

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**La estructura del dominio de Colchicina como base para el
diseño y síntesis de compuestos con propiedades antimitóticas
y antivasculares**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Oskía Bueno Zaragüeta

Directoras

Eva M^a Priego Crespo
M^a Jesús Pérez Pérez

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I

Tesis Doctoral

**LA ESTRUCTURA DEL DOMINIO DE COLCHICINA
COMO BASE PARA EL DISEÑO Y SÍNTESIS DE
COMPUESTOS CON PROPIEDADES ANTIMITÓTICAS Y
ANTIVASCULARES**

Oskía Bueno Zaragüeta

DIRECTORAS

Eva M^a Priego Crespo

M^a Jesús Pérez Pérez

Instituto de Química Médica (CSIC)

Madrid, 2017



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación *Nucleósidos y análogos como fuente de moléculas bioactivas* del Instituto de Química Médica perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección de la Prof. María Jesús Pérez Pérez y la Dra. Eva María Priego, y dentro del marco de los proyectos SAF2012-39760-C02-01 y SAF2015-64629-C2-1-R, financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad, y BIPEDD-CM-S2010/BMD-2457, financiado por la Comunidad de Madrid.

La autora agradece a la Sociedad Española de Química Terapéutica el premio “Ramón Madroñero” otorgado en la XVII Convocatoria de Premios para Investigadores Noveles de la Sociedad Española de Química Terapéutica. El trabajo recogido en este premio es parte de lo reflejado en el Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral.

ÍNDICE

Nota sobre puntuación y nomenclatura.....	i
Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	v
Summary.....	xi

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

1. Introducción General.....	3
1.1. Terapia antivascular como estrategia frente al cáncer.....	3
1.2. Agentes interruptores de la vascularización tumoral (VDAs).....	8
1.2.1. Clasificación.....	8
1.2.2. Mecanismo de acción.....	9
1.2.3. Colchicina, combretastatina A-4 y otros ejemplos de VDAs que se unen al sitio de colchicina en tubulina.....	11
1.3. Estructuras de rayos X de tubulina con ligandos del sitio de colchicina.....	15
1.3.1. Estructura de tubulina.....	15
1.3.2. Sitio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina.....	16
1.3.3. Ligandos del dominio de unión de colchicina como agentes desestabilizantes de los microtúbulos: Conformación recta versus conformación curva de tubulina.....	21
1.4. Actividad antitumoral de la CA-4: evidencias e interrogantes.....	22
2. Objetivos Generales.....	25
3. Bibliografía.....	27

1. CAPÍTULO 1. DERIVADOS DE CICLOHEXANODIONA COMO LIGANDOS DEL DOMINIO DE COLCHICINA EN TUBULINA

1.1. Introducción y antecedentes.....	39
1.2. Objetivos.....	43
1.3. Resultados y discusión.....	45
1.3.1. Estudios de docking de TUB075 en el dominio de colchicina.....	45
1.3.2. Síntesis y evaluación biológica de derivados de TUB075 basados en estudios de docking.....	47
1.2.3.1. Síntesis.....	47
1.2.3.2. Evaluación biológica.....	51
a) Actividad antiproliferativa.....	51
b) Determinación de la solubilidad de TUB075 , 1.22 y 1.23	52
c) Determinación de la constante de asociación (K_a) de 1.23 con tubulina.....	52

1.3.3. Determinación de la estructura del complejo TUB075-tubulina mediante difracción de rayos X.....	54
1.3.4. Nuevos derivados de TUB075 basados en estudios de mapas de afinidad del complejo TUB075-tubulina.....	56
1.3.4.1. Estudios de mapas de afinidad del complejo TUB075-tubulina.....	56
1.3.4.2. Síntesis y evaluación de derivados de benzofurano.....	58
a) Síntesis y evaluación del compuesto 1.35	58
b) Síntesis y evaluación de nuevos derivados de 1.35	59
c) Determinación de la constante de asociación (K_a).....	63
1.3.4.3. Estudios para la determinación del mecanismo de acción..	65
a) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular.....	65
b) Estudio de la actividad caspasa-3.....	67
c) Estudio del efecto interruptor de la vascularización.....	68
1.3.5. Nuevos derivados basados en la superposición de los complejos de rayos X TUB075-tubulina y DAMA-colchicina-tubulina.....	70
1.3.5.1. Mapas de afinidad del complejo DAMA-colchicina-tubulina y superposición con TUB075	70
1.3.5.2. Síntesis y evaluación de nuevos derivados basados en los mapas de afinidad de DAMA-colchicina.....	72
a) Síntesis.....	72
b) Evaluación de la actividad antiproliferativa.....	76
c) Determinación de la constante de asociación (K_a).....	78
1.3.5.3. Estudios para la determinación del mecanismo de acción..	79
a) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular.....	79
b) Estudio de la actividad caspasa-3.....	81
c) Estudio del efecto interruptor de la vascularización.....	82
1.3.5.4. Síntesis y evaluación del profármaco de 1.106	83
a) Síntesis.....	84
b) Determinación de la solubilidad de 1.106 y 1.109	85
c) Evaluación de la actividad antiproliferativa de 1.109	85
d) Estudios de estabilidad en PBS y suero fetal bovino.....	86
1.4. Conclusiones.....	89
1.5. Bibliografía.....	93

2. CAPÍTULO 2. CHALCONAS Y MIMÉTICOS COMO ESQUELETOS ALTERNATIVOS A LAS COMBRESTATINAS

2.1. Antecedentes.....	99
2.2. Objetivos.....	101
2.3. Resultados y discusión.....	103
2.3.1. Isomerización <i>E/Z</i> de TUB091 y síntesis mejorada de TUB099	103
2.3.2. Síntesis de análogos conformacionalmente restringidos por ciclación sobre el anillo A.....	106

2.3.3. Estructura de rayos X del complejo TUB092-tubulina.....	108
2.3.4. Diseño de nuevos ligandos basados en la estructura del complejo TUB092-tubulina.....	111
2.3.5. Síntesis y evaluación de nuevos análogos conformacionalmente restringidos mediante ciclación sobre el anillo B.....	113
2.3.5.1. Síntesis de nuevos derivados ciclados empleando un intermedio organolítico.....	113
2.3.5.2. Síntesis y actividad antiproliferativa de nuevos derivados ciclados mediante sustitución electrófila aromática.....	114
2.3.6. Estudio del modo de unión del compuesto 2.31 con tubulina.....	121
2.3.6.1. Determinación de la constante de asociación (K_a) de 2.31 con tubulina.....	121
2.3.6.2. Estudios de docking y dinámica molecular 2.31 con tubulina.....	121
2.3.7. Síntesis y evaluación de profármacos de 2.31	123
a) Síntesis del conjugado de Asn-Pro de 2.31	123
b) Determinación de la solubilidad de 2.31 y 2.38	124
c) Evaluación de la actividad antiproliferativa de 2.38	124
d) Estudio de estabilidad en PBS y en suero fetal bovino de 2.38	124
2.3.8. Ensayos <i>in vivo</i> del profármaco TUB099	125
2.4. Conclusiones.....	129
2.5. Bibliografía.....	131

CONCLUSIONES GENERALES..... 137

PARTE EXPERIMENTAL

1. Chemistry procedures.....	143
1.1. Chemistry procedures in chapter 1.....	143
1.2. Chemistry procedures in chapter 2.....	178
2. Computational methods.....	191
2.1. Docking studies.....	191
2.2. Molecular dynamics simulation.....	191
2.3. Analysis of molecular dynamics trajectories.....	192
2.4. Affinity maps calculation.....	192
3. Solubility and stability determination.....	193
3.1. Solubility determination.....	193
3.2. Stability determination in PBS and 10% fetal bovine serum (FBS).....	193
4. Biological methods.....	194
4.1. Cell proliferation.....	194
4.2. Cell cycle analysis.....	194
4.3. Fluorescence detection of caspase-3 activity in live cells.....	195
4.4. Tube formation.....	195
4.5. Determination of binding constants.....	195

4.6. In vivo experiments.....	196
5. X-Ray crystallography.....	197
6. Bibliography.....	199

ANEXO

Supplementary material. NMR spectra of selected compounds	205
---	-----

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y NOMENCLATURA

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la presente Memoria. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005 (<http://lema.rae.es/dpd/?key=punto>).

ABREVIATURAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en: *Journal of Organic Chemistry*: "Guidelines for Authors". Enero 2017. (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jocea/jocea_authguide.pdf).

Otras abreviaturas empleadas son menos frecuentes y se detallan a continuación:

CA-1	Combretastatina A-1
CA-2	Combretastatina A-2
CA-4	Combretastatina A-4
CA-1P	Combretastatina A-1 fosfato
CA-4P	Combretastatina A-4 fosfato
CD26	Dipeptidil-peptidasa tipo IV
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DMXAA	Ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético
DPP-IV	Dipeptidil-peptidasa tipo IV
FAA	Ácido 8-flavon acético
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N' tetrametiluronio
K_a	Constante de asociación
logP	Coeficiente de partición
NF-κB	Factor nuclear κB (<i>nuclear factor-κB</i>)
NSCLC	Cáncer de pulmón no microcítico (<i>Non small-cell lung cancer</i>)
PBS	Tampón fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDB	<i>Protein data bank</i>
P-gp	<i>Permeability glycoprotein</i>
RB3-SLD	Proteína tipo estatmina RB3 (<i>RB3-stathmin-like domain</i>)
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
R-PT	(R)-(+)-etil-5-amino-2-metil-1,2-dihidro-3-fenilpirido[3,4-b]pirazin-7-il carbamato
SFB	Suero fetal bovino
STING	Proteína estimuladora de genes de interferón
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
TTL	Tubulina tirosina ligasa
VDA	Agente interruptor de la vascularización tumoral (<i>Vascular Disrupting Agents</i>)

RESUMEN

LA ESTRUCTURA DEL DOMINIO DE COLCHICINA COMO BASE PARA EL DISEÑO Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS CON PROPIEDADES ANTIMITÓTICAS Y ANTIVASCULARES

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El desarrollo de redes de vasos sanguíneos que puedan aportar oxígeno y nutrientes es una de las características esenciales para el crecimiento de tumores sólidos. Dada la importancia de un adecuado flujo sanguíneo en el entorno tumoral para la expansión celular y la metástasis tumoral, la búsqueda de compuestos capaces de inhibir dicha vascularización centra grandes expectativas en el estudio actual de nuevas estrategias antineoplásicas. Dentro de la terapia antivascolar, los agentes interruptores de la vascularización tumoral (VDAs) ocupan un papel primordial debido a su mecanismo de acción, complementario a las terapias ya existentes. Los VDAs actúan directa y selectivamente sobre el endotelio tumoral, induciendo cambios morfológicos y funcionales que provocan el descenso rápido y dramático del flujo sanguíneo en el seno del tumor, el cual acaba necrosándose. Dentro de los VDAs, los compuestos más estudiados se encuadran dentro del grupo de ligandos del sitio de colchicina en tubulina, que inhiben la polimerización de los microtúbulos celulares, actuando así como agentes antimitóticos.

La acción antitumoral dual de los VDAs basados en colchicina (antivascolar y antimitótico) explica el enorme potencial terapéutico de esta clase de compuestos. Entre estos VDAs cabe destacar la combretastatina A4 (CA-4), compuesto de referencia del que además existen varios derivados que actualmente se encuentran en fases clínicas avanzadas. Ahora bien, estos candidatos, junto a otros VDAs que también están siendo objeto de investigación clínica, todavía presentan notables limitaciones que obstaculizan el desarrollo farmacéutico de los mismos, tales como la baja estabilidad química y/o la limitada solubilidad. Por ello, el objetivo central de esta Tesis ha consistido en la búsqueda de nuevos VDAs ligandos del sitio de colchicina de mejor perfil farmacológico, que solventen los problemas de los compuestos desarrollados hasta el momento.

Desde 2011, el desarrollo de nuevos VDAs ha sido un área de interés en nuestro grupo de investigación. Así, a partir de la información disponible en nuestro grupo relativa a dos familias de compuestos que habían mostrado su capacidad para unirse al dominio de colchicina en tubulina, en la presente Memoria se ha profundizado en la interacción a nivel molecular de estos ligandos con tubulina y así se ha realizado el

diseño, síntesis y evaluación de nuevas familias de compuestos. El trabajo realizado se ha organizado en 2 capítulos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Capítulo 1 se ha centrado en una familia de compuestos para la que ya se había demostrado su afinidad por tubulina y su actividad antiproliferativa y antivascular, siendo el compuesto “cabeza de serie” o hit, la 5-fenil-2-(1-((2-etoxi)fenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (TUB075). Haciendo uso de distintas herramientas computacionales se ha llevado a cabo el diseño racional y síntesis de nuevas series de compuestos con el fin de mejorar la solubilidad acuosa y/o la afinidad por tubulina, modificaciones que han estado centradas en el fragmento de 2-etoxifenilo (anillo D).

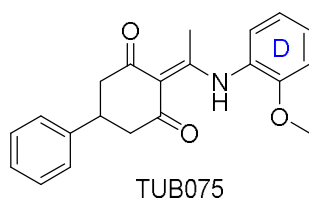


Figura A. Estructura química de TUB075, compuesto “cabeza de serie” del Capítulo 1.

Basándonos en estudios de docking del hit inicial TUB075 en el sitio de unión de colchicina, se observó la existencia de un túnel desde el sustituyente etoxi hacia la interfaz con la subunidad α de tubulina. Así, para ocupar este túnel, y con el fin de mejorar la solubilidad del hit inicial, se han incorporado grupos polares terminales alargando la cadena del sustituyente en posición *orto* del anillo D. Los mejores resultados se han obtenido mediante la introducción de una cadena de dietilenglicol, con el que se ha conseguido un derivado 16 veces más soluble que el hit inicial.

La resolución mediante difracción de rayos X del complejo TUB075-tubulina, descrito en esta Memoria, ha sido la base para el diseño de nuevos derivados con mayor afinidad por tubulina. Haciendo uso de distintas herramientas computacionales se han estudiado los mapas de afinidad de los complejos TUB075-tubulina y DAMA-colchicina, lo que ha permitido identificar nuevas zonas de interacción próximas al anillo D del esqueleto de ciclohexanodiona. Para ocupar estas zonas de interacción, se han diseñado dos series de compuestos.

Por una parte, y mediante el estudio de los mapas de afinidad del complejo TUB075-tubulina, se diseñaron compuestos que incorporaban un anillo de benzofurano como anillo D, que posteriormente fueron funcionalizados en la posición 2 de dicho heterociclo. Siguiendo esta estrategia, se ha obtenido un compuesto con una capacidad antiproliferativa en el rango nanomolar (8 - 31 nM), y una elevada constante de afinidad

por tubulina ($2.87 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), lo que supone la mayor constante de afinidad descrita para un ligando del sitio de colchicina. Por otra parte, la superposición de la estructura 3D de TUB075 y los mapas de afinidad obtenidos para el complejo DAMA-colchicina-tubulina permitieron el diseño de derivados que incorporaban en la posición *orto* del anillo D un anillo aromático extra manteniendo como nexo de unión de ambos anillos un átomo de oxígeno. Sobre este nuevo anillo se introdujeron sustituyentes de distinta naturaleza lo que permitió la obtención de derivados con actividades antiproliferativas en el rango submicromolar, siendo especialmente efectiva la incorporación de un grupo amino. La presencia de este grupo amino ha permitido la síntesis de un profármaco por derivatización con el dipéptido Asn-Pro. Este profármaco ha mostrado una actividad antiproliferativa en el mismo orden que el amino derivado, una solubilidad 100 veces mayor a éste, y una eficaz liberación del amino derivado por vía enzimática (SFB).

Los estudios biológicos llevados a cabo sobre los compuestos más prometedores de este capítulo han puesto de manifiesto su capacidad para detener el ciclo celular en la fase G2/M a una concentración inferior a la empleada para observar el mismo efecto en el hit inicial TUB075. Además, se ha confirmado la capacidad de estos derivados para inducir la apoptosis y su actividad antivascolar por interrupción de una red de vasos endoteliales preformada.

En el Capítulo 2, el punto de partida lo han constituido las α -metilchalconas TUB091 y TUB092 descritas por nuestro grupo de investigación. Las propiedades más características de estos compuestos incluyen su actividad antiproliferativa en el rango nanomolar y su unión al sitio de unión de colchicina en tubulina con una constante de asociación del orden de 10^7 M^{-1} . Además, el compuesto TUB099, producto de la derivatización como profármaco de TUB091, mantenía su actividad antiproliferativa y presentaba elevada solubilidad. Sin embargo, TUB099 se había obtenido como mezcla de isómeros *E/Z* en una relación 2/1, por lo que aún no era idóneo para su evaluación como VDA *in vivo*. Así, el primer objetivo de este capítulo ha sido el estudio de la isomerización de este compuesto, y una vez identificado que sufría un fenómeno de fotoisomerización, se llevó a cabo la síntesis del profármaco en ausencia de luz, lo que permitió obtener muy mayoritariamente el isómero *E*, responsable de la actividad.

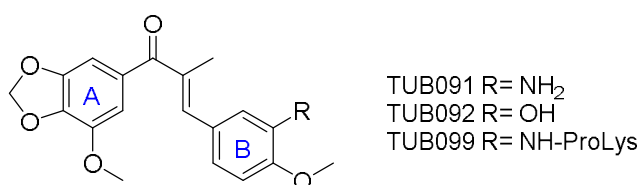


Figura B. Estructuras químicas de TUB091, TUB092 Y TUB099.

El segundo objetivo ha sido fijar la configuración *trans* del compuesto TUB091, mediante la síntesis de miméticos conformacionalmente restringidos para lo que se han seguido dos estrategias. En la primera se propuso restringir el derivado TUB091 por ciclación sobre el anillo A. Esta aproximación condujo a una pérdida de actividad de entre 2 y 3 órdenes de magnitud, por lo que se concluyó que esta restricción conformacional no era adecuada para mimetizar la conformación bioactiva de la chalcona TUB091.

Para la segunda estrategia, hemos hecho uso de un diseño racional basado en la estructura del complejo cristalino TUB092-tubulina descrito en esta Memoria. En base a los datos estructurales obtenidos, se abordó el diseño de nuevos derivados conformacionalmente restringidos mediante ciclación sobre el anillo B, y se exploraron distintos anillos aromáticos en el fragmento A. De los compuestos sintetizados, habría que destacar un derivado de 5-aminotetrahidronaftaleno, que presentó una potente actividad antiproliferativa (0.022 – 0.047 μM) y una constante de afinidad por tubulina similar a la de colchicina. Al igual que en el Capítulo 1, se ha sintetizado el conjugado de Asn-Pro de este compuesto, que mostró un incremento espectacular de la solubilidad respecto al compuesto padre pero su evaluación antiproliferativa puso de manifiesto una pérdida de actividad con respecto al derivado con amino libre, posiblemente debido a su ineficaz liberación.

Finalmente, se han llevado a cabo ensayos *in vivo* con el profármaco TUB099 en modelos de ratón de melanoma y cáncer de mama. Estos modelos han mostrado su potente efecto antitumoral y que además es capaz de impedir la metástasis. En particular, su efecto antimetastásico fue incluso superior al mostrado por el compuesto de referencia CA-4P. Además, estos ensayos permitieron demostrar el mecanismo de acción VDA *in vivo* de TUB099, poniendo de manifiesto una vez más el gran potencial terapéutico de este tipo de compuestos.

CONCLUSIONES

A partir de la información disponible en nuestro grupo de investigación relativa a dos familias de ligandos del sitio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina, en la presente Memoria, se ha profundizado en el análisis y estudio del dominio de unión de colchicina mediante distintas herramientas computacionales, lo que ha servido como base para el diseño de nuevos ligandos. Haciendo uso de procedimientos sintéticos ya establecidos o su adaptación a situaciones concretas, se han sintetizado y evaluado nuevos derivados con propiedades antimetóticas y antivasculares. Entre los nuevos derivados

sintetizados, se ha conseguido mejorar tanto la afinidad por tubulina, así como incrementar la solubilidad acuosa. Este último objetivo se ha logrado mediante la incorporación de sustituyentes polares dirigidos hacia la interfaz de las subunidades de α y β -tubulina o mediante la preparación de profármacos. La evaluación *in vivo* de uno de los profármacos sintetizados ha puesto de manifiesto su potente efecto antitumoral, antimetastásico y antivascular, avalando así el interés de los VDAs como agentes terapéuticos anticancerosos.

SUMMARY

STRUCTURE OF THE COLCHICINE DOMAIN TO DRIVE THE DESIGN AND SYNTHESIS OF LIGANDS WITH ANTIMITOTIC AND ANTIVASCULAR PROPERTIES

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The requirement of vascularization for tumor growth and metastasis has become one of the greatest areas of research in the latest years. Solid tumors cannot grow without blood supply to provide oxygen and nutrients. In addition, blood flow in the tumor environment is crucial for cell invasion during metastasis process. Thereby, the antivascular therapy is considered a promising approach to cancer treatment. Particularly, vascular disrupting agents (VDAs) play an important role due to their mechanism of action, complementary to other existing therapies. VDAs act directly and selectively over tumor endothelium, inducing crucial morphological and functional changes. Consequently, blood flow is dramatically decreased and the hypoxia generated unleashes the final tumor necrosis. The best studied VDAs are tubulin ligands at the colchicine binding site. These ligands inhibit microtubule polymerization, having in this way an additional antimitotic effect.

The antitumor activity of VDAs based on colchicine is due to their dual mechanism of action (antivascular and antimitotic) which support the potential therapeutic value of these agents. The prototype compound among VDAs acting at the colchicine site in tubulin is combretastatin A-4 (CA-4). Although identified more than two decades ago, the mechanism of action of CA-4 is still not fully elucidated. It should be mentioned that some CA-4 analogues and other VDAs are currently candidates in clinical trials. However, they still present serious drawbacks that hamper their pharmaceutical validation, such as low chemical stability and limited solubility. Therefore, the development of new VDAs with a better pharmaceutical profile is critical.

On the basis of the above mentioned, the central objective of this Thesis has consisted in the development of new VDAs acting at the colchicine-site of tubulin with better pharmaceutical profile that may contribute to the pharmaceutical validation of these agents and avoid main drawbacks of current VDA candidates.

Since 2011, VDAs have been a major interest in our research group. Based on the information related to two families of colchicine-site ligands identified in our laboratory, this work has envisaged a further study of the structure of the colchicine domain to drive

the design, synthesis and evaluation of new derivatives with antimitotic and antivasular properties. The performed work has been organized in two Chapters.

RESULTS AND DISCUSSION

Chapter 1 has been focused on a new family of tubulin binding agents at the colchicine-site with proved antiproliferative and antivasular activity, being the 2-(1-((2-ethoxyphenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (TUB075) our hit compound. Applying different computational methods, new series of compounds have been designed and further synthesized with the aim of improving aqueous solubility and/or tubulin affinity of our hit, so that structural modifications have been developed on the 2-ethoxyphenyl fragment (fragment D).

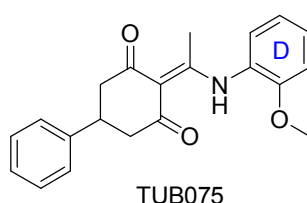


Figura A. Chemical structure of TUB075, hit compound of Chapter 1.

Based on docking studies of TUB075 at the colchicine-site, a tunnel was observed from the ethoxy substituent towards the α -tubulin interface. Thus, the elongation and incorporation of polar groups at this substituent was the first strategy applied to improve solubility. The best results were obtained by incorporating a diethylenglycol moiety so that the resulting derivative was 16-fold more soluble than the initial hit.

The resolution of the complex TUB075-tubulin by X-ray diffraction, described in this Thesis, has been the base for the design and synthesis of new analogues with higher affinity for tubulin. Binding domain analysis of the TUB075-tubulin and DAMA-colchicine-tubulin complexes has been carried out with different computational tools, that has been crucial to identify new interaction areas close to fragment D of the cyclohexanedione scaffold. To occupy these areas, two series of new analogues have been designed.

On the one hand, by studying the affinity maps of TUB075-tubulin complex, new analogues with a benzofuran ring as fragment D were envisaged. Position 2 of the benzofuran ring was differently functionalized to explore this pocket. Following this strategy, a compound with antiproliferative activity in the nanomolar range (8 – 31 nM) was identified, which showed a high affinity constant for tubulin ($2.87 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), being, to the best of our knowledge, the highest affinity constant described in the literature for a colchicine-site ligand. On the other hand, by studying the affinity maps of DAMA-colchicine-tubulin complex and its superposition with the 3D structure of TUB075, a new

series of derivatives were designed, which incorporate a new aromatic ring (called ring E) at the *ortho* position of fragment D, keeping an oxygen as linker between both rings. Different types of substituents were introduced at ring E, being particularly effective the incorporation of an amino group. The presence of this amino allowed the synthesis of a prodrug by its derivatization with the Asn-Pro dipeptide. This prodrug enhanced solubility 100-fold and stability determination in PBS and fetal bovine serum confirmed that the release of the active compound was via enzymatic process.

Studies performed to determine the mechanism of action of the most promising compounds revealed that they caused cell cycle arrest in G2/M at lower doses than TUB075, in the same manner as other colchicine-site ligands. In addition, their capacity to induce apoptosis was demonstrated by caspase-3 activity. Moreover, these new analogues produce vascular disruption by interrupting established endothelial tubular networks. Their binding at the colchicine site in tubulin was previously confirmed by competition assays with R-PT.

In [Chapter 2](#) the starting point were the α -methylchalcones TUB091 and TUB092 described by our research group. The main characteristics of these compounds included their antiproliferative activity in the nanomolar range and their binding constant for tubulin at 10^7 M^{-1} . In addition, prodrug TUB099, product of the derivatization of TUB091, showed the same antiproliferative activity with greater solubility. However, TUB099 was obtained as two isomers E/Z with a 2/1 rate. Therefore it was not still a good candidate for *in vivo* evaluation as VDA.

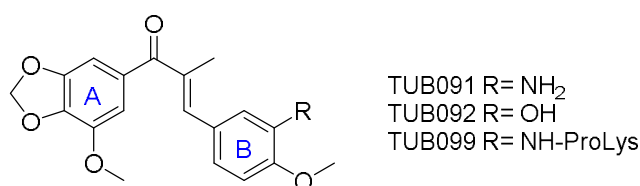


Figura B. Chemical structures of TUB091, TUB092 Y TUB099.

Thus, the first objective was the study of the isomerization of TUB099, which revealed that this compound underwent a photoisomerization phenomenon. The synthesis of this compound in the absence of light afforded mainly the *E* isomer, the one responsible for its antiproliferative activity.

The second objective was the synthesis of new analogues with restricted conformation. To do so, mimetics of the chalcone TUB091 were synthesized applying two approaches. Firstly, a cyclization on fragment A was proposed, incorporating an indenone at ring A. However, this structural modification led to a 2 or 3 orders of

magnitude lower activity. Thereby, this conformational restriction seemed to be not suitable to mimic the bioactive conformation of TUB091.

The second approach was based on the resolution of the complex TUB092-tubulin by X-ray diffraction, described in this Thesis. Based on this structural data, new analogues were designed by introducing a 6-membered saturated cycle at ring B, i.e. having a tetrahydronaftalene ring as fragment B. In addition, different aromatic rings were explored as fragment A. Among the synthesized compounds, one of the 5-amino-tetrahydronaftalene derivatives showed a potent antiproliferative activity (0.022 – 0.047 μM) and a binding constant for tubulin similar to that of colchicine. Following the prodrug strategy applied in Chapter 1, the Asn-Pro derivative was synthesized, which enhanced dramatically solubility compared to the parent compound. Nevertheless, its biological evaluation showed a decrease in the antiproliferative activity, probably due to an inefficiency release of the active compound.

Finally, *in vivo* experiments with the prodrug TUB099 in melanoma and breast cancer models in mice were carried out. In these models, TUB099 inhibited primary tumor growth and effectively reduced spontaneous metastasis. Particularly, the antimetastatic effect was higher than that of the reference compound CA-4P. In addition, this experiments showed the VDA mechanism of action of TUB099, demonstrating the potential therapeutic value of this type of compounds.

CONCLUDING REMARKS

In this Thesis, based on previous information from our research group about two families of colchicine-site binders in $\alpha\beta$ -tubulin, we have further analyzed the structure of the colchicine domain to drive the design of new analogues applying different computational tools. Making use of robust and well established chemical procedures, and adapting the described procedures when required, we have addressed the synthesis and evaluation of new derivatives with antimitotic and antivascular properties. Among the synthesized compounds, higher affinity for tubulin and increased solubility than initial hit was achieved. Particularly, solubility was enhanced through the incorporation of polar groups that may reach the $\alpha\beta$ -tubulin interface and through the preparation of prodrugs. One of the synthesized compounds evaluated *in vivo*, showed antitumor, antimetastatic and antivascular effects, which strongly supports the interest of these type of compounds as anticancer therapeutic agents.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades, con diferencias significativas en su etiología, naturaleza y sintomatología. Hay más de 200 tipos de cáncer, y en general, estas enfermedades reciben el nombre de los órganos o tejidos en donde se desarrollan, aunque también pueden denominarse de acuerdo al tipo de células que los forma. Todas estas enfermedades comparten una característica común: la presencia de células anormales, denominadas células cancerosas, resultado de alteraciones en genes fundamentales en el ciclo celular. Éstas células se dividen de forma autónoma y sin control invadiendo a nivel local y a distancia distintos tejidos. Las nuevas masas de tejido que se originan como consecuencia del crecimiento descontrolado de las células cancerosas se denominan neoplasia o tumor maligno. La malignidad de las neoplasias es variable, según la agresividad de sus células y demás características biológicas de cada tumor. Además de las características del tumor primario, el pronóstico de la enfermedad está estrechamente vinculado a la capacidad de metástasis, es decir, a la capacidad de las células para desprenderse del foco inicial y, a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático, diseminarse y ocasionar el crecimiento de nuevos tumores en otras partes del cuerpo alejadas de la localización inicial.¹⁻³

A pesar de los esfuerzos de investigación y de los avances conseguidos en los últimos años, el cáncer continúa siendo una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo: alrededor de 8 millones de personas mueren de cáncer cada año, siendo los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama los que causan un mayor número de muertes anuales.^{2,4} La OMS prevé que la incidencia de cáncer aumente de forma progresiva conforme al aumento en la esperanza de vida, alcanzando en las próximas dos décadas la cifra de 22 millones de nuevos casos.² Actualmente, alrededor del 90% de las defunciones se derivan de las metástasis y del fracaso terapéutico, como consecuencia de la aparición de distintos tipos de mecanismos de resistencia por parte de las células tumorales. Debido al gran impacto social y económico que supone el cáncer, la búsqueda de estrategias terapéuticas innovadoras para su tratamiento es una prioridad.^{1-2,4}

1.1. TERAPIA ANTIVASCULAR COMO ESTRATEGIA FRENTE AL CÁNCER

El desarrollo de nuevas redes de vasos sanguíneos es esencial para el crecimiento de tumores sólidos.⁵ De hecho, está ampliamente aceptado que un tumor sólido no crece más allá de aproximadamente 2 mm³ sin la existencia de vasos sanguíneos que le puedan aportar oxígeno y nutrientes.⁶ A su vez, a través del torrente sanguíneo las

células del tumor primario pueden colonizar zonas distantes del organismo en el proceso de la ya mencionada metástasis. Así, la vascularización en el entorno tumoral está estrechamente vinculada tanto al crecimiento de la masa tumoral primaria como al desarrollo de la metástasis tumoral. Por ello, la búsqueda de agentes capaces de inhibir dicha vascularización ocupa un papel primordial en el estudio actual de nuevas estrategias frente al cáncer.⁷

Existen dos aproximaciones para actuar sobre la vasculatura tumoral: mediante la inhibición de la angiogénesis, o lo que es lo mismo, inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos, o mediante la destrucción de la vasculatura tumoral ya existente.⁶ Ambas aproximaciones afectan a las células endoteliales, un tipo de célula más estable a nivel genético y más longeva que las células tumorales, y menos propensa a mutaciones. Mientras la quimioterapia convencional citotóxica ejerce el efecto antitumoral por medio de la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, la terapia antivascular afecta a las células endoteliales en el entorno tumoral, desencadenando así un efecto indirecto sobre las células tumorales.⁸⁻¹⁰ Por tanto, la intervención sobre los vasos sanguíneos del tumor supone una diana complementaria a la quimioterapia citotóxica.

La angiogénesis ha sido ampliamente estudiada y fruto de este extenso trabajo se ha avanzado muy notablemente en el conocimiento de este proceso bajo condiciones fisiológicas y patológicas.¹⁰⁻¹² En la actualidad hay fármacos aprobados capaces de actuar sobre este proceso de angiogénesis, tanto moléculas pequeñas como anticuerpos monoclonales.¹³ Sin embargo, los datos clínicos apuntan a que el tratamiento antitumoral con agentes antiangiogénicos va acompañado de una falta de eficacia, desarrollo de resistencias y toxicidad.¹² Aun así, se ha demostrado que estos agentes pueden resultar muy útiles en terapias combinadas. Además, su aplicación en otros ámbitos no relacionados con el cáncer se está estudiando actualmente.¹²

La segunda aproximación consiste en actuar sobre los vasos tumorales preexistentes, y a los agentes que actúan sobre estos vasos interrumpiendo el flujo sanguíneo se les denomina agentes interruptores de la vascularización tumoral (“vascular disrupting agents” o VDAs).^{6,14} Estos agentes provocan un colapso rápido en la irrigación tumoral dando lugar a una necrosis en el centro del tumor. Aunque en la práctica no siempre es fácil diferenciar entre un efecto antiangiogénico y un efecto VDA,^{9,14} esencialmente la terapia antiangiogénica presenta un efecto citostático sobre las células endoteliales y está especialmente enfocada para el tratamiento de tumores pequeños en las fases tempranas de la enfermedad. Los fármacos antiangiogénicos, al

inhibir la neovascularización, previenen el crecimiento y la diseminación de los tumores sólidos lo que justifica que su pauta de administración sea crónica.⁶ Sin embargo, los VDAs actúan por un mecanismo citotóxico e interrumpen de forma rápida y dramática el flujo sanguíneo preestablecido en el tumor, dando lugar a la isquemia y posterior necrosis del mismo durante las 24 horas posteriores a la administración. Por ello son particularmente eficaces para tratar grandes masas tumorales, que a su vez suelen presentar resistencia a la terapia citotóxica convencional. Así, están especialmente indicados en estadios avanzados de la enfermedad, con una pauta de administración aguda.¹⁵ Además de la aplicación oncológica, otra indicación propuesta para estos fármacos VDAs es el tratamiento de ciertas retinopatías, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE),¹⁶⁻¹⁸ principal causa de ceguera en personas mayores de 50 años en los países desarrollados.¹⁹

La selectividad de los VDAs por el endotelio tumoral es debida a las diferencias estructurales existentes entre éste y los vasos fisiológicos (Figura 1).²⁰ La vasculatura en los tejidos sanos (Figura 1A) está constituida por una red de vasos ordenada, madura, eficiente y estrictamente regulada por un equilibrio entre los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, que estimulan o inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos. En la vasculatura tumoral, la agresividad asociada al crecimiento de las células neoplásicas conlleva la sobreexpresión de factores pro-angiogénicos dando lugar a una vasculatura caótica, cuyos vasos tumorales se caracterizan por ser más finos y tortuosos.²¹ Como se puede observar en la Figura 1B, al hecho de que los vasos sean muy irregulares tanto en diámetro como en longitud, se añade la existencia de terminaciones ciegas y protuberancias anormales.^{20,22} Además, estos vasos sanguíneos tumorales generalmente presentan una ausencia de pericitos y deficiencias en la membrana basal y a nivel del músculo liso, lo que los hace más frágiles e inmaduros.²³

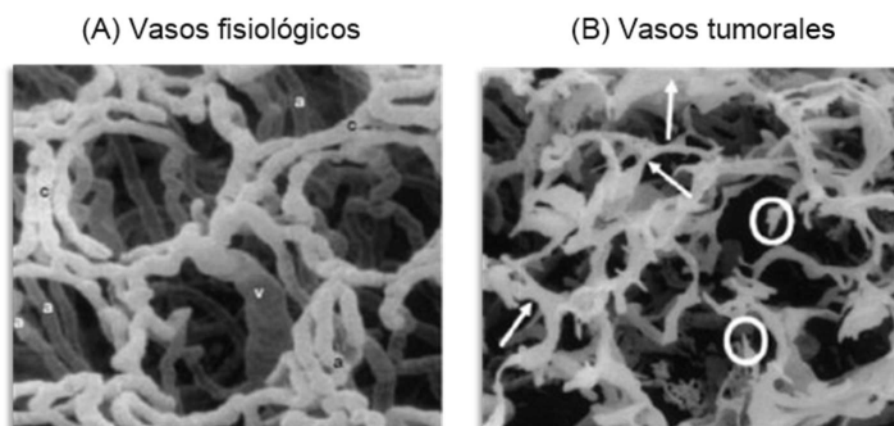


Figura 1. Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se observan vasos fisiológicos (A) y tumorales (B). Adaptación de la referencia *Cancer* 2010, 116, 1859-1871.

Como se ha mencionado previamente, los VDAs actúan sobre las células endoteliales, células poco propensas a fenómenos de resistencia.²⁴ Estas células son aplanadas y forman el endotelio vascular, que es un epitelio plano que recubre la pared interna o luminal de los vasos sanguíneos. Las células endoteliales forman una superficie lisa que facilita el flujo laminar de la sangre y previenen la adherencia de las células sanguíneas (Figura 2A). Sin embargo, las células endoteliales del entorno tumoral, con una morfología a menudo irregular y falta de planaridad, hacen que la superficie luminal del vaso sea discontinua y con pérdida de puntos de conexión entre células (Figura 2B).²⁵ Estas diferencias morfológicas tienen un gran impacto en las funciones que desarrollan los vasos sanguíneos, de modo que en el tumor se genera un incremento en la permeabilidad a macromoléculas de la sangre que conduce a una mayor presión intersticial. Del mismo modo aumenta la resistencia vascular, dificultando el flujo sanguíneo.²⁶ Así, cualquier modificación en la perfusión sanguínea, que apenas tendría efecto en los vasos fisiológicos, puede tener consecuencias catastróficas para la vasculatura intratumoral, dando lugar a la isquemia y necrosis del tumor (Figura 2B).⁶ Este efecto es rápido y muy selectivo, ya que la vascularización en el resto de tejidos apenas resulta alterada, como se ha podido demostrar con técnicas de imagen.¹⁵ Es importante destacar que las células de la periferia del tumor no se ven afectadas por los VDAs, constituyendo lo que se conoce como “viable rim”. Estas células probablemente se abastecen a través de los vasos fisiológicos de los tejidos en contacto, y prácticamente no sufren perturbaciones tras la administración de un VDA.¹⁶

La presencia del “viable rim” tras el tratamiento con un VDA y los ensayos clínicos llevados a cabo con estos compuestos apoyan la necesidad de que estos agentes sean administrados en terapias combinadas, y no en terapia única.^{14,22} Así, el VDA produce una necrosis en el centro del tumor, zona de perfusión reducida difícilmente accesible para la quimioterapia y la radioterapia. Por el contrario, estas terapias son particularmente eficientes frente a las células periféricas bien oxigenadas y resistentes al VDA.²⁷ De esta manera, el efecto antineoplásico se potencia, mientras que se minimizan los efectos secundarios por reducción de las dosis. Las combinaciones que se están evaluando en ensayos clínicos incluyen bien radio o quimioterapia (generalmente carboplatino y/o paclitaxel), o bien agentes antiangiogénicos (principalmente bevacizumab), más efectivos contra las células tumorales de la periferia donde el proceso de angiogénesis ocurre de forma más intensa.²⁸⁻²⁹ En el desarrollo de estos ensayos el orden y las pautas de administración de los distintos agentes terapéuticos parece ser crítico para maximizar el efecto anticanceroso.^{14,30}

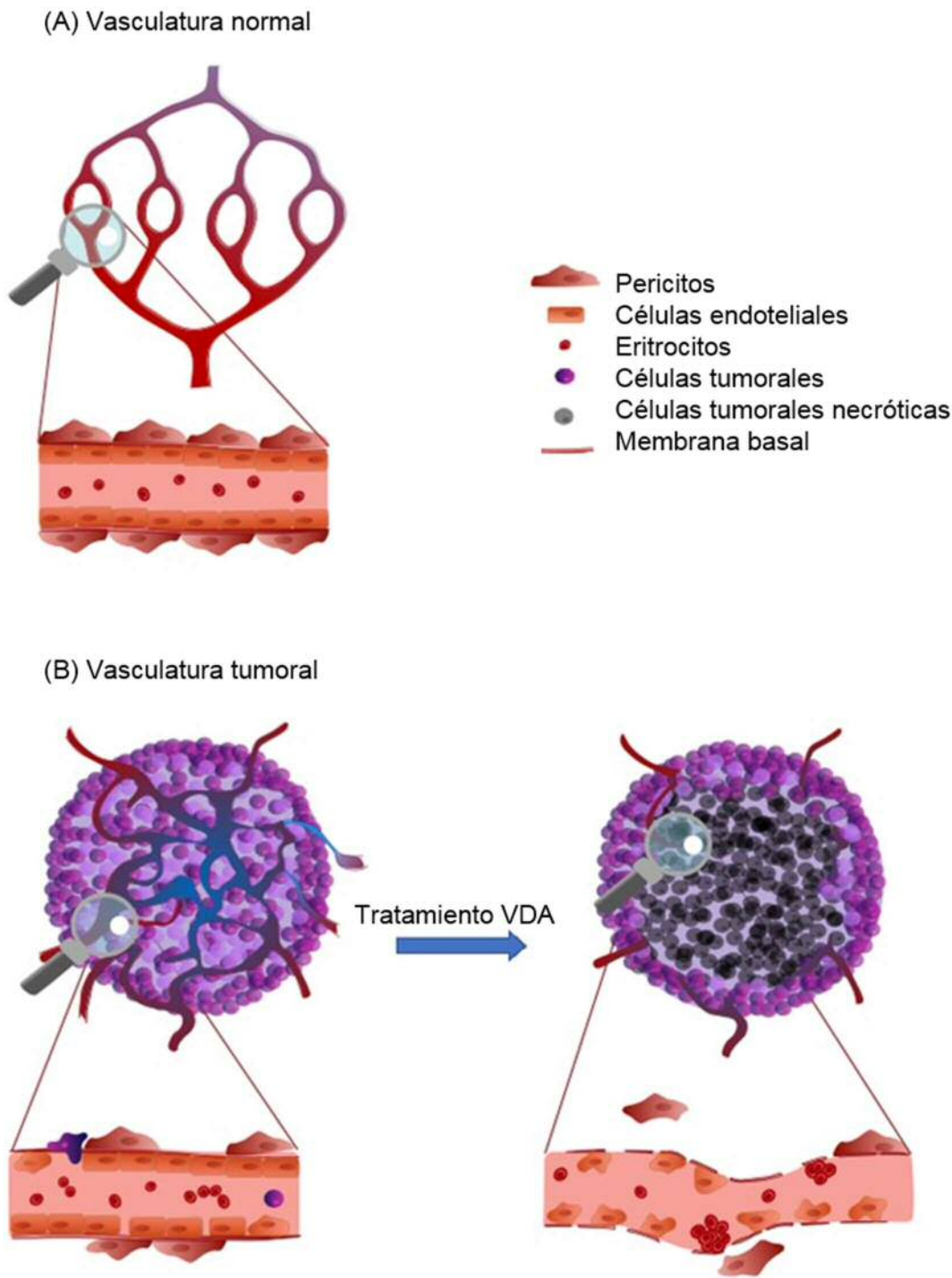


Figura 2. Representación de los efectos producidos en la vasculatura tumoral por un VDA. (A) En la vasculatura normal, los vasos sanguíneos están bien organizados y la membrana basal y los pericitos dan lugar a una estructura estable. (B) Los vasos tumorales son caóticos y presentan una falta de pericitos. El flujo sanguíneo está dificultado, lo que provoca una hipoxia en el centro del tumor y las células tumorales pueden invadir estos vasos débiles e inestables. El tratamiento con un VDA provoca una perturbación en el citoesqueleto y reduce las uniones intercelulares dando lugar a un incremento de la permeabilidad vascular. Esto desencadena una cascada de eventos que dan lugar a una reducción del flujo sanguíneo, la oclusión de estos vasos y finalmente la necrosis en el centro del tumor. En la periferia quedan células tumorales viables (“viable rim”) que reciben un aporte nutritivo por parte de los vasos sanguíneos periféricos, más resistentes a los VDAs. Adaptación de la referencia *J. Med. Chem.* 2016, 59, 8685-8711.

1.2. AGENTES INTERRUPTORES DE LA VASCULARIZACIÓN TUMORAL (VDAs)

1.2.1. Clasificación

Los VDAs engloban a un conjunto de agentes terapéuticos que, actuando sobre dianas primarias diferentes, producen cambios morfológicos y funcionales en el endotelio tumoral. De esta forma, atendiendo a la complejidad molecular del agente interruptor de la vascularización, los VDAs se clasifican en dos grandes grupos: los VDAs basados en ligandos fisiológicos, y las moléculas pequeñas VDAs.^{6,31} (Figura 3). El primer grupo comprende diferentes ligandos, generalmente anticuerpos, péptidos o factores de crecimiento, dirigidos frente a antígenos o receptores específicos de las células endoteliales tumorales.³² El segundo grupo, formado por las moléculas pequeñas VDAs, a su vez se divide en dos grandes familias en función del mecanismo de acción: los agentes que desencadenan la liberación de citoquinas actuando sobre la proteína estimuladora de genes de interferón (proteína STING), y los agentes despolimerizantes de tubulina que actúan en el sitio de colchicina (Figura 3).

Los compuestos más representativos del primer grupo, tradicionalmente denominados flavonoides,³¹⁻³² son el ácido 8-flavon acético (FAA) (**i.1**) y su derivado mejor estudiado, el ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (**i.2**, DMXAA, vadimezan o ASA404). Ambos inducen la activación del factor nuclear κB (NF- κB) que da lugar a un incremento en la producción de varias citoquinas, entre ellas el factor de necrosis tumoral α (TNF- α).^{22,32-34} Como consecuencia, se produce la apoptosis de las células endoteliales, lo que desencadena la necrosis hemorrágica del tumor.³⁵ El compuesto **i.2** mostró un efecto muy potente en la regresión tumoral tanto en estudios preclínicos como clínicos³⁶⁻³⁷ aunque posteriormente fue interrumpido en ensayos clínicos en fase III para NSCLC avanzado por falta de eficacia.³⁸⁻³⁹ Recientemente, se ha demostrado que la falta de eficacia de DMXAA en humanos es debida a las diferencias existentes entre la proteína STING en ratones y en humanos. A pesar de presentar una elevada homología, DMXAA actúa como agonista de STING en ratones, mientras que tiene una afinidad muy pequeña frente a STING en humanos, lo que explica su falta de eficacia en los ensayos clínicos.⁴⁰

La segunda familia de moléculas pequeñas está integrada por VDAs que actúan desestabilizando los microtúbulos y constituyen el objeto de estudio de la presente Memoria. El mecanismo de acción de estos compuestos es por unión al heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina, concretamente en el sitio de unión de la colchicina (**i.3**).^{14,41-42} Como se

detallará más adelante, el compuesto prototipo de esta familia es la combretastatina A-4 (i.4).

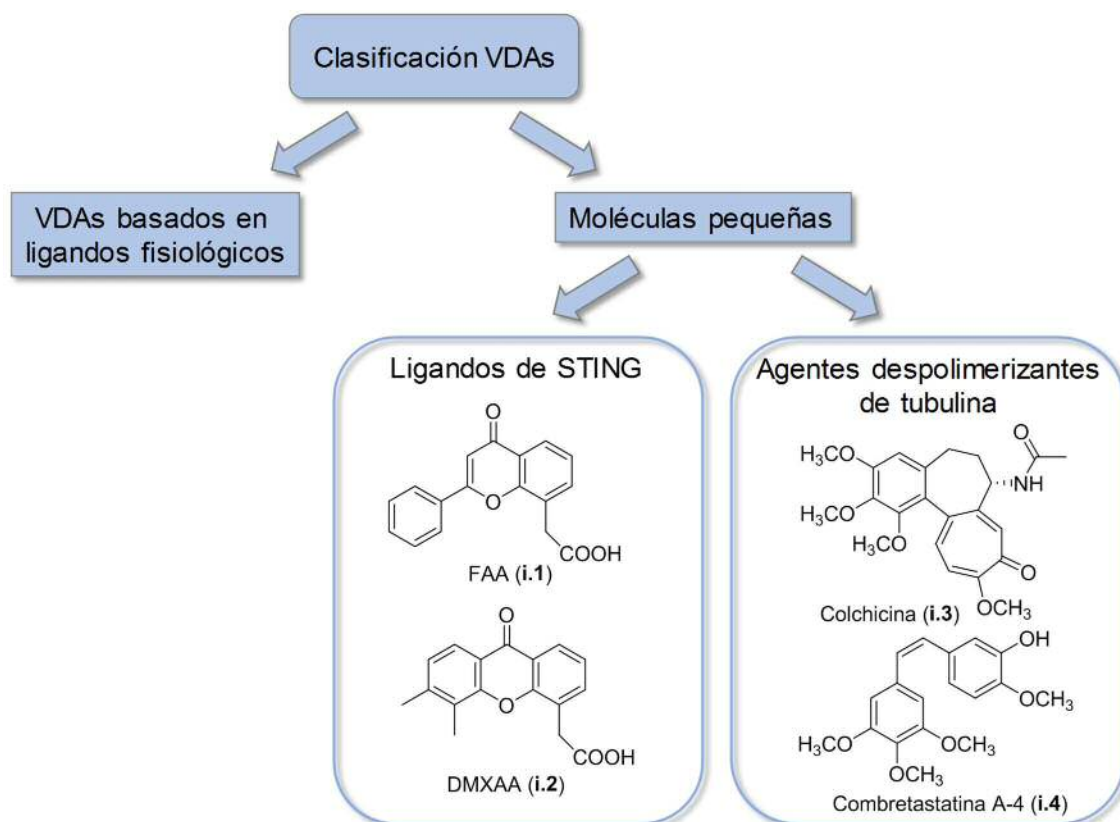


Figura 3. Clasificación de los VDAs.

1.2.2. Mecanismo de acción

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, los VDAs que actúan en el sitio de colchicina de $\alpha\beta$ -tubulina se comportan como agentes desestabilizantes de microtúbulos. Los microtúbulos son estructuras dinámicas que junto con los filamentos de actina (F-actina) y los filamentos intermedios constituyen el citoesqueleto celular.⁴³ Además de desempeñar un papel crucial en la división celular, también están involucrados en otras funciones fundamentales como el mantenimiento de la forma celular y su morfología, la movilidad celular y el tráfico de orgánulos y vesículas.⁴⁴ Así, esta estructura es crucial para la adecuada función del endotelio ya que permite la movilidad, invasión, unión, alineamiento y proliferación de las células endoteliales.

Los microtúbulos están constituidos por heterodímeros de α y β -tubulina (Figura 4A), que son proteínas globulares, muy semejantes entre sí, y con un peso molecular aproximado de 50 kDa. Existen diferentes isoformas en humanos, 6 de α -tubulina y 7 de β -tubulina, con diferente distribución en los distintos tejidos.⁴⁵ Estos heterodímeros

se asocian entre sí formando protofilamentos lineales, que a su vez se agregan lateralmente formando un cilindro hueco de aproximadamente 24 nm de diámetro externo, constituyendo un microtúbulo. Esta estructura es polar, presenta un extremo positivo (+) que expone β -tubulina y un extremo negativo (-) constituido por subunidades de la isoforma α .⁴⁶

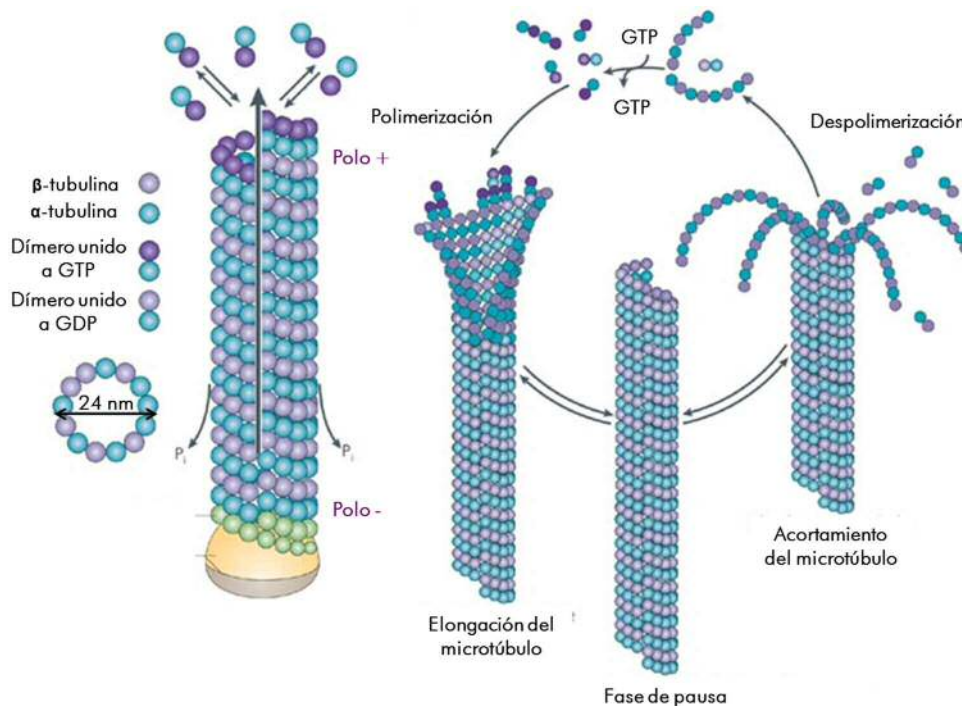


Figura 4. Estructura y dinámica de los microtúbulos. (A) Los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina se ensamblan formando protofilamentos lineales que se disponen formando un cilindro hueco, con un polo + y un polo -. (B) Dinámica de polimerización/despolimerización de los microtúbulos mediada por la unión e hidrólisis de GTP. Adaptación de la referencia *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 319-332.

La unión e hidrólisis de GTP en los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina está directamente involucrada en la dinámica de polimerización/despolimerización de los microtúbulos (Figura 4B).^{44,47} Cada subunidad del heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina contiene un sitio de unión de GTP. Así, la subunidad α está unida a una molécula de GTP, que desempeña una función estructural (GTP no intercambiable), mientras que el GTP unido a la subunidad β es hidrolizable (GTP intercambiable).⁴⁸ Es importante resaltar que la unión de GTP en la subunidad β es responsable de la adopción de una disposición recta y rígida de los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, necesaria para la elongación del microtúbulo.⁴⁹⁻⁵⁰ Así, durante la fase de polimerización, la adición de unidades de GTP- $\alpha\beta$ -tubulina al polo (+) del microtúbulo ocurre de manera más rápida que la hidrólisis de las moléculas de GTP unidas al mismo. Sin embargo, en la fase de despolimerización predomina la hidrólisis de GTP del extremo libre, quedando los heterodímeros de

tubulina unidos a moléculas de GDP. Los dímeros GDP-tubulina adoptan una disposición curva provocando la pérdida parcial de los contactos laterales entre los protofilamentos y su desestabilización. Como consecuencia, se liberan al citosol estas unidades de GDP- $\alpha\beta$ -tubulina, que pueden intercambiar el GDP por GTP y de nuevo incorporarse a un microtúbulo en fase de crecimiento.⁵¹

Conviene recordar la importancia vital de los microtúbulos en la mitosis celular al ser los componentes principales del huso mitótico, estructura celular que posibilita el reparto equitativo de los cromosomas duplicados permitiendo así que las nuevas células generadas posean la misma dotación genética. Dado que las células tumorales se caracterizan por su estado hiperproliferativo, los compuestos que se unen a los microtúbulos presentan propiedades antitumorales por inhibición de la mitosis.⁵² Los agentes antimitóticos que interfieren en la dinámica de los microtúbulos se clasifican en dos grandes grupos, según impidan (agentes desestabilizantes) o promuevan (agentes estabilizantes) el proceso de polimerización de los microtúbulos.⁵³ Al primer grupo pertenecen los ligandos que se unen al sitio de los alcaloides de la vinca y los ya mencionados ligandos del sitio de colchicina, mientras que al segundo grupo pertenecen los ligandos del sitio del taxano. Como es bien conocido, los taxanos y la vinblastina y análogos constituyen tratamientos de primera línea en la terapéutica de un elevado número de tipos de cáncer, si bien presentan limitaciones relacionados con fenómenos de resistencia y de fracaso terapéutico,⁵⁴ en particular debidos a la sobreexpresión de la proteína P-gp,⁵⁵ y a la aparición de la isoforma β III-tubulina en sustitución de la β I,⁵⁶ forma sensible y predominante en la mayoría de los tejidos.

1.2.3. Colchicina, combretastatina A-4 y otros ejemplos de VDAs que se unen al sitio de colchicina en tubulina

La colchicina (i.3, Figura 5) es un alcaloide de origen natural presente en diferentes especies de plantas, principalmente en el cólchico (*Colchicum autumnale*). Fue en los años 40 cuando se describió su potente efecto antitumoral y se iniciaron los estudios sobre su acción antimitótica.⁵⁷ En el año 1968 la colchicina fue empleada para la caracterización de una proteína desconocida hasta esa fecha y que formaba parte de los microtúbulos celulares: la tubulina.⁵⁸ A pesar de su acción antimitótica, la colchicina se descartó como agente antitumoral debido a su pequeña ventana terapéutica. Sin embargo, a dosis más bajas, se emplea habitualmente para el tratamiento de la gota, de la fiebre mediterránea familiar, y en otras enfermedades inflamatorias como artrosis, pericarditis y cardiopatía isquémica.⁵⁹

Si bien la colchicina ha quedado descartada como agente antitumoral, los ligandos del sitio de unión de colchicina en tubulina presentan un mecanismo de acción dual como antimitóticos y agentes VDAs, lo que les convierte en agentes antitumorales muy interesantes. Existen numerosos artículos de revisión que cubren las distintas familias de compuestos que comparten este mecanismo de acción,^{42,60-67} así como estudios computacionales y estructurales de estos compuestos y su interacción con tubulina.⁶⁸⁻⁶⁹ También se han publicado revisiones sobre los estudios clínicos realizados.^{14,33,70-72} En nuestro grupo de investigación también se ha publicado una revisión reciente.⁷³ En los siguientes apartados de esta memoria solo se recogerán algunos ejemplos significativos.

Se han descrito un gran número de productos naturales que se unen a tubulina en el sitio de colchicina, entre ellos cabe destacar la poligamaina (i.5, Figura 5)⁷⁴ o la podofilotoxina (i.6, Figura 5).⁷⁵ Como derivado semisintético de la colchicina destaca el compuesto ZD6126 (i.7, Figura 5). Este último presentó resultados muy prometedores como VDA y agente antimitótico en investigación clínica pero finalmente su desarrollo fue interrumpido por presentar graves problemas de cardiotoxicidad.⁷²

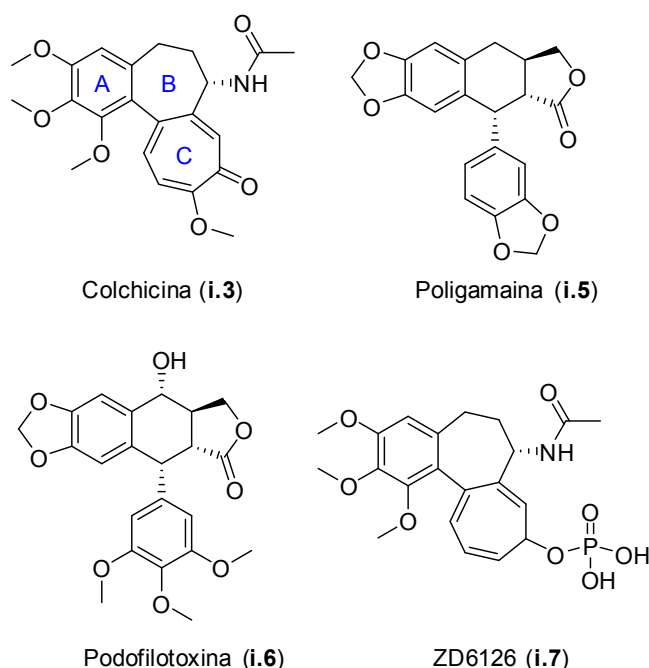


Figura 5. Estructura de la colchicina (i.3), de otros productos naturales (i.5, i.6) que se unen a tubulina en el sitio de colchicina y un derivado de colchicina evaluado en clínica (i.7).

La combretastatina A-4 (i.4, CA-4) (Figura 6), el *cis* estilbeno de origen natural obtenido de la corteza del arbusto *Combretum caffum*,⁷⁶ fue el primer inhibidor de la polimerización de microtúbulos para el que se describió su capacidad de interrumpir la

vascularización a una dosis bien tolerada⁷⁷ y constituye el compuesto prototipo de los VDAs despolimerizantes de microtúbulos. Además de la combretastina A-4, otras combretastatinas también han mostrado potente actividad antimetabólica y VDA, tales como la CA-1 (**i.8**)⁷⁶ o la CA-2 (**i.9**)⁷⁸ (Figura 6). Sin embargo, estos compuestos presentan dos notables limitaciones: su baja solubilidad en agua y su inestabilidad. En presencia de luz, calor o medio ácido, y también tras su administración *in vivo*, el *cis*-estilbeno isomeriza fácilmente al isómero *trans*, que es significativamente menos activo en la unión a tubulina.⁷⁹ Para mejorar la baja solubilidad de las combretastatinas, se han desarrollado profármacos, tales como el fosfato de CA-4 (**i.10**, CA-4P o fosbretabulina)⁸⁰ o el derivado de serina (**i.11**, AVE-8062 u ombrabulina)⁸¹, así como el difosfato de combretastatina A-1 (**i.12**, CA-1P u OXi-4503)⁸² (Figura 6). Estos compuestos han alcanzado ensayos clínicos, encontrándose actualmente en estados avanzados (fase II/III para CA-4P, y fase I/II para CA-1P) con resultados muy prometedores, a excepción de la ombrabulina, cuyo desarrollo clínico fue interrumpido en 2013 tras resultados no satisfactorios obtenidos en fase III.⁸³

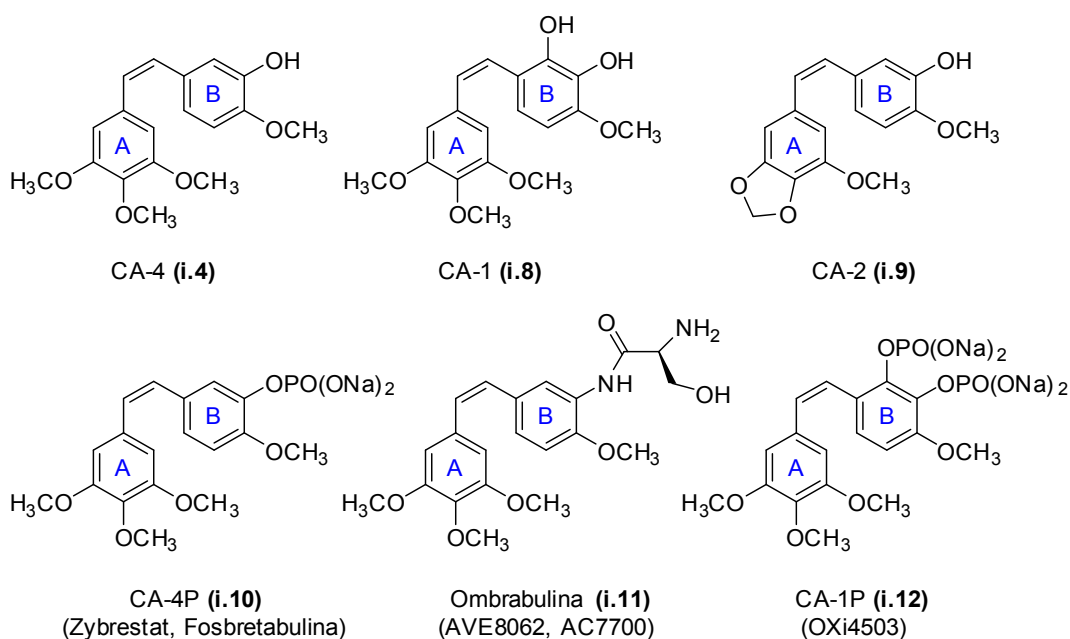


Figura 6. Combretastatinas más relevantes y sus profármacos.

Con el objetivo de solventar los problemas de estabilidad presentados por las combretastatinas, los esfuerzos sintéticos se han centrado en fijar la configuración *cis* de la olefina que une los anillos A y B. Así, como puente de unión entre ambos anillos aromáticos de la CA-4, se han introducido anillos heterocíclicos, que incluyen anillos heteroaromáticos como en los compuestos **i.13**,⁸⁴ **i.14**⁸⁵ o **i.15**,⁸⁶ y heterociclos no aromáticos, como en el compuesto **i.16**⁸⁷ (Figura 7). Como estrategia para estabilizar la forma *cis* también se ha propuesto la síntesis de derivados bicíclicos en el anillo A o B,

como se ilustra en el compuesto **i.17**.⁸⁸ El empleo de un carbonilo como nexo de unión entre los dos anillos aromáticos ha sido quizás una de las estrategias más exploradas, dando lugar a un abundante número de derivados de diarilcetona, destacando el compuesto **i.18** y su derivado de valina **i.19** (CKD-516)⁸⁹ (Figura 7), cuya evaluación clínica en fase I ha sido publicada recientemente,⁹⁰ y el compuesto **i.20** (BNC105)⁹¹⁻⁹² y su fosfato **i.21** (BNC105P), que actualmente está siendo evaluado en fase II. Entre otros derivados inspirados en la estructura de las combretastatinas destacan las chalconas, muy abundantes en productos naturales. En este grupo se incluyen además de las chalconas derivadas de CA-4,⁹³ el compuesto **i.22** (IPP51) (Figura 7), una chalcona sintética con efectos antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo*.⁹⁴

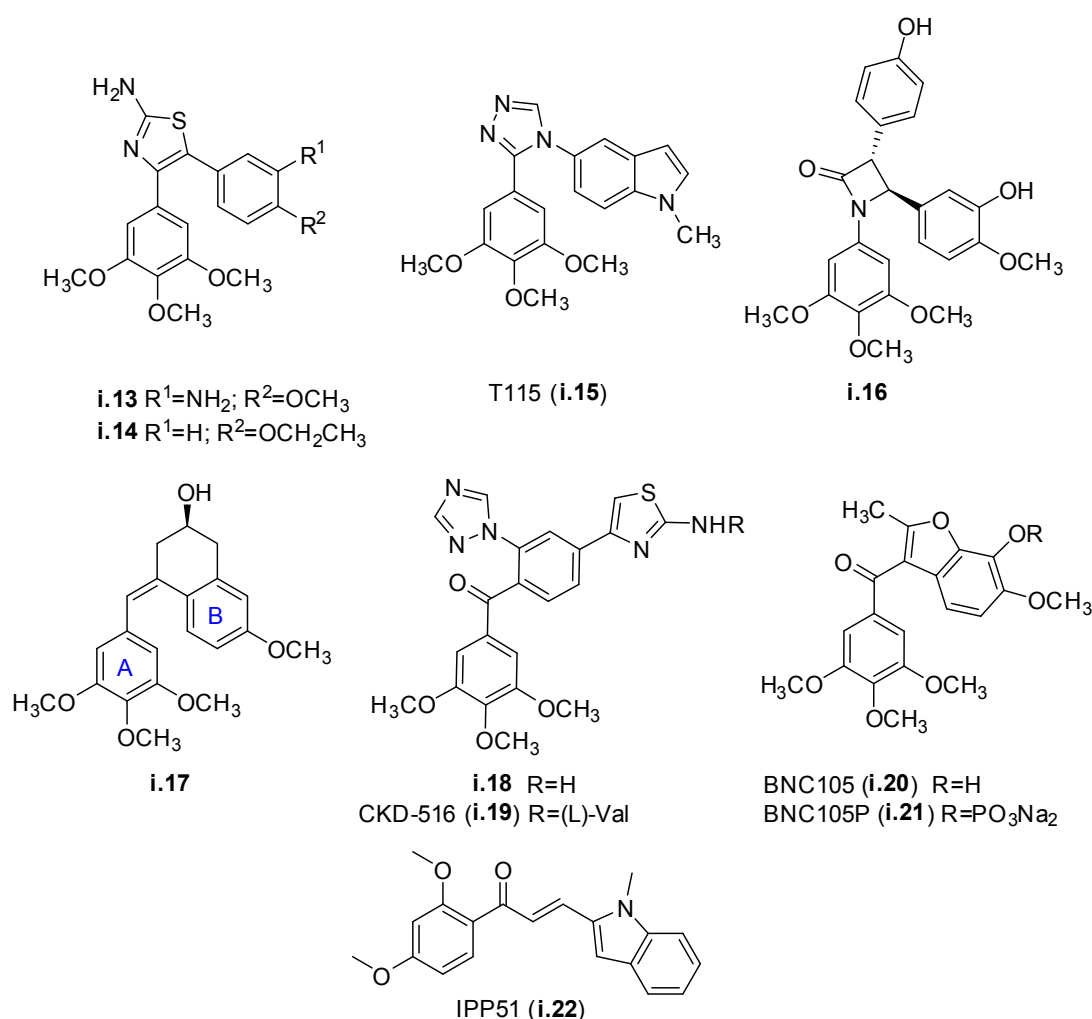


Figura 7. Ligandos del sitio de colchicina estructuralmente análogos a CA-4.

Por otro lado, hay un grupo importante de ligandos que podrían englobarse bajo la denominación de ligandos “no inspirados” en combretastatinas.⁷³ Dentro de este grupo (Figura 8) caben mencionar los compuestos lexibulina (**i.23**, CYT997),⁹⁵ cuyo complejo

cristalino con tubulina ha sido resuelto recientemente⁹⁶ y ABT-751 (**i.24**, E7010), éste último descrito como ligando del sitio de colchicina en 1997,⁹⁷ al mismo tiempo que se describía la actividad antivascular de CA-4.⁷⁷ Ambos compuestos presentaron resultados muy prometedores como agentes antitumorales pero su evaluación clínica ha sido interrumpida recientemente.⁷² Otros ligandos “no inspirados” en CA-4 que también han llegado a evaluación clínica son verubulina (**i.25**, MPC-6827, Azixa),⁹⁸ MN-029 (**i.26**, Denibulina),⁹⁹ y plinabulina (**i.27**, NPI-2358)¹⁰⁰ (Figura 8).

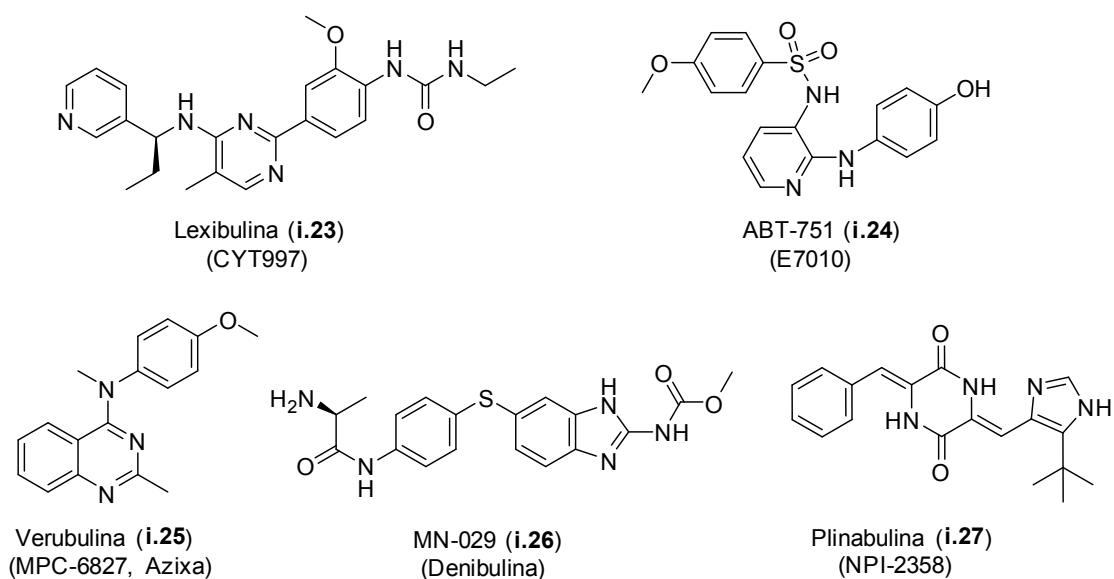


Figura 8. Ligandos del sitio de colchicina estructuralmente diferentes de CA-4.

1.3. ESTRUCTURAS DE RAYOS X DE TUBULINA CON LIGANDOS DEL SITIO DE COLCHICINA

1.3.1. Estructura de tubulina

Los primeros estudios estructurales de la $\alpha\beta$ -tubulina fueron descritos en 1998 por Nogales y col.,¹⁰¹ quienes detallaron, mediante criomicroscopía electrónica de transmisión, la estructura 3D de un heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina estabilizado con taxol con una resolución de 3.7 Å. En este modelo atómico el dímero presenta una conformación recta. Posteriormente, en el año 2000, y mediante cristalografía de rayos X, Gigant y col.¹⁰² consiguieron determinar la estructura de dos dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina estabilizados con la proteína tipo estatmina RB3 (RB3-SLD) con una resolución de 4 Å. El complejo presenta una estructura curva, donde cada dímero contiene GTP en la subunidad α y GDP en la subunidad β .

El empleo de estatmina y, más recientemente de otras proteínas como la tubulina tirosina ligasa (TTL) a modo de soporte estructural para estabilizar el complejo, ha sido clave para resolver una gran cantidad de estructuras de tubulina con diferentes ligandos mediante cristalografía de rayos X con una elevada resolución. Hasta el año 2014, se habían descrito complejos en 3 zonas bien diferenciadas de tubulina: el sitio del taxol (localizado en la subunidad β , Figura 9 en amarillo),¹⁰³ el sitio de los alcaloides de la vinca (localizado en la interfaz de dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, es decir, entre la subunidad $\alpha 1$ y la subunidad $\beta 2$, Figura 9 en azul),¹⁰⁴ y el sitio de la colchicina (localizado en la interfaz de un mismo heterodímero, más próximo a la subunidad β , Figura 9 en morado).¹⁰⁵ En 2014 se describieron 2 nuevos sitios a partir de los complejos con maytansina (sitio localizado en la subunidad β , muy cerca del sitio de unión de GTP, Figura 9 en marrón)¹⁰⁶ y con laulimalida/pelorusida A (sitio localizado en la subunidad β , muy cerca del sitio de los alcaloides de la vinca y orientado hacia la parte exterior del microtúbulo, Figura 9 en naranja).¹⁰⁷

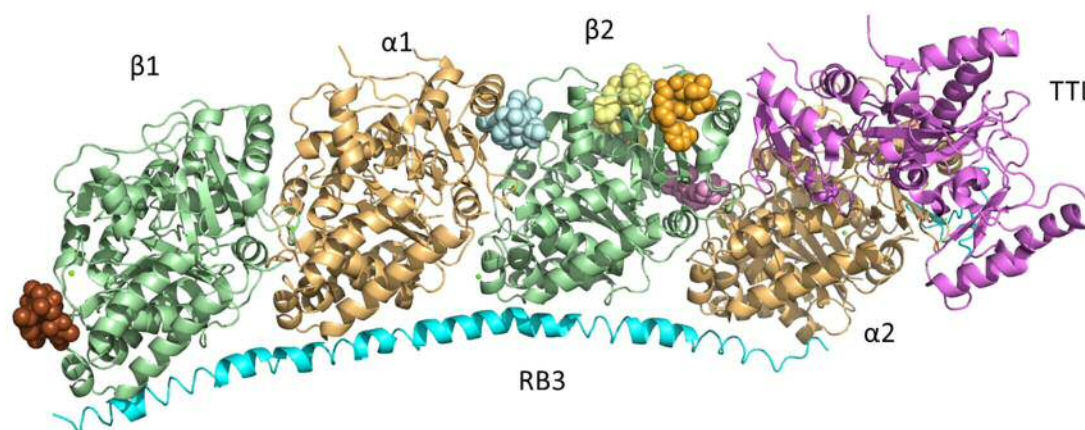


Figura 9. Sitios de unión de los distintos ligandos en dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. Los monómeros de α -tubulina se representan en marrón claro y los de β -tubulina en verde. La proteína RB3 se representa en cian y TTL en magenta. Los diferentes ligandos se representan con estos colores: vinblastina (azul), paclitaxel (amarillo), DAMA-colchicina (morado), laulimalida (naranja) y maytansina (marrón).

1.3.2. Sitio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina

Los detalles atómicos del sitio de colchicina se obtuvieron en 2004, cuando Ravelli y col.¹⁰⁵ resolvieron la estructura del complejo de $\alpha\beta$ -tubulina con la proteína tipo estatmina RB3 y el compuesto DAMA-colchicina (**i.28**) (Figura 10). Los resultados experimentales mostraron que DAMA-colchicina se une en la interfaz entre la subunidad α y β de un mismo heterodímero de tubulina, más próximo a la subunidad β . El sitio de unión queda confinado por las láminas S8 y S9, las hélices H7 y H8, y el loop T7 de la subunidad β , quedando próximo al loop T5 de la subunidad α (Figura 10). Así, el anillo

de trimetoxifenilo (anillo A) de DAMA-colchicina se encuentra en el interior de un bolsillo hidrofóbico en la subunidad β donde el 4-metoxi establece un enlace de hidrógeno con la Cys β 241. A su vez el anillo C interacciona con el loop T5 de la subunidad α mediante un enlace de H entre el grupo carbonilo del anillo C y el amino del esqueleto peptídico del residuo de Val α 181.

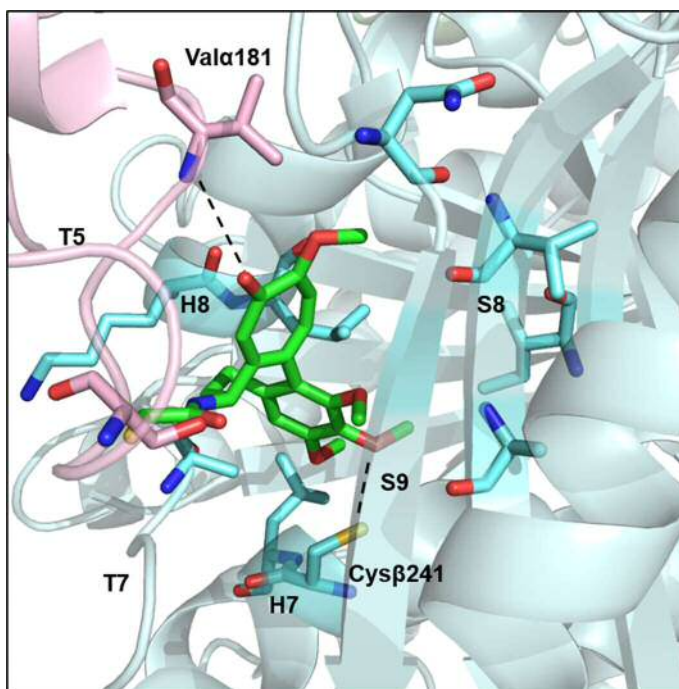


Figura 10. Sitio de unión de colchicina en el complejo tubulina:DAMA-colchicina:RB3-SLD. El sitio viene delimitado por las láminas S8 y S9, el loop T7, y las hélices H7 y H8 de la subunidad β (color azul cian). Existen también interacciones con el loop T5 de la subunidad α (color rosa).

Gracias al eficaz procedimiento de cristalización establecido, han sido co-cristalizados con $\alpha\beta$ -tubulina una gran variedad de ligandos (Figura 11). Los códigos PBD^{96,105,108-113} y la resolución atómica de los complejos se recogen en la Tabla 1. Como puede observarse, los primeros complejos cristalinos, que emplean RB3 como soporte estructural, tienen una resolución baja o media, mientras que el empleo de la tubulina-tirosina ligasa (TTL) como soporte estructural adicional a RB3, estrategia propuesta por Steinmetz y col.,¹¹⁴ ha supuesto un incremento considerable en la resolución de los complejos. Cabe destacar que el complejo con CA-4 no se ha descrito hasta enero de 2017.¹¹³

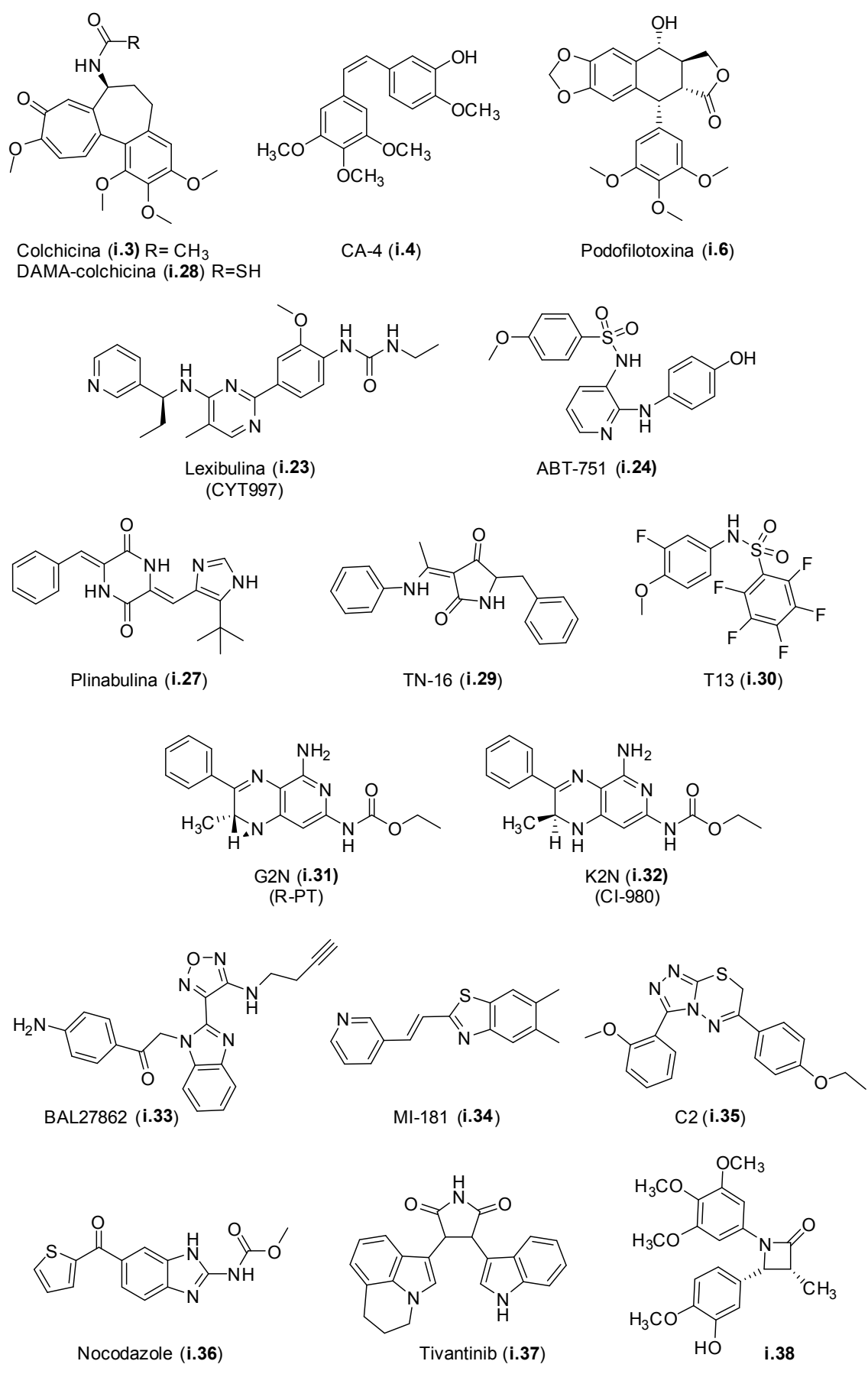


Figura 11. Estructuras químicas de ligandos del sitio de colchicina co-cristalizados con $\alpha\beta$ -tubulina.

Tabla 1. Códigos PDB de los complejos $\alpha\beta$ -tubulina-ligando del sitio de colchicina según orden cronológico de su publicación.

Ligando	Código PDB	Resolución (Å)	Referencia
DAMA-Colchicina (i.28)	1SA0	3.58	Ravelli, R.B.G. <i>Nature</i> 2004 ¹⁰⁵
Podofilotoxina (i.6)	1SA1	4.20	Ravelli, R.B.G. <i>Nature</i> 2004 ¹⁰⁵
ABT-751 (i.24)	3HKC	3.80	Dorléans, A. <i>PNAS</i> 2009 ¹⁰⁸
T13 (i.30)	3HKE	3.60	Dorléans, A. <i>PNAS</i> 2009 ¹⁰⁸
TN-16 (i.29)	3HKD	3.70	Dorléans, A. <i>PNAS</i> 2009 ¹⁰⁸
G2N (i.31)	3N2G	4.00	Barbier, P. <i>J Biol Chem</i> 2010 ¹⁰⁹
K2N (i.32)	3N2K	4.00	Barbier, P. <i>J Biol Chem</i> 2010 ¹⁰⁹
BAL27862 (i.33)	4O2A	2.50	Prota, A. E. <i>J. Mol. Biol.</i> 2014 ¹¹⁰
Colchicina (i.3)	4O2B	2.30	Prota, A. E. <i>J. Mol. Biol.</i> 2014 ¹¹⁰
MI-181 (i.34)	4YJ2	2.60	McNamara, D. E. <i>Protein Sci</i> 2015 ¹¹¹
C2 (i.35)	4YJ3	3.75	McNamara, D. E. <i>Protein Sci</i> 2015 ¹¹¹
Plinabulina (i.27)	5C8Y	2.59	Wang, Y. <i>FEBS J.</i> 2016 ⁹⁶
Lexibulina (i.23)	5CA0	2.50	Wang, Y. <i>FEBS J.</i> 2016 ⁹⁶
Nocodazole (i.36)	5CA1	2.40	Wang, Y. <i>FEBS J.</i> 2016 ⁹⁶
Tivantinib (i.37)	5CB4	2.19	Wang, Y. <i>FEBS J.</i> 2016 ⁹⁶
β -lactama i.38	5GON	2.48	Zhou. P. <i>J. Med. Chem.</i> 2016 ¹¹²
CA-4 (i.4)	5LYJ	2.40	Gaspari, R. <i>Chem.</i> 2017 ¹¹³

La comparación de los complejos de DAMA-colchicina (**i.28**) y de TN-16 (**i.29**) (Figura 11) descritos por Dorleans y col.¹⁰⁸ en 2009, en la que ambos ligandos solapaban solo parcialmente, condujo a proponer la denominación del sitio de unión como “el dominio de colchicina” formado por un sitio principal donde se une colchicina y una serie de zonas accesorias. Posteriormente Massaroti y col.⁶⁹ analizaron este dominio utilizando “structural interaction fingerprints” (SIFt), y propusieron la división del dominio en tres regiones fundamentales, denominadas como zona 1, 2 y 3,⁶⁹ como se muestra en la Figura 12A. La zona 1, considerada como un bolsillo accesorio, se encuentra en la interfaz entre las subunidades α y β . La zona 2, zona principal (localizada en el centro del dominio, Figura 12A), es un bolsillo hidrofóbico localizado en la subunidad β . Por último, la zona 3 comprende un segundo bolsillo accesorio localizado en una región más profunda de la subunidad β . De esta manera, los ligandos del dominio de colchicina pueden dividirse en dos grandes grupos. Por un lado, estarían los ligandos que se unen de forma similar a colchicina, es decir, ocupando principalmente las zonas 1 y 2. En base a los datos cristalográficos, los ligandos que pertenecen a este grupo son podofilotoxina (**i.6**), ABT-751 (**i.24**), T13 (**i.30**), BAL27862 (**i.33**), C2 (**i.35**), lexibulina (**i.23**), y tivantinib (**i.37**) (Figura 11) y cuya superposición de sus modos de unión se representa en la Figura 12B. También pertenecen a este grupo los dos últimos complejos descritos: la β -lactama **i.38** y la CA-4 (**i.4**). Por otro lado, el segundo grupo está formado por compuestos que se unen de forma similar a TN-16, ocupando las

zonas 2 y 3 del dominio de unión. En este grupo se encuentran los ligandos plinabulina (**i.27**), nocodazole (**i.36**), G2N (**i.31**) y su isómero K2N (**i.32**), y MI-181 (**i.34**). Tal y como se observa en la Figura 12C, la superposición de los modos de unión de estos ligandos muestra claramente cómo estos compuestos ocupan una zona más profunda de la subunidad β , posiblemente debido a su forma más alargada y plana, en comparación con la forma más “globular” de los ligandos cuyo modo de unión es similar al de colchicina (Figura 12B).

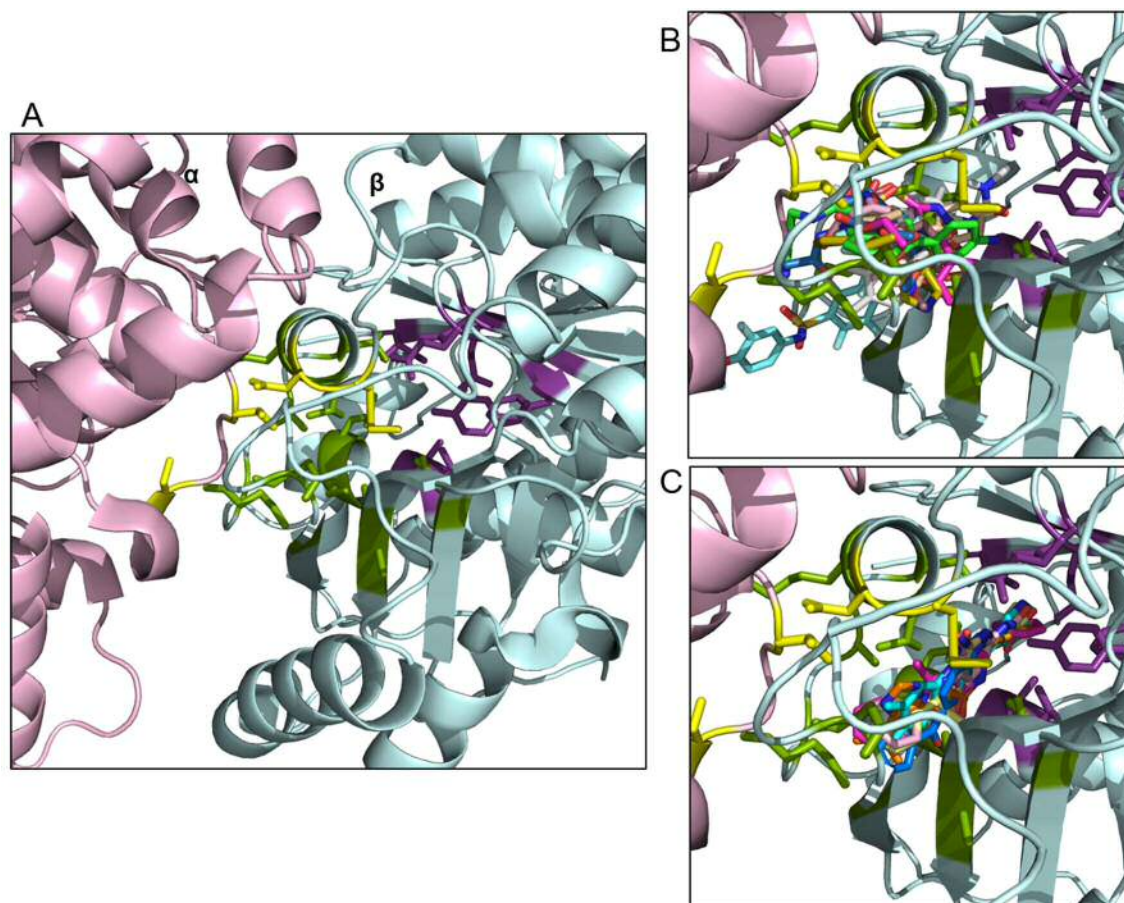


Figura 12. (A) Dominio de unión de colchicina. La subunidad α y β presentan el mismo código de color que en la Figura 10. Se muestran los residuos de la zona 1 (en amarillo), zona 2 (en verde) y zona 3 (en morado). (B) Superposición de los ligandos que se unen del mismo modo que colchicina: DAMA-colchicina (azul), podofilotoxina (marrón), ABT-751 (naranja), T13 (rosa pálido y cian), BAL27862 (verde), C2 (rosa), lexibulina (blanco) y tivantinib (amarillo). (C) Superposición de los ligandos que se unen del mismo modo que TN-16: TN-16 (rosa), G2N (rosa pálido), K2N (amarillo), MI-181 (cian), nocodazole (azul marino) y plinabulina (naranja).

Resulta llamativo que el complejo con la CA-4 haya sido uno de los últimos ejemplos descritos, si bien la unión de CA-4 en el sitio de colchicina había quedado demostrada mucho tiempo atrás mediante experimentos de competición con la propia colchicina.⁸⁰ Como se observa la Figura 13A, la CA-4 ocupa efectivamente el sitio de unión de colchicina en tubulina, solapando en gran medida con ésta. El anillo A de CA-4 (Figura 13B) se sitúa en la subunidad β , mientras que el anillo B está orientado hacia la interfaz

de las subunidades α y β de tubulina y queda apilado entre las cadenas laterales de los residuos de Asn β 258 y Lys β 353. Además, se observan dos enlaces de hidrógeno entre el grupo OH del anillo B y los grupos amida de la cadena peptídica de los residuos de Val α 181 y Thr α 179.

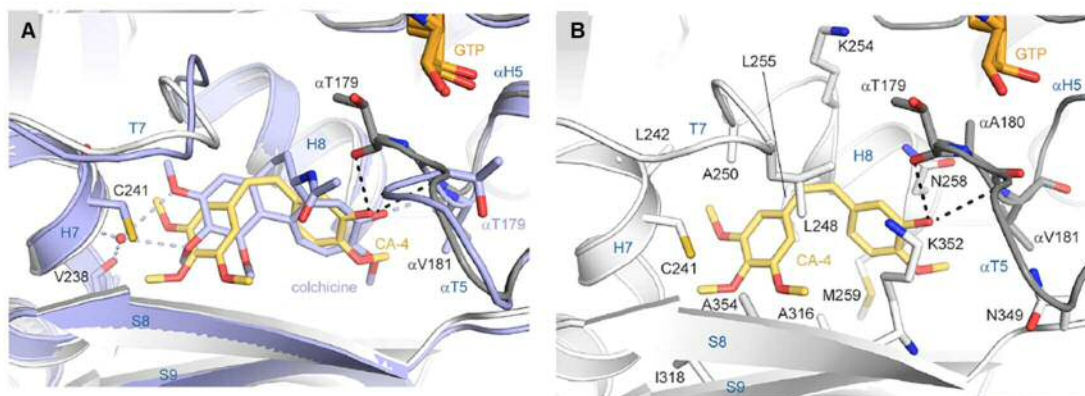


Figura 13. (A) Superposición de los complejos de colchicina-tubulina (azul) y CA-4-tubulina (tubulina en blanco, CA-4 en amarillo). (B) Detalle del modo de unión de CA-4 (en amarillo) con tubulina (en blanco). Las líneas discontinuas indican enlaces de hidrógeno. Los aminoácidos de los residuos que conforman el sitio de unión están etiquetados y se muestran sus cadenas laterales. Imagen tomada de la referencia *Chem.* 2017, 2, 102-113.

1.3.3. Ligandos del dominio de unión de colchicina como agentes desestabilizantes de los microtúbulos: Conformación recta versus conformación curva de tubulina

Como se ha detallado en apartados anteriores, durante el proceso de polimerización de los microtúbulos, es necesario que los dímeros de tubulina adopten una disposición recta, mientras que en disolución, la tubulina adopta una disposición curva. Por tanto, la transición estructural de tubulina de una disposición curva a una disposición recta es esencial para la formación del microtúbulo e implica el reordenamiento de distintos elementos estructurales de los dímeros de tubulina.

Comparando la estructura del complejo tubulina-colchicina (en disposición curva) con la estructura de la tubulina sin ligando (en disposición recta),¹⁰⁵ se observa un cambio conformacional que implica un movimiento del loop T7 del dominio de colchicina (Figura 14). En ausencia de colchicina, este loop se encuentra cerrando la cavidad donde se aloja la colchicina (Figura 14, representado en color violeta). En presencia de colchicina, este loop se desplaza (Figura 14, representado en color cian), abriendo la cavidad del sitio de colchicina. Este cambio en el loop T7 parece indicar que la colchicina no puede unirse al microtúbulo ya formado,^{105,108} si bien el complejo tubulina-colchicina sí se puede incorporar al microtúbulo en formación.¹¹⁵

Así, la presencia de colchicina u otro ligando del dominio de colchicina impide que el loop T7 pueda desplazarse, y por tanto, impide que la tubulina adopte la conformación recta necesaria para la elongación del microtúbulo. De esta manera, se explica la actividad de los ligandos del dominio de colchicina como agentes desestabilizantes de microtúbulos.

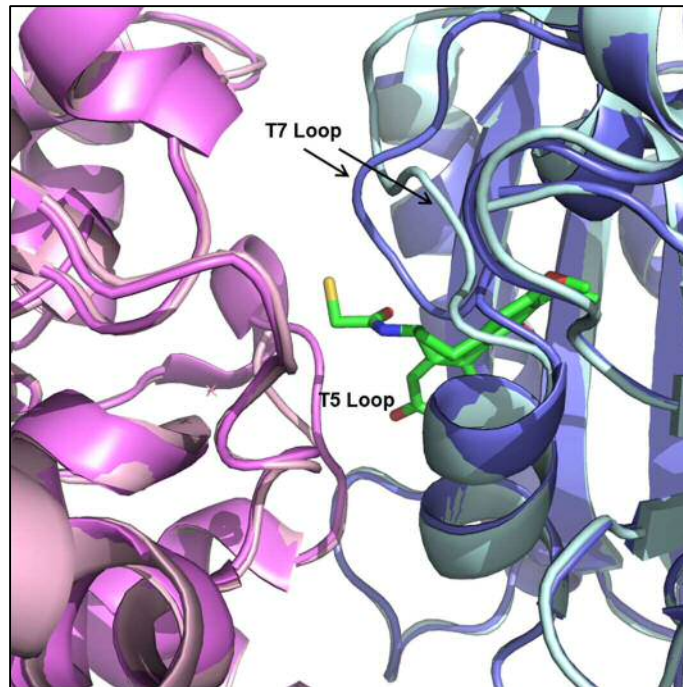


Figura 14. Cambio conformacional del loop T7 tras la unión de colchicina. α -tubulina en su estado sin ligando está representada en magenta y β -tubulina en violeta. En el complejo con colchicina, α -tubulina está representada en rosa pálido, mientras que β -tubulina se representa en cian.

1.4 ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA CA-4: EVIDENCIAS E INTERROGANTES

Como se ha mencionado a lo largo de esta introducción, la CA-4 presenta una marcada actividad antitumoral, que se ha relacionado con su capacidad de inhibir la polimerización de los microtúbulos. De ahí derivan:

- su capacidad para inhibir la mitosis tanto en células endoteliales como tumorales (efecto antimitótico),
- los efectos sobre el citoesqueleto en células endoteliales, lo que resulta en alteraciones en la forma celular, aumento de la permeabilidad vascular y colapso vascular (efecto antivascular),
- inhibición de la migración celular, lo que contribuye a la actividad antimetastásica (efecto antimetastásico).

Además, diversos estudios evidencian que la sobreexpresión de P-gp no confiere resistencia al tratamiento con CA-4, lo que supone una ventaja competitiva respecto a otros agentes dirigidos a los microtúbulos como los taxanos o los derivados de la vinca.⁷¹ Sin embargo, existen aún importantes lagunas para determinar su mecanismo de acción y las vías de señalización implicadas en las distintas líneas celulares. Además, la baja estabilidad metabólica de la CA-4 dificulta la interpretación de algunos resultados biológicos.

2. OBJETIVOS GENERALES

Durante los últimos años, nuestro grupo de investigación ha trabajado en la búsqueda de nuevos VDAs ligandos del sitio de colchicina en tubulina. Como se ha comentado en la introducción, estos agentes presentan un gran potencial terapéutico como agentes anticancerosos ya que inhiben el crecimiento tumoral mediante un mecanismo dual: por interrupción de la vascularización tumoral afectando a las células endoteliales y por inhibición de la mitosis de las células tumorales y endoteliales. En la actualidad, se están llevando a cabo estudios clínicos con este tipo de VDAs que avalan su utilidad para el tratamiento de una gran variedad de tumores^{14,33,70-72} aunque existen serias limitaciones que dificultan el desarrollo clínico de muchos de ellos, tales como la escasa solubilidad acuosa o la inestabilidad química y/o metabólica.⁶¹ Por ello, el desarrollo de nuevos VDAs que solventen estos inconvenientes y presenten un adecuado perfil farmacocinético manteniendo su efecto terapéutico es primordial.

Así, el objetivo global de esta Memoria ha sido el diseño, síntesis, evaluación y optimización de nuevos ligandos del dominio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina, con la finalidad de mejorar la solubilidad acuosa y otras propiedades tipo fármaco, y aumentar su actividad antiproliferativa mediante el establecimiento de interacciones adicionales con tubulina en el sitio de unión. El trabajo realizado se ha recopilado en dos capítulos. El primero de ellos se ha centrado en ligandos que se unen de forma similar a TN-16, y que por tanto, permiten explorar una zona más profunda del dominio de unión (zonas 2 y 3). El segundo capítulo se ha basado en ligandos que se unen de forma similar a colchicina, más próximos a la interfaz, explorando las zonas 1 y 2 del dominio de unión. En ambos capítulos el punto de partida ha estado determinado por los antecedentes e información disponible del grupo de investigación en el campo de los VDAs, antecedentes que se exponen al inicio de cada capítulo. Para el diseño de los ligandos propuestos ha sido clave el empleo de diversas herramientas computacionales.

La evaluación de la actividad antiproliferativa en cultivo celular de los compuestos sintetizados así como la mayoría de ensayos empleados para determinar el mecanismo de acción, se han llevado a cabo por el grupo de la Dra. Sandra Liekens en el Rega Institute for Medical Research de la Katholieke Universiteit Leuven (Bélgica). Los ensayos de determinación de las constantes de asociación con tubulina se han realizado en el laboratorio del Dr. Fernando Díaz en el Centro de Investigaciones Biológicas en Madrid (CIB-CSIC). La resolución por Rayos X de los complejos cristalinos de nuestros hits con tubulina ha sido llevada a cabo por el grupo de los Dres. Andrea Prota y Michel O. Steinmetz, del Paul Scherrer Institut (Villigen, Suiza).

3. BIBLIOGRAFÍA

1. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/> (Fecha consulta: 20/02/2017).
2. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (Fecha consulta: 20/02/2017).
3. Asociación Española Contra el Cáncer. <https://www.aecc.es/> (Fecha consulta: 20/02/2017).
4. Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA-Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87-108.
5. Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 4-6.
6. Siemann, D. W.; Bibby, M. C.; Dark, G. G.; Dicker, A. P.; Eskens, F. A. L. M.; Horsman, M. R.; Marmé, D.; LoRusso, P. M. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 416-420.
7. Heath, V. L.; Bicknell, R. Anticancer strategies involving the vasculature. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, *6*, 395-404.
8. Tozer, G. M.; Kanthou, C.; Baguley, B. C. Disrupting tumour blood vessels. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 423-435.
9. Kanthou, C.; Tozer, G. M. Selective destruction of the tumour vasculature by targeting the endothelial cytoskeleton. *Drug Discov. Today Ther. Strat.* **2007**, *4*, 237-243.
10. Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **2011**, *146*, 873-887.
11. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2005**, *438*, 932-936.
12. Vasudev, N. S.; Reynolds, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* **2014**, *17*, 471-494.
13. El-Kenawi, A. E.; El-Remessy, A. B. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *170*, 712-729.
14. Mita, M. M.; Sargsyan, L.; Mita, A. C.; Spear, M. Vascular-disrupting agents in oncology. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2013**, *22*, 317-328.
15. Siemann, D. W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by tumor-vascular disrupting agents. *Cancer Treat. Rev.* **2011**, *37*, 63-74.
16. Kanthou, C.; Tozer, G. M. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. *Int. J. Exp. Path.* **2009**, *90*, 284-294.

17. Ibrahim, M. A.; Do, D. V.; Sepah, Y. J.; Shah, S. M.; Anden, E. V.; Hafiz, G.; Donahue, J. K.; Rivers, R.; Balkissoon, J.; Handa, J. T.; Campochiaro, P. A.; Nguyen, Q. D. Vascular disrupting agent for neovascular age related macular degeneration: a pilot study of the safety and efficacy of intravenous combretastatin A-4 phosphate. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *14*, 1-10.
18. Sulaiman, R. S.; Basavarajappa, H. D.; Corson, T. W. Natural product inhibitors of ocular angiogenesis. *Exp. Eye Res.* **2014**, *129*, 161-171.
19. National Eye Institute. https://nei.nih.gov/health/maculardegen/armd_facts (Fecha consulta: 20/02/2017).
20. Konerding, M. A.; Malkusch, W.; Klapthor, B.; Ackern, C. V.; Fait, E.; Hill, S. A.; Parkins, C.; Chaplin, D. J.; Presta, M.; Denekamp, J. Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 724-732.
21. Baluk, P.; Morikawa, S.; Haskell, A.; Mancuso, M.; McDonald, D. M. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 1801-1815.
22. McKeage, M. J.; Baguley, B. C. Disrupting established tumor blood vessels: an emerging therapeutic strategy for cancer. *Cancer* **2010**, *116*, 1859-1871.
23. Siemann, D. W.; Horsman, M. R. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *153*, 107-124.
24. Kerbel, R.; Folkman, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 727-739.
25. Langenkamp, E.; Molema, G. Microvascular endothelial cell heterogeneity: general concepts and pharmacological consequences for anti-angiogenic therapy of cancer. *Cell Tissue Res.* **2009**, *335*, 205-222.
26. Boucher, Y.; Jain, R. K. Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5110-5114.
27. Horsman, M. R.; Siemann, D. W. Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11520-11539.
28. Wu, X.-Y.; Ma, W.; Gurung, K.; Guo, C.-H. Mechanisms of tumor resistance to small-molecule vascular disrupting agents: Treatment and rationale of combination therapy. *J. Formosan Med. Assoc.* **2013**, *112*, 115-124.
29. Nathan, P.; Zweifel, M.; Padhani, A. R.; Koh, D.M.; Ng, M.; Collins, D. J.; Harris, A.; Carden, C.; Smythe, J.; Fisher, N.; Taylor, N. J.; Stirling, J. J.; Lu, S. P.; Leach, M. O.; Rustin, G. J. S.; Judson, I. Phase I trial of combretastatin A4 phosphate (CA4P) in combination with bevacizumab in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 3428-3439.
30. Martinelli, M.; Bonezzi, K.; Riccardi, E.; Kuhn, E.; Frapolli, R.; Zucchetti, M.; Ryan, A. J.; Tarabozetti, G.; Giavazzi, R. Sequence dependent antitumour efficacy of the vascular disrupting agent ZD6126 in combination with paclitaxel. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 888-894.

31. Hasani, A.; Leighl, N. Classification and toxicities of vascular disrupting agents. *Clin. Lung Cancer* **2011**, *12*, 18-25.
32. Gaya, A. M.; Rustin, G. J. S. Vascular disrupting agents: a new class of drug in cancer therapy. *Clin. Oncol.* **2005**, *17*, 277-90.
33. Porcu, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Recent advances in vascular disrupting agents in cancer therapy. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1485-1498.
34. Philpott, M.; Baguley, B. C.; Ching, L. M. Induction of tumor necrosis factor- α by single and repeated doses of the antitumor agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *36*, 143-148.
35. Ching, L. M.; Cao, Z.; Kieda, C.; Zwain, S.; Jameson, M. B.; Baguley, B. C. Induction of endothelial cell apoptosis by the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 1937-1942.
36. Hinnen, P.; Eskens, F. Vascular disrupting agents in clinical development. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1159-1165.
37. Früh, M.; Cathomas, R.; Siano, M.; Tscherry, G.; Zippelius, A.; Mamot, C.; Erdmann, A.; Krasniqi, F.; Rauch, D.; Simcock, M.; Küttel, E.; Fustier, P.; Pless, M. Carboplatin and paclitaxel plus ASA404 as first-line chemotherapy for extensive-stage small-cell lung cancer: a multicenter single arm Phase II Trial (SAKK 15/08). *Clin. Lung Cancer.* **2013**, *14*, 34-39.
38. Lara, P. N.; Douillard, J. Y.; Nakagawa, K.; Pawel, J. V.; McKeage, M. J.; Albert, I.; Losonczy, G.; Reck, M.; Heo, D.-S.; Fan, X.; Fandi, A.; Scagliotti, G. Randomized phase III placebo-controlled trial of carboplatin and paclitaxel with or without the vascular disrupting agent vandimezan (ASA404) in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2965-2971
39. Lorusso, P. M.; Boerner, S. A.; Hunsberger, S. Clinical development of vascular disrupting agents: what lessons can we learn from ASA404? *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2952-2955.
40. Kim, S.; Li, L.; Maliga, Z.; Yin, Q.; Wu, H.; Mitchison, T. J. Anticancer flavonoids are mouse-selective STING agonists. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1396-1401.
41. Kanthou, C.; Tozer, G. M. Tumour targeting by microtubule-depolymerising vascular disrupting agents. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 1443-1457.
42. Kaur, R.; Kaur, G.; Gill, R. K.; Soni, R.; Bariwal, J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 89-124.
43. Nogales, E. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 397-420.
44. Risinger, A. L.; Giles, F. J.; Mooberry, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 255-261.
45. Janke, C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* **2014**, *206*, 461-472.

46. Pasquier, E.; Kavallaris, M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 165-170.
47. Kirschner, M. W.; Mitchison, T. Microtubule dynamics. *Nature* **1986**, *324*, 621.
48. Erickson, H. P.; O'Brien, E. T. Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 145-166.
49. Buey, R. M.; Díaz, J. F.; Andreu, J. M. The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5933-5938.
50. Mitchison, T.; Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **1984**, *312*, 237-242.
51. Howard, J.; Hyman, A. A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **2003**, *422*, 753-758.
52. Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.
53. Fanale, D.; Bronte, G.; Passiglia, F.; Calo, V.; Castiglia, M.; Di Piazza, F.; Barraco, N.; Cangemi, A.; Teresa Catarella, M.; Insalaco, L.; Listi, A.; Maragliano, R.; Massihnia, D.; Perez, A.; Toia, F.; Cicero, G.; Bazan, V. Stabilizing versus destabilizing the microtubules: a double-edge sword for an effective cancer treatment option? *Anal. Cell. Pathol.* **2015**, 690916.
54. Dumontet, C.; Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 790-803.
55. Yue, Q. X.; Liu, X.; Guo, D. A. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1037-1043.
56. Stengel, C.; Newman, S. P.; Leese, M. P.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Purohit, A. Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 316-324.
57. Seed, L.; Slaughter, D. P.; Limarzi, L. R. Effect of colchicine on human carcinoma. *Surgery* **1940**, *7*, 696-709.
58. Shelanski, M. L.; Taylor, E. W. Properties of the protein subunit of central-pair and outer-doublet microtubules of sea urchin flagella. *J. Cell Biol.* **1968**, *38*, 304-315.
59. Leung, Y. Y.; Hui, L. L. Y.; Kraus, V. B. Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin. Arthritis Rheum.* **2015**, *45*, 341-350.
60. Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.
61. Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943-2971.

62. Shan, Y.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, M.; Dong, Y. Developments of combretastatin A-4 derivatives as anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 523-538.
63. Marrelli, M.; Conforti, F.; Statti, G. A.; Cachet, X.; Michel, S.; Tillequin, F.; Menichini, F. Biological potential and structure-activity relationships of most recently developed vascular disrupting agents: an overview of new derivatives of natural combretastatin A-4. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3035-3081.
64. Patil, P. O.; Patil, A. G.; Rane, R. A.; Patil, P. C.; Deshmukh, P. K.; Bari, S. B.; Patil, D. A.; Naphade, S. S. Recent advancement in discovery and development of natural product combretastatin-inspired anticancer agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 955-969.
65. Rajak, H.; Dewangan, P. K.; Patel, V.; Jain, D. K.; Singh, A.; Veerasamy, R.; Sharma, P. C.; Dixit, A. Design of combretastatin A-4 analogs as tubulin targeted vascular disrupting agent with special emphasis on their *cis*-restricted isomers. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 1923-1955.
66. Dong, M.; Liu, F.; Zhou, H.; Zhai, S.; Yan, B. Novel natural product and privileged scaffold-based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. *Molecules* **2016**, *21*, 1375.
67. Banerjee, S.; Hwang, D. J.; Li, W.; Miller, D. D. Current advances of tubulin inhibitors in nanoparticle drug delivery and vascular disruption/angiogenesis. *Molecules* **2016**, *21*, 1468.
68. Alvarez, R.; Medarde, M.; Pelaez, R. New Ligands of the Tubulin Colchicine Site Based on X-Ray Structures. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2231-2252.
69. Massarotti, A.; Coluccia, A.; Silvestri, R.; Sorba, G.; Brancale, A. The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 33-42.
70. Kretzschmann, V. K.; Fuerst, R. Plant-derived vascular disrupting agents: compounds, actions, and clinical trials. *Phytochem. Rev.* **2014**, *13*, 191-206.
71. Greene, L. M.; Meegan, M. J.; Zisterer, D. M. Combretastatins: more than just vascular targeting agents? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *355*, 212-227.
72. Ji, Y. T.; Liu, Y. N.; Liu, Z. P. Tubulin colchicine binding site inhibitors as vascular disrupting agents in clinical developments. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1348-1360.
73. Pérez-Pérez, M. J.; Priego, E. M.; Bueno, O.; Martins, M. S.; Canela, M. D.; Liekens, S. Blocking blood flow to solid tumors by destabilizing tubulin: an approach to targeting tumor growth. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8685-8711.
74. Hartley, R. M.; Peng, J.; Fest, G. A.; Dakshanamurthy, S.; Frantz, D. E.; Brown, M. L.; Mooberry, S. L. Polygamain, a new microtubule depolymerizing agent that occupies a unique pharmacophore in the colchicine site. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *81*, 431-439.
75. Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253-265.
76. Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B. Antineoplastic agents 122. Constituents of *Combretum caffrum*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 386-391.

77. Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1829-1834.
78. Lin, C. M.; Ho, H. H.; Pettit, G. R.; Hamel, E. Antimitotic natural products combretastatin A-4 and combretastatin A-2: studies on the mechanism of their inhibition of the binding of colchicine to tubulin. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6984-6991.
79. Pettit, G. R.; Rhodes, M. R.; Herald, D. L.; Chaplin, D. J.; Stratford, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Chapuis, J. C.; Oliva, D. Antineoplastic agents 393. Synthesis of the *trans*-isomer of combretastatin A-4 prodrug. *Anti-cancer Drug Des.* **1998**, *13*, 981-993.
80. Pettit, G. R.; Temple, C. J.; Narayanan, V. L.; Varma, R.; Simpson, M. J.; Boyd, M. R.; Rener, G. A.; Bansal, N. Antineoplastic agents 322. synthesis of combretastatin A-4 prodrugs. *Anti-cancer Drug Des.* **1995**, *10*, 299-309.
81. Delmonte, A.; Sessa, C. AVE8062: a new combretastatin derivative vascular disrupting agent. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2009**, *18*, 1541-1548.
82. Pettit, G. R.; Lippert, J. W. Antineoplastic agents 429. Syntheses of the combretastatin A-1 and combretastatin B-1 prodrugs. *Anti-cancer Drug Des.* **2000**, *15*, 203-216.
83. Blay, J. Y.; Papai, Z.; Tolcher, A. W.; Italiano, A.; Cupissol, D.; Lopez-Pousa, A.; Chawla, S. P.; Bompas, E.; Babovic, N.; Penel, N.; Isambert, N.; Staddon, A. P.; Saada-Bouazid, E.; Santoro, A.; Franke, F. A.; Cohen, P.; Le-Guenec, S.; Demetri, G. D. Ombrabulin plus cisplatin versus placebo plus cisplatin in patients with advanced soft-tissue sarcomas after failure of anthracycline and ifosfamide chemotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 531-540.
84. Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Fujita, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. Syntheses and antitumor activity of *cis*-restricted combretastatins: 5-membered heterocyclic analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3153-3158.
85. Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Brancale, A.; Ricci, A.; Hamel, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Convergent synthesis and biological evaluation of 2-amino-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-aryl thiazoles as microtubule targeting agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5144-5153.
86. Zhang, Q.; Peng, Y.; Wang, X. I.; Keenan, S. M.; Arora, S.; Welsh, W. J. Highly potent triazole-based tubulin polymerization inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 749-754.
87. O'Boyle, N. M.; Carr, M.; Greene, L. M.; Bergin, O.; Nathwani, S. M.; McCabe, T.; Lloyd, D. G.; Zisterer, D. M.; Meegan, M. J. Synthesis and evaluation of azetidinone analogues of combretastatin A-4 as tubulin targeting agents. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8569-8584.
88. Jiang, J.; Zheng, C.; Zhu, K.; Liu, J.; Sun, N.; Wang, C.; Jiang, H.; Zhu, J.; Luo, C.; Zhou, Y. Quantum chemistry calculation-aided structural optimization of combretastatin A-4-like tubulin polymerization inhibitors: improved stability and biological activity. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2538-2546.

89. Lee, J.; Kim, S. J.; Choi, H.; Kim, Y. H.; Lim, I. T.; Yang, H. M.; Lee, C. S.; Kang, H. R.; Ahn, S. K.; Moon, S. K.; Kim, D. H.; Lee, S.; Choi, N. S.; Lee, K. J. Identification of CKD-516: a potent tubulin polymerization inhibitor with marked antitumor activity against murine and human solid tumors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6337–6354.
90. Oh, D. Y.; Kim, T. M.; Han, S. W.; Kim, T. Y.; Bang, Y. J.; Shin, D. Y.; Lee, Y. G.; Lee, K. W.; Kim, J. H.; Lee, J. S.; Jang, I. J. Phase I study of CKD-516, a novel vascular disrupting agent, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res. Treat.* **2016**, *48*, 28-36.
91. Flynn, B. L.; Gill, G. S.; Grobelny, D. W.; Chaplin, J. H.; Paul, D.; Leske, A. F.; Lavranos, T. C.; Chalmers, D. K.; Charman, S. A.; Kostewicz, E.; Shackelford, D. M.; Morizzi, J.; Hamel, E.; Jung, M. K.; Kremmidiotis, G. Discovery of 7-hydroxy-6-methoxy-2-methyl-3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)benzo[b]furan (BNC105), a tubulin polymerization inhibitor with potent antiproliferative and tumor vascular disrupting properties. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6014-6027.
92. Kremmidiotis, G.; Leske, A. F.; Lavranos, T. C.; Beaumont, D.; Gasic, J.; Hall, A.; O'Callaghan, M.; Matthews, C. A.; Flynn, B. BNC105: a novel tubulin polymerization inhibitor that selectively disrupts tumor vasculature and displays single-agent antitumor efficacy. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1562-1573.
93. Ducki, S.; Rennison, D.; Woo, M.; Kendall, A.; Fournier Dit Chabert, J.; McGown, A. T.; Lawrence, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: Synthesis and biological evaluation of antivasular activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7698-7710.
94. Martel-Frchet, V.; Ronot, X.; Keramidias, M.; Coll, J.-L.; Nurisso, A.; DeBonis, S.; Skoufias, D. A.; Rome, C.; Boumendjel, A. IPP51, a chalcone acting as a microtubule inhibitor with in vivo antitumor activity against bladder carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14669-14686.
95. Burns, C. J.; Harte, M. F.; Bu, X.; Fantino, E.; Joffe, M.; Sikanyika, H.; Su, S.; Tranberg, C. E.; Wilson, N.; Charman, S. A.; Shackelford, D. M.; Wilks, A. F. Discovery of CYT997: a structurally novel orally active microtubule targeting agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4639-4642.
96. Wang, Y.; Zhang, H.; Gigant, B.; Yu, Y.; Wu, Y.; Chen, X.; Lai, Q.; Yang, Z.; Chen, Q.; Yang, J. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J.* **2016**, *283*, 102-111.
97. Yoshimatsu, K.; Yamaguchi, A.; Yoshino, H.; Koyanagi, N.; Kitoh, K. Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3208-3213.
98. Kasibhatla, S.; Baichwal, V.; Cai, S. X.; Roth, B.; Skvortsova, I.; Skvortsov, S.; Lukas, P.; English, N. M.; Sirisoma, N.; Drewe, J.; Pervin, A.; Tseng, B.; Carlson, R. O.; Pleiman, C. M. MPC-6827: a small-molecule inhibitor of microtubule formation that is not a substrate for multidrug resistance pumps. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5865-5871.
99. Ricart, A. D.; Ashton, E. A.; Cooney, M. M.; Sarantopoulos, J.; Brell, J. M.; Feldman, M. A.; Ruby, K. E.; Matsuda, K.; Munsey, M. S.; Medina, G.; Zambito, A.; Tolcher, A. W.; Remick, S. C. A phase I study of MN-029 (denibulin), a novel vascular-disrupting agent, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *68*, 959-970.

100. Nicholson, B.; Lloyd, G. K.; Miller, B. R.; Palladino, M. A.; Kiso, Y.; Hayashi, Y.; Neuteboom, S. T. C. NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. *Anti-cancer Drugs* **2006**, *17*, 25-31.
101. Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **1998**, *391*, 199-203.
102. Gigant, B.; Curmi, P. A.; Martin-Barbey, C.; Charbaut, E.; Lachkar, S.; Lebeau, L.; Siavoshian, S.; Sobel, A.; Knossow, M. The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell* **2000**, *102*, 809-816.
103. Löwe, J.; Li, H.; Downing, K. H.; Nogales, E. Refined structure of α,β -tubulin at 3.5 Å resolution *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045-1057.
104. Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli, R. B. G.; Roussi, F.; Steinmetz, M. O.; Curmi, P. A.; Sobel, A.; Knossow, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **2005**, *435*, 519-522.
105. Ravelli, R. B. G.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.
106. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Diaz, J. F.; Marsh, M.; Cuevas, C.; Liniger, M.; Neuhaus, C.; Andreu, J. M.; Altmann, K.-H.; Steinmetz, M. O. A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 13817-13821.
107. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Northcote, P. T.; Marsh, M.; Altmann, K. H.; Miller, J. H.; Diaz, J. F.; Steinmetz, M. O. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1621-1625.
108. Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli, R. B.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossowa, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 13775-13779.
109. Barbier, P.; Dorléans, A.; Devred, F.; Sanz, L.; Allegro, D.; Alfonso, C.; Knossow, M.; Peyrot, V.; Andreu, J. M. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31672-31681.
110. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Buey, R. M.; Danel, F.; Bachmann, F.; Pohlmann, J.; Reinelt, S.; Lane, H.; Steinmetz, M. O. The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1848-1860.
111. McNamara, D. E.; Senese, S.; Yeates, T. O.; Torres, J. Z. Structures of potent anticancer compounds bound to tubulin. *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1164-1172.
112. Zhou, P.; Liu, Y.; Zhou, L.; Zhu, K.; Feng, K.; Zhang, H.; Liang, Y.; Jiang, H.; Luo, C.; Liu, M.; Wang, Y. Potent antitumor activities and structure basis of the chiral β -lactam bridged analogue of combretastatin A-4 binding to tubulin. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10329-10334.
113. Gaspari, R.; Prota, A. E.; Bargsten, K.; Cavalli, A.; Steinmetz, M. O. Structural basis of cis- and trans-combretastatin binding to tubulin. *Chem* **2017**, *2*, 102-113.

114. Prota, A. E.; Magiera, M. M.; Kuijpers, M.; Bargsten, K.; Frey, D.; Wieser, M.; Jaussi, R.; Hoogenraad, C. C.; Kammerer, R. A.; Janke, C.; Steinmetz, M. O. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 259-270.
115. Skoufias, D. A.; Wilson, L. Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* **1992**, *31*, 738-746.

CAPÍTULO 1

DERIVADOS DE CICLOHEXANODIONA COMO LIGANDOS DEL DOMINIO DE COLCHICINA EN TUBULINA

1.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Con el propósito de identificar nuevos ligandos del sitio de unión de colchicina en tubulina, estructuralmente diferentes tanto de la propia colchicina (**i.3**) como de la CA-4 (**i.4**) y análogos, en nuestro grupo de investigación se emprendió una campaña de búsqueda de nuevos compuestos empleando las herramientas computacionales de cribado virtual. La metodología empleada se basó en la comparación de la forma 3D de ligandos cuyos complejos con tubulina habían sido descritos. Para ello se empleó el compuesto TN-16 (**i.29**) como ligando de referencia, dado que permitía explorar un bolsillo accesorio dentro del dominio de colchicina (zonas 2 y 3). Este cribado virtual permitió la identificación del compuesto **1.1** (Figura 1.1) como un hit potencial.¹ Su evaluación en cultivo celular puso de manifiesto una actividad antiproliferativa en el rango micromolar ($Cl_{50} = 11\text{-}35 \mu\text{M}$). Tras verificar la unión de este compuesto al sitio de unión de colchicina en tubulina, el compuesto prototipo **1.1** pasó a ser objeto de un programa de síntesis de análogos estructurales, con el que se establecieron las relaciones estructura-actividad que se comentarán a continuación. De esta forma, se obtuvo una primera serie de análogos que inhibieron el crecimiento de células tanto endoteliales como tumorales a concentraciones submicromolares, destacando en particular los compuestos **TUB015** (**1.2**)¹ y **TUB075** (**1.3**)² (Figura 1.1), con una actividad antiproliferativa dos órdenes de magnitud más potente que el hit inicial **1.1**. Además, la constante de afinidad (K_a) de ambos compuestos fue muy similar a la de colchicina (**i.3**), destacando especialmente el valor de la constante de **TUB075** ($K_a = 1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$).

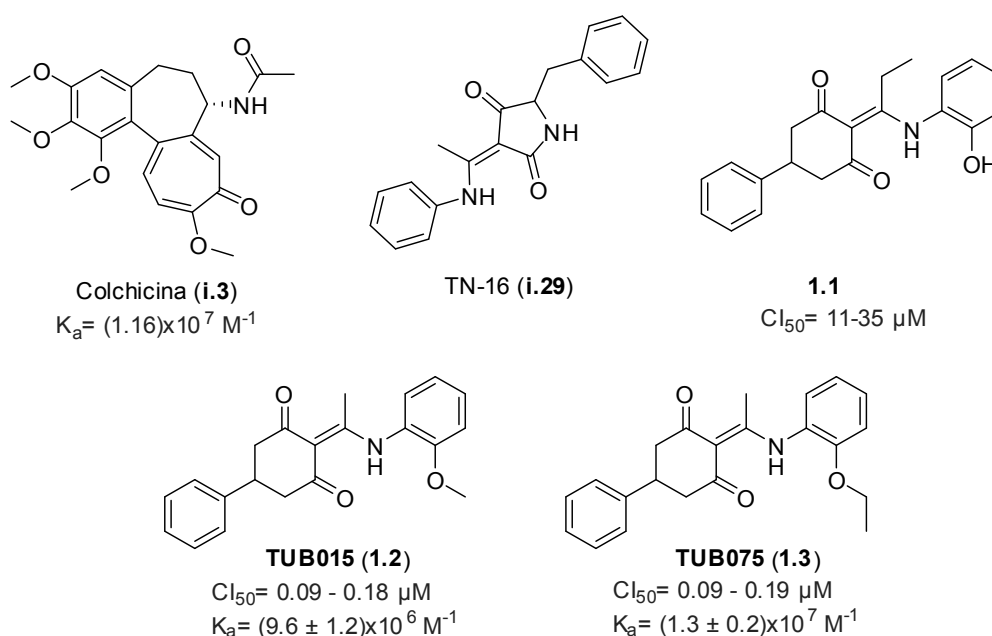


Figura 1.1. Estructuras de TN-16, del hit inicial **1.1** y de los compuestos **TUB015** y **TUB075**, con actividad antiproliferativa sub μM y K_a del mismo orden que colchicina.

Las relaciones de estructura-actividad antiproliferativa que se obtuvieron tras la evaluación de esta primera serie de análogos se puede resumir en los siguientes puntos haciendo referencia a los fragmentos que se representan en la Figura 1.2:¹⁻²

1) En referencia al fragmento A, en esta parte de la molécula es crucial la existencia de un grupo fenilo, preferentemente no sustituido. Así, la incorporación de sustituyentes en este anillo llevó a un descenso de actividad antiproliferativa, especialmente notable en los compuestos sustituidos en *para* y *orto*. La pérdida de efecto citotóxico fue menos marcada en los derivados sustituidos en *meta*, donde la incorporación de un metilo o metoxi condujo a compuestos tan activos como el compuesto no sustituido. Igualmente, la sustitución del fenilo por un anillo de 2-furanilo, y en menor medida por un 2-tiofenilo, dio lugar a compuestos con un marcado efecto antiproliferativo.

2) En cuanto a los grupos introducidos en C, los mejores resultados se obtuvieron cuando R es un grupo metilo. La actividad disminuyó al alargar la cadena con un etilo, siendo casi nula para los derivados con propilo. Asimismo, la incorporación de restos polares (CH₂OH frente a CH₃) condujo a una pérdida de la actividad de entre 100 y 500 veces.

3) En lo que respecta al fragmento D, se requiere la presencia de un fenilo, siendo además fundamental para la actividad la incorporación de un sustituyente en la posición *orto* del mismo. Los mejores valores de Cl₅₀ se obtuvieron con los derivados con un grupo alcoxi en particular con un metoxi o etoxi, y en menor medida, con un ciclopropilmetoxi, isopropoxi o propoxi. La actividad de los compuestos sustituidos con metilo y con cloro en posición *orto* fue también muy significativa, siendo algo inferior para el fluoroderivado. Otros sustituyentes en *orto* como NH₂, NHCH₃ o CH₂OH condujeron a compuestos entre 100 y 300 veces menos activos.

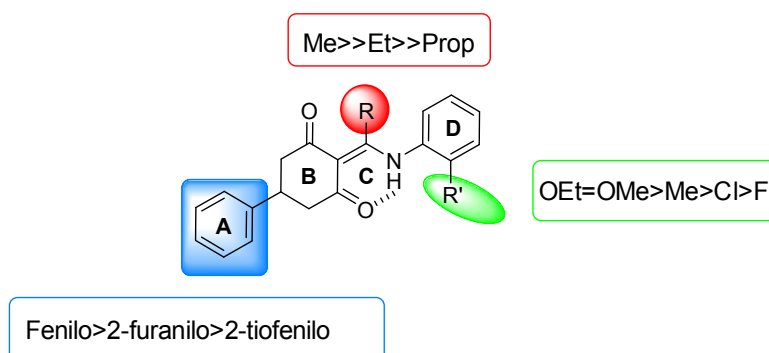


Figura 1.2. Principales relaciones estructura-actividad antiproliferativa de estos derivados de ciclohexanodiona.

Es importante destacar que los datos de ^1H -RMN de estos compuestos apoyan la existencia de un enlace de H intramolecular entre el NH del fragmento D y un grupo carbonilo del fragmento B, lo que puede condicionar la conformación global de estos compuestos y por ello el fragmento B se mantuvo intacto en las series sintetizadas.

1.2. OBJETIVOS

De la información aportada en la introducción y antecedentes se puede concluir que los derivados de ciclohexanodiona constituyen una familia de compuestos para los que se ha demostrado su capacidad de unión al dominio de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina, y cuyo prototipo, el compuesto **TUB075**, ha mostrado una K_a de $1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Esta elevada afinidad se traduce en una importante actividad antiproliferativa en cultivo y un potente efecto antimitótico y antivascular, como cabría esperar para un ligando del sitio de colchicina. Sin embargo, al igual que ocurre para otros ligandos del sitio de colchicina en tubulina, la solubilidad de estos compuestos es realmente baja. Los objetivos que se han abordado en este capítulo han sido:

1. Estudio del modo de unión de **TUB075** a tubulina mediante estudios de docking y posteriormente mediante resolución por difracción de Rayos X del complejo cristalino TUB075-tubulina.
2. Empleo de mapas de afinidad con la herramienta cGRILL para identificar zonas no exploradas por **TUB075** en el dominio de unión de colchicina.
3. Diseño de nuevos derivados de **TUB075** buscando interacciones adicionales con tubulina y/o el acceso a la interfaz de las subunidades α y β de tubulina.
4. Síntesis de los nuevos derivados propuestos.
5. Determinación de sus propiedades antiproliferativas y antivascuales y medida de su afinidad por tubulina.

A lo largo del capítulo se describirá cómo se han combinado los resultados de estos apartados con el fin último de obtener nuevos derivados de ciclohexanodiona relacionados con **TUB075** que mejoren su afinidad por tubulina y presenten una mayor solubilidad.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. ESTUDIOS DE DOCKING DE TUB075 EN EL DOMINIO DE COLCHICINA

Con el objetivo de determinar el modo de unión del nuevo hit **TUB075** con tubulina, se llevó a cabo un estudio de docking con el programa Autodock 4.2³ tomando el complejo cristalino DAMA-colchicina-tubulina (**i.28**) (PDB: 1SA0) como molde.⁴ La superposición de esta estructura con la del complejo con TN-16 (**i.29**) (PDB: 3HKD)⁵ nos permitió extender la caja en la que se realizó el docking a todo el dominio de unión de colchicina. El modo de unión propuesto para el derivado **TUB075** (en cian) con tubulina se muestra en la Figura 1.3. Como puede observarse, respecto a colchicina (en verde), **TUB075** se aloja en una zona más profunda de la subunidad β , solapando sólo parcialmente con colchicina y haciendo uso del sitio de unión ocupado por TN-16. Así, el grupo fenilo en A de **TUB075** se sitúa hacia el interior de la subunidad β , alojado en una cavidad delimitada por las cadenas laterales de los residuos Val β 238, Leu β 242, Thr β 239, Tyr β 202, Glu β 200 y Asn β 167. El uso de esta cavidad, de naturaleza mayoritariamente hidrofóbica, podría explicar las relaciones de estructura-actividad obtenidas en esta serie de ciclohexanodionas en lo que afecta al anillo A: así, el fenilo puede ser sustituido por otros anillos heteroaromáticos como tiofeno o furano, mientras que la presencia de anillos de piridina en esta posición lleva a la pérdida de la actividad ya que previsiblemente están protonados a pH fisiológico y por tanto no encajan en esta cavidad hidrófoba.

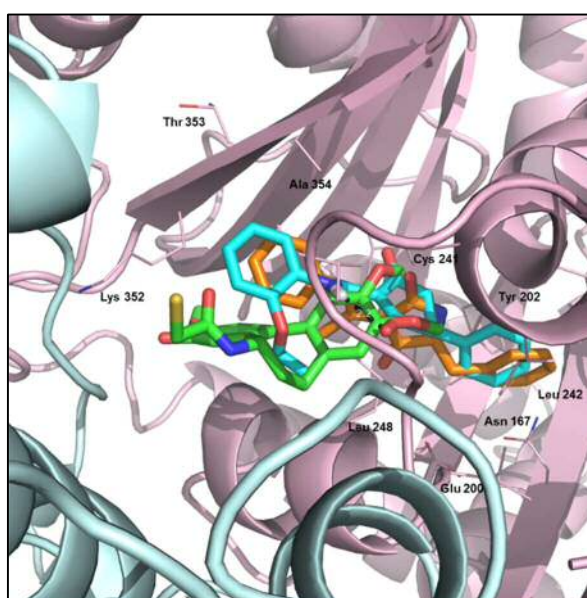


Figura 1.3. Representación del modo de unión de **TUB075** (en cian) en el dominio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina (α -tubulina representada en azul pálido y β -tubulina en rosa). Colchicina se representa en verde y TN-16 en naranja. Las líneas discontinuas indican enlaces de H. Los aminoácidos de los residuos próximos al sitio de unión (4Å) respecto a **TUB075** están etiquetados y se muestran sus cadenas laterales.

Además, se observó que la distancia y orientación del grupo NH y uno de los carbonilos de la ciclohexanodiona son adecuados para la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular (distancia CO-NH: 2.2 Å), formando así un pseudociclo. Como se ha comentado, este enlace de hidrógeno ya se había propuesto anteriormente basado en los datos experimentales de $^1\text{H-RMN}$ y podría ser relevante para la conformación bioactiva de estos compuestos permitiendo que se unan a tubulina de forma similar a TN-16.¹ Siguiendo con el análisis del modo de unión propuesto, se observó que el segundo carbonilo del esqueleto de ciclohexanodiona se encuentra orientado hacia la cadena lateral del residuo de Cys β 241, y podría interactuar con ella mediante la formación de un enlace de hidrógeno, si bien la distancia (distancia CO-SH: 3.7 Å) es algo mayor a la estándar para una interacción de este tipo. Este residuo de cisteína está implicado en la unión de varios ligandos mediante formación de enlace de hidrógeno, entre ellos la DAMA-colchicina (**i.28**).^{4,6}

Finalmente, el fragmento D de **TUB075** se acomoda próximo a la interfaz de las subunidades α y β de tubulina, en la región delimitada por los residuos Leu β 248, Thr β 353, Ala β 354 y Lys β 352, solapando parcialmente con los anillos B y C de colchicina. El sustituyente etoxi situado en posición *orto* del anillo D se orienta hacia la parte más exterior del dominio de colchicina, favoreciendo el átomo de O el ángulo adecuado para esa orientación. Esto ayudaría a explicar por qué otros sustituyentes introducidos en *orto* condujeron a una pérdida notable de la actividad.

1.3.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE DERIVADOS DE TUB075 BASADOS EN ESTUDIOS DE DOCKING

En base a los estudios de estructura-actividad previos y a los resultados de docking del compuesto **TUB075** ya comentados, se propuso la síntesis de nuevos derivados de **TUB075** alargando el sustituyente en posición *orto* en el anillo D, con el fin de alcanzar la interfaz de las subunidades de $\alpha\beta$ -tubulina con un grupo polar terminal manteniendo el átomo de O como nexo de unión con el anillo D (Figura 1.4). La incorporación de grupos polares dirigidos hacia la interfaz de $\alpha\beta$ -tubulina podría mejorar la solubilidad de estos compuestos.

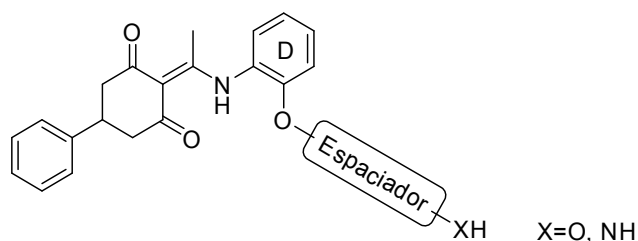
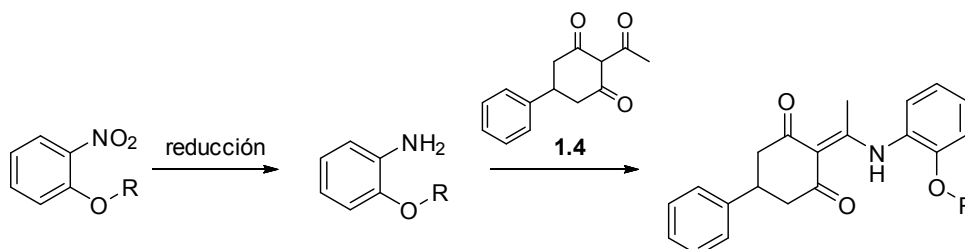


Figura 1.4. Estructura general de los nuevos derivados propuestos

Además, se propuso la incorporación en el sustituyente de heterociclos saturados, como morfolina y piperidina, que han sido descritos en la literatura como una buena alternativa para incrementar la solubilidad.⁷⁻⁸

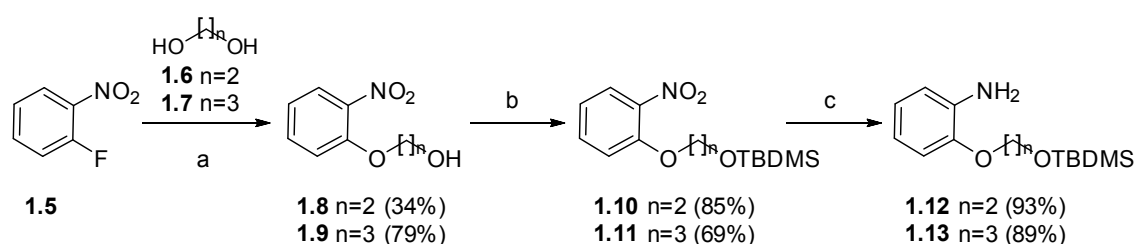
1.3.2.1. SÍNTESIS

El esquema general de síntesis propuesto consistió en la reacción de la 2-acetil-5-fenilciclohexano-1,3-diona (**1.4**)¹ con diferentes anilinas *orto*-sustituidas con grupos alcoxi, que a su vez se podrían obtener por reducción de los correspondientes nitroderivados, como se recoge en el Esquema 1.1.



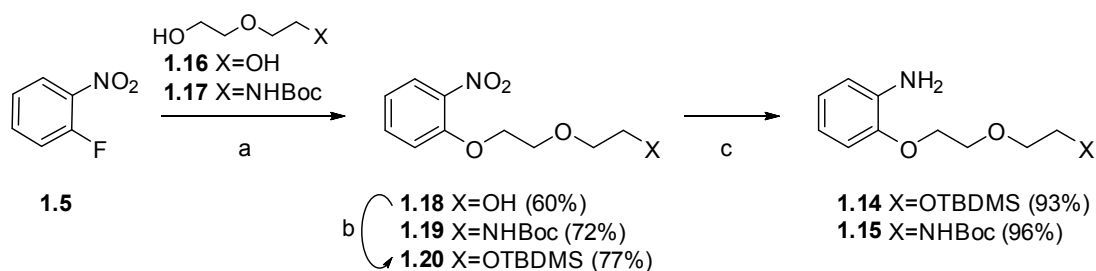
Esquema 1.1. Esquema general de síntesis de los compuestos sintetizados en este apartado.

La reacción del 1-fluoro-2-nitrobenceno (**1.5**) con 1,2-etanodiol (**1.6**) o 1,3-propanodiol (**1.7**) en medio básico y a 80 °C⁹ condujo a los derivados **1.8** y **1.9** (Esquema 1.2). Posteriormente, se llevó a cabo la protección del grupo OH empleando cloruro de *tert*-butildimetilsililo en condiciones básicas para dar lugar a **1.10** y **1.11** con buenos rendimientos. Finalmente, la reducción del grupo nitro se realizó mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C para obtener las anilinas **1.12** y **1.13**.



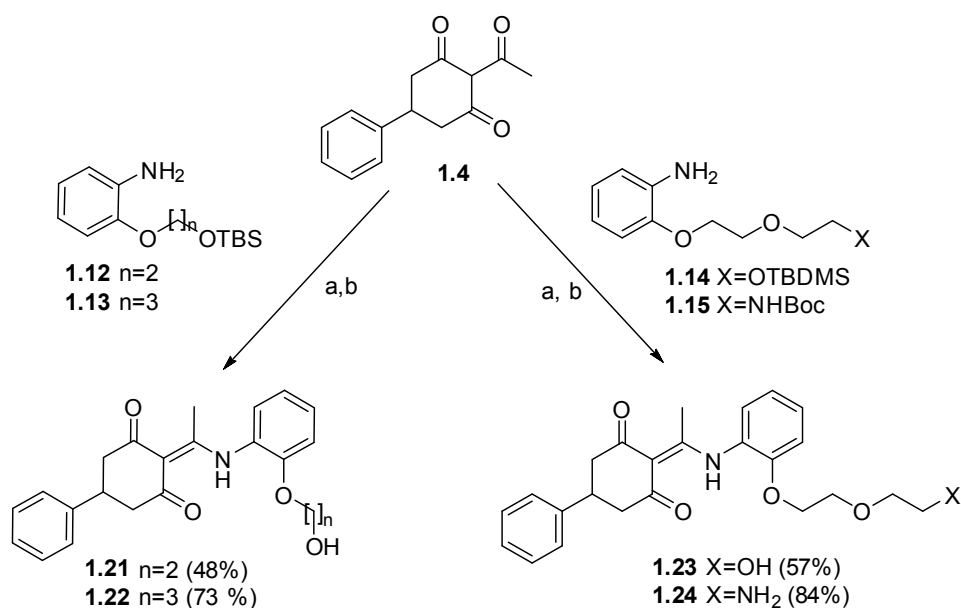
Esquema 1.2. Reactivos y condiciones: (a) K₂CO₃, DMF anh., 80 °C, 16 h; (b) TBDMSCl, DMAP, Imidazol, DMF anh., ta, 1 h; (c) H₂, Pd/C 10%, EtOH, ta, 12 h.

De forma análoga se sintetizaron las anilinas **1.14** y **1.15** (Esquema 1.3). Así, por reacción del 1-fluoro-2-nitrobenceno (**1.5**) con dietilenglicol (**1.16**) o con el alcohol **1.17**¹⁰ en medio básico,⁹ se obtuvieron los correspondientes nitroderivados **1.18** y **1.19**, éste último con el grupo amino terminal protegido con Boc. En el caso del compuesto **1.18**, se llevó a cabo la protección del grupo OH con TBDMSCl en condiciones básicas. Posteriormente, por reducción del grupo nitro de **1.19** y **1.20** mediante hidrogenación catalítica, se obtuvieron las anilinas deseadas **1.14** y **1.15**.



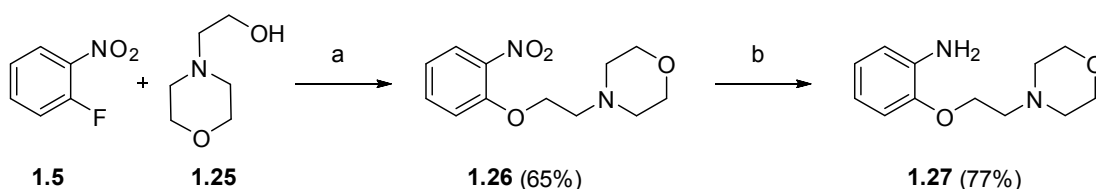
Esquema 1.3. Reactivos y condiciones: (a) K₂CO₃, DMF anh., 80 °C, 16 h; (b) TBDMSCl, DMAP, Imidazol, DMF anh., ta, 1 h; (c) H₂, Pd/C 10%, EtOH, ta, 12 h.

Finalmente, la reacción de la 2-acetil-5-fenilciclohexano-1,3-diona (**1.4**)¹ con las anilinas previamente sintetizadas (**1.12-1.15**) en tolueno a 110 °C, y posterior desprotección de los grupos sililos con TBAF o del grupo Boc con TFA condujo a los compuestos finales **1.21-1.24** (Esquema 1.4).



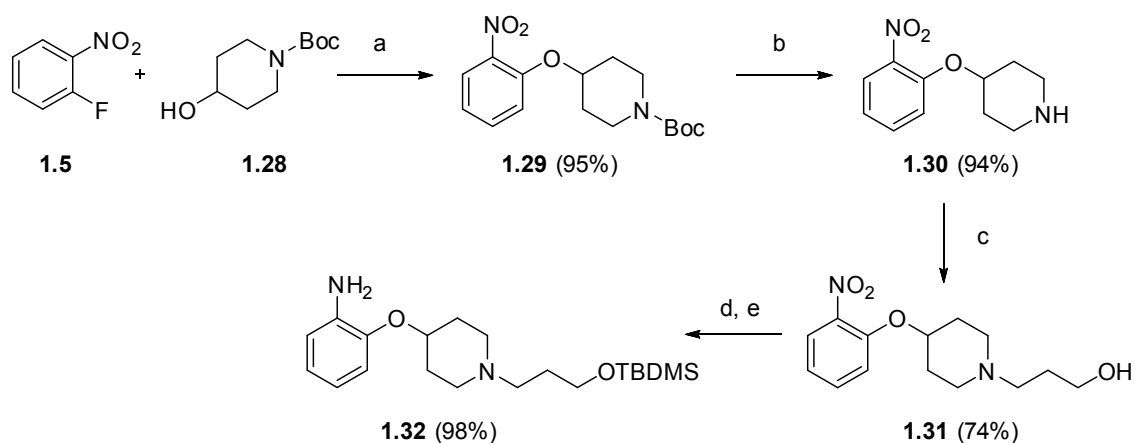
Esquema 1.4. Reactivos y condiciones: (a) Tolueno, tamiz molecular 4Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h; (b) TBAF, THF, ta, 1 h; ó TFA, CHCl₃, ta, 16 h (para **1.24**).

De manera similar, se hizo reaccionar 1-fluoro-2-nitrobenceno (**1.5**) con 4-(2-hidroxiethyl)morfolina (**1.25**) en presencia de NaH para obtener el nitroderivado **1.26**,¹¹ que se redujo con cloruro de estaño (II) para dar lugar a la anilina **1.27**¹¹ con buen rendimiento (Esquema 1.5).



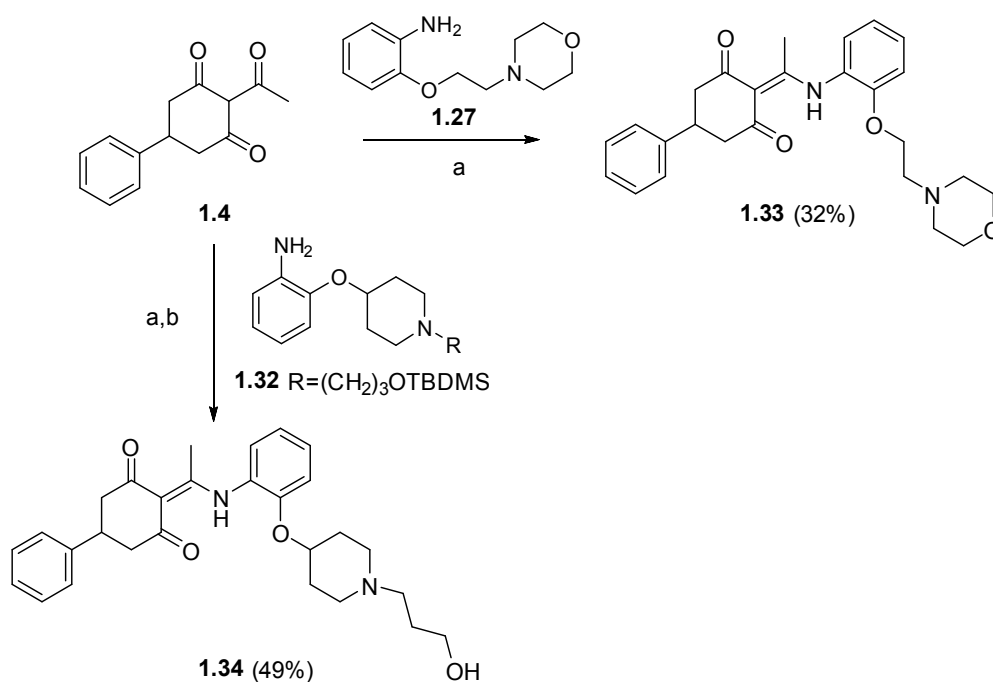
Esquema 1.5. Reactivos y condiciones: (a) NaH, DMF anh., ta, 22 h; (b) SnCl₂, EtOH, 60 °C, 3 h.

Por otro lado, la reacción del 1-fluoro-2-nitrobenceno (**1.5**) con 1-Boc-4-hidroxipiperidina (**1.28**) en medio básico condujo al compuesto **1.29** (Esquema 1.6), el cual, tras la eliminación del grupo Boc por tratamiento con TFA (compuesto **1.30**), se hizo reaccionar con 3-bromopropanol en acetona y medio básico¹² para dar el nitroderivado **1.31**. El grupo OH del compuesto **1.31** se protegió con TBDMSCl en medio básico, y posteriormente se redujo el grupo nitro mediante hidrogenación catalítica, dando lugar a la anilina **1.32**.



Esquema 1.6. Reactivos y condiciones: (a) NaH, DMF anh., ta, 22 h; (b) TFA, DCM, ta, 1 h; (c) Br(CH₂)₃OH, Na₂CO₃, TEA, acetona, 50 °C, 16 h; (d) TBDMSCl, DMAP, Imidazol, DMF anh., ta, 16 h; (e) H₂, Pd/C 10%, EtOH, 30 psi, 30 °C, 5 h.

La última etapa de síntesis consistió en la reacción de **1.4** con las anilinas diferentemente sustituidas **1.27** y **1.32** en tolueno a 110 °C y añadiendo tamiz molecular de 4 Å al medio de reacción, para dar lugar a los compuestos deseados **1.33** y **1.34** (Esquema 1.7), éste último obtenido tras desprotección del grupo sililo con TFA.



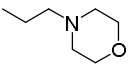
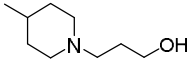
Esquema 1.7. Reactivos y condiciones: (a) Tolueno, tamiz molecular 4Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h; (b) TFA, DCM, ta, 1 h.

1.3.2.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

a) Actividad antiproliferativa

Las estructuras de los compuestos sintetizados en este apartado se representan en la Tabla 1.1. En la Tabla 1.2 se recogen los resultados de la evaluación antiproliferativa de dichos compuestos, incluyendo también el compuesto de referencia **TUB075**, a modo comparativo. La evaluación de esta serie de compuestos se realizó en ensayos de proliferación celular, empleando para ello cuatro líneas celulares diferentes: tres líneas tumorales (HeLa, L1210 y CEM) y una línea endotelial (HMEC-1). Los resultados de estos ensayos se expresan como concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), es decir, la concentración de compuesto que causa la inhibición del crecimiento del 50% de las células en cultivo. La colchicina (**i.3**) y la CA-4P (**i.10**) se emplearon como controles positivos en todos los experimentos de proliferación realizados y sus valores de CI_{50} se incluyen en la Tabla 1.2.

Tabla 1.1. Estructuras de **TUB075** y de sus derivados diferentemente sustituidos en el anillo D, **1.21-1.24**, **1.33** y **1.34**.

Compuesto	R
TUB075	CH ₂ CH ₃
1.21	(CH ₂) ₂ OH
1.22	(CH ₂) ₃ OH
1.23	(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OH
1.24	(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ NH ₂
1.33	
1.34	

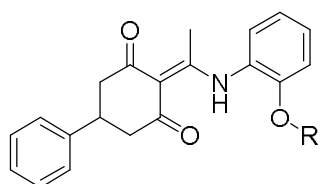


Tabla 1.2. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (μ M) de **TUB075** y los derivados sintetizados **1.21-1.24**, **1.33** y **1.34**, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	$CI_{50}^{(a)}$ (μ M)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
TUB075	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.0	0.10 ± 0.02
1.21	0.85 ± 0.28	1.1 ± 0.4	2.2 ± 1.6	0.83 ± 0.03
1.22	0.87 ± 0.09	0.82 ± 0.02	1.1 ± 0.0	0.50 ± 0.06
1.23	0.80 ± 0.01	0.42 ± 0.14	0.93 ± 0.05	0.46 ± 0.05
1.24	1.2 ± 0.0	4.3 ± 1.3	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.3
1.33	28 ± 4	25 ± 1	54 ± 36	13 ± 1
1.34	19 ± 3	26 ± 4	57 ± 39	21 ± 5
Colchicina	0.010 ± 0.0006	0.013 ± 0.001	0.0087 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0011
CA-4P	0.013 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.0029 ± 0.0001

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

Como se observa en la Tabla 1.2, la introducción de heterociclos saturados como morfolina o piperidina en el sustituyente en *orto* del anillo D (compuestos **1.33** y **1.34**) condujo a la disminución de la actividad antiproliferativa en más de dos órdenes de magnitud con respecto al hit inicial **TUB075**. El compuesto **1.24**, con un grupo amino terminal, mostró valores de CI_{50} ente 1.2 y 4.3 μM . El resto de los compuestos mantuvieron la actividad antiproliferativa en el rango $\text{sub}\mu\text{M}$, obteniéndose los mejores valores de CI_{50} con los derivados **1.22** y **1.23**, que incorporan una cadena de propilenglicol y dietilenglicol, respectivamente.

b) Determinación de la solubilidad de **TUB075**, **1.22** y **1.23**

Una vez sintetizados y evaluados los nuevos compuestos, se determinó la solubilidad de nuestro hit inicial **TUB075** y de los derivados que presentaron mayor actividad antiproliferativa en esta serie (**1.22** y **1.23**). Para este estudio de solubilidad se suspendió un exceso del compuesto a analizar en tampón fosfato (PBS) y la muestra se agitó durante 2 horas. Posteriormente, esta muestra se centrifugó, y la cantidad disuelta en el sobrenadante se cuantificó por HPLC interpolando los datos obtenidos en rectas patrón previamente elaboradas a partir de concentraciones conocidas para cada compuesto. El valor de solubilidad del hit **TUB075**, con un sustituyente etoxi, fue inferior a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El compuesto **1.22**, con un sustituyente 3-hidroxipropoxi, presentó un valor de solubilidad de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aproximadamente 5 veces superior con respecto a **TUB075**. Finalmente, el mejor valor de solubilidad lo mostró el derivado de dietilenglicol **1.23**, que presentó un valor de 49 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que supuso un incremento de solubilidad de 16 veces respecto a **TUB075**.

c) Determinación de la constante de asociación (K_a) de **1.23** con tubulina

A continuación, se determinó la constante de asociación (K_a) con $\alpha\beta$ -tubulina bovina del compuesto **1.23**, derivado que había presentado el mayor valor de solubilidad. Para ello, se efectuó un experimento de competición con el ligando reversible (*R*)-(+)-etil-5-amino-2-metil-1,2-dihidro-3-fenilpirido[3,4-*b*]pirazin-7-il carbamato (*R*-PT, **i.31**), cuyo valor de K_a es de $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.¹³ Este compuesto se caracteriza por la emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}=374 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}=425 \text{ nm}$) al estar unido al sitio de colchicina en tubulina.¹⁴ De este modo, en experimentos de competición, a una determinada concentración de ligando, se puede determinar no sólo si éste se une al sitio de colchicina en tubulina, sino también la afinidad del proceso de unión, en base al descenso producido en la emisión de fluorescencia del complejo tubulina-*R*-PT. Así, a

partir de los datos de desplazamiento de R-PT obtenidos, se pudo calcular el valor de la constante de asociación de **1.23** con $\alpha\beta$ -tubulina (Tabla 1.3). Este procedimiento ha sido el empleado para la determinación de la K_a a lo largo de esta Memoria. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid), bajo la supervisión del Dr. José Fernando Díaz.

Tabla 1.3. Constantes de asociación (K_a) de los compuestos **TUB075** y **1.23**, y de otros ligandos de referencia del sitio de colchicina.

Compuesto	K_a (M^{-1}) 25 °C
Colchicina (i.3)	1.16×10^7 (a 37 °C) ⁽¹⁵⁾
Podofilotoxina (i.6)	1.8×10^6 ⁽¹⁶⁾
R-PT (i.31)	3.2×10^6 ⁽¹³⁾
TUB075	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^7$ ^(a)
1.23	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^6$ ^(a)

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

Como se puede observar, el valor de K_a de **TUB075** está en el rango submicromolar ($1.3 \times 10^7 M^{-1}$) muy similar al de colchicina ($1.16 \times 10^7 M^{-1}$),¹⁵ y al mismo tiempo, un orden de magnitud mejor que la K_a de podofilotoxina (**i.6**) ($1.8 \times 10^6 M^{-1}$).¹⁶ En el caso del compuesto **1.23**, su K_a es un orden de magnitud inferior respecto a **TUB075**, por lo que podemos concluir que la incorporación del dietilenglicol presente en **1.23** respecto al etoxi presente en **TUB075** ha conllevado una pérdida de afinidad (1 orden de magnitud) por tubulina pero a su vez ha supuesto un incremento en su solubilidad (16 veces).

1.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO TUB075-TUBULINA MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Paralelamente a los resultados que se acaban de comentar, y en colaboración con el grupo del Prof. Michel O. Steinmetz del Laboratorio de Investigación Biomolecular del Instituto Paul Scherrer en Villingen (Suiza) se abordó el estudio del modo de unión de **TUB075** a tubulina mediante la resolución por difracción de Rayos X del complejo cristalino TUB075-tubulina.

En concreto se empleó un complejo proteico cristalizado compuesto por dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina (T), la proteína tipo estatmina RB3 (R) y la tubulina-tirosina ligasa (TTL) como soporte estructural adicional, y mediante técnicas de inmersión, o "soaking", se determinó la estructura cristalina del complejo T2R-TTL-TUB075 con una resolución de 2.15 Å (Figura 1.5A). Como se observa en la Figura 1.5B, el ligando **TUB075** se encuentra alojado en el interior de la subunidad de β -tubulina, ocupando las zonas 2 y 3 del dominio de unión de colchicina, de manera que no interactúa directamente con la subunidad α .

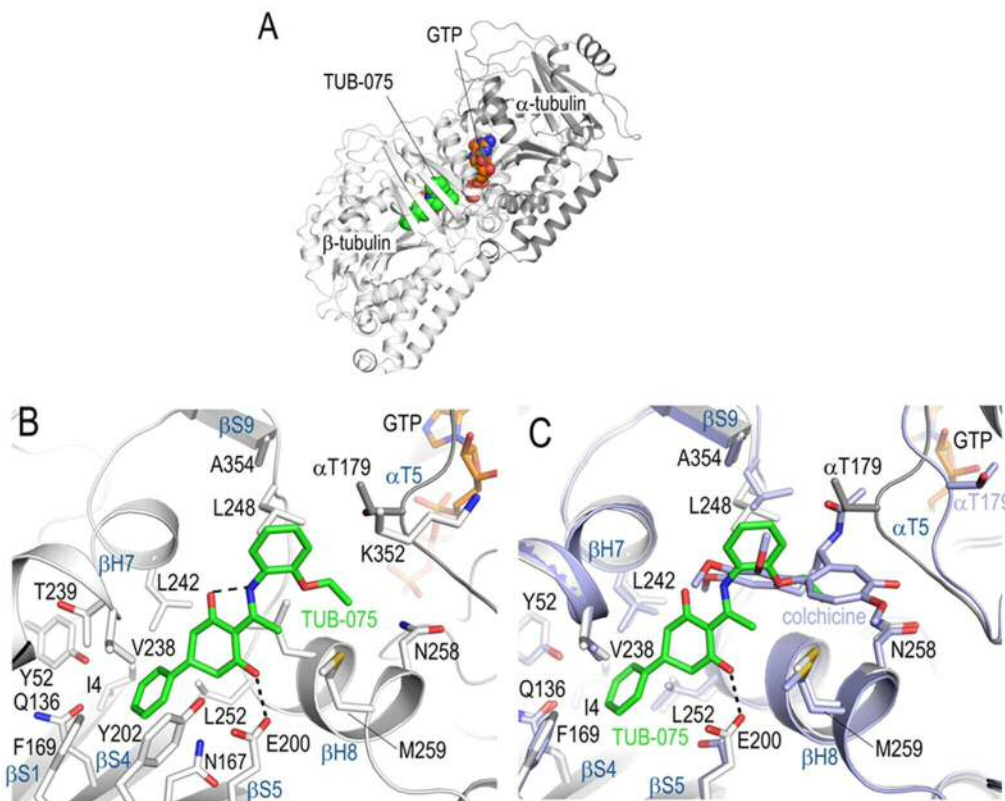


Figura 1.5. Análisis del modo de unión de TUB075 con tubulina. (A) Vista general del complejo $\alpha\beta$ -tubulina-TUB075. α y β -tubulina se representan en gris oscuro y claro, respectivamente. (B) Detalle de las interacciones observadas entre **TUB075** (en verde) y tubulina (en gris). Los residuos principales de la interacción se representan en sticks y están etiquetados. Las líneas discontinuas indican los enlaces de hidrógeno. (C) Superposición del complejo tubulina-TUB075 (tubulina en gris oscuro, **TUB075** en verde) y tubulina-colchicina (tubulina en gris claro, colchicina en gris azulado).

La cavidad ocupada por **TUB075** se encuentra delimitada por las hebras S1, S4 y S5 (en el bolsillo más interior), las hélices H7 y H8 en la zona intermedia y el loop T7 y la hebra S9 en la zona más exterior, con el loop T5 de la subunidad α cerrando el sitio de unión. Cabe destacar además que, en la conformación bioactiva de **TUB075**, se observa que la distancia entre uno de los grupos carbonilos del esqueleto de ciclohexadiona y el amino (distancia NH-CO: 1,7 Å), es la adecuada para la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. La existencia de este enlace de hidrógeno ya había sido propuesta a partir de los datos del desplazamiento químico de la señal de NH en los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y en la conformación observada en los estudios de docking.

En esta conformación bioactiva, el anillo A de **TUB075** se sitúa en una cavidad interior de la subunidad β (la denominada zona 3 del dominio de unión), de carácter mayoritariamente hidrófobo, formada por los residuos de Ile4, Tyr52, Gln136, Asn167, Phe169, Glu200, Tyr202, Val238, Thr239, Leu242 y Leu252, quedando apilado el anillo aromático entre las cadenas laterales de los residuos de Tyr202 y Leu252. Por su parte, el segundo grupo CO del anillo de ciclohexanodiona (anillo B), se encuentra a una distancia de 2,6 Å de la cadena lateral del Glu200, lo que sugiere la formación de un enlace de hidrógeno con ese residuo. En cuanto al anillo D de **TUB075**, éste se sitúa cerca del loop T7 y mantiene únicamente interacciones de tipo hidrofóbico con los residuos de Leu248, Asn258, Met259, Ala317, Lys352, Ala 354 y Thr179 (del loop T5). De esta manera, el grupo etoxilo en posición *orto* del anillo se orienta hacia la zona más exterior de la cavidad. La conformación de **TUB075** en el complejo con tubulina es similar a la comentada en el apartado anterior en los estudios de docking y el modo de unión se asemeja al de TN-16.

La superposición de las cadenas de β -tubulina de los complejos tubulina-colchicina (en gris azulado) y tubulina-TUB075 (en gris) se muestra en la Figura 1.5C, y como puede observarse, el solapamiento entre ambos ligandos es muy pequeño. Además, el hecho de que **TUB075** se aloje en el interior de la subunidad β provoca que el loop T5 (perteneciente a la subunidad α), se encuentre más cerrado y desplazado hacia la subunidad β en comparación con la posición que ocupa en el complejo con colchicina. También cabe destacar que la superposición de la estructura global del dímero de $\alpha\beta$ -tubulina en el complejo T2R-TTL-TUB075 con la estructura cristalina del dímero de tubulina sin ligando (PDB ID: 4I55) puso de manifiesto un rmsd muy bajo (0.37 Å sobre 1925 átomos de C α), lo que parece indicar que la unión de **TUB075** no afecta a la conformación global de tubulina en el complejo obtenido.

1.3.4. NUEVOS DERIVADOS DE TUB075 BASADOS EN ESTUDIOS DE MAPAS DE AFINIDAD DEL COMPLEJO TUB075-TUBULINA

1.3.4.1. ESTUDIOS DE MAPAS DE AFINIDAD DEL COMPLEJO TUB075-TUBULINA

Una vez obtenida la estructura de Rayos X del complejo TUB075-tubulina, se procedió al análisis del sitio de unión empleando métodos computacionales para estudiar las propiedades estructurales y energéticas mediante mapas de afinidad como método prospectivo para el diseño, síntesis y evaluación de nuevos ligandos basados en **TUB075**. Para los estudios de mapas de afinidad se empleó la herramienta computacional cGRILL,¹⁷⁻¹⁸ desarrollada en el grupo de investigación del Prof. Federico Gago, de la UAH. cGRILL, cuya raíz teórica se basa en los estudios del Prof. Peter Goodford y sus funciones GRID,¹⁹ permite la identificación de mapas de afinidad tridimensionales entre la proteína y una serie de sondas de distinta naturaleza, facilitando así la interpretación de la interacción proteína-ligando. Aplicando la metodología cGRILL al complejo cristalino TUB075-tubulina, y utilizando la sonda hidrofóbica (CH₃), se identificaron dos posibles zonas de interacción cercanas al anillo D (Figura 1.6).

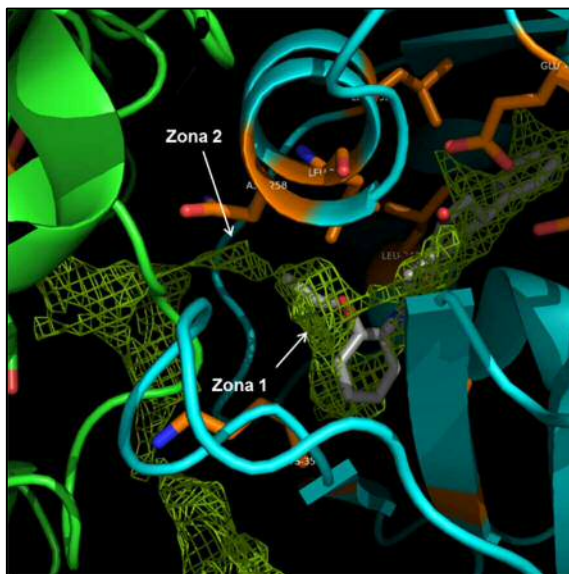


Figura 1.6. Representación de la sonda CH₃ (malla verde) en el complejo TUB075-tubulina y las dos zonas observadas. TUB075 se representa en color gris, α-tubulina representada en verde y β-tubulina en cian.

La zona 1 se encuentra en el anillo aromático del fragmento D y cubre tanto el resto etoxi en posición 2 como la posición 3 contigua. Se podría definir así una zona de pequeño tamaño anexa al anillo D que podría ser ocupada introduciendo un nuevo anillo fusionado sobre las posiciones 2 y 3 del fenilo. En concreto, se propuso fusionar las posiciones 2 y 3 de **TUB075** mediante un anillo de 5 miembros, lo que resultaría en el

anillo de 2-metilbenzofurano como fragmento en D (Figura 1.7). Este nuevo compuesto podría mantener las interacciones favorables de **TUB075**, rellenar la cavidad identificada en la zona 1 y además fijar la conformación del grupo etoxi de **TUB075**.

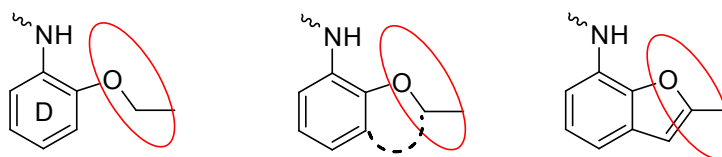


Figura 1.7. Propuesta de incorporación de un anillo fusionado

Por otro lado, la zona 2, con forma de túnel o pasillo, parece nacer en el extremo del sustituyente OEt y dirigirse hacia la interfaz entre las subunidades α y β de tubulina. Como ya se ha comentado en la sección anterior, los estudios de docking ya parecían indicar la existencia de este túnel y los datos obtenidos con el derivado de etilenglicol **1.23** avalaban la posibilidad de explorarlo. Por tanto, si el benzofurano resultara una alternativa interesante al 2-etoxifenilo, se podría introducir sustituyentes en la posición 2 del nuevo anillo que quedasen orientados hacia el túnel y presentaran un grupo polar (XH) terminal dirigido a la interfaz (Figura 1.8).

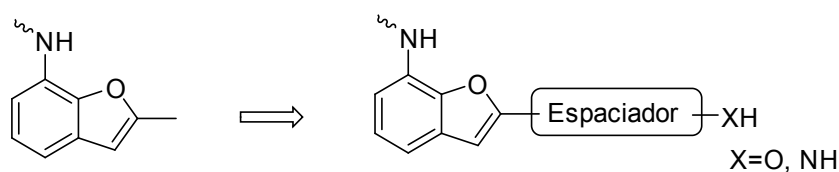


Figura 1.8. Propuesta de sustitución del benzofurano con un espaciador y un grupo polar terminal.

En la Figura 1.9 se muestra la simulación del modo de unión propuesto para el derivado de 2-metilbenzofurano y cómo la posición 2 del mismo enlaza con el túnel que se dirige a la interfaz.

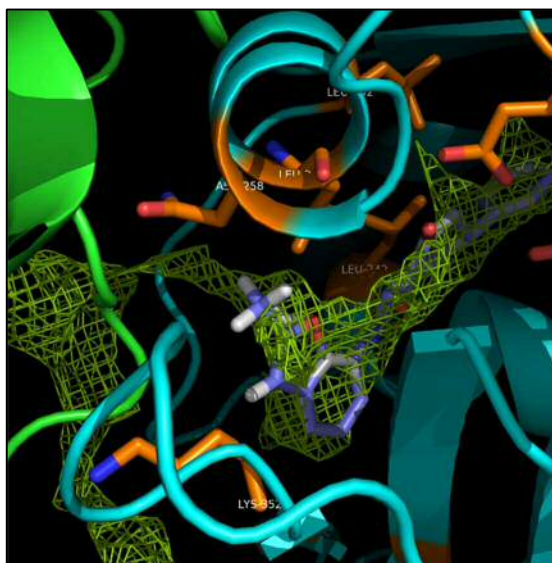
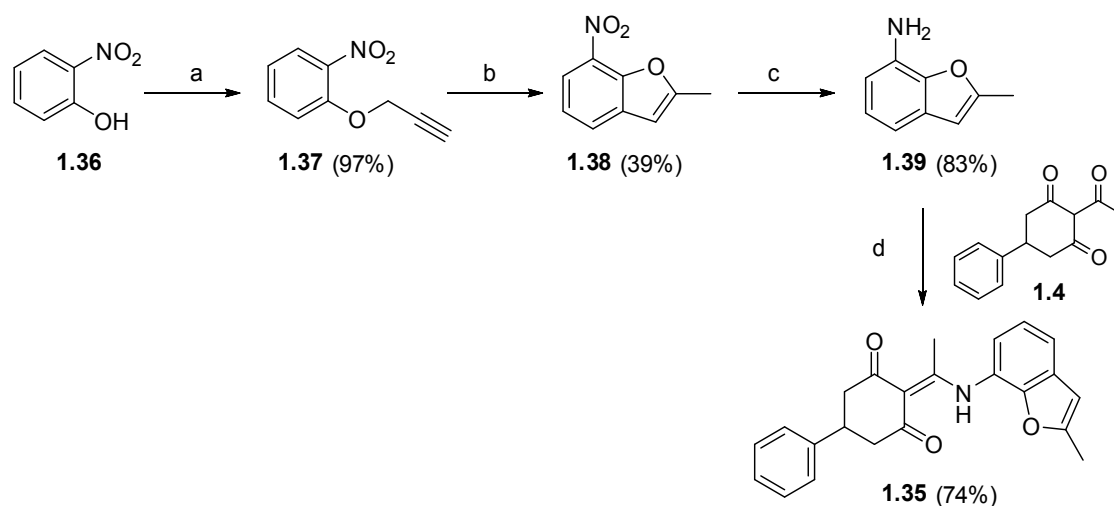


Figura 1.9. Simulación del modo de unión del nuevo compuesto diseñado (en morado) ocupando las zonas encontradas mediante la sonda CH_3 (malla verde) y su superposición con **TUB075** (en gris).

1.3.4.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE DERIVADOS DE BENZOFURANO

a) Síntesis y evaluación del compuesto 1.35

La síntesis del derivado 2-metilbenzofurano como anillo D (compuesto **1.35**) se detalla en el Esquema 1.8.



Esquema 1.8. Reactivos y condiciones: (a) 3-bromo-1-propino, K_2CO_3 , DMF, 65 °C, 30 min; (b) PEG-500, 215 °C, 90 min; (c) $SnCl_2$, HCl 37%, MeOH, 75 °C, 30 min; (d) Tolueno, tamiz molecular 4Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h.

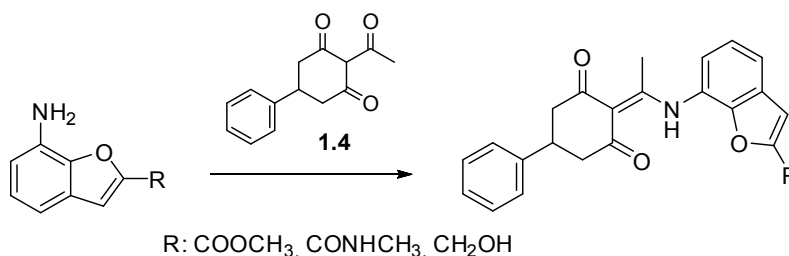
En primer lugar, se hizo reaccionar el 2-nitrofenol (**1.36**) con 3-bromo-1-propino en medio básico para obtener el éter **1.37**.²⁰ Conforme a precedentes bibliográficos,²¹⁻²² el calentamiento a elevada temperatura de arilpropargiléteres conduce, tras una transposición de Claisen, o transposición [3,3] sigmatrópica, a derivados ciclados pudiendo formarse un anillo de 5 miembros (2-metilbenzofurano) o/y de 6 miembros ((2*H*)-benzopirano). Tanto la naturaleza del disolvente como la de los sustituyentes presentes sobre el anillo aromático se han propuesto como factores que afectan al resultado de esta ciclación. En nuestro caso, el calentamiento de **1.37** en PEG-500 a 215 °C²³ dio lugar exclusivamente al 2-metilbenzofurano **1.38**, no observándose la formación del anillo de 6 miembros. Seguidamente, la reducción del grupo nitrado de **1.38** se llevó a cabo con cloruro de estaño (II),²³ dando lugar a la amina **1.39** con muy buen rendimiento. El último paso de reacción consistió en la reacción de **1.39** con **1.4**¹ en tolueno a 110 °C en presencia de tamiz molecular de 4 Å, obteniéndose así el compuesto deseado **1.35**.

La evaluación en cultivo celular del compuesto **1.35** mostró una mejora de la actividad antiproliferativa respecto a **TUB075**, como se verá en detalle más adelante. Además, el compuesto también presentó una mejor constante de afinidad por tubulina

respecto a **TUB075**. Por tanto, **1.35** fue considerado el nuevo compuesto prototipo sobre el que realizar modificaciones estructurales.

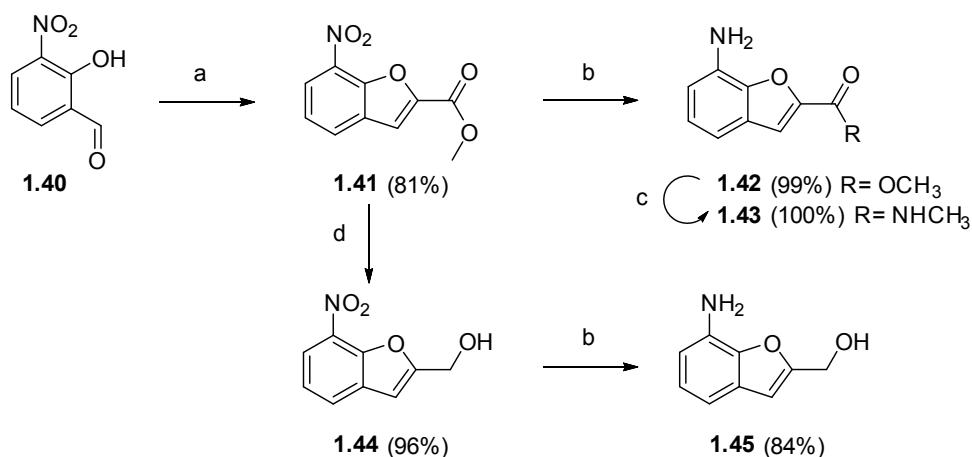
b) Síntesis y evaluación de nuevos derivados de 1.35

Conforme a los datos de los mapas de afinidad, sería posible alargar el sustituyente en posición 2 del benzofurano para rellenar el túnel (zona 2, Figura 1.6) y alcanzar la interfaz de las subunidades α y β de tubulina. Para conseguir ese alargamiento, se procedió a la síntesis de nuevos derivados donde el metilo del compuesto prototipo **1.35** se ha reemplazado por un grupo éster, amida o alcohol, grupos susceptibles de posterior modificación. La ruta de síntesis propuesta implicaba la preparación de los benzofuranos doblemente funcionalizados en las posiciones 2 y 7, esta última con un grupo amino, para su posterior condensación con la 2-acetil-5-fenilciclohexano-1,3-diona **1.4**¹ (Esquema 1.9).



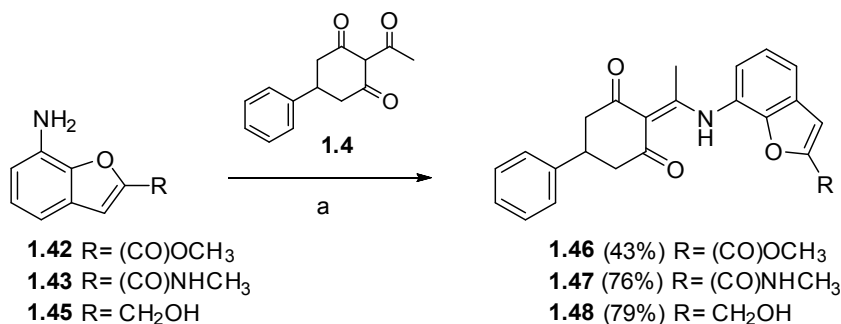
Esquema 1.9. Esquema general de síntesis

Conviene comentar que, a pesar de la reconocida importancia del anillo de benzofurano en química biológica y médica²⁴ y su abundante presencia en compuestos biológicamente activos, los benzofuranos requeridos representados en el Esquema 1.9 son sintones poco habituales, y en muchos casos no se ha descrito su síntesis. Entre los escasos ejemplos descritos figura el éster **1.41**²⁵⁻²⁶ (Esquema 1.10) sintetizado mediante reacción del 2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (**1.40**) con 2-bromomalonato de dimetilo en presencia de bromuro de tetrabutilamonio en condiciones básicas y aplicando calefacción. Estas condiciones de reacción permitieron la obtención del éster **1.41**, si bien hay que destacar que la correcta calefacción es crítica para la obtención del producto con buen rendimiento (81%).



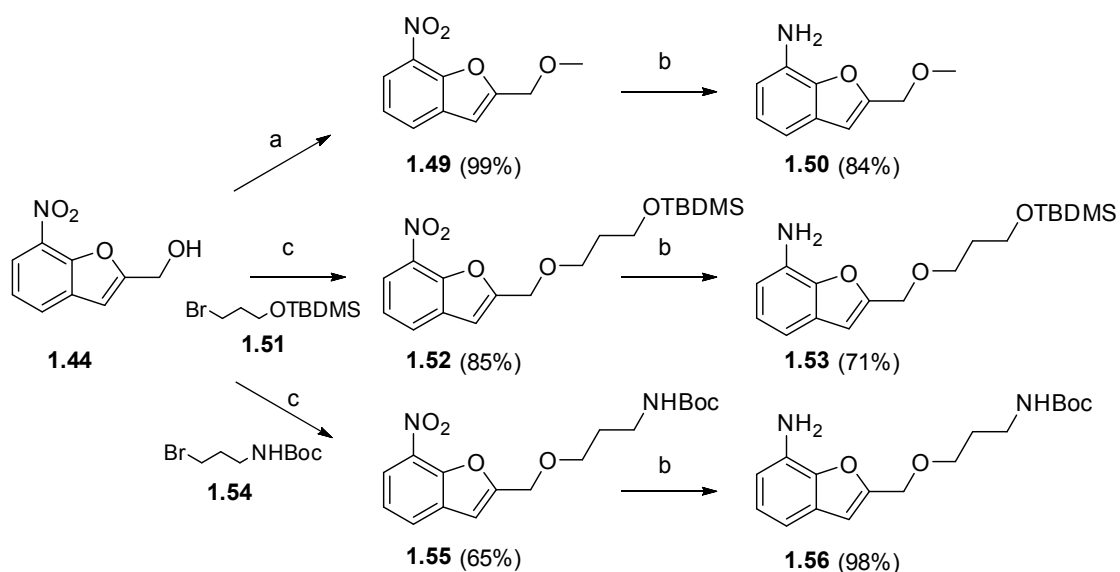
Esquema 1.10. Reactivos y condiciones: (a) 2-bromomalonato de dimetilo, K₂CO₃, TBABr, tolueno, tamiz molecular 4 Å, 110 °C, 20 h; (b) H₂, Pt/S 5%, AcOEt, 30 psi, ta, 4-5 h; (c) NH₂CH₃, NH₄Cl, MeOH, MW, 60 °C, 3 h; (d) DIBALH, dietiléter, ta, 6 h.

La hidrogenación catalítica de **1.41** en presencia de Pt/S dio lugar a la amina **1.42** con muy buen rendimiento (Esquema 1.10). A su vez, la reacción del éster **1.42** con metilamina en metanol empleando un reactor de microondas condujo cuantitativamente a la amida **1.43**. Por último, se llevó a cabo la reducción del grupo éster del compuesto **1.41** con DIBALH, dando lugar al alcohol **1.44** con muy buen rendimiento. La hidrogenación catalítica del nitroderivado **1.44** en presencia de Pt/S dio lugar a la amina **1.45**. Una vez sintetizadas las distintas aminas, éstas se hicieron reaccionar con 2-acetil-5-fenilciclohexano-1,3-diona (**1.4**)¹ en las condiciones detalladas en el Esquema 1.11.



Esquema 1.11. Reactivos y condiciones: (a) Tolueno, tamiz molecular 4Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h.

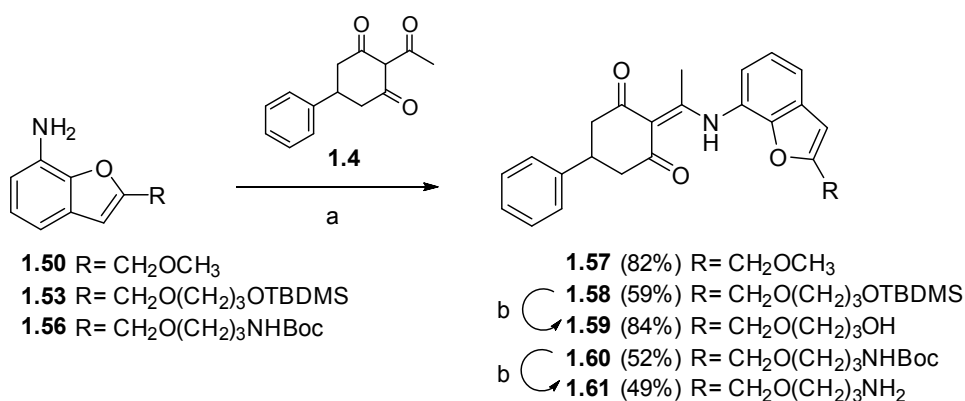
La evaluación en cultivo celular de estos tres compuestos puso de manifiesto que tanto el éster **1.46**, como la amida **1.47**, presentaron una pérdida significativa de la actividad antiproliferativa, mientras que los valores de Cl₅₀ del alcohol **1.48** eran equiparables a los del derivado con metilo **1.35**. En base a estos datos, se propuso la metilación y alquilación del alcohol **1.44** con cadenas alifáticas (Esquema 1.12) que permitieran alargar este sustituyente.



Esquema 1.12. Reactivos y condiciones: (a) Ioduro de metilo, NaH, DMF anh., ta, 2 h; (b) H₂, Pt/S 5%, 30 psi, ta, 2-8 h; (c) NaOH 50%, TBABr, THF, 60 °C, 4 h.

A partir de **1.44**, por metilación del grupo alcohol con ioduro de metilo en medio básico, se obtuvo **1.49**, cuyo grupo nitro se redujo mediante hidrogenación catalítica para obtener la amina **1.50** con muy buenos rendimientos. Por un lado, la alquilación de **1.44** por reacción con **1.51**²⁷ en medio básico, dio lugar al nitroderivado **1.52** con el grupo terminal OH protegido con TBDMS. Por hidrogenación catalítica de **1.52** con Pt/S se obtuvo la amina deseada **1.53**. Por otro lado, **1.44** se hizo reaccionar con el bromuro **1.54** en condiciones básicas dando lugar al compuesto **1.55**, que fue sometido a hidrogenación catalítica para obtener la amina **1.56**, cuya cadena alquímica incorporaba un amino terminal protegido con Boc.

Finalmente, se procedió al último paso de síntesis, en el que se hicieron reaccionar las distintas aminas con **1.4**¹ en tolueno a 110 °C y añadiendo tamiz molecular de 4 Å al medio de reacción (Esquema 1.13).



Esquema 1.13. Reactivos y condiciones: (a) Tolueno, tamiz molecular 4Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h; (b) TFA, DCM, ta, 20 min-1 h.

De este modo, a partir de la amina **1.50** se obtuvo el compuesto final **1.57**. A partir de **1.53** y tras desprotección del grupo OH del producto de acoplamiento **1.58** con TFA se obtuvo el derivado **1.59**. En último lugar, a partir de la amina **1.56** se obtuvo el producto de acoplamiento **1.60**, cuyo grupo amino se desprotegió en presencia de TFA, dando lugar al compuesto final **1.61**.

En la Tabla 1.4 y Tabla 1.5 se recogen las estructuras de los compuestos sintetizados en esta serie y los resultados de su evaluación en ensayos de proliferación celular, respectivamente.

Tabla 1.4. Estructuras de **1.35** y los derivados sintetizados **1.46**, **1.47**, **1.48**, **1.57**, **1.59** y **1.61**.

Compuesto	R
	1.35
1.46	COOCH ₃
1.47	CONHCH ₃
1.48	CH ₂ OH
1.57	CH ₂ OCH ₃
1.59	CH ₂ O(CH ₂) ₃ OH
1.61	CH ₂ O(CH ₂) ₃ NH ₂

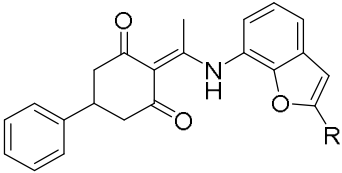


Tabla 1.5. Actividad antiproliferativa expresada como CI₅₀ (μM) de los compuestos **TUB075**, **1.35** y derivados **1.46**, **1.47**, **1.48**, **1.57**, **1.59** y **1.61** en células tumorales y endoteliales.

Comp.	CI ₅₀ ^(a) (μM)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
TUB075	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.0	0.10 ± 0.02
1.35	0.048 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.16 ± 0.01	0.065 ± 0.003
1.46	1.1 ± 0.1	0.64 ± 0.36	0.89 ± 0.03	1.6 ± 0.6
1.47	4.6 ± 0.2	5.5 ± 1.7	12 ± 6	14 ± 11
1.48	0.050 ± 0.000	0.040 ± 0.002	0.14 ± 0.04	0.15 ± 0.05
1.57	0.0083 ± 0.0005	0.031 ± 0.002	0.030 ± 0.002	0.016 ± 0.002
1.59	0.032 ± 0.002	0.051 ± 0.018	0.034 ± 0.003	0.038 ± 0.003
1.61	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.27 ± 0.00
Colchicina	0.010 ± 0.0006	0.013 ± 0.0004	0.0087 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0011
CA-4P	0.013 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.0029 ± 0.0001

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

En primer lugar, y como se ha comentado anteriormente, los resultados recogidos en la Tabla 1.5 pusieron de manifiesto que la incorporación de un anillo de furano fusionado sobre el anillo aromático D, compuesto **1.35**, condujo a un incremento significativo de la actividad antiproliferativa en la mayoría de las líneas celulares. La funcionalización de la posición 2 del benzofurano con un grupo éster (**1.46**) dio lugar a una disminución de un orden de magnitud en la actividad antiproliferativa, y de dos órdenes de magnitud cuando el sustituyente fue una *N*-metilamida (**1.47**). Sin embargo,

la introducción de un grupo alcohol (**1.48**) condujo a valores de actividad antiproliferativa muy similares a los del compuesto **1.35**. Esta modificación permitió la síntesis de análogos de **1.48** que incorporaron cadenas alifáticas sobre el grupo OH. Entre ellos, destaca el metiléter **1.57** que presentó valores de actividad antiproliferativa en el rango nanomolar ($CI_{50} = 8$ nM en células L1210), siendo equipotente en la mayoría de las líneas celulares a colchicina o CA-4P. El alargamiento de la cadena con un grupo polar terminal condujo a resultados dispares: el compuesto con un grupo OH terminal (**1.59**) condujo a valores de actividad antiproliferativa similares a los obtenidos para el ligando más potente de esta serie, **1.57**, mientras que la presencia de un grupo amino terminal (**1.61**) supuso una disminución de la actividad antiproliferativa de un orden de magnitud con respecto a **1.57**.

c) Determinación de la constante de asociación (K_a) con tubulina

Además de la evaluación de la actividad antiproliferativa, se llevó a cabo la determinación de la constante de afinidad (K_a) con $\alpha\beta$ -tubulina bovina mediante un experimento de competición con el ligando R-PT (**i.31**)¹³, como se ha descrito anteriormente. Los datos de la constante de afinidad de los distintos derivados sintetizados se encuentran en la Tabla 1.6, junto con los valores de **TUB075** y otros ligandos característicos del sitio de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina. Estas determinaciones han sido realizadas por Juan Estévez, en el laboratorio del Dr. José Fernando Díaz, en el CIB-CSIC, requiriendo de la puesta a punto de nuevas condiciones experimentales que se recogerán en su tesis doctoral.

Tabla 1.6. Constantes de asociación (K_a) de los compuestos **TUB075**, **1.35** y sus derivados **1.46**, **1.47**, **1.48**, **1.57**, **1.59** y **1.61** y de otros ligandos de referencia del sitio de colchicina.

Compuesto	K_a (M^{-1}) 25 °C
Colchicina (i.3)	11.6×10^6 (a 37 °C) ⁽¹⁵⁾
Podofilotoxina (i.6)	1.8×10^6 ⁽¹⁶⁾
R-PT (i.31)	3.2×10^6 ⁽¹³⁾
TUB075	$(13 \pm 2) \times 10^6$ ^(a)
1.35	$(89.5 \pm 3.6) \times 10^6$ ^(a)
1.46	$(1.57 \pm 0.35) \times 10^6$ ^(a)
1.47	$(0.07 \pm 0.01) \times 10^6$ ^(a)
1.48	$(91.0 \pm 10.1) \times 10^6$ ^(a)
1.57	$(287 \pm 106) \times 10^6$ ^(a)
1.59	$(65.1 \pm 6.80) \times 10^6$ ^(a)
1.61	$(3.57 \pm 0.24) \times 10^6$ ^(a)

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

Como se observa en la Tabla 1.6, el valor K_a de **1.35** ($K_a = 89.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) es casi un orden de magnitud superior al de **TUB075** ($K_a = 13 \times 10^6$), por lo que existe una buena correlación entre el incremento en la actividad antiproliferativa y el incremento en la afinidad. Cabe destacar que la constante de asociación de este compuesto (**1.35**) es un orden de magnitud superior a la presentada por la podofilotoxina ($K_a = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)¹⁶ y análoga a la presentada por el compuesto de referencia colchicina ($K_a = 11.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).¹⁵

Los compuestos **1.46** y **1.47**, funcionalizados con un grupo éster y amida respectivamente, fueron los que menores valores de constante de asociación presentaron. Sin embargo, el compuesto **1.48** con un grupo alcohol presentó un valor K_a de $91 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Así, la disminución de la actividad antiproliferativa de **1.46** y **1.47** correlaciona con una pérdida de afinidad observada para los valores de K_a . Como se ha comentado en el apartado anterior, la actividad antiproliferativa de **1.35** y **1.48** es similar en todas las líneas celulares y esto también está en consonancia con los valores de K_a obtenidos para estos dos compuestos. Los derivados que incorporan una cadena alifática con un grupo OH terminal (**1.59**) o un grupo amino terminal (**1.61**) presentan valores dispares de K_a , siguiendo la tendencia observada en la actividad antiproliferativa, siendo el derivado hidroxilado un orden de magnitud más afín que el compuesto con un grupo amino terminal. Mención especial requiere el derivado con un metoximetilo en la posición 2 del benzofurano (**1.57**) que mostró una $K_a = 287 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, es decir, $2.87 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, siendo 20 veces mejor a la K_a de **TUB075** y 90 veces más afín que el ligando de referencia R-PT. Para la determinación de esta constante de afinidad fue necesario poner a punto un experimento de competición empleando el alcohol **1.48**. Se llevaron a cabo dos experimentos en paralelo: realizar la incubación con **1.48** y añadir progresivamente **1.57**, o incubar la tubulina con **1.57** e ir añadiendo **1.48**. Los resultados obtenidos en ambos experimentos fueron similares.

La mayoría de ligandos del sitio de unión de colchicina presentan constantes con valores en torno a 10^6 M^{-1} y los más afines, como colchicina, en torno a 10^7 . En nuestro conocimiento, el compuesto **1.57** presenta la constante más alta de las descritas, en torno a 10^8 M^{-1} . Tanto mediante las condiciones empleadas en la determinación de la constante como mediante estudios de espectrometría de masas se ha descartado que la unión pueda ser de tipo covalente.

1.3.4.3. ESTUDIOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

Con estos datos de actividad antiproliferativa y valores de constante de asociación (K_a) con $\alpha\beta$ -tubulina en el sitio de colchicina tan prometedores, especialmente los presentados por los compuestos **1.57** y **1.59**, se realizaron ensayos biológicos adicionales con los que poder esclarecer el mecanismo de acción de ambos compuestos. Estos experimentos han sido llevados a cabo en el Instituto Rega (KULeuven, Bélgica) por el grupo de la Dra. Sandra Liekens.

a) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular

Los compuestos inhibidores de la polimerización de microtúbulos que se unen al sitio de la colchicina se comportan como antimetabólicos por interrupción del ciclo celular, concretamente en la fase G2/M.²⁸ Por este motivo, se realizó un estudio sobre el efecto de estas ciclohexanodionas en la progresión del ciclo celular, mediante tinción con yoduro de propidio, molécula fluorescente intercalante del ADN, y posterior análisis por citometría de flujo.²⁹ Esta técnica permite establecer de forma sencilla la distribución celular en las distintas fases del ciclo vital de una población de células en división, según el contenido en ADN.³⁰ De este modo, si las células que se encuentran en la fase G1 (previa a la división) contienen una cantidad de ADN igual a n , aquellas que hayan pasado a la fase G2/M (en mitosis), poseerán el doble de ADN, es decir, $2n$. En línea con el razonamiento anterior, durante la fase de síntesis S (replicación), el contenido en ADN se encontrará comprendido entre n y $2n$. Las células con un contenido de ADN inferior a n (fase subG1) son un indicador de apoptosis (muerte celular).

Para el estudio del ciclo celular se emplearon células HMEC-1 que se incubaron con los compuestos **1.57** y **1.59**, a distintas concentraciones (0.4 y 0.08 y 0.016 μM), junto a un experimento control (DMSO al 0.1%). Tras 24 horas de tratamiento se realizó un estudio por citometría de flujo. Los datos obtenidos se representan en la Figura 1.10. A modo comparativo, se incluyen también los resultados obtenidos en este experimento para el compuesto patrón **TUB075** (Figura 1.10A).

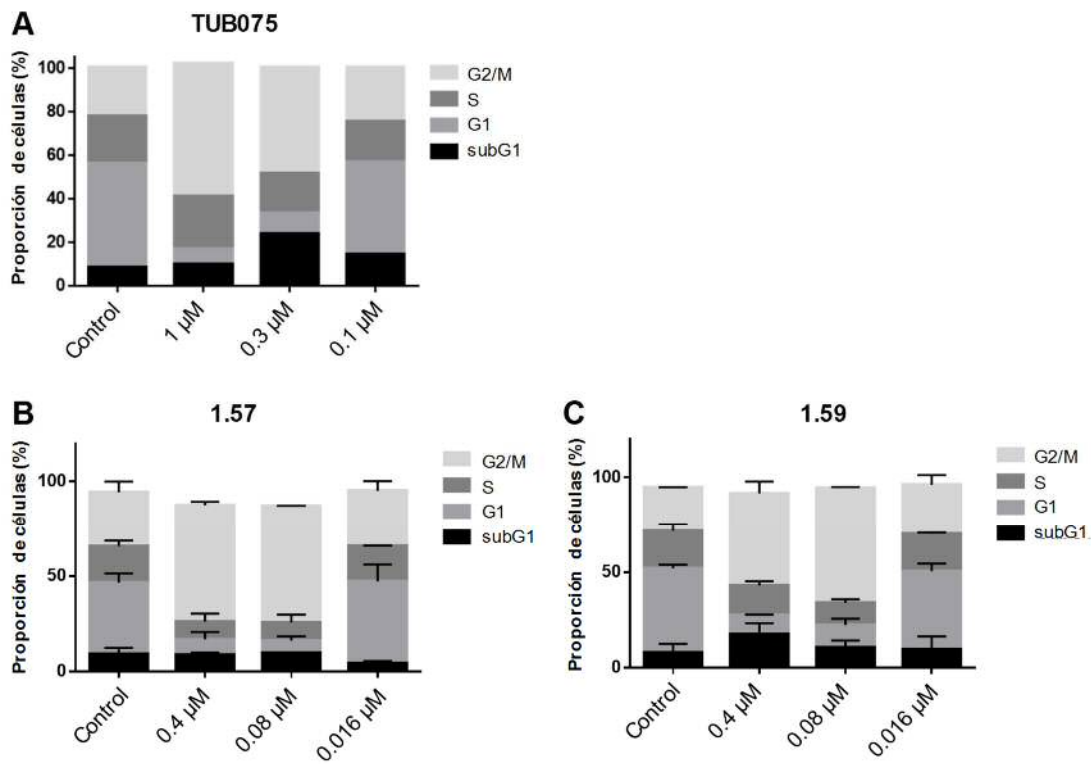


Figura 1.10. Efectos del hit inicial TUB075 (A) y los compuestos 1.57 (B) y 1.59 (C) sobre la progresión del ciclo celular. Las células HMEC-1 se incubaron con cada compuesto a diferentes concentraciones (0.4, 0.08 y 0.016 μM). Tras 24 horas de tratamiento se realizó un estudio por citometría de flujo, cuantificando así el % de células en cada fase del ciclo celular.

Como se puede observar en la Figura 1.10, en el experimento control (primera columna en cada una de las gráficas) las células mostraron el patrón de distribución típico en las distintas fases del ciclo celular (sub-G1, G1, S y G2/M). El tratamiento con **TUB075** a una concentración de 0.3 μM y particularmente a 1 μM (Figura 1.10A) provocó una acumulación de células en la fase G2/M. Esta acumulación en la fase G2/M se observa con los nuevos derivados **1.57** (Figura 1.10B) y **1.59** (Figura 1.10C), a una concentración de 0.4 μM e incluso a 0.08 μM. Se puede concluir así que el efecto antiproliferativo de estos compuestos es consecuencia del bloqueo que inducen en la división celular (fase G2/M), comportamiento similar respecto a colchicina, CA-4P y al resto de ligandos descritos de este sitio en tubulina.²⁸ Este efecto se observa para los nuevos derivados a una concentración de 0.08 μM, sensiblemente inferior a la concentración requerida para **TUB075**.

Además, se observó que el compuesto **1.59** causaba un incremento de células en fase sub-G1, efecto que era dependiente de la concentración. El aumento de células con el ADN fragmentado (subG1) es característico de células apoptóticas,³¹ lo que parece indicar que el compuesto **1.59** induce apoptosis.

b) Estudio de la actividad caspasa-3

Con el propósito de confirmar si el compuesto **1.59** era inductor de apoptosis, se realizó el experimento de actividad caspasa-3. Para ello se empleó la herramienta NucView® 530 Caspase-3 Substrate (1 mM DMSO, Biotium). Este sustrato consiste en un fluoróforo conjugado a un péptido DEVD. Cuando el sustrato conjugado no fluorescente es reconocido por la caspasa, se libera el pigmento que viaja al núcleo y tiñe el ADN con fluorescencia. En concreto el sustrato elegido NucView® 530 permite visualizar mediante fluorescencia el ADN de las células apoptóticas en color naranja.

En la Figura 1.11 se recogen las imágenes de microscopía de fluorescencia donde los núcleos de las células normales se tiñen en azul (experimento control) mientras que los núcleos de células apoptóticas se tiñen en naranja-rosa. A concentraciones de 1, 0.3 y 0.1 μM de **1.59**, la presencia de células apoptóticas es bien visible, efecto que desaparece cuando la concentración usada fue 0.03 μM . Como se observa en el diagrama de barras, el efecto también es más significativo a las 24 h que a las 16 h. Sin embargo, la relación entre la dosis empleada y el porcentaje de células apoptóticas no es evidente.

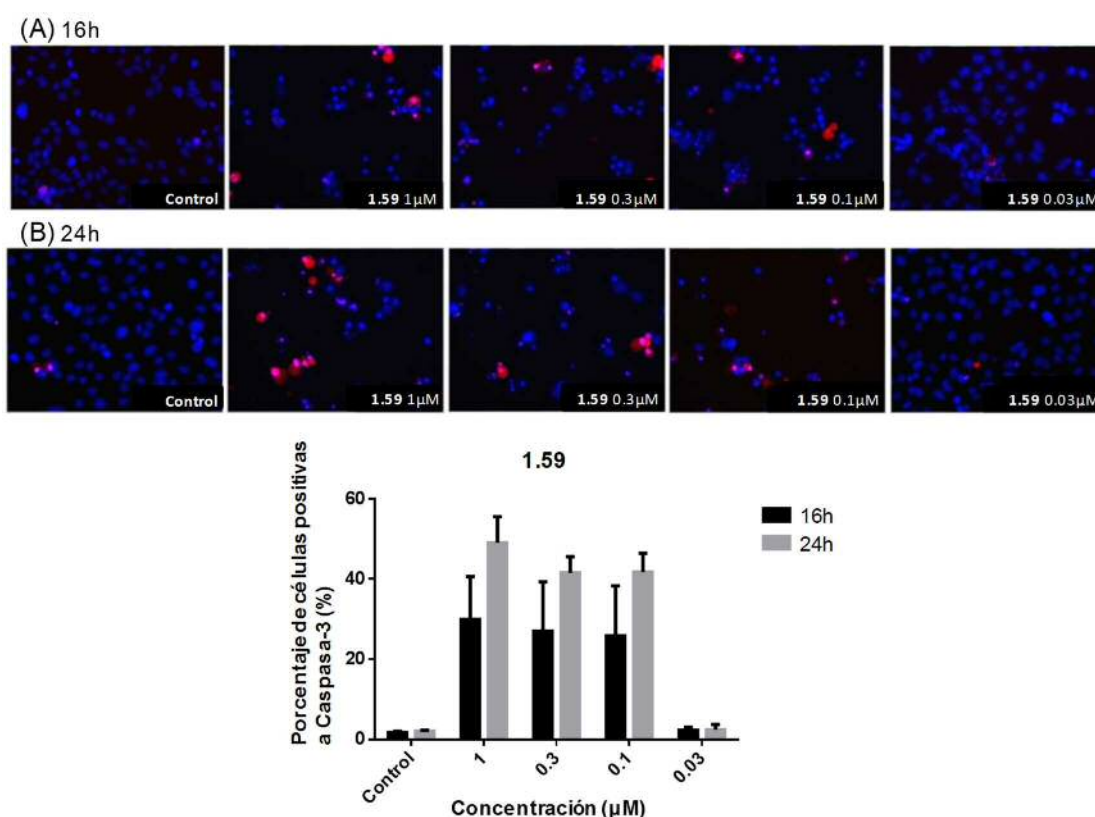


Figura 1.11. Actividad Caspasa-3 en células MDA-MB-231. El sustrato NucView® 530 (2 μM) y el compuesto **1.59** (a concentraciones de 1, 0.3, 0.1 y 0.03 μM) se añadieron a células MDA-MB-231. Tras 16 ó 24 h, las células se incubaron con Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para teñir el núcleo y se tomaron las imágenes. Los datos representan los resultados de 3 experimentos realizados por duplicado.

c) Estudio del efecto interruptor de la vascularización

Con el propósito de valorar la potencial actividad VDA de estos compuestos, se decidió evaluar el efecto de los derivados **1.57** y **1.59** sobre una red de vasos de células endoteliales previamente establecida. Para ello se cultivaron células endoteliales (HMEC-1) sobre matrigel, donde crecen formando redes de tubos.³² Una vez que estos tubos fueron apreciables (3 horas), se añadió DMSO (0.1%) a modo de control negativo, o bien el compuesto **1.57** ó **1.59** (0.016, 0.08, 0.4 y 2 μM). Tras 90 min de incubación, las diferentes muestras se visualizaron al microscopio y fueron fotografiadas. Como se puede observar en la Figura 1.12, mientras que las células no tratadas (Control) mantuvieron intacta la red de tubos que se había establecido en un principio, la adición tanto de **1.57** como de **1.59**, provocó una clara interrupción de estos tubos, fenómeno que además fue dependiente de la concentración de compuesto.

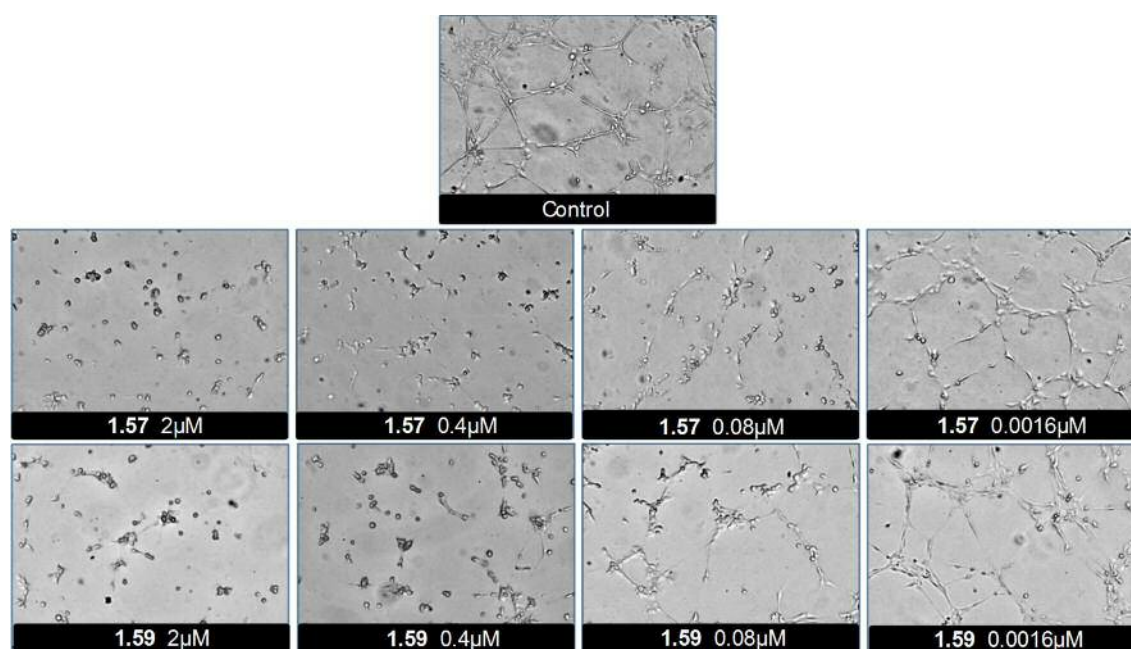


Figura 1.12. Efecto interruptor de los compuestos 1.57 y 1.59 sobre una red vascular de células endoteliales. Las células HMEC-1 se cultivaron sobre matrigel, donde crecen formando tubos. Tras 3 h se añadió DMSO (0.1%) como control negativo, o los compuestos **1.57** ó **1.59** (0.016, 0.08, 0.4, y 2 μM). Fotografías tomadas con ImageJ Angiogenesis Analyzer tras 90 min de tratamiento con los compuestos **1.57** y **1.59**.

Para cuantificar este efecto, se midieron tres indicadores de vascularización (el número de redes, las ramificaciones y la longitud de los vasos) a distintas concentraciones de los compuestos en estudio y se compararon con lo observado en el experimento control (0.1% DMSO). La longitud de la barra (Figura 1.13) indica el porcentaje de diferencia para cada indicador de vascularización respecto al control, por tanto, un valor próximo a -100 indica una desaparición casi total de este marcador por

el efecto del compuesto. Para ambos compuestos, se observa que a concentraciones de 2 μM y 0.4 μM no hay presencia de redes de vasos ni ramificaciones (valores próximos a -100), y la longitud de los vasos en las células tratadas ha disminuido más del doble con respecto al control (valores superiores a -50). A una concentración de 0.08 μM , el efecto antivascolar aún es claro siendo el compuesto **1.57** más activo que **1.59**, con valores superiores a -50 en los 3 marcadores. A la concentración de 0.016 μM , el efecto antivascolar es mucho menor para los dos compuestos.

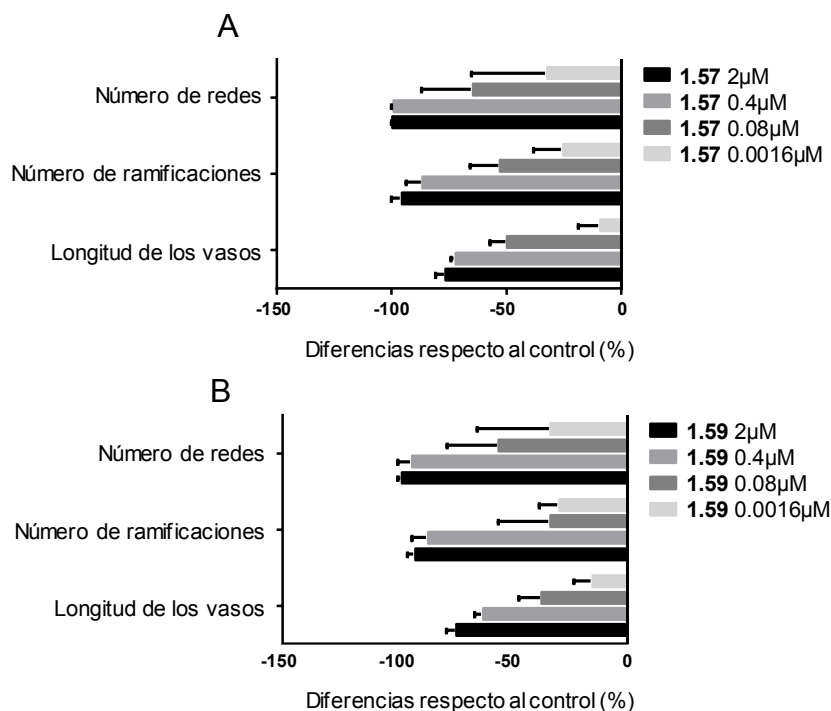


Figura 1.13. Diferencias observadas en indicadores vasculares entre el control y las células tratadas con 1.57 (Diagrama A) o 1.59 (Diagrama B). El número de redes, ramificaciones y longitud de vasos presentes en las células tratadas se comparó con lo observado en el experimento control. Un valor de la barra próximo a 0 indica que apenas hay diferencias con respecto al control, mientras que un valor próximo a -100 indica un claro efecto del compuesto con diferencias próximas al 100% respecto al control. Ambos compuestos (**1.57** y **1.59**) presentaron un efecto antivascolar que fue dependiente de la concentración.

De lo contenido en este apartado se puede concluir que la herramienta cGRILL ha resultado útil para explorar nuevas zonas anexas al sitio de unión de **TUB075**. El diseño, síntesis y posterior evaluación de derivados de benzofurano de las ciclohexanodionas ha permitido la obtención de compuestos con una elevada afinidad por tubulina, destacando especialmente el derivado de 2-metoximetilo **1.57** con una K_a de $2.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Los estudios en cultivo celular de este compuesto y del derivado **1.59** han confirmado su actividad antimitótica y de inducción de la apoptosis, así como su efecto antivascolar.

1.3.5. NUEVOS DERIVADOS BASADOS EN LA SUPERPOSICION DE LOS COMPLEJOS DE RAYOS X TUB075-TUBULINA Y DAMA-COLCHICINA-TUBULINA

1.3.5.1. MAPAS DE AFINIDAD DEL COMPLEJO DAMA-COLCHICINA-TUBULINA Y SUPERPOSICIÓN CON TUB075

Como ya se ha comentado, al realizar la superposición de los complejos cristalinos de DAMA-colchicina (**i.28**) y **TUB075** con tubulina, no se observaron cambios conformacionales significativos en el sitio de unión del ligando, salvo para el loop T5 de la subunidad α . Conviene recordar que este loop en el complejo con **TUB075** (rosa claro en la Figura 1.14) está más cerrado sobre el sitio de unión que en el complejo con DAMA-colchicina (rosa oscuro en la Figura 1.14), ya que la DAMA-colchicina se aloja más cerca de la interfaz de ambas subunidades y por tanto el loop se desplaza para poder alojar al ligando.

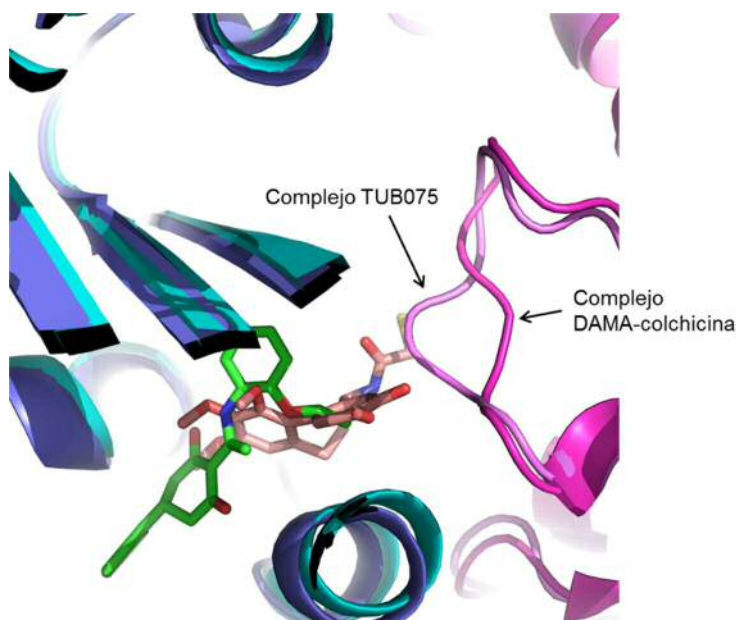


Figura 1.14. Movimiento del loop T5. Superposición del complejo DAMA-colchicina-tubulina (α -tubulina representada en azul oscuro y β -tubulina en rosa magenta) con el complejo **TUB075**-tubulina (α -tubulina representada en cian y β -tubulina en rosa). Parte de la estructura de $\alpha\beta$ -tubulina se ha omitido para mayor claridad.

Como consecuencia, el sitio de unión definido en el complejo TUB075-tubulina es más pequeño que el sitio de unión en el complejo DAMA-colchicina. Por ello, se decidió aplicar el programa cGRILL sobre el complejo DAMA-colchicina-tubulina y determinar qué zonas de este complejo eran accesibles a la sonda hidrofóbica (CH_3) y no eran observables en el complejo TUB075-tubulina.

En la Figura 1.15, se muestran los mapas de afinidad (en verde) obtenidos para el complejo DAMA-colchicina-tubulina (en azul) en los que se ha superpuesto la estructura

cristalina de **TUB075** (en magenta). Como se puede observar, existen tres zonas de afinidad bien definidas rodeando a DAMA-colchicina.

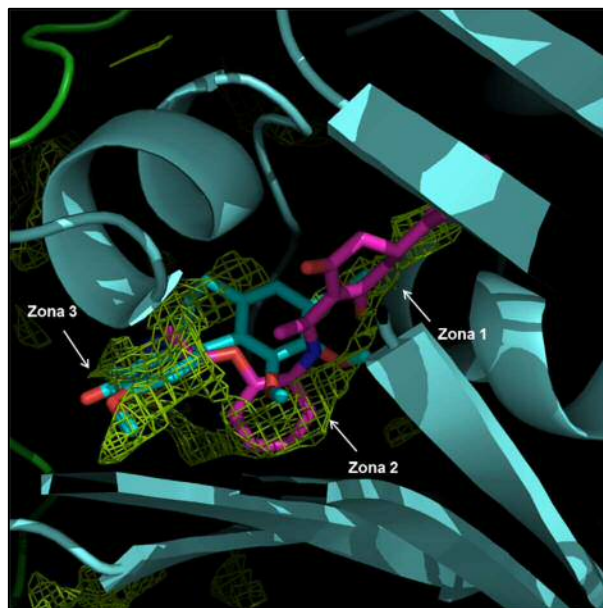


Figura 1.15. Mapas de afinidad obtenidos con la sonda CH_3 (malla verde) en el complejo tubulina-DAMA-colchicina (representada en cian) tubulina y su superposición con **TUB075** (representado en magenta).

La zona 1 aparece en la región interior de la subunidad β y está ocupada por los anillos A y B de **TUB075**. Como las relaciones estructura-actividad de esos fragmentos de **TUB075** ya estaban muy establecidas y los requisitos estructurales eran muy estrictos, se descartó introducir sobre estos anillos modificaciones adicionales. Por otro lado, la zona 2 se sitúa en la parte inferior del anillo de trimetoxifenilo de DAMA-colchicina (anillo A), zona donde se aloja el anillo aromático D de **TUB075**. Por último, la zona 3 se localiza en el anillo de tropolona de DAMA-colchicina (anillo C). Esta zona no es ocupada por ningún fragmento de **TUB075**, si bien el sustituyente etoxi en posición *orto* del anillo D se dirige hacia ella. Dado el carácter hidrofóbico y la forma de esa zona del mapa de afinidad, parecía adecuado ocuparla mediante un anillo bencénico. Así, se propuso incorporar sobre el anillo D de **TUB075** grupos fenilo manteniendo el átomo de O como nexo de unión con la posición *orto* del anillo D, resultando en la fórmula general representada en la Figura 1.16.

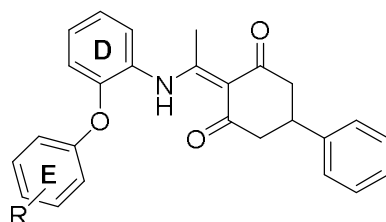


Figura 1.16. Estructura general de las ciclohexanodionas sintetizadas en este apartado.

La simulación del modo de unión de estos ariléteres se representa en la Figura 1.17, donde se observa que el nuevo anillo aromático (denominado anillo E) se adapta al mapa de afinidad definido por la sonda hidrofóbica y solapa con el anillo C de colchicina.

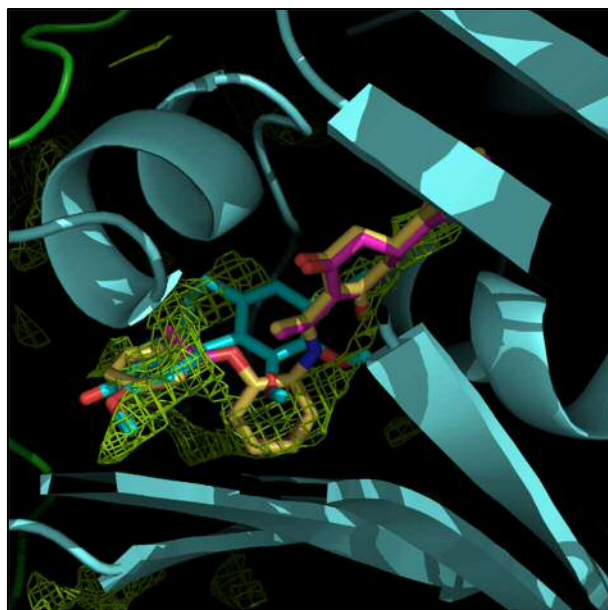


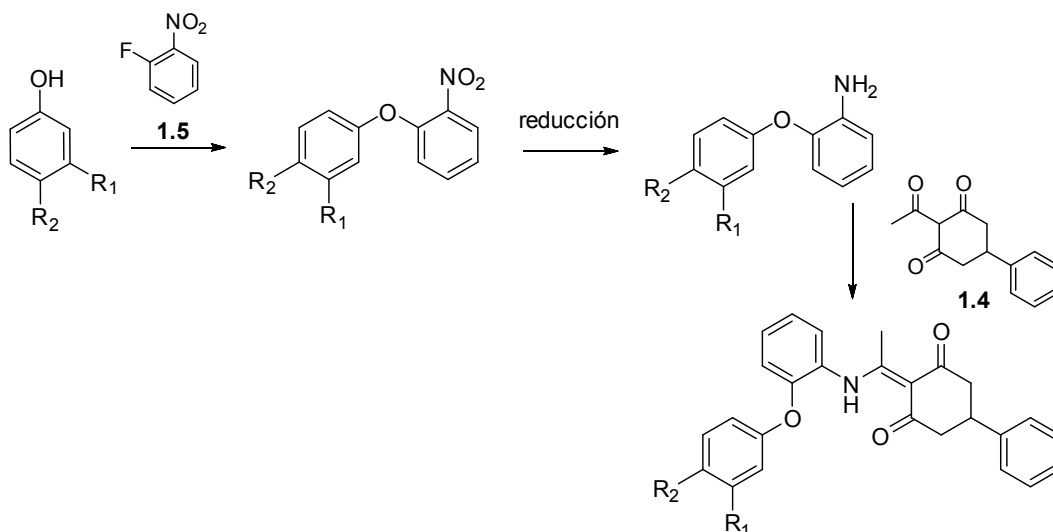
Figura 1.17. Simulación del modo de unión del nuevo compuesto diseñado (en amarillo) y su superposición con **TUB075** (magenta) y colchicina (cian).

1.3.5.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS BASADOS EN LOS MAPAS DE AFINIDAD DE DAMA-COLCHICINA

a) Síntesis

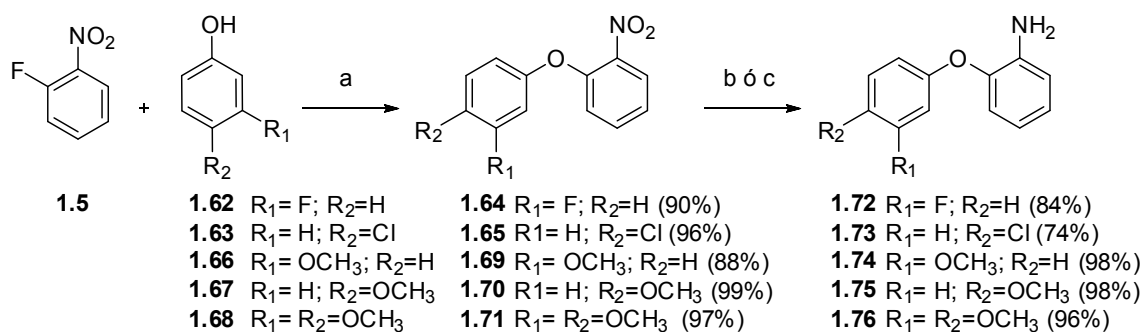
En base a los mapas de afinidad que se acaban de comentar, se propuso la síntesis de nuevos derivados de **TUB075** que incorporaran un anillo aromático (fragmento E) en el anillo D manteniendo como nexo de unión un átomo de O que permita dirigir el nuevo anillo hacia la zona hidrófoba observada en los mapas de afinidad. Así, se propuso la síntesis de una pequeña serie de compuestos que incorporaron distintos sustituyentes sobre las posiciones 3 y 4 del anillo E para explorar esa zona hidrófoba. La síntesis de estos compuestos, como se recoge en el Esquema 1.14, consistió en la reacción de la acetilciclohexanodiona **1.4** con las 2-fenoxianilinas convenientemente sustituidas. Estas 2-fenoxianilinas se obtuvieron mediante sustitución nucleófila aromática (S_NAr) del 1-fluoro-2-nitrobenceno (**1.5**) con los fenoles convenientemente funcionalizados, seguido de reducción del grupo NO_2 a la correspondiente amina. Los sustituyentes elegidos (R_1 y R_2) fueron halógenos, grupos OMe, acetilo y grupos amino, permitiendo incorporar de esta manera sustituyentes apolares y polares, con carácter tanto electroatractor como

electrodonador. Además, a modo comparativo, también se preparó el resto fenoxi no sustituido.



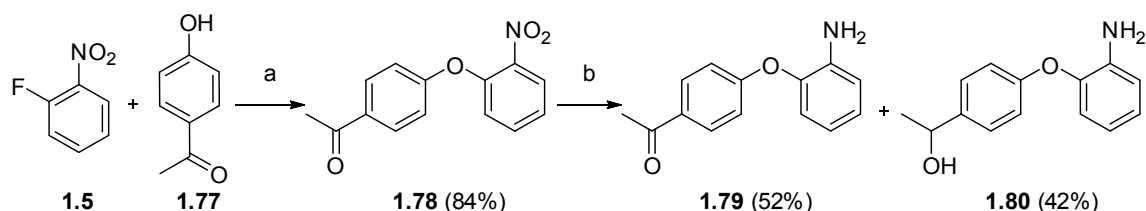
Esquema 1.14. Esquema general de síntesis.

La reacción del 1-fluoro-2-nitrobenceno (**1.5**) con 3-fluorofenol (**1.62**) o 4-clorofenol (**1.63**) en presencia de Cs_2CO_3 en acetonitrilo y con calefacción, con ligeras modificaciones sobre un procedimiento descrito,³³ condujo a los nitroderivados **1.64** y **1.65** con excelente rendimiento (Esquema 1.15). El empleo de NaH a temperatura ambiente condujo a resultados similares. Es razonable pensar que la presencia del grupo nitro en la posición *orto* con respecto al grupo saliente favorezca los buenos rendimientos. De un modo similar, por reacción de los fenoles con grupos OMe en las posiciones 3, 4 o ambas (**1.66-1.68**) con **1.5** se obtuvieron los nitroderivados (**1.69-1.71**) con rendimientos del 88 al 99%. La hidrogenación catalítica de **1.64** y **1.65** en presencia de Pt/S dio lugar a las anilinas **1.72** y **1.73** con buenos rendimientos (Esquema 1.15). La reducción del grupo nitro en los derivados metoxilados (**1.66-1.68**) se llevó a cabo en presencia de Pd/C, y así se obtuvieron las anilinas **1.74-1.76** con buenos rendimientos.



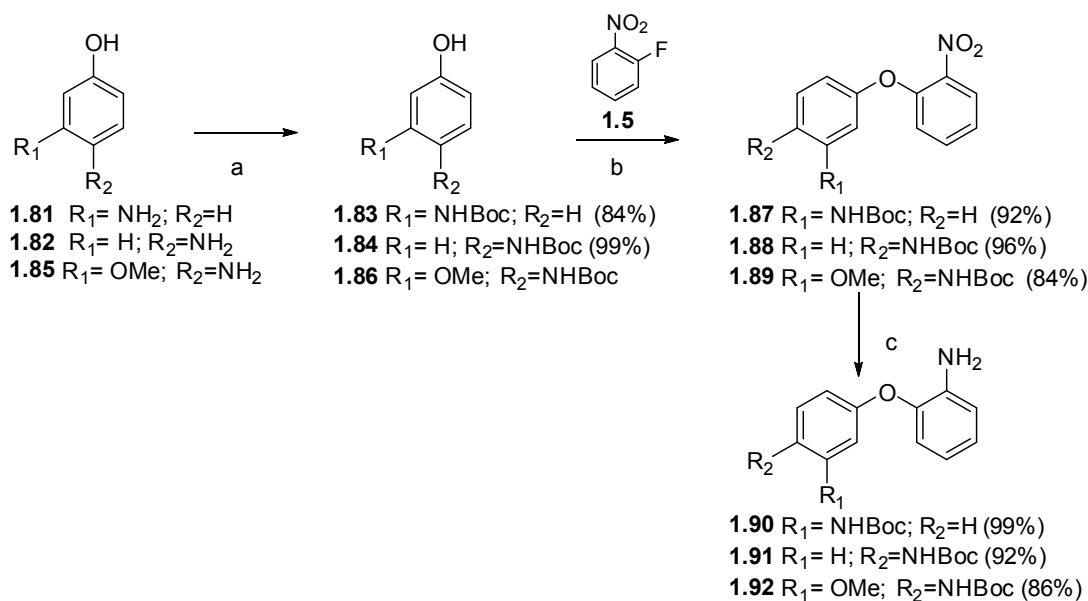
Esquema 1.15. Reactivos y condiciones: (a) Cs_2CO_3 , CH_3CN , 80 °C, 2-5 h; (b) para **1.64** y **1.65**: H_2 , Pt/S 5%, AcOEt, 30 psi, ta, 2 h; (c) para **1.69**, **1.70** y **1.71**: H_2 , Pd/C 10%, AcOEt, 30 psi, ta, 2 h.

Por otro lado, la 4-hidroxiacetofenona (**1.77**) se hizo reaccionar con 1-fluoro-2-nitrobenzoceno (**1.5**) en medio básico dando lugar al nitroderivado **1.78** (Esquema 1.16). La hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C de **1.78** dio lugar a la reducción del grupo nitro a amino y además se produjo la reducción parcial del grupo carbonilo a alcohol. Así, se obtuvieron las anilinas **1.79** y **1.80** con rendimientos del 52% y 42%, respectivamente.



Esquema 1.16. Reactivos y condiciones: (a) Cs_2CO_3 , CH_3CN , $80\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h; (b) H_2 , Pd/C 10%, AcOEt, 30 psi, ta, 1 h.

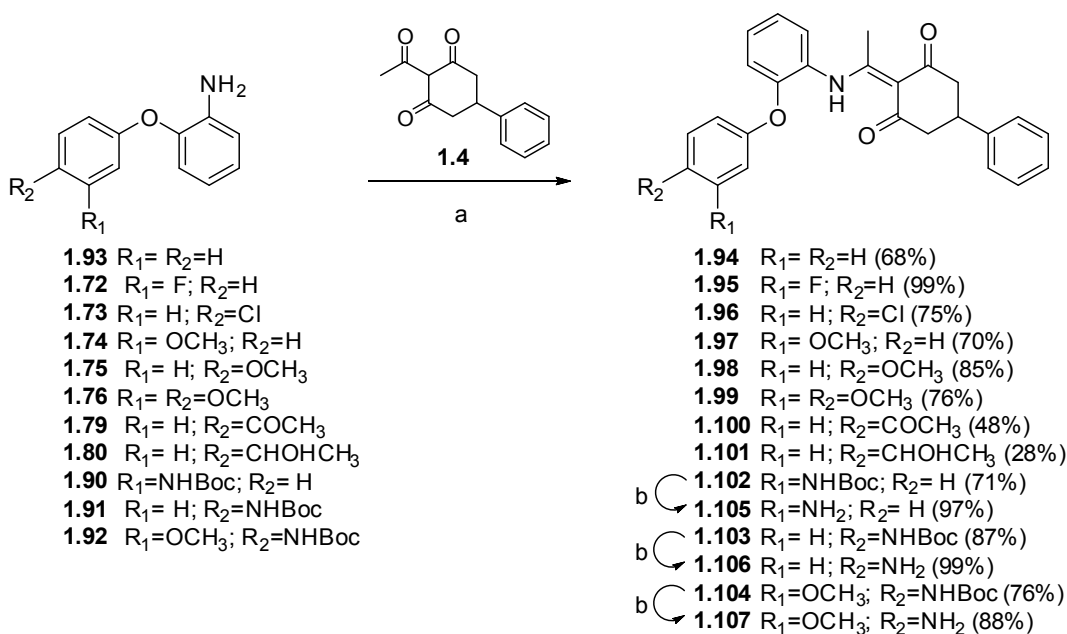
Para la síntesis de las fenoxianilinas funcionalizadas con grupos amino en el fenilo distal, se siguió un procedimiento similar si bien se procedió a la protección del NH_2 presente en el fenol de partida con un grupo Boc (Esquema 1.17). Así, el 3-aminofenol (**1.81**) y el 4-aminofenol (**1.82**) se hicieron reaccionar con anhídrido de Boc dando lugar a los fenoles **1.83** y **1.84** con el grupo amino protegido. El fenol **1.85**, con un amino en la posición 4 y un metoxi en la posición 3, se obtuvo a partir del 4-nitro-3-metoxifenol tal y como está descrito en la bibliografía,³⁴ seguido de protección del grupo amino dando lugar a **1.86**.



Esquema 1.17. Reactivos y condiciones: (a) $(\text{Boc})_2$, THF anh., ta, 24 h; (b) Cs_2CO_3 , CH_3CN , $80\text{ }^\circ\text{C}$, 3-4 h; (c) H_2 , Pd/C 10%, AcOEt, 30 psi, ta, 1-4 h.

Los distintos fenoles con el grupo amino ya protegido se hicieron reaccionar con 1-fluoro-2-nitrobenceno (**1.5**) en medio básico y así se obtuvieron los nitroderivados **1.87**, **1.88** y **1.89** (Esquema 1.17) con muy buenos rendimientos. Finalmente, las anilinas **1.90**, **1.91** y **1.92** se obtuvieron mediante hidrogenación catalítica de los derivados nitrados en presencia de Pd/C.

La reacción de la acetilciclohexanodiona **1.4** con la 2-fenoxianilina (**1.93**) y las distintas anilinas sintetizadas **1.72-1.76**, **1.79**, **1.80**, **1.90-1.92**, en tolueno a 110 °C y en presencia de tamiz molecular (Esquema 1.18), condujo a los compuestos **1.94-1.104** en general con buenos rendimientos, excepto para los productos **1.100** y **1.101** en los que el rendimiento fue moderado (48% y 28%, respectivamente). Finalmente, el tratamiento con TFA de los derivados protegidos con Boc **1.102**, **1.103** y **1.104** condujo a los compuestos con el grupo amino libre **1.105**, **1.106** y **1.107** con muy buenos rendimientos.

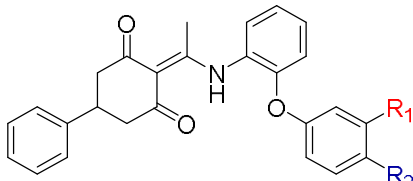


Esquema 1.18. Reactivos y condiciones: (a) Tolueno, tamiz molecular 4Å, tubo de presión, 110 °C, 16 h; (b) TFA, DCM, ta, 20 min-1 h.

b) Evaluación de la actividad antiproliferativa

Los compuestos descritos en este apartado, cuyas estructuras se muestran en la Tabla 1.7, se evaluaron como agentes antiproliferativos en células tumorales y endoteliales (Tabla 1.8).

Tabla 1.7. Estructuras de los derivados sintetizados **1.94-1.101** y **1.105-1.107**.



Compuesto	R ₁	R ₂
1.94	H	H
1.95	F	H
1.96	H	Cl
1.97	OCH ₃	H
1.98	H	OCH ₃
1.99	OCH ₃	OCH ₃
1.100	H	COCH ₃
1.101	H	CHOHCH ₃
1.105	NH ₂	H
1.106	H	NH ₂
1.107	OCH ₃	NH ₂

Tabla 1.8. Actividad antiproliferativa expresada como CI₅₀ (μM) de los compuestos **TUB075**, y los derivados **1.94-1.101**, **1.105**, **1.106** y **1.107** en células tumorales y endoteliales.

Comp.	CI ₅₀ ^(a) (μM)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
TUB075	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.0	0.10 ± 0.02
1.94	0.086 ± 0,003	0.17 ± 0.01	0.079 ± 0.031	0.16 ± 0.04
1.95	0.33 ± 0.10	0.17 ± 0.06	0.55 ± 0.30	0.36 ± 0.036
1.96	0.25 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.50 ± 0.40	0.26 ± 0.030
1.97	0.058 ± 0.014	0.041 ± 0.007	0.093 ± 0.022	0.059 ± 0.001
1.98	0.14 ± 0.08	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.083 ± 0.004
1.99	0.065 ± 0.003	0.16 ± 0.00	0.054 ± 0.014	0.14 ± 0.03
1.100	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.01
1.101	0.058 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.075 ± 0.012	0.14 ± 0.04
1.105	0.053 ± 0.006	0.042 ± 0.001	0.082 ± 0.063	0.041 ± 0.008
1.106	0.040 ± 0.002	0.037 ± 0.005	0.039 ± 0.000	0.047 ± 0.019
1.107	0.026 ± 0.007	0.012 ± 0.008	0.033 ± 0.000	0.029 ± 0.003
Colchicina	0.010 ± 0.0006	0.013 ± 0.0004	0.0087 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0011
CA-4P	0.013 ± 0.0023	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.0029 ± 0.0001

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar

En primer lugar, de los datos contenidos en la Tabla 1.8, se deduce que la incorporación de un anillo aromático extra (al que se ha denominado anillo E) sobre la estructura del compuesto patrón **TUB075** condujo a compuestos con marcada actividad antiproliferativa en las cuatro líneas celulares ensayadas, siendo en todos los casos las CI₅₀ del rango sub μM.

Si se comparan los datos del compuesto **1.94** con un resto fenoxi no sustituido, con los de los compuestos halogenados, bien sea con un F en la posición 3 (**1.95**) o con un Cl en la posición 4 (**1.96**), la actividad de los derivados halogenados fue algo peor que la del compuesto no sustituido, con valores de Cl_{50} entre 0.17-0.55 μ M. Sin embargo, la incorporación de grupos metoxi sobre las posiciones 3, 4 o en ambas (compuestos **1.97**, **1.98** y **1.99**, respectivamente) condujo a compuestos con valores de Cl_{50} entre 0.04-0.16 μ M, siendo el compuesto con el OMe en posición 3 el que presentó valores más bajos de Cl_{50} , entre 0.04-0.09 μ M. Analizando los datos del compuesto acetilado **1.100** (Cl_{50} en torno a 0.13-0.22 μ M) junto a los de los derivados halogenados, se podría argumentar que, en el conjunto de líneas ensayadas, los grupos electroattractores débiles en el anillo E disminuyen ligeramente la actividad antiproliferativa con respecto al compuesto no sustituido o compuestos que porten grupos electrodonadores, como OMe. El compuesto con un grupo hidroximetilo (**1.101**) mostró valores de Cl_{50} similares a los de los derivados con OMe. Los compuestos con grupos amino en las posiciones 3 ó 4 del anillo E (**1.105** y **1.106**, respectivamente) mostraron valores de Cl_{50} muy relevantes, entre 0.037-0.082 μ M. La sustitución conjunta de un grupo amino en la posición 4 y un OMe en la posición 3, compuesto **1.107**, condujo a valores de Cl_{50} ligeramente mejores a los del compuesto monosustituido con un grupo amino.

c) Determinación de la constante de asociación (K_a) con tubulina

Como en apartados anteriores, se llevó a cabo la determinación de la constante de afinidad (K_a) de **1.94** y sus derivados con $\alpha\beta$ -tubulina bovina mediante un experimento de competición con el ligando R-PT (**i.31**),¹³ como se ha descrito anteriormente. Los datos de la constante de afinidad de los distintos derivados sintetizados se encuentran en la Tabla 1.9, junto con los valores de **TUB075** y otros ligandos característicos del sitio de colchicina. No se han incluido en esta determinación los derivados halogenados **1.95** y **1.96**, ni el derivado acetilado **1.100**.

Tabla 1.9. Constantes de asociación (K_a) de los compuestos **TUB075**, de los derivados **1.94-1.101**, **1.105**, **1.106** y **1.107** y de otros ligandos de referencia del sitio de colchicina.

Compuesto	K_a (M^{-1}) 25 °C
Colchicina (i.3)	11.6×10^6 (a 37 °C) ⁽¹⁶⁾
Podofilotoxina (i.6)	1.8×10^6 ⁽¹⁵⁾
R-PT (i.31)	3.2×10^6 ⁽¹³⁾
TUB075	$(13 \pm 2) \times 10^6$ ^(a)
1.94	$(6.46 \pm 0.91) \times 10^6$ ^(a)
1.97	$(15.65 \pm 5.55) \times 10^6$ ^(a)
1.98	$(5.23 \pm 0.24) \times 10^6$ ^(a)
1.99	$(2.24 \pm 0.33) \times 10^6$ ^(a)
1.101	$(3.13 \pm 0.11) \times 10^6$ ^(a)
1.105	$(5.56 \pm 1.25) \times 10^6$ ^(a)
1.106	$(11.75 \pm 2.95) \times 10^6$ ^(a)
1.107	$(18.05 \pm 8.05) \times 10^6$ ^(a)

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

Como se observa en la Tabla 1.9, todos los compuestos mostraron una marcada afinidad por tubulina con valores de K_a que abarcan de 2 a $18 \times 10^6 M^{-1}$, siendo más afines que podofilotoxina. La incorporación de un anillo aromático (anillo E) no sustituido (compuesto **1.94**) supuso una ligera pérdida en la afinidad con respecto al hit **TUB075**. Sin embargo, mediante la introducción de distintos sustituyentes sobre el anillo E, se observan ciertas diferencias en la afinidad. Así, comparando los valores de K_a de los derivados con grupos metoxi (**1.97**, **1.98** y **1.99**), se observó que **1.97**, con un metoxi en la posición 3 dio lugar a un incremento en la afinidad ($K_a = 15.65 \times 10^6$) que no se apreció en los otros análogos. Este dato correlaciona con lo observado en los experimentos en cultivo celular, donde **1.97** presentaba una actividad ligeramente superior a **1.98** y **1.99**.

Dentro de los derivados que incorporaron un grupo OH (**1.101**) o un grupo amino (**1.105**, **1.106** y **1.107**), los mejores valores de K_a se obtuvieron con el compuesto **1.106** con un sustituyente 4-amino sobre el anillo E y con el compuesto **1.107**, disustituido con un grupo amino en 4 y un grupo metoxi en 3. Cabe destacar que la constante de asociación de estos compuestos (**1.106** y **1.107**), junto con la de **1.97**, se sitúan en el rango submicromolar (10^7), es decir, un orden de magnitud superior a la presentada por la podofilotoxina ($K_a = 1.8 \times 10^6$)¹⁶ y análoga a la presentada por el compuesto de referencia colchicina ($K_a = 11.6 \times 10^6$).¹⁵

1.3.5.3. ESTUDIOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

De forma análoga a lo descrito en el Apartado 1.3.4.3., se llevaron a cabo ensayos biológicos adicionales para estudiar el mecanismo de acción de estos nuevos derivados. De los datos contenidos en los apartados anteriores, se podría concluir que los compuestos **1.97**, **1.106** y **1.107** eran los que presentaban mejores valores tanto en la actividad antiproliferativa como en las determinaciones de afinidad por tubulina. Si tenemos en cuenta el valor calculado de logP para cada uno de ellos, el orden de mayor a menor es: **1.97** (4.759) >> **1.107** (4.112) > **1.106** (3.998). En base a estos valores, el compuesto **1.97** fue descartado para una evaluación más exhaustiva ya que su mayor lipofilia no suponía un incremento significativo en su afinidad por tubulina. Esta valoración está relacionada con el concepto de “ligand efficiency”, concepto empleado principalmente por la industria farmacéutica en el proceso “hit to lead” de desarrollo de nuevos fármacos.³⁵ Por tanto en estos estudios se han incluido sólo los compuestos **1.106** y **1.107**. Puesto que la finalidad de cada uno de estos ensayos ya ha sido ampliamente descrita en el Apartado 1.3.4.3., se presentarán directamente los resultados obtenidos.

a) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular

Para el estudio del efecto de los compuestos **1.106** y **1.107** en la progresión del ciclo celular, se empleó la línea endotelial HMEC-1, utilizando tres concentraciones diferentes (0.016, 0.08, y 0.4 μ M) de compuesto y realizando el análisis por citometría de flujo. Los datos obtenidos se representan en la Figura 1.18. A modo comparativo, se incluyen también los resultados obtenidos en este experimento para el hit inicial **TUB075**.

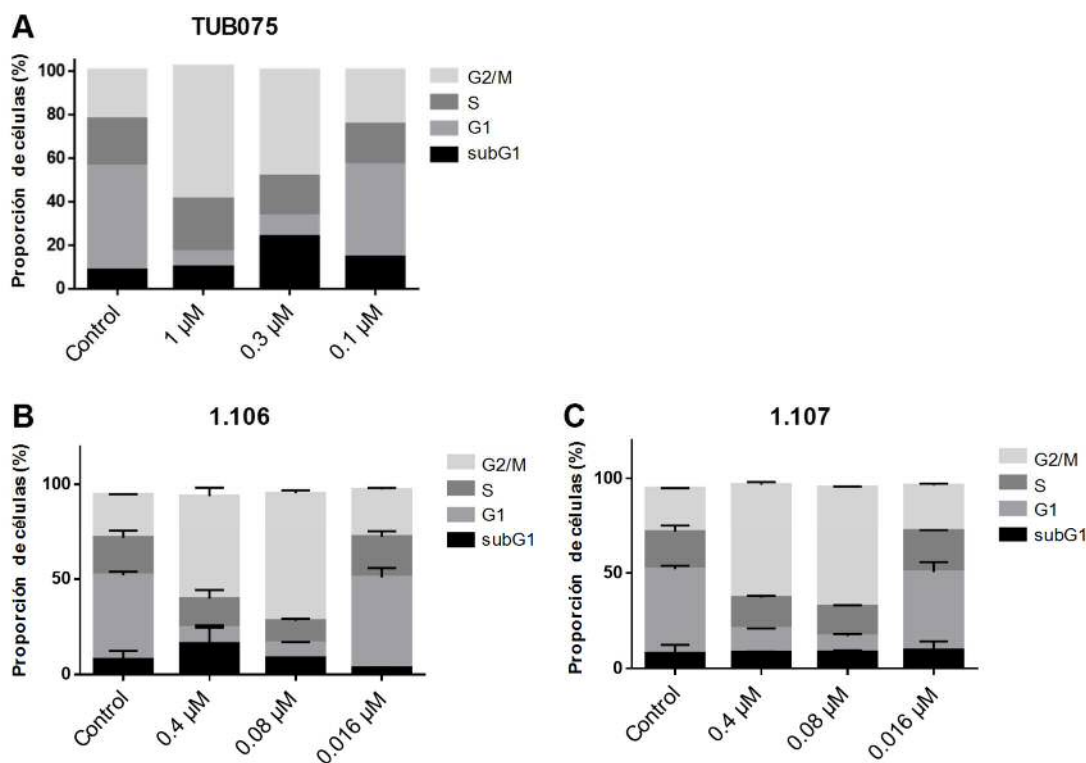


Figura 1.18. Efectos del hit inicial TUB075 y los compuestos 1.106 y 1.107 sobre la progresión del ciclo celular. Las células HMEC-1 se incubaron con cada compuesto a diferentes concentraciones (0.4, 0.08 y 0.016 μM). Tras 24 horas de tratamiento se realizó un estudio por citometría de flujo, cuantificando así el % de células en cada fase del ciclo celular.

Como se puede observar en la Figura 1.18, las células tratadas con 0.1% de DMSO (primera columna, experimento control), mostraron el patrón de distribución en las fases subG1, G1, S y G2/M típico de células en estado proliferativo. Al añadir una concentración de 0.08 ó 0.4 μM de **1.106** ó **1.107** se produjo una acumulación de células en la fase G2/M, poniendo de manifiesto que la capacidad antiproliferativa de estos compuestos era consecuencia del bloqueo que inducían en la fase G2/M del ciclo celular, comportamiento similar al de la mayoría de inhibidores del sitio de colchicina descritos.²⁸ Este mismo efecto se observó en las células tratadas con el hit inicial **TUB075**, pero sólo a concentraciones superiores del compuesto (0.3 y 1 μM). Es importante destacar que el compuesto **1.106** a una concentración de 0.4 μM también presentó una acumulación de células en fase subG1, fenómeno que además fue dependiente de la concentración. Como se ha comentado anteriormente, este efecto es típico de compuestos que inducen apoptosis.

b) Estudio de la actividad caspasa -3

Con el propósito de confirmar si el compuesto **1.106** era inductor de apoptosis, se realizó el experimento de actividad caspasa-3. En la Figura 1.19 se recogen las imágenes de microscopía de fluorescencia donde los núcleos de las células normales se tiñen en azul (experimento control) mientras que los núcleos de células apoptóticas se tiñen en naranja-rosa. Como se puede observar a concentraciones de 1, 0.3 y 0.1 μM de **1.106**, la presencia de células apoptóticas es bien visible, mientras que a la concentración de 0.03 μM ese efecto ya no se detecta. Como se observa en el diagrama de barras, el efecto es más significativo tras 24 h. Existe además una buena relación entre la dosis empleada y el porcentaje de células apoptóticas.

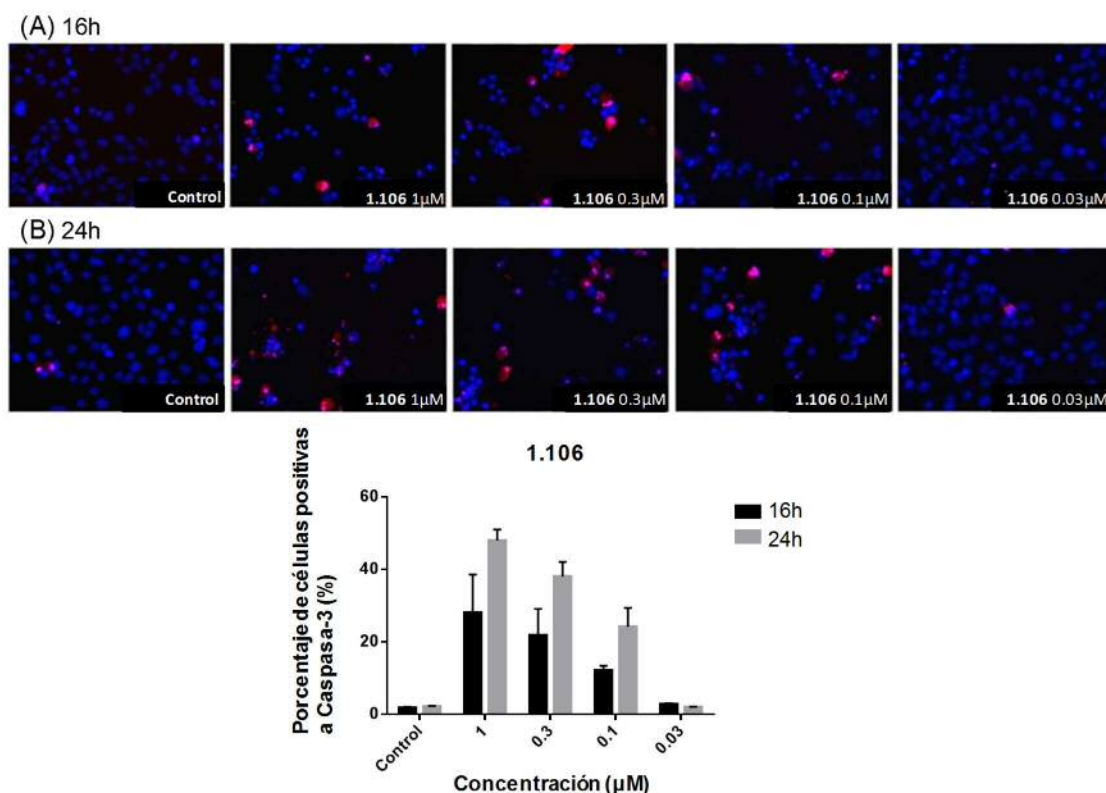


Figura 1.19. Actividad Caspase-3 en células MDA-MB-231. El sustrato NucView® 530 (2 μM) y el compuesto **1.106** (a concentraciones de 1, 0.3, 0.1 y 0.03 μM) se añadieron a células MDA-MB-231. Tras 16 ó 24 h, las células se incubaron con Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g/ml}$) para teñir el núcleo y se tomaron las imágenes. Los datos representan los resultados de 3 experimentos realizados por duplicado.

c) Estudio del efecto interruptor de la vascularización

En este ensayo se emplearon células endoteliales (HMEC-1), las cuales crecen formando tubos cuando se cultivan sobre matrigel. Una vez que estos tubos fueron apreciables, se añadió bien DMSO (0.1%, experimento control) o los compuestos en estudio (**1.106** ó **1.107**) a tres concentraciones (0.08, 0.4 y 2 μM). Como se puede apreciar en la Figura 1.20, la adición de **1.106** ó **1.107** a una concentración de 2 ó 0.4 μM condujo a una destrucción total de las redes de tubos visibles en el experimento control, destrucción que aún se aprecia parcialmente cuando la concentración empleada fue de 0.08 μM .

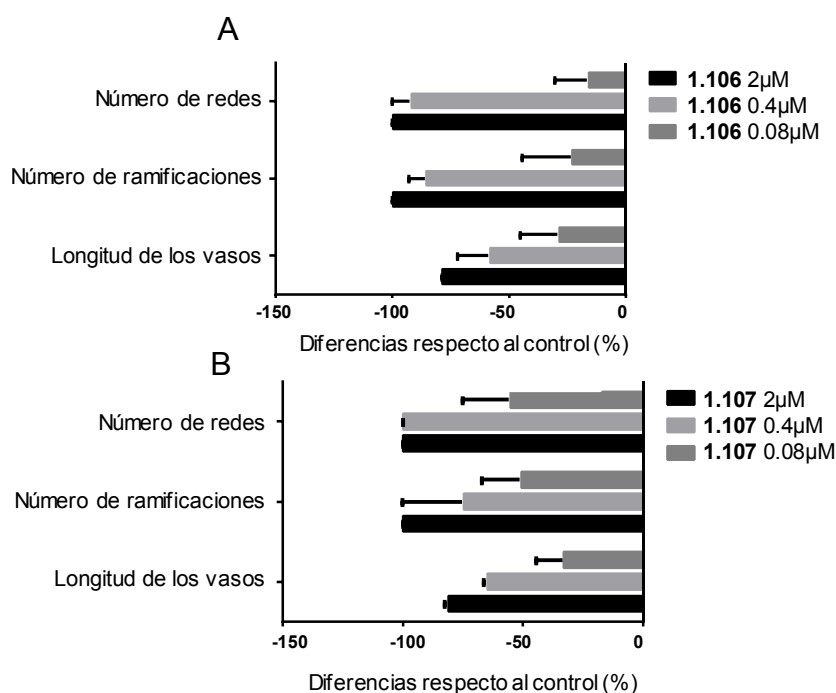
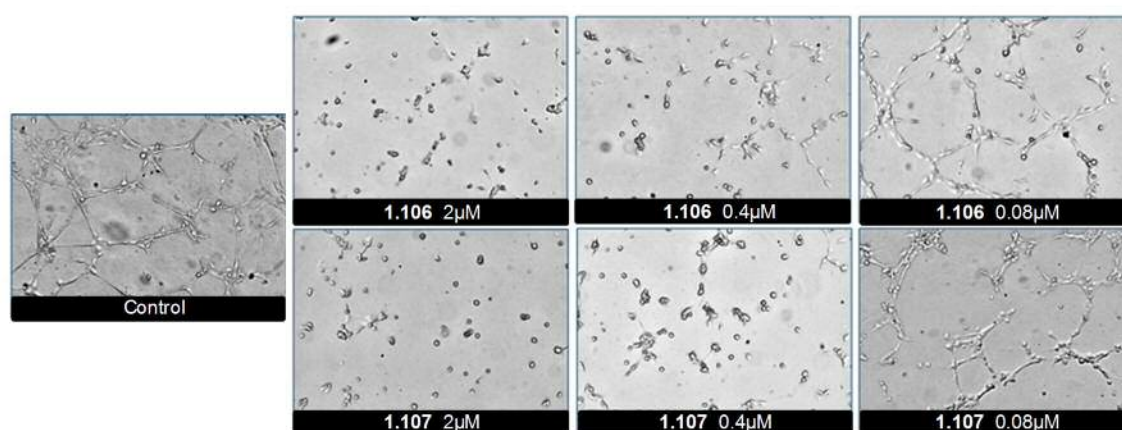


Figura 1.20. Efecto interruptor de los compuestos 1.106 y 1.107 sobre una red vascular de células endoteliales. Las células HMEC-1 se cultivaron sobre matrigel, donde crecen formando tubos. Tras 3 h se añadió DMSO (0.1%) como control negativo, o los compuestos **1.106** ó **1.107** (0.08, 0.4, y 2 μM). Fotografías tomadas con ImageJ Angiogenesis Analyzer tras 90 min de tratamiento con los compuestos **1.106** y **1.107**.

Para cuantificar este efecto, se comparó el número de redes, ramificaciones y la longitud de los vasos presentes en cada ensayo con lo observado en el experimento control (DMSO) expresados como % de diferencia con respecto al control. Para ambos compuestos, se observa que a concentraciones superiores a 0.4 μM no hay presencia de redes de vasos ni ramificaciones (valores próximos a -100). Además, la longitud de los vasos en las células tratadas ha disminuido más del doble (valores superiores a -50) con respecto al control. A una concentración de 0.08 μM el derivado **1.107** es ligeramente más activo que el compuesto **1.106**.

1.3.5.4. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL PROFÁRMACO DE 1.106

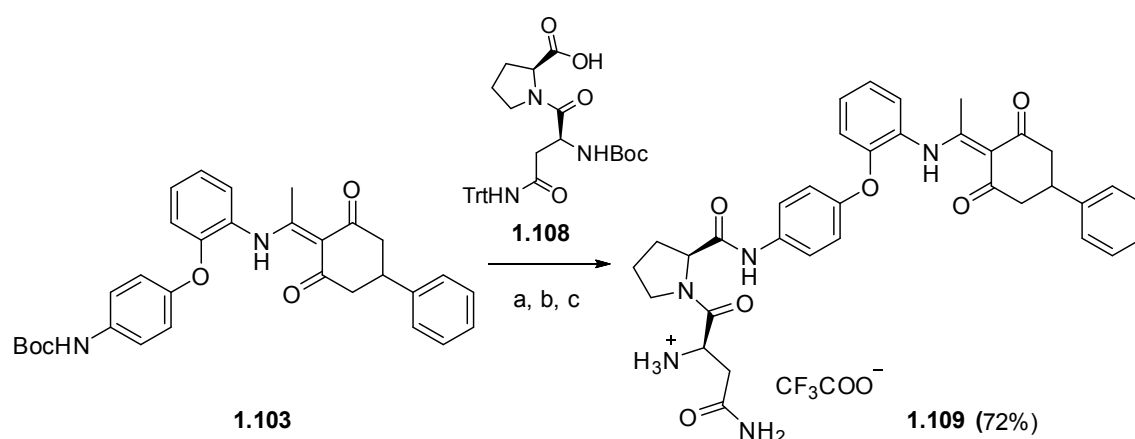
Como se deduce de la información aportada en los apartados previos, estos derivados de ciclohexanodionas que incorporan el anillo adicional E presentan una potente actividad antiproliferativa, con valores de K_a muy similares a colchicina, y los estudios del mecanismo de acción apoyan su actividad antimitótica y antivascular. Sin embargo, la baja solubilidad acuosa de las ciclohexanodionas constituye un problema recurrente. Como se comentó en el Apartado 1.3.2.2., la inclusión de una cadena de dietilenglicol (compuesto **1.23**) había permitido mejorar ligeramente la solubilidad pero aún se mantenía en valores muy bajos, inferiores a 0.05 mg/mL. Los compuestos **1.106** y **1.107**, descritos en estos apartados, con un grupo amino en el anillo E, permitían una estrategia alternativa para mejorar la solubilidad mediante la derivatización del grupo amino como profármaco.

La preparación de profármacos es una de las estrategias más habituales para mejorar la solubilidad acuosa de compuestos activos altamente hidrófobos. Un profármaco se define como una forma inactiva de la sustancia de interés que experimenta la conversión al compuesto activo dentro del organismo por un proceso químico o metabólico.³⁶ Normalmente, un profármaco consiste en un fármaco unido covalentemente a un grupo transportador, si bien la unión debe ser lo suficientemente lábil como para permitir que el fármaco se libere con facilidad en el organismo. Es importante resaltar que el transportador debe ser inerte biológicamente (no debe presentar ninguna actividad biológica ni ser tóxico), así como ser fácilmente metabolizable y excretable. En este sentido, los profármacos de aminoácidos han sido ampliamente utilizados para incrementar la solubilidad de fármacos con grupos hidroxilos o aminos libres, mediante la formación de un enlace éster o amida, respectivamente.³⁶⁻³⁸

Estudios recientes de nuestro grupo de investigación en síntesis de profármacos sobre grupos OH y NH₂ de distintos fármacos han puesto de manifiesto que el empleo de oligopéptidos mejora muy notablemente la solubilidad en agua.³⁹⁻⁴³ Además, la correcta elección de la secuencia peptídica permite su reconocimiento por la enzima endógena dipeptidil-peptidasa tipo IV (DPP-IV/CD26), presente en suero y en distintos tejidos, favoreciéndose de este modo la liberación del fármaco en su forma activa. La enzima CD26 se caracteriza por una gran especificidad de sustrato, dado que principalmente reconoce e hidroliza secuencias dipeptídicas que contienen una prolina en la penúltima posición del extremo *N*-terminal.⁴⁴⁻⁴⁶ Dentro de las secuencias que podrían conducir a un buen reconocimiento y liberación por CD26 se eligió el dipéptido Asn-Pro. Experimentos previos en nuestro grupo de investigación avalaban que la incorporación de este dipéptido permitía un incremento importante de la solubilidad acuosa gracias al amino primario de la posición α de la Asn y la amida de su cadena lateral, mientras que la prolina en penúltima posición permitiría el reconocimiento por CD26, y por tanto, la liberación del compuesto activo. Como compuesto activo se eligió el derivado **1.106**, con menor clogP que **1.107**.

a) Síntesis

La síntesis del profármaco de Asn-Pro de **1.106** se describe en el Esquema 1.19. Se utilizó como producto de partida el derivado protegido con Boc **1.103** y el dipéptido **1.108**, comercialmente disponible, donde el amino primario y la amida de la asparagina se encontraban protegidos con los grupos Boc y tritilo respectivamente.



Esquema 1.19. Reactivos y condiciones: (a) TFA, DCM, ta, 1 h; (b) HATU, DIPEA, DMF anh., MW, 40 °C, 2 h; (c) TFA, DCM, ta, 7 h 30 min.

Tras realizar la desprotección del grupo Boc de **1.103** por tratamiento con TFA, se llevó a cabo el acoplamiento de la amina resultante con el dipéptido (Esquema 1.19) empleando HATU y DIPEA, e irradiando con microondas a 40 °C durante 2 h. A continuación, por reacción con TFA, se desprotegieron los grupos Boc y tritilo obteniéndose el compuesto **1.109** con un rendimiento global de los 3 pasos de reacción del 72%.

b) Determinación de la solubilidad de **1.106** y **1.109**

La medida de la solubilidad de **1.106** y de su profármaco **1.109** en PBS se efectuó tal y como se ha descrito con anterioridad en este Capítulo. Así, el profármaco **1.109** presentó un valor de solubilidad de 265 µg/mL, más de 100 veces superior a la del compuesto padre **1.106**, cuyo valor de solubilidad fue de tan solo 2 µg/mL. Por tanto, la conjugación con el dipéptido Asn-Pro condujo a un incremento muy notable de la solubilidad respecto al compuesto precursor **1.106**.

c) Evaluación de la actividad antiproliferativa de **1.109**

Los resultados de la evaluación biológica del profármaco **1.109** en ensayos de proliferación celular se recogen en la Tabla 1.10 expresados como valores de CI_{50} . También se incluyen en esta tabla los datos del compuesto precursor con el grupo amino libre **1.106**, así como los de colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.10**) empleados como controles positivos.

Tabla 1.10. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (µM) del compuesto **1.106** y el profármaco **1.109** en células tumorales y endoteliales.

Comp.	$CI_{50}^{(a)}$ (µM)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
1.106	0.040 ± 0.002	0.037 ± 0.005	0.039 ± 0.000	0.047 ± 0.019
1.109	< 0.08	0.031 ± 0.009	0.034 ± 0.001	0.054 ± 0.003
Colchicina	0.010 ± 0.0006	0.013 ± 0.0004	0.0087 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0011
CA-4P	0.013 ± 0.0023	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.0029 ± 0.0001

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar

Tal y como se observa en la Tabla 1.10, el profármaco **1.109** mostró un efecto antiproliferativo equiparable a la del fármaco **1.106** en todas de las líneas celulares ensayadas. Estos datos parecían sugerir la adecuada bioconversión del profármaco **1.109** en cultivo celular.

d) Estudios de estabilidad en PBS y en suero fetal bovino

Dado el incremento en la solubilidad conseguido con el derivado dipeptídico **1.109**, y su excelente actividad antiproliferativa, comparable a la de su fármaco precursor **1.106**, se estudió la estabilidad de este profármaco **1.109** tanto a nivel químico como enzimático. Para los estudios de estabilidad química, el profármaco **1.109** se incubó en PBS a 37 °C. Se tomaron alícuotas tras distintos tiempos de incubación (0h, 1h, 3h, 6h y 24h), y se analizaron por HPLC. Del mismo modo, para los estudios de estabilidad enzimática el compuesto **1.109** se incubó en suero fetal bovino (SFB) al 10%. Conviene recordar que el suero bovino contiene DPPIV/CD26 en su forma soluble.⁴⁶ En la Figura 1.21 se representa el porcentaje de fármaco **1.106** liberado respecto a la cantidad de profármaco **1.109** inicial tras la incubación en PBS con barras verdes, y con barras azules para la incubación en suero (SFB).

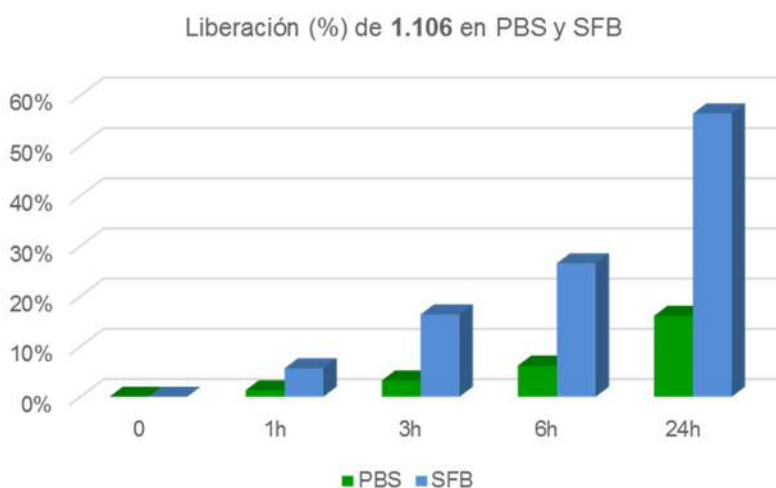


Figura 1.21. Porcentaje de fármaco 1.106 liberado tras la incubación del profármaco 1.109 en PBS y SFB 10% a 37 °C. Cada barra representa el % de compuesto **1.106** en cada intervalo de tiempo en PBS (barras verdes) y SFB 10% (barras azules).

Como se puede observar, la incubación del profármaco **1.109** en suero fetal bovino condujo a la liberación de aproximadamente el 60% del compuesto **1.106** (barras azules) tras 24h de incubación. Existe un pequeño porcentaje del profármaco que se hidroliza en PBS, aproximadamente un 16%, tras 24h. Por tanto, se puede concluir que la liberación de **1.106** ocurre preferentemente por vía enzimática (SFB) y no por vía química (PBS). Es probable que en el medio de cultivo el contenido enzimático sea más rico y la liberación de **1.106** sea más eficaz que la observada en la incubación con SFB. De hecho, conviene recordar que la actividad antiproliferativa en cultivo es muy similar para el profármaco **1.109** y para el compuesto padre **1.106**.

De lo contenido en este último apartado se puede concluir que el uso de la herramienta cGRILL aplicada a la estructura del complejo DAMA-colchicina-tubulina ha permitido identificar zonas no presentes en el complejo TUB075-tubulina. Así se han diseñado ligandos basados en **TUB075** que incorporan un anillo aromático adicional o anillo E. Los compuestos preparados en esta serie han mostrado actividad antiproliferativa muy notable, con valores de CI_{50} entre 0.037-0.082 μ M para los derivados más potentes. Ésto va acompañado de actividad antimetabólica, antivascular y de inducción de la apoptosis. Por último, mediante derivatización del grupo amino de **1.106** con el dipéptido Asn-Pro se ha preparado un profármaco mucho más soluble y que presenta un comportamiento similar en cuanto a actividad antiproliferativa en cultivo celular.

1.4. CONCLUSIONES

El punto de partida de este capítulo ha sido el compuesto **TUB075**, previamente sintetizado en nuestros laboratorios, que presentaba actividad VDA y antimetabólica por unión al sitio de colchicina en tubulina. Este compuesto mostraba una actividad antiproliferativa en el rango submicromolar ($CI_{50} = 0.09 - 0.19 \mu\text{M}$) y una constante de afinidad también submicromolar ($K_a = 1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), siendo su principal limitación la baja solubilidad ($S = 3 \mu\text{g/mL}$).

Con el propósito de mejorar la solubilidad de este compuesto se han llevado a cabo modificaciones estructurales que incorporaban grupos polares alargando el sustituyente en posición *orto* en el anillo D. En base a estudios de docking, se mantuvo el átomo de O como nexo de unión con el anillo D, de manera que el grupo polar terminal quedaba expuesto hacia la interfaz (zona más polar) de la subunidad α y β del heterodímero de tubulina. Entre todas las modificaciones propuestas, la incorporación de una cadena de dietilenglicol sobre el anillo D (compuesto **1.23**, Figura 1.22) supuso el mayor incremento de solubilidad aunque fue acompañado de la pérdida, en un orden de magnitud, de afinidad y actividad antiproliferativa.

Con el objetivo de determinar con exactitud el modo de unión de **TUB075** con tubulina, se abordó la resolución del complejo mediante cristalografía de rayos X. Este estudio permitió confirmar que **TUB075** se une de forma similar a TN-16, ocupando las zonas 2 y 3 del dominio de unión de colchicina. Además, se pudieron identificar las principales interacciones del ligando con los residuos de β tubulina.

Mediante el empleo de herramientas computacionales, se ha realizado el estudio de los mapas de afinidad del complejo cristalino TUB075-tubulina, lo que permitió identificar zonas de interacción adicionales próximas al anillo D. Así se diseñó la incorporación de un anillo de benzofurano como anillo D y posterior funcionalización de la posición 2 del mismo. Fruto de ello se obtuvo el compuesto **1.57** (Figura 1.22), con actividad antiproliferativa en el rango nanomolar (8 - 31 nM) y con una elevada afinidad por tubulina ($K_a = 2.87 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), siendo el ligando del sitio de colchicina con la mayor constante de asociación descrita hasta la fecha. Estos resultados avalan la eficacia de la estrategia de diseño racional utilizada para mejorar la afinidad de esta familia de ligandos por tubulina.

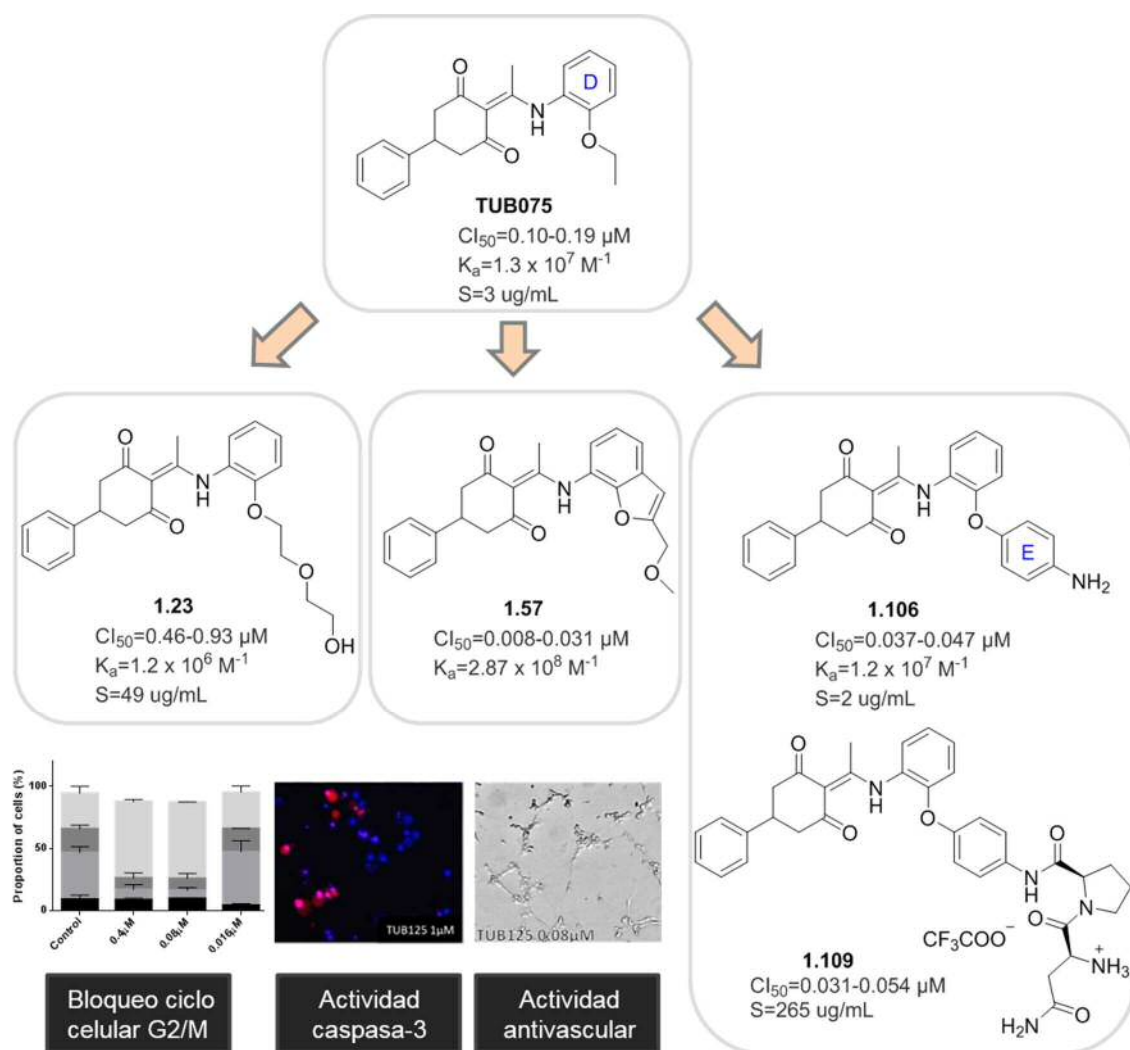


Figura 1.22. Estructuras del hit **TUB075** y de los derivados más destacados de este capítulo (**1.23**, **1.57**, **1.106** y **1.109**), incluyendo los valores de Cl_{50} , K_a y solubilidad. Se incluyen las principales actividades biológicas evaluadas.

Otra aproximación empleada para explorar el sitio de unión ha consistido en el estudio de los mapas de afinidad del complejo DAMA-colchicina-tubulina sobre los que se superpuso la estructura de **TUB075**, y que permitió identificar nuevas zonas de interacción no exploradas por este compuesto. Así, se propuso la incorporación de un anillo aromático adicional (anillo E) manteniendo de nuevo el átomo de O como nexo de unión con el anillo D. Sobre el nuevo anillo se introdujeron sustituyentes de distinta naturaleza, obteniendo en todos los casos compuestos con actividad en el rango submicromolar. Uno de los ligandos obtenidos, el compuesto **1.106**, mostró una actividad antiproliferativa un orden de magnitud inferior con respecto al hit **TUB075**. Además, la presencia de un grupo amino permitió la aplicación de una estrategia profármaco por conjugación con el dipéptido Asn-Pro. De esta forma, se sintetizó el derivado **1.109** que mostró una actividad antiproliferativa comparable a **1.106** y resultó

ser 100 veces más soluble. Se puede concluir que la modificación racional de la estructura del ligando **TUB075** persiguiendo interacciones adicionales con la proteína y posterior aplicación de una estrategia profármaco, ha sido una vía muy eficaz de optimización del hit **TUB075**, consiguiendo con el derivado **1.109** tanto un incremento de solubilidad como un aumento en la actividad antiproliferativa. Además, tras evaluar la estabilidad del profármaco **1.109**, se pudo concluir que la liberación de **1.106** ocurre preferentemente por vía enzimática (SFB) y no por vía química (PBS). Por todo esto, se podría considerar al profármaco **1.109** como un buen candidato para la futura evaluación *in vivo* de esta familia de ciclohexanodionas.

Estudios biológicos adicionales llevados a cabo con los compuestos más destacados han mostrado su capacidad para detener el ciclo celular en la fase G2/M a una concentración de 0.08 - 0.4 μM , siendo un orden de magnitud inferior a la necesaria para ver un efecto similar con **TUB075** (0.3 - 1 μM). Adicionalmente, se ha confirmado la capacidad de estos ligandos para inducir la apoptosis mediante técnicas de inmunofluorescencia para caspasa-3. Además, se ha comprobado su actividad antivascular por interrupción de una red de vasos endoteliales previamente formados. Conforme al objetivo fijado, con estos experimentos se ha corroborado la actividad dual antimitótica e interruptora de la vascularización tumoral de los nuevos derivados.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Canela, M. D.; Pérez-Pérez, M. J.; Noppen, S.; Saez-Calvo, G.; Diaz, J. F.; Camarasa, M. J.; Liekens, S.; Priego, E. M. Novel colchicine-site binders with a cyclohexanedione scaffold identified through a ligand-based virtual screening approach. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3924-3938.
2. Canela, M. D.; Bueno, O.; Noppen, S.; Saez Calvo, G.; Estevez Gallego, J.; Diaz, J. F.; Camarasa, M. J.; Liekens, S.; Pérez-Pérez, M. J.; Priego, E. M. Targeting the colchicine site in tubulin through cyclohexanedione derivatives. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 19492-19506.
3. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock and AutoDockTools: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.
4. Ravelli, R. B. G.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.
5. Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli, R. B.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossowa, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2009**, *106*, 13775-13779.
6. Massarotti, A.; Coluccia, A.; Silvestri, R.; Sorba, G.; Brancale, A. The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 33-42.
7. Tang, C.; Gu, G.; Wang, B.; Deng, X.; Zhu, X.; Qian, H.; Huang, W. Design, synthesis, and biological evaluation of andrographolide derivatives as potent hepatoprotective agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83*, 324-333.
8. Durrant, D. E.; Richards, J.; Tripathi, A.; Kellogg, G. E.; Marchetti, P.; Eleopra, M.; Grisolia, G.; Simoni, D.; Lee, R. M. Development of water soluble derivatives of *cis*-3, 4', 5-trimethoxy-3'-aminostilbene for optimization and use in cancer therapy. *Invest New Drugs* **2009**, *27*, 41-52.
9. Nitta, A.; Iura, Y.; Inoue, H.; Sato, I.; Morihira, K.; Kubota, H.; Morokata, T.; Takeuchi, M.; Ohta, M.; Tsukamoto, S.-i.; Imaoka, T.; Takahashi, T. Pyrrolidinyl phenylurea derivatives as novel CCR3 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6876-6881.
10. Muñoz, F. J.; Andre, S.; Gabius, H.-J.; Sinisterra, J. V.; Hernaiz, M. J.; Linhardt, R. J. Green glycosylation using ionic liquid to prepare alkyl glycosides for studying carbohydrate-protein interactions by SPR. *Green Chem.* **2009**, *11*, 373-379.
11. Alexander, R. P.; Aujla, P.; Crepy, K. V. L.; Foley, A. M.; Franklin, R. J.; Haughan, A. F.; Horsley, H. T.; Jones, W. M.; Lallemant, B. I.; Frederique, L.; Mack, S. R.; Morgan, T.; Pasau, P. M.; Phillips, D. J.; Sabin, V. M.; Buckley, G. M.; Jenkins, K.; Perry, B. G. Fused thiazole derivatives as kinase inhibitors. WO 2008001076A1, 2008.
12. Hersperger, R.; Janser, P.; Pfenninger, E.; Wuethrich, H. J.; Miltz, W. Chemokine receptor antagonists. WO2005077932A3, 2005.

13. Leynadie, D.; Peyrot, V.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Andreu, J. M.; Renner, G. A.; Temple, C. Tubulin binding of two 1-deaza-7,8-dihydropteridines with different biological properties: enantiomers NSC 613862 (S)-(-) and NSC 613863 (R)-(+). *Biochemistry* **1993**, *32*, 10675-10682.
14. Barbier, P.; Dorléans, A.; Devred, F.; Sanz, L.; Allegro, D.; Alfonso, C.; Knossow, M.; Peyrot, V.; Andreu, J. M. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31672-31681.
15. Diaz, J. F.; Andreu, J. M. Kinetics of dissociation of the tubulin-colchicine complex - Complete reaction scheme and comparison to thermodynamic measurements. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2890-2896.
16. Cortese, F.; Bhattacharyya, B.; Wolff, J. Podophyllotoxin as a probe for colchicine binding-site of tubulin. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1134-1140.
17. Gago, F. Available at <http://farmamol.uah.es>.
18. Cortes-Cabrera, A.; Gago, F.; Morreale, A. A computational fragment-based de novo design protocol guided by ligand efficiency indices (LEI). In *Fragment-Based Methods in Drug Discovery*, Klöner, A. E., Ed. Springer New York: New York, NY, 2015; pp 89-100.
19. Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849-857.
20. Kundu, N. G.; Chaudhuri, G.; Upadhyay, A. Palladium-catalyzed heteroannulation leading to heterocyclic structures with two heteroatoms: A highly regio- and stereoselective synthesis of (Z)-4-alkyl-2-alkyl(aryl)idene-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines and (Z)-3-alkyl(aryl)idene-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 20-29.
21. Rao, U.; Balasubramanian, K. K. Claisen rearrangement of aryl propargyl ethers in poly(ethylene glycol) - a remarkable substituent and solvent effect. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5023-4.
22. Li, X.; Zhou, X.; Zheng, Z.; Zhong, W.; Xiao, J.; Li, S. Short synthesis of 1-(3-*tert*-butyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)-3-(5-(2-morpholinoethoxy)-2H-chromen-8-yl)urea derivatives. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 3999-4009.
23. Thennati, R.; Samanta, B.; Pal, R. K.; Kumbhani, A. S.; Adhyapak, J. P.; Akolkar, N. P.; Parmar, P.; Dubey, M. Quinoline derivatives as renin inhibitors. WO2013088452A2, 2013.
24. Nevagi, R. J.; Dighe, S. N.; Dighe, S. N. Biological and medicinal significance of benzofuran. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 561-581.
25. Allan, M.; Manku, S.; Therrien, E.; Nguyen, N.; Styhler, S.; Robert, M.-F.; Goulet, A.-C.; Petschner, A. J.; Rahil, G.; Robert, M. A.; Deziel, R.; Besterman, J. M.; Nguyen, H.; Wahhab, A. N-Benzyl-1-heteroaryl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamides as inhibitors of co-activator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1218-1223.
26. Xiao, D.; Cheng, L.; Liu, X.; Hu, Y.; Xu, X.; Liu, Z.; Zhang, L.; Wu, W.; Wang, S.; Shen, Y.; Li, G.; Wang, Y.; Zhao, S.; Li, C.; Tang, J.; Yu, H. 2,4-Diamino-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[2,3]pyrimidine derivatives as FAK/Pyk2 inhibitors. WO2012092880A1, 2012.

27. Trapella, C.; Fischetti, C.; Pela, M.; Lazzari, I.; Guerrini, R.; Calo, G.; Rizzi, A.; Camarda, V.; Lambert, D. G.; McDonald, J.; Regoli, D.; Salvadori, S. Structure-activity studies on the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist 1-benzyl-N-{3-[spiroisobenzofuran-1(3H),4'-piperidin-1-yl]propyl} pyrrolidine-2-carboxamide. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5080-5095.
28. Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.
29. Liekens, S.; Gijssbers, S.; Vanstreels, E.; Daelemans, D.; De Clercq, E.; Hatse, S. The nucleotide analog cidofovir suppresses basic fibroblast growth factor (FGF2) expression and signaling and induces apoptosis in FGF2-overexpressing endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 695-703.
30. Darzynkiewicz, Z.; Zhao, H.; Halicka, H. D.; Rybak, P.; Dobrucki, J.; Wlodkovic, D. DNA damage signaling assessed in individual cells in relation to the cell cycle phase and induction of apoptosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2012**, *49*, 199-217.
31. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V.; El-Deiry, W. S.; Golstein, P.; Green, D. R.; Hengartner, M.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lipton, S. A.; Malorni, W.; Nunez, G.; Peter, M. E.; Tschopp, J.; Yuan, J.; Piacentini, M.; Zhivotovsky, B.; Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 3-11.
32. Ilić, M.; Ilaš, J.; Dunkel, P.; Mátyus, P.; Boháč, A.; Liekens, S.; Kikelj, D. Novel 1,4-benzoxazine and 1,4-benzodioxine inhibitors of angiogenesis. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 160-170.
33. Hwang, J.; Li, P.; Carroll, W. R.; Smith, M. D.; Pellechia, P. J.; Shimizu, K. D. Additivity of substituent effects in aromatic stacking interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14060-14067.
34. Lim, K. S.; Lee, H.; Kim, S. E.; Ha, T. H.; Ann, J.; Son, K.; Choi, S.; Sun, W.; Pearce, L. V.; De Andrea-Lazarus, I. A.; Blumberg, P. M.; Lee, J. The carbonate analogues of 5'-halogenated resiniferatoxin as TRPV1 ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 233-243.
35. Hopkins, A. L.; Keserue, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 105-121.
36. Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
37. Nam, N. H.; Kim, Y.; You, Y. J.; Hong, D. H.; Kim, H. M.; Ahn, B. Z. Water soluble prodrugs of the antitumor agent 3-[(3-amino-4-methoxy) phenyl]-2-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) cyclopent-2-ene-1-one. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1021-1029.
38. Delmonte, A.; Sessa, C. AVE8062: a new combretastatin derivative vascular disrupting agent. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2009**, *18*, 1541-1548.
39. García-Aparicio, C.; Bonache, M. C.; Meester, I. D.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Design and discovery of a novel dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-based prodrug approach. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5339-5351.

40. García-Aparicio, C.; Diez-Torrubia, A.; Balzarini, J.; Lambeir, A. M.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J. Efficient conversion of tetrapeptide-based TSAO prodrugs to the parent drug by dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV/CD26). *Antiviral Res.* **2007**, *76*, 130-139.
41. Diez-Torrubia, A.; García-Aparicio, C.; Cabrera, S.; Meester, I. D.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Application of the dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) based prodrug approach to different amine-containing drugs. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 559-572.
42. Diez-Torrubia, A.; Balzarini, J.; Andrej, G.; Snoeck, R.; Meester, I. D.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Dipeptidyl peptidase IV dependent water-soluble prodrugs of highly lipophilic bicyclic nucleoside analogues. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1927-1942.
43. Velázquez, S.; de Castro, S.; Diez-Torrubia, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26)-activated prodrugs: a successful strategy for improving water solubility and oral bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1041-1054.
44. Vanhoof, G.; Goossens, F.; Meester, I. D.; Hendriks, D.; Scharpe, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **1995**, *9*, 736-744.
45. Meester, I. D.; Korom, S.; Damme, J. V.; Scharpé, S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today* **1999**, *20*, 367-375.
46. Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* **1999**, *85*, 9-24.

CAPÍTULO 2

CHALCONAS Y MIMÉTICOS COMO ESQUELETOS ALTERNATIVOS A LAS COMBRETASTATINAS

2.1. ANTECEDENTES

Como se ha comentado en la introducción, otras combretastatinas además de CA-4 (**i.4**) han mostrado actividad antimitótica y VDA. Inspirados en la estructura de la combretastatina A2 (**i.9**) y en los buenos datos de actividad antiproliferativa de chalconas derivadas de la CA-4¹ y de otras chalconas,²⁻⁶ en nuestro grupo de investigación se sintetizaron una serie de chalconas cuyo anillo A presentaba el patrón de sustitución de la CA-2.⁷ De todas las chalconas sintetizadas, las α -metilchalconas **TUB092** (**2.1**) y **TUB091** (**2.2**) (Figura 2.1) presentaron valores de Cl_{50} en el rango nanomolar. En particular, el aminoderivado **TUB091** resultó ser más potente que compuestos tan activos como colchicina (**i.3**) o CA-4P (**i.10**). Además, el compuesto **TUB092** mostró una alta afinidad por tubulina con un valor de $K_a = (1.3 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. La chalcona **TUB092** se había obtenido como un único isómero de configuración *E*, mientras que **TUB091** se obtuvo como mezcla de isómeros *E/Z* en una relación 85/15. La asignación *E/Z* de estas α -metilchalconas se realizó mediante estudios de ¹H RMN y experimentos ROESY.⁷

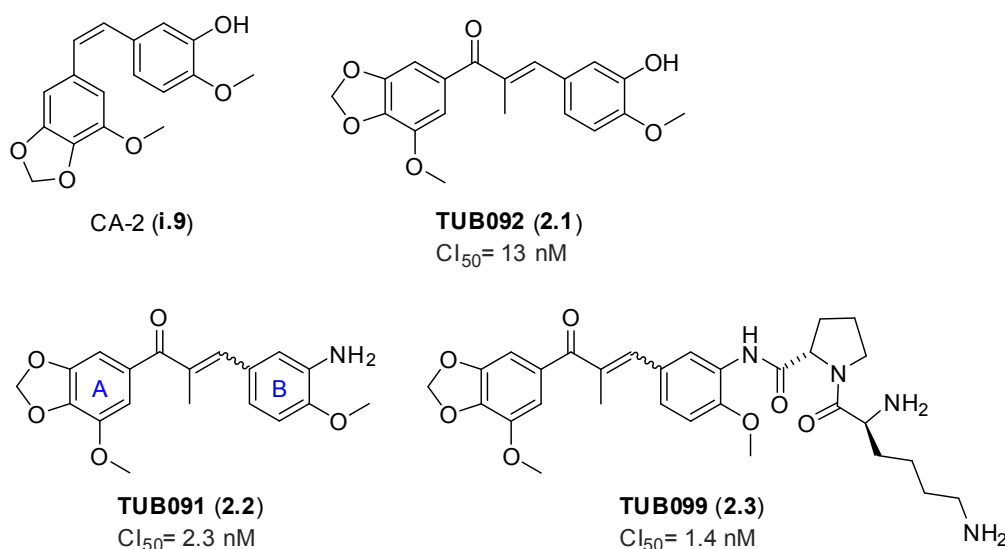


Figura 2.1. Estructuras y valores de Cl_{50} en células endoteliales (HMEC-1) de las chalconas más significativas sintetizadas previamente en el grupo de investigación.

Como estrategia para mejorar la solubilidad de la aminochalcona **TUB091**, el compuesto más activo, se abordó la síntesis de profármacos. De este modo, se obtuvo el compuesto **TUB099** (**2.3**, Figura 2.1), derivado dipeptídico de Lys-Pro de **TUB091** que, tras su evaluación antiproliferativa, mostró una actividad comparable a la de su precursor **TUB091**, pero con un valor de solubilidad dos mil veces superior ($S = 31 \text{ mg/mL}$). Estudios de incubación en suero y en extracto de hígado de ratón de **TUB099**

pusieron de manifiesto una liberación eficaz de **TUB091**. El compuesto **TUB099** se obtuvo como mezcla de isómeros *E/Z*, en este caso en proporción 2/1.

Cabe destacar que, conforme a precedentes bibliográficos donde se habían realizado estudios de docking para otras chalconas que se unen al sitio de colchicina en tubulina,⁸ se considera que el isómero *E* es el que mejor se adapta al sitio de unión en la proteína.

2.2. OBJETIVOS

Como se ha resumido en los antecedentes, las α -metilchalconas **TUB091** y **TUB092** presentan una potente actividad antiproliferativa en el rango nM frente a células endoteliales y tumorales, uniéndose al dominio de colchicina en tubulina con una alta afinidad como lo evidencia el valor de K_a de **TUB092** del orden de 10^7 M^{-1} . Además, la derivatización como profármaco de **TUB091** por conjugación con el dipéptido Lys-Pro mejoraba muy notablemente su solubilidad. Sin embargo, este profármaco se había obtenido como mezcla de isómeros *E/Z* en una relación 2/1, si bien, conforme a precedentes bibliográficos, la actividad debería ser atribuible sólo al isómero *E*. Los objetivos que se han abordado en este capítulo han sido:

1. Estudio de la isomerización *E/Z* de la metilchalcona **TUB099** y modificaciones en el procedimiento de síntesis para obtener mayoritariamente el isómero *E*.
2. Síntesis de un análogo conformacionalmente restringido de **TUB091** mediante ciclación sobre el anillo A.
3. Estudio del modo de unión de **TUB092** a tubulina mediante resolución por difracción de Rayos X del complejo cristalino TUB092-tubulina.
4. Diseño y síntesis de nuevos análogos conformacionalmente restringidos mediante ciclación sobre el anillo B.
5. Determinación de las propiedades antiproliferativas en cultivo celular y de la constante de asociación en el sitio de colchicina en tubulina de los nuevos productos sintetizados.
6. Estudios de docking de los nuevos compuestos en el dominio de unión de colchicina en tubulina.
7. Ensayos *in vivo* del profármaco **TUB099** en ratones para la determinación de la capacidad antitumoral y antimetastásica.

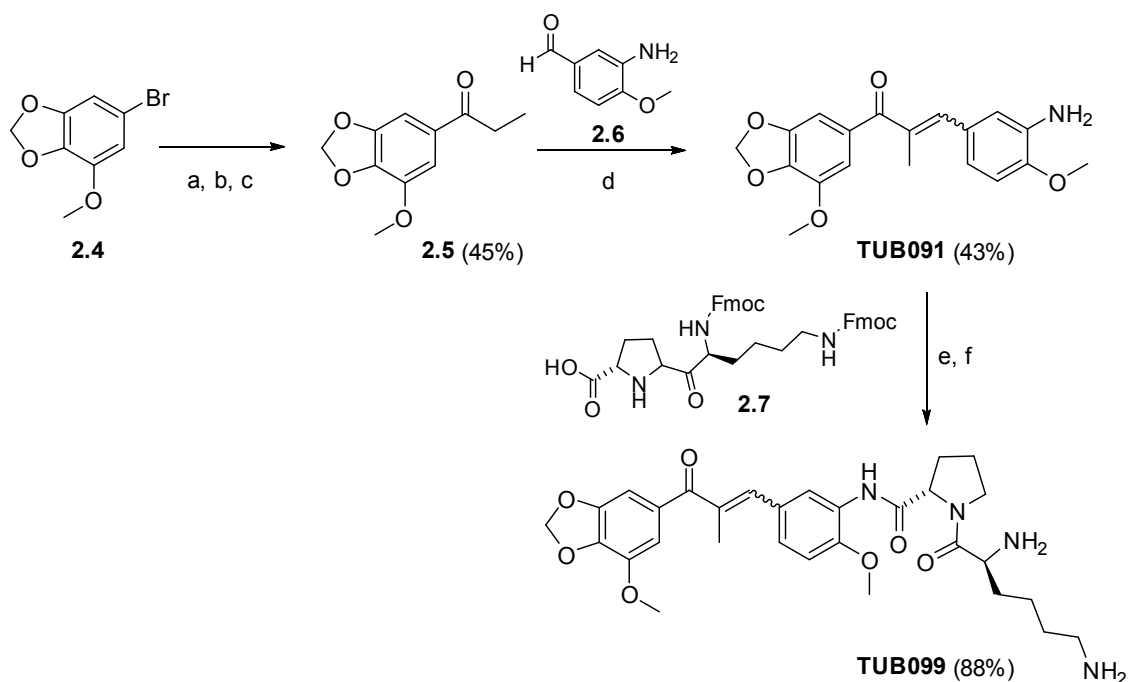
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. ISOMERIZACIÓN *E/Z* DE TUB091 Y SÍNTESIS MEJORADA DE TUB099

Como se ha comentado en los antecedentes de este capítulo, la α -metilchalcona **TUB091**, que presentaba una excelente capacidad antiproliferativa, se había obtenido como mezcla de isómeros *E/Z* en proporción 85/15, siendo atribuible la actividad al isómero *E*. Este compuesto se derivatizó como profármaco conjugándolo con el dipéptido Lys-Pro observándose en el profármaco resultante **TUB099** una relación 2/1 de isómeros *E/Z*. Por tanto, al aumentar el número de pasos de síntesis, parecía incrementarse la proporción de isómero *Z*. Además, cuando una disolución de **TUB099** se dejaba expuesta a la luz, se producía un aumento de la proporción del isómero *Z*. Presumiblemente se estaba produciendo un fenómeno de fotoisomerización, del que existían algunos precedentes en compuestos similares.⁹⁻¹⁰

Para comprobarlo, se prepararon dos disoluciones del profármaco **TUB099** en metanol, de las cuales una se expuso a la luz y la otra se protegió de la misma. Por HPLC se analizaron distintas alícuotas de ambas disoluciones en función del tiempo (0h, 1h, 3h, 6h y 24h). Los resultados obtenidos confirmaron que la disolución expuesta a la luz fue enriqueciéndose en el isómero minoritario (isómero *Z*), alcanzando una proporción *E/Z* 36/64 tras 24h, mientras que la que no había sido expuesta a la luz mantenía la relación *E/Z* inicial.

Una vez confirmado que la fotoisomerización tenía lugar, se llevó a cabo la síntesis de **TUB091** y su profármaco **TUB099** en ausencia de luz para minimizar la formación del isómero *Z* (pasos d, e y f en el Esquema 2.1). De manera análoga a la descrita en nuestro grupo,⁷ mediante reacción del derivado bromado **2.4** con *n*-BuLi y propionaldehído y posterior oxidación por tratamiento con PCC se obtuvo la propiofenona **2.5**. La condensación de **2.5** y el benzaldehído **2.6** se realizó en etanol en presencia de piperidina, AcOH, tamiz molecular a 80 °C durante 16h⁷ y en ausencia de luz, obteniéndose así la α -aminochalcona **TUB091** con una relación *E/Z* 92/8 y un rendimiento del 43%. Finalmente, para la síntesis del derivado de Lys-Pro **TUB099**, se llevó a cabo el acoplamiento de la chalcona **TUB091** con el dipéptido Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (**2.7**),¹¹ previamente sintetizado (Esquema 2.1). El acoplamiento se realizó empleando HATU y DIPEA, e irradiando al microondas a 40 °C. A continuación, se desprotegieron los grupos Fmoc por reacción con piperidina, obteniéndose el compuesto **TUB099** con un rendimiento del 88%.



Esquema 2.1. Reactivos y condiciones: (a) *n*-BuLi, -32 °C, TBME anh., 1 h. (b) CH₃CH₂CHO, -20 °C, 2 h. (c) PCC, CH₂Cl₂, 25 °C, 2 h; (d) Piperidina, AcOH, EtOH, tamiz molecular 4 Å, 80 °C, 16 h; (e) HATU, DIPEA, DMF anh., MW, 40 °C, 2 h.; (f) Piperidina, CH₂Cl₂, 25 °C, 2 h.

A modo comparativo se muestran en la Figura 2.2 los espectros de ¹H-RMN del compuesto obtenido en presencia de luz (espectro superior), y del compuesto obtenido al realizar la síntesis en ausencia de luz (espectro inferior), destacando las señales más características (Figura 2.2). Por HPLC, esta segunda muestra se cuantificó como una mezcla *E/Z* 94/6. Por tanto, evitando la exposición prolongada a la luz, se consiguió obtener **TUB099** muy enriquecido en el isómero *E*. En el último apartado de este capítulo se comentarán los ensayos biológicos realizados con este profármaco.

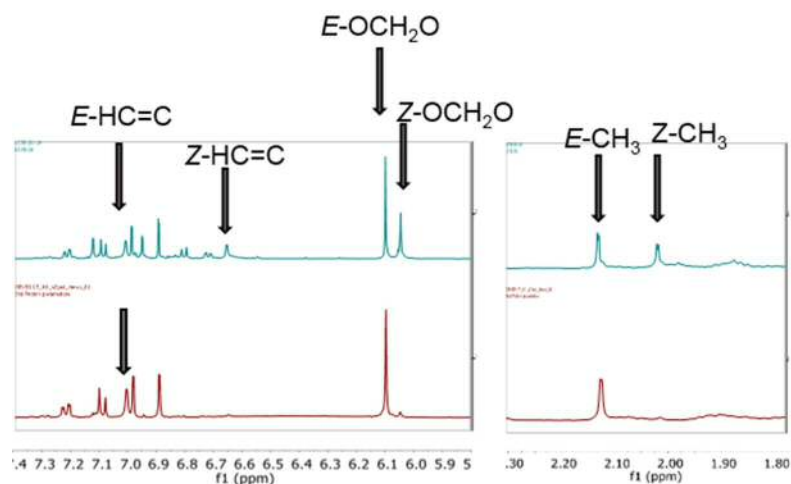


Figura 2.2. Comparativa de los espectros de ¹H-RMN de **TUB099** obtenidos tras la síntesis en presencia o ausencia de luz, destacando las señales más características de los isómeros *E* y *Z*. En ausencia de luz no se observa la formación del isómero *Z*.

Con el compuesto **TUB091** sintetizado se procedió a medir su constante de afinidad por tubulina. La K_a del derivado hidroxilado **TUB092** se había determinado por desplazamiento de R-PT (**i.31**) y disminución de la fluorescencia, de un modo similar a las determinaciones descritas en el Capítulo 1. Sin embargo, en el caso de la chalcona **TUB091**, su unión a tubulina provocaba fluorescencia, por lo que no fue posible emplear el desplazamiento de R-PT para la determinación de su constante de afinidad. Por ello, se realizó un experimento inverso, es decir, sobre una disolución de tubulina con la aminochalcona **TUB091** se añadieron concentraciones crecientes de la hidroxichalcona **TUB092** (Figura 2.3), cuya constante de afinidad ya se había determinado [$(1.3 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$]. Se pudo así medir el valor de K_a para la aminochalcona **TUB091** [$K_a = (1.3 \pm 0.0) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$], valor muy similar al de colchicina y a la del derivado con OH. Para la puesta a punto del experimento y determinación de esta constante, me desplazé al laboratorio del Dr. José Fernando Díaz en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), donde se realizaron las medidas.

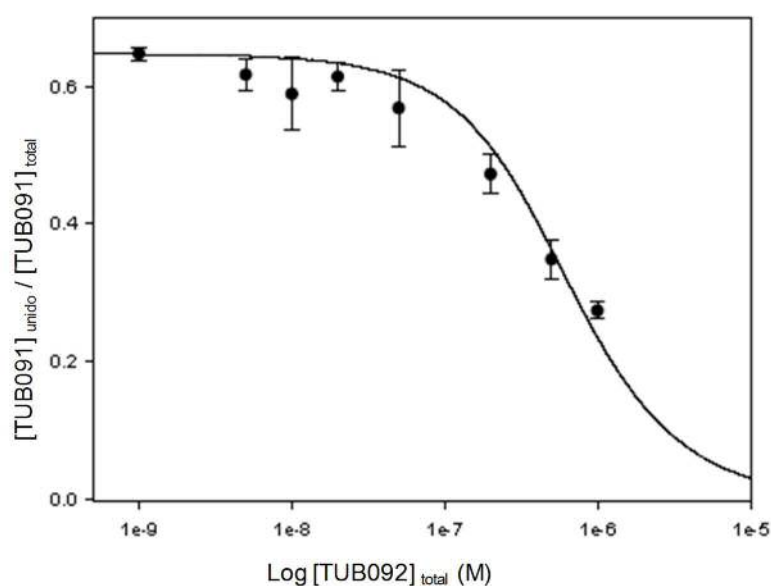


Figura 2.3. La chalcona **TUB092** desplaza a **TUB091** del sitio de colchicina de forma concentración-dependiente. Se evaluó el desplazamiento de **TUB091** por adición de concentraciones crecientes del compuesto **TUB092** empleando $0.4 \mu\text{M}$ del compuesto **TUB091** y $0.4 \mu\text{M}$ de tubulina en PBS con 0.1 mM de GTP a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores se obtuvieron una vez alcanzado el equilibrio, asumiendo una unión tubulina:compuesto 1:1.

2.3.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS POR CICLACIÓN SOBRE EL ANILLO A

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad biológica de las metilchalconas debería ser atribuible sólo al isómero *E*. Una posible estrategia para restringir la conformación de **TUB091** en su forma *E* podría consistir en la construcción de un anillo de 5 miembros entre el carbono β de la chalcona y la posición *orto* a la cetona en el anillo A, anillo que además incorporaría el metilo en posición α a la cetona, tal como se muestra en la Figura 2.4.

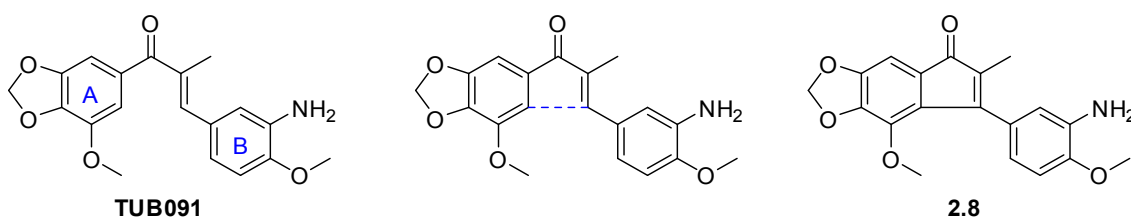
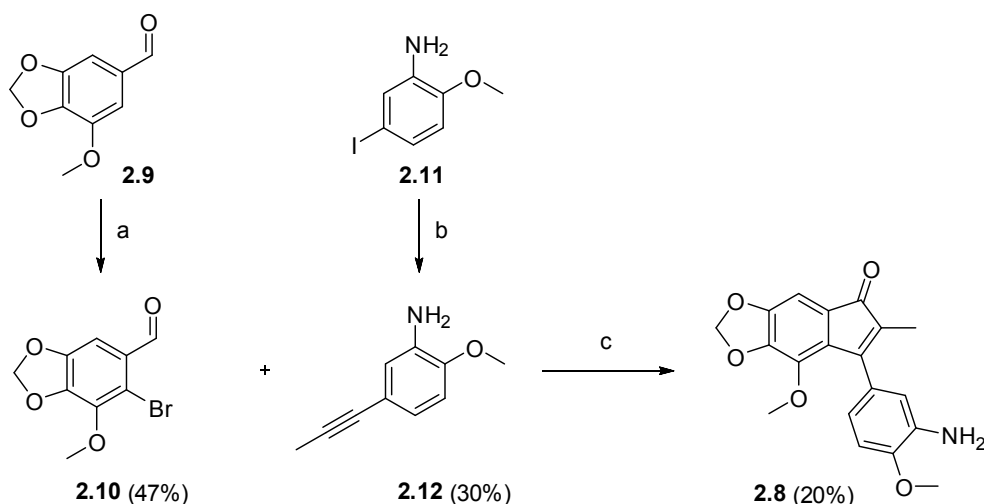


Figura 2.4. Estructura del isómero *E* de **TUB091**, posiciones implicadas en la ciclación y estructura del nuevo derivado propuesto **2.8**.

Para la síntesis del derivado ciclado **2.8**, se siguió el procedimiento sintético que se recoge en el Esquema 2.2. Por un lado, se llevó a cabo la bromación de **2.9** con NBS en presencia de ácido acético a 70 °C,¹² obteniendo así el compuesto **2.10** con un rendimiento moderado (47%), ya que además de este compuesto que incorporaba un bromo en la posición 6, se obtuvo también su isómero de posición con un bromo en la posición 4, siendo la proporción de ambos isómeros 6:4.

Por otro lado, siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía,¹³ se llevó a cabo el acoplamiento descarboxilativo del yoduro **2.11** con el ácido 2-butinoico en presencia de CuI, K₂CO₃ y PPh₃ en DMSO, dando lugar al compuesto **2.12** con una conversión del 5%. El bajo rendimiento obtenido condujo a emplear otros disolventes: en DMF, la reacción no tenía lugar, mientras que en acetonitrilo, se obtuvo una conversión del 38% y un rendimiento de producto aislado del 30%. La sustitución de K₂CO₃ por Cs₂CO₃ mantuvo inalterado el producto de partida. Igualmente, el empleo de fenantrolina en lugar de PPh₃ tampoco condujo al producto deseado. Por tanto, las condiciones elegidas fueron CuI, K₂CO₃ y PPh₃ en acetonitrilo, como se indica en el Esquema 2.2, si bien el rendimiento obtenido del alquino **2.12** fue del 30%.



Esquema 2.2. Reactivos y condiciones: (a) NBS, AcOH, 70 °C, 1 h; (b) ácido 2-butinoico, CuI, K₂CO₃, PPh₃, CH₃CN anh., tubo de presión, 90 °C, 24 h; (c) Pd(OAc)₂, NaOAc, TBACl, DMF, 100 °C, 20 h.

Una vez preparados los sintones **2.10** y **2.12**, se procedió a la síntesis de la indenona **2.8** siguiendo el procedimiento descrito por Larock y col.,¹⁴ utilizado también por otros autores,¹⁵⁻¹⁶ mediante ciclación catalizada por Pd. Así, la reacción del bromuro **2.10** con el alquino **2.12** en presencia de Pd(OAc)₂, NaOAc y TBACl en DMF a 100 °C condujo a la indenona **2.8** con un rendimiento del 20%. En este punto se procedió a la evaluación del compuesto en cultivo celular y a comparar los datos obtenidos con los del compuesto **TUB091**, tal y como se recoge en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Actividad antiproliferativa expresada como CI₅₀ (μM) de los compuestos **TUB091** y **2.8**, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	CI ₅₀ ^(a) (μM)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
TUB091	0.0010 ± 0.0007	0.0010 ± 0.0007	0.0039 ± 0.0033	0.0023 ± 0.0005
2.8	4.8 ± 0.5	0.65 ± 0.25	2.0 ± 1.4	0.31 ± 0.05
Colchicina	0.010 ± 0.0006	0.013 ± 0.001	0.0087 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0011
CA-4P	0.013 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.0029 ± 0.0001

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

Como se puede observar en la Tabla 2.1, el compuesto **2.8** sufre una pérdida de actividad de entre 2 y 3 órdenes de magnitud con respecto al compuesto **TUB091**. Estos datos pueden llevar a concluir que la restricción conformacional introducida en la indenona **2.8** no parece la más adecuada para mimetizar la conformación de la chalcona **TUB091**. Por tanto, se consideró que esta aproximación no merecía ser explorada con más profundidad.

2.3.3. ESTRUCTURA DE RAYOS X DEL COMPLEJO TUB092-TUBULINA

Las metilchalconas **TUB091** y **TUB092** presentaban una alta afinidad por tubulina, del orden de 10^7 M^{-1} , similar a la del ligando de referencia colchicina. Con el fin de determinar el modo de unión de estas chalconas con $\alpha\beta$ -tubulina, se abordó la resolución por Rayos X del complejo cristalino formado por dos unidades de $\alpha\beta$ -tubulina (T2), la proteína tipo estatmina RB3 y la tubulina-tirosina ligasa (TTL) como soporte estructural junto al ligando **TUB092**, complejo que se determinó con una resolución de 2.4 Å. Este estudio ha sido llevado a cabo por los Dres. Andrea Prota y Michel O. Steinmetz, del Paul Scherrer Institut (Villigen, Suiza) en colaboración con el Dr. José Fernando Díaz del CIB-CSIC (Madrid). La estructura cristalina del complejo T2R-TTL-TUB092 ha sido depositada en el RCSB Protein Data Bank¹⁷⁻¹⁸ con el código 5JVD (Figura 2.5).

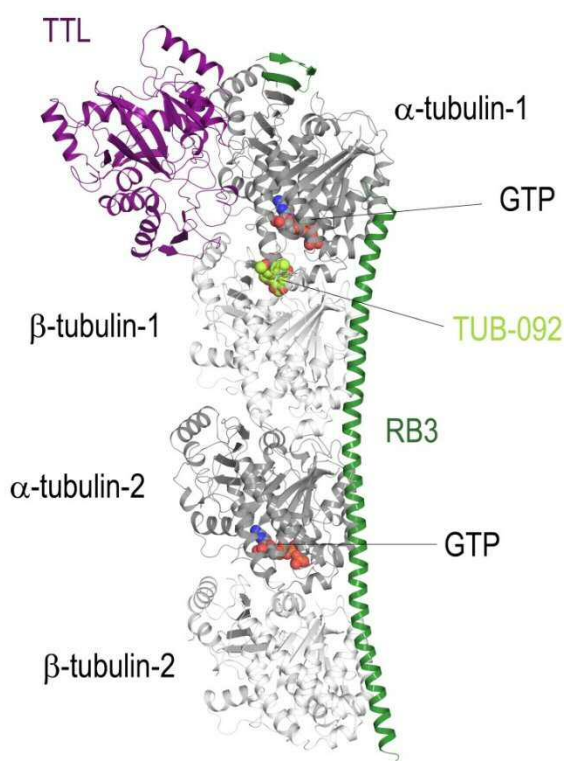


Figura 2.5. Estructura del complejo T2R-TTL-TUB092.

El compuesto **TUB092** (Figura 2.5, representado en verde) se aloja en el sitio de unión de colchicina, colocándose en un bolsillo formado por residuos de las hebras S8 y S9, el loop T7 y las hélices H7 y H8 de la subunidad de β -tubulina así como el loop T5 de α -tubulina. Cabe destacar además que la conformación bioactiva de **TUB092** corresponde con la configuración *E* (s-trans) del doble enlace, como ya se había propuesto (Figura 2.6).

Al analizar las interacciones del ligando con tubulina (Figura 2.6), se observa que el anillo de 1,3-benzodioxol (anillo A) de **TUB092** se aloja en un bolsillo hidrofóbico en la subunidad de β -tubulina formado por las cadenas laterales de los residuos Cys β 241, Leu β 242, Leu β 248, Ala β 250, Leu β 255, Met β 259, Ala β 316, Ile β 318, Lys β 352, Ala β 354 e Ile β 378, y queda apilado entre las cadenas laterales de los residuos de Cys β 241 y Leu β 255 (Figura 2.6A). Además, uno de los átomos de oxígeno del dioxolano forma un enlace de hidrógeno, mediado por una molécula de agua, con el CO y el NH del esqueleto peptídico de los residuos de Gly β 237 y Cys β 241, respectivamente (Figura 2.6A y 2.6B). Por su parte, el grupo carbonilo de la cetona α,β -insaturada de **TUB092** se encuentra a distancia de enlace de hidrógeno con el NH del esqueleto peptídico del residuo de Asp β 251 (distancia CO-NH: 3.3 Å). En cuanto al anillo B de **TUB092**, éste se sitúa cerca de la interfaz entre las subunidades α y β de tubulina y se apila entre las cadenas laterales de los residuos de Asn β 258 y Lys β 352 (Figura 2.6B). El grupo hidroxilo forma un enlace de hidrógeno con el CO del esqueleto peptídico del residuo de Thr α 179 (distancia OH-CO: 2.6 Å). Además forma un enlace de hidrógeno mediado por una molécula de agua con el CO del esqueleto de Asn β 349, interacción donde también interviene el OMe de la posición contigua.

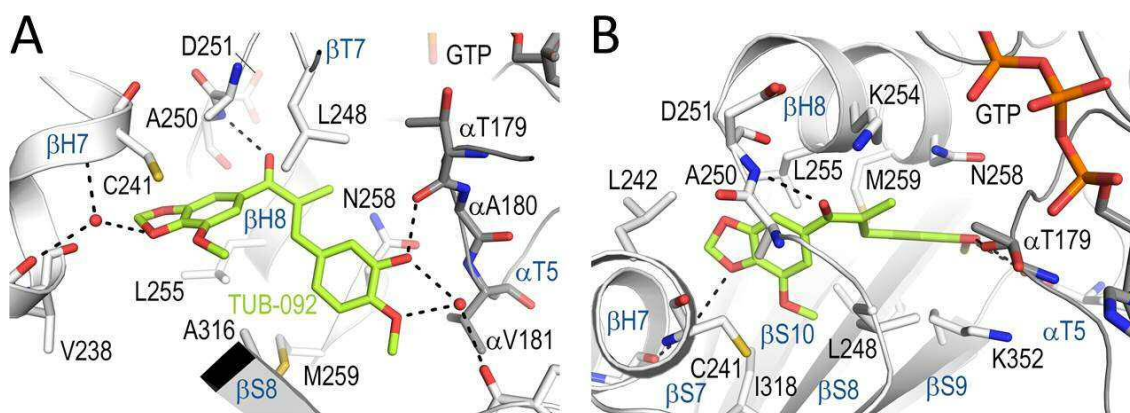


Figura 2.6. Análisis del modo de unión de **TUB092** con tubulina. Detalle de las interacciones observadas entre **TUB092** (en verde) y tubulina (en gris). Los residuos principales de la interacción se representan en sticks y están etiquetados. Las líneas discontinuas indican los enlaces de hidrógeno. La imagen B se ha obtenido por rotación de 90° de la imagen A.

Cuando se superponen las cadenas de β -tubulina de los complejos tubulina-colchicina y tubulina-TUB092 (Figura 2.7A), se observa que el anillo B y la cetona α,β -insaturada de **TUB092** (en verde) solapan bien con el anillo C y parte de los anillos B y A de colchicina (en morado). Además, los grupos hidroxilo y metoxi del anillo B de **TUB092** ocupan la misma posición de los correspondientes grupos del anillo C de colchicina. El menor tamaño de **TUB092** en comparación con colchicina permite que el residuo de Thr α 179, perteneciente al loop T5 de α -tubulina, gire hacia la interfaz y rellene un espacio ocupado por dos moléculas de agua en el complejo colchicina-tubulina.

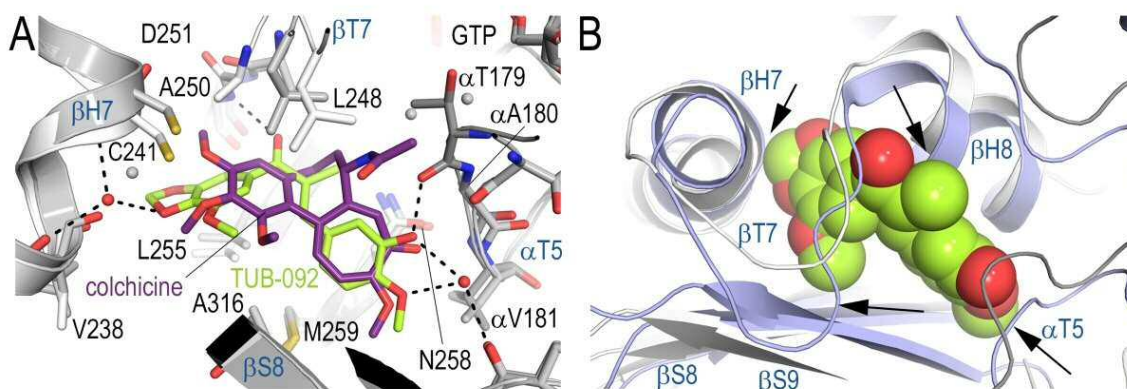


Figura 2.7. (A) Superposición del complejo tubulina-TUB092 (tubulina en gris oscuro, **TUB092** en verde) y tubulina-colchicina (tubulina en gris claro, colchicina en morado). Las moléculas de agua se representan como esferas grises. (B) Superposición de la conformación curva (tubulina-TUB092, en gris claro) y recta (PDB ID: 1JFF, en violeta) de tubulina. **TUB092** se representa en esferas. Las flechas indican las regiones con choques estéricos.

Es importante resaltar que la superposición de la estructura global del dímero de $\alpha\beta$ -tubulina en el complejo T2R-TTL-TUB092 con la estructura cristalina del dímero de tubulina sin ligando (PDB ID: 4I55) condujo a un rmsd muy bajo (0.236 Å sobre 776 átomos de C α), lo que parece indicar que la unión de **TUB092** no afecta a la conformación global de tubulina en el complejo obtenido.

Para discutir cuál es el posible mecanismo de inhibición que ejerce **TUB092** sobre la dimerización de tubulina hay que tener presente que los dímeros de tubulina libre adoptan en disolución una característica conformación curva. Sin embargo, cuando estos dímeros se incorporan a los microtúbulos, sufren una transición estructural de la conformación curva a una conformación recta. Este proceso es necesario para la formación del microtúbulo y está asociado con una serie de movimientos y reordenaciones de la estructura secundaria que llevan a la oclusión del sitio de unión de colchicina. Para estudiar el modo de unión de **TUB092** en el contexto del microtúbulo, se compararon las estructuras de tubulina en la conformación curva (unida a **TUB092**)

y recta. Así, la superposición del complejo tubulina-TUB092 (Figura 2.7B, representada en color gris) con la estructura de tubulina en conformación recta (Figura 2.7B, representada en color violeta) (PDB ID: 1JFF), mostró la existencia de posibles impedimentos estéricos de **TUB092** con residuos de las hélices H8 y H7, la hebra S9 y el loop T7 de β -tubulina así como con el loop T5 de α -tubulina. Estas observaciones sugieren que **TUB092** no se puede unir al sitio de colchicina en el microtúbulo ya formado. Por tanto, la actividad de **TUB092** como desestabilizante de microtúbulos se debe muy posiblemente a que la unión de **TUB092** impide la transición desde la conformación curva a la recta necesaria para la incorporación del dímero de tubulina al microtúbulo en crecimiento. Este comportamiento coincide con el propuesto con anterioridad para colchicina.¹⁹⁻²⁰

2.3.4. DISEÑO DE NUEVOS LIGANDOS BASADOS EN LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO TUBULINA-TUB092

Del análisis de la conformación bioactiva de **TUB092** en su unión con tubulina y de las relaciones estructura-actividad establecidas para esta familia de metilchalconas, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Existen grupos funcionales en la estructura de **TUB092** que son importantes para la interacción con tubulina, como son el grupo carbonilo de la cetona α,β -insaturada y la presencia del grupo OH y OMe en el anillo B. Es razonable asumir que el NH₂ de **TUB091** establecerá interacciones similares al OH de **TUB092**. Además, los dos anillos aromáticos A y B quedan alojados en cavidades eminentemente hidrófobas y apilados por cadenas laterales de algunos aminoácidos.

- La conformación *E* del doble enlace de la chalcona es la responsable de la orientación relativa de los anillos A y B en el modo de unión. Analizando esta conformación con detalle, se puede ver que ambos anillos no son coplanares sino que están ligeramente desviados del plano formando un ángulo de $\sim 43^\circ$. Además, la disposición relativa del grupo carbonilo y los anillos A y B en **TUB092** en la conformación bioactiva se diferencia sustancialmente de la disposición relativa de estos grupos con el cierre introducido en **2.8**, lo que ayudaría a explicar la pérdida de actividad de este derivado ciclado.

Por ello, se propuso un cierre alternativo, en este caso sobre el anillo B, donde el metilo de la metilchalcona quedara incluido en un anillo de seis miembros. Además, se optó por un anillo saturado para el cierre a fin de facilitar el ángulo entre los anillos A y

B observado en la conformación bioactiva de **TUB092**. La estructura propuesta, que incluye como anillo B un biciclo de tetrahidronaftaleno, se muestra en la Figura 2.8.

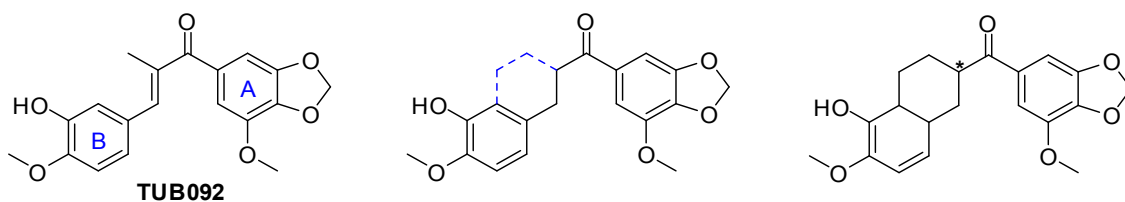


Figura 2.8. Estructura de **TUB092** y cierre propuesto con el anillo B, lo que resultaría en el derivado de tetrahidronaftaleno.

En este punto es importante resaltar que el nuevo esqueleto de tetrahidronaftaleno contiene un centro asimétrico (señalado con un asterisco en la Figura 2.8). Para determinar cuál de los dos posibles enantiómeros conservaba la conformación bioactiva de **TUB091**, se generaron las estructuras 3D de cada uno de ellos a partir de sus códigos SMILES utilizando el servidor CORINA. La geometría de las estructuras 3D generadas se optimizó con el programa MOPAC2012²¹ y se realizó la superposición manual de las mismas (mediante la herramienta “Pair Fitting” implementada en el programa PyMOL) con la estructura cristalina de **TUB092** (Figura 2.9). De esta superposición se pudo deducir que es el isómero *R* el que mimetiza la conformación bioactiva de **TUB092**. Sin embargo, al abordar la síntesis de estas nuevas estructuras, se decidió no tener en cuenta la estereoquímica de dicho centro y preparar el producto racémico, con el fin de corroborar si la hipótesis de diseño era correcta o no. Además, puesto que el grupo amino en el anillo B establecería interacciones similares al OH y además permitiría la posterior derivatización como profármaco, la ruta de síntesis diseñada está dirigida a la obtención del derivado de tetrahidronaftaleno con un grupo amino contiguo al OMe.

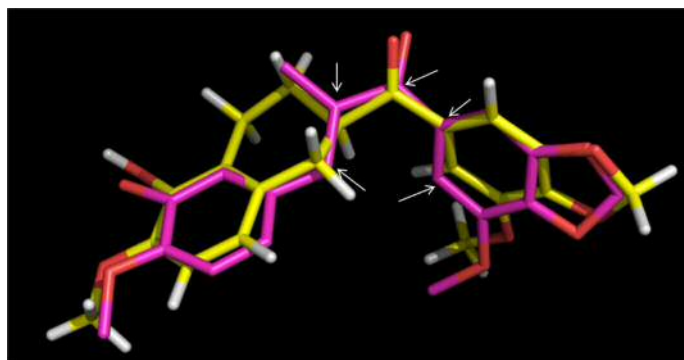
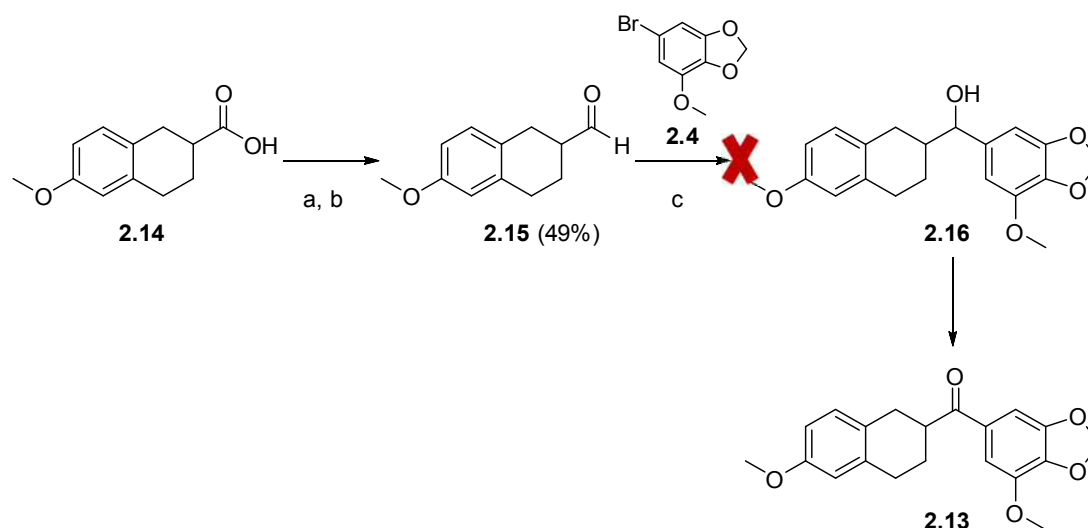


Figura 2.9. Superposición de las estructuras 3D de **TUB092** (en magenta) y el isómero *R* del derivado de tetrahidronaftaleno propuesto (en amarillo). Las flechas blancas indican los átomos sobre los cuales se ha realizado la superposición.

2.3.5. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS MEDIANTE CICLACIÓN SOBRE EL ANILLO B

2.3.5.1. SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS CICLADOS EMPLEANDO UN INTERMEDIO ORGANOLÍTICO

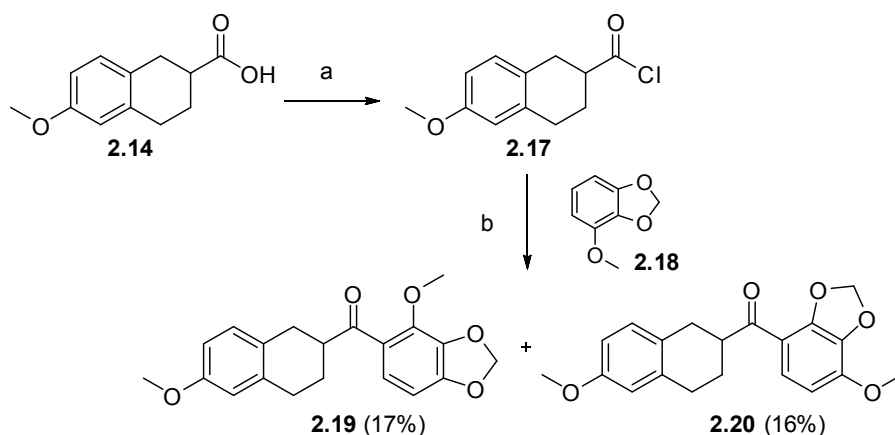
La síntesis propuesta para el derivado de tetrahidronaftaleno (**2.13**) se recoge en el Esquema 2.3. Se utilizó como producto de partida el ácido carboxílico **2.14**, que por reducción con $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ en THF²² y posterior oxidación Dess-Martin²³ del alcohol obtenido dio lugar al aldehído **2.15** con un rendimiento del 49% para ambos pasos de reacción. Este aldehído se añadió sobre el organolítico formado por reacción del bromuro **2.4** y *n*-BuLi. Tras 24 h de reacción no se observó la formación del alcohol deseado (**2.16**) y sólo se detectó el 4-metoxibenzo[*d*][1,3]dioxol, resultante de la pérdida de bromo en el compuesto de partida **2.4**. En la bibliografía existen ejemplos de reacciones similares entre un bromuro aromático y un aldehído alifático, como el ciclohexanocarbaldehído.²⁴⁻²⁷ Conviene recordar que el bromuro **2.4** ya había sido empleado con anterioridad en esta memoria para la síntesis de la α -metilchalcona **TUB091** en condiciones similares de organolitación. Estos datos parecerían indicar que el aldehído **2.15** no era lo suficientemente reactivo para reaccionar con el intermedio litiado, por lo que se decidió emplear una ruta de síntesis alternativa para acceder a la cetona.



Esquema 2.3. Reactivos y condiciones: (a) $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$, THF anh., ta, 1 h; (b) DMP, DCM, ta, 2 h; (c) *n*-BuLi, TBME anh., -78°C , ta, 20 h.

2.3.5.2. SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE NUEVOS DERIVADOS CICLADOS MEDIANTE SUSTITUCIÓN ELECTRÓFILA AROMÁTICA (SEAr)

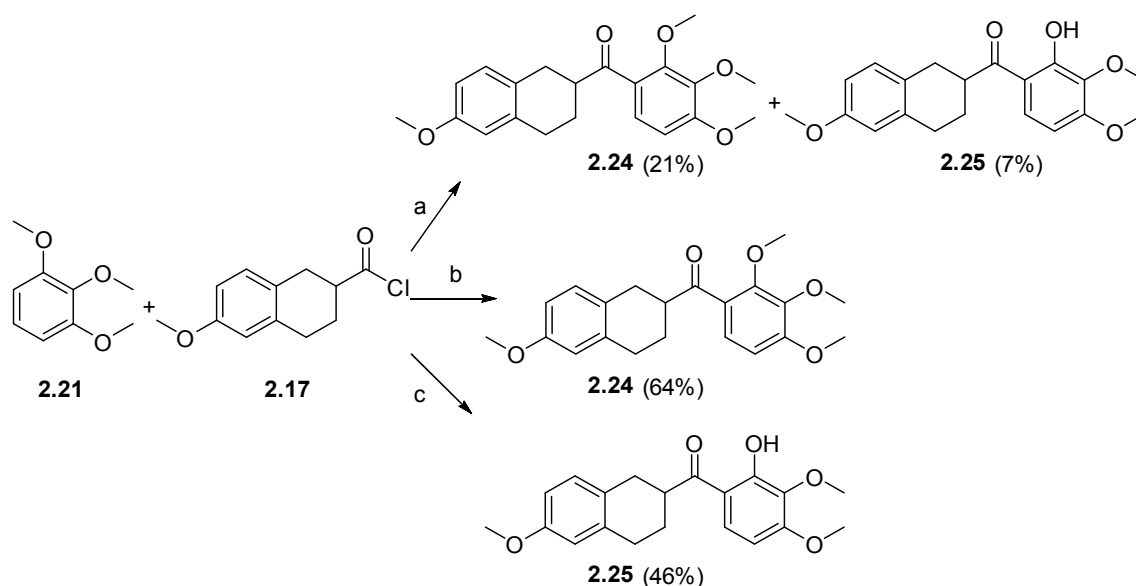
Una ruta alternativa para la síntesis de cetonas aromáticas es la reacción de acilación de Friedel-Crafts de un areno con un cloruro de ácido en presencia de un ácido de Lewis, siendo AlCl_3 o ZnCl_2 los más comúnmente utilizados.²⁸ Para la preparación del cloruro de ácido **2.17** (Esquema 2.4) se hizo reaccionar el ácido carboxílico **2.14** con cloruro de tionilo en tolueno a reflujo. Cabe destacar que cuando la reacción con cloruro de tionilo se llevó a cabo a temperaturas más bajas, no se obtuvo el cloruro de ácido. Posteriormente, **2.17** se hizo reaccionar con 4-metoxibenzo[*d*][1,3]dioxol (**2.18**)²⁹ empleando como catalizador AlCl_3 en diclorometano a temperatura ambiente, pero la reacción de acilación no tuvo lugar. Se sustituyó el diclorometano por dicloroetano y se calentó la reacción a 60 °C, pero tampoco así se observó la formación de productos acilados, únicamente se observaba la apertura del anillo de dioxolano de **2.18**. Se utilizó entonces ZnCl_2 en dicloroetano a temperatura ambiente y a 60 °C. Sólo en la reacción a 60 °C se observó la formación de dos nuevos compuestos. El aislamiento y caracterización de ambos compuestos por ^1H -RMN permitió asignarlos como las cetonas **2.19** y **2.20**, con el grupo metoxi en posición 2 y 4 con respecto al carbonilo. En estas condiciones de reacción no se observó la formación del compuesto con el grupo metoxi en posición 3. La multiplicidad de los protones aromáticos del anillo A permitió concluir que los sustituyentes estaban localizados en las posiciones 2, 3, y 4 de dicho anillo. La correcta asignación de los regioisómeros se hizo mediante un experimento NOESY. Así, para el compuesto **2.20** se observó una señal de correlación entre el OCH_3 del anillo A (δ 3.90 ppm) y un protón aromático del mismo anillo (δ 6.82 ppm, $J = 9.1$ Hz), lo que permitió la asignación inequívoca de las posiciones de sustitución. Se adjuntan en el Anexo los espectros ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y NOESY.



Esquema 2.4. Reactivos y condiciones: (a) SOCl_2 dest., tolueno, reflujo, 3 h; (b) ZnCl_2 , DCE anh., 60 °C, 4 h.

Los regioisómeros obtenidos están en consonancia con que la acilación ocurra preferentemente en las posiciones *orto* y *para* respecto a los sustituyentes activantes. Para evitar la formación de mezclas de regioisómeros en la reacción de acilación se decidió utilizar como areno el 1,2,3-trimetoxibenceno (**2.21**). Además, se utilizaron otros biciclos similares en estructura a **2.18**, concretamente el 7-metoxibenzofurano (**2.22**) y 7-metoxi-2,3-dihydrobenzofurano (**2.23**).

Así, el cloruro de ácido **2.17** se hizo reaccionar con 1,2,3-trimetoxibenceno (**2.21**) en presencia de $ZnCl_2$ dando lugar a dos compuestos acilados (Esquema 2.5). Tras su aislamiento y caracterización, éstos fueron asignados como **2.24** (21% rendimiento) con los metoxilos en las posiciones 2, 3 y 4 del anillo A, y **2.25** (7% de rendimiento) con el mismo patrón de sustitución, pero donde se ha producido la desmetilación en la posición 2, observándose la señal correspondiente al OH fenólico a 12.46 ppm. Además, al incrementar la temperatura o el tiempo de reacción, el rendimiento global de la reacción aumentaba ligeramente (35% transformación por HPLC) pero se favorecía la desprotección del OMe en *orto* al carbonilo (relación **2.24**:**2.25** 4:6). La desmetilación del grupo metoxi en posición 2 se ha descrito en otras reacciones de acilación de Friedel-Crafts.³⁰⁻³³ Algunos autores optan por metilar “a posteriori” ese OH.³²⁻³³ En nuestro caso, se procedió a modificar el ácido de Lewis para ver cómo afectaba a dicha desmetilación.

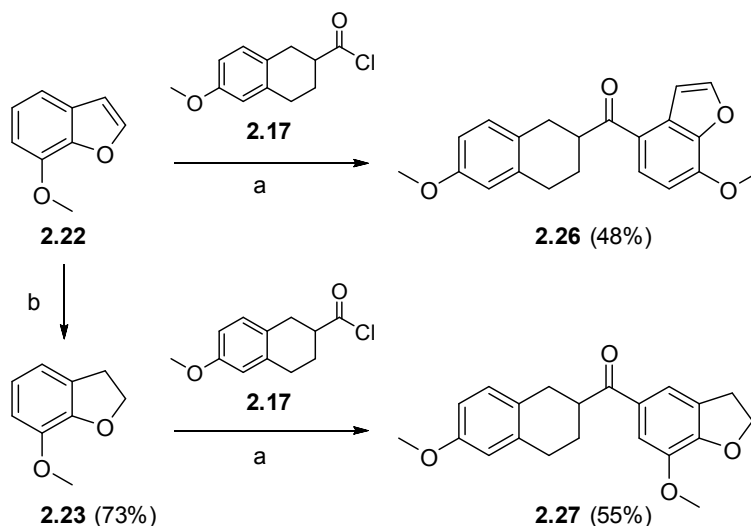


Esquema 2.5. Reactivos y condiciones: (a) $ZnCl_2$, DCE anh., 60 °C, 1 h; (b) TfOH, DCE anh., 60 °C, 1 h; (c) $BF_3 \cdot OEt_2$, DCE anh., 60 °C, 16 h.

Así, la reacción de **2.17** con **2.21** en presencia de ácido triflico³⁴ dio lugar al compuesto **2.24** con un 64% de rendimiento (Esquema 2.5). Cuando se empleó $BF_3 \cdot OEt_2$,³⁵ se observó desde el inicio de la reacción una proporción importante del

producto desmetilado, por lo que prolongando el tiempo de reacción se obtuvo el compuesto **2.25** como único producto, con un 46% de rendimiento. Por tanto, el cambio del ácido de Lewis en la reacción de acilación permitió obtener un único compuesto con rendimientos próximos al 50%.

La reacción de acilación sobre el 7-metoxibenzofurano (**2.22**) y el 7-metoxi-2,3-dihidrobenzofurano (**2.23**) se detalla en el Esquema 2.6. Así, por reacción del cloruro de ácido **2.17** con 7-metoxibenzofurano (**2.22**) a 60 °C y empleando ZnCl_2 como ácido de Lewis, se obtuvo el compuesto **2.26** con un 48% de rendimiento. Por otro lado, la hidrogenación catalítica del 7-metoxibenzofurano (**2.22**) en presencia de Pd/C dio lugar al 2,3-dihidroderivado **2.23**,³⁶ que se hizo reaccionar con el cloruro de ácido **2.17** en presencia de ZnCl_2 . El producto mayoritario de la reacción, aislado con un 55% de rendimiento, se asignó como **2.27**, conforme a precedentes bibliográficos.³⁷



Esquema 2.6. Reactivos y condiciones: (a) ZnCl_2 , DCE anh., 60 °C, 2-4 h.; (b) H_2 , Pd/C 10% wt, AcOEt, 40 psi, 40 °C, 20 h.

Los compuestos acilados representados en la Figura 2.10 fueron evaluados para determinar su capacidad antiproliferativa. Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 2.2, junto con los valores de los compuestos de referencia, colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.10**).

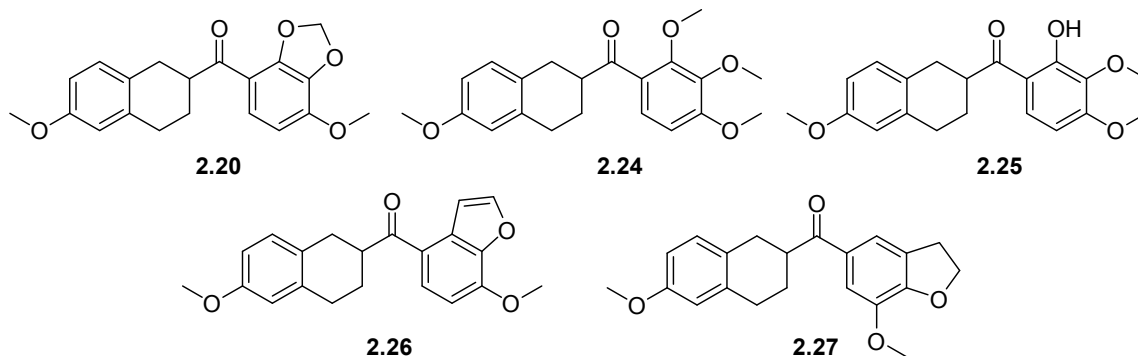


Figura 2.10. Estructuras de los compuestos sintetizados en este apartado.

Tabla 2.2. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (μM) de los compuestos sintetizados **2.20**, **2.24**-**2.27**, en células tumorales y endoteliales.

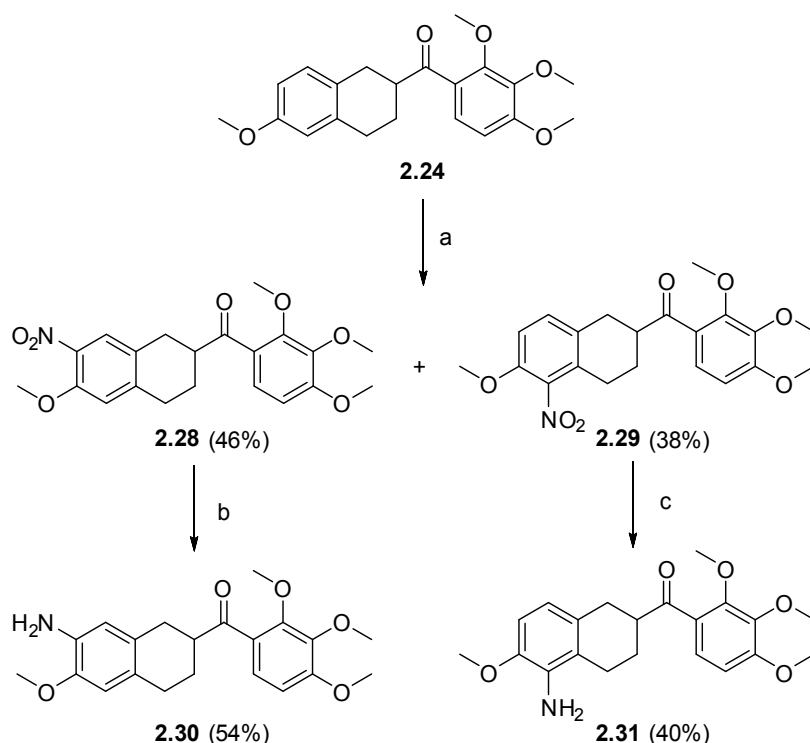
Comp.	$CI_{50}^{(a)}$ (μM)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
2.20	160 \pm 20	39 \pm 5	88 \pm 5	38 \pm 3
2.24	0.24 \pm 0.01	-	0.40 \pm 0.15	1.2 \pm 0.1
2.25	75 \pm 36	38 \pm 3	40 \pm 11	>250
2.26	>250	>250	>250	>250
2.27	43 \pm 15	31 \pm 3	>250	>250
Colchicina	0.010 \pm 0.0006	0.013 \pm 0.001	0.0087 \pm 0.0001	0.0038 \pm 0.0011
CA-4P	0.013 \pm 0.002	0.011 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001	0.0029 \pm 0.0001

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

Como puede observarse, de las cetonas ensayadas, sólo el compuesto **2.24** mostró actividad antiproliferativa significativa en el orden sub μM en células tumorales y en torno a 1 μM en células endoteliales. Cabe destacar que su análogo **2.25** con un OH en posición 2 en vez del OMe fue notablemente menos activo, con valores de CI_{50} 100 veces más altos. Por tanto, el compuesto **2.24** fue el elegido para incorporar en su estructura un grupo amino sobre el anillo B, por analogía con la chalcona **TUB091**.

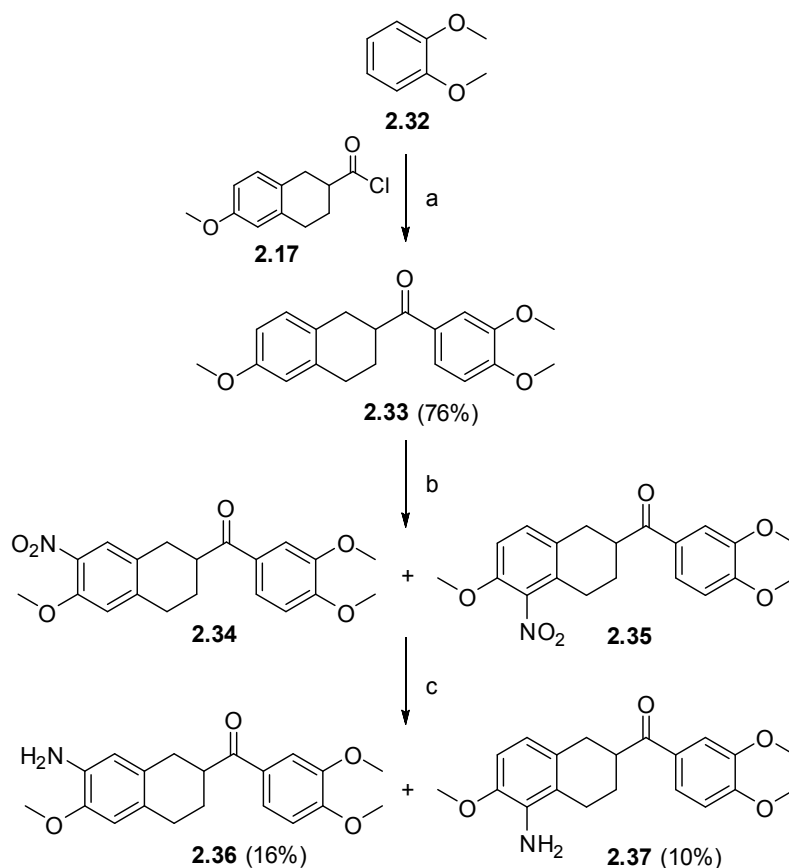
Así, como se indica en el Esquema 2.7, la nitración de **2.24** con HNO₃ y anhídrido acético a baja temperatura³⁸ dio lugar a los derivados **2.28** (rendimiento del 46%) con un grupo nitro en la posición 5 del anillo de tetrahidronaftaleno y **2.29** (rendimiento del 38%), donde el grupo nitro se encuentra en la posición 7 del anillo de tetrahidronaftaleno. Hay que destacar que el control de la temperatura en esta reacción es crítico. La adición del ácido se debe realizar a muy baja temperatura (-40 °C) para evitar la formación del derivado doblemente sustituido. La correcta asignación de los protones aromáticos de los anillos A y B, y así determinar la posición de sustitución de los grupos NO₂, se realizó mediante experimentos de correlación (COSY, HSQC, HMBC) de los dos isómeros. A modo ilustrativo, los espectros se han incluido en el Anexo, destacando las señales más representativas de cada isómero.

La hidrogenación catalítica de **2.28** en presencia de Pt/S dio lugar a la reducción del grupo nitro a amino, obteniéndose el compuesto **2.30** con un rendimiento moderado (Esquema 2.7). Al aplicar las mismas condiciones de reacción al nitroderivado **2.29**, la reducción del grupo nitro no tuvo lugar. Cuando la reducción de **2.29** se llevó a cabo con hierro en medio ácido,³⁹ se obtuvo el compuesto **2.31**, con el grupo amino en la posición 5 del anillo de tetrahidronaftaleno.



Esquema 2.7. Reactivos y condiciones: (a) HNO₃ 65%, Ac₂O, -40 °C a -10 °C, 30 min.; (b) H₂, Pt(S) 5% wt, AcOEt, 30 psi, 30 °C, 3 h.; (c) Fe polvo, HCl 37%, EtOH, H₂O, reflujo, 1 h.

Por último, se aplicó esta misma secuencia de síntesis utilizando el 1,2-dimetoxibenceno como precursor del anillo A (Esquema 2.8). Así, la reacción del cloruro de ácido **2.17** con 1,2-dimetoxibenceno (**2.32**) empleando ácido triflico³⁴ como catalizador condujo al derivado acilado **2.33** con un 76% de rendimiento, con los grupos metoxi en las posiciones 3 y 4 conforme a precedentes bibliográficos.⁴⁰⁻⁴¹ La nitración de **2.33** dio lugar a una mezcla de los isómeros de posición **2.34** y **2.35**, en una relación 60:40, que no pudo separarse por cromatografía. Esta mezcla se trató con hierro en medio ácido para dar lugar a los compuestos reducidos **2.36** y **2.37**, que se aislaron con rendimientos del 16% y 10%, respectivamente, tras los dos pasos de reacción. De nuevo, para la correcta asignación de ambos espectros fueron necesarios experimentos de correlación (COSY, HSQC, HMBC) que permitieron asignar las señales de ¹H y ¹³C de cada uno de los isómeros.



Esquema 2.8. Reactivos y condiciones: (a) TfOH, DCE anh., 60 °C, 2 h; (b) HNO₃ 65%, Ac₂O, -40 °C a -10 °C, 20 min.; (c) Fe polvo, HCl 37%, EtOH, H₂O, reflujo, 3 h.

Los compuestos descritos en este apartado cuyas estructuras se muestran en la Tabla 2.3, se evaluaron como agentes antiproliferativos en células tumorales y endoteliales (Tabla 2.4).

Tabla 2.3. Estructuras de los compuestos **2.28-2.31**, **2.33**, **2.36** y **2.37** sintetizados en este apartado, incluyendo **2.24** como referencia de la serie.

	R ₁	R ₂	R ₃
2.24	H	H	OCH ₃
2.28	NO ₂	H	OCH ₃
2.29	H	NO ₂	OCH ₃
2.30	NH ₂	H	OCH ₃
2.31	H	NH ₂	OCH ₃
2.33	H	H	H
2.36	H	NO ₂	H
2.37	H	NH ₂	H

Tabla 2.4. Actividad antiproliferativa expresada como Cl₅₀ (μM) de los compuestos sintetizados **2.28-2.31**, **2.33**, **2.36** y **2.37**, incluyendo **2.24** como referencia de la serie, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	Cl ₅₀ ^(a) (μM)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
2.24	0.24 ± 0.01	-	0.40 ± 0.15	1.2 ± 0.1
2.28	> 250	>250	> 250	199 ± 41
2.29	4.2 ± 0.0	0.86 ± 0.54	0.81 ± 0.06	5.3 ± 0.8
2.30	0.86 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.74 ± 0.10	1.3 ± 0.0
2.31	0.027 ± 0.000	0.022 ± 0.003	0.030 ± 0.002	0.047 ± 0.004
2.33	> 250	221 ± 40	> 250	> 250
2.36	> 250	> 250	> 250	> 250
2.37	52 ± 4	6.3 ± 2.6	23 ± 1	122 ± 70
Colchicina	0.010 ± 0.0006	0.013 ± 0.001	0.0087 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0011
CA-4P	0.013 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.0029 ± 0.0001

^(a)Valor medio de al menos tres experimentos ± desviación estándar.

Los resultados recogidos en la Tabla 2.4 indican que el compuesto **2.31** es el más activo de la serie con valores de Cl₅₀ en torno a 0.025 μM en células tumorales, siendo sólo 2 ó 3 veces superiores a los de los compuestos de referencia colchicina y combretastatina A-4P. El regioisómero **2.30** con el grupo amino en la posición 5 fue entre 20 y 30 veces menos activo que **2.31** que presenta el amino en posición 7. Además, la incorporación del amino en posición 7 mejora también entre 10 y 20 veces la actividad antiproliferativa respecto a **2.24**, no sustituido en dicha posición. También es importante para la actividad antiproliferativa la presencia de tres grupos metoxi en el anillo A: cuando solo hay dos grupos metoxi en las posiciones 3 y 4, y aun estando el amino en la posición 7 del anillo de tetrahidronaftaleno (compuesto **2.37**), la actividad antiproliferativa es muy débil.

2.3.6. ESTUDIO DEL MODO DE UNIÓN DEL COMPUESTO 2.31 CON TUBULINA

2.3.6.1. Determinación de la constante de asociación (K_a) de 2.31 con tubulina

Para el compuesto **2.31** se determinó la constante de asociación (K_a) con $\alpha\beta$ -tubulina bovina. Para ello, se efectuó un experimento de competición con el ligando reversible (*R*)-(+)-etil-5-amino-2-metil-1,2-dihidro-3-fenilpirido[3,4-*b*]pirazin-7-il carbamato (*R*-PT, **i.31**), cuyo valor de K_a es de $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ⁴² conforme se ha comentado ya en otros apartados. La K_a determinada para el compuesto **2.31** fue de $2.4 \pm 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Este valor indica que **2.31** se une a tubulina en el sitio de unión de colchicina si bien su afinidad es menor que la de la chalcona **TUB092**.

2.3.6.2. Estudios de docking y dinámica molecular de 2.31 con tubulina

Una vez demostrada la capacidad de unión de **2.31** a tubulina, se procedió a determinar su posible modo de unión mediante métodos computacionales. Los estudios de docking se realizaron con el isómero *R* del compuesto **2.31** tomando el complejo cristalino TUB092-tubulina (PDB ID:5JVD) como molde y empleando Autodock 4.2. ⁴³ Con la mejor solución obtenida del docking, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular durante 10 ns. El modo de unión obtenido para el derivado **2.31** (en cian) se muestra en la Figura 2.11, donde también se incluye la metilchalcona **TUB092** representada en verde.

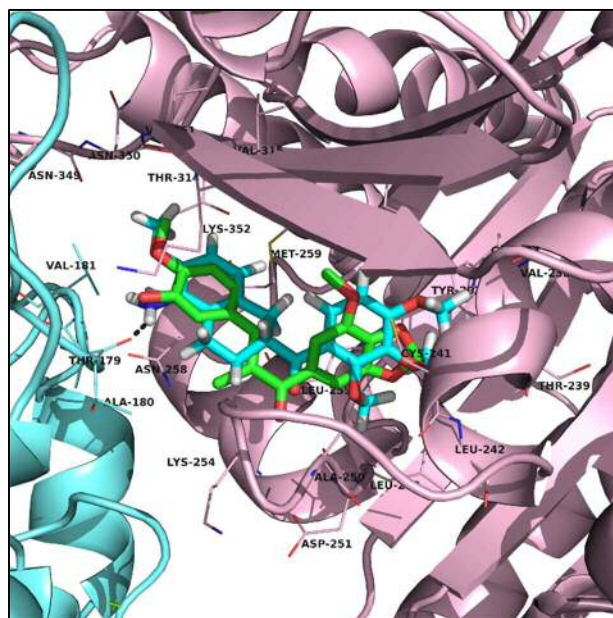


Figura 2.11. Representación del modo de unión de **2.31** (en cian) en el dominio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina (α -tubulina representada en azul pálido y β -tubulina en rosa). **TUB092** se representa en verde. Las líneas discontinuas indican enlaces de H. Los aminoácidos de los residuos próximos al sitio de unión (4Å) respecto a **2.31** están etiquetados y se muestran sus cadenas laterales.

El compuesto **2.31** se aloja en el sitio de unión de colchicina cerca de la interfaz con la subunidad α de tubulina. Así, el anillo de trimetoxibenceno de **2.31** se sitúa hacia el interior de la subunidad de β -tubulina, y se encuentra rodeado por los residuos de Tyr β 202, Gly β 237, Val β 238, Thr β 239, Cys β 241, Leu β 242, Ala β 250, Asp251, Leu β 252, Lys β 254, Leu β 255, Ile β 318 e Ile β 358. Sin embargo, y a diferencia de **TUB092**, no se observa puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo de **2.31** y los residuos que le rodean. En cuanto al anillo de tetrahidronaftaleno de **2.31**, éste se sitúa cerca de la interfaz entre las subunidades α y β de tubulina interactuando con los residuos de Thr α 179, Ala α 180 y Val α 181 pertenecientes al loop T5 de α -tubulina, así como con los residuos Asn β 258, Met β 259, Thr β 314, Val β 315, Ala β 316, Asn β 349, Asn β 350, Val β 311 y Lys β 352 de la subunidad de β -tubulina. Cabe destacar que se observa la formación de un puente de hidrógeno entre el NH₂ de **2.31** (situado en posición equivalente al OH de **TUB092**) y el CO del esqueleto peptídico del residuo de Thr α 179 (distancia NH-CO: 1,8 Å), y que este puente de hidrógeno se mantiene estable a lo largo de la simulación de dinámica molecular.

En la Figura 2.12 se representa el análisis teórico de la contribución por residuos a la energía de interacción (sólo los términos no-polares) entre tubulina y **TUB092** (representado en barras negras) ó **2.31** (representado en barras grises). Este estudio se ha llevado a cabo con el software MM-ISMA,⁴⁴⁻⁴⁵ desarrollado conjuntamente por el grupo de Bioinformática del CBM (UAM-CSIC) y el grupo del Prof. Federico Gago de la Universidad de Alcalá.

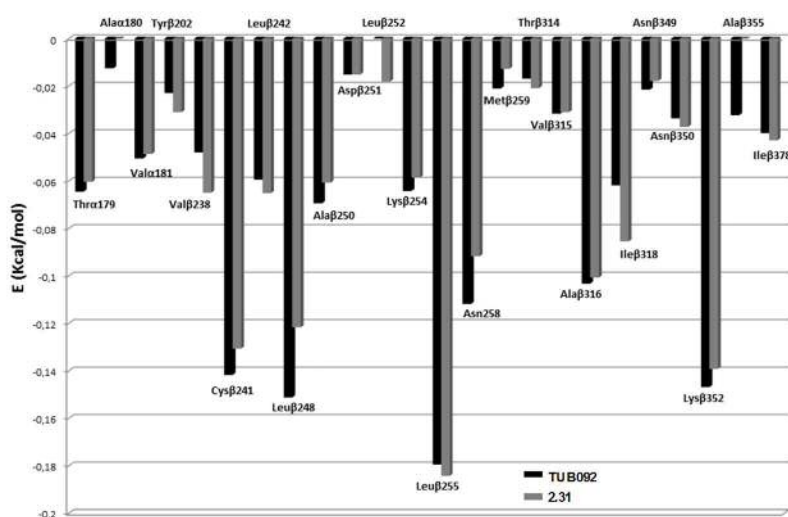


Figura 2.12. Contribución no-polar por residuo a la energía global de unión de **TUB092** (barras negras) y **2.31** (barras grises) a tubulina.

Como se observa en la Figura 2.12, las contribuciones energéticas de los residuos de Cys β 241, Leu β 242, Asn β 258 y Lys β 352 son las de mayor peso en el cómputo global

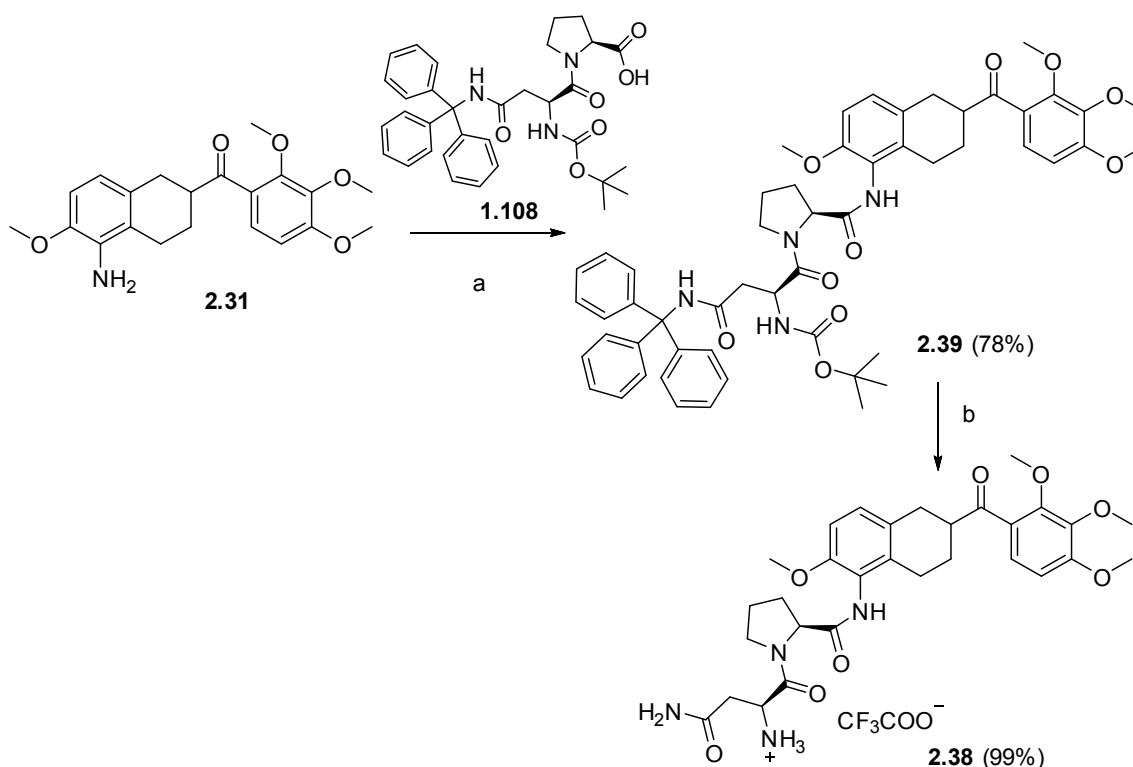
de la energía, y en todos los casos, se observa una mayor contribución, en términos cualitativos, en el modo de unión de **TUB092**. Estas pequeñas diferencias en las contribuciones de estos residuos podrían ayudar a explicar las diferencias observadas en la afinidad por tubulina y en la actividad antiproliferativa de **TUB092** y **2.31**. Además, conviene recordar que el producto sintetizado es un racémico mientras que los estudios teóricos se han realizado solo con el isómero *R*.

2.3.7. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE PROFÁRMACOS DE 2.31

a) Síntesis del conjugado de Asn-Pro de 2.31

Siguiendo una estrategia análoga a la empleada en el Capítulo 1 y con el mismo objetivo de mejorar la solubilidad, se propuso la síntesis del profármaco derivado de Asn-Pro del compuesto **2.31**, el más activo del Capítulo 2.

De esta manera, la síntesis del conjugado **2.38** (Esquema 2.9) se llevó a cabo mediante el acoplamiento del compuesto **2.31** con el dipéptido Boc-Asn(Trt)-Pro-OH (**1.108**), empleando HATU y DIPEA e irradiando con microondas a 40 °C, dando lugar al producto **2.39** con un rendimiento del 78%. A continuación, se desprotegeron los grupos Boc y tritilo por reacción de **2.39** con ácido trifluoroacético, obteniéndose el compuesto **2.38** de forma cuantitativa.



Esquema 2.9. Reactivos y condiciones: (a) HATU, DIPEA, DMF anh., MW, 40 °C, 2 h; (b) TFA, DCM, ta, 6 h.

b) Determinación de la solubilidad de 2.31 y 2.38

La medida de la solubilidad de **2.31** y su profármaco **2.38** se efectuó tal y como se ha descrito en el Capítulo 1. Así, mientras el compuesto **2.31** presentó un valor de solubilidad de 0.006 mg/mL, el derivado dipeptídico de Asn-Pro **2.38** condujo a un incremento espectacular de la solubilidad, consiguiendo un valor de solubilidad de 27 mg/mL.

c) Evaluación de la actividad antiproliferativa de 2.38

Los resultados de la evaluación del profármaco **2.38** en ensayos de proliferación celular se recogen en la Tabla 2.5 expresados como valores de CI_{50} . También se incluyen en esta tabla los datos del compuesto con el grupo amino libre **2.31**, así como los de colchicina (**i.3**) y CA-4P (**i.10**) empleados como controles positivos.

Tabla 2.5. Actividad antiproliferativa expresada como CI_{50} (μM) del compuesto **2.31** y su profármaco **2.38**, en células tumorales y endoteliales.

Comp.	$CI_{50}^{(a)}$ (μM)			
	CÉLULAS TUMORALES			CÉLULAS ENDOTELIALES
	L1210	CEM	HeLa	HMEC-1
2.31	0.027 \pm 0.000	0.022 \pm 0.003	0.030 \pm 0.002	0.047 \pm 0.004
2.38	1.1 \pm 0.1	0.43 \pm 0.08	0.74 \pm 0.04	0.89 \pm 0.20
Colchicina	0.010 \pm 0.0006	0.013 \pm 0.001	0.0087 \pm 0.0001	0.0038 \pm 0.0011
CA-4P	0.013 \pm 0.002	0.011 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001	0.0029 \pm 0.0001

^(a) Valor medio de al menos tres experimentos \pm desviación estándar.

En las cuatro líneas celulares ensayadas, el profármaco **2.38**, aun manteniendo la actividad antiproliferativa en el rango sub μM , resultó ser entre 20 y 40 veces menos activo que el compuesto precursor con el amino libre **2.31**.

d) Estudios de estabilidad en PBS y en suero fetal bovino de 2.38

La pérdida de actividad antiproliferativa presentada por el profármaco **2.38** podría apuntar a una falta de liberación eficaz de **2.31** (Figura 2.13) en las condiciones del ensayo. Por ello, se decidió llevar a cabo un estudio de la estabilidad de **2.38** tanto a nivel químico como enzimático.

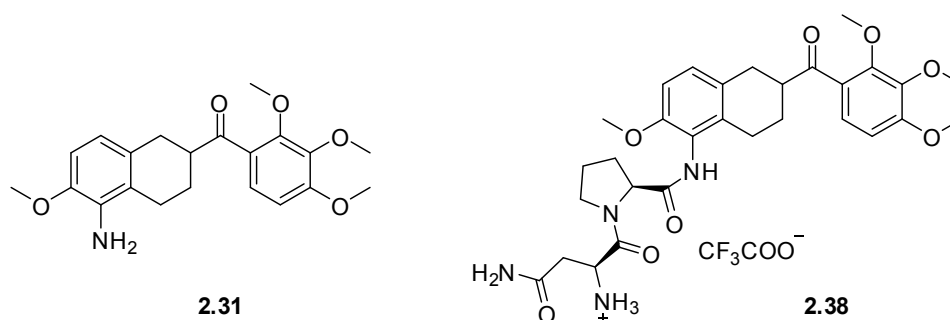


Figura 2.13. Estructuras del compuesto **2.31** y su profármaco **2.38**.

De forma similar a los estudios realizados para el profármaco **1.109** en el Capítulo 1, los estudios de estabilidad química se llevaron a cabo incubando el compuesto **2.38** en PBS a 37 °C, y por HPLC se analizaron distintas alícuotas de esta muestra en función del tiempo (0h, 1h, 3h, 6h y 24h). Del mismo modo, para los estudios de estabilidad enzimática, el compuesto **2.38** se incubó en suero fetal bovino (SFB) al 10%.

De los datos obtenidos en los estudios de estabilidad química, se pudo concluir que el profármaco es completamente estable en PBS, y tras 24h de incubación no se observó la liberación del compuesto con el grupo amino libre **2.31**. Los estudios de incubación del profármaco **2.38** en suero fetal bovino pusieron de manifiesto que, incluso tras 24 horas de incubación, el profármaco permanecía intacto y no se liberaba el compuesto activo **2.31**. Ahora bien, conviene tener en cuenta que en los experimentos en cultivo celular, debido a la presencia de una mayor cantidad y variedad de enzimas, puede que tenga lugar una cierta liberación de compuesto activo que justifique la actividad antiproliferativa observada para el profármaco **2.38**.

2.3.8. ENSAYOS *IN VIVO* DEL PROFÁRMACO TUB099

La baja actividad antiproliferativa presentada por el profármaco **2.38** (Figura 2.14) debido presumiblemente a la no eficaz liberación del compuesto activo **2.31** hizo que se descartara como un candidato para ensayos *in vivo*, y sólo se incluyó en estos ensayos el profármaco **TUB099** (Figura 2.14).

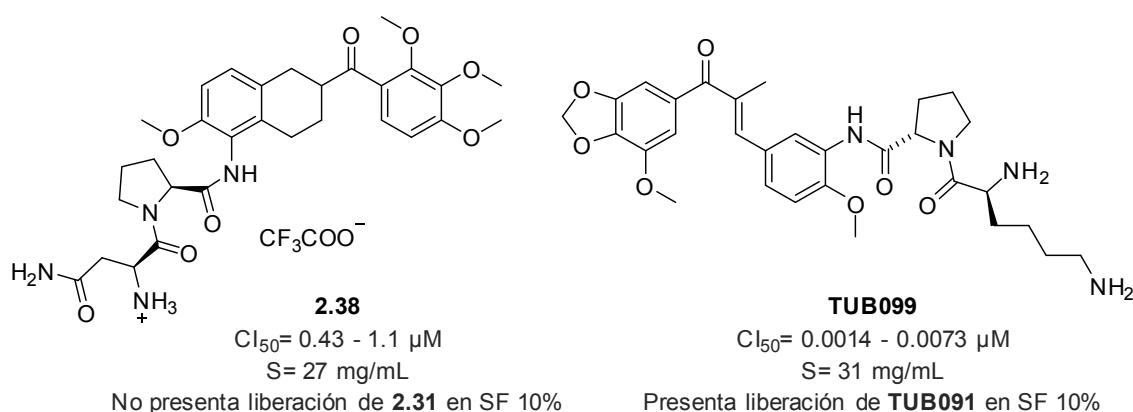


Figura 2.14. Estructuras de los profármacos **2.38** y **TUB099** sintetizados en el Capítulo 2 y sus propiedades.

Así, para determinar la actividad antitumoral *in vivo* de **TUB099** se emplearon ratones SCID que habían sido inoculados (vía subcutánea) con células de melanoma del tipo B16F10, que expresaban luciferasa.⁴⁶ Tras tres días desde la inoculación, el

compuesto **TUB099** se administró a una dosis de 10 mg/kg/día (vía intratumoral) durante cinco días consecutivos. El grupo control recibió el mismo volumen de inyección de PBS. A intervalos regulares se administró luciferina a los ratones, reactivo que al hidrolizarse por la luciferasa origina un producto bioluminiscente, permitiendo estimar el volumen del tumor por toma de imágenes con el sistema IVIS. Los ratones tratados con **TUB099** presentaron un volumen tumoral notablemente inferior respecto al grupo tratado con PBS (Figura 2.15A) en las imágenes tomadas con IVIS. Al final del experimento los ratones fueron sacrificados y se extirpó y pesó el tumor. Los valores medios obtenidos (Figura 2.15B) indicaron una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con **TUB099** y el grupo tratado con PBS, mostrando una acción claramente antitumoral para el compuesto **TUB099**.

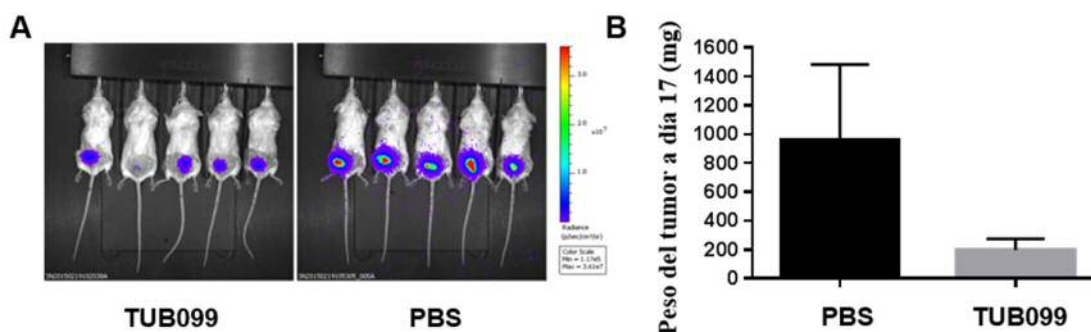


Figura 2.15. Ensayos *in vivo* para determinar la actividad antitumoral de TUB099 en estadios iniciales del desarrollo tumoral. (A) Imágenes tomadas con el sistema IVIS de los ratones SCID inoculados con células de melanoma tipo B16F10, mostrándose tanto los tratados con el compuesto **TUB099** como los no tratados. (B) Cada barra representa el valor medio de la masa tumoral de los ratones tratados con **TUB099** y no tratados una vez sacrificados los ratones.

Además, se llevaron a cabo ensayos para determinar la capacidad de **TUB099** de impedir la metástasis. Para ello, se utilizaron células humanas de cáncer de mama que expresan luciferasa (MDA-MB-231/4mRL.luc2) y se inyectaron en tejido mamario de los ratones. Se dejó crecer el tumor hasta el día 12, día en que se administró el compuesto por vía intratumoral a una única dosis de 15 mg/kg o durante 4 días consecutivos (días del 12 al 15) a la misma dosis. Se realizó un estudio paralelo usando CA-4P y PBS, como experimento control. Si bien el tamaño del tumor parecía similar en todos los grupos, las imágenes tomadas con IVIS mostraron que los tumores tratados con CA-4P o **TUB099** emitían mucha menos luz que los tumores del experimento control (Figura 2.16A), posiblemente indicando la necrosis de las células del centro del tumor en los animales tratados con CA-4P o **TUB099**. Tras 16 días desde la inoculación, se extirpó el tumor y los ratones se mantuvieron durante tres semanas más sin ningún tratamiento. En el grupo control el 90% de los ratones desarrollaron metástasis en los pulmones o

en los nodos linfáticos, como se puede ver en la Figura 2.16B. De los ratones tratados con CA-4P, el 40% desarrollaron metástasis mientras que en los ratones tratados con **TUB099** la metástasis fue prácticamente nula (basados en las señales de luminiscencia). Curiosamente, la metástasis fue menor en todos los grupos que recibieron una única dosis respecto a los grupos análogos que recibieron 4 dosis.

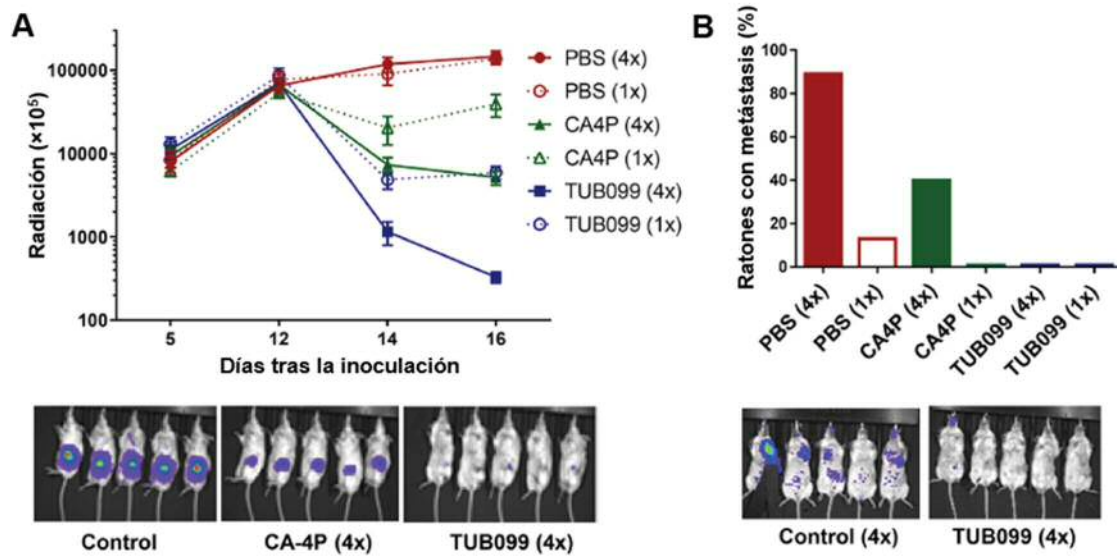


Figura 2.16. Efecto de TUB099 en la metástasis de células de cáncer de mama MDA-MB-231/4mRL.luc2. Ratones SCID fueron inoculados con células MDA-MB-231/4mRL.luc2 (10^6) en el tejido mamario y se les administró (via intratumoral) PBS, **TUB099** ó CA-4P tras 12 días de su inoculación (1x) o durante 4 días consecutivos del día 12 al día 15 (4x). (A) Imágenes tomadas con el sistema IVIS de los ratones SCID, mostrándose tanto los no tratados, como los tratados con CA-4P o el compuesto **TUB099**. Las medidas de luminiscencia corresponden al valor medio de 5 medidas. El día 16 se observa un descenso en la señal de luminiscencia en el grupo tratado con CA-4P, y de forma particular en el grupo tratado con **TUB099**. (B) Efecto anti-metastásico. Tras 3 semanas (19 días) posteriores a la extracción del tumor primario, se observó una metástasis pulmonar y ganglionar en el grupo control mientras que en el grupo tratado con **TUB099** la metástasis fue prácticamente nula. Los experimentos se realizaron por duplicado obteniéndose similares resultados, se muestran los resultados de uno de los experimentos.

A modo resumen, se puede decir que el compuesto **TUB099** tiene un marcado efecto antitumoral y que además es capaz de impedir la metástasis. En particular, su efecto anti-metastásico fue incluso superior al mostrado por el compuesto de referencia CA-4P.

2.4. CONCLUSIONES

Las chalconas **TUB091** y **TUB092**, descritas por nuestro grupo de investigación, han constituido el punto de partida de este capítulo. Estos compuestos presentaban una potente actividad antiproliferativa en el rango nM que podía atribuirse a su unión al sitio de colchicina en tubulina, con una constante de asociación del orden de 10^7 . Además, el compuesto **TUB099**, producto de la derivatización como profármaco de **TUB091**, mantenía su actividad antiproliferativa y presentaba elevada solubilidad. Sin embargo, **TUB099** se había obtenido como mezcla de isómeros *E/Z* en una relación 2/1, por lo que aún no era idóneo para su evaluación como VDA *in vivo*. Por ello, el primer objetivo consistió en el estudio de la isomerización de este compuesto, y una vez identificado que sufría un fenómeno de fotoisomerización, se llevó a cabo la síntesis del profármaco en ausencia de luz, lo que permitió obtener mayoritariamente el isómero *E*, responsable de la actividad.

Con el propósito de fijar la configuración *trans* del compuesto **TUB091** (Figura 2.17), se sintetizó un análogo conformacionalmente restringido mediante ciclación sobre el anillo A, dando lugar al compuesto **2.8**. Esta aproximación condujo a una pérdida de actividad de entre 2 y 3 órdenes de magnitud, por lo que se concluyó que esta restricción conformacional no era adecuada para mimetizar la conformación bioactiva de la chalcona **TUB091**.

Con el objetivo de determinar el modo de unión de las chalconas con $\alpha\beta$ -tubulina se llevó a cabo la resolución por rayos X del complejo cristalino del ligando **TUB092** con tubulina. El análisis del modo de unión permitió corroborar que **TUB092** se une de forma similar a colchicina, ocupando las zonas 1 y 2 del dominio de unión de colchicina. En base a los datos estructurales obtenidos, se abordó el diseño de nuevos derivados conformacionalmente restringidos mediante ciclación sobre el anillo B, y se exploraron distintos anillos aromáticos en el fragmento A. De los compuestos sintetizados, habría que destacar el compuesto **2.31**, que presentó una potente actividad antiproliferativa (0.022 – 0.047 μM). Además, se determinó su constante de afinidad por tubulina en el sitio de colchicina, obteniéndose un valor de $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Una vez determinada su afinidad por tubulina, se llevaron a cabo estudios de docking y dinámica molecular para establecer el modo de unión de **2.31** (isómero *R*) al sitio de colchicina e identificar los residuos que más contribuyen a la interacción.

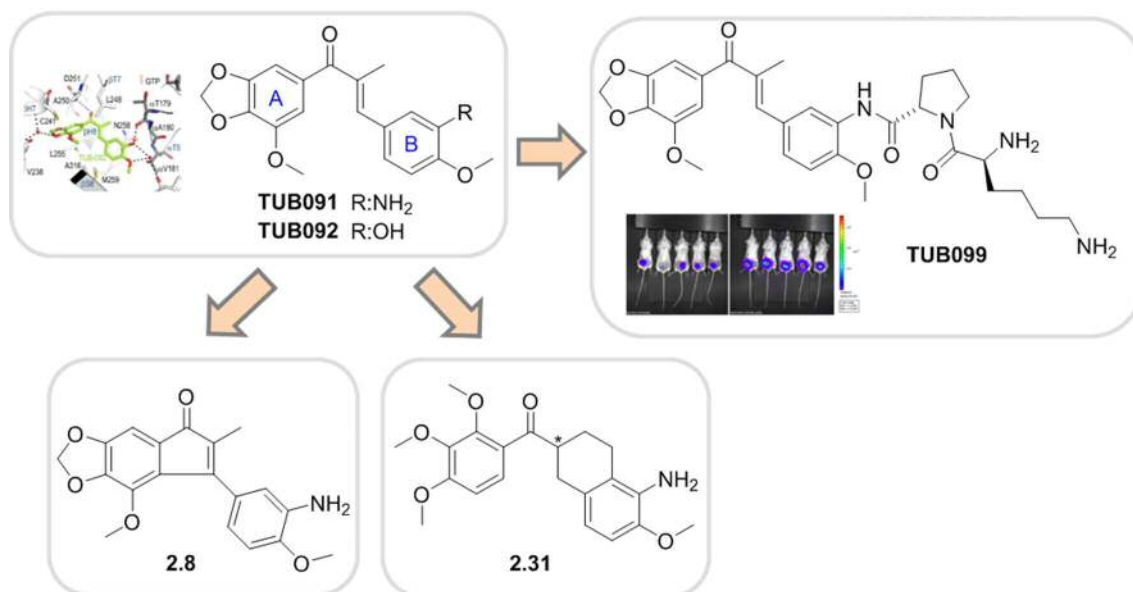


Figura 2.17. Estructuras del isómero *E* de **TUB091** y **TUB092**. Se muestra la estructura del profármaco **TUB099** evaluado *in vivo*, la estructura de **2.8** como representante de la ciclación sobre el anillo A, y **2.31** como representante de la ciclación sobre el anillo B.

Para mejorar la solubilidad del compuesto **2.31** se llevó a cabo la síntesis del conjugado **2.38** que incorpora el dipéptido Asn-Pro. El conjugado **2.38** permitió un gran aumento de solubilidad, pero, en los ensayos de actividad antiproliferativa, este derivado resultó ser entre 20 y 40 veces menos activo que el compuesto precursor con el grupo amino libre **2.31**. Los estudios de estabilidad en PBS y suero fetal bovino (FBS) del conjugado pusieron de manifiesto que la liberación del compuesto activo **2.31** no era eficaz, siendo la causa más probable de la pérdida de actividad de **2.38** en cultivo celular.

Tras los resultados obtenidos para el profármaco **2.38**, éste se descartó como candidato para ensayos *in vivo*, y se decidió incluir en estos estudios únicamente el profármaco **TUB099**. Así, tras la evaluación en modelo de ratón de la capacidad antitumoral y antimetastásica de **TUB099**, se pudo concluir que tiene un marcado efecto antitumoral y que además es capaz de impedir la metástasis. En particular, su efecto anti-metastásico fue incluso superior al mostrado por el compuesto de referencia CA-4P. Además, estos ensayos permitieron demostrar el mecanismo de acción VDA *in vivo* de **TUB099**, poniendo de manifiesto una vez más el gran potencial terapéutico de este tipo de compuestos.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Ducki, S.; Rennison, D.; Woo, M.; Kendall, A.; Chabert, J. F. D.; McGown, A. T.; Lawrence, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: synthesis and biological evaluation of antivasular activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7698-7710.
2. Edwards, M. L.; Stemerick, D. M.; Sunkara, P. S. Chalcones: a new class of antimitotic agents. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1948-1954.
3. Peyrot, V.; Leynadier, D.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Rodriguez, A.; Nieto, J. M.; Andreu, J. M. Interaction of tubulin and cellular microtubules with the new antitumor drug MDL 27048. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21296-21301.
4. Peyrot, V.; Leynadier, D.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Menendez, M.; Laynez, J.; Andreu, J. M. Mechanism of binding of the new antimitotic drug MDL 27048 to the colchicine site of tubulin: equilibrium studies. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11125-11132.
5. Martel-Frchet, V.; Ronot, X.; Keramidias, M.; Coll, J.-L.; Nurisso, A.; DeBonis, S.; Skoufias, D. A.; Rome, C.; Boumendjel, A. IPP51, a chalcone acting as a microtubule inhibitor with in vivo antitumor activity against bladder carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14669-14686.
6. Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K.; Asati, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *98*, 69-114.
7. Canela, M. D. Búsqueda, síntesis y evaluación de nuevos agentes interruptores de la vascularización tumoral. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, **2014**.
8. Ducki, S.; Mackenzie, G.; Greedy, B.; Armitage, S.; Chabert, J. F. D.; Bennett, E.; Nettles, J.; Snyder, J. P.; Lawrence, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerisation. Part 2: Structure-based discovery of alpha-aryl chalcones. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7711-7722.
9. Perjési, P.; Takács, M.; Ösz, E.; Pintér, Z.; Vámos, J.; Takács-Novák, K. In-solution and on-plate light-catalyzed *E/Z* isomerization of cyclic chalcone analogues. Lipophilicity of *E*- and *Z*-2-(*X*-benzylidene)-1-benzosuberones *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 289-295.
10. Iwata, S.; Nishino, T.; Inoue, H.; Nagata, N.; Satomi, Y.; Nishino, H.; Shibata, S. Antitumorigenic activities of chalcones (II). Photo-isomerization of chalcones and the correlation with their biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 1266-1270.
11. García-Aparicio, C.; Bonache, M. C.; Meester, I. D.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Design and discovery of a novel dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-based prodrug approach. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5339-5351.
12. Yasobu, N.; Kitajima, M.; Kogure, N.; Shishido, Y.; Matsuzaki, T.; Nagaoka, M.; Takayama, H. Design, synthesis, and antitumor activity of 4-halocolchicines and their pro-drugs activated by Cathepsin B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 348-352.
13. Qu, X.; Li, T.; Sun, P.; Zhu, Y.; Yang, H.; Mao, J. Highly effective copper-catalyzed decarboxylative coupling of aryl halides with alkynylcarboxylic acids. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6938-6942.

14. Larock, R. C.; Doty, M. J.; Cacchi, S. Synthesis of indenones via palladium-catalyzed annulation of internal alkynes. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4579-83.
15. Harrowen, D. C.; Newman, N. A.; Knight, C. A. On the identity of a neo-lignan from the fruits of *Virola sebifera*. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6757-6760.
16. Zhang, J.; Yang, F.; Wu, Y. Facile synthesis of indenones by cyclopalladated ferrocenylimine-catalyzed annulation of internal alkynes. *Appl. Organomet. Chem.* **2011**, *25*, 675-679.
17. Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
18. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.
19. Ravelli, R. B. G.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.
20. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Zurwerra, D.; Field, J. J.; Díaz, J. F.; Altmann, K.-H.; Steinmetz, M. O. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* **2013**, *339*, 587-589.
21. Stewart, J. J. P. MOPAC 2012. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA. <http://OpenMOPCAC.net>. **2012**.
22. Chow, K.; Gil, D. W.; Burke, J. A.; Harcourt, D. A.; Garst, M. E.; Wheeler, L. A. Preparation of imidazoles as selective agonists at $\alpha 2B$ or $\alpha 2B/\alpha 2C$ adrenergic receptors. US20030023098A1, 2003.
23. Brenna, E.; Gatti, F. G.; Malpezzi, L.; Monti, D.; Parmeggiani, F.; Sacchetti, A. Synthesis of robalzotan, ebalzotan, and rotigotine precursors via the stereoselective multienzymatic cascade reduction of α, β -unsaturated aldehydes. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4811-4822.
24. Ushijima, S.; Dohi, S.; Moriyama, K.; Togo, H. Facile preparation of aromatic ketones from aromatic bromides and arenes with aldehydes. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1436-1442.
25. Pozgan, F.; Stefane, B.; Kidjemet, D.; Smoldis, J.; Zupet, R. A new synthetic route towards Aliskiren intermediates. *Synthesis* **2014**, *46*, 3221-3228.
26. Bernet, A.; Seifert, K. A new approach to sesquiterpene arenes of the 9,11-drimenyl type ([1E,2RS,4aRS,8aRS]-octahydro-2,5,5,8a-tetramethylnaphthalen-1(2H)-ylidene] methyl type). *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 784-796.
27. Markwell-Heys, A. W.; Kuan, K. K. W.; George, J. H. Total synthesis and structure revision of (-)-siphonodictyal B and its biomimetic conversion into (+)-liphagal. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4228-4231.
28. Sartori, G.; Maggi, R. Use of solid catalysts in Friedel-Crafts acylation reactions. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1077-1104.

29. Pierce, A. C.; Arnost, M.; Davies, R. J.; Forster, C. J.; Galullo, V.; Grey, R.; Ledebuer, M.; Tian, S.-k.; Xu, J.; Binch, H.; Ledford, B.; Messersmith, D.; Nanthakumar, S.; Jayaraj, A. Preparation of 3,5-diamino[1,2,4]triazoles as protein kinase inhibitors. WO2004046120A2, 2004.
30. Al Rahim, M.; Nakajima, A.; Saigusa, D.; Tetsu, N.; Maruyama, Y.; Shibuya, M.; Yamakoshi, H.; Tomioka, Y.; Iwabuchi, Y.; Ohizumi, Y.; Yamakuni, T. 4'-Demethylnobiletin, a bioactive metabolite of nobiletin enhancing PKA/ERK/CREB signaling, rescues learning impairment associated with NMDA receptor antagonism via stimulation of the ERK cascade. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7713-7721.
31. Suzuki, K.; Tsuruga, T.; Hiranuma, K.; Yamaura, M. Synthesis of 7,8-dihydroxy-5-hydroxymethyl-2-phenyl-chroman-4-one; the aglycon of actinoflavoside. *Synlett* **2004**, 116-118.
32. Asakawa, T.; Hiza, A.; Nakayama, M.; Inai, M.; Oyama, D.; Koide, H.; Shimizu, K.; Wakimoto, T.; Harada, N.; Tsukada, H.; Oku, N.; Kan, T. PET imaging of nobiletin based on a practical total synthesis. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2868-2870.
33. Muller, G. W.; Payvandi, F.; Zhang, L. H.; Robarge, M. J.; Chen, R.; Man, H.-W.; Ruchelman, A. L. Diphenylethylene compounds preparation for treating cancer or an inflammatory disorder. US20050107339A1, 2005.
34. Ramulu, B. V.; Niharika, P.; Satyanarayana, G. Superacid-promoted dual C-C Bond formation by Friedel-Crafts alkylation/acylation of cinnamate esters: synthesis of indanones. *Synthesis* **2015**, *47*, 1255-1268.
35. Mahalingam, P.; Takroui, K.; Chen, T.; Sahoo, R.; Papadopoulos, E.; Chen, L.; Wagner, G.; Aktas, B. H.; Halperin, J. A.; Chorev, M. Synthesis of rigidified eIF4E/eIF4G inhibitor-1 (4EGI-1) mimetic and their in vitro characterization as inhibitors of protein-protein interaction. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5094-5111.
36. Clive, D. L. J.; Fletcher, S. P.; Liu, D. Formal radical cyclization onto benzene rings: a general method and its use in the synthesis of *ent*-nocardione A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3282-3293.
37. Li, W.; Yang, Z.-H.; Hu, A.-X.; Yan, X.-W.; Ding, N.; Ye, J. Design, synthesis, and antitumor activity of (*E,Z*)-1-(dihydrobenzofuran-5-yl)-3-phenyl-2-(1,2,4-triazol-1-yl)-2-propen-1-ones. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86*, 1339-1350.
38. Weinstock, J.; Gaitanopoulos, D.; Oh, H. J.; Pfeiffer, F. R.; Karash, C. B.; Venslavsky, J. W.; Sarau, H. M.; Flaim, K. E.; Hieble, J. P.; Kaiser, C. Synthesis and dopaminergic activity of some halogenated mono- and dihydroxylated 2-aminotetralins. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1615-27.
39. Treguier, B.; Lawson, M.; Bernadat, G.; Bignon, J.; Dubois, J.; Brion, J.-D.; Alami, M.; Hamze, A. Synthesis of a 3-(α -styryl)benzo[b]thiophene library via bromocyclization of alkynes and palladium-catalyzed tosylhydrazones cross-couplings: evaluation as antitubulin agents. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 702-710.
40. Butin, A. V.; Smirnov, S. K.; Stroganova, T. A.; Bender, W.; Krapivin, G. D. Simple route to 3-(2-indolyl)-1-propanones via a furan recyclization reaction. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 474-491.

41. Pailla, U. R.; Arava, V. R.; Ravindhranath, L. K. New synthesis of (\pm)-cherylline and mono- and dimethyl ethers. *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 2232-2238.
42. Leynadie, D.; Peyrot, V.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Andreu, J. M.; Renner, G. A.; Temple, C. Tubulin binding of two 1-deaza-7,8-dihydropteridines with different biological properties: enantiomers NSC 613862 (S)-(-) and NSC 613863 (R)-(+). *Biochemistry* **1993**, *32*, 10675-10682.
43. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock and AutoDockTools: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.
44. Klett, J.; Núñez-Salgado, A.; Dos Santos, H. G.; Cortés-Cabrera, Á.; Perona, A.; Gil-Redondo, R.; Abia, D.; Gago, F.; Morreale, A. MM-ISMSA: An ultrafast and accurate scoring function for protein-protein docking. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 3395-3408.
45. Morreale, A.; Gil-Redondo, R.; Ortiz, A. R. A new implicit solvent model for protein-ligand docking. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, *67*, 606-616.
46. Liekens, S.; Noppen, S.; Gijssbers, S.; Sienaert, R.; Ronca, R.; Tobia, C.; Presta, M. The broad-spectrum anti-DNA virus agent cidofovir inhibits lung metastasis of virus-independent, FGF2-driven tumors. *Oncotarget* **2015**, *6*, 4633-4648.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

A partir de la información disponible en nuestro grupo de investigación relativa a dos familias de compuestos que habían mostrado su capacidad para unirse al dominio de colchicina en tubulina, en la presente Memoria se ha profundizado en la interacción a nivel molecular de estos ligandos con tubulina y así se ha realizado el diseño, síntesis y evaluación de nuevas familias de compuestos. Como se ha mencionado varias veces a lo largo de esta Memoria, los ligandos del sitio de unión de colchicina en tubulina tienen un notable interés en terapias antitumorales por su mecanismo de acción dual, como antimetabólicos y como agentes interruptores de la vascularización tumoral. Los resultados más relevantes de esta Memoria se comentan a continuación, agrupados por capítulos.

El Capítulo 1 se ha centrado en una familia de compuestos para la que ya se había demostrado su afinidad por tubulina y su actividad antiproliferativa y antivascular, siendo el compuesto “cabeza de serie” o hit, la 5-fenil-2-(1-((2-etoxi)fenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (**TUB075**). Haciendo uso de distintas herramientas computacionales se ha llevado a cabo el diseño racional y síntesis de nuevas series de compuestos con el fin de mejorar la solubilidad acuosa y/o la afinidad por tubulina, modificaciones que han estado centradas en el fragmento de 2-etoxifenilo (anillo D) del hit. Los resultados obtenidos se pueden resumir en los siguientes puntos:

- El estudio del modo de unión de **TUB075** mediante estudios de docking y posteriormente mediante resolución por difracción de Rayos X del complejo cristalino TUB075-tubulina ha sido clave para el diseño de tres nuevas series de compuestos.
- En la primera serie se incorporaron grupos polares terminales dirigidos hacia la interfaz de $\alpha\beta$ -tubulina alargando el sustituyente en posición *orto* en el anillo D de **TUB075** manteniendo el átomo de O como nexo de unión. De los compuestos sintetizados, habría que destacar el glicol **1.23**, 16 veces más soluble que el hit.
- En la segunda serie, y mediante el empleo de mapas de afinidad, se ha llevado a cabo el diseño y síntesis de compuestos que incorporaron un anillo de benzofurano como anillo D. De los compuestos sintetizados destaca el compuesto **1.57**, con actividad antiproliferativa en el rango nanomolar ($IC_{50} = 8 - 31$ nM), y cuyo valor de constante de afinidad es de 2.87×10^8 M⁻¹, siendo, en nuestro conocimiento, el valor más alto descrito hasta la fecha (un orden de magnitud superior a la de colchicina).

- En la tercera serie, y empleando los mapas de afinidad sobre el complejo con colchicina, se diseñaron y sintetizaron una serie de análogos de **TUB075** que incorporaron un anillo aromático extra (anillo E) diferentemente sustituido, manteniendo el átomo de O como nexo de unión con el anillo D. Se obtuvieron compuestos con marcada actividad antiproliferativa en el rango submicromolar. Además, los compuestos **1.106** y **1.107**, con un grupo amino en la posición 4 del anillo E, presentaron valores de constante de afinidad de 10^7 M^{-1} , análogos al valor mostrado por colchicina.
- Estudios biológicos adicionales realizados con los derivados más activos de la segunda (compuestos **1.57** y **1.59**) y de la tercera serie (compuestos **1.106** y **1.107**) para la determinación del mecanismo de acción mostraron que: 1) los nuevos compuestos inducen el bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular, siendo necesaria una concentración menor a la empleada con **TUB075** para conseguir el mismo efecto; 2) estos compuestos inducen la apoptosis, efecto que fue confirmado mediante el experimento de actividad caspasa-3 realizado con **1.59** y **1.106**; 3) interrumpen la formación de redes de tubos de células endoteliales, apuntando a una potencial actividad VDA.
- Como estrategia para mejorar la solubilidad de **1.106**, se sintetizó el derivado conjugado con Asn-Pro **1.109**, lo que se tradujo en un incremento de solubilidad de más de 100 veces. Además, los estudios de estabilidad en PBS y suero fetal bovino mostraron que el profármaco fue capaz de liberar de un modo eficiente el fármaco **1.106**. Así, respecto a **TUB075**, **1.109** combina una actividad antiproliferativa que es entre 3 y 4 veces superior y una solubilidad en torno a 100 veces superior, cumpliendo con el objetivo marcado de optimización del hit **TUB075**.

El segundo capítulo se basa en la excelente actividad antiproliferativa y alta afinidad por tubulina de las metilchalconas **TUB091** y **TUB092**, sintetizadas en el grupo con anterioridad. Conforme a precedentes bibliográficos, la actividad biológica debía atribuirse al isómero *E* si bien se había observado la tendencia a la isomerización al isómero *Z*. Esta isomerización era especialmente notable en la síntesis del conjugado de Lys-Pro de **TUB091**, con código **TUB099**, que había sido propuesto para estudios *in vivo*. Por tanto, los objetivos propuestos han consistido en minimizar esa isomerización así como diseñar y sintetizar nuevos esqueletos que mimeticen la conformación del isómero *E* (conformación *s-trans*). Las conclusiones alcanzadas se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se ha minimizado la isomerización a la forma *Z* de la metilchalcona **TUB099** evitando la exposición a la luz durante la síntesis y purificación del compuesto. Se obtuvo así el profármaco de Lys-Pro altamente enriquecido en el isómero *E*.
- A partir de la conformación *s-trans* de la metilchalcona **TUB091**, se abordó el diseño y síntesis de derivados conformacionalmente restringidos que mimetizaran dicha conformación. La primera estrategia planteada mediante cierre sobre el anillo A condujo a la síntesis de la indenona **2.8**. La evaluación de **2.8** en cultivo celular reveló una pérdida sustancial de actividad antiproliferativa, por lo que se concluyó que esta restricción conformacional no era adecuada para mimetizar la chalcona **TUB091**.
- La resolución del complejo cristalino TUB092-tubulina por difracción de Rayos X ha permitido determinar la conformación bioactiva de la chalcona y a partir de ahí el diseño y síntesis de nuevos análogos conformacionalmente restringidos mediante ciclación sobre el anillo B. En concreto se propuso la incorporación del biciclo de tetrahidronaftaleno.
- La evaluación de la actividad antiproliferativa de los nuevos derivados de tetrahidronaftaleno sintetizados puso de manifiesto los estrictos requisitos estructurales para la actividad, siendo el compuesto **2.31** el más activo, con valores de CI_{50} en torno a 0.022 – 0.047 μ M. En todos los casos, los compuestos se sintetizaron como racémicos.
- El compuesto **2.31** presentó una constante de asociación de 10^6 M^{-1} con tubulina. Los estudios computacionales permitieron determinar las interacciones más relevantes y la contribución por residuos a la energía de interacción.
- El compuesto **2.38**, derivado de Asn-Pro del compuesto **2.31**, mostró un incremento espectacular de la solubilidad respecto al compuesto precursor pero su evaluación antiproliferativa puso de manifiesto una pérdida de actividad. Estos resultados se podrían explicar por la ineficiente liberación del compuesto activo **2.31** en el medio biológico, como se puso de manifiesto mediante estudios de incubación en suero bovino.
- La evaluación *in vivo* en ratones del compuesto **TUB099**, conjugado de Lys-Pro de la metilchalcona **TUB091**, mostró un marcado efecto antitumoral y un efecto anti-metastásico ligeramente superior al mostrado por el compuesto de referencia CA-4P.

PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental de esta Memoria está redactada en inglés para su uso directo en publicaciones científicas.

1. CHEMISTRY PROCEDURES

Melting points were obtained on a Reichert-Jung Kofler apparatus and are uncorrected. The elemental analysis was performed with a Heraeus CHN-O-RAPID instrument. The elemental compositions of the compounds agreed to within $\pm 0.4\%$ of the calculated values.

Electrospray mass spectra were measured on a quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray source (Hewlett-Packard, LC/MS HP 1100).

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian INNOVA 300 operating at 300 MHz (^1H) and 75 MHz (^{13}C), respectively, a Varian INNOVA-400 operating at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), respectively, and a VARIAN SYSTEM-500 operating at 500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C), respectively.

Analytical TLC was performed on silica gel 60 F_{254} (Merck) precoated plates (0.2 mm). Spots were detected under UV light (254 nm) and/or charring with ninhydrin or phosphomolibdic acid.

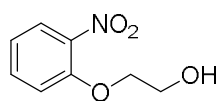
Separations on silica gel were performed by preparative centrifugal circular thin-layer chromatography (CCTLC) on a Chromatotron^R (Kiesegel 60 PF₂₅₄ gipshaltig (Merck)), with layer thickness of 1 and 2 mm and flow rate of 4 or 8 mL/min, respectively. Flash column chromatography was performed in a Biotage Horizon instrument.

Microwave reactions were performed using the Biotage Initiator 2.0 single-mode cavity instrument from Biotage (Uppsala). Experiments were carried out in sealed microwave process vials utilizing the standard absorbance level (400 W maximum power). The temperature was measured with an IR sensor on the outside of the reaction vessel.

The synthesis of the different series of compounds has been performed by applying the here described general procedures.

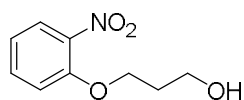
1.1. CHEMISTRY PROCEDURES IN CHAPTER 1

2-(2-Nitrophenoxy)ethan-1-ol (1.8)



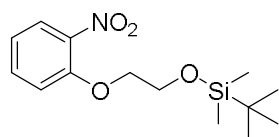
To a solution of 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (750 μ L, 7.09 mmol) in 5 mL of anhydrous DMF, ethylene glycol (**1.6**) (474 μ L, 8.50 mmol) and K_2CO_3 (2 g, 14.20 mmol) were added. The reaction was heated at 80 °C overnight. Then, it was quenched with water and extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 440 mg (34%) of **1.8** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 184 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO- d_6 300 MHz): δ 3.72 (q, J = 5.1 Hz, 2H, CH_2CH_2OH), 4.17 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH_2CH_2OH), 4.89 (t, J = 5.4 Hz, 1H, OH), 7.10 (td, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.37 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.63 (ddd, J = 8.9, 7.4, 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.84 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.¹

3-(2-Nitrophenoxy)propan-1-ol (1.9)



To a solution of 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (1.05 mL, 10 mmol) in 7 mL of anhydrous DMF, propylene glycol (**1.7**) (0.870 mL, 12 mmol) and K_2CO_3 (2.75 g, 20 mmol) were added. The reaction was heated at 80 °C overnight. Then, it was quenched with water and the crude was extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 1.56 g (79%) of **1.9** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 184 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.86 (m, 2H, CH_2), 3.44 (m, 2H, CH_2OH), 4.21 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH_2OAr), 4.56 (t, J = 5.1 Hz, 1H, OH), 7.09 (m, 1H, Ar), 7.36 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.64 (m, 1H, Ar), 7.85 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.²

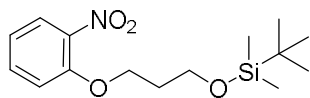
tert-Butyldimethyl(2-(2-nitrophenoxy)ethoxy)silane (1.10)



To a solution of **1.8** (400 mg, 2.18 mmol) in 14 mL of anhydrous DMF, imidazole (300 mg, 4.36 mmol), TBDMSCl (463 mg, 3.28 mmol) and DMAP (26 mg, 0.22 mmol) were added. The reaction was stirred at room temperature for 1 h. After removing the solvent, the crude was washed with water and extracted with ethyl acetate (3x10 mL). The organic layer was washed with brine (10 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 554 mg (85%) of **1.10** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 320 (M+Na)⁺. **¹H NMR** (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 0.83 (s, 9H, $(CH_3)_3$), 3.91 (m, 2H, CH_2OSi), 4.22 (m, 2H, CH_2OAr), 7.10 (ddd, J = 8.5, 7.4, 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.37 (m, 1H, Ar), 7.62

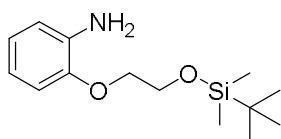
(ddd, $J = 8.5, 7.4, 1.7$ Hz, 1H, Ar), 7.83 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H, Ar). $^1\text{H NMR}$ data are similar to those previously described.³

***tert*-Butyldimethyl(3-(2-nitrophenoxy)propoxy)silane (1.11)**



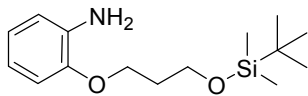
To a solution of **1.9** (1.50 g, 7.61 mmol) in 20 mL of anhydrous DMF, imidazole (1.04 g, 15.22 mmol), TBDMSCl (1.61 g, 11.41 mmol) and DMAP (90 mg, 0.76 mmol) were added. The reaction was stirred at room temperature for 1h. After removing the solvent, the crude was washed with water and extracted with ethyl acetate (3x10 mL). The organic layer was washed with brine (20 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 1.63 g (69%) of **1.11** as an oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 312 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 0.83 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.90 (p, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.75 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2OSi), 4.20 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH_2OAr), 7.09 (m, 1H, Ar), 7.35 (dd, $J = 8.5, 1.1$ Hz, 1H, Ar), 7.63 (m, 1H, Ar), 7.85 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H, Ar).

2-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)aniline (1.12)



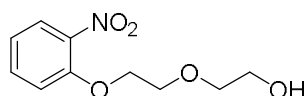
To a solution of **1.10** (500 mg, 1.68 mmol) in 5 mL of ethanol, 10% Pd/C (catalytic amount) was added under argon and the mixture was subjected to hydrogenation under balloon for 12h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 420 mg (93%) of **1.12** as a pink pale oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 268 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 0.88 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 3.90 (m, 2H, CH_2OSi), 3.97 (m, 2H, CH_2OAr), 4.62 (br s, 2H, NH_2), 6.49 (m, 1H, Ar), 6.63 (dd, $J = 7.7, 2.0$ Hz, 1H, Ar), 6.68 (m, 1H, Ar), 6.79 (m, 1H, Ar). Although this compound was mentioned in literature⁴ no analytical data were provided.

2-(3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propoxy)aniline (1.13)



To a solution of **1.11** (1.0 g, 3.21 mmol) in 8 mL of ethanol, 10% Pd/C was added under argon and the mixture was subjected to hydrogenation under balloon for 12h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 800 mg (89%) of **1.13** as a pink pale oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 282 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 0.86 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.90 (p, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.78 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2OSi), 3.98 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2OAr), 4.63 (br s, 2H, NH_2), 6.49 (m, 1H, Ar), 6.63 (m, 2H, Ar), 6.75 (m, 1H, Ar). Although this compound was mentioned in literature⁴ no analytical data were provided.

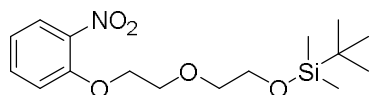
2-(2-(2-Nitrophenoxy)ethoxy)ethan-1-ol (**1.18**)



To a solution of 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (1.05 mL, 10 mmol) in 7 mL of anhydrous DMF, diethylene glycol (**1.16**) (1.14 mL, 12 mmol) and K_2CO_3 (2.75 g, 20 mmol) were added.

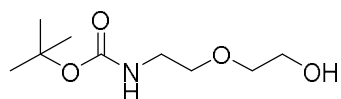
The reaction was heated at 80 °C overnight. Then, it was quenched with water and the crude was extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The organic layer was washed with brine (15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 1.36 g (60%) of **1.18** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 228 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.49 (d, J = 2.6 Hz, 4H, CH_2OCH_2), 3.76 (m, 2H, CH_2OH), 4.28 (m, 2H, CH_2OAr), 4.60 (t, J = 4.5 Hz, 1H, OH), 7.11 (m, 1H, Ar), 7.37 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.63 (ddd, J = 8.8, 7.4, 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.85 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar). Although this compound was mentioned in literature⁴ no analytical data were provided.

tert-Butyldimethyl(2-(2-(2-nitrophenoxy)ethoxy)ethoxy)silane (**1.20**)

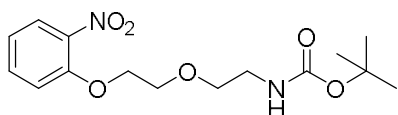


To a solution of **1.18** (1.30 g, 5.72 mmol) in 20 mL of anhydrous DMF, imidazole (780 mg, 11.44 mmol), TBDMSCl (1.21 g, 8.58 mmol) and DMAP (67 mg, 0.57 mmol) were added. The reaction was stirred at room temperature for 1h. After removing the solvent, the crude was washed with water and extracted with ethyl acetate (3x10 mL). The organic layer was washed with brine (20 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 1.51 g (77%) of **1.20** as an oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 364 ($M+Na$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.83 (s, 9H, $(CH_3)_3$), 3.52 (t, J = 5.0 Hz, 2H, CH_2CH_2OSi), 3.68 (m, 2H, CH_2CH_2OAr), 3.77 (m, 2H, CH_2CH_2OSi), 4.27 (t, J = 4.6 Hz, 2H, CH_2CH_2OAr), 7.11 (t, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.63 (m, 1H, Ar), 7.84 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H, Ar).

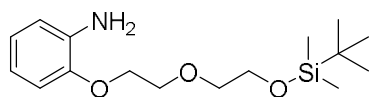
tert-Butyl (2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)carbamate (**1.17**)⁵



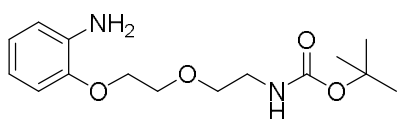
2-(2-Aminoethoxy)ethanol (1.0 mL, 9.97 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (40 mL) and di-*tert*-butylcarbonate (2.18 mg, 9.97 mmol) and triethylamine (1.39 mL, 9.97 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at rt overnight under argon. The crude was then concentrated and purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol, 20:1) to yield 1.85 g (90%) of **1.17** as an oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 206 ($M+H$). **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.37 (s, 9H, $(CH_3)_3$), 3.06 (q, J = 5.9 Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.38 (m, 4H, OCH_2), 3.47 (m, 2H, CH_2OH), 4.56 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 6.76 (br s, 1H, OH).

tert-Butyl (2-(2-(2-nitrophenoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (1.19)

To a solution of 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (214 μL , 2.03 mmol) in 1.4 mL of anhydrous DMF, **1.17** (500 mg, 2.44 mmol) and K_2CO_3 (558 mg, 4.06 mmol) were added. The reaction was heated at 80 $^\circ\text{C}$ for 48h. Then, it was quenched with water and the crude was extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The organic layer was washed with brine (15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 480 mg (72%) of **1.19** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 349 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. **$^1\text{H NMR}$** ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 1.36 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 3.07 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.44 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2O), 3.73 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2O), 4.27 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2OAr), 6.73 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, NH), 7.11 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 7.64 (m, 1H, Ar), 7.85 (m, 1H, Ar). Although this compound was mentioned in literature⁶ no analytical data were provided.

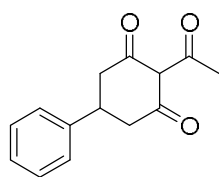
2-(2-(2-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)ethoxy)aniline (1.14)

To a solution of **1.20** (1000 mg, 2.93 mmol) in 5 mL of ethanol, 10% Pd/C (180 mg) was added under argon and the mixture was subjected to hydrogenation for 12h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 850 mg (93%) of **1.14** as a pink pale oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 312 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. **$^1\text{H NMR}$** ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 0.86 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 3.53 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSi}$), 3.73 (m, 4H, $\text{SiOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OAr}$), 4.03 (m, 2H, CH_2OAr), 4.63 (br s, 2H, NH_2), 6.49 (m, 1H, Ar), 6.65 (m, 2H, Ar), 6.79 (m, 1H, Ar). Although this compound was mentioned in literature⁴ no analytical data were provided.

tert-Butyl (2-(2-(2-aminophenoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (1.15)

To a solution of **1.19** (400 mg, 1.23 mmol) in 3 mL of ethanol, 10% Pd/C (80 mg) was added under argon and the mixture was subjected to hydrogenation under balloon for 12h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 350 mg (96%) of **1.15** as an oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 397 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. **$^1\text{H NMR}$** ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 1.37 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 3.10 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.45 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2O), 3.71 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2O), 4.03 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, CH_2OAr), 4.34 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, NH), 4.65 (br s, 2H, NH_2), 6.49 (m, 1H, Ar), 6.66 (m, 2H, Ar), 6.79 (m, 1H, Ar). Although this compound was mentioned in literature⁶ no analytical data were provided.

2-Acetyl-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (**1.4**)⁷

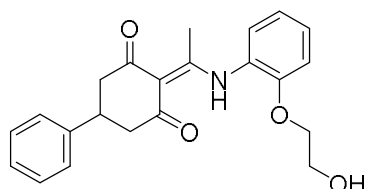


A microwave vial was charged with 5-phenylcyclohexane-1,3-dione (500 mg, 2.66 mmol), acetyl chloride (417 μ L, 5.31 mmol), anhydrous K_2CO_3 (809 mg, 5.85 mmol), 1,2,4-triazole (73 mg, 1.06 mmol) and tetrabutylammonium bromide (429 mg, 1.33 mmol) in anhydrous acetonitrile (10 mL). The reaction vessel was sealed, stirred under argon atmosphere for 10 min, and heated in a microwave reactor at 70 $^{\circ}C$ for 2 h. After cooling, the reaction mixture was acidified with 1 N HCl and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , concentrated, and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 350 mg (54%) of **1.4** as a white solid. **Mp** 100-102 $^{\circ}C$. **MS** (ES, positive mode): m/z 231 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (enol form) 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.66-2.72 (m, 2H, H-4, H-6), 2.94 (m, 2H, H-4, H-6), 3.41 (m, 1H, H-5), 7.22-7.34 (m, 5H, Ar).

General procedure for the reaction of 2-acetyl-5-phenylcyclohexane-1,3-dione with anilines (General procedure A).

A solution of 2-acetylcyclohexane-1,3-dione (**1.4**) (1.0 mmol) and the appropriate aniline (1.5 mmol) in toluene (10 mL) was placed in an Ace pressure tube. Then, 4 \AA molecular sieves were added, the vessel was sealed and heated at 110 $^{\circ}C$ overnight. After cooling, the solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography or by CCTLC in the Chromatotron.

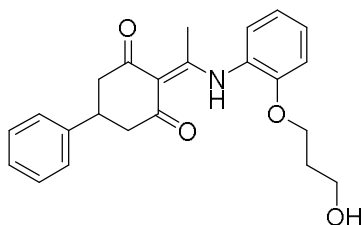
2-(1-((2-(2-Hydroxyethoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (**1.21**)



Following the general procedure A, a solution of **1.4** (143 mg, 0.62 mmol) and **1.12** (200 mg, 0.75 mmol) in toluene was placed in an Ace pressure tube. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the crude reaction mixture was then dissolved in anhydrous THF (3.8 mL), and 1 M TBAF in THF (830 μ L, 0.83 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h, quenched with water and the crude was extracted with dichloromethane (2x15 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 1:1) to yield 132 mg (48%) of **1.21** as a white solid. **Mp** 156-158 $^{\circ}C$. **MS** (ES, positive mode): m/z 366 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.61 (m, 2H, H-6, H-4), 2.82 (m, 2H, H-6, H-4), 3.34 (m, 1H, H-5), 3.70 (m, 2H, CH_2CH_2OH), 4.10 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH_2CH_2OH), 4.81 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, OH), 7.03 (dt, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H, Ar), 7.23 (m, 2H, Ar), 7.30 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.35 (m, 1H, Ar), 14.80 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 19.9 (CH_3), 36.1 (C-5), 45.6 (C-4, C-6), 57.9 (CH_2CH_2OH), 65.2 (CH_2CH_2OH), 108.9 (NHC=C), 113.5, 120.7, 124.5, 124.9, 126.5,

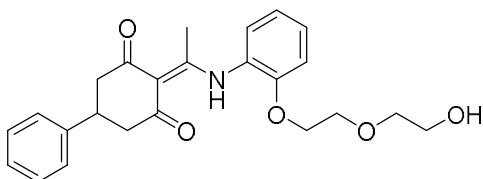
126.8, 128.5, 129.1, 143.6, 152.5 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₂H₂₃NO₄): C, 72.31; H, 6.34; N, 3.83. Found: C, 72.40; H, 6.53; N, 4.01.

2-(1-((2-(3-Hydroxypropoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.22)



Following the general procedure A, a solution of **1.4** (40 mg, 0.17 mmol) and **1.13** (73 mg, 0.26 mmol) in toluene in the presence of 4 Å molecular sieves was heated at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the crude reaction mixture was then dissolved in anhydrous THF (1.3 mL), and 1 M TBAF in THF (290 µL, 0.29 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. It was quenched with water and the crude was extracted with dichloromethane (2x15 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 47 mg (73%) of **1.22** as a white solid. **Mp** 83-85 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 380 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.85 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂OH), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.62 (m, 2H, H-6, H-4), 2.83 (m, 2H, H-6, H-4), 3.37 (m, 1H, H-5), 3.56 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂OH), 4.12 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH), 4.62 (br s, 1H, OH), 7.02 (dt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.20 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.23 (m, 1H, Ar), 7.33 (m, 6H, Ar), 14.79 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 20.3 (CH₃), 32.7 (CH₂), 36.6 (C-5), 45.9 (C-6, C-4), 59.4 (CH₂OH), 70.3 (OCH₂), 108.5 (NHC=C), 112.2, 114.30, 116.6, 127.2, 128.9, 138.2, 144.0, 147.0, 146.1, 152.8 (Ar), 172.7 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₃H₂₅NO₄): C, 72.80; H, 6.64; N, 3.69. Found: C, 72.53; H, 6.92; N, 3.99.

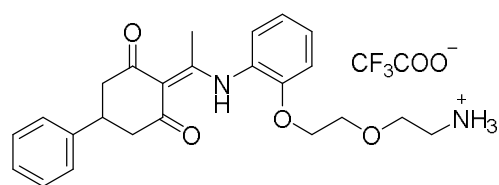
2-(1-((2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.23)



Following the general procedure A, a solution of **1.4** (40 mg, 0.17 mmol) and **1.14** (81 mg, 0.26 mmol) in toluene in the presence of 4 Å molecular sieves was heated at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the crude reaction mixture was then dissolved in anhydrous THF (1.3 mL), and 1 M TBAF in THF (290 µL, 0.29 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. It was quenched with water and the crude was extracted with DCM (2x15 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 40 mg (57%) of **1.23** as a white solid. **Mp** 105-107 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 410 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.59-2.63 (m, 2H, H-6, H-4), 2.82 (m, 2H, H-6, H-4), 3.30 (m, 1H, H-5), 3.47-

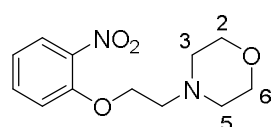
3.72 (m, 6H, CH₂CH₂OCH₂CH₂OH), 4.18 (m, 2H, CH₂CH₂OCH₂CH₂OH), 4.59 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, OH), 7.04 (dt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.23 (m, 2H, Ar), 7.33 (m, 6H, Ar) 14.79 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 19.9 (CH₃), 36.2 (C-5), 46.0 (C-6, C-4), 60.2 (CH₂), 68.2 (CH₂), 68.7 (CH₂), 72.6 (CH₂), 108.5 (NHC=C), 113.4, 120.8, 124.5, 124.9, 126.6, 126.8, 128.6, 129.2, 143.6, 152.4 (Ar), 172.7 (NHC=C), 220.2 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₄H₂₇NO₅): C, 70.40; H, 6.65; N, 3.42. Found: C, 70.26; H, 6.45; N, 3.45.

2-(1-((2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.24)



Following the general procedure A, a solution of **1.4** (220 mg, 0.78 mmol) and **1.15** (120 mg, 0.52 mmol) in toluene in the presence of 4 Å molecular sieves was heated at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 240 mg of the condensation product. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 509 (M+H)⁺. A solution of this compound (100 mg, 0.20 mmol) in CHCl₃ (2 mL) was treated with TFA (150 μL, 2 mmol) and the mixture was stirred at room temperature overnight. Volatiles were removed in vacuo. The residue was treated with diethyl ether, and the solid obtained was isolated. After filtration 96 mg (84% yield, two steps) of **1.24** were obtained as an amorphous solid. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 409 (M+H)⁺. ¹H NMR (Methanol-*d*₄, 500 MHz): δ 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.78 (m, 2H, H-4, H-6), 2.88 (m, 2H, H-4, H-6), 3.15 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.39 (m, 1H, H-5), 3.74 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.89 (m, 2H, OCH₂CH₂OPh), 4.27 (m, 2H, OCH₂CH₂OPh), 7.09 (dt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.18 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.26 (m, 1H, Ar), 7.30 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.34 (m, 4H, Ar), 7.40 (ddd, *J* = 8.3, 7.6, 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.75 (br s, 2H, NH₂), 14.91 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (Methanol-*d*₄, 125 MHz): δ 21.0 (CH₃), 38.3 (C-5), 40.8 (CH₂N), 47.2 (C-6, C-4), 60.2 (OCH₂), 68.4 (OCH₂), 70.6 (OCH₂), 110.2 (NHC=C), 113.9 (CF₃COO), 114.0, 122.1, 122.7, 126.2, 127.8, 127.9, 129.8, 130.7, 144.5, 154.0 (Ar), 175.3 (NHC=C), 199.9 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₆H₂₉F₃N₂O₆): C, 59.77; H, 5.59; N, 5.39. Found: C, 59.50; H, 5.30; N, 5.42.

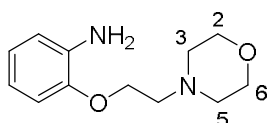
4-(2-(2-Nitrophenoxy)ethyl)morpholine (1.26)



To a stirred solution of 4-(2-hydroxyethyl)morpholine (**1.25**) (223 mg, 1.70 mmol) in anhydrous DMF (1 mL), NaH (68 mg, 60% dispersion in oil, 2.84 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 10 min, then cooled to 0°C. A solution of 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (150 μL, 1.42 mmol) in anhydrous DMF (1 mL) was added over 5 min. The solution was allowed to reach rt, stirred overnight and quenched by the addition of a saturated aqueous NH₄Cl solution (30 mL) and extracted with ethyl acetate (2x30 mL). The

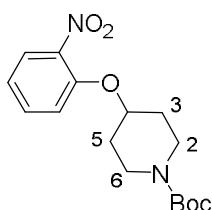
combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol, 10:1) to yield 231 mg (65%) of **1.26** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 253 (M+H)⁺. **¹H NMR** (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.43–2.48 (m, 4H, H-3, H-5), 2.70 (t, J = 5.6 Hz, 2H, NCH_2), 3.54 (m, 4H, H-2, H-6), 4.27 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH_2), 7.11 (m, 1H, Ar), 7.38 (dd, J = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.64 (m, 1H, Ar), 7.85 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those described.⁸

2-[2-(Morpholin-4-yl)ethoxy]aniline (**1.27**)



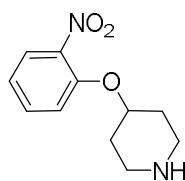
To a stirred solution of **1.26** (200 mg, 0.79 mmol) in EtOH (1.6 mL), SnCl_2 (451 mg, 2.38 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 3 h, then cooled to rt. The reaction mixture was neutralized with 1 N NaOH (5 mL) and extracted with *tert*-butyl methyl ether (4×20 mL). The combined organic layers were dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated in vacuo to yield 136 mg (53%) of **1.27** as a pink oil that was used without further purification. **MS** (ES, positive mode): m/z 323 (M+H)⁺. **¹H NMR** (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.64–2.71 (m, 6H, H-3, H-5, NCH_2), 3.55–3.60 (m, 4H, H-2, H-6), 4.02 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2), 4.71 (br s, 2H, NH_2), 6.49 (m, 1H, Ar), 6.62 (m, 1H, Ar), 6.68 (m, 1H, Ar), 6.80 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those described.⁸

tert-butyl 4-(2-nitrophenoxy)piperidine-1-carboxylate (**1.29**)



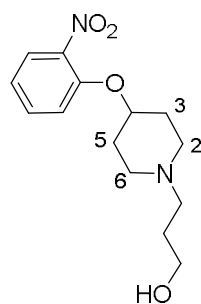
To a solution of 1-Boc-4-hydroxypiperidine (**1.28**) (200 mg, 0.99 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL), NaH (48 mg, 60% dispersion in oil, 1.99 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min and then cooled at 0° C. Then, a solution of 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (126 μL , 1.19 mmol) in DMF (0.5 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt for 22h and quenched by the addition of saturated aqueous NH_4Cl solution (10 mL). The reaction was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution and extracted with ethyl acetate (2x 20 mL). The combined organic extracts were dried over Na_2CO_3 , filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol, 10:0.1) to yield 304 mg (95%) of **1.29** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 323 (M+H)⁺. **¹H NMR** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.37 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.51–1.62 (m, 2H, H-3, H-5), 1.84 (m, 2H, H-3, H-5), 3.31 (m, 2H, H-2, H-6), 3.44 (m, 2H, H-2, H-6), 4.83 (m, 1H, H-4), 7.08 (m, 1H, Ar), 7.41 (m, 1H, Ar), 7.60 (m, 1H, Ar), 7.82 (dd, 1H, J = 8.1, 1.7 Hz, Ar). ¹H NMR data are similar to those described.⁹

4-(2-Nitrophenoxy)piperidine (1.30)



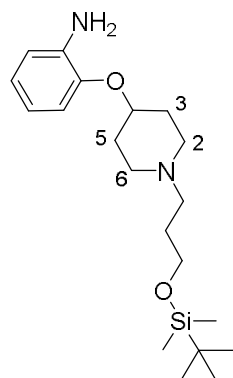
A solution of **1.29** (265 mg, 0.82 mmol) in dichloromethane (2.5 mL) and TFA (2.5 mL, 32.9 mmol) was stirred at rt for 1 h. Volatiles removal afforded 260 mg (94%) of **1.30** as an amorphous solid. **MS** (ES, positive mode): m/z 223 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.87 (m, 2H, H-3, H-5), 2.04 (m, 2H, H-3, H-5), 3.11 (m, 4H, H-2, H-6), 4.92 (m, 1H, H-4), 7.11 (m, 1H, Ar), 7.46 (m, 1H, Ar), 7.63 (m, 1H, Ar), 7.87 (dd, 1H, $J = 8.1, 1.7$ Hz, Ar), 8.49 (br s, 1H, NH). ¹H NMR data are similar to those described.⁹

3-(4-(2-Nitrophenoxy)piperidin-1-yl)propan-1-ol (1.31)



To a mixture containing **1.30** (372 mg, 1.11 mmol) and Na₂CO₃ (118 mg, 1.11 mmol) in acetone (4.4 mL), 3-bromopropanol (194 μ L, 2.22 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at 50 °C for 16 h under argon atmosphere. After cooling, a saturated aqueous NH₄Cl solution (20 mL) was added and extracted with dichloromethane (2x20 mL). The combined organic fractions were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by CCTLC (dichloromethane:ammonia solution 7 N in methanol, 10:0.2) to yield **1.31** (230 mg, 74%) as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 281 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.51–1.60 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 1.61–1.71 (m, 2H, H-3, H-5), 1.85–1.94 (m, 2H, H-3, H-5), 2.22–2.30 (m, 2H, H-2, H-6), 2.31–2.34 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 2.53–2.59 (m, 2H, H-2, H-6), 3.43 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 4.49 (br s, 1H, OH), 4.67 (m, 1H, H-4), 7.09 (m, 1H, Ar), 7.41 (m, 1H, Ar), 7.60 (m, 1H, Ar), 7.82 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H, Ar).

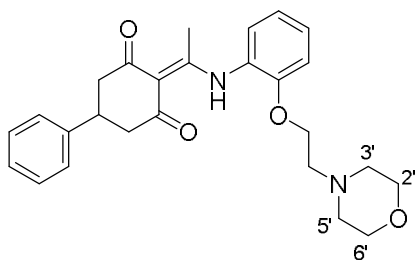
2-((1-(3-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)propyl)piperidin-4-yl)oxy)aniline (1.32)



To a solution of **1.31** (210 mg, 0.75 mmol) in anhydrous DMF, TBDMSCl (159 mg, 1.12 mmol), 4-dimethylaminopyridine (92 mg, 0.075 mmol) and imidazole (102 mg, 1.50 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 16 h under argon atmosphere, concentrated in vacuo, washed with a saturated aqueous NH₄Cl solution and extracted with dichloromethane (2x20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol, 10:1) to yield the protected alcohol (293 mg, 99%) [**MS** (positive mode): m/z 395 (M+H)⁺] that was used for the next step. A solution of the protected alcohol (293 mg, 0.74 mmol) in ethanol (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was hydrogenated (30 psi) for 5 h at 30 °C. Then, the reaction mixture was filtered and volatiles were removed to yield **1.32** (267 mg, 99%) as

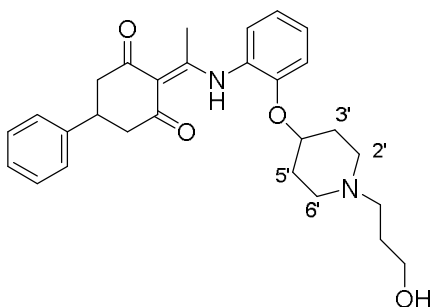
a rosaceous oil that was pure enough for the next step. **MS** (ES, positive mode): m/z 365 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0.87 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.67 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂O, H-3, H-5), 1.92 (m, 2H, H-3, H-5), 2.35 (m, 2H, H-2, H-6), 2.45 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 2.70 (m, 2H, H-2, H-6), 3.62 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 4.26 (m, 1H, H-4), 4.65 (br s, 2H, NH₂), 6.47 (m, 1H, Ar), 7.64 (m, 2H, Ar), 6.81 (m, 1H, Ar).

2-(1-((2-(2-Morpholinoethoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.33)



Following the general procedure A, a solution **1.4** (58 mg, 0.25 mmol) and **1.27** (37 mg, 0.17 mmol) reacted in toluene at 110 °C overnight. After workup, the residue was purified by CCTLC (dichloromethane/methanol 10:1) to yield **1.33** (24 mg, 32%) as a brown oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 435 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.39–2.45 (m, 7H, CH₃, H-3', H-5'), 2.56–2.63 (m, 2H, H-4, H-6), 2.66 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂), 2.72–2.90 (m, 2H, H-4, H-6), 3.30 (m, 1H, H-5), 3.50–3.54 (m, 4H, H-2', H-6'), 4.16 (t, J = 5.4 Hz, 2H, OCH₂), 7.03 (td, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.19–7.27 (m, 2H, Ar), 7.27–7.40 (m, 6H, Ar), 14.73 (s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 36.2 (C-5), 43.1 (C-4, C-6), 53.6 (C3', C5'), 56.8 (NCH₂), 66.2 (C2',C6'), 66.6 (OCH₂), 108.4 (NHC=C), 113.4, 120.8, 124.9, 126.5, 126.8, 126.9, 128.5, 129.2, 143.5, 152.4 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₆H₃₀N₂O₄·0.5H₂O): C, 70.41; H, 7.05; N, 6.32. Found: C, 70.70; H, 7.09; N, 6.70.

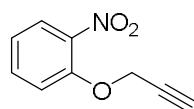
2-(1-((2-((1-(3-Hydroxypropyl)piperidin-4-yl)oxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.34)



Following the general procedure A, a solution **1.4** (155 mg, 0.68 mmol) reacted with **1.32** (164 mg, 0.45 mmol) in toluene. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue was dissolved in dichloromethane (1.4 mL) and TFA (1.4 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 1h and volatiles were removed. The residue was purified by CCTLC (dichloromethane/ methanol 10:1) to yield **1.34** (102 mg, 49%) as a white solid. **Mp** 104–106° C. **MS** (ES, positive mode): m/z 463 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.54 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 1.60 (m, 2H, H-3', H-5'), 1.85 (m, 2H, H-3', H-5'), 2.24 (m, 2H, H-2', H-6'), 2.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.53 (m, 2H, H-2', H-6'), 2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.80 (m, 2H, H-4, H-6), 3.28 (m, 1H, H-5), 3.40 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 4.51 (m, 2H, H-4', OH), 7.02 (m, 1H, Ar), 7.23 (m, 2H, Ar), 7.31

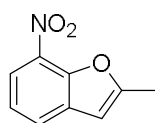
(m, 6H, Ar), 14.80 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 20.0 (CH₃), 29.7 (CH₂), 30.2 (C-3', C-5'), 36.2 (C-5), 40.1 (C-2', C-6'), 49.5 (C-4, C-6), 55.1 (CH₂), 59.5 (CH₂), 72.9 (C-4'), 108.5 (NHC=C), 115.3, 120.8, 126.1, 126.5, 126.8, 127.0, 128.5, 128.9, 143.5, 150.1 (Ar), 172.2 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₈H₃₄N₂O₄·0.5H₂O): C, 71.31; H, 7.48; N, 5.94. Found: C, 71.36; H, 7.60; N, 6.10.

1-Nitro-2-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**1.37**)¹⁰



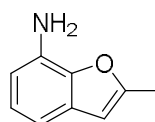
To a solution of 2-nitrophenol (**1.36**) (200 mg, 1.44 mmol) in DMF (2.2 mL) at room temperature, K₂CO₃ (401 mg, 2.88 mmol) was added and the reaction was stirred for 15 min. Then, propargyl bromide (209 μL , 2.34 mmol) was added and the reaction mixture was heated at 65 °C for 30 min. After cooling, the reaction mixture was diluted with water, extracted with ethyl acetate (3x15 mL) and the organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness to yield 252 mg (97%) of **1.37** as an orange oil, which was used for the next step without further purification. ^1H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.59 (t, J = 2.4 Hz, 1H, C \equiv CH), 4.86 (d, J = 2.4 Hz, 2H, CH₂), 7.11 (m, 1H, Ar), 7.27 (m, 1H, Ar), 7.56 (m, 1H, Ar), 7.87 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar).

2-Methyl-7-nitrobenzofuran (**1.38**)



Following a described procedure,¹¹ a solution of **1.37** (206 mg, 1.16 mmol) in polyethylene glycol-500 (1.2 mL) was heated at 215 °C for 90 min under nitrogen atmosphere. Then the reaction was cooled to room temperature, washed with water and extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 10:1) to yield 80 mg (39%) of **1.38** as a yellow solid. **Mp** 98-100 °C (lit¹² 101 °C). ^1H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.58 (d, J = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 6.53 (q, J = 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.29 (dd, J = 8.2, 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.77 (dd, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, Ar), 8.05 (dd, J = 8.2, 1.2 Hz, 1H, Ar). ^1H NMR data are similar to those previously described.¹²

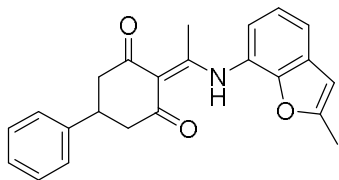
2-Methylbenzofuran-7-amine (**1.39**)



To a solution of **1.38** (64 mg, 0.36 mmol) in methanol (1.4 mL) at rt, SnCl₂ (205 mg, 1.08 mmol) and 37% HCl (0.3 mL) were added. The reaction mixture was heated at 75 °C for 30 min. Methanol was removed under reduced pressure. The reaction mixture was basified (up to pH 10) by adding a solution of 10% NaOH (4 mL) at 0-5 °C, and extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 44 mg (83%) of **1.39** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): 148 (M+H)⁺ ^1H NMR (CDCl₃,

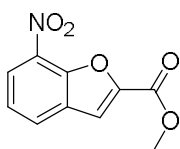
300 MHz): δ 2.41 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, CH₃), 5.22 (br s, 2H, NH₂), 6.42 (q, $J = 1.1$ Hz, 1H, Ar), 6.47 (dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H, Ar), 6.69 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H, Ar), 6.85 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.¹³

2-(1-((2-Methylbenzofuran-7-yl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.35)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (52 mg, 0.22 mmol), **1.39** (22 mg, 0.15 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.6 mL) overnight. The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 4:1) to yield 40 mg (74%) of **1.35** as a white solid. **Mp** 127-129 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 360 (M+H)⁺ ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃), 2.61–2.72 (m, 2H, H-4, H-6), 3.75–3.02 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (m, 1H, H-5), 6.70 (m, 1H, Ar), 7.19–7.39 (m, 7H, Ar), 7.57 (dd, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, Ar), 15.14 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 13.8 (CH₃), 19.9 (CH₃), 36.0 (C-5), 46.1 (C-4, C-6), 103.4 (Ar), 108.8 (NHC=C), 119.9, 120.1, 120.5, 123.3, 126.6, 126.8, 128.5, 130.5, 143.5, 147.7, 156.8 (Ar), 172.7 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₃H₂₁NO₃): C, 76.86; H, 5.89; N, 3.90. Found: C, 76.56; H, 6.18; N, 4.09.

Methyl 7-nitrobenzofuran-2-carboxylate (1.41)¹⁴

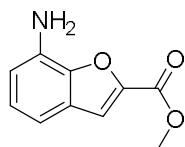


A mixture of 2-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde (**1.40**) (300 mg, 1.80 mmol), dimethyl 2-bromomalonate (260 μ L, 2.0 mmol), K₂CO₃ (372 mg, 2.7 mmol) and TBABr (58 mg, 0.18 mmol) in toluene (7.2 mL), in the presence of 4 Å molecular sieves, was heated and stirred overnight at 110 °C in an Ace pressure tube. After cooling to room temperature, the mixture was dissolved in ethyl acetate and washed with a saturated solution of NH₄Cl. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 320 mg (84%) of **1.41** as a yellow solid. **Mp** 134-136 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 222 (M+H)⁺, 443 (2M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.94 (s, 3H, OCH₃), 7.61 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 8.01 (s, 1H, Ar), 8.27 (dd, $J = 7.9, 1.1$ Hz, 1H, Ar), 8.38 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H, Ar).

General procedure for the synthesis of 7-aminobenzofuranes by reduction of 7-nitrobenzofuranes anilines (General procedure B). The corresponding 7-nitrobenzofuran (1 eq) was dissolved in ethyl acetate (12 mL) in a pressure vessel and then 5% Pt/S (catalytic amount) was added. The mixture was hydrogenated at 30 psi for 1-8 h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and volatiles were removed under reduced pressure. The obtained 2-aminobenzofuranes were directly

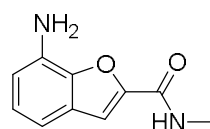
used as such in the subsequent reaction without further purification or purified as specified.

Methyl 7-aminobenzofuran-2-carboxylate (**1.42**)



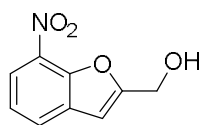
Following the general procedure B, a solution of **1.41** (56 mg, 0.25 mmol) in ethyl acetate (12 mL) with 5% Pt/S (catalytic amount) was subjected to hydrogenation (30 psi) for 5h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 48 mg (99 %) of **1.42** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 192 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.88 (s, 3H, CH₃), 5.51 (br s, 2H, NH₂), 6.71 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H, Ar), 6.93 (dd, J = 7.7, 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.04 (t, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.65 (s, 1H, Ar). Although this compound was mentioned in literature¹⁵ no analytical data were provided.

7-Amino-N-methylbenzofuran-2-carboxamide (**1.43**)



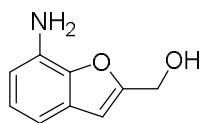
A microwave vial was charged with a mixture of **1.42** (82 mg, 0.43 mmol), 2 M *N*-methylamine in methanol (3.6 mL, 7.27 mmol), NH₄Cl (8 mg, 0.15 mmol) in methanol (4 mL). The reaction vessel was sealed and heated in a microwave reactor at 60 °C for 3h. After cooling, volatiles were removed. The residue was washed with water and extracted with DCM (3x15 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness to yield 82 mg of **1.43** (100%) as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 191 (M+H)⁺, 381 (2M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.83 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃), 5.34 (br s, 2H, NH₂), 6.65 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar), 6.88 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 6.99 (t, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.34 (s, 1H, Ar), 8.47 (m, 1H, NH).

(7-Nitrobenzofuran-2-yl)methanol (**1.44**)



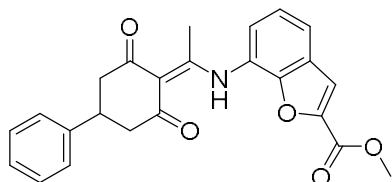
To a solution of **1.41** (191 mg, 0.86 mmol) in diethyl ether (3 mL) at -78 °C (liquid nitrogen/ethyl acetate bath), 1 M DIBALH in toluene (860 μ L, 0.86 mmol) was added. The mixture was stirred and allowed to reach room temperature over 1h. The mixture was again cooled to -78 °C (liquid nitrogen/ethyl acetate bath) and further portions of 1 M DIBALH in toluene (860 μ L, 0.86 mmol) were added. The mixture was stirred and allowed to reach ambient temperature over 4h. The mixture was cooled to 0 °C (ice/water bath) and quenched by adding de-ionized water and 1M NaOH. Then it was extracted with DCM (2x15 mL). The combined organic layers were dried and evaporated to afford 160 mg of **1.44** (96%) as a yellow solid. **Mp** 62-64 °C. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.66 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 2H, CH₂), 5.68 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OH), 7.02 (s, 1H, Ar), 7.46 (dd, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 8.08 (dd, J = 7.7, 1.1 Hz, 1H, Ar), 8.13 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H, Ar).

(7-Aminobenzofuran-2-yl)methanol (**1.45**)



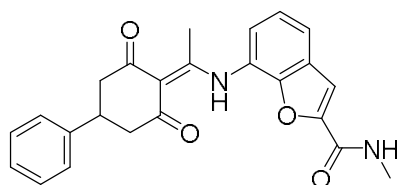
Following the general procedure B, a solution of **1.44** (45 mg, 0.22 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 5% Pt/S (catalytic amount) was subjected to hydrogenation (30 psi) for 4h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 29 mg (84%) of **1.45** as yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 164 (M+H)⁺. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.54 (d, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 5.17 (br s, 2H, NH₂), 5.37 (t, J = 5.7 Hz, 1H, OH), 6.51 (dd, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, Ar), 6.61 (s, 1H, Ar), 6.75 (dd, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, Ar), 6.89 (t, J = 7.7 Hz, 1H, Ar).

Methyl 7-((1-(2,6-dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)benzofuran-2-carboxylate (**1.46**)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (37 mg, 0.16 mmol), **1.42** (46 mg, 0.24 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.7 mL). The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 28 mg (43%) of **1.46** as a white solid. **Mp** 178-180 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 404 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.25–2.76 (m, 2H, H-4, H-6), 2.77–3.04 (m, 2H, H-4, H-6), 3.41 (tt, J = 12.2, 4.0 Hz, 1H, H-5), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.33–7.38 (m, 4H, Ar), 7.47 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.56 (m, 1H, Ar), 7.85 (m, 1H, Ar), 7.90 (s, 1H, Ar), 15.18 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.9 (CH₃), 35.9 (C-5), 46.5 (C-4, C-6), 52.6 (OCH₃), 109.0 (NHC=C), 114.7, 121.4, 123.0, 124.7, 125.2, 126.6, 126.78, 128.3, 128.56, 143.4, 145.7, 148.9 (Ar), 158.80 (COOCH₃), 172.8 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₄H₂₁NO₅): C, 71.45; H, 5.25; N, 3.47. Found: C, 71.06; H, 5.52; N, 3.71.

7-((1-(2,6-Dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)-*N*-methylbenzofuran-2-carboxamide (**1.47**)

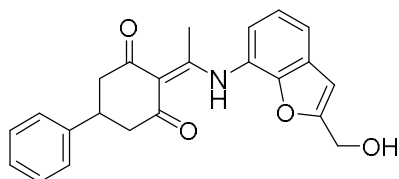


Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (66 mg, 0.28 mmol), **1.43** (82 mg, 0.43 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (1.1 mL). The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 10:1 and hexane/ethyl acetate, 1:2) to yield 86 mg (76%) of **1.47** as a white solid. **Mp** 108-110 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 403 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.56–2.74 (m, 2H, H-4, H-6), 2.80 (d, J = 4.6 Hz, 3H, HNCH₃), 2.85–3.02 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (tt, J = 12.5, 4.2 Hz, 1H, H-5), 7.25

(m, 1H, Ar), 7.32–7.39 (m, 4H, Ar), 7.39–7.47 (m, 2H, Ar), 7.62 (s, 1H, Ar), 7.81 (dd, $J = 7.1, 1.9$ Hz, 1H, Ar), 8.69 (q, $J = 4.6$ Hz, 1H, HNCH_3), 15.14 (br s, 1H, NH).

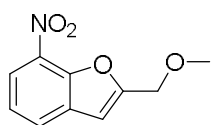
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 25.8 (HNCH₃), 36.0 (C-5), 45.3 (C-4, C-6), 108.8 (NHC=C), 109.4, 121.1, 122.6, 124.2, 124.4, 126.6, 126.8, 128.6, 128.9, 143.4, 148.2, 150.0 (Ar), 158.2 (NHCO), 173.1 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₄H₂₂N₂O₄·0.5H₂O): C, 70.06; H, 5.63; N, 6.81. Found: C, 69.82; H, 5.82; N, 6.98.

2-(1-((2-(Hydroxymethyl)benzofuran-7-yl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.48)



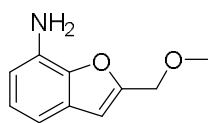
Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (52 mg, 0.23 mmol), **1.45** (26 mg, 0.16 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.7 mL). The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 20:1) to yield 57 mg (79%) of **1.48** as a white solid. **Mp** 120–122 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 376 (M+H)⁺. **^1H NMR** (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.46 (s, 1H, CH₃), 2.60–2.73 (m, 2H, H-4, H-6), 2.75–2.97 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (tt, $J = 12.3, 4.1$ Hz, 1H, H-5), 4.58 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH₂OH), 5.55 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, OH), 6.89 (s, 1H, Ar), 7.21–7.37 (m, 7H, Ar), 7.64 (dd, $J = 7.3, 1.6$ Hz, 1H, Ar), 15.15 (br s, 1H, NH). **^{13}C NMR** (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.4 (C-4, C-6), 56.0 (CH₂OH), 103.9 (Ar), 108.8 (NH-C=C), 120.3, 120.9, 121.3, 123.4, 126.6, 126.8, 128.5, 129.8, 143.4, 148.0, 159.7 (Ar), 172.8 (NH-C=C). **Anal. calc.** for (C₂₃H₂₁NO₄·0.5H₂O): C, 71.86; H, 5.77; N, 3.64. Found: C, 71.84; H, 5.98; N, 3.63.

2-(Methoxymethyl)-7-nitrobenzofuran (1.49)



To a solution of **1.44** (30 mg, 0.16 mmol) in anhydrous DMF at 0 °C, 60% NaH (13 mg, 0.32 mmol) was added. After 10 min methyl iodide (30 μL , 0.46 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 2h, quenched by adding a saturated aqueous NH₄Cl solution and extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness to yield 32 mg (99%) of **1.49** as a yellow oil. **^1H NMR** (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.35 (s, 3H, CH₃), 4.63 (s, 2H, CH₂), 7.17 (s, 1H, Ar), 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar), 8.11 (dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H, Ar), 8.16 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H, Ar).

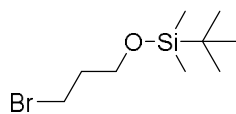
2-(Methoxymethyl)benzofuran-7-amine (1.50)



Following the general procedure B, a solution of **1.49** (45 mg, 0.22 mmol) in ethyl acetate (12 mL) was subjected to hydrogenation for 8 h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 40 mg (84%) of **1.50** as a yellow oil.

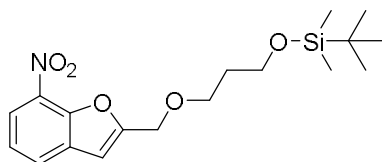
MS (ES, positive mode): m/z 178 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.30 (s, 3H, OCH₃), 4.49 (s, 2H, CH₂), 5.25 (br s, 2H, NH₂), 6.54 (dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H, Ar), 6.74–6.81 (m, 2H, Ar), 6.91 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar), 7.32–7.37 (m, 1H, Ar).

(3-Bromopropoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (1.51)¹⁶



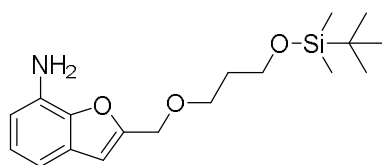
To a solution of 3-bromo-propan-1-ol (315 μ L, 3.60 mmol) and imidazole (589 mg, 8.64 mmol) in anhydrous THF (5.5 mL), TBDMSCI (651 mg, 4.32 mmol) was added. After stirring at room temperature for 2 h, the reaction mixture was filtered through a pad of silica and concentrated under reduced pressure to afford 912 mg (100%) of **1.51** as colorless oil. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0.87 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.93–1.99 (m, 2H, BrCH₂CH₂CH₂O), 3.56 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, BrCH₂CH₂CH₂O), 3.69 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, BrCH₂CH₂CH₂O).

1-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3-((7-nitrobenzofuran-2-yl)methoxy)propan-1-ol (1.52)



To a solution of **1.44** (67 mg, 0.35 mmol) in THF (1.4 mL), a 50% NaOH solution (208 μ L) was added dropwise at room temperature followed by the addition of tetrabutylammonium bromide (56 mg, 0.17 mmol). The mixture was heated to 60 °C and **1.51** (132 mg, 0.52 mmol) was slowly added. The final mixture was stirred for 4 h at 60 °C. The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 4:1) to yield 140 mg (85%) of **1.52** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 366 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0.78 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.71 (p, $J = 6.2$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 3.58 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 3.63 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 4.67 (s, 2H, OCH₂Ar), 7.16 (s, 1H, Ar), 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar), 8.11 (dd, $J = 7.8, 1.1$ Hz, 1H, Ar), 8.16 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H, Ar).

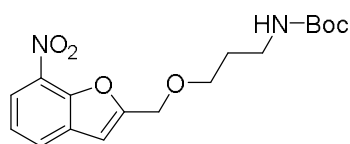
2-((3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propoxy)methyl)benzofuran-7-amine (1.53)



Following the general procedure B, a solution of **1.52** (100 mg, 0.27 mmol) in ethyl acetate (12 mL) was subjected to hydrogenation for 2 h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to yield 65 mg (71%) of **1.53** as yellow oil. **MS** (ES, positive mode): m/z

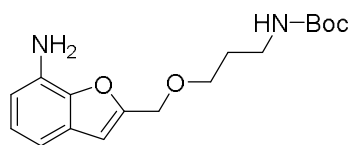
336 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0.84 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.70 (p, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OSi), 3.53 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OSi), 3.64 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OSi), 4.53 (s, 2H, OCH₂Ar), 5.22 (br s, 2H, NH₂), 6.53 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, Ar), 6.76 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, Ar), 6.73 (s, 1H, Ar), 6.90 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar).

***tert*-Butyl (3-((7-nitrobenzofuran-2-yl)methoxy)propyl)carbamate (1.55)**



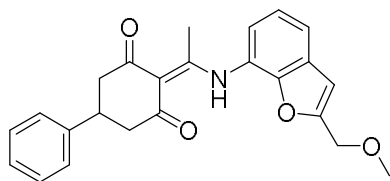
To a solution of **1.44** (60 mg, 0.31 mmol) in THF (1.3 mL), a 50% NaOH solution (62 μL) was added dropwise at room temperature followed by tetrabutylammonium bromide (50 mg, 0.16 mmol). The mixture was heated to 60 °C and *tert*-butyl (3-bromopropyl)carbamate (**1.54**) (81 mg, 0.34 mmol) was slowly added. The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The residue was worked up as in **1.53** and purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 1:1) to yield 131 mg (65%) of **1.55** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 351 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.65 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 2.98 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 3.52 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 4.67 (s, 2H, OCH₂Ar), 6.79 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar), 7.15 (s, 1H, Ar), 8.11 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, , Ar), 8.16 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H, Ar).

***tert*-Butyl (3-((7-aminobenzofuran-2-yl)methoxy)propyl)carbamate (1.56)**



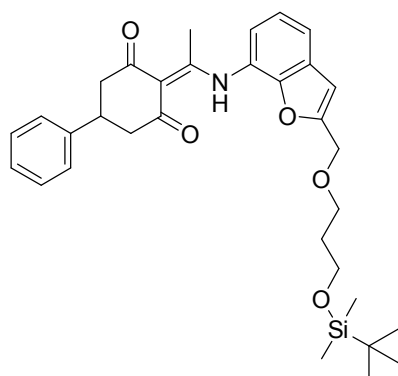
A solution of **1.55** (103 mg, 0.29 mmol) in ethyl acetate (12 mL) with 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation (30 psi) for 90 min at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to provide 91 mg (98%) as a pink oil. The HPLC-MS analysis of the hydrogenation reaction revealed a 9:1 mixture of **1.56** (**MS** (ES, positive mode): *m/z* 321 (M+H)⁺) and a minor product (**MS** (ES, positive mode): *m/z* 323 (M+H)⁺), tentatively assigned as the reduced analogue at the furan ring. The mixture was used as such for the next step. **¹H NMR** data for **1.56** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.63 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 2.97 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 3.46 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 4.52 (s, 2H, OCH₂Ar), 5.24 (br s, 2H, NH₂), 6.53 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, Ar), 6.73 (s, 1H, Ar), 6.76 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, Ar), 6.79 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 6.90 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar).

2-(1-((2-(Methoxymethyl)benzofuran-7-yl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.57)



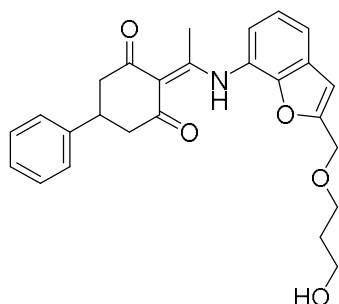
Following the general procedure A, an Ace pressure tube charged with **1.4** (58 mg, 0.25 mmol), **1.50** (30 mg, 0.17 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.7 mL). The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 1:1) and (dichloromethane/ methanol, 20:1) to yield 54 mg (82%) of **1.57** as a white solid. **Mp** 78–80 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 390 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.60–2.73 (m, 2H, H-4, H-6), 3.75–3.01 (m, 2H, H-4, H-6), 3.31 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (m, 1H, H-5), 4.56 (s, 2H, OCH₂), 7.04 (s, 1H, Ar), 7.24 (m, 1H, Ar), 7.32–7.37 (m, 6H, Ar), 7.68 (m, 1H, Ar), 15.16 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 36.0 (C-5), 46.2 (C-4, C-6), 57.5 (OCH₃), 65.7 (OCH₂), 106.6 (Ar), 108.8 (NH-C=C), 120.5, 121.1, 121.8, 123.6, 126.6, 126.8, 128.5, 129.4, 143.4, 148.2, 155.5 (Ar), 172.7 (NH-C=C). **Anal. calc.** for (C₂₄H₂₃NO₄): C, 74.02; H, 5.95; N, 3.60. Found: C, 73.85; H, 6.20; N, 3.86.

2-(1-((2-((3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propoxy)methyl)benzofuran-7-yl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.58)



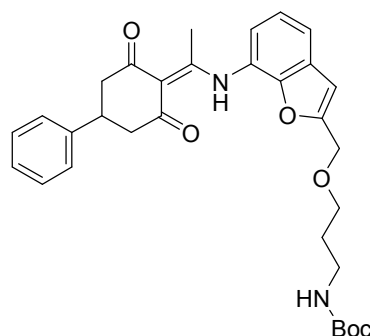
Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (45 mg, 0.13 mmol), **1.53** (21 mg, 0.09 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.4 mL). The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 32 mg (59%) of **1.58** as a colorless oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 548 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0.79 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.69 (p, J = 6.1 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OSi), 2.46 (s, 1H, CH₃), 2.59–2.74 (m, 2H, H-4, H-6), 2.75–2.98 (m, 2H, H-4, H-6), 3.39 (tt, J = 12.3, 4.1 Hz, 1H, H-5), 3.53 (t, J = 6.3 Hz, 1H, OCH₂CH₂CH₂OSi), 3.61 (t, J = 6.1 Hz, 1H, OCH₂CH₂CH₂OSi), 4.59 (s, 2H, OCH₂Ar), 7.02 (s, 1H, Ar), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.31 – 7.37 (m, 6H, Ar), 7.66 (m, 1H, Ar), 15.17 (br s, 1H, NH).

2-(1-((2-((3-Hydroxypropoxy)methyl)benzofuran-7-yl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.59)



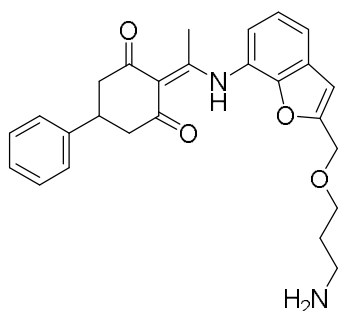
A solution of **1.58** (24 mg, 0.04 mmol) in dichloromethane (0.3 mL) was treated with TFA (0.3 mL) and stirred at rt for 1 h. Volatiles were removed to afford a residue that was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 10:0.2) to yield 16 mg (84%) of **1.59** as a white solid. **Mp** 73–75 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 434 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.67 (p, J = 6.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.60–2.72 (m, 2H, H-4, H-6), 2.76–2.98 (m, 2H, H-4, H-6), 3.38 (m, 1H, H-5), 3.44 (q, J = 5.9 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH), 3.53 (t, J = 6.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH), 4.42 (t, J = 5.0 Hz, 1H, OH), 4.59 (s, 2H, OCH₂Ar), 7.03 (s, 1H, Ar), 7.21–7.27 (m, 1H, Ar), 7.31–7.38 (m, 6H, Ar), 7.67 (m, 1H, Ar), 15.16 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 19.9 (CH₃), 32.6 (OCH₂CH₂CH₂OH), 36.0 (C-5), 45.3 (C-4/C-6), 46.5 (C-4/C-6), 57.6 (OCH₂CH₂CH₂OH), 64.2 (OCH₂Ar), 67.1 (OCH₂CH₂CH₂OH), 106.3 (Ar), 108.8 (NH-C=C), 120.5, 121.1, 121.8, 123.6, 126.6, 126.8, 128.6, 129.5, 143.5, 148.2, 156.0 (Ar), 172.7 (NH-C=C). **Anal. calc.** for (C₂₆H₂₇NO₅·2H₂O): C, 66.51; H, 6.66; N, 2.98. Found: C, 66.11; H, 6.56; N, 3.28.

tert-Butyl (3-((7-((1-(2,6-dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)benzofuran-2-yl)methoxy)propyl)carbamate (1.60)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (43 mg, 0.19 mmol), **1.56** (90 mg, 0.28 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.8 mL). The residue was worked up and purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 20:1) and (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 52 mg (52%) of **1.60** as a colorless oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 533 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.34 (s, 9H, C(CH₃)), 1.63 (p, J = 6.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.53–2.73 (m, 2H, H-4, H-6), 2.74–2.90 (m, 2H, H-4, H-6), 2.96 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 3.40 (tt, J = 12.2, 3.8 Hz, 1H, H-5), 3.47 (t, J = 6.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH), 4.60 (s, 2H, OCH₂Ar), 6.78 (t, J = 5.5 Hz, 1H, CONH), 7.02 (s, 1H, Ar), 7.25 (m, 1H, Ar), 7.31–7.37 (m, 6H, Ar), 7.66 (m, 1H, Ar), 15.16 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 28.2 (C(CH₃)₃), 29.7 (OCH₂CH₂CH₂NH), 36.0 (C-5), 37.0 (OCH₂CH₂CH₂NH), 45.8 (C-4, C-6), 64.2 (OCH₂Ar), 67.6 (OCH₂CH₂CH₂NH), 77.4 (C(CH₃)₃), 106.2 (Ar), 108.8 (NH-C=C), 120.5, 121.0, 121.7, 123.6, 126.5, 126.8, 128.5, 129.5, 143.4, 148.1, 155.5 (Ar), 155.9 ((CO)O(CH₃)₃), 172.7 (NH-C=C). **Anal. calc.** for (C₃₁H₃₆N₂O₆): C, 69.91; H, 6.81; N, 5.26. Found: C, 69.80; H, 7.11; N, 5.60.

2-(1-((2-((3-Aminopropoxy)methyl)benzofuran-7-yl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.61)

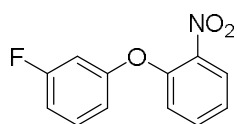


To a solution of **1.60** (38 mg, 0.07 mmol) in dichloromethane (0.2 mL), TFA (0.2 mL, 2.85 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min. Then volatiles were removed and the residue was purified by CCTLC (dichloromethane/ methanol 5/1) to afford 15 mg (49%) of **1.61** as a colorless oil. **MS** (ES, positive mode): 433 (M+H)⁺ for C₂₆H₂₈N₂O₄. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.73–1.88 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.47 (s, 3H, CH₃), 2.59–2.71 (m, 2H, H-4, H-6), 2.77–2.93 (m, 2H, H-4, H-6), 3.19 (m, 1H, H-5), 3.48–3.59 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂NH₂), 4.63 (s, 2H, C=C-CH₂-O), 6.78 (m, 1H, Ar), 6.91 (m, 1H, Ar), 7.05 (s, 1H, Ar), 7.17–7.40 (m, 5H, Ar), 7.67 (m, 1H, Ar), 7.85 (s, 2H, NH₂), 15.17 (s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 19.9 (CH₃), 27.5 (OCH₂CH₂CH₂NH₂), 36.0 (C-5), 36.7 (OCH₂CH₂CH₂NH), 45.9 (C-4, C-6), 64.2 (C=C-CH₂-O), 66.9 (OCH₂CH₂CH₂NH), 106.6 (Ar), 108.9 (NH-C=C), 120.5, 121.1, 121.8, 123.7, 126.7, 126.8, 128.6, 129.4, 143.4, 148.2, 155.6 (Ar), 172.7 (NH-C=C).

General procedure for the synthesis of 2-nitrodiphenyl ethers (General procedure C). Adapted from literature¹⁷ by using acetonitrile instead of DMF as solvent, and Cs₂CO₃ instead of K₂CO₃.

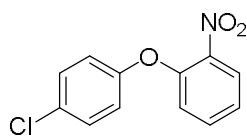
To a mixture of Cs₂CO₃ (1.0 mmol) and the substituted phenol (1.2 mmol) in anhydrous acetonitrile (2.5 mL/mmol), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (1.0 mmol) was added dropwise while stirring under argon. After 2-5 h at 80 °C, water (20 mL) and sat. aq. NaHCO₃ solution (20 mL) was added and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over Na₂SO₄, concentrated, and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate).

1-(4-Fluorophenoxy)-2-nitrobenzene (1.64)



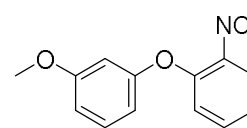
Following the general procedure C, to a mixture of Cs₂CO₃ (482 mg, 1.48 mmol) and 3-fluorophenol (**1.62**) (162 μL, 1.70 mmol) in ACN (3.6 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (156 μL, 1.48 mmol) was added. After 4h at 80 °C, the residue was worked up and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 10:1) to yield 310 mg (90%) of **1.64** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): 234 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.88 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H, Ar), 7.00 (m, 1H, Ar), 7.06 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H, Ar), 7.27 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.37 – 7.53 (m, 2H, Ar), 7.74 (m, 1H, Ar), 8.10 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.¹⁸

1-(4-Chlorophenoxy)-2-nitrobenzene (1.65)



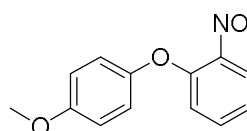
Following the general procedure C, to a mixture of Cs_2CO_3 (463 mg, 1.42 mmol) and 4-chlorophenol (**1.63**) (167 μL , 1.70 mmol) in ACN (3.6 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (149 μL , 1.42 mmol) was added. After 2h at 80 °C, the residue was worked up and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 10:1) to yield 864 mg (99%) of **1.65** as a yellow oil. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): δ 7.00–7.14 (m, 2H, Ar), 7.22 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H, Ar), 7.41 (m, 1H, Ar), 7.45–7.52 (m, 2H, Ar), 7.72 (m, 1H, Ar), 8.09 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H, Ar). $^1\text{H NMR}$ data are similar to those previously described.¹⁷

1-(3-Methoxyphenoxy)-2-nitrobenzene (1.69)



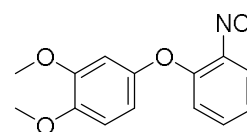
Following the general procedure C, to a mixture of Cs_2CO_3 (925 mg, 2.84 mmol) and 3-methoxyphenol (**1.66**) (373 μL , 3.40 mmol) in ACN (7.1 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (299 μL , 2.84 mmol) was added. After 3h at 80 °C, the residue was worked up and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 5:1) to yield 615 mg (88%) of **1.69** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): 246 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 3.75 (s, 3H, CH_3), 6.59 (ddd, $J = 8.2, 2.3, 0.8$ Hz, 1H, Ar), 6.67 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, Ar), 6.79 (ddd, $J = 8.4, 2.4, 0.8$ Hz, 1H, Ar), 7.16 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H, Ar), 7.32 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar), 7.37 (ddd, $J = 8.4, 7.4, 1.2$ Hz, 1H, Ar), 7.69 (ddd, $J = 8.3, 7.4, 1.7$ Hz, 1H, Ar), 8.06 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H, Ar). $^1\text{H NMR}$ data are similar to those previously described.¹⁷

1-(4-Methoxyphenoxy)-2-nitrobenzene (1.70)



Following the general procedure C, to a mixture of Cs_2CO_3 (1.15 g, 3.54 mmol) and 4-methoxyphenol (**1.67**) (528 mg, 4.25 mmol) in ACN (9 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (374 μL , 3.54 mmol) was added dropwise while stirring under argon. After 3h at 80 °C, the residue was worked up and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 10:1) to yield 864 mg (99%) of **1.70** as a yellow solid. **Mp** 76–78 °C (lit¹⁹ 75–76.5 °C). **MS** (ES, positive mode): 246 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): δ 3.76 (s, 3H, CH_3), 6.96–7.03 (m, 3H, Ar), 7.04–7.12 (m, 2H, Ar), 7.28 (m, 1H, Ar), 7.63 (m, 1H, Ar), 8.02 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H, Ar). $^1\text{H NMR}$ data are similar to those previously described.¹⁷

1,2-Dimethoxy-4-(2-nitrophenoxy)benzene (1.71)

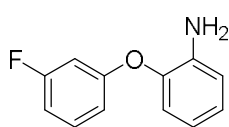


Following the general procedure C, to a mixture of Cs_2CO_3 (925 mg, 2.84 mmol) and 3,4-dimethoxyphenol (**1.68**) (525 mg, 3.40 mmol) in ACN (7.1 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (299 μL , 2.84 mmol) was added. After 5 h at 80 °C, the residue was worked up and purified by

flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 10:1) to yield 767 mg (97%) of **1.71** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): 276 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.74 (s, 3H, CH₃), 3.76 (s, 3H, CH₃), 6.61 (dd, *J* = 8.7, 2.8 Hz, 1H, Ar), 6.85 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, Ar), 6.97–7.02 (m, 2H, Ar), 7.27 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.63 (ddd, *J* = 8.5, 7.4, 1.7 Hz, 1H, Ar), 8.02 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.¹⁷

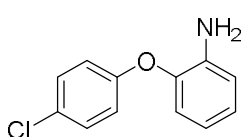
General procedure for the synthesis of 2-aminodiphenyl ethers (General procedure D). The corresponding 2-nitrodiphenyl ether was dissolved in ethyl acetate (12 mL) in a pressure vessel and then 10% Pd/C or 5% Pt/S (catalytic amount) was added. The vessel was hydrogenated at 30 psi for 1-5 h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered and volatiles were removed under reduced pressure. In most cases, the obtained 2-aminodiphenyl ethers were directly used as such in the subsequent reaction without further purification.

2-(3-Fluorophenoxy)aniline (**1.72**)



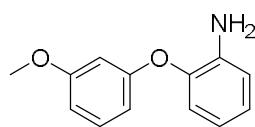
Following the general procedure D, a solution of **1.64** (431 mg, 1.85 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 5% Pt/S (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 2 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 5:1) to afford 316 mg (84%) of **1.72** as a colorless oil. **MS** (ES, positive mode): 246 (M+ACN+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 4.95 (br s, 2H, NH₂), 6.52–6.60 (m, 1H, Ar), 6.62–6.72 (m, 2H, Ar), 6.78–6.90 (m, 3H, Ar), 6.95 (m, 1H, Ar), 7.27–7.39 (m, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.¹⁸

2-(4-Chlorophenoxy)aniline (**1.73**)



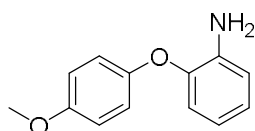
Following the general procedure D, a solution of **1.65** (63 mg, 0.252 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 5% Pt/S (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 2 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 10:3) to afford 41 mg (74%) of **1.73** as a colorless oil. **MS** (ES, positive mode): 220 (M+H)⁺ with Cl isotopic distribution. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 5.76 (br s, 2H, NH₂), 6.76–6.92 (m, 2H, Ar), 6.98–7.18 (m, 4H, Ar), 7.35–7.48 (m, 2H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.¹⁷

2-(3-Methoxyphenoxy)aniline (1.74)



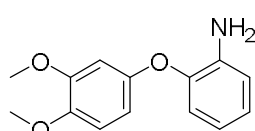
Following the general procedure D, a solution of **1.69** (400 mg, 1.63 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 2 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to afford 346 mg (98%) of **1.74** as an orange oil. **MS** (ES, positive mode): 216 (M+H)⁺, 257 (M+ACN+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.88 (br s, 2H, NH₂), 6.42 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 0.9 Hz, 1H, Ar), 6.47 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar), 6.55 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 1.6 Hz, 1H, Ar), 6.62 (ddd, *J* = 8.3, 2.4, 0.9 Hz, 1H, Ar), 6.80 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 2H, Ar), 6.92 (ddd, *J* = 8.0, 7.3, 1.5 Hz, 1H, Ar), 7.20 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.¹⁷

2-(4-Methoxyphenoxy)aniline (1.75)



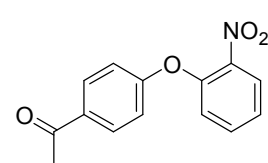
Following the general procedure D, a solution of **1.70** (648 mg, 2.64 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 2 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to afford 560 mg (98%) of **1.75** as a pink oil. **MS** (ES, positive mode): 216 (M+H)⁺, 257 (M+ACN+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.71 (s, 1H, CH₃), 4.88 (br s, 2H, NH₂), 6.50 (m, 1H, Ar), 6.66 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, Ar), 6.76 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, Ar), 6.81–6.93 (m, 5H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.²⁰

2-(3,4-Dimethoxyphenoxy)aniline (1.76)



Following the general procedure D, a solution of **1.71** (400 mg, 1.45 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 2 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to afford 343 mg (96%) of **1.76** as a white solid. **Mp** 115–117 °C. **MS** (ES, positive mode): 246 (M+H)⁺, 287 (M+ACN+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 4.86 (br s, 2H, NH₂), 6.34 (m, 1H, Ar), 6.51 (m, 1H, Ar), 6.67–6.72 (m, 2H, Ar), 6.77 (m, 1H, Ar), 6.83–6.89 (m, 2H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.²¹

1-(4-(2-Nitrophenoxy)phenyl)ethan-1-one (1.78)

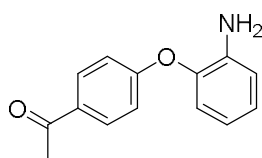


Following the general procedure C, to a mixture of Cs₂CO₃ (925 mg, 2.84 mmol) and 4-hydroxyacetophenone (**1.77**) (464 mg, 3.40 mmol) in ACN (7.1 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (299 μL, 2.84 mmol) was added. After 5 h at 80 °C, the residue was worked

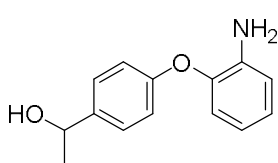
up and purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol, 20:1) to yield 613 mg (84%) of **1.78** as a white solid. **Mp** 104–106 °C (lit²² 104.6 °C) . **MS** (ES, positive mode): 258 (M+H)⁺, 515 (2M+H)⁺ **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.56 (s, 3H, CH₃), 7.07–7.15 (m, 2H, Ar), 7.37 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.50 (m, 1H, Ar), 7.79 (m, 1H, Ar), 7.98–8.03 (m, 2H, Ar), 8.14 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.²²

1-(4-(2-Aminophenoxy)phenyl)ethan-1-one (**1.79**) and 1-(4-(2-Aminophenoxy)phenyl)ethan-1-ol (**1.80**)

Following the general procedure D, a solution of **1.78** (250 mg, 0.97 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 1 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 2:1) to afford 114 mg (52%) of **1.79** as a colorless oil and 93 mg (42%) of **1.80** as a colorless oil.

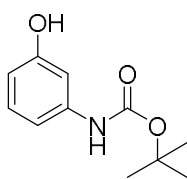


Experimental data for **1.79**: **MS** (ES, positive mode): 228 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.50 (s, 1H, CH₃), 4.96 (br s, 2H, NH₂), 6.58 (m, 1H, Ar), 6.79–7.01 (m, 5H, Ar), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar).



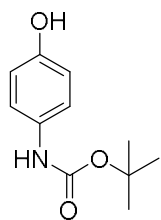
Experimental data for **1.80**: **MS** (ES, positive mode): 230 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.29 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 4.67 (m, 1H, CH), 4.87 (br s, 1H, NH), 5.08 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, OH), 6.53 (m, 1H, Ar), 6.72–6.85 (m, 4H, Ar), 6.90 (m, 1H, Ar), 7.27 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, Ar).

tert-Butyl (3-hydroxyphenyl)carbamate (**1.83**)²³



3-Aminophenol (**1.81**) (400 mg, 3.66 mmol) was dissolved in anhydrous THF (11 mL) and a solution of di-*tert*-butylcarbamate (1.2 g, 5.50 mmol) in anhydrous THF (5.5 mL) was added dropwise. After 24 h at room temperature, volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 5:1) to afford 640 mg (84%) of **1.83** as a colorless oil. **MS** (ES, positive mode): 210 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃), 6.34 (m, 1H, Ar), 6.82 (m, 1H, Ar), 6.96–7.03 (m, 2H, Ar), 9.18 (br s, 1H, NH/OH), 9.24 (br s, 1H, NH/OH).

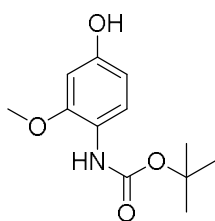
tert-Butyl (4-hydroxyphenyl)carbamate (1.84)²⁴



4-aminophenol (**1.82**) (400 mg, 2.87 mmol) was solubilized in anhydrous THF (8.6 mL) at room temperature. To this mixture, a solution of di-*tert*-butylcarbamate (629 mg, 2.87 mmol) in anhydrous THF (4.3 mL) was added dropwise. After 24 h at room temperature, solvent was removed under reduced pressure to afford 780 mg (99%) of **1.84** as a brown solid.

Mp 142-144 (lit²⁴ 144-145 °C). **MS** (ES, positive mode): 210 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.44 (s, 9H, O(CH₃)₃), 6.61–6.66 (m, 2H, Ar), 7.18–7.22 (m, 2H, Ar), 8.97 (br s, 1H, NH/OH), 9.02 (br s, 1H, OH/NH).

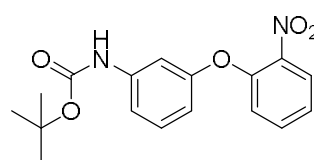
tert-Butyl (4-hydroxy-2-methoxyphenyl)carbamate (1.86)²⁵



4-Amino-3-methoxyphenol (**1.85**)²⁵ (130 mg, 0.93 mmol) was dissolved in anhydrous THF (2.8 mL) at room temperature and a solution of di-*tert*-butylcarbamate (305 mg, 1.40 mmol) in anhydrous THF (1.4 mL) was added dropwise. After 24 h at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure to afford 500 mg of **1.86** as a brown oil that was used as such for the next step.

MS (ES, positive mode): 240 (M+H)⁺, 262 (M+Na)⁺.

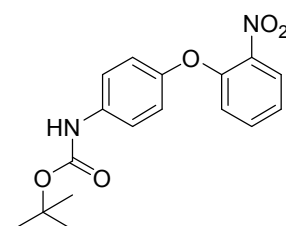
tert-Butyl (3-(2-nitrophenoxy)phenyl)carbamate (1.87)



Following the general procedure C, to a mixture of Cs₂CO₃ (694 mg, 2.13 mmol) and **1.83** (534 mg, 2.55 mmol) in ACN (5.3 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (224 μL, 2.13 mmol) was added dropwise while stirring under argon. After 4 h at 80

°C, the residue was worked up and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 4:1) to yield 650 mg (92%) of **1.87** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): 331 (M+H)⁺, 661 (2M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃), 6.64 (ddd, *J* = 7.8, 2.3, 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.15 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.22–7.31 (m, 3H, Ar), 7.36 (ddd, *J* = 8.3, 7.5, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.69 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.7 Hz, Ar), 8.06 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, Ar), 9.51 (br s, 1H, NH).

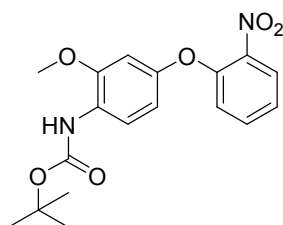
tert-Butyl (4-(2-nitrophenoxy)phenyl)carbamate (1.88)



Following the general procedure C, to a mixture of Cs₂CO₃ (436 mg, 1.34 mmol) and **1.84** (337 mg, 1.61 mmol) in ACN (3.5 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (141 μL, 1.34 mmol) was added dropwise while stirring under argon. After 3 h at 80 °C, the residue was worked up and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 4:1) to yield 512 mg (96%) of **1.88** as yellow oil. **MS** (ES, positive

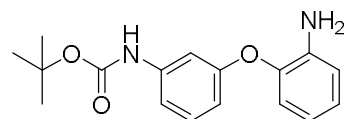
mode): 353 (M+Na)⁺, 661 (2M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.47 (s, 9H, (CH₃)₃), 6.99–7.05 (m, 3H, Ar), 7.29 (ddd, *J* = 8.3, 7.4, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.45–7.53 (m, 2H, Ar), 7.64 (ddd, *J* = 8.5, 7.4, 1.7 Hz, 1H, Ar), 8.02 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar), 9.44 (br s, 1H, NH).

***tert*-Butyl (2-methoxy-4-(2-nitrophenoxy)phenyl)carbamate (1.89)**



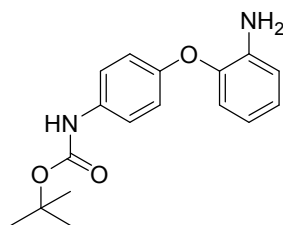
Following the general procedure C, to a mixture of Cs₂CO₃ (227 mg, 0.70 mmol) and **1.86** (200 mg, 0.84 mmol) in ACN (1.8 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (**1.5**) (74 μL, 0.70 mmol) was added dropwise while stirring under argon. After 4 h at 80 °C, the residue was worked up and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 4:1) to yield 212 mg (96%) of **1.89** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): 361 (M+H)⁺, 383 (M+Na)⁺, 721 (2M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.45 (s, 9H, (CH₃)₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 6.58 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H, Ar), 6.87 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, Ar), 7.08 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.31 (ddd, *J* = 8.4, 7.4, 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.60–7.69 (m, 2H, Ar), 8.02 (br s, 1H, NH), 8.04 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, Ar).

***tert*-Butyl (3-(2-aminophenoxy)phenyl)carbamate (1.90)**



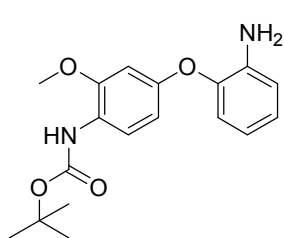
Following the general procedure D, a solution of **1.87** (530 mg, 1.60 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 2 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to afford 490 mg (99%) of **1.90** as a pink oil. **MS** (ES, positive mode): 301 (M+H)⁺, 601 (2M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.85 (br s, 2H, NH₂), 6.47 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 1.1 Hz, 1H, Ar), 6.54 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 1.6 Hz, 1H, Ar), 6.75 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, Ar), 6.79 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar), 6.90 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 1.5 Hz, 1H, Ar), 7.08–7.19 (m, 3H, Ar), 9.37 (br s, 1H, CONH).

***tert*-Butyl (4-(2-aminophenoxy)phenyl)carbamate (1.91)**



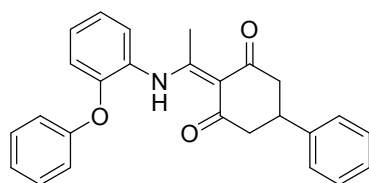
Following the general procedure D, a solution of **1.88** (275 mg, 0.83 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 1 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to afford 229 mg (92%) of **1.91** as a pink oil. **MS** (ES, positive mode): 301 (M+H)⁺, 601 (2M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.86 (br s, 2H, NH₂), 6.50 (m, 1H, Ar), 6.68 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, Ar), 6.77 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, Ar), 6.80–6.90 (m, 3H, Ar), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 9.24 (br s, 1H, NH).

tert-Butyl (4-(2-aminophenoxy)-2-methoxyphenyl)carbamate (1.92)



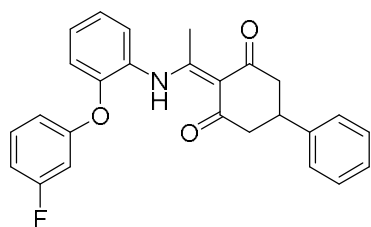
Following the general procedure D, a solution of **1.89** (190 mg, 0.53 mmol) in ethyl acetate (12 mL) in the presence of 10% Pd/C (catalytic amount) was subjected to hydrogenation for 4 h at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to afford 150 mg (86%) of **1.92** as a pink oil. **MS** (ES, positive mode): 331 (M+H)⁺, 661 (2M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.87 (br s, 2H, NH₂), 6.33 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H, Ar), 6.53 (m, 1H, Ar), 6.69 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, Ar), 6.75 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, Ar), 6.79 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar), 6.89 (m, 1H, Ar), 7.43 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.88 (br s, 1H, CONH).

2-(1-((2-Phenoxyphenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.94)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (58 mg, 0.26 mmol), 2-phenoxyaniline (**1.93**) (73 mg, 0.39 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (1.1 mL). The reaction vessel was sealed and heated in at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 2:1) to afford 70 mg (68%) of **1.94** as an oil. **MS** (ES, positive mode): 398 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.53–2.62 (m, 2H, H-4, H-6), 2.66–2.87 (m, 2H, H-4, H-6), 3.28 (m, 1H, H-5), 6.98–7.05 (m, 3H, Ar), 7.14–7.43 (m, 10H, Ar), 7.49 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, Ar), 14.89 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.8 (C-4, C-6), 108.6 (HNC=C), 118.4, 119.3, 124.0, 124.1, 126.5, 126.7, 127.3, 128.0, 128.5, 129.4, 130.2, 143.4, 150.8, 156.0 (Ar), 172.5 (HNC=C). **Anal. calc.** for (C₂₆H₃₀N₂O₄): C, 78.59; H, 5.83; N, 3.52. Found: C, 78.30; H, 5.95; N, 3.58.

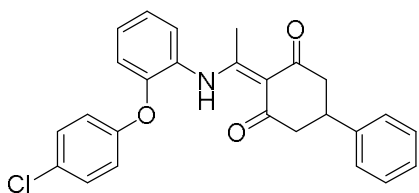
2-(1-((2-(3-Fluorophenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.95)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (189 mg, 0.82 mmol), **1.72** (250 mg, 1.23 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (5 mL). The reaction vessel was sealed and heated at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 5:1) to afford 340 mg (99%) of **1.95** as a brown oil. **MS** (ES, positive mode): 416 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.50–2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68–2.88 (m, 2H, H-4, H-6), 3.27 (tt, *J* = 12.0, 4.1 Hz, 1H, H-5), 6.80 (m, 1H, Ar), 6.90 (m, 1H, Ar), 7.00 (m, 1H, Ar), 7.16 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, Ar), 7.22 (m, 1H, Ar), 7.28–

7.35 (m, 5H, Ar), 7.37–7.47 (m, 2H, Ar), 7.52 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H, Ar), 14.84 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.2 (C-4, C-6), 105.8 (d, $J = 24.8$ Hz, Ar), 108.6 (NHC=C), 110.6 (d, $J = 21.1$ Hz, Ar), 113.9 (d, $J = 3.0$ Hz, Ar), 120.3, 125.00, 126.5, 126.7, 127.7, 128.2, 128.5, 129.6 (Ar), 131.4 (d, $J = 9.9$ Hz, Ar), 143.4, 149.9, 157.5 (d, $J = 11.0$ Hz, Ar), 162.8 (d, $J = 245.0$ Hz, Ar), 172.5 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₆H₂₂FNO₃): C, 75.17; H, 5.34; N, 3.37. Found: C, 74.85; H, 5.46; N, 3.37.

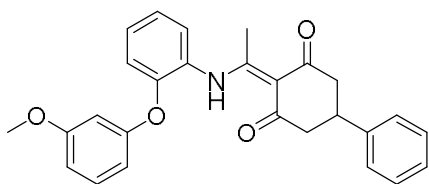
2-(1-((2-(4-Chlorophenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.96)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (53 mg, 0.23 mmol), **1.73** (34 mg, 0.15 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.7 mL). The reaction vessel was sealed and heated in a microwave reactor at 110 °C overnight.

After cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 10:3) to afford 50 mg (75%) of **1.96** as a brown oil. **MS** (ES, positive mode): 432 (M+H)⁺ with Cl isotopic distribution pattern. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.54–2.62 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68–2.88 (m, 2H, H-4, H-6), 3.27 (m, 1H, H-5), 6.98–7.04 (m, 2H, Ar), 7.11 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 1H, Ar), 7.22 (m, 1H, Ar), 7.28–7.34 (m, 5H, Ar), 7.39–7.46 (m, 3H, Ar), 7.51 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H, Ar), 14.84 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 20.5 (CH₃), 36.7 (C-5), 45.6 (C-4, C-6), 109.3 (NHC=C), 120.6, 120.60, 125.0, 127.2, 127.4, 128.2, 128.3, 128.8, 129.2, 130.2, 130.6, 144.1, 150.9, 155.7 (Ar), 173.1 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₆H₂₂ClNO₃): C, 72.30; H, 5.13; N, 3.24. Found: C, 71.95; H, 5.20; N, 3.38.

2-(1-((2-(3-Methoxyphenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.97)

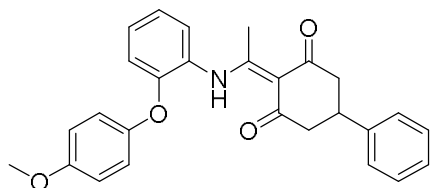


Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (65 mg, 0.28 mmol), **1.74** (92 mg, 0.42 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (1.1 mL). The reaction vessel was sealed and heated at 110 °C overnight. After cooling, the

solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 10:3) to afford 84 mg (70%) of **1.97** as an oil. **MS** (ES, positive mode): 428 (M+H)⁺. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.53–2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68–2.87 (m, 2H, H-4, H-6), 3.28 (tt, $J = 12.1, 4.1$ Hz, 1H, H-5), 3.73 (s, 1H, OCH₃), 6.51 (ddd, $J = 8.2, 2.4, 0.8$ Hz, 1H, Ar), 6.59 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, Ar), 6.74 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H, Ar), 7.08 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, Ar), 7.18–7.37 (m, 7H, Ar),

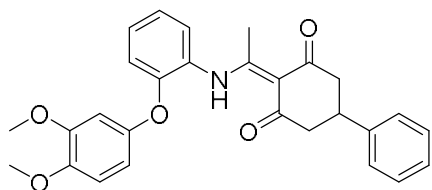
7.41 (m, 1H, Ar), 7.49 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, Ar), 14.87 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 19.3 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.1 (C-4, C-6), 55.3 (OCH₃), 104.5 (Ar), 108.6 (NHC=C), 109.8, 110.2, 119.6, 124.3, 126.5, 126.7, 127.4, 128.0, 128.5, 129.4, 130.6, 143.4, 150.7, 157.1, 160.7 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₇H₂₅NO₄): C, 75.86; H, 5.89; N, 3.28. Found: C, 75.55; H, 6.01; N, 3.29.

2-(1-((2-(4-Methoxyphenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.98)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (100 mg, 0.43 mmol), **1.75** (139 mg, 0.65 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (1.8 mL). The reaction vessel was sealed and heated at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol, 10:0.1) to afford 156 mg (85%) of **1.98** as a white solid. **Mp** 137-139 °C. **MS** (ES, positive mode): 428 (M+H)⁺, 855 (2M+H)⁺. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.52–2.64 (m, 2H, H-4, H-6), 2.69–2.90 (m, 2H, H-4, H-6), 3.25 (m, 1H, H-5), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 6.88 (dd, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 1H, Ar), 6.94–7.03 (m, 4H, Ar), 7.16–7.37 (m, 7H, Ar), 7.45 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H, Ar), 14.90 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 19.9 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.6 (C-4, C-6), 55.5 (OCH₃), 108.6 (NHC=C), 115.2, 117.6, 120.6, 123.2, 126.3, 126.5, 126.7, 127.8, 128.5, 129.3, 143.5, 148.7, 152.0, 156.0 (Ar), 172.6 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₇H₂₅NO₄): C, 75.86; H, 5.89; N, 3.28. Found: C, 75.71; H, 5.98; N, 3.42.

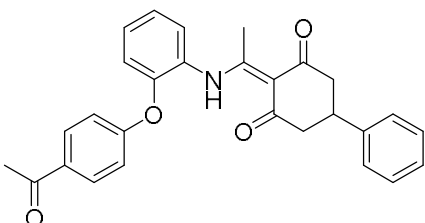
2-(1-((2-(3,4-Dimethoxyphenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.99)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (48 mg, 0.21 mmol), **1.76** (79 mg, 0.32 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.8 mL). The reaction vessel was sealed and heated at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 2:1) to afford 73 mg (76%) of **1.99** as a white solid. **Mp** 65-67 °C. **MS** (ES, positive mode): 458 (M+H)⁺, 915 (2M+H)⁺. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.53–2.62 (m, 2H, H-4, H-6), 2.71–2.88 (m, 2H, H-4, H-6), 3.29 (m, 1H, H-5), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 6.52 (dd, $J = 8.7, 2.8$ Hz, 1H, Ar), 6.76 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, Ar), 6.90–6.96 (m, 2H, Ar), 7.15–7.28 (m, 2H, Ar), 7.28–7.40 (m, 5H, Ar), 7.45 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H, Ar), 14.89 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 20.0 (CH₃), 36.1 (C-5), 45.2 (C-4, C-6), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 104.7 (Ar), 108.5

(NHC=C), 110.4, 112.5, 117.8, 123.2, 126.3, 126.5, 126.7, 127.8, 128.5, 129.3, 143.5, 145.7, 149.00, 149.8, 152.0 (Ar), 172.7 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₈H₂₇NO₅): C, 73.51; H, 5.95; N, 3.06. Found: C, 73.32; H, 6.00; N, 3.24.

2-(1-((2-(4-Acetylphenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.100)

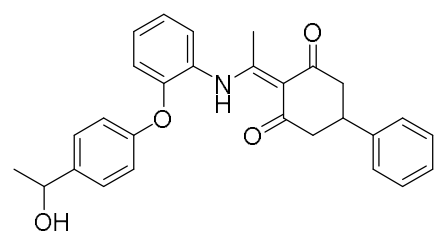


Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (26 mg, 0.11 mmol), **1.79** (39 mg, 0.17 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.5 mL). The reaction vessel was sealed and heated in a microwave reactor at 110 °C overnight.

After cooling, the solvent was evaporated to dryness.

The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 1:1) to afford 24 mg (48%) of **1.100** as a white solid. **Mp** 103–105 °C. **MS** (ES, positive mode): 440 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.54 (s, 3H, COCH₃), 2.52–2.58 (m, 2H, H-4, H-6), 2.67–2.81 (m, 2H, H-4, H-6), 3.23 (tt, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H, H-5), 7.01–7.06 (m, 2H, Ar), 7.20–7.34 (m, 6H, Ar), 7.37 (m, 1H, Ar), 7.48 (m, 1H, Ar), 7.55 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.95–7.99 (m, 2H, Ar), 14.85 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 26.6 (COCH₃), 36.0 (C-5), 45.0 (C-4, C-6), 108.6 (NHC=C), 117.1, 121.2, 125.6, 126.5, 126.7, 128.3, 128.3, 128.5, 129.7, 130.8, 132.3, 143.4, 149.2, 160.4, 172.4 (NHC=C), 196.5 (COCH₃). **Anal. calc.** for (C₂₈H₂₅NO₄): C, 76.52; H, 5.73; N, 3.19. Found: C, 76.12; H, 5.87; N, 3.24.

2-(1-((2-(4-(1-Hydroxyethyl)phenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.101)



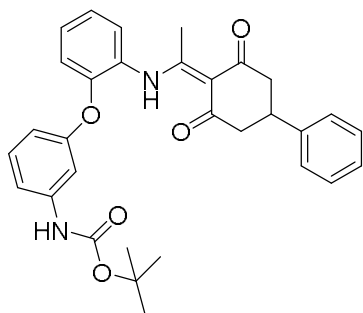
Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (30 mg, 0.14 mmol), **1.80** (46 mg, 0.20 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (1 mL). The reaction vessel was sealed and heated in a microwave reactor at 110 °C overnight.

After cooling, the solvent was evaporated to dryness.

The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 1;1) to afford 16 mg (28%) of **1.101** as a white solid. **Mp** 60–62 °C. **MS** (ES, positive mode): 442 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.31 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, (CH₃)CHOH), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.54–2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.70–2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 3.28 (m, 1H, H-5), 4.71 (m, 1H, CHOH), 5.16 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, OH), 6.93–6.97 (m, 2H, Ar), 7.00 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, Ar), 7.20–7.27 (m, 2H, Ar), 7.28–7.38 (m, 6H, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 7.48 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar), 14.90 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 19.9 (CH₃), 26.0 ((CH₃)CHOH), 36.0 (C-5), 45.3 (C-4, C-6), 67.5 (CHOH), 108.6 (NHC=C), 118.2,

119.0, 123.9, 126.5, 126.3, 127.0, 127.1, 127.9, 128.5, 129.4, 143.2, 143.5, 151.1, 154.4 (Ar), 172.5 (NHC=C). Analytical HPLC (gradient 15-95% acetonitrile in 10 min): T_R : 6.08; area: 100 %. (gradient 50-70% acetonitrile in 10 min): T_R : 4.57; area: 100 %.

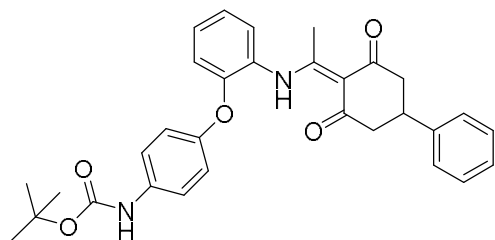
***tert*-Butyl (3-(2-((1-(2,6-dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)phenoxy)phenyl)carbamate (1.102)**



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (110 mg, 0.48 mmol), **1.90** (215 mg, 0.72 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (2 mL). The reaction vessel was sealed and heated in a microwave reactor at 110 °C overnight. After cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 2:1) to

afford 153 mg (71%) of **1.102** as a white solid. **Mp** 159-161 °C. **MS** (ES, positive mode): 513 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.52–2.64 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68–2.84 (m, 2H, H-4, H-6), 3.27 (tt, *J* = 12.2, 4.0 Hz, 1H, H-5), 6.54 (m, 1H, Ar), 7.08 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, Ar), 7.15–7.25 (m, 4H, Ar), 7.28 (m, 1H, Ar), 7.28–7.37 (m, 4H, Ar), 7.41 (m, 1H, Ar), 7.49 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, Ar), 9.46 (br s, 1H, CONH), 14.85 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 28.0 ((CH₃)₃), 36.0 (C-5), 46.3 (C-4, C-6), 79.3 (C(CH₃)₃), 108.5 (NHC=C), 107.7 111.5, 113.4, 119.8, 124.3, 126.5, 126.7, 127.5, 128.0, 128.5, 129.4, 130.0, 141.2, 143.5, 150.6, 152.6 (CONH), 156.4 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₃₁H₃₂N₂O₅): C, 72.64; H, 6.29; N, 5.47. Found: C, 72.52; H, 6.34; N, 5.74.

***tert*-Butyl (4-(2-((1-(2,6-dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)phenoxy)phenyl)carbamate (1.103)**

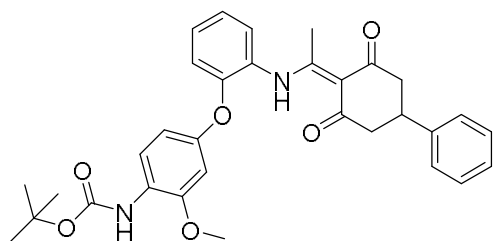


Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (100 mg, 0.43 mmol), **1.91** (195 mg, 0.65 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (1.9 mL). The reaction vessel was sealed and heated in a microwave reactor at 110 °C overnight. After

cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 2:1) to afford 192 mg (87%) of **1.103** as a white solid. **Mp** 108-110 °C. **MS** (ES, positive mode): 513 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.53–2.56 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68–2.87 (m, 2H, H-4, H-6), 3.28 (m, 1H, H-5), 6.91–6.96 (m, 3H, Ar), 7.18 – 7.25 (m, 2H, Ar), 7.30–7.34 (m, 4H, Ar), 7.36 (m, 1H, Ar), 7.44–7.48 (m, 3H, Ar), 9.38 (br s, 1H, CONH), 14.88 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.9 (CH₃), 28.1 ((CH₃)₃), 36.0 (C-5), 45.9 (C-4,

C-6), 79.0 ($\underline{C}(\text{CH}_3)_3$), 108.6 ($\text{NHC}=\underline{C}$), 118.2, 119.4, 119.7, 123.4, 126.5, 126.6, 126.7, 127.9, 128.5, 129.3, 136.0, 143.5, 150.0, 151.6 (Ar), 152.8 (CONH), 172.5 ($\text{NHC}=\underline{C}$). **Anal. calc.** for ($\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$): C, 72.64; H, 6.29; N, 5.47. Found: C, 72.29; H, 6.39; N, 5.65.

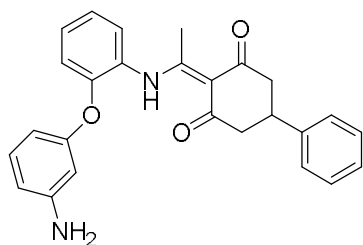
tert-Butyl 4-(2-((1-(2,6-dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)phenoxy)-2-methoxyphenyl)carbamate (1.104)



Following the general procedure A, an Ace pressure tube was charged with **1.4** (65 mg, 0.28 mmol), **1.92** (62 mg, 0.19 mmol) and 4 Å molecular sieves in toluene (0.8 mL). The reaction vessel was sealed and heated in a microwave reactor at 110 °C overnight. After

cooling, the solvent was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 3:1) to afford 78 mg (76%) of **1.104** as a white solid. **Mp** 189-191 °C. **MS** (ES, positive mode): 543 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. **¹H NMR** ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 1.44 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 2.47 (s, 3H, CH_3), 2.53–2.66 (m, 2H, H-4, H-6), 2.69 – 2.91 (m, 2H, H-4, H-6), 3.28 (m, 1H, H-5), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 6.49 (dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz, 1H, Ar), 6.76 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, Ar), 7.00 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, Ar), 7.20–7.26 (m, 2H, Ar), 7.32 (m, 4H, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 7.47 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H, Ar), 7.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar), 7.99 (br s, 1H, CONH), 14.89 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): δ 19.9 (CH_3), 28.1 ($(\text{CH}_3)_3$), 36.1 (C-5), 45.5 (C-4, C-6), 55.9 (OCH_3), 79.1 ($\underline{C}(\text{CH}_3)_3$), 103.3 (Ar), 108.6 ($\text{NHC}=\underline{C}$), 109.9, 118.6, 122.6, 123.7, 126.5, 126.8, 128.0, 128.5, 129.4, 143.5, 151.3 (Ar), 151.9 (CONH), 153.0 (Ar), 172.6 ($\text{NHC}=\underline{C}$). **Anal. calc.** for ($\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$): C, 70.83; H, 6.32; N, 5.16. Found: C, 70.60; H, 6.33; N, 5.37.

2-(1-((2-(3-Aminophenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (1.105)

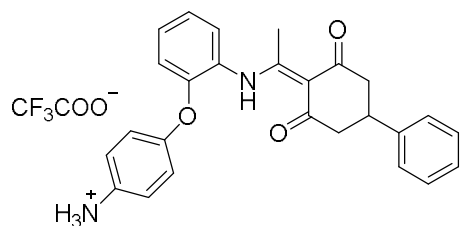


To a solution of **1.102** (60 mg, 0.12 mmol) in dichloromethane (0.4 mL), TFA (0.4 mL, 4.68 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. Then volatiles were removed and the residue was purified by CCTLC (hexane/ethyl acetate, 1:1) to afford 47 mg (97%) of **1.105** as a white solid. **Mp**

76-78 °C. **MS** (ES, positive mode): 413 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. **¹H NMR** ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 2.46 (s, 3H, CH_3), 2.53–2.63 (m, 2H, H-4, H-6), 2.68–2.88 (m, 2H, H-4, H-6), 3.30 (m, 1H, H-5), 5.27 (br s, 2H, NH_2), 6.08 (ddd, $J = 8.0, 2.4, 0.9$ Hz, 1H, Ar), 6.16 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar), 6.34 (ddd, $J = 8.1, 2.2, 0.9$ Hz, 1H, Ar), 6.98 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 7.04 (dd, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 1H, Ar), 7.17–7.25 (m, 2H, Ar), 7.30–7.33 (m, 4H, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 7.45 (dd, J

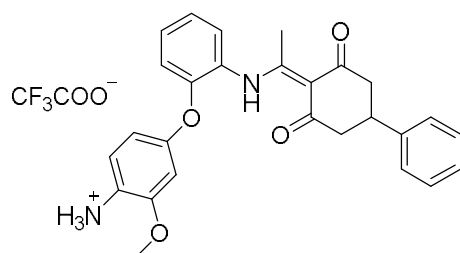
= 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar), 14.87 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.8 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.3 (C-4, C-6), 103.4, 105.4 (Ar), 108.5 (NHC=C), 109.7, 119.4, 123.7, 126.5, 126.7, 127.2, 127.8, 128.5, 129.3, 130.1, 143.5, 150.6, 151.0, 156.9 (Ar), 172.5 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₆H₂₄N₂O₃·H₂O): C, 72.54; H, 6.09; N, 6.51. Found: C, 72.86; H, 5.84; N, 6.89.

4-(2-((1-(2,6-Dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)phenoxy)benzenaminium 2,2,2-trifluoroacetate (1.106)



To a solution of **1.103** (66 mg, 0.13 mmol) in dichloromethane (0.4 mL), TFA (0.4 mL, 5.07 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min. Then volatiles were removed and the residue was triturated with dichloromethane and hexane yielding 65 mg (99%) of **1.106** as a white solid. **Mp** 73-75 °C. **MS** (ES, positive mode): 413 (M+H)⁺ for C₂₆H₂₄N₂O₃. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.54–2.61 (m, 2H, H-4, H-6), 2.69–2.86 (m, 2H, H-4, H-6), 3.29 (tt, *J* = 12.1, 4.0 Hz, 1H, H-5), 7.00–7.07 (m, 3H, Ar), 7.15–7.20 (m, 2H, Ar), 7.20–7.36 (m, 6H, Ar), 7.41 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.50 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar), 14.89 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.9 (CH₃), 36.0 (C-5), 45.9 (C-4, C-6), 108.6 (NHC=C), 119.1, 119.6, 122.3, 124.2, 126.6, 126.7, 127.2, 128.0, 128.5, 129.5, 132.2, 143.4, 150.8, 152.8 (Ar), 158.2 (q, *J* = 34.2 Hz, CF₃COO⁻), 172.6 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₈H₂₅F₃N₂O₅·H₂O): C, 63.87; H, 4.79; N, 5.32. Found: C, 63.50; H, 4.74; N, 5.14.

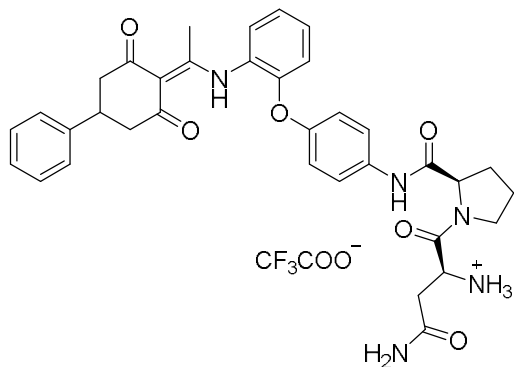
4-(2-((1-(2,6-Dioxo-4-phenylcyclohexylidene)ethyl)amino)phenoxy)-2-methoxybenzenaminium 2,2,2-trifluoroacetate (1.107)



To a solution of **1.104** (20 mg, 0.04 mmol) in dichloromethane (0.5 mL), TFA (0.1 mL, 1.47 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then volatiles were removed and the residue was triturated with dichloromethane and hexane yielding 18 mg (88%) of **1.107** as a white solid. **Mp** 79-81 °C. **MS** (ES, positive mode): 443 (M+H)⁺ for C₂₇H₂₆N₂O₄. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.55–2.63 (m, 2H, H-4, H-6), 2.71–2.85 (m, 2H, H-4, H-6), 3.30 (tt, *J* = 12.1, 4.0 Hz, 1H, H-5), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 6.50 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H, Ar), 6.83 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, Ar), 7.00 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, Ar), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.20–7.26 (m, 2H, Ar), 7.30–7.34 (m, 4H, Ar), 7.39 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.48 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar), 14.88 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 19.9 (CH₃), 36.1 (C-5), 45.4 (C-4, C-6), 56.1

(OCH₃), 108.6 (NHC=C), 103.8, 110.6, 118.5, 120.3, 123.8, 126.6, 126.8, 128.0, 128.5, 129.4, 143.4, 150.9, 151.3 (Ar), 172.6 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₂₉H₂₇F₃N₂O₆): C, 62.59; H, 4.89; N, 5.03. Found: C, 62.22; H, 5.10; N, 5.21.

2-(1-((2-(4-(L-prolyl-L-asparaginyl)aminophenoxy)phenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione trifluoroacetate salt (1.109)

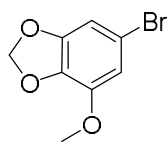


A solution of **1.103** (31 mg, 0.06 mmol) in TFA:CH₂Cl₂ (1:1) (1 mL) was stirred at rt for 1 h. The mixture was concentrated to dryness. The residue obtained was treated with dichloromethane/hexane and was concentrated to dryness. This procedure was repeated several times to obtain a white solid, which was used without further purification.

Then, a solution of this white solid (**1.106**) and DIPEA (27 μL, 0.16 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added to a solution of Boc-Asn(Trt)-Pro-OH (**1.108**) (59 mg, 0.10 mmol) and HATU (34 mg, 0.09 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) in a microwave vial. The reaction mixture was heated at 40 °C for 2 h. After cooling, the crude was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), acidified with 0.1 N citric acid (2 mL) and the organic phase was washed with sat. aq. NaHCO₃ (5 mL). After extracting with DCM (3x10 mL), the resulting organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 10:0.3) to yield 45 mg (77%) of a white solid. This solid was dissolved in CH₂Cl₂ (0.5 mL), and TFA (0.5 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. Further portions of CH₂Cl₂:TFA 1:1 (6x0.5 mL) were added during 7 h. Volatiles were removed and the residue was washed with petroleum ether (6x2 mL). Solvent was evaporated to yield 32 mg (94%) of **1.109** as a white amorphous solid. **MS** (ES, positive mode): m/z 624 (M+H)⁺ for C₃₅H₃₇N₅O₆. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.71–1.85 (m, 3H, CH₂-β Pro, CH₂-γ Pro), 2.05 (m, 1H, CH₂-β Pro), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.36–2.44 (m, 2H, H-4, H-6), 2.57–2.64 (m, 4H, H-4, H-6, CH₂-β Asn), 3.14 (m, 1H, H-5), 3.39 (m, 1H, CH₂-δ Pro), 3.54 (m, 1H, CH₂-δ Pro), 4.27 (m, 1H, CH-α Asn), 4.32 (m, 1H, CH-α Pro), 6.78–6.83 (m, 2H, Ar), 7.02–7.09 (m, 3H, Ar), 7.11–7.23 (m, 7H, 6 Ar, CONH₂), 7.31 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.46 (d, *J* = 8.2, 1H, Ar), 7.62 (br s, 1H, CONH₂), 7.99 (br s, 3H, NH₃⁺), 9.87 (br s, 1H, CONH), 14.73 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 20.9 (CH₃), 25.0 (γ-Pro), 29.9 (β-Pro), 35.1 (C-4, C-6), 36.5 (C-5), 47.4 (δ-Pro, β-Asn) 48.3 (α-Asn), 60.9 (α-Pro), 109.0 (NHC=C), 118.9, 119.6, 121.2, 124.2, 126.9, 127.1, 127.3, 127.9, 128.2, 128.3, 128.9, 129.8, 135.7, 143.9, 148.2, 151.7 (Ar), 158.2 (q, *J* = 31.6 Hz, CF₃COO⁻), 167.5, 170.0, 170.8 (CO), 173.0 (NHC=C). **Anal. calc.** for (C₃₇H₃₈F₃N₅O₈·4H₂O): C, 54.88; H, 5.73; N, 8.65. Found: C, 54.81; H, 5.33; N, 8.25.

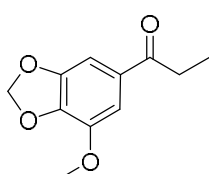
1.2 CHEMISTRY PROCEDURES IN CHAPTER 2

6-Bromo-4-methoxybenzo[d][1,3]dioxole (2.4)



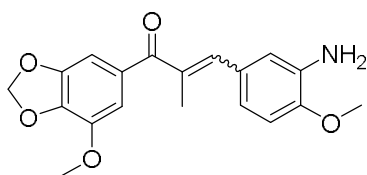
To a solution of *o*-vanilline (0.5 g, 3.29 mmol) in acetic acid (13 mL), *N*-bromosuccinimide (0.7 g, 3.95 mmol) previously dissolved in acetic acid (40 mL) was added. The mixture was heated at 70 °C for 1 h. Then, 10% aqueous solution of Na₂S₂O₃ was added. The aqueous phase was extracted with chloroform (2x15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate) to provide a yellow solid, which was dissolved in 2% aqueous NaOH (6.30 mL) and stirred for 5 min at rt. Then, 33% aqueous H₂O₂ (7.55 mL) was added and stirred for 10 min, and 37% HCl was added to reach pH 2. The crude was extracted with dichloromethane (3x20 mL), washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was dissolved in anhydrous DMF (6.3 mL), and K₂CO₃ (208 mg, 1.50 mmol) and dibromomethane (105 μL, 1.50 mmol) were added. The mixture was heated at 100 °C for 90 min and concentrated. The crude was dissolved in dichloromethane (20 mL), washed with saturated aqueous solution NaHCO₃ (15 mL) and brine (15 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate) to yield 523 mg (69%) of **2.4** as white solid. **Mp** 76-78 °C (lit²⁶ 80-81 °C). **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.82 (s, 3H, OCH₃), 6.02 (s, 2H, CH₂), 6.84 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar), 6.85 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.²⁶

1-(3',4'-Methylenedioxy-5'-methoxyphenyl)propan-1-one (2.5)



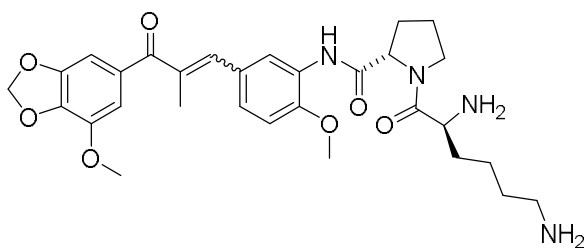
To a solution of **2.4** (400 mg, 1.73 mmol) in anhydrous TBME (4 mL), *n*-BuLi solution 1.6 M in hexane (5.8 mmol) was added. The mixture was stirred under argon at -32 °C for 1 h. Then, propionaldehyde (430 μL, 6.0 mmol) was added and the mixture was stirred at -20 °C for 2 h. Then, a saturated aqueous solution of NH₄Cl (10 mL) was added. The crude was extracted with ethyl acetate (3x15 mL), washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (7 mL) and PCC (740 mg, 3.43 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at rt. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate) to yield 162 mg (45%) of **2.5** as white solid. **Mp** 82-84 °C (lit²⁷ 88-89 °C). **MS** (ES, positive mode): *m/z* 209 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 2.98 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.11 (s, 2H, OCH₂O), 7.20 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar), 7.28 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.²⁷

(*E/Z*)-3-(3''-Amino-4''-methoxyphenyl)-1-(5'-methoxy-3',4'-methylenedioxyphenyl)-2-methylprop-2-en-1-one (TUB091)



To a solution of the propiophenone **2.5** (256 mg, 1.70 mmol) and the 3-amino-4-methoxybenzaldehyde **2.6** (354 mg, 1.70 mmol) in ethanol (8 mL), piperidine (2 mL), glacial acetic acid (1 mL) and 4 Å molecular sieves were added at rt. The mixture, protected from light, was stirred at 80 °C under argon atmosphere for 16 h. Then, volatiles were removed in vacuo and the residue was purified by flash column chromatography (hexane/ethyl acetate) to yield 250 mg (43%, two isomers *E/Z* ratio: 92/8) of **TUB091** as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 342 (*M+H*)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (*E* isomer) 2.13 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 4.82 (br s, 2H, NH₂), 6.09 (s, 2H, CH₂), 6.70 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H, Ar), 6.83 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, Ar), 6.84 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, Ar), 6.87 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 6.97 (s, 1H, H-3), 6.98 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar).

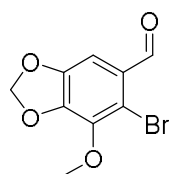
(*E/Z*)-3-(3''-Amino-L-prolil-L-lisil-4''- methoxyphenyl)-1-(5'-methoxy-3',4'- methylenedioxyphenyl)-2-methylprop- 2-en-1-one (TUB099)



A microwave vial was charged with Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (**2.7**) (206 mg, 0.30 mmol) and HATU (102 mg, 0.27 mmol) in anhydrous DMF (1 mL). Then DIPEA (61 μL, 0.35 mmol) and a solution of **TUB091** (61 mg, 0.18 mmol) in DMF (1 mL) were added. The reaction mixture was heated at 40 °C for 2 h. After cooling, the crude was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), acidified with 0.1 N citric acid (5 mL) and the organic phase was washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (15 mL). After extracting with DCM (3x10 mL), the resulting organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 4:1) to yield 67 mg of the coupling product as a yellow oil. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 665 (*M+Na*)⁺. This product was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL) and piperidine (50 μL, 0.52 mmol) was added. The reaction was stirred at rt for 2 h. Volatiles were removed in vacuo and the crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/7N NH₃ in methanol, 30:1) to yield 25 mg (88% yield, two isomers *E/Z* ratio 94/6) of **TUB099** as yellow oil. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 567 (*M+H*)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (*E* isomer) 1.34 (m, 4H, CH₂-γ Lys, CH₂-δ Lys), 1.53 (m, 2H, CH₂-β Lys), 1.91 (m, 4H, CH-β Pro, CH-γ Pro), 2.16 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, CH₃), 2.56 (m, 2H, CH₂-ε Lys), 3.51 (m, 1H, CH-α Lys), 3.66 (m, 2H, CH₂-δ Pro), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 4.70 (m, 1H, CH-α Pro), 6.11 (s, 2H, OCH₂O), 6.92 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.01 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.03 (s, 1H, H-3), 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz,

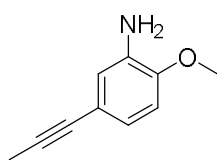
1H, Ar), 7.25 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H, Ar), 8.30 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar), 9.35 (s, 1H, NHCO). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (*E* isomer) 14.6 (CH₃), 21.6 (C- γ Lys), 22.3 (C- γ Pro), 27.7 (C- δ Lys), 28.6 (C- β Pro), 32.5 (C- β Lys), 41.3 (C- ϵ Lys), 46.6 (C- δ Pro), 52.0 (C- α Lys), 56.0 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 58.5 (C- α Pro), 102.2 (CH₂), 102.8, 103.4, 110.0, 127.4, 127.6, 115.3, 119.8, 127.5, 132.5, 138.2, 140.6, 148.2 (Ar), 132.5 (C-2), 142.8 (C-3), 170.1 (CO Pro), 196.9 (C-1), 198.2 (CO Lys). **Anal. calc.** for (C₃₀H₃₈N₄O₇·2H₂O): C, 59.79; H, 7.02; N, 9.30. Found: C, 59.62; H, 7.21; N, 9.57.

6-Bromo-7-methoxybenzo[*d*][1,3]dioxole-5-carbaldehyde (**2.10**)



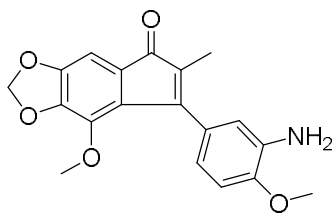
To a solution of 7-methoxy-benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carbaldehyde (**2.9**) (100 mg, 0.56 mmol) in acetic acid (1 mL), a solution of *N*-bromosuccinimide (119 mg, 0.67 mmol) in acetic acid (1 mL) was added dropwise at rt. The solution was heated at 70 °C for 1 h, cooled to rt and washed with 10% Na₂S₂O₃ aqueous solution (20 mL) and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ ethyl acetate, 4:1) to yield 68 mg (47%) of **2.10** as a white amorphous solid. **MS** (ES, positive mode): m/z 259 (M+H)⁺ with Br isotopic distribution pattern. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.99 (s, 3H, CH₃), 6.22 (s, 2H, CH₂), 7.09 (s, 1H, Ar), 10.11 (s, 1H, COH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 60.2 (CH₃), 102.6 (Ar), 103.4 (CH₂), 114.7, 127.8, 139.7, 143.2, 149.2 (Ar), 190.2 (COH). ^1H NMR data are similar to those previously described.²⁸

2-Methoxy-5-(prop-1-yn-1-yl)aniline (**2.12**)



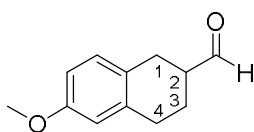
An Ace pressure tube was charged with 5-iodo-2-methoxyaniline (**2.11**) (200 mg, 0.80 mmol), 2-butyric acid (82 mg, 0.96 mmol), anhydrous K₂CO₃ (222 mg, 5.85 mmol), CuI (12 mg, 0.06 mmol) and triphenylphosphine (14 mg, 0.06 mmol) in anhydrous acetonitrile (3 mL). The reaction vessel was sealed, stirred under argon atmosphere for 10 min, and heated at 90 °C for 48 h. Then, it was cooled to rt, washed with water (20 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 39 mg (30%) of **2.12** as yellow oil. **MS** (ES, positive mode): 162 (M+H)⁺. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1.97 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.77 (s, 2H, NH₂), 6.55 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H, Ar), 6.62 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, Ar), 6.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar).

7-(3-Amino-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-6-methyl-5H-indeno[5,6-d][1,3]dioxol-5-one (2.8)



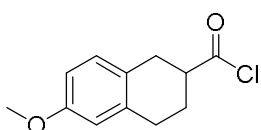
An Ace pressure tube was charged with **2.10** (24 mg, 0.1 mmol), **2.12** (30 mg, 0.2 mmol), anhydrous NaOAc (30 mg, 0.4 mmol), Pd(OAc)₂ (4 mg, 0.02 mmol) and TBACl (14 mg, 0.06 mmol) in anhydrous DMF (0.8 mL). The reaction vessel was sealed, stirred under argon atmosphere for 10 min, and heated at 100 °C for 20 h. Then, the solution was cooled to rt, washed with saturated aqueous solution of NH₄Cl (10 mL) and extracted with DCM (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 3:1) to yield 7 mg (20%) of **2.8** as red oil. **MS** (ES, positive mode): 340 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.65 (s, 3H, CH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.79 (s, 2H, NH₂), 6.09 (s, 2H, CH₂), 6.62 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, Ar), 6.71 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 6.81 (s, 1H, Ar), 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar).

(±)-6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carbaldehyde (2.15)



To a solution of 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylic acid (**2.14**) (150 mg, 0.73 mmol) in anhydrous THF (6.5 mL), 2 M BH₃·Me₂S in THF (0.5 mL, 0.89 mmol) was added at rt under argon. After stirring at rt for 1h, ethyl acetate was added and the solution was successively washed with saturated aqueous NaHCO₃, water and brine. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness to provide yellow oil which was used in the next step without further purification. To a solution of this alcohol in DCM (7.2 mL) Dess–Martin periodinane (370 mg, 0.88 mmol) was added at rt. The mixture was stirred for 2h at rt, washed with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 10:0.5) to yield 68 mg (49%) of **2.15** as colorless oil. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.68 (m, 1H, H-3), 2.08 (m, 1H, H-3), 2.70–2.84 (m, 5H, H-1, H-4, H-2), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 6.64 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, Ar), 6.69 (dd, *J* = 8.4, 2.8 Hz, 1H, Ar), 7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 9.70 (s, 1H, COH).

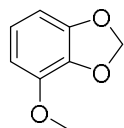
(±) 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carbonyl chloride (2.17)



To a solution of 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylic acid (**2.14**) (260 mg, 1.26 mmol) in anhydrous toluene (12 mL), distillate thionyl chloride (1.48 mL, 12.6 mmol) was added at room temperature under argon. The solution was heated at reflux for 3h, cooled to

room temperature and concentrated under reduced pressure to provide a tan solid. The acid halide was used in the next step without further purification.

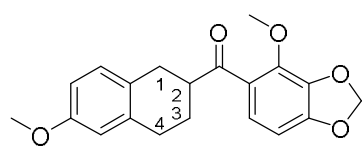
4-Methoxybenzo[d][1,3]dioxole (**2.18**)²⁹



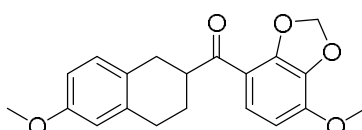
To a mixture of 3-methoxybenzene-1,2-diol (500 mg, 3.56 mmol) and K_2CO_3 (785 mg, 4.28 mmol) in anhydrous DMF (18 mL) bromochloromethane (374 μ L, 5.35 mmol) was added. The mixture was heated at 100 °C for 4 h. The solution was allowed to reach room temperature and volatiles were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with dichloromethane and neutralized with 1N HCl. The aqueous phase was further extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 10:1) to yield 255 mg (47%) of **2.18** as colorless oil. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.81 (s, 3H, OCH₃), 5.96 (s, 2H, OCH₂O), 6.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Ar), 6.63 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 6.79 (t, J = 8.2 Hz, 1H, Ar).

(±)-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(4-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methanone (**2.19**) and (±)-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(7-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)methanone (**2.20**)

To a solution of 4-methoxybenzo[d][1,3]dioxole (**2.18**) (18 mg, 0.12 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (1.0 mL), $ZnCl_2$ (16 mg, 0.12 mmol) was added under argon, followed by the addition of **2.17** (55 mg, 0.24 mmol). The resultant mixture was stirred at 60 °C for 4h, quenched with ice water and extracted with dichloromethane (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 7 mg (17%) of **2.19** as a white amorphous solid and 6 mg (16%) of **2.20** as a white amorphous solid.



Experimental data for **2.19**: MS (ES, positive mode): m/z 341 (M+H)⁺. Analytical HPLC (gradient 15-95% acetonitrile in 10 min): T_R : 7.48; area: 70 %. 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 1.59 (m, 1H, H-3), 2.03 (m, 1H, H-3), 2.71–2.86 (m, 4H, H-1, H-4), 3.49 (m, 1H, H-2), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 6.12 (m, 2H, OCH₂O), 6.64 (d, J = 2.7 Hz, 1H, Ar), 6.67 (dd, J = 8.3, 2.7 Hz, 2H, Ar), 6.74 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.14 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar).

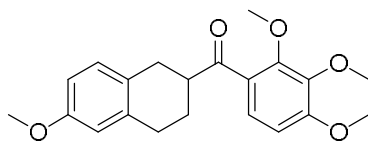


Experimental data for **2.20**: MS (ES, positive mode): m/z 341 (M+H)⁺. Analytical HPLC (gradient 15-95% acetonitrile in 10 min): T_R : 9.16; area: 98 %. (gradient 60-80% acetonitrile in 10 min): T_R : 3.62; area: 98 %. 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 1.63 (m, 1H, H-3), 2.06 (m, 1H, H-3), 2.70 – 2.91 (m, 4H, H-1, H-4), 3.54 (m, 1H, H-2), 3.70

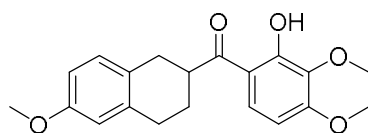
(s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 6.13 (m, 2H, OCH₂O), 6.66 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, Ar), 6.68 (dd, *J* = 8.3, 2.8 Hz, 1H, Ar), 6.82 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, Ar), 7.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 25.6 (C-3), 28.7 (C-4), 30.1 (C-1), 44.5 (C-2), 55.0 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 102.1 (OCH₂O), 108.1, 112.1, 113.1, 113.2, 122.8, 127.3, 129.8, 135.1, 136.8, 147.2, 148.6, 157.3 (Ar), 198.3 (CO).

(±)-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl) methanone (2.24) and **(±)-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)(6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)methanone (2.25)**

To a solution of 1,2,3-trimethoxybenzene (**2.21**) (40 mg, 0.24 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (1 mL), ZnCl₂ (34 mg, 0.24 mmol) was added under argon, followed by the addition of **2.17** (130 mg, 0.48 mmol). The resultant mixture was stirred at 60 °C for 1h. The mixture was quenched by the addition of saturated aqueous solution of NaHCO₃ and ice water and extracted with dichloromethane (3x15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ ethyl acetate, 2:1) to yield 18 mg (21%) of **2.24** as a white solid and 6 mg (7%) of **2.25** as a white solid.

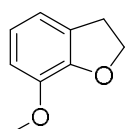


Experimental data for **2.24**: **Mp** 66-67 °C. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 357 (M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.61 (m, 1H, H-3), 2.03 (m, 1H, H-3), 2.71 – 2.86 (m, 4H, H-1, H-4), 3.51 (m, 1H, H-2), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 6.65 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, Ar), 6.67 (dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz, 1H, Ar), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 25.7 (C-3), 28.6 (C-4), 30.4 (C-1), 45.4 (C-2), 54.9 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 60.4 (OCH₃), 61.6 (OCH₃), 107.8, 112.1, 113.1, 124.8, 125.3, 127.3, 129.8, 136.8, 141.5, 152.5, 156.6, 157.2 (Ar), 203.2 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₁H₂₄O₅): C, 70.77; H, 6.79. Found: C, 70.38; H, 6.84.



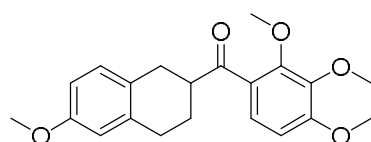
Experimental data for **2.25**: **Mp** 78-80 °C. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 343 (M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.73 (m, 1H, H-3), 2.03 (m, 1H, H-3), 2.77 – 2.86 (m, 3H, H-1, H-4), 2.92 (m, 1H, H-1), 3.71 (s, 6H, OCH₃), 3.82 (m, 1H, H-2), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 6.66 – 6.72 (m, 3H, Ar), 7.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, Ar), 12.46 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 26.4 (C-3), 28.4 (C-4), 31.0 (C-1), 41.3 (C-2), 55.0 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 59.9 (OCH₃), 103.8, 112.1, 113.1, 113.7, 127.0, 127.2, 129.7, 135.9, 136.8, 156.3, 157.3, 158.3 (Ar), 208.1 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₀H₂₂O₅): C, 70.16; H, 6.48. Found: C, 69.78; H, 6.62.

7-Methoxy-2,3-dihydrobenzofuran (2.23)



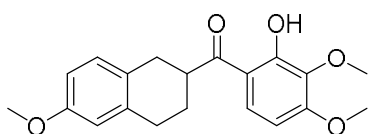
7-methoxybenzofuran (**2.22**) (96 mg, 0.65 mmol) was dissolved in ethyl acetate (12 mL) in a pressure vessel and then 10% Pd/C (catalytic amount) was added. The mixture was hydrogenated at 40 psi for 20 h at 40 °C. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 10:0.01) to yield 71 mg (73%) of **2.23** as colorless oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 151 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.16 (pt, 1H, CH₂), 3.75 (s, 1H, OCH₃), 4.50 (pt, 2H, CH₂), 6.74 (m, 1H, Ar), 6.78 (m, 1H, Ar), 6.82 (m, 1H, Ar). ¹H NMR data are similar to those previously described.³⁰

(±)-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl) methanone (2.24)



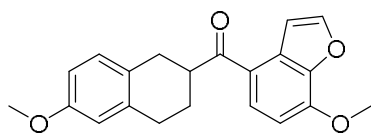
To a solution of 1,2,3-trimethoxybenzene (**2.21**) (346 mg, 2.06 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (8.2 mL), **2.17** (692 mg, 3.09 mmol) was added under argon, followed by the addition of TfOH (183 μ L, 2.06 mmol). The resultant mixture was stirred at 60 °C for 1h. The mixture was quenched by the addition of saturated aqueous solution of NaHCO₃ and ice water and extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 355 mg (64%) of **2.24** as a white solid.

(±)-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)(6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)methanone (2.25)



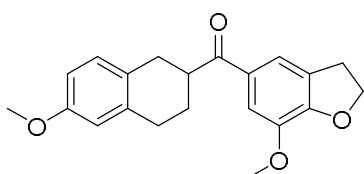
To a solution of 1,2,3-trimethoxybenzene (**2.21**) (82 mg, 0.49 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (2 mL), BF₃·etherate (62 μ L, 0.49 mmol) was added under argon, followed by the addition of **2.17** (163 mg, 0.73 mmol). The resultant mixture was stirred at 60 °C overnight. The mixture was quenched by the addition of ice water and extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 76 mg (46%) of **2.25** as a white solid.

(±)-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(7-methoxybenzofuran-5-yl) methanone (2.26)



To a solution of 7-methoxybenzofuran (**2.22**) (18 mg, 0.12 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (1 mL), ZnCl₂ (16 mg, 0.12 mmol) was added, followed by the addition under argon of **2.17** (55 mg, 0.24 mmol). The resultant mixture was stirred at 60 °C for 4h. The mixture was quenched by the addition of saturated aqueous solution of NaHCO₃ and ice water and extracted with dichloromethane (3x15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 25 mg (48%) of **2.26** as a white solid. **Mp** 92-94 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 337 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.73 (m, 1H, H-3), 2.06 (m, 1H, H-3), 2.76 – 2.87 (m, 3H, H-1, H-4), 2.94 (m, 1H, H-1), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (m, 1H, H-2), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 6.67 – 6.71 (m, 2H, Ar), 7.02 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, Ar), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 8.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 8.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 26.5 (C-3), 28.5 (C-4), 31.1 (C-1), 41.5 (C-2), 55.0 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 106.1, 108.0, 112.1, 113.1, 121.4, 127.4, 127.8, 128.4, 129.7, 136.9, 143.7, 148.1, 148.9, 157.3 (Ar), 201.6 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₁H₂₀O₄·0.5H₂O): C, 73.03; H, 6.13. Found: C, 73.19; H, 5.99.

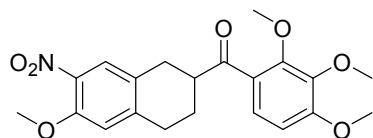
(±)-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)methanone (2.27)



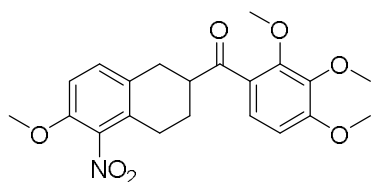
To a solution of 7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran (**2.23**) (36 mg, 0.24 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (1.9 mL), ZnCl₂ (33 mg, 0.24 mmol) was added, followed by the addition under argon of **2.17** (109 mg, 0.48 mmol). The resultant mixture was stirred at 60 °C for 2h. The mixture was quenched by the addition of saturated aqueous solution of NaHCO₃ and ice water and extracted with dichloromethane (3x15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 45 mg (55%) of **2.27** as a white solid. **Mp** 89-91 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 339 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.67 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-3), 2.73 – 2.85 (m, 3H, H-1, H-4), 2.91 (m, 1H, H-1/H-4), 3.24 (pt, 2H, CH₂CH₂O), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.65 (pt, 2H, CH₂CH₂O), 6.66 – 6.70 (m, 2H, Ar), 7.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.44 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.64 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 26.4 (C-3), 28.5 (C-4), 29.0 (CH₂CH₂O), 31.1 (C-1), 40.9 (C-2), 54.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 72.5 (CH₂CH₂O), 111.8, 112.0, 113.1, 118.9, 127.3, 128.8, 129.6, 129.7, 144.0, 152.6, 157.2 (Ar), 200.9 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₁H₂₂O₄): C, 74.54; H, 6.55. Found: C, 74.15; H, 6.44.

(±)-(6-Methoxy-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl) methanone (2.28) and **(±)-(6-Methoxy-5-nitro-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl)methanone (2.29)**

To a solution of **2.24** (233 mg, 0.65 mmol) in acetic anhydride (2 mL) at -40 °C, 65% HNO₃ (100 μL) was slowly added. The reaction was allowed to reach -14 °C and stirred 20 min at this temperature. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and ice water was added. The crude product was washed with brine and extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/ethyl acetate, 10:0.2) to yield 121 mg (46%) of **2.28** as a yellow solid and 100 mg (38%) of **2.29** as a yellow solid.

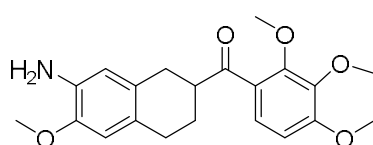


Experimental data for **2.28**: **Mp** 120-122 °C. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 401 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.67 (m, 1H, H-3), 2.06 (m, 1H, H-3), 2.79 – 2.95 (m, 4H, H-1, H-4), 3.58 (m, 1H, H-2), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 6H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.08 (s, 1H, Ar), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.68 (s, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 25.0 (C-3), 28.5 (C-4), 29.7 (C-1), 44.5 (C-2), 56.1 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 60.4 (OCH₃), 61.6 (OCH₃), 107.8, 113.8, 124.8, 125.0, 125.1, 128.0, 137.1, 141.5, 143.6, 150.0, 152.5, 156.7 (Ar), 202.6 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₁H₂₃NO₇·0.5H₂O): C, 61.46; H, 5.89; N, 3.41. Found: C, 61.61; H, 5.91; N, 3.56.



Experimental data for **2.29**: **Mp** 93-95 °C. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 401 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.64 (m, 1H, H-3), 2.06 (m, 1H, H-3), 2.53 – 2.72 (m, 2H, H-4), 2.77 – 2.98 (m, 2H, H-1), 3.55 (m, 1H, H-2), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 23.1 (C-4), 24.4 (C-3), 30.2 (C-1), 44.2 (C-2), 56.1 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 60.4 (OCH₃), 61.6 (OCH₃), 107.8, 111.1, 124.8, 124.9, 127.7, 129.0, 131.7, 140.6, 141.5, 148.1, 152.6, 156.8 (Ar), 202.5 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₁H₂₃NO₇): C, 62.84; H, 5.78; N, 3.49. Found: C, 62.80; H, 5.96; N, 3.58.

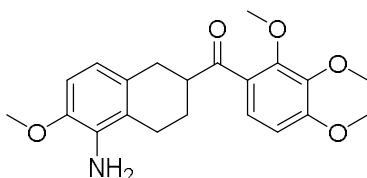
(±)-(7-Amino-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl)methanone (2.30)



2.28 (30 mg, 0.07 mmol) was dissolved in ethyl acetate (12 mL) in a pressure vessel and then 5% Pt/S (catalytic amount) was added. The mixture was hydrogenated at 30 psi for 3 h at 30 °C. Then, the reaction mixture was

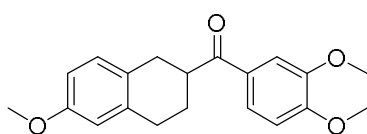
filtered and the solvent was evaporated. The crude was purified by flash chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 10:0.5) to yield 14 mg (54%) of **2.30** as colorless oil. **MS** (ES, positive mode): m/z 342 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.55 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-3), 2.61 – 2.72 (m, 4H, H-1, H-4), 3.45 (m, 1H, H-2), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.43 (br s, 2H, NH₂), 6.34 (s, 1H, Ar), 6.48 (s, 1H, Ar), 6.90 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.32 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 26.3 (C-3), 28.0 (C-4), 30.7 (C-1), 45.7 (C-2), 55.2 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 60.4 (OCH₃), 61.6 (OCH₃), 107.8, 110.5, 113.9, 122.9, 124.7, 125.5, 126.9, 135.3, 141.5, 145.0, 152.5, 156.5 (Ar), 203.5 (CO). Analytical HPLC (gradient 15-95% acetonitrile in 10 min): T_R : 6.32; area: 95 %. (gradient 30-50% acetonitrile in 10 min): T_R : 4.60; area: 95 %.

(±)-(5-Amino-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl)methanone (2.31)



Iron powder (125 mg, 2.2 mmol) and 37% HCl (1 drop) were added to a solution of **2.29** (90 mg, 0.22 mmol) in EtOH (2.2 mL) and water (1 mL). The mixture was heated at reflux for 1h. Ethyl acetate (10 mL) was added to the mixture, washed with water and extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/ethyl acetate, 10:1) to yield 34 mg (40%) of **2.31** as a white solid. **Mp** 133-135 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 372 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.59 (m, 1H, H-3), 2.09 (m, 1H, H-3), 2.43 (m, 1H, H-4), 2.59 (m, 1H, H-4), 2.67 – 2.79 (m, 2H, H-1), 3.41 (m, 1H, H-2), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.35 (br s, 2H, NH₂), 6.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 6.62 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 6.91 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.33 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 23.9 (C-4), 25.7 (C-3), 31.6 (C-1), 45.2 (C-2), 55.6 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 60.4 (OCH₃), 61.6 (OCH₃), 107.8, 108.4, 116.2, 120.0, 124.8, 125.4, 127.9, 134.4, 141.5, 144.2, 152.5, 156.6 (Ar), 203.5 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₁H₂₅NO₅·H₂O): C, 64.77; H, 6.99; N, 3.60. Found: C, 64.39; H, 6.85; N, 4.00.

(±)-(3,4-Dimethoxyphenyl)(6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)methanone (2.33)

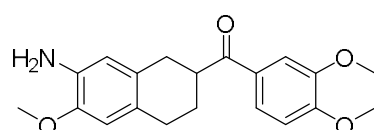


To a solution of 1,2-dimethoxybenzene (**2.32**) (95 μ L, 0.74 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (3 mL), TfOH (65 μ L, 0.74 mmol) was added under argon, followed by the addition of **2.17** (228 mg, 1.02 mmol). The resultant mixture was stirred at 60 °C for 2h. The mixture was quenched by the addition of saturated aqueous solution NaHCO₃ and ice water and extracted with dichloromethane (3 x 15 mL). The combined organic layers

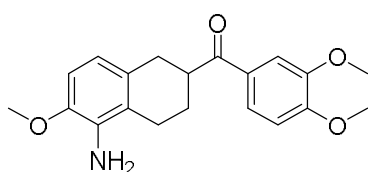
were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 2:1) to yield 184 mg (76%) of **2.33** as a white solid. **Mp** 98-100 °C. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 327 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.67 (m, 1H, H-3), 2.01 (m, 1H, H-3), 2.74 – 2.86 (m, 3H, H-1, H-4), 2.92 (m, 1H, H-1/ H-4), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.67 (s, 1H, Ar), 6.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 7.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.49 (s, 1H, Ar), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 26.4 (C-3), 28.5 (C-4), 31.0 (C-1), 40.8 (C-2), 55.0 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 110.5, 111.0, 112.0, 113.1, 122.9, 127.3, 128.6, 129.7, 136.9, 148.7, 153.0, 157.3 (Ar), 201.1 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₀H₂₂NO₄): C, 73.60; H, 6.79. Found: C, 73.21; H, 6.64.

(±)-(7-Amino-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(3,4-dimethoxyphenyl) methanone (2.36) and **(±)-(5-Amino-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(3,4-dimethoxyphenyl)methanone (2.37)**

To a solution of **2.33** (170 mg, 0.49 mmol) in acetic anhydride (2 mL) at -40 °C, 65% HNO₃ (100 μL) was slowly added. The reaction was allowed to reach -10 °C and stirred for 20 min at this temperature. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and ice water was added. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3x15 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/ethyl acetate, 10:0.1) to yield 95 mg of a mixture of the 5/7 nitro isomers. Analytic HPLC (gradient 15-95% acetonitrile in 10 min): T_R: 7.48; area: 60 % and T_R: 7.78; area: 40 %. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 372 (M+H)⁺. The mixture of the two isomers was dissolved in EtOH (2.7 mL) and water (1 mL), and iron powder (140 mg, 2.5 mmol) and HCl 37% (2 drops) were added to the solution. The mixture was heated to reflux for 3h. Ethyl acetate (6 mL) was added to the mixture, washed with water and extracted with ethyl acetate (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/ethyl acetate, 10:2) to yield 27 mg (16%) of **2.36** as a colorless oil and 17 mg (10%) of **2.37** as a white solid.

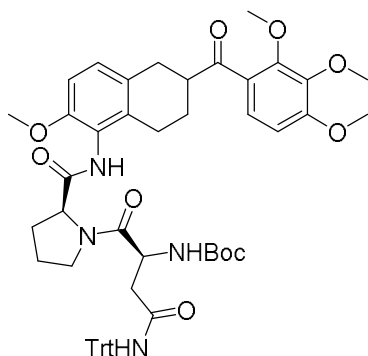


Experimental data for **2.36**: **MS** (ES, positive mode): *m/z* 342 (M+H)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.62 (m, 1H, H-3), 1.97 (m, 1H, H-3), 2.61 – 2.85 (m, 4H, H-1, H-4), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.43 (br s, 2H, NH₂), 6.35 (s, 1H, Ar), 6.51 (s, 1H, Ar), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.71 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, Ar).



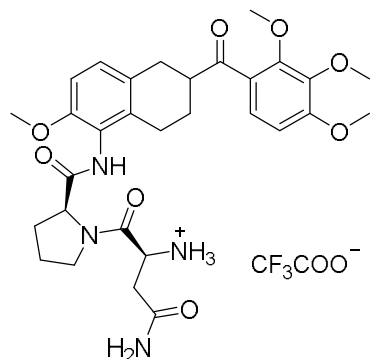
Experimental data for **2.37**: **Mp** 125-127 °C. **MS** (ES, positive mode): m/z 342 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.66 (m, 1H, H-3), 2.07 (m, 1H, H-3), 2.52 – 2.70 (m, 2H, H-1, H-4), 2.71 – 2.81 (m, 2H, H-1, H-4), 3.68 (m, 1H, H-2), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.37 (br s, 2H, NH₂), 6.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar), 6.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar), 7.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.49 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 7.71 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H, Ar). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 23.8 (C-4), 26.3 (C-3), 32.2 (C-1), 40.6 (C-2), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 108.4, 110.4, 111.0, 116.2, 120.1, 122.8, 127.9, 128.7, 134.4, 144.2, 148.7, 153.0 (Ar), 201.4 (CO). **Anal. calc.** for (C₂₀H₂₃NO₄·H₂O): C, 66.84; H, 7.01; N, 3.90. Found: C, 66.94; H, 6.94; N, 4.29.

(±)-(5-Amino-L-Boc-Asn(Trt)-L-Pro-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl) (2,3,4-trimethoxyphenyl)methanone (2.39)



A microwave vial was charged with Boc-Asn(Trt)-Pro-OH (**1.108**) (78 mg, 0.014 mmol) and HATU (46 mg, 0.12 mmol) in anhydrous DMF (0.8 mL). Then DIPEA (38 μ L, 0.21 mmol) and a solution of **2.31** (30 mg, 0.081 mmol) in DMF (0.5 mL) were added. The reaction mixture was heated at 40 °C for 2 h. After cooling, the crude was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), acidified with 0.1N citric acid (2 mL) and the organic phase was washed with NaHCO₃ (5 mL). After extracting with DCM (3x10 mL), the resulting organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (dichloromethane/methanol, 10:0.3) to yield 39 mg (78%) of **2.39** as an amorphous solid. **MS** (ES, positive mode): m/z 926 ($M+H$)⁺. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.39 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.48 (m, 1H, H-3), 1.88–1.99 (m, 3H, H-3, β -Pro, γ -Pro), 2.11 (m, 1H, β -Pro), 2.36–2.45 (m, 2H, β -Asn), 2.58–2.70 (m, 3H, H-4, γ -Pro), 2.72–2.88 (m, 2H, H-1), 3.37 (m, 1H, H-2), 3.49–3.57 (m, 2H, δ -Pro), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.36–4.45 (m, 2H, α -Asn, α -Pro), 6.80 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 6.89 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, Ar), 7.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.13–7.22 (m, 16H, NH, Trt), 7.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Ar), 8.57 (br s, 1H, NH), 8.80 (br s, 1H, NH).

(±)-(5-(L-prolil-L-asparaginyl) amino -6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl)methanone (2.38)



2.39 (29 mg, 0.031 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (0.5 mL), and TFA (0.5 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. Further portions of CH₂Cl₂:TFA 1:1 (4 × 0.2 mL) were added during 6h. Volatiles were removed and the residue was washed with petroleum ether (6 × 2mL). Solvent was evaporated to yield 21 mg (99%) of **2.38** as an amorphous solid. **MS** (ES, positive mode): *m/z* 583 (M+H)⁺ for C₃₀H₃₈N₄O₈. **¹H NMR**

(DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 1.52 (m, 1H, H-3), 1.92–2.07 (m, 3H, H-3, CH₂-β Pro, CH₂-γ Pro), 2.20 (m, 1H, CH₂-β Pro), 2.62 (m, 1H, CH₂-γ Pro), 2.73–2.89 (m, 4H, H-1, H-4), 3.45–3.55 (m, 3H, H-2, CH₂-β Asn), 3.67–3.85 (m, 2H, CH₂-δ Pro), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.39 (m, 1H, CH-α Asn), 4.53 (m, 1H, CH-α Pro), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 6.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.15 (br s, 1H, CONH₂), 7.30 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar), 7.77 (br s, 1H, CONH₂) 8.16 (br s, 3H, NH₃⁺), 8.96 (br s, 1H, CONH). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 24.3 (γ-Pro), 25.5 (C-3), 29.7 (β-Pro), 30.9 (C-1), 34.9 (C-4), 45.1 (C-2), 46.8 (δ-Pro), 46.9 (β-Asn), 47.8 (α-Asn), 55.8 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 60.1 (α-Pro), 60.5 (OCH₃), 61.7 (OCH₃), 107.8, 109.5, 123.9, 125.3, 127.5, 127.8, 134.7, 141.5, 147.8, 152.5, 153.0, 156.7 (Ar), 157.7 (d, *J* = 30.8 Hz, CF₃COO⁻), 167.2 (CO), 169.7 (CO), 170.4 (CO), 203.2 (CO). **Anal. calc.** for (C₃₂H₃₉F₃N₄O₁₀·2H₂O): C, 52.46; H, 5.92.; N, 7.65 Found: C, 52.78; H, 5.75; N, 7.46

2. COMPUTATIONAL METHODS

2.1 Docking studies

3D structures of **TUB075** and **2.31** were generated through conversion from their SMILES strings to 3D pdb format using CORINA (Molecular Networks GmbH, Germany and Altamira, LLC, USA). The geometry of **TUB075** and **2.31** were first optimized using the semiempirical quantum chemistry program MOPAC2012 (AM1 method).³¹ Partial atomic charges were then obtained using the RESP³² methodology with the 6-31G(d) basis set as implemented in the ab initio quantum chemistry program Gaussian09.³³

Compound **TUB075** was used as ligand for the automated docking experiments using DAMA-colchicine-tubulin complex (PDB ID: 1SA0)³⁴ and TN-16-tubulin complex (PDB ID: 3HKD).³⁵ Compound **2.31** was used as ligand for the automated docking experiments using TUB092-tubulin complex (PDB ID: 5JVD).³⁶

The Lamarckian genetic algorithm implemented in AutoDock 4.2³⁷ was used to generate the docked conformations within the putative binding cavity by randomly changing the overall orientation of the molecule as well as the torsion angles of all rotatable bonds. Default settings were used except for the number of runs, population size, and maximum number of energy evaluations, which were fixed at 250, 100 and 250.000, respectively. Rapid intra- and intermolecular energy evaluations of each configuration was achieved by having the receptor's atomic affinity potentials for aliphatic and aromatic carbon, oxygen, nitrogen and hydrogen atoms pre-calculated in a three-dimensional grid with a spacing of 0.375 Å. A distance-dependent dielectric function was used in the computation of electrostatic interactions.

2.2 Molecular dynamics simulations

The MD simulations were carried out using the AMBER 12 suite of programs.³⁸ The bonded and non-bonded parameters for **2.31**, GTP⁴⁻, GDP³⁻ and Mg²⁺ were assigned, by analogy or through interpolation from those already present in the AMBER database, in a way consistent with the general AMBER force field (GAFF) for organic molecules.³⁹

The molecular system consisting of bovine α,β -tubulin, **2.31**, GDP³⁻, GTP⁴⁻ and 2 Mg²⁺ ions was neutralized by the addition of 36 Na⁺ ions⁴⁰ and immersed in a truncated octahedron of ~29500 TIP3P water molecules.⁴¹ Periodic boundary conditions were applied and electrostatic interactions were treated using the smooth particle mesh Ewald (PME) method⁴² with a grid spacing of 1 Å. The cutoff distance for the non-bonded interactions was 9 Å. The SHAKE algorithm⁴³ was applied to all bonds and an integration

step of 2.0 fs was used throughout. Solvent molecules and counterions were relaxed by energy minimization and allowed to redistribute around the positionally restrained solute ($25\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$) during 50 ps of MD at constant temperature (300 K) and pressure (1 atm). These initial harmonic restraints were gradually reduced in a series of progressive energy minimizations until they were completely removed. The resulting systems were heated again from 100 to 300 K during 20 ps and allowed to equilibrate in the absence of any restraints for 10.0 ns during which system coordinates were collected every 2 ps for further analysis.

2.3 Analysis of molecular dynamics trajectories

Three-dimensional complexes structures and trajectories were visually inspected using the computer graphics program PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.5. Schrödinger, LLC). Interatomic distances and angles, as well as root-mean-square deviations (rmsd) from a given structure, were monitored using the Ptraj module in AMBER.

2.4 Affinity maps calculation

Binding pocket analysis of the tubulin-TUB075 and tubulin-colchicine complexes were carried out with cGRILL,⁴⁴⁻⁴⁵ a computational tools formally equivalent to Goodford's program GRID.⁴⁶ Hydrogen atoms, atom point charges and radii for all atoms in the complexes were calculated by submission to H++ server (<http://biophysics.cs.vt.edu>) in order to obtain their pqr format files. Grid center was defined by selecting the corresponding ligand and a cubic box of 50x50x50 points and a 0.5 Å was set for the calculations. cGRILL evaluates, at each grid point, the interaction energy between the whole receptor and five different probes combining van der Waals (Leonard-jones potential), electrostatic (Coulombic), and hydrogen bonding⁴⁷ (geometry based) terms.

The five calculated affinity maps: lipophilic (CH₃), hydrogen bond acceptor (=O), hydrogen bond donor (NH₄⁺), mixed hydrogen bond donor-acceptor (OH) and hydrophobic-like (hydrophobic) were visualized and analysed using the PyMOL plugin provided with the software.

3. SOLUBILITY AND STABILITY DETERMINATION

3.1 Solubility determination

Excess amount of the tested compound was added to 400 μL of PBS buffer with 1% DMSO, and the resulting suspension was shaken at room temperature for 2 h on a rotary shaker. The samples were centrifuged at 135 rpm in a Hettich microcentrifuge for 15 min at room temperature. Finally, 160 μL of the clear supernatant were transferred in a quartz microplate and were diluted by adjunction of 40 μL of $\text{CH}_3\text{CN}:\text{DMSO}$ 8:2 solution. The solubility was determined using UV detection and comparison with calibration standards previously prepared. Standards are made in an $\text{PBS}:\text{CH}_3\text{CN}$ (8:2) solution to ensure overall compound solubility. Additionally, the level of DMSO in all calibrators is maintained at 5% (v/v) ensuring that the final solvent content of all standards and samples remains consistent. For the preparation of standards, the $\text{PBS}:\text{CH}_3\text{CN}$ solution and DMSO were added to the plate and mixed thoroughly before the addition of 10 mM DMSO stock compound. Concentration of the 5 standard calibrators were 10 μM , 100 μM , 250 μM , 350 μM and 500 μM . A standard solution with a known concentration was used to validate the calibration curve.

3.2 Stability determination in phosphate buffer solution (PBS) and 10% fetal bovine serum (FBS)

The tested compounds were exposed at 100 μM in 5% DMSO to PBS and incubated at 37 $^\circ\text{C}$. Aliquots were analyzed at different time periods (0, 1, 3, 6 y 24 h) by HPLC analysis, using a HPLC Agilent Technologies 1120 Compact LC instrument, reverse phase column ACE 5 C-18-300 (150 \times 4.6 mm), Photodiode Array Detector (PDA) and mobile phase A: acetonitrile and B: 0.05% TFA in water. In all cases the flow rate was 1 mL/min and different gradients were used depending on the compound.

To investigate the biological stability of the synthesized prodrugs, compounds were incubated in 10% FBS at 37 $^\circ\text{C}$. To do so, 40 μL of FBS were added to 400 μL of PBS, then the tested compound (100 μM in 5% DMSO) was added to the solution. At determined time periods (0, 1, 3, 6 y 24 h), an aliquot (50 μL) of medium is transferred to an eppendorf and quenched with 100 μL of cold methanol. Samples were ice cold during 5 minutes and centrifugated at 135 rpm in a Hettich microcentrifuge for 5 minutes. Finally, the clear supernatant was analyzed by HPLC to determine the conversion of the prodrug to the parent compound.

4. BIOLOGICAL METHODS

In all these experiments, colchicine and/or CA-4P have been used as reference compounds.

Cell lines: Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were purchased from Lonza and grown in macrovascular endothelial medium (EGM2, Lonza, Verviers, Belgium). The human microvascular endothelial cell line HMEC-1 was obtained at passage 12 from the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA, USA) and used from passage 17 till 27. Luciferase-expressing human breast carcinoma cells (MDA-MB-231.luc2) and murine melanoma cells (B16-F10.luc2) were obtained from Perkin Elmer (Zaventem, Belgium). Human cervical carcinoma (HeLa) and human T-lymphoid (CEM) cells were obtained from ATCC (Middlesex, UK). Cell lines were maintained in culture for up to 3 months and grown in DMEM, supplemented with 10% FBS, 0.01M Hepes and 1 mM sodium pyruvate. All cells were cultured in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C.

4.1 Cell proliferation

Endothelial cells. Human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) were seeded in 48-well plates at 20,000 cells/well. After 24 h, 5-fold dilutions of the compounds were added. The cells were allowed to proliferate 4 days in the presence of the compounds, trypsinized, and counted by means of a Coulter counter (Analis, Belgium).

Tumor cells. Human cervical carcinoma (HeLa) cells were seeded in 96-well plates at 15,000 cells/well in the presence of different concentrations of the compounds. After 4 days of incubation, the cells were trypsinized and counted in a Coulter counter. Suspension cells (Mouse leukemia L1210 and human lymphoid Cem cells) were seeded in 96-well plates at 60,000 cells/well in the presence of different concentrations of the compounds. L1210 and Cem cells were allowed to proliferate for 48 h or 96 h, respectively and then counted in a Coulter counter. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was defined as the compound concentration required to reduce cell proliferation by 50%. Colchicine [obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany)] and CA-4P [fosbretulin, obtained from Sigma-Aldrich (Diegem, Belgium)] were added as reference compounds.

4.2 Cell cycle analysis

HMEC-1 cells were seeded in 6-well plates at 125,000 cells/well in DMEM with 10 % FCS. After 24 h, the cells were exposed to different concentrations of the compounds. After 24 h, the DNA of the cells was stained with propidium iodide using the CycleTEST

PLUS DNA Reagent Kit (BD Biosciences, San Jose, CA). The DNA content of the stained cells was assessed by flow cytometry on a FACSCalibur flow cytometer and analyzed with CellQuest software (BD Biosciences) within 3h after staining. Cell debris and clumps were excluded from the analysis by appropriate dot plot gating. Percentages of sub-G1, G1, S, and G₂/M cells were estimated using appropriate region markers.⁴⁸

4.3 Fluorescence detection of caspase-3 activity in live cells

MDA-MB-231 cells were seeded at 40,000 cells/cm². After 24h, cells were incubated in Fluorobrite DMEM (Gibco), containing the compound and 2 μM of the caspase-3 substrate DEVD-NucView488 (Biotium, Hayward, CA). At indicated time-points the DNA was stained with Hoechst33342 and the cells were imaged by fluorescence microscopy.

4.4 Tube formation

Wells of a 96-well plate were coated with 70 μl matrigel (10 mg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) at 4°C. After gelatinization at 37°C during 30 min, HMEC-1 cells were seeded at 60,000 cells/well on top of the matrigel in 200 μl DMEM containing 10% FCS. After 3 h of incubation at 37°C, when the endothelial cells had reorganized to form tube-like structures, the compounds were added. Ninety minutes later, colchicine, which was added as a reference compound, had destroyed the endothelial tubes. The cultures were photographed at 100 x magnification.

4.5 Determination of binding constants

Proteins and ligands. Calf brain tubulin was purified as described.⁴⁹ (*R*)-(+)-ethyl 5-amino 2-methyl-1,2-dihydro-3-phenylpyrido[3,4-*b*]pyrazin-7-yl carbamate (R-PT)⁵⁰ was a kind gift of Prof. G.A. Rener, Organic Chemistry Research Department, Southern Research Institute, Birmingham, Alabama. The compounds were diluted in 99.8% D₆-DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) to a final concentration of 10 mM and stored at -80 °C.

Determination of binding constants. The binding constant of R-PT for dimeric tubulin was determined using the competition method in 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM GTP pH 7.0 at 25°C. To do so 0.2 μM of R-PT was incubated with increasing amounts of tubulin up to 10μM and vice versa, 0.2 μM of tubulin was incubated with increasing amounts of R-PT up to 10μM, the fluorescence emission spectra (excitation 374 nm) of the samples (5 nm excitation and emission slits) were determined using a Jobin-Yvon SPEX Fluoromax-2 (HORIBA, Ltd. Kyoto, Japan). Using these spectra it is possible to

calculate the free and the bound R-PT concentration for each sample and thus to determine the binding constant of R-PT for tubulin.

Once K_b of R-PT is determined ($3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) this compound could be used as a reference ligand as described in. For that purpose, the fluorescence emission of a previous mixed sample of $0.2 \mu\text{M}$ of R-PT and $0.2 \mu\text{M}$ of tubulin was evaluated in the presence of increasing concentrations of studied ligand in a black 96-well plate (0; 0.05; 0.2; 0.5; 2; 5; 10; 30; 50; 70 μM). The samples were incubated 30 minutes at 25°C in a *Varioskan* plate reader (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA) before the fluorescence emission intensity at 456 nm (excitation 374 nm) was measured. The data were analyzed and the binding constants determined using Equigra V5.0.⁵¹

4.6 *In vivo* experiments

Animals. Female severe combined immunodeficient (SCID) mice, weighing about 20 g were used. The animals were bred at the animal facility of the Rega Institute. All studies were done in compliance with the ethical guidelines for animal welfare of the KU Leuven (P028/2011).

Primary tumor models. Thirty thousand B16-F10-luc2 cells were injected subcutaneously (s.c.) in SCID mice. Intratumoral (i.t.) treatment with vehicle or **TUB099** (10 mg/kg) was started 3 days after cell injection and continued for 5 consecutive days. The same volume of phosphate-buffered saline (PBS) was given to control mice. Body weight was determined twice weekly.

MDA-MB.231/4mRL.luc2 cells (10^6) were suspended in 50 μL of 50% matrigel/PBS and injected in the mammary fat pad of SCID mice. The mice were treated intraperitoneally (i.p.) with vehicle, **TUB099** or CA-4P at day 14 or treated it at day 12 or at day 12 till day 15. At day 16, primary tumors were removed and processed for histological examination. The growth of the luciferase-positive tumor cells and the appearance of metastases were quantified using the IVIS spectrum imaging system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA).^{52,53} Before imaging, the mice were injected s.c. with 200 μl of luciferin (15 mg/ml in PBS).

5. X-RAY CRISTALLOGRAPHY

Crystallization, Data Collection, and Structure Solution. Crystals of T₂R-TTL were generated as described.^{54,55,56} Suitable T₂R-TTL crystals were exchanged into reservoir solutions containing 2 mM **TUB092** or **TUB075** and soaked overnight. Soaked crystals were flash cooled in liquid nitrogen following a brief transfer into cryo solution containing 20% glycerol. T₂R-TTL-TUB092 and T₂R-TTL-TUB075 data were collected at beamline X06SA at the Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland). Images were indexed and processed using XDS.⁵⁷ Structure solution using the difference Fourier method and refinement were performed using PHENIX [45].⁵⁸ Model building was carried out iteratively using the Coot software.⁵⁹ Data collection and refinement statistics for T₂R-TTL-TUB092 are given in Table 1.

Structural Analysis and Figure Preparation. Molecular graphics and analyses were performed with PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.5. Schrödinger, LLC). Chains in the T₂R-TTL complex were defined as follows: chain A, α -tubulin-1; chain B, β -tubulin-1; chain C, α -tubulin-2; chain D, β -tubulin-2; chain E, RB3; chain F, TTL.

Table 1. Data collection and refinement statistics.

T ₂ R-TTL-TUB092	
Data collection ^a	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	104.3, 156.3, 180.6
Resolution (Å)	49.5 – 2.39 (2.54 – 2.39)
R _{meas} (%)	13.3 (206.4)
R _{pim} (%)	
CC _{1/2} ^b	99.8 (36.1)
I/σI	11.6 (0.95)
Completeness (%)	99.6 (97.7)
Redundancy	7.0 (6.97)
Refinement	
Resolution (Å)	49.5 – 2.39
No. unique reflections	116285
R _{work} /R _{free} (%)	17.0 / 21.2
Average B-factors (Å ²)	
Complex	72.1
Solvent	61.3
Ligands (chain B/D)	52.1 / 61.3
Wilson B-factor	56.7
Root mean square deviation from ideality	
Bond length (Å)	0.008
Bond angles (°)	1.236
Ramachandran statistics ^c	
Favored regions (%)	98.2
Allowed regions (%)	1.7
Outliers (%)	0.1

^aHighest shell statistics are in parentheses. ^bCC_{1/2}= percentage of correlation between intensities from random half-datasets⁶⁰. ^cAs defined by MolProbity⁶¹.

6. BIBLIOGRAPHY

1. Torii, S.; Murakami, Y.; Tanaka, H.; Okamoto, K. Electrogenated base (EG base) induced hydroxymethylation of the side chain of nitroalkylbenzenes with paraformaldehyde. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3143-3147.
2. Que, E. L.; Chang, C. J. A smart magnetic resonance contrast agent for selective copper sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15942-15943.
3. Xie, H.; Ng, D.; Savinov, S. N.; Dey, B.; Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Smith, A. B.; Hendrickson, W. A. Structure-activity relationships in the binding of chemically derivatized CD4 to gp120 from human immunodeficiency virus. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4898-4908.
4. Nitta, A.; Iura, Y.; Inoue, H.; Sato, I.; Morihira, K.; Kubota, H.; Morokata, T.; Takeuchi, M.; Ohta, M.; Tsukamoto, S.; Imaoka, T.; Takahashi, T. Pyrrolidinyl phenylurea derivatives as novel CCR3 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6876-6881.
5. Munoz, F. J.; Andre, S.; Gabius, H. J.; Sinisterra, J. V.; Hernaiz, M. J.; Linhardt, R. J. Green glycosylation using ionic liquid to prepare alkyl glycosides for studying carbohydrate-protein interactions by SPR. *Green Chem.* **2009**, *11*, 373-379.
6. Robitaille, P. M. L.; Jiang, Z. New calcium-sensitive ligand for nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12585-12591.
7. Canela, M. D.; Pérez-Pérez, M. J.; Noppen, S.; Saez-Calvo, G.; Diaz, J. F.; Camarasa, M. J.; Liekens, S.; Priego, E. M. Novel colchicine-site binders with a cyclohexanedione scaffold identified through a ligand-based virtual screening approach. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3924-3938.
8. Zhu, D.; Xing, Q.; Cao, R.; Zhao, D.; Zhong, W. Synthesis and p38 inhibitory activity of some novel substituted N,N'-diaryurea derivatives. *Molecules* **2016**, *21*, 677.
9. Bischoff, A.; Sundaresan, K.; Koteswara Rao, P. B.; Ainan, B.; Ayyamperumal, H.; Girish, A. R.; Tatiparthi, S.; Prabhu, G.; Subramanya, H. Novel piperidine derivatives as inhibitors of stearyl-CoA desaturase. WO2009117676A2, 2009.
10. Kundu, N. G.; Chaudhuri, G.; Upadhyay, A. Palladium-catalyzed heteroannulation leading to heterocyclic structures with two heteroatoms: A highly regio- and stereoselective synthesis of (Z)-4-alkyl-2-alkyl(aryl)idene-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines and (Z)-3-alkyl(aryl)idene-4-tosyl-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 20-29.
11. Thennati, R.; Samanta, B.; Pal, R. K.; Kumbhani, A. S.; Adhyapak, J. P.; Akolkar, N. P.; Parmar, P.; Dubey, M. Quinoline derivatives as renin inhibitors. WO2013088452A2, 2013.
12. Menon, R. S.; Findlay, A. D.; Bissember, A. C.; Banwell, M. G. The Au(I)-catalyzed intramolecular hydroarylation of terminal alkynes under mild conditions: application to the synthesis of 2H-chromenes, coumarins, benzofurans, and dihydroquinolines. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8901-8903.
13. Vazzana, I.; Sparatore, F. 7-(N-substituted)amino-2,3-polymethylene benzofurane derivatives with tracheal relaxant activity. *Farmaco* **1996**, *51*, 637-642.

14. Xiao, D.; Cheng, L.; Liu, X.; Hu, Y.; Xu, X.; Liu, Z.; Zhang, L.; Wu, W.; Wang, S.; Shen, Y.; Li, G.; Wang, Y.; Zhao, S.; Li, C.; Tang, J.; Yu, H. 2,4-Diamino-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[2,3]pyrimidine derivatives as FAK/Pyk2 inhibitors. WO2012092880A1, 2012.
15. Allan, M.; Manku, S.; Therrien, E.; Nguyen, N.; Styhler, S.; Robert, M.-F.; Goulet, A.-C.; Petschner, A. J.; Rahil, G.; Robert, M. A.; Deziel, R.; Besterman, J. M.; Nguyen, H.; Wahhab, A. N-Benzyl-1-heteroaryl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamides as inhibitors of co-activator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1218-1223.
16. Trapella, C.; Fischetti, C.; Pela, M.; Lazzari, I.; Guerrini, R.; Calo, G.; Rizzi, A.; Camarda, V.; Lambert, D. G.; McDonald, J.; Regoli, D.; Salvadori, S. Structure-activity studies on the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist 1-benzyl-N-{3-[spiroisobenzofuran-1(3H),4'-piperidin-1-yl]propyl} pyrrolidine-2-carboxamide. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5080-5095.
17. Hwang, J.; Li, P.; Carroll, W. R.; Smith, M. D.; Pellechia, P. J.; Shimizu, K. D. Additivity of substituent effects in aromatic stacking interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14060-14067.
18. Tietze, L. F.; Hungerland, T.; Duefert, A.; Objartel, I.; Stalke, D. Synthesis of tetrasubstituted alkenes through a palladium-catalyzed domino carbopalladation/C-H-activation reaction. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 3286-3291.
19. Mole, J. D. C.; Turner, E. E. Intramolecular substitution as a means of comparing activating and deactivating effects. *J. Chem. Soc.* **1939**, 1720-1724.
20. Chen, Z.; Wu, Y.; Liu, Y.; Yang, S.; Chen, Y.; Lai, L. Discovery of dual target inhibitors against cyclooxygenases and leukotriene A4 hydrolase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3650-3660.
21. Yang, C.; Chen, S.; Zhou, M.; Li, Y.; Li, Y.; Zhang, Z.; Liu, Z.; Ba, Q.; Li, J.; Wang, H.; Yang, X.; Ma, D.; Wang, R. Development of 3-phenyl-N-(2-(3-phenylureido)ethyl)-thiophene-2-sulfonamide compounds as inhibitors of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1436-1452.
22. Huang, M.; Wang, L.; Li, X.; Yan, S.; Yeung, K. W. K.; Chu, P. K.; Xu, Z.; Yi, C. Design and preparation of novel fluorescent polyimides containing ortho-linked units and pyridine moieties. *Des. Monomers Polym.* **2012**, *15*, 389-404.
23. Tomasic, T.; Zidar, N.; Sink, R.; Kovac, A.; Blanot, D.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Muller-Premru, M.; Zega, A.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Peterlin Masic, L. Structure-based design of a new series of D-glutamic acid based inhibitors of bacterial UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate Ligase (MurD). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4600-4610.
24. Vigroux, A.; Bergon, M.; Zedde, C. Cyclization-Activated Prodrugs: N-(Substituted 2-hydroxyphenyl and 2-hydroxypropyl)carbamates based on ring-opened derivatives of active benzoxazolones and oxazolidinones as mutual prodrugs of acetaminophen. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3983-3994.
25. Lim, K. S.; Lee, H.; Kim, S. E.; Ha, T. H.; Ann, J.; Son, K.; Choi, S.; Sun, W.; Pearce, L. V.; De Andrea-Lazarus, I. A.; Blumberg, P. M.; Lee, J. The carbonate analogues of 5'-halogenated resiniferatoxin as TRPV1 ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 233-243.
26. Magnus, P.; Sebhat, I. K. Application of the β -azidonation reaction to the synthesis of the antitumor alkaloid (+)-pancratistatin. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15509-15524.

27. Schneiders, G. E.; Stevenson, R. Structure and synthesis of (\pm)-wuweizisu C. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2969-2971.
28. Coleman, R. S.; Gurralla, S. R. Total synthesis of eupomatilones 4 and 6: structurally rearranged and atropisomerically fluxional lignan natural products. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4025-4028.
29. Pierce, A. C.; Arnost, M.; Davies, R. J.; Forster, C. J.; Galullo, V.; Grey, R.; Ledebner, M.; Tian, S.-k.; Xu, J.; Binch, H.; Ledford, B.; Messersmith, D.; Nanthakumar, S.; Jayaraj, A. Preparation of 3,5-diamino[1,2,4]triazoles as protein kinase inhibitors. WO2004046120A2, 2004.
30. Clive, D. L. J.; Fletcher, S. P.; Liu, D. Formal radical cyclization onto benzene rings: a general method and its use in the synthesis of *ent*-nocardione A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3282-3293.
31. Stewart, J. J. P. MOPAC 2012. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA. <http://OpenMOPCAC.net>. **2012**.
32. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges. The RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
33. Frisch, M. J. T., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, Scalami, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, G.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K. M.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kovayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian Inc, Wallingford CT. **2009**.
34. Ravelli, R. B. G.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.
35. Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli, R. B.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossowa, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2009**, *106*, 13775-13779.
36. Canela, M. D.; Bueno, O.; Velazquez, S.; Camarasa, M. J.; Priego, E. M.; Pérez-Pérez, M. J.; Noppen, S.; Benkheil, M.; Liekens, S.; Prota, A. E.; Bargsten, K.; Steinmetz, M. O.; Saez-Calvo, G.; Diaz, J. F.; Jimeno, M. L.; Ribatti, D. Antivascular and antitumor properties of the tubulin-binding chalcone TUB091. *Oncotarget* **2016**, *8*, 14325-14342.
37. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.
38. Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.;

Swails, J.; Götz, A. W.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. (2012), AMBER 12, University of California, San Francisco.

39. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
40. Aqvist, J. Ion water interaction potential-derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.
41. L. Jorgensen, W.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
42. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh ewald - an n.Log(n) method for ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.
43. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - Molecular dynamics of *N*-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327-341.
44. Gago, F. Available at <http://farmamol.uah.es>.
45. Cortes-Cabrera, A.; Gago, F.; Morreale, A. A computational fragment-based de novo design protocol guided by ligand efficiency indices (LEI). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2015**, *1289*, 89-100.
46. Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding-sites on biologically important molecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849-857.
47. Boobbyer, D. N. A.; Goodford, P. J.; McWhinnie, P. M.; Wade, R. C. New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding-sites on molecules of known structure. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1083-1094.
48. Liekens, S.; Gijsbers, S.; Vanstreels, E.; Daelemans, D.; De Clercq, E.; Hatse, S. The nucleotide analog cidofovir suppresses basic fibroblast growth factor (FGF2) expression and signaling and induces apoptosis in FGF2-overexpressing endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 695-703.
49. Andreu, J. M., Tubulin purification. In *Methods in Molecular Medicine*, Zhou, J., Ed. Humana Press Inc: Totowa, NJ, 2007; pp 17-28.
50. Temple, C.; Rener, G. A.; Comber, R. N. New anticancer agents - Alterations of the carbamate group of ethyl (5-amino-1,2-dihydro-3-phenylpyrido-3,4-*b*-pyrazin-7-yl)carbamates. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2363-2367.
51. Diaz, J. F.; Buey, R. M., Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. In *Methods in Molecular Medicine*, Zhou, J., Ed. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2007; pp 245-260.

52. Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **2011**, *146*, 873-887.
53. Liekens, S.; Bronckaers, A.; Belleri, M.; Bugatti, A.; Sienaert, R.; Ribatti, D.; Nico, B.; Gigante, A.; Casanova, E.; Opdenakker, G.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J.; Presta, M. The thymidine phosphorylase inhibitor 5'-O-tritylinosine (KIN59) is an antiangiogenic multitarget fibroblast growth factor-2 antagonist. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 817-829.
54. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Zurwerra, D.; Field, J. J.; Fernando Diaz, J.; Altmann, K.-H.; Steinmetz, M. O. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* **2013**, *339*, 587-590.
55. Prota, A. E.; Magiera, M. M.; Kuijpers, M.; Bargsten, K.; Frey, D.; Wieser, M.; Jaussi, R.; Hoogenraad, C. C.; Kammerer, R. A.; Janke, C.; Steinmetz, M. O. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *Journal of Cell Biology* **2013**, *200*, 259-270.
56. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Buey, R. M.; Danel, F.; Bachmann, F.; Pohlmann, J.; Reinelt, S.; Lane, H.; Steinmetz, M. O. The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1848-1860.
57. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2010**, *66*, 125-132.
58. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2010**, *66*, 213-221.
59. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2004**, *60*, 2126-2132.
60. Karplus, P. A.; Diederichs, K. Linking crystallographic model and data quality. *Science* **2012**, *336*, 1030-3.
61. Davis, I. W.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic acids research* **2004**, *32*, W615-9.

ANEXO

SUPPLEMENTARY MATERIAL

NMR spectra of compounds **1.59**, **2.20**, **2.28** and **2.29** are included for illustrative purpose.

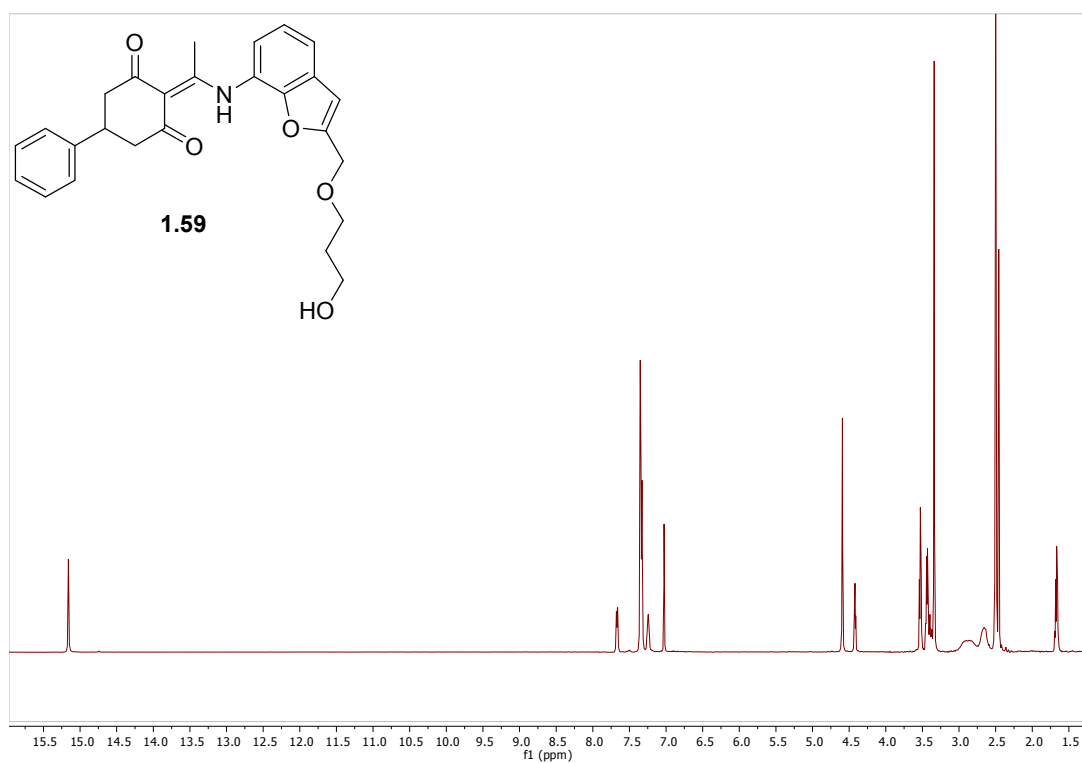


Figure S1. ¹H NMR spectra of compound **1.59**.

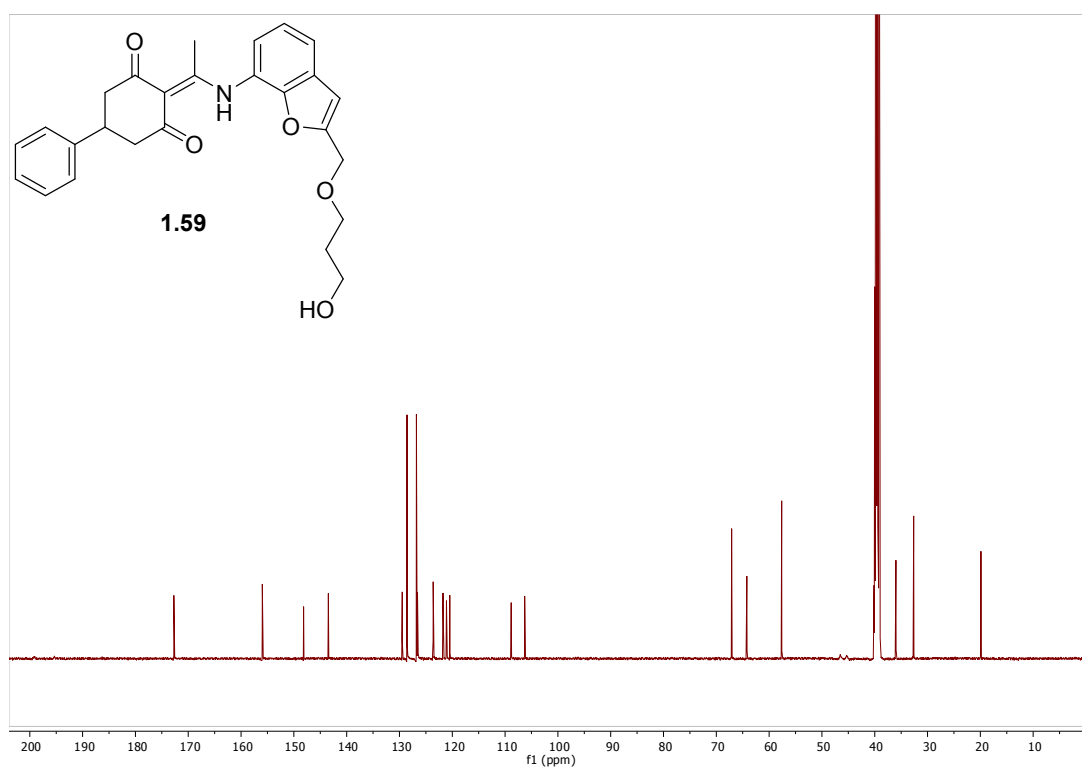


Figure S2. ¹³C NMR spectra of compound **1.59**.

Compound **2.20**

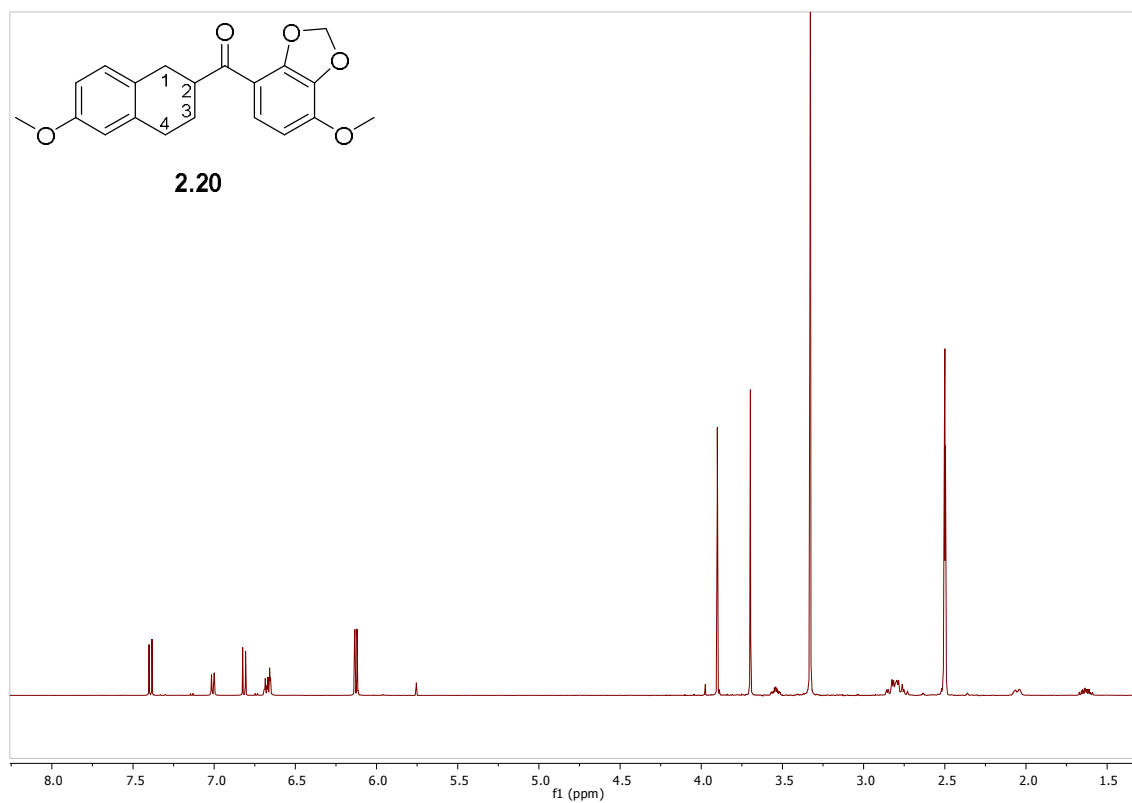


Figure S3. ¹H NMR spectra of compound **2.20**.

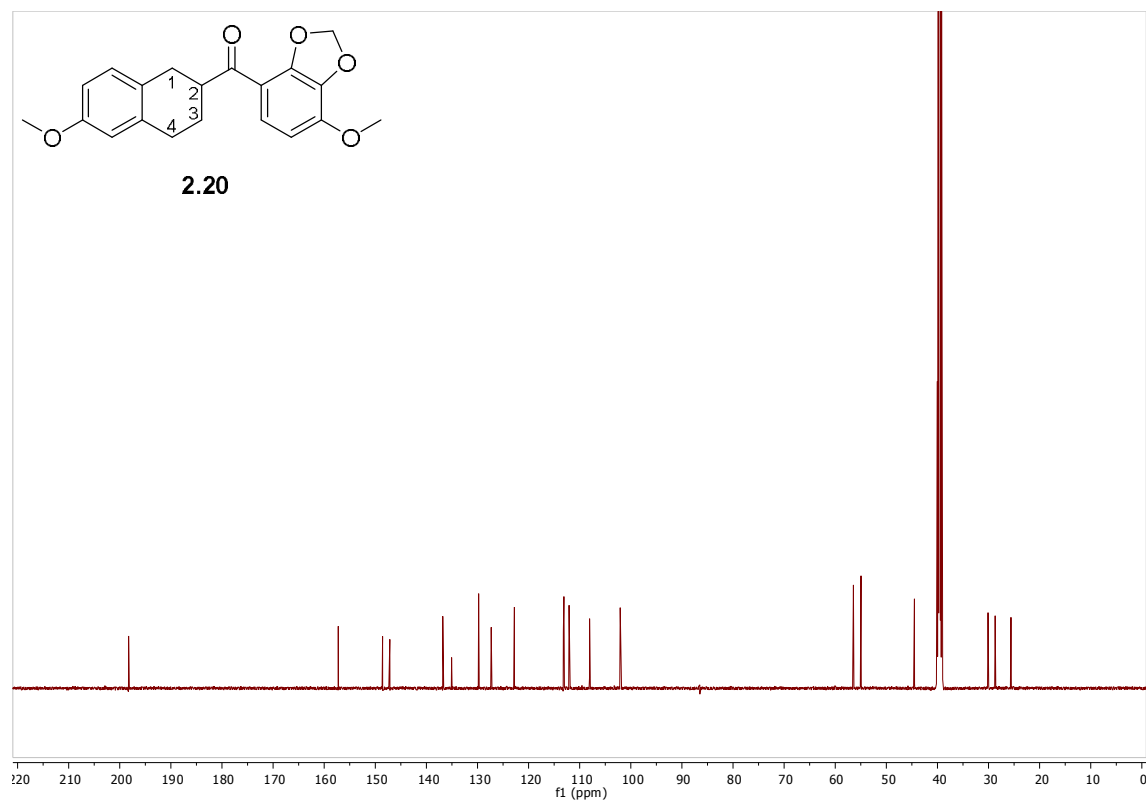


Figure S4. ¹³C NMR spectra of compound **2.20**.

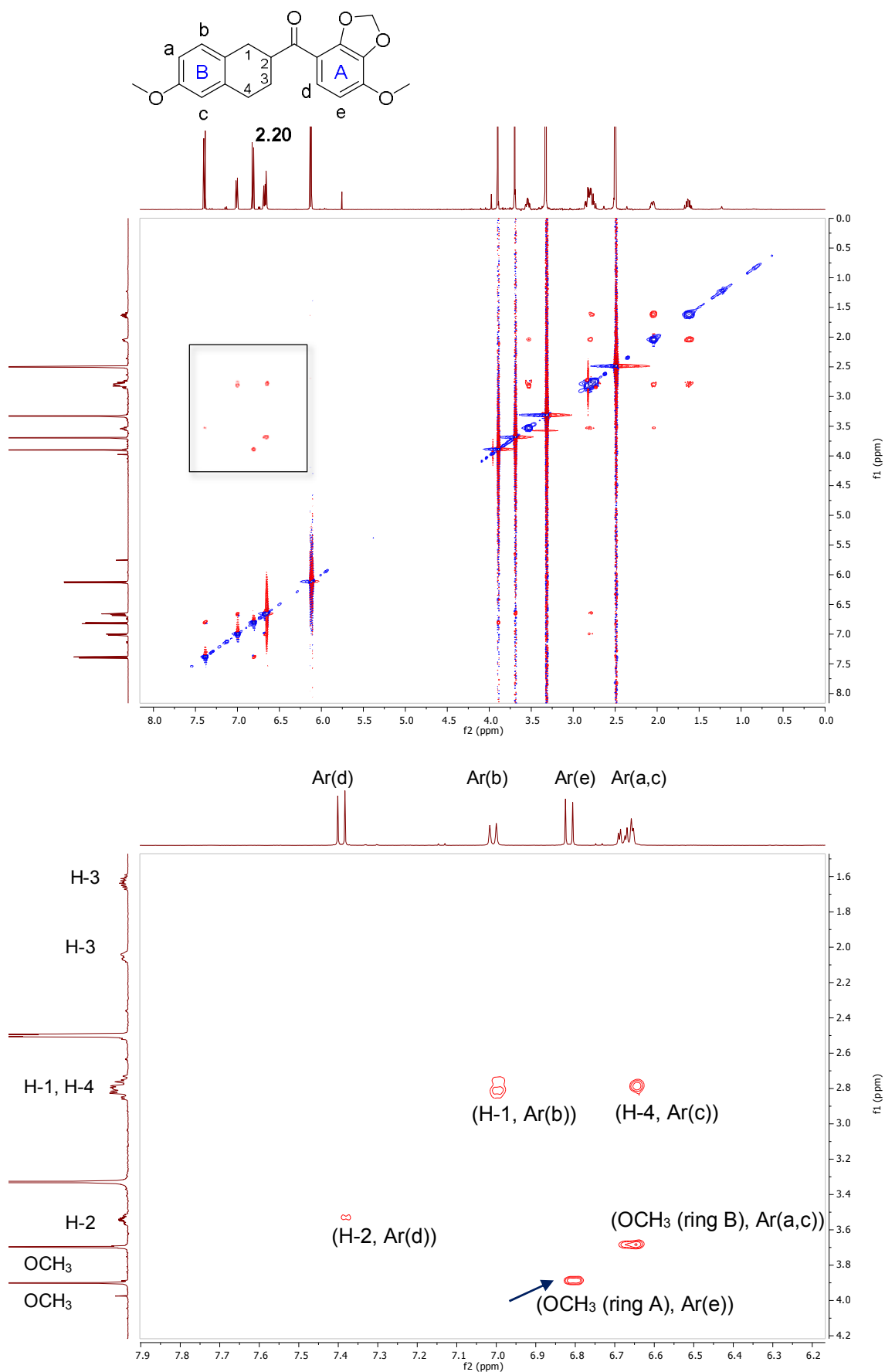


Figure S5. NOESY spectra of compound **2.20** and zoom area.

Compound **2.28**

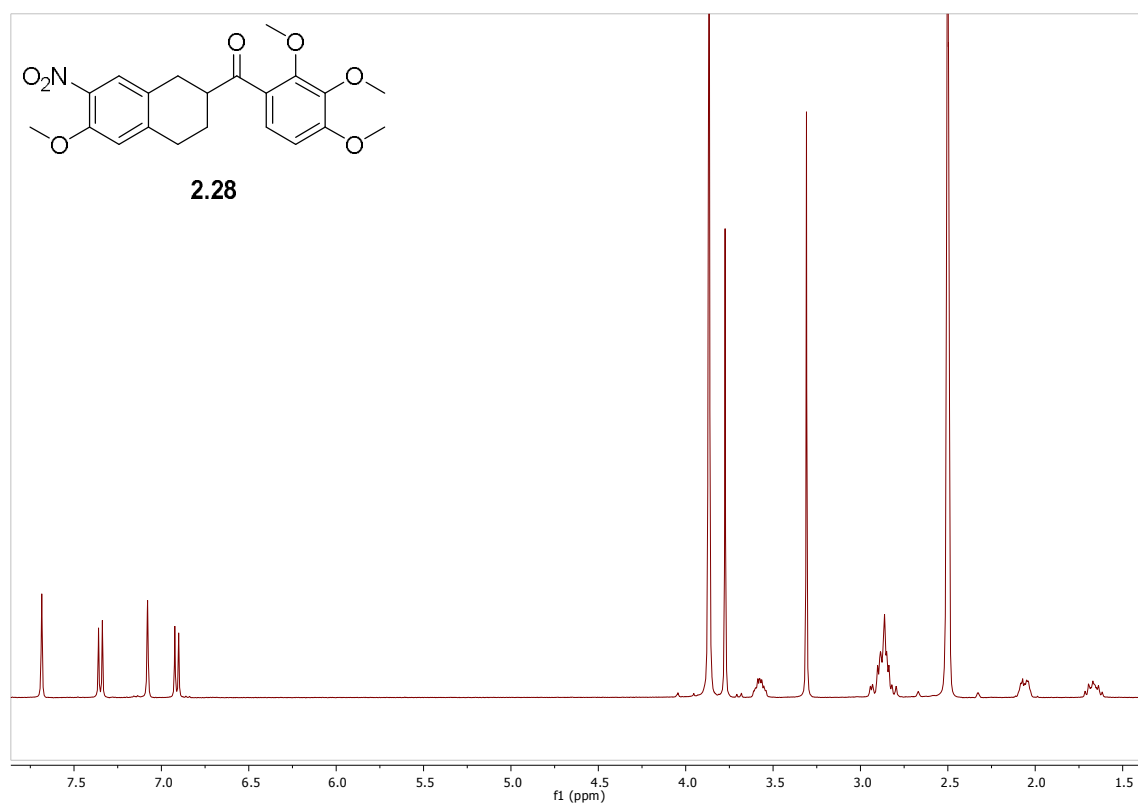


Figure S6. ¹H NMR spectra of compound **2.28**.

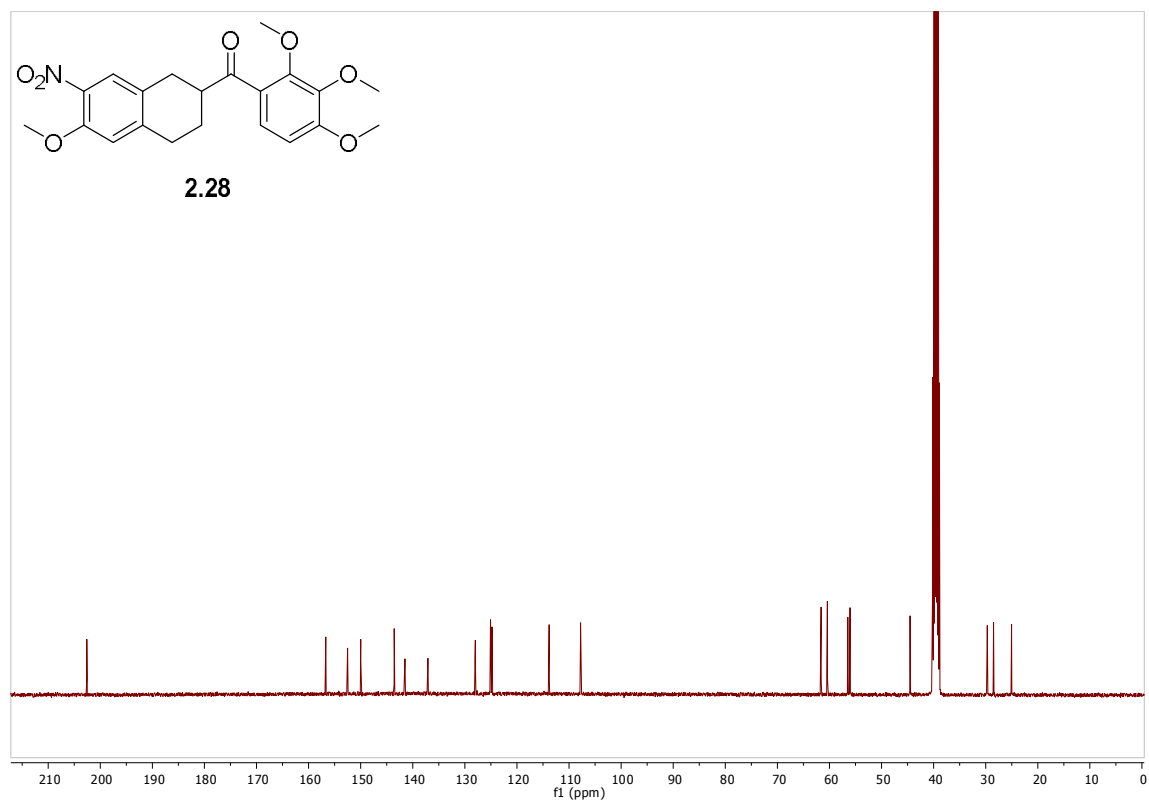


Figure S7. ¹³C NMR spectra of compound **2.28**.

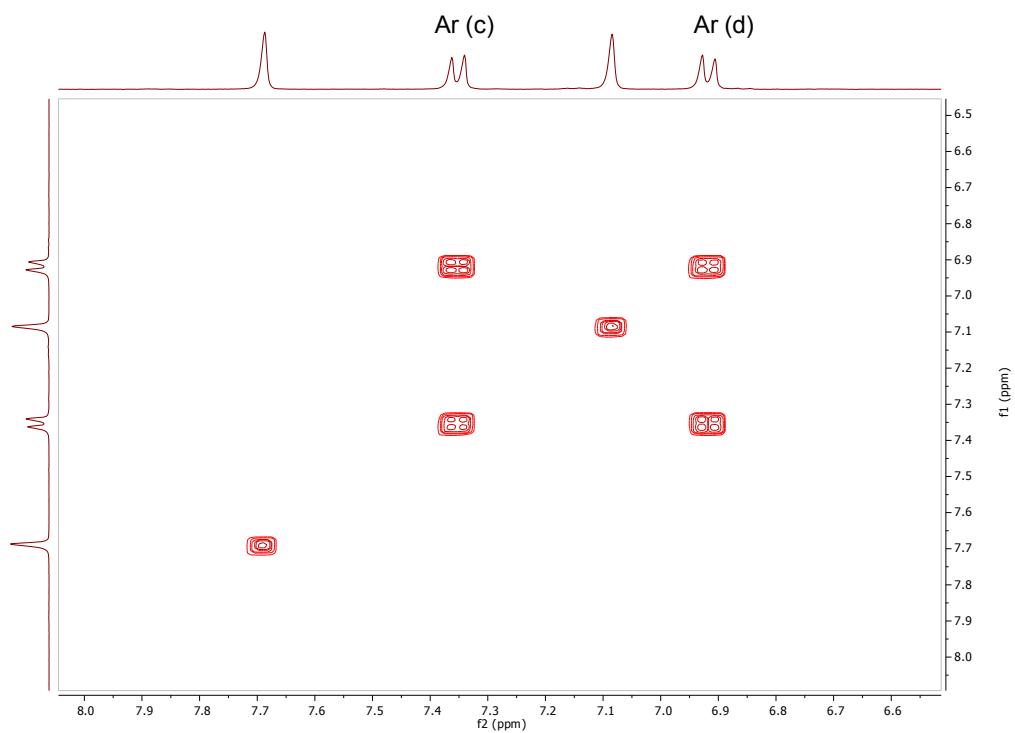
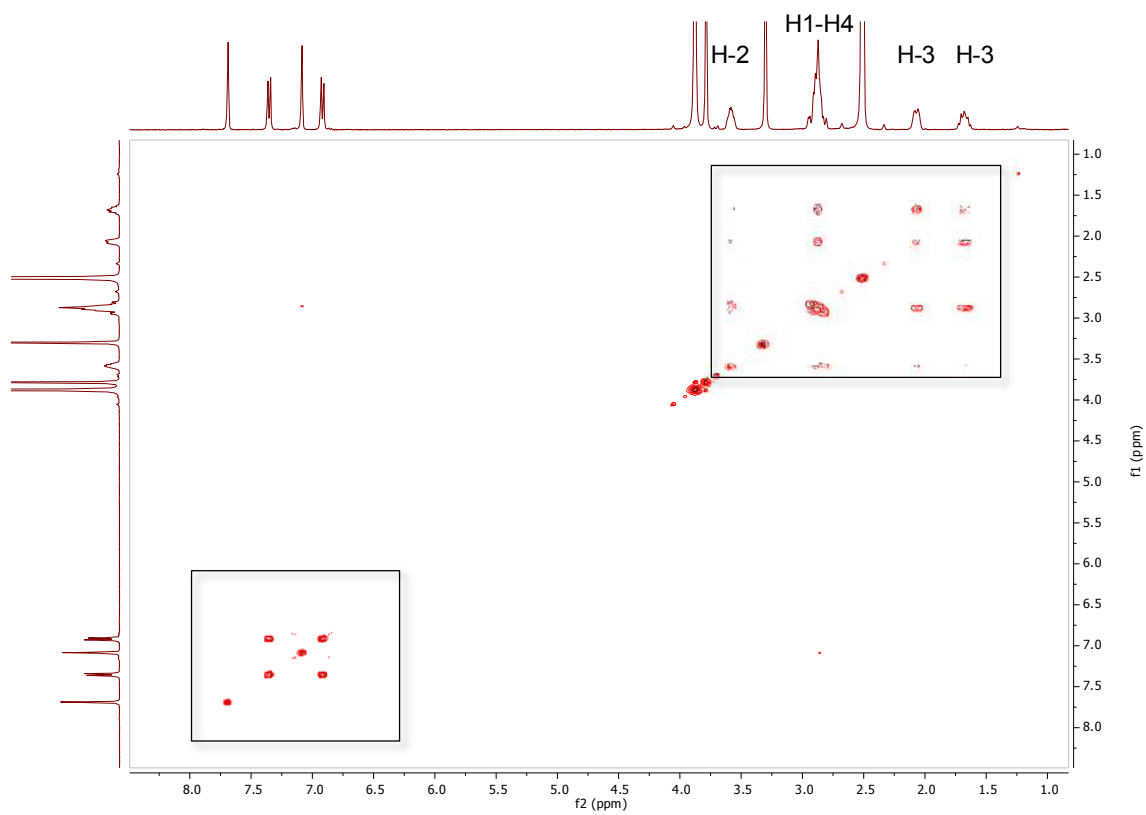
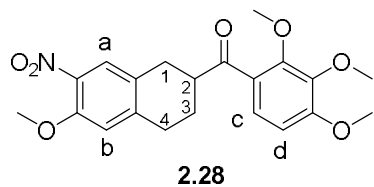


Figure S8. COSY spectra of compound **2.28** and zoom area.

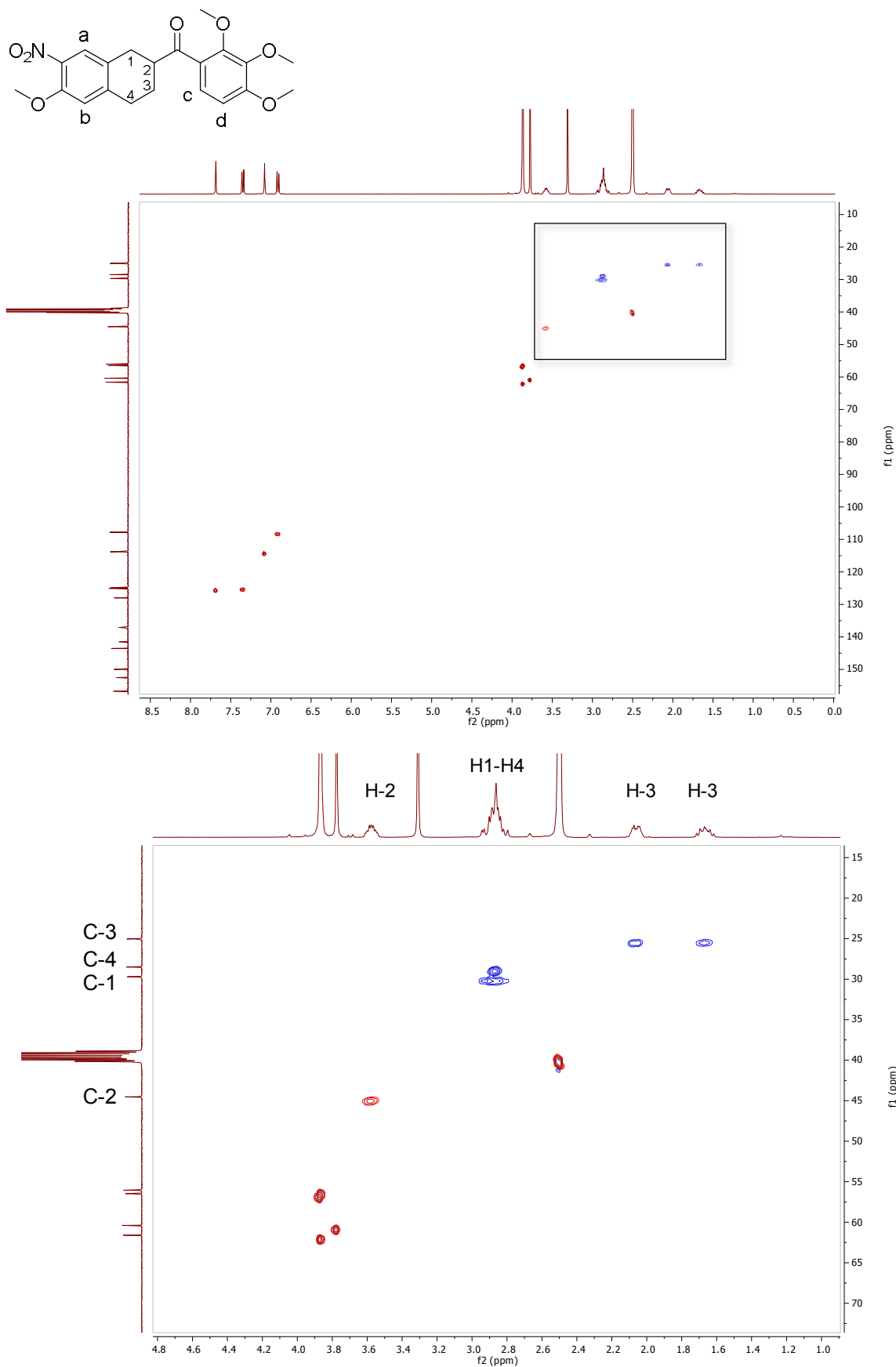


Figure S9. HSQC spectra of compound **2.28** and zoom area.

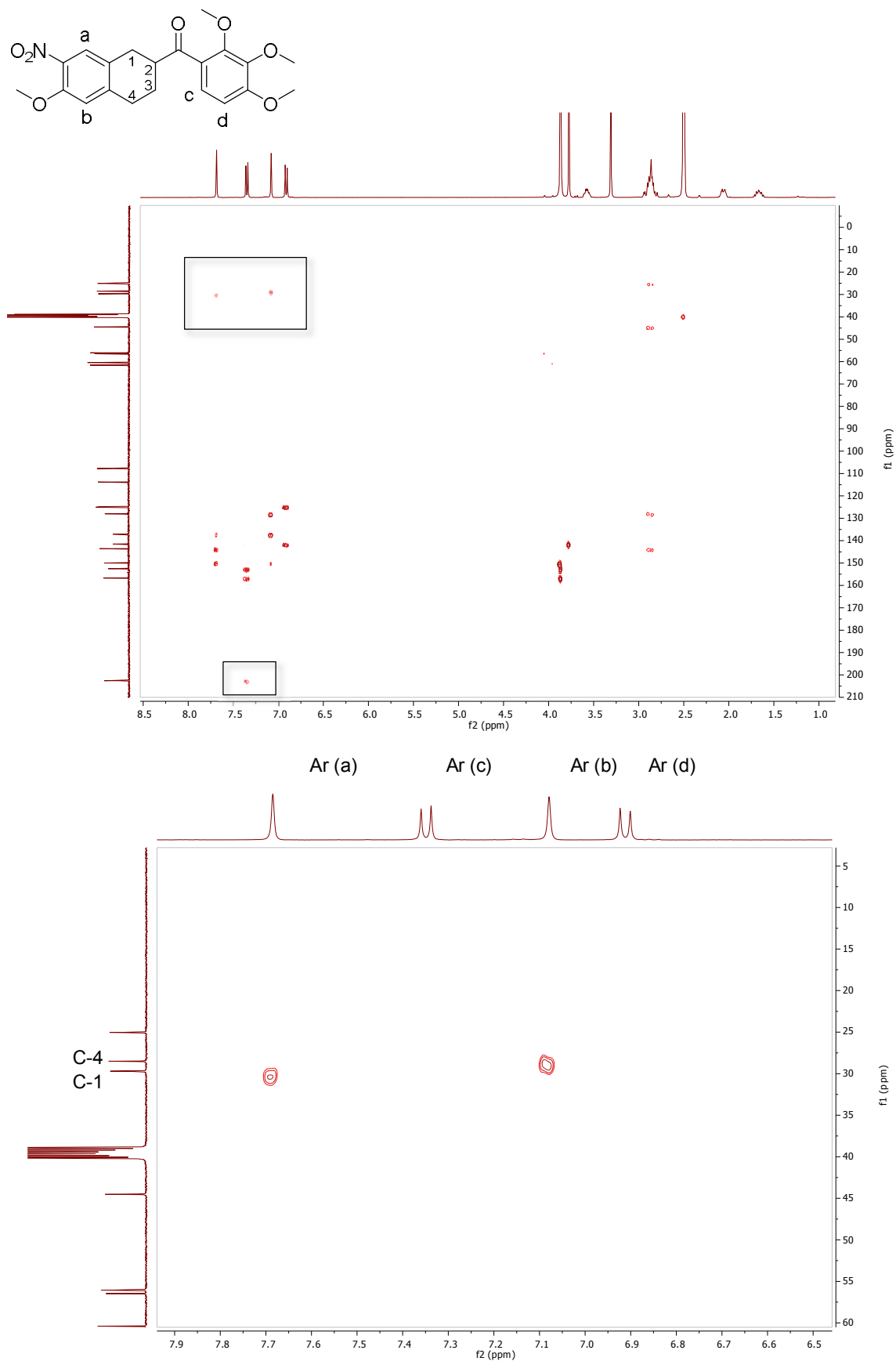


Figure S10. HMBC spectra of compound 2.28 and zoom area.

Compound **2.29**

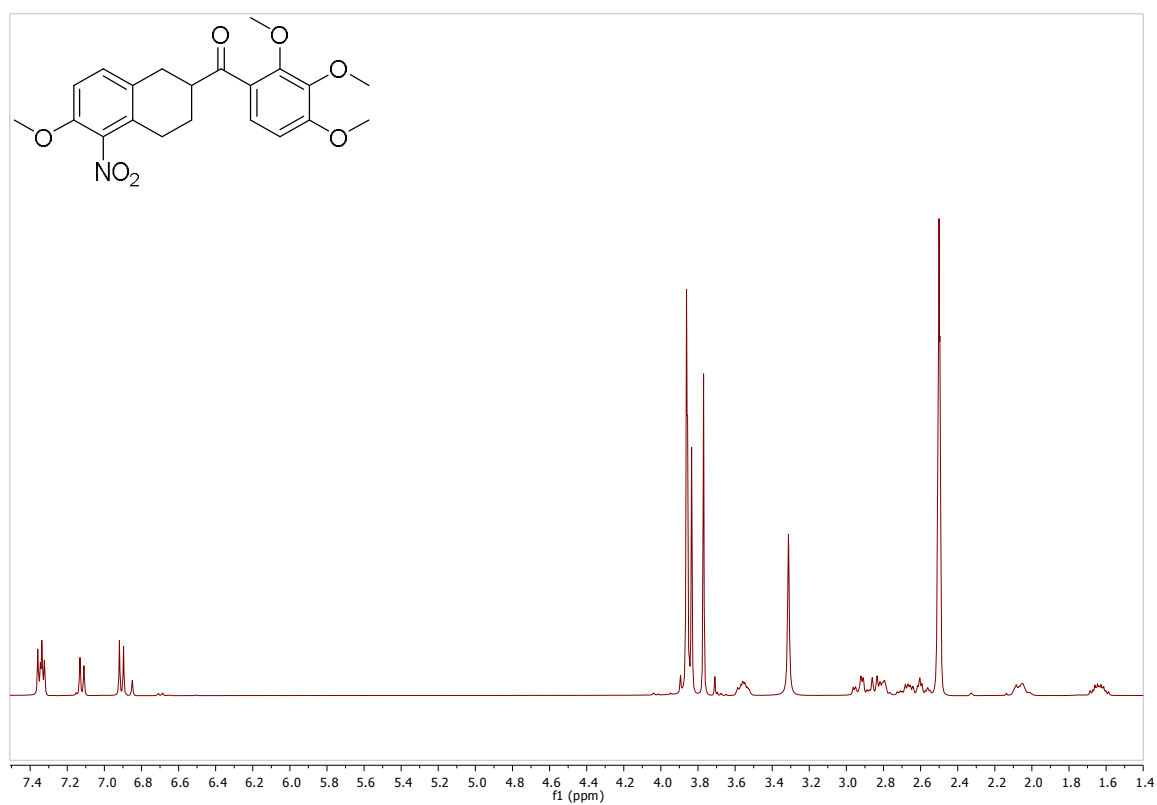


Figure S11. ¹H NMR spectra of compound **2.29**.

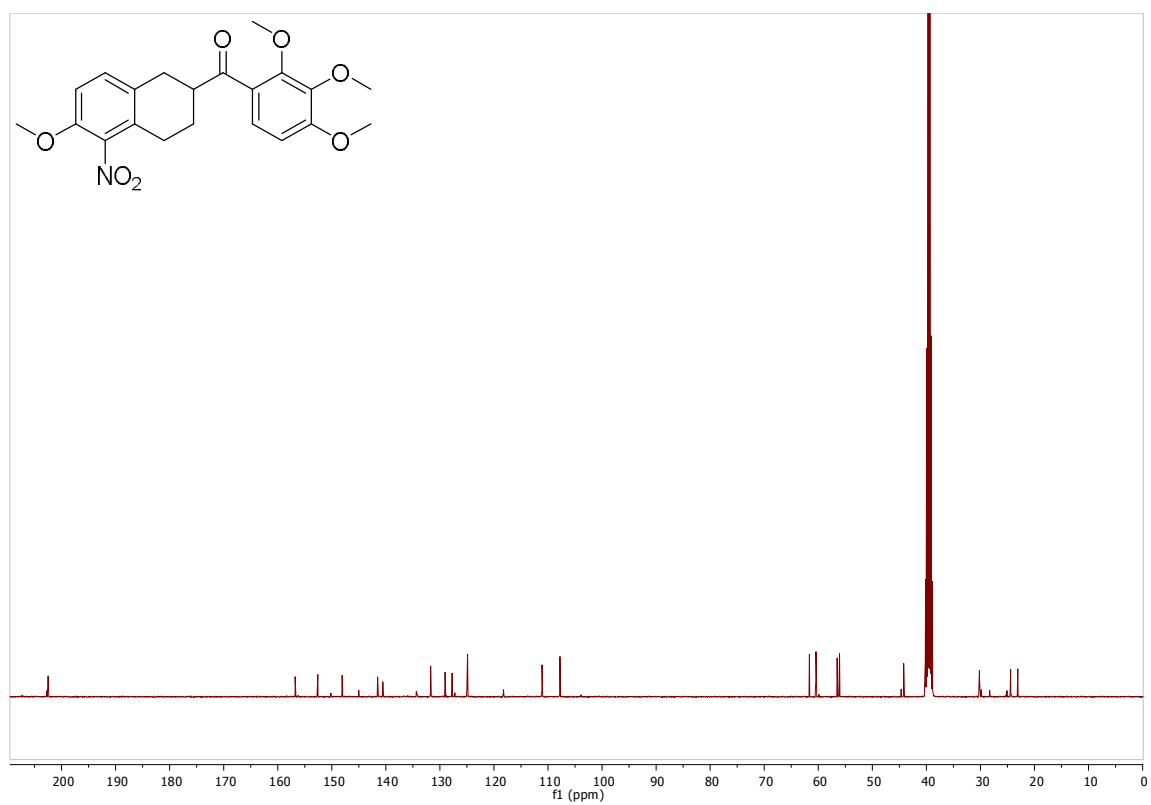


Figure S12. ¹³C NMR spectra of compound **2.29**.

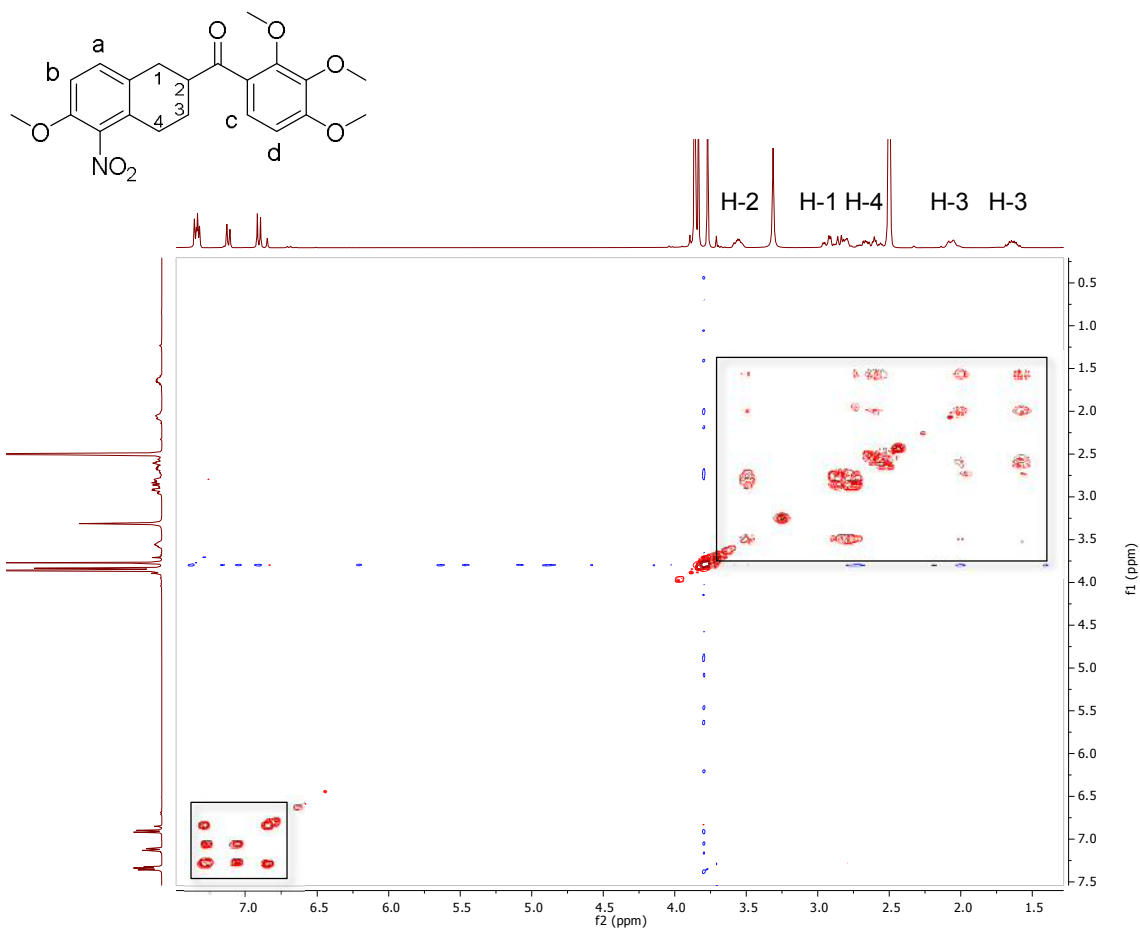


Figure S13. COSY spectra of compound 2.29.

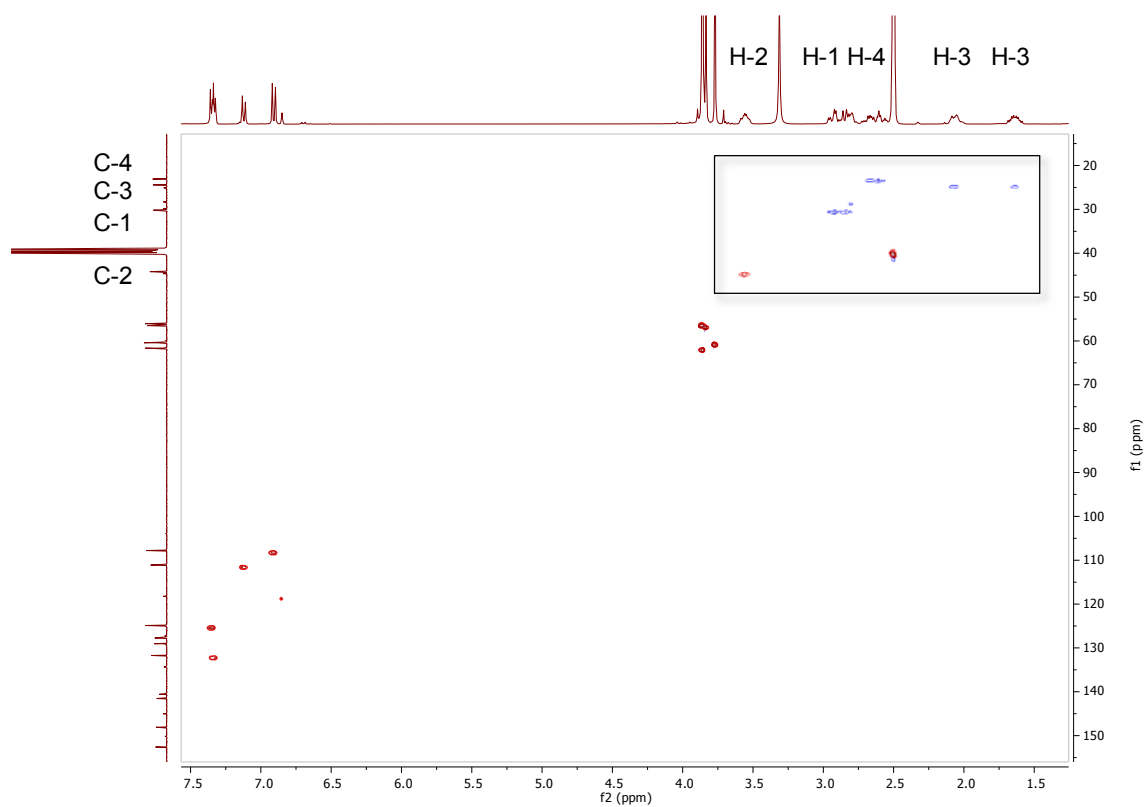


Figure S14. HSQC spectra of compound 2.29.

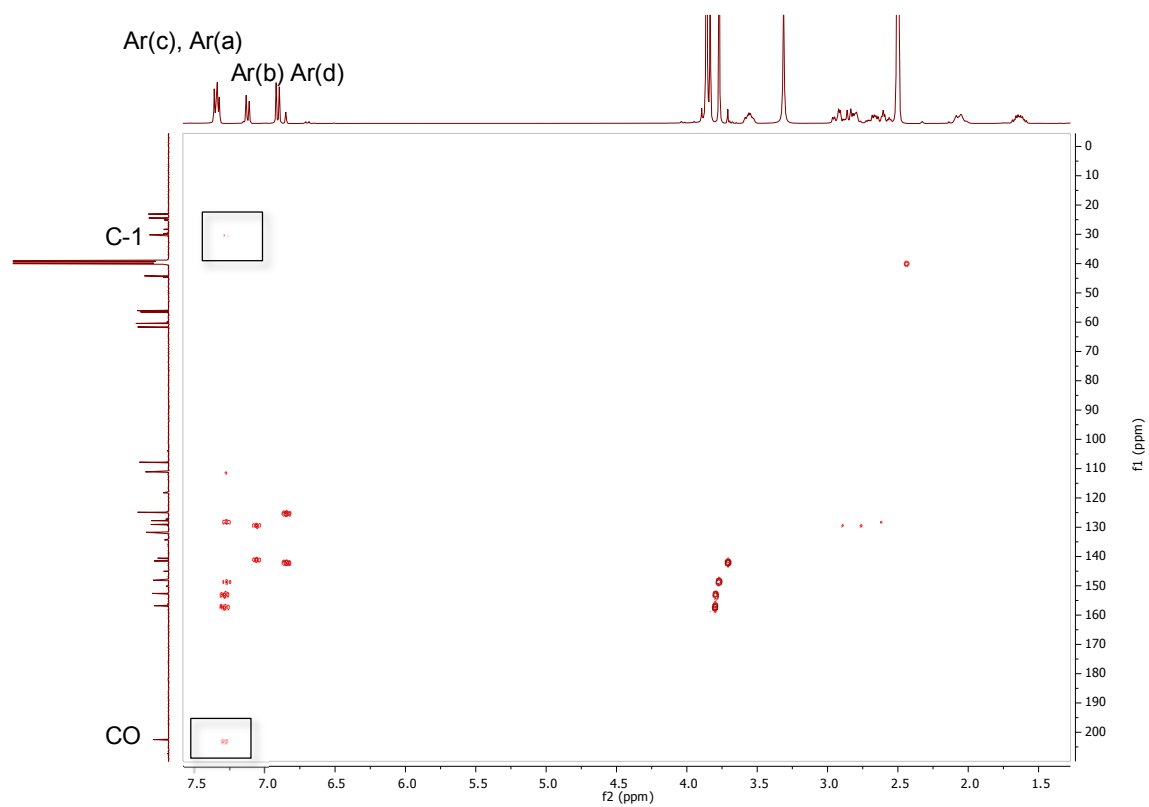


Figure S15. HMBC spectra of compound **2.29**.

