



**Preparación de compuestos
quinónicos como potenciales
inhibidores de la ruta oncogénica
JAK-STAT.**

Trabajo Fin de Máster

Alumna: Yaiza Pérez Pérez

Tutora: Ana Estévez Braun

Universidad de La Laguna, ULL

Curso académico 2018-2019

**ANA ESTÉVEZ BRAUN, CATEDRÁTICA DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.**

AUTORIZA:

La presentación y defensa del Trabajo de Fin de Máster titulado “Preparación de compuestos quinónicos como potenciales inhibidores de la ruta oncogénica JAK-STAT”, realizado por Dña. Yaiza Pérez Pérez bajo mi supervisión durante el curso académico 2018-2019 en los laboratorios del Instituto Universitario de Bio-Organica.

Laguna, a 9 de septiembre de 2019.

ESTEVEZ BRAUN
ANA MARIA -
42093285L

Firmado digitalmente
por ESTEVEZ BRAUN
ANA MARIA - 42093285L
Fecha: 2019.09.10
11:54:03 +01'00'

Agradecimientos

El TFM ha sido para mí una experiencia muy gratificante no sólo porque he podido aprender muchas cosas sobre la profesión que me apasiona, sino también porque he conocido a gente maravillosa con la que he podido compartir muy buenos momentos. Gracias al equipo de investigación de Ana Estévez (Quibionat), que no sólo me han ayudado muchísimo, sino que además me lo han hecho pasar genial. Gracias al Dr. Ángel Amesty por su ayuda en los estudios de modelización molecular. Gracias a mis compañeros de máster por su apoyo incondicional. Y gracias a mi tutora Ana Estévez, por su dedicación, por confiar siempre en mí y por darme la oportunidad de formar parte de Quibionat durante este tiempo.

Índice

1.- Resumen / Abstract.....	8
2.- Introducción.	10
2.1.- Ruta JAK-STAT.....	10
2.2.- Inhibidores de JAK2.....	15
2.3.- Quinonas y la ruta JAK-STAT.....	17
3.- Objetivo y alcance del trabajo	21
4. Resultados y discusión	22
4.1.- Síntesis de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona	24
4.2.- Síntesis de compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona	26
4.3.- Eliminación del grupo <i>t</i> -butilo, síntesis de 2-amino-3-(4 clorofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona	35
4.4.- Síntesis de compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo.....	36
4.5.- Estudio de modelización molecular (Docking).....	46
4.5.1.- Selección de la diana y preparación para el docking	47
4.5.2.- Cálculos y resultados del Docking	47
4.6.- Datos físico químicos de los compuestos obtenidos	50
5.- Parte experimental.....	52
5.1.- Técnicas instrumentales	52
5.1.1.- Resonancia magnética nuclear.....	52
5.1.2.- Espectrometría de masas	52
5.1.3.- Difracción de rayos-X	53
5.2.- Técnicas cromatográficas	53
5.2.1.- Cromatografía líquida en columna (CLC)	53
5.2.2.- Cromatografía en capa fina (CCF)	54
5.2.3.- Cromatografía en placa preparativa (CP).....	54
5.2.4.- Cromatografía de exclusión por tamaños	55
5.3.- Reactor de microondas	55
5.4.- Técnica de modelización molecular	55
5.5.- Medidor de punto de fusión	55
5.6.- Síntesis y caracterización de los compuestos obtenidos:	55

5.6.1.- Síntesis de 3-oxo-3- (tiofen-2-il) propanoato de etilo (1a).....	55
5.6.2.- Síntesis de 5-hidroxi-4,7-dioxo-benzotiofeno-6-carboxilato de etilo (1b).	56
5.6.3.- Síntesis de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona (1).	56
5.6.4- Procedimiento general para la síntesis de compuestos tipo 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona.	57
5.6.5.- Síntesis de 2-amino-3-(4-clorofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-dione (5a).	71
5.6.6.- Procedimiento general para la síntesis de compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo.	72
6.- Conclusiones:	79
8.- Anexo de espectros seleccionados.	80
8.1.- Compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona:	80
8.2.- Compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo.....	94

Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ACN:	Acetonitrilo
ADN:	Ácido desoxirrinonucleico
Ala:	Alanina
Arg:	Arginina
Asn:	Asparagina
Asp:	Aspartato
ATP:	Trifosfato de adenosina
AcOEt:	Acetato de etilo.
DBU:	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno.
CCF:	Cromatografía de capa fina
CP:	Cromatografía de placa preparativa
CLC:	Cromatografía líquida en columna
DCM:	Diclorometano
DEPT 135:	Del término inglés Distortionless Enhancement by Polarization Transfer. Es un experimento de RMN en el que las señales de los CH ₂ son negativas y las de los CH y CH ₃ positivas con respecto a la línea base del espectro. En ellos no se observan los carbonos cuaternarios.
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EDDA:	Diacetato de etiléndiamina
EM:	Espectrometría de masas de baja resolución
EMAR:	Espectrometría de masas de alta resolución
[M ⁺]	Ión molecular
MCR	Reacción multicomponente.
Gly	Glicina
h:	Hora
HBA	Nº aceptores de enlaces de hidrógeno
HBD	Nº donadores de enlace de hidrógeno
His:	Histidina
HMBC:	Del término inglés Heteronuclear Multiple Bond Correlation. Es un experimento bidimensional de resonancia magnética nuclear en la que se puede observar la correlación protón-carbono a 2 y 3 enlaces.

Hz:	Hertzios
IC ₅₀ :	Concentración de inhibidor a la cual la actividad enzimática se reduce a la mitad.
IE:	Impacto Electrónico
<i>J</i> :	Constante de acoplamiento
ⁿ <i>J</i> _{C-F} :	Constante de acoplamiento Carbono-Fluor a n = 1 , 2, 3 ó 4 enlaces.
JAK	Designa a la familia de proteínas Janus quinasa
Lys:	Lisina
equiv:	Equivalente
Met	Metionina
min.:	Minuto
mmol:	Milimol
mg:	Miligramo
mL:	Mililitro
<i>m/z</i> :	Relación masa/carga
MW:	Microondas
n-hex	n-hexano
ta:	Temperatura ambiente
PDB:	Protein Data Bank
Ph:	Fenilo
PM	Peso molecular
ppm:	Partes por millón
PTSA	Área polar superficial
pTSA:	Ácido p-toluenosulfónico
RB	Nº enlaces rotables
RMN:	Resonancia magnética nuclear
Rto:	Rendimiento
STAT:	Familia de proteínas que actúan como factores de transcripción. Proviene del término inglés Signal Transducer and Activator of Transcription
THF:	Tetrahidrofurano
TMS:	Tetrametilsilano
TYK2	Tirosina Kinasa 2
Tyr:	Tirosina

Val: Valina
VM: Volumen molecular

1.- Resumen / Abstract:

Resumen:

Actualmente existe una gran necesidad de encontrar fármacos anticancerígenos debido a los problemas de resistencia a los mismos, la baja selectividad de muchos de ellos y por tanto los efectos secundarios que producen. Una estrategia es la búsqueda de compuestos antitumorales específicos que interaccionen con dianas farmacológicas implicadas en los procesos oncogénicos.

En este trabajo se ha preparado dos familias de compuestos como inhibidores de la enzima JAK-2 involucrada en diferentes tipos de cáncer y enfermedades mieloproliferativas.

Ambas familias de compuestos han sido sintetizadas mediante una reacción multicomponente, a partir de la quinona heterocíclica, 6-hidroxibenzotiofen-4,7-diona.

La primera de esta familia la constituyen derivados tipo 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona, que se han obtenido a partir de la reacción multicomponente de dicha quinona con diferentes isonitrilos y aldehídos sustituidos, generando compuestos con dos puntos de diversidad estructural.

La segunda familia, derivados tipo 2-amino-3-ciano-4H piranos, han sido sintetizados mediante la reacción multicomponente de 6-hidroxibenzotiofen-4,7-diona, malononitrilo y diferentes aldehídos, generando en este caso estructuras con un solo punto de diversidad estructural.

Las principales interacciones de estos compuestos en el sitio activo de JAK2, han sido analizados por estudios de modelización tipo Docking.

Abstract:

Currently there is a great need to find anticancer drugs due to the problems of resistance to them, the low selectivity of many of them and therefore the side effects they produce. One strategy is the search for specific antitumor compounds that interact with pharmacological targets involved in oncogenic processes.

In this work, two families of compounds have been prepared as JAK-2 inhibitors. This enzyme is involved in different types of cancer and myeloproliferative diseases.

Both families of compounds have been synthesized by a multicomponent reaction, from the heterocyclic quinone, 6-hydroxybenzothiophene-4,7-dione.

The first family is formed by 2-amino-thieno [2,3-f] benzofuran-4,8-dione derivatives, which have been obtained through a multicomponent reaction from the mentioned quinone, different isonitriles and different substituted aldehydes, generating compounds with two points of structural diversity.

The second family, Includes 2-amino-3-cyano-4H pyran derivatives, synthesized in similar way by the multicomponent reaction of 6-hydroxybenzothiophene-4,7-dione, malononitrile and different aldehydes. In this case, the obtained compounds only have a point of structural diversity.

The key interactions of these compounds in the active site of JAK2, have been analyzed by Docking studies.

2.- Introducción.

El cáncer es una de las enfermedades más comunes en la actualidad. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial, con 9,6 millones de muertes el pasado 2018. Además, se estima que esta cifra se eleve a 23,6 millones para el año 2030.¹

Actualmente, los tres principales tratamientos contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. En cuanto a esta última, la baja selectividad de los fármacos actuales, para las células tumorales frente a las normales, provoca toxicidad y la generación de mecanismos de resistencia por parte de las células. Esto no sólo disminuye la efectividad del fármaco frente a esta enfermedad, sino que debido a que también interaccionan con las células normales del organismo, dan lugar a efectos secundarios muy graves que pueden incluso, causar la muerte del paciente.² Por este motivo las investigaciones más recientes se han dirigido hacia la búsqueda de fármacos que actúen en dianas específicas, que intervengan selectivamente en la función de las vías de señalización celular de las células cancerígenas.

En este trabajo se persigue la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos de la ruta oncogénica JAK-STAT. Se ha observado, en diversos tipos de cáncer, una sobreexpresión de proteínas quinasas que intervienen en esta ruta de señalización, como la proteína JAK2, por lo que resultan dianas muy atractivas³ para permitir el descubrimiento de nuevas moléculas susceptibles de transformarse en fármacos antitumorales.

2.1.- Ruta JAK-STAT

La ruta JAK-STAT es una ruta de señalización intracelular que interviene en procesos celulares como la hematopoyesis, procesos inmunitarios, procesos embriológicos, entre otros.

¹ Organización mundial de la salud, <https://www.who.int/cancer/en/>.

² Chakraborty, S.; Rahman, T. *Ecancer* **2012**, *6*, 1-5.

³ Recio, C.; Guerra, B.; Guerra-Rodríguez, M.; Aranda-Tavío, H.; Martín-Rodríguez, P., de Mirecki-Garrido, M.; Brito-Casillas, Y.; García-Castellano, J.M., Estévez-Braun, A., Fernández-Pérez, L. *Oncogen* **2019**. *38*, 4657-4668.

Esta ruta regula la expresión genética, que está involucrada en la proliferación celular, la diferenciación, la migración celular y la apoptosis.^{4,5}

La señalización comienza cuando las citocinas, interleucinas o los factores de transcripción, hormonas que se encuentran fuera de la célula, se unen a sus respectivos receptores transmembrana. Cada hormona ligando se une a dos moléculas de receptor, lo que provoca un cambio conformacional que hace que estos receptores se aproximen y se unan formando un dímero. Cada uno de los monómeros de receptor tiene asociado una proteína quinasa JAK que al aproximarse en el espacio, debido a la dimerización de los receptores, se fosforilan la una a la otra, lo cual produce un aumento de la capacidad de fosforilación de estas enzimas quinasas, es decir produce su activación. La activación de las proteínas JAK, da lugar a la fosforilación de residuos de tirosina en la región citoplasmática del receptor, creando sitios de unión para otras proteínas denominadas STAT, que se encuentran en estado latente en el citosol de la célula. Entonces las STAT ancladas al receptor son fosforiladas por las enzimas quinasas JAK, provocando su unión a otra proteína STAT y por tanto su dimerización. Estos dímeros denominados pSTAT constituyen los mensajeros que viajan hacia el núcleo celular, penetran la membrana del núcleo y se unen al ADN, activando la transcripción de los genes específicos que regulan la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis de la célula.^{6,7}

⁴ Rawlings, J.S.; Rosler, K.M.; Harrison, D.A. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1281-12

⁵ Luo, N; Balko, J.M. Role of JAK-STAT Pathway in Cancer Signaling. *Predictive Biomarkers in Oncology* [Online]; Badve S., Kumar G. (eds), Springer, Cham: 2019; pp 311-319. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-95228-4_26#citeas

⁶ Jatiani, S.S.; Baker, S.J.; Silverman, L.R.; Reddy, E.P. *Genes & cancer* **2010**, *1* (10), 979–993.

⁷ Villarino, A.V.; Kanno, Y.; Ferdinand, J.R.; O'Shea, J.J.; *J. Immunol.* **2015**, *194*(1), 21–27.

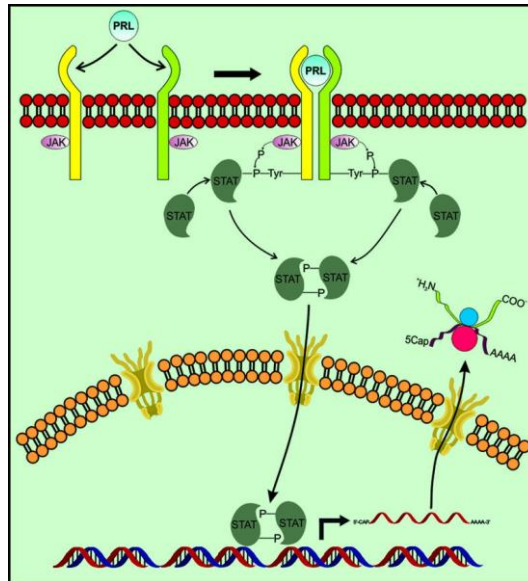


Figura 1. Mecanismo de la ruta JAK-STAT.⁸

Por otro lado, la regulación negativa de una ruta de señalización es el mecanismo que poseen las células para desconectar la cascada de señalización, inhibiendo así la ruta. Es decir, es la manera de regular la amplitud de la señalización y de evitar que esta ruta esté permanentemente activa en el tiempo. La regulación negativa de la ruta JAK-STAT, está mediada por tres mecanismos diferentes que implican proteínas reguladoras. El primero implica a las proteínas tirosina fosfatasa (PTP), las cuales desfosforilan a las proteínas JAK activadas. Otro mecanismo de regulación negativa es el de los supresores de señalización de citoquinas (SOCS), que compiten con las proteínas STAT por el sitio de unión al receptor de citoquinas. El tercer mecanismo, involucra a los inhibidores de las proteínas STAT activadas (PIAS), los cuales inhiben la unión de los dímeros STATs al ADN.⁹

En cuanto a los componentes de esta ruta de señalización, encontramos siete proteínas STAT diferentes en el ser humano: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6, cada una de los cuales contiene siete dominios.⁹ Por otro lado, existen cuatro tipos de proteínas JAK en los seres humanos JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2,¹⁰ todas estas proteínas JAK se caracterizan por poseer cuatro dominios: Un dominio de quinasa (JH1) con actividad típica de quinasa, es decir es el encargado de llevar a cabo la fosforilación del sustrato. Contiguo a

⁸ Aranda-Abreu, G.M.; Coria Ávila, G.A.; Locia-Espinoza, J.; Hernández-Aguilar, M.E.; Manzo-Denes, J.; Rojas-Durán, F.; Soto Cid, A.H., Yerena-Aguilar, C.E. *Neurobiología* [Online], **2013**.

<https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2013/8/Locia/HTML.html>

⁹ Kiu, H.; Nicholson, S.E. *Growth Factors* **2012**, 30(2), 88–106.

¹⁰ Yamaoka, K.; Saharinen, P.; Pesu, P.; et Holt III, V.; Silvennoinen, O.; O'Shea, J.J. *Genome Biol.* **2004**, 5: 253.

JH1 encontramos un dominio de pseudo quinasa (JH2) que es inactivo frente al sustrato, pero que es capaz de llevar a cabo la fosforilación de sus residuos Ser⁵²³ y Tyr⁵⁷⁰, que se ha visto que son sitios de regulación negativa para la actividad catalítica de la enzima, al inhibir la actividad del dominio JH1.¹¹ A continuación, contienen un dominio SH2 y finalmente, en el extremo amino terminal, encontramos el dominio FERM que interviene en la unión de la proteína con el receptor transmembrana.¹⁰

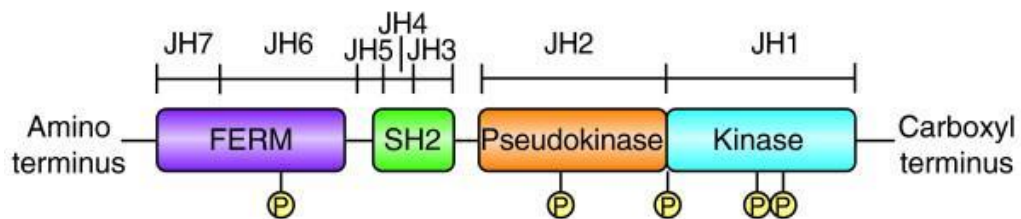


Figura 2. Dominios de las proteínas JAKs.¹⁰

La activación aberrante o persistente de la vía JAK/STAT se ha encontrado en diferentes afecciones inflamatorias, cáncer y enfermedades autoinmunes.^{12,13}

Dentro de la familia JAK, la enzima JAK2 juega un papel importante en el crecimiento celular y la supervivencia.¹² Existen evidencias que sugieren que la señalización aberrante de JAK2 está implicada en tumores sólidos como el cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, etc.¹² Por ejemplo, se ha reportado que la inhibición de la vía JAK2/STAT3 conduce a la apoptosis en las células cancerígenas del cáncer colorrectal.¹⁴ Por lo que no es de extrañar que se haya convertido en los últimos años en una diana para el tratamiento del cáncer.¹²

Además de esto, en el año 2005 cuatro grupos de investigación encontraron casi de manera simultánea una mutación en el dominio de pseudoquinasa (JH2) de la proteína JAK2,

¹¹ Silvennoinen, O.; Ungureanu, D.; Niranjana, Y.; Hammaren, H.; Bandaranayake, R.; Hubbard, S.R.; *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*(4)1002-1007.

¹² Eight, L.T.; Wei-Chun, H.F.; Min-Wu, C.; Tzu-Ying, S.; Chao-Di, C.; Yi-Ying, C.; Jui-Hua, H.; Huang-Ju, T.; Han-Li, H.; Shiow-Lin, P.; Kai-Cheng, H. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*:1379, 1-14.

¹³ Banerjee, S.; Biehl, A.; Gadina, M.; Hasni, S.; Schwartz, D.M. *Drugs* **2017**, *77*, 521-546.

¹⁴ Zhang, X.; Fayong, H.; Geng, L.; Guodong, L.; Yang, X.; Liu, L. Zhang, R.; Zhang, B.; Feng, Y. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*:25, 1-13.

la cual denominaron mutación JAK2 V617F.^{15,16,17,18,19} Esta mutación surge de la sustitución de una valina por una fenilalanina en el codón 617, lo cual interrumpe la actividad inhibitoria de dicho dominio de pseudoquinasa (JH2) sobre el dominio de quinasa (JH1), provocando así una actividad descontrolada e independiente de las citocinas, de la mutante JAK2 V617F.¹⁹

La mutación JAK2V617F se ha asociado con enfermedades como la trombocitosis, mielofibrosis, leucemia y linfoma.¹²

Se ha observado la presencia de dicha mutación JAK2 V617F en la mayoría de los pacientes con cáncer mieloproliferativos (neoplasias mieloproliferativas), concretamente se ha encontrado en aproximadamente el 90% de los pacientes con policitemia vera y cerca del 50% de los pacientes con trombocitosis esencial y mielofibrosis primaria.^{15,20,21,22,23.}

Sin embargo, aunque JAK2 V617F es la mutación más común en estas enfermedades, se han encontrado otras mutaciones de esta enzima dentro del axón 12.²⁴

¹⁵ Baxter, E.J.; Scott, L.M.; Campbell, P.J.; East, C.; Fourouclas, N.; Swanton, S.; Vassiliou, G.S.; Bench, A.J.; Boyd, E.M.; Curtin, N.; Scott, M.A.; Erber, W.N.; Green, A.R. *Lancet* **2005**, *365*, 1054-1061.

¹⁶ James, C.; Ugo, V.; Le Couedic, J.P.; Staerk, J.; Delhommeau, F.; Lacout, C.; Garçon, L.; Raslova, H.; Berger, R.; Bennaceur-Griscelli, A.; Villeval, J.L.; Constantinescu, S.N.; Casadevall, N.; Vainchenker, W. *Nature* **2005**, *434*, 1144-1148.

¹⁷ Kralovics, R.; Passamonti, F.; Buser, A.S.; Teo, S.S.; Tiedt, R.; Passweg, J.R.; Tichelli, A.; Cazzola, M.; Skoda, R.C. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1779-1790.

¹⁸ Levine, R.L.; Wadleigh, M.; Cools, J.; Ebert, B.L.; Wernig, G.; Huntly, B.J.P.; Boggon, T.J.; Wlodarska, I.; Clark, J.J.; Moore, S.; Adelsperger, J.; Koo, S.; Lee, J.C.; Gabriel, S.; Mercher, T.; D'Andrea, A.; Fröhling, S.; Döhner, K.; Gilliland, D.G. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 387-397.

¹⁹ Zhao, R.; Xing, S.; Li, Z.; Fu, X.; Li, Q.; Krantz, S.B.; Zhao, Z.J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22788-22792.

²⁰ Jelinek, J.; Oki, Y.; Gharibyan, V.; Bueso-Ramos, C.; Prchal, J.T.; Verstovsek, S.; Beran, M.; Estey, E.; Kantarjian, H.M.; Issa, J.P. *Blood* **2005**; *106*, 3370-3373.

²¹ Levine, R.L.; Loriaux, M.; Huntly, B.J.P.; Loh, M.L.; Beran, M.; Stoffregen, E.; Berger, R.; Clark, J.J.; Willis, S.G.; Nguyen, K.M.; Flores, N.J.; Estey, E.; Gattermann, N.; Armstrong, S.; Look, A.T.; Griffin, J.D.; Bernard, O.A.; Heinrich, M.C.; Gilliland, D.G.; Druker, B.; Deininger, M.W.N. Levine R.L. et col. *Blood* **2005**, *106*, 3377-3379.

²² Levine, R.L.; Pardanani, A.; Tefferi, A.; Gary Gilliland, D. *Nat. Rev. Cancer.* **2007**, *7*, 673-683.

²³ Scott, L.M.; Scott, M.A.; Campbell, P.J.; Green, A.R. Scott L.M. et col. *Blood* **2006**, *108*, 2435-2437.

²⁴ Verstovsek S. American Society of Hematology. Education Program, **2009**, 636-642.

2.2.- Inhibidores de JAK2.

Como se ha comentado anteriormente, la sobreexpresión de JAK2 en diversos cánceres,¹² la ha convertido en una excelente diana oncogénica. Lo cual unido al descubrimiento de la mutación *JAK2 V617F* y su presencia en las enfermedades mieloproliferativas, ha fomentado la búsqueda de inhibidores de esta quinasa, como posibles fármacos para el tratamiento de estas enfermedades.²⁵

Algunos ejemplos de inhibidores de JAK2 que han conseguido pasar a fase clínica para el tratamiento de las enfermedades mieloproliferativas son los siguientes:

El ruxolitinib (Figura 3), que presenta un valor de IC_{50} de 2,8 nM para JAK2 y de 3,3 nM para JAK1. Fue el primer inhibidor de JAK2 en entrar en fase clínica y de momento el único inhibidor de JAK1 y JAK2, utilizado como fármaco para el tratamiento de estas enfermedades. Este fármaco permite paliar y controlar los efectos hiperproliferativos de estas enfermedades, pero no elimina la enfermedad.²⁵

Otro ejemplo, lo constituye lestaurtinib, que presenta un valor de IC_{50} de 1 nM para JAK2 y que entró en fase clínica 1 y 2 pero fue retirado, debido a los efectos adversos que provocaba, en los que se incluye trombocitopenia (recuento bajo de plaquetas), anemia, diarrea y náuseas.²⁵

El compuesto denominado XL019 es un potente inhibidor de JAK2, muy selectivo, con un valor de IC_{50} de 2 nM. También entró en fase clínica 1, sin embargo, fue retirado debido a su neurotoxicidad.²⁵

Momelotinib es un inhibidor de JAK1 y JAK2, que poseen un valor de IC_{50} de 11 y 18 nM para JAK1 y JAK2 respectivamente. Continúa en la etapa 3 de la fase clínica, para el tratamiento de las enfermedades mieloproliferativas.²⁵

Pacritinib es otro de los inhibidores de JAK2, que continúa en fase clínica para el tratamiento de estas mismas enfermedades y posee un valor de IC_{50} de 23 nM para JAK2, siendo bastante selectivo.²⁵

Fedratinib también es un inhibidor muy selectivo de JAK2 y presenta un valor de IC_{50} de 3 nM para esta enzima. Aunque llegó a la etapa III de la fase clínica para el tratamiento de

²⁵ Luo, N.; Balko, J.M. Role of JAK-STAT Pathway in Cancer Signaling. En *Predictive Biomarkers in Oncology* [Online]. Badve, S.; Kumar, G., Ed. Springer: Cham, 2019; pp 311-319.
https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-95228-4_26#citeas

las enfermedades mieloproliferativas, también fue retirado ya que provocaba trombocitopenia, elevación de las transaminasas, anemia, entre otros efectos secundarios.²⁵

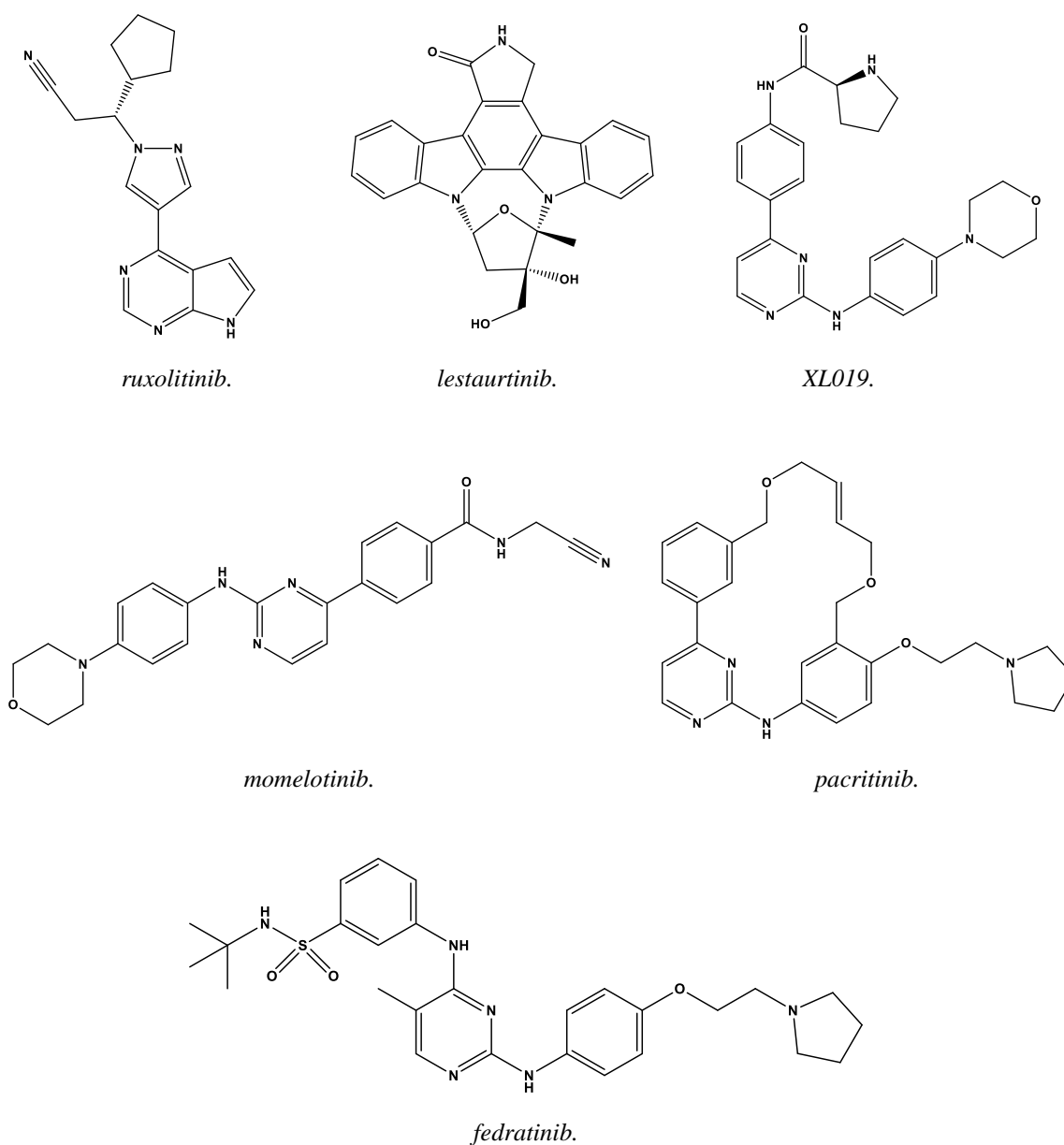


Figura 3. Estructura de algunos inhibidores de JAK2 que han entrado en fase clínica.²⁵

Todos los inhibidores de JAK2 que han conseguido pasar a fase clínica hasta el momento, son competitivos del ATP. Sin embargo, el bolsillo de unión del ATP en la enzima, se encuentra en el dominio de quinasa JH1 y no en el de pseudoquinasa, que es en el que se encuentra la mutación *JAK2* V617F. Esto hace que los actuales inhibidores de JAK2 no sean específicos para la *JAK2* mutante, sino que también inhiban la actividad de la *JAK2* normal. Además, debido a la estructura similar del sitio de unión de ATP en las enzimas de la familia

JAK, en algunos casos también inhiben la actividad de otras JAK, como hemos visto en algunos ejemplos anteriores. Todo ello tiene consecuencias negativas en la hematopoyesis normal, dando lugar a efectos secundarios como trombocitopenia.^{26,27}

Estudios de modelización molecular, de diferentes inhibidores conocidos en el bolsillo de unión al ATP de la enzima,¹² han determinado algunas interacciones comunes para la mayoría de estos inhibidores y la enzima, y por tanto claves desde el punto de vista farmacológico. Estas interacciones se dieron con una frecuencia de más del 50% e incluyen 4 interacciones hidrofóbicas con los residuos Leu983, Ala880, Val863, Leu855 del bolsillo¹² y dos enlaces de hidrógeno. La gran mayoría de inhibidores forman enlaces de hidrógeno con el residuo Leu932 de la región bisagra de la enzima, mientras que otra buena parte lo forman con el residuo Asp994. Por otro lado, aunque no supera el 50% y por tanto no debe ser considerado una interacción característica, muchos inhibidores también forman enlaces de hidrogeno con el residuo de Glu930. Por otro lado, cabe destacar que cuando el ATP se une al sitio de unión en la enzima, no forma enlaces de hidrógeno con la Asp994, como en el caso de la mayoría de inhibidores de JAK2, sino que forma un enlace de hidrógeno con la Lys882.¹²

2.3.- Quinonas y la ruta JAK-STAT.

El núcleo quinónico es considerado una estructura privilegiada, ya que está presente en multitud de productos naturales tanto de origen animal como vegetal que presentan una gran variedad de actividades biológicas, por ejemplo como anticancerígenos²⁸, antibacterianos,²⁹ y antifúngicos.³⁰

El grupo de investigación Quibionat³¹ en los últimos años, ha encontrado diversos compuestos quinónicos, capaces de modular la actividad de la ruta JAK-STAT. Entre ellos cabe

²⁶ Hernández Boluda, J.C.; Gómez, M.; Pérez, A. *Medicina Clínica (English Edition)* **2016**, *147* (2), 70-75.

²⁷ Verstovsek S. *Am. Soc. Hematol. Educ.* **2009**, 636–642. doi: 10.1182 / asheducation-2009.1.636.

²⁸ Jiménez-Alonso, S.; Chávez, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Pérez-Sacau, E.; Machín, F. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6761-6772.

²⁹ Haraguchi, H.; Yokohama, K.; Oike, S.; Ito, M.; Nozaki, H. *Arch. Microbiol.* **1997**, *167*, 6-10.

³⁰ Perez-Sacau, E.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Yapu, D. G.; Turba, A. G. *Chem. Biodiversity.* **2005**, *2*, 264-274.

³¹ Grupo de investigación Quibionat. <https://www.ull.es/grupoinvestigacion/quibionat/>

destacar la familia de compuestos quinónico fusionados a heterociclos, cuya estructura general podemos visualizar en la Figura 4.³²

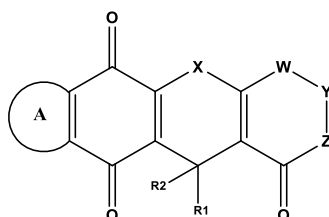


Figura 4. Estructura general de compuestos quinónicos fusionados a heterociclos inhibidores de la ruta JAK-STAT.³²

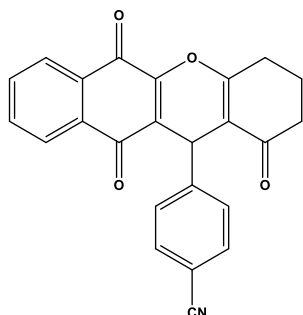
Un ejemplo, es la naftoquinona 4-(1,6,11-trioxo-2,3,4,6,11,12-hexahidro-1H-benzo[b]xanteno-12-il) benzonitrilo (CM363)³³ que ha demostrado ser un inhibidor de la ruta BCR-ABL1-JAK2-STAT5 en las células de leucemia mielógena crónica (K562), provocando así su apoptosis.

Otro tipo de compuesto quinónico encontrado, activo frente a esta ruta de señalización, es el híbrido de naftoquinona-cumarina 7-(3,4-dimetoxifenil)-6 H,7 H-benzo [h] cromeno [4,3- b] cromeno-6,8,9-triona (NPQ-C6).³⁴ El cual también actúa inhibiendo las rutas BCR-ABL1/ STAT5 y JAK2-STAT5 en dichas células de leucemia, de nuevo este compuesto provoca el bloqueo del ciclo celular de las células cancerígenas e induce así su apoptosis.³³

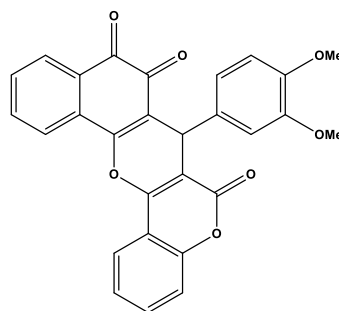
³² McNaughton-Smith, G.; Estévez-Braun, A.; Jiménez-Alonso, S.; Gutiérrez-Ravelo, A.D.; Fernández-Pérez, L.; Díaz-Chico, B.N. Fused quinonic compounds. US20150175585A1.

³³ Guerra, B.; Martín-Rodríguez, P.; Díaz-Chico, J.C.; McNaughton-Smith, G.; Jiménez-Alonso, S.; Hueso-Falcón, I.; Montero, J.C.; Blanco, R.; León, J.; Rodríguez-González, G.; Estévez-Braun, A.; Pandiella, A.; Díaz-Chico, B.N.; Fernández-Pérez, L. *Oncotarget* **2017**, *8*, 29679-29698.

³⁴ Martín-Rodríguez, P.; Guerra, B.; Hueso-Falcón, I.; Aranda-Tavío, H.; Díaz-Chico, J.C.; Quintana, J. Estévez Regidor, F.; Diaz Chico, B.; Amesty, A.; Estévez-Braun, A.; Fernández-Pérez, L. *Frontiers in Pharmacology* **2019**, *9*, 1-17.



4-(1,6,11-trioxo-2,3,4,6,11,12-hexahidro-1H-benzo[b]xanteno-12-il) benzonitrilo (CM363)



7-(3,4-dimetoxifenil)-6H,7H benzo[h] cromeno [4,3-b] cromeno-6,8,9-triona (NPQ-C6)

Figura 5. Estructuras de inhibidores quinónicos de la ruta JAK-STAT.^{32,33}

Los estudios de modelización molecular realizados con NPQ-C6, sugieren que su papel en la modulación de la ruta, podría estar provocada por la inhibición de las proteínas BCR-ABL1 y JAK2. En el caso de JAK2, se observó la posible formación de un enlace de hidrógeno entre el carbonilo de la naftoquinona y el residuo Leu932 del bolsillo de la enzima, entre otras interacciones (Figura 6).³³

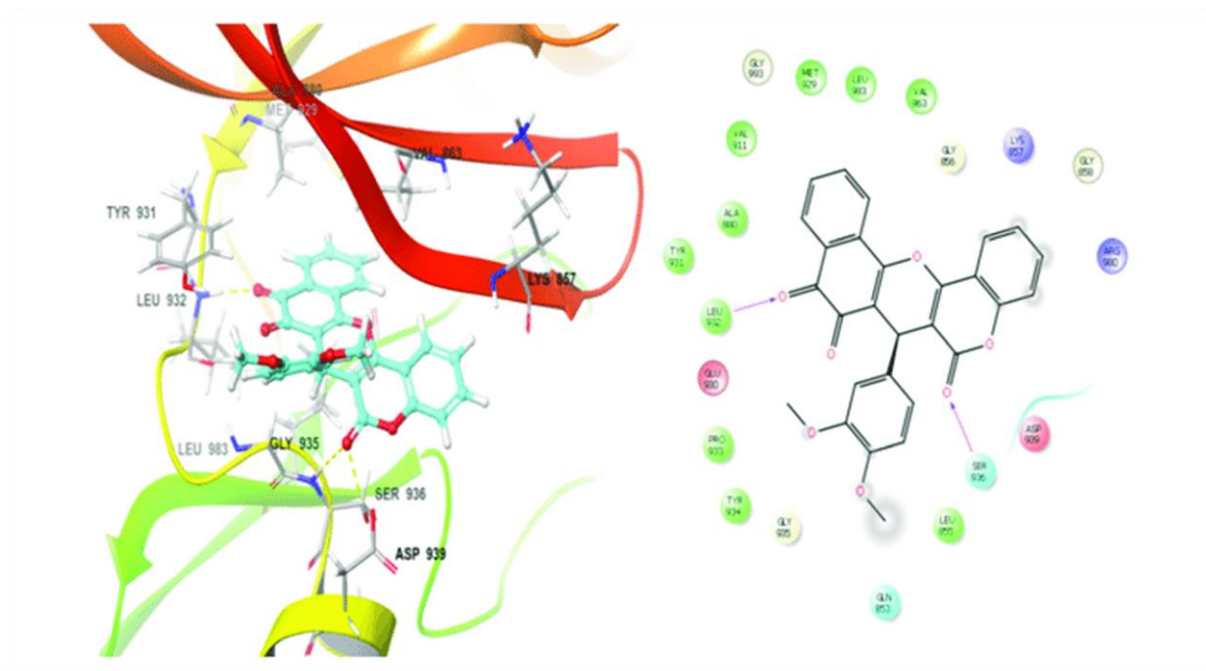


Figura 6. Docking del compuesto NPQ-C6 en el sitio activo de JAK2.³³

En base a estos antecedentes, nos hemos propuesto la preparación de dos nuevas familias de quinonas heterocíclicas, las cuales se ilustran en la Figura 7 y que en estudios de modelización molecular tipo Docking previos, han mostrado buenas interacciones en el bolsillo de la quinasa JAK2.

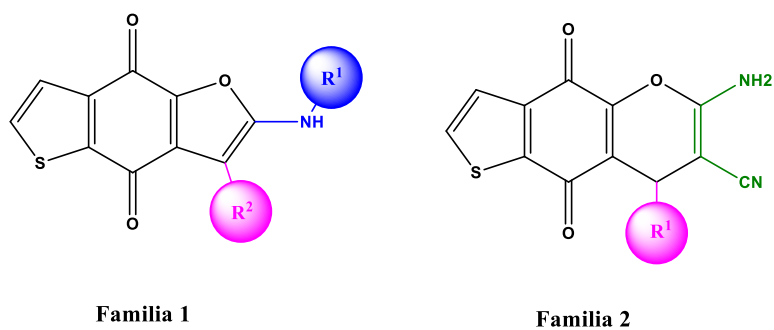
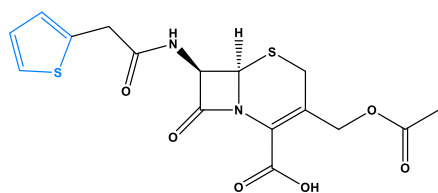


Figura 7. Esqueletos de las familias a sintetizar en este trabajo.

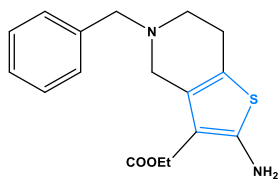
3.- Objetivo y alcance del trabajo:

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

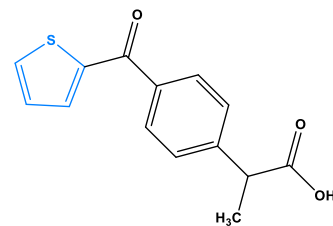
1. Preparación de dos familias de compuestos quinónicos como potenciales inhibidores de la diana oncogénica JAK-2, haciendo uso de reacciones multicomponentes.
2. Síntesis de compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona mediante la reacción multicomponente de la quinona heterocíclica 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona con diferentes isonitrilos y aldehídos.
3. Síntesis de compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo a partir de la reacción multicomponente entre la quinona heterocíclica 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona, malonitrilo y diferentes aldehídos.
4. Purificación y caracterización de todos los compuestos sintetizados.
5. Estudio de modelado molecular tipo Docking, con el fin de predecir las posibles interacciones de los compuestos sintetizado con el bolsillo activo de la enzima JAK2.
6. Determinación de algunas propiedades físico-químicas de los derivados sintetizados, con el objetivo de analizar su potencial como posibles fármacos (“druggability”).



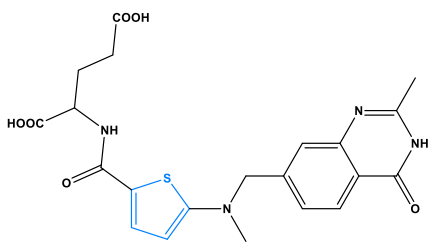
cefalotina ® (antibiótico)³⁵



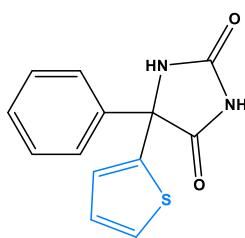
tinoridine ® (antiinflamatorio)³⁶



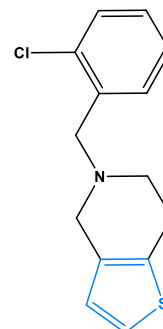
suprofen (antiinflamatorio)³⁶



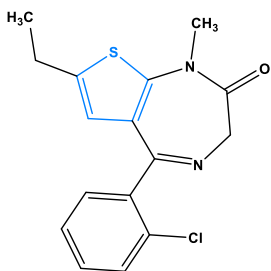
raltitrexed ® (anticancerígeno)³⁷



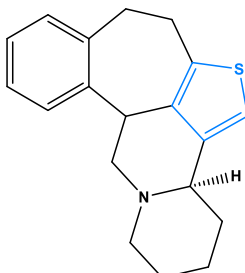
5-fenil-5-(tiofeno-2-il)imidazolidina-2,4-diona (anticonvulsante)³⁶



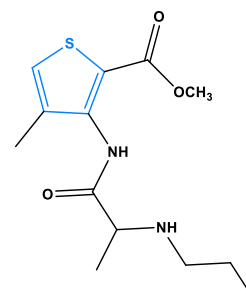
ticlopidine ® (anticoagulante)³⁶



diazepam ® (ansiolítico)³⁶



tiofeno isómero de taclamina (antipsicótico)³⁸



articaína (anestésico local)³⁹

Figura 8. Fármacos con un anillo de tiofeno en su estructura y actividad de los mismos.

Las dos familias de quinonas se prepararán a partir de reacciones multicomponentes, que son aquellas reacciones donde tres o más reactivos generan un producto final a través de un único mecanismo de reacción, incorporando en su estructura la mayoría de los átomos de cada uno de los reactivos de partida.⁴⁰

⁴⁰ Biggs-Houck, J.E.; Younai, A.; Shaw, J.T. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 371-382.



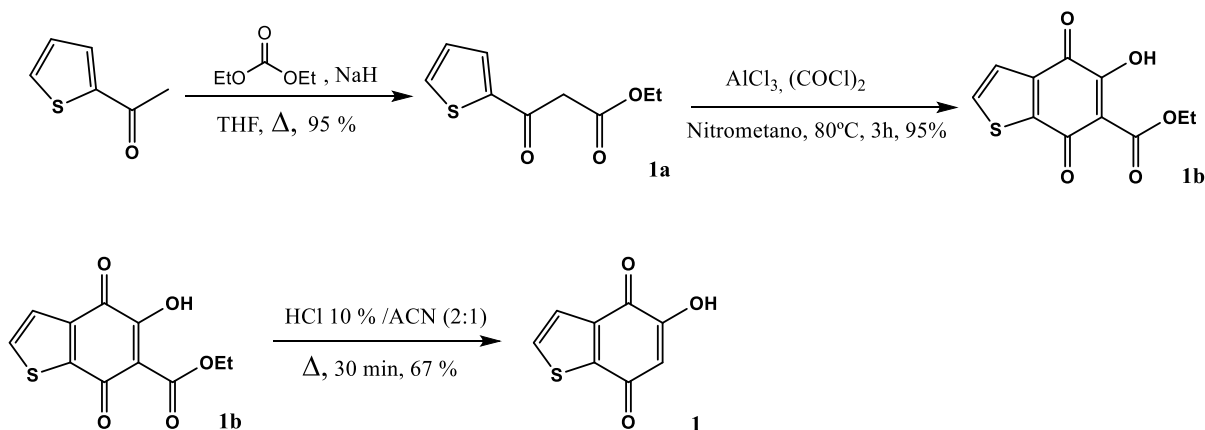
Esquema 2. Reacción multicomponente.

Este tipo de reacciones presentan varias ventajas frente a la síntesis convencional, la primera es que, dado que las reacciones multicomponente implican una sola etapa de reacción, en general dan lugar a rendimientos globales mayores. Por otro lado, son procesos “one-pot” (en un solo recipiente) evitando la separación y purificación de intermedios de reacción, con el consiguiente ahorro de tiempo, recursos y mejora de los rendimientos.⁴⁰

Dado el carácter modular de las reacciones multicomponentes, se puede acceder a un buen número de compuestos con diversidad estructural.⁴⁰

4.1.- Síntesis de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona:

La síntesis de la quinona heterocíclica de partida (**1**) en la reacción multicomponente, se llevó a cabo en 3 etapas de reacción, partiendo de la cetona comercial 1-(tiofen-2-il) etan-1-ona y dietil carbonato, según se ilustra en el Esquema 3.

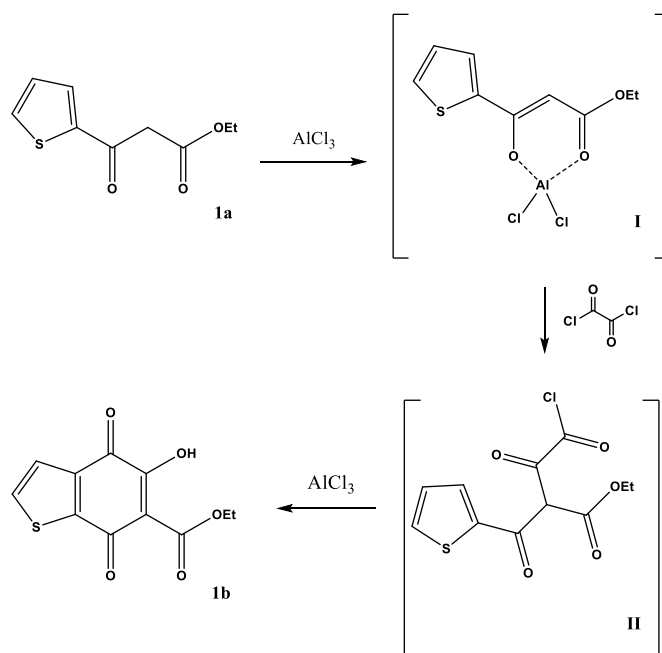


Esquema 3. Síntesis de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona (**1**).

Así el β-ceto éster, 3-oxo-3(tiofen-2-il)propanoato de etilo (**1a**) se sintetizó a partir de una condensación tipo Claisen entre la cetona de partida y dietilcarbonato, utilizándose NaH como base para formar el enolato de la 1-(2-tienil) etanona y THF como disolvente, siguiendo

el procedimiento experimental descrito por Park y colaboradores,⁴¹ obteniéndose el producto **1a** como un líquido aceitoso de color marrón, con un rendimiento del 95 %.

El compuesto 5-hidroxi-4,7-dioxo-benzotiofeno-6-carboxilato de etilo (**1b**), se obtuvo a partir del β -cetoéster anterior como un sólido amorfo de color amarillo anaranjado con un rendimiento del 95%, siguiendo la metodología descrita por Sartori y colaboradores.⁴² Dicha metodología consiste en la condensación del β -cetoéster y cloruro de oxalilo en presencia de AlCl_3 , seguida de una acilación de Friedel-Crafts. El AlCl_3 actúa como ácido de Lewis, produciendo la enolización del β -ceto éster y dando lugar al intermedio (**I**). A continuación, se produce la condensación entre este intermedio y el cloruro de oxalilo, generando el intermedio (**II**). Finalmente, se produce una acilación de Friedel-Crafts intramolecular, que da lugar a la formación del producto de reacción **1b**.⁴¹



Esquema 4. Reacción de formación del compuesto **1b**.

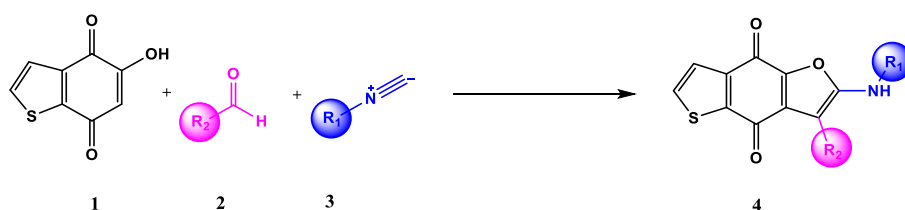
La hidrólisis y descarboxilación del éster anterior da lugar a la formación de la quinona heterocíclica, 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona (**1**). En este caso las condiciones experimentales utilizadas fueron una variación de la metodología descrita por Sartori y col.⁴² La hidrólisis se llevó a cabo en una mezcla 2:1 de ácido clorhídrico al 10% y acetonitrilo, a reflujo, durante 30 minutos, dando lugar al producto **1** con un rendimiento del 67 %.

⁴¹ Loy, N.S.Y.; Choi, S.; Kima, S.; Park, C. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 7336-7339.

⁴² Bigi, F.; Canali, G.; Casnati, G.; Maggi, R.; Sartori, G; Tao, X. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 840-843.

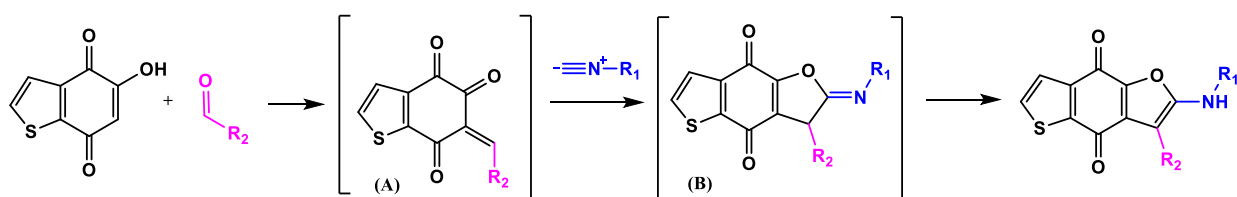
4.2.- Síntesis de compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona:

La síntesis de los compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-dionas, se llevó a cabo por medio de una reacción multicomponente, utilizando como reactivos de partida la quinona heterocíclica, 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona (**1**), diferentes aldehídos e isonitrilos, mediante una variación de la metodología descrita previamente en el grupo de investigación.⁴³



Esquema 5. Síntesis de los derivados 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-dionas.

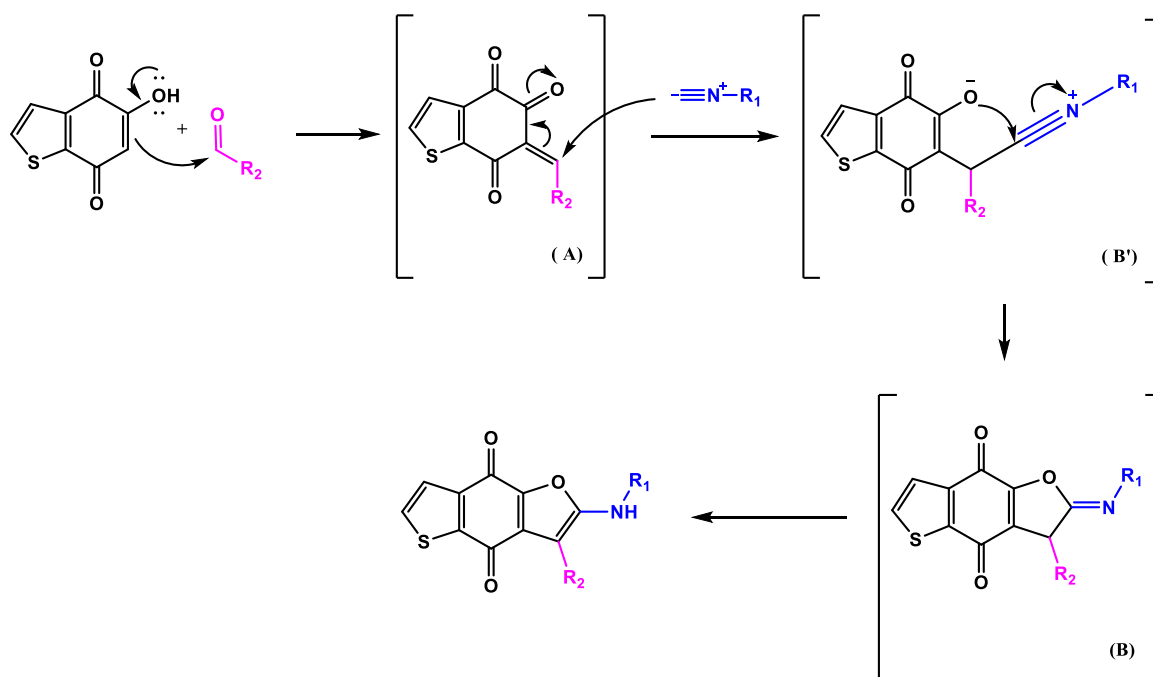
Un mecanismo de reacción plausible para la formación de estos derivados quinónicos, implica la formación inicial de un intermedio α - β insaturado (**A**) a través de una condensación de Knoevenagel entre la 5-hidroxibenzotiofeno-4,7-diona y el aldehído. Un siguiente paso de este mecanismo, podría suponer una reacción de cicloadición [4 + 1], entre el heterodieno deficiente en electrones formado en el intermedio (**A**) y el isonitrilo, dando lugar un intermedio tipo iminolactona (**B**), cuya isomerización da lugar a los derivados quinónicos deseados (Esquema 6).⁴³



Esquema 6. Posible mecanismo de la reacción basado en una cicloadición [4+1].

Otro posible mecanismo de reacción podría suponer una adición de Michael del isonitrilo al intermedio α - β insaturado (**A**), dando lugar al intermedio (**B'**), que posteriormente sufre una ciclación intramolecular, formando así el mismo intermedio (**B**) que en la propuesta anterior, que finalmente tautomeriza, dando lugar al producto de reacción (Esquema 7).

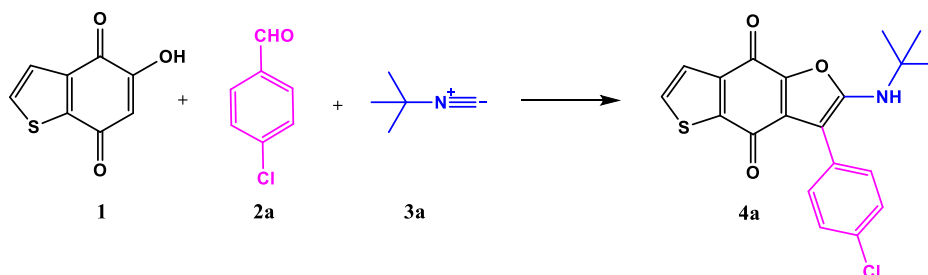
⁴³ Jiménez-Alonso, S.; Guasch, J.; Estévez-Braun, A.; Ratera, I.; Veciana, J.; Ravelo A.G. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1634-1643.



Esquema 7. Otro posible mecanismo de la reacción multicomponente basado en una adición de Michael.

Para la optimización de las condiciones de reacción tomamos como modelo la reacción entre la 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona (**1**), el 4-clorobenzaldehído (**2a**) y el *t*-butil isonitrilo (**3a**). Se evaluaron diferentes disolventes, catalizadores tanto ácidos y bases de Brønsted (Et_3N , piperidina, DBU, EDDA y *p*TSA) así como ácidos de Lewis (InCl_3) y temperaturas de reacción.

Tabla 1. Optimización de las condiciones de reacción.



Entrada	Catalizador (10 %)	Condiciones de reacción	Rto. (%)
1	EDDA	DCE, MW120 °C, 15 min	28
2	EDDA	DCM, MW 120 °C, 15 min	54
3	EDDA	ACN, MW 120 °C, 15 min	58
4	EDDA	C_7H_8 , MW 120 °C, 15 min	63
5	EDDA	H_2O , MW 120 °C, 15 min	62
6	EDDA	EtOH , MW 120 °C, 15 min	77
7	EDDA	EtOH , MW 150 °C, 5 min	42
8	EDDA	EtOH , MW 100 °C, 30 min	75
9	Et_3N	EtOH MW 120 °C, 15 min	11

10	DBU	EtOH, MW 120°C, 15min	31
11	Piperidina	EtOH, MW 120°C, 15min	39
12	pTSA	EtOH, MW 120 °C, 15 min	26
13	InCl ₃	EtOH, MW 120°C, 30 min	19

Inicialmente se evaluó el efecto del disolvente sobre la reacción. Entre los disolventes polares apróticos que se probaron, fue con el acetonitrilo ACN (58 %) con el que se obtuvo un mejor resultado (entrada 3), seguido del DCM con un 54 % de rendimiento (entrada 2) y por último el DCE (39 %) (entrada 1). En cuanto a los disolventes apolares, se probó llevar a cabo la reacción en tolueno, consiguiendo un mayor rendimiento que en los casos anteriores (63 %) (entrada 4). Mejores resultados se obtuvieron cuando se emplearon disolventes polares próticos, como el EtOH (77 %) (entrada 6), que fue el que dio lugar a un rendimiento más alto, mientras que en agua se obtuvo un menor rendimiento (62 %) (entrada 5).

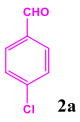
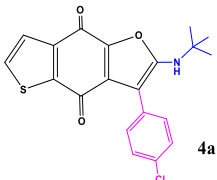
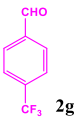
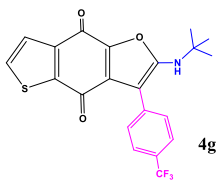
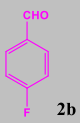
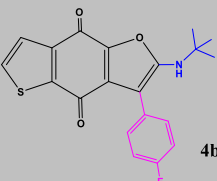
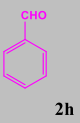
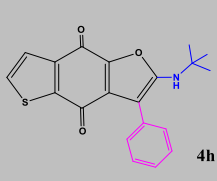
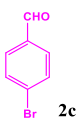
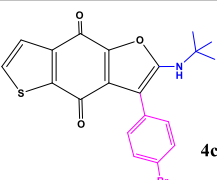
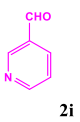
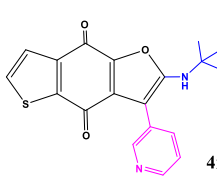
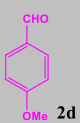
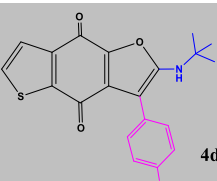
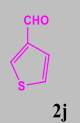
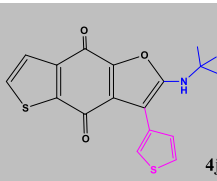
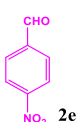
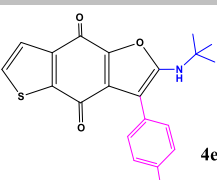
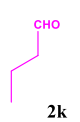
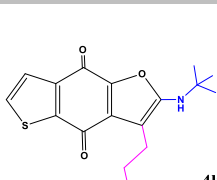
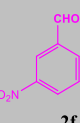
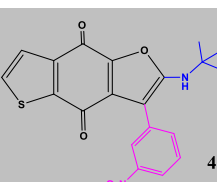
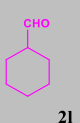
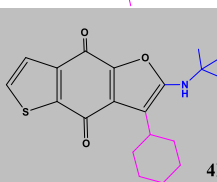
Seleccionado el disolvente, se probó a llevar a cabo la reacción a diferentes temperaturas. Al aumentar la temperatura a 150 °C la reacción se completó en tan sólo en 5 minutos, sin embargo el rendimiento cayó a un 42 % (entrada 7). Por otro lado, disminuir la temperatura a 100 °C, no implicó una gran pérdida del rendimiento (75 %) (entrada 8), pero la reacción tardó el doble de tiempo en completarse (30 minutos).

Finalmente se estudió el efecto del catalizador, añadiéndose en todos los casos un 10% del mismo. Se probaron diferentes catalizadores básicos como trietilamina (Et₃N), 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU) y piperidina, dando lugar a bajos rendimientos (Tabla 1, entradas 9-11) siendo la piperidina la que mejores resultados proporcionó (39 %). Entre los catalizadores ácidos que se probaron se utilizó un ácido de Brønsted, el ácido para toluensulfónico (pTSA) con el que se obtuvo un bajo rendimiento (26 %) (entrada 12), un ácido de Lewis, el InCl₃ (19 %) (entrada 13), con el que la reacción tardó 30 minutos en completarse y se obtuvo otro producto mayoritario. El uso de EDDA, catalizador bifuncional, que puede actuar como ácido o como base, mejoró notablemente el rendimiento, de entre todos los catalizadores probados fue el único que dió un rendimiento alto, siendo éste de un 77 %. Con todo ello, se concluyó que las mejores condiciones de reacción eran calentamiento por irradiación de microondas a 150°C durante 15 minutos, usando EtOH como disolvente y EDDA como catalizador (10 % mol).

Las condiciones anteriormente descritas fueron utilizadas para evaluar el alcance de la reacción con respecto al aldehído. Se utilizaron distintos aldehídos aromáticos sustituidos con grupos electrón-atradores y electrón-donadores, heteroaromáticos y alifáticos. Todos los

productos se obtuvieron con rendimientos entre moderados y buenos, por lo que las condiciones de reacción resultaron bastante robustas con respecto a la naturaleza del aldehído utilizado en la condensación de Knoevenagel.

Tabla 2. Estructura y rendimiento de los derivados quinónicos obtenidos utilizando diferentes aldehídos y *t*-butilisonitrilo.

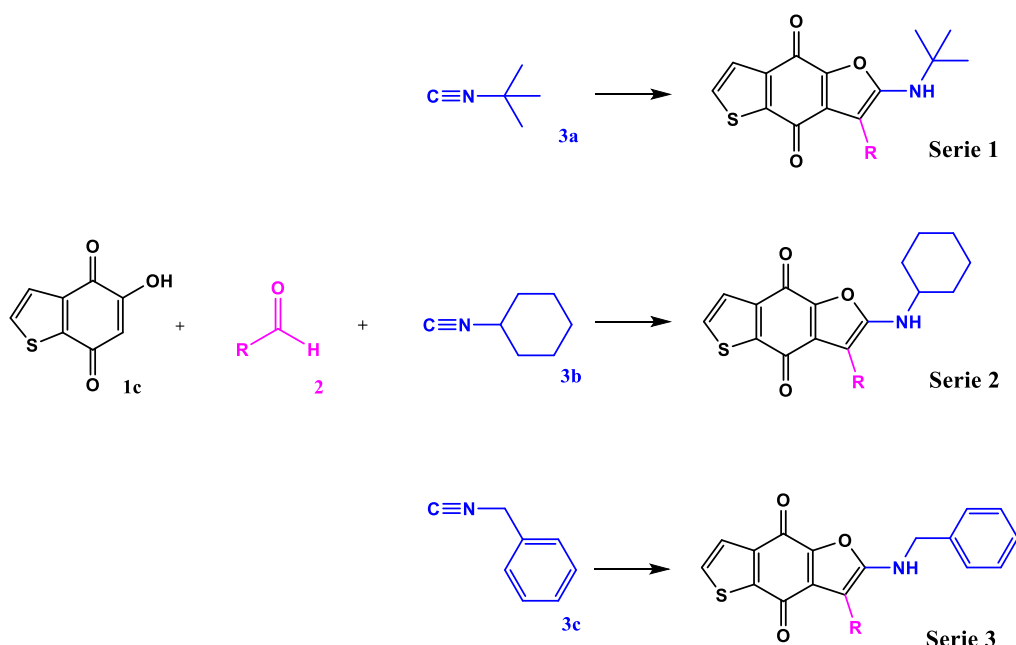
<i>SERIE 1</i>							
<i>Entrada</i>	<i>Aldehído</i>	<i>Producto</i>	<i>Rto. (%)</i>	<i>Entrada</i>	<i>Aldehído</i>	<i>Producto</i>	<i>Rto. (%)</i>
1			77	7			70
2			67	8			63
3			55	9			82
4			66	10			67
5			62	11			58
6			47	12			82

El cambio del 4-clorobenzaldehído, por aldehídos aromáticos sustituidos por otros halógenos, como el 4-Ph-F y el 4-Ph-Br, condujo a una pérdida en el rendimiento de la reacción con respecto al primero, siendo con el 4-bromobenzaldehído con un 55 % con el que peores resultados se obtuvieron.

Por otro lado, aldehídos aromáticos sustituidos con grupos tanto electro-donadores (4-Ph-OMe) como electro-atractores (4-Ph-NO₂, 3-Ph-NO₂ y 4-Ph-CF₃) dieron lugar a la formación de los productos con rendimientos entre un 47% para el 3-nitrobenzaldehído a un 77% para el 4-clorobenzaldehído. La no sustitución del anillo de benzaldehído, dio lugar a un rendimiento moderado del 63%. Uno de los mejores rendimientos obtenidos fue utilizando aldehídos heteroaromáticos como el 3-piridincarboxaldehído, con el que se obtuvo el producto **4i** con un rendimiento del 82%. Sin embargo, otros aldehídos heteroaromáticos, como el 3-tiofenocarboxaldehído dio lugar a un rendimiento no tan bueno del 67%.

El uso de aldehídos alifáticos como el butanal y ciclohexilcarboxaldehídos, nos lleva también a la formación de los correspondientes productos con rendimientos que van desde moderados con un 58 %, en el caso del butanal, a muy buenos, como es el caso del ciclohexilcarboxaldehído, con el que se consigue el producto **4l** con un rendimiento del 82 %.

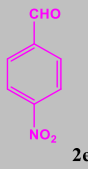
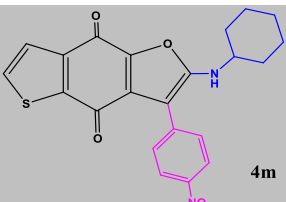
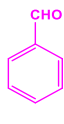
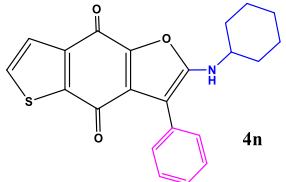
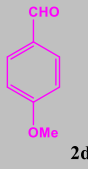
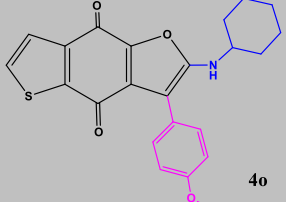

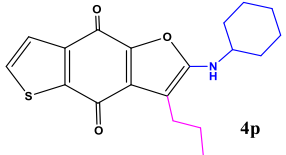
Con el objetivo de introducir diversidad estructural en la preparación de los derivados 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-dionas, se utilizaron otros isonitrilos como el ciclohexil (**3b**) y bencilisonitrilo (**3c**). La reacción con cada uno de ellos constituye una serie diferente (Esquema 8). Así, la **serie 1** la forman aquellos productos de reacción entre la quinona heterocíclica, el *t*-butil isonitrilo y los diferentes aldehídos utilizados, dando lugar a una serie de 12 compuestos.



Esquema 8. Clasificación de los productos de reacción en función del isonitrilo de partida (series).

Por otro lado, el uso del ciclohexilisonitrilo da lugar a la **serie 2** mientras que el bencilisonitrilo a la **serie 3**, constituidas cada una de ellas por 4 productos.

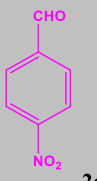
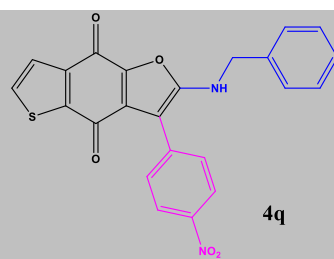
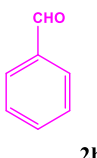
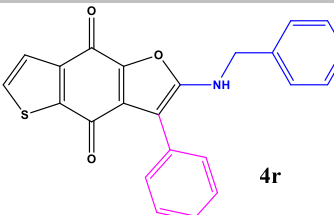
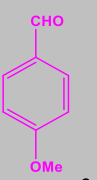
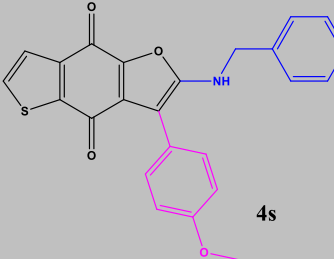
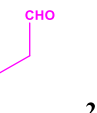
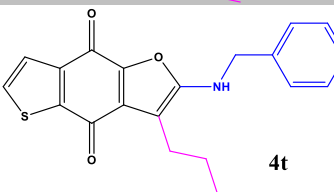
Tabla 3. Estructura y rendimiento de reacción de los productos de la serie 2

<i>SERIE 2</i>			
<i>Entrada</i>	<i>Aldehído</i>	<i>Producto</i>	<i>Rto. (%)</i>
1	 2e	 4m	64
2	 2h	 4n	73
3	 2d	 4o	58
4	 2k	 4p	70

Tanto en la serie 2 como en la 3, se utilizaron únicamente cuatro aldehídos. Tres de ellos aromáticos: el benzaldehído, el 4-nitrobenzaldehído (con un grupo electrón-atrayente) y el 4-metoxibenzaldehído (con un grupo electrón-dador), y un aldehído alifático, el butiraldehído.

Para la serie 2, se obtuvieron rendimientos de moderados a altos. En general son mayores que para los compuestos obtenidos en la serie 1. El mejor rendimiento de esta serie se obtuvo a partir del aldehído alifático para el compuesto **4n** (73%), mientras que a partir del benzaldehído se obtuvo el producto **4p** con un rendimiento del 58%, que constituye el más bajo de la serie.

Tabla 4. Estructura y rendimiento de reacción de los productos de la serie 3.

SERIE 3			
Entrada	Aldehído	Producto	Rto. (%)
1	 2e	 4q	48
2	 2h	 4r	80
3	 2d	 4s	61
3	 2k	 4t	72

El uso del bencilsonitrilo en la reacción (serie 3), también da lugar a los derivados quinónicos deseados con buenos y moderados rendimientos. El más alto de todos se obtuvo para el compuesto **4r** (80 %) cuando se empleó benzaldehído, el compuesto **4t** también se obtuvo con un buen rendimiento (72 %). El compuesto **4q** (48 %) por el contrario es el que se alcanza el rendimiento más bajo cuando se emplea el 4-NO₂-Ph-CHO.

Los derivados 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona fueron aislados como sólidos amorfos coloreados, mayoritariamente azules, verde oscuro y violeta. Sin embargo, algunos de los productos como el **4c** pudo ser cristalizado en DCM.

Todos los compuestos fueron caracterizados por ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas de baja y alta resolución. Además, se confirmó la estructura del compuesto **4c** por difracción de rayos-x.

A continuación, a modo de ejemplo se presenta una interpretación de los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y DEPT 135 obtenidos para el compuesto **4c**. Así como la confirmación de la estructura de la molécula por rayos-x.

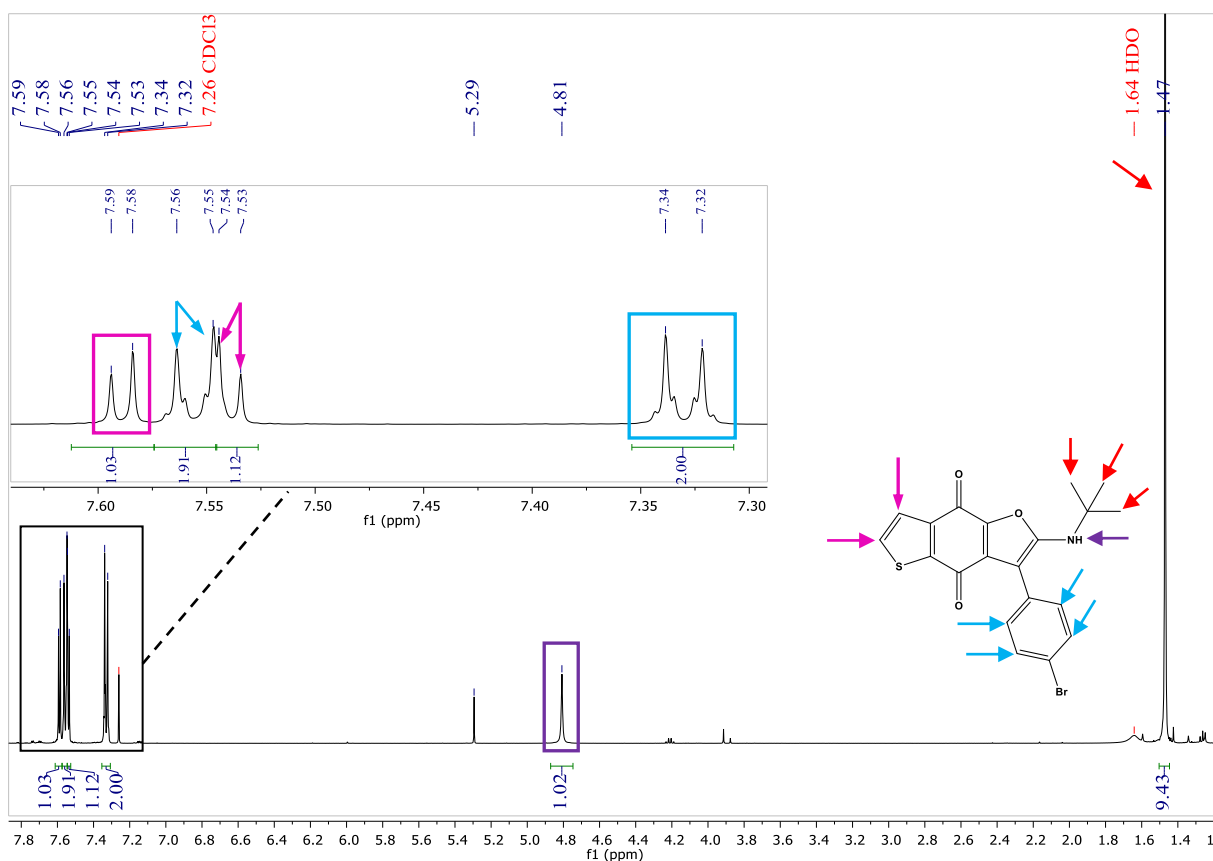


Figura 9. Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4c**

En el espectro de ^1H -RMN podemos observar que a desplazamientos químicos (δ) entre 7,32 y 7,59 ppm aparecen las señales de los protones enlazados a los carbonos CH aromáticos. Si ampliamos esa zona, se puede ver que a δ 7,59 ppm existe un doblete que integra para un protón y que está acoplado a otra señal observada a δ 7,54 ppm, con una constante de acoplamiento de $J=5,0$ Hz. Estas dos señales, pertenecen a los protones del anillo de tiofeno de la molécula **4c**.

Por otro lado, en la misma zona, a campo bajo, se observan otras dos señales dobletes a desplazamientos químicos de δ 7,56 y 7,33 ppm respectivamente, con una constante de $J=8,5$ Hz. Estas señales que integran para dos protones cada una, pertenecen a los protones del 4-bromofenilo, que son equivalentes dos a dos. En la zona opuesta del espectro, a campo alto, se observa una señal singlete a δ 1,47 ppm que integra para 9 protones. Esta señal es producida por los protones de grupo *t*-butilo, ya que son equivalentes. El protón del grupo amino, se observa a un desplazamiento químico de δ 4,81 ppm y se presenta como un singlete ancho, característica típica de estos protones.

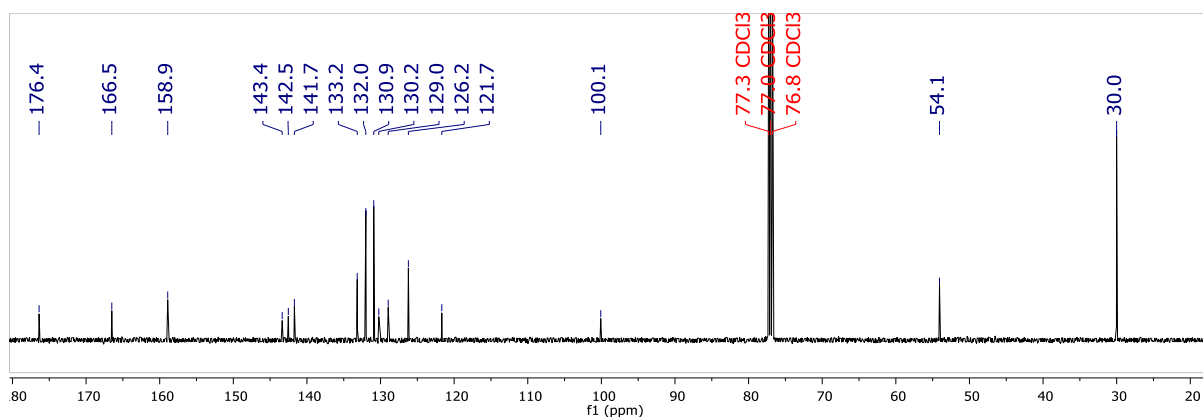


Figura 10. Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto **4c**.

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observan 12 señales de carbonos aromáticos, entre δ 100-160 ppm, mientras que a δ 166,5 y δ 176,4 ppm se observan las señales de los carbonilos de la quinona. Las 12 señales que se observan en la zona de carbonos aromáticos, concuerdan perfectamente con la estructura prevista de la molécula, ya que existen dos pares de carbonos equivalentes (los del agrupamiento 4-bromofenilo), cuyas señales aparecen en el espectro como un solo pico de mayor intensidad con respecto a otros picos CH de la molécula.

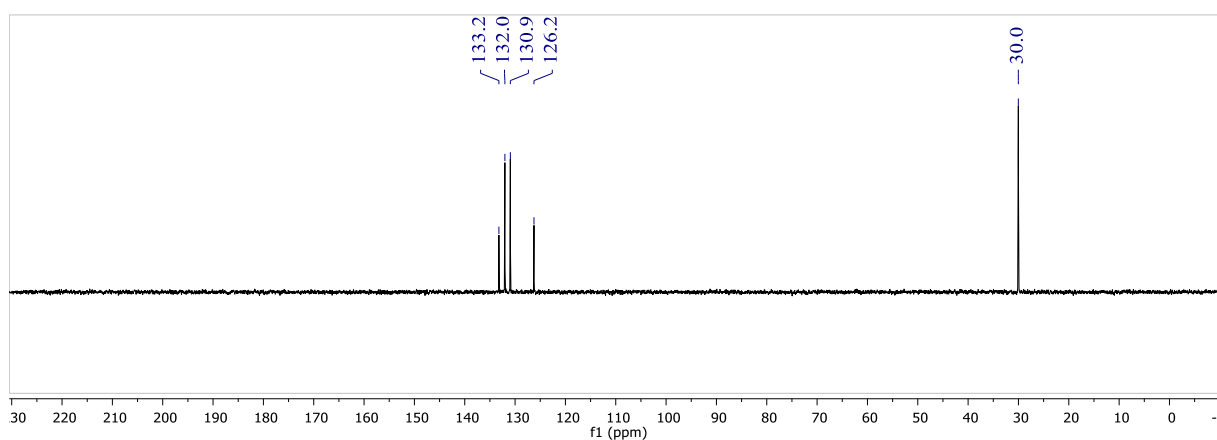


Figura 11. DEPT 135 del compuesto **4c**

Con ayuda del DEPT 135, hemos podido identificar que picos del espectro, pertenecen a estos carbonos CH del anillo aromático, y que otras dos señales pertenecen a los carbonos CH del anillo de tiofeno. Los primeros, aparecen a δ 130,9 y δ 132,0 ppm, mientras que los segundos aparecen a δ 126,2 y 133,2 ppm, probablemente el carbono CH con mayor desplazamiento químico sea el que se encuentra más cerca del átomo de azufre en la molécula. Finalmente, observamos una señal, a un desplazamiento químico típico de carbonos unidos a heteroátomo (δ 54,1 ppm), que corresponde al carbono cuaternario del *t*-butilo. A δ 30,0 ppm se encuentra la señal de los tres carbonos CH_3 equivalentes de este grupo.

La estructura de la molécula **4c** fue confirmada por difracción de rayos-x. Donde se pudo concluir que la molécula presenta mayoritariamente una estructura tridimensional plana, formada por los tres anillos aromático, de tiofeno, benzoquinona y furano, unidos entre sí. El anillo de benzofurano formado por estos dos últimos núcleos, se encuentra sustituido en la posición 2 por el grupo *t*-butilamino, proveniente del isocianuro, y en la posición 3 por el 4-bromofenil del aldehído. Este último grupo, se encuentra girado respecto al plano que forma la molécula, un ángulo de 41,71° y se dispone hacia al lado contrario que el grupo amino (Figura 12).

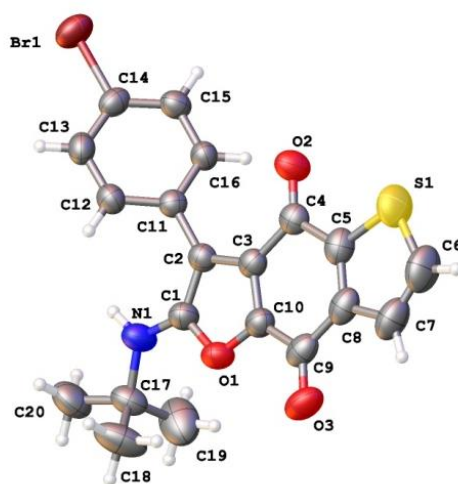


Figura 12. Estructura tridimensional del compuesto **4c**

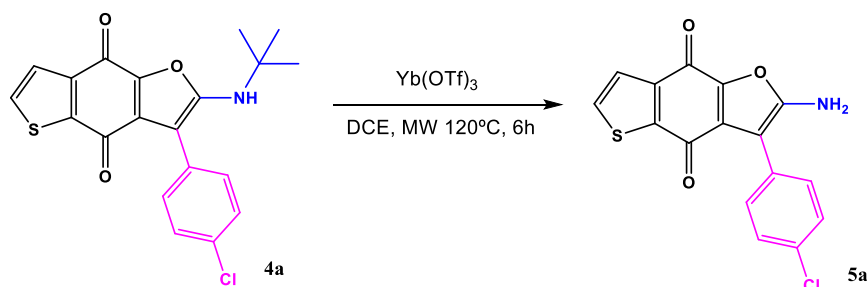
4.3.- Eliminación del grupo *t*-butilo, síntesis de 2-amino-3-(4-clorofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona:

Con el fin de introducir algo más de diversidad estructural en la familia de derivados 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona, se ha realizado una transformación posterior en la que se elimina el grupo *t*-butilo, pasando de una amina secundaria a una amina primaria. Dicha transformación puede ser favorable de cara a las posibles interacciones de estas moléculas con el bolsillo de la proteína quinasa JAK2.

Para llevar a cabo dicha transformación, se seleccionó el producto **4a**, y siguiendo una variación del procedimiento descrito por Sharada y colaboradores,⁴⁴ el compuesto **4a** se trató con un exceso de triflato de yterbio en dicloroetano, y se sometió a irradiación con microondas

⁴⁴ Arepally, S.; Baravkar, M.D.; Sharada, D.S.; Shinde, A.H. Strategy. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 331-342.

a 120°C, durante 6 h a una potencia de 150 W, obteniéndose el producto **5a** con un rendimiento del 75% (Esquema 9).



Esquema 9. Obtención de 2-amino-3-(4 clorofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona.

Para determinar su estructura se utilizaron las técnicas de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas. Se observó que dicho compuesto presentaba un marcado efecto solvatocrómico, siendo violeta las disoluciones de este compuesto en disolventes clorados como DCM, DCE y CDCl₃. Mientras que en disolventes polares próticos como el metanol presenta un color azul marino intenso.

4.4.- Síntesis de compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo:

Dado que el agrupamiento 2-amino-3-ciano-4H piranos, se encuentra presente en una gran variedad de compuestos con actividades anticancerígenas,^{45,46,47} antibacterianas^{46,47} y antirreumáticas,⁴⁸ como los que se ilustran en la Figura 13, nos pareció interesante fusionar dicho núcleo a la quinona heterocíclica **1**.

⁴⁵ Amr, A.E.; Mohamed, A.M.; Mohamed, S.F.; Abdel-Hafez, N.A.; Hammam, A.G. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5481-5488.

⁴⁶ Abdelrazeka, F.M.; Metz, P.; Farrag, E.K. *Arch. Pharm. Med. Chem.* **2004**, *337*, 482-485.

⁴⁷ Kennitzer, W.; Drewe, J.; Jiang, S.; Zhang, H.; Zhao, J.; Crogan-Grundy, C.; Xu, L.; Lamothe, S.; Gourdeau, H.; Denis, D.; Tseng, B.; Kasibhatla, S.; Xiong Cai, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2858-2864.

⁴⁸ Smith, C.W. Bailey, J.M.; Billingham, M.E.J.; Chandrasekhar, S.; Dell, C.P.; Harvey, A.K.; Hicks, C.A.; Kingston, A.E.; Wishart, G.N. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *5*, 2783-2788.

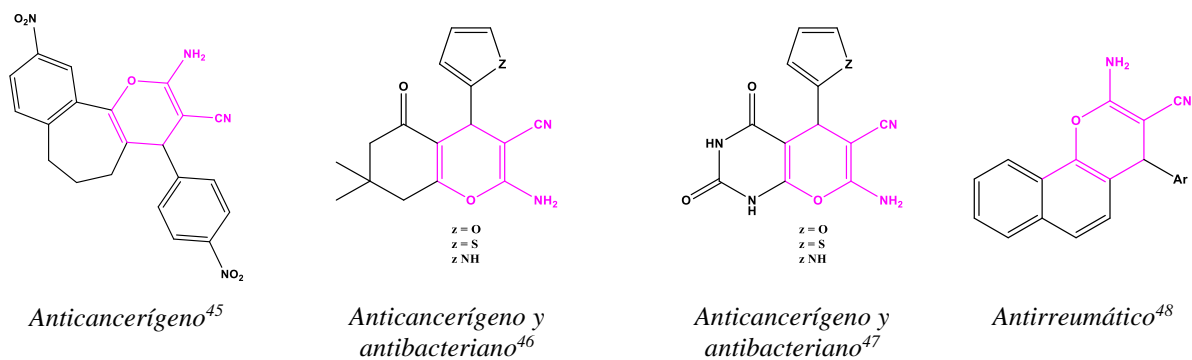
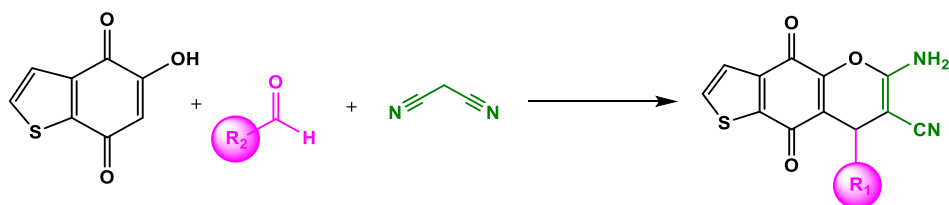


Figura 13. Estructura de algunos compuestos tipo 2-amino-3-ciano-4H piranos con actividad biológica.

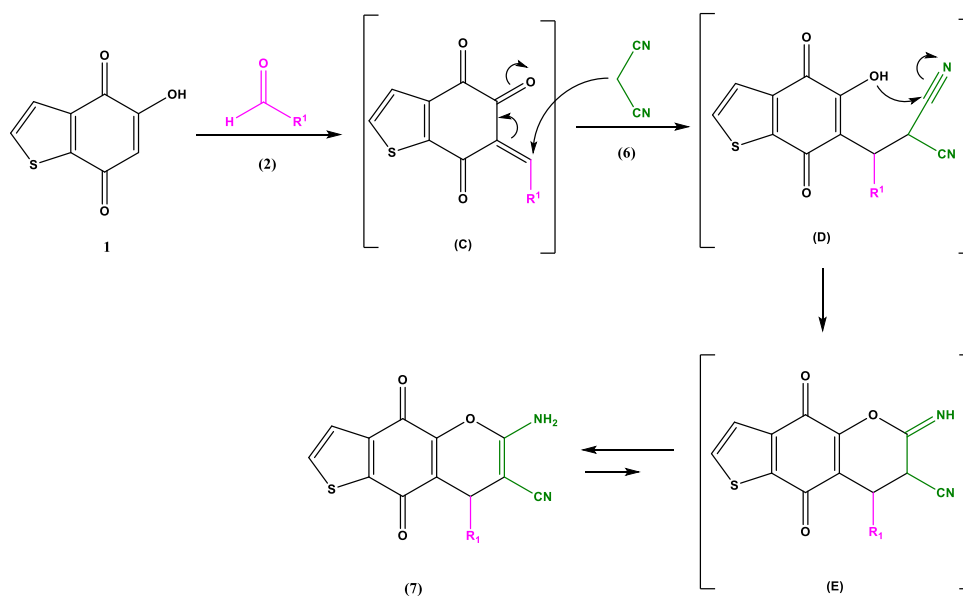
Así en este trabajo se ha sintetizado una serie de compuestos tipo 2-amino-3-ciano-4H piranos, a partir de la reacción multicomponente entre la quinona heterocíclica 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona (**1c**), malonitrilo y diferentes aldehídos.



Esquema 10. Síntesis de los derivados 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo.

El mecanismo de esta reacción⁴⁹ se ilustra en el Esquema 11, en el que el primer paso es la condensación de Knoevenagel entre la quinona (**1**) y el aldehído (**2**), formando el intermedio α,β -insaturado (**C**). A continuación, se produce una reacción de Michaels entre el malononitrilo (**6**) y dicho intermedio (**C**), generando un nuevo intermedio (**D**) que sufre una ciclación intramolecular (**E**) y posterior tautomerización para dar lugar a los productos (**7 a-i**).

⁴⁹ Martín-Acosta, P.; Haider, S.; Amesty, Á.; Aichele, D.; Jose, J.; Estévez-Braun, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 410-423.



Esquema 11. Posible mecanismo de reacción para la formación de los derivados de dihidropirano.

Para determinar las condiciones óptimas de la reacción se utilizó como modelo, la reacción entre la quinona heterocíclica **1**, malononitrilo y 4-clorobenzaldehído, empleándose diferentes condiciones de reacción descritas en la bibliografía, para la formación del agrupamiento 2-amino-3-ciano-4H pirano.^{49,50,51,52,53,54,55,56.}

⁵⁰ Magedov, I.V.; Kireev, A.S.; Jenkins, A.R.; Evdokimov, N.M.; Lima, D.T.; Tongwa, P.; Altig, J.; Steelant, W.F.A.; Van Slambrouck, S.; Antipin, M.Y.; Kornienko, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5195-5198.

⁵¹ Khurana, J.M.; Nand, B.; Saluja, P. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5637-5641.

⁵² Shaabani, A.; Ghadari, R.; Ghasemi, S.; Pedarpour, M.; Rezayan, A.H.; Sarvary, A.; Ng, S.W. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 956-959

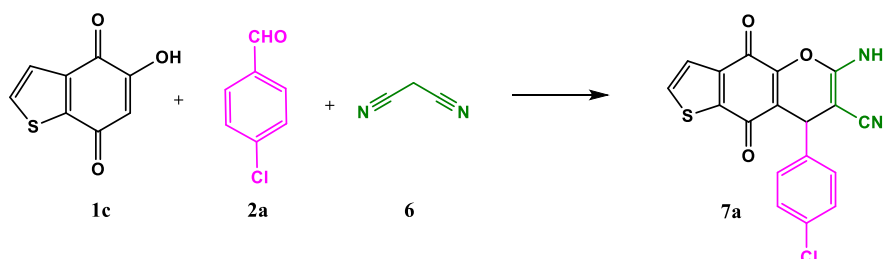
⁵³ Khan, M.N.; Pal, S.; Karamthulla, S.; Choudhury, L.H. *RSC Advances* **2014**, *4*, 3732-3741.

⁵⁴ Wang, X.; Zhang, X.; Tu, S.; Shi, F.; Zou, X.; Yan, S.; Han, Z.; Hao, W.; Cao, X.; Wu, S. *J. Heterocyclic Chem.* **2009**, *46*, 832-836.

⁵⁵ Wang, X.; Zhang, X.; Tu, S.; Shi, F.; Zou, X.; Yan, S.; Han, Z.; Hao, W.; Cao, X.; Wu, S. *J. Heterocyclic Chem.* **2009**, *46*, 832-836.

⁵⁶ Brahmachari, G.; Banerjee, B. *ACS Sustainable Chem. Ing.* **2014**, *2*, 411-422.

Tabla 5. Optimización de las condiciones de reacción.

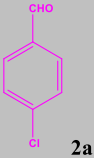
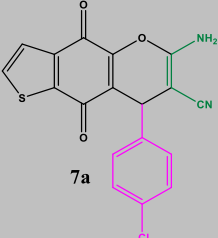
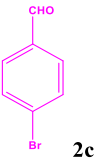
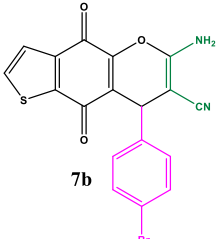
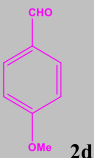
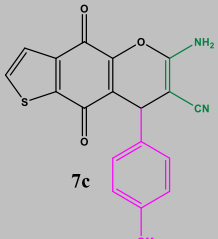
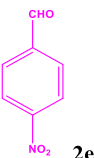
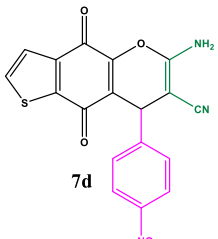
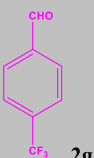
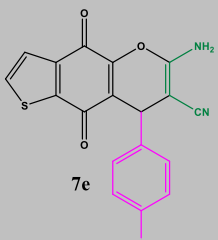
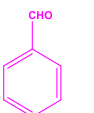
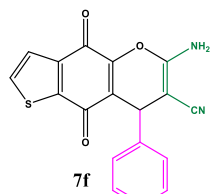


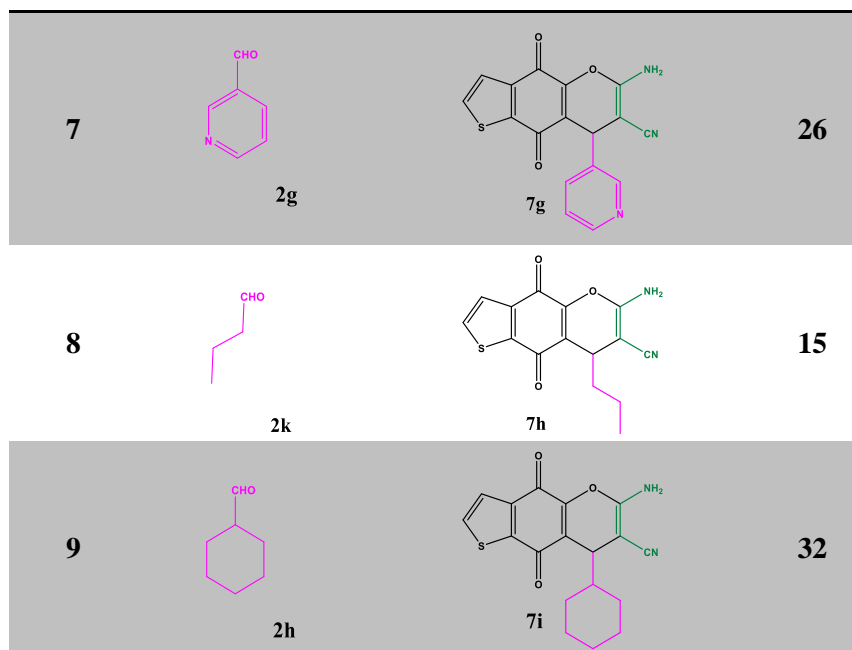
Entrada	1/2a/6	Catalizador	Condiciones de reacción	Rto. (%)
1	1.0/1.0/1.0	Et ₃ N (10 %)	EtOH, reflujo, 2h	32
2	1.0/1.0/1.5	DBU (10%)	H ₂ O, reflujo, 30 min.	-
3	1.0/1.0/1.0	Et ₃ N (10 %)	CH ₃ CN, ta, 5h	49
4	1.0/1.0/1.0	Imidazol (20%)	EtOH, reflujo, 1h	24
5	1.0/1.0/1.0	-	DMF:AcOH (2:1), MW, 130°C, 10 min.	35
6	1.0/1.0/1.0	Glicina (20%)	H ₂ O, 60 °C, 2h.	-
7	1.0/1.0/1.1	Urea (10 %)	EtOH/ H ₂ O (1:1), ta	-
8	1.0/1.0/1.0	Et ₃ N (10 %)	EtOH, MW, 120 °C, 10 min.	57

En vista de que los rendimientos obtenidos con las condiciones de reacción anteriores no fueron del todo favorables (entradas 1-7), se decidió probar a llevar a cabo la reacción bajo irradiación de microondas, con cantidades equimolares de los tres reactivos de partida, utilizando etanol como disolvente y Et₃N como catalizador, ya que fue el catalizador que mejores resultados había dado en las condiciones evaluadas anteriores. La reacción se llevó a cabo a 120 °C durante 10 minutos (entrada 8), tras los cuales se observó la desaparición de la quinona heterocíclica (**1**) de partida, obteniendo el producto deseado (**7a**) con un 57 % de rendimiento.

Estas últimas condiciones descritas, fueron utilizadas para evaluar el alcance de la reacción con respecto al aldehído. Se utilizaron diferentes aldehídos tanto aromáticos como alifáticos, entre los aldehídos aromáticos utilizados, se emplearon principalmente aldehídos sustituidos en la posición para-, tanto por grupos activantes como desactivantes, también se empleó el aldehído heterocíclico 4-piridincarboxaldehído. En cuanto a los aldehídos alifáticos utilizados, la reacción se llevó a cabo con un aldehído lineal, el butiraldehído y con un aldehído alifático cíclico, el ciclohexanocarbaldehído.

Tabla 6. Estructura y rendimiento de los derivados quinónicos, 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo.

<i>SERIE 1</i>			
<i>Entrada</i>	<i>Aldehído</i>	<i>Producto</i>	<i>Rto. (%)</i>
1	 2a	 7a	57
2	 2c	 7b	32
3	 2d	 7c	19
4	 2e	 7d	37
5	 2g	 7e	45
6	 2h	 7f	43



La sustitución del 4-clorobenzaldehído por cualquiera de estos aldehídos, trajo consigo una disminución del rendimiento de la reacción, obteniéndose en todos los casos, rendimientos moderados que van desde el 15 % para el compuesto **7h** hasta el 57 % alcanzado cuando se utilizó el 4-clorobenzaldehído.

Se ha de destacar, que la mayoría de estos compuestos son parcialmente solubles en disolventes como el EtOH, MeOH o el DCM, por lo que esta característica de algunos de los productos de esta familia de compuestos, se aprovechó para su purificación por precipitación en agua. Sin embargo, hubo algunas excepciones como los compuestos **7g** y **7h**, que o bien su solubilidad o bien la cantidad de producto, impidió su precipitación en dicha mezcla de disolventes.

La estructura de los compuestos se confirmó mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN), tales como ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y DEPT 135. Además, también se realizó un experimento bidimensional de HMBC para el compuesto **7b**.

Así a modo ilustrativo pasaré a comentar las características espectroscópicas de esta familia, tomando como ejemplo el producto **7b**. Comenzaremos por describir el espectro de ^1H -RMN (DMSO) de dicho compuesto (Figura 14).

A campo bajo, se observan las señales correspondientes a los protones aromáticos y del grupo amino de la molécula. Los dos dobletes que aparecen a 8,1 y 7,6 ppm respectivamente, con una constante de acoplamiento de 5,0 Hz, corresponden a los protones **H-2** y **H-3** del anillo de tiofeno, ambas señales integran cada una para un protón.

A desplazamientos químicos menores, pero aún en la zona aromática del espectro, se observan las señales correspondientes a los CH del anillo 4-metoxifenil de la molécula, estas señales aparecen como dos dobletes a 7,21 y 6,87 ppm, que integran para dos protones cada una, con una constante de acoplamiento de 8,7 Hz. La señal a 6,87 ppm corresponde a los hidrógenos **H-3'** y **H-5'** del anillo, ya que son los hidrógenos más cercanos al grupo metoxi, que es un activante del anillo de benceno. Además, esto se confirma por las correlaciones en el experimento bidimensional HMBC.

A 7,27 ppm se observa un singlete, algo ancho en la base, que integra para dos protones, esta señal corresponde a los dos protones equivalentes del grupo amino.

Por otro lado, a campo alto, se observan dos singletes. Uno de ellos a 4,51 ppm que integra para un protón y corresponde al hidrógeno **H-8** situado en el anillo de pirano, mientras que el otro singlete a 3,72 ppm corresponde a los tres protones del grupo metoxi.

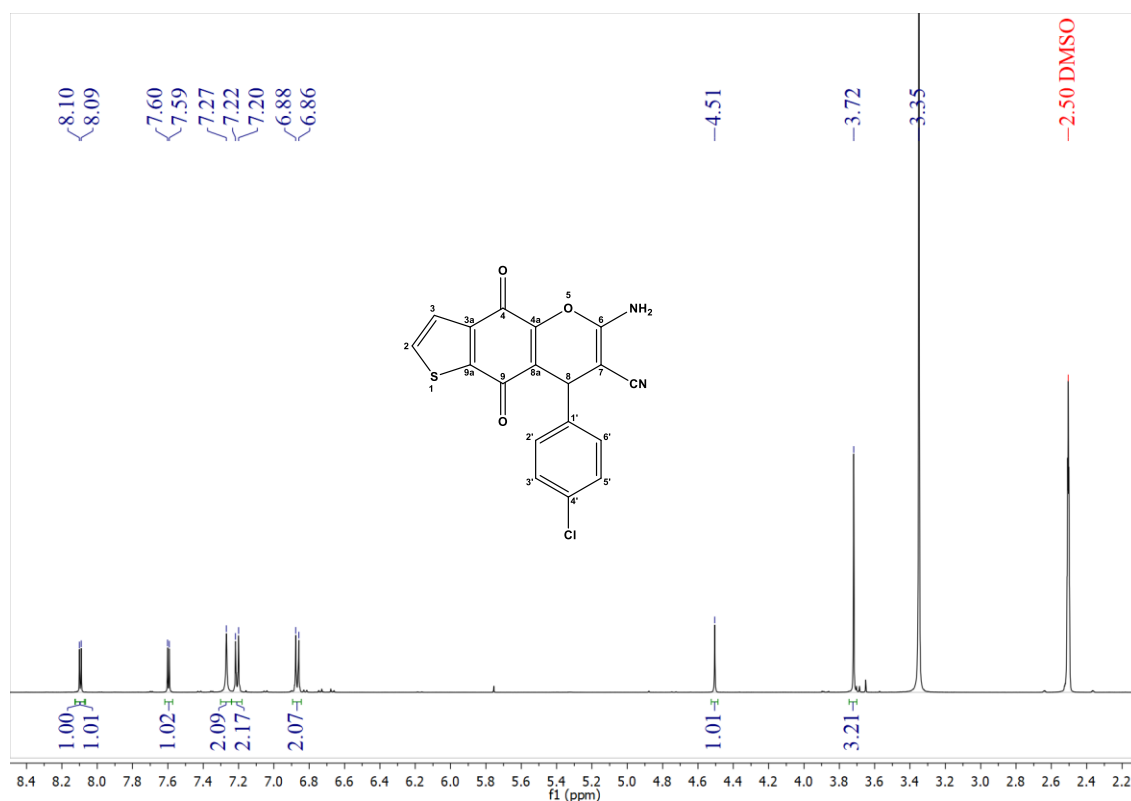


Figura 14. Espectro ¹H-RMN (DMSO) del compuesto **7b**.

En cuanto al espectro de ¹³C-RMN, las señales de los carbonos carbonílicos **C-4** y **C-9** de la quinona, se observan en todos los compuestos de la familia entre 172,0 y 178,0 ppm. En el espectro de ¹³C-RMN del compuesto **7b**, estas señales se observan a 173,2 y 177,8 ppm.

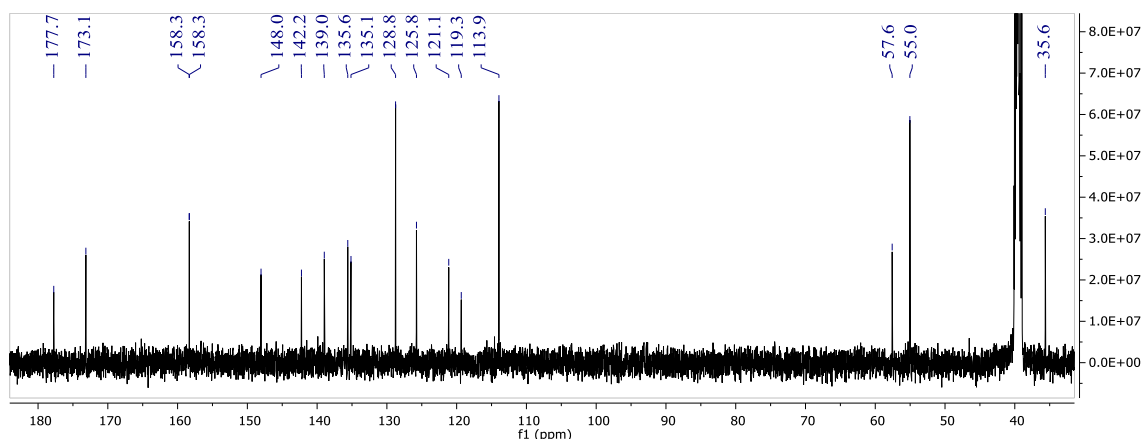


Figura 15. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto **7b**.

Gracias al espectro de DEPT 135 se han podido asignar las señales correspondientes a los carbonos CH y al grupo metilo de la molécula. Las dos señales más intensas que se observan en la región aromática del espectro, corresponden a los carbonos CH del anillo 4-metoxifenil, mientras que las señales aromáticas a 135,2 y 125,8 ppm corresponden a los carbonos CH del anillo de tiofeno. A campo alto, se observa una señal más intensa a 55,0 ppm, que dado el desplazamiento químico corresponde al carbono del grupo $-\text{OCH}_3$, y una señal a 35,6 ppm que corresponde al carbono CH (C-8) del anillo de pirano.

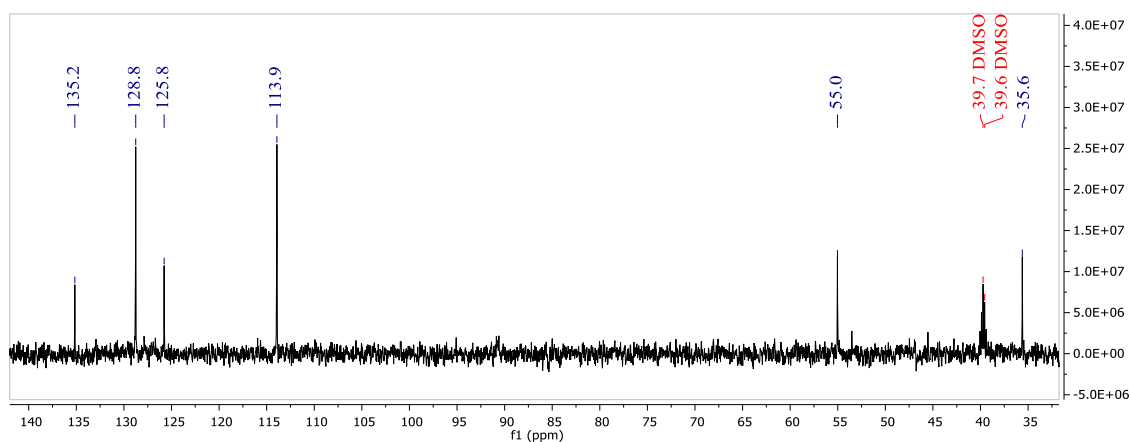


Figura 16. DEPT 135 del compuesto **7b**.

Para la asignación del resto de señales del espectro de carbono y confirmación de la estructura, se recurrió al análisis del espectro bidimensional HMBC (Figura 17).

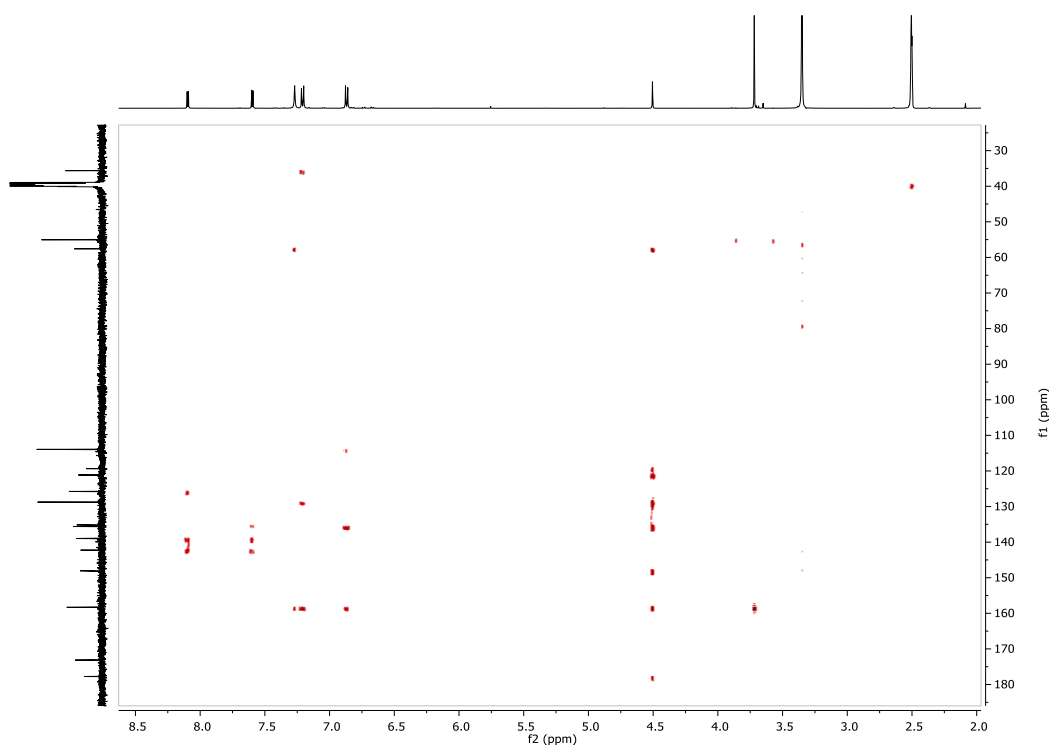
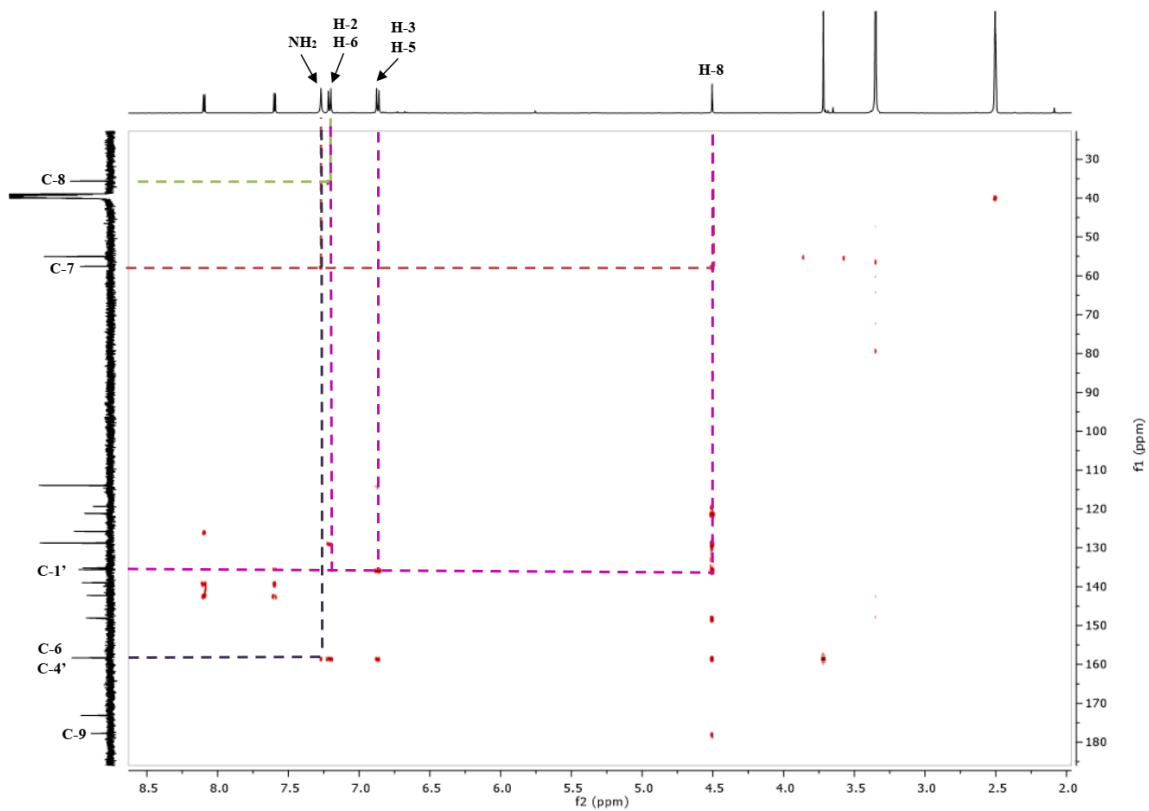


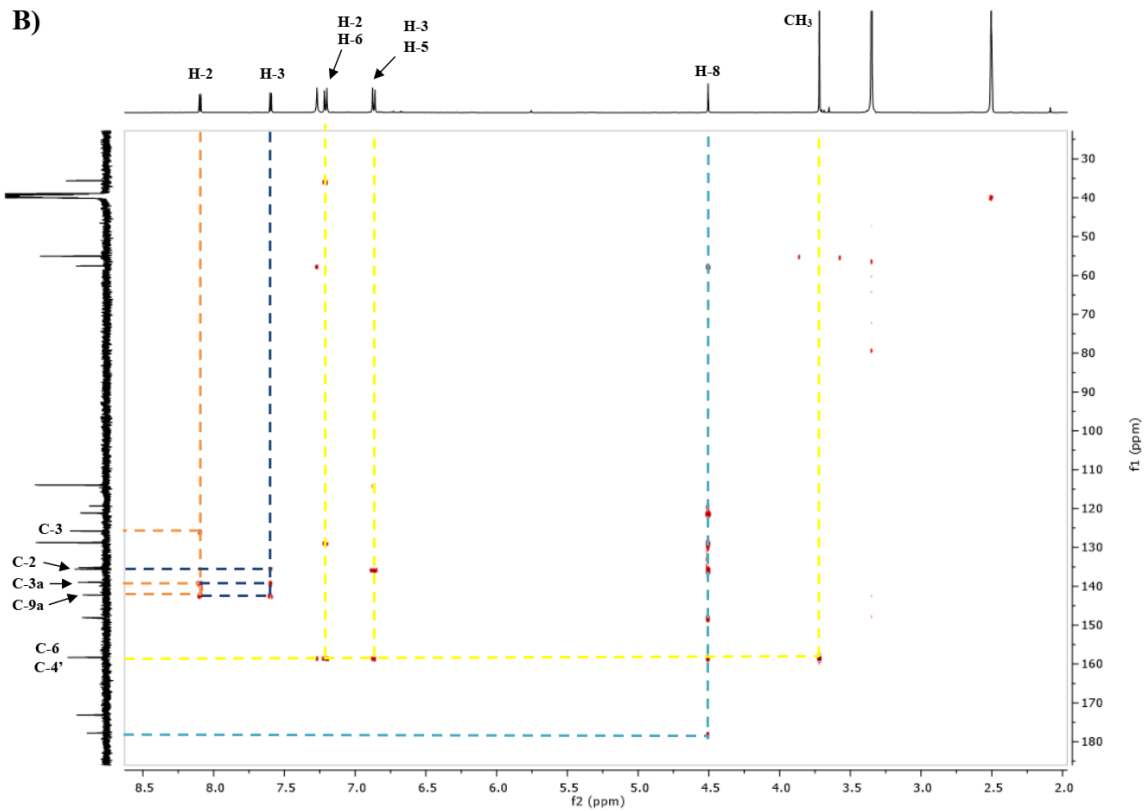
Figura 17. Espectro HMBC del compuesto **7b**.

En el espectro HMBC, podemos observar algunas correlaciones que nos proporcionan información importante para llevar a cabo dichas asignaciones, como la correlación a tres enlaces entre la señal del carbono cuaternario a 57,6 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN y la señal de los protones del grupo amino. Este mismo carbono, además correlaciona con el protón **H-8** del anillo de pirano, por lo que dicha señal a 57,6 ppm en el espectro de carbono puede corresponder al carbono **C-7**. Esto se confirma, dado el desplazamiento químico, más bajo de lo normal para un carbono sp^2 , que se explica debido al efecto de anisotropía magnética producido por el grupo ciano, al cual se encuentra enlazado. Otra correlación interesante de este protón **H-8**, es la correlación a tres enlaces con la señal del carbono cuaternario a 177,8 ppm en el ^{13}C -RMN, que como hemos comentado anteriormente, corresponde a uno de los carbonos carbonílicos de quinona. Por tanto, esta señal es la del **C-9** y por descarte, la señal a 172,0 ppm corresponde al carbono **C-4** de la quinona. El resto de las interacciones dadas se ilustran en la figura 18.

A)



B)



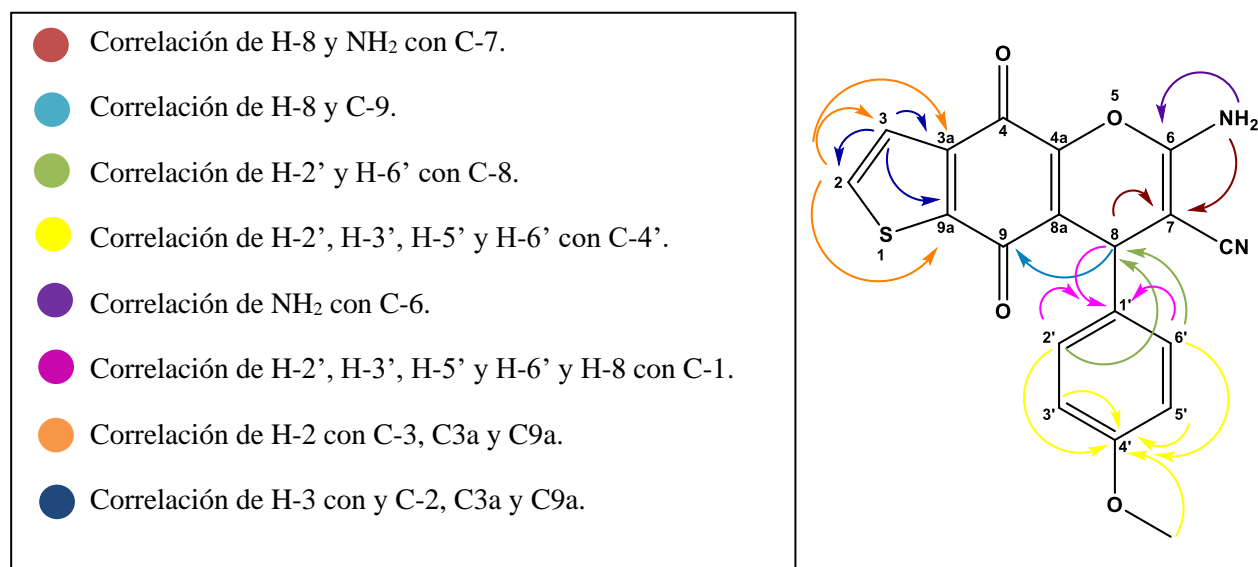


Figura 18. Correlaciones más relevantes observadas en el espectro de HMBC del compuesto **7b**.

4.5.- Estudio de modelización molecular (Docking).

La modelización molecular o Docking es un método, dentro del campo de la química computacional, que predice la conformación que preferiblemente adopta una molécula, cuando interacciona con otra, formando un complejo estable. Por lo general una molécula pequeña y una proteína, o dos proteínas.⁵⁷

Este método computacional, permite colocar a esta pequeña molécula (ligando) en el sitio activo de su diana molecular (por ejemplo, una proteína), de la cual se conoce su estructura tridimensional, y explorar las distintas conformaciones y orientaciones (poses) que el ligando puede adoptar en dicho lugar, así como las interacciones que se producen en cada una de estas poses, entre el ligando y la proteína. Todo ello con el fin de evaluar la geometría de enlace más estable entre el ligando y esta diana molecular, en función del valor de energía libre de cada una de estas poses.⁵⁷

Para llevar a cabo dicha evaluación el método combina un algoritmo de búsqueda, que explora cada uno de los grados de libertad de la molécula para identificar la conformación que mejor se adapte al sitio activo de la proteína, y un algoritmo de evaluación, que debe representar las contribuciones termodinámicas (entálpicas y entrópicas) de todos los tipos de interacciones que

⁵⁷ Amesty Arrieta, Ángel. Búsqueda de compuestos fenólicos como moduladores de los receptores de estrógenos. Tesis doctoral, Universidad de La Laguna, Tenerife, 2015.

tienen lugar en cada pose. Con el fin de predecir el modo de unión del ligando en el sitio activo de la proteína.⁵⁷

Todo ello puede orientarnos, sobre la interacción que tendrá dicho ligando con una determinada diana molecular. Es por ello que esta técnica es bastante usada en el diseño y descubrimiento de nuevos fármacos.⁵⁷

4.5.1.- Selección de la diana y preparación para el docking: Entre las diferentes estructuras cristalinas de la subunidad catalítica de JAK2, disponibles en la base de datos Protein Data Bank (PDB), se ha seleccionado como modelo para nuestro estudio la **5CF4**.

Una vez descargada la proteína de PDB e importada al programa Maestro 11.1, la proteína se preparó para poder ser utilizada. Se adicionaron los hidrógenos, se asignaron los órdenes de enlace, se eliminaron las moléculas de agua y sales presentes en la proteína, así como la molécula de ligando. Por último, se repararon las cadenas y “loops” incompletos y se procedió a optimizar la geometría de la proteína usando el campo de fuerza OPLS3.

Por otro lado, se dibujaron las estructuras de los compuestos sintetizados en este trabajo, utilizando el programa ChemDraw 18.0 y a continuación, fueron importadas al programa Maestro 11.1, donde también fueron preparados para su evaluación. Se utilizó el módulo LigPred para obtener la conformación de mínima energía de cada molécula mediante el campo de fuerza OPLS3, generando los estados de ionización más probables a $\text{pH } 7 \pm 1$.

4.5.2.- Cálculos y resultados del Docking:

Tras la optimización de todos los parámetros necesarios para el docking, los ligandos fueron acoplados al sitio activo de la enzima usando el programa Glide v6.8. Durante la evaluación de los compuestos, se dio flexibilidad a las moléculas de ligando, mientras que por el contrario el sitio activo de la proteína se mantuvo rígido, con el fin de acortar el tiempo de cálculo del programa.

Se utilizó el algoritmo “Xtra precision” para hallar las conformaciones o poses de mínima energía de cada compuesto, en el sitio activo de la enzima. Estas conformaciones, se ordenaron de acuerdo a su valor en la función de puntuación GlideScore (GScore), valor que representa la energía libre de formación (ΔG) de dicho complejo ligando-enzima, por lo que valores negativos de esta función implica una mayor afinidad de la molécula por el sitio activo de la proteína, que podría traducirse en una mayor actividad del compuesto.

A) Resultados del docking para la familia de compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona:

Entre los 21 compuestos que forman parte de esta familia, los derivados **4d** y **4i** son los que presentan mejores valores de glide score, siendo dichos valores -8,23 y -8,53 Kcal/mol respectivamente, valores de afinidad bastante buenos.

Los resultados del docking para el compuesto **4d**, muestran que esta molécula podría formar un enlace de hidrógeno con la Leu-855 del sitio activo de la enzima, a través del grupo amino introducido con el *t*-butilisonitrilo. Mientras que el compuesto **4i**, formaría un enlace de hidrógeno con la Leu-392, por medio del nitrógeno del anillo de piridina de la molécula, introducido en la estructura con el aldehído. Por lo cual, ambos puntos de diversidad estructural, han resultado interesantes de modular, de cara a las posibles interacciones en el sitio activo de la enzima.

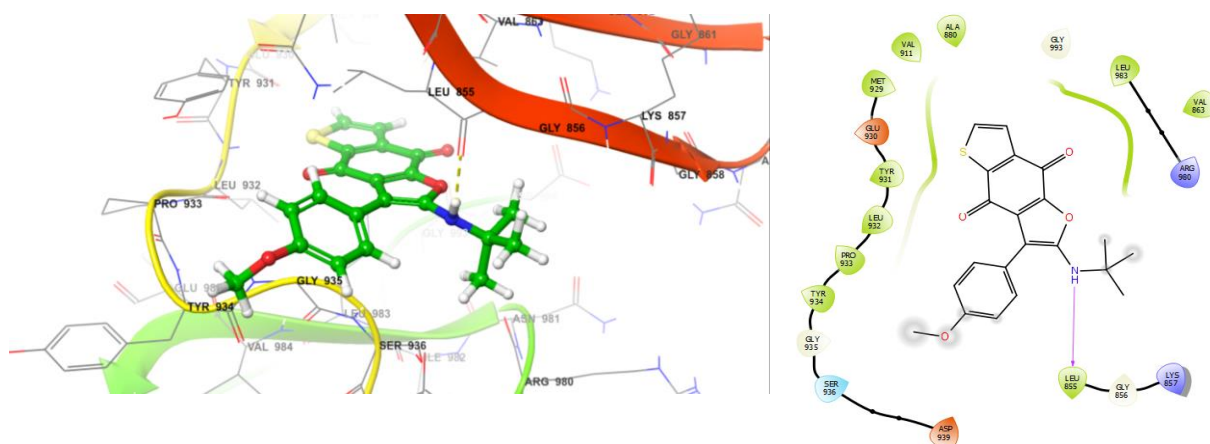


Figura 19. Predicción del modo de unión del compuesto **4d** a la enzima JAK2 (PDB 5CF4).

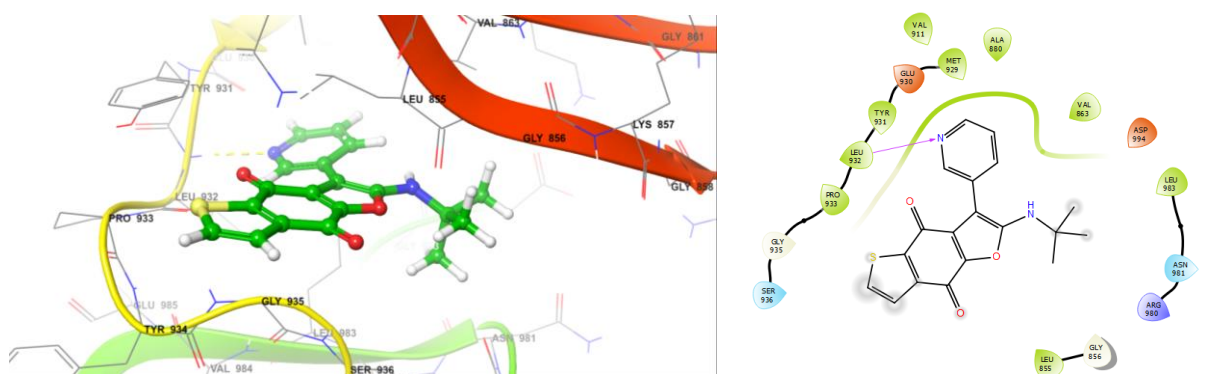


Figura 20. Predicción del modo de unión del compuesto **4i** a la enzima JAK2 (PDB 5CF4).

B) Resultados del docking para la familia de compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo:

En este caso los compuestos de esta familia, presentan valores de glide score más moderados, que van desde -5,93 Kcal/mol para el derivado **7e** a -7,37 Kcal/mol para el derivado **7f**.

Para el compuesto **7f**, se han analizado las interacciones que esta molécula podría tener en el sitio activo de la enzima y por las cuales se obtiene el mencionado valor de glide score, que puede ser considerado como bueno.

Según los resultados del docking, esta molécula presentaría interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Leu 855, Ala 880, Tyr 931, Met 929, Val 863, Gly 935, Leu 983, Val, 911, Gly 993, Asp 994, Arg 980, Asn 981 y además formaría un enlace de hidrógeno con la Leu 932 a través de uno de los carbonilos del anillo quinónico de su estructura.

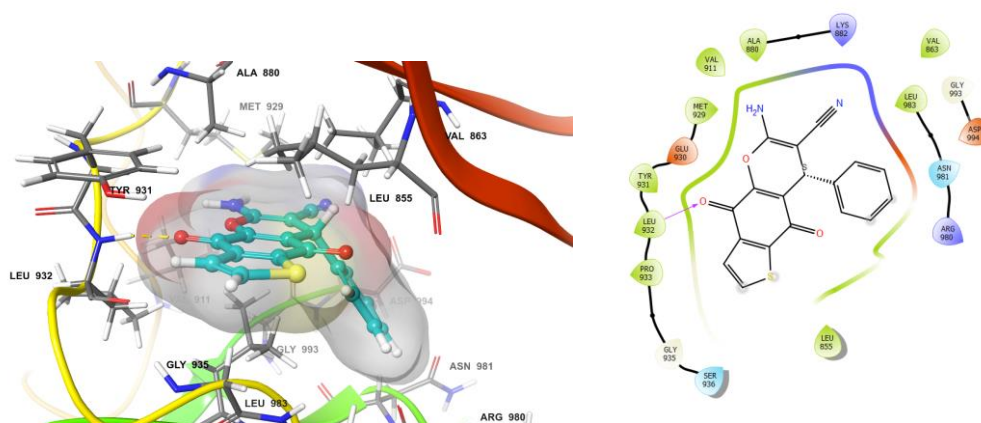


Figura 21. Predicción del modo de unión del compuesto **7f** a la enzima JAK2 (PDB 5CF4).

Esta interacción con la Leu 932 es bastante interesante, ya que como hemos visto con anterioridad, la gran mayoría de inhibidores de JAK2 la presentan. Además, este compuesto también presenta las cuatro interacciones hidrofóbicas que con más frecuencia se dan entre los inhibidores de JAK2 y el sitio activo de esta enzima, interacciones con la Leu983, Ala880, Val863, Leu855. Con todo ello, aunque estos cálculos son meramente predictivos, podríamos considerar al compuesto **7f** como un buen candidato para la inhibición de JAK2.

4.6.- Parámetros físico-químicos de los compuestos obtenidos:

Se han calculado algunos parámetros físico-químicos de importancia farmacocinética, de los compuestos sintetizados. Los valores de estos parámetros dan idea de la capacidad de transporte de las moléculas utilizadas como fármacos, a través de membranas biológicas o de su distribución y biodisponibilidad.

Para el cálculo de estas propiedades se ha empleado el programa molinspiration.⁵⁸ Los parámetros analizados y sus valores, para cada compuesto, se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Parámetros físico-químicos de algunos de los compuestos sintetizados.

Entrada	Compuesto	PM ¹ (g/mol)	log P ²	HBA ³	HBD ⁴	PTSA ⁵ (Å ²)	RB ⁶	VM ⁷ (Å ³)
1	4a	385,87	5,22	4	1	59,31	3	318,39
2	4b	369,42	4,71	4	1	59,31	3	309,79
3	4c	430,12	5,36	4	1	59,31	3	322,74
4	4d	381,45	4,60	5	1	68,54	4	330,40
5	4e	396,42	4,50	7	1	105,13	4	328,19
6	4f	396,42	4,48	7	1	105,13	4	328,19
7	4g	419,42	5,44	4	1	59,31	4	336,15
8	4h	351,43	4,55	4	1	59,31	3	304,86
9	4i	352,42	3,48	5	1	72,20	3	300,70
10	4j	357,46	4,13	4	1	59,31	3	295,57
11	4k	317,41	4,06	4	1	59,31	4	283,61
12	4l	357,48	4,64	4	1	59,31	4	323,44
13	4m	422,46	5,22	7	1	105,13	4	352,00
14	4n	377,46	5,27	4	1	59,31	3	328,66
15	4o	407,49	5,32	5	1	68,54	4	354,21
16	4p	343,45	4,78	4	1	59,31	4	307,42
17	4q	430,44	4,72	7	1	105,13	5	350,21
18	4r	385,44	4,76	4	1	59,31	4	326,88
19	4s	415,47	4,82	5	1	68,54	5	352,42
20	4t	351,43	4,27	4	1	59,31	5	305,63
21	5a	329,76	3,67	4	2	73,31	1	251,09
22	7a	368,80	2,81	5	2	93,19	1	284,78
23	7b	413,25	2,94	5	2	93,19	1	289,13
24	7c	364,38	2,19	6	2	102,42	1	296,79
25	7d	379,35	2,09	8	2	139,01	2	294,57
26	7e	402,35	3,03	5	2	93,19	2	302,54
27	7f	334,36	2,13	5	2	93,19	1	271,24
28	7g	335,34	0,90	6	2	106,08	1	267,08
29	7h	300,34	1,98	5	2	93,19	2	250,00
30	7i	340,40	2,83	5	2	93,19	1	289,83

⁵⁸ Molinspiration, Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score.
<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>

¹ *PM: Masa molecular.*

² *Log P: Coeficiente de partición octanol/agua.*

³ *HBA: N° de aceptores de enlaces de hidrógeno.*

⁴ *HBD: N° de dadores de enlaces de hidrógeno.*

⁵ *TPSA: Área polar superficial.*

⁶ *RB: N° de enlaces rotables.*

⁷ *VM: Volumen molecular.*

El rango óptimo para cada uno de estos parámetros es: $PM < 500$; $\text{Log } P < 5$; $HBD < 5$; $HBA < 10$; $RB < 5$; $TPSA < 140$.

A la vista de los valores obtenidos, la mayoría de los compuestos de ambas familias, presentan valores apropiados de “drugability”. Solo los compuestos **4a**, **4c**, **4g**, **4m**, **4n**, **4j** presentan un log p ligeramente superior a 5. Siguiendo la regla empírica de Lipinski,⁵⁹ si estos derivados llegaran a ser utilizados como fármacos, probablemente podrían ser administrados por vía oral.

⁵⁹ Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.

5.- Parte experimental

5.1.- Técnicas instrumentales:

5.1.1.- *Resonancia magnética nuclear:* La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica analítica no destructiva, cuyo fundamento es la interacción entre los núcleos de átomos magnéticamente activos, es decir con momento magnético nuclear, y un campo magnético. Dicha interacción da lugar a señales, cuya forma, posición y tamaño, representadas en un espectro, dan información acerca de la estructura de la molécula.

Todos los compuestos obtenidos en este trabajo fueron caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y DEPT 135. Además, se llevó a cabo un experimento bidimensional de HMBC del compuesto **6b**. El equipo utilizado para ello fue Bruker AMX 500, empleando una frecuencia de 500 MHz para la obtención de los espectros de ^1H -RMN y 125 MHz para los de ^{13}C -RMN.

Para realizar dichos experimentos, las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3) con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Excepto en el caso del compuesto **5a** que también se utilizó DMSO.

En los espectros, los desplazamientos químicos (δ), tiene unidades de partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J), unidades de Hertzios (Hz).

La multiplicidad de las señales en ^1H -RMN, atienden a las siguientes abreviaturas: singlete (s), singlete ancho (sa), doblete (d), triplete (t), cuadruplete (c), multiplete (m), doble doblete (dd), doble doble doblete (ddd) y doble triplete (dt).

5.1.2.- *Espectrometría de masas:* La espectrometría de masas (MS), es una técnica analítica, cuyo fundamento es el generar fragmentos cargados que al atravesar un campo magnético se separan en función de su relación carga/masa. Generando espectros en los que se representa intensidad de la señal frente a dicha relación carga/masa, y que dan información tanto de la fórmula molecular del compuesto analizado, como de la relación isotópica de los átomos que contiene y la estructura de la molécula.

Los compuestos de la familia 1, preparados en este trabajo, fueron caracterizados por espectrometría de masas de alta (EMAR) y baja resolución (EM). Los análisis se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas modelo Micromass AutoSpec de trisector magnético con geometría EBE, mediante inyección directa y utilizando la técnica de impacto electrónico (IE). El potencial de ionización utilizado fue en todos los casos de 70 eV.

5.1.3.- *Difracción de rayos-X*: La difracción de rayos-x es una técnica basada en el fenómeno de difracción que tiene lugar en las ondas. Los rayos-x son dispersados por los electrones de los átomos debido a que la longitud de onda de esta radiación es del orden de la magnitud de los radios atómicos. Gracias a la disposición ordenada de los átomos en un cristal, se producen interferencias constructivas de los rayos-x dispersados, que dan lugar a un patrón de difracción. Dicho patrón proporciona información acerca de la disposición espacial y naturaleza de los átomos en un cristal, así como distancias y ángulos de enlace, etc. Es por tanto una técnica, mediante la cual se puede determinar la composición química y estructura de moléculas y cristales.

Las medidas de rayos-x se realizaron en el Servicio de Difracción de Rayos X de la Universidad de La Laguna (SIDIX), utilizando el Difractómetro Oxford Diffraction SuperNova equipado con un detector EOS. La longitud de onda de la radiación empleada fue de $\lambda = 1.54184$ Å. El software CrysAlisPro8 se utilizó para el procesamiento de los datos obtenidos en el análisis. Para la determinación y refinamiento de la estructura se utilizó el programa SHELXT9.

5.2.- Técnicas cromatográficas:

5.2.1.- *Cromatografía líquida en columna (CLC)*: La cromatografía líquida en columna es una técnica cromatográfica en la que se utiliza una columna vertical de vidrio, la cual se rellena de un material adsorbente que constituye la fase estacionaria. La muestra a separar se deposita en la parte superior de la columna, adsorbiéndose en dicha fase estacionaria y a continuación se rellena el resto de la columna con un eluyente adecuado, que por efecto de la gravedad bajará a través de la fase estacionaria, arrastrando los diferentes compuestos presentes en la muestra, en función de su polaridad, pudiendo así separarlos.

En este trabajo se ha utilizado dicha técnica cromatográfica, para la purificación del 3-oxo-3-(3-tienil)propanoato de etilo (**1a**), el 6-hidroxi-4,7-dioxo-benzotiofeno-5-carboxilato de etilo (**1b**) y el 6-hidroxibenzotiofeno-4,7-diona (**1c**).

El adsorbente utilizado en todos los casos fue gel de sílice de 0,2-0,5 nm de diámetro de la marca Macherey-Nagel. La compactación de la columna se hizo en todos los casos por vía seca, aplicando media presión.

En cuanto a la técnica de elución, se llevó a cabo a media presión (cromatografía en columna rápida) y por gravedad. Además en todos los casos se hizo un gradiente, empleando en primer lugar diclorometano (CH_2Cl_2) como eluyente y a continuación se aumentó la polaridad, empleando mezclas de diclorometano:metanol al 2, al 5 y al 10 % .

5.2.2.- *Cromatografía en capa fina (CCF)*: En este tipo de cromatografía la muestra se coloca en la parte inferior de la placa, sobre el adsorbente polar. La placa se introduce en una cubeta, en la que hay una pequeña cantidad de un eluyente adecuado. Dicho eluyente sube por capilaridad a través de la fase estacionaria arrastrando consigo los diferentes compuestos en función de la polaridad. Esta técnica se ha utilizado para determinar el punto final de las reacciones, para comprobar la pureza de los compuestos obtenidos y como técnica auxiliar, con el fin de determinar el eluyente adecuado para purificar los compuestos por CLC o por CP.

En todos los casos se utilizaron placas de gel de sílice tipo G de la marca Macherey-Nagel Sil G/UV254 con soporte de plástico y dimensiones 20x20 cm y 0,25 mm de espesor, con marcador de fluorescencia a 254 nm.

Dado que todos los compuestos obtenidos son coloreados, su detección se llevó a cabo por luz visible. Únicamente se utilizó luz UV a 254 nm, como técnica de revelado para comprobar la presencia o ausencia de impurezas no coloreadas.

5.2.3.- *Cromatografía en placa preparativa (CP)*: El fundamento de este tipo de cromatografía es básicamente el mismo, que el de la cromatografía de capa fina. Sin embargo, en este caso el soporte empleado es más resistente (normalmente de vidrio) y el espesor de la fase estacionaria mayor. Este tipo de cromatografía se utiliza para purificar muestras inferiores a 100 mg.

Para llevarla a cabo, la muestra se disuelve en un disolvente volátil y se extiende en la parte inferior de la placa, formando una línea recta. A continuación, se introduce la placa preparativa en una cubeta, con el eluyente adecuado para separar los compuestos de la mezcla. Una vez separados, se seca la placa y se raspa la sílice del soporte, en el que se encuentra adsorbido el compuesto que se desea purificar. A continuación, se coloca dicha sílice, en un filtro y se hace pasar un disolvente capaz de disolver el compuesto, arrastrándolo con él a través del filtro, mientras que la sílice queda retenida en el mismo.

Esta técnica cromatográfica se ha empleado para purificar todos los productos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona, excepto el compuesto **4i**. Se emplearon cromatoplasmas de 20 x 20 cm, de marca la Analtech, constituidas por un soporte de vidrio y gel de sílice tipo GF de 1 mm de espesor, como fase estacionaria con indicador de fluorescencia a 254 nm.

Los productos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona, dado que son coloreados fueron detectados por luz visible, únicamente se utilizó luz UV como técnica de revelado para

determinar la presencia o ausencia de impurezas no coloreadas. El eluyente empleado ha sido en todos los casos diclorometano (CH₂Cl₂).

5.2.4.- Cromatografía de exclusión por tamaños: En este tipo de cromatografía, los distintos compuestos se separan en función de su tamaño molecular. Las moléculas de mayor tamaño salen en primer lugar, mientras que las moléculas de menor tamaño quedan retenidas en las oquedades de la fase estacionaria, tardando más en salir de la columna. La fase estacionaria utilizada está constituida por el gel Sephadex LH-20, el cual se introduce dentro de una columna de vidrio. La fase estacionaria debe acondicionarse previamente con un eluyente adecuado, en función del tamaño de poro que se desee que tenga el gel. Una vez introducida la muestra en la parte superior de la columna, se rellena el resto con el mismo eluyente y se deja pasar a través de la fase estacionaria por gravedad. El eluyente utilizado para dicha purificación, fue una mezcla hexano:diclorometano:metanol (2:1:1).

5.3.-Reactor de microondas:

Todas las reacciones multicomponentes para la obtención de los compuestos, se llevaron a cabo en un reactor de microondas monomodo de la marca Biotage modelo initiator 2.5, en viales especiales para el uso de este equipo.

5.4.- Técnica de modelización molecular:

Para el estudio de Docking se utilizó el programa Glide v6.8. Utilizando la interfaz gráfica Maestro 11.1. de la empresa Schödingen Small Molecule Drug Discovery.

5.5.- Determinación de punto de fusión:

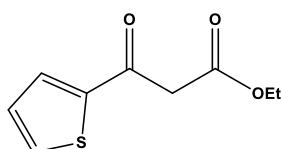
Se ha determinado el punto de fusión de aquellos productos sólidos obtenidos, para ello se utilizó un aparato BÜCHI B-540.

5.6.- Síntesis y caracterización de los compuestos obtenidos:

5.6.1.- Síntesis de 3-oxo-3- (tiofen-2-il) propanoato de etilo (1a).

A 800 mg (20 mmol) de NaH en 20 mL de THF seco, se añadió 2,4 mL (20 mmol) de carbonato de dietilo y seguidamente 1,5 mL (14 mmol) de 1-(2-tienil) etanona. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que cesó el desprendimiento de hidrógeno. Entonces, fue calentada a reflujo durante 4h. Tras finalizar la reacción, la mezcla se enfrió en un baño de agua-hielo y se añadió una disolución acuosa de NH₄Cl. El crudo se extrajo con Et₂O y a continuación la fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró. El β-ceto éster fue

purificado por cromatografía líquida en columna, usando una mezcla de Hex: AcOEt al 10% como eluyente. Se obtuvieron 2,62 g (95%) del producto **1a** como un líquido aceitoso de color marrón-negruzco. La estructura se confirmó por $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$.⁴¹

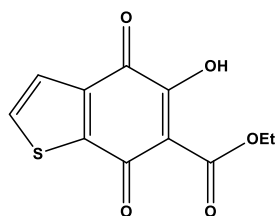


$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.74 (dd, $J = 3.7, 1.1$ Hz, 1H), 7.69 (dd, $J = 4.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J = 4.9, 3.8$ Hz, 1H), 4.21 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.91 (s, 2H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 184.9 (C), 166.9 (C), 143.2 (C), 134.9 (CH), 133.2 (CH), 128.3 (CH), 61.6 (CH_2), 46.5 (CH_2), 14.02 (CH_3).

5.6.2.- Síntesis de 5-hidroxi-4,7-dioxo-benzotiofeno-6-carboxilato de etilo (**1b**).

1,0 g (5 mmol) del β -ceto ester (**1a**) y 2,0 g de AlCl_3 (15 mmol; 3 equiv), fueron disueltos en 10 mL de nitrometano seco bajo atmosfera de argón. Después de agitar la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 0,51 mL (6 mmol; 1,2 equiva.) de cloruro de oxalilo. A continuación, se agitó la mezcla durante otros 15 minutos y posteriormente se calentó a 80°C durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo y con la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se añadió una disolución de ácido oxálico al 10%, lentamente y con agitación continua. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo, hasta que la fase acuosa quedó transparente. La fase orgánica, en la que se encontraba disuelto el producto de la reacción, se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El producto de la reacción se purificó por cromatografía líquida en columna, mediante gradiente. Se comenzó utilizando CH_2Cl_2 como eluyente y posteriormente mezclas de CH_2Cl_2 : MeOH al 2%, al 5% y al 10%. Se obtuvieron 1,2 g (95%) del producto **1b** como un sólido amorfo de color amarillo-anaranjado. La estructura se confirmó por $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$.⁴²



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.65 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.50 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.46 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

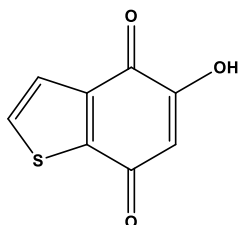
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 14.0 (CH_3), 63.2 (CH_2), 125.8 (CH), 133.0 (CH), 157.4 (C), 158.8 (C), 175.1 (C), 156.1 (C), 163.5 (C), 182.2

(C), 184.4 (C).

5.6.3.- Síntesis de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona (**1**).

200,0 mg (0,8 mmol) del compuesto **1b**, se hidrolizaron en una mezcla de 10 mL de HCl al 10% y 5 mL de acetonitrilo, bajo calentamiento a reflujo durante 30 minutos. La mezcla resultante, se extrajo con acetato de etilo, hasta que la fase acuosa fuera transparente. La fase

orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró en el rotavapor. El producto de la hidrólisis, se purificó mediante cromatografía líquida en columna, usando inicialmente CH₂Cl₂ como eluyente y continuándose con un gradiente, usando mezclas de CH₂Cl₂: MeOH al 2%, al 5% y al 10%. Se obtuvieron 97 mg (67 %) de la quinona heterocíclica **1** como un sólido amorfo de color amarillo. La estructura se confirmó por ¹H-RMN y ¹³C-RMN.²¹



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 7.63 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 7,21 (s, 1H, OH).

¹³C-RMN (δ, 125 MHz, CDCl₃): 180.4 (C), 177.1 (C), 156.4 (C), 146.6 (C), 136.9 (C), 132.4 (CH), 125.6 (CH), 109.0 (CH)

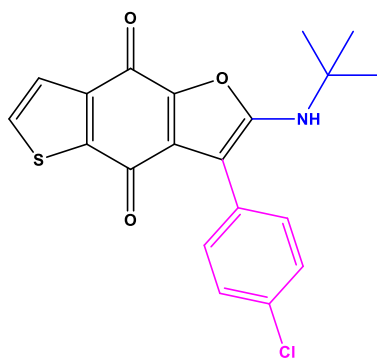
5.6.4- Procedimiento general para la síntesis de compuestos tipo 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona.

En un tubo de microondas de 5 ml, 20 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equivalentes (0,13 mmol) de aldehído, 1,2 equivalentes (0,13 mmol) de isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 10%). La mezcla se sometió a radiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. Una vez finalizada la reacción, se evaporó el etanol y el crudo fue purificado por cromatografía de placa preparativa, usándose como eluyente CH₂Cl₂. Excepto en el caso del producto **4i**, el cual se purificó por cromatografía de exclusión de tamaños usando sephadex LH-20.⁴³

SERIE I

2-(tert -butilamino)-3-(4-chlorofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4a).

Siguiendo el procedimiento general descrito, 20 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 ml de EtOH, se trataron con 1,2 equiv (0,13 mmol, 18,7 mg) de 4-clorobenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μl) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a radiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fué purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 33 mg (77 %) del producto **4a** como un sólido amorfo de color azul oscuro (pf: 232 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.59 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.75 (sa, 1H, NH), 1.47 (s, 9H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.5 (C), 166.6 (C), 159.0 (C), 143.4 (C), 142.6 (C), 141.7 (C), 133.6 (C), 133.2 (CH), 130.7 (CH x 2), 130.3 (C), 129.1 (CH x 2), 128.5 (C), 126.3

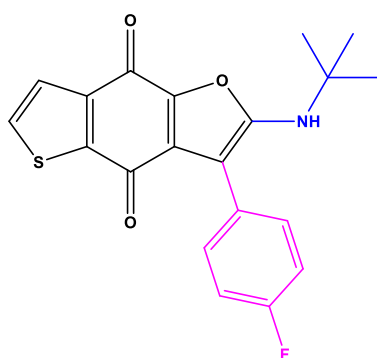
(CH), 100.1 (C), 54.1 (C), 30.0 (CH_3 x 3).

EM-EI m/z (%): 385 ($[\text{M}^+]$, (65)); 386 (30); 387 (46); 332 (35); 331 (77); 330 (58); 329 (100); 295 (27); 294 (73); 273 (23); 163 (30); 110 (20); 57 (58).

EMAR: 387,0522 (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{S}^{37}\text{Cl}$ 387,0510); 385,0529 (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{S}^{35}\text{Cl}$ $[\text{M}^+]$ 385,0539)

2-(tert-butylamino)-3-(4-fluorophenyl)thieno[2,3-f]benzofuran-4,8-dione (4b)

Seguendo el procedimiento general descrito 20,1 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, se trataron con 1,2 equiv (0,13 mmol, 16,51 mg) de 4-fluorobenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μl) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se irradió con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvieron 27,8 mg (67%) del producto **4b** como un sólido de color azul oscuro (pf: 234 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.58 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.7, 5.4$ Hz, 2H), 7.13 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.76 (s, 1H, NH), 1.47 (s, 9H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.5 (C), 166.5 (C), 161.7 (C, $^1J_{\text{C-F}} = 246$ Hz), 159.1 (C), 143.3 (C), 142.5 (C), 141.8 (C), 133.2 (CH), 131.2 (CH x 2, $^3J_{\text{C-F}} = 7.9$ Hz), 130.5 (C), 126.2

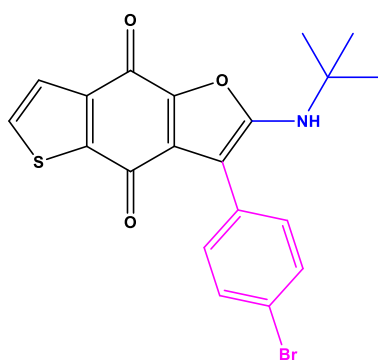
(CH), 125.8 (C, $^4J_{\text{C-F}} = 2.9$ Hz), 115.09 (CH x 2, $^2J_{\text{C-F}} = 21.3$ Hz), 100.5 (C), 54.0 (C), 30.0 (CH_3 x 3).

EM-EI m/z (%): 369 ($[\text{M}^+]$, 50); 315 (29); 314 (49); 313 (100); 312 (28); 257 (21); 57 (50).

EMAR: 369.0829 (calculado para $C_{20}H_{16}NO_3SF [M^+]$ 369.0835)

3-(4-bromofenil)-2-(tert-butilamino)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4c).

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,3 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 24,61 mg) de 4-bromobenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μ l) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación de microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvieron 26,7 mg (55%) del producto **4c** como un sólido cristalino de color azul oscuro. La estructura se confirmó por 1H -RMN, ^{13}C -RMN, EM-EI m/z, EMAR y espectroscopia de rayos-x (pf: 237 °C).



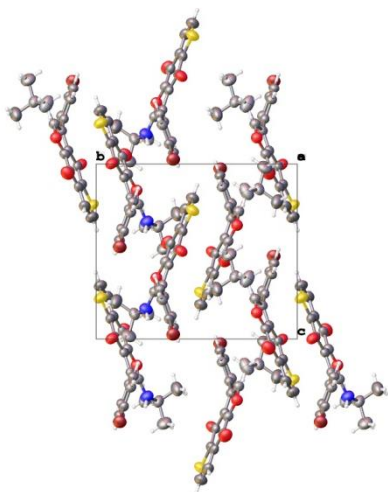
1H -RMN (δ , 500 MHz, $CDCl_3$): 7.59 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.81 (s, 1H, NH), 1.47 (s, 9H).

^{13}C -RMN (δ , 125 MHz, $CDCl_3$): 176.4 (C), 166.5 (C), 158.9 (C), 143.4 (C), 142.5 (C), 141.7 (C), 133.2 (CH), 132.0 (CH X 2), 131.0 (CH X 2), 130.2 (C), 129.0 (C), 126.2 (CH), 121.7 (C),

100.1 (C), 54.1 (C), 30.0 (CH₃ X 3).

EM-EI m/z (%): 431 ($[M^+]$, 40); 429 (40); 376 (43); 375 (76); 374 (44); 373 (89); 294 (100); 266 (21); 239 (21); 209 (29); 57 (66).

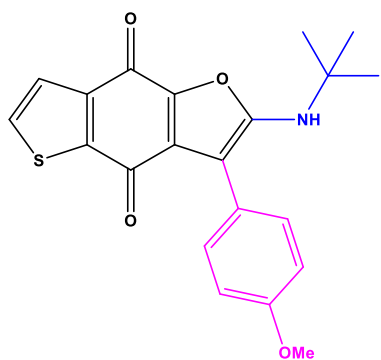
EMAR: 431.0011 (calculado para $C_{20}H_{16}NO_3S^{81}Br$ 431.0014); 429.0038 (calculado para $C_{20}H_{16}NO_3S^{79}Br$ 429.0034)



Datos del cristal: sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/n$, $a=12.0231(6)$ Å, $b=13.5263(7)$ Å, $\beta=106.531(5)^\circ$, $\alpha=\gamma=90^\circ$, $V=1910.64(18)$ Å³, $\rho_{\text{calculada}}=1.496$ gcm⁻³. Índice R finales: $wR_2=0.1175$ y $R_1=0.0434$ para las 1841 reflexiones observadas de las 3722 independientes y 7561 reflexiones medidas ($\theta_{\text{max}}=73.457^\circ$, $I > 2(I)$). $\mu(\text{CuK}\alpha)=4.117$ mm⁻¹ a esta longitud de onda ($\lambda=1.542$ Å) y las transmisiones mínima y máxima son 0.764 y 0.994.

2-(*tert*-butilamino)-3-(4-metoxifenil)tieno[2,3-*f*]benzofuran-4,8-diona (4d).

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, se tratan con 1,2 equiv (0,13 mmol, 17 µl) de 4-metoxibenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 µl) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 26,9 mg (64%) del producto **4d** como un sólido amorfo azul oscuro (pf: 174 °C).



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 7.57 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.82 (sa, 1H, NH), 3.84 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

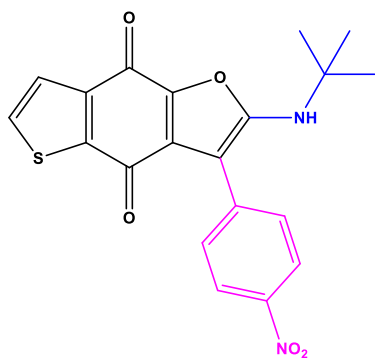
¹³C-RMN (δ, 125 MHz, CDCl₃): 176.6 (C), 166.2 (C), 159.3 (C), 159.2 (C), 143.1 (C), 142.5 (C), 142.0 (C), 133.0 (CH), 130.6 (CH x 2), 130.6 (C), 126.2 (CH), 122.0 (C), 114.4 (CH x 2), 101.6 (C), 55.3 (CH₃), 54.0 (C), 30.0 (CH₃).

EM-EI m/z (%): 381 ([M⁺], (100)); 327 (64); 326 (56); 325 (100); 324 (58); 310 (70); 394 (100); 159 (40).

EMAR: 381.1038 (calculado para C₂₁H₁₉NO₄S [M⁺] 381.1035).

2-(tert-butilamino)-3-(4-nitrofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4e).

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,3 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 20,1 mg) de 4-nitrobenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μ l) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 27,6 mg (62%) del producto **4e** como un sólido amorfo de color verde oscuro (pf: 272 °C).



¹H-RMN (δ , 500 MHz, CDCl₃): 8.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.92 (sa, 1H, NH), 1.51 (s, 9H).

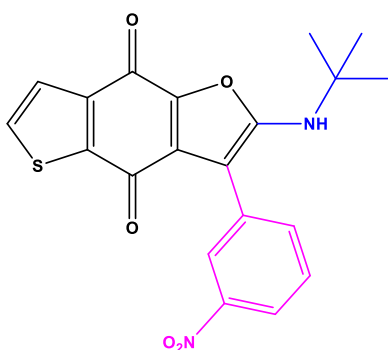
¹³C-RMN (δ , 125 MHz, CDCl₃): 176.2 (C), 166.9 (C), 158.9 (C), 146.6 (C), 144.0 (C), 142.7 (C), 141.4 (C), 137.5 (C), 133.49 (CH), 129.87 (CH x 2), 129.8 (C), 126.3 (CH), 124.1 (CH x 2), 98.6 (C), 54.4 (C), 30.0 (CH₃ x 3).

EM-IE m/z (%): 396 ([M⁺], 43); 342 (28); 341 (61); 340 (100); 294 (38); 293 (34).

EMAR: 396,0779 (calculado para C₂₀H₁₆N₂O₅S [M⁺] 396,0780).

2-(tert-butilamino)-3-(3-nitrofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4f).

Siguiendo el procedimiento general descrito, 19,9 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 20,3 mg) de 3-nitrobenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μ l) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 20,4 mg (47%) del producto **4f** como un sólido amorfo de color violeta (pf: 198 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 8.31 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.15 (ddd, $J = 8.3, 2.3, 1.0$ Hz, 1H), 7.82 (dt, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.63-7.57 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.86 (sa, 1H, NH), 1.50 (s, 9H).

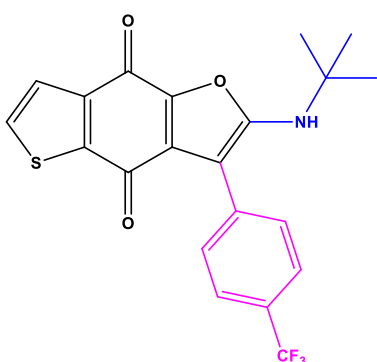
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.3 (C), 166.8 (C), 158.9 (C), 148.5 (C), 143.6 (C), 142.5 (C), 141.5 (C), 135.6 (CH), 133.5 (CH), 132.0 (C), 130.0 (C), 129.7 (CH), 126.3 (CH), 124.0 (CH), 122.4 (CH), 98.6 (C), 54.4 (C), 30.0 ($\text{CH}_3 \times 3$).

EM-EI m/z (%): 396 ($[\text{M}^+]$, 15); 341 (21); 340 (100); 57 (52).

EMAR: 396.0783 (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}^+]$ 396.0780).

2-(*tert*-butilamino)-3-[4-(trifluorometil)fenil]tieno[2,3-*f*]benzofuran-4,8 diona (4g).

Seguendo el procedimiento general descrito 20,4 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv de 4-(trifluorometil)benzaldehído (0,13 mmol, 19 μl), 1,2 equiv de *t*-butil isonitrilo (0,13 mmol, 15 μl) y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvieron 33,3 mg (70 %) del producto **4g** como un sólido amorfo de color azul-violáceo (pf: 233 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.82 (sa, 1H, NH), 1.49 (s, 9H).

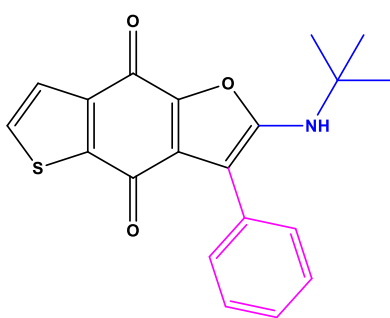
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 176.3 (C), 166.7 (C), 159.0 (C), 143.6 (C), 141.6 (C), 134.0 (C), 133.3 (CH), 130.2 (C), 129.6 (CH $\times 2$, $^4J_{\text{CF}} = 1\text{Hz}$), 129.5 (C, $^2J_{\text{CF}} = 32.5$ Hz), 126.2 (CH), 125.8 (CH $\times 2$, $^3J_{\text{CF}} = 3.7$ Hz), 124.1 (C, $^1J_{\text{CF}} = 270.3\text{Hz}$), 99.6 (C), 54.2 (C), 30.0 ($\text{CH}_3 \times 3$).

EM-EI m/z (%): 419 ($[\text{M}^+]$, 14); 364 (23); 363 (100); 294 (18); 69 (32).

EMAR: 419.0780 (Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{F}_3\text{S}$ $[\text{M}^+]$ 419.0803)

2-(tert-butilamino)-3-fenil-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4h).

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,3 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, se trataron con 1,2 equiv (0,13 mmol, 14 μ l) de benzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μ l) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 25 mg (63%) del producto **4h** como un sólido amorfo de color azul oscuro (pf: 207 °C).



¹H-RMN (δ , 500 MHz, CDCl₃): 7.58 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.48-7.44 (m, 4H), 7.36 (m, 1H), 4.87 (sa, 1H, NH), 1.47 (s, 9H).

¹³C-RMN (δ , 125 MHz, CDCl₃): 176.5 (C), 166.5 (C), 159.2 (C), 143.3 (C), 142.6 (C), 141.8 (C), 133.0 (CH), 130.6 (C), 130.0 (C), 129.3 (CH x 2), 128.9 (CH x 2), 127.8 (CH), 126.2

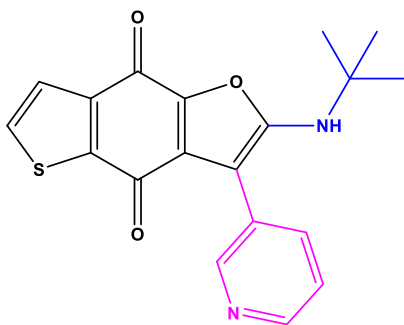
(CH), 101.5 (C), 54.0 (C), 30.0 (CH₃ x 3).

EM-EI m/z (%): 351 ([M⁺],(100)); 278 (63); 277 (22); 269 (21); 268 (62); 267 (46); 266 (26); 240 (21); 239 (78); 238 (37); 211 (47); 210 (58); 184 (34); 139 (53); 129 (73); 111 (22); 110 (24); 57 (100).

EMAR: 351.0931 (calculado para C₂₀H₁₇NO₃S [M⁺] 351.0929).

2-(tert-butilamino)-3-(3-piridil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4i).

Siguiendo el procedimiento general descrito, 20,7 mg (0,12 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, se trataron con 1,2 equiv (0,13 mmol, 13 μ l) de 3-piridincarboxaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μ l) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de exclusión, usando una mezcla Hex:CH₂Cl₂:MeOH 2:1:1 como eluyente. Se obtuvieron 33,1 mg (82 %) del producto **4i** como un sólido amorfo azul. (pf: 185 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 8.66 (sa, 1H), 8.54 (sa, 1H), 7.85 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.65-7.51 (m, 2H), 7.38 (s, 1H), 4.97 (s, 1H, NH), 1.48 (s, 9H).

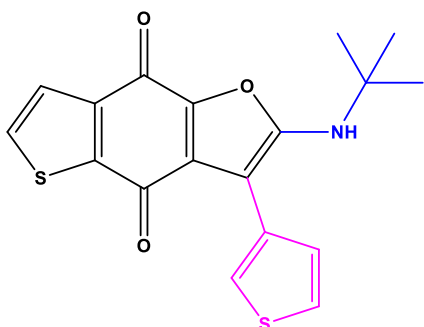
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.4 (C), 166.6 (C), 159.1 (C), 149.4 (CH), 148.5 (CH), 143.6 (C), 142.5 (C), 141.7 (C), 137.7 (CH), 133.3 (CH), 130.5 (C), 126.7 (C), 126.3 (CH), 123.6 (CH), 97.3 (C), 54.3 (C), 30.0 ($\text{CH}_3 \times 3$).

EM-EI m/z (%): 352 ($[\text{M}^+]$, 14); 297 (20); 296 (100); 57 (41); 55 (19).

EMAR: 352.0896 (calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}^+]$ 352.0882).

2-(tert-butylamino)-3-(3-tiofenil)thieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4J)

Seguendo el procedimiento general descrito, se disolvieron 20,1 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, y fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 12 μl) de tiofeno-3-carbaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μl) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía en placa preparativa, usando CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvieron 26,7 mg (67%) del producto **4j** como un sólido amorfo de color azul (Pf: 181°C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.59 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.47 (dd, $J = 2.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 4.9, 2.9$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 5.0, 1.3$ Hz, 1H), 4.94 (sa, 1H, NH), 1.50 (s, 9H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.6 (C), 166.4 (C), 159.3 (C), 143.0 (C), 142.6 (C), 141.8 (C), 133.1 (CH), 130.3 (C), 130.1 (C), 128.4 (CH), 126.2 (CH), 126.0 (CH),

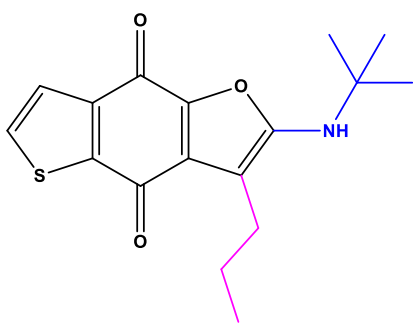
123.4 (CH), 96.9 (C), 54.1 (C), 30.0 ($\text{CH}_3 \times 3$).

EM-EI m/z (%): 357 ($[\text{M}^+]$, 20); 302 (20); 301 (100); 57(18).

EMAR: 357.0483 (Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}_2$ $[\text{M}^+]$ 357.0493).

2-(tert-butilamino)-3-propil-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4k).

Siguiendo el procedimiento general descrito 19,6 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, se trataron con 1,2 equiv (0,13 mmol, 13 μ l) de butiraldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μ l) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 20,0 mg (58 %) del producto **4k** como un sólido amorfo de color azul (pf: 181°C).



¹H-RMN (δ , 500 MHz, CDCl₃): 7.57 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.15 (sa, 1H, NH), 2.51 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C-RMN (δ , 125 MHz, CDCl₃): 177.5 (C), 166.1 (C), 159.4 (C), 143.1 (C), 142.4 (C), 142.1 (C), 132.8 (CH), 132.0 (C), 126.3 (CH), 103.4 (C), 53.9 (C), 30.2 (CH₃ x 3), 24.6

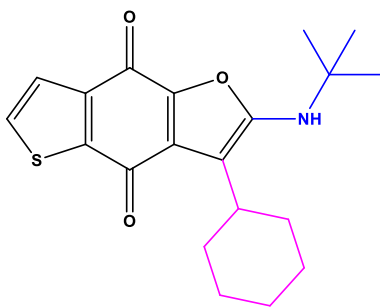
(CH₂), 22.6 (CH₂), 13.9 (CH₃).

EM-EI m/z (%):317 ([M⁺], 50); 263 (22); 262 (49); 261 (100); 234 (22); 233 (42); 232 (85); 219 (28); 57 (71).

EMAR: 317.1096 (calculado para C₁₇H₁₉NO₃S [M⁺] 317.1086).

2-(tert-butilamino)-3-ciclohexil-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4l).

Siguiendo el procedimiento general descrito, 20,5 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, se trataron con 1,2 equiv (0,13 mmol, 17 μ l) de ciclohexanaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 15 μ l) de *t*-butil isonitrilo y cantidades catalíticas de EDDA (0,01 mmol, 2 mg). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 33,3 mg (82%) del producto **4l** como un sólido amorfo de color azul (pf: 216 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.56 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.17 (sa, 1H, NH), 2.65 (tt, $J = 12.2, 3.6$ Hz, 1H), 1.88-1.64 (m, 8H), 1.44 (s, 9H), 1.36 (t, $J = 9.1$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 177.3 (C), 166.6 (C), 158.1 (C), 143.9 (C), 142.9 (C), 141.7 (C), 132.8 (CH), 131.3 (C), 126.1 (CH), 109.4 (C), 54.0 (C), 34.4 (CH), 31.0 (C), 31.0 ($\text{CH}_2 \times 2$), 30.3 ($\text{CH}_3 \times 3$), 26.8 ($\text{CH}_2 \times 2$), 25.8 (CH_2).

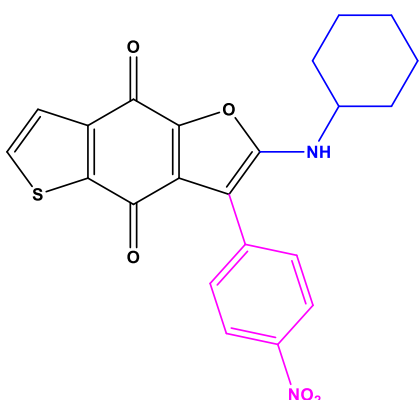
EM-EI m/z (%): 357 ($[\text{M}^+]$, 43); 303 (24); 302 (53); 301 (100); 258 (32); 233 (32); 232 (63); 57 (52).

EMAR: 357.1393 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}^+]$ 357.1399).

SERIE II

2-(ciclohexilamino)-3-(4-nitrofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4m).

Seguendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona, en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 16,37 mg) de 4-nitrobenzaldehído, 1,2 equiv de ciclohexilisocianuro (0,13 mmol, 17 μl) y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto de la reacción fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa usando CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvieron 30,1 mg (64%) del producto **4m** como un sólido amorfo de color verde oscuro (pf: 219 °C).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, CDCl_3): 8.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 3.85 (m, 1H), 2.08 (m, 2H), 1.77 (dt, $J = 13.5, 3.4$ Hz, 2H), 1.67 (dt, $J = 12.5, 3.5$ Hz, 1H), 1.44 (m, 2H), 1.25 (m, 3H).

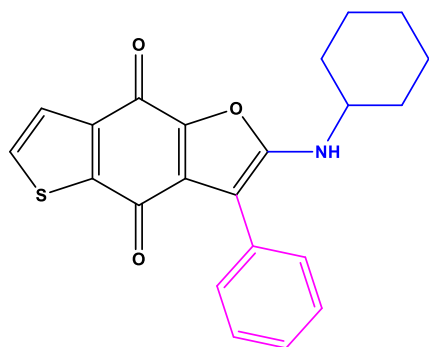
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.3(C), 166.9 (C), 158.7 (C), 146.6 (C), 143.2(C), 142.6 (C), 141.4 (C), 137.4 (C), 133.5(CH), 130.5 (C), 129.8 (CH $\times 2$), 126.3 (CH), 124.1 (CH $\times 2$), 97.2 (C), 52.5 (C), 33.9 ($\text{CH}_2 \times 2$), 25.3 (CH_2), 24.7($\text{CH}_2 \times 2$).

EM-EI m/z (%): 422 ([M⁺], 78); 341 (30); 340 (100); 69 (25); 55 (24).

EMAR: 422.0934 (Calculado para C₂₂H₁₈N₂O₅S [M⁺] 422.0936)

2-(ciclohexilamino)-3-feniltieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4n).

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,2 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 14 µl) de benzaldehído, 1,2 equiv de ciclohexilisonitrilo (0,13 mmol, 17 µl) y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 31 mg (73%) del producto **4n** como un sólido amorfo de color azul (pf: 207 °C).



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 7.59 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.50 – 7.42 (m, 4H), 7.35 (tt, *J* = 6.5, 1.8 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 3.82 (m, 1H), 2.06 (dd, *J* = 12.5, 3.4 Hz, 2H), 1.75 (dt, *J* = 13.5, 3.6 Hz, 2H), 1.65 (dt, *J* = 12.9, 3.7 Hz, 1H), 1.42 (m, 2H), 1.21 (m, 3H).

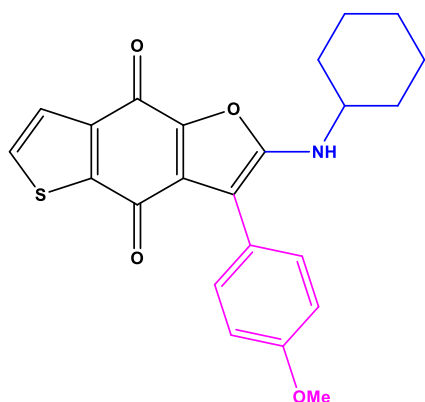
¹³C-RMN (δ, 125 MHz, CDCl₃): 176.5 (C), 166.4 (C), 158.9 (C), 142.5 (C), 142.5 (C), 141.9 (C), 133.1 (CH), 131.3 (C), 129.9 (C), 129.3 (CH x 2), 128.8 (CH x 2), 127.7 (CH), 126.3 (CH), 100,0 (C), 52.27 (CH), 33.9 (CH₂ x 2), 25.3 (CH₂), 24.7 (CH₂ x 2).

EM-EI m/z (%): 377 ([M⁺], 69); 296 (23); 295 (100); 69 (21).

EMAR: 377.1092 (Calculado para C₂₂H₁₉NO₃S [M⁺] 377.1086).

2-(ciclohexilamino)-3-(4-metoxifenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4o).

Siguiendo el procedimiento general descrito, 20,4 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 17 µl) de 4-metoxibenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 17 µl) de ciclohexilisonitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 26,7 mg (58%) del producto **4o** como un sólido amorfo de color azul (pf: 155 °C).



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 7.58 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 3.84 (s, 3H), 3.80 (m, 1H), 2.05 (dd, *J* = 12.5, 3.3 Hz, 2H), 1.74 (dt, *J* = 13.5, 3.5 Hz, 2H), 1.64 (dt, *J* = 13.1, 3.8 Hz, 1H), 1.41 (m, 2H), 1.29-1.12 (m, 3H).

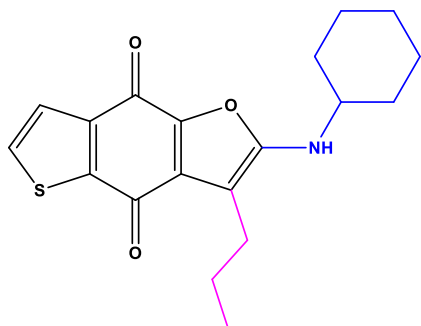
¹³C-RMN (δ, 125 MHz, CDCl₃): 176.7 (C), 166.1 (C), 159.1 (C), 159.0 (C), 142.3 (C), 142.2 (C), 142.1 (C), 133.0 (CH), 131.4 (C), 130.5 (CH), 126.3 (CH), 121.9 (C), 114.3 (CH), 100.1 (C), 55.3 (CH₃), 52.3 (CH), 33.9 (CH₂ x 2), 25.4 (CH₂), 24.7 (CH₂ x 2).

EM-EI m/z (%): 407 ([M⁺] 100), 407 (100), 326 (57); 325 (100); 324 (26); 324 (26); 310 (29); 296 (21); 294 (56); 135 (44); 55 (45).

EMAR: 407.1188 (Calculado para C₂₃H₂₁NO₄S [M⁺] 407.1191).

2-(ciclohexilamino)-3-propiltieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4p).

Seguendo el procedimiento general descrito 20,3 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv. (0,13 mmol, 13 μl) de butiraldehído, 1,2 equiv. (0,13 mmol, 17 μl) de ciclohexilisonitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 27,2 mg (70%) del producto **4p** como un sólido amorfo de color azul (pf: 179 °C).



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 7.58 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 3.77 (m, 1H), 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.07 (dd, *J* = 12.5, 3.4 Hz, 2H), 1.77 (dt, *J* = 13.5, 3.6 Hz, 2H), 1.66 (dt, *J* = 12.9, 3.6 Hz, 1H), 1.58 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.29-1.16 (m, 3H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C-RMN (δ, 125 MHz, CDCl₃): 177.6 (C), 165.5 (C), 159.5 (C), 142.6 (C), 141.7 (C), 141.7 (C), 133.1 (CH), 132.9 (C), 126.4 (CH), 100.9 (C), 52.5 (CH), 34.1 (CH₂ x 2), 25.4 (CH₂), 24.8 (CH₂), 24.4 (CH₂ x 2), 22.6 (CH₂), 13.9 (CH₃).

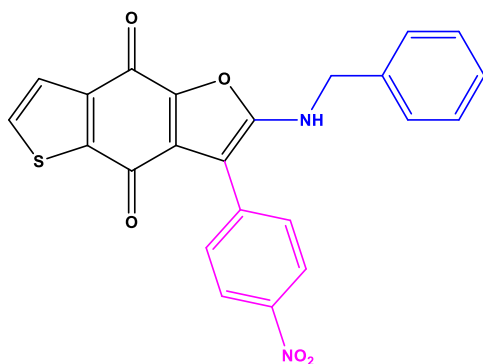
EM-EI m/z (%): 343 ([M⁺] 100); 343 (100); 314 (36); 262 (49); 261 (100); 261(100); 234 (21); 233(48); 232 (100); 232 (100); 219 (30); 55 (64).

EMAR: 343.1243 (Calculado para C₁₉H₂₁NO₃S [M⁺] 343.1242).

SERIE III

2-(benzilamino)-3-(4-nitrofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4q).

Seguendo el procedimiento general descrito 20,3 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 20,1 mg) de 4-nitrobenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 17 µl) de bencilsonitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120 °C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 23,2 mg (48%) del producto **4q** como un sólido amorfo de color verde oscuro (pf: 234 °C).



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 8.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.68 –7.62 (m, 3H), 7.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.41 – 7.31 (m, 5H), 5.22 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.68 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H).

¹³C-RMN (δ, 125 MHz, CDCl₃): 176.2 (C), 167.2 (C), 158.6 (C), 146.6 (C), 143.5 (C), 142.8 (C), 141.2 (C), 137.0 (C), 136.7 (C), 133.6 (CH), 130.4 (C), 129.8 (CH x 2), 129.1 (CH x 2), 128.4 (CH), 127.9 (CH x 2), 126.3 (CH), 124.0 (CH x 2), 97.5 (C), 47.6 (CH₂).

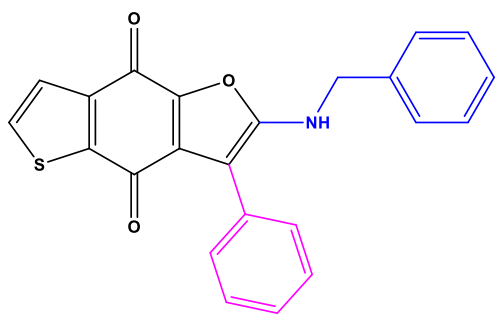
EM-EI m/z (%): 430 ([M⁺], 100); 428 (40); 92 (34); 91 (100); 65 (20).

EMAR: 430.0620 (Calculado para C₂₃H₁₄N₂O₅S [M⁺] 430.0623).

2-(benzilamino)-3-feniltieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4r).

Seguendo el procedimiento general descrito 20,2 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 14 µl) de

benzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 17 μ l) de bencilsonitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120 $^{\circ}$ C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvieron 34,4 mg (80%) del producto **4r** como un sólido amorfo de color azul (pf: 140 $^{\circ}$ C).



^1H -RMN (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.59 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.55 (dt, $J = 5.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.48 – 7.44 (m, 2H), 7.41 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.38-7.28 (m, 6H), 5.22 (sa, 1H, NH), 4.64 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H).

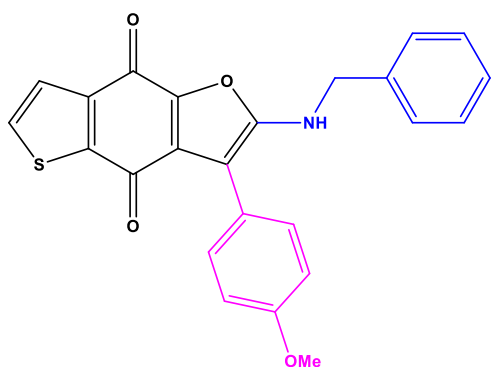
^{13}C -RMN (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.4 (C), 166.7 (C), 158.8 (C), 142.8 (C), 142.7 (C), 141.7 (C), 137.3 (C), 133.1 (CH), 131.2 (C), 129.6 (C), 129.3 (CH x 2), 129.0 (CH x 2), 128.8 (CH x 2), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 127.8 (CH x 2), 126.2 (CH), 100.2 (C), 47.4 (CH_2).

EM-EI m/z (%): 385 ($[\text{M}^+]$, 83); 266 (30); 129 (19); 91 (100).

EMAR: 385.0768 (Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}^+]$ 385.0773).

2-(benzilamino)-3-(4-metoxifenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4s).

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,1 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol; 17 μ l) de 4-metoxibenzaldehído, 1,2 equiv (0,13 mmol, 17 μ l) de bencilsonitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120 $^{\circ}$ C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvieron 28,5 mg (61%) del producto **4s** como un sólido amorfo de color azul verdoso (pf: 168 $^{\circ}$ C).



^1H -RMN (δ , 500 MHz, CDCl_3): 7.59 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.43-7.28 (m, 7H), 6.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.15 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 4.64 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H).

^{13}C -RMN (δ , 125 MHz, CDCl_3): 176.5 (C), 166.5 (C), 159.2 (C), 158.8 (C), 142.6 (C), 142.6 (C), 141.8 (C), 137.3 (C), 133.1 (CH), 131.3 (C), 130.5 (CH x 2),

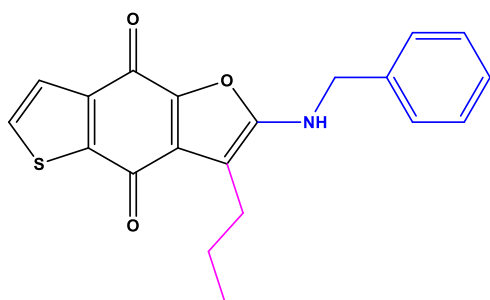
129.0 (CH x 2), 128.1 (CH), 127.8 (CH x 2), 126.22 (CH), 121.50 (C), 114.3 (CH x 2), 100.23 (C), 55.3 (CH₃), 47.4 (CH₂).

EM-EI m/z (%): 415 ([M⁺], 100); 413 (20); 324 (41); 297 (40); 296 (95); 269 (23); 241 (22); 159 (33); 91 (75).

EMAR: 415.0889 (Calculado para C₂₄H₁₇NO₄S [M⁺] 415.0878).

2-(benzilamino)-3-propiltieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (4t).

Siguiendo el procedimiento general descrito 19,9 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona en 2 mL de EtOH, fueron tratados con 1,2 equiv (0,13 mmol, 13 µl) de butiraldehído, 1,2 equiv de (0,13 mmol, 17 µl) de bencilisonitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 2 mg) de EDDA. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 15 minutos. El producto fue purificado mediante cromatografía de placa preparativa, usando CH₂Cl₂ como eluyente. Se obtuvieron 27,9 mg (72%) del producto **4t** como un sólido amorfo de color azul (pf: 166 °C).



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 7.59 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.40-7.29 (m, 5H), 4.64 (m, 3H), 2.53 (t, *J* = 14.7 Hz, 2H), 1.57 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-RMN (δ, 125 MHz, CDCl₃): 177.5 (C), 166.1 (C), 159.3 (C), 142.3 (C), 142.2 (C), 142.0 (C), 137.6 (C), 133.0 (CH), 132.99, 129.0 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 126.3 (CH), 100.8 (C), 47.7 (CH₂), 24.3 (CH₂), 22.6 (CH₂), 13.8 (CH₃).

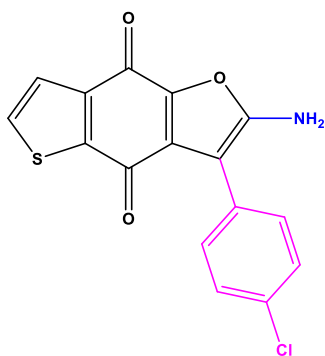
EM-EI m/z (%): 351 ([M⁺], 50); 322 (28); 92 (29); 91 (100).

EMAR: 351.0932 (Calculado para C₂₀H₁₇NO₃S [M⁺] 351.0929).

5.6.5.- Síntesis de 2-amino-3-(4-clorofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (5a).

Para la preparación de este compuesto, 12,3 mg (0,03 mmol) del derivado **5a** se trataron con 1,2 equiv. (0,04 mmol, 23,7 mg) de triflato de yterbio (III). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C durante 6h. A continuación, el producto se purificó por cromatografía de placa preparativa, haciendo un doble recorrido del disolvente. Primero se eluyó con CH₂Cl₂

y a continuación con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH al 5%. Se obtuvieron 7,9 mg (75 %) del producto **5a** como un sólido amorfo de color verde claro (pf: 260 °C).



¹H-RMN (δ, 500 MHz, CDCl₃): 7.62 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.79 (sa, 2H, NH₂).

¹H-RMN (δ, 500 MHz, DMSO): 8.05 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.58 (sa, 2H, NH₂), 7.52 – 7.47 (m, 3H), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H).

¹³C-RMN (δ, 125 MHz, DMSO): 176.1 (C), 165.3 (C), 160.7 (C), 141.8 (C), 141.2 (C), 141.0 (C), 135.0 (CH), 131.4 (C), 131.3 (CH x 2), 130.7 (C), 128.8 (C), 128.0 (CH x 2), 125.6 (CH), 96.8 (C).

EM-EI m/z (%): 330 ([M⁺], 31); 329 (100); 294 (42); 147 (20).

EMAR: 328.9913 (Calculado para C₁₆H₈NO₃S³⁵Cl 328.9913); 330.9893 (Calculado para C₁₆H₈NO₃S³⁷Cl 330.9884).

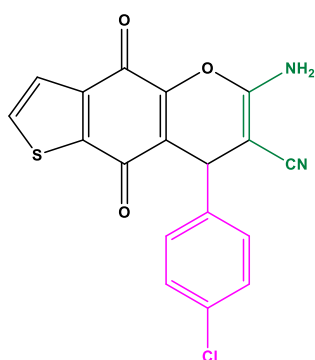
5.6.6.- Procedimiento general para la síntesis de compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo.

En un tubo de microondas 20 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona se disolvieron en 2 mL de EtOH y fueron tratados con 1,0 equiv. (0,11 mmol) de aldehído, 1,0 equiv. (0,11 mmol) de malononitrilo y cantidades catalíticas de Et₃N (0,01 mmol, 10%). La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. Una vez finalizada la reacción, en algunos casos el producto se pudo obtener puro tras precipitar en agua, mientras que en otros se purificaron por placa preparativa, utilizando en todos los casos DCM:MeOH al 10 % como eluyente.⁴⁹

6-amino-8-(4-clorofenil)-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo (7a)

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 15,6 mg) de 4-cloro-benzaldehído, 1,0 equiv de (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μl) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con

microondas a 120°C, durante 10 minutos. Finalizada la reacción se añadieron 2 ml de agua destilada al tubo de microondas y este se sumergió en un baño agua hielo para favorecer la precipitación del producto. A continuación, el producto se filtró a vacío y se lavó con una pequeña cantidad de la mezcla etanol:agua 1:1, obteniendo un sólido puro. El filtrado contenía parte disuelta del producto, por lo que este se llevó a sequedad y se purificó mediante cromatografía de placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. En total se obtuvieron 22,1 mg (54 %) de **7a** como un sólido de color naranja. (pf: 231 °C).

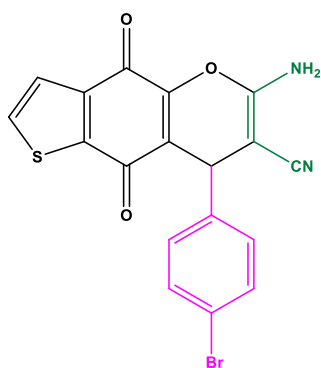


¹H-RMN (δ, 600 MHz, DMSO): 8.11 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.44 – 7.26 (m, 6H), 4.60 (s, 1H).

¹³C-RMN (δ, 151 MHz, DMSO): 178.0 (C), 173.5 (C), 158.9 (C), 149.0 (C), 143.0 (C), 142.7 (C), 139.6 (C), 135.7 (CH), 132.2 (C), 130.1 (CH x 2), 129.0 (CH x 2), 126.3 (CH), 120.9 (C), 119.6 (C), 57.5 (C), 36.4 (CH).

6-amino-8-(4-bromofenil)-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo (7b).

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 20,5 mg) de 4-bromo-benzaldehído, 1,0 equiv (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μl) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. Finalizada la reacción se añadieron 2 ml de agua destilada al tubo de microondas y éste se sumergió en un baño agua hielo para favorecer la precipitación del producto. A continuación, el producto se filtró a vacío y se lavó con una pequeña cantidad de la mezcla etanol:agua 1:1 obteniendo un sólido puro. El filtrado contenía parte disuelta del producto, por lo que este se llevó a sequedad y se purificó mediante cromatografía de placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. En total se obtuvieron 14,5 mg (32 %) de **7b** como un sólido de color naranja (pf: 242 °C).



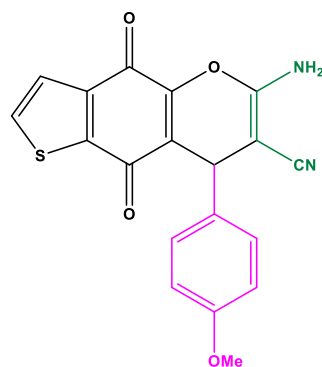
$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, DMSO): 8.12 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.37 (sa, 2H, NH_2), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.58 (s, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 151 MHz, DMSO): 177.7 (C), 173.0 (C), 158.3 (C), 148.5 (C), 143.0 (C), 142.2 (C), 139.1 (C), 135.2 (CH), 131.4 (CH x 2), 130.0 (CH x 2), 125.78 (CH), 120.3 (C), 120.2 (C), 119.1 (C),

56.9 (C), 36.0 (CH).

6-amino-8-(4-metoxifenil)-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo (7c)

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotieno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 13 μl) de 4-metoxibenzaldehído, 1,0 equiv (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μl) de Et_3N . La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. Finalizada la reacción se añadieron 2 ml de agua destilada al tubo de microondas y éste se sumergió en un baño agua hielo para favorecer la precipitación del producto. A continuación, el producto se filtró a vacío y se lavó con una pequeña cantidad de la mezcla etanol:agua 1:1 obteniendo un sólido puro. El filtrado contenía parte disuelta del producto, por lo que este se llevó a sequedad y se purificó mediante cromatografía de placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. En total se obtuvieron 7,68 mg (19 %) de **7c** como un sólido de color naranja (pf: 219 °C).

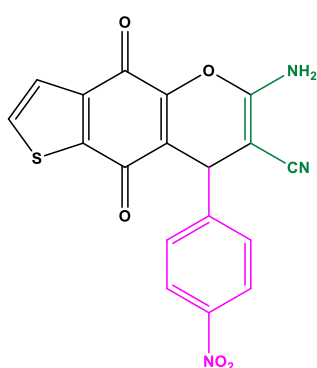


$^1\text{H-RMN}$ (δ , 500 MHz, DMSO): 8.10 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.27 (sa, 2H, NH_2), 7.21 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.51 (s, 1H), 3.72 (s, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 126 MHz, DMSO): 177.8 (C), 173.2 (C), 158.3 (C), 158.3 (C), 148.0 (C), 142.3 (C), 139.0 (C), 135.6 (C), 135.2 (CH), 128.8 (CH x 2), 125.8 (CH), 121.1 (C), 119.3 (C), 113.9 (CH x 2), 57.6 (C), 55.0 (CH_3), 35.6 (CH).

6-amino-8-(4-nitrofenil)-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo (7d)

Seguendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 ml de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 16,8 mg) de 4-nitrobenzaldehído, 1,0 equiv de (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μ l) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. A continuación, la mezcla se reacción se concentró y se purifico mediante cromatografía de placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. Se obtuvieron 15,4 mg (37 %) de **7d** como un sólido de color naranja (pf: 214 °C).

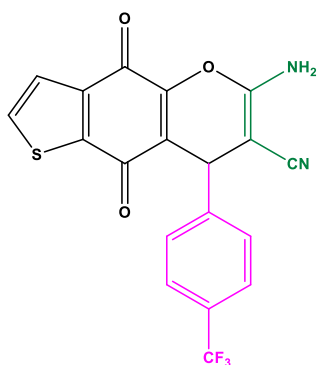


¹H-RMN (δ , 500 MHz, DMSO) 8.19 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.12 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.67 – 7.61 (m, 3H), 7.46 (sa, 2H, NH₂), 4.78 (s, 1H).

¹³C-RMN (δ , 126 MHz, DMSO) 177.6 (C), 172.9 (C), 158.4 (C), 150.9 (C), 148.9 (C), 146.6 (C), 142.1 (C), 139.1 (C), 135.3 (CH), 129.1 (CH x 2), 125.8 (CH), 123.7 (CH x 2), 119.6 (C), 118.9 (C), 56.3 (C), 54.9 (C), 36.4 (CH).

6-amino-4,9-dioxo-8-(4-(trifluorometil)fenil)-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo (7e)

Seguendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 15 μ l) de 4-trifluorometil-benzaldehído, 1,0 equiv de (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μ l) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. Finalizada la reacción se añadieron 2 ml de agua destilada al tubo de microondas y este se sumergió en un baño agua hielo para favorecer la precipitación del producto. A continuación, el producto se filtró a vacío y se lavó con una pequeña cantidad de la mezcla etanol:agua (1:1), obteniendo un sólido puro. El filtrado contenía parte del producto disuelto, por lo que este se llevó a sequedad y se purifico mediante cromatografía de placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. En total se obtuvieron 20,5 mg (45 %) de **7e** como un sólido de color naranja (pf: 240 °C).

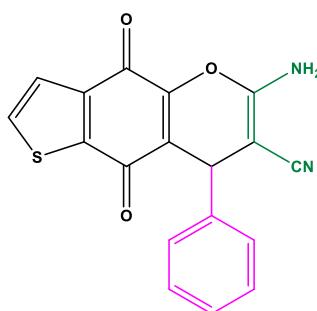


¹H-RMN (δ, 500 MHz, DMSO): 8.12 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.42 (s, 2H, NH₂), 4.71 (s, 1H).

¹³C-RMN (δ, 126 MHz, DMSO): 182.9 (C), 178.2 (C), 163.6 (C), 154.0 (C), 153.3 (C), 147.4 (C), 144.3 (C), 140.5 (CH), 133.8 (CH x 2, $^4J_{CF} = 0.9$ Hz), 132.9 (C, $^2J_{CF} = 31.5$ Hz), 131.0 (CH), 130.7 (CH x 2, $^3J_{CF} = 3.7$ Hz), 129.4 (C, $^1J_{CF} = 272.0$ Hz), 125.2 (C), 124.3 (C), 61.9 (C), 41.6 (CH).

6-amino-4,9-dioxo-8-fenil-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromene-7-carbonitrilo (7f)

Seguendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 11 μl) de benzaldehído, 1,0 equiv de (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μl) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. Finalizada la reacción se añadieron 2 ml de agua destilada al tubo de microondas y éste se sumergió en un baño agua hielo para favorecer la precipitación del producto. A continuación, el precipitado se centrifugó y el sobrenadante se desechó. Posteriormente, el sólido se lavó con una pequeña cantidad de la mezcla etanol:agua (1:1) obteniendo 16,1 mg (43 %) del producto **7f** como un sólido puro de color naranja (pf: 258 °C).



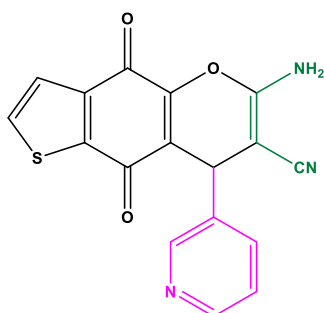
¹H-RMN (δ, 500 MHz, DMSO): 8.10 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 6H), 7.26 – 7.21 (m, 1H), 4.55 (s, 1H).

¹³C-RMN (δ, 126 MHz, DMSO): 177.7 (C), 173.1 (C), 158.4 (C), 148.4 (C), 143.5 (C), 142.2 (C), 139.0 (C), 135.2 (CH), 128.6 (CH x 2), 127.6 (CH x 2), 127.1 (CH), 125.8 (CH), 120.9 (C), 119,3 (C), 57.4 (C), 36.4 (CH).

6-amino-4,9-dioxo-8-(piridin-3-il)-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo (7g)

Seguendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 11 μl) de 3-piridincarboxaldehído, 1,0 equiv de (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y

cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μ l) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía de placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. Se obtuvieron 9,7 mg (26 %) de **7g** como un sólido de color naranja (pf: 211 °C).

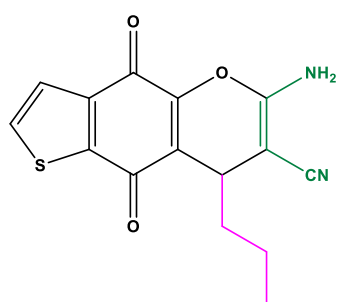


¹H-RMN (δ , 500 MHz, DMSO) 8.57 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.46 (dd, $J = 4.7, 1.6$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.75 (dt, $J = 7.9, 2.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.41 (s, 2H, NH₂), 7.36 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 1H), 4.66 (s, 1H).

¹³C-RMN (δ , 151 MHz, DMSO) 177.7 (C), 172.9 (C), 158.4 (C), 148.9 (C), 148.8 (CH x 2), 148.2 (CH), 142.1 (C), 139.1 (C), 139.1 (C), 135.4 (CH x 2), 135.2 (CH), 125.8 (CH), 123.8 (CH), 119.7 (C), 119.1 (C), 56.6 (C), 34.3 (CH).

6-amino-4,9-dioxo-8-propil-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo (7h)

Siguiendo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 10 μ l) de butiraldehído, 1,0 equiv de (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μ l) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía de placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. Se obtuvieron 5,0 mg (15 %) de **7h** como una cera de color marrón oscuro.



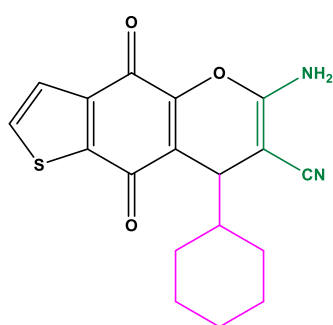
¹H-RMN (δ , 500 MHz, CDCl₃): 7.68 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.71 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 1.46 – 1.20 (m, 4H), 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

¹³C-RMN (δ , 126 MHz, CDCl₃): 177.8 (C), 173.0 (C), 159.1 (C), 148.9 (C), 143.4 (C), 138.7 (C), 133.6 (CH), 126.0 (CH), 124.0 (C), 118.7 (C), 59.7 (C), 38.0 (CH₂), 30.5 (CH), 18.4 (CH₂), 13.9 (CH₃).

6-amino-8-ciclohexil-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromene-7-carbonitrilo

(7i)

Seguindo el procedimiento general descrito 20,0 mg (0,11 mmol) de 5-hidroxi benzotiofeno-4,7-diona fueron disueltos en 2 mL de EtOH y tratados con 1,0 equiv (0,11 mmol, 13 μ l) de ciclohexanaldehído, 1,0 equiv de (0,11 mmol, 7,3 mg) de malononitrilo y cantidades catalíticas (0,01 mmol, 1 μ l) de Et₃N. La mezcla fue sometida a irradiación con microondas a 120°C, durante 10 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en placa preparativa, utilizando DCM:MeOH al 10 % como eluyente. Se obtuvieron 12,2 mg (32 %) de **7i** como un sólido de color naranja (pf: 216 °C).



¹H-RMN (δ , 500 MHz, DMSO) 8.13 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.29 (s, 2H, NH₂), 3.34 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.59 (m, 2H), 1.55 – 1.42 (m, 2H), 1.36 – 1.21 (m, 1H), 1.21 – 0.99 (m, 3H), 0.88 (m, 1H).

¹³C-RMN (δ , 126 MHz, DMSO) 178.0 (C), 173.0 (C), 161.2 (C), 149.5 (C), 142.5 (C), 139.0 (C), 135.1 (CH), 125.7 (CH), 122.6 (C), 120.7 (C), 51.8 (C), 44.2 (CH), 35.9 (CH), 30.3 (CH₂), 27.0 (CH₂), 26.1 (CH₂), 25.8 (CH₂), 25.5 (CH₂).

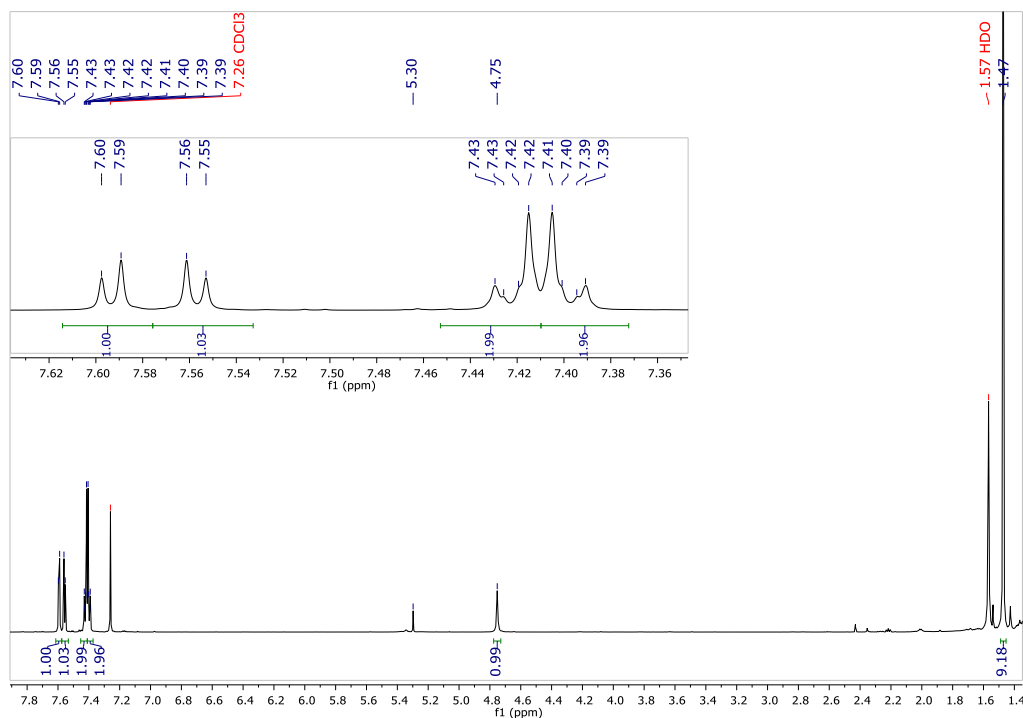
6.- Conclusiones:

- ❖ A partir de la quinona heterocíclica 5-hidroxi-benzotiofeno-4,7-diona y mediante reacciones multicomponentes se sintetizaron dos familias de compuestos como potenciales inhibidores de la diana oncogénica JAK-2.
- ❖ El acceso a la familia de compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona se realizó mediante la reacción multicomponente de la quinona heterocíclica, 5-hidroxi-benzotiofeno-4,7-diona, diferentes isonitrilos (*t*-butil-, ciclohexil- y bencilisonitrilo) y diferentes aldehídos tanto aromáticos como alifáticos. Se obtuvieron 21 compuestos de esta familia, con dos puntos de diversidad estructural y con rendimientos de moderados a buenos.
- ❖ A partir de los derivados tipo 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona, sintetizados con un grupo *t*-butilamino, es posible obtener nuevos análogos en los que el grupo amino se encuentra libre, como amina primaria.
- ❖ Mediante también una reacción multicomponente a partir de la quinona heterocíclica, 5-hidroxi-benzotiofeno-4,7-diona, malononitrilo y diferentes aldehídos aromáticos y alifáticos, se sintetizaron un total de 9 derivados tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo con rendimientos moderados.
- ❖ Todos los compuestos obtenidos, fueron caracterizados por ¹H-RMN y ¹³C-RMN, además se llevó a cabo un experimento bidimensional de HMBC para el compuesto **7b**. En el caso de los derivados 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona, estos también fueron caracterizados por espectrometría de masas. El compuesto **4c** pudo ser cristalizado y su estructura tridimensional se pudo confirmar por difracción de rayos-x. Además, se determinó el punto de fusión de todos los derivados sólidos.
- ❖ Los compuestos obtenidos fueron sometidos a estudios de modelización molecular tipo Docking. Algunos de los compuestos sintetizados, como el **4d**, **4i** o el **6f** entre otros, podrían tener buena actividad frente a la enzima JAK2, ya que poseen buenos valores de la función de Score.
- ❖ Gran número de compuestos de ambas familias presentaron valores apropiados de parámetros fisicoquímicos lo cual es indicativo de una buena administración como posibles fármacos de dichos derivados.

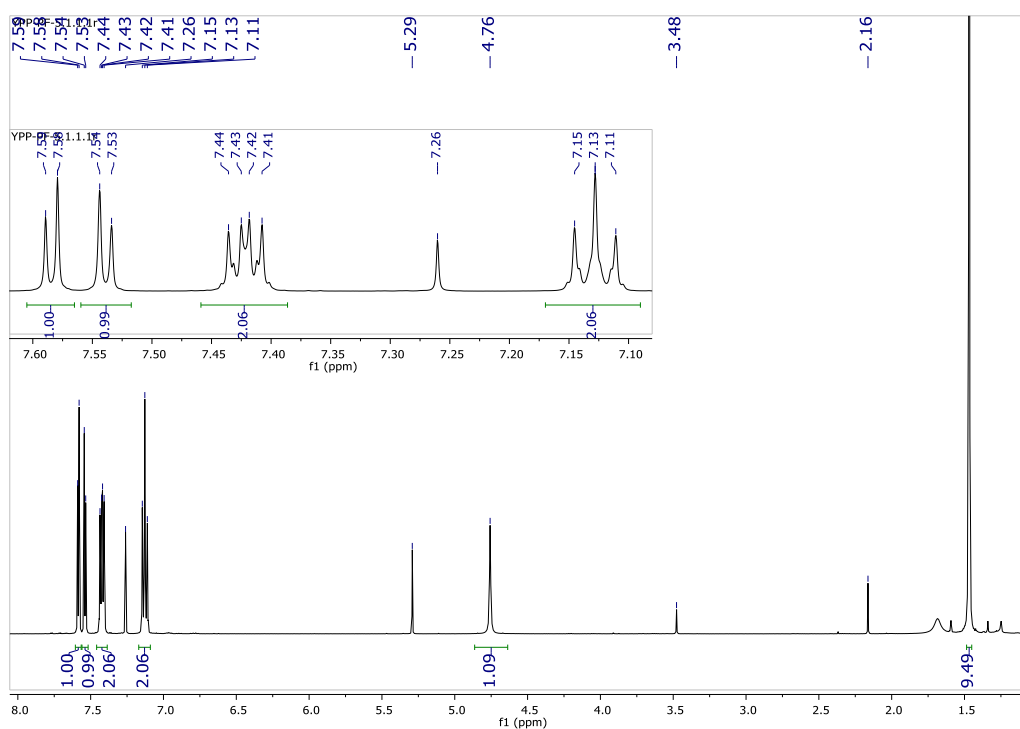
8.- Anexo de espectros seleccionados.

8.1.- Compuestos 2-amino-tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona:

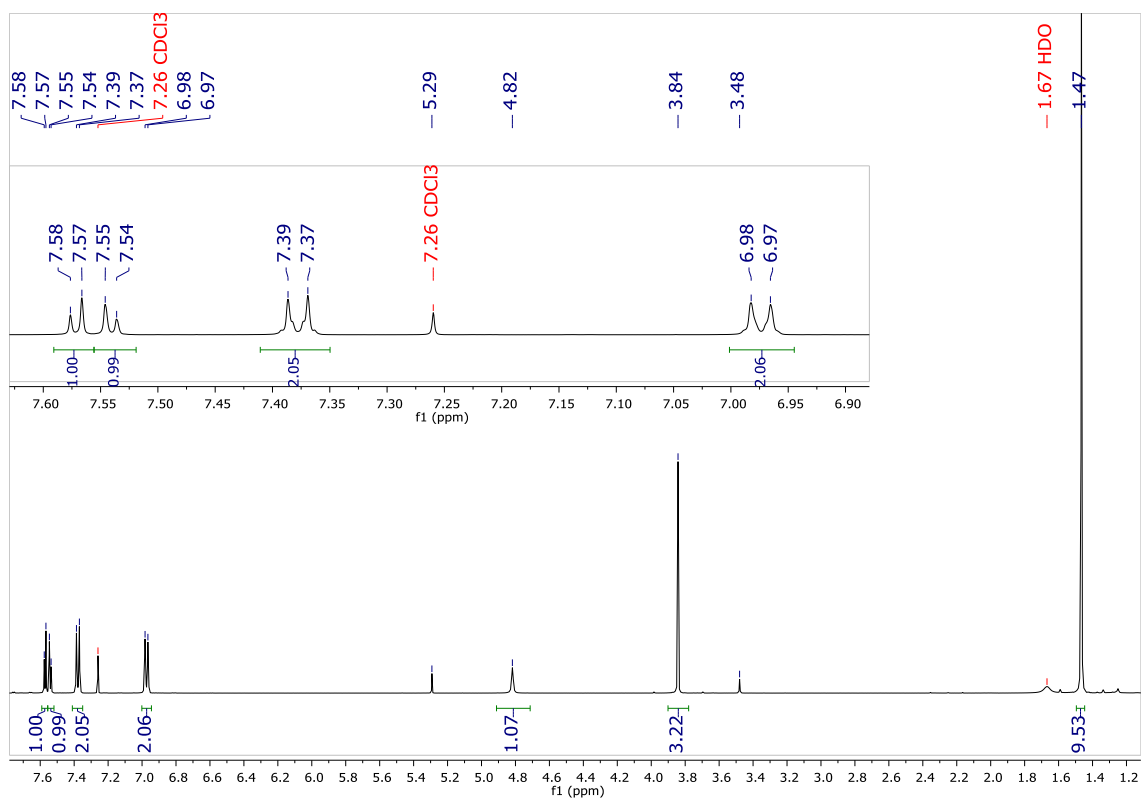
SERIE I



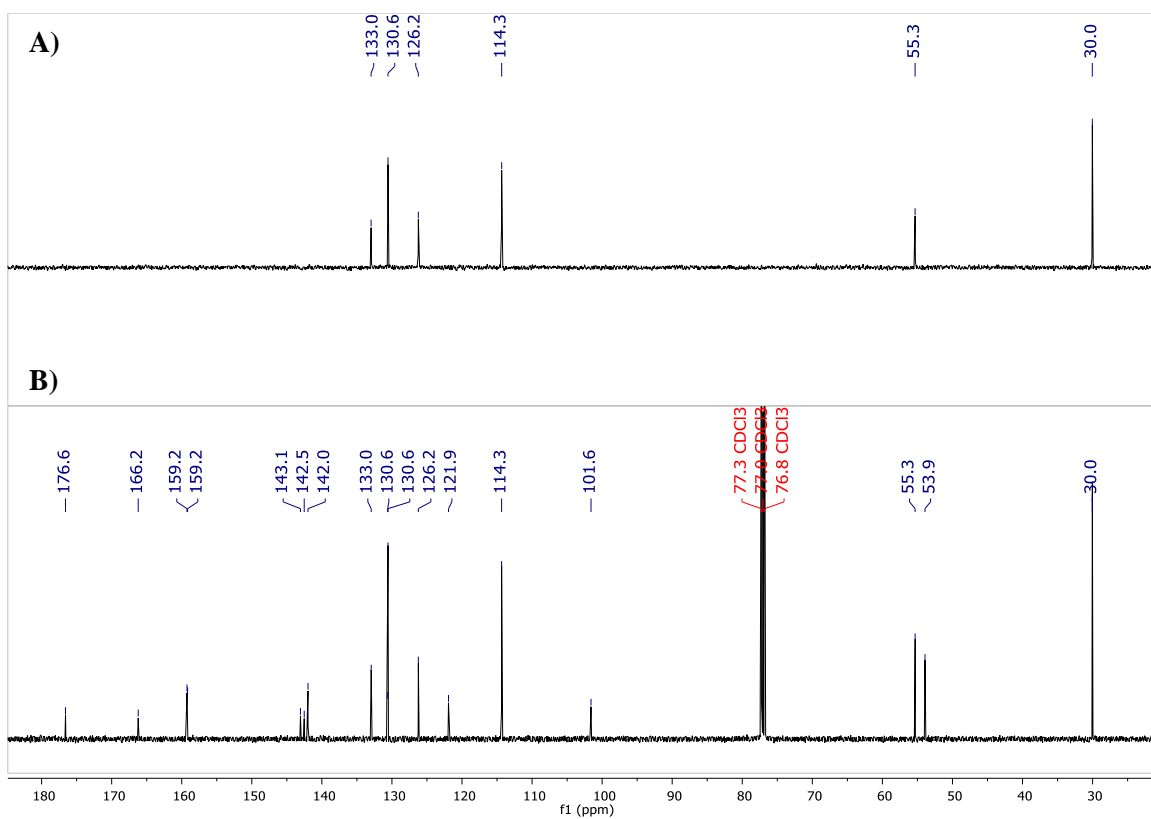
Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto **4a**.



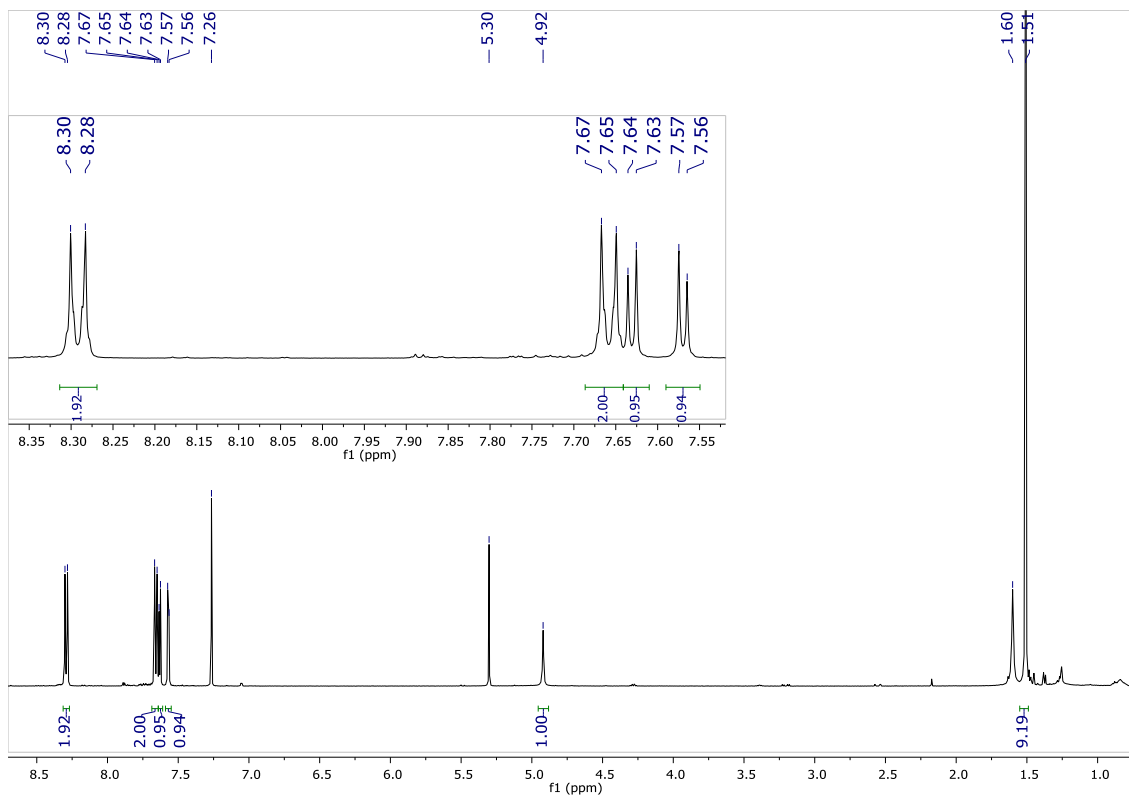
Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto **4b**.



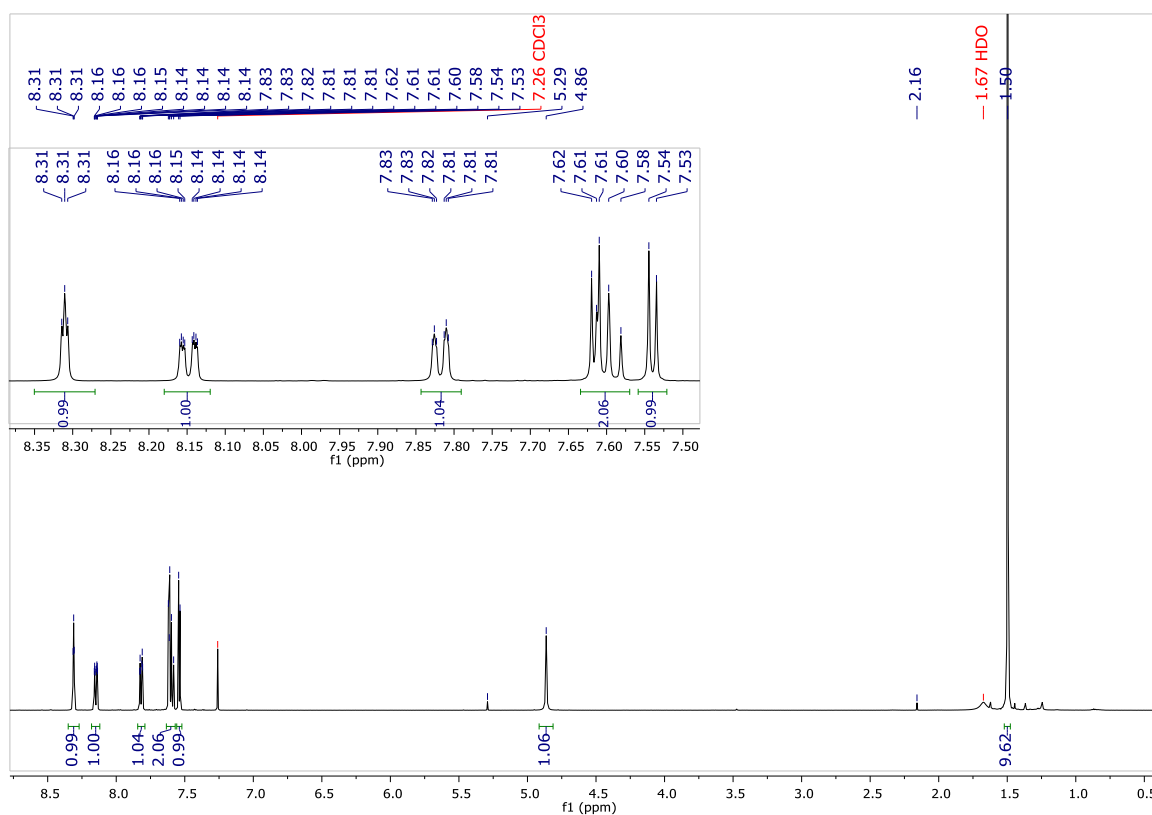
Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4d**.



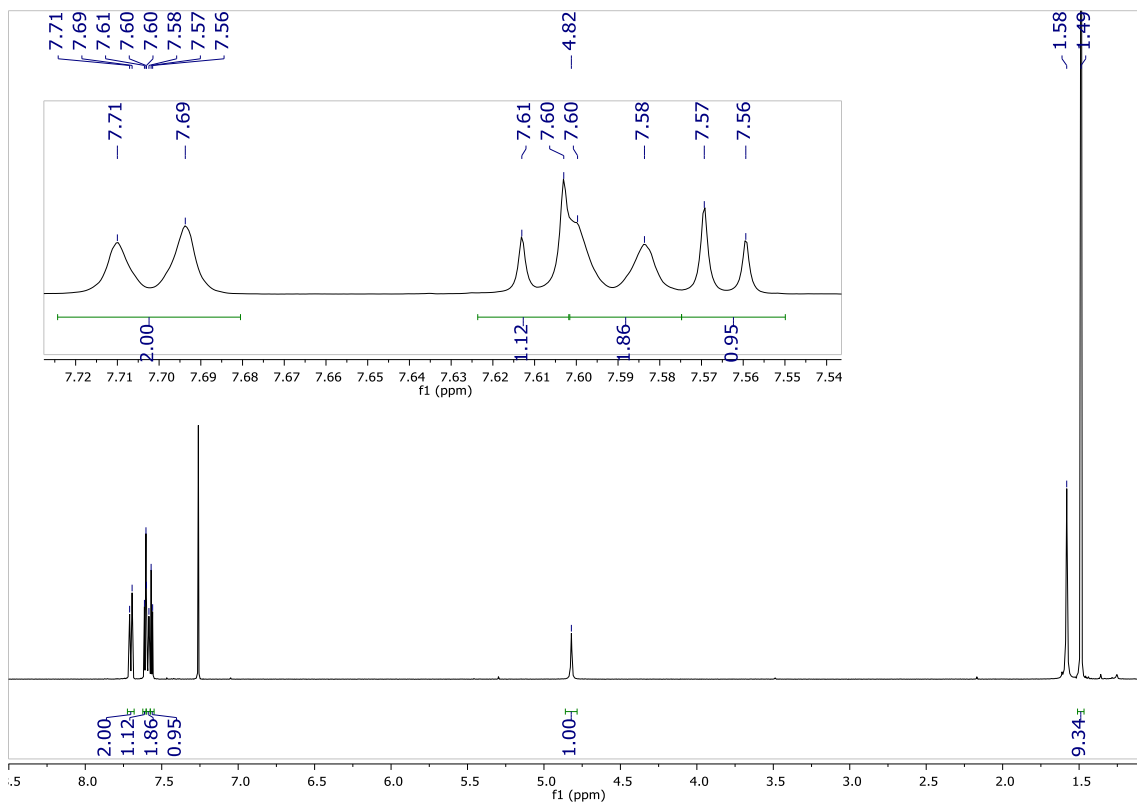
A) DEPT 135 del compuesto **4d**. B) Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto **4d**.



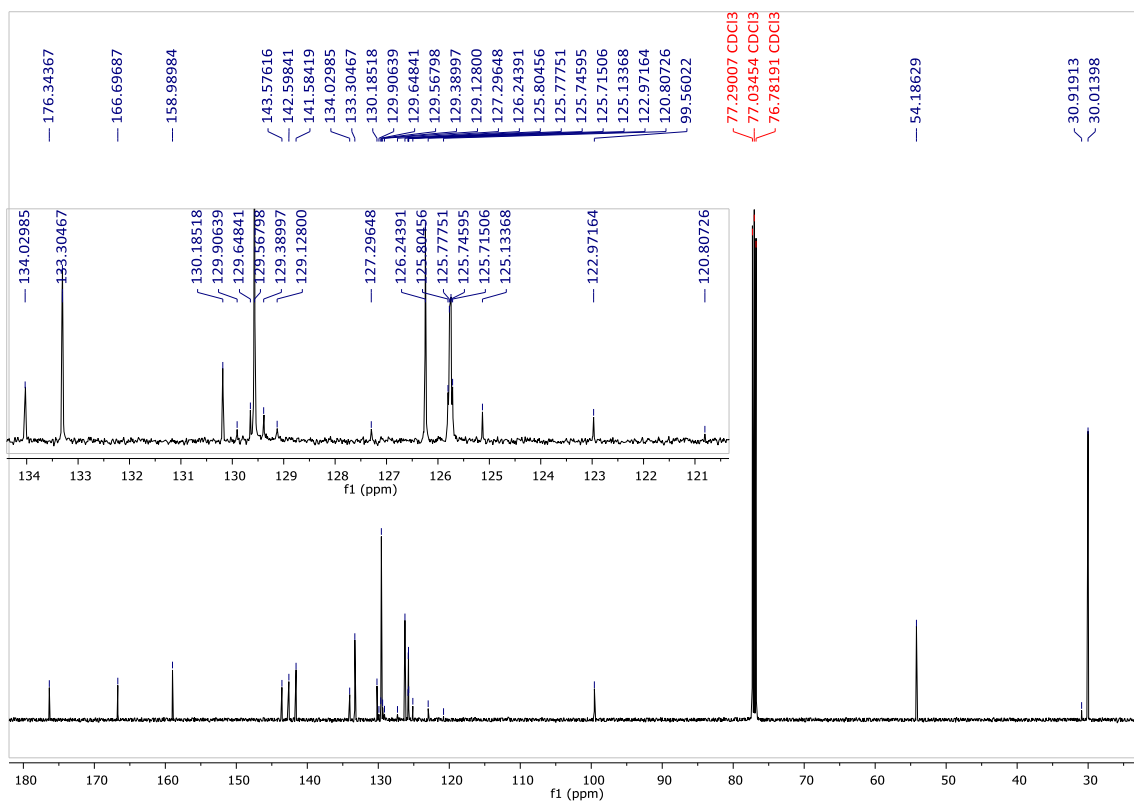
Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4e**.



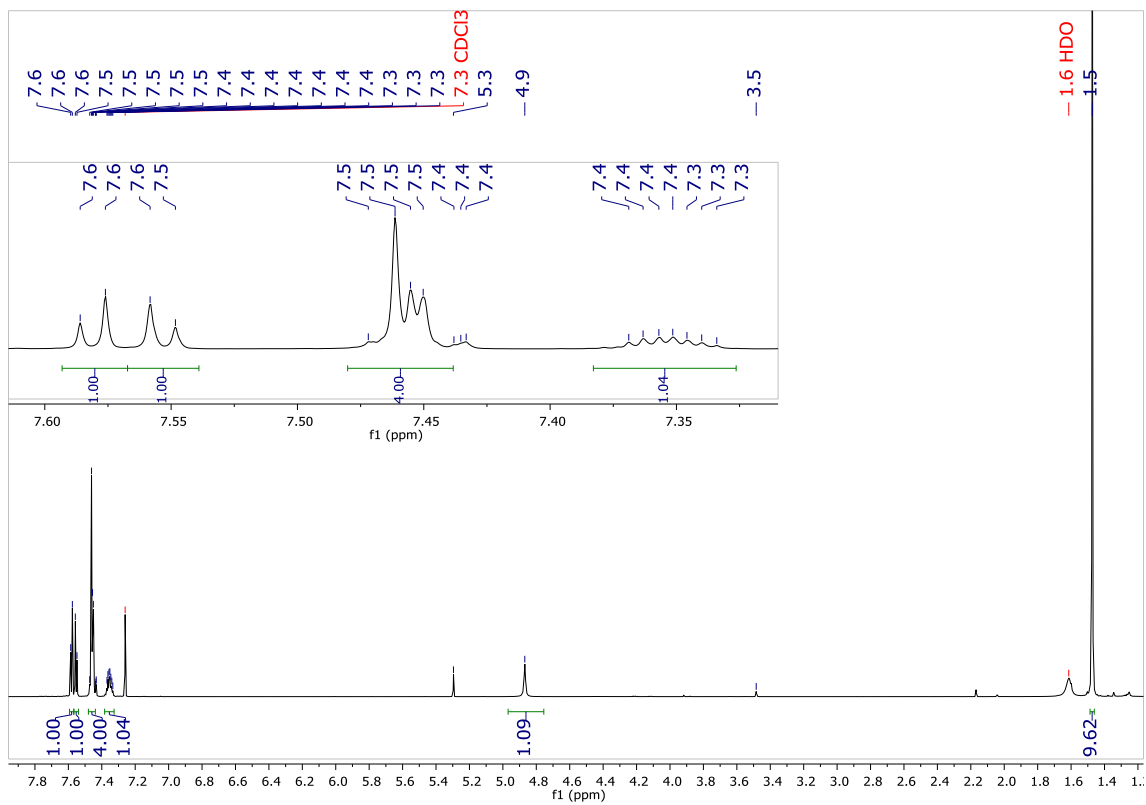
Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4f**.



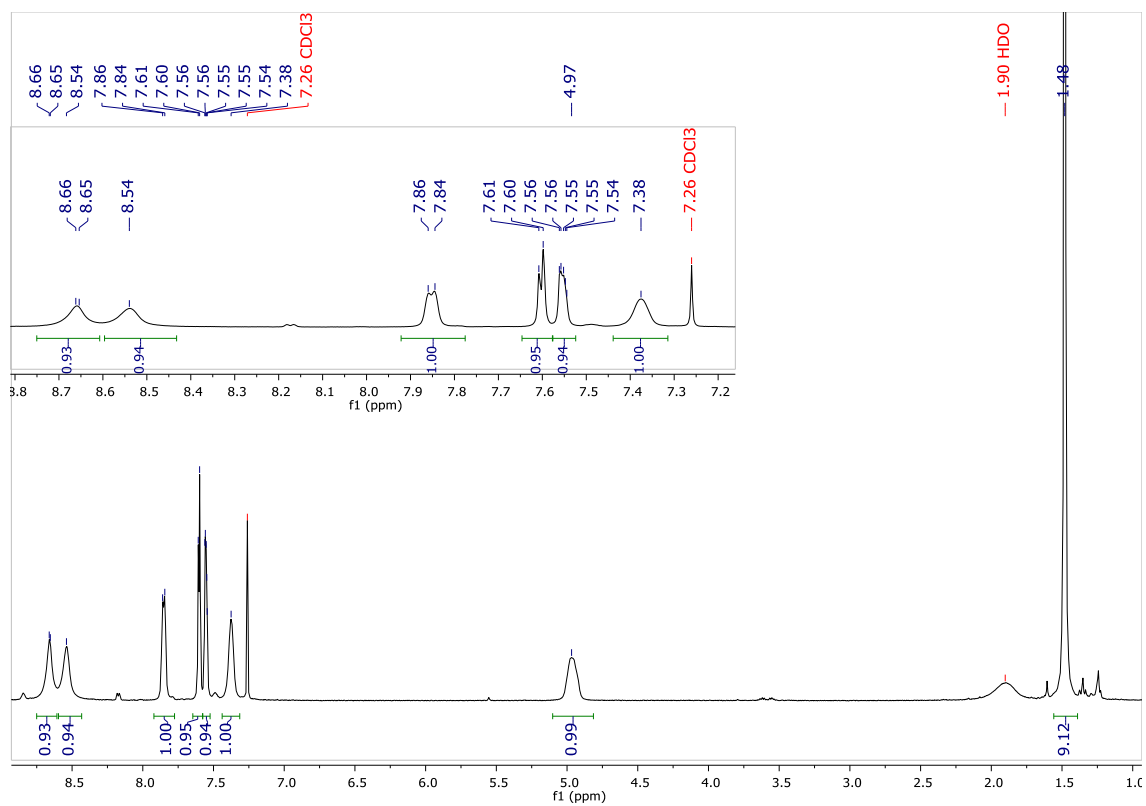
Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4g**.



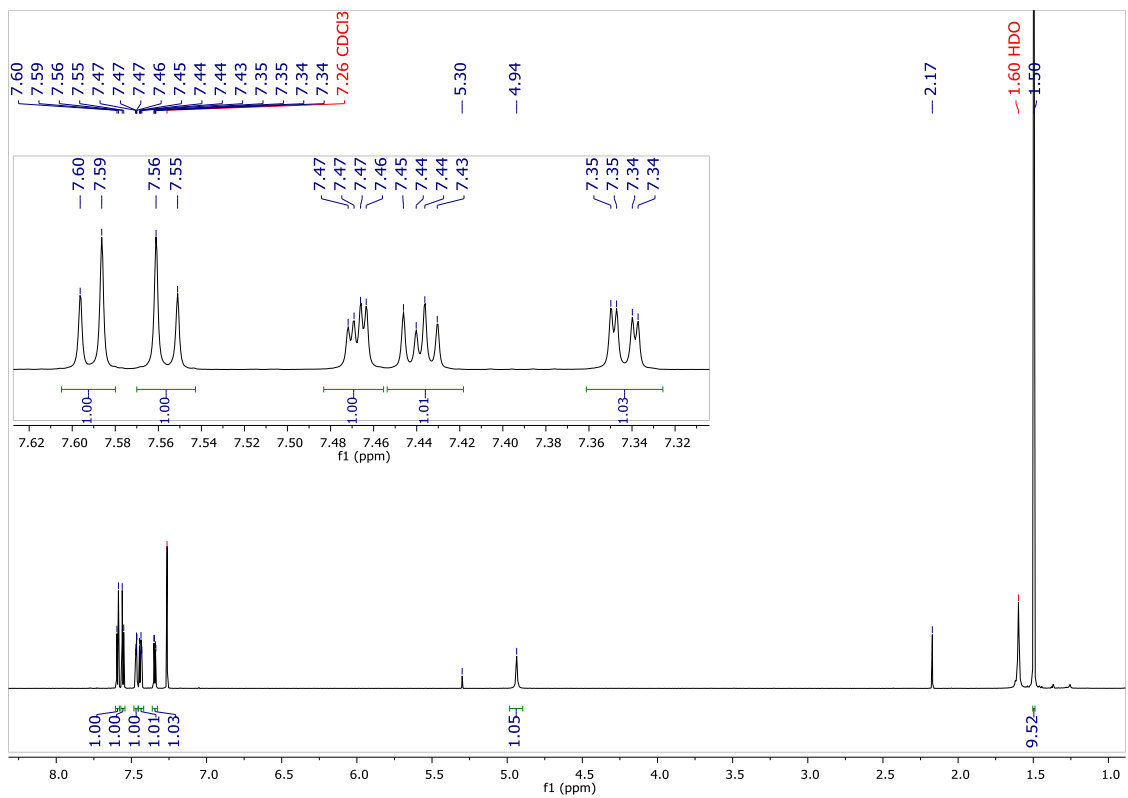
Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto **4g**.



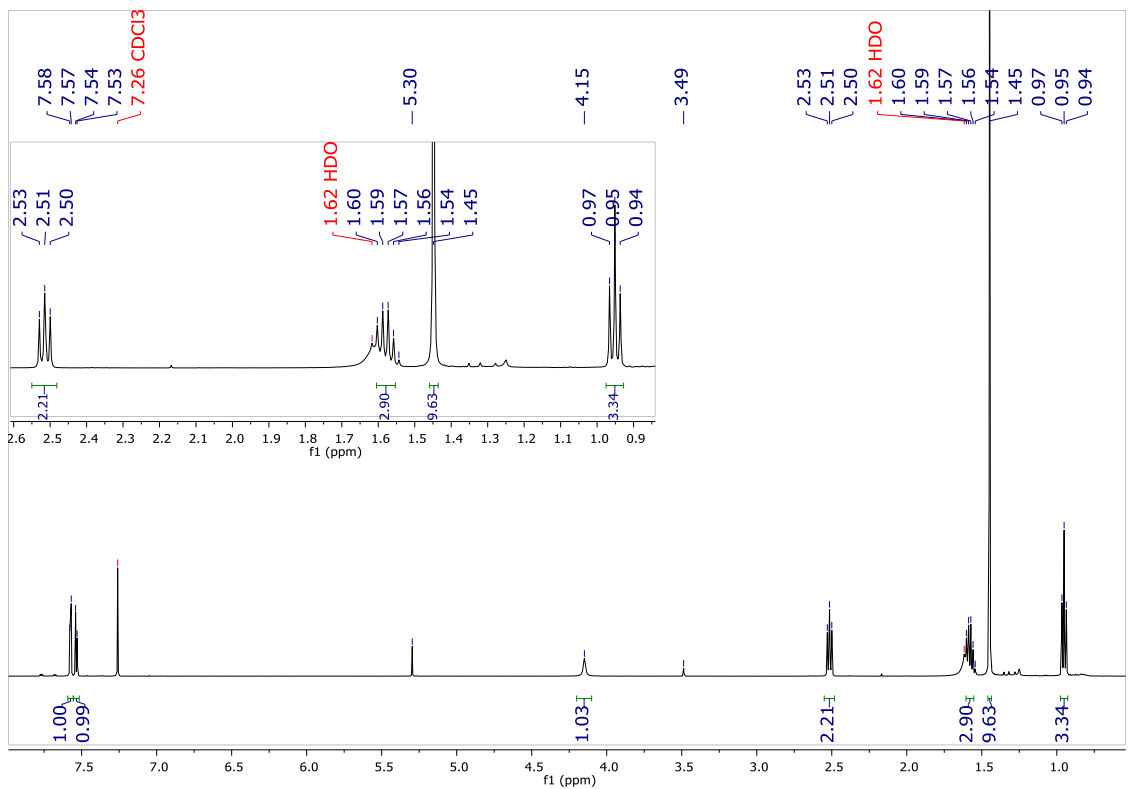
Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4h**.



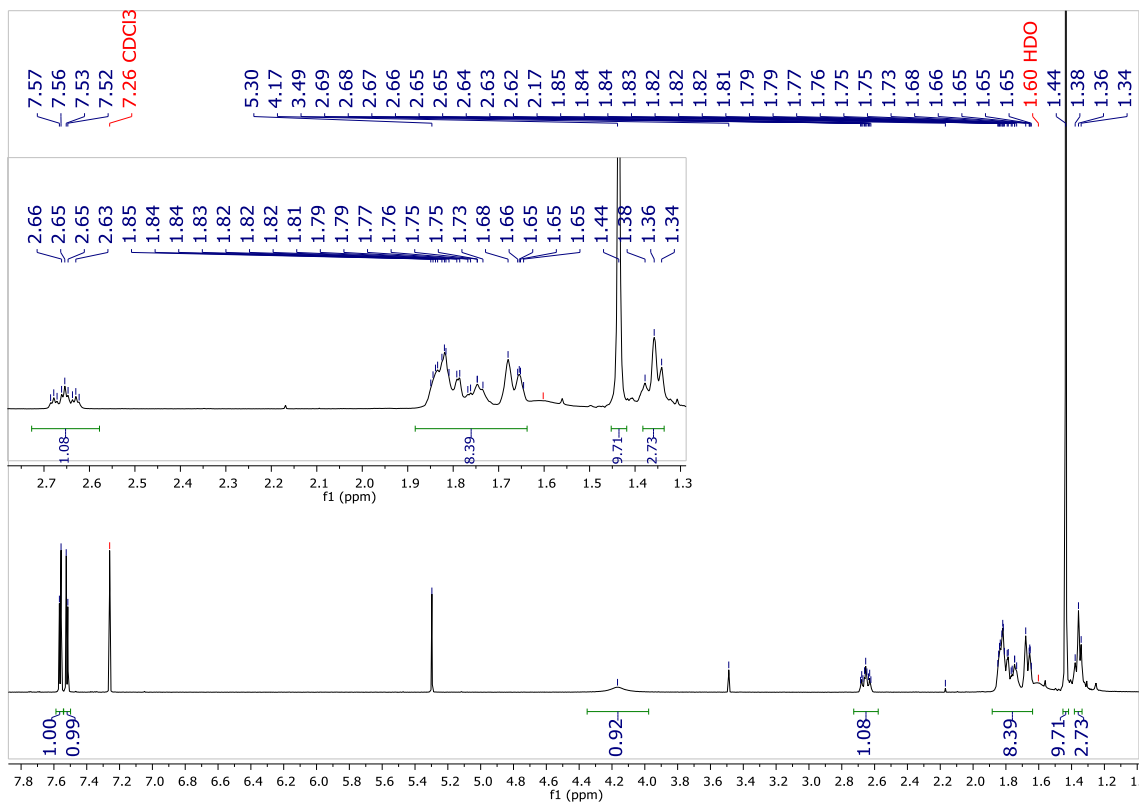
Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4i**.



Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto **4j**.

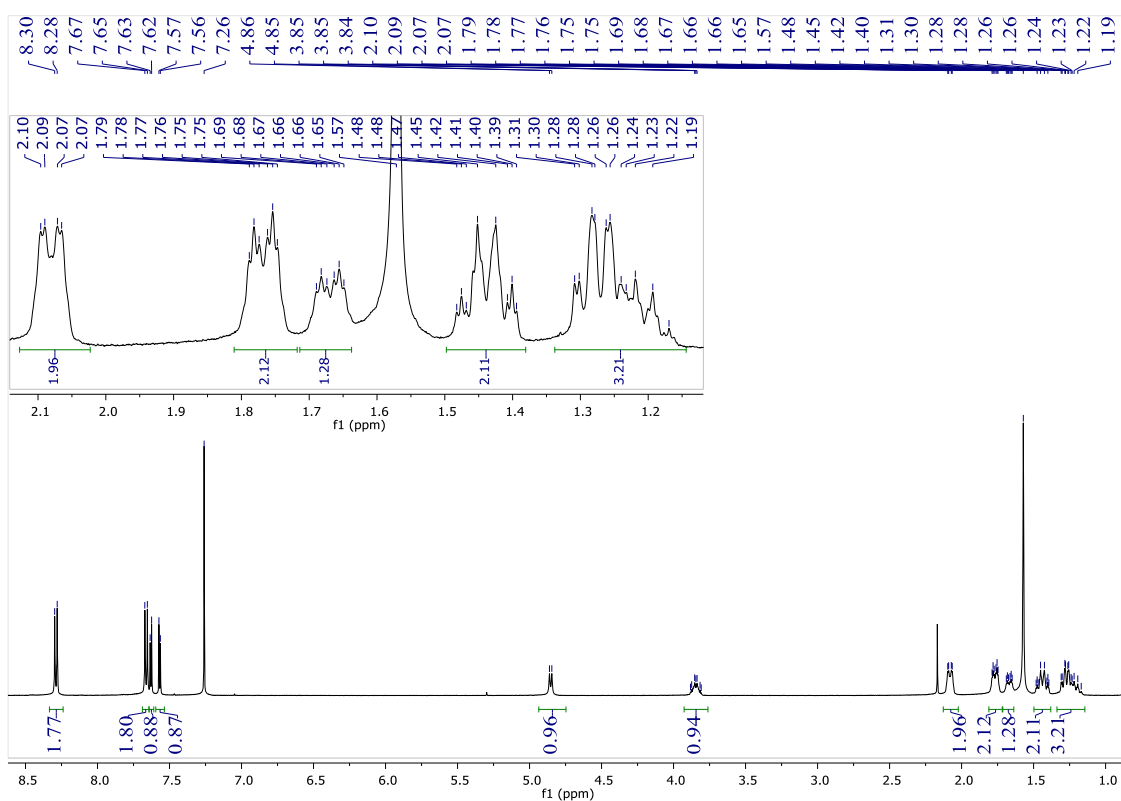


Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto **4k**.

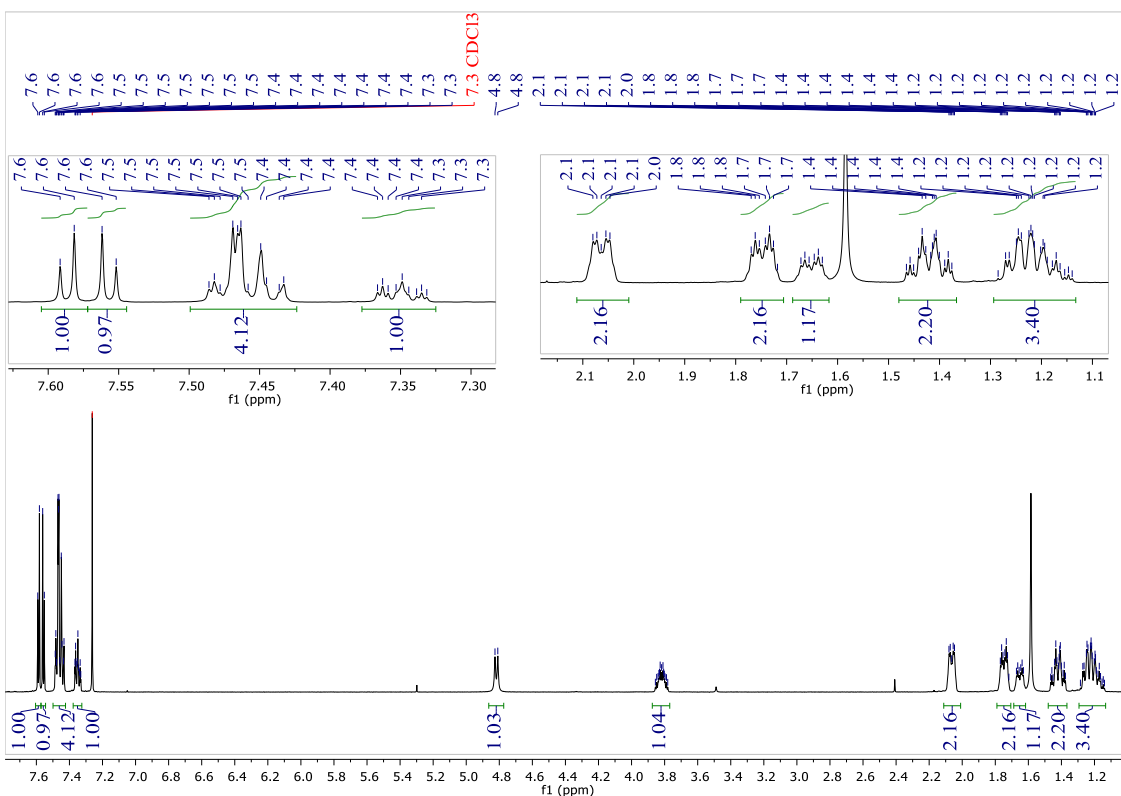


Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4I**.

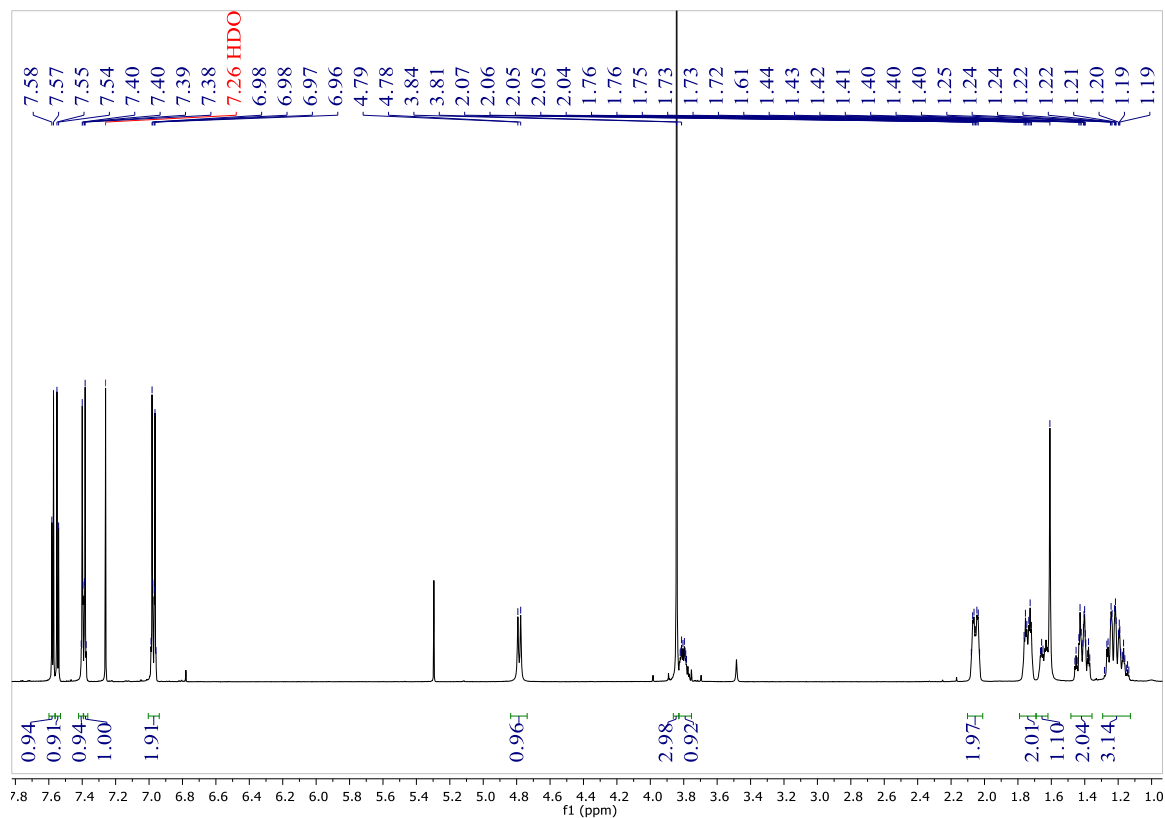
SERIE II



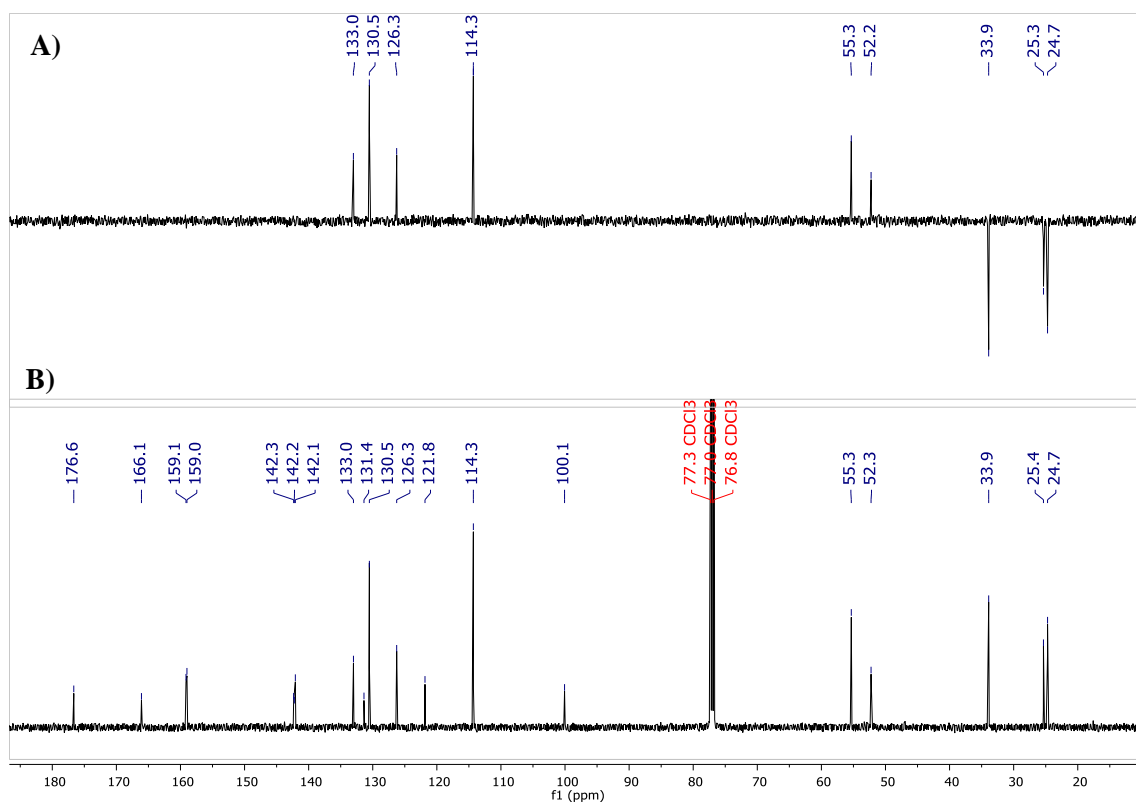
Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto 4m.



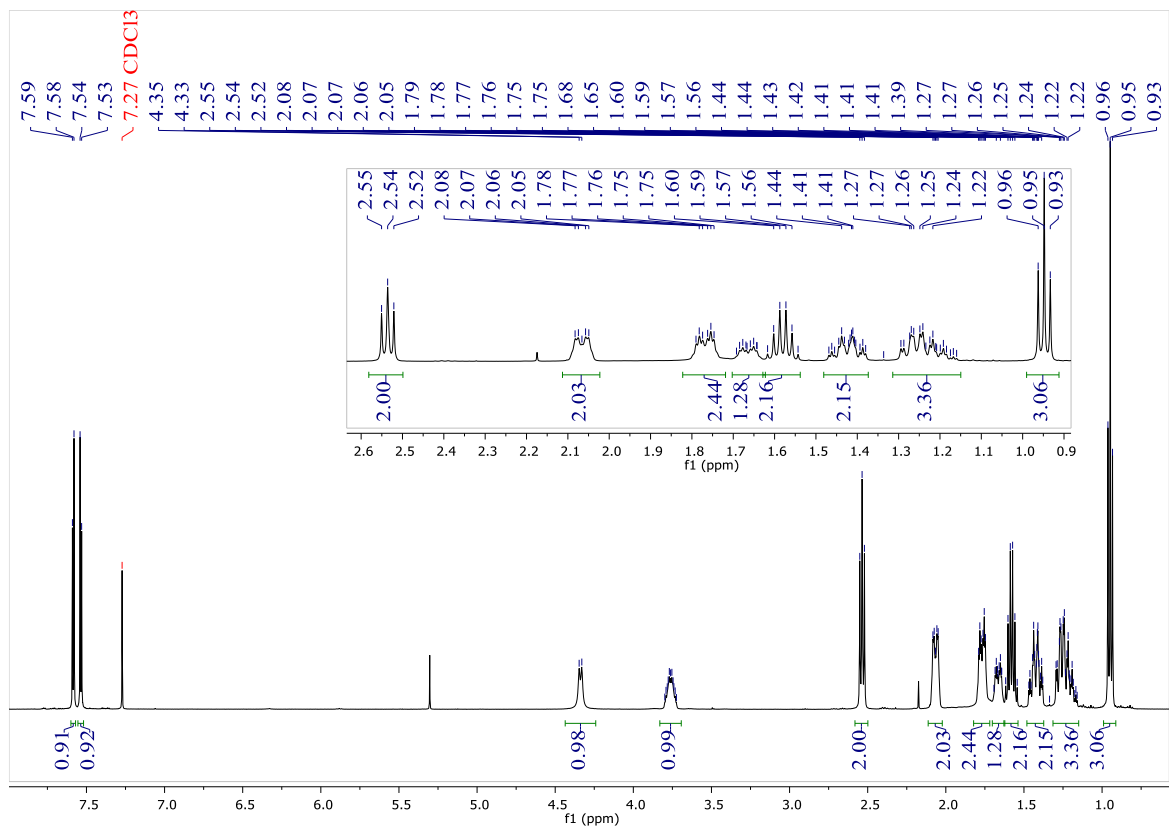
Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto 4n.



Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4o**.

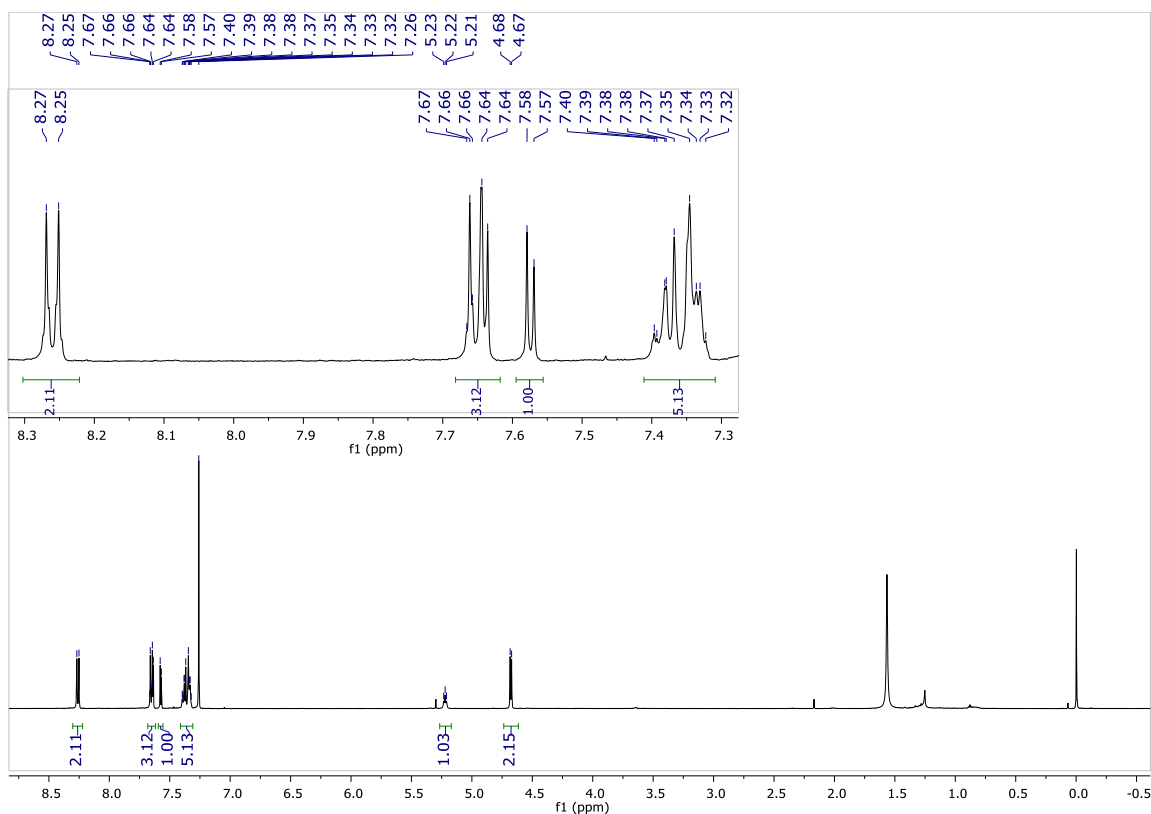


A) DEPT 135 del compuesto **4o**. B) Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto **4o**.

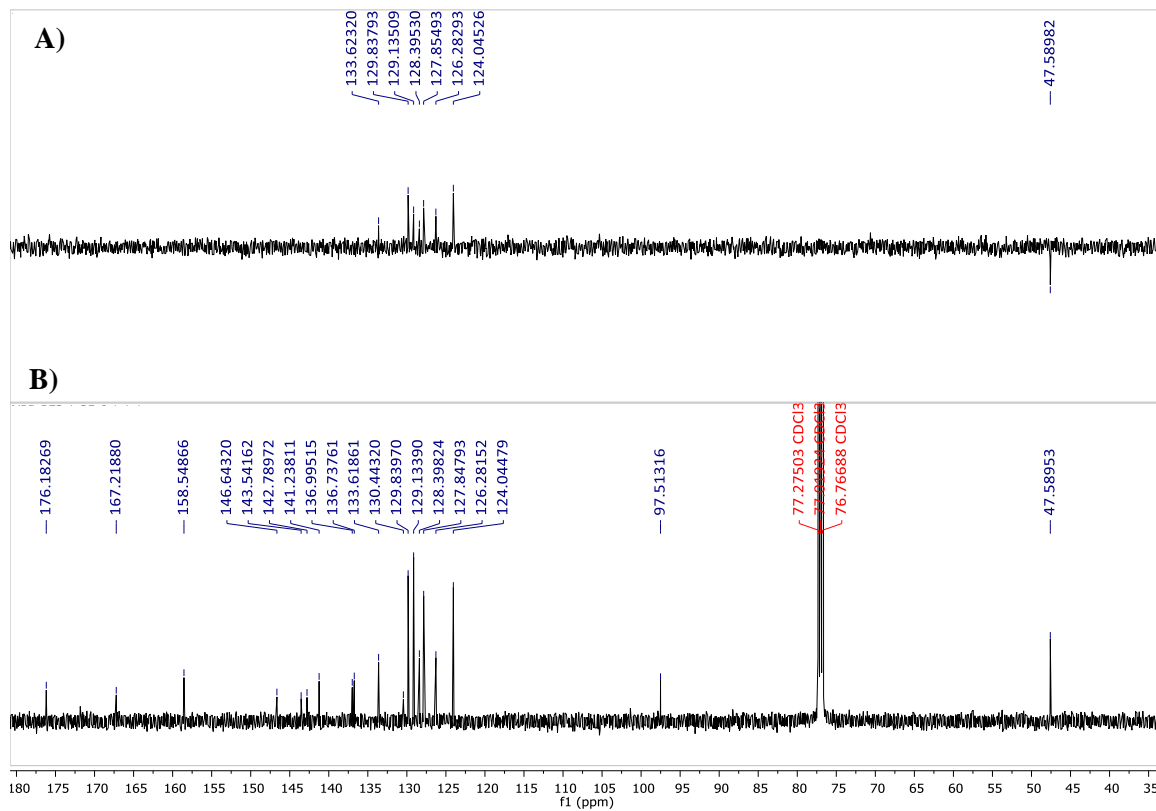


Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto **4p**.

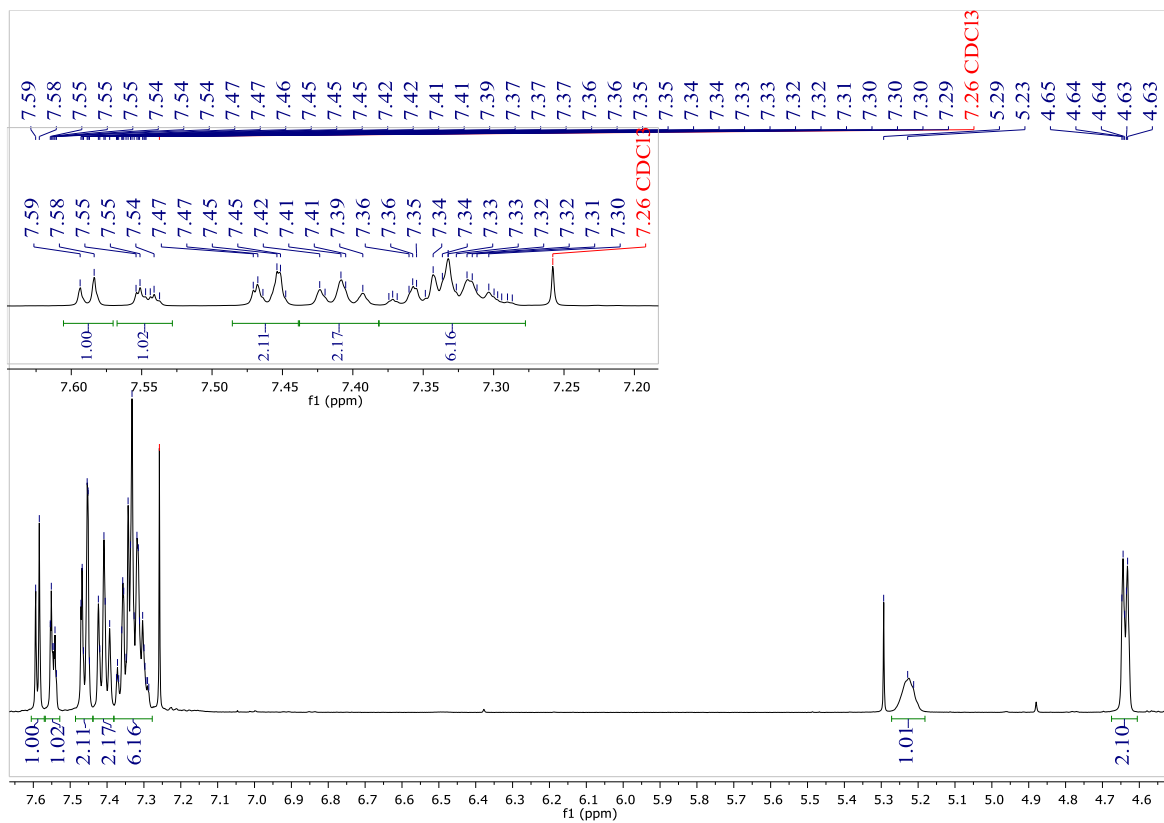
SERIE III



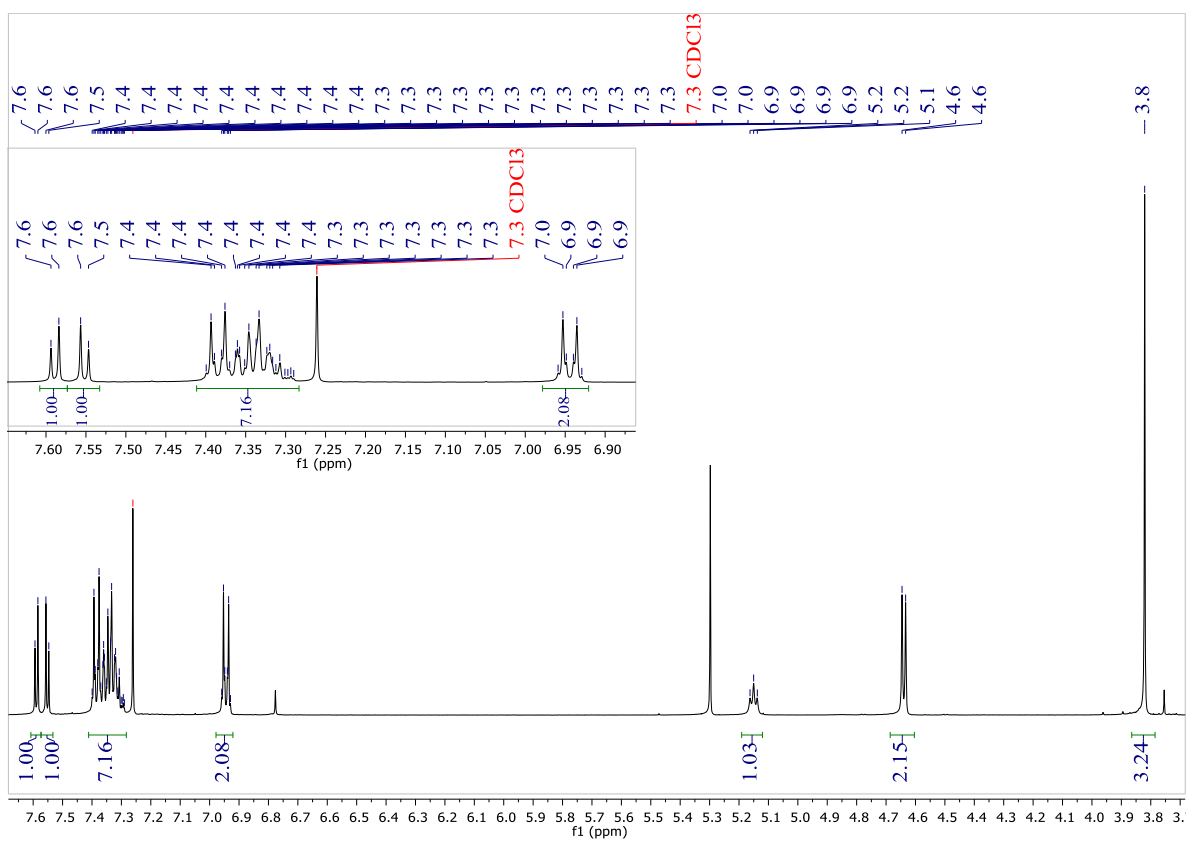
Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4q**.



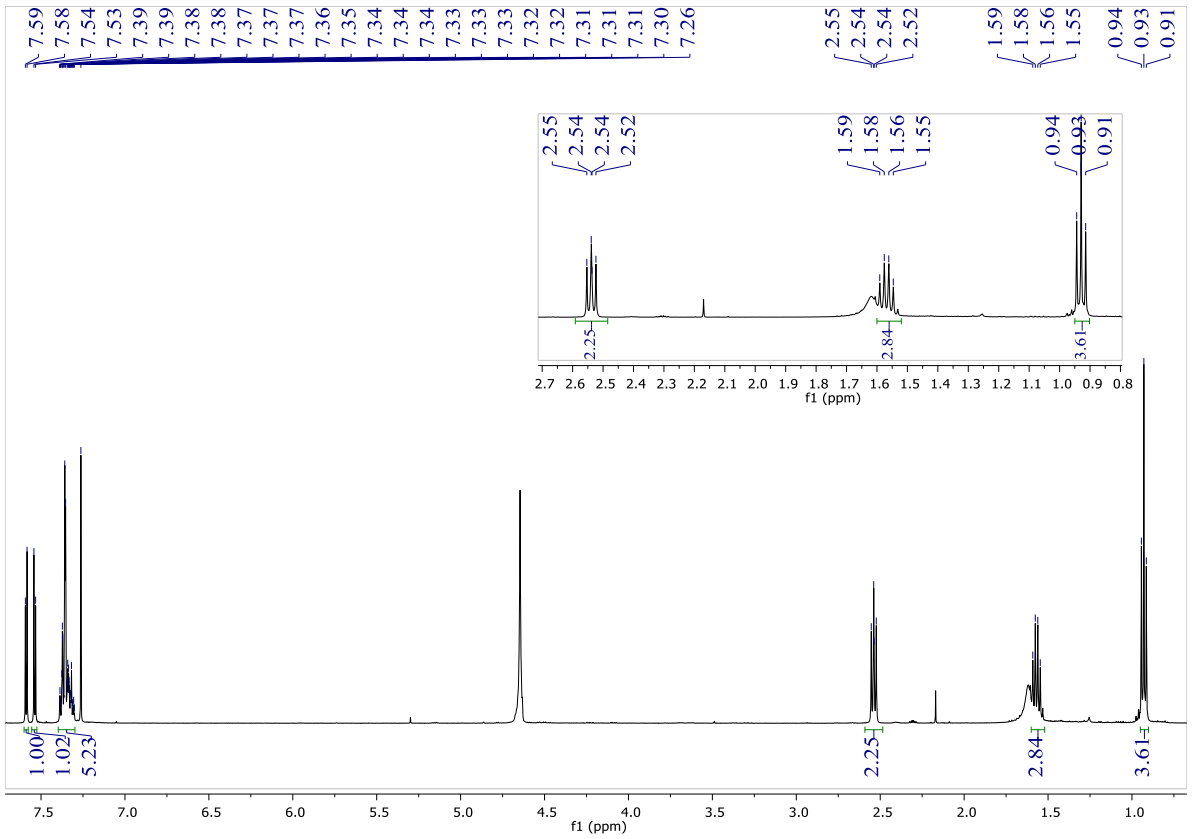
A) DEPT 135 del compuesto **4q**. B) Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto **4q**.



Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto 4r.

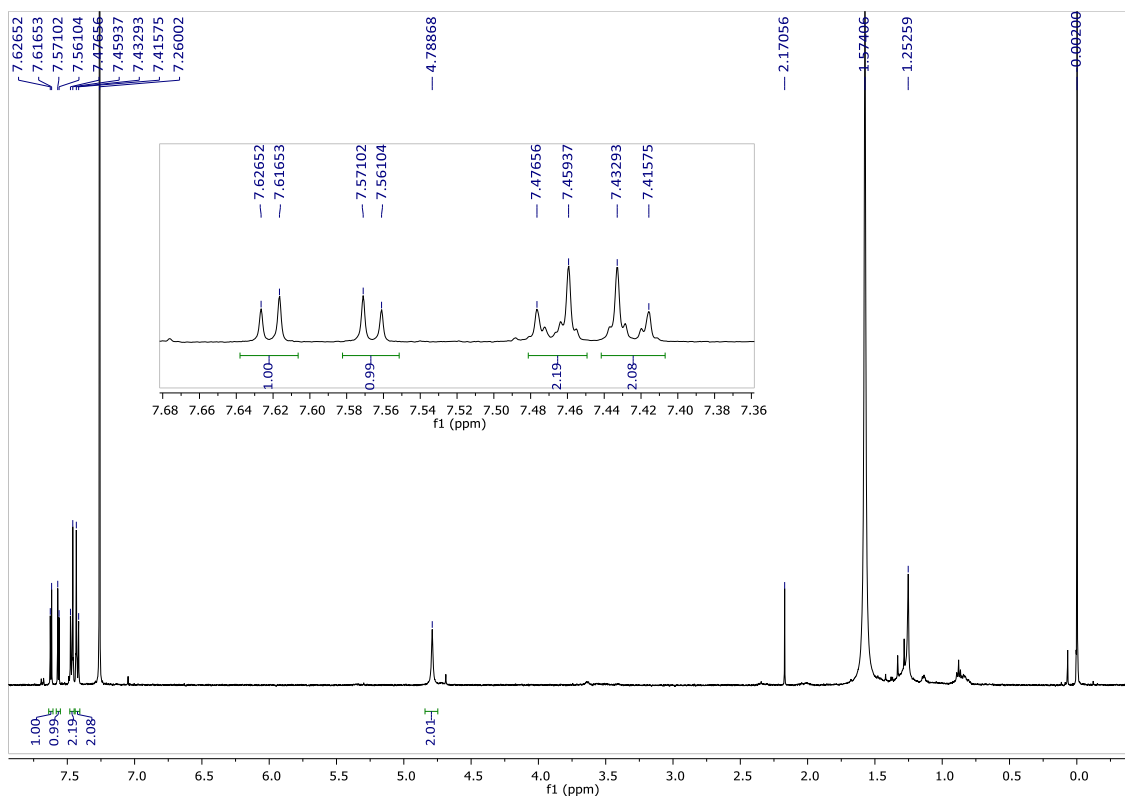


Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) del compuesto 4s.

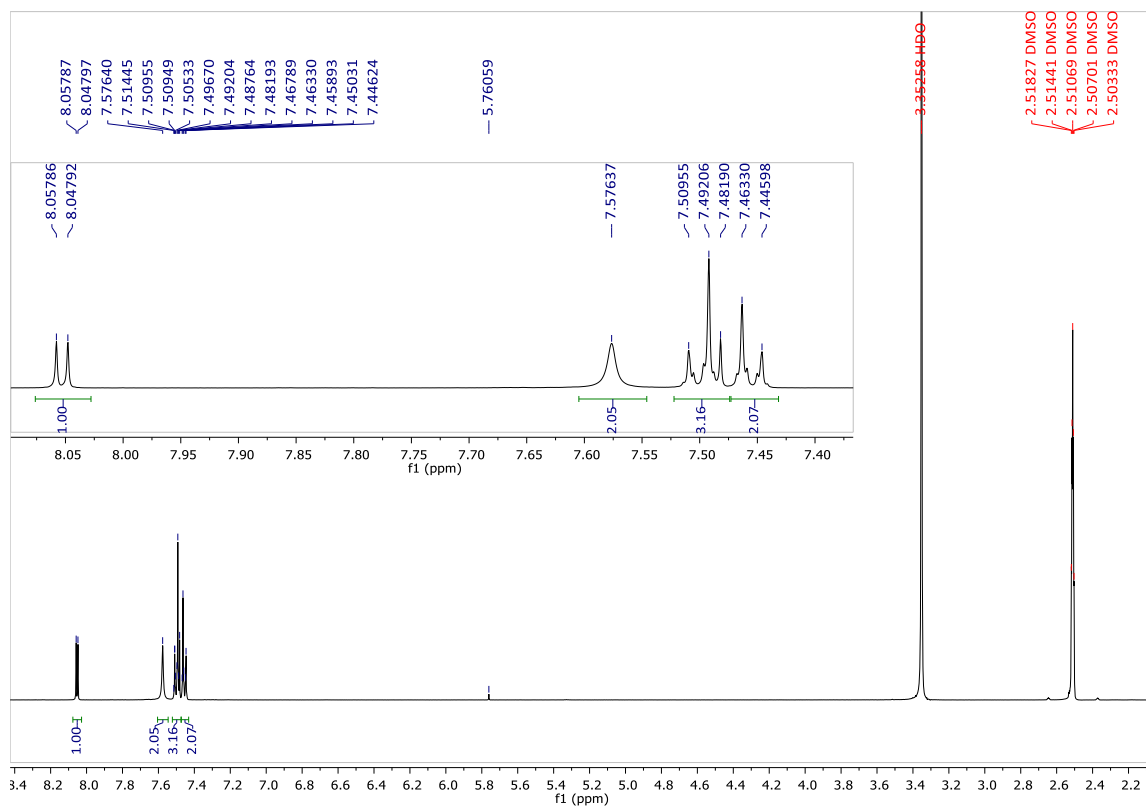


Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4t**.

2-amino-3-(4-clorofenil)tieno[2,3-f]benzofuran-4,8-diona (5a).

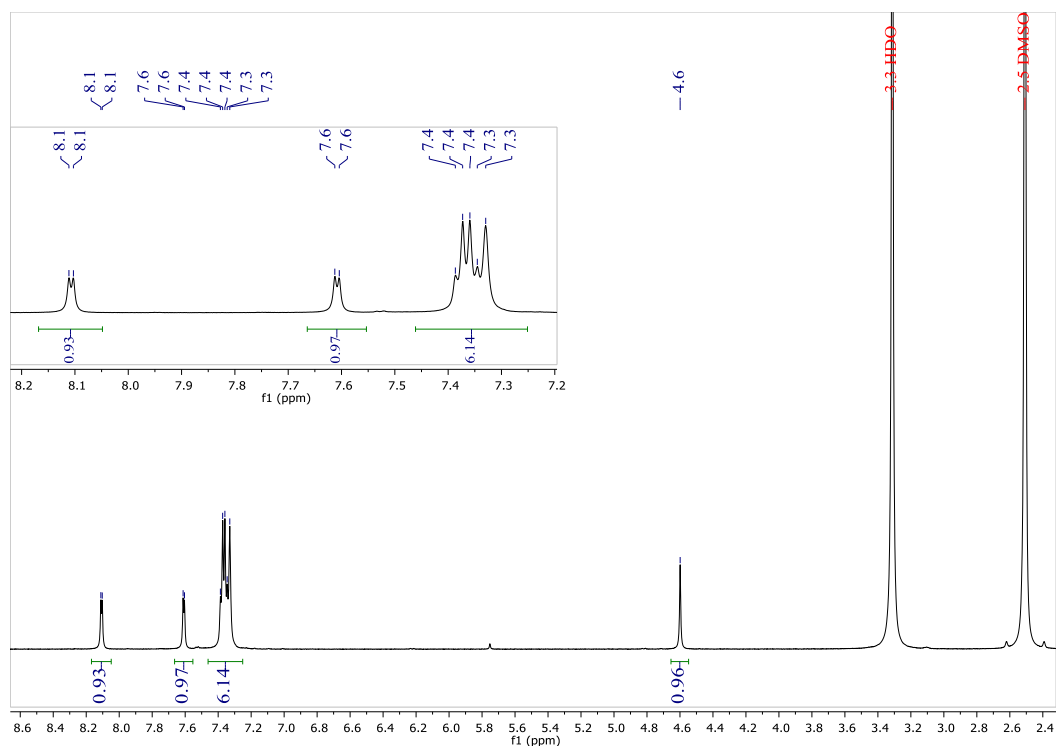


Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **5a**.

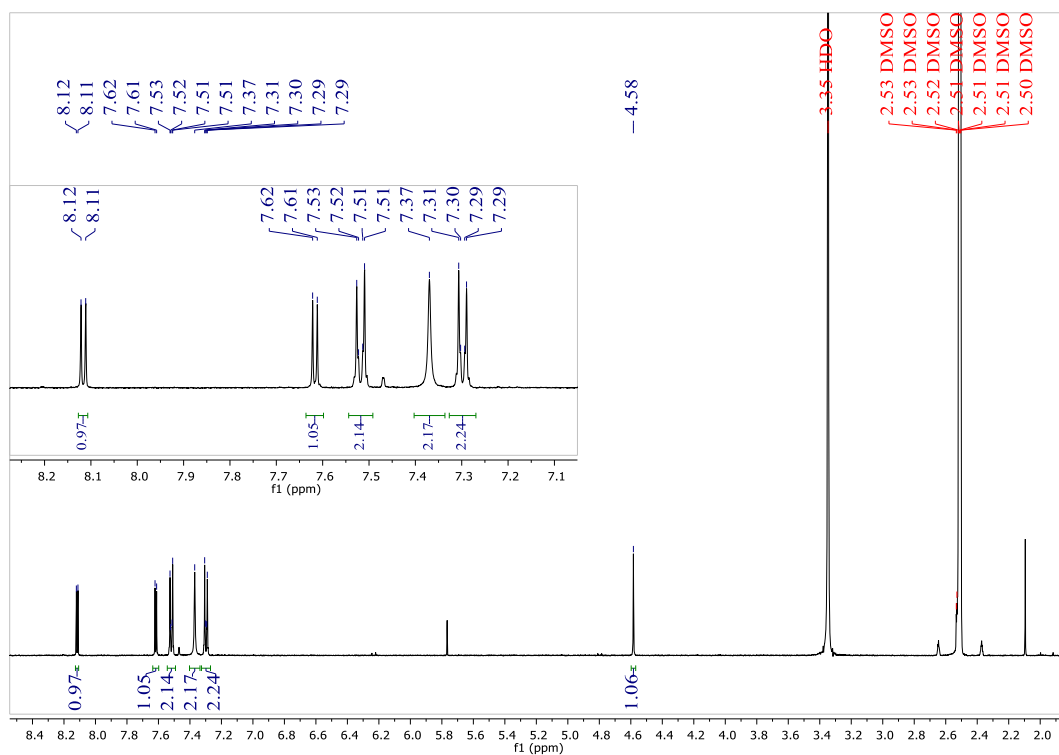


Espectro de ^1H -RMN (DMSO, 125 MHz) del compuesto **5a**.

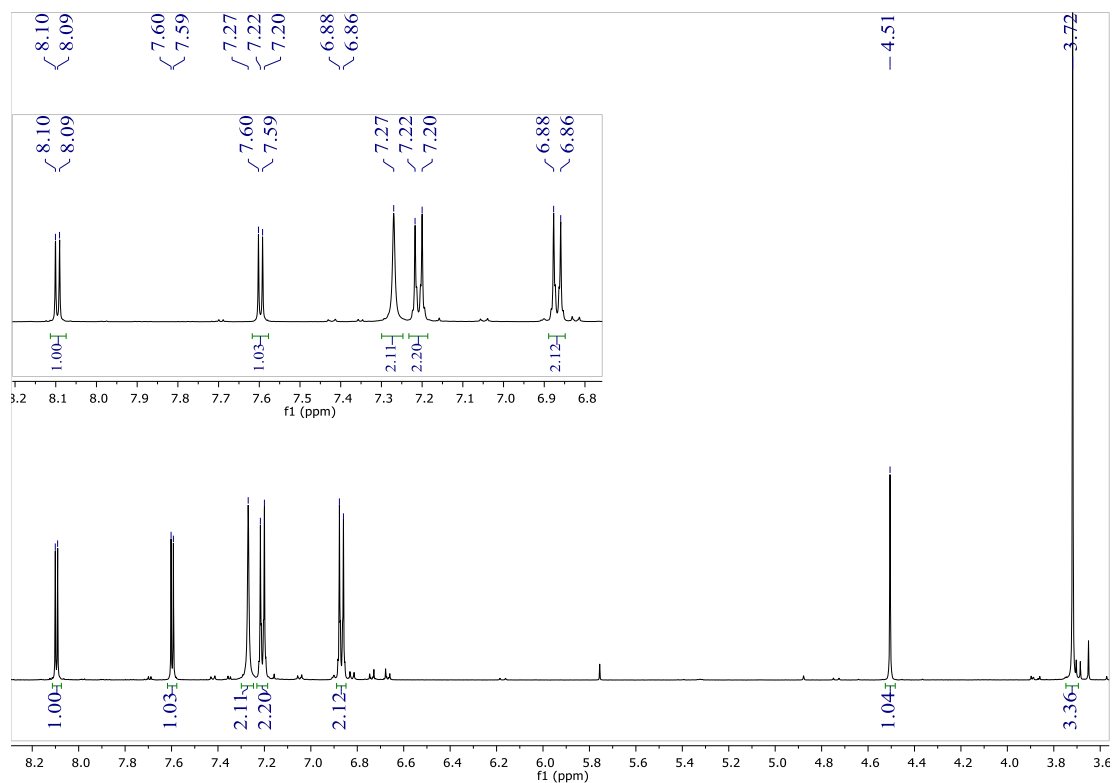
8.2.- Compuestos tipo 6-amino-4,9-dioxo-4,9-dihidro-8H-tieno[2,3-g]cromeno-7-carbonitrilo.



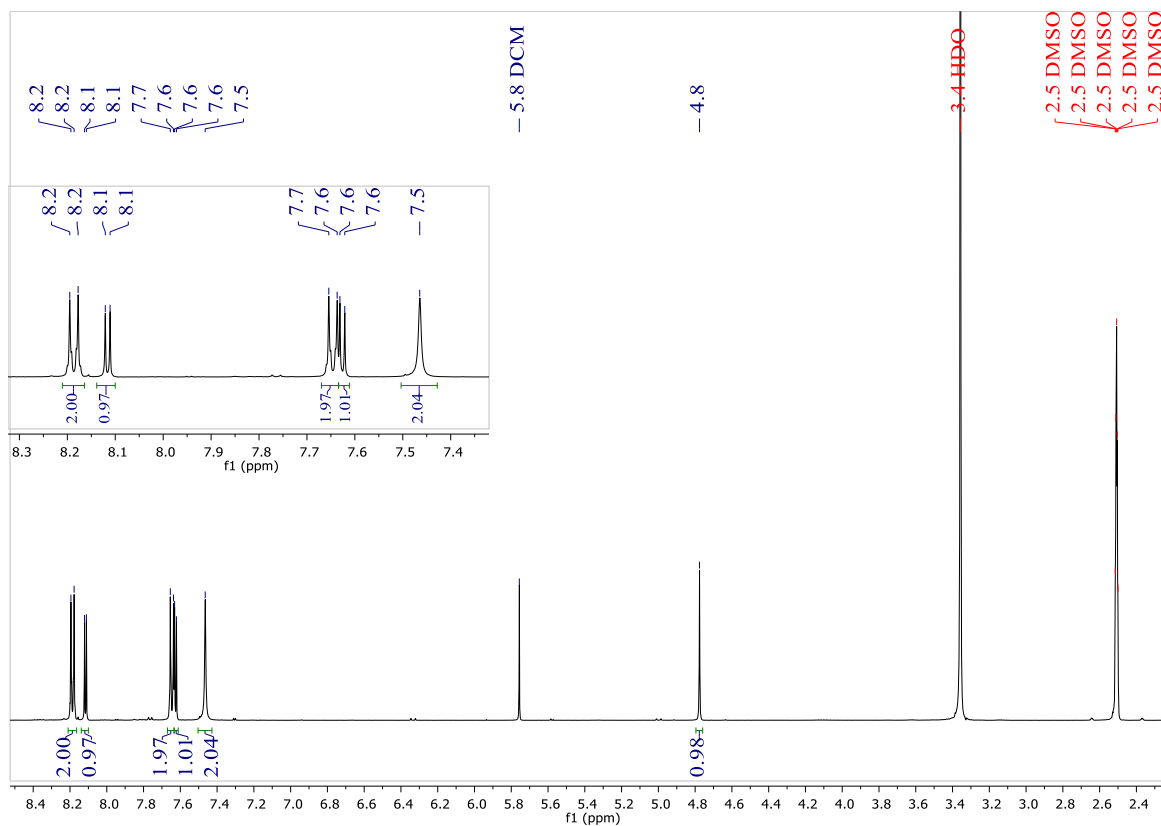
Espectro de ¹H-RMN (DMSO, 500 MHz) del compuesto **7a**.



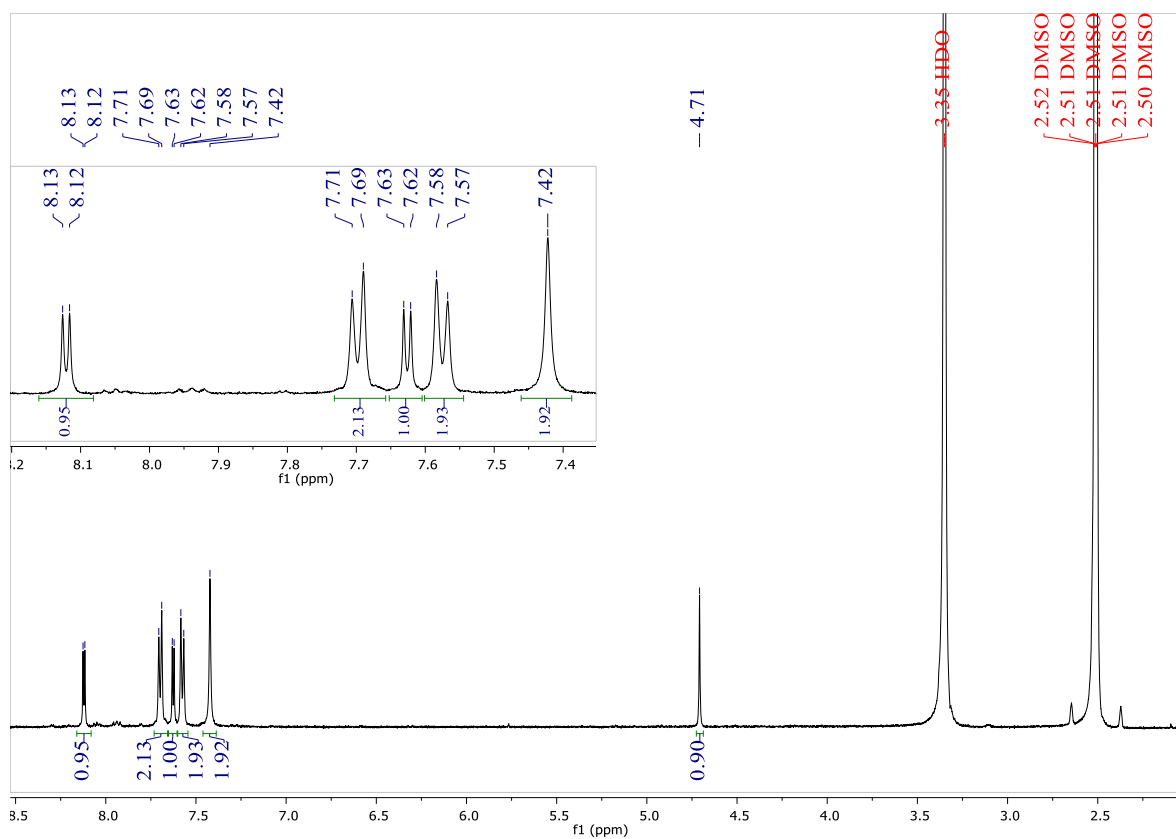
Espectro de ¹H-RMN (DMSO, 500 MHz) del compuesto **7b**.



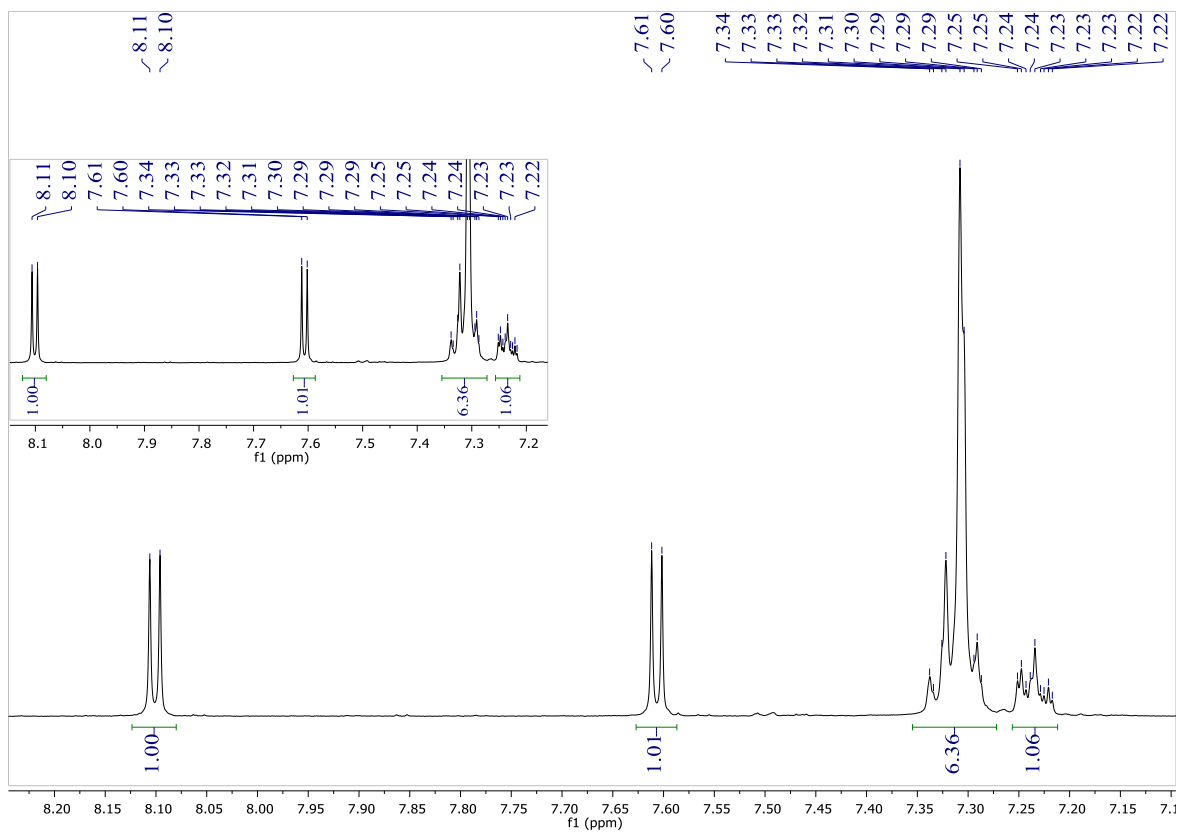
Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO, 500 MHz) del compuesto **7c**.



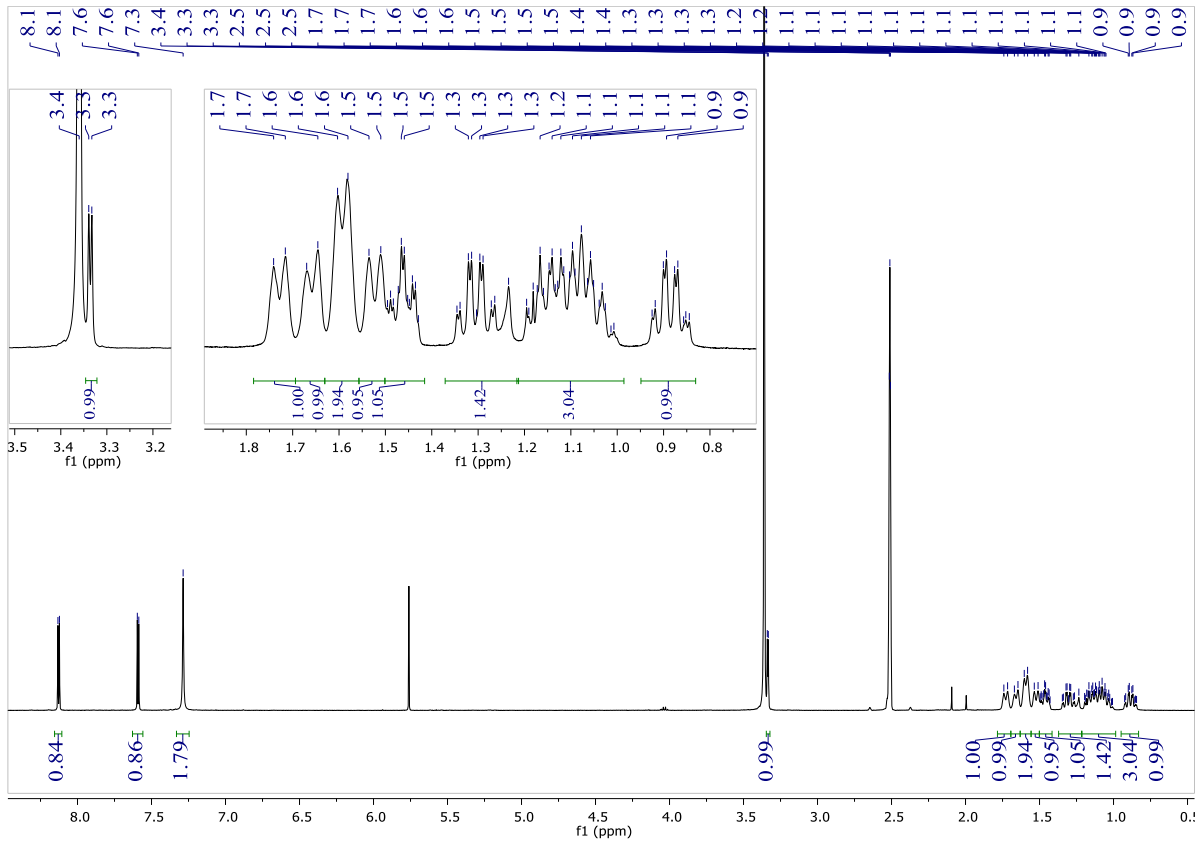
Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO, 500 MHz) del compuesto **7d**.



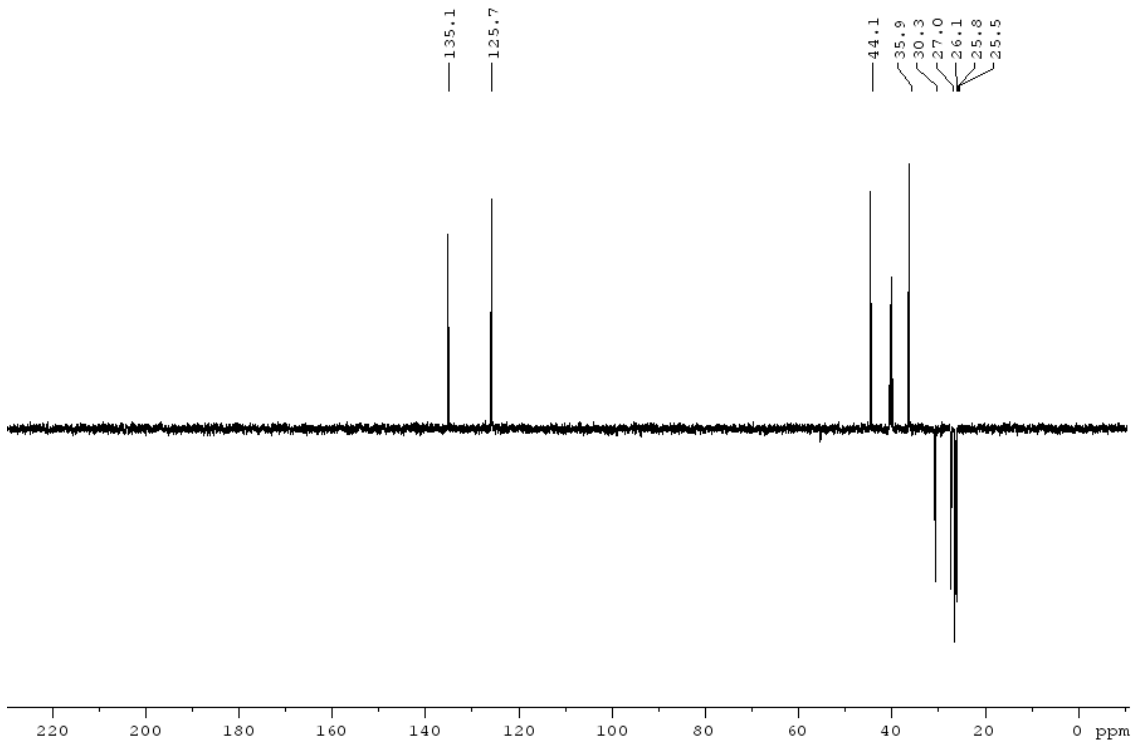
Espectro de ^1H -RMN (DMSO, 500 MHz) del compuesto **7e**.



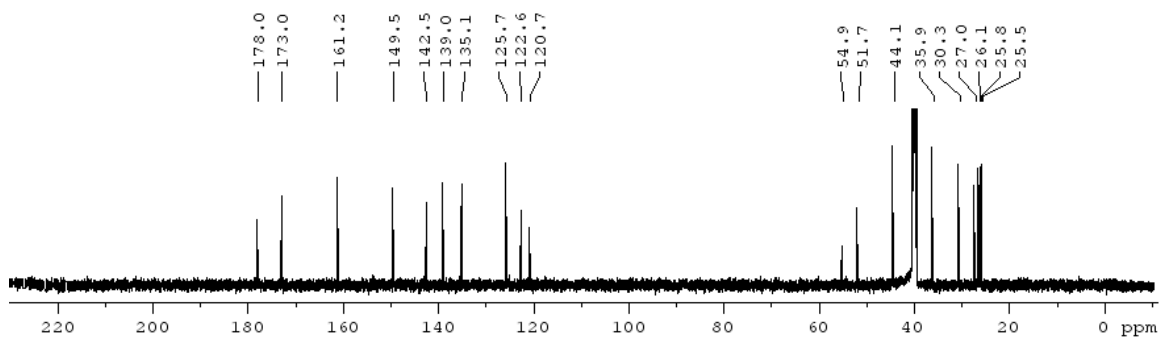
Espectro de ^1H -RMN (DMSO, 500 MHz) del compuesto **7f**.



Espectro de ^1H -RMN (DMSO, 500 MHz) del compuesto **7i**.



DEPT 135 del compuesto **7i**.



Espectro de ^{13}C -RMN (DMSO, 250 MHz) del compuesto **7i**.