

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



DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS DE PURINAS Y  
DE 1,2-CICLOHEXANODIAMINAS COMO AGENTES  
ANTITUMORALES.

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL  
Fátima Morales Marín  
Programa Oficial de Doctorado en Química  
GRANADA 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Fátima Morales Marín  
D.L.: GR 1018-2014  
ISBN: 978-84-9028-990-7



El doctorando Fátima Morales Marín y los directores de la tesis D. Joaquín María Campos Rosa y Dña. Ana Conejo García garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 26 de Noviembre de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

D. Joaquín María Campos Rosa  
Catedrático de Química  
Farmacéutica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

Dña. Ana Conejo García  
Prof. Titular de Química  
Farmacéutica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

Fátima Morales Marín



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado gracias a la concesión de una beca predoctoral por el Programa para la Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación (AP2008-02508) y a la financiación procedente del Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070227 y FIS PI10/00592).

Tres estancias han sido realizadas como complemento de formación en el Departamento de Química de la Universidad de British Columbia (UBC, Vancouver, Canadá), Departamento de Medicina Aplicada de la Universidad de Aberdeen (Escocia, Reino Unido) y Fundación Sbarro para la Investigación en Salud de la Temple University (Filadelfia, EEUU) gracias a las ayudas para estancias breves concedidas dentro del Programa para la Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación.

Parte de los resultados recogidos en la presente Tesis Doctoral han sido enviados en formato de artículo científico a la revista *European Journal of Medicinal Chemistry*. Otra parte de los mismos se incluyen en una patente española titulada "*Sulfonamidas secundarias con grupos 1,3-dioxolanilalquílicos y fenilmetilpurínicos, y su utilización como agentes anticancerígenos*" (IPR-524).

Con objeto de obtener la Mención de Doctorado Internacional se incluye un resumen en inglés de la presente Tesis Doctoral. En la totalidad del documento se ha utilizado la puntuación inglesa para los decimales en lugar de coma a fin de facilitar su incorporación posterior a los artículos y otras comunicaciones científicas.



A mi tío Diego y mis abuelos Tono, Diego y Teresa,  
que ya no están con nosotros debido al cáncer.





"No tenemos en nuestras manos la solución a todos los problemas del mundo, pero ante los problemas del mundo tenemos nuestras manos".

Teresa de Calcuta



## AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación recogido en esta Memoria no hubiera sido posible sin el apoyo y ayuda de un gran número de personas. Estas líneas son mi oportunidad de ofrecerles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, debo agradecer enormemente a Joaquín y Ana la confianza que han depositado en mí desde el principio, así como por ofrecerme su tiempo y dedicación del que siempre disfruté con pasión. A Joaquín por prestarme la libertad necesaria y a Ana por tener la capacidad de guiarme en el trabajo con sólo dos palabras. Vuestros conocimientos y profesionalidad han sido imprescindibles y de gran satisfacción. Gracias por enseñarme todo lo necesario para realizar este trabajo y más. Sin vosotros, esta Tesis no hubiera sido posible.

A D. Antonio Espinosa por inculcarme el “gusanillo” de la investigación cuando cursando tercero de carrera fui a su despacho preguntando por una beca Erasmus y terminé sustituyéndola por una beca de Iniciación a la Investigación. Mil gracias por ser como es y porque siempre ha sido un ejemplo a seguir admirable.

Quisiera agradecer a D. Miguel Ángel Gallo, por su respeto y sus saludos a primera y última hora en el laboratorio. Asimismo a D. Antonio Entrena, por preocuparse siempre por mi estado de ánimo. A Encarna, por compartir esos “ratillos” de prácticas y de laboratorio siempre con una sonrisa. A mi querida M<sup>a</sup> José, nuestra “alegría de la huerta”, por esos días de columnas interminables con nuestro alabado Julio y su “bacalao” que ya empiezo a echar de menos. Mil gracias por alegrarme con esos chistes e historietas que me hacían reír durante todo el día. Nunca los olvidaré. Así como a Dori y Carlota, con las que siempre he compartido columnas, matraces, probetas, embudos y buenos momentos con tremenda generosidad y alegría. A Olga y Manme, por compartir risas y buenas normas de seguridad, gracias por vuestro respeto y solidaridad en estos últimos meses de trabajo.

A mis compañeros de batallas y aventuras que siempre quedarán en mi recuerdo. A Maria Kimatrai, por ser la primera en enseñarme todo el “cacharreo” de síntesis orgánica siempre con gran disposición y una sonrisa enorme en su gesto. A menudo recurro a tu expresión “tranquilidad” que me enseñaste en mis primeros días de laboratorio. A Eugenia y Vero, por esa despedida en Toledo que nunca olvidaremos. A Lucía, por esas Jornadas en Baeza, tardes de columnas, canturreo y risas compartidas después de una larga jornada de trabajo. A Santi, Giuseppe y Lourdes, por nuestras andanzas de flamenquito y no flamenquito en esos primeros meses de máster y doctorado. A Esther, por invitarme tantas veces al cine cuando no podíamos más en el laboratorio. A Fermín, porque aunque hayamos compartido poco tiempo juntos y solamente al final de mi etapa de laboratorio, sé que podremos contar el uno con el otro en un futuro para todo. A Mariem, porque siempre ha tenido la palabra de apoyo necesaria en el momento adecuado como buena amiga mía. A Belén, por ser mi compañera fiel desde el principio hasta el final de este viaje y ser extremadamente bella como persona. A Nawal, porque además de una gran compañera de trabajo, es una amiga con mayúsculas. Estoy muy agradecida de que hayas entrado en mi vida, guapa.

Estos años de investigación también me han permitido compartir una vida Erasmus gracias a los numerosos becarios que han pasado por el laboratorio. Así debo destacar mis agradecimientos a Elena Andreolli y a Sandro Cimino, con los que descubrí mis primeras palabras y el verdadero espíritu italiano. A Stephan, que además de enseñarme a decir “te quiero” en alemán desde el primer día, sé que siempre podré contar con sus “humildes” desayunos. A mi amada y

admirada Matilde, persona extraordinaria de la que aprendí a valorar las pequeñas cosas que nos ofrece la vida y con la que espero compartir muchas cosas más. A Alessandra, con la que disfruté tantas tardes discotecueras de interminables columnas, preparativas y reacciones, y con la que espero seguir compartiendo esos momentos de afinidad personal por muchos años. A Antonio Leonardi, mi compañero y amigo de doctorado por excelencia. Solamente Antonio y yo sabemos todo lo que hemos disfrutado en tantas horas de laboratorio, en Granada y fuera de ella. Mil gracias por esos momentos que sé que serán muchos más.

A mis aprendices, a los que espero haber aportado al menos tanto como ellos me han aportado a mí. A Lurdes, por ser la primera en pagar la novatada y por hacerme descubrir mi pasión por la enseñanza. A Valeria, por nuestros ratos en el laboratorio hasta las tantas de la noche que después siempre compensábamos con una buena conversación y tapa en "italospagnolo". A Alicia, por su estimable apoyo en el último año de laboratorio, por nuestras charlas y salidas en buena compañía. A Saúl, por enseñarme a resolver dudas técnicas, por su constancia y responsabilidad. Espero que el tiempo compartido os corresponda en vuestro futuro profesional y personal.

A Cayetana, Esther y Angélica, que aunque hayan estado menos tiempo en el laboratorio, han dejado su huequito en el mismo y hemos compartido buenos momentos e incluso penas que transformábamos en alegrías fácilmente.

*I also wanted to express my gratitude to the people that helped me during my three research stays in Vancouver, Aberdeen and Philadelphia. They made these experiences unforgettable for the rest of my life. Firstly, to Prof. Marco A. Ciufolini for making me improve my knowledge of organic chemistry and of security and lab techniques in just three months. To Prof. Heather Wallace for teaching me all the biological assays and showing me the necessary skills to be a good scientific researcher. To Prof. Antonio Giordano for opening his lab and his heart up for my professional career and success. I hope we can triumph together soon. To Dylan, Obinna and Agnese, for their patience, for teaching me everything I need in another language and for being in a good mood every day. To all the members of Ciufolini group, specially to Miranda, Brian and Tim for sharing the room and some Spanish and Chinese songs. Also to the members of Wallace and Giordano group for providing the perfect atmosphere to work in. I also need to say thanks to all the friends that I made there, specially to my "sisters" in Vancouver: Patricia, Cristina and Elisa, a las que espero poder ver pronto somewhere in the world. To my "sisters" in Aberdeen: Tina and Cecile for being the best flatmates ever. To Grace, my "grandmother" in Philly, Gaetano for our coffee sharings, Francesca, both Silvias, Onder and many people who I shared IPAs with there. Thanks for making my experiences unique.*

Al grupo de investigación BIO 250, a los que cada vez que necesité de su ayuda, me fue prestada amable y desinteresadamente. En especial a Sonia y Ana María, con las que tuve oportunidad de compartir laboratorio durante mi primer año, además de congresos en Valencia y momentazos en "Edinbrá" que nunca olvidaré. Mil gracias.

A Luis y Antonio, por su disposición y amabilidad, incluso cuando más persistente he sido.

A D. Juan Antonio Marchal, Cynthia y Alberto, por la realización de los ensayos biológicos incluidos en esta Tesis Doctoral, así como a su disposición, interés, reuniones y emails de última hora para que todo quedara perfecto. Mil gracias.

Al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. En especial a Alí y Samuel, por no poner pegas cuando les llevaba muestras que necesitaba urgentemente, mostrándome su apoyo y profesionalidad en todo momento.

A mi segunda casa en la facultad, el departamento de Química Inorgánica. Muchísimas gracias por acogerme como una hija más y ayudarme cuando más lo he necesitado. En especial a las niñas, y a Juan y Pepa, recordándoles que todavía nos queda pendiente cristalizar alguna de mis moléculas con éxito.

También me gustaría agradecer a María y Pilar del Departamento de Fisiología por sus primeros consejos antes de iniciar esta Tesis Doctoral. Así como a D. Rafael Peñafiel García, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Murcia, por facilitarme el contacto de mi estancia en Aberdeen.

A todo el personal de la Facultad de Farmacia que con tanto afecto me han tratado durante todos estos años, especialmente a Luis, por prepararme esos capuchinos como nadie más ha sabido. A Moisés, por sus fotografías de auténtico profesional, y a Marina, por su cariño y por los trayectos en su coche hasta la puerta de mi casa después de alguna que otra larga noche en la facultad. Mil gracias por tratarme como mi madre haría en cada momento.

Igualmente necesito dar mis más sinceros agradecimientos a todos mis amigos y familiares que me han apoyado y con los que tanto he disfrutado en estos años.

En primer lugar, a mi “familia granaína” formada por muchísimas personas maravillosas que me han permitido disfrutar y sentir esta ciudad como mi segunda casa. A Jose, por todo lo que hemos compartido en estos años desde que me llamaste por teléfono para decirme que nos habían concedido la FPU, nunca olvidaré tu voz en ese día. Mil gracias por tu apoyo y tu paciencia incluso en los momentos más difíciles, guapo. A Alicia, porque siempre que la he necesitado ha estado ahí con su ayuda por encima de lo preciso. Estoy muy contenta de haber convivido contigo estos dos últimos años después de diez de amistad desde que coincidimos en Primero de Farmacia. A Rocío, por su dulzura extrema y cariño, siempre de gran ayuda cuando la familia está lejos de casa, un encanto de persona que espero conservar por muchos años. A Paula, por compartir ese primer año de locura después de terminar nuestra carrera juntas. A Diego, porque es una persona increíble con la que siempre he podido contar en todos estos años desde que Antonio nos presentó una noche de su santo. A Germán, porque desde que hablamos una noche en Etnosur de investigación hasta hoy mismo he sabido que es mi chico perfecto como “marido”, amigo fiel e investigador incansable de la ciencia y la vida en general. Mil gracias por ser cómo eres y cruzarte en mi camino, además de haber hecho unos gráficos preciosos para esta tesis.

A mis queridísimas farmacéuticas Marga y M. José, por estar siempre a mi lado, así como a Edel, Marian, M. Eugenia, Palmira & compañía, por nuestras largas charlas de todo un poco y de nada en especial, por vuestro apoyo y cariño tan necesario para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Mil gracias. A mis farmacéuticos Maico, Octavio y Loubna, por sus interesantes discusiones en comedores universitarios y fuera de ellos. A mi querida Rebeca, por ser uno de los pilares fundamentales durante mi carrera investigadora, por preocuparse por mí y por su apoyo incondicional. A Pedro y todo el equipo de Ingeniería Química de Ciencias que me ha alegrado muchos días de estos años de laboratorio y por sus últimas ayudas con el “papeleo doctoril”. A Celia e Inma, por ser perfectas compañeras como becarias y ofrecerme también de forma desinteresada su documentación de doctorado. A José Antonio y el resto del grupo de Física Aplicada de Ciencias con el que también he compartido muchas discusiones científicas y no tan científicas en más de una comida. A Esther Vivancos y Liliana, por su ayuda con ese recurso de estancias en pleno verano de 2011. A Dani, por sus primeros consejos piscineros y australianos también. A Elena, por nuestro inolvidable día en Viena con famoseo incluido. A M. Carmen y Sergio de Parasitología, por nuestros encuentros de pasillo y ascensor, así como por ofrecerme la posibilidad de formar parte del Curso de Iniciación a la Investigación tan adecuado y necesario para esta nuestra facultad.

Al equipo de Oxfam Intermón en Granada, por compartir ilusiones y esperanza en cada momento que disfrutábamos juntos. Así como por respetar y comprender mi ausencia en momentos difíciles de tesis y escapadas de estancias. En especial a Helena y Javi, por sus admirables consejos y guía doctoral en nuestras tapas post-reuniones que Sonia y Amparo siempre aguantaban con mucho cariño y respeto.

A M. Del Mar, por su energía y alegría, y a Nieves, por su fortaleza, que siempre te permiten seguir adelante en tu camino. A Dani, Azahara, Alejandro y Rosalía, por compartir tantas ricas barbacoas, pizzas y deliciosas comidas que te hacen superar cualquier obstáculo doctoral en los momentos más difíciles. A mi Martínez y mi “Novio”, por todo lo vivido juntos y por hacer que Aguilar sea mi segundo pueblo de acogida. A Nuria, por nuestras noches de desconexión y buena música en compañía. A Migui, por su desparpajo y su intento de arreglarme el disco duro donde guardaba la única copia actualizada de mi Tesis. A Nancy, porque siempre tuvo una sonrisa, un buen abrazo y uno o varios mojitos para alegrarme en el momento más adecuado. A Fernando, por ser el artista con mayúsculas de esta Tesis Doctoral, autor exclusivo de las figuras y portada de la misma, además de haberme ayudado muchísimo en estos últimos meses, tanto moral como técnicamente.

A mis murcianic@s que son mi “alegría de la huerta”, porque siempre me ayudaron a levantarme cuando más abajo me encontraba. A mis niñas Cala Flores y sin Cala también, porque con ellas he pasado momentos inolvidables sin necesidad de muchos medios ni dinero. Sois geniales. A Carmen, por ser la primera en ayudar a nuestra unión después de nuestros años de Maristas que ahora sé que no vamos a perder nunca más. Mil gracias por ser tan dulce y preciosa, guapa. A Lucía, porque es la eficacia personalizada. Sé que siempre que la necesite estará ahí y además pensando por delante mía, hecho que se agradece muchísimo. A Clara, por nuestros momentos compartidos aquí y allá, en Granada, Murcia, Madrid, Portugal y Galicia, así como por los que nos quedan por vivir. A Laura, porque siempre nos da sorpresas y alegrías inesperadas que vienen muy bien. A Sol, porque es mi descubrimiento como hermana y risas incansables a todas horas. De verdad pienso que no aguantaríamos más de 24 horas juntas sin que nos dolieran los hoyuelos una barbaridad de tanto reírnos. Love you. A Marta, Barby, Lidia, Cristina, África y Myriam por nuestros bailes, conciertos y estrellicas juntas que espero que sean muchas más. A los “hombres Coura”, Pedro y Ángel, porque sin vosotros ese verano y ese festival no hubiera sido lo mismo. A Rasty, por nuestras tapas, bailes, conciertos y festivales compartidos tanto en Granada como en Murcia, tan reconfortantes para mi estado de ánimo. Así como a los susodichos Lean, Gregorio, Edu y Fernando, con los que siempre he compartido risas y chirigotas caseras.

A Myriam, porque gracias al link que me pusiste un buen día en mi muro de Facebook, hemos conseguido la segunda familia de compuestos con actividad antitumoral que aparecen en esta Tesis Doctoral (familia B). A mis “Héroes de la Pliego” Ana y Techa, conjuntamente con Clara y Carmen, porque siempre he tenido vuestro apoyo y admiración por mi trabajo. Os quiero. A mis torrevejenses amadas: Paloma, Mery, Merche y Cristinas porque aunque no nos veamos mucho, siempre nos tenemos en cuenta y en el corazón. A Manolo, por compartir muchas conversaciones científicas y pueblerinas. A Natalia, por nuestras agradables cenas delicatessen que curan cualquier mal. A mi Marta, porque siempre llevaré mi alma santomerana dónde haga falta gracias a tu amistad.

A mi casi familia formada por personas extraordinarias que no puedo dejar de mencionar. A mi vecina Dolores, que aunque ya no está con nosotros, su alegría y pensamientos siguen en mi alma. A mi vecina María, por sus deliciosas pizzas y cariño. A mi Mari del Rosendo y toda su familia, por su admiración y por seguir sintiéndome con ellas como en mi segunda casa. A Pepa, porque toda Granada ha disfrutado de sus pastelillos, almendrados y torta de chicharrones. A Tere, por su paciencia, por tenerlo todo listo para llevarme a Granada, por pasar largas horas buscándome el pantalón o chaquetón que quería y no abandonar en el intento.

Por último, mis más sinceros agradecimientos a mi querida familia de la que estoy más que orgullosa en mi vida. A mi tía Isabel por criarme y darme la educación que tengo. Seguro que parte del esfuerzo que he puesto en esta tesis me lo enseñaste tú. A mis tíos Alita y José María, por vuestro apoyo y cariño en todo momento. A mis tíos José Antonio y Marisol, por sus sabios consejos. A mi tío Fulgencio, por hacerme que me gustará todavía más el inglés después de nuestro congreso de planchas en Londres. A mi tía Luz, por ser siempre tan cariñosa, atenta y alegre conmigo. A mi tía Alicia y mi padrino Longinos, por la música y afinidad compartida, pero sobre todo por ser una fuente de sabiduría y ejemplo a seguir.

A mis “primos grandes” Inma, Maria, Laura, Ali y José María, por escucharme siempre con admiración y por el cariño recibido. A mis “primos pequeños” Soledad, Clara, Lucía, Marcelo, María, Pablo y Laura, por saber hacerme reír en cualquier momento, aunque a veces fuera riéndoos de mí y por nuestras aventurillas juntos así como por las que vendrán. A Marta y Adelaida, por nuestro momento jacuzzi tan oportuno en esas fechas. A Nuria, Diego e Isabel, por regalarme lindos momentos de aventura en estos últimos meses.

A mi abuela Joaquina, por estar siempre pendiente de mí y darme el consejo oportuno en el momento adecuado, aunque no se diera ni cuenta de ello. A mis hermanas Isabel María y Luz María, por vuestra paciencia y apoyo incondicional, porque sé que aunque hemos estado lejos, siempre nos teníamos muy cerca. Os quiero. A mis padres, a los que debo todo lo que soy y he hecho en esta vida y de los que me siento tremendamente afortunada. Papá, mil gracias por estar siempre ahí, por no poder verme llorar, por ayudarme en todo lo que he necesitado y más. Por tus viajes a Granada en un día solamente para verme dos horas o incluso menos, por ser como eres y por educarme tal cual. Te quiero mucho. Mamá, muchísimas gracias por ser mi ejemplo a seguir, por educarme en la honestidad, agradecimiento, humildad y fortaleza que tú tienes. Si esta tesis ha llegado a su fin, ha sido sobre todo gracias a tu persistencia y ayuda continua. Te quiero mucho.

A las personas que leyendo estas líneas han pensado que verían su nombre y no ha sido así, gracias por haber estado presente en mi vida en estos años y gracias porque seguro que aprendí algo con vosotros que me ha ayudado a realizarme como persona y poder llegar hasta aquí.

MIL GRACIAS A TOD@S





## **ÍNDICE**



# ÍNDICE

SIGLAS Y ABREVIATURAS .....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Cáncer .....	4
2. Ciclo celular .....	6
3. Apoptosis .....	9
4. Evolución estructural desde el 5-FU hasta purinas con actividad anticancerosa .....	11
4.1. Derivados de 5-FU de tipo aciclonucleósido y modificaciones .....	11
4.2. Compuestos <i>O,N</i> -acetálicos cíclicos.....	13
4.3. Compuestos no acetálicos.....	21
4.4. Compuestos <i>O,N</i> -acetálicos acíclicos.....	25
5. Fluorescencia en fármacos .....	29
6. Importancia del DCA en la terapia antitumoral.....	32
7. Diaminas con actividad antitumoral.....	34
II. OBJETIVOS.....	37
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
1. Familia A .....	45
1.1. Diseño molecular .....	45
1.2. Síntesis química .....	47
1.3. Análisis espectroscópico.....	52
1.3.1. Derivados de <i>p</i> -nitrobencensulfonamido .....	52
1.3.2. Derivados de dansilo.....	65
1.4. Estudios biológicos.....	76
1.4.1. Ensayos de citotoxicidad.....	76

1.4.2. Análisis de distribución del ciclo celular .....	80
1.4.3. Ensayo de apoptosis.....	82
1.4.4. Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> .....	84
1.4.5. Estudio de distribución del fármaco <i>in vivo</i> .....	84
2. Familia B .....	87
2.1. Diseño molecular.....	87
2.2. Síntesis química .....	88
2.3. Análisis espectroscópico.....	88
2.4. Estudios biológicos .....	93
2.4.1. Ensayos de citotoxicidad.....	94
2.4.2. Relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) .....	95
2.4.3. Análisis de distribución del ciclo celular .....	96
2.4.4. Ensayo de apoptosis.....	98
3. Familia C .....	99
3.1. Diseño molecular.....	99
3.2. Síntesis química .....	100
3.3. Análisis espectroscópico.....	102
3.4. Estudios biológicos .....	106
3.4.1. Ensayos de citotoxicidad.....	106
3.4.2. Análisis de distribución del ciclo celular .....	108
3.4.3. Ensayo de apoptosis.....	109
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	111
1. Metodología sintética y caracterización química .....	113
1.1. Familia A .....	115
1.1.1. Metodología general de síntesis de los compuestos <b>173–176</b> .....	123
1.1.2. Metodología general de síntesis de los compuestos <b>177–182</b> .....	125
1.1.3. Metodología general de síntesis de los compuestos <b>183–186</b> .....	128

1.2. Familia B.....	132
1.3. Familia C.....	135
2. Evaluación de la actividad biológica .....	138
2.1. Cultivos celulares .....	138
2.2. Conservación de los fármacos .....	138
2.3. Ensayos de citotoxicidad.....	138
2.4. Ensayo de apoptosis.....	139
2.5. Análisis de distribución del ciclo celular .....	139
2.6. Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> .....	139
2.7. Estudio de distribución del fármaco <i>in vivo</i> .....	140
V. CONCLUSIONES.....	141
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	147
VII. SUMMARY.....	159
ANEXO: Caracterización estructural de los compuestos.....	209



## SIGLAS Y ABREVIATURAS

A375	Línea celular de melanoma maligno humano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
CCF	Cromatografía en capa fina
Cdk	Quinasa dependiente de ciclinas
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
Cyc	Ciclina
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doble doblete
dan	Dansilo
DIAD	Diisopropilazodicarboxilato
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ds-Cl	Cloruro de dansilo
eIF2 $\alpha$	Factor de inicio de la traducción
5-FU	5-Fluoroacilo
g	Gramos
G361	Línea celular de melanoma humano
h	Horas
HCT-116	Línea celular de carcinoma de colon humano
HMBC	Heteronuclear multi-bond correlation
HMDS	Hexametildisilazano
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation



Ink4	Proteína inhibidora de Cdk4
Isóm.	Isómero
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
m	Multiplete
MCF-7	Línea celular de carcinoma de mama humano
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mmol	Milimoles
Nu	Nucleófilo
Pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo
$p$ NO <sub>2</sub> -Ph-SO <sub>2</sub> Cl	Cloruro de $p$ -nitrobencensulfonilo
pt	Pseudotriplete
pur	Purina
QSAR	Relaciones estructura-actividad cuantitativas
R <sub>f</sub>	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singlete
SAR	Relaciones estructura-actividad
SRB	Sulforodamina-B
t	Triplete
ta	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDMS-Cl	Cloruro de <i>terc</i> -butildimetilsililo
td	Triple doblete
THF	Tetrahidrofurano
TMS-Cl	Cloruro de tretametilsililo

## **INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de más de 200 enfermedades que puede afectar a cualquier tejido corporal con una distribución heterogénea en función de la edad y el sexo. Actualmente constituye uno de los problemas de salud más relevantes en nuestra sociedad, siendo la primera causa de mortalidad en el mundo y un motivo significativo de hospitalización. La colaboración entre investigadores, epidemiólogos y clínicos está siendo fundamental para el avance en el control del mismo.

La terapia oncológica actual se sigue basando en la cirugía, radioterapia y quimioterapia en general. Este tratamiento carece de la especificidad necesaria para destruir las células cancerosas sin ocasionar graves efectos colaterales. La terapia hormonal antitumoral solamente se utiliza en algunos tipos de cáncer de mama y próstata, y sólo algunos de los denominados fármacos biológicos se han aprobado para el tratamiento de tumores sólidos.

La investigación ha conducido a un avance notable en la comprensión de las bases celulares y moleculares del cáncer, lo que permite profundizar en el diseño de nuevos agentes antitumorales más específicos y seguros para el paciente. Este avance en el conocimiento científico del cáncer junto con el desarrollo de la multirresistencia a fármacos en los tratamientos oncológicos justifican la búsqueda y necesidad de nuevos modelos químicos útiles como agentes antiproliferativos.

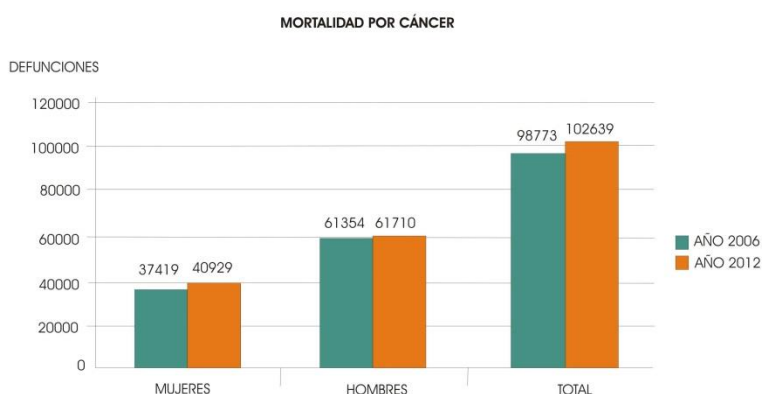
El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevas moléculas que inhiban la proliferación celular sin causar graves efectos secundarios en el futuro como tratamiento antitumoral, cuando se ensayen en organismos vivos.

En este trabajo se detalla el diseño, síntesis, caracterización y análisis de la actividad biológica de 3 familias de fármacos antitumorales con diversidad estructural.

## 1. Cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial, siendo responsable de 7.6 millones de defunciones en 2008. Se prevé que las muertes sigan aumentando y alcancen la cifra de 13.1 millones en 2030. Datos escalofriantes que también afectan a los países en vías de desarrollo donde el cáncer está aumentando en los últimos años. Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer los índices de mortalidad son similares en los países desarrollados y en vías de desarrollo, aunque la incidencia de nuevos casos de cáncer es dos veces mayor en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo<sup>1</sup>.

En España, se estima que la mortalidad por cáncer en este año 2013 es cercana a 41.000 en mujeres y 62.000 en hombres, lo que supone 103.000 defunciones en total. La Figura 1 muestra la estimación de la mortalidad de todos los tumores malignos en mujeres, hombres y totales para los años 2006 y 2012. La cifra de mortalidad ha aumentado en 4.000 en 2012 con respecto a 2006, afectando este aumento principalmente a las mujeres<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Estimación de la mortalidad por cáncer en mujeres, hombres y ambos grupos para los años 2006 y 2012 en España.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define cáncer como un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. También los denomina tumores malignos o neoplasias malignas. Se caracterizan por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales. Cuando invaden partes adyacentes del cuerpo o se propagan a otros órganos se denomina metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer<sup>3</sup>.

El cáncer es una enfermedad genética, ya que se produce por alteraciones en genes específicos, pero en la mayoría de los casos no es una enfermedad hereditaria<sup>4</sup>. El cáncer se desarrolla por una proliferación continua e incontrolada de células cancerosas. Estas células, en lugar de responder apropiadamente a las señales que controlan el comportamiento celular normal, crecen y se dividen sin control alguno produciendo una masa celular diferenciable denominada tumor, invadiendo tejidos y órganos sanos y finalmente, diseminándose por todo el cuerpo alcanzando al sistema circulatorio y/o linfático produciendo metástasis<sup>5</sup>.

Los tumores se desarrollan a partir de una única célula que prolifera de manera anormal como consecuencia de una mutación; es decir, son clones. Sin embargo, el origen clonal de los tumores no implica que la célula que da lugar al tumor tenga todas las características de una célula cancerosa. Por el contrario, el desarrollo de un cáncer es un proceso "multietapa" donde las células se convierten en malignas progresivamente después de una acumulación gradual de mutaciones<sup>5</sup>. En esta acumulación, afectan además los cambios epigenéticos que son los cambios que modifican la pauta de expresión génica y organización de la cromatina sin que exista cambio en la secuencia del ADN<sup>6</sup>. Por ello, la mayoría de los cánceres se desarrollan en las etapas tardías de la vida.

Estas mutaciones y cambios epigenéticos son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos denominados carcinógenos que pueden clasificarse en: físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes, químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua que se bebe) y biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos<sup>3</sup>.

Cada célula sana posee una serie de genes que participan en la regulación de su crecimiento y división celular. Una célula se transforma en cancerosa tras varias transformaciones genéticas, donde participan dos clases de genes que tienen un papel fundamental en el inicio de la progresión tumoral: los genes supresores de tumores y los oncogenes<sup>7</sup>.

Los genes supresores de tumores codifican proteínas que inhiben la proliferación celular. Algunos ejemplos son el gen *p53*, también conocido como guardián del genoma, y el gen del retinoblastoma (*Rb*) mutados de forma excepcional en un número muy amplio de cánceres. Estos genes intervienen en el proceso tumoral cuando sufren mutaciones genéticamente recesivas, que requieren una mutación o cambio epigenético en los dos alelos del gen<sup>7</sup>.

Por otro lado, los oncogenes activan la división celular incontrolada. Como ejemplos existen oncogenes que codifican proteínas G, factores de crecimiento, proteínas-quinazas, factores de transcripción y/o productos que afectan a la apoptosis. En este caso, las mutaciones tienen un efecto dominante, por lo que solamente es necesario el fallo en uno de los dos alelos para que se dé la mutación<sup>7</sup>.

En general, aunque el cáncer es un conjunto de diferentes enfermedades y puede ser debido a multitud de causas, el proceso de carcinogénesis es el mismo para todos los tipos de cáncer. Las células cancerosas que aparecen en el proceso presentan gran cantidad de alteraciones respecto a las células sanas del organismo humano en la regulación del ciclo celular, restricciones en la mitosis o capacidad de diferenciación, entre otras. Por ello resulta imprescindible conocer estas alteraciones de las células cancerosas que no aparecen en las células sanas de manera que sean utilizadas como dianas farmacológicas. Con ello se evitarían los efectos adversos que los tratamientos actuales de quimioterapia causan en el resto de células sanas del organismo<sup>8</sup>.

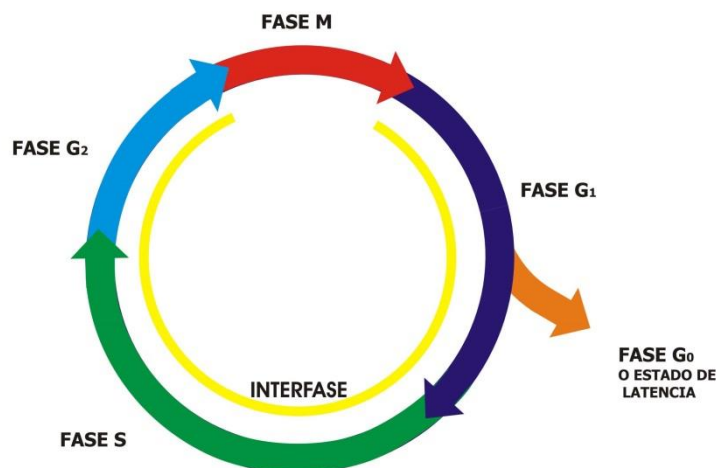
Un tumor es un conjunto de anormalidades dinámicas que aparecen por evolución molecular. La naturaleza variante y heterogénea del cáncer afecta al avance en la investigación<sup>9</sup>. Por ello aparecen tantos obstáculos en la búsqueda del tratamiento eficaz contra el cáncer. Sin embargo, los grandes avances en ciencia, así como el desarrollo de redes y conexiones entre la investigación biológica, genética, química y biomédica en cáncer están ayudando en gran medida a acelerar el proceso de curación del cáncer.

El Atlas del Genoma del Cáncer creado por el Instituto Nacional de Salud de EEUU (NIH, acrónimo de National Institute of Health) que contiene mapas multidimensionales completos de los cambios genómicos clave en los tipos y subtipos principales de cáncer<sup>10</sup> es un ejemplo de ello. El Mapa de Conectividad que revela las conexiones entre medicamentos, genes y enfermedades<sup>11</sup> creado por el Instituto Broad de EEUU y la Universidad de Harvard constituye otro ejemplo de una importante base de datos para el futuro en el tratamiento del cáncer. Por último, la Enciclopedia de Líneas Celulares del Cáncer<sup>12</sup> llevada a cabo por expertos del Instituto Broad en colaboración con miembros del Instituto de Novartis para la Investigación Biomédica también podría resultar de utilidad en un futuro no muy lejano.

## **2. Ciclo celular**

El ciclo celular es el proceso por el que una célula duplica su contenido, crece y se divide en dos células hijas. Así, regula la división celular y es fundamental, no sólo para generar nuevas células, sino también para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Presenta una serie de intervalos que culminan con la mitosis y la citocinesis, momentos de la división del núcleo y división de la célula respectivamente. El espacio entre una fase de mitosis (fase M) y la siguiente es conocido como interfase (Figura 2)<sup>5</sup>.

La interfase incluye una serie de etapas en las que tienen lugar los procesos de preparación para la división celular<sup>13</sup>. A cada fase M le sigue un intervalo denominado fase G<sub>1</sub>. A continuación tiene lugar la replicación del ADN en la llamada fase de síntesis (fase S) seguida de otro intervalo denominado G<sub>2</sub>. Las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> proporcionan tiempos adicionales. En G<sub>1</sub>, la célula expresa los genes responsables de su fenotipo y aumenta su tamaño. En G<sub>2</sub>, la célula comprueba la correcta replicación del ADN y se prepara para la mitosis.



**Figura 2.** Fases del Ciclo Celular.

La célula puede detener su progresión en el ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> o entrar en un estado de reposo denominado estado de latencia (fase G<sub>0</sub>). En fase G<sub>0</sub> las células pueden permanecer incluso años antes de volver a proliferar. El tiempo que transcurre desde el comienzo de la fase S hasta el fin de la fase M es breve y relativamente constante (12-24 h) mientras que el periodo que transcurre desde el fin de la mitosis y la fase G<sub>1</sub> varía en función del tipo celular<sup>14</sup>. Algunas células se dividen con gran frecuencia, como las células epiteliales o intestinales, mientras que otras lo hacen esporádicamente o incluso nunca, como los hepatocitos, células nerviosas y musculares.

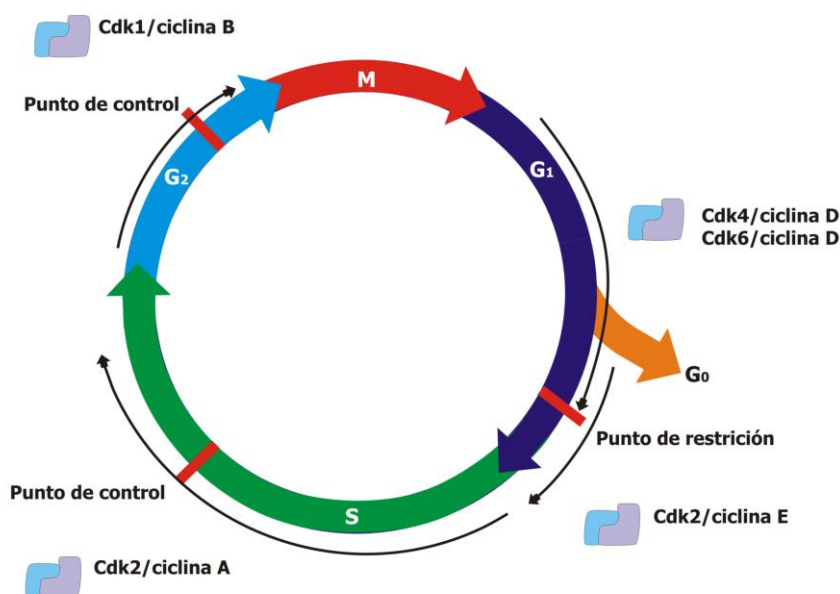
El ciclo celular tiene un riguroso sistema de control que se encargan de integrar la información de las señales extra y/o intracelulares y que dirige a la célula a las diferentes etapas del ciclo celular. La célula es incluso capaz de retrasar la entrada en una fase del ciclo celular a través de este sistema si observa que no está preparada para ello.

La regulación principal de dicho sistema de control se lleva a cabo a través de un complejo formado por dos proteínas, proteín-quinasas dependientes de ciclinas (Cdks, acrónimo de cyclin dependent kinases) y proteín-ciclinas (Cyc) que se unen a las anteriores para su activación. Dichos complejos fosforilan diferentes sustratos implicados en el control de la transcripción y progresión del ciclo celular<sup>15</sup>. Existen más de 20 Cdks diferentes en células eucariotas: algunas son reguladoras del ciclo celular, otras son reguladoras de la transcripción y la función de algunas otras todavía no se conoce<sup>16</sup>.

La activación de un complejo Cdk/Cyc tiene como consecuencia la progresión del ciclo celular a través de la etapa que regula mientras que su inactivación detiene el ciclo celular en dicha fase. Las ciclinas D, producidas al inicio de G<sub>1</sub>, forman complejos con Cdk4 y Cdk6 (Figura 3) que provocan el paso de la célula a través del punto de restricción en esta fase. Al final de G<sub>1</sub>, se forma la Cyc-E que se asocia a Cdk2 permitiendo el paso a la fase S. En la fase S, Cdk2/Cyc-A activa el paso a G<sub>2</sub> y en caso de daño celular, se inhibe



induciendo apoptosis. Cdk1/Cyc-B permite el paso a M siempre que no exista daño celular. En caso contrario, se inicia la apoptosis por inhibición del complejo Cdk1/Cyc-B<sup>14</sup>.

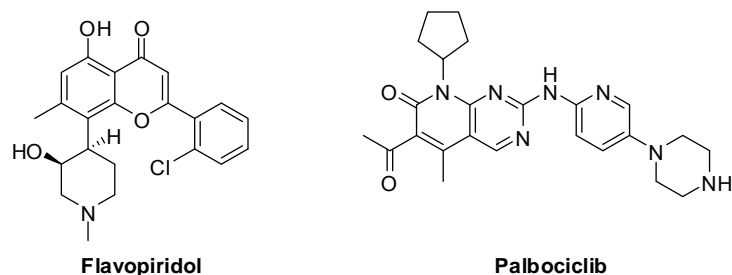


**Figura 3.** Puntos de control e intervención de los complejos Cdk/Cyc en el ciclo celular.

Las Cdk's son imprescindibles en los denominados puntos de control donde la célula comprueba su estado y decide si continuar o no el ciclo celular. Existen tres puntos de control (Figura 3), siendo el punto de restricción el más importante al ser éste en el que la célula decide si entra en un nuevo ciclo o se queda en la fase G<sub>0</sub>. El control sobre este punto es una buena estrategia terapéutica para el diseño de agentes antiproliferativos al provocar la parada de la célula en estado de latencia sin causar efectos colaterales<sup>17</sup>.

Un ejemplo son los fármacos inhibidores de ciclinas que se dividen en dos familias de compuestos en función de que su inhibición sea en cualquier fase del ciclo celular (familia Cip/Kip) o que la inhibición sea selectiva a Cdk's que actúan en la fase G<sub>1</sub> (familia Ink4)<sup>5</sup>.

Uno de los fármacos más estudiados dentro de la familia Cip/Kip es el flavopiridol (Figura 4). Es un inhibidor no selectivo de Cdk1, Cdk2 y Cdk4<sup>15</sup> que detiene el ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y ha dado buenos resultados en pacientes con leucemia linfocítica crónica refractaria<sup>18</sup>. El NIH está llevando a cabo sesenta ensayos clínicos y todavía no ha conseguido su aprobación por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, acrónimo de Food and Drug Administration).



**Figura 4.** Ejemplos de fármacos pertenecientes a las familias Cip/Kip (flavopiridol) e Ink 4 (palbociclib) de inhibidores de Cdks.

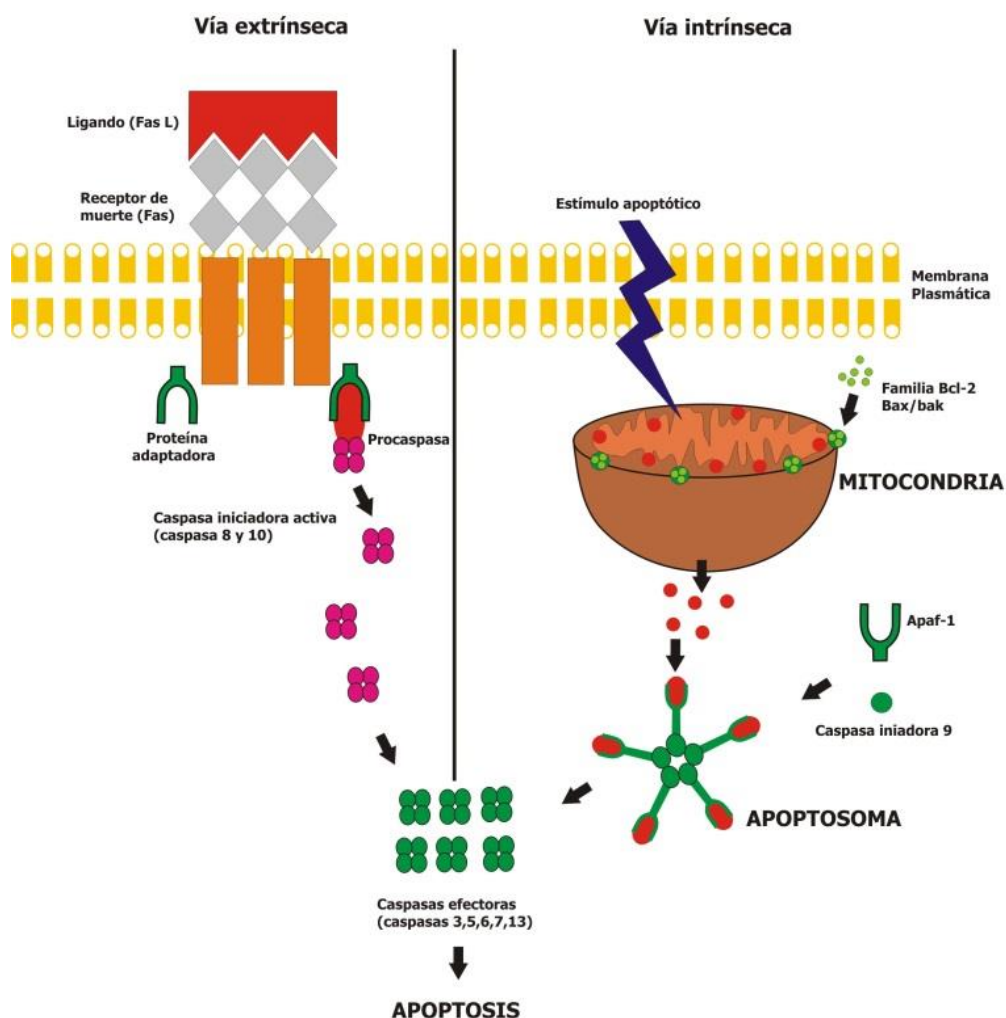
Sin embargo, el fármaco palbociclib (Figura 4) que pertenece a la familia Ink 4 de inhibidores de Cdks recibió en Abril de 2013 la designación de terapia innovadora para el tratamiento del cáncer de mama por la FDA<sup>19</sup>. Esta designación está establecida en el marco del Programa de Seguridad e Innovación de la FDA de 2012 y tiene por objeto acelerar el desarrollo y revisión de un nuevo medicamento potencial, ya sea en monoterapia o en combinación con otras terapias, para el tratamiento de enfermedades que supongan una amenaza para la vida<sup>20</sup>. La designación de terapia innovadora se basa en los resultados de un estudio en fase II para mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico ER positivo y HER2 negativo<sup>21</sup>. Palbociclib es un inhibidor selectivo de Cdk4 y Cdk6 que pertenece a la segunda generación de fármacos inhibidores de Cdks<sup>15</sup>. Actualmente se están llevando a cabo nueve ensayos clínicos por el NIH con este fármaco<sup>22</sup> y presenta una trayectoria segura en el tratamiento contra el cáncer.

A diferencia de flavopiridol y palbociclib que se unen a las Cdks por el sitio de unión del ATP, los inhibidores ATP-no competitivos son una nueva generación de inhibidores de Cdks que se unen a dichas enzimas por un lugar diferente a la unión del ATP. Este hecho hace que los fármacos sean más selectivos y por tanto presenten un mejor umbral terapéutico. La mayoría de los fármacos de esta familia están todavía en desarrollo y bajo patente. Un ejemplo de ellos es Spa310<sup>23</sup>, un péptido de 39 aminoácidos que se une al complejo Cdk2/ciclina A y E por el sitio de unión de su proteína reguladora RB2/p130.

### 3. Apoptosis

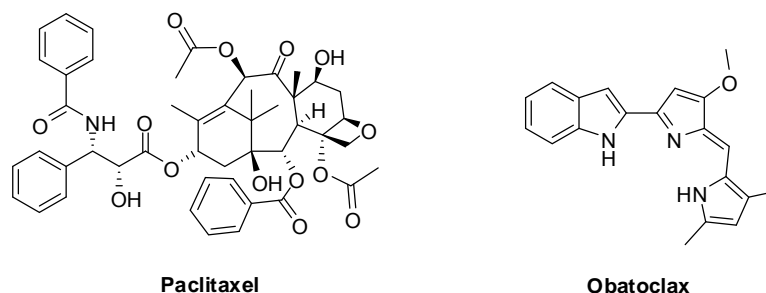
La apoptosis es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. Cuando una célula tiene un daño irreparable en el ADN, sufre un proceso apoptótico y no sigue dividiéndose, sino que se degrada y elimina permitiendo mantener la normalidad en los tejidos. Por ello es un proceso fundamental de protección y mantenimiento de la homeostasis en mamíferos.

Existen dos rutas de señalización principales por las que una célula entra en apoptosis: la vía extrínseca o de los llamados receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Las proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas conocidas como caspasas juegan un papel fundamental en ambas vías (Figura 5)<sup>14</sup>. En mamíferos se conocen 14 tipos de caspasas que se dividen en caspasas iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras son las que se activan primero, y activan a las efectoras actuando en cascada. Como sustrato final tienen a proteínas que producen los cambios morfológicos necesarios de la apoptosis<sup>24</sup>. Entre las más importantes están la caspasa-9 como caspasa iniciadora y la caspasa-3 como caspasa efectora, siendo ambas críticas para la apoptosis en numerosas células.



**Figura 5.** Esquema simplificado del mecanismo de apoptosis.

La activación de la apoptosis es otra estrategia terapéutica fundamental en cáncer. Un ejemplo de ello es el paclitaxel (Figura 6), fármaco natural de la familia de los taxanos que se utiliza como medicamento frente el cáncer desde 1993. Es un agente estabilizador de microtúbulos que induce apoptosis vía caspasa 8<sup>25</sup> (vía extrínseca).



**Figura 6.** Ejemplos de fármacos utilizados dentro de una estrategia antitumoral apoptótica.

Otro ejemplo de estrategia antitumoral apoptótica es la inhibición de la familia de proteínas bcl-2 que regulan la vía intrínseca de la apoptosis. Obatoclax (Figura 6) es un fármaco inhibidor de esta vía<sup>26</sup> presente en diecinueve ensayos clínicos en fase II y III llevados a cabo por el NIH para el tratamiento de leucemia, linfoma y cáncer de pulmón, principalmente<sup>22</sup>. Otro fármaco a destacar es oblimersen (Esquema 1), un oligodesoxirribonucleótido antisentido de 18 bases que se une a los seis primeros codones del ARNm de Bcl-2<sup>27</sup>. Aunque se encuentra en cuarenta y cinco ensayos clínicos del NIH para el tratamiento de leucemia, todavía no ha conseguido la aprobación de la FDA. Este hecho puede ser debido a la preferencia de la FDA por moléculas pequeñas anticancerosas frente a moléculas grandes como el oblimersen<sup>28</sup>.

T-C-T-C-C-C-A-G-C-G-T-G-C-G-C-C-A-T

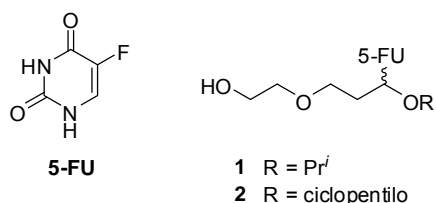
**Esquema 1.** Estructura de Oblimersen. Secuencia de 18 nucleótidos donde T, C, A y G representan las bases nitrogenadas que contiene cada nucleótido, así T= timina, C= citosina, A= adenina y G= guanina.

## 4. Evolución estructural desde el 5-FU hasta purinas con actividad anticancerosa

### 4.1. Derivados de 5-FU de tipo aciclonucleósido y modificaciones

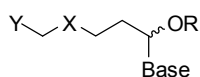
El 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco que se introdujo en el mercado farmacéutico como agente antitumoral en el año 1957 y se sigue utilizando en la actualidad en una amplia gama de tumores sólidos. Sin embargo, el 5-FU presenta graves efectos colaterales que impulsan a la investigación y desarrollo de agentes antiproliferativos más efectivos y menos tóxicos que el 5-FU. Para ello, nuestro grupo de investigación partió de agentes antitumorales que, en un principio, se diseñaron como profármacos del 5-FU (Figura 7), como por ejemplo los seco-nucleósidos que son nucleósidos no clásicos en los que el azúcar es lineal en lugar de cíclico. Se diseñaron diferentes compuestos, siendo los análogos *isopropoxi* (**1**, Figura 7) y *ciclopentoxi*<sup>29</sup> (**2**, Figura 7) los que exhibían una mejor actividad antiproliferativa frente a la línea celular humana HEP de cáncer de laringe. La estructura más lipofílica resultó ser la más activa

(**2**), siendo 4 veces más potente que el 5-FU bajo las mismas condiciones de ensayo con valores de concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de 18  $\mu\text{M}$  para **2** frente a 90  $\mu\text{M}$  para 5-FU.



**Figura 7.** Molécula de 5-fluorouracilo y seco-nucleósidos con actividad antiproliferativa.

Se modificó la cadena de 3-hidroxietoxipropilo<sup>30</sup> (Tabla 1) con el objetivo de estudiar su influencia en la actividad antiproliferativa.

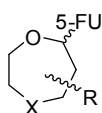


Compuesto	R	X	Y	Base
<b>3</b>	Me	O	CH <sub>2</sub> OTs	5-FU
<b>4</b>	Me	S	CH <sub>2</sub> Cl	5-FU
<b>5</b>	Me	O	COOMe	5-FU
<b>6</b>	<sup>i</sup> Pr	O	CH=CH <sub>2</sub>	Adenina
<b>7</b>	<sup>i</sup> Pr	O	CH=CH <sub>2</sub>	Uracilo
<b>8</b>	<sup>i</sup> Pr	O	CH=CH <sub>2</sub>	5-FU
<b>9</b>	<sup>i</sup> Pr	O	CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	5-FU
<b>10</b>	Me	O	CH(OH)CH <sub>2</sub> Cl	5-FU
<b>11</b>	Me	O	CH(OMe)5FU	5-FU

**Tabla 1.** Estructuras de los aciclonucleósidos modificados.

Los compuestos **3-11** se diseñaron para liberar dos sustancias citotóxicas como son el 5-FU y la acroleína en los tejidos tumorales tras su metabolización. La acroleína inhibe el crecimiento de células tumorales de ovario de hámster chino ( $CI_{50}$  de 50  $\mu\text{M}$ )<sup>31</sup>. Este diseño implica los siguientes dos pasos: hidrólisis del *O,N*-acetal a un derivado de propionaldehído sustituido en posición 3 y una reacción de retroadición de Michael para producir acroleína. De esta serie, el único compuesto que resultó ser activo frente a la línea celular de carcinoma humano de colon HT-29 fue **10** presentando una  $CI_{50}$  de 70  $\mu\text{M}$ <sup>30</sup>, aunque sigue siendo ocho veces menos activo que el 5-FU ( $CI_{50}$  = 9  $\mu\text{M}$ )<sup>32</sup>. En un estudio sobre capacidad diferenciadora en cultivos de células de rhabdomiosarcoma humano, tanto **10** como el 5-FU produjeron un incremento de los marcadores de diferenciación desmina,  $\alpha$ -actinina y tropomiosina, siendo más acusado en **10** que además mostró menor toxicidad que el 5-FU<sup>30</sup>.

También se prepararon ciclos de siete miembros que pertenecen a la familia de derivados del 5-FU con el grupo 1-(1,4-diheteroepanilo)<sup>33</sup> (Figura 8).



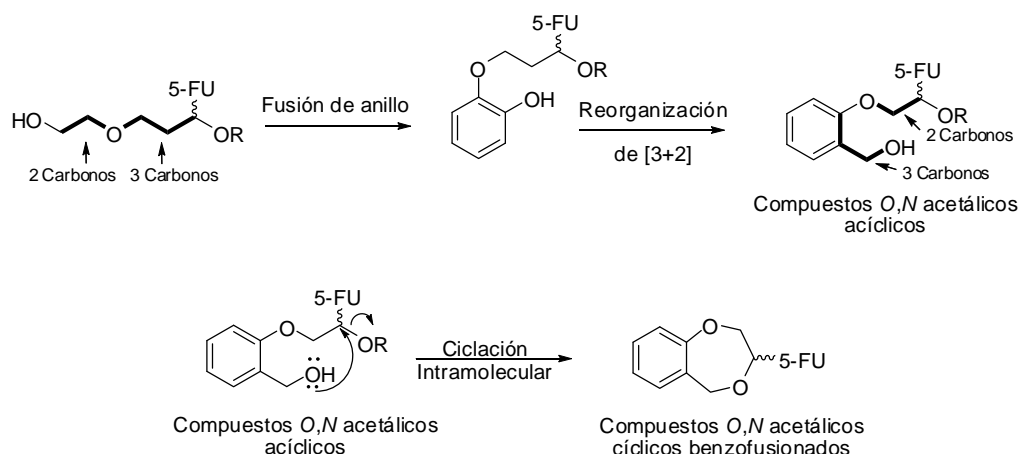
<b>12</b> X=O R=H	<i>cis</i> - <b>17</b> X=O R=3-Me
<b>13</b> X=S R=H	<i>trans</i> - <b>17</b> X=O R=3-Me
<b>14</b> X=NTs R=H	<i>cis</i> - <b>18</b> X=O R=CH <sub>2</sub> Cl
<i>cis</i> - <b>15</b> X=O R=6-Me	<i>trans</i> - <b>18</b> X=O R=CH <sub>2</sub> Cl
<i>trans</i> - <b>15</b> X=O R=6-Me	<i>cis</i> - <b>19</b> X=O R=CH <sub>2</sub> I
<i>cis</i> - <b>16</b> X=O R=7-Me	<i>trans</i> - <b>19</b> X=O R=CH <sub>2</sub> I
<i>trans</i> - <b>16</b> X=O R=7-Me	

**Figura 8.** Estructuras generales de los derivados de 5-FU con un grupo 1-(1,4-diheteroepanilo).

Los compuestos **12-19** podrían actuar como profármacos del 5-FU y su actividad se debería a la liberación del mismo a través de la enzima uridina fosforilasa. Esta enzima es menos abundante que la timidina fosforilasa, lo que podría explicar que estos compuestos sean menos activos que el 5-FU. El único compuesto interesante resultó ser el *cis*-**18** con una actividad moderada frente a la línea celular HT-29 ( $CI_{50} = 30 \mu M$ ), seis veces inferior que la del 5-FU bajo el mismo protocolo ( $CI_{50} = 4.5 \mu M$ ). El resto de compuestos presentan actividades en torno a  $100 \mu M$ . La mejor actividad de **18** parece ser debida a una mayor labilidad del enlace hemiaminámico por la elevada electronegatividad del átomo de cloro que favorecería la hidrólisis enzimática<sup>33</sup>.

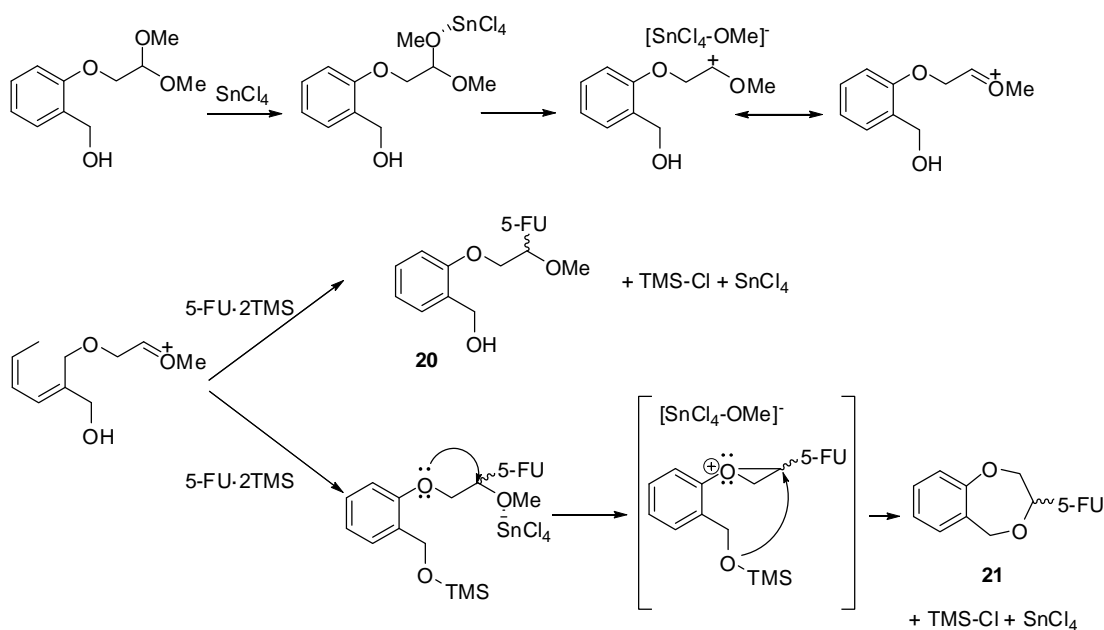
#### 4.2. Compuestos *O,N*-acetálicos cíclicos

Una aproximación posterior consistió en un nuevo aumento de la lipofilia del aciclonucleósido **2** con el fin de obtener mejores resultados antiproliferativos. Este objetivo se logró basándose en dos estrategias: fusión de un anillo de benceno a la cadena lateral de la estructura tipo aciclonucleósido y reorganización molecular del fragmento [3+2] [el número 3 corresponde al número de carbonos del fragmento de la acroleína y el número 2 al fragmento hidroxietoxi perteneciente al aciclonucleósido] (Esquema 1). Además, la ciclación formal intramolecular aumentaría todavía más la lipofilia<sup>34</sup> (Esquema 1).



**Esquema 1.** Estrategias de mejora de la lipofilia del compuesto **2**.

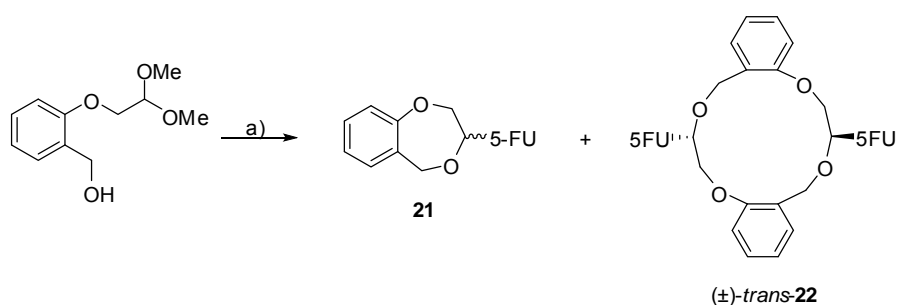
Para la obtención de los derivados *O,N*-acetálicos acíclicos y cíclicos presentes en el Esquema 1 se utilizó una modificación de la reacción de Vorbrüggen, método de elección para la formación de nucleósidos<sup>35</sup>. El ácido de Lewis empleado fue el tetracloruro de estaño ( $\text{SnCl}_4$ ) y como agentes silanzantes se utilizaron hexametildisilazano (HMDS) y cloruro de tetrametilsililo (TMS-Cl). La síntesis se puede llevar a cabo partiendo de compuestos *O,O*-acetálicos tanto acíclicos como cíclicos indistintamente. Los productos obtenidos (**20** y **21**, Esquema 2) dependen de la regioselectividad de la reacción, de las condiciones en las que se desarrolla y de las características de los sustratos. El mecanismo de reacción propuesto partiendo de un *O,O*-acetal acíclico se detalla en el Esquema 2<sup>34</sup>.



**Esquema 2.** Procesos de formación de *O,N*-acetales a partir de *O,O*-acetales acíclicos benzofusionados con el concurso del ácido de Lewis  $\text{SnCl}_4$  y el 5-FU bis-silanzado.

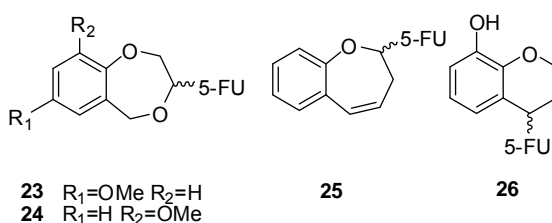
El oxígeno fenólico facilita la ciclación de los *O,N*-acetales abiertos por participación de grupo vecino (Esquema 2). El mecanismo propuesto conlleva la formación de un ion oxiranio altamente reactivo que permite el ataque del grupo éter bencílico silanizado como nucleófilo<sup>34</sup>.

El compuesto macrocíclico con estructura de éter corona-14 (**22**) se obtuvo tras 24 h en la reacción de formación de **21** partiendo del *O,O*-acetal ácido correspondiente en presencia de SnCl<sub>4</sub><sup>36</sup> (Esquema 3).



**Esquema 3.** *Reactivos y condiciones:* a) 5-FU, HMDS, TMSCl, SnCl<sub>4</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 24h, ta.

Además se obtuvieron los derivados **23-26** (Figura 9) como compuestos adicionales de la serie. La unión con el resto de 5-FU tiene lugar en la posición *M1* del anillo en todos los casos (**20-26**).



**Figura 9.** Compuestos *O,N*-acetálicos adicionales obtenidos en esta serie.

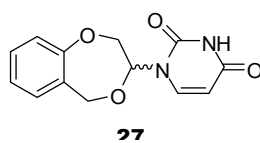
El incremento de la lipofilia llevado a cabo en los compuestos **20-26** condujo a una mejora en la actividad antiproliferativa de los mismos con respecto a los derivados sintetizados anteriormente (**1-19**). Los compuestos **21**, **22** y **23** son los que presentan mejor actividad antiproliferativa frente a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama en esta serie con valores de CI<sub>50</sub> de 7, 4 y 5.5 μM respectivamente<sup>34,36</sup>. El compuesto acíclico **20** y el derivado cíclico de 6 miembros **26** presentan una actividad menor (CI<sub>50</sub> de 18.5 μM para **20** y de 69 μM para **26**) pero un porcentaje de apoptosis elevado del 59.9 %



para **20** y del 54.3 % para **26** a las 24 h de tratamiento a la  $CI_{50}$  frente al 1.2 % del control en la línea MCF-7<sup>34,36</sup>. Cabe mencionar que los compuestos **21-26** no mostraron toxicidad alguna cuando se administraron a ratones vía intravenosa durante un mes, dos veces por semana (dosis de 50 mg/Kg)<sup>34,36</sup>.

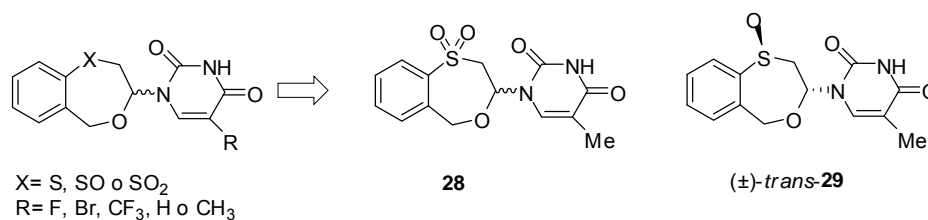
Los compuestos **21-26** detienen el ciclo celular en la fase  $G_0/G_1$  cuando actúan frente a la línea celular MCF-7<sup>37</sup>. El hecho de que estos compuestos detengan el ciclo celular en una fase diferente a la del 5-FU y a su profármaco ftorafur (fase S) indica que estos derivados no son profármacos del 5-FU y sí fármacos *per se*, en los que las dos entidades que los forman, tales como los anillos de 6, 7 y 14 miembros benzofusionados y el o los restos de 5-FU, son necesarios para la actividad antitumoral.

Por ello se decidió introducir bases nitrogenadas naturales en lugar de 5-FU en los nuevos agentes sintetizados. Se comenzó sustituyendo el 5-FU por la base natural uracilo en **21** obteniendo el compuesto **27**<sup>37</sup> (Figura 10). Los resultados biológicos de dicho compuesto son muy similares a los descritos para el compuesto **21** con una  $CI_{50}$  de  $5 \pm 0.25 \mu\text{M}$  frente a MCF-7 y detención del ciclo celular tanto en fase  $G_0/G_1$  como en  $G_2/M$ . Además, estudios de inhibición de ciclinas mediante citometría de flujo (FACScan) mostraron que **27** provoca una disminución de los niveles de Cyc-D1 hasta prácticamente hacerla desaparecer (7.96 % frente al 20.01 % del control). Este hecho se confirmó utilizando las técnicas de Western blot y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, acrónimo de Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). La técnica de FACScan también reveló la disminución de los niveles de Cdk1 por **27** (18.07 % frente al 31.52 % del control) y aumento en los niveles de p21 y p27 (56.63 % frente al 26.96 % y 62.14 % frente al 28.63 % del control respectivamente)<sup>37</sup>. Estos efectos son contrarios a los de 5-FU, que aumenta los niveles de Cyc-D1 y detiene el ciclo celular en fase S. Este hecho es destacable porque el compuesto **27**, con la base natural uracilo, es el primer prototipo de agente antiproliferativo.



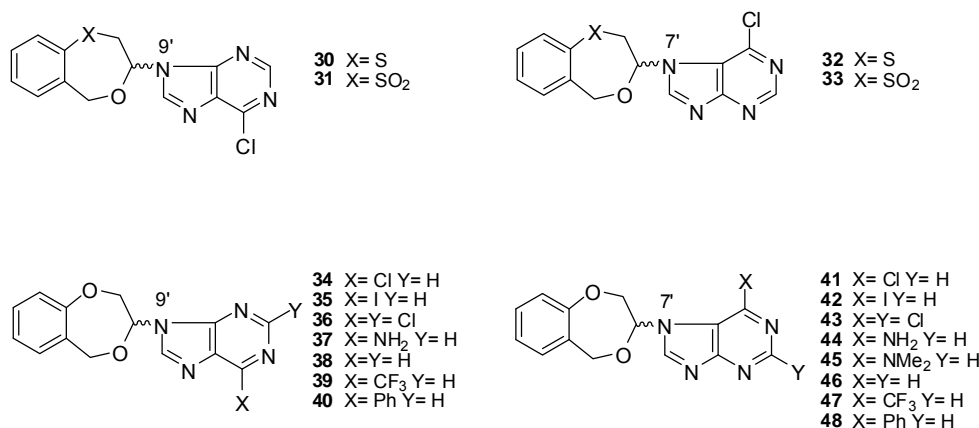
**Figura 10.** Primer compuesto *O,N*-acetálico con la base nitrogenada natural uracilo.

A continuación se llevaron a cabo sustituciones isostéricas sobre el prototipo **27** con cambio del átomo de O unido al benceno por un S, un grupo SO o  $SO_2$ <sup>38</sup> y modificaciones en la base pirimidínica con restos de 5-FU, 5-bromouracilo, 5-trifluoroacilo<sup>39</sup> y las bases naturales timina, además de uracilo (Figura 11). Los compuestos derivados de timina **28** y ( $\pm$ )-*trans*-**29**<sup>39</sup> son los únicos que presentaron valores moderados de actividad antiproliferativa frente a la línea MCF-7 en esta serie ( $CI_{50}$ = 12 y 30  $\mu\text{M}$ , respectivamente).



**Figura 11.** Sustituciones isostéricas en los compuestos *O,N*-acetálicos y derivados de timina con actividad antiproliferativa.

Con objeto de aumentar la diversidad estructural de las moléculas, se sustituyeron las bases pirimidínicas por púricas manteniendo los átomos de O, S, SO o SO<sub>2</sub> unidos al benceno (Figura 12).



**Figura 12.** Modificaciones isostéricas en derivados de purina *O,N*-acetálicos cíclicos de 7 miembros.

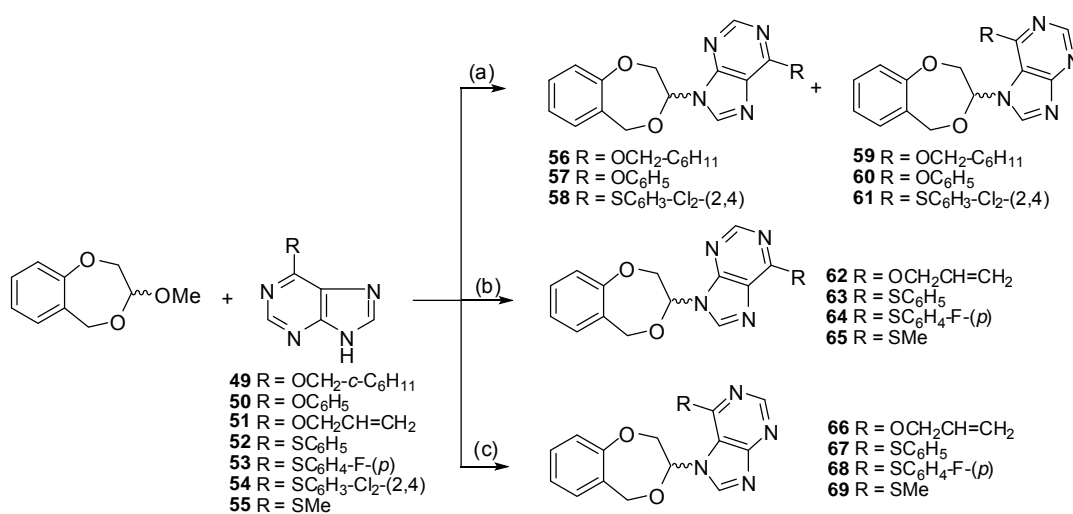
Tras analizar su actividad biológica se observó un aumento de actividad con respecto a los compuestos que contienen pirimidinas en su estructura, siendo el derivado **33** con SO<sub>2</sub> (CI<sub>50</sub>= 2.6 μM)<sup>39</sup> y el derivado **43** con O (CI<sub>50</sub>= 1.3 μM)<sup>40</sup> los compuestos más activos como agentes antiproliferativos frente a MCF-7.

Los derivados de purina presentan mayor actividad antiproliferativa que sus análogos de pirimidina: por ejemplo **33** (CI<sub>50</sub>= 2.6 μM) y **43** (CI<sub>50</sub>= 1.3 μM) frente a **28** (CI<sub>50</sub>= 12 μM) y **27** (CI<sub>50</sub>= 30 μM) respectivamente<sup>39,40</sup>. Entre dichos derivados de purina, los isómeros *N*-7 **32**, **33**, **41-48** presentan mejor actividad que sus análogos *N*-9 (**30**, **31**, **34-40**), excepto en el caso de los compuestos que presentan un grupo CF<sub>3</sub> en posición 6 de la purina (**39** y **47**)<sup>39,40</sup>.

Los derivados de adenina y dimetilaminopurina **37**, **44** y **45** no muestran actividad antiproliferativa frente al compuesto de referencia **27**<sup>40</sup>. En los compuestos **34-48**, la

presencia de al menos un halógeno en el esqueleto de purina es necesaria para mejorar su actividad antiproliferativa<sup>40</sup>.

Posteriormente, se decidió hacer modificaciones en la posición 6 de la purina unida a derivados 1,4-benzodioxapinos, introduciendo grupos voluminosos (Esquema 4). Para la obtención de dichos compuestos se utilizó por primera vez la síntesis asistida por microondas para la reacción de Vorbrüggen que permitió una síntesis más rápida y selectiva, obteniéndose uno de los dos regioisómeros en mayor proporción (*N*-9 o *N*-7) en función de la temperatura<sup>41</sup>.



**Esquema 4.** *Reactivos y condiciones:* HMDS, TMS-Cl, SnCl<sub>4</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN anhidro. Método a) 45 °C, 24-72 h. b) Microondas, 130 °C, 5 min. c) Microondas, 100 °C, 5 min.

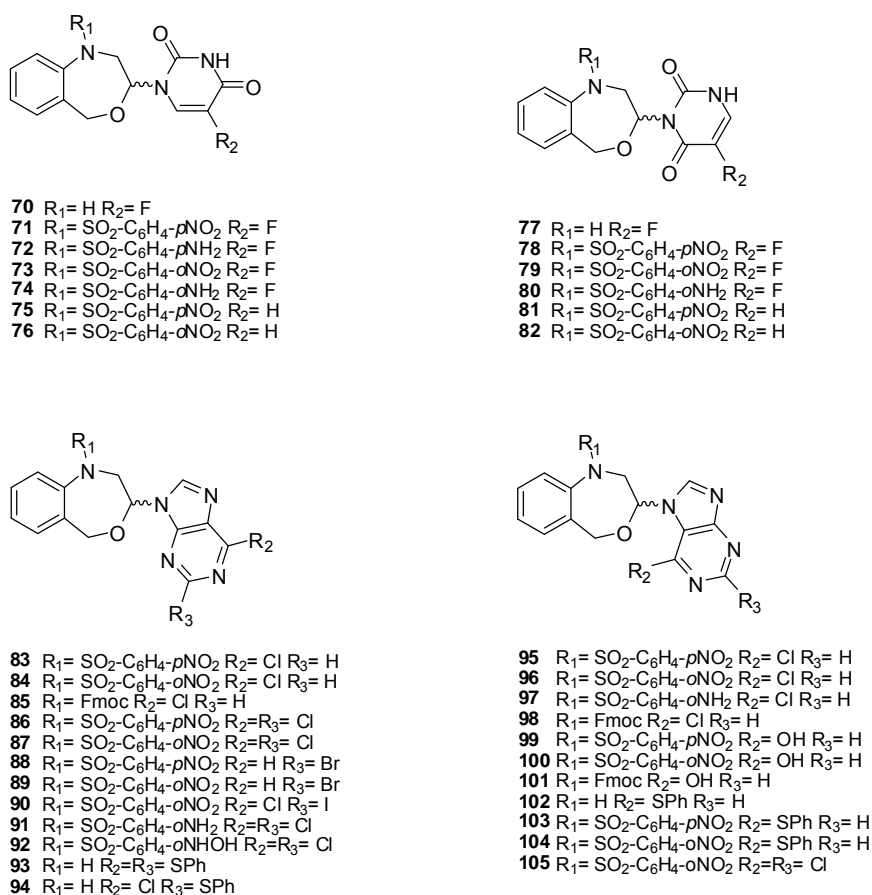
Los derivados de purina **56-69** son más activos como agentes antiproliferativos frente a la línea MCF-7 que las purinas correspondientes (**49-55**)<sup>41</sup>. En esta serie de compuestos (**56-69**), no existen diferencias significativas entre las actividades antiproliferativas de los isómeros *N*-9 y *N*-7<sup>41</sup>, a excepción de los derivados de aliloxi (**62** y **66**). El compuesto **62** (*N*-9) es el más activo con CI<sub>50</sub> de 5.04 μM, valores muy similares a los de 5-FU (CI<sub>50</sub>= 4.32 μM), mientras que la CI<sub>50</sub> de su isómero *N*-7 (**66**) es de 20.9 μM. Los compuestos **61** y **63** que presentan grupos voluminosos en posición 6 de la purina también muestran actividades destacables, con CI<sub>50</sub> de 8.40 μM al contener un grupo 2,4-diclorofeniltilio y CI<sub>50</sub> de 7.12 μM conteniendo un grupo feniltilio, respectivamente.

Finalmente, se llevaron a cabo nuevas modificaciones isostéricas con la sustitución de un átomo de N unido al benceno en lugar del O, S, SO o SO<sub>2</sub> en el anillo de 7 miembros. Además se introdujeron grupos voluminosos en dicho N para aumentar la lipofilia de los compuestos<sup>42,43</sup> (Figura 13).

En esta serie de 1,4-benzoxazepinas encontramos compuestos con valores de CI<sub>50</sub> frente a la línea celular MCF-7 menores a 1 μM (**85, 86, 87, 90, 91, 96, 98** y **104**,

$CI_{50} = 0,35 - 0,92 \mu M$ )<sup>42,43</sup>. Dichos compuestos poseen un grupo voluminoso unido al N del anillo y un átomo de Cl en la posición 6 de la purina, a excepción del compuesto **104** que posee un grupo feniltio en la purina.

Los derivados de purina (**83-105**) son más activos como agentes antiproliferativos que los de pirimidina (**70-82**) con valores medios de  $CI_{50}$  de 10  $\mu M$  frente a 40  $\mu M$  respectivamente<sup>42,43</sup>. Esta relación también ocurre en los derivados benzoxatiepínicos y benzodioxapínicos. Por ello, podemos confirmar que los derivados de purina presentan mejor actividad que los de pirimidina en general.

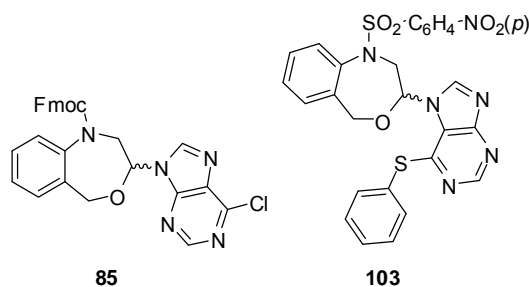


**Figura 13.** 1,4 benzoxazepinas *O,N*-acetálicas derivadas de pirimidina y purina.

La sustitución de la posición 6 de la purina es esencial para aumentar la actividad antiproliferativa de los compuestos, siendo el átomo de Cl uno los más apropiados. Tanto los compuestos derivados de purina como los de pirimidina presentan mejores valores de actividad cuando el N del anillo está sustituido, por ejemplo por un grupo *p*-nitrobenzensulfonilo<sup>42,43</sup> (**86**,  $CI_{50} = 0.35 \mu M$ ).

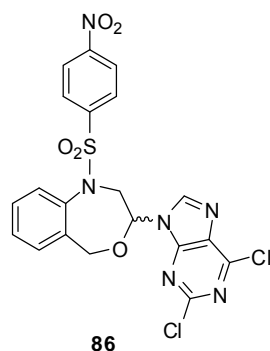
Cabe mencionar que los derivados de purina 1,4-benzoxazepínicos (**83-105**) son más activos como agentes antiproliferativos frente a la línea celular MCF-7 que los 1,4-benzoxatiepínicos (**30-33**) y 1,4-benzodioxapínicos (**34-48, 56-69**)<sup>42</sup>.

También se realizaron estudios mediante tecnología de microarrays sobre **85** y **103** (Figura 14) que muestran que la diana molecular principal de dichos compuestos son genes pro-apoptóticos tales como GP132 relacionado con la proteína G2α implicada en la apoptosis, ERN1 con actividad quinasa sobre el control del ciclo celular y apoptosis o RAC1 que impiden la progresión metastática<sup>42</sup>.



**Figura 14.** Compuestos que actúan sobre los genes pro-apoptóticos GP132, ERN1 y RAC1 como agentes antiproliferativos.

El derivado 1,4-benzoxazepínico más activo es el compuesto **86** (Figura 15) con una  $CI_{50}$  de 0.166  $\mu$ M y 0.355  $\mu$ M frente a las líneas tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente. El índice terapéutico (IT) definido como la relación entre la dosis tóxica y la dosis terapéutica *in vitro* ( $CI_{50}$  frente a una línea celular no tumoral/  $CI_{50}$  frente a la línea celular tumoral correspondiente) se midió con las líneas celulares MCF-10/MCF-7. El IT que presenta **86** es de 5.1 frente a células MCF-7 y 11.0 frente a células MDA-MB-231. Este compuesto induce apoptosis frente a células MCF-7 de hasta 52.50 % de población después de 48 horas, además de que no induce toxicidad aguda en ratones después de dos semanas de tratamiento incluso a la dosis más alta administrada que fue de 200 mg/kg<sup>43</sup>.



**Figura 15.** Estructura molecular del mejor derivado 1,4-benzoxazepínico como agente antiproliferativo bozepinib (**86**).

Los enantiómeros *R* y *S* de **86** (Figura 15) se resolvieron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, acrónimo de High Performance Liquid Chromatography)

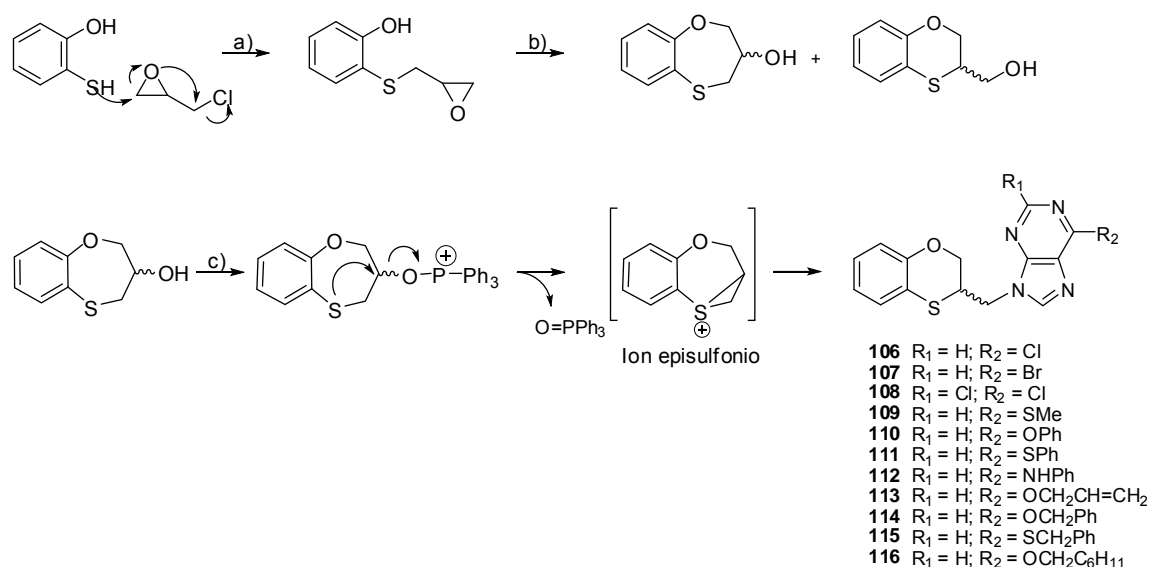
utilizando una columna quiral y son incluso más activos que su racémico, presentando actividades de 0.11  $\mu\text{M}$  y 0.15  $\mu\text{M}$  frente a las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente<sup>43</sup>.

Bozepinib es el nombre que se le ha asignado al compuesto **86** (Figura 15). Es un potente agente antitumoral que induce apoptosis en células de cáncer de mama y colon mediante la interacción con la proteína-quinasa R (PKR o quinasa dependiente de ARN de doble cadena). Además, se ha visto que la combinación terapéutica con el interferón  $\alpha$  aumenta la eficacia apóptica del bozepinib e incluso mejora la capacidad autofágica y de senescencia celular del mismo<sup>44</sup>, procesos que son de vital importancia en la lucha contra la resistencia quimioterápica. Por tanto, bozepinib presenta las características necesarias para ser un fármaco prometedor en una nueva terapia antitumoral frente a la quimioterapia clásica actual.

### 4.3. Compuestos no acetálicos

Como los compuestos descritos anteriormente no son profármacos del 5-FU, no es necesario mantener el enlace lábil *O,N*-acetálico en la molécula. Por ello y con objeto de controlar la estereoquímica de la reacción, se diseñaron una serie de benzoxatiinos (**106-116**), en donde la unión a la purina se hace a través de un enlace C-C<sup>45</sup> (Esquema 4).

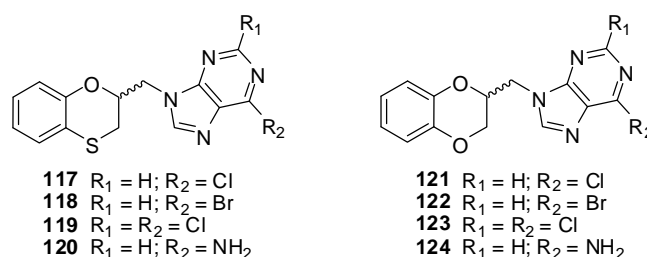
La síntesis de dichos compuestos se realizó por reacción de Mitsunobu en la que, aunque se parte de compuestos benzofusionados con anillo de 7 miembros, se obtienen compuestos benzofusionados con anillo de 6 miembros. El átomo de S actúa como nucleófilo alternativo y se forma un ion intermedio episulfonio por participación de grupo vecino S-3<sup>1</sup>. Este hecho provoca la contracción del anillo de 7 a 6 miembros que conduce finalmente a los compuestos **106-116**<sup>45</sup> (Esquema 4).



**Esquema 4.** *Reactivos y condiciones:* a) NaH, DMF, -5 °C, 95 min. b) NaOH, H<sub>2</sub>O, 100 °C. c) DIAD, PPh<sub>3</sub>, THF anhidro, 140 °C, microondas, 5 min.

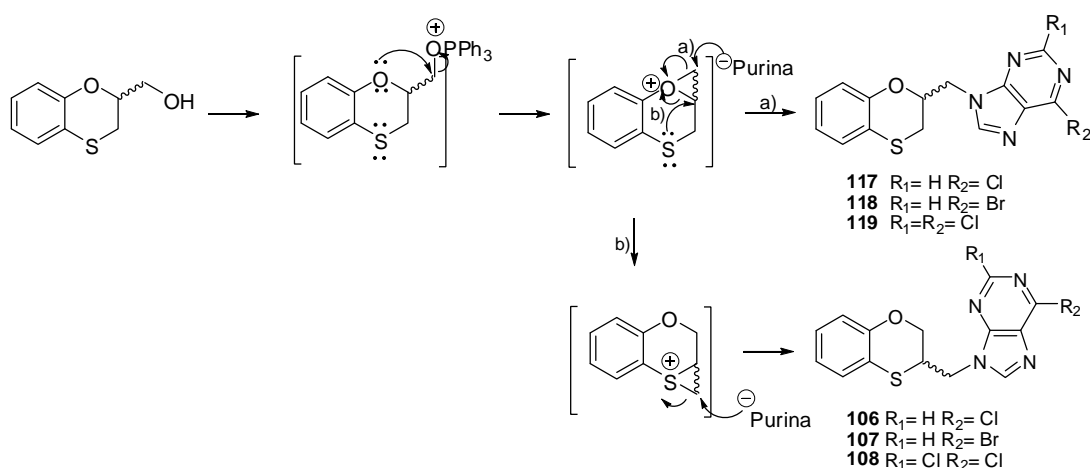
Los compuestos **106**, **107** y **108**<sup>45</sup> (Esquema 4) son los compuestos más activos de esta serie frente a MCF-7 que detienen el ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Un resultado muy importante de esta serie de compuestos es su gran capacidad para inducir apoptosis, 58.29 % para **106**, 63.05 % para **107** y 76.22 % para **108** frente a 0.22 % del control<sup>45</sup>.

Por ello se realizaron diversas modificaciones (Figura 16) tales como el cambio de la posición 3 a la 2 del anillo de purina (**117-120**) y sustitución, además, del átomo de S por O (**121-124**).



**Figura 16.** Modificaciones isostéricas sobre los derivados no acetálicos.

Los derivados **117-120** se obtuvieron por reacción de Mitsunobu (Esquema 5). En este caso la doble participación de grupo vecino justifica la formación de los derivados **106-108**, además de los deseados **117-119** (Esquema 5).

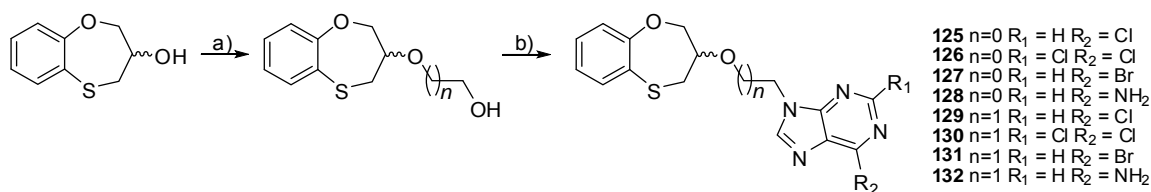


**Esquema 5.** Mecanismo propuesto para la formación de **106-108** y **117-119**.

Con los estudios de actividad antiproliferativa que se llevaron a cabo frente a la línea celular MCF-7 se demuestra que los derivados de 1,4-benzoxatiinos (**117-119**) presentan mayor actividad que los derivados de 1,4-benzodioxanos (**121-123**) con una

media de  $CI_{50}$  de 5.6  $\mu\text{M}$  frente a 15.3  $\mu\text{M}$  respectivamente, sin tener en cuenta los derivados de adenina (**120** y **124**,  $CI_{50} > 30 \mu\text{M}$ ). Los benzoxatiinos que presentan la purina en posición 2 son más activos (**117-119**, media de  $CI_{50}$  de 5.6  $\mu\text{M}$ ) que los que la presentan en posición 3 (**106-108**, media de  $CI_{50}$  de 8.6  $\mu\text{M}$ ). El derivado benzoxatiínico de dicloropurina es el compuesto más activo como agente antiproliferativo (**123**,  $CI_{50} = 2.8 \mu\text{M}$ ). Dichos benzoxatiinos (**117-119**) detienen el ciclo celular en fase  $G_2/M$  (23.35 %, 31.37 % y 43.89 % frente al 13.26 % del control, respectivamente) y son capaces de fosforilar el factor de iniciación eIF2 $\alpha$  implicado en la inhibición de la síntesis proteica. Además inducen apoptosis (70.08 % frente al 0.92 % del control para **119**), así como activan la caspasa-9 de forma similar al paclitaxel que se utilizó como control en el ensayo de western blot<sup>46</sup>.

Posteriormente con objeto de evitar la contracción del anillo por participación de grupo vecino y mantener, por lo tanto, la integridad del anillo de siete miembros, se llevó a cabo la síntesis de derivados de purina con un espaciador de 2 y 3 carbonos entre el anillo benzofusionado y el resto de purina. La reacción de Mitsunobu conduce en este caso a la obtención de los derivados **125-132**<sup>47</sup> representados en el Esquema 6.



**Esquema 6.** *Reactivos y condiciones:* a) 2-bromoetanol (para **125-128**) o 3-bromoetanol (para **129-132**), NaH 60%, DMF anhidro. b) DIAD,  $\text{PPh}_3$ , THF anhidro, 140 °C, microondas, 5min.

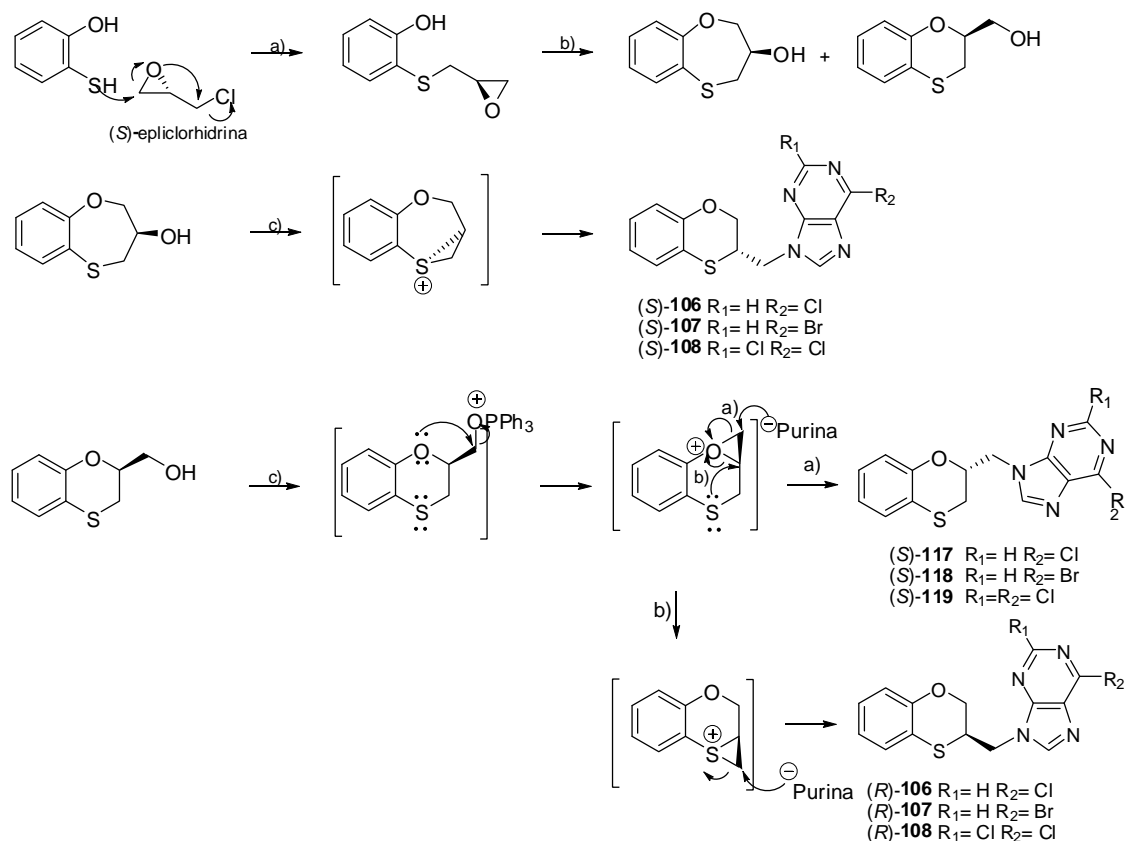
Los compuestos **125-132** son más activos frente a la línea celular MCF-7 que sus análogos de 6 miembros **106-108** ( $CI_{50} = 6.67 \mu\text{M}$  de **130** frente a  $8.97 \mu\text{M}$  de **108** como ejemplos). Los derivados de purina bromados (**107** y **131**) presentan mejores actividades antiproliferativas que sus correspondientes derivados diclorados (**108** y **130**) y clorados (**106** y **129**), hecho que ocurre tanto en los derivados benzofusionados de 6 miembros como en los de 7 miembros. Cabe mencionar que la actividad antiproliferativa de los compuestos **129-131** está relacionada con la inhibición de la síntesis de proteínas en las vías de señalización del factor eIF2 $\alpha$  y de las quinasas PI3K<sup>47</sup>, fundamentales en los procesos de apoptosis de células cancerosas<sup>48,49</sup>.

En estos últimos años, el control de la quiralidad viene tomando una mayor importancia en el desarrollo de nuevos fármacos. En consecuencia, se decidió la preparación y valoración biológica de los derivados homoquirales **106-108** y **117-119** con el objetivo de relacionar la configuración del estereocentro con la actividad biológica<sup>50</sup>.

En esta síntesis asimétrica se comparó la utilización de epiclorhidrina (Esquema 7) y *m*-nitrobenzensulfonato de (*S*)-glicidilo (Esquema 8) como productos de partida para la

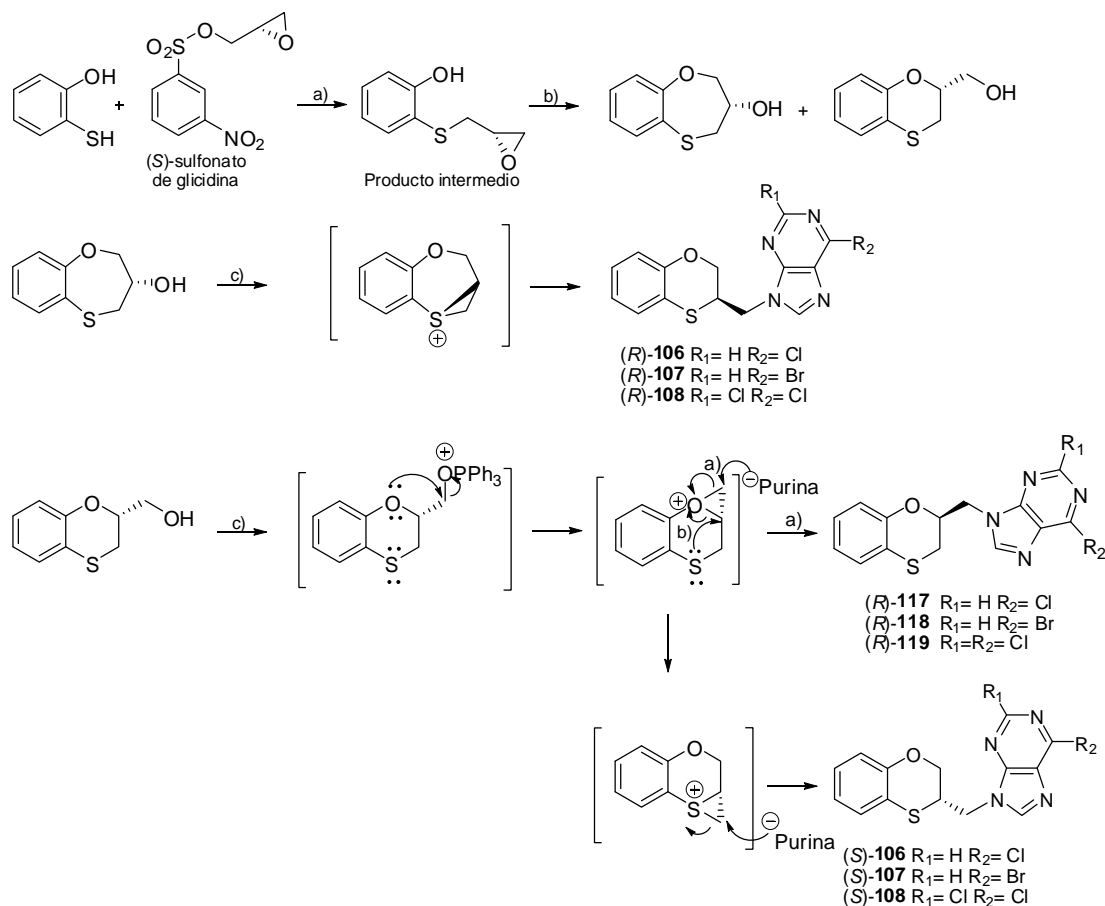


preparación de los enantiómeros. Es destacable el hecho de que cuando se parte de la (*S*)-epiclorhidrina y del *m*-nitrobencensulfonato de (*S*)-glicidilo, los productos objetivo que se obtienen son enantiómeros entre sí<sup>50</sup>.



**Esquema 7.** *Reactivos y condiciones:* a) Piridina, H<sub>2</sub>O, ta, 24 h. b) NaOH, H<sub>2</sub>O, 95 °C, 6h. c) purina, PPh<sub>3</sub>, DIAD, THF anhidro, microondas, 140 °C, 5 min.

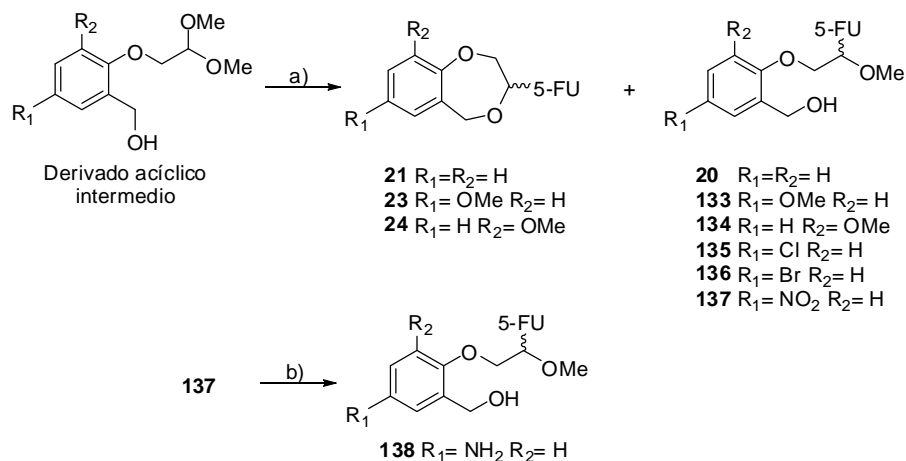
Se observó que los compuestos racémicos **106-108**, **117-119** presentan actividades antiproliferativas similares a sus estereoisómeros frente a MCF-7, siendo la actividad de los isómeros *S* en los compuestos **106**, **108**, **118** y **119** ligeramente mejores con la diferencia más significativa en **106** (CI<sub>50</sub> = 3.30 μM para *S*-**106** frente a 10,6 μM para (*R,S*)-**106**). Merece la pena destacar que el compuesto (*S*)-**117** activa la vía intrínseca de apoptosis de caspasa-8/caspasa-3 y (*R,S*)-**119** induce la activación de caspasa 2 en la línea celular MCF-7<sup>50</sup>.



**Esquema 8.** *Reactivos y condiciones:* a) NaH, DMF, desde -30 °C a -5 °C, 95 min. b) NaOH, H<sub>2</sub>O, 95 °C, 6 h. c) purina, PPh<sub>3</sub>, DIAD, THF anhidro, microondas, 140 °C, 5 min.

#### 4.4. Compuestos *O,N*-acetálicos acíclicos

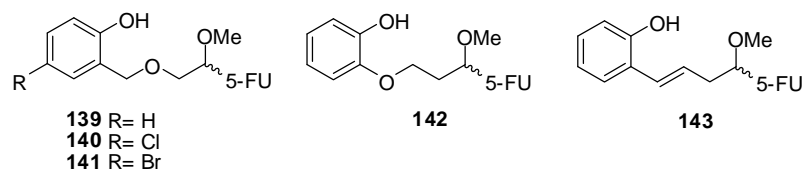
Los compuestos *O,N*-acetálicos acíclicos **20**, **133-138** (Esquema 9) se obtuvieron como subproductos en la reacción tipo Vorbrüggen (ver Esquema 2) llevada a cabo para la síntesis de los derivados cíclicos 1,4-benzodioxepínicos. La naturaleza y posición de los sustituyentes  $R_1$  y  $R_2$  en el derivado acíclico intermedio influye en el rendimiento y regioselectividad de la reacción. Cuando  $R_2$  es Cl, Br o NO<sub>2</sub>, la reacción es regioselectiva hacia la formación de los derivados acíclicos **135-137**. En cambio cuando el sustituyente es OMe (en  $R_1$  o  $R_2$ ) se forma tanto el derivado cíclico (**23** y **24**) como el acíclico (**133** y **134**) en igual proporción. El compuesto **138** se obtuvo por reducción con cloruro de estaño de **137** (Esquema 9)<sup>34</sup>.



**Esquema 9.** *Reactivos y condiciones:* a) 5-FU, HMDS, TMS-Cl,  $SnCl_4/CH_2Cl_2$ ,  $CH_3CN$ , 24 h, ta. b)  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ , EtOH, 2h, reflujo.

El compuesto **137** es el agente antiproliferativo más activo frente a la línea celular MCF-7 en esta serie de compuestos ( $CI_{50} = 5.42 \mu M$ ). Los compuestos **135** y **136** detienen el ciclo celular en fase  $G_2/M$  a expensas de la fase S (28.99 % y 20.66 % respectivamente frente al 12.04 % del control) y el compuesto **20** destaca por su capacidad apoptótica de 59.9 % frente al 1.24 % del control a las 24 h de tratamiento. Cabe mencionar que el agente más potente **137** no presenta toxicidad cuando se administra a ratones vía intravenosa durante un mes de tratamiento (dosis de 50 mg/kg) dos veces por semana<sup>34</sup>.

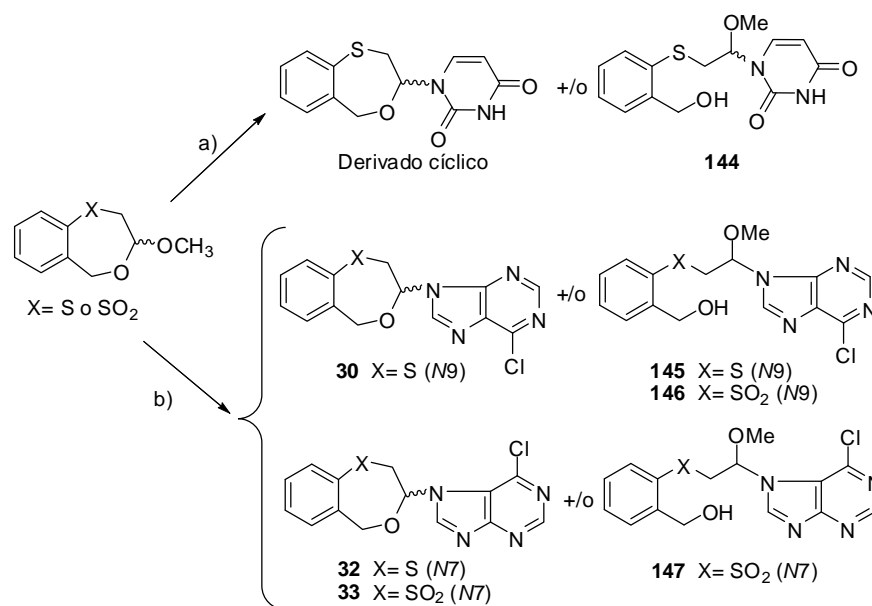
Los siguientes estudios de *O,N*-acetales acíclicos se llevaron a cabo sobre los compuestos **139-143** (Figura 17) en los que se analizó su capacidad de diferenciación mediante la medición de incremento de lípidos intracelulares<sup>51,52</sup>. Todos aumentan el contenido en lípidos intracelular a excepción de **139**. El 5-FU tampoco provoca este incremento, por lo que el mecanismo de acción antiproliferativo de **140-143** debe diferir del correspondiente a **139** y 5-FU<sup>53</sup>.



**Figura 17.** Compuestos *O,N*-acetálicos acíclicos con capacidad de diferenciación, a excepción de **139**.

Los productos derivados del alcohol 2-mercaptobencílico también se estudiaron como agentes antiproliferativos. El compuesto **144** se obtuvo partiendo del intermedio cíclico *O,O*-acetálico (Esquema 10) y utilizando tanto triflato de trimetil sililo (TMSOTf), triflato de escandio ( $ScOTf_3$ ) o cloruro de estaño ( $SnCl_4$ ) como ácidos de Lewis en la

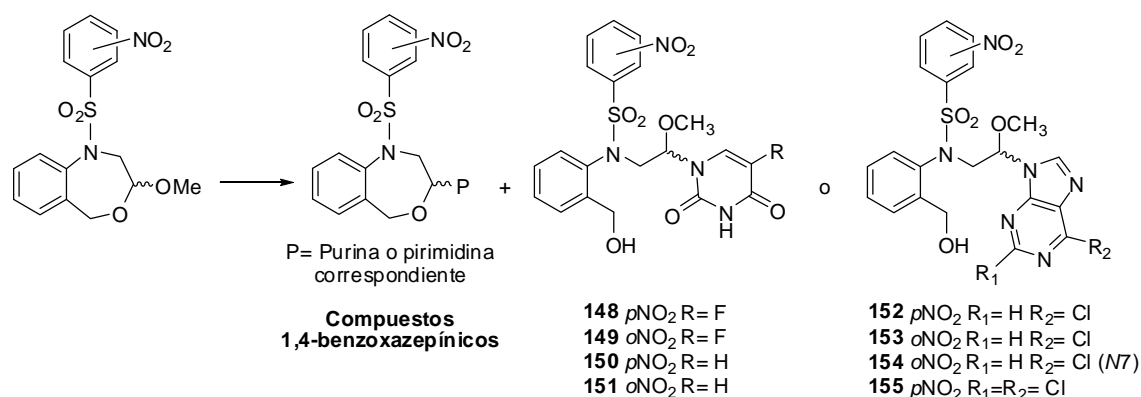
reacción de Vorbrüggen con un rendimiento aproximado del 50%, siendo menor el rendimiento del derivado cíclico. En la reacción de obtención de **30** y **32**, se utilizó TMSOTf y SnCl<sub>4</sub> como ácidos de Lewis respectivamente y en ambas reacciones se forma **145** como producto minoritario (4-13%). Los productos **146** y **147** se obtuvieron en la reacción de **33** con SnCl<sub>4</sub>, siendo el mayoritario **147** (19 %) y obteniéndose **33** y **146** con un rendimiento del 12 %<sup>39</sup>.



**Esquema 10.** *Reactivos y condiciones:* a) Uracilo, HMDS, TMS-Cl, ácido de Lewis, CH<sub>3</sub>CN, 24-72 h, ta. b) Cloropurina, HMDS, TMS-Cl, ácido de Lewis, CH<sub>3</sub>CN, 20 h, 45 °C.

Las actividades antiproliferativas de los derivados **144-147** frente a la línea celular MCF-7 son moderadas con valores de CI<sub>50</sub> de 27.5 μM para **144** y de 40-82 μM para **145-147**<sup>39</sup>.

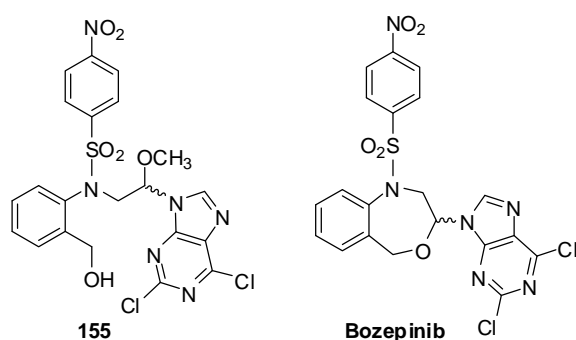
Para la obtención de los compuestos 1,4-benzoxazepínicos<sup>43,54</sup> (Esquema 11), se observó que cuando se utiliza el *p*-nitroderivado como producto de partida en la reacción, la proporción de obtención de compuesto acíclico/cíclico es mayor (acíclico/cíclico= 22/17) que utilizando el *o*-nitroderivado (13/34)<sup>54</sup>.



**Esquema 11.** a) Base púrica o pirimidínica, HMDS, TMS-Cl, SnCl<sub>4</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN anhidro, 50 °C, 24-72 h para **148-154** y 140 °C, microondas, 5 min para **155**. La unión de la pirimidina es siempre por posición *N*-1 y la de la purina por *N*-9, a excepción de **142** (*N*7).

El estudio de las actividades antiproliferativas de **148-155** demuestra que los derivados de purina presentan mayor potencia antiproliferativa que sus análogos de pirimidina, al igual que ocurre en los *O,N*-acetales cíclicos, siendo la media de las CI<sub>50</sub> de 8.4 μM para los derivados de purina frente a 64.2 μM de los de pirimidina<sup>42,43</sup>.

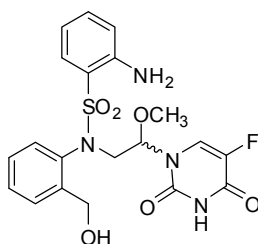
El compuesto con mejor actividad antiproliferativa es el derivado **155** (Figura 17) que presenta valores de CI<sub>50</sub> de rango nanomolar muy similares a su análogo cíclico bozepinib (CI<sub>50</sub> de 355 nM frente MCF-7 y de 409 nM frente MDA-MB-231). Además, su IT es de 5.25 frente a células MCF-7 y de 4.55 frente a células MDA-MB-231<sup>43</sup>. Estudios posteriores de microarrays llevados a cabo en el compuesto **154** indican que las dianas farmacológicas de estos compuestos son genes reguladores de la apoptosis y genes involucrados en la carcinogénesis<sup>55</sup>.



**Figura 17.** *O,N*-acetal acíclico con mejor actividad antiproliferativa y su análogo cíclico bozepinib.

El último estudio relacionado con compuestos acíclicos se centró en el compuesto **156** (Figura 18), producto de reducción del derivado **149** (Esquema 11). El compuesto **156** presenta una potente inhibición frente a MCF-7 (CI<sub>50</sub> = 1.09 M) y un IT de 34.5. Su capacidad apoptótica es incluso mayor que la del compuesto **108**, con un porcentaje de

apoptosis tardía de 77.40 % a las 48 h de tratamiento frente a MCF-7. Además, su mecanismo de acción está relacionado con genes proapoptóticos relacionados con la apoptosis inducida por el retículo endoplásmico como *BBC3* y *Noxa*<sup>56</sup>. El descubrimiento de la selectividad de este compuesto acíclico apoptótico vía retículo endoplásmico supone la apertura de una línea de investigación novedosa en el campo de la actividad anticancerosa.



156

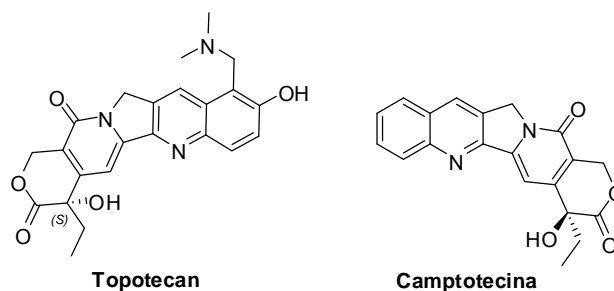
**Figura 18.** *O,N*-acetal acíclico que induce apoptosis vía retículo endoplásmico.

## 5. Fluorescencia en fármacos

La fluorescencia es una técnica muy útil para dilucidar el mecanismo de acción de un fármaco a nivel celular, así como para conocer su distribución en el organismo a nivel macroscópico. El conocimiento de estos procesos es crucial para el diseño de fármacos más eficientes y con menos efectos secundarios, aunque dicho conocimiento no siempre está disponible debido a las limitaciones de los métodos experimentales que se utilizan. Sin embargo, la emisión de fluorescencia es una técnica sencilla que facilita de forma radical este tipo de estudios.

La aplicación de las técnicas de fluorescencia no es siempre fácil debido a que sólo se conocen algunos ejemplos de fármacos que poseen fluorescencia intrínseca y la disponibilidad de análogos fluorescentes del fármaco diana, es decir, de compuestos que presenten las mismas propiedades que el fármaco y además emitan fluorescencia con intensidad, no es muy grande.

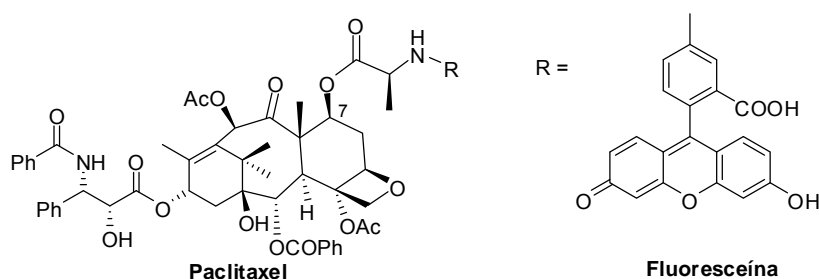
Dos ejemplos de fármacos que emiten fluorescencia intrínseca<sup>57</sup> son los antitumorales topotecan y camptotecina, cuyas estructuras se muestran en la Figura 19.



**Figura 19.** Estructuras químicas de fármacos antitumorales con fluorescencia intrínseca topotecan y camptotecina.

Sin embargo, lo más frecuente es que el fármaco no presente fluorescencia, por lo que se recurre a la obtención de un análogo fluorescente. La introducción de fluorescencia en el fármaco se puede llevar a cabo mediante unión covalente de grupos fluorescentes denominadas etiquetas o construyendo el fluoróforo sobre la estructura original del fármaco.

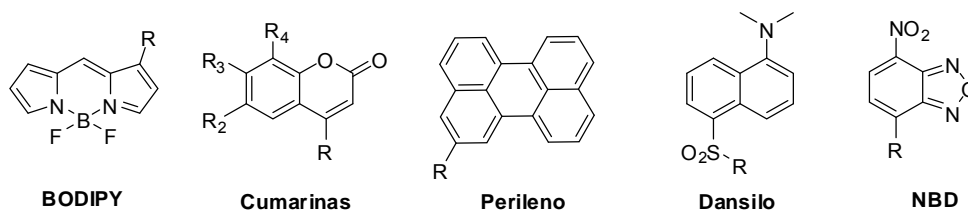
Las etiquetas fluorescentes se unen al fármaco covalentemente a través de un sustituyente reactivo del fármaco, como por ejemplo un grupo  $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOH}$  u  $\text{OH}$  entre otros. El mecanismo de acción del fármaco paclitaxel, ampliamente utilizado como antitumoral en la actualidad, se conoce por el estudio de un análogo fluorescente donde se introdujo un grupo emisor fluoresceína a través de un grupo L-alanina en posición 7 del paclitaxel<sup>58</sup> (Figura 20). La fluorescencia emitida por este análogo ha permitido identificar el sistema de microtúbulos celular como diana terapéutica del paclitaxel, que presenta actividad antitumoral por la estabilización de dicho sistema.



**Figura 20.** Análogo fluorescente del fármaco antitumoral paclitaxel obtenido por derivatización a través de un grupo L-alanina en posición 7.

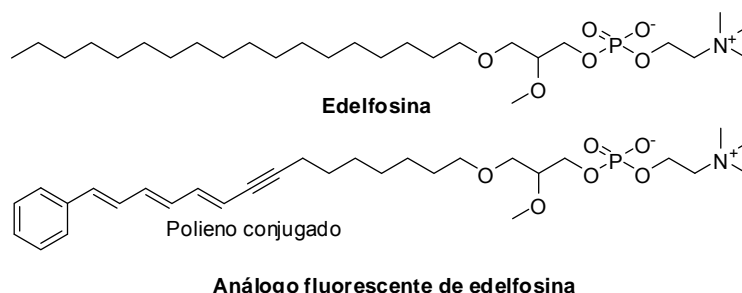
Aunque siempre hay que tener en consideración que la introducción de este grupo fluorescente en el fármaco a modo de etiqueta no garantiza que el fármaco mantenga sus propiedades biológicas anteriores, existen etiquetas fluorescentes<sup>59</sup> comerciales para una gran diversidad de grupos funcionales. Entre las etiquetas fluorescentes más utilizadas se encuentran los BODIPYs (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno), cumarinas,

perileno, dansilo (5-*N,N*-dimetilamino-1-naftalensulfonilo) y NBD (7-nitrobenzo-[2,3-d]-2-oxa-1,3-diazol) (Figura 21).



**Figura 21.** Estructura de algunos grupos fluorescentes para el etiquetado de fármacos.

Otro método de obtención de análogos fluorescentes consiste en construir el grupo fluoróforo como parte de la estructura original del fármaco. Un ejemplo de ello es el diseño llevado a cabo por Castro *et al.*, que sintetizan los lípidos con actividad antitumoral edelfosina y miltefosina conteniendo grupos polieno conjugados<sup>60</sup> con propiedades fluorescentes (Figura 22), permitiendo estudiar el papel de estos lípidos en las membranas de células apoptóticas.



**Figura 22.** Lípido fluorescente utilizado para el seguimiento del mecanismo de acción de la edelfosina.

En este caso, se evitan muchos inconvenientes de la introducción de etiquetas en el fármaco como son el incremento de masa y dimensiones moleculares, la posible variación de carga y punto isoeléctrico del compuesto y la alteración del balance hidro-lipófilo del fármaco<sup>60</sup>. Sin embargo, para llevar a cabo este segundo método debemos considerar la fluorescencia desde el inicio del diseño del fármaco, lo que también presenta desventajas y no siempre se puede llevar a cabo. En la Tabla 1 se presentan las principales ventajas e inconvenientes de la utilización de BODIPY, NBD, dansilo y polieno como métodos de obtención de análogos fluorescentes de fármacos.



	<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconveniente</b>
<b>BODIPY</b>	Etiqueta Fluorescente	Ampliamente utilizado Propiedades fotofísicas* adecuadas	Tamaño grande Elevado coste (disponible comercial) Síntesis larga a partir de reactivos más económicos
<b>NBD</b>	Etiqueta Fluorescente	Bajo coste (disponible comercial) Tamaño menor	Presencia de grupos polares Propiedades fotofísicas no siempre adecuadas
<b>Dansilo</b>	Etiqueta Fluorescente	Bajo coste (disponible comercial) Tamaño menor	Presencia de grupos polares Propiedades fotofísicas no siempre adecuadas
<b>Polieno conjugado</b>	Construcción del Fluoróforo	Control más preciso de todas las propiedades	Desde el inicio del diseño Posibles complicaciones en síntesis

\*Propiedades fotofísicas = absorción, rendimiento cuantitativo

**Tabla 1.** Ventajas e inconvenientes de diversos métodos de introducción de un análogo fluorescente en fármacos.

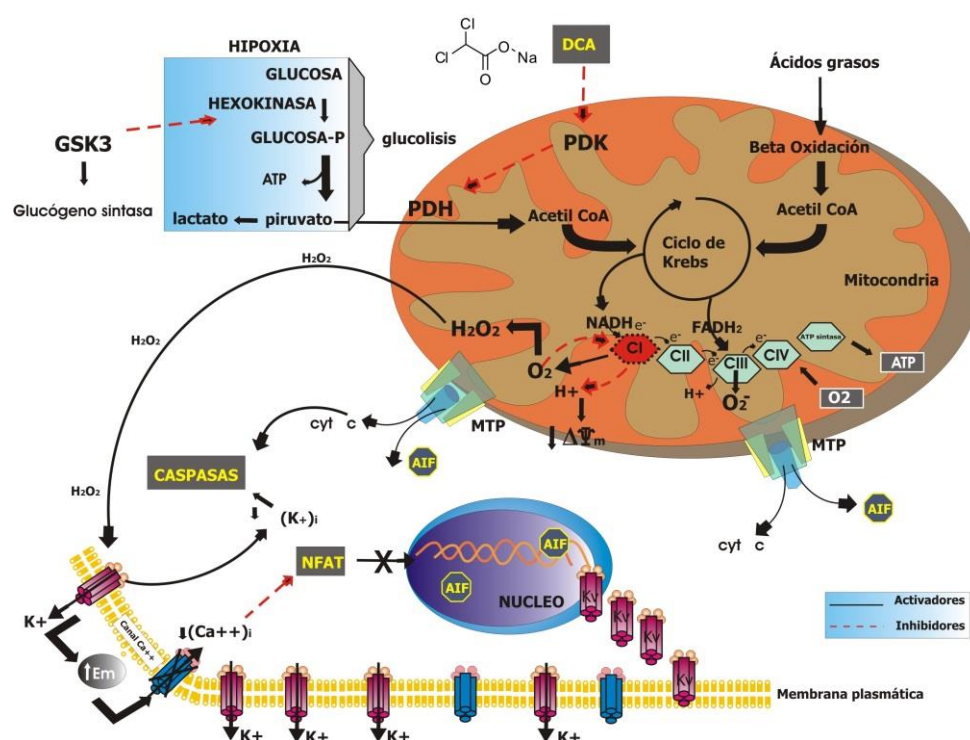
## 6. Importancia del DCA en la terapia antitumoral

El producto químico de uso común dicloroacetato (DCA) es un modulador metabólico que se utiliza como medicamento en el tratamiento de la acidosis láctica desde hace varias décadas. Desde el 2006, se estudia su utilización como agente antitumoral. Michelakis *et al.* en la patente de 2006<sup>61</sup> publicada en 2007 confirman que el DCA es un fármaco prometedor en la lucha contra el cáncer<sup>62</sup>.

El DCA es un derivado conveniente como antitumoral por su mecanismo de acción selectivo en las células cancerosas. Actúa en el único perfil metabólico que caracteriza a la mayoría de los cánceres: oxidación de glucosa mitocondrial. Su efectividad se debe a una doble activación del mecanismo de apoptosis<sup>62</sup>: despolarización de la mitocondria y activación del canal K<sup>+</sup>.

En las células cancerosas, la oxidación de la glucosa mitocondrial está inhibida y la producción de la energía recae en la glucólisis citoplasmática (glucólisis aeróbica). Esta inactividad de la mitocondria induce en la mayoría de los tumores a un estado de resistencia a la apoptosis. Además, el ácido láctico y otros productos acumulados de la glucólisis ayudan a descomponer la matriz extracelular, facilitando la movilidad celular y el potencial de invasión de las células cancerosas, por lo que la inhibición de la glucosa mitocondrial no solo suprime los mecanismos de apoptosis sino que además facilita la evolución y el crecimiento del cáncer<sup>62</sup>.

Se ha observado que el tratamiento con DCA aumenta significativamente la oxidación de la glucosa mitocondrial, permitiendo revertir el proceso de resistencia a la apoptosis y disminuir el crecimiento celular anormal *in vitro* e *in vivo*. Las vías de inducción de la apoptosis por el DCA son en consecuencia: despolarización mitocondrial con salida de mediadores proapoptóticos e incremento en la expresión de los canales Kv. Cabe destacar que el DCA solo actúa sobre mitocondrias que están hiperpolarizadas<sup>61</sup>, por lo que no afecta a células sanas ni causa toxicidad sistémica.



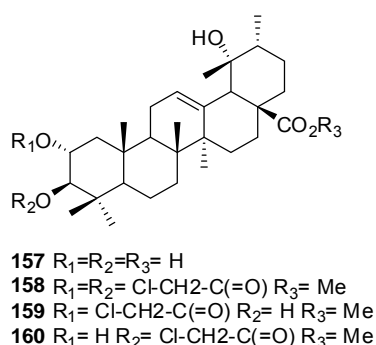
**Figura 23.** Mecanismo de acción del DCA.

El DCA inhibe a la quinasa piruvato deshidrogenasa (PDK). Esta quinasa inactiva a la enzima piruvato deshidrogenasa mitocondrial (PDH) que cataliza la conversión del piruvato en acetil-CoA que alimenta el ciclo de Krebs en la mitocondria. Por tanto, el DCA, al inhibir PDK, reactiva a PDH y permite la oxidación de glucosa en la mitocondria (Figura 23). Esta activación lleva a la producción de  $H_2O_2$  que permite la activación del canal de  $K^+$ . Entonces, la proteína trifuncional mitocondrial (MTP) se abre permitiendo la salida del citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF). El citocromo c también permite la apertura del canal de  $K^+$  en la membrana plasmática y así hiperpolarizan a la célula, inhibiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ . La disminución en la concentración de  $Ca^{2+}$  impide la activación del factor 1 de transcripción (NFAT), por lo que no se mueve al núcleo y aumenta la expresión del canal regulado por voltaje (Kv 1.5). Además la salida de  $K^+$  de la célula disminuye la concentración de  $K^+$  en el interior de la célula, lo que conlleva una activación de las caspasas y desemboca en apoptosis<sup>62</sup>.

Posteriores estudios corroboran la selectividad y efectividad del DCA como candidato en la terapia antitumoral. Así encontramos estudios en cáncer de endometrio<sup>63</sup>, cáncer de mama metastásico<sup>64</sup>, cáncer de próstata<sup>65</sup>, colorrectal<sup>66,67</sup>, en leucemia<sup>68</sup>, en células madre de glioma<sup>69</sup>, en melanoma<sup>70</sup>, en cáncer gástrico<sup>71</sup>, en carcinoma hepatocelular<sup>72</sup>, en cáncer de cerebro<sup>73</sup> y en mieloma<sup>74</sup>. Todos los estudios concluyen que el DCA es un agente antiproliferativo potencial en función de los resultados de sus ensayos *in vitro*. Además, cinco de estos estudios también han dado resultados positivos en ensayos *in vivo*.

El DCA es un compuesto químico sencillo, barato y sobre todo, seguro, ya que lleva más de 30 años en el mercado como medicamento para el tratamiento de la acidosis láctica y es un agente antiproliferativo prometedor. Sin embargo, la dosis utilizada de DCA es elevada y su actividad antiproliferativa no es ideal ( $CI_{50}$  frente a A549 > 1000  $\mu\text{M}$ )<sup>75</sup>. Por ello resulta necesario llevar a cabo modificaciones en la molécula de DCA que mejoren su actividad antitumoral.

Csuk et al<sup>76</sup> diseñaron una serie de moléculas donde fusionan la actividad natural del ácido torméntico (**157**, Figura 24) con diferentes radicales como el cloroacetato (**158-160**). Estos compuestos se ensayaron frente a la línea celular MCF-7 y los derivados con cloroacético resultaron ser las moléculas más activas con valores de  $CI_{50}$  entre 1.5 – 6.9  $\mu\text{M}$ . Además, el compuesto **158** es un excelente agente antitumoral con mecanismo de acción apoptótico.

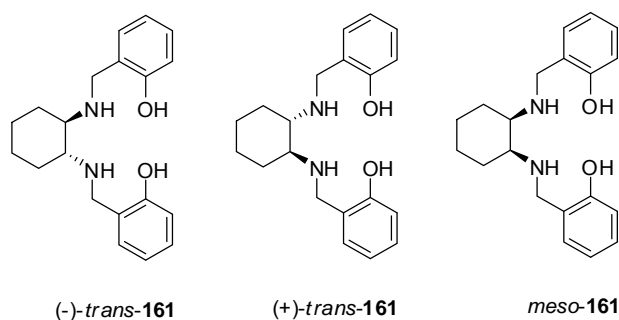


**Figura 24.** Compuestos derivados de cloroacetato con actividad antiproliferativa.

## 7. Diaminas con actividad antitumoral

Las poliaminas macrocíclicas han adquirido últimamente mucha importancia como agentes antitumorales representando una nueva y prometedora línea de agentes citotóxicos<sup>77</sup>.

Las diaminas derivadas del aldehído salicílico representadas en la Figura 25 presentan actividad anticancerosa frente a la línea MCF-7<sup>78</sup>.



**Figura 25.** 1,2-Ciclohexanodiaminas con actividad antiproliferativa frente a la línea celular MCF-7.

Estos compuestos inducen la inhibición de las células cancerosas a concentraciones submicromolares. El compuesto más activo [*(-)-trans-161*] resulta ser más citotóxico frente a la línea cancerosa MCF-7 que frente a la línea no tumoral de mama MCF-10A. Estudios de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real demuestran que *(-)-trans-161* es un regulador extremadamente eficaz de los genes antiapoptóticos Bcl-xl, Bcl-2 y de la ciclina D1. Estudios posteriores confirman que también regulan los niveles de *p53*, con un 32.7 % frente a las células no tratadas<sup>79</sup>.



## **OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene por objeto el desarrollo de fármacos anticancerígenos con menores efectos secundarios a fin de obtener agentes selectivos para el tratamiento antitumoral. Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Diseño de moléculas como fármacos antitumorales con diversidad estructural.
2. Síntesis de las moléculas propuestas mediante la metodología apropiada en cada caso.
3. Caracterización de los compuestos obtenidos utilizando las técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, acrónimo de High Resolution Mass Spectrometry), además de realizar estudios de RMN bidimensional para la asignación inequívoca de todos los átomos de H y C de los derivados.
4. Determinación de la actividad biológica mediante estudios de actividad antiproliferativa en todos los compuestos obtenidos frente a cuatro líneas tumorales y estudio de ciclo celular y apoptosis en los derivados más activos con el fin de profundizar en el mecanismo de acción por el que ejercen su efecto antiproliferativo.
5. Establecimiento de las relaciones estructura-actividad (SARs) y QSARs (acrónimo de Quantitative Structure-Activity Relationships) correspondientes. Estos estudios proporcionan información valiosa para orientar la investigación futura hacia el diseño de estructuras más potentes como agentes antiproliferativos.
6. Análisis de toxicidad en ratones de compuestos seleccionados.
7. Estudio de distribución *in vivo* de compuestos seleccionados empleando la técnica de fluorescencia para su marcaje.



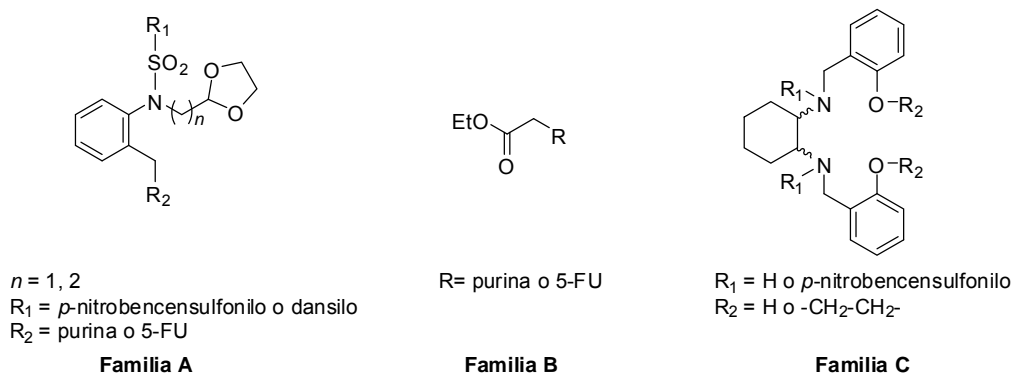


## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han obtenido veintisiete compuestos finales englobados en 3 familias denominadas A, B y C en función de su naturaleza estructural (Figura 26).



**Figura 26.** Estructura general de las tres familias diseñadas.

La familia A está compuesta por 10 derivados de *p*-nitrobenzensulfonilo y cuatro de dansilo que presentan propiedades fluorescentes. Todos se han ensayado como fármacos antiproliferativos frente a cuatro líneas tumorales (MCF-7, HCT-116, A375 y G361). Los seis compuestos más activos han sido seleccionados para estudiar su actuación sobre el ciclo celular y capacidad para inducir apoptosis en la línea celular en la que manifiestan la mayor actividad antiproliferativa (A375). Se han llevado a cabo ensayos de toxicidad en ratones sobre el derivado más activo. Además, se han realizado estudios de distribución *in vivo* de un compuesto seleccionado.

La familia B engloba seis compuestos derivados de purina y dos de 5-FU fusionados a un resto de acetato de etilo. Se ha estudiado la actividad antiproliferativa de todos ellos frente a las líneas celulares anteriormente mencionadas y se ha conseguido establecer dos ecuaciones QSAR que cumplen con los parámetros estadísticos establecidos. Además, se han llevado a cabo estudios de apoptosis y ciclo celular en los dos compuestos más activos.

La familia C comprende 5 compuestos derivados de 1,2-ciclohexanodiaminas. Todos ellos se han ensayado como fármacos antiproliferativos frente a las cuatro líneas tumorales. Además, se ha estudiado su actuación en el ciclo celular y capacidad apoptótica en la línea tumoral frente a la que presenta mayor actividad antiproliferativa (A375).

Todos los compuestos que no han sido descritos con anterioridad se han identificado por espectroscopía de RMN y espectrometría HRMS. Además, se han realizado estudios de RMN bidimensional.

A continuación se detalla el diseño, preparación, caracterización y estudios biológicos de las familias A, B y C.

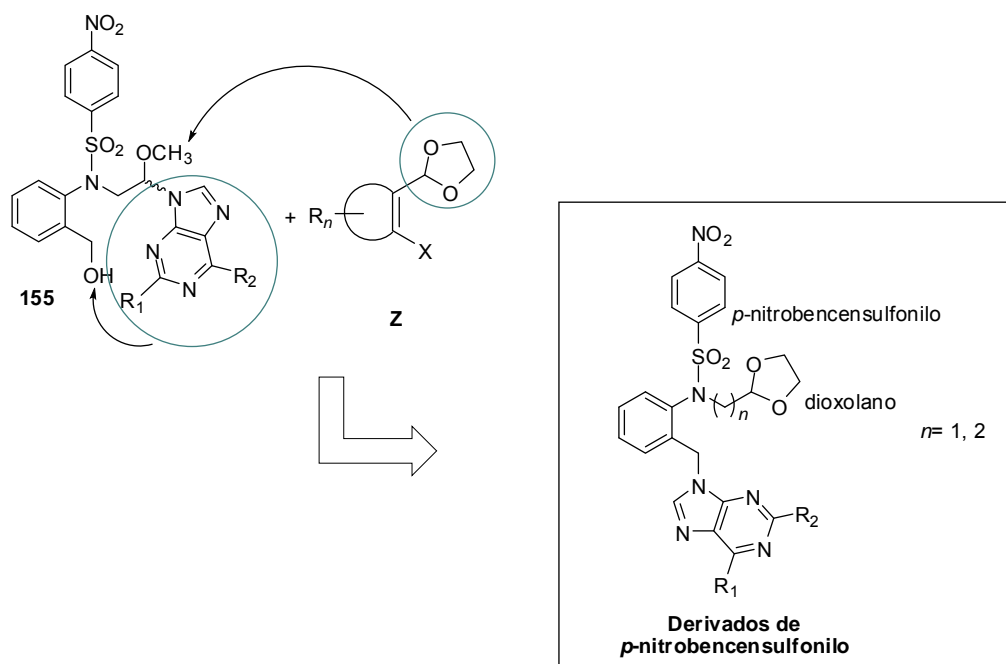
## 1. Familia A

### 1.1. Diseño molecular

Los compuestos *O,N*-acetálicos acíclicos a pesar de ser los menos estudiados presentan actividades biológicas interesantes como agentes antitumorales (ver apartado I.4.4.). Concretamente, el derivado **155** (Figura 27) es un agente antiproliferativo óptimo presentando valores de  $CI_{50}$  de 0.355  $\mu$ M frente MCF-7 y de 0.409  $\mu$ M frente MDA-MB-231. Además, su índice terapéutico es de 5.25 frente a células MCF-7 y de 4.55 frente a células MDA-MB-231<sup>43</sup>.

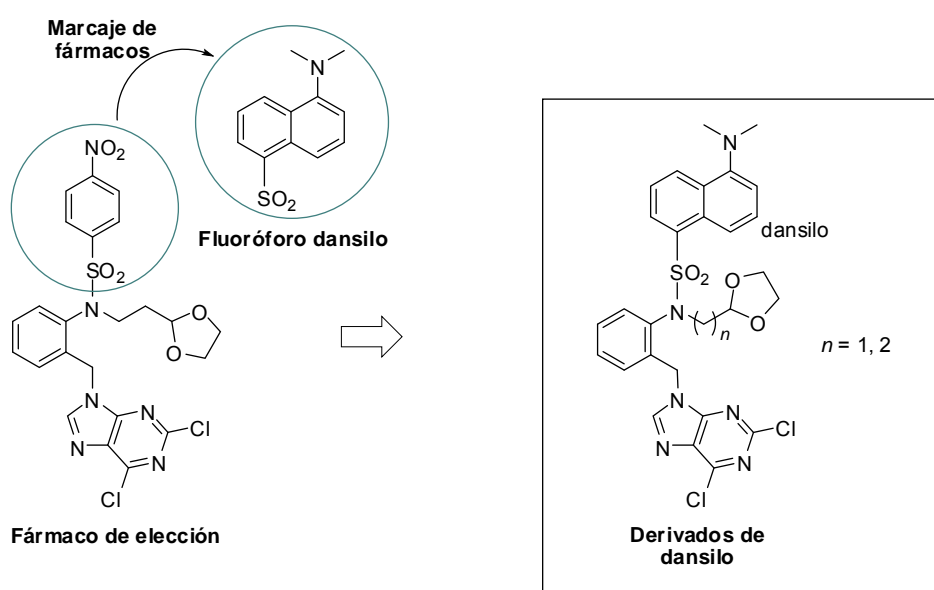
Recientemente se ha descrito la actividad antitumoral de una serie de derivados (**Z**, Figura 27) que presentan un resto de dioxolano en su estructura<sup>80</sup>. Dichos compuestos se recogen en una patente como inhibidores de la proliferación y/o erradicación de células cancerosas, además de cómo inhibidores en células madre cancerosas.

Con el objeto de profundizar en el estudio de compuestos acíclicos, se plantea el diseño y síntesis *de novo* de los derivados de *p*-nitrobenzensulfonilo representados en la Figura 27. Las modificaciones estructurales llevadas a cabo se basan en el cambio de posición del resto de purina al carbono bencílico y consiguiente modificación de la estructura *O,N*-acetálica en la agrupación 1,3-dioxolánica. El resto *p*-nitrobenzensulfonilo se mantiene en dichos derivados ya que se ha demostrado que su presencia aumenta el efecto antiproliferativo<sup>42</sup>. Además, se presentan variaciones en la longitud de la cadena alifática de unión entre la sulfonamida y el resto de dioxolano ( $n= 1$  o  $2$ ). Se ha incluido también el derivado de 5-FU correspondiente.



**Figura 27.** Diseño llevado a cabo para la obtención de los derivados de *p*-nitrobenzensulfonilo pertenecientes a la familia A. La estructura **Z** se protege en la patente de derivados de dioxolano donde el anillo es un ciclo de 4-8 miembros parcialmente insaturado o un anillo aromático,  $n$  es 0-4 y  $X = H, F, Cl, Br$  o  $I$ .

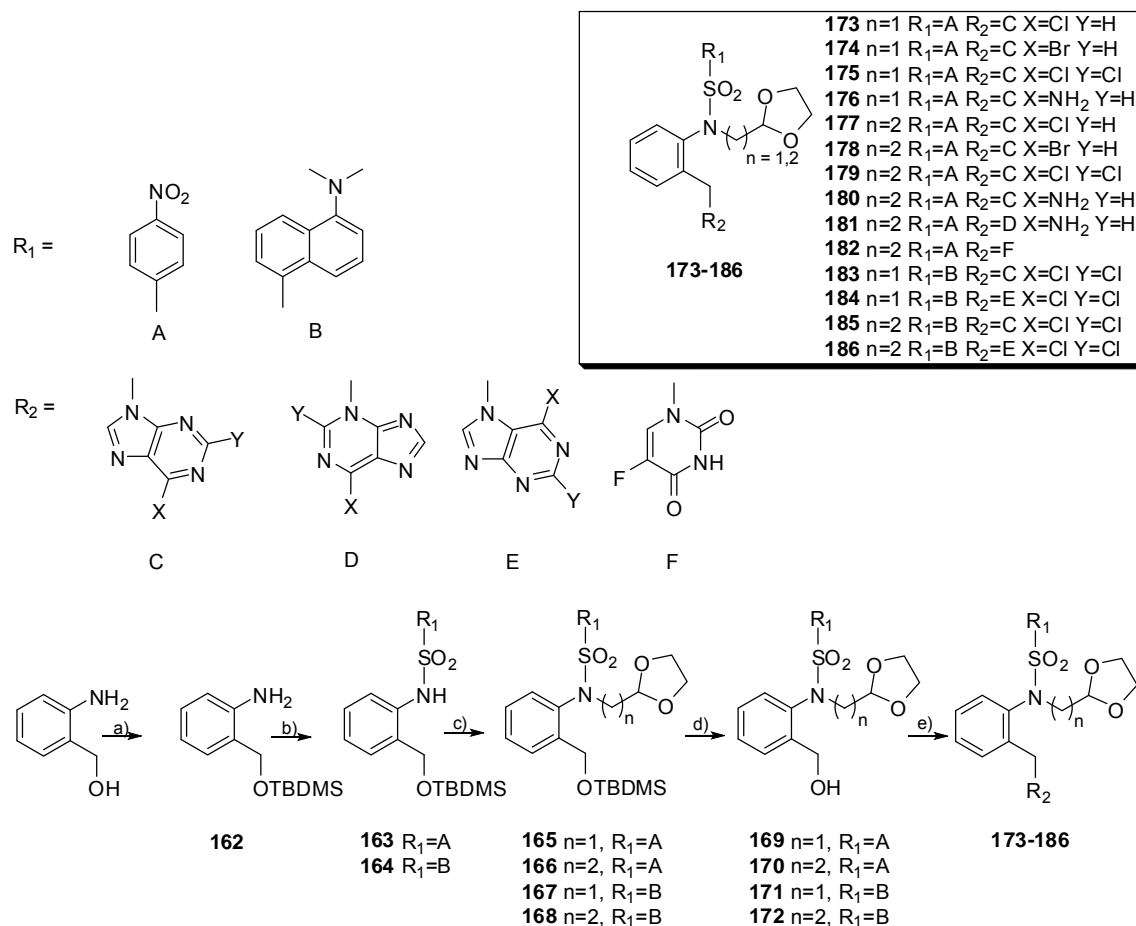
El derivado de *p*-nitrobenzensulfonilo con  $n= 2$  y un resto de 2,6-dicloropurina en su molécula (Figura 28) es el fármaco de elección para el estudio de distribución *in vivo* por ser el derivado que presenta mejor actividad antiproliferativa. Dicho estudio requiere de la técnica de fluorescencia y por tanto del diseño de un análogo fluorescente del compuesto elegido. Para ello, el grupo *p*-nitrobenzensulfonilo se sustituye por el fluoróforo dansilo en la molécula debido a las similitudes que presentan ambos grupos (Figura 28). Además la publicación de un estudio de fluorescencia que incluye varios derivados de dansilo<sup>81</sup> con propiedades antiproliferativas y sin toxicidad aparente en ratones confirma la utilización de dansilo en el diseño de dicho análogo. Con el propósito de llevar a cabo un estudio comparativo de actividades biológicas también se ha incluido el compuesto análogo con  $n= 1$ .



**Figura 28.** Diseño llevado a cabo para la obtención de los derivados de dansilo pertenecientes a la familia A.

## 1.2. Síntesis química

La metodología sintética empleada para la preparación de los compuestos finales **173-186** se detalla en el Esquema 12.

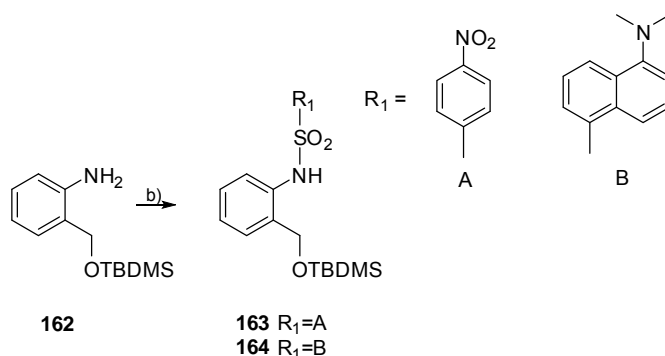


**Esquema 12. Reactivos y condiciones:** a) TBDMS-Cl, DMAP, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, ta, 6h. b) *p*NO<sub>2</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, ta, 3h (para **163**); Ds-Cl, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, 30 °C, 24h (para **164**). c) 2-hidroxi-etil-1,3-dioxolano (**187**, para **165** y **167**) o 2-hidroxi-etil-1,3-dioxolano (**188**, para **166** y **168**), DIAD, PPh<sub>3</sub>, THF anhidro, 30 °C, 21h. d) TBAF, THF anhidro, ta, 3h. e) DIAD (1.1 eq. para **177**, 2.2 eq. para **173-176** y **178-186**), PPh<sub>3</sub> (1.1 eq. para **177**, 2.2 eq. para **173-176** y **178-186**), THF anhidro, 140 °C (para **173-178** y **180-182**) o 160 °C (para **179** y **183-186**), microondas, 25min (para **173-178** y **180-186**) o 1 h (para **179**).

El primer paso de la síntesis consiste en la protección del grupo hidroxilo con cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMS), reacción que tiene lugar con rendimiento cuantitativo. Dicha protección se realiza para evitar su posible competencia en la posterior reacción de Mitsunobu.

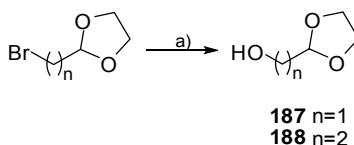


La síntesis de la sulfonamida **163** se realiza utilizando cloruro de *p*-nitrobenzensulfonilo y agitando a temperatura ambiente en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro<sup>82</sup> con rendimiento cuantitativo (Esquema 13). Cuando la reacción se lleva a cabo utilizando estas condiciones pero empleando cloruro de dansilo para obtener la sulfonamida **164**, el rendimiento es menor del 50 %. La presencia del grupo electrón-donante dimetilamino en el dansilo hace que el cloro sea peor grupo saliente. Por ello la reacción se repite a 30 °C añadiendo una base (Et<sub>3</sub>N) y aumentando el tiempo de reacción hasta 24 h consiguiéndose entonces el 100 % de rendimiento (Esquema 13).



**Esquema 13.** *Reactivos y condiciones:* a) *p*-NO<sub>2</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, ta, 3h (para **163**, 100 %); Ds-Cl, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, 30 °C, 24h (para **164**, 100 %).

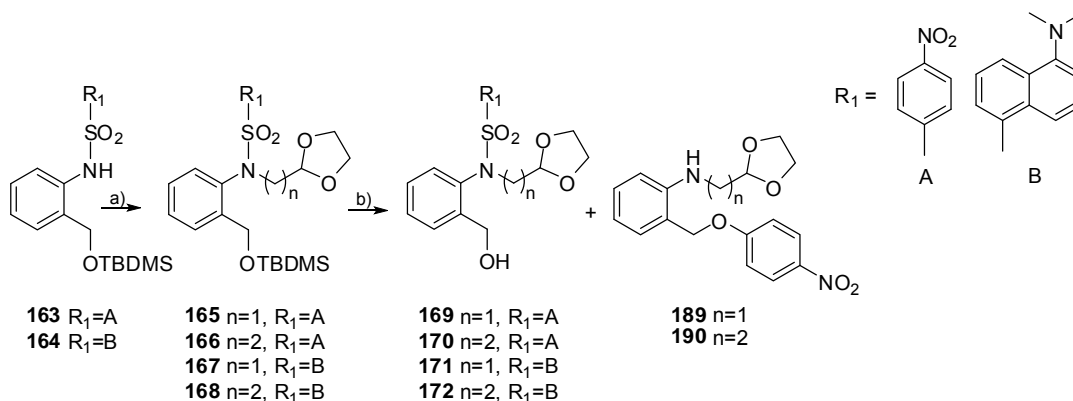
La síntesis de **188** se ha descrito utilizando el 2-(2-cloroetil)-1,3-dioxolano como producto de partida<sup>83</sup>. Con objeto de mejorar el rendimiento de la reacción, los intermedios **187** y **188** se han sintetizado a partir de los correspondientes derivados de bromo (Esquema 14). Sin embargo, los rendimientos obtenidos son similares a los descritos a partir de los correspondientes derivados de cloro.



**Esquema 14.** *Reactivos y condiciones:* a) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10·H<sub>2</sub>O/NaOH, 160 °C, 6h (24 % para **187** y 36 % para **188**).

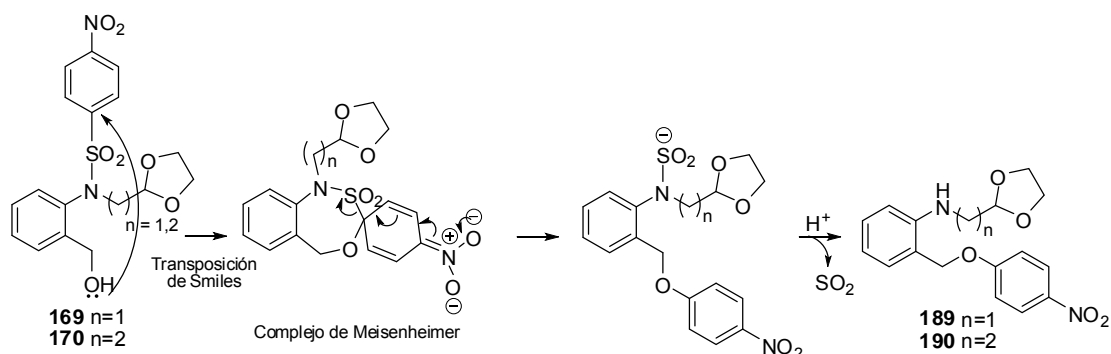
La introducción del resto que lleva el anillo de dioxolano se lleva a cabo por reacción de Mitsunobu. Aunque el azodicarboxilato de dietilo (DEAD) es el reactivo tradicional, se ha reemplazado por el azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) ya que es más económico y fácil de manejar<sup>84</sup>. El grupo *p*-nitrobenzensulfonilo presente en **163** facilita la reacción de Mitsunobu, al ser un grupo activante que disminuye el p*K*<sub>a</sub> del grupo N-H<sup>82</sup>. Cabe mencionar que la reacción se obtiene con un 68 - 91 % de rendimiento y no conlleva los problemas de purificación de las reacciones de Mitsunobu clásicas<sup>84</sup> como son

los de las eliminaciones del óxido de trifenilfosfina y del 1,2-hidrazinodicarboxilato de diisopropilo (etapa a, Esquema 15).



**Esquema 15.** *Reactivos y condiciones:* a) **187** (para **165** y **167**) o **188** (para **166** y **168**), DIAD,  $PPh_3$ , THF anhidro, 30 °C, 21h (84 % para **165**, 71 % para **166**, 68 % para **167** y 91 % para **168**). b) TBAF, THF anhidro, ta, 3h (48 % para **169**, 78 % para **170**, 100 % para **171** y **172**, 22 % para **189**, 15 % para **190**).

La desprotección del grupo TBDMS se realiza por tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) obteniéndose los derivados **169**, **170**, **171** y **172**. Mientras que la reacción con el derivado de dansilo transcurre con rendimiento cuantitativo (**171** y **172**), la reacción con el derivado de *p*-nitrobenzensulfonilo tiene un rendimiento menor (**169** y **170**) debido a la formación de los subproductos (**189** y **190**, etapa b, Esquema 4). La formación de los compuestos **189** y **190** se puede explicar en base a la transposición de Smiles<sup>85</sup> que da lugar a la migración del grupo *p*-nitrofenilo hacia el grupo hidroxilo (Esquema 16) a través de un intermedio espiránico. Aunque los complejos de Meisenheimer son más comunes en los derivados de polinitrobenzeno, se propone la formación del complejo con un derivado de mononitrobenzeno como han descrito Zerner & Blakeley<sup>86</sup>.

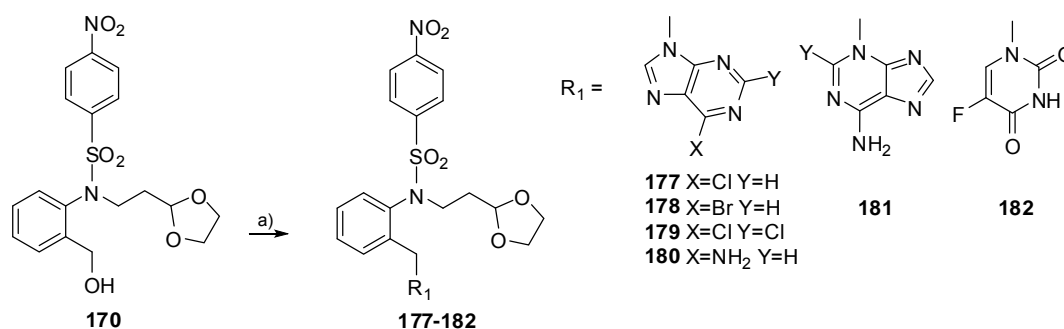


**Esquema 16.** Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los subproductos **189** y **190**.

Los compuestos finales **173-186** se han obtenido mediante reacción de Mitsunobu asistida por microondas. La síntesis orgánica asistida por microondas es un instrumento

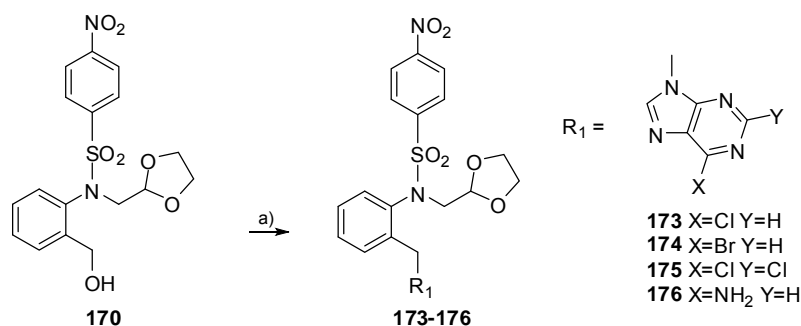
fundamental para la obtención rápida de fármacos. En general, permite no sólo disminuir el tiempo de reacción, al aumentar la temperatura y presión, sino mejorar los rendimientos de los compuestos objetivos.

Para la obtención de **177**, se utilizan las condiciones de reacción descritas<sup>45</sup>: 1.1 equivalentes de PPh<sub>3</sub> y DIAD irradiando la mezcla de reacción a 140 °C durante 5 min y utilizando THF anhidro como disolvente (Esquema 17). Transcurrido ese tiempo el seguimiento de la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF) no muestra la formación de ningún producto nuevo, por lo que se aumenta el tiempo hasta 25 min. La reacción procede con tan sólo un 14 % de rendimiento (compuesto **177**). Aumentado los equivalentes de PPh<sub>3</sub> y DIAD hasta 2.2, se obtiene **178** con un rendimiento del 32 %. En otro intento de mejorar la reacción en la síntesis de **179** se eleva la temperatura hasta 160 °C durante 1 h sin conseguir el deseado aumento de rendimiento. Para la síntesis del derivado de adenina, se decide utilizar las condiciones de 140 °C durante 25 min y 2.2 equivalentes de PPh<sub>3</sub> y DIAD. A diferencia de los tres compuestos anteriores (**177**, **178** y **179**) en este caso se aísla el isómero *N*-3 (**181**) además del *N*-9 (**180**). El grupo amino presente en la adenina hace que el *N* en posición 3 del anillo de purina sea más nucleófilo. La identificación de dichos isómeros viene detallada en el análisis espectroscópico que se describe a continuación (apartado III.1.3.1.). El compuesto **182** se obtiene calentando a 100 °C durante 10 min ya que cuando la reacción se lleva a cabo a 140 °C durante 25 min los espectros de RMN muestran la degradación del producto. Se obtiene el isómero *N*-1 (**182**), identificado y caracterizado por RMN (ver apartado III.1.3.1.).



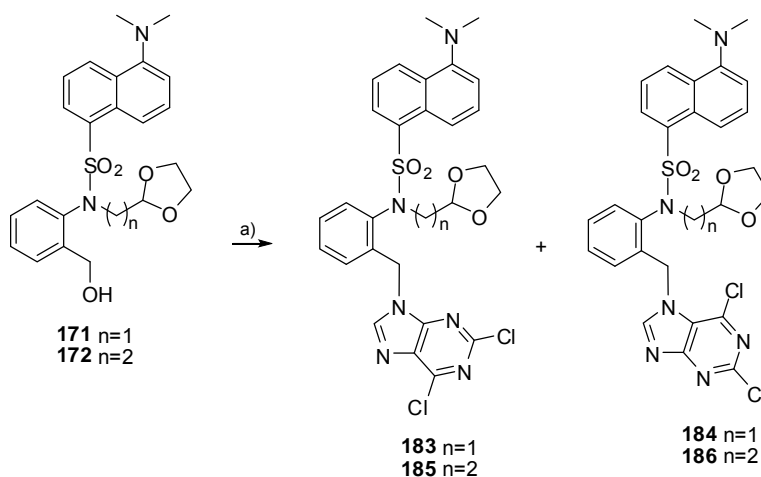
**Esquema 17.** *Reactivos y condiciones:* a) DIAD, PPh<sub>3</sub>, THF anhidro, 140 °C (para **177**, **178** y **180-182**) o 160 °C (para **179**), microondas, 25min (para **177**, **178** y **180-182**) ó 1 h (para **179**) (14 % para **177**, 32 % para **178**, 32 % para **179**, 48 % para **180**, 25 % para **181**, 17 % para **182**).

Los compuestos **173-176** (Esquema 18) se obtienen aplicando las condiciones que dan un mayor rendimiento en la obtención de **177-182**: 2.2 equivalentes de PPh<sub>3</sub> y DIAD calentando a 140 °C durante 25 min. Solamente se obtienen los isómeros *N*-9 en esta serie de compuestos, incluyendo al derivado con adenina.



**Esquema 18.** Reactivos y condiciones: a) DIAD, PPh<sub>3</sub>, THF anhidro, 140 °C, microondas, 25 min (53 % para **173**, 44 % para **174**, 53 % para **175**, 18 % para **176**).

En la síntesis de **183** y **184** (Esquema 19), la mezcla de reacción se irradia a 140 °C durante 25 minutos. Transcurrido ese tiempo, el seguimiento de la reacción mediante CCF no mostraba la formación de ningún otro producto, por lo que se decide irradiar la mezcla a 160 °C durante 25 minutos adicionales. El seguimiento por CCF revela la aparición de un nuevo producto que tras purificación en columna y caracterización con estudios de RMN bidimensionales (ver apartado III.1.3.2.) se identifica como el isómero *N*-7 (**184**). También se aísla el isómero *N*-9 (**183**) cuyo factor de retención ( $R_f$ ) coincide con el del producto de partida. El rendimiento total de esta reacción es del 80 %, obteniéndose los isómeros *N*-9 (**183**) y *N*-7 (**184**) en la misma reacción. La síntesis de **185** y **186** (Esquema 19) se lleva a cabo irradiando a 160 °C durante 25 minutos obteniéndose de nuevo los isómeros *N*-9 (**185**) y *N*-7 (**186**) con un rendimiento total del 82 %.



**Esquema 19.** Reactivos y condiciones: a) DIAD, PPh<sub>3</sub>, THF anhidro, 160 °C, microondas, 25min (62 % para **183**, 13 % para **184**, 75 % para **185**, 7 % para **186**).

### 1.3. Análisis espectroscópico

Todos los compuestos que no han sido descritos con anterioridad se han identificado por espectroscopía de RMN tanto de  $^1\text{H}$  (300, 400, 500 o 600 MHz) como de  $^{13}\text{C}$  (75, 125 o 150 MHz), espectrometría de HRMS y análisis elemental. Además, se han llevado a cabo estudios de RMN bidimensional HSQC (acrónimo de Heteronuclear Multi-Bond Correlation) y HMBC (acrónimo de Heteronuclear Multi-Quantum Correlation) para la asignación inequívoca de los desplazamientos químicos de todos los átomos de H y C en todos los compuestos. Los espectros y estudios bidimensionales se encuentran detallados en el anexo a este documento.

Los productos se han dividido en dos grupos para facilitar su análisis espectroscópico: derivados de *p*-nitrobencensulfonamido y derivados de dansilo.

Los datos espectroscópicos se presentan recogidos en tablas que muestran las estructuras químicas de los compuestos acompañada de una explicación detallada de las señales. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hz (ciclos por segundo). El aspecto y la multiplicidad de las señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: (s) singlete; (d) doblete; (dd) doblete; (ddd) doblete; (t) triplete; (pst) pseudotriplete; (m) multiplete. El disolvente empleado es cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) en todos los casos. La numeración de los compuestos aparece en función de las reglas establecidas por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) eligiendo como función principal en los compuestos finales la purina y 5-FU, al ser el elemento estructural común de todos ellos.

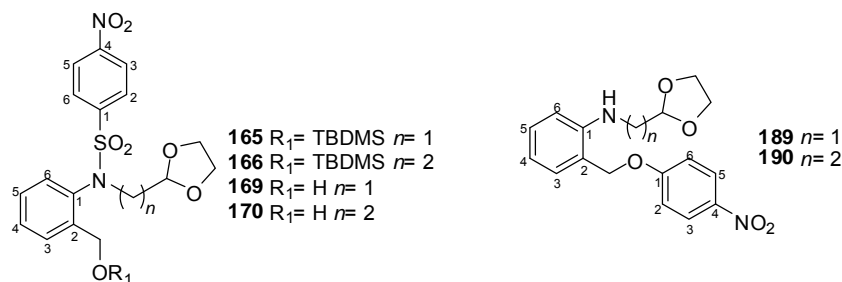
#### 1.3.1. Derivados de *p*-nitrobencensulfonamido

En este apartado, se lleva a cabo el análisis espectroscópico de los compuestos intermedios (**165**, **166**, **169** y **170**) y finales (**173-182**) derivados de *p*-nitrobencensulfonilo. Se incluye además el análisis espectroscópico de los productos **189** y **190** obtenidos durante la síntesis de este grupo de compuestos.

Los datos espectroscópicos de los compuestos de este grupo aparecen recogidos en las Tablas 2-9. En ellas, se muestran los valores de desplazamiento químico en primer lugar y entre paréntesis las multiplicidades y las constantes de acoplamiento.

Los espectros bajo estudio contienen dos zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes a los dos anillos aromáticos; y b) zona alifática, correspondiente a los protones bencílicos, al grupo *tert*-butildimetilsililo, al dioxolano y a los protones de los grupos metilénicos de la cadena que unen a la sulfonamida y al anillo de dioxolano.

Las señales espectroscópicas de  $^1\text{H}$ -RMN correspondientes a la zona aromática de los compuestos **165**, **166**, **169**, **170**, **189** y **190** aparecen recogidas en la Tabla 2.



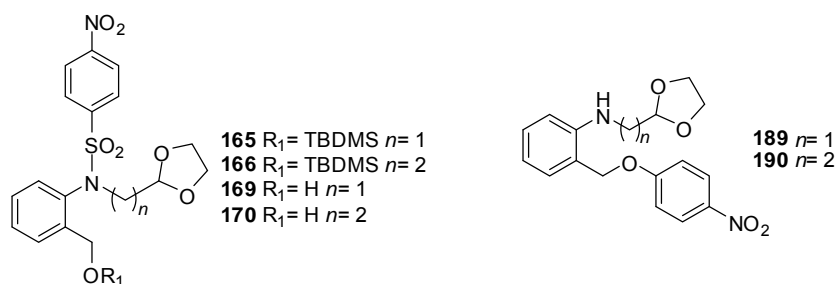
Comp	H <sub>3,5</sub> <sub>PhNO<sub>2</sub></sub>	H <sub>2,6</sub> <sub>PhNO<sub>2</sub></sub>	H <sub>3</sub> <sub>Ph</sub>	H <sub>4</sub> <sub>Ph</sub>	H <sub>5</sub> <sub>Ph</sub>	H <sub>6</sub> <sub>Ph</sub>
<b>165</b>	8.33 (d, 9.0)	7.85 (d, 9.0)	7.69 (dd, 7.7, 1.1)	7.39 (ddd, 7.7, 7.4, 1.1)	7.11 (ddd, 7.8, 7.4, 1.1)	6.47 (dd, 7.8, 1.1)
<b>166</b>	8.32 (d, 8.6)	7.84 (d, 8.6)	7.66 (d, 7.5)	7.35 (pst, 7.5)	7.10 (pst, 7.5)	6.43 (d, 7.5)
<b>169</b>	8.34 (d, 9.0)	7.83 (d, 9.0)	7.64 (dd, 7.6, 1.5)	7.40 (ddd, 7.6, 7.5, 1.2)	7.17 (ddd, 7.6, 7.5, 1.5)	6.40 (dd, 7.6, 1.2)
<b>170</b>	8.35 (d, 8.8)	7.84 (d, 8.8)	7.67 (d, 7.7)	7.41 (pst, 7.7)	7.18 (pst, 7.7)	6.41 (d, 7.7)
<b>189</b>	8.21 (d, 9.3)	7.08 (d, 9.3)	7.21 (dd, 7.7, 1.6)	6.80 – 6.72 (m)	7.28 (ddd, 7.8, 7.6, 1.6)	6.80 – 6.72 (m)
<b>190</b>	8.22 (d, 9.2)	7.08 (d, 9.2)	7.21 (dd, 7.3, 1.3)	6.75 – 6.72 (m)	7.30 (ddd, 7.9, 7.6, 1.3)	6.75 – 6.72 (m)

**Tabla 2.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a la zona aromática de los compuestos **165**, **166**, **169**, **170**, **189** y **190**.

Los átomos H<sub>3</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub> y H<sub>5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub> aparecen como un d (δ 8.35 – 8.32 ppm) por su acoplamiento con H<sub>2</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub> y H<sub>6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub> (*J* = 9.3 – 8.6 Hz), que también aparecen como un d pero a campo más alto (δ 7.85 – 7.84 ppm). En los compuestos **189** y **190**, las señales correspondientes a H<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub> y H<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub> aparecen también como d pero a campo más alto (δ 8.22 y 7.08 ppm) al estar presente el grupo éter en lugar del sulfonamido.

Con respecto a las señales del otro anillo aromático, se observa que los hidrógenos 3 y 6 en los compuestos **165**, **169**, **189** y **190** aparecen como dd entre δ 7.69 y 6.40 ppm debido al acoplamiento a corta distancia (*J* = 7.8 – 7.3 Hz) con H<sub>4</sub><sub>Ph</sub> o H<sub>5</sub><sub>Ph</sub> y a larga distancia (*J* = 1.6 – 1.1 Hz) con H<sub>5</sub><sub>Ph</sub> o H<sub>4</sub><sub>Ph</sub>, mientras que en los compuestos **166** y **170** aparecen como d (δ = 7.67 – 6.41 ppm) por su acoplamiento con H<sub>4</sub><sub>Ph</sub> y H<sub>5</sub><sub>Ph</sub> (*J* = 7.7 – 7.5 Hz). Las señales H<sub>4</sub><sub>Ph</sub> y H<sub>5</sub><sub>Ph</sub> aparecen como ddd entre δ 7.40 – 7.11 ppm por el acoplamiento a corta distancia (*J* = 7.9 – 7.4 Hz) con H<sub>3</sub><sub>Ph</sub> o H<sub>6</sub><sub>Ph</sub> y con H<sub>5</sub><sub>Ph</sub> o H<sub>4</sub><sub>Ph</sub>, y a larga distancia (*J* = 1.6 – 1.1 Hz) con H<sub>6</sub><sub>Ph</sub> o H<sub>3</sub><sub>Ph</sub>. En los compuestos **166** y **170**, estas dos señales aparecen como pts (*J* = 7.7 - 7.5 Hz) en lugar del dd teórico. Las señales H<sub>4</sub><sub>Ph</sub> y H<sub>6</sub><sub>Ph</sub> en los compuestos **189** y **190** aparecen como m entre δ 6.80 – 6.72 ppm.

La segunda zona del espectro corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales que se presentan a continuación (Tabla 3):



Comp	Ph-CH <sub>2</sub>	MH	N-CH <sub>2</sub>	N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> diox	CH <sub>diox</sub>	CH <sub>3</sub> -C-Si	CH <sub>3</sub> -Si
<b>165</b>	5.02 (d, 14.4)		3.91 (dd, 14.1, 5.1)		3.89 – 3.77	4.96	0.97	0.12
	4.94 (d, 14.4)		3.48 (dd, 14.1, 5.1)		(m)	(pst, 4.7)	(s)	(s)
<b>166</b>	4.94 (d, 14.3)		4.03 – 3.92 (m)	2.03 – 1.89 (m)	3.92 – 3.75	4.80	0.92	0.02
	4.87 (d, 14.3)		3.43 – 3.30 (m)	1.80 – 1.65 (m)	(m)	(pst, 4.4)	(s)	(s)
<b>169</b>	4.93 (d, 12.5)		3.98 (dd, 14.0, 4.1)		3.95 – 3.80	5.07		
	4.75 (d, 12.5)		3.32 (dd, 14.0, 5.7)		(m)	(dd, 5.6, 4.1)		
<b>170</b>	4.84 (d, 12.6)		4.05 – 3.96 (m)	1.96 – 1.83 (m)	3.91 – 3.71	4.80		
	4.63 (dd, 12.6, 7.4)		3.35 – 3.23 (m)	1.72 – 1.60 (m)	(m)	(pst, 4.2)		
<b>189</b>	5.14	4.62	3.39		3.97 – 3.86	5.15 – 5.11		
	(s)	(s)	(d, 3.8)		(m)	(m)		
<b>190</b>	5.14	4.97	3.31	2.07 - 1.99	3.91 – 3.63	4.95		
	(s)	(s)	(t, 6.2)	(m)	(m)	(t, 4.4)		

**Tabla 3.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a la zona alifática de **165**, **166**, **169**, **170**, **189** y **190**.

Los átomos de hidrógeno correspondientes al MH de los compuestos **189** y **190** aparecen como s, resonando entre  $\delta$  4.97 - 4.62 ppm.

En los compuestos **165**, **166**, **169** y **170**, los hidrógenos bencílicos son diastereotópicos y resuenan entre  $\delta$  5.02 – 4.75 ppm. Las señales aparecen como dos d ( $J_{\text{gem}} = 14.4 - 12.5$  Hz). Sin embargo, en los compuestos **189** y **190**, aparecen como un s a  $\delta$  5.14 ppm.

Los hidrógenos correspondientes a los metilenos de la cadena de unión entre la sulfonamida y el anillo de dioxolano en los compuestos **165**, **166**, **169** y **170** son también diastereotópicos. Las señales de los átomos de hidrógeno de N-CH<sub>2</sub> aparecen como dos dd en los compuestos **165** y **169** por el acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y con el hidrógeno del anillo de dioxolano ( $J_{\text{gem}} = 14.1 - 14.0$  Hz y  $J_{\text{vic}} = 5.7 - 4.1$  Hz) entre  $\delta$  3.98 – 3.32 ppm. En los compuestos **166** y **170**, las señales aparecen como dos m entre  $\delta$  4.05 – 3.23 ppm debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena.

Por el contrario, en los compuestos **189** y **190**, los hidrógenos de N-CH<sub>2</sub> son homotópicos. La señal aparece como d en **189** a  $\delta$  3.39 ppm debido al acoplamiento con el hidrógeno del anillo de dioxolano ( $J = 3.8$  Hz). En el compuesto **190** aparece como t a

$\delta$  3.31 ppm por acoplamiento con el hidrógeno del anillo de dioxolano y los hidrógenos del metileno vecino en la cadena ( $J = 6.2$  Hz).

Las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno  $N\text{-CH}_2\text{-CH}_2$  aparecen como m entre  $\delta$  2.07 – 1.65 ppm. Mientras que en las moléculas **166** y **170** los hidrógenos de este metileno son diasterotópicos y las señales aparecen como dos m debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico, los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena y el hidrógeno del anillo de dioxolano; por el contrario en el compuesto **190**, los hidrógenos son iguales y la señal aparece como un solo m por acoplamiento con los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena y el hidrógeno del anillo de dioxolano.

Los átomos de hidrógeno del anillo de dioxolano muestran sus señales de resonancia de la siguiente forma: la señal del hidrógeno de  $\text{CH}_{\text{diox}}$  aparece como dd a  $\delta$  5.07 en el compuesto **169** debido al acoplamiento con los dos hidrógenos diastereotópicos del metileno contiguo en la cadena ( $J = 5.6$  y  $4.1$  Hz). En el caso de los compuestos **165**, **166** y **170**, la señal aparece como pst a  $\delta$  4.96 – 4.80 ppm en lugar del dd teórico ( $J = 4.7$  –  $4.2$  Hz). En el compuesto **190** aparece como t a  $\delta$  4.95 ppm debido al acoplamiento con los hidrógenos homotópicos vecinos ( $J = 4.4$  Hz). La señal aparece solapada en el compuesto **189** con la de los hidrógenos del  $\text{Ph-CH}_2$  mostrándose entonces como m entre  $\delta$  5.15 – 5.11 ppm.

La señal correspondiente a los metilenos  $\text{CH}_{2\text{diox}}$  aparece como m con la simetría característica del sistema AA'BB' entre  $\delta$  3.97 – 3.63 ppm.

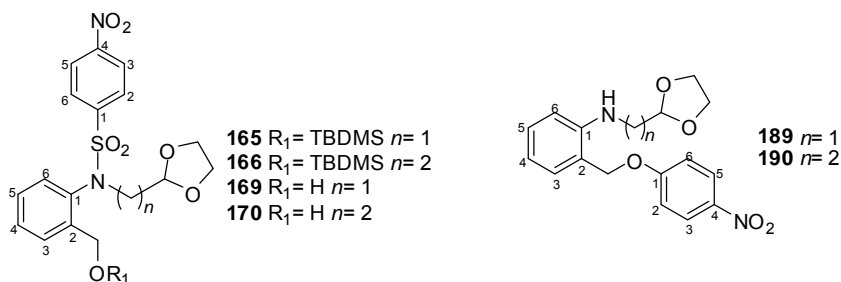
En los compuestos **165** y **166**, los 9 átomos de hidrógeno del grupo *tert*-butildimetilsililo correspondientes a  $\text{CH}_3\text{-C-Si}$  resuenan como un s entre  $\delta$  0.97 – 0.92 ppm. Los 6 átomos de hidrógeno de  $\text{CH}_3\text{-Si}$  resuenan como un s entre  $\delta$  0.12 – 0.02 ppm.

También se han obtenido los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de todos los derivados de *p*-nitrobenzensulfonilo. Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **165**, **166**, **169**, **170**, **189** y **190** se recogen en las Tablas 4 y 5.

Los datos de desplazamiento químico correspondientes a los carbonos de la zona aromática de los compuestos **165**, **166**, **169**, **170**, **189** y **190** aparecen recogidos en la Tabla 4.

El desplazamiento químico de los carbonos correspondientes al anillo aromático unido al grupo nitro aparece de la siguiente forma: las señales de C4 y de C1, ambos carbonos cuaternarios, son las que se registran a campo más bajo ( $\delta$  163 – 141 ppm) en todos los casos. La señal de los carbonos 3 y 5 presenta un desplazamiento en torno a  $\delta$  126 - 124 ppm para todos los derivados. La señal de  $\text{C}_{2,6\text{PhNO}_2}$  aparece a  $\delta$  129 ppm en los compuestos derivados de la sulfonamida (**165**, **166**, **169** y **170**) y a mayor campo en los compuestos **189** y **190** ( $\delta$  115 ppm) debido a la presencia de un grupo éter en lugar de un sulfonilo.





Comp	C <sub>4</sub> <sup>PhNO<sub>2</sub></sup>	C <sub>1</sub> <sup>PhNO<sub>2</sub></sup>	C <sub>2</sub> <sup>Ph</sup>	C <sub>1</sub> <sup>Ph</sup>	C <sub>2,6</sub> <sup>PhNO<sub>2</sub></sup>	C <sub>3</sub> <sup>Ph</sup>	C <sub>4</sub> <sup>Ph</sup>	C <sub>5</sub> <sup>Ph</sup>	C <sub>6</sub> <sup>Ph</sup>	C <sub>3,5</sub> <sup>PhNO<sub>2</sub></sup>
<b>165</b>	150.32	144.27	143.35	135.88	129.55	129.40	128.46	127.57	127.37	124.05
<b>166</b>	150.41	144.08	143.43	135.38	129.51	129.38	128.77	127.64	126.93	124.31
<b>169</b>	150.50	143.36	142.81	137.50	129.58	131.99	129.90	128.86	127.26	124.27
<b>170</b>	150.28	143.28	142.78	136.38	129.50	131.73	129.75	128.87	126.75	124.32
<b>189</b>	163.44	142.02	119.83	147.45	115.23	130.68	117.56	130.41	111.65	126.02
<b>190</b>	163.84	141.87	119.35	147.65	115.09	130.76	116.89	130.51	111.05	125.99

**Tabla 4.** Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C-RMN en la zona aromática de **165**, **166**, **169**, **170**, **189** y **190**.

La señales correspondientes a los carbonos del otro anillo aromático aparecen en un rango de desplazamiento que oscila entre  $\delta$  147 – 137 ppm para los carbonos cuaternarios y  $\delta$  130 – 126 ppm para los carbonos terciarios en todos los casos, a excepción de las señales C<sub>2</sub><sup>Ph</sup>, C<sub>4</sub><sup>Ph</sup> y C<sub>6</sub><sup>Ph</sup> en los compuestos **189** y **190** que aparecen a campo más alto ( $\delta$  119 – 111 ppm).

La segunda zona del espectro corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales de carbonos que se presentan a continuación (Tabla 5).

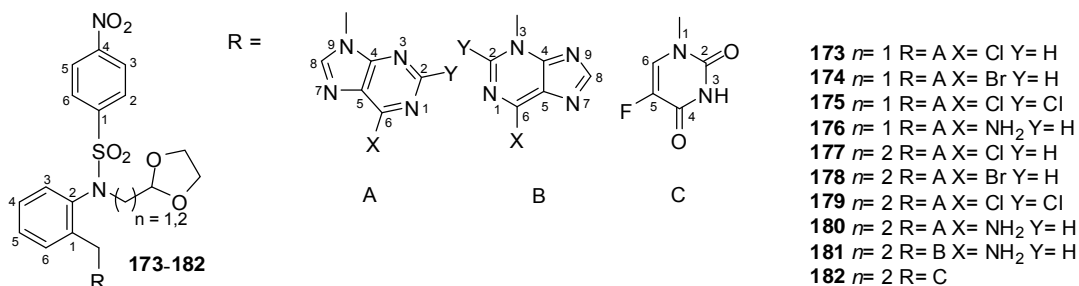
Comp	Ph-CH <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> <sup>diox</sup>	CH <sup>diox</sup>	CH <sub>3</sub> -C-Si	C-Si	CH <sub>3</sub> -Si
<b>165</b>	61.21	54.76		65.14	101.70	26.06	18.71	- 5.06
<b>166</b>	61.37	47.66	32.77	65.18	102.11	26.20	18.62	- 5.07
<b>169</b>	61.30	55.17		65.18	102.06			
<b>170</b>	61.08	47.63	32.42	65.16	102.02			
<b>189</b>	70.46	46.44		65.44	102.41			
<b>190</b>	70.15	39.09	33.00	64.96	104.14			

**Tabla 5.** Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C-RMN en la zona alifática de **165**, **166**, **169**, **170**, **189** y **190**.

En la zona alifática del espectro de <sup>13</sup>C-RMN aparecen las señales correspondientes a los carbonos: Ph-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  70 – 61 ppm), *N*-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  55 – 39 ppm), *N*-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  33 – 32 ppm), CH<sub>2</sub><sup>diox</sup> ( $\delta$  65 – 64 ppm) y CH<sup>diox</sup> ( $\delta$  104 – 101 ppm).

Es también en esta zona donde se localizan los átomos de carbono del grupo *tert*-butildimetilsililo: los 9 carbonos metilénicos  $\text{CH}_3\text{-C-Si}$  a  $\delta$  26 ppm, el carbono cuaternario a  $\delta$  18 ppm y la señal del grupo  $\text{CH}_3\text{-Si}$  a  $\delta$  -5 ppm.

Las señales espectroscópicas de  $^1\text{H-RMN}$  correspondientes a la zona aromática de los compuestos finales **173-182** aparecen recogidas en la Tabla 6. En este caso, la zona aromática presenta también las señales correspondientes a la purina o al 5-FU.



Comp	H3 <sub>5FU</sub>	H6 <sub>5FU</sub>	H2 <sub>pur</sub>	H8 <sub>pur</sub>	H3,5Ph	H2,6Ph
<b>173</b>			8.80	8.38	8.35	7.84
			(s)	(s)	(d, 8.8)	(d, 8.8)
<b>174</b>			8.75	8.38	8.35	7.84
			(s)	(s)	(d, 8.7)	(d, 8.7)
<b>175</b>				8.34	8.38	7.84
				(s)	(d, 8.9)	(d, 8.9)
<b>176</b>			8.42	8.04	8.37	7.86
			(s)	(s)	(d, 8.8)	(d, 8.8)
<b>177</b>			8.78	8.38	8.38	7.85
			(s)	(s)	(d, 8.9)	(d, 8.9)
<b>178</b>			8.72	8.42	8.37	7.84
			(s)	(s)	(d, 8.8)	(d, 8.8)
<b>179</b>				8.39	8.36	7.85
				(s)	(d, 8.5)	(d, 8.5)
<b>180</b>			8.38	8.04	8.36	7.86
			(s)	(s)	(d, 8.8)	(d, 8.8)
<b>181</b>			8.44	8.13	8.38	7.85
			(s)	(s)	(d, 8.8)	(d, 8.8)
<b>182</b>	8.85	7.62			8.38	7.86
	(d, 5.0)	(d, 5.0)			(d, 8.8)	(d, 8.8)

**Tabla 6.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de  $^1\text{H-RMN}$  correspondientes a la zona aromática de **173-182**.

Comp	H3 <sub>Ph</sub>	H4 <sub>Ph</sub>	H5 <sub>Ph</sub>	H6 <sub>Ph</sub>
<b>173</b>	6.49 (d, 7.3)	7.21 – 7.17 (m)	7.29 – 7.25 (m)	7.05 (d, 7.3)
<b>174</b>	6.45 (d, 7.7)	7.20 – 7.17 (m)	7.28 – 7.25 (m)	7.05 (d, 7.7)
<b>175</b>	6.47 (dd, 7.6, 1.3)	7.20 (ddd, 7.8, 7.6, 1.4)	7.30 (ddd, 7.8, 7.6, 1.3)	6.80 (dd, 7.6, 1.4)
<b>176</b>	6.44 (d, 7.9)	7.17 – 7.14 (m)	7.28 – 7.25 (m)	7.07 (d, 7.9)
<b>177</b>	6.49 (dd, 7.7, 1.3)	7.21 (ddd, 7.7, 7.7, 1.3)	7.31 – 7.25 (m)	6.41 (dd, 7.7, 1.3)
<b>178</b>	6.48 (d, 7.3)	7.19 (pst, 7.3)	7.27 (pst, 7.3)	7.05 (d, 7.3)
<b>179</b>	6.48 (d, 7.5)	7.22 (pst, 7.5)	7.30 (pst, 7.5)	7.06 (d, 7.5)
<b>180</b>	6.45 (d, 7.9)	7.19 – 7.15 (m)	7.28 – 7.25 (m)	7.07 (d, 7.9)
<b>181</b>	6.47 (d, 7.7)	7.25 – 7.20 (m)	7.33 – 7.29 (m)	7.13 (d, 7.7)
<b>182</b>	6.44 (d, 7.9)	7.24 – 7.19 (m)	7.43 – 7.38 (m)	7.28 (d, 7.2)

**Tabla 6 (continuación).** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a la zona aromática de **173-182**.

Los átomos de hidrógeno en posiciones 2 y 8 de la purina aparecen como s. El desplazamiento químico de H2<sub>pur</sub> (8.80 – 8.38 ppm) es mayor que el observado para H8<sub>pur</sub> (8.42 – 8.04 ppm). Los átomos de hidrógeno en posición 3 y 5 del 5-FU aparecen como d. La señal H3<sub>5FU</sub> aparece a campo más bajo ( $\delta$  8.85 ppm) que la señal H6<sub>5FU</sub> ( $\delta$  7.62 ppm), ambas con  $J = 5.0$  Hz.

El comportamiento de los átomos de hidrógeno del anillo aromático unido al grupo nitro es análogo al de los compuestos intermedios. Los átomos H3<sub>PhNO2</sub> y H5<sub>PhNO2</sub> aparecen como d ( $\delta$  8.38 – 8.35 ppm) por su acoplamiento con H2<sub>PhNO2</sub> y H6<sub>PhNO2</sub> ( $J = 8.9 - 8.5$  Hz), que también aparecen como d pero a campos más altos ( $\delta$  7.86 – 7.84 ppm).

Con respecto al comportamiento del otro anillo aromático, en general, las señales H3<sub>Ph</sub> y H6<sub>Ph</sub> aparecen como d ( $\delta = 7.28 - 6.44$  ppm) por su acoplamiento con H4<sub>Ph</sub> y H5<sub>Ph</sub> ( $J = 7.9 - 7.2$  Hz), a excepción de los compuestos **175** y **177** donde aparecen como dd entre  $\delta$  6.80 y 6.47 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.7 - 7.6$  Hz) con H4<sub>Ph</sub> o H5<sub>Ph</sub> y a larga distancia ( $J = 1.4 - 1.3$  Hz) con H5<sub>Ph</sub> o H4<sub>Ph</sub>.

En los compuestos **175** y **177**, las señales H4<sub>Ph</sub> y H5<sub>Ph</sub> aparecen como ddd entre  $\delta$  7.30 – 7.20 ppm por el acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.8 - 7.6$  Hz) con H3<sub>Ph</sub> o H6<sub>Ph</sub> y con H5<sub>Ph</sub> o H4<sub>Ph</sub>; y a larga distancia ( $J = 1.4 - 1.3$  Hz) con H6<sub>Ph</sub> o H3<sub>Ph</sub>. En los compuestos **178** y **179**, estas dos señales aparecen como pst ( $J = 7.5 - 7.3$  Hz) en lugar del dd teórico. Por el contrario, en **173**, **174**, **176**, **180-182** aparecen como m.

La segunda zona del espectro de **173-182** corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales que se presentan en la Tabla 7.

Los átomos de hidrógeno correspondientes al  $MH_2$  del **176** aparecen como un s a  $\delta$  5.98 ppm.

En todos los casos, los hidrógenos bencílicos son diastereotópicos y resuenan entre  $\delta$  6.05 – 5.70 ppm. Las señales aparecen como dos d ( $J_{gem} = 16.2 - 15.8$  Hz).

Los hidrógenos correspondientes a los metilenos de la cadena que une la sulfonamida al anillo de dioxolano son también diastereotópicos. En **173-176**, cada átomo de hidrógeno de  $N-CH_2$  aparece como un dd por el acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y con el hidrógeno del anillo de dioxolano ( $J_{gem} = 14.1 - 13.8$  Hz y  $J_{vic} = 5.6 - 4.0$  Hz) a campo entre  $\delta$  4.09 – 3.30 ppm con excepción de la señal de uno de los átomos de hidrógeno del compuesto **173**, que aparece como m a  $\delta$  4.16 – 4.04. Por el contrario, en los compuestos **177-182**, cada átomo de hidrógeno de  $N-CH_2$  aparece como m entre  $\delta$  4.29 – 3.21 ppm debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena.

Comp	$MH_{2pur}$	Ph- $CH_2$	$N-CH_2$	$N-CH_2-CH_2$	$CH_{2diox}$	$CH_{diox}$
<b>173</b>		5.92 (d, 16.2)	4.16 – 4.04 (m)		4.01 – 3.82	5.18 – 5.15
		5.85 (d, 16.2)	3.30 (dd, 13.9, 5.6)		(m)	(m)
<b>174</b>		5.92 (d, 16.1)	4.09 (dd, 14.1, 4.0)		4.00 – 3.83	5.16
		5.84 (d, 16.1)	3.30 (dd, 14.1, 5.6)		(m)	(dd, 5.6, 4.3)
<b>175</b>		5.90 (d, 16.2)	4.09 (dd, 13.8, 4.4)		4.00 – 3.86	5.15
		5.80 (d, 16.2)	3.28 (dd, 13.8, 5.6)		(m)	(dd, 6.0, 4.1)
<b>176</b>	5.98	5.82 (d, 16.2)	4.09 (dd, 13.8, 4.3)		4.01 – 3.85	5.17
	(s)	5.77 (d, 16.2)	3.33 (dd, 13.8, 5.5)		(m)	(pst, 4.9)
<b>177</b>		5.89 (d, 16.2)	4.26 – 4.07 (m)	2.07 – 1.95 (m)	3.99 – 3.77	4.92
		5.79 (d, 16.2)	3.41 – 3.28 (m)	1.89 – 1.75 (m)	(m)	(pst, 4.1)
<b>178</b>		5.87 (d, 16.1)	4.24 – 4.08 (m)	2.08 – 1.94 (m)	4.00 – 3.75	4.90
		5.78 (d, 16.1)	3.40 – 3.25 (m)	1.87 – 1.74 (m)	(m)	(pst, 4.0)
<b>179</b>		5.80 (d, 16.0)	4.21 – 4.09 (m)	2.04 – 1.93 (m)	3.97 – 3.72	4.93
		5.70 (d, 16.0)	3.33 – 3.21 (m)	1.84 – 1.71 (m)	(m)	(pst, 3.8)
<b>180</b>		5.75 (d, 16.2)	4.21 – 4.14 (m)	2.07 – 1.99 (m)	3.99 – 3.77	4.91
		5.71 (d, 16.2)	3.40 – 3.28 (m)	1.86 – 1.75 (m)	(m)	(pst, 4.1)
<b>181</b>		6.05 (d, 15.8)	4.29 – 4.11 (m)	2.04 – 1.90 (m)	4.03 – 3.73	4.90
		5.88 (d, 15.8)	3.41 – 3.24 (m)	1.90 – 1.74 (m)	(m)	(pst, 3.9)
<b>182</b>		5.45 (d, 16.0)	4.20 – 4.02 (m)	2.04 – 1.87 (m)	3.99 – 3.74	4.88
		5.09 (d, 16.0)	3.35 – 3.23 (m)	1.79 – 1.72 (m)	(m)	(pst, 4.1)

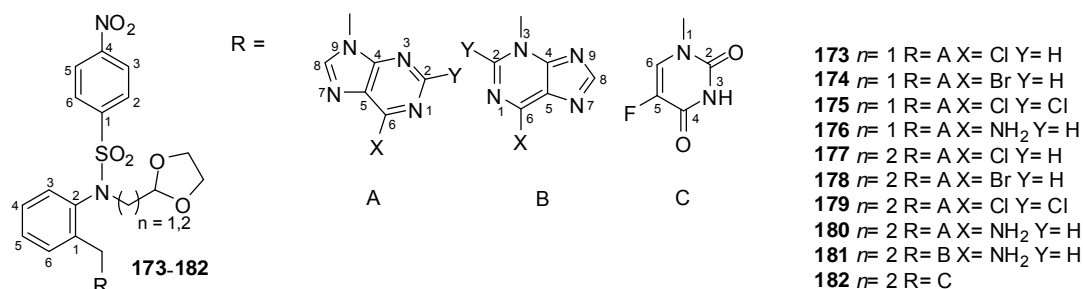
**Tabla 7.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de  $^1H$ -RMN correspondientes a la zona alifática de **173-182**.

Las señales correspondientes a  $N\text{-CH}_2\text{-CH}_2$  aparecen como m entre  $\delta$  2.08 – 1.71 ppm. En todos los casos (**177-182**), los hidrógenos de este metileno son diastereotópicos y las señales aparecen como dos m debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico, los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena y el hidrógeno del anillo de dioxolano.

Los átomos de hidrógeno del anillo de dioxolano muestran sus señales de resonancia de la siguiente manera: la señal del hidrógeno de  $\text{CH}_{\text{diox}}$  aparece como dd entre  $\delta$  5.16 - 5.15 en **174** y **175** debido al acoplamiento con los dos hidrógenos diastereotópicos del metileno contiguo en la cadena ( $J = 6.0 - 4.1$  Hz). En el resto de compuestos, la señal aparece como pst a  $\delta$  5.17 – 4.88 ppm en lugar del dd teórico ( $J = 4.9 - 3.8$  Hz), a excepción de **173** donde aparece como m entre  $\delta$  5.18 – 5.15 ppm.

La señal correspondiente a los protones metilénicos  $\text{CH}_{2\text{diox}}$  aparece como m con la simetría característica del sistema AA'BB' entre  $\delta$  4.03 – 3.72 ppm.

También se han obtenido los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los compuestos **173-182**. Los datos de desplazamiento químico de los carbonos se recogen en las Tablas 8 y 9.



Comp	C4 <sub>5FU</sub>	C2 <sub>5FU</sub>	C5 <sub>5FU</sub>	C6 <sub>5FU</sub>	C4 <sub>pur</sub>	C2 <sub>pur</sub>	C6 <sub>pur</sub>	C8 <sub>pur</sub>	C5 <sub>pur</sub>
<b>173</b>					152.69	152.35	151.23	146.49	131.47
<b>174</b>					151.48	152.34	153.37	146.37	134.09
<b>175</b>					153.97	153.36	151.99	147.21	130.67
<b>176</b>					152.40	152.41	155.08	150.64	137.37
<b>177</b>					152.52	152.48	151.35	146.28	131.12
<b>178</b>					151.28	152.52	151.20	146.13	134.11
<b>179</b>					153.86	153.39	152.05	146.95	131.51
<b>180</b>					150.72	152.95	155.56	141.57	119.15
<b>181</b>					149.80	146.09	154.43	148.90	119.15
<b>182</b>	157.05	150.13	141.74	129.12					
	(d, 26.5)		(d, 238.2)	(d, 32.9)					

**Tabla 8.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la zona aromática de **173-182**.

Comp	C4 <sub>PhNO2</sub>	C1 <sub>PhNO2</sub>	C2 <sub>Ph</sub>	C1 <sub>Ph</sub>	C2,6 <sub>PhNO2</sub>	C3 <sub>Ph</sub>	C4 <sub>Ph</sub>	C5 <sub>Ph</sub>	C6 <sub>Ph</sub>	C3,5 <sub>PhNO2</sub>
<b>173</b>	150.64	142.77	137.64	137.98	129.56	127.31	129.30	129.92	129.14	124.41
<b>174</b>	150.41	142.77	137.66	138.00	129.58	127.30	129.33	129.95	129.19	124.43
<b>175</b>	150.68	142.71	137.71	137.56	129.56	127.32	129.49	130.01	129.10	124.46
<b>176</b>	150.65	142.13	138.76	138.13	129.58	127.30	129.25	129.91	128.97	124.39
<b>177</b>	150.67	142.73	136.93	137.70	129.65	126.99	129.44	129.86	129.23	124.42
<b>178</b>	150.64	142.60	136.99	137.35	129.70	126.98	129.65	129.86	129.59	124.43
<b>179</b>	150.64	142.62	136.90	137.31	129.90	126.98	129.61	130.71	129.19	124.43
<b>180</b>	150.54	142.93	136.55	138.51	129.59	126.88	129.28	129.79	129.05	124.38
<b>181</b>	150.80	142.42	137.11	136.62	129.74	127.03	129.67	129.98	129.20	124.45
<b>182</b>	150.61	142.79	137.13	137.66	129.41	127.11	129.15	130.02	129.29	124.44

**Tabla 8 (continuación).** Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C-RMN en la zona aromática de **173-182**.

El desplazamiento químico de los carbonos correspondientes a los anillos de purina aparece de la siguiente manera: las señales de C2<sub>pur</sub>, C4<sub>pur</sub> y C6<sub>pur</sub> son las que se registran a campo más bajo, alrededor de  $\delta$  150 ppm. La señal de C8<sub>pur</sub> aparece a  $\delta$  146 ppm y la señal de C5<sub>pur</sub> es la que se registra a menor desplazamiento de todas, localizándose a  $\delta$  130 ppm en los compuestos **173-179** y a  $\delta$  119 ppm en los compuestos que contienen adenina (**180-181**). En el anillo de 5-FU, las señales C4<sub>5FU</sub>, C5<sub>5FU</sub> y C6<sub>5FU</sub> aparecen como d debido al acoplamiento con el flúor: la señal C4<sub>5FU</sub> a campo más bajo ( $\delta$  157 ppm,  $J = 26.5$  Hz), seguida de C5<sub>5FU</sub> ( $\delta$  151 ppm,  $J = 238.2$ ) y C6<sub>5FU</sub> a campo más alto ( $\delta$  129 ppm,  $J = 32.9$  Hz). La señal C2<sub>5FU</sub> aparece como s, registrándose a 150 ppm.

En general, se observa una gran uniformidad en los desplazamientos químicos de los átomos de C análogos de los compuestos **173-182**.

Con respecto al anillo aromático unido al grupo nitro, las señales de C4<sub>PhNO2</sub> y de C1<sub>PhNO2</sub>, ambos carbonos cuaternarios, son las que se registran a campo más bajo ( $\delta$  150 – 142 ppm). La señal de los carbonos 2 y 6 presenta un desplazamiento a  $\delta$  129 ppm. La señal de C3,5<sub>PhNO2</sub> es la que aparece a campo más alto ( $\delta$  124 ppm).

Las señales correspondientes a los carbonos del otro anillo aromático aparecen en un rango de desplazamiento que oscila entre  $\delta$  138 – 136 ppm para los carbonos cuaternarios y  $\delta$  129 – 126 ppm para los carbonos terciarios.

La segunda zona del espectro corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales de carbonos que se muestran en la Tabla 9.

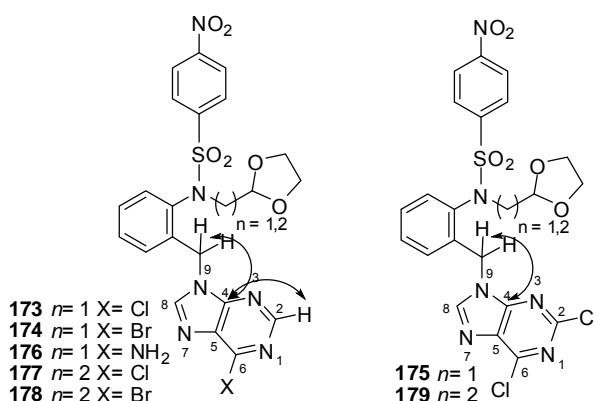
Comp	Ph-CH <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> <sub>diox</sub>	CH <sub>diox</sub>
<b>173</b>	43.41	54.92		65.33	101.88
<b>174</b>	43.59	55.16		65.25	101.96
<b>175</b>	43.75	55.19		65.28	101.85
<b>176</b>	43.09	55.13		65.28	101.89
<b>177</b>	43.93	47.58	32.44	65.25	102.06
<b>178</b>	44.12	47.47	32.38	65.24	102.00
<b>179</b>	43.90	47.33	32.22	65.25	101.98
<b>180</b>	43.19	47.54	32.42	65.20	102.00
<b>181</b>	49.36	47.47	32.21	65.24	101.96
<b>182</b>	47.46	47.55	32.32	65.19	101.90

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C-RMN en la zona alifática de **173-182**.

En la zona alifática del espectro de <sup>13</sup>C-RMN aparecen las señales correspondientes a los carbonos metilénicos Ph-CH<sub>2</sub> (δ 43 ppm), *N*-CH<sub>2</sub> (δ 55 – 47 ppm) y CH<sub>2</sub><sub>diox</sub> (δ 65 ppm) y la señal del CH<sub>diox</sub> (δ 101 ppm). En **177-182**, la señal *N*-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> aparece a δ 32 ppm.

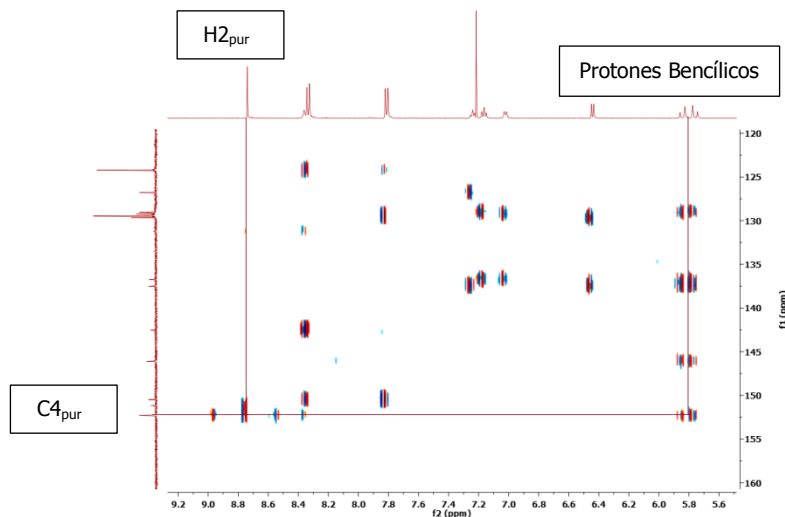
Los estudios de RMN bidimensionales han permitido demostrar inequívocamente que la unión a la purina o 5-FU se establece a través del *N*-9 en los compuestos **173-180**, a través del *N*-3 en **181** y a través de *N*-1 en **182**.

La identificación de los isómeros *N*-9 en **173-179** se basa en la correlación a tres enlaces que existe entre los dos protones del grupo bencílico unido a la purina y el carbono C4<sub>pur</sub>. La señal de C4<sub>pur</sub> se identifica por su correlación a tres enlaces con el H2<sub>pur</sub> (Esquema 20) en **173, 174, 176, 177** y **178**. La señal de C4<sub>pur</sub> se identifica por similitud a los derivados anteriores en **175** y **179**, en los que no se puede observar dicha correlación al presentar un cloro en posición 2 de la purina.



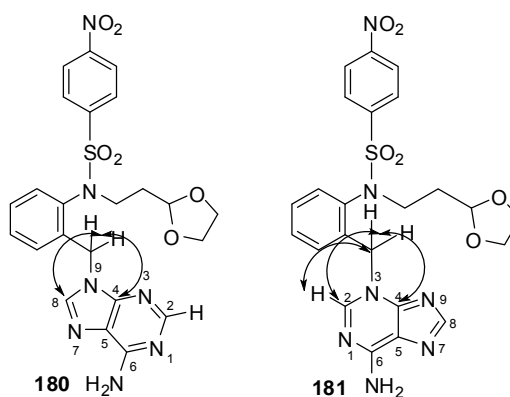
**Esquema 20.** Interacciones a tres enlaces que justifican la naturaleza *N*-9 de **173-179**.

En la Figura 29 se muestra como ejemplo el estudio HMBC de **177** donde se observan las correlaciones entre el  $C_{4_{pur}}$  y  $H_{2_{pur}}$  que identifica el  $C_{4_{pur}}$ , y entre el  $C_{4_{pur}}$  y los protones bencílicos que permite identificar a **177** como isómero *N*-9.



**Figura 29.** Región aromática del espectro HMBC de **177**.

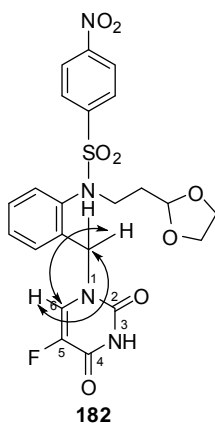
La discriminación entre los isómeros *N*-9 y *N*-3 de los derivados de adenina (**180** y **181**, respectivamente) se basa en la correlación a tres enlaces que existe entre los protones del grupo bencílico unido a la adenina y los carbonos cuaternarios de la adenina:  $C_{2_{pur}}$ ,  $C_{4_{pur}}$  y  $C_{8_{pur}}$  (Esquema 21). En los isómeros *N*-9, los protones bencílicos se correlacionan a través de tres enlaces con los  $C_{4_{pur}}$  y  $C_{8_{pur}}$  de la adenina, mientras que en los isómeros *N*-3, estos protones se correlacionan con  $C_{2_{pur}}$  y  $C_{4_{pur}}$  (ver Anexo). Además, en los isómeros *N*-3,  $H_{2_{pur}}$  se correlaciona a tres enlaces con el carbono bencílico, señal que sólo es posible cuando la conexión con la adenina es a través de dicho *N*.



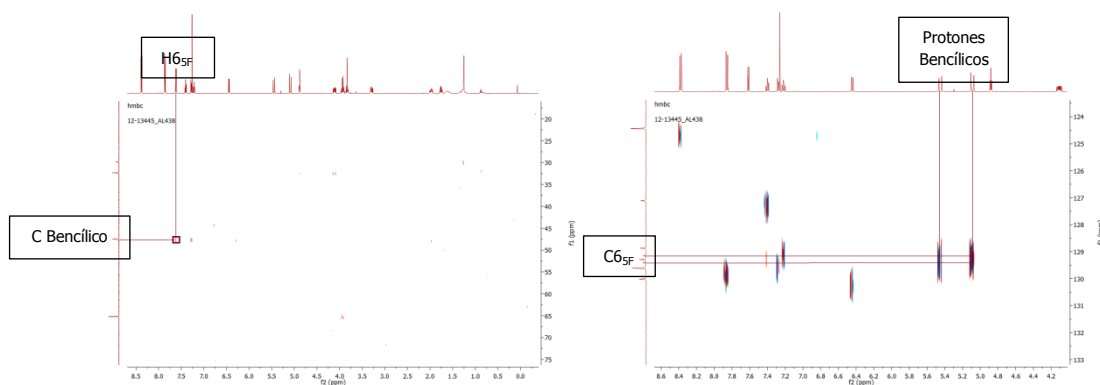
**Esquema 21.** Interacciones a tres enlaces que justifican la naturaleza *N*-9 (**180**) y *N*-3 (**181**) del derivado de adenina.



La identificación del isómero *N*-1 en el compuesto **182** se basa en la correlación a tres enlaces que existe entre los dos protones del grupo bencílico unido al 5-FU y el carbono C6<sub>5FU</sub>, así como la correlación inversa: H6<sub>5FU</sub> y carbono bencílico (Esquema 22, Figura 30), correlaciones que no existirían si la unión se diera a través de *N*-3. La señal de C6<sub>5FU</sub> se identifica fácilmente al ser el único carbono terciario del 5-FU (Ver Anexo).



**Esquema 22.** Interacciones a tres enlaces que justifican la naturaleza *N*-1 de **182**.



**Figura 30.** Regiones del espectro HMBC de **182**.

Finalmente, el análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M + Na)<sup>+</sup>, (M + H)<sup>+</sup> o (M - H)<sup>+</sup> de los derivados de *p*-nitrobenzensulfonyl y los correspondientes valores encontrados:

**165:** Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SSiNa (M + Na)<sup>+</sup>: 531.1699, encontrado: 531.1585 (desviación - 2.3 ppm).

**166:** Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SSiNa (M + Na)<sup>+</sup>: 545.1856, encontrado: 545.1752 (desviación - 0.4 ppm).

**169:** Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SNa (M + Na)<sup>+</sup>: 417.0835, encontrado: 417.0733 (desviación 0.2 ppm).

**170:** Calculado para  $C_{18}H_{19}N_2O_7S$  (M - H)<sup>+</sup>: 407.0991, encontrado: 407.0922 (desviación 0.2 ppm).

**189:** Calculado para  $C_{17}H_{19}N_2O_5$  (M + H)<sup>+</sup>: 331.1216, encontrado: 331.1293 (desviación - 0.3 ppm).

**190:** Calculado para  $C_{18}H_{21}N_2O_7S$  (M + H)<sup>+</sup>: 345.1372, encontrado: 345.1444 (desviación - 1.7 ppm).

**173:** Calculado para  $C_{22}H_{20}ClN_6O_6S$  (M + H)<sup>+</sup>: 531.0775, encontrado: 531.0845 (desviación 0.3 ppm).

**174:** Calculado para  $C_{22}H_{19}BrN_6O_6SNa$  (M + Na)<sup>+</sup>: 597.0270, encontrado: 597.0159 (desviación -0.9 ppm).

**175:** Calculado para  $C_{22}H_{18}Cl_2N_6O_6SNa$  (M + Na)<sup>+</sup>: 587.0386, encontrado: 587.0276 (desviación - 1.2 ppm).

**176:** Calculado para  $C_{22}H_{22}N_7O_6S$  (M + H)<sup>+</sup>: 512.1274, encontrado: 512.1358 (desviación 1.2 ppm).

**177:** Calculado para  $C_{23}H_{22}ClN_6O_6S$  (M + H)<sup>+</sup>: 545.0932, encontrado: 545.1012 (desviación 0.4 ppm).

**178:** Calculado para  $C_{23}H_{22}BrN_6O_6S$  (M + H)<sup>+</sup>: 589.0427, encontrado: 589.0497 (desviación 0.8 ppm).

**179:** Calculado para  $C_{23}H_{21}Cl_2N_6O_6S$  (M + H)<sup>+</sup>: 579.0542, encontrado: 579.0616 (desviación 1.6 ppm).

**180:** Calculado para  $C_{23}H_{24}N_7O_6S$  (M + H)<sup>+</sup>: 526.1431, encontrado: 526.1501 (desviación - 1.5 ppm).

**181:** Calculado para  $C_{23}H_{24}N_7O_6S$  (M + H)<sup>+</sup>: 526.1431, encontrado: 526.1505 (desviación - 0.8 ppm).

**182:** Calculado para  $C_{22}H_{21}FN_4O_8SNa$  (M + Na)<sup>+</sup>: 543.1064, encontrado: 543.0961 (desviación 0.0 ppm).

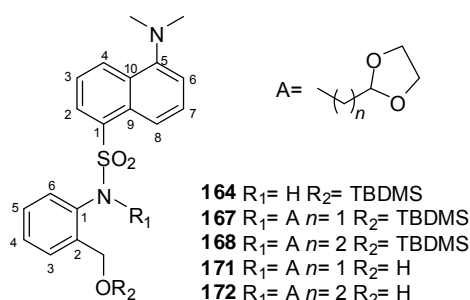
### 1.3.2. Derivados de dansilo

En este apartado se lleva a cabo el análisis espectroscópico de los compuestos intermedios (**164**, **167**, **168**, **171** y **172**) y finales (**183-186**) derivados de dansilo.

Los datos espectroscópicos de los compuestos de este grupo aparecen recogidos en las Tablas 10-17. En ellas, se muestran los valores de desplazamiento químico en primer lugar y entre paréntesis las multiplicidades y las constantes de acoplamiento.

Los espectros bajo estudio contienen dos zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes a los dos anillos aromáticos; y b) zona alifática, correspondiente a los protones bencílicos, al grupo *tert*-butildimetilsililo, al anillo de dioxolano y los grupos metilénicos de la cadena de unión entre la sulfonamida y el anillo de dioxolano.

Las señales espectroscópicas de  $^1\text{H}$ -RMN correspondientes a la zona aromática de los compuestos **164**, **167**, **168**, **171** y **172** aparecen recogidas en la Tabla 10.



Comp	H4 <sub>dan</sub>	H8 <sub>dan</sub>	H2 <sub>dan</sub>	H7 <sub>dan</sub>	H3 <sub>dan</sub>	H6 <sub>dan</sub>
<b>164</b>	8.49 (d, 8.5)	8.39 (d, 8.7)	8.22 (dd, 7.3, 1.2)	7.53 (dd, 8.7, 7.7)	7.47 – 7.42 (m)	7.18 – 7.14 (m)
<b>167</b>	8.54 (d, 8.4)	8.15 (d, 8.7)	8.02 (dd, 7.5, 1.1)	7.36 (dd, 8.7, 7.6)	7.42 (dd, 8.4, 7.5)	7.14 (d, 7.6)
<b>168</b>	8.54 (d, 8.5)	8.17 (d, 8.7)	8.05 (dd, 7.5, 1.2)	7.38 (dd, 8.7, 7.5)	7.44 (dd, 8.5, 7.5)	7.14 (d, 7.5)
<b>171</b>	8.57 (d, 8.4)	8.05 – 8.02 (m)	8.05 – 8.02 (m)	7.32 (dd, 8.6, 7.6)	7.45 (dd, 8.4, 7.5)	7.14 (d, 7.6)
<b>172</b>	8.56 (d, 8.4)	8.08 (d, 8.7)	8.05 (dd, 7.5, 1.1)	7.34 (dd, 8.7, 7.6)	7.46 (dd, 8.4, 7.5)	7.14 (d, 7.6)

Comp	H6 <sub>ph</sub>	H5 <sub>ph</sub>	H4 <sub>ph</sub>	H3 <sub>ph</sub>
<b>164</b>	7.47 – 7.42 (m)	7.18 – 7.14 (m)	6.93 (ddd, 7.5, 7.4, 1.1)	6.88 (dd, 7.5, 1.4)
<b>167</b>	6.64 (d, 7.9)	6.96 (ddd, 7.9, 7.5, 1.2)	7.30 – 7.26 (m)	7.56 (d, 7.7)
<b>168</b>	6.67 (dd, 8.0, 0.8)	7.00 (ddd, 8.0, 7.6, 1.5)	7.29 (ddd, 7.6, 7.4, 1.1)	7.56 (d, 7.4)
<b>171</b>	6.31 (dd, 8.0, 0.8)	6.92 (ddd, 8.0, 7.5, 1.7)	7.29 (ddd, 7.7, 7.5, 0.8)	7.57 (dd, 7.7, 1.5)
<b>172</b>	6.37 (dd, 7.9, 0.8)	6.95 (ddd, 7.9, 7.5, 1.5)	7.30 (ddd, 7.6, 7.5, 0.8)	7.60 (dd, 7.6, 1.5)

**Tabla 10.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de  $^1\text{H}$ -RMN correspondientes a la zona aromática de **164**, **167**, **168**, **171** y **172**.

Los átomos de hidrógeno correspondientes al grupo dansilo muestran sus señales de resonancia de la siguiente manera:  $H_{4_{dan}}$  aparece como d a  $\delta$  8.57 – 8.49 ppm debido a su acoplamiento con  $H_{3_{dan}}$  ( $J = 8.5 - 8.4$  Hz).  $H_{8_{dan}}$  y  $H_{6_{dan}}$  aparecen como d ( $\delta$  8.39 – 8.02 ppm) en la mayoría de los casos por su acoplamiento con  $H_{7_{dan}}$  ( $J = 8.7 - 7.3$  Hz), a excepción de dos señales correspondientes a  $H_{6_{dan}}$  en el compuesto **164** y  $H_{8_{dan}}$  en el compuesto **171**, que aparecen como m.

En general, los átomos  $H_{3_{dan}}$  y  $H_{7_{dan}}$  aparecen como dd entre  $\delta$  7.53 - 7.32 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 8.7 - 7.5$  Hz) con  $H_{2_{dan}}$  y  $H_{4_{dan}}$  o  $H_{6_{dan}}$  y  $H_{8_{dan}}$ , con excepción de la señal de  $H_{3_{dan}}$  en el compuesto **164** que aparece como m ( $\delta$  7.47 – 7.42 ppm) por solapamiento con la señal de  $H_{6_{Ph}}$ . La señal de  $H_{2_{dan}}$  aparece en todos los casos como dd en torno a  $\delta$  8.22 - 8.05 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.5 - 7.3$  Hz) con  $H_3$  y a larga distancia ( $J = 1.2 - 1.1$  Hz) con  $H_4$ , a excepción de la señal en el compuesto **171** que aparece como m ( $\delta$  8.05 – 8.02 ppm) por solapamiento con la señal de  $H_{8_{dan}}$ .

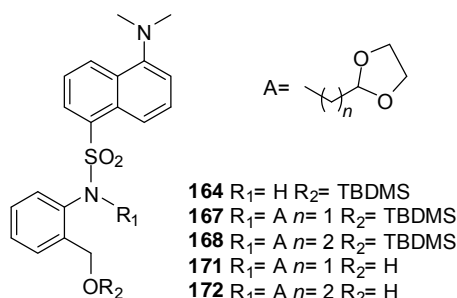
Con respecto a las señales del otro anillo aromático, mientras que los  $H_{3_{Ph}}$  y  $H_{6_{Ph}}$  en **164**, **168**, **171** y **172** aparecen como dd entre  $\delta$  7.60 - 6.37 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.8 - 7.3$  Hz) con  $H_{4_{Ph}}$  o  $H_{5_{Ph}}$  y a larga distancia ( $J = 1.6 - 0.8$  Hz) con  $H_{5_{Ph}}$  o  $H_{4_{Ph}}$ , en el compuestos **167** y  $H_{3_{Ph}}$  de **168** aparecen como d ( $\delta = 7.56 - 6.64$  ppm) por su acoplamiento con  $H_{4_{Ph}}$  y  $H_{5_{Ph}}$  ( $J = 7.9 - 7.4$  Hz).

Las señales  $H_{4_{Ph}}$  y  $H_{5_{Ph}}$  aparecen como ddd entre  $\delta$  7.30 – 6.92 ppm por el acoplamiento a corta distancia ( $J = 8.0 - 7.4$  Hz) con  $H_{3_{Ph}}$  o  $H_{6_{Ph}}$  y con  $H_{5_{Ph}}$  o  $H_{4_{Ph}}$ ; y a larga distancia ( $J = 1.7 - 0.8$  Hz) con  $H_{6_{Ph}}$  o  $H_{3_{Ph}}$ . En el compuesto **164**, la señal de  $H_{5_{Ph}}$  aparece como m ( $\delta$  7.18 – 7.14 ppm) por solapamiento con la señal de  $H_{6_{dan}}$ , mientras que en el compuesto **167** aparece como m ( $\delta$  7.30 – 7.26 ppm).

La segunda zona del espectro corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales que se presentan en la Tabla 11.

Los átomos de hidrógeno correspondientes al MH de **164** aparecen como s resonando a  $\delta$  8.66 ppm.

En **167**, **168**, **171** y **172**, los hidrógenos bencílicos son diastereotópicos y resuenan entre  $\delta$  4.92 – 4.58 ppm. Las señales aparecen como dos d debido al acoplamiento entre ellos ( $J_{gem} = 14.4 - 12.3$  Hz), a excepción del compuesto **171** donde aparecen como dos dd debido al acoplamiento entre ellos ( $J_{gem} = 12.4$  Hz) y con el hidrógeno del grupo hidroxilo ( $J_{vic} = 5.3 - 5.2$  Hz). La señal de uno de los hidrógenos en el compuesto **172** aparece como m ( $\delta$  4.62 – 4.53 ppm) en lugar del dd teórico. Sin embargo, en **164** aparece como singlete a  $\delta$  4.30 ppm.



Comp	MH	Ph-CH <sub>2</sub>	N-CH <sub>2</sub>	N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
<b>164</b>	8.66 (s)	4.30 (s)		
<b>167</b>		4.85 (d, 14.4) 4.57 (d, 14.4)	3.95 (dd, 14.1, 4.9) 3.51 (dd, 14.1, 4.6)	
<b>168</b>		4.71 (d, 14.1) 4.58 (d, 14.1)	3.95 – 3.88 (m) 3.64 – 3.53 (m)	1.95 – 1.86 (m) 1.81 – 1.73 (m)
<b>171</b>		4.92 (dd, 12.4, 5.2) 4.70 (dd, 12.4, 5.3)	4.15 (dd, 14.1, 4.3) 3.25 (dd, 14.1, 5.5)	
<b>172</b>		4.89 (d, 12.3) 4.62 – 4.53 (m)	4.14 – 4.02 (m) 3.45 – 3.36 (m)	1.95 – 1.85 (m) 1.73 – 1.62 (m)

Comp	CH <sub>2</sub> diox	CH <sub>diox</sub>	M(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> -C-Si	CH <sub>3</sub> -Si
<b>164</b>			2.86 (s)	0.94 (s)	0.06 (s)
<b>167</b>	3.93 – 3.70 (m)	5.02 (pst, 4.8)	2.88 (s)	0.92 (s)	0.02 (s)
<b>168</b>	3.89 – 3.71 (m)	4.81 (pst, 4.6)	2.88 (s)	0.90 (s)	0.02 (s)
<b>171</b>	3.94 – 3.76 (m)	5.11 (pst, 4.8)	2.88 (s)		
<b>172</b>	3.93 – 3.73 (m)	4.82 (pst, 4.4)	2.89 (s)		

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a la zona alifática de **164**, **167**, **168**, **171** y **172**.

Los hidrógenos correspondientes a los metilenos de la cadena de unión entre la sulfonamida y el anillo de dioxolano son también diastereotópicos. Las señales de los átomos de hidrógeno de N-CH<sub>2</sub> aparecen como dos dd en **167** y **171** por el acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y con el hidrógeno del anillo de dioxolano ( $J_{gem}=14.1$  Hz y  $J_{vic}=5.5 - 4.3$  Hz) a campo entre  $\delta$  4.15 – 3.25 ppm. En **168** y **172**, las señales aparecen como dos m entre  $\delta$  4.14 – 3.36 ppm debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena.

Las señales correspondientes a N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> aparecen como m entre  $\delta$  1.95 – 1.62 ppm debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico, los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena y el hidrógeno del anillo de dioxolano en **168** y **172**.

Los átomos de hidrógeno del anillo de dioxolano muestran sus señales de resonancia de la siguiente forma: la señal del hidrógeno de CH<sub>diox</sub> aparece como pst a  $\delta$

5.11 – 4.82 ppm en lugar del dd teórico ( $J = 4.8 - 4.4$  Hz) debido al acoplamiento con los dos hidrógenos diastereotópicos del metileno contiguo en la cadena.

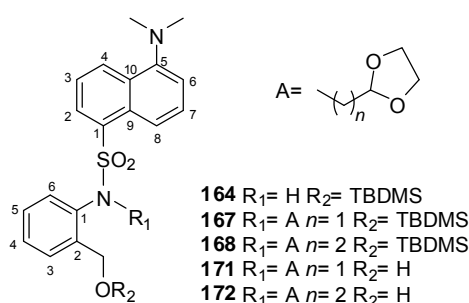
La señal correspondiente a  $\text{CH}_{2\text{diox}}$  aparece como m con la simetría característica del sistema AA'BB' entre  $\delta$  3.94 – 3.70 ppm.

La señal de los 6 hidrógenos correspondientes a  $\text{M}(\text{CH}_3)_2$  en el grupo dansilo aparecen como singlete a  $\delta$  2.89 – 2.86 ppm.

En los compuestos **164**, **167** y **168**, los 9 átomos de hidrógeno  $\text{CH}_3\text{-C-Si}$  resuenan como un s entre  $\delta$  0.94 – 0.90 ppm. Los 6 átomos de hidrógeno  $\text{CH}_3\text{-Si}$  resuenan como un s entre  $\delta$  0.06 – 0.02 ppm.

También se han registrado los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN en todos los derivados de dansilo. Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de **164**, **167**, **168**, **171** y **172** se recogen en las Tablas 12 y 13.

Los datos de desplazamiento químico correspondientes a los carbonos de la zona aromática de **164**, **167**, **168**, **171** y **172** aparecen recogidos a continuación (Tabla 12).



Comp	$\text{C5}_{\text{dan}}$	$\text{C1}_{\text{dan}}$	$\text{C4}_{\text{dan}}$	$\text{C9}_{\text{dan}}$	$\text{C2}_{\text{dan}}$	$\text{C10}_{\text{dan}}$	$\text{C7}_{\text{dan}}$	$\text{C3}_{\text{dan}}$	$\text{C8}_{\text{dan}}$	$\text{C6}_{\text{dan}}$
<b>164</b>	152.03	135.57	130.68	129.97	129.95	129.74	128.36	123.26	118.95	115.31
<b>167</b>	151.47	134.41	130.67	130.55	131.14	129.98	127.88	123.21	120.46	115.32
<b>168</b>	151.60	134.66	130.60	130.52	131.13	130.06	128.07	123.30	120.50	115.34
<b>171</b>	151.59	133.64	130.99	130.61	131.39	130.05	128.00	123.22	120.34	115.40
<b>172</b>	151.63	133.87	130.85	130.52	131.27	130.06	127.94	123.27	120.33	115.37

Comp	$\text{C1}_{\text{ph}}$	$\text{C2}_{\text{ph}}$	$\text{C5}_{\text{ph}}$	$\text{C3}_{\text{ph}}$	$\text{C4}_{\text{ph}}$	$\text{C6}_{\text{ph}}$
<b>164</b>	137.26	130.38	128.78	128.00	124.22	121.46
<b>167</b>	136.22	143.00	126.93	127.64	128.63	129.51
<b>168</b>	135.53	142.90	127.15	127.88	128.66	129.49
<b>171</b>	138.03	142.86	128.36	131.42	129.17	128.80
<b>172</b>	136.69	142.62	128.36	131.29	129.11	128.82

**Tabla 12.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la zona aromática de **164**, **167**, **168**, **171** y **172**.

En todos los casos, el desplazamiento químico de los carbonos correspondientes al grupo dansilo aparece de la siguiente manera: la señal del  $\text{C5}_{\text{dan}}$  es la que se registra a

campo más bajo ( $\delta$  151 ppm). Las señales de los carbonos 1, 2, 4, 9 y 10 presentan desplazamientos en torno a  $\delta$  135 - 129 ppm. A  $\delta$  128 - 120 ppm aparecen las señales de los carbonos 3, 7 y 8. La señal del C6<sub>dan</sub> es la que se registra a campo más alto ( $\delta$  115 ppm).

Las señales correspondientes a los carbonos del otro anillo aromático aparecen en un rango de desplazamiento que oscila entre  $\delta$  143 – 130 ppm para los carbonos cuaternarios y  $\delta$  131 – 121 ppm para los carbonos terciarios en todos los derivados.

La segunda zona del espectro corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales de carbonos que se presentan a continuación (Tabla 13):

Comp	Ph-CH <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> diox	CH <sub>diox</sub>	<i>N</i> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> -C-Si	C-Si	CH <sub>3</sub> -Si
<b>164</b>	65.40					45.56	25.94	18.33	- 5.26
<b>167</b>	61.10	54.58		64.98	102.20	45.54	26.08	18.43	- 5.31
<b>168</b>	61.22	47.20	33.01	65.01	102.34	45.59	26.10	16.46	- 5.26
<b>171</b>	61.53	55.07		65.03	102.54	45.57			
<b>172</b>	61.22	47.44	32.75	65.05	102.26	45.57			

**Tabla 13.** Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C-RMN en la zona alifática de **164, 167, 168, 171 y 172**.

En la zona alifática del espectro de <sup>13</sup>C-RMN aparecen las señales correspondientes a los carbonos: Ph-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  65 – 61 ppm), *N*-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  55 – 47 ppm), *N*-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  33 – 32 ppm), CH<sub>2</sub>diox ( $\delta$  65 – 64 ppm) y CH<sub>diox</sub> ( $\delta$  102 ppm).

La señal de los carbonos *N*(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en el grupo dansilo presenta un desplazamiento en torno a  $\delta$  45 ppm.

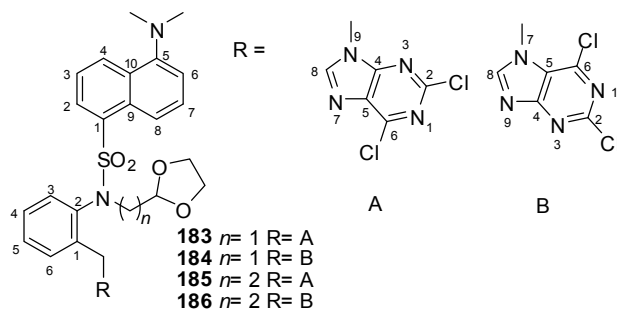
Es también en esta zona donde se localizan los átomos de carbono del grupo *terc*-butildimetilsililo: los 9 carbonos CH<sub>3</sub>-C-Si dan una señal a  $\delta$  26 ppm, el carbono cuaternario da una señal en torno a  $\delta$  18 - 16 ppm y la señal de CH<sub>3</sub>-Si aparece a  $\delta$  - 5 ppm.

Las señales de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a la zona aromática de los compuestos finales **183-186** aparecen recogidas en la Tabla 14. En esta ocasión, la zona aromática contiene también las señales correspondientes a la 2,6-dicloropurina presente en estas moléculas.

Los átomos de hidrógeno en posición 8 de la purina aparecen como s entre  $\delta$  8.34 – 8.28 ppm.

El comportamiento de los átomos de hidrógeno del grupo dansilo es análogo al de los compuestos intermedios. H4<sub>dan</sub> aparece como d por su acoplamiento con H3<sub>dan</sub> ( $J$  = 8.5 – 7.6 Hz) a  $\delta$  8.60 – 8.58 ppm. H8<sub>dan</sub> y H6<sub>dan</sub> aparecen como d ( $\delta$  8.60 – 7.13 ppm) en la mayoría de los casos por su acoplamiento con H7<sub>dan</sub> ( $J$  = 8.7 – 7.5 Hz), a excepción de la señal de H8<sub>dan</sub> en **185**, que no se puede distinguir por solapamiento. Los átomos H3<sub>dan</sub> y H7<sub>dan</sub> aparecen como dd entre  $\delta$  7.49 - 7.32 ppm debido al acoplamiento a corta

distancia ( $J = 8.7 - 7.5$  Hz) con  $H_{2dan}$  y  $H_{4dan}$  o  $H_{6dan}$  y  $H_{8dan}$ , con excepción del compuesto **183** donde aparecen como pst en lugar del dd teórico. En **183** y **184**, la señal de  $H_{2dan}$  aparecen como dd a  $\delta$  8.06 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.6 - 7.5$  Hz) con  $H_{3dan}$  y a larga distancia ( $J = 1.2 - 1.1$  Hz) con  $H_{4dan}$ . En **185** aparece como m ( $\delta$  8.09 – 8.06 ppm) por solapamiento con la señal de  $H_{8dan}$ , mientras que en el compuesto **186**, la señal aparece como d a  $\delta$  8.06 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.9$  Hz) con  $H_{3dan}$ .



Comp	$H_{4dan}$	$H_{8dan}$	$H_{2dan}$	$H_{7dan}$	$H_{3dan}$	$H_{6dan}$
<b>183</b>	8.60 (d, 7.6)	8.01 (d, 7.6)	8.06 (dd, 7.6, 1.2)	7.32 (pst, 7.6)	7.48 (pst, 7.6)	7.14 (d, 7.6)
<b>184</b>	8.60 (d, 8.4)	8.01 (d, 8.7)	8.05 (dd, 7.5, 1.1)	7.33 (dd, 8.7, 7.6)	7.49 (dd, 8.4, 7.5)	7.14 (d, 7.6)
<b>185</b>	8.58 (d, 8.5)	8.09 – 8.06 (m)	8.09 – 8.06 (m)	7.33 (dd, 8.7, 7.5)	7.49 (dd, 8.5, 7.5)	7.13 (d, 7.5)
<b>186</b>	8.59 (d, 8.4)	8.06 (d, 8.5)	8.06 (d, 7.9)	7.34 (dd, 8.5, 7.6)	7.49 (dd, 8.4, 7.9)	7.13 (d, 7.6)

Comp	$H_{8Ph}$	$H_{3Ph}$	$H_{4Ph}$	$H_{5Ph}$	$H_{6Ph}$
<b>183</b>	8.34 (s)	6.36 (d, 7.8)	6.95 – 6.91 (m)	7.19 – 7.15 (m)	6.99 (d, 7.8)
<b>184</b>	8.31 (s)	6.74 (d, 8.0)	7.01 – 6.95 (m)	7.22 – 7.14 (m)	6.43 (d, 8.0)
<b>185</b>	8.27 (s)	6.49 (dd, 8.4, 1.0)	7.01 – 6.97 (m)	7.22 – 7.17 (m)	7.01 – 6.97 (m)
<b>186</b>	8.28 (s)	6.56 (d, 7.6)	7.03 (pst, 7.6)	7.21 (pst, 7.6)	6.68 (d, 7.6)

**Tabla 14.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de  $^1H$ -RMN correspondientes a la zona aromática de **183-186**.

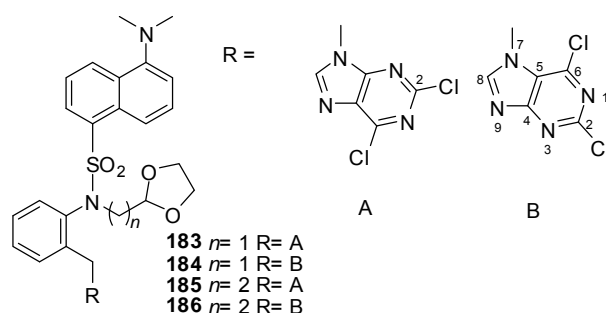
Con respecto al comportamiento del otro anillo aromático, en general, las señales  $H_{3Ph}$  y  $H_{6Ph}$  aparecen como d ( $\delta = 6.99 - 6.36$  ppm) por su acoplamiento con  $H_{4Ph}$  y  $H_{5Ph}$  ( $J = 8.0 - 7.6$  Hz), a excepción de **185** donde  $H_{3Ph}$  aparece como dd a  $\delta$  6.49 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 8.4$  Hz) con  $H_{4Ph}$  y a larga distancia ( $J = 1.0$



Hz) con H5<sub>Ph</sub>. En **185**, H6<sub>Ph</sub> aparece como m ( $\delta$  7.01 – 6.97 ppm) por solapamiento con la señal de H4<sub>Ph</sub>.

En general, las señales H4<sub>Ph</sub> y H5<sub>Ph</sub> aparecen como m entre  $\delta$  7.22 – 6.91 ppm en lugar del ddd teórico que aparece en los compuestos anteriores. En **186**, estas dos señales aparecen como pst ( $J = 7.6$  Hz) a  $\delta$  7.03 y 7.21 ppm.

La segunda zona del espectro de **183-186** corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales que se presentan en la Tabla 15.



Comp	Ph-CH <sub>2</sub>	N-CH <sub>2</sub>	N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> diox	CH <sub>2</sub> diox	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>183</b>	5.92 (d, 16.1)	4.24 (dd, 13.9, 4.5)		4.03 – 3.82	5.18	2.89
	5.82 (d, 16.1)	3.26 (dd, 13.9, 5.5)		(m)	(pst, 5.0)	(s)
<b>184</b>	6.12 (s)	4.20 (dd, 14.0, 4.3)		4.02 – 3.76	5.17	2.89
		3.22 (dd, 14.0, 5.9)		(m)	(dd, 5.8, 4.3)	(s)
<b>185</b>	5.79 (d, 15.9)	4.21 – 4.09 (m)	1.99 – 1.90 (m)	3.95 – 3.76	4.89	2.88
	5.73 (d, 15.9)	3.47 – 3.39 (m)	1.82 – 1.73 (m)	(m)	(pst, 4.1)	(s)
<b>186</b>	6.07 (d, 16.7)	4.15 – 4.04 (m)	1.96 – 1.85 (m)	3.94 – 3.74	4.88	2.89
	5.94 (d, 16.7)	3.51 – 3.41 (m)	1.84 – 1.74 (m)	(m)	(pst, 4.1)	(s)

**Tabla 15.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a la zona alifática de **183-186**.

Los hidrógenos bencílicos son diastereotópicos en **183**, **185** y **186**, resonando entre  $\delta$  6.07 – 5.73 ppm. Las señales aparecen como dos d debido al acoplamiento entre ellos ( $J_{\text{gem}} = 16.7 - 15.9$  Hz). En **184**, la señal aparece como s ( $\delta$  6.12 ppm).

Los hidrógenos correspondientes a los metilenos de la cadena de unión entre la sulfonamida y el anillo de dioxolano son también diastereotópicos. En **183** y **184**, cada átomo de hidrógeno de N-CH<sub>2</sub> aparece como un dd por el acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y con el hidrógeno del anillo de dioxolano ( $J_{\text{gem}} = 14.0 - 13.9$  Hz y  $J_{\text{vic}} = 5.9 - 4.3$  Hz) a campo entre  $\delta$  4.24 – 3.22 ppm. Por el contrario, en **185** y

**186**, cada átomo de hidrógeno de  $N\text{-CH}_2$  aparece como m entre  $\delta$  4.21 – 3.39 ppm debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico y los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena.

Las señales correspondientes a  $N\text{-CH}_2\text{-CH}_2$  aparecen como m entre  $\delta$  1.99 – 1.73 ppm. Los hidrógenos de este metileno son diastereotópicos y las señales aparecen como dos m debido al acoplamiento con el otro hidrógeno diastereotópico, los dos hidrógenos del metileno contiguo en la cadena y el hidrógeno del anillo de dioxolano.

Los átomos de hidrógeno del anillo de dioxolano muestran sus señales de resonancia de la siguiente forma: la señal del hidrógeno de  $\text{CH}_{\text{diox}}$  aparece como dd a  $\delta$  5.17 ppm en **184** debido al acoplamiento con los dos hidrógenos diastereotópicos del metileno contiguo en la cadena ( $J = 5.8$  y  $4.3$  Hz). En el resto de compuestos, la señal aparece como pst entre  $\delta$  5.18 – 4.88 ppm ( $J = 5.0$  –  $4.1$  Hz) en lugar del dd teórico.

La señal correspondiente a los protones metilénicos  $\text{CH}_{2\text{diox}}$  aparece como m con la simetría característica del sistema AA'BB' entre  $\delta$  4.03 – 3.74 ppm.

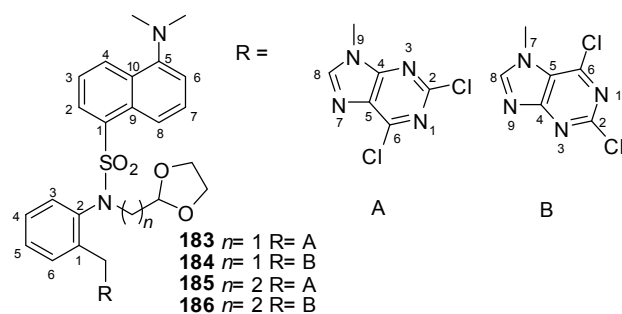
La señal de los 6 hidrógenos  $N(\text{CH}_3)_2$  en el grupo dansilo aparecen como s entre  $\delta$  2.89 – 2.88 ppm.

También se han registrado los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **183-186**. Los datos de desplazamiento químico de los carbonos se recogen en las Tablas 16 y 17.

La señal  $\text{C}_{4\text{pur}}$  aparece a  $\delta$  154 ppm en los isómeros  $N$ -9 y a  $\delta$  163 ppm en los isómeros  $N$ -7, comportamiento que se asemeja a derivados de purina previamente sintetizados<sup>38-40</sup>. El resto de señales de carbono correspondientes al anillo de purina presentan también diferencias entre los isómeros  $N$ -9 y  $N$ -7: la señal del  $\text{C}_{2\text{pur}}$  se registra a  $\delta$  152 ppm para  $N$ -9 y a  $\delta$  144 ppm para  $N$ -7. La señal de  $\text{C}_{8\text{pur}}$  difiere en 4 ppm de desplazamiento químico entre ambos isómeros ( $\delta$  147 y 151 ppm). El  $\text{C}_{6\text{pur}}$  no presenta diferencias, registrándose en torno a  $\delta$  146 – 143 ppm. La señal que se registra a menor desplazamiento de todas es la de  $\text{C}_{5\text{pur}}$ , que presenta diferencias de 8 ppm entre las señales de ambos isómeros, registrándose a 130 ppm para  $N$ -9 y 122 ppm para  $N$ -7.

En general, se observa una gran constancia en los desplazamientos químicos de los distintos átomos de C de **183-186**.

En el grupo dansilo, el desplazamiento químico de los carbonos aparece de la siguiente manera: la señal del  $\text{C}_{5\text{dan}}$  es la que se registra a campo más bajo ( $\delta$  151 ppm). Las señales de los carbonos 1, 2, 4, 9 y 10 presentan un desplazamiento en torno a  $\delta$  133 - 130 ppm. La señal de los carbonos 3, 7 y 8 aparece a  $\delta$  128 - 119 ppm. La señal del  $\text{C}_{6\text{dan}}$  es la que se registra a campo más alto ( $\delta$  115 ppm).



Comp	C5 <sub>dan</sub>	C1 <sub>dan</sub>	C4 <sub>dan</sub>	C9 <sub>dan</sub>	C2 <sub>dan</sub>	C10 <sub>dan</sub>	C7 <sub>dan</sub>	C3 <sub>dan</sub>	C8 <sub>dan</sub>	C6 <sub>dan</sub>
<b>183</b>	151.80	133.19	131.34	130.65	131.50	130.11	127.89	123.25	120.03	115.51
<b>184</b>	151.76	132.94	131.48	130.60	131.62	130.12	128.26	123.25	119.94	115.54
<b>185</b>	151.85	133.34	131.22	130.54	131.50	130.08	128.10	123.28	120.01	115.45
<b>186</b>	151.84	133.18	131.37	130.62	131.59	130.13	128.18	123.29	119.93	115.50

Comp	C4 <sub>pur</sub>	C2 <sub>pur</sub>	C6 <sub>pur</sub>	C8 <sub>pur</sub>	C5 <sub>pur</sub>	C2 <sub>ph</sub>	C1 <sub>ph</sub>	C3 <sub>ph</sub>	C4 <sub>ph</sub>	C5 <sub>ph</sub>	C6 <sub>ph</sub>
<b>183</b>	154.07	153.24	156.33	147.51	130.59	138.18	137.52	128.47	128.91	129.26	128.19
<b>184</b>	163.52	144.00	153.29	151.65	122.58	138.08	137.75	129.14	128.97	129.40	127.30
<b>185</b>	153.92	151.74	153.22	147.12	130.66	137.21	137.00	129.12	128.63	129.24	129.04
<b>186</b>	163.67	144.00	153.44	151.47	122.40	137.24	137.14	129.41	129.07	129.45	127.30

**Tabla 16.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la zona aromática de **183-186**.

La señales correspondientes a los carbonos del otro anillo aromático aparecen en un rango de desplazamiento que oscila entre  $\delta$  138 – 137 ppm para los carbonos cuaternarios y  $\delta$  129 – 127 ppm para los carbonos terciarios.

La segunda zona del espectro corresponde a la zona alifática donde se distinguen las señales de carbonos que se presentan en la Tabla 17.

Comp	Ph-CH <sub>2</sub>	<i>N</i> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub>	<i>N</i> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> diox	CH <sub>diox</sub>
<b>183</b>	43.90	45.57	55.04		65.14	102.46
<b>184</b>	45.56	46.98	55.16		65.25	101.96
<b>185</b>	43.93	45.55	47.14	32.66	65.16	102.20
<b>186</b>	47.32	45.56	47.15	32.94	65.20	102.16

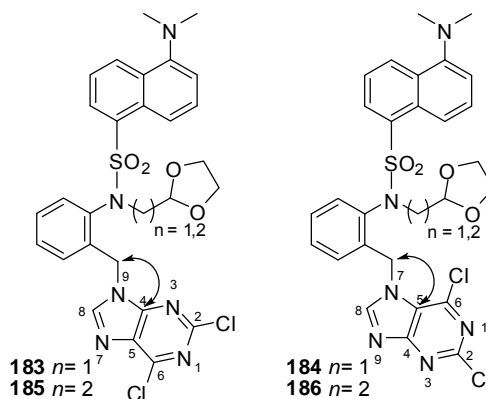
**Tabla 17.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la zona alifática de **183-186**.

En la zona alifática del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN aparecen las señales correspondientes a los carbonos Ph-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  47 - 43 ppm), *N*-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  55 – 47 ppm), *N*-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  32 ppm), CH<sub>2</sub>diox ( $\delta$  65 ppm), CH<sub>diox</sub> ( $\delta$  102 - 101 ppm) y *N*(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ( $\delta$  46 - 45 ppm).

Los estudios de RMN bidimensionales han permitido demostrar inequívocamente que la unión a la purina se establece a través de *N*-9 en **183** y **185**, y a través de *N*-7 en **184** y **186**.

La discriminación entre los isómeros *N*-9 y *N*-7 en los derivados de dansilo **183-186** se basa en la correlación a tres enlaces que existe entre los protones del grupo

bencílico unido a la purina y los carbonos cuaternarios de la purina: C4<sub>pur</sub> y C5<sub>pur</sub> (Esquema 23). En los isómeros *N*-9, los protones bencílicos se correlacionan a tres enlaces con el C4<sub>pur</sub>, mientras que en los isómeros *N*-7, estos protones se correlacionan con el C5<sub>pur</sub> (Ver Anexo). Las señales C4<sub>pur</sub> y C5<sub>pur</sub> han sido asignadas por similitud a las señales de los compuestos anteriormente descritos en esta Tesis Doctoral (**173-179**).



**Esquema 23.** Interacciones a tres enlaces que justifican la naturaleza *N*-9 (**183** y **185**) y *N*-7 (**184** y **186**) de los derivados de dansilo.

Finalmente, el análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para la fórmula empírica (M + H)<sup>+</sup> de los derivados del dansilo y los correspondientes valores encontrados:

**164:** Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>SSi (M + H)<sup>+</sup>: 471.2059, encontrado: 471.2138 (desviación - 0.8 ppm).

**167:** Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SSi (M + H)<sup>+</sup>: 557.2427, encontrado: 557.2514 (desviación 1.6 ppm).

**168:** Calculado para C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SSi (M + H)<sup>+</sup>: 571.2584, encontrado: 571.2662 (desviación - 0.9 ppm).

**171:** Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 443.1562, encontrado: 443.1637 (desviación -0.9 ppm).

**172:** Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 457.1719, encontrado: 457.1797 (desviación 0.0 ppm).

**183:** Calculado para C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 613.1113, encontrado: 613.1202 (desviación 1.6 ppm).

**184:** Calculado para C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 613.1113, encontrado: 613.1184 (desviación - 1.3 ppm).

**185:** Calculado para  $C_{29}H_{29}Cl_2N_6O_4S$  (M + H)<sup>+</sup>:627.1270, encontrado: 627.1346 (desviación – 0.3 ppm).

**186:** Calculado para  $C_{29}H_{29}Cl_2N_6O_4S$  (M + H)<sup>+</sup>: 627.1270, encontrado: 627.1348 (desviación – 0.5 ppm).

#### 1.4. Estudios biológicos

Los diez compuestos finales derivados del *p*-nitrobencensulfonilo (**173-182**) se han ensayado como agentes antiproliferativos frente a cuatro líneas celulares de cáncer humano. Los seis compuestos con mejor actividad antiproliferativa (**173-175, 177-179**) se han seleccionado para estudiar su efecto sobre el ciclo celular y su capacidad de inducción de apoptosis/necrosis en la línea celular de melanoma humano A375. Se han llevado a cabo además ensayos de toxicidad con el compuesto **179** en ratones.

Los cuatro compuestos finales derivados del dansilo (**183-186**) se han ensayado como agentes antiproliferativos frente a dos líneas celulares. Se han llevado a cabo estudios de fluorescencia con el derivado **185** que permiten conocer en qué órganos se localiza el fármaco diana, utilizando el compuesto **179** como control. Se han realizado también ensayos de toxicidad sobre el compuesto **185**.

Estos estudios se han realizado por el Grupo de Investigación dirigido por el Dr. Juan Antonio Marchal Corrales, Catedrático del Departamento de Anatomía y Embriología Humana e Investigador del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

Los protocolos seguidos para la determinación de las distintas actividades biológicas se detallan en la Parte Experimental de esta Tesis Doctoral.

##### 1.4.1. Ensayos de citotoxicidad

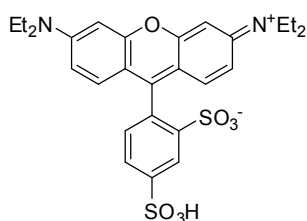
Los estudios de actividad antiproliferativa se han llevado a cabo frente a cultivos celulares de las líneas de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, cáncer colorrectal HCT-116 y melanomas humanos A375 y G361. Estas líneas constituyen un buen modelo para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad por las características que se detallan a continuación.

La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, junto con la T-47D y la MDA-MB-231, son las más utilizadas en investigación llegando a ocupar dos tercios de los artículos sobre cáncer de mama según un estudio de Medline<sup>87</sup>. MCF-7 pertenece a las líneas celulares de carcinoma con fenotipo luminal epitelial y es ampliamente utilizada ya que el fenotipo se mantiene en los tumores primarios<sup>88</sup>.

La tasa de mutación de microsatélites es elevada en las células HCT-116 de carcinoma humano, por lo que coincide con los patrones de inestabilidad de los cánceres de colon que muestran defectos en la reparación de emparejamientos erróneos del ADN<sup>87</sup>.

A375 y G361 son dos líneas celulares de melanoma maligno obtenidas por biopsia de tejido epitelial con metástasis. La diferencia entre ellas es que A375 proviene de una mujer, mientras que G361 de un hombre. Ambas producen tumores y metástasis en modelos animales, por lo que existe una excelente correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*<sup>89,90</sup>.

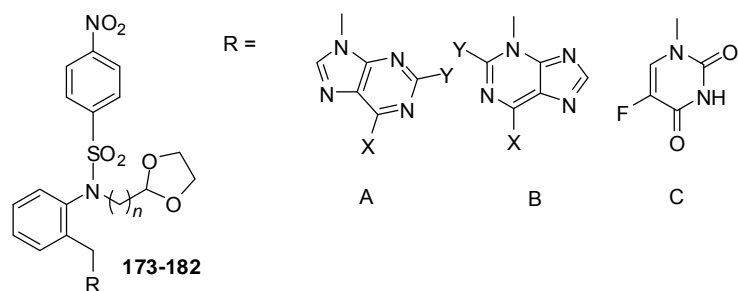
La viabilidad celular se ha estudiado utilizando la técnica de la sulforrodamina B (SRB). La SRB (Figura 31) es un colorante de aminoxantano rosado brillante que se une de forma electrostática a los aminoácidos básicos de las proteínas celulares previamente fijados con ácido tricloroacético produciendo un color que permite su cuantificación<sup>91</sup>. La unión se da por los dos grupos sulfónicos que posee la molécula de SRB. El colorante no fijado se elimina y se mide la absorbancia a 492 nm. Es un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica sensible, rápido y sencillo.



**Figura 31.** Estructura de la SRB.

La concentración de fármaco que disminuye a la mitad la población celular se mide al representar en una gráfica la absorbancia proporcional a la cantidad de sulforrodamina que se ha unido a las células con respecto a las concentraciones de fármaco utilizado. Los datos se ajustan por regresión de mínimos cuadrados, siendo la ecuación de la recta:  $y = ax + b$ , donde el valor de  $x$  corresponde a la  $CI_{50}$ .

Los datos de  $CI_{50}$  de la proliferación sobre cultivos celulares de MCF-7, HCT-116, A375 y G361 de **173-182** se detallan en la Tabla 20. En ella se muestran los valores medios de  $CI_{50}$  en unidades de  $\mu M$  ( $\mu mol/l$ ) obtenidos después de 6 días de tratamiento para cada compuesto  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas realizadas en cada caso. Se han utilizado 3 decimales para los valores menores a  $10 \mu M$  y 2 decimales para el resto de valores.



Comp.	<i>n</i>	R	X	Y	Isóm.	MCF-7	HCT-116	A375	G361
						CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)
<b>173</b>	1	A	Cl	H	<i>N</i> -9	12.20 ± 0.08	3.100 ± 0.030	0.663 ± 0.018	1.453 ± 0.003
<b>174</b>	1	A	Br	H	<i>N</i> -9	12.10 ± 0.03	3.060 ± 0.020	1.371 ± 0.039	1.238 ± 0.003
<b>175</b>	1	A	Cl	Cl	<i>N</i> -9	1.170 ± 0.028	15.87 ± 0.03	1.329 ± 0.016	1.295 ± 0.005
<b>176</b>	1	B	NH <sub>2</sub>	H	<i>N</i> -9	15.15 ± 0.04	13.68 ± 0.04	6.549 ± 0.058	6.841 ± 0.004
<b>177</b>	2	A	Cl	H	<i>N</i> -9	2.200 ± 0.050	2.620 ± 0.050	0.340 ± 0.009	0.747 ± 0.003
<b>178</b>	2	A	Br	H	<i>N</i> -9	3.260 ± 0.040	2.690 ± 0.060	0.557 ± 0.090	1.225 ± 0.003
<b>179</b>	2	A	Cl	Cl	<i>N</i> -9	3.010 ± 0.008	4.110 ± 0.001	0.134 ± 0.033	0.836 ± 0.010
<b>180</b>	2	B	NH <sub>2</sub>	H	<i>N</i> -9	17.22 ± 0.02	21.3 ± 0.04	6.823 ± 0.045	6.352 ± 0.004
<b>181</b>	2	B	NH <sub>2</sub>	H	<i>N</i> -3	12.57 ± 0.03	13.6 ± 0.04	5.349 ± 0.014	5.777 ± 0.003
<b>182</b>	2	C			<i>N</i> -1	27.30 ± 0.08	20.28 ± 0.10	11.23 ± 0.02	10.66 ± 0.005

**Tabla 18.** Actividad antiproliferativa de **173-182** frente a las líneas celulares MCF-7, HCT-116, A375 y G361.

En la línea celular MCF-7 el compuesto que presenta la mayor actividad antiproliferativa es el derivado de dicloropurina **175** (CI<sub>50</sub>= 1.17 μM). Los derivados de cloro y bromopurina presentan diferencias de actividad en función del número de carbonos que aparece en la cadena de unión entre la sulfonamida y el dioxolano (*n*): cuando *n*= 1 los valores son mayores (CI<sub>50</sub>= 12 μM para **173** y **174**) que cuando *n*= 2 (CI<sub>50</sub>= 2-3 μM para **177** y **178**). Sin embargo, en los derivados de dicloropurina ocurre lo contrario, siendo los valores de CI<sub>50</sub> menores cuando *n*= 1 (CI<sub>50</sub>= 1.17 μM para **175**) que cuando *n*= 2 (CI<sub>50</sub>= 3.01 μM para **179**). Los compuestos que presentan peor actividad antiproliferativa son los derivados de adenina (**176**, **180** y **181**) y 5-FU (**182**) con valores en torno a 15 y 27 μM, respectivamente, siendo ligeramente superior la actividad del isómero *N*-3 a la del isómero *N*-9 en el caso de la adenina (12 frente 17 μM para **181** y **180** respectivamente).

Los dos compuestos más activos como agentes antiproliferativos en la línea celular HCT-116 son los derivados de cloropurina y bromopurina que presentan un resto de dos carbonos en la cadena de unión de la sulfonamida al dioxolano (**177** y **178**, CI<sub>50</sub>= 2.62 y 2.69 μM). Sus derivados análogos con un carbono en la cadena (**173** y **174**) presentan valores similares de CI<sub>50</sub> (3 μM). En el caso de los derivados de dicloropurina, el derivado con *n*= 1 presenta menor actividad antiproliferativa (CI<sub>50</sub>= 15.87 μM para **175**) que el derivado con *n*= 2 (CI<sub>50</sub>= 4.11 μM para **179**). Los compuestos menos activos en esta línea celular son los derivados de adenina y 5-FU (**176**, **180-182**) con valores de CI<sub>50</sub> en torno a 13 – 21 μM.

Todos los derivados de *p*-nitrobenzensulfonilo (**173-182**) presentan los mejores valores de  $CI_{50}$  en la línea A375 que en las 3 anteriores, siendo **179** el que presenta una destacada actividad antiproliferativa con un valor de  $CI_{50}$  de 0.13  $\mu$ M. El resto de derivados de purina muestran valores de  $CI_{50}$  en torno a 0.34 - 1.37  $\mu$ M, siendo inferiores en los compuestos que presentan  $n=2$  (**177-179**) que en los que presentan  $n=1$  (**173-175**). Los derivados de adenina presentan valores de  $CI_{50}$  de 5  $\mu$ M para el isómero *N*-3 (**181**) y de 6  $\mu$ M para los isómeros *N*-9 (**176** y **180**). El derivado de 5-FU (**182**) es el que presenta peor actividad antiproliferativa con un valor de  $CI_{50}$  de 11.23  $\mu$ M.

Los resultados en la línea celular G361 son similares a los de la línea celular A375, ambas de melanoma humano. Los compuestos más activos como antiproliferativos son los derivados de cloropurina **177** ( $CI_{50}= 0.75 \mu$ M) y dicloropurina **179** ( $CI_{50}= 0.84 \mu$ M), ambos con  $n=2$ , mientras que sus análogos respectivos con  $n=1$  presentan actividades de 1.45  $\mu$ M para **173** y 1.30  $\mu$ M para **175**. El derivado de bromopurina presenta actividades en torno a 1.2  $\mu$ M tanto cuando  $n=1$  (**174**) como cuando  $n=2$  (**178**). Los derivados de adenina presentan valores de  $CI_{50}$  similares a los de la línea A375, siendo en este caso también más activo el isómero *N*-3 ( $CI_{50}= 5.78 \mu$ M para **181**) que los isómeros *N*-9 ( $CI_{50}= 6.35$  y  $6.84 \mu$ M para **180** y **176**). El compuesto menos activo es el derivado de 5-FU (**182**) con valores de  $CI_{50}$  de 10.66  $\mu$ M.

El comportamiento de los compuestos **173-182** como agentes antiproliferativos frente a las cuatro líneas celulares presentan una serie de similitudes que nos permiten establecer las siguientes SARs:

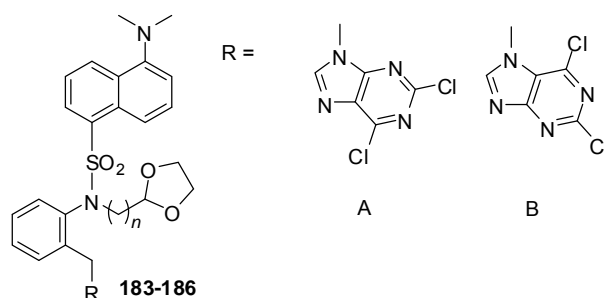
Los valores de  $CI_{50}$  de los compuestos que presentan dos carbonos en la cadena de unión entre la sulfonamida y el dioxolano ( $n=2$ ) son mejores que los de los compuestos que presentan un solo carbono en la cadena ( $n=1$ ). Esta mejor actividad antiproliferativa puede ser debida a la mayor lipofilia que confiere a la molécula la presencia de un grupo metilénico más en la cadena, permitiendo una mejor penetración en las células.

Los compuestos más activos en todas las líneas celulares son los derivados de bromo, cloro y dicloropurina (**173-179**) frente a los derivados de adenina y 5-FU, como ya se ha observado anteriormente<sup>39</sup>. La actividad antiproliferativa del isómero *N*-3 en el derivado de adenina es ligeramente mejor que la del isómero *N*-9.

Además, cabe mencionar que todos los compuestos presentan la mayor potencia frente a las líneas celulares de melanoma humano con valores de  $CI_{50}$  en el rango submicromolar, siendo el compuesto **179** el más activo con una  $CI_{50}$  de 134 nM frente a la línea celular A375.

Los compuestos **183-186** han sido ensayados frente a las líneas celulares MCF-7 y HCT-116 (Tabla 19).





Compuesto	<i>n</i>	R	Isómero	MCF-7	HCT-116
				CI <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)
<b>183</b>	1	A	<i>N</i> -9	10.40 ± 0.03	2.910 ± 0.013
<b>184</b>	1	B	<i>N</i> -7	2.170 ± 0.070	1.280 ± 0.001
<b>185</b>	2	A	<i>N</i> -9	2.610 ± 0.040	2.290 ± 0.020
<b>186</b>	2	B	<i>N</i> -7	1.930 ± 0.030	3.300 ± 0.005

**Tabla 19.** Actividad antiproliferativa de **183-186** frente a las líneas celulares MCF-7 y HCT-116.

Los derivados de dansilo (**183-186**) presentan también actividad antiproliferativa en las líneas celulares MCF-7 y HCT-116 con valores de CI<sub>50</sub> en torno a 1 – 3 μM, a excepción del compuesto **183** en la línea MCF-7 que presenta una CI<sub>50</sub> = 10.40 μM.

En la línea MCF-7 se observa que los isómeros *N*-7 (**184** y **186**) son más activos como antiproliferativos que los *N*-9 (**183** y **185**). Esta diferencia no se observa en la línea HCT-116 donde todos los valores son similares.

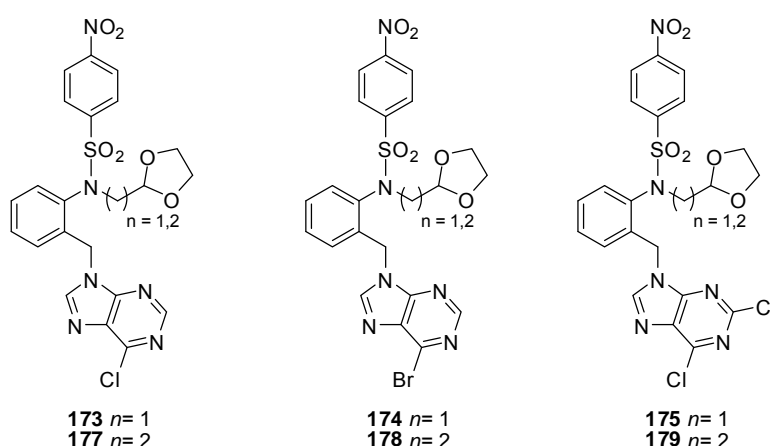
Mientras en la línea MCF-7 los derivados **185** y **186** con *n* = 2 presentan valores de CI<sub>50</sub> mejores que sus análogos con *n* = 1 (**183** y **184**), en la línea HCT-116 ocurre lo contrario ya que los derivados con *n* = 1 presentan valores inferiores de CI<sub>50</sub>.

#### 1.4.2. Análisis de distribución del ciclo celular

Se han seleccionado los derivados de cloro, bromo y dicloropurina del *p*-nitrobenzensulfonilo (**173-175** y **177-179**) para el estudio de ciclo celular frente a la línea A375, que es en la que presentan mejores valores de actividad antiproliferativa. Dicho estudio se ha realizado mediante citometría de flujo después de 24 y 48 h de tratamiento a tres veces la CI<sub>50</sub> de cada derivado. Este estudio permite conocer la distribución de las células a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M) en base al contenido en ADN. Para ello, las células son teñidas previamente con yoduro de propidio (IP), un fluorocromo que actúa como agente intercalante del ADN. De este modo, la fluorescencia emitida por el IP se correlaciona con el contenido de ADN de la célula, que será mayor o menor en función de la fase del ciclo en la que se encuentre.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20 y en la Figura 32. El tratamiento con **173** y **175** no produce cambios considerables en la distribución de las

células en las diferentes fases del ciclo con respecto al grupo control. Sin embargo, sí se observan cambios significativos en el perfil de fluorescencia tras el tratamiento con los compuestos **174**, **177-179**, que detienen el ciclo celular en fase G<sub>2</sub>/M a expensas de las otras dos fases (26.60 %, 34.40 %, 37.27 % y 21.36 % respectivamente frente a 8.71 % del control) a las 24 h. El compuesto **177** también detiene el ciclo celular en fase G<sub>2</sub>/M a las 48 h de tratamiento (38.00 % frente a 19.75 % del control) mientras que el compuesto **179** lo detiene en fase S a expensas de G<sub>2</sub>/M y G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (49.43 % frente al 39.37 % del control). **173-175** no muestran diferencias con respecto al control a las 48 h de tratamiento.



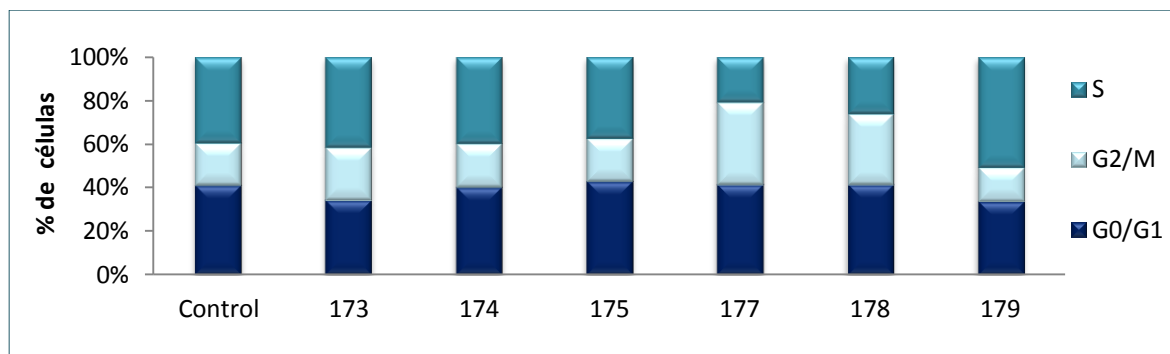
	Control (%)	<b>173</b> (%)	<b>174</b> (%)	<b>175</b> (%)	<b>177</b> (%)	<b>178</b> (%)	<b>179</b> (%)
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	40.55 ± 0.70	47.42 ± 3.46	33.69 ± 4.34	40.22 ± 1.28	28.25 ± 3.02	26.38 ± 1.80	38.68 ± 2.55
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	8.71 ± 0.93	10.62 ± 1.23	26.60 ± 1.15	9.93 ± 0.93	34.40 ± 1.84	37.27 ± 1.94	21.36 ± 1.53
<b>S</b>	50.75 ± 0.23	41.96 ± 2.23	39.72 ± 5.49	49.86 ± 0.35	37.26 ± 1.33	36.35 ± 3.73	40.16 ± 0.73

\*24 h de tratamiento

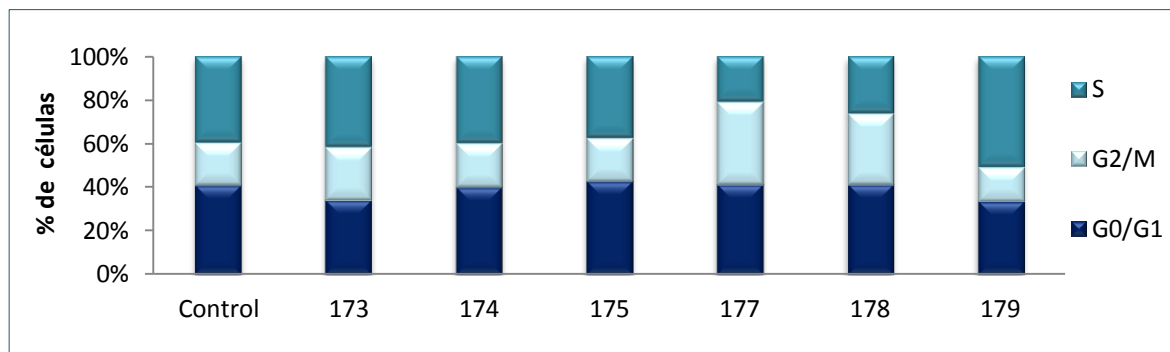
	Control (%)	<b>173</b> (%)	<b>174</b> (%)	<b>175</b> (%)	<b>177</b> (%)	<b>178</b> (%)	<b>179</b> (%)
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	40.86 ± 1.14	34.23 ± 0.69	39.88 ± 4.62	42.79 ± 0.91	41.19 ± 2.43	41.09 ± 0.50	32.78 ± 2.87
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	19.75 ± 0.67	24.32 ± 0.38	20.34 ± 17.40	19.80 ± 0.88	38.00 ± 4.04	32.88 ± 10.89	15.31 ± 2.14
<b>S</b>	39.37 ± 0.47	41.46 ± 1.07	39.78 ± 12.77	37.42 ± 0.03	20.82 ± 6.47	26.03 ± 10.39	49.43 ± 1.49

\*48 h de tratamiento

**Tabla 20.** Porcentaje de células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M y S del ciclo celular en la línea A375 tras el tratamiento con **173-175** y **177-179** (24 y 48 h, 3 × CI<sub>50</sub>).



\*24 h de tratamiento



\*48 h de tratamiento

**Figura 32.** Efecto de **173-175** y **177-179** sobre el ciclo celular de la línea A375 determinado por citometría de flujo. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M y S representan el porcentaje de células distribuidas en dicha fase después del tratamiento (24 y 48 h, 3 × CI<sub>50</sub>).

### 1.4.3. Ensayo de apoptosis

El estudio de apoptosis/necrosis se ha realizado en la línea celular A375 después de 24 y 48 h de tratamiento con **173-175** y **177-179** a tres veces su CI<sub>50</sub> (Tabla 21 y Figura 33). Se ha utilizado un kit de anexina V-FITC que detecta los cambios que ocurren en la superficie celular. La anexina V es una proteína con capacidad de unión específica a los fosfolípidos como la fosfatidilserina que se encuentra en la superficie interna de la membrana plasmática y se expone en la superficie externa de la membrana cuando comienza la apoptosis. El kit también contiene yoduro de propidio (PI), un agente intercalante de bases que nos permite visualizar el ADN. Con la mezcla de anexina V y PI, se pueden diferenciar las células apoptóticas tempranas (sólo marcadas con anexina V), de las células apoptóticas tardías (teñidas tanto con anexina V como con PI) y de las células necróticas (sólo teñidas con PI)<sup>92</sup>.

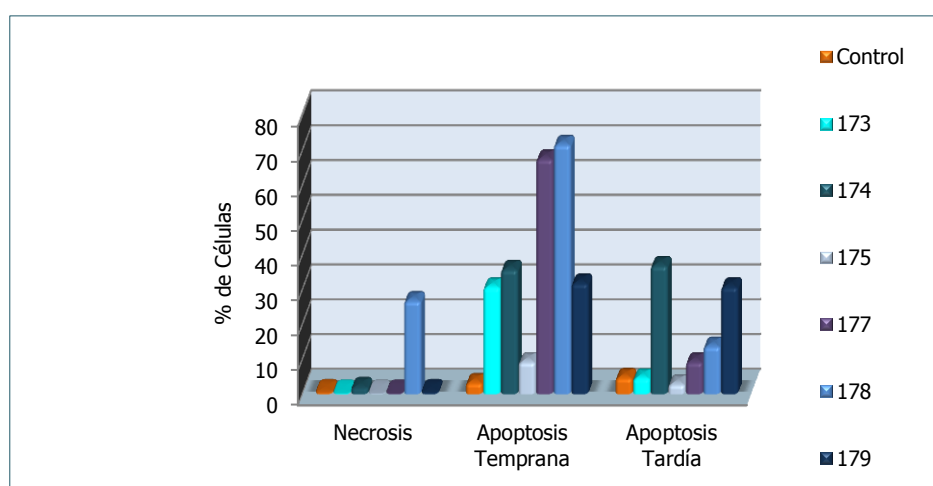
	Control (%)	173 (%)	174 (%)	175 (%)	177 (%)	178 (%)	179 (%)
<b>N</b>	0.45 ± 0.21	0.15 ± 0.07	1.45 ± 0.35	0.15 ± 0.07	0.10 ± 0.00	26.38 ± 1.80	0.45 ± 0.07
<b>A. Temp</b>	2.85 ± 0.35	30.30 ± 3.82	35.35 ± 4.17	8.85 ± 1.63	67.10 ± 1.41	71.25 ± 4.03	31.42 ± 0.59
<b>A. Tardía</b>	4.30 ± 0.14	4.20 ± 0.71	36.45 ± 5.44	2.45 ± 0.21	8.80 ± 2.12	13.30 ± 6.22	30.35 ± 0.35

\*24 h de tratamiento

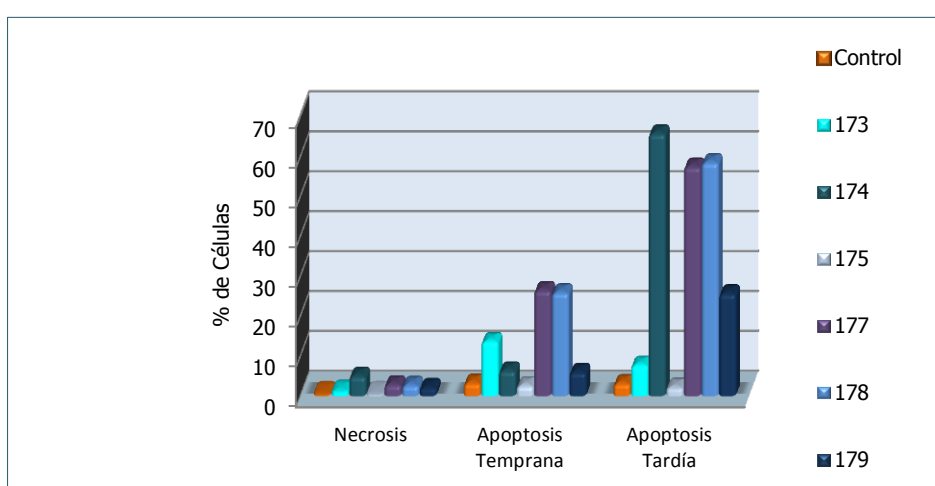
	Control (%)	173 (%)	174 (%)	175 (%)	177 (%)	178 (%)	179 (%)
<b>N</b>	0.40 ± 0.14	0.95 ± 0.21	4.50 ± 0.14	0.35 ± 0.07	2.40 ± 0.14	2.25 ± 0.49	1.60 ± 0.28
<b>A. Temp</b>	2.80 ± 0.42	13.20 ± 1.41	5.85 ± 0.49	2.15 ± 0.07	26.00 ± 0.14	25.45 ± 1.34	5.50 ± 0.57
<b>A. Tardía</b>	2.70 ± 0.28	7.30 ± 0.99	65.25 ± 0.21	1.70 ± 0.28	56.95 ± 4.88	58.05 ± 2.75	25.2 ± 1.13

\*48 h de tratamiento

**Tabla 21.** Estudio mediante citometría de flujo de la inducción de apoptosis mediante doble marcaje con an V y IP. Porcentaje de células necróticas (N), en apoptosis temprana (A. Temp) o apoptosis tardía (A. tardía) después de su tratamiento con **173-175** y **177-179** (24 y 48 h, 3 × CI<sub>50</sub>).



\*tras 24 h de tratamiento.



\*tras 48 h de tratamiento.

**Figura 33.** Porcentaje de células necróticas, en estado apoptótico temprano y tardío después de su tratamiento con los compuestos **173-175** y **176-179** (24 y 48 h, 3 × CI<sub>50</sub>).

Los compuestos más apoptóticos son los derivados con  $n= 2$ , que además presentan mayor efecto antiproliferativo ( $CI_{50}$  de 0.34, 0.56 y 0.13  $\mu\text{M}$  para **177**, **178** y **179**, respectivamente) y parada del ciclo celular en fase  $G_2/M$ , siendo el derivado **178** que contiene bromopurina en su estructura el que presenta valores mayores de apoptosis total: 84.55 % frente a 7.15 % del control tras 24 h de tratamiento y 83.50 % frente a 5.50 % del control tras 48 h de tratamiento. El compuesto **178** es el derivado de purina con mayor actividad apoptótica sintetizado por el grupo de investigación.

Los compuestos **117-119** y **129-131** (ver apartado I.4.3) detienen el ciclo celular en fase  $G_2/M$  al igual que **174** y **177-179**. Además la acción antiproliferativa de **117-119** y **129-131** ha demostrado estar relacionada con las vías de señalización del factor eIF2 $\alpha$ <sup>46,47</sup>. Dicho factor es fundamental en la inhibición de la síntesis proteica y en los procesos de apoptosis, justificando así la parada en fase  $G_2/M$  y elevada capacidad apoptótica de los compuestos. Los derivados aquí descritos (**174** y **177-179**) presentan las mismas características de acción sobre ciclo celular y apoptosis que **117-119** y **129-131**, por lo que podrían actuar a través de las mismas dianas biológicas como agentes antiproliferativos, siendo necesaria la corroboración de dicha hipótesis con estudios posteriores.

#### **1.4.4. Ensayos de toxicidad *in vivo***

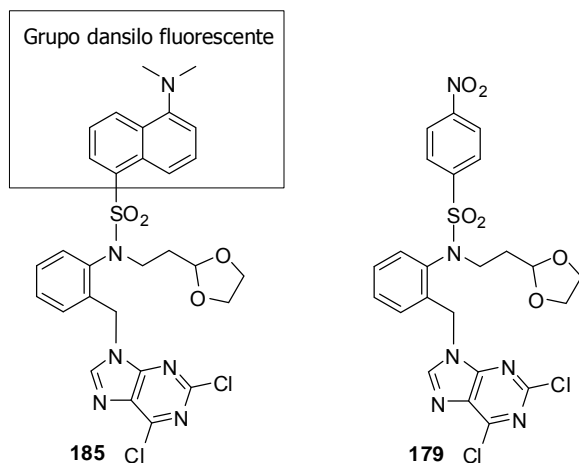
Los estudios de toxicidad aguda *in vivo* se han llevado a cabo con los compuestos **179** y **185**. El compuesto **179** se ha seleccionado por ser es el compuesto más activo como antiproliferativo en la línea A375 y el compuesto **185** por ser su análogo fluorescente.

La toxicidad de los compuestos se ha evaluado utilizando ratones BALB7c ( $n= 40$ ) a los que se les administra por vía oral una dosis diaria de hasta 250 mg/Kg/día (50/75/100/150/250) de los compuestos durante 1 semana seguida de 1 semana de descanso.

Durante el periodo de estudio no se han observado cambios en la conducta, signos clínicos de toxicidad, ni muertes en el 100 % de los animales tratados. El análisis macroscópico de los órganos estudiados no ha mostrado modificaciones, siendo su aspecto normal.

#### **1.4.5. Estudio de distribución del fármaco *in vivo***

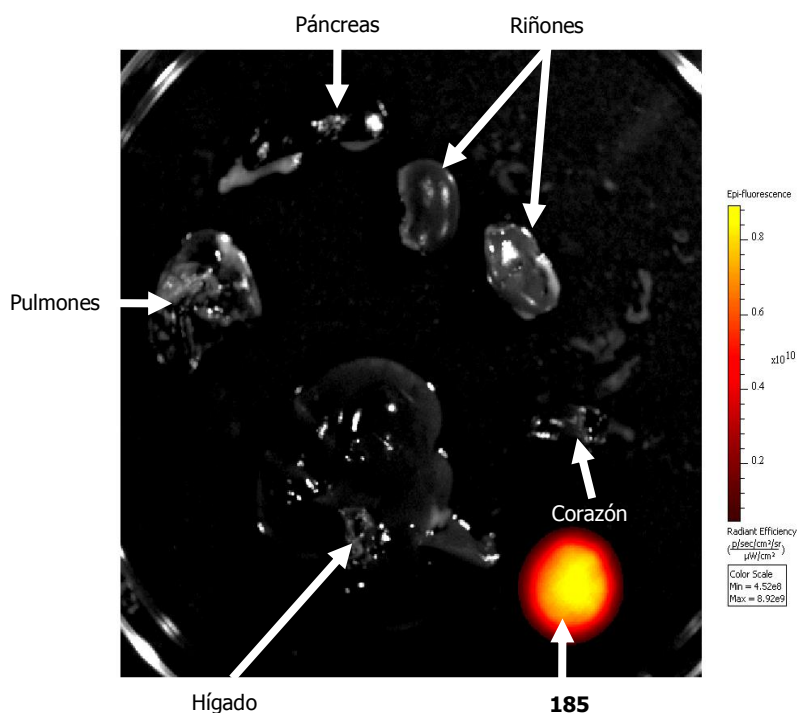
Con este estudio, se observa en qué órganos se acumula **185** ya que dicho compuesto es capaz de emitir fluorescencia por la presencia del grupo dansilo en su estructura tras la excitación con un haz de luz (Figura 34). Se ha utilizado además su análogo no fluorescente como control (**179**).



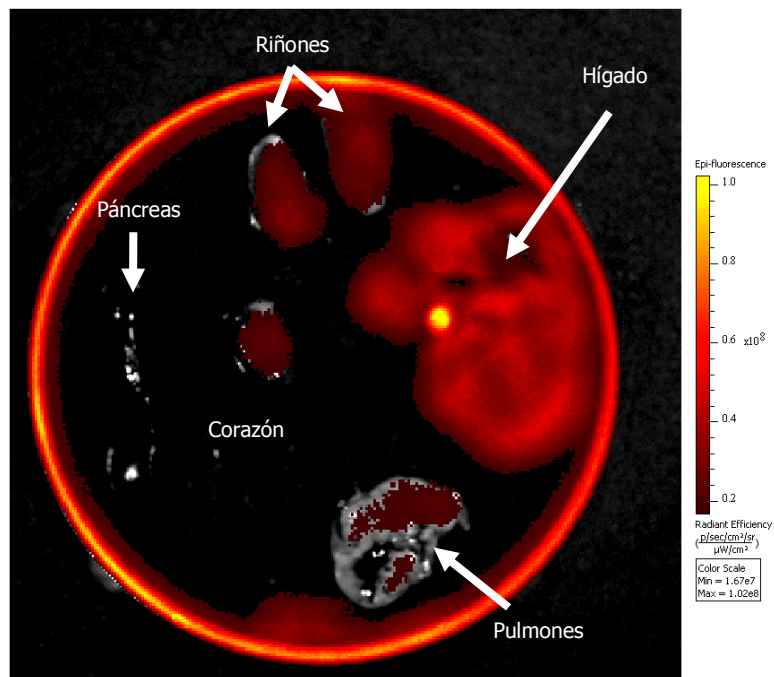
**Figura 34.** Compuestos utilizados en el estudio de distribución de fármaco *in vivo*.

El análisis muestra que a diferencia de los ratones a los que se les administró **179** (Figura 35), los ratones tratados con **185** presentan una alta señal en todos los órganos analizados, excepto el páncreas que no emite fluorescencia y los pulmones que emiten una señal muy baja (Figura 36).

Estos datos indican, en primer lugar, que el compuesto tras ser suministrado por vía oral se distribuye por todo el organismo y en segundo lugar, que tanto el hígado como los riñones son los órganos donde más se acumula. Esto puede ser explicado por su metabolización y excreción renal. No obstante son necesarios estudios complementarios para obtener más conclusiones acerca de su biodistribución y biodisponibilidad.



**Figura 35.** Estudio de distribución de **179** *in vivo*.



**Figura 36.** Estudio de distribución de  $^{185}\text{Lu}$  *in vivo*.

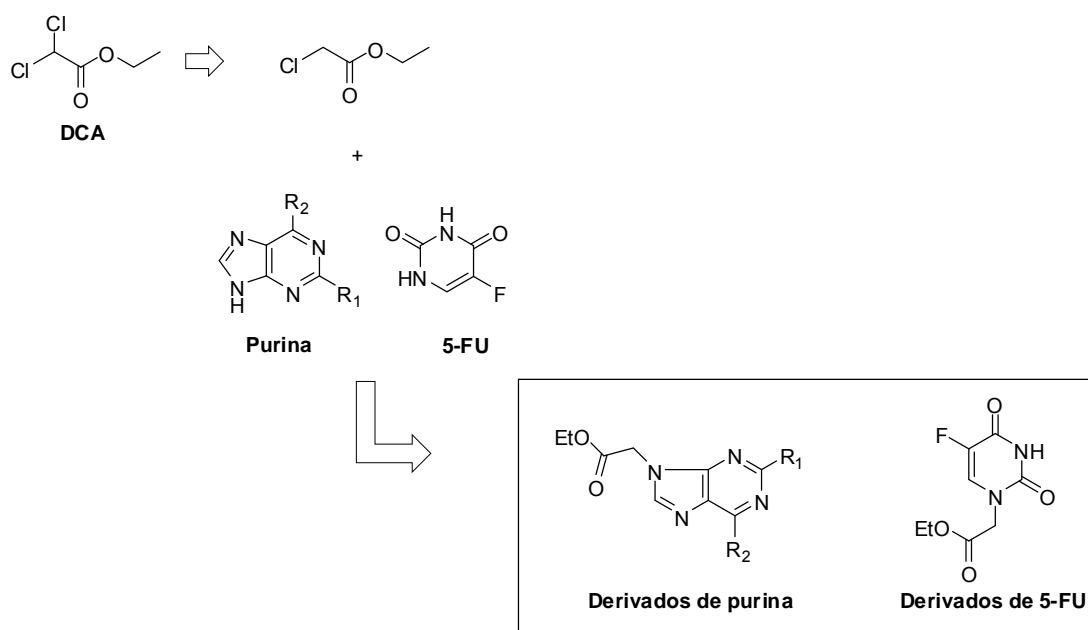
## 2. Familia B

### 2.1. Diseño molecular

El DCA es un fármaco para el tratamiento de la acidosis láctica que ha mostrado mayor interés en la comunidad científica desde el 2006 al comprobar que también posee actividad como fármaco antitumoral<sup>62</sup>. Derivados de cloroacetato han demostrado ser potentes agentes antiproliferativos con valores de  $CI_{50}$  de 1.5 – 6.9  $\mu$ M frente a la línea celular MCF-7<sup>76</sup> (ver apartado I.6.).

Los derivados de purina han demostrado ser mejores agentes antiproliferativos que sus respectivos derivados de pirimidina<sup>40,42</sup> (ver apartado I.4.). El anillo de purina es el anillo que más se ubiquita de todos los compuestos heterocíclicos debido a que un gran número de enzimas utilizan bases púricas. Por ello las bases púricas y sus nucleósidos se utilizan como fuente de diseño de nuevas moléculas con actividad biológica constituyendo un grupo importante de fármacos antineoplásicos en la actualidad<sup>93</sup>.

Por tanto en esta familia se plantea la unión de las diferentes bases púricas cloropurina, bromopurina y dicloropurina al derivado de cloroacetato (Figura 37). Se han incluido también los derivados de 5-FU a fin de realizar un estudio comparativo con respecto a los derivados de purina.

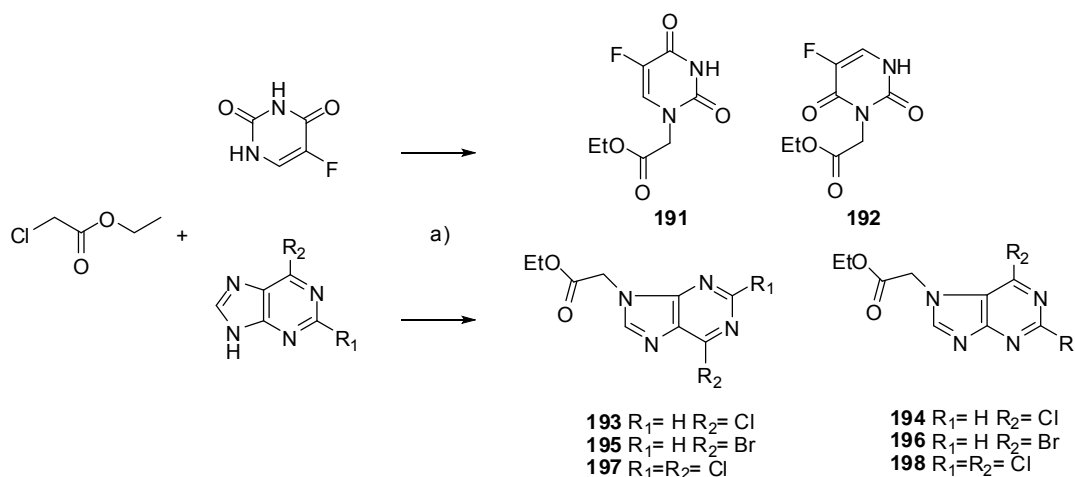


**Figura 37.** Diseño molecular de los compuestos pertenecientes a la familia B.



## 2.2. Síntesis química

La metodología sintética empleada para la preparación de los compuestos finales **191-198** se detalla en el Esquema 24.



**Esquema 24.** *Reactivos y condiciones:* a) Et<sub>3</sub>N, H<sub>2</sub>O, 105 °C, microondas, 8 min (13 % para **191**, 6 % para **192**, 24 % para **193**, 12 % para **194**, 28 % para **195**, 9 % para **196**, 40 % para **197**, 15 % para **198**).

Esta metodología se basa en la previamente descrita para la síntesis de **193** y **197**<sup>94</sup>. La mezcla de reacción se irradia durante 8 min a 105 °C en microondas utilizando agua como disolvente y Et<sub>3</sub>N como base. Mientras que los autores sólo describen el aislamiento de los isómeros *N*-9 (**193** y **197**), en nuestro caso se obtienen los isómeros *N*-9 y *N*-7 en cada reacción (**193** y **194**, **197** y **198**, respectivamente). Se han llevado a cabo además las síntesis con los derivados de bromopurina y 5-FU, obteniéndose los isómeros *N*-9 y *N*-7 para los derivados de bromopurina (**195** y **196**) y los isómeros *N*-1 y *N*-3 (**191** y **192**) para los derivados del 5-FU. La identificación inequívoca de dichos isómeros aparece detallada en el análisis espectroscópico (apartado 2.3). Cabe mencionar que la síntesis de estos compuestos consiste en una reacción limpia, sencilla y muy económica que se engloba dentro de las reacciones de *química ecológica* o *green chemistry*.

## 2.3. Análisis espectroscópico

Todos los compuestos se han identificado por espectroscopía de RMN, tanto de <sup>1</sup>H (300, 400, 500 o 600 MHz) como de <sup>13</sup>C (75, 125 o 150 MHz), espectrometría HRMS y análisis elemental. Además, se han llevado a cabo estudios de RMN bidimensional HSQC y HMBC para la identificación inequívoca de los isómeros obtenidos *N*-1 (**191**), *N*-3 (**192**), *N*-7 (**194**, **196** y **198**) y *N*-9 (**193**, **195** y **197**). Los espectros y estudios

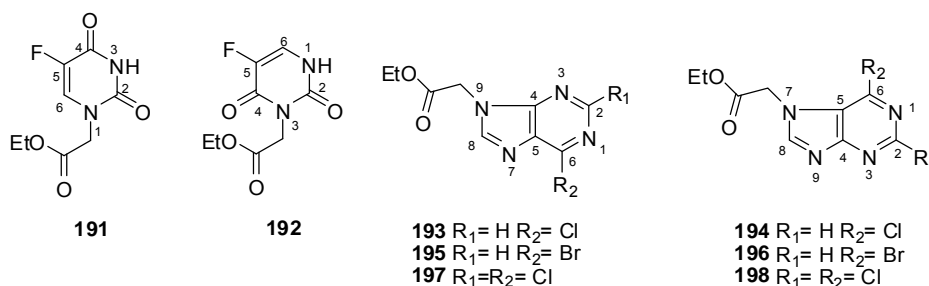
bidimensionales de todos los compuestos se encuentran detallados en el anexo a este documento.

Los datos espectroscópicos se presentan recogidos en las Tablas 22 y 23, con un esquema de las estructuras y una explicación detallada de las señales. En las tablas, se muestran los valores de desplazamiento químico en primer lugar y entre paréntesis, las multiplicidades y las constantes de acoplamiento. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hz (ciclos por segundo). El aspecto y la multiplicidad de las señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: (s) singlete; (t) triplete; (c) cuatriplete. El disolvente empleado es cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) en todos los casos.

La numeración de los compuestos aparece en función de las reglas establecidas por la IUPAC, eligiendo como función principal la purina y 5-FU.

Los espectros bajo estudio contienen dos zonas de resonancia que se corresponden con los átomos pertenecientes a los anillos de purina o 5-FU, y con los átomos pertenecientes a la cadena alifática presente en todos los compuestos.

Las señales espectroscópicas de  $^1\text{H}$ -RMN de **191-198** aparecen recogidas en la Tabla 22.



Comp	H1 <sub>5FU</sub>	H3 <sub>5FU</sub>	H6 <sub>5FU</sub>	H2 <sub>pur</sub>	H8 <sub>pur</sub>	CH <sub>2</sub> CO	CH <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub>
<b>191</b>		8.83	7.21			4.43	4.27	1.31
		(s)	(d, 5.3)			(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)
<b>192</b>	9.26		7.29			4.68	4.24	1.30
	(s)		(pst, 5.0)			(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)
<b>193</b>				8.74	8.20	5.05	4.27	1.29
				(s)	(s)	(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)
<b>194</b>				8.87	8.28	5.23	4.27	1.27
				(s)	(s)	(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)
<b>195</b>				8.70	8.21	5.05	4.28	1.30
				(s)	(s)	(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)
<b>196</b>				8.88	8.66	5.33	4.29	1.29
				(s)	(s)	(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)
<b>197</b>					8.18	5.02	4.24	1.28
					(s)	(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)
<b>198</b>					8.29	5.22	4.29	1.29
					(s)	(s)	(c, 7.1)	(t, 7.1)

**Tabla 22.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de  $^1\text{H}$ -RMN correspondientes a **191-198**.

Los átomos de hidrógeno en posición 1 y 3 del 5-FU en los derivados **192** y **191**, respectivamente, aparecen como s a  $\delta$  9.26 y 8.83 ppm. En **191**, H<sub>6</sub><sub>5FU</sub> aparece como d a  $\delta$  7.21 ppm por su acoplamiento con el átomo de F ( $J = 5.3$  Hz) mientras que en **192** aparece como pst por su acoplamiento con el F y el NH ( $J = 5.0$  Hz), acoplamiento que justifica su naturaleza *N*-3.

En el anillo de purina, los átomos de hidrógeno en posición 2 y 8 aparecen también como s. En los compuestos **193-195**, se observa que H<sub>2</sub><sub>pur</sub> resuena a campo más bajo ( $\delta$  8.87 – 8.70 ppm) que H<sub>8</sub><sub>pur</sub> ( $\delta$  8.28 – 8.20 ppm). La diferencia de desplazamiento químico entre los átomos H-2 y H-8 se hace menor en **196**, con valores de 8.88 ppm para H<sub>2</sub><sub>pur</sub> y 8.66 ppm para H<sub>8</sub><sub>pur</sub>. En **197** y **198** el desplazamiento químico de H<sub>8</sub><sub>pur</sub> es menor en el isómero *N*-9 ( $\delta$  8.18 ppm) que en el isómero *N*-7 ( $\delta$  8.29 ppm). Este comportamiento de H<sub>8</sub><sub>pur</sub> también aparece en los derivados **193-196**.

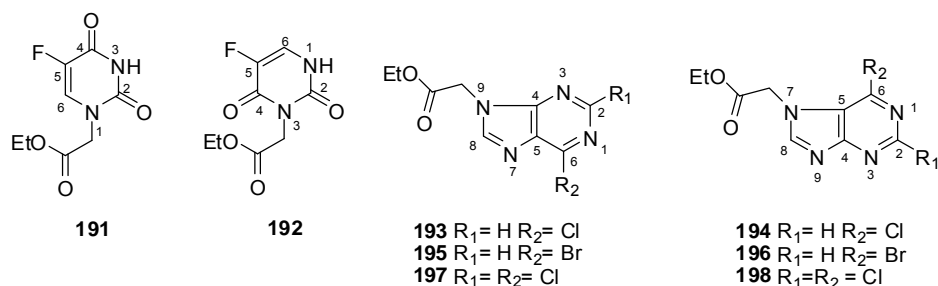
La señal correspondiente a CH<sub>2</sub>CO en la cadena alifática aparece como s, en todos los casos, en torno a  $\delta$  5.33 – 4.43 ppm.

Los átomos de hidrógeno del metileno y metilo del éster etílico son homotópicos. En todos los derivados, la señal de CH<sub>2</sub>O aparece como c ( $\delta$  4.29 – 4.24 ppm) debido al acoplamiento con los hidrógenos del metilo ( $J = 7.1$  Hz), que aparece como t pero a campo más alto ( $\delta$  1.31 - 1.28 ppm).

También se han realizado técnicas de espectroscopía de <sup>13</sup>C-RMN en todos los derivados. Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **191-198** se recogen en la Tabla 23.

El desplazamiento químico de los carbonos correspondientes al 5-FU aparece de la siguiente manera: la señal C<sub>4</sub><sub>5FU</sub> es la que se registra a campo más bajo ( $\delta$  157 ppm). La señal de C<sub>2</sub><sub>5FU</sub> aparece a  $\delta$  149 ppm y la de C<sub>5</sub><sub>5FU</sub> alrededor de  $\delta$  140 ppm. La señal que se registra a menor desplazamiento es la de C<sub>6</sub><sub>5FU</sub> ( $\delta$  128 ppm).

Con respecto al resto de purina, las señales que presentan mayores diferencias en los desplazamientos químicos entre los dos isómeros de cada purina son las correspondientes a los C<sub>4</sub><sub>pur</sub> y C<sub>5</sub><sub>pur</sub>. Como ya se ha comentado anteriormente en este documento y ha sido publicado por el grupo de investigación, la señal de C<sub>4</sub><sub>pur</sub> identifica los isómeros *N*-9 y *N*-7 en el análisis espectroscópico<sup>38-40</sup>, apareciendo a  $\delta$  153 – 150 ppm en los isómeros *N*-9 y a  $\delta$  163 – 159 ppm en los isómeros *N*-7. La señal de C<sub>5</sub><sub>pur</sub> presenta diferencias de 8-10 ppm entre ambos isómeros, registrándose a  $\delta$  133-130 ppm para *N*-9 y  $\delta$  122 ppm para *N*-7. Este comportamiento es análogo al de los compuestos derivados del dansilo **183-186** de la familia A. Las señales de los C<sub>2</sub><sub>pur</sub> aparecen a  $\delta$  152 ppm, mientras que las de los C<sub>4</sub><sub>pur</sub> aparecen en torno a  $\delta$  163 - 150 ppm. El C<sub>6</sub><sub>pur</sub> aparece a  $\delta$  153 – 133 ppm y el C<sub>8</sub><sub>pur</sub> a  $\delta$  149 - 143 ppm.



Comp	C4 <sub>5FU</sub>	C2 <sub>5FU</sub>	C5 <sub>5FU</sub>	C6 <sub>5FU</sub>	C2 <sub>pur</sub>	C4 <sub>pur</sub>	C6 <sub>pur</sub>	C8 <sub>pur</sub>	C5 <sub>pur</sub>
<b>191</b>	156.87	149.31	141.60	128.86					
<b>192</b>	156.77	149.59	139.70	128.59					
<b>193</b>					152.34	152.03	151.34	145.62	131.31
<b>194</b>					152.81	162.00	149.72	143.16	122.80
<b>195</b>					152.33	150.80	143.49	145.44	133.95
<b>196</b>					152.99	159.41	133.93	149.77	122.69
<b>197</b>					151.95	153.26	153.30	146.33	130.39
<b>198</b>					152.00	163.61	153.53	143.90	122.05

Comp	CO	CH <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> CO	CH <sub>3</sub>
<b>191</b>	167.09	62.67	49.02	14.24
<b>192</b>	167.09	62.67	49.07	14.24
<b>193</b>	166.56	62.78	44.70	14.17
<b>194</b>	166.76	62.90	48.19	14.17
<b>195</b>	166.54	62.84	44.71	14.21
<b>196</b>	166.67	63.06	48.29	14.21
<b>197</b>	166.25	62.90	44.67	14.13
<b>198</b>	166.49	63.11	48.25	14.21

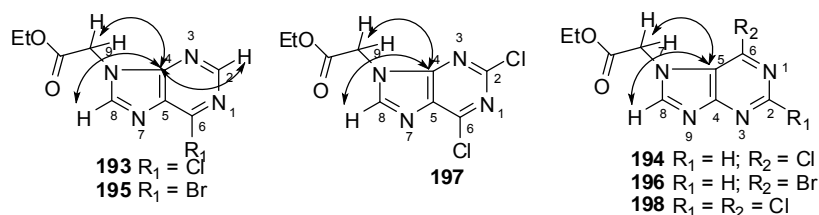
**Tabla 23.** Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C-RMN de **191-198**.

La señal CO es la que aparece a mayor desplazamiento químico ( $\delta$  167 - 166 ppm). La señal del carbono secundario del éster etílico se registra a  $\delta$  63 – 61 ppm, mientras que la del CH<sub>3</sub> lo hace a  $\delta$  14 ppm. El CH<sub>2</sub>CO presenta un desplazamiento entre 49 – 44 ppm.

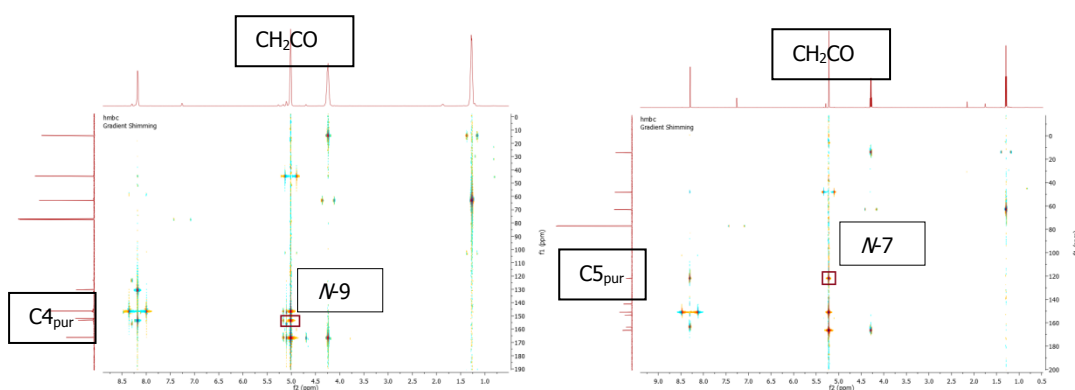
Los estudios de RMN bidimensionales han permitido demostrar inequívocamente que la unión a la purina o 5-FU se establece a través de *N*-9 en **193**, **195** y **197**, a través de *N*-7 en **194**, **196** y **198**, a través de *N*-1 en **191** y a través de *N*-3 en **192**.

La discriminación entre los isómeros *N*-9 y *N*-7 en los derivados de purina **193-198** se basa en la correlación a tres enlaces que existe entre los protones del grupo metilénico unido a la purina y los carbonos cuaternarios de la purina: C4<sub>pur</sub> y C5<sub>pur</sub> (Esquema 25). En los isómeros *N*-9, los protones metilénicos se correlacionan a tres enlaces con el C4<sub>pur</sub>, mientras que en los isómeros *N*-7, estos protones se correlacionan con C5<sub>pur</sub> (Figura 38). La señal de C4<sub>pur</sub> se identifica por su correlación a tres enlaces con H2<sub>pur</sub> y H8<sub>pur</sub>, mientras que la señal de C5<sub>pur</sub> se identifica por su correlación a tres enlaces con el H8<sub>pur</sub> (Esquema 25). Las señales de C4<sub>pur</sub> y C5<sub>pur</sub> se identifican por similitud a las de

los derivados anteriores en **197** y **198**, en los que no se pueden distinguir dichos carbonos al presentar un cloro en posición 2 de la purina.

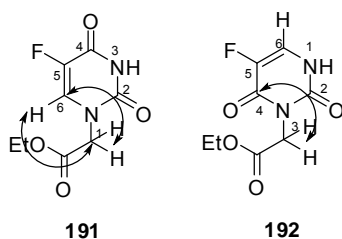


**Esquema 25.** Interacciones a tres enlaces que justifican la naturaleza *N*-9 (**193**, **195** y **197**) y *N*-7 (**194**, **196** y **198**) de los derivados de purina.



**Figura 38.** Regiones de los espectro HMBC de los isómeros *N*-9 (**197**) y *N*-7 (**198**) del derivado de 2,6-dicloropurina.

La discriminación entre los isómeros *N*-1 y *N*-3 en los derivados del 5-FU **191** y **192** se basa en la correlación a tres enlaces que existe entre los protones del grupo metilénico unido al 5-FU y el carbono terciario C6<sub>5FU</sub> en el isómero *N*-1, así como la correlación a la inversa: H6<sub>5FU</sub> y carbono bencílico, ausentes en el isómero *N*-3 donde la correlación aparece entre los protones del grupo metilénico unido al 5-FU y el carbono C4<sub>5FU</sub> (Esquema 26). La señal de C6<sub>5FU</sub> se identifica fácilmente al ser el único carbono terciario del 5-FU.



**Esquema 26.** Interacciones a tres enlaces que justifican la naturaleza *N*-1 (**191**) y *N*-3 (**192**) del derivado de 5-FU.

Finalmente, el análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para la fórmula empírica  $(M + H)^+$  de los compuestos y los correspondientes valores encontrados:

**191:** Calculado para  $C_8H_{10}FN_2O_4$   $(M + H)^+$ : 217.0546, encontrado: 217.0546 (desviación 1.0 ppm).

**192:** Calculado para  $C_8H_{10}FN_2O_4$   $(M + H)^+$ : 217.0546, encontrado: 217.0546 (desviación 1.0 ppm).

**193:** Calculado para  $C_9H_{10}ClN_4O_2$   $(M + H)^+$ : 241.0414, encontrado: 241.0488 (desviación -1.7 ppm).

**194:** Calculado para  $C_9H_{10}ClN_4O_2$   $(M + H)^+$ : 241.0414, encontrado: 241.0487 (desviación -2.1 ppm).

**195:** Calculado para  $C_9H_{10}BrN_4O_2$   $(M + H)^+$ : 284.9909, encontrado: 284.9991 (desviación 1.8 ppm).

**196:** Calculado para  $C_9H_{10}BrN_4O_2$   $(M + H)^+$ : 284.9909, encontrado: 284.9991 (desviación 1.4 ppm).

**197:** Calculado para  $C_9H_9Cl_2N_4O_2$   $(M + H)^+$ : 275.0024, encontrado: 275.0096 (desviación -2.5 ppm).

**198:** Calculado para  $C_9H_9Cl_2N_4O_2$   $(M + H)^+$ : 275.0024, encontrado: 275.0096 (desviación -2.5 ppm).

## 2.4. Estudios biológicos

Los ocho compuestos finales (**191-198**) se han ensayado como agentes antiproliferativos frente a las líneas celulares de cáncer humano: MCF-7, HCT-116, A375 y G361. Se han llevado a cabo también estudios QSAR que relacionan la lipofilia de los compuestos con la actividad antiproliferativa de los mismos. Además, los compuestos que presentan mejor actividad antiproliferativa (**197** y **198**) han sido seleccionados para estudiar su efecto sobre el ciclo celular y su capacidad de inducción de apoptosis/necrosis en las líneas celulares MCF-7, HCT-116 y A375.

Los estudios de actividad antiproliferativa, apoptosis y efecto sobre el ciclo celular también se han realizado por el Grupo de Investigación dirigido por el Dr. Juan Antonio Marchal Corrales.

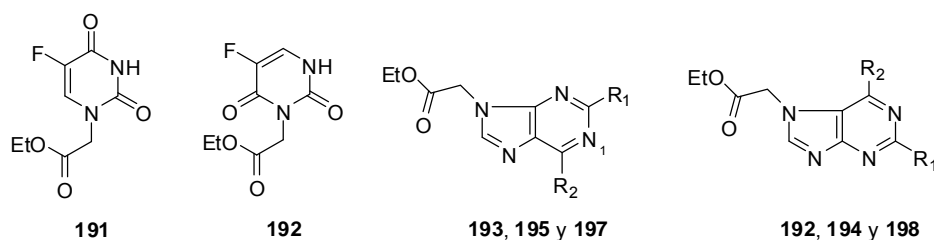
Los protocolos seguidos para la determinación de las distintas actividades biológicas se detallan en la Parte Experimental de esta memoria.

### 2.4.1. Ensayos de citotoxicidad

Los estudios de actividad antiproliferativa se han llevado a cabo frente a cultivos celulares de las líneas de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, cáncer colorrectal HCT-116 y melanoma humano A375 y G361. Como ya se ha especificado en el apartado 1.3.1., estas líneas constituyen un buen modelo para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad.

La viabilidad celular se ha estudiado utilizando la técnica de SRB explicada también en el apartado 1.3.1.

Los datos de  $CI_{50}$  de la proliferación sobre cultivos celulares de MCF-7, HCT-116, A375 y G361 de **191-198** se detallan en la Tabla 24. En ella se muestran los valores medios de  $CI_{50}$  en unidades de  $\mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol/l}$ ) obtenidos después de 6 días de tratamiento para cada compuesto  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas realizadas en cada caso. Se han utilizado 3 decimales para los valores menores a  $10 \mu\text{M}$  y 2 decimales para el resto de valores.



Compuesto	Isómero	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MCF-7	HCT-116	A375	G361
				( $CI_{50} \mu\text{M}$ )	( $CI_{50} \mu\text{M}$ )	( $CI_{50} \mu\text{M}$ )	( $CI_{50} \mu\text{M}$ )
<b>191</b>	<i>N</i> -1			25.20 $\pm$ 0.03	24.56 $\pm$ 0.01	38.37 $\pm$ 0.06	29.03 $\pm$ 0.01
<b>192</b>	<i>N</i> -3			30.48 $\pm$ 0.03	22.64 $\pm$ 0.01	50.92 $\pm$ 0.13	25.35 $\pm$ 0.01
<b>193</b>	<i>N</i> -9	H	Cl	35.06 $\pm$ 0.03	5.270 $\pm$ 0.040	18.862 $\pm$ 0.092	21.42 $\pm$ 0.01
<b>194</b>	<i>N</i> -7	H	Cl	49.82 $\pm$ 0.03	68.00 $\pm$ 0.04	14.46 $\pm$ 0.12	21.41 $\pm$ 0.01
<b>195</b>	<i>N</i> -9	H	Br	14.10 $\pm$ 0.07	23.46 $\pm$ 0.04	13.45 $\pm$ 0.03	15.76 $\pm$ 0.01
<b>196</b>	<i>N</i> -7	H	Br	20.17 $\pm$ 0.06	55.70 $\pm$ 0.04	26.74 $\pm$ 0.01	18.26 $\pm$ 0.01
<b>197</b>	<i>N</i> -9	Cl	Cl	3.930 $\pm$ 0.035	6.200 $\pm$ 0.046	1.178 $\pm$ 0.028	3.058 $\pm$ 0.006
<b>198</b>	<i>N</i> -7	Cl	Cl	5.630 $\pm$ 0.029	6.360 $\pm$ 0.059	4.984 $\pm$ 0.074	5.688 $\pm$ 0.007

**Tabla 24.** Actividad antiproliferativa de **191-198** frente a las líneas celulares MCF-7, HCT-116, A375 y G361.

Atendiendo a todos los valores de  $CI_{50}$  de **191-198** en las cuatro líneas celulares ensayadas, se observa que los derivados de dicloropurina (**197** y **198**) son los compuestos más activos como antiproliferativos, siendo los únicos que tienen valores menores a  $10 \mu\text{M}$  en todas las líneas celulares ( $CI_{50}$  entre 1 y  $6 \mu\text{M}$ ), siendo el efecto antiproliferativo del isómero *N*-9 ( $CI_{50}$  entre 1 y  $6 \mu\text{M}$  para **197**) superior al del correspondiente isómero *N*-7 ( $CI_{50}$  entre 4 y  $6 \mu\text{M}$  para **198**).

Los derivados de bromo y cloropurina (**193-196**) presentan valores de  $CI_{50}$  intermedios, siendo los valores para los isómeros *N*-9 ( $CI_{50}$  entre 5 y 35  $\mu M$  para **193** y **195**) menores que para los isómeros *N*-7 correspondientes ( $CI_{50}$  entre 18 y 68  $\mu M$  para **194** y **196**), a excepción de los valores de  $CI_{50}$  para los derivados de cloropurina en las líneas de melanoma humano A375 y G361 donde ocurre lo contrario: los isómeros *N*-7 ( $CI_{50}$  de 14.46 y 21.41  $\mu M$  para **194** y **196**) presentan valores de  $CI_{50}$  ligeramente menores que los *N*-9 ( $CI_{50}$  de 18.86 y 21.42  $\mu M$  para **193** y **195**).

Los derivados del 5-FU (**191** y **192**) presentan valores de  $CI_{50}$  entre 22 y 50  $\mu M$  para todas las líneas celulares sin que la actividad de uno de los isómeros destaque sobre la del otro, siendo más activos los isómeros *N*-1 frente a las líneas MCF-7 y A375, y los isómeros *N*-3 frente a HCT-116 y G361.

En general se observa que los derivados de dicloropurina son los más activos, con valores de  $CI_{50}$  muy inferiores al resto de compuestos ( $CI_{50}$  entre 1-6  $\mu M$  para **197** y **198** frente a 14-68  $\mu M$  para **191-196**). Además los isómeros *N*-9 presentan una mayor actividad que sus correspondientes isómeros *N*-7, a excepción de los derivados de cloropurina **193** y **194** frente a las líneas A375 y G361.

#### 2.4.2. Relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR)

Se observa una correlación entre los valores de actividad antiproliferativa y la lipofilia que presentan las moléculas si se observan dichos valores detenidamente para todas las líneas celulares (Tabla 24). Por ello se han llevado a cabo estudios QSAR para las cuatro líneas celulares, obteniéndose dos ecuaciones para las líneas celulares de melanoma humano A375 y G361.

Las ecuaciones QSAR relacionan la actividad biológica con la lipofilia, utilizando como medida de lipofilia el logaritmo del coeficiente de reparto ( $\log P$ ) de cada compuesto (Esquema 27).

$$P = [\text{fármaco}]_{\text{octanol}} / [\text{fármaco}]_{\text{agua}}$$

$$\log (1/C) = k_1 \log P + k_2$$

$$p(CI_{50}) = k_2 + k_1 \log P$$

**Esquema 27.** Ecuaciones QSAR utilizadas en el estudio.

El descriptor  $\log P$  se ha calculado utilizando la opción consensus del programa PALLAS 3.8.1.1<sup>95</sup>. Los valores de  $\log P$  para cada compuesto aparecen recogidos en la Tabla 25 junto a los valores de  $CI_{50}$  para las cuatro líneas celulares estudiadas. En este caso se han utilizado sólo dos decimales ya que los cálculos de  $\log P$  se han llevado a cabo con dos decimales.



Compuesto	log <i>P</i>
<b>191</b>	-0.07 ± 0.20
<b>192</b>	-0.27 ± 0.19
<b>193</b>	0.49 ± 0.15
<b>194</b>	0.49 ± 0.15
<b>195</b>	0.56 ± 0.14
<b>196</b>	0.51 ± 0.14
<b>197</b>	1.34 ± 0.15
<b>198</b>	1.32 ± 0.15

**Tabla 25.** Valores de log *P* de **191-198**.

Las ecuaciones 1 y 2 en el Esquema 28 muestran la correlación entre las  $CI_{50}$  de los compuestos **191-198** frente a la línea celular A375 y G361, respectivamente. Hay que tener en cuenta que los valores de actividad antiproliferativa están expresados como  $p(CI_{50}) = -\log(CI_{50})$ , por lo que cuanto más alto sea el valor de  $p(CI_{50})$  más potente es el compuesto.

$$\begin{aligned} \text{Ecuación 1:} \quad p(IC_{50})_{A375} &= 4.40 (\pm 0.12) + 0.85 (\pm 0.15) \text{ clog } P \\ n &= 8, r = 0.920, s = 0.224, F_{1,5} = 32.96, p < 0.005 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ecuación 2:} \quad p(CI_{50})_{G361} &= 4.55 (\pm 0.08) + 0.55 (\pm 0.10) \text{ clog } P \\ n &= 8, r = 0.920, s = 0.159, F_{1,5} = 27.12, p < 0.005 \end{aligned}$$

**Esquema 28.** Ecuaciones QSAR obtenidas para las líneas celulares de melanoma humano A375 (Ecuación 1) y G361 (Ecuación 2).  $n$  = número de compuestos,  $r$  = coeficiente de correlación,  $s$  = desviación estándar,  $F_{1,5}$  = test de Fisher,  $p$  = significancia.

Para las líneas celulares MCF-7 y HCT-116 no se han encontrado correlaciones entre la actividad antiproliferativa y la lipofilia de los compuestos, siendo los valores de  $r = 0.631$  frente a la línea MCF-7 y de  $r = 0.353$  frente a HCT-116.

### 2.4.3. Análisis de distribución del ciclo celular

El estudio del ciclo celular se ha realizado en las líneas celulares MCF-7, HCT-116 y A375 después de 24 horas de tratamiento sobre los compuestos más activos (**197** y **198**) a su  $CI_{50}$ . El estudio se ha llevado a cabo en células humanas de cáncer de mama (MCF-7), colon (HCT-116) y melanoma (A375), excluyendo la línea tumoral G361, al ser también de melanoma y al ser los valores obtenidos de  $CI_{50}$  ligeramente mayores a los de A375. Además, la línea de melanoma A375 tiene un perfil metastásico mayor al de la G361<sup>95</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 26-28 para cada una de las líneas estudiadas.

El tratamiento con **197** en la línea MCF-7 (Tabla 26) aumenta ligeramente el porcentaje de células en fase G<sub>2</sub>/M, mientras que el tratamiento con **198** disminuye ligeramente el porcentaje en fase S.

Compuesto	Ciclo Celular		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	34.58 ± 0.09	14.50 ± 1.06	50.91 ± 1.15
<b>197</b>	28.17 ± 1.37	15.39 ± 0.68	54.63 ± 1.18
<b>198</b>	34.54 ± 0.08	18.27 ± 0.79	47.19 ± 0.89

**Tabla 26.** Estudio del ciclo celular frente a MCG-7 tras el tratamiento de 24 a la CI<sub>50</sub> de **197** y **198**.

El tratamiento con **197** en la línea celular HCT-116 (Tabla 27) no modifica el perfil del ciclo celular mientras que el tratamiento con **198** detiene el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M, a expensas de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

Compuesto	Ciclo Celular		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	44.70 ± 0.38	38.26 ± 1.40	17.02 ± 1.40
<b>197</b>	45.93 ± 1.11	36.75 ± 0.70	17.31 ± 0.44
<b>198</b>	33.58 ± 1.90	37.93 ± 1.92	28.47 ± 0.07

**Tabla 27.** Porcentaje de células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M y S del ciclo celular de la línea HCT-116 tras el tratamiento de 24 a la CI<sub>50</sub> de **197** y **198**.

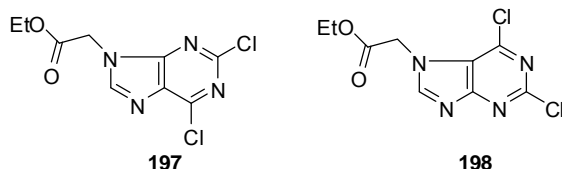
El tratamiento con **197** en la línea celular A375 (Tabla 28) no modifica el perfil del ciclo celular mientras que el tratamiento con **198** provoca una parada en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, disminuyendo el porcentaje en fase G<sub>2</sub>/M y S.

Compuesto	Ciclo Celular		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	57.97 ± 0.93	29.60 ± 0.78	12.42 ± 0.70
<b>197</b>	58.48 ± 1.03	28.78 ± 0.26	12.73 ± 0.77
<b>198</b>	70.55 ± 1.47	20.10 ± 0.75	9.34 ± 0.62

**Tabla 28.** Porcentaje de células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M y S del ciclo celular de la línea HCT-116 tras el tratamiento con **197** y **198** (24 h, CI<sub>50</sub>).

#### 2.4.4. Ensayo de apoptosis

Se ha estudiado también la capacidad de inducir apoptosis/necrosis de **197** y **198** en las líneas celulares MCF-7, HCT-116 y A375 tras 24 h de tratamiento a la  $CI_{50}$  de dichos derivados (Tabla 29).



	MCF-7			HCT-116		
	Control (%)	<b>197</b> (%)	<b>198</b> (%)	Control (%)	<b>197</b> (%)	<b>198</b> (%)
<b>N</b>	2.70 ± 0.99	2.13 ± 1.54	1.26 ± 0.61	2.57 ± 1.05	4.93 ± 1.29	2.53 ± 0.58
<b>A. Temp</b>	4.45 ± 0.21	9.57 ± 1.53	13.40 ± 3.51	4.40 ± 1.61	6.63 ± 1.42	5.47 ± 0.81
<b>A. Tardía</b>	6.35 ± 1.06	10.97 ± 0.64	9.57 ± 1.01	9.87 ± 3.09	13.57 ± 1.82	11.57 ± 1.16

	A375		
	Control (%)	<b>197</b> (%)	<b>198</b> (%)
<b>N</b>	1.27 ± 0.81	4.80 ± 0.26	1.70 ± 0.46
<b>A. Temp</b>	3.13 ± 0.50	16.14 ± 0.52	14.67 ± 1.36
<b>A. Tardía</b>	3.70 ± 0.61	19.23 ± 0.45	12.47 ± 1.71

**Tabla 29.** Porcentaje de células en apoptosis para las líneas celulares MCF-7, HCT-116 y A375 después de su tratamiento de 24 h a la  $CI_{50}$  de **197** y **198**.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento a la dosis de  $CI_{50}$  con **197** y **198** durante 24 horas muestran un aumento significativo del porcentaje de células en apoptosis (Tabla 29) en comparación con las células control, siendo dicho aumento más acusado en la línea de melanoma A375 (35.37 % de apoptosis total para **197** y 27.13 % para **198** frente al 6.83 % del control).

El efecto apoptótico se observa incluso en la línea celular MCF-7 que tiene deficiencia en la activación de la cascada de caspasas<sup>96</sup>, principal vía de apoptosis en células (ver apartado I.3.).

Cabe destacar que **197** es el que tiene mayor capacidad apoptótica en A375, no mostrando modificaciones en el ciclo celular en esta línea. Este efecto puede ser debido a que el mecanismo de acción del compuesto **197** en A375 sea preferentemente apoptótico.

El hecho de que **198** detenga el ciclo celular en fase G<sub>2</sub>/M y G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en las líneas celulares HCT-116 y A375 respectivamente acompañado de altos niveles de apoptosis indica que dicho compuesto presentan efectos citotóxicos diferentes en cada línea celular.

### 3. Familia C

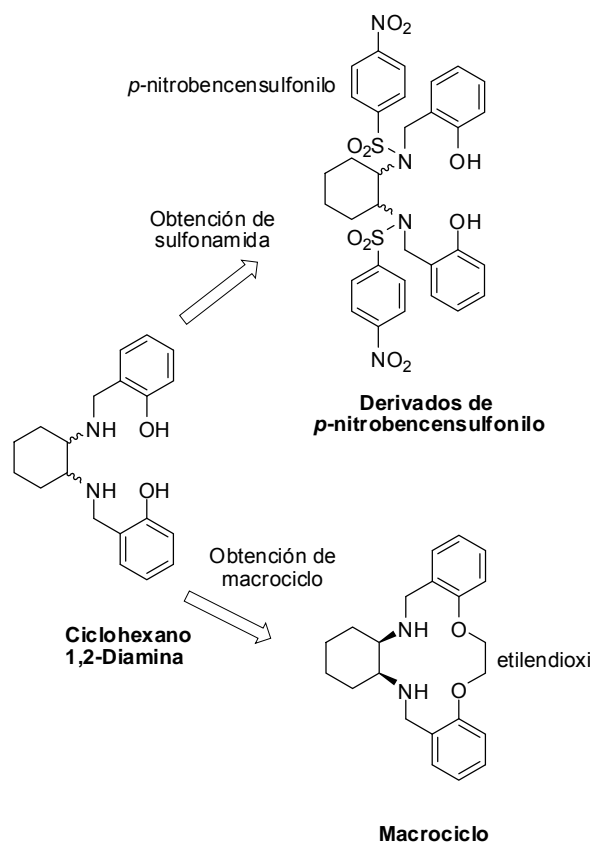
#### 3.1. Diseño molecular

Se ha demostrado que las 1,2-ciclohexanodiaminas poseen gran cantidad de bioactividades y entre ellas, antitumorales (ver apartado I.7.). Los grupos amino son útiles para modelar la solubilidad del fármaco, así como para aceptar o donar enlaces de hidrógeno a un receptor biológico. Además, las 1,2-diaminas pueden ser fácilmente convertibles en un anillo de 5 o 6 miembros y presentan ventajas de unión a su diana farmacológica al formar estructuras rígidas heterocíclicas<sup>98</sup>.

Los compuestos que contienen estructuras macrocíclicas (anillos de 12 miembros o más) muestran actividades biológicas extremadamente potentes, además de especificidad<sup>99</sup>. Actualmente, más de 100 fármacos aprobados por la FDA que incluyen antitumorales tienen la característica de ser macrociclos<sup>100</sup>. Muestran una característica intermedia entre la pre-organización estructural y la flexibilidad conformacional<sup>101</sup>. Sus estructuras cíclicas tienen menos libertad conformacional que las acíclicas equivalentes sufriendo una menor penalización entrópica al unirse al receptor. Pero además no son completamente rígidos a diferencia de los sistemas cíclicos más pequeños y pueden adaptarse a la superficie del objetivo biológico dando lugar a una afinidad óptima. Otra ventaja es que su mayor tamaño posibilita la interacción con centros más alejados en la diana terapéutica.

Las bencensulfonamidas han demostrado tener diferentes actividades biológicas entre ellas antitumorales. Esta actividad es debida a diversos mecanismos de acción como parada del ciclo celular en fase G<sub>1</sub>, desestabilización de microtúbulos o inhibición angiogénica entre otras<sup>102</sup>.

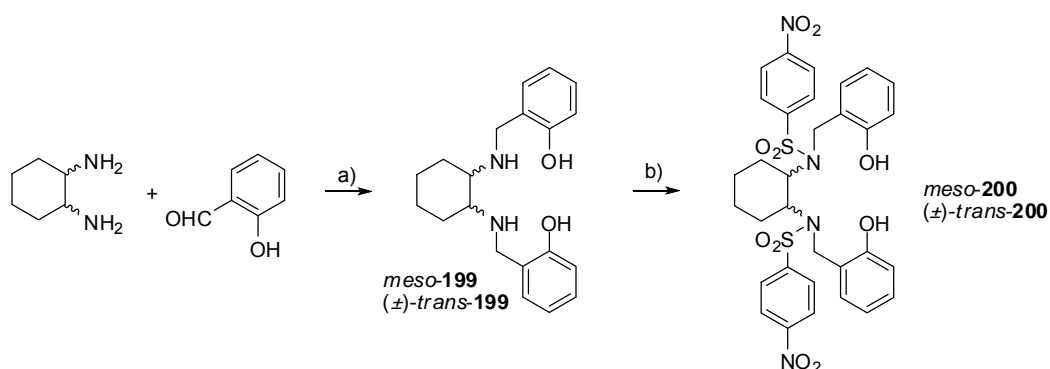
Esta familia se ha diseñado con objeto de estudiar la influencia de dos modificaciones estructurales sobre la actividad antiproliferativa del derivado de ciclohexano 1,2-diamina que se muestra en la Figura 39: introducción de un resto *p*-nitrobencensulfonilo y el cierre de la molécula mediante un puente etilénico que conecta a los dos OH fenólicos. Los compuestos **161** [(-)-*trans*, (+)-*trans* y *meso*] se han renombrado como **199** con el fin de mantener el orden numérico de la familia.



**Figura 39.** Diseño de las estructuras propuestas para su estudio en la Familia C.

### 3.2. Síntesis química

La síntesis de los compuestos finales **199** y **200** se detalla en el Esquema 29.

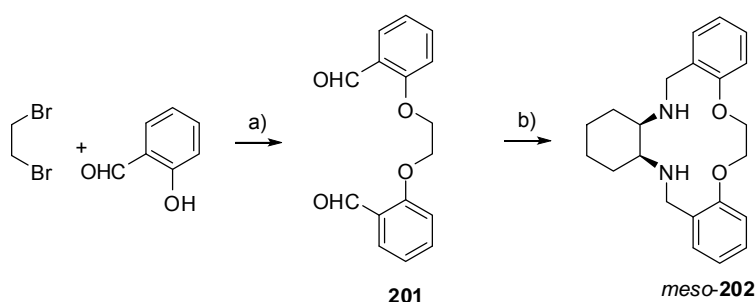


**Esquema 29.** *Reactivos y condiciones:* a) Et<sub>3</sub>N/ EtOH, ta, 48h; NaBH<sub>4</sub>, ta, 4 h. b) *p*NO<sub>2</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, ta, 4.5 h.

Los compuestos **199** se obtienen por aminación reductora utilizando Et<sub>3</sub>N como base, NaBH<sub>4</sub> como agente reductor y EtOH como disolvente siguiendo la metodología descrita por *Gao et al*<sup>78</sup>. En primer lugar, en la síntesis de *meso-199*, la reacción se lleva a cabo en dos etapas tal y como describen los autores: filtración de la base de Schiff tras 2 h de agitación y tratamiento con el agente reductor durante 4 h, siendo el rendimiento de un 58 %. El rendimiento descrito para esta reacción es de un 80 %, por lo que se decide repetir la reacción aumentando el tiempo de agitación en la primera etapa hasta 48 horas para favorecer la formación de la base de Schiff. En estas condiciones, el rendimiento se optimiza hasta el 100 %. En la reacción del derivado (±)-*trans-199* el precipitado no aparece ni a las 48 h de agitación, por lo que se decide eliminar el disolvente a vacío y continuar con la segunda etapa de reacción, obteniéndose el compuesto con un rendimiento del 41 %.

La alquilación del *MH* se lleva a cabo agitando los compuestos **199** en presencia de cloruro de *p*-nitrobencensulfonilo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro como disolvente para obtener los compuestos **200**. El rendimiento de esta reacción es mayor cuando se parte del isómero (±)-*cis*-1,2-diaminociclohexano (63 % para *meso-200*) que cuando se parte de su análogo *trans* [23 % para (±)-*trans-200*].

El macrociclo **202** se obtiene en 2 etapas de reacción que aparecen especificadas en el Esquema 30.



**Esquema 30.** *Reactivos y condiciones:* a) NaOH 2%/ EtOH, reflujo, 72 h (27 %). b) *cis*-1,2-diaminociclohexano, MeOH, reflujo, 5h; NaBH<sub>4</sub>, 50 °C, 3.5 h (38 %).

El intermedio **201** se obtiene calentando la mezcla de reacción a reflujo en presencia de NaOH, utilizando EtOH como disolvente<sup>102</sup>.

Finalmente la reacción de ciclación se lleva a cabo por aminación reductora sin necesidad de base utilizando MeOH como disolvente y NaBH<sub>4</sub> como agente reductor<sup>103</sup>. Cabe mencionar que *meso-202* se aísla puro como un sólido blanco, tras filtración.

### 3.3. Análisis espectroscópico

Los compuestos que no han sido descritos con anterioridad se han identificado por espectroscopía de RMN, tanto de  $^1\text{H}$  (300, 400, 500 o 600 MHz) como de  $^{13}\text{C}$  (75, 125 o 150 MHz) y espectrometría HRMS. Además, se han realizado estudios de RMN bidimensional HSQC y HMBC. Los espectros y estudios bidimensionales de los compuestos se encuentran detallados en el anexo a este documento.

Los datos espectroscópicos se presentan recogidos en las Tablas 30-33, con las estructuras correspondientes y una explicación detallada de las señales. En las tablas, se muestran los valores de desplazamiento químico en primer lugar y entre paréntesis, las multiplicidades y las constantes de acoplamiento. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hz (ciclos por segundo). El aspecto y la multiplicidad de las señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: (s) singlete; (sa) singlete ancho; (d) doblete; (dd) doblete; (ddd) triplete; (m) multiplete. El disolvente empleado es cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) en todos los casos.

La numeración de los compuestos aparece en función de las reglas establecidas por la IUPAC.

Los espectros bajo estudio contienen dos zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes a los dos anillos aromáticos; y b) zona alifática, correspondiente a los protones bencílicos, metilénicos y del ciclohexano.

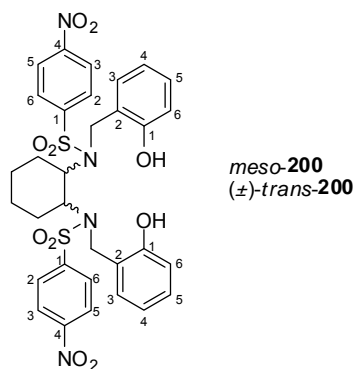
Las señales espectroscópicas de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos **200** aparecen recogidas en la Tabla 30.

Los átomos  $\text{H}_{3\text{PhNO}_2}$  y  $\text{H}_{5\text{PhNO}_2}$  aparecen como un d ( $\delta$  8.38 – 8.37 ppm) por su acoplamiento con  $\text{H}_{2\text{PhNO}_2}$  y  $\text{H}_{6\text{PhNO}_2}$  ( $J = 8.8$  Hz), que también aparecen como un d pero a campo más alto ( $\delta$  8.09 – 8.07 ppm).

Con respecto a las señales del otro anillo aromático, los hidrógenos 3 y 6 aparecen como d entre  $\delta$  7.54 y 6.86 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 8.0 - 7.3$  Hz) con  $\text{H}_{4\text{Ph}}$  o  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ , a excepción de la señal de  $\text{H}_{3\text{Ph}}$  en ( $\pm$ )-*trans*-**200** que aparece como dd ( $\delta = 7.52$  ppm) por su acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.4$  Hz) con  $\text{H}_{4\text{Ph}}$  y a larga distancia ( $J = 1.1$  Hz) con  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ .

Las señales  $\text{H}_{4\text{Ph}}$  y  $\text{H}_{5\text{Ph}}$  aparecen como ddd entre  $\delta$  7.25 – 7.20 ppm por el acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.7 - 7.4$  Hz) con  $\text{H}_{3\text{Ph}}$  o  $\text{H}_{6\text{Ph}}$  y con  $\text{H}_{5\text{Ph}}$  o  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ , y a larga distancia ( $J = 1.6 - 0.9$  Hz) con  $\text{H}_{6\text{Ph}}$  o  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ .

Los hidrógenos bencílicos son diastereotópicos y resuenan entre  $\delta$  3.89 – 3.62 ppm. Las señales aparecen como dos d ( $J_{\text{gem}} = 14.0$  y 13.6 Hz).



Comp	H3,5 <sub>Ph</sub>	H2,6 <sub>Ph</sub>	H3 <sub>Ph</sub>	H4 <sub>Ph</sub>	H5 <sub>Ph</sub>	H6 <sub>Ph</sub>
<i>meso</i> - <b>200</b>	8.38 (d, 8.8)	8.09 (d, 8.8)	7.54 (d, 7.4)	7.25 (ddd, 7.7, 7.4, 0.9)	7.20 (ddd, 7.9, 7.7, 1.6)	6.86 (d, 7.9)
(±)- <i>trans</i> - <b>200</b>	8.37 (d, 8.8)	8.07 (d, 8.8)	7.52 (dd, 7.4, 1.3)	7.23 (ddd, 7.6, 7.4, 1.1)	7.20 (ddd, 7.9, 7.6, 1.3)	6.86 (d, 7.9)

Comp	<i>N</i> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>ciclohex</sub>	CH <sub>2ciclohex</sub>
<i>meso</i> - <b>200</b>	3.73 (d, 14.0)	2.79	1.70 – 1.56 (m)
	3.62 (d, 14.0)	(sa)	1.44 – 1.35 (m)
			1.34 – 1.27 (m)
(±)- <i>trans</i> - <b>200</b>	3.89 (d, 13.6)	2.35	2.14 – 2.06 (m)
	3.66 (d, 13.6)	(sa)	1.79 – 1.68 (m)
			1.28 – 1.19 (m)

**Tabla 30.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a los compuestos **200**.

Los átomos de hidrógeno del anillo de ciclohexano muestran sus señales de resonancia de la siguiente manera: la señal de CH<sub>ciclohex</sub> aparece como sa a δ 2.79 – 2.35 ppm y las señales de los protones metilénicos aparecen como m entre δ 2.14 – 1.19 ppm.

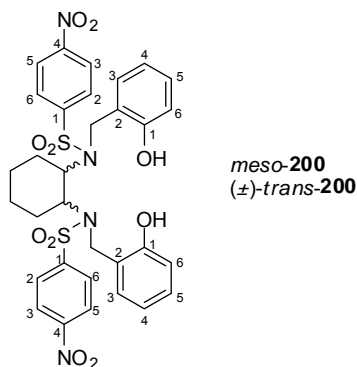
También se han registrado los espectros de <sup>13</sup>C-RMN de los compuestos. Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **200** se recogen en la Tabla 31.

El desplazamiento químico de los carbonos correspondientes al anillo aromático unido al grupo nitro aparece de la siguiente forma: las señales de C<sub>4PhNO<sub>2</sub></sub> y de C<sub>1PhNO<sub>2</sub></sub>, ambos carbonos cuaternarios, son las que se registran a campo más bajo (δ 151 y 141 ppm). La señal de los carbonos 3 y 5 presentan un desplazamiento a δ 129 ppm y la señal de C<sub>2,6PhNO<sub>2</sub></sub> aparece a δ 124 ppm.

La señales correspondientes a los carbonos del otro anillo aromático aparecen en un rango de desplazamiento que oscila entre δ 147 – 132 ppm para los carbonos cuaternarios y δ 131 – 121 ppm para los carbonos terciarios en los dos casos.



En la zona alifática del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN aparecen las señales correspondientes a los carbonos:  $N\text{-CH}_2$  ( $\delta$  45 – 44 ppm),  $\text{CH}_{\text{ciclohex}}$  ( $\delta$  61 – 56 ppm) y  $\text{CH}_{2\text{ciclohex}}$  ( $\delta$  30 – 22 ppm).

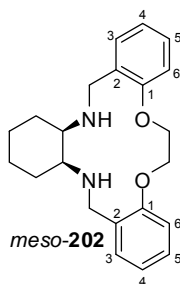


Comp	C4 <sub>PhNO2</sub>	C1 <sub>PhNO2</sub>	C2 <sub>Ph</sub>	C1 <sub>Ph</sub>	C2,6 <sub>PhNO2</sub>	C3 <sub>Ph</sub>	C4 <sub>Ph</sub>	C5 <sub>Ph</sub>	C6 <sub>Ph</sub>	C3,5 <sub>PhNO2</sub>
<i>meso</i> - <b>200</b>	151.21	141.39	133.17	147.63	129.98	131.43	127.99	128.76	121.83	124.58
(±)- <i>trans</i> - <b>200</b>	151.21	141.29	132.58	147.61	129.97	131.58	128.10	128.97	121.96	124.64

Comp	$N\text{-CH}_2$	$\text{CH}_{\text{ciclohex}}$	$\text{CH}_{2\text{ciclohex}}$
<i>meso</i> - <b>200</b>	45.09	56.11	27.74 22.05
(±)- <i>trans</i> - <b>200</b>	44.92	61.00	30.65 24.76

**Tabla 31.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los compuestos **200**.

Las señales espectroscópicas de  $^1\text{H}$ -RMN del macrociclo **202** aparecen recogidas en la Tabla 32.



Comp	H3 <sub>Ph</sub>	H4 <sub>Ph</sub>	H5 <sub>Ph</sub>	H6 <sub>Ph</sub>	CH <sub>2</sub> O	$N\text{-CH}_2$	$\text{CH}_{\text{ciclohex}}$	$\text{CH}_{2\text{ciclohex}}$
<i>meso</i> - <b>202</b>	7.20 – 7.16 (m)	6.91 (t, 7.4)	7.25 – 7.20 (m)	6.82 (d, 8.1)	4.23 (s)	3.75 (d, 13.7) 3.63 (d, 13.7)	2.71 (sa)	1.71 – 1.50 (m) 1.27 – 1.15 (m)

**Tabla 32.** Desplazamientos químicos, multiplicidades y constantes de acoplamiento de  $^1\text{H}$ -RMN correspondientes al macrociclo **202**.

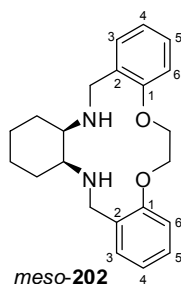
Las señales de los protones de los dos anillos aromáticos son equivalentes entre sí. Los hidrógenos 6 aparecen como d a  $\delta$  6.82 ppm debido al acoplamiento a corta distancia ( $J = 8.1$  Hz) con  $H5_{Ph}$ , mientras que los hidrógenos 3 aparecen como m a  $\delta$  7.20 – 7.16 ppm. La señal  $H4_{Ph}$  aparece como t a  $\delta$  6.91 ppm por el acoplamiento a corta distancia ( $J = 7.4$  Hz) con  $H3_{Ph}$  y  $H5_{Ph}$ , mientras que la señal  $H5_{Ph}$  aparece como m a  $\delta$  7.25 – 7.20 ppm.

Los 4 hidrógenos del resto etilendioxi son equivalentes, apareciendo como s a  $\delta$  4.23 ppm.

Los hidrógenos bencílicos son diastereotópicos y resuenan a  $\delta$  3.75 y 3.63 ppm. Las señales aparecen como dos d ( $J_{gem} = 13.7$  Hz).

Los átomos de hidrógeno del anillo de ciclohexano muestran sus señales de resonancia de la siguiente manera: la señal de  $CH_{ciclohex}$  aparece como sa a  $\delta$  2.71 ppm y las señales de los protones metilénicos aparecen como multipletes entre  $\delta$  1.71 – 1.15 ppm.

Los datos de desplazamiento químico de los carbonos del espectro de  $^{13}C$  del compuesto **202** se recogen en la Tabla 33.



Comp	C2 <sub>Ph</sub>	C1 <sub>Ph</sub>	C3 <sub>Ph</sub>	C4 <sub>Ph</sub>	C5 <sub>Ph</sub>	C6 <sub>Ph</sub>	CH <sub>2</sub> O	N-CH <sub>2</sub>	CH <sub>ciclohex</sub>	CH <sub>2ciclohex</sub>
<i>meso</i> - <b>202</b>	127.26	156.91	130.27	121.02	128.45	111.41	66.70	46.06	54.82	27.22
										22.22

**Tabla 33.** Desplazamientos químicos de  $^{13}C$ -RMN de *meso*-**202**.

El desplazamiento químico de los carbonos correspondientes al anillo aromático aparece de la siguiente forma: la señal de C1<sub>Ph</sub> es la que se registra a campo más bajo ( $\delta$  156 ppm). Las señales de los carbonos 2, 3, 4 y 5 presentan un desplazamiento químico entre 130 - 121 ppm y la señal de C6<sub>Ph</sub> es la que se registra a campo más alto ( $\delta$  111 ppm).

En la zona alifática del espectro de  $^{13}C$ -RMN aparecen las señales correspondientes a los carbonos: CH<sub>2</sub>O ( $\delta$  66.70 ppm), N-CH<sub>2</sub> ( $\delta$  46.06 ppm), CH<sub>ciclohex</sub> ( $\delta$  54.82 ppm) y CH<sub>2ciclohex</sub> ( $\delta$  27 – 22 ppm).

Finalmente, el análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para la fórmula empírica  $(M + H)^+$  de los compuestos y los correspondientes valores encontrados:

*meso-200*: Calculado para  $C_{32}H_{33}N_4O_{10}S_2$   $(M + H)^+$ : 697.1560, encontrado: 697.1644 (desviación 0.9 ppm).

$(\pm)$ -*trans-200*: Calculado para  $C_{32}H_{33}N_4O_{10}S_2$   $(M + H)^+$ : 697.1560, encontrado: 697.1643 (desviación 0.7 ppm).

*meso-202*: Calculado para  $C_{22}H_{29}N_2O_2$   $(M + H)^+$ : 353.2151, encontrado: 353.2229 (desviación 0.0 ppm).

### 3.4. Estudios biológicos

Los cinco compuestos finales [*meso* y  $(\pm)$ -*trans* de **199** y **200**, y *meso-202*] se han ensayado como agentes antiproliferativos frente a cuatro líneas celulares de cáncer humano. En todos ellos se estudia su efecto sobre el ciclo celular y su capacidad de inducción de apoptosis/necrosis en la línea celular de melanoma humano A375.

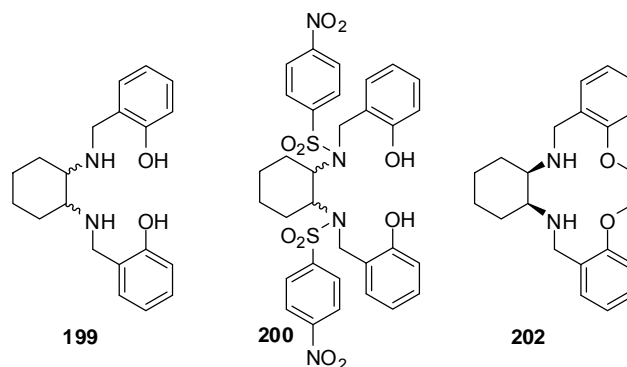
Estos estudios se han realizado por el Grupo de Investigación dirigido por el Dr. Juan Antonio Marchal Corrales, Catedrático del Departamento de Anatomía y Embriología Humana e Investigador del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

Los protocolos seguidos para la determinación de las distintas actividades biológicas se detallan en la Parte Experimental de este documento.

#### 3.4.1. Ensayos de citotoxicidad

Los estudios de actividad antiproliferativa se han llevado a cabo frente a cultivos celulares de las líneas MCF-7, HCT-116, A375 y G361 utilizando la técnica de la SRB anteriormente explicado en apartado 1.3.1.

Los datos de  $CI_{50}$  de la proliferación sobre cultivos celulares de MCF-7, HCT-116, A375 y G361 de **199**, **200** y **202** se detallan en la Tabla 34. En ella se muestran los valores de  $CI_{50}$  en unidades de  $\mu M$  ( $\mu mol/l$ ) obtenidos después de 6 días de tratamiento para cada compuesto  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas realizadas en cada caso. Se han utilizado 3 decimales para los valores menores a 10  $\mu M$  y 2 decimales para el resto de valores.



Compuesto	MCF-7 (CI <sub>50</sub> μM)	HCT-116 (CI <sub>50</sub> μM)	A375 (CI <sub>50</sub> μM)	G361 (CI <sub>50</sub> μM)
<i>meso</i> - <b>199</b>	0.058 ± 0.014	0.236 ± 0.060	0.099 ± 0.018	1.486 ± 0.005
(±)- <i>trans</i> - <b>199</b>	1.240 ± 0.018	0.066 ± 0.017	0.205 ± 0.015	0.507 ± 0.007
<i>meso</i> - <b>200</b>	7.010 ± 0.044	5.070 ± 0.032	3.413 ± 0.016	1.484 ± 0.004
(±)- <i>trans</i> - <b>200</b>	2.630 ± 0.044	3.680 ± 0.045	2.398 ± 0.020	1.144 ± 0.009
<i>meso</i> - <b>202</b>	2.900 ± 0.018	1.460 ± 0.001	1.106 ± 0.064	8.520 ± 0.009

**Tabla 34.** Actividad antiproliferativa de **199**, **200** y **202** frente a las líneas celulares MCF-7, HCT-116, A375 y G361.

Los compuestos que presentan mayor actividad antiproliferativa frente a todas las líneas celulares son los **199** con valores de CI<sub>50</sub> en el orden de nM (0.05 - 1.49 μM), siendo los isómeros *meso* más potentes frente a las líneas MCF-7 y A375 (CI<sub>50</sub>= 58 y 99 nM respectivamente) y los isómeros (±)-*trans* frente a las líneas HCT-116 y G361 (CI<sub>50</sub>= 66 y 507 nM respectivamente).

El macrociclo *meso*-**202** presenta valores de CI<sub>50</sub> de entre 1 y 3 μM para las líneas celulares MCF-7, HCT-116 y A375, y de 8.52 μM para la línea G361, siendo más activo frente a la línea A375 con una CI<sub>50</sub>= 1.11 μM.

Los compuestos **200** son los que presentan menor actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares MCF-7, HCT-116 y A375 con valores de CI<sub>50</sub> entre 2 y 7 μM, mientras que presentan valores de CI<sub>50</sub> en torno a 1 μM frente a la línea G361. En todos los casos, el isómero (±)-*trans* es más activo como antiproliferativo (CI<sub>50</sub> entre 1 y 4 μM) que el *meso* (CI<sub>50</sub> entre 1 y 7 μM). La introducción del grupo *p*-nitrobenzensulfonamido en los compuestos **200** no ha conducido a un aumento de actividad con respecto a los compuestos **199**.

Todos los compuestos de esta familia son potentes agentes antiproliferativos, presentando mayor actividad frente a la línea de melanoma A375. La introducción del grupo *p*-nitrobenzensulfonamido en los compuestos **200**, así como el cierre del ciclo en **202** con respecto a los compuestos **199** han inducido a una disminución de la actividad.

### 3.4.2. Análisis de distribución del ciclo celular

El estudio del ciclo celular se ha realizado después de 24 y 48 h horas de tratamiento con los compuestos **199**, **200** y **202** a tres veces sus respectivas  $CI_{50}$  en la línea celular A375, al ser en la que presentan mejores valores de actividad antiproliferativa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 35 y en la Figura 40.

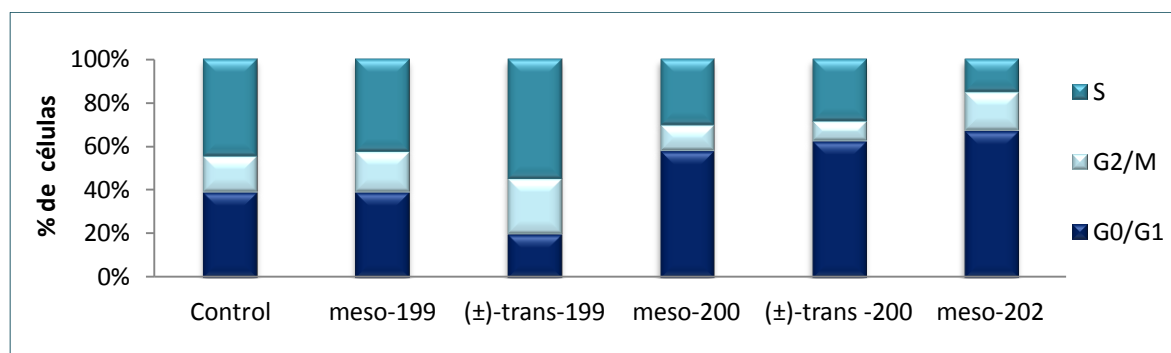
	Control (%)	<i>meso-199</i> (%)	(±)- <i>trans-199</i> (%)	<i>meso-200</i> (%)	(±)- <i>trans-200</i> (%)	<i>meso-202</i> (%)
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	41.10 ± 0.71	35.37 ± 0.64	34.70 ± 0.71	54.08 ± 0.31	57.53 ± 0.54	67.31 ± 1.02
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	20.38 ± 1.26	17.58 ± 0.76	11.08 ± 1.76	10.50 ± 0.35	6.93 ± 0.74	14.99 ± 1.99
<b>S</b>	38.37 ± 0.34	47.05 ± 0.12	54.23 ± 1.05	35.42 ± 0.65	35.54 ± 0.20	17.70 ± 0.97

\*24 h de tratamiento

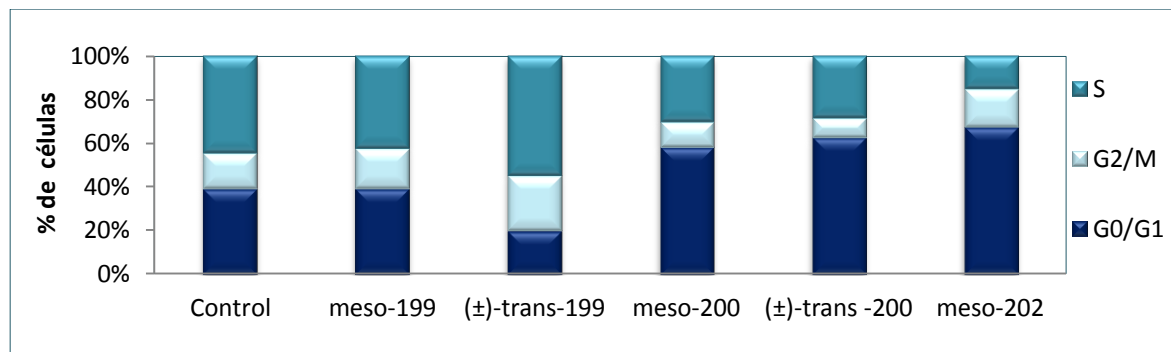
	Control (%)	<i>meso-199</i> (%)	(±)- <i>trans-199</i> (%)	<i>meso-200</i> (%)	(±)- <i>trans-200</i> (%)	<i>meso-202</i> (%)
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	38.97 ± 0.22	39.04 ± 1.63	19.97 ± 0.13	58.01 ± 0.36	62.28 ± 0.14	66.97 ± 3.59
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	16.61 ± 0.45	18.73 ± 1.35	25.26 ± 1.83	11.85 ± 0.11	9.19 ± 1.20	17.82 ± 4.63
<b>S</b>	44.42 ± 0.66	42.24 ± 2.98	54.78 ± 1.95	30.14 ± 0.24	28.54 ± 1.33	15.22 ± 1.05

\* 48 h de tratamiento

**Tabla 35.** Porcentaje de células acumuladas en las distintas fases del ciclo celular con su respectiva desviación estándar de los compuestos de la familia C tras 24 y 48 h de tratamiento ( $3 \times CI_{50}$ ) en A375.



\*24 h de tratamiento



\*48 h de tratamiento

**Figura 40.** Efecto de los compuestos de la familia C sobre la acumulación en las distintas fases del ciclo celular tras 24 y 48 h de tratamiento a  $3 \times CI_{50}$  en A375.

El derivado *meso-199* presenta un aumento leve en el porcentaje de células en fase S (47.05 %) tras 24 h de tratamiento con respecto al control (38.37 %). Este comportamiento desaparece a las 48 h de tratamiento. Su análogo ( $\pm$ )-*trans-199* detiene el ciclo celular en fase S tanto tras 24 como 48 h de tratamiento (54.23 % y 54.78 % frente a 38.37 % y 44.42 % del control respectivamente), mientras que el resto de derivados (*meso-200*, ( $\pm$ )-*trans-200* y *meso-202*) lo detienen en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, siendo esta parada más pronunciada por el macrociclo *meso-202* (66.97 % frente a 38.97 % del control tras 48 h).

El hecho de que los compuestos **199**, **200** y **202** detengan el ciclo celular en fases diferentes (fase S para **199** y fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> para **200** y **202**) indica que deben actuar sobre dianas moleculares diferentes. Son necesarios estudios más profundos para determinar las dianas terapéuticas específicas de dichos derivados.

### 3.4.3. Ensayo de apoptosis

Se ha estudiado la capacidad de inducción de apoptosis/necrosis de los compuestos **199**, **200** y **202** tras 24 y 48 h de tratamiento a  $3 \times \text{CI}_{50}$  en la línea celular A375.

Los compuestos de esta familia presentan efectos apoptóticos muy diferentes (Tabla 36 y Figura 41). Esto puede ser debido a la diversidad estructural que caracteriza a la familia. De esta forma, el compuesto macrocíclico (*meso-202*) presenta una capacidad apoptótica extremadamente elevada llegando al 95 % de apoptosis total tras 48 h de tratamiento frente al 7.65 % del control. Mientras que los derivados *meso-200* y ( $\pm$ )-*trans-200* incrementan levemente el porcentaje de células apoptóticas tras 48 h de tratamiento (13.65 % de apoptosis total y 28.30 % frente al 7.65 % del control respectivamente) y los compuestos **199** no presentan diferencias significativas con respecto al control.

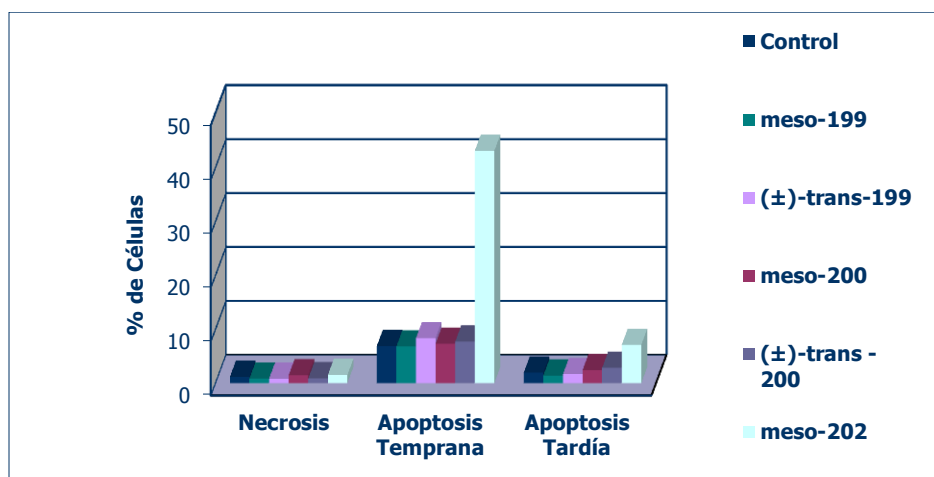
	Control	<i>meso-199</i>	( $\pm$ )- <i>trans-199</i>	<i>meso-200</i>	( $\pm$ )- <i>trans-200</i>	<i>meso-202</i>
<b>Necrosis</b>	1.15 $\pm$ 0.21	0.85 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.28	1.45 $\pm$ 0.78	0.90 $\pm$ 0.14	1.50 $\pm$ 0.14
<b>A. Temprana</b>	6.90 $\pm$ 0.28	6.80 $\pm$ 1.84	8.35 $\pm$ 3.18	7.30 $\pm$ 2.12	7.70 $\pm$ 2.40	43.10 $\pm$ 18.53
<b>A. Tardía</b>	1.95 $\pm$ 1.06	1.40 $\pm$ 0.00	1.65 $\pm$ 0.35	2.40 $\pm$ 0.71	2.85 $\pm$ 0.07	7.10 $\pm$ 0.71

\*24 h de tratamiento.

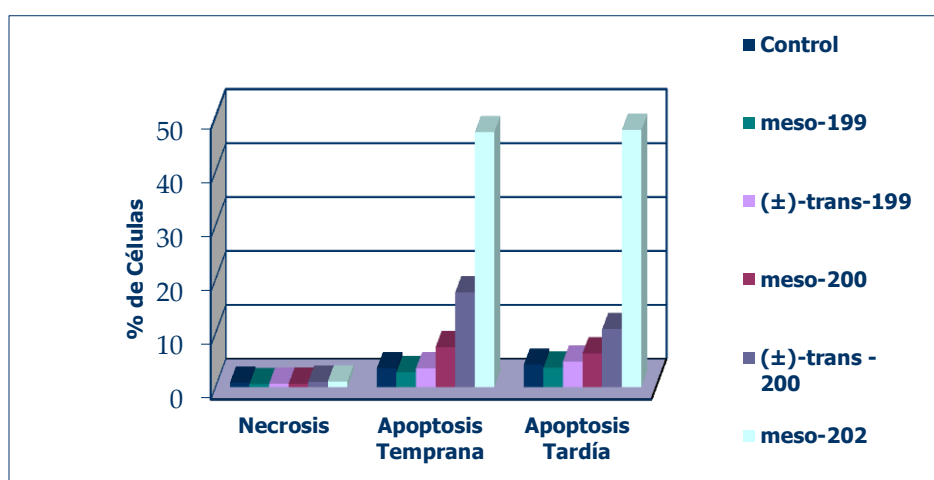
	Control	<i>meso-199</i>	( $\pm$ )- <i>trans-199</i>	<i>meso-200</i>	( $\pm$ )- <i>trans-200</i>	<i>meso-202</i>
<b>Necrosis</b>	0.80 $\pm$ 0.42	0.55 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.00	0.65 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.28	1.05 $\pm$ 0.21
<b>A. Temprana</b>	3.50 $\pm$ 2.55	2.75 $\pm$ 0.78	3.45 $\pm$ 0.35	7.40 $\pm$ 0.14	17.55 $\pm$ 2.62	47.30 $\pm$ 7.64
<b>A. Tardía</b>	4.15 $\pm$ 1.06	3.60 $\pm$ 0.42	4.75 $\pm$ 0.35	6.25 $\pm$ 0.49	10.75 $\pm$ 1.20	47.70 $\pm$ 7.92

\*48 h de tratamiento.

**Tabla 36.** Porcentaje de células necróticas y apoptóticas tempranas y tardías tras 24 y 48 h de tratamiento con  $3 \times \text{CI}_{50}$  de los compuestos de la familia C en A375.



\*tras 24 h de tratamiento



\*tras 48 h de tratamiento

**Figura 41.** Necrosis y apoptosis temprana y tardía en células A375 tras 24 y 48 h de cultivo con  $3 \times CI_{50}$  de los compuestos de la familia C.

**PARTE EXPERIMENTAL**





## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Metodología sintética y caracterización química

Los reactivos utilizados se han obtenido comercialmente de Aldrich® sin necesidad de posteriores purificaciones. Todas las reacciones anhidras se han llevado a cabo bajo atmósfera inerte de argón. VWR International Eurolab® ha proporcionado los disolventes anhidros necesarios.

Los procesos de reacción se han controlado de forma rutinaria mediante cromatografía en capa fina en cromatofolios Merck AL de Silicagel 60 F<sub>254</sub>, observándose posteriormente en lámparas de rayos ultravioleta. Ocasionalmente ha sido necesaria la utilización de reveladores con yodo, solución de ninhidrina y permanganato potásico.

La evaporación de los disolventes se ha llevado a cabo a vacío en rotavapores Büchi con controladores de presión Vacuubrand CVCII.

La cromatografía en columna flash se ha realizado utilizando Merck silicagel 60 con un tamaño de partícula de 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM). Para la destilación en aparato Kugelrohr se ha utilizado un dispositivo Büchi GKR-51.

La síntesis química asistida por microondas se ha efectuado en un aparato Initiator 2.0 que produce una radiación controlada a 2.450 GHz (Biotage AB, Upsala). El tiempo de reacción descrito se refiere al tiempo en el que la reacción se mantiene a la temperatura deseada y no al tiempo total de irradiación. La temperatura se mide con un sensor de IR situado fuera del recipiente de reacción.

Los puntos de fusión se han medido en un aparato Stuart Scientific Melting Point Apparatus SMP3 y están sin corregir.

Los espectros de RMN y de masas de alta resolución, así como los análisis elementales de los compuestos aquí presentados se han llevado a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Los espectros RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se han ejecutado en espectrómetros VarianInova Unity (300 MHz) y VarianDirect Drive (400 MHz, 500 MHz y 600 MHz) a temperatura ambiente. El disolvente deuterado empleado ha sido  $\text{CDCl}_3$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hz (ciclos por segundo). El aspecto y la multiplicidad de las señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: (s) singlete; (sa) singlete ancho; (d) doblete; (dd) doblete; (ddd) triplete; (t) triplete; (pst) pseudotriplete; (c) cuadruplete; (m) multiplete.

Los espectros de masas de alta resolución se han realizado en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal, LCT Premier Waters XE, mediante ionización por electronebulización (ESI-TOF).

Los análisis elementales se han hecho en un aparato ThermoScientific Modelo Flash 2000. Las muestras estudiadas se han secado en una estufa Gallencamp a presión reducida con  $\text{P}_2\text{O}_5$  en su interior.

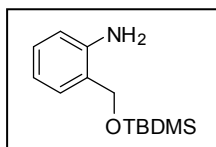
En este capítulo se describe la metodología sintética y caracterización química de los 27 compuestos finales que aparecen en la presente Tesis Doctoral, incluyendo la descripción de los compuestos intermedios necesarios para su obtención. Las estructuras **162**, **163** y **188** de la familia A, **193** y **197** de la familia B y *meso*- y ( $\pm$ )-*trans*-**199** y **201** de la familia C han sido previamente descritas. Los compuestos finales de las familias A y B se han nombrado siguiendo las reglas de la IUPAC eligiendo como función principal la purina y el 5-fluoroacilo, al ser el elemento común de todos ellos. La familia C contiene un macrociclo que se ha nombrado de acuerdo con las reglas de la IUPAC para fanos<sup>105,106</sup>. La nomenclatura de fanos es un método para nombrar estructuras orgánicas que se realiza por agrupación de los nombres de las partes sencillas que componen una estructura compleja. El término ciclofano se usa para describir un tipo particular de estructuras cíclicas pero la nomenclatura de fano puede usarse tanto para estructuras abiertas como para macrocíclicas. Por tanto, se ha utilizado también para nombrar las estructuras abiertas de la familia C.

Se han utilizado las abreviaturas "NMR" y "HRMS" en inglés para facilitar su incorporación posterior a los artículos y otras comunicaciones científicas.

## 1.1. Familia A

### 2-(*tert*-Butildimetilsililoximetil)anilina (**162**)

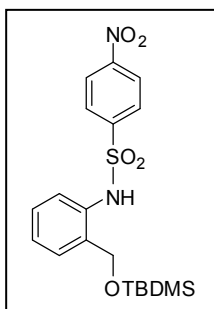
Sobre una disolución de *tert*-butilclorodimetilsilano (18.4 g, 121.80 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0.50 g, 4.06 mmol), se añade alcohol 2-aminobencílico (5.00 g, 40.06 mmol) y Et<sub>3</sub>N (12.4 g, 121.80 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (120 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 h. Se diluye (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y la fase orgánica se lava con agua destilada. Se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtra y se evapora a vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash utilizando como eluyente EtOAc/hexano (1:10).



Líquido naranja (9.64 g, 100 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.16 (t, *J* = 7.6, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.3, 1H), 6.76 (t, *J* = 7.4, 1H), 6.70 (d, *J* = 7.9, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 0.99 (s, 9H), 0.15 (s, 6H). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>NOSi (M + H)<sup>+</sup>: 238.1549, encontrado: 238.1559 (desviación 0.1 ppm).

### *N*-[2-(*tert*-Butildimetilsililoximetil)fenil]-4-nitrobenzensulfonamida (**163**)

A una disolución de **162** (4.23 g, 17.82 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (50 mL), se añade cloruro de 4-nitrobenzensulfonilo (1.97 g, 8.91 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h. Se diluye (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y se lava (H<sub>2</sub>O). La fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtra y se evapora el disolvente al rotavapor. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente EtOAc:hexano (0.5:10).

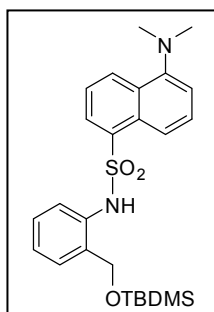


Sólido blanco (7.53 g, 100 %). Pf: 95-96 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.68 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.6, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.1, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.3, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.1, 1H), 4.35 (s, 2H), 0.92 (s, 9H), 0.05 (s, 6H). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SSi (M + H)<sup>+</sup>: 423.1332, encontrado: 423.1335 (desviación 0.3 ppm).

### *N*-[2-(*tert*-Butildimetilsililoximetil)fenil]-5-dansilamina (**164**)

A una disolución de **162** (2.74 g, 11.52 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (35 mL), se añade cloruro de dansilo (3.42 g, 12.67 mmol) y Et<sub>3</sub>N (1.76 g, 17.28 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agita durante 24 h a 30 °C. Se lava (H<sub>2</sub>O) y la fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Se evapora el disolvente al rotavapor y el crudo se purifica mediante

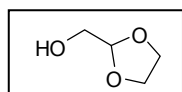
cromatografía en columna flash utilizando como eluyente un gradiente de disolventes EtOAc:hexano (0.5:10 → 1:10).



Líquido denso amarillento (4.04 g, 100 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.66 (s, 1H, NH), 8.49 (d,  $J_{3-4} = 8.5$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{dan}}$ ), 8.39 (d,  $J_{7-8} = 8.7$ , 1H,  $\text{H}_{8\text{dan}}$ ), 8.22 (dd,  $J_{2-3} = 7.3$ ,  $J_{2-4} = 1.2$ ,  $\text{H}_{2\text{dan}}$ ), 7.53 (dd,  $J_{7-8} = 8.7$ ,  $J_{6-7} = 7.7$ , 1H,  $\text{H}_{7\text{dan}}$ ), 7.47 – 7.42 (m, 2H,  $\text{H}_{3\text{dan}}$  y  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 7.18 – 7.14 (m, 2H,  $\text{H}_{6\text{dan}}$  y  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 6.93 (ddd,  $J_{3-4} = 7.5$ ,  $J_{4-5} = 7.4$ ,  $J_{4-6} = 1.1$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 6.88 (dd,  $J_{3-4} = 7.5$ ,  $J_{3-5} = 1.4$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 4.30 (s, 2H, Ph- $\text{CH}_2$ ), 2.86 (s, 6H, N-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0.94 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -C-Si), 0.06 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -Si).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.03 ( $\text{C}_{5\text{dan}}$ ), 137.26 ( $\text{C}_{1\text{Ph}}$ ), 135.57 ( $\text{C}_{1\text{dan}}$ ), 130.68 ( $\text{C}_{4\text{dan}}$ ), 130.38 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 129.97 ( $\text{C}_{9\text{dan}}$ ), 129.95 ( $\text{C}_{2\text{dan}}$ ), 129.74 ( $\text{C}_{10\text{dan}}$ ), 128.78 ( $\text{C}_{5\text{Ph}}$ ), 128.36 ( $\text{C}_{7\text{dan}}$ ), 128.00 ( $\text{C}_{3\text{Ph}}$ ), 124.22 ( $\text{C}_{4\text{Ph}}$ ), 123.26 ( $\text{C}_{3\text{dan}}$ ), 121.46 ( $\text{C}_{6\text{Ph}}$ ), 118.95 ( $\text{C}_{8\text{dan}}$ ), 115.31 ( $\text{C}_{6\text{dan}}$ ), 65.40 (Ph- $\text{CH}_2$ ), 45.56 (N-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 25.94 ( $\text{CH}_3$ -C-Si), 18.33 (C-Si), -5.26 ( $\text{CH}_3$ -Si). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_3\text{SSi}$  (M + H) $^+$ : 471.2059, encontrado: 471.2138 (desviación - 0.8 ppm). Análisis Elemental:  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3\text{SSi}$  Teórico (%): C 63.79; H 7.28, N 5.95; Obtenido (%): C 63.76, H 7.22, N 5.92.

## 2-(Hidroximetil)-1,3-dioxolano (187)

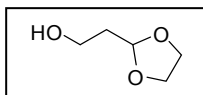
Sobre una disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (23.5 g, 0.082 mol) en 60 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , se añade una disolución de NaOH al 27 % (22 mL). A continuación, se añade gota a gota 2-(2-bromometil)-1,3-dioxolano (16.7 g, 0.100 mol). La mezcla de reacción se agita a 160 °C durante 6 h en tubo cerrado. Se elimina el exceso de sales por filtración y el líquido resultante se extrae ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). La fase orgánica se seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y el disolvente se elimina a vacío en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica por destilación en un aparato Kugelrohr.



Líquido denso transparente (2.43 g, 24 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.06 (t,  $J = 4.0$ , 1H), 3.93 (m, 4H), 3.62 (d,  $J = 4.0$ , 2H). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_3$  (M + H) $^+$ : 105.0473, encontrado: 105.0493 (desviación 0.2 ppm).

## 2-(Hidroxietil)-1,3-dioxolano (188)

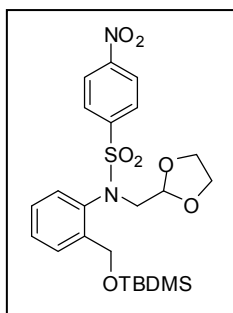
Sobre una disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (23.5 g, 0.082 mol) en 60 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , se añade una disolución de NaOH al 27 % (22 mL). A continuación, se añade gota a gota 2-(2-bromoetil)-1,3-dioxolano (18.1 g, 0.100 mol). La mezcla de reacción se agita durante 6 h a 160 °C en tubo cerrado. Tras ese tiempo, se elimina el exceso de sales por filtración y el líquido resultante se extrae ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). La fase orgánica se seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y el disolvente se elimina a vacío en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica por destilación en un aparato Kugelrohr.



Líquido denso transparente (4.18 g, 36 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.02 (t,  $J = 4.23$ , 1H), 3.98 (m, 4H), 3.78 (m, 2H), 2.32 (s, 1H), 1.96 (m, 2H). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ : 118.0630, encontrado: 118.0642 (desviación 0.1 ppm).

### ***N*-[2-(*tert*-Butildimetilsiloximetil)fenil]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)metil]-4-nitrobencensulfonamida (165)**

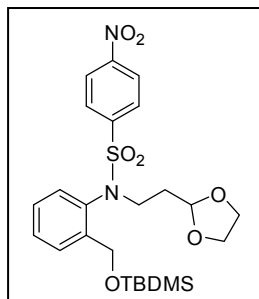
Bajo atmósfera de argón se prepara una disolución de **163** (2.00 g, 4.73 mmol), **187** (492 mg, 4.73 mmol) y  $\text{PPh}_3$  (1.49 g, 5.68 mmol) en THF anhidro (25 mL) que se enfría a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  en un baño de acetona y  $\text{CO}_2$  antes de adicionar el DIAD gota a gota (1.05 g, 5.20 mmol). A continuación se eleva la temperatura lentamente hasta  $5\text{ }^\circ\text{C}$  por adición de acetona al baño y la mezcla de reacción se calienta a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  durante 21 h. Tras este tiempo, el disolvente se evapora a vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente EtOAc:hexano (1:8).



Líquido denso amarillento (2.03 g, 84 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.33 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=9.0$ , 2H,  $\text{H}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 7.85 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=9.0$ , 2H,  $\text{H}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 7.69 (dd,  $J_{3-4}=7.7$ ,  $J_{3-5}=1.1$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 7.39 (ddd,  $J_{3-4}=7.7$ ,  $J_{4-5}=7.4$ ,  $J_{4-6}=1.1$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 7.11 (ddd,  $J_{5-6}=7.8$ ,  $J_{4-5}=7.4$ ,  $J_{3-5}=1.1$ , 1H,  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 6.47 (dd,  $J_{5-6}=7.8$ ,  $J_{4-6}=1.1$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 5.02 (d,  $J_{\text{gem}}=14.4$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 4.96 (pst,  $J_{\text{CH-CH}_2}=4.7$ , 1H,  $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 4.94 (d,  $J_{\text{gem}}=14.4$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 3.91 (dd,  $J_{\text{gem}}=14.1$ ,  $J_{\text{vic}}=5.1$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.89 – 3.77 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 3.48 (dd,  $J_{\text{gem}}=14.1$ ,  $J_{\text{vic}}=5.1$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 0.97 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-C-Si}$ ), 0.12 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.32 ( $\text{C}_{4\text{PhNO}_2}$ ), 144.27 ( $\text{C}_{1\text{PhNO}_2}$ ), 143.35 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 135.88 ( $\text{C}_{1\text{Ph}}$ ), 129.55 ( $\text{C}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 129.40 ( $\text{C}_{3\text{Ph}}$ ), 128.46 ( $\text{C}_{4\text{Ph}}$ ), 127.57 ( $\text{C}_{5\text{Ph}}$ ), 127.37 ( $\text{C}_{6\text{Ph}}$ ), 124.05 ( $\text{C}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 101.70 ( $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 65.14 ( $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 61.21 ( $\text{Ph-CH}_2$ ), 54.76 ( $\text{N-CH}_2$ ), 26.06 ( $\text{CH}_3\text{-C-Si}$ ), 18.71 ( $\text{C-Si}$ ), -5.06 ( $\text{CH}_3\text{-Si}$ ). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7\text{SSiNa}$  ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ : 531.1699, encontrado: 531.1585 (desviación - 2.3 ppm). Análisis Elemental:  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7\text{SSi}$  Teórico (%): C 54.31, H 6.34, N 5.51. Obtenido (%): C 54.38; H 6.32, N 5.53.

### ***N*-[2-(*tert*-Butildimetilsiloximetil)fenil]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-4-nitrobencensulfonamida (166)**

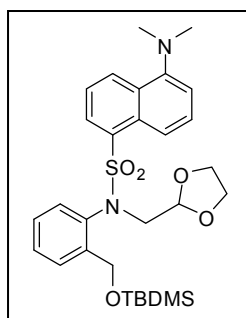
Bajo atmósfera de argón se prepara una disolución de **163** (2.00 g, 4.73 mmol), **188** (559 mg, 4.73 mmol) y  $\text{PPh}_3$  (1.49 g, 5.68 mmol) en THF anhidro (25 mL) que se enfría a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  en un baño de acetona y  $\text{CO}_2$  antes de adicionar el DIAD gota a gota (1.05 g, 5.20 mmol). A continuación se eleva la temperatura lentamente hasta  $5\text{ }^\circ\text{C}$  por adición de acetona al baño y la mezcla de reacción se calienta a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  durante 21 h. Tras este tiempo, el disolvente se evapora a vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente EtOAc:hexano (1:7).



Sólido blanco (1.75 g, 71 %). Pf: 107-108 °C.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.32 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.6$ , 2H,  $\text{H}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 7.84 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.6$ , 2H,  $\text{H}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 7.66 (d,  $J_{3-4}= 7.5$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 7.35 (pst,  $J_{3-4}= J_{4-5}= 7.5$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 7.10 (pst,  $J_{5-6}= J_{4-5}= 7.5$ , 1H,  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 6.43 (d,  $J_{5-6}= 7.5$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 4.94 (d,  $J_{\text{gem}}= 14.3$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2\text{-O}$ ), 4.87 (d,  $J_{\text{gem}}= 14.3$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 4.80 (pst,  $J_{\text{CH-CH}_2}= 4.4$ , 1H,  $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 4.03 – 3.92 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.92 – 3.75 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 3.43 – 3.30 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.03 – 1.89 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.80 – 1.65 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 0.92 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-C-Si}$ ), 0.02 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.41 ( $\text{C}_{4\text{PhNO}_2}$ ), 144.08 ( $\text{C}_{1\text{PhNO}_2}$ ), 143.43 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 135.38 ( $\text{C}_{1\text{Ph}}$ ), 129.51 ( $\text{C}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 129.38 ( $\text{C}_{3\text{Ph}}$ ), 128.77 ( $\text{C}_{4\text{Ph}}$ ), 127.64 ( $\text{C}_{5\text{Ph}}$ ), 126.93 ( $\text{C}_{6\text{Ph}}$ ), 124.31 ( $\text{C}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 102.11 ( $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 65.18 ( $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 61.37 ( $\text{Ph-CH}_2$ ), 47.66 ( $\text{N-CH}_2$ ), 32.77 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 26.20 ( $\text{CH}_3\text{-C-Si}$ ), 18.62 ( $\text{C-Si}$ ), -5.07 ( $\text{CH}_3\text{-Si}$ ). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7\text{SSiNa}$  ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ : 545.1856, encontrado: 545.1752 (desviación - 0.4 ppm). Análisis Elemental:  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7\text{SSi}$  Teórico (%): C 55.15, H 6.56, N 5.36. Obtenido (%): C 55.20; H 6.58, N 5.39.

### ***N*-[2-(*tert*-Butildimetilsililoximetil)fenil]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)metil]-5-dansilamina (167)**

Se prepara una disolución de **164** (2.00 g, 4.67 mmol), **187** (486 mg, 4.67 mmol) y  $\text{PPh}_3$  (1.47 g, 5.60 mmol) en THF anhidro (25 mL) bajo atmósfera de argón que se enfría a - 20 °C en un baño de acetona y  $\text{CO}_2$  antes de adicionar el DIAD gota a gota (1.04 g, 5.14 mmol). A continuación se eleva la temperatura lentamente hasta 5 °C por adición de acetona al baño y la mezcla de reacción se calienta a 30 °C durante 21 h. Finalmente, el disolvente se evapora a vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente EtOAc:hexano (1:9).



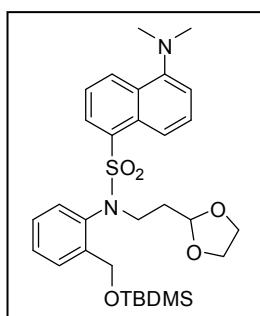
Líquido denso amarillento (1.76 g, 68 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.54 (d,  $J_{3-4}= 8.4$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{dan}}$ ), 8.15 (d,  $J_{7-8}= 8.7$ , 1H,  $\text{H}_{8\text{dan}}$ ), 8.02 (dd,  $J_{2-3}= 7.5$ ,  $J_{2-4}= 1.1$ ,  $\text{H}_{2\text{dan}}$ ), 7.56 (d,  $J_{3-4}= 7.7$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 7.42 (dd,  $J_{3-4}= 8.4$ ,  $J_{2-3}= 7.5$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{dan}}$ ), 7.36 (dd,  $J_{7-8}= 8.7$ ,  $J_{6-7}= 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{7\text{dan}}$ ), 7.30 – 7.26 (m, 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 7.14 (d,  $J_{6-7}= 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{dan}}$ ), 6.95 (ddd,  $J_{5-6}= 7.9$ ,  $J_{4-5}= 7.5$ ,  $J_{3-5}= 1.2$ , 1H,  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 6.64 (d,  $J_{5-6}= 7.9$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 5.02 (pst,  $J_{\text{CH-CH}_2}= 4.8$ , 1H,  $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 4.85 (d,  $J_{\text{gem}}= 14.4$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 4.57 (d,  $J_{\text{gem}}= 14.4$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 3.95 (dd,  $J_{\text{gem}}= 14.1$ ,  $J_{\text{vic}}= 4.9$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.93 – 3.70 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 3.51 (dd,  $J_{\text{gem}}= 14.1$ ,  $J_{\text{vic}}= 4.6$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.88 (s, 6H,  $\text{N-(CH}_3)_2$ ), 0.92 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-C-Si}$ ), 0.02 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151.47 ( $\text{C}_{5\text{dan}}$ ), 143.00 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 136.22 ( $\text{C}_{1\text{Ph}}$ ), 134.41 ( $\text{C}_{1\text{dan}}$ ), 131.14 ( $\text{C}_{2\text{dan}}$ ), 130.67 ( $\text{C}_{4\text{dan}}$ ), 130.55 ( $\text{C}_{9\text{dan}}$ ), 129.98 ( $\text{C}_{10\text{dan}}$ ), 129.51 ( $\text{C}_{6\text{Ph}}$ ), 128.63 ( $\text{C}_{4\text{Ph}}$ ), 127.88 ( $\text{C}_{7\text{dan}}$ ), 127.64 ( $\text{C}_{3\text{Ph}}$ ), 126.93 ( $\text{C}_{5\text{Ph}}$ ), 123.21 ( $\text{C}_{3\text{dan}}$ ), 120.46 ( $\text{C}_{8\text{dan}}$ ), 115.32 ( $\text{C}_{6\text{dan}}$ ), 102.20 ( $\text{CH}_{\text{diox}}$ ),

64.98 (CH<sub>2diox</sub>), 61.10 (Ph-CH<sub>2</sub>), 54.58 (N-CH<sub>2</sub>), 45.54 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.08 (CH<sub>3</sub>-C-Si), 18.43 (C-Si), -5.31 (CH<sub>3</sub>-Si). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SSi (M + H)<sup>+</sup>: 557.2427, encontrado: 557.2514 (desviación 1.6 ppm). Análisis Elemental: C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SSi Teórico (%): C 62.56, H 7.24, N 5.03; Obtenido (%): C 62.60, H 7.28, N 5.08.

### ***N*-[2-(*tert*-Butildimetilsililoximetil)fenil]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-5-dansilamina (168)**

Se prepara una disolución de **164** (2.00 g, 4.67 mmol), **188** (552 mg, 4.67mmol) y PPh<sub>3</sub> (1.47 g, 5.60 mmol) en THF anhidro (25 mL) bajo atmósfera de argón que se enfría a - 20 °C en un baño de acetona y CO<sub>2</sub> antes de adicionar el DIAD gota a gota (1.04 g, 5.14 mmol). A continuación se eleva la temperatura lentamente hasta 5 °C por adición de acetona al baño y la mezcla de reacción se calienta a 30 °C durante 21 h. Finalmente, el disolvente se evapora a vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente EtOAc:hexano (1:9).

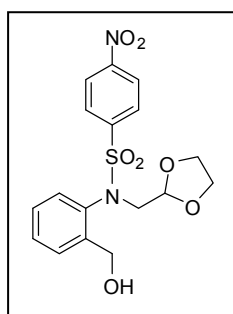
Líquido denso amarillento (2.43 g, 91 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.54 (d, *J*<sub>3-4</sub> = 8.5, 1H, H<sub>4dan</sub>), 8.17 (d, *J*<sub>7-8</sub> = 8.7, 1H, H<sub>8dan</sub>), 8.05 (dd, *J*<sub>2-3</sub> = 7.5, *J*<sub>2-4</sub> = 1.2, H<sub>2dan</sub>), 7.56 (d, *J*<sub>3-4</sub> = 7.4, 1H, H<sub>3Ph</sub>), 7.44 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 8.5, *J*<sub>2-3</sub> = 7.5, 1H, H<sub>3dan</sub>), 7.38 (dd, *J*<sub>7-8</sub> = 8.7, *J*<sub>6-7</sub> = 7.5, 1H, H<sub>7dan</sub>), 7.29 (ddd, *J*<sub>4-5</sub> = 7.6, *J*<sub>3-4</sub> = 7.4, *J*<sub>4-6</sub> = 1.1, 1H, H<sub>4Ph</sub>), 7.14 (d, *J*<sub>6-7</sub> = 7.5, 1H, H<sub>6dan</sub>), 7.00 (ddd, *J*<sub>5-6</sub> = 8.0, *J*<sub>4-5</sub> = 7.6, *J*<sub>3-5</sub> = 1.5, 1H, H<sub>5Ph</sub>), 6.67 (dd, *J*<sub>5-6</sub> = 8.0, *J*<sub>4-6</sub> = 0.8, 1H, H<sub>6Ph</sub>), 4.81 (pst, *J*<sub>CH-CH2</sub> = 4.6, 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.71 (d, *J*<sub>gem</sub> = 14.1, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.58 (d, *J*<sub>gem</sub> = 14.1, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 3.95 – 3.88 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.89 – 3.71 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.64 – 3.53 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.88 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.95 – 1.86 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.81 – 1.73 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.90 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-C-Si), 0.02 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-Si). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.60 (C<sub>5dan</sub>), 142.90 (C<sub>2Ph</sub>), 135.53 (C<sub>1Ph</sub>), 134.66 (C<sub>1dan</sub>), 131.13 (C<sub>2dan</sub>), 130.60 (C<sub>4dan</sub>), 130.52 (C<sub>9dan</sub>), 130.06 (C<sub>10dan</sub>), 129.49 (C<sub>6Ph</sub>), 128.66 (C<sub>4Ph</sub>), 128.07 (C<sub>7dan</sub>), 127.88 (C<sub>3Ph</sub>), 127.15 (C<sub>5Ph</sub>), 123.30 (C<sub>3dan</sub>), 120.50 (C<sub>8dan</sub>), 115.34 (C<sub>6dan</sub>), 102.34 (CH<sub>diox</sub>), 65.01 (CH<sub>2diox</sub>), 61.22 (Ph-CH<sub>2</sub>), 47.20 (N-CH<sub>2</sub>), 45.59 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 33.01 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 26.10 (CH<sub>3</sub>-C-Si), 16.46 (C-Si), -5.26 (CH<sub>3</sub>-Si). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SSi (M + H)<sup>+</sup>: 571.2584, encontrado: 571.2662 (desviación - 0.9 ppm). Análisis Elemental: C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SSi Teórico (%): C 63.12, H 7.42, N 4.91; Obtenido (%): C 63.18, H 7.48, N 5.01.



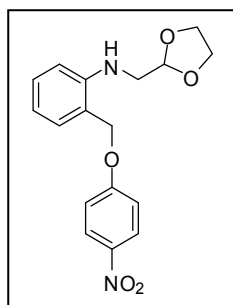


***N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*-(2-hidroximetilfenil)-4-nitrobencensulfonamida (**169**) y *N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)metil]-2-(4-nitrofenoximetil)anilina (**189**)**

Se añade TBAF (1.07 g, 3.40 mmol) a una disolución de **165** (1.73 g, 3.40 mmol) en THF anhidro (20 mL). La reacción se agita bajo atmósfera de argón durante 3 h a temperatura ambiente. El disolvente se elimina al rotavapor y el residuo se disuelve (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se lava (H<sub>2</sub>O), la fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentra a vacío. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente EtOAc:hexano (1:3 → 1:1), lo que permite separar los compuestos **169** y **189**.



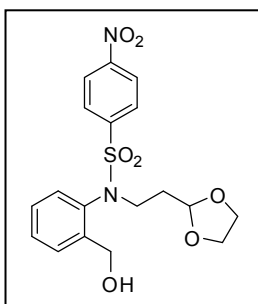
**169**: Sólido blanco (643 mg, 48 %). Pf: 135-136 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.34 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 9.0$ , 2H, H<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.83 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 9.0$ , 2H, H<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.64 (dd,  $J_{3-4}= 7.6$ ,  $J_{3-5}= 1.5$ , 1H, H<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 7.40 (ddd,  $J_{3-4}= 7.6$ ,  $J_{4-5}= 7.5$ ,  $J_{4-6}= 1.2$ , 1H, H<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 7.17 (ddd,  $J_{5-6}= 7.6$ ,  $J_{4-5}= 7.5$ ,  $J_{3-5}= 1.5$ , 1H, H<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 6.40 (dd,  $J_{5-6}= 7.6$ ,  $J_{4-6}= 1.2$ , 1H, H<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 5.07 (dd,  $J_{CH-CH_2}= 5.6$ , 4.1, 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.93 (d,  $J_{gem}= 12.5$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.75 (d,  $J_{gem}= 12.5$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 3.98 (dd,  $J_{gem}= 14.0$ ,  $J_{vic}= 4.1$ , 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.95 – 3.80 (m, 4H, CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 3.32 (dd,  $J_{gem}= 14.0$ ,  $J_{vic}= 5.7$ , 1H, N-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.50 (C<sub>4</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 143.36 (C<sub>1</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 142.81 (C<sub>2</sub><sub>Ph</sub>), 137.50 (C<sub>1</sub><sub>Ph</sub>), 131.99 (C<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 129.90 (C<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 129.58 (C<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 128.86 (C<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 127.26 (C<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 124.27 (C<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 102.06 (CH<sub>diox</sub>), 65.18 (CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 61.30 (Ph-CH<sub>2</sub>), 55.17 (N-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SNa (M + Na)<sup>+</sup>: 417.0835, encontrado: 417.0733 (desviación 0.2 ppm). Análisis Elemental: C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S Teórico (%): C 51.77, H 4.60, N 7.10. Obtenido (%): C 51.80; H 4.65, N 7.06.



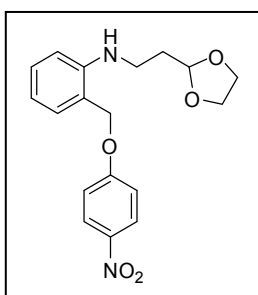
**189**: Sólido blanco (240 mg, 22 %). Pf: 125-126 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.21 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 9.3$ , 2H, H<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.28 (ddd,  $J_{4-5}$  o  $J_{5-6}= 7.8$ ,  $J_{5-6}$  o  $J_{4-5}= 7.6$ ,  $J_{3-5}= 1.6$ , 1H, H<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 7.21 (dd,  $J_{3-4}= 7.7$ ,  $J_{3-5}= 1.6$ , 1H, H<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 7.08 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 9.3$ , 2H, H<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 6.80 – 6.72 (m, 2H, H<sub>4</sub><sub>Ph</sub> y H<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 5.15 – 5.11 (m, 1H, CH<sub>diox</sub>), 5.14 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.62 (s, 1H, NH), 3.97 – 3.86 (m, 4H, CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 3.39 (d,  $J_{CH_2-CH}= 3.8$ , 2H, N-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.44 (C<sub>4</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 147.45 (C<sub>1</sub><sub>Ph</sub>), 142.02 (C<sub>1</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 130.68 (C<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 130.41 (C<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 126.02 (C<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 119.83 (C<sub>2</sub><sub>Ph</sub>), 117.56 (C<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 115.23 (C<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 111.65 (C<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 102.41 (CH<sub>diox</sub>), 70.46 (Ph-CH<sub>2</sub>), 65.44 (CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 46.44 (N-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 331.1216, encontrado: 331.1293 (desviación - 0.3 ppm). Análisis Elemental: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Teórico (%): C 61.81, H 5.49, N 8.48. Obtenido (%): C 61.78, H 5.50, N 8.44.

***N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-*N*-(2-hidroximetilfenil)-4-nitrobencensulfonamida (170) y *N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-2-(4-nitrofenoximetil)anilina (190)**

Se añade TBAF (372 mg, 1.18 mmol) a una disolución de **166** (616 mg, 1.18 mmol) en THF anhidro (7 mL). La reacción se agita durante 3 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Se elimina el disolvente al rotavapor. El residuo se disuelve (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y se lava (H<sub>2</sub>O). La fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentra a vacío. Se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente un gradiente de disolventes EtOAc:hexano (1:3 → 1:1), lo que permite separar los compuestos **170** y **190**.



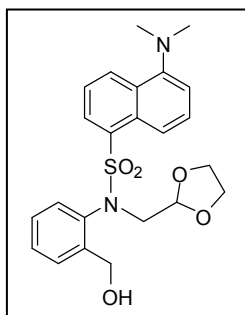
**170**: Sólido amarillento (304 mg, 78 %). Pf: 63-64 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.35 (d,  $J_{3-2}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H, H<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.84 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H, H<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.67 (d,  $J_{3-4}= 7.7$ , 1H, H<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 7.41 (pst,  $J_{3-4}= J_{4-5}= 7.7$ , 1H, H<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 7.18 (pst,  $J_{5-6}= J_{4-5}= 7.7$ , 1H, H<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 6.41 (d,  $J_{5-6}= 7.7$ , H<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 4.84 (d,  $J_{gem}= 12.6$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>-O), 4.80 (pst,  $J_{CH-CH_2}= 4.2$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.63 (dd,  $J_{gem}= 12.6$ ,  $J_{vic}= 7.4$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.05 – 3.96 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.91 – 3.71 (m, 4H, CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 3.35 – 3.23 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 1.96 – 1.83 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.72 – 1.60 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.28 (C<sub>4</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 143.28 (C<sub>1</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 142.78 (C<sub>2</sub><sub>Ph</sub>), 136.38 (C<sub>1</sub><sub>Ph</sub>), 131.73 (C<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 129.75 (C<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 129.50 (C<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 128.87 (C<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 126.75 (C<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 124.32 (C<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 102.02 (CH<sub>diox</sub>), 65.16 (CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 61.08 (Ph-CH<sub>2</sub>), 47.63 (N-CH<sub>2</sub>), 32.42 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S (M - H)<sup>+</sup>: 407.0991, encontrado: 407.0922 (desviación 0.2 ppm). Análisis Elemental: C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S Teórico (%): C 52.93, H 4.94, N 6.86; Obtenido (%): C 52.80; H 4.90, N 6.88.



**190**: Sólido amarillento (60.9 mg, 15 %). Pf: 106-107 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.22 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 9.2$ , 2H, H<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.30 (ddd,  $J_{4-5}$  o  $J_{5-6}= 7.9$ ,  $J_{5-6}$  o  $J_{4-5}= 7.6$ ,  $J_{3-5}= 1.3$ , 1H, H<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 7.21 (dd,  $J_{3-4}= 7.3$ ,  $J_{3-5}= 1.3$ , 1H, H<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 7.08 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 9.2$ , 2H, H<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 6.75 – 6.72 (m, 2H, H<sub>4</sub><sub>Ph</sub> y H<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 5.14 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.97 (s, 1H, NH), 4.95 (t,  $J_{CH-CH_2}= 4.4$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 3.91 – 3.63 (m, 4H, CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 3.31 (t,  $J_{CH_2-CH_2}= 6.2$ , 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2.07 – 1.99 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.84 (C<sub>4</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 147.65 (C<sub>1</sub><sub>Ph</sub>), 141.87 (C<sub>1</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 130.76 (C<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 130.51 (C<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 125.99 (C<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 119.35 (C<sub>2</sub><sub>Ph</sub>), 116.89 (C<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 115.09 (C<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 111.05 (C<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 104.14 (CH<sub>diox</sub>), 70.15 (Ph-CH<sub>2</sub>-O), 64.96 (CH<sub>2</sub><sub>diox</sub>), 39.09 (N-CH<sub>2</sub>), 33.00 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 345.1372, encontrado: 345.1444 (desviación - 1.7 ppm). Análisis Elemental: C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S Teórico (%): C 52.93, H 4.94, N 6.86. Obtenido (%): C 52.98, H 4.99, N 6.90.

***N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*-(2-hidroximetilfenil)-5-dansilamina (171)**

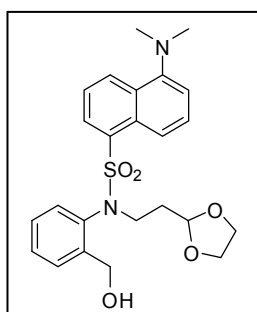
A una disolución de **167** (1.67 g, 3.01 mmol) en THF anhidro (18 mL), se añade TBAF (950 mg, 3.01 mmol). La reacción se agita durante 3 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Se elimina el disolvente al rotavapor y el crudo de reacción se disuelve (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se lava (H<sub>2</sub>O) y la fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Se concentra a vacío y se purifica mediante cromatografía flash en columna utilizando como eluyente un gradiente de disolventes EtOAc:hexano (1:3 → 1:1).



Sólido amarillento (1.33 g, 100 %). Pf: 58-59 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.57 (d, *J*<sub>3-4</sub> = 8.4, 1H, H<sub>4dan</sub>), 8.05 – 8.02 (m, 2H, H<sub>2dan</sub> y H<sub>8dan</sub>), 7.57 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 7.7, *J*<sub>3-5</sub> = 1.5, 1H, H<sub>3Ph</sub>), 7.45 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 8.4, *J*<sub>2-3</sub> = 7.5, 1H, H<sub>3dan</sub>), 7.32 (dd, *J*<sub>7-8</sub> = 8.6, *J*<sub>6-7</sub> = 7.6, 1H, H<sub>7dan</sub>), 7.29 (ddd, *J*<sub>3-4</sub> = 7.7, *J*<sub>4-5</sub> = 7.5, *J*<sub>4-6</sub> = 0.8, 1H, H<sub>4Ph</sub>), 7.14 (d, *J*<sub>6-7</sub> = 7.6, 1H, H<sub>6dan</sub>), 6.92 (ddd, *J*<sub>5-6</sub> = 8.0, *J*<sub>4-5</sub> = 7.5, *J*<sub>3-5</sub> = 1.7, 1H, H<sub>5Ph</sub>), 6.31 (dd, *J*<sub>5-6</sub> = 8.0, *J*<sub>4-6</sub> = 0.8, 1H, H<sub>6Ph</sub>), 5.11 (pst, *J*<sub>CH-CH2</sub> = 4.8, 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.92 (dd, *J*<sub>gem</sub> = 12.4, *J*<sub>vic</sub> = 5.2, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.70 (dd, *J*<sub>gem</sub> = 12.4, *J*<sub>vic</sub> = 5.3, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.15 (dd, *J*<sub>gem</sub> = 14.1, *J*<sub>vic</sub> = 4.3, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.94 – 3.76 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.25 (dd, *J*<sub>gem</sub> = 14.1, *J*<sub>vic</sub> = 5.5, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.88 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.59 (C<sub>5dan</sub>), 142.86 (C<sub>2Ph</sub>), 138.03 (C<sub>1Ph</sub>), 133.64 (C<sub>1dan</sub>), 131.42 (C<sub>3Ph</sub>), 131.39 (C<sub>2dan</sub>), 130.99 (C<sub>4dan</sub>), 130.61 (C<sub>9dan</sub>), 130.05 (C<sub>10dan</sub>), 129.17 (C<sub>4Ph</sub>), 128.80 (C<sub>6Ph</sub>), 128.36 (C<sub>5Ph</sub>), 128.00 (C<sub>7dan</sub>), 123.22 (C<sub>3dan</sub>), 120.34 (C<sub>8dan</sub>), 115.40 (C<sub>6dan</sub>), 102.54 (CH<sub>diox</sub>), 65.03 (CH<sub>2diox</sub>), 61.53 (Ph-CH<sub>2</sub>), 55.07 (N-CH<sub>2</sub>), 45.57 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 443.1562, encontrado: 443.1637 (desviación - 0.9 ppm). Análisis Elemental: C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S Teórico (%): C 62.42, H 5.92, N 6.33; Obtenido (%): C 62.54, H 5.98, N 6.36.

***N*-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-*N*-(2-hidroximetilfenil)-5-dansilamina (172)**

Se añade TBAF (1.33 g, 4.20 mmol) a una disolución de **168** (2.40 g, 4.20 mmol) en THF anhidro (25 mL). La reacción se agita bajo atmósfera de argón durante 3 h a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente al rotavapor y el residuo se disuelve (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se lava (H<sub>2</sub>O) y la fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Se concentra a vacío y se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando un gradiente de disolventes EtOAc:hexano (1:3 → 1:1).



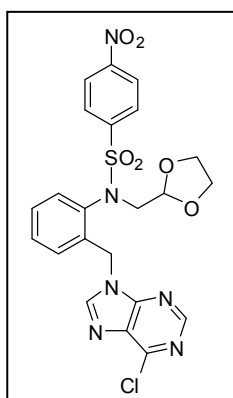
Sólido amarillento (1.58 g, 100 %). Pf: 65-66 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.56 (d, *J*<sub>3-4</sub> = 8.4, 1H, H<sub>4dan</sub>), 8.08 (d, *J*<sub>7-8</sub> = 8.7, 1H, H<sub>8dan</sub>), 8.05 (dd, *J*<sub>2-3</sub> = 7.5, *J*<sub>2-4</sub> = 1.1, 1H, H<sub>2dan</sub>), 7.60 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 7.6, *J*<sub>3-5</sub> = 1.5, 1H, H<sub>3Ph</sub>), 7.46 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 8.4, *J*<sub>2-3</sub> = 7.5, 1H, H<sub>3dan</sub>), 7.34 (dd, *J*<sub>7-8</sub> = 8.7, *J*<sub>6-7</sub> = 7.6, 1H, H<sub>7dan</sub>), 7.30 (ddd, *J*<sub>3-4</sub> = 7.6, *J*<sub>4-5</sub> = 7.5, *J*<sub>4-6</sub> = 0.8, 1H, H<sub>4Ph</sub>), 7.14 (d, *J*<sub>6-7</sub> = 7.6, 1H, H<sub>6dan</sub>), 6.95 (ddd, *J*<sub>5-6</sub> = 7.9, *J*<sub>4-5</sub> = 7.5, *J*<sub>3-5</sub> = 1.5, 1H, H<sub>5Ph</sub>), 6.37 (dd, *J*<sub>5-6</sub> = 7.9, *J*<sub>4-6</sub> = 0.8, 1H, H<sub>6Ph</sub>),

4.89 (d,  $J_{gem}=12.3$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.82 (pst,  $J_{CH-CH_2}=4.4$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.62 – 4.53 (m, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.14 – 4.02 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.93 – 3.73 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.45 – 3.36 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.89 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.95 – 1.85 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.62 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.63 (C5<sub>dan</sub>), 142.62 (C2<sub>Ph</sub>), 136.69 (C1<sub>Ph</sub>), 133.87 (C1<sub>dan</sub>), 131.29 (C3<sub>Ph</sub>), 131.27 (C2<sub>dan</sub>), 130.85 (C4<sub>dan</sub>), 130.52 (C9<sub>dan</sub>), 130.06 (C10<sub>dan</sub>), 129.11 (C4<sub>Ph</sub>), 128.82 (C6<sub>Ph</sub>), 128.36 (C5<sub>Ph</sub>), 127.94 (C7<sub>dan</sub>), 123.27 (C3<sub>dan</sub>), 120.33 (C8<sub>dan</sub>), 115.37 (C6<sub>dan</sub>), 102.26 (CH<sub>diox</sub>), 65.05 (CH<sub>2diox</sub>), 61.22 (Ph-CH<sub>2</sub>), 47.44 (N-CH<sub>2</sub>), 45.57 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 32.75 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 457.1719, encontrado: 457.1797 (desviación 0.0 ppm). Análisis Elemental: C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S Teórico (%): C 63.14, H 6.18, N 6.14; Obtenido (%): C 63.18, H 6.20, N 6.19.

### 1.1.1. Metodología general de síntesis de los compuestos 173 –176

Bajo atmósfera de argón se prepara una mezcla de PPh<sub>3</sub> (2.2 equiv.), **169** (1 equiv.) y la purina correspondiente (1 equiv.) en THF anhidro (5 mL) que se enfría a -20 °C en un baño de acetona y CO<sub>2</sub> antes de adicionar el DIAD (2.2 equiv.) gota a gota. Se eleva la temperatura de la mezcla de reacción lentamente hasta 5 °C por adición de acetona al baño y se irradia en microondas a 140 °C durante 25 min. El disolvente se evapora a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes EtOAc:hexano (1:1).

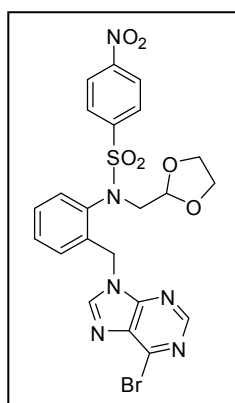
#### 6-Cloro-9-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*(4-nitrofenilsulfonyl)amino}fenilmetil)-9*H*-purina (173)



Sólido blanco (71.6 mg, 53 %). Pf: 220-221 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.80 (s, 1H, H<sub>2pur</sub>), 8.38 (s, 1H, H<sub>8pur</sub>), 8.35 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=8.8$ , 2H, H<sub>3,5PhNO2</sub>), 7.84 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=8.8$ , 2H, H<sub>2,6PhNO2</sub>), 7.29 – 7.25 (m, 1H, H<sub>5Ph</sub>), 7.21 – 7.17 (m, 1H, H<sub>4Ph</sub>), 7.05 (d,  $J_{5-6}=7.3$ , 1H, H<sub>6Ph</sub>), 6.49 (d,  $J_{3-4}=7.3$ , 1H, H<sub>3Ph</sub>), 5.92 (d,  $J_{gem}=16.2$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.85 (d,  $J_{gem}=16.2$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.18 – 5.15 (m, 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.16 – 4.04 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 4.01 – 3.82 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.30 (dd,  $J_{gem}=13.9$ ,  $J_{vic}=5.6$ , 1H, N-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 152.69 (C<sub>4pur</sub>), 152.35 (C<sub>2pur</sub>), 151.23 (C<sub>6pur</sub>), 150.64 (C<sub>4PhNO2</sub>), 146.49 (C<sub>8pur</sub>), 142.77 (C<sub>1PhNO2</sub>), 137.98 (C<sub>1Ph</sub>), 137.64 (C<sub>2Ph</sub>), 131.47 (C<sub>5pur</sub>), 129.92 (C<sub>5Ph</sub>), 129.56 (C<sub>2,6PhNO2</sub>), 129.30 (C<sub>4Ph</sub>), 129.14 (C<sub>6Ph</sub>), 127.31 (C<sub>3Ph</sub>), 124.41 (C<sub>3,5PhNO2</sub>), 101.88 (CH<sub>diox</sub>), 65.33 (CH<sub>2diox</sub>), 54.92 (N-CH<sub>2</sub>), 43.41 (Ph-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 531.0775, encontrado: 531.0845 (desviación 0.3 ppm). Análisis Elemental: C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S

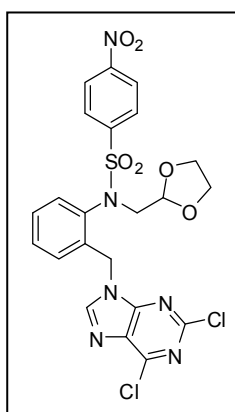
Teórico (%): C 49.77, H 3.61, N 15.83. Obtenido (%): C 49.81, H 3.65, N 15.85.

### 6-Bromo-9-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*(4-nitrofenilsulfonil)amino}fenilmetil)-9*H*-purina (174)



Sólido amarillento (46.7 mg, 44 %). Pf: 198-199 °C.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.75 (s, 1H,  $\text{H}_{2\text{pur}}$ ), 8.38 (s, 1H,  $\text{H}_{8\text{pur}}$ ), 8.35 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=8.7$ , 2H,  $\text{H}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 7.84 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=8.7$ , 2H,  $\text{H}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 7.28 – 7.25 (m, 1H,  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 7.20 – 7.17 (m, 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 7.05 (d,  $J_{5-6}=7.7$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 6.45 (d,  $J_{3-4}=7.7$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 5.92 (d,  $J_{\text{gem}}=16.1$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 5.84 (d,  $J_{\text{gem}}=16.1$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 5.16 (dd,  $J_{\text{CH-CH}_2}=5.6$ , 4.3, 1H,  $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 4.09 (dd,  $J_{\text{gem}}=14.1$ ,  $J_{\text{vic}}=4.0$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4.00 – 3.83 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 3.30 (dd,  $J_{\text{gem}}=14.1$ ,  $J_{\text{vic}}=5.6$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 152.34 ( $\text{C}_{2\text{pur}}$ ), 151.48 ( $\text{C}_{4\text{pur}}$ ), 150.41 ( $\text{C}_{4\text{PhNO}_2}$ ), 146.37 ( $\text{C}_{8\text{pur}}$ ), 153.37 ( $\text{C}_{6\text{pur}}$ ), 142.77 ( $\text{C}_{1\text{PhNO}_2}$ ), 138.00 ( $\text{C}_{1\text{Ph}}$ ), 137.66 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 134.09 ( $\text{C}_{5\text{pur}}$ ), 129.95 ( $\text{C}_{5\text{Ph}}$ ), 129.58 ( $\text{C}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 129.33 ( $\text{C}_{4\text{Ph}}$ ), 129.19 ( $\text{C}_{6\text{Ph}}$ ), 127.30 ( $\text{C}_{3\text{Ph}}$ ), 124.43 ( $\text{C}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 101.96 ( $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 65.25 ( $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 55.16 ( $\text{N-CH}_2$ ), 43.59 ( $\text{Ph-CH}_2$ ). HRMS ( $m/z$ ): Calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrN}_6\text{O}_6\text{SNa}$  ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ : 597.0270, encontrado: 597.0159 (desviación -0.9 ppm). Análisis Elemental:  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrN}_6\text{O}_6\text{S}$  Teórico (%): C 45.92, H 3.33, N 14.61. Obtenido (%): C 45.98, H 3.38, N 14.69.

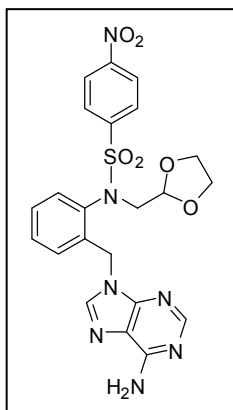
### 2,6-Dicloro-9-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*(4-nitrofenilsulfonil)amino}fenilmetil)-9*H*-purina (175)



Sólido amarillento (91.5 mg, 53 %). Pf: 212-213 °C.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.38 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=8.9$ , 2H,  $\text{H}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 8.34 (s, 1H,  $\text{H}_{8\text{pur}}$ ), 7.84 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}=8.9$ , 2H,  $\text{H}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 7.30 (ddd,  $J_{4-5}=7.8$ ,  $J_{5-6}=7.6$ ,  $J_{3-5}=1.3$ , 1H,  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 7.20 (ddd,  $J_{4-5}=7.8$ ,  $J_{3-4}=7.6$ ,  $J_{4-6}=1.4$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 6.80 (dd,  $J_{5-6}=7.6$ ,  $J_{4-6}=1.4$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 6.47 (dd,  $J_{3-4}=7.6$ ,  $J_{3-5}=1.3$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 5.90 (d,  $J_{\text{gem}}=16.2$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 5.80 (d,  $J_{\text{gem}}=16.2$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 5.15 (dd,  $J_{\text{CH-CH}_2}=6.0$ , 4.1, 1H,  $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 4.09 (dd,  $J_{\text{gem}}=13.8$ ,  $J_{\text{vic}}=4.4$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4.00 – 3.86 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 3.28 (dd,  $J_{\text{gem}}=13.8$ ,  $J_{\text{vic}}=5.6$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.97 ( $\text{C}_{4\text{pur}}$ ), 153.36 ( $\text{C}_{2\text{pur}}$ ), 151.99 ( $\text{C}_{6\text{pur}}$ ), 150.68 ( $\text{C}_{4\text{PhNO}_2}$ ), 147.21 ( $\text{C}_{8\text{pur}}$ ), 142.71 ( $\text{C}_{1\text{PhNO}_2}$ ), 137.71 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 137.56 ( $\text{C}_{1\text{Ph}}$ ), 130.67 ( $\text{C}_{5\text{pur}}$ ), 130.01 ( $\text{C}_{5\text{Ph}}$ ), 129.56 ( $\text{C}_{2,6\text{PhNO}_2}$ ), 129.49 ( $\text{C}_{4\text{Ph}}$ ), 129.10 ( $\text{C}_{6\text{Ph}}$ ), 127.32 ( $\text{C}_{3\text{Ph}}$ ), 124.46 ( $\text{C}_{3,5\text{PhNO}_2}$ ), 101.85 ( $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 65.28 ( $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 55.19 ( $\text{N-CH}_2$ ), 43.75 ( $\text{Ph-CH}_2$ ). HRMS ( $m/z$ ): Calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_6\text{SNa}$  ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ : 587.0386, encontrado: 587.0276 (desviación - 1.2 ppm). Análisis Elemental:

$C_{22}H_{18}Cl_2N_6O_6S$  Teórico (%): C 46.74, H 3.21, N 14.86; Obtenido (%): C 46.81, H 3.25, N 14.92.

### 9-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*(4-nitrofenilsulfonil)amino}fenilmetil)-9*H*-adenina (176)



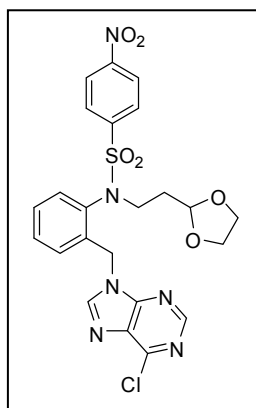
Sólido amarillento (28.5 mg, 18 %). Pf: 227-228 °C.  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.42 (s, 1H,  $H_{2_{pur}}$ ), 8.37 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H,  $H_{3,5_{PhNO_2}}$ ), 8.04 (s, 1H,  $H_{8_{pur}}$ ), 7.86 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H,  $H_{2,6_{PhNO_2}}$ ), 7.28 – 7.25 (m, 1H,  $H_{5_{Ph}}$ ), 7.17 – 7.14 (m, 1H,  $H_{4_{Ph}}$ ), 7.07 (d,  $J_{5-6}= 7.9$ , 1H,  $H_{6_{Ph}}$ ), 6.44 (d,  $J_{3-4}= 7.9$ , 1H,  $H_{3_{Ph}}$ ), 5.98 (s, 2H,  $NH_{2_{pur}}$ ), 5.82 (d,  $J_{gem}= 16.2$ , 1H, Ph- $CH_2$ ), 5.77 (d,  $J_{gem}= 16.2$ , 1H, Ph- $CH_2$ ), 5.17 (pst,  $J_{CH-CH_2}= 4.9$ , 1H,  $CH_{diox}$ ), 4.09 (dd,  $J_{gem}= 13.8$ ,  $J_{vic}= 4.3$ , 1H, N- $CH_2$ ), 4.01 – 3.85 (m, 4H,  $CH_{2_{diox}}$ ), 3.33 (dd,  $J_{gem}= 13.8$ ,  $J_{vic}= 5.5$ , 1H, N- $CH_2$ ).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155.08 ( $C_{6_{pur}}$ ), 152.41 ( $C_{2_{pur}}$ ), 152.40 ( $C_{4_{pur}}$ ), 150.65 ( $C_{4_{PhNO_2}}$ ), 150.64 ( $C_{8_{pur}}$ ), 142.13 ( $C_{1_{PhNO_2}}$ ), 138.76 ( $C_{2_{Ph}}$ ), 138.13 ( $C_{1_{Ph}}$ ), 137.37 ( $C_{5_{pur}}$ ), 129.91 ( $C_{5_{Ph}}$ ), 129.58 ( $C_{2,6_{PhNO_2}}$ ), 129.25 ( $C_{4_{Ph}}$ ), 128.97 ( $C_{6_{Ph}}$ ), 127.30 ( $C_{3_{Ph}}$ ), 124.39 ( $C_{3,5_{PhNO_2}}$ ), 101.89 ( $CH_{diox}$ ), 65.28 ( $CH_{2_{diox}}$ ), 55.13 (N- $CH_2$ ), 43.09 (Ph- $CH_2$ ). HRMS (m/z): Calculado para  $C_{22}H_{22}N_7O_6S$  (M + H) $^+$ : 512.1274, encontrado: 512.1358 (desviación 1.2 ppm). Análisis Elemental:  $C_{22}H_{21}N_7O_6S$  Teórico (%): C 51.66, H 4.14, N 19.17; Obtenido (%): C 51.70, H 4.19, N 19.22.

#### 1.1.2. Metodología general de síntesis de los compuestos 177 – 182

Bajo atmósfera de argón se prepara una mezcla de  $PPh_3$  (1.1 equiv. para **177**, 2.2 equiv. para **178-182**), **170** (1 equiv.) y 5-FU o la purina correspondiente (1 equiv.) en THF anhidro (5 mL) que se enfría a -20 °C en un baño de acetona y  $CO_2$  antes de adicionar el DIAD (1.1 equiv. para **177**, 2.2 equiv. para **178-182**) gota a gota. Se eleva la temperatura de la mezcla de reacción lentamente hasta 5 °C por adición de acetona al baño y se irradia en microondas a: 140 °C durante 25 min para **177**, **178**, **180** y **181**, a 160 °C durante 1 h para **179** y a 100 °C durante 10 min para **182**. El disolvente se evapora a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes EtOAc:hexano (1:1).

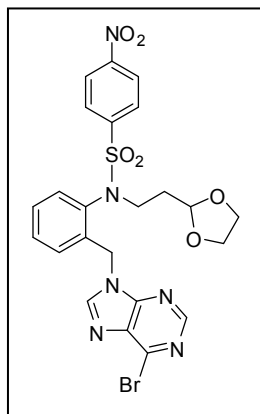
### 6-Cloro-9-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)etil]-*N*(4-nitrofenilsulfonil)amino}fenilmetil)-9*H*-purina (177)

Sólido amarillento (18.5 mg, 14 %). Pf: 80-81 °C.  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.78 (s, 1H,  $H_{2_{pur}}$ ), 8.38 (s, 1H,  $H_{8_{pur}}$ ), 8.38 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.9$ , 2H,  $H_{3,5_{PhNO_2}}$ ), 7.85 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.9$ , 2H,  $H_{2,6_{PhNO_2}}$ ), 7.31 – 7.25 (m, 1H,  $H_{5_{Ph}}$ ), 7.21 (ddd,  $J_{4-5}= 7.7$ ,  $J_{3-4}= 7.7$ ,  $J_{4-6}= 1.3$ ,



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.49 (dd,  $J_{3-4} = 7.7$ ,  $J_{3-5} = 1.3$ , 1H, H<sub>3Ph</sub>), 6.41 (dd,  $J_{5-6} = 7.7$ ,  $J_{4-6} = 1.3$ , 1H, H<sub>6Ph</sub>), 5.89 (d,  $J_{gem} = 16.2$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.79 (d,  $J_{gem} = 16.2$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.92 (pst,  $J_{CH-CH_2} = 4.1$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.26 – 4.07 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.99 – 3.77 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.41 – 3.28 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.07 – 1.95 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.89 – 1.75 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.52 (C<sub>4pur</sub>), 152.48 (C<sub>2pur</sub>), 151.35 (C<sub>6pur</sub>), 150.67 (C<sub>4PhNO2</sub>), 146.28 (C<sub>8pur</sub>), 142.73 (C<sub>1PhNO2</sub>), 137.70 (C<sub>1Ph</sub>), 136.93 (C<sub>2Ph</sub>), 131.12 (C<sub>5pur</sub>), 129.86 (C<sub>5Ph</sub>), 129.65 (C<sub>2,6PhNO2</sub>), 129.44 (C<sub>4Ph</sub>), 129.23 (C<sub>6Ph</sub>), 126.99 (C<sub>3Ph</sub>), 124.42 (C<sub>3,5PhNO2</sub>), 102.06 (CH<sub>diox</sub>), 65.25 (CH<sub>2diox</sub>), 47.58 (N-CH<sub>2</sub>), 43.93 (Ph-CH<sub>2</sub>), 32.44 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 545.0932, encontrado: 545.1012 (desviación 0.4 ppm). Análisis Elemental: C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S Teórico (%): C 50.69, H 3.88, N 15.42. Obtenido (%): C 50.73, H 3.92, N 15.47.

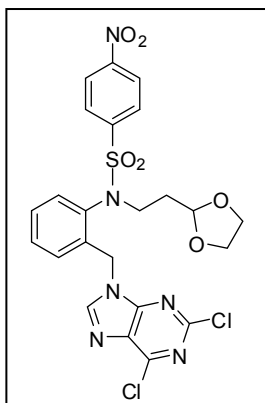
### 6-Bromo-9-(2-((4-nitrofenilsulfonil)amino)fenilmetil)-9H-purina (178)



Sólido amarillento (45.4 mg, 32 %). Pf: 80-81 °C.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.72 (s, 1H, H<sub>2pur</sub>), 8.42 (s, 1H, H<sub>8pur</sub>), 8.37 (d,  $J_{2-3} = J_{5-6} = 8.8$ , 2H, H<sub>3,5PhNO2</sub>), 7.84 (d,  $J_{2-3} = J_{5-6} = 8.8$ , 2H, H<sub>2,6PhNO2</sub>), 7.27 (pst,  $J_{5-6} = J_{4-5} = 7.3$ , 1H, H<sub>5Ph</sub>), 7.19 (pst,  $J_{4-5} = J_{3-4} = 7.3$ , 1H, H<sub>4Ph</sub>), 7.05 (d,  $J_{5-6} = 7.3$ , 1H, H<sub>6Ph</sub>), 6.48 (d,  $J_{3-4} = 7.3$ , 1H, H<sub>3Ph</sub>), 5.87 (d,  $J_{gem} = 16.1$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.78 (d,  $J_{gem} = 16.1$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.90 (pst,  $J_{CH-CH_2} = 4.0$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.24 – 4.08 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 4.00 – 3.75 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.40 – 3.25 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.08 – 1.94 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.87 – 1.74 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.52 (C<sub>2pur</sub>), 151.28 (C<sub>4pur</sub>), 151.20 (C<sub>6pur</sub>), 150.64 (C<sub>4PhNO2</sub>), 146.13 (C<sub>8pur</sub>), 142.60 (C<sub>1PhNO2</sub>), 137.35 (C<sub>1Ph</sub>), 136.99 (C<sub>2Ph</sub>), 134.11 (C<sub>5pur</sub>), 129.86 (C<sub>5Ph</sub>), 129.70 (C<sub>2,6PhNO2</sub>), 129.65 (C<sub>4Ph</sub>), 129.59 (C<sub>6Ph</sub>), 126.98 (C<sub>3Ph</sub>), 124.43 (C<sub>3,5PhNO2</sub>), 102.00 (CH<sub>diox</sub>), 65.24 (CH<sub>2diox</sub>), 47.47 (N-CH<sub>2</sub>), 44.12 (Ph-CH<sub>2</sub>), 32.38 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 589.0427, encontrado: 589.0497 (desviación 0.8 ppm). Análisis Elemental: C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S Teórico (%): C 45.92, H 3.33, N 14.61. Obtenido (%): C 45.98, H 3.38, N 14.69.

### 2,6-Dicloro-9-(2-((4-nitrofenilsulfonil)amino)fenilmetil)-9H-purina (179)

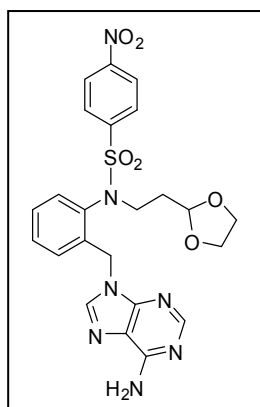
Sólido blanco (67.2 mg, 32 %). Pf: 80-81 °C.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.39 (s, 1H, H<sub>8pur</sub>), 8.36 (d,  $J_{2-3} = J_{5-6} = 8.5$ , 2H, H<sub>3,5PhNO2</sub>), 7.85 (d,  $J_{2-3} = J_{5-6} = 8.5$ , 2H, H<sub>2,6PhNO2</sub>), 7.30 (pst,  $J_{5-6} = J_{4-5} = 7.5$ , 1H,



H5<sub>Ph</sub>), 7.22 (pst,  $J_{4-5}=J_{3-4}= 7.5$ , 1H, H4<sub>Ph</sub>), 7.06 (d,  $J_{5-6}= 7.5$ , 1H, H6<sub>Ph</sub>), 6.48 (d,  $J_{3-4}= 7.5$ , 1H, H3<sub>Ph</sub>), 5.80 (d,  $J_{gem}= 16.0$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.70 (d,  $J_{gem}= 16.0$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.93 (pst,  $J_{CH-CH_2}= 3.8$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.21 – 4.09 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.97 – 3.72 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.33 – 3.21 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.04 – 1.93 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.84 – 1.71 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.86 (C4<sub>pur</sub>), 153.39 (C2<sub>pur</sub>), 152.05 (C6<sub>pur</sub>), 150.64 (C4<sub>PhNO2</sub>), 146.95 (C8<sub>pur</sub>), 142.62 (C1<sub>PhNO2</sub>), 137.31 (C1<sub>Ph</sub>), 136.90 (C2<sub>Ph</sub>), 131.51 (C5<sub>pur</sub>), 130.71 (C5<sub>Ph</sub>), 129.90 (C2,6<sub>PhNO2</sub>), 129.61 (C4<sub>Ph</sub>), 129.19 (C6<sub>Ph</sub>), 126.98 (C3<sub>Ph</sub>), 124.43 (C3,5<sub>PhNO2</sub>), 101.98 (CH<sub>diox</sub>), 65.25 (CH<sub>2diox</sub>), 47.33 (N-CH<sub>2</sub>), 43.90 (Ph-CH<sub>2</sub>), 32.22 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 579.0542, encontrado: 579.0616 (desviación 1.6 ppm). Análisis Elemental: C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S Teórico (%): C 47.68; H 3.48, N 14.50; Obtenido (%): C 47.72, H 3.53, N 14.54.

### 9-(2-{N-[(1,3-Dioxolan-2-yl)etil]-N-(4-nitrofenilsulfonil)amino}fenilmetil)-9H-adenina (180)

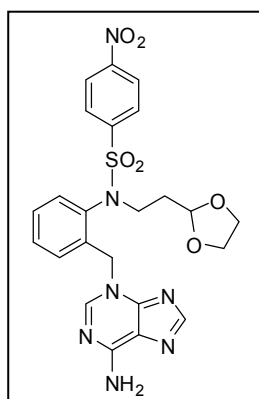
Sólido blanco (93.0 mg, 48 %). Pf: 172-173 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.38 (s, 1H, H2<sub>pur</sub>), 8.36 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H, H3,5<sub>PhNO2</sub>), 8.04 (s, 1H, H8<sub>pur</sub>), 7.86 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H, H2,6<sub>PhNO2</sub>), 7.28 – 7.25 (m, 1H, H5<sub>Ph</sub>), 7.19 – 7.15 (m, 1H, H4<sub>Ph</sub>), 7.07 (d,  $J_{5-6}= 7.9$ , 1H, H6<sub>Ph</sub>), 6.45 (d,  $J_{3-4}= 7.9$ , 1H, H3<sub>Ph</sub>), 5.75 (d,  $J_{gem}= 16.2$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.71 (d,  $J_{gem}= 16.2$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.91 (pst,  $J_{CH-CH_2}= 4.1$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.21 – 4.14 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.99 – 3.77 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.40 – 3.28 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.07 – 1.99 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.86 – 1.75 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.56 (C6<sub>pur</sub>), 152.95 (C2<sub>pur</sub>), 150.72 (C4<sub>pur</sub>), 150.54 (C4<sub>PhNO2</sub>), 142.93 (C1<sub>PhNO2</sub>), 141.57 (C8<sub>pur</sub>), 138.51 (C1<sub>Ph</sub>), 136.55 (C2<sub>Ph</sub>), 129.79 (C5<sub>Ph</sub>), 129.59 (C2,6<sub>PhNO2</sub>), 129.28 (C4<sub>Ph</sub>), 129.05 (C6<sub>Ph</sub>), 126.88 (C3<sub>Ph</sub>), 124.38 (C3,5<sub>PhNO2</sub>), 119.15 (C5<sub>pur</sub>), 102.00 (CH<sub>diox</sub>), 65.20 (CH<sub>2diox</sub>), 47.54 (N-CH<sub>2</sub>), 43.19 (Ph-CH<sub>2</sub>), 32.42 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 526.1431, encontrado: 526.1501 (desviación - 1.5 ppm). Análisis Elemental: C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S Teórico (%): C 52.56, H 4.41, N 18.66; Obtenido (%): C 52.60, H 4.48, N 18.72.



### 3-(2-{N-[(1,3-Dioxolan-2-yl)etil]-N-(4-nitrofenilsulfonil)amino}fenilmetil)-3H-adenina (181)

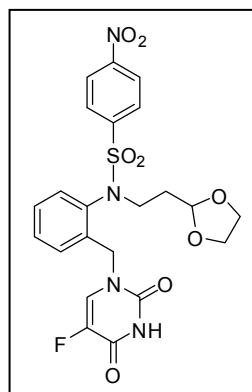
Sólido amarillento (47.4 mg, 25 %). Pf: 155-156 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.44 (s, 1H, H2<sub>pur</sub>), 8.38 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H, H3,5<sub>PhNO2</sub>), 8.13 (s, 1H, H8<sub>pur</sub>), 7.85 (d,  $J_{2-3}=J_{5-6}= 8.8$ , 2H, H2,6<sub>PhNO2</sub>), 7.33 – 7.29 (m, 1H, H5<sub>Ph</sub>), 7.25 – 7.20 (m, 1H, H4<sub>Ph</sub>),





7.13 (d,  $J_{5-6} = 7.7$ , 1H, H<sub>6Ph</sub>), 6.47 (d,  $J_{3-4} = 7.7$ , 1H, H<sub>3Ph</sub>), 6.05 (d,  $J_{gem} = 15.8$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.88 (d,  $J_{gem} = 15.8$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.90 (pst,  $J_{CH-CH_2} = 3.9$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.29 – 4.11 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 4.03 – 3.73 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.41 – 3.24 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.04 – 1.90 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.90 – 1.74 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154.43 (C<sub>6pur</sub>), 150.80 (C<sub>4PhNO2</sub>), 149.80 (C<sub>4pur</sub>), 148.90 (C<sub>8pur</sub>), 146.09 (C<sub>2pur</sub>), 142.42 (C<sub>1PhNO2</sub>), 137.11 (C<sub>2Ph</sub>), 136.62 (C<sub>1Ph</sub>), 129.98 (C<sub>5Ph</sub>), 129.74 (C<sub>2,6PhNO2</sub>), 129.67 (C<sub>4Ph</sub>), 129.20 (C<sub>6Ph</sub>), 127.03 (C<sub>3Ph</sub>), 124.45 (C<sub>3,5PhNO2</sub>), 119.15 (C<sub>5pur</sub>), 101.96 (CH<sub>diox</sub>), 65.24 (CH<sub>2diox</sub>), 49.36 (Ph-CH<sub>2</sub>), 47.47 (N-CH<sub>2</sub>), 32.21 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 526.1431, encontrado: 526.1505 (desviación - 0.8 ppm). Análisis Elemental: C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S Teórico (%): C 52.56, H 4.41, N 18.66; Obtenido (%): C 52.62, H 4.38, N 18.71.

### 1-(2-{*N*[(1,3-Dioxolan-2-il)etil]-*N*(4-nitrofenilsulfonil)amino}fenilmetil)-5-fluoroacilo (182)



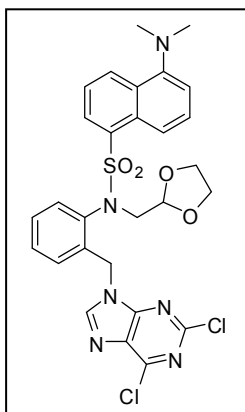
Sólido blanco (35.5 mg, 17 %). Pf: 128-129 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.85 (d,  $J_{3-F} = 5.0$  Hz, 1H, H<sub>35FU</sub>), 8.38 (d,  $J_{2-3} = J_{5-6} = 8.8$ , 2H, H<sub>3,5PhNO2</sub>), 7.86 (d,  $J_{2-3} = J_{5-6} = 8.8$ , 2H, H<sub>2,6PhNO2</sub>), 7.62 (d,  $J_{6-F} = 5.0$  Hz, 1H, H<sub>65FU</sub>), 7.43 – 7.38 (m, 1H, H<sub>5Ph</sub>), 7.28 (d,  $J_{5-6} = 7.2$ , 1H, H<sub>6Ph</sub>), 7.24 – 7.19 (m, 1H, H<sub>4Ph</sub>), 6.44 (d,  $J_{3-4} = 7.9$ , 1H, H<sub>3Ph</sub>), 5.45 (d,  $J_{gem} = 16.0$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.09 (d,  $J_{gem} = 16.0$ , 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.88 (pst,  $J_{CH-CH_2} = 4.1$ , 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.20 – 4.02 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.99 – 3.74 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.35 – 3.23 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.04 – 1.87 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.79 – 1.72 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.05 (d,  $J_{C-F} = 26.5$ , C<sub>45FU</sub>), 150.61 (C<sub>4PhNO2</sub>), 150.13 (C<sub>25FU</sub>), 142.79 (C<sub>1PhNO2</sub>), 140.79 (d,  $J_{C-F} = 238.2$ , C<sub>55FU</sub>), 137.66 (C<sub>1Ph</sub>), 137.13 (C<sub>2Ph</sub>), 130.02 (C<sub>5Ph</sub>), 129.41 (C<sub>2,6PhNO2</sub>), 129.29 (C<sub>4Ph</sub>), 129.12 (d,  $J_{C-F} = 32.9$ , C<sub>65FU</sub>), 128.87 (C<sub>6Ph</sub>), 127.11 (C<sub>3Ph</sub>), 124.44 (C<sub>3,5PhNO2</sub>), 101.90 (CH<sub>diox</sub>), 65.19 (CH<sub>2diox</sub>), 47.55 (N-CH<sub>2</sub>), 47.46 (Ph-CH<sub>2</sub>), 32.32 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>SNa (M + Na)<sup>+</sup>: 543.1064, encontrado: 543.0961 (desviación 0.0 ppm). Análisis Elemental: C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S Teórico (%): C 50.77, H 4.07, N 10.76; Obtenido (%): C 50.83, H 4.12, N 10.81.

#### 1.1.3. Metodología general de síntesis de los compuestos 183 –186

Se prepara una mezcla de PPh<sub>3</sub> (2.20 mmol), **171** (para **183** y **184**) o **172** (para **185** y **186**) (1.00 mmol) y 2,6-dicloropurina (1.00 mmol) en THF anhidro (5 mL) bajo atmósfera de argón que se enfría a -20 °C en un baño de acetona y CO<sub>2</sub> antes de adicionar DIAD (2.20 mmol) gota a gota. Se eleva la temperatura de la mezcla de reacción lentamente hasta 5 °C por adición de acetona al baño y se irradia en microondas a 160 °C

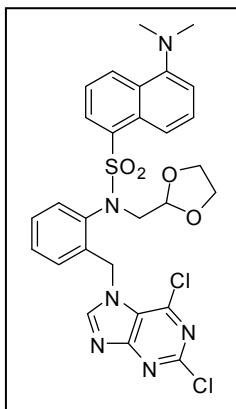
durante 25 min. El disolvente se evapora a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes EtOAc:hexano (1:1), obteniéndose los regioisómeros **183** y **184** en una reacción, así como los derivados **185** y **186** en la otra.

### 2,6-Dicloro-9-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*(5-dansil)amino}fenilmetil)-9*H*-purina (**183**)



Sólido amarillento (257 mg, 62 %). Pf: 82-83 °C.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.60 (d,  $J_{3-4} = 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{dan}}$ ), 8.34 (s, 1H,  $\text{H}_{8\text{pur}}$ ), 8.06 (dd,  $J_{2-3} = 7.6$ ,  $J_{2-4} = 1.2$ , 1H,  $\text{H}_{2\text{dan}}$ ), 8.01 (d,  $J_{7-8} = 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{8\text{dan}}$ ), 7.48 (pst,  $J_{3-4} = J_{2-3} = 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{dan}}$ ), 7.32 (pst,  $J_{7-8} = J_{6-7} = 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{7\text{dan}}$ ), 7.19 – 7.15 (m, 1H,  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 7.14 (d,  $J_{6-7} = 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{dan}}$ ), 6.99 (d,  $J_{5-6} = 7.8$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 6.95 – 6.91 (m, 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 6.36 (d,  $J_{3-4} = 7.8$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 5.92 (d,  $J_{\text{gem}} = 16.1$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 5.82 (d,  $J_{\text{gem}} = 16.1$ , 1H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 5.18 (pst,  $J_{\text{CH-CH}_2} = 5.0$ , 1H,  $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 4.24 (dd,  $J_{\text{gem}} = 13.9$ ,  $J_{\text{vic}} = 4.5$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4.03 – 3.82 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 3.26 (dd,  $J_{\text{gem}} = 13.9$ ,  $J_{\text{vic}} = 5.5$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.89 (s, 6H,  $\text{N-(CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.33 ( $\text{C}_{6\text{pur}}$ ), 154.07 ( $\text{C}_{4\text{pur}}$ ), 153.24 ( $\text{C}_{2\text{pur}}$ ), 151.80 ( $\text{C}_{5\text{dan}}$ ), 147.51 ( $\text{C}_{8\text{pur}}$ ), 138.18 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 137.52 ( $\text{C}_{1\text{Ph}}$ ), 133.19 ( $\text{C}_{1\text{dan}}$ ), 131.50 ( $\text{C}_{2\text{dan}}$ ), 131.34 ( $\text{C}_{4\text{dan}}$ ), 130.65 ( $\text{C}_{9\text{dan}}$ ), 130.59 ( $\text{C}_{5\text{pur}}$ ), 130.11 ( $\text{C}_{10\text{dan}}$ ), 129.26 ( $\text{C}_{5\text{Ph}}$ ), 128.91 ( $\text{C}_{4\text{Ph}}$ ), 128.47 ( $\text{C}_{3\text{Ph}}$ ), 128.19 ( $\text{C}_{6\text{Ph}}$ ), 127.89 ( $\text{C}_{7\text{dan}}$ ), 123.25 ( $\text{C}_{3\text{dan}}$ ), 120.03 ( $\text{C}_{8\text{dan}}$ ), 115.51 ( $\text{C}_{6\text{dan}}$ ), 102.46 ( $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 65.14 ( $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 55.04 ( $\text{N-CH}_2$ ), 45.57 ( $\text{N-(CH}_3)_2$ ), 43.90 ( $\text{Ph-CH}_2$ ). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ : 613.1113, encontrado: 613.1202 (desviación 1.6 ppm). Análisis Elemental:  $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$  Teórico (%): C 54.82, H 4.27, N 13.70; Obtenido (%): C 54.89, H 4.32, N 13.78.

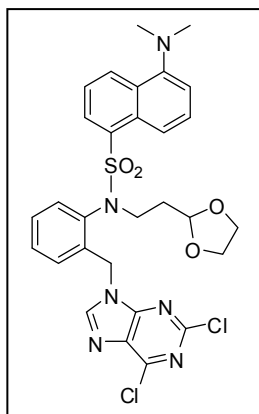
### 2,6-Dicloro-7-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)metil]-*N*(5-dansil)amino}fenilmetil)-7*H*-purina (**184**)



Sólido amarillento (76.3 mg, 13 %). Pf: 89-90 °C.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.60 (d,  $J_{3-4} = 8.4$ , 1H,  $\text{H}_{4\text{dan}}$ ), 8.31 (s, 1H,  $\text{H}_{8\text{pur}}$ ), 8.05 (dd,  $J_{2-3} = 7.5$ ,  $J_{2-4} = 1.1$ , 1H,  $\text{H}_{2\text{dan}}$ ), 8.01 (d,  $J_{7-8} = 8.7$ , 1H,  $\text{H}_{8\text{dan}}$ ), 7.49 (dd,  $J_{3-4} = 8.4$ ,  $J_{2-3} = 7.5$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{dan}}$ ), 7.33 (dd,  $J_{7-8} = 8.7$ ,  $J_{7-6} = 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{7\text{dan}}$ ), 7.22 – 7.14 (m, 1H,  $\text{H}_{5\text{Ph}}$ ), 7.14 (d,  $J_{6-7} = 7.6$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{dan}}$ ), 7.01 – 6.95 (m, 1H,  $\text{H}_{4\text{Ph}}$ ), 6.74 (d,  $J_{3-4} = 8.0$ , 1H,  $\text{H}_{3\text{Ph}}$ ), 6.43 (d,  $J_{5-6} = 8.0$ , 1H,  $\text{H}_{6\text{Ph}}$ ), 6.12 (s, 2H,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 5.17 (dd,  $J_{\text{CH-CH}_2} = 5.8$ , 4.3, 1H,  $\text{CH}_{\text{diox}}$ ), 4.20 (dd,  $J_{\text{gem}} = 14.0$ ,  $J_{\text{vic}} = 4.3$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4.02 – 3.76 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{diox}}$ ), 3.22 (dd,  $J_{\text{gem}} = 14.0$ ,  $J_{\text{vic}} = 5.9$ , 1H,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.89 (s, 6H,  $\text{N-(CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.52 ( $\text{C}_{4\text{pur}}$ ), 153.29 ( $\text{C}_{6\text{pur}}$ ), 151.76 ( $\text{C}_{5\text{dan}}$ ), 151.65 ( $\text{C}_{8\text{pur}}$ ), 144.00 ( $\text{C}_{2\text{pur}}$ ), 138.08 ( $\text{C}_{2\text{Ph}}$ ), 137.75

(C1<sub>Ph</sub>), 132.94 (C1<sub>dan</sub>), 131.62 (C2<sub>dan</sub>), 131.48 (C4<sub>dan</sub>), 130.60 (C9<sub>dan</sub>), 130.12 (C10<sub>dan</sub>), 129.40 (C5<sub>Ph</sub>), 129.14 (C3<sub>Ph</sub>), 128.97 (C4<sub>Ph</sub>), 128.26 (C7<sub>dan</sub>), 127.30 (C6<sub>Ph</sub>), 123.25 (C3<sub>dan</sub>), 122.58 (C5<sub>pur</sub>), 119.94 (C8<sub>dan</sub>), 115.54 (C6<sub>dan</sub>), 101.96 (CH<sub>diox</sub>), 65.25 (CH<sub>2diox</sub>), 55.16 (N-CH<sub>2</sub>), 46.98 N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 45.56 (Ph-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 613.1113, encontrado: 613.1184 (desviación - 1.3 ppm). Análisis Elemental: C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S Teórico (%): C 54.82, H 4.27, N 13.70; Obtenido (%): C 54.79, H 4.31, N 13.80.

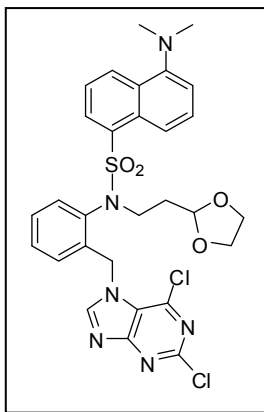
### 2,6-Dicloro-9-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)etil]-*N*(5-dansil)amino}fenilmetil)-9*H*-purina (185)



Sólido amarillento (317 mg, 75 %). Pf: 106-107 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.58 (d, *J*<sub>4-3</sub> = 8.5, 1H, H4<sub>dan</sub>), 8.27 (s, 1H, H8<sub>pur</sub>), 8.09 – 8.06 (m, 2H, H2<sub>dan</sub> y H8<sub>dan</sub>), 7.49 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 8.5, *J*<sub>2-3</sub> = 7.5, 1H, H3<sub>dan</sub>), 7.33 (dd, *J*<sub>7-8</sub> = 8.7, *J*<sub>6-7</sub> = 7.5, 1H, H7<sub>dan</sub>), 7.22 – 7.17 (m, 1H, H5<sub>Ph</sub>), 7.13 (d, *J*<sub>6-7</sub> = 7.5, 1H, H6<sub>dan</sub>), 7.01 – 6.97 (m, 2H, H4<sub>Ph</sub> y H6<sub>Ph</sub>), 6.49 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 8.4, *J*<sub>3-5</sub> = 1.0, 1H, H3<sub>Ph</sub>), 5.79 (d, *J*<sub>gem</sub> = 15.9, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.73 (d, *J*<sub>gem</sub> = 15.9, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.89 (pst, *J*<sub>CH-CH2</sub> = 4.1, 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.21 – 4.09 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.95 – 3.76 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.47 – 3.39 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.88 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.99 – 1.90 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.82 – 1.73 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.92 (C4<sub>pur</sub>), 153.22 (C6<sub>pur</sub>), 151.85 (C5<sub>dan</sub>), 151.74 (C2<sub>pur</sub>), 147.12 (C8<sub>pur</sub>), 137.21 (C2<sub>Ph</sub>), 137.00 (C1<sub>Ph</sub>), 133.34 (C1<sub>dan</sub>), 131.50 (C2<sub>dan</sub>), 131.22 (C4<sub>dan</sub>), 130.66 (C5<sub>pur</sub>), 130.54 (C9<sub>dan</sub>), 130.08 (C10<sub>dan</sub>), 129.24 (C5<sub>Ph</sub>), 129.12 (C3<sub>Ph</sub>), 129.04 (C6<sub>Ph</sub>), 128.63 (C4<sub>Ph</sub>), 128.10 (C7<sub>dan</sub>), 123.28 (C3<sub>dan</sub>), 120.01 (C8<sub>dan</sub>), 115.45 (C6<sub>dan</sub>), 102.20 (CH<sub>diox</sub>), 65.16 (CH<sub>2diox</sub>), 47.14 (N-CH<sub>2</sub>), 45.55 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.93 (Ph-CH<sub>2</sub>), 32.66 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 627.1270, encontrado: 627.1346 (desviación - 0.3 ppm). Análisis Elemental: C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S Teórico (%): C 55.50, H 4.50, N 13.39; Obtenido (%): C 55.59, H 4.58, N 13.42.

### 2,6-Dicloro-7-(2-{*N*[(1,3-dioxolan-2-il)etil]-*N*(5-dansil)amino}fenilmetil)-7*H*-purina (186)

Sólido amarillento (30.0 mg, 7 %). Pf: 111-112 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.59 (d, *J*<sub>4-3</sub> = 8.4, 1H, H4<sub>dan</sub>), 8.28 (s, 1H, H8<sub>pur</sub>), 8.06 (d, *J*<sub>2-3</sub> = 7.9, 1H, H2<sub>dan</sub>), 8.06 (d, *J*<sub>7-8</sub> = 8.5, 1H, H8<sub>dan</sub>), 7.49 (dd, *J*<sub>3-4</sub> = 8.4, *J*<sub>2-3</sub> = 7.9, 1H, H3<sub>dan</sub>), 7.34 (dd, *J*<sub>7-8</sub> = 8.5, *J*<sub>6-7</sub> = 7.6, 1H, H7<sub>dan</sub>), 7.21 (pst, *J*<sub>4-5</sub> = *J*<sub>5-6</sub> = 7.6, 1H, H5<sub>Ph</sub>), 7.13 (d, *J*<sub>6-7</sub> = 7.6, 1H, H6<sub>dan</sub>), 7.03 (pst, *J*<sub>3-4</sub> = *J*<sub>4-5</sub> = 7.6, 1H, H4<sub>Ph</sub>), 6.68 (d, *J*<sub>5-6</sub> = 7.6,



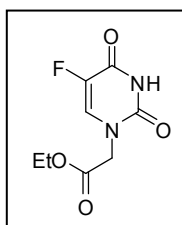
1H, H<sub>6Ph</sub>), 6.56 (d,  $J_{3-4}$  = 7.6, 1H, H<sub>3Ph</sub>), 6.07 (d,  $J_{gem}$  = 16.7, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 5.94 (d,  $J_{gem}$  = 16.7, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.88 (pst,  $J_{CH-CH_2}$  = 4.1, 1H, CH<sub>diox</sub>), 4.15 – 4.04 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 3.94 – 3.74 (m, 4H, CH<sub>2diox</sub>), 3.51 – 3.41 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>), 2.89 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.96 – 1.85 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.84 – 1.74 (m, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.67 (C<sub>4pur</sub>), 153.44 (C<sub>6pur</sub>), 151.84 (C<sub>5dan</sub>), 151.47 (C<sub>8pur</sub>), 144.00 (C<sub>2pur</sub>), 137.24 (C<sub>2Ph</sub>), 137.14 (C<sub>1Ph</sub>), 133.18 (C<sub>1dan</sub>), 131.59 (C<sub>2dan</sub>), 131.37 (C<sub>4dan</sub>), 130.62 (C<sub>9dan</sub>), 130.13 (C<sub>10dan</sub>), 129.45 (C<sub>5Ph</sub>), 129.41 (C<sub>3Ph</sub>), 129.07 (C<sub>4Ph</sub>), 128.18 (C<sub>7dan</sub>), 127.30 (C<sub>6Ph</sub>), 123.29 (C<sub>3dan</sub>), 122.40 (C<sub>5pur</sub>), 119.93 (C<sub>8dan</sub>), 115.50 (C<sub>6dan</sub>), 102.16 (CH<sub>diox</sub>), 65.20 (CH<sub>2diox</sub>), 47.32 (Ph-CH<sub>2</sub>), 47.15 (N-CH<sub>2</sub>), 45.56 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 32.94 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S (M + H)<sup>+</sup>: 627.1270, encontrado: 627.1348 (desviación – 0.5 ppm). Análisis Elemental: C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S Teórico (%): C 55.50, H 4.50, N 13.39; Obtenido (%): C 55.61, H 4.53, N 13.42.

## 1.2. Familia B

### Metodología general de síntesis de los compuestos 191-198

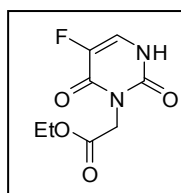
A una solución de Et<sub>3</sub>N (4.00 mmol) y 5-FU o la purina correspondiente (2.00 mmol) en agua (5 mL), se añade cloroacetato de etilo gota a gota (6.00 mmol). La solución se irradia en microondas a 105 °C durante 8 min. Se extrae (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y se seca (MgSO<sub>4</sub>). El disolvente se evapora a vacío en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (10:0.1).

#### 1-(Etoxicarbonilmetil)-5-fluoroacilo (191)



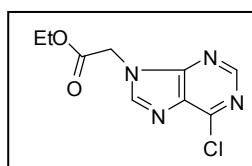
Sólido blanco (56.6 mg, 13 %). Pf 165-166 °C (lit: 164-165 °C). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.83 (s, 1H, H<sub>3</sub><sub>5FU</sub>), 7.21 (d, *J*<sub>F-6</sub> = 5.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub><sub>5FU</sub>), 4.43 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.27 (c, *J*<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 7.1, 2H, CH<sub>2</sub>O), 1.31 (t, *J*<sub>CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 7.1, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.09 (CO), 156.87 (C<sub>4</sub><sub>5FU</sub>), 149.31 (C<sub>2</sub><sub>5FU</sub>), 141.60 (C<sub>5</sub><sub>5FU</sub>), 128.86 (C<sub>6</sub><sub>5FU</sub>), 62.67 (CH<sub>2</sub>O), 49.02 (CH<sub>2</sub>CO), 14.24 (CH<sub>3</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 217.0546, encontrado: 217.0546 (desviación 1.0 ppm). Análisis Elemental: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Teórico (%): C 44.45, H 4.20, N 12.96; Obtenido (%): C 44.21, H 4.39, N 13.01.

#### 3-(Etoxicarbonilmetil)-5-fluoroacilo (192)



Sólido naranja (26.5 mg, 6 %). Pf: 131-132 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.26 (s, 1H, H<sub>1</sub><sub>5FU</sub>), 7.29 (pst, *J*<sub>F-6</sub> = *J*<sub>NH-6</sub> = 5.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub><sub>5FU</sub>), 4.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.24 (c, *J*<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 7.1, 2H, CH<sub>2</sub>O), 1.30 (t, *J*<sub>CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 7.1, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.09 (CO), 156.77 (C<sub>4</sub><sub>5FU</sub>), 149.59 (C<sub>2</sub><sub>5FU</sub>), 139.70 (C<sub>5</sub><sub>5FU</sub>), 128.59 (C<sub>6</sub><sub>5FU</sub>), 62.67 (CH<sub>2</sub>O), 49.07 (CH<sub>2</sub>CO), 14.24 (CH<sub>3</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 217.0546, encontrado: 217.0546 (desviación 1.0 ppm). Análisis Elemental: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: Teórico (%): C 44.45, H 4.20, N 12.96; Obtenido (%): C 44.21, H 4.59, N 12.63.

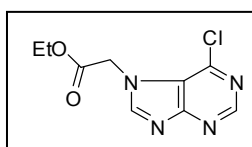
#### 6-Cloro-9-(etoxicarbonilmetil)-9H-purina (193)



Sólido blanco (117 mg, 24 %). Pf: 97-98 °C (lit: 96-98 °C). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.74 (s, 1H, H<sub>2</sub><sub>pur</sub>), 8.20 (s, 1H, H<sub>8</sub><sub>pur</sub>), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.27 (c, *J*<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 7.1, 2H, CH<sub>2</sub>O), 1.29 (t, *J*<sub>CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 7.1, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.56 (CO), 152.34 (C<sub>2</sub><sub>pur</sub>), 152.03 (C<sub>4</sub><sub>pur</sub>), 151.34 (C<sub>6</sub><sub>pur</sub>), 145.62 (C<sub>8</sub><sub>pur</sub>), 131.31 (C<sub>5</sub><sub>pur</sub>), 62.78 (CH<sub>2</sub>O), 44.70 (CH<sub>2</sub>CO), 14.17 (CH<sub>3</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 241.0414, encontrado: 241.0488 (desviación

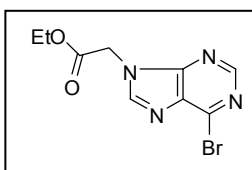
1.7 ppm). Análisis Elemental: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> Teórico (%): C 44.92, H 3.77, N 23.28; Obtenido (%): C 44.99, H 3.59, N 23.39.

### 6-Cloro-7-(etoxicarbonilmetil)-7H-purina (194)



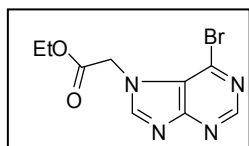
Sólido blanco (58.8 mg, 12 %). Pf: 122-123 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.87 (s, 1H, H<sub>2pur</sub>), 8.28 (s, 1H, H<sub>8pur</sub>), 5.23 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.27 (c, *J*<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 7.1, 2H, CH<sub>2</sub>O), 1.27 (t, *J*<sub>CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 7.1, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.76 (CO), 162.00 (C<sub>4pur</sub>), 152.81 (C<sub>2pur</sub>), 149.72 (C<sub>6pur</sub>), 143.16 (C<sub>8pur</sub>), 122.80 (C<sub>5pur</sub>), 62.90 (CH<sub>2</sub>O), 48.19 (CH<sub>2</sub>CO), 14.17 (CH<sub>3</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 241.0414, encontrado: 241.0487 (desviación - 2.1 ppm). Análisis Elemental: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> Teórico (%): C 44.92, H 3.77, N 23.28; Obtenido (%): C 45.21, H 3.59, N 23.42.

### 6-Bromo-9-(etoxicarbonilmetil)-9H-purina (195)

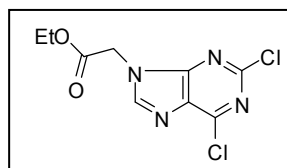


Sólido blanco (157 mg, 28 %). Pf: 104-105 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.70 (s, 1H, H<sub>2pur</sub>), 8.21 (s, 1H, H<sub>8pur</sub>), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.28 (c, *J*<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 7.1, 2H, CH<sub>2</sub>O), 1.30 (t, *J*<sub>CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 7.2, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.54 (CO), 152.33 (C<sub>2pur</sub>), 150.80 (C<sub>4pur</sub>), 145.44 (C<sub>8pur</sub>), 143.49 (C<sub>6pur</sub>), 133.95 (C<sub>5pur</sub>), 62.84 (CH<sub>2</sub>O), 44.71 (CH<sub>2</sub>CO), 14.21 (CH<sub>3</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 284.9909, encontrado: 284.9910 (desviación 1.8 ppm). Análisis Elemental: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> Teórico (%): C 37.92, H 3.18, N 19.65; Obtenido (%): C 37.72, H 3.49, N 19.38.

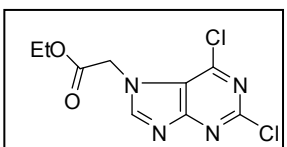
### 6-Bromo-7-(etoxicarbonilmetil)-7H-purina (196)



Líquido denso amarillento (50.1 mg, 9 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.88 (s, 1H, H<sub>2pur</sub>), 8.66 (s, 1H, H<sub>8pur</sub>), 5.33 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.29 (c, *J*<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 7.1, 2H, CH<sub>2</sub>O), 1.29 (t, *J*<sub>CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 7.1, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.67 (CO), 159.41 (C<sub>4pur</sub>), 152.99 (C<sub>2pur</sub>), 149.77 (C<sub>8pur</sub>), 133.93 (C<sub>6pur</sub>), 122.69 (C<sub>5pur</sub>), 63.06 (CH<sub>2</sub>O), 48.29 (CH<sub>2</sub>CO), 14.21 (CH<sub>3</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 284.9909, encontrado: 284.9991 (desviación 1.4 ppm). Análisis Elemental: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> Teórico (%): C 37.92, H 3.18, N 19.65; Obtenido (%): C 37.64, H 3.42, N 19.33.

**2,6-Dicloro-9-(etoxicarbonilmetil)-9H-purina (197)**

Sólido blanco (218 mg, 40 %). Pf: 120-121 °C (lit: 112-113 °C).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.18 (s, 1H,  $\text{H}_{8\text{pur}}$ ), 5.02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.24 (c,  $J_{\text{CH}_2-\text{CH}_3} = 7.1$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.28 (t,  $J_{\text{CH}_3-\text{CH}_2} = 7.2$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.25 (CO), 153.30 ( $\text{C}_{6\text{pur}}$ ), 153.26 ( $\text{C}_{4\text{pur}}$ ), 151.95 ( $\text{C}_{2\text{pur}}$ ), 146.33 ( $\text{C}_{8\text{pur}}$ ), 130.39 ( $\text{C}_{5\text{pur}}$ ), 62.90 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 44.67 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 14.13 ( $\text{CH}_3$ ). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_9\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ : 275.0024, encontrado: 275.0096 (desviación - 2.5 ppm). Análisis Elemental:  $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$  Teórico (%): C 39.29, H 2.93, N 20.37; Obtenido (%): C 39.01, H 2.63, N 20.09.

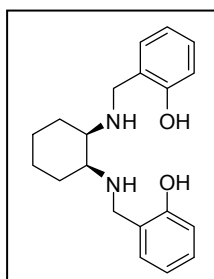
**2,6-Dicloro-7-(etoxicarbonilmetil)-7H-purina (198)**

Líquido denso amarillento (81.7 mg, 15 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.29 (s, 1H,  $\text{H}_{8\text{pur}}$ ), 5.22 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.29 (c,  $J_{\text{CH}_2-\text{CH}_3} = 7.1$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.29 (t,  $J_{\text{CH}_3-\text{CH}_2} = 7.1$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.49 (CO), 163.61 ( $\text{C}_{4\text{pur}}$ ), 153.53 ( $\text{C}_{6\text{pur}}$ ), 152.00 ( $\text{C}_{8\text{pur}}$ ), 143.90 ( $\text{C}_{2\text{pur}}$ ), 122.05 ( $\text{C}_{5\text{pur}}$ ), 63.11 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 48.25 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 14.21 ( $\text{CH}_3$ ). HRMS (m/z): Calculado para  $\text{C}_9\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ : 275.0024, encontrado: 275.0096 (desviación - 2.5 ppm). Análisis Elemental:  $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$  Teórico (%): C 39.29, H 2.93, N 20.37; Obtenido (%): C 38.91, H 2.64, N 20.20.

### 1.3. Familia C

#### 3,5-Diaza-1,7-dibencena-*meso*-4(1,2)-ciclohexanaheptafano-1<sup>2</sup>,7<sup>2</sup>-diol (*meso*-199)

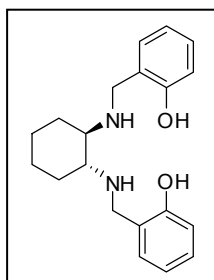
Sobre una disolución de *meso*-1,2-diaminociclohexano (114 mg, 1.00 mmol) en 10 mL de EtOH, se añade gota a gota una disolución de 2-hidroxibenzaldehído en 2 mL de EtOH. A continuación, se adiciona Et<sub>3</sub>N (101 mg, 1.00 mmol) gota a gota. La reacción se agita durante 48 h a temperatura ambiente. Se filtra el precipitado formado y se disuelve en 10 mL de una mezcla de disolventes EtOH:CH<sub>3</sub>CN (1:1). Se añade NaBH<sub>4</sub> (80.0 mg, 2.00 mmol) lentamente y la disolución se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el disolvente se evapora a vacío en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9:1).



Sólido blanco (326 mg, 100 %). Pf: 82-83 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.19 (ddd, *J* = 8.1, 7.5, 1.6, 2H), 6.99 – 6.96 (m, 2H), 6.84 (dd, *J* = 8.1, 0.7, 4H), 6.80 (ddd, *J* = 7.5, 7.4, 1.0, 2H), 4.00 (d, *J* = 13.8, 2H), 3.84 (d, *J* = 13.8, 2H), 2.86 (s, 2H), 1.73 – 1.34 (m, 8H). HRMS (*m/z*): Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*M* + *H*)<sup>+</sup>: 327.1994, encontrado: 327.2056 (desviación 1.2 ppm).

#### 3,5-Diaza-1,7-dibencena-(±)-*trans*-4(1,2)-ciclohexanaheptafano-1<sup>2</sup>,7<sup>2</sup>-diol [(±)-*trans*-199]

Sobre una disolución de (±)-*trans*-1,2-diaminociclohexano (114 mg, 1.00 mmol) en 10 mL de EtOH, se añade gota a gota una disolución de 2-hidroxibenzaldehído en 2 mL de EtOH. A continuación, se adiciona Et<sub>3</sub>N (101 mg, 1.00 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agita durante 48 h a temperatura ambiente. Se concentra al rotavapor y el residuo se disuelve en 10 mL de una mezcla de disolventes de EtOH/CH<sub>3</sub>CN (1:1). Se añade NaBH<sub>4</sub> (80.0 mg, 2.00 mmol) lentamente y la disolución se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evapora a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9:1).

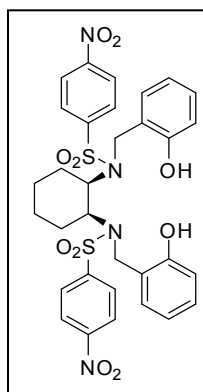


Líquido denso marrón (1.17 g, 41 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.16 (t, *J* = 7.6, 2H), 6.98 (d, *J* = 7.4, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.0, 2H), 6.78 (t, *J* = 7.4, 2H), 4.04 (d, *J* = 13.8, 2H), 3.92 (d, *J* = 13.8, 2H), 2.45 (s, 2H), 1.79 – 1.10 (m, 8H). HRMS (*m/z*): Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*M* + *H*)<sup>+</sup>: 327.1994, encontrado: 327.2078 (desviación 1.5 ppm).



### 3,5-Bis-(4-nitrobenzensulfonil)-3,5-diaza-1,7-dibencena-*meso*-4(1,2)-ciclohexanaheptafano-1<sup>2</sup>,7<sup>2</sup>-diol (*meso*-200)

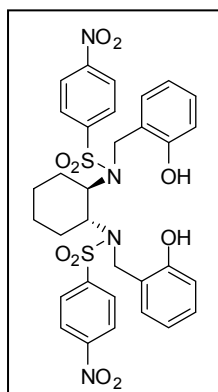
Se añade cloruro de 4-nitrobenzensulfonilo (424 mg, 1.92 mmol) sobre una disolución de *meso*-199 (250 mg, 0.77 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (2.5 mL). La disolución se agita durante 4.5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con agua y la fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El disolvente se evapora a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9.9:0.1).



Sólido amarillento (337 mg, 63 %). Pf: 74-75 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.38 (d, *J*<sub>3,5-2,6</sub> = 8.8, 4H, H<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 8.09 (d, *J*<sub>2,6-3,5</sub> = 8.8, 4H, H<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.54 (d, *J*<sub>3,4</sub> = 7.4, 2H, H<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 7.25 (ddd, *J*<sub>4-5</sub> = 7.7, *J*<sub>3-4</sub> = 7.4, *J*<sub>4-6</sub> = 0.9, 2H, H<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 7.20 (ddd, *J*<sub>5-6</sub> = 7.9, *J*<sub>4-5</sub> = 7.7, *J*<sub>3-5</sub> = 1.6, 2H, H<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 6.86 (d, *J*<sub>5-6</sub> = 7.9, 2H, H<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 3.73 (d, *J*<sub>gem</sub> = 14.0, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 3.62 (d, *J*<sub>gem</sub> = 14.0, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2.79 (sa, 2H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 1.70 – 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 1.44 – 1.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 1.34 – 1.27 (m, 4H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.21 (C<sub>4</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 147.63 (C<sub>1</sub><sub>Ph</sub>), 141.39 (C<sub>1</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 133.17 (C<sub>2</sub><sub>Ph</sub>), 131.43 (C<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 129.98 (C<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 128.76 (C<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 127.99 (C<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 124.58 (C<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 121.83 (C<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 56.11 (CH<sub>ciclohex</sub>), 45.09 (N-CH<sub>2</sub>), 27.74 (CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 22.05 (CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 697.1560, encontrado: 697.1644 (desviación 0.9 ppm). Análisis Elemental: C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> Teórico (%) C 55.16, H 4.63, N 8.04; Obtenido: C, 55.21, H 4.56, N 8.06.

### 3,5-Bis-(4-nitrobenzensulfonil)-3,5-diaza-1,7-dibencena-(±)-*trans*-4(1,2)-ciclohexanaheptafano-1<sup>2</sup>,7<sup>2</sup>-diol [(±)-*trans*-200]

Sobre una disolución de (±)-*trans*-199 (250 mg, 0.77 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (2.5 mL), se añade cloruro de 4-nitrobenzensulfonilo (424 mg, 1.92 mmol). La disolución se agita durante 4.5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con agua y la fase orgánica se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El disolvente se evapora a vacío en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9.9:0.1).

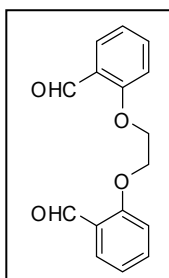


Sólido amarillento (138 mg, 26 %). Pf: 82-83 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.37 (d, *J*<sub>3,5-2,6</sub> = 8.8, 4H, H<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 8.07 (d, *J*<sub>2,6-3,5</sub> = 8.8, 4H, H<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 7.52 (dd, *J*<sub>3,4</sub> = 7.4, *J*<sub>3,5</sub> = 1.3, 2H, H<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 7.23 (ddd, *J*<sub>4-5</sub> = 7.6, *J*<sub>3-4</sub> = 7.4, *J*<sub>4-6</sub> = 1.1, 2H, H<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 7.20 (ddd, *J*<sub>5-6</sub> = 7.9, *J*<sub>4-5</sub> = 7.6, *J*<sub>3-5</sub> = 1.3, 1H, H<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 6.86 (d, *J*<sub>5-6</sub> = 7.9, 2H, H<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 3.89 (d, *J*<sub>gem</sub> = 13.6, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 3.66 (d, *J*<sub>gem</sub> = 13.6, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2.35 (sa, 2H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 2.14 – 2.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 1.79 – 1.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 1.28 – 1.19 (m, 4H, CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.21 (C<sub>4</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 147.61 (C<sub>1</sub><sub>Ph</sub>), 141.29 (C<sub>1</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 132.58 (C<sub>2</sub><sub>Ph</sub>), 131.58 (C<sub>3</sub><sub>Ph</sub>), 129.97 (C<sub>2,6</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 128.97 (C<sub>5</sub><sub>Ph</sub>), 128.10 (C<sub>4</sub><sub>Ph</sub>), 124.64 (C<sub>3,5</sub><sub>PhNO<sub>2</sub></sub>), 121.96 (C<sub>6</sub><sub>Ph</sub>), 61.00 (CH<sub>ciclohex</sub>), 44.92 (N-CH<sub>2</sub>), 30.65 (CH<sub>2</sub><sub>ciclohex</sub>), 24.76

(CH<sub>2</sub>ciclohex). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 697.1560, encontrado: 697.1643 (desviación 0.7 ppm). Análisis Elemental: C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> Teórico (%): C 55.16, H 4.63, N 8.04; Obtenido (%): C 55.21, H 4.59, N 8.08.

### 2,5-Dioxa-1,6-dibencenahehexano-1<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-dicarbaldehído (201)

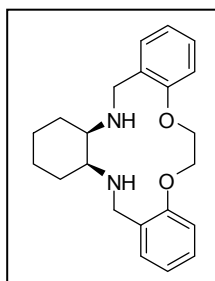
Sobre una disolución de aldehído salicílico (12.2 g, 0.100 mol) en 10 mL de EtOH, se añade una disolución de NaOH al 2 % (200 mL). La disolución amarilla resultante se agita durante 15 min. Se añade 1,2-dibromoetano (9.39 g, 0.050 mol) en 10 mL de EtOH. La mezcla de reacción se agita durante 72 h a reflujo. Transcurrido este tiempo, se enfría a 0 °C durante 24 h y aparece un precipitado negro que se filtra y se disuelve (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Las impurezas se eliminan con filtro de pliegues y el compuesto se obtiene puro.



Sólido verde oscuro (3.64 g, 27 %). Pf: 80-81 °C (lit: 130 °C). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.44 (s, 2H), 7.85 (dd, *J* = 7.6, 1.6, 2H), 7.63 – 7.52 (m, 2H), 7.14 – 7.03 (m, 4H), 4.53 (s, 4H, CH<sub>2</sub>O). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>Na (M + Na)<sup>+</sup>: 293.0892, encontrado: 293.0785 (desviación - 1.7 ppm).

### 8,11-Dioxa-3,5-diaza-1,7(1,2)-dibencena-*meso*-4(1,2)ciclohexanacicloundecafano (*meso*-202)

Se añade *meso*-1,2-diaminociclohexano (228 mg, 2.00 mmol) en 30 mL de MeOH a una disolución de **201** (541 mg, 2.00 mmol) en 75 mL de MeOH. La mezcla de reacción se agita durante 5 h a reflujo. El precipitado que aparece se filtra y se disuelve en 100 mL de MeOH y se añade NaBH<sub>4</sub> (757 mg, 20.00 mmol) lentamente. La mezcla de reacción se agita durante 3.5 h a 50 °C. Se extrae (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Después de concentrar al rotavapor el compuesto se obtiene puro.



Sólido blanco (268 mg, 38 %). Pf: 107-108 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.25 – 7.20 (m, 2H, H<sub>5</sub>Ph), 7.20 – 7.16 (m, 2H, H<sub>3</sub>Ph), 6.91 (t, *J*<sub>4-3</sub> = *J*<sub>4-5</sub> = 7.4, 2H, H<sub>4</sub>Ph), 6.82 (d, *J*<sub>6-5</sub> = 8.1, 2H, H<sub>6</sub>Ph), 4.23 (s, 4H, CH<sub>2</sub>O), 3.75 (d, *J*<sub>gem</sub> = 13.7, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 3.63 (d, *J*<sub>gem</sub> = 13.7, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2.71 (sa, 2H, CH<sub>2</sub>ciclohex), 1.71 – 1.50 (m, 4H, CH<sub>2</sub>ciclohex), 1.27 – 1.15 (m, 4H, CH<sub>2</sub>ciclohex). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 156.91 (C<sub>1</sub>Ph), 130.27 (C<sub>3</sub>Ph), 128.45 (C<sub>5</sub>Ph), 127.26 (C<sub>2</sub>Ph), 121.02 (C<sub>4</sub>Ph), 111.41 (C<sub>6</sub>Ph), 66.70 (CH<sub>2</sub>O), 54.82 (CH<sub>2</sub>ciclohex), 46.06 (N-CH<sub>2</sub>), 27.22 (CH<sub>2</sub>ciclohex), 22.22 (CH<sub>2</sub>ciclohex). HRMS (m/z): Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 353.2151, encontrado: 353.2229 (desviación 0.0 ppm). Análisis Elemental: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Teórico (%): C 74.97, H 8.01, N 7.95; Obtenido (%): C 75.11, H 7.88, N 7.98.

## **2. Evaluación de la actividad biológica**

### **2.1. Cultivos celulares**

Se han utilizado las líneas tumorales humanas de cáncer de mama MCF-7, cáncer colorrectal HCT-116 y melanoma A375 y G361. Todas las líneas celulares se mantienen en medio de cultivo DMEM (Gibco, EEUU) con suero fetal bovino al 10 % y 1 % de penicilina-estreptomicina. Las células se incuban a 37 °C en una atmósfera húmeda que contiene 95 % de aire y el 5 % de CO<sub>2</sub>. Los cambios de medio y los pases se han realizado en una campana de flujo laminar bajo condiciones estériles.

### **2.2. Conservación de los fármacos**

Los compuestos se disuelven en DMSO y se conservan a – 20 °C. La solución stock se diluye en el medio correspondiente para obtener las concentraciones que se requieren en cada experimento, siendo la concentración final siempre menor al 0.1 % v/v de DMSO. Como controles se han utilizado cultivos paralelos de las líneas celulares MCF-7, HCT-116, A375 y G361 en el medio.

### **2.3. Ensayos de citotoxicidad**

Las células se siembran en placas de 24 pocillos (3.000 células/pocillo) en su respectivo medio. Después de permitir la adhesión celular durante la noche, se tratan durante 6 días con concentraciones crecientes de los compuestos **173-186**, **191-200** y **202**. El medio se cambia a los 3 días adicionándole las respectivas concentraciones de los compuestos. Cultivos paralelos de las líneas celulares sin adicción de fármacos y con DMSO se utilizan como controles.

Tras los 6 días de tratamiento, se lleva a cabo la tinción con SRB para determinar la tasa de supervivencia. En primer lugar, se fijan las células con ácido tricloroacético al 10 % durante 20 min a 4 °C, y tras lavar las placas 3 veces con agua bidestilada, se dejan secar a temperatura ambiente. A continuación, se agrega 0.4 % de SRB en 1 % de ácido acético y tras incubarlo 20 minutos a temperatura ambiente, se elimina la SRB y se lava tres veces con ácido acético al 1 %. Finalmente, se fijan las células con una solución 10 mM Tris-base (pH 10.5) mediante agitación suave durante diez minutos. Posteriormente se transfieren 100 µL a placas de 96 pocillos por duplicado y se analizan en un colorímetro Multiscan Titertek a 492 nm.

Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos en el Titertek se transforman en el porcentaje correspondiente de las células vinculando los valores conocidos de porcentajes y sus densidades ópticas. Después se calcula la CI<sub>50</sub> mediante el uso de una línea de regresión ajustada, determinando el valor de la concentración del compuesto que produce una reducción del 50% de la población celular. Todos los experimentos se realizan por triplicado y se llevan a cabo al menos dos veces.

## 2.4. Ensayo de apoptosis

Las células se siembran en placas de 6 pocillos y se mantienen en la incubadora durante 24 h. Posteriormente, se inducen durante 24 h con diferentes concentraciones de los fármacos **173-175**, **177-179**, **197-200** y **202**. Se utilizan como controles cultivos en paralelo sin fármacos.

Se utiliza un kit de anexina V-FITC. El protocolo que se lleva a cabo comienza despegando las células con tripsina a 37 °C durante 5 min, lavando 2 veces, centrifugando durante 8 min a 1700 rpm y re-suspendiendo el botón celular de cada muestra en 100 µL de reactivo de incubación de la anexina V, que se compone de 1mL de solución de anexina V, 10 µL de tampón de unión (10×), 10 µL PI (50µg/mL) y 79 µL de agua. A continuación se incuban en oscuridad durante 15 min. Por último se añaden 300 µL de solución tampón de unión (1×).

Se analizan mediante un citómetro de flujo FACScan "VANTAGE". Todos los experimentos se realizan por triplicado y se llevan a cabo al menos dos veces.

## 2.5. Análisis de distribución del ciclo celular

Las células de la línea celular A375 se inducen con los fármacos **173-175**, **177-179**, **197-200** y **202** durante 24 h. Las células se lavan con una solución tampón, se cuentan y se fijan después en etanol al 70 % frío (-20 °C) durante toda la noche a 4 °C. A continuación se tiñen con una solución de PI durante media hora en la oscuridad. La citometría de flujo y el análisis se lleva a cabo mediante FACScan. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se llevan a cabo al menos dos veces.

## 2.6. Ensayos de toxicidad *in vivo*

Se han utilizado ratones BALB/c ( $n= 40$ ) hembra de 6 semanas de edad y un peso de unos 20 mg a los que se les administra por vía oral mediante una sonda bucoesofágica una dosis en bolo de 50, 75, 100, 150 y 250 mg/kg/día durante 1 semana, con una semana más de seguimiento sin tratamiento para detectar signos clínicos de aparición tardía o la recuperación de los posibles efectos tóxicos.

Los compuestos se disuelven en metilcelulosa al 1 %. Los ratones de control se inoculan con el mismo volumen de metilcelulosa al 1 % (grupo de control) y DMSO sólo (grupo de DMSO). Los ratones se mantienen bajo condiciones estándares y se pesan. Se evalúa la toxicidad sistémica: apatía, excitación, pérdida de peso, y la local: alopecia, reacciones cutáneas y motilidad de una pata cada 24 horas.

## **2.7. Estudio de distribución del fármaco *in vivo***

El sistema de imagen *in vivo* utilizado ha sido el dispositivo IVIS SPECTRUM de Caliper Life Sciences, 68 Elm Street Hopkinton, MA 01748, USA de la Unidad de Bioanálisis-CIC de la Universidad de Granada.

Los animales tratados con los fármacos **179** y **185** se sacrifican por dislocación cervical previamente a la captura de las imágenes. Inmediatamente después se realiza la necropsia para la extracción de los órganos a estudiar: riñones, páncreas, corazón, pulmones e hígado con la vesícula biliar y se colocan en una placa de Petri para su análisis.

Las fotos de fluorescencia se adquieren con los filtros de Excitación/Emisión 465/520, 430/520 y 430/540.

**CONCLUSIONES**



## V. CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se han diseñado, sintetizado y caracterizado veintisiete compuestos finales englobados en 3 familias: A, que incluye 10 derivados de *p*-nitrobenzensulfonilo y 4 derivados de dansilo con una molécula de purina o 5-FU en su estructura; B, formada por 6 derivados de purina y 2 de 5-FU fusionados a acetato de etilo y C, que presenta 5 derivados de 1,2-ciclohexanodiamina.

Todas las moléculas se han ensayado frente a las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, cáncer colorrectal HCT-116, y melanoma humano A375 y G361. Se han realizado estudios de ciclo celular y apoptosis en compuestos seleccionados. Además, se ha elegido el agente antiproliferativo más potente de la familia A para llevar a cabo ensayos de toxicidad y distribución *in vivo*.

Dicho trabajo de investigación conduce a las siguientes conclusiones:

1. Los compuestos más activos de la familia A en todas las líneas celulares son los derivados de bromo, cloro y dicloropurina frente a los derivados de adenina y 5-fluoroacilo, presentando mayor potencia frente a la línea tumoral A375.

2. La actividad antiproliferativa del isómero *N*-3 en el derivado de adenina de la familia A es levemente mayor que la del isómero *N*-9.

3. Los compuestos que presentan dos carbonos en la cadena de unión entre la sulfonamida y el dioxolano ( $n= 2$ ) en la familia A son mejores agentes antiproliferativos que los compuestos que presentan un solo carbono en la cadena ( $n= 1$ ).



4. El compuesto de la familia A que ha presentado mejor actividad antiproliferativa ha sido el derivado de dicloropurina con  $n= 2$  y una  $CI_{50}$  de 134 nM frente a la línea celular A375.

5. Los compuestos más apoptóticos de la familia A son los derivados de purina con  $n= 2$ , que detienen el ciclo celular en fase  $G_2/M$ , siendo el derivado de bromopurina el que presenta los mayores valores de apoptosis total publicados hasta la fecha por el grupo de investigación.

6. Se ha comprobado que el derivado de dicloropurina y  $n= 2$  de la familia A y su análogo fluorescente no provocan toxicidad en ratones tratados con una dosis de hasta 250 mg/Kg/día durante 1 semana de tratamiento. No se han observado cambios en la conducta, signos clínicos de toxicidad, ni muertes en el 100 % de los animales tratados. El análisis macroscópico de los órganos estudiados no muestra ningún tipo de modificación, siendo su aspecto normal.

7. Los estudios de distribución del fármaco *in vivo* revelan que el derivado fluorescente *N*-9 de dicloropurina y  $n= 2$  en la familia A es absorbido por vía oral y que se distribuye por todo el organismo, siendo el hígado y los riñones los órganos donde más se acumula.

8. Los derivados de la familia B que presentan en su estructura un resto de dicloropurina han resultado tener mayor efecto antiproliferativo que el resto de derivados, siendo este efecto mayor frente a la línea A375.

9. Los isómeros *N*-9 de la familia B presentan una mayor actividad antiproliferativa que sus correspondientes isómeros *N*-7, a excepción de los derivados de cloropurina frente a las líneas A375 y G361.

10. Se han obtenido dos ecuaciones QSAR que relacionan la actividad antiproliferativa de los compuestos de la familia B frente a las líneas celulares A375 y G361 y el parámetro lipofílico ( $\log P$ ) de las moléculas.

11. El derivado *N*-9 de dicloropurina de la familia B es el que tiene mayor capacidad apoptótica en la línea celular A375, no mostrando modificaciones en el ciclo celular en esta línea. Sin embargo, su isómero *N*-7 detiene el ciclo celular en fase G<sub>2</sub>/M en la línea celular HCT-116 y en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en A375, acompañado de altos niveles de apoptosis.

12. Las estructuras que han demostrado mayor potencia antiproliferativa pertenecen a la familia C. El compuesto más activo como agente antiproliferativo frente a la línea celular A375 ha presentado una CI<sub>50</sub> de 58 nM.

13. En los derivados de 1,2-ciclohexanodiaminas, ni la introducción del grupo *p*-nitrobencensulfonilo ni el cierre de la molécula favorece el efecto antiproliferativo.

14. Los derivados de *p*-nitrobencensulfonilo y el compuesto macrocíclico de la familia C detienen el ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en la línea A375 tanto a 24 como a 48 h de tratamiento, mientras que los otros dos derivados lo detienen en fase S.

15. El macrociclo obtenido en la familia C presenta un índice de apoptosis del 95 % tras 48 h de tratamiento en la línea tumoral de melanoma A375.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2011**, *61* (2), 69-90.
2. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larrañaga N, Capocaccia R, Martínez C. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol* **2010**, *21* (3), 30-36.
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Nota Descriptiva N° 297, Febrero **2013**. Fecha de entrada: 19 Nov 2013.
4. Karp G. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos. México: McGraw-Hill Interamericana, **2010**.
5. Cooper GM. La célula. Madrid: Marbán, **2013**.
6. Giordano A, Macaluso M. Cancer epigenetics. Biomolecular therapeutics for human cancer. Wiley-Blackwell, **2011**.
7. Paniagua Gómez Álvarez, R. Biología celular. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, **2007**.
8. Patel MN, Halling-Brown MD, Tym JE. Objective assessment of cancer genes for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12*, 35-50.
9. Creixell P, Schoof EM, Eler JT, Linding R. Navigating cancer network attractors for tumor-specific therapy. *Nature Biotechnol* **2012**, *30* (9), 842-848.
10. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2012**, *490*, 61-70.

11. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, Lerner J, Brunet JP, Subramanian A, Ross KN, Reich M, Hieronymus H, Wei G, Armstrong SA, Haggarty SJ, Clemons PA, Wei R, Carr SA, Lander ES, Golub TR. The connectivity map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* **2006**, *313*, 1929-1935.
12. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jané-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P Jr, de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **2012**, *483*, 603–607.
13. Burgués Gasió JP, Pontones Moreno JL, Vera Donoso CD, Jiménez Cruz JF, Ozonas Moragues M. [Cell cycle and apoptosis mechanisms implicated in intravesical chemotherapy resistances in superficial bladder cancer. Article in Spanish]. *Actas Urol Esp* **2005**, *29* (9), 846-859.
14. Lewin B. Células. México: McGraw Hill, **2012**.
15. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **2005**, *30*, 630-641.
16. Abate AA, Pentimalli F, Esposito L, Giordano A. ATP-noncompetitive CDK inhibitors for cancer therapy: an overview. *Expert Opin Investig Drugs* **2013**, *22* (7), 895-906.
17. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8* (7), 547-566.
18. Byrd JC, Lin TS, Dalton JT, Wu D, Phelps MA, Fischer B, Moran M, Blum KA, Rovin B, Brooker-McEldowney M, Broering S, Schaaf LJ, Johnson AJ, Lucas DM, Heerema NA, Lozanski G, Young DC, Suárez JR, Colevas AD, Grever MR. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2007**, *109* (2), 399-404.
19. <http://press.pfizer.com/press-release/pfizers-palbociclib-pd-0332991-receives-food-and-drug-administration-breakthrough-ther>. Fecha de entrada: 19 Nov **2013**.
20. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-112publ144/pdf/PLAW-112publ144.pdf>. U.S. Food and Drug Administration Safety and Innovation Act. Fecha de entrada: 19 Nov **2013**.

21. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, Ettl J, Patel R, Pinter T, Schmidt M, Shparyk Y, Thummala AR, Voytko NL, Breazna A, Kim ST, Randolph S, Slamon DJ. Results of a randomized phase 2 study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitor, in combination with letrozole vs letrozole alone for first-line treatment of ER+/HER2- advanced breast cancer (BC). *Cancer Res* **2012**, *72* (24), 3.
22. <http://clinicaltrials.gov/>. Fecha de entrada: 19 Nov **2013**.
23. Bagella L, Sun A, Tonini T, Abbadessa G, Cottone G, Paggi MG, De Luca A, Claudio PP, Giordano A. A small molecule based on the pRb2/p130 spacer domain leads to inhibition of cdk2 activity, cell cycle arrest and tumor growth reduction in vivo. *Oncogene* **2007**, *26* (13), 1829-1839.
24. Thornberry N, Lazebnick Y. Caspases: Enemies within. *Science* **1998**, *281*, 1312-1316.
25. Stupack DG. Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. *Cancer Lett* **2013**, *332* (2), 133-140.
26. Konopleva M, Watt J, Contractor R, Tsao T, Harris D, Estrov Z, Bornmann W, Kantarjian H, Viallet J, Samudio I, Andreeff M. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res* **2008**, *68* (9), 3413-3420.
27. Borthakur G, O'Brien S. Pharmacology and clinical potential of oblimersen sodium in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Lymphat Cancer* **2012**, *2*, 137-143.
28. Jiang K. Biotech comes to its 'antisenses' after hard-won drug approval. *Nat Med* **2013**, *19* (3), 252.
29. Campos JM, Pineda MJ, Gómez JA, Entrena A, Trujillo MA, Gallo MA, Espinosa, A. 5-fluorouracil derivatives. 1. Acyclonucleosides through a tin (IV) chloride-mediated regiospecific ring opening of alkoxy-1,4-diheteroepanes. *Tetrahedron* **1996**, *52* (26), 8907-8924.
30. Gómez JA, Campos JM, Marchal JA, Trujillo MA, Melguizo C, Prados J, Gallo MA, Aránega A, Espinosa A. Chemical modifications on the acyclic moiety of 3-(2-hydroxyethoxy)-1-alkoxypropyl nucleobases. 2. Differentiation and growth inhibition in rhabdomyosarcoma cells after exposure to a novel 5-fluorouracil acyclonucleoside. *Tetrahedron* **1997**, *53* (21), 7319-7334.
31. Farquhar D, Chen R, Khan S. 5'-[4-(Pivaloyloxy)-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl]-2'-deoxy-5-fluorouridine: a membrane-permeating prodrug of 5-fluoro-2'-deoxyuridylic acid (FdUMP). *J Med Chem* **1995**, *38* (3), 488-495.
32. Pizzorno G, Sun Z, Handschumacher RE. Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* **1995**, *49* (4), 553-557.



33. Gómez JA, Trujillo MA, Campos JM, Gallo MA, Espinosa A. Synthesis of novel 5-fluorouracil derivatives with 1,4-oxaheteroepane moieties. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13295-13312.
34. Saniger E, Campos JM, Entrena A, Marchal JA, Boulaiz H, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A. Neighbouring-group participation as the key step in the reactivity of acyclic and cyclic salicyl-derived *O,O*-acetals with 5-fluorouracil. Antiproliferative activity, cell cycle dysregulation and apoptotic induction of new *O,N*-acetals against breast cancer cells. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8017-8026.
35. Vorbrüggen H., Ruh-Polenz C. Synthesis Of Nucleosides. *Org React* **2004**, 1–630.
36. Saniger E, Campos JM, Entrena A, Marchal JA, Suarez I, Aránega A, Choquesillo D, Niclós J, Gallo MA, Espinosa A. Medium benzene-fused oxacycles with the 5-fluorouracil moiety: synthesis, antiproliferative activities and apoptosis induction in breast cancer cells. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5457-5467.
37. Marchal JA, Núñez MC, Suárez I, Díaz-Gavilán M, Gómez-Vidal JA, Boulaiz H, Rodríguez-Serrano F, Gallo MA, Espinosa A, Aránega A, Campos JM. A synthetic uracil derivative with antitumor activity through decreasing cyclin D1 and Cdk1, and increasing p21 and p27 in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* **2007**, *105*, 237-246.
38. Núñez MC, Entrena A, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis of novel 1-(2,3-dihydro-5H-4,1-benzoxathiepin-3-yl)-uracil and -thymine, and their corresponding S-oxidized derivatives. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10363-10369.
39. Núñez MC, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Caba O, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. 6'-Chloro-7- or 9-(2,3-dihydro-5H-4,1-benzoxathiepin-3-yl)-7H or 9H-purines and their corresponding sulfones as a new family of cytotoxic drugs. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 183-190.
40. Núñez MC, Pavani MG, Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Gómez-Vidal JA, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis and anticancer activity studies of novel 1-(2,3-dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-3-yl)uracil and (6'-substituted)-7- or 9-(2,3-dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-3-yl)-7H or 9H-purines. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11724-11733.
41. Conejo-García A, Núñez MC, Marchal JA, Rodríguez-Serrano F, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Regiospecific microwave-assisted synthesis and cytotoxic activity against human breast cancer cells of (*RS*)-6-substituted-7- or 9-(2,3-dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-3-yl)-7H or -9H-purines. *Eur J Med Chem* **2008**, *43* (8), 1742-1748.
42. Díaz-Gavilán M, Gómez-Vidal JA, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Caba O, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Anticancer activity of (1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl)-pyrimidines and -purines against the MCF-7 cell line: Preliminary cDNA microarray studies. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (4), 1457-1460.

43. López-Cara LC, Conejo-García A, Marchal JA, Macchione G, Cruz-López O, Boulaiz H, García MA, Rodríguez-Serrano F, Ramírez A, Cativiela C, Jiménez AI, García-Ruiz JM, Choquesillo-Lazarte D, Aránega A, Campos JM. New (*RS*)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: The chiral switch from (*RS*)-2,6-dichloro-9-[1-(*p*-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9*H*-purine. *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 249-258.
44. Marchal JA, Carrasco E, Ramirez A, Jiménez G, Olmedo C, Peran M, Agil A, Conejo-García A, Cruz-López O, Campos JM, García MA. Bozepinib, a novel small antitumor agent, induces PKR-mediated apoptosis and synergizes with IFN $\alpha$  triggering apoptosis, autophagy and senescence. *Drug Des Devel Ther* **2013**, *7*, 1301-1313.
45. Díaz-Gavilán M, Conejo-García A, Cruz-López O, Núñez MC, Choquesillo-Lazarte D, González-Pérez JM, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis and anticancer activity of (*R,S*)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9*H*-purines. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 127-135.
46. Conejo-García A, García-Rubiño ME, Marchal JA, Núñez MC, Ramírez A, Cimino S, García MÁ, Aránega A, Gallo MA, Campos JM. Synthesis and anticancer activity of (*RS*)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxaheteroin-2-ylmethyl)-9*H*-purines. *Eur J Med Chem* **2011**, *46* (9), 3795-3801.
47. Kimatrai M, Conejo-García A, Ramírez A, Andreolli E, Da Silveira-Gomes A, García MA, Aránega A, Marchal JA, Campos JM. Synthesis and anticancer activity of the (*R,S*)-benzofused 1,5-oxathiepine moiety tethered to purines through alkylidenoxy linkers. *ChemMedChem* **2011**, *6* (10), 1854-1859.
48. Baltzis D, Pluquet O, Papadakis AI, Kazemi S, Qu L-K, Koromilas AE. The eIF2 $\alpha$  kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 31675-31687.
49. Li Y, Wang R, Ma E, Deng Y, Wang X, Xiao J, Jing Y. The induction of G<sub>2</sub>/M cell-cycle arrest and apoptosis by cucurbitacin E is associated with increased phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in leukemia cells. *Anticancer Drugs* **2010**, *21* (4), 389-400.
50. García-Rubiño ME, Conejo-García A, Núñez MC, Carrasco E, García MA, Choquesillo-Lazarte D, García-Ruiz JM, Gallo MA, Marchal JA, Campos JM. Enantiospecific Synthesis of Heterocycles Linked to Purines: Different Apoptosis Modulation of Enantiomers in Breast Cancer Cells. *Curr Med Chem* **2013**, publicado *on line*.
51. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* **1985**, *100*, 965-973.
52. Seewaldt VL, Kim JH, Parker MB, Dietze EC, Srinivasan KV, Caldwell LE. Dysregulated expression of cyclin D1 in normal human mammary epithelial cells inhibits all-trans-retinoic acid-mediated G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase arrest and differentiation *in vitro*. *Exp Cell Res* **1999**, *249* (1), 70-85.

53. Marchal JA, Rodríguez-Serrano F, Caba O, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Antiproliferative activity, cell-cycle dysregulation, and cellular differentiation: salicyl- and catechol-derived acyclic 5-fluorouracil *O,N*-acetals against breast cancer cells. *ChemMedChem* **2007**, *2*(12), 1814-1821.
54. Díaz-Gavilán M, Choquesillo-Lazarte D, González-Pérez JM, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis and reactivity of (*RS*)-6-chloro-7- or 9-(1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl)-7*H* or 9*H*-purines bearing a nitrobenzenesulfonyl group on the nitrogen atom. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5274-5286.
55. Caba O, Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Boulaiz H, Aránega A, Gallo MA, Marchal JA, Campos JM. Anticancer activity and cDNA microarray studies of a (*RS*)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl]-6-chloro-9*H*-purine, and an acyclic (*RS*)-*O,N*-acetalic 6-chloro-7*H*-purine. *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 3802-3809.
56. Caba O, Rodríguez-Serrano F, Díaz-Gavilán M, Conejo-García A, Ortiz R, Martínez-Amat A, Alvarez P, Gallo MA, Campos JM, Marchal JA, Aránega A. The selective cytotoxic activity in breast cancer cells by an anthranilic alcohol-derived acyclic 5-fluorouracil *O,N*-acetal is mediated by endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Eur J Med Chem* **2012**, *50*, 376-382.
57. Coley HM, Amos WB, Twentyman PR, Workman P. Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines. *Br J Cancer* **1993**, *67*(6), 1316-1323.
58. Lillo MP, Cañadas O, Dale RE, Acuña AU. Location and properties of the taxol binding center in microtubules: a picosecond laser study with fluorescent taxoids. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12436-12449.
59. Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes Inc, Oregon. **2002**.
60. Castro B, Fedorov A, Hornillos V, Delgado J, Acuña AU, Mollinedo F, Prieto M. Edelfosine and miltefosine effects on lipid raft properties: membrane biophysics in cell death by antitumor lipids. *J Phys Chem* **2013**, *117*, 7929–7940.
61. Michelakis E, Archer S. A method of treating cancer using dichloroacetate. PCT Int Appl. **2006**, WO 2006108276 A1 20061019.
62. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 37-51.
63. Wong JY, Huggins GS, Debidda M, Munshi NC, De Vivo I. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol* **2008**, *109*, 394-402.

64. Sun RC, Fadia M, Dahlstrom JE, Parish CR, Board PG, Blackburn AC. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *120*, 253-260.
65. Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells *in vitro* to radiation. *Prostate* **2008**, *11*, 1223-1231.
66. Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA, Jayne DG. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* **2010**, *102*, 1746-1752.
67. Tong J, Xie G, He J, Li J, Pan F, Liang H. Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 740564.
68. Zhang N, Palmer AF. Development of a dichloroacetic acid-hemoglobin conjugate as a potential targeted anti-cancer therapeutic. *Biotechnol Bioeng* **2011**, *108*, 1413-1420.
69. Morfouace M, Lalier L, Bahut M, Bonnamain V, Naveilhan P, Guette C, Oliver L, Gueguen N, Reynier P, Vallette FM. Comparison of spheroids formed by rat glioma stem cells and neural stem cells reveals differences in glucose metabolism and promising therapeutic applications. *J Biol Chem* **2012**, *287*(40), 33664-33674.
70. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Zapata-Benavides P, Miranda-Hernández DF, Chávez-Reyes A, Rivera-Morales LG, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. *In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of sodium dichloroacetate (DCA-Na) against murine melanoma. *African J Microb Res* **2012**, *6*(22), 4782-4796.
71. Hur H, Xuan Y, Kim YB, Lee G, Shim W, Yun J, Ham IH, Han SU. Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. *Int J Oncology* **2013**, *42*, 44-54.
72. Shen YC, Ou DL, Hsu C, Lin KL, Chang CY, Lin CY, Liu SH, Cheng AL. Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **2013**, *108*, 72-81.
73. Duan Y, Zhao X, Ren W, Wang X, Yu KF, Li D, Zhang X, Zhang Q. Antitumour activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Onco Targets Ther* **2013**, *6*, 189-198.
74. Sánchez WY, McGee SL, Connor T, Mottram B, Wilkinson A, Whitehead JP, Vuckovic S, Catley L. Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. *Br J Cancer* **2013**, *108*, 1624-1633.
75. Li T, Yang Y, Cheng C, Tiwari AK, Sodani K, Zhao Y, Abraham I, Chen ZS. Design, synthesis and biological evaluation of N-arylphenyl-2,2-dichloroacetamide analogues as anti-cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 7268-7271.

76. Csuk R, Siewert B, Dressel C, Schäfer R. Tormentic acid derivatives: synthesis and apoptotic activity. *Eur J Med Chem* **2012**, *56*, 237-245.
77. Liang F, Wan S, Li Z, Xiong X, Yang L, Zhou X, Wu C. Medical applications of macrocyclic polyamines. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 711-727.
78. Gao J, Liu Y-G, Zhou Y. Chiral salicyl diamines. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1723-1729.
79. Gao J, Liu Y-G, Zingaro RA. Cytotoxic activities, celular uptake, gene regulation, and optical imaging of novel platinum (II) complexes. *Chem Res Toxicol* **2009**, *22*, 1705-1712.
80. Annette M, Patil S, Malik NS, Panghavane KD. Cyclopentylidene ketals for treatment of cancer. PCT Int Appl. **2012**, WO 2012081039 A1 20120621.
81. Chui CH, Wang Q, Chow WC, Yuen MC, Wong KL, Kwok WM, Cheng GY, Wong RS, Tong SW, Chan KW, Lau FY, Lai PB, Lam KH, Fabbri E, Tao XM, Gambari R, Wong WY. 5-(Dimethylamino)-*N*-(4-ethynylphenyl)-1-naphthalenesulfonamide as a novel bifunctional antitumor agent and two-photon induced bio-imaging probe. *Chem Commun* **2010**, *46*, 3538-3540.
82. Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Gómez-Vidal JA, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis of tetrahydrobenzoxazepine acetals with electron-withdrawing groups on the nitrogen atom. Novel scaffolds endowed with anticancer activity against breast cancer cells. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11547-11557.
83. Espinosa A, Gallo MA, Campos JM. Derivatives of C-6 functionalized 4-heteroalkanals. VI. Cyclic modifications in 6-hydroxy-4-oxa-alkanals. *Bull Soc Chim Fr* **1983**, *9-10*, 265-268.
84. Dembinski R. Recent advances in the mitsunobu reaction: modified reagents and the quest for chromatography-free separation. *Eur J Org Chem* **2004**, *13*, 2763-2772.
85. Bowden K, Williams PR. Intramolecular catalysis. Part 7. The Smiles rearrangement of substituted 2-hydroxy-2'-nitro- and -2',4'-dinitro-diphenyl sulphones, as well as 2-amino-2',4'-dinitrodiphenyl sulphide, 2-[(2-aminophenyl)thio]-3-nitropyridine and 2-hydroxy-2',4'-dinitrodiphenyl ether. *J Chem Soc Perkin Trans* **1991**, *2*, 215-224.
86. Fitzgerald L, Blakeley RL, Zerner B. The smiles rearrangement of 4-nitrophenyl *N*-hydroxycarbamate: the involvement of a spiro meisenheimer complex of a mononitrobenzene derivative as a transient reaction intermediate. *Chem Lett* **1984**, 29-32.
87. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* **2004**, *83* (3), 249-289.
88. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, *91*, 6319-6323.

89. Su DM, Zhang Q, Wang X, He P, Zhu YJ, Zhao J, Rennert OM, Su YA. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8*, 1292-1304.
90. Lin WM, Baker AC, Beroukhir R, Winckler W, Feng W, Marmion JM, Laine E, Greulich H, Tseng H, Gates C, Hodi FS, Dranoff G, Sellers WR, Thomas RK, Meyerson M, Golub TR, Dummer R, Herlyn M, Getz G, Garraway LA. Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res* **2008**, *68*, 664-673.
91. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* **2006**, *1* (3), 1112-1116.
92. Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, García AM, Marchal JA, Ramos JL, Carrillo E, Vélez C, Aránega A. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of gef gene. *Br J Cancer* **2003**, *89*, 192-198.
93. Conejo-García A, Cruz-López O, Gómez-Pérez V, Morales F, García-Rubiño ME, Kimatrai M, Núñez MC, Campos JM. Synthesis of purine derivatives as scaffolds for a diversity of biological activities. *Curr Org Chem* **2010**, *14*, 2463-2482.
94. Qu G, Zhang Z, Guo H, Geng M, Xia R. Microwave-Assisted Rapid and Regioselective Synthesis of N-(alkoxycarbonylmethyl) Nucleobases in Water. *J Braz Chem Soc* **2007**, *18* (5), 1061-1067.
95. PALLAS 3.8.1.1, a prediction tool of physicochemical parameters, is supplied by CompuDrug Chemistry, Ltd, PO Box, Rochester, NY 14692, USA.
96. Ikoma N, Yamazaki H, Abe Y, Oida Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Matsumoto H, Matsuyama T, Ohta Y, Ozawa A, Ueyama Y, Nakamura M. S100A4 expression with reduced E-cadherin expression predicts distant metastasis of human malignant melanoma cell lines in the NOD/SCID/gammaCnull (NOG) mouse model. *Oncol Rep* **2005**, *14* (3), 633-637.
97. Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res* **2001**, *7*(5), 1474-1480.
98. Kim H, So SM, Chin J. Preparation of Chiral Diamines by the Diaza-Cope Rearrangement (DCR). *Aldrichimica ACTA* **2008**, *41* (3), 77-88.
99. O'Connell KM, Beckmann HS, Laraia L, Horsley HT, Bender A, Venkitaraman AR, Spring DR. A two-directional strategy for the diversity-oriented synthesis of macrocyclic scaffolds. *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 7545-7550.
100. Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. The exploration of macrocycles for drug discovery – an underexploited structural class. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 608-624.

101. Wessjohann LA, Ruijter E, Garcia-Rivera D, Brandt W. What can a chemist learn from nature's macrocycles? – A brief, conceptual view. *Mol Divers* **2005**, *9*, 171-186.
102. Balderas-Rentería I, González-Barranco P, García A, Banik BK, Rivera G. Anticancer drug design using scaffolds of  $\beta$ -lactams, sulfonamides, quinoline, quinoxaline and natural products. Drugs advances in clinical trials. *Curr Med Chem* **2012**, *19* (26), 4377-4398.
103. Simion C, Simion A, Mitoma Y, Nagashima S, Kawaji T, Hashimoto I, Tashiro M. Synthesis of New Dihydroxy-dioxygenated ortho-[2,x]Cyclophanes. *Heterocycles* **2000**, *53* (11), 2459-2470.
104. Fernández-Fernández MC, Bastida de la Calle R, Macías A, Valencia Matarranz L, Pérez-Lourido P. Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes of new [1+1] and [2+2] macrocyclic ligands derived from 1,4-bis(2'-formylphenyl)-1,4-dioxabutane and *cis*-1,2-diaminocyclohexane. *Polyhedron* **2008**, *27* (11), 2301-2308.
105. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/phane/>. Nomenclatura de Fanos. Parte I. Recomendaciones de la IUPAC 1998. Fecha de entrada: 26 Nov 2013.
106. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/phane2/>. Nomenclatura de Fanos. Parte II. Recomendaciones de la IUPAC 2002. Fecha de entrada: 26 Nov 2013.

## **SUMMARY**





## I. INTRODUCTION

Cancer is a generic term for more than 200 diseases that can affect any part of the body in which abnormal cells divide without control. It is one of the most important health issues and the leading cause of death worldwide. Collaboration between researchers, epidemiologists y clinicians is critical to improve cancer control.

Cancer treatment usually consists of surgery in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. This treatment lacks the specificity needed to destroy tumour cells without causing several adverse effects. The hormone therapy is used only for some breast and prostate cancers and only a few biological drugs are approved for the treatment of solid tumours.

Research has increased the understanding of the cell and the molecular biology of cancer. It allows the development of more specific antiproliferative drugs and subsequently greater safety for the patient. The better knowledge of cancer and the development of multidrug resistance to chemotherapy remain a major challenge in the treatment of cancer.

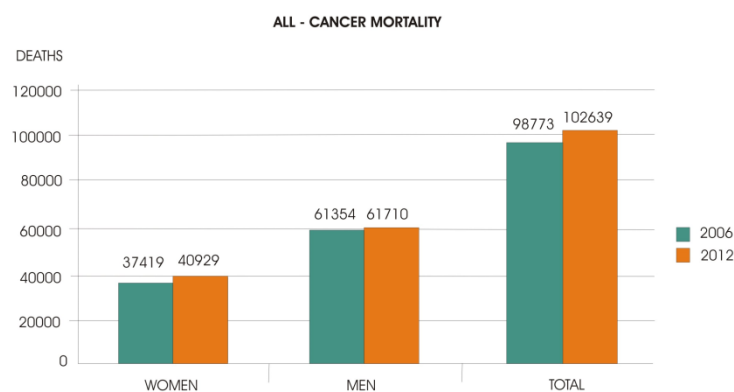
The main aim of this PhD dissertation is to develop new antitumour agents that inhibit proliferation without causing adverse effects.

Herein we report the design, synthesis, characterization and biological evaluation of three different families of compounds as potential anticancer drugs. Moreover, the structural diversity of the molecules will allow hit confirmation, hit to lead generation, SAR (or QSAR) studies, and lead optimization.

## 1. Cancer

Cancer is the leading cause of death worldwide accounting for 7.6 million deaths in 2008. Deaths from cancer worldwide are expected to continue to rise to over 13.1 million in 2030. Cancer is also increasing in developing countries in the last years. According to the International Agency for Research on Cancer, overall cancer mortality rates are generally similar between developed and developing countries although overall cancer incidence rates are double in developed countries<sup>1</sup>.

The number of total cancer deaths in Spain in 2013 was estimated at around 41,000 in women and 62,000 in men. Estimates of all-cancer mortality in Spain for the years 2006 and 2012 are shown in Figure 1. From 2006 to 2012, the total mortality data show an increase of 4,000 deaths with a greater number of those of women<sup>2</sup>.



**Figure 1.** Estimates of all-cancer mortality in Spain for 2006 and 2012.

The World Health Organization (WHO) defines cancer as a generic term for a large group of diseases that can affect any part of the body. Other terms used are malignant tumours and neoplasms. One defining feature of cancer is the rapid creation of abnormal cells that grow beyond their usual boundaries, and which can then invade adjoining parts of the body and spread to other organs. This process is referred to as metastasis. Metastases are the major cause of death from cancer<sup>3</sup>.

Cancer is a genetic disease because it can be traced to alterations within specific genes, but in most cases, it is not an inherited disease<sup>4</sup>. Cancer starts by an uncontrolled growth and division of cells that invade normal tissues and organs and eventually spread throughout the body in the process called metastasis<sup>5</sup>.

A tumour arises from a single cell that begins to proliferate abnormally becoming a tumour cell. The transformation from a normal cell into a tumour one is a multistep

process in which cells gradually become malignant through a progressive series of alterations. That is the reason why most cancers develop late in life<sup>5</sup>.

These changes are the result of the interaction between a person's genetic factors and three categories of external agents, including: physical carcinogens, such as ultraviolet and ionizing radiation, chemical ones, such as asbestos, the components of tobacco smoke, aflatoxin (a food contaminant) and arsenic (a drinking water contaminant) and biological carcinogens, such as infections from certain viruses, bacteria or parasites<sup>3</sup>.

Although there are many kinds of cancer that appear because of many different causes, the process of carcinogenesis is common to all of them. Cancer cells show differences from normal cells, such as cell cycle regulation, mitosis and differentiation mechanisms. Cancer results from defects in fundamental cell regularity mechanisms, so it is a disease that ultimately has to be understood at the molecular and cellular levels. Indeed, understanding cancer is still an objective of molecular and cellular biologists. They have created different bioinformatics tools for that purpose.

The Cancer Genome Atlas Network is an example. It is a comprehensive and coordinated effort of the National Cancer Institute and the National Human Genome Research Institute to accelerate our understanding of the molecular basis of cancer through the application of genome analysis technologies, including large-scale genome sequencing<sup>6</sup>. Another example is the Connectivity Map that is a technique developed by the Broad Institute and Harvard University to connect small molecules, chemicals and physiologic processes, diseases, genes and drugs<sup>7</sup>. There is also a Cancer Cell Line Encyclopedia where we can find a compilation of gene expression, chromosome copy number and massively parallel sequencing data from 947 human cancer cell lines<sup>8</sup> created by the Broad Institute and Novartis Institute for Biomedical Research.

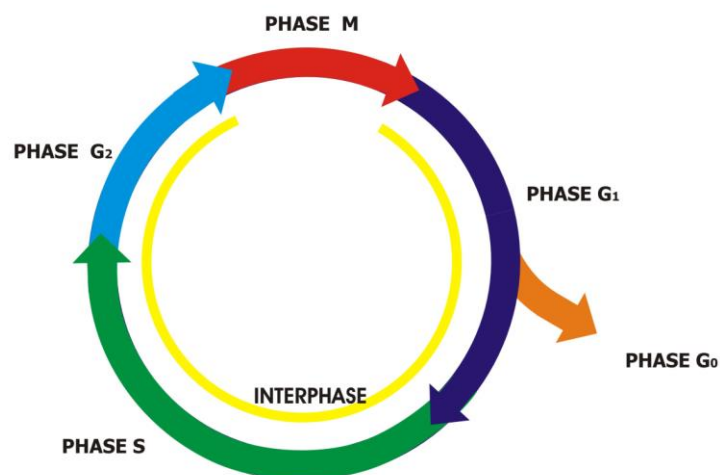
Targeted therapies based on our newly formed insight into the molecular basis of malignancy are needed. The improved knowledge of cancer biology will help to identify new drugs<sup>9</sup> avoiding the serious side effects of conventional chemotherapy and radiotherapy. Although the cure rate for most types of cancers has not improved significantly over the past 50 years, there is a reason to believe that effective targeted therapies will become available to treat cancer in the near future.

## 2. Cell cycle

The cell cycle is the process by which cells duplicate themselves, grow, and prepare to divide again. It regulates cell division in multicellular organisms and it is essential to replace damaged cells.

The cell cycle is divided into four phases that end with mitosis (M phase) and cytokinesis. Mitosis corresponds to the separation of daughter chromosomes and cytokinesis to the division of the cell itself. The period between mitoses is called interphase (Figure 2)<sup>5</sup>.

Interphase is the period in which cells growth and DNA replication occur in different phases in preparation for cell division<sup>10</sup>. The M phase is followed by the G<sub>1</sub> phase. Subsequently, the DNA replication takes place in the synthesis phase (S phase) followed by the G<sub>2</sub> phase. G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> phases represent the two gap periods, during which cells grow and prepare themselves for the successful completion of the next phase. During G<sub>1</sub>, the cell is metabolically active and grows continuously. During G<sub>2</sub> the cell growth continues and proteins are synthesized in preparation for mitosis.

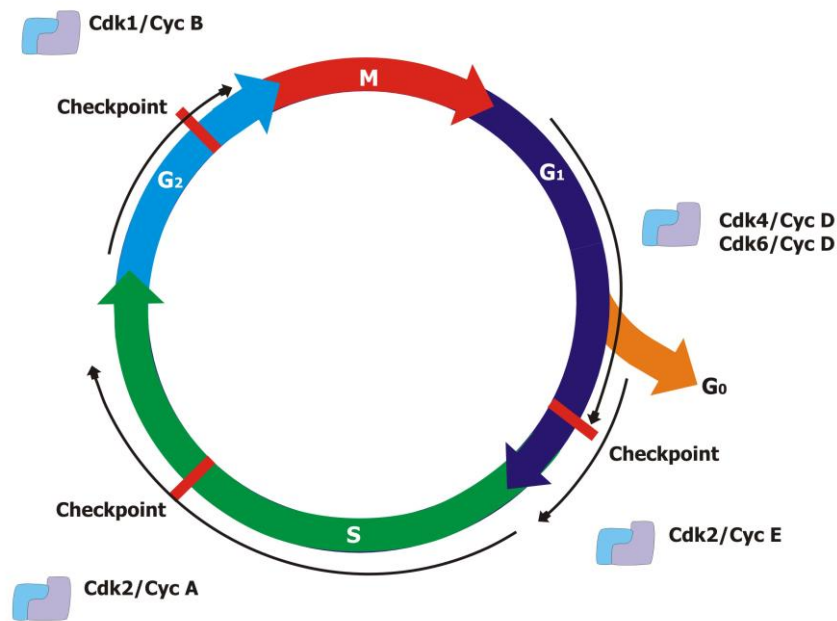


**Figure 2.** Cell cycle phases.

As part of their cell cycle control cells possess checkpoints that prevent them from entering into a new phase until they have successfully completed the previous one as for example if any of the chromosomal DNA is damaged or certain critical process such as DNA replication have not been properly completed. This cell cycle control system is regulated by extracellular and internal signals where the protein complexes between cyclins (cyc) and cyclin-dependent kinases (CDKs) play a crucial role. These complexes phosphorylate different substrates involved in the control of transcription and cell cycle progression<sup>11</sup>. There are more than twenty different CDKs identified in mammalian cells,

but only a few are well characterized as cell cycle regulators, others are involved in transcriptional control and others still do not have a clear function<sup>12</sup>.

Three checkpoints ensure that the cell can continue the cell cycle properly. On the other hand, if any damage is detected the cell cycle is arrested (Figure 3). CDKs are critical in cell cycle regulation and could be a good strategy for the design of targeted therapies.

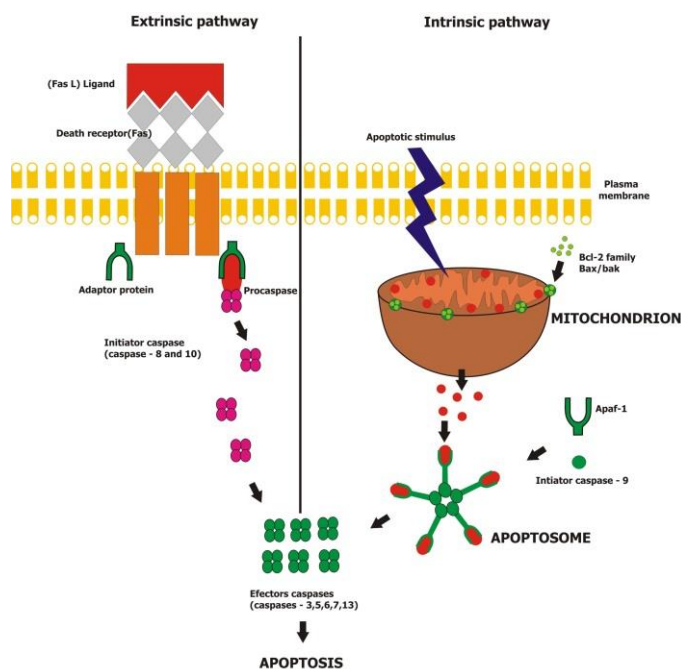


**Figure 3.** Checkpoints and Cdk/Cyc intervention in the cell cycle regulation.

### 3. Apoptosis

Apoptosis is a genetic orderly process in which cells lead to their own death in response to different stimuli. It is an essential process to maintain homeostasis in multicellular organisms.

There are two fundamental pathways in apoptosis: the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway. The central component of both pathways is a proteolytic system involving a family of proteases called caspases (Figure 4). There are 14 caspases identified in mammalian cells divided into initiator and effector caspases. These enzymes participate in a cascade that culminates in apoptosis<sup>13</sup>. Caspase-9 as an initiator caspase and caspase-3 as an effector caspase are the critical enzymes in apoptosis.

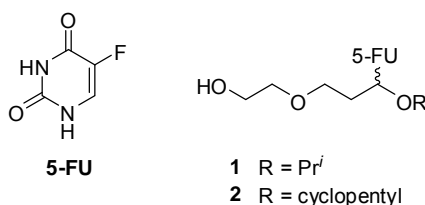


**Figure 4.** The two fundamental pathways in apoptosis.

The understanding of caspase regulation is intimately linked to the ability to rationally manipulate apoptosis for therapeutic gain against cancer.

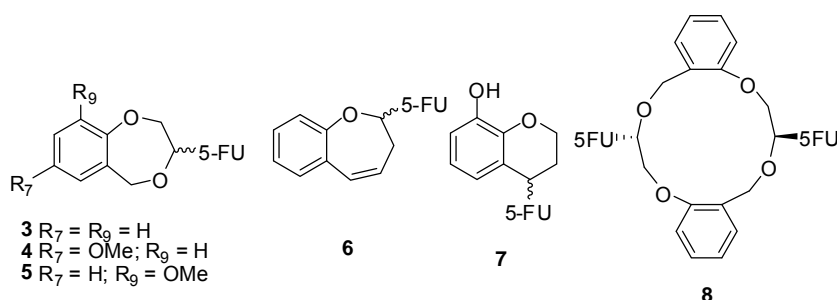
#### 4. *O,N*-Acetals as antiproliferative agents

Although 5-fluorouracil (5-FU, Figure 5) was first introduced in 1957, it still remains an essential part of the treatment of a wide range of solid tumours. Novel 5-FU derivatives, possessing a broader spectrum of antitumour activity and fewer toxic side effects than 5-FU, have been diligently sought in our research group from the start. The mechanistic and synthetic aspects of the acyclonucleosides **1** and **2**<sup>14</sup> (Figure 5) have been described. Their antitumour activity was tested against HEp human cells *in vitro*. The most active compound **2** with a half 50 % maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 18 μM is the most lipophilic structure due to the cyclopentoxy moiety. This drug is 4-fold more active than 5-FU<sup>14</sup>.



**Figure 5.** 5-Fluorouracil and 5-FU acyclonucleoside-type derivatives.

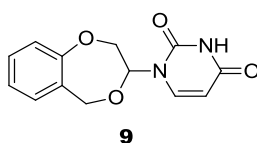
Having demonstrated that the most lipophilic acyclonucleoside (**2**) were the most active compounds against the HEp human cells, cyclic *O,N*-acetalic compounds were synthesized in order to increase the lipophilicity of the molecules and subsequently improve their anticancer activity. With this aim, the synthesis and anticancer activities of compounds **3-8** (Figure 6) have been reported. In all cases the attachment of the 5-FU moiety occurs at the *N*-1 position of the pyrimidine ring.



**Figure 6.** Several 5-FU derivatives with antiproliferative activity.

Cyclic 5-FU *O,N*-acetals **3-8**<sup>15,16</sup> (Figure 6) provoked a  $G_0/G_1$ -phase cell cycle arrest whereas ftorafur [1-(2-tetrahydrofuranyl)-5-fluorouracil] a known prodrug of 5-FU, induced a S-phase cell cycle arrest. Moreover, **8** increased the expression of proteins p21 or p27 up to double the control. Compounds **3**, **4** and **8** significantly decrease the cdc2 activity. Compound **6** increased the expression of protein p53 and considerably decreased bcl-2 levels<sup>17</sup>. All these biological activities are not shown by 5-FU itself. Therefore, compounds **3-8** can be considered drugs *per se* and not 5-FU prodrugs because they show a different mechanism of action from the one shown by 5-FU and ftorafur.

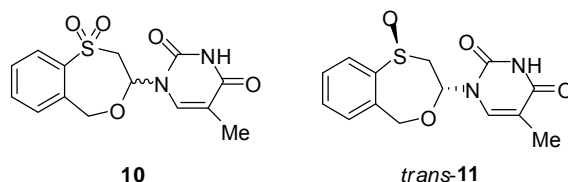
Due to the fact that compounds **3-8** are not prodrugs of 5-FU, the synthesis of **9** (Figure 7) was described<sup>18</sup> replacing the 5-FU moiety for the natural base uracil, with the prospect of finding an antiproliferative agent endowed with a new mechanism of action. Compound **9** showed a very interesting antiproliferative activity ( $IC_{50} = 5 \pm 0.25 \mu M$ ) against the MCF-7 human breast cancer cell line and was slightly more active than its 5-FU analogue **3** ( $IC_{50} = 7 \pm 0.61 \mu M$ ). Moreover, **9** also recruited cells into de  $G_0/G_1$  phase of the cell cycle, and this feature seemed to be a common characteristic of the cyclic *O,N*-acetals **3-8**.



**Figure 7.** First *O,N*-acetal with a natural base instead of 5-FU.

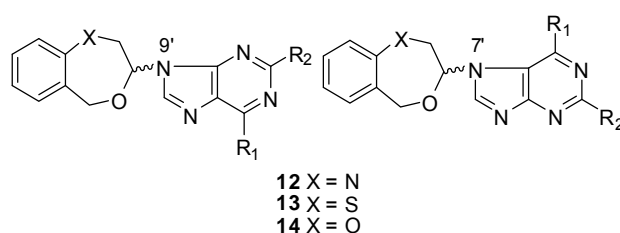


The isosteric change of the phenolic oxygen atom on **9** and the substitution of uracil to thymine base gave **10** and *trans*-**11** (Figure 8). They show antiproliferative activity against the human breast cancer cell line MCF-7 ( $IC_{50} = 12.74 \pm 4.79$  and  $30.05 \pm 0.71 \mu\text{M}$ , respectively)<sup>19</sup>.



**Figure 8.** Bioisosteres of **9**.

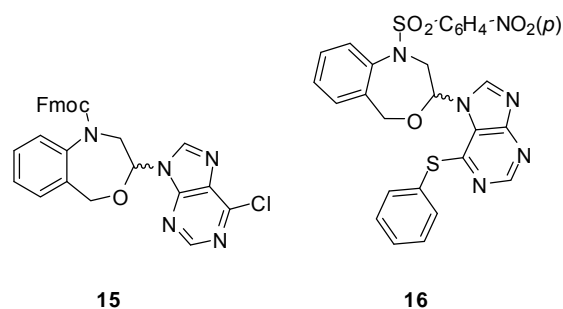
In order to complete the study of a structure–activity relationship (SAR), a series of benzo-fused seven membered *O,N*-acetals linked to pyrimidine or purine were described<sup>20–22</sup> (Figure 9).



**Figure 9.** *N*-9 and *N*-7 Benzo-fused seven membered compounds linked to purines.

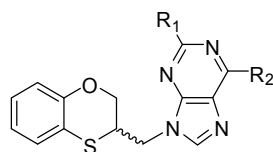
As a rule the following can be stated: a) the purine analogues showed better activities than the pyrimidine ones<sup>21,22</sup>, b) the presence of at least one halogen atom on the purine skeleton was necessary to improve the antiproliferative activity<sup>20,22</sup> ( $R_1$  and  $R_2$  in Figure 9), c) 4,1-benzoxazepine rings (**12**, Figure 9) afforded an enhancement of the antiproliferative activity on MCF-7 cells in relation to the 4,1-benzoxathiepin (**13**, Figure 9) and 1,4-benzodioxepin<sup>22</sup> (**14**, Figure 9).

Moreover, studies by microarray technology showed that the main molecular targets of compounds **15** and **16** (Figure 10) are pro-apoptotic genes with protein kinase activity such as GP132, ERN1 or RAC1, which prevent the metastatic progression<sup>22</sup>.



**Figure 10.** Compounds with interesting anticancer activities.

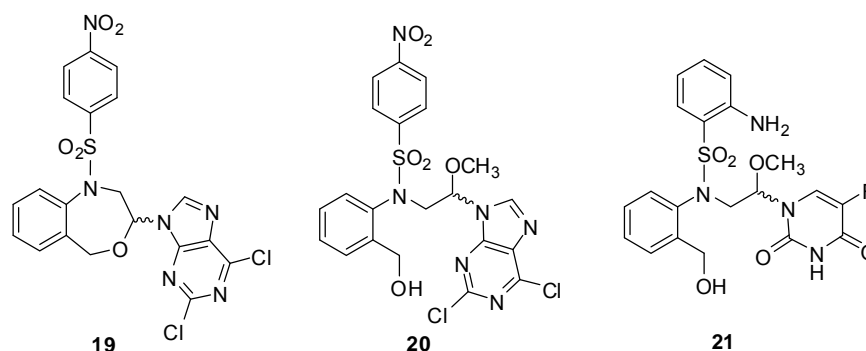
If the previously described compounds are not prodrugs, it is not necessary to maintain the *O,N*-acetalic characteristic with the corresponding weakness of the N-C-O bond, and the stereochemistry of the reaction could also be controlled. Therefore, molecules in which the benzoheterocyclic ring and the purine base are linked by a heteroatom-C-C-N bond were designed<sup>23</sup> (**17-18**, Figure 11). The apoptotic indexes of the target compounds must be pointed out: 63.05% for **17** and 76.22% for **18**. To our knowledge, compound **18** is the most important apoptotic inducer against the MCF-7 human breast cancer cell line so far reported<sup>24</sup>.



**17** R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = Br  
**18** R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = Cl

**Figure 11.** Non *O,N*-acetalic compounds with interesting antitumour activities.

The biological activity by the cyclic and acyclic *O,N*-acetals **19** and **20** (Figure 12) should be emphasized. The IC<sub>50</sub> values against MCF-7 cell line obtained for these compounds were below 1 μM, **19** also called bozepinib being the most potent structure so far reported (IC<sub>50</sub> = 0.355 μM). Moreover, they are the most selective compounds against MCF-7 cell line [TIs (Therapeutic Index) = 5.1 and 5.2, respectively] in relation to the normal one<sup>25</sup>. cDNA microarray technology reveals potential drug targets, mainly centred on positive apoptosis regulatory pathway genes, and the repression of genes involved in carcinogenesis, proliferation and tumour invasion<sup>26</sup>.



**Figure 12.** Cyclic and acyclic *O,N*-acetals with interesting anticancer activities.

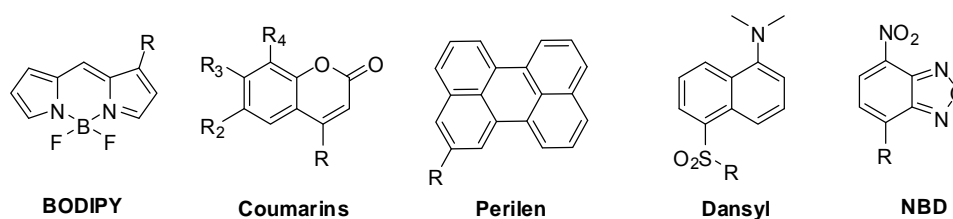
Also studied was the acyclic compound **21** (Figure 12), a potent growth inhibitor of MCF-7 ( $IC_{50} = 1.09 \mu\text{M}$ ) that displayed low toxicity in the normal cell line MCF-10A ( $TI = 34.5$ ). Moreover, it induces selective apoptosis in MCF-7 with better activity than compound **18** (77.40 % for **21** against 76.22 % for **18**). Further studies showed that pro-apoptotic genes *BBC3* y *Noxa* related with the endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis appeared up-regulated. The selective activity of this compound against tumour cells *via* the ER stress-induced apoptosis can imply a great advantage for future therapeutic use<sup>27</sup>.

Bozenipib, the most active compound of the cyclic *O,N*-acetals, is a potent antitumoural agent that induces apoptosis in breast and colon cancer cells<sup>28</sup>. The double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is a target of bozenipib. Moreover, the combination with IFN $\alpha$  potentiates the apoptosis induced by bozenipib and also enhances autophagy and senescence<sup>28</sup>, both processes of great importance in tumour cells that show resistance to conventional chemotherapy. Therefore bozenipib has the required features as an emergent drug in the targeted antitumour therapy.

## 5. Fluorescence techniques for drug delivery research

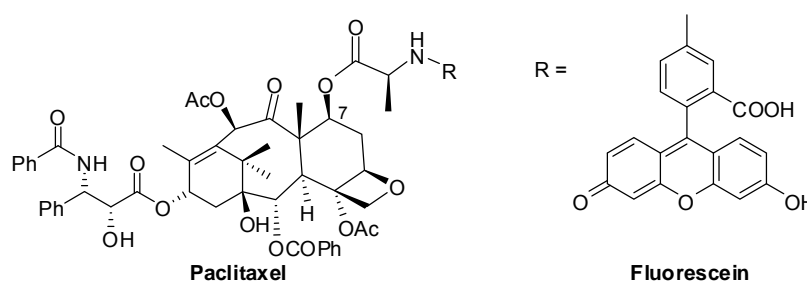
Fluorescence is a very useful technique to elucidate the mechanism of action of drugs inside the cell and to know their distribution in tissues and organs. Knowing the drug distribution is critical for the design of more selective and efficient agents in cancer therapy, although this knowledge is neither always easy nor cheap. However, fluorescence technique provides a comprehensive tool for investigating these aspects in single cells and whole tissue<sup>29</sup>.

Some drugs are inherently auto-fluorescent, such as topotecan and camptothecin<sup>30</sup>, but others need to be labelled with chromophores such as the ones shown in Figure 13.



**Figure 13.** Some chromophores commonly used as labels for drug delivery with fluorescence techniques.

As an example, the mechanism of action of the antitumour drug paclitaxel by the stabilization of the microtubules was disclosed by the fluorescence technique using fluorescein as a label in the drug<sup>31</sup> (Figure 14).



**Figure 14.** Fluorescent analogous of paclitaxel with fluorescein as label.

## 6. DCA in antitumour therapy

The small molecule dichloroacetate (DCA) is a metabolic modulator that has been used in humans for decades in the treatment of lactic acidosis and inherited mitochondrial diseases<sup>32</sup>. However, DCA has been considered as an antitumour agent since 2006. A patent<sup>33</sup> and subsequent publication<sup>32</sup> of Michelakis *et al.* established that DCA is a promising selective anticancer agent.

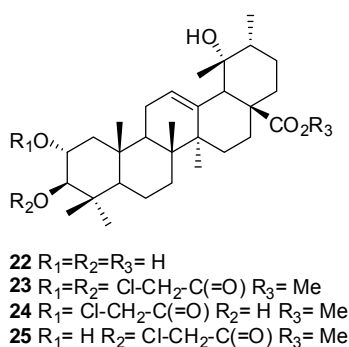
DCA is a highly selective antitumour drug. It is able to target the unique metabolic profile that characterizes most cancers: mitochondrial glucose oxidation. Its effectiveness is explained by its dual mechanism, both of which induce apoptosis: by mitochondrial depolarization and the efflux of pro-apoptotic mediators (proximal pathway) and by an increase in Kv channel expression/function (distal pathway)<sup>32</sup>.

Succeeding studies demonstrated the selectivity and effectiveness of DCA as a promising candidate in antitumour therapy: in endometrial cancer<sup>34</sup>, metastasis breast cancer<sup>35</sup>, prostate cancer<sup>36</sup>, colorectal<sup>37,38</sup>, leukaemia<sup>39</sup>, in glioma stem cells<sup>40</sup>, melanoma<sup>41</sup>, gastric cancer<sup>42</sup> and hepatocellular carcinoma<sup>43</sup>.

DCA has been used for more than 30 years as a drug, so its safety and security is well proved. However, the dose of DCA is rather high and its antitumour activity is still not

good enough. For example, the  $IC_{50}$  value against lung human carcinoma A549 is over  $1000 \mu M^{44}$ . Modifications in the small molecule DCA are needed in order to increase its antitumour activity.

Csuk *et al*<sup>45</sup> designed several molecules where they join the natural activity of tormentic acid (**22**, Figure 15) with that of chloroacetate, a derivative of DCM (**23-25**). These molecules have been assayed against several cell lines. The activity against the breast cancer cell line MCF-7, in which these chloroacetic derivatives were the most active compounds with values of  $IC_{50}$  between  $1.5-6.9 \mu M$ , should be highlighted.

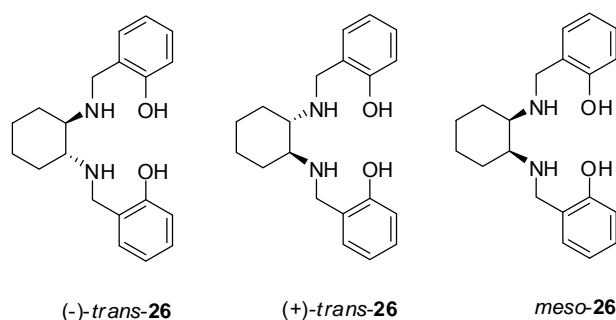


**Figure 15.** Derivatives of chloroacetate with antiproliferative activity.

## 7. Diamines with anticancer activity

Medical interest has focused on macrocyclic polyamines in the last decades because of their chemical and biological properties as antitumour agents. Their antiproliferative activity belongs to their affinity to the DNA<sup>46</sup>.

The diamines represented in Figure 16 showed antiproliferative activity against the MCF-7 cell line<sup>47</sup>.



**Figure 16.** Diamines with antiproliferative activity against the MCF-7 cell line.

Compounds (-)-*trans*, (+)-*trans* and *meso*-**26** induce growth inhibition at submicromolar concentrations. The most active compound (-)-*trans*-**26** shows greater cytotoxic activity toward MCF-7 cells than MCF-10A cells. Real-time RT-PCR analysis demonstrated that (-)-*trans*-**26** is an extremely efficient regulator of the anti-apoptotic genes Bcl-xl, Bcl-2 and cyclin D1. Later studies of the molecule confirm that it also regulates *p53*<sup>48</sup>.



## II. AIMS

The aim of this PhD dissertation is the development of potential anticancer drugs that lack adverse effects with the purpose of obtaining selective drugs for a targeted antitumour therapy. The specific aims are the following:

1. Design of molecules as antitumour drugs with structural diversity.
2. Synthesis of the proposed compounds with their corresponding methodologies.
3. Characterization of the molecules obtained using nuclear magnetic resonance (NMR) techniques and high resolution mass spectroscopy (HRMS) as well as the identification of their H and C atoms, unequivocally, employing two dimensional NMR studies.
4. Biological activity evaluation by: a) antiproliferative studies of all the synthesised derivatives against four different cancer cell lines and b) apoptosis and cell cycle studies in the most active compounds in order to determinate the mechanism by which these compounds exert their antiproliferative effects.
5. Assessment of the qualitative and quantitative structure-activity relationships (QSAR) of the compounds with the establishment of their corresponding QSAR equations in order to know the molecules or parts of the molecules that are essential for the biological activity in order to even design more potent derivatives in the future.
6. *In vivo* drug toxicity studies of selected compounds.
7. Drug distribution analysis of selected compounds in mice by the fluorescence technique.





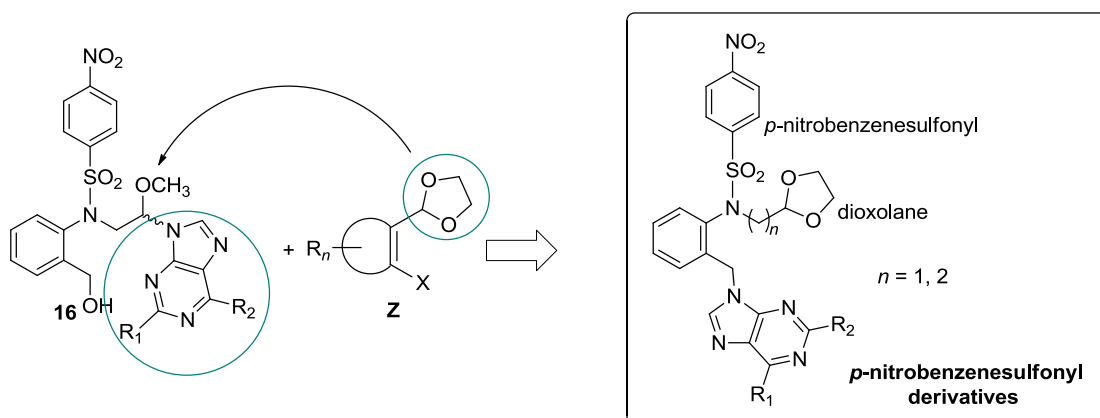
### III. RESULTS AND DISCUSSION

The 27 target compounds obtained are included in three different families of compounds named A, B and C. The design, synthesis, characterization and biological studies for each family of compounds are detailed below.

#### 1. Family A

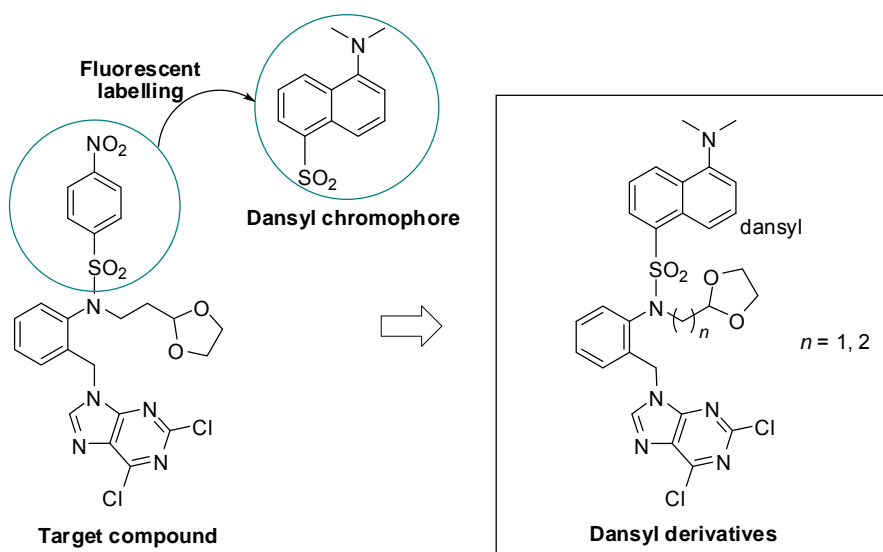
##### 1.1. Molecular design

The design of new acyclic compounds is based on the following modifications of compound **16**: the transition of the purine base to the benzylic carbon and replacement of the *O,N*-acetalic structure for a 1,3-dioxolane group (Scheme 1). We maintain the *p*-nitrobenzenesulfonyl group and we introduce a linker between the sulfonamide and the dioxolane ( $n= 1, 2$ ). We have also included a 5-FU derivative in order to compare their activities.



**Scheme 1.** Design of the *p*-nitrobenzenesulfonyl derivatives of family A. Structure **Z** is included in a patent, showing compounds with antiproliferative activity against cancer cells and cancer stem cells<sup>49</sup> in which the ring is a 4-8 membered partially unsaturated or an aromatic ring,  $n= 0-4$  and  $X= H, F, Cl, Br$  or  $I$ .

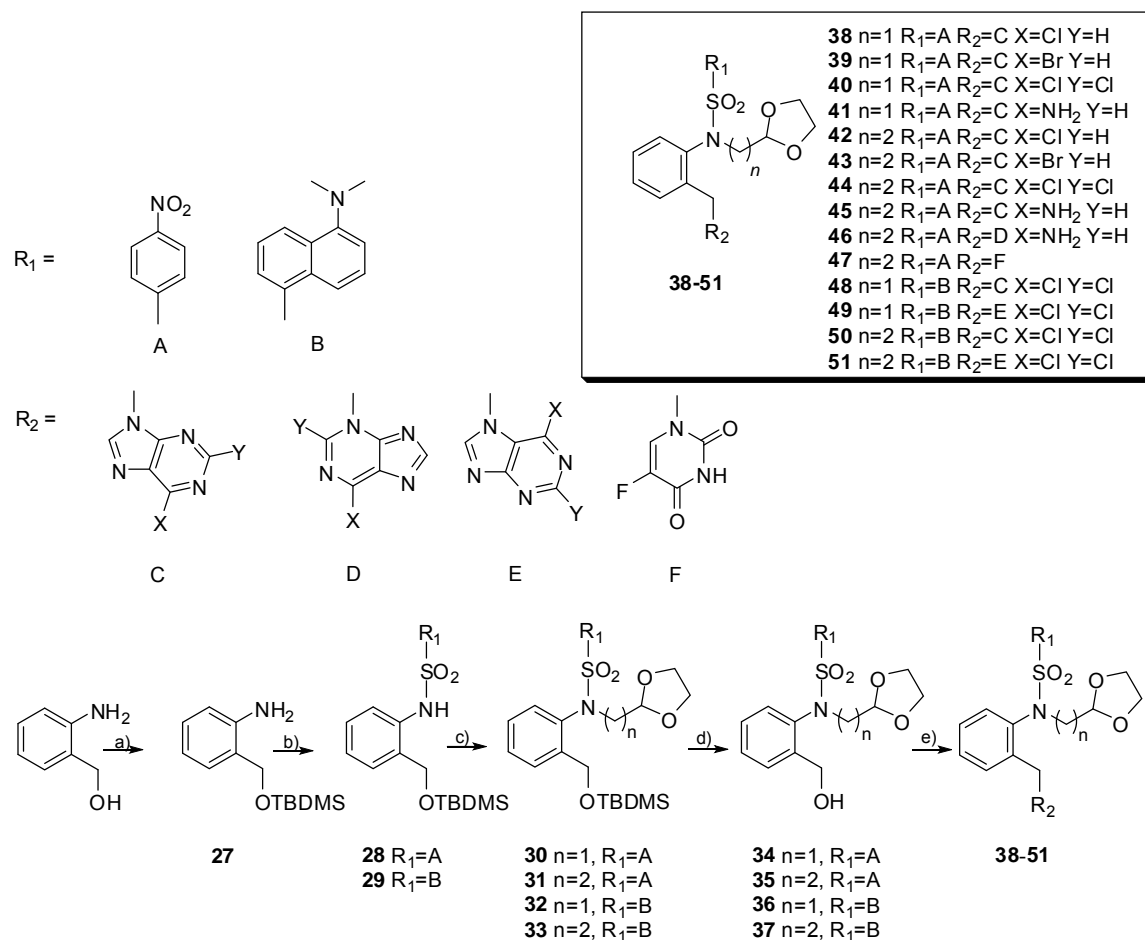
The *p*-nitrobenzenesulfonyl derivative with  $n=2$  and the dichloropurine moiety is the target compound to study the drug distribution *in vivo* by fluorescence technique. Therefore we need to design a fluorescent analogous of the target compound. The *p*-nitrobenzenesulfonyl group was interchanged with the dansyl group as a chromophore because of its similarity (Scheme 2). Moreover, a fluorescence study of some antitumour drugs with a dansyl group in their structure that present no toxicity *in vivo*<sup>50</sup> confirms the employment of this chromophore in the design. We also include the dansyl derivative with  $n=1$  in order to establish their SARs.



**Scheme 2.** Design of the dansyl derivatives of family A.

## 1.2. Chemistry

The target compounds **38-51** are obtained following the synthetic procedure described in Scheme 3.

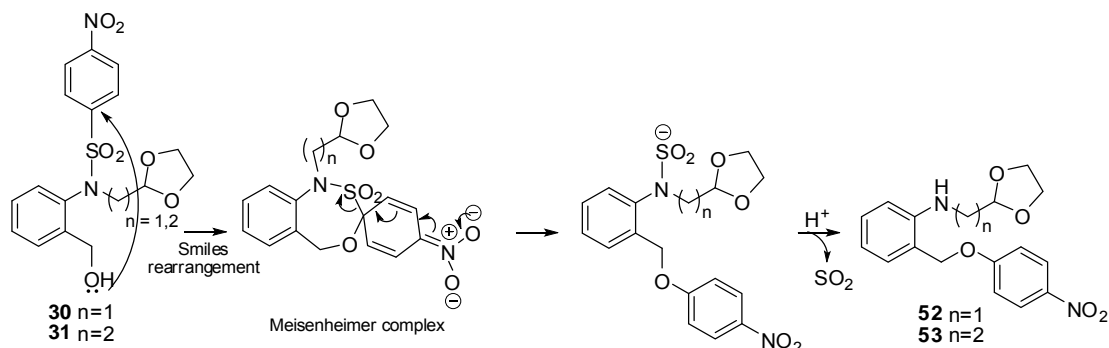


**Scheme 3. Reagents and conditions:** a) TBDMS-Cl, DMAP, Et<sub>3</sub>N, anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 6h (100%). b) *p*NO<sub>2</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>Cl, anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 3h (100% for **28**);Ds-Cl, Et<sub>3</sub>N anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30 °C, 24h (100% for **29**). c) 2-Hydroxymethyl-1,3-dioxolane (for **30** and **32**) or 2-(2-hydroxyethyl)-1,3-dioxolane (for **31** and **33**), DIAD, PPh<sub>3</sub>, anhydrous THF, 30 °C, 21h (84% for **30**, 71% for **31**, 68% for **32** and 91% for **33**). d) TBAF, anhydrous THF, rt, 3h (48% for **34**, 78% for **35**, 100% for **36** and **37**). e) DIAD (1.1 eq for **42**, 2.2 eq for **38-41**, **43-51**), PPh<sub>3</sub> (1.1 eq for **42**, 2.2 eq for **38-41**, **43-51**), anhydrous THF, 140 °C (for **38-43**, **45-47**) or 160 °C (for **44**, **48-51**), MW, 25min (for **38-43**, **45-51**) or 1 h (for **44**) (53% for **38**, 44% for **39**, 53% for **40**, 18% for **41**, 14% for **42**, 32% for **43**, 32% for **44**, 48% for **45**, 25% for **46**, 17% for **47**, 62% for **48**, 13% for **49**, 75% for **50**, and 7% for **51**).

Compounds **27-29** were synthesised as previously described<sup>51</sup>.

When **30** and **31** are treated with tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in anhydrous THF to allow the de-protected compounds **34** and **35**, by-products (**52** and **53**) are also obtained in smaller yields, respectively (Scheme 4). Compounds **52** and **53** are the result of a Smiles rearrangement<sup>52</sup>, in which the *p*-nitrophenyl group migrates to the hydroxyl group (Scheme 4). Despite the fact that the spiro complexes of the

mononitro derivatives have been less documented than the spiro Meisenheimer complexes of the polinitro benzene derivatives, we proposed the formation of a mononitro complex as Zerner *et al.* demonstrated<sup>53</sup>.



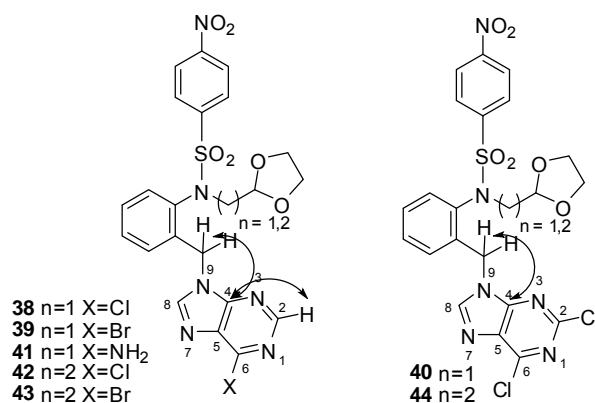
**Scheme 4.** Proposed mechanism for the formation of the by-products **52** and **53**.

The target compounds **38-51** were obtained by microwave-assisted Mitsunobu reaction. Microwave-assisted organic synthesis is becoming instrumental for the rapid synthesis of drugs. In general, it allows not only the decrease of reaction time but also improves the reaction yields with the increase of temperature and pressure of this non-classical method.

### 1.3. Spectroscopic analysis

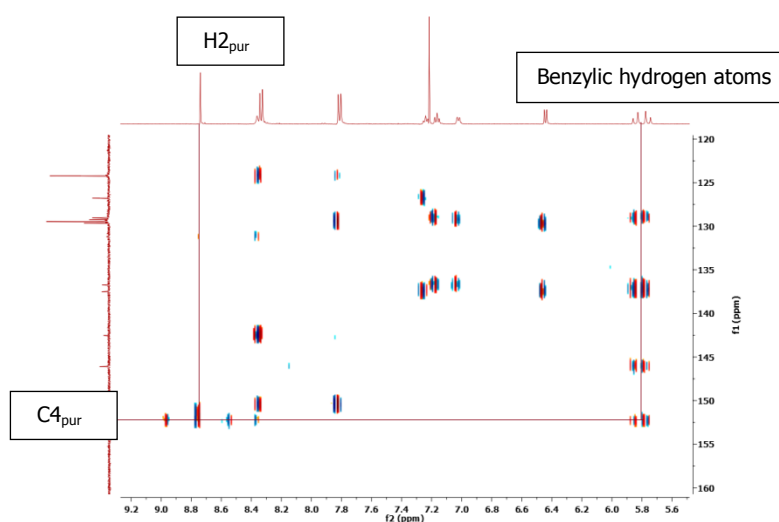
The compounds **27-53** have been identified by NMR-spectroscopy and high resolution mass spectroscopy. The two dimensional NMR studies heteronuclear single quantum correlation (HSQC) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) have been employed in **29-53** to the unequivocally identification of each atom of H and C.

The identification of *N*-9 substituted derivatives **38-44** relies on the observation of the correlation of the benzylic hydrogen atoms linked to the purine with the C4 of the purine moiety in the HMBC spectrum. The C4 of the purine moiety can be identified due to its 1,3-relationship with the H2 atom of the purine ring (Scheme 5) in **38**, **39**, **41**, **42** and **43**.



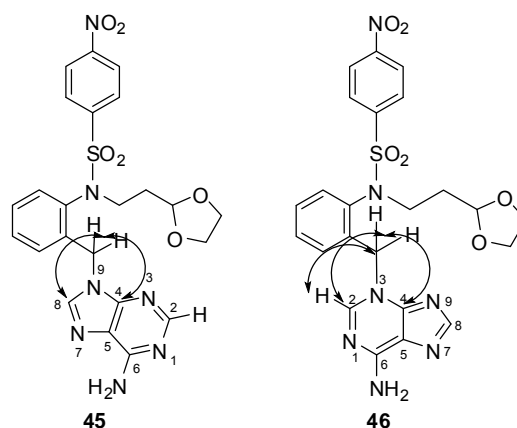
**Scheme 5.** The HMBC interactions in the *N*-9 regioisomers **38-44**.

As an example, the interactions in the HMBC spectrum of compound **42** are shown in Figure 17.



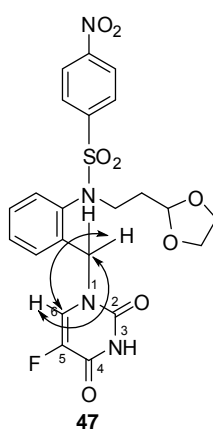
**Figure 17.** The HMBC spectrum of **42**.

The discrimination between the *N*-9- and *N*-3-substituted derivatives of adenine (**45** and **46** respectively) relies on the observation of the connection between the benzylic hydrogen atoms linked to the adenine and the quaternary carbons of the adenine moiety:  $C_{2_{pur}}$ ,  $C_{4_{pur}}$  and  $C_{8_{pur}}$  (Scheme 6). While the benzylic hydrogen atoms are correlated with  $C_{4_{pur}}$  and  $C_{8_{pur}}$  in the *N*-9 regioisomer, the benzylic hydrogen atoms are correlated with  $C_{2_{pur}}$  and  $C_{4_{pur}}$  in the *N*-3 regioisomer.

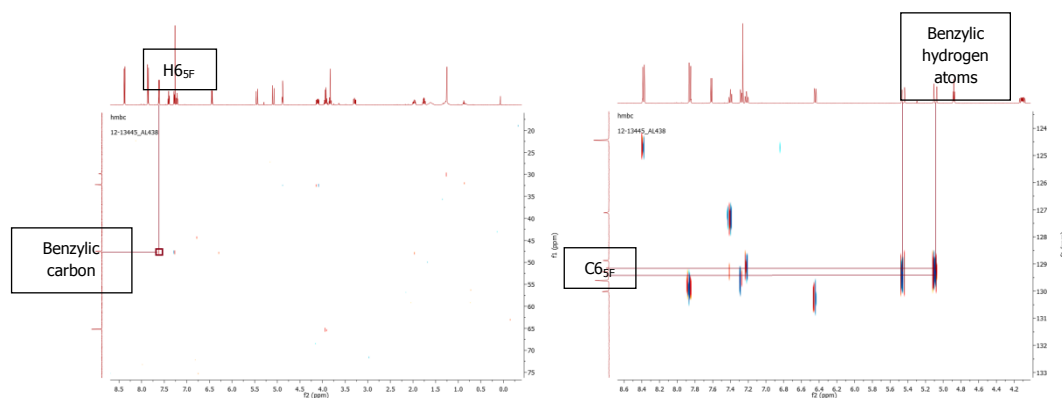


**Scheme 6.** The HMBC interactions in the *N*-9 (**45**) and *N*-3 (**46**) adenine regioisomers.

The identification of the *N*-1 5-FU regioisomer **47** relies on the 1,3-relationship between the benzylic hydrogen atoms linked to the 5-FU and the C6 of 5-FU moiety, and *viceversa*, the H6 of 5-FU moiety and the benzylic carbon (Scheme 7, Figure 18).



**Scheme 7.** The HMBC interactions in the *N*-1 5-FU (**47**) regioisomer.

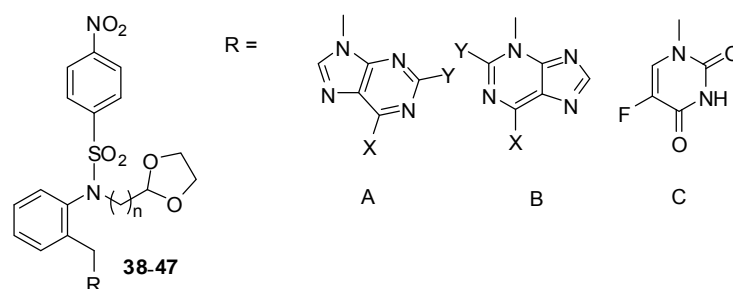


**Figure 18.** The HMBC spectrum of **47**.

## 1.4. Biological activities

### 1.4.1. Antiproliferative activities

The effects on cell proliferation were investigated on the human breast cancer cell line MCF-7, human colon carcinoma cell line HCT-116 and the human malignant melanoma cell lines A375 and G361. The antiproliferative activities for **38-47** against the four tumour cell lines are shown in Table 1 in  $\mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol/l}$ ) unit.



Comp.	<i>n</i>	R	X	Y	Isom	MCF-7 (IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$ )	HCT-116 (IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$ )	A375 (IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$ )	G361 (IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$ )
<b>38</b>	1	A	Cl	H	<i>N</i> -9	12.20 $\pm$ 0.08	3.100 $\pm$ 0.030	0.663 $\pm$ 0.018	1.453 $\pm$ 0.003
<b>39</b>	1	A	Br	H	<i>N</i> -9	12.10 $\pm$ 0.03	3.060 $\pm$ 0.020	1.371 $\pm$ 0.039	1.238 $\pm$ 0.003
<b>40</b>	1	A	Cl	Cl	<i>N</i> -9	1.170 $\pm$ 0.028	15.87 $\pm$ 0.03	1.329 $\pm$ 0.016	1.295 $\pm$ 0.005
<b>41</b>	1	B	NH <sub>2</sub>	H	<i>N</i> -9	15.15 $\pm$ 0.04	13.68 $\pm$ 0.04	6.549 $\pm$ 0.058	6.841 $\pm$ 0.004
<b>42</b>	2	A	Cl	H	<i>N</i> -9	2.200 $\pm$ 0.050	2.620 $\pm$ 0.050	0.340 $\pm$ 0.009	0.747 $\pm$ 0.003
<b>43</b>	2	A	Br	H	<i>N</i> -9	3.260 $\pm$ 0.040	2.690 $\pm$ 0.060	0.557 $\pm$ 0.090	1.225 $\pm$ 0.003
<b>44</b>	2	A	Cl	Cl	<i>N</i> -9	3.010 $\pm$ 0.008	4.110 $\pm$ 0.001	0.134 $\pm$ 0.033	0.836 $\pm$ 0.010
<b>45</b>	2	B	NH <sub>2</sub>	H	<i>N</i> -9	17.22 $\pm$ 0.02	21.3 $\pm$ 0.04	6.823 $\pm$ 0.045	6.352 $\pm$ 0.004
<b>46</b>	2	B	NH <sub>2</sub>	H	<i>N</i> -3	12.57 $\pm$ 0.03	13.6 $\pm$ 0.04	5.349 $\pm$ 0.014	5.777 $\pm$ 0.003
<b>47</b>	2	C			<i>N</i> -1	27.30 $\pm$ 0.08	20.28 $\pm$ 0.10	11.23 $\pm$ 0.02	10.66 $\pm$ 0.005

**Table 1.** The antiproliferative activities of the *p*-nitrobenzenesulfonyl derivatives against the MCF-7, HCT-116, A375 and G361 cell lines.

The IC<sub>50</sub> values of compounds with *n* = 2 (**42-44**) are better than the ones of compounds with *n* = 1 (**38-40**). That could be attributed to the increase of lipophilicity.

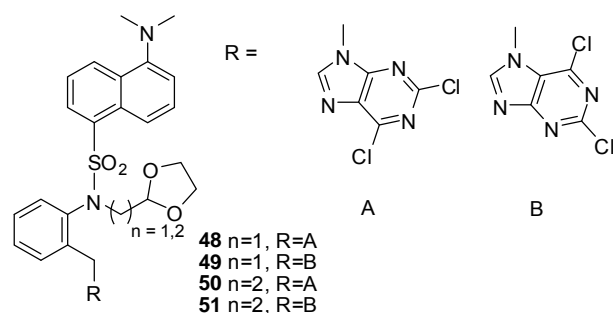
The most active compounds against all cell lines assayed are the bromo, chloro and dichloropurine derivatives (**38-40, 42-44**), as has been previously reported<sup>21</sup>. The *N*-



3 adenine isomer (**46**) is slightly more active than the *N*-9 one (**45**). 5-FU derivative (**47**) is the least active as antiproliferative agent against all the cell lines.

It should be pointed out that all the target compounds show higher antiproliferative activity against human melanoma cell lines with sub-micromolar  $IC_{50}$  values. Compound **44** is the best antiproliferative agent of these *p*-nitrobenzenesulfonyl derivatives with an  $IC_{50}$  of 134 nM against the A375 cell line.

The antiproliferative activities for the compounds **48-51** against the MCF-7 and HCT-116 human cell lines are shown in Table 2.



Compound	<i>n</i>	R	Isomer	MCF-7 ( $IC_{50}$ $\mu$ M)	HCT-116 ( $IC_{50}$ $\mu$ M)
<b>48</b>	1	A	<i>N</i> -9	10.40 $\pm$ 0.03	2.910 $\pm$ 0.013
<b>49</b>	1	B	<i>N</i> -7	2.170 $\pm$ 0.070	1.280 $\pm$ 0.001
<b>50</b>	2	A	<i>N</i> -9	2.610 $\pm$ 0.040	2.290 $\pm$ 0.020
<b>51</b>	2	B	<i>N</i> -7	1.930 $\pm$ 0.030	3.300 $\pm$ 0.005

**Table 2.** The antiproliferative activities of dansyl derivatives against the MCF-7 and the HCT-116 cell lines.

Dansyl derivatives (**48-51**) are also potent antiproliferative agents against MCF-7 y HCT-116 cell lines with  $IC_{50}$  values between 1 – 3  $\mu$ M, with the exception of **48** against the MCF-7 cell line ( $IC_{50}$ = 10.40  $\mu$ M).

### 1.4.2. Cell-cycle analysis

The effects on cell cycle distribution of the most active compounds (**38-40**, **42-44**) were analysed by flow cytometry for 24 and 48h at  $3 \cdot IC_{50}$  in A375 cell line (Table 3).

	Control	38	39	40	42	43	44
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	40.55 ± 0.70	47.42 ± 3.46	33.69 ± 4.34	40.22 ± 1.28	28.25 ± 3.02	26.38 ± 1.80	38.68 ± 2.55
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	8.71 ± 0.93	10.62 ± 1.23	26.60 ± 1.15	9.93 ± 0.93	34.40 ± 1.84	37.27 ± 1.94	21.36 ± 1.53
<b>S</b>	50.75 ± 0.23	41.96 ± 2.23	39.72 ± 5.49	49.86 ± 0.35	37.26 ± 1.33	36.35 ± 3.73	40.16 ± 0.73
*24 h of treatment							
	Control	38	39	40	42	43	44
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	40.86 ± 1.14	34.23 ± 0.69	39.88 ± 4.62	42.79 ± 0.91	41.19 ± 2.43	41.09 ± 0.50	32.78 ± 2.87
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	19.75 ± 0.67	24.32 ± 0.38	20.34 ± 17.40	19.80 ± 0.88	38.00 ± 4.04	32.88 ± 10.89	15.31 ± 2.14
<b>S</b>	39.37 ± 0.47	41.46 ± 1.07	39.78 ± 12.77	37.42 ± 0.03	20.82 ± 6.47	26.03 ± 10.39	49.43 ± 1.49
*48 h of treatment							

**Table 3.** The cell cycle distribution in the A375 cancer cell line after treatment for 24 and 48 h for the six most active compounds **38-40** and **42-44** as antiproliferative agents ( $3 \times IC_{50}$ ).

Compounds **39** and **42-44** provoked a G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest at the expense of the other two phases (26.60 %, 34.40 %, 37.27 % y 21.36 % respectively in contrast to 8.71 % of the control).

### 1.4.3. Apoptosis assay

The effects of the most active compounds (**38-40**, **42-44**) on apoptosis in the A375 cell line were analysed by flow cytometry after 24 and 48 h of treatment, in order to study the mechanisms of their antitumour activity. The results are shown in Table 4.

	Control	38	39	40	42	43	44
<b>N</b>	0.45 ± 0.21	0.15 ± 0.07	1.45 ± 0.35	0.15 ± 0.07	0.10 ± 0.00	26.38 ± 1.80	0.45 ± 0.07
<b>ESA</b>	2.85 ± 0.35	30.30 ± 3.82	35.35 ± 4.17	8.85 ± 1.63	67.10 ± 1.41	71.25 ± 4.03	31.42 ± 0.59
<b>LSA</b>	4.30 ± 0.14	4.20 ± 0.71	36.45 ± 5.44	2.45 ± 0.21	8.80 ± 2.12	13.30 ± 6.22	30.35 ± 0.35
*24 h of treatment							
	Control	38	39	40	42	43	44
<b>N</b>	0.40 ± 0.14	0.95 ± 0.21	4.50 ± 0.14	0.35 ± 0.07	2.40 ± 0.14	2.25 ± 0.49	1.60 ± 0.28
<b>ESA</b>	2.80 ± 0.42	13.20 ± 1.41	5.85 ± 0.49	2.15 ± 0.07	26.00 ± 0.14	25.45 ± 1.34	5.50 ± 0.57
<b>LSA</b>	2.70 ± 0.28	7.30 ± 0.99	65.25 ± 0.21	1.70 ± 0.28	56.95 ± 4.88	58.05 ± 2.75	25.2 ± 1.13
*48 h of treatment							

**Table 4.** Apoptosis induction in the A375 cell line after treatment for 24 and 48 h ( $3 \times IC_{50}$ ). N= Necrosis, ESA= Early-stage apoptosis, LSA= Late-stage apoptosis.

The most apoptotic compounds are **42-44**, that are also the most active as antiproliferative agents.

#### 1.4.4. *In vivo* toxicity

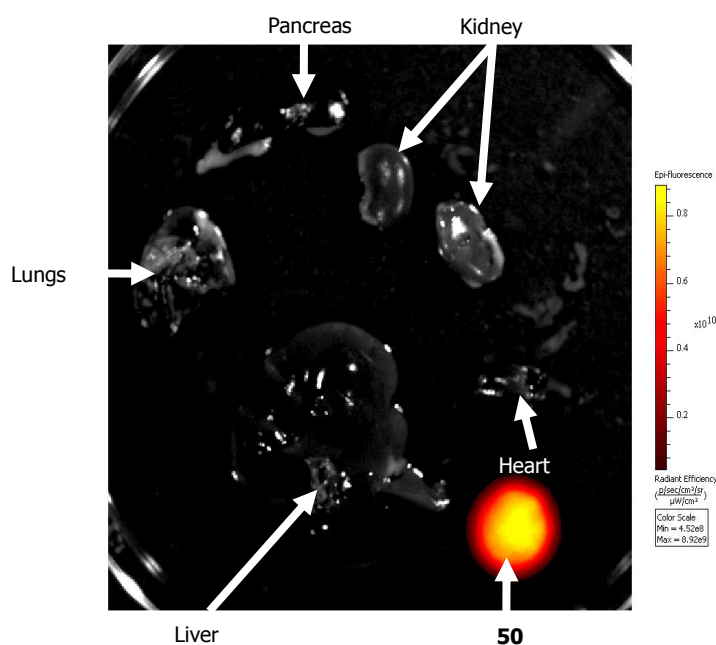
Toxicity was determined selecting the most active compound (**44**) that presents an  $IC_{50}$  value of  $0.134 \mu\text{M}$  against the A375 cells. Its fluorescence analogous **50** was studied too.

We examined the acute-toxicity profile of **44** and **50** in BALB/c mice when it was administrated in a single oral bolus ( $n= 40$ ) at doses levels of 50-250 mg/kg for a week. Compounds **44** and **50** were nontoxic even at the highest bolus dose of 250 mg/kg after 2 weeks. All the 40 **44**-treated and **50**-treated mice remained healthy throughout the 14-day observation period with no evidence of morbidity.

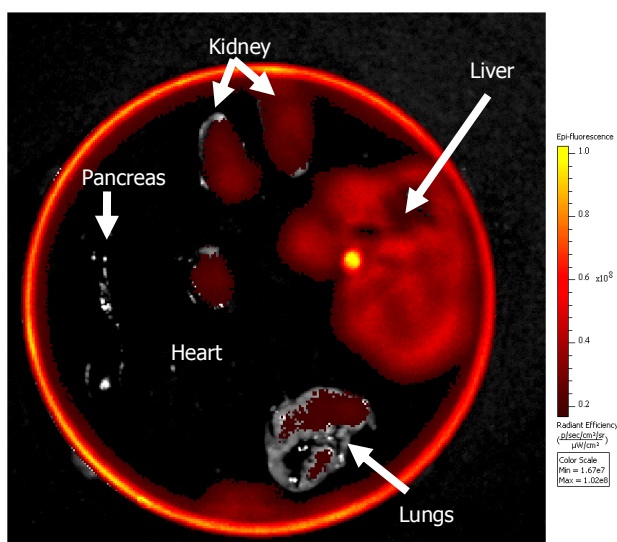
#### 1.4.5. Drug distribution study

Fluorescence lifetime imaging microscopy has been shown to be a useful tool in studying drug distribution in biological tissues<sup>54</sup>. Herein, we have investigated the *in vivo* distribution of **50**, which is the fluorescent analogous of **44**, in mice organs and tissues. Control mice were treated with **44**.

Fluorescence intensity was high in all organs and tissues of mice treated with **50**, with the exception of pancreas and lungs (Figure 20). Fluorescence intensity is not detected in mice treated with **44** (Figure 19).



**Figure 19.** *In vivo* distribution study of **44**.



**Figure 20.** *In vivo* distribution study of **50**.

Our results confirm that the drug is absorbed by the oral route of administration with systemic distribution. Furthermore the drug accumulates mainly in liver and kidney, the organs associated to drug metabolism and excretion, respectively.

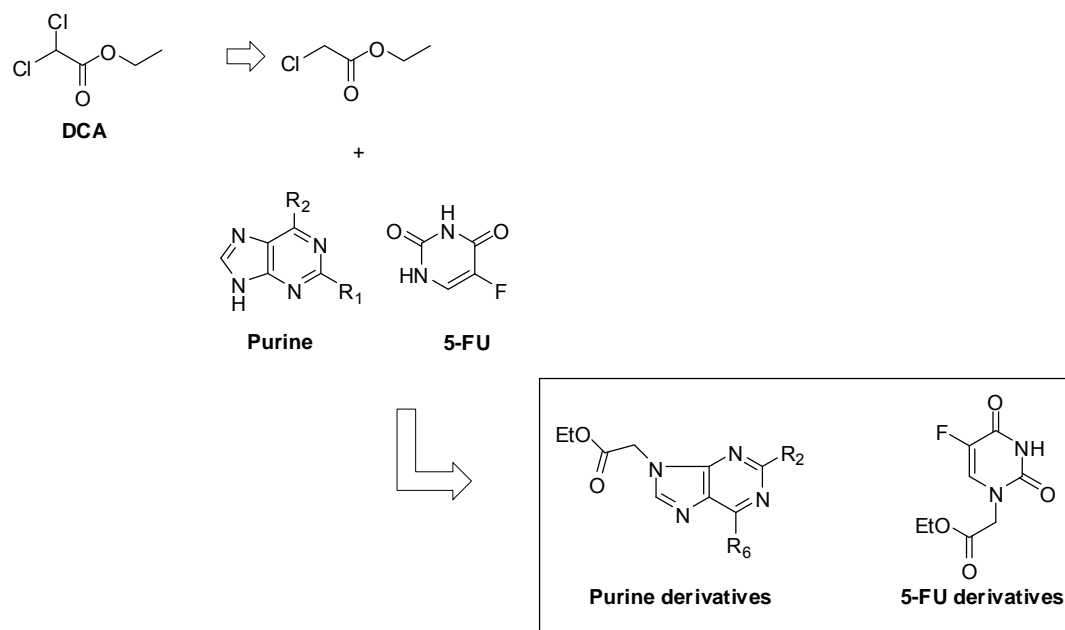
## 2. Family B

### 2.1. Molecular design

DCA has been used for decades in the treatment of lactic acidosis. A patent<sup>33</sup> in 2006 made DCA an attractive candidate for pro-apoptotic cancer therapy<sup>32</sup>.

We have demonstrated that purine derivatives show higher potency as antiproliferative agents than the pyrimidine ones<sup>22</sup>. In recent years, purine bases have been the subject of extensive research that led to the discovery of thousands of biological active compounds including antineoplastic ones<sup>55</sup>.

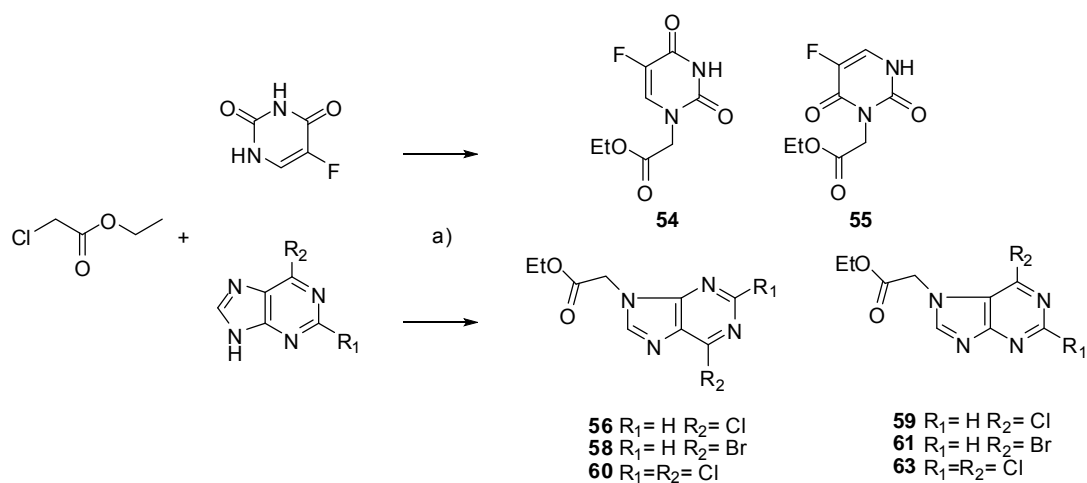
Therefore, we have connected the purine bases 6-chloropurine, 6-bromopurine or 2,6-dichloropurine to the ethyl acetate moiety, which is related to DCA (Scheme 8). We also include the 5-FU derivatives in order to compare their biological activities to the purine ones.



**Scheme 8.** Molecular design of family B derivatives.

## 2.2. Chemistry

Compounds **54-61** are obtained as shown in Scheme 9.



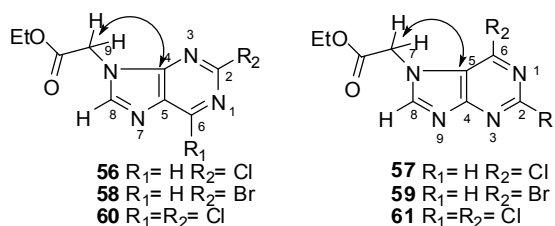
**Scheme 9.** Reagents and conditions: a)  $Et_3N$ ,  $H_2O$ ,  $105\text{ }^\circ C$ , MW, 8 min (13 % for **54**, 6 % for **55**, 24 % for **56**, 12 % for **57**, 28 % for **58**, 9 % for **59**, 40 % for **60**, 15 % for **61**).

The target compounds are prepared using the rapid, convenient and green protocol previously reported for the synthesis of **56** and **60**<sup>56</sup>. The nucleophilic substitution assisted by microwave irradiation of ethyl chloroacetate using water as solvent affords **54-61**.

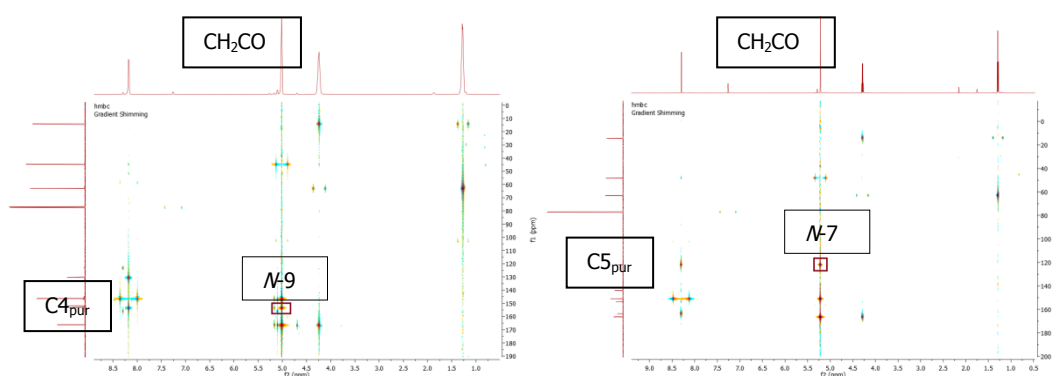
### 2.3. Spectroscopic analysis

Compounds **54-61** have been identified by NMR-spectroscopy and high resolution mass spectroscopy. The two dimensional NMR studies HSQC and HMBC have been employed for the unequivocally identification of each atom of H and C.

The discrimination between the *N*-9 and *N*-7 substituted purine derivatives (**56-61**) relies on the observation of the 1,3-relationship between the hydrogen atoms of the carbon linked to the purine and the quaternary carbons of the purine moiety: C4<sub>pur</sub> and C5<sub>pur</sub> in the HMBC spectrum (Figure 21). While these hydrogen atoms are correlated with C4<sub>pur</sub> in the *N*-9 regioisomers, they are correlated with C5<sub>pur</sub> in the *N*-7 regioisomers (Scheme 10).

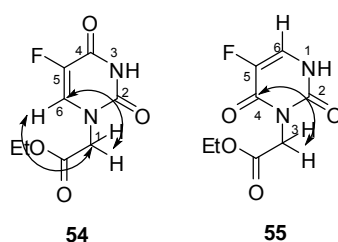


**Scheme 10.** The HMBC interactions that discriminate *N*-9 (**56**, **58** and **60**) and *N*-7 (**57**, **59** y **61**) purine regioisomers.



**Figure 21.** The HMBC spectrum of the *N*-9 (**60**) and *N*-7 (**61**) 2,6-dichloropurine isomers.

In the 5-FU derivatives, the identification of the *N*-1 isomer (**54**) relies on the observation of the 1,3-connection between the hydrogen atoms of the carbon linked to the 5-FU and the sole tertiary carbon of the 5-FU moiety (C6<sub>5FU</sub>) and the opposite connection: H6<sub>5FU</sub> and the carbon linked to the 5-FU (Scheme 11) in the HMBC spectrum. These correlations do not exist in its isomer *N*-3 (**55**). The correlation in **55** appears between the hydrogen atoms of the carbon linked to the 5-FU and C4<sub>5FU</sub>.

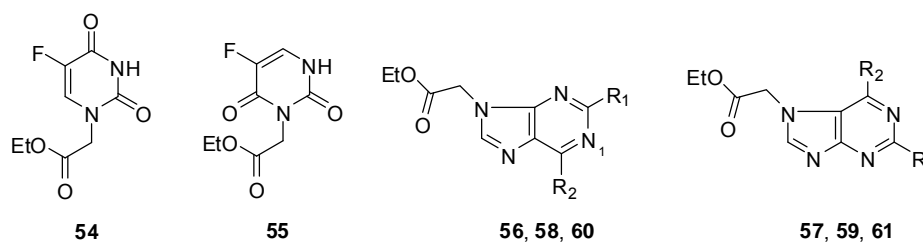


**Scheme 11.** The HMBC interactions that discriminate *N*-1 (**54**) and *N*-3 (**55**) 5-FU derivatives.

## 2.4. Biological activities

### 2.4.1. Antiproliferative activities

The antiproliferative activities against the MCF-7, HCT-116, A375 and G361 cancerous cell lines for the target compounds are shown in Table 5 (IC<sub>50</sub> μM).



Compound	Isomer	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MCF-7 (IC <sub>50</sub> μM)	HCT-116 (IC <sub>50</sub> μM)	A375 (IC <sub>50</sub> μM)	G361 (IC <sub>50</sub> μM)
<b>54</b>	<i>N</i> -1	-	-	25.20 ± 0.03	24.56 ± 0.01	38.37 ± 0.06	29.03 ± 0.01
<b>55</b>	<i>N</i> -3	-	-	30.48 ± 0.03	22.64 ± 0.01	50.92 ± 0.13	25.35 ± 0.01
<b>56</b>	<i>N</i> -9	H	Cl	35.06 ± 0.03	5.270 ± 0.040	18.862 ± 0.092	21.42 ± 0.01
<b>57</b>	<i>N</i> -7	H	Cl	49.82 ± 0.03	68.00 ± 0.04	14.46 ± 0.12	21.41 ± 0.01
<b>58</b>	<i>N</i> -9	H	Br	14.10 ± 0.07	23.46 ± 0.04	13.45 ± 0.03	15.76 ± 0.01
<b>59</b>	<i>N</i> -7	H	Br	20.17 ± 0.06	55.70 ± 0.04	26.74 ± 0.01	18.26 ± 0.01
<b>60</b>	<i>N</i> -9	Cl	Cl	3.930 ± 0.035	6.200 ± 0.046	1.178 ± 0.028	3.058 ± 0.006
<b>61</b>	<i>N</i> -7	Cl	Cl	5.630 ± 0.029	6.360 ± 0.059	4.984 ± 0.074	5.688 ± 0.007

**Table 5.** The antiproliferative activities of **54-61** against the MCF-7, HCT-116, A375 y G361 cell lines.

The 2,6-dichloropurine derivatives (**60** and **61**) are the most active compounds showing single-digit micromolar  $IC_{50}$  values against all the assayed cell lines. The *N*-9 derivative (**60**) presents improved activities in all the cancerous cell lines than its *N*-7 regioisomer (**61**).

In general, the *N*-9 purine derivatives present higher activity than the one of their *N*-7 regioisomers except in the case of the 6-chloropurine derivatives (**56** and **57**). In compounds **56** and **57** this tendency is reversed against the MCF-7 and HCT-116 cell lines and both regioisomers are equally potent in inhibiting the growth of both melanoma cancer cells.

The 5-FU derivatives present intermediate potencies ( $IC_{50}$ = 22 and 50  $\mu$ M), being the *N*-1 isomer (**54**) more active than *N*-3 (**55**) against MCF-7 and A375, except in the case of the HCT-116 and G361 cell lines.

#### 2.4.2. QSAR studies

Correlations 1 and 2 show the antiproliferative activities of the target compounds against the melanoma cell lines (A375 and G361) and the  $\log P$  values of **54-61**. Such  $\log P$  values are calculated using the PALLAS programme<sup>57</sup>.

$$\begin{aligned} \text{Correlation 1:} \quad & p(IC_{50})_{A375} = 4.40 (\pm 0.12) + 0.85 (\pm 0.15) \log P \\ & n = 8, r = 0.920, s = 0.224, F_{1,5} = 32.96, p < 0.005 \end{aligned}$$

where  $p(IC_{50})_{A375} = -\log (IC_{50})_{A375}$ , bearing in mind that the higher the value of  $p(IC_{50})_{A375}$  the more potent is the compound,  $n$  is the number of compounds,  $r$  is the correlation coefficient,  $s$  is the standard deviation, data within parentheses are standard errors of estimate, and  $F_{1,5}$  is the Fisher test ( $p < 0.005$ ).

$$\begin{aligned} \text{Correlation 2:} \quad & p(IC_{50})_{G361} = 4.55 (\pm 0.08) + 0.55 (\pm 0.10) \log P \\ & n = 8, r = 0.920, s = 0.159, F_{1,5} = 27.12, p < 0.005 \end{aligned}$$

No correlation is obtained for the antiproliferative activity of **54-61** and their  $\log P$  values ( $r = 0.631$  against MCF-7 and  $r = 0.353$  against HCT-116).



### 2.4.3. Cell-cycle analysis

The effects on cell cycle distribution of the most active compounds (**60** and **61**) were analysed by flow cytometry (Tables 6, 7 and 8).

MCF-7 cells treated for 24 h with **60** and **61** did not show significant differences in the cell cycle progression compared with DMSO-treated control cells. We found a slight cell cycle arrest in the G<sub>2</sub>/M and S-phases induced by **60** ( $54.63 \pm 1.18$ ) and **61** ( $18.27 \pm 0.79$ ) respectively (Table 6).

Compound	Cell cycle		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	$34.58 \pm 0.09$	$14.50 \pm 1.06$	$50.91 \pm 1.15$
<b>60</b>	$28.17 \pm 1.37$	$15.39 \pm 0.68$	$54.63 \pm 1.18$
<b>61</b>	$34.54 \pm 0.08$	$18.27 \pm 0.79$	$47.19 \pm 0.89$

**Table 6.** The cell cycle distribution in the MCF-7 cancer cell line after treatment for 24 h for the two most active compounds **60** and **61** as antiproliferative agents.

In the HCT-116- and A375-treated cells, **60** did not modify the cell cycle profile and **61** provoked a G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest ( $28.47 \pm 0.07$ ) at the expense of the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase ( $33.58 \pm 1.90$ ) in the colon cancer cells and accumulated the A375 melanoma cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase ( $70.55 \pm 1.47$ ) at the expense of both G<sub>2</sub>/M and S phases ( $20.10 \pm 0.75$  and  $9.34 \pm 0.62$ , respectively) (Tables 7 and 8).

Compound	Cell cycle		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	$44.70 \pm 0.38$	$38.26 \pm 1.40$	$17.02 \pm 1.40$
<b>60</b>	$45.93 \pm 1.11$	$36.75 \pm 0.70$	$17.31 \pm 0.44$
<b>61</b>	$33.58 \pm 1.90$	$37.93 \pm 1.92$	$28.47 \pm 0.07$

**Table 7.** The cell cycle distribution in the HCT-116 cancer cell line after treatment with **60** and **61** for 24 h.

Compound	Cell cycle		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	57.97 ± 0.93	29.60 ± 0.78	12.42 ± 0.70
<b>60</b>	58.48 ± 1.03	28.78 ± 0.26	12.73 ± 0.77
<b>61</b>	70.55 ± 1.47	20.10 ± 0.75	9.34 ± 0.62

**Table 8.** The cell cycle distribution in the A375 cancer cell line after treatment with **60** and **61** for 24 h.

#### 2.4.4. Apoptosis assay

The effects of the most active compounds (**60** and **61**) on apoptosis in the MCF-7, HCT-116 and A375 cell lines were analysed by flow cytometry, in order to study the mechanisms of their antitumour activity. The results are shown in Table 9.

Compound	Apoptosis		
	MCF-7	HCT-116	A375
<b>Control</b>	10.80 ± 0.85	7.27 ± 1.57	6.83 ± 0.40
<b>60</b>	20.53 ± 0.91	20.20 ± 3.18	35.37 ± 0.47
<b>61</b>	24.10 ± 4.37	17.03 ± 1.00	27.13 ± 3.07

**Table 9.** Apoptosis induction in the MCF-7, HCT-116 y A375 cell lines after treatment for 24 h for the two most active compounds **60** and **61** as antiproliferative agents.

Although compounds **60** and **61** show different cell cycle profiles that are dependent upon the cell line studied, they induce high levels of apoptosis at 24 h in all cancer cells in comparison with DMSO-treated cell cultures (Table 7). This apoptosis is induced even in the MCF-7 breast cancer cells that have shown deficiency in the caspase-activation mechanisms<sup>58</sup>.

Interestingly, **60** is the most apoptotic compound against the A375 melanoma cell line ( $35.37 \pm 0.47$ ), where no modification in the cell cycle is found. This effect could be explained by a preferentially apoptotic mechanism of action.

Moreover, the fact that **61** gather cells at  $G_2/M$  and  $G_0/G_1$  phases respectively in the colon and melanoma cancer cells accompanied by high levels of programmed death cell indicates that this compound has different cytotoxic effects on each tumour cell type.

### 3. Family C

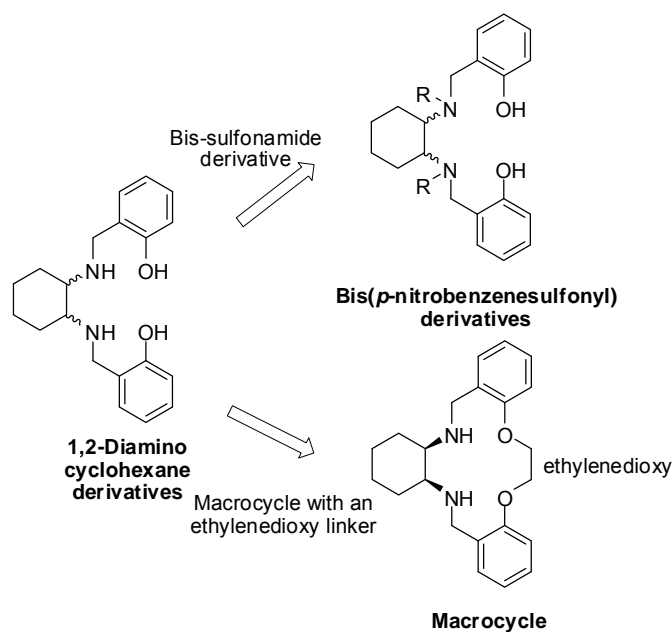
#### 3.1. Molecular design

1,2-Diamines possess a wide range of bioactivities, such as anticancer ones (see compounds (-)-*trans*-, (+)-*trans*- and *meso*-**26** in chapter I.7.). The amine groups are useful for modulating the solubility of the drug as well as for donating or accepting hydrogen bonds to and from a biological receptor. Moreover, 1,2-diamines can easily be converted into five- and six-membered rings that provide entropic advantages for binding to the biological target<sup>59</sup>.

Macrocyclic compounds (12-membered rings or bigger) represent a structural class with exceptional potential for biological activity and specificity<sup>60</sup>. Nowadays, there are more than 100 marketed macrocycle drugs that included antitumour drugs<sup>61</sup>.

Benzenesulfonamides also show anticancer activity through a variety of mechanism such as cell cycle perturbation on the  $G_1$  phase, the disruption of microtubule assembly or angiogenesis inhibition<sup>62</sup>.

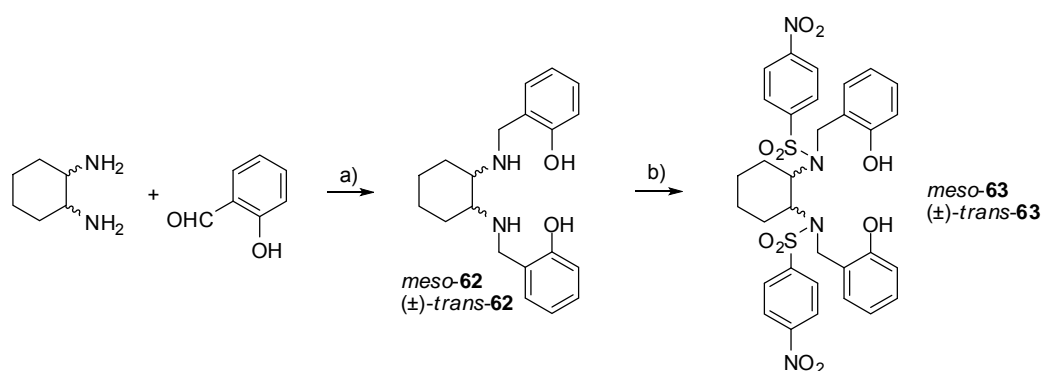
We designed this family of compounds in order to study the influence of two structural modifications in the 1,2-diaminocyclohexane derivative (**26**): the introduction of a *p*-nitrobenzenesulfonyl group and its conversion into a macrocycle (Scheme 12). Compounds **26** [(-)-*trans*-, (+)-*trans*- and *meso*-] have been renumbered as **62** [(±)-*trans*- and *meso*-] to maintain consistency with the tags of the remaining members of the family C.



**Scheme 12.** Molecular design of the proposed structures of family C.

### 3.2. Synthesis

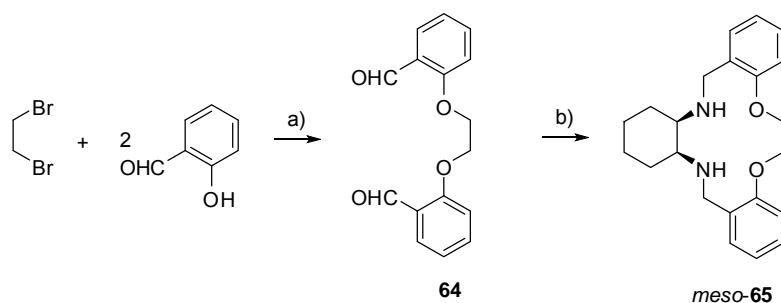
The synthesis of the *p*-nitrobenzenesulfonyl derivatives *meso*- and ( $\pm$ )-*trans*-**63** is detailed in Scheme 13.



**Scheme 13.** Reagents and conditions: a)  $\text{Et}_3\text{N}$ /  $\text{EtOH}$ , rt, 48h;  $\text{NaBH}_4$ , rt, 4 h [100 % for *meso*-**62**, 41 % for ( $\pm$ )-*trans*-**62**]. b)  $p\text{NO}_2\text{-Ph-SO}_2\text{Cl}$ , anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 4.5 h [63 % for *meso*-**63** and 23 % for ( $\pm$ )-*trans*-**63**].

The yield for the synthesis of *meso*-**62** was improved from that described<sup>47</sup> by increasing the reaction time during the reductive amination.

The *meso*-macrocycle **65** is obtained in two steps (Scheme 14):



**Scheme 14.** *Reagents and conditions:* a) NaOH 2%/ EtOH, reflux, 72 h (27 %). b) *meso*-1,2-diaminocyclohexane, MeOH, reflux, 5h; NaBH<sub>4</sub>, 50 °C, 3.5 h (38 %).

The macrocycle *meso*-**65** is isolated pure without further purification.

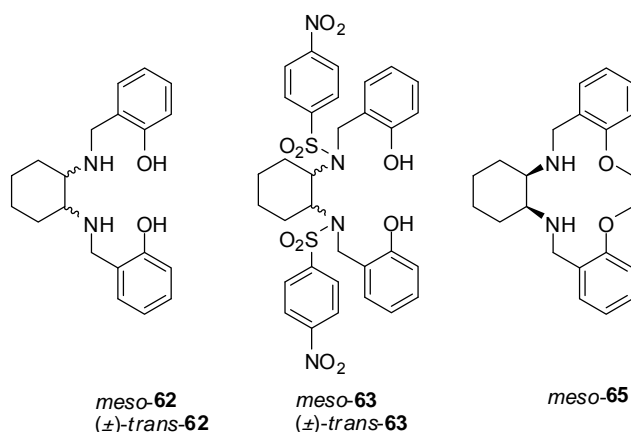
### 3.3. Spectroscopic analysis

Compounds **62-65** have been identified by NMR-spectroscopy and high resolution mass spectroscopy. Each atom of H and C of compounds *meso*-**63**, ( $\pm$ )-*trans*-**63** and *meso*-**65** has been unequivocally identified by the two-dimensional NMR techniques HSQC and HMBC.

### 3.4. Biological activities

#### 3.4.1. Antiproliferative activities

Compounds **62**, **63** and **65** were assayed for their *in vitro* antiproliferative activities against the MCF-7, HCT-116, A375 and G361 cell lines. The results are summarized in Table 10.



Compound	MCF-7 (IC <sub>50</sub> μM)	HCT-116 (IC <sub>50</sub> μM)	A375 (IC <sub>50</sub> μM)	G361 (IC <sub>50</sub> μM)
<i>meso-62</i>	0.058 ± 0.014	0.236 ± 0.060	0.099 ± 0.018	1.486 ± 0.005
(±)- <i>trans-62</i>	1.240 ± 0.018	0.066 ± 0.017	0.205 ± 0.015	0.507 ± 0.007
<i>meso-63</i>	7.010 ± 0.044	5.070 ± 0.032	3.413 ± 0.016	1.484 ± 0.004
(±)- <i>trans-63</i>	2.630 ± 0.044	3.680 ± 0.045	2.398 ± 0.020	1.144 ± 0.009
<i>meso-65</i>	2.900 ± 0.018	1.460 ± 0.001	1.106 ± 0.064	8.520 ± 0.009

**Table 10.** The antiproliferative activities for **62**, **63** and **65** against the MCF-7, HCT-116, A375 and G361 cell lines.

All the compounds of family C are potent antiproliferative agents with the highest potency against the A375 melanoma cancer cell line (submicromolar values of IC<sub>50</sub>). The introduction of the *p*-nitrobenzenesulfonyl group into *meso-62* and (±)-*trans-62* to give *meso-63* and (±)-*trans-63* as well as the macrocyclization to produce *meso-65* do not improve the antiproliferative activity in relation to those of *meso-62* and (±)-*trans-62*.

### 3.4.2. Cell-cycle analysis

The effects on cell cycle distribution of the compounds were analysed by flow cytometry at 24 and 48 h with the 3·CI<sub>50</sub> of the compounds (Table 11).

	Control	<i>meso-62</i>	(±)- <i>trans-62</i>	<i>meso-63</i>	(±)- <i>trans-63</i>	<i>meso-65</i>
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	41.10 ± 0.71	35.37 ± 0.64	34.70 ± 0.71	54.08 ± 0.31	57.53 ± 0.54	67.31 ± 1.02
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	20.38 ± 1.26	17.58 ± 0.76	11.08 ± 1.76	10.50 ± 0.35	6.93 ± 0.74	14.99 ± 1.99
<b>S</b>	38.37 ± 0.34	47.05 ± 0.12	54.23 ± 1.05	35.42 ± 0.65	35.54 ± 0.20	17.70 ± 0.97

\*24 h of treatment

	Control	<i>meso-62</i>	(±)- <i>trans-62</i>	<i>meso-63</i>	(±)- <i>trans-63</i>	<i>meso-65</i>
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	38.97 ± 0.22	39.04 ± 1.63	19.97 ± 0.13	58.01 ± 0.36	62.28 ± 0.14	66.97 ± 3.59
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	16.61 ± 0.45	18.73 ± 1.35	25.26 ± 1.83	11.85 ± 0.11	9.19 ± 1.20	17.82 ± 4.63
<b>S</b>	44.42 ± 0.66	42.24 ± 2.98	54.78 ± 1.95	30.14 ± 0.24	28.54 ± 1.33	15.22 ± 1.05

\* 48 h of treatment

**Table 11.** The cell cycle distribution in the A375 cancer cell line after treatment for 24 and 48 h (3 × CI<sub>50</sub>).

We found a cell cycle arrest in the S-phase induced by **62** and a cell cycle arrest in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase by **63** and **65**.

### 3.4.3. Apoptosis assay

The effects on apoptosis in the A375 cell line were analysed by flow cytometry at 24 and 48 h of treatment, in order to study the mechanisms of their antitumour activity. The results are shown in Table 12.

	Control	<i>meso-62</i>	(±)- <i>trans-62</i>	<i>meso-63</i>	(±)- <i>trans-63</i>	<i>meso-65</i>
<b>N</b>	1.15 ± 0.21	0.85 ± 0.07	0.80 ± 0.28	1.45 ± 0.78	0.90 ± 0.14	1.50 ± 0.14
<b>ESA</b>	6.90 ± 0.28	6.80 ± 1.84	8.35 ± 3.18	7.30 ± 2.12	7.70 ± 2.40	43.10 ± 18.53
<b>LSA</b>	1.95 ± 1.06	1.40 ± 0.00	1.65 ± 0.35	2.40 ± 0.71	2.85 ± 0.07	7.10 ± 0.71

\*24 h of treatment.

	Control	<i>meso-62</i>	(±)- <i>trans-62</i>	<i>meso-63</i>	(±)- <i>trans-63</i>	<i>meso-65</i>
<b>N</b>	0.80 ± 0.42	0.55 ± 0.07	0.60 ± 0.00	0.65 ± 0.07	1.00 ± 0.28	1.05 ± 0.21
<b>ESA</b>	3.50 ± 2.55	2.75 ± 0.78	3.45 ± 0.35	7.40 ± 0.14	17.55 ± 2.62	47.30 ± 7.64
<b>LSA</b>	4.15 ± 1.06	3.60 ± 0.42	4.75 ± 0.35	6.25 ± 0.49	10.75 ± 1.20	47.70 ± 7.92

\*48 h of treatment.

**Table 7.** Apoptosis induction in the A375 cell line after treatment for 24 and 48 h with 3 × IC<sub>50</sub> of **62**, **63** and **65**. N= necrosis, ESA= Early-stage apoptosis, LSA= Late-stage apoptosis.

Compounds **63** and **65** induce high levels of apoptosis at 24 and 48 h in A375 cancer cells in comparison with DMSO-treated cell cultures.

## IV. CONCLUSIONS

In this PhD dissertation twenty seven target compounds have been designed, synthesised and characterized. They are included in three families: A, incorporating ten *p*-nitrobenzenesulfonyl derivatives and four dansyl derivatives with purine and 5-FU moieties in their structures; B, containing six purine derivatives and two 5-FU derivatives linked to ethyl acetate and C with five 1,2-diaminocyclohexane derivatives.

All the molecules have been assayed against the human breast cancer cell line MCF-7, human colon carcinoma cell line HCT-116 and the human malignant melanoma cell lines A375 and G361. Apoptosis and cell cycle studies have been also carried out for all the compounds of family B against the MCF-7, HCT-116 and A375 cell lines, and *in vivo* studies for two compounds of family A.

The referred contributions include original results that lead to the following conclusions:

1. The bromo, chloro and dichloropurine derivatives of family A show better antiproliferative activities against all the assayed cell lines than the adenine and 5-FU derivatives.
2. The antiproliferative activities of adenine *N*-3 isomer of family A are slightly better than those of its *N*-9 isomer.
3. Compounds with a dimethylene linker between the sulfonamide and the dioxolane of family A (*n*= 2) are better antiproliferative agents than compounds with a methylene linker (*n*= 1).



4. The dichloropurine derivative with  $n=2$  is the most active compound of family A as an antiproliferative agent with an  $IC_{50}$  of 134 nM against the A375 cell line.

5. The most apoptotic compounds of family A are the purine derivatives with  $n=2$  and they provoked a  $G_2/M$  cell cycle arrest. The bromopurine derivative is the most potent inducer of apoptosis so far reported by the research group.

6. It has been demonstrated that dichloropurine derivative with  $n=2$  in family A and its fluorescent analogue are nontoxic to BALB/c mice even at the highest bolus dose of 250 mg/kg after 2 weeks. All 40 treated mice remain healthy throughout the 14-day observation period with no evidence of morbidity.

7. Drug distribution studies *in vivo* have reveal that the fluorescent *N*-9 dichloropurine derivative with  $n=2$  is absorbed by the oral route of administration with systemic distribution. Furthermore the drug accumulates mainly in liver and kidney, the organs associated to drug metabolism and excretion respectively.

8. The dichloropurine derivatives are more active as antiproliferative agents than the rest of the derivatives of family B, showing better  $IC_{50}$  values against A375 cell line.

9. *N*-9 purine derivatives of family B present a higher antiproliferative activity than that of their *N*-7 regioisomers except in the case of chloropurine derivatives. In these two compounds, the tendency is reversed against the MCF-7 and HCT-116 cell lines and both regioisomers are equally potent in inhibiting both melanoma cancer cell growths.

10. Two QSAR equations are obtained between the antiproliferative  $IC_{50}$  values for the compounds of family B and the  $\log P$  against the melanoma cell lines A375 and G361.

11. In family B, the *N*-9 dichloropurine derivative is the most apoptotic compound against the A375 melanoma cell line, in which no modification in the cell cycle is found. However, its regioisomer gathers cells at the G<sub>2</sub>/M and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases respectively in the colon and melanoma cancer cells accompanied by high levels of programmed death cell.

12. Family C molecules are the most active compounds as antiproliferative agents against all the assayed cell lines. The most active one presents an IC<sub>50</sub> value of 58 nM against the A375 cell line.

13. Introduction of the *p*-nitrobenzenesulfonyl group, besides the macrocyclization do not improve the antiproliferative activities of the 1,2-diaminocyclohexanes.

14. The *p*-nitrobenzenesulfonyl derivatives and the macrocycle of family C provokes a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest in A375 cell line at 24 and 48 h of treatment, whereas the other two 1,2-diaminocyclohexane derivatives provoke S phase arrest.

15. The macrocycle of family C presents a very significant apoptotic index of 95 % after 48 h of treatment in the A375 human melanoma cell line.



## References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2011**, *61* (2), 69-90.
2. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larrañaga N, Capocaccia R, Martínez C. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol* **2010**, *21* (3), 30-36.
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Fact sheet N° 297. Reviewed January 2013. Access 15 Nov **2013**.
4. Karp G. Cell biology. Hoboken, New Jersey: John Wiley, **2010**.
5. Cooper GM. The cell: a molecular approach. Washington, D.C.: ASM, **2007**.
6. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2012**, *490*, 61-70.
7. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, Lerner J, Brunet JP, Subramanian A, Ross KN, Reich M, Hieronymus H, Wei G, Armstrong SA, Haggarty SJ, Clemons PA, Wei R, Carr SA, Lander ES, Golub TR. The connectivity map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* **2006**, *313*, 1929-1935.
8. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jané-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P Jr, de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **2012**, *483*, 603-607.
9. Patel MN, Halling-Brown MD, Tym JE. Objective assessment of cancer genes for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12*, 35-50.
10. Burgués Gasió JP, Pontones Moreno JL, Vera Donoso CD, Jiménez Cruz JF, Ozonas Moragues M. [Cell cycle and apoptosis mechanisms implicated in intravesical chemotherapy resistances in superficial bladder cancer. Article in Spanish]. *Actas Urol Esp* **2005**, *29* (9), 846-859.
11. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **2005**, *30*, 630-641.
12. Abate AA, Pentimalli F, Esposito L, Giordano A. ATP-noncompetitive CDK inhibitors for cancer therapy: an overview. *Expert Opin Investig Drugs* **2013**, *22* (7), 895-906.

13. Thornberry N, Lazebnick Y. Caspases: Enemies within. *Science* **1998**, *281*, 1312-1316.
14. Campos J, Pineda MJ, Gómez JA, Entrena A, Trujillo MA, Gallo MA, Espinosa, A. 5-Fluorouracil Derivatives. 1. Acyclonucleosides through a Tin (IV) Chloride-Mediated Regiospecific Ring Opening of Alkoxy-1,4-Diheteroepanes. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8907-8924.
15. Saniger E, Campos JM, Entrena A, Marchal JA, Boulaiz H, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A. Neighbouring-group participation as the key step in the reactivity of acyclic and cyclic salicyl-derived *O,O*-acetals with 5-fluorouracil. Antiproliferative activity, cell cycle dysregulation and apoptotic induction of new *O,N*-acetals against breast cancer cells. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8017-8026.
16. Saniger E, Campos JM, Entrena A, Marchal, JA, Suarez I, Aránega A, Choquesillo D, Niclós J, Gallo MA, Espinosa A. Medium benzene-fused oxacycles with the 5-fluorouracil moiety: synthesis, antiproliferative activities and apoptosis induction in breast cancer cells. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5457-5467.
17. Campos JM, Saniger E, Marchal JA, Aiello S, Suárez I, Boulaiz H, Aránega A, Gallo M, Espinosa A. New Medium Oxacyclic *O,N*-Acetals and Related Open Analogues: Biological Activities. *Curr Med Chem* **2005**, *12*, 1423-1438.
18. Marchal JA, Núñez MC, Suárez I, Díaz-Gavilán M, Gómez-Vidal JA, Boulaiz H, Rodríguez-Serrano F, Gallo MA, Espinosa A, Aránega A, Campos JM. A synthetic uracil derivative with antitumor activity through decreasing cyclin D1 and Cdk1, and increasing p21 and p27 in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* **2007**, *105*, 237-246.
19. Núñez MC, Entrena A, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis of novel 1-(2,3-dihydro-5*H*-4,1-benzoxathiepin-3-yl)-uracil and -thymine, and their corresponding *S*-oxidized derivatives. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10363-10369.
20. Núñez MC, Pavani MG, Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Gómez-Vidal JA, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis and anticancer activity studies of novel 1-(2,3-dihydro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-yl)uracil and (6'-substituted)-7- or 9-(2,3-dihydro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-yl)-7*H* or 9*H*-purines. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11724-11733.
21. Núñez MC, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Caba O, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. 6'-Chloro-7- or 9-(2,3-dihydro-5*H*-4,1-benzoxathiepin-3-yl)-7*H* or 9*H*-purines and their corresponding sulfones as a new family of cytotoxic drugs. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 183-190.

22. Díaz-Gavilán M, Gómez-Vidal JA, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Caba O, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Anticancer activity of (1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl)-pyrimidines and -purines against the MCF-7 cell line: Preliminary cDNA microarray studies. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (4), 1457-1460.
23. Díaz-Gavilán M, Conejo-García A, Cruz-López O, Núñez MC, Choquesillo-Lazarte D, González-Pérez JM, Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis and anticancer activity of (*R,S*)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9*H*-purines. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 127-135.
24. Núñez MC, Díaz-Gavilán M, Conejo-García A, Cruz-López O, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Design, synthesis and anticancer activity against the MCF-7 cell line of benzo-fused 1,4-dihetero seven- and six-membered tethered pyrimidines and purines. *Curr Med Chem* **2008**, *15*, 2614-2631.
25. López-Cara LC, Conejo-García A, Marchal JA, Macchione G, Cruz-López O, Boulaiz H, García MA, Rodríguez-Serrano F, Ramírez A, Cativiela C, Jiménez AI, García-Ruiz JM, Choquesillo-Lazarte D, Aránega A, Campos JM. New (*RS*)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: The chiral switch from (*RS*)-2,6-dichloro-9-[1-(*p*-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9*H*-purine. *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 249-258.
26. Caba O, Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Boulaiz H, Aránega A, Gallo MA, Marchal JA, Campos JM. Anticancer activity and cDNA microarray studies of a (*RS*)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl]-6-chloro-9*H*-purine, and an acyclic (*RS*)-*O,N*-acetalic 6-chloro-7*H*-purine. *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 3802-3809.
27. Caba O, Rodríguez-Serrano F, Díaz-Gavilán M, Conejo-García A, Ortiz R, Martínez-Amat A, Álvarez P, Gallo MA, Campos JM, Marchal JA, Aránega A. The selective cytotoxic activity in breast cancer cells by an anthranilic alcohol-derived acyclic 5-fluorouracil *O,N*-acetal is mediated by endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Eur J Med Chem* **2012**, *50*, 376-382.
28. Marchal JA, Carrasco E, Ramírez A, Jiménez G, Olmedo C, Perán M, Agil A, Conejo-García A, Cruz-López O, Campos JM, García MA. Bozepinib, a novel small antitumor agent, induces PKR-mediated apoptosis and synergizes with IFN $\alpha$  triggering apoptosis, autophagy and senescence. *Drug Des Devel Ther* **2013**, *7*, 1301-1313.
29. Whitea NS, Erringtonb RJ. Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, *57*, 17– 42.
30. Coley HM, Amos WB, Tewntyman PR. Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines. *Br J Cancer* **1993**, *67*, 1316-1323.
31. Lillo MP, Cañadas O, Dale RE. Location and properties of the taxol binding center in microtubules: a picosecond laser study with fluorescent taxoids. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12436-12449.

32. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 37-51.
33. Michelakis E, Archer S. A method of treating cancer using dichloroacetate. PCT Int Appl. **2006**, WO 2006108276 A1 20061019.
34. Wong JY, Huggins GS, Debidda M, Munshi NC, De Vivo I. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol* **2008**, *109*, 394-402.
35. Sun RC, Fadia M, Dahlstrom JE, Parish CR, Board PG, Blackburn AC. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *120*, 253-260.
36. Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* **2008**, *11*, 1223-1231.
37. Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA, Jayne DG. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* **2010**, *102*, 1746-1752.
38. Tong J, Xie G, He J, Li J, Pan F, Liang H. Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 740564.
39. Zhang N, Palmer AF. Development of a dichloroacetic acid-hemoglobin conjugate as a potential targeted anti-cancer therapeutic. *Biotechnol Bioeng* **2011**, *108*, 1413-1420.
40. Morfouace M, Lalier L, Bahut M, Bonnamain V, Naveilhan P, Guette C, Oliver L, Gueguen N, Reynier P, Vallette FM. Comparison of spheroids formed by rat glioma stem cells and neural stem cells reveals differences in glucose metabolism and promising therapeutic applications. *J Biol Chem* **2012**, *287*(40), 33664-33674.
41. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Zapata-Benavides P, Miranda-Hernández DF, Chávez-Reyes A, Rivera-Morales LG, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. *In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of sodium dichloroacetate (DCA-Na) against murine melanoma. *African J Microb Res* **2012**, *6* (22), 4782-4796.
42. Hur H, Xuan Y, Kim YB, Lee G, Shim W, Yun J, Ham IH, Han SU. Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. *Int J Oncology* **2013**, *42*, 44-54.
43. Shen YC, Ou DL, Hsu C, Lin KL, Chang CY, Lin CY, Liu SH, Cheng AL. Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **2013**, *108*, 72-81.

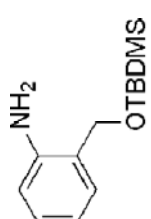
44. Li T, Yang Y, Cheng C, Tiwari AK, Sodani K, Zhao Y, Abraham I, Chen ZS. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-arylphenyl-2,2-dichloroacetamide analogues as anti-cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 7268-7271.
45. Csuk R, Siewert B, Dressel C, Schäfer R. Tormentic acid derivatives: synthesis and apoptotic activity. *Eur J Med Chem* **2012**, *56*, 237-245.
46. Liang F, Wan S, Li Z, Xiong X, Yang L, Zhou X, Wu C. Medical applications of macrocyclic polyamines. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 711-727.
47. Gao J, Liu Y-G, Zhou Y. Chiral salicyl diamines. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1723-1729.
48. Gao J, Liu Y-G, Zingaro RA. Cytotoxic activities, cellular uptake, gene regulation, and optical imaging of novel platinum (II) complexes. *Chem Res Toxicol* **2009**, *22*, 1705-1712.
49. Annette M, Patil S, Malik NS, Panghavane KD. Cyclopentylidene ketals for treatment of cancer. PCT Int Appl. **2012**, WO 2012081039 A1 20120621.
50. Chui CH, Wang Q, Chow WC, Yuen MC, Wong KL, Kwok WM, Cheng GY, Wong RS, Tong SW, Chan KW, Lau FY, Lai PB, Lam KH, Fabbri E, Tao XM, Gambari R, Wong WY. 5-(Dimethylamino)-*N*-(4-ethynylphenyl)-1-naphthalenesulfonamide as a novel bifunctional antitumor agent and two-photon induced bio-imaging probe. *Chem Commun* **2010**, *46*, 3538-3540.
51. Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Gómez-Vidal JA, Marchal JA, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A, Campos JM. Synthesis of tetrahydrobenzoxazepine acetals with electron-withdrawing groups on the nitrogen atom. Novel scaffolds endowed with anticancer activity against breast cancer cells. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11547–11557.
52. Bowden K, Williams PR. Intramolecular catalysis. Part 7. The Smiles rearrangement of substituted 2-hydroxy-2'-nitro- and -2',4'-dinitro-diphenyl sulphones, as well as 2-amino-2',4'-dinitrodiphenyl sulphide, 2-[(2-aminophenyl)thio]-3-nitropyridine and 2-hydroxy-2',4'-dinitrodiphenyl ether. *J Chem Soc Perkin Trans* **1991**, *2*, 215-224.
53. Fitzgerald L, Blakeley RL, Zerner B. The smiles rearrangement of 4-nitrophenyl *N*-hydroxycarbamate: the involvement of a spiro meisenheimer complex of a mononitrobenzene derivative as a transient reaction intermediate. *Chem Lett* **1984**, 29-32.
54. Thorling CA, Dancik Y, Hupple CW, Medley G, Liu X, Zvyagin AV, Robertson TA, Burczynski FJ, Roberts MS. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging provide a novel method in studying drug distribution and metabolism in the rat liver *in vivo*. *J Biomed Opt* **2011**, *16* (8), 086013.
55. Conejo-García A, Cruz-López O, Gómez-Pérez V, Morales F, García-Rubiño ME, Kimatrai M, Núñez MC, Campos JM. Synthesis of purine derivatives as scaffolds for a diversity of biological activities. *Curr Org Chem* **2010**, *14*, 2463-2482.



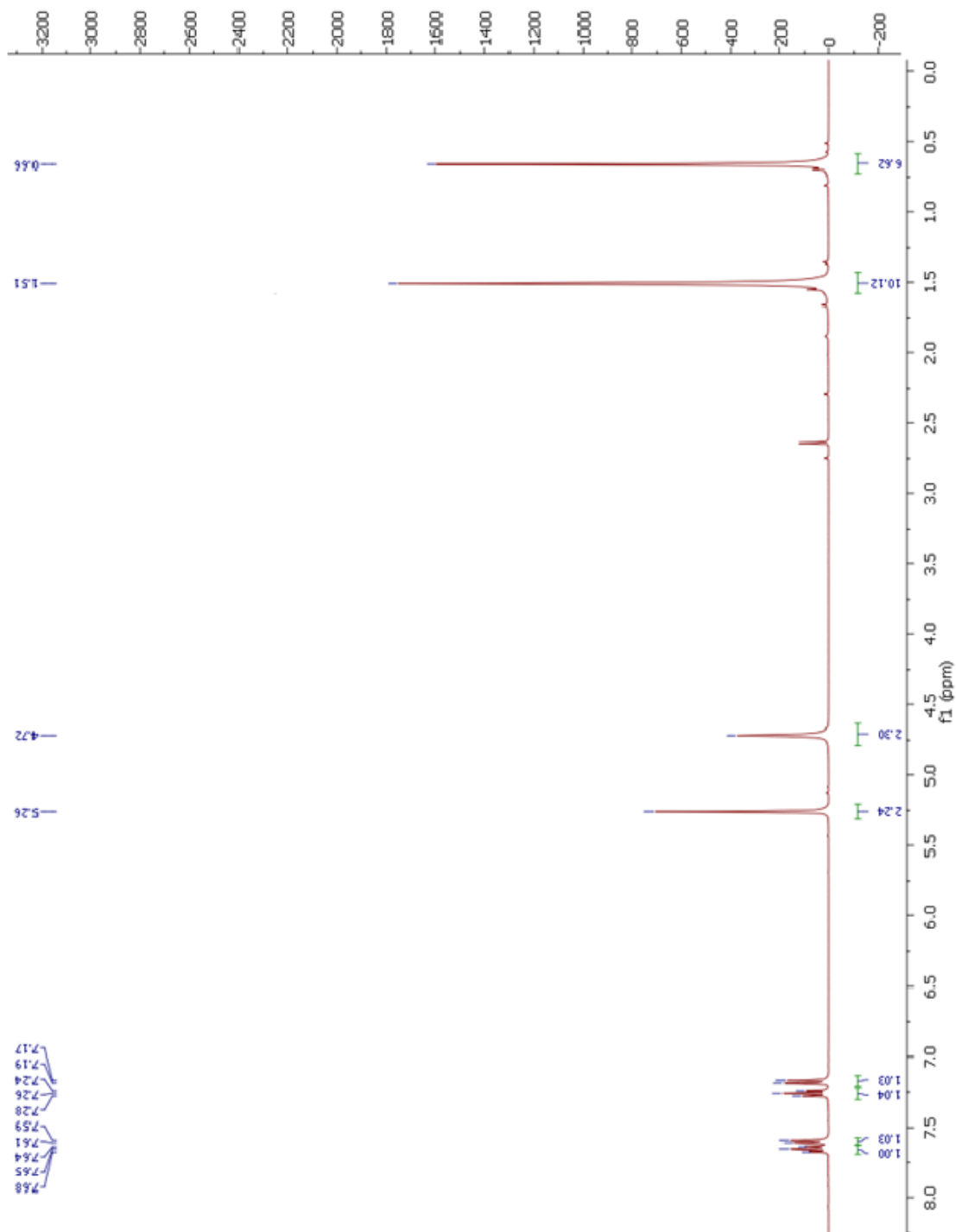
56. Qu G, Zhang Z, Guo H, Geng M, Xia Ran. Microwave-assisted rapid and regioselective synthesis of *N*-(alkoxycarbonylmethyl) nucleobases in water. *J Braz Chem Soc* **2007**, *18* (5), 1061-1067.
57. PALLAS 3.8.1.1, a prediction tool of physicochemical parameters, is supplied by CompuDrug Chemistry, Ltd, PO Box, Rochester, NY 14692, USA.
58. Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res* **2001**, *7*(5), 1474-1480.
59. Kim H, So SM, Chin J. Preparation of Chiral Diamines by the Diaza-Cope Rearrangement (DCR). *Aldrichimica ACTA* **2008**, *41* (3), 77-88.
60. O'Connell KM, Beckmann HS, Laraia L, Horsley HT, Bender A, Venkitaraman AR, Spring DR. A two-directional strategy for the diversity-oriented synthesis of macrocyclic scaffolds. *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 7545-7550.
61. Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. The exploration of macrocycles for drug discovery – an underexploited structural class. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 608-624.
62. Balderas-Rentería I, González-Barranco P, García A, Banik BK, Rivera G. Anticancer drug design using scaffolds of  $\beta$ -lactams, sulfonamides, quinoline, quinoxaline and natural products. *Drugs advances in clinical trials. Curr Med Chem* **2012**, *19* (26), 4377-4398.

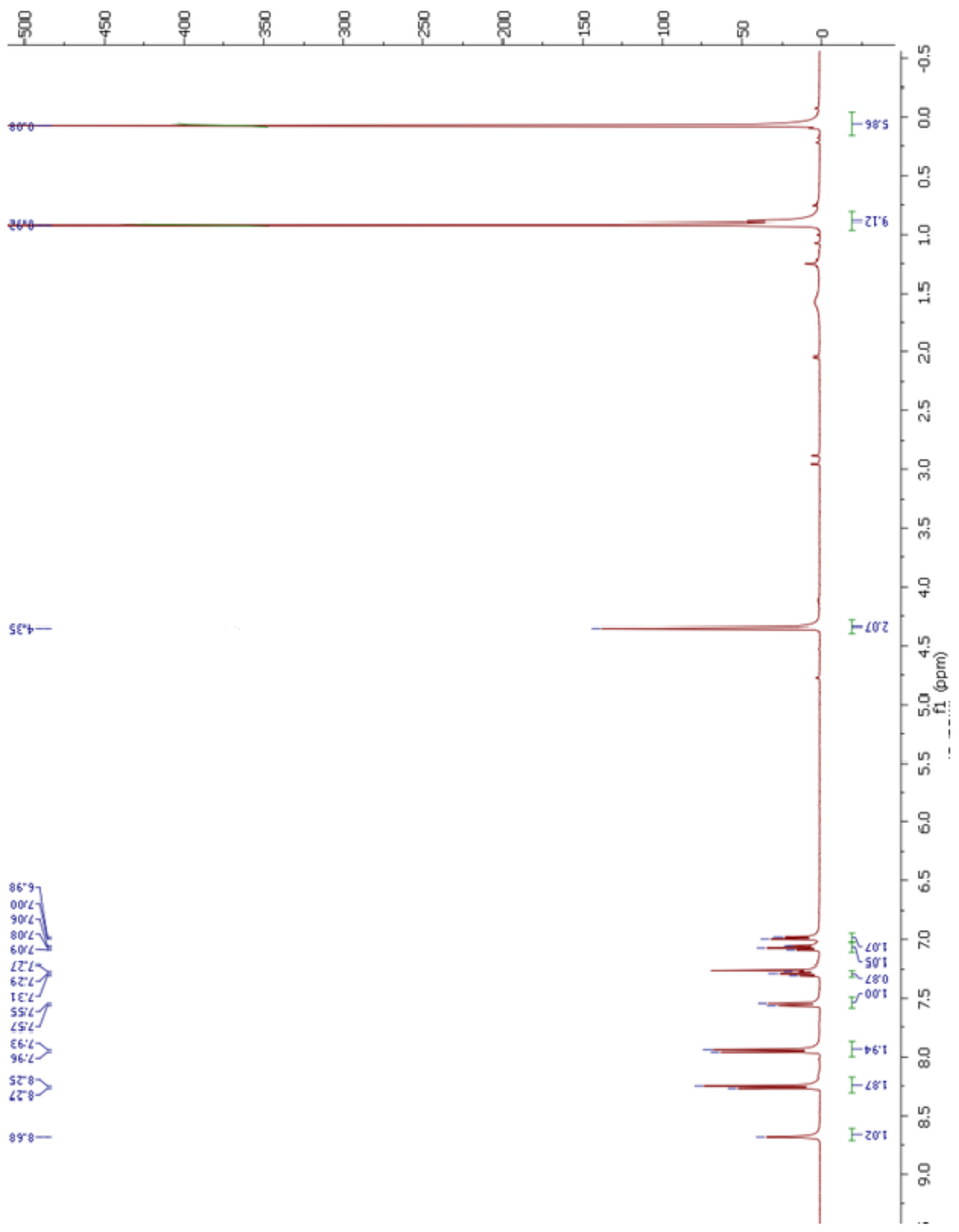
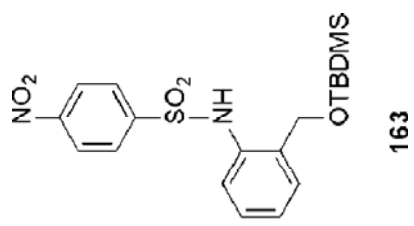
**ANEXO**

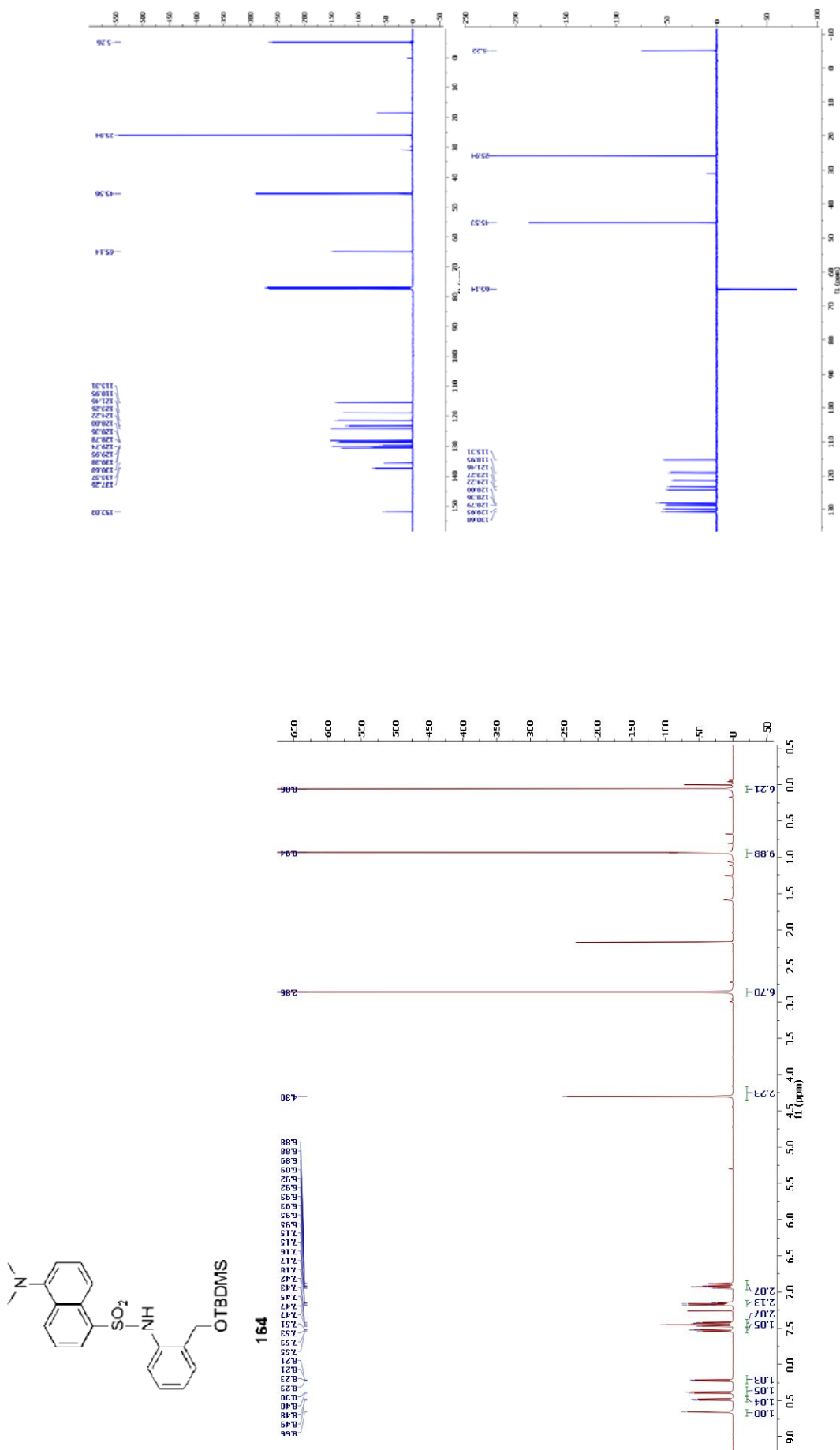


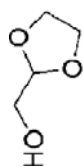


162

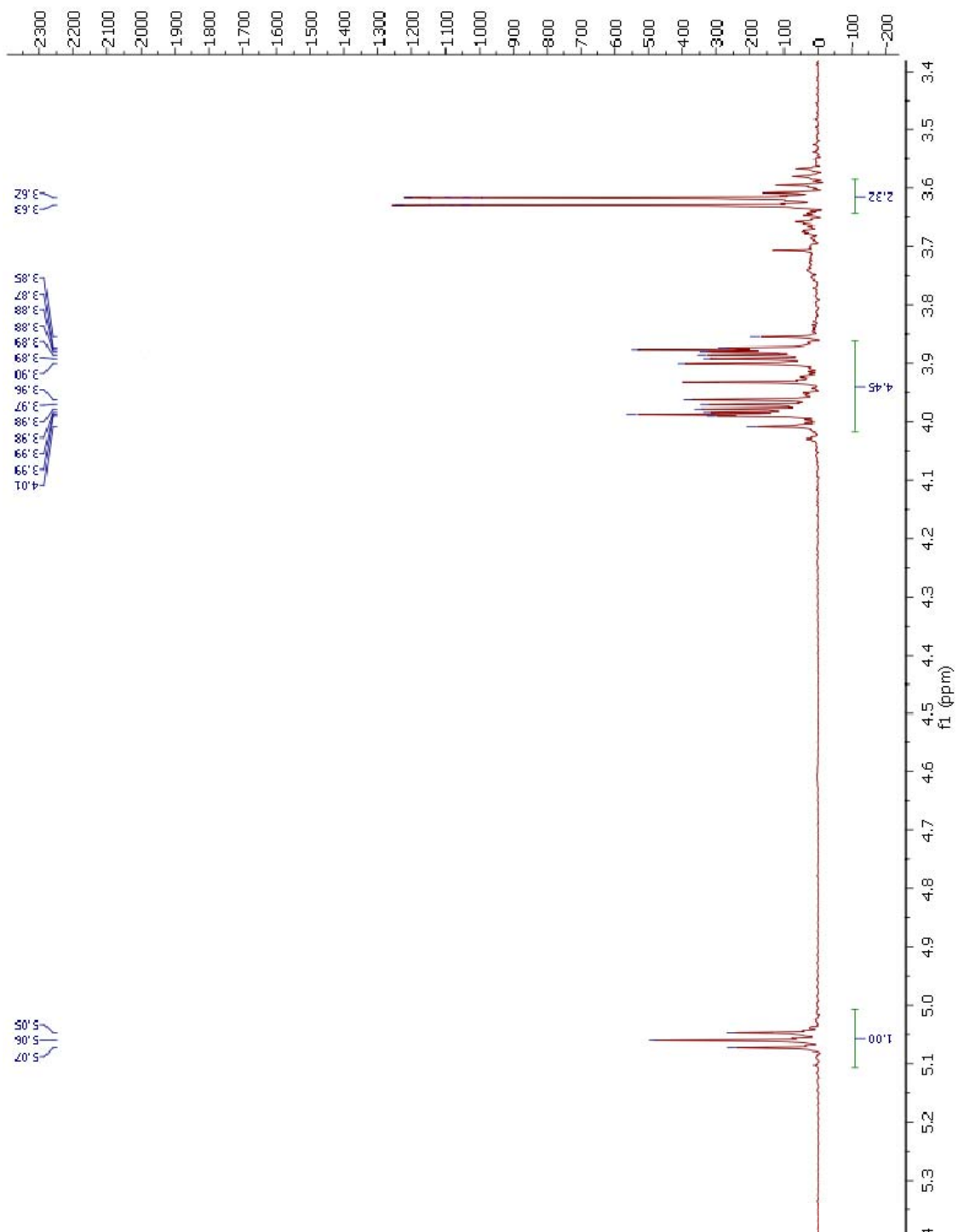


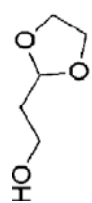
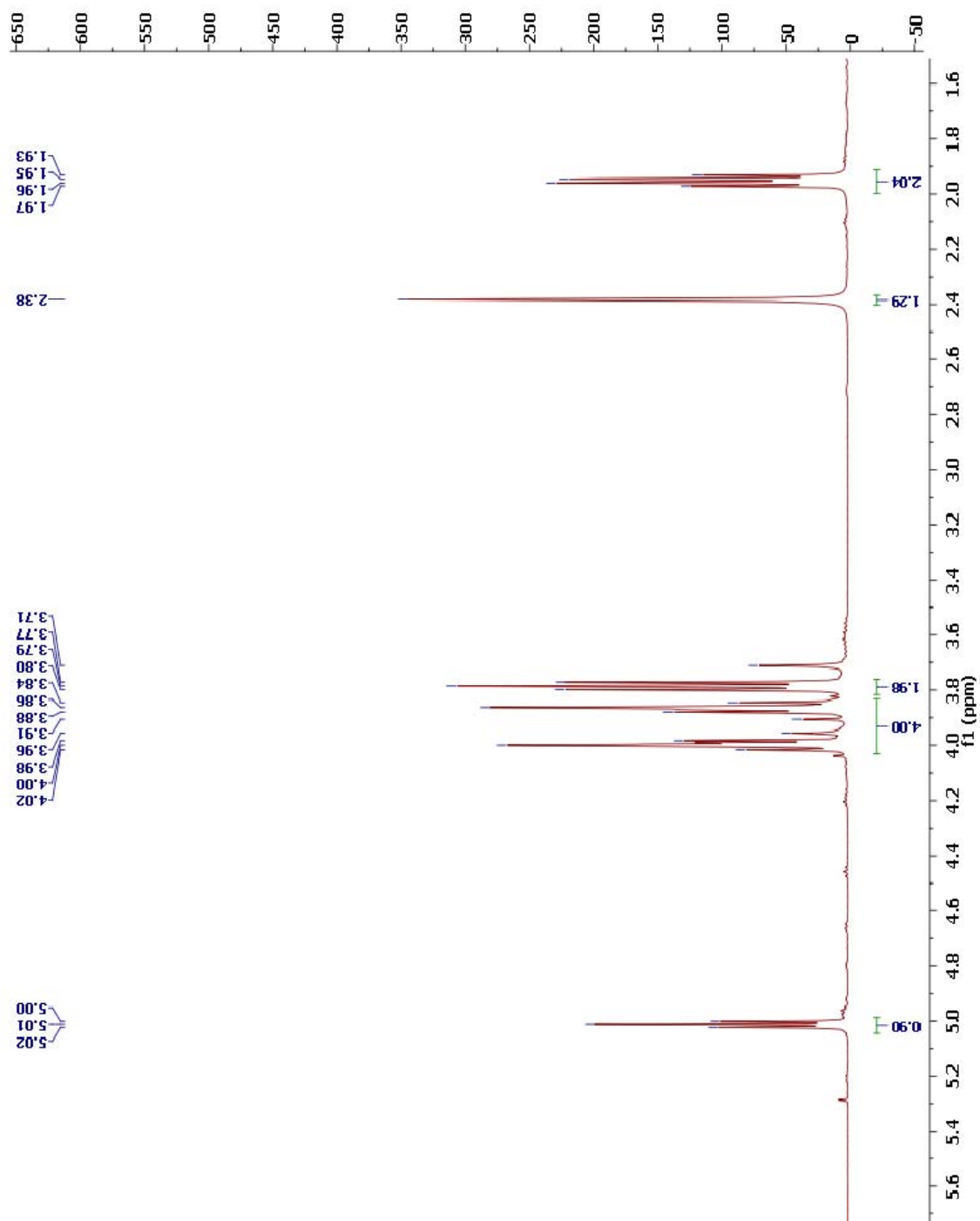






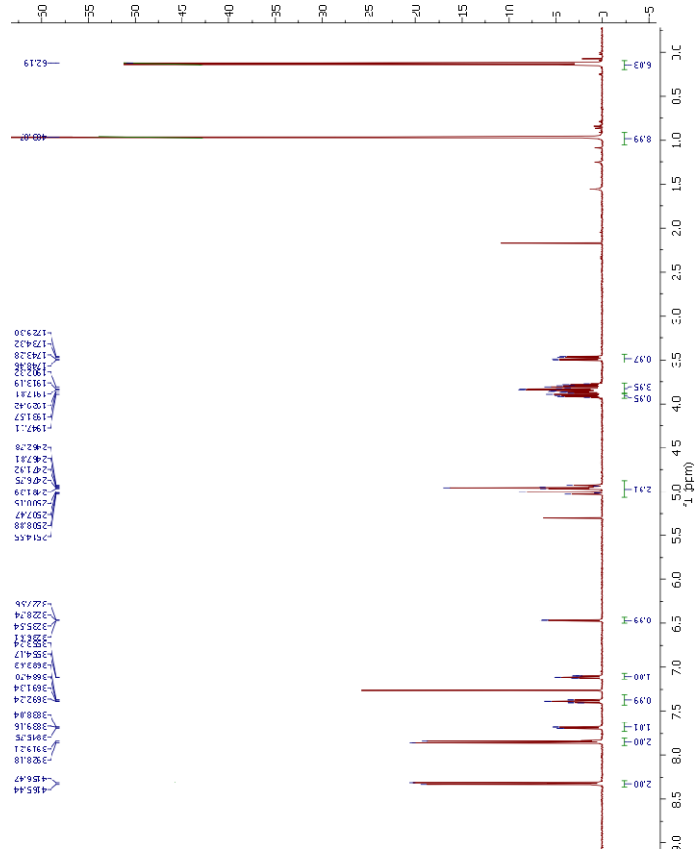
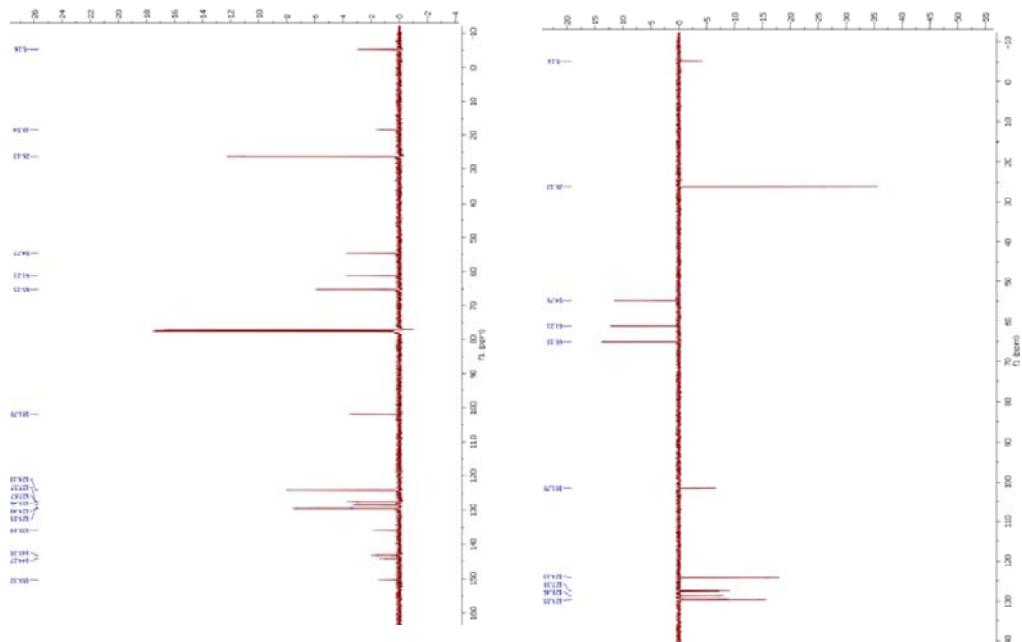
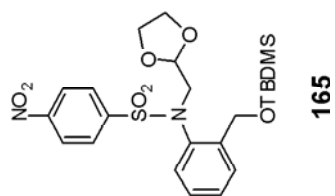
187

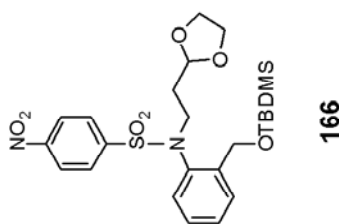
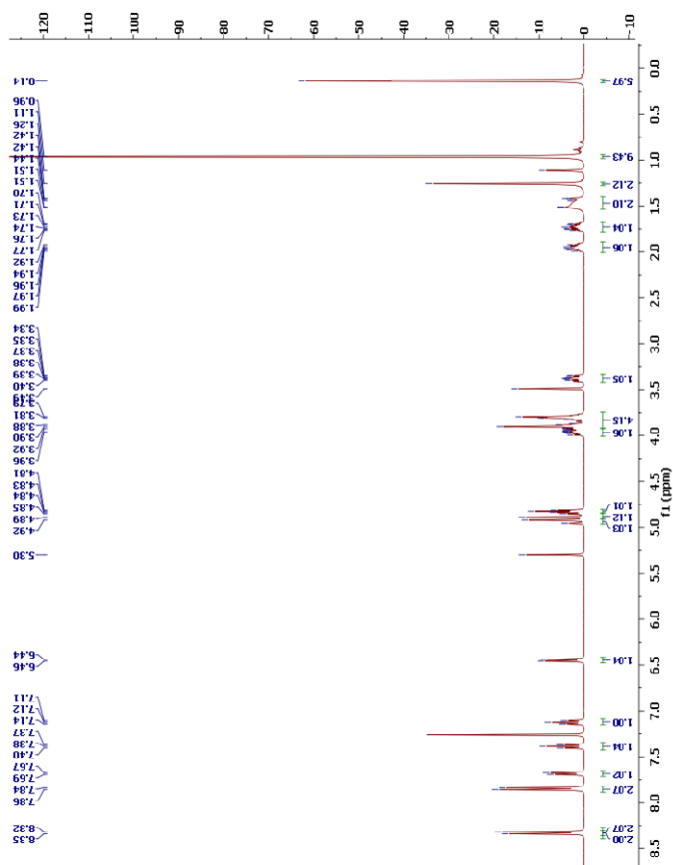
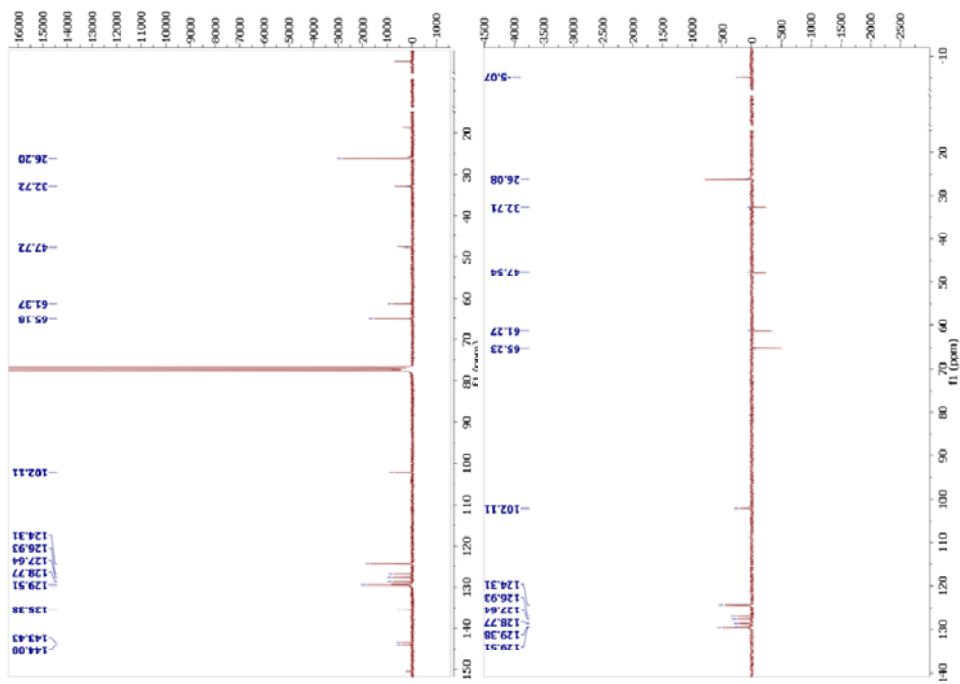


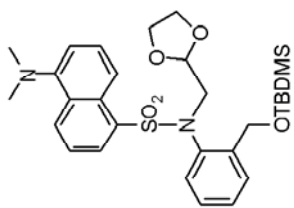


188

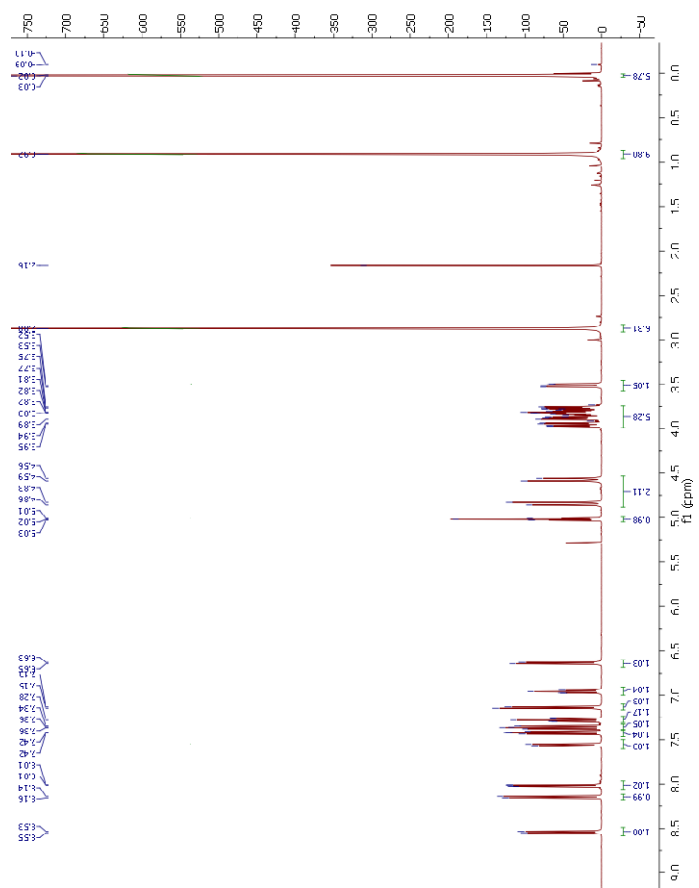
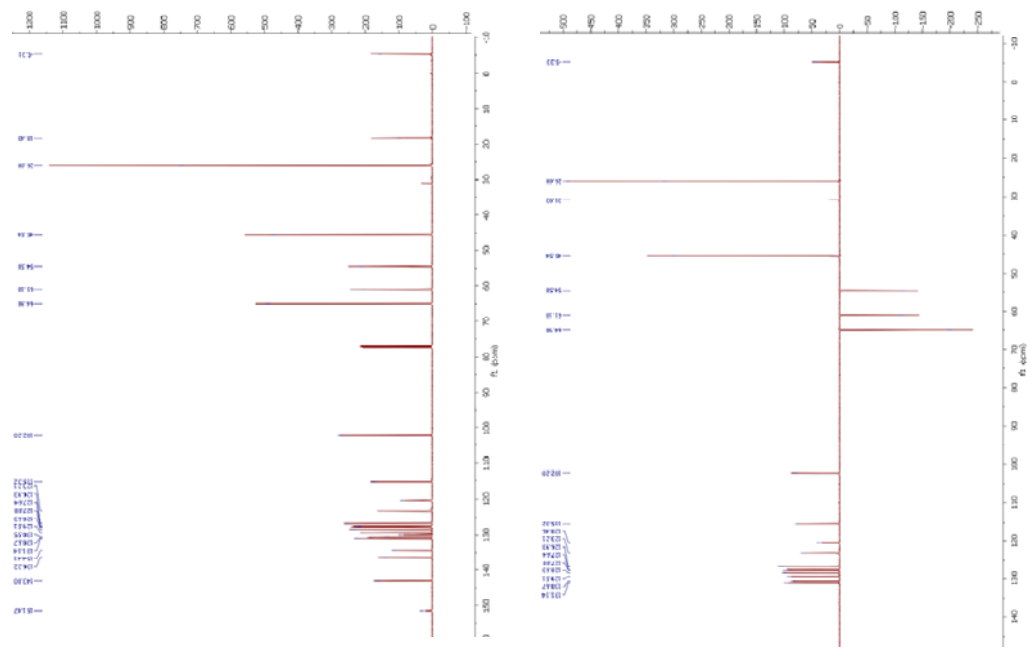


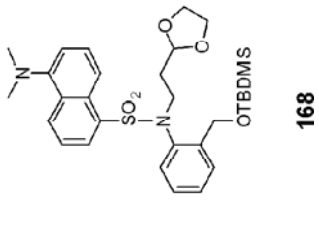
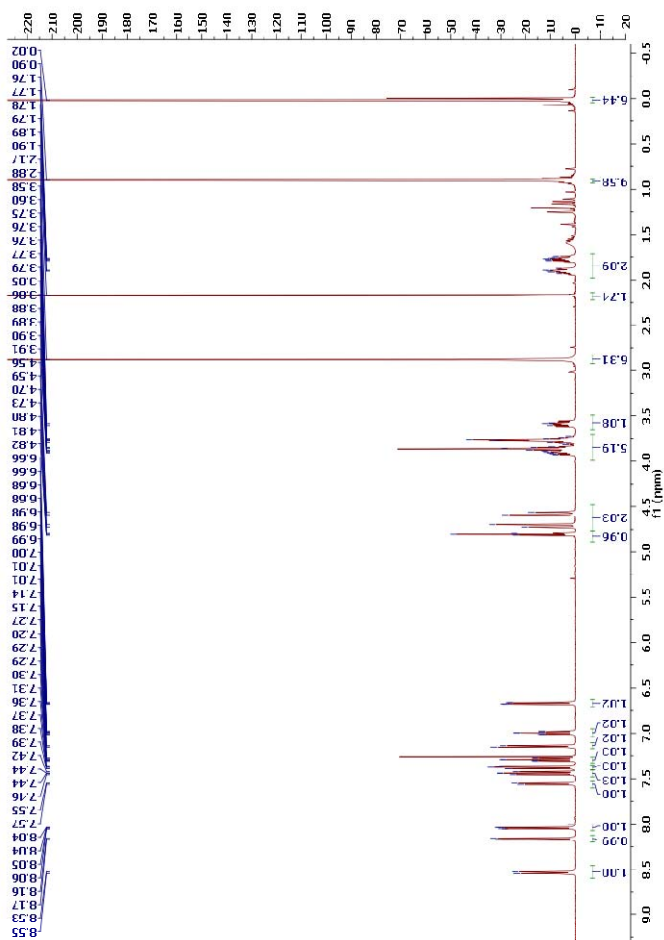
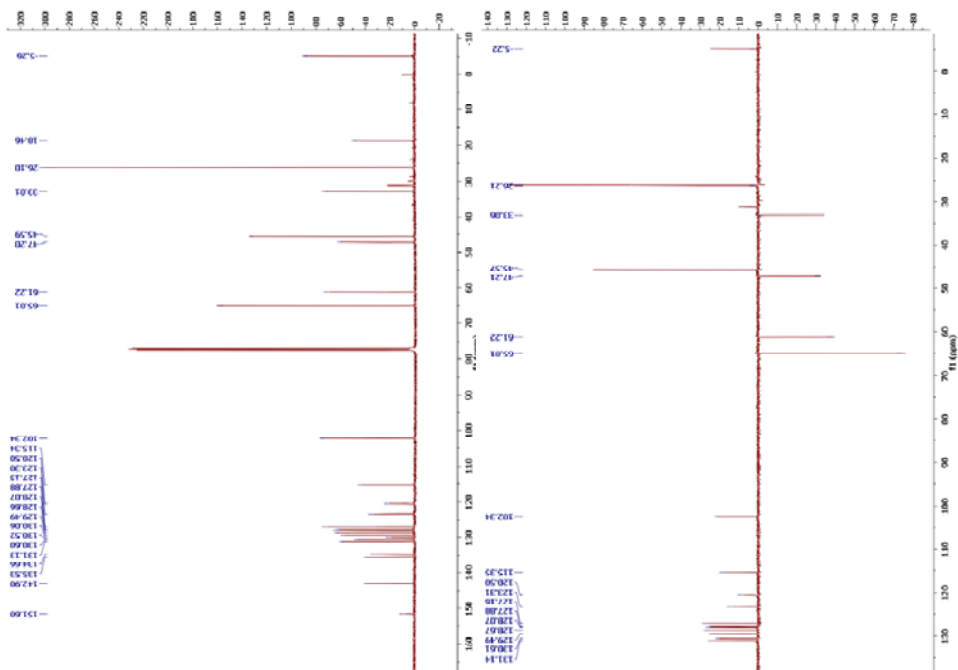


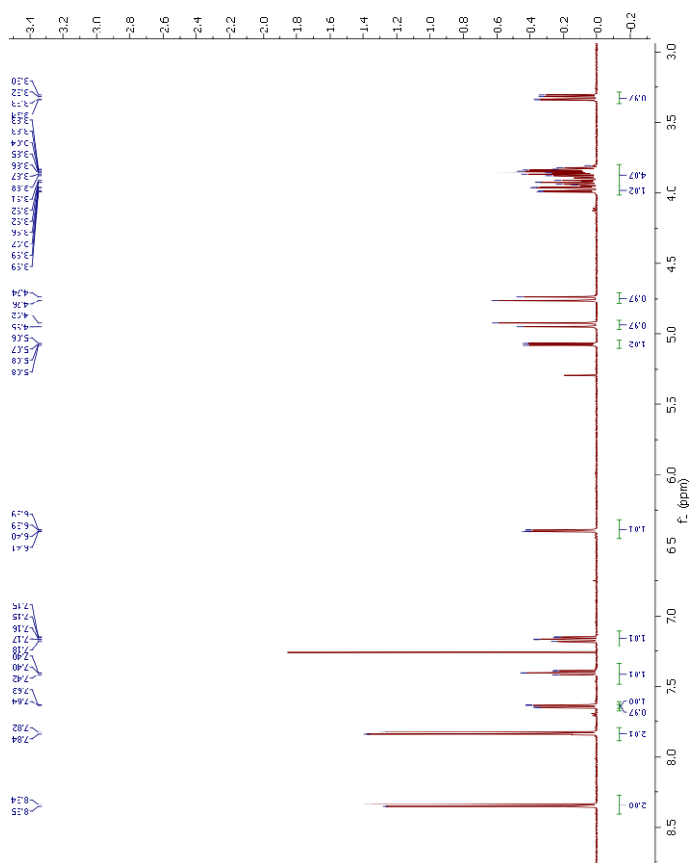
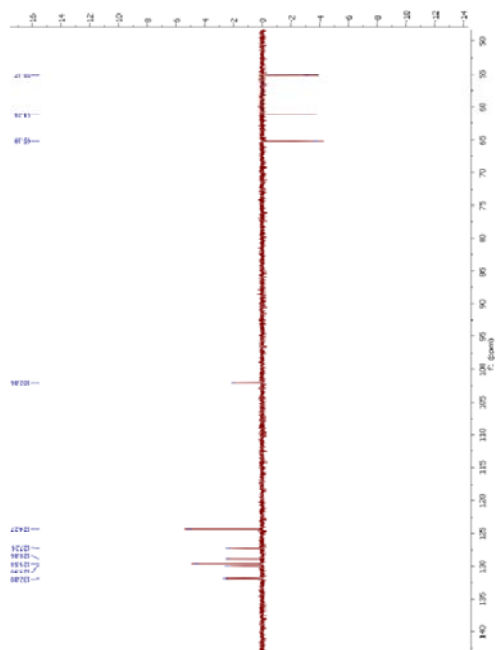
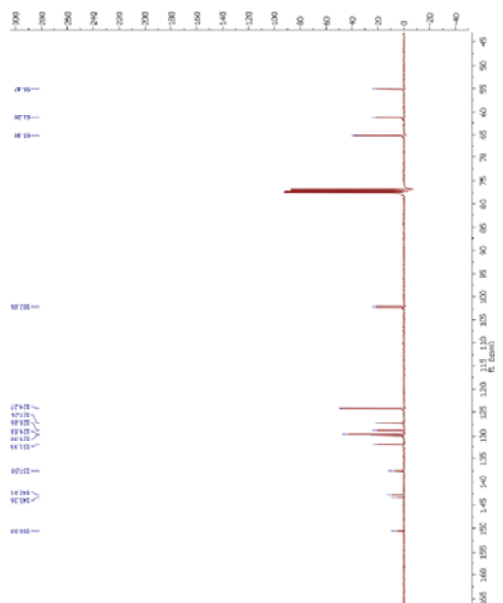
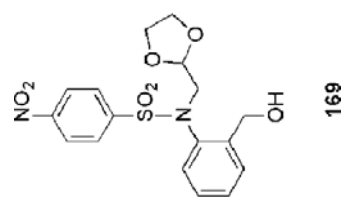


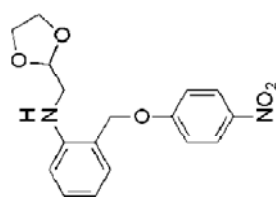


167

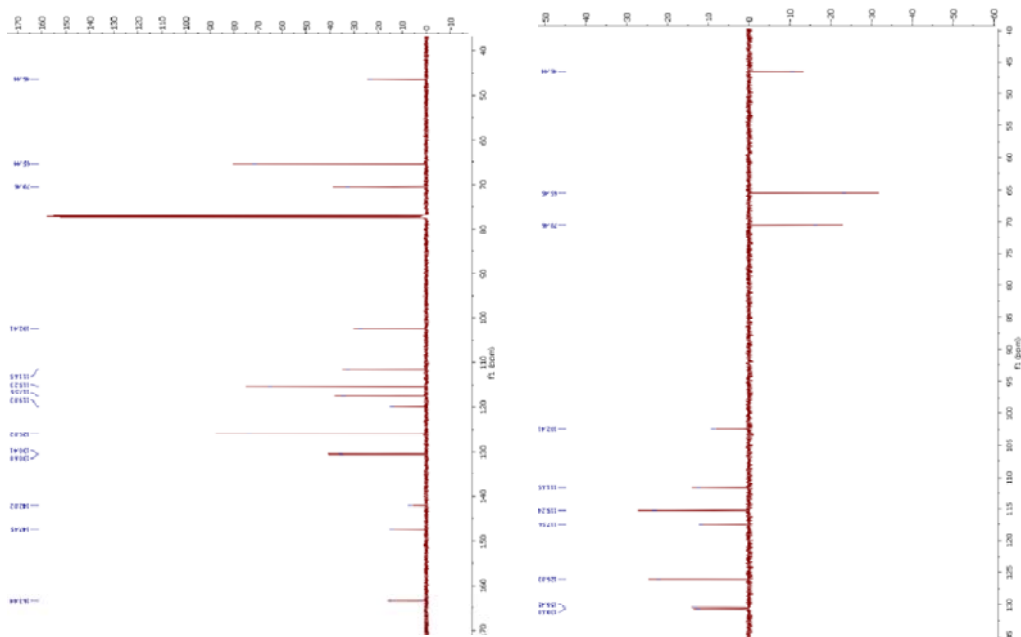
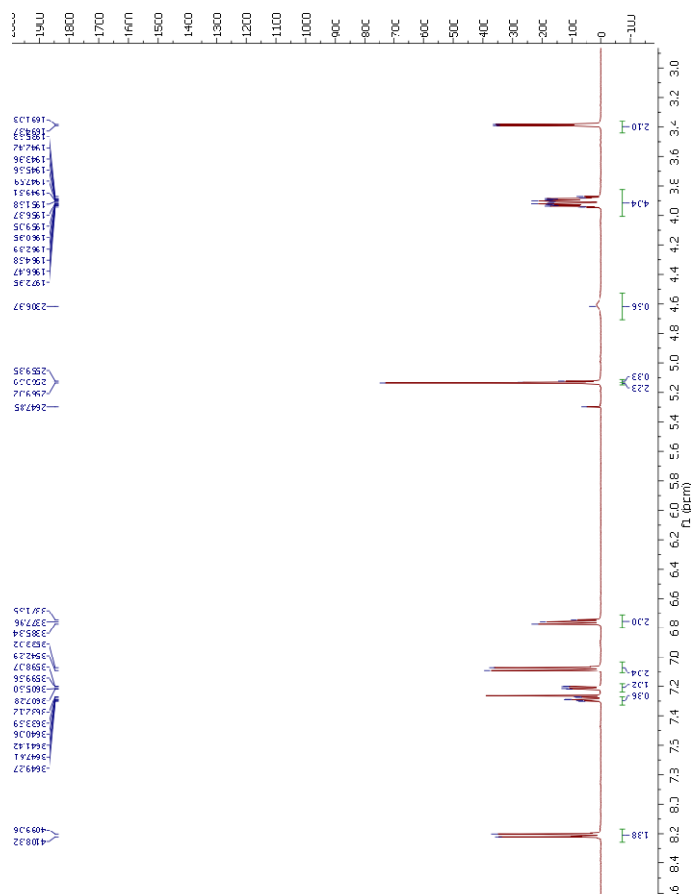


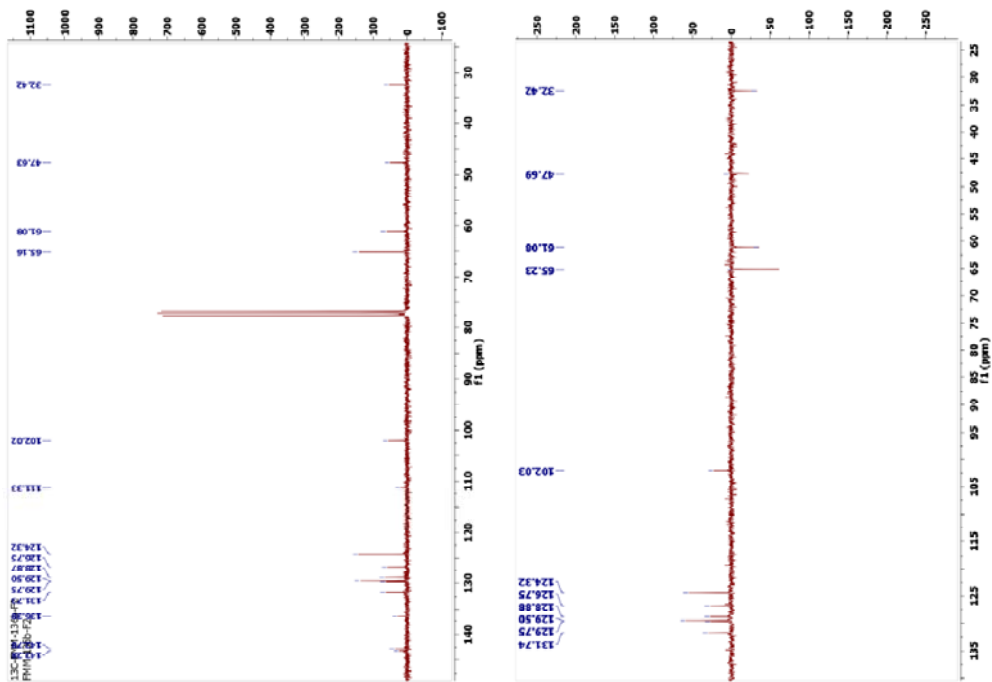
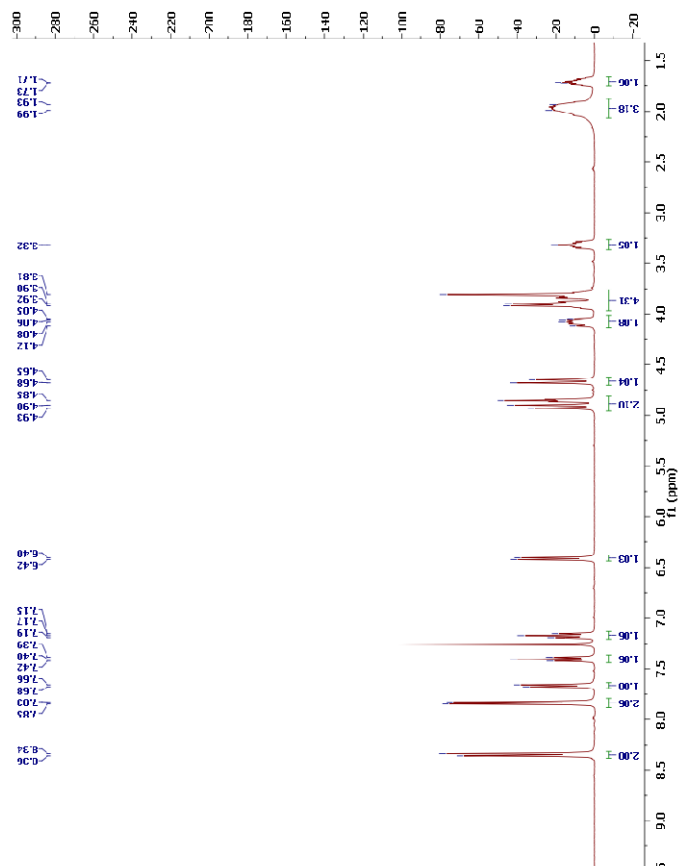
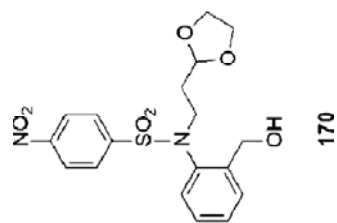


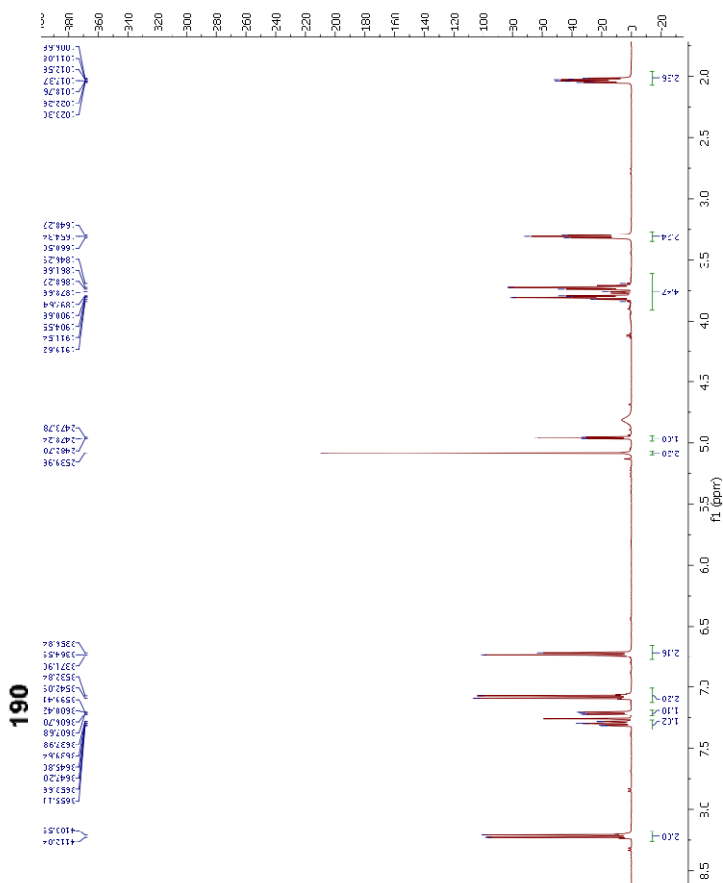
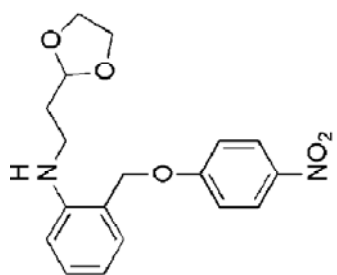




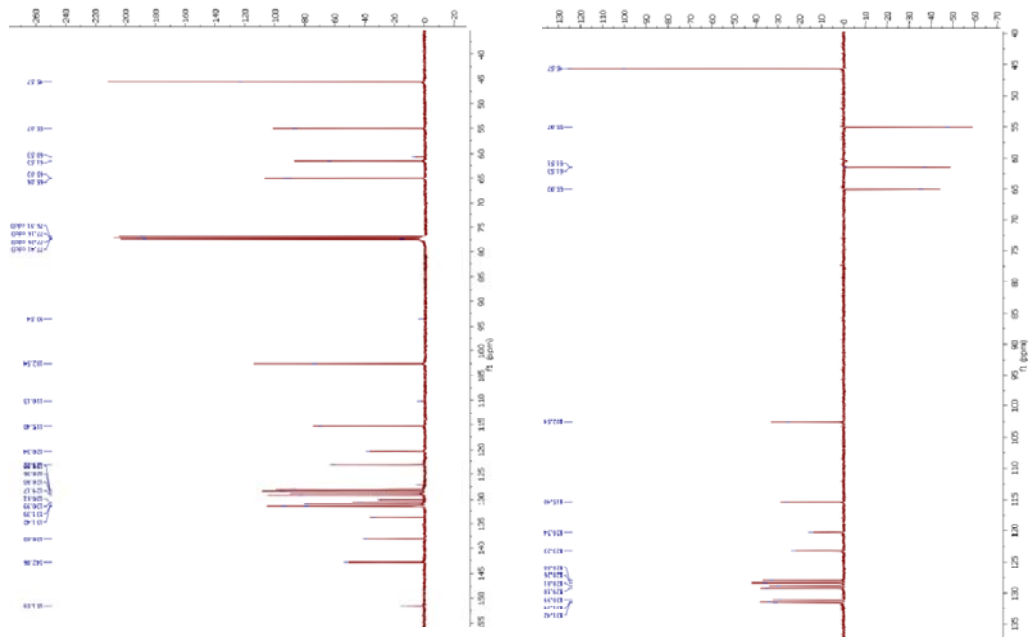
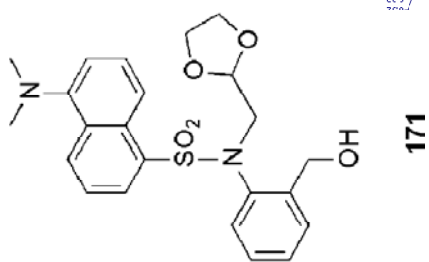
189



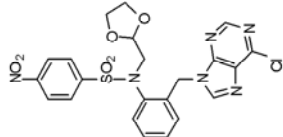




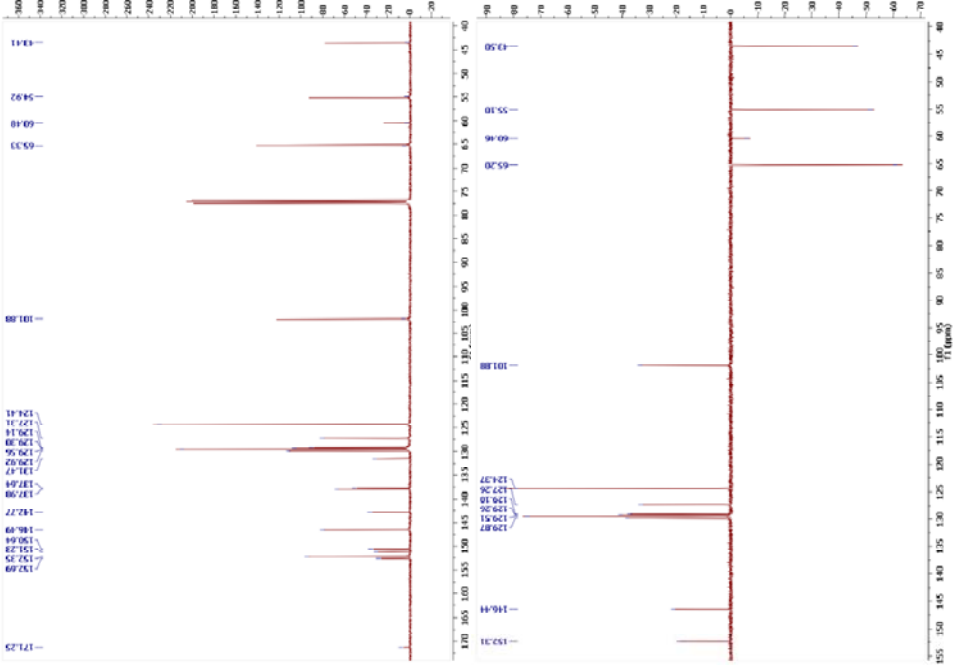


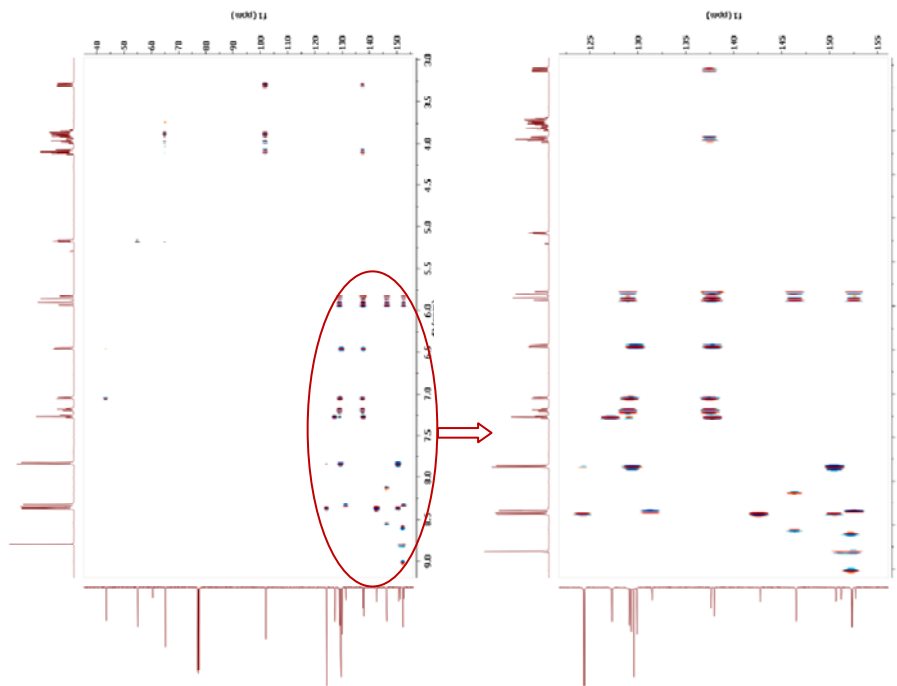
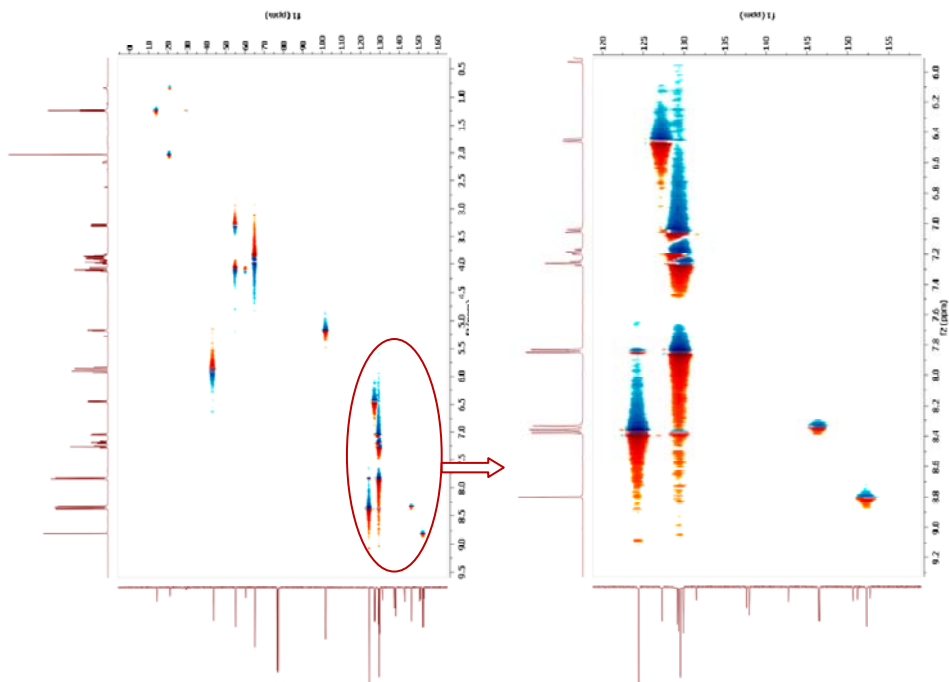


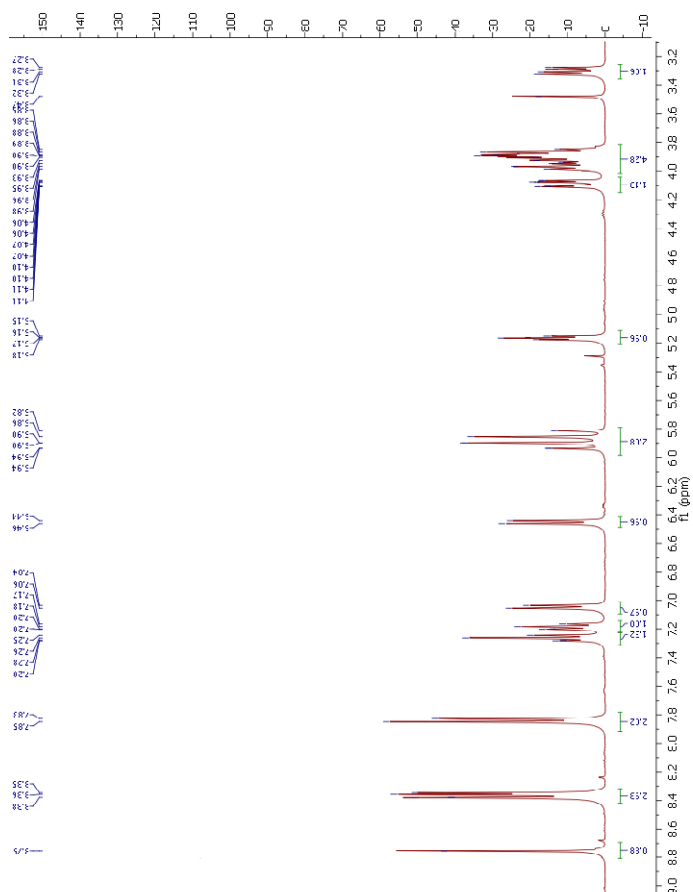
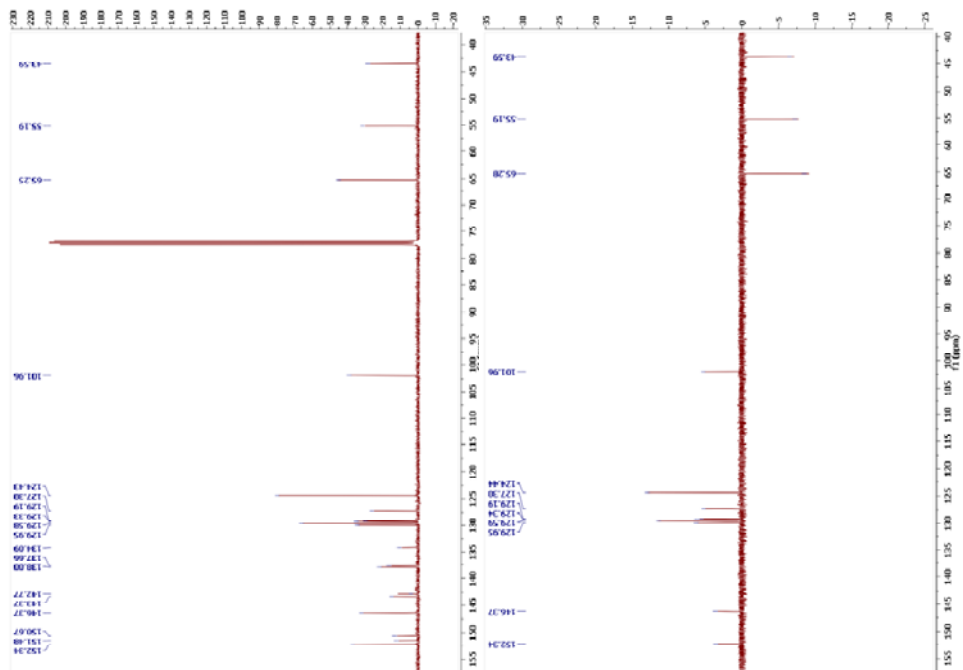
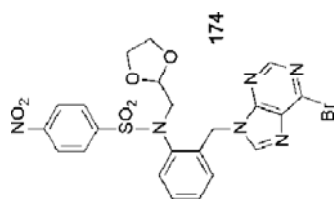


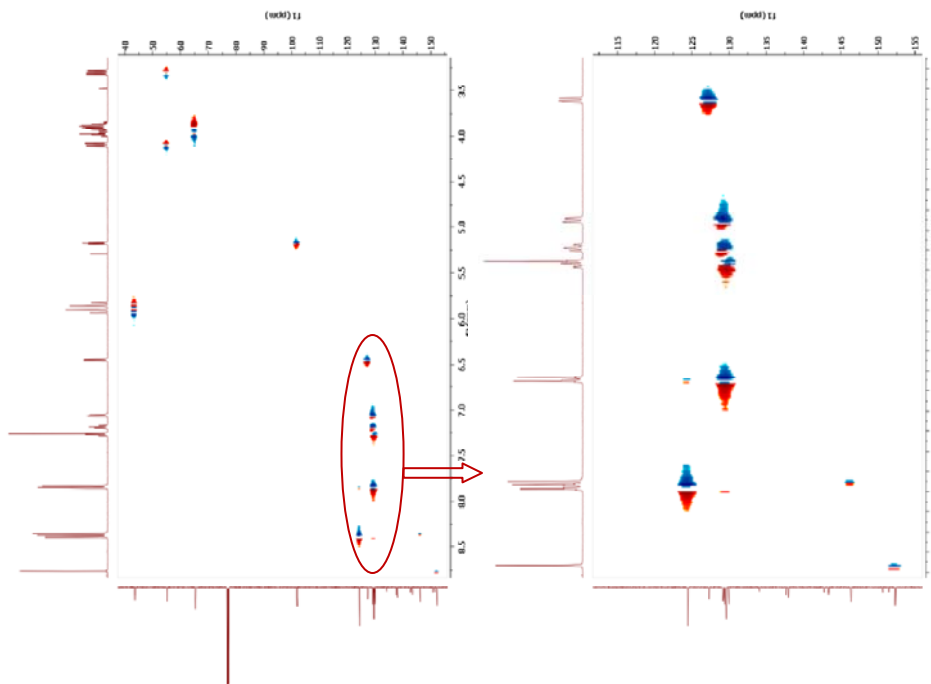
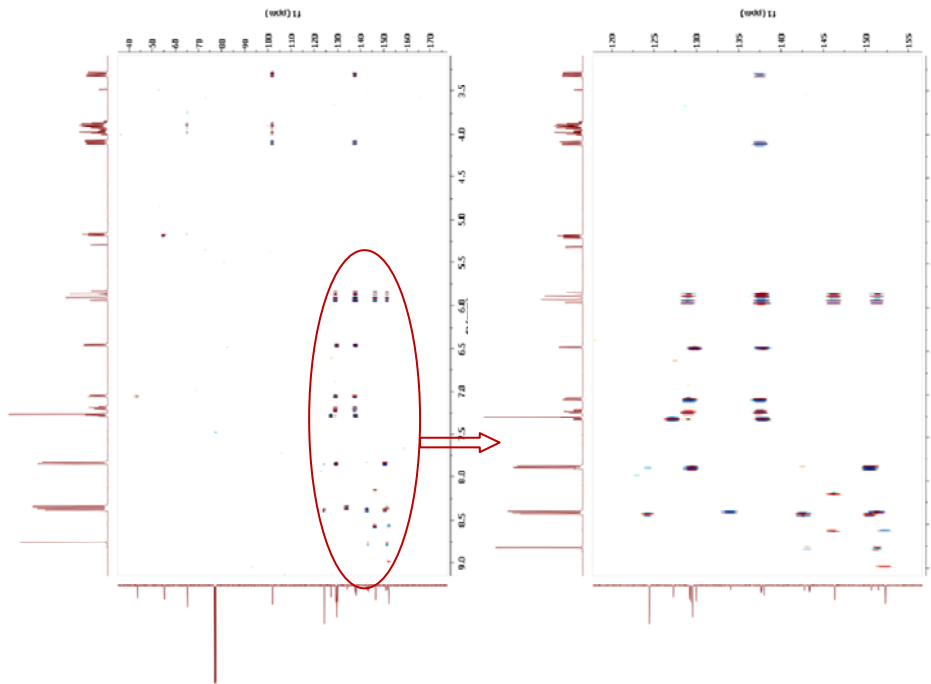


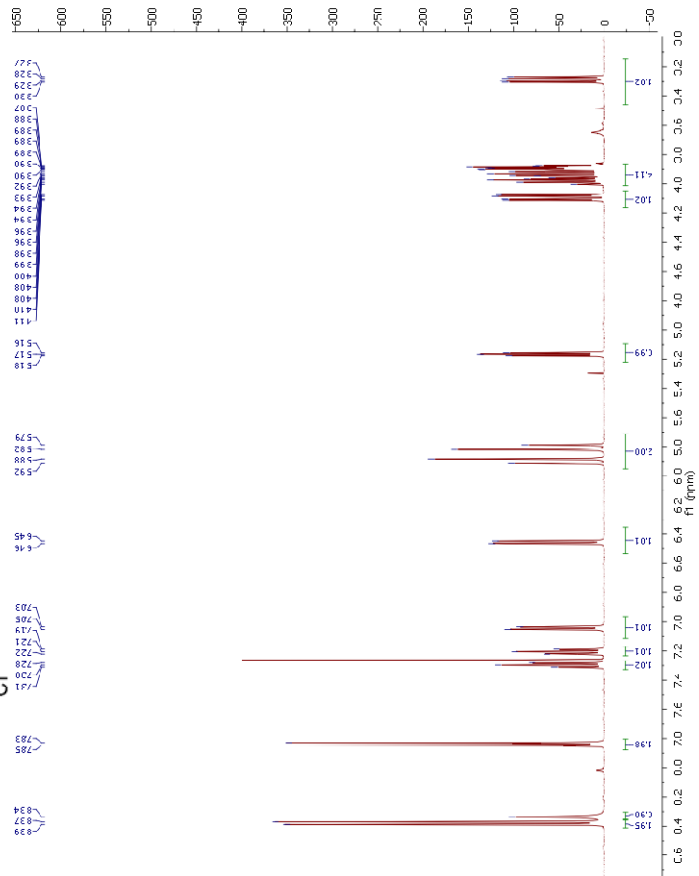
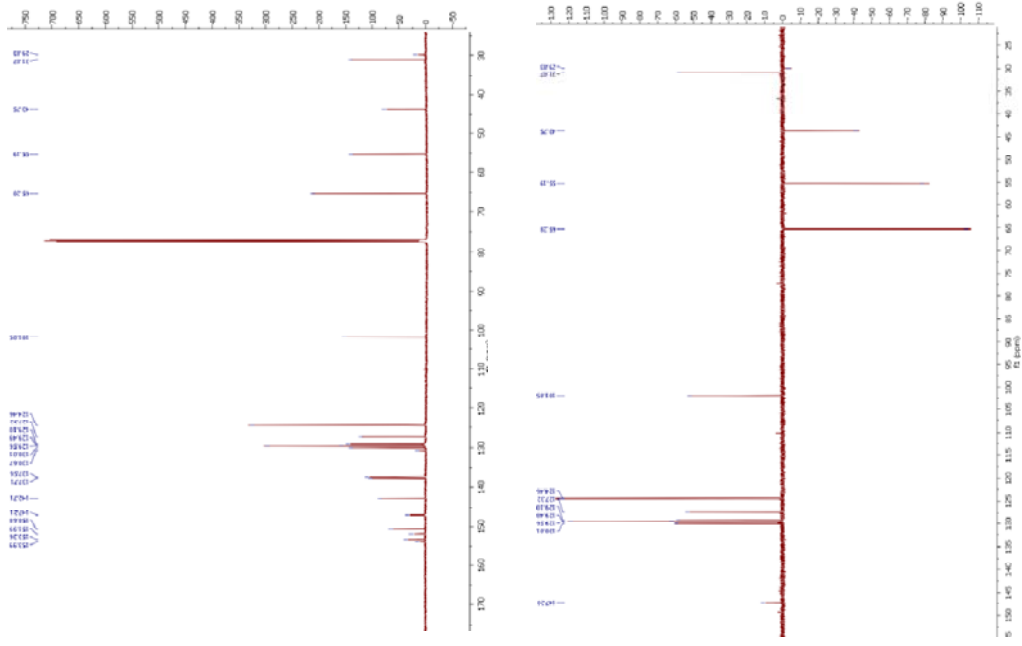
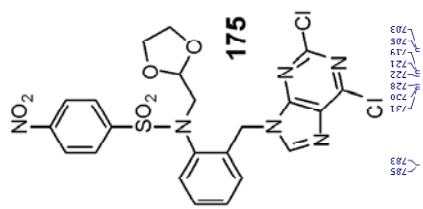
173



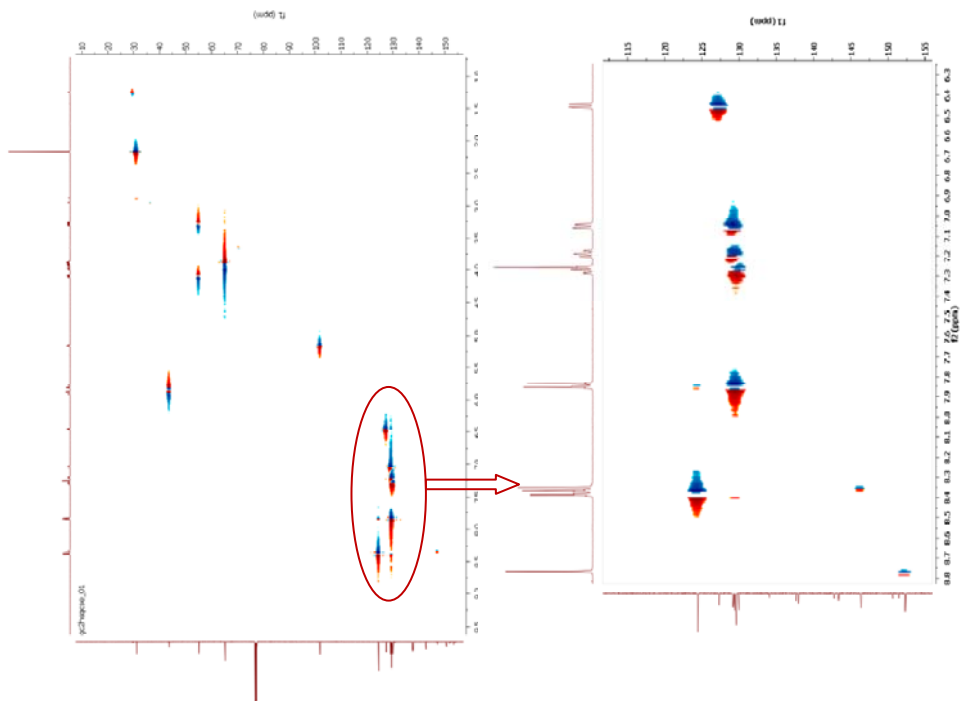
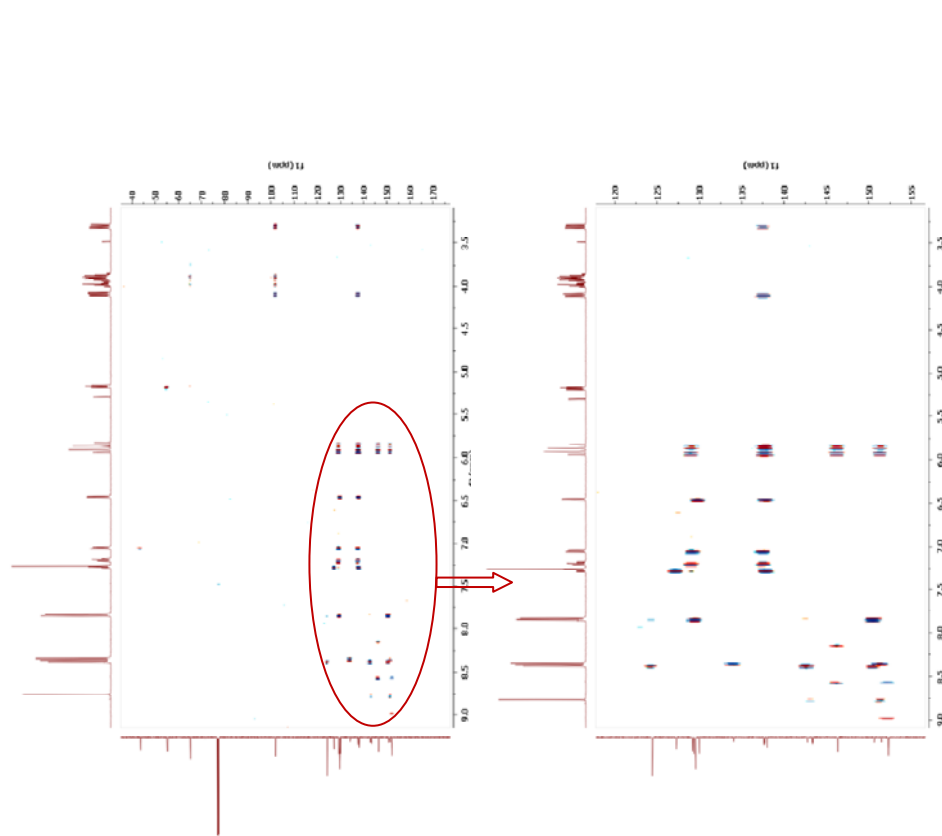








175







176

