



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica

**TESIS DOCTORAL**

**Nuevos derivados de purinas con actividad antiproliferativa y estudios de aminación reductora por biotransformación**

Programa de doctorado en Farmacia

**Nerea Fernández Sáez**

Granada, 19 de Julio de 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Nerea Fernández Sáez  
ISBN: 978-84-1306-315-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/57268>



*A mi abuela Rosina*





*“Nuestra recompensa se encuentra en el  
esfuerzo y no en el resultado. Un  
esfuerzo total es una victoria completa”  
(Mahatma Gandhi)*



## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no podría haberse llevado a cabo sin las personas que a lo largo del camino, me han ayudado y apoyado. El proceso ha sido largo y tedioso, muchos días frustrantes y agotadores, en los que no salen los experimentos sin saber por qué y otros eufóricos en los que ves como el trabajo da sus frutos. Sin las personas que han estado ahí, de una forma o de otra, habría sido mucho más difícil llegar a este día que tanto ansiaba, por ello me gustaría agradecerles este trabajo.

A mis directoras, Dori y Encarna, por darme la oportunidad de trabajar con vosotras y enseñarme tanto estos años. Gracias por vuestra paciencia y constancia para al final, conseguir leer por artículos pese a lo difícil se veía. Dori, me diste la primera oportunidad de descubrir lo que era la investigación en química farmacéutica, y resultó ser la vocación a la que intentaré dedicar mi futuro, gracias. Encarna, agradecerte la dedicación y sabiduría que has compartido conmigo todos estos años, eres un ejemplo a seguir.

A Joaquín, fuiste fuente de inspiración para mí y muchos otros alumnos que asombrados, veíamos la pasión con la que nos dabas la asignatura de Química Farmacéutica, como hablabas del descubrimiento de nuevos fármacos y rutas sintéticas de una forma que parecía (y lo es) la cosa más interesante del mundo. Gracias por darme la oportunidad de investigar en vuestra línea de investigación, habéis cosechado muchos éxitos y estoy segura de que seguirá siendo así.

A mis padres, Juan y M<sup>a</sup> Carmen, por creer en mí y apoyarme en todo lo que me he propuesto hacer, gracias por tener siempre unas palabras de aliento, incluso en los días en los que lo único que quería era rendirme y dejar la tesis. Gracias por la “fundación SAT fersa” que me ha costado todos los másters, cursos, estancias y doctorados que he querido hacer, gracias por ser tan buenos, comprensivos, inteligentes y generosos. Os lo debo todo.

A mi hermana, María, han sido unos años difíciles para todos pero, a pesar de la distancia, sé que siempre estás ahí y que puedo contar contigo. Gracias por aguantarme cuando me pongo negativa y veo todo negro, siempre tienes algún consejo o refrán acertado para cada situación. Eres un ejemplo de superación y con esfuerzo y constancia llegarás donde te propongas.

A Mari Tere, si alguien sabe lo que es pasar por lo que he pasado hasta llegar aquí eres tú, me has acompañado desde el primer día de carrera hasta el último de tesis, y espero que esto sólo sea el principio. Gracias por apoyarme y darme ánimos hasta cuando tú estabas en la misma situación. Recordaré siempre nuestras risas, llantos y tiempo convivido, lo bueno y lo malo, me ha encantado compartirlo contigo. Eres la persona más fuerte y generosa que conozco, gracias por estar ahí.

A Manu, has sido uno de los mayores apoyos que he tenido a lo largo de estos años, gracias por escucharme cuando necesitaba desahogarme porque no me salían las síntesis, cuando no avanzaba escribiendo, cuando no contestaban de las revistas y cuando me desesperaba hasta con el aire. Gracias por tu paciencia y tus palabras de ánimo en todo momento. Eres una de las personas de mejor corazón y más buenas que conozco, es una suerte tenerte en mi vida.

A Fabio, empezaste como compañero de laboratorio y te has convertido en un buen amigo. Gracias por amenizar los largos ratos de laboratorio, ha sido un placer compartir contigo esta etapa. En breve terminarás tu tesis, te deseo lo mejor y que consigas todo lo que te propongas. A los compañeros del departamento, a Guille y M<sup>a</sup> Dolores por las incontables ayudas en momentos de bloqueo. A Jesica, Ilaria y Stefanía por los buenos ratos, las largas conversaciones y la amistad que me habéis brindado en este tramo final de la tesis.

A mis amigas, a Rosa y Cristina, sabéis bien lo que es este proceso y sois un ejemplo de constancia y esfuerzo, gracias por vuestro apoyo. A ti Ana Lorena, eres una bomba de alegría, es una suerte tenerte como amiga, no cambies nunca. A Radio Patio, somos un grupo grande pero, aunque diferentes, todas sois una parte importante de mi vida. Los ratos y viajes que hacemos han sido como un soplo de positivismo para seguir con energía e ilusión.

A mi familia, a mis tíos Rosa y Antonio, a mis primas Patri y Marina, gracias por el entusiasmo que me habéis mostrado cuando os daba noticias sobre mi tesis, y la fuerza e ilusión que me transmitíais para continuar. A mis tíos Juanjo y Adeli, que a pesar de decepcionaros cada vez que me preguntabais como iba el descubrimiento del crece pelo definitivo, siempre me habéis apoyado y dado ánimos. A mis primas Rosi, Lorena, Mari, Tamara, Yasmina y Aurori por darme ánimos para terminar y ser fuente de inspiración como mujeres fuertes y emprendedoras.

A mis abuelos, José y Carmen, gracias a vosotros por alentarme a estudiar y conseguir lo que me proponga.

A mi abuela Rosina, te has ido antes de que pudiese acabar, el cáncer no tiene compasión con nadie pero tú has puesto todo de tu parte para que estemos lo mejor posible. Has sido un ejemplo para mí, de mujer fuerte y trabajadora, pero que también valoraba la familia y los buenos ratos, gracias por tus historias de juventud, por tu cariño y por tu sonrisa, te echo de menos y nunca te olvidaré.



# ÍNDICE

---





## I INTRODUCCIÓN

<b>1. Cáncer</b> .....	1
<b>1.1. Ciclo celular</b> .....	3
<b>1.2. Muerte celular programada</b> .....	5
1.2.1. Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas.....	6
1.2.2. Genes supresores de tumores y proto-oncogenes.....	10
<b>1.3. Macrófagos M1 y M2</b> .....	14
<b>1.4. Células madre cancerígenas</b> .....	15
<b>1.5. Líneas tumorales usadas en ensayos biológicos</b> .....	17
1.5.1. Ensayos en cultivos celulares 2D y 3D.....	18
1.5.2. Ensayos biológicos realizados en células tumorales...	20
<b>2. Antecedentes estructurales</b> .....	23
<b>2.1. 5-Fluorouracilo</b> .....	24
<b>2.2. Desarrollo racional desde el 5-FU al bozinib</b> .....	24
2.2.1. Aciclonucleósidos.....	24
2.2.2. Derivados 1-(1,4-diheteroepanilo) .....	27
2.2.3. Estructuras O,N-acetálicas cíclicas y acíclicas unidas a 5-FU.....	28
2.2.4. Estructuras O,N-acetálicas unidas a otras bases nitrogenadas.....	33
<b>2.3. Compuestos no acetálicos</b> .....	46
<b>3. Otros antitumorales heterocíclicos</b>	50
<b>3.1. Purinas y heterociclos unidos a purinas con actividad antitumoral</b> .....	51
<b>3.2. Derivados de 1,3- y 1,4-benzoxacinas</b> .....	52
<b>3.3. Derivados de quinazolininas</b> .....	54

3.4. Tetrahydroisoquinolinas.....	55
3.5. Tetrahydroquinolinas.....	56
<b>4. Biocatálisis y enantioselectividad.....</b>	<b>58</b>
4.1. Importancia de las transaminasas (TAs) .....	61
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>63</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>87</b>
<b>III. METODOLOGÍA.....</b>	<b>93</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
Artículo 1.....	99
Artículo 2.....	171
Artículo 3.....	195
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>221</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>227</b>

## Abreviaturas

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

ADN: Ácido desoxirribonucleico

OMS: Organización Mundial de la Salud

INC: Instituto Nacional del Cáncer

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

hTERC: ARN codificante de telomerasa humana, *human Telomerase Encoded RNA*

hTERT: Transcriptasa Inversa del Telómero humano, *human Telomere Reverse Transcriptase*

CDK: Quinasas dependientes de ciclinas, Cyclin-Dependent Kinase

ATP: Adenosina Trifosfato

*RB*: Gen retinoblastoma

RB: Proteína del retinoblastoma

FDA: Administración de comida y fármacos, Food and Drug Administration

ROX y RNX: Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

TAM: Macrófagos asociados a tumores, Tumor Associated Macrophages

CSC: Células madre cancerígenas, Cancer Stem Cells

MEC: Matriz extracelular

CCLE: Enciclopedia de líneas celulares de cáncer, Cancer Cell Line Encyclopedia

5-FU: 5-Fluorouracilo

OPr<sup>i</sup>: Isopropoxilo

OCp: Ciclopentoxilo

Hep-2: Línea celular de cáncer de laringe

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria máxima 50

HT-29: Línea de carcinoma humano de colon

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama

DBDU: (*RS*)-1-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzoxacepin-3-il)-uracilo

T: Timina

U: Uracilo

MCF-10: Línea celular sana del epitelio mamario no canceroso

IEC-6: Células del epitelio intestinal de una línea de rata no tumoral

IT: Índice terapéutico

Fmoc: Fluorenilmetoxicarbonilo

SAR: Relación estructura actividad, Structure-Activity Relationship

MDA-MB-231: Línea de cáncer de mama hormono-dependiente

TMSCl: Clorotrimetilsilano

HMDS: Hexametildisilazano

RKO y HCT-116: Líneas de cáncer de colon

IFN-  $\alpha$ : Interferón- $\alpha$

A375: Línea celular de melanoma humano

SKBR3: Línea celular de cáncer de mama

SNU638: Línea celular de cáncer de estómago

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, Epidermal Growth Factor Receptor

THIQ: Tetrahidroisoquinolinas

ER $\alpha$ : Receptor de estrógenos- $\alpha$ , Estrogen Receptor- $\alpha$

SERD: Degradación selectiva de receptores de estrógenos , Selective Estrogen Receptor Degradation

THQ: Tetrahydroquinolinas

PANC-1: Línea celular de cáncer de páncreas

EPAC: Proteínas de intercambio activadas directamente por cAMP,  
Exchange Proteins Directly Activated by cAMP

TAs: Transaminasas









# I. INTRODUCCIÓN

---



## I INTRODUCCIÓN

### 1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética que surge cuando hay mutaciones en tres principales grupos de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Entre los diferentes factores que pueden causar estas alteraciones están incluidos el tabaquismo, la falta de ejercicio físico, la alimentación, algunas infecciones, exposición a factores químicos y radiaciones.

Los datos más recientes recogidos por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) indican que los tumores más diagnosticados siguen siendo el colorrectal, el de próstata, pulmón, mama, vejiga y el de estómago. En España, en 2019 se estima que se alcanzarán los 277.234 nuevos casos diagnosticados de cáncer y se predice que para 2035 la estimación sea de 315.413 nuevos casos<sup>1</sup>. Las cifras recogidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) hablan de un mayor número de casos de cáncer en 2018, que oscilan en los 18.1 millones y estiman en 9.6 millones los casos de muerte por esta causa; reporta, de igual manera, que a nivel mundial el mayor número de casos de cáncer según localización corresponde a los de pulmón, colorrectal y cáncer de mama en mujeres. Si hablamos de mortalidad ocuparían el primer, segundo y quinto lugar respectivamente<sup>2</sup>.

La clasificación general de los tipos de tratamientos que existen para combatir el cáncer (que se pueden hacer de forma independiente o combinándolos) según el Instituto Nacional del Cáncer (INC) es:

- Cirugía: se aplica cuando el cáncer está localizado. Existen diversas clases en función del tipo de cáncer:
  - Criocirugía, en cáncer de piel en estado inicial o retinoblastoma.

- Cirugía láser, cuando es en órganos internos como cáncer de cérvix, vagina, esófago...
- Terapia fotodinámica, empleando fármacos fotosensibles, en cáncer de piel o de pulmón de células no pequeñas.
- Radioterapia: en la que hay dos divisiones, de haz externo, para tratamiento local (como cáncer de cérvix o pulmón) y de haz interno, donde la fuente de radiación (que puede ser en estado sólido o líquido) está dentro del cuerpo y se emplea para cánceres de cabeza y cuello, o de mama, por ejemplo.
- Quimioterapia: se pueden clasificar en función de la vía de administración que puede ser oral, intravenosa (a través de un catéter o puerto que puede ir unido a una bomba), por inyección, intratecal, intraperitoneal, intraarterial o vía tópica. Otra clasificación que puede hacerse es como neoadyuvante, para disminuir el tamaño de un tumor antes de aplicar radioterapia o realizar una intervención quirúrgica, o adyuvante, que se administra tras estos procedimientos a fin de destruir las células cancerígenas que no hayan sido eliminadas para que no se reproduzca el tumor de nuevo.
- Inmunoterapia: se puede hacer una distinción entre los tratamientos que refuerzan el sistema inmune y los que combaten más activamente el tumor ayudando al sistema inmunitario.
  - En el primer grupo se incluyen los inhibidores del punto de control, que ayudan a las células T a responder al tumor con mayor agresividad, la transferencia adoptiva celular, que consiste en crecer de forma artificial en un laboratorio las células T más activas del paciente frente a ese tumor, los anticuerpos monoclonales que son proteínas creadas en el laboratorio y, por último, vacunas de tratamiento, las cuales son diferentes de las vacunas de prevención.

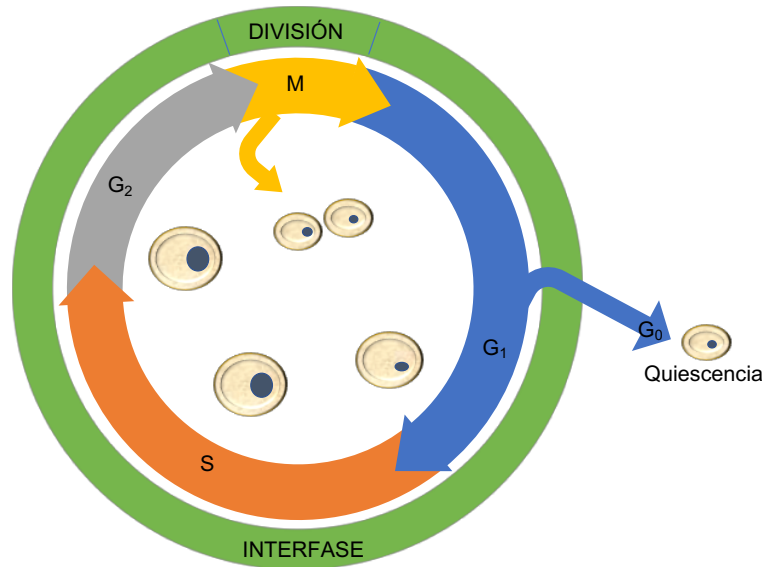
- En el segundo grupo se encuentra la inmunoterapia que combate el cáncer de forma más activa reforzando el sistema inmune, como las citocinas (interferones e interleucinas) y el bacilo de Calmette-Guérin (BCG).
- Terapia hormonal: se divide en dos grupos bien definidos, los que bloquean la producción de determinadas hormonas por parte del organismo, y los que modulan la forma en la que las hormonas actúan en el cuerpo.
- Trasplante de células madre: este tratamiento se realiza cuando la persona que tiene cáncer, o bien ha perdido células sanguíneas por un tratamiento agresivo de quimioterapia o radioterapia, o bien el cáncer es una leucemia y se encuentran afectadas las células hematopoyéticas. En este último caso el trasplante también actuaría combatiendo la neoplasia. En función del donante de células, estos trasplantes se clasifican en:
  - Autólogos cuando provienen del mismo paciente.
  - Sintólogos cuando provienen de un hermano/a gemelo/a.
  - Alogénicos cuando provienen de un familiar consanguíneo o una persona compatible.

### **1.1. Ciclo celular**

El ciclo celular de la mayoría de las células es un mecanismo de proliferación a través de cuatro procesos coordinados: crecimiento celular (fase  $G_1$ ), replicación de ADN (fase S), distribución de los cromosomas duplicados (fase  $G_2$ ) y división celular (mitosis y citocinesis, fase M), para dar dos células hijas, no solo para el crecimiento de los tejidos sino también para el reemplazo de las células dañadas en tejidos y órganos adultos.

La célula también puede salir del ciclo celular por diferentes motivos, como arresto permanente asociado a una diferenciación terminal o senescencia,

o bien una salida del ciclo reversible conocida como quiescencia (fase  $G_0$ )<sup>3</sup>(Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo celular.

La transición a través del ciclo celular eucariota está coordinada por la fosforilación y defosforilación de sustratos específicos de cada fase, conocidos como proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)<sup>4</sup>. La progresión de estas etapas depende de este aparato regulador conservado que no sólo regula el paso entre las diferentes fases del ciclo (entre las fases  $G_1$ -S y la  $G_2$ -M)<sup>5</sup>, sino que también regula la proliferación celular en base a las señales externas como pueden ser inhibición por contacto o por falta de nutrientes.

Hay que tener en cuenta que no todas las células del organismo tienen el mismo periodo de división (aproximadamente de 24 horas) donde el proceso de mitosis y citocinesis sólo dura sobre una hora. Una minoría de células tiene un ciclo celular activo, es decir, están regularmente proliferando, como pueden ser zonas que necesiten regenerarse constantemente, por ejemplo, el tejido epitelial o la médula ósea. Por otra parte, las células más especializadas se quedan en fase  $G_0$  (quiescencia),

bien de forma irreversible (como las neuronas o los miocitos) o bien de forma reversible que, al recibir estímulos vuelven al ciclo celular (como los hepatocitos)<sup>6</sup>.

## 1.2. Muerte celular programada

En el organismo existe un equilibrio entre las nuevas células que se generan y la desaparición de las que lo componen, con el objetivo de mantener un tamaño constante. El proceso celular por el que una célula induce su propia muerte es conocido como apoptosis, proceso que se denomina también como “muerte celular programada”. Desde la etapa embrionaria, millones de células mueren sin ser a causa de una patología o porque estén dañadas, sino que se trata de un proceso natural, definido genéticamente, por el cual las células mueren tras un determinado número de divisiones. Este proceso está controlado por los telómeros, unas secuencias ubicadas en los extremos de los cromosomas que se van acortando en las sucesivas divisiones celulares<sup>7</sup>. Los telómeros, además, poseen una actividad protectora manteniendo la integridad del ADN<sup>8</sup>.

Las telomerasas tienen dos componentes: uno de ellos es el ARN, conocido como hTERC (ARN codificante de telomerasa humana, *human Telomerase Encoded RNA*) y un componente catalítico resultado de la traducción de ese RNA, hTERT (Transcriptasa Inversa del Telómero humano, *human Telomere Reverse Transcriptase*). La función de la hTERT es la síntesis de secuencias teloméricas que se han ido perdiendo a lo largo de las sucesivas divisiones de la célula, y su actividad es crucial en la estabilización de los telómeros, y lo hace a través de la incorporación de secuencias repetidas de TTAGGG.

Las alteraciones genéticas que afectan a una erosión mayor de los telómeros e inhiben la correcta reparación del ADN, tienen como consecuencia un envejecimiento prematuro<sup>9</sup>, característica observada en



diferentes enfermedades tales como disqueratosis congénita<sup>10</sup>, síndrome de Werner<sup>11</sup> o anemia aplásica<sup>12</sup>, entre otras.

La célula menos diferenciada en los humanos es el cigoto, célula totipotente a partir de la cual, a través de estímulos intrínsecos y extrínsecos a ella, se repiten divisiones celulares para crear el organismo humano completo con hasta 260 tipos de células que aparecen en distintas fases del desarrollo<sup>13</sup>. Las células madre pluripotentes son células indiferenciadas que tienen la habilidad de proliferar por un periodo indefinido de tiempo, dividirse dando células hijas para la autorenovación, y diferenciarse en células especializadas con el fin de cumplir con los requisitos del desarrollo del organismo. Estas células madre se clasifican en tres grupos: células madre somáticas, células madre embrionarias y células pluripotentes inducidas<sup>14</sup>.

A partir de todas ellas se generan dos tipos de células, las somáticas que son las responsables del crecimiento de los tejidos y órganos, y las germinales que son aquellas a partir de las cuales se forman los gametos. El número de veces que una célula somática (en la mayoría de las cuales no se expresa el hTERT)<sup>8</sup> se divide, suele adaptarse al límite de Hayflick, en el que se estipula que el ciclo celular puede repetirse un número que oscila entre 30 y 50 veces a lo largo de la vida de la célula<sup>15,16</sup>.

### **1.2.1. Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas**

La regulación del ciclo celular es uno de los aspectos más importantes del mismo, debido a las enfermedades derivadas de los fallos en el control de la proliferación. Es por esto que los diferentes puntos de control han sido objeto de estudio, ya que pueden usarse como dianas para posibles tratamientos antitumorales. Los sistemas de control de regulación del ciclo son unos complejos bioquímicos compuestos por proteínas reguladoras que interaccionan entre sí, entre ellas las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs).

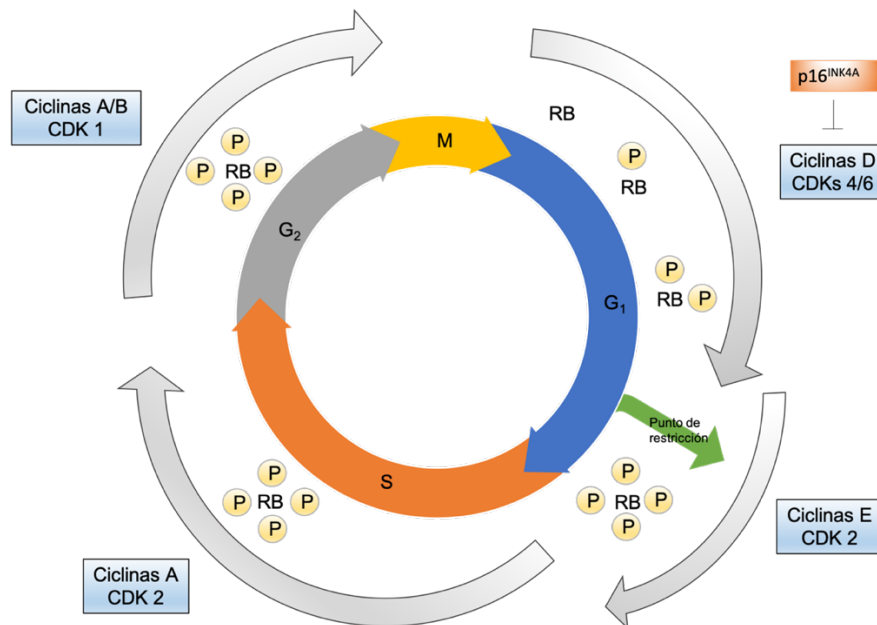
Las CDKs ejercen una regulación positiva sobre el ciclo, se trata de enzimas binarias cuya subunidad catalítica se coordina con adenosina trifosfato (ATP) y trasfiere un fosfato al sustrato apropiado. Por sí solas las subunidades de CDK no tienen actividad enzimática, sino que necesitan asociarse a un activador alostérico específico denominado ciclina. Estas ciclinas son específicas para cada fase del ciclo, cuando se unen entre sí inducen un cambio conformacional en el dominio C terminal que conlleva la activación de las CDKs, y los complejos formados desencadenan la transición de las distintas fases del ciclo celular<sup>17</sup>.

Se conocen más de 20 CDKs diferentes. De algunas de ellas, aún se desconoce su función. Las restantes conocidas están identificadas como reguladoras del ciclo celular, o como reguladoras de la transcripción<sup>18</sup>. Existe una clasificación de las CDK en función de la etapa y los procesos que controlan.

Los fármacos inhibidores de ciclinas basan su mecanismo de acción en este sistema de regulación, el cual ha sido objeto de múltiples investigaciones para el desarrollo de nuevos medicamentos contra el cáncer. Su atención se ha alentado en los últimos años, no solo por el hecho de que regulan el ciclo celular, sino porque también regulan diversos aspectos de la transcripción. Debido a la falta de selectividad de los fármacos inhibidores de las CDK, estos presentaban una alta toxicidad y no tenían una buena actividad contra el cáncer<sup>19</sup>.

Las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 juegan papeles fundamentales en la proliferación de células mamarias. Su actividad enzimática en la primera etapa del ciclo celular ( $G_1$ ) está regulada por ciclinas tipo D, expresadas en respuesta a señales extracelulares, como por ejemplo estimuladores de mitógenos, inductores de la diferenciación o contacto célula-célula, entre otros<sup>20</sup>.

El gen retinoblastoma (*RB*) es un gen canónico supresor de tumores, la proteína que codifica, RB, es desfosforilada (activada) en la fase M y progresivamente refosforilada (inactivada) en la fase G<sub>1</sub>, primero por las quinasas dependientes de ciclinas D (CDKs 4/6) y después por las E dependientes (CDK 2). La proteína RB es completamente fosforilada al final de la fase G<sub>1</sub>, lo que conlleva la inactivación de su función supresora de la proliferación y permite la entrada de la célula en la siguiente fase, S<sup>21</sup> (Figura 2). Se han relacionado las quinasas dependientes de ciclinas D con diversos tipos de cáncer como el de mama. Cuando hay una sobreexpresión de ciclinas tipo D o una falta del inhibidor de estas CDKs, las proteínas INK4 (p16<sup>INK4A</sup>)<sup>22</sup> inhiben la fosforilación de la proteína RB y dejan a las células arrestadas en la fase G<sub>0</sub> (quiescencia), en el punto de restricción (Figura 2).

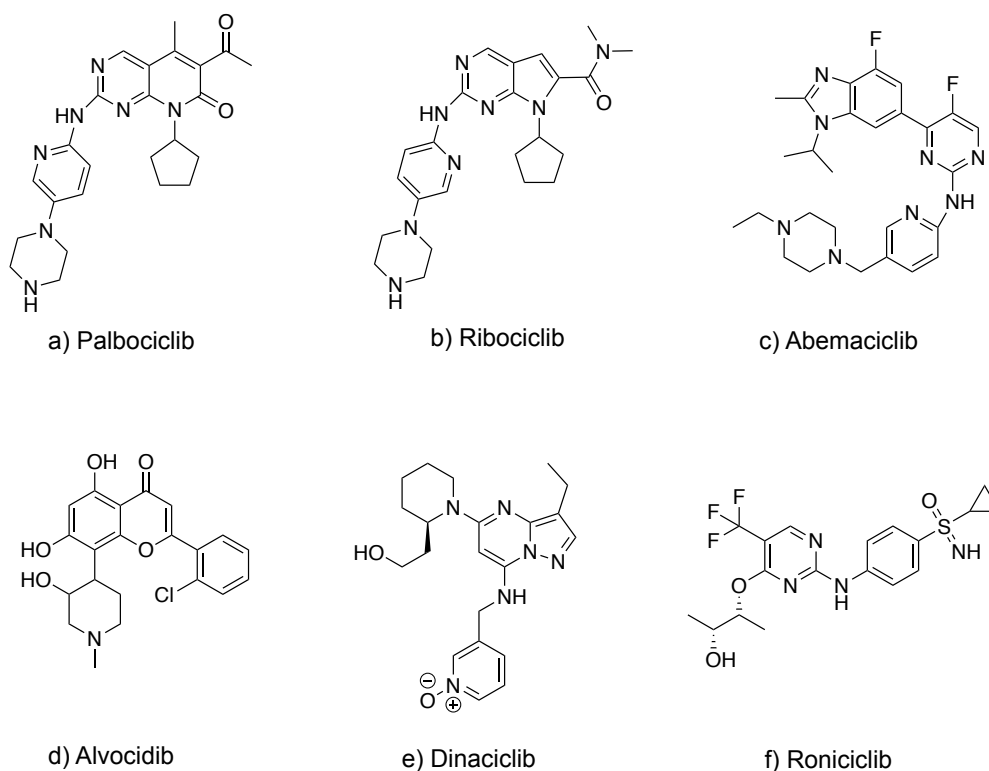


**Figura 2.** Fosforilación de RB en el ciclo celular por las quinasas.

Recientemente, se han desarrollado fármacos selectivos de isoformas clave, como el palbociclib (Figura 3), un inhibidor selectivo de la isoforma CDK4/6, activo frente a cáncer de mama. Esta técnica se basa en el estudio

de biomarcadores personales de cada paciente, que permiten seleccionar dianas más específicas y tener así una mayor ventana terapéutica. Sin embargo, uno de los mayores problemas de esta familia de fármacos antitumorales es la resistencia que generan<sup>23</sup>.

Otros ejemplos de fármacos inhibidores de las CDKs aprobados por la FDA son el ribociclib (nombre comercial Kisqali®) o el abemaciclib (Verzenio®), ambos activos contra las CDK4 y CDK6 para el tratamiento vía oral de cáncer de mama. El ribociclib es activo cuando se administra en combinación con inhibidores de aromatasa para el tratamiento de mujeres pre/peri/post menopáusicas con HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> avanzado o cáncer de mama metastásico. Este fármaco inhibe la CDK4 con un valor de CI<sub>50</sub> de 10 nM y la CDK6 con una CI<sub>50</sub> de 39 nM<sup>20</sup>. Sin embargo, la potencia inhibitoria contra las CDKs 1 y 2 es mucho menor (>50 μM).



**Figura 3.** Moléculas inhibidoras de CDKs aprobados por la FDA (a-c); Estructuras inhibidoras de CDKs que están actualmente en ensayos clínicos o próximos a estarlo (d-f)<sup>24</sup>.

Estos son algunos de los fármacos inhibidores de las CDKs aprobados por la FDA, pero también hay muchas moléculas que están en estudios clínicos o que estarán en breve en este proceso (Figura 3).

Las ciclinas y las CDKs responden a señales intra y extracelulares que determinan que la célula continúe el ciclo, señales positivas como pueden ser los factores de crecimiento que estimulan la actividad de las CDKs, o señales negativas como pueden ser daños o errores en el ADN.

### **1.2.2. Genes supresores de tumores y proto-oncogenes**

Una idea importante a destacar, es que los tumores se desarrollan a partir de una célula mutada, que ve afectada su capacidad de control sobre la proliferación. A partir de ella, se crean clones con la misma mutación y, por tanto, la misma capacidad de proliferar incontroladamente. Pero la mutación no es única, es decir, para que una célula se vuelva cancerosa tiene que pasar por un proceso de varias etapas donde se van acumulando una serie de mutaciones<sup>25</sup>.

Los genes supresores de tumores y los oncogenes tienen un papel crucial en funciones como la proliferación celular, el crecimiento y la apoptosis<sup>26</sup>. Diversos estudios realizados en moscas de la especie *Drosophila*, han demostrado que más del 75% de los genes que se han identificado en enfermedades humanas tienen sus homólogos en este insecto modelo<sup>27</sup>; las actividades de estos genes afectados han servido para explicar mejor su contribución<sup>28,29</sup>.

La competencia celular es un mecanismo por el cual células viables son eliminadas por la presencia de células más competentes. Este mecanismo potencia el desarrollo de los animales y los tejidos, sin embargo puede ser alterado, como en el caso de las células malignas, para proliferar y

expandirse<sup>26</sup>. Hay tres tipos de competitividades celulares en función de la clase de células involucradas (estudiado en *Drosophila*):

- Competición canónica, en la que las células implicadas son igualmente viables, pero una es superior a la otra. Por ejemplo, los mutantes *Minute*, contienen mutaciones dominantes que afectan a genes codificantes de proteínas de los ribosomas que causan un crecimiento más lento (biogénesis reducida)<sup>30</sup>. Estas células, a pesar de ser viables, en presencia de células silvestres (sin mutación), son eliminadas por apoptosis<sup>31</sup>. Este fenómeno también se ha observado en mamíferos<sup>32</sup>.
- Supercompetición, son células alteradas genéticamente que han adquirido la habilidad de vencer a las células silvestres<sup>33,34</sup>. Estas mutaciones pueden ser, bien por inactivación de genes supresores del crecimiento (como el gen *warts*)<sup>35</sup>, o bien por activación de genes promotores del crecimiento (como el protooncogen *Myc*)<sup>36,37</sup>.
- Competencia endógena, es la descubierta más recientemente. Tiene lugar en el epiblasto (tejido embrionario que está formado por células madre pluripotentes, a partir del cual se forma el embrión completo), que tiene cantidades variables de la proteína Myc en sus células. En este tejido se ha visto que la competición endógena selecciona las células con mayores cantidades de Myc, como consecuencia el epiblasto se enriquece con células con mayor potencial de crecimiento<sup>38</sup>.

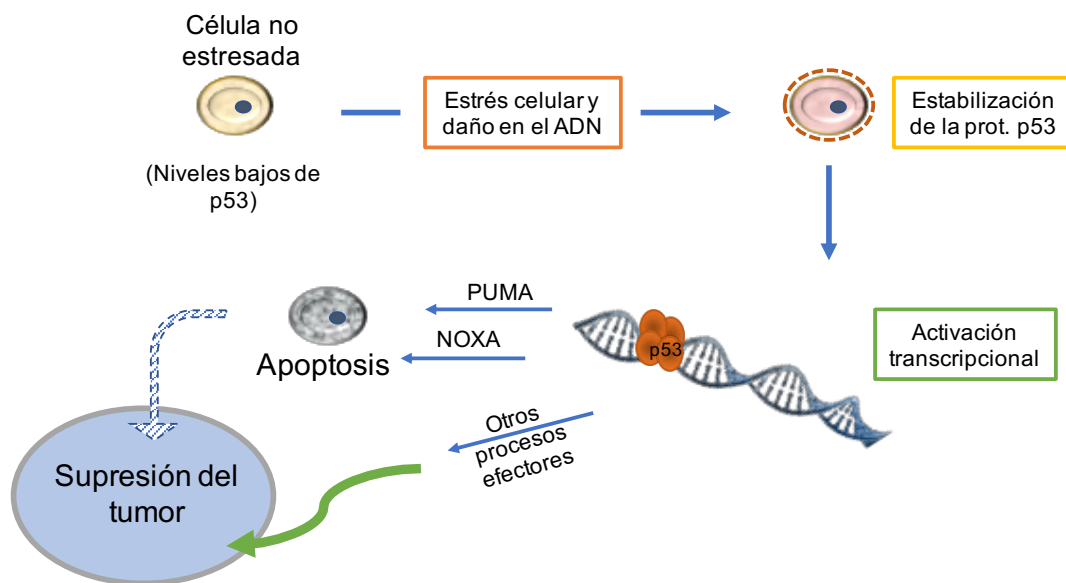
La competición celular mayoritariamente se ve como un sistema homeostático en el que se sustituyen células ganadoras por células perdedoras (subóptimas). La eliminación de estas últimas es necesaria para la expansión de las células más competentes sin que afecte al tamaño

final del organismo. Teniendo en cuenta que los diferentes tipos de competencia no ocurren de forma independiente y separada, no están definidas del todo las características que determinan en un organismo qué células son ganadoras y cuáles son perdedoras<sup>26</sup>.

Toda esta maquinaria de homeostasis del crecimiento y mantenimiento celular es una caja de herramientas para las células cancerígenas, de modo que una pérdida de la regulación que ejerce esta competición celular por mutaciones en genes implicados, es un mecanismo para que un tumor maligno se expanda y mantenga<sup>39,40</sup>.

Los genes supresores de tumores son un conjunto de genes que codifican proteínas implicadas en la inhibición de la proliferación celular, como el gen *p53*, clave en la respuesta al daño del ADN, (también conocido como “el guardián del genoma”<sup>41</sup>) o el gen *RB*, ambos se han descubierto mutados de forma excepcional en diversos tipos de cáncer. Para que una mutación que afecte a estos genes desencadene un proceso tumoral deben verse afectados ambos alelos del gen, es decir, son mutaciones genéticamente recesivas<sup>42</sup>.

El gen *p53* (que codifica la proteína p53) está mutado en aproximadamente la mitad de los cánceres humanos. Este gen se activa como respuesta a diversos estímulos, como agresiones al ADN por radiaciones, y factores como el estrés o los malos hábitos, que crean radicales libres que atacan al ADN. También se ve estimulado en respuesta a la activación de oncogenes de forma que la proteína p53 induce transcripción de las proteínas efectoras de la apoptosis PUMA Y NOXA<sup>43</sup>, aunque hay estudios recientes que señalan que la pérdida de actividad de estas dos proteínas por sí solas no es suficiente para la supresión de la formación de tumores, ya que en ausencia de ellas no se forman tumores espontáneos<sup>44</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de p53.

En este mismo apartado, nos encontramos con los genes que poseen una actividad opuesta a los anteriormente mencionados, los oncogenes. Esta familia de genes actúa activando la división celular incontrolada. Algunos ejemplos de proteínas codificadas por dichos genes son los factores de crecimiento, proteínas quinasas, factores de transcripción, o factores que afectan a la apoptosis. A diferencia de los genes supresores de tumores, en estos genes sería necesaria una única mutación en un alelo, lo que significa que tiene un efecto dominante<sup>42</sup>.

Pese a conocer que estos genes están afectados en una amplia variedad de tumores, un cáncer es dinámico y sus anomalías aparecen por evolución molecular<sup>45</sup>. Por ello, el descubrimiento de un tratamiento eficaz encuentra muchos obstáculos. Pero el conocimiento de todos estos sistemas de regulación y restricción, así como su desregularización, nos acercan más a tratamientos efectivos y específicos<sup>26</sup>.

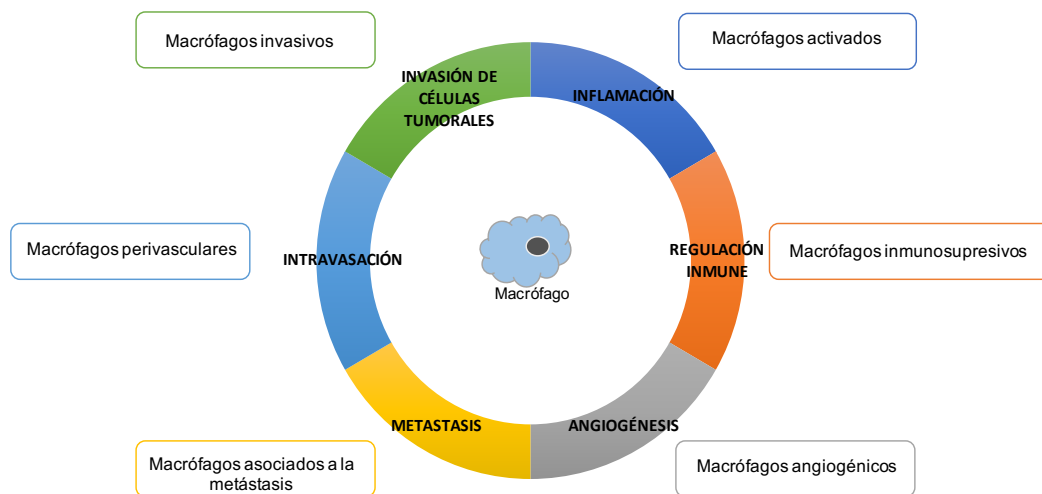


### **1.3. Macrófagos M1 y M2**

Los macrófagos son células mieloides del sistema inmune innato involucradas en diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos. Intervienen principalmente en infecciones e inflamación. Cuando tiene lugar alguna de estas condiciones, los monocitos presentes en la sangre migran al tejido afectado y se diferencian a macrófagos<sup>46</sup>, los cuales, dependiendo del estímulo, pueden diferenciarse y adaptar su fenotipo debido a la alta plasticidad que presentan<sup>47</sup>.

Los macrófagos se pueden asociar principalmente a dos estados de polarización<sup>48</sup>: por un lado, nos podemos encontrar con la activación clásica tipo 1 (M1) que ocurre tras un daño o una infección, produciéndose citoquinas proinflamatorias como TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 e IL-12<sup>49</sup>, o especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROX y RNX) que inhiben la polarización de los linfocitos por la vía alternativa y consecuente diferenciación a macrófagos M2<sup>50</sup>; por otro lado, la activación alternativa de linfocitos (M2) está promovida por M-CSF, interleucinas como IL-3, IL-4, IL-10, corticoides o la Vitamina D. Entre las funciones de estos M2 se encuentran la inmunosupresión, reparación de tejidos, angiogénesis y retirada de desechos, procesos que continúan llevándose a cabo en las masas tumorales actuando de “trabajadores activos” en el mantenimiento de las células<sup>51</sup>.

Dentro de esta vía hay diferentes subpoblaciones asociadas a su actividad. Todos estos subtipos de macrófagos están definidos por la expresión de marcadores canónicos Cd11d, F4/80 CSF 1R y la ausencia de Gr1<sup>52</sup>, y todos vienen determinados por señales del microentorno para adoptar un fenotipo en concreto y actuar según la clasificación mostrada en la Figura 5.



**Figura 5.** Funciones de los macrófagos M2 que aumentan la progresión tumoral.

Los macrófagos asociados a tumores (TAM, Tumor Associated Macrophages) presentan un fenotipo similar a los M2<sup>53</sup>, y representan la mayor parte de los leucocitos presentes en un tumor sólido, constituyendo, por las funciones que desempeñan en el crecimiento del cáncer, un interesante objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos<sup>54</sup>.

#### 1.4. Células madre cancerígenas

Las células madre cancerígenas (CSC, Cancer Stem Cells), son una subpoblación de células tumorales capaces de autoregenerarse, proliferar<sup>55</sup> y diferenciarse. Además presentan una gran plasticidad, por lo que se adaptan rápidamente al entorno, lo que les confiere la capacidad de evadir al sistema inmune. Estas características están asociadas a la tumorigénesis, la metástasis y la resistencia a las terapias antitumorales<sup>56</sup>.

La célula de origen de las CSCs varía en los diferentes tipos de cáncer<sup>57</sup>. Según determinadas hipótesis, estas provienen de células madre somáticas, células madre parcialmente diferenciadas, o incluso de células

ya diferenciadas que han adquirido el carácter de células madre por diferentes mecanismos<sup>58</sup>.

Las células madre cancerígenas se encuentran en estado quiescente y así, resisten a fármacos que actúan atacando a los tumores activos<sup>59</sup>. Además estas células pueden bombear los quimioterápicos al espacio extracelular al presentar una elevada expresión de proteínas que actúan como bombas para extraer fármacos, incluso las CSCs pueden escapar de medicamentos que inducen apoptosis<sup>60</sup>.

El porcentaje de células madre cancerígenas en un tumor viene determinado por:

- ◆ Las características de las CSCs que han iniciado el proceso tumoral.
- ◆ El microentorno en el que se desarrolla el tumor.
- ◆ La frecuencia con que se crean nuevas CSCs y la tasa de eliminación de este tipo de células<sup>61</sup>.

Un mayor número de este tipo de células en una masa tumoral puede indicar peores recuperaciones, mayor tasa de proliferación, mayor inestabilidad genética (mayor probabilidad de sufrir mutaciones) o una falta de diferenciación celular. Las CSCs también son conocidas como “células iniciadoras de tumores”, ya que son las células predominantes en el inicio de un tumor<sup>62</sup>.

Recientemente se han identificado marcadores de superficie de las CSCs, como CD133, CD13, CD24, ALDH1A1 y CD44, entre otros<sup>63–66</sup>. Por lo general, en la superficie celular se encuentran más de un tipo de marcador, lo que indica la existencia de heterogeneidad entre estas células<sup>67</sup>. Una mejor identificación del tipo de CSCs posibilita la elección de un tratamiento más adecuado<sup>68</sup>. Además, estos marcadores son proteínas que pueden

emplearse como dianas para tratamientos, como anticuerpos contra la proteína CD13 presente en las CSCs del hígado que consiguen<sup>67</sup> eliminarlas. Otras proteínas que se han empleado como objetivos terapéuticos son las proteínas de membrana, usadas para provocar la eliminación de las células madre, como la RSPO3 sobreexpresada en el cáncer colorrectal, que juega un papel crucial para la renovación las CSCs colorrectales, y se ha visto que, anticuerpos de bloqueo específicos de esta proteína intervienen de forma eficaz en células madre cancerígenas y tumorales de cáncer colorrectal<sup>69</sup>. Sin embargo, los marcadores de superficie de las CSCs también se encuentran en la superficie de las células madre de tejidos no tumorales, por lo que la intervención en los procesos de las CSCs también puede afectar a la renovación y homeostasis de los tejidos sanos<sup>60</sup>.

### **1.5. Líneas tumorales usadas en ensayos biológicos**

La biología y patología de los cánceres humanos puede ser estudiada en muestras de tumores extraídas en cirugías. De estos tejidos pueden aislarse células individuales y, aplicando determinadas condiciones nutricionales y ambientales, hacerlas proliferar hasta conseguir una línea tumoral<sup>70</sup>. Estas nuevas células conservan los marcadores del cáncer, son puras, fáciles de hacer crecer y genéticamente manipulables por lo que proporcionan de resultados reproducibles cuando se aplica el mismo protocolo en la misma etapa o tras numerosos cultivos.

Al comienzo de la década de los 90, el INC en Estados Unidos, introdujo un nuevo sistema que consistía en un estudio de barrido de fármacos, empleando un panel con 60 líneas celulares cancerígenas derivadas de 9 tipos cáncer (cerebro, colon, leucemia, pulmón, melanoma, ovario, renal, mama y próstata)<sup>71</sup>. Esta técnica resultó muy útil ya que permitía ensayar fármacos en diferentes líneas celulares, y hacer una rápida selección de

los posibles tipos de cáncer objetivo de los nuevos agentes quimioterápicos, así como de las moléculas más activas.

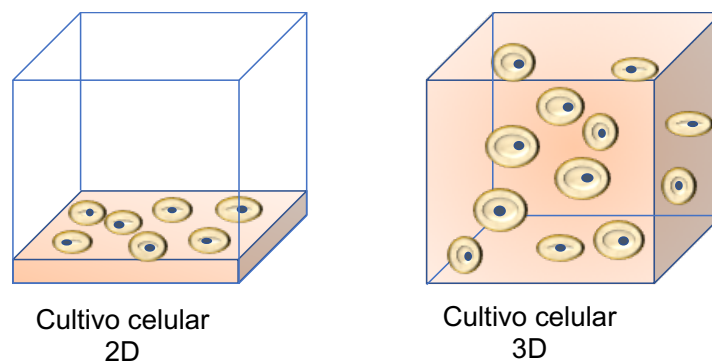
Sin embargo, hay detractores del empleo de células tumorales ya que defienden que no mantienen algunas características importantes para la extrapolación de resultados<sup>72</sup>, como son:

- Las líneas celulares cambian al estar en cultivo (cambios genéticos y en el ARNm).
- La heterogeneidad celular presente en el cáncer primario no se conserva.
- Las líneas celulares no contienen los componentes del microentorno que se forma en la localización de la masa tumoral.

Posteriormente se han desarrollado nuevas técnicas para corregir el limitado abanico de tipos de cáncer ensayados, que sólo incluía 6 ó 7 líneas celulares de cada tipo, así como cultivos celulares sin las limitaciones antes mencionadas. Hoy día existen nuevas tecnologías de procesamiento de datos de alto rendimiento, que hacen posible comparaciones de mutaciones de genes, control de los cambios estructurales y perfiles de expresión de ARNm, comparando las líneas tumorales primarias y las obtenidas a partir de estas<sup>72</sup>.

### **1.5.1. Ensayos en cultivos celulares 2D y 3D**

El cultivo celular es una herramienta básica en biología celular. Tradicionalmente se han utilizado cultivos clásicos bidimensionales (2D) (Figura 6), en los cuales una monocapa de células se hace crecer fijada a una superficie plástica<sup>73</sup>. Las células precisan de un sustrato para su crecimiento y supervivencia, los cultivos 2D han sido ampliamente utilizados, pero esta técnica sólo nos aporta información *in vitro*, y no refleja la realidad de, por ejemplo, un fármaco en un sistema biológico complejo<sup>74</sup>.



**Figura 6.** Cultivos celulares bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D).

Con el objetivo de buscar cultivos más productivos y que se asemejen más a las condiciones *in vivo*, se ha desarrollado el cultivo 3D (Figura 6). Estos cultivos surgen como una herramienta que nos permite tener información más fiable y realista del comportamiento de un agente químico en tejidos y órganos, un punto intermedio entre los ensayos *in vitro* y los ensayos con animales<sup>75</sup>.

Los cultivos 3D muestran mayor grado de complejidad y pueden mimetizar características cruciales del entorno celular *in vivo*, como pueden ser interacciones célula-célula o célula-medio extracelular. También permiten que las células repliquen condiciones que presentan en los tejidos como morfología, diferenciación, polarización, expresión genética y perfiles genómicos. Además, se pueden estudiar otros aspectos importantes, como heterogeneidad celular y gradientes de oxígeno y nutrientes en tumores<sup>76</sup>. Sin embargo este procedimiento, pese a la superioridad en términos de extrapolación de resultados, no está exento de desventajas. La metodología del cultivo celular 3D necesita continuas mejoras para el desarrollo de ensayos simples, reproducibles y bien validados, además el coste es significativamente superior al de la técnica 2D<sup>77</sup>.

En relación al estudio del cáncer, los cultivos 3D permiten conocer aspectos tales como morfología de células cancerígenas, microentorno en el que se desarrollan, expresión genética y proteica, así como su comportamiento en

procesos de invasión, migración, metástasis, angiogénesis y metabolismo de las masas tumorales<sup>75</sup>. Otra importante aplicación de esta técnica es aplicarla para el descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales, ensayando agentes quimioterápicos y realizando estudios de la respuesta adaptativa o el efecto sobre las CSCs.

En resumen, los cultivos celulares 2D proveen de información básica en el descubrimiento de nuevos medicamentos, como citotoxicidad, penetración del compuesto en la célula y acumulación de este. Por otro lado, los cultivos 3D, al mimetizar las condiciones *in vivo*, pueden reducir costes en el desarrollo de fármacos, mejorar el cribado de compuestos activos, minimizar la tasa de errores e incluso eliminar la experimentación con animales durante la etapa inicial del desarrollo de nuevos agentes antitumorales<sup>78</sup>.

### **1.5.2. Ensayos biológicos realizados en células tumorales**

La investigación contra el cáncer se ha visto muy beneficiada por las líneas celulares tumorales. Éstas proporcionan muestras uniformes y un gran número de células aisladas<sup>75</sup>, lo que ha permitido someterlas a toda clase de estudios y ensayos a fin de conocer más sobre su fisiología, y su comportamiento, así como la posibilidad de estudiar el efecto de diferentes compuestos químicos y agentes físicos sobre ellas.

Dentro de los diferentes ensayos que pueden realizarse sobre las líneas tumorales se encuentran:

- Ensayos de genotoxicidad, que consisten en la inducción de daño en el material genético, tanto por un agente físico como químico.
- Migración celular. Las células tumorales se diseminan a lo largo del cuerpo mediante migración e invasión atravesando la matriz extracelular. Se produce una intravasación en el torrente

sanguíneo o linfático, llegando a lugares distantes y finalmente extravasación para la formación de otro nuevo tumor del mismo tipo que el original (tumor primario). Este proceso es conocido como metástasis. Por ello, es de gran importancia conocer el comportamiento de las células cancerígenas en la migración celular<sup>79</sup>.

- Proliferación celular y ensayos de citotoxicidad. Los ensayos *in vitro* se realizan para cuantificar la proliferación celular en respuesta a diferentes estímulos celulares, o para determinar los efectos de agentes químicos o físicos sobre las células. Este tipo de estudios nos permite monitorizar la división celular, el número de células generadas a lo largo del tiempo, o la viabilidad de estas. Para comprobar estos parámetros se pueden emplear diversos métodos, los cuales se clasifican en diferentes categorías<sup>80</sup>:
  - Métodos de tinte de exclusión, como el ensayo Trypan Blue.
  - Métodos basados en la actividad metabólica.
  - Ensayos de ATP.
  - Ensayos de Kiton Red 620, para la cuantificación de proteínas celulares por métodos fluorométricos.
  - Ensayos de marcadores de viabilidad de proteasas.
  - Ensayos de supervivencia de células clonogénicas.
  - Ensayos de proliferación celular por síntesis de ADN.

En muchos tipos de cáncer, las CSCs (descritas en el apartado 1.4.) son una población celular distinta de las que forman la masa tumoral y pueden ser aisladas del resto de células tumorales. La ventaja de estas células es que, gracias a su capacidad de auto-renovación y auto-preservación, se pueden obtener poblaciones durante un tiempo indeterminado. Sin embargo, en algunos tipos de cáncer no es posible distinguir las CSCs de

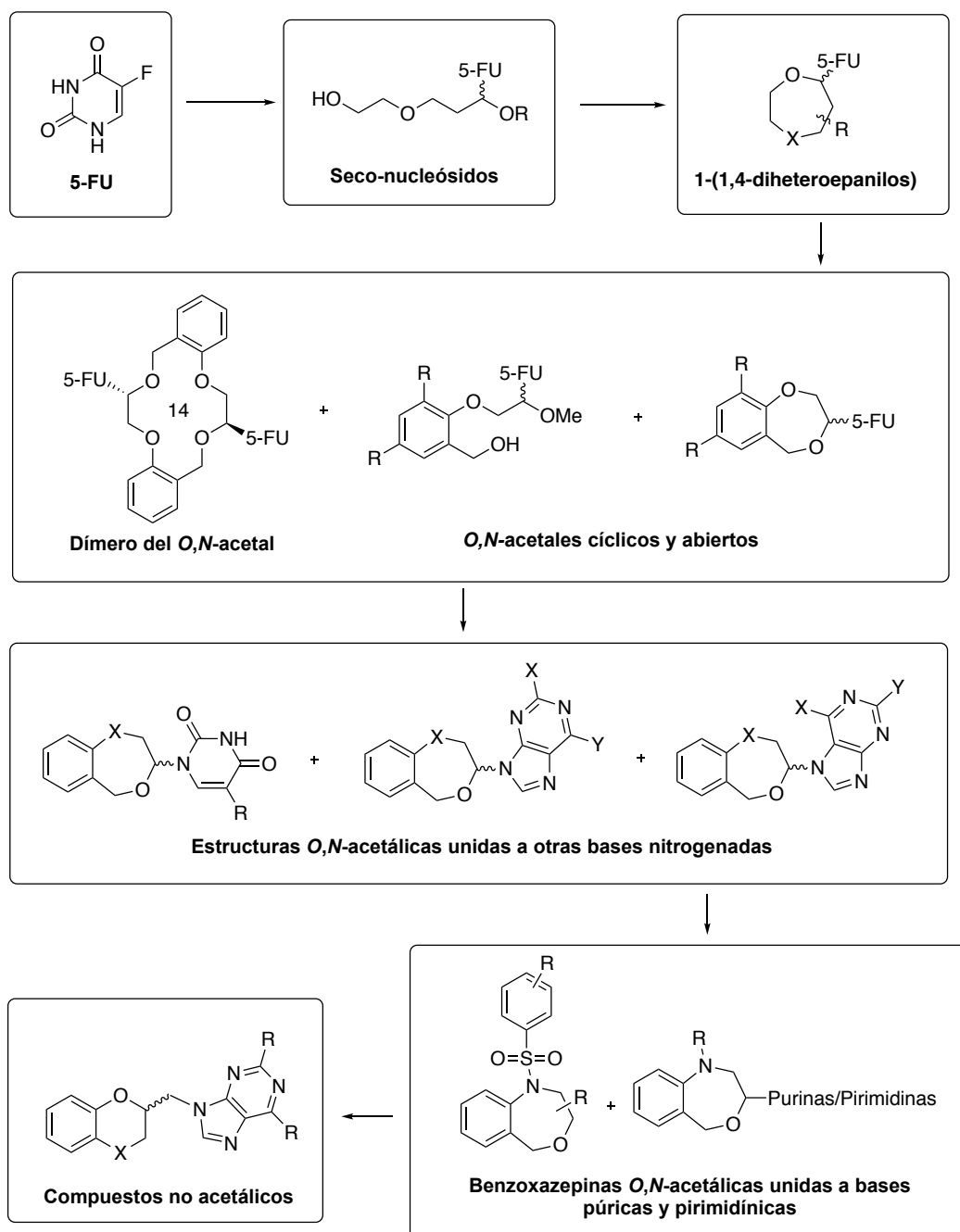


las células tumorales normales, ya que todas presentan una alta tasa de replicación<sup>81</sup>.

Otra posibilidad para el descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales, es el empleo de modelos de sistemas de predicción de actividad. Uno de los más destacados es la Enciclopedia de líneas cancerígenas (Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE), que consiste en una compilación de expresión de genes, número de copias cromosomales y secuencias genéticas de 947 líneas celulares cancerígenas humanas<sup>82</sup>. En este modelo se ensayaron 24 fármacos anticancerígenos frente a 479 líneas celulares, lo que permitió una predicción de la sensibilidad a medicamentos basada en la genética, la línea celular y la expresión de genes. Esta base de datos se actualiza constantemente<sup>83</sup>, lo que permite una predicción actualizada de la posible actividad de las moléculas de interés. Si podemos predecir la respuesta molecular de un tumor frente a un fármaco, aceleraremos los tratamientos personalizados<sup>84-86</sup> que con tanta urgencia necesitamos

## 2. Antecedentes estructurales

El Esquema 1 muestra un resumen de las diferentes estructuras publicadas por nuestro grupo de investigación, diseñadas a partir del 5-Fluorouracilo (5-FU).



**Esquema 1.** Esquema general de la evolución del diseño racional desde el 5-FU hasta los compuesto no acetálicos.

## 2.1. 5-Fluorouracilo

El (5-FU) (Esquema 1) es una molécula empleada como agente antitumoral sintetizada en 1957 mediante un diseño racional. Se diferencia del uracilo por tener un átomo de flúor en lugar de un hidrógeno en la posición 5 del anillo pirimidínico<sup>87</sup>. Actualmente se sigue empleando en cáncer de tracto genitourinario, tracto gastrointestinal (colon, páncreas y estómago), y cáncer de mama, cabeza y cuello. También se ha visto que es más efectivo cuando se aplica con radioterapia en cáncer de cuello, cabeza, páncreas, esófago y gástrico<sup>88</sup>.

Esta molécula, que actúa como un antimetabolito<sup>89</sup>, requiere pasar por un proceso enzimático (ribosilación y fosforilación) para ejercer su actividad citotóxica, así su mecanismo de acción es a través de la interferencia con la síntesis de ADN y la traducción de ARNm<sup>90</sup>.

Entre los muchos efectos secundarios tras su administración por perfusión, destaca la mielotoxicidad, pero también presenta otros como son estomatitis, eritrodisestesia palmo-plantar, neuro y cardiotoxicidad asociados a un tratamiento continuado<sup>91</sup>. Hay técnicas nuevas para disminuir estos efectos adversos, como los pellets inyectables<sup>92</sup> o la obtención de derivados mediante cambios estructurales<sup>93,94,95</sup>.

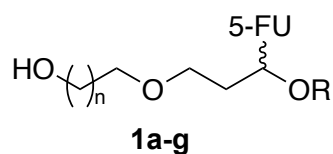
## 2.2. Desarrollo racional desde el 5-FU al bozinib

### 2.2.1. Aciclonucleósidos

Nuestro grupo de investigación partió de moléculas que en un principio se diseñaron como profármacos del 5-FU, en busca de derivados más efectivos y menos tóxicos. En primer lugar, se sintetizaron los denominados *seco*-nucleósidos (Tabla 1), con una estructura de nucleósido no clásico con el azúcar lineal en lugar de cíclico. Estos derivados se obtuvieron por la reacción de acetales de 7 miembros (**1a-g**) con 5-FU en presencia de

cloruro de estaño (IV), trimetilclorosilano y hexametildisilazano, a temperatura ambiente, para dar 1{[3-(2-hidroxietilhetero)-1-alcoxi]alquil}-5-fluorouracilos (**1a-f**) y 1-[[2-(3-hidroxiopropoxi)-1-isopropoxi]etil]-5-fluorouracilo (**1g**)<sup>96</sup>.

**Tabla 1.** Derivados 1{[3-(2-hidroxietilhetero)-1-alcoxi]alquil}-5-fluorouracil (**1a-f**) y 1-[[2-(3-hidroxiopropoxi)-1-isopropoxi]etil]-5-fluorouracilo(**1g**).

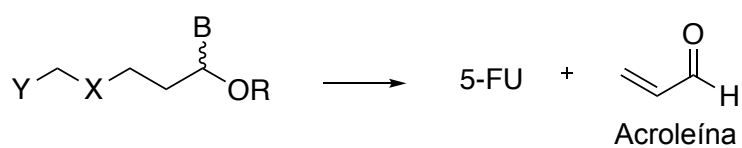


Precursor	Comp.	Cl <sub>50</sub> (μM)
	 <b>1a</b>	-
	 <b>1b</b>	45
	 <b>1c</b>	18
	 <b>1d</b>	45
	 <b>1e</b>	25
	 <b>1f</b>	362
	 <b>1g</b>	4300

De estos derivados, los análogos con radicales isopropoxilo (OPr<sup>i</sup>) y ciclopentoxilo (OCp) fueron los que presentaron una mayor actividad antiproliferativa frente a la línea celular humana Hep-2 (cáncer de laringe). De todos ellos destacó el compuesto **1c**, que resultó ser 4 veces más potente que el 5-FU bajo las mismas condiciones de ensayo, con una  $Cl_{50}$  de 18  $\mu$ M frente a 90  $\mu$ M de la molécula de referencia (5-FU). Los derivados ensayados no mostraron una toxicidad clara en comparación con los efectos tóxicos del 5-FU. Se observó también que la estructura más lipofílica resultó ser la más activa<sup>96</sup>.

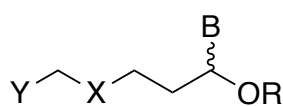
A partir de los compuestos **1a-g**, mediante la modificación de la cadena de 3-(2-hidroxietoxi)propilo, se obtuvieron nuevos derivados (**2a-i**) a fin de conocer un poco más las relaciones estructura-actividad de esta familia de compuestos<sup>97</sup> (Tabla 2).

Estas estructuras se ensayaron frente a la línea de carcinoma humano de colon HT-29 y fueron diseñadas para liberar dos sustancias citotóxicas, la acroleína por un lado y el antimetabolito 5-FU, por otro (Figura 7). Esta idea se basaba en conjugar la actividad inhibitoria de la acroleína frente a células tumorales de ovario de hámster chino, con una  $Cl_{50}$  de 50  $\mu$ M<sup>98</sup>, con la ya mencionada actividad antiproliferativa del 5-FU.



**Figura 7.** Descomposición de los aciclonucleósidos para liberar 5-FU y acroleína.

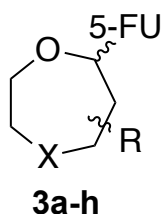
Sin embargo, solo el compuesto **2h** resultó activo frente a la línea HT-29, presentando 8 veces menos actividad ( $Cl_{50}$  = 70  $\mu$ M) que el fármaco de referencia ( $Cl_{50}$  = 9  $\mu$ M).

**Tabla 2.** Nuevos derivados de aciclonucleósidos**2a-i**

Comp.	R	X	Y	B
<b>2a</b>	Me	O	CH <sub>2</sub> OTs	5-FU
<b>2b</b>	Me	S	CH <sub>2</sub> Cl	5-FU
<b>2c</b>	Me	O	COOMe	5-FU
<b>2d</b>	<i>i</i> Pr	O	CH=CH <sub>2</sub>	Uracilo
<b>2e</b>	<i>i</i> Pr	O	CH=CH <sub>2</sub>	Adenina
<b>2f</b>	<i>i</i> Pr	O	CH=CH <sub>2</sub>	5-FU
<b>2g</b>	Me	O	CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	5-FU
<b>2h</b>	Me	O	CH(OH)CH <sub>2</sub> Cl	5-FU
<b>2i</b>	Me	O	CH(OMe)5-FU	5-FU

### 2.2.2. Derivados 1-(1,4-diheteroepanilo)

La siguiente aproximación fue la obtención de derivados cíclicos (Figura 8), anillos de 7 miembros (1-(1,4-diheteroepanilo) unidos a 5-FU<sup>99</sup>. La teoría que sustentaba este diseño era la de actuar como profármaco, con la liberación del 5-FU mediante la enzima uridina fosforilasa. Pero esas estructuras resultaron ser menos activas que el fármaco solo, siendo únicamente el estereoisómero *cis* del compuesto **3g** moderadamente activo ( $Cl_{50} = 30 \mu\text{M}$ ) frente a la línea celular HT-29, en comparación con la  $Cl_{50} = 4.5 \mu\text{M}$  del 5-FU. La presencia del cloro y su electronegatividad parecían proporcionar una mayor labilidad del enlace hemiacetalico por hidrólisis enzimática.

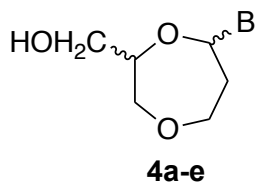


Compuesto	X	R
<b>3a</b>	O	H
<b>3b</b>	S	H
<b>3c</b>	NTs	H
<b>3d</b>	O	6-Me*
<b>3e</b>	O	7-Me*
<b>3f</b>	O	3-Me*
<b>3g</b>	O	CH <sub>2</sub> Cl*
<b>3h</b>	O	CH <sub>2</sub> I*

**Figura 8.** Estructura general de los derivados 5-FU con un resto de 1-(1,4-diheteroepanilo); (\*cis/trans).

### 2.2.3. Estructuras O,N-acetálicas cíclicas y acíclicas unidas a 5-FU

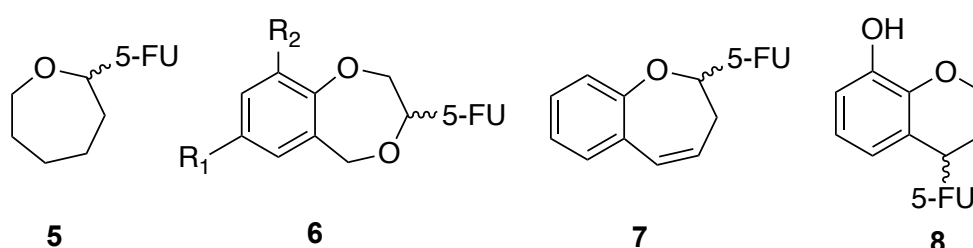
Teniendo en cuenta que de la serie de los seco-nucleósidos la estructura más lipofílica fue la más activa<sup>96</sup>, se siguió esa vía con objeto de obtener compuestos más potentes. Tras la síntesis de los derivados de 1-(1,4-diheteroepanilo) se llevo a cabo la obtención de nucleósidos cis/trans-[3-(hidroximetil)-1,4-dioxepan-5-il]pirimidina **4a-e**<sup>100</sup>(Figura 9), para su posible aplicación como antineoplásicos y antivirales. Sin embargo los ensayos biológicos no fueron satisfactorios.



comp.	B
<b>4a</b>	5-FU
<b>4b</b>	5-bromouracilo
<b>4c</b>	5-(trifluorometil)uracilo
<b>4d</b>	timina
<b>4e</b>	citosina

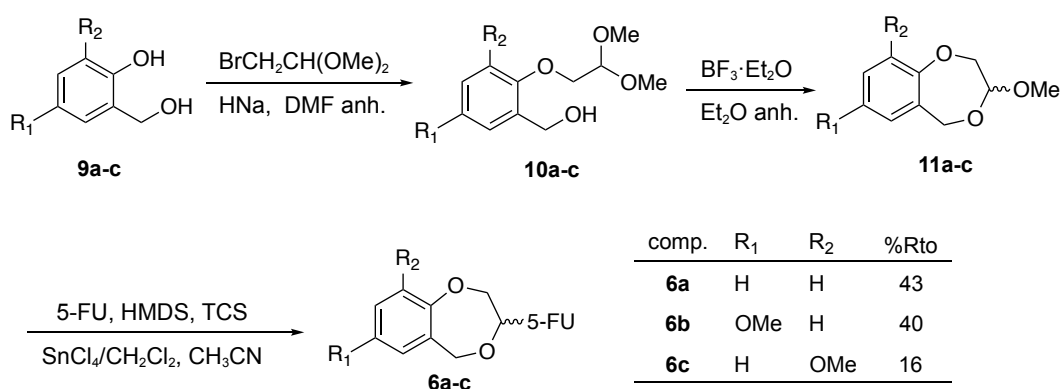
**Figura 9.** Estructura cis/trans-[3(hidroximetil)-1,4-dioxepan-5-il]pirimidinas **4a-e**.

Así, con idea de aumentar la lipofilia, la siguiente aproximación fue la obtención de una serie bioisostérica de *O,N*-acetales de siete miembros condensados con benceno **6** y **7**<sup>101</sup> basados en el compuesto **5** previamente publicado por el grupo<sup>102</sup>. Durante la preparación de estos productos se obtuvo también el derivado de seis miembros **8**. En todos los casos la unión del 5-FU tenía lugar a través de la posición N1 del anillo pirimidínico (Figura 10).



**Figura 10.** Nuevos derivados *O,N*-acetálicos.

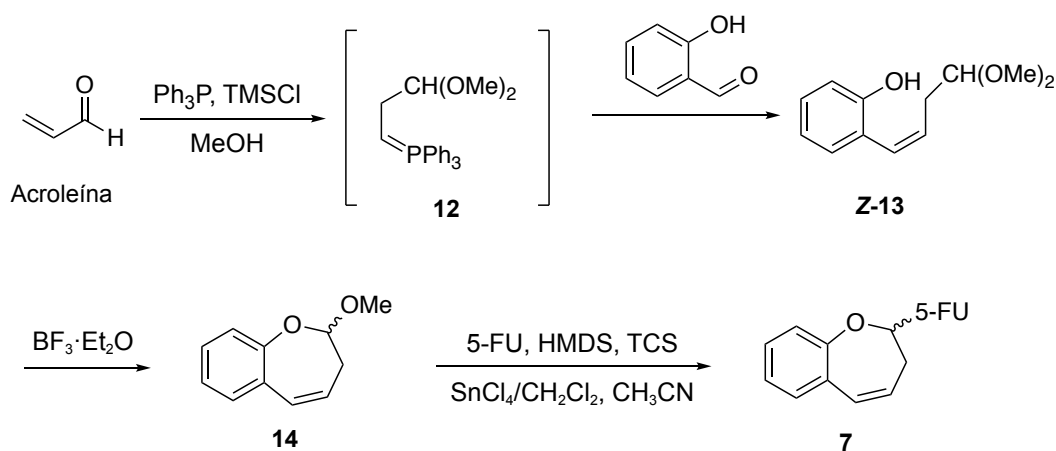
La estrategia sintética para la obtención de los cicloacetales de siete miembros partió del alcohol 2-hidroxibencílico **9a** o sus correspondientes derivados sustituidos con un grupo metoxilo en posición 3 ó 5 del anillo **9b-c**, que se cicló en dos etapas hasta los derivados benzo[1,4]dioxepínicos **11a-c** y posteriormente se unió a la base pirimidínica 5-FU (Esquema 2).



**Esquema 2.** Ruta sintética para la obtención de *O,N*-acetales de siete miembros unidos a benceno.



Para la síntesis del compuesto **7** se partió de acroleína (Esquema 3), que se transformó en la correspondiente sal de fosonio no aislada (**12**), obtenida por un método ya publicado<sup>103</sup>, y esta se hizo reaccionar con 2-hidroxibenzaldehído vía reacción de Wittig para obtener el aducto **Z-13**. La ciclación posterior empleando  $\text{BF}_3$  en éter etílico, dio el compuesto 2-metoxi-2,3-dihidrobenzoxazepina **14**. Finalmente, la sustitución del grupo metoxilo por 5-FU se llevó a cabo como se describe en el Esquema 3 para dar el derivado **7**<sup>101</sup>.



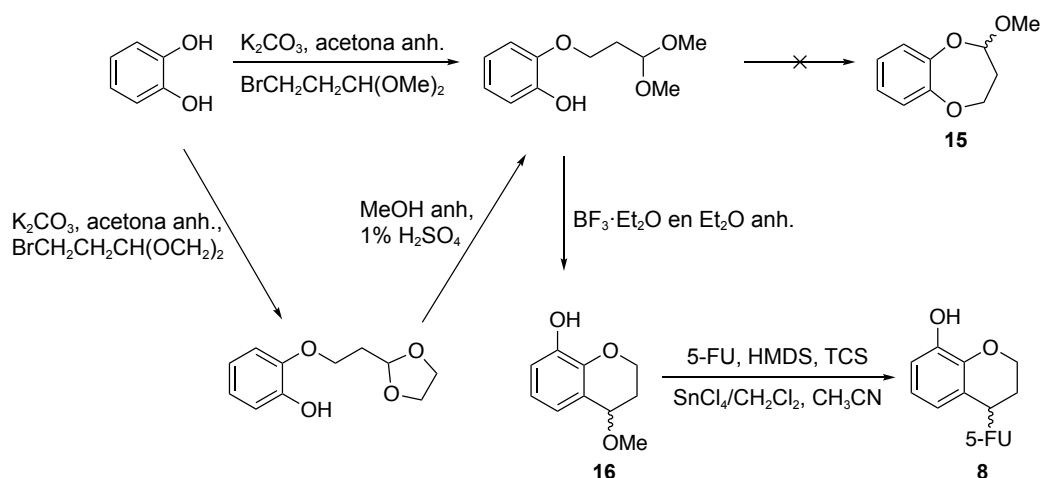
**Esquema 3.** Síntesis de (RS)-1-(2,3-dihidrobenzoxepin-2-il)-5-fluorouracilo **7**.

El último compuesto que se obtuvo de esta serie fue el **8**. Cabe destacar que durante su síntesis se forma un anillo de seis miembros, en lugar de uno de siete (Esquema 4). En el penúltimo paso de ciclación, el trifluoruro de boro se coordinó con uno de los grupos metoxilo para dar un ion oxocarbenio, resultante de la pérdida del otro grupo metoxilo, de modo que la ciclación podía progresar por dos vías:

- Ciclación intramolecular con el grupo hidroxifenólico y la consiguiente formación del anillo de siete miembros **15**. Este proceso era bastante improbable debido a la pobre nucleofilia del antes mencionado grupo hidroxilo, al estar formando un complejo con el ácido de Lewis,  $\text{BF}_3$ .

- b) Ciclación intramolecular con el anillo aromático, cuya posición no sustituida adyacente al oxígeno etéreo era suficientemente nucleofílica para formar el cromeno no acetálico **16**.

La sustitución del grupo metoxilo por un resto de 5-FU se llevó a cabo partiendo en este caso del cromeno **16**, utilizando las mismas condiciones experimentales que en los casos anteriores para, finalmente, obtener el compuesto **8**.

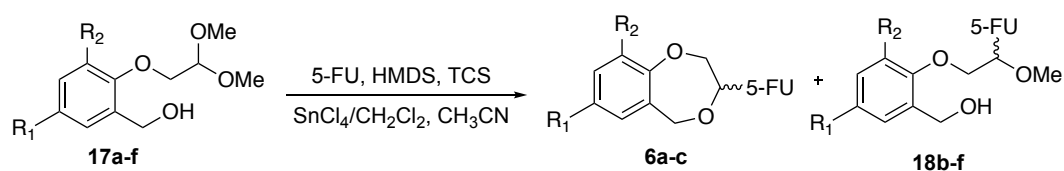


**Esquema 4.** Síntesis del derivado de cromeno **8**.

De todos los derivados *O,N*-acetálicos obtenidos mediante las rutas sintéticas descritas, los compuestos **6a** ( $\text{Cl}_{50} = 7 \mu\text{M}$ ) y **6b** ( $\text{Cl}_{50} = 4.5 \mu\text{M}$ ) fueron los que presentaron mejores resultados como inhibidores del crecimiento celular de la línea MCF-7 de cáncer de mama. El derivado **7** inducía la apoptosis en un 57.33% de la población celular total en 24 horas. Es interesante destacar que los compuestos **6a-c**, **7** y **8** han resultado detener el ciclo celular en la fase  $\text{G}_0/\text{G}_1$  cuando se han ensayado en la línea MCF-7, a diferencia del 5-FU que lo hace en la fase S, de lo que se deduce que estas estructuras no actúan como profármacos del 5-FU sino como fármacos en sí, entendiendo que los anillos de 5, 6 y 7 miembros benzofusionados son necesarios para su actividad inhibitoria, además del resto 5-FU<sup>104</sup>.

En base a los resultados obtenidos para los derivados de *O,N*-acetales con anillos de siete miembros fusionados con benceno y unidos a 5-FU, **6a** y **6b**<sup>101</sup>, se prepararon análogos abiertos y cíclicos con otros sustituyentes en el anillo bencénico para evaluar su efecto inhibitorio frente a células de cáncer de mama<sup>105</sup>.

Por otro lado se llevó a cabo la condensación directa de los *O,O*-acetales acíclicos **17a-f** (con grupos tanto dadores como atrayentes de electrones en el anillo aromático), con 5-FU según se describe en el Esquema 5. En este caso, los compuestos resultantes fueron derivados cíclicos (**6a-c**) y acíclicos (**18b-f**), a través de un proceso cuya regioselectividad dependía de los sustituyentes del anillo bencénico. Así, en el caso del compuesto **17a** (anillo bencénico sin sustituir), sólo se obtuvo el derivado cíclico **6a**; cuando el anillo aromático estaba sustituido por grupos electrón donantes (**17b-c**), se obtuvieron mezclas de productos cíclicos (**6b-c**) y acíclicos (**18b-c**) y, finalmente, sólo se obtuvieron acetales abiertos (**18d-f**) partiendo de los acetales (**17d-f**) con sustituyentes electrón atrayentes en el anillo bencénico

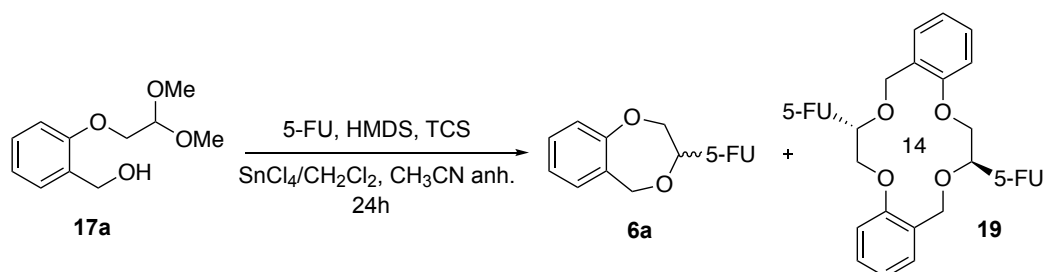


comp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>a</b>	H	H
<b>b</b>	OMe	H
<b>c</b>	H	OMe
<b>d</b>	Cl	H
<b>e</b>	Br	H
<b>f</b>	NO <sub>2</sub>	H

**Esquema 5.** Síntesis *O,N*-acetales cíclicos y abiertos.

En la reacción entre el *O,O*-acetal acíclico sin sustituyentes en el anillo de benceno (**17a**) y el 5-FU, además del ya comentado anteriormente **6a**, se

obtuvo también su correspondiente dímero **19** (Esquema 6), con un tiempo de reacción de 24 horas y empleando SnCl<sub>4</sub> como ácido de Lewis.



**Esquema 6.** Obtención del dímero de 14 miembros **19** y del acetal cíclico **6a**

Esta estructura correspondía a un éter que presentaba una corona de 14 miembros con dos fragmentos de 5-FU. El rendimiento para este producto **19** fue muy bajo, pero la estructura resultaba muy atractiva y presentaba interesantes propiedades biológicas.

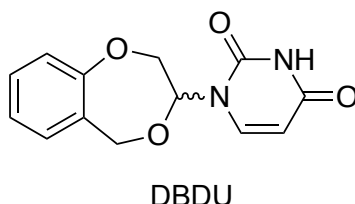
Respecto a las actividades inhibitorias de este nuevo grupo de análogos abiertos y cíclicos procedentes de los *O,O*-acetales cíclicos, los compuestos más activos fueron los derivados **18f** (Cl<sub>50</sub> = 5.42 ± 0.26 μM) y **19** (Cl<sub>50</sub> = 5.5 ± 0.58 μM) con actividades en el mismo orden que el fármaco de referencia ftorafur (Cl<sub>50</sub> = 3 ± 0.11 μM) frente a la línea MCF-7<sup>105</sup>.

#### 2.2.4. Estructuras *O,N*-acetálicas unidas a otras bases nitrogenadas

Una vez estudiada la influencia del resto *O,N*-acetálico y visto que el mecanismo de acción de estos compuestos es diferente al del 5-FU, el siguiente paso de este desarrollo racional consistió en obtener derivados con distinta base nitrogenada<sup>104</sup>.

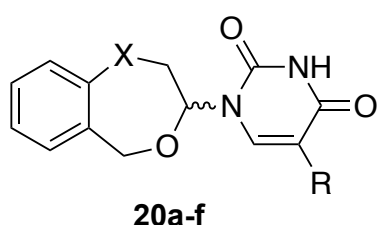
En primer lugar se sintetizó el derivado (*RS*)-1-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzoxacepin-3-il)-uracilo (DBDU) (Figura 11), con la misma estructura que el compuesto **6a**, pero sustituyendo la base 5-FU por la base natural uracilo (U)<sup>104</sup>. Se observó que este compuesto actuaba sobre la ciclina D1 a nivel de la transcripción. El arresto que producía en la fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> era irreversible,

conduciendo a las células a la apoptosis por una vía independiente de p53, y presentaba una  $CI_{50} = 5 \pm 0.25 \mu\text{M}$  en la línea MCF-7. También se vio que la administración intravenosa, dos veces por semana de 50 mg por kg en ratas, durante cinco semanas no producía muerte ni toxicidad<sup>104</sup>.



**Figura 11.** Estructura de DBDU.

Más tarde se obtuvieron seis derivados *O,N*-acetálicos (**20a-f**) con bases diferentes a 5-FU (Figura 12). Las dos modificaciones principales que se hicieron fueron, por un lado, la de la base pirimidínica, empleando las bases naturales timina (T) y uracilo (U), y, por otro lado, la sustitución del O del anillo de siete miembros que está directamente unido al benceno por azufre (S) y óxidos de azufre (SO y SO<sub>2</sub>)<sup>106</sup>.

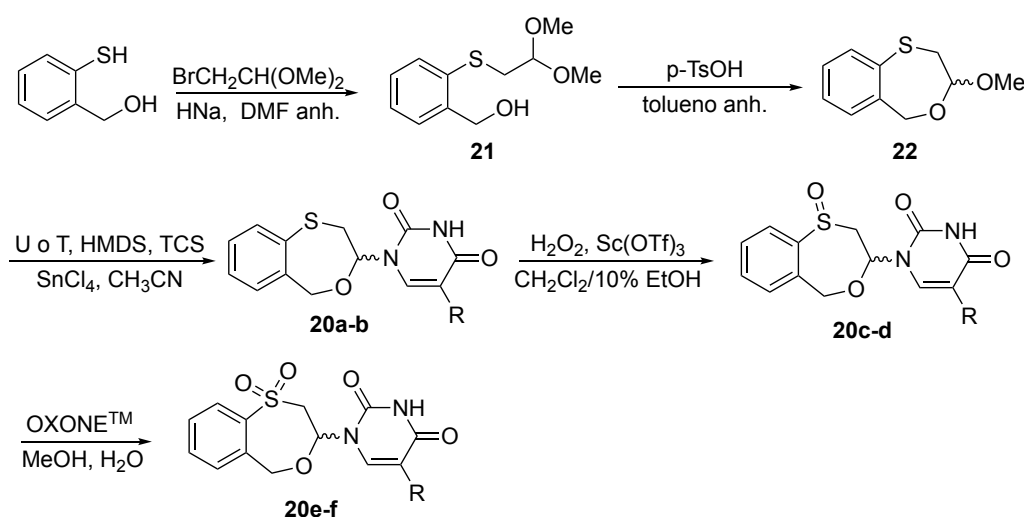


Comp.	X	R
<b>20a</b>	S	H
<b>20b</b>	S	Me
<b>20c</b>	SO	H
<b>20d</b>	SO	Me
<b>20e</b>	SO <sub>2</sub>	H
<b>20f</b>	SO <sub>2</sub>	Me

**Figura 12.** Derivados *O,N*-acetálicos con timidina ( $R=\text{Me}$ ) y uracilo ( $R=\text{H}$ ).

En este sentido, la oxidación de sulfuros es una técnica importante y directa para preparar sulfonas, las cuales se han empleado en la obtención de sustratos activos para la síntesis de fármacos<sup>107</sup>.

La síntesis de los mencionados compuestos se llevó a cabo aplicando un procedimiento similar al descrito anteriormente para la obtención de los derivados (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepinas **6b-c**<sup>101</sup> y partiendo del compuesto comercial (2-mercaptofenil)metanol. Este compuesto se sometió a una alquilación selectiva empleando las condiciones descritas por Crombie et al.<sup>108</sup> para dar el compuesto **21** con un rendimiento del 79%. A continuación, la ciclación se realizó usando cantidades catalíticas de ácido *p*-toluensulfónico en tolueno anhidro durante un tiempo de reacción de 3 horas para obtener el compuesto **22** con un rendimiento del 95%. La introducción de las bases pirimidínicas T y U se realizó empleando el mismo procedimiento descrito en los análogos oxigenados con el 5-FU tal y como se detalla en el Esquema 7.

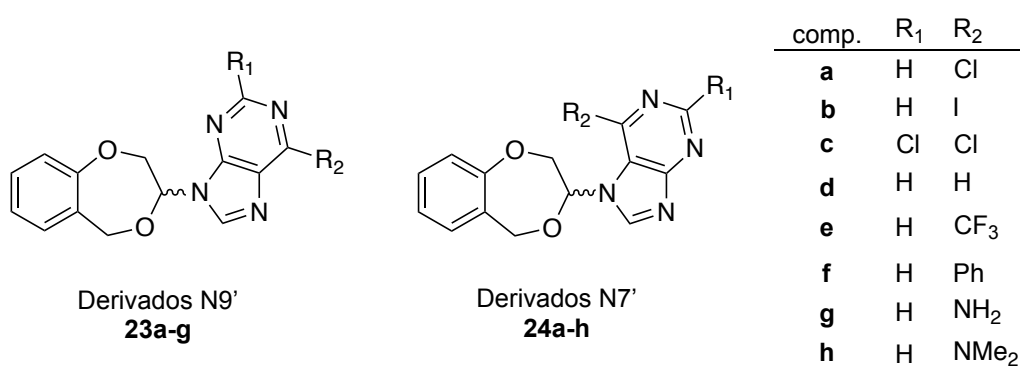


**Esquema 7.** Síntesis de los derivados *O,N*-acetales **20a-f**.

Estos seis compuestos **20a-f** fueron ensayados frente a la línea tumoral MCF-7, y los mejores resultados se obtuvieron para las moléculas **20f** ( $\text{Cl}_{50} = 12.74 \pm 4.79 \mu\text{M}$ ) y *trans*-**20d** ( $\text{Cl}_{50} = 30.05 \pm 0.71 \mu\text{M}$ ), resultando el resto inactivos con una  $\text{Cl}_{50} > 100 \mu\text{M}$ . Es interesante destacar que estos dos compuestos contenían la base natural timina en su estructura.

La siguiente aproximación consistió en la sustitución de la base pirimidínica en el compuesto **6a** por una púrica<sup>109</sup>. Con este cambio se pretendían mejorar tanto la lipofilia como la diversidad molecular.

En este caso se obtuvieron dos familias de análogos que diferían en el N de la purina a través del cual se formaba el enlace *O,N*-acetálico, N7' ó N9' (Figura 13). Esta modificación abrió las puertas a nuevas estructuras con bases nucleotídicas, purinas sustituidas, para su posible utilidad como agentes antitumorales.

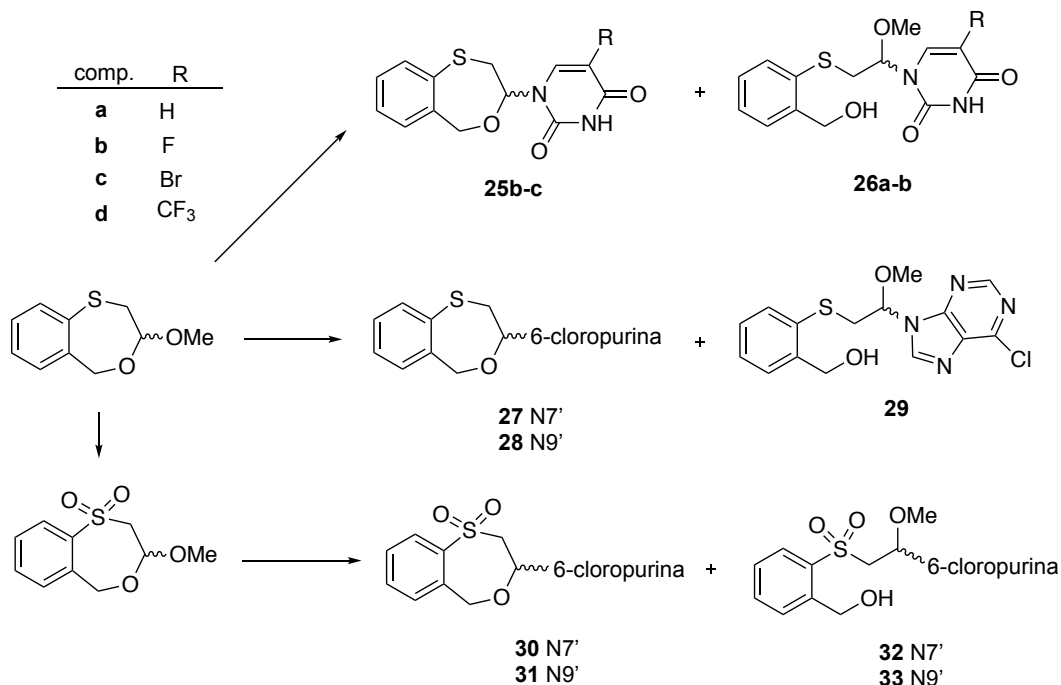


**Figura 13.** Derivados *O,N*-acetálicos unidos a purinas.

En general los derivados con el resto purina unido a través del N7', **24a-h**, presentaban mejor actividad que sus regioisómeros unidos por el N en posición 9', excepto en el caso de compuestos que contenían un resto CF<sub>3</sub> en posición 6' de la purina (**23e**). También se llegó a la conclusión de que era necesaria la presencia de, al menos, un halógeno para que la molécula presentara actividad antiproliferativa. El compuesto más activo resultó ser la N7'-2',6'-dicloropurina **24c**, con una Cl<sub>50</sub> = 1.28 ± 0.61 μM, siendo 3.4 veces más potente que el 5-FU (Cl<sub>50</sub> = 4.32 ± 0.02 μM), sin embargo su regioisómero N9'-2',6'-dicloropurina **23c** presentaba la misma potencia inhibitoria que el fármaco de referencia.

La siguiente modificación realizada, con objeto de obtener compuestos más potentes, fue la combinación del anillo benzoxatropínico con bases tanto

pirimidínicas como púricas que contenían átomos de halógenos (Esquema 8).

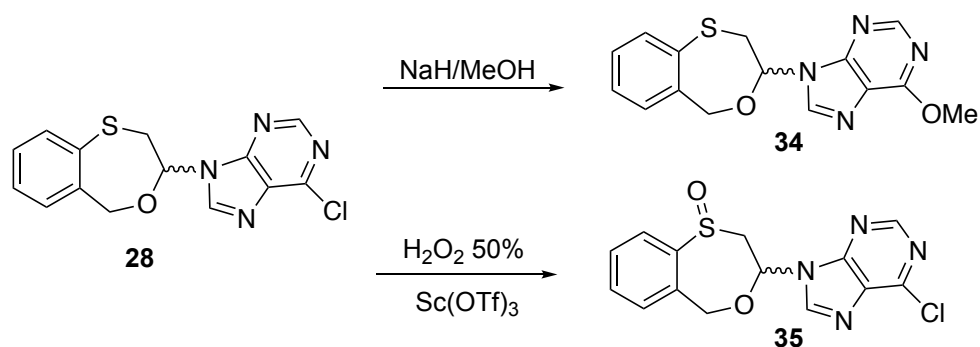


**Esquema 8.** Nuevos derivados cíclicos y acíclicos O,N-acetálicos con bases pirimidínicas y púricas halogenadas

Así en el transcurso de esta investigación se obtuvieron las moléculas 4,1-benzoxatiepínicas cíclicas y acíclicas<sup>110</sup> representadas en el Esquema 8, **25-33**. Estos compuestos con pirimidinas sustituidas con F, H, Br y CF<sub>3</sub> y 6-cloropurina se sintetizaron empleando el procedimiento usado para obtener sus análogos no halo-sustituidos mostrado en el Esquema 7.

Además, partiendo de **28** se obtuvieron dos compuestos, uno con la purina sustituida en posición 6 por un grupo metoxilo, **34**, y otro derivado con el resto de 6-cloropurina y el azufre monooxidado, **35**, como se muestra en el Esquema 9





**Esquema 9.** Obtención del derivado de 6-metoxipurina **34** y del sulfóxido **35**.

De estos 14 compuestos finalmente sintetizados destacaron las actividades de **27** ( $Cl_{50} = 3.55 \pm 1.10 \mu\text{M}$ ), **28** ( $Cl_{50} = 5.46 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) y **30** ( $Cl_{50} = 2.58 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ) frente a la línea de cáncer MCF-7. Estas moléculas fueron seleccionadas y testadas frente a otra línea celular cancerosa, HT-29, y las correspondientes líneas de células sanas del epitelio mamario no canceroso (MCF-10) y células del epitelio intestinal de una línea de rata no tumoral (IEC-6) (Tabla 3). El objetivo de este ensayo era determinar la selectividad de los compuestos por las células cancerosas frente a las sanas de modo que pudiera valorarse la toxicidad de los distintos derivados.

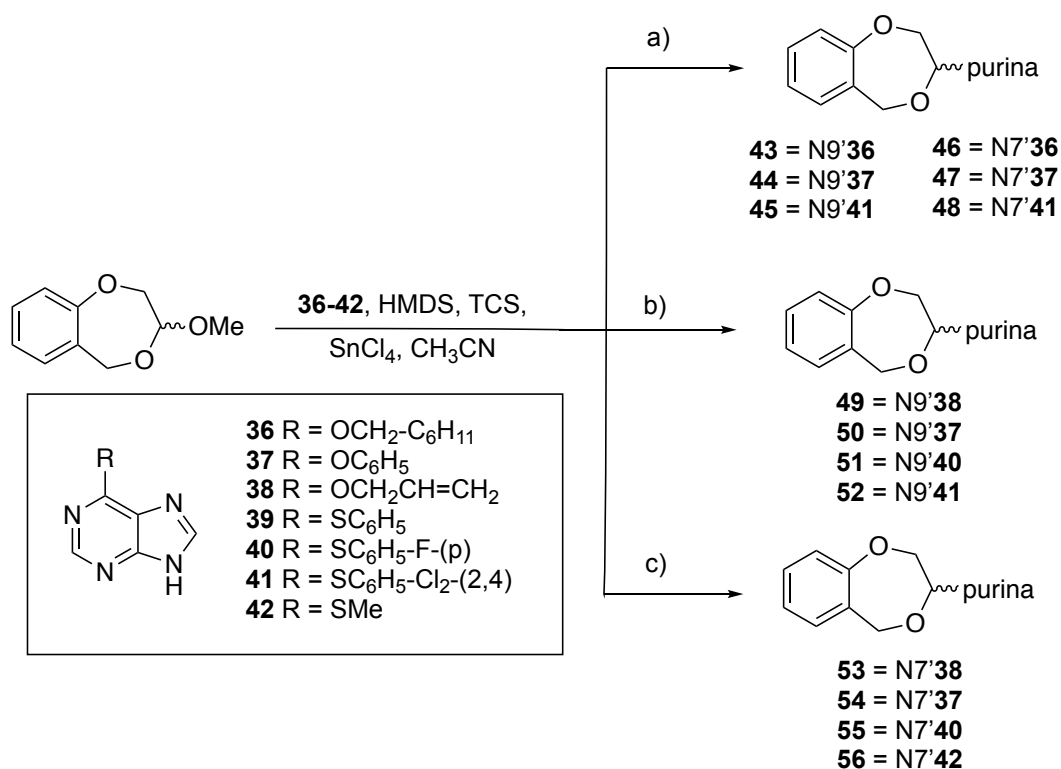
**Tabla 3.** Actividades antiproliferativas de los compuestos más activos, **27**, **28** y **30** frente a líneas MCF-7, MCF-10, HT-29 e IEC-6 con 5-FU de referencia. Índice terapéutico (IT): a) *In vitro*  $IT(\text{mama}) = Cl_{50} \text{ MCF-10} / Cl_{50} \text{ MCF-7}$ ; b) *In vitro*  $IT(\text{intestinal}) = Cl_{50} \text{ IEC-6} / Cl_{50} \text{ HT-29}$ .

Comp.	$Cl_{50}$ MCF-7	$Cl_{50}$ MCF-10	IT (a)	$Cl_{50}$ HT-29	$Cl_{50}$ IEC-6	IT (b)
5-FU	$4.32 \pm 0.02$	$0.73 \pm 0.12$	0.17	$1.08 \pm 1.15$	$0.66 \pm 0.10$	0.61
<b>27</b>	$3.55 \pm 1.10$	$1.68 \pm 0.12$	0.47	$2.85 \pm 0.26$	$5.46 \pm 0.34$	1.90
<b>28</b>	$5.46 \pm 0.02$	$1.85 \pm 0.10$	0.34	$0.92 \pm 0.04$	$11.7 \pm 2.40$	12.7
<b>30</b>	$2.58 \pm 0.08$	$5.84 \pm 2.48$	2.26	$10.48 \pm 4.03$	$10.36 \pm 0.01$	0.99

De estos ensayos se pudieron obtener las siguientes conclusiones: a) Las estructuras más activas fueron los derivados 4,1-benzoxatiepínicos (**27** y **28**) y las 1,1-dioxo-4,1-benzoxatiepinas-6'-cloropurinas **30** y **31** ( $CI_{50} = 16.5 \pm 1.59 \mu M$ ); b) los regioisómeros con la purina unida a través del N7' (**27**, **30**) presentaron mejor actividad que las unidas por N9' (**28**, **31**) y c) el compuesto más activo fue la N7'-6'-cloropurina **30**, que resultó ser dos veces más potente que el 5-FU frente a MCF-7.

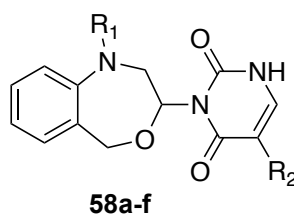
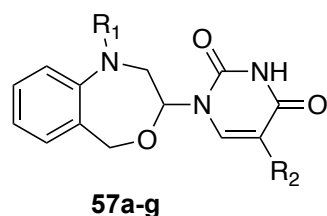
Para continuar ampliando la diversidad de compuestos 4,1-benzoxazepínicos, y tomando como referencia el compuesto DBDU anteriormente sintetizado<sup>104</sup>, se llevó a cabo la síntesis de una nueva familia por sustitución del resto de pirimidina de DBDU por uno de purina, tratando de encontrar análogos con buena actividad inhibitoria y baja toxicidad. Se sintetizaron compuestos unidos tanto por el N9' como por el N7' de las purinas sustituidas en posición 6' por grupos voluminosos como fenoxilo, feniltio, *p*-fluorofeniltio ó 2,4-diclorofeniltio, y por otros grupos más pequeños como aliloxi o metiltio, con objeto de estudiar la influencia del tamaño del sustituyente en la actividad biológica<sup>111</sup> (Esquema 10).

Así, de esta serie de derivados, se pudieron obtener diversas conclusiones en base a los resultados: primero, la síntesis asistida por microondas proporciona un procedimiento más rápido y selectivo para obtener los regioisómeros N7' ó N9' simplificando así su purificación; segundo, en base a los resultados biológicos en la línea MCF-7, se pudo concluir que la actividad biológica depende de los sustituyentes en la posición 6' de la purina; por último, se observó que los derivados con purinas cloradas son los más activos.

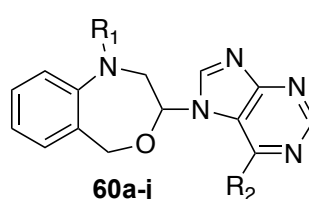
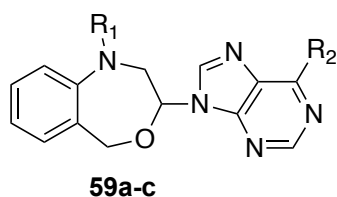


**Esquema 10.** Síntesis de los derivados (*RS*)-6'-sustituidos-7' ó 9'-(2,3-dihidro-5H-1,4-benzodioxepin-3-il)-7H ó 9H purinas a) 45°C, 24-72 h; b) Microondas, 130°C, 5 min; c) Microondas, 100°C, 5 min.

El siguiente cambio que se propuso fue la sustitución del heteroátomo en posición 1 en el anillo de siete miembros por un nitrógeno<sup>112</sup>, que permitía la introducción en esa posición de diferentes sustituyentes, entre ellos el grupo toluensulfonilo sustituido en posiciones *orto* o *para* por un grupo nitro (**57** y **58**). Además, para seguir aumentando la diversidad estructural se sintetizaron, con la metodología previamente publicada, bioisómeros con restos de pirimidinas<sup>113</sup> así, como con diferentes purinas sustituidas<sup>110</sup>, obteniéndose en este segundo caso los derivados unidos por N9' (**59a-c**) y por N7' (**60a-j**) (Figura 14).



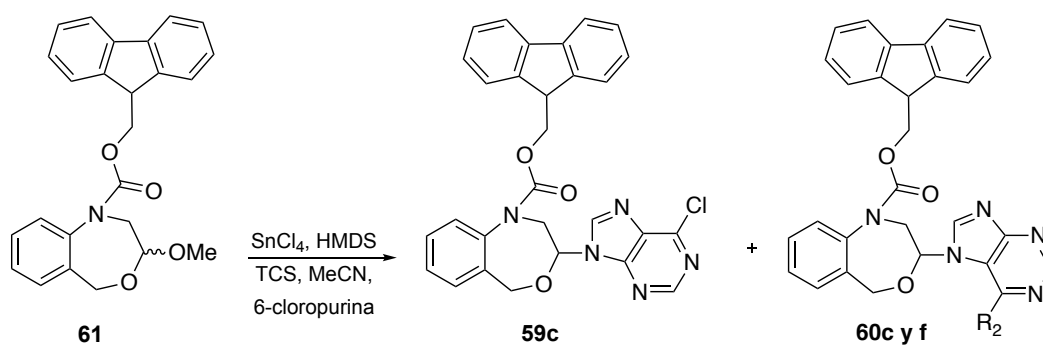
comp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>a</b>	H	F
<b>b</b>	<i>p</i> -Ns	F
<b>c</b>	<i>o</i> -Ns	F
<b>d</b>	SO <sub>2</sub> <sup>-</sup> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> <sup>-</sup> <i>o</i> NH <sub>2</sub>	F
<b>e</b>	<i>p</i> -Ns	H
<b>f</b>	<i>o</i> -Ns	H
<b>g</b>	SO <sub>2</sub> <sup>-</sup> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> <sup>-</sup> <i>p</i> NH <sub>2</sub>	F



comp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>a</b>	<i>p</i> -Ns	Cl
<b>b</b>	<i>o</i> -Ns	Cl
<b>c</b>	Fmoc	Cl
<b>d</b>	<i>p</i> -Ns	OH
<b>e</b>	<i>o</i> -Ns	OH
<b>f</b>	Fmoc	OH
<b>g</b>	H	SPh
<b>h</b>	<i>p</i> -Ns	SPh
<b>i</b>	<i>o</i> -Ns	SPh
<b>j</b>	SO <sub>2</sub> <sup>-</sup> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> <sup>-</sup> <i>o</i> NH <sub>2</sub>	Cl

**Figura 14.** Benzoxazepinas *O,N*-acetálicas unidas a pirimidinas (**57a-g** y **58a-f**) y unidas a purinas por N9' (**59a-c**) o por N7' (**60a-j**).

También se sintetizaron compuestos con el nitrógeno sustituido por diferentes grupos voluminosos, entre ellos un resto de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). La síntesis de estas estructuras con Fmoc como sustituyente se realizó mediante la condensación del *O,O*-acetal **61** con 6-cloropurina, según el procedimiento empleado para obtener sus análogos con nosilo en el nitrógeno<sup>110</sup>, igualmente a 50°C durante 48 horas (Esquema 11).



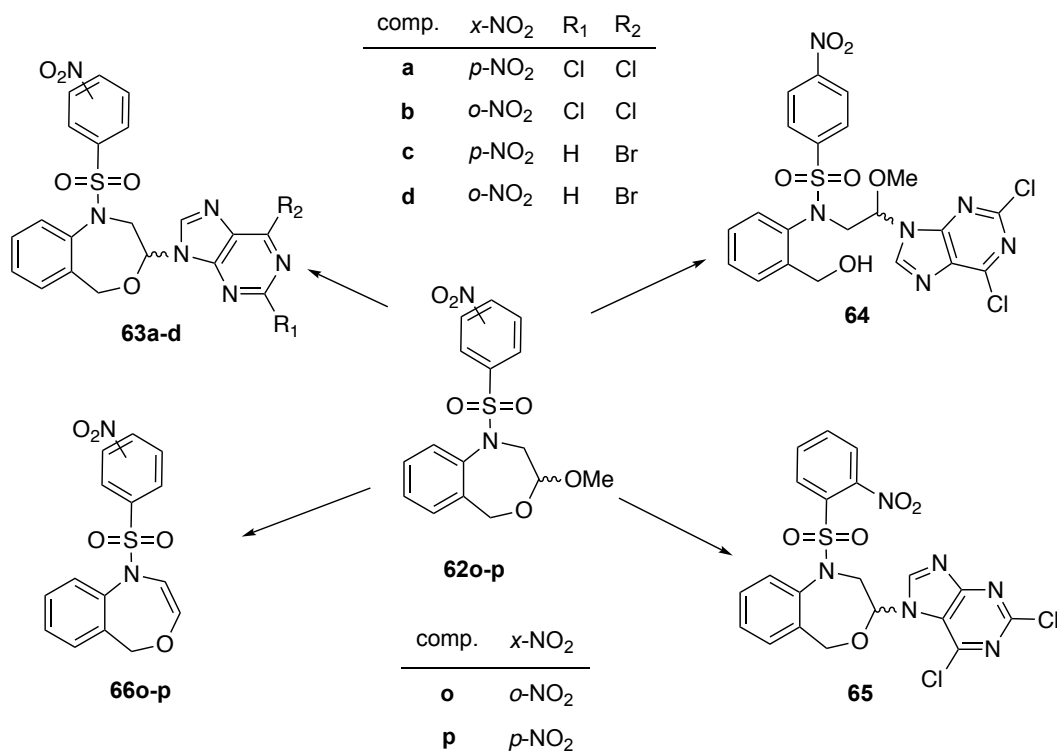
**Esquema 11.** Síntesis de los derivados *O,N*-acetálicos sustituidos en *N* con el grupo *Fmoc*.

Las actividades que destacaron de las nuevas 4,1-benzoxazepinas unidas a purinas y pirimidinas ensayadas frente a la línea tumoral MCF-7 fueron las de los compuestos **60b** ( $Cl_{50} = 0.92 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ), **60h** ( $Cl_{50} = 0.86 \pm 0.12 \mu\text{M}$ ), **60c** ( $Cl_{50} = 0.84 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ) y **59c** ( $Cl_{50} = 0.67 \pm 0.18 \mu\text{M}$ ), con valores de  $Cl_{50}$  por debajo de  $1 \mu\text{M}$ . Las dianas objetivo de estos derivados con actividad antitumoral fueron principalmente reguladores positivos de genes proapoptóticos, así como inhibidores de genes involucrados en carcinogénesis, proliferación celular e invasión tumoral<sup>114</sup>.

Se utilizaron los compuestos **59c** y **60h** para intentar establecer los objetivos moleculares claves para su actividad anticancerígena. A través de ensayos de microarrays (chips de ADN y ARN usados para el estudio de la expresión de muchos genes simultáneamente), se determinó que los objetivos moleculares eran genes proapoptóticos con actividad proteínica como GP132, ERN1 ó RAC1, los cuales previenen la progresión de la metástasis.

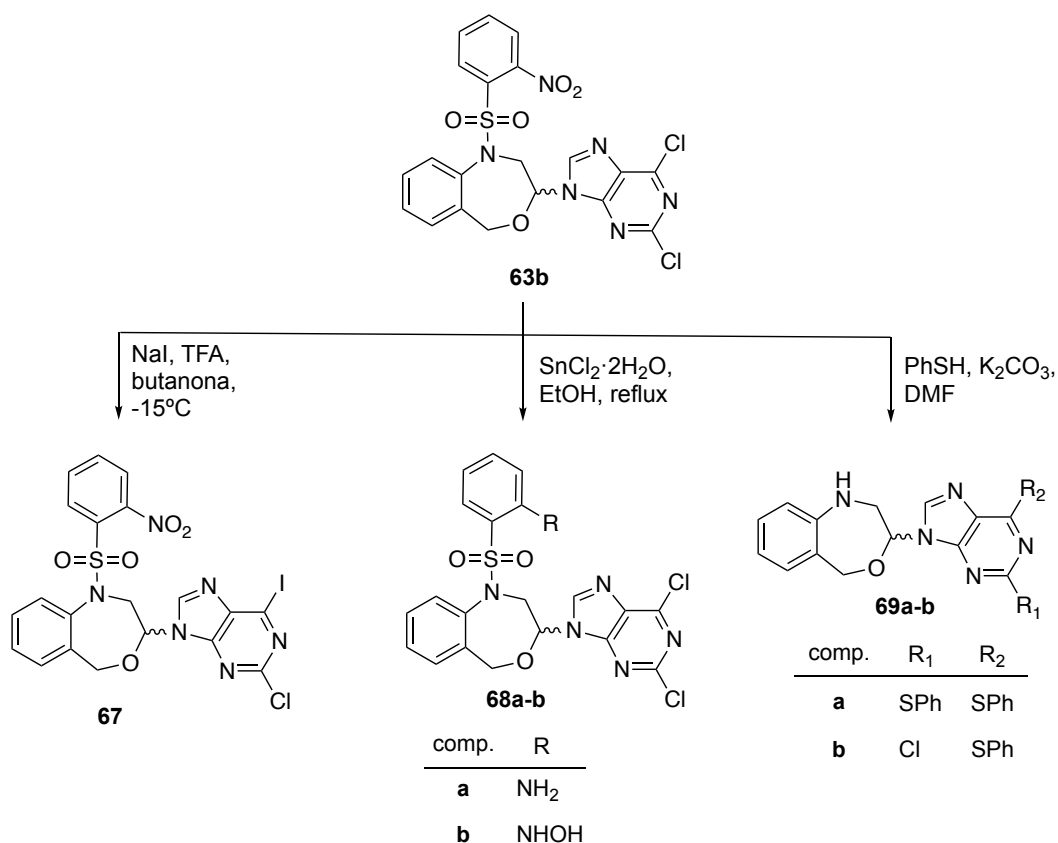
Para completar el estudio de relación estructura actividad (SAR) se sintetizaron una serie de compuestos asistidos por microondas, las (*RS*)-6-sustituidos-7- ó 9-(1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il)-7*H* ó 9*H*-purinas<sup>115</sup>, las cuales se ensayaron frente a las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 (línea de cáncer de mama hormona-dependiente).

Inicialmente se obtuvieron los derivados **63-66**, que se sintetizaron en un solo paso mediante la condensación de Vorbrüggen asistida por microondas de los acetales cíclicos **62o** y **62p** con tres bases púricas comerciales, 6-cloro-, 6-bromo- y 2,6-dicloropurina-, empleando TMSCl, HMDS y SnCl<sub>4</sub> en acetonitrilo anhidro<sup>116</sup> (Esquema 12).



**Esquema 12.** Compuestos (*RS*)-6-sustituidos-7 ó 9-(1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il)-7*H* ó 9*H*-purinas.

Por último, se hicieron varias modificaciones en el compuesto **63b**. Por una parte, la posición 6 de la purina fue sustituida mediante una sustitución nucleofílica selectiva, empleando yoduro sódico y ácido trifluoroacético para dar **67**. También se realizó una reducción del grupo NO<sub>2</sub> a NH<sub>2</sub> y NHOH con SnCl<sub>2</sub>, para obtener **68a** y **68b**, respectivamente. Para terminar con los derivados de este apartado de *O,N*-acetales con bases nitrogenadas diferentes de 5-FU, se trató el compuesto **63b** con tiofenol para dar los derivados **69a-b** (Esquema 13)<sup>115</sup>.



**Esquema 13.** Compuestos obtenidos a partir de **63b**.

En estos derivados (*RS*)-6-sustituidos-7- ó 9-(1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il)-7*H*- ó 9*H*-purinas nos encontramos que la mayoría tienen una  $Cl_{50}$  con valores por debajo de 1  $\mu\text{M}$ . Entre ellos destaca **63a**, la molécula más activa publicada hasta ese momento<sup>115</sup>. Los compuestos se ensayaron frente a dos líneas tumorales de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231 y, adicionalmente, se ensayaron en una línea no tumoral, MCF-10, con la finalidad de estudiar el índice terapéutico. En estos ensayos de actividad destacó por su elevada citotoxicidad el compuesto **63a**, que posteriormente pasaría a ser conocido como bozepinib. Las actividades de la mezcla racémica frente a las líneas tumorales, así como de los enantiómeros separados, están recogidas en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Actividades antiproliferativas de la mezcla racémica de (RS)-**63a** y los enantiómeros (R)-**63a** y (S)-**63a** frente a líneas MCF-7 y MDA-MB-231.

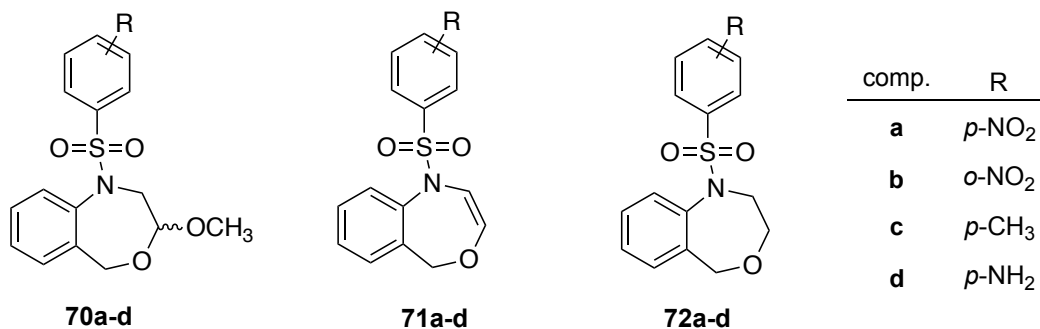
Comp.	CI <sub>50</sub> MCF-7	CI <sub>50</sub> MDA-MB-231
(RS)- <b>63a</b>	0.355 ± 0.011	0.166 ± 0.063
(R)- <b>63a</b>	0.19 ± 0.001	0.11 ± 0.001
(S)- <b>63a</b>	0.1 ± 0.001	0.11 ± 0.001

La tabla muestra cómo los enantiómeros en ambas líneas tumorales presentan más actividad antiproliferativa que la correspondiente mezcla racémica. (R)-**63a** induce la apoptosis hasta el 52.5% de la población celular tras 48 horas en la línea MCF-7, resultando más activo que el fármaco empleado en la práctica clínica, el paclitaxel, que induce un 43% de apoptosis. El índice terapéutico (IT= CI<sub>50</sub> MCF-10/CI<sub>50</sub> MCF-7) del compuesto (RS)-**63a** para MCF-7 es de 5.14 y para MDA-MB-231 de 11.0.

Posteriormente se hizo un estudio para determinar el mecanismo de acción del bozepinib ((RS)-**63a**) y mostró un interesante efecto inhibitorio sobre las quinasas involucradas en carcinogénesis, proliferación y angiogénesis<sup>117</sup>. Este compuesto se ensayó también frente a líneas de cáncer de colon, RKO y HCT-116, mostrando mayor actividad frente a ellas que respecto a las líneas de cáncer de mama inicialmente ensayadas. En este mismo estudio se ensayó la actividad sinérgica del bozepinib con interferón- $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ) presentando una CI<sub>50</sub> = 0.09 ± 0.01  $\mu$ M frente a la línea tumoral RKO cuando se administraban conjuntamente (RS)-**63a** e IFN- $\alpha$ <sup>118</sup>. Recientemente se ha llevado a cabo una investigación en la que el bozepinib se ha administrado en combinación con el gen suicida *gef*, obteniéndose un IT de 11.30 (frente al valor de 5.14 que presenta al administrarse solo). Estos resultados muestran una nueva aproximación para agentes antitumorales que eviten la proliferación tumoral con una dosis mínima, más efectiva y menos tóxica <sup>119</sup>.



Para analizar la influencia del anillo de siete miembros benzofusionado en la actividad biológica, dado que se ha demostrado que los fragmentos de purinas no tienen actividad por sí solos, se sintetizaron una serie de derivados de 1-(bencenosulfonil)-4,1-benzoxazepinas (**70-72**) sin unir a bases nitrogenadas<sup>120</sup> (Figura 15).



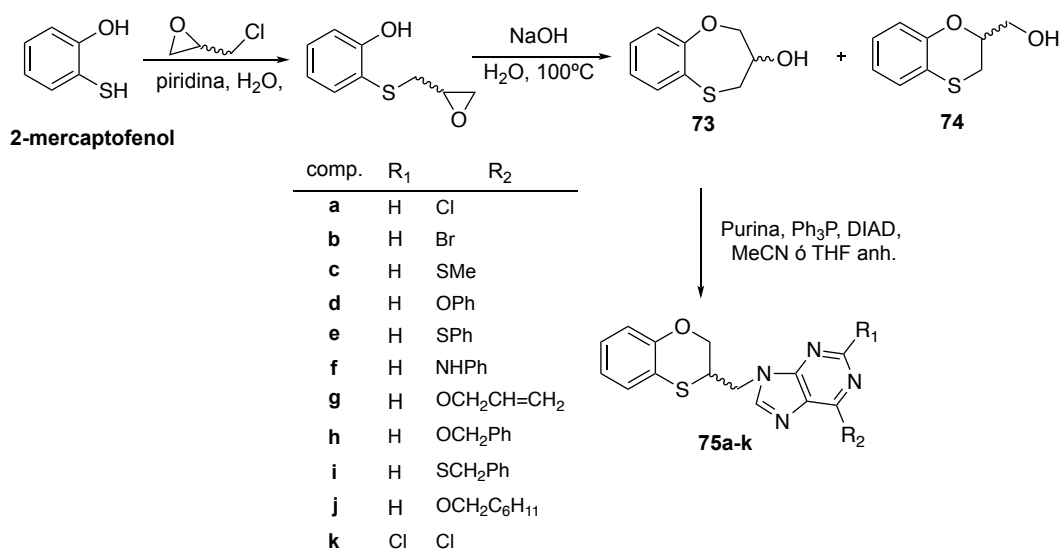
**Figura 15.** Derivados 1-(bencenosulfonil)-4,1-benzoxazepinas.

Tras la síntesis de estas nuevas estructuras sin restos de purina, se analizó su influencia sobre la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y la apoptosis frente a tres líneas tumorales, MCF-7, HCT-116 y la línea de melanoma humano A375. Estos ensayos llevaron a la conclusión de que el grupo sulfonilo unido a un resto de metilenoamina presente en las estructuras **71a-d**, era esencial para su actividad antitumoral.

### 2.3. Compuestos no acetálicos

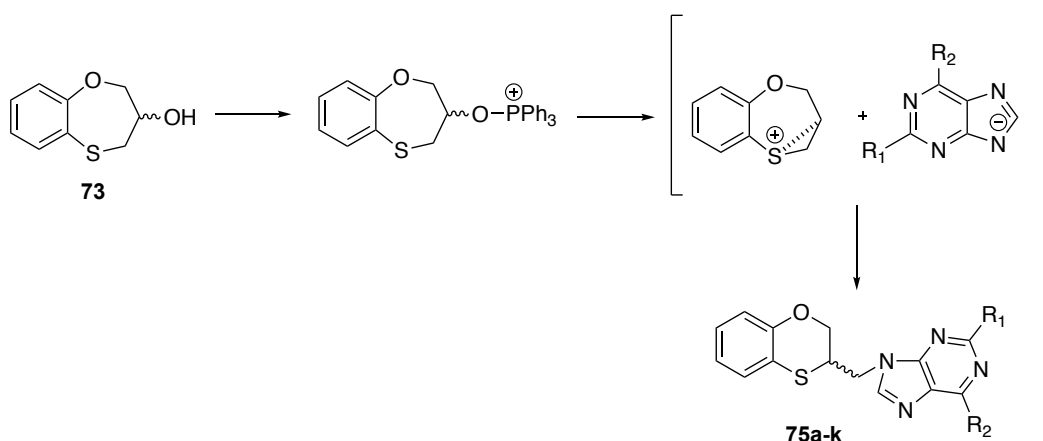
Un estudio demostró que cuanto más débil era el enlace con el N<sub>1</sub> del 5-FU, mayores eran tanto la actividad antitumoral como la toxicidad de sus derivados<sup>121</sup>. Así que, teniendo en cuenta esto y que los compuestos descritos hasta ahora no actúan como profármacos<sup>104</sup>, no era necesario mantener las características de los *O,N*-acetales. Así, se diseñaron nuevas estructuras que contenían tanto el anillo heterocíclico benzofusionado como las bases de purina sustituidas, pero en este caso unido el anillo a la purina mediante un puente metilénico. Concretamente se obtuvo una familia de derivados con un anillo de seis miembros y dos heteroátomos en

su estructura. En primer lugar, se sintetizaron derivados de 1,5-benzoxatiepina mediante la reacción de 2-mercaptofenol con epiclorhidrina<sup>122</sup> (Esquema 14) y, posteriormente, se produjo la contracción del anillo para dar los compuestos unidos a purinas **75a-k**<sup>123</sup>. También se formó un derivado, en menor proporción, con un anillo de seis miembros, **74**, resultado del ataque del oxígeno fenólico a la posición más impedida del anillo del epóxido.



**Esquema 14.** Síntesis de los derivados 2- y 6-disustituídos (RS)-9-(2,3-dihidro-1,4-benzoxatin-3-ilmetil)-9H-purina.

La contracción del anillo que tiene lugar en la molécula **73** para dar los derivados de seis miembros benzofusionados unidos a purinas **75a-k**, se podría explicar debido al impedimento estérico causado por la Ph<sub>3</sub>P al unirse al grupo hidroxilo secundario de **73**, el cual afectaría al ataque de un grupo voluminoso como la 6-cloropurina durante la reacción de Mitsunobu. La participación del grupo vecino S-3 implicaría la formación de un intermedio episulfonio debido al fuerte carácter nucleófilo del azufre (Esquema 15).



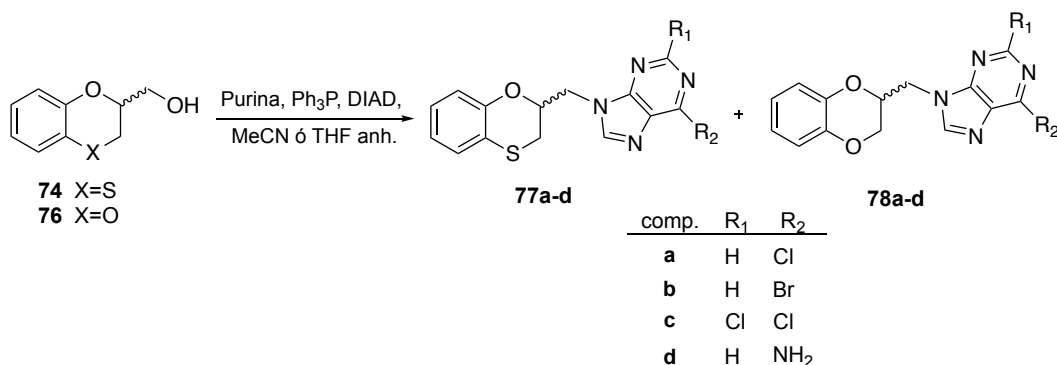
**Esquema 15.** Posible vía de formación de los productos **75a-k** mediante la reacción de Mitsunobu.

Las condiciones de reacción empleadas para la síntesis de estos derivados (microondas, 5 min, 140°C), llevaron a la obtención de los distintos compuestos con rendimientos satisfactorios (>50%).

La actividad antiproliferativa se estudió frente a la línea tumoral MCF-7, destacando los compuestos **75b** ( $\text{Cl}_{50} = 6.18 \pm 1.70 \mu\text{M}$ ) y **75k** ( $\text{Cl}_{50} = 8.97 \pm 0.83 \mu\text{M}$ ). Al comparar estas actividades con la del 5-FU ( $\text{Cl}_{50} = 4.32 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) en las mismas condiciones, se deduce que la presencia de un halógeno en la posición 6' de la purina o la presencia de dos cloros en la posiciones 2' y 6' de dicha base confieren a las moléculas una capacidad antiproliferativa casi comparable a la del 5-FU<sup>124</sup>.

Basándose en los nuevos resultados más prometedores obtenidos en la serie anterior (**75a-b** y **75k**), se sintetizaron isómeros con átomos de halógenos en el resto de purina y con la base natural adenina, obteniéndose dos series de bioisómeros: por una parte, (*RS*)-9-(2,3-dihidro-1,4-benzoxatin-2-il-metil)-9*H*-purinas (**77a-d**) en las que la unión de la purina, en lugar de mediante la cadena metilénica unida por la posición 3 como sus análogos (**75a-b** y **76k**), se hace a través de la posición 2 y (*RS*)-9-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-ilmetil)-9*H*-purinas (**78a-d**)<sup>125</sup> en los que el azufre se ha reemplazado por un oxígeno (Figura 16).

El compuesto de partida (*RS*)-2,3-dihidro-2*H*-1,4-benzoxatin-2-metanol **74**, fue sintetizado con la metodología previamente descrita para el precursor de los isómeros de posición **75a-k**<sup>123</sup>. Por otra parte, el producto de partida con el anillo benzodioxínico **76** se obtuvo por la reacción de catecol con epiclorhidrina en NaOH y agua<sup>126</sup>.



**Figura 16.** (*RS*)-9-(2,3-dihidro-1,4-benzoxatin-2-ilmetil)-9*H*-purinas (**77a-d**) y (*RS*)-9-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-il-metil)-9*H*-purinas (**78a-d**).

Todos los derivados de halopurinas sintetizados presentaron buena actividad, destacando el bioisostero **77c**, isómero de posición de **75k**, que mostró una notable mejoría de la capacidad apoptótica, con una  $Cl_{50} = 2.75 \pm 0.03 \mu\text{M}$ , siendo incluso mejor que el 5-FU. Los derivados con adenina no presentaron una actividad llamativa.

Dentro de la serie de benzoxatinas, los compuestos más activos (**75a-b**, **75k**, **77a-c**) se seleccionaron para la obtención de sus enantiómeros puros. Se publicaron síntesis enantioespecíficas efectivas así como ensayos de actividad antiproliferativa contra dos líneas de cáncer de mama (MCF-7 y SKBR3), de los enantiómeros puros (*R* y *S*) y de las mezclas racémicas (*RS*)<sup>127</sup>.

Los enantiómeros presentaron actividades diferentes entre ellos y con respecto a la mezcla de ambos (Tabla 5), donde la mayor diferencia se encontró entre los enantiómeros de **77a** y los valores más similares entre

enantiómeros y con la mezcla racémica fue para **77b**. De todos ellos destaca el compuesto (S)-**75k** con una  $CI_{50} = 1.85 \pm 0.05 \mu M$ .

**Tabla 5.** Actividades antiproliferativas ( $CI_{50} = \mu M$ ) de las mezclas racémicas y los enantiómeros puros frente a líneas MCF-7 y SKBR3.

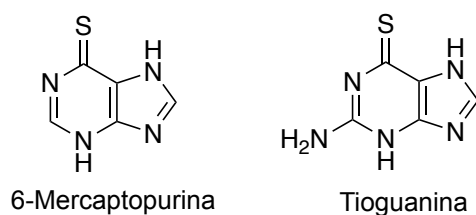
Comp.	$CI_{50}$ MCF-7	$CI_{50}$ SKBR3	Comp.	$CI_{50}$ MCF-7	$CI_{50}$ SKBR3
(RS)- <b>75a</b>	$9.24 \pm 0.01$	$8.04 \pm 0.00$	(RS)- <b>77a</b>	$10.6 \pm 0.66$	$8.17 \pm 0.00$
(R)- <b>75a</b>	$4.73 \pm 0.02$	$6.56 \pm 0.11$	(R)- <b>77a</b>	$15.2 \pm 0.03$	$12.1 \pm 0.04$
(S)- <b>75a</b>	$11.4 \pm 0.06$	$9.46 \pm 0.00$	(S)- <b>77a</b>	$3.33 \pm 0.02$	$4.50 \pm 0.12$
(RS)- <b>75b</b>	$4.87 \pm 0.02$	$7.25 \pm 0.00$	(RS)- <b>77b</b>	$6.18 \pm 1.70$	$8.98 \pm 0.00$
(R)- <b>75b</b>	$4.45 \pm 0.07$	$5.18 \pm 0.00$	(R)- <b>77b</b>	$6.17 \pm 0.07$	$9.94 \pm 0.00$
(S)- <b>75b</b>	$3.33 \pm 0.13$	$7.78 \pm 0.00$	(S)- <b>77b</b>	$6.32 \pm 0.04$	$9.05 \pm 0.14$
(RS)- <b>75k</b>	$2.75 \pm 0.03$	$5.0 \pm 0.00$	(RS)- <b>77c</b>	$8.97 \pm 0.83$	$5.73 \pm 0.22$
(R)- <b>75k</b>	$3.33 \pm 0.04$	$4.34 \pm 0.00$	(R)- <b>77c</b>	$10.3 \pm 0.01$	$7.52 \pm 0.01$
(S)- <b>75k</b>	$1.85 \pm 0.05$	$7.03 \pm 0.00$	(S)- <b>77c</b>	$6.93 \pm 0.09$	$4.35 \pm 0.00$

### 3. Otros antitumorales heterocíclicos

Los heterociclos son unas estructuras moleculares muy empleadas en diversas aplicaciones terapéuticas<sup>128–130</sup>. Entre ellas, el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antitumoral, aparte de los compuestos sintetizados y ensayados previamente en el grupo, tal y como se describe en el apartado 2, se han desarrollado otras familias de compuestos relacionados.

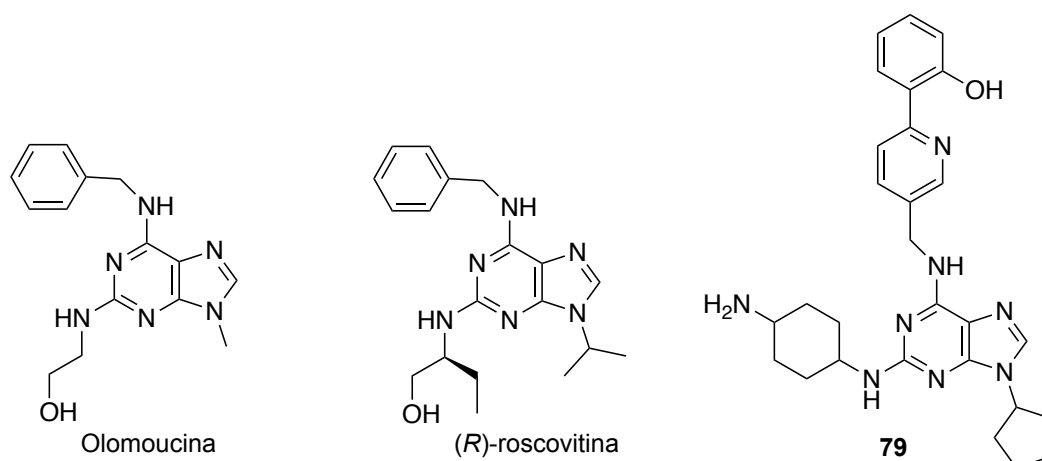
### 3.1. Purinas y heterociclos unidos a purinas con actividad antitumoral

Las purinas son un grupo de heterociclos ampliamente usado en el diseño de fármacos antitumorales, tienen la característica de unirse fuertemente a pliegues hidrofóbicos e inhibir un amplio abanico de enzimas clave<sup>131</sup>. En 1953 y 1966<sup>132</sup>, entre los primeros fármacos anticancerígenos descubiertos estaban la 6-mercaptopurina y la tioguanina (Figura 17). Estas purinas modificadas empleadas como antimetabolitos se utilizaban como inhibidores del metabolismo de ácidos nucleicos en leucemia infantil<sup>133-135</sup>, sin embargo la pobre biodisponibilidad de estas moléculas, la desactivación metabólica, el desarrollo de resistencia frente a ellas y su toxicidad, limitan su uso clínico<sup>136</sup>.



**Figura 17.** 6-mercaptopurina y tioguanina.

Otros análogos de purinas unidas a fragmentos más voluminosos o a heterociclos han sido sintetizados posteriormente, entre ellos destacan algunas moléculas ya empleadas en la práctica clínica o en estados avanzados de desarrollo, como el (*R*)-roscovitina (Seliciclib®) o la olomoucina<sup>137</sup> (Figura 19), inhibidores de CDKs<sup>138,139</sup>. Otro ejemplo de fármaco derivado de purina unido a un heterociclo que actúa como inhibidor de las CDKs es el *N*2-(4-aminociclohexil)-9-ciclopentil-*N*6-[6-(2-hidroxifenil)-piridin-3-ilmetil]-9*H*-purina-2,6-diamina, **79** (Figura 18). Este compuesto presenta una  $CI_{50} = 0.018 \mu\text{M}$  frente a la línea celular MCF-7 y una  $CI_{50} = 0.035 \mu\text{M}$  frente a la línea HCT-116. Esta molécula se diseñó a partir de la (*R*)-roscovitina, la cual mostró una  $CI_{50}$  de 12.3 y 14.4  $\mu\text{M}$  respectivamente, para las mismas líneas tumorales<sup>140</sup>.



**Figura 7.** Estructura de fármacos antitumorales con restos de purina olomoucine, (R)-roscovitine y 79.

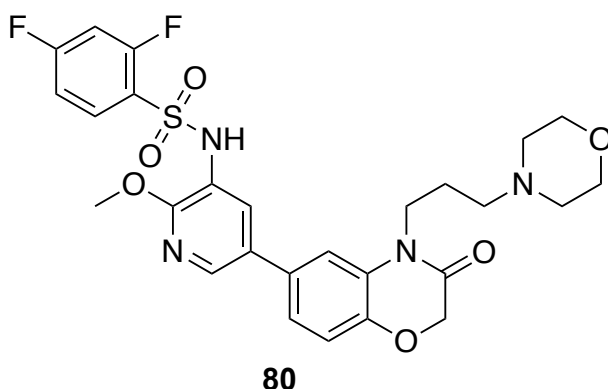
Por último, las purinas unidas a pentosas son otro grupo de moléculas de gran interés<sup>141</sup>. Existen fármacos ya comercializados y empleados en la práctica clínica que actúan como antimetabolitos de nucleósidos, como la clofarabina (Clolar®) o la fludarabina (Fludara®)<sup>131</sup>. Se han descrito derivados de estos nucleósidos con diferentes aplicaciones en cáncer, como por ejemplo el derivado de adenosina con sal de aspartato que muestra actividad como preventivo de la aparición de tumores en el hígado<sup>142</sup>. Entre los últimos nucleósidos en ensayos clínicos se encuentran la sapacitabina, para el tratamiento de leucemia mieloide crónica y otros tumores sólidos, y ECyD, un análogo de la citidina para su uso contra el cáncer de cuello y cabeza<sup>143</sup>.

### 3.2. Derivados de 1,3- y 1,4-benzoxacinas

Las benzoxacinas son compuestos heterocíclicos que han demostrado importante actividad como proapoptóticos e inhibidores de la proliferación celular<sup>144,145</sup>. También son componentes muy útiles en la obtención de derivados más complejos con actividad terapéutica<sup>146</sup>, por ejemplo, en la síntesis de compuestos con actividad quimiosensibilizadora frente a fármacos antitumorales, como la doxorubicina, para su empleo en cáncer

de colon, actuando como potenciador del quimioterápico al inhibir la fosforilación de la enzima AKT, encargada de la reparación de la rotura de la doble cadena<sup>147</sup>.

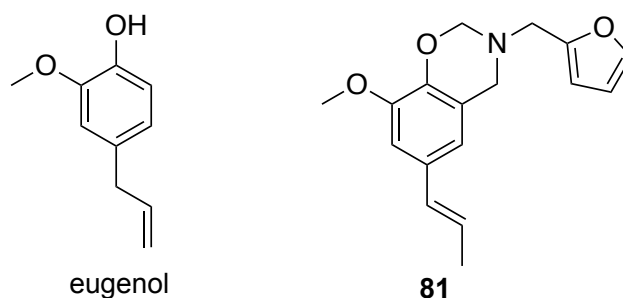
Recientemente se han descrito estructuras con benzoxazinas benzofusionadas que han presentado una interesante actividad antitumoral frente a las líneas tumorales HCT-116, MDA-MB-231 y SNU638 (cáncer de estómago). Entre estas moléculas destacó el compuesto **80**, que presentaba una  $CI_{50}$  de  $0.58 \pm 0.03$  ,  $0.59 \pm 0.02$  y  $0.52 \pm 0.04$   $\mu\text{M}$  respectivamente para estas líneas de cáncer ensayadas. Este compuesto además fue estudiado en dos líneas celulares sanas, indicando que el compuesto **80** inhibe la proliferación celular de forma selectiva en células cancerígenas<sup>148</sup>



**Figura 19.** Estructura de **80**

Últimamente se ha publicado un artículo en el que derivados benzoxacínicos del eugenol (Figura 20) (fitofenol bioactivo utilizado como fármaco natural que ha demostrado una supresión del crecimiento de melanoma<sup>149</sup>), en combinación con óxido de grafeno, el cual es empleado como vehículo, han resultado ser activos frente a líneas tumorales de cáncer de mama. En concreto, el compuesto **81** presentó una prometedora actividad frente a las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 ( $CI_{50} = 31.3$   $\mu\text{M}$  y  $CI_{50} = 21.8$   $\mu\text{M}$ , respectivamente).



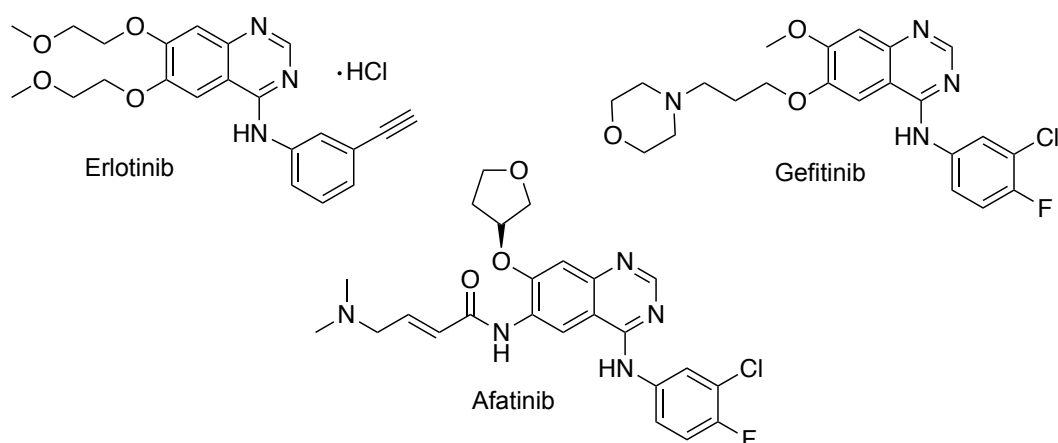


**Figura 20.** Eugenol y su derivado benzoxacínico, **81**

En el 2018 se han obtenido otros derivados de 1,3-benzoxazinas benzofusionados con aplicaciones en tratamiento del cáncer, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, que han puesto de manifiesto una potente actividad antitumoral a través de la unión al bolsillo hidrofóbico en el sitio de unión del ATP de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)<sup>150</sup>.

### 3.3. Derivados de quinazolininas

Los heterociclos con nitrógeno representan un importante grupo de compuestos ampliamente usados en ciencia de los materiales, agroquímica y química médica<sup>151,152</sup>. Debido a la gran importancia de este tipo de compuestos, la obtención de nuevas rutas sintéticas mas económicas y efectivas es objeto de trabajo de muchos grupos de investigación<sup>151,153–155</sup>. En los últimos años, han sido publicados derivados de quinazolininas con aplicación como inhibidores de EGFR, por ejemplo gefitinib, erlotinib, canertinib y afatinib<sup>156</sup>(Figura 21), algunos de ellos han sido recientemente puestos en fase 4 de ensayos clínicos, como el fármaco de segunda generación, afatinib que bloquea de forma irreversible miembros de la familia EGFR<sup>157,158</sup>.

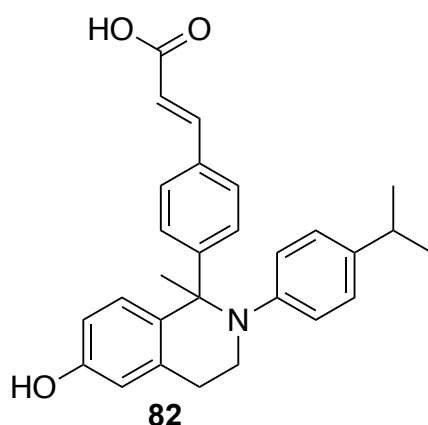


**Figura 21.** Estructuras químicas de los principales fármacos inhibidores de EGFR.

Entre los fármacos de primera generación que inhiben de forma reversible EGFR, se encuentran el erlotinib y gefitinib<sup>159</sup> (Figura 21). Sin embargo se han detectado resistencias al fármaco de primera línea, gefitinib, asociada a la actividad de los TAMs y a diversos tipos de células tumorales<sup>160–162</sup>.

### 3.4. Tetrahidroisoquinolinas

Las tetrahidroisoquinolinas (THIQ), son moléculas ampliamente estudiadas por su presencia en la estructura de multitud de fármacos con diferentes actividades terapéuticas, como antitusivos, agentes antimuscarínicos o con propiedades anti-isquémicas, entre otras<sup>163,164</sup>. Estos heterociclos también son muy útiles en el desarrollo de agentes antitumorales<sup>165</sup>. Un ejemplo actual es el compuesto **82**, potente antagonista de los receptores de estrógenos- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y con capacidad para degradar de forma selectiva estos (SERD, Selective Estrogen Receptor Degradation), presenta una buena disponibilidad oral, eficacia antitumoral y buena SERD (CI<sub>50</sub> = 0.9 nM)<sup>166</sup> frente a la línea MCF-7.



**Figura 22.** Estructura del compuesto **82**.

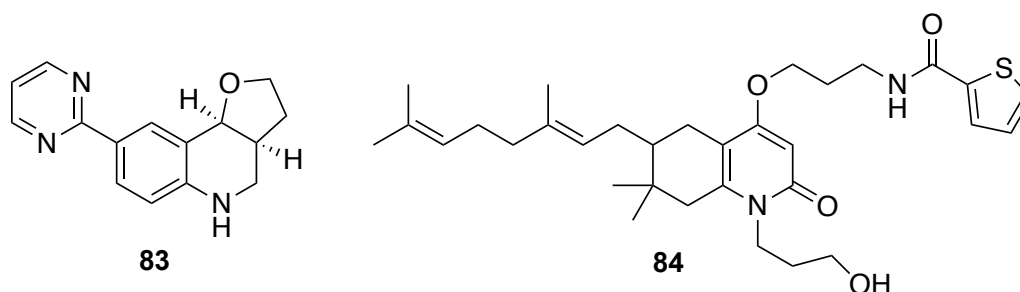
Las posibles vías de actuación como antitumorales de los derivados de THIQ han sido estudiadas por muchos investigadores, como por ejemplo su aplicación antiproliferativa a través de su capacidad disruptiva de los microtubos<sup>167</sup>, como antagonistas del receptor de quimiocinas CXCR4<sup>168</sup>, involucrado en la progresión del cáncer<sup>169</sup>, o como moduladores de glicoproteínas-P (transportadores de membrana altamente expresados en CSCs, que están relacionados con fallos y resistencias a muchos tratamientos quimioterápicos)<sup>170,171</sup>.

### 3.5. Tetrahydroquinolinas

Las tetrahydroquinolinas (THQ), son un grupo de compuestos considerado como privilegiado por sus aplicaciones médicas, debido a su afinidad por diferentes dianas moleculares, tienen un amplio espectro de actividades biológicas<sup>172</sup>, entre ellas destaca su actividad anticancerígena<sup>173-175</sup>.

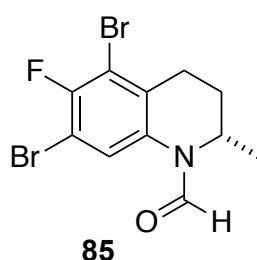
Algunos ejemplos de derivados de THQ con interesantes actividades como antitumorales son, el compuesto **83** que presenta valores de  $CI_{50} = 9.7 \mu M$  para la línea tumoral MCF-7 y de  $2.5 \mu M$  en la línea tumoral de glioma murino C6, los estudios realizados parecen indicar que este compuesto actúa induciendo la apoptosis mitocondrial<sup>175</sup>. Otra molécula derivada de THQ con actividad interesante desarrollada recientemente, es el derivado

**84**, este compuesto actúa inhibiendo la formación de colonias e induciendo la apoptosis en la línea de cáncer de páncreas PANC-1, mostrando una  $Cl_{50} = 4.9 \mu M^{176}$ .



**Figura 23.** Derivados de THQ con actividad anticancerígena.

Se han publicado estudios SAR de análogos de THQ con diferentes sustituyentes<sup>173</sup>. El compuesto **85** (Figura 24) mostró una potente actividad inhibitoria de las proteínas de intercambio activadas directamente por cAMP (EPAC) implicadas en numerosos procesos celulares como secreción de insulina, supervivencia celular, apoptosis, transcripción de genes e integridad cromosomal<sup>177</sup>. Además se ha visto que la activación de las EPAC está relacionada con la regulación de procesos de proliferación y migración en el cáncer de próstata<sup>178</sup>. Estos estudios demostraron que, los diferentes enantiómeros presentaban distintas actividades, siendo el derivado (*R*)-**85**, con una  $Cl_{50} = 3.3 \pm 0.4 \mu M$ , mucho mas activo que el su estereoisómero S ( $Cl_{50} = 31.3 \pm 9.2 \mu M$ ) frente a la proteína EPAC1.



**Figura 24.** Estructura del compuesto **85**.

#### **4. Biocatálisis y enantioselectividad**

El empleo de enzimas aisladas o de células enteras (que incluyen cofactores como ATP, NAD o CoASH, entre otros) como catalizadores para síntesis química, se conoce como biocatálisis<sup>179</sup>. El uso de esta técnica para llevar a cabo transformaciones estereoselectivas, está adquiriendo gran auge en las últimas décadas, tanto en el sector académico como en la industria<sup>180</sup>. La gran abundancia de enzimas en la naturaleza capaces de producir compuestos enantioméricamente puros, nos permite realizar transformaciones de manera eficiente y selectiva para obtener una gran variedad de compuestos quirales<sup>181</sup>.

La decisión de emplear enzimas aisladas o el microorganismo entero (libre o inmovilizado) depende de muchos factores, como el tipo de reacción, si hay cofactores involucrados que necesiten ser reciclados, o la escala a la que debe realizarse la reacción. Además, el empleo de la célula completa puede presentar otros problemas entre los que destacan: que otra enzima metabolice el sustrato, el transporte hacia dentro y hacia afuera de la célula del producto o del sustrato, o que estos sean tóxicos para la célula<sup>182</sup>. Sin embargo, el uso de células enteras es muy útil cuando se hacen múltiples reacciones catalizadas por enzimas, o cuando las enzimas requieren estar unidas a la membrana. En casos como preparaciones a gran escala en la industria se pueden emplear enzimas inmovilizadas que presentan muchas ventajas<sup>183,184</sup>. Suelen ser más activas y más estables, y los rendimientos de la relación espacio-tiempo de reacciones optimizadas suelen ser más altos<sup>181,185</sup>.

Un conjunto de estudios bioquímicos, microbiológicos y de ingeniería bioquímica (biotecnología) ha llevado al desarrollo de rutas para la obtención de compuestos, desde aminoácidos hasta penicilinas, partiendo de fuentes económicas de carbono como son los carbohidratos<sup>186</sup>.

El empleo de enzimas para catalizar reacciones no siempre es posible. Su uso presenta una serie de ventajas aunque también diversas desventajas<sup>182</sup>:

#### Ventajas

- Puede aumentarse la tasa de transformación hasta en 10 veces<sup>187</sup>.
- Amplia tolerancia a la variabilidad estructural de sustratos.
- Alto grado de regio, estéreo y enantioselectividad.
- La reacción se puede llevar a cabo en condiciones suaves.
- Las enzimas pueden sobreexpresarse y actuar incrementando la eficiencia y/o la especificidad de unión al sustrato.
- Baja sobrecarga operacional.
- Reacción considerada como “química verde” o sostenible con el medio ambiente<sup>188</sup>.
- Baja producción de desechos con un ratio de efectividad alto.
- Los desechos producidos por la fermentación son, normalmente, sostenibles y pueden ser retirados por el sistema municipal de recogida de residuos.

#### Desventajas:

- Inestabilidad de algunas enzimas en estado aislado.
- Necesidad de cofactores cuando se emplean oxidoreductasas.
- Baja disponibilidad comercial y coste de aislamiento elevado así como alta sobreexpresión de las enzimas requeridas.
- Dificultad de sustitución de procesos ya establecidos, debido a que la biocatálisis suele aceptarse mejor para nuevos productos cuyo proceso de obtención no existe todavía.
- Requiere nuevas técnicas que precisan de formación específica.

Existen más de 3000 enzimas conocidas, las cuales se pueden clasificar en seis grupos mayoritarios:

<b>Tipo de enzima</b>	<b>Actividad</b>
<b>Oxidoreductasas</b>	llevan a cabo oxidación de alcoholes, dobles enlaces, cetonas así como reducción de cetonas, aldehídos y enolatos
<b>Hidrolasas</b>	producen la formación e hidrólisis de esteres, péptidos, glicéridos, etc.
<b>Liasas</b>	generan enlaces múltiples, adición-eliminación de pequeñas moléculas sobre enlaces C=C, C=N, C=O, etc.
<b>Isomerasas</b>	producen la isomerización de olefinas y racemización
<b>Ligasas</b>	forman de enlaces C-O, C-N, C-S y enlaces fosfóricos.
<b>Transferasas</b>	producen la transferencia de grupos de una molécula a otra (metilo, acilo, fosfato, glicosilo y de grupos amino)

De esta clasificación, las enzimas más empleadas son las hidrolasas, muy útiles para la resolución de racematos y desimetrización de moléculas *meso* con la consiguiente formación de compuestos enantioméricamente puros. Por otro lado, las enzimas oxidoreductasas se emplean para convertir compuestos aquirales y *meso* en enantiómeros ópticamente puros.

Como se ha comentado antes, la biocatálisis ha suscitado gran interés en las últimas décadas, sobre todo en la industria farmacéutica<sup>189,190</sup>. La síntesis de moléculas con centros estereogénicos supone en muchas ocasiones un reto para la obtención de compuestos enantioméricamente puros. A raíz de este problema, se han desarrollado múltiples aproximaciones basadas en métodos organometálicos y organocatalíticos que pueden llegar a convertirse en síntesis complejas<sup>180</sup>.

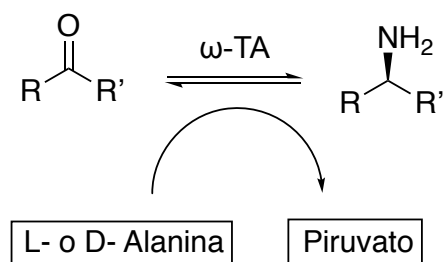
#### 4.1. Importancia de las transaminasas (TAs)

La obtención de aminas enantioméricamente puras es una técnica de síntesis que ha generado un gran interés, sobre todo en la industria farmacéutica y agrícola<sup>191</sup>. Las aminas quirales son uno de los componentes estructurales básicos para la formación del núcleo de los fármacos con centros quirales<sup>192</sup>. Existen diferentes aproximaciones biocatalíticas para la obtención de aminas quirales, como el empleo de hidrolasas, oxidoreductasas o transferasas<sup>193</sup>. Dentro de los posibles procesos están la resolución cinética con hidrolasas<sup>194</sup> o la desracemización con monoamina oxidasa<sup>195</sup>. Sin embargo, el proceso que ha generado mayor interés es la resolución cinética y síntesis asimétrica con  $\omega$ -transaminasas ( $\omega$ -TA)<sup>196,197</sup> ya que son la únicas enzimas capaces de producir una aminación estereoselectiva de cetonas de forma natural<sup>196,198</sup>.

Las transaminasas (TAs) pueden clasificarse en  $\alpha$ -TA y  $\omega$ -TA, basándose en la posición relativa del grupo amino que va a ser transferido en relación al grupo carboxilo del sustrato<sup>199</sup>. En el caso de  $\alpha$ -TA se requiere la presencia de un ácido carboxílico en la posición  $\alpha$  respecto a la función ceto o amino y sólo permite la formación de  $\alpha$ -amino ácidos<sup>192</sup>. Sin embargo las  $\omega$ -TA permiten la aminación de cetoácidos, aldehídos y cetonas<sup>200</sup>. Existen  $\omega$ -TAs con preferencia enantioselectiva (*R*) o (*S*). Dentro de estos dos grupos de TAs ( $\alpha$ -TA y  $\omega$ -TA) hay una gran cantidad de enzimas, de

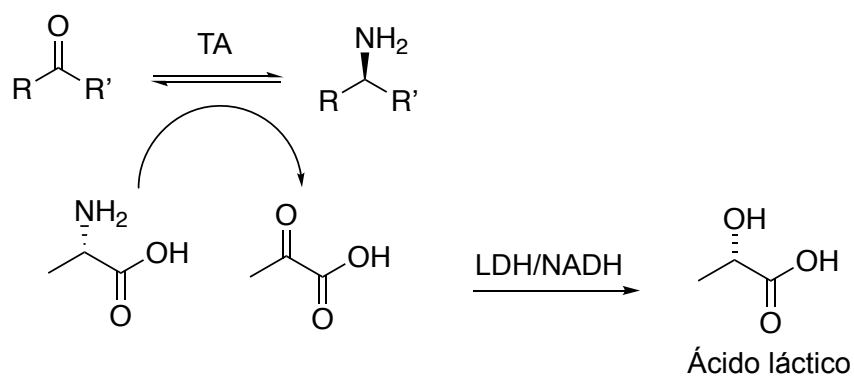


las que se ha estudiado su adecuación para diferentes tipos de reacciones<sup>201</sup>. Un ejemplo de síntesis en que está involucrada una TA es aquella que emplea aminoácidos como donadores del grupo amino (Esquema 16).



**Esquema 16.** *Trasferencia de un grupo amino biocatalizado por una transaminasa ( $\omega$ -TA).*

Para conseguir una conversión eficiente es necesario forzar un equilibrio termodinámico favorable mediante la eliminación o retirada del producto ceto formado como subproducto, siendo posible incluso su reciclado con una ácido deshidrogenasa<sup>202</sup>. Una técnica puede ser mediante la reducción del producto ceto a un ácido hidroxílico para forzar la conversión al grupo amino (Esquema 17).



**Esquema 17.** *Trasferencia de un grupo amino y reducción del producto secundario formado.*

## 5. Bibliografía

- (1) Las cifras del cáncer en España, 2018 <https://seom.org/ultimas-noticias/106525-las-cifras-del-cancer-en-espana-2018>).
- (2) Organización Mundial de la Salud, informe de incidencias de cáncer. <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>.
- (3) Matson, J. P.; Cook, J. G. Cell Cycle Proliferation Decisions: The Impact of Single Cell Analyses. *FEBS J.* **2017**, *284* (3), 362–375. <https://doi.org/10.1111/febs.13898>.
- (4) Boward, B.; Wu, T.; Dalton, S. Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2016**, *34* (6), 1427–1436. <https://doi.org/10.1002/stem.2345>.
- (5) Harashima, H.; Dissmeyer, N.; Schnittger, A. Cell Cycle Control across the Eukaryotic Kingdom. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23* (7), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>.
- (6) Williams, G. H.; Stoeber, K. The Cell Cycle and Cancer. *J. Pathol.* **2012**, *226* (2), 352–364. <https://doi.org/10.1002/path.3022>.
- (7) Bernadotte, A.; Mikhelson, V. M.; Spivak, I. M. Markers of Cellular Senescence. Telomere Shortening as a Marker of Cellular Senescence. *Aging* **2016**, *8* (1), 3–11. <https://doi.org/10.18632/aging.100871>.
- (8) Rocca, M. S.; Foresta, C.; Ferlin, A. Telomere Length: Lights and Shadows on Their Role in Human Reproduction. *Biol. Reprod.* **2018**. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory208>.
- (9) Opresko, P. L.; Shay, J. W. Telomere-Associated Aging Disorders. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *33*, 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.05.009>.
- (10) Jose, S. S.; Tidu, F.; Burilova, P.; Kepak, T.; Bendickova, K.; Fric, J. The Telomerase Complex Directly Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Senescence in an Induced Pluripotent Stem Cell Model of Telomeropathy. *Front. Genet.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00345>.
- (11) Agrelo, R.; Sutz, M. A.; Setien, F.; Aldunate, F.; Esteller, M.; Da Costa, V.; Achenbach, R. A Novel Werner Syndrome Mutation: Pharmacological Treatment by Read-through of Nonsense Mutations and Epigenetic Therapies. *Epigenetics* **2015**, *10* (4), 329–341. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1027853>.

- (12) Bär, C.; Povedano, J. M.; Serrano, R.; Benitez-Buelga, C.; Popkes, M.; Formentini, I.; Bobadilla, M.; Bosch, F.; Blasco, M. A. Telomerase Gene Therapy Rescues Telomere Length, Bone Marrow Aplasia, and Survival in Mice with Aplastic Anemia. *Blood* **2016**, *127* (14), 1770–1779. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-667485>.
- (13) Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell. [Hauptbd.] [Hauptbd.]*; Garland Science Taylor & Francis: New York, 2008.
- (14) Ito, N.; Ohta, K. Reprogramming of Human Somatic Cells by Bacteria. *Dev. Growth Differ.* **2015**, *57* (4), 305–312. <https://doi.org/10.1111/dgd.12209>.
- (15) Hayflick, L. The Cell Biology of Aging. *J. Invest. Dermatol.* **1979**, *73* (1), 8–14.
- (16) Hayflick, L.; Moorhead, P. S. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 585–621.
- (17) *The Molecular Basis of Cancer*, Edition 4.; Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W., Thompson, C., Eds.; Saunders/Elsevier: Philadelphia, PA, **2015**.
- (18) Abate, A. A.; Pentimalli, F.; Esposito, L.; Giordano, A. ATP-Noncompetitive CDK Inhibitors for Cancer Therapy: An Overview. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2013**, *22* (7), 895–906. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.798641>.
- (19) Kalra, S.; Joshi, G.; Munshi, A.; Kumar, R. Structural Insights of Cyclin Dependent Kinases: Implications in Design of Selective Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 424–458. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.071>.
- (20) Sherr, C. J.; Beach, D.; Shapiro, G. I. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov.* **2016**, *6* (4), 353–367. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0894>.
- (21) Buchkovich, K.; Duffy, L. A.; Harlow, E. The Retinoblastoma Protein Is Phosphorylated during Specific Phases of the Cell Cycle. *Cell* **1989**, *58* (6), 1097–1105.
- (22) Hall, M.; Peters, G. Genetic Alterations of Cyclins, Cyclin-Dependent Kinases, and Cdk Inhibitors in Human Cancer. *Adv. Cancer Res.* **1996**, *68*, 67–108.
- (23) Whittaker, S. R.; Mallinger, A.; Workman, P.; Clarke, P. A. Inhibitors

of Cyclin-Dependent Kinases as Cancer Therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *173*, 83–105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>.

(24) Roskoski, R. Cyclin-Dependent Protein Serine/Threonine Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Pharmacol. Res.* **2018**, *139*, 471–488. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.035>.

(25) Cooper, G. M.; Hausman, R. E. *The Cell: A Molecular Approach*, 6th ed.; Sinauer Associates: Sunderland, MA, **2013**.

(26) Baillon, L.; Basler, K. Reflections on Cell Competition. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *32*, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.034>.

(27) Reiter, L. T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M.; Bier, E. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences in *Drosophila Melanogaster*. *Genome Res.* **2001**, *11* (6), 1114–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>.

(28) Worley, M. I.; Setiawan, L.; Hariharan, I. K. TIE-DYE: A Combinatorial Marking System to Visualize and Genetically Manipulate Clones during Development in *Drosophila Melanogaster*. *Development* **2013**, *140* (15), 3275–3284. <https://doi.org/10.1242/dev.096057>.

(29) Heemskerk, I.; Lecuit, T.; LeGoff, L. Dynamic Clonal Analysis Based on Chronic in Vivo Imaging Allows Multiscale Quantification of Growth in the *Drosophila* Wing Disc. *Development* **2014**, *141* (11), 2339–2348. <https://doi.org/10.1242/dev.109264>.

(30) Morata, G.; Ripoll, P. Minutes: Mutants of *Drosophila* Autonomously Affecting Cell Division Rate. *Dev. Biol.* **1975**, *42* (2), 211–221.

(31) Moreno, E.; Basler, K.; Morata, G. Cells Compete for Decapentaplegic Survival Factor to Prevent Apoptosis in *Drosophila* Wing Development. *Nature* **2002**, *416* (6882), 755–759. <https://doi.org/10.1038/416755a>.

(32) Bondar, T.; Medzhitov, R. P53-Mediated Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Competition. *Cell Stem Cell* **2010**, *6* (4), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.002>.

(33) Abrams, J. M. Competition and Compensation. *Cell* **2002**, *110* (4), 403–406. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00904-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00904-2).

(34) Vincent, J.-P.; Kolahgar, G.; Gagliardi, M.; Piddini, E. Steep Differences in Wingless Signaling Trigger Myc-Independent Competitive

Cell Interactions. *Dev. Cell* **2011**, *21* (2), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.021>.

(35) Tyler, D. M.; Li, W.; Zhuo, N.; Pellock, B.; Baker, N. E. Genes Affecting Cell Competition in *Drosophila*. *Genetics* **2007**, *175* (2), 643–657. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.061929>.

(36) de la Cova, C.; Abril, M.; Bellosta, P.; Gallant, P.; Johnston, L. A. *Drosophila* Myc Regulates Organ Size by Inducing Cell Competition. *Cell* **2004**, *117* (1), 107–116.

(37) Moreno, E.; Basler, K. DMyc Transforms Cells into Super-Competitors. *Cell* **2004**, *117* (1), 117–129. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00262-4).

(38) Clavería, C.; Giovinazzo, G.; Sierra, R.; Torres, M. Myc-Driven Endogenous Cell Competition in the Early Mammalian Embryo. *Nature* **2013**, *500* (7460), 39–44. <https://doi.org/10.1038/nature12389>.

(39) Maruyama, T.; Fujita, Y. Cell Competition in Mammals — Novel Homeostatic Machinery for Embryonic Development and Cancer Prevention. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, *48*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.06.007>.

(40) Merino, M. M.; Levayer, R.; Moreno, E. Survival of the Fittest: Essential Roles of Cell Competition in Development, Aging, and Cancer. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26* (10), 776–788. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.009>.

(41) Nguyen, D.; Liao, W.; Zeng, S. X.; Lu, H. Reviving the Guardian of the Genome: Small Molecule Activators of P53. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *178*, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.013>.

(42) Lamb, J.; Crawford, E. D.; Peck, D.; Modell, J. W.; Blat, I. C.; Wrobel, M. J.; Lerner, J.; Brunet, J.-P.; Subramanian, A.; Ross, K. N.; et al. The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science* **2006**, *313* (5795), 1929–1935. <https://doi.org/10.1126/science.1132939>.

(43) Aubrey, B. J.; Kelly, G. L.; Janic, A.; Herold, M. J.; Strasser, A. How Does P53 Induce Apoptosis and How Does This Relate to P53-Mediated Tumour Suppression? *Cell Death Differ.* **2018**, *25* (1), 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>.

(44) Michalak, E. M.; Villunger, A.; Adams, J. M.; Strasser, A. In Several Cell Types Tumour Suppressor P53 Induces Apoptosis Largely via Puma

but Noxa Can Contribute. *Cell Death Differ.* **2008**, *15* (6), 1019–1029. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.16>.

(45) Patel, M. N.; Halling-Brown, M. D.; Tym, J. E.; Workman, P.; Al-Lazikani, B. Objective Assessment of Cancer Genes for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (1), 35–50. <https://doi.org/10.1038/nrd3913>.

(46) Gordon, S. The Macrophage: Past, Present and Future. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37* (S1), S9–S17. <https://doi.org/10.1002/eji.200737638>.

(47) Gordon, S.; Taylor, P. R. Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5* (12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>.

(48) Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes. *Trends Immunol.* **2002**, *23* (11), 549–555.

(49) Genin, M.; Clement, F.; Fattaccioli, A.; Raes, M.; Michiels, C. M1 and M2 Macrophages Derived from THP-1 Cells Differentially Modulate the Response of Cancer Cells to Etoposide. *BMC Cancer* **2015**, *15* (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>.

(50) Zhang, Y.; Choksi, S.; Chen, K.; Pobezinskaya, Y.; Linnoila, I.; Liu, Z.-G. ROS Play a Critical Role in the Differentiation of Alternatively Activated Macrophages and the Occurrence of Tumor-Associated Macrophages. *Cell Res.* **2013**, *23* (7), 898–914. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.75>.

(51) Goswami, K. K.; Ghosh, T.; Ghosh, S.; Sarkar, M.; Bose, A.; Baral, R. Tumor Promoting Role of Anti-Tumor Macrophages in Tumor Microenvironment. *Cell. Immunol.* **2017**, *316*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.04.005>.

(52) Qian, B.-Z.; Pollard, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **2010**, *141* (1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>.

(53) Yamaguchi, T.; Fushida, S.; Yamamoto, Y.; Tsukada, T.; Kinoshita, J.; Oyama, K.; Miyashita, T.; Tajima, H.; Ninomiya, I.; Munesue, S.; et al. Tumor-Associated Macrophages of the M2 Phenotype Contribute to Progression in Gastric Cancer with Peritoneal Dissemination. *Gastric Cancer* **2016**, *19* (4), 1052–1065. <https://doi.org/10.1007/s10120-015-0579-8>.

- (54) Petty, A. J.; Yang, Y. Tumor-Associated Macrophages: Implications in Cancer Immunotherapy. *Immunotherapy* **2017**, 9 (3), 289–302. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0135>.
- (55) Cicalese, A.; Bonizzi, G.; Pasi, C. E.; Faretta, M.; Ronzoni, S.; Giulini, B.; Brisken, C.; Minucci, S.; Di Fiore, P. P.; Pelicci, P. G. The Tumor Suppressor P53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. *Cell* **2009**, 138 (6), 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.048>.
- (56) Ramos, E. K.; Hoffmann, A. D.; Gerson, S. L.; Liu, H. New Opportunities and Challenges to Defeat Cancer Stem Cells. *Trends Cancer* **2017**, 3 (11), 780–796. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.08.007>.
- (57) Driessens, G.; Beck, B.; Caauwe, A.; Simons, B. D.; Blanpain, C. Defining the Mode of Tumour Growth by Clonal Analysis. *Nature* **2012**, 488 (7412), 527–530. <https://doi.org/10.1038/nature11344>.
- (58) Caussinus, E.; Gonzalez, C. Induction of Tumor Growth by Altered Stem-Cell Asymmetric Division in Drosophila Melanogaster. *Nat. Genet.* **2005**, 37 (10), 1125–1129. <https://doi.org/10.1038/ng1632>.
- (59) Kurtova, A. V.; Xiao, J.; Mo, Q.; Pazhanisamy, S.; Krasnow, R.; Lerner, S. P.; Chen, F.; Roh, T. T.; Lay, E.; Ho, P. L.; et al. Blocking PGE2-Induced Tumour Repopulation Abrogates Bladder Cancer Chemoresistance. *Nature* **2015**, 517 (7533), 209–213. <https://doi.org/10.1038/nature14034>.
- (60) Zhu, P.; Fan, Z. Cancer Stem Cells and Tumorigenesis. *Biophys. Rep.* **2018**, 4 (4), 178–188. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0062-2>.
- (61) Chen, K.; Huang, Y.; Chen, J. Understanding and Targeting Cancer Stem Cells: Therapeutic Implications and Challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, 34 (6), 732–740. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.27>.
- (62) O'Brien, C. A.; Pollett, A.; Gallinger, S.; Dick, J. E. A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice. *Nature* **2007**, 445 (7123), 106–110. <https://doi.org/10.1038/nature05372>.
- (63) Henderson, T.; Chen, M.; Darrow, M. A.; Li, C.-S.; Chiu, C.-L.; Monjazeb, A. M.; Murphy, W. J.; Canter, R. J. Alterations in Cancer Stem-Cell Marker CD44 Expression Predict Oncologic Outcome in Soft-Tissue Sarcomas. *J. Surg. Res.* **2018**, 223, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.11.016>.
- (64) Li, W.; Ma, H.; Zhang, J.; Zhu, L.; Wang, C.; Yang, Y. Unraveling the

Roles of CD44/CD24 and ALDH1 as Cancer Stem Cell Markers in Tumorigenesis and Metastasis. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 13856. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2>.

(65) Marotta, L. L. C.; Almendro, V.; Marusyk, A.; Shipitsin, M.; Schemme, J.; Walker, S. R.; Bloushtain-Qimron, N.; Kim, J. J.; Choudhury, S. A.; Maruyama, R.; et al. The JAK2/STAT3 Signaling Pathway Is Required for Growth of CD44+CD24- Stem Cell-like Breast Cancer Cells in Human Tumors. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121* (7), 2723–2735. <https://doi.org/10.1172/JCI44745>.

(66) Organista-Nava, J.; Gómez-Gómez, Y.; Gariglio, P. Embryonic Stem Cell-Specific Signature in Cervical Cancer. *Tumor Biol.* **2014**, *35* (3), 1727–1738. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1321-y>.

(67) Haraguchi, N.; Ishii, H.; Mimori, K.; Tanaka, F.; Ohkuma, M.; Kim, H. M.; Akita, H.; Takiuchi, D.; Hatano, H.; Nagano, H.; et al. CD13 Is a Therapeutic Target in Human Liver Cancer Stem Cells. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120* (9), 3326–3339. <https://doi.org/10.1172/JCI42550>.

(68) Wang, N.; Wang, S.; Li, M.-Y.; Hu, B.; Liu, L.; Yang, S.; Yang, S.; Gong, Z.; Lai, P. B. S.; Chen, G. G. Cancer Stem Cells in Hepatocellular Carcinoma: An Overview and Promising Therapeutic Strategies. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2018**, *10*, 175883591881628. <https://doi.org/10.1177/1758835918816287>.

(69) Storm, E. E.; Durinck, S.; de Sousa e Melo, F.; Tremayne, J.; Kljavin, N.; Tan, C.; Ye, X.; Chiu, C.; Pham, T.; Hongo, J.-A.; et al. Targeting PTPRK-RSPO3 Colon Tumours Promotes Differentiation and Loss of Stem-Cell Function. *Nature* **2016**, *529* (7584), 97–100. <https://doi.org/10.1038/nature16466>.

(70) van Staveren, W. C. G.; Solís, D. Y. W.; Hébrant, A.; Detours, V.; Dumont, J. E.; Maenhaut, C. Human Cancer Cell Lines: Experimental Models for Cancer Cells in Situ? For Cancer Stem Cells? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2009**, *1795* (2), 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.12.004>.

(71) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83* (11), 757–766.

(72) Wilding, J. L.; Bodmer, W. F. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res.* **2014**, *74* (9), 2377–2384. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2971>.



- (73) Breslin, S.; O'Driscoll, L. The Relevance of Using 3D Cell Cultures, in Addition to 2D Monolayer Cultures, When Evaluating Breast Cancer Drug Sensitivity and Resistance. *Oncotarget* **2016**, *7* (29). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9935>.
- (74) Edmondson, R.; Broglie, J. J.; Adcock, A. F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **2014**, *12* (4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
- (75) Ravi, M.; Ramesh, A.; Pattabhi, A. Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research: contributions of 3D cell cultures for cancer research. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232* (10), 2679–2697. <https://doi.org/10.1002/jcp.25664>.
- (76) Koledova, Z. 3D Cell Culture: An Introduction. In *3D Cell Culture*; Koledova, Z., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2017; Vol. 1612, pp 1–11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_1).
- (77) Jaroch, K.; Jaroch, A.; Bojko, B. Cell Cultures in Drug Discovery and Development: The Need of Reliable in Vitro-in Vivo Extrapolation for Pharmacodynamics and Pharmacokinetics Assessment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.023>.
- (78) Amelian, A.; Wasilewska, K.; Megias, D.; Winnicka, K. Application of Standard Cell Cultures and 3D in Vitro Tissue Models as an Effective Tool in Drug Design and Development. *Pharmacol. Rep.* **2017**, *69* (5), 861–870. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>.
- (79) Justus, C. R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L. V. In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J. Vis. Exp. JoVE* **2014**, No. 88. <https://doi.org/10.3791/51046>.
- (80) Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17* (14), 1213–1221.
- (81) Kreso, A.; Dick, J. E. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* **2014**, *14* (3), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>.
- (82) Barretina, J.; Caponigro, G.; Stransky, N.; Venkatesan, K.; Margolin, A. A.; Kim, S.; Wilson, C. J.; Lehár, J.; Kryukov, G. V.; Sonkin, D.; et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive Modelling of Anticancer Drug Sensitivity. *Nature* **2012**, *483* (7391), 603–607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.

- (83) Barretina, J.; Caponigro, G.; Stransky, N.; Venkatesan, K.; Margolin, A. A.; Kim, S.; Wilson, C. J.; Lehár, J.; Kryukov, G. V.; Sonkin, D.; et al. Addendum: The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive Modelling of Anticancer Drug Sensitivity. *Nature* **2019**, *565* (7738), E5–E6. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0722-x>.
- (84) MacConaill, L. E.; Garraway, L. A. Clinical Implications of the Cancer Genome. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28* (35), 5219–5228. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.4944>.
- (85) Fang, Y.; Qin, Y.; Zhang, N.; Wang, J.; Wang, H.; Zheng, X. DISIS: Prediction of Drug Response through an Iterative Sure Independence Screening. *PLOS ONE* **2015**, *10* (3), e0120408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120408>.
- (86) Zhu, R.; Zhao, Y.-Q.; Chen, G.; Ma, S.; Zhao, H. Greedy Outcome Weighted Tree Learning of Optimal Personalized Treatment Rules. *Biometrics* **2017**, *73* (2), 391–400. <https://doi.org/10.1111/biom.12593>.
- (87) Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duschinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Scheiner, J. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* **1957**, *179* (4561), 663–666. <https://doi.org/10.1038/179663a0>.
- (88) Marchal, J.; Boulaiz, H.; Rodriguez-Serrano, F.; Peran, M.; Carrillo, E.; Velez, C.; Dominguez, J.; Gomez-Vidal, J.; Campos, J.; Gallo, M.; et al. 5-Fluorouracil Derivatives Induce Differentiation Mediated by Tubulin and HLA Class I Modulation. *Med. Chem.* **2007**, *3* (3), 233–239. <https://doi.org/10.2174/157340607780620671>.
- (89) Wigmore, P. M.; Mustafa, S.; El-Beltagy, M.; Lyons, L.; Umka, J.; Bennett, G. Effects of 5-FU. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *678*, 157–164.
- (90) Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>.
- (91) Malet-Martino, M.; Jolimaitre, P.; Martino, R. The Prodrugs of 5-Fluorouracil. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2002**, *2* (2), 267–310.
- (92) Leelakanok, N.; Geary, S. M.; Salem, A. K. Antitumor Efficacy and Toxicity of 5-Fluorouracil-Loaded Poly(Lactide Co-Glycolide) Pellets. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107* (2), 690–697. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.10.005>.
- (93) Pan, X.; Wang, C.; Wang, F.; Li, P.; Hu, Z.; Shan, Y.; Zhang, J.

Development of 5-Fluorouracil Derivatives as Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (29), 4538–4556.

(94) Álvarez, P.; Marchal, J. A.; Boulaiz, H.; Carrillo, E.; Vélez, C.; Rodríguez-Serrano, F.; Melguizo, C.; Prados, J.; Madeddu, R.; Aranega, A. 5-Fluorouracil Derivatives: A Patent Review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22* (2), 107–123. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.661413>.

(95) Carrillo, E.; Navarro, S. A.; Ramírez, A.; García, M. Á.; Griñán-Lisón, C.; Perán, M.; Marchal, J. A. 5-Fluorouracil Derivatives: A Patent Review (2012 – 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25* (10), 1131–1144. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1056736>.

(96) Campos, J.; Pineda, M. J.; Gómez, J. A.; Entrena, A.; Trujillo, M. A.; Gallo, M. A.; 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. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00439-5](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00439-5).

(97) Gómez, J. A.; Campos, J.; Marchal, J. A.; Trujillo, M. A.; Melguizo, C.; Prados, J.; Gallo, M. A.; 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. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00415-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00415-8).

(98) Farquhar, D.; Chen, R.; Khan, S. 5'-[4-(Pivaloyloxy)-1,3,2-Dioxaphosphorinan-2-YI]-2'-Deoxy-5-Fluorouridine: A Membrane-Permeating Prodrug of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridylic Acid (FdUMP). *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (3), 488–495. <https://doi.org/10.1021/jm00003a012>.

(99) Gómez, J. A.; Trujillo, M. A.; Campos, J.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. Synthesis of Novel 5-Fluorouracil Derivatives with 1,4-Oxaheteroepane Moieties. *Tetrahedron* **1998**, *54* (43), 13295–13312. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00815-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00815-1).

(100) Trujillo, M. A.; Gómez, J. A.; Campos, J.; Espinosa, A.; Gallo, M. A. Cis- and Trans-1-[3-(Hydroxymethyl)-1,4-Dioxepan-5-YI]Pyrimidines: A New Nucleoside Prototype with a Seven-Membered Moiety. *Tetrahedron* **2001**, *57* (18), 3951–3961. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00270-8).

(101) Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Suárez, I.; Aránega, A.; Choquesillo, D.; Niclós, J.; Gallo, M. Á.; Espinosa, A. Medium Benzene-Fused Oxacycles with the 5-Fluorouracil Moiety: Synthesis,

Antiproliferative Activities and Apoptosis Induction in Breast Cancer Cells. *Tetrahedron* **2003**, 59 (29), 5457–5467. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00871-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00871-8).

(102) Campos, J.; Dominguez, J.; Gallo, M.; Espinosa, A. From a Classic Approach in Cancer Chemotherapy Towards Differentiation Therapy: Acyclic and Cyclic Seven-Membered 5-Fluorouracil O,N-Acetals. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6 (18), 1797–1810. <https://doi.org/10.2174/1381612003398627>.

(103) Wanner, M. J.; Koomen, G.-J. Synthesis of the Cyclostelletamines A–F and Related Bis(3-Alkylpyridinium) Macrocycles. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1998 (5), 889–895. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199805\)1998:5<889::AID-EJOC889>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199805)1998:5<889::AID-EJOC889>3.0.CO;2-G).

(104) Marchal, J. A.; Núñez, M. C.; Suárez, I.; Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J. A.; Boulaiz, H.; Rodríguez-Serrano, F.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Aránega, A.; et al. 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 (3), 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9450-2>.

(105) Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Boulaiz, H.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; 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 (40), 8017–8026. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.08.016>.

(106) del Carmen Núñez, M.; Entrena, A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. 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 (43), 10363–10369. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.07.065>.

(107) Ward, R. S.; Diaper, R. L. Synthesis of Aryl Sulfones. *Sulfur Rep.* **2001**, 22 (3), 251–275. <https://doi.org/10.1080/01961770108047963>.

(108) Crombie, L.; Josephs, J. L.; Larkin, J.; Weston, J. B. 5-Thiorotenoids: A New Synthesis of General Applicability to Rotenoids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, No. 14, 972. <https://doi.org/10.1039/c39910000972>.

(109) Núñez, M. C.; Pavani, M. G.; Díaz-Gavilán, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Gómez-Vidal, J. A.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa,

A.; Campos, J. M. 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 (50), 11724–11733. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.09.039>.

(110) Núñez, M. C.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. 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 (1), 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.10.023>.

(111) Conejo-García, A.; Núñez, M. C.; Marchal, J. A.; Rodríguez-Serrano, F.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.10.025>.

(112) Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J. A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. 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. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.12.070>.

(113) Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J. A.; Entrena, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. Study of the Factors That Control the Ratio of the Products between 5-Fluorouracil, Uracil, and Tetrahydrobenzoxazepine O, O -Acetals Bearing Electron-Withdrawing Groups on the Nitrogen Atom. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (3), 1043–1054. <https://doi.org/10.1021/jo052167m>.

(114) Caba, O.; Díaz-Gavilán, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Boulaiz, H.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Marchal, J. A.; Campos, J. M. Anticancer Activity and CDNA Microarray Studies of a (RS)-1,2,3,5-Tetrahydro-4,1-Benzoxazepine-3-Yl]-6-Chloro-9H-Purine, and an Acyclic (RS)-O,N-Acetalic 6-Chloro-7H-Purine. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (9), 3802–3809. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.047>.

(115) López-Cara, L. C.; Conejo-García, A.; Marchal, J. A.; Macchione, G.; Cruz-López, O.; Boulaiz, H.; García, M. A.; Rodríguez-Serrano, F.; Ramírez, A.; Cativiela, C.; et al. 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]-9H-Purine. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (1), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.011>.

(116) Díaz-Gavilán, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Gómez-Vidal, J. A.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. Á.; Espinosa, A.; Campos, J. M. 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* (50), 11547–11557. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.09.072>.

(117) Ramírez, A.; Boulaiz, H.; Morata-Tarifa, C.; Perán, M.; Jiménez, G.; Picon-Ruiz, M.; Agil, A.; Cruz-López, O.; Conejo-García, A.; Campos, J. M.; et al. HER2-Signaling Pathway, JNK and ERKs Kinases, and Cancer Stem-like Cells Are Targets of Bozepinib. *Oncotarget* **2014**, *5* (11). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1962>.

(118) García, M. A.; Marchal, J. A.; Carrasco, E.; Ramirez, A.; Jimenez, G.; Olmedo, C.; Peran, M.; Agil, A.; Conejo-Garcia, A.; Cruz-Lopez, O.; et al. 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**, 1301. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S51354>.

(119) Ramírez, A.; Conejo-García, A.; Griñán-Lisón, C.; López-Cara, L. C.; Jiménez, G.; Campos, J. M.; Marchal, J. A.; Boulaiz, H. Enhancement of Tumor Cell Death by Combining Gef Gene Mediated Therapy and New 1,4-Benzoxazepin-2,6-Dichloropurine Derivatives in Breast Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00798>.

(120) Cruz-López, O.; Ramírez, A.; Navarro, S. A.; García, M. A.; Marchal, J. A.; Campos, J. M.; Conejo-García, A. 1-(Benzenesulfonyl)-1,5-Dihydro-4,1-Benzoxazepine as a New Scaffold for the Design of Antitumor Compounds. *Future Med. Chem.* **2017**, *9* (11), 1129–1140. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0006>.

(121) Ozaki, S. Synthesis and Antitumor Activity of 5-Fluorouracil Derivatives. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16* (1), 51–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(199601\)16:1<51::AID-MED2>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(199601)16:1<51::AID-MED2>3.0.CO;2-T).

(122) Cabiddu, S.; Melis, S.; Sotgiu, F.; Cerioni, G. Heterocyclic Compounds Studies, Synthesis of 1,5-Benzoxathiepies. *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.* **1983**, *14* (2), 151–156. <https://doi.org/10.1080/03086648308075936>.

(123) Díaz-Gavilán, M.; Conejo-García, A.; Cruz-López, O.; Núñez, M. C.; Choquesillo-Lazarte, D.; González-Pérez, J. M.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; et al. Synthesis and Anticancer Activity of (R,S)-9-(2,3-Dihydro-1,4-Benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-Purines.

*ChemMedChem* **2008**, *3* (1), 127–135.  
<https://doi.org/10.1002/cmdc.200700180>.

(124) Nunez, M.; Diaz-Gavilan, M.; Conejo-Garcia, A.; Cruz-Lopez, O.; Gallo, M.; Espinosa, A.; Campos, J. 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* (25), 2614–2631. <https://doi.org/10.2174/092986708785909021>.

(125) Conejo-García, A.; García-Rubiño, M. E.; Marchal, J. A.; Núñez, M. C.; Ramírez, A.; Cimino, S.; García, M. Á.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Campos, J. M. Synthesis and Anticancer Activity of (RS)-9-(2,3-Dihydro-1,4-Benzoxaheteroin-2-Ylmethyl)-9H-Purines. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (9), 3795–3801. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.046>.

(126) Díaz Gavilán, M.; Choquesillo-Lazarte, D.; Campos, J. M. (2,3-Dihydro-1,4-Benzodioxin-2-Yl)Methanol. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **2007**, *63* (6), o2940–o2940. <https://doi.org/10.1107/S1600536807016625>.

(127) García-Rubiño, M. E.; Conejo-García, A.; Núñez, M. C.; Carrasco, E.; García, M. A.; Choquesillo-Lazarte, D.; García-Ruiz, J. M.; Gallo, M. A.; Marchal, J. A.; Campos, J. M. Enantiospecific Synthesis of Heterocycles Linked to Purines: Different Apoptosis Modulation of Enantiomers in Breast Cancer Cells. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (38), 4924–4934.

(128) Wang, M.; Rakesh, K. P.; Leng, J.; Fang, W.-Y.; Ravindar, L.; Channe Gowda, D.; Qin, H.-L. Amino Acids/Peptides Conjugated Heterocycles: A Tool for the Recent Development of Novel Therapeutic Agents. *Bioorganic Chem.* **2018**, *76*, 113–129. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.11.007>.

(129) Martorana, A.; Giacalone, V.; Bonsignore, R.; Pace, A.; Gentile, C.; Pibiri, I.; Buscemi, S.; Lauria, A.; Piccionello, A. P. Heterocyclic Scaffolds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22* (26), 3971–3995.

(130) Hotchandani, T.; Desgagne-Penix, I. Heterocyclic Amaryllidaceae Alkaloids: Biosynthesis and Pharmacological Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (4), 418–427.

(131) Fosu-Mensah, N. A.; Jiang, W.; Brancale, A.; Cai, J.; Westwell, A. D. The Discovery of Purine-Based Agents Targeting Triple-Negative Breast Cancer and the AB-Crystallin/VEGF Protein–Protein Interaction. *Med. Chem. Res.* **2019**, *28* (2), 182–202. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2275-9>.

- (132) Kucukdumlu, A.; Tuncbilek, M.; Guven, E. B.; Atalay, R. C. Synthesis of Some Substituted 6-Phenyl Purine Analogues and Their Biological Evaluation as Cytotoxic Agents. *Acta Chim. Slov.* **2017**, 621–632. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3419>.
- (133) Escherich, G.; Richards, S.; Stork, L. C.; Vora, A. J.; Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Collaborative Group (CALLCG). Meta-Analysis of Randomised Trials Comparing Thiopurines in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Leukemia* **2011**, 25 (6), 953–959. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.37>.
- (134) Hoffmann, M.; Chrzanowska, M.; Hermann, T.; Rychlewski, J. Modeling of Purine Derivatives Transport across Cell Membranes Based on Their Partition Coefficient Determination and Quantum Chemical Calculations. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (13), 4482–4486. <https://doi.org/10.1021/jm0495273>.
- (135) Sierpe, R.; Noyong, M.; Simon, U.; Aguayo, D.; Huerta, J.; Kogan, M. J.; Yutronic, N. Construction of 6-Thioguanine and 6-Mercaptopurine Carriers Based on Bcyclodextrins and Gold Nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 177, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.102>.
- (136) Elgemeie, G. H. Thioguanine, Mercaptopurine: Their Analogs and Nucleosides as Antimetabolites. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9 (31), 2627–2642.
- (137) Haesslein, J.; Jullian, N. Recent Advances in Cyclin-Dependent Kinase Inhibition. Purine-Based Derivatives as Anti-Cancer Agents. Roles and Perspectives for the Future. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2 (9), 1037–1050. <https://doi.org/10.2174/1568026023393291>.
- (138) De Azevedo, W. F.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Kim, S. H. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues: Crystal Structure of Human Cdk2 Complexed with Roscovitine. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243 (1–2), 518–526.
- (139) Khalil, H. S.; Mitev, V.; Vlaykova, T.; Cavicchi, L.; Zhelev, N. Discovery and Development of Seliciclib. How Systems Biology Approaches Can Lead to Better Drug Performance. *J. Biotechnol.* **2015**, 202, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.032>.
- (140) Gucký, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Rezníčková, E.; Béres, T.; Strnad, M.; Kryštof, V. A Novel Series of Highly Potent 2,6,9-Trisubstituted Purine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (15), 6234–6247. <https://doi.org/10.1021/jm4006884>.



- (141) Guillon, R.; Rahimova, R.; Preeti; Egron, D.; Rouanet, S.; Dumontet, C.; Aghajari, N.; Jordheim, L. P.; Chaloin, L.; Peyrottes, S. Lead Optimization and Biological Evaluation of Fragment-Based CN-II Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *168*, 28–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.040>.
- (142) Velasco-Loyden, G.; Pérez-Martínez, L.; Vidrio-Gómez, S.; Pérez-Carreón, J. I.; Chagoya de Sánchez, V. Cancer Chemoprevention by an Adenosine Derivative in a Model of Cirrhosis-Hepatocellular Carcinoma Induced by Diethylnitrosamine in Rats. *Tumor Biol.* **2017**, *39* (2), 101042831769119. <https://doi.org/10.1177/1010428317691190>.
- (143) Petrelli, R.; Grifantini, M.; Cappellacci, L. Development of C-Methyl Branched Purine Ribonucleoside Analogs: Chemistry, Biological Activity and Therapeutic Potential. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23* (28), 3118–3135. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160627100755>.
- (144) Zilifdar, F.; Alper-Hayta, S.; Yilmaz, S.; Kaplan-Özen, Ç.; Foto, E.; Aydoğan, Z.; Yildiz, I.; Aki, E.; Yalçın, I.; Diril, N. Genotoxic Potentials and Eukaryotic DNA Topoisomerase I Inhibitory Effects of Some Benzoxazine Derivatives. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23* (1), 480–486. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0658-5>.
- (145) Morrison, R.; Al-Rawi, J. M. A.; Jennings, I. G.; Thompson, P. E.; Angove, M. J. Synthesis, Structure Elucidation, DNA-PK and PI3K and Anti-Cancer Activity of 8- and 6-Aryl-Substituted-1,3-Benzoxazines. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *110*, 326–339. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.042>.
- (146) Prajapati, R.; Kumar, A.; Kandhikonda, R.; Kant, R.; Tadigoppula, N. Synthesis of 4H-1,3-Benzoxazin-4-Ones from 2,2-Diazidobenzofuran-3(2H)-Ones. *Tetrahedron* **2019**, *75* (3), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.12.001>.
- (147) Suraj, R.; Al-Rawi, J.; Bradley, C. Inhibition of AKT Signalling by Benzoxazine Derivative LTUR6 through the Modulation of Downstream Kinases. *Invest. New Drugs* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00726-2>.
- (148) Dong, F.-D.; Liu, D.-D.; Deng, C.-L.; Qin, X.; Chen, K.; Wang, J.; Song, H.-R.; Ding, H.-W. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Series of 2 H -Benzo[ b ][1,4]Oxazin-3(4 H )-One and 2 H -Benzo[ b ][1,4]Oxazine Scaffold Derivatives as PI3K $\alpha$  Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (14), 3982–3991. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.06.022>.
- (149) Ghosh, R.; Nadiminty, N.; Fitzpatrick, J. E.; Alworth, W. L.; Slaga, T. J.; Kumar, A. P. Eugenol Causes Melanoma Growth Suppression through

Inhibition of E2F1 Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (7), 5812–5819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411429200>.

(150) Kakkerla, R.; Marri, S.; Krishna, M. P. S. M.; Molgara, P.; Reddy, Y. N. Synthesis and Biological Evaluation of 3,4-Dihydro-3-(3-Methylisoxazol-5-yl)-2H-Benzo[e][1,3]Oxazine Derivatives as Anticancer Agents. *Lett. Org. Chem.* **2018**, *15* (2). <https://doi.org/10.2174/1570178614666170623121207>.

(151) Zhang, B.; Studer, A. Recent Advances in the Synthesis of Nitrogen Heterocycles via Radical Cascade Reactions Using Isonitriles as Radical Acceptors. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (11), 3505–3521. <https://doi.org/10.1039/c5cs00083a>.

(152) Zhou, L.; Lokman Hossain, M.; Xiao, T. Synthesis of *N*-Containing Heterocyclic Compounds Using Visible-Light Photoredox Catalysis. *Chem. Rec.* **2016**, *16* (1), 319–334. <https://doi.org/10.1002/tcr.201500228>.

(153) Vinogradov, M. G.; Turova, O. V.; Zlotin, S. G. Recent Advances in the Asymmetric Synthesis of Pharmacology-Relevant Nitrogen Heterocycles via Stereoselective Aza-Michael Reactions. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (15), 3670–3708. <https://doi.org/10.1039/C8OB03034K>.

(154) Prandi, C.; Occhiato, E. G. From Synthetic Control to Natural Products: A Focus on *N*-Heterocycles: From Synthetic Control to Natural Products. *Pest Manag. Sci.* **2019**. <https://doi.org/10.1002/ps.5322>.

(155) Ke, Z.; Yu, B.; Wang, H.; Xiang, J.; Han, J.; Wu, Y.; Liu, Z.; Yang, P.; Liu, Z. Cobalt-Catalyzed Synthesis of *N*-Containing Heterocycles via Cyclization of *Ortho*-Substituted Anilines with CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>. *Green Chem.* **2019**, *21* (7), 1695–1701. <https://doi.org/10.1039/C9GC00095J>.

(156) OuYang, Y.; Zou, W.; Peng, L.; Yang, Z.; Tang, Q.; Chen, M.; Jia, S.; Zhang, H.; Lan, Z.; Zheng, P.; et al. Design, Synthesis, Antiproliferative Activity and Docking Studies of Quinazoline Derivatives Bearing 2,3-Dihydro-Indole or 1,2,3,4-Tetrahydroquinoline as Potential EGFR Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *154*, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.006>.

(157) Barbarisi, M.; Barbarisi, A.; De Sena, G.; Armenia, E.; Aurilio, C.; Libutti, M.; Iaffaioli, R. V.; Botti, G.; Maurea, N.; Quagliariello, V. Boswellic Acid Has Anti-inflammatory Effects and Enhances the Anticancer Activities of Temozolomide and Afatinib, an Irreversible ErbB Family Blocker, in Human Glioblastoma Cells. *Phytother. Res.* **2019**, ptr.6354. <https://doi.org/10.1002/ptr.6354>.

(158) Hei, Y.-Y.; Shen, Y.; Wang, J.; Zhang, H.; Zhao, H.-Y.; Xin, M.; Cao, Y.-X.; Li, Y.; Zhang, S.-Q. Synthesis and Evaluation of 2,9-Disubstituted 8-Phenylthio/Phenylsulfinyl-9 H -Purine as New EGFR Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (8), 2173–2185. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.03.025>.

(159) Tamura, K.; Nukiwa, T.; Gemma, A.; Yamamoto, N.; Mizushima, M.; Ochai, K.; Ikeda, R.; Azuma, H.; Nakanishi, Y. Real-World Treatment of over 1600 Japanese Patients with EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer with Daily Afatinib. *Int. J. Clin. Oncol.* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01439-5>.

(160) Yin, X.; Han, S.; Song, C.; Zou, H.; Wei, Z.; Xu, W.; Ran, J.; Tang, C.; Wang, Y.; Cai, Y.; et al. Metformin Enhances Gefitinib Efficacy by Interfering with Interactions between Tumor-Associated Macrophages and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cell. Oncol.* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00446-y>.

(161) Gu, X.; Qiu, Y.; Lin, M.; Cui, K.; Chen, G.; Chen, Y.; Fan, C.; Zhang, Y.; Xu, L.; Chen, H.; et al. CuS Nanoparticles as a Photodynamic Nanoswitch for Abrogating Bypass Signaling to Overcome Gefitinib Resistance. *Nano Lett.* **2019**, *acs.nanolett.9b01065*. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01065>.

(162) Xu, C.; Wu, P.; Gao, J.; Zhang, L.; Ma, T.; Ma, B.; Yang, S.; Shao, G.; Yu, Y.; Huang, X.; et al. Heptadecanoic Acid Inhibits Cell Proliferation in PC-9 Non-small-cell Lung Cancer Cells with Acquired Gefitinib Resistance. *Oncol. Rep.* **2019**. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7130>.

(163) Capilla, A. S.; Soucek, R.; Grau, L.; Romero, M.; Rubio-Martínez, J.; Caignard, D. H.; Pujol, M. D. Substituted Tetrahydroisoquinolines: Synthesis, Characterization, Antitumor Activity and Other Biological Properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.098>.

(164) Cabedo, N.; Berenguer, I.; Figadère, B.; Cortes, D. An Overview on Benzylisoquinoline Derivatives with Dopaminergic and Serotonergic Activities. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (19), 2441–2467.

(165) Zhu, P.; Ye, W.; Li, J.; Zhang, Y.; Huang, W.; Cheng, M.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Liu, H.; Zuo, J. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Tetrahydroisoquinoline Derivatives as Potential Antitumor Candidate. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89* (3), 443–455. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12873>.

(166) Burks, H. E.; Abrams, T.; Kirby, C. A.; Baird, J.; Fekete, A.; Hamann,

L. G.; Kim, S.; Lombardo, F.; Loo, A.; Lubicka, D.; et al. Discovery of an Acrylic Acid Based Tetrahydroisoquinoline as an Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Degradable for ER $\alpha$ + Breast Cancer. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (7), 2790–2818. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01468>.

(167) Dohle, W.; Prota, A. E.; Menchon, G.; Hamel, E.; Steinmetz, M. O.; Potter, B. V. L. Tetrahydroisoquinoline Sulfamates as Potent Microtubule Disruptors: Synthesis, Antiproliferative and Antitubulin Activity of Dichlorobenzyl-Based Derivatives, and a Tubulin Cocrystal Structure. *ACS Omega* **2019**, *4* (1), 755–764. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02879>.

(168) Katzman, B. M.; Cox, B. D.; Prosser, A. R.; Alcaraz, A. A.; Murat, B.; Héroux, M.; Tebben, A.; Zhang, Y.; Schroeder, G. M.; Snyder, J. P.; et al. Tetrahydroisoquinoline CXCR4 Antagonists Adopt a Hybrid Binding Mode within the Peptide Subpocket of the CXCR4 Receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (1), 67–73. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00441>.

(169) Balkwill, F. Cancer and the Chemokine Network. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (7), 540–550. <https://doi.org/10.1038/nrc1388>.

(170) Contino, M.; Guglielmo, S.; Perrone, M. G.; Giampietro, R.; Rolando, B.; Carrieri, A.; Zaccaria, D.; Chegaev, K.; Borio, V.; Riganti, C.; et al. New Tetrahydroisoquinoline-Based P-Glycoprotein Modulators: Decoration of the Biphenyl Core Gives Selective Ligands. *MedChemComm* **2018**, *9* (5), 862–869. <https://doi.org/10.1039/c8md00075a>.

(171) Riganti, C.; Contino, M.; Guglielmo, S.; Perrone, M. G.; Salaroglio, I. C.; Milosevic, V.; Giampietro, R.; Leonetti, F.; Rolando, B.; Lazzarato, L.; et al. Design, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of Tetrahydroisoquinoline Derivatives: Discovery of A Potent P-Glycoprotein Ligand Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (2), 974–986. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01655>.

(172) Álvarez Santos, M. R.; Bueno Duarte, Y.; Güiza, F. M.; Romero Bohórquez, A. R.; Mendez-Sanchez, S. C. Effects of New Tetrahydroquinoline-Isoxazole Hybrids on Bioenergetics of Hepatocarcinoma Hep-G2 Cells and Rat Liver Mitochondria. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *302*, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.02.002>.

(173) Sonawane, Y. A.; Zhu, Y.; Garrison, J. C.; Ezell, E. L.; Zahid, M.; Cheng, X.; Natarajan, A. Structure-Activity Relationship Studies with Tetrahydroquinoline Analogs as EPAC Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (11), 1183–1187.

<https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00358>.

(174) Sridharan, V.; Suryavanshi, P. A.; Menéndez, J. C. Advances in the Chemistry of Tetrahydroquinolines. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 7157–7259. <https://doi.org/10.1021/cr100307m>.

(175) Chen, C.; Zingales, S.; Wang, T.; Yuan, M.; Wang, D.; Cai, L.; Jiang, Q. Synthesis and *in Vitro* Evaluation of 4-Substituted Furano[3,2-c]Tetrahydroquinolines as Potential Anti-Cancer Agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31* (5), 853–858. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1064120>.

(176) Shen, Q.; Wang, J.; Liu, C.-X.; Cui, W.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Wu, J.; Li, J.-X. Synthesis and Evaluation of Tetrahydroquinolin-2(1H)-One Derivatives as Novel Anti-Pancreatic Cancer Agents via Targeting Autophagy. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *170*, 28–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.013>.

(177) Chen, H.; Wild, C.; Zhou, X.; Ye, N.; Cheng, X.; Zhou, J. Recent Advances in the Discovery of Small Molecules Targeting Exchange Proteins Directly Activated by CAMP (EPAC): Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (9), 3651–3665. <https://doi.org/10.1021/jm401425e>.

(178) Grandoch, M.; Rose, A.; ter Braak, M.; Jendrossek, V.; Rübber, H.; Fischer, J. W.; Schmidt, M.; Weber, A. A. Epac Inhibits Migration and Proliferation of Human Prostate Carcinoma Cells. *Br. J. Cancer* **2009**, *101* (12), 2038–2042. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605439>.

(179) Recent Trends in Whole Cell and Isolated Enzymes in Enantioselective Synthesis. *Arkivoc* **2012**, *2012* (1), 321. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.109>.

(180) Albarrán-Velo, J.; González-Martínez, D.; Gotor-Fernández, V. Stereoselective Biocatalysis: A Mature Technology for the Asymmetric Synthesis of Pharmaceutical Building Blocks. *Biocatal. Biotransformation* **2018**, *36* (2), 102–130. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1340457>.

(181) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, Third, completely revised and enlarged edition.; Drauz, K., Gröger, H., May, O., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012.

(182) Hudlicky, T.; Reed, J. W. Applications of Biotransformations and Biocatalysis to Complexity Generation in Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (11), 3117. <https://doi.org/10.1039/b901172m>.

(183) Green, K. D.; Gill, I. S.; Khan, J. A.; Vulfson, E. N. Microencapsulation

of Yeast Cells and Their Use as a Biocatalyst in Organic Solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *49* (5), 535–543. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960305\)49:5<535::AID-BIT6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960305)49:5<535::AID-BIT6>3.0.CO;2-K).

(184) Gervais, T. R.; Carta, G.; Gainer, J. L. Asymmetric Synthesis with Immobilized Yeast in Organic Solvents: Equilibrium Conversion and Effect of Reactant Partitioning on Whole Cell Biocatalysis. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19* (2), 389–395. <https://doi.org/10.1021/bp020134b>.

(185) Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. *Biocatalysis*; Wiley-VCH: Weinheim ; Cambridge, 2004.

(186) Faber, K. Biocatalytic Applications. In *Biotransformations in Organic Chemistry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 31–313. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6_2).

(187) Hudlicky, T.; Seoane, G.; Price, J. D.; Gadamasetti, K. G. An Overview of the Total Synthesis of Pyrrolizidine Alkaloids via [4 + 1]Azide-Diene Annulation Methodology. *Synlett* **1990**, *1990* (08), 433–440. <https://doi.org/10.1055/s-1990-34718>.

(188) Ni, Y.; Holtmann, D.; Hollmann, F. How Green Is Biocatalysis? To Calculate Is To Know. *ChemCatChem* **2014**, *6* (4), 930–943. <https://doi.org/10.1002/cctc.201300976>.

(189) Pollard, D. J.; Woodley, J. M. Biocatalysis for Pharmaceutical Intermediates: The Future Is Now. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25* (2), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.12.005>.

(190) Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N. Expanding the Organic Toolbox: A Guide to Integrating Biocatalysis in Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (4), 1585. <https://doi.org/10.1039/c2cs15286j>.

(191) Gundersen, M. T.; Tufvesson, P.; Rackham, E. J.; Lloyd, R. C.; Woodley, J. M. A Rapid Selection Procedure for Simple Commercial Implementation of  $\omega$ -Transaminase Reactions. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (3), 602–608. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00159>.

(192) Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem* **2009**, *1* (1), 42–51. <https://doi.org/10.1002/cctc.200900110>.

(193) Malik, M. S.; Park, E.-S.; Shin, J.-S. Features and Technical Applications of  $\omega$ -Transaminases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94* (5), 1163–1171. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4103-3>.

- (194) Ismail, H.; Lau, R. M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Fully Enzymatic Resolution of Chiral Amines: Acylation and Deacylation in the Presence of *Candida Antarctica* Lipase B. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350* (10), 1511–1516. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800091>.
- (195) Turner, N. J. Deracemisation Methods. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.027>.
- (196) Koszelewski, D.; Tauber, K.; Faber, K.; Kroutil, W.  $\omega$ -Transaminases for the Synthesis of Non-Racemic  $\alpha$ -Chiral Primary Amines. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (6), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.003>.
- (197) Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Jensen, J. S.; Al-Haque, N.; Neto, W.; Woodley, J. M. Process Considerations for the Asymmetric Synthesis of Chiral Amines Using Transaminases. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108* (7), 1479–1493. <https://doi.org/10.1002/bit.23154>.
- (198) Ward, J.; Wohlgemuth, R. High-Yield Biocatalytic Amination Reactions in Organic Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14* (17), 1914–1927. <https://doi.org/10.2174/138527210792927546>.
- (199) Yun, H.; Hwang, B.-Y.; Lee, J.-H.; Kim, B.-G. Use of Enrichment Culture for Directed Evolution of the *Vibrio Fluvialis* JS17 -Transaminase, Which Is Resistant to Product Inhibition by Aliphatic Ketones. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (8), 4220–4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4220-4224.2005>.
- (200) Shin, J.-S.; Kim, B.-G. Exploring the Active Site of Amine:Pyruvate Aminotransferase on the Basis of the Substrate Structure–Reactivity Relationship: How the Enzyme Controls Substrate Specificity and Stereoselectivity. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 2848–2853. <https://doi.org/10.1021/jo016115i>.
- (201) Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Asymmetric Synthesis of Optically Pure Pharmacologically Relevant Amines Employing  $\omega$ -Transaminases. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350* (17), 2761–2766. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800496>.
- (202) Zhu, D.; Hua, L. Biocatalytic Asymmetric Amination of Carbonyl Functional Groups - a Synthetic Biology Approach to Organic Chemistry. *Biotechnol. J.* **2009**, *4* (10), 1420–1431. <https://doi.org/10.1002/biot.200900110>.







## II. OBJETIVOS

---

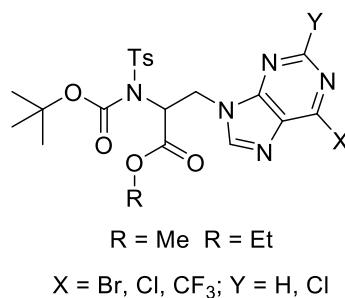


Debido a la falta de modelos químicos útiles para el desarrollo de agentes antitumorales y a la urgente necesidad de nuevos fármacos para tratar la alarmante aparición del elevado número de casos de cáncer, el objetivo de esta Tesis doctoral es la búsqueda de nuevos prototipos estructurales más potentes y útiles.

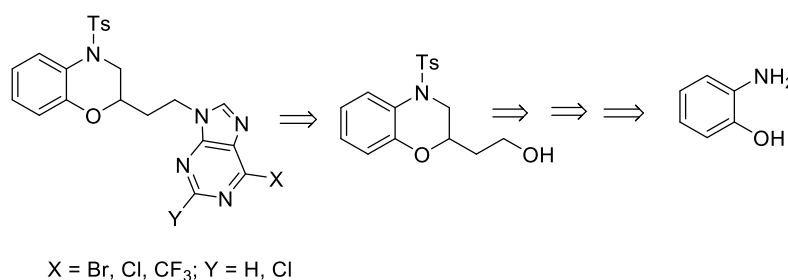
El propósito general de este trabajo de investigación, es la obtención y evaluación biológica de derivados de purinas unidas a diferentes heterociclos, así como análogos abiertos relacionados y la síntesis de un heterociclo de 7 miembros condensado con benceno para su reducción enantioespecífica por biocatálisis.

En base a los resultados antes obtenidos por el grupo de investigación, se plantean los siguientes objetivos específicos:

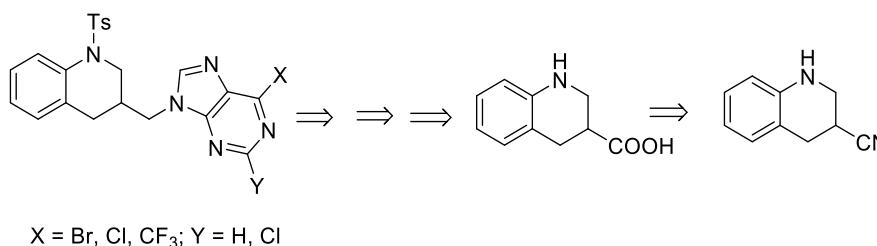
1. Síntesis de los derivados abiertos mediante protección ortogonal desde la *L*-serina para otra serie de compuestos (unidos a metilo y unidos a etilo) con las diferentes purinas:



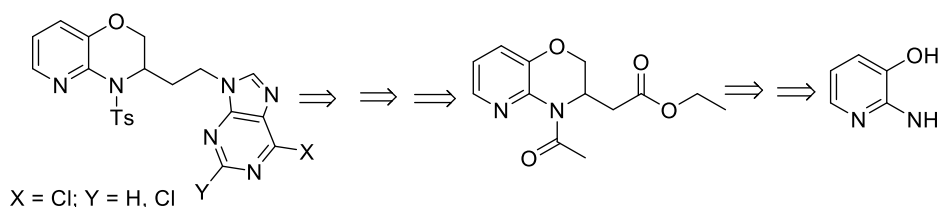
2. Síntesis de derivados de purina unidos a benzoxazinas a partir de aminofenol:



3. Síntesis de derivados de purina unidas a tetrahydroquinolina a partir de tetrahydroquinolina-3-carbonitrilo:



4. Síntesis de derivados de purina unida a piridoxazina a partir de 2-amino-3-hidroxipiridina:



5. Purificación e identificación inequívoca de las moléculas sintetizadas mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) mono (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT) y bidimensionales (HSQC, HMBC), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y análisis elemental de los productos finales.
6. Evaluación *in vivo* de los compuestos sintetizados como antiproliferativos, proapoptóticos y agentes que actúan sobre el ciclo celular contra las líneas tumorales A375, MCF-7 y HCT-116.
7. Síntesis de heterociclo de 7 miembros condensado con benceno (concretamente benzoxatiepina) con objeto de llevar a cabo estudios de aminación reductora estereoespecífica con microorganismos.





## III. METODOLOGÍA

---





La metodología empleada para la realización de este trabajo consiste en:

En primer lugar, la síntesis y el análisis estructural de los nuevos derivados incluidos en las distintas familias anteriormente mencionadas. Este análisis se ha realizado mediante el uso de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN), tanto de protones ( $^1\text{H}$ RMN) como de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ RMN) y de espectrometría de masas de alta resolución. También se han llevado a cabo estudios de resonancia bidimensional de tipo HMBC ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) y HSQC ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) para los compuestos representativos de cada familia estructural, a fin de elucidar de forma inequívoca las estructuras de los nuevos compuestos sintetizados. La pureza de los compuestos sometidos a ensayos biológicos ha sido determinada mediante los correspondientes análisis elementales de C, H y N.

Las técnicas descritas anteriormente están disponibles en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Desde el punto de vista biológico se ha llevado a cabo la evaluación de la inhibición de la proliferación celular *in vitro* de los compuestos sintetizados, utilizando diversas líneas celulares tumorales, A375, MCF-7 y HCT-116. Estos ensayos se detallan en Artículo 1.

Las relaciones estructura-actividad en los derivados ensayados nos permitirán proponer posibles modificaciones estructurales con objeto de incrementar la potencia y selectividad de los compuestos.

Por último, la reducción enantioespecífica del derivado de 7 miembros, benzoxatiepino, se llevó a cabo empleando TAs comerciales, para la obtención de los derivados enantioespecíficos aminados.



## IV. RESULTADOS

---



## Artículo 1

---



## Purine derivatives with heterocyclic moieties and related analogs as new antitumor agents

Nerea Fernández-Sáez<sup>1</sup>, Belén Rubio-Ruiz<sup>2</sup>, Joaquín M Campos<sup>1,3</sup>, Asier Unciti-Broceta<sup>2</sup>, María Dora Carrión<sup>\*,†,1,3</sup> & María Encarnación Camacho<sup>\*\*,†,1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada 18071, Spain

<sup>2</sup>Cancer Research UK Edinburgh Centre, MRC Institute of Genetics & Molecular Medicine, University of Edinburgh, Crewe Road South, Edinburgh EH4 2XR, UK

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs. GRANADA), Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Universidad de Granada, Granada, Spain

\*Author for correspondence: [dcarrion@ugr.es](mailto:dcarrion@ugr.es)

\*\*Author for correspondence: [ecamacho@ugr.es](mailto:ecamacho@ugr.es)

†These authors contributed equally

**Aim:** Identification of new antiproliferative compounds. **Methodology:** Four series of compounds were synthesized by the Mitsunobu reaction. Their antiproliferative activity was studied against several cancer cells and a noncancerous fibroblast cell line. Their apoptotic activity was analyzed using a caspase 3/7 fluorescence assay. **Results & conclusion:** 9-alkylated-6-halogenated and 2,6-dihalogenated purines show remarkable inhibition of tumor cell proliferation, with the dichloro derivatives being the most potent of all the series. The most promising compound, *tetrahydroquinoline 4c*, exhibits significant antiproliferative activity against the cancer cells tested, while displaying a 19-fold lower potency against noncancerous fibroblasts, a key feature that indicates potential selectivity against cancer cells. This compound produces a high percentage of apoptosis (58%) after 24 h treatment in human breast cancer MCF-7 cells.

### Abstract

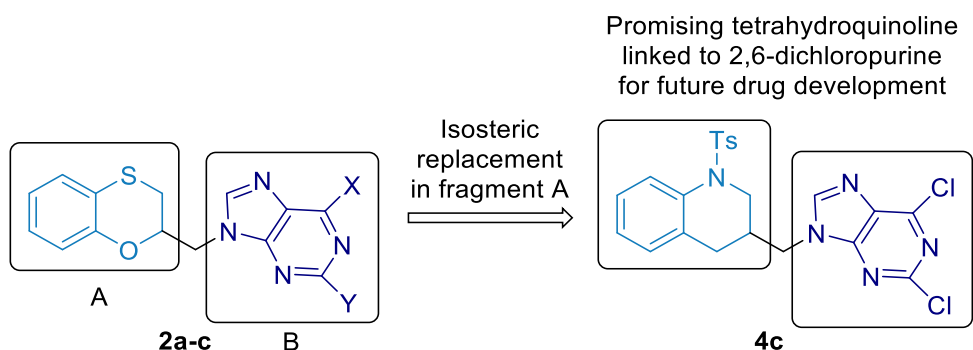
**Aim:** Identification of new antiproliferative compounds.

**Methodology:** Four series of compounds were synthesized by the Mitsunobu reaction. Their antiproliferative activity was studied against several cancer cells and a non-cancerous fibroblast cell line. Their apoptotic activity was analyzed using a caspase 3/7 fluorescence assay.

**Results & Conclusion:** 9-Alkylated-6-halogenated and 2,6-dihalogenated purines show remarkable inhibition of tumour cell proliferation, with the dichloro derivatives being the most potent of all the series. The most promising compound, *tetrahydroquinoline 4c*, exhibits significant antiproliferative activity against the cancer cells tested, while displaying a 19-fold lower potency against non-cancerous fibroblasts, a key feature that indicates potential selectivity against cancer cells. This compound produces a high percentage of apoptosis (58%) after 24h treatment in the human breast cancer MCF-7 cells.



## Graphical abstract



**Keywords:** *benzoxazine, quinoline, pyridoxazine, Mitsunobu, antiproliferative activity, apoptosis.*

## Introduction

Cancer is one of the major public health problems in the world with 17.5 million cases worldwide and 8.7 million deaths in 2015 [1]. An increase of 13.1 million cancer deaths has been estimated in 2030, according to the World Health Organization [2]. Although in recent years there have been important advances in the understanding of the underlying mechanisms leading to many cancers, some of them are still very difficult to treat and remain unmet clinical needs. Multi-drug resistance and systemic toxicity are some of the main drawbacks limiting the efficacy of current cancer treatments [3]. To tackle these limitations, the design of more effective and safer drugs is required.

It is known that many drugs activate apoptosis as a mechanism for their antitumour activity. Apoptosis is a cellular natural process whereby cells induce their own death in response to several biochemical signals that are typically triggered by an irreparable damage to DNA. It is a fundamental process of protection and maintenance of homeostasis. Generally, a group of cysteine aspartyl proteases known as caspases are responsible for the initiation (e.g. caspases 2, 8, 9 and 10) and effecting (e.g. caspases 3, 6

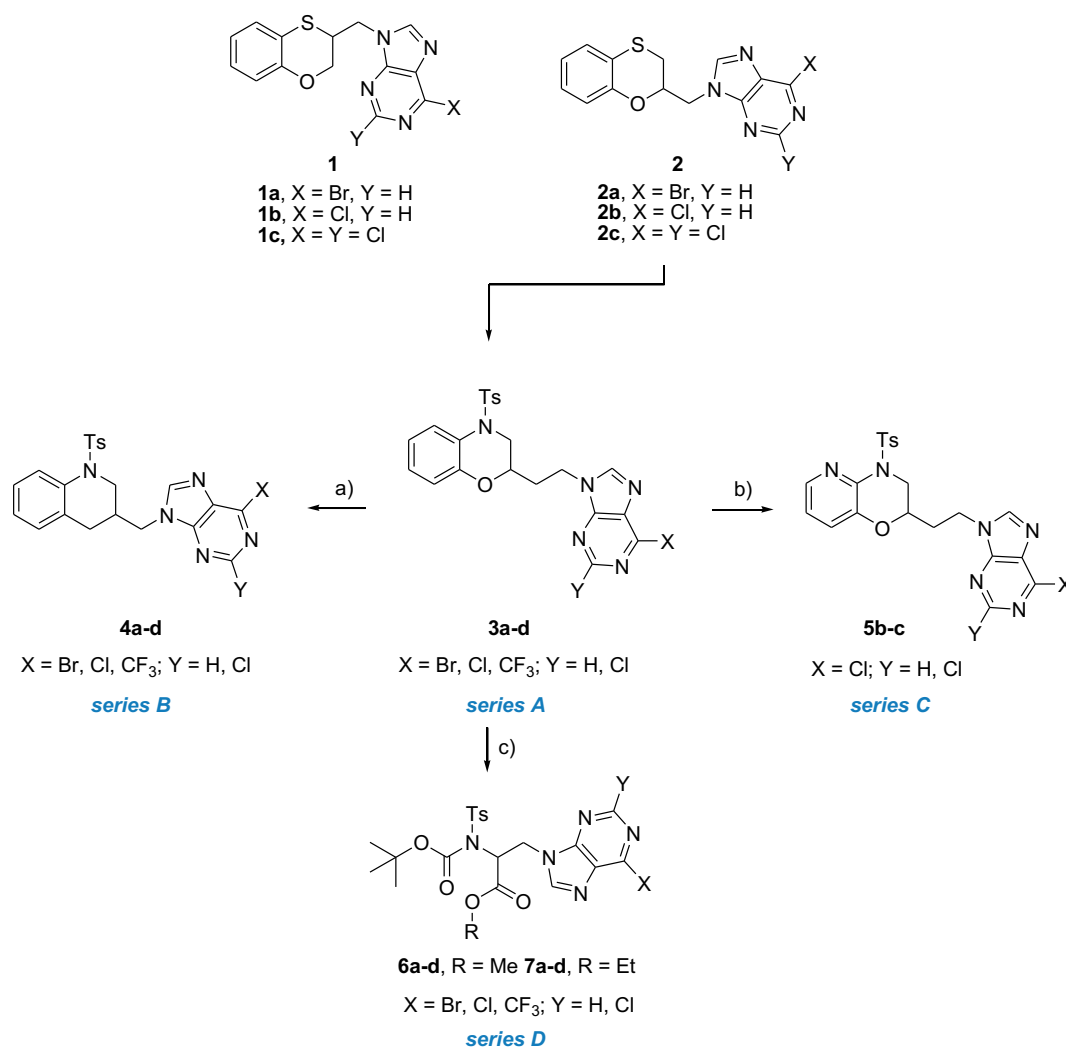
and 7) of apoptosis [4]. The development of drugs that induce apoptosis is an area of great activity for the discovery of new anticancer therapies [5].

Our research group has previously published several compounds that effectively induce caspase-mediated apoptosis, including a series of benzo-fused six-membered rings linked to purines through a methylene group. Substituted 9-(2,3-dihydro-1,4-benzo[*b*][1,4]oxathiin-3-ylmethyl)-9*H*-purines (**1a-c**) [6] and their isomers 9-(2,3-dihydro-1,4-benzo[*b*][1,4]oxathiin-2-ylmethyl)-9*H*-purines (**2a-c**) [7] (Figure 1) showed interesting antiproliferative activities and high apoptosis levels on the human breast adenocarcinoma MCF-7 cells.

In this article, we have introduced several structural modifications on the scaffold **2** to explore a new chemical space (Figure 1). A bioisosteric replacement was made by changing the sulfur atom of the 6-membered ring by a nitrogen one, obtaining the 2*H*-1,4-benzoxazine derivatives **3** (series A). For synthetic reasons, in order to carry out the Mitsunobu reaction, the nitrogen atom in the heterocycle was converted into the tosylsulfonamide group. This moiety was maintained in the structure as the removal of the *o*- and *p*-nosyl group in a series of benzoxapine derivatives proved to be deleterious for the antiproliferative activity in a previous work [8] (see Figure S.1. in Supplementary Information). Additionally, the toxicity described for the NO<sub>2</sub> group [9, 10] led us to replace it by the *p*-CH<sub>3</sub> on the benzene ring (tosyl group). The influence of the distance between the heterocyclic ring and the purine was also evaluated by introducing a linker of two carbon atoms. Electron-withdrawing groups (Cl, Br, di-Cl) were used as substituents at positions 2 and 6 of the purine ring since they conferred good antiproliferative properties in previously reported derivatives **1** and **2** [6, 7].

Additionally, we decided to explore the introduction of a trifluoromethyl group (CF<sub>3</sub>), a common substituent used in medicinal chemistry. This group offers not only high lipophilicity but also increased electron density, and is

found in approved drugs such as efavirenz (for HIV disease) [11] and desoxyepothilone b (anticancer activity) [12]. Finally taking **3** as a reference scaffold, the following modifications were also introduced: (a) Elimination of the oxygen atom in the heterocycle and shortening of the side chain (derivatives **4**, *series B*); (b) change of the benzene ring for a pyridine moiety and linking the (purine-9-yl)ethyl fragment through the position 3 of the [1,4]oxazine (compounds **5**, *series C*); (c) aperture of the heterocycle to obtain open analogues, in which the tosyl group and the substituted purine moieties have been maintained (derivatives **6** and **7**, *series D*).



**Figure 1.** Benzo-fused six-membered rings linked to purines described by our research group (**1 – 2**) and chemical structure of the novel compounds objective of this article (**3 – 7**).

---

## Materials and methods

### Chemistry

The determination of melting points was made in open capillaries employing an Electrothermal 1A 6301 instrument and they are unrectified. Elemental analyses were designated by the element symbols, the results were not over 0.4% of the postulated values and they were carried out in a Thermo Scientific Flash 2000 analyzer. Silica (0.035-0.070 mm), 60 Å used for flash chromatography was manufactured by Acros Organic. NMR spectra were carried out on a Varian Direct Drive 400 spectrometer operating at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and 101 MHz for  $^{13}\text{C}$ , on a Varian Direct Drive 500 spectrometer operating at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 126 MHz for  $^{13}\text{C}$  at room temperature (rt) in all cases. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm and are referenced to the residual solvent peak. A VG AutoSpec Q high-resolution apparatus (Fision Instrument) was used to perform the high-resolution mass spectroscopy (HRMS). Anhydrous reactions were carried out under argon atmosphere. Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (now Merck) and Acros Organics (part of Thermo Fisher Scientific).

Synthesis and characterization of the intermediate derivatives are presented in the Supplementary Information.

Characterization of 6-bromopurines **3a**, **4a**, **6a**, and **7a**, are described in the Supplementary Information.

Synthesis and characterization of 6-trifluoromethylpurines **3d**, **4d**, **6d** and **7d** are reported in the Supplementary Information.

General synthetic procedure of halo and dihalopurine derivatives

The tosylated derivatives **9**, **11**, **16** or **18** (0.31 mmol),  $\text{Ph}_3\text{P}$  (164.43 mg, 0.63 mmol) and the adequate halo or dihalopurine (0.34 mmol) were purged with 3 cycles of vacuum-argon exchanges in a Schlenk line previously

anhydried. Anhydrous THF was added (2 mL) under argon atmosphere and the reaction mixture was cooled to -20°C. After that, DIAD (124  $\mu$ l, 0.63 mmol) was added dropwise and stirred from -20°C to rt. After 36 h the solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 2:1).

Characterization of 6-chloropurines **3b**, **4b**, **5b**, **6b** and **7b**.

*2-(2-(6-Chloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (3b)*

White solid (92 mg, 0.195 mmol), yield 63%, mp: 189 - 190°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8.75 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ), 7.96 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ), 7.79 (dd,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 7.34 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.16 – 7.00 (m, 3H,  $2\times\text{H}_{\text{tosyl}}$ ,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 7.01 – 6.88 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 6.78 (dd,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 4.52 – 4.39 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.20 (dd,  $J_1 = 14.1$  Hz,  $J_2 = 1.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 3.38 – 3.27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 3.21 (dd,  $J_1 = 14.1$  Hz,  $J_2 = 9.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 2.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{tosyl}$ ), 2.35 – 2.18 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.10 – 1.93 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 152.0 ( $\text{CH}_{\text{purine}}$ ), 151.7 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 151.1 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 146.0 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ), 145.2 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 144.6 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 135.3 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 131.6 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 129.7 ( $2\times\text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 126.9 ( $2\times\text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 126.3 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 124.3 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 123.5 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ), 121.4 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 117.2 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 68.3 ( $\text{CH}_{\text{oxazine}}$ ), 48.2 ( $\text{CH}_2\text{oxazine}$ ), 40.3 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 31.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 21.6 ( $\text{CH}_3\text{tosyl}$ ); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{SCl}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  470.1054, found 470.1055. Anal. Calc. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_3\text{SCl}$ : C, 56.23; H, 4.29; N, 14.90. Found: C, 56.22; H, 4.31; N, 14.88.

*3-((6-Chloro-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (4b)*

White solid (85 mg, 0.186 mmol), yield 60%, mp: 202 - 203°C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8.74 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ), 8.04 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ), 7.73 (dd,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 11.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 7.39 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.23 –

7.17 (m, 1H, H<sub>benz</sub>), 7.12 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.10 – 7.05 (m, 1H, H<sub>benz</sub>), 6.98 (dd,  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 4.25 (dd,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.15 (dd,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 6.7$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.01 (dd,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 4.1$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 3.45 (dd,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 8.9$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 2.59 (dd,  $J_1 = 16.0$  Hz,  $J_2 = 5.3$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 2.42 – 2.37 (m, 1H, H<sub>pyr</sub>), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 2.30 (dd,  $J_1 = 15.9$  Hz,  $J_2 = 9.1$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 152.0 (CH<sub>purine</sub>), 151.8 (C<sub>purine</sub>), 151.3 (C<sub>purine</sub>), 145.2 (CH<sub>purine</sub>), 144.0 (C<sub>tosyl</sub>), 136.3 (C<sub>benz</sub>), 136.2 (C<sub>tosyl</sub>), 131.6 (C<sub>purine</sub>), 129.7 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 129.3 (CH<sub>benz</sub>), 127.3 (C<sub>benz</sub>), 127.2 (CH<sub>benz</sub>), 126.8 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 125.2 (CH<sub>benz</sub>), 124.0 (CH<sub>benz</sub>), 48.5 (CH<sub>2</sub>pyr), 46.7 (CH<sub>2</sub>N), 32.8 (CH<sub>pyr</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>pyr), 21.5 (CH<sub>3</sub>tosyl); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SCI (M + H)<sup>+</sup> 454.1104, found 454.1098. Anal. calc. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SCI: C, 58.21; H, 4.44; N, 15.43. Found: C, 58.19; H, 4.46; N, 15.45.

*3-(2-(6-Chloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine (5b)*

Yellowish solid (80 mg, 0.171 mmol), yield 55%, mp: 180 - 181°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 8.73 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.30 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.02 (dd,  $J_1 = 4.7$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 7.84 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.25 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.15 (dd,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 6.96 (dd,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 4.80 – 4.75 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 4.61 – 4.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.18 (dd,  $J_1 = 11.4$  Hz,  $J_2 = 1.4$  Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.77 (dd,  $J_1 = 11.4$  Hz,  $J_2 = 2.3$  Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 2.49 – 2.39 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 2.20 – 2.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 151.8 (C<sub>purine</sub>), 151.7 (CH<sub>purine</sub>), 151.0 (C<sub>purine</sub>), 146.0 (CH<sub>purine</sub>), 144.4 (C<sub>tosyl</sub>), 140.9 (CH<sub>benz</sub>), 140.3 (C<sub>benz</sub>), 137.1 (C<sub>benz</sub>), 136.2 (C<sub>tosyl</sub>), 131.8 (C<sub>purine</sub>), 129.4 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.2 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 124.7 (CH<sub>benz</sub>), 120.4 (CH<sub>benz</sub>), 67.0 (CH<sub>2</sub>pyr), 51.2 (C<sub>pyr</sub>), 41.6 (CH<sub>2</sub>N), 30.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 21.5 (CH<sub>3</sub>tosyl); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>SCI (M + H)<sup>+</sup> 471.1006, found 471.0981. Anal. calc. for

C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S: C, 53.56; H, 4.07; N, 17.85. Found: C, 53.54; H, 4.09; N, 17.88.

*Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-chloro-9H-purine-9-yl)propanoate (6b)*

White solid (110 mg, 0.217 mmol), yield 70%, mp: 164 - 165°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.67 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.20 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.59 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.18 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 5.58 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 5.05 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 4.95 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.4 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 1.34 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 167.8 (COOMe), 152.0 (C<sub>purine</sub>), 151.9 (CH<sub>purine</sub>), 150.9 (C<sub>purine</sub>), 149.8 (COOBu<sup>t</sup>), 145.5 (CH<sub>purine</sub>), 144.8 (C<sub>tosyl</sub>), 135.6 (C<sub>tosyl</sub>), 131.3 (C<sub>purine</sub>), 129.0 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.1 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 86.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 58.1 (CH<sub>prop</sub>), 53.0 (OCH<sub>3</sub>), 43.4 (CH<sub>2prop</sub>), 27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.5 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (*m/z*) calcd. For C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SCl (M + H)<sup>+</sup> 510.1214, found 510.1215. Anal. calc. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SCl: C, 49.46; H, 4.74; N, 13.73. Found: C, 49.48; H, 4.74; N, 13.71.

*Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-chloro-9H-purine-9-yl)propanoate (7b)*

White solid (146 mg, 0.279 mmol), yield 90%, mp: 175 - 176°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.71 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.18 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 5.55 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9.2, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 5.03 – 4.97 (m, 2H, H<sub>prop</sub>), 4.27 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 1.33 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>), 1.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 167.3 (COOEt), 152.1 (C<sub>purine</sub>), 151.8 (CH<sub>purine</sub>), 150.9 (C<sub>purine</sub>), 149.8 (COOBu<sup>t</sup>), 145.4 (CH<sub>purine</sub>), 144.7 (C<sub>tosyl</sub>), 135.7 (C<sub>tosyl</sub>), 131.4 (C<sub>purine</sub>), 128.9 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.0 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 85.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 58.1 (CH<sub>prop</sub>), 43.3 (CH<sub>2prop</sub>), 27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.4 (CH<sub>3tosyl</sub>), 13.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI-TOF) (*m/z*)

calcd. for  $C_{22}H_{27}N_5O_6SCl$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 524.1371, found 524.1370. Anal. Calc. for  $C_{22}H_{26}N_5O_6SCl$ : C, 50.43; H, 5.00; N, 13.37. Found: C, 50.41; H, 5.03; N, 13.35.

Characterization of 2,6-dihalopurines **3c**, **4c**, **5c**, **6c** and **7c**.

*2-(2-(2,6-Dichloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (3c)*

White solid (91 mg, 0.221 mmol), yield 68%, mp: 195-196°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.96 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.77 (dd,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.40 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, 2×H<sub>tosyl</sub>), 7.16 – 7.02 (m, 3H, 2×H<sub>tosyl</sub>, H<sub>benz</sub>), 7.01 – 6.88 (m, 1H, H<sub>benz</sub>), 6.76 (dd,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 4.46 - 4.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.19 (dd,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 2.3$  Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.42 – 3.29 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.28 – 3.13 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 2.30 – 2.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.09 – 1.97 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 153.2 (2×C<sub>purine</sub>), 151.9 (C<sub>Purine</sub>) 146.1 (C<sub>Purine</sub>), 146.0 (C<sub>benz</sub>), 144.8 (C<sub>tosyl</sub>), 135.5 (C<sub>tosyl</sub>), 130.9 (C<sub>purine</sub>), 129.9 (2×CH<sub>tosyl</sub>), 127.1 (2×CH<sub>tosyl</sub>), 126.4 (CH<sub>benz</sub>), 124.3 (CH<sub>benz</sub>), 123.7 (C<sub>benz</sub>), 121.6, (CH<sub>benz</sub>), 117.4 (CH<sub>benz</sub>), 68.7 (CH<sub>oxazine</sub>), 48.3 (CH<sub>2oxazine</sub>), 40.6 (CH<sub>2</sub>N), 31.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 21.8 (CH<sub>3</sub>tosyl); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $C_{22}H_{20}N_5O_3SCl_2$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 504,0586, found 504,0636; Anal. Calc. for  $C_{22}H_{19}N_5O_3SCl_2$ : C, 52.39; H, 3.80; N, 13.89. Found: C, 52.37; H, 3.82; N, 13.91.

*3-((2,6-Dichloro-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (4c)*

White solid (102 mg, 0.232 mmol), yield 75%, mp: 207-208°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.07 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.69 (dd,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 1.1$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 7.38 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, 2×H<sub>tosyl</sub>), 7.21 – 7.12 (m, 3H, H<sub>benz</sub>, 2×H<sub>tosyl</sub>), 7.08 – 7.03 (m, 1H, H<sub>benz</sub>), 6.97 (dd,  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 4.20 (dd,  $J_1 = 14.1$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.12 (dd,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 6.7$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>N), 3.98 (dd,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 3.8$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>),



3.42 (dd,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 8.7$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 2.59 (dd,  $J_1 = 15.9$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 2.39 – 2.37 (m, 1H, H<sub>pyr</sub>), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 2.31 (dd,  $J_1 = 15.9$  Hz,  $J_2 = 9.0$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 153.0 (C<sub>purine</sub>), 152.9 (C<sub>purine</sub>), 151.8 (C<sub>purine</sub>), 146.0 (C<sub>purine</sub>), 144.0 (C<sub>tosyl</sub>), 136.1 (C<sub>benz</sub>), 135.9 (C<sub>tosyl</sub>), 130.6 (C<sub>purine</sub>), 129.6 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 129.3 (CH<sub>benz</sub>), 127.0 (C<sub>benz</sub>), 126.9 (CH<sub>benz</sub>), 126.7 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 125.1 (CH<sub>benz</sub>), 123.6 (CH<sub>benz</sub>), 48.2 (CH<sub>2pyr</sub>), 46.7 (CH<sub>2N</sub>), 32.3 (CH<sub>pyr</sub>), 30.4 (CH<sub>2pyr</sub>), 21.4 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SCl<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> 488.0637, found 488.0640. Anal. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S: C, 54.11; H, 3.92; N, 14.34. Found: C, 54.13; H, 3.90; N, 14.32.

*3-(2-(2,6-Dichloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine (5c)*

White solid (75 mg, 0.198 mmol), yield 64%, mp: 185 - 186°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.30 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.02 (dd,  $J_1 = 4.6$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 7.85 – 7.80 (m, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.28 - 7.25 (m, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.15 (dd,  $J_1 = 8.1$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 6.96 (dd,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 4.81 – 4.73 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 4.56 – 4.49 (m, 1H, CH<sub>2N</sub>), 4.47 – 4.40 (m, 1H, CH<sub>2N</sub>), 4.18 (dd,  $J_1 = 11.4$  Hz,  $J_2 = 1.4$  Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.75 (dd,  $J_1 = 11.4$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 2.49 – 2.39 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2N</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 2.16 – 2.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2N</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 153.1 (C<sub>purine</sub>), 152.6 (C<sub>purine</sub>), 151.7 (C<sub>purine</sub>), 146.7 (CH<sub>purine</sub>), 144.5 (C<sub>tosyl</sub>), 140.9 (CH<sub>benz</sub>), 140.3 (C<sub>benz</sub>), 137.0 (C<sub>benz</sub>), 136.0 (C<sub>tosyl</sub>), 131.9 (C<sub>purine</sub>), 129.4, (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.2 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 124.8 (CH<sub>benz</sub>), 120.5 (CH<sub>benz</sub>), 66.9 (CH<sub>2pyr</sub>), 51.1 (C<sub>pyr</sub>), 41.7 (CH<sub>2N</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2N</sub>), 21.5 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>SCl<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> 505.0859, found 505.0823; Anal. calc. for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S: C, 49.91; H, 3.59; N, 16.63. Found: C, 49.93; H, 3.61; N, 16.62.

*Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(2,6-dichloro-9H-purine-9-yl)propanoate (6c)*

White solid (101 mg, 0.186 mmol), yield 60%, mp: 170-171°C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8.21 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ), 7.59 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $2 \times \text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.16 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $2 \times \text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 5.47 (dd,  $J_1 = 9.4$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{prop}}$ ), 4.98 – 4.81 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{prop}}$ ), 3.78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_{3\text{tosyl}}$ ), 1.31 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 168.2 ( $\text{COOMe}$ ), 153.9 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 153.3 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 151.8 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 150.1 ( $\text{COOBu}^t$ ), 146.7 ( $\text{CH}_{\text{purine}}$ ), 145.3 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 135.9 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 130.9 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 129.4 ( $2 \times \text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 128.4 ( $2 \times \text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 86.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 58.7 ( $\text{CH}_{\text{prop}}$ ), 53.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 43.9 ( $\text{CH}_{2\text{prop}}$ ), 28.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 21.9 ( $\text{CH}_{3\text{tosyl}}$ ); HRMS (ESI-TOF) ( $m/z$ ) calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_6\text{SCl}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  544.0824, found 544.0855; Anal. calc. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_6\text{SCl}_2$ : C, 46.33; H, 4.26; N, 12.86. Found: C, 46.31; H, 4.27; N, 12.83.

*Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(2,6-dichloro-9H-purine-9-yl)propanoate (7c)*

White solid (95 mg, 0.170 mmol), yield 55%, mp: 182-183°C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8.19 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{purine}}$ ), 7.68 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $2 \times \text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.22 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $2 \times \text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 5.47 (dd,  $J_1 = 9.2$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{prop}}$ ), 5.04 – 4.84 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{prop}}$ ), 4.28 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.42 (s, 3H,  $\text{CH}_{3\text{tosyl}}$ ), 1.37 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 1.27 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 167.2 ( $\text{COOEt}$ ), 153.5 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 153.0 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 151.6 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 149.8 ( $\text{COOBu}^t$ ), 146.1 ( $\text{CH}_{\text{purine}}$ ), 144.8 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 135.7 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 130.6 ( $\text{C}_{\text{purine}}$ ), 129.0 ( $2 \times \text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 128.1 ( $2 \times \text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 86.2, ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 62.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 58.3 ( $\text{CH}_{\text{prop}}$ ), 43.5 ( $\text{CH}_{2\text{prop}}$ ), 27.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 21.5 ( $\text{CH}_{3\text{tosyl}}$ ); 13.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); HRMS (ESI-TOF) ( $m/z$ ) calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_6\text{SCl}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  558.0981, found 558.0972; Anal. calc. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_6\text{SCl}_2$ : C, 47.32; H, 4.51; N, 12.54. Found: C, 47.35; H, 4.50; N, 12.52.

## **Biology**

### **Tissue culture**

Cell lines were maintained in a tissue culture incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and grown in culture media complemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and L-glutamine (2 mM). Human breast adenocarcinoma MCF-7 cells (purchased from ATCC), human melanoma A375 (a kind gift from Dr Liz Patton) and RFP TERT immortalized fibroblasts [13] were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM). Human colorectal carcinoma HCT-116 cells (a kind gift from Prof Mark Arends) were cultured in McCoy's 5A Medium.

### **Dose-Response Viability Assay**

All final products were preserved at -20°C dissolved in DMSO. In order to obtain the desired concentrations in each experiment, the stock solutions (100 mM) were successively diluted in culture media. 96-Well plates were used to seed the cells at 1,000 cells/well for A375; 1,500 cells/well for MCF-7 and HCT-116 and 2000 cells/well for RFP TERT immortalized fibroblasts. After 48 h of incubation, cells were treated with compounds **3a-d**, **4a-d**, **5b-c**, **6a-d** and **7a-d** (0.01 μM – 100 μM) and incubated for 5 d. Each experiment was performed in triplicate. Cells treated with DMSO (0.1 % v/v) were used as control. After 5d treatment, cell viability was determined using PrestoBlue™ reagent (10 % v/v) and results analyzed as previously described [14]. EC<sub>50</sub> (half-maximal effective concentration) values are expressed as mean ± SD of 3 independent experiments.

### **Apoptosis Assay**

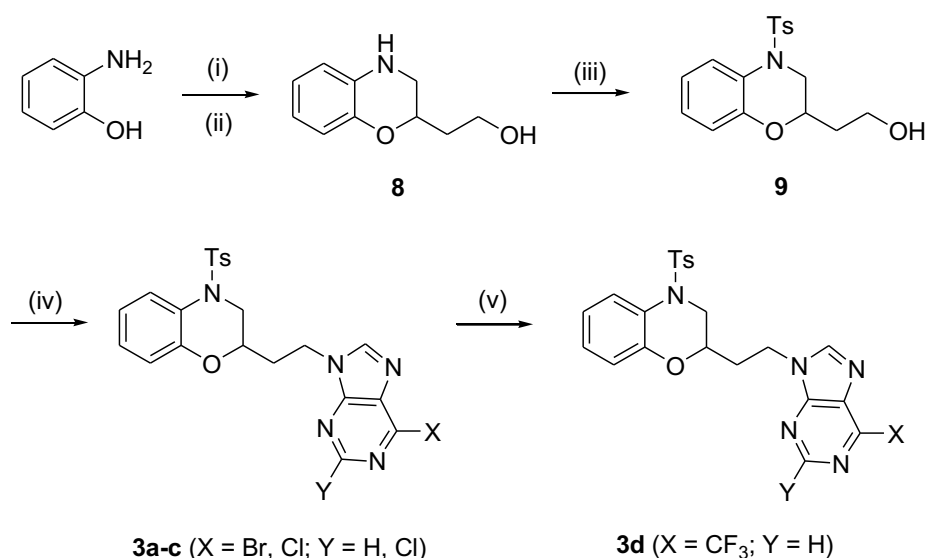
Nunc black optical bottom plates acquired from Thermo Scientific were used to seed MCF-7 cells at 1500 cells/well. After 48h of incubation, NucView 488 substrate (Biotium) at 1 μM concentration in culture media was added

to each well and cells treated either with DMSO or compounds **3c**, **4c**, **4d** and **5c** at 3, 10 and 30  $\mu\text{M}$ . Plates were imaged in an IncuCyte™ ZOOM system for 5d and cell confluence and apoptotic counts determined with the IncuCyte software as previously described [15].

## Results and discussion

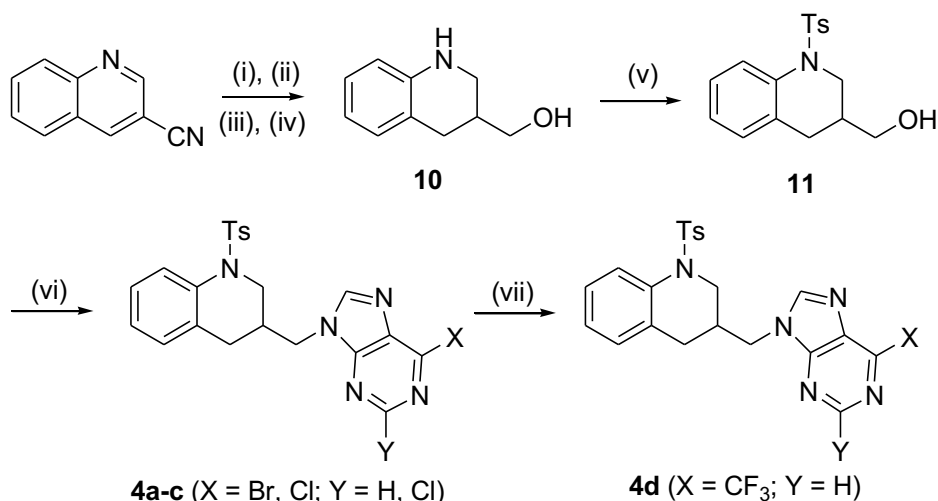
### Chemistry

The synthetic routes of all compounds included in four series are outlined in Figures 2 – 5. Derivatives **3a-c** enclosed in the first series have been synthesized from 2-aminofenol and ethyl 4-bromobut-2-enoate to give the ethyl 2-(3,4-dihydro-2H-benzo[*b*][1,4]oxazine-2-yl)acetate [16], that was reduced with  $\text{LiAlH}_4$  to give alcohol **8**. This alcohol was tosylated to give derivative **9**, which was treated with different purines under Mitsunobu conditions to produce the final molecules **3a-c**. Finally, the 6-Br group of **3a** was substituted by 6- $\text{CF}_3$  to obtain **3d** [17] (Figure 2).



**Figure 2. Synthesis of compounds included in series A.** Reagents and conditions: (i) ethyl 4-bromobut-2-enoate,  $\text{NaHCO}_3$ , EtOH, 3 h, rt, then  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 30 min; (ii)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 1 h,  $0^\circ\text{C}$  to rt; (iii)  $\text{TsCl}$ , py, 12 h,  $0^\circ\text{C}$  to rt; (iv) 6-halopurine or 2,6-dihalopurine, DIAD,  $\text{Ph}_3\text{P}$ , 36 h,  $-20^\circ\text{C}$  to rt; (v) MFSDA,  $\text{CuI}$ , HMAP, DMF, 12 h,  $70^\circ\text{C}$ .

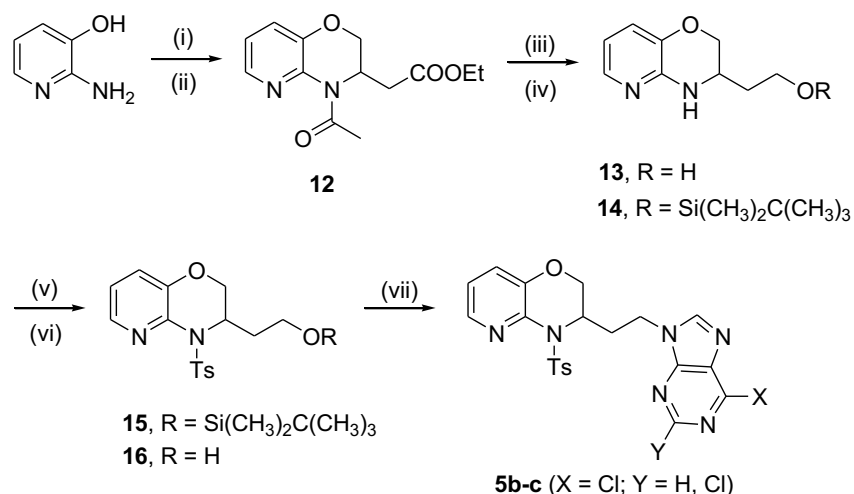
Figure 3 shows the synthetic route followed for compounds **4a-d** included in *series B*. These compounds have been synthesized from quinoline-3-carbonitrile, which is transformed into quinoline-3-carboxylic acid by treatment with aq. NaOH and acidified with HCl 1N [18]. The carboxylic acid is esterified to ethyl quinoline-3-carboxylate [19] and then partially reduced to the ethyl 1,2,3,4-tetrahydroquinoline-3-carboxylate using sodium cyanoborohydride [18]. Reduction of the ester function to the corresponding alcohol **10** [16] and subsequent tosylation with *p*-toluenesulfonyl chloride gave (1,2,3,4-tetrahydro-1-tosylquinoline-3-yl)methanol **11**. Final compounds **4a-c** were obtained by Mitsunobu reaction with DIAD and the corresponding purines (6-bromo-, 6-chloro-, and 2,6-dichloro-purines). Finally, derivative **4d** was synthesized from bromopurine **4a**, as in the previous series, using MFSDA, CuI and HMPA [17].



**Figure 3. Synthesis of compounds included in series B.** Reagents and conditions: (i) aq. NaOH, EtOH, 20h, reflux, then HCl 1N; (ii) SOCl<sub>2</sub>, EtOH, 4h, reflux; (iii) NaBH<sub>3</sub>CN, THF, MeOH, HCl, Et<sub>2</sub>O, 6h, rt; (iv) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 1h, 0°C; (v) TsCl, py, 12h, 0°C to rt; (vi) 6-halopurine or 2,6-dihalopurine, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, 36h, -20°C to rt; (vii) MFSDA, CuI, HMAP, DMF, 12h, 70°C.

The synthesis of series C is shown in Figure 4. Firstly, 2-aminopyridine-3-ol was acetylated and then, cyclized with ethyl 4-bromobut-2-enoate to give **12**, which was reduced to the alcohol **13** and then silylated to **14**. This

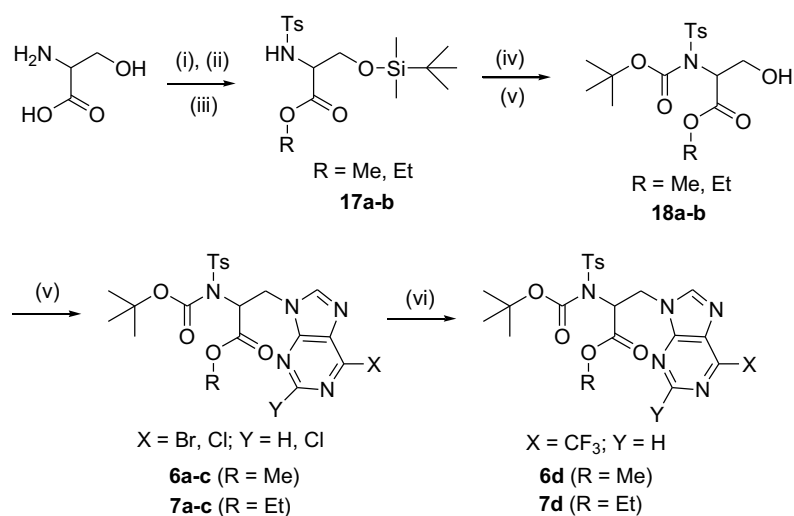
compound was tosylated with *p*-toluenesulfonyl chloride to **15** and the silyl group was removed to give the alcohol **16**. The last step includes the Mitsunobu reaction with 6-chloro- and 2,6-dichloro-purines to lead to **5b-c**.



**Figure 4. Synthesis of compounds included in series C.** Reagents and conditions:

(i) Ac<sub>2</sub>O/py, 5min, reflux, then NaOH; (ii) ethyl 4-bromobut-2-enoate, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, 24h; (iii) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 1h, 0°C to rt; (iv) TBDMSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, DCM, 12h, rt; (v) TsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, DCM, 12h, rt; (vi) AcOH, H<sub>2</sub>O, THF, 12h, rt; (vii) 6-chloropurine or 2,6-dichloropurine, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, -20°C to rt, 36h.

Finally, compounds **6a-d** and **7a-d** were synthesized as shown in Figure 5 from D/L-serine, which is tosylated [20], then esterified with methanol or ethanol [21] and silylated to compounds **17a-b** [22]. Subsequent protection of the amine with Boc anhydride [23], followed by removal of the silyl group [24] leads to the alcohols **18a-b**, which are transformed into the last derivatives **6a-c** and **7a-c** by the Mitsunobu reaction with the appropriate purines. Finally, **6a** and **7a** were converted into **6d** and **7d** as previously described.



**Figure 5. Synthesis of compounds included in series D.** Reagents and conditions: (i) TsCl, 2N NaOH, 12h, rt; (ii) SOCl<sub>2</sub>, ROH, 1h, 0°C, then 12h rt; (iii) TBDMSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, DCM, 2h, rt; (iv) (Boc)<sub>2</sub>O, DMAP, Et<sub>3</sub>N, DCM, 2h; (v) AcOH, H<sub>2</sub>O, THF, 12h, rt; (vi) 6-halo- or 2,6-dihalo-purines, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, 36h, -20°C to rt; (vii) MFSDA, CuI, HMAP, DMF, 12h, 70°C.

### Biological evaluation

Breast adenocarcinoma MCF-7 [25], colorectal carcinoma HCT-116 [26] and melanoma A375 [27] are human cell lines that have been widely used as experimental cell models in drug discovery. These 3 types of cancers are nowadays in the top-20 of the most deadly ones, therefore the identification of new treatments is required.

We first analysed the antiproliferative properties of the 18 synthesized compounds against MCF-7 cell line. Those structures that exhibited an EC<sub>50</sub> value lower than 50 μM were further investigated in A375 and HCT-116 cells. The results of this assessment are shown in Table 1. 5-Fluorouracil (5-FU) has been used as a control for the breast and colon carcinoma cell lines. Today this drug and its derivatives such as capecitabine, are widely used in different solid tumours despite its high toxicity and side effects [28, 29].

In general, 6-halo, 2,6-dihalo and 6-trifluoromethyl groups on the 9-alkylated purine show a notable inhibition on cell proliferation, with the dichloro analogue being the most interesting in each of the series and tumour cell lines. This data are in agreement with the results previously published by our research group where the highest antiproliferative activity were obtained with electron-withdrawing groups in the purine ring [7], specifically derivatives bearing two chloro atoms at 2 and 6 positions. Accordingly, the most active compounds in MCF-7 cell line are the 9-alkylated 2,6-disubstituted purines with two chlorine atoms, with **4c** being the most potent inhibitor ( $EC_{50} = 4.26 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ), only slightly less active than the positive control 5-FU. Compounds **4c-d** (within *series B*), which feature a tetrahydroquinoline heterocycle, exhibited higher activity than their isosteric benzoxazines **3c-d** (*series A*). The open structures included in *series D* (**6a-d** and **7a-d**) mediated no or low inhibition of cell proliferation. Only the most lipophilic derivative, **7c** (R = Et; X = Cl, Y = Cl), showed some level of activity. This might be due to a reduced capacity of the open structures to penetrate the cell membrane.

Regarding the A375 cell line, derivatives with a tetrahydroquinoline (**4c**) and pyridoxazine (**5c**) heterocycle show similar inhibition values ( $EC_{50} = 5.54 \pm 0.64$  and  $5.66 \pm 0.65 \mu\text{M}$ , respectively). In this cell line there is not much difference of activity between the 6-chloro (**3b**) and 2,6-dichloro (**3c**) derivatives from *series A*.

The best inhibition values were obtained in the carcinoma colon line HCT-116 where the 2,6-dichloro derivatives **3c** ( $7.06 \pm 0.80 \mu\text{M}$ ), **4c** ( $2.80 \pm 0.31 \mu\text{M}$ ) and **5c** ( $3.13 \pm 0.35 \mu\text{M}$ ) mediated high activity. **4c**, the most potent derivative of the series, showed an activity comparable to the reference compound 5-FU. Interestingly, in this tumour cell line the open derivative with a methyl carboxylate moiety (**6c**) shows a better inhibition than the one with an ethyl carboxylate group, unlike the other two cell lines.



Generally, in all derivatives it is observed that the oxygen atom of the benzoxazine ring (derivatives **3**) is not essential for the antitumour activity since when it was eliminated (derivatives **4**) compounds show better inhibition values. Furthermore, if we compare derivatives **3** and **5**, the substitution of the benzene ring by its isosteric pyridine, as well as the change of the side chain position in the condensate system, have led to an improvement in the activity. Finally, the presence of a heterocyclic system is very important for the antitumour inhibition since compounds are less active when it is not present (open derivatives **6** and **7**).

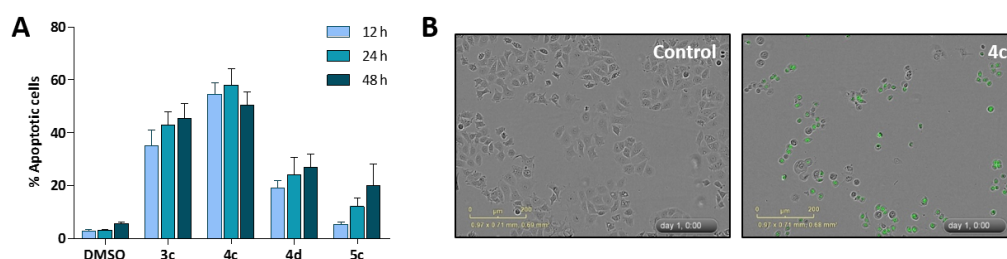
**Table 1.** In vitro anticancer activity of final compounds against MCF-7, A375 and HCT-116 tumour cells.

Comp	X	Y	R	Cancer cell lines		
				MCF-7 EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	A375 EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	HCT-116 EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
<b>3a</b>	Br	H	-	27.45 ± 0.18	26.11 ± 3.01	17.30 ± 2.67
<b>3b</b>	Cl	H	-	37.63 ± 4.85	13.32 ± 0.43	17.54 ± 0.86
<b>3c</b>	Cl	Cl	-	13.00 ± 0.11	10.85 ± 1.40	7.06 ± 0.80
<b>3d</b>	CF <sub>3</sub>	H	-	33.61 ± 3.62	34.59 ± 2.80	56.06 ± 2.66
<b>4a</b>	Br	H	-	> 100	-	-
<b>4b</b>	Cl	H	-	> 100	-	-
<b>4c</b>	Cl	Cl	-	4.26 ± 0.15	5.54 ± 0.64	2.80 ± 0.31
<b>4d</b>	CF <sub>3</sub>	H	-	21.95 ± 1.7	61.57 ± 0.67	60.14 ± 5.35
<b>5b</b>	Cl	H	-	> 100	-	-
<b>5c</b>	Cl	Cl	-	11.56 ± 0.28	5.66 ± 0.65	3.13 ± 0.35
<b>6a</b>	Br	H	Me	> 100	-	-
<b>6b</b>	Cl	H	Me	> 100	-	-
<b>6c</b>	Cl	Cl	Me	45.96 ± 5.69	20.48 ± 2.40	22.20 ± 1.57
<b>6d</b>	CF <sub>3</sub>	H	Me	> 100	-	-
<b>7a</b>	Br	H	Et	> 100	-	-
<b>7b</b>	Cl	H	Et	> 100	-	-
<b>7c</b>	Cl	Cl	Et	26.15 ± 3.22	17.62 ± 1.90	38.32 ± 2.01
<b>7d</b>	CF <sub>3</sub>	H	Et	> 100	-	-
5-FU				1.5 ± 0.31	-	2.40 ± 0.62

<sup>a</sup>Cell viability was measured after 5 days treatment using the PrestoBlue™ reagent. Experiments were conducted in triplicate. Data are the mean ± SD of 3 independent determinations.

To analyze if the observed growth inhibition was due to an apoptotic effect, NucView™ 488 caspase-3 substrate was used to assess the rate of caspase-3/7 mediated apoptosis in MCF-7 cells once treated with derivatives **3c**, **4c**, **4d** and **5c**. This fluorescent probe contains a peptide sequence (DEVD) that after cleaved by caspase-3/7 activity releases a DNA-binding dye which stains the cell nucleus bright green.

As shown in Figure 6, image-based measurement of caspase 3/7 activity demonstrated significant levels of apoptotic cell death in a time-dependent manner in comparison with the control DMSO.

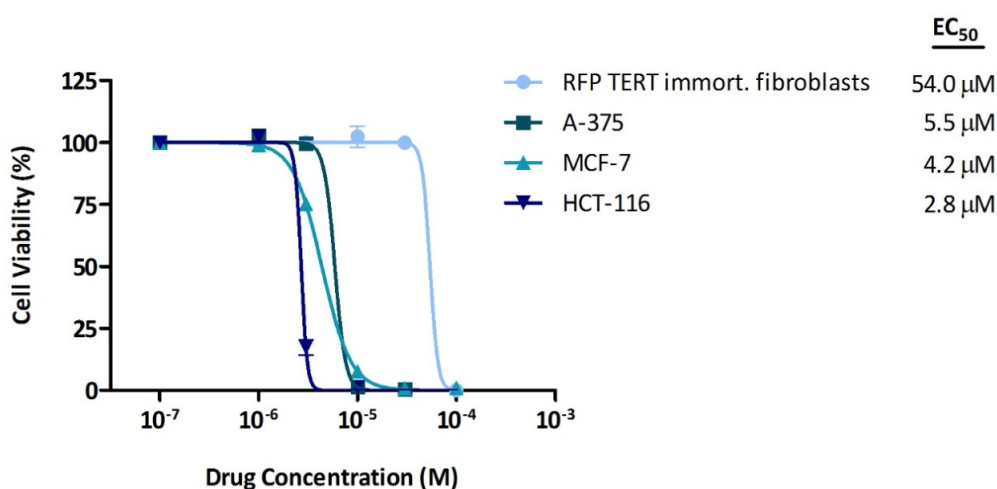


**Figure 6.** (A) Percentage of apoptotic cells after treatment with compounds **3c**, **4c**, **4d** and **5c** (30  $\mu$ M) for 12h (blue), 24 h (light green) and 48h (dark green). (B) Representative images of MCF-7 cells stained using caspase 3/7-detecting reagent after 24 h treatment with compound **4c** (30  $\mu$ M).

The most interesting compound was the tetrahydroquinoline **4c** that induces 58% apoptosis after 24 h treatment at 30  $\mu$ M. This structure also displayed strong apoptotic activity at lower concentrations (see Figure S.2. of the Supplementary Information). On the contrary, compound **5c** (which showed moderate activity in MCF-7 with an  $EC_{50}$  value of  $11.56 \pm 0.28$   $\mu$ M) did not produce an important increase in apoptotic cells (18% at 48 h). This fact could indicate a different mechanism of action (e.g. cell cycle inhibitor, cytotoxic, etc.) for this pyridoxazine derivative. In addition, the change of the 2,6-dichloropurine moiety (**4c**) to 6-trifluoromethylpurine (**4d**) has produced a significant decrease of apoptosis (from 58 to 25% after 24h)

as we observed with the antiproliferative activity. The benzoxazine **3c** has shown moderate apoptosis after 48h of treatment (45%).

Furthermore, as a preliminary assessment of the safety profile of compound **4c**, a cell proliferation study was performed in non-tumour cells (RFP TERT immortalized fibroblasts). As shown in Figure 7, treatment of non-cancerous fibroblasts with compound **4c** resulted in a significantly lower antiproliferative activity, with a reduction of activity of up to 19-fold respect to the HCT-116 tumour cell line, indicating promising preferential activity towards cancerous cells.



**Figure 7.** Semilog dose-response curves and EC<sub>50</sub> values for compound **4c** against RFP TERT immortalized fibroblasts, A375, MCF-7 and HCT-116 cells. Error bars:  $\pm$  SD from  $n = 3$ .

## Conclusion

In an attempt to find new antitumour agents, eighteen purine molecules linked to different heterocycles (benzoxazine, quinoline and pyridoxazine) and open analogues (methyl and ethyl propanoate derivatives) were synthesized. We evaluated their antiproliferative activity against three cancerous cell lines (MCF-7, A375 and HCT-116) and the induction of

apoptosis in MCF-7. In this study we have shown the importance of the substitution in the purine rings since compounds with a 2,6-dichloropurine moiety are consistently more active than other members of the series. In addition, compounds with the complete heterocyclic systems have been more active than open analogues, highlighting the compound with the quinoline ring. In addition, an increase in the distance between the purine and the heterocycle leads to a decrease of antiproliferative activity. **4c** is the most active compound in the cancer cell lines tested and an apoptotic inducer through activation of caspases 3/7, with a low cytotoxicity in non-cancerous cells. In conclusion, this derivative can be considered as a promising antiproliferative lead compound for future optimization campaigns.

### **Future prespective**

One of the main hallmarks of cancer is the ability of malignant cells to evade programmed cell death. Therefore, the development of chemical structures able to effectively induce apoptosis represents an interesting approach in the finding of new anticancer treatments. In the search for improved therapies, chemical moieties such as purines and related heterocycles are privileged structures in medicinal chemistry. This work reports an interesting derivative **4c** (3-((2,6-dichloro-9*H*-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline) that was easily prepared and had a promising activity against three cancer cells lines. Moreover, this compound induces apoptosis through activation of caspases, and shows a good safety profile. This quinoline could be an interesting starting point for further structural optimization to obtain new promising antitumour agents.

## **Executive summary**

### **Purine derivatives linked to heterocycles as a promising scaffold**

- 18 Novel purine compounds incorporating different heterocycles and their open analogues were designed, synthesized and evaluated for their antiproliferative activity.
- In the 4 series of derivatives the most interesting molecules have a moiety of 2,6-dichloropurine.

### **Antiproliferative and apoptosis activity**

- Compound **4c** with a quinoline ring shows the lowest EC<sub>50</sub> values against MCF-7 (4.26 μM), A375 (5.54 μM) and HCT-116 (2.80 μM).
- **4c** induced apoptosis by activation of caspases 3/7 in a time-dependent manner. It shows a pronounced selectivity against cancer cells.
- **4c** is therefore a leading structure for future anticancer drug development due to its straightforward synthesis and relevant bioactivity.

### **Supplementary data**

See online the supplementary data with the synthesis and characterization of intermediate compounds, 6-bromo and 6-trifluoromethylpurines derivatives and a two-day time-lapse motion picture of MCF-7 cell proliferation under treatment with 30 μM of **4c** with Nucview 488 (apoptosis fluorescent marker).

### **Financial & competing interest disclosure**

This paper was supported financially by the Junta de Andalucía (project nº. CS2016.1).

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

### • Importance of cancer in today's society

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. *JAMA Oncol.* 3(4), 524–548 (2017).
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* 68, 7–30 (2018).
3. Singla H, Kalra S, Kheterpal P *et al.* Role of genomic alterations in HER2 positive breast carcinoma: focus on susceptibility and trastuzumab-therapy. *Curr. Cancer Drug Target* 17, 344–356 (2017).

### •• Caspases as apoptosis regulators, an attractive strategy in cancer therapy

4. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 22, 526-539 (2015).
5. Bai L, Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med.* 65, 139-155 (2014).

**•• Interesting purine derivatives linked to heterocycles previously published**

6. Díaz-Gavilán M, Conejo-García A, Cruz-López O *et al.* Synthesis and Anticancer Activity of (RS)-9-(2,3-Dihydro-1,4-Benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-Purines. *ChemMedChem.* 3, 127-135 (2008).
7. Conejo-García A, García-Rubiño ME, Marchal J *et al.* Synthesis and anticancer activity of (RS)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxaheteroin-2-ylmethyl)-9H-purine. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 3795-380 (2011).
8. Díaz-Gavilán M, Gómez-Vidal JA, Rodríguez-Serrano F *et al.* 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.* 18, 1457-1460 (2008).

**Nitro group toxicity**

9. Kovacic P, Somanathan R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J Appl Toxicol.* 34, 810-824 (2014).
10. Purohit V, Basu AK. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 673–692 (2000).

**The trifluoromethyl group in medicinal chemistry**

11. Chen J, Akhtari FS, Wagner M J *et al.* Pharmacogenetic Analysis of the Model-Based Pharmacokinetics of Five Anti-HIV Drugs: How Does This Influence the Effect of Aging?. *Clin Transl Sci* 11, 226–236 (2018).
12. Rivkin, A, Biswas K, Chou T, Danishefsky SJ. On the Introduction of a Trifluoromethyl Substituent in the Epothilone Setting: Chemical Issues Related to Ring Forming Olefin Metathesis and Earliest Biological Findings. *Org. Lett.* 4(23), 4081-4084 (2002).

**Biological assays procedure**

13. Munro J, Steeghs K, Morrison V, Ireland H, Parkinson EK. Human fibroblast replicative senescence can occur in the absence of extensive cell division and short telomeres. *Oncogene*, 20 (27), 3541-3552 (2001).
14. Rubio-Ruiz B, Weiss JT, Unciti-Broceta A. Efficient Palladium-Triggered Release of Vorinostat from a Bioorthogonal Precursor. *J. Med. Chem.* 59 (21), 9974-9980 (2016).
15. Fraser C, Dawson JC, Dowling R *et al.* Rapid Discovery and Structure-Activity Relationships of Pyrazolopyrimidines That Potently Suppress Breast Cancer Cell Growth via SRC Kinase Inhibition with Exceptional Selectivity over ABL Kinase. *J. Med. Chem.* 59 (10), 4697-4710 (2016).

**Chemical procedures for syntheses**

16. Mayer S, Guillaumet G, Merour JY. Regioselective formylation of ethyl 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine-2-carboxylate or 2-acetate derivatives. *Heterocycles*, 55(10), 1873-1888 (2001).
17. Véliz EA, Stephens OM, Beal PA. Synthesis and analysis of RNA containing 6-trifluoromethylpurine ribonucleoside. *Org. Lett.* 3(19), 2969–2972 (2001).
18. Ferrabosch iP, Ciceri S, Grisenti P. Chemoenzymatic synthesis of the enantiomerically pure 1,2,3,4-tetrahydroquinoline moiety of the antithrombotic (21R)- and (21S)-argatroban. *Tetrahedron: Asymmetry* 24, 1142-1147 (2013).
19. PCT Int. Appl. WO 2016008411 (2016)
20. Provoost OY, Hazelwood AJ, Harrity J. P. Pd-Catalysed [3 + 3] annulations in the stereoselective synthesis of indolizidines. *Beilstein J. Org. Chem.* 3 (8), 1-13 (2007).
21. Van Dijk M, Postma TM, Rijkers, DTS, Liskamp RMJ, Nostrum CF, Hennink WE. Synthesis and characterization of tailorable biodegradable thermoresponsive methacryloylamide polymers based on L-serine and L-threonine alkyl esters. *Polymer* 51(12), 2479–2485 (2010).



22. Takahashi K, Fukushima K, Tsubuki M, Honda T. The formal synthesis of lucentamycin A: Construction of *cis*-2,3-disubstituted pyrrolidine core by application of Sml2-DMPU system. *Tetrahedron Lett.* 59, 1435-1437 (2018).

23. Shields SWJ, Manthorpe JM. Efficient, scalable and economical preparation of tris(deuterium)- and <sup>13</sup>C-labelled *N*-methyl-*N*-nitroso-*p*-toluenesulfonamide (DiazaId®) and their conversion to labelled diazomethane. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 57 (12), 674–679 (2014).

24. Myers MC, Wang, Iera JA, Bang J, Hara T, Saito S, Zambetti GP, Appella DH. A new family of small molecules to probe the reactivation of mutant P53. *J. Am. Chem. Soc.* 127(17), 6152–6153 (2005).

• **Experimental cell models in drug discovery**

25. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst.* 107(7): djv073 (2015).

26. Datta A, Dey S, Das P, Kayum Alam SK, Roychoudhury, S. Transcriptome profiling identifies genes and pathways deregulated upon floxuridine treatment in colorectal cancer cells harboring GOF mutant p53. *Genomics Data* 8, 47–51 (2016).

27. Rozzo C, Sanna D, Garribba E *et al.* Antitumoral effect of vanadium compounds in malignant melanoma cell lines. *J. Inorg. Biochem.* 174, 14–24 (2017).

• **Reported the pharmacological importance of a lead compound such as 5-FU**

28. Xiaoyan P, Chen W, Fang W *et al.* Development of 5-Fluorouracil Derivatives as Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem.* 18, 4538-4556 (2011).

29. Walther R, Rautio J, Zelikin A N. Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 118, 65-77 (2017).

## **Supplementary Information**

# **PURINE DERIVATIVES WITH HETEROCYCLIC MOIETIES AND RELATED ANALOGUES AS NEW ANTITUMOUR AGENTS**

**Nerea Fernández-Sáez<sup>1</sup>, Belén Rubio-Ruiz<sup>2</sup>, Joaquín M. Campos<sup>1,3</sup>, Asier Unciti-Broceta<sup>2</sup>, M. Dora Carrión<sup>1,3,‡,\*</sup>, M. Encarnación Camacho<sup>1,3,‡,\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada 18071, Spain.

<sup>2</sup>Cancer Research UK Edinburgh Centre, MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Crewe Road South, Edinburgh EH4 2XR, UK.

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA. Complejo Hospitalario Universitario de Granada/Universidad de Granada, Granada, Spain.

<sup>‡</sup>These authors contribute equally

\* Corresponding authors

E-mail: [dcarrion@ugr.es](mailto:dcarrion@ugr.es); [ecamacho@ugr.es](mailto:ecamacho@ugr.es)

### **Preparation of intermediate derivatives**

#### *2-(3,4-Dihydro-2H-1,4-benzo[b][1,4]oxazine-2-yl)ethanol (8)*

To a solution of LiAlH<sub>4</sub> 1M (1.79 mL, 1.79 mmol) in anhydrous diethyl ether (7.5 mL) at 0°C, ethyl 2-(3,4-dihydro-2H-1,4-benzo[b][1,4]oxazine-2-yl)acetate (396 mg, 1.79 mmol) in anhydrous diethyl ether (7.5 mL) was added dropwise and stirred for 1h. After this time, fresh water (15 mL) was added and the resulting mixture was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated. The resulting residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:1) to afford **8**. White solid (240 mg, 1.34 mmol), yield 89%, mp: 55 - 56°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6.80 – 6.74 (m, 2H, H<sub>benz</sub>), 6.66 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 6.60 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 4.33 – 4.27 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.91 – 3.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.36 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.4 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.17 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.7 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 2.99 (s, 1H, NH), 2.02 – 1.89 (m, 1H), 1.90 – 1.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 143.3 (C<sub>benz</sub>), 132.9 (C<sub>benz</sub>), 121.2 (CH<sub>benz</sub>), 118.7 (CH<sub>benz</sub>), 116.6 (CH<sub>benz</sub>), 115.3 (CH<sub>benz</sub>), 72.2 (CH<sub>oxazine</sub>), 59.4 (CH<sub>2</sub>OH), 45.3 (CH<sub>2oxazine</sub>), 35.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> 180.0946, found 180.0878.

#### *(3,4-Dihydro-4-tosyl-2H-1,4-benzo[b][1,4]oxazine-2-yl)ethanol (9)*

A solution of (3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine-2-yl)ethanol **8** (292 mg, 1.63 mmol) and pyridine (396 μL, 4.89 mmol) in DCM (17 mL) was prepared under argon atmosphere and cooled to 0°C, then *p*-toluenesulfonyl chloride (1.34 mg, 1.63 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt. after 12h, cold water was added, the reaction was extracted with DCM, and the organic layer was washed with aq. 1N HCl and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash chromatography

(EtOAc/hexane, 1:3). White solid (429 mg, 1.288 mmol), yield 79%, mp: 130 - 131°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.83 (dd,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 7.56 – 7.51 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.26 – 7.20 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.04 (ddd,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz,  $J_3 = 1.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 6.92 (ddd,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz,  $J_3 = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 6.79 (dd,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 4.32 (dd,  $J_1 = 14.3$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 3.80 – 3.73 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.63 – 3.54 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 3.19 (dd,  $J_1 = 14.3$ ,  $J_2 = 9.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 2.38 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{tosyl}$ ), 1.83 – 1.72 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 146.4 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ), 144.1 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 135.4 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 129.7 (2x $\text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 127.1 (2x $\text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 125.8 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 124.0 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 123.5 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ), 120.8 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 117.2 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 70.0 ( $\text{CH}_{\text{oxazine}}$ ), 58.7 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 48.5 ( $\text{CH}_2\text{oxazine}$ ), 34.9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 21.4 ( $\text{CH}_3\text{tosyl}$ ); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{NaS}$  ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$  356.0932, found 356.0919.

*(1,2,3,4-Tetrahydro-1-tosylquinoline-3-yl)methanol (11)*

Following the same procedure used for the synthesis of **9**, and starting from (1,2,3,4-tetrahydroquinoline-3-yl)methanol **10** (266 mg, 1.63 mmol), a residue was obtained and was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:2). Yellow solid (414 mg, 1.30 mmol), yield 80%, mp: 172 - 173°C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7.68 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 7.51 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.21 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{tosyl}}$ ), 7.18 – 7.13 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 7.08 – 7.01 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ), 4.12 (dd,  $J_1 = 13.4$  Hz,  $J_2 = 4.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ ), 3.57 – 3.47 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.42 (dd,  $J_1 = 13.3$  Hz,  $J_2 = 9.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ ), 2.59 (dd,  $J_1 = 16.5$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ ), 2.38 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{tosyl}$ ), 2.24 (dd,  $J_1 = 16.5$  Hz,  $J_2 = 9.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ ), 1.98 – 1.90 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 143.8 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 137.0 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ), 136.9 ( $\text{C}_{\text{tosyl}}$ ), 129.8 (2x $\text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 129.5 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 129.3 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ), 127.1 (2x $\text{CH}_{\text{tosyl}}$ ), 126.6 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 124.9 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ), 123.8 ( $\text{CH}_{\text{benz}}$ ), 64.3 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 48.5 ( $\text{CH}_2\text{pyr}$ ), 35.2 ( $\text{CH}_{\text{pyr}}$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2\text{pyr}$ ), 21.6 ( $\text{CH}_3\text{tosyl}$ ); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{S}$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  318.1086, found 318.1103.

*Ethyl (4-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine-3-yl)acetate (12)*

To a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (1.089 g, 7.88 mmol) in EtOH (20 mL), *N*-(3-hydroxypyridine-2-yl)acetamide (300 mg, 1.97 mmol) and ethyl 4-bromobut-2-enoate (0.54 mL, 2.96 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 24h. After this time, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 2:1) to provide **12**. Yellow solid (264 mg, 0.99 mmol), yield 51%, mp: 59 - 60°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.96 (dt, *J*<sub>1</sub> = 4.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 7.20 (dt, *J*<sub>1</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 7.00 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 0.9 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 5.44 – 5.38 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 4.47 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 4.16 – 4.09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.07 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 2.59 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.51 – 2.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 170.2 (COO), 169.7 (COCH<sub>3</sub>), 140.7 (C<sub>pyr</sub>), 139.5 (CH<sub>pyr</sub>), 138.5 (C<sub>pyr</sub>), 124.3 (CH<sub>pyr</sub>), 120.6 (CH<sub>pyr</sub>), 67.2 (CH<sub>2oxazine</sub>), 60.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 44.6 (CH<sub>oxazine</sub>), 33.6 (CH<sub>2</sub>COO), 25.7 (COCH<sub>3</sub>), 13.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI-TOF) (*m/z*) calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (*M* + *H*)<sup>+</sup> 265.1188, found 265.1182.

*2-(3,4-Dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine-3-yl)ethanol (13)*

To a solution of **12** (950 mg, 3.59 mmol) in anhydrous THF (36 mL) at 0°C, LiAlH<sub>4</sub> 1M (4.5 mL, 4.5 mmol) was added dropwise and stirred for 1h. After this time, ethyl acetate (3 mL) and sodium potassium tartrate (3 mL) were added. The resulting precipitate was filtered over celite. The filtrated solvent was extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 5:1). Yellow solid (455 mg, 2.51 mmol), yield 70%, mp: 90 - 91°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.57 (dt, *J*<sub>1</sub> = 5.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.4 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 6.93 (dt, *J*<sub>1</sub> = 7.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 6.49 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 7.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.1 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 6.14 (bs, 1H, OH), 5.12 (bs, 1H, NH), 4.15 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 10.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.8 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.99 – 3.95

(m, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$ ), 3.88 – 3.85 (m, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$ ), 3.82 (ddd,  $J_1 = 10.3$  Hz,  $J_2 = 7.6$  Hz,  $J_3 = 1.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 3.78 – 3.74 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 1.78 – 1.61 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 147.0 ( $\text{C}_{\text{pyr}}$ ), 139.1 ( $\text{C}_{\text{pyr}}$ ), 139.0 ( $\text{CH}_{\text{pyr}}$ ), 121.7 ( $\text{CH}_{\text{pyr}}$ ), 113.2 ( $\text{CH}_{\text{pyr}}$ ), 68.7 ( $\text{CH}_{2\text{oxazine}}$ ), 60.1 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 49.2 ( $\text{CH}_{\text{oxazine}}$ ), 33.3 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup> 181.0977, found 181.0965.

*3-(((tert-Butyldimethyl)silyl)oxy)ethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine (14)*

To a suspension of DMAP (14 mg, 0.11 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (427  $\mu\text{L}$ , 2.22 mmol), **13** (200 mg, 1.11 mmol) in anhydrous DCM (5 mL), TBDMSCl (250 mg, 1.66 mmol) dissolved in anhydrous DCM (1 mL) was added under argon atmosphere and stirred at rt. After 12h the reaction mixture was poured into aq. AcOH (5%) and extracted with DCM. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:5). Yellow oil (278 mg, 0.94 mmol), yield 86%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7.66 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ ), 6.94 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ ), 6.52 (dd,  $J_1 = 7.7$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{pyr}}$ ), 5.32 (bs, 1H, NH), 4.21 (dd,  $J_1 = 10.7$  Hz,  $J_2 = 2.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 3.87 (dd,  $J_1 = 10.6$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 3.84 – 3.77 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$ ), 3.77 – 3.70 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{oxazine}}$ ), 1.76 – 1.65 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 0.91 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 0.07 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 147.5 ( $\text{C}_{\text{pyr}}$ ), 140.5 ( $\text{CH}_{\text{pyr}}$ ), 139.6 ( $\text{C}_{\text{pyr}}$ ), 122.1 ( $\text{CH}_{\text{pyr}}$ ), 114.2 ( $\text{CH}_{\text{pyr}}$ ), 69.3 ( $\text{CH}_{2\text{oxazine}}$ ), 60.7 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$ ), 48.6 ( $\text{CH}_{\text{oxazine}}$ ), 35.3 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 26.4 ( $(\text{CH}_3)_3$ ), 18.7 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), -4.9 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ), -5.0 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{Si}$  ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup> 295.1842, found 295.1863.

*3-(2-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine (15)*

To a suspension of DMAP (73.30 mg, 0.6 mmol), Et<sub>3</sub>N (812 μL, 5.82 mmol) and **14** (857 mg, 2.91 mmol) in dry DCM (10 mL) under argon atmosphere, *p*-toluenesulfonyl chloride was added (1.165 g, 6.11 mmol) at 0 °C and stirred at rt. After 36h the reaction mixture was poured into fresh water. The precipitate was filtered off and the solvent was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:10). Yellow sirup (391 mg, 0.87 mmol), yield 30%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 7.94 (dd, *J*<sub>1</sub> = 4.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 7.28 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 7.12 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 6.90 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 5.01 - 4.96 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 4.37 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 4.02 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.1, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.72 – 3.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 1.73 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) 0.90 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.04 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.05 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 143.4 (C<sub>tosyl</sub>), 140.7 (C<sub>pyr</sub>), 140.1 (CH<sub>pyr</sub>), 138.0 (C<sub>pyr</sub>), 137.9 (C<sub>tosyl</sub>), 128.9 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.3 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 123.9 (CH<sub>pyr</sub>), 119.6 (CH<sub>pyr</sub>), 67.4 (CH<sub>2oxazine</sub>), 59.4 (CH<sub>2</sub>O), 50.9 (CH<sub>oxazine</sub>), 33.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 25.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>tosyl), 18.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.5 (CH<sub>3</sub>Si), -5.7 (CH<sub>3</sub>Si); HRMS (ESI-TOF) (*m/z*) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>SiS (M + H)<sup>+</sup> 449.1930, found 449.1964.

#### 2-(4-Tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine-3-yl)etanol (**16**)

The silyl derivative **15** (200 mg, 0.44 mmol) was added to a mixture of THF/H<sub>2</sub>O (1:1) (6.6 mL) and glacial acetic acid (16 mL) was added. After stirred for 22h the mixture was poured into sat. NaHCO<sub>3</sub> (25 ml). The aqueous fractions were extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:2). Colourless oil (74 mg, 0.22 mmol), yield 50 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.97 (dd, *J*<sub>1</sub> = 4.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 7.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 7.14 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 6.92 (dd,

$J_1 = 8.1$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 4.95 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 4.27 (dd,  $J_1 = 11.2$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.86 (dd,  $J_1 = 11.2$  Hz,  $J_2 = 2.5$  Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.84 – 3.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 3.74 – 3.68 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 1.89 - 1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 144.0 (C<sub>tosyl</sub>), 140.5 (C<sub>pyr</sub>), 140.2 (CH<sub>pyr</sub>), 137.4 (C<sub>pyr</sub>), 136.7 (C<sub>tosyl</sub>), 129.2 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.2 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 124.5 (CH<sub>pyr</sub>), 119.8 (CH<sub>pyr</sub>), 67.4 (CH<sub>2oxazine</sub>), 58.3 (CH<sub>2</sub>OH), 50.8 (CH<sub>oxazine</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 21.7 (CH<sub>3</sub>tosyl); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S (M + H)<sup>+</sup> 335.0987, found 335.0878.

*Methyl/Ethyl 2-(N-(tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-hydroxypropanoate (18a,b)*

To a suspension of DMAP (11.4 mg, 0.1 mmol), Et<sub>3</sub>N (156.3 μl, 1.12 mmol) and **17a,b** (360 mg, 0.95 mmol) in anhydrous DCM (3 ml) under argon atmosphere, (Boc)<sub>2</sub>O was added (244 mg, 1.12 mmol), dissolved in anhydrous DCM (3 ml) and stirred at rt. After 2h the reaction mixture was poured into aq. AcOH (5%) and extracted with DCM. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated. The crude obtained without isolation was added to a mixture of THF/H<sub>2</sub>O (1:1) (10 ml) and glacial acetic acid was added (40 ml). After stirring for 22h the mixture reaction was poured into brine and sat. NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous fraction was extracted with EtOAc, and the organic layer was dried, filtered and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:7).

(**18a**): White solid (262 mg, 0.846 mmol), yield 89%, mp: 102 - 103°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.93 – 7.90 (m, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 7.34 – 7.30 (m, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 5.22 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 4.31 (dd,  $J_1 = 11.6$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 3.96 (dd,  $J_1 = 11.6$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 1.31 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 169.6 (C=OOME), 150.2 (COOBu<sup>t</sup>), 144.4 (C<sub>tosyl</sub>), 136.5 (C<sub>tosyl</sub>), 129.1 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.3 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 85.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 61.8 (CH<sub>2</sub>prop), 59.9 (CH<sub>prop</sub>),



52.4 (OCH<sub>3</sub>), 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.5 (CH<sub>3</sub>tosyl); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>7</sub>S (M + H)<sup>+</sup> 374.1273, found 374.1278.

(**18b**): White solid (282 mg, 0.874 mmol), yield 92%, mp: 119 - 120°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.94 – 7.90 (m, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 7.33 – 7.30 (m, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 5.19 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 4.32 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.6 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.95 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.4 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 1.31 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 169.7 (COOEt), 150.6 (COOBu<sup>t</sup>), 144.9 (C<sub>tosyl</sub>), 137.1 (C<sub>tosyl</sub>), 129.5 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.8 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 85.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.2 (CH<sub>2</sub>prop), 60.3 (CH<sub>prop</sub>), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.1 (CH<sub>3</sub>tosyl), 14.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>7</sub>S (M + H)<sup>+</sup> 388.1430, found 388.1444.

### **Synthesis and characterization of 6-bromopurines 3a, 4a, 6a, and 7a**

For the preparation of these compounds the general synthetic procedure of halopurine derivatives is followed.

#### *2-(2-(6-Bromo-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (3a)*

Yellow solid (120 mg, 0.232 mmol), yield 75%, mp: 192 - 193°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.69 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.98 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.77 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 7.44 – 7.31 (m, 2H, H<sub>tosyl</sub>), 7.12 – 7.01 (m, 3H, 2xH<sub>tosyl</sub>, H<sub>benz</sub>), 6.93 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.3 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 6.77 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 4.54 – 4.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.19 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.3 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.36 – 3.32 (m, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 3.21 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.7 Hz, 1H, H<sub>oxazine</sub>), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 2.30 – 2.26 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.10 – 1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 151.8 (CH<sub>purine</sub>), 150.4 (C<sub>purine</sub>), 145.9 (C<sub>benz</sub>), 145.0 (CH<sub>purine</sub>), 144.5 (C<sub>tosyl</sub>), 143.1 (C<sub>purine</sub>), 135.2 (C<sub>tosyl</sub>), 134.1

(C<sub>purine</sub>), 129.6 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 126.8 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 126.2 (CH<sub>benz</sub>), 124.1 (CH<sub>benz</sub>), 123.4 (C<sub>benz</sub>), 121.3 (CH<sub>benz</sub>), 117.2 (CH<sub>benz</sub>), 68.3 (CH<sub>oxazine</sub>), 48.1 (CH<sub>2oxazine</sub>), 40.3 (CH<sub>2N</sub>), 31.7 (CH<sub>2CH<sub>2</sub>N</sub>), 21.6 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>SBr (M + H)<sup>+</sup> 514.0548, found 514.0565. Anal. calc. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>SBr: C, 51.37; H, 3.92; N, 13.61. Found: C, 51.35; H, 3.90; N, 13.63.

*3-((6-Bromo-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline*  
**(4a)**

White solid (115 mg, 0.23 mmol), yield 73%, mp: 204 - 205°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 8.76 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.70 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H<sub>benz</sub>), 7.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.21 – 7.12 (m, 3H, 2xH<sub>tosyl</sub>, H<sub>benz</sub>), 7.07 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, 2xH<sub>benz</sub>), 4.26 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 2H, CH<sub>2N</sub>), 4.05 (dd, *J*<sub>1</sub> = 13.5, *J*<sub>2</sub> = 4.0 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 3.35 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz, 2H, 2xH<sub>pyr</sub>) 2.55 (dd, *J*<sub>1</sub> = 16.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz, 1H, H<sub>pyr</sub>), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 2.15 – 2.04 (m, 1H, H<sub>pyr</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 151.8 (CH<sub>purine</sub>), 150.9 (C<sub>purine</sub>), 147.6 (CH<sub>purine</sub>), 144.0 (C<sub>tosyl</sub>), 142.0 (C<sub>purine</sub>), 136.0 (C<sub>benz</sub>), 135.7 (C<sub>tosyl</sub>), 133.6 (C<sub>purine</sub>), 129.9 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 129.7 (CH<sub>benz</sub>), 128.8 (C<sub>benz</sub>), 126.7 (CH<sub>benz</sub>), 126.6 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 125.1 (CH<sub>benz</sub>), 123.5 (CH<sub>benz</sub>), 48.5 (CH<sub>2pyr</sub>), 46.1 (CH<sub>2N</sub>), 32.6 (CH<sub>pyr</sub>), 30.3 (CH<sub>2pyr</sub>), 21.1 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SBr (M + H)<sup>+</sup> 498.0599, found 498.0619. Anal. calc. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SBr: C, 53.02; H, 4.04; N, 14.05. Found: C, 53.05; H, 4.01; N, 14.02.

*Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-bromo-9H-purine-9-yl)propanoate (6a)*

White solid (139 mg, 0.251 mmol), yield 81%; mp: 160 - 161°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.56 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.19 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 5.54 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 4.98 – 4.93 (m, 2H, H<sub>prop</sub>), 3.78

(s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 1.30 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 168.0 (COOMe), 151.9 (C<sub>purine</sub>), 151.0 (CH<sub>purine</sub>), 149.9 (COOBu<sup>t</sup>), 145.6 (CH<sub>purine</sub>), 144.9 (C<sub>tosyl</sub>), 143.0 (C<sub>purine</sub>), 135.7 (C<sub>tosyl</sub>), 134.1 (C<sub>purine</sub>), 129.1(2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.1 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 86.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 58.2 (CH<sub>prop</sub>), 53.1 (OCH<sub>3</sub>), 43.5 (CH<sub>2prop</sub>), 27.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>tosyl); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SBr (M + H)<sup>+</sup> 554.0709, found 554.0728. Anal. calc. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SBr: C, 45.49; H, 4.36; N, 12.63. Found: C, 45.51; H, 4.34; N, 12.61.

*Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-bromo-9H-purine-9-yl)propanoate (7a)*

White solid (140 mg, 0.248 mmol), yield 80%, mp: 171 - 172°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.63 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 8.19 (s, 1H, H<sub>purine</sub>), 7.60 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 7.19 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 2xH<sub>tosyl</sub>), 5.55 (dd, J<sub>1</sub> = 9.3 Hz, J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 5.04 (dd, J<sub>1</sub> = 14.7 Hz, J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 4.95 (dd, J<sub>1</sub> = 14.7 Hz, J<sub>2</sub> = 9.3 Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 4.28 (q, J = 7.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>tosyl), 1.33 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>), 1.27 (t, J = 7.4 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 167.6 (COOEt), 152.1 (CH<sub>purine</sub>), 151.1 (C<sub>purine</sub>), 150.1 (COOBu<sup>t</sup>), 145.6 (CH<sub>purine</sub>), 145.0 (C<sub>tosyl</sub>), 143.3 (C<sub>purine</sub>), 136.0 (C<sub>tosyl</sub>), 134.3 (C<sub>purine</sub>), 129.2 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.3 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 86.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 58.4 (CH<sub>prop</sub>), 43.7 (CH<sub>2prop</sub>), 27.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.8 (CH<sub>3</sub>tosyl), 14.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SBr (M + H)<sup>+</sup> 568.0865, found 568.0867; Anal. calc. for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SBr: C, 46.49; H, 4.61; N, 12.32. Found: C, 46.51; H, 4.60; N, 12.34.

**Synthesis and characterization of 6-trifluoromethylpurines 3d, 4d, 6d and 7d**

A mixture of FSO<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me (MFSDA, 32μl, 0.25 mmol), CuI (32 mg, 0.17 mmol), HMPA (30.5 μl, 0.175 mmol) and the appropriate bromopurines (**3a**,

**4a, 6a and 7a**) (0.14 mmol) in anhydrous DMF was stirred for 13h at 70°C. After this time, the reaction was cooled, dissolved in EtOAc/hexane (7:3), washed with sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl, sat. aq. NaHCO<sub>3</sub>, water and brine, dried, filtered and the solvent was evaporated off. The residue was purified by flash chromatography using EtOAc/hexane as eluent.

*2-(2-(6-Trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (3d)*

(EtOAc/hexane, 1:1), white solid, (47 mg, 0.094 mmol), yield 67%, mp: 178 - 179°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 9.08 (s, 1H, CH<sub>purine</sub>), 8.13 (s, 1H, CH<sub>purine</sub>), 7.76 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, 1H, CH<sub>benz</sub>), 7.46 – 7.35 (m, 2H, 2xCH<sub>tosyl</sub>), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2xCH<sub>tosyl</sub>), 7.08 – 7.03 (m, 1H, CH<sub>purine</sub>), 6.95 – 6.90 (m, 1H, CH<sub>purine</sub>), 6.74 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5 Hz, 1H, CH<sub>purine</sub>), 4.55 – 4.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.20 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2oxazine</sub>), 3.46 – 3.42 (m, 1H, CH<sub>oxazine</sub>), 3.23 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.6 Hz, 1H, CH<sub>2oxazine</sub>), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 2.30 – 2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.13 – 2.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 153.6 (C<sub>purine</sub>), 152.4 (C<sub>purine</sub>), 151.8 (CH<sub>purine</sub>), 145.8 (C<sub>benz</sub>), 145.2 (q, *J* = 37.1 Hz, C<sub>purine</sub>), 144.6 (C<sub>tosyl</sub>), 135.3 (C<sub>tosyl</sub>), 129.9 (C<sub>purine</sub>), 129.7 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 126.8 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 126.2 (CH<sub>benz</sub>), 124.0, (CH<sub>benz</sub>), 123.4 (C<sub>benz</sub>), 121.4 (CH<sub>benz</sub>), 120.69 (q, *J* = 274.9 Hz, CF<sub>3</sub>), 117.1 (CH<sub>benz</sub>), 68.6 (CH<sub>oxazine</sub>), 48.1 (CH<sub>2oxazine</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 31.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 21.4 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (*m/z*) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>SF<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 504.1317, found 504.1345. Anal. Calc. for C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>SF<sub>3</sub>: C, 54.87; H, 4.00; N, 13.91. Found: C, 54.86; H, 4.03; N, 13.94.

*3-((6-Trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (4d)*

(EtOAc/hexane, 1:1), yellowish solid, (41 mg, 0.105 mmol), yield 75%, mp: 195 - 196°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 9.08 (s, 1H, CH<sub>purine</sub>), 8.21

(s, 1H, CH<sub>purine</sub>), 7.72 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), CH<sub>benz</sub>, 7.40 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2xCH<sub>tosyl</sub>), 7.20 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, CH<sub>benz</sub>), 7.16 – 7.09 (m, 2H, 2xCH<sub>tosyl</sub>), 7.07 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, CH<sub>benz</sub>), 6.99 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, CH<sub>benz</sub>), 4.32 (dd,  $J_1 = 14.3$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz, 1H, CH<sub>2N</sub>), 4.21 (dd,  $J_1 = 14.4$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz, 1H, CH<sub>2N</sub>), 4.02 (dd,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 3.7$  Hz, 1H, CH<sub>2pyr</sub>), 3.48 (dd,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, CH<sub>2pyr</sub>), 2.61 (dd,  $J_1 = 15.9$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz, 1H, CH<sub>2pyr</sub>), 2.49 – 2.38 (m, 1H, CH<sub>pyr</sub>), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 2.31 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, CH<sub>2pyr</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 154.2 (C<sub>purine</sub>), 152.4 (CH<sub>purine</sub>), 147.9 (CH<sub>purine</sub>), 145.8 (q,  $J = 37.7$  Hz, C<sub>purine</sub>), 144.4 (C<sub>tosyl</sub>), 136.7 (C<sub>benz</sub>), 136.6 (C<sub>tosyl</sub>), 130.4 (C<sub>purine</sub>), 130.1 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 129.8 (CH<sub>benz</sub>), 127.6 (CH<sub>benz</sub>), 127.5 (C<sub>benz</sub>), 127.2 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 125.6 (CH<sub>benz</sub>), 124.3 (CH<sub>benz</sub>), 120.8 (q,  $J = 275.9$  Hz, CF<sub>3</sub>), 48.9 (CH<sub>2pyr</sub>), 47.0 (CH<sub>2N</sub>), 33.2 (CH<sub>pyr</sub>), 31.1 (CH<sub>2pyr</sub>), 21.9 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SF<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 488.1368, found 488.1415. Anal. Calc. for C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SF<sub>3</sub>: C, 56.67; H, 4.14; N, 14.37. Found: C, 56.65; H, 4.15; N, 14.40.

*Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)propanoate (6d)*

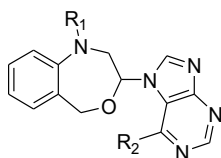
(EtOAc/hexane, 1:1), white solid, (41 mg, 0.075 mmol), yield 50%, mp: 156 – 157°C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm)  $\delta$  9.03 (s, 1H, CH<sub>purine</sub>), 8.36 (s, 1H, CH<sub>purine</sub>), 7.63 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, 2xCH<sub>tosyl</sub>), 7.19 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, 2xCH<sub>tosyl</sub>), 5.61 (dd,  $J_1 = 9.2$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 5.12 (dd,  $J_1 = 14.7$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 5.01 (dd,  $J_1 = 14.7$  Hz,  $J_2 = 9.2$  Hz, 1H, H<sub>prop</sub>), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3tosyl</sub>), 1.28 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 168.1 (COOMe), 154.3 (C<sub>purine</sub>), 152.1 (CH<sub>purine</sub>), 150.1 (COOBu<sup>t</sup>), 148.0 (CH<sub>purine</sub>), 145.3 (C<sub>tosyl</sub>), 145.1 (q,  $J = 37.2$  Hz, C<sub>purine</sub>), 135.9 (C<sub>tosyl</sub>), 130.1 (C<sub>purine</sub>), 129.3 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 128.4 (2xCH<sub>tosyl</sub>), 120.6 (q,  $J = 275.9$  Hz, CF<sub>3</sub>), 86.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 58.1 (CH<sub>prop</sub>), 53.3 (OCH<sub>3</sub>), 43.7 (CH<sub>2prop</sub>), 27.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.7 (CH<sub>3tosyl</sub>); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SF<sub>3</sub> (M + H)<sup>+</sup> 544.1478, found 544.1480. Anal. calc. for

$C_{22}H_{24}N_5O_6SF_3$ : C, 48.62; H, 4.45; N, 12.89. Found: C, 48.63; H, 4.42; N, 12.91.

*Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)propanoate (7d)*

(EtOAc/hexane, 1:1), white solid, (47 mg, 0.084 mmol), yield 61%, mp: 160 - 161°C;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 9.03 (s, 1H,  $CH_{\text{purine}}$ ), 8.36 (s, 1H,  $CH_{\text{purine}}$ ), 7.65 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $2xCH_{\text{tosyl}}$ ), 7.21 (t,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $2xCH_{\text{tosyl}}$ ), 5.57 (dd,  $J_1 = 9.0$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz, 1H,  $H_{\text{prop}}$ ), 5.07 – 5.03 (m, 2H,  $H_{\text{prop}}$ ), 4.29 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $OCH_2CH_3$ ), 2.41 (d,  $J = 8.9$  Hz, 3H,  $CH_{3\text{tosyl}}$ ), 1.30 (s, 9H,  $3xCH_3$ ), 1.27 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $OCH_2CH_3$ );  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 167.9 (COOEt), 154.7 ( $C_{\text{purine}}$ ), 152.4 ( $CH_{\text{purine}}$ ), 150.4 (COOBu<sup>t</sup>), 148.4 ( $CH_{\text{purine}}$ ), 145.2 (q,  $J = 37.4$  Hz,  $C_{\text{purine}}$ ), 144.9 ( $C_{\text{tosyl}}$ ), 136.3 ( $C_{\text{tosyl}}$ ), 130.4 ( $C_{\text{purine}}$ ), 129.5 ( $2xCH_{\text{tosyl}}$ ), 128.7 ( $2xCH_{\text{tosyl}}$ ), 120.6 (q,  $J = 275.9$  Hz,  $CF_3$ ), 86.7 ( $C(CH_3)_3$ ), 63.0 ( $OCH_2CH_3$ ), 58.5 ( $CH_{\text{prop}}$ ), 43.9 ( $CH_{2\text{prop}}$ ), 28.2 ( $C(CH_3)_3$ ), 22.0 ( $CH_{3\text{tosyl}}$ ), 14.4 ( $OCH_2CH_3$ ); HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $C_{23}H_{27}N_5O_6SF_3$  (M + H)<sup>+</sup> 558.1634, found 558.1634. Anal. calc. for  $C_{23}H_{26}N_5O_6SF_3$ : C, 49.55; H, 4.70; N, 12.56. Found: C, 49.57; H, 4.69; N, 12.56.

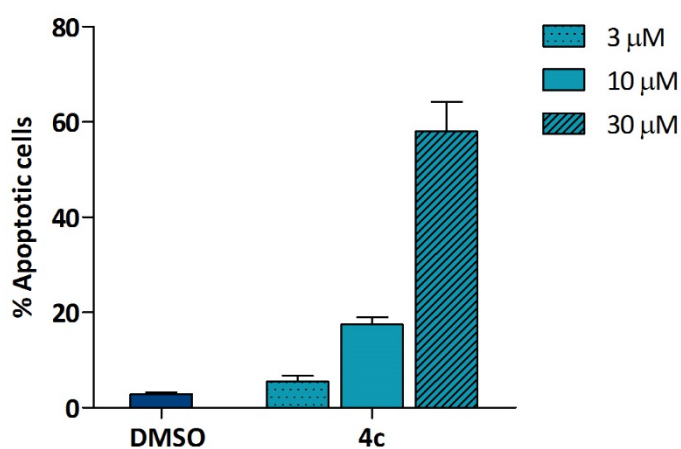
**Figure S.1. Chemical structure of benzoxazepine derivatives** [Díaz-Gavilán, M. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1457-1460 (2008)]



- a  $R_1 = SO_2-C_6H_4-oNO_2$ ,  $R_2 = SPh$   
 b  $R_1 = SO_2-C_6H_4-pNO_2$ ,  $R_2 = SPh$   
 c  $R_1 = H$ ,  $R_2 = SPh$

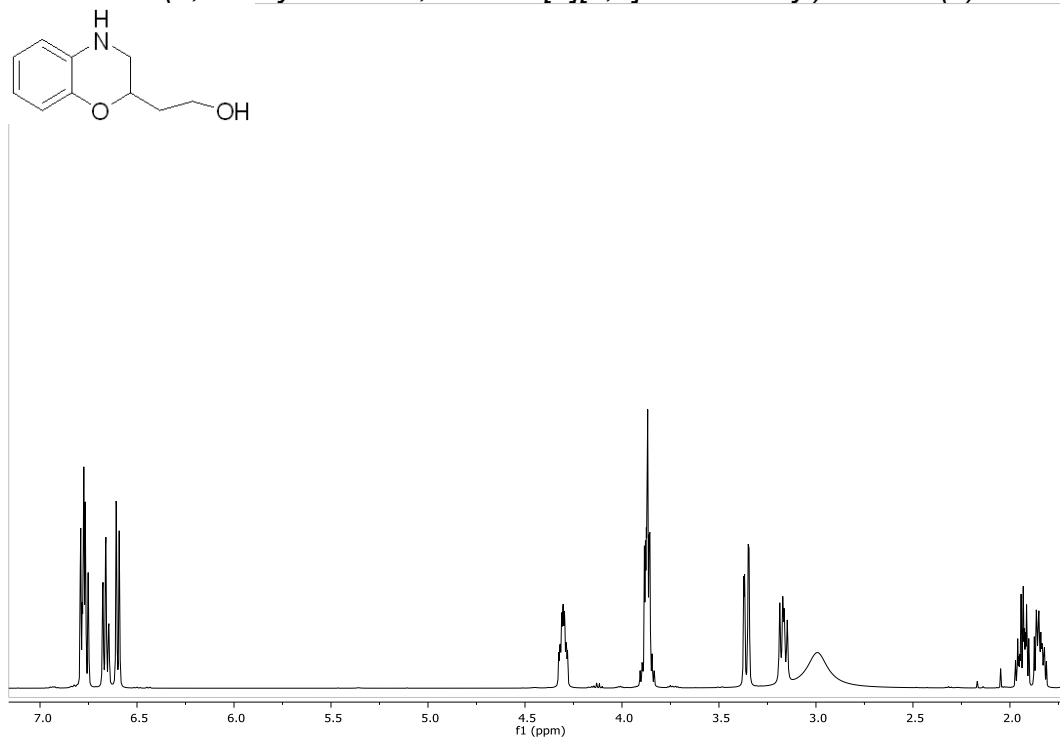
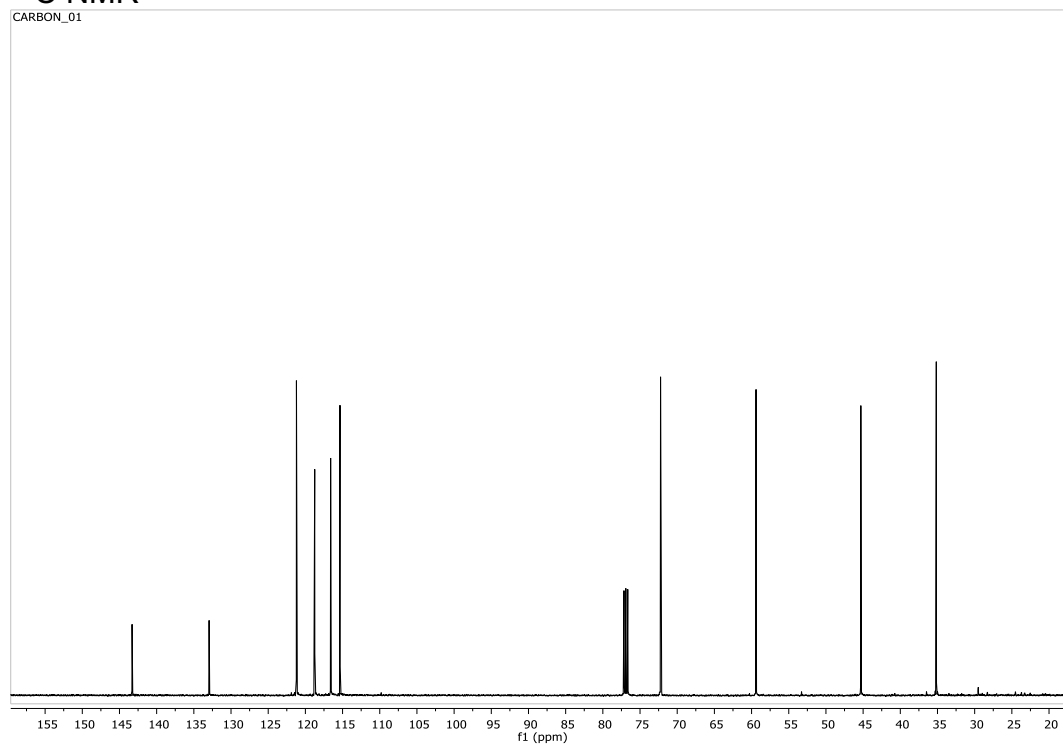
**Figure S.1.** Benzoxazepine derivatives previously published by our group.

**Figure S.2. Apoptosis after treatment with 4c at lower concentrations**



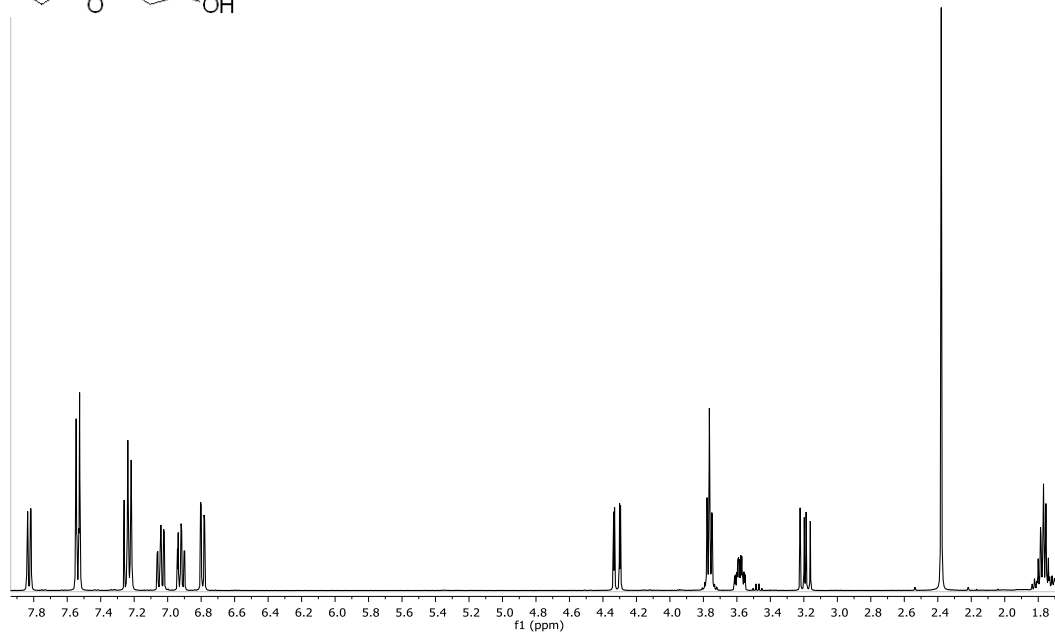
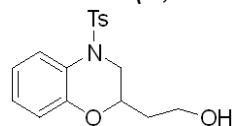
**Figure S.2.** Percentage of apoptotic cells after treatment with compound **4c** at 3, 10 and 30  $\mu\text{M}$ .

**Supplementary video:** two-day time-lapse motion picture of MCF-7 cell proliferation under treatment with 30  $\mu\text{M}$  of **4c** with Nucview488 (apoptosis fluorescent marker)

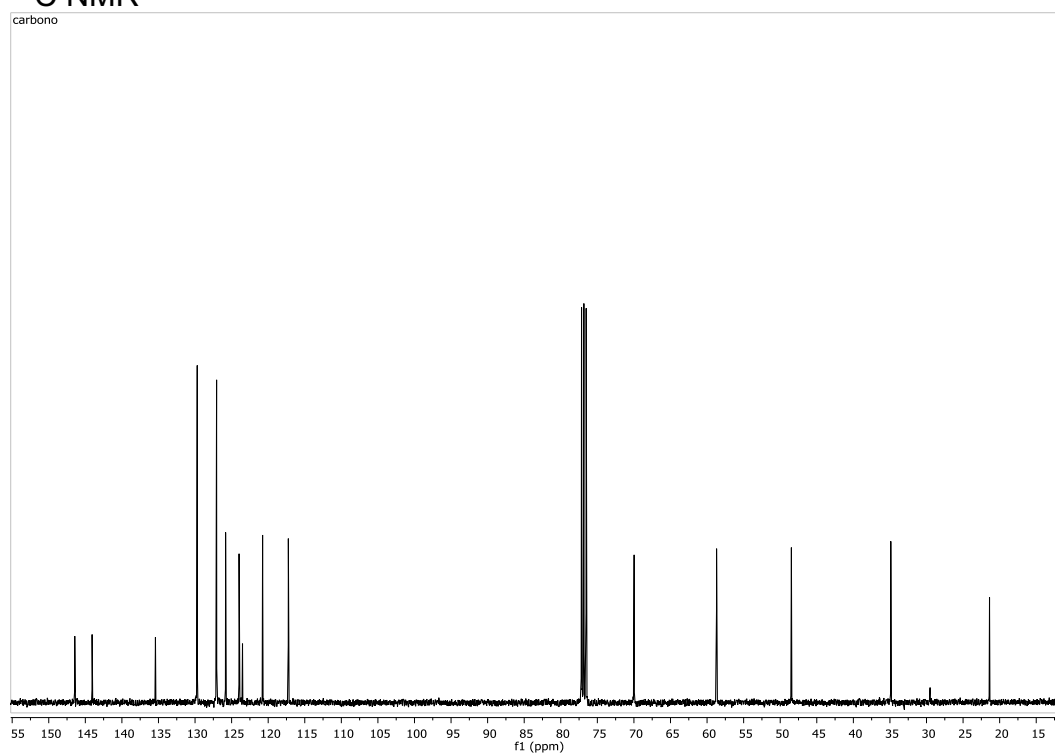
**$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -RMN spectra of intermediate derivatives** **$^1\text{H}$  NMR 2-(3,4-Dihydro-2H-1,4-benzo[b][1,4]oxazine-2-yl)ethanol (**8**)** **$^{13}\text{C}$  NMR**

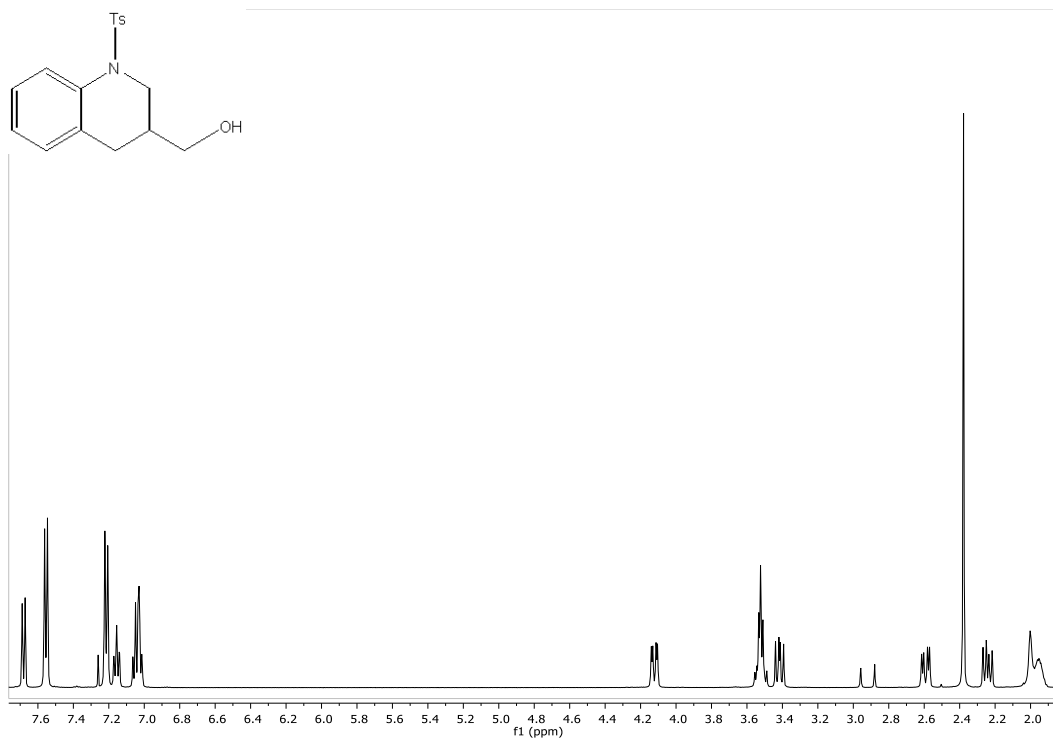
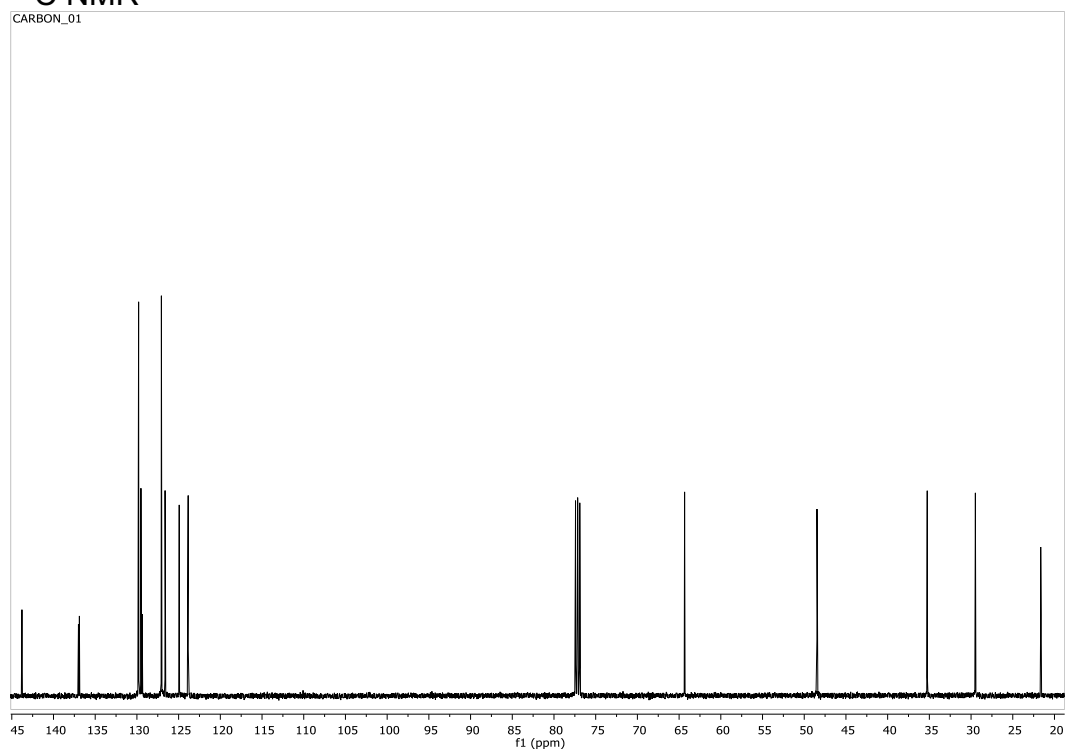


$^1\text{H}$  NMR (3,4-Dihydro-4-tosyl-2H-1,4-benzo[b][1,4]oxazine-2-yl)ethanol (9)

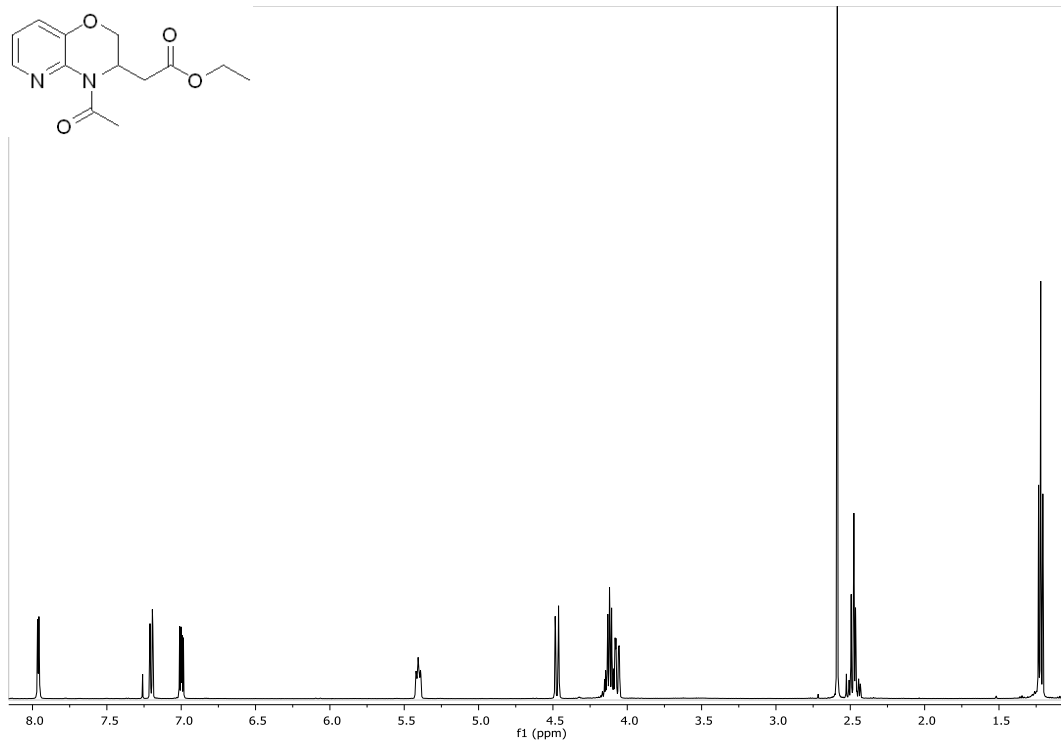


$^{13}\text{C}$  NMR

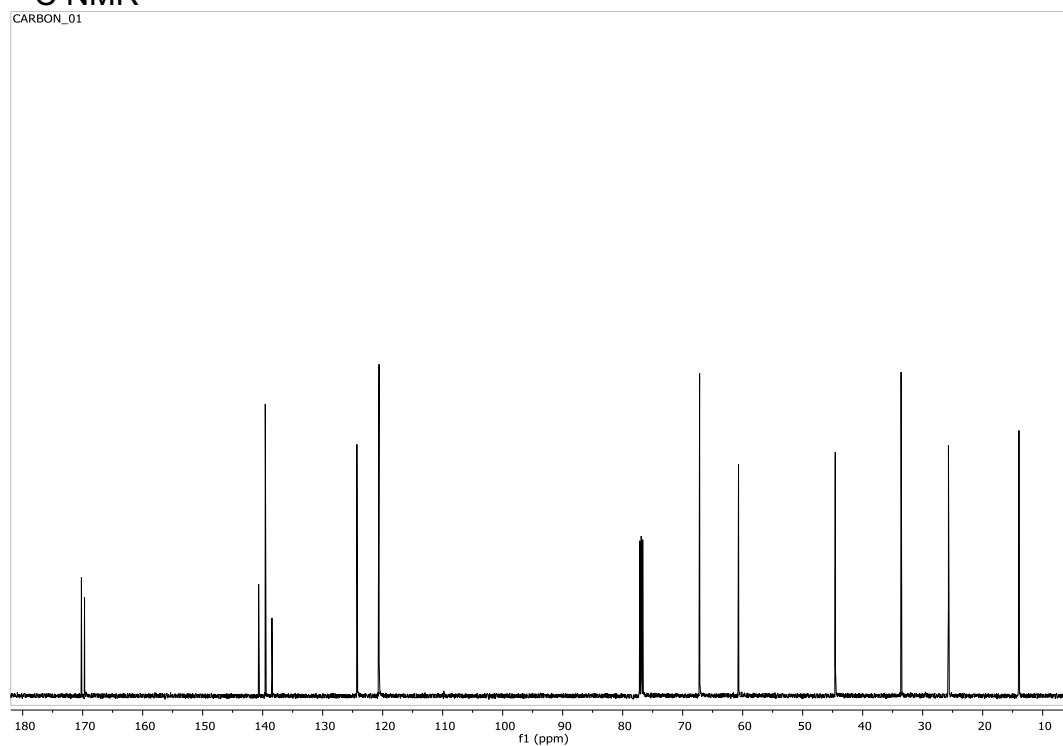


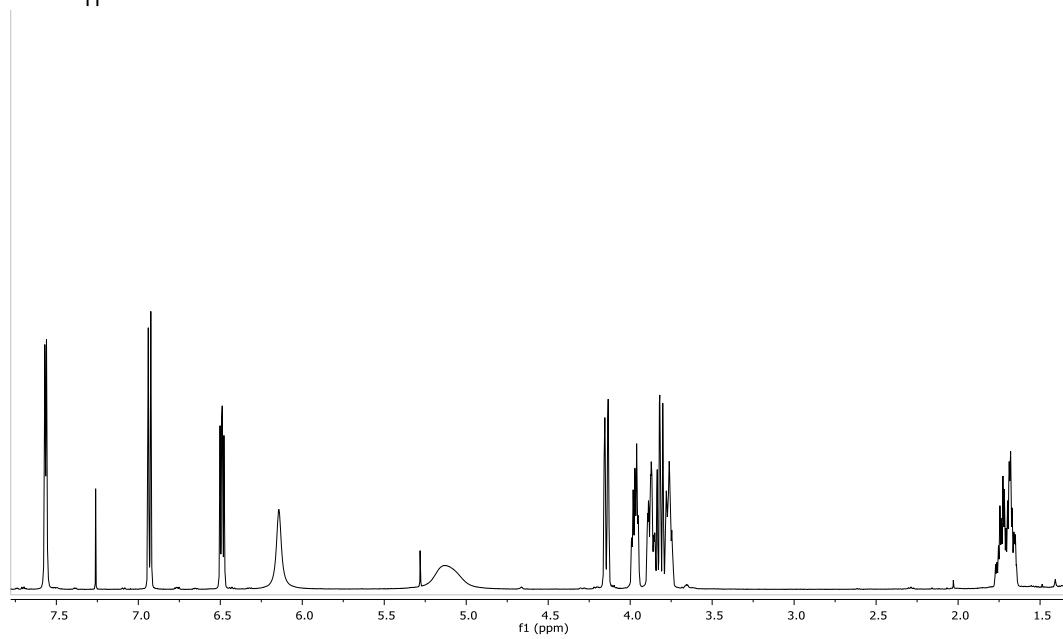
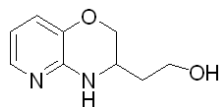
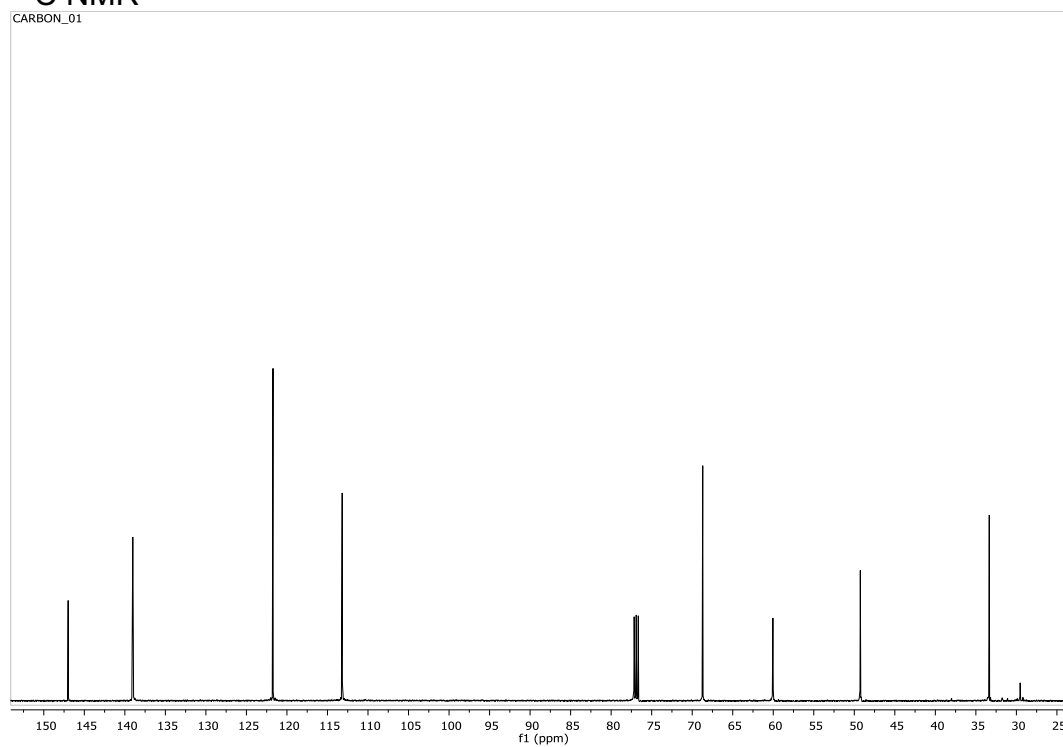
**<sup>1</sup>H NMR (1,2,3,4-Tetrahydro-1-tosylquinoline-3-yl)methanol (11)****<sup>13</sup>C NMR**

<sup>1</sup>H NMR Ethyl (4-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine-3-yl)acetate (**12**)

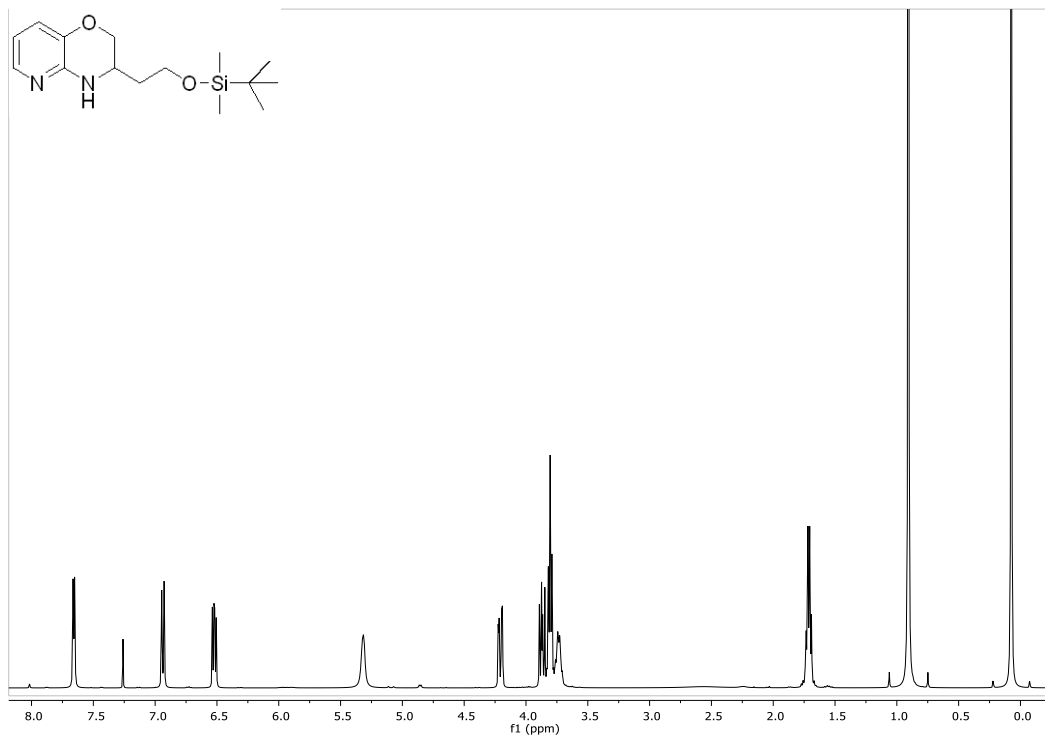


<sup>13</sup>C NMR

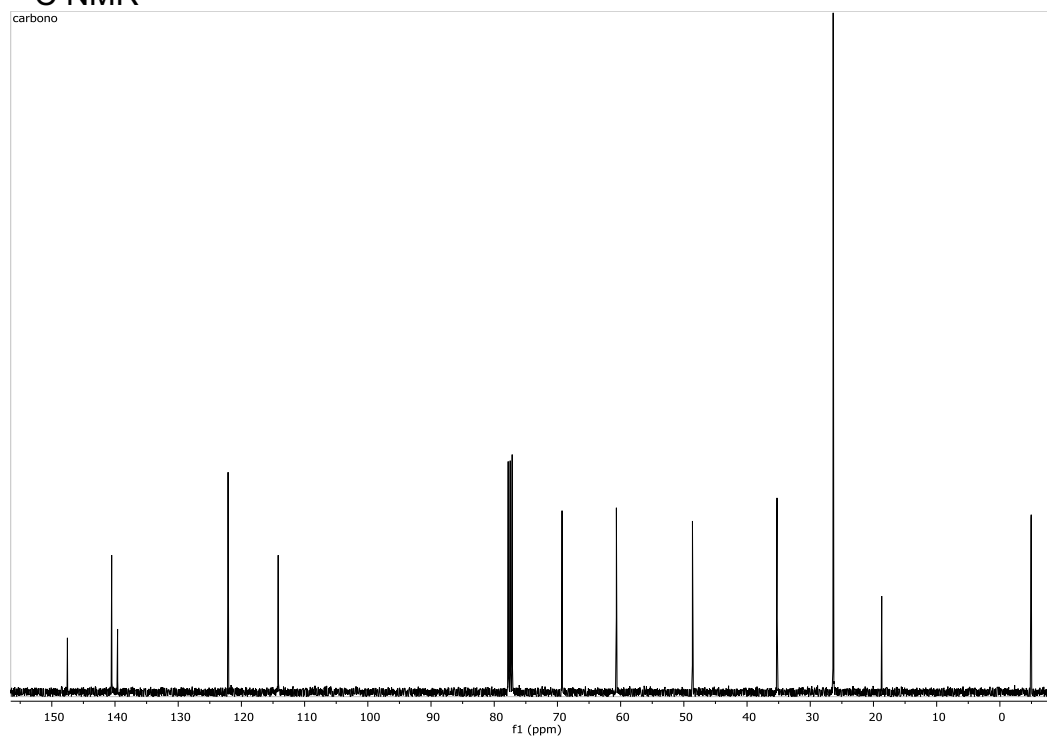


**<sup>1</sup>H NMR 2-(3,4-Dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine-3-yl)ethanol (13)****<sup>13</sup>C NMR**

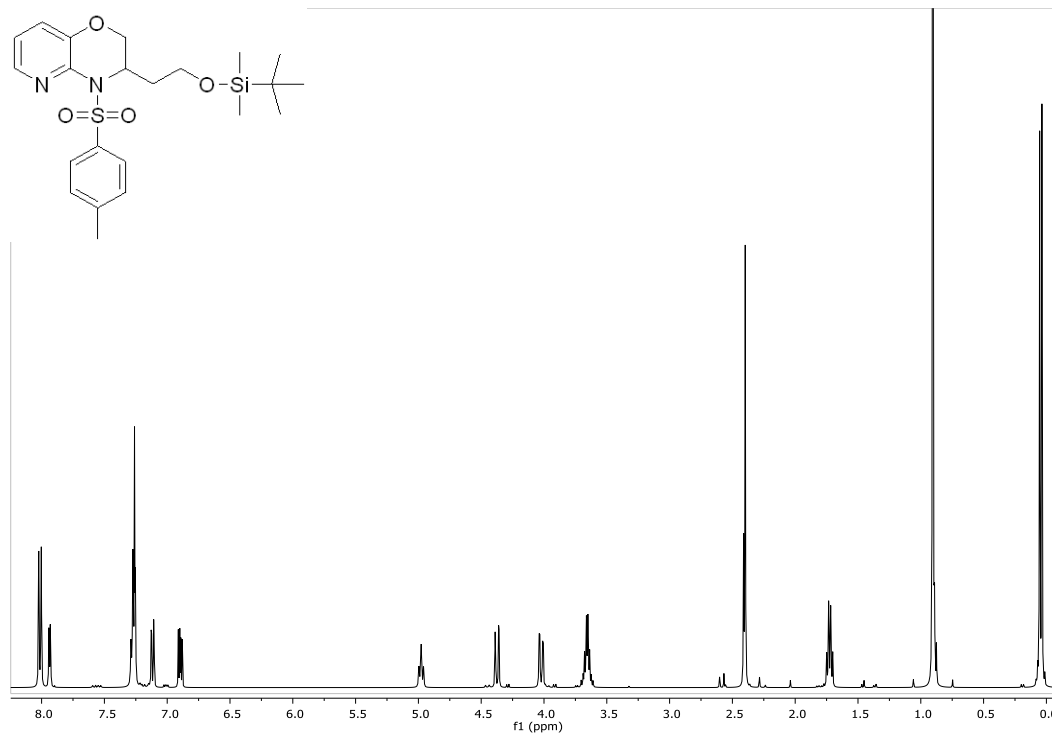
$^1\text{H}$  NMR 3-(((tert-Butyldimethyl)silyl)oxy)ethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine (**14**)



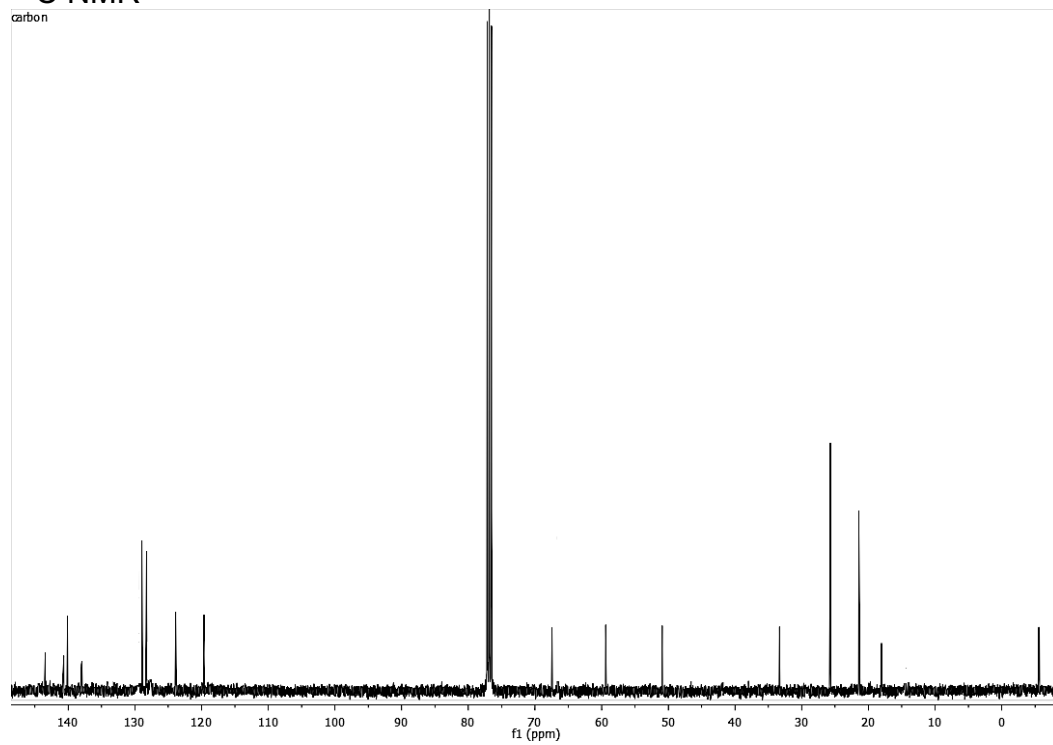
$^{13}\text{C}$  NMR



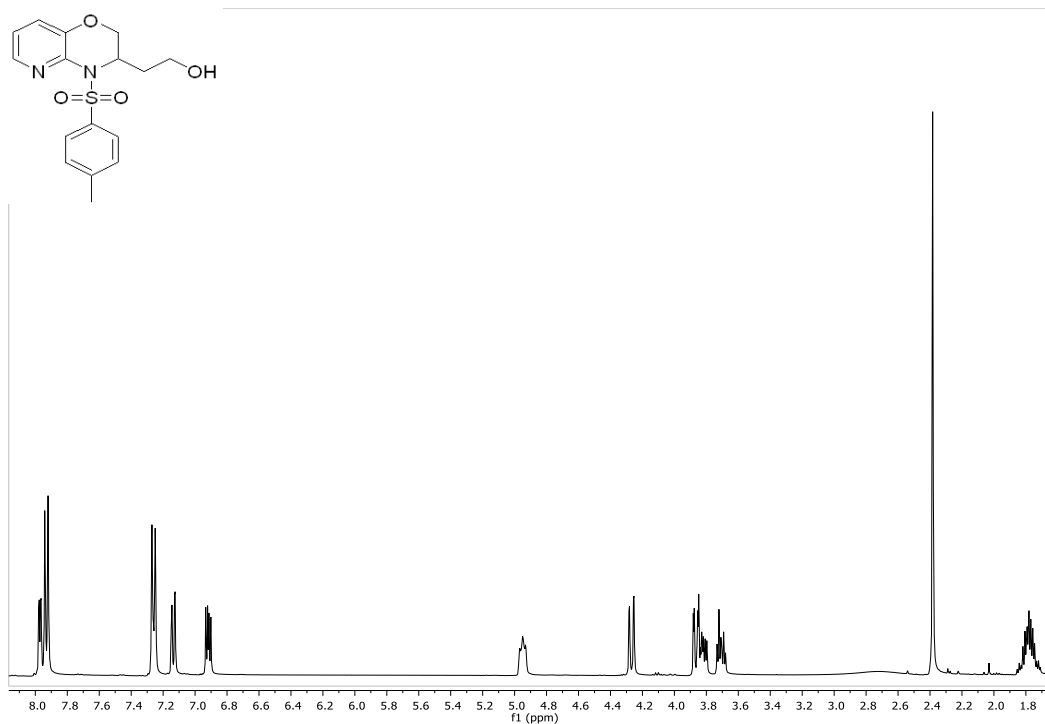
$^1\text{H}$  NMR 3-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-*b*][1,4]oxazine (**15**)



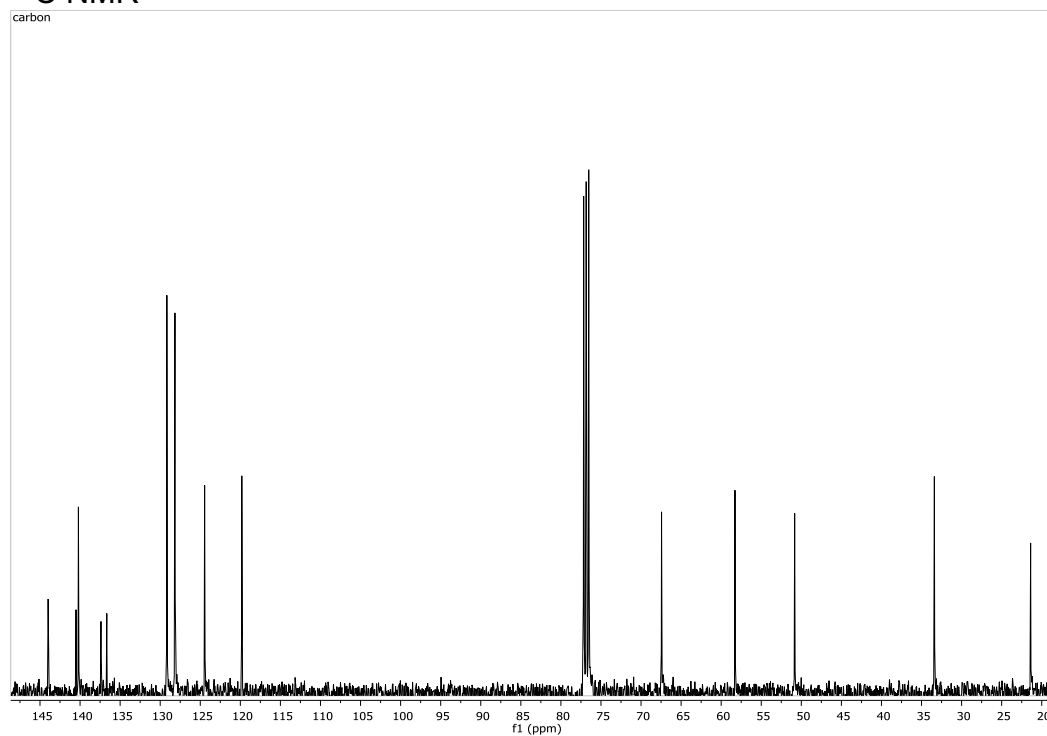
$^{13}\text{C}$  NMR



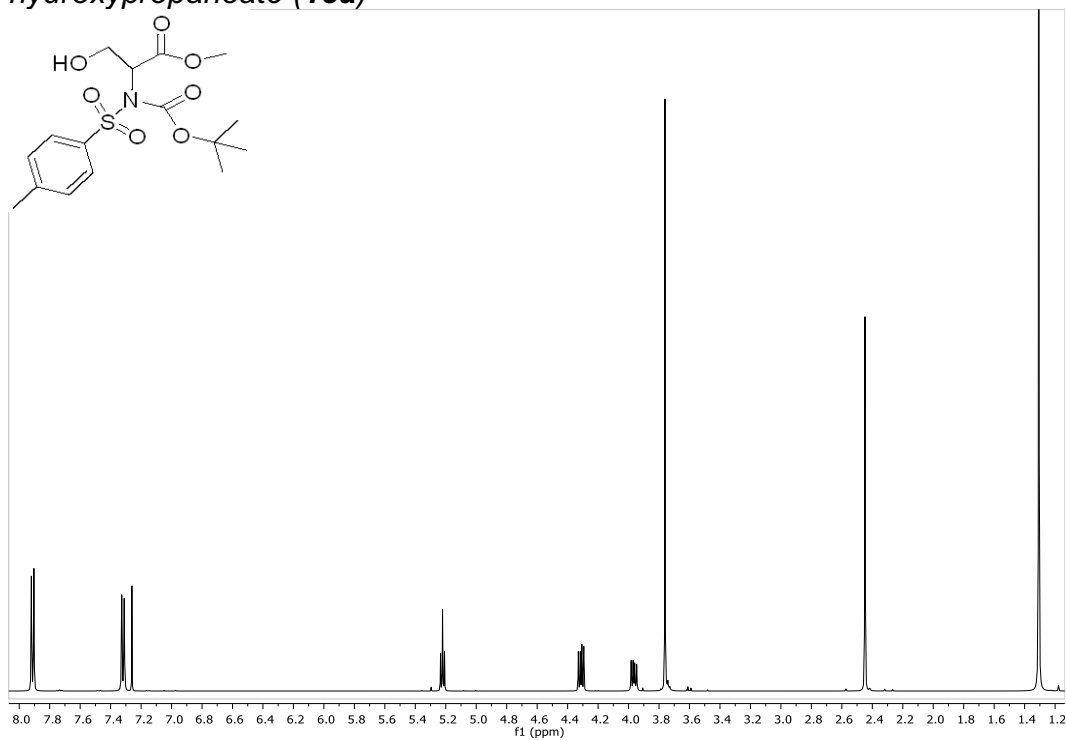
<sup>1</sup>H NMR 2-(4-Tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine-3-yl)ethanol  
(16)



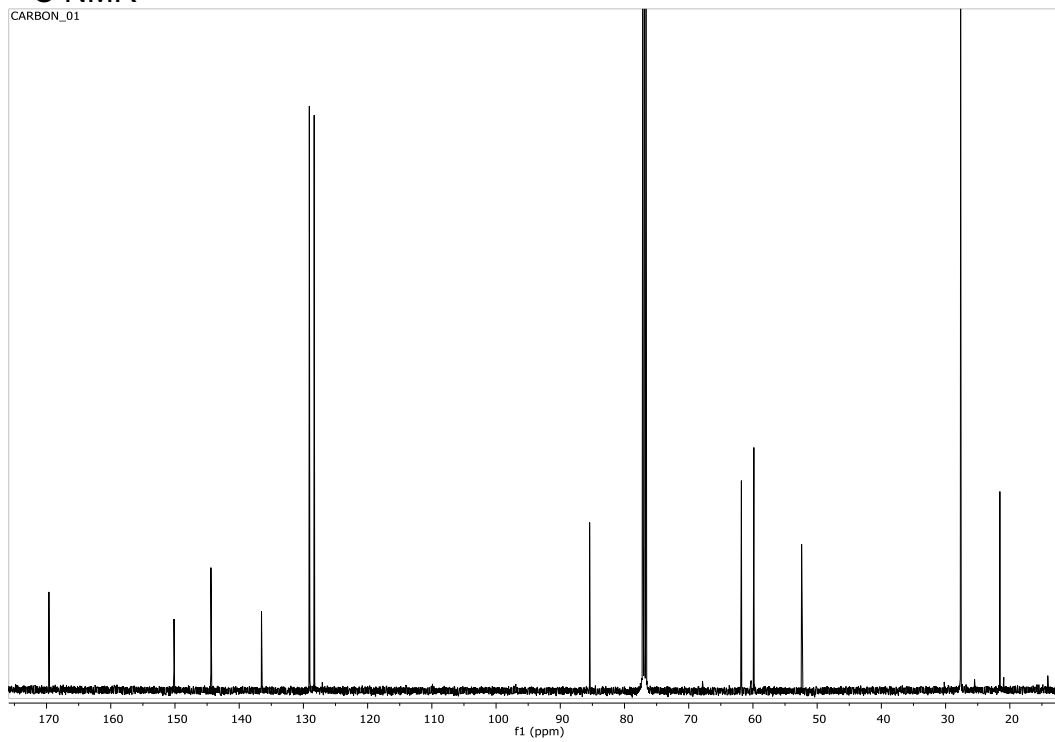
<sup>13</sup>C NMR



<sup>1</sup>H NMR Methyl 2-(N-(tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-hydroxypropanoate (**18a**)

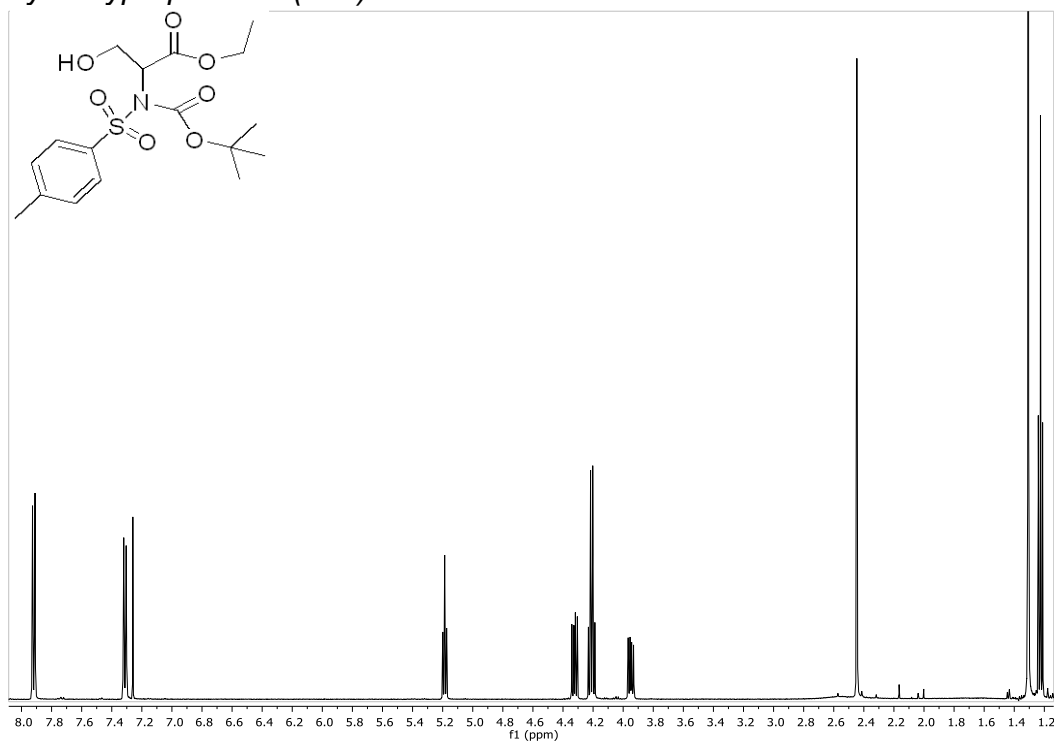


<sup>13</sup>C NMR

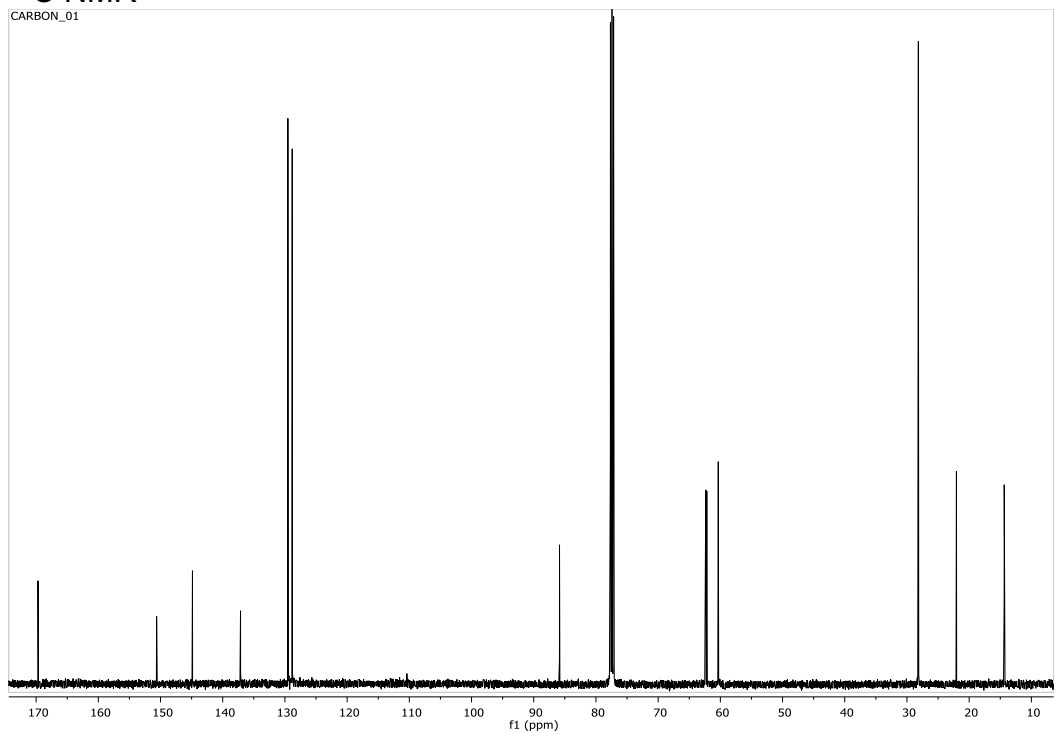




<sup>1</sup>H NMR Ethyl 2-(N-(tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-hydroxypropanoate (**18b**)

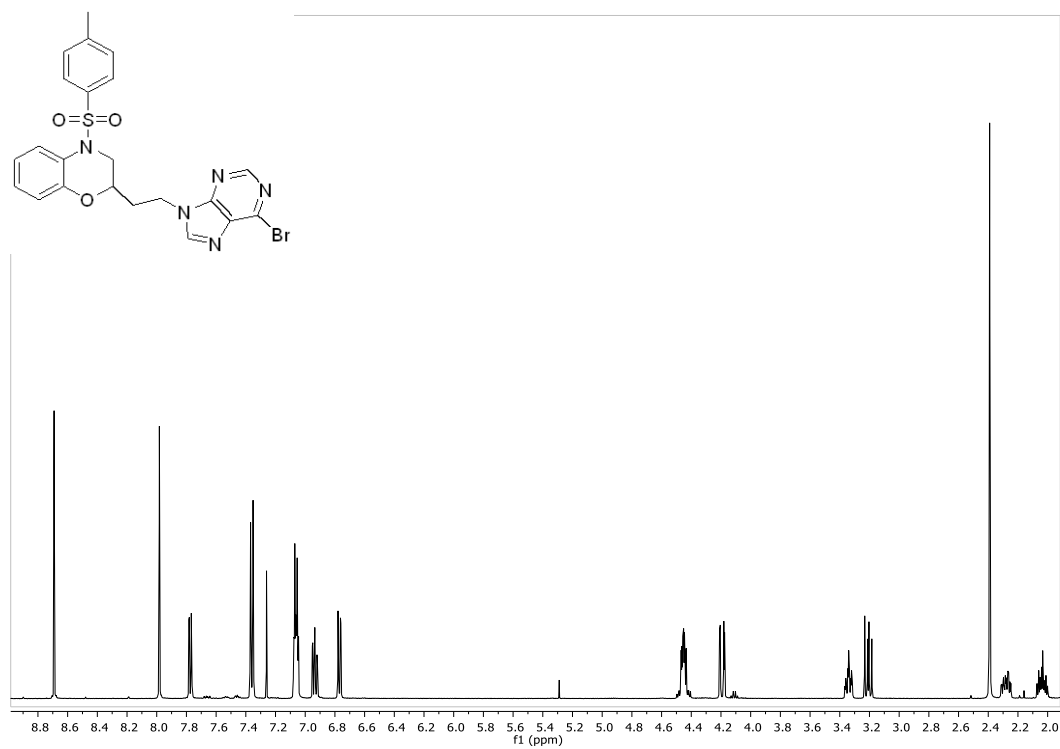
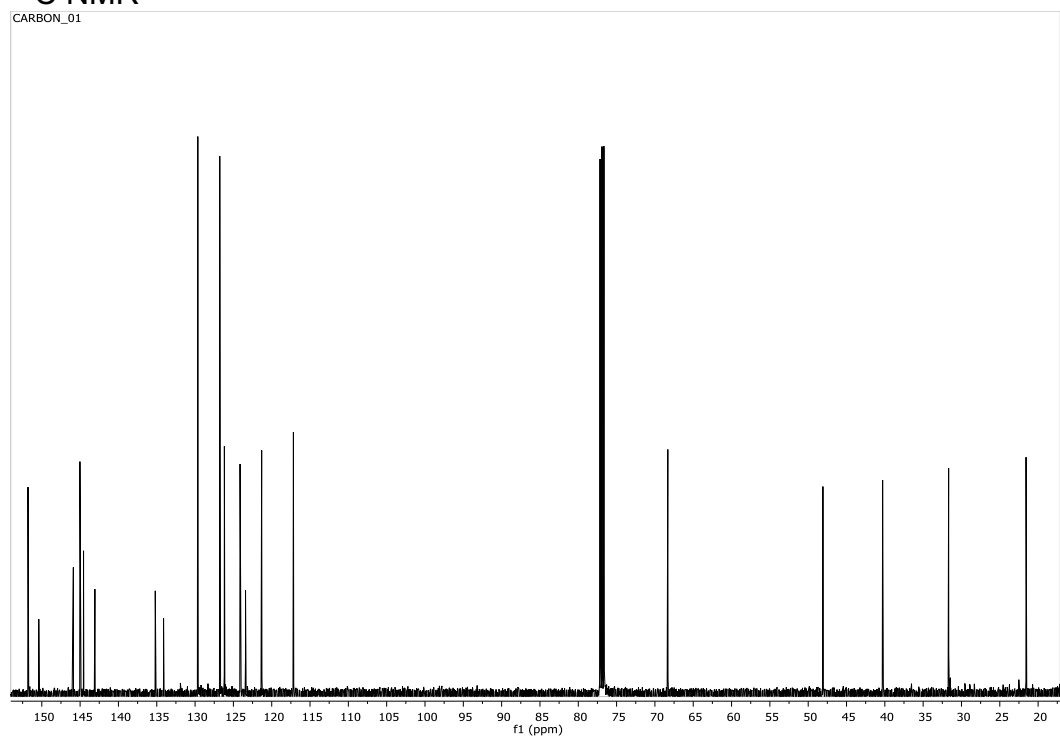


<sup>13</sup>C NMR

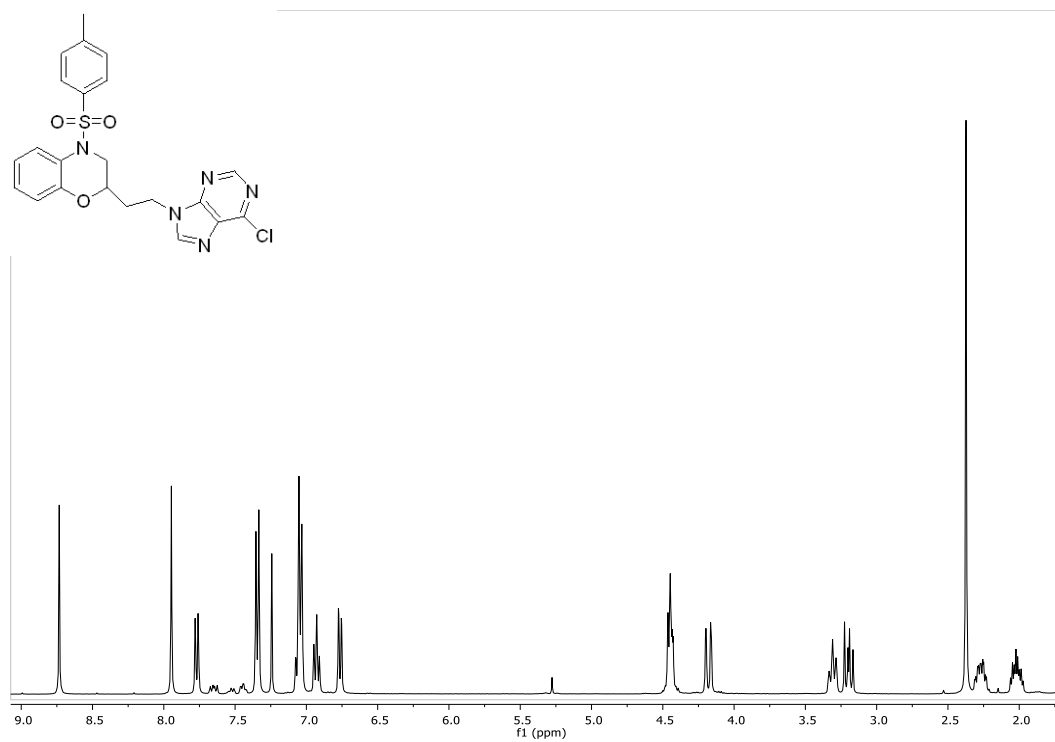


**$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -RMN spectra of 6-halo and 2,6-dihalopurines**

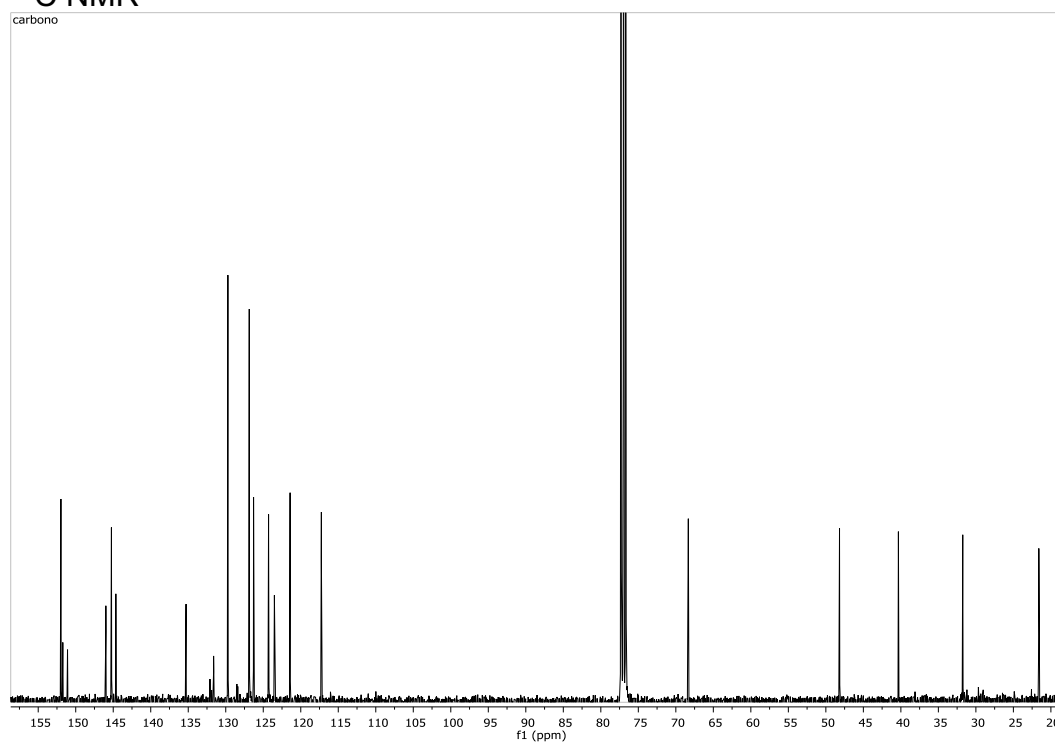
$^1\text{H}$  NMR 2-(2-(6-Bromo-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (3a)

 **$^{13}\text{C}$  NMR**

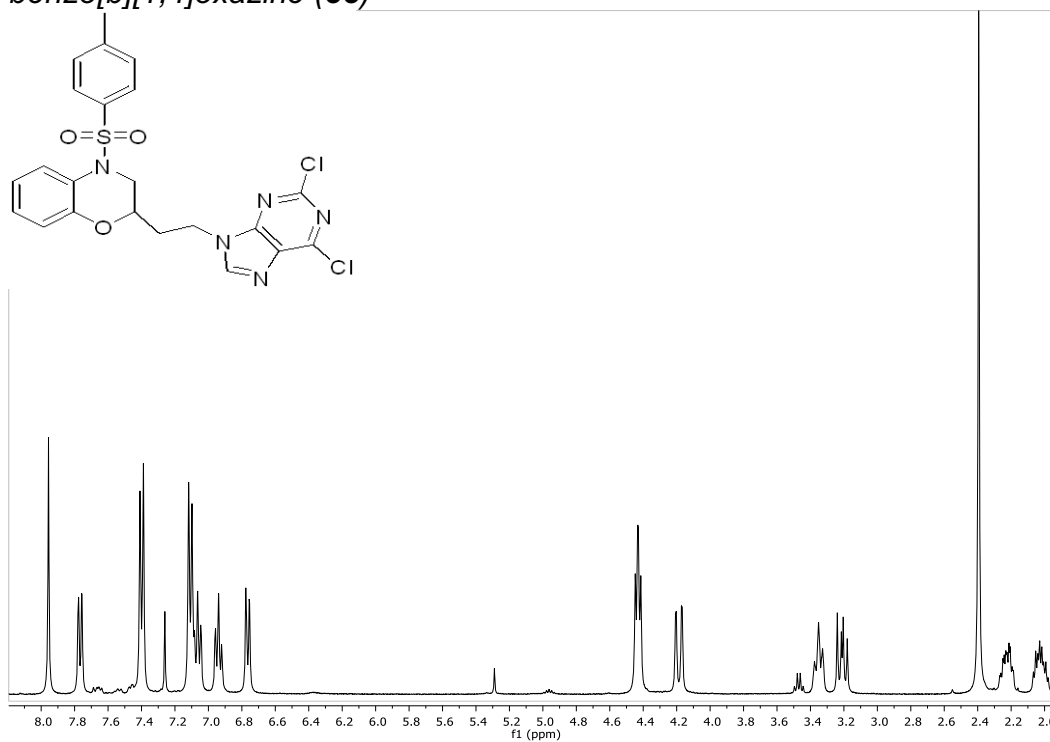
$^1\text{H}$  NMR 2-(2-(6-Chloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (**3b**)



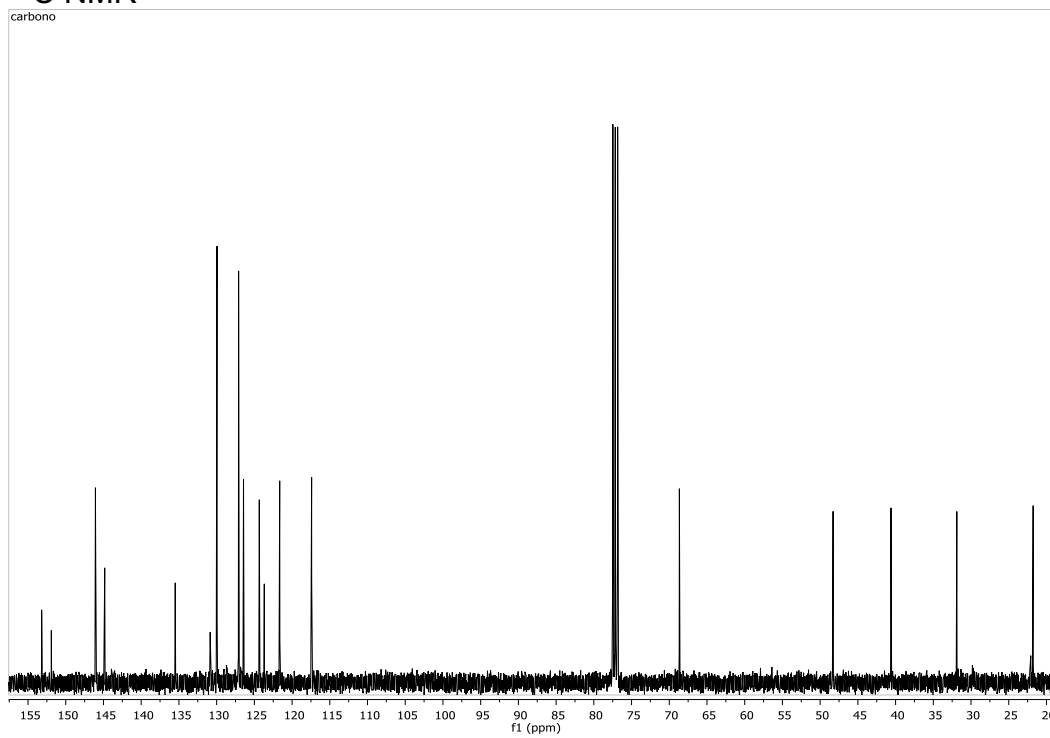
$^{13}\text{C}$  NMR



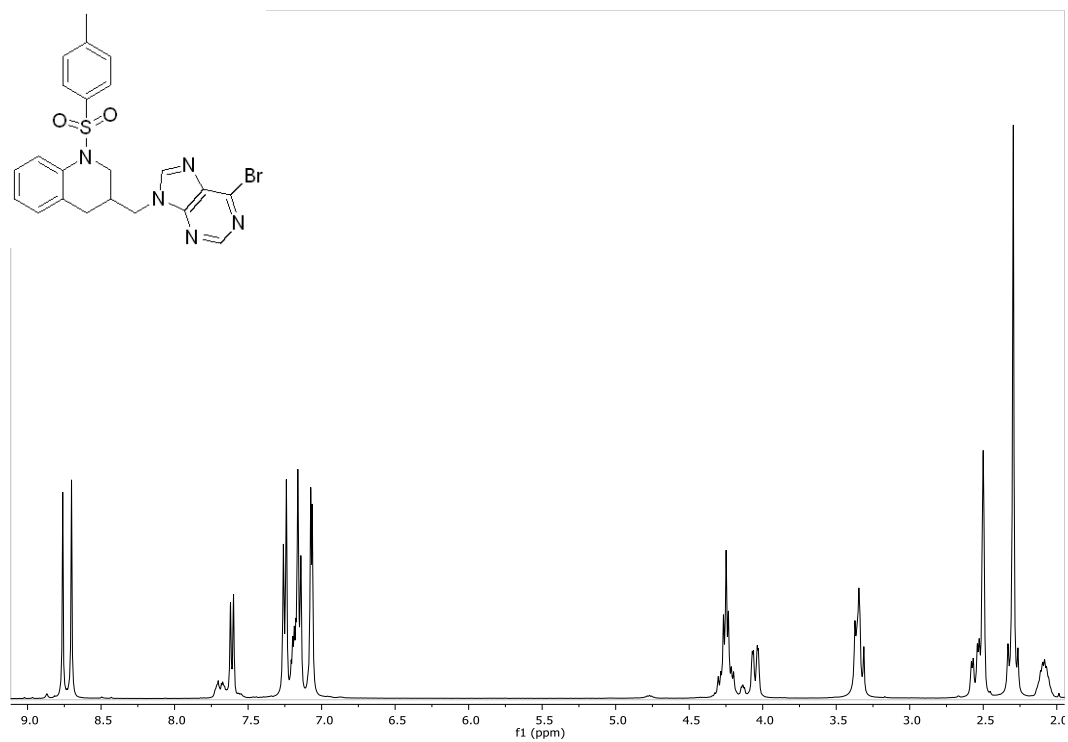
<sup>1</sup>H NMR 2-(2-(2,6-Dichloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (**3c**)



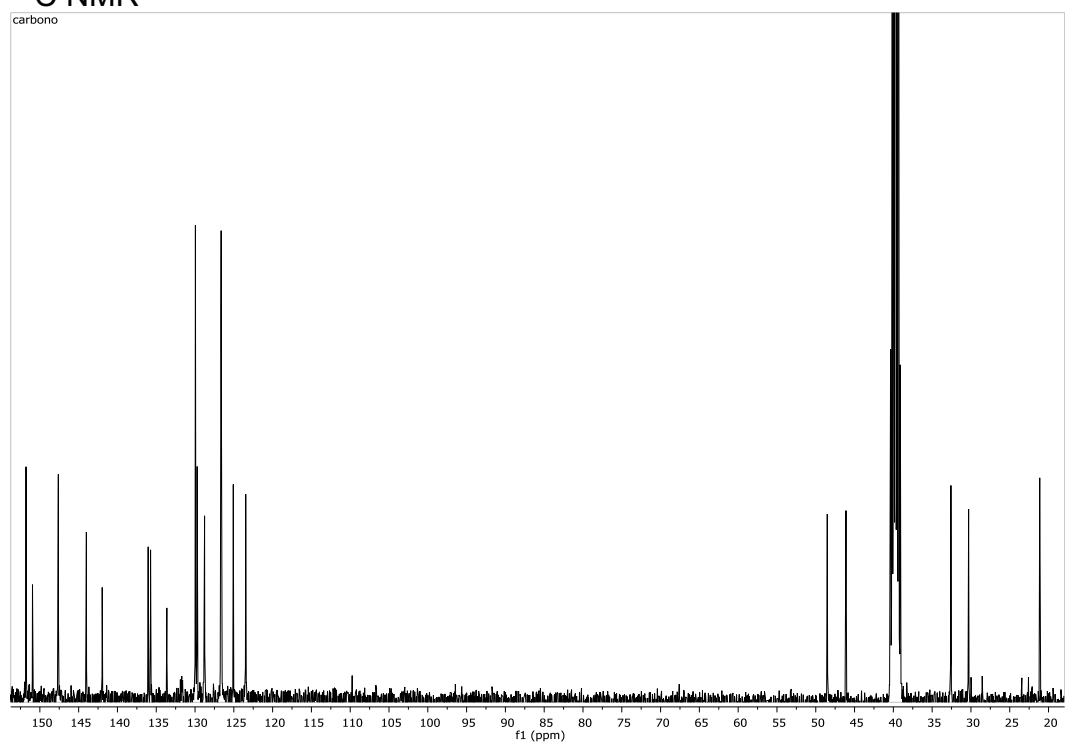
<sup>13</sup>C NMR



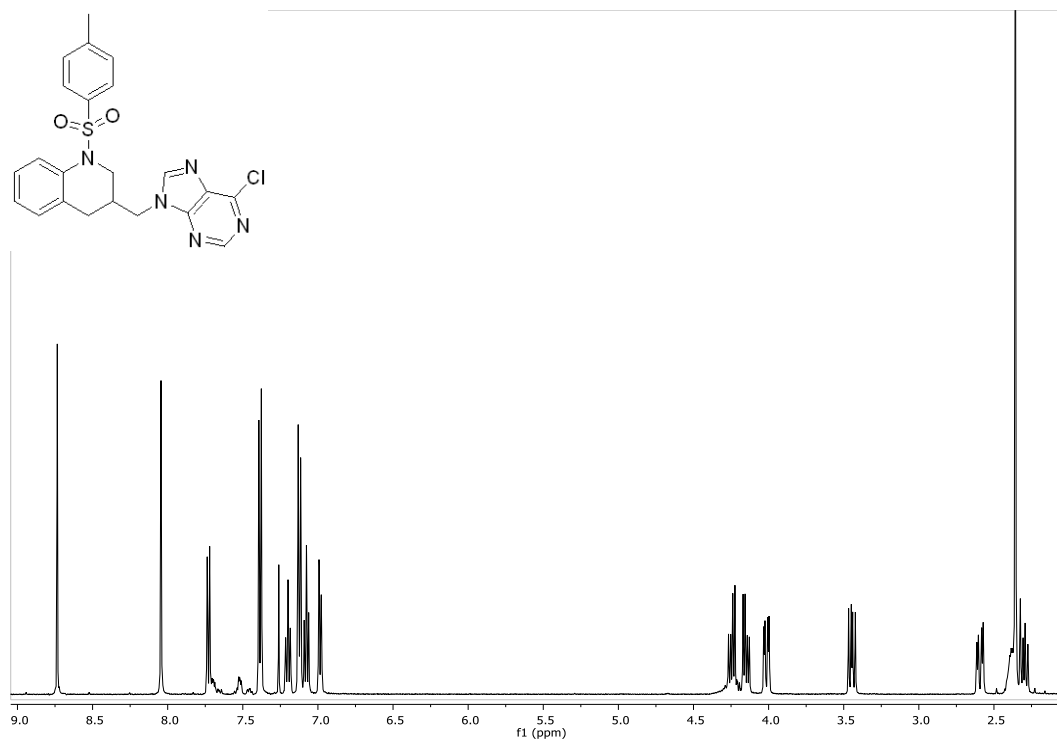
<sup>1</sup>H NMR 3-((6-Bromo-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**4a**)



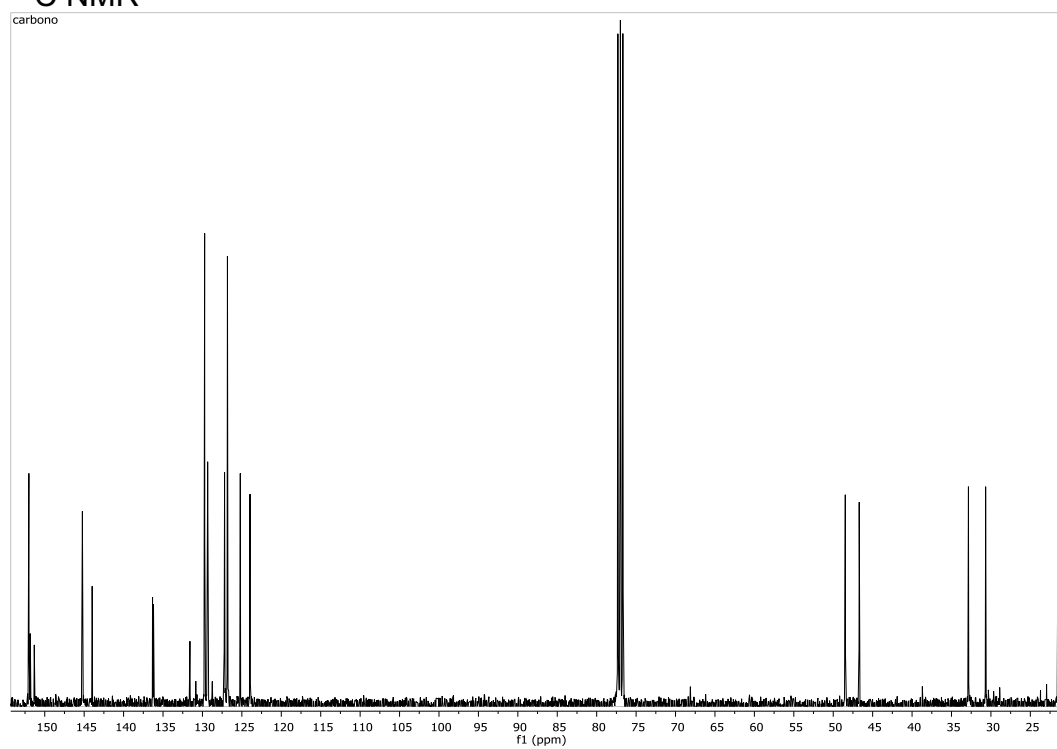
<sup>13</sup>C NMR



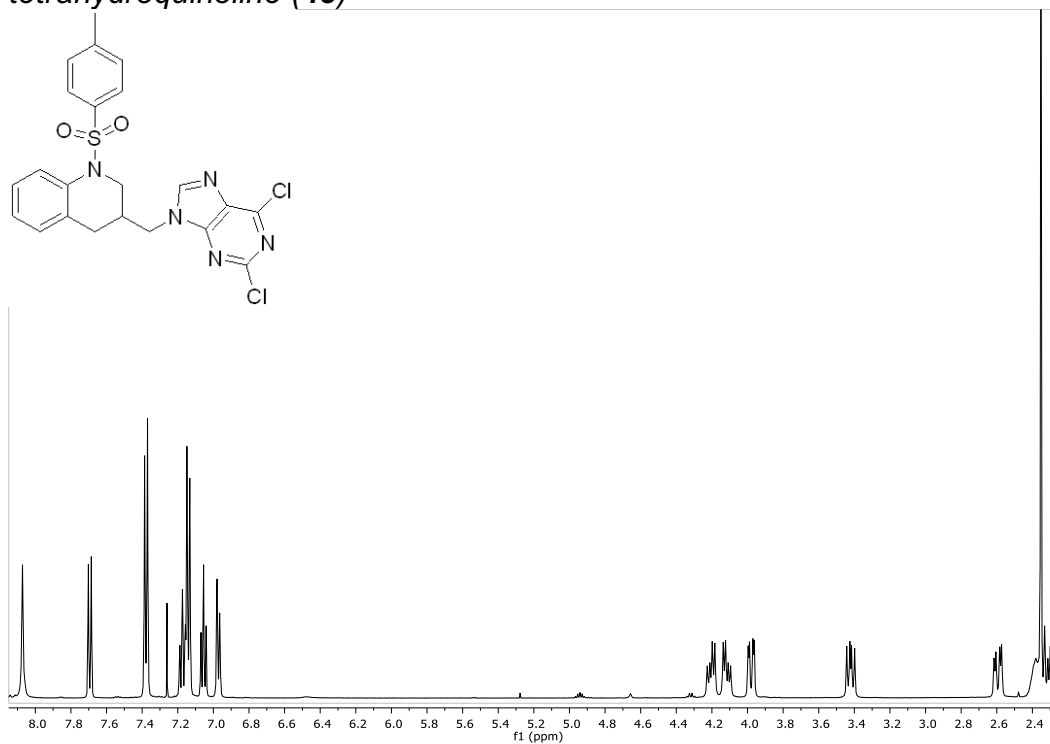
$^1\text{H}$  NMR 3-((6-Chloro-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**4b**)



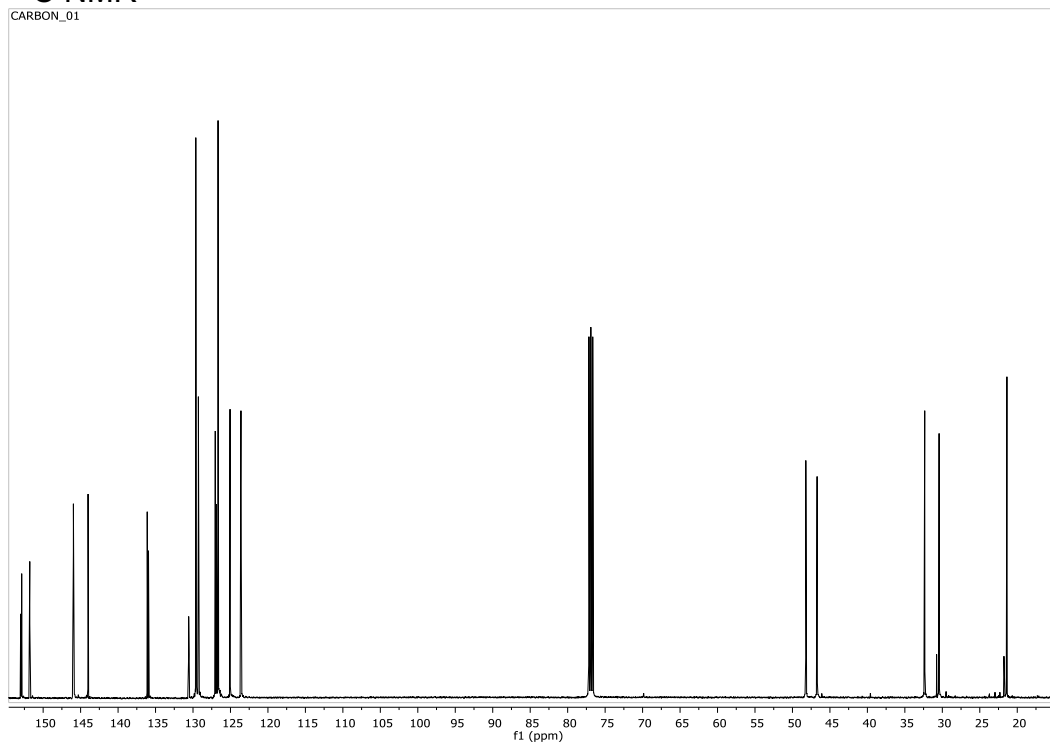
$^{13}\text{C}$  NMR



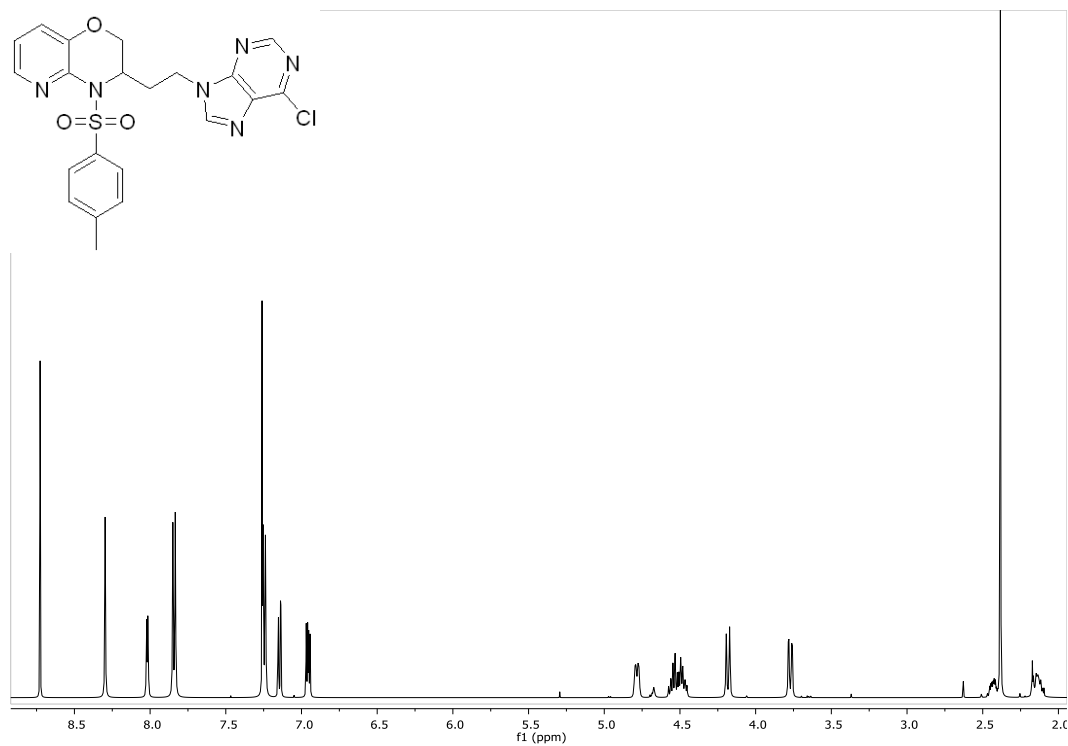
<sup>1</sup>H NMR 3-((2,6-Dichloro-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**4c**)



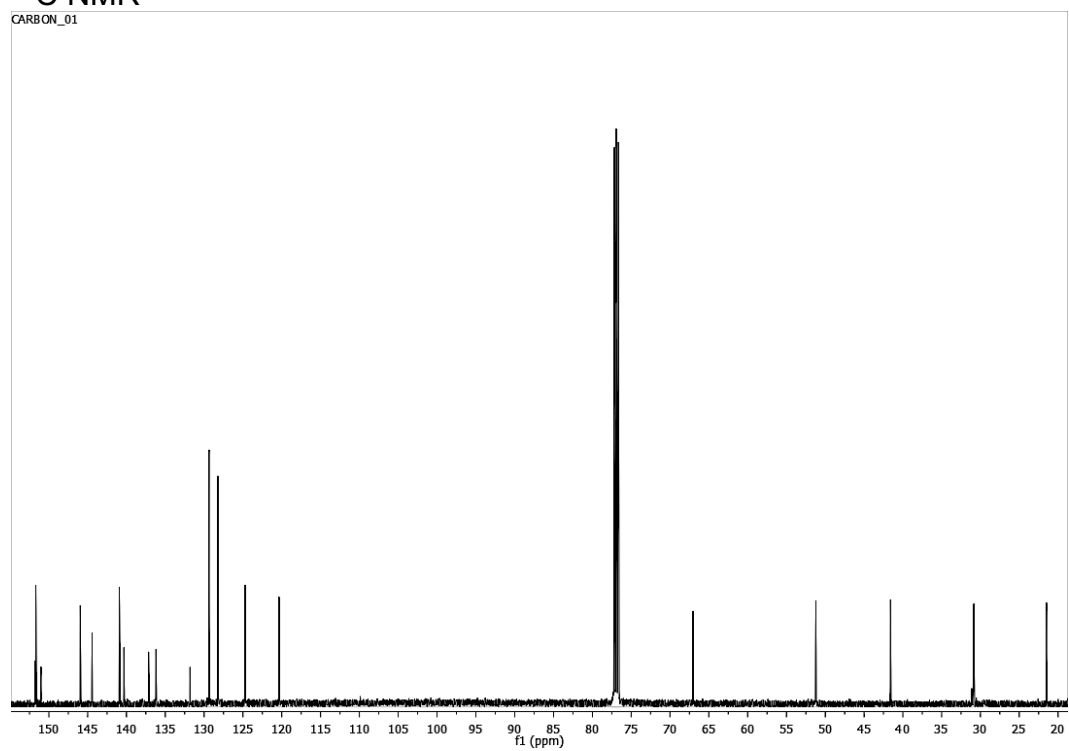
<sup>13</sup>C NMR



$^1\text{H}$  NMR 3-(2-(6-Chloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine (**5b**)

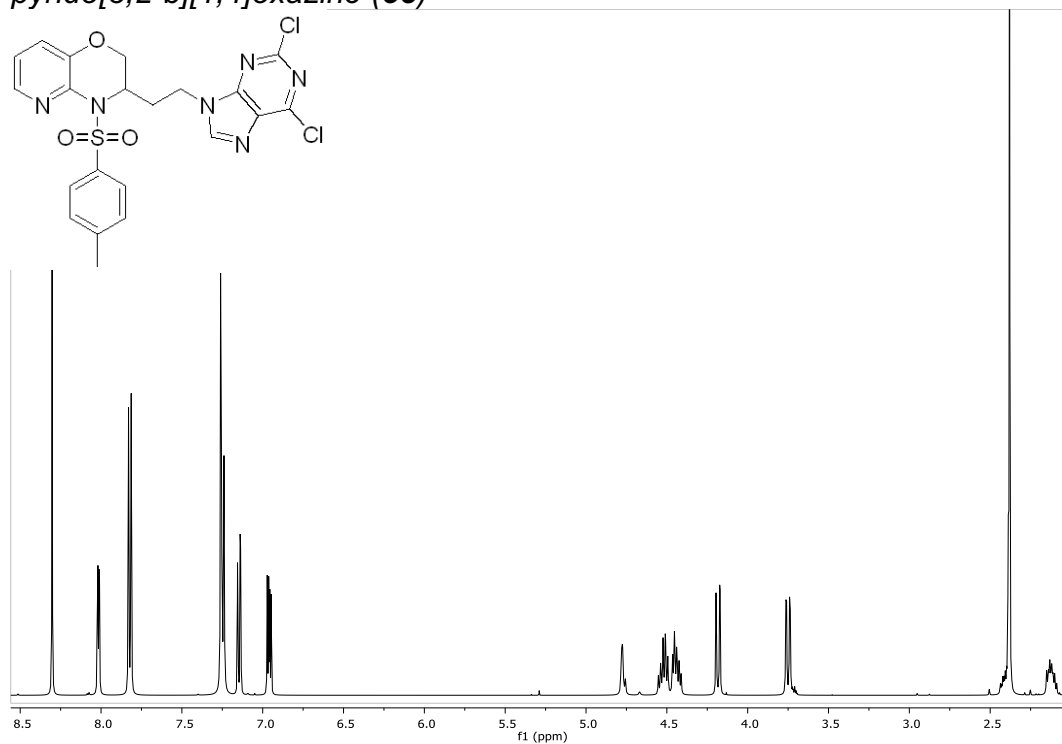


$^{13}\text{C}$  NMR

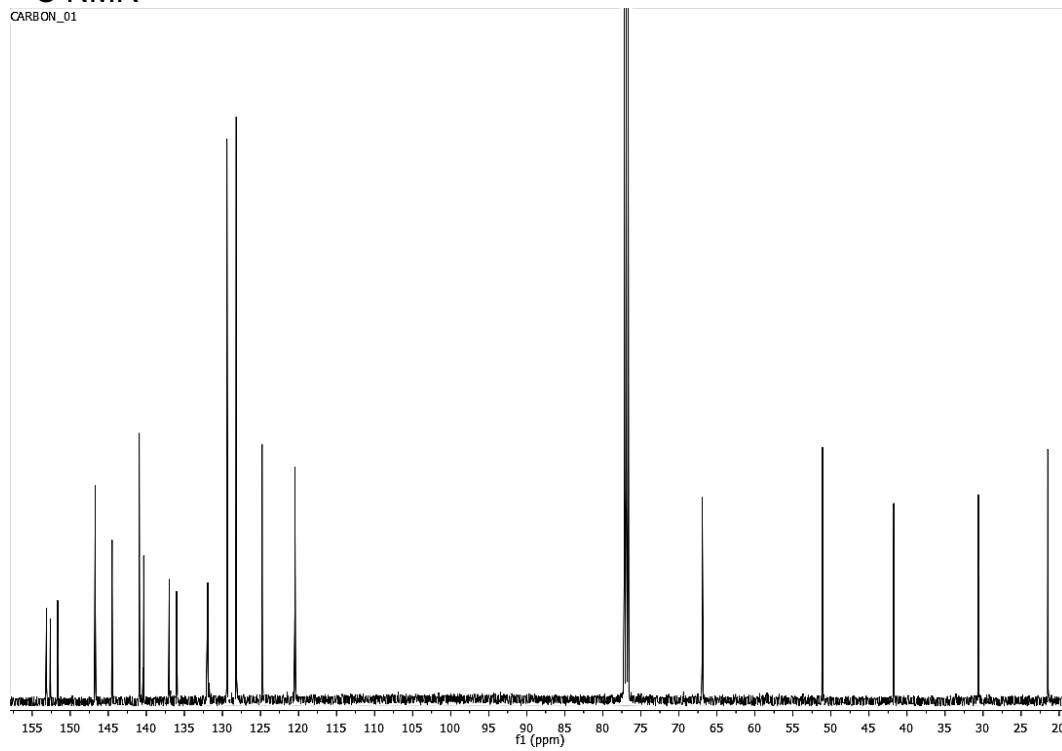




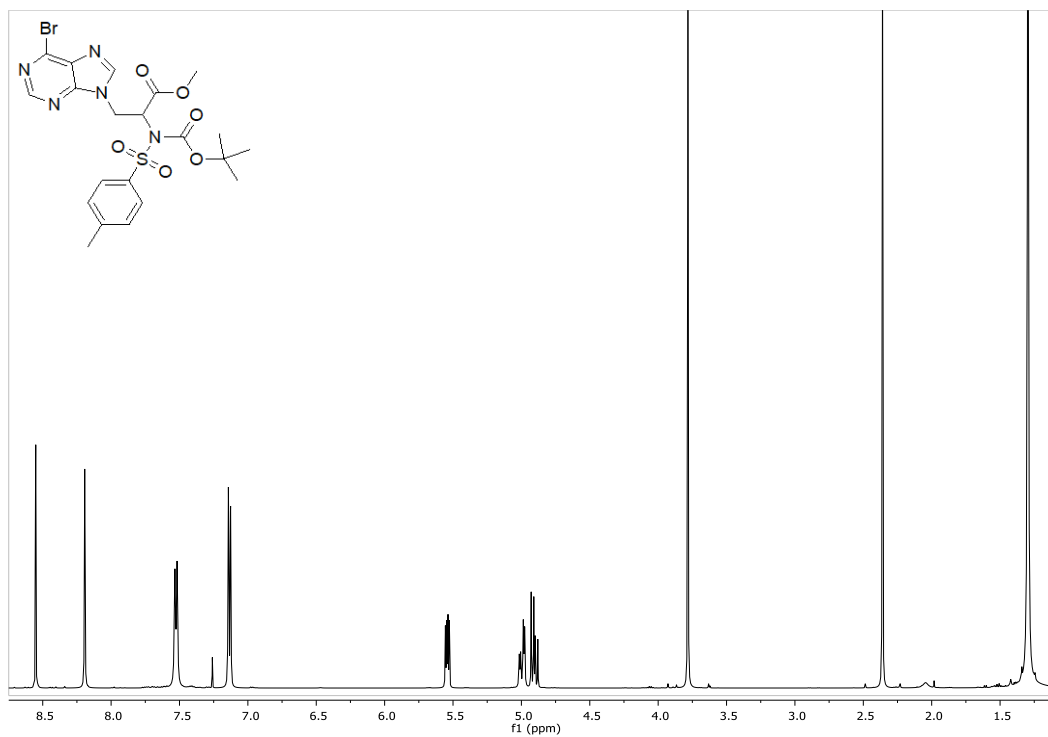
<sup>1</sup>H NMR 3-(2-(2,6-Dichloro-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazine (**5c**)



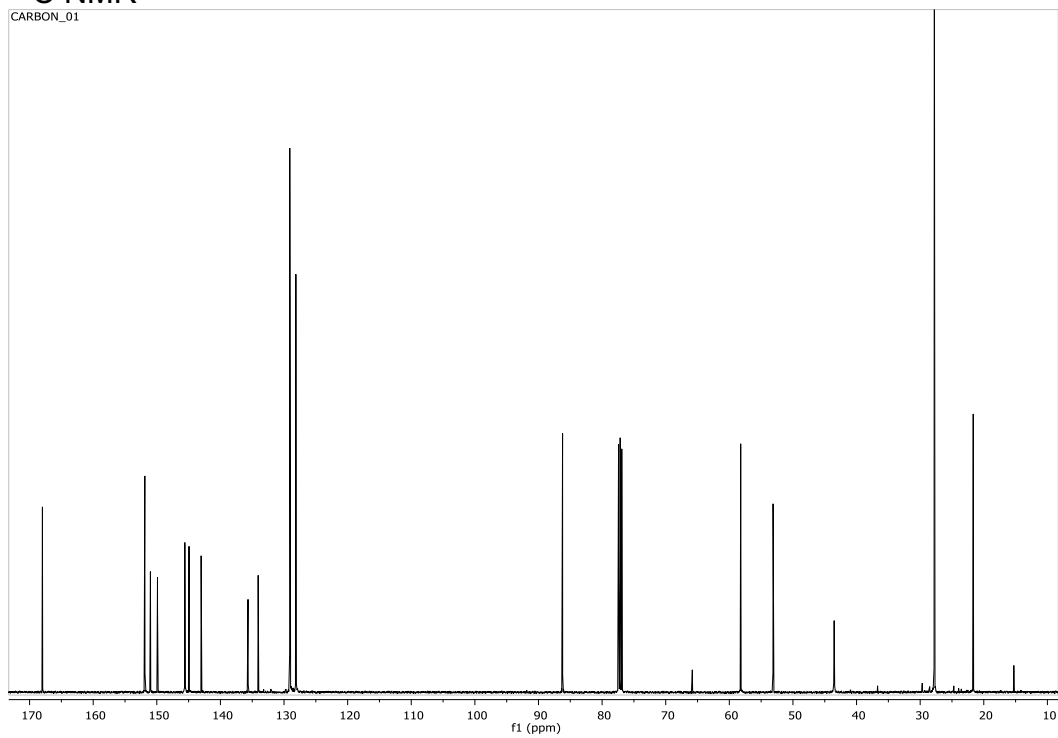
<sup>13</sup>C NMR



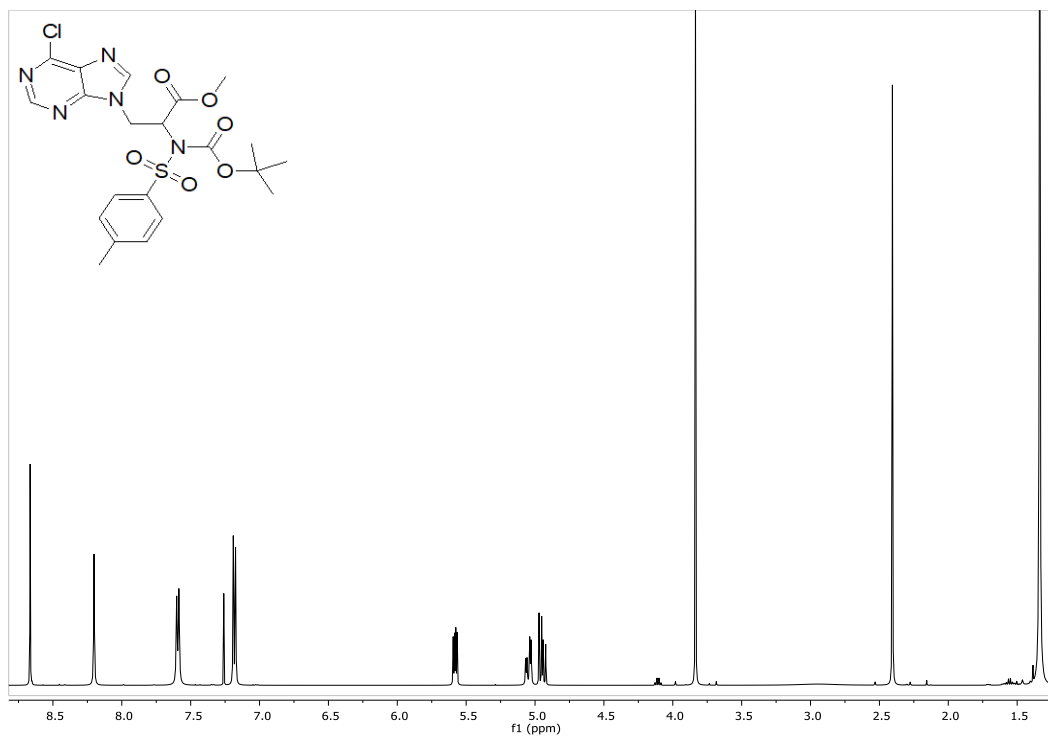
$^1\text{H}$  NMR *Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-bromo-9H-purine-9-yl)propanoate (6a)*



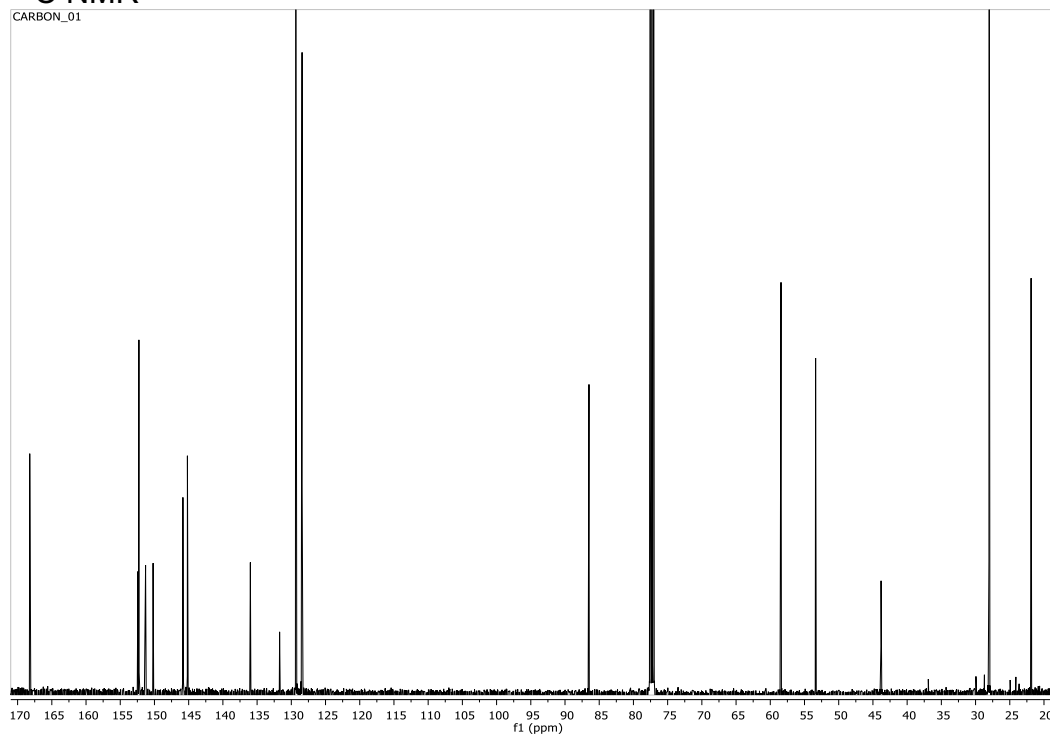
$^{13}\text{C}$  NMR



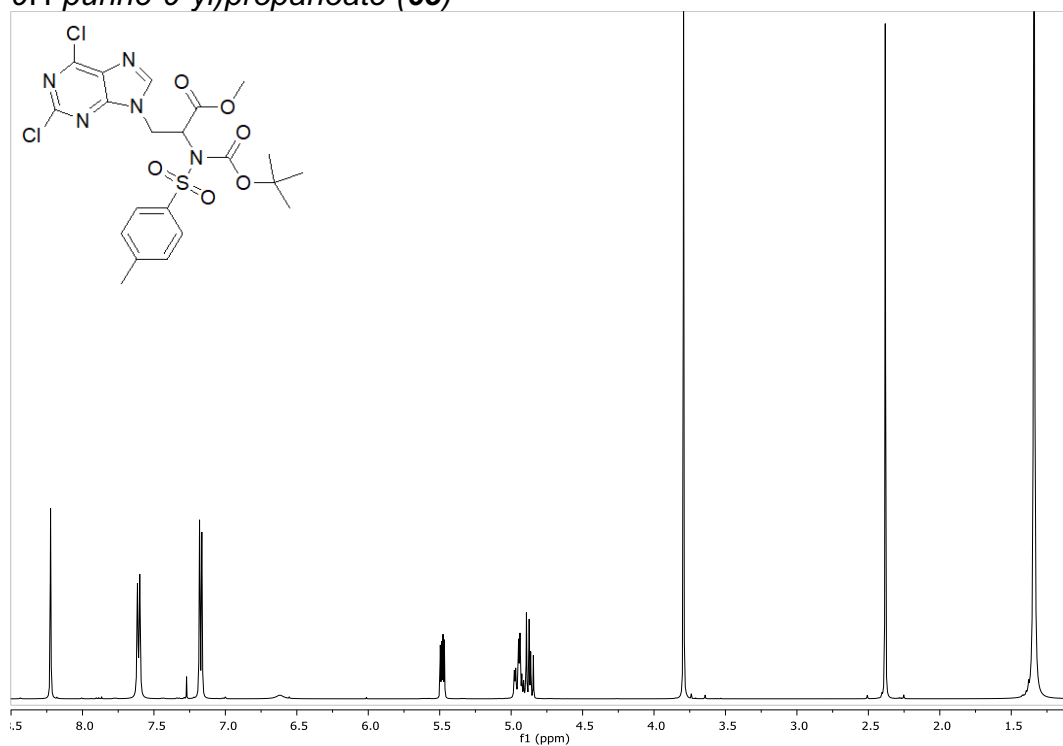
<sup>1</sup>H NMR Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-chloro-9H-purine-9-yl)propanoate (**6b**)



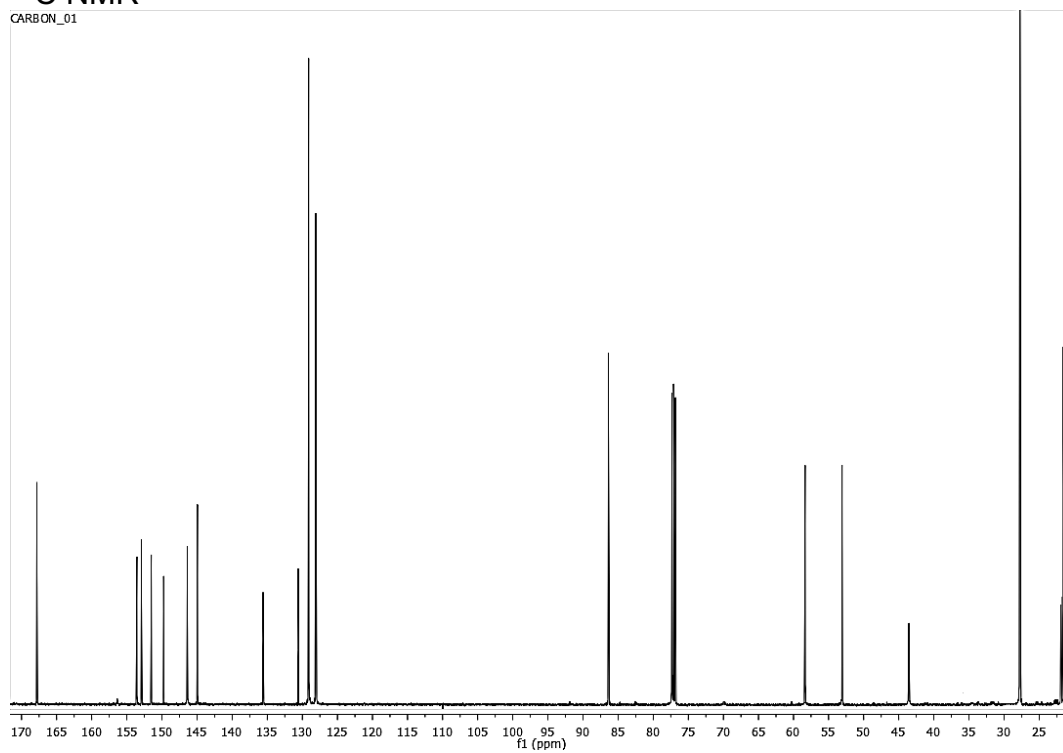
<sup>13</sup>C NMR



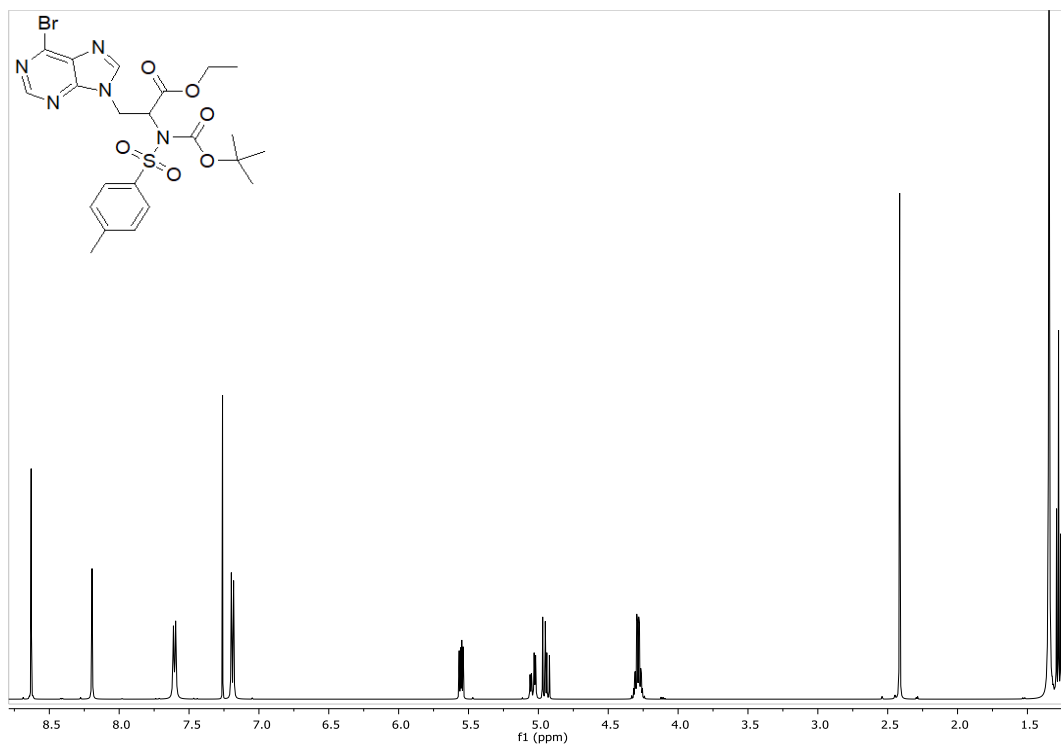
<sup>1</sup>H NMR Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(2,6-dichloro-9H-purine-9-yl)propanoate (**6c**)



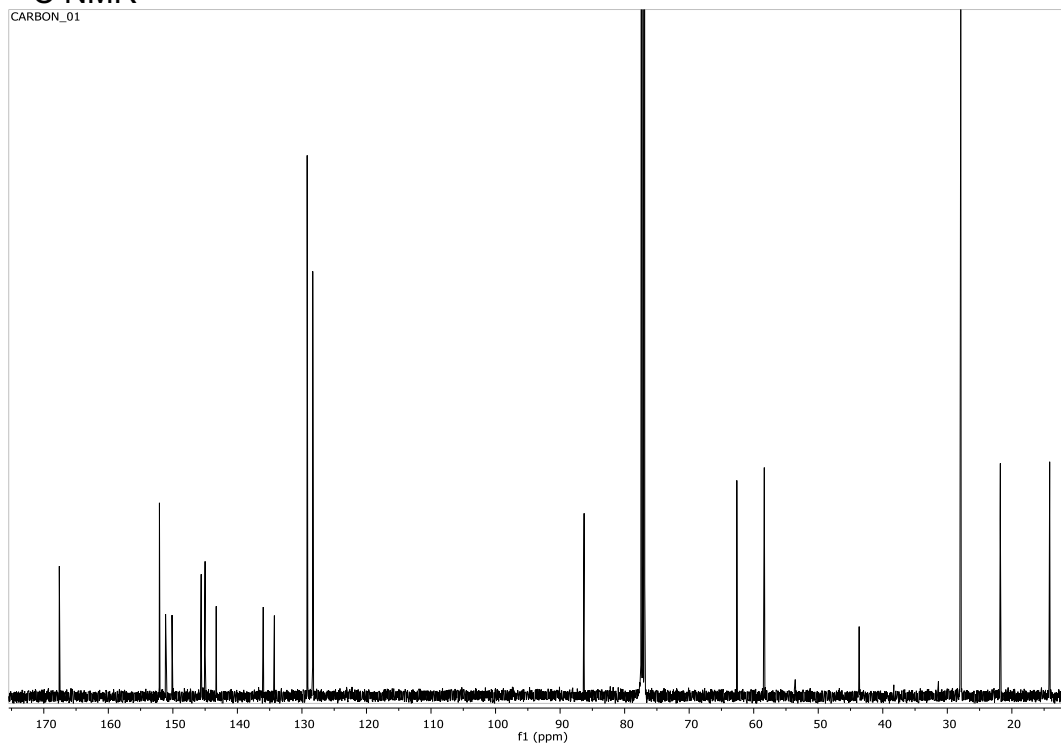
<sup>13</sup>C NMR



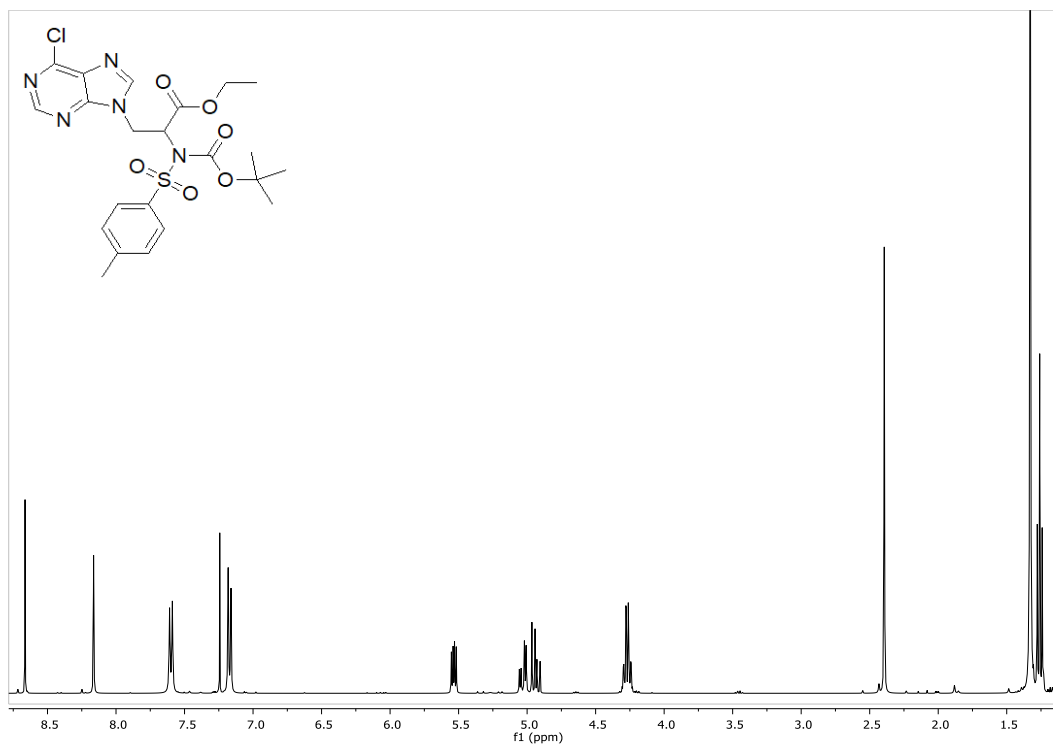
$^1\text{H}$  NMR Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-bromo-9H-purine-9-yl)propanoate (**7a**)



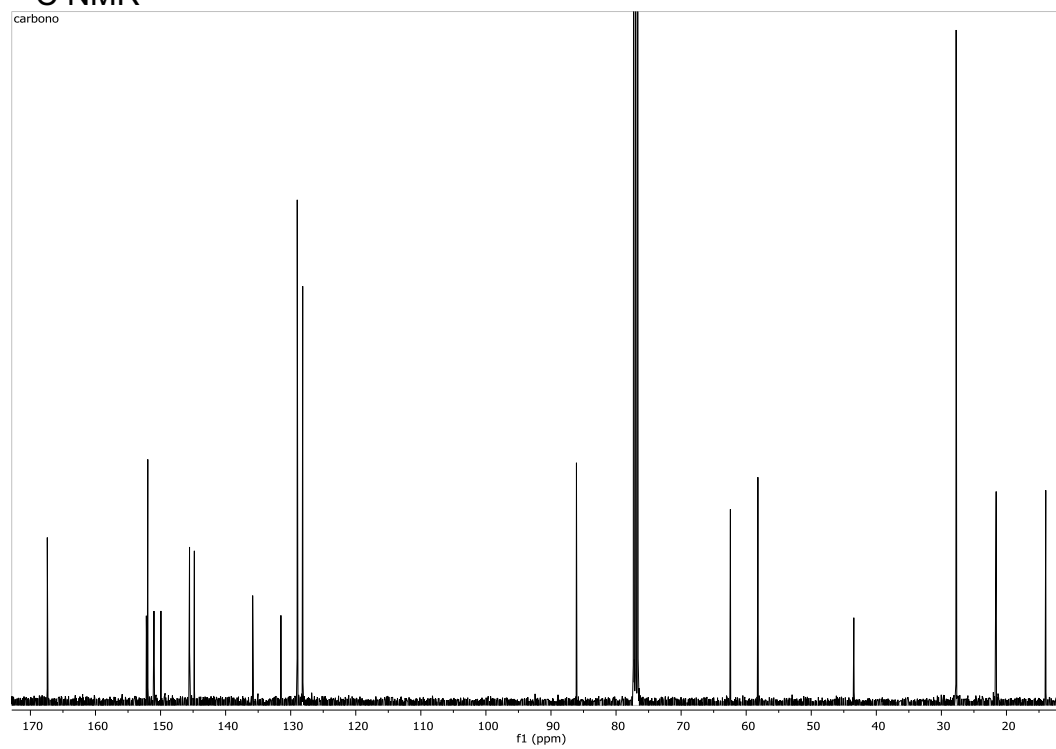
$^{13}\text{C}$  NMR



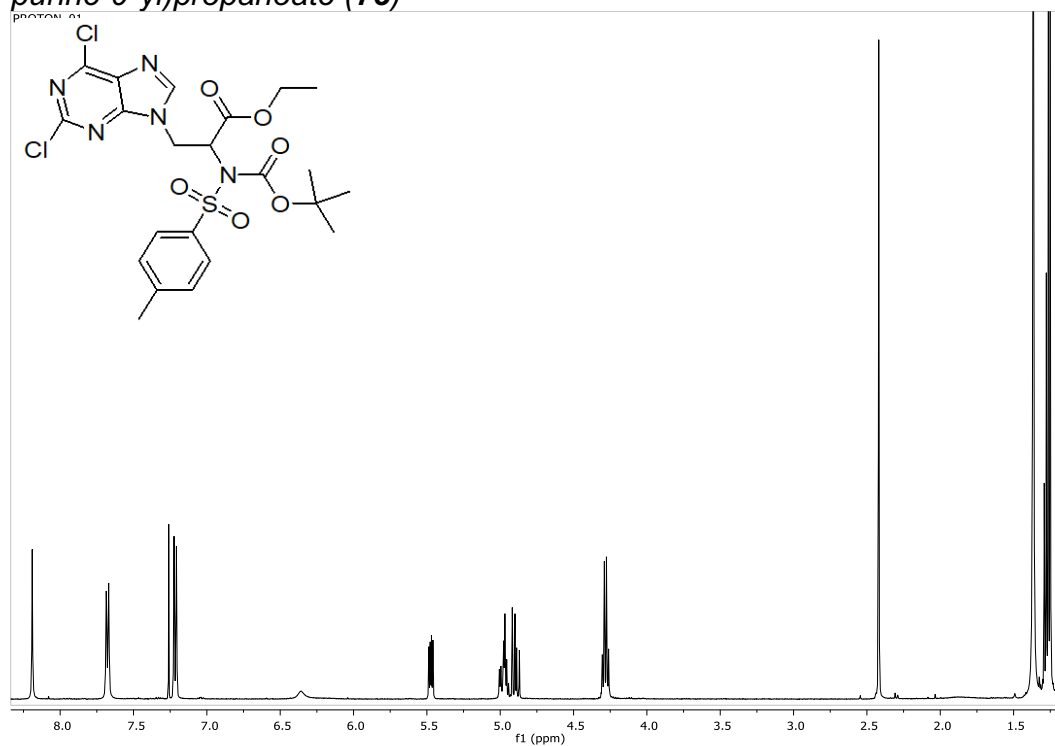
$^1\text{H}$  NMR *Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-chloro-9H-purine-9-yl)propanoate (7b)*



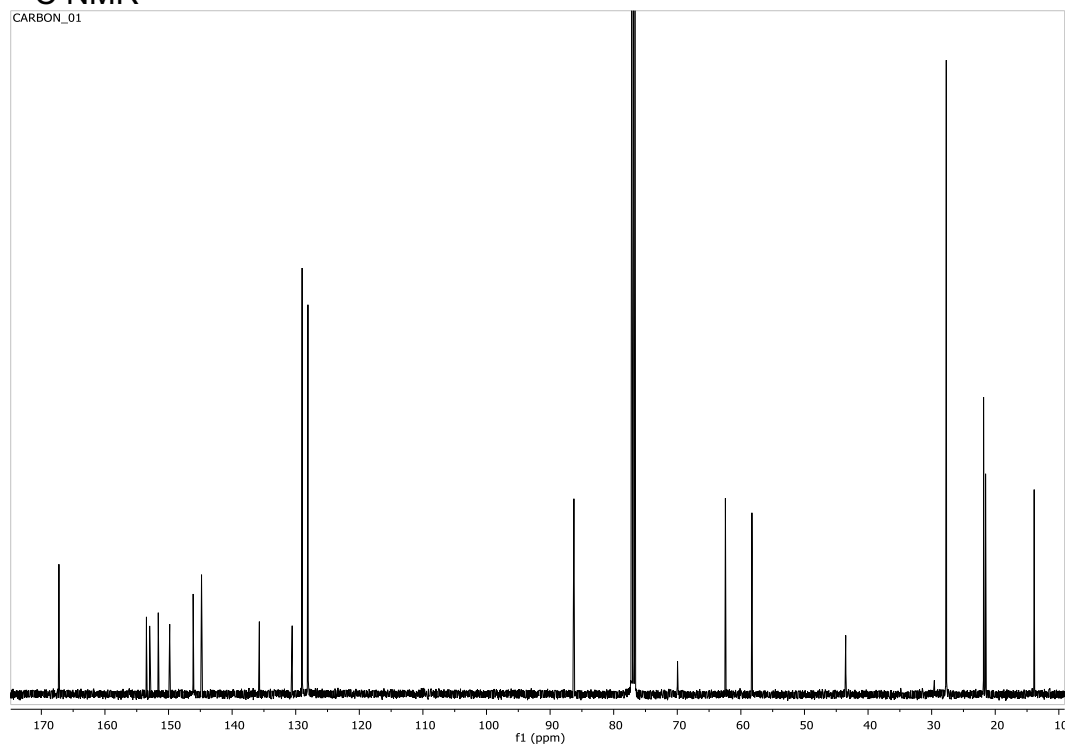
$^{13}\text{C}$  NMR



<sup>1</sup>H NMR Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(2,6-dichloro-9H-purine-9-yl)propanoate (**7c**)

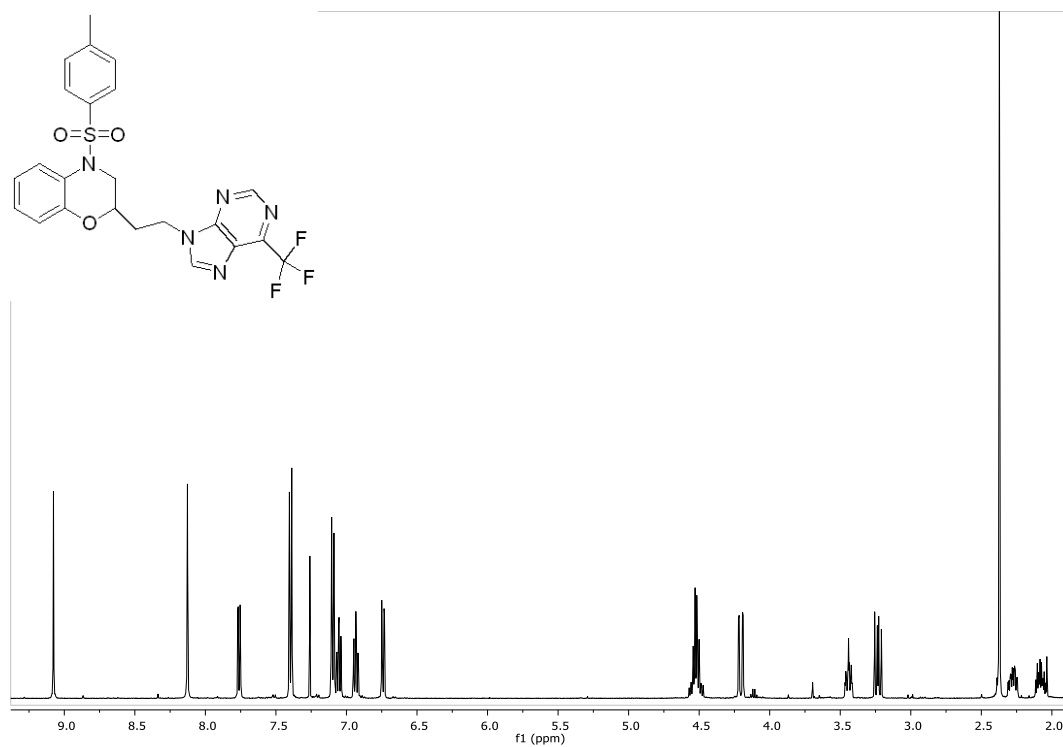
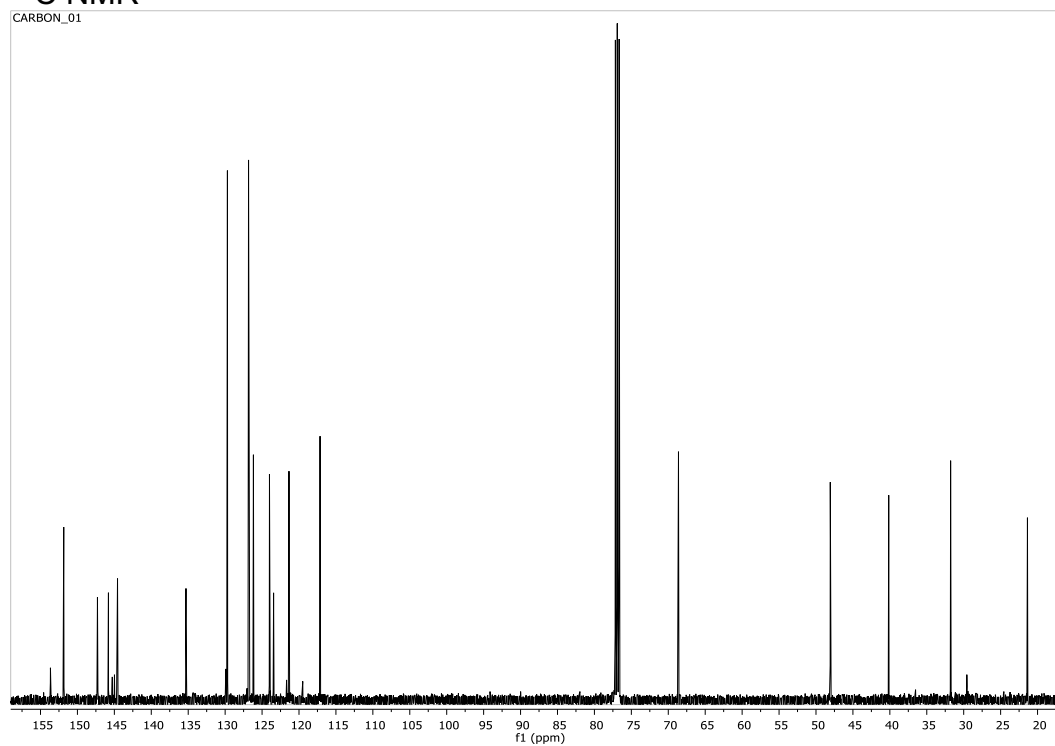


<sup>13</sup>C NMR



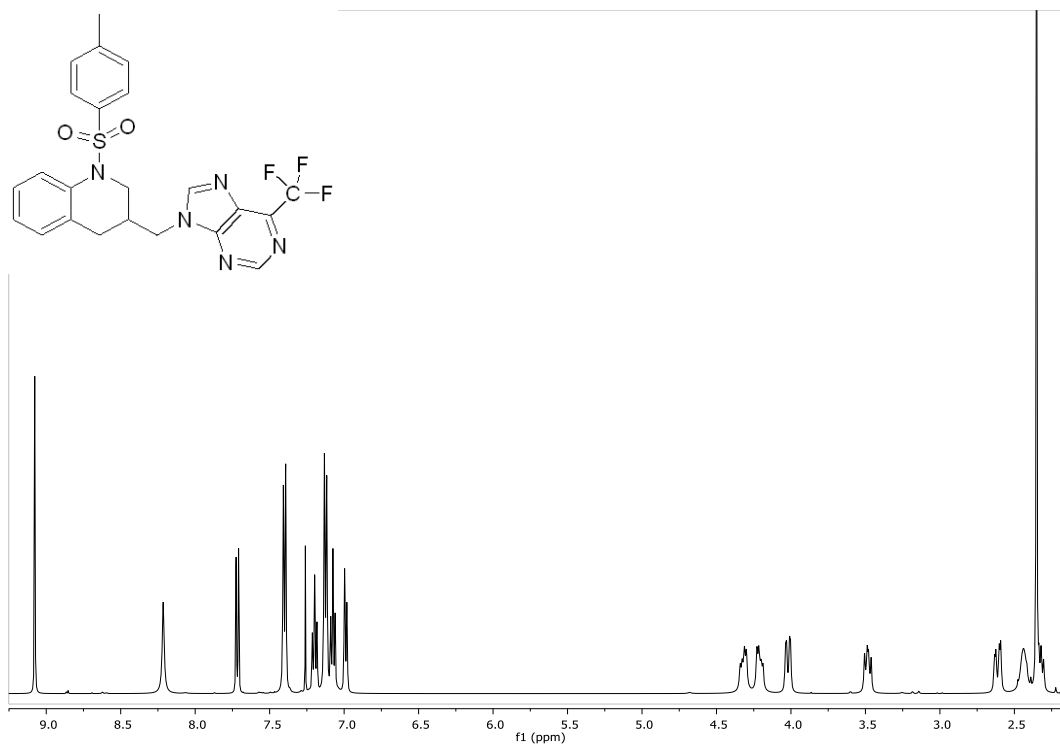
**$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -RMN spectra of 6-trifluoromethylpurines**

$^1\text{H}$  NMR 2-(2-(6-Trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)ethyl)-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine (**3d**)

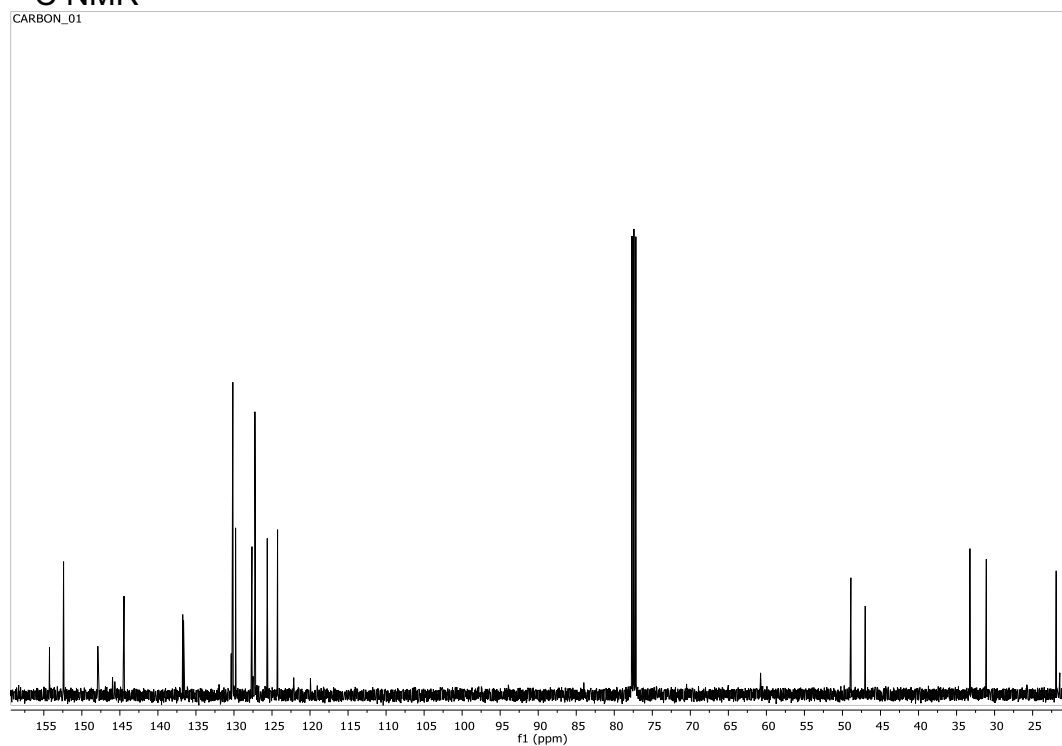
 **$^{13}\text{C}$  NMR**



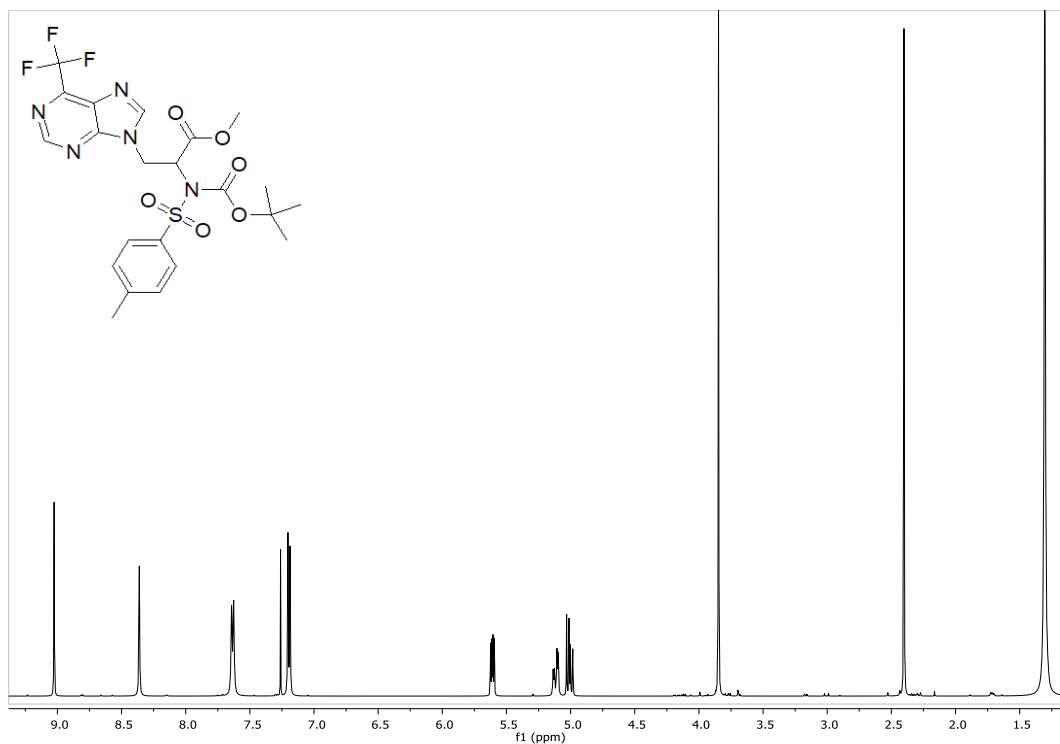
$^1\text{H}$  NMR 3-((6-Trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)methyl)-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**4d**)



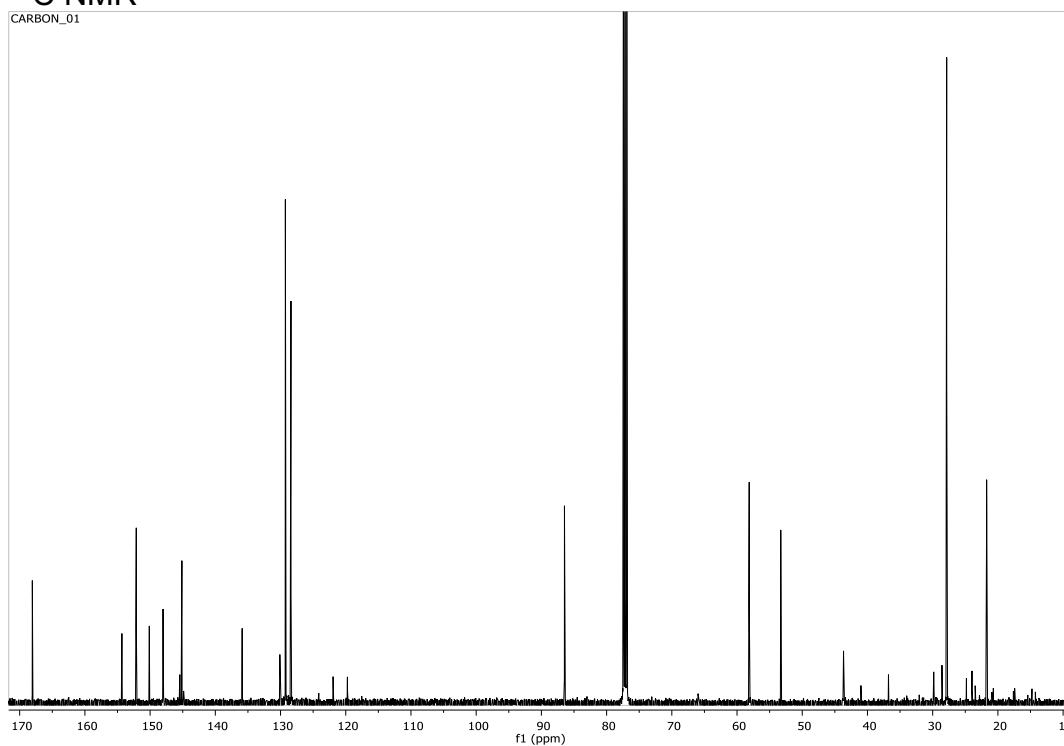
$^{13}\text{C}$  NMR



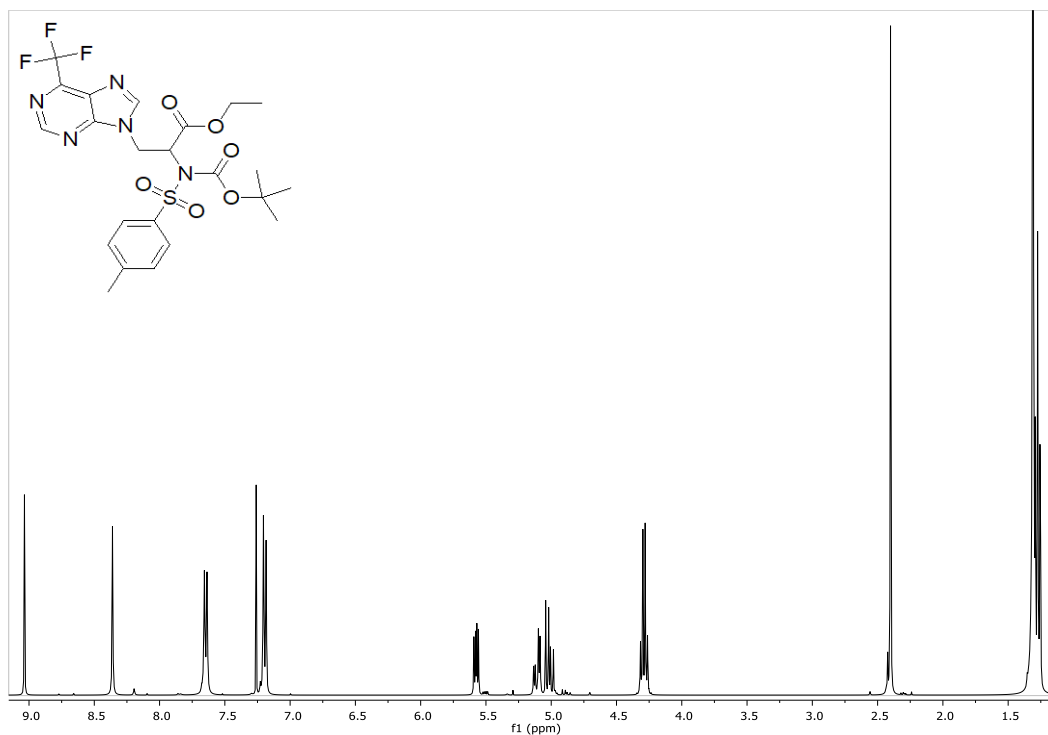
<sup>1</sup>H NMR *Methyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)propanoate(6d)*



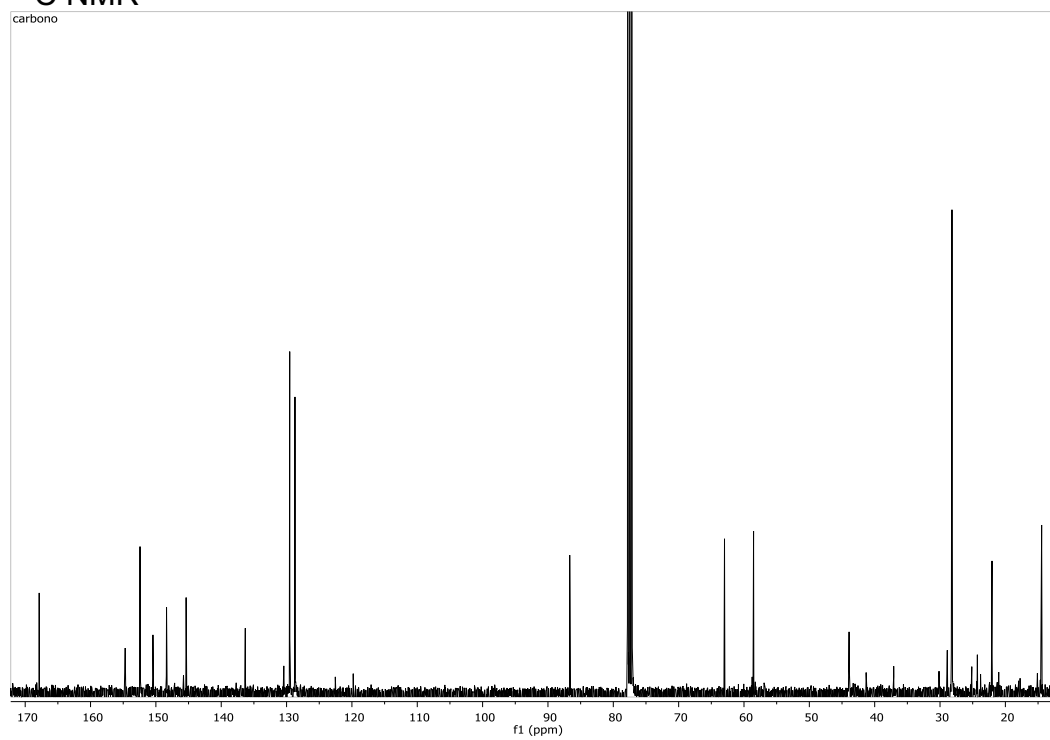
<sup>13</sup>C NMR



<sup>1</sup>H NMR Ethyl-2-(N-tert-butoxycarbonyl)-N-tosylamino)-3-(6-trifluoromethyl-9H-purine-9-yl)propanoate(7d)



<sup>13</sup>C NMR







## Artículo 2

---



## NMR studies of new heterocycles tethered to purine moieties with anticancer activity

### 1 | INTRODUCTION

Cancer is one of the greatest threats of our society because it is one of the leading causes of death. Many active compounds have been developed to face this problem in recent years.<sup>[1–3]</sup> Some purine derivatives with an interesting anti-proliferative activity have been previously synthesized by combining benzo-fused heterocycles linked to substituted purines.<sup>[4–10]</sup> In order to improve the activity and have a deeper idea of the structure–activity relationship, new compounds have been obtained. Such changes include some bioisosteric replacements as elimination of oxygen atom of the heterocycle or elongation of the linking chain between the six-membered heterocycles and the substituted purines.

MHz <sup>1</sup>H NMR and 125-MHz <sup>13</sup>C NMR Agilent Varian Innova Unity spectrometers at 298 K. In DEPT experiments, the employed parameters were the following: pulse width (135°), 9.0 ms; recycle time, 1 s; 0.5 J (CH) = 4 ms; 65,536 data points acquired and transformed from 1,024 scans; spectral width, 15 KHz; and line broadening, 1.3 Hz. Chemical shifts ( $\delta$ ) are quoted in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent peak: CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  = 7.26 ppm (<sup>1</sup>H),  $\delta$  = 77.4 ppm (<sup>13</sup>C) or (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO,  $\delta$  = 2.50 ppm (<sup>1</sup>H),  $\delta$  = 39.52 ppm (<sup>13</sup>C). Spin multiplicities are given as s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), td (triplet of doublet), t (triplet), tt (triplet of triplet), q (quadruplet), and m (multiplet). Coupling constants (*J*) are given in Hertz.

## NMR studies of new heterocycles tethered to purine moieties with anticancer activity

Nerea Fernández-Sáez, Joaquín M. Campos, M. Encarnación Camacho,\*  
M. Dora Carrión\*

*Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.*

**Abstract:** Ten compounds containing benzoxazine (**3a-d**), quinoline (**5a-d**) and pyridoxazine (**11a-b**) heterocycles linked to purine fragments, designed as anticancer molecules, as well as their eight intermediate precursors (**1**, **2**, **4**, **6-10**) have been elucidated completely using 1D and 2D spectroscopic

\*Corresponding author: M. Encarnación Camacho. Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. c/ Campus de Cartuja, s/n. 18071 Granada, Spain. E-mail: [ecamacho@ugr.es](mailto:ecamacho@ugr.es). Tfno. +34958243844.

\*Corresponding author: M. Dora Carrión. Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. c/ Campus de Cartuja, s/n. 18071 Granada, Spain. E-mail: [dcarrion@ugr.es](mailto:dcarrion@ugr.es). Tfno. +34958240728.



experiments ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, HSQC and HMBC). Derivative **6**, predecessor of the pyridoxazine series, has also been studied in detail to corroborate the obtaining of the 3-regioisomer only in the cyclization process of its synthesis. In addition, 2D NOESY experiments have been used to investigate the chain conformation for a series of structures.

**KEYWORDS:**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  1D NMR;  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  2D NMR (HSQC, HMBC); 2D NOESY; benzoxazine, quinoline, pyridoxazine.

## **Introduction**

Cancer is one of the greatest threats of our society because is one of the leading causes of death. Many active compounds have been developed to face this problem in recent years.<sup>[1-3]</sup> Some purine derivatives with an interesting anti-proliferative activity have been previously synthesized by combining benzo-fused heterocycles linked to substituted purines.<sup>[4-10]</sup> In order to improve the activity and have a deeper idea of the structure-activity relationship, new compounds have been obtained. Such changes include some bioisoteric replacements as elimination of oxygen atom of the heterocycle or elongation of the linking chain between the six-membered heterocycles and the substituted purines.

In this way the synthesis and biological evaluation of these novel families of purine derivatives linked to six-membered heterocyclic moieties **3a-d**, **5a-d** and **11a-b**, which were designed and evaluated as anticancer agents, have been described.<sup>[11]</sup>

The structures of these new compounds have been determined by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and mass spectrometry (MS). Some of them have been studied more detailed in order to corroborate their skeleton by using two-dimensional techniques, and an elemental analysis have been performance to all the final compounds.

The present study reports the unambiguous assignment of each signal in the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra in benzoxazine derivatives (**3a-d**), including elongation of the side chain, tetrahydroquinolines (**5a-d**) and pyridoxazine derivatives (**11a-b**) in which a pyridine ring is merged to the oxazine heterocycle, using one- and two-dimensional resonance techniques. The assignment of derivatives **1**, **2**, **4**, **6-10**, the precursors in their synthetic pathway, are also included.

## Experimental

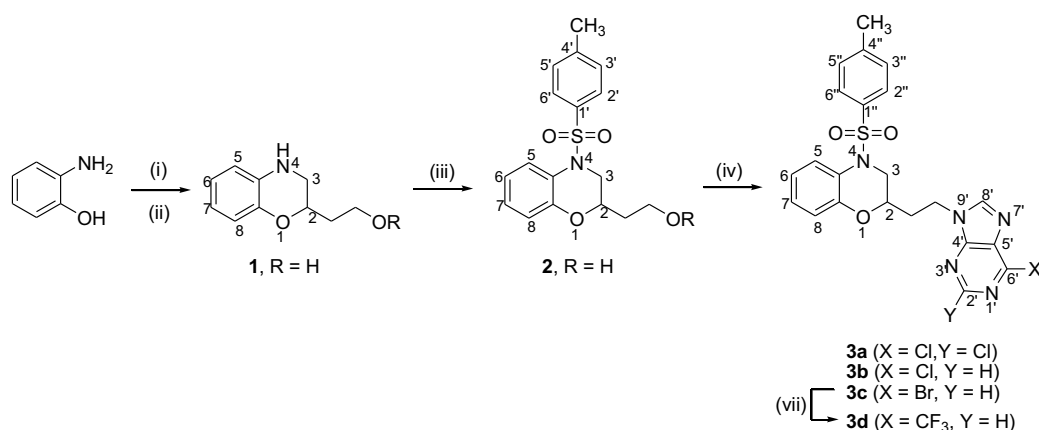
### NMR spectra

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were made on a 400-MHz  $^1\text{H}$  and 101 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Agilent Varian Direct Drive, and a 500-MHz  $^1\text{H}$  and 125-MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Agilent Varian Innova Unity spectrometers at 298 K. In DEPT experiments the employed parameters were the following: pulse width ( $135^\circ$ ), 9.0 ms; recycle time, 1 s;  $\frac{1}{2} J (\text{CH}) = 4$  ms; 65 536 data points acquired and transformed from 1024 scans; spectral width, 15 KHz; and line broadening, 1.3 Hz. Chemical shifts ( $\delta$ ) are quoted in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent peak:  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta = 7.26$  ppm ( $^1\text{H}$ ),  $\delta = 77.4$  ppm ( $^{13}\text{C}$ ) or  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta = 2.50$  ppm ( $^1\text{H}$ ),  $\delta = 39.52$  ppm ( $^{13}\text{C}$ ). Spin multiplicities are given as s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), td (triplet of doublet), t (triplet), tt (triplet of triplet), q (quadruplet), and m (multiplet). Coupling constant ( $J$ ) are given in Hz.

The HSQC spectra were calculated with a pulse sequence gc2hsqcse (Standard sequence, Agilent Vnmrj\_3.2A software). The HMBC spectra were determined with a pulse sequence gc2hmbc (standard sequence, Agilent Vnmrj\_3.2A software) optimized for 8 Hz (inter-pulse delay for the evolution of long-range couplings: 62.5 ms).

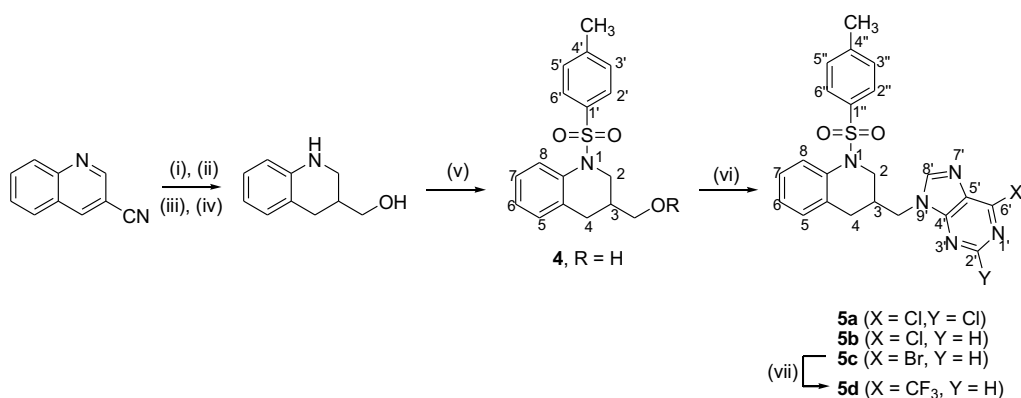
## Results and Discussion

Schemes 1-3 depict the synthetic route carried out in the preparation of final compounds **3a-d**, **5a-d** and **11a-b**, previously reported<sup>[11]</sup> and Tables 1-4 show the spectroscopic data for both the intermediate and final synthesized compounds.



### Scheme 1. Synthesis of compounds **3a-d** included in the benzoxazine family.

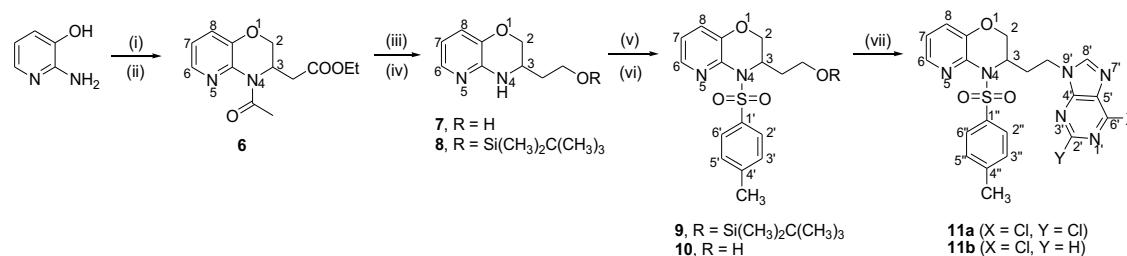
*Reagents and conditions:* (i) ethyl 4-bromobut-2-enoate, NaHCO<sub>3</sub>, EtOH, 3 h, rt, then K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 30 min; (ii) LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, 1 h, 0°C to rt; (iii) TsCl, py, 12 h, 0°C to rt; (iv) 2,6-dihalopurine or 6-halopurine, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, 36 h, -20°C to rt; (v) MFSDA, CuI, HMAP, DMF, 12 h, 70°C.



### Scheme 2. Synthesis of the tetrahydroquinoline family compounds (**5a-d**). *Reagents*

*and conditions:* (i) aq. NaOH, EtOH, 20 h, reflux, then HCl 1N; (ii) SOCl<sub>2</sub>, EtOH, 4 h, reflux; (iii) NaBH<sub>3</sub>CN, THF, MeOH, HCl, Et<sub>2</sub>O, 6 h, rt; (iv) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 1 h, 0°C; (v) TsCl, py, 12 h,

0°C to rt; (vi) 2,6-dihalopurine or 6-halopurine, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, 36 h, -20°C to rt; (vii) MFSDA, CuI, HMAP, DMF, 12 h, 70°C.



**Scheme 3. Synthesis of compounds belonging to the pyridoxazine family (11a-b).**

*Reagents and conditions:* (i) Ac<sub>2</sub>O/py, 5 min, reflux, then NaOH; (ii) ethyl 4-bromobut-2-enoate, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, 24 h; (iii) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 1 h, 0°C to rt; (iv) TBDMSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, DCM, 12 h, rt; (v) TsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, DCM, 12 h, rt; (vi) AcOH, H<sub>2</sub>O, THF, 12 h, rt; (vii) 2,6-dichloropurine or 6-halopurine, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, -20°C to rt, 36 h.

**Table 1.** <sup>1</sup>H NMR signal assignments of intermediate compounds **1**, **2**, **4**, **6-10**

Compound	H-2a	H-2b	H-3a	H-3b	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	CH <sub>2</sub> OR	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OR
<b>1</b>	4.30 (m)	-	3.36 (dd, 11.6, 2.4)	3.17 (dd, 11.6, 7.7)	2.99 (bs)	6.60 (dd, 7.7, 1.5)	6.66 (dd, 7.7, 1.5)	6.77 (m)	6.77 (m)	3.87 (m)	1.84 (m), 1.94 (m)
<b>2</b>	3.58 (m)	-	4.32 (dd, 14.3, 2.4)	3.19 (dd, 14.3, 9.9)	-	6.79 (dd, 8.1, 1.6)	6.92 (ddd, 8.1, 7.3, 1.6)	7.04 (ddd, 8.2, 7.3, 1.6)	7.83 (dd, 8.2, 1.6)	3.76 (m)	1.77 (m)
<b>4</b>	4.12 (dd, 13.4, 4.2)	3.42 (dd, 13.3, 9.4)	1.94 (m)	-	2.24 (dd, 16.5, 9.1), 2.59 (dd, 16.5, 6.0)	7.04 (m)	7.15 (m)	7.06 (m)	7.68 (d, 8.3)	3.53 (m)	-
<b>6</b>	4.47 (dd, 11.4, 1.2)	4.07 (dd, 11.4, 2.9)	5.41 (m)	-	-	-	7.96 (dd, 4.6, 1.4)	7.00 (dd, 8.1, 4.6)	7.20 (dd, 8.1, 1.4)	-	-
<b>7</b>	4.15 (dd, 10.3, 2.8)	3.82 (dd, 10.3, 1.3)	3.76 (m)	-	5.12 (bs)	-	7.57 (dd, 5.1, 1.4)	6.49 (dd, 7.8, 5.1)	6.93 (dd, 7.8, 1.4)	3.87 (m), 3.97 (m)	1.70 (m)
<b>8</b>	4.21 (dd, 10.7, 2.9)	3.87 (dd, 10.6, 7.0)	3.74 (m)	-	5.32 (bs)	-	7.66 (dd, 5.0, 1.4)	6.52 (dd, 7.7, 5.0)	6.94 (dd, 7.7, 1.4)	3.80 (m)	1.70 (m)
<b>9</b>	4.37 (dd, 11.1, 1.6)	4.02 (dd, 11.1, 2.5)	4.98 (m)	-	-	-	7.94 (dd, 4.7, 1.6)	6.90 (dd, 8.0, 4.7)	7.12 (dd, 8.0, 1.6)	3.65 (m)	1.73 (q, 6.4)
<b>10</b>	4.27 (dd, 11.2, 1.5)	3.86 (dd, 11.2, 2.5)	4.95 (m)	-	-	-	7.97 (dd, 4.7, 1.6)	6.92 (dd, 8.1, 4.7)	7.14 (dd, 8.1, 1.6)	3.71 (m), 3.82 (m)	1.79 (m)

<sup>a</sup> Solvent used CD<sub>3</sub>OD.

Chemical shifts (in CDCl<sub>3</sub>) are reported in δ (ppm) relative to CDCl<sub>3</sub>; multiplicities and coupling constants (Hz) are given in parentheses.

<sup>1</sup>H signals for the tosyl substituent: **2**, H-2', H-6': 7.54 (m), H-3', H-5': 7.23 (m), CH<sub>3</sub>: 2.38 (s); **4**, H-2', H-6': 7.51 (d, 8.0), H-3', H-5': 7.21 (d, 8.0), CH<sub>3</sub>: 2.38 (s); **9**, H-2', H-6': 8.01 (d, 8.3), H-3', H-5': 7.28 (d, 5.9), CH<sub>3</sub>: 2.40 (s); **10**, H-2', H-6': 7.93 (d, 8.3), H-3', H-5': 7.26 (d, 8.1), CH<sub>3</sub>: 2.38 (s).

<sup>1</sup>H signals for the syll substituent: **8**: (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>: 0.91 (s), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 0.07 (s); **9**: (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>: 0.90 (s), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 0.05 (s).

Other signals of compound **6**: COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: 4.12 (m), CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: 2.47 (m), COCH<sub>3</sub>: 2.59 (s), COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: 1.22 (t, 7.2).

s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; dd, doublet doublet; ddd, doublet doublet doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet.

**Table 2.** <sup>1</sup>H NMR signal assignments of final compounds **3a-d**, **5a-d**, **11a-b**.

Compound	H-2a	H-2b	H-3a	H-3b	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-2'	H-8'	CH=N	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N
<b>3a</b>	3.35 (m)	-	4.19 (dd, 14.2, 2.3)	3.21 (dd, 14.2, 9.6)	-	6.76 (dd, 8.2, 1.6)	6.94 (m)	7.08 (m)	7.77 (dd, 8.3, 1.6)	-	7.96 (s)	4.43 (dd, 7.7, 5.5)	2.02 (m), 2.23 (m)
<b>3b</b>	3.31 (m)	-	4.20 (dd, 14.1, 1.9)	3.21 (dd, 14.1, 9.7)	-	6.78 (dd, 8.2, 1.5)	6.93 (m)	7.05 (m)	7.79 (dd, 8.3, 1.5)	8.75 (s)	7.96 (s)	4.44 (m)	2.27 (m), 2.02 (m)
<b>3c</b>	3.34 (m)	-	4.19 (dd, 14.2, 2.3)	3.21 (dd, 14.2, 9.7)	-	6.77 (dd, 8.2, 1.5)	6.93 (ddd, 8.8, 7.3, 1.5)	7.06 (m)	7.77 (dd, 8.3, 1.6)	8.69 (s)	7.98 (s)	4.44 (m)	2.04 (m), 2.28 (m)
<b>3d</b>	3.44 (t, 9.7, 2.8)	-	4.20 (dd, 14.2, 2.4)	3.23 (dd, 14.3, 9.6)	-	6.74 (dd, 8.2, 1.5)	6.93 (ddd, 8.6, 7.3, 1.5)	7.05 (m)	7.76 (dd, 8.3, 1.6)	9.08 (s)	8.13 (s)	4.52 (m)	2.08 (m), 2.28 (m)
<b>5a</b>	3.98 (dd, 13.5, 3.8)	3.42 (dd, 13.5, 8.7)	2.38 (m)	-	2.31 (dd, 15.9, 9.0), 2.59 (dd, 15.9, 5.2)	6.98 (dd, 7.6, 1.5)	7.16 (m)	7.06 (td, 7.5, 1.2)	7.69 (dd, 8.3, 1.1)	-	8.07 (s)	4.12 (dd, 14.2, 6.7), 4.20 (dd, 14.2, 7.3)	-
<b>5b</b>	4.01 (dd, 13.5, 4.1)	3.45 (dd, 13.5, 8.9)	2.39 (m)	-	2.30 (dd, 15.9, 9.1), 2.59 (dd, 15.9, 5.3)	6.98 (dd, 7.6, 1.5)	7.2 (td, 7.9, 1.5)	7.08 (td, 7.5, 1.2)	7.73 (dd, 8.3, 1.1)	8.74 (s)	8.04 (s)	4.15 (dd, 14.2, 6.7), 4.25 (dd, 14.2, 7.2)	-
<b>5c<sup>a</sup></b>	4.05 (dd, 13.5, 4.0)	3.35 (m)	2.09 (m)	-	2.30 (m), 2.55 (dd, 16.5, 5.3)	7.07 (d, 7.5)	7.17 (m)	7.07 (d, 7.5)	7.61 (d, 8.3)	8.76 (s)	8.70 (s)	4.26 (m)	-
<b>5d</b>	4.02 (dd, 13.5, 3.7)	3.48 (dd, 13.5, 8.5)	2.48 (m)	-	2.31 (d, 8.6), 2.61 (dd, 15.9, 5.1)	6.99 (d, 7.6)	7.20 (t, 7.8)	7.07 (d, 7.3)	7.72 (d, 8.3)	9.08 (s)	8.21 (s)	4.21 (dd, 14.4, 6.4), 4.32 (dd, 14.3, 6.6)	-
<b>11a</b>	4.18 (dd, 11.4, 1.4)	3.75 (dd, 11.4, 2.4)	4.77 (d, 10.2)	-	-	-	8.02 (dd, 4.6, 1.5)	6.96 (dd, 8.1, 4.6)	7.15 (dd, 8.1, 1.5)	-	8.30 (s)	4.44 (m), 4.52 (m)	2.13 (m)
<b>11b</b>	4.18 (dd, 11.4, 1.4)	3.77 (dd, 11.4, 2.3)	4.78 (d, 9.8)	-	-	-	8.02 (dd, 4.7, 1.5)	6.96 (dd, 8.0, 4.6)	7.15 (dd, 8.0, 1.5)	8.73 (s)	8.30 (s)	4.51 (m)	2.44 (m), 2.15 (m)

Solvent used CD<sub>3</sub>OD; <sup>a</sup>Solvent used DMSO-d<sub>6</sub>.  
 Chemical shifts (in CDCl<sub>3</sub>) are reported in  $\delta$  (ppm) relative to CDCl<sub>3</sub>; multiplicities and coupling constants (Hz) are given in parentheses.  
<sup>1</sup>H signals for the **tosyl** substituent: **3a**, H-2": 7.40 (d, 8.2), H-3": H-5": 7.08 (m), CH<sub>3</sub>: 2.39 (s); **3b**, H-2": 7.35 (d, 8.1), H-3": H-5": 7.05 (m), CH<sub>3</sub>: 2.39 (s); **3c**, H-2": 7.36 (m), H-3": H-5": 7.06 (m), CH<sub>3</sub>: 2.39 (s); **3d**, H-2": 7.39 (m), H-3": H-5": 7.10 (d, 8.0), CH<sub>3</sub>: 2.37 (s); **5a**, H-2": 7.38 (d, 8.0), H-3": H-5": 7.16 (m), CH<sub>3</sub>: 2.35 (s); **5b**, H-2": 7.39 (d, 8.1), H-3": H-5": 7.12 (d, 8.1), CH<sub>3</sub>: 2.36 (s); **5c**, H-2": 7.39 (m), H-3": H-5": 7.16 (m), CH<sub>3</sub>: 2.30 (s); **5d**, H-2": 7.40 (d, 7.9), H-3": H-5": 7.12 (m), CH<sub>3</sub>: 2.35 (s); **11a**, H-2": 7.82 (m), H-3": H-5": 7.25 (d, 10.3), CH<sub>3</sub>: 2.38 (s); **11b**, H-2": 7.84 (d, 8.1), H-3": H-5": 7.25 (d, 8.1), CH<sub>3</sub>: 2.38 (s).  
 s, singlet; d, doublet; dd, doublet; ddd, doublet; t, triplet; td, triplet doublet; tt, triplet triplet; m, multiplet.

The structure of these compounds has been elucidated by routine  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR techniques. Nevertheless, a definitive assignment of all signals was accomplished with the help of NMR techniques. Such procedures include the following: i) DEPT experiments for determining the presence of primary, secondary and tertiary carbon atoms; ii) HSQC spectra to assign the  $^{13}\text{C}$  resonances of the primary, secondary and tertiary carbons; iii) HMBC sequences to corroborate the signals of quaternary carbons via two-bond and three-bond interactions.

Tables 1 and 2 show the  $^1\text{H}$  NMR signals of each proton for molecules **1-11**, whereas Tables 3 and 4 show the corresponding  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for the same compounds. The NMR spectra of the intermediates were carried out in  $\text{CDCl}_3$  solutions. The NMR spectra of the final compounds were performed in  $\text{CDCl}_3$  solutions, except for **5c**, which was accomplished in  $\text{DMSO-}d_6$ . For this reason, some significant variations are observed in the chemical shifts depending of the solvent.

In relation to the benzoxazine family, chemical shifts of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of the tosylated intermediate **2** and the final derivatives **3a-d** are similar for H-2, H-3a, H-3b, H-5, H-6, H-7 and H-8; nevertheless, in the untosylated intermediate **1**, H-2 appears at a greater chemical shift than H-3a. In the same way, C-2 of the intermediate **1** appears at a higher shift than C-2 in both compounds, the tosylated intermediate **2** and the tosylated purines **3a-d**. Finally, the presence of trifluoromethyl group in **3d** is justified due to the following C-F couplings: 145.20 (q,  $J_{\text{C-CF}_3} = 37.1$ , C-6') and 120.69 (q,  $J_{\text{CF}} = 274.9$ ,  $\text{CF}_3$ ).

In addition, in the dihydroquinoline series, the  $^1\text{H}$  NMR signals are similar in both, the intermediate **4** and the final purines **5a-d**, except for the  $\text{CH}_2$  signal of the side chain. In derivative **4** the  $\text{CH}_2$  linked to the OH group appears as a multiplet at  $\delta = 3.53$  ppm, while in **5a-d** the  $\text{CH}_2$  peak, which is linked to the purine moiety, appears as two doublet of doublets between  $\delta 4.12 - 4.21$

ppm and  $\delta$  4.20 - 4.32 ppm respectively. Nevertheless, the methylene group of **5c** appears as multiplet centered at  $\delta$  4.26 ppm. Moreover, in this family, the main difference in  $^{13}\text{C}$  is the  $\text{CH}_2$  aliphatic signal, which appears at  $\delta$  64.34 ppm in the intermediate **4** and between  $\delta$  46.10 - 47.00 in purines **5a-d**. Otherwise, the trifluoromethyl group presents in **5d** is corroborated by the two quadruplets in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum which appear at  $\delta$  145.80 ppm ( $J_{\text{C-CF}_3} = 37.7$ , C-6') and  $\delta$  120.80 ppm ( $J_{\text{CF}} = 275.9$ ,  $\text{CF}_3$ ), respectively.

In the last pyridoxazine family, the intermediate **6**, structurally different from derivatives **7 – 10**, does not follow the same coupling pattern of the latter, being similar the signals of the remaining intermediates except for H-3. This proton appears between  $\delta$  3.74 – 3.76 ppm in the untosylated derivatives (**7, 8**) and at  $\delta$  4.95 – 4.98 ppm in the tosylated ones (**9, 10**), respectively. In addition, target molecules **11a** and **11b** show similar chemical shifts with respect to their tosylated intermediates, except for the  $\text{CH}_2\text{X}$  and  $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{X}$  aliphatic signals, due to the different nature of the heteroatom linked to the aliphatic chain (X = O in the intermediate compounds; X = N in the final derivatives).



**Table 3.**  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignments of intermediate compounds **1**, **2**, **4**, **6-10**.

Compound	C-2	C-3	C-4	C-4a	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	$\underline{\text{CH}_2\text{OR}}$	$\frac{\text{CH}_2\text{CH}_2}{\text{OR}}$
<b>1</b>	72.24	45.31	-	132.95	115.35	121.20	118.75	116.60	143.30	59.40	35.16
<b>2</b>	69.97	48.47	-	123.51	117.25	120.76	125.82	123.98	146.44	58.70	34.88
<b>4</b>	48.47	35.25	29.48	137.01	129.52	126.62	124.93	123.60	129.37	64.34	-
<b>6</b>	67.17	44.57	-	138.46	-	139.56	120.60	124.30	140.67	33.60	-
<b>7</b>	68.70	49.25	-	146.99	-	139.02	113.18	121.72	139.08	60.06	33.35
<b>8</b>	69.27	48.64	-	147.53	-	140.52	114.18	121.11	139.59	60.67	35.26
<b>9</b>	67.75	50.92	-	140.66	-	140.11	119.64	123.88	137.96	59.39	33.33
<b>10</b>	67.44	50.83	-	140.50	-	140.21	119.82	124.46	137.39	58.28	33.40

Solvent used  $\text{CD}_3\text{OD}$ .  
 Chemical shifts (in  $\text{CDCl}_3$ ) are reported in  $\delta$  (ppm) relative to  $\text{CDCl}_3$ ;  $^{13}\text{C}$  signals for the tosyl substituents: **2**, C-1': 135.41, C-2', C-6': 127.05, C-3', C-5': 129.70, C-4': 144.07,  $\text{CH}_3$ : 21.39; **4**, C-1': 136.90, C-2', C-6': 127.07, C-3', C-5': 129.79, C-4': 143.78,  $\text{CH}_3$ : 21.65; **9**, C-1': 137.98, C-2', C-6': 128.26, C-3', C-5': 128.95, C-4': 143.98,  $\text{CH}_3$ : 21.39; **10**, C-1': 136.66, C-2', C-6': 128.16, C-3', C-5': 129.17, C-4': 143.98,  $\text{CH}_3$ : 21.39.  
 $^{13}\text{C}$  signals for the syllil substituent: **8**: C: 18.69,  $(\text{CH}_3)_3$ : 26.38,  $(\text{CH}_3)_2$ : 4.96; **9**: C: 18.03,  $(\text{CH}_3)_3$ : 25.76,  $(\text{CH}_3)_2$ : 5.65.  
 Other signals of compound **6**:  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ : 170.21,  $\text{COCH}_3$ : 169.69,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ : 60.69,  $\text{COCH}_3$ : 25.70,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ : 13.95.

Table 4. <sup>13</sup>C NMR signal assignments of final compounds **3a-d**, **5a-d**, **11a-b**.

Comp.	C-2	C-3	C-4	C-4a	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	CH <sub>2</sub> N H <sub>2</sub> N	C-2'	C-4'	C-5'	C-6'	C-8'
<b>3a</b>	68.66	48.31	-	123.6 8	117.4 0	121.6 0	126.4 4	124.3 5	145.9 8	40.61	153.1 9	153.1 7	130.8 6	151.9 1	146.0 7
<b>3b</b>	68.33	48.18	-	123.5 2	117.2 5	121.4 2	126.2 9	124.2 9	145.9 8	40.33	151.9 7	151.7 2	131.6 2	151.0 9	145.2 4
<b>3c</b>	68.32	48.08	-	123.4 2	117.1 7	121.3 1	126.1 8	124.1 3	145.8 8	40.29	151.8 0	150.3 9	135.2 0	143.0 7	145.0 3
<b>3d</b>	68.62	48.07	-	123.4 4	117.1 5	121.3 6	126.1 7	124.0 0	145.8 0	40.15	152.4 0	153.6 5	129.9 2	145.2 0(q, 37.1)	147.2 9
<b>5a</b>	48.22	32.35	30.43	136.1 1	129.2 9	127.0 3	125.0 6	123.6 0	126.8 7	46.71	153.0 0	152.8 6	130.5 8	151.7 8	145.9 6
<b>5b</b>	48.47	32.85	30.67	136.3 3	129.3 4	127.1 9	125.2 0	123.9 7	127.2 3	46.70	152.0 1	151.8 4	131.5 9	151.3 3	145.2 2
<b>5c<sup>a</sup></b>	48.51	32.58	30.30	136.0 4	129.7 3	126.7 1	125.0 7	123.4 7	128.7 7	46.10	151.7 8	150.9 5	133.6 3	141.9 6	147.6 2
<b>5d</b>	48.90	33.24	31.09	136.7 3	129.7 9	127.6 4	125.6 2	124.2 7	127.5 1	47.00	152.4 0	154.2 5	130.3 6	145.8 0(q, 37.7)	147.9 2
<b>11a</b>	66.92	51.13	-	137.0 0	-	140.9 4	120.4 6	124.7 9	140.3 4	41.74	152.6 3	153.1 3	130.9 5	151.6 6	146.7 2
<b>11b</b>	67.02	51.21	-	137.1 5	-	140.9 3	120.3 6	124.7 2	140.3 4	41.60	151.0 2	151.8 1	131.8 2	151.6 8	145.9 6

Solvent used CD<sub>3</sub>OD.<sup>a</sup>Solvent used DMSO-d<sub>6</sub>.Chemical shifts (in CDCl<sub>3</sub>) are reported in  $\delta$  (ppm) relative to CDCl<sub>3</sub>.

<sup>13</sup>C signals for the tosyl substituents: **3a**, C-1": 135.49, C-2": 127.08, C-3": 129.95, C-4": 144.83, CH<sub>3</sub>: 21.77; **3b**, C-1": 135.29, C-2": 126.87, C-3": 129.72, C-4": 144.65, CH<sub>3</sub>: 21.61; **3c**, C-1": 134.11, C-2": 126.78, C-3": 129.64, C-4": 144.55, CH<sub>3</sub>: 21.57; **3d**, C-1": 135.30, C-2": 126.83, C-3": 129.69, C-4": 144.57, CH<sub>3</sub>: 21.37; **5a**, C-1": 135.94, C-2": 126.66, C-3": 129.63, C-4": 144.01, CH<sub>3</sub>: 21.38; **5b**, C-1": 136.21, C-2": 126.83, C-3": 129.72, C-4": 143.99, CH<sub>3</sub>: 21.51; **5c**, C-1": 135.76, C-2": 126.63, C-3": 129.95, C-4": 144.43, CH<sub>3</sub>: 21.13; **5d**, C-1": 136.63, C-2": 127.25, C-3": 129.15, C-4": 144.45, CH<sub>3</sub>: 21.90; **11a**, C-1": 136.01, C-2": 128.18, C-3": 129.41, C-4": 144.51, CH<sub>3</sub>: 21.49; **11b**, C-1": 136.21, C-2": 128.23, C-3": 129.37, C-4": 144.43, CH<sub>3</sub>: 21.50.

<sup>13</sup>C signals for the CF<sub>3</sub> substituent: **3d**: 145.20 (q, 37.1), 120.69 (q, 274.9); **5d**: 145.89 (q, 37.7), 120.80 (q, 275.9).

HSQC and HMBC experiments were performed on an intermediate and a final molecule of each family. Table 5 shows the HSQC correlations for compounds **2**, **4**, **7**, **3c**, **5b** and **11a**, whereas Figure 1 illustrates the more important connectivities found in the HMBC spectra of the same molecules.

**Table 5.** HSQC correlations found for compounds **2**, **4**, **6**, **7**, **3c**, **5b** and **11a**

<sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>3c</b>	<b>5b</b>	<b>11a</b>
H-2	3.58	4.12, 3.42	4.47, 4.07	4.15, 3.82	3.34	4.01, 3.45	4.18, 3.75
C-2	69.97	48.47	67.17	68.7	68.32	48.47	66.92
H-3	4.32, 3.19	1.94	5.41	3.76	4.19, 3.21	2.39	4.77
C-3	48.47	35.25	44.57	49.25	48.08	32.85	51.13
H-4	-	2.24	-	5.12	-	2.30	-
C-4	-	29.48	-	-	-	30.67	-
H-5	6.79	7.04	-	-	6.77	6.98	-
C-5	115.35	129.52	-	-	117.17	129.34	-
H-6	6.92	7.15	7.96	7.57	6.93	7.2	8.02
C-6	120.76	126.62	139.5 6	139.02	121.31	127.19	140.34
H-7	7.04	7.04	7.00	6.49	7.06	7.08	6.96
C-7	125.82	124.93	120.6 0	113.18	126.18	125.2	120.46
H-8	7.83	7.8	7.20	6.93	7.77	7.73	7.15
C-8	123.98	123.60	124.3 0	121.72	124.13	123.97	124.79
H-2'	-	-	-	-	8.69	8.74	-
C-2'	-	-	-	-	151.8	152.01	153.13
H-8'	-	-	-	-	7.98	8.04	8.30
C-8'	-	-	-	-	145.03	145.22	146.72
CH <sub>2</sub> X	3.76	3.53	2.47	3.87, 3.97	4.44	4.15,4.2 5	4.44, 4.52
CH <sub>2</sub> X	58.7	64.34	33.60	60.06	40.29	46.7	41.74
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> X	1.77	-	-	1.70	2.04, 2.28	-	2.13
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> X	34.88	-	-	33.35	31.67	-	30.63
COOCH <sub>2</sub> CH	-	-	4.12	-	-	-	-
<sup>3</sup> COOCH <sub>2</sub> CH	-	-	60.69	-	-	-	-
<sup>3</sup> COOCH <sub>2</sub> CH	-	-	1.22	-	-	-	-
<sup>3</sup> COOCH <sub>2</sub> CH	-	-	13.95	-	-	-	-
<sup>3</sup> COCH <sub>3</sub>	-	-	2.59	-	-	-	-
<sup>3</sup> COCH <sub>3</sub>	-	-	25.70	-	-	-	-

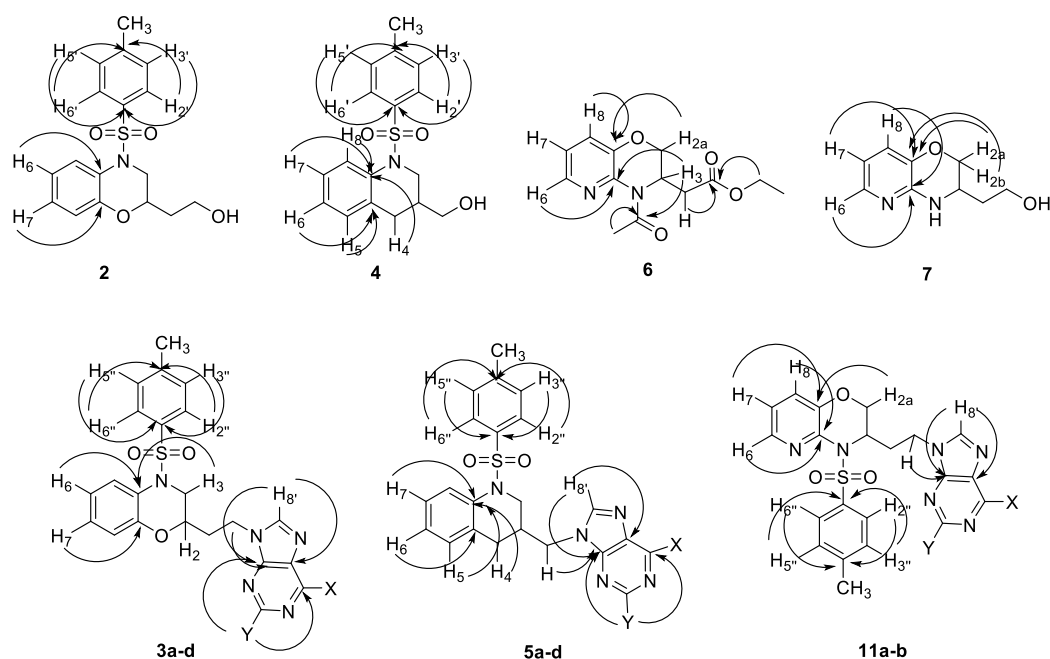
HSQC experiments performed on compounds **2**, **4**, and **7** allows the assignment of the secondary carbon atoms chemical shifts C-3, CH<sub>2</sub>OR and CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR, and the assignment of the chemical shifts for tertiary carbon atoms C-5, C-6, C-7 and C-8 in the intermediate derivatives **1**, **2**, **4**, **6-8** and **10**. These atoms show signals in ranges of  $\delta$  48.87 - 72.24 (C-2),  $\delta$  35.25 - 50.92 (C-3),  $\delta$  33.60 - 64.34 (CH<sub>2</sub>OR),  $\delta$  33.33 - 35.26 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR),  $\delta$  115.35 - 129.52 (C-5),  $\delta$  120.76 -140.52 (C-6),  $\delta$  113.18 - 125.82 (C-7) and  $\delta$  116.60 - 124.46 (C-8).

Similar HSQC experiments performed on **3c**, **5b** and **11a** indicate that the <sup>13</sup>C NMR signals for the secondary and tertiary carbon atoms in the purine derivatives **3a-d**, **5a-d** and **11a-b** are in similar ranges. Such chemical shifts are the following:  $\delta$  48.22 - 68.66 (C-2),  $\delta$  32.35 - 51.21 (C-3),  $\delta$  40.15 - 47.00 (CH<sub>2</sub>N),  $\delta$  30.63 - 31.88 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N),  $\delta$  30.30 - 31.09 (C-4),  $\delta$  117.15 - 129.79 (C-5),  $\delta$  121.31 - 140.94 (C-6),  $\delta$  120.31 - 126.44 (C-7),  $\delta$  123.47 - 124.79 (C-8),  $\delta$  151.02 -153.19 (C-2') (except for **3a**, **5a** and **11a** where C-2' is a quaternary carbon atom) and  $\delta$  145.03 - 147.92 (C-8').

The quaternary carbon signals were confirmed by HMBC spectra on the intermediate (**2**, **4** and **7**) and final (**3c**, **5b** and **11a**) compounds (Figure 1). In **2**, correlation between H-6 ( $\delta$  6.92) and the <sup>13</sup>C at 123.51 ppm, allows the unequivocal assignment of C-4a; another correlation between H-7 ( $\delta$  7.04) and the peak at 146.44 ppm allows the identification of C-8a. In the same way, the H-2' and H-6' signals ( $\delta$  7.54) correlate with the <sup>13</sup>C peak at 144.07 ppm, making possible to assign this peak to C-4', and the H-3' and H-5' signals ( $\delta$  7.23) correlate to peak at  $\delta$  135.41 ppm, being identified as C-1' accordingly. In **4**, correlations between H-6 ( $\delta$  7.15) and H-5 ( $\delta$  7.04) with the <sup>13</sup>C signal which appears at 137.01 ppm allow to identify it as C-4a. Assignment of C-8a has been possible due to the interactions between the signals at  $\delta$  7.06 ppm (H-7) and  $\delta$  7.68 ppm (H-8) and the <sup>13</sup>C peak at 129.27 ppm. Correlation between H-4 ( $\delta$  2.24 and  $\delta$  2,59 ppm) and the same <sup>13</sup>C peak permits us to assign this peak to C-8a. Furthermore, the quaternary

carbons of the tosyl group C-1'' and C-4'' were assigned by the observed correlation among  $\delta$  7.21 ppm (H-3'' and H-5'') and the  $^{13}\text{C}$  atom at 139.90 ppm (C-1''). Correlation between  $\delta$  7.51 ppm (H-2'' and H-6'') and  $\delta$  143.78 ppm allows us to assign unequivocally this signal to C-4''. Finally, in **7**, correlations of H-2a ( $\delta$  4.14), H-2b ( $\delta$  3.82) and H-7 ( $\delta$  6.49) and the  $^{13}\text{C}$  at  $\delta$  139.08 ppm enables the assignment of C-8a at  $\delta$  130.08 ppm. In addition, the assignment of C-4a is possible due to the observed correlation between H-6 ( $\delta$  7.57) and H-8 ( $\delta$  6.93) with the peak at  $\delta$  139.08 ppm.

The HMBC experiment performed on **3c** indicates correlations between H-3 ( $\delta$  4.19) and H-6 ( $\delta$  6.93) with the signal  $\delta$  123.42 ppm (C-4a). Other correlation exists between H-7 ( $\delta$  7.06) and the peak which appears at  $\delta$  145.88 ppm (C-8a). In the same way, the  $^{13}\text{C}$  at  $\delta$  150.39 ppm that correlates with H-2' ( $\delta$  8.69), H-8' ( $\delta$  7.98) and  $\text{CH}_2\text{N}$  ( $\delta$  7.98) can be identified as C-4'. A correlation of H-2' ( $\delta$  8.69) and the  $^{13}\text{C}$  peak at  $\delta$  143.07 ppm allows to identify C-6' and finally, correlation of H-8' ( $\delta$  7.98) and the signal at 135.20 ppm permits us to identify it as C-5'. C-1'' corresponds to a signal appearing at  $\delta$  134.11 ppm due to its correlation with H-2'' and H-6'' ( $\delta$  7.36). C-4'' is assigned to the  $^{13}\text{C}$  peak at  $\delta$  129.64 ppm because is correlated with H-3'' and H-5'' ( $\delta$  7.06).



**Figure 1.** Main connectivities found in the HMBC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  spectra of intermedia compounds (**2**, **4**, **6**, **7**) and final derivatives (**3a-d**, **5a-d**, **11a-b**).

In **5b**, the assignment of the C-4a and C-8a signals of the quaternary carbons included in the tetrahydroquinoline heterocycle has been deduced through the correlations between H-6 ( $\delta$  7.20) and the  $^{13}\text{C}$  at 136.33 ppm (C-4a). In the same way, correlations between  $\delta$  7.08 (H-7),  $\delta$  6.96 (H-5) and H-4 ( $\delta$  2.31 and 2.59) with  $\delta$  127.23, permits the latter to be assigned to C-8a. In addition, the quaternary carbons of the purine moiety and the tosyl group have been assigned by similar correlations to those of their benzoxazine isosteres, being these signals C-4' ( $\delta$  151.84 ppm), C-5' ( $\delta$  131.59 ppm), C-6' ( $\delta$  152.01 ppm), C-1'' ( $\delta$  136.21 ppm) and C-4'' ( $\delta$  143.99 ppm).

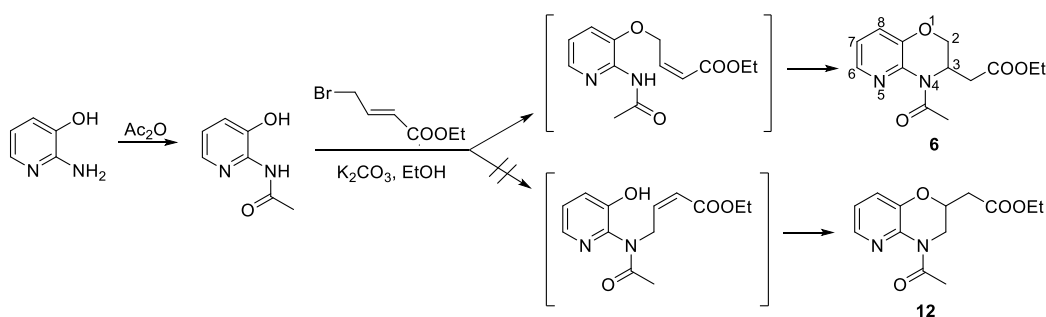
The HMBC experiment performed on **11a**, shows that H-8 ( $\delta$  7.15) is correlated with the  $^{13}\text{C}$  signal at  $\delta$  137.00 ppm, being assigned this to C-4a. H-7 ( $\delta$  6.96) and H-2a ( $\delta$  4.18) are correlated with the peak at  $\delta$  140.34 ppm (C-8a). Furthermore, the signal appearing at  $\delta$  153.13 ppm is assigned to C-4' due to its correlation with H-8' ( $\delta$  8.30) and  $\text{CH}_2\text{N}$  ( $\delta$  4.44 and  $\delta$  4.52).

In addition, H-8' is correlated with a signal at  $\delta$  130.95, which can be assigned to C-5'. Moreover, the quaternary carbon atoms identification of the tosyl moiety has been deduced similar as in their two isosteric families, being C-1'' the peak at  $\delta$  136.01 ppm and C-4'' the  $\delta$  144.51 ppm signal. At last, the characterization of quaternary atoms in the purine skeleton C-2' and C-6' has been deduced by analogy to the corresponding purine chemical shifts already justify in the two previous isosteric families (see Figure 1).

Intermediate **6**, precursor of the pyridoxazine family **11a-b**, has been studied in detail to prove its structure. In this way, to obtain only the desired 3-regioisomer we have started from 2-aminopyridin-3-ol, followed by acylation of its amino group by treatment with acetic anhydride and pyridine, to decrease the nucleophilicity of the amino group. Subsequently, cyclization of this intermediate with 4-bromobut-2-enoate (ethyl crotonate) in ethanol and  $K_2CO_3$  only gave **6**, but not its 2-regioisomer **12** (Scheme 4). This is contrary to that described by other authors who obtained a mixture of two pyridoxazine regioisomers (ethyl-4-acetyl-3,4-dihidro-2*H*-pyrido[3,2-*b*][1,4]oxazine-2-carboxylate and ethyl-4-acetyl-3,4-dihidro-2*H*-pyrido[3,2-*b*][1,4]oxazine-3-carboxylate), by reaction between *N*-(3-hydroxypyridin-2-yl)acetamide and ethyl 2,3-dibromopropionate in the presence of  $K_2CO_3$ , employing  $CH_3CN$  as solvent [12].

In order to unequivocally determine the structure of **6**, 2D NMR (HSQC and HMBC) experiments have been carried out. HSQC (Table 5) allows the unequivocal assignment of the tertiary carbon in the pyrido[3,2-*b*][1,4]oxazine ring C-3, C-6, C-7 and C-8, and the methyl group of both, acetyl and ethyl carboxylate moieties. These atoms show signals at  $\delta$  44.57, 139.56, 120.60, 124.30, 25.70 and 13.95 ppm, respectively. In addition, the secondary carbons C-2 ( $\delta$  67.17 ppm), the  $CH_2$  linker carbon ( $\delta$  33.60 ppm) and the  $CH_2$  of the ethyl carboxylate group ( $\delta$  60.69 ppm) have also been assigned.

The HMBC experiment to determine the quaternary carbons (Figure 1) shows that H-2a ( $\delta$  4.47 ppm) and H-8 ( $\delta$  6.93 ppm) are correlated with the  $^{13}\text{C}$  at  $\delta$  140.67 ppm (C-8a). H-3 ( $\delta$  5.41 ppm) and H-6 ( $\delta$  7.96 ppm) peaks are correlated with the signal at  $\delta$  138.46 (C-4a). In addition, both ester and amide CO groups show very similar chemical shifts ( $\delta$  170.21 and  $\delta$  169.69 ppm). The signal at  $\delta$  4.12 ppm of the  $\text{CH}_2$  ethyl carboxylate group is correlated with a peak at  $\delta$  170.21 ppm (CO ester group). Furthermore, a correlation between the  $\text{CH}_3$  amide group ( $\delta$  2.59 ppm) and the  $^{13}\text{C}$  at  $\delta$  169.69 ppm indicates that this peak is the CO amide moiety.



**Scheme 4.** Detailed route leading to the intermediate regioisomer **6** from 2-aminopyridin-3-ol.

Scheme 4 shows two possible structures (**6** and **12**) that could be formed in the cyclization reaction. In our case, we have only obtained **6**, as demonstrated by the  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMBC study. This experiment corroborates that H-3 ( $\delta$  5.41 ppm) is correlated with the  $^{13}\text{C}$  chemical shift of the amide group ( $\delta$  169.69). This correlation confirms the proximity between these groups and proves that **6** but not **12** is the obtained regioisomer.

Due to **6** is the intermediate of the final purines **11a-b**, it is demonstrated that the side chain links through the 3-position of the heterocycle, unlike derivatives **3a-d**, whose purine residue binds through its 2-position.

Nuclear Overhauser Spectroscopy experiments performed on compound **3c** (X = Br, Y = H) shows the existence of a NOESY effect between H-2 and



H-8' and within both multiplet hydrogen atoms  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$  of the linear chain and H-8', A correlation with  $\text{CH}_2\text{N}$  and the same hydrogen of the purine skeleton H-8' is observed, but no NOESY effects are noticed among H-3a or H-3b and H-8'. These facts are compatible with a preferred conformational arrangement in which the imidazole ring of the purine is located below that of the benzoxazine moiety (Figure 2a).

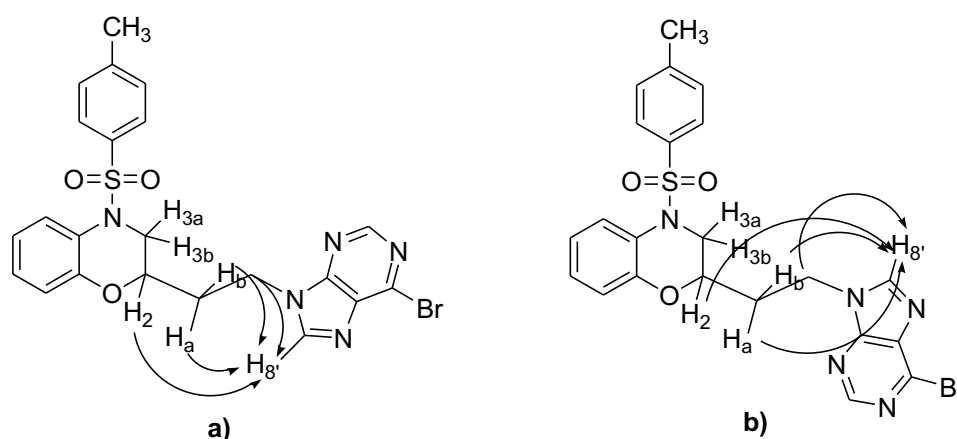


Figure 2. Selected NOESY correlations for compound 3c.

## Acknowledgements

This work was partially supported by the Junta de Andalucía (project nº CS2016.1).

## References

- [1] S. Ijaz, N. Akhtar, M. S. Khan, A. Hameed, M. Irfan, M. A. Arshad, S. Ali, M. Asrar. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103*, 1643–1651.
- [2] S. J. Li, X. Zhang, X. H. Wang, C. Q. Zhao. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *156*, 316–343.

- [3] M. S. Kumar, K. M. Adki. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 233–245.
- [4] J. Campos, E. Saniger, J. A. Marchal, S. Aiello, I. Suárez, H. Boulaiz, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1423–1438.
- [5] A. Conejo-García, M. C. Núñez, M. Díaz-Gavilán, O. Cruz-López, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos. *Expert Opin. DrugDiscov.* **2008**, *3*, 1223–1235.
- [6] M. C. Núñez, M. Díaz-Gavilán, A. Conejo-García, O. Cruz-López, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2614–2631.
- [7] A. Conejo-García, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2008**, *12*, 212–222.
- [8] M. Díaz-Gavilán, A. Conejo-García, O. Cruz-López, M. C. Núñez, D. Choquesillo-Lazarte, J. M. González-Pérez, F. Rodríguez-Serrano, J. A. Marchal, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 127–135.
- [9] A. Conejo-García, M. E. García-Rubiño, J. A. Marchal, M. C. Núñez, A. Ramírez, S. Cimino, M. A. García, A. Aránega, M. A. Gallo, J. M. Campos. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3795–3801.
- [10] M. Díaz-Gavilán, J. A. Gómez-Vidal, F. Rodríguez-Serrano, J. A. Marchal, O. Caba, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1457–1460.
- [11] N. Fernández-Sáez, B. Rubio-Ruiz, J. M. Campos, A. Unciti-Broceta, M. D. Carrión, M. E. Camacho. *Future Med. Chem.* **2019**, DOI: 10.4155/fmc-2018-0291.

- [12] N. Henry, I. Sánchez, A. Sabatié, V. Bénéteau, G. Guillamuet, M. D. Pujol. *Tetrahedron* **2006**, 62, 2405-2412.









## Artículo 3

---




*Nerea Fernández Sáez*

---



Article

## Development of Biotransamination Reactions towards the 3,4-Dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-amine Enantiomers

Daniel González-Martínez <sup>1</sup>, Nerea Fernández-Sáez <sup>2</sup>, Carlos Cativiela <sup>3</sup>, Joaquín M. Campos <sup>2,4,\*</sup> and Vicente Gotor-Fernández <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Organic and Inorganic Chemistry Department, University of Oviedo, Avenida Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain; daniel.dgm9@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, c/Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain; nefdez\_p73@hotmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH), CSIC–Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; cativiela@unizar.es

<sup>4</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada/Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

\* Correspondence: jmcampos@ugr.es (J.M.C.); vicgotfer@uniovi.es (V.G.-F); Tel.: +34-958-243-850 (J.M.C.); +34-985-103-454 (V.G.-F)

Received: 7 September 2018; Accepted: 16 October 2018; Published: 19 October 2018



**Abstract:** The stereoselective synthesis of chiral amines is an appealing task nowadays. In this context, biocatalysis plays a crucial role due to the straightforward conversion of prochiral and racemic ketones into enantiopure amines by means of a series of enzyme classes such as amine dehydrogenases, imine reductases, reductive aminases and amine transaminases. In particular, the stereoselective synthesis of 1,5-benzoxathiepin-3-amines have attracted particular attention since they possess remarkable biological profiles; however, their access through biocatalytic methods is unexplored. Amine transaminases are applied herein in the biotransamination of 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-one, finding suitable enzymes for accessing both target amine enantiomers in high conversion and enantiomeric excess values. Biotransamination experiments have been analysed, trying to optimise the reaction conditions in terms of enzyme loading, temperature and reaction times.

**Keywords:** amine transaminases; asymmetric synthesis; benzoxathiepins; biocatalysis; biotransamination; stereoselective synthesis

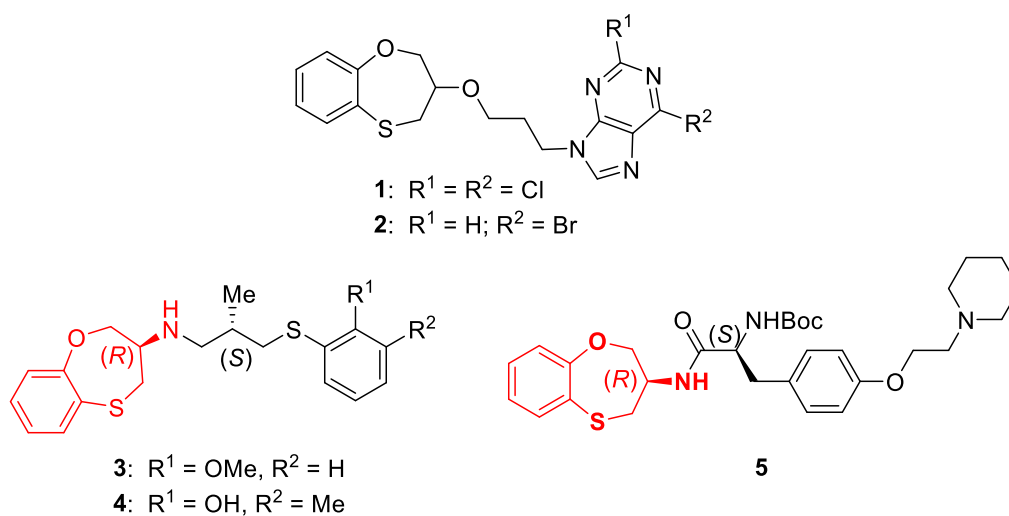
**Abstract:** The stereoselective synthesis of chiral amines is an appealing task nowadays. In this context, biocatalysis plays a crucial role due to the straightforward conversion of prochiral and racemic ketones into enantiopure amines by means of a series of enzyme classes such as amine dehydrogenases, imine reductases, reductive aminases and amine transaminases. In particular, the stereoselective synthesis of 1,5-benzoxathiepin-3-amines have attracted particular attention since they possess remarkable biological profiles; however, their access through

biocatalytic methods is unexplored. Amine transaminases are applied herein in the biotransamination of 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-one, finding suitable enzymes for accessing both target amine enantiomers in high conversion and enantiomeric excess values. Biotransamination experiments have been analysed, trying to optimise the reaction conditions in terms of enzyme loading, temperature and reaction times.

**Keywords:** amine transaminases; asymmetric synthesis; benzoxathiepins; biocatalysis; biotransamination; stereoselective synthesis

## 1. Introduction

We have reported several (*RS*)-benzo-fused seven-membered rings with oxygen and sulfur atoms in 1,5 relative positions with interesting anti-proliferative activities against the MCF-7 cancer cell line. The most active compounds are **1** and **2** [1] (Figure 1). Other compounds, such as **3** [2] and **4** [3], exhibited more potent anti-ischemic effects than reference compounds, whilst **5** can be the prototype for the design of more potent anti-proliferative agents [4] (Figure 1). The (*3R*)-3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-amine core appears in red in compounds **3–5** (Figure 1). Such a (*3R*)-amino-1,5-benzoxathiepin scaffold has been obtained from L-cystine  $((2R)$ -2-amino-3-[[ $((2R)$ -2-amino-2-carboxyethyl]disulfanyl]propanoic acid) [4,5]. The incorporation of  $\alpha$ -amino acids into heterocyclic structures is an effective strategy for generating numerous peptidomimetics and combinatorial library scaffolds.

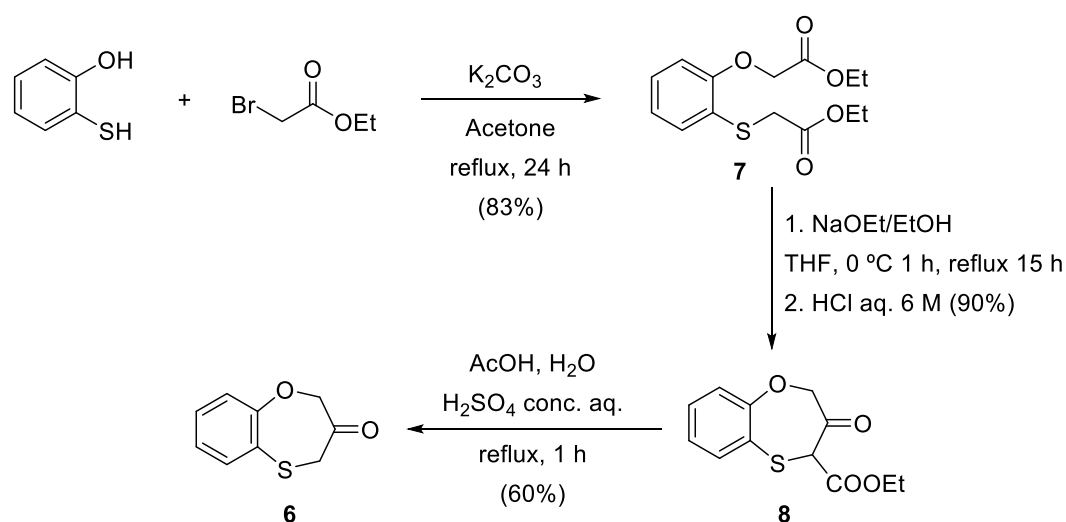


**Figure 1.** Benzo-fused seven-membered rings with oxygen and sulphur atoms in 1,5 relative positions (**1–5**) with interesting biological properties [1–5]. The (3*R*)-3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-amine core appears in red in compounds **3–5**.

Due to the fact that the primary amine is a key functional group in all areas of chemistry, methods to generate molecules containing primary amine groups are of intense interest and impact on many research fields. The use of enzymes in organic synthesis has gained maturity in the last few decades, since the advances in enzyme immobilisation, modification and rational design allow for the application of improved biocatalysts for the development of a wide variety of stereoselective transformations [6–10]. In this context, the synthesis of chiral amines is particularly challenging, with the conversion of prochiral ketones into optically active amines receiving great attention in recent years [11–14] by using mainly imine reductases [15–17] and amine transaminases (ATAs) [18–23]. Taking into account the potential of ATAs in the single biotransamination of cyclic ketones [24–32], even as part of multienzymatic sequences [33–38], but especially since they have served as valuable biocatalysts in the production of pharmacologically active products [39–43], we have focused herein our efforts in the pursuit of an efficient biotransamination protocol for 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-one (**6**).

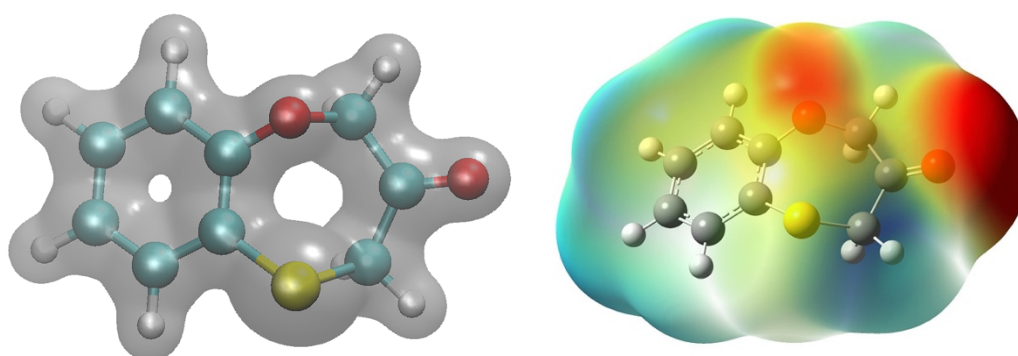
## 2. Results and Discussion

The synthesis of the benzo-fused seven-membered ketone **6** is depicted in Scheme 1. 2-Mercaptophenol was alkylated with two equivalents of ethyl bromoacetate in refluxing acetone in the presence of dry potassium carbonate to give diester **7** (83%). Examination of the Dieckmann reaction of **3** showed that the reaction occurred smoothly when sodium ethoxide/ethanol was used as a base in dry tetrahydrofuran (THF) to give ethyl 3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzothiepin-4-carboxylate **8** as the sole cyclised product in 90% yield. Decarboxylation of the  $\beta$ -ketoester **4** in boiling acetic acid containing aqueous sulfuric acid gave the 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzothiepin-3-one (**6**, 60%). Regioselectivity of the Dieckmann cyclisation was deduced based on the  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) spectral data of the resulting product **8**, which exhibited two doublets (integrating each one for 1H) at  $\delta$  4.88 and 4.59 ppm ( $J = 17.5$  Hz) assignable to the geminal methylene protons adjacent to the oxygen atom in the seven-membered ring. Compounds **7** and **8** have not been described previously, whilst ketone **6** was reported formerly by Sugihara et al. [44].



**Scheme 1.** Chemical synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-one **6**.

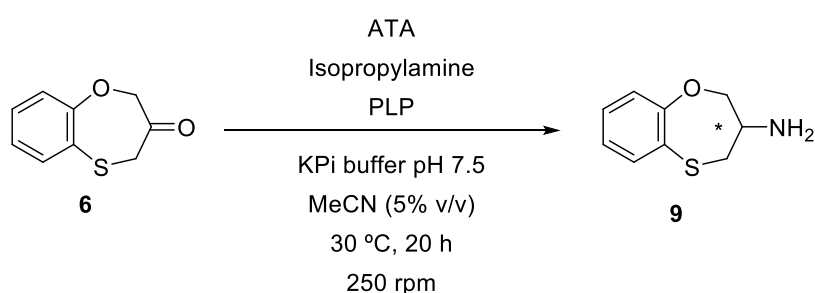
Due to the amine transaminases catalytic mechanism, which involves two pairs of ketones and amines in equilibrium, the reductive amination of the substrate must be thermodynamically favoured in order to obtain high yields of the desired product [45,46]. In order to displace the equilibrium towards amine formation, the removal of the generated co-products by coupling different multienzyme networks is often required [20], but also worth noting is the use of sacrificial substrates, which normally range from the use of a large excess of a commercially available amine donor, typically isopropylamine [47], to “smart cosubstrates”, mainly diamines, in a stoichiometric amount that are able to drive equilibrium by spontaneous cyclisation or aromatisation reactions [31,48–50]. Promisingly, we have found a favourable  $\Delta G$  of  $-31.0$  kJ/mol (calculated at M06-2X/6-311++G(3df,2p) level; see Section 3.8) for the transamination of **6** to **9** when using isopropylamine and acetone is formed as a by-product, probably due to ring strain instability. Figure 2 shows the charge density of the optimised geometry of the ketone **6**, where steric and electronic differences between the two substituents of the carbonyl group can be observed. This prompted us to study the biocatalytic process in depth.



**Figure 2.** Optimised geometry of 3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxathiepin-3-one (**6**): electronic isodensity contour (**left**); colour-mapped with the electrostatic potential (**right**), where red and blue zones are related to the electrophilic and nucleophilic zones of the molecule, respectively.

The biotransamination of 3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxathiepin-3-one (**6**, 20 mM) was then studied in standard conditions previously employed in our

research group [46,51]. These settings include the use of a large excess of isopropylamine as amine donor (1 M), pyridoxal 5'-phosphate (PLP, 1 mM) as cofactor, a 100 mM phosphate buffer pH 7.5 with acetonitrile (5% v/v) as cosolvent to favour the ketone solubility, at 30 °C and 250 rpm for 20 h (Scheme 2). Three different types of enzymes were employed: (a) lyophilised *Escherichia coli* cells containing overexpressed ATAs; (b) commercially available ATAs from Codexis Inc.; (c) commercially available ATAs from Enzymicals AG.



**Scheme 2.** Biotransamination of 3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxathiepin-3-one (**6**) into amine **9**, using ATAs.

Initially, for the biotransamination experiments made in house ATAs were used, all of them overexpressed in *Escherichia coli*. Some of them, such as the ones from *Chromobacterium violaceum* [52] or *Arthrobacter* species [53], displayed very low activity (<5%), while others such as *Arthrobacter citreus* [54] or the *Arthrobacter* species evolved variant named ArRmut11 [55] provided almost quantitative conversion but moderate (74% ee) or negligible stereoselectivity, respectively. Trying to improve both activity and selectivity values, commercially available ATAs were employed from two different commercial sources (Codexis Inc. and Enzymicals AG).

To start with, 30 Codexis enzymes were employed (Table 1), and we found that 19 of them led to the complete disappearance of the starting ketone. Remarkably, four enzymes from this kit provided the desired amine **9** in optical purities over 80% ee, the ATA-200 conducting to the (*S*)-**9** (entry 8),

while the TA-P1-B04, TA-P1-F03 and TA-P1-G05 gave access to its amine antipode (entries 23, 24 and 26).

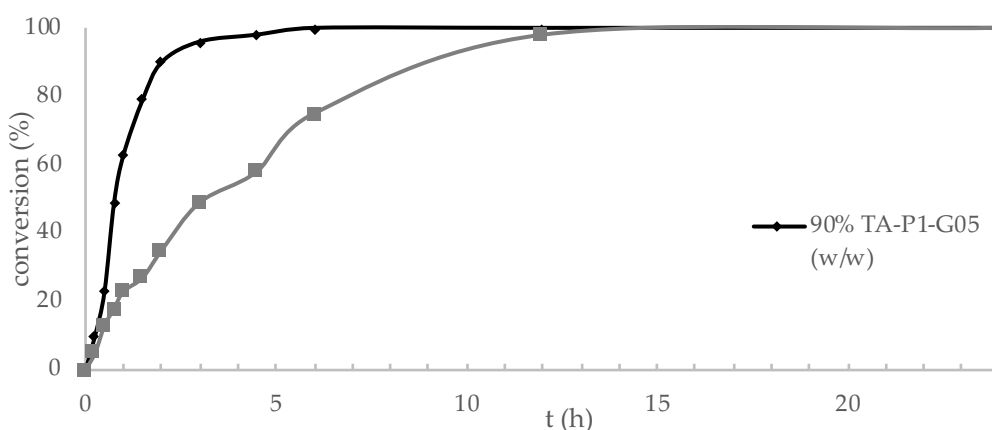
**Table 1.** Biotransamination of ketone **6** using Codexis ATAs.<sup>a</sup>

Entry	Enzyme	Conversion (%) <sup>b</sup>	ee (%) <sup>c</sup>
1	ATA-7	<1	n.d.
2	ATA-13	30	n.d.
3	ATA-24	93	<1
4	ATA-25	96	<1
5	ATA-33	>99	<1
6	ATA-113	13	n.d.
7	ATA-117	2	n.d.
8	ATA-200	>99	85 (S)
9	ATA-217	6	n.d.
10	ATA-234	4	n.d.
11	ATA-237	>99	41 (S)
12	ATA-238	4	n.d.
13	ATA-251	>99	72 (S)
14	ATA-254	>99	56 (S)
15	ATA-256	>99	63 (S)
16	ATA-260	>99	79 (S)
17	ATA-301	>99	7 (S)
18	ATA-303	>99	<1
19	ATA-412	>99	55 (S)
20	ATA-415	>99	<1
21	TA-P1-A01	>99	62 (R)
22	TA-P1-A06	>99	50 (R)
23	TA-P1-B04	>99	82 (R)
24	TA-P1-F03	>99	90 (R)
25	TA-P1-F12	>99	28 (R)
26	TA-P1-G05	>99	93 (R)
27	TA-P1-G06	>99	67 (R)
28	TA-P2-A01	4	n.d.
29	TA-P2-A07	60	16 (S)
30	TA-P2-B01	99	19 (R)

<sup>a</sup> For reaction details, see Section 3.6. <sup>b</sup> Conversion values measured by GC analyses of the reaction crudes. <sup>c</sup> Enantiomeric excess (ee) of amine **9** determined by HPLC analyses after derivatisation of the reaction crude. These ee values were calculated for those reactions with conversions over 30% (n.d.: not determined).

Using the best found enzyme, TA-P1-G05 (entry 26, >99% conversion and 93% ee), the transamination of **6** was followed over time using two enzyme loadings (90% and 45% w/w enzyme vs. ketone); we observed a very fast conversion in the first 2 h and then a slower rate until complete depletion of the substrate occurred, after 6 h or 24 h, respectively (Figure 3).





**Figure 3.** Study of the enzymatic transamination of ketone **6** with TA-P1-G05 over time employing: (◆) 90% of enzyme loading (w/w) or (■) 45% of enzyme loading (w/w vs. **6**).

Eight enzymes from Enzymicals AG were employed (Table 2), finding in three cases an amine with over 90% ee (entries 3, 7 and 8). Interestingly, the ATA08 from *Silicibacter pomeroyi* allowed the quantitative conversion of the ketone into the amine (*R*)-**9** (entry 7).

**Table 2.** Biotransamination of ketone **6** using Enzymicals AG ATAs.<sup>a</sup>

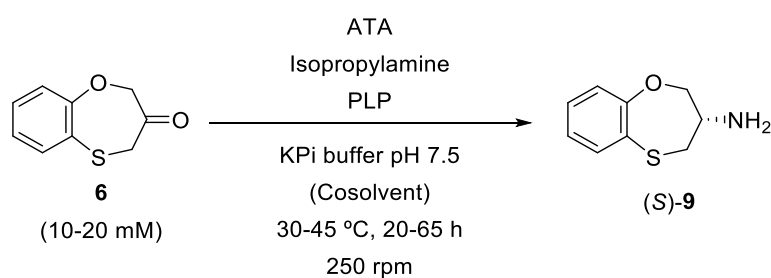
Entry	Enzyme	Conversion (%) <sup>b</sup>	ee (%) <sup>c</sup>
1	ATA01 <i>Aspergillus fumigatus</i>	9	n.d.
2	ATA02 <i>Gibberella zeae</i>	<1	n.d.
3	ATA03 <i>Neosartorya fischeri</i>	29	90 (S)
4	ATA04 <i>Aspergillus oryza</i>	2	n.d.
5	ATA05 <i>Aspergillus terreus</i>	8	n.d.
6	ATA06 <i>Penicillium chrysogenum</i>	<1	n.d.
7	ATA07 <i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	20	95 (S)
8	ATA08 <i>Silicibacter pomeroyi</i>	>99	91 (R)

<sup>a</sup> For reaction details, see Section 3.6. <sup>b</sup> Conversion values measured by GC analyses of the reaction crudes. <sup>c</sup> Enantiomeric excess of amine **9** determined by HPLC analyses after derivatisation of the reaction crude. These values were calculated for those reactions with conversions over 20% (n.d.: not determined).

In order to improve the conversion values towards the amine (*S*)-**9** the ATA03 *Neosartorya fischeri* (entry 3) and ATA07 *Mycobacterium vanbaalenii* (entry 7) were selected for optimization studies. So, new experiments were developed that includes the decrease of the substrate

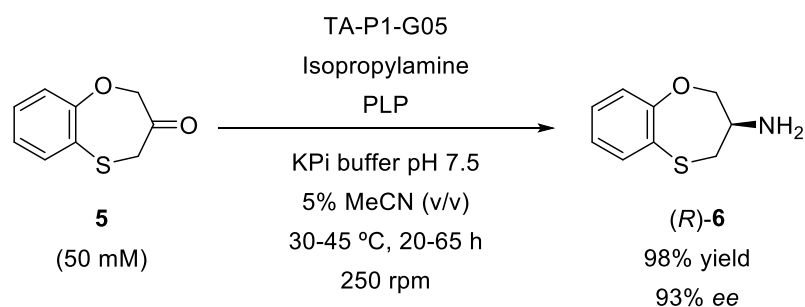
concentration, the use of longer reaction times, higher temperatures and enzyme loadings, and the performance of the biotransformations without an organic cosolvent (Table 3). Interestingly, the best results were found when no cosolvent was employed, suggesting a deactivation of both enzymes in the presence of even low amounts of the organic solvent (MeCN, 5% v/v). In particular, the reduction of the substrate concentration from 20 to 10 mM of ketone **6** allowed higher conversions, although this limited its practical application. In addition, prolonged reaction times led to better conversions, while the use of higher temperatures led to a significant deactivation of the enzyme.

**Table 3.** Optimisation of the biotransformation of ketone **6** using selected enzymes.<sup>a</sup>



Entry	Enzyme	[ <b>6</b> ] (mM)	Cosolvent <sup>b</sup>	T (°C)	t (h)	c (%) <sup>c</sup>
1	ATA03 <i>Neosartorya fischeri</i>	20	MeCN (5%)	30	20	29
2	ATA03 <i>Neosartorya fischeri</i>	10	none	30	48	86
3	ATA07 <i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	20	MeCN (5%)	30	20	20
4	ATA07 <i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	10	none	30	20	73
5	ATA07 <i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	20	none	45	48	43
6 <sup>d</sup>	ATA07 <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> <sup>d</sup>	20	none	30	65	91

<sup>a</sup> For reaction details, see Section 3.6. <sup>b</sup> Concentration values in v/v % indicated in brackets. <sup>c</sup> Conversion values measured by GC analyses of the reaction crudes. <sup>d</sup> Double the amount of enzyme was used (4 mg, 180% w/w).



**Scheme 3.** Scale-up of the biotransamination towards the (3*R*)-3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-amine (**R-9**).

Focusing on the scaling up of the biotransformations, we decided to move to higher substrate concentrations (50 mM of ketone) in order to produce a significant amount of the optically active amine (**R-9**), which is a precursor of organic molecules with interesting biological profiles [2–5]. In this case, 225 mg of **6** were used, selecting TA-P1-G05 (entry 26, Table 1) as the ideal candidate since in standard conditions the amine (**R-9**) was formed in complete conversion and good selectivity (93% ee). The enzyme loading was reduced from an initial 90% w/w enzyme vs. substrate ratio to 33% to improve the economy of the process, and after 22 h quantitative conversion was also achieved, maintaining the selectivity and isolating the desired amine in 98% yield after a simple liquid–liquid extraction protocol (Scheme 3). Measurement of the optical rotation for the pure amine and its corresponding hydrochloride salt allowed us to unequivocally assign the absolute configuration by comparison with previously reported data [4,5].

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. General Materials and Methods

2-Mercaptophenol, ethyl bromoacetate and sodium ethoxide were purchased from Sigma-Aldrich, now Merck (Madrid, Spain). PLP as enzyme cofactor, other chemical reagents and solvents were obtained with the highest quality available from Sigma-Aldrich-Fluka (Steinheim, Germany). Amine transaminases were obtained from Codexis Inc. (Redwood City, CA,

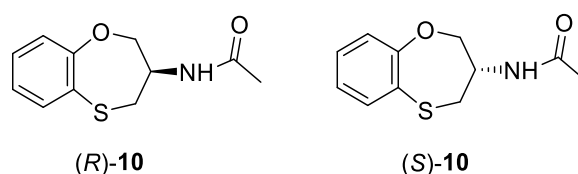
USA) and Enzymicals AG (Greifswald, Germany). Transaminases from *Chromobacterium violaceum* (2.1 U/mg), *Arthrobacter citreus* (0.9 U/mg), *Arthrobacter* species (0.6 U/mg) and the evolved ArRmut11 were overexpressed in *E. coli* and used as lyophilised cell lysates, as previously reported [26,56].

Melting point of compound **6** was measured in an open capillary in an Electrothermal digital melting point IA9200 apparatus (Cole-Parmer, Stone, UK) and is uncorrected. Elemental analyses were performed on a Thermo Scientific Flash 2000 analyzer (Thermo Flash & Carlo Erba Analyzers, Pennsauken, NJ, USA) and the measured values were indicated with the symbols of the elements or functions within  $\pm 0.4\%$  of the theoretical values. NMR spectra were recorded on a Bruker AV300 MHz spectrometer (Bruker Co., Faellanden, Switzerland). All chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) and referenced to the residual solvent signal as internal standard. High-resolution mass spectroscopy (HRMS) was performed on a VG AutoSpec Q high-resolution mass spectrometer (Fision Instrument, Milford, MA, USA). Measurement of the optical rotation values was carried out at 590 nm on an Autopol IV Automatic polarimeter (Rudolph Research Analytical, Hackettstown, NJ, USA).

Gas chromatography (GC) analyses were performed for the determination of conversion values using a Hewlett-Packard HP-6890 chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). A non-chiral HP-1 column (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) was used with the following temperature programme: 90 °C (2 min) then 10 °C/minutes and finally 180 °C (0 min). The reaction crudes were analysed, obtaining the following retention times: 9.3 min for ketone **6** and 10.5 min for amine **9**.

High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed for enantiomeric excess value measurements using an Agilent 1260 Infinity chromatograph with UV detector at 210 nm (Agilent Technologies, Inc.,

Wilmington, DE, USA). A Chiralpak IA (25 cm × 4.6 mm) was used as chiral column at 30 °C (Chiral Technologies, Mainz, Germany), employing a mixture of n-hexane/2-propanol (90:10) as eluent with a 0.8 mL/min flow. The reaction crudes were derivatised as acetamides, obtaining the following retention times: 11.2 min for the (*R*)-**10** and 12.6 min for the (*S*)-**10** enantiomer (Figure 4).



**Figure 4.** Structures of (*R*)- and (*S*)-**10**.

Thin-layer chromatography (TLC) analyses were conducted with Merck Silica Gel 60 F254 precoated plates (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). They were visualised with UV and potassium permanganate stain. Column chromatography purifications were performed using Merck Silica Gel 60 (230–400 mesh, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### 3.2. General Procedure for the Synthesis of Ethyl 2-Ethoxycarbonylmethylthiophenoxyacetate (**7**)

A mixture of 2-mercaptophenol (1 g, 7.925 mmol), ethyl bromoacetate (1.93 mL, 17.4 mmol) and dry K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.3 g, 23.8 mmol) in anhydrous acetone (20 mL) was added under argon atmosphere, and then stirred under reflux. After 24 h the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue purified by column chromatography (EtOAc/n-hexane, 1:8), obtaining **7** as a colourless syrup. Yield 83%. <sup>1</sup>H NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.43 (dd, J<sub>HH</sub> = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.21 (td, J<sub>HH</sub> = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 6.95 (td, J<sub>HH</sub> = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 6.76 (dd, J<sub>HH</sub> = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.26 (q, J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 2H), 4.11 (q, J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 2H), 3.72 (s, 2H), 1.28 (t, J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 1.18 (t, J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H) ppm. HRMS (ESI-TOF) (*m/z*) calcd.

for  $C_{14}H_{19}O_5S$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 299.0953, found 299.0955. Anal. Calcd for  $C_{14}H_{18}O_5S$ : C, 56.36; H, 6.08; S, 10.75. Found: C, 56.45; H, 5.89; S, 10.55.

### 3.3. General Procedure for the Synthesis of Ethyl 3-Oxo-3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxathiepin-4-carboxylate (**8**)

To a mixture of diester **7** (1.37 g, 4.59 mmol) in THF (40 mL) at 0 °C, a solution of NaOEt (21% wt, 1.78 g, 5.51 mmol) in EtOH (2.06 mL) was added. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h and then refluxed for 15 h. Solvent was evaporated under reduced pressure and the residue cooled to 0 °C, quenched first with water, and later with an aqueous HCl 6 M solution up to pH 6. The mixture was extracted with EtOAc (2 × 40 mL) and the organic fractions combined, dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , filtered and the solvent was removed under reduced pressure. Compound **8** was purified by column chromatography (EtOAc/n-hexane, 1:7) as a colourless oil. Yield, 90%. <sup>1</sup>H NMR (300.13 MHz,  $CDCl_3$ ) δ 7.22–7.12 (m, 1H), 7.08–6.85 (m, 3H), 4.88 (d,  $J_{HH} = 17.5$ , 1H), 4.75 (s, 1H), 4.59 (d,  $J_{HH} = 17.5$ , 1H), 4.29–4.15 (m, 2H), 1.21 (td,  $J_{HH} = 7.1$ , 1.4 Hz, 3H) ppm. HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for  $C_{12}H_{11}O_4S$  ( $M - H$ )<sup>+</sup> 251.0378, found 251.0376. Anal. Calcd for  $C_{12}H_{12}O_4S$ : C, 57.13; H, 4.79; S, 12.71. Found: C, 56.99; H, 4.98; S, 12.72.

### 3.4. General Procedure for the Synthesis 3,4-Dihydro-2H-1,5-benzoxathiepin-3-one (**6**)

A mixture of keto ester **8** (2.5 g, 11.9 mmol), acetic acid (4.16 mL),  $H_2SO_4$  concentrated (4.16 mL) and  $H_2O$  (23.8 mL) was refluxed for 1 h. The reaction was cooled to 0 °C, and water was added and extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 × 40 mL). The organic fractions were combined, dried (anhydrous  $Na_2SO_4$ ), filtered and the solvent was removed under reduced pressure. Compound **6** was purified by column chromatography (n-hexane and then, EtOAc/n-hexane 0.5:10) as a white solid, mp 29–31 °C, literature 28–31 °C [43]. Yield 60%. <sup>1</sup>H NMR (300.13 MHz,  $CDCl_3$ ) δ 7.18 (dd,  $J_{HH} = 8.0$ , 1.8 Hz, 1H), 7.14–7.07 (m, 1H), 7.01 (m,  $J_{HH} = 8.1$ , 4.8, 1.5 Hz, 2H), 4.75 (s,  $OCH_2$ ,

2H), 3.93 (s, SCH<sub>2</sub>, 2H) ppm. HRMS (ESI-TOF) (m/z) calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>S (M + H)<sup>+</sup> 181.0323, found 181.0321.

### *3.5. General Procedure for the Biotransamination of **6** Using ATAs Overexpressed in Escherichia coli*

The lyophilised cells of *E. coli* containing overexpressed transaminases (5 mg) were suspended in a 100 mM phosphate buffer pH 7.5 (475 µL) containing PLP (1 mM) and 2-propylamine (1 M). Then, a stock solution of ketone **6** in MeCN was added (25 µL of stock 0.4 M; final concentration 20 mM) and the mixture was shaken at 30 °C and 250 rpm for 20 h. After this time, the reaction was quenched by adding an aqueous 10 M NaOH solution (200 µL) and extracted with EtOAc (2 × 500 µL). The organic phases were combined and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The reaction crudes were analysed by GC to determine conversion values. Derivatisation were carried out in situ using acetic anhydride and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for the measurement of the enantiomeric excesses through HPLC.

### *3.6. General Procedure for the Biotransamination of **6** Using Commercial ATAs*

Transaminases from Codexis or Enzymicals AG (2 mg, 90% w/w) were suspended in a 100 mM phosphate buffer pH 7.5 (475 µL) containing PLP (1 mM) and 2-propylamine (1 M). Then, a stock solution of ketone **6** in MeCN was added (25 µL of stock 0.4 M; final concentration 20 mM) and the mixture was shaken at 30 °C and 250 rpm for 20 h. After this time, the reaction was quenched by adding an aqueous 10 M NaOH solution (200 µL) and extracted with EtOAc (2 × 500 µL). The organic phases were combined and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reaction crude was analysed by GC to determine conversion values and in situ derivatisation was carried out using acetic anhydride and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for the measurement of the enantiomeric excesses by HPLC.

### *3.7. Preparative Biotransamination of **6** under Optimised Conditions*

Ketone **6** (225 mg, 1.25 mmol) was dissolved in MeCN (1.25 mL) and 100 mM phosphate buffer pH 7.5 (25 mL), containing PLP (0.5 mM) and 2-propylamine (1 M), and the TA-P1-G05 (75 mg, 33% w/w) were successively added. The mixture was shaken at 30 °C and 250 rpm for 22 h. The reaction was quenched by adding an aqueous NaOH 4 M solution (5 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The organic phases were combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, combined and the solvent removed under reduced pressure, affording the (*R*)-**9** amine (220 mg).

(3*R*)-3,4-Dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-amine (*R*)-**9**. Yield: 220 mg (98%). <sup>1</sup>H NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.37 (dd, J<sub>HH</sub> = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.15 (ddd, J<sub>HH</sub> = 8.1, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.02–6.92 (m, 2H), 4.12–4.08 (m, 2H), 3.50–3.42 (m, 1H), 3.18 (dd, J<sub>HH</sub> = 14.2, 3.2 Hz, 1H), 2.80 (dd, J<sub>HH</sub> = 14.2, 5.7 Hz, 1H), 1.89 (br s, 2H) ppm. For the free amine (*R*)-**9** in 93% ee [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +32.6 (c = 0.1, MeOH), and for the hydrochloride salt (*R*)-**9**·HCl in 93% ee [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +41.2 (c = 0.1, MeOH); literature [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +48.9 (c = 0.35, MeOH) for the (*R*)-**9**·HCl in >99% ee [4].

### 3.8. Computational Methods

Calculations were performed using the Gaussian 09 package [57] at the M06-2X/6-311++G(3df,2p) level [58]. Molecular geometries of the studied compounds were optimised with tight convergence criteria and the frequencies were computed in order to obtain the thermal correction to the energy (298.15 K).

The molecular electrostatic potential of 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-one (**6**) was computed at M06-2X/6-311++G(3df,2p) level with tight SCF procedure and generating the density and potential cubes to plot the isodensity surface, colour-coded with the electrostatic potential.



#### **4. Conclusions**

The synthesis of the 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-amine enantiomers has been possible by means of the stereoselective biotransamination of the 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-one. A broad panel of commercially available amine transaminases were employed, finding after optimisation of parameters that affect the enzyme catalysis suitable reaction conditions for the access to both amine antipodes in high conversions and good selectivities. A scale-up experiment considering 50 mM substrate concentration was successfully achieved for the formation of the (*R*)-3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-amine (*R*-**9**), a valuable precursor of anti-proliferative agents.

**Author Contributions:** C.C, J.M.C. and V.G.-F. conceived the project; N.F-S performed the experiments for the chemical synthesis of the starting ketone; D.G.-M. performed the biotransamination experiments; D.G.-M. carried out analytical measurements and analysed the data; C.C, J.M.C. and V.G.-F. wrote the paper.

**Funding:** Financial support has been received from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Projects CTQ2013-40855-R and CTQ2016-75752-R), Junta de Andalucía (Project CS2016.1) and Gobierno de Aragon-FEDER (Research group E19\_17R).

**Acknowledgments:** D.G.-M (Severo Ochoa predoctoral fellowship) thanks the Asturian regional government for personal funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### **References**

1. Kimatrai, M.; Conejo-García, A.; Ramírez, A.; Andreolli, E.; García, M.Á.; Aránega, A.; Marchal, J.A.; Campos, J.M. Synthesis and

- Anticancer Activity of the (*R,S*)-Benzofused 1,5-Oxathiepin Moiety Tethered to Purines through Alkylidenoxy Linkers. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1854–1859.
2. Le Grand, B.; Pignier, C.; Létienne, R.; Cuisiat, F.; Rolland, F.; Mas, A.; Vacher, B. Sodium late current blockers in ischemia reperfusion: Is the bullet magic? *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3856–3866.
  3. Le Grand, B.; Pignier, C.; Létienne, R.; Cuisiat, F.; Rolland, F.; Mas, A.; Borrás, M.; Vacher, B. Na<sup>+</sup> currents in cardioprotection: Better to be late. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4149–4160.
  4. Mahfoudh, N.; Marín-Ramos, N.I.; Gil, A.M.; Jiménez, A.I.; Choquesillo-Lazarte, D.; Kawano, D.F.; Campos, J.M.; Cativiela, C. Cysteine-based 3-substituted 1,5-benzoxathiepin derivatives: Two new classes of anti-proliferative agents. *Arab. J. Chem.* **2018**, *11*, 426–441.
  5. Vacher, V.; Brunel, Y.; Castan, C.F. An improved process for the preparation of benzoxathiepins and their intermediates. FR 2868779 A120051014, 14 October 2005.
  6. Hudlicky, T.; Reed, J.W. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117–3132.
  7. Clouthier, C.M.; Pelletier, J.M. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585–1605.
  8. Milner, S.E.; Maguire, A.R. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. *Arkivoc* **2012**, 321–382.
  9. Torrelo, G.; Hanefeld, U.; Hollmann, F. Biocatalysis. *Catal. Lett.* **2015**, *145*, 309–345.
  10. Albarrán-Velo, J.; González-Martínez, D.; Gotor-Fernández, V. Stereoselective Biocatalysis. A mature technology for the asymmetric synthesis of pharmaceutical building blocks. *Biocatal. Biotransf.* **2018**, *36*, 102–130.

11. Höhne, M.; Bornscheuer, U.T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51.
12. Kroutil, W.; Fischereeder, E.-M.; Fuchs, C.S.; Lechner, H.; Mutti, F.G.; Pressnitz, D.; Rajagopalan, A.; Sattler, J.H.; Simon, R.C.; Siirola, E. Asymmetric preparation of *prim*-, *sec*-, and *tert*-amines employing selected biocatalysts. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751–759.
13. Kohls, H.; Steffen-Munsberg, F.; Höhne, M. Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180–192.
14. Schrittwieser, J.H.; Velikogne, S.; Kroutil, W. Biocatalytic imine reduction and reductive amination of ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655–1685.
15. Gaménara, D.; Domínguez de María, P. Enantioselective imine reduction catalyzed by imine reductases and artificial metalloenzymes. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2989–2992.
16. Grogan, G.; Turner, N.J. InspiRED by nature: NADPH-dependent imine reductases (IREDs) as catalysts for the preparation of chiral amines. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 1900–1907.
17. Mangas-Sánchez, J.; France, S.P.; Montgomery, S.L.; Aleku, G.A.; Man, H.; Sharma, M.; Ramsden, J.I.; Grogan, G.; Turner, N.J. Imine reductases (IREDs). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 19–25.
18. Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Jensen, J.S.; Al-Haque, N.; Neto, W.; Woodley, J.M. Process Considerations for the Asymmetric Synthesis of Chiral Amines Using Transaminases. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479–1493.
19. Man, S.; Yun, H.  $\omega$ -Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001.
20. Simon, R.C.; Richter, N. Busto, E.; Kroutil, W. Recent developments of cascade reactions involving  $\omega$ -transaminases. *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143.

21. Fuchs, M.; Farnberger, J.E.; Kroutil, W. The industrial age of biocatalytic transamination. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6965–6982.
22. Guo, F.; Berglund, P. Transaminase biocatalysis: Optimization and application. *Green Chem.* **2017**, *19*, 333–360.
23. Patil, M.D.; Grogan, G.; Bommarius, A.; Yun, H. Recent advances in  $\omega$ -transaminase-mediated biocatalysis for the enantioselective synthesis of chiral amines. *Science* **2010**, *329*, 305–309.
24. Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Asymmetric synthesis of optically pure pharmacologically relevant amines Employing  $\omega$ -transaminases. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761–2766.
25. Höhne, M.; Kühn, S.; Robins, K.; Bornscheuer, U.T. Efficient asymmetric synthesis of chiral amines by combining transaminase and pyruvate decarboxylase. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 363–365.
26. Mutti, F.G.; Fuchs, C.S.; Pressnitz, D.; Sattler, J.H.; Kroutil, W. Stereoselectivity of four (*R*)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3227–3233.
27. Truppo, M.; Janey, J.M.; Grau, B.; Morley, K.; Pollack, S.; Hughes, G.; Davies, I. Asymmetric, biocatalytic labeled compound synthesis using transaminases. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1556–1559.
28. Pressnitz, D.; Fuchs, C.S.; Sattler, J.H.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Mutti, F.G.; Kroutil, W. Asymmetric amination of tetralone and chromanone derivatives employing  $\omega$ -transaminases, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 555–559.
29. Park, E.-S.; Malik, M.S.; Dong, J.-Y.; Shin, J.-S. One-pot production of enantiopure alkylamines and arylalkylamines of opposite chirality catalyzed by  $\omega$ -transaminase. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1734–1738.
30. Richter, N.; Simon, R.C.; Lechner, H.; Kroutil, W.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.  $\omega$ -Transaminases for the amination of functionalised cyclic ketones. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8843–8851.

31. Martínez-Montero, L.; Gotor, V.; Gotor-Fernández, V.; Lavandera, I. But-2-ene-1,4-diamine and but-2-ene-1,4-diol as donors for thermodynamically favored transaminase- and alcohol dehydrogenase-catalyzed processes. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618–1624.
32. Gundersen, M.T.; Tufvesson, P.; Rackham, E.J.; Lloyd, R.C.; Woodley, J.M. A rapid selection procedure for simple commercial implementation of  $\omega$ -transaminase reactions. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 602–608.
33. Siirola, E.; Mutti, F.G.; Grischek, B.; Hoefler, S.F.; Fabian, W.M.F.; Grogan, G.; Kroutil, W. Asymmetric synthesis of 3-substituted cyclohexylamine derivatives from prochiral diketones via three biocatalytic steps. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1703–1708.
34. Tauber, K.; Fuchs, M.; Sattler, J.H.; Pitzer, J.; Pressnitz, D.; Koszelewski, D.; Faber, K.; Pfeffer, J.; Haas, T.; Kroutil, W. Artificial multi-enzyme networks for the asymmetric amination of sec-alcohols. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030–4035.
35. Skalden, L.; Peters, C.; Dickerhoff, J.; Nobili, A.; Joosten, H.-J.; Weisz, K.; Höhne, M.; Bornscheuer, U.T. Two subtle amino acid changes in a transaminase substantially enhance or invert enantioselectivity in cascade syntheses. *ChemBioChem* **2015**, *15*, 1041–1045.
36. Monti, D.; Forchin, M.C.; Crotti, M.; Parmeggiani, F.; Gatti, F.G.; Brenna, E.; Riva, S. Cascade coupling of ene-reductases and  $\omega$ -Transaminases for the stereoselective synthesis of diastereomerically enriched amines. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3106–3109.
37. Skalden, L.; Peters, C.; Ratz, L.; Bornscheuer, U.T. Synthesis of (1*R*,3*R*)-1-amino-3-methylcyclohexane by an enzyme cascade reaction. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7207–7211.

38. Liardo, E.; Ríos-Lombardía, N.; Morís, F.; Rebolledo, F.; González-Sabín, J. Hybrid organo- and biocatalytic process for the asymmetric transformation of alcohols into amines in aqueous medium. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4768–4774.
39. Molinaro, C.; Bulger, P.G.; Lee, E.E.; Kosjek, B.; Lau, S.; Gauvreau, D.; Howard, M.E.; Wallace, D.J.; O’Shea, P.D. CRTH2 antagonist MK-7246: A synthetic evolution from discovery through development. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2299–2309.
40. Richter, N.; Simon, R.C.; Kroutil, W.; Ward, J.M.; Hailes, H.C. Synthesis of pharmaceutically relevant 17- $\alpha$ -amino steroids using an  $\omega$ -transaminase. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6098–6100.
41. Limanto, J.; Ashley, E.R.; Yin, J.; Beutner, G.L.; Grau, B.T.; Kassim, A.M.; Kim, M.M.; Klapars, A.; Liu, Z.; Strotman, H.R.; Truppo, M.D. A highly efficient asymmetric synthesis of Vernakalant. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2716–2719.
42. Weiß, M. S.; Pavlidis, I.V.; Spurr, P.; Hanlon, S.P.; Wirz, B.; Iding, H.; Bornscheuer, U.T. Protein-engineering of an amine transaminase for the stereoselective synthesis of a pharmaceutically relevant bicyclic amine. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10249–10254.
43. Feng, Y.; Luo, Z.; Sun, G.; Chen, M.; Lai, J.; Lin, W.; Goldmann, S.; Zhang, L.; Wang, Z. Development of an Efficient and Scalable Biocatalytic Route to (3*R*)-3-Aminoazepane: A Pharmaceutically Important Intermediate, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 648–654.
44. Sugihara, H.; Mabuchi, H.; Kawamatsu, Y. 1,5-Benzoxathiepin derivatives, I. Synthesis and reaction of 1,5-benzoxathiepin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1919–1929.
45. López-Iglesias, M.; González-Martínez, D.; Gotor, V.; Busto, E.; Kroutil, W.; Gotor-Fernández, V. Biocatalytic Transamination for the Asymmetric Synthesis of Pyridylalkylamines. Structural and Activity

- Features in the Reactivity of Transaminases. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 4003–4009.
46. López-Iglesias, M.; González-Martínez, D.; Rodríguez-Mata, M.; Gotor, V.; Busto, E.; Kroutil, W.; Gotor-Fernández, V. Asymmetric Biocatalytic Synthesis of Fluorinated Pyridines through Transesterification or Transamination: Computational Insights into the Reactivity of Transaminases. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 279–291.
47. Cassimjee, K.E.; Branneby, C.; Abedi, V.; Wells, A.; Berglund, P. Transaminations with isopropyl amine: Equilibrium displacement with yeast alcohol dehydrogenase coupled to *in situ* cofactor regeneration. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5569–5571.
48. Green, A.P.; Turner, N.J.; O'Reilly, E. Chiral Amine Synthesis Using  $\omega$ -Transaminases: An Amine Donor that Displaces Equilibria and Enables High-Throughput Screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714–10717.
49. Gomm, A.; Lewis, W.; Green, A.P.; O'Reilly, E. A New Generation of Smart Amine Donors for Transaminase-Mediated Biotransformations. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12692–12695.
50. Payer, S.E.; Schrittwieser, J.H.; Kroutil, W. Vicinal Diamines as Smart Cosubstrates in the Transaminase-Catalyzed Asymmetric Amination of Ketones. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2553–2559.
51. Paul, C.E.; Rodríguez-Mata, M.; Busto, E.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; García-Cerrada, S.; Mendiola, J.; de Frutos, Ó.; Collado, I. Transaminases applied to the synthesis of high added-value enantiopure amines. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 788–792.
52. Kaulman, U.; Smithies, K.; Smith, M.E.B.; Hailes, H.C.; Ward, J.M. Substrate spectrum of  $\omega$ -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628–637.

53. Yamada, Y.; Iwasaki, A.; Kizaki, N.; Matsumoto, K.; Ikenaka, Y.; Ogura, M.; Hasegawa, J. Enzymic preparation of optically active (*R*)-amino compounds with transaminase of *Arthrobacter*. PCT Int. Appl. WO 9848030A1, 19981029, 1998.
54. Pannuri, S.; Kamat, S.V.; Garcia, A.R.M. Methods for engineering *Arthrobacter citreus*  $\alpha$ -transaminase variants with improved thermostability for use in enantiomeric enrichment and stereoselective synthesis. PCT Int. Appl. WO 2006063336A2, 20060615, 2006.
55. Savile, C.K.; Janey, J.M.; Mundorff, E.M.; Moore, J.C.; Tam, S.; Jarvis, W.R.; Colbeck, J.C.; Krebber, A.; Fleitz, F.J.; Brands, J.; et al. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science* **2010**, 329, 305–309.
56. Koszelewski, D.; Göritzer, M.; Clay, D.; Seisser, B.; Kroutil, W. Synthesis of optically active amines employing recombinant  $\alpha$ -transaminases in *E. coli* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93, 2425–2435.
57. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; et al. *Gaussian 09*; Revision D.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
58. Zhao, Y.; Truhlar, D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, 120, 215–241.







## V. CONCLUSIONES

---





De manera general, en la presente Tesis Doctoral se han diseñado, sintetizado y caracterizado tres familias de compuestos heterocíclicos y una de análogos abiertos, con posible aplicación como agentes antitumorales. Entre los derivados cíclicos se encuentran las familias de benzoxazinas, quinolinas y piridoxazinas. Los análogos abiertos poseen diferentes radicales en el grupo éster, habiéndose obtenido una serie con metilo y otra con etilo.

Todas las moléculas se han ensayado frente a las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, melanoma humano A375, y cáncer colorrectal HCT-116. Se ha realizado un estudio de apoptosis con el compuesto más activo.

También se ha llevado a cabo la síntesis de una benzoxatiepinona para estudiar su aminación reductora enantioselectiva por transaminasas, obteniéndose buenos rendimientos y una gran estereoselectividad.

En concreto, en el trabajo de investigación llevado a cabo en esta Tesis se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Con la finalidad de encontrar nuevos agentes antitumorales, se ha sintetizado una familia de benzoxazinas unidas a diferentes purinas sustituidas con halógenos, 6-cloro, 2,6-dicloro, 6-bromo y 6-trifluorometilpurina.
2. Se han obtenido derivados de quinolina unida por un enlace metilénico a purinas halosustituidas (6-cloro, 2,6-dicloro, 6-bromo y 6-trifluorometilpurina).

3. Dos compuestos con restos de piridoxazina unida a 6-cloro y 2,6-dicloropurina, han sido sintetizados para comprobar el efecto sobre la actividad antiproliferativa de la introducción de un átomo de nitrógeno en el benceno fusionado al anillo oxazínico inicial.

4. Se han sintetizado ocho análogos abiertos, unidos a restos de purinas sustituidas por halógenos (6-cloro, 2,6-dicloro, 6-bromo y 6-trifluorometilpurina), para estudiar el papel del heterociclo en la actividad anticancerígena.

5. Se ha evaluado su actividad antiproliferativa frente a tres líneas tumorales, MCF-7, A375 y HCT-116, así como la inducción de la apoptosis frente a la línea de cáncer de mama humano MCF-7.

6. De los compuestos ensayados con diferentes bases púricas, se deduce que aquellos que incluyen la base 2,6-dicloropurina son los más activos. Además, los análogos cíclicos mostraron mayor actividad que los abiertos, destacando los derivados de quinolina.

7. Ha quedado demostrado que la distancia entre el heterociclo y el resto de purina también influye en la actividad, existiendo una relación inversa entre ellas, es decir, a mayor distancia menor actividad.

8. El compuesto **4c** (3-((2,6-dicloro-9*H*-purina-9-il)metil-1-tosil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina) del artículo 1, ha resultado ser el más activo frente a las líneas celulares ensayadas, con un valor de CE<sub>50</sub> de  $2.8 \pm 0.31 \mu\text{M}$  frente a la línea HCT-116. Este derivado induce apoptosis a través de la activación de las caspasas 3/7. Destaca también su baja citotoxicidad en las células no cancerígenas.

9. Las estructuras han quedado inequívocamente determinadas por estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) tanto mono (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C,

DEPT) como bidimensionales (HSQC, HMBC), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y análisis elemental.

10. Con objeto de obtener información sobre la disposición espacial de los derivados heterocíclicos, se ha llevado a cabo un experimento bidimensional NOESY sobre el compuesto **3c** del artículo 2, siendo compatibles los efectos NOESY encontrados con una conformación preferida.

11. Los estudios bidimensionales HMBC han demostrado que la cadena lateral de los derivados piridoxazínicos enlaza a través de la posición 3 del heterociclo, a diferencia de sus isómeros benzoxazínicos.

12. Gracias a una biotransaminación estereoselectiva de la 3,4-dihidro-2*H*-1,5-benzoxatiepín-3-ona, se han sintetizado diferentes aminas enantioméricamente puras, empleando un amplio número de transaminasas comerciales.

13. Una optimización de los parámetros que afectan a la reacción enzimática, ha permitido obtener aminas estereoisómeras con altos rendimientos y buena selectividad.

14. Se ha llevado a cabo con éxito un experimento de escalado para la obtención de la amina (*R*)-**9** del artículo 3, empleando una concentración 50 mM de la benzoxatiepínona y la transaminasa TA-PI-G05, lo que podría ser útil para la obtención industrial de esta amina precursora de moléculas biológicas con interesantes actividades antiproliferativas.







## VI. PERSPECTIVAS FUTURAS





Esta investigación ha proporcionado nuevas moléculas con actividad antitumoral, algunas de ellas con una interesante  $CE_{50}$ , que nos han permitido un mejor conocimiento de las relaciones estructura-actividad de los compuestos obtenidos por el grupo, así como el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas. No obstante, presenta algunas limitaciones que requieren futuras investigaciones:

a) Los compuestos obtenidos se han sintetizado como mezclas racémicas y, teniendo en cuenta la importancia del uso de fármacos enantioméricamente puros, dadas las diferentes actividades que pueden presentar ambos estereoisómeros, se plantea el reto de cada uno de los enantiómeros.

b) En los antecedentes del grupo se ha visto la importancia de un sustituyente voluminoso en el nitrógeno del heterociclo benzofusionado, por lo que la síntesis con sustituyentes como nosilo o fmoc, que han demostrado ser una buena opción para aumentar la actividad, sería una interesante aproximación para los derivados de tetrahydroquinolina.

c) Todos los compuestos sintetizados en este trabajo poseen halógenos únicamente en el resto de purina. Sería interesante estudiar la influencia sobre la actividad antitumoral de la introducción de sustituyentes electrón-atrayentes en el otro sistema heterocíclico, tal y como muestran otras estructuras del apartado 3 de la introducción.

d) Se han realizado estudios de actividad sobre líneas celulares cancerígenas para determinar qué moléculas son activas así como su  $EC_{50}$ , pero aún se desconoce el mecanismo de acción y las dianas concretas de los compuestos obtenidos en esta Tesis, por lo que serán necesarios

posteriores ensayos para determinar la vía de actuación de los derivados más activos.

e) Los estudios computacionales representan una valiosa herramienta en el campo de la Química Farmacéutica, por lo que los conocimientos teóricos que aportarían estos estudios ayudarían a un mejor entendimiento de las relaciones estructura-actividad.

A pesar de estas limitaciones, los resultados obtenidos en este trabajo serán de gran ayuda para definir futuras líneas de investigación. La continuación del trabajo con el tipo de estructuras descritas, junto con los estudios para determinar las dianas terapéuticas mediante ensayos más específicos y estudios computacionales, servirán para encontrar moléculas no sólo más potentes, sino también más selectivas.





