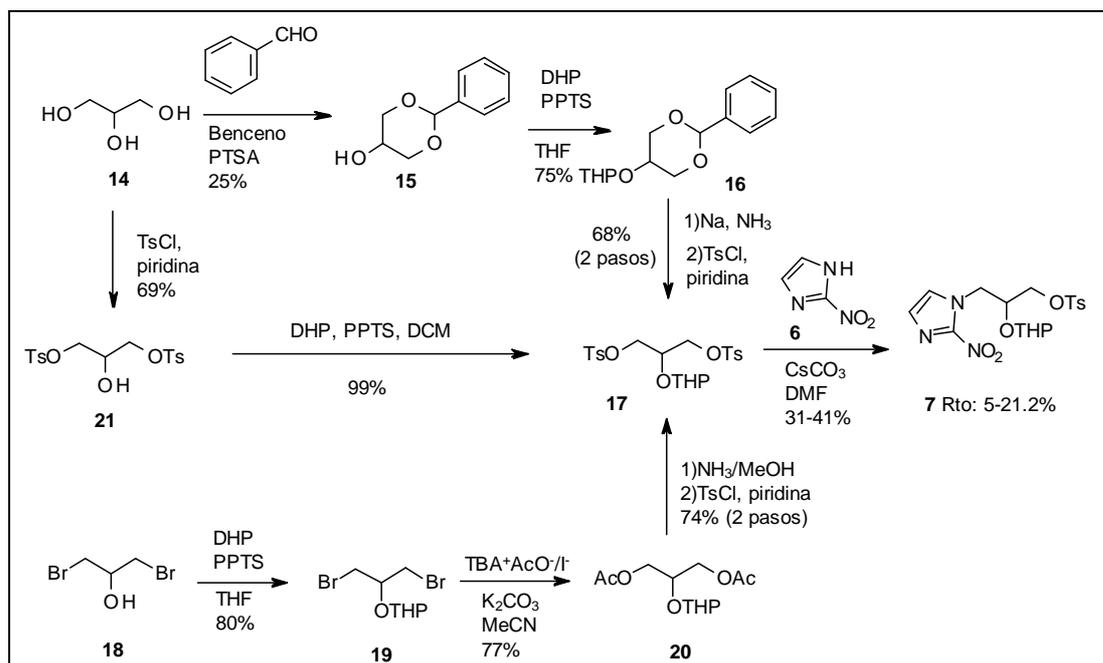
El precursor más utilizado en la síntesis de $[\text{18F}]\text{-FMISO}$ es **7**, en cuya síntesis el 2-nitroimidazol (**6**) se une en la última etapa (Esquema 2.2). En 1993 Lim y Berridge describen una síntesis que empieza con glicerol (**14**). La reacción con benzaldehído conduce a la formación del hidroxiacetal **15**, que por protección del grupo hidroxilo con 3,4-dihidro-2H-pirano origina **16** con buenos rendimientos. La desprotección del grupo acetal en condiciones suaves y la tosilación del diol resultante conduce a **17**. Por último, la sustitución nucleófila del grupo tosilo con 2-nitroimidazol (**6**) proporciona **7** con un

rendimiento global del 5% en las cinco etapas.⁵⁹ Sin embargo, el producto comercial **7** es muy caro y esta síntesis es engorrosa y en algunos pasos peligrosa, por lo que debido a su demanda, Adamsen y *col.* describen en 2005 una síntesis diferente con el mismo número de pasos. La protección de 1,3-dibromopropan-2-ol (**18**) con 3,4-dihidro-2*H*-pirano conduce a **19**, que por sustitución nucleófila de bromo con TBA⁺AcO⁻ origina **20** con buenos rendimientos. La hidrólisis de los grupos éster seguida de la protección del diol resultante con cloruro de tosilo conduce a **17**, que por sustitución nucleófila con **6** proporciona **7** con un rendimiento global del 18,2%.¹⁰⁸ Al igual que la síntesis anterior, esta es larga y tediosa por lo que poco después Oh y *col.* publicaron una tercera síntesis de solo 3 etapas (21,2%) a partir de **14**. La protección de los grupos hidroxilos primarios condujo a **21**, que por reacción con 3,4-dihidro-2*H*-pirano generó **17**. Por último, se llevó a cabo la sustitución nucleófila con **6** (paso común a todas las síntesis) para dar **7**.¹⁰⁶ En todas las síntesis la etapa limitante es el desplazamiento nucleófilo de un grupo tosilato en **17** por **6**, con un rendimiento en dicha etapa del 31-41%. En todos los métodos de síntesis, el precursor de FMISO se obtiene como una mezcla de diastereoisómeros.

⁵⁹ Lim, J. L.; Berridge, M. S. *Appl. Radiat. Isot.* **1993**, *44*, 1085-1091.

¹⁰⁸ Adamsen, T. C. H.; Grierson, J. R.; Krohn, K. A. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2005**, *48*, 923-927.

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 899-905.



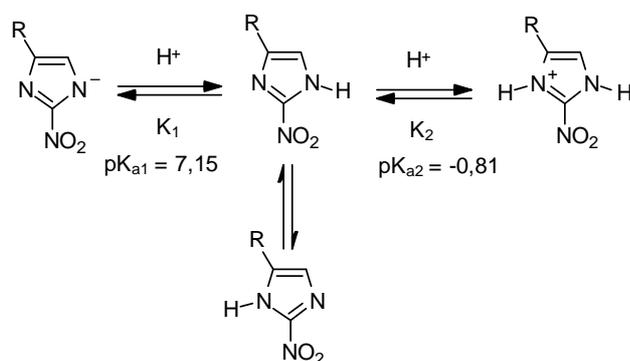
Esquema 2.2. Síntesis descritas para el precursor de FMISO.

2.9. Reactividad y síntesis de 2-nitroimidazol

2.9.1. Introducción

El grupo nitro en nitroimidazoles, como los 2-nitroimidazoles, tiene efecto mesómero e inductivo, esto provoca una retirada de electrones en el núcleo heterocíclico y como consecuencia, la densidad electrónica en el heterociclo se ve reducida. El efecto es una desactivación del imidazol en sustituciones electrófilas. 2-nitroimidazol es una base mucho más débil que el imidazol y posee propiedades ácidas más fuertes. 2-nitroimidazol y sus derivados alquilados son estables en disoluciones alcalinas.

La rápida transferencia intramolecular del protón no permite el aislamiento de los tautómeros C-4 y C-5 de 2-nitroimidazol. Sin embargo, si el nitrógeno N1 está sustituido entonces no existe tautomería.



Esquema 2.3. Protonación/desprotonación y tautomería de 2-nitroimidazoles C-monosustituidos

2.9.2. Reactividad

2.9.2.1. Alquilación

La alquilación de 2-nitroimidazol en medio alcalino tiene lugar en el nitrógeno después de la desprotonación. Se han descrito muchos procedimientos hasta la fecha. En 1964 Beaman y *col.* describieron un método de alquilación en presencia de una base fuerte donde se usaron halogenuros de alquilo en DMF como disolvente (Esquema 2.4a), sin embargo, en algunos casos se obtuvieron rendimientos bajos.^{120,121,122,123,124} Se

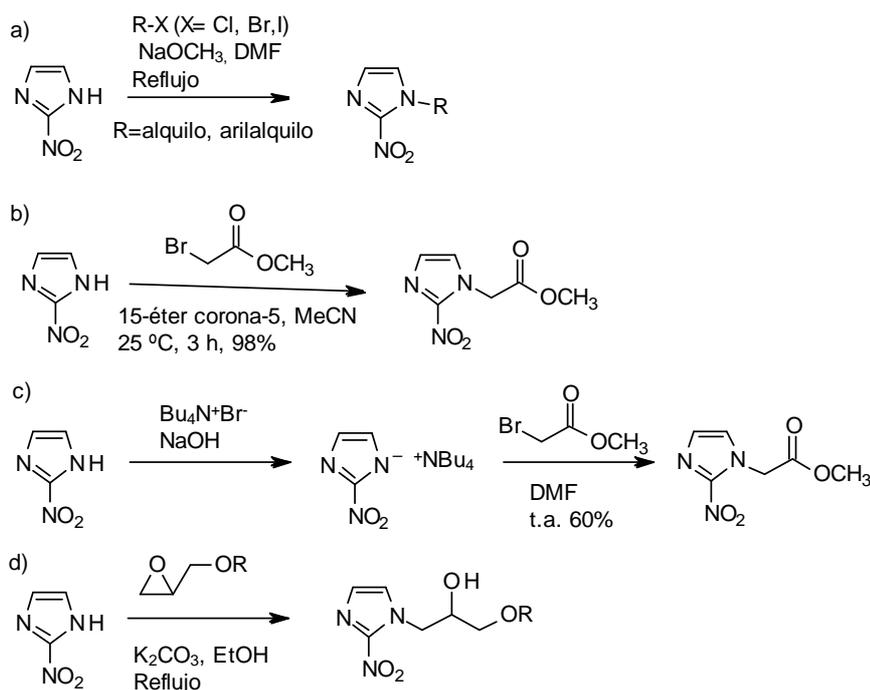
¹²⁰ Beaman, A. G.; Tautz, W.; Gabriel, T.; Keller, O.; Toome, V.; Duschinsky, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1964**, 469-477.

¹²¹ Adebayo, A. T. O. M.; Bowman, W. R.; Salt, W. G. *Tetrahedron lett.* **1986**, 27, 1943-1946.

¹²² Hodgkiss, R. J.; Jone, G. W.; Long, A.; Middleton, R. W.; Parrik, J.; Stratford, M. R. L.; Wardman, P.; Wilson, G. D. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2268-2274.

¹²³ Perlman, M. E.; Dunn, J. A.; Piscitelli, T. A.; Earle, J.; Rose, W. C.; Wampler, G. L.; MacDiarmid, J. E.; Bardos, T. J. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1400-1407.

obtuvieron rendimientos mejores por alquilación en presencia de éteres corona en fase homogénea (Esquema 2.4b).¹²⁵ Otro método similar fue la preparación de la sal de tetrabutilamonio de 2-nitroimidazol y su reacción con el halogenuro de alquilo correspondiente utilizando un disolvente orgánico (Esquema 2.4c).¹²⁶ Un procedimiento habitual de alquilación es utilizar un epóxido como electrófilo (Esquema 2.4d).^{123,127}



Esquema 2.4. Métodos de alquilación de 2-nitroimidazol.

¹²⁴ Beaman, A. G.; Tautz, W.; Duschinsky, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1968**, 520-530.

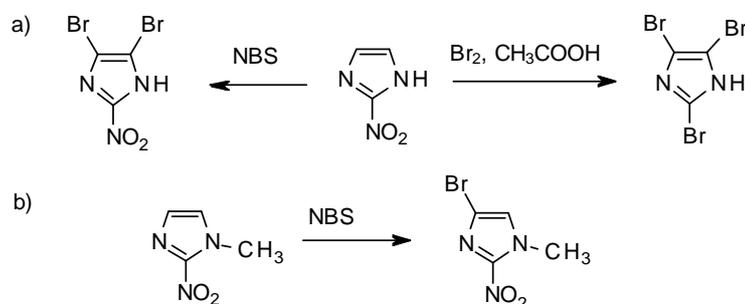
¹²⁵ Long, A.; Parrick, J.; Hodgkiss, R. J. *Synthesis* **1991**, 709-713.

¹²⁶ Searcey, M.; Pye, P. L.; Lee, J. B.; *Synth. Commun.* **1989**, 19, 1309-1315.

¹²⁷ Hori, H.; Jin, C. Z.; Kiyono, M.; Kasai, S.; Shimamura, M.; Inayama, S. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 591-599.

2.9.2.2. Bromación

En 1963, Lancini y *col.* describieron la bromación con Br₂ y ácido acético donde el grupo nitro fue sustituido por un bromo para dar 2,4,5-tribromoimidazol (Esquema 2.5a).¹²⁸ Años después, Palmer y Denny llevaron a cabo un estudio de bromación directa de 2-nitroimidazol, en particular para sintetizar el 4(5)-bromo-2-nitroimidazol.¹²⁹ Cuando utilizaron un equivalente de *N*-bromosucinimida se obtuvo el inesperado 4,5-dibromo-2-nitroimidazol y se recuperó producto de partida. Cuando se bajó la temperatura para una mayor selectividad los resultados se repitieron. Cuando se utilizaron 2 equivalentes de NBS en DMF, se obtuvo el producto dibromado con rendimientos casi cuantitativos. En este mismo trabajo, se estudió la bromación de 1-metil-2-nitroimidazol utilizando las mismas condiciones y se obtuvo el producto monobromado con buenos rendimientos (Esquema 2.5b). Años más tarde, McClelland y *col.* estudiaron diferentes condiciones para la preparación del 4-bromo-1-metil-2-nitroimidazol.¹³⁰



Esquema 2.5. Bromación del 2-nitroimidazol y derivados.

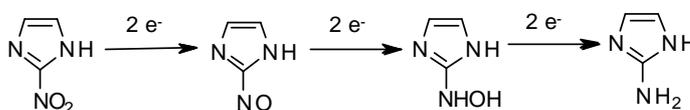
¹²⁸ Lancini, G. C.; Maggi, N.; Sensi, P. *Farmaco. Ed. Sci.* **1963**, *18*, 390.

¹²⁹ Palmer, B. D.; Denny, W. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 95-99.

¹³⁰ Farah, S. F.; McClelland, R. A. *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 427-432.

2.9.2.3. Reducción de 2-nitroimidazol

La reducción de 2-nitroimidazol da lugar a 2-aminoimidazol por captación de 6 electrones, la captación de solo 4 electrones da lugar al hidroxilaminoimidazol (Esquema 2.6). Otro método de reducción bastante habitual para 2-nitroimidazol es la adición de un metal, como por ejemplo zinc.^{131,52,55} McClelland y *col.* observaron estos procesos bajo condiciones fisiológicas en algunos derivados de 2-nitroimidazol.



Esquema 2.6. Reducción de 2-nitroimidazol.

2.9.2.4. Reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio

2.9.2.4.1. La química del paladio

Las reacciones de acoplamiento carbono-carbono (C-C) catalizadas por paladio se han convertido en uno de los procesos de mayor interés en química orgánica. Los compuestos organometálicos son ideales para llevarlas a cabo debido a que la polaridad del enlace carbono-metal confiere un carácter nucleófilo al carbono unido a él, haciendo que éste pueda reaccionar con electrófilos orgánicos conduciendo a la formación de un enlace sencillo C-C. Estas reacciones siguen un ciclo catalítico común. Consta de tres etapas: a) Adición oxidante del electrófilo sobre el complejo de Pd(0) formando una especie de Pd(II) que es a menudo la etapa determinante en el ciclo catalítico. La

¹³¹ Varghese, A. J.; Whitmore, G. F. *Chem. Biol. Interactions* **1985**, *56*, 269-287.

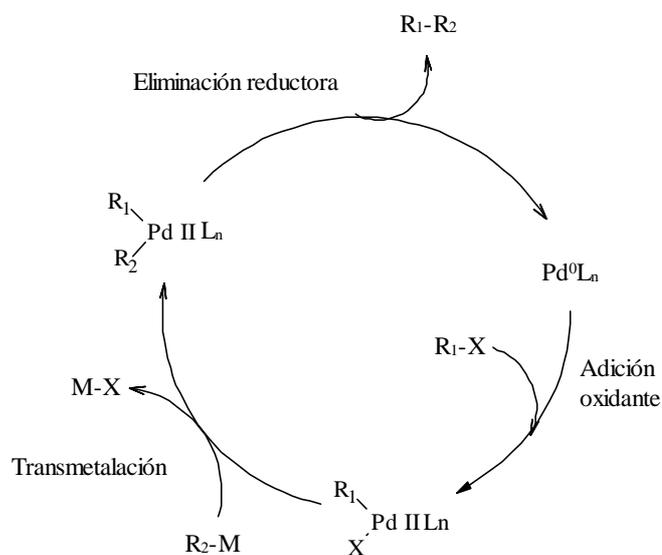
⁵² McClelland, R. A.; Panicucci, R.; Rauth, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4308-4314.

⁵⁵ Bolton, J. L.; McClelland, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8172-8181.

reactividad relativa del enlace C-X del electrófilo decrece en el orden I > OTf > Br >> Cl. Se puede usar una amplia gama de complejos de Pd, sin embargo, el más comúnmente utilizado es el Pd(PPh₃)₂, pero PdCl₂(PPh₃)₂, Pd(OAc)₂ y otras fosfinas pueden ser también eficientes para activar el Pd(0); b) En segundo lugar, se produce la transmetalación con el reactivo organometálico presente en el medio generando un nuevo complejo de Pd(II) que presenta los dos componentes carbonados a acoplar enlazados al metal. Cuando hay más de un grupo unido al metal, el orden de transmetalación para los diferentes sustituyentes es: alquínico > vinilo > arilo > alilo ~ bencilo >> alquilo, c) Finalmente se produce la eliminación reductora que conduce al producto final de acoplamiento cruzado y regenera la especie de Pd(0) que reinicia el ciclo catalítico (Esquema 2.7).¹³² Sin embargo, los detalles de cada etapa, sobre todo de la transmetalación, no se conocen en toda su extensión y además dependen del nucleófilo utilizado en cada reacción de acoplamiento.¹³³

¹³² Li, J. J.; Gribble, G. W. Tetrahedron Organic Chemistry Series; *Palladium in Heterocyclic Chemistry*; Baldwin, J. E.; Willians, R. M.; Eds.; Elsevier Science: Oxford, 2000, Vol. 20.

¹³³ Diederich, F.; Stang, P. J. *Metal-Catalyzed Cross-coupling Reactions*; Wiley-Vch: Weinheim, 1998.



Esquema 2.7. Mecanismo de reacción de acoplamiento C-C catalizadas por Pd.

Entre las diversas reacciones de acoplamiento de carbonos sp² catalizadas por Pd para la formación de enlaces C-C, la diferencia radica en el metal que va unido al fragmento nucleófilo (Esquema 2.8).



R y R' tienen hibridación sp²

X= I, OSO₂CF₃, Br, Cl

M= Sn, B, Zr, Zn

Catalizador= Pd (a veces Ni)

Esquema 2.8. Esquema general de una reacción de acoplamiento C-C.

Dependiendo del metal las reacciones se denominan: Stille (Sn),¹³⁴ Suzuki-Miyaura (B),¹³⁵ Sonogashira (Cu-alquinos),¹³⁶ Kumada-Corriu (Mg)¹³⁷ y Negishi (Zn).¹³⁸

2.9.2.4.2. Reacciones de Suzuki-Miyaura

Desde su descubrimiento en 1979, la reacción de Suzuki-Miyaura ha sido una de las herramientas más poderosas para la construcción de enlaces C-C. Esta reacción implica el acoplamiento de un electrófilo orgánico, como pueden ser triflatos o haluros de arilo o alqueno, con un ácido borónico, un borato de dialquilo o un trifluorborato en presencia de una base.

El ciclo general para esta reacción se muestra en el esquema 2.7, donde tiene lugar la adición oxidante de un haluro de arilo a un complejo de Pd(0) para formar un intermedio de haluro de arilpaladio. La transmetalación con un ácido borónico y la posterior eliminación reductora conduce al correspondiente producto de acoplamiento y se regenera el complejo de Pd(0). Las bases comúnmente empleadas en esta reacción son Na₃PO₄, Na₂CO₃, K₃PO₄, K₂CO₃, hidróxidos y alcóxidos. Estas bases se pueden usar en disolución acuosa o como suspensión en dioxano o DMF. El papel de la base es facilitar la transmetalación formando especies más reactivas como son los boronatos.^{139,140}

¹³⁴ Espinet, P.; Echavarren, A. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4704-4734.

¹³⁵ Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2487-2483.

¹³⁶ Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467-4470.

¹³⁷ Tamao, K.; Sumitani, K.; Kumada, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4374-4376.

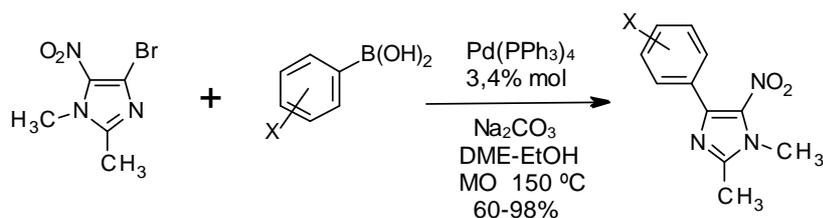
¹³⁸ Negishi, E.; Anastasia, L.; *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1979-2017.

¹³⁹ Miyaura, N. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 54-57.

¹⁴⁰ Slagt, V. F.; De Vries, A. H. M.; De Vries, J. G.; Kellogg, R. M. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 30-47.

Las reacciones de Suzuki-Miyaura han demostrado ser extremadamente versátiles y han encontrado un uso extensivo en síntesis de productos naturales y síntesis heterocíclica. Además, la fácil preparación de organoboranos y su relativa estabilidad al aire y al agua, combinado con las suaves condiciones de reacción y subproductos menos tóxicos, han hecho de esta reacción un proceso muy utilizado en química orgánica.¹⁴¹

Poco se ha descrito sobre reacciones de acoplamiento C-C en nitroimidazoles. En mayo de 2009, Vanelle y *col.* fueron los primeros en publicar una serie de reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio y aceleradas por microondas a partir de 4-bromo-1,2-dimetil-5-nitro-1*H*-imidazol y una gran variedad de ácidos aril, heteroaril y estiril borónicos con buenos rendimientos (Esquema 2.9).¹⁴²



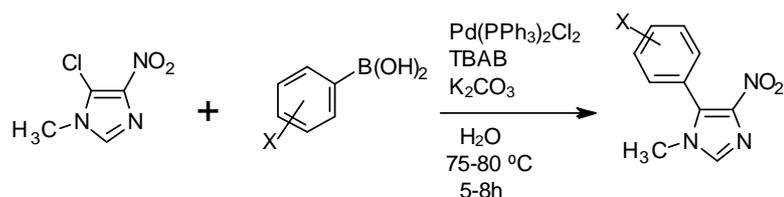
Esquema 2.9. Acoplamiento C-C del derivado 5-nitroimidazol.

Poco mas tarde, El-Abadelah y *col.* llevaron a cabo una síntesis de 5-aril-1-metil-4-nitroimidazoles en agua por reacción de 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol con ácidos arilborónicos mediante reacción de Suzuki-Miyaura usando dicloro bis-(trifenilfosfina) paladio (II) (3% en mol) como catalizador, K₂CO₃ y TBAB como aditivo. Las reacciones de acoplamiento catalizadas por Pd mejoran en presencia de TBAB. Se ha observado que la velocidad de acoplamiento aumenta con la estabilidad de

¹⁴¹ Nicolau, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D. *Angew. Chem. Int.* **2005**, *44*, 4442-4489.

¹⁴² Crozet, M. D.; Zink, L.; Remusat, V.; Curti, C.; Vanelle, P. *Synthesis* **2009**, *18*, 315-3156.

nanopartículas coloidales de paladio que actúan como catalizadores en el acoplamiento de Suzuki.¹⁴³ Además, la presencia de grupos fuertemente electroattractores como un grupo nitro en el anillo del imidazol facilita este proceso de acoplamiento, obteniéndose buenos rendimientos (57-75%) (Esquema 2.10).¹⁴⁴



Esquema 2.10. Acoplamiento C-C de 4-nitroimidazol.

En la literatura existen muchos mas ejemplos de la reacción de Suzuki-Miyaura sobre imidazoles que no llevan un sustituyente nitro, probablemente debido a que se encuentran en muchos compuestos con actividad biológica y productos naturales.¹⁴⁵ Los avances recientes en catálisis organometálica, química de la coordinación y química verde han extendido el uso de imidazoles a su aplicación como líquidos iónicos¹⁴⁶ y carbenos *N*-heterocíclicos estables.¹⁴⁷ Esto hace que la investigación y la industria tengan gran interés en la preparación y funcionalización de derivados de imidazoles.¹⁴⁸

Se han descrito acoplamientos de Suzuki en todas las posiciones del heterociclo, pudiendo funcionalizarse en las posiciones 2, 4 y 5 del anillo.

¹⁴³ Reetz, M. T.; Westermann, E. *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.* **2000**, *39*, 165-168.

¹⁴⁴ Saadeh, H. A.; Mosleh, I. M.; El-Abadelah, M. M. *Molecules* **2009**, *14*, 2758-2767.

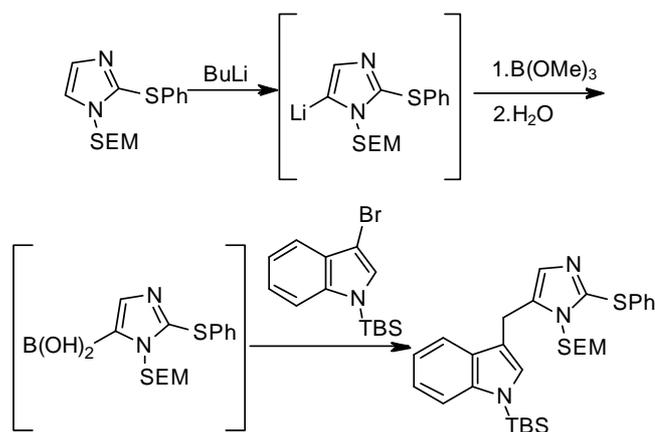
¹⁴⁵ Schnüch, M.; Flasiak, R.; Khan, A. F.; Spina, M.; Mihovilovic, M. D.; Stanetty, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3283-3307.

¹⁴⁶ Wasserscheid, P.; Keim, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3772-3789.

¹⁴⁷ Herrmann, W. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1290-1309.

¹⁴⁸ De Luca, L. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1-23.

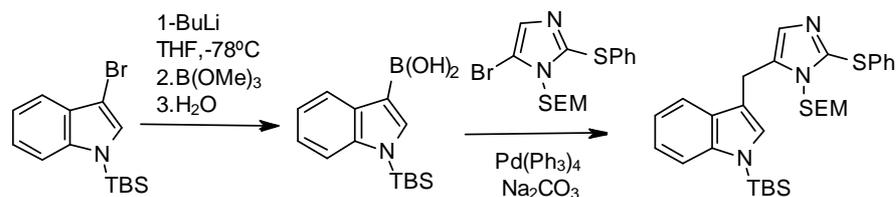
A pesar de la gran variedad de productos naturales que contienen un fragmento de imidazol se conocen muy pocos ejemplos en el que este fragmento actúe como nucleófilo en reacciones de Suzuki. Al igual que en la mayoría de los sistemas heterocíclicos, la formación de ácidos borónicos en la serie de azoles es una tarea difícil y no se logra a menudo. Parece que estos compuestos tienen una estabilidad limitada debido a la rápida desboronación, especialmente en las condiciones básicas requeridas en las reacciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura. En 1998, Ohta y *col.* sintetizaron *in situ* un ácido 5-imidazolborónico por litiación selectiva en la posición C(5) a partir de un imidazol 1,2-diprotectado. Sin embargo, la reacción de acoplamiento con un 3-bromoindol dio el producto esperado en solo un 7% (Esquema 2.11).¹⁴⁹



Esquema 2.11. Acoplamiento C-C a partir del ácido imidazolborónico.

Cuando se investigó la ruta de síntesis inversa, la condensación de 5-bromoimidazol con el ácido 3-indolborónico la reacción de acoplamiento dio el producto de acoplamiento con buen rendimiento (79%) (Esquema 2.12).

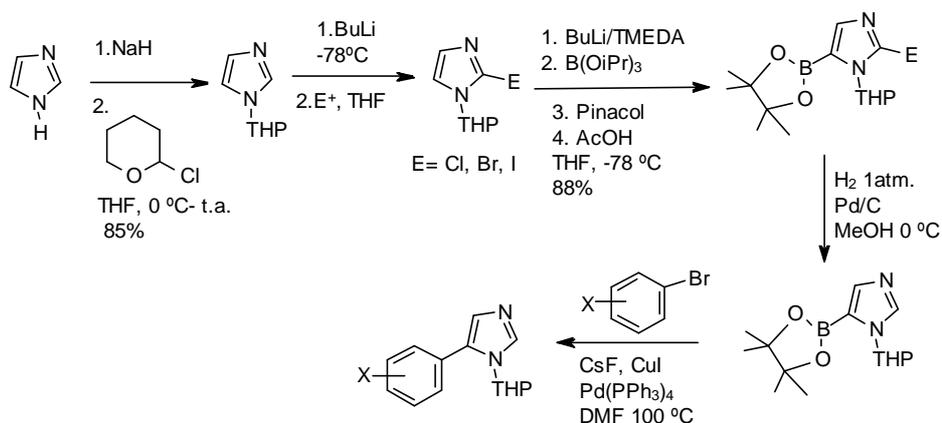
¹⁴⁹ Kawasaki, I.; Yamashita, M.; Ohta, S. *Heterocycles* **1998**, *48*, 1887-1901.



Esquema 2.12. Acoplamiento C-C a partir del ácido indolborónico.

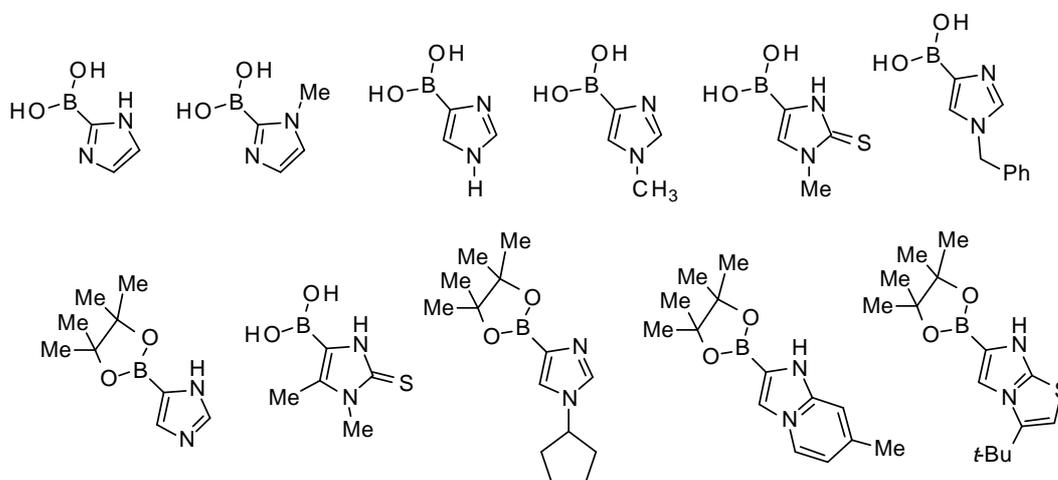
En la última década se ha prestado mucha atención al desarrollo de métodos eficientes para la preparación de 4(5)-arilimidazoles por sus importantes propiedades biológicas y farmacológicas. Rault y *col.* describieron un método nuevo y eficiente para la preparación de derivados de éster de pinacol del ácido 4(5)-imidazolborónico seguido de una reacción de Suzuki-Miyaura con un amplio número de haluros de heteroarilo con buenos rendimientos, permitiendo fácilmente la introducción de fragmentos imidazol en estructuras variadas que incluyen los grupos sensibles CN, COOEt, CHO (Esquema 2.13).¹⁵⁰

¹⁵⁰ Primas, N.; Mahatsekake, C.; Bouillon, A.; Lancelot, J.C. ; Santos. J. S. O.; Lohier, J. F.; Rault, S. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 4596-4601.



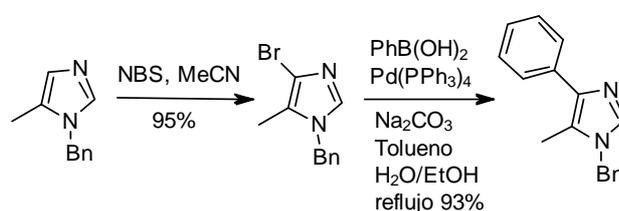
Esquema 2.13. Síntesis de 4(5)-arilimidazoles.

Se han descritos otros ácidos imidazolborónicos donde el ácido borónico se encuentra en las posiciones 2, 4 y 5 del anillo. Algunos ejemplos se indican en el Esquema 2.14. Únicamente el ácido imidazol-2-borónico es asequible comercialmente (Sigma-Aldrich).



Esquema 2.14. Ejemplos de ácidos imidazolborónicos y derivados.

Cuando se utilizan haloimidazoles, éstos pueden actuar como electrófilos en las reacciones de Suzuki. La bromación regioselectiva en la posición C4 se ha conseguido por reacción entre un 1,5-dialquilimidazol con NBS en MeCN. El acoplamiento C-C por reacción de Suzuki de 1-bencil-4-bromo-5-metilimidazol con ácido fenilborónico dio el compuesto deseado con un rendimiento del 93% (Esquema 2.15). Sin embargo, cuando se llevó a cabo la correspondiente reacción de Stille con feniltrimetilestaño se obtuvo un rendimiento moderado del 51%.¹³²



Esquema 2.15. Bromación regioselectiva seguida de reacción de acoplamiento de Suzuki.

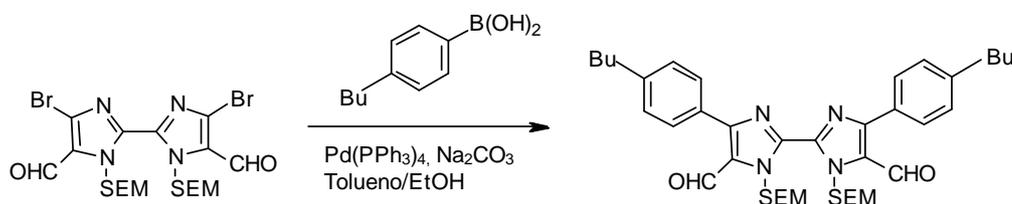
Se han descrito relativamente pocos métodos para la formación de arilimidazoles. Heerding y *col.* han descrito la reacción de acoplamiento del ácido 3-tienilborónico con el 4(5)-iodoimidazol obteniendo el diarilo esperado con buenos rendimientos.¹⁵¹ Mas recientemente, Bellina y *col.* han estudiado la reacción de Suzuki de 4(5)-bromoimidazol con varios ácidos arilborónicos. Obtuvieron buenos rendimientos cuando utilizaban ácidos cloro-, metoxi- y metilendioxfenilborónicos, pero observaron que este método no era eficiente en presencia de grupos sensibles como el formilo.¹⁵² Sin embargo, Teixido y *col.* llevaron a cabo con buenos rendimientos una

¹³² Li, J. J.; Gribble, G. W. *Tetrahedron Organic Chemistry Series; Palladium in Heterocyclic Chemistry*; Baldwin, J. E.; Willians, R. M.; Ed.; Elsevier Science: Oxford, 2000, Vol. 20.

¹⁵¹ Heerding, D. A.; Chan, G.; DeWolf, W. E.; Fosberry, A. P.; Janson, C. A.; Jaworski, D. D.; McManus, E.; Miller, W. H.; Moore, T. D.; Payne, D. J.; Quiu, X.; Rittenhouse, S. F.; Slater-Radosti, C.; Smith, W.; Takata, D. T.; Vaidya, K. S.; Yuan, C. C. K.; Huffman, W. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2061-2065.

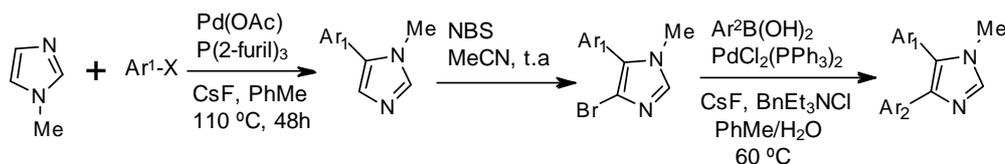
¹⁵² Bellina, F.; Causeruccio, S.; Rossi, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8543.

doble reacción de acoplamiento en la posición *C5* y *C5'* de un biimidazol sustituido (Esquema 2.16).¹⁵³



Esquema 2.16. Doble reacción de acoplamiento en presencia de un grupo fenilo.

Belina y *col.* estudiaron la arilación directa en *C-5* catalizada por Pd de 1-metil-1*H*-imidazol con yoduros y bromuros de arilo para preparar 5-aryl-1-metil-imidazoles, seguido de la bromación regioselectiva en *C-4* por tratamiento con NBS en un segundo paso. Por último, una posterior reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura catalizada con Pd permitió obtener 4,5-diaril-1-metil-1*H*-imidazoles. La aportación más importante de este procedimiento es que permite preparar derivados de imidazoles con buenos rendimientos, alta regioselectividad y sustituidos por arilos π -excedentes y π -deficientes en las posiciones 4 y 5 del anillo del imidazol (Esquema 2.17).¹⁵⁴

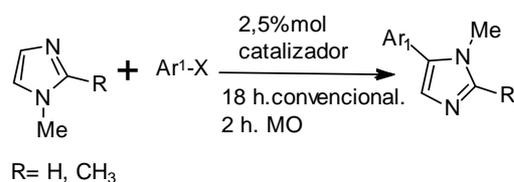


Esquema 2.17. Arilación directa de 1-metilimidazol y preparación de imidazoles 4,5-diaril-sustituídos.

¹⁵³ Nonell, S.; Borrell, J. I.; Borros, S.; Colominas, C.; Rey, O.; Rubio, N.; Sanchez-Garcia, D.; Teixido, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1635-1640.

¹⁵⁴ Bellina, F.; Cauteruccio, S.; Fiore, A. D.; Rossi, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5436-5445.

Recientemente, Kumar y *col.* describen una nueva síntesis eficiente por arilación directa catalizada con complejos de Pd para la obtención de 5-aryl-1-metil-1*H*-imidazoles utilizando microondas (Esquema 2.18).¹⁵⁵

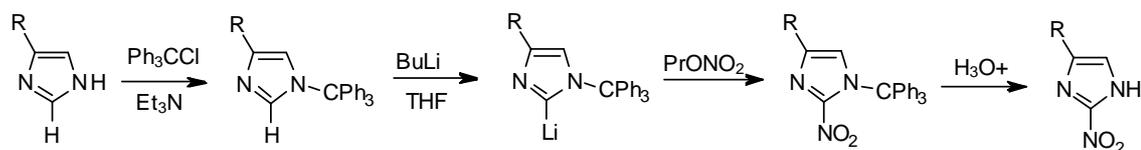


Esquema 2.18. Arilación directa por calentamiento con microondas.

2.9.3. Síntesis de 2-nitroimidazoles

2.9.3.1. A partir de 1-tritilimidazoles

Dwight y *col.* describieron la síntesis de 2-nitroimidazoles a partir 1-tritilimidazoles preparados por protección de los correspondientes imidazoles. El tratamiento de 1-tritilimidazoles con butillitio en THF a 0 °C da lugar a los correspondientes 2-litio-derivados. La reacción de estos con nitrato de propilo origina los 2-nitro-1-tritilimidazoles, los cuales, por hidrólisis ácida dan lugar a los correspondientes 2-nitroimidazoles con rendimientos del 27-35% (Esquema 2.19).¹⁵⁶



R=H, CH₃, CH₂OH

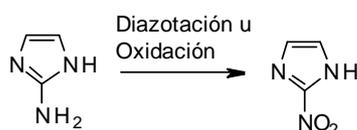
Esquema 2.19. Síntesis de 2-nitroimidazoles a partir de 1-tritilimidazoles.

¹⁵⁵ Kumar, P. V.; Lin, W. S.; Shen, J. S.; Nandi, D.; Lee, H. M. *Organometallics*, **2011**, *30*, 5160-5169.

¹⁵⁶ Dwight, P. D.; Kenneth, L. K.; Cohen, V. L. *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, *19*, 253-256.

2.9.3.2. Por diazotación-nitración u oxidación de 2-aminoimidazoles

2.9.3.2.1. Síntesis de 2-aminoimidazoles



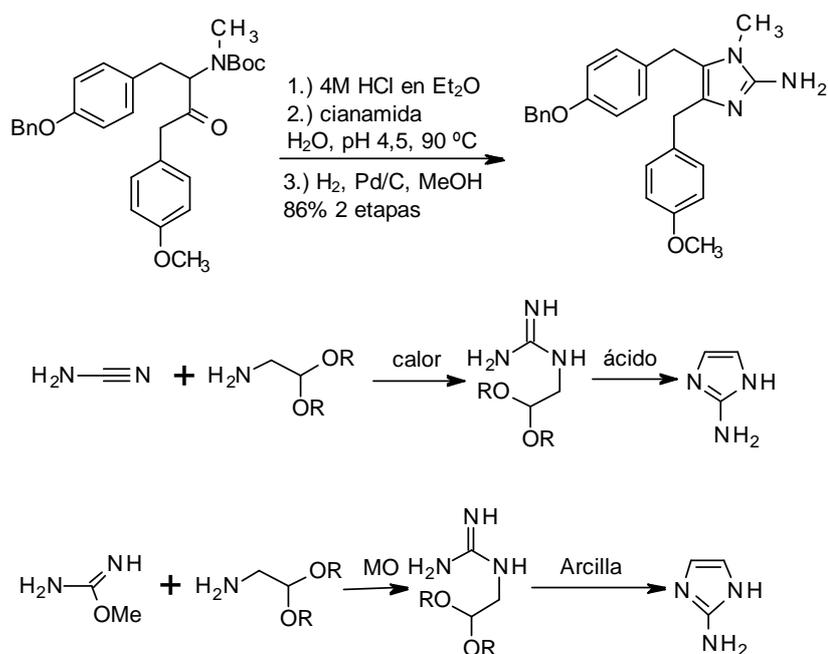
Esquema 2.20. Síntesis de 2-nitroimidazol.

Los 2-aminoimidazoles constituyen una clase importante de heterociclos ya que forman parte de productos con actividad farmacológica y de varios metabolitos, algunos de los cuales son por ejemplo, antagonistas potentes receptores de serotonina y receptores de histamina. 2-aminoimidazol es el producto de partida para la síntesis de azomicina y sus homólogos, los cuales tienen actividad antibacteriana y actividad antiprotozoal. El primer método se describió en 1912 por Pyman y *col.* quienes llevaron a cabo la reducción de 2-arilazoimidazoles para la formación de 2-aminoimidazoles. Desafortunadamente, este procedimiento no fue viable para hacer su escalado.¹⁵⁷ Se han publicado numerosas rutas sintéticas para la síntesis de 2-aminoimidazoles y derivados. Sin embargo, pocas describen la síntesis directa de 2-aminoimidazoles sustituidos. Probablemente el método más rápido y más popular es la condensación de compuestos tipo α -aminoaldehídos o cetonas con cianamidas o isotioureas (Esquema 2.21).¹⁵⁸ Este método se mejoró en 2011, cuando Phukan y *col.* aplicaron calentamiento mediante microondas y la utilización de arcilla de alfarero (Assam, India) como ácido, obteniendo

¹⁵⁷ Fargher, R. G.; Pyman, F. L. *J. Chem. Soc.* **1919**, 115, 217-260.

¹⁵⁸ (a) Lawson, A. *J. Chem. Soc.* **1956**, 307-310. (b) Aberle, N. S.; Lessene, G.; Watson, K. G. *Org. Lett.* **2006**, 8, 419-421. (c) Weinmann, H.; Harre, M.; Koenig, K.; Merten, E.; Tilstam, U. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 593-595.

4(5)-2-aminoimidazoles sustituidos con buenos rendimientos en una sola etapa.¹⁵⁹ No obstante, esta reacción es muy sensible al pH y puede dar auto condensación de α -aminoaldehídos o cetonas formando pirazinas simétricas.^{160,161}



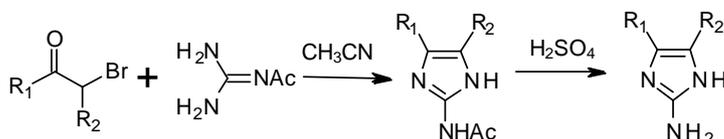
Esquema 2.21. Ejemplos de síntesis directa de 2-aminoimidazoles a partir de cianamidas y α -aminoaldehídos o cetonas.

¹⁵⁹ Phukan, D.; Devi, N. *Der Chemica Sinica* **2011**, 2, 32-41.

¹⁶⁰ Lancini, G. C.; Lazzari, E. *J. Heterocycl. Chem.* **1966**, 29, 3118.

¹⁶¹ Cavalleri, B.; Ballotta, R.; Lancini, G. C. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, 9, 979.

Otro método es la ciclocondensación de aldehídos (2 eq.) y nitratos de guanidina usando cianuro sódico soportado en óxido de alúmina, lo que lleva a la formación de 2-aminoimidazoles con sustituyentes idénticos en las posiciones 4 y 5 del anillo.¹⁶² Ohta y *col.* publicaron la síntesis de 2-aminoimidazoles sustituidos mediante funcionalización del anillo del imidazol.¹⁶³ Otras estrategias son las reacciones de α -dicetonas con guanidinas¹⁶⁴ y α -halocetonas con *N*-acetilguanidinas, que requieren tiempos muy largos, por lo que se han estudiado mediante calentamiento por microondas mejorando los rendimientos (Esquema 2.22).¹⁶⁵ También, la preparación de 2-aminoimidazoles-1,5-disustituidos por reacción de α -azidoésteres con iminofosforanos.¹⁶⁶



Esquema 2.22. Síntesis de 2-aminoimidazoles sutituidos a partir de 2-bromocetonas y acetilguanidinas

Una alternativa es la formación de imidazo[1,2-a]pirimidinas, seguida de la ruptura del anillo de pirimidina por tratamiento con un nucleófilo fuerte como pueden ser hidracinas o aminas (Esquema 2.23).¹⁶⁷

¹⁶² Thangavel, N.; Murgesh, K. *Asian J. Chem.* **2005**, *17*, 2769-2772.

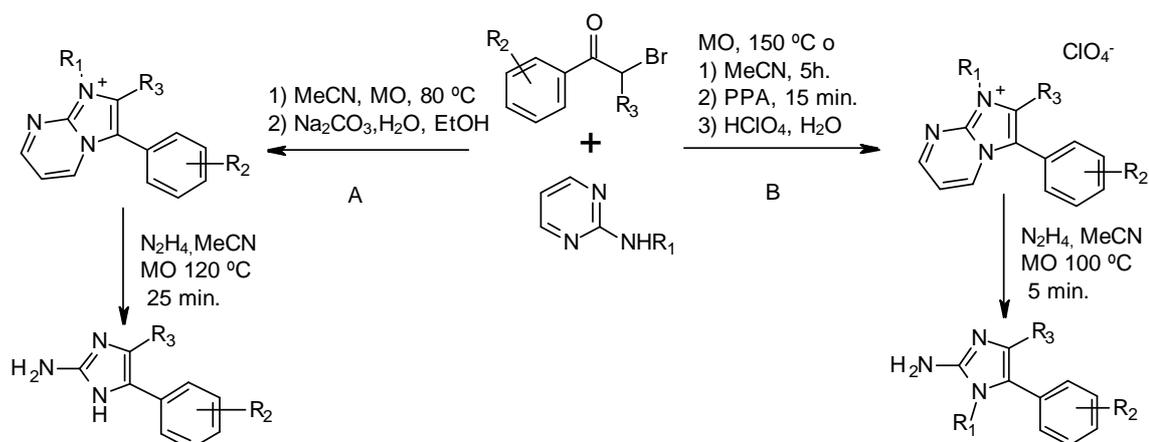
¹⁶³ Ohta, S.; Tsuno, N.; Nakamura, S.; Taguchi, N.; Yamashita, M.; Kawasaki, I.; Fujieda, M. *Heterocycles*, **2000**, *53*, 1939.

¹⁶⁴ Nishimura, T.; Kitajima, K. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 818.

¹⁶⁵ (a) Little, T. L.; Webber, T. L. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7299. (b) Soh, C. H.; Chui, W. K.; Lam, Y. J. *Comb. Chem.* **2008**, *10*, 118-122.

¹⁶⁶ Molina, P.; Fesneda, P.; Sanz, M. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2540.

¹⁶⁷ (a) Casagrande, C.; Ferrini, R.; Miragoli, G.; Ferrari, G. *Farmaco (Ed. Sci.)* **1972**, *27*, 715. (b) Fajgelj, S.; Stanovnik, B.; Tisler, M. *Heterocycles*, **1986**, *24*, 379. (c) Steenackers, H. P. L.; Ermolat'ev, D. S.; Savaliya, B.; De Weerd, A.; De Coster, D.; Shah, A.; Van der Eycken, E. V.; De Vos, D. E.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, S. C. J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 472-484.



Esquema 2.23. A) síntesis de 2-amino-1*H*-imidazoles 4(5)-aril y 4,5-diarilsustituídos a partir de imidazo[1,2-*a*]pidimidinas. B) Síntesis de 2-aminoimidazoles-1-sustituídos a partir de 2-aminopirimidinas por formación de sales imidazo[1,2-*a*]pirimidin-1-inio.

2.9.3.2.2. Nitración de 2-aminoimidazoles vía diazotación

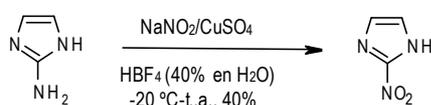
2-nitroimidazol se aisló por primera vez por Maeda y *col.*⁴⁹ en 1953 de la cepa *Nocardia mesenterica*. En 1955, Nakamura estableció su estructura.¹⁶⁸ Hasta 1965, 2-nitroimidazol y sus homólogos no se prepararon mediante síntesis a pesar de que estos compuestos son estructuralmente simples y ofrecen un reto tentador para los químicos que buscan agentes quimioterapéuticos potencialmente activos. Una posible ruta de estos compuestos se describió por Jones y Robins quienes por la acción de ácido nitroso convierten 8-aminopurinas en 8-nitropurinas vía 8-diazopurinas.¹⁶⁹ Sin embargo, cuando se hizo reaccionar 2-aminoimidazol con NaNO_2 a temperatura ambiente a $\text{pH} \sim 6$ el diazocompuesto no se aisló y 2-nitroimidazol no se formó. Si después de reposar a temperatura ambiente durante un breve periodo de tiempo, esta mezcla de reacción se llevaba a reflujo, se observaba por espectrofotometría un 6% de producto final,

⁴⁹ Maeda, K.; Osato, T.; Umezawa, H. *J. Antibiot.* **1953**, *6*, 182.

¹⁶⁸ Nakamura, S. *Pharm. Bull.* **1955**, *3*, 379.

¹⁶⁹ Jones, J. W.; Robins, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3773-3779.

pudiéndose aislar solo un 1%. En 1965, Beaman y *col.* demostraron que en presencia de sulfato cúprico, la reacción tenía lugar a temperatura ambiente en 16 horas, dando rendimientos apreciables (Esquema 2.24).¹⁷⁰ Lancini y Lazzari en este mismo año, describieron la diazotación de 2-aminoimidazol con nitrito sódico en ácido tetrafluorbórico (40% en agua), seguido de la adición de mas cantidad de nitrito sódico y cobre en polvo, para obtener un rendimiento del 30%.¹⁷¹ Poco mas tarde Agrawal y *col.* modificaron este método utilizando temperaturas inferiores (-20 °C, -10 °C) en las adiciones, con un menor tiempo de reacción (2 horas) a temperatura ambiente.¹⁷²



Esquema 2.24. Diazotación-nitración de 2-aminoimidazol

En 1988, Yang y *col.* llevan a cabo la diazotación de 2-aminoimidazol con $\text{NaN}^{18}\text{O}_2$ en presencia de ácido sulfúrico y sulfato de cobre en H_2^{18}O , obteniendo un rendimiento de 2-nitroimidazol marcado ^{18}O del 43% (Esquema 2.25).



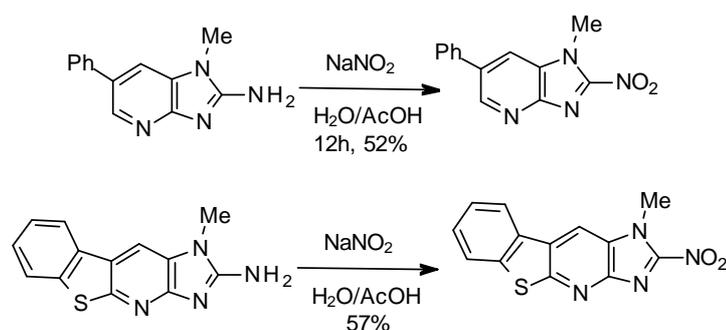
Esquema 2.25. Diazotación-nitración de 2-aminoimidazol.

¹⁷⁰ Beaman, A. G.; Taautz, W.; Gabriel, T.; Duschinsky, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 389-390.

¹⁷¹ Lancini, G. C.; Lazzari, E. *Experientia* **1965**, 21, 83.

¹⁷² Agrawal, K. C.; Bears, K. B.; Sehgal, R. K. *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 583-586.

También se han descrito diazotaciones en 2-aminoimidazopiridinas, siguiendo el método de Grivas y *col.* en los que utiliza $\text{NaNO}_2/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ obteniendo rendimientos medios (Esquema 2.27).¹⁷³

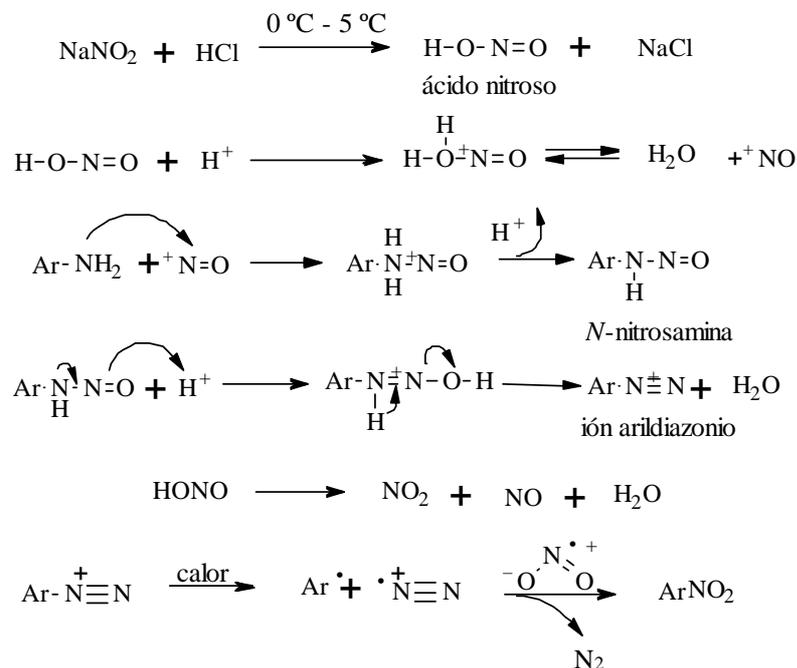


Esquema 2.27. Ejemplos de diazotaciones de 2-aminoimidazopiridinas.

En 2011, Phukan y *col.* publicaron un método eficiente de química verde para la formación de 2-nitroimidazoles sustituidos a partir de 2-aminoimidazoles sustituidos mediante calentamiento por microondas, reduciendo el tiempo de reacción.¹⁷⁴ Utilizaban una arcilla natural de Assam (India) rica en hierro y con un elevado contenido en caolinita. Esta arcilla actúa tanto como ácido de Lewis como de Brönsted. Aprovechando el fuerte carácter ácido de la arcilla, sustituyen por ésta el ácido utilizado en el método convencional. Sin embargo, este nuevo método no es reproducible, ya que la arcilla utilizada no es comercial. Además, la reacción se lleva a cabo con solo 1,5 equivalentes de NaNO_2 , cuando son necesarios al menos 2 equivalentes, uno para la formación de la sal de diazonio, y un segundo equivalente para la sustitución radicalaria del grupo diazonio por el anión nitrito (Esquema 2.28).

¹⁷³ a) Grivas, S. *J. Chem. Res.* **1988**, 84. b) Björk, M.; Grivas, S. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 101-109. c) Nguyen, T. M.; Novak, M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4698-4706. d) Stover, J. S.; Rizzo, C. *J. Org. Lett.* **2004**, *6*, 4985-4988.

¹⁷⁴ Phukan, k.; Devi, N. *J. Chem. Pharm. Res.* **2011**, *3*, 1037-1044.



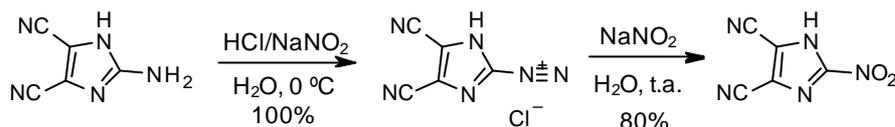
Esquema 2.28. Mecanismo de diazotación-nitración de una amina primaria aromática.

2.9.2.2.1. Aislamiento de la sal de diazonio

Las sales de diazonio son un grupo de compuestos orgánicos cuya estructura general es $\text{R-N}_2^+\text{X}^-$, donde R puede ser un radical alquilo o arilo y X^- es habitualmente un anión haluro. Las sales de diazonio alifáticas son muy inestables y no tienen aplicación práctica. En cambio, históricamente, las sales de diazonio aromáticas, más estables, se han mostrado como importantes intermedios en la síntesis de colorantes. El método más importante de preparación de las sales de diazonio aromáticas es el tratamiento de aminas aromáticas primarias, con nitrito sódico en presencia de un ácido mineral, por ejemplo ácido clorhídrico (Esquema 2.29). En solución acuosa estas sales son inestables a temperaturas superiores a los 5°C , por lo que se emplea un baño de hielo durante la síntesis. A este proceso se le conoce como *diazotación*. Normalmente

no se aislan y se emplean inmediatamente una vez preparadas *in situ*. Las sales de diazonio son sensibles a la luz y se descomponen bajo luz ultravioleta. En estado sólido son altamente sensibles al choque, comportándose de forma explosiva. En disolución deben transferirse cuidadosamente al cambiarles de recipiente.

En algunos casos, se ha aislado la sal de diazonio. Lu y *col.* aislaron el cloruro de 4,5-dicianoimidazol-2-diazonio cuando llevaron a cabo la reacción de 2-amino-4,5-dicianoimidazol en agua a 0 °C en medio ácido. El crudo de reacción lo filtraron aislando un sólido blanco que usaron directamente para la siguiente reacción. La adición de una disolución de NaNO₂ en agua a temperatura ambiente dio 4,5-diciano-2-nitroimidazol con un 80% de rendimiento.¹⁷⁵



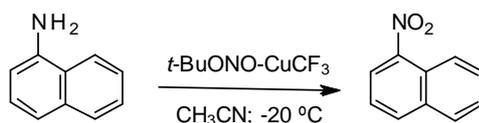
Esquema 2.29. Aislamiento de la sal de diazonio seguido de la formación del derivado de 2-nitroimidazol

Aunque la forma más común de obtener sales de diazonio es en disolución acuosa, Cadogan y *col.* describieron en los años 60 un método en medio orgánico para la obtención de éstas. La diazotación no acuosa hace uso de la capacidad de los nitritos de alquilo (nitrito de isoamilo, amilo, *tert*-butilo...) para producir radicales arilo a partir de aminas aromáticas.¹⁷⁶ Se han descrito diferentes métodos utilizando disolventes como cloruro de metileno, THF, dicloroetano o acetonitrilo entre otros. Holzapfel y *col.* describieron la formación de nitroarenos a partir de aminoarenos utilizando nitrito de

¹⁷⁵ Lu, Y.; Just, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1677-1687.

¹⁷⁶ a) Cadogan, J. I. G.; Roy, D. A.; Martin, D. M. *J. Chem. Soc.* **1966**, 1249. b) Cadogan, J. I. G.; Molina, G. A. *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1973**, 541. c) Devivar, R. V.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1105-1110. d) Garell, L.; Saint-Jalmes, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5705-5708.

butilo en acetonitrilo anhidro con rendimientos medios (Esquema 2.30). Cuando esta reacción se llevaba a cabo de forma convencional en medio acuoso, la reacción no tenía lugar.¹⁷⁷



Esquema 2.30. Síntesis de 1-nitronaftaleno en medio orgánico.

2.9.2.3. Oxidación de aminoimidazoles

En 1954, Emmons describió la oxidación de aminas aromáticas a nitroarenos con ácido peroxitrifluoroacético obtenido a partir del anhídrido trifluoroacético y peróxido de hidrógeno (90% en agua) en cloruro de metileno, obteniendo buenos rendimientos cuando existen grupos electrodonadores en las aminas aromáticas. Poco más tarde, el mismo autor describió la oxidación de aminas con ácido peracético preparado por reacción de anhídrido acético con peróxido de hidrógeno (90% en agua), un reactivo más económico, obteniendo mejores rendimientos que con el método anterior.¹⁷⁸

Se ha utilizado también un complejo de hexafluoroacetona-peróxido de hidrógeno, que aunque es efectivo es menos oxidante que los anteriores.¹⁷⁹ Las aminas también pueden oxidarse hasta grupos nitro mediante las siguientes etapas con el reactivo de Murray (dimetildioxirano):¹⁸⁰

¹⁷⁷ Holzapfel, C. W.; Koekemoer, J. M.; Van-Dyk, M. S.; *S. Afr. J. Chem.* **1986**, *39*, 158-161.

¹⁷⁸ a) Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3470-3472. b) Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5528-5530.

¹⁷⁹ Chambers, R. D.; Clark, M. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *32*, 2741-2742.

¹⁸⁰ Murray, R. W.; Jeyaraman, R.; Mohan, L. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *21*, 2335-2336.



Crandall y *col.* compararon la oxidación con dimetildioxirano con oxone[®] (mezcla de tres sales formada por monosulfato, bisulfato y sulfato de potasio: 2 KHSO₅, KHSO₄, K₂SO₄), observando que en algunas aminas alifáticas primarias el primer método daba lugar a un gran número de subproductos como oximas, nitronas y oxaziridinas entre otros. Cuando utilizaban un gran exceso de oxone[®] en acetona acuosa, se obtenía mayoritariamente el nitroderivado. Desafortunadamente, este procedimiento no fue satisfactorio para aminas con sustituyentes alquilo primarios.¹⁸¹ Obviamente, la selectividad de la reacción para producir productos oxigenados específicos es de crucial importancia. Sin embargo, esto es complicado debido a la gran competencia de productos de oxidación que se pueden formar en los diferentes estados, obteniendo una mezcla de productos. Así, la mayoría de los métodos descritos hasta ahora, no están catalizados o muestran una pequeña selectividad, lo que hace de gran importancia un control efectivo de la selectividad de cada reacción.

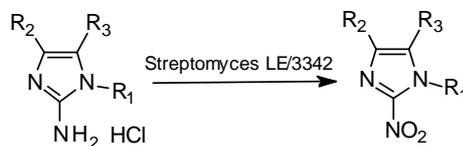
Años más tarde, Suresh y *col.* incorporaron diferentes metales reductores como litio, vanadio, cromo o aluminio en silicatos, utilizándolos como catalizadores sólidos con nuevas actividades. El resultado de la oxidación de aminas utilizando dichos catalizadores, es el control de la selectividad de la reacción con H₂O₂ e hidroperóxido de *tert*-butilo (TBHP) como oxidantes. Las arilaminas se oxidan selectivamente a los correspondientes nitroarenos cuando se usa como catalizador silicato de cromo con H₂O₂ y TBHP.¹⁸²

¹⁸¹ Crandall, J. K.; Reix, T. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6759-6764.

¹⁸² Suresh, S.; Joseph, R.; Jayachandran, B.; Pol, A. V.; Vinod, M. P.; Sudalai, A.; Sonawane, H. R.; Ravindranathan, T. *Tetrahedron*, **1995**, *41*, 11305-11318.

Se han utilizado otros catalizadores para la oxidación de aminas a los correspondientes nitrocompuestos como son el metiltrioxorenio con H_2O_2 ,¹⁸³ tetra-*tert*-butilato de circonio con TBHP,¹⁸⁴ ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}\cdot n\text{H}_2\text{O}$) con perborato de sodio (SPB),¹⁸⁵ sulfato de manganeso con oxone[®] en agua,¹⁸⁶ heteropoliácidos (HPAs) con peróxido de hidrógeno (por ejemplo, $\text{HFePMo}_{11}\text{VO}_{40}$),¹⁸⁷ o yoduro de potasio con TBHP entre otros.¹⁸⁸ Otro procedimiento selectivo importante de oxidación de aminas aromáticas primarias radica en el uso de bromato de tetraalquilamonio en medio ácido. Esta reacción es compatible con muchos grupos funcionales.¹⁸⁹

Hasta la fecha solo se ha descrito la oxidación de 2-aminoimidazoles a 2-nitroimidazoles mediante transformación microbiana por la cepa *Streptomyces* LE/3342 (Esquema 2.31). Se llevó a cabo la oxidación de sustratos con grupos alquilos en posición 4(5), observándose que la eficacia decrecía con el aumento de la longitud de la cadena. Se observaron menores rendimientos con el derivado 4,5-dimetilo y la presencia de un grupo metilo en posición N1 o un grupo fenilo en la posición 4(5) impedía la biotransformación.¹⁹⁰



Esquema 2.31. Oxidación de 2-aminoimidazoles por *streptomyces* LE/3342.

¹⁸³ Murray, R. W.; Iyanar, D.; Chen, J.; Wearing, J. T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *6*, 805-808.

¹⁸⁴ Krohn, K.; Kúpke, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 679-682.

¹⁸⁵ Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Amani, K. *Green Chem.* **2001**, *3*, 131-132.

¹⁸⁶ Vázquez, S. A.; Ávila, Z. J. G. *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**, *51*, 213-216.

¹⁸⁷ Tundo, P.; Romanelli, G. P.; Vázquez, P. G.; Loris, A.; Aricó, F. *Sylentt*, **2008**, *7*, 967-970.

¹⁸⁸ a) Rajender, R. K.; Uma, M. C.; Venkateshwar, M.; Lakshmi, K. M. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 93-96. b) Rajender, R. K.; Uma, M. C.; Venkateshwar, M.; Lakshmi, K. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3619-3622.

¹⁸⁹ Sandhya, D. S.; Nath, U.; Deb, D.; Das, P. J. *Synth. Commun.* **2004**, *13*, 2359-2363.

¹⁹⁰ a) Lancini, G. C.; Kluepfel, D.; Lazzari, E.; Sartori, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *130*, 37-44. b) Lancini, G. C.; Lazzari, E.; Sartori, G. *The Journal of Antibiotics*, **1968**, *6*, 387-392.

3.1. Introducción

El desarrollo de la síntesis de precursores para la preparación de compuestos marcados radiológicamente ha sido un objetivo de considerable interés en los últimos años. Dentro de este campo, diversos grupos de investigación trabajan en la obtención de nuevos marcadores para la detección de hipoxia, mas selectivos, con una menor toxicidad y de preparación sencilla y reproducible.

En la bibliografía se ha descrito una serie de derivados de 2-nitroimidazol marcados con radioisótopos, principalmente con ^{18}F (Figura 3.1).

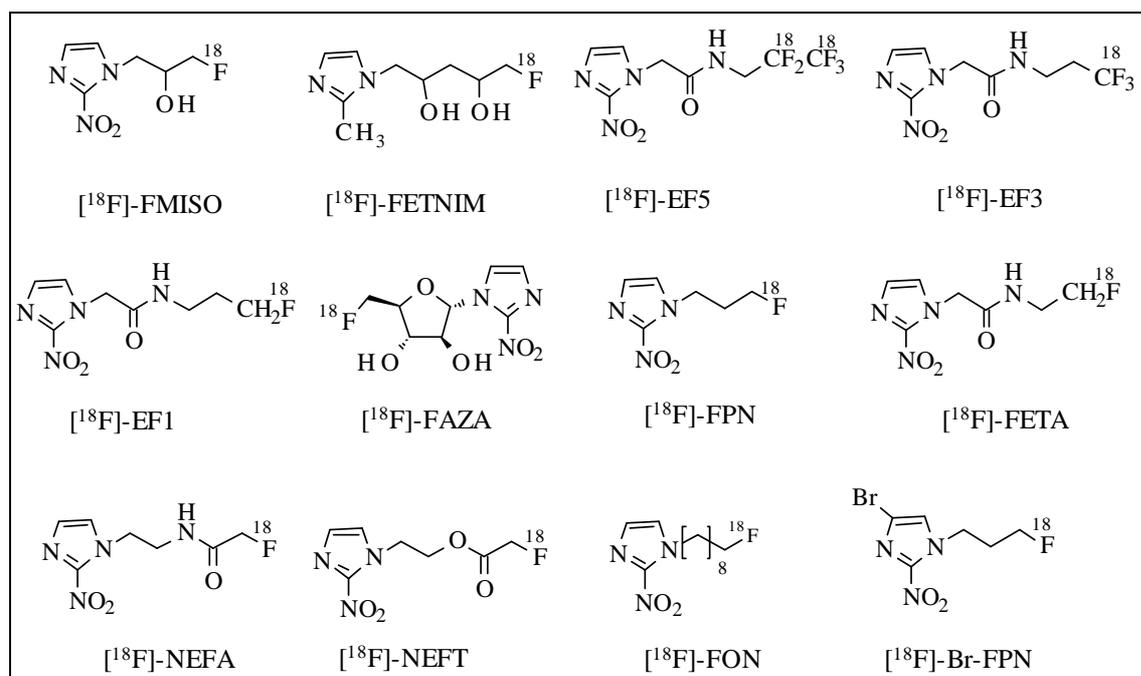


Figura 3.1. [^{18}F]-FMISO y análogos.

Como se ha mencionado anteriormente, el radiotrazador más utilizado hasta el momento como marcador de hipoxia *in vivo* mediante la técnica no invasiva de imagen por PET es [^{18}F]-FMISO (**1a**) (Figura 3.2). Sin embargo, no cumple todos los requisitos que debe cumplir un marcador ideal de hipoxia para el cerebro. Por ello, la presente Tesis se enmarca en un proyecto de Química Médica cuyo objetivo es la búsqueda de nuevos candidatos a radiotrazadores derivados de FMISO capaces de mejorar sus propiedades como marcador para hipoxia.

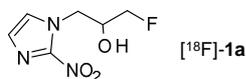


Figura 3.2. [^{18}F]-FMISO (**1a**).

3.2. Objetivos

Para la realización de la Tesis Doctoral que se presenta en esta Memoria nos hemos propuesto llevar a cabo la síntesis y el estudio de nuevos derivados lipófilos de FMISO, con el objetivo de encontrar un candidato a radiotrazador para la detección de hipoxia en tejido cerebral mediante imagen PET, más selectivo y menos tóxico que [^{18}F]-FMISO (**1a**).

En la estructura del precursor **7a** de FMISO se pueden destacar 3 regiones que, en principio, podrían ser susceptibles de modificación para conseguir nuevos derivados más lipófilos (Figura 3.3). Sin embargo, el grupo nitro no puede sustituirse por otro grupo así como tampoco puede modificarse su posición en el anillo sin eliminar o disminuir su capacidad como sonda. Es necesario que el anillo lleve un grupo nitro para que el potencial redox sea el adecuado para que el radiotrazador sea atrapado en las

células hipóxicas por bio-reducción^{51,52} y, además, es importante que el grupo nitro se encuentre en la posición C2 para conseguir un potencial de reducción máximo.^{56,57,77} Por otro lado, es conveniente que la cadena lateral en el nitrógeno N1, zona reactiva con ¹⁸F, no pierda su reactividad en el proceso de fluoración. Es por ello conveniente la existencia de un carbono primario unido a un buen grupo saliente. Por otro lado, cadenas laterales más lipófilas en el nitrógeno N1 no han mostrado ventajas sobre FMISO.⁷⁴ Finalmente, el grupo hidroxilo protegido como tetrahidropiranyl (THP) éter no es esencial ya que se han descrito otros grupos como amida o éster en radiomarcadores derivados de FMISO tan eficientes como éste.^{65,72} Por lo tanto, la región más susceptible y no explorada de modificación para dar nuevos derivados de FMISO son los carbonos C4 y C5 del anillo de 2-nitroimidazol.

⁵¹ McClelland, R. A. *In Advanced Research Workshop on Selective Activation of Drugs by Redox Processes*. Adams, G. E.; Breccia, A.; Fiedlen, E. N.; Wardman, P. Eds. NATO, Plenum Press, New York, 1990, 125-136.

⁵² McClelland, R. A.; Panicucci, R.; Rauth, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4308-4314.

⁵⁶ Adams, G. E.; Flockhart, I. R.; Smithen, C. E.; Stratford, I. J.; Wardman, P.; Watts, M. E. *Radiat. Res.* **1976**, *67*, 9-20.

⁵⁷ Wardman, P. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *64*, 309-320.

⁷⁷ Huang, H.; Zhou, H.; Li, Z.; Wang, X.; Chu, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 172-177.

⁷⁴ Yamamoto, F.; Oka, H.; Antoku, S.; Ichiya, Y.; Masuda, K.; Maeda, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 590-597.

⁶⁵ Dubois, L.; Landuyt, W.; Cloetens, L.; Bol, A.; Bormans, G.; Haustermans, D.; Labar, D.; Nuyts, J.; Gregoire, V.; Mortelmans, L. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 209-218.

⁷² Zha, Z.; Zhu, L.; Liu, Y.; Du, F.; Gan, H.; Qiao, J.; Dung, H. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 501-508.

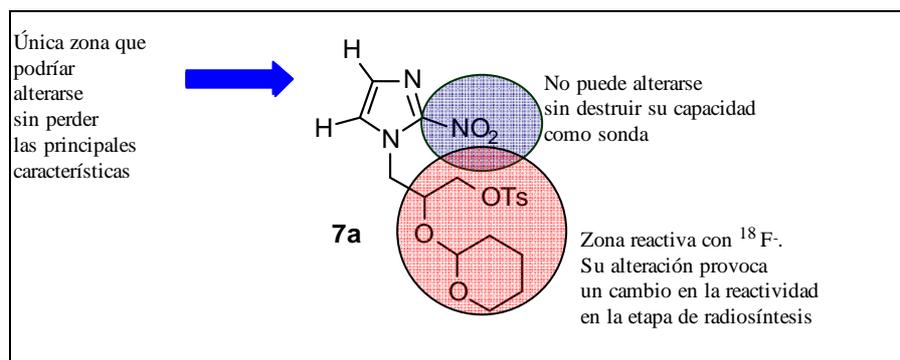
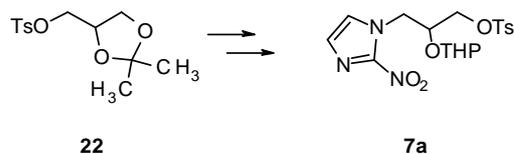


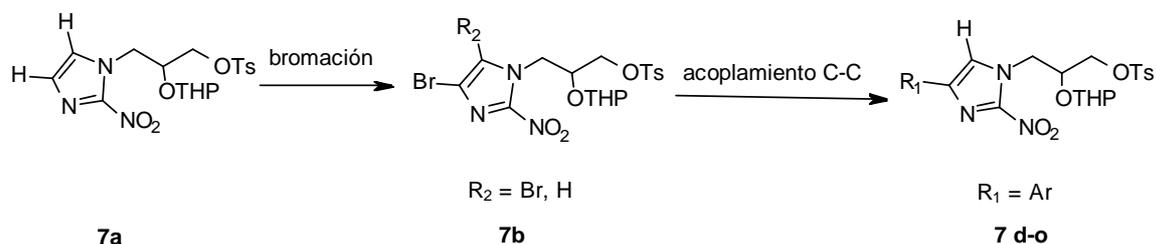
Figura 3.3. Diferentes regiones que se pueden alterar para modificar la lipofilia de FMISO.

Se investigará un nuevo método de síntesis de precursor de FMISO que permita prepararlo de una forma mas eficiente. Este método se aplicará posteriormente a la síntesis de los derivados lipófilos. Como propuesta inicial se utilizará **22** como material de partida para llegar a **7a** (Esquema 3.1).



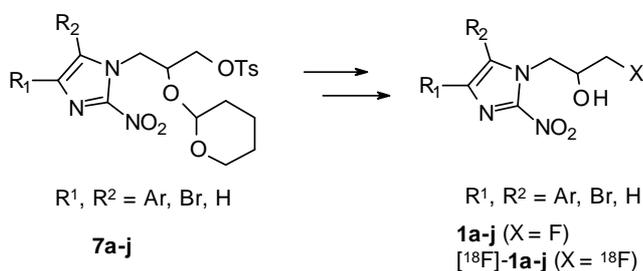
Esquema 3.1. Síntesis del precursor de FMISO.

Los derivados lipófilos **7d-o** ($R_1 = \text{Ar}$) se prepararan a partir de **7a** mediante bromación del anillo del imidazol y posterior reacción de acoplamiento C-C catalizada por complejos metálicos (Esquema 3.2).



Esquema 3.2. Síntesis de derivados lipófilos del precursor de FMISO.

Finalmente a partir de los precursores lipófilos **7** ($R_1, R_2 = \text{Ar, Br, H}$) se prepararán los derivados lipófilos **1** ($X = \text{F}$) sobre los que se estudiarán diversas propiedades como su toxicidad, potencial redox y lipofilia. Aquellos derivados que muestren una mejor combinación de estas propiedades, serán seleccionados para su transformación en los derivados $[\text{}^{18}\text{F}]\text{-1}$ ($X = \text{}^{18}\text{F}$) en los laboratorios PET y posteriormente se someterán a estudios de selectividad de tejido y marcaje de hipoxia sobre modelos animales (Esquema 3.3).



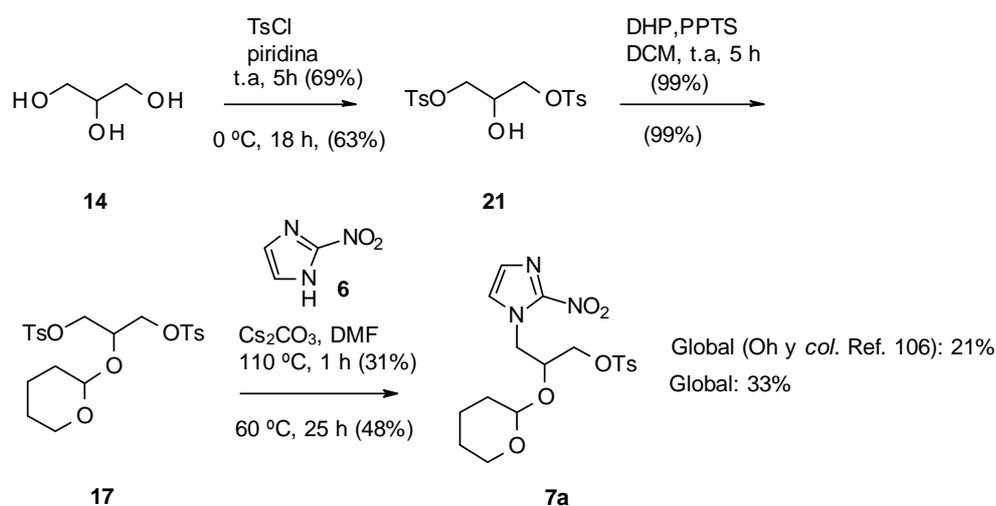
Esquema 3.3. Síntesis de derivados lipófilos de FMISO.

3.3. Síntesis del precursor de FMISO (7a)

La síntesis del precursor, tosilato de 3-(2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxan-2-iloxy)propilo (**7a**) (Esquema 3.4), descrita por Oh y *col.*¹⁰⁶, se mejoró desde un

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899–905.

rendimiento global del 21% hasta el 33% disminuyendo la temperatura de la última etapa de la síntesis, favoreciendo así la formación del producto de monosustitución **7a** e incrementando el rendimiento en el último paso un 17%. También, la reacción de **14** con cloruro de tosilo se llevó a cabo a 0 °C para favorecer la selectividad, sin embargo, no fue posible mejorar en estas condiciones el rendimiento descrito para **21**.



Esquema 3.4. Síntesis de **7a**.

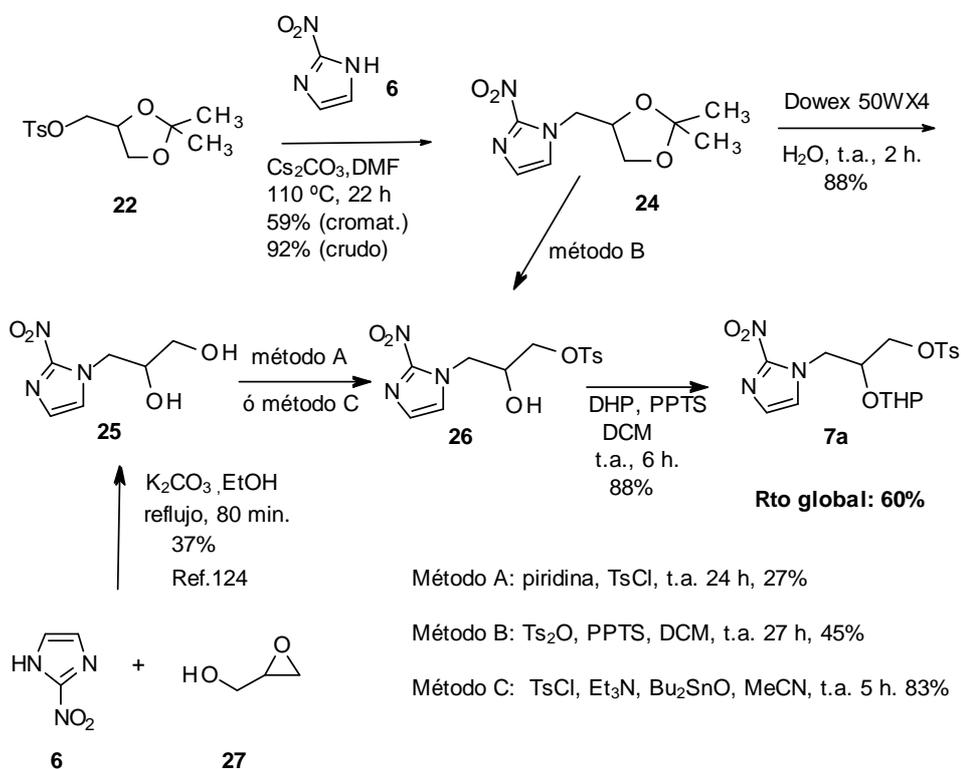
3.4. Síntesis alternativa del precursor de FMISO (**7a**)¹⁹¹

Debido a la importancia de **1a** como marcador de diagnóstico por imagen y su potencial para predecir la respuesta al tratamiento y el pronóstico en un amplio rango de procesos patológicos, así como el elevado coste de su precursor **7a**,¹⁹² se llevó a cabo el desarrollo de un nuevo método sintético para **7a** mejorando el rendimiento global y por lo tanto reduciendo su alto coste.

¹⁹¹ Nieto, E.; Alajarín, R.; Álvarez-Builla, J.; Larrañaga, I.; Gorospe, E.; Pozo, M. A. *Synthesis* **2010**, *21*, 3700-3704.

¹⁹² ABX Advanced Biochemical Compounds, Germany (57.06 EUR/vial 10 mg).

En todas las síntesis descritas antes del comienzo de este proyecto de Tesis Doctoral, la última etapa consiste en el desplazamiento nucleófilo de un grupo tosilo por 2-nitroimidazol (**6**) en un intermedio ditosilato tipo **17** (Esquema 3.4), siendo la etapa limitante como consecuencia de la presencia de dos grupos salientes. A la vista de estos resultados, consideramos una nueva síntesis a partir de la alquilación de **6** con un derivado monotosilado **22**, un producto comercial y de bajo coste (Esquema 3.5).



Esquema 3.5. Síntesis de **7a**.

Inicialmente, la sustitución nucleófila de **22** con **6** dio el compuesto **24**. Para conseguir la conversión completa de **22** fue necesario el calentamiento de la mezcla de reacción a 110 °C durante 22 horas. Se observó que durante la purificación por

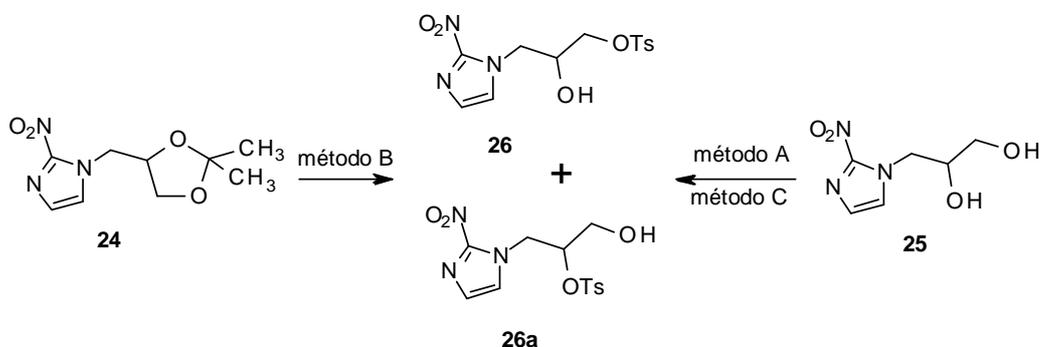
cromatografía en columna de gel de sílice se producía la apertura del anillo de dioxolano como consecuencia de la acidez de la fase estacionaria hidratada, dando un 59% de rendimiento para **24**. Por ello, se decidió continuar con el crudo de reacción. Después de evaporar la DMF y tratar el residuo con AcOEt para separar el Cs₂CO₃ por filtración, se obtuvo **24** en un 92% de rendimiento con una buena pureza (92,6%, HPLC). Posteriormente, la hidrólisis del acetónido se consiguió por tratamiento del crudo **24** con Dowex 50WX4 en agua a temperatura ambiente durante 2 horas, obteniéndose **25** con un rendimiento del 88%.¹⁹³ La síntesis de **25** se publicó previamente por reacción de **6** con glicidol (**27**) en presencia de K₂CO₃ a reflujo, donde describen un rendimiento del 37%.¹²⁴

Posteriormente, **25** se trató en condiciones convencionales de tosilación (Esquema 3.6), con cloruro de tosilo y trietilamina en cloruro de metileno a temperatura ambiente.¹⁹⁴ Así, se obtuvo **26** con un rendimiento de solo el 15% como una mezcla de regioisómeros **26/26a** 85:15 (Tabla 3.1, entrada 1). Este método no se pudo mejorar usando tiempos mayores, temperaturas mas elevadas, ni por adición del reactivo activante DMAP. Cuando se usó piridina como disolvente (método A) y base, la reacción dio, después de 24 horas a temperatura ambiente, un rendimiento del 27% y una selectividad mejorada (**26/26a** 92:8) (Tabla 3.1, entrada 2). Entonces se cambió el cloruro de tosilo por anhídrido toluensulfónico. Cuando se utilizó trietilamina como base no hubo conversión, sin embargo, al utilizar PPTS como catalizador se obtuvo un rendimiento del 14% y una mayor selectividad (**26/26a** 99,5:0,5) (Tabla 1, entrada 3).

¹⁹³ Ho, P. T. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1623-1626.

¹²⁴ Beaman, A. G.; Tautz, W.; Duschinsky, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1968**, 520-530.

¹⁹⁴ Takano, S.; Moriya, M.; Suzuki, M.; Iwabuchi, Y.; Sugihara, T.; Ogasawara, K. *Heterocycles* **1990**, *31*, 1555-1563.



Esquema 3.6. Métodos de preparación de **26a**.

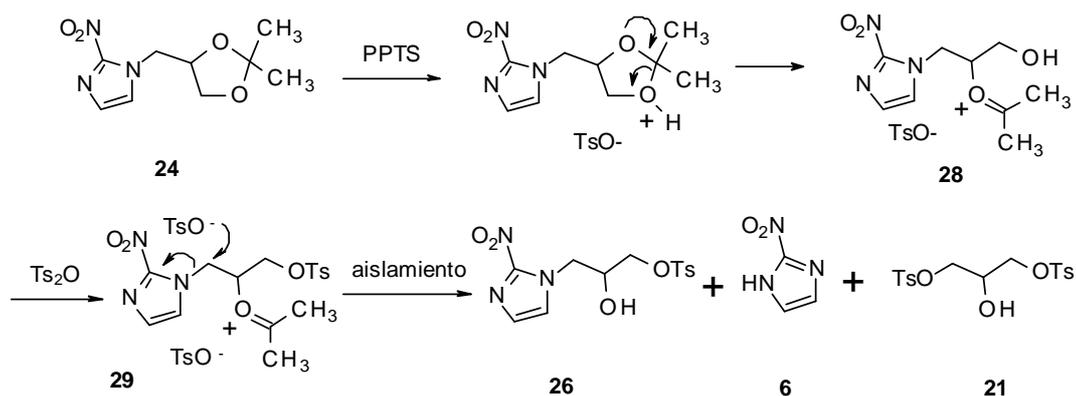
Tabla 3.1. Tosilación regioselectiva de **24** (método B) y **25** (método A y C).

Entrada	Método, reactivo ^a	Aditivo	Disolvente	Tiempo (h)	Relación ^b 26/26a	Rto.(%) ^c
1 ^d	A, TsCl	Et ₃ N	DCM	6	85:15	15
2 ^d	A, TsCl	Piridina	Piridina	24	92:8	27
3	A, Ts ₂ O	PPTS ^e	DCM	23	99,5:0,5	14
4	B, Ts ₂ O	Bi(OTf) ₃ ^e	DCM	20	95:5	25
5	B, Ts ₂ O	PPTS ^e	DCM	27	98:2	45
6 ^d	C, TsCl	Et ₃ N	DCM	6	98:2	39
7 ^d	C ^f , TsCl	Et ₃ N	DCM	24	99,6:0,4	65
8 ^d	C ^f , TsCl	Et ₃ N	DCM-1,4-dioxano	18	98,6:1,4	84
9	C ^f , TsCl	Et ₃ N	MeCN	26	99:1	53
10	C, TsCl	Et ₃ N	MeCN	5	99,3:0,7	83
11 ^d	C, TsCl	Et ₃ N	DCM	6	85:15	15

^a Métodos A a C: las reacciones se llevaron a cabo a partir de **24** o **25** como producto de partida, TsCl o Ts₂O como reactivos, y Et₃N como aditivo básico a temperatura ambiente. ^b Determinado por HPLC. ^c Rendimiento de **26** calculado en la mezcla (**26/26a**), aislada mediante cromatografía en columna. ^d Las reacciones no se completaron. ^e Se añadieron 0,2 eq. de PPTS o Bi(OTf)₃. ^f La reacción se llevó a cabo a 0 °C.

Después de estos resultados, se estudió la posibilidad de la apertura y tosilación en un solo paso del acetónido, de forma análoga a como se ha descrito para la conversión de acetónidos en diacetatos usando Bi(OTf)₃ como catalizador y Ac₂O

(método B).¹⁹⁵ Cuando **25** se trató con Bi(OTf)₃ (0,2 eq.) y Ts₂O (1 eq.) durante 20 horas a temperatura ambiente se obtuvo **26** con un rendimiento del 25% (**26/26a** 95:5, Tabla 3.1, entrada 4). Mejores rendimientos se consiguieron cuando **25** se trató con Ts₂O, (1 eq.) y PPTS (0,2 eq.) en DCM durante 27 horas a temperatura ambiente (45% **26/26a** 98:2, Tabla 3.1, entrada 5). Cuando la reacción se llevó a cabo con PPTS en piridina o DMF no se observó conversión de **25**. Pequeñas cantidades de **6** y **21** fueron aisladas como subproductos en la mezcla de reacción, debido probablemente al desplazamiento de 2-nitroimidazol desde **28** por el anión tosilato (Esquema 3.7). La propuesta para este posible desplazamiento, se ha explicado mediante el curso de reacción descrito para la desprotección del acetónido por Poon y *col.*¹⁹⁶



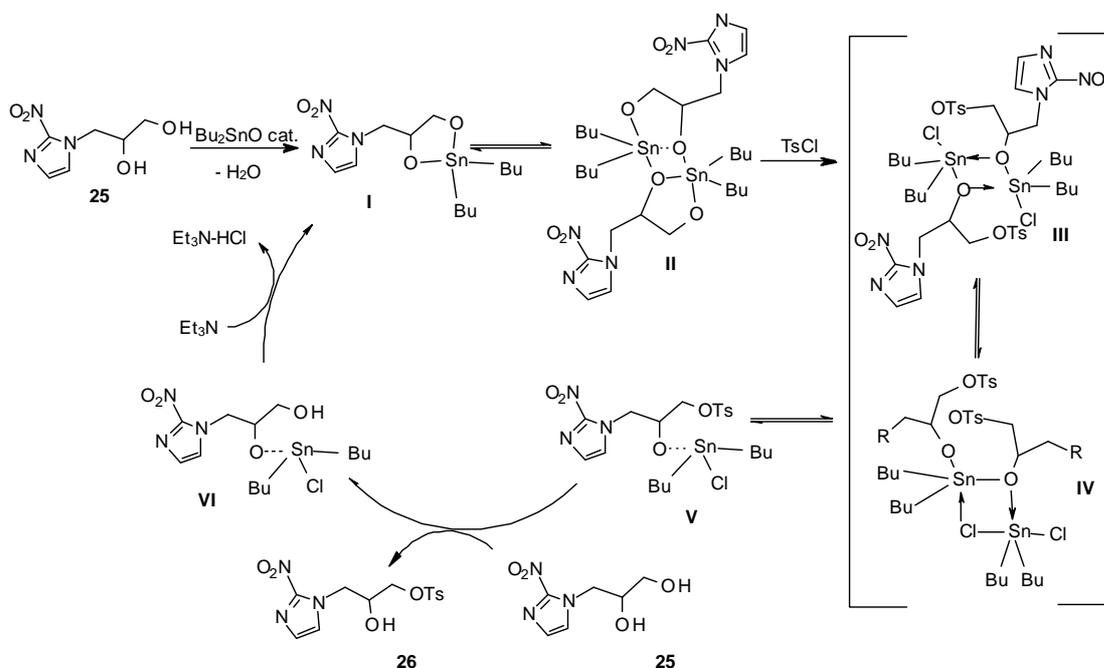
Esquema 3.7. Propuesta de curso de reacción en cascada de apertura y tosilación del acetónido **24**.

Martinelli y *col.* describieron un método muy eficiente para la tosilación regioselectiva de dioles a través de un intermedio [1,3,2]-dioxastannolano usando

¹⁹⁵ Wu, Q.-P.; Zhou, M.-X.; Xi, X.-D.; Song, D.; Wang, Y.; Liu, H.-X.; Li, Y.-Z.; Zhang, Q.-S. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 2714-2718.

¹⁹⁶ Poon, K. W. C.; Lovell, K. M.; Dresner, K. N.; Datta, A. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 752-755.

Bu₂SnO de forma catalítica (Esquema 3.8).¹⁹⁷ Este enfoque representó una mejora respecto métodos anteriores que utilizaban el intermedio aislado.¹⁹⁸



Esquema 3.8. Mecanismo propuesto para la tosilación catalítica regioselectiva de glicoles vía [1,3,2]-dioxastannolano intermedio.

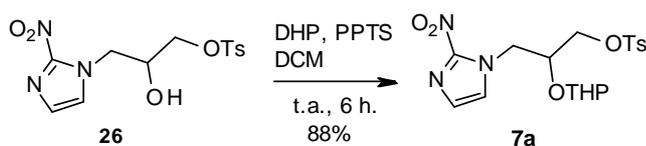
En nuestro trabajo, llevamos a cabo este procedimiento con el diol **25** (Tabla 3.1, método C), utilizando cloruro de metileno a temperatura ambiente y consiguiendo un rendimiento para **26** del 39% (**26/26a** 98:2, Tabla 3.1, entrada 6). Cuando la reacción se llevó a cabo a 0 °C con mayor tiempo de reacción, se consiguió el tosilato **26** con mayor rendimiento (65%) y regioselectividad (**26/26a** 99,6:0,4) (Tabla 3.1, entrada 7). Sin embargo, cuando se utilizó cloruro de metileno como disolvente, la conversión del producto de partida no era completa debido a la baja solubilidad del diol **25**. La adición

¹⁹⁷ Martinelli, M. J.; Vaidyanathan, R.; Pawlak, J. M.; Nayyar, N. k.; Dhorkte, U. P.; Doecke, C. W.; Zollars, L. M. H.; Moher, E. D.; Khau, V. V.; Kôsmrlj, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3578.

¹⁹⁸ Reginato, G.; Ricci, A.; Roelens, S.; Scapecchi, S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5132.

de 1,4-dioxano como codisolvente mejoró el rendimiento de **26** (84%, **26/26a**, 98,6:1,4, Tabla 3.1, entrada 8) aunque la conversión del producto de partida fue incompleta debido también a la solubilización parcial de **25**. A la vista de estos resultados, se ensayó un disolvente mas polar. Así, se utilizó MeCN a 0 °C consiguiendo rendimientos medios de **26** (53%, **26/26a**, 99:1, Tabla 3.1, entrada 9). Cuando esta misma reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, se consiguió el mejor rendimiento y la regioselectividad mas alta (83%, **26/26a**, 99,3:0,7, Tabla 3.1, entrada 10).

Finalmente, la protección de **26** con dihidropirano (DHP) permitió la obtención de **7a** (88%) como una mezcla de diastereómeros **7a1/7a2** 51:49 (Esquema 3.9). De esta manera, el rendimiento global de esta síntesis (59%) es mas del doble que el descrito por Oh y col. (21,2%).¹⁰⁶



Esquema 3.9. Protección del tosilato **26**.

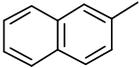
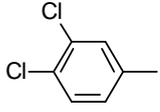
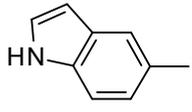
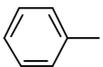
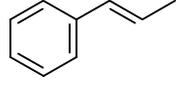
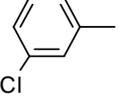
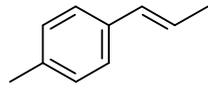
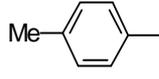
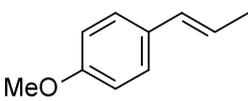
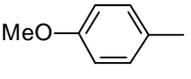
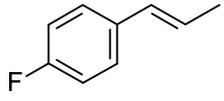
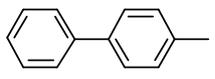
3.5. Elección de los grupos para la preparación de derivados mas lipófilos

Como se ha indicado anteriormente, las posiciones mas favorables para hacer una molécula mas lipófila sin modificar las capacidades de la molécula como radiotrazador para detectar hipoxia por imagen PET, son las posiciones C4 y C5 del anillo de imidazol. Por otro lado, es importante que la lipofilia de la molécula expresada

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899–905.

a través del valor de Clog P tenga valores entre 1,5 y 3.⁷³ Así, se propuso la preparación de los siguientes derivados con sustituyentes aromáticos que proporcionarían la lipofilia adecuada (Tabla 3.2).

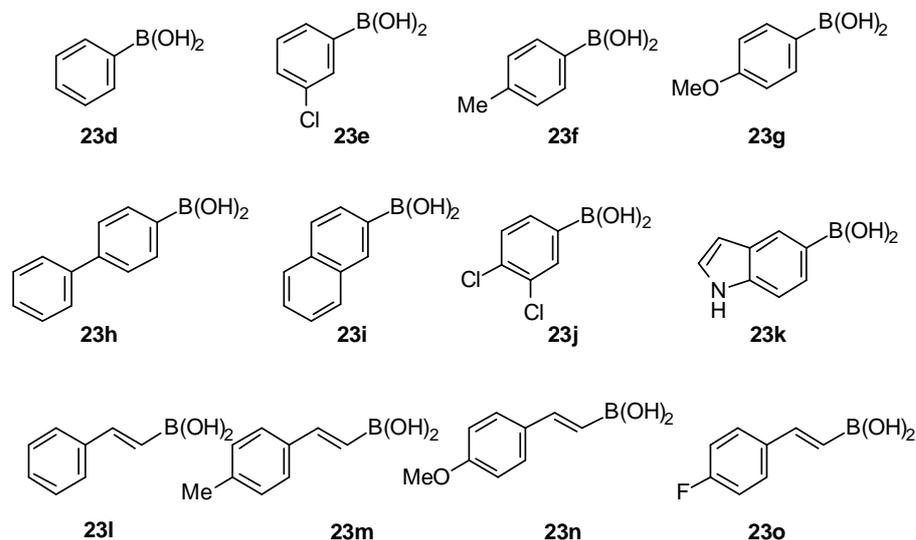
Tabla 3.2. Clog P de FMISO y análogos

Producto	R ₁	R ₂	Clog P ^a	Producto	R ₁	R ₂	Clog P
1a	H	H	0,43	1i		H	3,45
1b	Br	H	1,27	1j		H	3,76
1c	Br	Br	1,79	1k		H	2,52
1d		H	2,48	1l		H	2,73
1e		H	3,12	1m		H	3,24
1f		H	2,99	1n		H	2,60
1g		H	2,35	1o		H	2,86
1h		H	4,14				

^a Calculados en la página web ChemAxon.

⁷³ Aboagye, E. O. *Design and development of probes for in vivo molecular and functional imaging of cancer and cancer therapies by positron emission tomography (PET)*; Knäblein, J., Ed.; WILEY-VCH, Weinheim, 2005.

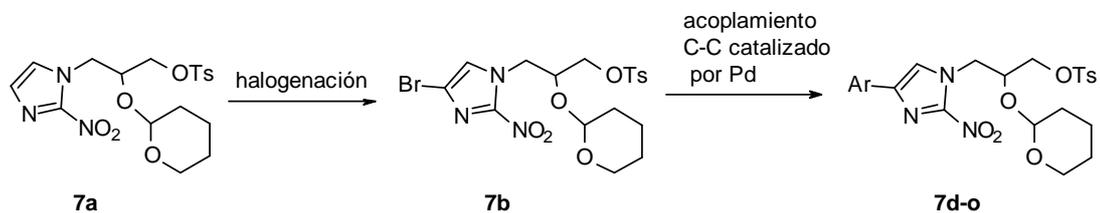
Se seleccionaron un total de 12 ácidos borónicos comerciales **23d-o** (Esquema 3.10).



Esquema 3.10. Ácidos borónicos seleccionados.

3.6. Síntesis de derivados lipófilos del precursor de FMISO

Con el fin de encontrar derivados con mayor selectividad por tejido cerebral, con mayor lipofilia y menor toxicidad, se estudió una síntesis de derivados lipófilos a partir de **7a** a través de una primera etapa de halogenación seguido de una reacción de acoplamiento C-C catalizada por paladio (Esquema 3.11).

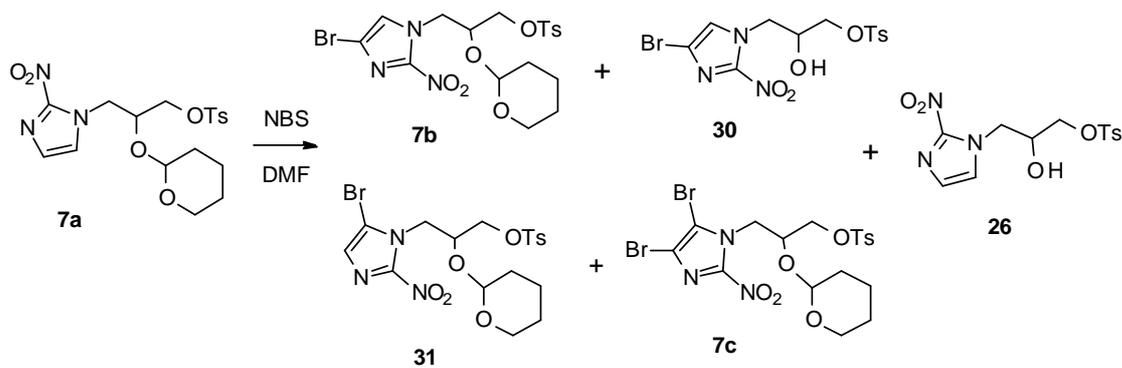


Esquema 3.11. Síntesis de derivados lipófilos de FMISO.

3.6.1. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO mediante bromación de 7a

3.6.1.1. Síntesis de 7b

En primer lugar se llevó a cabo la bromación de **7a** con NBS en DMF (Esquema 3.12). En condiciones habituales de bromación, los rendimientos para **7b** eran muy bajos a temperatura ambiente, por lo que sobre estas condiciones se modificó el número de equivalentes de NBS, el tiempo y la temperatura (Tabla 3.3). Se observó que el resultado era sensible a las condiciones de reacción y al método de aislamiento. El principal problema encontrado fue la desprotección del grupo tetrahidropirranilo, tanto durante la reacción o durante el aislamiento de la misma. Así, se aisló una mezcla diversa de productos en los distintos experimentos realizados. Los compuestos más comúnmente aislados fueron el producto bromado en C4 **7b** y su derivado desprotegido **30**, así como también el producto de partida **7a** y su derivado desprotegido **26**. También se identificaron los productos de bromación en C5 **31** y dihalogenación **7c** en cantidades traza.



Esquema 3.12

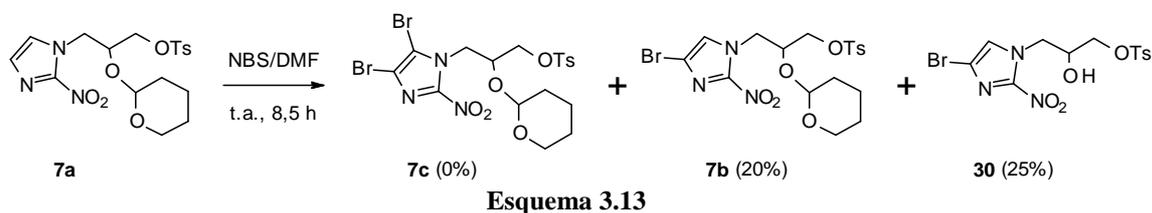
Tabla 3.3. Optimización de la bromación de **7a** con NBS.

Entrada	Disolvente	NBS (eq.)	t(h)	T(°C)	Rto.7b (%)
1	DMF	1.1	72	t.a	2
2	DMF	1.5	24	10	28
3	DMF	2	19	t.a	0
4	DMF	2	24	0	5
5	DMF	2	17	10	67
6	DCM	2	48	10	0

Cuando la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente el rendimiento de **7b** fue muy bajo (entradas 1 y 3), probablemente debido a que según se va formando **7b**, este se desprotege para dar **30**. Hay que tener en cuenta que aunque en todas las reacciones se utilizó NBS recientemente recristalizada y, por lo tanto, libre de trazas de HBr, sin embargo, no se puede descartar la formación de Br₂ y en consecuencia, de HBr que podría conducir a la desprotección del grupo THP. Por otro lado, a 0 °C la reacción es muy lenta y apenas hay conversión de **7a** (entrada 4). Cuando el disolvente utilizado es cloruro de metileno, no hay reacción (entrada 6). Los mejores resultados se obtienen al realizar la reacción a 10 °C (entrada 5), aislándose únicamente **7a** y **7b** con mejores resultados al aumentar el número de equivalentes. Además, observamos que es necesario llevar a cabo el aislamiento de la reacción mediante extracción con un disolvente volátil para que la evaporación de disolventes pueda hacerse a temperatura ambiente, evitando así la desprotección del producto de reacción observada cuando se evapora directamente el disolvente de la reacción (DMF). Aun así, parte del producto se desprotege para dar **30**. Por otro lado, se llevaron a cabo algunas modificaciones del método de aislamiento, como la adición de una solución saturada de NaHCO₃ para neutralizar las posibles trazas de ácido pero no se consiguieron mejores resultados.

3.6.1.2. Síntesis de 7c

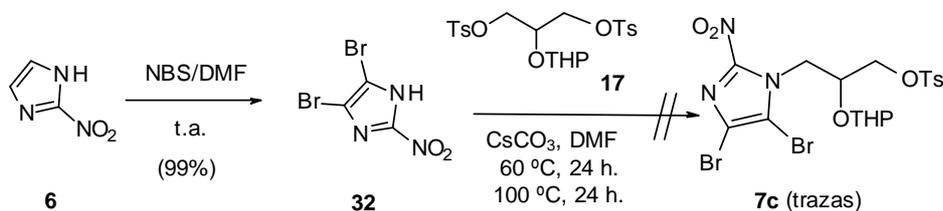
Con la finalidad de generar otro análogo del precursor **7a** de FMISO, y tras el estudio de bromación que habíamos llevado a cabo, se pensó en la preparación de **7c**, aumentando el número de equivalentes de NBS. Sin embargo, para nuestra sorpresa, cuando aumentamos los equivalentes de NBS (3 eq.) durante 8,5 horas a temperatura ambiente, se aisló solamente producto monobromado **7b** y su derivado desprotegido **30** (Esquema 3.13). Cuando disminuimos la temperatura (10 °C) y aumentamos la cantidad de NBS (4 eq.) solo se observó **7c** en cantidades traza por HPLC-MS. Este resultado podría justificarse en base a la sustitución muy impedida en la posición C5 tanto por efecto electrónico electroattractor del grupo nitro y el átomo de Br como por el intenso efecto estérico de los dos sustituyentes voluminosos en las posiciones C4 y N1. De hecho, Palmer y *col.*¹²⁹ describen la formación cuantitativa de 4,5-dibromo-2-nitroimidazol a partir de imidazol y NBS.



Tras el fracaso de esta primera aproximación a la preparación del derivado **7c**, se pensó en una ruta sintética diferente mediante la preparación de 4,5-dibromo-2-nitroimidazol **32** por bromación de 2-nitroimidazol (**6**) con NBS según el método descrito por Palmer y *col.*¹²⁹ A continuación, **32** se trataría con el ditosilato **17** en presencia de Cs₂CO₃ en DMF (Esquema 3.14). Primero, la bromación de **6** con NBS condujo a **32** con un rendimiento cuantitativo, que posteriormente se trató con **17**

¹²⁹ Palmer, B. D.; Denny, W. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1989**, 95-99.

durante 24 horas a 60 °C sin observar la conversión de los materiales de partida. Posteriormente, la temperatura se elevó hasta 100 °C. A las 24 horas se observó la conversión completa de los materiales de partida, pero se aisló una mezcla compleja de reacción en la que fue posible identificar, mediante espectrometría de masas, el producto de reacción **7c** en cantidades traza. Este resultado puede justificarse por la baja nucleofilia del anión imidazolato como consecuencia de la presencia de tres grupos electroattractores en el anillo, así como el mayor impedimento estérico debido a la presencia de dos sustituyentes en las posiciones C2 y C5.

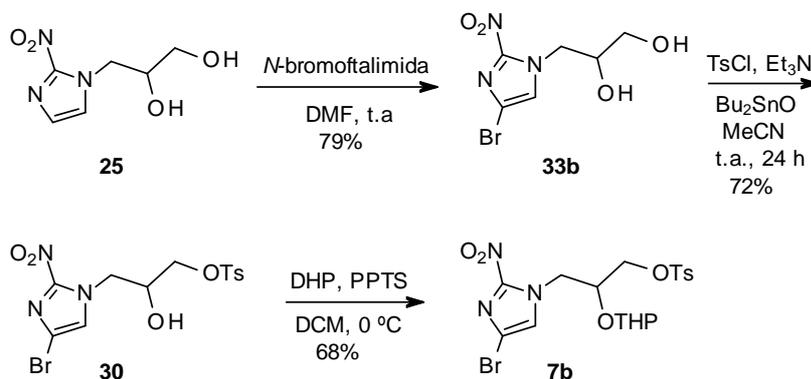


Esquema 3.14

3.6.2. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO a partir de 3-(2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (**25**)

3.6.2.1. Síntesis de **7b**

A pesar del éxito de la reacción de monohalogenación, hay que resaltar la notable inestabilidad de **7b** en disolución o como aceite, que con facilidad se desprotege a **30**, por lo se planteó un cambio de estrategia en la ruta sintética con el fin de evitar la desprotección de **7b** en la etapa de bromación (Esquema 3.15).

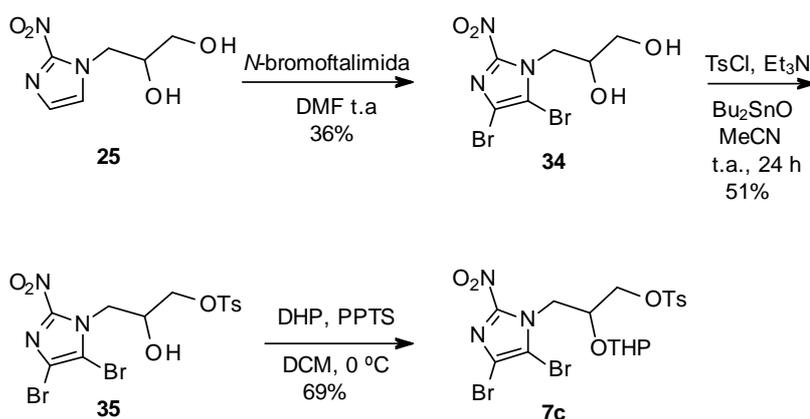


Esquema 3.15

Se llevó a cabo el estudio de bromación del diol **25** con NBS en DMF modificando tanto los equivalentes de NBS, tiempos y temperaturas de reacción. En todos los casos se obtuvo el producto deseado con purezas relativas bajas o medias medidas por HPLC (37-70%), sin embargo, la imposibilidad de separación del producto final y de la succinimida formada, mediante cromatografía en columna con diferentes polaridades nos llevó a cambiar el reactivo utilizado por *N*-bromoftalimida. Cuando se hizo reaccionar el diol **25** con *N*-bromoftalimida (1,4 eq.) se obtuvo el derivado bromado **33b** con un 79% de rendimiento (Esquema 3.16). Posteriormente, la tosilación regioselectiva de **33b** con TsCl catalizada por Bu₂SnO proporcionó **30** con un 72% de rendimiento. La protección de **30** con dihidropirano en DCM catalizado por PPTS condujo a **7b** con buenos rendimientos. A pesar de que el rendimiento global para obtener **7b** según este método es inferior al descrito anteriormente (39% frente a un 49%), cuando seguimos este último procedimiento, en el último paso de reacción se utiliza un disolvente muy volátil, por lo que el aislamiento del producto final es mucho más rápido y permite conseguir el producto en estado sólido fácilmente, evitando largos tiempos de evaporación de disolvente para prevenir su desprotección.

3.6.2.2. Síntesis de 7c

De forma análoga a como se hizo anteriormente, y aumentando el número de equivalentes de *N*-bromoftalimida, se continuó con el propósito de conseguir **7c** según una nueva ruta sintética que supone la dihalogenación del diol **25** (Esquema 3.16).



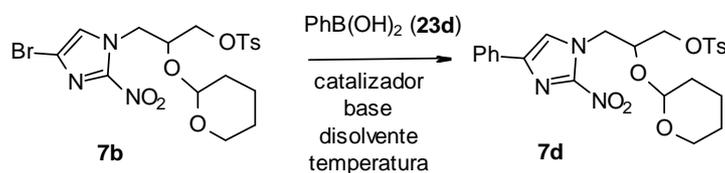
Esquema 3.16

El diol **25** se hizo reaccionar con *N*-bromoftalimida (4 eq.) dando lugar al derivado dibromado **34** con un 36% de rendimiento. A continuación, la tosilación regioselectiva de **34** con TsCl catalizada con Bu₂SnO condujo a **35** con un 51% de rendimiento. Finalmente la protección de este con dihidropirano en DCM proporcionó **7c** con buen rendimiento (69%).

3.6.3. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO por reacción de Suzuki-Miyaura

Uno de los objetivos de este proyecto de Tesis Doctoral es la síntesis de derivados lipófilos de **7a** mediante reacción de acoplamiento C-C entre **7b** y compuestos organometálicos catalizada por paladio. Para abordar este objetivo, inicialmente se llevó a cabo

un estudio de la reacción de Suzuki (Esquema 3.17) mediante la optimización de la reacción entre **7b** y el ácido fenilborónico (**23d**) (Tabla 3.4).



Esquema 3.17

Tabla 3.4. Optimización de la reacción de Suzuki entre **7b** y **23d**.

Entrada	23d (eq.)	Catalizador (% mol)	Disolvente	Aditivo (eq.)	T (°C)	t(h)	Relación (7b:7d) ^a	7d Rto.(%)
1	1.1	Pd(PPh ₃) ₄ (3)	DME	CsF (2,2)	reflujo	18	88:12	3
2	1.5	Pd(PPh ₃) ₄ (5)	Tolueno/ EtOH	K ₂ CO ₃ (10)	reflujo	19	10:90	25
3	1.5	Pd ₂ (dba) ₃ (10)	Tolueno	Na ₃ PO ₄ (3)	100	24	nd ^d	0
4	1.8	Pd(OAc) ₂ (12)	H ₂ O	Na ₂ CO ₃ (3)	120	16	nd	7
5	1.05	Pd(OAc) ₂ (4) ^b	Acetona/H ₂ O	K ₂ CO ₃ (2.5)	65	18	53:47	26
6	2.10	Pd(OAc) ₂ (5)	Acetona/H ₂ O	K ₂ CO ₃ (5)	65	5	36:64	50
7	2.5	Pd(OAc) ₂ (15) ^c	Acetona/H ₂ O	K ₂ CO ₃ (6)	65	41	8:92	69
8 ^e	2.5	Pd(OAc) ₂ (10)	Acetona/H ₂ O	K ₂ CO ₃ (6)	65	17	97:3	nd
9 ^f	2.5	Pd(OAc) ₂ (15)	Acetona/H ₂ O	K ₂ CO ₃ (6)	65	0,16	nd	34

^a Relación relativa por HPLC; ^b Añadido como dos porciones iguales al comienzo de la reacción y después de 17 h; ^c Se añadió una tercera porción de catalizador a las 25 horas; ^d nd. No determinado. ^e Se utilizó feniltrifluoroborato de potasio; ^f Se llevó a cabo por calentamiento con microondas.

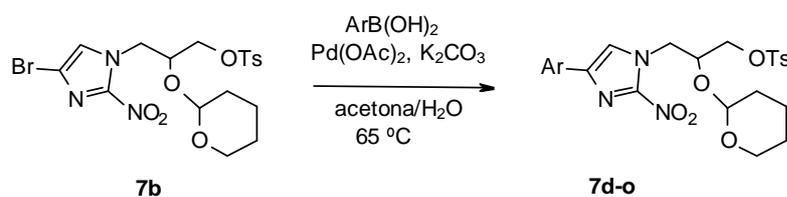
Cuando se realizó la reacción de acoplamiento C-C, en todas las condiciones ensayadas se obtuvo una mezcla de **7b:7d**, así como formación de bifenilo. La utilización de Pd(PPh₃)₄ condujo a un rendimiento mejor en tolueno/EtOH (25%) que

en DME (3%) (entradas 1 y 2). Al modificar el catalizador por Pd₂(dba)₃ no se observó conversión (entrada 3). Debido al bajo rendimiento obtenido, se pensó en modificar las condiciones siguiendo las descritas por Novak y *col.*, quienes encuentran que los catalizadores de paladio libres de fosfinas, como Pd(OAc)₂ o Pd₂(dba)₃·C₆H₆, son notablemente más activos que sistemas catalíticos basados en fosfinas como Pd(PPh₃)₄.¹⁹⁹ La reacción llevada a cabo en agua proporcionó un rendimiento bajo (7%) (entrada 4), pero al cambiar el disolvente de reacción por una mezcla acetona/agua el resultado mejoró notablemente (26%) (entrada 5). El aumento del número de equivalentes de la base, **23d** y catalizador, y del tiempo de reacción, permitió conseguir una relación **7b:7d** (8:92) máxima y un rendimiento mejorado (69%) (entradas 5-7). La utilización del correspondiente trifluorborato condujo a una conversión muy baja (entrada 8). Debido a los largos tiempos empleados para la reacción y a no llegar a la conversión total de **7b** se decidió aplicar un método mediante calentamiento por microondas, y así conseguir en tiempos más cortos, mayores conversiones. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la reacción por calentamiento mediante microondas (10 minutos) el rendimiento obtenido fue peor debido al aumento de subproductos en el crudo de reacción y a una menor conversión en todos los casos (entrada 9).

Una vez optimizada la reacción de Suzuki, las condiciones de reacción se aplicaron a la preparación de una serie de derivados **7d-o** tanto por calentamiento convencional como por microondas (Esquema 3.18; Tabla 3.5). Los rendimientos obtenidos con calefacción convencional varían entre buenos y bajos, mientras que los obtenidos mediante microondas están entre valores medios y bajos. Los ácidos borónicos más nucleófilos reaccionan mejor debido a la presencia de grupos electrodonadores, y esta es la tendencia general observada con el método convencional

¹⁹⁹ Wallow, L. T.; Novak, B. M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5034-5037.

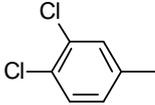
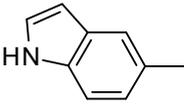
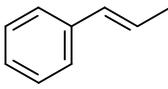
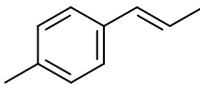
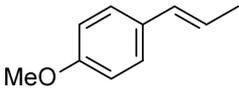
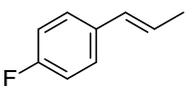
(**7d**, **7f**, **7g** y **7h** vs **7e** y **7j**) y con el método de microondas (**7d**, y **7f-i**, vs **7e** y **7j**). Además, cuando el ácido arilborónico tiene un grupo electrodonador el rendimiento obtenido mediante microondas prácticamente iguala al rendimiento obtenido mediante calentamiento convencional. Aunque esto no se cumple para los estirilderivados **7l-7o**, la variación irregular de rendimientos puede ser debida a su difícil separación del producto de partida **7b**.



Esquema 3.18

Tabla 3.5. Rendimientos obtenidos en la síntesis de **7d-o**.

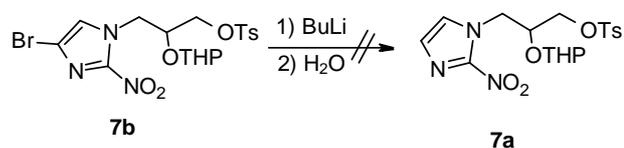
Producto ^a	R	Rto.(%) Método convencional ^b	Rto.(%) Microondas ^c
7d		69	34
7e		55	17
7f		66	65
7g		71	--
7h		68	63
7i		45	44

Producto ^a	R	Rto.(%) Método convencional ^b	Rto.(%) Microondas ^c
7j		50	31
7k		52 ^d	---
7l		---	50
7m		---	7
7n		---	26
7o		---	25

^a Se utilizaron 2,5 eq. de ácido borónico, 15 % mol de Pd(OAc)₂ y como disolvente acetona/H₂O en todas las reacciones. ^b Se llevaron a cabo a 65 °C durante 48 horas; ^c Se llevaron a cabo a 100 °C durante 10 minutos; ^d El compuesto no se caracterizó por ser una mezcla inseparable de **7k** y **7b**.

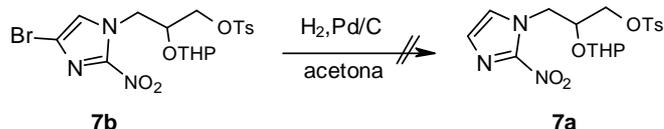
Para solucionar la dificultad de separación mediante cromatografía por columna de los derivados lipófilos y el material de partida **7b** que queda sin reaccionar en las reacciones de Suzuki-Miyaura, se llevó a cabo la reacción de litiación de **7b** con BuLi y posterior hidrólisis para dar **7a**. Luego, esta reacción se aplicaría a las mezclas **7d-o/7b**, para dar mezclas **7d-o/7a**. Sin embargo la reacción no tuvo lugar a temperatura ambiente, observándose solo producto de partida **7b** (Esquema 3.19).²⁰⁰

²⁰⁰ Langhammer, I.; Erker, T. *Heterocycles* **2005**, *65*, 1975-1984.



Esquema 3.19

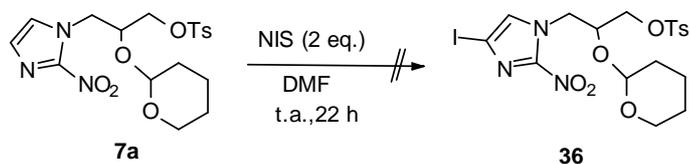
Con el mismo objetivo, se ensayó la reducción del enlace C-Br de **7b** con hidrógeno en presencia de paladio al 5, 10 y 30% sobre carbono. De la misma manera la reacción se aplicaría en las mezclas de **7x/7b** que no presentan grupos reducibles para dar mezclas de **7x/7a**. Estas nuevas mezclas se podrían separar fácilmente por cromatografía en columna por diferencia de polaridad consiguiendo su purificación. La reacción se llevó a cabo utilizando H₂ a 1 atm en acetona (Esquema 3.20)²⁰¹ pero en ningún caso se observó la formación del producto de reacción **7a**.



Esquema 3.20

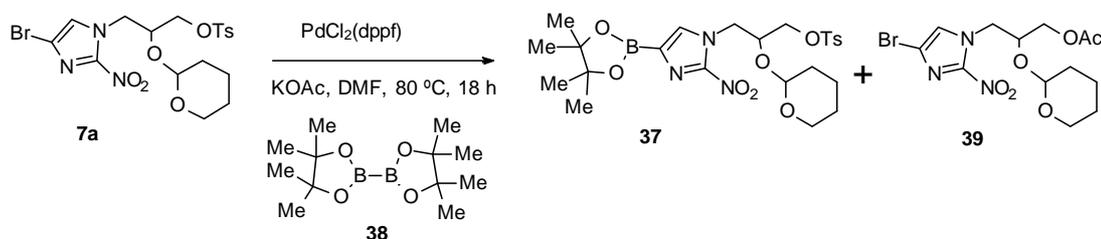
También se llevaron a cabo otras aproximaciones para aumentar la reactividad del derivado halogenado en la reacción de Suzuki. Así se planteó la preparación del yododerivado **36** mediante reacción de **7a** con NIS y así conseguir la conversión completa de este en la reacción de acoplamiento C-C. Sin embargo, no se observó reacción después de 22 horas a temperatura ambiente (Esquema 3.21).

²⁰¹ Li, J. J.; Gribble, G. W. Tetrahedron Organic Chemistry Series; *Palladium in Heterocyclic Chemistry*; Baldwin, J. E.; Willians, R. M.; Eds.; Elsevier Science: Oxford, 2000, Vol. 20, pag. 347-349.



Esquema 3.21

Por último, se intentó la formación del derivado borónico **37** a partir de **7a** y **38** para explorar el acoplamiento de Suzuki inverso. En la reacción solo se aisló el producto de sustitución nucleófila del tosilato por ión acetato **39** (Esquema 3.22).²⁰²



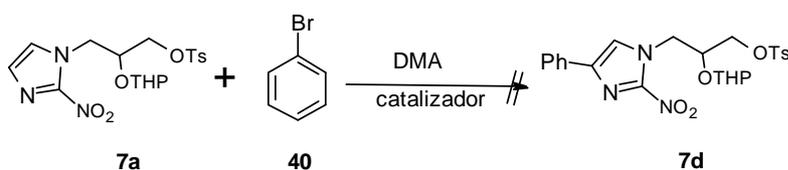
Esquema 3.22

3.6.4. Síntesis de **7d** por arilación directa con bromoarenos

Uno de los problemas encontrados en el aislamiento de la reacción de Suzuki-Miyaura de **7b** con ácidos arilborónicos fue la dificultad de separación del producto de reacción **7d-o** y el material de partida **7b** que quedaba sin reaccionar mediante cromatografía en columna, debido a que ambos compuestos tienen una polaridad muy similar en las distintas condiciones cromatográficas ensayadas. Por ello, se ensayó la arilación mediante activación C-H de **7a** con bromobenceno catalizada por paladio en *N,N*-dimetilacetamida (DMA) de forma convencional y utilizando microondas con

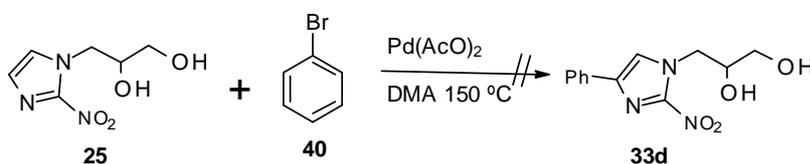
²⁰² Ishiyama, T; Murata, M; Miyaura, N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510.

diferentes temperaturas (100, 150 y 200 °C), tiempos (0,3-20 horas), bases (KOAc, K₂CO₃) y catalizadores (Pd(OAc)₂, PdCl₂(PPh₃)₂) según han descrito Kumar y *col.* (Esquema 3.23).^{155,203} En ningún caso se identificó **7a** ó **7d** en el análisis de HPLC-MS.



Esquema 3.23

Ante la imposibilidad de la formación de **7d** por arilación directa de **7a** con bromobenceno, se investigó otra ruta sintética. Siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior se llevó a cabo esta misma reacción a partir del diol **25**. A pesar de la desaparición de **25** no se observó la formación de **33d**, obteniendo por HPLC-MS productos sin identificar en cantidades traza, lo que nos hizo suponer que **25** se descomponía (Esquema 3.24).



Esquema 3.24

3.6.5. Reacciones de Suzuki por acoplamiento del bromodiol **33b**

Entre los intentos de encontrar condiciones mas adecuadas para la preparación y el aislamiento de los derivados lipófilos de FMISO, se estudió la reacción de Suzuki

¹⁵⁵ Kumar, P. V.; Lin, W. S.; Shen, J. S.; Nandi, D.; Lee, H. M. *Organometallic*, **2011**, *30*, 5160-5169.

²⁰³ Roger, J.; Doucet, H.; *Tetrahedron*. 2009, *65*, 9772-9781.

entre el bromodiol **33b** con el ácido fenilborónico (**23d**) para obtener el diol **33d** utilizando las mismas condiciones que se utilizaron anteriormente para el precursor bromado **7b** de FMISO tanto de forma convencional como por microondas (Esquema 3.25; Tabla 3.6).¹⁹⁹

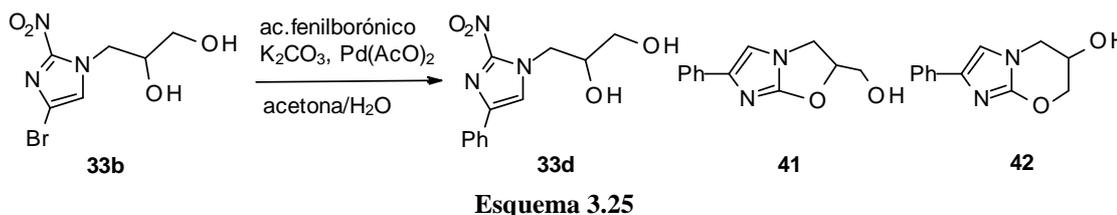


Tabla 3.6. Reacción de Suzuki por acoplamiento de **33b** con ácido fenilborónico (**23d**).

Entrada ^a	Método	T (°C)	Tiempo (h)	33b (%) ^b	33d (%) ^b	41+42 (%) ^b	Rto (%) ^c
1	Microondas	100	0.17	0	90	10	n.d. ^d
2	Microondas	100	0.33	0	90	10	27
3	Microondas	100	0.50	0	84	16	n.d.
4	Convencional	65	24	2	93	5	30
5^e	Convencional	65	56	43	55	2	n.d.

^a Cantidades de productos: ácido fenilborónico (2,5 eq.), K₂CO₃ (6 eq.), Pd(OAc)₂ (0.15 eq.), acetona/H₂O. ^b Relaciones relativas obtenidas por HPLC. ^c Aislado por cromatografía en columna sobre gel de sílice. ^d nd. no determinado. ^e Se utilizó feniltrifluoroborato de potasio en lugar del ácido fenilborónico, PdCl₂(dppf) como catalizador y TBACl en tolueno/agua.

Se observó que cuando se utilizaba microondas como método de calentamiento (Tabla 3.6; entrada 1-3) al aumentar el tiempo de reacción el producto final **33d** se transformaba en los productos de ciclación **41** y **42**. Cuando la reacción se llevó a cabo mediante calentamiento convencional, se alcanzó una mayor formación del producto de acoplamiento **33d** y la formación de subproductos de ciclación disminuía (Entrada 4). Sin embargo, en todos los casos el rendimiento del producto **33d** aislado fue muy bajo

¹⁹⁹ Wallow, T. L.; Novak, B. M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5034-5037.

(27-30%). A continuación, se llevó a cabo la reacción con feniltrifluoroborato de potasio, mediante calentamiento convencional (entradas 5), después de 56 horas la conversión de **33** fue de solo el 57% mediante calentamiento convencional. Se continuó con un estudio mas exhaustivo de la reacción mediante calentamiento con microondas durante 10 minutos con el ácido fenilborónico (**23d**), modificando el catalizador, la base y el disolvente (Esquema 3.26; Tabla 3.6).

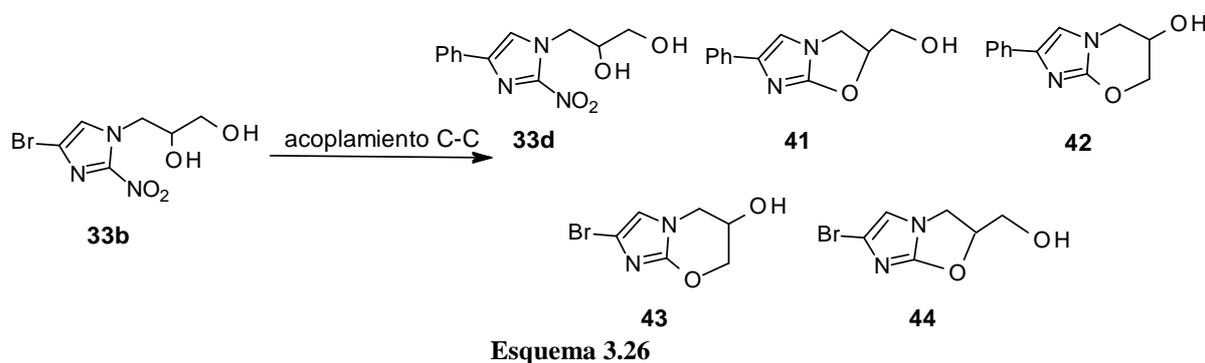


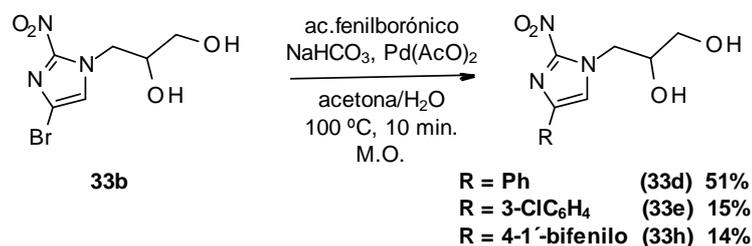
Tabla 3.7. Ensayos de la reacción de Suzuki por microondas.

Entrada ^a	Disolvente	Catalizador	Base	33b (%) ^b	33d (%) ^b	41/42 (%) ^b	43/44 (%) ^b	Rto (%)
1	Acetona/H ₂ O	Pd(dba) ₂	K ₂ CO ₃	0	47	46	7	nd ^c
2	Acetona/H ₂ O	PdCl ₂ (PPh) ₃	K ₂ CO ₃	0	79	21	0	nd
3	Acetona/H ₂ O	PdCl ₂ (Pddf) ₂	K ₂ CO ₃	0	76	24	0	nd
4	Acetona/H ₂ O	Pd(PPh ₃) ₄	K ₂ CO ₃	0	82	18	0	nd
5	Acetona/H ₂ O	Pd(OAc) ₂	K ₂ CO ₃	0	86	14	0	nd
6	Acetona/H ₂ O	Pd(OAc) ₂	TEA	0	97	3	0	44
7	Acetona/H ₂ O	Pd(OAc) ₂	NaHCO ₃	0	95	5	3	51
8	Acetona/H ₂ O	Pd(OAc) ₂	Na ₃ PO ₄	0	85	15	0	nd
9	Acetona/H ₂ O	Pd(OAc) ₂	CsF	5	99	1	0	nd
10	DMF	Pd(OAc) ₂	K ₂ CO ₃	0	94	6	8	nd
11	Tolueno-EtOH	Pd(OAc) ₂	K ₂ CO ₃	0	87	13	10	nd
12^d	DME	Pd(OAc) ₂	K ₂ CO ₃	11	84	5	0	nd
13^e	Acetona/H ₂ O	Pd(OAc) ₂	----	56	41	3	0	36

^a Todos los experimentos se realizaron a escala de 50 mg, a 100 °C, durante 10 minutos con 15% mol de catalizador, 2,5 eq. de ácido borónico y 6 eq. de base; ^b Relaciones relativas por HPLC; ^c nd. no determinado. ^d Se utilizó TBA Cl; ^e Se utilizó feniltrifluoroborato de potasio en lugar del ácido fenilborónico.

La utilización de Pd(OAc)₂ y acetona/H₂O fue la mejor combinación de catalizador/disolvente. Las bases que proporcionaron mejores resultados fueron trietilamina, NaHCO₃ y CsF (Tabla 3.7; entradas 6, 7 y 9). Otros disolventes como DMF, tolueno/EtOH o DME conducen a conversiones menores o mayor formación de productos secundarios (entradas 10-12). Finalmente, la utilización de feniltrifluoroborato de potasio sin base, condujo a tan solo un 44% de conversión de producto de partida (entrada 13). Los crudos de reacción correspondientes a las entradas 6 y 7 se purificaron mediante cromatografía en placa preparativa (entrada 6: 44% rto; entrada 7: 51% rto).

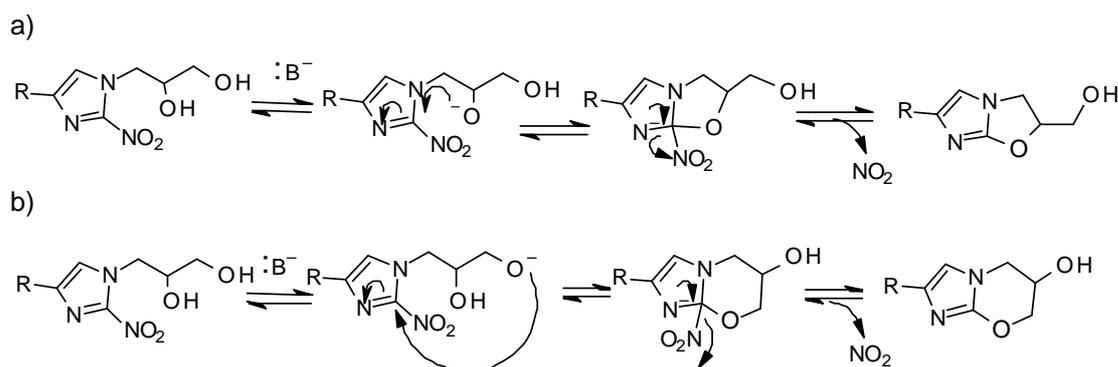
Una vez optimizada la reacción de Suzuki, las mejores condiciones de reacción (entrada 7) se aplicaron a la preparación de los derivados **33e,h** mediante calentamiento por microondas.



Esquema 3.27

Los rendimientos obtenidos con calefacción mediante microondas para los derivados seleccionados fueron muy bajos, no mejorando en ningún caso la síntesis de derivados de FMISO a partir del bromoderivado **7b**, por lo que no se continuó con esta síntesis.

La formación de los compuestos cíclicos se ha descrito anteriormente en la literatura²⁰⁴ y se explicaría a través del mecanismo propuesto en el esquema 3.28. La sustitución nucleófila intramolecular del grupo nitro del nitroimidazol, por el grupo OH de los carbonos C2 y C3 de la cadena alifática, conduce a la formación de un éter cíclico de cinco o seis miembros. La formación preferida de un anillo de 5 átomos se publicó recientemente por Suehiro y col.²⁰⁴ Aunque en este trabajo los autores especulan sobre una preferencia cinética para la formación del anillo de cinco, sin embargo, anteriormente Kim y col.²⁰⁵ describen la formación preferida de un anillo de seis. En este caso, cuando el alcohol primario está desprotegido (y protegido el secundario), se forma el anillo de seis. Pero cuando el alcohol secundario está desprotegido (y protegido el primario), no se forma ningún anillo.



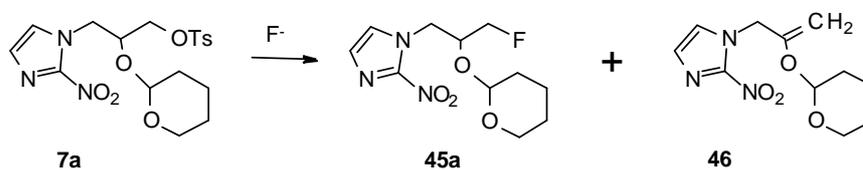
Esquema 3.28. Sustitución intramolecular del grupo nitro a) formación del anillo de cinco b) formación del anillo de seis.

²⁰⁴ Suehiro, M.; Yang, G.; Torchon, G.; Ackerstaff, E.; Humm, J.; Koutcher, J.; Ouerfelli, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2287-2297.

²⁰⁵ Kim, P.; Zhang, L.; Manunatta, U.H.; Singh, R.; Patel, S.; Jiricek, J.; Keller, T.H.; Beshoff, H.I.; Barry, III, C.E.; Dowd, C.S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1317-1328.

3.7. Fluoración de los precursores de FMISO

Teniendo en cuenta que la reacción de fluoración y posterior hidrólisis de los derivados precursores de FMISO son etapas muy importantes desde el punto de vista del proceso radioquímico, se realizó un estudio de la reacción de fluoración de **7a** en frío en diferentes condiciones (Esquema 3.29). Además del producto fluorado **45a**, se identificó también el producto de eliminación **46**. En la tabla 3.8 se recogen las condiciones ensayadas para la fluoración de **7a**.



Esquema 3.29

Tabla 3.8. Estudio de reacción de fluoración.

Entrada ^a	Disolvente	Reactivo	T (min.)	7a ^b	45a ^b	46 ^b
1	MeCN/H ₂ O (bmim)(BF ₄ ⁻)	CsF (5 eq.)	20	47	45	7
			40	21	67	11
			60	14	75	11
			80	8	78	14
			100	3	82	15
			120	1	85	14
2	Alcohol <i>terc</i> -amílico	CsF (3 eq.)	150	2	95	3
3	MeCN	SiO ₂ /TBAF (5 eq.)	210	0	81	19
4	MeCN	PSN(CH ₃) ₃ F (5 eq.)	30	94	5	1
			150	73	25	2
			1440	3	90	7
5	MeCN	CsF (5 eq.)	420	48	37	15
			1440	20	58	22
6 ^c	-----	SiO ₂ /TBAF (7,5 eq.)	10	25	65	10
			15	26	61	13

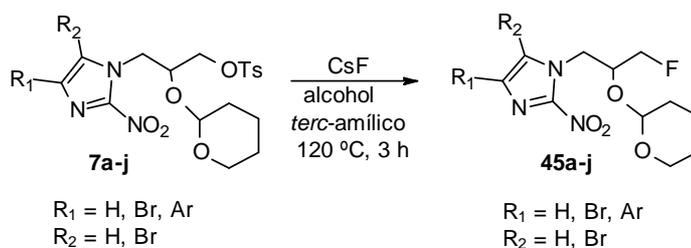
^a Todas las reacciones se llevaron a cabo a 100 °C excepto la entrada 2 (120 °C). ^b Porcentajes relativos por HPLC. ^c La reacción se llevó a cabo en medio seco y calentamiento por microondas.

Las reacciones realizadas proporcionaron en la mayoría de los casos una mezcla de **7a**, **45a** y **46**. Utilizando MeCN como disolvente orgánico, cuando se utilizó un líquido iónico como codisolvente se obtuvieron mejores resultados, consiguiendo en un menor tiempo de reacción la conversión total de **7a** y una menor cantidad de subproducto **46** (entradas 1 y 5). Cuando se llevó a cabo la reacción con TBAF soportado en SiO₂ (entrada 3) se consiguió la conversión completa de **7a** a mayor tiempo de reacción y se obtuvo una mayor cantidad de subproducto **46**. Al utilizar un fluoruro de amonio cuaternario soportado sobre gel de sílice o soportado en una resina de poliestireno (entrada 4) la reacción fue mas lenta, no completándose después de un día de reacción.²⁰⁶ Al cambiar el disolvente por alcohol *terc*-amílico e incrementar la temperatura (entrada 2) la reacción fue mucho mas limpia, obteniendo un mayor porcentaje de **45a** en un tiempo mas corto, disminuyendo la cantidad de subproducto. Según describen Kim y col.,²⁰⁷ la utilización de un alcohol terciario, disolvente prótico, proporciona una mayor actividad catalítica, lo que es sorprendente ya que las reacciones S_N2 son mucho mas eficaces cuando se llevan a cabo en disolventes apróticos. Una segunda ventaja, cuando se usa el alcohol terciario como disolvente es el alto rendimiento del producto final, que es dependiente del catión utilizado (Cs⁺ es mucho mejor que K⁺). Como tercera ventaja, la reactividad del ión haluro (nucleofilía) está invertida respecto a la reactividad de un haluro en disolventes polares típicos (F⁻ es mas reactivo que Br⁻) y por último, el efecto del grupo saliente, parece ser mucho mayor que para la S_N2 convencional, lo que sugiere que algún tipo de interacción entre el grupo saliente y los otros componentes de la reacción (el nucleófilo, catión o disolvente) afecta a la velocidad de reacción.

²⁰⁶ Thompson, L.; Ellman, J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9333-9336.

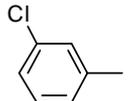
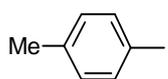
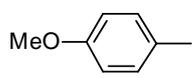
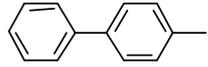
²⁰⁷ Kim, D. W.; Ahn, D.-S.; Oh, Y.-Ho; Lee, S.; Kil, H. S.; Oh, S. J.; Lee, S. J.; Kim, J. S.; Ryu, J. S.; Moon, D. H.; Chi, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16394-16397.

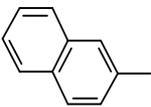
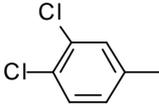
A partir del precursor de FMISO y sus derivados **7b-j**, la sustitución nucleófila de flúor por desplazamiento del grupo tosilo transcurrió con rendimientos buenos a moderados obteniéndose los derivados fluorados **45a-j** (Esquema 3.30, Tabla 3.9).



Esquema 3.30

Tabla 3.9. Rendimientos de los productos fluorados **42a-j**.

Producto	R ₁	R ₂	Rto.(%)
45a	H	H	82 ^a
45b	Br	H	69 ^a
45c	Br	Br	31 ^a
45d		H	85 ^b
45e		H	50 ^b
45f		H	61 ^b
45g		H	62 ^b
45h		H	87 ^a

Producto	R ₁	R ₂	Rto.(%)
45i		H	74 ^b
45j		H	56 ^b

^a Rendimientos aislados por cromatografía en columna. ^b Rendimiento del producto crudo aislado y no purificado.

Los productos **45a, b, c** y **h** se aislaron por cromatografía en columna de gel de sílice. En el resto de los casos se utilizó el producto crudo aislado para ser tratado en la posterior etapa de hidrólisis del grupo tetrahidropiraniolo.

3.8. Hidrólisis de los precursores de FMISO

Por último, el grupo tetrahidropiraniolo se hidrolizó con ácido acético acuoso para dar **1a-j** con rendimientos buenos a moderados (Esquema 3.31; Tabla 3.10).

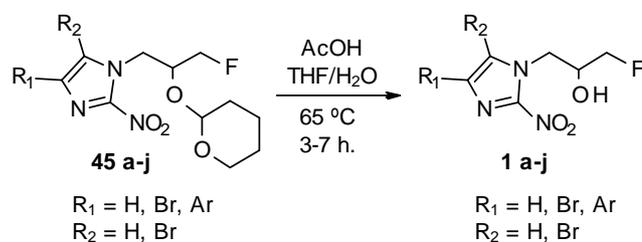
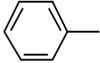
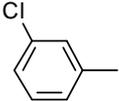
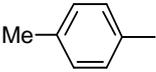
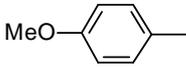
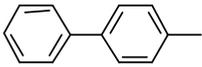
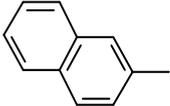
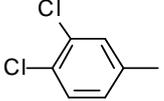


Tabla 3.10. Rendimientos de FMISO y sus análogos **1a-f**.

Producto	R ₁	R ₂	Rto.(%)
1a	H	H	55
1b	Br	H	65

Producto	R ₁	R ₂	Rto.(%)
1c	Br	Br	69
1d		H	61
1e		H	60
1f		H	73
1g		H	76
1h		H	56
1i		H	25
1j		H	59

Se llevó a cabo una comparación del desplazamiento químico de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de los diferentes derivados en comparación con FMISO para el protón *H5* y los carbonos *C2*, *C4* y *C5* del anillo de 2-nitroimidazol (Tabla 3.11). No se encontraron diferencias significativas, observando que para cada uno de ellos las variaciones observadas correlacionan con los desplazamientos tabulados para los sustituyentes bromo y arilo en un anillo de benceno.

Cuando el derivado tiene bromo como sustituyente en la posición C4 del anillo del imidazol, las variaciones observadas ($\delta_{C4} = -13,2$ ppm; $\delta_{C5} = -0,2$ ppm; $\delta_{H5} = +0,09$ ppm) correlacionan bien con las tabuladas para este mismo sustituyente en el anillo de benceno ($\delta_{C4} = -5,8$ ppm; $\delta_{C5} = +3,2$ ppm; $\delta_{H5} = +0,18$ ppm).

Cuando el derivado tiene como sustituyente un grupo fenilo en la posición C4 del anillo del imidazol, los desplazamientos observados ($\delta_{C4} = +13,6$ ppm; $\delta_{C5} = -3,6$ ppm; $\delta_{H5} = +0,30$ ppm), correlacionan bien con los tabulados para este mismo sustituyente en el anillo de benceno ($\delta_{C4} = +13,1$ ppm; $\delta_{C5} = -1,1$ ppm; $\delta_{H5} = +0,37$ ppm).

En cuanto al desplazamiento químico del C5, un sustituyente en C4 no produce ningún efecto (**1b**, $\delta_{C5} = 128,7$ ppm; **1a**, $\delta_{C5} = 128,9$ ppm) por lo que no se observa el efecto mesómero del sustituyente sobre C5. Cuando C5 está también sustituido por bromo se produce un desplazamiento a campos mas altos (**1c**, $\delta_{C5} = 117,7$), lo que se opone al efecto inductivo del bromo. Este desplazamiento a campos mas altos se ha atribuido al elevado volumen atómico del bromo. Por otro lado, los sustituyentes arilo en C4 producen un desplazamiento de C5 a campos mas altos mas atenuado ($\Delta\delta : 3,6-4,6$ ppm) que el átomo de bromo, sin diferencias significativas independientemente del carácter electrónico del sustituyente en el arilo ($\Delta\delta : 1$ ppm), lo que parece indicar la no coplanaridad de los dos anillos.

En cuanto al desplazamiento químico del C4, ya se ha comentado el efecto apantallante que ejerce un átomo de bromo unido al carbono como consecuencia del volumen atómico del halógeno (**1a**, $\delta_{C4} = 127,8$ ppm; **1b**, $\delta_{C4} = 114,6$ ppm; **1c**, $\delta_{C4} = 114,7$ ppm). Sin embargo, los sustituyentes arilo en C4 producen un efecto

desapantallante sobre este carbono ($\Delta\delta$: 7,2-13,6 ppm), que es independiente del carácter electrónico del sustituyente en el anillo ($\Delta\delta$: 6,4 ppm)).

Para el C2 del anillo del nitroimidazol, no se aprecia ningún efecto en el desplazamiento químico por parte del sustituyente en el C4 del anillo, manteniéndose prácticamente constante para los diferentes análogos, debido a que el grupo nitro y el sustituyente en C4 no están conjugados.

Para el desplazamiento químico del hidrógeno H5 se observa en todos los casos un desplazamiento a campos más bajos, más acentuado cuando el sustituyente en C4 es un grupo arilo ($\Delta\delta$: 0,34-0,47 ppm) que cuando es bromo ($\Delta\delta$: 0,09 ppm), y que puede atribuirse al efecto anisotrópico del anillo sobre H5. Grupos arilo con sustituyentes electroattractores producen un efecto anisotrópico ligeramente más intenso (**1j**, δ_{H5} : 7,95 ppm) que aquellos que presentan grupos electrodonadores (**1g**; δ_{H5} : 7,79 ppm).

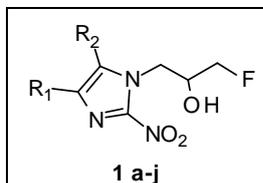
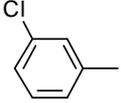
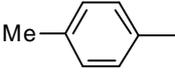
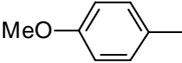
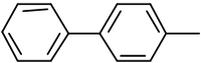
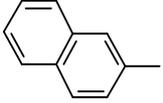
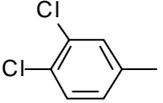


Tabla 3.11. Desplazamientos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en los derivados de FMISO

Producto	R ₁	R ₂	δ H5 (ppm)	δ C2 (ppm)	δ C4 (ppm)	δ C5 (ppm)
1a	H	H	7,48	146,2	127,8	128,9
1b	Br	H	7,57	146,0	114,6	128,7
1c	Br	Br	---	146,3	114,7	117,7

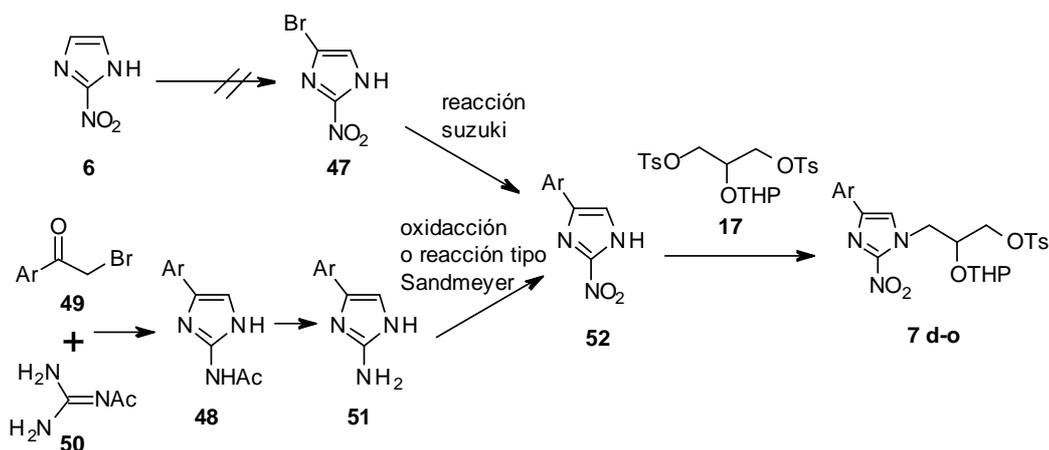
Producto	R ₁	R ₂	δ H5 (ppm)	δ C2 (ppm)	δ C4 (ppm)	δ C5 (ppm)
1d		H	7,87	146,4	141,4	125,3
1e		H	7,94	146,2	139,4	125,5
1f		H	7,82	n.o.	141,3	124,7
1g		H	7,79	146,0	141,3	124,3
1h		H	7,92	n.o. ^a	140,8	125,2
1i		H	7,93	n.o.	135,0	125,5
1j		H	7,95	n.o.	137,0	124,4

^a n.o. no observado.

3.9. Otras alternativas para la síntesis de derivados de 7a

Debido a que las reacciones de acoplamiento de **7b** con ácidos arilborónicos transcurrían con rendimientos de medios a moderados, ya que no se completaban y por la difícil separación mediante cromatografía por columna del producto de partida **7b** y el producto final **7d-o**, nos planteamos otras alternativas para la síntesis de derivados lipófilos de **7a**. La monobromación de **6**, seguida de reacción de acoplamiento C-C con ácidos arilborónicos y posterior alquilación con **17** (Esquema 3.32) no era viable debido

a la imposibilidad de obtener **47** según han descrito Palmer y *col.*,¹²⁹ que llevaron a cabo el estudio de bromación obteniendo solo el producto dibromado, nunca el monobromado **47**.



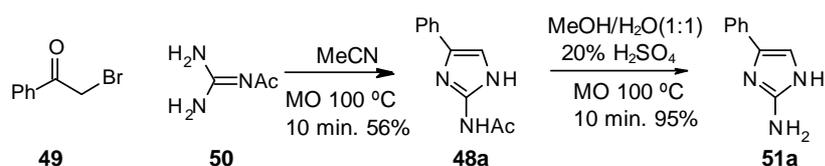
Esquema 3.32

Teniendo en cuenta estos resultados, se planteó otra ruta sintética a través de la preparación del 2-acetilaminoimidazol **48**. Partiendo de bromoacetofenonas (**49**) y *N*-acetilguanidina (**50**) se pueden preparar acetilaminoimidazoles **48**, fácilmente hidrolizables a los aminoimidazoles **51**. Posteriormente, la oxidación o la reacción tipo Sandmeyer debería conducir a la formación del nitroderivado **52** que por alquilación con **17** formaría el producto deseado **7 d-o** como regioisómero mayoritario (Esquema 3.32).

¹²⁹ Palmer, B. D.; Denny, W. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 95-99.

3.9.1. Síntesis de 2-aminoimidazoles sustituidos

Partiendo de bromoacetofenona (**49**) y *N*-acetilguanidina (**50**) se ha preparado el acetilaminoimidazol **48a**, el cual en medio ácido se hidrolizó a la amina **51a** (Esquema 3.33). Ambas reacciones se realizaron por calefacción por microondas según se ha descrito previamente.^{165b} Se llevó a cabo una optimización para la primera etapa (Esquema 3.33). Se modificó tanto el tiempo de reacción, la temperatura y la potencia de irradiación con microondas. Se observó que a mayores tiempos de reacción aumentaba el número de subproductos en el crudo, que no se pudieron identificar por HPLC-MS. También se estudió la formación del acetilaminoimidazol **48a** en diferentes disolventes (Tabla 3.12), con el objetivo de mejorar tanto el rendimiento como de hacer un método mas verde.



Esquema 3.33

Tabla 3.12. Estudio de formación de **48a** con diferentes disolventes.

Entrada ^a	Disolvente	Rto. (%) ^b	Pureza HPLC (%) ^c
1	glicerol	nd ^d	4
2 ^e	PEG-400	nd	85
3	DMF	52	88
4	EtOH	29	61
5 ^e	BMINBF ₄	nd	70

^{165b} Soh, H. C.; Chui, W. K.; Lam, Y. J. *Comb. Chem.* **2008**, *10*, 118-122.

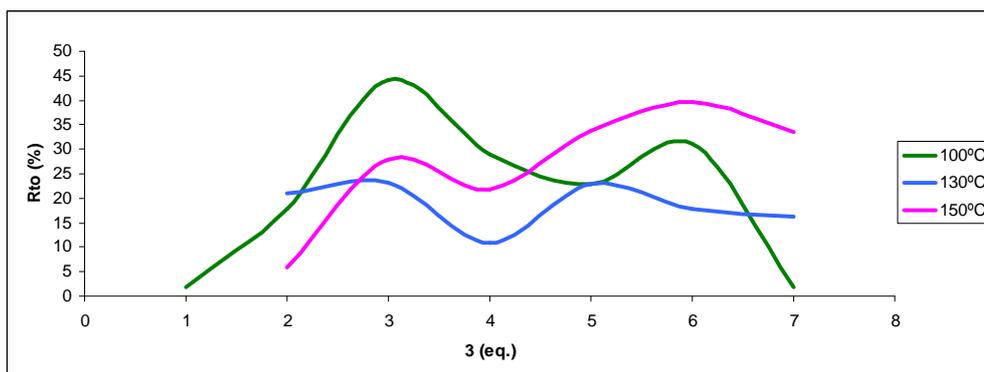
Discusión de Resultados

6	sin disolvente	44	63
7	MeCN	45	90

^a Todas las reacciones se llevaron a cabo a 100 °C, durante 10 minutos, utilizando 3 equivalentes de *N*-acetilguanidina. ^b Rto de **48a** aislado y puro; ^c en el crudo de reacción; ^d nd: no determinado; ^e mezcla inseparable de **48a** y el disolvente.

Las relaciones relativas obtenidas por HPLC-MS fueron buenas en todas las reacciones excepto cuando se utilizó glicerol como disolvente, sin embargo, en algunos casos el producto **48a** no se pudo separar del disolvente cuando se utilizó PEG o un líquido iónico (entradas 2 y 5). Cuando se llevó a cabo el aislamiento en cada caso, los mejores valores de rendimiento aislado de **48a** se encontraron cuando se utilizó DMF, acetonitrilo y cuando la reacción se realizó en ausencia de disolvente (entradas 3, 6 y 7). Como lo que se pretendía era conseguir un método mas verde y la diferencia de rendimiento obtenido con los mejores disolventes era pequeña, se decidió hacer un estudio mas detallado modificando tanto los equivalentes de **50** utilizados como la temperatura para la reacción en ausencia de disolvente.

En la Gráfica 3.1 se muestra la influencia del número de equivalentes de **50** utilizados frente al rendimiento de **48a** a diferentes temperaturas (100, 130 y 150 °C). Los resultados experimentales ponen de manifiesto que los mejores resultados se obtienen cuando la reacción se lleva a cabo a 100 °C utilizando 3 equivalentes de **50**. Al aumentar el número de equivalentes el rendimiento disminuye pero vuelve a alcanzar un segundo máximo al utilizar 6 equivalentes de acetilguanidina (**50**), sin embargo, este no superó al primero. Cuando la reacción se llevó a cabo a 130 y 150 °C (punto de fusión de la mezcla) el comportamiento fue similar pero se obtuvo un menor rendimiento del producto.



Grafica 3.1. Estudio de formación de acetilaminoimidazol en ausencia de disolvente.

Una vez puesta a punto la reacción para la obtención de acetilaminoimidazoles, mediante microondas en medio seco, se extendió el estudio a otras bromoacetofenonas. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 3.4.

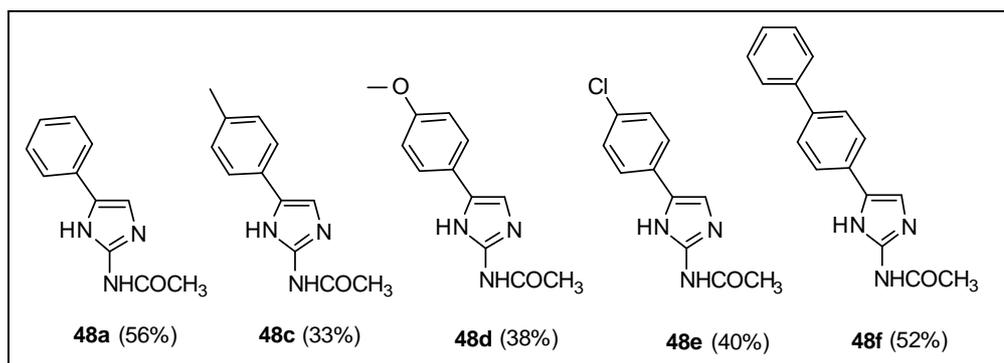


Figura 3.4

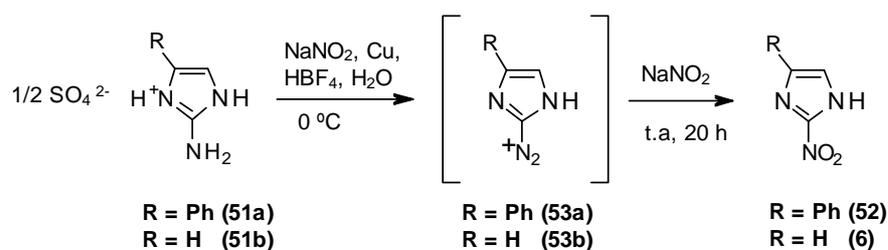
Este método presenta la ventaja de no utilizar un disolvente tóxico como MeCN. Por otro lado, el aislamiento del producto solo necesita de un lavado con agua del producto precipitado.

3.9.2. Estudio de la reactividad de 2-aminoimidazoles 4(5)-aril sustituidos

Las reacciones de oxidación y tipo Sandmeyer para la transformación del grupo amino en un grupo nitro resultaron de gran interés tanto desde el punto de vista de los objetivos de la Tesis (búsqueda de nuevos derivados lipófilos de FMISO) como desde el punto de vista de la reactividad de estos aminoimidazoles ya que se trataba de una reacción no descrita previamente para estos sustratos. Por ello, nos planteamos un estudio de esta reacción.

3.9.2.1. Reacción tipo Sandmeyer

La formación de 2-nitroimidazol (**6**) a partir de 2-aminoimidazol (**51b**) mediante reacción tipo Sandmeyer se describió por Lancini y *col.* en 1965 con un rendimiento del 30% (Esquema 3.34).¹⁷¹ Se llevó a cabo por diazotación del sulfato de **51b** con una disolución de nitrito sódico en ácido tetrafluorbórico diluido, en presencia de cobre en polvo, a 0 °C para dar la sal de diazonio **53b** seguido de la reacción tipo Sandmeyer con un exceso de nitrito sódico a temperatura ambiente.



Esquema 3.34. Diazotación-nitración de **51b** según Lancini y *col.* (Ref. 171).

¹⁷¹ Lancini, G. C.; Lazzari, E. *Experientia* **1965**, *21*, 83.

Cuando se ensayaron estas condiciones para la formación de 4(5)-fenil-2-nitroimidazol (**52**) a partir de sulfato de 4(5)-fenil-2-aminoimidazol (**51a**) (Esquema 3.34), en el análisis de HPLC-MS del crudo de reacción se observaron tres productos mayoritarios **A** (tr = 2,44 minutos; 6%; M: 191,0 g/mol), **B** (tr = 3,70 minutos; 21%; M: 144,0 g/mol) y **C** (tr = 5,85 minutos; 38%; M: 173,2 g/mol) (Figura 3.5). El producto **B** se aisló por cromatografía en columna del crudo de reacción y se caracterizó como **54** (50%) por comparación de sus datos espectroscópicos con los de una muestra comercial (Esquema 3.35).

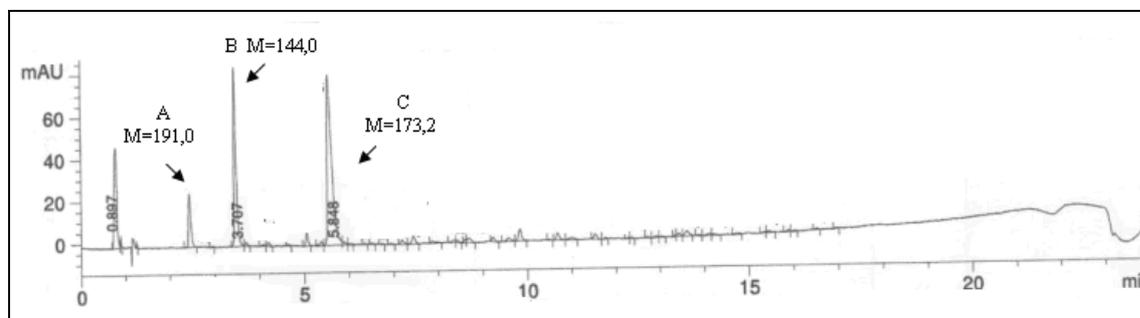
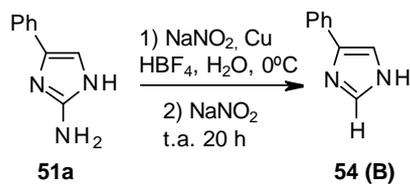


Figura 3.5. Cromatograma del crudo de reacción de diazotación-nitración de **51a** utilizando las condiciones de Lancini (ref. 171).



Esquema 3.35. Formación de **54 (B)** a partir de **51a**.

La descomposición de sales de arenodiazonio es un proceso bien conocido que, aunque su mecanismo no ha sido muy estudiado, se ha propuesto que puede transcurrir

por vía radicalaria y heterolítica.²⁰⁸ Se han utilizado diferentes agentes reductores para este proceso como ácido hipofosfórico, alcoholes y estannito de sodio. Mientras que la reducción con ácido hipofosfórico puede transcurrir mediante un proceso radicalario,²⁰⁹ DeTar y Kosuge sugieren que cuando se utiliza alcohol en presencia de oxígeno el mecanismo de la reacción es heterolítico.^{210,211}

Para la catálisis con Cu (0), la descomposición de la sal de arenodiazonio **53a** mediante un proceso radicalario podría suponer la formación de un complejo con la sal de diazonio (Ec. 1), que en presencia de agua conduce al radical arilo, nitrógeno y al complejo de Cu(I) (Ec. 2).²¹² Finalmente, el radical arilo puede abstraer un radical hidrógeno del disolvente mediante un proceso por el que se genera un radical hidrógeno por captación por parte del ión hidronio de un electrón solvatado procedente de la oxidación del Cu (0) (Ec. 3 y Ec. 4).²¹³



²⁰⁸ Rieker, A.; Niederer, P.; Leibfritz, D. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 49, 4287-90.

²⁰⁹ Kornblum, N.; Cooper, G. D.; Taylor, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 3013-3021.

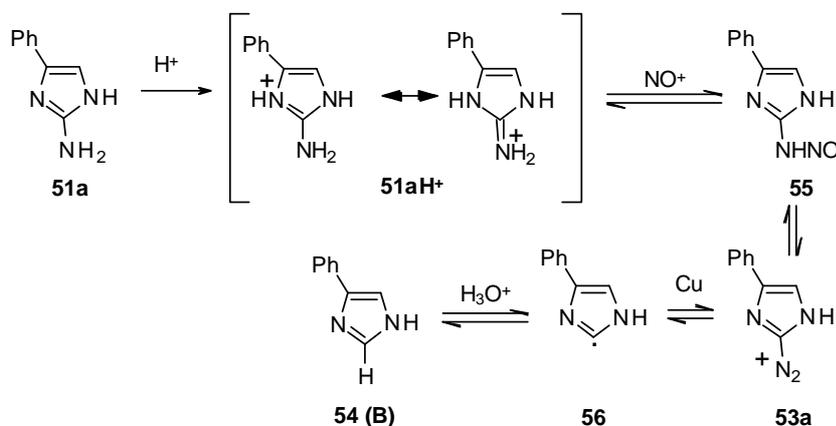
²¹⁰ DeTar, D. F.; Kosuge, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6072-6077.

²¹¹ a) *March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*; 6th ed.; Smith, M. B.; March, J., Ed.; Wiley-Interscience, New Jersey, 2007, cap. 12-14. b) *The Chemistry of Diazonium and Diazo Groups, pt 1,2*; Patai, S. Ed.; Wiley, New York, 1978. c) *The Chemistry of the Amino Group*, Patai, S. Ed.; Wiley, New York, 1968.

²¹² Nonhebel, D. C. *Special Publication-Chem. Soc.* **1970**, 24, 409-437.

²¹³ Ohno, S. I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1966**, 39, 2560.

En nuestro caso, la desaminación de **51a** para dar **54 (B)** mediante descomposición radicalaria de la sal de diazonio **53a** catalizada por cobre (Esquema 3.36) supone la protonación del anillo de imidazolio para dar su ácido conjugado **51aH⁺**. Este experimenta a continuación *N*-nitrosación para dar la nitrosamina **55** y posteriormente conduce a la sal de diazonio **53a** que por catálisis de Cu descompone en el radical **56**. Finalmente, la captura de un hidrógeno del disolvente genera **54 (B)**.



Esquema 3.36. Mecanismo para la formación de **54 (B)**.

A la vista de estos resultados se modificaron las condiciones de reacción según se ha descrito por Agrawal y *col.*, quienes sustituyen el Cu en polvo por una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.¹⁷² Cuando se ensayaron estas condiciones para la formación de 4(5)-fenil-2-nitroimidazol a partir de 2-amino-4(5)-fenilimidazol, el análisis por HPLC-MS del crudo de reacción fue muy similar al obtenido utilizando las condiciones de Lancini y *col.*, con la única diferencia de la aparición de un nuevo producto **D** ($t_r = 4,28$ minutos; 10%; $M = 205,2$ g/mol) (Figura 3.6). En este caso también se aisló **54 (B)** (24%) por cromatografía en columna del crudo de reacción.

¹⁷² Agrawal, K. C.; Bears, K. B.; Sehgal, R. K. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 583-586.

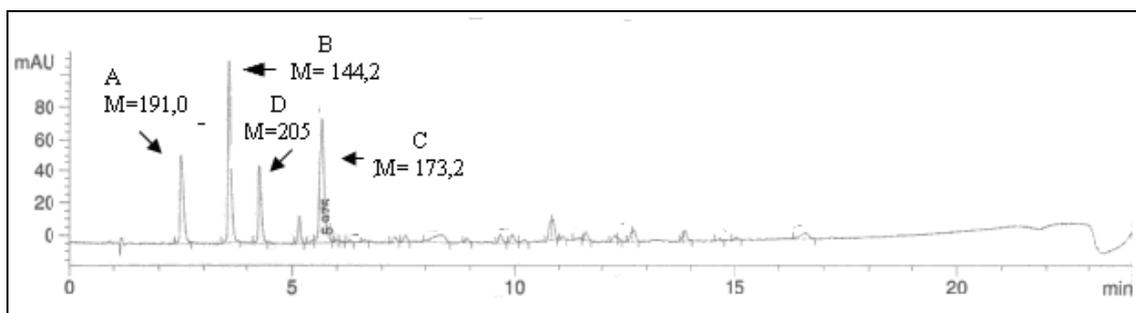
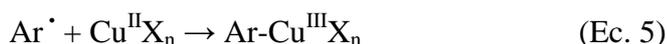


Figura 3.6. Ejemplo de cromatograma del crudo de reacción de diazotación-nitración de **51a** utilizando las condiciones descritas por Agrawal y *col.* (Ref. 172).¹⁷²

Las reacciones de Sandmeyer normalmente se catalizan por sales de Cu(I), pero también se usan sales de Cu(II).²¹⁴ El radical arilo formado reacciona con el complejo de Cu(II) para dar un complejo aril-Cu(III) (Ec. 5) que experimenta eliminación reductiva para dar los productos de Sandmeyer (Ec. 6).



A continuación, se llevó a cabo el estudio de las condiciones de reacción modificando el medio ácido, la cantidad de NaNO₂, el tiempo y la cantidad de Cu(II). En ninguno de los casos se consiguieron las condiciones necesarias para la formación de **52**, sin embargo, **51a** reaccionó completamente para dar otros productos. En los distintos ensayos se encontraron tres productos mayoritarios en el crudo de reacción dependiendo de las condiciones de la misma: **54** (**B**) (M = 144,0 g/mol), **D** (M: 205,2 g/mol) y un nuevo producto **E** (tr = 9,8 minutos; M: 189,0 g/mol), además de los ya mencionados **A** y **C**.

¹⁷² Agrawal, K. C.; Bears, K. B.; Sehgal, R. K. *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 583-586.

²¹⁴ Hanson, P.; Rowell, S. C.; Walton, P. H.; Timms, A. W. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1838-1855.

El compuesto **E** ($M = 189$ g/mol) se aisló por cromatografía en columna. Sin embargo, los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e IR, su masa molecular y su análisis de combustión no coincidían con los esperados para **52**, y tampoco permitieron caracterizar inequívocamente su estructura.

Se llevó a cabo la cristalización de **E** en MeOH para la obtención de cristales aptos para el estudio de difracción de rayos X. Este estudio fue realizado por el Dr. Adrián Pérez Redondo (Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá), con lo que se caracterizó la estructura de 1,2,4-oxadiazol del compuesto **E** (**57**) (Figura 3.7).

Los datos para el estudio de difracción de rayos-X se tomaron a 100K en un difractoro Bruker-Nonius Kappa CCD. Las muestras se extrajeron directamente del vial recubiertas por una capa de un perfluoropoliéter viscoso (Fomblin[®] Y). Con ayuda de un microscopio se seleccionó un monocristal adecuado y, pegado a una fibra de vidrio, se dispuso inmediatamente en el difractoro bajo una corriente de N_2 a baja temperatura.

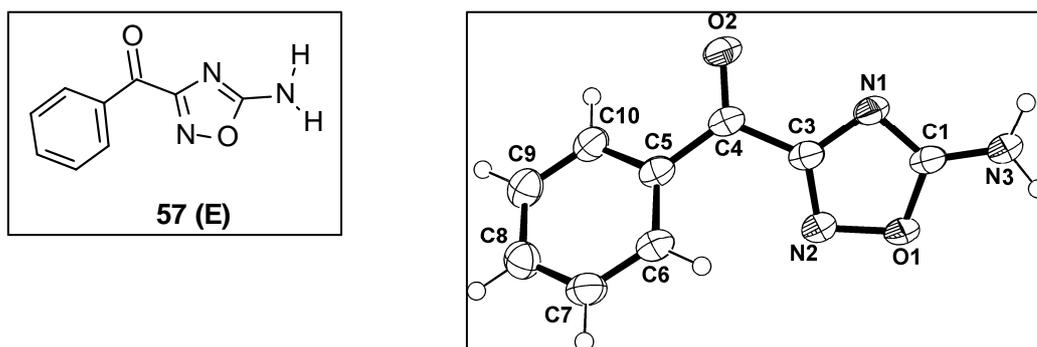


Figura 3.7. Estructura cristalina de **57 (E)**.

En la Tabla 3.13 se muestran algunas distancias y ángulos de enlace, que son coincidentes con los descritos para el anillo de 1,2,4-oxadiazol.²¹⁵

Tabla 3.13. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) para **57 (E)**.

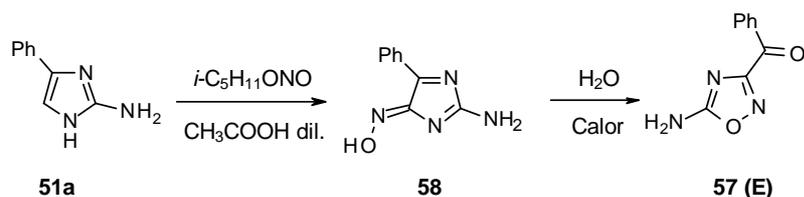
Distancia de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
N(2)-C(3)	1,298(2)	C(3)-N(2)-O(1)	101,91(12)
N(2)-O(1)	1,4284(18)	N(1)-C(1)-N(3)	129,06(14)
C(1)-N(1)	1,311(2)	N(1)-C(1)-O(1)	112,30(14)
C(1)-N(3)	1,319(2)	N(3)-C(1)-O(1)	118,33(13)
C(1)-O(1)	1,3460(19)	C(1)-N(1)-C(3)	102,12(12)
N(1)-C(3)	1,372(2)	O(2)-C(4)-C(5)	122,76(14)
C(4)-O(2)	1,2156(19)	O(2)-C(4)-C(3)	116,71(14)
C(4)-C(5)	1,481(2)	C(5)-C(4)-C(3)	116,71(13)
C(4)-C(3)	1,498(2)	C(10)-C(5)-C(6)	120,53(15)
C(5)-C(10)	1,392(2)	C(10)-C(5)-C(4)	119,06(14)
C(5)-C(6)	1,394(2)	C(6)-C(5)-C(4)	118,24(15)
C(6)-C(7)	1,382(2)	N(2)-C(3)-N(1)	116,48(14)
C(7)-C(8)	1,377(2)	N(2)-C(3)-C(4)	122,80(15)
C(8)-C(9)	1,382(3)	N(1)-C(3)-C(4)	120,68(13)
C(9)-C(10)	1,382(2)	C(1)-O(1)-N(2)	106,89(11)

Una búsqueda detallada en la bibliografía permitió encontrar la preparación de **57 (E)** a partir de **51a** utilizando condiciones de diazotación en medio orgánico como un método de síntesis de 3-acil-5-amino-1,2,4-oxadiazoles a partir de 4(5)-aril-2-aminoimidazoles (Esquema 3.37).^{161, 216} Los autores describen la formación y aislamiento del producto de C-nitrosación en la forma del tautómero **58** por reacción con nitrito de isoamilo en ácido acético y posteriormente el calentamiento de **58** con agua para obtener **57 (E)**. Sin embargo, los autores no describen el curso de la transformación de **58** en **57 (E)**.

²¹⁵ a) Wheeler, W. J.; Deeter, J. B.; Finley, D. R.; Kinnick, M. D.; Koehler, R.; Osborne, H. E.; Ott, J. T.; Swartzendruber, J. K.; Wishka, D. G. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 111-120. b) Webb, R. L.; Eggleston, D. S.; Labaw, C. S.; Lewis, J. J.; Wert, K. *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, *24*, 275-278.

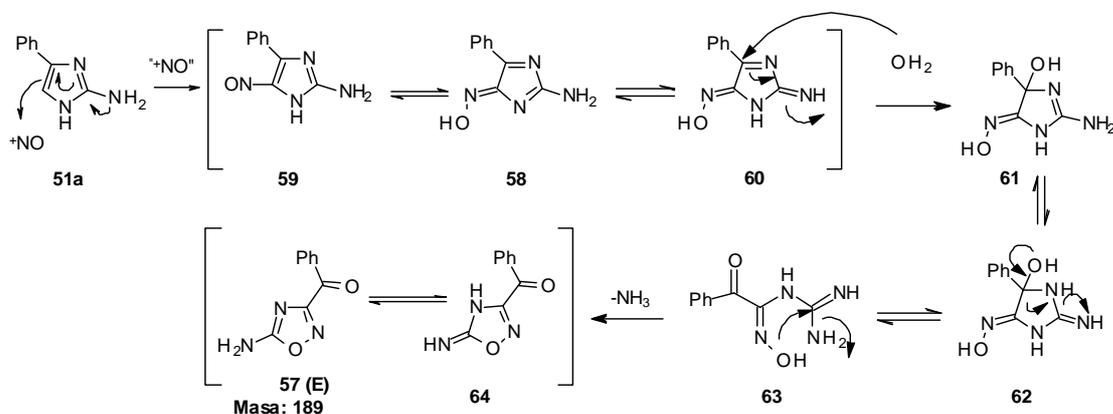
¹⁶¹ Cavalleri, B.; Bellani, P.; Lancini, G. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 357-362.

²¹⁶ a) Cavalleri, B.; Volpe, G.; Rosselli del Turco, B.; Diena, A. *Il Farmaco, Ed. Sc.* **1976**, *31*, 393-403. b) Cusmano, S.; Ruccia, M. *Gazz. Chim. Ital.* **1958**, *85*, 1686. d) Cusmano, S.; Ruccia, M. *Gazz. Chim. Ital.* **1955**, *88*, 463.



Esquema 3.37. Síntesis en dos pasos de 5-amino-3-benzoyl-1,2,4-oxadiazol **57 (E)** a partir de 2-amino-4(5)-fenilimidazol **51a**.

Nuestra propuesta de curso de reacción para la transformación de **51a** en **57 (E)** en medio ácido (Esquema 3.38) supondría la nitrosación en la posición C-5 activada por el grupo amino para dar el nitroso derivado **59**, mas estable en su tautómero oxima **58**, que a su vez puede tautomerizar a **60**. El ataque nucleófilo de la molécula de agua sobre la imina **60** podría generar el intermedio **61** que, a través de su tautómero **62**, experimenta un proceso de apertura de anillo por retrocondensación originando la guanidina **63**. Efectivamente, **63** debe ciclar fácilmente por catálisis ácida con eliminación de amoniaco para dar **64** que isomeriza al tautómero 1,2,4-oxadiazol mas estable **57 (E)**.



Esquema 3.38. Curso de reacción propuesto para la formación del 1,2,4-oxadiazol **57 (E)** a partir de **51a**.

En la Tabla 3.14 se indican los resultados de los ensayos realizados para la reacción de **51a** en condiciones de diazotación-nitración en medio acuoso ácido modificando el pH, el tiempo de reacción y la cantidad de NaNO₂ y de Cu(II).

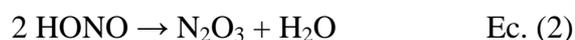
Tabla 3.14. Estudio de diazotación-nitración de **51a**.

Entrada	Método ^a	pH	NaNO ₂ (eq.)	CuSO ₄ (eq.)	t (h)	A (%) ^b	54(B) (%) ^b	C (%) ^b	D (%) ^b	57(E) (%) ^b
1	A	1	20	1	2,5	2	95	0	3	0
2	A	1	20	1	72	3	86	11	0	0
3	A	1	5,6	1	2	4	89	5	2	0
4	A	1	5,6	---	3	11	83	0	7	0
5	A	1	5,6	1	12	0	100	0	0	0
6	A	1	5,6	---	12	6	87	0	3	4
7	B	1,5	5,6	---	1,5	14	70	0	16	0
8	B	1,5	5,6	---	64	13	60	0	27	0
9	C	2	8	16	2,5	15	55	5	8	17
10	C	2	8	16	72	24	63	5	3	5
11	C	2	8	1	3	45	23	28	4	0
12	C	2	8	---	3	40	6	18	0	36
13	D	3	8	1	20	47	1	24	10	18
14	D	3	8	---	6	46	1	0	2	31
15	D	3	8	---	20	32	1	1	10	56
16	E	4,8	5,6	---	2	36	6	11	2	45
17	E	4,8	5,6	---	18	4	5	26	16	49

^a Método A: H₂SO₄/AcOH/H₂O; B: HCl/AcOH/H₂O; C: HNO₃/AcOH/H₂O; D: AcOH/H₂O/HBF₄; E: AcOH/H₂O; ^b Porcentajes relativos por HPLC.

Si atendemos al efecto general de la acidez del medio en el resultado de la reacción (Tabla 3.14), la transformación de **51a** en condiciones de diazotación-nitración parece transcurrir por dos rutas principales. A pH menor que 2 se favorece la formación del producto desaminado **54 (B)** (entradas 1-8), mientras que a pH mayor que 2 se favorece la formación del producto **A** (entradas 13 y 14) y del oxadiazol **57 (E)** (entradas 15-17). A valores de pH igual a 2, el producto mayoritario (**A**, **54 (B)** o **57 (E)**) parece depender de otras condiciones de reacción (entradas 9-12).

El aumento de la acidez del medio debería provocar un aumento de la concentración de ácido nitroso y, por lo tanto, de la concentración de catión nitrosonio, el cual se ha descrito como la especie atacante a acidez alta (Ec. 1).²¹⁷ Por otro lado, se ha descrito que en ácido diluído la especie atacante es N₂O₃, un transportador de catión nitrosonio (Ec. 2). Además, para valores de pH menor que 3 la especie reactiva de una arilamina es la pequeña cantidad de amina libre presente,²¹⁸ la reacción de diazotación es de segundo orden en HNO₂ y, a acidez suficientemente baja, la amina no aparece en la ecuación de velocidad.²¹⁹



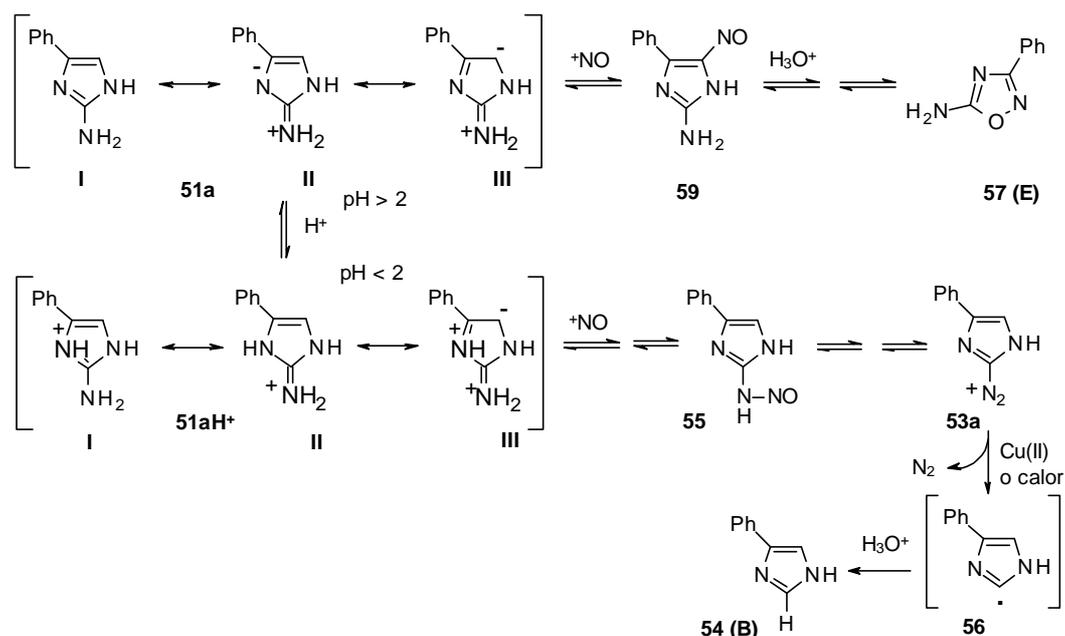
En el caso de 2-aminoimidazol, el aumento de la acidez del medio no afecta al grupo amino, ya que es el nitrógeno *N*-3 más básico el que se protona (Esquema 3.39). A pH suficientemente ácido (pH < 2), **51a** se encuentra mayoritariamente en forma de catión imidazolío (**51aH⁺**), por lo que el anillo aromático se encuentra desactivado para la reacción de S_EAr, especialmente por la baja contribución de la forma resonante **51aH⁺(III)**, y reacciona a través del nitrógeno exocíclico para dar preferentemente la *N*-nitrosamina **55** que posteriormente se transforma en la sal de diazonio **53a**. Esta descompone posteriormente en **54 (B)** a través del radical **56** por efecto térmico o catálisis por Cu(II). Por otro lado, a menor acidez del medio (pH > 2) la concentración de **51a**, aunque baja en el equilibrio, debe ser sensiblemente más alta. Esto unido a la fuerte activación del anillo por el grupo amino como consecuencia de la deslocalización

²¹⁷ Willians, D. L. H. **Nitrosation**; Cambridge University Press, Cambridge, 1988, pag. 84-93.

²¹⁸ a) Challis, B. C.; Ridd, J. H. *J. Chem. Soc.* **1962**, 5197-5203; b) Challis, B. C.; Larkworthy, L. F.; Ridd, J. H. *J. Chem. Soc.* **1962**, 5203-5207; c) Challis, B. C.; Ridd, J. H. *J. Chem. Soc.* **1962**, 5208-5217.

²¹⁹ a) Hughes, E. D.; Ingold, C. K.; Ridd, J. H. *J. Chem. Soc.* **1958**, 58-65, 65-69, 77-82, 88-98; b) Hughes, E. D.; Ridd, J. H. *J. Chem. Soc.* **1958**, 70-76, 82-88.

del par electrónico del nitrógeno exocíclico en la forma resonante **51a(III)**, mas estable que su análoga **51aH⁺(III)**, debe permitir que **51a** reaccione preferentemente mediante S_EAr para dar el producto de C-nitrosación **59**, que posteriormente se transforma en **57 (E)** (Esquema 3.39).



Esquema 3.39. Influencia del pH en el curso de la reacción de diazotación de **51a**.

Cuando el pH es menor que 2 (Tabla 3.14; Métodos A y B; entradas 1-8), **54 (B)** es el producto mayoritario de la reacción y su formación se favorece a tiempos cortos de reacción (entradas 1 vs 2 y 7 vs 8), a pH mas ácido (entradas 4 vs 7), por la presencia de Cu(II) (entradas 3 vs 4 y 5 vs 6) y por un mayor exceso de NaNO₂ (entradas 1 vs 3) (Figura 3.8). Esto está de acuerdo con el curso de reacción propuesto a pH < 2 (Esquema 3.39).

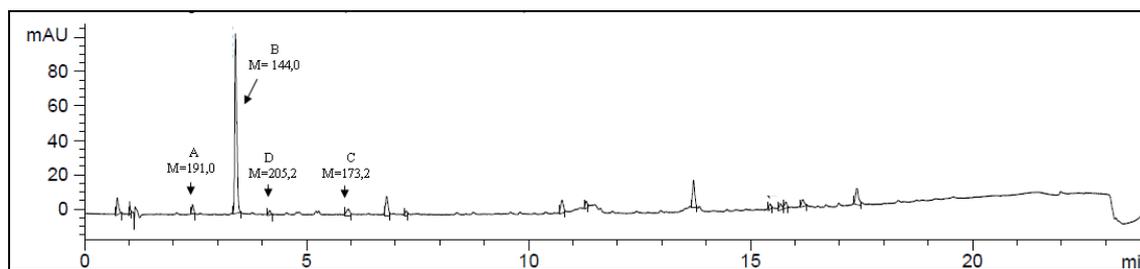


Figura 3.8. Ejemplo de cromatograma del crudo de reacción de diazotación-nitración de **51a** utilizando $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$, NaNO_2 (5,6 eq.), CuSO_4 (1 eq.), 2 horas, t.a. (Tabla 3.14; entrada 3).

Por otro lado, cuando el pH es mayor que 2 (Tabla 3.14; Métodos D y E; entradas 13-17), en ausencia de Cu(II) y a tiempos cortos de reacción, el producto **A** predomina cuando el pH es 3 (entrada 14) (Figura 3.9), mientras que **57 (E)** predomina a tiempos largos de reacción (entrada 15). Sorprendentemente, a tiempos largos de reacción, la presencia de Cu(II) produce un cambio drástico en la proporción de productos, pasando a ser **A** mayoritario (entradas 13 vs 15). Cuando el pH es 4,8 (entradas 16 y 17), **57 (E)** es el producto mayoritario independientemente del tiempo de reacción.

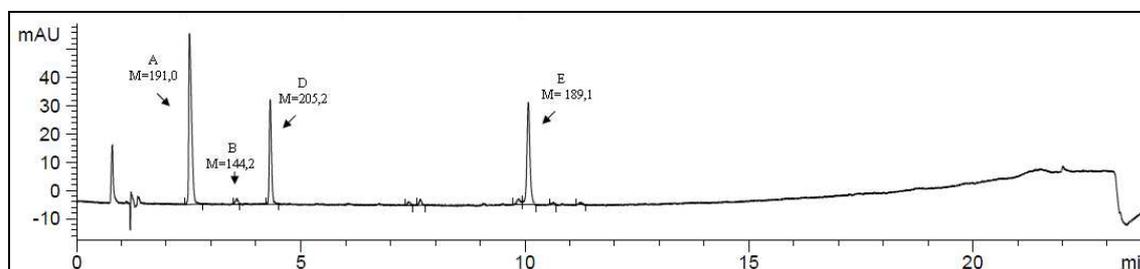


Figura 3.9. Ejemplo de cromatograma del crudo de reacción de diazotación-nitración de **51a** utilizando $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HBF}_4$, NaNO_2 (8 eq.), 6 horas, t.a. (Tabla 3.14; entrada 14).

A pH igual a 2 la acidez del medio deja de ser la principal variable de la reacción y cualquiera de los productos **54 (B)** o **A** puede predominar en función del resto de variables (Tabla 3.14; Método C; entradas 9-12). Parece que un valor 2 de pH es el valor límite en el que la reacción sigue una u otra ruta: *N*-nitrosación o *C*-

nitrosación. Independientemente del tiempo de reacción, el producto desaminado **54 (B)** predomina cuando se utiliza un gran exceso de Cu(II) que favorece la descomposición radicalaria de la sal de diazonio **53a** (Tabla 3.14; entradas 9 y 10; Esquema 3.39). A este valor de pH, la presencia de solo un equivalente de Cu(II) a pesar de favorecer la formación de **54 (B)**, no impide que la reacción siga la ruta de reacción para dar **A** como producto mayoritario (entradas 11 y 12) (Figura 3.10).

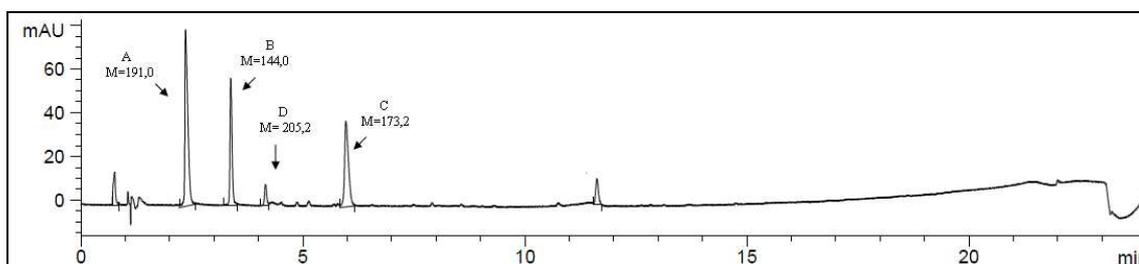


Figura 3.10. Ejemplo de cromatograma del crudo de reacción de diazotación-nitración de **51a** utilizando $\text{HNO}_3/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$, NaNO_2 (8 eq.), CuSO_4 (1 eq.), 3 horas, t.a. (Tabla 3.14; entrada 11).

Se aisló **A** (entrada 13) y se analizó por ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD), observándose un doble doblete a 7,50 ppm (2H, $J_o = 8,0$ Hz; $J_m = 2,1$ Hz) que pueden asignarse a los H_o de un anillo de fenilo conjugado con un enlace $\text{C}=\text{X}$, y un multiplete a 7,33 ppm (3H) correspondientes a los H_m y H_p del anillo (Figura 3.11a). También se aisló **C** y su espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) mostró un doble doblete a 8,01 ppm (2H, $J_o = 7,9$ Hz, $J_m = 1,4$ Hz) que corresponde a los H_o de un anillo de fenilo conjugado con un enlace $\text{C}=\text{X}$, un triplete de tripletes aparente a 7,65 ppm (1H, $J_o = 7,3$ Hz, $J_o = 7,5$ Hz, $J_m = 1,2$ Hz) correspondiente al H_p , y un triplete aparente a 7,55 ppm (2H, $J_o = 7,5$ Hz, $J_o = 7,9$ Hz) correspondiente a los H_m (Figura 3.11c). En ambos casos, se observó una conversión hasta alcanzar un equilibrio **A**:**C** 50:40 que se confirmó por HPLC-MS (API- ES^+) por la presencia de dos picos a los tiempos de retención de **A** (M: 191,0) y **C** (M: 173,2) con una relación **A**:**C** 55:45. El espectro de ^{13}C -RMN (CD_3OD) de esta mezcla muestra para el producto **A** señales para 8 átomos de carbono: 173,4 ppm

(CO₂H), 159,8 ppm (C=N), 135,2 ppm (C_{ipso-Ph}), 130,0 ppm (C_{p-Ph}), 129,3 ppm (C_{o-Ph}) y 127,8 ppm (C_{m-Ph}).

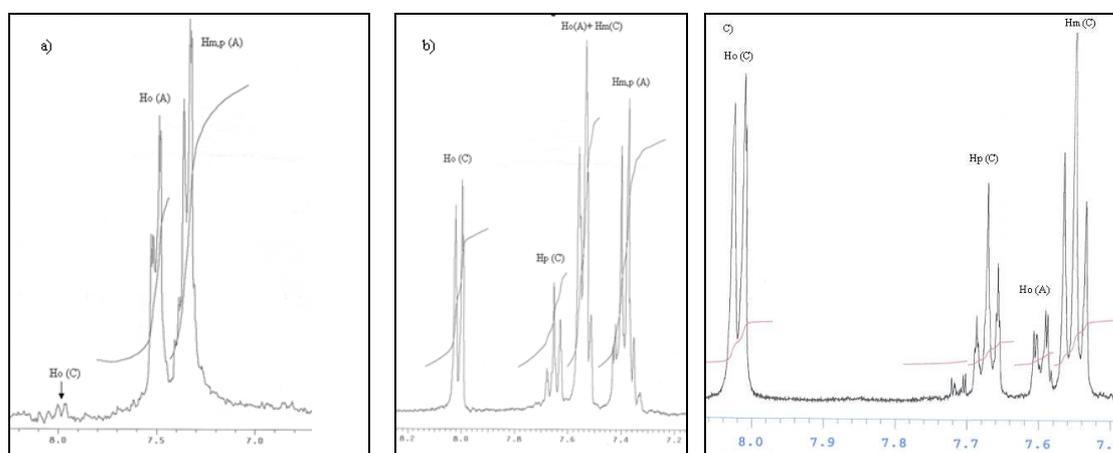
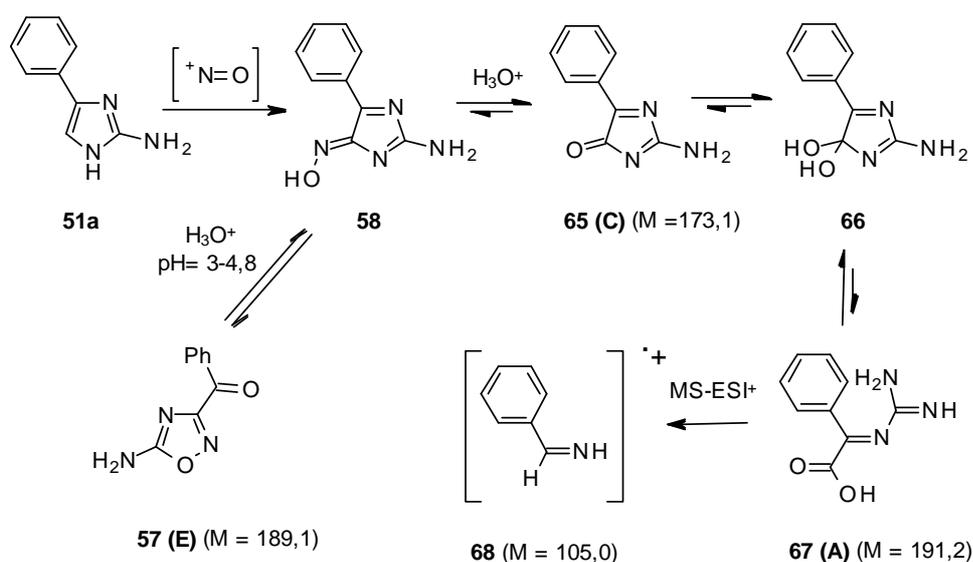


Figura 3.11. Espectros ¹H-RMN, CD₃OD, 300 MHz, 25 °C de: a) **A** recientemente disuelto; b) **A** después de un día en disolución; c) **C** recientemente disuelto.

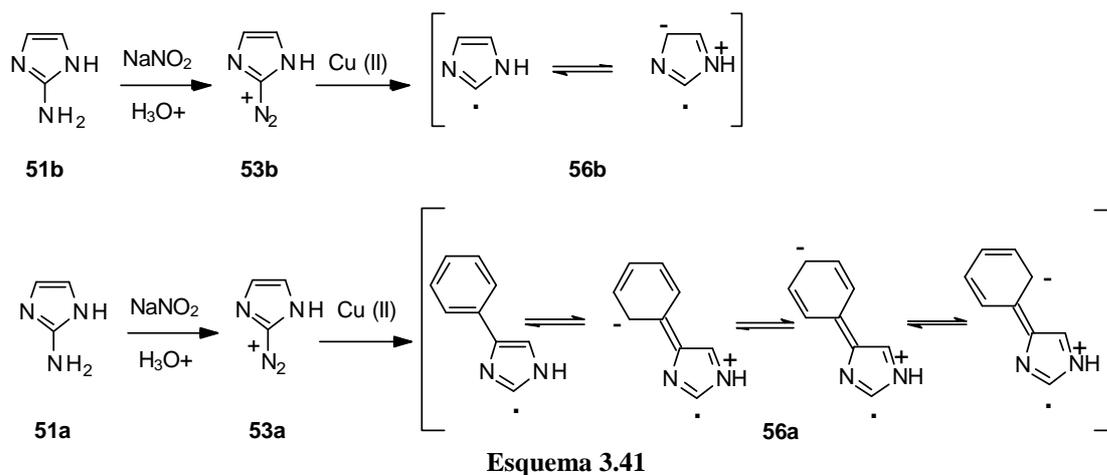
Una mirada mas detallada a la transformación de **51a** en **57 (E)** permite suponer otras reacciones secundarias (Esquema 3.40). El tautómero **58** puede hidrolizarse en el medio ácido de reacción a la 2-amino-4-fenil-4*H*-imidazol-4-ona (**65**) cuya masa molecular coincide con la del producto **C** (M: 173,2). Además, **65** podría hidrolizarse en las condiciones de reacción para conducir al hidrato **66** poco estable, que puede dar lugar al ácido **67** mediante apertura de anillo por retrocondensación, y cuya masa molecular coincide con la del producto **A** (M: 191,0). Esta transformación parece estar de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos a pH ≥ 3 y con los datos de espectroscópicos asignados para **A** y **C**. Que no se observe el carbono del grupo guanidina de **A**, puede explicarse por la pequeña cantidad de muestra y el mayor tiempo de relajación para este carbono. Por otro lado, aunque para las poco frecuentes 4*H*-imidazol-4-onas no se han encontrado datos espectroscópicos, el espectro simulado de ¹³C-RMN para la 2-amino-4*H*-imidazol-4-ona y la 2-amino-4*H*-5-(2-

metilfenil)imidazol-4-ona, estima un valor cercano a 180 ppm para el grupo carbonilo, mientras que para el ácido metiliminofenilacético la estimación es de aproximadamente 170 ppm (CO₂H) y de 157 (C=N). Por lo tanto, parece que **A** tiene la estructura de ácido iminoacético **67**. Además, el espectro de MS-API muestra un fragmento de 105,0 una asignable al ión radical **68**. La estructura de **C** podría ser la de **65** en función de su masa molecular. Para el compuesto **D** no pudo asignarse una estructura.



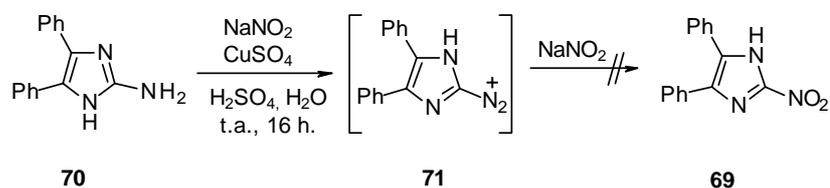
Esquema 3.40. Propuesta de curso de reacción para la formación de **65 (C)** y **67 (A)**.

La diferencia de reactividad observada entre 2-aminoimidazol (**51b**) y 2-amino-4(5)-fenilimidazol (**51a**), en condiciones de diazotación en medio acuoso es obviamente debida a la presencia de grupo fenilo en la posición C-4(5). En el proceso de diazotación, **51a** y **51b** dan lugar a las correspondientes sales de diazonio **53a** y **53b**, las cuales descomponen posteriormente en sus respectivos radicales 2-imidazolilo **56a** y **56b** (Esquema 3.41).



El radical **56a** debe ser menos reactivo debido al efecto electroattractor mas intenso del nitrógeno *N*-1(3) como consecuencia de la mejor deslocalización de su par electrónico en el anillo en *C*-4(5). Por ello, el radical **56a** no reacciona con el óxido de nitrógeno (IV) mientras que el radical **56b** deslocaliza peor el par electrónico del nitrógeno, lo que hace a este radical mas reactivo. Un resultado similar fue observado por Beaman y *col.* que no obtuvieron el 4,5-difenil-2-nitroimidazol (**69**) por diazotación del correspondiente 2-aminoimidazol **70**. Aunque los autores no aislan la sal de diazonio **71**, esta se detectó por UV-VIS (Esquema 3.42).²²⁰

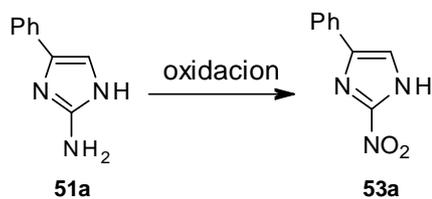
²²⁰ Beaman, A.; Tautz, W.; Gabriel, T.; Keller, O.; Toome, V.; Duschinsky, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1965**, 469-477.



Esquema 3.42. Diazotación de **70** según Beaman y *col.* (Ref. 220).

3.9.2.2. Oxidación

A la vista de estos resultados se llevó a cabo un estudio de la oxidación de **51a** utilizando diferentes oxidantes, catalizadores, disolventes, variando tiempos y temperaturas, así como utilizando tanto calentamiento convencional como mediante microondas (Esquema 3.41; Tabla 3.15). En ninguno de los casos se obtuvo **53a**. Sin embargo, **51a** reaccionó completamente para dar otros productos, excepto en las entradas 4, 5, y 8 en las que la conversión no fue total, ya que **51a** no se disolvió completamente en el medio de reacción debido a su baja solubilidad en el disolvente.



Esquema 3.41

Tabla 3.15. Ensayos de oxidación de 51a.

Entrada	Método ^a	Aditivo	Disolvente	T (°C)	t (h)	51(a) ^b	F ^b	G ^b
1	A	MnSO ₄	H ₂ O	t.a	17	---	---	---
2	A	Na ₂ EDTA NaHCO ₃	MeCN/THF/ DMSO/H ₂ O	5	3	52	--	--
3	B	MnSO ₄	H ₂ O/ acetona	t.a	3	--	--	--
4	B	MnSO ₄	H ₂ O/DCM	t.a	4	27	27	18
5 ^c	B	MnSO ₄	H ₂ O/DCM	t.a	3	--	59	17
6 ^d	C	KI	MeCN	100	0.1	---	---	---
7 ^d	C	--	MeCN	100	0.2	---	19	30
8	C	KI	MeCN	80	15	8	17	--
9	D	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	MeOH/H ₂ O	0	8	--	65	--
10	D	H ₃ (P(Mo ₃ O ₁₀) ₄) Aliquat.336	Tolueno	60	8	--	61	--
11	D	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	MeOH	0	8	--	34	--

^a Método: A: Oxone[®] (monopersulfato de potasio); B: Oxone[®].TBA; C: TBHP ac; D: H₂O₂; ^b porcentajes relativos por HPLC; ^c la reacción se llevó a cabo a partir de la sal de sulfato de 4-fenil-2-aminoimidazol; ^d calentamiento mediante microondas.

En la mayoría de los experimentos se detectó por HPLC-MS un producto mayoritario **F** con tiempo de retención $t_r = 3,23$ minutos (M: 163,0 g/mol). Se detectó también otro producto **G** con menos frecuencia y con un tiempo de retención $t_r = 2,31$ minutos (M: 191,0 g/mol) (Tabla 3.15, Figura 3.12).

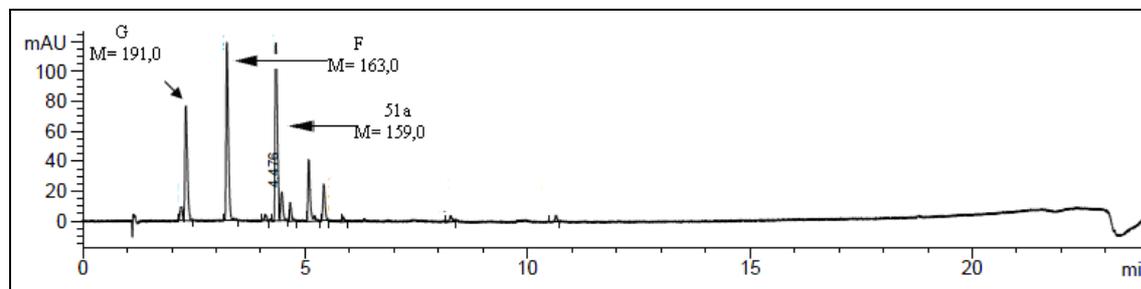


Figura 3.12. Cromatograma del crudo de reacción para la entrada 4, Tabla 3.15.

Se utilizaron tres oxidantes distintos utilizados previamente para la oxidación de anilinas a nitrobenzenos: Oxone[®] (sal de potasio o de tetrabutilamonio)¹⁸⁶, TBHP (hidroperóxido de *tert*-butilo)¹⁸⁸ y H₂O₂ (peróxido de hidrógeno)^{221,187}. Cuando se utiliza Oxone[®] (sal de potasio) como oxidante en presencia de Mn (II) (el manganeso actúa como ácido de Lewis para facilitar la ruptura del enlace O-O)²²² el sistema parece ser demasiado oxidante y se produce la descomposición total o parcial de **51a** a tiempos largos y cortos de reacción (entradas 1 y 2). La utilización de Oxone[®] (sal de tetrabutilamonio) en presencia de Mn (II) parece ser aún muy oxidante en un medio monofásico (entrada 3) pero en medio bifásico la conversión de **51a** es mas controlable para dar **F** y **G** (entrada 4). Curiosamente, la utilización del sulfato de **51a** permite una mayor conversión en el compuesto **F** (entrada 5).

Cuando se utilizó TBHP acuoso en presencia de KI (como catalizador), el medio resultó ser muy oxidante tanto cuando la reacción se aceleró con microondas o no (entrada 6 y 8). La ausencia de KI condujo a la conversión total de **51a** y a la formación de **F** y **G** (entrada 7).

También se utilizó H₂O₂ como oxidante en presencia de heteropoliácidos (ácidos formados por una combinación de hidrógeno y oxígeno con ciertos metales (tungsteno, molibdeno o vanadio) y no metales (silicio, fósforo o arsénico como heteroátomo). Este tipo de ácidos se utilizan con frecuencia como catalizadores. En todos los casos, la

¹⁸⁶ Vázquez, S. A.; Ávila, Z. J. G. *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**, *51*, 213-216.

¹⁸⁸ a) Rajender, R. K.; Uma, M. C.; Venkateshwar, M.; Lakshmi, K. M. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 93-96. b) Rajender, R. K.; Uma, M. C.; Venkateshwar, M.; Lakshmi, K. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3619-3622.

²²¹ Defoin, A. *Synthesis* **2004**, *5*, 706-710.

¹⁸⁷ Tundo, P.; Romanelli, G. P.; Vázquez, P. G.; Loris, A.; Aricó, F. *Sylentt*, **2008**, *7*, 967-970.

²²² Lane, B. S.; Vogt, M.; DeRose, V. J.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11946-11954.

conversión de **51a** fue completa, formándose únicamente el compuesto **F** (entradas 9, 10 y 11).

El compuesto **F** se aisló por cromatografía en columna pero sus datos espectroscópicos ($^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, IR, MS) y su análisis elemental no nos permitieron confirmar la estructura del compuesto. Por ello, se obtuvieron cristales aptos para el estudio de difracción de rayos X que realizó el Dr. Adrián Pérez Redondo (Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá), lo que permitió confirmar la estructura del compuesto **F** (Figura 3.13).

Los datos para el estudio de difracción de rayos-X, como en el caso anterior, se tomaron a 100K en un difractómetro Bruker-Nonius Kappa CCD y las muestras se trataron de la misma forma.

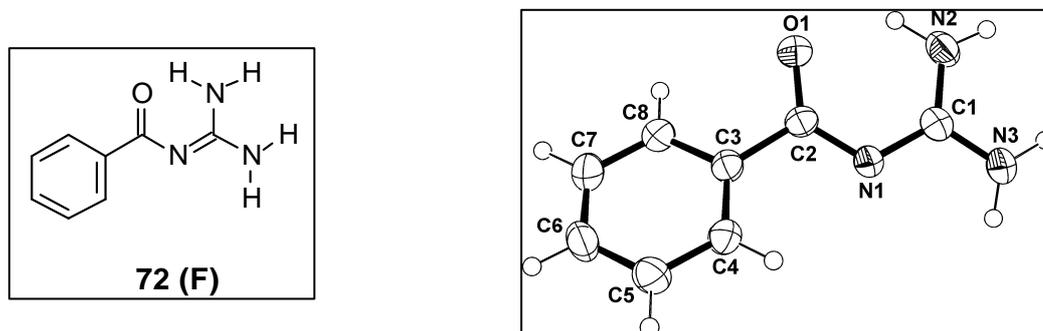


Figura 3.13. Estructura cristalina de **72 (F)**.

En la siguiente tabla se muestran algunas distancias y ángulos de enlace donde se observan distancias del mismo orden a las descritas en la bibliografía para compuestos similares como *N*-aminoiminometil-3-difenilfosfinobenzamida, *N*-

aminoiminometil-6-difenilfosfinil-2-piridinacarboxamida y *N*-aminoiminometil-1*H*-pirrol-2-carboxamida entre otros.²²³

Tabla 3.15. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) para **72**.

Distancia de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
N(3)-C(1)	1,335(2)	N(3)-C(1)-N(2)	118,43(16)
N(2)-C(1)	1,338(2)	N(3)-C(1)-N(1)	116,81(15)
C(1)-N(1)	1,370(2)	N(2)-C(1)-N(1)	124,73(16)
C(2)-O(1)	1,264(2)	O(1)-C(2)-N(1)	126,48(15)
C(2)-N(1)	1,354(2)	N(1)-C(2)-C(3)	116,38(14)
C(2)-C(3)	1,513(2)	C(8)-C(3)-C(4)	118,43(15)
C(3)-C(8)	1,393(2)	C(8)-C(3)-C(2)	119,18(15)
C(3)-C(4)	1,396(2)	C(4)-C(3)-C(2)	122,24(15)
C(4)-C(5)	1,398(3)	C(3)-C(4)-C(5)	122,24 (17)
C(5)-C(6)	1,382(3)	C(6)-C(5)-C(4)	119,98(18)
C(6)-C(7)	1,385(3)	C(5)-C(6)-C(7)	119,57(17)
C(7)-C(8)	1,392(2)	C(6)-C(7)-C(8)	120,68(17)

La unidad “asimétrica” de **72** está constituida por dos moléculas de compuesto que interaccionan entre sí mediante enlaces de hidrógeno (Figura 3.14).

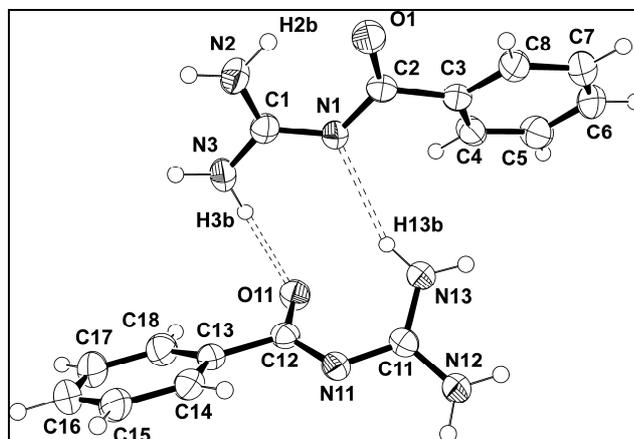


Figura 3.14. Dos moléculas de **72** relacionadas entre sí mediante enlaces de hidrógenos.

²²³ a) Diab, L.; Smejkal, T.; Geier, J.; Breit, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8022-8026. b) Smejkal, T.; Breit, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 311-315. c) Begley, M. J.; Hubberstey, P.; Moore, C. H. *M. J. Chem. Res.* **1985**, *12*, 380-381.

Los parámetros de enlace que caracterizan estas interacciones se recogen en la Tabla 3.17.

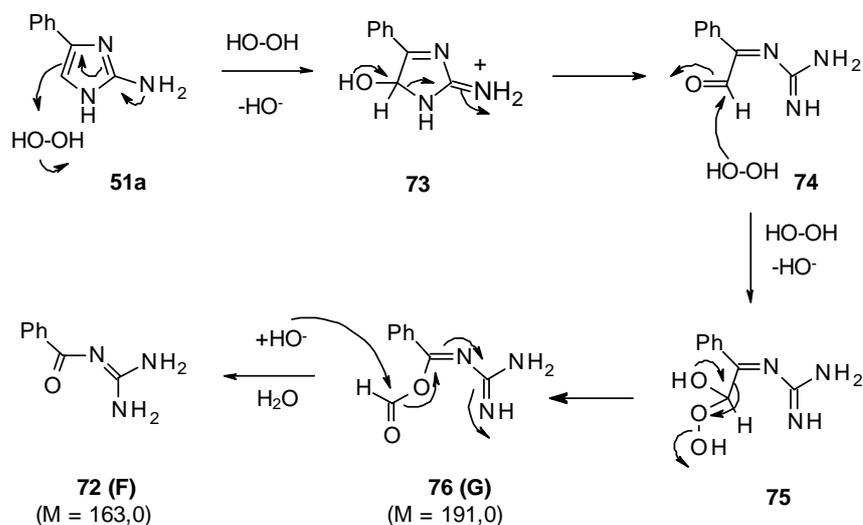
Tabla 3.17. Enlaces de hidrógeno relevantes en el compuesto **72**.

D-H...A	D...A/Å	H...A/Å	D-H...A°
N(2)-H(2B)...O(1)	2.581(2)	1.84(2)	131(2)
N(13)-H(13B)...O(11)	2.792(2)	2.34(2)	111(2)
N(3)-H(3B)...O(11)	2.877(2)	1.97(2)	167(2)
N(13)-H(13B)...N(1)	3.186(2)	2.35(2)	155(2)

A = aceptor de hidrógeno; D = dador de hidrógeno.

Según los resultados obtenidos en los experimentos de oxidación hemos propuesto el siguiente curso de reacción para la formación de **72 (F)** a partir de **51a** en presencia de un oxidante e iones HO^- (Esquema 3.43). El anillo de 2-aminoimidazol, especialmente rico en electrones, reacciona con un electrófilo débil, como un peróxido (Oxone[®], TBHP o H_2O_2) produciéndose la hidroxilación del anillo para dar el intermedio **73** que por apertura del anillo evoluciona al aldehído **74**. Este puede ser oxidado mediante un proceso tipo Baeyer-Villiger al formiato **76**, el cual probablemente puede ser el compuesto **G** identificado por HPLC-MS, vía el intermedio **75**. Finalmente, el medio básico generado puede hidrolizar el formiato **76** a la muy estable benzoilguanidina **72**. Por otro lado, el no aislamiento del formiato **76** puede justificarse por su fácil hidrólisis durante el aislamiento o durante la purificación a través del medio ácido de la gel de sílice. Esto se puede justificar de acuerdo con la bibliografía, que describe que para aminas muy básicas, la reacción con oxidantes como el ácido trifluoroperacético se favorece por ataque del anillo aromático y no del nitrógeno del grupo amino.^{211c}

^{211c} *The Chemistry of the Amino Group*, Patai, S. Ed.; Wiley, New York, 1968.



Esquema 3.43. Curso de reacción propuesto para la formación de **72** a partir de 5-fenil-2-aminoimidazol.

Se ha descrito que los imidazoles son resistentes a la oxidación, pero pueden ser oxidados por peróxido de hidrógeno y perácidos como ácido perbenzoico o peracético. Sin embargo, no se obtiene la *N*-oxidación sino la degradación del anillo hasta la oxamida o urea. Se ha propuesto que la destrucción de derivados de imidazoles oxidados por hidroperóxidos de alquilo es debido a la formación de un radical intermedio por adición de HO· al C-4 del anillo del imidazol.²²⁴

3.10. Estudio de voltimetría cíclica de los derivados de FMISO

La reducción *in vivo* del grupo nitro en nitroimidazoles puede producirse a través de dos rutas diferentes, aeróbica y anaeróbica. Ambas rutas requieren un primer

²²⁴ a) Revuelta, J.; Machetti, F.; Cicchi, S. *Five-Membered Heterocycles: 1,3-Azoles in Modern Heterocyclic Chemistry*; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J.; Barluenga, J. Eds.; Wiley-Vch, Alemania, 2011, Vol. 2. p 842. b) Balasubramanian, P. N.; Sinha, A.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1456-1462. c) Yong, S. H.; Karel, M. *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 568-574.

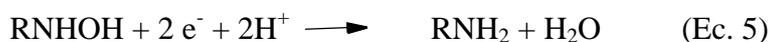
paso caracterizado por la reducción monoelectrónica del grupo nitro a su anión radical (Ec. 1):



Bajo condiciones aeróbicas, el anión radical se reoxida al reaccionar con oxígeno generando el anión-radical superóxido y el nitrocompuesto (Ec. 2):



Bajo condiciones anaeróbicas y en medio prótico, el anión radical puede reducirse sucesivamente produciendo el derivado nitroso, hidroxilamina o amina (Ec. 3-5).²²⁵



Mientras que en condiciones anaeróbicas y medio aprótico, como es en DMF,²²⁶ el grupo nitro se reduce reversiblemente a su anión radical, a un potencial mas negativo se reduce hasta su dianión, estable en ausencia de electrófilos. Este segundo pico de

²²⁵ a) Pacheco-Torres, J.; Perez-Mayoral, E.; Soriano, E.; López-Larrubia, P.; Ouari, O.; González-Cortes, A.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. *Synthesis* **2006**, 3859-3864, b) Carbajo, J.; Bollo, S.; Núñez-Vergara, L.J.; Campero, A.; Squella, J.A. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 531, 187-194. c) Cavalcanti, J. C.M., Oliveira, N.V.; de Moura M.A.B.F.; Fruttero, R.; Bertinaria, M.; Goulart, M.O.F. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 571, 177-182.

²²⁶ Jensen, B. S.; Parker, V, K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1974**, 367.

reducción llega a ser irreversible si hay impurezas en el medio y en algunos casos el anión radical puede dimerizar (Ec. 6).²²⁷



Para elucidar la influencia de la sustitución del anillo de nitroimidazol en el comportamiento electroquímico de los derivados de FMISO (**1a-g**), se llevó a cabo un estudio de voltametría cíclica en medio aprótico ($\text{Bu}_4\text{NBF}_4/\text{DMF}$) con una muestra representativa de los productos sintetizados. El estudio se llevó a cabo con la colaboración de la Dra. María Belén Batanero Hernán (Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá).

En nuestro estudio los derivados se prepararon con una concentración de aproximadamente 4×10^{-3} M utilizando como disolvente-electrolito soporte (SSE, en inglés Supporting Electrolyte) una disolución 0,1 M de Bu_4NBF_4 en DMF. La voltametría cíclica se registró en un pontenciostato VoltaLab PGZ100. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura constante de 25 ± 1 °C en ausencia de oxígeno. Se utilizó un electrodo de carbono vítreo, un electrodo auxiliar de platino y como referencia un electrodo de Ag/Ag^+ (sat.) a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Se eligieron los primeros análogos sintetizados con sustituyentes en C-4 bromo (**1b**), fenilo (**1d**), y fenilo sustituido con grupos electroattractores (**1e**, Cl) y grupos electrodonadores (**1f**, Me; **1g**, OMe), y se compararon con FMISO (**1a**) (Figura 3.15).

²²⁷ a) Lund, H. *Cathodic Reduction of Nitro and Related Compounds in Organic Electrochemistry*; 4th ed.; Lund, H.; Hammerich, O. Eds.; Marcel Dekker, New York, 2001, chapter 9. b) Arguelho, M. L. P. M.; Silva, G. M.; Stradiotto, N. R. *J. Electrochem. Soc.* **2001**, *148*, D1-D3.

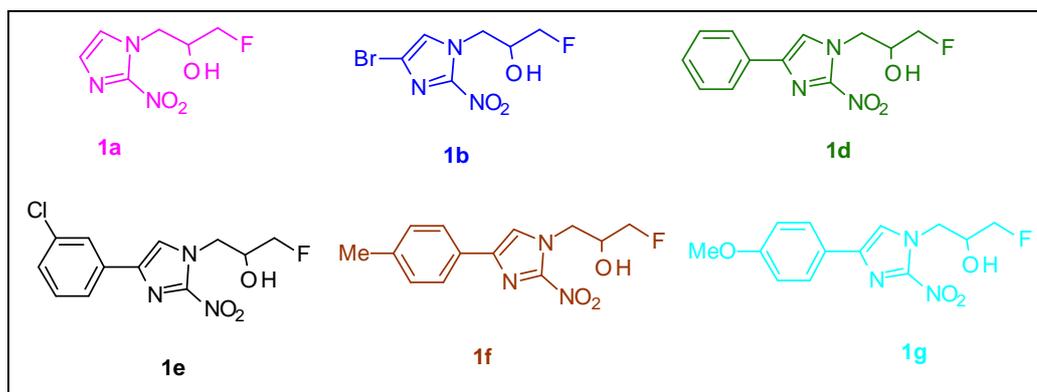
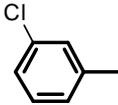
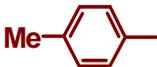


Figura 3.15

En primer lugar se añadieron 20 mL de SSE en la cubeta, se colocaron los electrodos en contacto con la disolución, se hizo pasar una corriente de argón durante 15 minutos y se realizó un barrido de SSE. A continuación, se añadió el sustrato electroactivo y se hizo pasar otra corriente de argón durante 15 minutos asegurando que no quedara oxígeno en la célula. Por último, se realizó un barrido en ciclos de 0 a -2,5 V y de -2,5 a 0 V obteniéndose los voltagramas de cada derivado (Tabla 3.18; Gráfico 3.2).

Tabla 3.18. Potenciales de pico de los derivados **1a**, **1b**, **1d-g** vs Ag/Ag⁺ en DMF/TBABF₄.

Producto	R	C (x10 ⁻³ M)	E _{pc1} (V)	E _{pc2} (V)	E _{pa1} (V)
1a	H	4.5	-1.04	-1.97	-0.97
1b	Br	3.7	-0.89	-1.64	-0.82
1d		3.7	-0.98	-1.64	-0.90
1e		3.3	-0.95	-1.60	-0.86
1f		3.6	-0.98	-1.77	-0.93
1g		3.4	-0.98	-1.64	-0.90

E_{pc1}: potencial catódico en el pico 1; E_{pc2}: potencial catódico en el pico 2; E_{pa1}: potencial anódico pico 1.

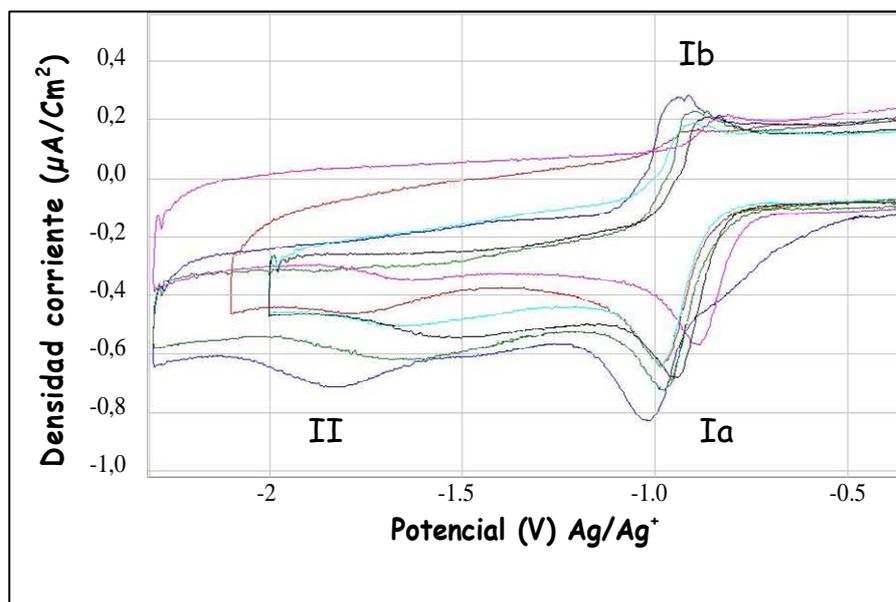


Gráfico 3.2. Voltametría cíclica de **1a**, **1b**, **1d-g** en 0,1M Bu₄NBF₄/DMF. Velocidad de barrido 100mV/s. Electrodo: carbón vidriado/platino.

En la reducción en medio aprótico, se observó para todos los derivados un primer pico de reducción reversible (Ia) correspondiente a la reducción del grupo nitro a su anión radical ($R-NO_2 \rightarrow R-NO_2^{\cdot-}$), un pico (Ib) correspondiente a la oxidación del anión nitro radical a grupo nitro ($R-NO_2^{\cdot-} \rightarrow R-NO_2$), y un segundo pico de reducción irreversible (II) que corresponde a la reducción del anión nitro radical al dianión ($R-NO_2^{\cdot-} \rightarrow R-NO_2^{2-}$).

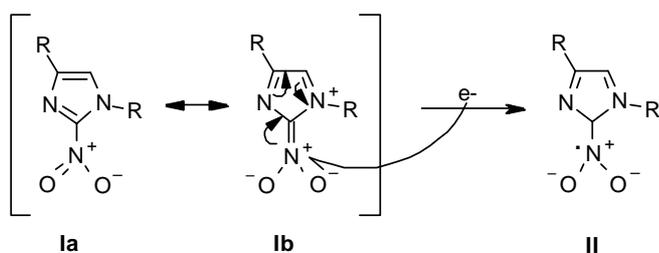
Los valores de potencial de reducción aumentan (se hacen mas catódicos, mas negativos) en el siguiente orden:

Pico I: **1b** (Br) < **1e** (3-ClC₆H₄) < **1g** (4-MeOC₆H₄) = **1d** (C₆H₅) = **1f** (4-MeC₆H₄) < **1a** (H). Todos los derivados (**1b-g**) se reducen mas fácilmente que FMISO (**1a**) a su correspondiente anión radical.

Pico II: **1e** (3-ClC₆H₄) < **1b** (Br) = **1g** (4-MeOC₆H₄) = **1d** (C₆H₅) < **1f** (4-MeC₆H₄) < **1a** (H). Todos los derivados (**1b-g**) se reducen mas fácilmente que FMISO (**1a**) desde su anión radical a su correspondiente dianión.

Puesto que todos los análogos resultaron ser mas fácilmente reducibles, la presencia de un átomo de halógeno o un grupo fenilo en el átomo de carbono C4 del anillo de imidazol les convierte en mejores sondas de hipoxia desde el punto de vista del proceso redox. Por otro lado, parece haber una cierta correlación entre la facilidad de reducción y el carácter electrónico del sustituyente R en la posición C4 del anillo de nitroimidazol. La presencia de grupos electroattractores favorece la reducción (Br) y (3-ClC₆H₄). Una posible explicación a este efecto sería la mayor importancia de la forma resonante Ib del nitroimidazol cuando el grupo R está conjugado (Br, Ar) que cuando no

lo está (R=H). Además, si R es electroatractor el átomo de nitrógeno exocíclico es más electrófilo y aceptará un electrón con más facilidad para dar el anión radical II. (Esquema 3.44).



Esquema 3.44. Reducción mono-electrónica del grupo nitro a su anión radical.

3.11. Toxicidad de los derivados de FMISO

Uno de nuestros objetivos para la realización de este proyecto fue la síntesis de nuevos precursores lipófilos de FMISO con el objetivo de encontrar un candidato a radiotrazador para imagen por PET, más selectivo y menos tóxico que [¹⁸F]-FMISO como agente marcador de hipoxia en tejido cerebral. Por ello, una vez sintetizada una serie representativa de análogos con sustituyentes en la posición C-4, bromo (**1b**), fenilo (**1d**), y fenilo sustituido con un grupo electroatractor (**1e**, Cl) y uno electrodonador (**1g**, OMe), se hicieron ensayos *in vitro* de viabilidad/mortalidad para estudiar y comparar su toxicidad con FMISO (Figura 3.16).

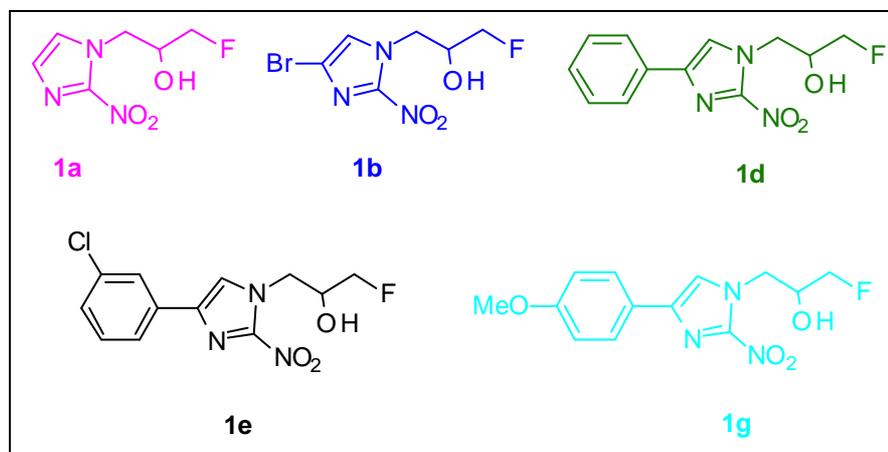


Figura 3.16

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo en cultivos primarios de células corticales de rata (neuronales y mixtos) por el grupo de investigación del Dr. Ignacio Lizasoain en la Unidad de Investigación Neurovascular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Para la preparación de los cultivos primarios de neuronas corticales de rata se utilizaron cerebros de rata Wistar en el día embrionario 16 (E16) a los que se extrajeron las cortezas. Estas se disociaron mecánicamente en un medio de incubación básico (MEM, *Eagle's Minimum Essential Medium*) suplementado con glucosa (33 mM), glutamina (2 mM), gentamicina (16 mg/L), suero de caballo (HS, 10%) y suero bovino fetal (SFB, 10%) (*medio de cultivo*). Una vez disociadas, las células se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/cm³ en placas de 24 pocillos previamente tratadas con poli-L-lisina (Aldrich) para facilitar su adhesión. Las placas se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂. En el día 4 de cultivo *in vitro* se cambió el medio por *medio de crecimiento* que tiene la misma composición que

el medio de cultivo pero sin suero fetal. Los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo entre los días 7-9.

Para la preparación de los cultivos primarios mixtos (neuronas y astrocitos) se utilizaron cerebros de rata Wistar en el día embrionario 18 (E18) que se trataron exactamente igual que en el caso anterior. Para evitar la interferencia en la lectura de la lactato deshidrogenasa (LDH) con el suero, se usó Neurobasal con 2% de B27 y 0,5M de L-glutamina.

Utilizamos dos métodos para medir la toxicidad de los derivados en el cultivo: la cuantificación de la LDH y el ensayo de MTT.

El ensayo del MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este proceso es realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabolitamente activas, la cual transforma al MTT de un compuesto hidrofílico de color amarillo a un compuesto azul, hidrofóbico (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.²²⁸ La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular así como para determinar la citotoxicidad de potenciales agentes terapéuticos.

Dos horas antes de finalizar el experimento con la incubación de los fármacos, se añadió al cultivo celular la solución de MTT (Aldrich, M2128) a una concentración final de 0,5 mg/mL. Después de 2 horas de incubación a 37 °C se retiró el medio y se

²²⁸ Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63. Cole, S. P. C. *Cancer Chemoth. Pharm.* **1986**, 17, 259-263. Denizot, F.; Lang, R. *J. Immunol. methods* **1986**, 89, 271-277.

añadieron 500 µL de DMSO para lisar las células y solubilizar el MTT. Se recogieron 100 µL de cada pocillo y se pusieron en una placa de 96 pocillos para su posterior lectura a 540 nm (Thermomax, Molecular Devices). El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{DO células tratadas} / \text{DO células control}) \times 100$$

DO= densidad óptica

Para los ensayos de mortalidad se utilizó el método LDH. La LDH es un enzima citoplasmática que está presente en las células. Cuando las membranas citoplasmáticas sufren algún daño y las células se lisan, se produce la liberación de LDH en el medio de incubación, utilizándose por lo tanto como indicador de muerte celular.²²⁹

La muerte celular se monitorizó después de 24 horas de incubación con los derivados de FMISO midiendo la actividad enzimática de LDH liberada (según kit-protocolo LDH; ROCHE Cat. No. 11 644 793 001) a la solución de incubación²²⁹ como un marcador del daño celular. La LDH intracelular (LDHi) que queda en los cultivos se obtuvo incubando éstos con 1% de Tritón-X100 al final del experimento, durante 30 minutos. La actividad de la LDH liberada o extracelular y la intracelular se midió espectrofotométricamente a 490-600 nm, en un lector de placas (Sunrise Basic , Tecan Austria GmbH) como la absorbancia de la sal de formazán formada.

La LDH liberada en el medio de cultivo (LDH extracelular, o LDHe) se utilizó como un índice de la muerte celular. El porcentaje de muerte celular se calculó como sigue:

²²⁹ a) Koh, J. Y.; Choi, D. W. *J. Neurosci. Methods* **1987**, 20, 83-90. b) Koh, J. Y.; Cotman, C. W. *Brain Res.* **1992**, 587, 233-240.

$$\text{muerte celular (\%)} = \text{LDHe} / (\text{LDHe} + \text{LDHi}) \times 100$$

El procedimiento para evaluar la toxicidad de los derivados consistió en lo siguiente: brevemente, tras 7-9 días de cultivo *in vitro*, los cultivos se incubaron durante 24 horas con varias concentraciones de cada derivado de FMISO (0, 1, 10 y 100 μM). Después de este tiempo de incubación, se evaluó la viabilidad/mortalidad por los ensayos MTT y LDH (Figura 3.17).

Cada ensayo se realizó por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (1 mM H_2O_2) y células no tratadas.

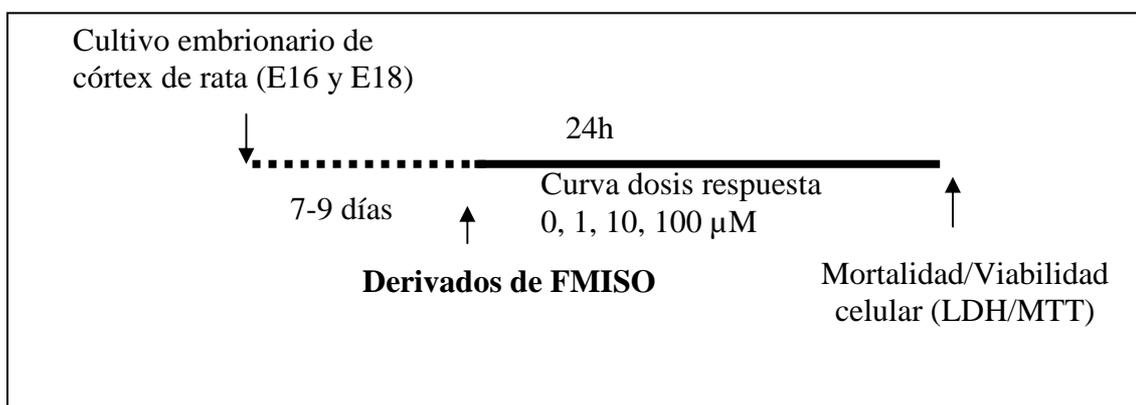
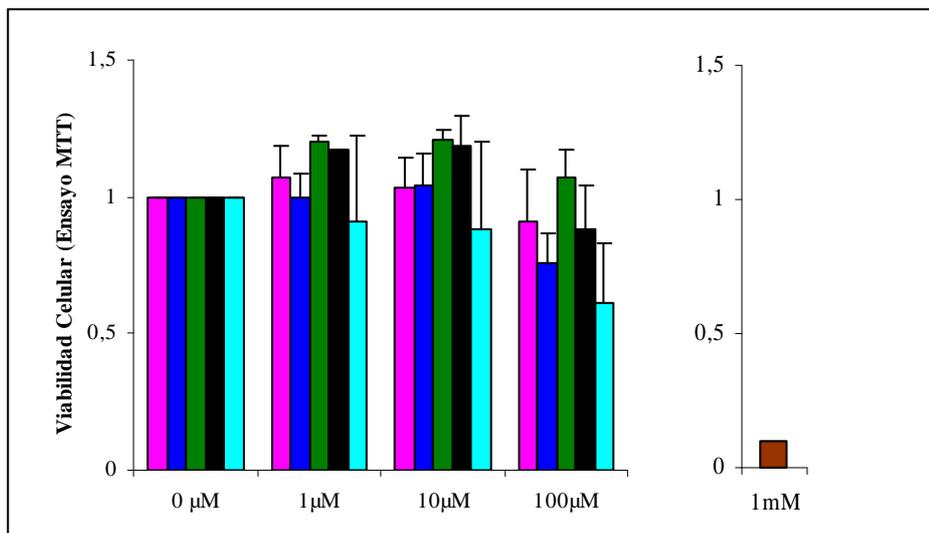


Figura 3.17. Esquema de ensayos de toxicidad en ratas.

Las Figuras 3.18a y 3.19a muestran los valores para la viabilidad celular medida por el ensayo MTT 24 horas después de la incubación de los compuestos en el medio de cultivo primario de neuronas corticales y cortical mixto, respectivamente. Los resultados obtenidos para la muerte celular medida por ensayo LDH se muestran en las Figuras 3.18b y 3.19b. Los valores de 0 μM corresponden al vehículo (1% de DMSO). Se utilizó H_2O_2 (1 mM) como control de la toxicidad en nuestras condiciones. Los datos representan la media \pm desviación estándar (SD) y corresponden a $N = 3$ cultivos neuronales puros y neuronales mixtos, respectivamente.

Cultivo primario de neuronas corticales

a)



b)

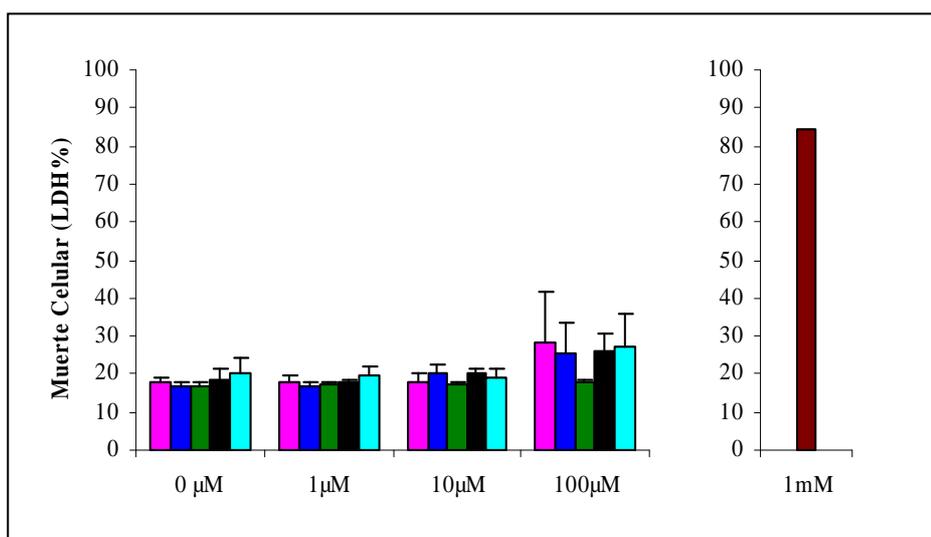
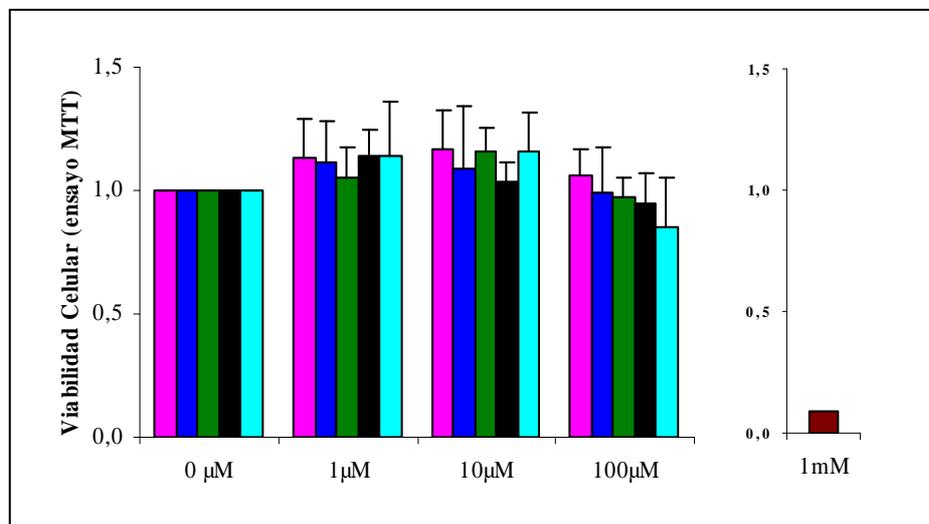


Figura 3.18 Toxicidad de FMISO y de sus derivados: curvas dosis-respuesta en cultivos embrionarios de neuronas corticales de rata. a) Viabilidad celular por ensayo MTT 24 horas después de la incubación de los derivados. b) Muerte celular por ensayo LDH 24 horas después de la incubación de los derivados.

Cultivo primario cortical mixto

a)



b)

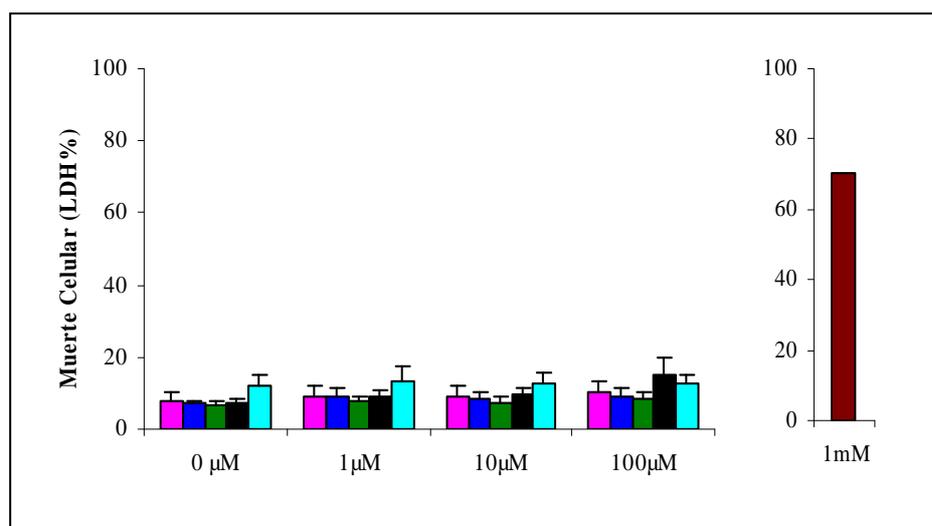


Figura 3.19. Toxicidad de FMISO y de sus derivados: Curvas dosis-respuesta en cultivos embrionarios mixto de corteza de rata. a) Viabilidad celular por ensayo MTT 24 horas después de la incubación de los derivados. b) Muerte celular por ensayo LDH 24 horas después de la incubación de los derivados.

Cuando comparamos la toxicidad de los distintos derivados con FMISO, en las concentraciones usadas no se observan cambios en los valores de LDH ni de MTT en ambos tipos de cultivos excepto una reducción significativa de la LDH al comparar el compuesto **1d** (100 μ M) vs FMISO y resto de derivados en el cultivo puro (ANOVA de dos colas y test de Bonferroni; $P < 0.05$). En conclusión, los derivados no muestran mayor toxicidad que FMISO a las concentraciones estudiadas.

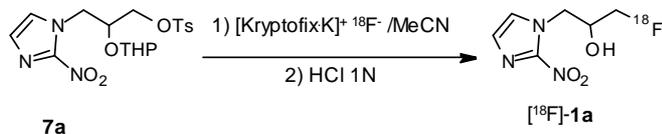
Por otro lado, los compuestos no mostraron toxicidad al compararlos con el vehículo (0 μ M), ni siquiera a las concentraciones mas altas utilizadas. Los compuestos tampoco presentan mayor toxicidad que FMISO (vs vehículo). Además, ninguno de los compuestos parece incrementar la muerte celular. El derivado **1d** (R= Ph) resultó ser el menos tóxico.

3.12. Radiosíntesis de FMISO y sus derivados

Todos los estudios de radiosíntesis se llevaron a cabo por parte del grupo de investigación del Dr. Miguel A. del Pozo en el Instituto Tecnológico PET (ITP) de Madrid.

El radiotrazador [18 F]-FMISO, marcador *in vivo* de hipoxia por imagen PET, fue preparado de acuerdo al proceso desarrollado por Oh y *col.* (Esquema 3.45).¹⁰⁶

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899-905.



Esquema 3.45

El agua enriquecida (H_2O^{18}) al igual que los casetes desechables se obtubieron de Rotem Industries Ltd. El isótopo radiactivo se preparó en un ciclotrón Oxford mediante la reacción nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$.

Se utilizó un módulo TRACERLab Mx, diseñado para la síntesis de [^{18}F]-fluorodesoxiglucosa ([^{18}F]-FDG), adaptado para la síntesis de [^{18}F]-FMISO (Figura 3.20).

En la síntesis de [^{18}F]-FMISO se determinó el rendimiento radioquímico de la síntesis y la pureza radionucleidica con un Espectrómetro Multicanal Genie 2000 Canberra. La pureza radioquímica mediante radio-TLC (fase estacionaria tiras de sílica gel/fase móvil de cloruro de metileno:metanol 90:10). Para la purificación de los radioligandos se utilizó un cromatógrafo de líquidos analítico (Waters 600 pump, Waters 600 controller, detector ultravioleta Waters 2996 photodiode array y detector de radiactividad Berthold LB509) con una columna Waters Symmetry C18 (3,9 mm x 150 mm, 5 μm) con precolumna.

Los disolventes residuales en el producto final se analizaron en un cromatógrafo de gases provisto de un detector FID (Hewlett Packard 4890A) con una columna capilar (HF-FFAP 15 m de longitud x 0,25 mm de espesor de película) a temperaturas de horno, inyector y detector de 50, 140 y 250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Todos los ensayos, incluidos los de determinación de Kryptofix[®] 2.2.2., endotoxinas bacterianas y

esterilidad, se realizaron según describe la Farmacopea Europea y se tomaron como valores límite los indicados en la misma para preparaciones radiofarmacéuticas inyectables. El pH de la solución final se determinó empleando papel indicador de pH.

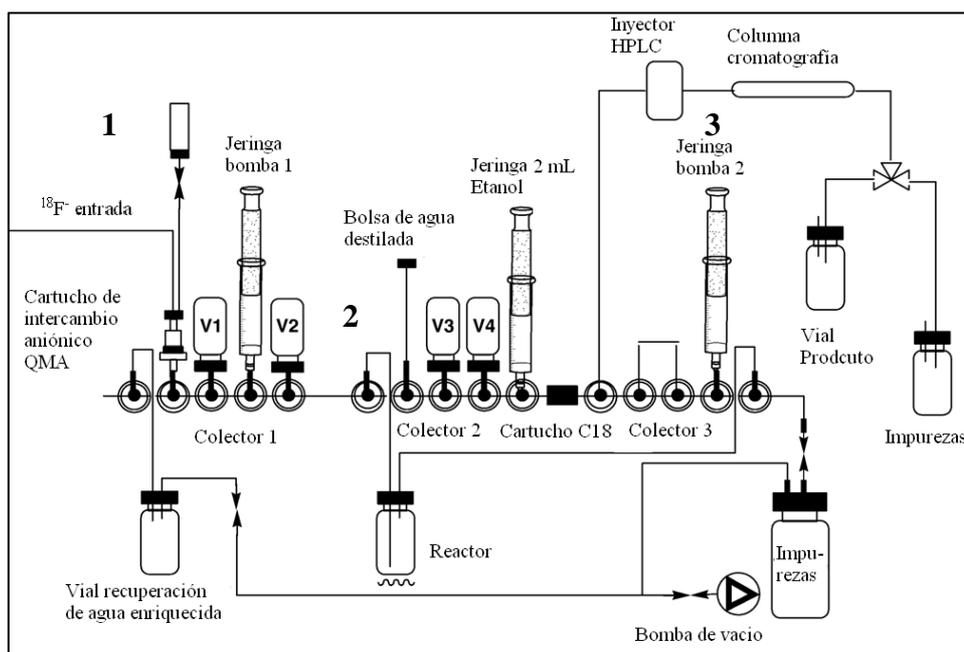


Figura 3.20. Diagrama del módulo para radiosíntesis de $[^{18}\text{F}]\text{-FMISO}$. V1-4 contienen acetoneitrilo, el precursor, HCl 1N, y NaOH 2N-tampon citrato, respectivamente (tomada de ref. 106).

El fluoruro radiactivo, $^{18}\text{F}^-$, se transfirió desde el ciclotrón al módulo de síntesis TRACERLab-Mx donde se llevó a cabo la síntesis de $[^{18}\text{F}]\text{-FMISO}$. El ^{18}F se retuvo en un cartucho QMA (K_2CO_3) (Figura 3.20, 1) y eluido al reactor con una mezcla de 7 mg de K_2CO_3 en 300 μL de agua y 2,2 mg de Kryptofix[®] 2.2.2 en 300 μL de acetoneitrilo (Figura 3.20, V1). Después de la evaporación de los disolventes a sequedad, el precursor **7a** disuelto en 2 mL de acetoneitrilo (Figura 3.20, V2) se envió al reactor donde se encuentra el complejo $[\text{Kryptofix}^{\text{®}} 2.2.2.\text{K}]^+ ^{18}\text{F}^-$. La sustitución nucleofílica con $^{18}\text{F}^-$ se llevó a cabo a 100 °C durante 6 minutos para posteriormente ir reduciendo progresivamente la temperatura hasta los 70 °C durante otros 3 minutos. A

continuación, el precursor marcado se disolvió en agua y se retuvo en un cartucho C18. Después de lavar el cartucho con agua, el compuesto marcado se eluyó con etanol al reactor. El etanol se evaporó y el precursor marcado se hidrolizó con ácido clorhídrico 1N (Figura 3.20, V3) a 100 °C durante 3 minutos y se neutralizó a continuación con la disolución tampón (hidróxido de sodio y tampón citrato) (Figura 3.20, V4). Para finalizar, la preparación se purificó empleando un cartucho de fase reversa C18 y un cartucho de alúmina N y se filtró a través de un filtro Cathivex de 0,22 µm (Figura 3.20, 2).

La purificación del producto final se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa (HPLC) (Figura 3.20, 2), eluyendo con una mezcla de agua:etanol 95:5. Se recogió la fracción eluida al tiempo de retención de una solución patrón de FMISO inyectada previamente (teniendo en cuenta el tiempo muerto que existe entre el detector U. V. y el radiactivo) y que corresponde al pico principal del cromatograma obtenido con el detector radiactivo.

3.12.1. Radiosíntesis de FMISO sintetizado en nuestro grupo de investigación

Se realizaron doce síntesis de [¹⁸F]-FMISO empleando el precursor **7a** suministrado por nuestro grupo de investigación. En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados obtenidos:

Tabla 3.19. Radiosíntesis de [¹⁸F]-1a.

Parámetro	Método	Valor de referencia	Resultado
Aspecto	Visual	Solución clara, transparente, ligeramente amarilla	Bien
Actividad específica	HPLC	169 GBq/μmol	No realizado ^a
Rendimiento radioquímico	Activímetro	50% - 60% (corregida por decaimiento)	30 – 54% (corregida por decaimiento)
pH	Papel indicador	5 – 8,5	6 – 8
Pureza radioquímica	TLC	[¹⁸ F]-FMISO >95%	100%
	HPLC	[¹⁸ F]-FMISO >95%	> 99%
Pureza radionucleídica	Espectrómetro (pico de energía)	0,511 MeV (+/-10%)	Bien
	Activímetro (T _{1/2})	105-115 minutos	Bien
Pureza química	TLC	Kryptofix [®] 2.2.2. (< 2,2 mg /15 ml)	Bien
	HPLC	FMISO	No realizado
Disolventes orgánicos	Cromatógrafo de gases	Acetonitrilo (< 4,1 mg / 15 mL)	Bien
		Etanol (< 50 mg / 15 mL)	Bien
Endotoxinas	LAL-Test	< 175 U.I. / 15 mL)	Bien
Esterilidad	Siembra en medios de cultivo	Estéril	Bien

^a No pudo cuantificarse la cantidad total de [¹⁸F]-FMISO en las preparaciones radioquímicas, por tanto tampoco pudo determinarse la actividad específica debido a problemas técnicos en el HPLC analítico durante el periodo que se realizaron la síntesis.

Después de los ensayos no se encontraron diferencias en cuanto a rendimiento de marcaje o pureza radioquímica en tres lotes distintos.

Las variaciones en el rendimiento radioquímico entre las distintas síntesis (Tabla 3.19) probablemente se debieron al empleo de distintos módulos en las síntesis realizadas, con los que también se han observado diferencias en cuanto al rendimiento obtenido en la síntesis de otros radiofármacos y a la manipulación manual en la síntesis e inyección en HPLC para la purificación.

3.12.2. Estudio comparativo de radiosíntesis¹⁹¹

Se hizo un estudio comparativo de la radiosíntesis del precursor sintetizado en nuestro grupo de investigación **7a** con el precursor adquirido en la casa comercial ABX (Advanced Biochemical Compound). En la siguiente tabla se recogen los resultados:

Tabla 3.20. Radiosíntesis de FMISO

Precursor	Actividad inicial ¹⁸ F ⁻ (mCi)	Actividad mezcla cruda (mCi)	Actividad [¹⁸ F]-FMISO mezcla cruda (%)	Actividad [¹⁸ F]-FMISO en solución final (mCi)	R ^{a,b} (%)	FMISO mezcla crudo (%)	P.R.Q. ^c solución final (%)
Comercial ^d	482	227	87,9	199,5	41,4	13,1	> 99
7a	557	216	92,6	200	35,9	7,6	> 99

^a Rendimiento radioquímico [$R = (A_{\text{FMISO}} / A_{18\text{F}}) \times 100$]; ^b corregido por decaimiento; ^c pureza radioquímica [$\text{P.R.Q.} = (A_{\text{FMISO}} / A_{\text{total}}) \times 100$]; ^d ABX.

No se aprecian diferencias significativas entre ambos precursores. En la síntesis realizada con el precursor comercial el rendimiento radioquímico fue de un 5,5% superior. Sin embargo, se observó una menor proporción de impurezas radioquímicas para el precursor **7a** (sintetizado por nuestro grupo de investigación) con respecto al comercial, como indican los datos obtenidos en la tabla 3.20 (actividad de [¹⁸F]-FMISO en el crudo de reacción 92,6% frente a 87,9%). Aunque la proporción de impurezas químicas fuera ligeramente superior en nuestro precursor que en el comercial, estas se marcaron en menor proporción con el isótopo radiactivo. Dichas impurezas orgánicas presentan tiempos de retención similares y si se presupone que se trata de los mismos compuestos el motivo quizás pudiera estar relacionado con el proceso de síntesis radioquímica, como la actuación del módulo en cada una de las síntesis, los reactivos

¹⁹¹ Nieto, E.; AlaJarín, R.; Álvarez-Builla, J.; Larrañaga, I.; Gorospe, E.; Pozo, M. A. *Synthesis* **2010**, *21*, 3700-3704.

empleados, las posibles desviaciones en los equipos de medida o en el procesamiento de las señales.

En las siguientes figuras se presentan los cromatogramas de la mezcla de reacción obtenida en el módulo de síntesis:

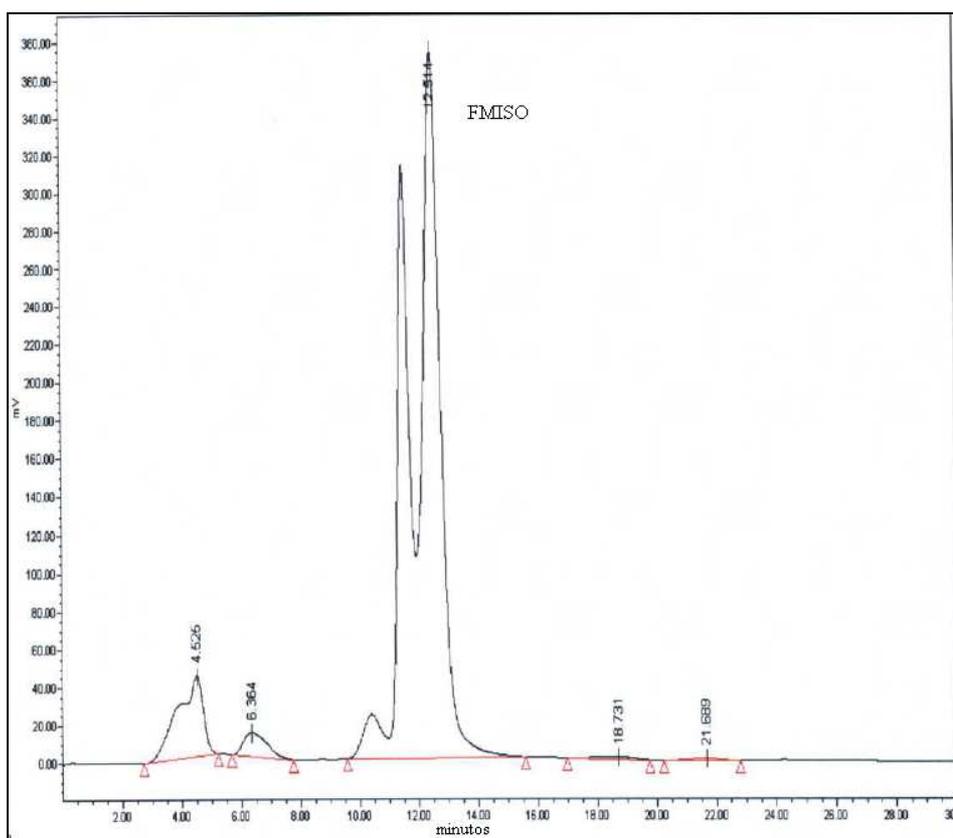


Figura 3.21. Cromatograma con detector de radiactividad del crudo de reacción obtenido en el módulo de síntesis (impurezas radioquímicas) de **7a** (comercial). El pico correspondiente a $[^{18}\text{F}]$ -FMISO se desdobra por la saturación del detector radiactivo.

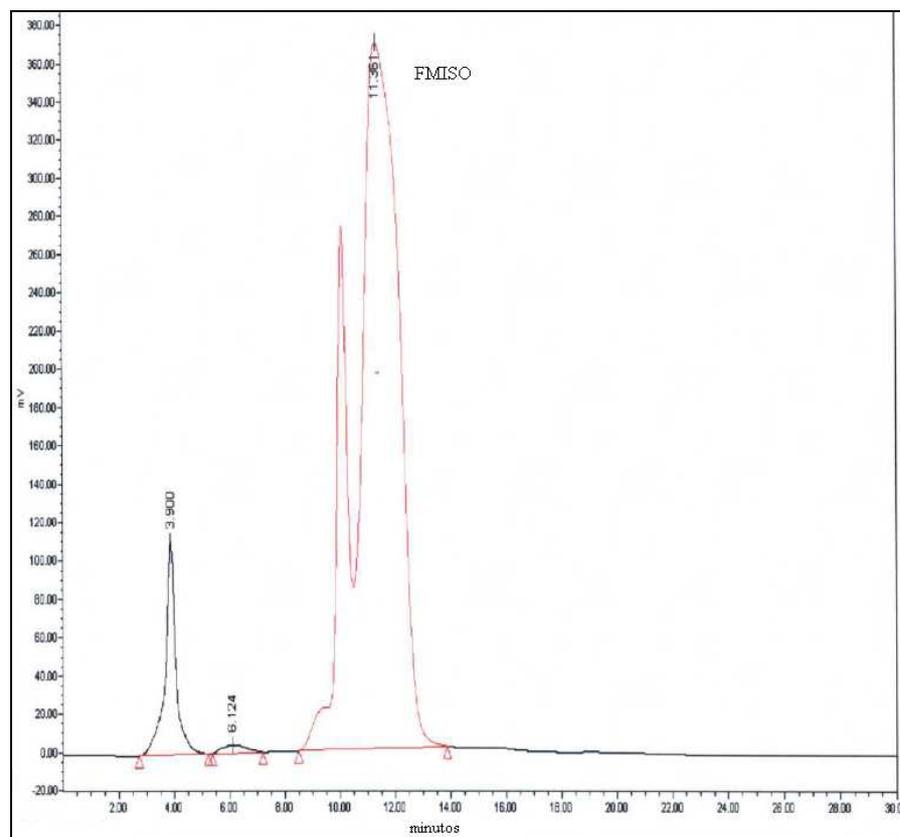
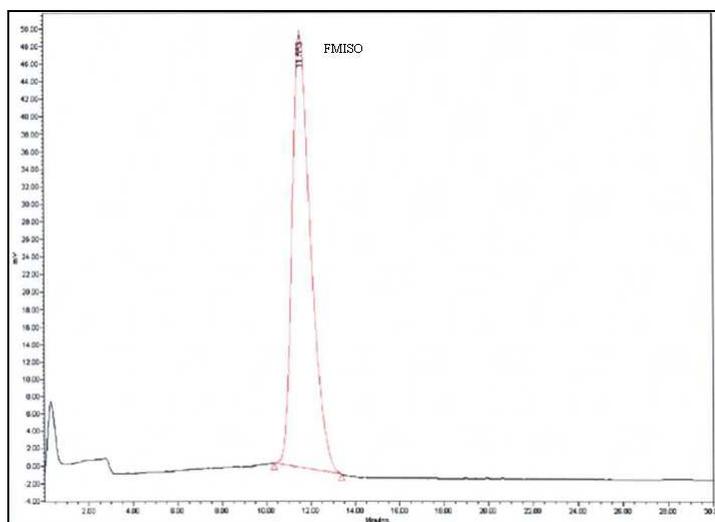


Figura 3.22. Cromatograma con detector de radiactividad del crudo de reacción obtenido en el módulo de síntesis (impurezas radioquímicas) **7a** (sintetizado por nuestro método). El pico correspondiente a [^{18}F]-FMISO se desdobra por la saturación del detector radiactivo.

A continuación, se muestran los cromatogramas de la fracción recogida por HPLC preparativo correspondiente al producto final [^{18}F]-FMISO a partir de ambos precursores (Figura 3.23).

a)



b)

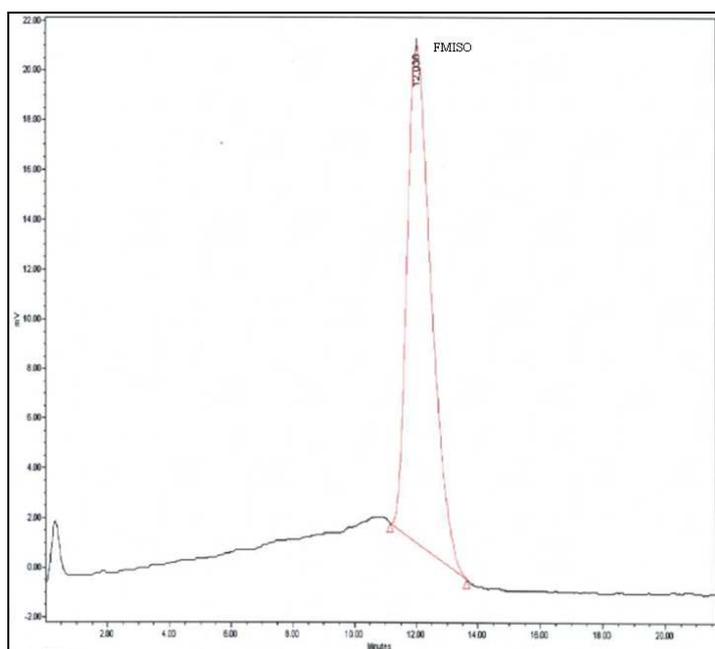


Figura 3.23. Cromatograma con detector radiactivo de la fracción correspondiente a [^{18}F]-FMISO a) **7a** (comercial) b) **7a** (sintetizado por nuestro método).

En la figura 3.23 se muestra el cromatograma de [¹⁸F]-FMISO puro. Los artefactos que aparecen al inicio de los radiocromatogramas, el pequeño pico inicial y la línea base con progresión ascendente son debidos a la proximidad del detector radiactivo e inyector, y son consecuencia de la ausencia de un blindaje perfecto frente a la radiación en el momento de la inyección de la muestra.

3.12.3. Síntesis de [¹⁸F]-FMISO con purificación en fase sólida

Una de las variaciones en la radiosíntesis de [¹⁸F]-FMISO por Oh y col.¹⁰⁶ fue la purificación en fase sólida en lugar de HPLC semipreparativo. Por ello, se realizó una síntesis con nuestro precursor **7a** empleando un sistema de purificación en fase sólida en lugar de HPLC preparativo como en ensayos anteriores. La ruta de síntesis, reactivos y cartuchos empleados fueron suministrados por ABX. En la siguiente tabla se muestran los resultados.

Tabla 3.21. Radiosíntesis de **7a** con purificación en fase sólida.

Precursor	Actividad inicial ¹⁸ F ⁻ (mCi)	Actividad específica solución final (GBq/μmol)	Actividad [¹⁸ F]-FMISO en solución final (mCi)	R ^a (%)	FMISO en mezcla cruda (ppm)	P.R.Q. ^b solución final (%)
7a	2354	560	593	25	0,32	> 99

^a Rendimiento radioquímico [R= (A_{FMISO} /A_{18F-}) x 100]; ^b pureza radioquímica [P.R.Q. = (A_{FMISO} /A_{total}) x 100].

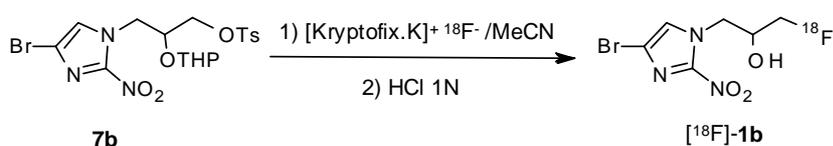
El rendimiento radioquímico fue mas bajo que cuando se utilizó purificación mediante HPLC semipreparativo, aunque la pureza radioquímica fue del mismo orden. La diferencia entre purificación en fase sólida y purificación en fase líquida es la pureza

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899–905.

química, ya que aparecen mas impurezas químicas no marcadas después de la purificación en fase sólida. La cuantificación de FMISO se realizó a partir de una recta de calibración en la que se utilizaron 8 soluciones patrón de FMISO en un rango de concentración desde 1000 ppm a 7,8 ppm, con un coeficiente de correlación de 1. La cantidad detectada de FMISO fue de 0,32 ppm, lo que estaba cerca de los límites de detección del equipo, el pico estaba poco definido y la integración de la señal no pudo ser totalmente precisa.

3.12.4. Radiosíntesis del análogo [¹⁸F]-BrFMISO ([¹⁸F]-1b)

Se preparó el radiofármaco [¹⁸F]-BrFMISO según el método desarrollado por Oh y col¹⁰⁶ para [¹⁸F]-FMISO y se comparó con la radiosíntesis de este preparado a partir del precursor **7a** comercial (Esquema 3.46).¹⁹²



Esquema 3.46. Radiosíntesis de [¹⁸F]- Br-FMISO.

El método de radiosíntesis fue el mismo que el descrito en el punto 3.12, con las modificaciones que se presentan a continuación:

-El isótopo radiactivo se obtuvo en un ciclotrón IBA mediante la reacción nuclear ¹⁸O(p,n)¹⁸F.

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899-905.

¹⁹² ABX Advanced Biochemicla Compounds, Germany (57.06 EUR/vial 10 mg).

-Se utilizó un sintetizador IBA Synthera[®] para la síntesis. Este módulo de síntesis (IBA Molecular), está acoplado a un HPLC para purificación semi-preparativa.

-La pureza radioquímica se determinó con HPLC analítico y un detector de radiación Berthold LBXXX.

-La sustitución nucleofílica con $^{18}\text{F}^-$ se llevó a cabo a 130 °C durante 5 minutos para posteriormente ir reduciendo progresivamente la temperatura hasta los 100 °C durante otros 3 minutos. A continuación, el precursor marcado se hidrolizó con ácido clorhídrico 1N a 100 °C durante 5 minutos y neutralizado con la solución neutralizante (hidróxido de sodio y tampón citrato).

-La purificación del producto final se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC synthera[®]), con columna semi-preparativa C18 de fase reversa, eluyendo con una mezcla de agua:etanol 95:5. El compuesto fue purificado una segunda vez a través de un cartucho de alúmina (Sep-Pak Light AluminaN). Los resultados obtenidos mediante este método se muestran en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22. Comparación de la radiosíntesis de **7a** y su derivado análogo **7b**.

Precursor	Actividad inicial $^{18}\text{F}^-$ (mCi)	Actividad Específica producto final puro (GBq/ μmol)	Actividad producto final en solución final (mCi)	R ^{a b} (%)	P.R.Q. ^c solución final (%)	Duración de síntesis (min.)
7a (ABX) (n=10)	1352	192,4	549	54,9	99,7	50
7b (n=3)	1840	138,5	210	17,9	99,2	70

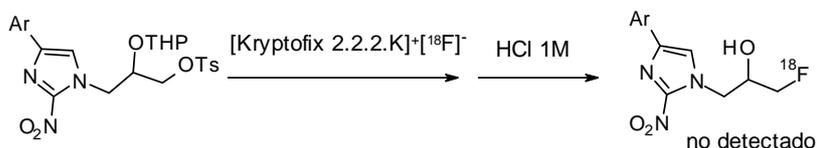
^a Rendimiento radioquímico [$R = (A_{\text{FMISO}} / A_{^{18}\text{F}}) \times 100$]; ^b decaimiento corregido; ^c pureza radioquímica [$\text{P.R.Q.} = (A_{\text{FMISO}} / A_{\text{total}}) \times 100$]; ^d suministrado por ABX.

Como resultado, la síntesis de [^{18}F]-**1b** fue menos eficiente que la síntesis de [^{18}F]-**1a** cuando se aplicaron las condiciones del método optimizado para [^{18}F]-**1a**. Por otro lado, la radiosíntesis de **1a** realizada con el sintetizador Synthera[®] mejoró los rendimientos y las purezas con respecto a ensayos anteriores. Si comparamos la radiosíntesis a partir del precursor comercial **7a** con un sistema TRACERLab Mx con el sistema Synthera[®], observamos que el rendimiento radioquímico de **1a** aumenta en un 13,5% para el segundo. La pureza radioquímica en ambos casos es mayor al 99% (Tablas 3.19 y Tabla 3.22).

3.12.5. Radiosíntesis de los análogos [^{18}F]-ArFMISO ([^{18}F]-**1d-j**)

Cuando se llevó a cabo la radiosíntesis de los análogos de FMISO **1d-j** (Esquema 3.47) no se detectó el producto de reacción, tanto utilizando un sintetizador automático TracerLAB MX (GE Healthcare) con un casete para síntesis de FGD (ROTEM Industries) modificado para síntesis de FMISO, como cuando se utilizó un sintetizador automático Synthera[®] (IBA Molecular) con un procesador de flujo integrado (ABX). La modificación del método de purificación de la mezcla de reacción, llevada a cabo mediante inyección manual o automática de la misma en una columna

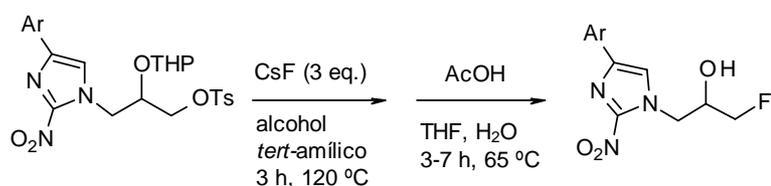
semi-preparativa de HPLC, o la purificación mediante extracción en fase sólida, tampoco permitió la identificación del producto de reacción en la mayoría de los casos.



Esquema 3.47

En todos los casos la radiosíntesis se llevó a cabo en condiciones similares a las descritas en el punto 3.12 con pequeñas variaciones, utilizando diferentes disolventes (acetonitrilo, alcohol *tert*-amílico y DMSO) y diferentes temperaturas (100, 105 y 120 °C).

La síntesis de análogos lipófilos de FMISO no resulta ser un problema cuando se realiza en condiciones habituales de laboratorio. La síntesis transcurre en dos etapas a partir del correspondiente precursor (Esquema 3.48) y los rendimientos globales obtenidos oscilan entre 20% y 52%.



Rendimientos: 20-52% (dos etapas)

Esquema 3.48

Cuando se llevó a cabo la radiosíntesis con los derivados arilo, los picos radiactivos del cromatograma con detector de radiactividad del crudo de reacción no coincidían con su correspondiente patrón en el cromatograma con detector UV-VIS, por

lo que una vez decaída la muestra se estudió por HPLC-MS en la Universidad de Alcalá (Figura 3.24).

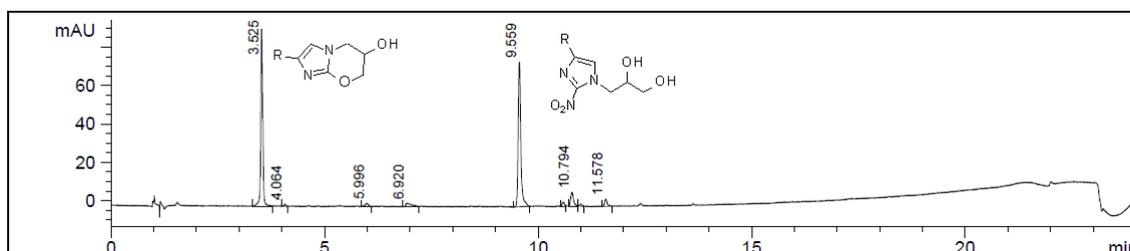
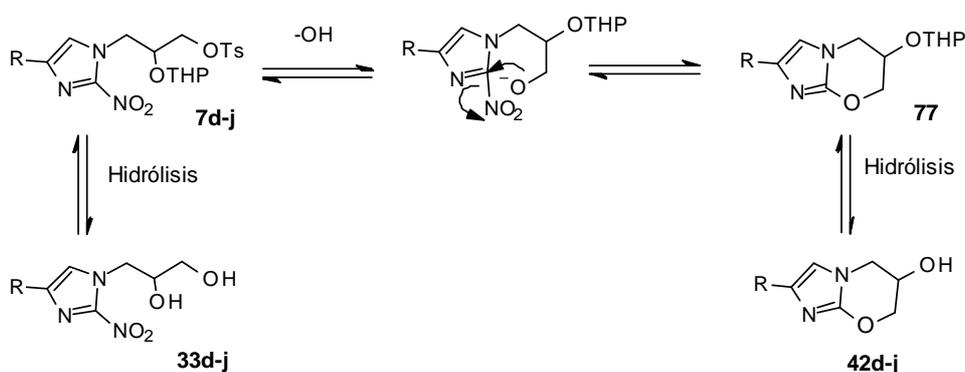


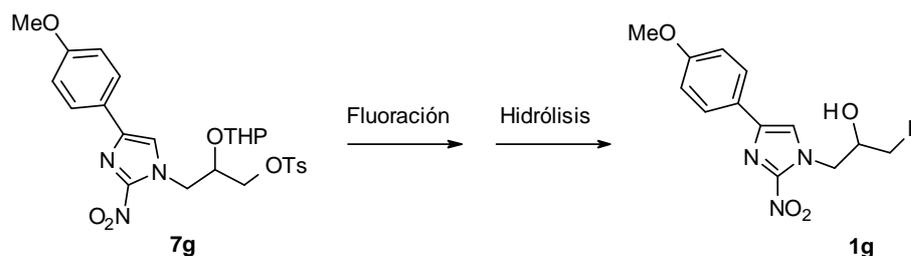
Figura 3.24. HPLC-MS del crudo de reacción de la radiosíntesis de **1e** (R= 3-ClC₆H₄).

En la mayoría de los casos, los crudos de radiosíntesis presentaban dos productos mayoritarios. Uno de ellos se identificó como los dioles **33d-j**, que se producen por sustitución nucleófila del grupo tosilato (grupo buen saliente) por el ión hidróxido (en exceso), y un segundo pico que aparece en todas las preparaciones, asociado a una pérdida de masa de 49 uma que resulta de la S_NAr intramolecular del grupo nitro por el grupo hidroxilo primario resultante de la reacción anterior produciendo el compuesto **42d-j** (Esquema 3.49).



Esquema 3.49. Formación de los compuestos ciclados.

A la vista de estos resultados, se llevó a cabo un estudio de las condiciones de síntesis en frío en los laboratorios del Instituto Tecnológico PET (ITP) y en nuestro grupo de investigación. Como modelo de estudio se utilizó la síntesis del análogo **1g** (Esquema 3.50).



Esquema 3.50

Se llevaron a cabo cuatro experimentos (Tabla 3.23). En nuestro grupo de investigación se llevaron a cabo dos experimentos en frío que reproducían lo más fielmente posible las condiciones de radiosíntesis tal y como se ha descrito en el punto 3.12, utilizando KF en lugar de $^{18}\text{F}^-$. Ambos experimentos se realizaron en un vial roscado equipado con un septum. En uno de ellos se reprodujeron todas las variables (entrada 2), mientras que la única variable que se modificó en el otro experimento fue el contenido de K_2CO_3 , que se eliminó completamente con el objetivo de ver su influencia en la reacción (entrada 1). En ambos casos se eliminó el agua de los reactivos por destilación azeotrópica con MeCN a presión reducida utilizando 4 ciclos de destilación durante 8,4 minutos en cada ciclo. Finalizada la primera etapa, el disolvente (MeCN) se evaporó antes de llevar a cabo la hidrólisis. Finalizadas las dos etapas de síntesis, el crudo de reacción se hizo pasar por una columna de fase reversa C18 y los productos de reacción lipófilos se eluyeron con EtOH. El disolvente se evaporó y la mezcla cruda de reacción se analizó mediante LC-MS-MS.

En el ITP se llevaron a cabo dos experimentos utilizando un exceso de NaF de 7,2 eq. (entrada 3) y 5,0 eq. (entrada 4). Ambos experimentos se llevaron a cabo utilizando un sintetizador automático Synthera® en las condiciones indicadas anteriormente para los experimentos de radiosíntesis. En ambos experimentos se realizó un único proceso de destilación azeotrópica durante 5 minutos y la etapa de hidrólisis se llevó a cabo sin eliminar previamente el disolvente de la primera etapa. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O y se analizó mediante LC-MS-MS.

Tabla 3.23. Condiciones de reacción y resultados para la síntesis de **1g**.

Método/ Entrada	Etapa 1: Fluoración ^a						Etapa 2: Hidrólisis			1g
	7g (μmol)	KF (μmol)	Kryptofix® (μmol)	K ₂ CO ₃ (μmol)	T (°C)	t (s)	HCl 1M (mL)	T (°C)	t (s)	Rto. (%)
UAH/ 1	4,7	2 10 ⁻⁴	1,12	---	100 70	360 180	3	100	180	22
UAH/ 2	4,7	2 10 ⁻⁴	1,12	10,50	100 70	360 180	3	100	180	102
ITP/ 3	7,1	51	5,80	50,7	130 70	300 180	1	100	300	0,1
ITP/ 4	10,15	51	5,80	50,7	130 70	300 180	1	100	300	6,5

^aTodas las reacciones se llevaron a cabo en acetonitrilo (2 mL para los ensayos en la UAH, y 2,5 mL para los ensayos en el ITP).

Podemos asumir, con bastante certeza, que en todos los experimentos las condiciones de la segunda etapa son suficientemente energéticas como para considerar la hidrólisis completa del grupo tetrahidropiraniolo. Por ello, las diferencias en rendimiento de síntesis deben ser consecuencia de la etapa de fluoración.

Cuando el experimento se realizó en condiciones de radiosíntesis (entrada 2) se obtuvo un rendimiento cuantitativo. Sin embargo, cuando sobre estas condiciones se eliminó el carbonato potásico (entrada 1), el rendimiento disminuyó notablemente (22 %). Esto parece indicar que es necesario un exceso de K_2CO_3 para la formación cuantitativa del complejo nucleófilo $[Kryptofix^{\text{®}} 2.2.2-K]^+F^-$ (entrada 2) ya que utilizando solo exceso de criptando no se observa transformación cuantitativa (entrada 1). Para los experimentos realizados en presencia de K_2CO_3 (entradas 2-4), el proceso es tanto más eficiente cuanto menor es el exceso respecto del precursor (entrada 2: 2,2 eq.; entrada 3: 7,1 eq.; entrada 4: 5,0 eq.) independientemente de si la reacción utiliza exceso o defecto de ión F^- (entradas 3 y 4 vs entrada 2).

Los sintetizadores para radiosíntesis solo permiten una modificación limitada de las variables del proceso y de los pasos a desarrollar en el mismo. Una limitación importante es el secado eficiente de la disolución que contiene el complejo $[kryptofix^{\text{®}}.K]^+ ^{18}F^-$, H_2O y K_2CO_3 en el vial de reacción, por lo cual, la presencia de K_2CO_3 y H_2O en el matraz de reacción puede dar lugar a procesos de sustitución nucleófila, eliminación e hidrólisis. Si bien es cierto que el procedimiento de radiosíntesis no puede evitar la presencia de K_2CO_3 , si es posible reducir su exceso. En el proceso de radiosíntesis, el ión $[^{18}F]$ -fluoruro se eluye del cartucho QMA (29,9 μeq), por lo que llegan al matraz de reacción aproximadamente 44,0 μmol de K_2CO_3 y Kryptofix[®] 2.2.2 (5,1 μmol). Si consideramos la utilización de una cantidad media de precursor **7g** (5,0 mg, 9,3 μmol) y las limitaciones del secado azeotrópico del reactivo (el carbonato de potasio es higroscópico) bastaría que quedaran en el reactor 4,7 μmol de agua (84 μL ; 28% de la cantidad a evaporar) para que se formaran cuantitativamente 9,3 μmol de KOH. Este proceso está favorecido por el exceso de K_2CO_3 y por las condiciones de temperatura alta y presión baja en las que se realiza el secado (Ec. 1).

Los iones HO⁻ formados, mas nucleófilos que los iones F⁻, podrían entonces reaccionar completamente con el precursor provocando la sustitución del grupo tosilato (Ec. 2).



Por todo lo anterior, se llevó a cabo un experimento en frío en el ITP, por duplicado, que reproducían las condiciones de radiosíntesis optimizadas por nuestro grupo de investigación (Tabla 3.23; entrada 2). Se llevaron a cabo dos ciclos de secado azeotrópico (limitado por la bomba del módulo) y con la única modificación de la adición de una disolución mas diluida de KF (la misma cantidad que llega del ciclotrón) manteniendo constante la cantidad de F⁻ (Tabla 3.24).

Tabla 3.24. Condiciones de reacción y resultados para la síntesis de **1g**.

Método/ Entrada	Etapa 1: Fluoración ^a						Etapa 2: Hidrólisis			1g
	7g (μmol)	KF (μmol)	Kryptofix [®] (μmol)	K ₂ CO ₃ (μmol)	T (°C)	t (s)	HCl 1M (mL)	T (°C)	t (s)	Rto. (%)
ITP/ 1	4,7	2 10 ⁻⁴	1,12	10,50	100 70	360 180	3	100	180	62
ITP/ 2	4,7	2 10 ⁻⁴	1,12	10,50	100 70	360 180	3	100	180	57

^aTodas las reacciones se llevaron a cabo en 2 mL de acetonitrilo.

Cuando el experimento se realizó en condiciones de radiosíntesis en la UAH (Tabla 3.23) se obtuvo un rendimiento cuantitativo, mientras que cuando se realizó en el ITP (Tabla 3.24) se obtuvo un rendimiento medio, posiblemente debido a las pérdidas de volúmenes en el casete de síntesis (manifolds, tubos, jeringas...) durante varias transferencias de reactivos y disolventes además de la limitación del secado azeotrópico

a solo dos ciclos debido al trabajo que supone para la bomba del módulo. Sin embargo, la obtención de un 62 y 57% de rendimiento para cada una de las síntesis en frío del análogo de FMISO **1g** utilizando condiciones de radiosíntesis muestran dos conclusiones importantes:

- Es posible la síntesis en frío de **1g** con buenos rendimientos en condiciones similares a las de radiosíntesis.
- El secado de la mezcla de reactivos que contiene K_2CO_3 es esencial para evitar la reacción del precursor con iones hidróxido.

3.13. Ensayos de marcaje de hipoxia *in vivo* con [^{18}F]-**1b** mediante microPET

Se llevó a cabo un estudio de la fijación de [^{18}F]-**1b** mediante PET en cerebro hipóxico de rata (Figura 3.25).

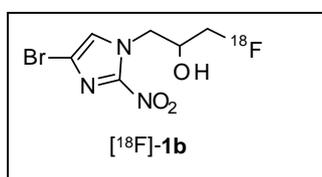


Figura 3.25

Los ensayos de fijación *in vivo*, la adquisición PET y la posterior obtención de la imagen tomográfica y evaluación de los resultados se llevó a cabo por parte del grupo de investigación del Dr. Miguel A. del Pozo en el Centro de Cartografía Cerebral de la UCM.

Como modelo experimental se eligió la oclusión de la arteria cerebral media en rata, bien de forma transitoria (tMCAO) o permanente (pMCAO). Este modelo experimental fue realizado por el grupo de investigación del Dr. Ignacio Lisazoáin, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UCM.

La evaluación se realizó a diferentes tiempos después de la intervención quirúrgica con la finalidad de ver la evolución de la fijación del compuesto en el área hipóxica. Estos resultados se compararon con los obtenidos a partir del compuesto de referencia FMISO [^{18}F]-**1a**. A las 24-48 horas después se realizaron estudios PET de la actividad metabólica con [^{18}F]-desoxiglucosa ([^{18}F]-FDG) con la finalidad de comprobar efectivamente la eficacia del modelo experimental.

Previo a la administración del radiotrazador, se procedió a medir la actividad recibida en el activímetro, con el fin de preparar la monodosis exacta a inyectar. Para ello, se diluyó el compuesto recibido con la cantidad necesaria de solución salina fisiológica estéril.

La administración de los radiotrazadores se realizó por vía i.v. en la vena caudal (aprox. 55,5 MBq -1,5 mCi- en un volumen final de 0,2 mL). Los tiempos a los que se administró el compuesto fueron de 30 minutos, 6 y 12 horas tras la finalización de la intervención quirúrgica.

Una vez administrado el radiofármaco, y debido a las características farmacocinéticas de estos compuestos, se dejó incorporar un tiempo aproximado de 2,5 horas (150 minutos) con la finalidad de asegurar su fijación en cantidades detectables en la zona isquémica.

El protocolo del estudio consistió en una doble adquisición PET-TAC, siendo la adquisición PET un estudio estático de 20 minutos de duración. El TAC se empleó para la delimitación anatómica de la lesión y de la zona afectada. Para el TAC se eligieron los siguientes parámetros:

Nº proyecciones: 350.

Intensidad: 0,8 mA.

Diferencia de potencial: 45 kV.

Para la adquisición de la imagen tomográfica se usó el tomógrafo Albira ARS, un tomógrafo híbrido PET-TAC para animales pequeños (rata/ratón). Para asegurar la inmovilización durante los registros de PET, las ratas se anestesiaron inhalatoriamente mediante isoflurano (5% de isoflurano en oxígeno en la inducción y 2% de isoflurano en oxígeno durante la adquisición).

La visualización y análisis de las imágenes PET-TAC fusionadas se realizó mediante el programa informático especializado PMOD (versión 3.1).

Una vez finalizada la adquisición, las imágenes PET se reconstruyeron mediante el algoritmo OSEM (3 iteraciones) y se les aplicaron las correcciones de tiempo muerto, decaimiento, dispersión y coincidencias aleatorias (fotones procedentes de eventos no asociados a una misma aniquilación, fotones emitidos en aniquilaciones posteriores o fotones de fuentes externas). Las imágenes TAC se reconstruyeron mediante el algoritmo FBP (retroproyección filtrada –*filtered back projection*-).

El protocolo de la adquisición de la imagen metabólica con [^{18}F]-FDG fue similar al de [^{18}F]-FMISO y [^{18}F]-**1b**, variando únicamente el tiempo de incorporación (30 minutos) y la actividad inyectada (18,5 MBq -0,5 mCi).

Los ensayos y observaciones obtenidas del estudio de imágenes PET se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3.25. Ensayos y resultados del estudio por imagen PET con [^{18}F]-**1a** y **b**.

Inyección de marcadores tras desoclusión (h)	Tiempo de incorporación (h)	Adquisición imágenes PET tras desoclusión (h)	Observaciones
0,5	2,5	3	Marcado todo el centro de la intervención
6	2	8	Extensión del área de fijación del centro a los bordes
12	3	15	El área central (“core”) no marcada. Positivo hacia la zona periférica

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 3.26, donde se muestran cortes coronales PET-TAC de cerebro de rata de [^{18}F]-FMISO y [^{18}F]-**1b** en la que se compara la fijación en el tejido hipóxico 3 horas después de la oclusión permanente de la arteria cerebral media derecha (pMCAO). El radiotrazador fue inyectado 30 minutos después de la finalización de la isquemia. El área hipóxica (marcada por flechas) obtenidas por ambos trazadores son similares. En ambos casos, los marcadores fueron inyectados 2 horas y 30 minutos antes del inicio de la adquisición PET-TAC.

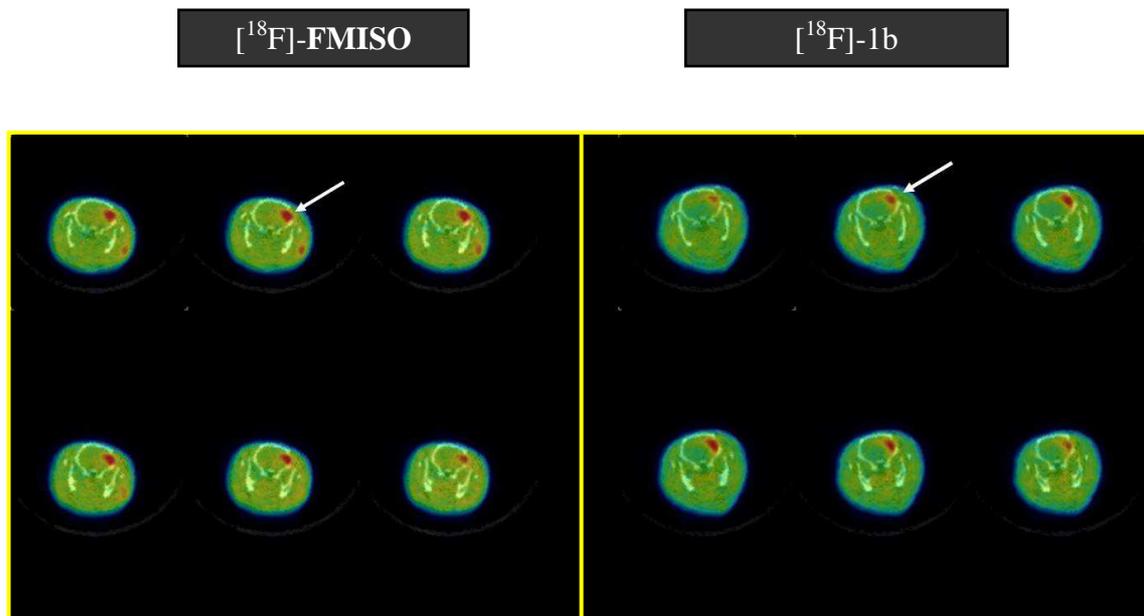


Figura 3.26. Cortes coronales PET-TAC de cerebro de rata de $[^{18}\text{F}]$ -FMISO y de $[^{18}\text{F}]$ -BrFMISO.

En la figura 3.27 se muestran cortes coronales PET-TAC de $[^{18}\text{F}]$ -**1b** inyectado 30 minutos, 6 y 12 horas después de la inducción de la isquemia mostrando la evolución del área hipóxica. A 3 y 8 horas después de la isquemia permanente (pMCAO), se muestra una zona hipóxica marcada. Después de 15 horas no se observa captación del trazador en el centro de la lesión, posiblemente debido a la muerte neuronal que tiene lugar a este tiempo. En cambio, la captación está marcada en su proximidad. En ambos casos, el trazador se inyectó 2 horas y 30 minutos antes del inicio de la adquisición PET-TAC.

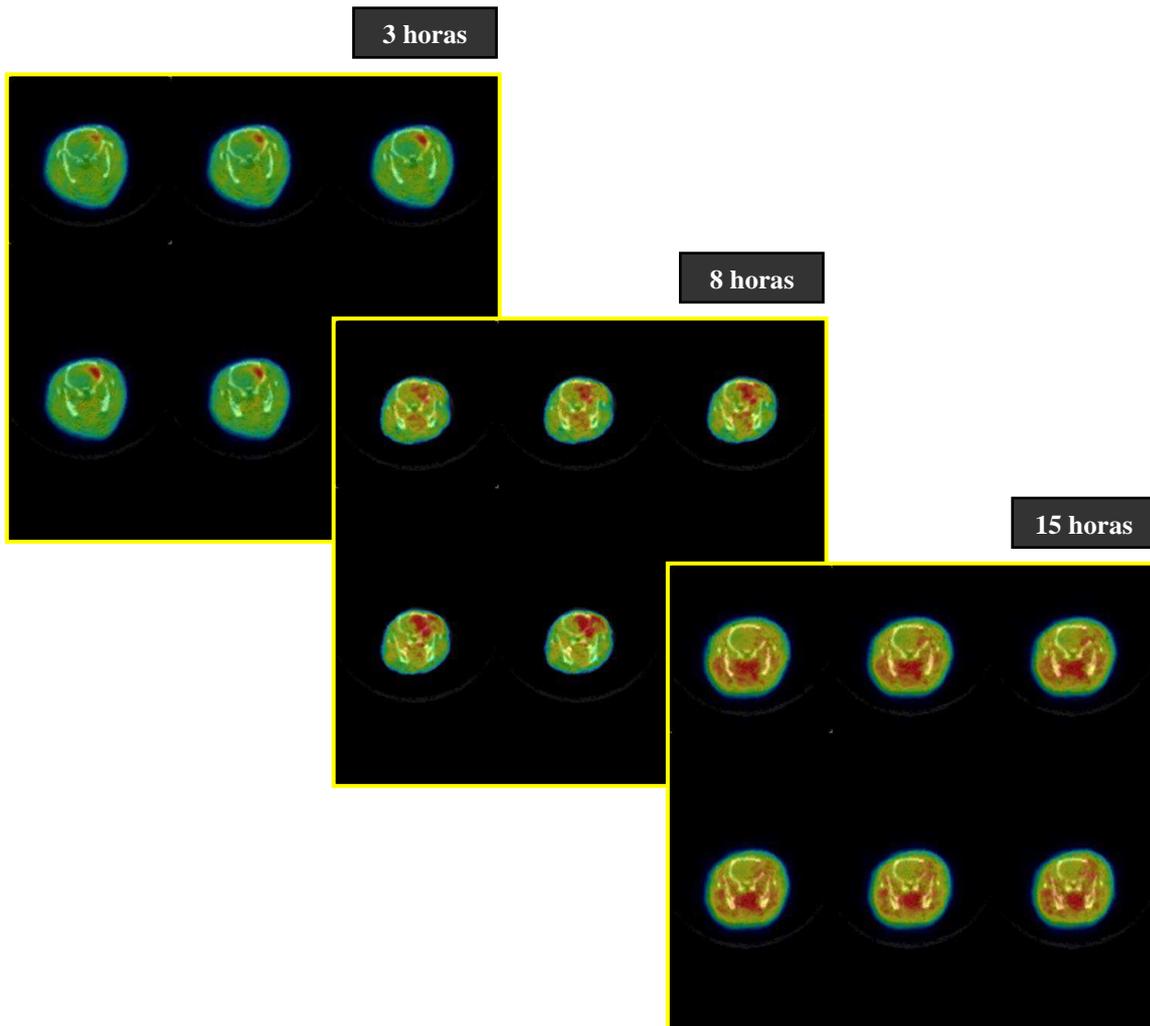


Figura 3.27. Cortes coronales PET-TAC de cerebro de rata estudiado con [^{18}F]-BrFMISO.

Los resultados obtenidos mediante imagen molecular PET en el modelo experimental de oclusión de la arteria cerebral media muestran una fijación cualitativamente similar a la obtenida con el nitroimidazol de referencia [^{18}F]-FMISO, permitiendo discernir el área hipóxica de la lesión. Todo ello, nos permite asegurar que [^{18}F]-**1b** podría ser utilizado como un nuevo radiotrazador para localizar *in vivo* y de forma mínimamente invasiva la extensión del área isquémica.

3.14. Estudios de permeación *in vitro* de FMISO (7a), BrFMISO (7b) y PhFMISO (7d)

Como se ha comentado en los antecedentes, un factor a tener en cuenta en el desarrollo de nuevos radiofármacos para hipoxia cerebral es su lipofilia para que pueda atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, en inglés). Sin embargo, no es tan importante el valor de lipofilia, un parámetro físico-químico de un compuesto que se valora normalmente mediante el coeficiente de reparto octanol/agua, como el paso real del compuesto a través de la BBB. Para determinar cuál es paso a través de la BBB se llevó a cabo un ensayo funcional con células *in vitro* en colaboración con la Dra Maria L. de Ceballos del Dpto. Neurobiología Celular, Molecular y del Desarrollo del Instituto Cajal de Madrid.

3.14.1. Preparación de células *in vitro*

Para los estudios *in vitro* de transporte de FMISO y sus análogos se utilizó un sistema de cámara doble con células de la línea epitelial b.end5 (en inglés, brain endothelial cells), que mimetiza la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés blood brain barrier) de acuerdo con estudios previos.²³⁰

La línea celular endotelial b.end5, derivadas de células cerebrales endoteliales de ratón, fue generada por Williams y *col.*,²³¹ y expresan las proteínas endoteliales PECAM, endoglina, MECA-23 y Flk-1.²³²

²³⁰ Carro, E.; Trejo, J. L.; Gomez-Isla, T.; LeRoith, D.; Torres-Aleman, I. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1390-1397.

²³¹ Williams, R. L.; Risau, W.; Zerwes, H. G.; Drexler, H.; Aguzzi, A.; Wagner, E. F. *Cell.* **1989**, *57*, 1053-1063.

²³² Yang, T.; Roder, K.E.; Abbruscato, T.J. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 3196–3213.

Se utilizaron placas de 24 pocillos con insertos de 9 mm de diámetro, cuyas membranas tenían poros de 0.4 μm (Costar, MA, USA). En el compartimento superior se sembraron 50.000 células (100 μL de medio DMEM, alto contenido en glucosa, que contenía 10% suero de ternera, Lonza, USA) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, en atmósfera húmeda y 5% CO_2 en aire. Una vez transcurrido ese tiempo, cuando las células habían alcanzado confluencia, se sustituyó el medio por otro sin suero y se añadió el compuesto **1a** en estudio (10 μg en 10 μL de agua destilada). Por último se tomaron muestras del compartimento de abajo a distintos tiempos (2, 4, 6, 8 y 24 horas), y en algunos casos del compartimento de arriba, que fueron liofilizadas, almacenadas a 4 °C hasta su análisis. Para elegir esa concentración se ha tenido en cuenta la sensibilidad del sistema de HPLC para su valoración, que se transporte $\approx 10\%$ y que el compuesto se diluirá 6 veces, ya que el compartimento de abajo tiene 600 μL . Se recogieron muestras del compuesto que fue añadido considerando su valor como el máximo del compartimento de arriba a $t = 0$.

En cultivos hermanos se comprobó, mediante el ensayo de la MTT, que la viabilidad de las células b.end5 no se veía afectada por la exposición al FMISO durante 24 horas.

3.14.2. Cuantificación de FMISO por HPLC-UV

La cuantificación de muestras de FMISO en ambas partes de la cubeta a diferentes tiempos, se realizó mediante análisis por cromatografía líquida (HPLC) acoplada a detección Ultravioleta-Visible (UV) en la Unidad Analítica de la Planta Piloto de Química Fina de la Universidad de Alcalá.

3.14.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

Se procedió al estudio y optimización de las condiciones cromatográficas. Las mejores condiciones encontradas para la cuantificación de forma selectiva de FMISO en la muestra se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 3.26. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de FMISO.

Columna analítica	Luna C18 5 μ 100 \AA (150 x 4,6 mm) Precolumna C18 (4 x 3 mm ID)
Flujo	1 mL / min.
Fases	A = Agua B = Metanol
Elución en isocrático	98% A y 2% B
Temperatura	25 °C
Volumen de inyección	10 μ L
Detección UV	325 nm

En la siguiente figura se muestra un cromatograma de FMISO con una pureza por HPLC del 96%, empleando las condiciones en medio isocrático 98:2 (Agua:MeOH) descritas en la tabla 3.26. Todas las muestras a analizar se disolvieron en agua.

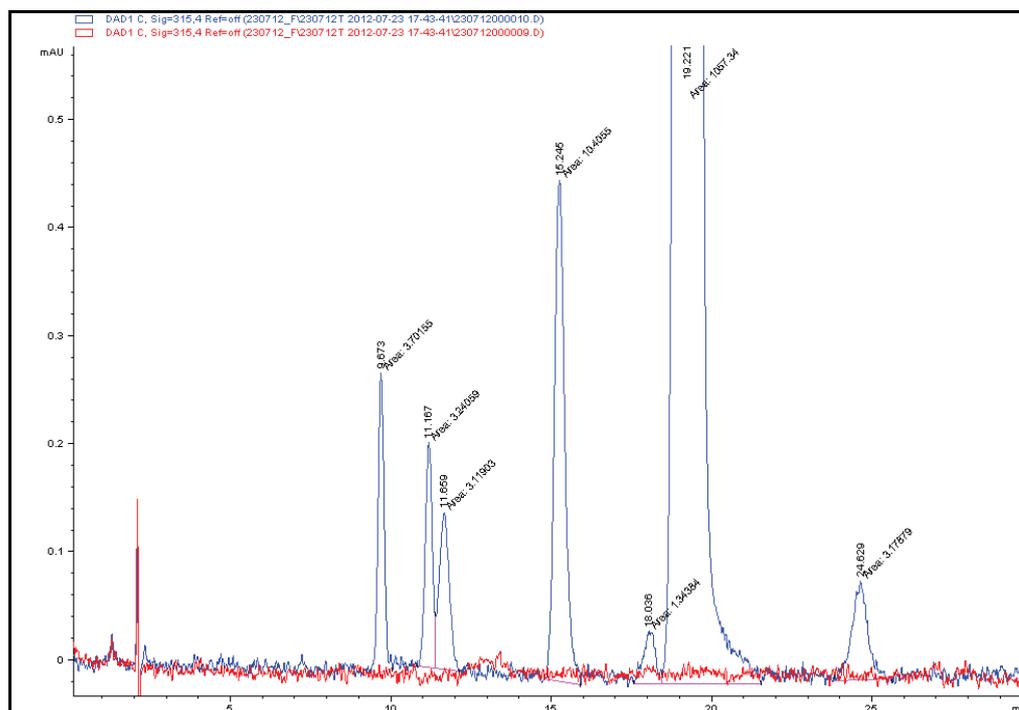


Figura 3.28. Cromatograma en medio isocrático 98:2 (agua/MeOH) de FMISO (la línea roja corresponde al blanco).

3.14.2.2. Estudio de linealidad

Se evaluó la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo de trabajo. Estos estudios se efectúan a partir de disoluciones patrón según el método de la recta de calibrado. La linealidad se establecerá abarcando el intervalo de trabajo, aproximado entre el 1% y el 120% del contenido nominal teórico seleccionado. En este caso la concentración nominal seleccionada para el FMISO fue de 50 ppm (100% nominal). En todos los casos se tuvo en cuenta la pureza del compuesto (FMISO 96%) (Figura 3.29).

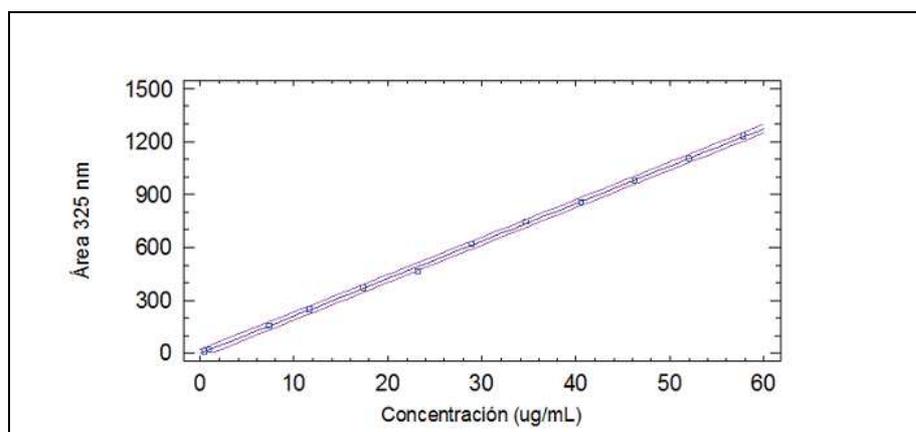


Figura 3.29. Rectas de regresión obtenidas del FMISO mediante patrón externo.

$$\text{Area} = 21.28 C (\mu\text{g/mL}) + 1.832 ; r = 0.999$$

3.14.2.3. Análisis de las muestras

Para el análisis de las muestras, una vez liofilizadas, se diluyeron en volúmenes de agua, (100 µL para las procedentes de la parte superior de la placa ó 150 µL para muestras procedentes de la parte inferior de la placa), se centrifugaron y se transfirieron a un vial de HPLC, una vez preparadas se inyectaron en el HPLC con las condiciones descritas (Tabla 3.26) y se analizaron los resultados. Todas las muestras se inyectaron por triplicado. En la siguiente figura se recogen los resultados:

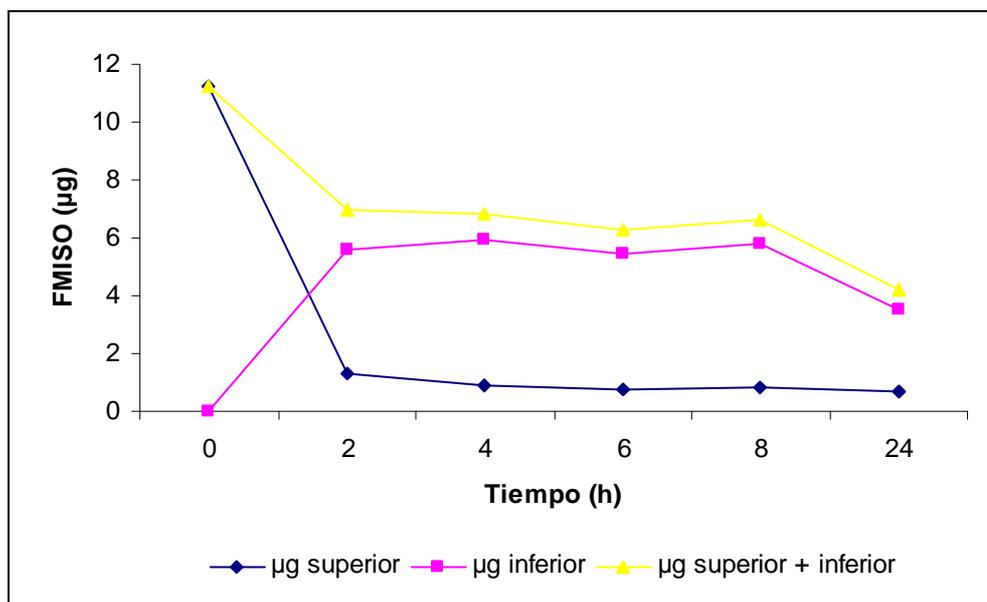


Figura 3.30. Cuantificación de FMISO por HPLC.

Como se observa en la figura 3.30 hay una tendencia de disminución de la cantidad de FMISO con el tiempo en el compartimento superior y un aumento de la misma en el compartimento inferior, tal y como cabría esperar.

A las 2 horas del ensayo, ha habido una permeación de FMISO a través de la membrana máxima, manteniéndose prácticamente constante a las 24 horas. Observamos que la suma de compuesto en el compartimento inferior y el del superior no corresponde al 100%, esto se podría explicar por la retención del analito en la membrana por interacción con las células.

A la vista de este primer estudio, y tras los resultados obtenidos, se decidió llevar a cabo nuevos ensayos a tiempos menores, ya que a las 2 horas del ensayo, la permeación de FMISO fue máxima.

Como nuestro objetivo, era comparar la capacidad que tiene cada uno de los derivados de FMISO para atravesar la BBB según su lipofilia, se llevó a cabo un ensayo con los análogos **1b** y **1d** de FMISO a tiempos cortos (0 a 1 hora).

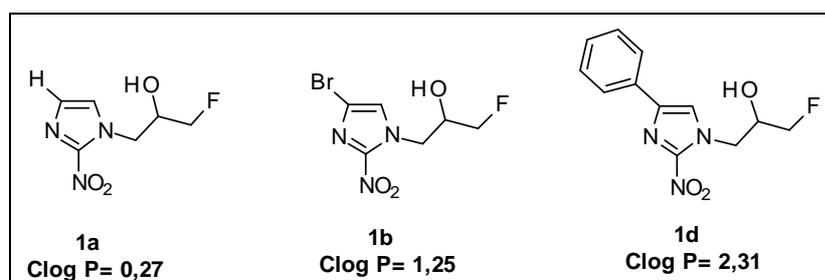


Figura 3.31.

Para la preparación de células *in vitro* se utilizaron las mismas condiciones que las descritas en el punto 3.14.1, con la única diferencia que las muestras se tomaron a tiempos mas cortos (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) del compartimento de abajo.

Se llevaron a cabo los mismos estudios de cuantificación, optimización, linealidad y análisis de muestras para los diferentes análogos.

En la siguiente figura se recogen los resultados:

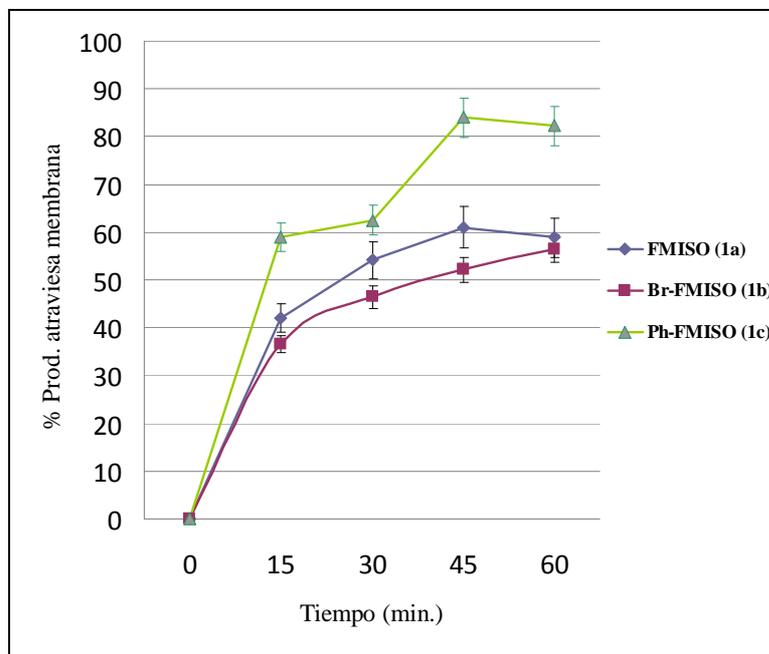


Figura 3.32. Porcentaje de compuesto (**1a**, **1b** y **1d**) que atraviesa la membrana.

Para cada tiempo se tomaron tres muestras ($n=3$) procedentes de tres experimentos diferentes y cada muestra se analizó por duplicado mediante HPLC.

Los resultados obtenidos mostraron sorprendentemente el orden de permeación (**1d**>**1a**>**1b**) distinto del orden correspondiente a sus valores de $Clog P$ (**1d** > **1b** > **1a**). Que **1b** atravesase peor la membrana que **1a** no parece tener una explicación sencilla. Se podría hipotetizar que esto es debido al metabolismo parcial del bromderivado **1b** por parte de las células de la BBB. Como se ha descrito en esta Memoria, el compuesto **1b** se reduce mejor que **1d** y **1a**. En el proceso de reducción, y según ha descrito

McClelland⁵⁵ para la reducción de 2-nitroimidazoles, se genera un catión nitreno que posteriormente puede adicionar agua o grupos nucleófilos de proteínas, como grupos tiol de la propia nitroreducta (por ejemplo. Glutation), formándose un complejo covalente (Figura 3.33).

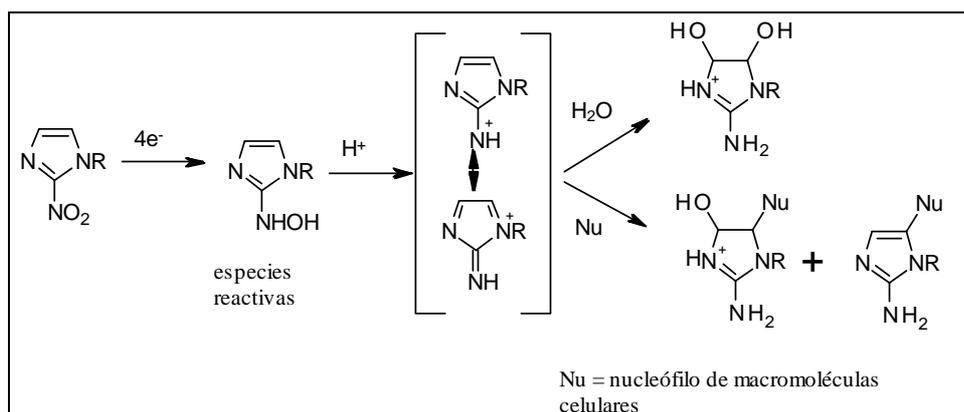


Figura 3.33. Reducción de [¹⁸F]-FMISO en las diferentes células y su unión a macromoléculas, tomado de ref. 55

Sin embargo, no tenemos datos que apoyen estas hipótesis y, por ello, es necesario estudiar mas a fondo el comportamiento del compuesto **1b**. En estos momentos se está llevando a cabo el estudio del resto de la serie, para comprobar si el comportamiento de **1b** es una excepción o no. De aquí se derivará un modelo de comportamiento de los productos al atravesar membranas neuronales.

⁵⁵ Bolton, J. L.; McClelland, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8172-8181.

Los reactivos y los disolventes utilizados se han adquirido en las casas comerciales Aldrich, Acros, SDS, Merck y se utilizaron sin ningún tratamiento posterior.

Las reacciones que exigieron condiciones anhidras se llevaron a cabo en atmósfera de argon desoxigenado y seco. Los disolventes anhidros utilizados en estas reacciones se secaron por destilación sobre un agente desecante adecuado, en atmósfera de argon, inmediatamente antes de su uso,²³³ o se hicieron pasar a través de una columna de alúmina anhidra bajo atmósfera inerte.²³⁴ Las adiciones de disolventes y disoluciones en condiciones anhidras se realizaron vía jeringa o cánula.

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

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos en un aparato GALLENKAMP.

Para las cromatografías analíticas de placa fina se emplearon cromatofolios de gel de sílice Alugram Sil G/UV₂₅₄ con un espesor de 0,2 mm sobre soporte de aluminio y se revelaron con luz ultravioleta, KMnO₄, ácido fosfomolibdico, vainillina, vapores de I₂ o ninhidrina. Para la cromatografía en columna (flash) se utilizó gel de sílice Merck (230-400 mesh). El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones del disolvente son siempre volumen-volumen.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo FTIR 1725X en las condiciones indicadas en cada compuesto (película

²³³ Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemical*, Ed. Elsevier, **2009**.

²³⁴ Sistema de purificación de disolventes M. Braun SPS-800.

entre cristales de NaCl o pastilla de KBr) y las frecuencias de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1} .

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en espectrofotómetros Varian UNITY-300, Varian Mercury-VX-300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) y Varian Gemini 200 (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) y Varian UNITY^{Plus}-500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C). Para los espectros de RMN se emplearon los disolventes deuterados CDCl_3 , CD_3OD y DMSO-d_6 de SDS. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en unidades δ (ppm) utilizando como referencia la señal residual del disolvente, y las constantes de acoplamiento se expresan en Hz.

Los análisis elementales cuantitativos de C, H y N se llevaron a cabo en un analizador elemental modelo Heraeus CHN Rapid y se expresan en %. Los espectros de masas de baja resolución (EM) se registraron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5988A (70 eV) utilizando técnicas de impacto electrónico (IE) o ionización química (IQ) y la técnica de electrospray (ES) en un Hewlett-Packard 1100MSD con analizador de trampa de iones LCQ deca XP plus de la casa Thermo. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (m/z) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas respecto al pico base. Los espectros de masas de alta resolución se realizaron en un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo Agilent 6210 LC/MS TOF, utilizando como patrón de referencia picos a 922,009798 y 121,05873 por ES+. Los HPLC-MS se han llevado a cabo en un cromatógrafo Agilent HP1100, utilizando una columna Luna C18 (100 x 2 mm x 3 μm); utilizando como fase móvil un gradiente de $\text{H}_2\text{O-CH}_3\text{CN}$ o $\text{H}_2\text{O-MeOH}$ con un 4% de ácido fórmico.

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

4.1. Síntesis del precursor de FMISO

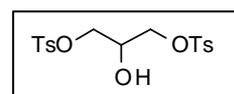
4.1.1. Optimización de la síntesis de Oh y col.¹⁰⁶

4.1.1.1. Tosilato de 2-hidroxi-3-tosiloxipropilo (**21**), tosilato de 2,3-ditosiloxipropilo (**77**) y tosilato de 2,3-dihidroxi-3-tosiloxipropilo (**78**)

Una disolución de glicerol anhidro (5,38 g; 58,4 mmol) en piridina anhidra (60 mL) en atmosfera de argon se adicionó gota a gota y con agitación vigorosa una disolución de cloruro de *p*-toluenesulfonilo (22,26 g; 116,8 mmol) en piridina anhidra (40 mL) durante 1 hora a 0 °C. Transcurrido este tiempo se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 21 horas. La mezcla de reacción de color rosado se vertió sobre hielo picado y se acidificó con HCl concentrado. La fase orgánica se separó de la acuosa y se lavó con DCM (2 x 100 mL). Los extractos orgánicos se juntaron y se lavaron con HCl 2N (2 x 20 mL) y agua (2 x 20 mL) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró el desecante, el filtrado se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía flash en columna de gel de sílice usando como eluyente DCM/AcOEt (92:8) para dar **21** (14,7 g; 63%) como un aceite incoloro, **77** (4,8 g; 15%) y **78** (1,4g; 10%) como sólidos blancos.

Rendimiento (21): 63%

Rf (DCM/AcOEt 92:8): 0,5



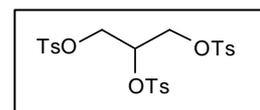
¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899-905.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,74 (d, 4H, *J* = 8,1 Hz, H_{o-Ts}); 7,33 (d, 4H, *J* = 8,1 Hz, H_{m-Ts}); 4,02 (s_{ap}, 5H, CH₂-OTs + CH-OH); 2,50 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, OH); 2,44 (s, 6H, CH₃) ppm.

Rendimiento (77): 15%

Rf (DCM/AcOEt 92:8): 0,65

P.f.: 101-102 °C (Lit²³⁵: 102 °C)



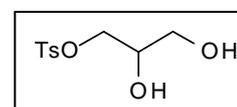
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (d, 6H, *J* = 8,1 Hz, H_{o-Ts}); 7,33 (d, 6H, *J* = 8,1 Hz, H_{m-Ts}); 4,64 (q, 1H, *J* = 5,1 Hz, CH-OTs); 4,05 (d, 4H, *J* = 5,1 Hz, CH₂-OTs); 2,44 (s, 9H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 145,5 (3C); 131,6 (3C); 130,0 (6C); 127,9 (6C); 74,3; 66,3 (2C); 21,7 (3C) ppm.

Rendimiento (78): 10%

Rf (DCM/AcOEt 92:8): 0,39

P.f.: 52-53 °C (Lit²³⁶: 54 °C)



¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD): δ 7,82 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H_{o-Ts}); 7,47 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H_{m-Ts}); 4,11 (dd, 1H, *J* = 9,8 Hz, *J* = 4,3 Hz, CH₂-OTs); 3,98 (dd, 1H, *J* = 9,8 Hz, *J* = 5,9 Hz, CH₂-OTs); 3,79 (m, 1H, CH-OH); 3,51 (d, 2H, *J* = 5,9 Hz, CH₂-OH); 2,48 (s, CH₃) ppm.

²³⁵ Garner, E. F.; Goldstein, I. J.; Montgomery, R.; Smith, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1206-1208.

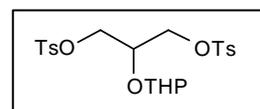
²³⁶ Tipson, R. S.; Clapp, M. A.; Cretcher, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 1092-1094.

4.1.1.2. Tosilato de 2-(oxan-2-iloxi)-3-tosiloxipropilo (**17**)

Una disolución de **21** (11,03 g, 27,5 mmol), *p*-toluensulfonato de piridinio (1,39 g, 5,53 mmol) y 3,4-dihidro-2*H*-pirano (5,10 g, 60,6 mmol) en DCM anhidro (163 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas. La mezcla de reacción se diluyó con una disolución saturada de NaCl (100 mL), se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL) y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El filtrado se evaporó para dar **17** como un sólido blanco (13,17 g, 99 %).

Rendimiento: 99%

P.f.: 103-104 °C (Lit¹⁰⁶: 104-105 °C)



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,73 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H_{o-Ts}); 7,72 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H_{o-Ts}); 7,32 (d, 4H, *J* = 8,3 Hz, H_{m-Ts}); 4,56 (m, 1H, H_{2-THP}); 4,12–3,94 (m, 5H, CH₂-OTs + CH-OTHP); 3,63 (m, 1H, H_{6-THP}); 3,35 (m, 1H, H_{6-THP}); 2,43 (s, 6H, CH₃); 1,62–1,39 (m, 6H, H_{3-5-THP}) ppm.

4.1.1.3. Tosilato de 3-(1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxan-2-iloxi)propilo (**7a**) y 1,3-bis-(1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxan-2-iloxi)propano (**79**)

Una disolución de **17** (5,96 g; 12,3 mmol), 2-nitroimidazol (1,25 g; 11,08 mmol) y carbonato de cesio (3,61 g; 11,08 mmol) en DMF anhidra (118 mL) se burbujó con argón durante 5 minutos y se calentó a 60 °C durante 25 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se trató con AcOEt (50 mL), quedando un residuo que se filtró y se lavó

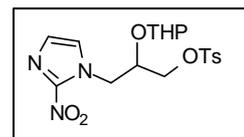
¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899-905.

con AcOEt (50 mL), finalmente la mezcla se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por columna cromatográfica flash en columna de gel de sílice usando como eluyente hexano/AcOEt (1:1). Aislado **7a** (2,26 g; 48%), compuesto por una mezcla de diastereómeros 55:45 y **79** (0,122 g; 3%) como aceites amarillentos.

Rendimiento (7a): 48 %

Rf (Hex/AcOEt 1:1): 0,42

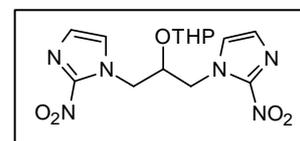
P.f.: 106-109 °C (Lit¹⁰⁶: 106-109 °C, mezcla de diastereisómeros 71:29)



¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,80 (dt, 2H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,9 Hz, H_{o-Ts}, dias. A); 7,78 (dt, 2H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,9 Hz, H_{o-Ts}, dias. B); 7,36 (dt, 4H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 0,6 Hz, H_{m-Ts}, dias. A+B); 7,13 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{5-Im}, dias. B); 7,09 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{5-Im}, dias. A); 7,08 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{4-Im}, dias. B); 7,07 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{4-Im}, dias. A); 4,78 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,2 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,67 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,2 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,49 (m, 1H, H_{2-THP}, dias. A); 4,42 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 8,4 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,34 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 7,5 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,25-4,19 (m, 3H, CH-OTHP, dias. A + CH₂-OTs, dias. B + H_{2-THP}, dias. B); 4,14 (dd, 1H, *J* = 11,1 Hz, *J* = 4,3 Hz, CH₂-OTs, dias. A); 4,06–3,99 (m, 3H, CH-OTHP, dias. B, CH₂-OTs, dias. A+B); 3,62 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. B); 3,34 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. B); 3,24 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,07 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 2,45 (s, 3H, CH₃ dias. A+B); 1,56-1,38 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

Rendimiento (79): 3%

Rf (Hex/AcOEt 1:1): 0,50



¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,24 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{5-Im}); 7,17 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{5-Im}); 7,15 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{4-Im}); 7,11 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz, H_{4-Im}); 4,83 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,1 Hz, CH₂-Im); 4,75 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,9 Hz, CH₂-Im); 4,60 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 6,8 Hz, CH₂-Im); 4,41 (m, 1H, CH-OTHP); 4,29 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 8,5 Hz, CH₂-Im); 3,99 (dd, 1H, *J* = 7,4 Hz, *J* = 2,5 Hz, H_{2-THP}); 3,48 (m, 1H, H_{6-THP}); 3,23 (m, 1H, H_{6-THP}); 1,67-1,17 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 145,0 (C_{2Im}); 144,9 (C_{2'Im}); 128,4 (C_{5Im}); 128,1 (C_{5'Im}); 127,7 (C_{4Im}); 126,8 (C_{4'Im}); 101,1 (C_{2THP}); 74,6 (C-OTHP); 64,8 (C_{3THP}); 51,5 (CH_{2Im}); 51,0 (CH_{2Im}); 30,7 (C_{6THP}); 24,6 (C_{4THP}); 20,7 (C_{5THP}) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₁₄H₁₉N₆O₆ [M]⁺: 367,1361; Encontrado [M]⁺: 367,1294.

IR (CHCl₃): *v*_{max} 3400; 2917; 1537; 1484; 1359; 1034 cm⁻¹.

4.1.2. Síntesis alternativa¹⁹¹

4.1.2.1. 1-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilmetil)-1*H*-2-nitroimidazol (24)

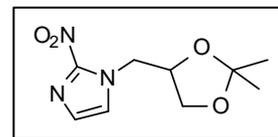
Una disolución del tosilato **22** (12,00 g; 41,80 mmol), 2-nitroimidazol (**6**) (5,19 g; 45,98 mmol), Cs₂CO₃ (13,58 g; 41,80 mmol) y DMF anhidra (144 mL) se calentó a 110 °C durante 22 horas bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se concentró a sequedad, el residuo obtenido se disolvió en AcOEt y el sólido formado se filtró. El filtrado se evaporó a presión reducida obteniendo un aceite marrón (418 mg, 92%). Una

¹⁹¹ Nieto, E.; Alajarín, R.; Álvarez-Builla, J.; Larrañaga, I.; Gorospe, E.; Pozo, M. A. *Synthesis* **2010**, *21*, 3700-3704.

muestra se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano (4:6) para dar **24** como un aceite de color marrón-amarillento.

Rendimiento: 92%

Rf (AcOEt/Hex 4:6): 0,2



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,17 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,10 (s, 1H, H_{4-Im}); 4,69 (dd, 1H, *J* = 13,5 Hz, *J* = 2,3 Hz, CH_{2-Im}); 4,47-4,38 (m, 1H, CH); 4,35 (dd, 1H, *J* = 13,5 Hz, *J* = 7,2 Hz, CH_{2-Im}); 4,13 (dd, 1H, *J* = 8,9 Hz, *J* = 5,9 Hz, CH_{2-O}); 3,65 (dd, 1H, *J* = 8,9 Hz, *J* = 5,6 Hz, CH_{2-O}); 1,34 (s, 3H, CH₃); 1,28 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 144,7 (C_{2-Im}); 128,1 (C_{5-Im}); 127,1 (C_{4-Im}); 110,2 (C₂); 73,8 (C₅); 66,2 (C₄); 52,0 (CH_{2-Im}); 26,5 (CH₃); 25,1 (CH₃) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₉H₁₄N₃O₄ [M]⁺: 228,0984; Encontrado [M]⁺: 228,1012.

IR (CHCl₃): ν_{max} 1787 (NO₂); 1539 (C=N); 1363 (NO₂); 1066; 969 (C-O) cm⁻¹.

Análisis elemental (C₉H₁₃N₃O₄) Calculado: C = 47,57; H = 5,76; N = 18,49; Encontrado: C = 47,77; H = 5,92; N = 18,59.

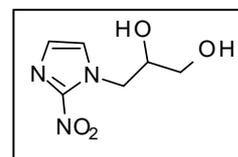
4.1.2.2. 3-(1*H*-2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (**25**) y 3-(1*H*-2-nitroimidazol-1-il)prop-2-en-1-ol (**80**)

Una disolución de **24** (8,87 g; 39,0 mmol) y Dowex 50WX4 (26,98 g; 34,3 mmol) en agua (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con MeOH (3 x 20 mL), el disolvente se concentró a sequedad y el residuo se purificó por columna cromatográfica flash en columna de gel de sílice usando como eluyente AcOEt/MeOH (9:1) aislando dos sólidos amarillos **25** (6,38 g; 88%) y **80** (0,45 g; 7%).

Rendimiento (25): 88%

Rf (AcOEt/MeOH 9:1): 0,44

P.f.: 109,4-112,7 °C (EtOH) (Lit¹²⁴: 110-112 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,48 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,16 (s, 1H, H_{4-Im}); 4,77 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 3,3 Hz, CH₂-Im); 4,39 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 8,4 Hz, CH₂-Im); 4,01-3,93 (m, 1H, CH); 3,64-3,53 (m, 2H, CH₂-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 146,4 (C_{2-Im}); 129,2 (C_{5-Im}); 128,0 (C_{4-Im}); 71,6 (CH-OH); 64,7 (CH₂-OH); 53,6 (CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₆H₁₀N₃O₄ [M]⁺: 188,0671; Encontrado [M]⁺: 188,0670.

IR (KBr): ν_{max} 3275 (OH); 1537 (C= N); 1491 (NO₂); 1366 (NO₂); 1053 cm⁻¹.

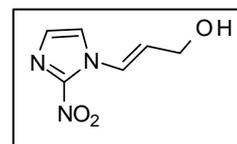
¹²⁴ Beaman, A. G.; Tautz, W.; Duschinsky, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1968**, 520-530.

Análisis elemental (C₆H₉N₃O₄). Calculado: C (38,50); H (4,85); N (22,45); Encontrado: C (38,29); H (4,94); N (22,19).

Rendimiento (80): 7%

Rf (AcOEt/MeOH 9:1): 0,55

P.f.: 88-90 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,74 (d, 1H, *J* = 1,0 Hz, H_{5-Im}); 7,64 (dt, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 2,0 Hz, Im-CH=C); 7,21 (d, 1H, *J* = 1,0 Hz, H_{4-Im}); 6,32 (dt, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 5,3 Hz, C=CH); 4,31 (dd, 2H, *J* = 5,3 Hz, *J* = 2,0 Hz, CH₂-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 129,1 (C_{5-Im}); 127,9 (C_{4-Im}); 125,5 (C3); 125,2 (C2); 60,4 (C1) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₆H₈N₃O₃ [M]⁺: 170,0566; Encontrado: [M]⁺: 170,0566.

Análisis elemental (C₆H₇N₃O₃). Calculado: C (42,60); H (4,17); N (24,84); Encontrado: C (42,86); H (4,26); N (24,57).

4.1.2.3. Tosilato de 2-hidroxi-3-(1H-2-nitroimidazol-1-il)propilo (26)

Método A: Una disolución de diol **25** (117 mg; 0,62 mmol) en piridina anhidra (3 mL) enfriada a 0 °C se le añadió gota a gota una disolución de TsCl (119 mg; 0,62 mmol) en piridina anhidra (3 mL) durante 15 minutos bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió hielo picado (3 mL) y HCl 2N (5 mL) y se extrajo con Et₂O (10 x 3 mL). Se combinaron las

fases orgánicas, se lavaron con NaCl saturado, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna de gel de sílice eluyendo con AcOEt, obteniéndose un sólido amarillo **26** (57,8 mg; 27%) como una mezcla de regioisómeros 85:15.

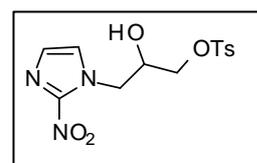
Método B: Se disolvió el acetónido **24** (50,0 mg; 0,22 mmol), Ts₂O (71,9 mg; 0,22 mmol) y PPTS (11,1 mg; 0,044 mmol) en DCM (1,1 mL) bajo atmósfera de argon a temperatura ambiente y se agitó durante 27 horas vigorosamente. El disolvente se concentró a sequedad y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con AcOEt para dar un sólido amarillo **26** (33,6 mg; 45%) como una mezcla de regioisómeros 98:2.

Método C: Una solución de **25** (50,0 mg; 0,267 mmol), cloruro de *p*-toluensulfonilo (50,0 mg; 0,267 mmol), trietilamina (0,037 g; 0,267 mmol) y Bu₂SnO (1,3 mg; 0,053 mmol) en MeCN anhidro (4 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente se concentró a sequedad y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano (8:2) para dar el sólido amarillo **26** (76,0 mg; 83%) como una mezcla de regioisómeros 99,3:0,7. Una muestra se recristalizó en AcOEt.

Rendimiento: Método C: 83%

Rf (AcOEt/Hex 8:2) : 0,45

P.f.: 140,9-143,5 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,85 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{o-Ts}); 7,49 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{m-Ts}); 7,41 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,13 (s, 1H, H_{4-Im}); 4,66 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 3,3

Hz, CH₂-Im); 4,36 (dd, 1H, $J = 13,8$ Hz, $J = 8,2$ Hz, CH₂-Im); 4,12-4,05 (m, 3H, CH, CH₂-OTs); 2,50 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆): δ 144,6 (C_{4Ts}); 144,38 (C_{2Im}); 131,4 (C_{1Ts}); 129,7 (2C; C_{3Ts}); 127,9 (C_{5Im}); 127,2 (2C; C_{2Ts}); 126,8 (C_{4Im}); 71,0 (CH-OH); 66,2 (CH₂-OTs); 50,7 (CH₂-Im); 20,6 (CH₃) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₁₃H₁₆N₃SO₆ [M]⁺: 342,0706; Encontrado [M]⁺: 342,0624.

IR (KBr): ν_{\max} 3204 (OH); 1539 (C= N); 1492 (NO₂); 1365 (SO₂); 1171 (SO₂) cm⁻¹.

Análisis elemental (C₁₃H₁₅N₃O₆S). Calculado: C (45,74); H (4,42); N (12,31); S (9,39). Encontrado: C (45,58); H (4,42); N (12,11); S (9,61).

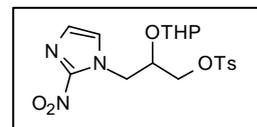
4.1.2.4. Tosilato de 3-(1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-2-iloxi)propilo (7a)

Una disolución de **26** (0,200 g; 0,586 mmol); PPTS (0,176 g; 0,700 mmol) y 3,4-dihidro-2*H*-pirano (0,148 g; 1,758 mmol) en DCM anhidro (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se evaporó y el residuo obtenido se purificó a través de una columna corta de gel de sílice y se eluyó primero en hexano seguido de AcOEt/hexano (7:3). Después de evaporar el disolvente se obtuvo un aceite que se trituró con éter dietílico para dar **7a** (0,221 g, 88%) un sólido amarillo como mezcla de diastereómeros 51:49.

Rendimiento: 88%

Rf (Hex/AcOEt 7:3) : 0,43

P.f.: 110-112,9 °C (Lit¹⁰⁶: 106-109 °C, mezcla de diastereómeros 71:29)



4.2. Síntesis del precursor de FMISO monobromado

4.2.1. A partir del precursor 7a de FMISO

4.2.1.1. Tosilato de 3-(4-bromo-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-2-iloxi)propilo (7b)

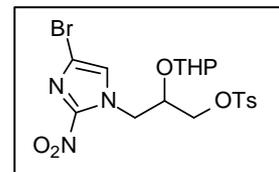
Una disolución de **7a** (1,0 g; 2,4 mmol), *N*-bromosuccinimida (0,836 g; 4,80 mmol) en DMF anhidra (7 mL) bajo atmósfera de argon se dejó agitando 17 horas a 10 °C. Pasado este tiempo se añadió a 0 °C una disolución saturada de NaCl que contenía 5% de Na₂CO₃. Se extrajo con dietil éter (3 x 30 mL), las fases orgánicas se lavaron con NaCl saturado (20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad a temperatura ambiente. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (6:4), obteniéndose un aceite que se trituró en dietil éter para dar el sólido amarillento **7b** (0,83 g, 69%) como mezcla de diastereómeros 67:33.

¹⁰⁶ Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Mosdzianowski, C.; Kim, J. Y.; Gil, H. S.; Kang, S. H.; Ryu, J. S.; Moon, D. H. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 899-905.

Rendimiento: 69 %

Rf (Hex/AcOEt 6:4) : 0,44

P.f.: 120,0-124,3 °C



¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,79 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{o-Ts}, dias. A); 7,78 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{o-Ts}, dias. B); 7,36 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{m-Ts}, dias. A+B); 7,09 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. B); 7,01 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. A); 4,79 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,3 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,68 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,3 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,44 (m, 1H, H_{2-THP}, dias. B); 4,34 (m, 2H, CH₂-Im dias. A+B); 4,27 (m, 1H, H_{2-THP}, dias. A); 4,21 (m, 2H, CH-OTHP, dias. B + CH₂-OTs, dias. A); 4,11 (dd, 1H, *J* = 11,2 Hz, *J* = 4,5 Hz, CH₂-OTs, dias. B); 4,05-3,98 (m, 3H, CH-OTHP, dias. B + CH₂-OTs, dias. A+B); 2,45 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 1,67-1,38 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 145,8; 132,5; 130,1 (2C); 128,0 (2C); 126,3; 115,3; 100,9; 97,8; 74,1; 70,3; 68,5; 67,0; 63,2; 51,1; 50,5; 30,3; 30,1; 24,9; 24,8; 21,7; 19,7; 19,3 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₁₈H₂₃BrN₃O₇S [M]⁺: 504,0440; Encontrado [M]⁺: 504,0400.

IR (KBr): *v*_{max} 3449 (OH); 1535 (C=N); 1499 (NO₂); 1350 (SO₂); 1168 (SO₂) cm⁻¹.

Análisis elemental (C₁₈H₂₂BrN₃O₇S). Calculado: C (42,86); H (4,39); N (8,33); S (6,35). Encontrado: C (42,60); H (4,46); N (8,24); S (6,36).

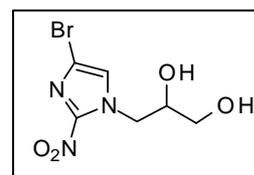
4.2.2. A partir del diol **25**

4.2.2.1. 3-(4-bromo-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (**33b**)

Una disolución de diol **25** (2,25 g; 12,03 mmol) y *N*-bromoftalimida (3,80 g; 16,84 mmol) en DMF anhidra (12 mL) se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. El disolvente se evaporó, se añadió MeOH frío (20 mL) y se filtró el precipitado blanco formado. Se concentró el filtrado a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt 2:1, obteniéndose un aceite amarillento (2,51 g, 79%).

Rendimiento: 79%

R_f_(Hex/AcOEt 2:1): 0,32



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,56 (s, 1H, H_{5-Im}); 4,75 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 3,3 Hz, CH₂-Im); 4,37 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 8,5 Hz, CH₂-Im); 4,00–3,93 (m, 1H, CH-OH); 3,60 (m, 2H, CH₂-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 145,3 (C₂_{Im}); 128,6 (C₅_{Im}); 114,4 (C₄_{Im}); 71,3 (CH-OH); 64,6 (CH₂-OH); 54,0 (CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₆H₉BrN₃O₄ [M]⁺: 265,9776; Encontrado [M]⁺: 265,9777.

IR (KBr): ν_{max} 3369 (OH); 15943 (C=N); 1469 (NO₂); 1369 (NO₂) cm⁻¹.

Análisis elemental (C₆H₈BrN₃O₄). Calculado: C (27,08); H (3,03); N (15,79).
Encontrado: C (27,06); H (3,08); N (15,75).

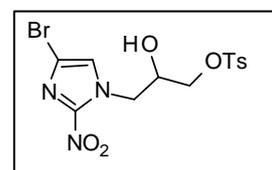
4.2.2.2. Tosilato de 3-(4-bromo-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-hidroxiopilo (30)

Una disolución de **33** (2,5 g; 9,47 mmol) en MeCN anhidro (142 mL) se le añadió cloruro de *p*-toluensulfonilo (1,80 g; 9,47 mmol), trietilamina (0,955 g; 9,47 mmol) y Bu₂SnO (0,046 g; 0,188 mmol) bajo atmósfera de argón y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Pasado este tiempo el disolvente se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en DCM (50 mL), se filtró y se lavó con NaCl saturado (2 x 20 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (3 x 10 mL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. Por último el residuo se purificó por cromatografía flash sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (6:4). Se obtuvo un aceite que se trituró con DCM obteniéndose el sólido amarillento **30** (2,84 g, 72%) como un único regioisómero.

Rendimiento: 72%

R_f_(Hex/AcOEt 6:4): 0,43

P.f.: 123,6-125,7 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,84 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{o-Ts}); 7,48 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{m-Ts}); 7,47 (s, 1H, H_{5-Im}); 4,64 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz; *J* = 3,3 Hz, CH₂-Im); 4,34 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz; *J* = 8,2 Hz, CH₂-Im); 4,14–4,09 (m, 1H, CH-OH); 4,05 (m, 2H, CH₂-OTs); 2,50 (s, 3H, CH₃) ppm.

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 146,8 ($\text{C}_{4\text{Ts}}$); 145,3 ($\text{C}_{2\text{Im}}$); 133,8 ($\text{C}_{1\text{Ts}}$); 131,2 (2C; $\text{C}_{3\text{Ts}}$); 129,1 (2C; $\text{C}_{2\text{Ts}}$); 128,6 ($\text{C}_{5\text{Im}}$); 114,5 ($\text{C}_{4\text{Im}}$); 71,9 (CH-OH); 68,4 ($\text{CH}_2\text{-OTs}$); 53,2 ($\text{CH}_2\text{-Im}$); 21,6 (CH_3) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrN}_3\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 419,9865; Encontrado $[\text{M}]^+$: 419,9874.

IR (KBr): ν_{max} 3419 (OH); 1596 (C=N); 1465 (NO_2); 1364 (NO_2); 1365 (SO_2); 1177 (SO_2) cm^{-1} .

Análisis elemental ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_6\text{S}$). Calculado: C (37,15); H (3,35); N (9,99). Encontrado: C (37,39); H (3,32); N (9,81).

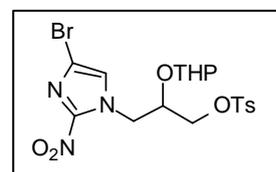
4.2.2.3. Tosilato de 3-(4-bromo-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (**7b**)

A una disolución de **30** (1,2 g; 2,85 mmol) en DCM anhidro (78 mL) bajo atmósfera de argón, se le añadió PPTS (0,89 g; 3,54 mmol) y 3,4-dihidro-2H-pirano (0,74 g; 8,83 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 22 horas y pasado este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida y a temperatura ambiente. El residuo se cromatografió sobre gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano 6:4 obteniéndose el sólido amarillento **7b** (1,0 g, 68%) como una mezcla de diastereoisómeros 1:1.

Rendimiento: 68%

Rf_(Hex/AcOEt 6:4): 0,44

P.f.: 120,0-122,3 °C



4.3. Síntesis del precursor de FMISO dibromado **34** a partir del diol **25**

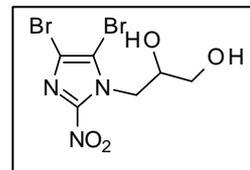
4.3.1. 3-(4,5-dibromo-1H-2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (**34**)

Una disolución de diol **25** (1,56 g; 8,38 mmol) y *N*-bromoftalimida (7,57 g; 33,53 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se agitó durante 18 horas a 10 °C bajo atmósfera de argón. El disolvente se evaporó, se añadió MeOH frío (20 mL) y se filtró el precipitado blanco formado. Se concentró el filtrado a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (1:1), obteniéndose el sólido amarillo **34** (1,03 g, 36%).

Rendimiento: 36%

R_f_(Hex/AcOEt 2:1): 0,26

P.f.: 98-100 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 4,70 (d, 2H, *J* = 5,9 Hz, CH₂-Im); 3,95 (q, 1H, *J* = 5,9 Hz, CH-OH); 3,62 (dd, 2H, *J* = 5,9 Hz, *J* = 3,9 Hz, CH₂-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 117,5 (C₅_{Im}); 114,5 (C₄_{Im}); 71,3 (CH-OH); 65,1 (CH₂-OH); 53,8 (CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₆H₈Br₂N₃O₄ [M]⁺: 343,8876; Encontrada [M]⁺: 343,8847.

IR (KBr): *v*_{max} 3392 (OH); 2933; 1543 (C=N); 1478 (NO₂); 1363 (NO₂) cm⁻¹.

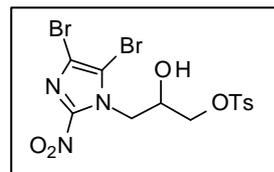
4.3.2. Tosilato de 3-(4,5-dibromo-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-hidroxipropilo (35)

Una disolución de **34** (0,905 g; 2,64 mmol) en MeCN anhidro (40 mL) se le añadió cloruro de *p*-toluensulfonilo (0,503 g; 2,64 mmol), trietilamina (0,268 g; 2,64 mmol) y Bu₂SnO (0,013 g; 0,052 mmol) bajo atmósfera de argón y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este tiempo se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en DCM (20 mL), se filtró y se lavó con NaCl saturado (2 x 10 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (3 x 10 mL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. Por último el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (8:2), seguido de hexano/AcOEt (6:4). Se obtuvo un sólido amarillento **35** (0,67 g, 51%) como un único regioisómero.

Rendimiento: 51%

R_f_{(Hex/AcOEt 6:4):} 0,50

P.f.: 44-46 °C



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,84 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H_{o-Ts}); 7,48 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H_{m-Ts}); 4,62 (m, 2H, CH₂-Im); 4,11 (s_{ap}, 3H, CH-OH, CH₂-OTs); 2,50 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 146,8 (C_{4-Ts}); 133,9 (C_{1-Ts}); 131,1 (2C; C_{3-Ts}); 129,1 (2C; C_{2-Ts}); 117,6 (C_{5-Im}); 114,6 (C_{4-Im}); 72,1 (CH-OH); 68,3 (CH₂-OTs); 52,8 (CH₂-Im); 21,6 (CH₃) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $C_{13}H_{14}Br_2N_3O_6S$ $[M]^+$: 497,8965; Encontrado $[M]^+$: 497,8991.

IR (KBr): ν_{max} 3413 (OH); 1597 (C=N); 1474 (NO₂); 1362 (NO₂); 1175 (SO₂) cm^{-1} .

Análisis elemental ($C_{13}H_{13}Br_2N_3O_6S$). Calculado: C (31,28); H (2,65); N (8,42); S (6,42); Encontrado: C (31,39); H (2,67); N (8,61); S (6,49).

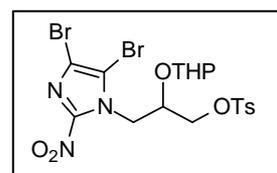
4.3.3. Tosilato de 3-(4-bromo-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (**7c**)

Una disolución de **35** (0,62 g; 1,25 mmol) en DCM anhidro (35 mL) bajo atmósfera de argón, se le añadió PPTS (0,38 g; 1,5 mmol) y 3,4-dihidro-2*H*-pirano (0,34 g; 3,75 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 4 horas y pasado este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida y a temperatura ambiente. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano (4:6), obteniéndose un aceite que se trituró con dietil éter para dar un sólido amarillo **7c** (0,50 g, 69%).

Rendimiento: 69%

Rf_(Hex/AcOEt 6:4): 0,54

P.f.: 51,0-53,0 °C



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,78 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, H_{o-Ts}, dias. A+B); 7,36 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, H_{m-Ts}, dias. A+B); 4,66 (m, 2H, H_{2-THP}, CH₂-Im, dias. A+B); 4,36-3,95 (m, 4H, CH₂-Im + CH-OTHP + CH₂-OTs dias. A+B); 3,67-3,27 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A+B);

3,13 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A+B); 2,45 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 1,54-1,18 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 145,8; 145,4; 132,4; 132,2; 131,8; 130,0 (2C); 127,9 (2C); 101,3; 97,5; 74,7; 70,6; 67,9; 63,9; 62,9; 51,5; 50,5; 30,3; 24,7; 21,7; 20,2; 19,2 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₁₈H₂₂Br₂N₃O₇S [M]⁺: 581,9540; Encontrado [M]⁺: 581,9545.

IR (KBr): ν_{max} 3435 (OH); 2945; 1597 (C=N); 1545; 1474 (NO₂); 1363 (NO₂); 1176 (SO₂) cm⁻¹.

Análisis elemental (C₁₈H₂₁Br₂N₃O₇S). Calculado: C (37,06); H (3,62); N (7,20); S (5,49); Encontrado: C (37,13); H (3,63); N (7,25); S (5,67).

4.4. Reacción de acoplamiento C-C de Suzuki-Miyaura

4.4.1. A partir del diol **33b**

4.4.1.1. Procedimiento General

Método A: Una disolución de **33b**, PhB(OH)₂ y K₂CO₃ en acetona/H₂O (1:0,6) se desoxigenó mediante tres ciclos de congelación-vacío-descongelación bajo atmósfera de argón. A continuación se añadió una disolución de Pd(OAc)₂ (9,8 mM) en acetona a la que previamente se habían hecho tres ciclos de congelación-vacío-descongelación, y se dejó agitando a 65 °C. A las 15 y 24 horas de reacción se añadieron dos nuevas

porciones de la disolución de Pd(OAc)₂ (9,8 mM) en acetona y la reacción se dejó agitando 48 horas. El disolvente se evaporó a sequedad, se añadió AcOEt y el precipitado formado se filtró a través de celita. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

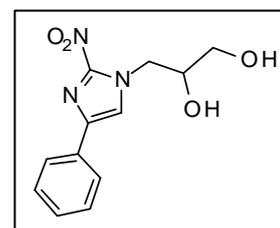
Método B.²³⁷ Una disolución de **33b**, PhB(OH)₂, Pd(OAc)₂ y NaHCO₃ en acetona-H₂O (1:0,6) se desoxigenó mediante tres ciclos de congelación-vacío-descongelación y se calentó a 100 °C en microondas durante 10 minutos bajo atmósfera de argón. Pasado este tiempo el disolvente se evaporó a sequedad, se añadió AcOEt y el precipitado se filtró a través de celita. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con DCM/AcOEt (2:8) seguido de una cromatografía por HPLC preparativo en fase reversa C18 con una mezcla MeOH/H₂O (7:3).

4.4.1.1.1. 3-(4-fenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (**33d**)

Siguiendo el método B, a partir de **33b** (0,580 g, 2,18 mmol), PhB(OH)₂ (0,667 g, 5,47 mmol), NaHCO₃ (1,098 g, 13,08 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,080 g, 0,33 mmol) en una mezcla de acetona/H₂O (8,70 mL/5,40 mL) se obtuvo **33d** (0,290 g; 51%) como un aceite amarillento.

Rendimiento: Método A: 30%, Método B: 51%

Rf_(DCM/AcOEt 2:8): 0,41



²³⁷ Wallow, T. I.; Novak, B. M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5034-5037.

¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD): δ 7,85 (dd, 2H, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,7 Hz, H_{o-Ph}); 7,85 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,55-7,31 (m, 3H, H_{m,p-Ph}); 4,80 (dd, 1H, *J* = 13,6 Hz, *J* = 3,4 Hz, CH₂-Im); 4,42 (dd, 1H, *J* = 13,6 Hz; *J* = 8,5 Hz, CH₂-Im); 4,06–3,97 (m, 1H, CH-OH); 3,60 (m, 2H, CH₂-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 140,9 (C2_{Im}); 134,4 (C1_{Ph}); 133,2 (C4_{Ph}); 129,9 (2C; C3_{Ph}); 129,3 (C5_{Im}); 126,3 (2C; C2_{Ph}); 125,1 (C4_{Im}); 71,6 (CH-OH); 64,8 (CH₂-OH); 54,0 (CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₁₂H₁₄N₃O₄ [M]⁺: 264,0984; Encontrado [M]⁺: 264,1000.

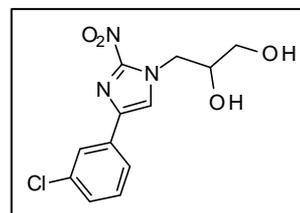
Análisis elemental (C₁₂H₁₃N₃O₄). Calculado: C (54,75); H (4,97); N (15,96). Encontrado: C (54,65); H (4,85); N (15,92).

4.4.1.1.2. 3-(3-clorofenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (33e)

Siguiendo el método B, a partir de **33b** (0,163 g, 0,61 mmol), ácido 3-clorofenilborónico (0,240 g, 1,53 mmol), NaHCO₃ (0,307 g, 3,66 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,022 g, 0,091 mmol) en una mezcla de acetona-H₂O (2,60 mL/1,60 mL) se obtuvo **33e** (0,025 g, 15%) como un aceite amarillento.

Rendimiento: 15%

R_f(DCM/AcOEt 2:8): 0,40



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,92 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,91 (t_{ap}, 1H, *J* = 1,3 Hz, H_{2-Ar}); 7,78 (dt_{ap}, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,3 Hz, H_{4-Ar}); 7,45 (t_{ap}, 1H, *J* = 8,4 Hz, H_{5-Ar}); 7,3 (dt_{ap}, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,2 Hz, H_{6-Ar}); 4,80 (dd, *J* = 13,8 Hz; *J* = 3,6 Hz, 1H, CH₂-Im); 4,43 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz; *J* = 8,5 Hz, CH₂-Im); 4,06–3,99 (m, 1H, CH-OH); 3,62 (t, 2H, CH₂-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 139,3; 135,9; 135,4; 131,4; 129,1; 126,1; 125,5; 124,5; 71,5; 64,7; 53,9 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₁₂H₁₃ClN₃O₄ [M]⁺: 298,0595; Encontrado [M]⁺: 298,0595.

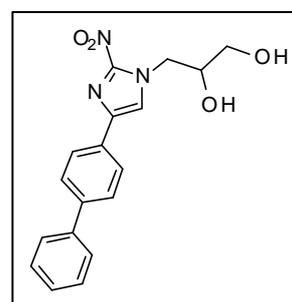
IR (KBr): ν_{max} 3365; 2917; 1531; 1480; 1440; 1418; 1340; 1263; 759; 639 cm⁻¹.

4.4.1.1.3. 3-(4-4'-bifenil-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)propano-1,2-diol (**33h**)

Seguendo el método B, a partir de **33b** (0,170 g, 0,64 mmol), ácido 4-bifenilborónico (0,317 g, 1,60 mmol), NaHCO₃ (0,322 g, 3,84 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,023 g, 0,096 mmol) en una mezcla de acetona-H₂O (2,60 mL/1,60 mL) se obtuvo **33h** (0,030 g) como un aceite amarillento.

Rendimiento: 14%

R_f_(DCM/AcOEt 2:8): 0,40



¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD): δ 7,92 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{3,5-Ar}); 7,89 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,68 (m, 4H, H_{2,6,2',6'-Ar}); 7,43 (m, 3H, H_{3',4',5'-Ar}); 4,80 (dd, 1H, *J* = 13,6 Hz, *J* = 3,4 Hz, CH₂-Im); 4,42 (dd, 1H, *J* = 13,6 Hz, *J* = 8,5 Hz, CH₂-Im); 4,07–4,01 (m, 1H, CH-OH); 3,63 (dd, 2H, *J* = 4,2 Hz, *J* = 1,3 Hz, CH₂-OH) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD): δ 139,7; 139,2; 138,1; 129,7; 127,3 (2C); 126,0 (2C); 125,8 (2C); 125,2 (2C); 124,2; 122,6; 69,1; 62,3; 51,5 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₁₈H₁₈N₃O₄ [M]⁺: 340,1297. Encontrado [M]⁺: 340,1305.

Análisis elemental (C₁₈H₁₇N₃O₄). Calculado: C (63,71); H (5,04); N (12,38); Encontrado: C (63,46); H (4,88); N (12,30).

4.4.2. Síntesis de precursores lipófilos de FMISO mediante reacción Suzuki-Miyaura a partir del bromoderivado **7b**

4.4.2.1. Procedimiento General

Método A:²³⁷ Una disolución de **7b**, ácido borónico y K₂CO₃ en acetona/H₂O 1:0,6 se burbujeó bajo argón. Se aplicaron tres ciclos de congelación-vacío-descongelación y se añadió una disolución de Pd(OAc)₂ (9,8 mM) en acetona a la que previamente se habían hecho tres ciclos de congelación-vacío-descongelación y la mezcla se dejó agitando a 65 °C. Transcurridas 15 y 24 horas de reacción se añadió una nueva porción de la disolución de Pd(OAc)₂ en acetona. A las 48 horas de reacción el

²³⁷ Wallow, T. I.; Novak, B. M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5034-5037.

disolvente se evaporó a sequedad, se añadió AcOEt y el precipitado formado se filtró a través de Celita. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

Método B: Una disolución de **7b**, ácido borónico (2,5 eq.), K₂CO₃ (6 eq.) y Pd(OAc)₂ (15% en mol) se disolvió en acetona-H₂O 1:0,6 bajo atmósfera de argón, y se aplicaron tres ciclos de congelación-vacío-descongelación. A continuación se calentó a 65 °C en microondas durante 10 minutos. Pasado este tiempo el disolvente se evaporó a sequedad, se añadió AcOEt y el precipitado formado se filtró a través de Celita. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

4.4.2.1.1. Tosilato de 3-(4-fenil-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7d**) y **81****

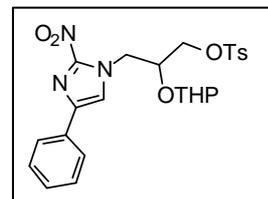
Siguiendo el método A, a partir de **7b** (0,300 g, 0,59 mmol), PhB(OH)₂ (0,179 g, 1,47 mmol), K₂CO₃ (0,584 g, 3,54 mmol) y Pd(OAc)₂ en acetona (3 x 6,6 mg/3 mL) en una mezcla de acetona/H₂O 1:0,6 (2,40 mL/1,50 mL). Se eluyó con CHCl₃/AcOEt (94:6) para dar **7d** como un aceite amarillento y **81** (0,03 g) como un sólido blanco. El aceite se trituró en dietil éter y se filtró para obtener **7d** (0,207 g) como un sólido amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros 77:23.

Rendimiento (7d): Método A: 69%

Método B: 34%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,40

P.f.: 52,5-53,7 °C



¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,80 (m, 4H, H_{o-Ts} + H_{o-Ph}); 7,43-7,39 (m, 2H, H_{m-Ts}); 7,38 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,33-7,30 (m, 3H, H_{m-Ph} + H_{p-Ph}); 4,83 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,73 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,54 (m, 1H, H_{2-THP}, dias. B); 4,49 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 7,3 Hz, CH₂-Im, dias B); 4,40 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 7,3 Hz, CH₂-Im, dias A); 4,30-4,28 (m, 2H, H_{2-THP}, dias. A + CH-OTHP, dias. B); 4,23 (dd, 1H, *J* = 10,0 Hz, *J* = 2,8 Hz, CH₂-OTs, dias A); 4,17 (dd, 1H, *J* = 10,0 Hz, *J* = 2,8 Hz, CH₂-OTs, dias B); 4,10-4,00 (m, 3H, CH-OTHP, dias. A + CH₂-OTs, dias. A+B); 3,63 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,33 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,24 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. B); 3,15 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. B); 2,44 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 1,75-1,25 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 145,4; 144,6; 140,6; 132,1; 131,3; 130,0 (2C); 128,8 (2C); 128,6; 128,0 (2C); 127,9; 125,3 (2C); 123,15; 122,45; 100,8; 96,7; 94,6; 74,1; 70,2; 68,8; 67,0; 63,0; 62,9; 51,0; 50,5; 30,4; 30,0; 24,9; 24,7; 21,6; 19,3 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₂₄H₂₈N₃O₇S [M]⁺: 502,1648; Encontrada [M]⁺: 502,1630.

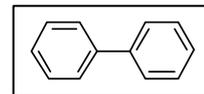
IR (KBr): *v*_{max} 3449 (OH); 1537 (C=N); 1483 (NO₂); 1362 (NO₂); 1264 (SO₂); 1177 (SO₂) cm⁻¹.

Análisis experimental (C₂₄H₂₇N₃O₇S). Calculado: C (57,47); H (5,43); N (8,38); S (6,39); Encontrado: C (57,43); H (5,41); N (8,30); S (6,35).

Rendimiento (81): Método A: 30%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,60

P.f.: 68-70 °C (EtOH)(Lit²³⁸ 68,5 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,57 (d, 4H, *J* = 8,3 Hz, H_{2,6,2',6'}); 7,43 (t, 4H, *J* = 7,9 Hz, H_{3,5,3',5'}); 7,33 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, H_{4,4'}) ppm.

4.4.2.1.2. Tosilato de 3-(4-3'-clorofenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-ilo)propilo (7e) y 82

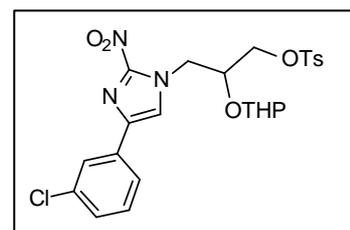
Siguiendo el método A, a partir de **7b** (0,300 g, 0,59 mmol), ácido 3-clorofenilborónico (0,232 g, 1,48 mmol), K₂CO₃ (0,584 g, 3,54 mmol) y Pd(OAc)₂ en acetona (3 x 6,6 mg / 3 mL) disueltos en acetona/H₂O 1:0,6 (2,40 mL/1,50 mL). Se eluyó con CHCl₃/AcOEt (94:6) para obtener **7e** como un aceite amarillento y **82** (0,05 g) como un sólido blanco. El aceite se trituró en dietil éter y se filtró para dar **7e** (0,174 g) como un sólido amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros de 55:45.

Rendimiento (7e): Método A: 55%

Método B: 17%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,41

P.f.: 53,2-55,3 °C



²³⁸ Mukhopadhyay, S.; Rothenberg, G.; Gitis, D.; Sasson, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3107-3110.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,78 (m, 3H, H_{o-Ts} + H_{2-Ar}); 7,60 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz, H_{4-Ar}); 7,44 (s, 1H, H_{5-Im}, dias A); 7,38 (s, 1H, H_{5-Im}, dias B); 7,33 (m, 4H, H_{m-Ts} + H_{5,6-Ar}); 4,83 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH_{2-Im}, dias. A); 4,73 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH_{2-Im}, dias. B); 4,50–4,05 (m, 5H, H_{2-THP}+ CH_{2-Im} + CH-OTHP + CH-OTs, dias. A+B); 3,67-3,60 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,36–3,16 (m, 3H, H_{6-THP}, dias. A+B); 2,43 (s, 3H, CH₃, dias. B); 2,42 (s, 3H, CH₃, dias. A); 1,66-1,18 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 145,5; 144,8; 139,0; 134,9; 133,3; 133,1; 132,5; 130,1 (2C); 128,5 (2C); 128,0; 125,4; 123,3; 122,7; 74,0; 70,2; 68,7; 67,0; 63,1; 62,9; 51,1; 50,5; 30,4; 30,1; 24,9; 24,7; 21,6; 19,4; 19,3 ppm.

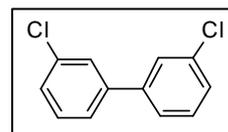
HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₂₄H₂₇ClN₃O₇S [M]⁺: 536,1253; Encontrado [M]⁺: 536,1250.

IR (KBr): *v*_{max} 3444 (OH); 2945, 1538 (C=N); 1486 (NO₂); 1361 (NO₂); 1284 (SO₂); 1176 (SO₂); 985, 778, 664 cm⁻¹.

Rendimiento (82): Método A: 31%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,62

P.f.: 28-29 °C (Lit²³⁹ 29 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,52 (s, 2H, H_{2,2'}); 7,42 (m, 2H, H_{6,6'}); 7,36 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, H_{5,5'}); 7,32 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz, H_{4,4'}) ppm.

²³⁹Chiou, C. T.; Schmedding, D. W.; Manes, M. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 8840-8846.

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 141,5 (2C, C1,1'), 134,7 (2C, C5,5'); 130,1 (2C, C3,3'); 127,8 (2C, C6,6'); 127,2 (2C, C4,4'); 125,2 (2C, C2,2') ppm.

4.4.2.1.3. Tosilato de 3-(4-4'-metilfenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7f) y 83

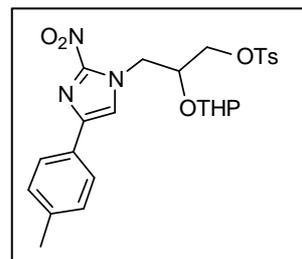
Siguiendo el método A, a partir de **7b** (0,300 g, 0,59 mmol), ácido 4-metilfenilborónico (0,202 g, 1,48 mmol), K_2CO_3 (0,584 g, 3,54 mmol) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ en acetona (3 x 6,6 mg / 3 mL) disueltos en de acetona/ H_2O 1:0,6 (2,40 mL/1,50 mL). Se eluyó con $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (94:6) obteniéndose **7f** como un aceite amarillento y **83** (0,03 g) como un sólido blanco. El aceite se trituró en dietil éter y se filtró para dar **7f** (0,200 g) como un sólido amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros 77:23.

Rendimiento (7f): Método A: 66%

Método B: 65%

Rf_($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 94:6): 0,40

P.f.: 56,9-58,7 °C



^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 7,79 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{o-Ts}}$, dias A); 7,77 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{o-Ts}}$, dias B); 7,62 (m, 2H, $\text{H}_{2\text{-Ar}}$, dias A+B); 7,36 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-Im}}$, dias A+B); 7,35 (m, 2H, $\text{H}_{3\text{-Ar}}$, dias A+B); 7,20 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{m-Ts}}$, dias A); 7,18 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{m-Ts}}$, dias B); 4,84-4,65 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias A+B); 4,51-4,05 (m, 5H, $\text{H}_{2\text{-THP}}$, $\text{CH}_2\text{-Im} + \text{CH-OTHP} + \text{CH}_2\text{-OTs}$, dias. A+B); 3,85-3,10 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{-THP}}$, dias. A+B); 2,43 (s, 3H, CH_3 , dias. A+B); 2,35 (s, 3H, CH_3 , dias. A+B); 1,62-1,20 (m, 6H, $\text{H}_{3,4,5\text{-THP}}$, dias. A+B) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 145,3; 140,7; 132,1; 129,9 (2C); 129,5 (2C); 128,4; 128,1 (2C); 125,2 (2C); 122,8; 122,1; 100,8; 96,6; 74,2; 70,3; 68,9; 68,1, 67,1; 63,0; 62,5; 52,1; 51,0; 50,5; 30,4; 30,0; 24,9; 24,8; 21,7; 21,3; 19,3; 19,2 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 516,1804; Encontrado $[\text{M}]^+$: 516,1716.

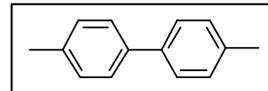
IR (KBr): ν_{max} 3448; 2946; 2365; 1598; 1537; 1480; 1363; 1264; 1177 cm^{-1} .

Análisis elemental ($\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$) Calculado: C (58,24); H (5,67); N (8,15); S (6,22); Encontrado: C (58,17); H (5,84); N (8,25); S (6,00).

Rendimiento (83): Método A: 30%

Rf($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 94:6): 0,60

P.f.: 107-109 °C (Lit²⁴⁰ 122 °C)



$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz CDCl_3): δ 7,47 (d, 4H, $J = 7,9$ Hz, $\text{H}_{2,6,2',6'}$); 7,22 (d, 4H, $J = 7,9$ Hz, $\text{H}_{3,5,3',5'}$); 2,83 (s, 6H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 138,2 ($\text{C}_{1,1'}$), 136,6 ($\text{C}_{4,4'}$); 129,4 ($\text{C}_{3,5,3',5'}$); 126,8 ($\text{C}_{2,6,2',6'}$); 21,1 (CH_3) ppm.

²⁴⁰ Castro, C. E.; Andrews, L. J.; Keefer, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2322-2326.

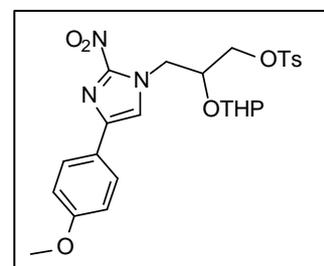
4.4.2.1.4. Tosilato de 3-(4-4'-metoxifenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (**7g**) y **84**

Siguiendo el método A, a partir de **7b** (0,300 g, 0,59 mmol), ácido 4-metoxifenilborónico (0,226 g, 1,48 mmol), K₂CO₃ (0,584 g, 3,54 mmol) y Pd(OAc)₂ en acetona (3 x 6,6 mg / 3 mL) disueltos en acetona/H₂O 1:0,6 (2,40 mL/1,50 mL). Se eluyó con CHCl₃/AcOEt (94:6) para dar **7g** como aceite amarillento y **84** (0,02 g) como un sólido blanco. El aceite se trituró en dietil éter y se filtró obteniéndose **7g** (0,225 g) como un sólido amarillento que consistía en una mezcla de diastereoisómeros de 80:20.

Rendimiento (7g): Método A: 71%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,40

P.f.: 49,8-51,1 °C



¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,79 (dt, 2H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,8 Hz, H_{o-Ts}); 7,69 (dt, 2H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,1 Hz, H_{o-Ar}); 7,32 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, H_{m-Ts}); 7,29 (s, 1H, H_{5-Im}); 6,92 (dt, 2H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,1 Hz, H_{m-Ar}); 4,79 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 3,8 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,68 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 2,8 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,52 (m, 1H, H_{2-THP}, dias. B); 4,44 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 7,4 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,38 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 7,4 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,28 (m, 2H, H_{2-THP}, dias. A, CH₂-OTs dias.B); 4,21 (dd, 1H, *J* = 9,6 Hz, *J* = 2,4 Hz, CH₂-OTs, dias. A); 4,14 (m, 4H, CH₂-OTs, CH-OTHP dias. A+B); 3,82 (s, 3H, CH₃-O, dias. A+B); 3,63 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,56 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,26 (m, 2H, H_{6-THP}, dias. B); 2,42 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 2,02-1,35 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz CDCl₃): δ 159,9; 145,3; 144,4; 140,6; 132,1; 129,9 (2C); 128,0 (2C); 126,6 (2C); 123,9; 121,7; 114,2 (2C); 100,8; 74,1; 68,8; 65,8; 62,9; 55,3; 50,4; 30,4; 24,9; 21,6; 19,3; 15,2 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₂₅H₃₀N₃O₈S [M]⁺: 532,1754; Encontrado [M]⁺: 532,1755.

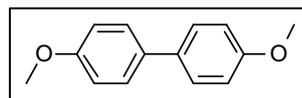
IR (KBr): ν_{max} 3445; 2946; 1615; 1538; 1480; 1410; 1251; 1176 cm⁻¹.

Análisis elemental (C₂₅H₂₉N₃O₈S). Calculado: C (56,48); H (5,49); N (7,90); Encontrado: C (56,43); H (5,39); N (7,77).

Rendimiento (84): Método A: 15%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,60

P.f.: 165-167 °C (Lit²⁴¹ 178-180 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,46 (dd, 4H, *J* = 6,6 Hz, *J* = 2,3 Hz, H_{2,6,2',6'}); 6,93 (d, 4H, *J* = 6,6 Hz, H_{3,5,3',5'}); 3,83 (s, 6H, CH₃) ppm.

4.4.2.1.5. Tosilato de 3-(4-bifenil-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7h) y 85

Siguiendo el método A, a partir de **7b** (0,300 g; 0,59 mmol), ácido bifenilborónico (0,294 g, 1,48 mmol), K₂CO₃ (0,584 g, 3,54 mmol) y Pd(OAc)₂ en acetona (3 x 6,6 mg / 3 mL) disueltos en acetona/H₂O 1:0,6 (2,40 mL/1,50 mL). Se

²⁴¹ Tsai, F. Y.; Lin, B. N.; Chen, M.; Mou, C. Y.; Liu, S. T. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 4304-4309.

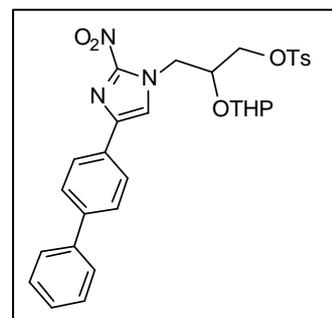
eluyó con $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (96:4) para dar **7h** como un aceite amarillento y **85** como un sólido blanco. El aceite se trituró en dietil éter y se filtró obteniéndose **7h** (0,392 g) como un sólido amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros de 60:40.

Rendimiento (7h): Método A: 68%

Método B: 63%

Rf_($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 94:6): 0,40

P.f.: 63,5-65,7 °C



$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7,81 (m, 4H, $\text{H}_{2',6'\text{-Ar}}$, $\text{H}_{\text{o-Ts}}$, dias A+B); 7,61 (m, 4H, $\text{H}_{2,6\text{-Ar}}$, $\text{H}_{3',5'\text{-Ar}}$, dias A+B); 7,51 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-Im}}$, dias. A); 7,47 (m, 2H, $\text{H}_{3,5\text{-Ar}}$, dias A+B); 7,46 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-Im}}$, dias. B); 7,34 (m, 3H, $\text{H}_{\text{m-Ts}}$, $\text{H}_{4'\text{-Ar}}$, dias A+B); 4,88 (dd, 1H, $J = 14,0$ Hz, $J = 3,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias A); 4,78 (dd, 1H, $J = 14,0$ Hz, $J = 3,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias. B); 4,57 (m, 1H, $\text{H}_{2\text{-THP}}$, dias. B); 4,52 (dd, 1H, $J = 14,1$ Hz, $J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias. B); 4,45 (dd, 1H, $J = 14,1$ Hz, $J = 8,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias. A); 4,34 (m, 2H, $\text{H}_{2\text{-THP}}$, dias. A, CH-OTHP , dias. B); 4,27 (dd, 1H, $J = 9,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OTs}$, dias. A); 4,22 (dd, 1H, $J = 11,0$ Hz, $J = 4,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OTs}$, dias. A); 4,17-4,07 (m, 3H, CH-OTHP , dias. A, $\text{CH}_2\text{-OTs}$, dias. B); 3,68 (m, 1H, $\text{H}_{6\text{-THP}}$, dias. A); 3,36 (m, 1H, $\text{H}_{6\text{-THP}}$, dias. A); 3,27 (m, 1H, $\text{H}_{6\text{-THP}}$, dias. B); 3,21(m, 1H, $\text{H}_{6\text{-THP}}$, dias. B); 2,42 (s, 3H, CH_3 , dias. A+B); 1,64-1,16 (m, 6H, $\text{H}_{3,4,5\text{-THP}}$, dias. A+B) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 145,4; 141,4; 140,3; 132,1; 130,3; 130,0 (2C); 128,8 (2C.); 128,1 (2C); 127,9; 127,5 (2C); 126,9 (2C); 125,7(2C); 123,2; 122,5; 74,2; 70,2; 68,8; 67,1; 63,0; 62,7; 51,1; 50,5; 30,4; 30,1; 24,9; 24,8; 21,7; 19,4; 19,3 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₃₀H₃₂N₃O₇S [M]⁺: 578,1955; Encontrado [M]⁺: 578,1971.

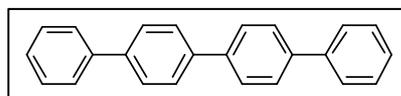
IR (KBr): ν_{\max} 3434; 2945; 1598; 1535; 1478; 1420; 1364; 1176; 986; 766 cm⁻¹.

Análisis elemental (C₃₀H₃₁N₃O₇S). Calculado: C (60,74); H (5,64); N (7,50); S (5,79); Encontrado: C (60,62); H (5,43); N (7,34); S (5,59).

Rendimiento (85): Método A: 20%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,60

P.f.: > 300 °C (Lit²⁴² 318-320 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,70 (m, 2H); 7,65 (m, 2H); 7,59 (m, 5H); 7,42 (m, 6H); 7,34 (m, 3H) ppm.

4.4.2.1.6. Tosilato de 3-(4-2'-naftil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (**7i**) y **86**

Siguiendo el método A, a partir de **7b** (0,300 g, 0,59 mmol), ácido 2-naftilborónico (0,202 g, 1,48 mmol), K₂CO₃ (0,584 g, 3,54 mmol) y Pd(OAc)₂ en acetona (3 x 6,6 mg / 3 mL) que se disolvió en una mezcla de acetona/H₂O 1:0,6 (2,40 mL/1,50 mL). Se eluyó con CHCl₃/AcOEt (96:4) para dar **7i** como un aceite amarillento y **86** (0,04 g) como un sólido blanco. El aceite se trituró en dietil éter para dar **7i** (0,146 g) como un sólido amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros de 63:37.

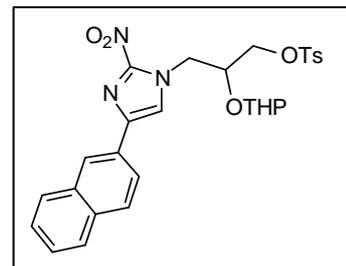
²⁴² Cheng, J. W.; Luo, F. T.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1293-1294.

Rendimiento (7i): Método A: 45%

Método B: 44%

R_f_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,39

P.f.: 50-52,5 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8,31 (s, 1H, H_{1-Ar}, dias A+B); 7,82 (m, 6H, H_{0-Ts}, H_{3-4-5-8-Ar}, dias A+B); 7,55 (s, 1H, H_{5-Im}, dias A); 7,48 (m, 3H, H_{5-Im}, dias B, H_{6,7-Ar}, dias A+B); 7,32 (dd, 2H, *J* = 7,9 Hz, *J* = 4,4 Hz, H_{m-Ts}, dias A+B); 4,86 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,5 Hz, CH₂-Im, dias A); 4,77 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,5 Hz, CH₂-Im, dias B); 4,54-4,02 (m, 5H, H_{2-THP} + CH₂-Im + CH-OTHP + CH₂-OTs, dias. A+B); 3,67-3,17 (m, 2H, H_{6-THP}, dias. A+B); 2,44 (s, 3H, CH₃ dias. A); 2,41 (s, 3H, CH₃ dias. B); 1,59-1,16 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 145,4; 140,5; 133,4; 132,2; 130,1 (2C); 129,9; 128,5; 128,2; 128,0 (2C); 127,9; 127,7; 126,6; 126,2; 122,8; 124,3; 123,5; 122,9; 122,8; 100,9; 96,5; 74,1; 70,2; 68,8; 67,0; 63,0; 62,6; 51,1; 50,5; 30,4; 30,0; 24,9; 24,8; 21,7; 19,3; 19,2 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₂₈H₃₀N₃O₇S [M]⁺: 552,1799; Encontrado [M]⁺: 552,1778.

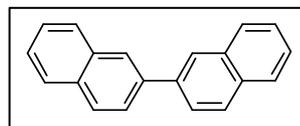
IR (KBr): *v*_{max} 3434; 2944; 1597; 1535; 1479; 1414; 1363; 1263; 1176 cm⁻¹.

Análisis elemental (C₂₈H₂₉N₃O₇S). Calculado: C (60,96); H (5,29); N (7,61); S (5,81); Encontrado: C (60,93); H (5,50); N (7,69); S (5,84).

Rendimiento (86): Método A: 25%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,61

P.f.: 185-186 °C (Lit²⁴³ 184-185 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,16 (s, 2H, H_{1,1'}); 7,98-7,84 (m, 8H, H_{3,4,5,8,3',4',5',8'}); 7,55-7,48 (m, 4H, H_{6,7,6',7'}) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 138,3 (2C, C_{2,2'}), 133,6 (2C, C_{8a,8a'}); 132,6 (2C, C_{4a,4a'}); 128,5 (2C, C_{4,4'}); 128,2 (2C, C_{8,8'}); 127,6 (2C, C_{5,5'}); 126,3 (2C, C_{7,7'}); 126,0 (2C, C_{1,1'}); 125,9 (2C, C_{6,6'}); 125,6 (2C, C_{3,3'}) ppm.

4.4.2.1.7. Tosilato de 3-(4-3',4'-diclorofenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7j) y 87

Siguiendo el método A, a partir de **7b** (0,300 g, 0,59 mmol), ácido 3,4-diclorofenilborónico (0,284 g, 1,48 mmol), K₂CO₃ (0,584 g, 3,54 mmol) y Pd(OAc)₂ en acetona (3 x 6,6 mg / 3 mL) disueltos en acetona/H₂O 1:0,6 (2,40 mL/1,50 mL). Se eluyó con CHCl₃/AcOEt (96:4) para dar **7j** como un aceite amarillento y **87** (0,12 g) como un sólido blanco. El aceite se trituró en dietil éter y se filtró obteniéndose **7j** (0,170 g) como un sólido amarillento que consistía en mezcla de diastereómeros de 62:38.

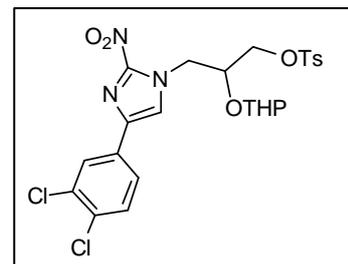
²⁴³ Hauptmann, H.; Walter, W. F.; Marino, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5832-5835.

Rendimiento (7j): Método A: 50%

Método B: 31%

R_f_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,40

P.f.: 50-52 °C



¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,89 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H_{2-Ar}, dias A); 7,88 (d, 1H, *J* = 2,9 Hz, H_{2-Ar}, dias B); 7,79 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{o-Ts}, dias A); 7,78 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{o-Ts}, dias B); 7,59 (dd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, H_{5-Ar}, dias A); 7,58 (dd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, H_{5-Ar}, dias B); 7,46 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H_{6-Ar}, dias A); 7,45 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H_{6-Ar}, dias B); 7,44 (s, 1H, H_{5-Im}, dias A); 7,40 (s, 1H, H_{5-Im}, dias B); 7,36 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{m-Ts}, dias A); 7,35 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{m-Ts}, dias B); 4,84 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 3,8 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,73 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 3,5 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,4 (m, 1H, H_{2-THP}, dias. B); 4,42 (m, 2H, CH₂-Im, dias A+B); 4,29 (m, 2H, CH-OTHP, dias B, H_{2-THP}, dias. A); 4,22 (dd, 1H, *J* = 10,2 Hz, *J* = 3,3 Hz, CH₂-OTs, dias. A); 4,16-4,08 (m, 2H, CH-OTHP, dias. A, CH₂-OTs, dias. B); 4,05-4,02 (m, 2H, CH₂-OTs, dias. A+B); 3,63 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,27 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,22 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. B); 3,18 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. B); 2,44 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 1,59-1,16 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 145,7; 145,5; 138,2; 137,9; 133,2; 132,5; 132,1; 131,4; 130,8; 130,0 (2C); 128,1 (2C); 127,1; 124,4; 123,5; 122,7; 100,9; 97,2; 74,0; 70,3; 68,6; 67,0; 63,1; 51,1; 50,5; 30,4; 24,8; 21,7; 19,4 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₂₄H₂₆Cl₂N₃O₇S [M]⁺: 570,0869; Encontrado [M]⁺: 570,0886.

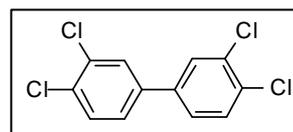
IR (KBr): ν_{\max} 3422 (OH); 2945, 1536 (C=N); 1484 (NO₂); 1362 (NO₂); 1283 (SO₂); 1176 (SO₂); 984; 813; 799; 666 cm⁻¹.

Análisis elemental (C₂₄H₂₅Cl₂N₃O₇S). Calculado: C (50,53); H (4,41); N (7,36); S (5,92); Encontrado: C (50,27); H (4,60); N (7,36); S (5,69).

Rendimiento: Método A: 52%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,62

P.f.: 161-163 °C (Lit²⁴⁴ 172-175 °C)



¹**H-RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 7,60 (d, 2H, $J = 1,6$ Hz, H_{2,2'}); 7,49 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_{5,5'}); 7,34 (dd, 2H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,6$ Hz, H_{6,6'}) ppm.

¹³**C-RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 138,7 (2C, C1,1'); 133,1 (2C, C5,5'); 132,4 (2C, C4,4'); 130,9 (2C, C3,3'); 128,8 (2C, C6,6'); 126,1 (2C, C2,2') ppm.

4.4.2.1.8. Tosilato de 3-(4-2'-fenilvinil-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (7l) y 88

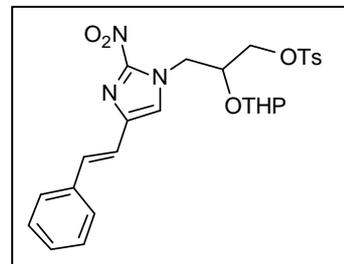
Siguiendo el método B, a partir de **7b** (0,100 g, 0,198 mmol), ácido trans-2-fenilvinilborónico (0,073 g, 0,49 mmol), K₂CO₃ (0,197 g, 1,19 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,007 g, 0,030 mmol) disueltos en una mezcla de acetona/H₂O 1:0,6 (0,80 mL/ 0,50 mL). Se eluyó con CHCl₃/AcOEt (96:4) para dar **7l** (0,052 g) como un aceite

²⁴⁴ Er, J. A. V.; Tennyson, A. G.; Kamplain, J. W.; Lynch, V. M.; Bielawski, C. W. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 13, 1729-1738.

amarillento y **88** (0,01 g) como un sólido blanco. El aceite amarillento consistía en una mezcla de diastereómeros de 60:40.

Rendimiento (71): Método B: 50%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,40



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,80 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{o-Ts}, dias. A); 7,78 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H_{o-Ts}, dias. B); 7,47 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, H_{o-Ar}, dias. A+B); 7,38-7,25 (m, 6H, H_{m-Ar}, H_{p-Ar}, H_{m-Ts}, Ph-CH=C-, dias. A+B); 7,17 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. A); 7,10 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. B); 6,88 (d, 1H, *J* = 16,3 Hz, C=CH-Im, dias. A); 6,85 (d, 1H, *J* = 16,3 Hz, C=CH-Im, dias. B); 4,77 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,2 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,70 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,2 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,49-3,99 (m, 5H, H_{2-THP} + CH₂-Im + CH-OTHP + CH₂-OTs, dias. A+B); 3,66-3,13 (m, 2H, H_{6-THP}, dias. A+B); 2,43 (s, 3H, CH₃, dias. B); 2,42 (s, 3H, CH₃, dias. A); 1,63-1,16 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

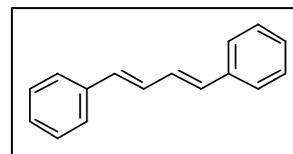
¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 145,4; 144,5; 139,1; 136,4; 131,4; 130,0 (2C); 128,7 (2C); 128,1(2C); 126,6 (2C); 124,7; 124,1; 117,7; 100,8; 96,8; 74,2; 70,2; 98,8; 67,1; 63,0; 62,7; 51,0; 50,5; 30,4; 30,1; 29,7; 24,9; 24,8; 21,7; 19,4 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₂₆H₃₀N₃O₇S [M]⁺: 528,1799; Encontrado [M]⁺: 528,1777.

Rendimiento (88): Método B: 19%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,61

P.f.: 149-150 °C (Lit²⁴⁵ 148-149 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,44-7,19 (m, 10H_{Ar}); 6,93 (dd, 2H, *J* = 11,9 Hz, *J* = 2,9 Hz, Ph-CH=C-); 6,64 (dd, 2H, *J* = 11,9 Hz; *J* = 2,9 Hz, Ph-C=CH-) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 137,4 (2C), 132,8 (2C); 129,3 (2C); 128,7 (4C); 127,6 (2C); 126,4 (4C) ppm.

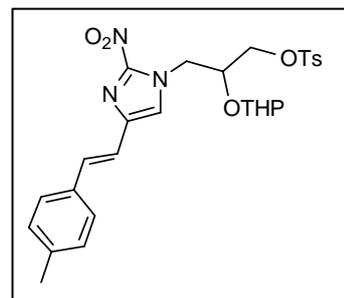
4.4.2.1.9. Tosilato de 3-(4-2'-4''-metilfenilvinil-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (**7m**) y **89**

Siguiendo el método B, a partir de **7b** (0,050 g, 0,099 mmol), ácido trans-2-(4-metilfenil)vinilborónico (0,040 g, 0,25 mmol), K₂CO₃ (0,098 g, 0,59 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,003 g, 0,015 mmol) disueltos en acetona/H₂O 1:0,6 (0,80 mL / 0,50 mL). Se eluyó con AcOEt/Hex (9:1) para obtener **7m** (0,004 g) como un aceite amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros de 50:50 y **89** (0,007 g) como un sólido blanco.

²⁴⁵Kamigata, N.; Ozaki, J.; Kobayashi, M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5045-5050.

Rendimiento (7m): Método B: 7%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,28



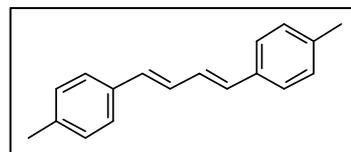
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,81 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{o-Ts}, dias. A); 7,78 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{o-Ts}, dias. B); 7,33 (m, 5H, H_{m-Ts}, H_{2,6-Ar} + Ar-CH= C-, dias. A+B); 7,14 (d, 2H, *J* = 7,9 Hz, H_{3,5-Ar}, dias. A+B); 7,15 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. A); 7,08 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. B); 6,83 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, C=CH-Im, dias. A); 6,80 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz, C=CH-Im, dias. B); 4,79 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,2 Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,67 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 3,2 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,50-3,99 (m, 5H, H_{2-THP} + CH₂-Im + CH-OTHP + CH₂-OTs, dias. A+B); 3,64-3,13 (m, 2H, H_{6-THP}, dias. A + B); 2,43 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 2,34 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 1,63-1,16 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 145,3; 144,5; 139,3; 138,2; 133,6; 132,1; 131,2; 130,0 (2C); 129,4 (2C); 128,1(2C); 127,9; 126,5 (2C); 124,5; 123,8; 116,7; 116,5; 100,8; 96,7; 74,2; 70,2; 68,8; 67,1; 63,0; 62,7; 50,9; 50,5; 30,4; 30,1; 24,9; 24,8; 21,7; 21,3; 19,3 ppm.

Rendimiento (89): Método B: 26%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,63

P.f.: 199-200 °C (Lit²⁴⁶ 199-200 °C)



²⁴⁶ Cicco, S. R.; Farinola, G. M.; Martinelli, C.; Naso, F.; Tiecco, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 12, 2275-2279.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,31 (d, 4H, *J* = 7,9 Hz, H_{o-Ar}); 7,12 (d, 4H, *J* = 7,9 Hz, H_{m-Ar}); 6,85 (dd, 2H, *J* = 11,9 Hz; *J* = 2,8 Hz, Ph-CH=C-); 6,63 (d, 2H, *J* = 11,9 Hz, *J* = 2,8 Hz, Ph-CH=C-); 2,31 (s, 6H, CH₃) ppm.

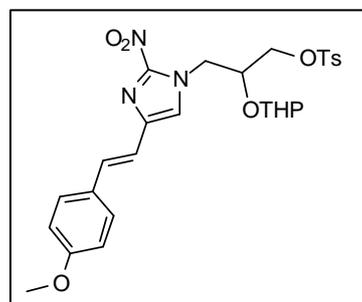
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 137,4 (2C), 134,6 (2C); 132,2 (2C); 129,3 (4C); 128,4 (2C); 126,2 (4C); 21,2 (2C) ppm.

4.4.2.1.10. Tosilato de 3-(4-2'-4''-metoxifenilvinil-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (**7n**) y **90**

Siguiendo el método B, a partir de **7b** (0,050 g, 0,099 mmol), ácido trans-2-(4-metoxifenil)vinilborónico (0,044 g, 0,247 mmol), K₂CO₃ (0,098 g, 0,594 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,003 g, 0,0015 mmol) disueltos en acetona/H₂O 1:0,6 (0,40 mL/ 0,25 mL). Se eluyó con AcOEt/Hexano (9:1) para obtener **7n** (0,014 g) como un aceite amarillento que consistía de una mezcla de diastereómeros 60:40 y **90** (0,006 g) como un sólido blanco.

Rendimiento (7n): Método B: 25%

Rf_(AcOEt/Hex 9:1): 0,27



¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD): δ 7,80 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{o-Ts}, dias. A); 7,78 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{o-Ts}, dias. B); 7,42 (d, 2H, *J* = 8,9 Hz, H_{2,6-Ar}, dias. A+B); 7,35 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{3,5-Ts}, dias. A+B); 7,36 (m, 1H, Ar-CH=C-, dias. A+B); 7,13 (s, 1H, H_{5-Im}, dias A); 7,06 (s, 1H, H_{5-Im}, dias B); 6,88 (d, 2H, *J* = 8,9 Hz, H_{3,5-Ar}, dias. A+B); 6,74 (d, 1H, *J* =

16,1 Hz, C=CH-Im, dias. A); 6,72 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, C=CH-Im, dias. B); 4,76 (dd, 1H, $J = 14,0$ Hz, $J = 3,4$ Hz, CH₂-Im, dias. A); 4,67 (dd, 1H, $J = 14,0$ Hz, $J = 3,4$ Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,50-4,04 (m, 5H, H₂-THP + CH₂-Im + CH-OTHP + CH₂-OTs, dias. A+B); 3,81 (s, 3H, O-CH₃, dias. A+B); 3,68-3,12 (m, 2H, H₆-THP, dias. A+B); 2,43 (s, 3H, CH₃, dias. A+B); 1,64-1,16 (m, 6H, H_{3,4,5}-THP, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 159,7; 145,4; 145,3; 139,6; 132,1; 131,0; 130,0 (2C); 129,1; 128,1 (2C); 127,9 (2C); 115,4; 114,2 (2C); 100,9; 74,2; 68,8; 63,0; 55,4; 50,4; 30,4; 29,7; 24,9; 21,7; 19,4 ppm.

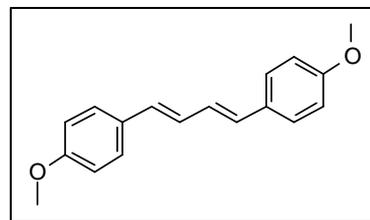
HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₂₇H₃₂N₃O₈S [M]⁺: 558,1905; Encontrado [M]⁺: 558,1906.

IR (KBr): ν_{\max} 3369; 2922; 2850; 1605; 1509; 1362; 1250; 1175; 816; 665 cm⁻¹.

Rendimiento (90): Método B: 20%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,60

P.f.: 199-200 °C (Lit²⁴⁷ 199-200 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,35 (d, 4H, $J = 8,9$ Hz, H_{o-Ar}); 6,85 (d, 4H, $J = 8,9$ Hz, H_{m-Ar}); 6,81 (m, 2H, Ph-CH=C); 6,58 (m, 2H, Ph-C=CH); 3,77 (s, 6H, CH₃) ppm.

²⁴⁷ Kirai, N.; Yamamoto, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 12, 1864-1867.

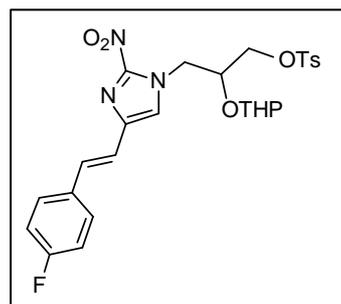
^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 159,1 (2C), 131,3 (2C); 130,4 (2C); 127,5 (4C); 114,1 (4C); 113,9 (2C); 55,3 (2C) ppm.

4.4.2.1.11. Tosilato de 3-(4-2'-4''-fluorofenilvinil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-2-(oxiran-1-iloxi)propilo (**7o**) y **91**

Siguiendo el método B, a partir de **7b** (0,050 g, 0,099 mmol), ácido trans-2-(4-fluorofenil)vinilborónico (0,041 g, 0,247 mmol), K_2CO_3 (0,098 g, 0,594 mmol) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,003 g, 0,0015 mmol) disueltos en acetona/ H_2O 1:0,6 (0,40 mL/ 0,25 mL). Se eluyó con AcOEt/Hexano (9:1) para obtener **7o** (0,013 g) como un aceite amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros 50:50 y **91** (0,005 g) como un sólido blanco.

Rendimiento (7o):Método B: 25%

Rf_($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 94:6): 0,28



^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 7,80 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{o-Ts}}$, dias A); 7,78 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{o-Ts}}$, dias B); 7,28-7,47 (m, 5H, $\text{H}_{\text{m-Ts}} + \text{H}_{2,6-\text{Ar}} + \text{Ar-CH=C}$, dias. A+B); 7,16 (s, 1H, $\text{H}_{5-\text{Im}}$, dias A); 7,09 (s, 1H, $\text{H}_{5-\text{Im}}$, dias B); 7,05 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{3,5-\text{Ar}}$, dias.A); 6,99 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{3,5-\text{Ar}}$, dias. B); 6,79 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, C=CH-Im , dias.A); 6,77 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, C=CH-Im , dias. B); 4,77 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, $J = 2,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias. A); 4,67 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, $J = 2,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias. B); 4,47-4,03 (m, 5H, $\text{H}_{2\text{-THP}} + \text{CH}_2\text{-Im} + \text{CH-OTHP} + \text{CH}_2\text{-OTs}$, dias. A+B); 3,65-3,14 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{-THP}}$, dias. A+B); 2,43 (s, 3H, CH_3 , dias. A+B); 1,54-1,16 (m, 6H, $\text{H}_{3,4,5\text{-THP}}$, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 162,6 (d, 1C, ¹J_{C-F} = 248,6 Hz) ; 145,5; 144,8; 138,8 (d, 1C, ²J_{C-F} = 21,8 Hz); 132,5; 130,1; 130,0 (2C); 128,1; 128,0 (2C); 124,7; 124,1; 117,2; 115,8 (2C); 115,6 (2C); 100,8; 96,8; 74,2; 70,2; 68,8; 67,1; 63,0; 62,7; 52,1; 50,5; 30,4; 30,1; 24,9; 24,8; 21,7; 19,7; 19,3 ppm.

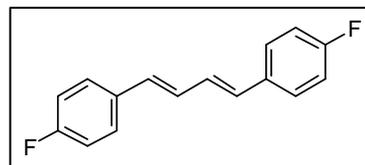
HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₂₆H₂₉N₃O₇S [M]⁺: 546,1705; Encontrado [M]⁺: 546,1707.

IR (KBr): ν_{max} 3360; 2921; 2850; 1598; 1540; 1507; 1364; 1176; 985; 665 cm⁻¹.

Rendimiento (91): Método B: 19%

Rf_(CHCl₃/AcOEt 94:6): 0,59

P.f.: 143-145 °C



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,38 (d, 4H, J = 8,6 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,01 (t, 4H, J = 8,6 Hz, H_{3,5-Ar}); 6,82 (dd, 2H, J = 11,8 Hz, J = 2,9 Hz, Ph-CH=C); 6,59 (dd, 2H, J = 11,8 Hz, J = 2,9 Hz, Ph-C=CH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 162,2 (d, 2C, ¹J_{C-F} = 247,4 Hz); 133,5 (d, 2C, ⁴J_{C-F} = 3,7 Hz); 131,5 (2C); 128,7 (2C); 127,8 (d, 4C, ³J_{C-F} = 8,0 Hz); 115,5 (d, 4C, ²J_{C-F} = 21,7 Hz) ppm.

4.5. Fluoración de los precursores de derivados lipófilos de FMISO

4.5.1. Procedimiento General

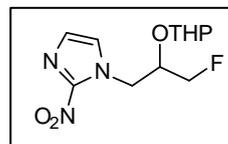
Una disolución de **7** y CsF en alcohol *terc*-amílico anhidro se calentó a 120 °C bajo atmósfera de argón durante 3 horas. Pasado este tiempo el disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se purificó sobre gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano.

4.5.1.1. 1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)propil)-1*H*-2-nitroimidazol (**45a**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7a** (0,400 g, 0,94 mmol) y CsF (0,428 g, 2,82 mmol) en alcohol *terc*-amílico (3,13 mL). Se eluyó con AcOEt/hexano (6:4) obteniéndose **45a** (0,210 g) como un aceite amarillento que consistía en una mezcla de diastereómeros 66:34.

Rendimiento: 82 %

Rf_(AcOEt/Hex 6:4): 0,49



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,18 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. B); 7,13 (s, 2H, H_{5-Im}, dias. A H_{4-Im}, dias. B); 7,12 (s, 1H, H_{4-Im}, dias. A); 4,85 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH₂-Im, dias. A+B); 4,75 (dd, 1H, *J* = 14,1 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH₂-Im, dias. A+B); 4,66–4,22 (m, 5H, H_{2-TPH} + CH₂-Im + CH₂-F, dias. A+B, CH-OTHP, dias. B); 4,15-4,04 (m, 1H, CH-OTHP, dias. A); 3,81 (m, 1H, H_{6-TPH}, dias. A); 3,45 (m, 1H, H_{6-TPH}, dias. A); 3,28-3,15 (m, 2H, H_{6-TPH}, dias. B); 1,71-1,46 (m, 6H, H_{3,4,5-TPH}, dias. A+B) ppm.

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 144,8 ($\text{C}_{2\text{Im}}$); 127,9 ($\text{C}_{5\text{Im}}$); 127,7 ($\text{C}_{4\text{Im}}$); 100,6 ($\text{C}_{2\text{THP}}$, dias A); 96,9 ($\text{C}_{2\text{THP}}$, dias B); 82,6 (d, 1C, $^1J_{\text{C-F}} = 172,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-F}$, dias A); 81,2 (d, 1C, $^1J_{\text{C-F}} = 172,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-F}$, dias B); 75,2 (d, 1C, $^2J_{\text{C-F}} = 20,7$ Hz, CH-OH , dias. A); 71,4 (d, 1C, $^2J_{\text{C-F}} = 19,1$ Hz, CH-OH , dias. B); 63,0 ($\text{C}_{6\text{THP}}$, dias A); 62,6 ($\text{C}_{6\text{THP}}$, dias B); 50,5 (d, 1C, $^3J_{\text{C-F}} = 7,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$ dias. A+B); 30,5 ($\text{C}_{3\text{THP}}$, dias. A); 30,2 ($\text{C}_{3\text{THP}}$, dias. B); 24,9 ($\text{C}_{5\text{THP}}$, dias. A); 24,8 ($\text{C}_{5\text{THP}}$, dias. B); 19,4 ($\text{C}_{4\text{THP}}$, dias. A); 19,3 ($\text{C}_{4\text{THP}}$, dias. B) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$: 274,1203; Encontrado $[\text{M}]^+$: 274,1228.

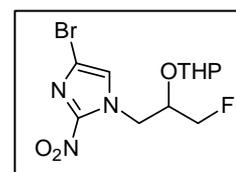
IR (KBr): ν_{max} 3419 (OH); 1596 (C=N); 1465 (NO_2); 1364 (NO_2); 1365 (SO_2); 1177 (SO_2) cm^{-1} .

4.5.1.2. 4-bromo-1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)propil)-1H-2-nitroimidazol (45b)

Seguendo el procedimiento general, a partir de **7b** (0,500 g, 0,99 mmol) y CsF (0,452 g, 2,98 mmol) en alcohol *terc*-amílico (3,3 mL). Se eluyó con AcOEt/hexano (6:4) obteniéndose **45b** (0,240 g) como un aceite amarillo que consistía en una mezcla de diastereómeros 46:54.

Rendimiento: 69 %

Rf_(AcOEt/Hex 6:4): 0,42



^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,17 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-Im}}$, dias. B); 7,11 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-Im}}$, dias. A); 4,81 (dd, 1H, $J = 14,1$ Hz, $J = 3,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$, dias. A); 4,73 (dd, 1H, $J = 14,1$ Hz, $J =$

3,6 Hz, CH₂-Im, dias. B); 4,65–4,30 (m, 4H, H₂-THP + CH₂-Im + CH₂-F, dias. A+B); 4,28-4,16 (m, 1H, CH-OTHP, dias. A); 4,11–4,01 (m, 1H, CH-OTHP, dias. B); 3,81-3,74 (m, 1H, H₆-THP, dias. A); 3,45-3,38 (m, 1H, H₆-THP, dias. A); 3,25-3,21(m, 2H, H₆-THP, dias. A+B); 1,70-1,37 (m, 6H, H_{3,4,5}-THP, dias. A+B) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₁₁H₁₆BrFN₃O₄ [M]⁺: 352,0303; Encontrado [M]⁺: 352,0315.

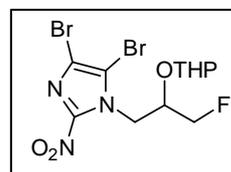
IR (KBr): ν_{\max} 3420 (OH); 1595 (C=N); 1462 (NO₂); 1354 (NO₂); 1358 (SO₂); 1178 (SO₂) cm⁻¹.

4.5.1.3. 4,5-dibromo-1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)-propil)-1H-2-nitroimidazol (45c)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7c** (0,200 g, 0,35 mmol) y CsF (0,156 g, 1,03 mmol) en alcohol *terc*-amílico (1,2 mL). Se eluyó con AcOEt/hexano (3:7) obteniéndose **45c** (0,045 g) como un aceite amarillo.

Rendimiento: 31 %

Rf_(AcOEt/Hex 7:3): 0,48



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 4,81-4,40 (m, 5H, H₂-THP + CH₂-Im + CH₂-F, dias. A+B); 4,24-4,16 (m, 2H, + CH-OTHP, dias. A+B); 3,80 (m, 1H, H₆-THP, dias. A); 3,46 (m, 1H, H₆-THP, dias. A); 3,20 (m, 2H, H₆-THP, dias. B); 1,64-1,22 (m, 6H, H_{3,4,5}-THP, dias. A+B) ppm.

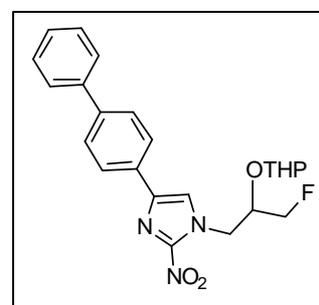
HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $C_{11}H_{15}Br_2FN_3O_4$ $[M]^+$: 429,9408; Encontrado $[M]^+$: 429,9404.

4.5.1.4. 4-4'-bifenil-1-(3-fluoro-2-(oxiran-2-iloxi)-propil)-1H-2-nitroimidazol (45h)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7h** (0,060g, 0,10 mmol) y CsF (0,48 g, 0,30 mmol) en alcohol *terc*-amílico (0,35 mL). Se eluyó con AcOEt/hexano (3:7) obteniéndose **45h** (0,0425 g) como un aceite amarillo que consistía en una mezcla de diastereómeros 61: 39.

Rendimiento: 87 %

Rf_(AcOEt/Hex 3:7): 0,43



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,86 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H_{3,5-Ar}, dias. A+B); 7,64 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H_{2,6-Ar}, dias. A+B); 7,60 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H_{2',6'-Ar}, dias. A+B); 7,51 (s, 1H, H_{5-Im}, dias. B); 7,46-7,32 (m, 4H, H_{5-Im}, dias. A, H_{3',5',4'-Ar}, dias. A+B); 4,90 (dd, 1H, $J = 13,8$ Hz, $J = 3,6$ Hz, CH_{2-Im}, dias. A); 4,82 (dd, 1H, $J = 13,8$ Hz, $J = 3,6$ Hz, CH_{2-Im}, dias. B); 4,71-4,11 (m, 5H, H_{2-THP} + CH_{2-Im} + CH-OTHP + CH_{2-F}, dias. A+B); 3,84 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,46 (m, 1H, H_{6-THP}, dias. A); 3,25 (m, 2H, H_{6-THP}, dias. A+B) 1,70-1,23 (m, 6H, H_{3,4,5-THP}, dias. A+B) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 141,3; 140,3; 140,2; 130,3; 128,8 (2C); 127,5 (2C); 126,9 (2C); 125,7 (2C); 123,3; 122,6; 100,8 (C_{2-THP}, dias. A); 97,1 (C_{2-THP}, dias. B); 82,6 (d, 1C, $^1J_{C-F} = 172,8$ Hz, CH_{2-F}, dias A); 81,2 (d, 1C, $^1J_{C-F} = 174,5$ Hz, CH_{2-F}, dias B);

75,2 (d, 1C, $^2J_{C-F} = 20,4$ Hz, CH-OTHP, dias. A); 71,4 (d, 1C, $^2J_{C-F} = 19,3$ Hz, CH-OTHP, dias. B); 63,1 (C6_{THP}, dias. A); 62,8 (C6_{THP}, dias. B); 50,8 (CH₂-Im, dias. A+B); 30,53 (C3_{THP}, dias. A); 30,3 (C3_{THP}, dias. B); 24,9 (C5_{THP}, dias. A); 24,8 (C5_{THP}, dias. B); 19,5 (C4_{THP}, dias. A); 19,4 (C4_{THP}, dias. B) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₂₃H₂₅FN₃O₄ [M]⁺: 426,1824; Encontrado [M]⁺: 426,1848.

IR (KBr): ν_{\max} 3330 (OH); 1597 (C=N); 1465 (NO₂); 1352 (NO₂); 1360 (SO₂); 1180 (SO₂) cm⁻¹.

4.6. Desprotección de los precursores fluorados de derivados lipófilos de FMISO

4.6.1. Procedimiento General

Una disolución de **45**, en AcOH, THF y H₂O se calentó a 65 °C hasta desaparición de producto de partida. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt. El producto obtenido se trituró en dietil éter precipitando un sólido, que se filtró y se secó.

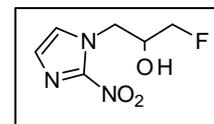
4.6.1.1. 1-fluoro-3-(1H-2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (**1a**)

Según el procedimiento general a partir de **45a** (0,186 g, 0,67 mmol), AcOH (2,80 mL), THF (1,45 mL) y H₂O (0,73 mL) y se agitó durante 4 horas. Se eluyó con AcOEt. aislando **1a** (0,070 g) como un sólido blanco-amarillento.

Rendimiento: 55%

Rf_(AcOEt): 0,52

P.f.: 108-109 °C



¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,48 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,17 (s, 1H, H_{4-Im}); 4,76 (dd, 1H, $J = 14,2$ Hz, $J = 3,6$ Hz, CH₂-Im); 4,47 (dd, 2H, $^1J_{\text{H-F}} = 47,4$ Hz, $J = 4,6$ Hz, CH₂-F); 4,47 (dd, 1H, $J = 14,2$ Hz, $J = 8,6$ Hz, CH₂-Im); 4,23-4,12 (dq, 1H, $^2J_{\text{H-F}} = 19,6$ Hz, $J = 4,4$ Hz, CH-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 146,2 (C_{2-Im}); 128,9 (C_{5-Im}); 127,8 (C_{4-Im}); 85,1 (d, 1C, $^1J_{\text{C-F}} = 171,5$ Hz, CH₂-F); 69,4 (d, 1C, $^2J_{\text{C-F}} = 19,9$ Hz, CH-OH); 52,3 (d, 1C, $^3J_{\text{C-F}} = 7,5$ Hz, CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₆H₉FN₃O₃ [M]⁺: 190,0628.

Encontrado [M]⁺: 190,0615.

IR (KBr): ν_{max} 3255; 2951; 2420; 1537; 1490; 1509; 1366 cm⁻¹.

Análisis elemental (C₆H₈FN₃O₃) Calculado: C (38,10); H (4,16); N (22,22);
Encontrado: C (38,34); H (4,38); N (22,03).

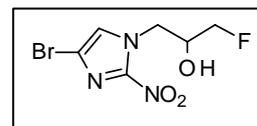
4.6.1.2. 3-(4-bromo-1H-2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1b)

Según el procedimiento general a partir de **45b** (0,209 g, 0,59 mmol), AcOH (2,5 mL); THF (1,3 mL) y H₂O (0,6 mL) y se agitó durante 6 horas. Se eluyó con AcOEt/ hexano (4:6) aislando **1b** (0,103 g) como un sólido blanco-amarillento.

Rendimiento: 65%

Rf_(AcOEt/Hex 4:6): 0,44

P.f.: 104-105 °C



¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,57 (s, 1H, H_{5-Im}); 4,75 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 3,3 Hz, CH₂-Im); 4,47 (dd, 2H, ¹*J*_{H-F} = 47,1 Hz, *J* = 4,3 Hz, CH₂-F); 4,44 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 8,9 Hz, CH₂-Im); 4,18 (dq, 1H, ²*J*_{H-F} = 19,8 Hz, *J* = 4,0 Hz, CH-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 146,0 (C_{2-Im}); 128,7 (C_{5-Im}); 114,6 (C_{4-Im}); 85,3 (d, 1C, ¹*J*_{C-F} = 171,2 Hz, CH₂-F); 69,5 (d, 1C, ²*J*_{C-F} = 19,8 Hz, CH-OH); 53,1 (d, 1C, ³*J*_{C-F} = 7,4 Hz, CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₆H₈BrFN₃O₃ [M]⁺: 267,9733; Encontrado [M]⁺: 267.9719.

IR (KBr): *v*_{max} 3398; 3103; 1541; 1510; 1470; 1400; 1377; 1261; 1012; 959; 845 cm⁻¹

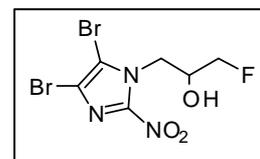
Análisis elemental (C₆H₇BrFN₃O₃) Calculado: C (26,89); H (2,63); N (15,68); Encontrado: C (26,67); H (2,82); N (15,91).

4.6.1.3. 3-(4,5-dibromo-1H-2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (**1c**)

Según el procedimiento general a partir de **45c** (0,045 g, 0,10 mmol), AcOH (0,40 mL), THF (0,22 mL) y H₂O (0,11 mL) y se agitó durante 3 horas. Se eluyó con AcOEt/ hexano (4:6) aislando **1c** (0,025 g) como un aceite amarillo.

Rendimiento: 69%

Rf_(AcOEt/Hex 4:6): 0,44



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 4,75 (dd, 2H, *J* = 6,6 Hz, *J* = 0,6 Hz, CH₂-Im); 4,50 (dd, 2H, ¹*J*_{H-F} = 47,1 Hz, *J* = 4,4 Hz, CH₂-F); 4,24-4,12 (m, 1H, CH-OH) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 146,3 (C₂_{Im}); 117,7 (C₅_{Im}); 114,7 (C₄_{Im}); 85,3 (d, 1C, ¹*J*_{C-F} = 170,7 Hz, CH₂-F); 69,3 (d, 1C, ²*J*_{C-F} = 20,0 Hz, CH-OH); 52,5 (d, 1C, ³*J*_{C-F} = 7,6 Hz, CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₆H₇Br₂FN₃O₃ [M]⁺: 345,8833; Encontrado [M]⁺: 345.8879.

IR (KBr): *v*_{max} 3404; 1547; 1473; 1361; 1248 cm⁻¹.

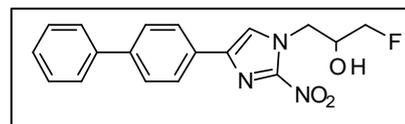
4.6.1.4. 3-(4-bifenil-2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (**1h**)

Según el procedimiento general a partir de **45h** (0,037 g, 0,087 mmol), AcOH (0,40 mL), THF (0,20 mL) y H₂O (0,10 mL) y se agitó durante 7 horas. Se eluyó con AcOEt/Hex (4:6) aislando **1h** (0,016 g) como un sólido amarillo-anaranjado.

Rendimiento: 56%

Rf_(AcOEt/Hex 4:6): 0,44

P.f.: 153-155 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,94 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_{3,5-Ar}); 7,92 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,69 (m, 4H, H_{2,6,2',6'-Ar}); 7,47 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H_{3',5'-Ar}); 7,38 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz, H_{4'-Ar}); 4,81 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, $J = 3,2$ Hz, CH₂-Im); 4,52 (dd, 2H, $^1J_{H-F} = 47,5$ Hz, $J = 4,2$ Hz, CH₂-F); 4,51 (dd, 1H, $J = 13,8$ Hz, $J = 8,6$ Hz, CH₂-Im); 4,24 (m, 1H, CH-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 142,4 ; 141,7; 140,8 (C_{4Im}); 132,2; 129,9 (2C); 128,6, 128,4 (2C); 127,8 (2C); 126,8 (2C); 125,2 (C_{5Im}); 85,4 (d, 1C, $^1J_{C-F} = 171,5$ Hz, CH₂-F); 69,7 (d, 1C, $^2J_{C-F} = 19,9$ Hz, CH-OH); 53,1 (d, 1C, $^3J_{C-F} = 7,5$ Hz, CH₂-Im) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₁₈H₁₇N₃O₃F [M]⁺: 342,1248; Encontrado [M]⁺: 342,1248.

IR (KBr): ν_{\max} 3376; 3133; 1535; 1513; 1481; 1423; 1390; 1337; 1234; 1048; 953; 762 cm⁻¹.

4.7. Fluoración-desprotección secuencial de los precursores de derivados lipófilos de FMISO

4.7.1. Procedimiento General

Una solución de **7** y CsF en alcohol *terc*-amílico anhidro, se calentó a 120 °C bajo atmósfera de argon durante 3 horas. Pasado este tiempo el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante filtración rápida a través de gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano. Se evaporó el disolvente y al aceite resultante se le añadió AcOH, THF y H₂O bajo atmósfera de argon y se calentó a 65 °C hasta desaparición de producto de partida. Se evaporaron los disolventes y el residuo resultante se purificó por

cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano y el producto obtenido se trituró en dietil éter para dar un sólido que se filtró y se secó.

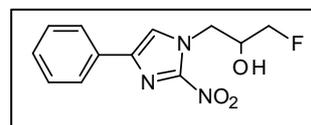
4.7.1.1. 3-(4-fenil-1*H*-2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (1d)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7d** (0,359 g, 0,716 mmol) y CsF (0,326 g, 2,149 mmol) en alcohol *terc*-amílico (2,40 mL) se obtuvieron 0,213 g de un aceite que se disolvió en AcOH (2,30 mL), THF (1,30 mL) y H₂O (0,6 mL) para dar **1d** (0,098 g) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 52%

Rf_(Hex/AcOEt 4:6): 0,52

P.f.: 149,8-152,8 °C



¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,87 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,86 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,45 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, H_{3,5-Ar}); 7,38 (t, 1H, *J* = 7,3 Hz, H_{4-Ar}); 4,79 (dd, 1H, *J* = 13,9 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH₂-Im); 4,51 (dd, 2H, ¹*J*_{H-F} = 47,3 Hz, *J* = 4,4 Hz, CH₂-F); 4,50 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 8,6 Hz, CH₂-Im); 4,25 (dq, 1H, ²*J*_{H-F} = 19,9 Hz, *J* = 4,3 Hz, CH-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 146,4 (C₂_{Im}); 141,4 (C₄_{Im}); 133,4 (C₁_{Ar}); 130,1 (2C, C₄_{Ar}); 129,6 (C₃_{Ar}); 126,6 (2C, C₂_{Ar}); 125,4 (C₅_{Im}); 85,7 (d, 1C, ¹*J*_{C-F} = 170,2 Hz, CH₂-F); 70,0 (d, 1C, ²*J*_{C-F} = 19,9 Hz, CH-OH); 53,3 (d, 1C, ³*J*_{C-F} = 7,9 Hz, (CH₂-Im)) ppm.

IR (KBr): ν_{max} 3352; 1533; 1483; 1417; 1389; 1266; 1014; 764 cm⁻¹.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₁₂H₁₃FN₃O₃ [M]⁺: 266,0941; Encontrado [M]⁺: 266,0904.

Análisis elemental (C₁₂H₁₂FN₃O₃). Calculado: C (54,34); H (4,56); N (15,84); Encontrado: C (54,52); H (4,56); N (15,79).

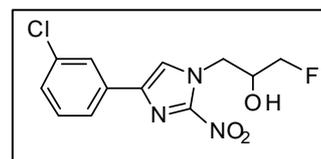
4.7.1.2. 3-(4-3'-clorofenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (**1e**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7e** (0,343 g, 0,646 mmol) y CsF (0,294 g, 1,938 mmol) en alcohol *terc*-amílico (2,1 mL) se obtuvo un aceite que se disolvió en AcOH (1,3 mL), THF (0,7 mL) y H₂O (0,3 mL). Obteniéndose **1e** (0,098 g) como un sólido amarillo.

Rendimiento global: 30%

R_f_{(Hex/AcOEt 4:6):} 0,26

P.f.: 138,3-140,1 °C



¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,94 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,92 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H_{2-Ar}); 7,79 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, H_{4-Ar}); 7,43 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, H_{5-Ar}); 7,38 (dd, 1H, *J* = 7,9 Hz, *J* = 1,9 Hz, H_{6-Ar}); 4,80 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH_{2-Im}); 4,52 (dd, 2H, ¹*J*_{H-F} = 47,4 Hz, *J* = 4,3 Hz, CH_{2-F}); 4,50 (dd, 1H, *J* = 13,8 Hz, *J* = 8,5 Hz, CH_{2-Im}); 4,24 (m, 1H, CH-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 146,2 (C_{2-Im}); 139,4 (C_{4-Im}); 135,9; 135,2; 131,4; 129,1; 126,1; 125,5 (C_{5-Im}); 124,5; 85,7 (d, 1C, ¹*J*_{C-F} = 171,1 Hz, CH_{2-F}); 69,7 (d, 1C, ²*J*_{C-F} = 19,9 Hz, CH-OH); 53,1 (d, 1C, ³*J*_{C-F} = 7,7 Hz, CH_{2-Im}) ppm.

IR (KBr): ν_{max} 3408; 3141; 1535; 1489; 1394; 1335; 1021; 783 cm⁻¹.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $C_{12}H_{12}ClFN_3O_3$ $[M]^+$: 300,0551; Encontrado $[M]^+$: 300,0516.

Análisis elemental ($C_{12}H_{11}ClFN_3O_3$). Calculado: C (48,09); H (3,02); N (12,58); Encontrado: C (48,11); H (3,28); N (12,60).

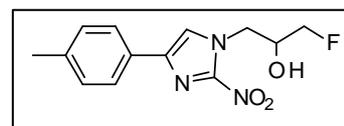
4.7.1.3. 1-fluoro-3-(4-4'-metilfenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (1f)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7f** (0,141 g, 0,273 mmol) y CsF (0,124 g, 0,821 mmol) en alcohol *terc*-amílico (2,9 mL) se obtuvieron 0,060 g de un aceite, que se disolvió en AcOH (0,70 mL); THF (0,4 mL) y H₂O (0,2 mL) para dar **1f** (0,034 g) como un sólido amarillo

Rendimiento global: 45%

Rf_(Hex/AcOEt 6:4): 0,47

P.f.: 153,3-154,1 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,82 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,74 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,26 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H_{3,5-Ar}); 4,79 (dd, 1H, *J* = 13,6 Hz, *J* = 3,4 Hz, CH₂-Im); 4,52 (dd, 2H, ¹*J*_{H-F} = 47,2 Hz, *J* = 4,2 Hz, CH₂-F); 4,52 (dd, 1H, *J* = 13,6 Hz, *J* = 8,0 Hz, CH₂-Im); 4,24 (m, 1H, CH-OH) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 141,3 (C_{4-Im}); 139,4 (C_{1-Ar}); 130,5 (2C, C_{3,5-Ar}); 130,3 (C_{4-Ar}); 126,3 (2C, C_{2,6-Ar}); 124,7 (C_{5-Im}); 85,5 (d, 1C, ¹*J*_{C-F} = 171,2 Hz, CH₂-F); 69,7 (d, 1C, ²*J*_{C-F} = 19,9 Hz CH-OH); 53,0 (d, 1C, ³*J*_{C-F} = 7,7 Hz, CH₂-Im); 21,3 (CH₃) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $C_{13}H_{15}FN_3O_3$ $[M]^+$: 280,1097; Encontrado $[M]^+$: 280,1103.

IR (KBr): ν_{\max} 3354; 1536; 1485; 1391; 1014; 758; 636 cm^{-1} .

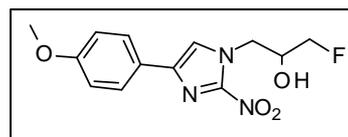
4.7.1.4. 1-fluoro-3-(4-4'-metoxifenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (1g)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7g** (0,330 g, 0,621 mmol) y CsF (0,283 g, 1,860 mmol) en alcohol *terc*-amílico (2,07 mL) se obtuvieron 0,146 g de un aceite que se disolvió en AcOH (1,60 mL); THF (0,8 mL) y H₂O (0,4 mL) para dar **1g** (0,086 g) como un sólido amarillo.

Rendimiento global: 47 %

Rf_(Hex/AcOEt 6:4): 0,35

P.f.: 180-182 °C



¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,80 (dd, 2H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{2,6-Ar}); 7,79 (s, 1H, H_{5-Im}); 7,00 (dd, 2H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{3,5-Ar}); 4,79 (dd, 1H, $J = 13,9$ Hz, $J = 3,6$ Hz, CH₂-Im); 4,51 (dd, 2H, $^1J_{H-F} = 47,3$ Hz, $J = 4,4$ Hz, CH₂-F); 4,49 (dd, 1H, $J = 13,9$ Hz, $J = 8,6$ Hz, CH₂-Im); 4,29-4,19 (dq, $^2J_{H-F} = 20,1$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H, CH-OH); 3,85 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 161,4 (C_{4-Ar}); 146,0 (C_{2-Im}); 141,3 (C_{4-Im}); 127,7 (2C, C_{2-Ar}); 125,7 (C_{1-Ar}); 124,2 (C_{5-Im}); 115,2 (2C, C_{3-Ar}); 85,5 (d, 1C, $^1J_{C-F} = 171,2$ Hz); 69,7 (d, 1C, $^2J_{C-F} = 19,9$ Hz); 53,0 (d, 1C, $^3J_{C-F} = 7,4$ Hz); 15,4 (CH₃) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $C_{13}H_{15}FN_3O_4$ $[M]^+$: 296,1047; Encontrado $[M]^+$: 296,1035.

IR (KBr): ν_{max} 3356 (OH); 2495; 1531 (C-NO₂); 1412 (C-NO₂); 1255 (C-O-C); 1028 (C-O-C) cm^{-1} .

Análisis elemental ($C_{13}H_{14}FN_3O_4$). Calculado: C (52,88); H (4,78); N (14,23); Encontrado: C (52,78); H (4,55); N (14,31).

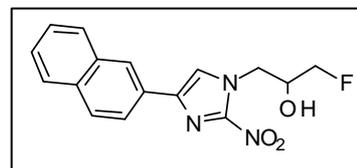
4.7.1.5. 1-fluoro-3-(4-2'-naftil-1H-2-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol (1i)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7i** (0,120 g, 0,210 mmol) y CsF (0,099 g, 0,650 mmol) en alcohol *terc*-amílico (0,75 mL) se obtuvieron 0,062 g de un aceite que se disolvió en AcOH (0,80 mL), THF (0,4 mL) y H₂O (0,2 mL) para dar **1i** (0,016 g) como un sólido amarillo.

Rendimiento global: 18%

Rf_(Hex/AcOEt 1:1): 0,50

P.f.: 159-161 °C



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8,38 (s, 1H, H_{1-Ar}); δ 7,93 (m, 5H, H_{3,4,5,8-Ar}, H_{5-Im}); 7,54 (m, 2H, H_{6,7-Ar}); 4,83 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, $J = 3,4$ Hz, CH₂-Im); 4,54 (dd, 2H, $^1J_{H-F} = 47,2$ Hz, $J = 4,2$ Hz, CH₂-F); 4,52 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, $J = 8,9$ Hz, CH₂-Im); 4,28 (m, 1H, CH-OH) ppm.

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 135,0 (C4_{Im}); 134,7 (2C); 131,2; 129,6; 129,3; 128,8; 127,6; 127,4; 125,5 (C5_{Im}); 125,1; 124,2; 85,5 (d, 1C, $^1J_{\text{C-F}} = 171,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-F}$); 69,7 (d, 1C, $^2J_{\text{C-F}} = 20,4$ Hz, CH-OH); 53,0 (d, 1C, $^3J_{\text{C-F}} = 7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$: 316,1097; Encontrado $[\text{M}]^+$: 316,1103.

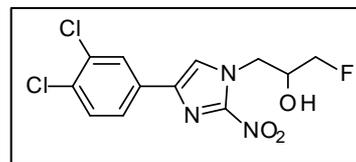
4.7.1.6. 3-(4-3',4'-diclorofenil-1H-2-nitroimidazol-1-il)-1-fluoropropan-2-ol (**1j**)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **7j** (0,130 g, 0,228 mmol) y CsF (0,104 g, 0,680 mmol) en alcohol *terc*-amílico (0,80 mL) se obtuvieron 0,053 g de un aceite que se disolvió en AcOH (0,50 mL), THF (0,3 mL) y H_2O (0,1 mL) para dar **1j** (0,025 g) como un sólido amarillo.

Rendimiento global: 33 %

Rf_(Hex/AcOEt 7:3): 0,24

P.f.: 153-155 °C



^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 8,05 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, $\text{H}_{2\text{-Ar}}$); 7,95 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-Im}}$); 7,78 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,0$ Hz, $\text{H}_{6\text{-Ar}}$); 7,59 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{5\text{-Ar}}$); 4,79 (dd, 1H, $J = 13,7$ Hz, $J = 3,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$); 4,51 (dd, 2H, $^2J_{\text{H-F}} = 47,4$ Hz, $J = 4,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-F}$); 4,49 (dd, 1H, $J = 14,0$ Hz, $J = 8,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$); 4,28–4,17 (m, 1H, CH-OH) ppm.

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 137,0 (C4_{Im}); 132,5; 131,4; 130,6; 126,6; 124,5; 124,4 (C5_{Im}); 85,5 (d, 1C, $^1J_{\text{C-F}} = 171,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-F}$); 69,7 (d, 1C, $^2J_{\text{C-F}} = 19,3$ Hz, CH-OH); 53,1 (d, 1C, $^3J_{\text{C-F}} = 7,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Im}$) ppm.

IR (KBr): ν_{\max} 3392, 1527; 1487; 1395; 1336; 1136; 1029; 800 cm^{-1} .

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$: 334,0156; Encontrado $[\text{M}]^+$: 334,0166.

4.8. Síntesis de 2-acetilaminoimidazoles 4(5)-sustituidos

4.8.1. Procedimiento general

Método A.^{165b} Una disolución de 2-halo-acetofenona (1,98 mmol) y acetilguanidina (0,60 g; 5,94 mmol) en MeCN anhidro (40 mL) se calentó en microondas (300W, 100 °C) durante 10 minutos bajo atmosfera de argon. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se concentró la mezcla hasta mitad de volumen. El residuo se filtró y se lavó con agua fría.

Método B. Una disolución de 2-halo-acetofenona (1,98 mmol) y acetilguanidina (0,60 g; 5,94 mmol) se calentó en microondas (300W, 100 °C) durante 10 minutos bajo atmosfera de argon. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se añadió agua (1 mL), se trituró en baño de ultrasonidos durante 10 minutos y se filtró.

4.8.1.1. 4(5)-fenil-2-acetilamino-1H-imidazol (48a)

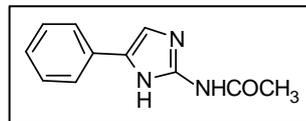
Siguiendo el método A, a partir de 2-bromoacetofenona (0,39 g; 1,98 mmol), acetilguanidina (0,60 g, 5,94 mmol) y calentando a 110 °C se obtuvo **48a** como un sólido blanco cristalino.

^{165b} Soh, H. C.; Chui, W. K.; Lam, Y. J. *Comb. Chem.* **2008**, *10*, 118-122.

Rendimiento: método A: 56%

método B: 44%

P.f.: 228-229 °C (EtOH)(Lit^{165a} 230-231 °C)



¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆): δ 7,71 (s_{ancho}, 1H, NH); 7,68 (s_{ancho}, 1H, NH); 7,32 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,20 (m, 4H, H_{3,4,5-Ar} + H_{5-Im}); 2,05 (s, 3H, COCH₃) ppm.

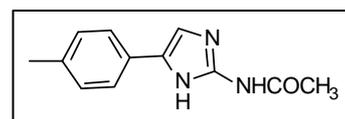
¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 169,0; 140,8; 135,6; 134,2; 127,9 (2C); 125,7; 123,4 (2C); 108,7; 22,3 ppm.

4.8.1.2. 4(5)-*p*-Tolil-2-acetilamino-1*H*-imidazol (48c)

Siguiendo el método B, a partir de 2-bromo-4'-metilacetofenona (0,10 g; 0,47 mmol), acetilguanidina (0,14 g, 1,40 mmol) y calentando a 110 °C se obtuvo **48c** como un sólido marrón.

Rendimiento: método B: 33%

P.f.: 209-210 °C(EtOH) (Lit^{165a} 210-211 °C)



¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆): δ 11,54 (s_{ancho}, 1H, NH); 11,19 (s_{ancho}, 1H, NH); 7,57 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,08 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H_{3,5-Ar}); 6,93 (s, 1H, H_{5-Im}); 2,26 (s, 3H, CH₃); 2,05 (s, 3H, COCH₃) ppm.

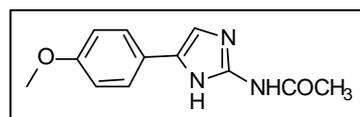
^{165a} Little, T. L.; Webber, S. E. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7299-7305.

4.8.1.3. 4(5)-*p*-metoxifenil-2-acetilaminoimidazol (48d)

Siguiendo el método B, a partir de 2-bromo-4'-metilacetofenona (0,10 g; 0,44 mmol), acetilguanidina (0,13 g, 1,30 mmol) y calentando a 130 °C se obtuvo **48d** como un sólido blanco.

Rendimiento: método B: 38%

P.f.: 218-219 °C (EtOH) (Lit^{165a} 220-221 °C)



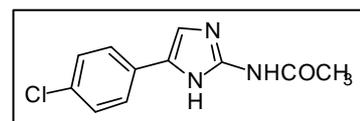
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,60 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,07 (s, 1H, H_{5-Im}); 6,94 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{3,5-Ar}); 3,83 (s, 3H, CH₃); 2,09 (s, 3H, COCH₃) ppm.

4.8.1.4. 4(5)-*p*-clorofenil-2-acetilamino-1*H*-imidazol (48e)

Siguiendo el método B, a partir de 2-bromo-4'-metilacetofenona (0,10 g; 0,43 mmol), acetilguanidina (0,13 g, 1,28 mmol) y calentando a 130 °C se obtuvo **48e**^{165a} como un sólido marrón.

Rendimiento: método B: 36%

P.f.: 214-215 °C



^{165a} Soh, C. H.; Chui, W. K.; Lam, Y. J. *Comb. Chem.* **2008**, *10*, 118-122.

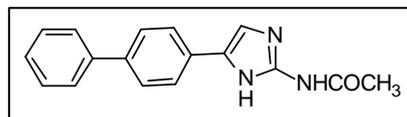
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 11,67 (s_{ancho}, 1H, NH); 11,22 (s_{ancho}, 1H, NH); 7,70 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,34 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, H_{3,5-Ar}); 6,93 (s, 1H, H_{5-Im}); 2,05 (s, 3H, COCH₃) ppm.

4.8.1.5. 4(5)-*p*-bifenil-2-acetilamino-1*H*-imidazol (48f)

Siguiendo el método B, a partir de 2-bromo-4'-metilacetofenona (0,10 g; 0,36 mmol), acetilguanidina (0,11 g, 1,09 mmol) y calentando a 130 °C se obtuvo **48f**^{165a} como un sólido marrón.

Rendimiento: método B: 52%

P.f.: 273-275 °C (EtOH)



¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆): δ 11,66 (s_{ancho}, 1H, NH); 11,25 (s_{ancho}, 1H, NH); 7,81-7,60 (m, 5H); 7,48-7,31 (m, 5H); 2,06 (s, 3H, COCH₃) ppm.

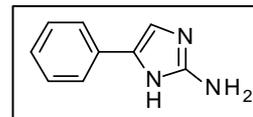
4.9. Hidrólisis de 4(5)-fenil-2-acetilamino-1*H*-imidazol (51a)

Una disolución de **48a** (0,20 g; 0,99 mmol) en una mezcla de MeOH/H₂O 1:1 (18 mL) que contiene un 20% H₂SO₄, se calentó en microondas (300 W; 100 °C) durante 10 minutos bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se evaporó el MeOH, y el precipitado formado se filtró para dar la sal de sulfato, que se convirtió en una base libre ajustando el pH~9-10 por adición de una disolución KOH (5%). El precipitado se filtró para dar **51a** (0,15 g; 95%) como un sólido blanco cristalino.

^{165a} Soh, C. H.; Chui, W. K.; Lam, Y. J. *Comb. Chem.* **2008**, *10*, 118-122.

Rendimiento: 95%

P.f.: 243-244 °C (Lit²⁴⁸ 245 °C)



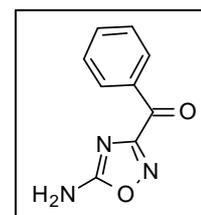
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7,56 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz, H_{o-Ar}); 7,24 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, H_{m-Ar}); 7,06 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz, H_{p-Ar}); 6,95 (s, 1H, H_{5-Im}); 5,77 (Sancho, 2H, NH₂) ppm.

4.10. Diazotación de 2-amino-5-fenil-1H-imidazol (57)

51a (0,12 g; 0,75 mmol) se disolvió en una mezcla de H₂O (8 mL) y AcOH (8 mL). Se añadió gota a gota HBF₄ (48% en peso en agua) (2 mL) y se enfrió en un criostato a 0 °C. Cuando todo se disolvió, se añadió NaNO₂ (0,41 g; 6,06 mmol) poco a poco manteniendo la temperatura de reacción. Una vez finalizada la adición se dejó agitando a 0 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo, la reacción se dejó agitando durante 20 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se purificó por cromatografía en columna den gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH (96:0,4) para dar **57** (0,163 g; 56%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 56%

P.f.: 191-192 °C (MeOH)(Lit²⁴⁹ 193 °C)



²⁴⁸ Nath, J. P.; Mahapatra, G. N. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1980**, *19*, 526-528.

²⁴⁹ Hemming, K. *Sci. Synth.* **2004**, *13*, 127-184.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,26 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, H_{o-Ar}); 7,64 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz, H_{p-Ar}); 7,49 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, H_{m-Ar}); 6,15 (s_{ancho}, 2H, NH₂) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 182,1; 165,7; 134,5; 130,6; 128,9 (2C); 128,7 (2C); 125,8 ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₉H₈N₃O₂ [M]⁺: 190,0611; Encontrado [M]⁺: 190,0632.

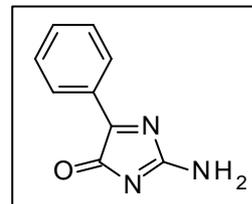
IR (KBr): ν_{max} 3406 (NH₂); 1655 (C=O); 1497 (C=O); 1227; 916; 733 cm⁻¹.

Tabla 4.1. Datos cristalográficos de **57**.

Compuesto	57
Fórmula empírica	C ₉ H ₇ N ₃ O ₂
M	189,18
Simetría	Monoclínico
Grupo especial	P 2 _{1/c}
Volumen (Å ³)	874,8 (12)
a (Å)	11,227 (11)
α (°)	90
β (°)	95,07 (5)
c (Å)	13,976(10)
γ (°)	90
Z	4
Dclac. (Mg.m ⁻³)	1,736
F(000)	392
μ (mm ⁻¹)	0,106
Reflexiones únicas	2021
Reflexiones observadas [F>4σ(F)]	1035
R1	0,0411
wR2	0,1124
GOF	1,019

También se aislaron los compuesto **65** y **67** como sólidos blancos.

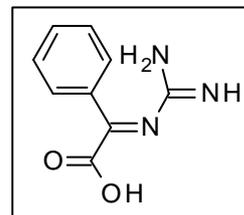
Rendimiento: 15%



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8,01 (dd, 2H, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,4$ Hz, H_{o-Ar}); 7,65 (ttap, 1H, $J = 7,3$ Hz, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H_{p-Ar}); 7,55 (tap, 2H, $J = 7,5$ Hz, $J = 7,9$ Hz, H_{m-Ar}); 6,88 (s_{ancho}, 2H, NH₂) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₉H₈N₃O [M]⁺: 174,0666; Encontrado [M]⁺: 174,0658.

Rendimiento: 14%



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,50 (dd, 2H, $J = 8,0$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H_{o-Ar}); 7,33 (m, 3H, H_{p-m-Ar}); 7,49 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H_{m-Ar}); 6,15 (s_{ancho}, 2H, NH₂) ppm.

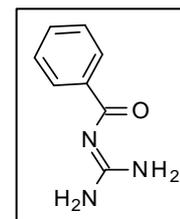
HRMS (TOF-APCI-POS): m/e calculado para C₉H₁₀N₃O₂ [M]⁺: 192,0771; Encontrado [M]⁺: 192,0764.

4.11. Oxidación de 4(5)-fenil-2-amino-1H-imidazol (72)

A Una disolución de **51a** (0,29 g; 1,79 mmol) y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,22 g; 0,18 mmol) en MeOH (28 mL) y H_2O (59 mL), se le añadió gota a gota (2,8 mL; 21,48 mmol) de H_2O_2 al 30%. La mezcla de reacción se dejó agitando durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de reacción el disolvente se concentró a sequedad y el sólido amarillo obtenido se trató con H_2O (10 mL) y se basificó con una disolución de KOH (5M) hasta pH~9-10 y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro. El desecante se filtró y el filtrado se concentró a sequedad para dar **72** (0,163 g; 56%) como un sólido amarillo.

Rendimiento: 56%

P.f.: 161-162 °C (Lit²⁵⁰ 162-164 °C)



¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8,06 (d, 2H, *J* = 7,9 Hz, H_{2,6-Ar}); 7,45 (m, 1H, H_{4-Ar}); 7,42 (d, 2H, *J* = 7,9 Hz, H_{3,5-Ar}) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 179,7; 164,9; 139,9; 132,1; 129,7 (2C); 128,9 (2C) ppm.

HRMS (TOF-APCI-POS): *m/e* calculado para C₈H₁₀N₃O [M]⁺: 164,0822; Encontrado [M]⁺: 164,0822.

²⁵⁰ Kurzer, F.; *J. Chem. Soc.* **1956**, 4524-31.

IR (KBr): ν_{\max} 3350; 1664; 1413; 1367; 718; 685 cm^{-1} .

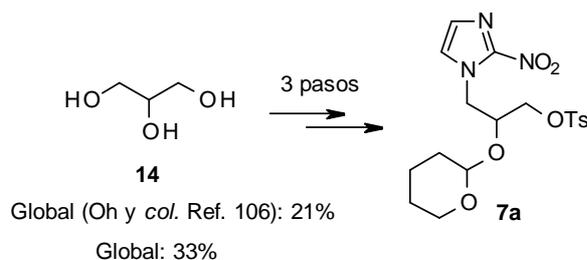
Análisis elemental ($\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$). Calculado: C (58,88); H (5,56); N (25,75); Encontrado: C (58,65); H (5,68); N (25,68).

Tabla 4.2. Datos cristalográficos de **72**.

Compuesto	72
Fórmula empírica	$\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$
M	163,18
Simetría	Ortorómbico
Grupo especial	P bca
Volumen (Å^3)	3413,2(10)
a (Å)	15,6021(15)
α ($^\circ$)	90
β ($^\circ$)	90
c (Å)	22,221(4)
γ ($^\circ$)	90
Z	16
Dclac. ($\text{Mg}\cdot\text{m}^{-3}$)	1,270
F(000)	1376
μ (mm^{-1})	0,089
Reflexiones únicas	3925
Reflexiones observadas [$F > 4\sigma(F)$]	2330
R1	0,0467
wR2	0,1367
GOF	1,032

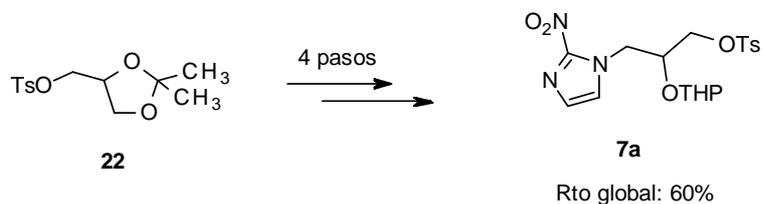
Durante la presente Tesis Doctoral se ha realizado la síntesis de FMISO (**1a**), de nuevos derivados lipófilos **1b-j** y de los precursores **7a-o**. Con los derivados lipófilos de FMISO se llevaron a cabo estudios de voltametría cíclica, toxicidad y permeación. A partir de los precursores **7a-o** se estudió la radiosíntesis de los derivados [¹⁸F]-**1b-o** y su fijación en tejido hipóxico.

- Se ha conseguido una mejora en la síntesis del precursor **7a** de FMISO (**1a**) descrita por Oh y col., que permite prepararlo aumentando el rendimiento global de un 21% a un 33%.



Esquema 5.1

- Se ha descrito un nuevo método alternativo de síntesis del precursor **7a** mas eficiente. La síntesis solo requiere la purificación por cromatografía en columna en dos pasos de reacción, obteniendo un rendimiento global del 60% a partir del acetónido **22** como producto comercial.



Esquema 5.2

- Se han sintetizado los precursores **7b-o**. Para la preparación de **7d-o**, etapa de introducción del fragmento responsable del aumento de lipofilia, se utilizó la reacción de Suzuki-Miyaura, tanto en condiciones clásicas como acelerada por microondas, a partir de **7b** y **33b**. El proceso en condiciones clásicas a partir de **7b** resultó ser el mas eficiente.

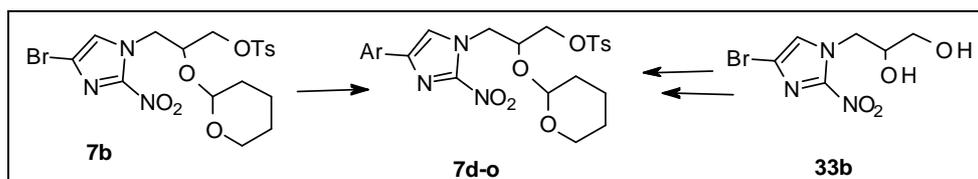


Figura 5.1

- Se ha realizado un estudio de la reacción de fluoración de **7a** en frío y se han preparado los derivados **1a-j**.

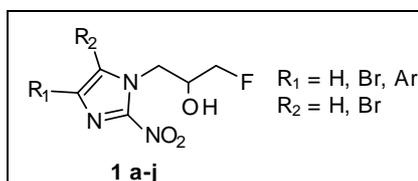


Figura 5.2

- Se ha realizado una síntesis verde de 2-acetilamino-4-aryl-imidazoles partiendo de α -bromoacetofenonas y *N*-acetilguanidina (**50**), mediante calentamiento por microondas en ausencia de disolvente.

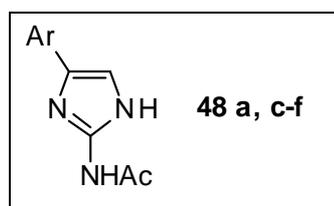
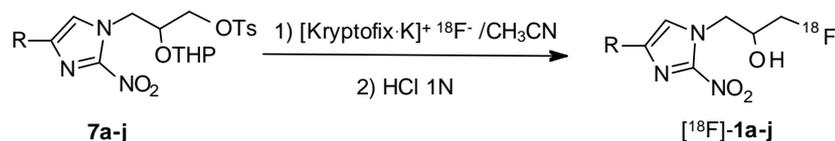


Figura 5.3

- Se ha llevado a cabo un estudio por voltametría cíclica de los derivados lipófilos **1b,d-g** vs FMISO (**1a**), encontrando que todos ellos se reducen mas fácilmente que **1a**.
- Se han realizado ensayos *in vitro* de viabilidad/mortabilidad en cultivos primarios de células corticales de rata (neuronales y mixtos) para estudiar la toxicidad de los derivados lipófilos **1b,d-e,g** vs FMISO (**1a**), resultando que los derivados no muestran mayor toxicidad que FMISO a las concentraciones estudiadas. El derivado **1d** (R = Ph) resultó ser el

menos tóxico. Además, ninguno de los compuestos parece incrementar la muerte celular.

- Se ha estudiado la radiosíntesis de [^{18}F]-**1a-j** a partir de los precursores **7a-j** y se han comparado con la radiosíntesis a partir del precursor **7a** adquirido en la casa comercial ABX, destacando que:
 - No se aprecian diferencias significativas para la radiosíntesis de [^{18}F]-**1a** a partir del precursor sintetizado en nuestro grupo vs al adquirido en la casa comercial ABX.
 - La radiosíntesis de [^{18}F]-**1b** ha mostrado ser menos eficiente que la síntesis de [^{18}F]-**1a** cuando se aplicaron las condiciones del método optimizado para [^{18}F]-**1a**.
 - No se ha conseguido la radiosíntesis de ninguno de los derivados arilos hasta el momento.



Esquema 5.3

- Se han estudiado las condiciones de radiosíntesis para **7g** encontrando que es necesaria la presencia de K_2CO_3 en el reactor y la importancia de realizar varios ciclos de evaporación azeotrópica para que la etapa de fluoración transcurra con buen rendimiento.

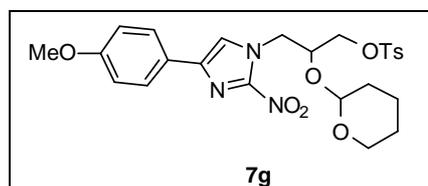


Figura 5.3

- Se ha llevado a cabo un estudio de la fijación de [^{18}F]-**1a** vs [^{18}F]-**1b** mediante PET en cerebro hipóxico de rata, destacando que:
 - [^{18}F]-**1b** muestra una fijación cualitativamente similar a la obtenida con el nitroimidazol de referencia [^{18}F]-FMISO, permitiendo discernir el área hipóxica de la lesión.
 - [^{18}F]-**1b** podría ser utilizado como un nuevo radiotrazador para localizar *in vivo* y de forma mínimamente invasiva la extensión del área isquémica.

- Se ha estudiado la permeación de **1a**, **1b** y **1d** a través de un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro*, resultando que el orden de permeación encontrado para **1a** y **1d** está en concordancia con los valores relativos de coeficientes Clog P, sin embargo, **1b** no cumple la regla probablemente debido al metabolismo celular.

Hypoxia is a pathological condition in which the body as a whole or a particular region is deprived of an adequate oxygen supply. Hypoxia has been shown to be present in many disease states, such as anemia, hemorrhage, pneumonia, lung disease, cardiovascular disease and cancer.¹ The degree of hypoxia is highly relevant in functional recovery in ischemic events such as stroke and myocardial ischemia but, in particular, tumor hypoxia is an important determinant of treatment response, relapse-free survival, and overall prognosis, which is independent of the treatment modality used in cancer patients.^{9,10} Previous efforts to evaluate hypoxia have centered upon invasive assessment, but the emergence of new radiotracers has allowed the noninvasive assessment of hypoxia, with the most extensively investigated and validated positron emission tomography (PET) hypoxia radiotracer to date being [¹⁸F]-fluoromisonidazole ([¹⁸F]-FMISO).¹¹ FMISO (**1a**) is a derivative of the 2-nitroimidazole group of compounds, which has the chemical structure 1-fluoro-2-(2-nitro-imidazol-1-yl)-propan-2-ol (Figure 6.1).

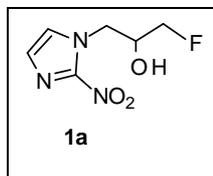


Figure 6.1. FMISO

FMISO enters cells by passive diffusion, and it is then reduced by nitroreductase enzymes. In normoxic cells, FMISO is quickly regenerated from the reduced compound by reoxidation and its metabolites do not accumulate. However, in hypoxic cells, the

¹ Semenza, L. G. *Physiology* **2009**, *24*, 97-106.

⁹ Tatum, J. L.; Kelloff, G. J.; Gillies, R. J.; Arbeit, J. M.; Brown, J. M.; Chao, K. S. C.; Chapman, J. D.; Eckelman, W. C.; Fyles, A. W.; Giaccia, A. J. *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, *82*, 699-757.

¹⁰ Foo, S. S.; Abbott, D. F.; Lawrentschuk, N.; Scott A. M. *Mol. Imaging Biol.* **2004**, *6*, 291-305.

¹¹ Lee, S.T.; Scott, A. M. *Nuc. Med.* **2007**, *37*, 451-461.

low oxygen partial pressure prevents reoxidation of FMISO, resulting in tracer accumulation. This accumulation can be detected by PET, a non-invasive method to detect hypoxia. In anoxic conditions, tissue becomes necrotic and reduction is not observed.¹¹

In spite of its widespread use as a radiotracer for hypoxia, FMISO has slow uptake and slow clearance and consequently its image contrast is potentially limited.²⁵¹ The development of new lipophilic compounds as PET brain hypoxia markers is of current interest therefore, since these markers could exhibit even more rapid localization in hypoxic tissue, with a greater BBB permeability and a lower toxicity than FMISO.

A large number of hypoxia radiotracers have been reported in recent years mostly based on the 2-nitroimidazole moiety. However, to date, [¹⁸F]-FMISO remains the most widely studied PET hypoxia radiotracer in both animals and humans.²⁵²

In this context, this Thesis has focused on the synthesis of new lipophilic analogs of FMISO, which bear a lipophilic substituent, like bromo, aryl or styryl groups, at the C-4 position on the imidazole ring. These FMISO derivatives (**1a-j**) have been prepared from their respective precursors (Figure 6.2).

¹¹ Lee, S.T.; Scott, A. M. *Nuc. Med.* **2007**, *37*, 451-461.

²⁵¹ Kronhn, K. A.; Link, J. M.; Mason, R. P. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 129S-148S.

²⁵² Hicks, R. J.; Doerow, D.; Roselt, P. *Cancer Imaging* **2006**, *6*, S102-S106.

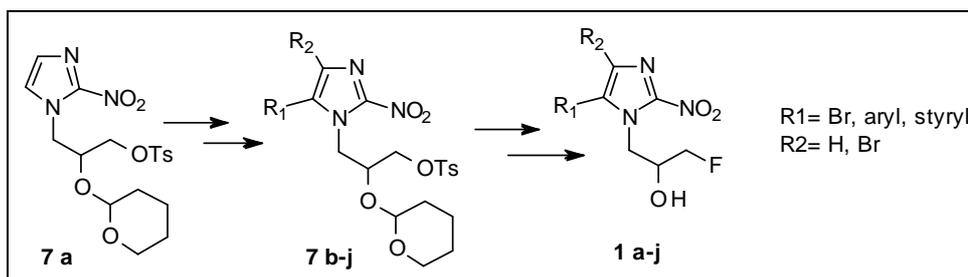
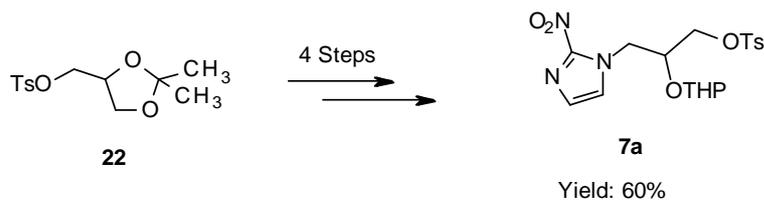


Figure 6.2

In addition, a new synthetic approach to the precursor of [^{18}F]-FMISO has been developed. Three different tosylation methods were studied for the preparation of the key intermediate (**22**). The overall yield was markedly higher than those reported in previous synthesis (Scheme 6.1).



Scheme 6.1

A series of lipophilic precursor (**7b-o**) have been synthesized via bromoderivatives **7b** and **33b**, which were used as substrates for the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction to give **7d-o** (Figure 6.3).

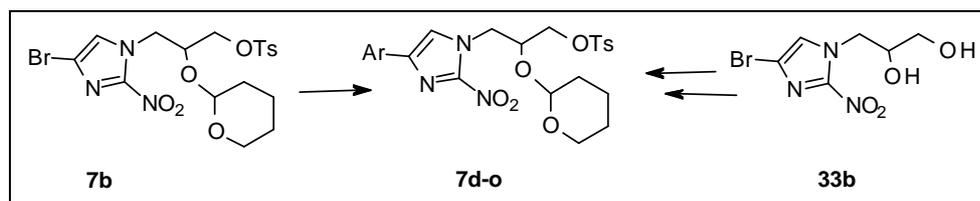
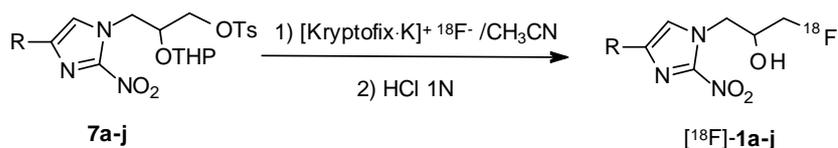


Figure 6.3

Radiolabeling experiments with ^{18}F have been carried out on **7a-j** in a radiopharmaceutical laboratory. However, limitations were found in the proposed radiolabeling strategy, and the aryl analogs have not been successfully radiolabeled to date. Bromo analog **7b** has been radiolabeled, but its radiosynthesis proved to be less efficient than the [^{18}F]-FMISO process (Scheme 6.2).



Scheme 6.2

During the course of this work, the precursors **7b-j** were converted into **1b-j** lipophilic analogs of FMISO (Figure 6.4).

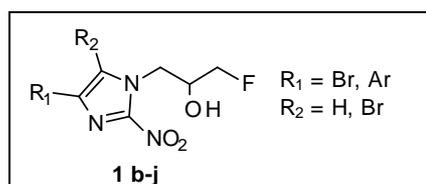


Figure 6.4

A cyclic voltammetric study and *in vitro* toxicity assays were performed for the synthesized analogs of FMISO, and each of the analogs proved to be more easily reduced than FMISO. In addition, these derivatives did not show toxicity in rat cortical neuronal and glial cultures (*vs* vehicle) at the concentrations tested (Figure 6.5).

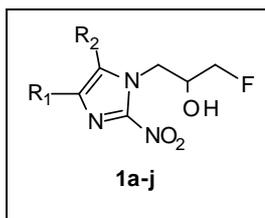


Figure 6.5

In order to predict *in vivo* blood-brain barrier (BBB) permeability from FMISO and its derivatives, an *in vitro* permeability assay of **1a**, **1b** and **1d** was undertaken in brain endothelial cells (bEnd5). BBB permeation was found to correlate with the ClogP coefficients of the analogs **1a** and **1d**. However, **1b** behaves unexpectedly and further studies are needed in order to explain this result.

7.1. Introducción

En el año 2010, realicé una estancia de tres meses financiada por la Universidad de Alcalá (Ayuda de Movilidad para el Personal Investigador) en el grupo del Profesor Finian Leeper en la Universidad de Cambridge, Reino Unido, con el objetivo de ampliar mi formación predoctoral.

El grupo del Prof. Leeper ha trabajado dentro del campo de la síntesis de productos naturales, catalizadores, enzimas y coenzimas químicas, biosíntesis, así como en la síntesis de nuevos agentes de contraste por MRI y nuevos radiotrazadores para PET utilizando una metodología moderna de síntesis orgánica: la química “clic”.

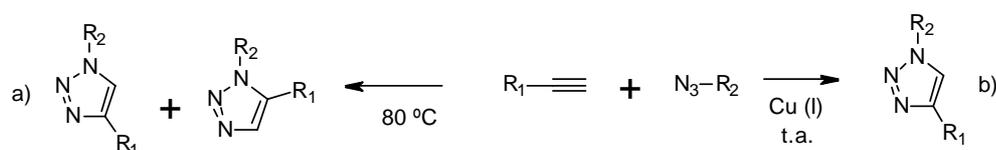
Durante mi estancia en la Universidad de Cambridge mi trabajo se centró en la preparación de nuevos ciclooctinos como precursores de radiofármacos para posteriormente ser utilizados mediante reacciones de bioconjugación *in vivo* a través de la química clic. En la actualidad existe un gran número de aplicaciones con este tipo de reacciones con los mas variados objetivos, como pueden ser, por ejemplo, técnicas de radioetiquetado o marcaje de biomoléculas con sondas fluorescentes.

El concepto de química clic fue introducido por Sharpless y *col.* en 2001.²⁵³ Define un tipo de química pensada para generar nuevos compuestos de manera rápida, eficiente y fiable mediante la unión de unidades estructurales de menor tamaño mediante enlaces carbono-heteroátomo (C-X-C). Los requisitos que deben cumplir las reacciones clic son: rendimientos altos, condiciones de reacción simples, alta economía atómica y aislamiento y purificación sencilla. Tiene gran importancia en áreas como la

²⁵³ a) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075. b) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

modificación de biomoléculas, química supramolecular, ciencia de los materiales y nanotecnología.²⁵⁴

Huisgen describió una de las reacciones más útiles en biomedicina, las reacciones de cicloadición [1,3]-dipolares con heteroátomos mediante la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos (Esquema 7.1).²⁵⁵ Su elevado rendimiento químico, la sencillez de las condiciones de reacción, la facilidad de purificación, la aplicabilidad en una variedad de disolventes (incluido el agua) y un rango amplio de pH y la tolerancia de un gran número de grupos funcionales, hace que esta reacción sea un prototipo de química clic.²⁵⁶ Las altas temperaturas de reacción y la falta de regioselectividad hizo que Sharpless y *col.*²⁵⁷ y Meldal y *col.*²⁵⁷ describieran la formación regioselectiva de triazoles 1,4-disustituídos a temperatura ambiente mediante la reacción de Huisgen catalizada por Cu (I).



Esquema 7.1. a) Reacción de Huisgen; b) Reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I).

Una aplicación muy novedosa de la química clic en biomedicina se encuentra en las reacciones de bioconjugación.²⁵⁸ La reacción clic es especialmente útil en biomedicina por varias razones. Por un lado, los 1,2,3-triazoles generados son

²⁵⁴ a) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998; b) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.

²⁵⁵ Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 633-645. b) *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.

²⁵⁶ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

²⁵⁷ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

²⁵⁸ New K.; Brechbiel, M. W. *Canc. Biother. Rad.* **2009**, *24*, 289-302.

espaciadores (Linkers) ideales. Son muy solubles en agua, lo que facilita su administración *in vivo*, y estructuralmente son muy similares a los enlaces peptídicos que están presentes en las proteínas, pero sin embargo son más robustos frente a las reacciones de hidrólisis enzimáticas. A pesar de su uso en la síntesis de numerosos radiomarcadores, hasta la fecha, no se ha utilizado ninguno en clínica, debido en parte a las dificultades asociadas para quitar las trazas de cobre, las cuales muestran una toxicidad incluso a niveles bajos en humanos.²⁵⁹

Bertozi y *col.* han sido pioneros en el desarrollo de una clase especial de alquinos cíclicos que no necesitan la presencia de cobre para reaccionar por cicloadición [3+2] con azidas. En 1961, Wittig y Krebs describieron la reacción entre el cicloalquino más pequeño y estable (ciclooctino) y la fenil azida, que ocurría explosivamente para dar un único producto, el triazol.²⁶⁰ El desarrollo de los alquinos cíclicos tensionados permiten el estudio de la dinámica de los glicanos presentes en la superficie de las células, los cuales son fundamentales para el proceso de señalización celular durante el desarrollo, además de estar implicados en otros procesos relacionados con las infecciones bacterianas y virales, así como en la respuesta del sistema inmunológico frente a ellas. Bertozi ha desarrollado una metodología consistente en suministrar al organismo en estudio, monosacáridos no naturales que contienen un grupo azida en su estructura. La maquinaria metabólica celular es capaz de asimilar estas moléculas, incorporándolas y distribuyéndolas en diferentes puntos y a distintas concentraciones en las superficies celulares del organismo. Posteriormente, se le suministra una sonda fluorescente con un grupo alquino presente en su estructura que es capaz de reaccionar únicamente con los glicanos que poseen una azida en su estructura. De esta manera, se

²⁵⁹ Brewer, G. J.; Clin. Neurophysiol. 2010, 121, 459-460; Ala, A.; Walker, A. P.; Ashkan, K.; Dooley, J. S.; Schilsky, M. L. Lancet, 2007, 369, 397-408.

²⁶⁰ Wittig, G.; Krebs, A. Chem. Ber. 1961, 94, 3260-3275.

puede visualizar en tiempo real la distribución de estos glicanos en diferentes tejidos (Figura 7.1).^{261,262}

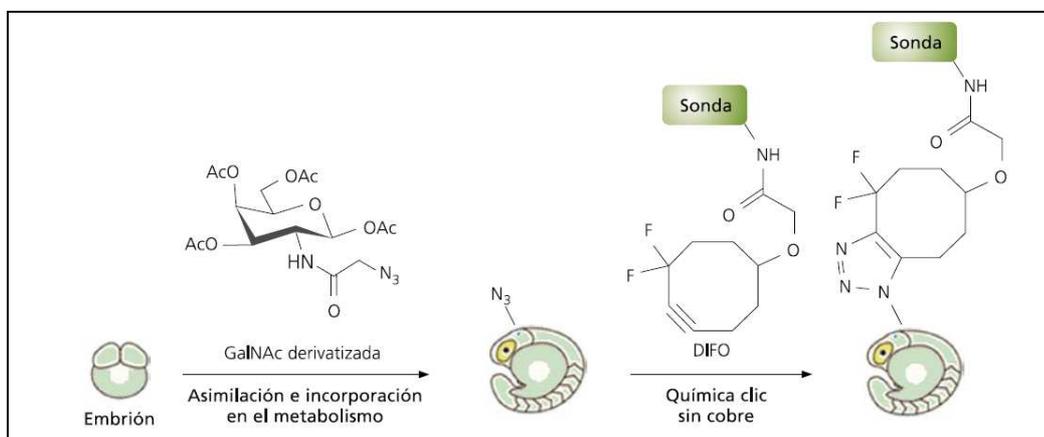


Figura 7.1. Química clic *in vivo* desarrollada por Bertozzi: La *N*-azidoacetilgalactosamina (GaNAC) se incorpora al metabolismo de un embrión de pez de cebra. Posteriormente se suministra una sonda fluorescente con un ciclooctino en su estructura que es capaz de reaccionar con los grupos azida presentes en el embrión sin la necesidad de la presencia de cobre. Tomada de Ref. 263a.

7.2. Discusión de resultados

Desde una perspectiva estructural, el ciclooctino **92** (Esquema 7.2) representa un objetivo sintético de interés ya que contiene dos subunidades idénticas conectadas mediante dos ciclaciones intramoleculares.

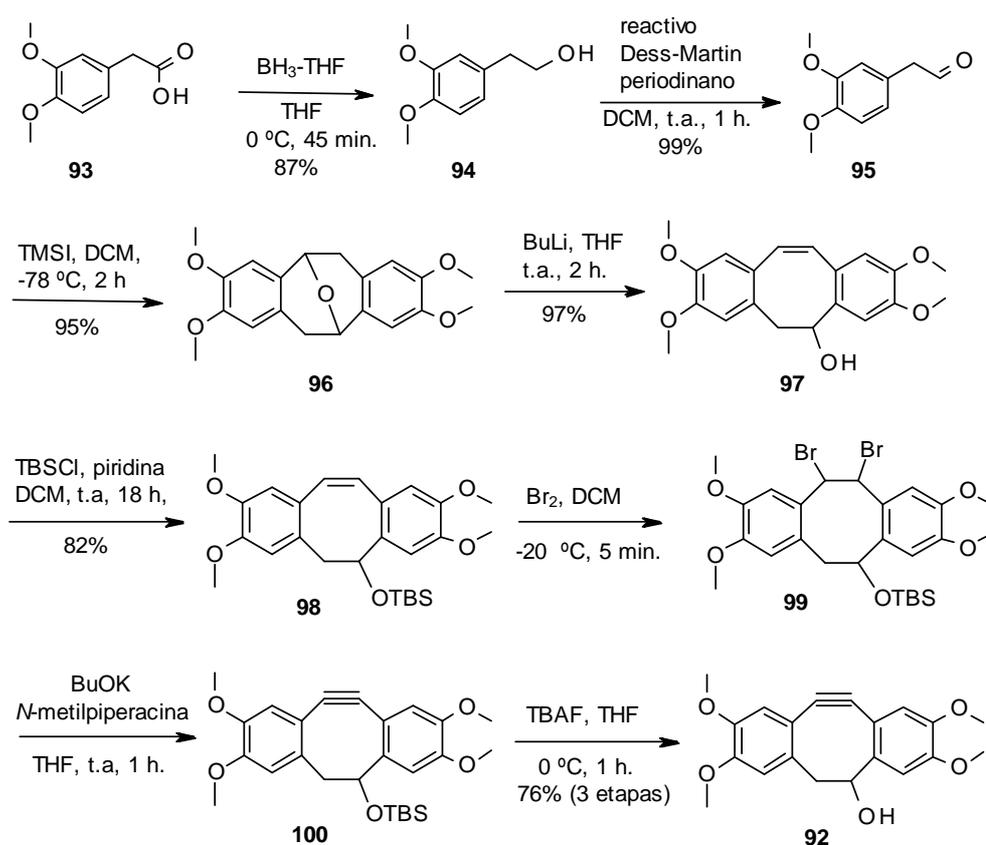
7.2.1. Síntesis del ciclooctino **92** (TMDIBO)

Se llevó a cabo la síntesis del tetrametoxidibenzociclooctino TMDIBO (**92**), como marcador selectivo de azidoglicanos en la superficie celular, la cual fue publicada

²⁶¹ Mann, E. *SEBBM* **2011**, *169*, 12-16.

²⁶² a) Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. *Science* **2008**, *320*, 664-667; b) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *PNAS*, **2007**, *104*, 16793-16797. c) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097-3099. d) Fokin, V. V. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 775-778.

posteriormente por Leeper y *col.*,²⁶³ inspirado por el trabajo de Seitz y *col.* quienes encontraron que **92** era muy estable, mientras que el ciclooctino sin grupos metoxi descomponía en pocos días a temperatura ambiente. **92** es un compuesto estable tanto en condiciones básicas como ácidas. Para acceder a **92**, se planteó una síntesis a partir del ácido **93** (Esquema 7.2).



Esquema 7.2. Síntesis de TMDIBO.

²⁶³ Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.

En primer lugar, se realizó la reducción del grupo ácido a su correspondiente alcohol con el complejo $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ a 0 °C durante 45 minutos, obteniendo **94** como un aceite con un rendimiento del 87%. El alcohol sin purificar se oxidó con el reactivo de Dess-Martin en condiciones habituales para dar el aldehído **95** como un aceite con un 99% de rendimiento.²⁶⁴ La formación del éter **96** es el resultado de la condensación en el oxígeno aldehídico seguida de una doble reacción de alquilación de Friedel-Crafts con ciclación intramolecular.²⁶⁵ La reacción se llevó a cabo utilizando yoduro de trimetilsililo²⁶⁶ como reactivo, a -78 °C en cloruro de metileno durante 2 horas, obteniendo un rendimiento del 95% después de la recristalización con MeOH. Posteriormente el sólido obtenido se trató con BuLi en THF durante 2 horas a temperatura ambiente para generar el cicloocteno **97** con un 97% después de purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Para la protección del grupo hidroxilo del cicloocteno **97** se utilizó TBSCl en cloruro de metileno anhidro a temperatura ambiente. Después de dos horas de reacción se obtuvo un 82% (mediante cromatografía en columna de gel de sílice) de cicloocteno protegido **98**.²⁶⁷ La bromación del alqueno **98** con Br_2 en cloruro de metileno a -20 °C condujo al producto dibromado **99**, que por tratamiento del crudo de reacción con 1-metilpiperacina y *t*-BuOK en THF permitió preparar **100**. Por último la desprotección del grupo TBS con TBAF, sin purificación previa, condujo al producto final TMDIBO (**92**), que se obtuvo por precipitación en el medio como un sólido blanco con un buen rendimiento (76% en 3 pasos de reacción). La síntesis solo requiere la purificación por cromatografía en columna en dos pasos de reacción, obteniendo un rendimiento global del 57% a partir del alcohol **94** como producto comercial.

²⁶⁴ Kraus, G. E.; melekhev, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1720-1722.

²⁶⁵ Maurin, C.; Bailly, F.; Cotellet, P. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7054-7058.

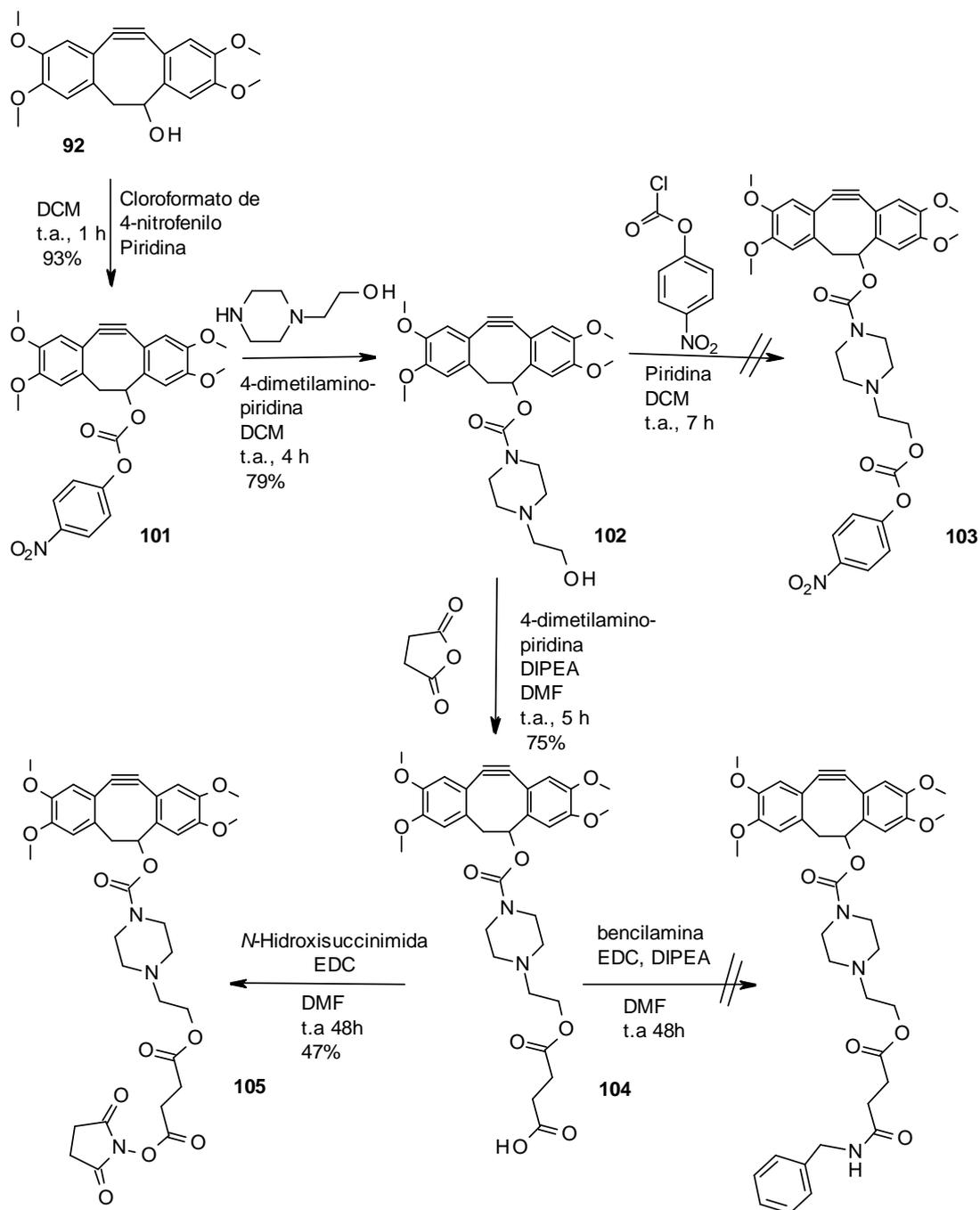
²⁶⁶ Jung, M. E.; Mossman, A. B.; Lyster, M. A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3698-3701.

²⁶⁷ Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984-1992.

7.2.2. Síntesis de posibles candidatos a nuevos radiotrazadores por acoplamiento con DOTA

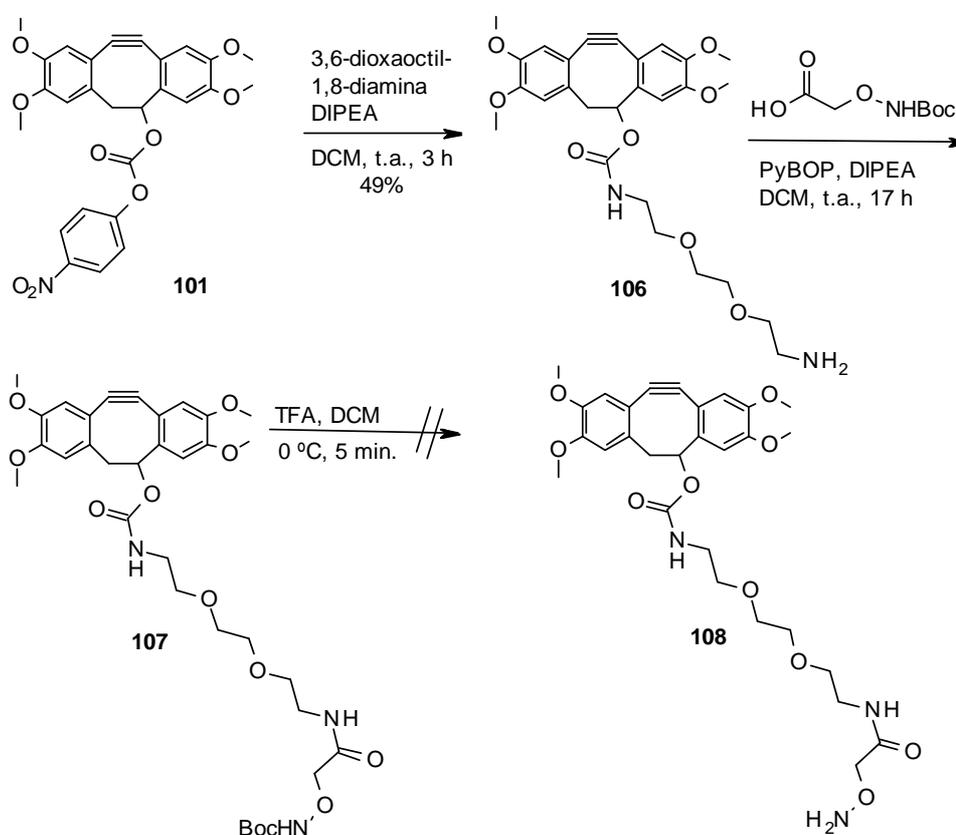
A partir del ciclooctino TMDIBO **92** se pensó en modificar la cadena alifática con grupos de diferente polaridad para obtener una variedad de productos como carbamatos y carbonatos que posteriormente se utilizarían para el acoplamiento con diferentes complejos de DOTA-Gd para estudios de MRI o SPECT.

Inicialmente TMDIBO fue derivatizado a su carbonato de 4-nitrofenilo **101** por reacción con cloroformiato de 4-nitrofenilo y piridina en cloruro de metileno a temperatura ambiente (Esquema 7.3). La reacción de **101** con 1-(2-hidroxi)etil)piperacina y 4-dimetilaminopiridina en cloruro de metileno a temperatura ambiente condujo después de 4 horas al alcohol **102** con un 79% de rendimiento. Posteriormente, **102** se trató con piridina y cloroformato de 4-nitrofenilo en cloruro de metileno a temperatura ambiente, sin embargo, después de 7 días de reacción, no se formó el carbamato **103** esperado. A la vista de estos resultados, se ensayó la reacción de esterificación del alcohol **102** con anhídrido succínico en medio básico para dar el ácido **104** con un 75% de rendimiento, que a continuación se trató con *N*-hidroxisuccinimida y PyBOP (reactivo de acoplamiento peptídico, sustituto del reactivo BOP), pero no hubo conversión después de dos horas de reacción. Cuando el ciclooctino **104** se hizo reaccionar con *N*-hidroxisuccinimida y EDC (agente activante del grupo carboxílico para la formación de amidas), en presencia de DIPEA y DMAP se obtuvo **105** después de 48 horas de agitación a temperatura ambiente con un 47% de rendimiento. Por otro lado, se ensayó además la reacción del ácido **104** con bencilamina y EDC en medio básico pero después de 48 horas de reacción no hubo formación del producto.



Esquema 7.3. Síntesis de precursores.

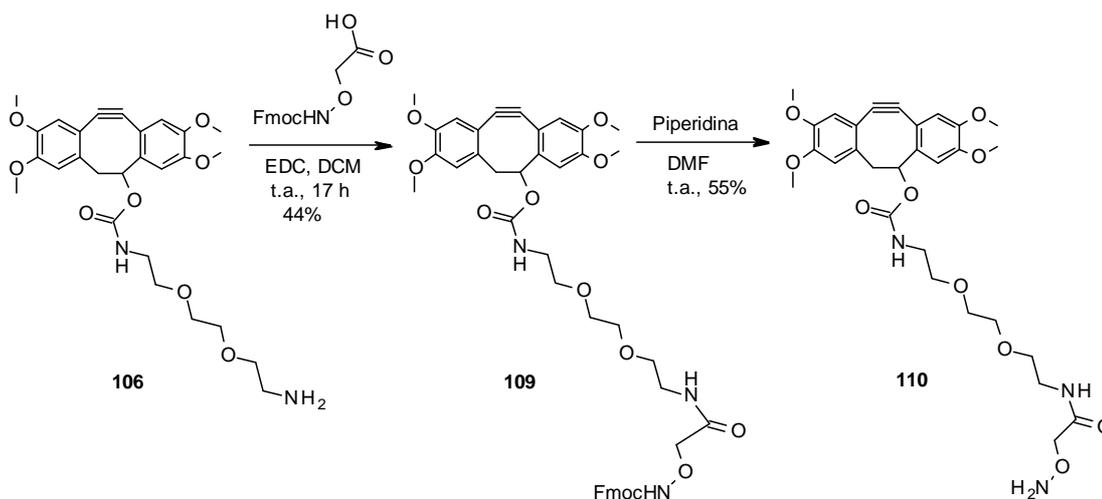
También, se ensayaron otros derivados a partir del carbonato **101**. La reacción de **101** con 3,6-dioxaoctil-1,8-diamina en medio básico en cloruro de metileno proporcionó **106** después de 3 horas de reacción a temperatura ambiente (49% rendimiento) (Esquema 7.4). La adición de ácido *N*-(*tert*-butoxicarbonil)aminoxiacético, PyBOP y DIPEA condujo a la formación de **107**, pero cuando éste se trató con TFA a 0 °C no se produjo su desprotección después de 5 minutos, observando la descomposición del producto de partida.²⁶⁸



Esquema 7.4. Intento de síntesis de la amina **108** a partir del carbonato **101**.

²⁶⁸ Boons, G. J.; Guo, J.; Ning, X.; Wolfert, M. WO 2009067663 A1 20090528, **2009**.

A la vista de estos resultados la amina **106** se trató con ácido *N*-(9-*H*-fluoren-9-ilmtoxycarbonil)aminoxiacético (preparado previamente) y EDC lo que condujo a un 44% de **109**. La desprotección posterior de **109** con piperidina en DMF a temperatura ambiente condujo a **110** (55%) (Esquema 7.5).²⁶⁸



Esquema 7.5. Formación del carbamato **110** a partir del carbonato **106**.

7.2.3. Acoplamiento de moléculas precursoras con DOTA

Gd-DOTA es un quelato iónico macrocíclico de gadolinio, con una alta estabilidad termodinámica y una cinética rápida.²⁶⁹ La eficacia paramagnética del ión Gd^{3+} se debe a la presencia de 7 electrones desapareados, que genera una reducción del tiempo de relajamiento longitudinal T1, permitiendo de esa manera un mejor contraste de imagen. Los estudios clínicos confirman la buena tolerancia del producto por vía intravenosa.

²⁶⁸ Boons, G. J.; Guo, J.; Ning, X.; Wolfert, M. WO 2009067663 A1 20090528, **2009**.

²⁶⁹ a) Caravan, P.; Ellison, J. J.; Mc.Murry, T. J.; Laufer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293-352. b) Morcos, S. K. *Eur. J. Radiol.* **2008**, 66, 175-179.

En el grupo de investigación del Prof. Leeper se han utilizado tanto los precursores comerciales **111**, **112** y **113** de agentes de contraste (Figura 7.2), así como precursores de agentes de contraste sintetizados en el laboratorio a partir del producto comercial **111**, como son los ligandos **114** y **115**.

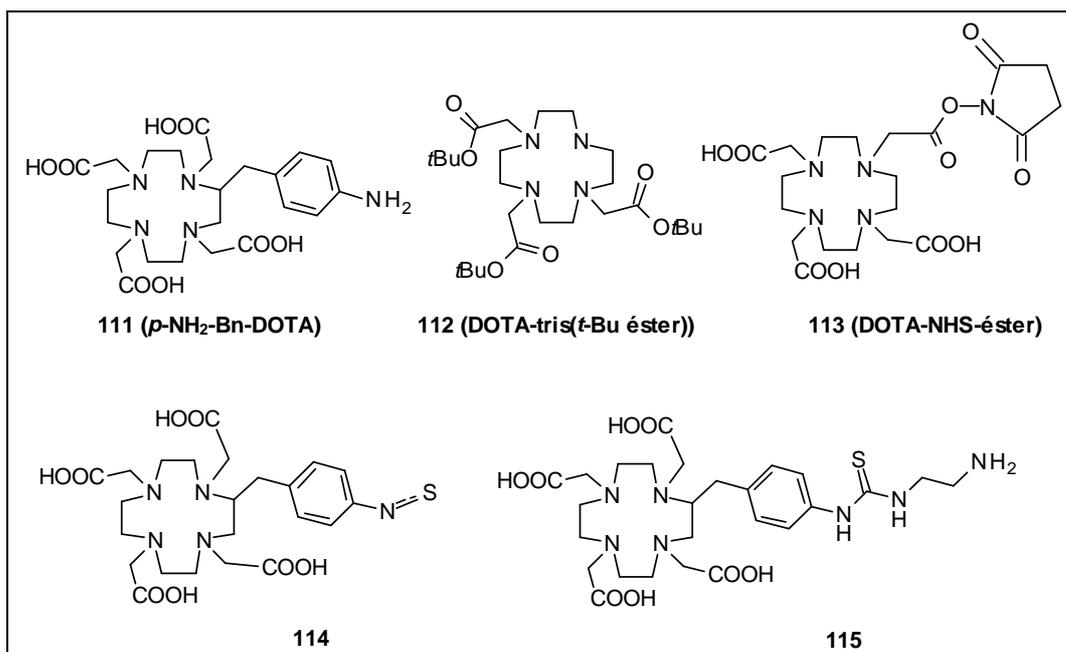
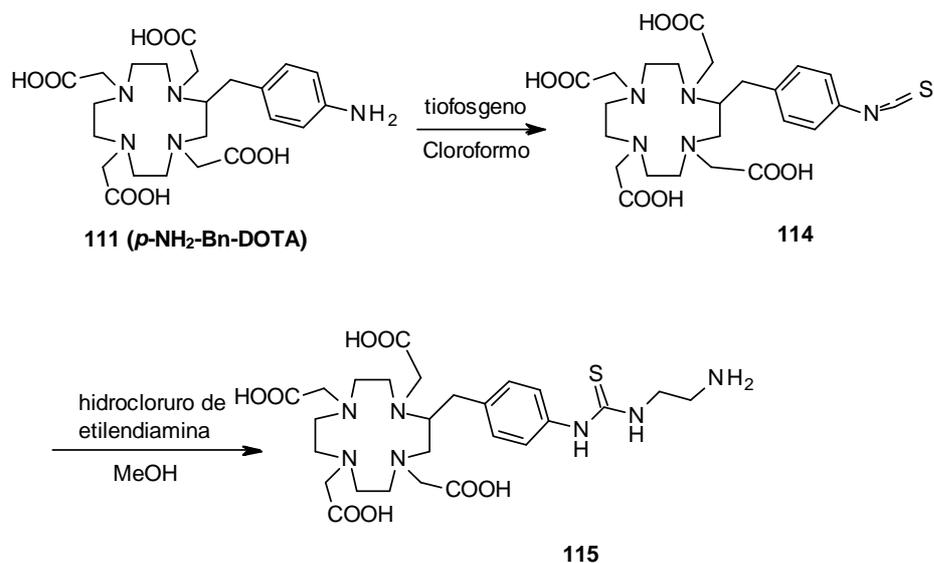


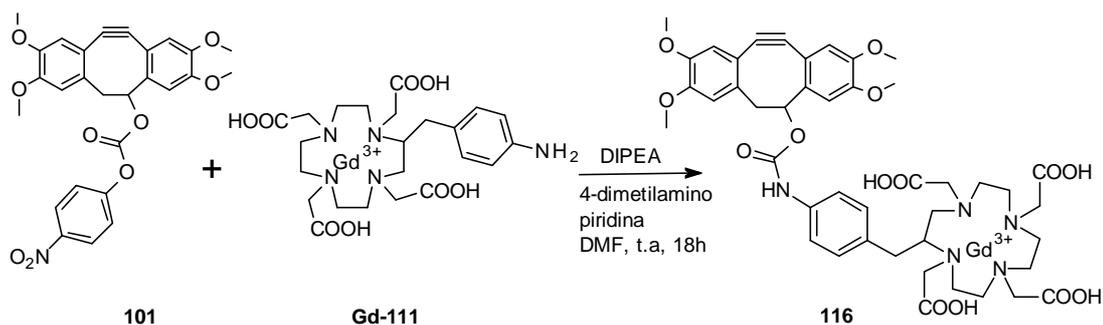
Figura 7.2. Diferentes estructuras de los complejos de DOTA.

En primer lugar, se sintetizaron los ligandos **114** y **115**. Para ello, *p*-NH₂-Bn-DOTA (**111**) se trató con tiosfosgeno 1M en cloroformo y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El producto **114** se identificó por HPLC-MS y a continuación el crudo de reacción se disolvió en metanol y se añadió gota a gota una disolución de hidrocloreuro de etilendiamina en medio básico. Después de una noche de agitación la reacción condujo a **115** como un sólido blanco (17%) (Esquema 7.6).



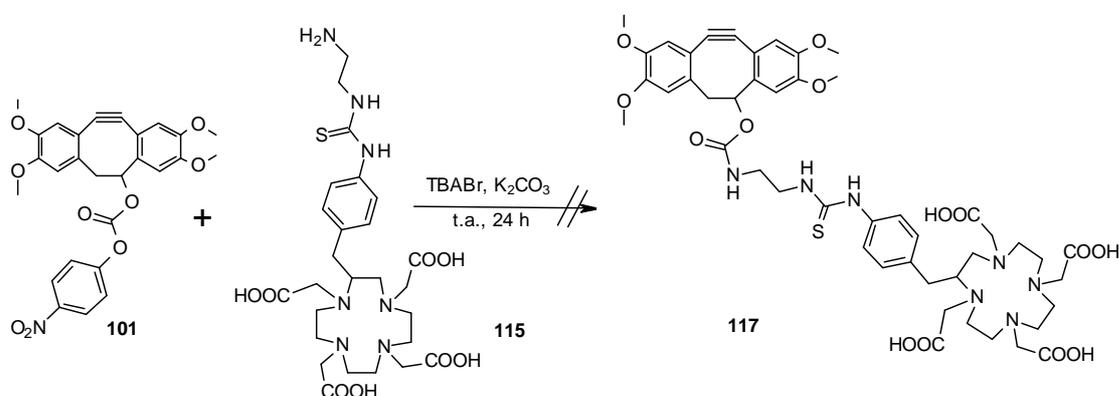
Esquema 7.6. Síntesis de DOTA-114 y DOTA-115.

Una vez sintetizados los precursores de radiotrazadores, éstos se acoplaron con los complejos quelantes Gd-DOTA para posteriormente ser estudiados mediante MRI. Así, el alquino **101** se disolvió en DMF y se le añadió Gd-*p*-NH₂-Bn-DOTA (Gd-**111**), DIPEA y 4-dimetilaminopiridina. Después de 18 horas de agitación se identificó el producto **116** mediante HPLC-MS (Esquema 7.7).



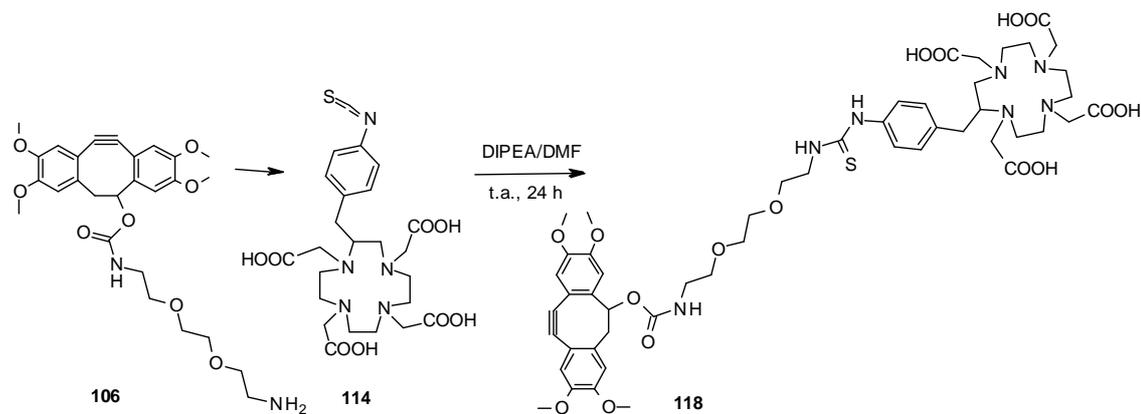
Esquema 7.7. Acoplamiento del ciclooctino **101** con Gd-*p*-NH₂-Bn-DOTA (**111**).

Posteriormente se ensayaron otros acoplamientos, que se llevaron a cabo sin Gd. Se estudió la solubilidad del ligando **115** que resultó ser insoluble en DMF, DCM y MeOH y soluble en agua. Por otro lado, **101** era soluble en esos disolventes e insoluble en agua. Por ello, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento en agua/DCM, en presencia de K_2CO_3 y TBABr (como agente de transferencia de fase) para obtener **117**, pero después de 24 horas de agitación no se identificó el producto final por HPLC-MS. Se repitió la reacción de acoplamiento utilizando DMSO como disolvente pero tampoco se formó el producto deseado (Esquema 7.8).

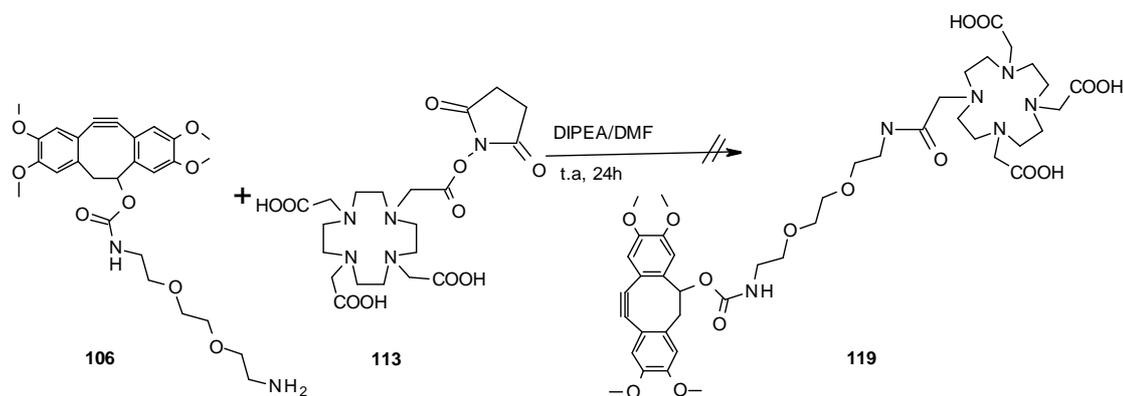


Esquema 7.8. Intento de acoplamiento de **101** con **115**.

Como consecuencia del acoplamiento sin éxito anterior, se ensayó el acoplamiento del alquino **106** y el ligando **114**. Para ello, una mezcla de ambos en DMF se trató con DIPEA. Después de 24 horas de agitación a temperatura ambiente se observó por HPLC-MS la formación del producto **118** (Esquema 7.9).

Esquema 7.9. Acoplamiento de **106** con el ligando **114**.

Para finalizar con el proyecto se llevó a cabo la reacción de acoplamiento de **106** con el ligando **113** en las mismas condiciones indicadas anteriormente. Sin embargo, la reacción no condujo al producto esperado **119** (Esquema 7.10).

Esquema 7.10. Acoplamiento de **106** con el ligando **113**.

7.3. Parte experimental

7.3.1. Síntesis del ciclooctino TMDIBO (92)

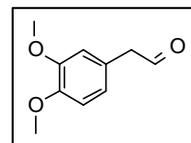
7.3.1.1. 3,4-dimetoxibenzaldehído (95)

Una disolución de ácido trimetoxifenilacético (10,00 g, 50,96 mmol), se disolvió en THF anhidro (200 mL) bajo atmósfera de argón, se agitó y se enfrió a 0 °C. A continuación se añadió una solución 1M de BH₃.THF en THF (100 mL, 100,0 mmol) gota a gota durante 30 minutos y la mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos a 0 °C. Pasado este tiempo, se añadió agua (200 mL) cuidadosamente manteniendo la temperatura a 0 °C. La mezcla de reacción se diluyó con dietil éter (300 mL), se lavó sucesivamente con una disolución de NaHCO₃ saturada (100 mL), agua (100 mL), una disolución saturada de NaCl (100 mL) y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El filtrado se evaporó para dar el alcohol **94** como un aceite (8,10 g, 87%). El crudo de reacción se diluyó en cloruro de metileno (166 mL) y se añadió una disolución del reactivo Dess-Martin (20 g, 47,24 mmol) en cloruro de metileno (190 mL). Después de una hora de reacción, se añadió dietil éter (100 mL), una disolución saturada de NaHCO₃ (100 mL), una disolución de Na₂S₂O₃ al 25% (100 mL) y se dejó agitando durante 10 minutos. Se separaron las fases acuosas y se extrajeron con dietil éter (3x100 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución de NaHCO₃ saturada (100 mL), agua (100 mL), una disolución saturada de NaCl (100 mL) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó para dar el aldehído **95** como un aceite (7,87 g, 99%).^{265,270}

²⁶⁵ Kraus, G.; Melekhov, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1720-1722.

²⁷⁰ Chikashita, H.; Morita, Y.; Itoh, K. *Synth. Commun.* **1987**, *17*, 677-684.

Rendimiento: 82%



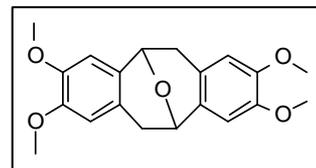
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9,73 (t, 1H, $J=2,4$ Hz); 6,86 (d, 1H, $J=8,2$ Hz); 6,76 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 6,70 (dd, 1H, $J=8,2$, $J=1,8$ Hz); 3,83 (s, 6H); 3,63 (d, 2H, $J=2,4$ Hz) ppm.

7.3.1.2. 5,11-epoxi-5,6,11,12 tetrahidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocteno (96)

A una disolución de **95** (7,07 g, 39,23 mmol) en cloruro de metileno (235 mL) enfriada a -78 °C se le añadió lentamente y con agitación vigorosa yoduro de trimetilsililo (5,30 mL, 40,00 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 2 horas y se dejó calentar lentamente hasta temperatura ambiente. La reacción se interrumpió rápidamente al llegar a temperatura ambiente por adición de una disolución acuosa 1M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (250 mL) agitando durante 10 minutos. La mezcla de reacción se extrajo con cloruro de metileno (2x200 mL). Se juntaron las fases orgánicas, se lavaron con una disolución saturada de NaHCO_3 (2x200 mL) y se secó con Na_2SO_4 anhidro. El filtrado se evaporó y se purificó por recristalización con MeOH para dar el éter **96** como un sólido amarillo (12,75 g, 95%).

Rendimiento: 82%

P.f.: 161-162 °C (Lit²⁶⁸ 163-164 °C)



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 6,58 (s, 2H); 6,49 (s, 2H); 5,21 (d, 2H, *J*=5,4 Hz); 3,85 (s, 6H); 3,80 (s, 6H); 3,47 (dd, 2H, *J*=15,6 Hz, *J*=5,4 Hz); 2,66 (d, 2H, *J*=15,6 Hz) ppm.

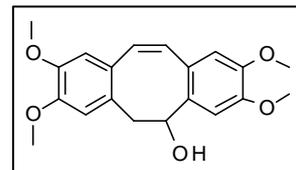
7.3.1.3. 5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-ol (97)

A una mezcla de **96** (4,59 g, 13,80 mmol) en THF anhidro (138 mL) bajo atmósfera de argon, se añadió lentamente una disolución 2,5M de BuLi en hexano (11,30 mL, 27,50 mmol) y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió con la adición de agua (100 mL) y se extrajo con cloruro de metileno (3x100 mL). Se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con una disolución saturada de NaCl (100 mL) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo primero en DCM/AcEtO 9:1 seguido de AcEtO para dar el alcohol **97** como un sólido cristalino (4,42 g, 97%).

²⁶⁸ Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984-1992.

Rendimiento: 97%

P.f.: 100-102 °C (Lit²⁶⁸ 90-110 °C)



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,00 (s, 1H); 6,76 (s, 1H); 6,71 (s, 1H); 6,70 (s, 1H); 6,62 (s, 1H); 6,59 (s, 1H); 5,20 (m, 1H); 3,88 (s, 6H); 3,84 (s, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,30 (m, 2H) ppm.

7.3.1.4. 5-*tert*-butildimetilsililoxi-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocteno (**98**)²⁶⁴

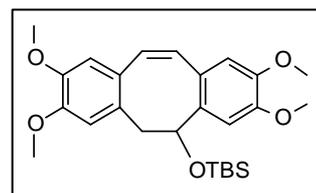
Una mezcla de **97** (3,31 g, 9,6 mmol), cloruro de *tert*-butildimetilsililo (4,60 g, 28,8 mmol) y piridina (1,86 mL, 23,0 mmol) en cloruro de metileno anhidro (22 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos se juntaron, se lavaron con agua (20 mL), una disolución saturada de NaCl (20 mL) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. El filtrado se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo en una mezcla de AcEtO/ Hex 1:1 para dar el silil éter **98** como un aceite claro (3,49 g, 82 %).

²⁶⁸ Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984-1992.

²⁶⁴ Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.

Rendimiento: 82%

Rf (AcOEt/MeOH 1:1) 0,50



¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,09 (s, 1H, H_{Ar}); 6,73 (d, 1H, *J*=12,2 Hz, CH=CH); 6,61 (d, 1H, *J*=12,2 Hz, CH=CH); 6,57 (s, 1H, H_{Ar}); 6,56 (s, 1H, H_{Ar}); 6,55 (s, 1H, H_{Ar}); 5,39 (dd, 1H, *J*=10,2 Hz, *J*=5,4 Hz, CHOSi); 3,88 (s, 3H, OCH₃); 3,81 (s, 3H, OCH₃); 3,81 (s, 3H, OCH₃); 3,80 (s, 3H, OCH₃); 3,40 (dd, 1H, *J*=15,3 Hz, *J*=5,4 Hz, CH); 3,11 (dd, 1H, *J*=15,3 Hz, *J*=10,2 Hz, CH); 0,90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0,00 (s, 3H, SiCH₃), -0,05 (s, 3H, SiCH₃) ppm.

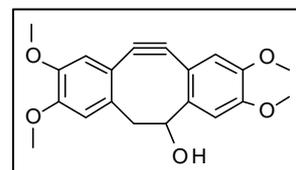
7.3.1.5. 11,12-dideshidro-5,6,-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-ol (92)

A una disolución de la olefina **98** (2,60 g, 5,70 mmol) en cloruro de metileno anhidro (49 mL) a -20 °C bajo atmósfera de argón, se le añadió lentamente bromo (0,29 mL, 5,70 mmol) con agitación, hasta que el color oscuro persistiera. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en THF (49 mL). Se añadió *N*-metil-piperacina (8,56 g, 85 mmol) y *t*-BuOK (2,55 g, 22,80 mmol) y se dejó agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se vertió en agua/hielo y se extrajo con AcEtO. Las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con una disolución saturada de NaOH (50 mL) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. El residuo se disolvió en THF (49 mL) y se agitó a 0 °C. Se añadió TBAF (1M en THF, 7,40 g, 7,40 mmol) gota a gota. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente agitando durante 30 minutos. La reacción se paró con la adición de una disolución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con AcEtO. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl (50 mL) y se

secaron con Na₂SO₄. El residuo se concentró hasta el comienzo de la cristalización. Los cristales fueron filtrados para dar un sólido blanco (1,48 g, 4,30 mmol, 76% yield).

Rendimiento: 76%

P.f.: 231-232 °C (Lit²⁶⁴ 232 °C)



¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,37 (s, 1H, H_{Ar}); 7,13 (s, 1H, H_{Ar}); 6,96 (s, 1H, H_{Ar}); 6,96 (s, 1H, H_{Ar}); 5,78 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz, OH); 4,28 (dd_{ap}, 1H, *J* = 5,0 Hz, *J* = 2,1 Hz, CHOH); 3,86 (s, 6H, CH₃); 3,81 (s, 6H, CH₃); 3,06 (dd, 1H, *J* = 14,2, *J* = 2,1 Hz, CH₂); 2,64 (dd, 1H, *J* = 14,2 Hz, *J* = 3,6 Hz, CH₂) ppm.

7.3.2. Derivados del ciclooctino TMDIBO (92)

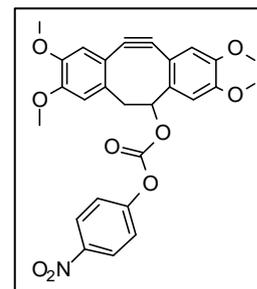
7.3.2.1. Carbonato de 11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo [a,e]cicloocten-5-ilo y 4'-nitrofenilo (101)

El ciclooctino **92** (0,200 g, 0,59 mmol) se disolvió en cloruro de metileno (19,6 mL) y a continuación se añadió piridina (0,24 mL, 2,93 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (0,236 g, 1,17 mmol). Se dejó agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. Cuando la reacción finalizó, se diluyó con cloruro de metileno (20 mL) y se lavó con una disolución saturada de NaCl (2x20 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se secaron con Na₂SO₄. El residuo se concentró a sequedad y se recrystalizó con AcEtO para dar un sólido blanco (0,274 g, 0,55 mmol, 93% yield).

²⁶⁴ Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.

Rendimiento: 93%

P.f.: 204-205 °C (Lit²⁶⁴ 204-205 °C)



¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, rotámero mayor): δ 8,28 (d, 2H, *J* = 9,3 Hz, H_{Ar}); 7,42 (d, 2H, *J* = 9,3 Hz, H_{Ar}); 7,13 (s, 1H, H_{Ar}); 6,90 (s, 1H, H_{Ar}); 6,86 (s, 1H, H_{Ar}); 6,83 (s, 1H, H_{Ar}); 5,51 (dd, 1H, *J* = 3,7 Hz, *J* = 1,9 Hz, CHOCO₂Ar); 3,95 (s, 3H, CH₃); 3,91 (s, 3H, CH₃); 3,90 (s, 3H, CH₃); 3,89 (s, 3H, CH₃); 3,23 (dd, 1H, *J* = 15,4 Hz, *J* = 1,9 Hz, CH₂); 2,97 (dd, 1H, *J* = 15,4 Hz, *J* = 3,7 Hz, CH₂); rotámero menor: 8,14 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz, H_{Ar}); 7,13 (s, 1H, H_{Ar}); 6,90 (s, 1H, H_{Ar}); 6,88 (s, 1H, H_{Ar}); 6,87 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz, H_{Ar}); 6,84 (s, 1H, H_{Ar}); 6,14 (dd, 1H, *J* = 9,8 Hz, *J* = 2,0 Hz, CHOCO₂Ar); 3,94 (s, 3H, CH₃); 3,93 (s, 3H, s, CH₃); 3,91 (s, 3H, CH₃); 3,88 (s, 3H, CH₃); 3,72 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 9,8 Hz, CH₂); 2,90 (dd, 1H, *J* = 14,0 Hz, *J* = 2,0 Hz, CH₂) ppm.

7.3.2.2. 2-[4-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil)piperazin-1-il]etanol (102)

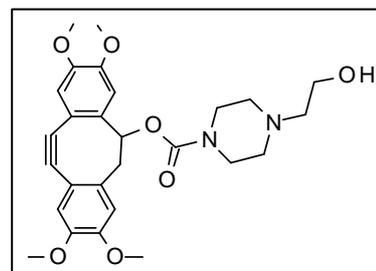
El ciclooctino **101** (20 mg, 0,039 mmol) se disolvió en cloruro de metileno (1 mL) y a continuación se añadió 4-dimetilaminopiridina (0,5 mg, 0,0039 mmol) y 1-(2-hidroxi)etilpiperacina (5,67 mg, 0,043 mmol). Se dejó agitando durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de las 4 horas, la mezcla de reacción se concentró hasta

²⁶⁴ Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, 2, 932-936.

sequedad y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo primero con 1% MeOH/DCM seguido de 5% MeOH/DCM para dar el alcohol como un aceite (15,3 mg, 0.030 mmol, 79%).

Rendimiento: 79%

Rf (1% MeOH/DCM): 0,20



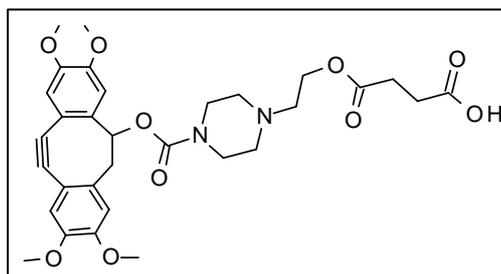
LC-MS (ESI): m/e calculado para $C_{27}H_{33}N_2O_7$ $[M]^+$: 497,5; Encontrado $[M]^+$: 497,3.

7.3.2.3. Succinato de 2-{4-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil)piperazin-1-il}etilo e hidrógeno (104)

El ciclooctino **102** (12 mg, 0,024 mmol) se disolvió en DMF (0,5 mL) y a continuación se añadió 4-dimetilaminopiridina (0,87 mg, 0,0072 mmol), DIPEA (3,0 mg, 0,024 mmol) y anhídrido succínico (4,8 mg, 0,048 mmol) y se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con 5% MeOH/DCM para dar el ácido como un aceite (10,8 mg, 0.018 mmol, 75%).

Rendimiento: 75%

R_f (5% MeOH/DCM): 0,35

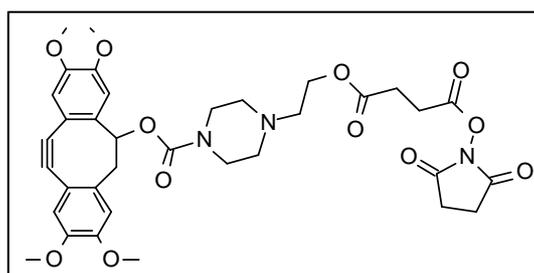


LC-MS (ESI): m/e calculado para C₃₁H₃₇N₂O₁₀ [M]⁺: 597,6; Encontrado [M]⁺: 597,3.

7.3.2.4. Succinato 2-{4-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-ilocarbonil)piperazin-1-il}etilo y N-succinimidilo (105)

El ciclooctino **104** (10 mg, 0,018 mmol) se disolvió en DMF (1 mL) y a continuación se añadió *N*-hidroxisuccinimida (7,7mg, 0,066 mmol) y EDC (7,7 mg, 0,050 mmol) y se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción, la mezcla se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo primero en 5% MeOH/DCM para dar **105** como un aceite (5,8 mg, 0,0085 mmol, 47%).

Rendimiento: 47%

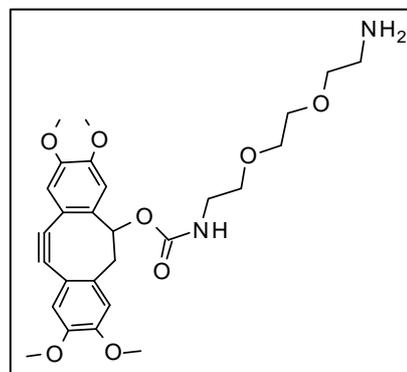


LC-MS (ESI): m/e calculado para C₃₅H₄₀N₃O₁₂ [M]⁺: 694,7; Encontrado [M]⁺: 694,3.

7.3.2.5. *N*-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[*a,e*]cicloocten-5-iloxicarbonil)-3,6-dioxaoctan-1,8-diamina (106)

El ciclooctino **101** (90 mg, 0,17 mmol) se disolvió en cloruro de metileno anhidro (5 mL) y a continuación se añadió 3,6-dioxaoctil-1,8-diamina (251,9 mg, 1,7 mmol) y DIPEA (109,6mg, 0,85 mmol) y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción, la mezcla se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo en gradiente 10%-30% MeOH/DCM para dar **106** como un aceite (44,8 mg, 0.087 mmol, 49%).

Rendimiento: 49%

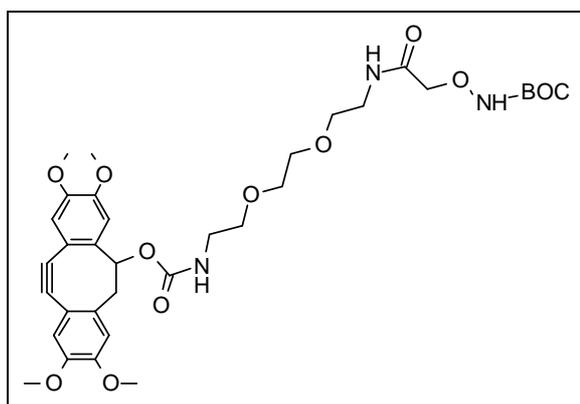


LC-MS (ESI): m/e calculado para C₂₇H₃₅N₂O₈ [M]⁺: 515,6; Encontrado [M]⁺: 515,6.

7.3.2.6. *Terc*-butiloxicarbonilaminooxi-*N*-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[*a,e*]cicloocten-5-iloxicarbonil)-8-amino-3,6-dioxaoctil) acetamida (107)

El ciclooctino **106** (44,8 mg, 0,087 mmol) se disolvió en cloruro de metileno anhidro (0,5 mL) y a continuación se añadió *N*-Boc-(carboximetoxi)amina (16,0 mg, 0,087 mmol), PyBOP (43,2 mg, 0,087 mmol) y DIPEA (21,5 mg, 0,17 mmol) y se agitó

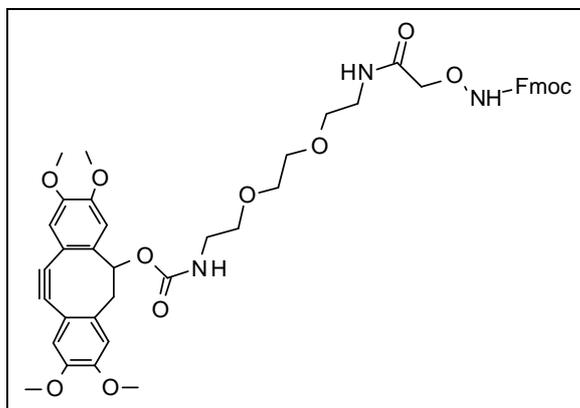
durante toda la noche a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción, la mezcla se concentró a vacío. El producto final **107** se identificó por LC-MS en el crudo de reacción.



LC-MS (ESI): m/e calculado para $C_{35}H_{47}N_2O_{12}$ $[M]^+$: 688,7; Encontrado $[M]^+$: 688,6.

7.3.2.7 9-*H*-fluoren-9-ilmetoxicarbonil)aminooxi-N-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil)-8-amino-3,6-dioxaocetil acetamida (**109**)

La amina **106** (10,0 mg, 0,019 mmol) se disolvió en cloruro de metileno anhidro (0,3 mL) y a continuación se añadió ácido *N*-(9-*H*-fluoren-9-ilmetoxicarbonil)aminooxiacético (7,3 mg, 0,023 mmol) y EDC (2,9 mg, 0,019 mmol) y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción, la mezcla se concentró a vacío. El producto final **109** se identificó por LC-MS en el crudo de reacción.

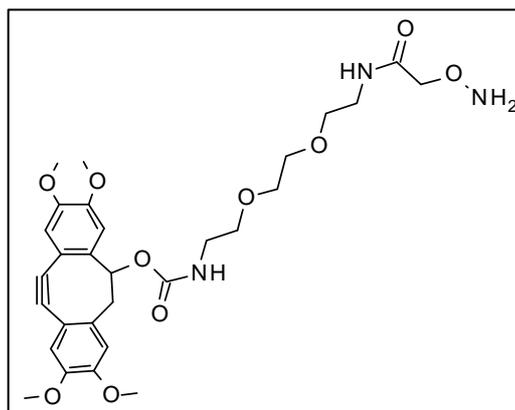


LC-MS (ESI): m/e calculado para $C_{45}H_{49}N_2O_{12}$ $[M]^+$: 809,7; Encontrado $[M]^+$: 809,6.

7.3.2.8. Aminooxi-N-(11,12-dideshidro-5,6-dihidro-2,3,8,9-tetrametoxidibenzo[a,e]cicloocten-5-iloxicarbonil)-8-amino-3,6-dioxaocetil)acetamida (110)

El ciclooctino **109** (55,0 mg, 0,107 mmol) se disolvió en DMF anhidra (0,67 mL), se añadió piperidina (0,67 mL) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a vacío, se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar **110** (43,3 mg, 0,073 mmol, 68%).

Rendimiento: 68%

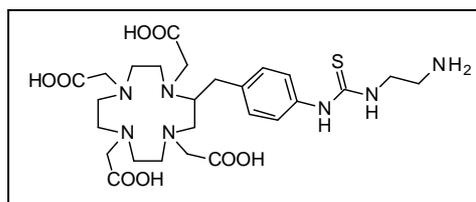


LC-MS (ESI): m/e calculado para $C_{29}H_{38}N_3O_{10}$ $[M]^+$: 588,3; Encontrado $[M]^+$: 588,1

7.3.3. Síntesis de precursores de agentes de contraste

7.3.3.1. *p*-3-(2-aminoetil)-tiourea-Bn-DOTA (115)

p-NH₂-Bn-DOTA (13,0 mg, 0,025 mmol) se disolvió en H₂O (0,16 mL) y se añadió a una disolución 1M de tiofosgeno en cloroformo (0,033 mL, 0,033 mmol) y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El residuo se evaporó a sequedad y el producto final se identificó por LC-MS (M+1 552,7). El crudo de reacción (9,37 mg, 0,017 mmol) se disolvió en MeOH (0,66 mL) y se añadió gota a gota durante 15 minutos a una solución de hidrocloreuro de etilendiamina (11,3 mg, 0,085 mmol) en MeOH (3,30 mL) y trietilamina (0,033 mL) y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El residuo se concentró a sequedad y se purificó por cromatografía preparativa de gel sílice para dar un sólido blanco (2,5 mg, 0,0040 mmol, 16%) identificado por LC-MS.

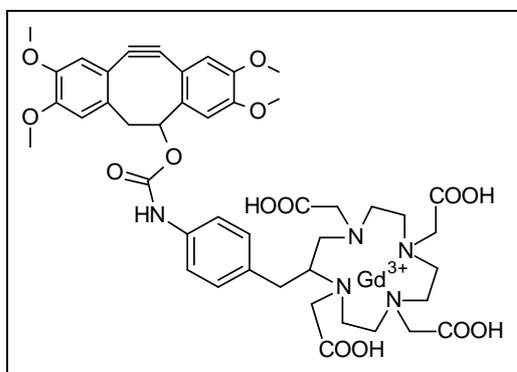


LC-MS (ESI): m/e calculado para C₂₆H₄₃N₇O₈S [M]⁺: 612,7; Encontrado [M]⁺: 612,7

7.3.4. Acoplamiento de los derivados ciclooctinos con los ligandos DOTA

7.3.4.1. Síntesis del compuesto 116

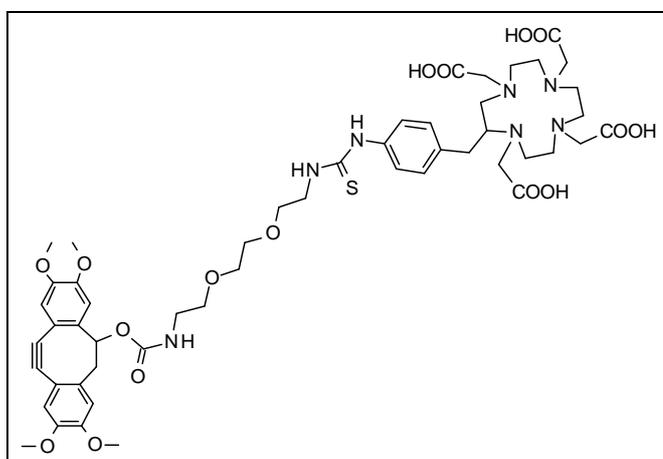
Una mezcla de Gd-*P*-NH₂-Bn-Dota (**111**) (10,0 mg, 0,014 mmol), DIPEA (5,4 mg, 0,042 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0,51 mg, 0,0042 mmol) y el alquino **101** (7,5 mg, 0,017 mmol) se disolvió en DMF (1,0 mL) y se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. El producto final se identificó por LC-MS.



LC-MS (ESI): m/e calculado para C₄₄H₆₂GdN₂O₆ [M]⁺: 914,2; Encontrado [M]⁺: 914,6

7.3.4.2. Síntesis del compuesto 118

Una mezcla de *p*-3-(2-aminoetil)-tiourea-Bn-DOTA (**114**) (5,1 mg, 0,0075 mmol), DIPEA (1 gota) y el alquino **106** (4,0 mg, 0,0075 mmol) se disolvió en DMF (0,1 mL) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto final se identificó por LC-MS ($M+1=1066,6$).



LC-MS (ESI): m/e calculado para $C_{51}H_{69}N_7O_{16}S$ $[M]^+$: 1067,4; Encontrado $[M]^+$: 1067,6.

