



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA O  
QUÍMICA**

**“DISEÑO Y SINTESIS DE NUEVOS LIGANDOS BETA-3 ADRENERGICOS”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS MENCIÓN  
QUÍMICA**

**NOMBRE ALUMNO**

**GASTÓN GUSTAVO APABLAZA ARTEAGA**

**PROFESOR GUÍA**

**Dr. JAIME ALBERTO MELLA RAIPAN**

**Valparaíso, enero de 2016, Chile**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron en esta etapa universitaria, aquellas que han estado presentes desde antes de iniciarla y a quienes tuve la fortuna de conocerlas en el transcurso de ella.

Dar las gracias a mis padres, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Me entregaron todo el cariño, el apoyo y la tranquilidad para así poder siempre dar un paso adelante en este ciclo universitario. Sin duda alguna son los mejores padres del mundo.

Constanza, amor tú cariño, apoyo y paciencia fue incondicional en toda circunstancia, en aquellos buenos y por supuesto aún más en los malos momentos que tuve como estudiante. Que fue un factor imprescindible para lograr sortear esta importante etapa de mi vida. Con toda certeza puedo afirmar que eres un pilar fundamental en mi vida. Gracias a su familia también por todo su apoyo y cariño.

A mis hermanas, mi hermano y familiares que siempre estuvieron preocupados por mi persona y avance académico.

A mis amigos Riffo, Lola, Larry, Franco, Omar, Jota y Patito que siempre estuvieron presentes para acompañarme y alegrarme la vida tanto como en la universidad como en los ratos libres.

Agradecer a mi profesor de tesis Dr. Jaime Mella por la oportunidad, la dedicación, la preocupación, ayuda y por supuesto por su optimista y bondadosa actitud frente todos los imprevistos que tuve en el proceso de la investigación.

Se agradece el aporte financiero de FONDECYT (proyecto de Inicio N°11130701) a la ejecución de este trabajo, lo que se materializó en la compra de los insumos y reactivos necesarios y una beca para la ejecución de la tesis.

## INDICE.

ABREVIATURAS.....	3.
RESUMEN.....	4.
ABSTRACT.....	5.
INTRODUCCIÓN.....	6.
HIPÓTESIS.....	35.
OBJETIVOS.....	35.
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36.
3.1 Generación de los modelos 3D-QSAR CoMFA y CoMSIA.....	36.
3.1.1 Generación de los conformeros y alineamiento molecular.....	42.
3.1.2 Cálculo de potenciales en CoMFA y CoMSIA.....	43.
3.1.3 Análisis de la regresión de los mínimos cuadrados parciales.....	43.
3.1.4 Validación externa de los mejores modelos CoMFA y CoMSIA.....	44.
3.2 Síntesis de los compuestos con cadena de estructura general benzoimidazo-2- alquil-etanolamina.....	44.
RESEULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45.
4.1 Estudios de relación estructura-actividad cuantitativos tridimensionales (3D-QSAR) CoMFA y CoMSIA de una serie de derivados ariletanolamina con potencia beta-3 adrenergica.....	45.
4.2 Estudio de la obtención del benzimidazol mediante la protección de la amina con t-butiloxicarbonilo.....	52.
4.3 Estudio de obtención de los 2-aminoalquillbenzimidazoles mediante ciclación directa con ácido polifosforico.....	57.
4.4 Estudio de la obtención de benzoimidazo-2-alquil-etanolamina mediante el procedimiento de Philips y obtención de la serie N-(benzoimidazo-2-alquil)- feniletanolamina por adición de 2-feniloxirano.....	61.

CONCLUSIONES.....	66.
PARTE EXPERIMENTAL.....	67.
REFERENCIAS.....	91.
ANEXOS.....	97.

## ABREVIATURAS.

3D QSAR = Relaciones cuantitativas de estructura-actividad en tres dimensiones (de sus siglas en inglés *Quantitative structure-activity relationship*)

2D QSAR = Relaciones cuantitativas de estructura-actividad en dos dimensiones

CoMFA = Análisis comparativo de campos moleculares (de sus siglas en inglés *Comparative Molecular Field Analysis*).

CoMSIA = Análisis Comparativo de Índices de Similitud Molecular (de sus siglas en inglés, *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*).

$\beta$ -ARs = receptores  $\beta$  adrenérgicos.

$\beta$ -ARK=  $\beta$  kinasas para los receptores beta adrenérgicos

cGMP = Guanosín monofosfato cíclico.

cAMP = Adenosín monofosfato cíclico.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés *Polymerase chain reaction*).

mRNA = Ácido ribonucleico mensajero.

OAB = Síndrome de vejiga hiperactiva (de sus siglas en inglés *overactive bladder*).

PLS = mínimos cuadrados parciales (del inglés *partial least squares*)

## **RESUMEN.**

Actualmente el receptor beta-3 adrenérgico humano es un target farmacológico de gran interés dada su amplia distribución tisular y su capacidad para modular una gran cantidad de procesos fisiológicos, lo que lo hace un atractivo blanco para el diseño de compuestos que puedan ser útiles en el tratamiento de la obesidad, diabetes, colon irritable, cáncer y depresión, entre otras patologías. Solamente existe un fármaco aprobado para el tratamiento de la vejiga hiperactiva que actúa en este receptor. Por ello los esfuerzos de esta tesis se enfocaron en la generación de un modelo farmacofórico mediante la técnica 3D-QSAR que nos entregó valiosa información para el diseño de compuestos con potencial actividad beta-3 adrenérgica, que luego fueron sintetizados y purificados en nuestro laboratorio. Este trabajo es el primer estudio computacional y de síntesis de heterociclos bioactivos llevado a cabo en nuestro instituto, y representa el esfuerzo de más de 1 año de trabajo enmarcado en el proyecto FONDECYT de Inicio N°11130701.

## **ABSTRACT.**

Nowadays the beta-3 adrenergic receptor is an interesting pharmacological target due its extensive tisular distribution and its capacity to modulate a wide range of physiological processes. This receptor is involved in a series of pathological conditions like obesity, type II diabetes, irritable bowel syndrome, cancer and depression among others. Mirabegron has been the only drug approved in recent years for the treatment of overactive bladder. In view of this scenario, the efforts of the present work have been focused in the developed of a 3D-QSAR model that allow for the design of new promising compounds, which were synthesized in our laboratory. This thesis is the first computational and synthetic work carried out in the Institute of Chemistry, and is the result of one year of hard work, financially supported by FONDECYT grant N° 11130701.

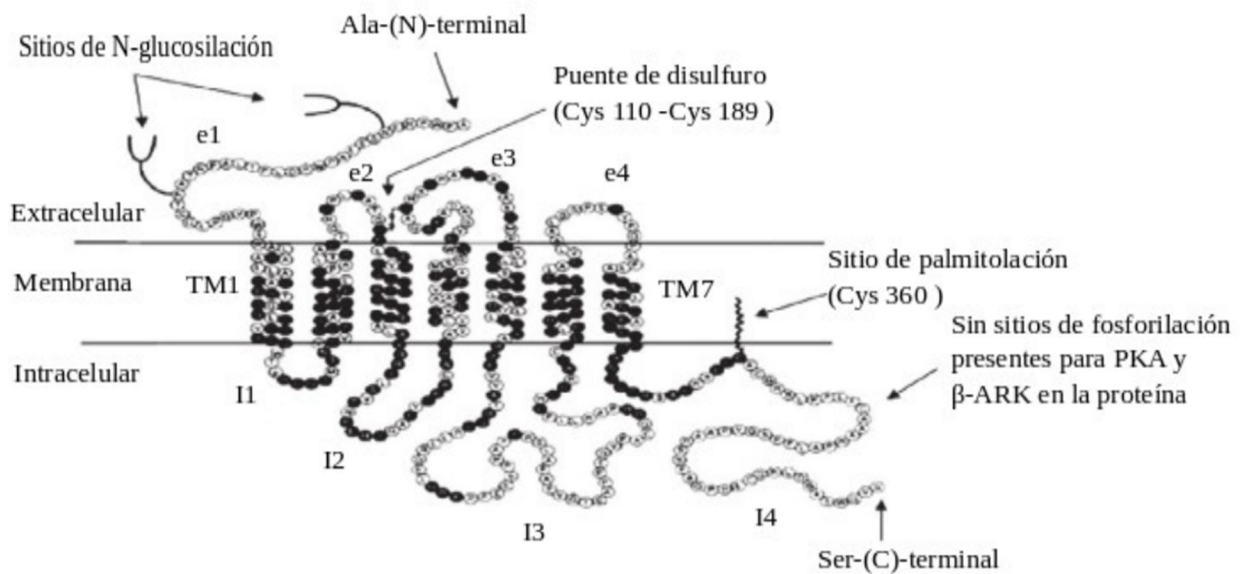
## 1. INTRODUCCIÓN.

Actualmente se reconocen tres tipos de receptores  $\beta$ -Adrenérgicos ( $\beta$ -ARs). Los primeros en ser clasificados fueron los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  en el año 1967 de acuerdo a los diferentes efectos fisiológicos que producían sus ligandos [1]. El receptor  $\beta_1$  se encuentra distribuido en el corazón (mayoritariamente), el tejido adiposo, y los riñones. Mientras que el receptor  $\beta_2$  se encuentra distribuido en los pulmones (principalmente), corazón, tejido adiposo, vejiga y útero [2]. El descubrimiento de estos dos tipos de receptores llevó al desarrollo de drogas selectivas para el tratamiento de la hipertensión y el asma. El hallazgo de la existencia del receptor  $\beta_3$  se llevó a cabo durante la década de 1980 observándose su presencia en varias especies, incluyendo humanos, ratas, y ganado [3, 4]. Recientes reportes indican que los receptores  $\beta_3$  están expresados en el corazón [5], tejido adiposo [6], vesícula biliar, tracto gastrointestinal [7], próstata, vejiga urinaria [8], cerebro [9, 10] y también en el miometrio [11], modulando diferentes funciones fisiológicas. La amplia distribución del receptor  $\beta_3$  en el cuerpo humano ha hecho de éste un interesante y novedoso blanco para el desarrollo de drogas, enfocándose los esfuerzos en el descubrimiento de nuevos agonistas selectivos del receptor  $\beta_3$ . Algunas de las patologías que se pueden tratar mediante la modulación de este receptor son la obesidad, diabetes tipo II [12], caquexia, síndrome metabólico, fallas cardíacas, ansiedad y desórdenes depresivos, trabajo de parto prematuro, vejiga hiperactiva [13] y como paliativo en la terapia del cáncer de colon [14, 15].

### 1.1 Características estructurales del receptor $\beta_3$ -adrenérgico

Al igual que los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , el receptor  $\beta_3$  pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) que se caracterizan por tener siete dominios transmembrana, con tres bucles intracelulares y tres extracelulares (Fig. 1.1). Las propiedades generales de los tres subtipos de receptores se muestran en la tabla 1.1. El receptor  $\beta_3$  está constituido por 408 amino ácidos. La región *N*-terminal de estos receptores es extracelular y está glicosilada (el nitrógeno del amino ácido se encuentra enlazado a un polisacárido), mientras que el extremo *C*-terminal es intracelular y en el caso del receptor  $\beta_3$  no posee ningún sitio que pueda ser fosforilado por una enzima quinasa tipo A (PKA) o receptores quinasa beta ( $\beta$ -ARK), sitio que sí está presente en los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Los dominios de transmembrana TM3, TM4, TM5 y TM6 son

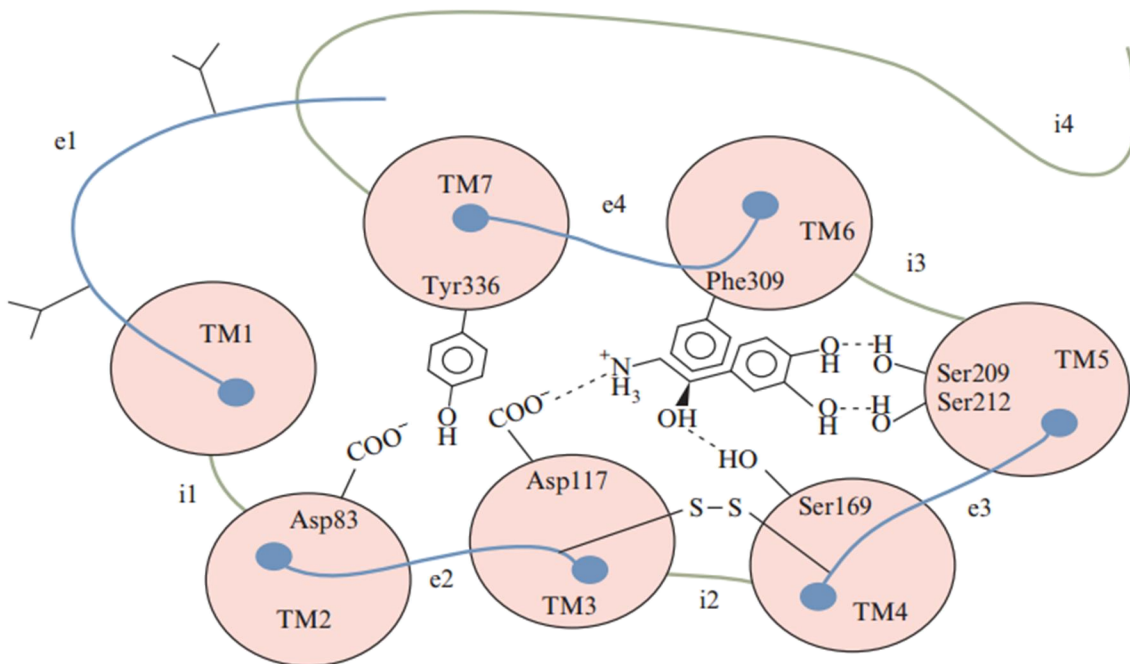
esenciales para la unión con el ligando (Fig.1.2), mientras que los dominios TM2 y TM7 están involucrados en la activación de la proteína G [4]. El puente de disulfuro entre Cys110 en el segundo bucle y Cys189 en el tercer bucle extracelular es esencial para la unión del ligando y la actividad del receptor. El residuo de Cys361 en el cuarto dominio intracelular está palmitoilado, es decir, se encuentra unido covalentemente a un ácido palmítico. La palmitoilación ha mostrado mediar la estimulación de la adenilil ciclasa cuando se encuentra un agonista unido al receptor, posiblemente promoviendo la inserción de varios residuos adyacentes en la membrana y así formando un bucle intracelular adicional resultando en una conformación activa para el acoplamiento de proteína G [16].



**Figura 1.1** Estructura primaria del receptor  $\beta_3$ . Los residuos en círculos son comunes para los tres subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgico.

**Tabla 1.1** Propiedades de los tres subtipos de receptores  $\beta$  (Datos de Perrone et al. [17])

	$\beta_1$ -AR	$\beta_2$ -AR	$\beta_3$ -AR
Amino ácidos, n	477	413	408
Intrones, n	-	-	2
Fosforilación por PKA y $\beta$ -ARK	Sí	Sí	No
Agonista endógeno	Noradrenalina	Adrenalina	Noradrenalina
Antagonista selectivo	CGP 20712A, atenolol, metoprolol		
Proteína G	Gs	Gs	Gs, Gi
Efector	Adenilil ciclasa	Adenilil ciclasa	Adenilil ciclasa, NO sintasa
Distribución tisular	Corazón (principalmente), tejido adiposo, riñones.	Pulmones (principalmente), corazón, tejido adiposo, vejiga, útero	Tejido adiposo, corazón, vejiga, intestino, útero, páncreas y cerebro



**Figura 1.2** Sitios de unión de los ligandos del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico. Se muestra una molécula de noradrenalina rodeada por varios de los amino ácidos involucrados en la unión del agonista.

## 1.2 Importancia terapéutica del receptor $\beta_3$ -adrenérgico

El receptor  $\beta_3$  se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo humano abarcando diferentes tejidos y regulando diversas funciones fisiológicas, lo que lo hace un atractivo blanco para desarrollar drogas con el fin de generar nuevos tratamientos para las patologías que afectan estos órganos. A continuación se describen brevemente las funciones fisiológicas que cumple este receptor en los tejidos mencionados en la tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Tejidos humanos que expresan el  $\beta_3$ -AR.

Tejido adiposo blanco	Cerebro
Tejido adiposo marrón	Vesícula biliar
Corazón	Próstata
Colon	Intestino delgado
Vejiga urinaria	Estómago
Uréteres	Miometrio
Musculo esquelético	Cuerpos cavernosos del pene

### Receptores $\beta_3$ del miocardio.

En los miocitos auriculares la activación de los  $\beta_3$ -ARs conduce a la fosforilación de los canales de calcio junto con el aumento del flujo de calcio a través de la membrana [18]. Estudios recientes han mostrado que los receptores  $\beta_3$  tienen una acción ionotrópica negativa en los ventrículos, acción mediada por la activación de las proteínas  $G_i$ . Los receptores  $\beta_3$  del músculo ventricular humano estimularon la producción de NO (óxido nítrico) mediante la activación de la NO sintasa endotelial, la cual fue descubierta en los miocitos ventriculares. De este modo, NO produce un aumento de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) con la consecuente inhibición de la fosfodiesterasa 3 y/o activación de la fosfodiesterasa 2, la cual puede disminuir la fuerza contráctil del miocardio. En el ventrículo humano, en el caso de la insuficiencia cardíaca, se produjo un aumento de 2 a 3 veces en la cantidad normal de receptores  $\beta_3$  [19].

### Receptores $\beta_3$ de los vasos sanguíneos.

Receptores  $\beta_3$  fueron encontrados en anillos arteriales pulmonares aislados de caninos bajo condiciones isométricas *in vitro* y su estimulación indujo una vasodilatación dependiente de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) [20]. La presencia de receptores  $\beta_3$

en músculo periférico microvascular fue estudiada en perros mediante mediciones del flujo sanguíneo cutáneo y cambios en la temperatura de la piel. Su estimulación indujo vasodilatación en esta zona [21]. En monos *rhesus* anestesiados, se observó también un efecto vasodilatador en los territorios cutáneos y grasos y condujo a una baja en la presión sanguínea y a un incremento en la frecuencia cardíaca [22].

En humanos, los receptores  $\beta_3$  fueron encontrados empleando análisis de reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa y *Western Blotting*, en el endotelio de la arteria mamaria interna produciendo vasodilatación inducida por NO, lo que sugiere una posible implicación práctica en cirugía de bypass de arteria coronaria [23].

También fueron encontrados en arterias coronarias humanas empleando reacción en cadena de polimerasa (PCR) de transcripción reversa e inmunotinción, hallándose que mediaban la vasodilatación adrenérgica por dos mecanismos: incremento en la síntesis de NO e hiperpolarización celular (a través de canales de potasio activados por calcio) [24].

### **Receptores $\beta_3$ cerebrales.**

La presencia de adrenoreceptores  $\beta_3$  en diferentes regiones del cerebro de rata fue demostrada empleando PCR de transcripción reversa. Los niveles de mRNA (ácido ribonucleico mensajero) para  $\beta_3$  fueron mayores en el hipocampo, corteza y cuerpo estriado y bajos en el hipotálamo, tronco cerebral y cerebelo [9]. La administración intracerebroventricular de un agonista  $\beta_3$  a una rata condujo a la activación de las áreas hipotalámicas que son responsables de la regulación central del apetito a través de un efecto mediado por receptores  $\beta_3$  [25]. Se encontró además que en niños muy pequeños las cantidades en el cerebro de mRNA para  $\beta_3$  era cien veces mayor que en adultos [10].

### **Receptores $\beta_3$ en el tracto gastrointestinal.**

Mediante el uso de agonistas  $\beta_3$  selectivos los receptores  $\beta_3$  fueron estudiados en el tracto intestinal, los cuales pueden jugar un papel en la modulación de la movilidad gastrointestinal [26]. Los receptores  $\beta_3$  produjeron una ralentización en el vaciado gástrico y en el tránsito intestinal. En conejillos de india la estimulación de  $\beta_3$ -ARs indujo relajación dependiente de cAMP en el *fundus* del estómago y una relajación independiente de cAMP en el duodeno [27].

En ratas, los receptores  $\beta_3$  tienen un rol inhibitorio en el control de la secreción ácida inducida por estímulos indirectos (pentagastrina, deoxiglucosa) [28].

Los receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son detectables en el colon humano y la estimulación de cada tipo por agonistas indujo relajación de la musculatura longitudinal del colon [29].

### **Receptores $\beta_3$ del aparato urinario.**

La estimulación de los receptores  $\beta_3$  indujo relajación del músculo detrusor vesical (músculo de la pared) [30].

Los receptores  $\beta_3$  ubicados en el músculo liso de los uréteres junto con los otros subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos produjeron relajación uretral inducida por estimulación adrenérgica [31].

### **Receptores $\beta_3$ del aparato genital.**

Receptores del tipo  $\beta_3$  están presentes en el cuerpo cavernoso del pene, en las células de músculo liso, según lo indicado por los análisis de inmunohistoquímica y *Western Blot*. Después de la activación de estos receptores por el ligando BRL 37344, se produjo una relajación vascular dependiente de cGMP pero independiente de NO [32].

Empleando ensayos de radioligandos, análisis de RT-PCR y *Western blotting* se encontró que en el miometrio humano están presentes los receptores  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Ambos fueron identificados en el tejido miometrial tanto de embarazadas como de no embarazadas. En ambos casos el  $\beta_3$ -AR era el mayoritario [33]. La expresión de  $\beta_3$ -AR y la reactividad inmune del receptor fueron mayores en el miometrio de las mujeres embarazadas. La inhibición de contracciones espontáneas producida por un agonista  $\beta_3$ , SR 59119A, fue significativamente mayor en las embarazadas, en comparación con el miometrio de no embarazadas [11].

### **Receptores $\beta_3$ adrenérgicos del aparato respiratorio.**

En conejos, la existencia de los  $\beta_3$ -ARs se demostró en el epitelio nasal y estos receptores estaban implicados en el control del movimiento del agua y sal a través del epitelio [34]. Los receptores  $\beta_3$  también se encuentran en el músculo liso bronquial de los perros y su estimulación induce bronquiodilatación dependiente de cAMP [35].

La presencia de receptores  $\beta_3$  funcionales en los músculos bronquiales parece ser dependiente de la especie. De modo que después de administrar agonistas específicos de receptores  $\beta_3$  se produjo relajación bronquial en perros pero no en humanos, conejillos de indias u ovejas [36].

### **Receptores $\beta_3$ del músculo esquelético.**

Los receptores  $\beta_3$  median la inhibición de proteólisis dependiente de calcio, participando en el efecto antiproteolítico de las catecolaminas en los músculos esqueléticos privados de nutrientes [37]. La captura de glucosa en músculo esquelético, directamente estimulada por agonistas de  $\beta_3$ -ARs, pareciera no estar involucrada en la estimulación directa de adenilil ciclasa [38].

### **Receptores $\beta_3$ en el tejido adiposo blanco.**

La estimulación de los receptores  $\beta_3$ -Adrenérgicos mediante agonistas específicos constituye un aspecto central en la lipólisis en el tejido adiposo blanco y la consecuente liberación de ácidos grasos en la sangre. Este efecto es de corta duración, no se extiende por más de 24 horas. Los ácidos grasos libres son la principal fuente para mantener la termogénesis (proceso de producción de calor en el organismo) en el tejido adiposo marrón [39].

El tratamiento crónico con agonistas  $\beta_3$  en roedores obesos insulinoresistentes condujo a una baja en el peso producto de la reducción del tejido adiposo. Un hecho interesante es que este efecto sólo se apreció en animales obesos y no en los normales [40].

Los efectos metabólicos se pueden considerar como los efectos más interesantes producidos por la estimulación de los adrenoreceptores  $\beta_3$ . Las perspectivas terapéuticas

incluyen el empleo de agonistas  $\beta_3$  como droga contra la diabetes y la obesidad. Una lista de las potenciales indicaciones terapéuticas se da a continuación en la tabla 1.3.

**Tabla 1.3** Posible uso clínico de los ligandos de  $\beta_3$ -ARs [41].

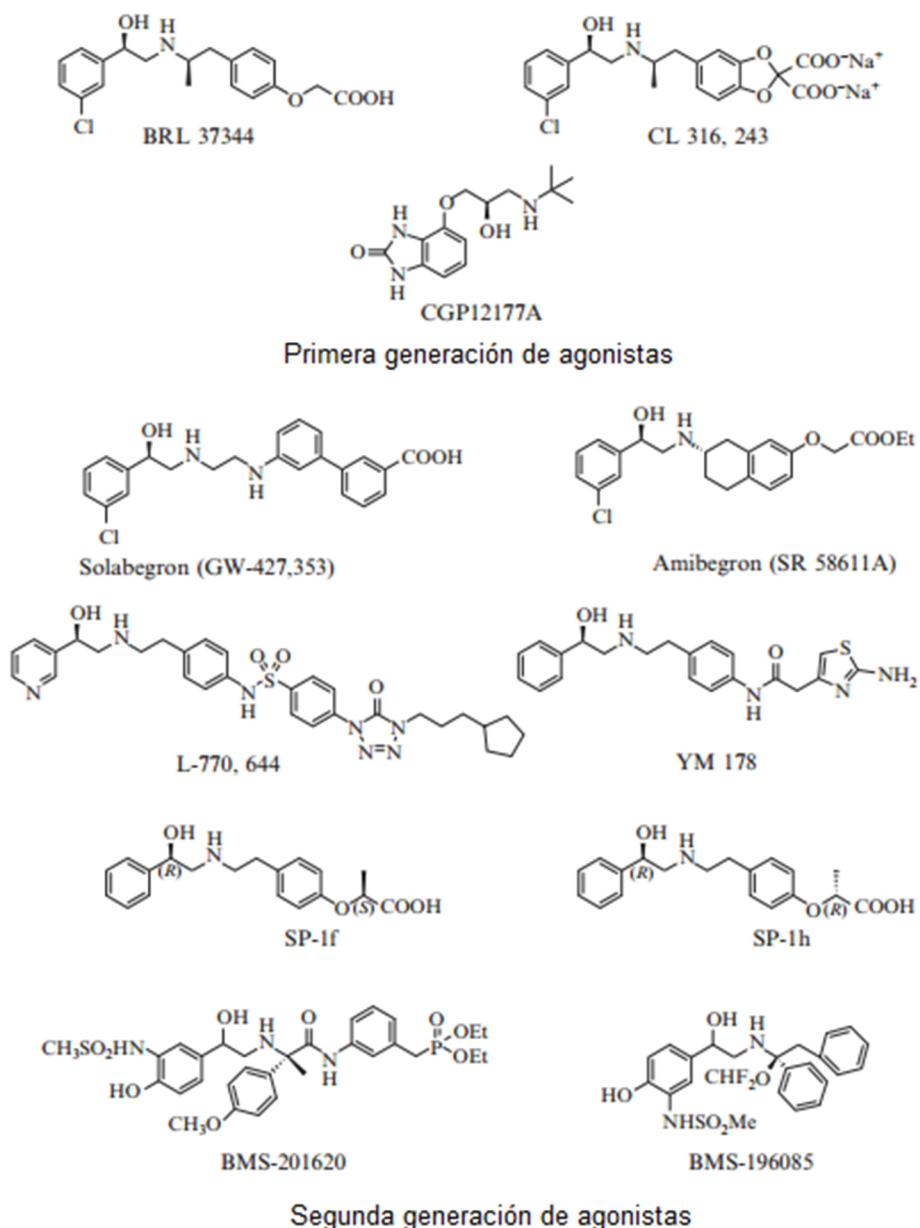
Localización	Potencial indicación	Tipo de droga
Tejido adiposo	Diabetes tipo 2, caquexia, síndrome metabólico, obesidad	Agonista, antagonista, agonista inverso
Corazón	Enfermedades cardíacas	Agonista, antagonista, agonista inverso
Cerebro (hipocampo, hipotálamo, amígdala y corteza cerebral)	Desórdenes de ansiedad y depresivos	Agonista (amibegron, descontinuado después de fase III)
Miometrio	Trabajo de parto prematuro	Agonista
Vejiga urinaria	Vejiga hiperactiva	Agonista (mirabegron, aprobado 2012; solabegron, fase II)
Intestino	Modulación de la movilidad colónica, Síndrome irritable de Bowel (IBS), cáncer de colon	Agonista (solabegron, fase II, IBS), antagonista, agonista inverso
Vasos sanguíneos (endotelio)	Hipertensión, bypass coronario	Agonista
Hígado y circulación portal	Hipertensión portal	Agonista

### 1.3 Ligandos afines al receptor $\beta_3$ -adrenérgico.

A pesar de la similitud que existe entre los subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, existe evidencia de que los ligandos se unen de manera diferente al  $\beta_3$ -AR respecto a como lo hacen con los  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -ARs. Cierta número de ligandos que se comportan como antagonistas en  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son agonistas parciales o totales en  $\beta_3$ . Adicionalmente se ha desarrollado un número de ligandos que muestran alta selectividad por el receptor  $\beta_3$ , lo que demuestra que existen diferencias explotables entre estos subtipos de receptores [40], los cuales presentan diferentes características y actividades particulares, según sean agonistas, antagonistas o agonistas inversos. Estos tipos se definen a continuación.

### 1.3.1 Agonistas $\beta_3$ adrenérgicos.

Desde su descubrimiento, el receptor  $\beta_3$  atrajo el interés de la empresa farmacéutica ya que parecía jugar un papel en la regulación del balance energético y homeostasis de la glucosa, expresándose tanto en el tejido adiposo blanco humano como en el marrón. En adipocitos de roedores los receptores  $\beta_3$  tienen ese papel fisiológico establecido. Los agonistas  $\beta_3$  sirven de tratamiento crónico en animales obesos y diabéticos, y hay reportes que reducen la adiposidad y mejoran la diabetes tipo II [42]. Los efectos de agonistas  $\beta_3$  observado en roedores llevó al desarrollo del compuesto para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo II en humanos, pero los estudios clínicos no fueron satisfactorios debido a la mala actividad y selectividad de estos compuestos en el humano. Los agonistas  $\beta_3$  adrenérgicos más conocidos de primera y segunda generación se reportan en la tabla 1.3.1.



**Figura 1.3.1** Estructuras de Agonistas  $\beta_3$ -AR.

En adultos jóvenes sanos, los  $\beta_3$  juegan un papel de menor importancia en el control de la lipólisis y nutrición del flujo de sangre en el tejido adiposo abdominal subcutáneo humano [45]. Mientras que en el adipocito blanco adulto, fue detectada una baja expresión de  $\beta_3$ -AR [46]. Los resultados de estudios recientes confirman que el efecto antidiabético de los agonistas  $\beta_3$  CL316,243 y SR58611 (Figura 1.3.1) se debe a la relación mecanicista entre

el receptor de ácidos grasos libres (GPR40) y la señalización adrenérgica en los tejidos adiposos y pancreáticos de las células- $\beta$  [12].

La presencia de  $\beta_3$ -AR en el cerebro aun es aún tema de debate [47], pero experimentos usando PCR con transcripción inversa abogan por la presencia de ARNm  $\beta_3$ -AR en discretas regiones del cerebro humano y rata, incluido el hipocampo, hipotálamo, la amígdala y la corteza cerebral [10, 48]. Estas regiones del cerebro participan en el control de las emociones y son consideradas como el objetivo principal de los tratamientos actuales de la depresión [49]. El amibegron (SR58611A, figura 1.3.1), un selectivo agonista  $\beta_3$ -AR activo por vía oral y cerebro-penetrante, ha demostrado amplia utilidad por sus efectos de tipo ansiolíticos y antidepresivo en una amplia variedad de modelos de roedores comparables con la eficacia de los efectos de un antidepresivo clásico como la Fluoxetina. El amibegron parece carecer de efectos secundarios importantes tales como la taquicardia o alteración de la actividad motora [50]. La fase III de ensayos clínicos sobre SR58611A para el tratamiento de la ansiedad y la depresión han sido terminada y se espera la información de la fase IV.

Dado a la presencia predominante de adnorreceptores  $\beta_3$  en el miometrio de mujeres embarazadas y no embarazadas. Donde el acoplamiento a la proteína Gi reduce la contracciones y por consiguiente inhibe la adenilato ciclasa/ AMPc. En este ámbito los agonistas  $\beta_3$  pueden tener un considerable uso farmacológico en el manejo clínico del trabajo de parto prematuro por ejemplo BRL3744 (Figura 1.3.1), un agonista  $\beta_3$  induce la relajación de las contracciones del miometrio humano con una potencia similar a la ritodrina (un agonista  $\beta_2$ -AR) [51].

La contracción fisiológica de la vejiga urinaria es en su mayoría mediada por los receptores muscarínicos, principalmente por subtipos  $M_3$ . La relajación de la vejiga, requerida para el almacenamiento de la orina, es predominante, si no exclusivamente, mediada por receptores  $\beta_3$  adrenérgico. Una estimulación excesiva de la contracción o una reducción de la relajación del musculo liso detrusor durante la fase de almacenamiento de la orina puede traducirse en síndrome de vejiga hiperactiva (OAB, de sus siglas en inglés *overactive bladder*), el que es caracterizado por frecuencia urinaria, nocturia e incontinencia de urgencia. Dado a la sobreexpresión de  $\beta_3$ -AR en la vejiga humana se sugiere que los agonistas de este receptor podrían ser eficaces en el

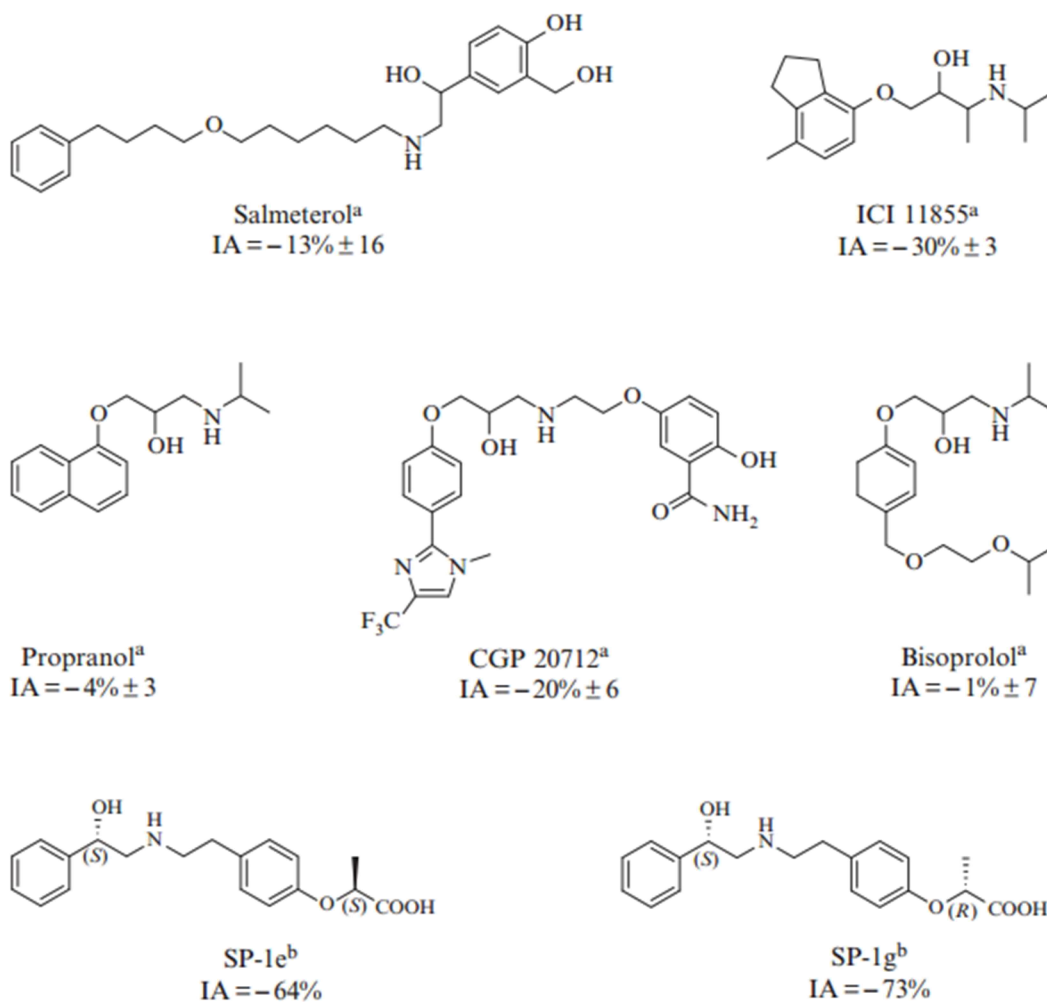
tratamiento de OAB. Diferentes estudios han sido encaminados a demostrar la participación de  $\beta_3$ -AR en la frecuencia urinaria y en la identificación de agentes relajantes potentes del musculo detrusor humano como alternativa al tratamiento clásico con antagonistas de los receptores muscarínicos dotado de pobres índices terapéuticos. De hecho, los agonistas  $\beta_3$ -AR solabegron e YM178 (Figura 1.3.1) están actualmente en la fase I y II de ensayos clínicos para el tratamiento de OAB [52].

Los  $\beta_3$ -AR modulan la motilidad del colon. Las contracciones espontaneas se reducen e inhiben, por agonistas  $\beta_3$ -AR como SR58611A o CGP12177A [53] (Figura 1.3.1) respectivamente. El efecto relajante de los agonistas  $\beta_3$  adrenérgicos en el musculo liso intestinal explica el aumento de “cumplimiento” (es decir, la capacidad del intestino para relajarse tras la aplicación de un estímulo de distensión), y puede llegar a ser un enfoque útil en el tratamiento de algunos trastornos intestinales funcionales (por ejemplo, la dispepsia funcional), donde disminuye la acomodación gástrica [54].

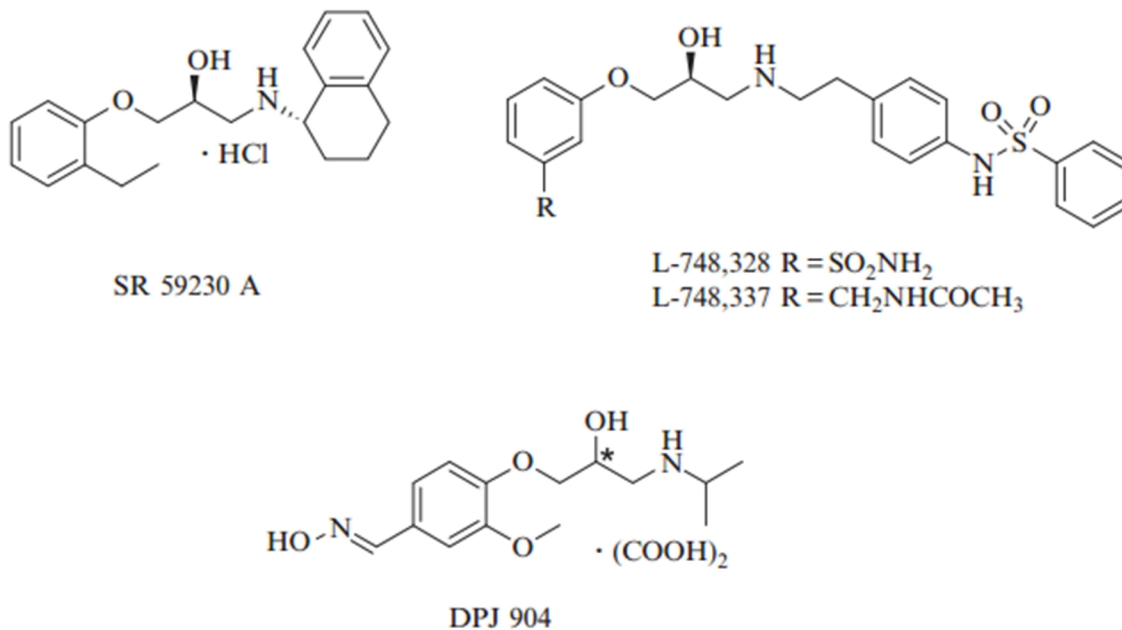
### **1.3.2 Antagonistas y agonistas inversos $\beta_3$ adrenérgicos.**

A diferencia del receptor  $\beta_1$  [55, 56] y el  $\beta_2$ , [57] son pocos los agonistas inversos  $\beta_3$  adrenérgicos que se han reportado [58, 59].

Nuevos datos sugieren que algunos antagonistas  $\beta$ -AR clásicos, se comportan bien como agonistas parciales, antagonistas neutros o agonistas inversos en sistemas de células que expresa el tipo nativo o un mutante humano. Por ejemplo, el metoprolol un antagonista  $\beta_1$  selectivo con significativa actividad agonista inversa, ha demostrado ser seguro en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardiaca. Desafortunadamente, los estudios clínicos hasta la fecha con agonistas inversos del  $\beta_2$  y  $\beta_3$  aún no están disponibles. En la figura 1.3.2 se muestran agonistas inversos beta-3 adrenérgicos conocidos y en la figura 1.3.3 la estructura de antagonistas beta-3 adrenérgicos selectivos.



**Figura 1.3.2** Agonistas inversos  $\beta_3$  adrenérgicos. <sup>a</sup>La estimulación de la adenilato ciclasa presenta un porcentaje de estimulación máximo alcanzado por isoproterenol (130 mM). Las actividades de los agonistas inversos se calcularon como el porcentaje de reducción de la actividad de la adenilato ciclasa [58]. <sup>b</sup>IA es el valor máximo esperado de la curva de concentración-respuesta, expresada como porcentaje de la respuesta máxima para (*R*)-(-)-isoproterenol ( $10^{-4}$  M) [59].



**Figura 1.3.3** Antagonistas selectivos  $\beta_3$  adrenérgicos. Dentro de los posibles usos de los antagonistas  $\beta_3$ -AR resalta el ser útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca avanzada.

Salmaterol (Figura 1.3.2) es un fármaco agonista  $\beta_2$ -AR de acción prolongada que está actualmente pre descrito para el tratamiento del asma y obstrucción pulmonar crónica. Es dotado también de actividad agonista inversa tanto para  $\beta_1$  y  $\beta_3$  (IA = -33% a -13% respectivamente) [58]. Se encontró que ICI 118551(Figura 1.3.2) es un agonista inverso para los tres subtipos (IA = -22% para  $\beta_1$ -AR, -32% para  $\beta_2$ -AR, y -30% para  $\beta_3$ -AR). Propranolol es un  $\beta$  bloqueador no selectivo que se usa principalmente en el tratamiento de la hipertensión. Fue el primer  $\beta$  bloqueador desarrollado. En ciertas investigaciones [58] se encontró que era un agonista inverso para los tres sub tipos de  $\beta$ -AR (IA = -35% para  $\beta_1$ -AR, -35% para  $\beta_2$ -AR, y -4% para  $\beta_3$ -AR), mientras que el ligando CGP20712 (Figura 1.3.2) es altamente selectivo como agonista inverso y además es un potente antagonista  $\beta_1$ .

La mayoría de los ligandos  $\beta_3$ -AR reportados hasta el momento, comparten una estructura general bastante similar, en el que tres porciones moleculares pueden ser identificadas: un fragmento a la izquierda (LHS, del inglés *Left Hand Side*), un conector (LK, del inglés

*linker*), y un fragmento a la derecha (RHS, del inglés *Right Hand Side*). LHS es típicamente un fragmento ariletanolamina o ariloxipropanolamina [59, 60], LK tiene diversas estructuras que incluyen restos tanto conectores aromáticos y alifáticos [17], RHS suele contener funciones polares y/o ionizables incluyendo ureas, acilamidas, sulfonamidas y grupos sulfónico, fosfónico y carboxílicos [61, 62].

El receptor  $\beta_3$  exhibe un grado diferente de estereoselectividad para varios ligandos  $\beta$ -ARs tales como la isoprenalina y la noradrenalina [63]. Además, en distintas especies como humano, rata y ratón, el grado del efecto  $\beta_3$ -ARs varía entre las especies. En el receptor  $\beta_3$  humano, en particular, los ligandos tienden a mostrar mayores afinidades e índices más altos que en los receptores enantioselectivos de ratón o rata [63].

Hasta ahora, varios estudios tratan la relación que existe entre los requerimientos estereoquímicos y la actividad agonista  $\beta_3$  adrenérgica usando compuestos ópticamente activos, lo que demuestra que la actividad hacia el receptor es mayor cuando el centro estereogénico que lleva el grupo hidroxilo en LHS tiene configuración absoluta *R* en la serie de ariletanolaminas, y configuración *S* en la serie de ariloxipropanolaminas (Figura 1.3.3). Además varias investigaciones han evaluado y sintetizado nuevos grupos de compuestos ópticamente activos con centros estereogénicos adicionales, situados casi exclusivamente en los átomos de carbono adyacentes al nitrógeno amínico con respecto a LHS y LK [64-70]. Dichos compuestos resultaron ser agonistas completos o parciales o bien antagonistas  $\beta_3$  adrenérgicos.

A continuación se explicarán cuáles son los requisitos estructurales necesarios para que un compuesto posea afinidad beta adrenérgica y que se deben tener en consideración en el diseño de cualquier compuesto que se espere presente selectividad por el receptor  $\beta_3$ .

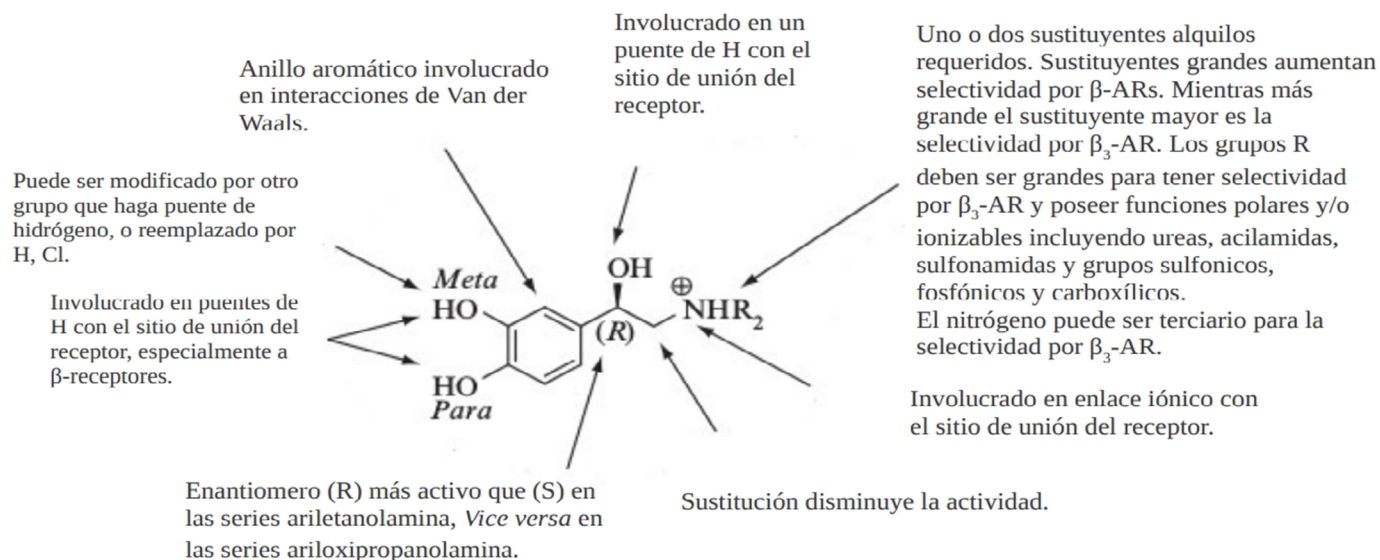
#### 1.4 Relaciones estructura-actividad para ligandos $\beta_3$ adrenérgicos.

Los estudios de relaciones estructura-actividad (SAR, de sus siglas en inglés *structure-activity relationship*) se han llevado a cabo con numerosos ligandos de la familia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos para comprender que partes de la molécula constituyen un componente esencial para la actividad biológica y selectividad por uno u otro subtipo de receptor. Respecto a los componentes estructurales de los ligandos afines al receptor beta-3 se deben tener las siguientes consideraciones:

- El grupo alcohol: el enantiomero (*R*) de la molécula de noradrenalina es más activo que el enantiomero (*S*), lo que implica que el alcohol secundario está involucrado en un puente de hidrógeno estereoespecífico. Los compuestos que carecen del grupo hidroxilo (p. ej. dopamina) muestran una afinidad reducida, validando el hecho que el grupo hidroxilo es importante pero no esencial.
- La amina está normalmente protonada a pH fisiológico. Esto es importante, ya que al reemplazar el nitrógeno por carbono ocurre una gran baja en la actividad. La actividad también se ve afectada por el número de sustituyentes sobre el nitrógeno. Las aminas primarias y secundarias tienen una buena actividad adrenérgica, mientras que las aminas terciarias o las sales de amonio cuaternario no la tienen. Sólo existen pocos ejemplos de ligandos  $\beta_3$  que poseen muy buena actividad y son aminas terciarias en donde el átomo de nitrógeno es parte de un anillo de piperazina y la parte ariletanolamina es reemplazada por un núcleo arioxipropanolamina [17].
- Los sustituyentes sobre el benceno son importantes. Los hidroxilos pueden ser reemplazados por otros sustituyentes capaces de interactuar por puente de hidrógeno con el sitio de unión. Sin embargo, el hidroxilo en posición meta en el fenol puede ser reemplazado por Cl o hidrógeno.
- Sustituyente alquilo en el nitrógeno: se descubrió que la adrenalina tiene la misma potencia para ambos tipos de adrenoreceptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ), mientras que la noradrenalina tiene mayor potencia en receptores  $\alpha$  que  $\beta$ . Esto indica que el sustituyente *N*-alquil juega un papel en la selectividad de receptor. Incrementar el tamaño del sustituyente *N*-alquil disminuye la potencia en  $\alpha$ -ARs pero la incrementa para  $\beta$ -ARs. La presencia de un sustituyente *N*-alquil voluminoso es beneficioso para la actividad  $\beta_3$  adrenérgica. Estos resultados indican que el receptor  $\beta_3$  debe tener un bolsillo hidrofóbico más

grande que los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , en el cual puede caber un grupo alquilo/arilo/alquilarilo voluminoso. Además, la actividad  $\beta_3$  adrenérgica sigue siendo apreciable cuando el grupo R (o Ar) lleva una función polar o ionizable, entre las que se incluyen ureas, sulfonamidas, acilamidas, y grupos sulfónicos, fosfónicos y ácidos carboxílicos [61, 62, 71-73].

En la figura 1.4 se presenta un resumen de los relaciones y variaciones estructurales más importantes a tener en cuenta para la unión de un ligando a los receptores  $\beta_3$ .



**Figura 1.4** Relaciones estructura-actividad más importantes para la unión al receptor  $\beta_3$ .

### **1.5 Relaciones estructura-actividad cuantitativas (QSAR) tridimensionales.**

El desarrollo racional de un ligando con determinada afinidad por un sitio de unión se puede abordar mediante técnicas computacionales y estadísticas que relacionen la actividad biológica de una molécula con sus características estructurales mediante lo que se conoce como estudios de relaciones estructura-actividad cuantitativos (QSAR, del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Existen estudios bidimensionales (QSAR 2D) y estudios con técnicas tridimensionales (QSAR 3D). Dentro de las técnicas tridimensionales podemos encontrar dos tipos: CoMFA y CoMSIA, las que se detallan a continuación.

### **1.6 Análisis comparativo de campos moleculares, CoMFA (de sus siglas en inglés *Comparative Molecular Field Analysis*).**

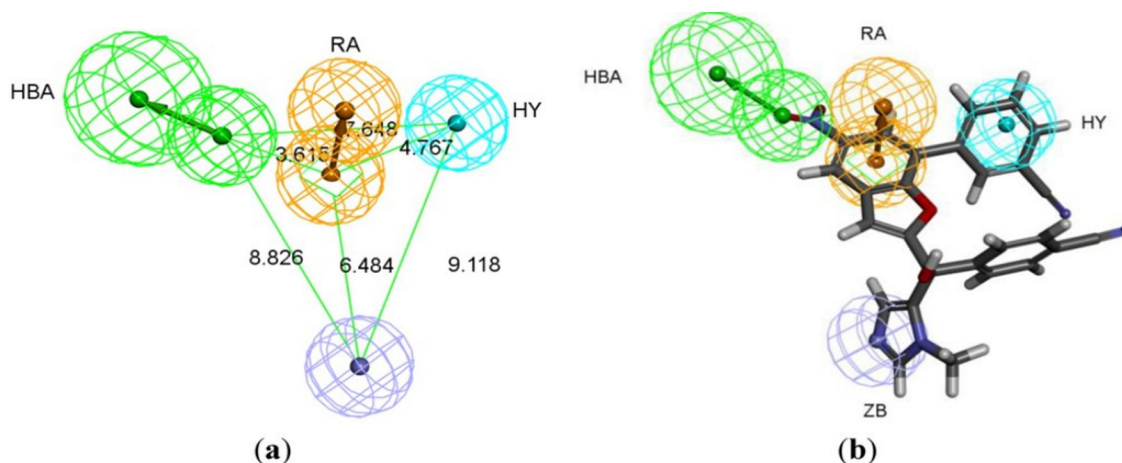
En el método de QSAR 3D las propiedades tridimensionales de la molécula son consideradas como un todo en lugar de tomar en cuenta las propiedades locales. En esta técnica se asume que las características más importantes de una molécula son su tamaño, forma y sus propiedades electrónicas (campos estéricos y electrostáticos).

Existen diversas aproximaciones a la técnica 3D QSAR, pero el método que ha captado mayor interés fue desarrollado por la compañía Tripos y se le conoce como CoMFA (de sus siglas en inglés *Comparative Molecular Field Analysis*), el cual se basa en el supuesto de que las interacciones entre la droga y el receptor son de tipo no covalentes y que los cambios en la actividad biológica están correlacionados con cambios en los campos estéricos y/o electrostáticos de la droga [74].

#### **Definiendo el campo estérico y electrostático.**

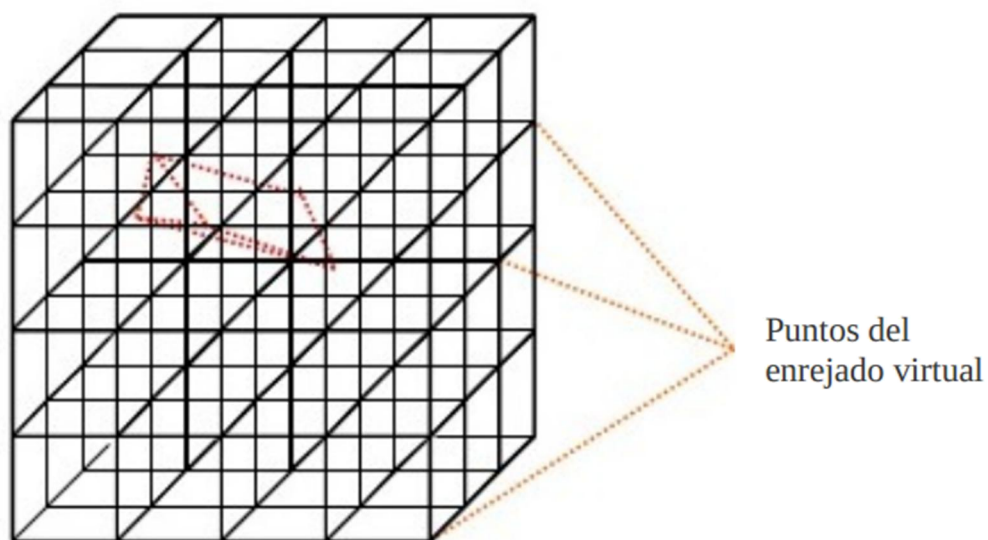
Para poder definir los campos estéricos y electrostáticos, una molécula se construye utilizando software de modelación molecular. Si se tienen diversas conformaciones estables para una molécula, entonces la conformación activa debe ser identificada y la energía minimizada. Luego se identifica el farmacóforo (Figura 1.6.1), que corresponde al conjunto de rasgos estéricos y electrónicos incluyendo la disposición espacial de ciertos átomos que son necesarios para asegurar las óptimas interacciones intermoleculares con

un blanco biológico específico y así gatillar o bloquear, según sea el caso, la respuesta biológica [75].

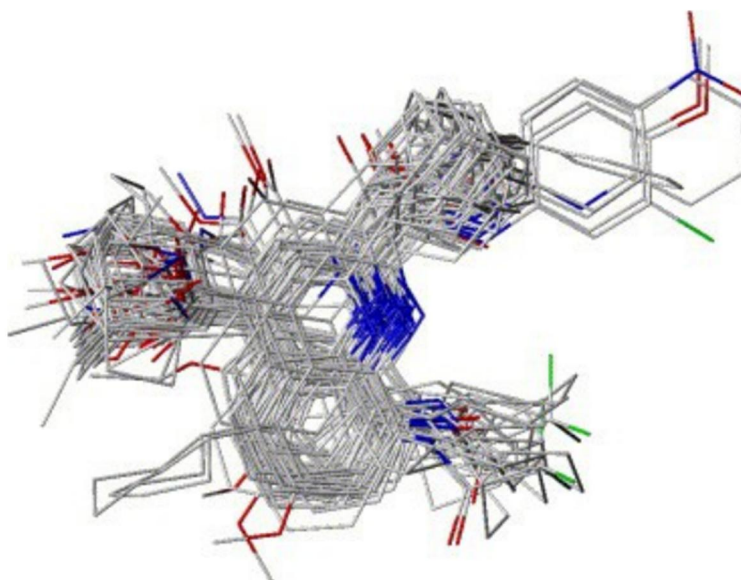


**Figura 1.6.1** (a) Representación de un farmacóforo con sus propiedades químicas y distancias entre sus diferentes regiones. HBA, aceptor de puente de hidrogeno; RA, anillo aromático; HY, zona hidrofóbica; ZB enlace de cinc. (b) Una molécula solapada con el farmacóforo.

El siguiente paso es colocar el farmacóforo en un enrejado virtual (Fig. 1.6.2). La posición del farmacóforo se mantiene constante y actúa como un punto de referencia cuando se posicionan diferentes moléculas en el enrejado. Por cada molécula que se estudie, su conformación activa y su farmacóforo son identificados y luego la molécula es colocada en el enrejado de tal manera que su farmacóforo calce con el farmacóforo de referencia. Para obtener los mejores resultados al superponer todas las moléculas en estudio sus farmacóforos respectivos deben calzar lo mejor posible con el de referencia (Fig. 1.6.3).



**Figura 1.6.2** Representación del farmacóforo (poliedro de puntos rojos) colocado al interior del enrejado virtual. Cada vértice representa un punto en el espacio.



**Figura 1.6.3** Ejemplo de una serie de análogos en estudio alineados todos respecto a un farmacóforo de referencia.

Una vez que se ha colocado una molécula en el enrejado, se mide el campo estérico y electrostático alrededor de ella. Esta medida se realiza posicionando un átomo sonda como un protón o un carbocatión con hibridación  $sp^3$  en cada uno de los puntos del

enrejado virtual. En lo que concierne al campo estérico, este aumentará a medida que el átomo sonda se acerca a la molécula. Por otra parte, en lo que respecta al campo electrostático, habrá una atracción entre la carga positiva del carbocatión y las regiones ricas en electrones de la molécula, y habrá repulsión entre el carbocatión y las regiones deficientes en electrones de la molécula. El valor de los campos estéricos y electrostáticos en cada punto del enrejado son tabulados, y esto se repite para cada molécula en estudio. Un valor en particular de la energía estérica se elige para definir la forma de la molécula, y los puntos del enrejado que tengan ese valor de energía se conectan por líneas de contorno para definir el campo estérico. Para medir el campo electrostático se lleva a cabo un proceso similar. Las regiones ricas y pobres son definidas para cada molécula por líneas de contorno apropiadas.

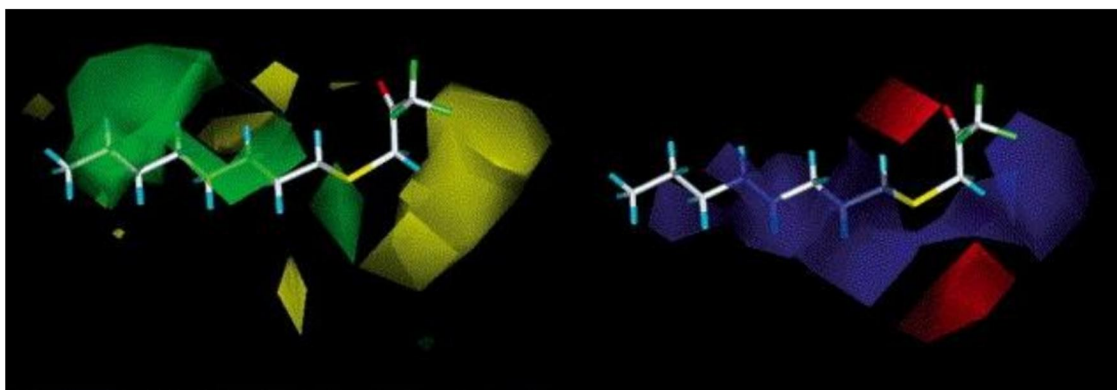
### **Relacionando la forma de la molécula y la distribución electrónica con la actividad biológica.**

En QSAR 3D, las variables para cada molécula son las interacciones estéricas y electrónicas calculadas en miles de puntos del enrejado virtual. Si se tuvieran 100 moléculas en estudio, el número de variables sobrepasa en gran manera el número de estructuras, por lo que no es posible relacionarlas con la actividad biológica por medio del análisis de regresión lineal estándar. Se debe seguir un procedimiento estadístico diferente, que se denomina mínimos cuadrados parciales o PLS (del inglés *partial least squares*). Es un proceso estadístico computacional, el cual es repetido iterativamente para intentar encontrar la mejor ecuación que relacione la actividad biológica con las diversas variables. Como parte de este proceso el número de variables se reduce a medida que se filtran aquellas que claramente no están relacionadas con la actividad biológica.

Una característica importante de este análisis es que una estructura es deliberadamente dejada fuera (método LOO, del inglés *Leave-One-Out*) mientras que con el resto de las moléculas se formula una regresión parcial. Cuando una ecuación ha sido definida, ésta es probada con la estructura que fue previamente excluida. A esto se le llama validación cruzada, y permite evaluar cuán bien la fórmula predice la actividad biológica para la molécula que fue excluida [76]. Los resultados son empleados en una nueva ronda de cálculos, pero esta vez se incluye en los cálculos la estructura que fue retirada y una estructura distinta se excluye. Esto conduce a una nueva fórmula mejorada la cual es

nuevamente probada con el compuesto dejado fuera. Este proceso continua hasta que la validación cruzada se ha llevado a cabo contra todas las estructuras.

Al término del proceso se obtiene la ecuación óptima. El poder de predicción de la ecuación final está cuantificado por el coeficiente de correlación de validación cruzada  $r^2$ , que usualmente se escribe como  $q^2$ . En contraste con el QSAR normal (bidimensional) donde  $r^2$  debe ser mayor que 0.8, los valores de  $q^2$  mayores que 0.5 son considerados significativos. Es más útil mostrar una representación gráfica que muestre cuáles regiones alrededor de la molécula son importantes para la actividad biológica por motivos estéricos o electrónicos. De esta manera, un mapa estérico muestra una serie de contornos coloreados indicando las interacciones estéricas benéficas y perjudiciales alrededor de una molécula representativa del conjunto de moléculas probadas. Un mapa similar de contornos se crea para ilustrar las interacciones electrostáticas benéficas y perjudiciales (Fig. 1.6.4).



**Figura 1.6.4** Se muestran dos mapas de contornos para una misma molécula donde se señala mediante color verde los sitios donde un sustituyente voluminoso mejoraría la actividad biológica, y en amarillo donde un sustituyente voluminoso perjudica la actividad biológica. El color rojo indica que un sustituyente con potencial electrostático negativo incrementa la actividad biológica, mientras que en las zonas azules un sustituyente con potencial electrostático positivo beneficiaría la actividad.

#### **Ventajas de CoMFA (QSAR 3D) por encima del QSAR tradicional (QSAR 2D).**

La técnica de QSAR tradicional presenta los siguientes problemas:

- Sólo se pueden estudiar moléculas con estructuras similares.

- La validez de los descriptores numéricos está en tela de juicio debido a que estos descriptores se obtienen midiendo velocidades de reacción y constantes de equilibrio en reacciones modelo y luego son tabuladas. Sin embargo, separar una propiedad de otra no es siempre posible en mediciones experimentales. Por ejemplo, la medición del factor estérico de Taft no es puramente una medida del factor estérico porque las velocidades de reacción empleadas para definirlo son también afectadas por factores electrónicos.
- Los descriptores tabulados podrían no incluir datos para sustituyentes inusuales.
- Se requiere sintetizar un rango de moléculas donde se varían los sustituyentes para probar una propiedad en particular.
- Las ecuaciones de QSAR tradicional no sugieren directamente que nuevos compuestos sintetizar.

Los problemas anteriores se evitan realizando estudios 3D-QSAR como CoMFA, que además posee las siguientes ventajas:

- Las interacciones favorables y desfavorables son representadas gráficamente por contornos tridimensionales alrededor de una molécula representativa. Una imagen es mucho más fácil de interpretar que una fórmula matemática.
- En QSAR 3D las propiedades de las moléculas son calculadas individualmente por un programa. No existe dependencia de factores experimentales o tabulados. No hay necesidad de restringir el estudio sólo a moléculas de estructura similar. Mientras uno esté seguro de que todos los compuestos en estudio compartan el mismo farmacóforo e interaccionan del mismo modo con la diana biológica, pueden ser analizados en un estudio de QSAR 3D.
- La representación gráfica de las interacciones benéficas y perjudiciales permiten diseñar nuevas estructuras. Como ejemplo, si un mapa de contorno muestra un efecto estérico favorable en una ubicación particular, esto implica que el sitio de unión de la droga tiene espacio para extender más la molécula en esa ubicación. Esto puede conducir a interacciones más favorables entre la droga y su receptor.

- Tanto el QSAR tradicional como el 3D pueden ser empleados sin la necesidad de conocer la estructura de la diana biológica.

### **Problemas potenciales del QSAR 3D.**

Hay que tener en cuenta ciertas consideraciones al momento de realizar un QSAR 3D para evitar equivocaciones. Algunas de estas son:

- Se debe procurar que cada molécula este en su conformación activa cuando se procede al alineamiento.
- Cada molécula debe estar debidamente alineada con respecto a las otras, de manera tal que sus farmacóforos coincidan.

Es posible conocer la conformación activa en estructuras rígidas como los esteroides, pero es más difícil con moléculas flexibles que tienen la capacidad de rotar sus enlaces. Por lo que resulta de utilidad tener un análogo cuya conformación esté restringida y sea biológicamente activo para que actúe como guía para la probable conformación activa. Entonces se pueden construir en el computador moléculas más flexibles con la conformación que calce lo más posible con la del análogo más rígido. Si la estructura del sitio de unión se conoce, esto puede ser útil para decidir la conformación activa probable para las moléculas y como deben ser alineadas previo al estudio QSAR 3D.

Se debe asegurar que todos los compuestos en estudio interactúen con la diana farmacológica de manera similar. Por ejemplo, un estudio de todos los posibles inhibidores de la acetilcolinesterasa está condenado al fracaso. La gran diversidad de estructuras involucradas hace imposible alinearlas para generar un farmacóforo tridimensional. Además, los diferentes inhibidores no interaccionan con la enzima del mismo modo. Estudios cristalográficos de rayos X de complejos enzima-inhibidor muestran que los inhibidores tacrina, edrofonio, y decametonio tienen todos diferentes orientaciones al unirse al sitio activo.

### **1.7 Análisis Comparativo de Índices de Similitud Molecular, CoMSIA (de sus siglas en inglés, *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*).**

El otro método empleado en la técnica de QSAR 3D es el CoMSIA. En el método de CoMFA tradicional se emplean únicamente potenciales de Lennard-Jones y Coulomb. Hay evidencia de que estos potenciales sólo describen las contribuciones energéticas a la constante de unión ligando-receptor [77]. Las influencias entrópicas no son consideradas en el CoMFA. Por tanto, de manera que sea posible incluir las contribuciones entrópicas, se requiere algún tipo de campo que considere las contribuciones hidrofóbicas a la actividad.

Los campos usados habitualmente en CoMFA presentan algunos problemas adicionales. Por ejemplo, el potencial de Lennard-Jones es extremadamente alto en la superficie de las moléculas. Como consecuencia, la energía potencial expresada en los puntos de enrejado en las proximidades a la superficie cambia dramáticamente. De este modo, tan sólo pequeños desplazamientos de las moléculas o cambios conformacionales mínimos pueden resultar en fuertes variaciones de estos descriptores.

Adicionalmente, los potenciales de Lennard-Jones y Coulomb presentan singularidades en las posiciones atómicas. Para evitar valores energéticos inaceptablemente grandes, los cálculos de los potenciales están normalmente restringidos a las regiones exteriores de la molécula, y se hace necesario definir algunos valores de corte energético arbitrarios. Estos valores de corte y otros parámetros arbitrarios pueden llevar a la pérdida de información sobre un determinado campo.

Para superar los problemas mencionados anteriormente surge el método CoMSIA. Usando una sonda común, se calculan los índices de similitudes para cada una de las moléculas alineadas en los puntos del enrejado espaciados regularmente. En principio, cualquier propiedad fisicoquímica puede ser considerada en esta aproximación para calcular un “campo” de índices de similitudes. Sin embargo, normalmente se emplean sólo propiedades estéricas, electrostáticas e hidrofóbicas [78]. Los índices obtenidos son evaluados en un análisis de PLS según el protocolo usual del método CoMFA [79], obteniendo finalmente gráficos de contornos análogos a los de CoMFA.

## 1.8 Estudios de QSAR 3D para ligandos $\beta_3$ -AR.

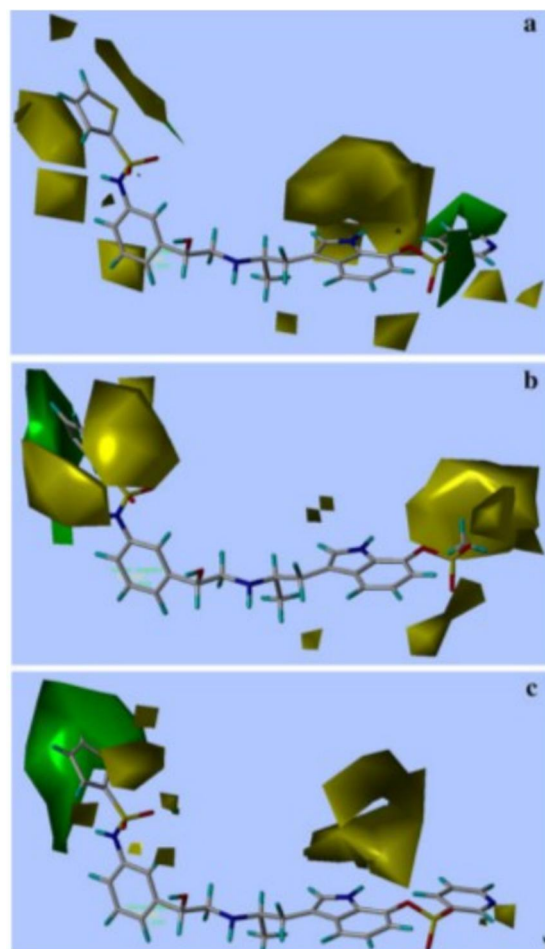
A continuación se presentan un estudio relevante de 3D QSAR de ligandos del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico en los que se puede apreciar el uso de los métodos CoMFA/CoMSIA. El trabajo fue publicado en el año 2010. La importancia de este estudio es que permitió esclarecer las grandes diferencias en cuanto a los requisitos de volumen y electronegatividad necesarios para conseguir selectividad  $\beta_3$  adrenérgica.

### 1.8.1 Estudio comparativo 3D QSAR en agonistas de receptores adrenérgicos $\beta_1$ , $\beta_2$ , $\beta_3$ .

Este estudio fue llevado a cabo por P. Senthil Kumar y Prasad V. Bharatam y publicado en la revista Medicinal Chemistry Research [80].

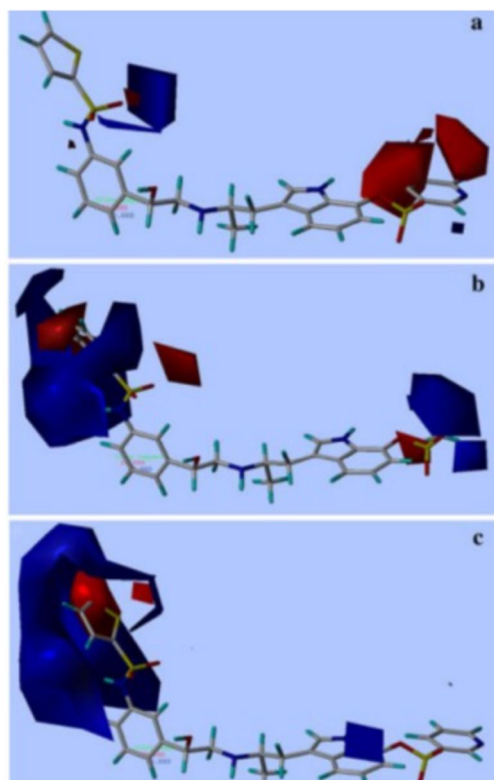
Se realizó un CoMFA a una serie de 27 derivados de triptamina con actividad biológica ( $EC_{50}$ , concentración a la cual se obtiene la mitad de la respuesta máxima del compuesto) reportada en los receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  [67, 71, 81-83]. Los compuestos fueron divididos en *training set* (compuestos con los que se desarrolla el modelo) y *test set* (compuestos con los que se somete a prueba el modelo). Las actividades biológicas son reportadas con valores de  $EC_{50}$  que van desde 0.13 a 1700, 5.2 a 330, y 0.062 a 220 nM para los receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , respectivamente. Las actividades biológicas en el training set fueron convertidas a valores de  $pEC_{50}$ , que son los logaritmos negativos de la concentración molar, y fueron usados como variable dependiente en el estudio CoMFA.

Los mapas de contornos estéricos obtenidos en este estudio se muestran en la figura 1.8.1. Se aprecian claras diferencias en los requerimientos espaciales de volumen necesarios para conseguir afinidad por un tipo de receptor beta adrenérgico. La diferencia clave es que el receptor beta 3 presenta mayor libertad para la inserción de grupos voluminosos en la zona izquierda (LHS) y una menor restricción para el incremento de volumen en la zona derecha (RHS) de los mismos, lo que se aprecia por la menor restricción impuesta (poliedro amarillo de menor tamaño) en el mapa **c** de la figura 1.8.1.



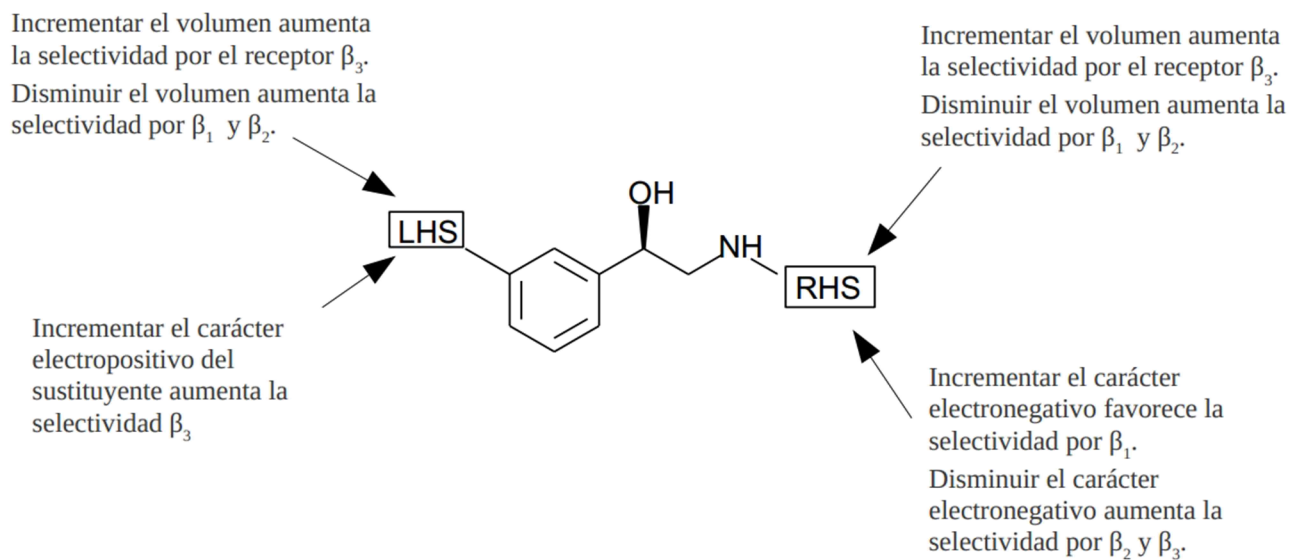
**Figura 1.8.1** Graficos de contorno estéricos de CoMFA de los derivados basados en triptamina del training set generados para los modelos  $\beta_1$  (a),  $\beta_2$  (b) ,  $\beta_3$  (c).

Por otra parte los mapas de contornos electrostáticos (Figura 1.8.2) dan cuenta de una preferencia de sustituyentes electropositivos en LHS, mientras que solo un pequeño poliedro azul en RHS da lugar a una exploración más exhaustiva de los requerimientos electrónicos necesarios en esa región.



**Figura 1.8.2** Gráficos de contorno electrostaticos de CoMFA de los derivados basados en triptamina del training set generados para los modelos  $\beta_1$  (a),  $\beta_2$  (b) ,  $\beta_3$  (c).

A continuación se resume en el esquema 1.8.3 las relaciones estructura actividad (SAR) derivadas de este estudio para tener en cuenta en el diseño y síntesis de ligandos selectivos por el receptor beta-3.



**Esquema 1.8.3** Resumen de relaciones estructura actividad (SAR). LHS= lado izquierdo de la molécula; RHS= lado derecho de la molécula.

## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

### 2.1 Hipótesis:

1. Dada la amplia variedad de compuestos de estructura heterocíclica con afinidad por el receptor beta-3 adrenérgico, postulamos que es posible hallar una correlación entre los potenciales estérico, electrostático, hidrofóbico, donador y aceptor de puente de hidrógeno y la potencia beta-3 adrenérgica de las moléculas. Dado que el receptor beta-3 posee un bolsillo hidrofóbico adicional respecto a los receptores beta-1 y beta-2, la actividad de los ligandos dependerá mayormente de sus propiedades estéricas e hidrofóbicas.

2. Teniendo en consideración, la escasa cantidad de benzimidazoles reportados con afinidad beta-3, nos interesamos en la síntesis de derivados de esta estructura en base al diseño basado en la información propuesta por nuestro modelo y los reportes previos de literatura ya comentados; y postulamos que es posible obtener moléculas de estructura *N*-(benzimidazo-2-alquil)-feniletanolamina, mediante reacciones clásicas de ciclación intramolecular a partir de ortofenilendiamina y derivados electrofílicos varios.

### 2.2 Objetivos

1. Bioinformáticos:

Llevar a cabo un modelo 3D-QSAR que permita proponer racionalmente la síntesis de nuevos derivados afines al receptor beta-3 adrenérgico con estructura de benzimidazol.

2. Sintéticos:

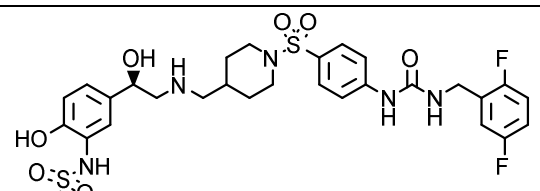
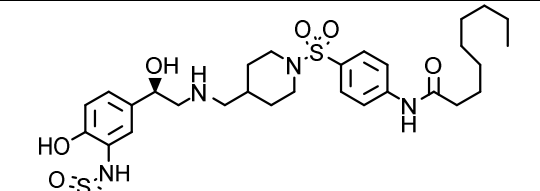
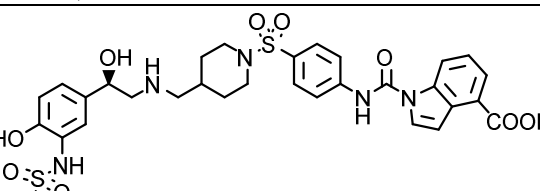
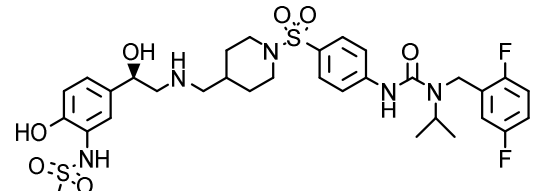
Llevar a cabo la síntesis de una serie de nuevos compuestos de estructura general *N*-(benzimidazo-2-alquil)-feniletanolamina

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS.

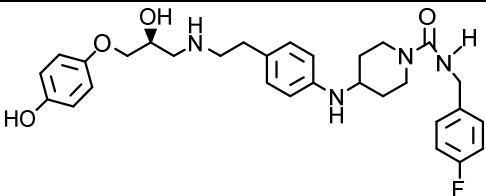
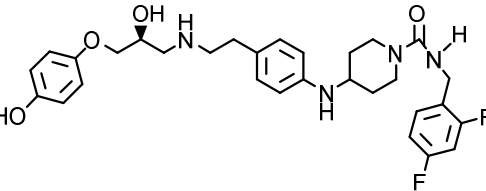
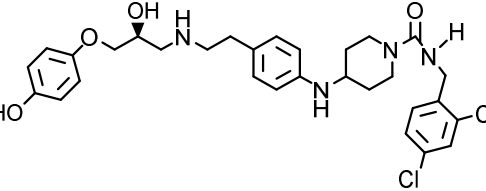
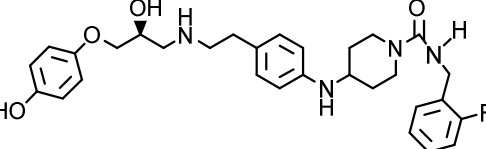
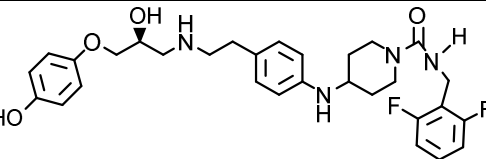
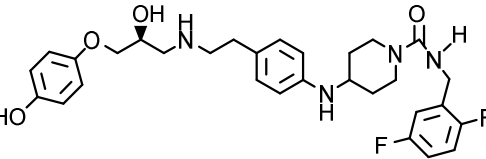
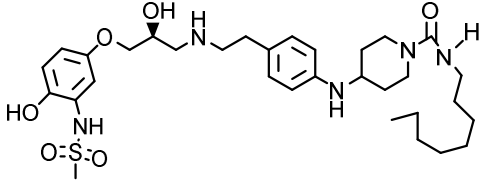
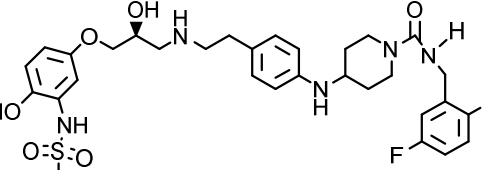
#### 3.1 Generación de los modelos 3D-QSAR CoMFA y CoMSIA.

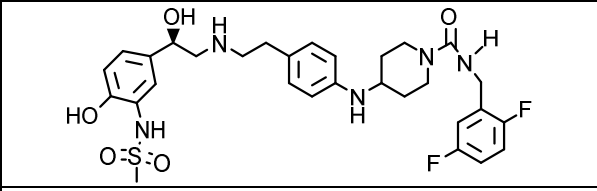
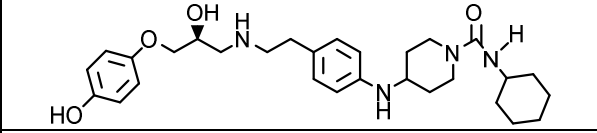
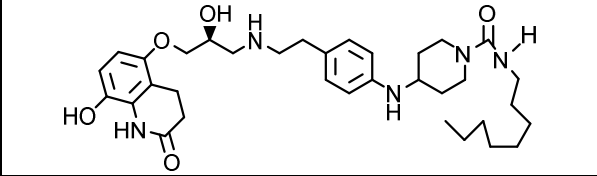
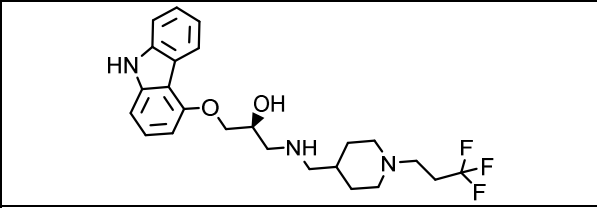
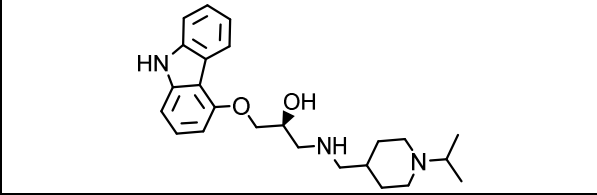
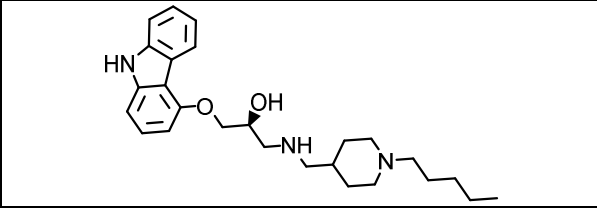
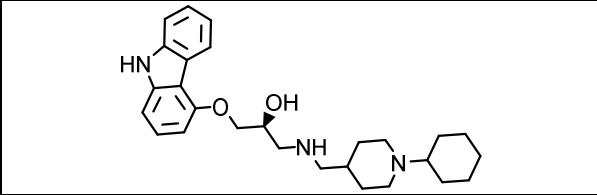
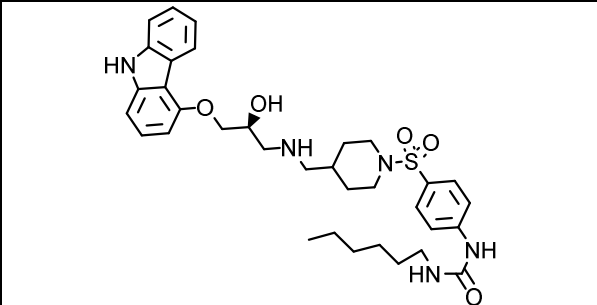
Para los estudios CoMFA y CoMSIA se trabajó con un extenso set de 47 estructuras obtenidas de la literatura [84-86] (tabla 3.1). Los valores de actividad biológica se encuentran reportados como EC<sub>50</sub> y fueron transformados a escala logarítmica. Los valores de pEC<sub>50</sub> se distribuyen de manera gaussiana a lo largo de más de 4 unidades logarítmicas. Un 20% de los compuestos fue separado como set de prueba (test set) y con el 80% restante se construyeron los modelos (training set). Esto permitió la validación de las ecuaciones obtenidas mediante el cálculo del coeficiente de validación cruzada predictivo para el test set ( $r^2_{pred}$ ).

**Tabla 3.1.** Estructura de los compuestos estudiados y su valor de actividad biológica.<sup>a</sup>

ID	Estructura	pEC <sub>50</sub>
QSAR_1		8.301
QSAR_2		8.221
QSAR_3		8.045
QSAR_4		4.568

QSAR_5		7.366
QSAR_6		7.508
QSAR_7		7.958
QSAR_8		7.327
QSAR_9		7.522
QSAR_10		7.045
QSAR_11		7.443
QSAR_12		6.537
QSAR_13		5.991
QSAR_14		7.301

QSAR_15		7.387
QSAR_16		7.522
QSAR_17		6.602
QSAR_18		7.431
QSAR_19		7.494
QSAR_20		7.638
QSAR_21		6.698
QSAR_22		9.000

QSAR_23		8.301
QSAR_24		7.096
QSAR_25		7.180
QSAR_26		6.725
QSAR_27		6.537
QSAR_28		6.496
QSAR_29		6.177
QSAR_30		7.318

QSAR_31		6.420
QSAR_32		7.154
QSAR_33		6.060
QSAR_34		6.899
QSAR_35		7.537
QSAR_36		9.000
QSAR_37		8.301

QSAR_38		7.236
QSAR_39		7.309
QSAR_40		6.869
QSAR_41		7.221
QSAR_42		7.698
QSAR_43		7.585

QSAR_44		7.346
QSAR_45		6.514
QSAR_46		7.259
QSAR_47		8.000

<sup>a</sup> p = -log

### 3.1.1 Generación de los conformeros y alineamiento molecular

Los cálculos CoMFA y CoMSIA se llevaron a cabo en el software SYBYL X-1.2 [87], instalado en un PC con procesador Intel core i7 y sistema operativo Windows 10. Para obtener los mejores conformeros de cada compuesto, cada molécula se sometió a un estudio preliminar de optimización de geometría molecular usando el campo de fuerza implementado en Sybyl a 1000 iteraciones [88]. El criterio de convergencia para el gradiente de energía se ajustó a 0.005Kcal/molÅ, asignando cargas de Gasteiger-Hückel

a cada átomo[89]. Posterior a esto se ejecutaron 10 ciclos de dinámica de templado simulado, calentando las estructuras a 1000 K por 1000 fs seguidos de un enfriamiento a 50 K por 1000 fs. Por cada compuesto fueron seleccionados 10 confórmeros de mínima energía, construyendo con ellos un modelo 3D-QSAR preliminar. A partir de esta exploración los confórmeros que presentaron el mínimo valor residual fueron escogidos para la construcción de los modelos finales. El alineamiento de las moléculas se llevó a cabo en una base de datos mol2 utilizando el máximo común de subestructuras bajo el protocolo de alineamiento rígido Distill (sin incluir tipos de enlaces o anillos).

### **3.1.2 Cálculo de potenciales en CoMFA y CoMSIA**

Para derivar los descriptores de potenciales en CoMFA y CoMSIA el training set de compuestos alineados fue centrado en un enrejado virtual con una separación de grilla de 2Å en las direcciones x, y y z del plano cartesiano. Las energías de campo electrostático y estérico para CoMFA se calcularon usando como sonda un átomo de carbono sp<sup>3</sup> con un radio de Van der Waals de 1.52 Å y carga +1.0. Los valores de corte energético para ambos potenciales se dejaron por defecto en 30.0 Kcal/mol. Para el cálculo de los potenciales CoMSIA estérico, electrostático, hidrofóbico, donador y aceptor de puente de hidrógeno, se utilizaron los valores por defecto (sonda con carga +1.0, radio 1Å, hidrofobicidad +1.0, capacidad donante y aceptora de puente de hidrógeno +1.0[78]).

### **3.1.3 Análisis de la regresión de los mínimos cuadrados parciales.**

Una regresión de mínimos cuadrados parciales (análisis PLS, de sus siglas en inglés Partial Least Square) permitió construir la correlación lineal entre los descriptores CoMFA y CoMSIA (variables independientes) y la actividad biológicas de los compuestos (variables dependientes)[90]. Para generar los modelos se empleó el método de “dejar uno afuera” (LOO, de sus siglas en inglés leave-one-out) y el algoritmo SAMPLS [91], a partir de lo cual se obtiene el número óptimo de componentes (N), el error estándar de la predicción (SEP), y el coeficiente de validación cruzada ( $q^2$ ), el cual se utilizó como criterio de selección de los mejores modelos CoMFA y CoMSIA.

### 3.1.4 Validación externa de los mejores modelos CoMFA y CoMSIA.

La robustez del poder predictivo de ambos modelos fue evaluada mediante cálculo del coeficiente de validación cruzada predictivo ( $r_{pred}^2$ ) para el test set de datos [92, 93].  $r_{pred}^2$  se define de acuerdo a la ecuación 1 como sigue:

$$r_{pred}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde  $y_i$  es el valor de la actividad biológica predicha para molécula en el test set,  $x_i$  es la actividad biológica experimental para molécula del test set, y  $\bar{x}$  es la actividad biológica experimental promedio de cada compuesto en el training test.

### 3.2 Síntesis de los compuestos con cadena de estructura general benzoimidazo-2-alkil-etanolamina.

La síntesis de los compuestos fue realizada en el laboratorio de Química Medicinal de la facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso Chile.

Los reactivos con calidad PA, solventes con calidad HPLC fueron adquiridos desde Sigma-Aldrich® y Merck®.

La estructura principal se obtuvo mediante el método de Philips [94]. Todas las reacciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina en papel de aluminio 60 F<sub>254</sub> (Merck) utilizando como referencia los reactivos de partida correspondientes. Una vez sintetizados los compuestos, se purificaron mediante cromatografía en capa preparativa, para lo cual se utilizó sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (Merck).

La caracterización fisicoquímica de los compuestos se llevó a cabo mediante técnicas de resonancia 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) en un equipo Bruker AM-400, los compuestos que se encontraban en su forma de base libre fueron disueltos en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>), por otra parte aquellas muestras que se encontraban en forma de clorhidrato se disolvieron en agua deuterada (D<sub>2</sub>O). El punto de fusión de los productos se midió con un aparato Stuart Scientific SMP3 reportándose como valores no corregidos. Por otro lado los espectros de infrarrojo se midieron en un equipo Bruker Vector 22 usando discos de KBr.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 Estudios de relación estructura-actividad cuantitativos tridimensionales (3D-QSAR) CoMFA y CoMSIA de una serie de derivados ariletanolamina con potencia beta-3 adrenérgica.

Con el fin de obtener útiles relaciones de estructura-actividad que permitiesen el diseño racional de los ligandos abordados en este trabajo efectuamos una extensa búsqueda de modelos 3D-QSAR con buenos valores estadísticos y alta capacidad predictiva. La búsqueda secuencial de las mejores combinaciones de campo en CoMFA y CoMSIA se muestra en la Tabla 4.1.1 Se creó el máximo total de 34 modelos posibles (3 para CoMFA y 31 para CoMSIA). En el caso de CoMFA el mejor modelo obtenido fue el que solo presenta la contribución del campo estérico (modelo no. 1). El modelo 1 presenta un valor de  $q^2$  mayor que el mínimo recomendado de 0.5, tiene un bajo número de componentes, una baja desviación estándar y ajuste perfecto en cuanto  $r^2$ . El valor de la F de Fisher está dentro de los más altos por lo que la probabilidad que los resultados sean por azar es despreciable.

Por otra parte en el caso de CoMSIA solo un modelo presentó un  $q^2$  mayor a 0.5 (modelo 4), el cual de forma correlativa a CoMFA es el que solo contiene la contribución del campo estérico. Estos resultados son concordantes con el hecho que en el receptor beta-3 adrenérgico las propiedades estéricas y/o hidrofóbicas son claves para una buena afinidad al receptor.

Dentro de los peores modelos se encuentran los que solo contienen los potenciales electrostáticos, hidrofóbicos y donador, siendo este último el peor de todos. Otros modelos con una mala capacidad predictiva interna son el modelo que combina los potenciales electrostático y donador, y electrostático-hidrofóbico-donador. A pesar que el valor de  $r^2$  en muchos casos es cercano a 1.0, no obstante el bajo valor de  $q^2$  hace que no merezcan confiabilidad, por lo que estos mapas no se analizarán.

**Tabla 4.1.1** Búsqueda paso a paso de las mejores correlaciones de campos en los estudios CoMFA y CoMSIA.<sup>a</sup>

Modelo No.	Combinaciones de Campos	q <sup>2</sup>	N	SEP	SEE	r <sup>2</sup>	F	Contribuciones					
								S	E	H	D	A	
1	<b>CoMFA-S</b>	<b>0.598</b>	6	0.591	0.016	1.000	15805.61	1					
2	CoMFA-E	0.179	2	0.792	0.332	0.855	97.52		1				
3	CoMFA-SE	0.505	2	0.615	0.193	0.951	322.9	0.569	0.431				
4	<b>CoMSIA-S</b>	<b>0.547</b>	2	0.588	0.3032	0.88	120.87	1					
5	CoMSIA-E	0.188	3	0.8	0.13	0.979	489.35		1				
6	CoMSIA-H	0.196	7	0.851	0.003	1.000	517179.74			1			
7	CoMSIA-D	-0.139	3	0.947	0.129	0.979	494.87				1		
8	CoMSIA-A	0.376	5	0.724	0.164	0.968	181.92						1
9	CoMSIA-SE	0.434	2	0.657	0.232	0.929	217.26	0.52	0.48				
10	CoMSIA-SEH	0.393	2	0.681	0.175	0.96	397.18	0.354	0.327	0.319			
11	CoMSIA-SEHD	0.348	3	0.7417	0.059	0.996	2428.81	0.264	0.257	0.255	0.224		
12	CoMSIA-SEHA	0.392	3	0.687	0.088	0.990	1071.489	0.254	0.252	0.25		0.244	
13	CoMSIA-SED	0.359	3	0.711	0.084	0.991	1172.043	0.348	0.351		0.301		
14	CoMSIA-SEA	0.415	3	0.679	0.118	0.982	596.222	0.337	0.343			0.32	
15	CoMSIA-SEDA	0.369	3	0.705	0.090	0.99	1023.485	0.259	0.259		0.232	0.25	
16	CoMSIA-SH	0.48	4	0.65	0.038	0.998	4303.64	0.487		0.513			
17	CoMSIA-SD	0.435	2	0.657	0.221	0.936	242.465	0.556			0.444		
18	CoMSIA-SA	0.494	3	0.631	0.146	0.973	385.54	0.511				0.489	
19	CoMSIA-SHD	0.406	3	0.684	0.061	0.995	2212.127	0.353		0.346	0.301		
20	CoMSIA-SHA	0.454	3	0.656	0.094	0.989	937.041	0.337		0.338		0.325	
21	CoMSIA-SDA	0.41	3	0.682	0.107	0.986	726.732	0.347			0.317	0.336	
22	CoMSIA-SHDA	0.397	3	0.689	0.077	0.992	1399.286	0.26		0.255	0.231	0.254	
23	CoMSIA-EH	0.222	3	0.783	0.061	0.995	2278.254		0.505	0.495			
24	CoMSIA-ED	0.08	3	0.851	0.087	0.99	1096.345		0.547		0.453		
25	CoMSIA-EA	0.298	4	0.756	0.097	0.988	659.663		0.522			0.478	
26	CoMSIA-EHD	0.17	3	0.809	0.047	0.997	3727.877		0.354	0.349	0.298		
27	CoMSIA-EHA	0.288	4	0.761	0.047	0.997	2835.773		0.337	0.338		0.324	
28	CoMSIA-EDA	0.245	4	0.783	0.051	0.997	2377.975		0.346		0.32	0.334	
29	CoMSIA-EHDA	0.253	5	0.792	0.014	1	25877.074		0.256	0.254	0.235	0.255	
30	CoMSIA-HD	0.149	6	0.86	0.004	1	244538.44			0.54	0.46		
31	CoMSIA-HA	0.333	3	0.725	0.101	0.987	820.165			0.51		0.49	
32	CoMSIA-HDA	0.271	5	0.783	0.018	1	15251.4			0.342	0.315	0.344	
33	CoMSIA-DA	0.255	5	0.791	0.036	0.998	3860.73				0.494	0.506	
34	CoMSIA-ALL	0.358	3	0.711	0.071	0.994	1639.16	0.208	0.204	0.201	0.184	0.203	

<sup>a</sup> q<sup>2</sup>, coeficiente de validación cruzada. N, número óptimo de componentes. SEP, error estándar de la predicción. SEE, error estándar de la estimación de r<sup>2</sup>. r<sup>2</sup>, coeficiente de regresión de Pearson. F, valor F de Fisher. S, E, H, D y A son las contribuciones tanto por uno de los potenciales estérico, electrostático, hidrofóbico, donador y aceptor de puente de hidrógeno respectivamente.

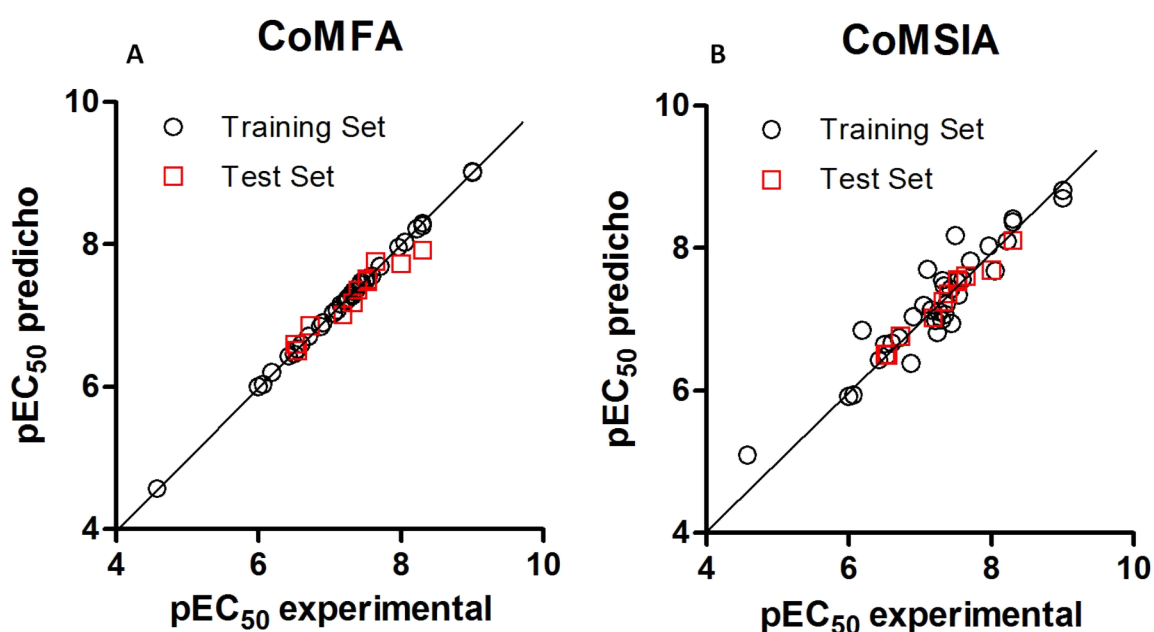
**Tabla 4.1.2.** Potencia experimental versus potencia predicha por los mejores modelos CoMFA y CoMSIA y sus respectivos valores residuales.<sup>a</sup>

Molécula	pEC <sub>50</sub> (M) experimental	CoMFA-S		CoMSIA-S	
		pE <sub>50</sub> (M) predicho	Residual	pE <sub>50</sub> (M) predicho	Residual
1	8.3010	8.2670	0.03	8.3780	-0.08
2	8.2210	8.2220	0.00	8.1060	0.12
3	8.0450	8.0370	0.01	7.6830	0.36
4	4.5680	4.5770	-0.01	5.0950	-0.53
5	7.3660	7.3610	0.01	7.2240	0.14
6	7.5080	7.5100	0.00	7.5350	-0.03
7	7.9580	7.9640	-0.01	8.0390	-0.08
8	7.3270	7.3440	-0.02	7.4710	-0.14
9t	7.5220	7.4840	0.04	7.5680	-0.05
10	7.0450	7.0490	0.00	7.2030	-0.16
11	7.4430	7.4740	-0.03	6.9440	0.50
12	6.5370	6.5330	0.00	6.5010	0.04
13	5.9910	6.0010	-0.01	5.9230	0.07
14	7.3010	7.3000	0.00	6.9910	0.31
15t	7.3870	7.3670	0.02	7.3690	0.02
16t	7.5220	7.5200	0.00	7.5300	-0.01
17	6.6020	6.6080	-0.01	6.6790	-0.08
18	7.4310	7.4430	-0.01	7.4330	0.00
19	7.4940	7.4910	0.00	8.1820	-0.69
20t	7.6380	7.7600	-0.12	7.6130	0.02
21	6.6980	6.7110	-0.01	6.7430	-0.05
22	9.0000	9.0230	-0.02	8.7020	0.30
23	8.3010	8.3020	0.00	8.4140	-0.11
24	7.0960	7.0890	0.01	7.7030	-0.61
25t	7.1800	7.0130	0.17	7.0240	0.16
26t	6.7250	6.8700	-0.15	6.7630	-0.04
27t	6.5370	6.5100	0.03	6.5090	0.03
28	6.4960	6.4660	0.03	6.6530	-0.16
29	6.1770	6.2040	-0.03	6.8530	-0.68
30t	7.3180	7.1820	0.14	7.2560	0.06
31	6.4200	6.4350	-0.02	6.4360	-0.02
32	7.1540	7.1620	-0.01	7.1380	0.02
33	6.0600	6.0390	0.02	5.9440	0.12
34	6.8990	6.9050	-0.01	7.0480	-0.15
35	7.5370	7.5420	-0.01	7.3480	0.19
36	9.0000	9.0110	-0.01	8.8130	0.19
37t	8.3010	7.9200	0.38	8.1130	0.19
38	7.2360	7.2300	0.01	6.8120	0.42
39	7.3090	7.2840	0.03	7.5520	-0.24
40	6.8690	6.8540	0.02	6.3840	0.49
41	7.2210	7.2090	0.01	6.9860	0.24
42	7.6980	7.6990	0.00	7.8220	-0.12
43	7.5850	7.5680	0.02	7.5610	0.02
44	7.3460	7.3360	0.01	7.0790	0.27
45t	6.5140	6.6060	-0.09	6.5130	0.00
46	7.2590	7.2530	0.01	7.1200	0.14
47t	8.0000	7.7320	0.27	7.6980	0.30

<sup>a</sup> Los compuestos aquí reportados como 1 a 47 corresponden a las estructuras ID QSAR\_1 a QSAR\_47 de la Tabla 4.1.1. t, compuesto test set.

Con los mejores modelos obtenidos (CoMFA-S y CoMSIA-S, Modelos no. 1 y 4 respectivamente), se procedió a calcular las actividades biológicas para los 47 compuestos estudiados, incluyendo el 20% de compuestos test set (Tabla 4.1.1). Como se aprecia en la tabla 4.1.2, los mejores residuales fueron para los compuestos del modelo CoMFA, no obstante en ambos modelos no se reporta la presencia de valores atípicos (outliers), lo que es una prueba de la buena capacidad predictiva de los modelos dentro de los rangos de actividad estudiados.

La gráfica de potencia experimental versus predicha se muestra a continuación en la figura 4.1.



**Figura 4.1.1.** Gráficas de Potencia real versus predicha para A. el modelo CoMFA-S y B. el modelo CoMSIA-S.

En la Figura 4.1.1 vemos que la potencia de los compuestos abarca un rango de más de 4 unidades logarítmicas y presenta una distribución gaussiana de los valores con una tendencia sobre la recta  $Y=X$ , lo que avala la robustez estadística de ambos modelos. En el caso de CoMFA, los menores valores residuales tanto para el training como test set de valores hace que este modelo tienda más a la idealidad que el CoMSIA.

La validación de los modelos se estimó mediante el cálculo de  $r^2_{pred}$ , valores que reportamos en la tabla 4.1.3.

**Tabla 4.1.3.** Valores de  $r^2_{pred}$  para los mejores modelos.

Modelo No.	Combinaciones de Campo	PRESS	SSD	SSD-PRESS	$r^2_{pred}$
1	COMFA-S	0.3103	3.3466	3.0363	0.9073
4	COMSIA-S	0.1601	3.3466	3.1865	0.9522

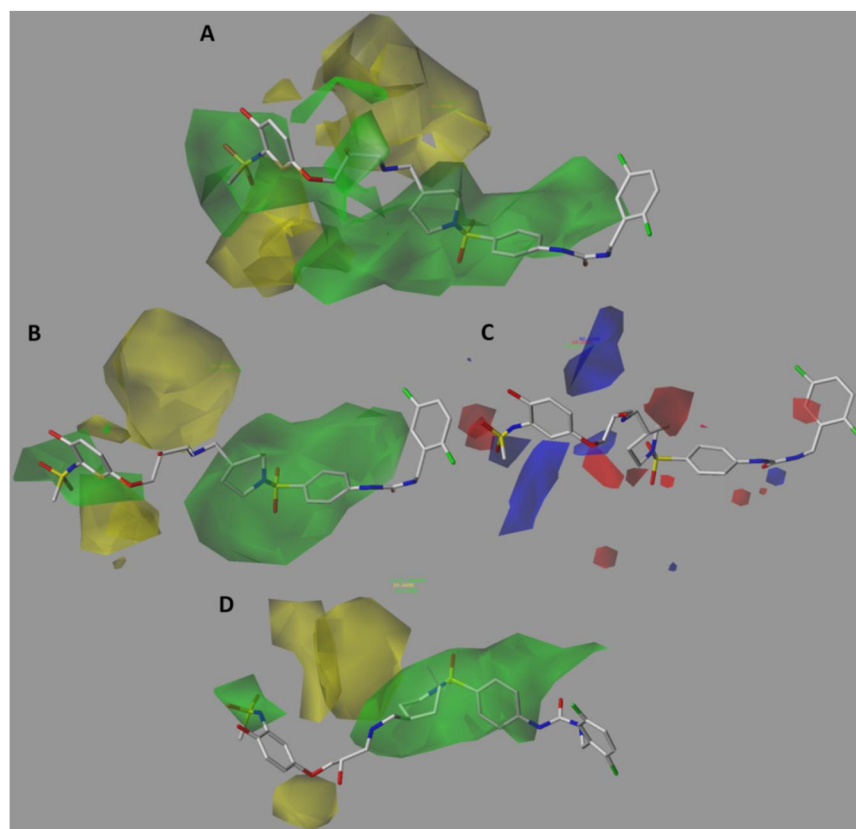
En la Tabla 4.1.3 se puede ver que ambos modelos presentan altos valores de  $r^2_{pred}$ , lo que permite extrapolar la información que proveen ambos estudios al diseño de nuevos compuestos y a la predicción de actividad de compuestos nuevos. El valor PRESS (suma de los cuadrados de los residuales) es pequeño en ambos casos y el valor de SSD es de 3.3466 (suma de los cuadrados de la diferencia entre la actividad de los compuestos test y la media de la actividad en el grupo training), al menos 10 veces mayor que PRESS, por lo que se puede garantizar buenas predicciones en el amplio rango de valores estudiados.

Para obtener útiles relaciones estructura actividad se analizaron los mapas de contorno de los mejores modelos, los que se reportan a continuación en la figura 4.1.2.

En los mapas de contornos estéricos (figura 4.1.2 A, B y D) el color verde significa que el incremento de volumen en dichas posiciones es favorable para la actividad, mientras que los contornos amarillos sugieren que el uso de sustituyentes pequeños es lo favorable. En el mapa de contorno electrostático (Figura 4.1.2 C), el color rojo significa que el uso de sustituyentes electronegativos es favorable, mientras que el color azul sugiere el uso de sustituyentes electropositivos. En general se aprecia una buena correlación de los mapas estéricos de CoMFA y CoMSIA, apreciándose un contorno verde entorno el grupo sulfonamida del benceno del lado izquierdo (LHS) en el núcleo ariloxipropanolamina. Por otra parte un gran poliedro verde rodea la zona derecha (RHS) terminal de los compuestos. Esto concede gran libertad para la exploración de otros grupos voluminosos, como ciclos, cadenas ramificadas y átomos de gran tamaño.

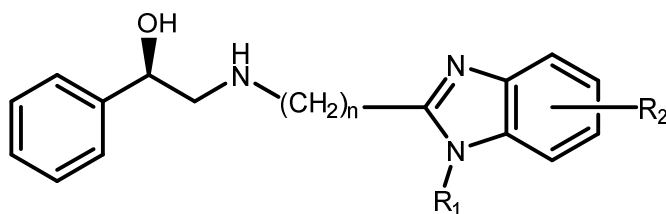
Por otra parte el mapa de potencial electrostático (figura 4.1.2 C) muestra dos contornos azules en torno el benceno de LHS por lo que sustituir este anillo con grupos electroattractores sería beneficiosos. La presencia de varios pequeños poliedros rojos hacia el lado derecho de la estructura es menos concluyente.

Teniendo en consideración la escasa cantidad de compuestos afines al receptor beta-3 adrenérgico que contengan el núcleo benzimidazólico, y dado que este fragmento satisface los requerimientos de la información provista por los estudios QSAR en cuanto a que presenta un volumen adecuado y la posibilidad de funcionalizarlo con sustituyentes de variada naturaleza electrónica, nos enfocamos en la síntesis de una serie de benzimidazoles acoplados al sistema farmacofórico feniletanolamina como se describe en la sección siguiente.



**Figura 4.1.2.** Mapas de contorno estéricos y electrostáticos de los modelos no.1 CoMFA-S (A), no. 3 CoMFA-SE (B y C), y no. 4 CoMSIA-S (D), en torno al compuesto más activo de la serie (QSAR\_36)

En base a estos resultados y las consideraciones de estructura-actividad previamente discutidas proponemos la siguiente estructura general de compuestos objetivos con potencial actividad beta-3 adrenérgica (Figura 4.1.3).



**Figura 4.1.3.** Estructura general de los compuestos objetivos.

Como primer objetivo de nuestro grupo de investigación, nos centramos en este trabajo en modificar el largo “n” de la cadena conectora, con el fin de evaluar la distancia óptima para obtener la mejor potencia y selectividad beta-3, así como probar en R<sub>2</sub> sustituyentes donores y atractores de electrones. En futuros trabajos de tesis, manteniendo constante el largo del conector “n”, se llevará a cabo la síntesis de derivados con distintos sustituyentes en R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>.

#### **4.2 Estudio de la obtención del benzimidazol mediante la protección de la amina con t-butiloxicarbonilo.**

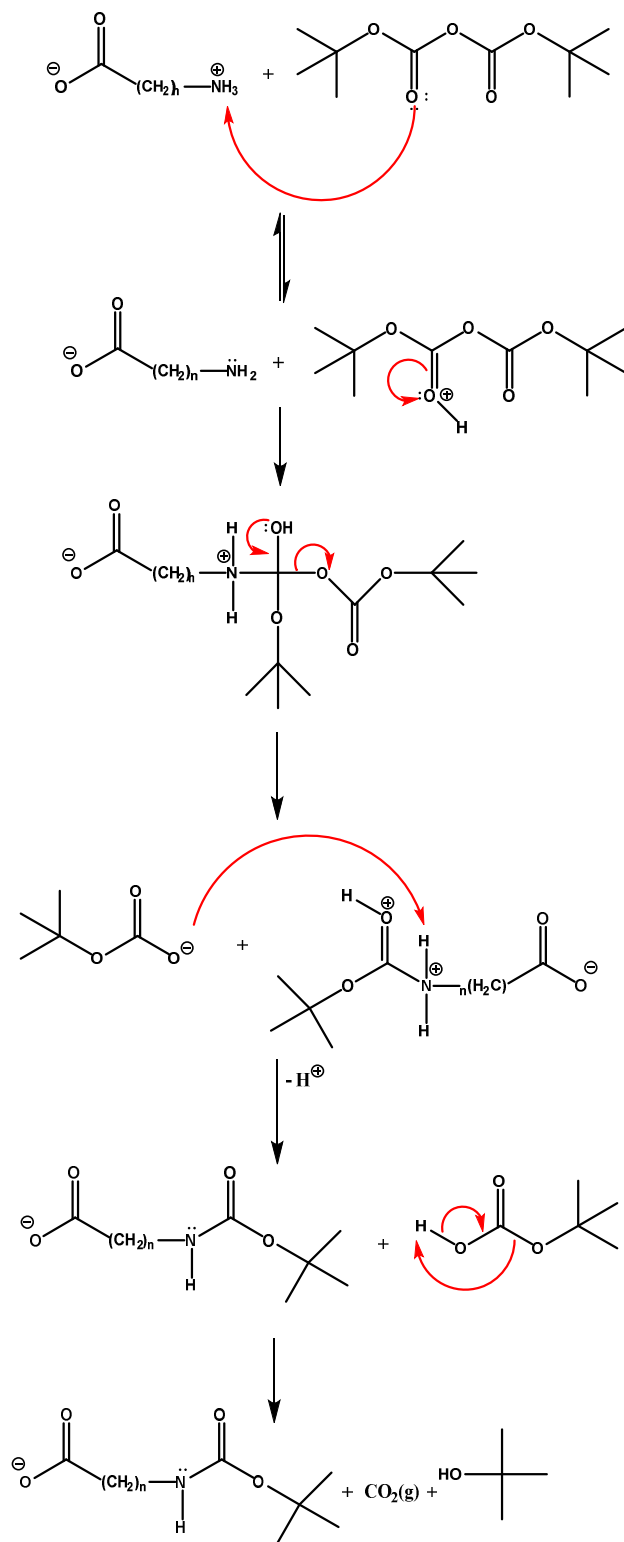
Con miras a obtener los compuestos propuestos se ensayaron varias rutas de síntesis, las que se detallan a continuación.

En una primera instancia la síntesis del compuesto se realizó cuatro etapas. En la primera etapa se protegió el aminoácido utilizando como grupo protector el t-butiloxicarbonilo (BOC), el cual se adiciona a la amina como grupo protector, para ello, el aminoácido se hace reaccionar con di-tert-butil dicarbonato ( $\text{BOC}_2\text{O}$ ). Los productos de esta reacción son el aminoácido unido al t-butiloxicarbonilo, 2-metilpropan-2-ol (terbutanol) y dióxido de carbono como lo muestra el esquema 4.2.1. El dióxido de carbono así generado se pierde como gas, lo cual de acuerdo al principio de Le Chatelier, desplaza el equilibrio a la formación de más producto. Por otra parte el 2-metilpropan-2-ol es un producto indeseable, dado que contamina el producto final dándole una consistencia oleosa. Para eliminar los restos de 2-metilpropan-2-ol se realizan enjuagues con hexano hasta que el producto sea completamente sólido.

Posteriormente, en una segunda etapa, se adiciona por goteo cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ) con el objetivo de activar el aminoácido protegido como lo muestra el esquema 4.2.1 gracias a la formación de un cloruro de ácido.

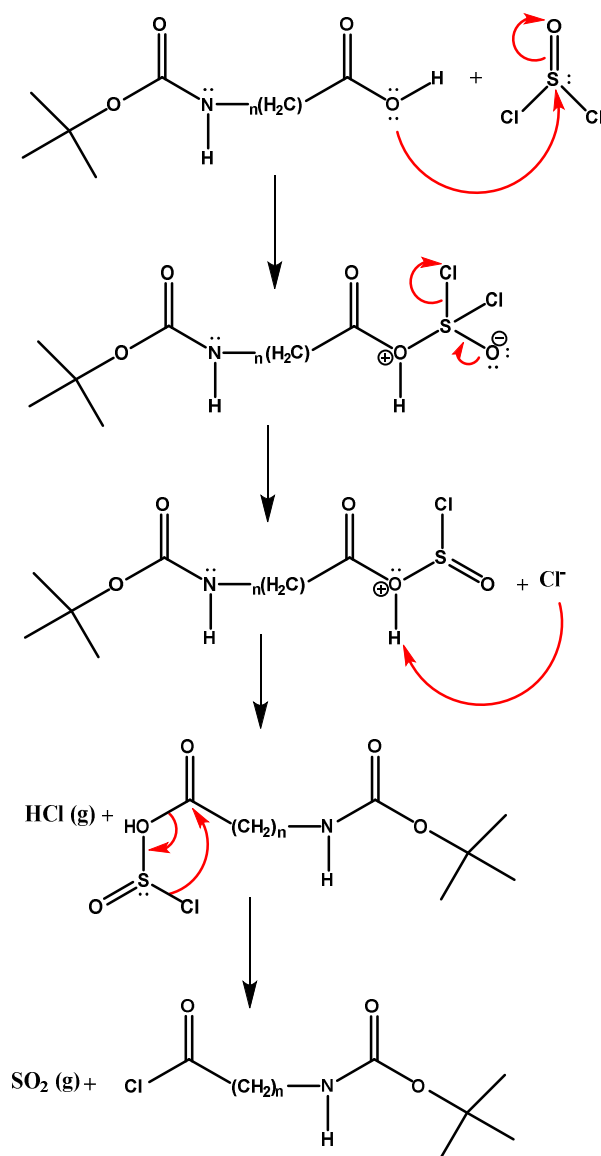
En una tercera etapa, se adiciona la *o*-fenilendiamina al aminoácido protegido y activado, lo que genera como intermediario la amida respectiva (esquema 4.2.2).

En una cuarta y última etapa, se genera la ciclación del producto intermediario, para este fin se lleva a cabo la reacción de Philips (esquema 4.2.3).



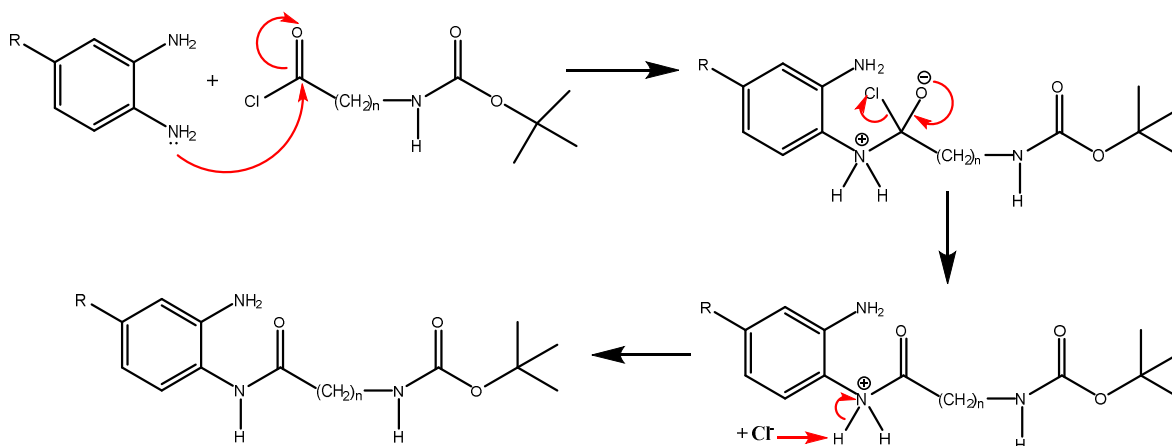
**Esquema 4.2.1** Mecanismo de protección del aminoácido mediante la adición de di-tert-butil dicarbonato.

La primera etapa de la protección con BOC (esquema 4.2.1) transcurre a través de un ataque nucleofílico del grupo amino hacia el carbonilo del dicarbonato. El colapso del intermediario tetraédrico da origen a la amina protegida y a un terbutil carbonato ácido que se descompone en  $\text{CO}_2$  y terbutanol, siendo la liberación de este gas la fuerza propulsora principal de la reacción. Por otra parte, la presencia de terbutanol requiere una purificación rigurosa del crudo de reacción, logrando eliminar el terbutanol a través de evaporación a presión reducida.



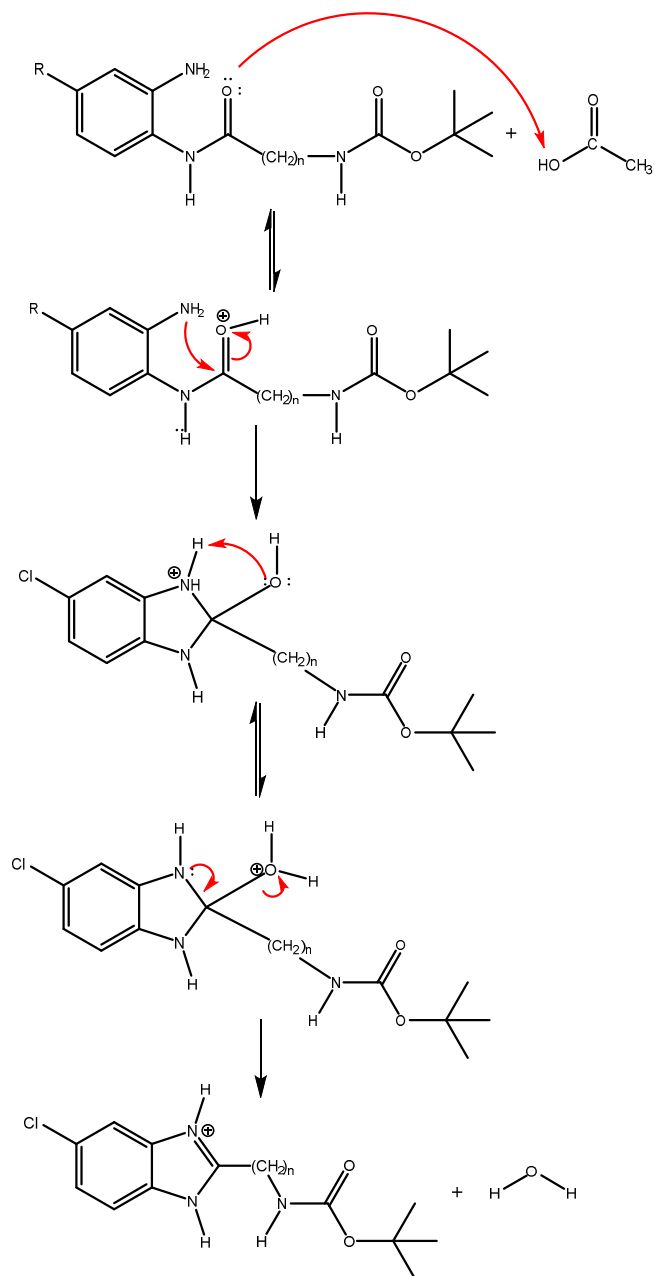
**Esquema 4.2.2** Mecanismo de reacción de la activación del aminoácido ya protegido con BOC.

Para transformar el ácido carboxílico en un electrófilo activado se utiliza a continuación cloruro de tionilo (esquema 4.2.2). La primera etapa en la transformación del ácido carboxílico a cloruro de ácido es el ataque nucleofílico del OH del ácido al azufre oxofílico del  $\text{SOCl}_2$ . El reordenamiento y liberación de  $\text{Cl}^-$  lleva a la generación y pérdida de  $\text{HCl}$  gaseoso. Posteriormente el reordenamiento intramolecular del intermediario azufrado genera el cloruro de ácido por transposición del  $\text{Cl}$  al carbonilo con la consecuente liberación de  $\text{SO}_2$ .



**Esquema 4.2.3** Mecanismo de reacción de la formación del intermediario amida mediante la adición de derivados benceno-1,2-diamina al aminoácido ya protegido y activado.

La formación de la amida intermediaria se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como tetrahidrofurano anhidro y corresponde a una reacción de sustitución nucleofílica de carbonilo. En la primera fase (esquema 4.2.3), un nitrógeno de la o-fenilendiamina ataca nucleofílicamente al cloruro de ácido dando origen a un intermediario tetrahédrico, que luego colapsa para liberar cloruro con la consecuente pérdida de  $\text{HCl}$ . Para no reducir el poder nucleofílico por los equilibrios de protonación entre el nitrógeno libre del intermediario y el ácido generado, se puede adicionar una base no nucleofílica al medio de reacción como  $\text{K}_2\text{CO}_3$  o trietilamina (TEA), lo que mejora los rendimientos, disminuye el tiempo de reacción y permite obtener productos más limpios.



**Esquema 4.2.4** Mecanismo de ciclación (procedimiento de Philips).

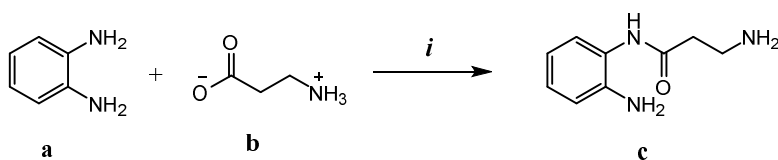
Finalmente luego de aislar y purificar el intermediario amida, éste se somete a una reacción de ciclación intramolecular en presencia de ácido acético glacial como disolvente y catalizador (esquema 4.2.4). El grupo amida se activa por la presencia de ácido y la elevada temperatura del medio de reacción. La cercanía del amino libre de la o-fenilendimaina y el grupo carbonilo de la amina (y, por ende, baja entropía del sistema)

permite el ataque intramolecular que genera un intermediario tetraédrico no aislable de tipo carbinolamina, el cual luego de la subsecuente deshidratación y aromatización permite obtener los benzimidazoles objetivo. La posterior desprotección del grupo amino alifático se realiza con ácido trifluoroacético a temperatura ambiente.

### 4.3 Estudio de obtención de los 2-aminoalquilbenzimidazoles mediante ciclación directa con ácido polifosfórico.

Teniendo en consideración la extensa secuencia anteriormente descrita para la síntesis de los benzimidazoles, se ensayaron diversos métodos alternativos de ciclación directa en presencia de ácido polifosfórico (Tabla 4.3.1)

El Esquema 4.3.1 muestra la obtención del derivado **c**:



**Esquema 4.3.1.** Síntesis del derivado 3-amino-*N*-(2-aminofenil)propanamida (**c**). *i*: condiciones de reacción.

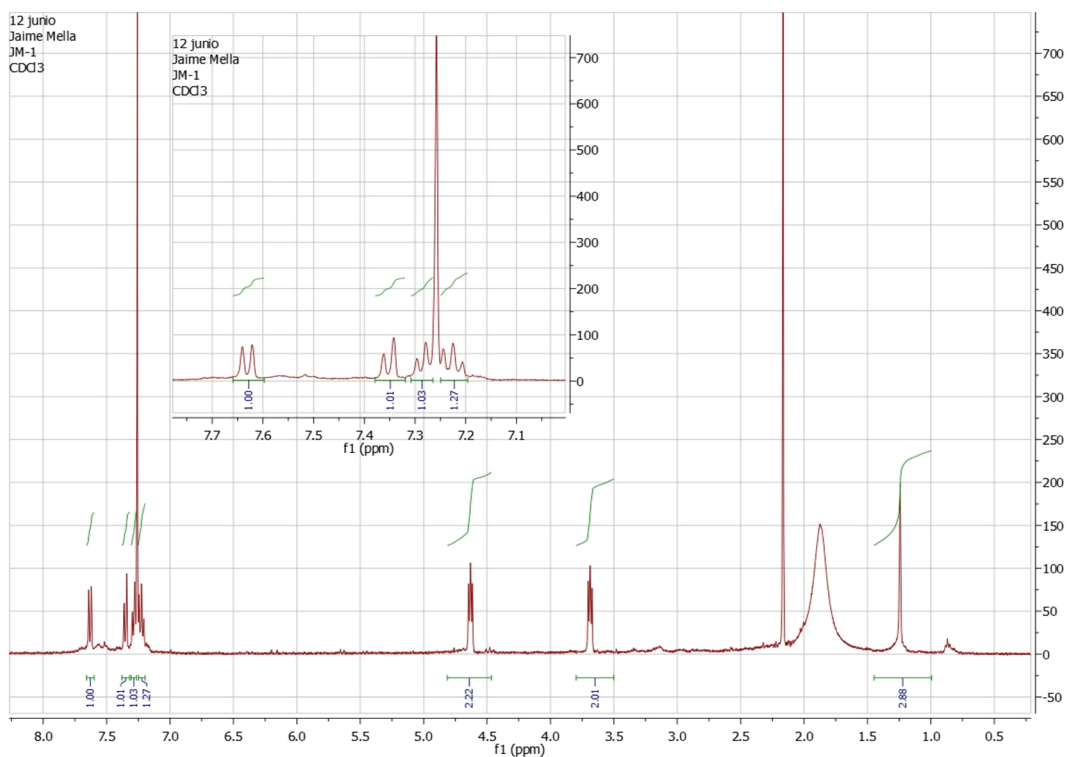
Se ensayaron 3 condiciones de reacción y los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 4.3.1.

**Tabla 4.3.1.**

<i>Condiciones de reacción (i)</i>	<i>Tiempo (h)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> OH, HCl 4M, Reflujo	6	0
	12	0
	24	<10
	48	<10
CH <sub>3</sub> OH, HCl 4M, Reflujo	6	0
	12	0
	24	<10
	48	<10
Ácido Polifosfórico 200 °C	6	<10
	12	15
	24	15

Como se aprecia en la Tabla 4.3.1, el uso de HCl 4M o ácido polifosfórico a diversos tiempos no permitió un rendimiento satisfactorio de la reacción. Esto, se debe a la gran cantidad de energía que requiere el sistema para lograr acoplar un mal nucleófilo (o-fenilendiamina) a un pobre electrófilo (el ácido carboxílico), lo que además se ve empeorado por los equilibrios ácidos base indeseable.

El espectro de Resonancia magnética nuclear de protones (RMN-H<sup>1</sup>) para la amida obtenida se muestra en la Figura 4.3.1.

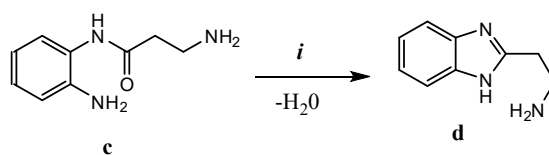


**Figura 4.3.1.** Espectro de RMN- $H^1$  para el compuesto **1**.

En el espectro se aprecia el patrón aromático de 4 señales entre 7,2 y 7,6 ppm. Por otra parte en 3,7 y 4,6 ppm hay dos tripletes correspondientes a la cadena etilamina, mientras que en 1,2 y 1,8 aparecen las señales para los hidrógenos de los grupos amino alifático y aromático respectivamente (este último solapado con la señal del agua).

Sin embargo, es bien sabido el poder del ácido polifosfórico como agente de ciclación intramolecular. Bajo este enfoque, se realizaron intentos de ciclación don este ácido para conseguir la síntesis en un paso del derivado 2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etanamina (**d**)

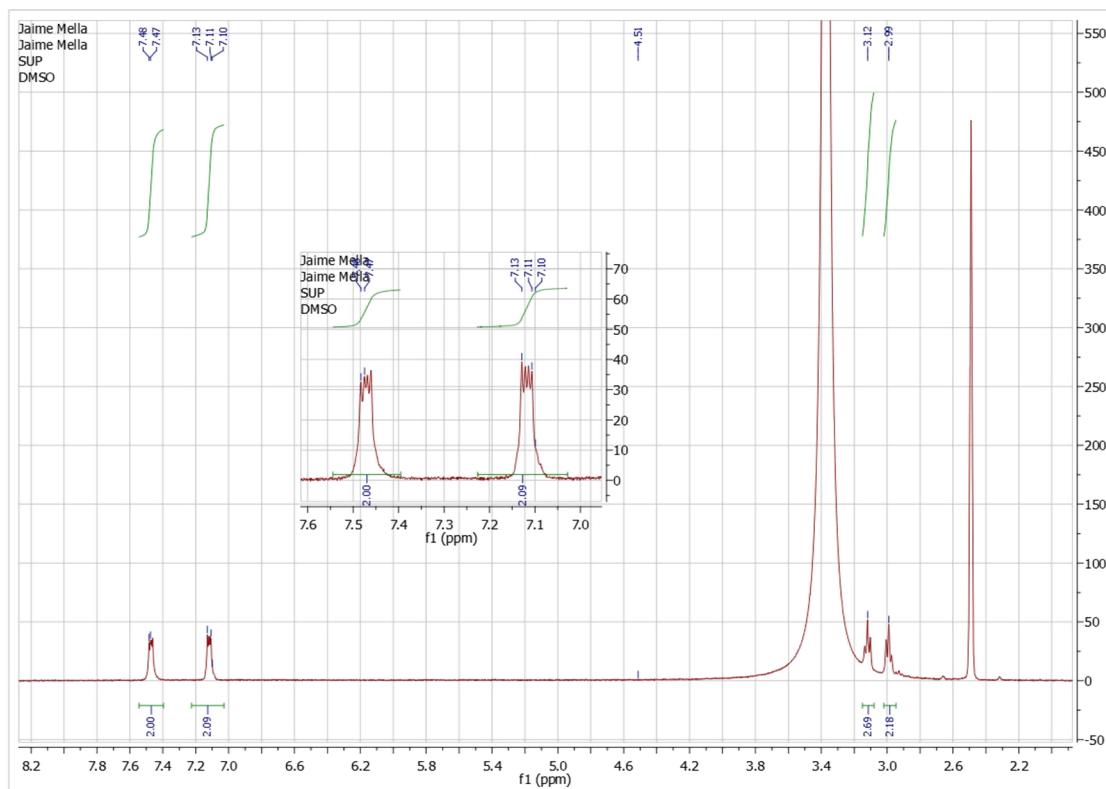
En el Esquema 4.3.2 se muestra la obtención del derivado **d**.



**Esquema 4.3.2.** Síntesis del derivado 2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etanamina (**2**). *i*: Ácido Polifosfórico, 250°C, 48 h.

La obtención del derivado **d** se logró gracias a la ciclación intramolecular de la amida **c** en ácido polifosfórico bajo condiciones elevadas de temperatura. Los rendimientos no superaron el 15%, lo que en parte puede deberse a la descomposición térmica de los compuestos.

A continuación se muestra el espectro de RMN-H1 obtenido para el compuesto **2**:



**Figura 4.3.2.** Espectro de RMN-H<sup>1</sup> para el compuesto de partida **d**.

La simplificación del patrón aromático de 4 a 2 señales debido a la simetría y tautomería del sistema benzimidazol corrobora la obtención del producto **d**. Se aprecia también el desplazamiento a campo alto en 3.0 y 3.1 para los grupos metílenos de la cadena alquílica, lo que comprueba la desaparición del grupo carbonilo.

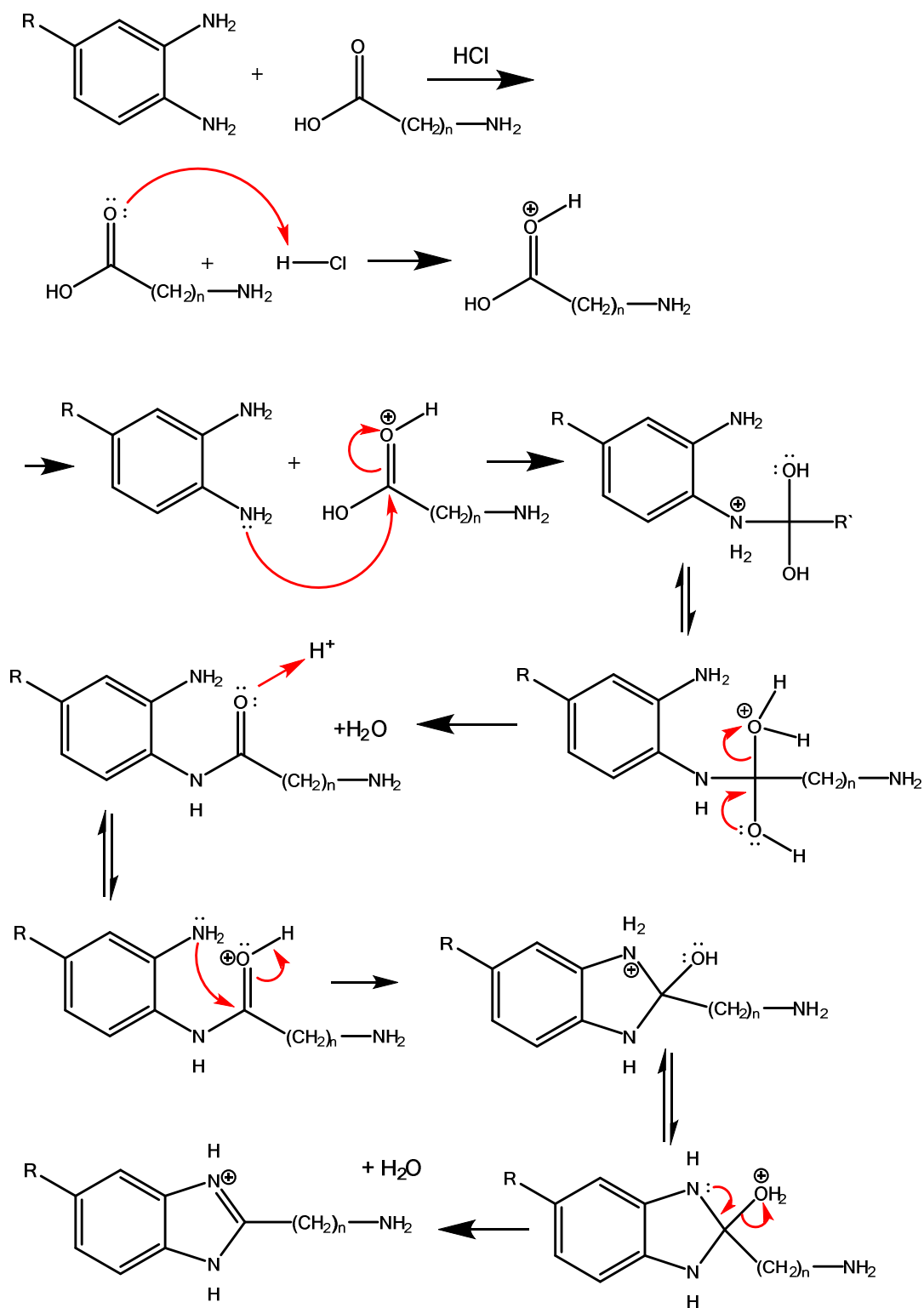
Los ensayos fueron realizados siguiendo condiciones reportadas en la literatura[95-97]. Otras modificaciones experimentales como el cambio del ácido inorgánico, tiempos de reacción más extensos, o uso de codisolventes no llevaron a una mejora de los rendimientos.

Con el fin de mejorar los rendimientos y generar el derivado **d** en una cantidad apreciable para la siguiente fase de síntesis del proyecto, se realizaron cálculos computacionales que muestran una fuerte interacción intramolecular en el sistema *zwitteriónico* de la beta-alanina (compuesto **b**, Esquema 4.3.1), lo que sería una de las causas de la dificultad encontrada en la ciclación intramolecular.

#### **4.4 Estudio de la obtención de benzoimidazo-2-alquil-etanolamina mediante el procedimiento de Phillips y obtención de la serie *N*-(benzoimidazo-2-alquil)-feniletanolamina por adición de 2-feniloxirano.**

El problema de los rendimientos anteriormente discutidos, se solucionó gracias a la aplicación de la reacción de Phillips. La síntesis de la serie benzoimidazo-2-alquil-etanolamina se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa consiste en la reacción entre benceno-1,2-diamina y el aminoácido respectivo en ácido clorhídrico 5.5 M a reflujo durante 70 h de reacción (esquema 4.4.1).

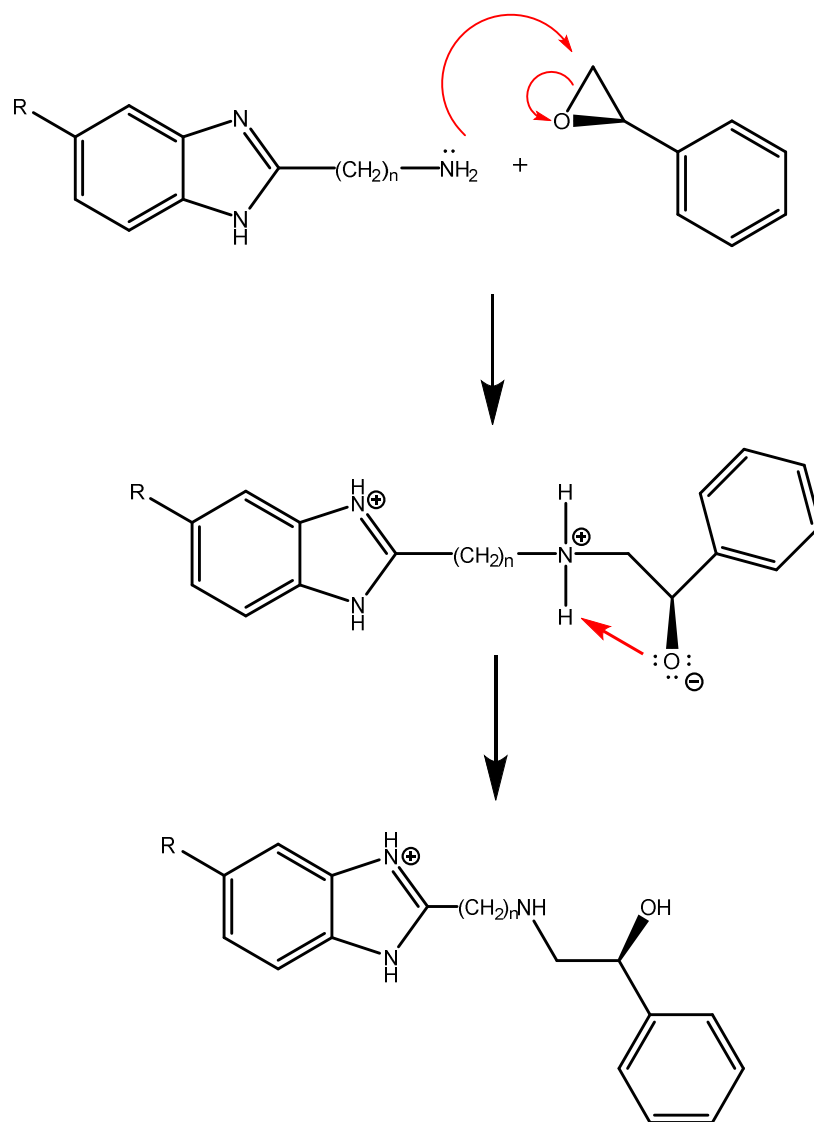
Luego, en una segunda etapa se adicionó 2-feniloxirano con el objetivo de obtener los productos finales *N*-(benzoimidazo-2-alquil)-feniletanolamina como se muestra en el esquema 4.4.1.



**Esquema 4.4.1** Mecanismo de ciclación mediante el procedimiento de Philips.

La reacción de Phillips (esquema 4.4.1) se vale del principio que las constantes de equilibrio cambian en función de la temperatura del sistema estudiado de acuerdo a la ecuación de Arrhenius. A elevadas temperaturas los equilibrios ácido base pierden importancia para dar lugar al ataque nucleofílico del grupo amino sobre el carbonilo activado del ácido carboxílico, lo que genera la amida intermediaria que posteriormente sufre el ataque intramolecular del segundo grupo amino de la o-fenilendiamina, ciclándose gracias a la deshidratación del intermediario carbinolamina, actuando como fuerza motriz de la reacción la aromatización final del sistema benzimidazólico.

Dentro de los inconvenientes de esta reacción se halló el hecho del tiempo excesivamente extenso para la obtención de los derivados (70 h), los rendimientos no superiores al 80%, y la descomposición que se observó en algunos derivados de ortofenilendiamina halogenados, por el efecto térmico. No obstante lo anterior, el hecho de ser un método económico y que permite en una sola etapa generar los derivados de partida, justifica con creces su utilización en esta investigación. En futuros trabajos de tesis se evaluará el uso de esta reacción bajo irradiación de microondas.



**Esquema 4.4.2** Mecanismo de reacción de 2-feniloxirano y benzoimidazo-2-alkil-etanoamina.

Finalmente la obtención de los derivados quirales *N*-(benzoimidazo-2-alkil)-feniletanolamina se consiguió gracias a la reacción entre (*R*)-2-feniloxirano comercialmente disponible y la serie de benzoimidazo-2-alkil-etanoaminas (esquema 4.4.2). El mecanismo de la reacción transcurre a través del ataque nucleofílico de la amina alquílica sobre el carbono asimétrico del feniloxirano, lo que genera la apertura del epóxido con retención de la configuración absoluta en el carbono quiral. Se estudiaron distintos disolventes y tiempos de reacción, encontrándose que los disolventes polares

apróticos como THF y acetonitrilo presentaron los mejores rendimientos, lo que se explica dado el carácter  $SN_2$  de esta reacción. La apertura del epóxido a través del carbono quiral no fue observada.

Por otra parte, el seguimiento cromatográfico de la reacción siempre mostraba una mancha adicional al producto en muy baja cantidad, lo que eventualmente puede corresponder al producto formado por el ataque nucleofílico de un nitrógeno benzimidazólico hacia el epóxido.

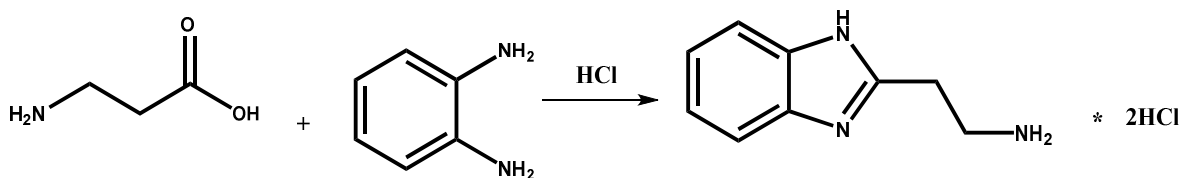
La presencia persistente de restos de epóxido (líquido) al final de las reacciones, demandó un extenso trabajo de purificación por enjuagues con hexano y cromatografía en capa preparativa.

## 5. CONCLUSIONES.

El presente trabajo ha permitido mostrar la utilidad de los estudios 3D-QSAR para obtener información útil en el diseño de nuevos derivados bioactivos, lo que se materializó en la síntesis, purificación y caracterización de una serie de compuestos de estructura general *N*-(benzoimidazo-2-alquil)-feniletanolamina con potencial actividad beta 3 adrenérgica. Los estudios 3D-QSAR dan cuenta que en la zona derecha de los derivados (RHS) es altamente favorable el incremento de volumen, lo que permite la exploración de grupos heterocíclicos como el anillo de benzimidazol. La hipótesis se confirmó en cuanto a que la actividad biológica de la serie estudiada depende fundamentalmente del aporte estérico, y en menor medida del potencial electrostático, pero no de las propiedades hidrofóbicas. Los valores de  $q^2$  obtenidos fueron mayores a 0.5 y los valores de  $r^2_{\text{pred}}$  mayores a 0.9, por lo que los modelos son altamente confiables.

Por otra parte la síntesis de un sistema novedoso que incluye el anillo benzimidazol y el fragmento feniletanolamina fue posible gracias al uso de la reacción de Phillips en la primera etapa. Este procedimiento resultó satisfactorio, no obstante los rendimientos de reacción así como el tiempo de reacción extremadamente largo, será tema de estudio en la tesis siguiente, donde esperamos que el empleo de irradiación en microondas mejore significativamente estos parámetros.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL.

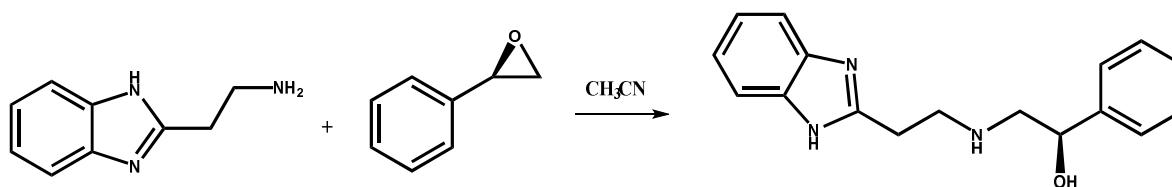


### 2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 10,8 g (0,1 mol) de o-fenilendiamina y 13,4 g (0,15 moles) de β-alanina en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo dos veces y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido cristalino de color blanco, 18,3468 g, con 75,8% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, un gramo de 2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-etan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 0,4125 g de 2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina en su forma de base libre.

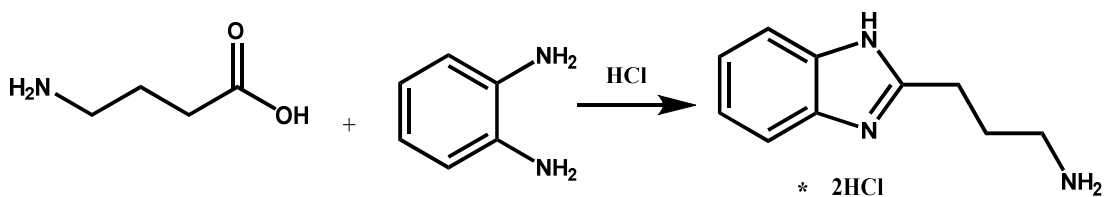
%Rendimiento = 75.8%. Pto. fus. = 256.0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.58 (dd, J = 6.2, 3.2 Hz, 2H), 7.42 (dd, J = 6.2, 3.2 Hz, 2H), 3.61 – 3.38 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 148.34, 130.49, 126.38, 113.74, 36.51, 24.41. Anal. Elem. C, 67.06; H, 6.88; N, 26.07. IR, 3381.



**(1R)-2-[[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)etil]amino]-1-feniletanol.**

Una solución de 2-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)etan-1-amina en su forma de base libre (0,4125g) y 2-feniloxirano (0,3074 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo: etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color blanco, 0,2314g con 32% de rendimiento.

% Rendimiento= 32%. Pto. Fus=230.1 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.64 (dd, J = 6.2, 3.1 Hz, 2H), 7.44 (dd, J = 6.2, 3.1 Hz, 2H), 7.39 – 7.29 (m, 5H), 5.00 (dd, J = 8.9, 3.9 Hz, 1H), 3.64 – 3.51 (m, J = 6.0 Hz, 4H), 3.40 – 3.27 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 148.69, 139.27, 132.02, 129.06, 128.92, 125.99, 125.79, 114.02, 68.84, 53.26, 44.36, 23.57. Anal. Elem. C, 72.57; H, 6.81; N, 14.94; O, 5.69. IR, 3422.

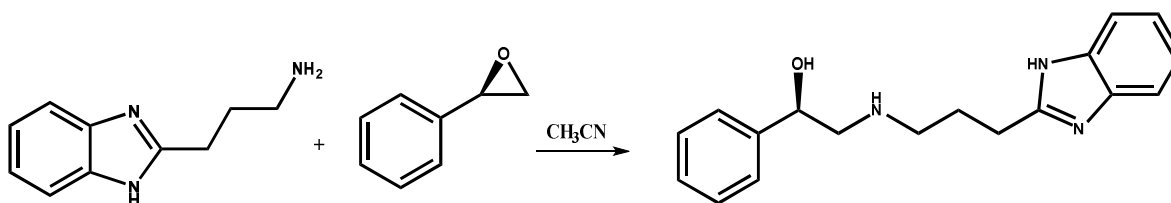


### 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 10,8 g (0,1 mol) de o-fenilendiamina y 15,47 g (0,15 moles) de ácido 4-aminobutanóico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo dos veces y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido de color rosado claro, 15,5412 g, con 56,6 % de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, un gramo de 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 0,5668 g de 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre.

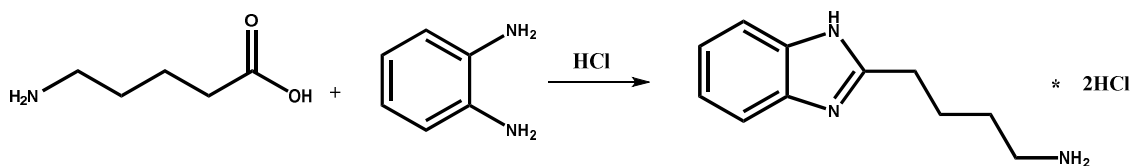
% Rendimiento= 56.6%. Pto. Fus= 259.1 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.65 (dd, J = 6.1, 3.2 Hz, 2H), 7.48 (dd, J = 6.1, 3.2 Hz, 2H), 3.29 – 3.19 (t, J= 7.96 Hz, 2H), 3.14 – 3.03 (t, J= 7.85 Hz, 2H), 2.28 – 2.16 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 151.4, 138.9, 123.0, 115.2, 41.6, 31.4, 26.3. Anal. Elem. C, 68.54; H, 7.48; N, 23.98. IR. 2976.



**(R)-2-((3-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre (0,5668 g) y 2-feniloxirano (0,3886 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo: etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color rosado pálido, 0,3495 g con 36,6% de rendimiento.

% Rendimiento= 36,6%. Pto. Fus.= 91,0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.49 – 7.40 (m, 4H), 7.36 – 7.25 (m, 1H), 7.10 (dd, J = 5.9, 2.9 Hz, 4H), 3.21 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.12 (dd, J = 12.9, 6.6 Hz, 1H), 2.89 – 2.75 (m, 4H), 2.51 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.61, 166.66, 155.56, 155.12, 129.27, 126.38, 124.68, 121.50, 50.42, 38.66, 31.14, 23.08, 18.66. Anal. Elem. C, 73.19; H, 7.17; N, 14.23; O, 5.42. IR, 3058.

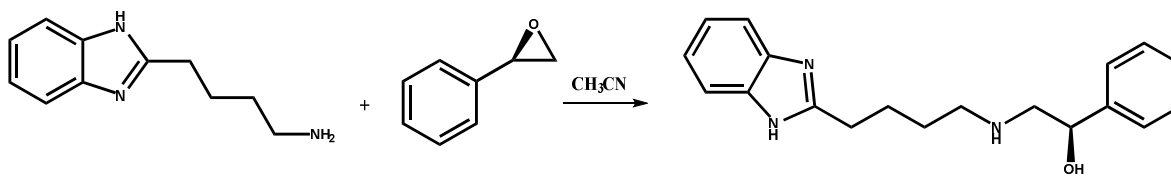


#### 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 10,8 g (0,1 mol) de o-fenilendiamina y 17,57 g (0,15 moles) de ácido 5-aminopentanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo dos veces y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido de color rosado claro, 16,439 g, con 57,9% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, un gramo de 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 0,3936 g de 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina en su forma de base libre.

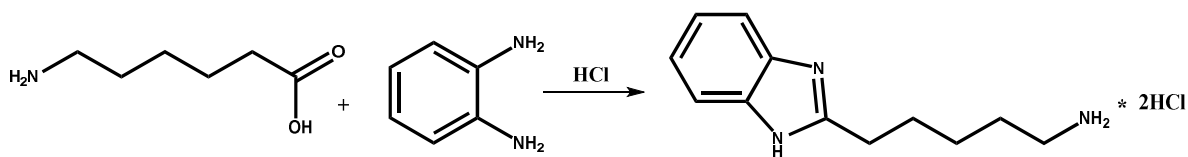
% Rendimiento= 57,9. Pto. Fus.= 268.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.71 – 7.66 (m, 2H), 7.53 – 7.48 (m, 2H), 2.98 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.56 – 1.15 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 151.14, 138.9, 123.0, 115.2, 42.0, 32.3, 28.0, 28.9. Anal. Elem. C, 69.81; H, 7.99; N, 22.20. IR. 3296.



**(R)-2-((4-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)butyl)amino)-1-pheniletan-1-ol.**

Una solución de 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina en su forma de base libre (0,3936 g) y 2-feniloxirano (0,25 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color rosado claro, 0,0352 g con 5,5% de rendimiento.

% Rendimiento = 5,5%. Pto. Fus=268,1.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.62 (dd, J = 6.8, 4.2 Hz, 2H), 7.46 (dd, J = 6.8, 4.2 Hz, 2H), 7.42 – 7.22 (m, 5H), 4.96 (dd, J = 8.5, 4.2 Hz, 1H), 3.23 (t, J = 10.8 Hz, 2H), 3.16 – 2.99 (m, 2H), 2.92 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.51 – 1.36 (m, 2H), 1.35 – 1.25 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  151.4, 138.9, 137.7, 128.9, 127.6, 127.1, 123.0, 115.2, 69.4, 53.7, 50.2, 30.1, 28.9, 28.3. Anal. Elem. C, 73.76; H, 7.49; N, 13.58; O, 5.17. IR, 3494.

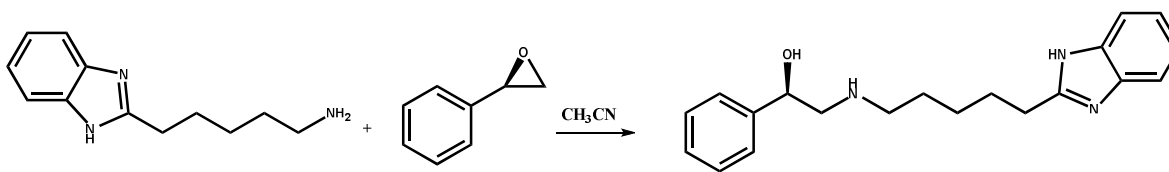


### 5-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)pentan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 10,8 g (0,1 mol) de o-fenilendiamina y 19,677 g (0,15 moles) de ácido 6-aminohexanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo dos veces y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido de color rosado claro, 10,5102 g, con 34,6% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, un gramo de 5-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)pentan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 0,7151 g de 5-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)pentan-1-amina en su forma de base libre.

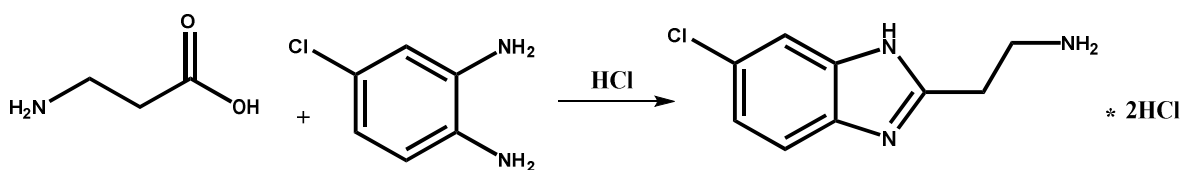
% Rendimiento= 34,6%. Pto.Fus= 247,0.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.60 (dd,  $J = 6.1, 3.1$  Hz, 2H), 7.43 (dd,  $J = 6.1, 3.1$  Hz, 2H), 3.09 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.90 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.91 – 1.77 (m, 2H), 1.66 – 1.60 (m, 2H), 1.45 – 1.36 (m, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  151.4, 138.9, 123.0, 115.2, 42.0, 32.7, 29.2, 26.3, 22.2. Anal. Elem. C, 70.90; H, 8.43; N, 20.67. IR. 3219.



**(R)-2-((5-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)pentil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 5-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)pentan-1-amina en su forma de base libre (0,7151 g) y 2-feniloxirano (0,4226 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color rosado claro, 0,6732 g con 59,2% de rendimiento.

% Rendimiento= 59,2%. Pto. Fus= 138,1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.22 (s, 1H), 7.49 – 7.16 (m, 9H), 5.11 (s, 1H), 4.60 (dd, J = 7.7, 4.9 Hz, 1H), 3.52 – 3.19 (m, 2H), 2.84 – 2.65 (m, 2H), 2.62 – 2.54 (m, 2H), 1.85 – 1.55 (m, 2H), 1.48 – 1.12 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.24, 164.84, 161.40, 160.71, 149.16, 146.11, 137.61, 132.82, 130.97, 127.91, 127.64, 125.64, 121.12, 110.77, 77.67, 77.67, 77.34, 39.92, 39.92, 39.29, 39.08. Anal. Elem. C, 74.27; H, 7.79; N, 12.99; O, 4.95. IR. 3422.

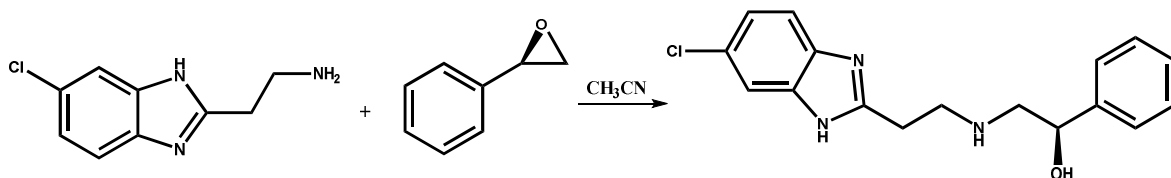


### 2-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 7,13 g (0,05 moles) de 4-clorobenceno-1,2-diamina y 8,9 g (0,1 mol) de ácido 3-aminopropanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido cristalino blanco, 1,2516 g, con 7,8% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, 500 mg de 2-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 0,3763 g de 2-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina en su forma de base libre.

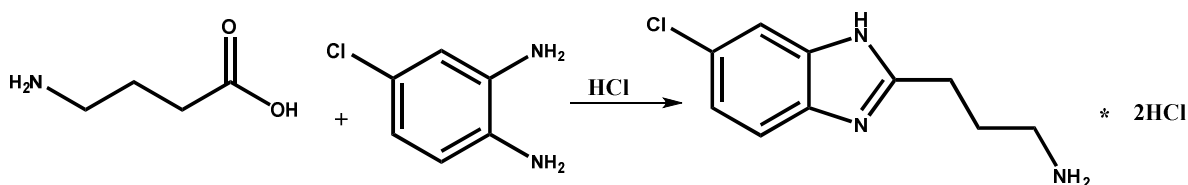
% Rendimiento= 7,8%. Pto. Fus= 264.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.70 (s, 1H), 7.62 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.56 (dq, J = 11.9, 5.9 Hz, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 149.68, 131.49, 131.43, 129.56, 126.80, 115.01, 113.74, 36.39, 24.49. Anal.Elem. C, 55.25; H, 5.15; Cl, 18.12; N, 21.48. IR. 3221.



**(R)-2-((2-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 2-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina en su forma de base libre (0,3763 g) y 2-feniloxirano (0,23 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color café claro, 0,2064 g con 34% de rendimiento.

% Rendimiento= 34,0%. Pto. Fus. = 120.0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.67 (s, 1H), 8.12 (s, 2H), 7.55 – 7.42 (m, J = 8.2 Hz, 2H), 7.39 – 7.26 (m, 2H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.13 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 5.67 – 5.38 (m, 2H), 4.79 – 4.66 (m, 2H), 2.08 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 1.80 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.01, 143.14, 142.65, 128.58, 128.45, 128.36, 127.93, 127.39, 126.37, 125.91, 124.66, 121.83, 121.67, 37.76, 29.88, 29.42, 23.06. Anal. Elem. C, 64.66; H, 5.75; Cl, 11.23; N, 13.31; O, 5.07. IR. 3422.

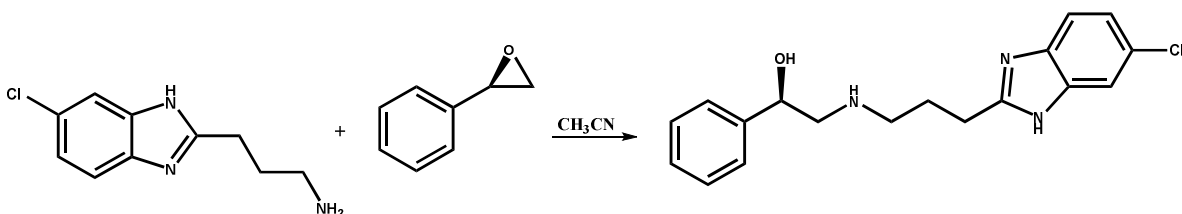


### 3-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 7,13 g (0,05 moles) de 4-clorobenceno-1,2-diamina y 10,31 g (0,1 mol) de ácido 4-aminobutanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un aceite de color café, 10,0327 g, con 57,5% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, toda la masa de 3-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro (10,0327 g) se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 6,38 g de 3-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre.

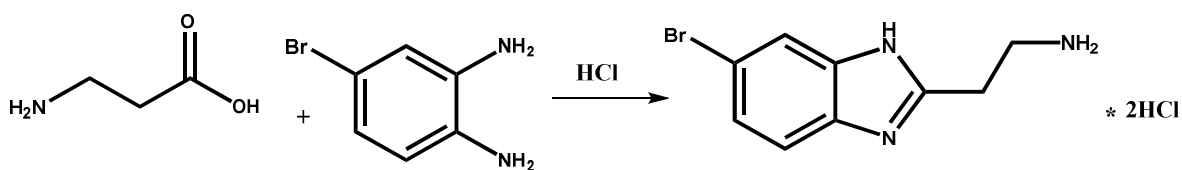
Porcentaje de rendimiento = = 57.5%. Pto. Fus = 110.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.68 (s, 1H), 7.48 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.23 (dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 2H), 6.76 (s, 2H), 2.68 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.59 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 1.94 (dq, J = 16.1, 7.9 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 151.4, 140.3, 137.0, 129.2, 124.1, 116.6, 115.8, 41.6, 31.4, 26.3. Anal. ELEM. C, 57.28; H, 5.77; Cl, 16.91; N, 20.04. IR. 3367.



**(R)-2-((3-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 3-(6-cloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre (1 g) y 2-feniloxirano (0,57 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color mostaza claro, 0,1694 g con 10,8% de rendimiento.

% Rendimiento= 10,8%. Pto. Fus= 86,0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.40 (s, 1H), 7.55 – 7.49 (m, 1H), 7.48 – 7.43 (m, 1H), 7.38 – 7.27 (m, 5H), 7.13 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 4.95 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.48 – 3.22 (m, 2H), 2.92 – 2.83 (m, Hz, 2H), 2.70 – 2.62 (m, 2H), 1.92 (dd, J = 12.6, 6.4 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.01, 145.66, 142.95, 142.33, 128.62, 128.42, 127.87, 127.71, 127.29, 126.37, 126.34, 125.85, 121.70, 57.65, 47.93, 31.15, 27.29, 24.07. Anal. Elem. C, 65.55; H, 6.11; Cl, 10.75; N, 12.74; O, 4.85. IR. 3483.

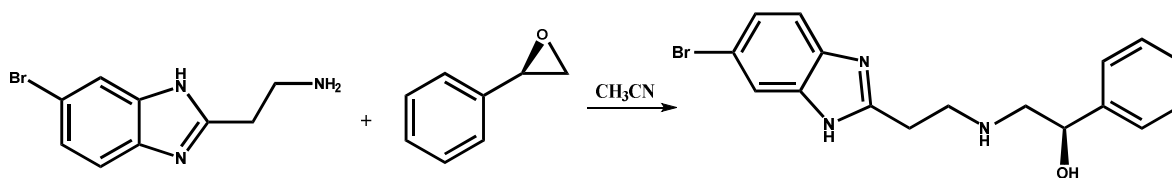


### 2-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 9,35 g (0,05 moles) de 4-bromobenceno-1,2-diamina y 8,9 g (0,1 mol) de ácido 3-aminopropanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y refluxo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido cristalino blanco, 0,9669 g, con 5,3% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, 0,5 g de 2-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 0,4215 g de 2-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina en su forma de base libre.

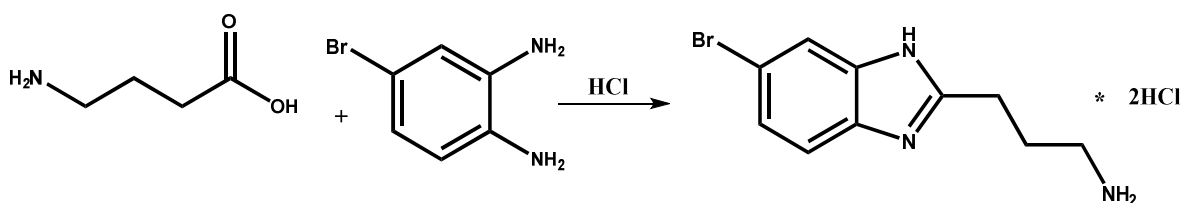
% Rendimiento= 5,3%. Pto. Fus= 276,1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.86 – 7.82 (m, J = 1.7 Hz, 1H), 7.59 – 7.51 (m, J = 7.5 Hz, 2H), 3.55 – 3.46 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 149.62, 132.02, 130.13, 129.45, 118.79, 116.81, 115.29, 36.40, 24.51. Anal. Elem. C, 45.02; H, 4.20; Br, 33.28; N, 17.50. IR. 3369.



**(R)-2-((2-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 2-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina en su forma de base libre (0,4215 g) y 2-feniloxirano (0,21 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color café claro, 0,1346 g con 21,3% de rendimiento.

% Rendimiento = 21,3%. Pto.Fus= 153,1.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  12.68 (s, 1H), 7.77 – 7.59 (m, 7H), 7.40 – 7.19 (m, 1H), 5.65 – 5.21 (m, 2H), 4.68 (dd,  $J$  = 38.2, 32.2 Hz, 2H), 2.86 – 2.66 (m, 2H), 2.14 – 2.07 (m, 2H), 1.99 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  128.91, 128.80, 128.60, 128.40, 128.19, 128.02, 127.87, 127.40, 126.89, 126.63, 126.55, 126.47, 126.40, 40.39, 40.18, 39.97, 39.77. Anal. Elem. C, 56.68; H, 5.04; Br, 22.18; N, 11.66; O, 4.44. IR. 3515.

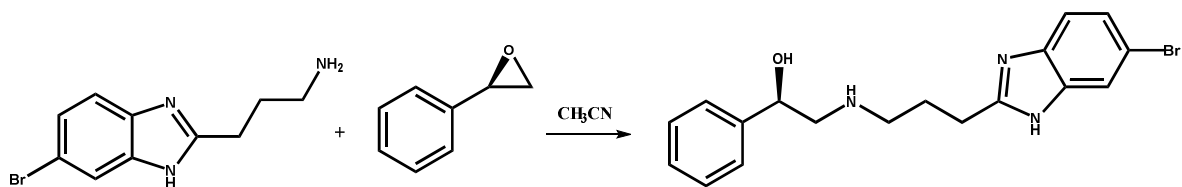


### 3-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 9,35 g (0,05 moles) de 4-bromobenceno-1,2-diamina y 10,3 g (0,1 mol) de ácido 4-aminobutanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido de color café, 11,145 g, con 56,7% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, toda la masa de 3-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 5,714 g de 3-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre.

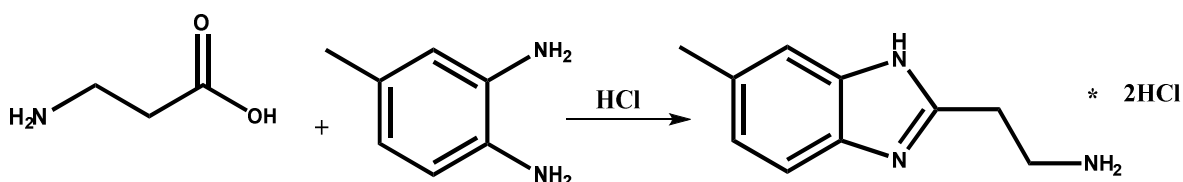
% Rendimiento = 56,7%. Pto. Fus. 109.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (s, 1H), 7.44 – 7.35 (m, 2H), 6.76 (s, 2H), 2.68 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.59 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 1.94 (dq, J = 16.1, 7.9 Hz, 2H), 1.17 – 1.14 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 151.4, 137.9, 141.1, 126.2, 118.7, 117.5, 117.4, 41.6, 31.4, 26.3. Anal. Elem. C, 47.26; H, 4.76; Br, 31.44; N, 16.54. IR. 2287.



**(R)-2-((3-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 3-(6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre (1 g) y 2-feniloxirano (0,47 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color café oscuro, 0,3831 g con 26,1% de rendimiento.

% Rendimiento = 26,1%. Pto. Fus= 111,0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.71 (d, J = 18.7 Hz, 2H), 8.08 (s, J = 26.1 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 17.5 Hz, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 2H), 7.31 – 7.21 (m, 4H), 5.85 – 5.76 (m, J = 4.5 Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 3.09 (dd, J = 12.7, 6.5 Hz, 2H), 2.51 (s, J = 9.4 Hz, 2H), 1.81 (s, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 206.98, 169.66, 128.61, 128.06, 127.60, 127.49, 126.77, 126.41, 124.70, 123.46, 120.37, 113.51, 60.21, 45.97, 27.88, 23.07, 19.01. Anal. Elem. C, 57.76; H, 5.39; Br, 21.35; N, 11.23; O, 4.27. IR, 3460.

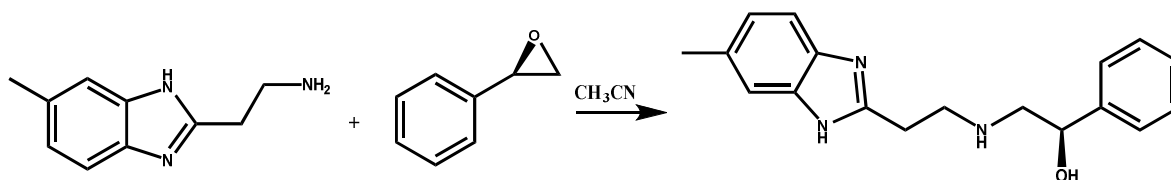


### 2-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 15,9 g (0,1 moles) de 4-metilbenceno-1,2-diamina y 13,4 g (0,15 mol) de ácido 3-aminopropanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un sólido cristalino blanco, 4,27 g, con 14,6% de rendimiento.

Para generar la base libre respectiva, un gramo de 2-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 0,7151 g de 2-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina en su forma de base libre.

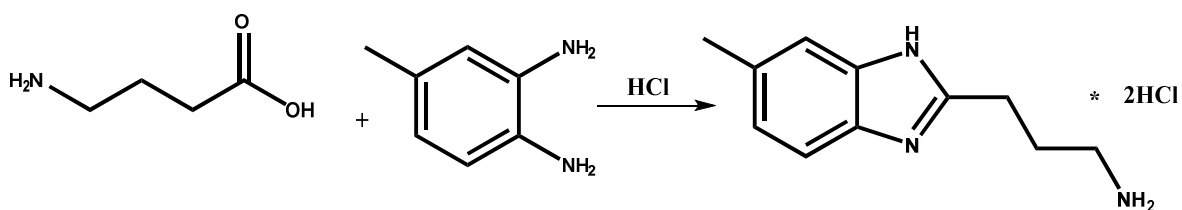
% Rendimiento= 14,6%. Pto. Fus =269,1.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.53 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.69 (s, 3H), 3.59 – 3.54 (m, 2H), 3.50 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  147.74, 137.31, 130.84, 128.59, 127.86, 113.20, 113.12, 36.52, 24.35, 20.67. Anal. Elem. C, 68.54; H, 7.48; N, 23.98. IR. 3255.



**(R)-2-((2-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 2-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etan-1-amina en su forma de base libre (1 g) y 2-feniloxirano (0,68 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color blanco invierno, 0,3153 g con 18,8% de rendimiento.

% Rendimiento = 18,8%. Pto Fus= 141.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.13 (d, J = 31.7 Hz, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 5H), 7.25 – 7.17 (m, 2H), 7.02 – 6.89 (m, 1H), 5.44 – 5.29 (m, 1H), 4.71 – 4.60 (m, 2H), 3.48 – 3.40 (m, 2H), 3.02 – 2.88 (m, 3H), 2.44 – 2.35 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 144.41, 128.62, 128.58, 128.36, 127.89, 127.27, 127.19, 126.53, 126.56, 126.53, 126.47, 126.45, 126.37, 122.93, 71.42, 55.38, 31.15, 22.19, 21.57. Anal. Elem. C, 73.19; H, 7.17; N, 14.23; O, 5.42. IR. 3490.

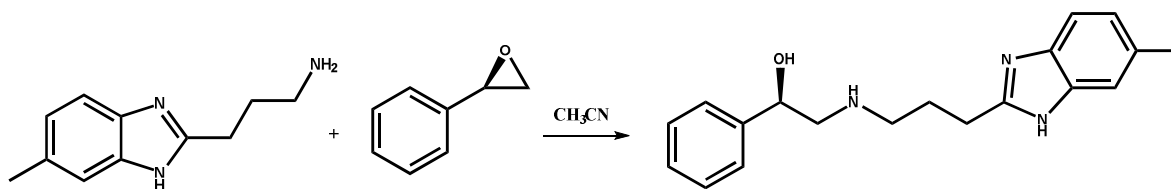


### 3-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 12,2 g (0,1 moles) de 4-metilbenceno-1,2-diamina y 15,5 g (0,15 mol) de ácido 4-aminobutanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un aceite de color café oscuro.

Para generar la base libre respectiva, toda la masa de 3-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 6,3029 g de 3-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre, con un 22,8% de rendimiento.

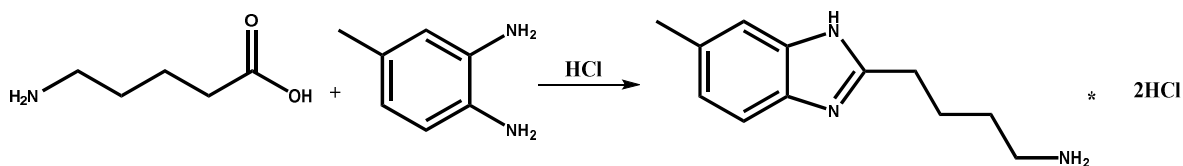
% Rendimiento = 22.8%. Pto. fus = 111.0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.52 – 7.47 (m, 2H), 7.08 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 2.68 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.60 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.40 – 2.33 (m, 3H), 1.94 (p, J = 7.9 Hz, 2H) 1.16 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 160.49, 137.28, 135.73, 132.18, 124.20, 117.55, 113.76, 41.09, 27.62, 26.37, 21.20. Anal. Elem. C, 69.81; H, 7.99; N, 22.20. IR. 3203.



**(R)-2-((3-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 3-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina en su forma de base libre (2 g) y 2-feniloxirano (1,27 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color café claro, 0,8625 g con 26,4% de rendimiento.

% Rendimiento = 26,4%. Pto. Fus. = 180. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.03 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 7.95 (s, 2H), 7.40 – 7.12 (m, 2H), 6.92 (s, 2H), 3.37 (s, 2H), 3.12 (dd, J = 12.9, 6.6 Hz, 2H), 2.78 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.51 (s, 2H), 2.10 – 2.06 (m, J = 4.2 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.60, 154.64, 123.43, 122.91, 123.03, 118.55, 118.31, 118.05, 113.67, 113.32, 111.16, 110.56, 110.11, 39.36, 38.68, 28.03, 26.56, 23.08, 21.69. Anal. Elem. C, 73.76; H, 7.49; N, 13.58; O, 5.17. IR. 3347.

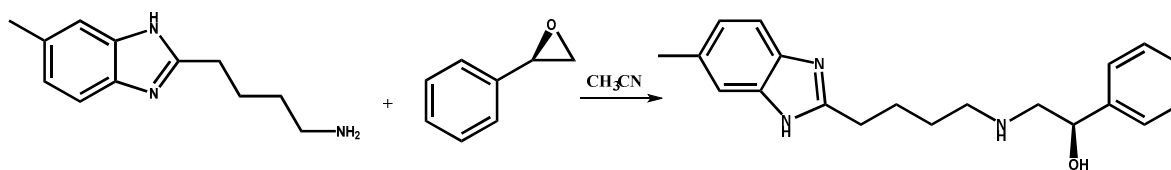


#### 4-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 12,2 g (0,1 moles) de 4-metilbenceno-1,2-diamina y 17,6 g (0,15 mol) de ácido 5-aminopentanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un aceite de color café oscuro.

Para generar la base libre respectiva, toda la masa de 4-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 12,2931 g de 4-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina en su forma de base libre, con un 41,3% de rendimiento.

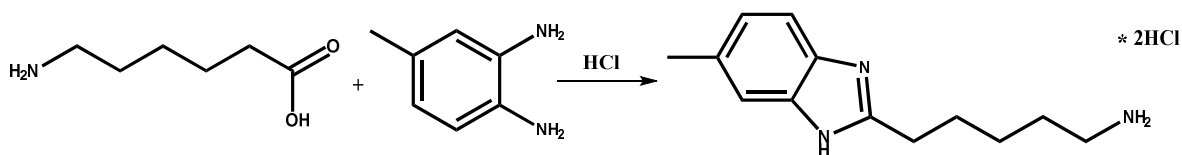
% Rendimiento = 41.3%. Pto. Fus = 105.0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.51 (s, 1H), 7.48 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.08 (s, 2H), 6.73 (s, 2H), 2.68 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.71 (dq, J = 15.7, 8.0 Hz, 2H), 1.56 (dq, J = 16.5, 8.1 Hz, 2H), 1.14 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 160.49, 137.29, 135.73, 132.18, 124.21, 117.56, 113.76, 41.23, 31.86, 30.65, 22.16, 21.21. Anal. Elem. C, 70.90; H, 8.43; N, 20.67. IR. 3216.



**(R)-2-((4-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)butil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 4-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)butan-1-amina en su forma de base libre (1g) y 2-feniloxirano (0,59 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color café claro, 0,3043 g con 19% de rendimiento.

% Rendimiento= 19,0%. Pto. Fus = 161. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.00 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 7.82 (s, 2H), 7.43 – 7.12 (m, 2H), 6.92 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 3.35 (s, 2H), 3.06 (dd, J = 12.9, 6.7 Hz, 3H), 2.77 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 2.51 (s, 2H), 1.73 (dd, J = 15.3, 7.6 Hz, 3H), 1.49 – 1.39 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.39, 154.32, 152.94, 151.66, 142.38, 135.27, 130.32, 122.78, 118.34, 117.95, 111.34, 111.06, 110.62, 40.61, 38.65, 29.24, 28.63, 25.51, 23.07, 21.38. Anal. Elem. C, 74.27; H, 7.79; N, 12.99; O, 4.95. IR. 3320.

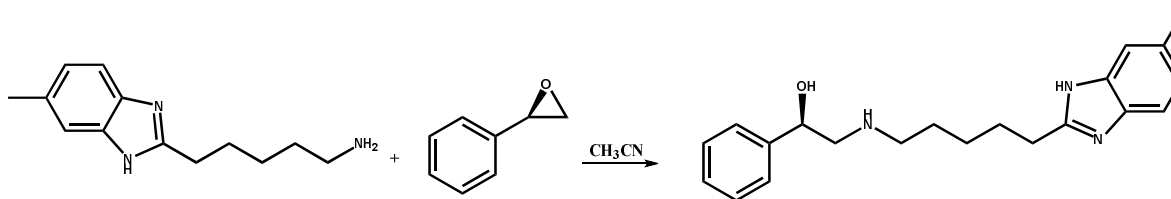


### 5-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2il)pentan-1-amina dihidrocloruro.

Una solución de 12,2 g (0,1 moles) de 4-metilbenceno-1,2-diamina y 19,7 g (0,15 mol) de ácido 6-aminohexanoico en ácido clorhídrico (100 ml, 5,5 M) se mantuvo en agitación y reflujo por 72 horas. El avance de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina durante el primer día cada 2 horas y los días posteriores cada 12 horas. El crudo de reacción se trató con carbón activo (dos veces) y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un aceite de color café oscuro.

Para generar la base libre respectiva, toda la masa de 5-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2il)pentan-1-amina dihidrocloruro se disolvió en la mínima cantidad de agua y se llevó a pH 10 utilizando una solución saturada de hidróxido de sodio. Se realizaron 5 extracciones con acetato de etilo (50 ml cada una), se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniendo 18,7 g de 5-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2il)pentan-1-amina en su forma de base libre, con un 58,6% de rendimiento.

% Rendimiento = 58,6%. Pto. Fus = 98.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.52 – 7.46 (m, J = 12.0 Hz, 2H), 7.10 – 7.05 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 2.68 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.60 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.71 (p, J = 8.0 Hz, 2H), 1.56 (p, J = 7.8 Hz, 2H), 1.33 (p, J = 8.2 Hz, 2H), 1.12 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 160.49, 137.29, 135.73, 132.18, 124.21, 117.56, 113.76, 41.23, 32.42, 30.65, 27.07, 23.36, 21.21. Anal. Elem. C, 71.85; H, 8.81; N, 19.34. IR. 3223.



**(R)-2-((5-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2il)pentil)amino)-1-feniletan-1-ol.**

Una solución de 5-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2il)pentan-1-amina en su forma de base libre (1g) y 2-feniloxirano (0,55 g, 1 equivalente) en acetonitrilo (50ml) se mantuvo en agitación y reflujo por un periodo de 1 hora. El avance de la reacción se siguió mediante el uso de cromatografía en placa fina a 15, 30, 45 y 60 minutos, evaporando el crudo de reacción hasta sequedad. El sólido resultante se enjuagó tres veces con hexano (30 ml cada enjuague) y se disolvió en la mínima cantidad de etanol. Se purificó por cromatografía preparativa utilizando como fase móvil acetato de etilo:etanol = 5:1. Se obtuvo el producto de la sílica extrayendo tres veces con acetona (100 ml cada extracción) y se secó con cloruro de calcio. El disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose un sólido de color café claro, 0,3229 g con 20,8% de rendimiento.

% Rendimiento = 20,8%. Pto. Fus= 116. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45 – 7.29 (m, 5H), 7.23 (s, 3H), 3.92 (dd, J = 11.9, 8.3 Hz, 3H), 3.83 – 3.68 (m, 2H), 3.68 – 3.50 (m, 2H), 2.80 – 2.56 (m, 3H), 2.53 – 2.30 (m, 2H), 1.72 – 1.38 (m, 3H), 1.23 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 134.72, 128.82, 128.76, 128.66, 128.46, 127.97, 127.68, 127.55, 127.45, 127.29, 126.12, 125.87, 124.89, 77.35, 77.03, 76.71, 67.93, 64.42, 50.34, 32.26, 27.29. Anal. Elem. C, 74.74; H, 8.06; N, 12.45; O, 4.74. IR. 3422.

## REFERENCIAS.

1. Lands, A.M., et al., *Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines*. Nature, 1967. **214**(5088): p. 597-8.
2. Minneman, K.P., R.N. Pittman, and P.B. Molinoff, *Beta-adrenergic receptor subtypes: properties, distribution, and regulation*. Annu Rev Neurosci, 1981. **4**: p. 419-61.
3. Arch, J.R., *The brown adipocyte beta-adrenoceptor*. Proc Nutr Soc, 1989. **48**(2): p. 215-23.
4. Stroberg, A.D.a.P.-R., F. , *Function and regulation of b3-adrenoreceptor*. Trends Pharmacol. Sci., 1996. **17**: p. 373-381.
5. Kaumann, A.J., *Is there a third heart beta-adrenoceptor?* Trends Pharmacol Sci, 1989. **10**(8): p. 316-20.
6. Arch, J.R., et al., *Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs*. Nature, 1984. **309**(5964): p. 163-5.
7. De Ponti, F.e.a., *Functional evidence of atypical beta 3-adrenoceptors in the human colon using the beta 3-selective adrenoceptor antagonist, SR 59230A*. Br. J. Pharmacol, 1996. **117**: p. 1374-1376.
8. Igawa, Y., et al., *Functional and molecular biological evidence for a possible beta3-adrenoceptor in the human detrusor muscle*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(3): p. 819-25.
9. Summers, R.J., et al., *Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain*. Br J Pharmacol, 1995. **116**(6): p. 2547-8.
10. Rodriguez, M., et al., *Evidence for the presence of beta 3-adrenergic receptor mRNA in the human brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **29**(2): p. 369-75.
11. Bardou, M., et al., *Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible beta(3)-adrenoceptor in human near-term myometrium*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(8): p. 1960-6.
12. Pang, Z., et al., *GPR40 is partially required for insulin secretion following activation of beta3-adrenergic receptors*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **325**(1-2): p. 18-25.
13. Chapple, C., *Mirabegron the first beta3-adrenoceptor agonist for overactive bladder (OAB): a summary of the phase III studies*. BJU Int, 2014. **113**(6): p. 847-8.
14. Engineer, D.R., et al., *Exposure to ACEII/ARB and beta-Blockers Is Associated with Improved Survival and Decreased Tumor Progression and Hospitalizations in Patients with Advanced Colon Cancer*. Transl Oncol, 2013. **6**(5): p. 539-45.
15. Iseri, O.D., et al., *beta-Adrenoreceptor antagonists reduce cancer cell proliferation, invasion, and migration*. Pharm Biol, 2014. **52**(11): p. 1374-81.
16. Stroberg, A.D., *Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor*. Annu Rev. Pharmacol. toxicol, 1997. **37**: p. 421-450.
17. Perrone, M.G., et al., *The tertiary amine nitrogen atom of piperazine sulfonamides as a novel determinant of potent and selective beta3-adrenoceptor agonists*. ChemMedChem, 2009. **4**(12): p. 2080-97.
18. Kaumann, A.J., *(-)-CGP 12177-induced increase of human atrial contraction through a putative third beta-adrenoceptor*. Br J Pharmacol, 1996. **117**(1): p. 93-8.
19. Gauthier, C., et al., *Functional beta3-adrenoceptor in the human heart*. J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 556-62.
20. Tagaya, E., et al., *Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway*. Lung, 1999. **177**(5): p. 321-32.

21. Berlan, M., et al., *Beta-3 adrenoceptor-mediated increase in cutaneous blood flow in the dog*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **268**(3): p. 1444-51.
22. Hom, G.J., et al., *Beta(3)-adrenoceptor agonist-induced increases in lipolysis, metabolic rate, facial flushing, and reflex tachycardia in anesthetized rhesus monkeys*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(1): p. 299-307.
23. Rozec, B., et al., *Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(2): p. 351-9.
24. Dessy, C., et al., *Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization*. Circulation, 2004. **110**(8): p. 948-54.
25. Castillo-Meléndez, M., McKinley, M. J & Summers, R. J., *Intracerebroventricular administration of the beta(3)-adrenoceptor agonist CL 316243 causes Fos immunoreactivity in discrete region of rat hypothalamus*. Neurosci. Lett., 2000. **290**: p. 161-164.
26. Arch, J.R. and A.J. Kaumann, *Beta 3 and atypical beta-adrenoceptors*. Med Res Rev, 1993. **13**(6): p. 663-729.
27. Horinouchi, T., Y. Tanaka, and K. Koike, *[Beta 3-adrenoceptor-mediated relaxation of guinea-pig gastric fundus smooth muscle: cAMP-independent characteristics and a primary role of 4-aminopyridine-sensitive voltage-dependent K<sup>+</sup> (K<sub>v</sub>) channels]*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2002. **120**(1): p. 109P-111P.
28. Adami, M., et al., *Pharmacological evidence for beta3 adrenoceptors in the control of rat gastric acid secretion*. Dig Dis Sci, 2003. **48**(2): p. 334-9.
29. Shabalina, I., et al., *Uncoupling protein-1: involvement in a novel pathway for beta-adrenergic, cAMP-mediated intestinal relaxation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(5): p. G1107-16.
30. Yamaguchi, O., *Beta3-adrenoceptors in human detrusor muscle*. Urology, 2002. **59**(5 Suppl 1): p. 25-9.
31. Park, Y.C., et al., *Existence of a beta3-adrenoceptor and its functional role in the human ureter*. J Urol, 2000. **164**(4): p. 1364-70.
32. Cirino, G., et al., *Involvement of beta 3-adrenergic receptor activation via cyclic GMP- but not NO-dependent mechanisms in human corpus cavernosum function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5531-6.
33. Rouget, C., et al., *Beta3-adrenoceptor is the predominant beta-adrenoceptor subtype in human myometrium and its expression is up-regulated in pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1644-50.
34. Danner, I., D. Escande, and C. Gauthier, *Beta(3)-adrenoceptors control Cl(-) conductance in rabbit nasal epithelium*. Eur J Pharmacol, 2001. **422**(1-3): p. 203-7.
35. Tamaoki, J., et al., *Atypical beta-adrenoceptor- (beta 3-adrenoceptor) mediated relaxation of canine isolated bronchial smooth muscle*. J Appl Physiol (1985), 1993. **74**(1): p. 297-302.
36. Martin, C.A. and C. Advenier, *Beta 3-adrenoceptors and airways*. Fundam Clin Pharmacol, 1995. **9**(2): p. 114-8.
37. Navegantes, L.C., et al., *CL 316,243, a selective beta3-adrenergic agonist, inhibits protein breakdown in rat skeletal muscle*. Pflugers Arch, 2006. **451**(5): p. 617-24.
38. Roberts, S.J. and R.J. Summers, *Cyclic AMP accumulation in rat soleus muscle: stimulation by beta2- but not beta3-adrenoceptors*. Eur J Pharmacol, 1998. **348**(1): p. 53-60.

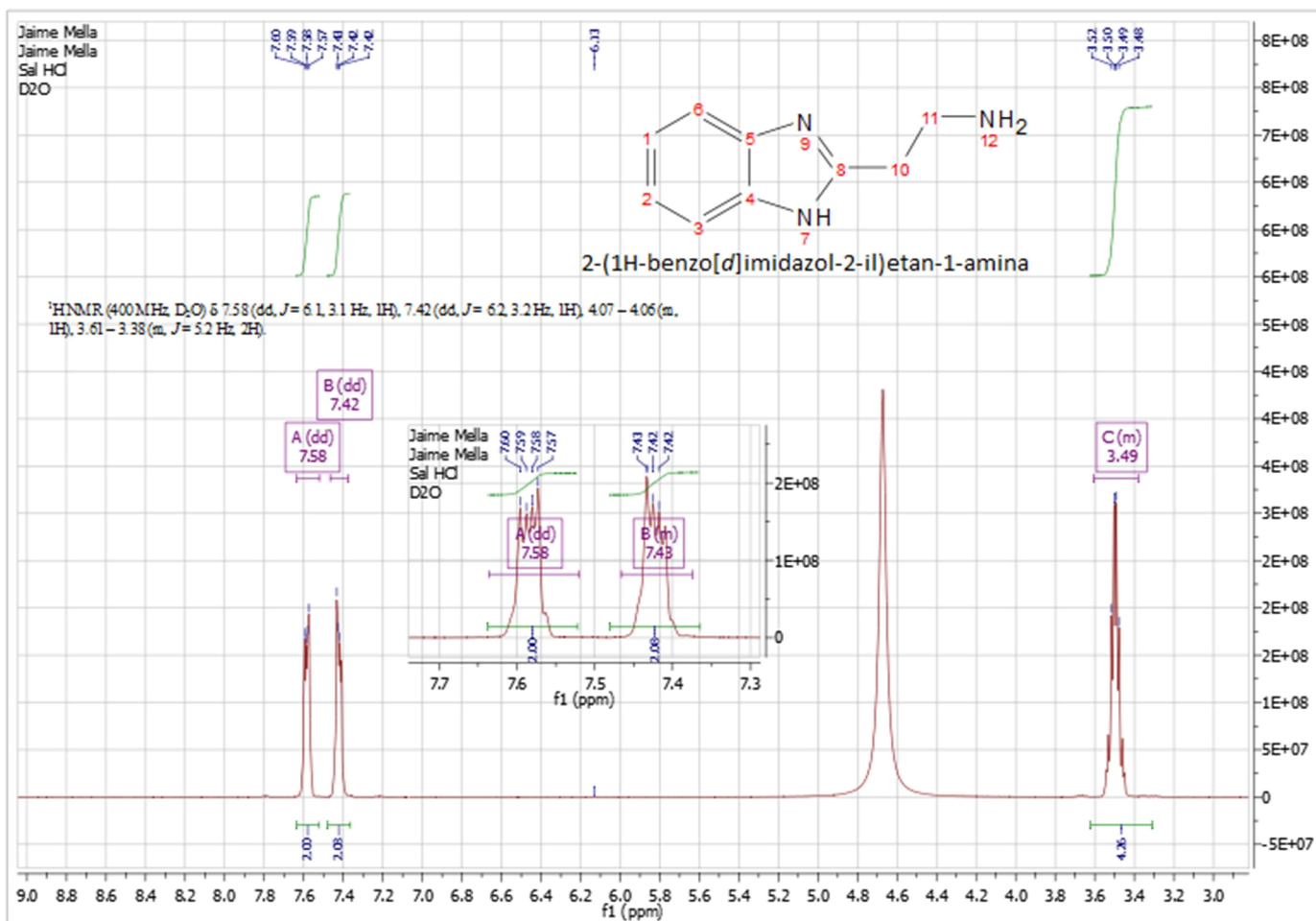
39. Collins, S., W. Cao, and J. Robidoux, *Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2123-31.
40. De Souza, C.J.B., B. F., *Beta 3-adrenoceptor agonists as anti-diabetic and anti-obesity drugs in humans*. Curr. Pharm. Des., 2001. **7**: p. 1433-1449.
41. Ursino, M.G., et al., *The beta3-adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives*. Pharmacol Res, 2009. **59**(4): p. 221-34.
42. Kato, H., et al., *Mechanism of amelioration of insulin resistance by beta3-adrenoceptor agonist AJ-9677 in the KK-Ay/Ta diabetic obese mouse model*. Diabetes, 2001. **50**(1): p. 113-22.
43. Blin, N., et al., *Mediation of most atypical effects by species homologues of the beta 3-adrenoceptor*. Br J Pharmacol, 1994. **112**(3): p. 911-9.
44. Dolan, J.A., et al., *Beta-3 adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **269**(3): p. 1000-6.
45. Barbe, P., et al., *In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue*. Br J Pharmacol, 1996. **117**(5): p. 907-13.
46. Deng, C., et al., *Respective degree of expression of beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in human brown and white adipose tissues*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(4): p. 929-34.
47. Simiand, J., et al., *Antidepressant profile in rodents of SR 58611A, a new selective agonist for atypical beta-adrenoceptors*. Eur J Pharmacol, 1992. **219**(2): p. 193-201.
48. Claustre, Y., et al., *Effects of the beta3-adrenoceptor (Adrb3) agonist SR58611A (amibegron) on serotonergic and noradrenergic transmission in the rodent: relevance to its antidepressant/anxiolytic-like profile*. Neuroscience, 2008. **156**(2): p. 353-64.
49. Nestler, E.J., et al., *Neurobiology of depression*. Neuron, 2002. **34**(1): p. 13-25.
50. Stemmelin, J., et al., *Stimulation of the beta3-Adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(3): p. 574-87.
51. Denny, M.C., et al., *Beta-3 versus beta-2 adrenergic agonists and preterm labour: in vitro uterine relaxation effects*. BJOG, 2001. **108**(6): p. 605-9.
52. Takasu, T., et al., *Effect of (R)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl} acetanilide (YM178), a novel selective beta3-adrenoceptor agonist, on bladder function*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 642-7.
53. De Ponti, F.C., M., Costa, A., Girani, M., Gibelli, G., D'Angelo, L., Frigo, G., and Crema, A., *Inhibitory effects of SR 58611A on canine colonic motility: Evidence for a role of beta 3-adrenoceptor*. Br. J. Pharmacol, 1995. **114**: p. 1447-1453.
54. Celtek, S., et al., *Demonstration of functional neuronal beta3-adrenoceptors within the enteric nervous system*. Gastroenterology, 2007. **133**(1): p. 175-83.
55. Lohse, M.J.H., C., and Engelhardt, S., *Inverse agonism at  $\beta_1$ -adrenergic receptors*. Int. Congr. Ser., 2003. **1249**: p. 55-61.
56. Maack, C., et al., *Characterization of beta(1)-selectivity, adrenoceptor-G(s)-protein interaction and inverse agonism of nebivolol in human myocardium*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(8): p. 1817-26.

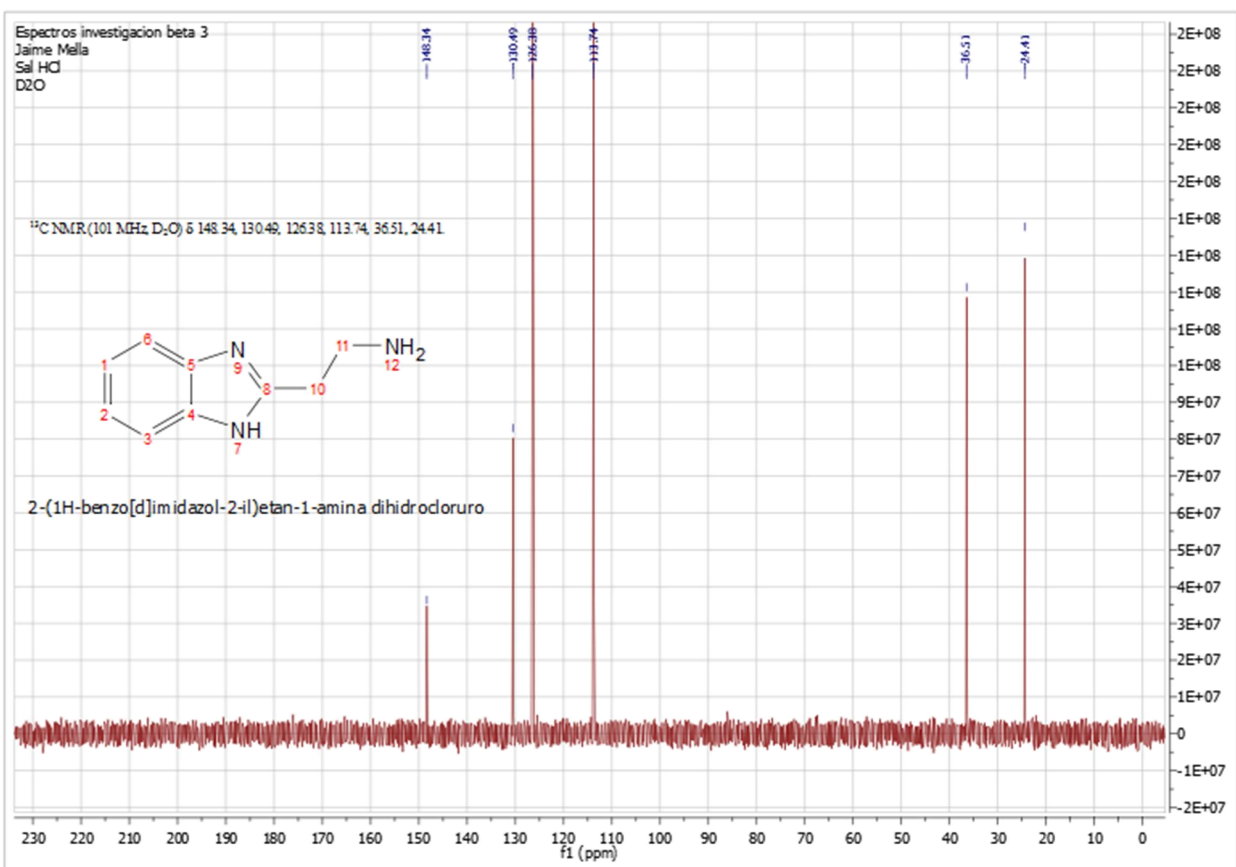
57. Baker, J.G., I.P. Hall, and S.J. Hill, *Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling*. *Mol Pharmacol*, 2003. **64**(6): p. 1357-69.
58. Hoffmann, C., et al., *Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004. **369**(2): p. 151-9.
59. Perrone, M.G., et al., *Stereospecific synthesis and bio-activity of novel beta(3)-adrenoceptor agonists and inverse agonists*. *Bioorg Med Chem*, 2008. **16**(5): p. 2473-88.
60. Perrone, M.G., et al., *A chemoenzymatic scalable route to optically active (R)-1-(pyridin-3-yl)-2-aminoethanol, valuable moiety of beta3-adrenergic receptor agonists*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(4): p. 1207-14.
61. Nakajima, Y., et al., *Discovery of a novel, potent and selective human beta3-adrenergic receptor agonist*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. **15**(2): p. 251-4.
62. Dow, R.L., et al., *Potent and selective, sulfamide-based human beta 3-adrenergic receptor agonists*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. **14**(12): p. 3235-40.
63. Popp, B.D., et al., *Stereoselectivity for interactions of agonists and antagonists at mouse, rat and human beta3-adrenoceptors*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **484**(2-3): p. 323-31.
64. Dallanoce, C., et al., *Novel chiral isoxazole derivatives: synthesis and pharmacological characterization at human beta-adrenergic receptor subtypes*. *Bioorg Med Chem*, 2007. **15**(7): p. 2533-43.
65. Fisher, L.G., Sher, P. M., Skwish, S., Michel, I.M., Seiler, S. M., and Dickinson, K. E. J., *BMS-187257, a potent, selective, and novel heterocyclic  $\beta_3$  adrenergic receptor agonist*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006. **6**: p. 2253-2258.
66. Gavai, A.V., et al., *BMS-196085: a potent and selective full agonist of the human beta(3) adrenergic receptor*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001. **11**(23): p. 3041-4.
67. Harada, H., et al., *Novel and potent human and rat beta3-adrenergic receptor agonists containing substituted 3-indolylalkylamines*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. **13**(7): p. 1301-5.
68. Shearer, B.G., et al., *Synthesis and evaluation of potent and selective beta3 adrenergic receptor agonists containing heterobiaryl carboxylic acids*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. **17**(16): p. 4670-7.
69. Tanaka, N., et al., *Relationship between stereochemistry and the beta3-adrenoceptor agonistic activity of 4'-hydroxynorephedrine derivative as an agent for treatment of frequent urination and urinary incontinence*. *J Med Chem*, 2003. **46**(1): p. 105-12.
70. Weber, A.E., et al., *Potent, selective benzenesulfonamide agonists of the human beta 3 adrenergic receptor*. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998. **8**(9): p. 1101-6.
71. Mizuno, K., et al., *Tryptamine-based human beta3-adrenergic receptor agonists. Part 1: SAR studies of the 7-position of the indole ring*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. **14**(24): p. 5959-62.
72. Kashaw, S.K., et al., *Development of 3D-QSAR models in cyclic ureidobenzenesulfonamides: human beta3-adrenergic receptor agonist*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. **13**(15): p. 2481-4.
73. Brockunier, L.L., et al., *Human beta3 adrenergic receptor agonists containing cyanoguanidine and nitroethylenediamine moieties*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001. **11**(3): p. 379-82.

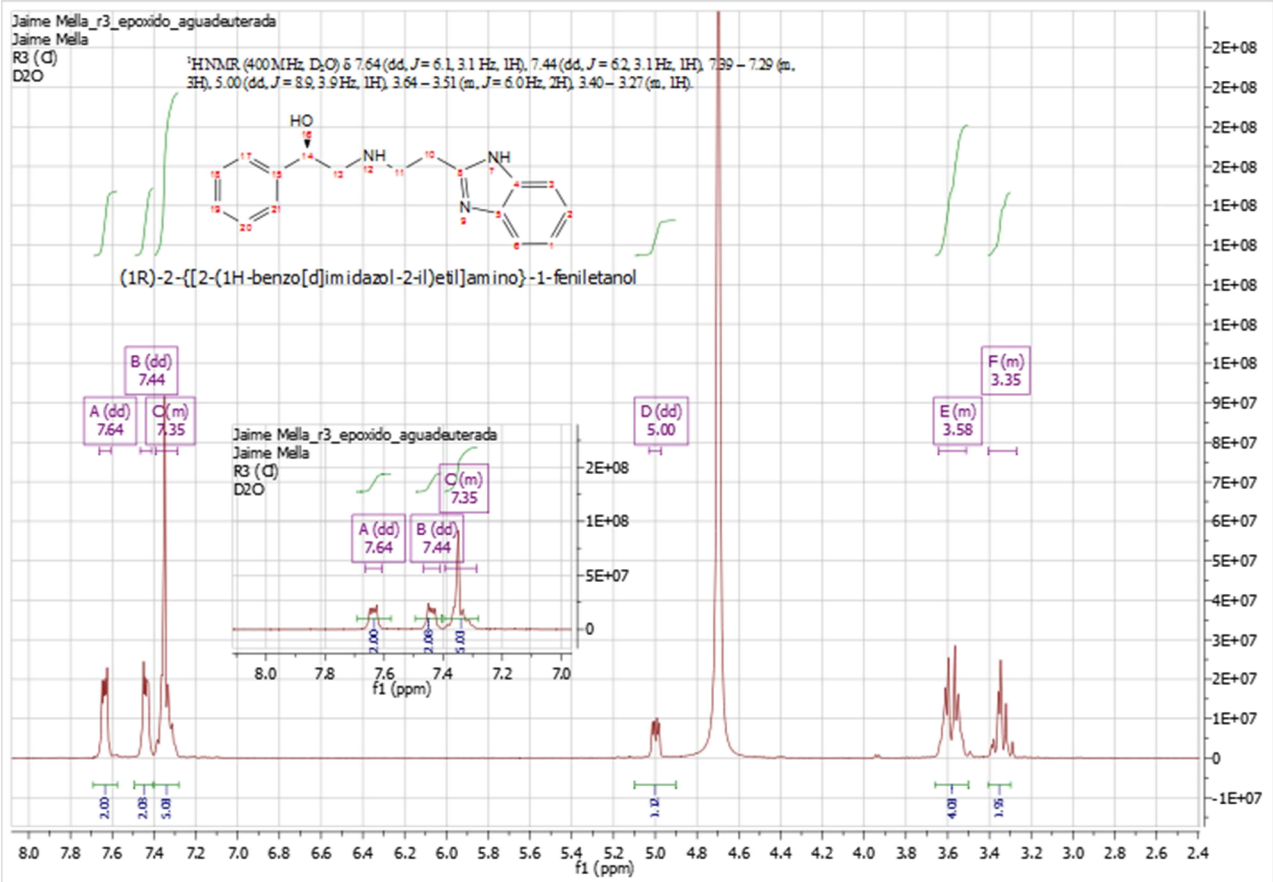
74. Cramer, R.D., 3rd, D.E. Patterson, and J.D. Bunce, *Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA)*. Prog Clin Biol Res, 1989. **291**: p. 161-5.
75. Byberg, J.R., F.S. Jorgensen, and P.D. Klemmensen, *Towards an identification of the pyrethroid pharmacophore. A molecular modelling study of some pyrethroid esters*. J Comput Aided Mol Des, 1987. **1**(3): p. 181-95.
76. Konovalov, D.A., et al., *Robust cross-validation of linear regression QSAR models*. J Chem Inf Model, 2008. **48**(10): p. 2081-94.
77. Klebe, G. and U. Abraham, *On the prediction of binding properties of drug molecules by comparative molecular field analysis*. J Med Chem, 1993. **36**(1): p. 70-80.
78. Klebe, G., U. Abraham, and T. Mietzner, *Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity*. J Med Chem, 1994. **37**(24): p. 4130-46.
79. Stahle, L. and S. Wold, *Multivariate data analysis and experimental design in biomedical research*. Prog Med Chem, 1988. **25**: p. 291-338.
80. Senthil Kumar, P.B., P. V. , *Comparative 3D QSAR study on  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\beta_3$ -adrenoceptor agonists*. Med. Chem. Res., 2010. **19**: p. 1121-1140.
81. Mizuno, K., et al., *Discovery of 1,7-cyclized indoles as a new class of potent and highly selective human beta3-adrenergic receptor agonists with high cell permeability*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(3): p. 855-68.
82. Sawa, M., et al., *Tryptamine-based human beta3-adrenergic receptor agonists. Part 3: improved oral bioavailability via modification of the sulfonamide moiety*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(4): p. 1061-4.
83. Sawa, M., et al., *Tryptamine-based human beta3-adrenergic receptor agonists. Part 2: SAR of the methylene derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(24): p. 5963-6.
84. Ashwell, M.A., et al., *4-Aminopiperidine ureas as potent selective agonists of the human beta(3)-adrenergic receptor*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(24): p. 3123-7.
85. Steffan, R.J., et al., *Novel substituted 4-aminomethylpiperidines as potent and selective human beta3-agonists. Part 1: aryloxypropanolaminomethylpiperidines*. Bioorg Med Chem Lett, 2002. **12**(20): p. 2957-61.
86. Steffan, R.J., et al., *Novel substituted 4-aminomethylpiperidines as potent and selective human beta3-agonists. Part 2: aryloxypropanolaminomethylpiperidines*. Bioorg Med Chem Lett, 2002. **12**(20): p. 2963-7.
87. SYBYL-X 1.2, Tripos International, St. Louis, MS.
88. Vinter, J.G., A. Davis, and M.R. Saunders, *Strategic approaches to drug design. I. An integrated software framework for molecular modelling*. J Comput Aided Mol Des, 1987. **1**(1): p. 31-51.
89. Gasteiger, J. and M. Marsili, *Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges*. Tetrahedron, 1980. **36**: p. 3219-3228.
90. Clark, M., R.D. Cramer, and N.V. Opdenbosch, *Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field*. J. Comput. Chem., 1989. **10**: p. 982-1012.
91. Bush, B.L. and R.B. Nachbar, Jr., *Sample-distance partial least squares: PLS optimized for many variables, with application to CoMFA*. J Comput Aided Mol Des, 1993. **7**(5): p. 587-619.

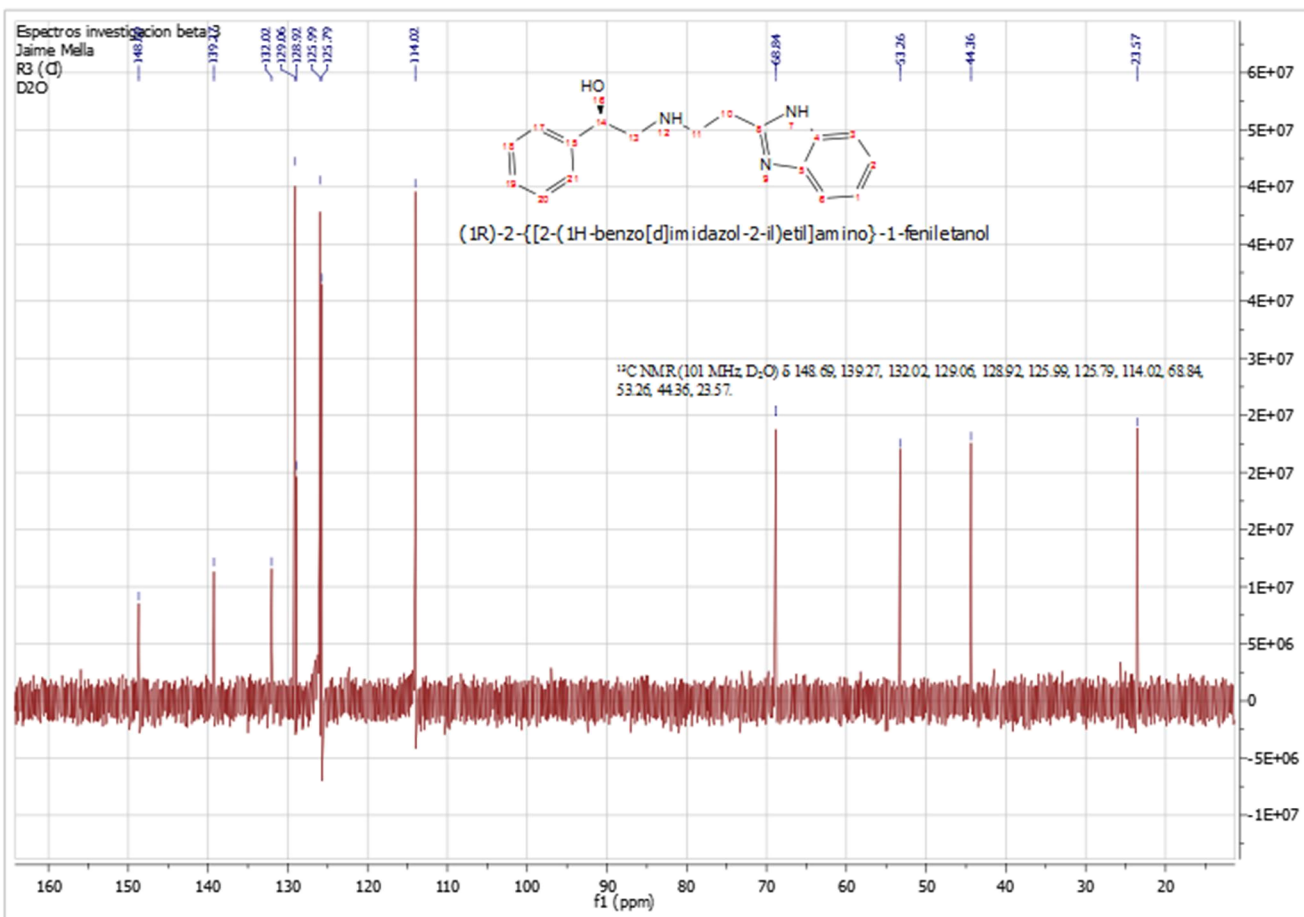
92. Oprea, T.I., C.L. Waller, and G.R. Marshall, *Three-dimensional quantitative structure-activity relationship of human immunodeficiency virus (I) protease inhibitors. 2. Predictive power using limited exploration of alternate binding modes.* J Med Chem, 1994. **37**(14): p. 2206-15.
93. Waller, C.L., et al., *Three-dimensional QSAR of human immunodeficiency virus (I) protease inhibitors. 1. A CoMFA study employing experimentally-determined alignment rules.* J Med Chem, 1993. **36**(26): p. 4152-60.
94. Phillips, M.A., *The formation of 2-methylbenzimidazoles.* Journal of the Chemical Society, 1928: p. 172-177.
95. Husain, A., et al., *Benzimidazole clubbed with triazolo-thiadiazoles and triazolo-thiadiazines: new anticancer agents.* Eur J Med Chem, 2013. **62**: p. 785-98.
96. Sereena, K., et al., *Synthesis and Anthelmintic Activity of Benzimidazole Derivatives.* Hygeia, 2009. **1**(1): p. 21-22.
97. Mochona, B., et al., *Synthesis of 2-(N-Benzylpyrrolyl)-benzimidazoles Using Polyphosphoric Acid Prompted Cyclocondensation.* J Heterocycl Chem, 2010. **47**(6): p. 1367-1371.

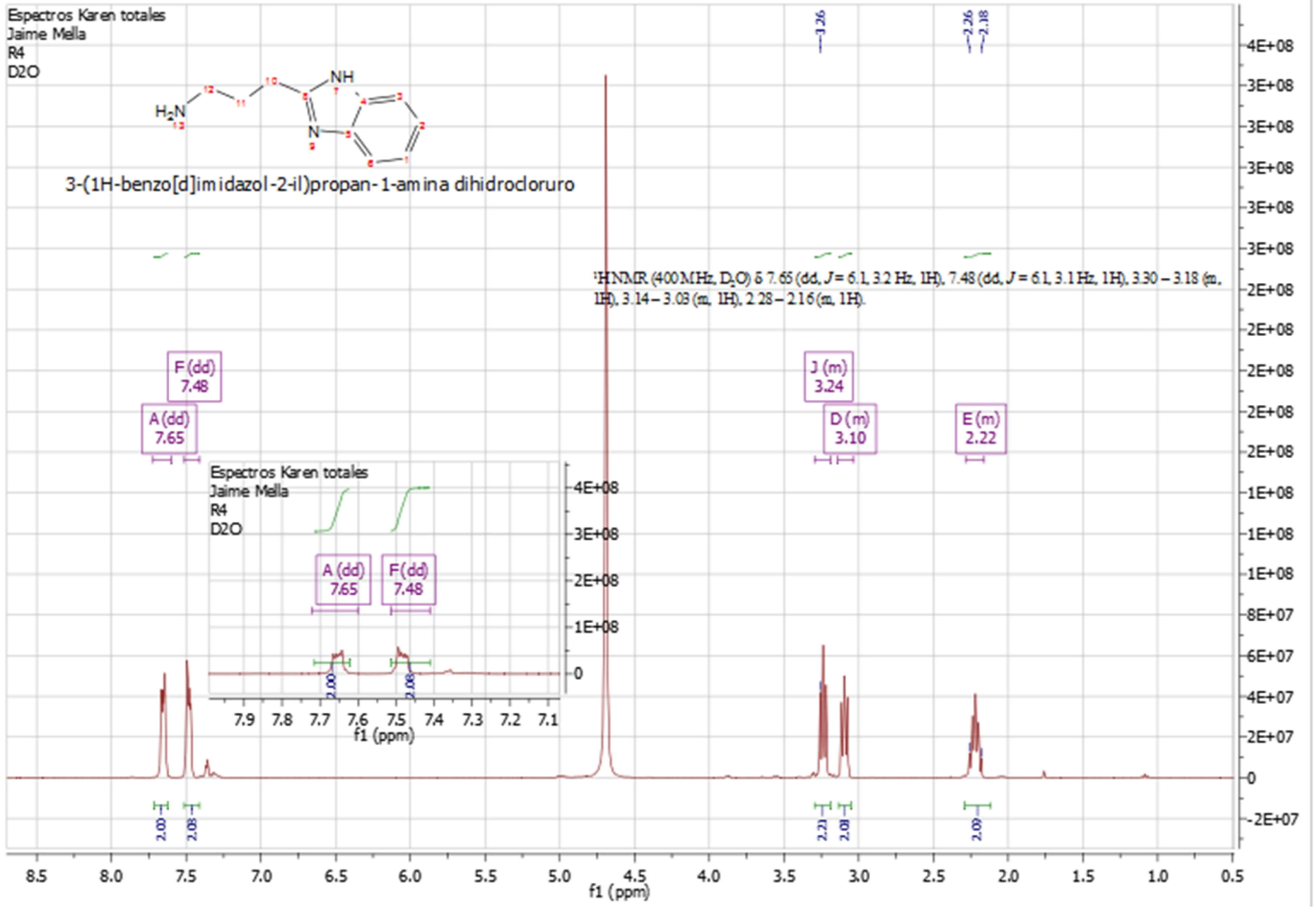
# ANEXOS.





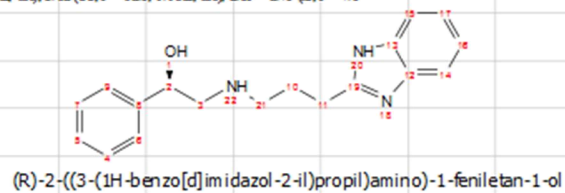






G.Recabarren-R4BL

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO) δ 7.49–7.40(m, J=2.8 Hz, 2H), 7.36–7.25(m, J=8.4 Hz, 1H), 7.10  
(dd, J=5.9, 2.9 Hz, 2H), 3.21 (t, J=6.6 Hz, 1H), 3.12(dd, J=12.9, 6.6 Hz, 1H), 2.89–2.75(m, J=7.5  
Hz, 1H), 2.51(s, 1H).



A (m)  
7.44

G (m)  
7.30

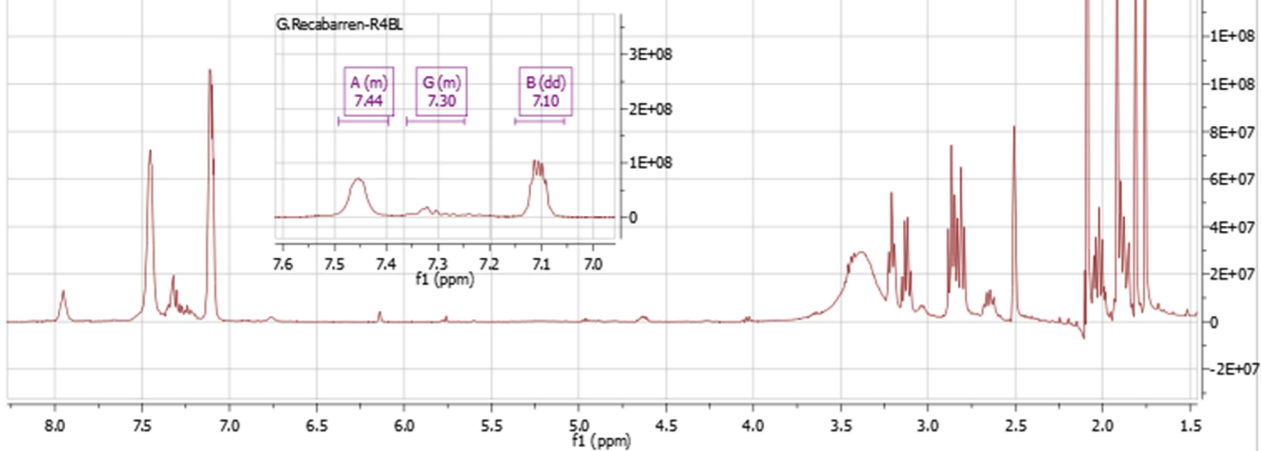
B (dd)  
7.10

F (dd)  
3.12

E (t)  
3.21

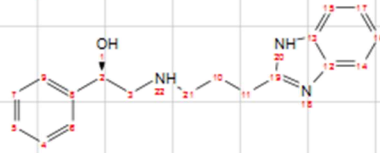
C (m)  
2.82

D (s)  
2.51

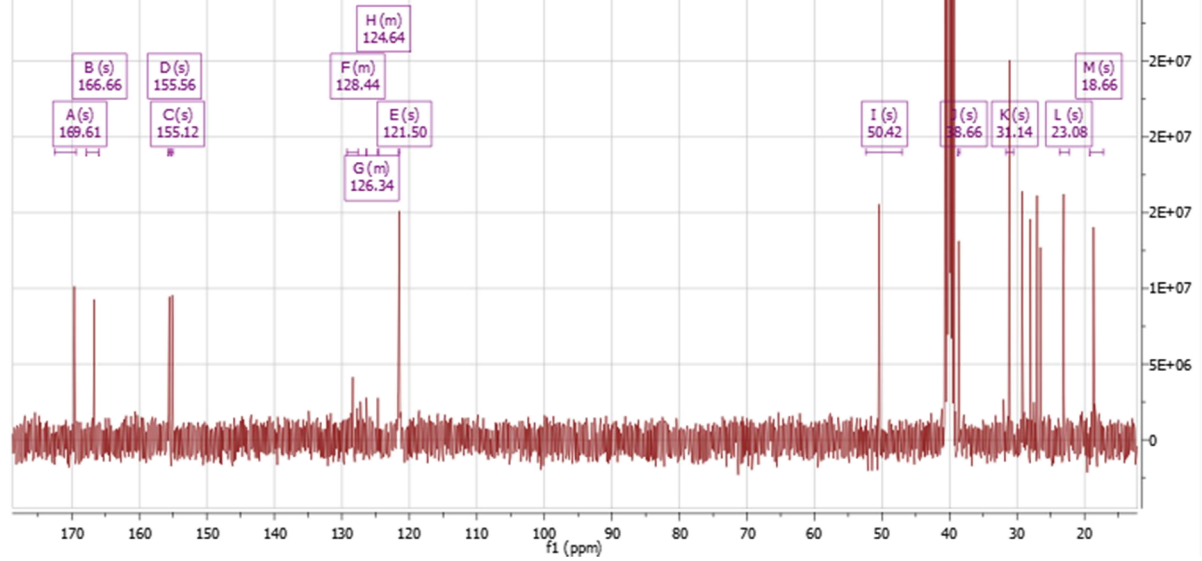


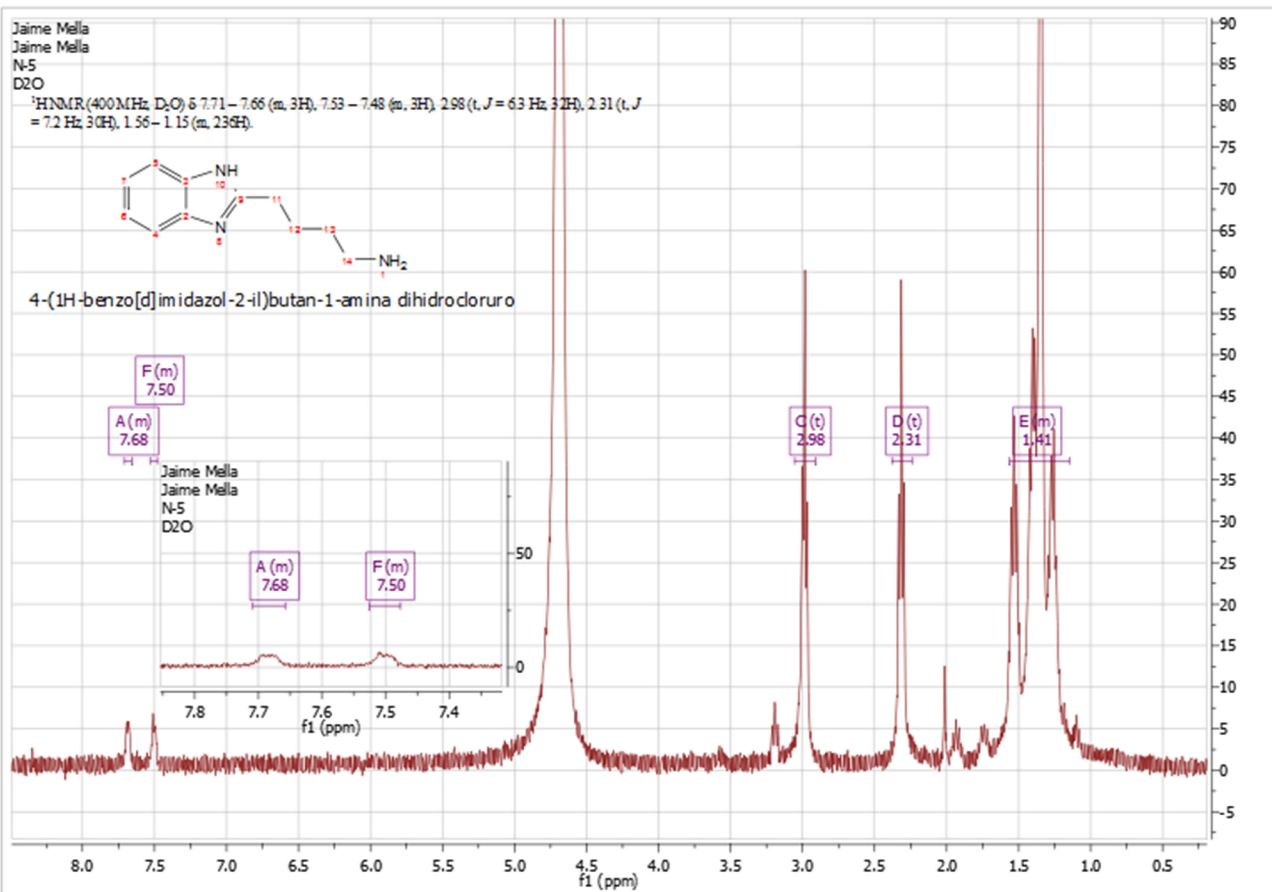
G.Recabarren-R4BL

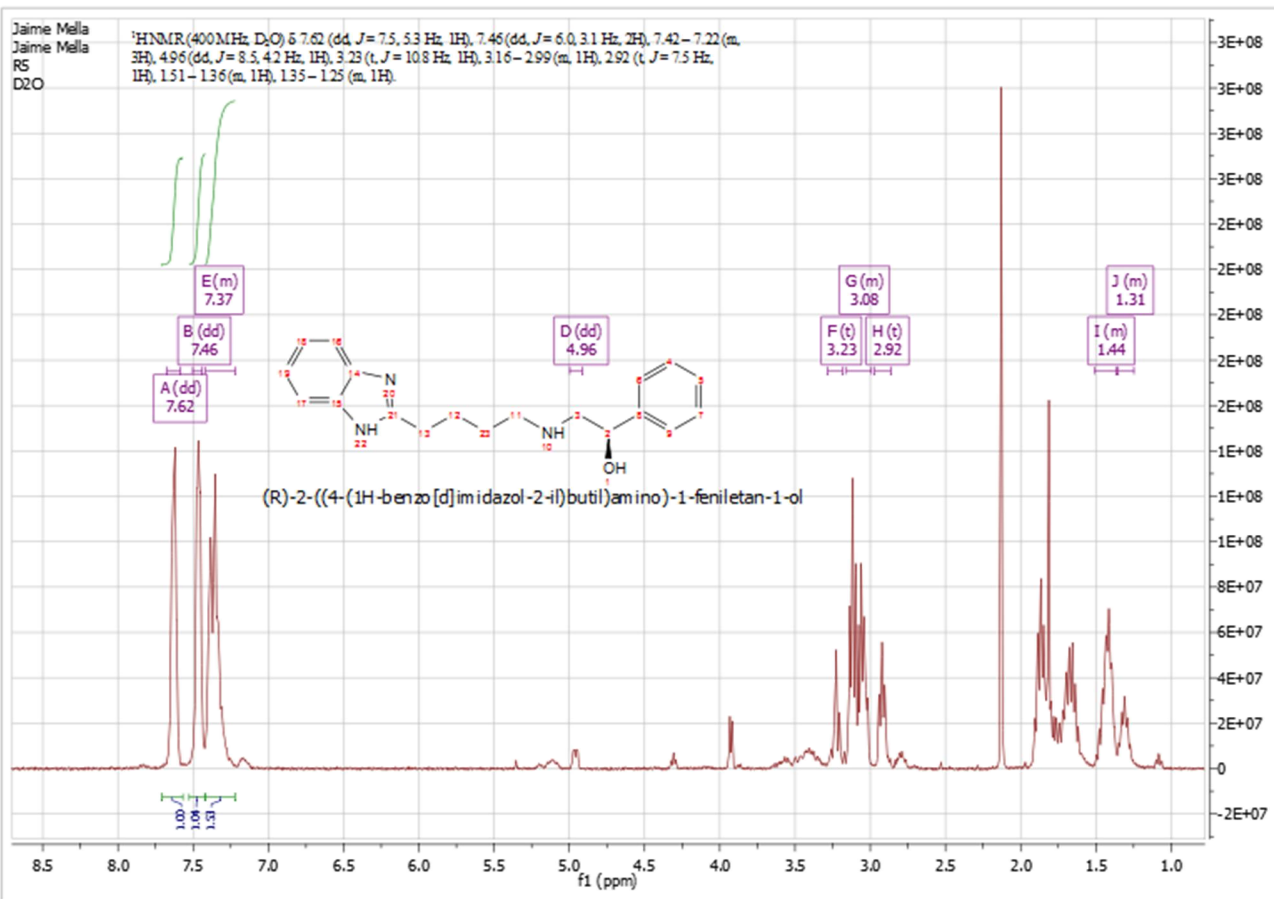
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.61 (s), 166.66 (s), 155.56 (s), 155.12 (s), 129.27 – 127.61 (m),  
126.38 – 126.30 (m), 124.68 – 124.59 (m), 121.50 (s), 50.42 (s), 38.66 (s), 31.14 (s), 23.08 (s), 18.66 (s).

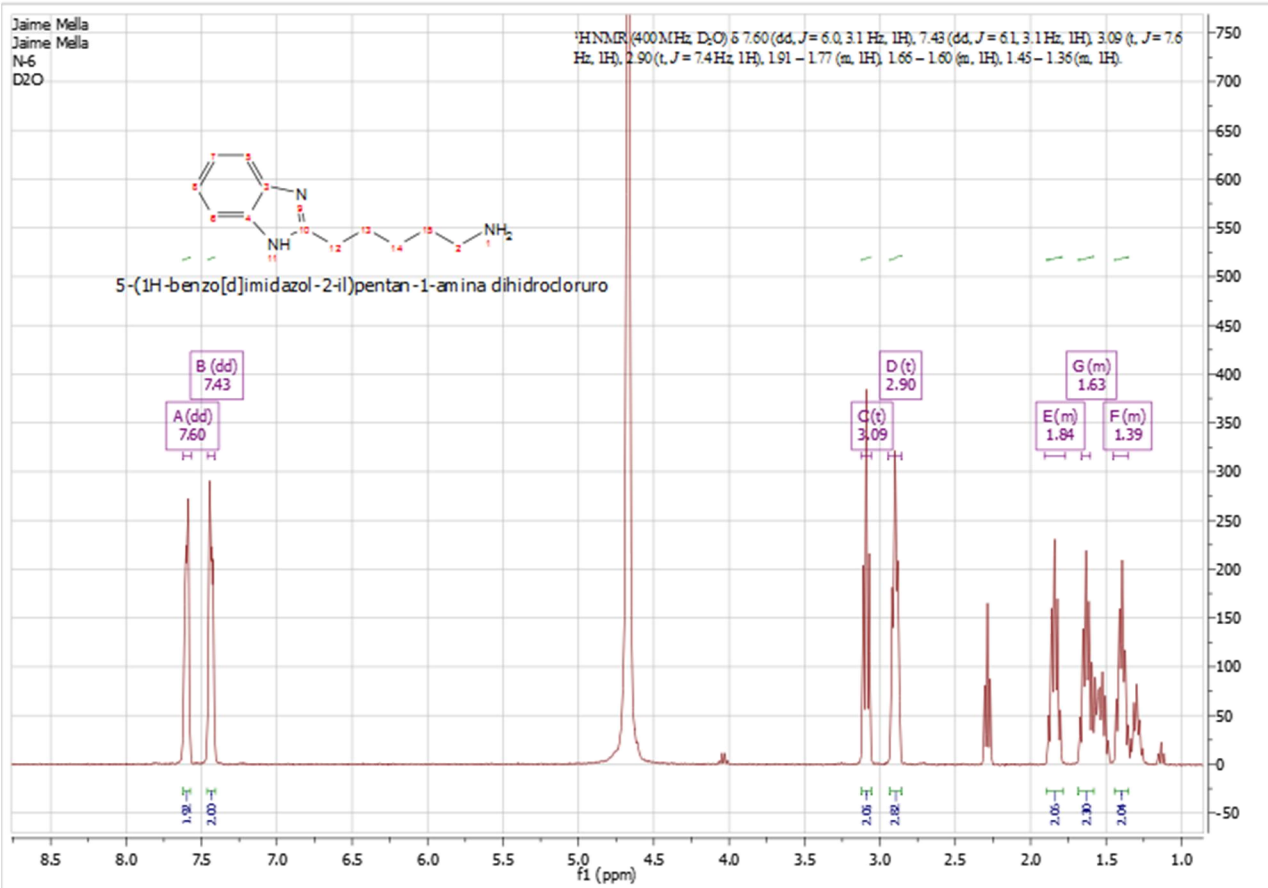


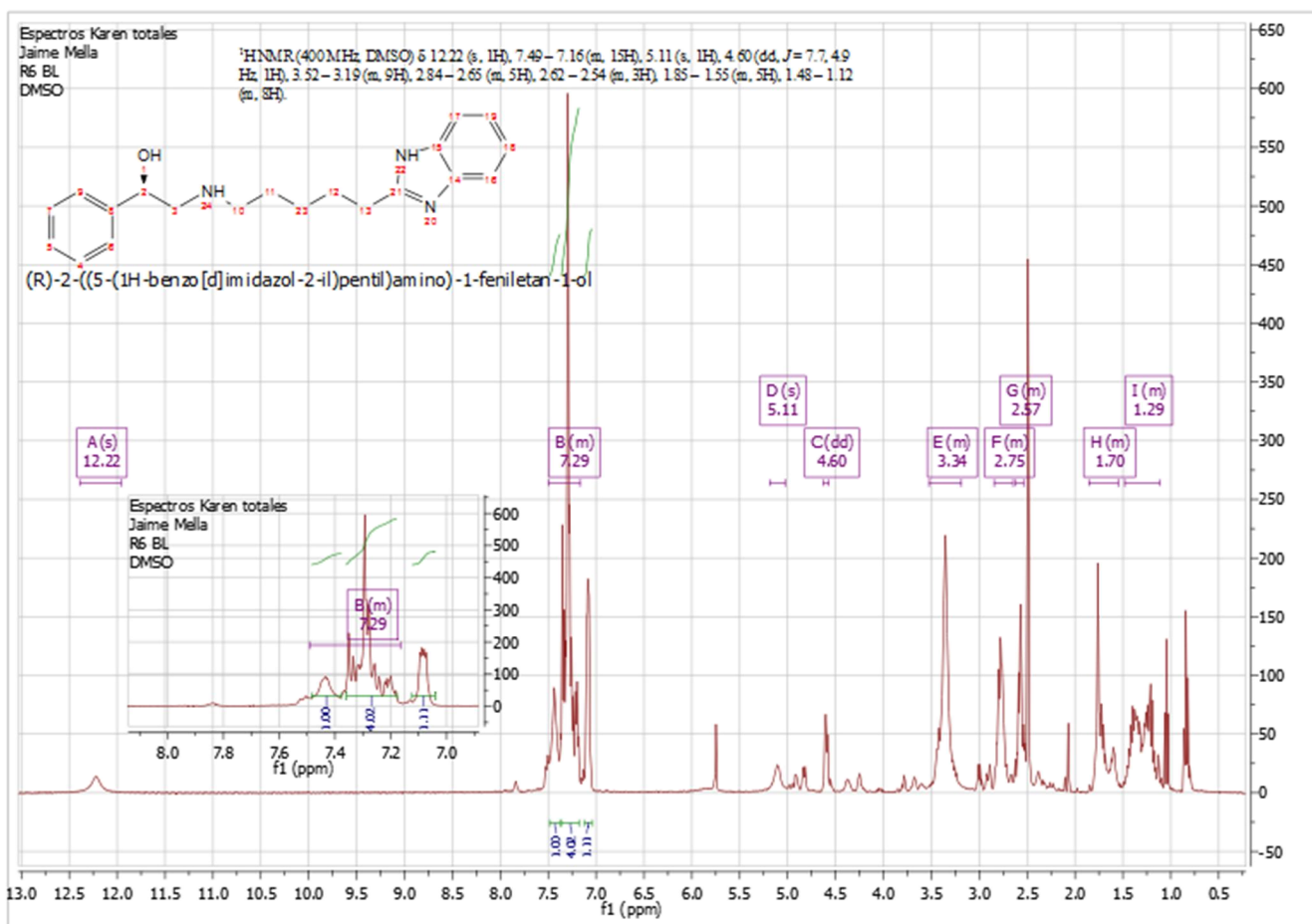
(R)-2-((3-(1H-benzodimidazol-2-yl)propyl)amino)-1-phenyletan-1-ol

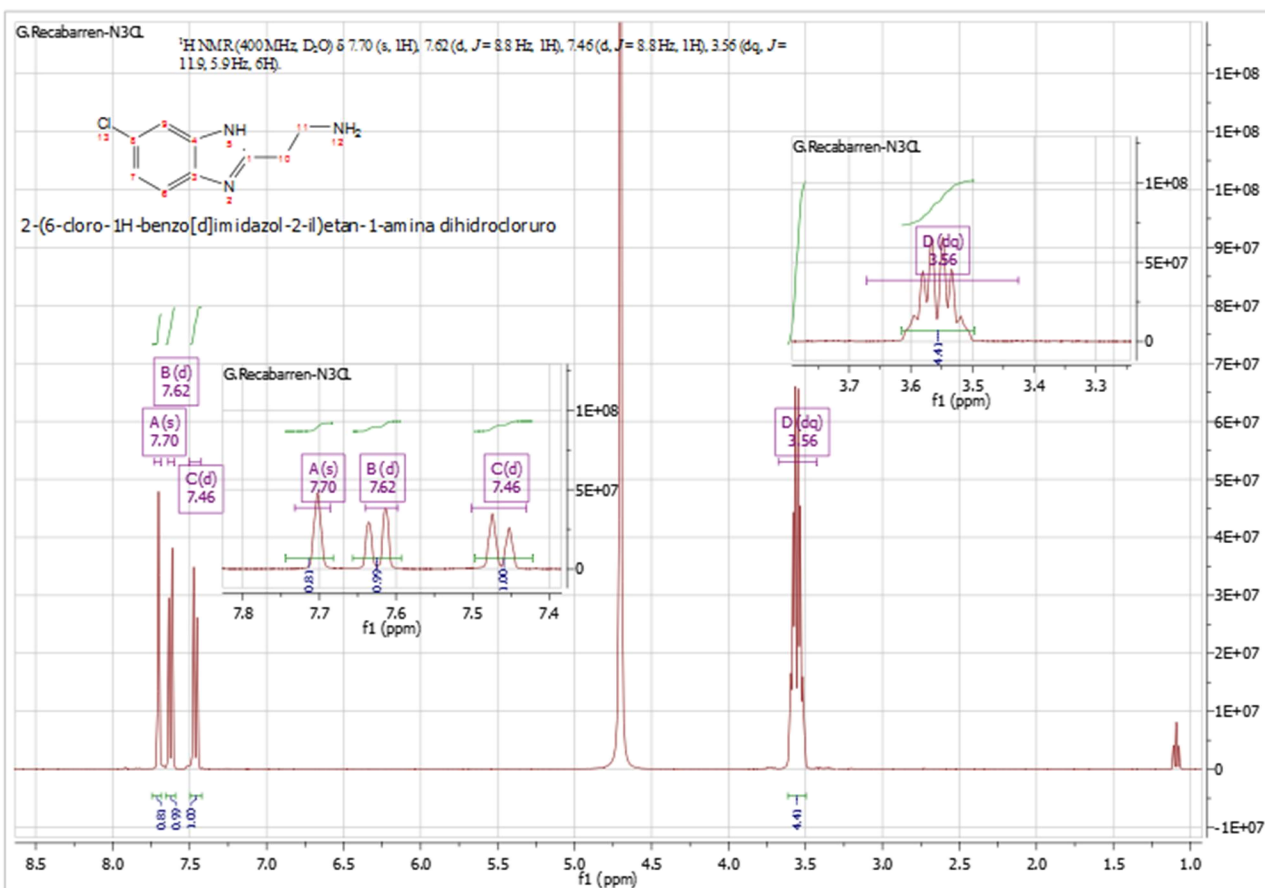


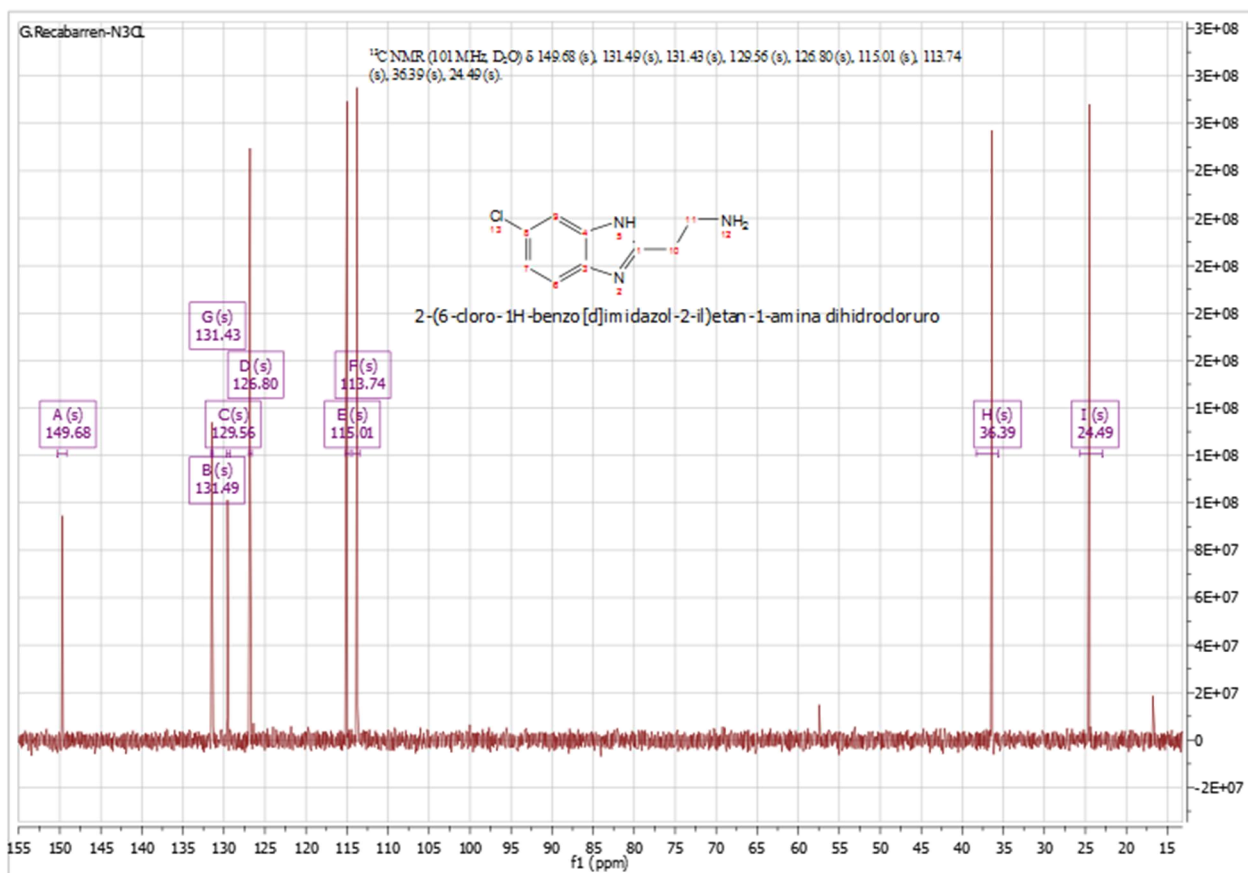


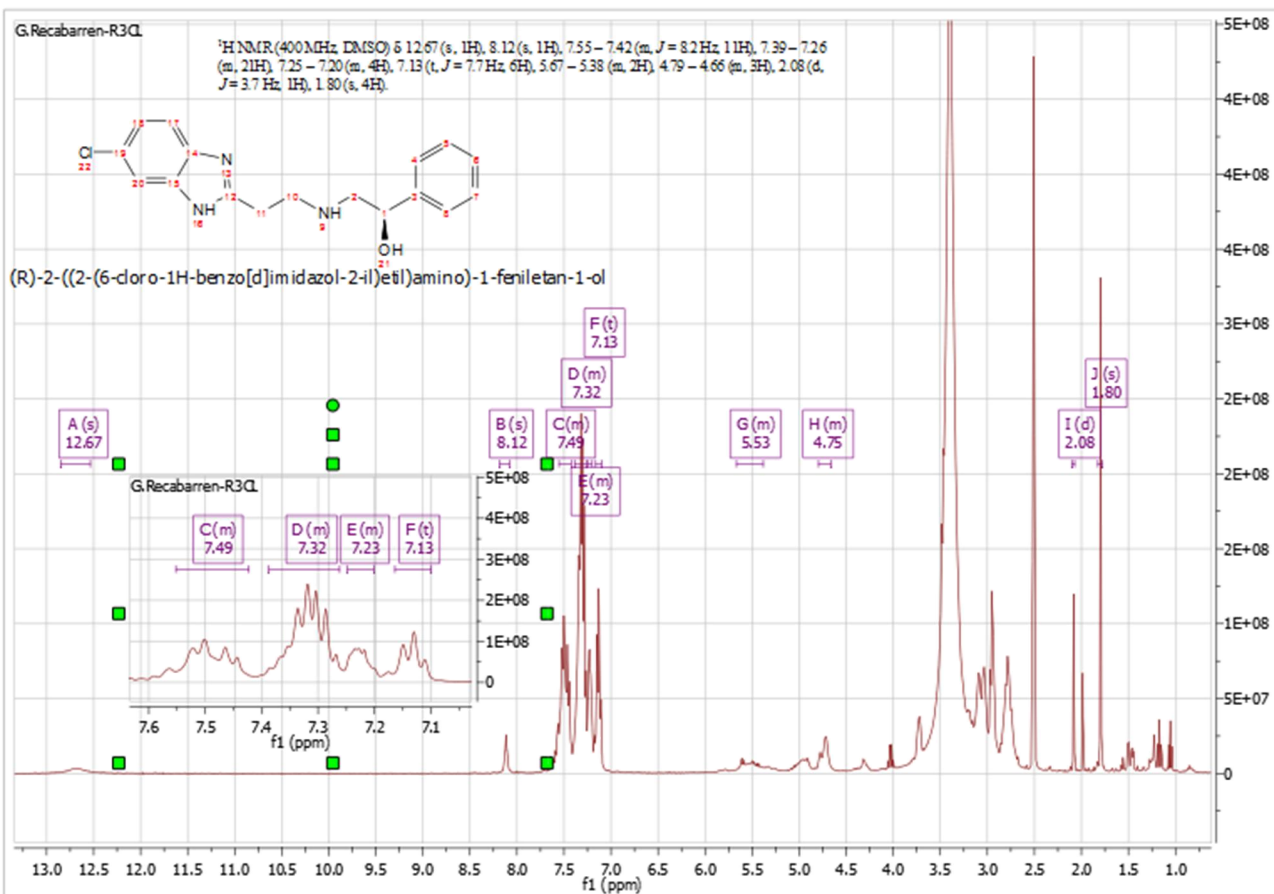


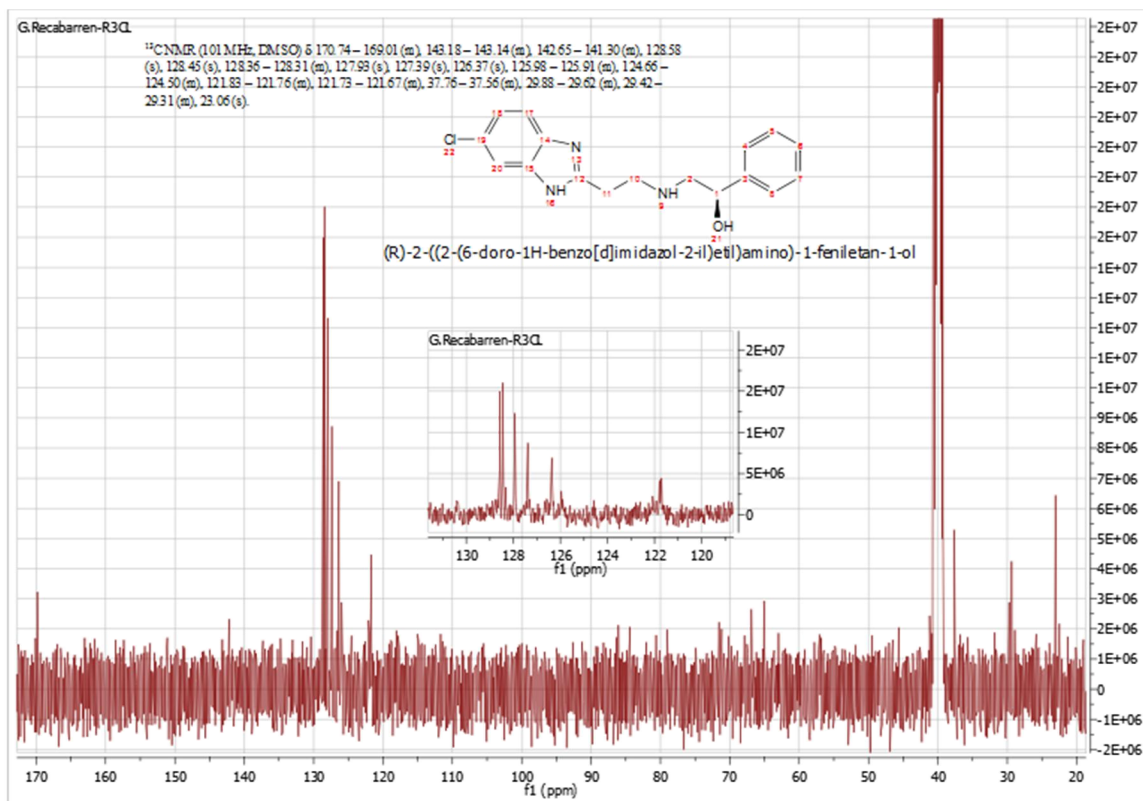


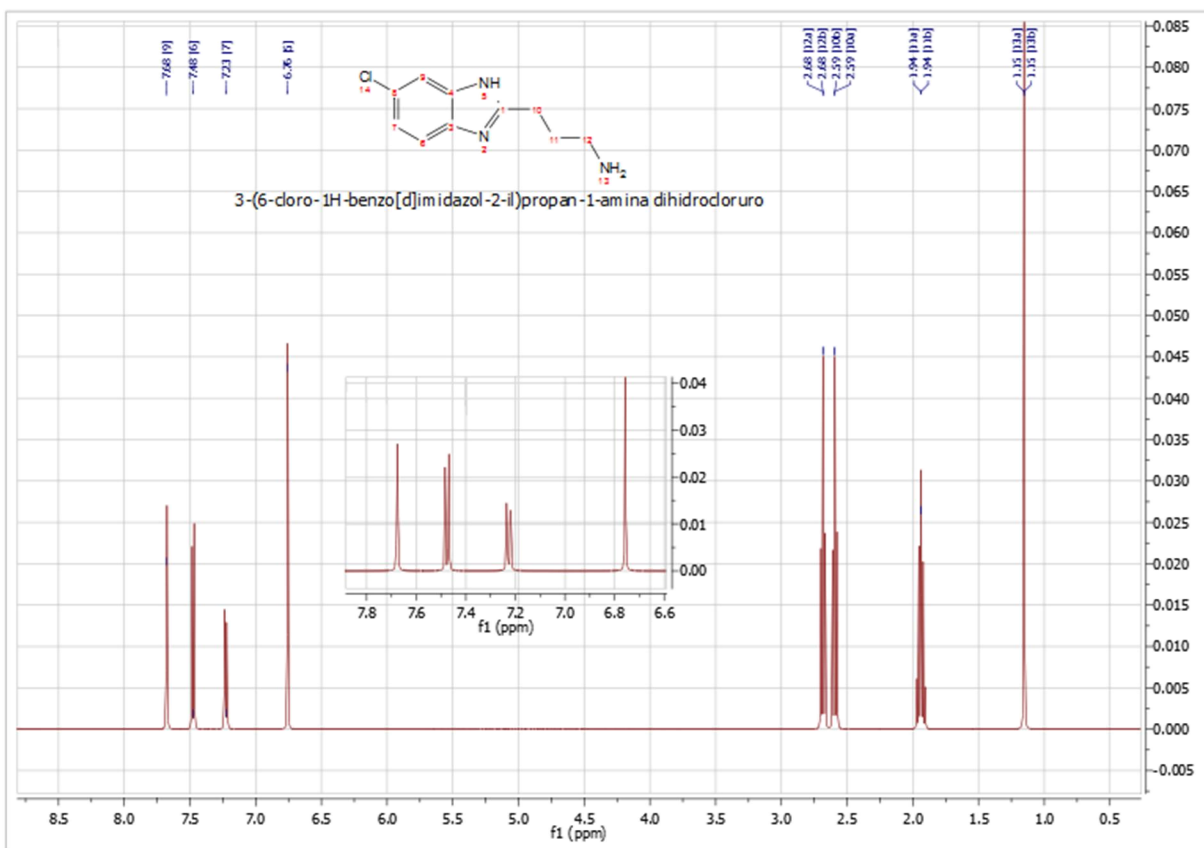


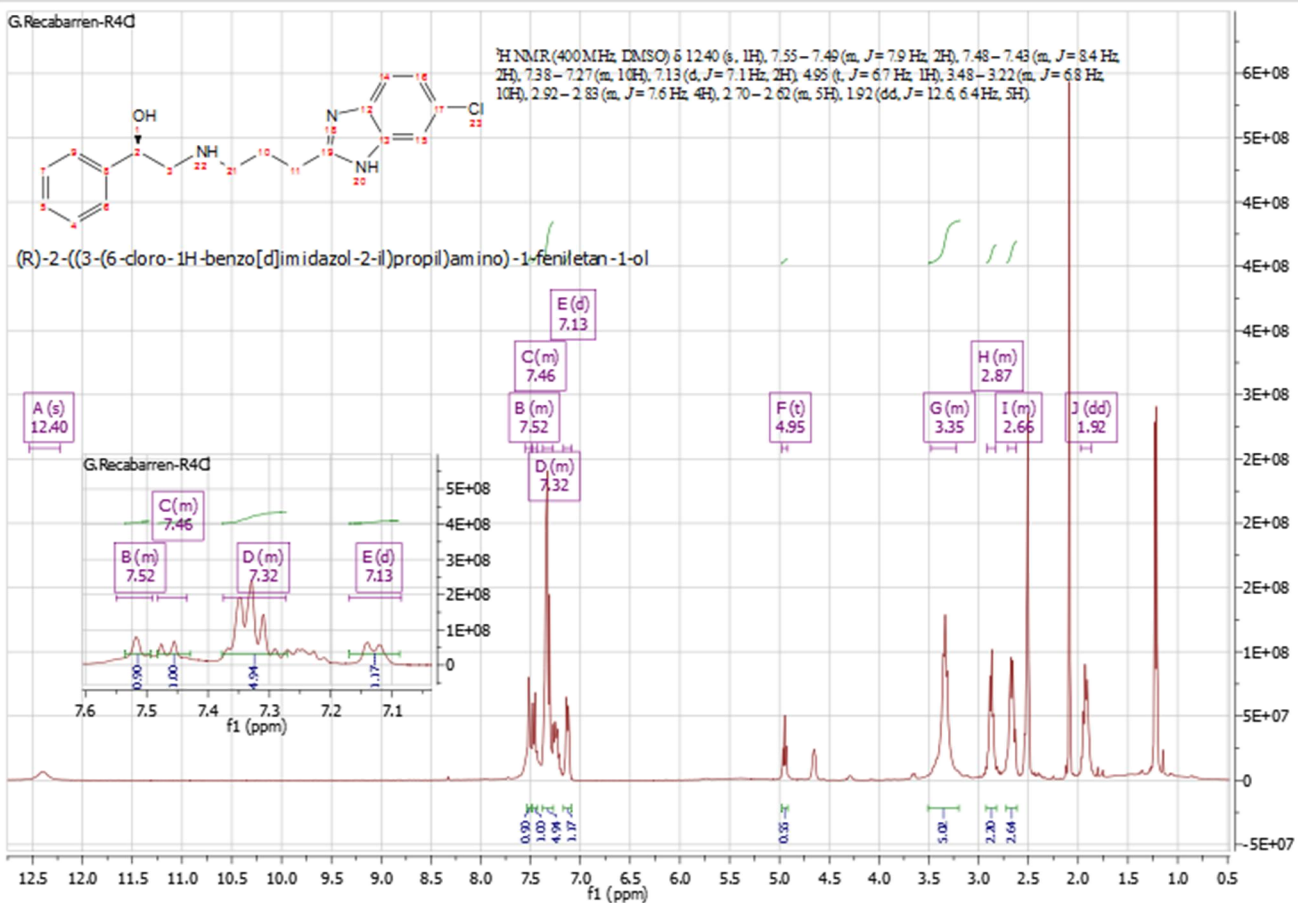


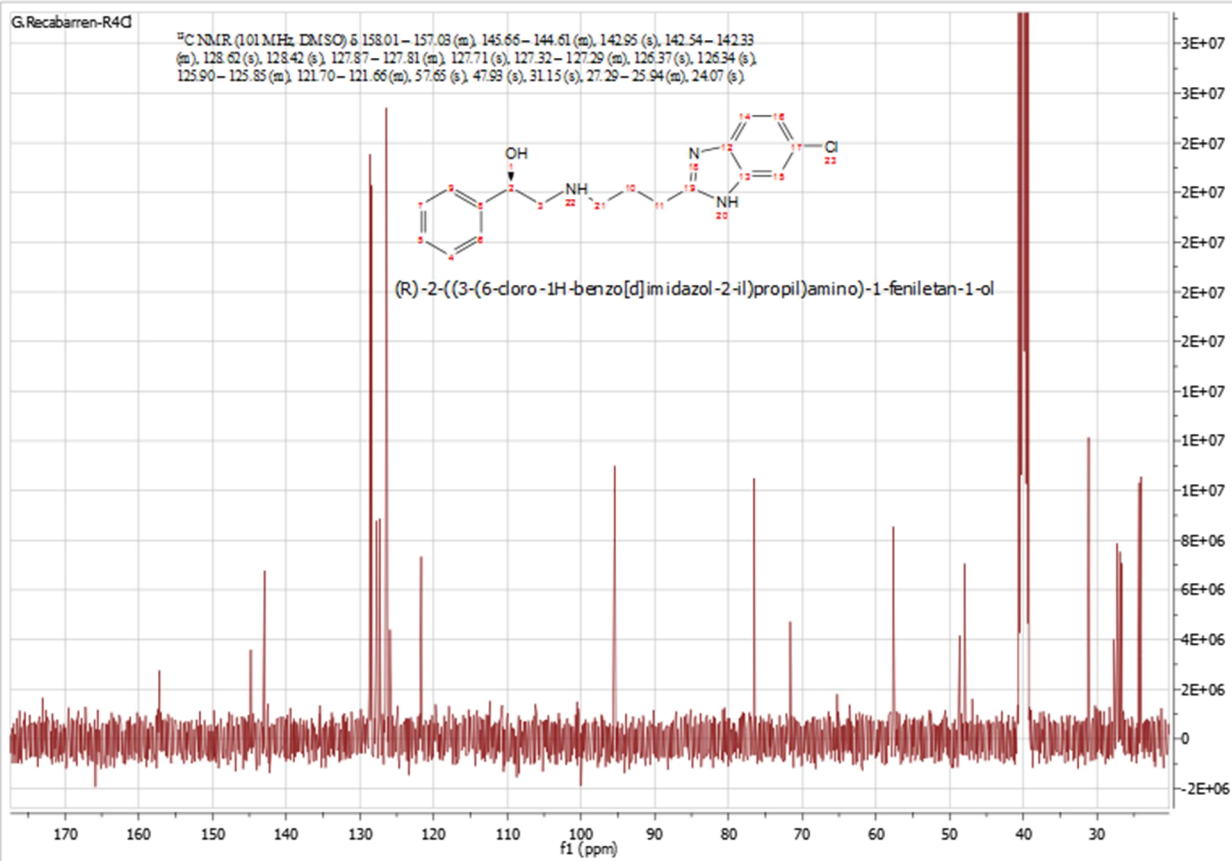


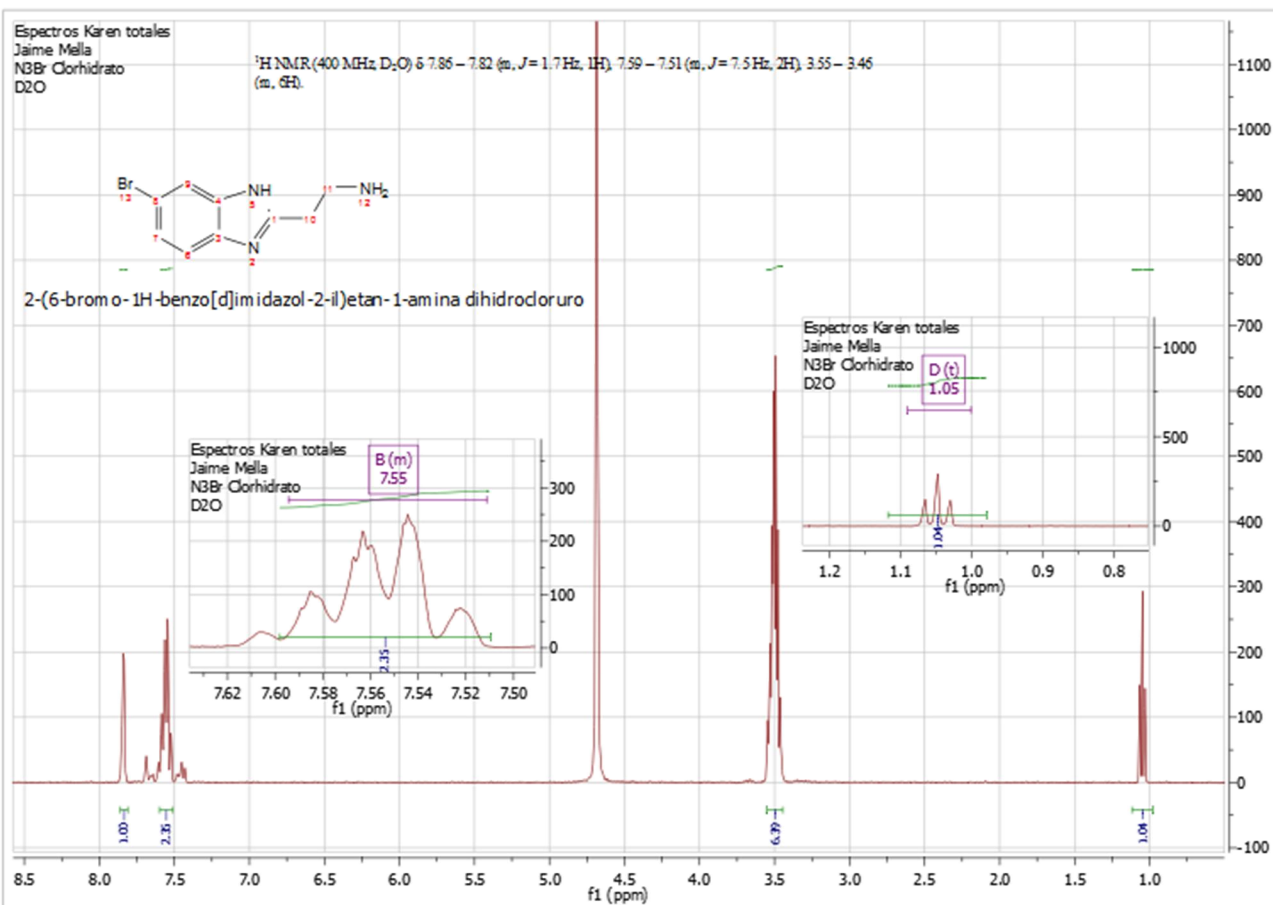


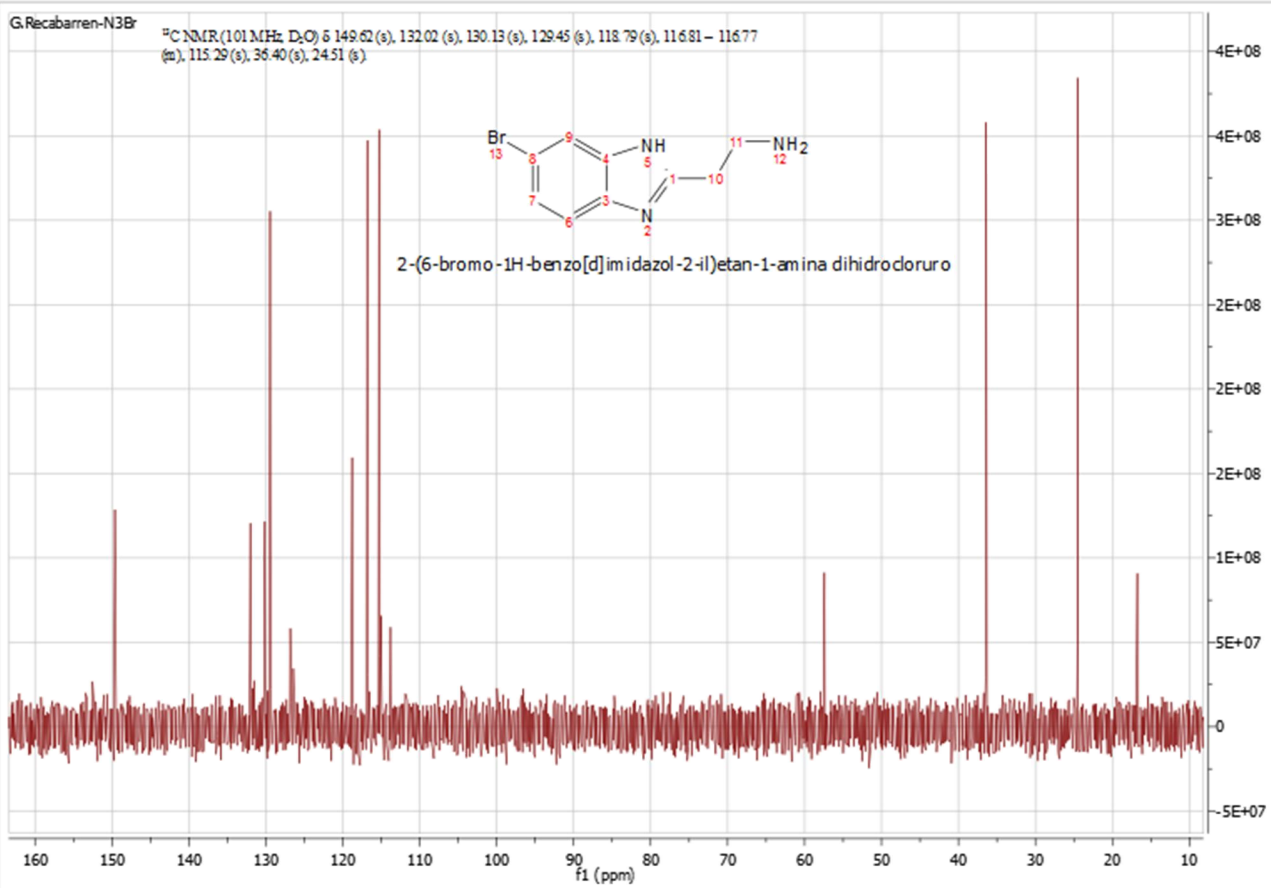






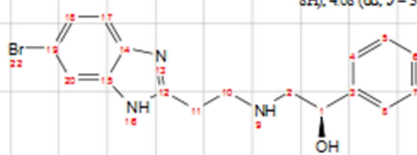




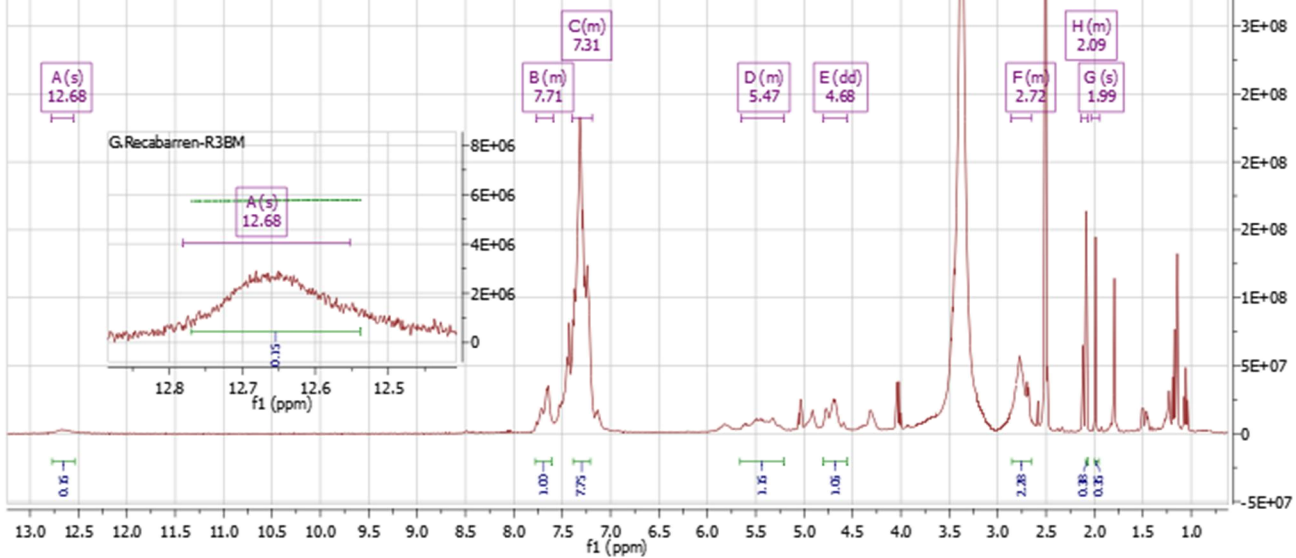


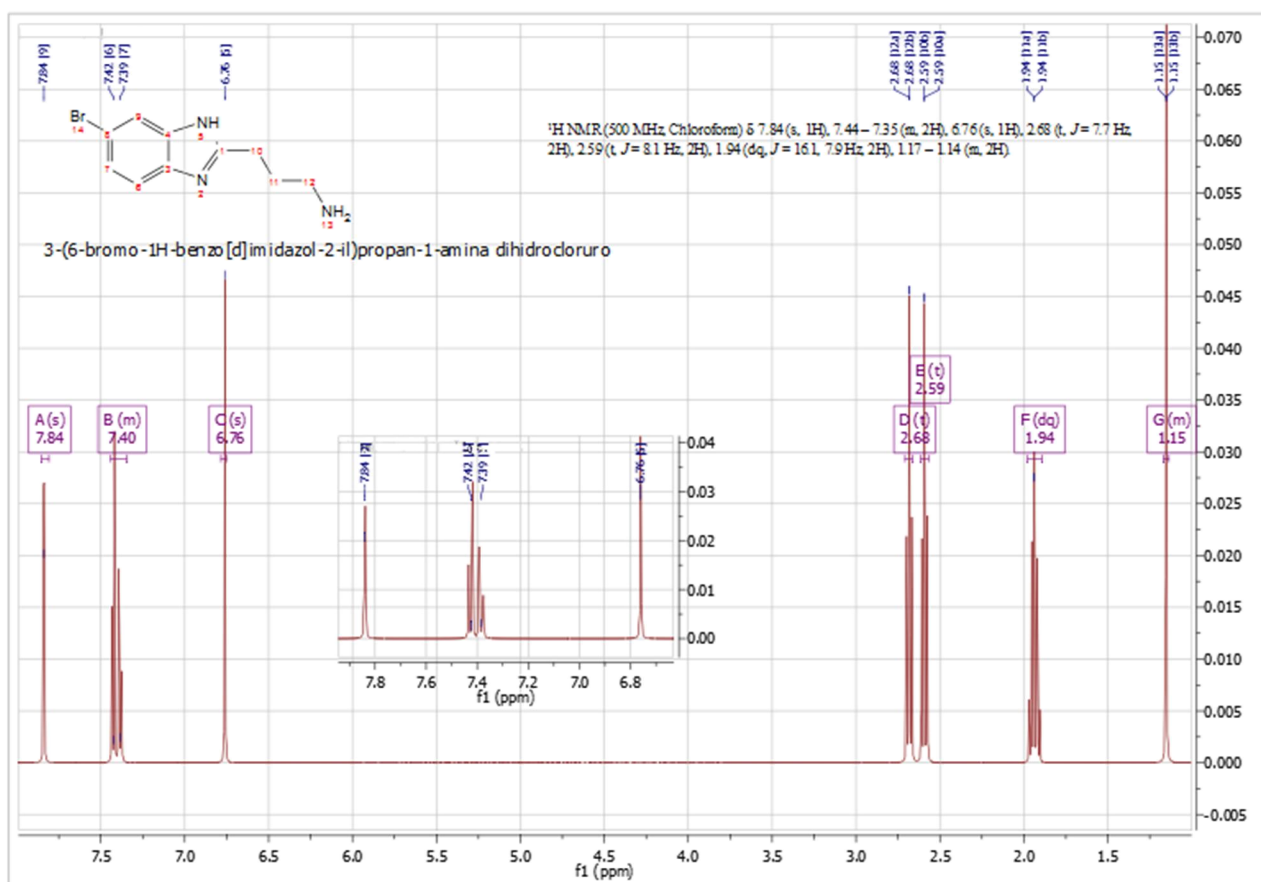
G.Recabarren-R3BM

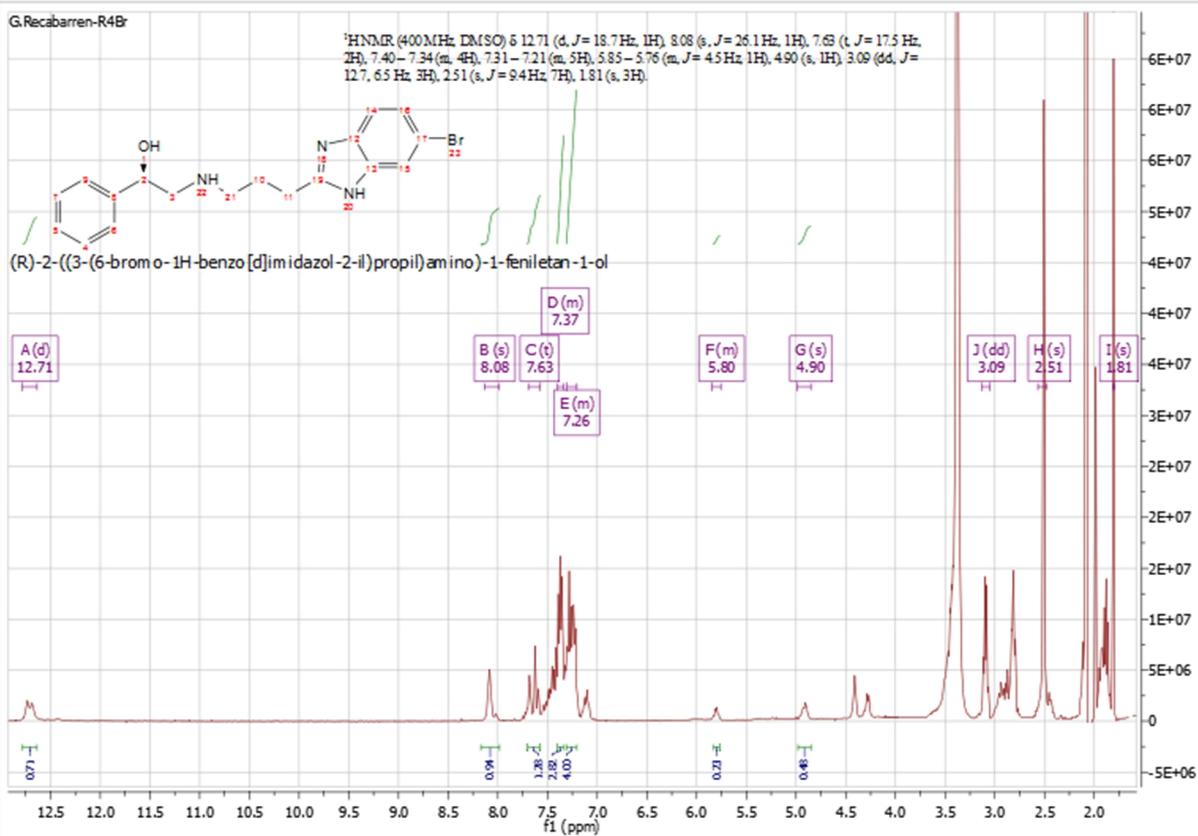
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), 7.77–7.59 (m, 7H), 7.40–7.19 (m, 5H), 5.65–5.21 (m, 8H), 4.68 (dd, J=38.2, 32.2 Hz, 7H), 2.86–2.66 (m, 16H), 2.14–2.07 (m, 4H), 1.99 (s, 3H).

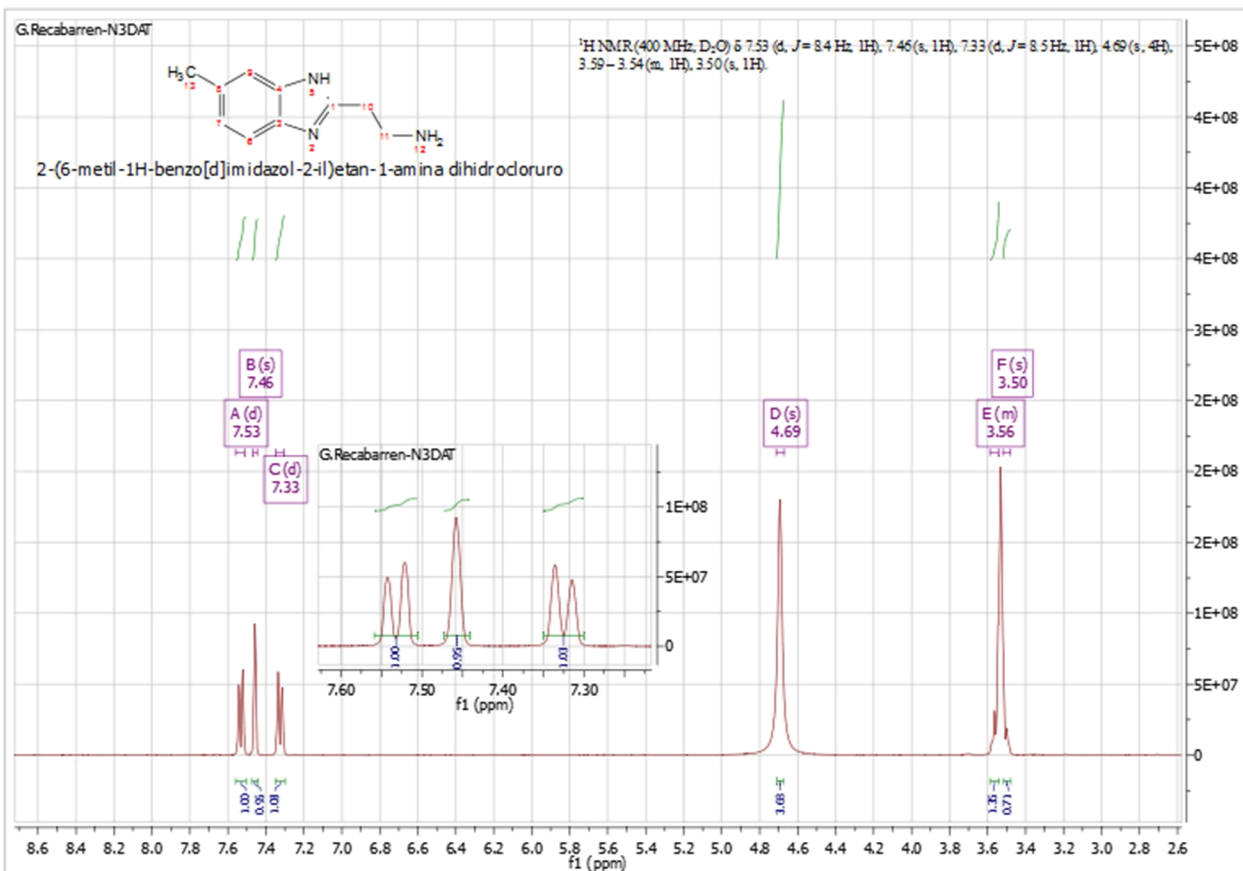


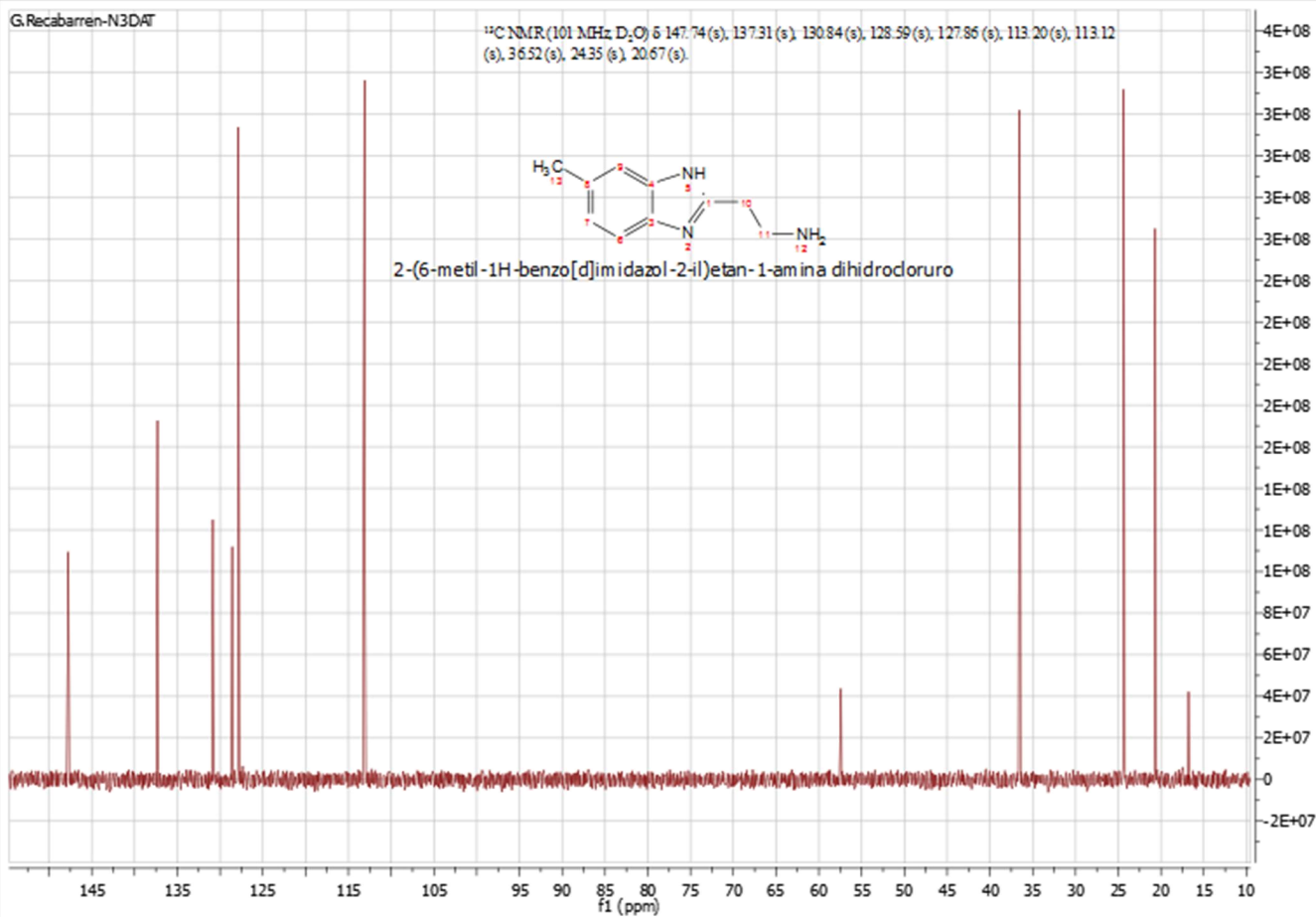
(R)-2-((2-(6-bromo-1H-benzodimidazol-2-yl)ethyl)amino)-1-phenylethan-1-ol

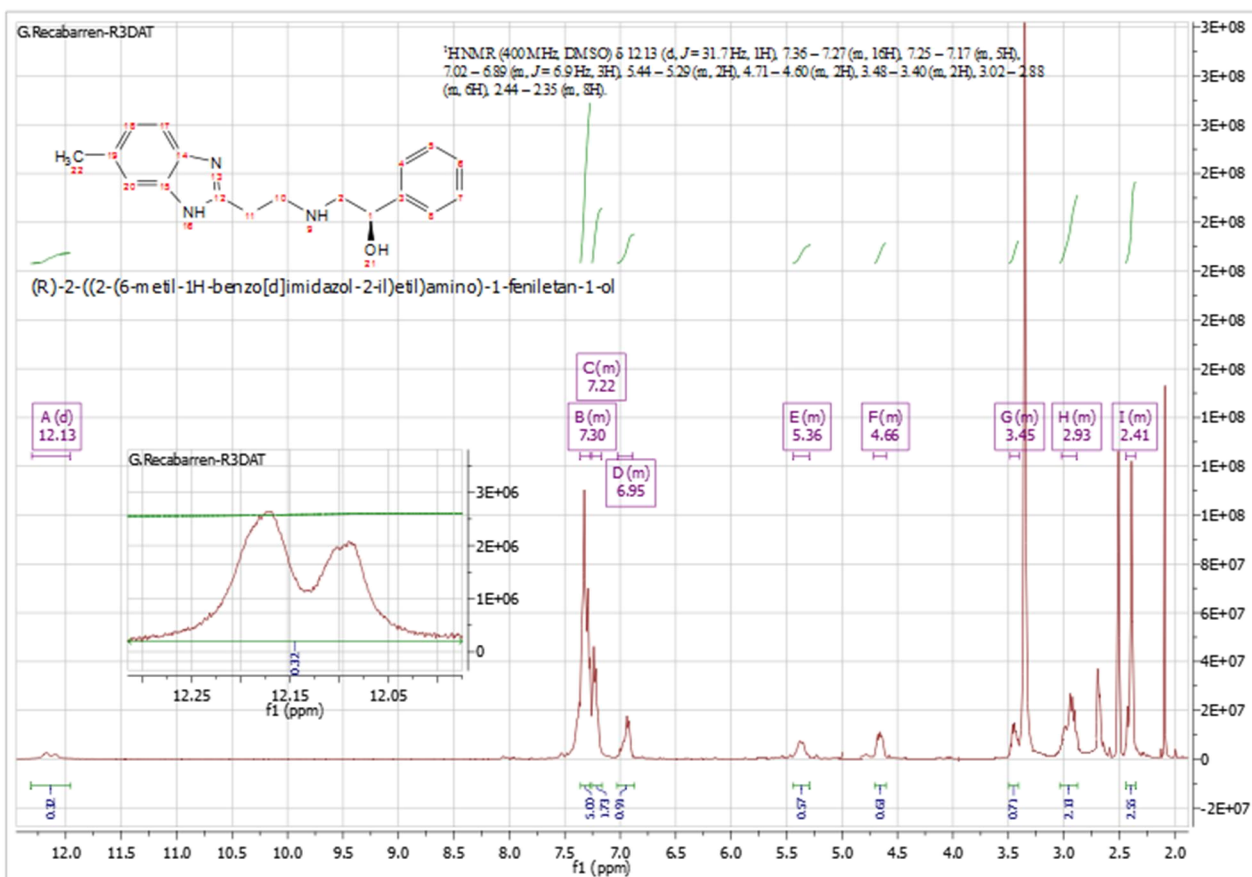


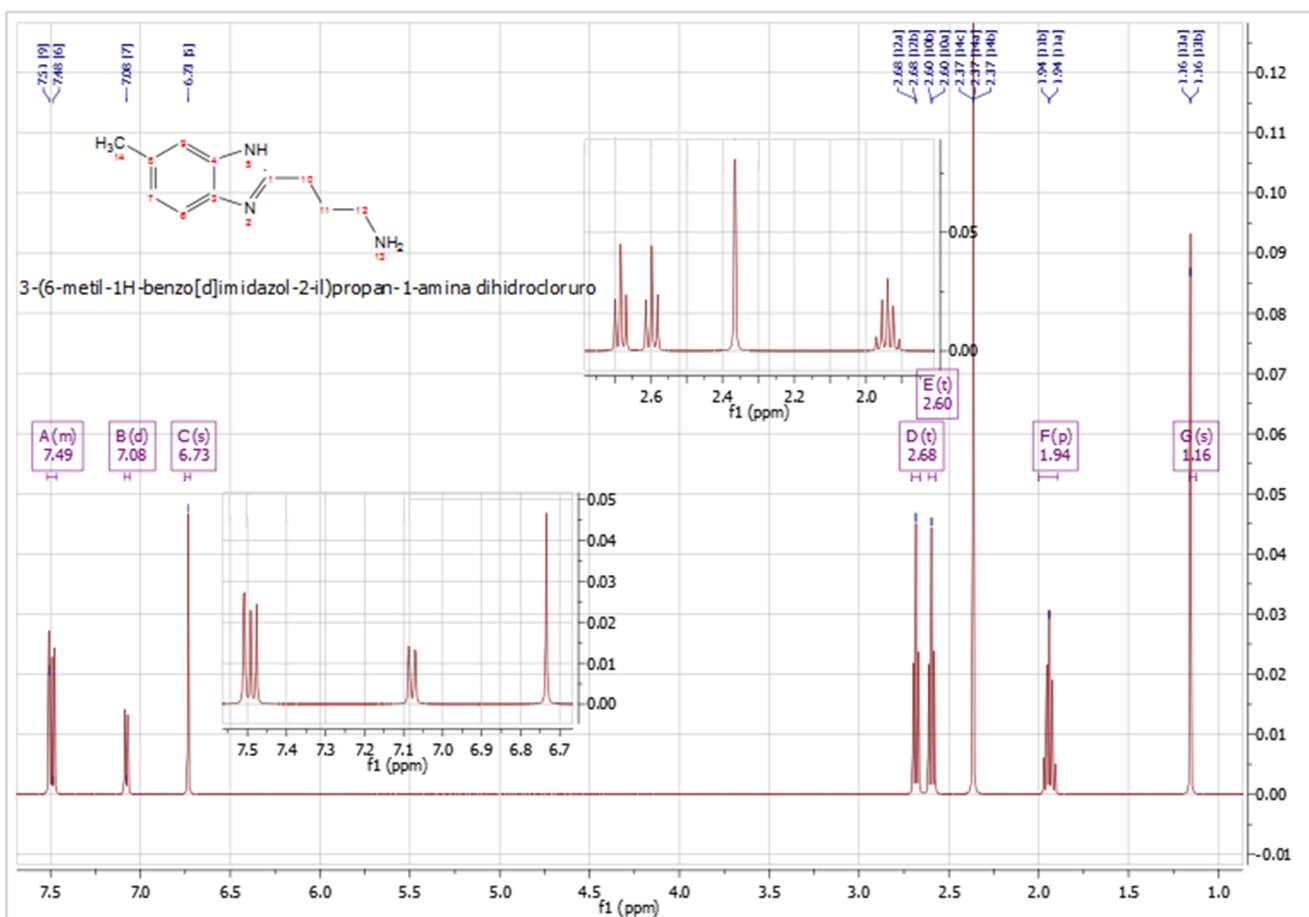






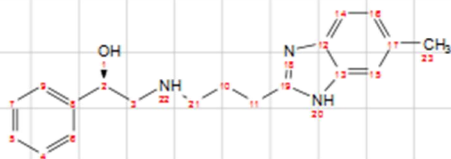






G.Recabarren-R4DAT

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.03 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.40 – 7.12 (m, 2H), 6.92 (s, 1H), 3.37 (s, 1H), 3.12 (dd, J = 12.9, 6.6 Hz, 2H), 2.78 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.51 (s, 1H), 2.10 – 2.06 (m, J = 4.2 Hz, 1H).



(R)-2-((3-(6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propil)amino)-1-feniletan-1-ol

