



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**DISEÑO, SÍNTESIS, ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y  
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES  
DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG**

**ANA MARÍA ZÁRATE MÉNDEZ**

**Tesis de Doctorado**

**Comité de tesis:**

**Dr. Cristian Salas Sánchez**  
Profesor tutor  
Facultad de Química y de Farmacia  
Pontificia Universidad Católica de Chile

**Dr. Jaime Meléndez**  
Profesor co-tutor  
Facultad de Química y de Farmacia  
Pontificia Universidad Católica de Chile

**Dr. Mario Faúndez**  
Profesor corrector  
Facultad de Química y de Farmacia  
Pontificia Universidad Católica de Chile

**Dr. Bruce Cassels**  
Profesor corrector  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

**Dr. Mario Chiong**  
Profesor corrector  
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Santiago de Chile, diciembre de 2019**

**© 2019, Ana María Zárate Méndez**

**© 2019, Ana María Zárate Méndez**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica que acredita al trabajo y a su autor.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**DISEÑO, SÍNTESIS, ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y  
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES  
DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG**

Tesis presentada por:

**ANA MARÍA ZÁRATE MÉNDEZ**

Para optar al Grado Académico de  
Doctor en Química.

**Aprobado por:**

Dr. Mario Faúndez C. ....  
Prof. Examinador

Dr. Mario Chiong L. ....  
Prof. Examinador

Dr. Bruce Cassels N. ....  
Prof. Examinador

Dr. Cristian Salas S. ....  
Director de Tesis

**19 de diciembre de 2019**

**DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

“Este prologo llega tarde, aunque no demasiado tarde; ¿qué más da, a fin de cuentas, cinco años que seis? Un libro y un poema como éstos no tienen prisa; además tanto mi libro como yo somos amigos de la lentitud. No en vano he sido filólogo y tal vez lo siga siendo. La palabra “filólogo” designa a quien domina el arte de leer con lentitud que acaba escribiendo también con lentitud..... Pacientes amigos míos, este libro no aspira a otra cosa que a tener lectores y filólogos perfectos. ¡aprended, pues, a leerme bien!

Friedrich Nietzsche, prologo Aurora.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Beca de Doctorado Nacional CONICYT N°21140348.

A los proyectos FONDECYT regular N°1120128 y N°1161816.

Quisiera dar todo mi agradecimiento Dr. Mario Faúndez quién fue mi profesor de pregrado en el curso de toxicología, mi evaluador de la tesis de pregrado y ahora mi evaluador de tesis del postgrado. Gracias profesor por todas sus enseñanzas, su gran apoyo y la formación personal y profesional. Sin duda está tesis si su ayuda no hubiera resultado de la misma manera.

Quisiera agradecer al Dr. Bruce Cassels y Dr. Mario Chiong por las recomendaciones en los experimentos que sin duda ayudaron a mejorar la tesis. Agradecer su disposición para atender mis dudas e infinitas gracias por las correcciones a mi manuscrito de tesis.

A mi director de tesis Dr. Cristian Salas por todo el apoyo brindado durante mi estadía en su laboratorio, por su tiempo y guía, por su ayuda, por la enseñanza brindada en el laboratorio, por las correcciones en las presentaciones y escritos. Agradezco cada llamado de atención que me llevó a tomar conciencia y cada recomendación para poder llevar a cabo de forma exitosa este trabajo de tesis.

Al Dr. Ariel Ruiz I Altaba (UNIGE) por brindarme la oportunidad de realizar mi estadía doctoral y por incluirme en sus seminarios de grupo. Realmente esta oportunidad me llevó a madurar científicamente a notar como es trabajar con un grupo de alto nivel académico y a intentar perseguir mis sueños.

A la Dra. Lucia Di Marcotullio (U. Sapienza, Roma), Dr. Andrew Quest (U. CHILE), Dr. Felipe Oyarzún (U. Chile) y Dr. Simón Guerrero (U. Chile) y a sus equipos de trabajo por la disposición a colaborar con nuestro grupo de laboratorio. Sin sus experimentos no habría sido posible haber respondido nuestra hipótesis.

A la Dra. Verónica Palma (U. Chile) por los consejos biológicos y por facilitarme más de una vez la línea celular DAOY. Al Dr. Adam Aguirre por su apoyo con los experimentos de citometría de flujo.

A la Dra. Virginia Delgado (P.U.C) por ser un buen soporte en esta etapa y una excelente colega en el programa PENTA UC.

A la Dra. Angélica Fierro (P.U.C) por brindarme un espacio en su laboratorio, por la valiosa enseñanza de sus seminarios, por el nerviosismo que me generaba y genera ser sometida a sus rondas de preguntas (¡¡¡grande profe!!!) y por el constante apoyo en todo lo que necesité.

A mi amigo y Dr. Cristian Espinosa (P.U.C) por la gran ayuda en la realización de esta tesis, por los consejos académicos y personales, por los momentos de amistad compartidos y por la enseñanza entregada.

Al Dr. Jorge Saavedra (U CHILE) por su ayuda en la revisión de esta tesis y por sus consejos en mi presentación. Sin duda una de las mejores revisiones de la tesis paso por sus manos, un gran profesional.

A la Dra. Carolina Bernal (UNIGE), a la Dra. Margarita Aliaga (P.U.C), al Dr. José Vicente G. (P.U.C) y al Dr. Marco Soto (P.U.C).

Al codirector de la presente tesis Dr. Jaime Meléndez por confiar en este proyecto.

A los profesores de mi formación de pregrado y postgrado. Quisiera destacar a los profesores que dejaron una huella en mi formación y a quienes siempre noté apasionados por entregar sus conocimientos. Sin duda el número uno fue el profesor Fernando López (¡siempre será recordado profe!), a la profesora Georgina Copia, a la profesora Jeannette Moreno (gracias profe por confiar siempre en mí), al profesor Mario Faúndez, profesor David Pessoa (mi director de pregrado), Profesor Pablo González, profesor Marcelo Preite, profesora Verónica Armstrong, y Profesor Edwin Pérez. Todos ellos grandes personas y profesionales.

A mis compañeros de laboratorio (a los que pasaron y a los que se integran). Thalía D. te deseo lo mejor en la etapa que comienzas a

emprender (gracias por tu amistad). Quisiera agradecer muy especialmente a grandes amigos Jean-Luc Bertrand y Bernardo Olivares por toda la ayuda brindada en esta tesis, por ser un tremendo aporte académico y personal, por el aguante y por su solidaridad.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacia (el team Marío Faúndez y team Pablo Gonzalez, Team Pessoa), en especial a Carlos Gallardo. por todas las recomendaciones biológicas, la amistad y los préstamos de células. Sin duda sin la gente del tercer piso no hubiera sido posible soportar. A mis amigos del doctorado Sebastián Almendras y a Eduardo Fuentes. Gracias chicos!

A mis amigas de la vida (Javiera, Carolina y Karina) y en especial a mi amiga Natalia Moreno que siempre ha estado ahí apoyando moralmente e imprimiendo mis tesis (¡gracias amiga!).

Al apoyo fundamental de mi pareja y colega Jorge Saavedra. Por los momentos de distensión, por el ánimo y el amor infinito. ¡gracias Yorch!. Realmente te admiro como profesional y persona, somos un gran equipo. También quisiera agradecer a la hermosa familia de mi pareja Elizabeth O. hermana, Elizabeth S. madre y a don Jorge S padre por su cariño y comprensión.

A mi familia, a mis hermanos Paulina y José Zárate y a mis padres Ana Méndez y José Zárate por todo su apoyo, y por ser un pilar fundamental en mi vida. Realmente los amo demasiado a todos y estoy orgullosa de tenerlos como mi familia y mi motor.

Finalmente quisiera dedicar está tesis a mis queridos abuelos Alfonso Méndez y María González. El ejemplo de ustedes es algo que me marcará para siempre. Abuelita, aunque me duele enormemente no haber podido doctorarme a tiempo para que me vieras en persona antes que enfermaras y ya no estés conmigo, quiero que sepas que te amo y que tu ejemplo es lo máspreciado que yo tengo. Tu nieta regalona cumplió su segunda meta y te llevará en su interior y transmitirá tu bondad a todos los que la sepan apreciar.

## LISTA DE ABREVIACIONES

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**BINAP:** 2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftilo  
**CCB:** Carcinoma de células Basales  
**CCF:** Cromatografía de capa fina  
**CDI:** 1,1 carbonilimidazol  
**CFSE:** Ester de succinimidil carboxifluoresceína  
**DHh:** Desert Hedgehog  
**DMF:** Dimetilformamida  
**FAP:** Fosfatasa ácida prostática  
**FBS:** Suero fetal bovino.  
**GA3PDH:** Gliceraldehído-3-fosfato- deshidrogenasa  
**Gli1:** Oncogén asociado a glioma  
**GPCR:** Receptor acoplado a proteína G  
**Hh:** Hedgehog  
**hSmo:** Receptor Smoothened humano  
**IHh:** Indian Hedgehog  
**IWB:** Inmuno western blot  
**kDa:** kilo-Dalton  
**MB:** Meduloblastoma  
**NEM:** Nanoemulsión  
**PI:** Yoduro de propido  
**PFA:** Paraformaldehido  
**Ptch1:** Receptor Patched  
**RT-qPCR:** Reacción en cadena de Polimerasa en tiempo real con transcripción inversa  
**SHh:** Sonic Hedgehog  
**Smo:** Receptor Smoothened  
**URL:** Unidades relativas de luminiscencia  
**XANTPHOS:** 4,5-bis(difenilfosfina)-9,-dimetilxanteno

## INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS .....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE ESQUEMAS .....	xiv
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1    Cáncer.....	1
1.2    Vía de señalización Hedgehog y su relación con el cáncer.....	3
1.3    Receptor Smoothened y características estructurales.....	10
1.4    Ligandos de Smoothened: del diseño al uso clínico .....	14
1.4.1    Andamio de compuestos no análogos a ciclopamina .....	17
1.4.2    Quinazolinas .....	18
1.4.3    Biarilcarboxamidas y Bisamidas .....	18
1.4.4    Otras moléculas sintéticas como potentes inhibidores de Hh ..	19
1.4.5    Purinas como heterociclo central y andamiaje privilegiado .....	21
1.5    Características químicas de las purinas .....	23
1.5.1    Carácter electrofílico de los átomos de carbono 2, 6 y 8 del anillo de purina. ....	24
1.5.2    Tautomería del anillo de imidazol. ....	24
1.5.3    Reacciones químicas sobre el anillo de purina. ....	25
<b>CAPITULO II: HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>INVESTIGACIÓN PROPUESTA .....</b>	<b>27</b>
<b>CAPITULO III: OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>

3.1	Objetivo General	29
3.2	Objetivos Específicos	29
3.2.1	Objetivos Sintéticos	29
3.2.2	Objetivos Biológicos	29
3.2.3	Objetivo Bioinformático	30
<b>CAPÍTULO IV: SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>		<b>31</b>
4.1	Metodología Sintética	31
4.1.2	Aspectos generales de la etapa sintética	31
4.1.3	Análisis retrosintético para los derivados de las series I-III	32
4.1.4	Metodología sintética para los derivados de las series I-III	34
4.2	Metodología Biológica	38
4.2.1	Aspectos generales de la etapa biológica	38
4.2.1.1	Líneas celulares	38
4.2.1.2	Medios de cultivo y suplementos	38
4.2.1.3	Partidores para qRT-PCR	38
4.2.1.4	Reactivos generales: lista de proveedores y número de catálogo	39
4.2.2	Aspectos generales de cultivo celular	39
4.2.2.1	Cultivo celular	39
4.2.2.2	Almacenamiento de células, crio-preservación y subcultivos	39
4.2.2.3	Conteo de células	40
4.2.2.4	Compuestos utilizados en cultivo celular	41
4.2.2.5	Transfección y tratamientos	41
4.2.3	Estudios de viabilidad celular: ensayo colorimétrico de MTT	41
4.2.4	Ensayos mediante citometría de flujo	43

4.2.4.1	Ensayo de muerte celular mediante marcaje con yoduro de propidio (PI) y doble marcaje con anexina-V FITC/PI _____	43
4.2.4.2	Ensayo de proliferación celular con sonda fluorescente CFSE	45
4.2.5	Tinción nuclear con DAPI y evaluación de la capacidad formadora de colonias _____	46
4.2.6	Evaluación de la capacidad de los compuestos como inhibidores de la vía Hedgehog mediante ensayos funcionales _____	47
4.2.6.1	Ensayo de gen reportero Gli-luciferasa _____	47
4.2.6.2	Ensayo de qRT-PCR _____	49
4.2.6.3	Ensayo de radioligando _____	53
4.2.7	Ensayos “ <i>in vivo</i> ”: evaluación de la respuesta antitumoral ____	53
4.3	Metodología Bioinformática _____	56
4.3.1	Parametrización de ligandos y preparación de modelo de hSmc _____	56
4.3.2	Acoplamiento molecular de ligandos _____	56
4.3.3	Determinación de parámetros fisicoquímicos teóricos _____	56
<b>CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>57</b>
5.1	Síntesis de los compuestos _____	57
5.1.1	Obtención de los derivados <b>2a-c</b> y <b>2'a-c</b> (serie I) y <b>6a-c</b> + <b>6'a-c</b> (series II y III): Reacción de <i>N</i> -alquilación _____	57
5.1.2	Obtención de los derivados <b>3a-c</b> (serie I) y <b>7a-c</b> (series II y III): Reacción de acoplamiento carbono-carbono de Suzuki-Miyaura _____	59
5.1.3	Obtención de los derivados finales <b>4a-s</b> (serie I): Sustitución Nucleofílica Aromática (SNAr) _____	64
5.1.4	Obtención de los derivados finales <b>11a-o</b> (serie II): Reacción de acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig _____	66
5.1.5	Obtención de los derivados finales <b>14a-o</b> (serie III) _____	69

5.2	Evaluación biológica de los compuestos _____	78
5.2.1	Evaluación del efecto citotóxico de purinas 2,6,9 tri-sustituidas en un panel de líneas celulares neoplásicas y una línea no neoplásica. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT _____	80
5.2.2	Evaluación del tipo de muerte celular mediante C.F _____	88
5.2.3	Evaluación del efecto anti-proliferativo de <b>4s</b> mediante C.F. _	101
5.2.4	Evaluación del efecto del compuesto <b>4s</b> en la inhibición de genes propios de la vía de señalización Hh _____	103
5.2.4.1	Ensayo de qRT-PCR para células nativas (WT) y Smo <sup>-/-</sup> y ensayo de gen reportero de luciferasa _____	103
5.2.4.2	Evaluación del efecto antagonista del compuesto 4s mediante ensayos de desplazamiento de Bodipy-Ciclopamina (BC) _____	109
5.3	Estudios de acoplamiento molecular entre <b>4s</b> Smo _____	113
5.4	Evaluación del efecto antitumoral del compuesto <b>4s</b> en células de melanoma murino B16F10 utilizando un modelo de ratón _____	116
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES .....</b>		121
<b>CAPÍTULO VII: REFERENCIAS.....</b>		123
<b>CAPÍTULO VIII: MATERIAL ANEXO .....</b>		134
8.1	Síntesis y datos espectroscópicos para los compuestos de la Serie I _____	134
8.2	Síntesis y datos espectroscópicos para los compuestos de la Serie II y Serie III _____	147
8.3	Espectros de RMN para las moléculas sintetizadas _____	173
8.4	Espectros masa de alta resolución para las moléculas sintetizadas _____	244
8.5	Ensayos biológicos suplementarios _____	266

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de partidores humanos utilizados en qRT-PCR.....	38
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de rendimiento de la reacción de Suzuki al utilizar diferentes bases.....	62
<b>Tabla 3.</b> Evaluación de la citotoxicidad de los mejores compuestos de las series I-III en un panel de 4 líneas celulares neoplásicas y una línea celular no neoplásica HEK293 .....	84
<b>Tabla 4.</b> Determinación del IC <sub>50</sub> (μM) e índice de selectividad (IS) para los compuestos <b>4a</b> , <b>4b</b> , <b>4r</b> , <b>4s</b> , <b>11a</b> , <b>14g</b> y <b>14j</b> contra un panel de seis líneas celulares neoplásicas que expresan todos los componentes de la vía Hh en altos niveles y una línea no neoplásica HEK293 .....	85
<b>Tabla 5.</b> Unión de <b>4s</b> versus vismodegib, ambos en células humanas HEK293T -transfectadas transientemente- con Smo nativas (WT) o Smo mutante D473H (resistente a drogas) .....	112

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alteraciones moleculares implicadas en el cáncer.....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema simplificado para la cascada de señalización Hh/Gli .	6
<b>Figura 3.</b> Formas de activación aberrantes de la vía Hh en el cáncer. ....	8
<b>Figura 4.</b> Diagrama de la activación dependiente de ligando de la vía Hh. ....	8
<b>Figura 5.</b> Estructuras de antagonistas del receptor Smo aprobados por la FDA el año 2012 y 2015 respectivamente. <b>a)</b> vismodegib, <b>b)</b> sonidegib. ..	9
<b>Figura 6.</b> Modelo esquemático de Smo.....	11
<b>Figura 7.</b> Sitios de unión para antagonistas Smo en TM1.....	12
<b>Figura 8.</b> Sitios de unión para antagonistas Smo en TM1.....	13
<b>Figura 9.</b> Estructuras de potenciales inhibidores de la vía Hh llevaron al descubrimiento de vismodegib.....	16

<b>Figura 10.</b> Estructuras químicas de los primeros ligandos de Smo: ciclopamina y SANT19 (antagonistas) y purmorfamina y SAG (agonistas) descubiertos mediante un tamizaje con un gen reportero Shh. ....	17
<b>Figura 11.</b> Estructuras de quinazolininas. Destaca el compuesto BMS-833923/XL139.....	18
<b>Figura 12.</b> Estructuras de biarilcarboxamidas y bisamidas. Destaca el compuesto NVP-LDE225 (Sonidegib).....	19
<b>Figura 13.</b> Moléculas sintéticas que han llevado al desarrollo de potentes inhibidores de la vía Hh. ....	20
<b>Figura 14.</b> Principales estructuras químicas de purinas antitumorales y compuestos antineoplásicos aprobados por la FDA. ....	22
<b>Figura 15.</b> Citotoxicidad <i>in vitro</i> de los compuestos <b>4f</b> , <b>4j</b> y <b>4k</b> en dos líneas celulares neoplásicas .....	23
<b>Figura 16.</b> Heterociclo purina generado a partir de la fusión de los anillos de pirimidina e imidazol. ....	24
<b>Figura 17.</b> Tautomería del anillo de purina en los nitrógenos <i>N7</i> y <i>N9</i> ....	25
<b>Figura 18.</b> Principales reacciones sobre el anillo de purinas que han llevado a compuestos bioactivos e inhibidores de Hh.....	25
<b>Figura 19.</b> Representación de los regioisómeros <i>N9</i> - y <i>N7</i> -alquilados....	58
<b>Figura 20.</b> Condiciones generales para el acoplamiento carbono-carbono de Suzuki-Miyaura. ....	61
<b>Figura 21.</b> Ciclo catalítico de la reacción de Suzuki-Miyaura. ....	61
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>7b</b> .....	64
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>4s</b> .....	65
<b>Figura 24.</b> Mecanismo de reacción de Buchwald-Hartwig para la obtención del acoplamiento C-N de las moléculas propuestas .....	67
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>11b</b> . ....	69
<b>Figura 26.</b> a) Intento fallido para la obtención del producto <b>13a-c</b> . b) Ruta alternativa con la generación de los compuestos <b>12a-c</b> . c) Hidrólisis básica de <b>12a-c</b> para la obtención de <b>13a-c</b> . ....	70
<b>Figura 27.</b> a) Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>12a</b> . b) Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>12a</b> . ....	71

<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>13a</b> .....	72
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>13a</b> en conjunto con el producto aislado de la reacción con el agente acoplante HATU ( <b>13a-HATU</b> ). .....	73
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>14g</b> y ampliación de la señal del carbonilo del grupo amida en RMN <sup>13</sup> C. ....	77
<b>Figura 31.</b> Representación de las estructuras bases de las moléculas finales de las series <b>I-III</b> . ....	77
<b>Figura 32.</b> Estructura de los compuestos que presentaron mayor potencia citotóxica (IC <sub>50</sub> ) e índice de selectividad (IS) de las series <b>I-III</b> . ....	86
<b>Figura 33.</b> Niveles de expresión de mRNA blanco de genes Hh .....	87
<b>Figura 34.</b> Modalidad de muerte celular.....	92
<b>Figura 35.</b> Inducción de apoptosis dosis dependiente utilizando el compuesto <b>4s</b> en líneas celulares neoplásicas de meduloblastoma DAOY, cáncer de pulmón H1975 y adenocarcinoma colorrectal HCT116 y HT29 y en la línea celular no neoplásica HEK293 .....	94
<b>Figura 36.</b> Inhibición de la capacidad formadora de colonias en un panel de tres líneas celulares neoplásicas HT29, HCT116 y H1975 .....	96
<b>Figura 37.</b> Análisis de muerte celular por citometría de flujo (CF) en células HT29 .....	98
<b>Figura 38.</b> Evaluación del efecto antiproliferativo en la línea celular de cáncer de colon HT29 ( <b>a</b> ) y HEK293 ( <b>b</b> ) .....	102
<b>Figura 39.</b> Expresión de los niveles de mRNA blanco de Hh .....	104
<b>Figura 40.</b> Inhibición de la vía de señalización celular Hh por parte de <b>4s</b> . .....	105
<b>Figura 41.</b> Activación de Gli-luciferasa en células HCT16 transfectadas con los constructos Luciérnaga de luciferasa y renilla.....	108
<b>Figura 42.</b> Unión de <b>4s</b> a células HEK293T incubadas con el compuesto fluorescente Bodipy-Ciclopamina (BC) en un ensayo de unión competitiva. ....	110
<b>Figura 43.</b> Unión de <b>4s</b> a células transfectadas con Smo WT y Smo mutante D473H.....	112

<b>Figura 44.</b> Modo de unión pronosticado de <b>4s</b> (verde) dentro del haz heptahelico cristalográfico del receptor hSmo .....	115
<b>Figura 45.</b> Superposición gráfica de <b>4s</b> -Smo (verde) y vismodegib-Smo (Fucsia).....	115
<b>Figura 46.</b> Diagrama de flujo de la evaluación de la reincidencia tumoral y metástasis en pulmón en ratones C57BL/6 sin tratamiento (control) o tratados con una inyección de <b>4s</b> -NEM (nano-emulsión agua-aceite (o-w). .....	117
<b>Figura 47.</b> Ensayo de viabilidad celular mediante MTS en células B16F10 .....	118
<b>Figura 48.</b> Eficiencia del compuesto <b>4s</b> nanovehiculizado en nanoemulsiones ( <b>4s</b> -NEM) de aceite en agua (O / W) .....	120

## INDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Estructuras químicas generales propuestas para los compuestos de las series <b>I-III</b> como nuevos antagonistas de Smo.....	28
<b>Esquema 2.</b> Análisis retrosintético para la obtención de los derivados de purinas de la serie <b>I</b> .....	33
<b>Esquema 3.</b> Análisis retrosintético para la obtención de los derivados de purinas de las series <b>II</b> y <b>III</b> . .....	34
<b>Esquema 4.</b> Reactivos y condiciones para la obtención de los derivados de la serie <b>I</b> .....	35
<b>Esquema 5.</b> Reactivos y condiciones para la obtención de los derivados de las series <b>II</b> y <b>III</b> .....	37
<b>Esquema 6.</b> Procedimiento de trabajo con el Kit Gli luciferasa para estudios de moléculas pequeñas antagonistas de Smo.....	48
<b>Esquema 7.</b> Equilibrio tautomérico de purinas. ....	59
<b>Esquema 8.</b> Reducción de Pd (II) a Pd (0) y formación de óxido de fosfina .....	63

<b>Esquema 9.</b> Mecanismo general de la formación de amidas, usando HATU como agente acoplante para la formación de las purinas 2,6,9 trisustituidas finales de la Serie III. ....	74
<b>Esquema 10.</b> Mecanismo general para la formación de amidas, usando CDI como agente acoplante para la formación de las purinas 2,6,9 trisustituidas.....	75

## RESUMEN

Debido a que la activación aberrante de la vía de señalización Hedgehog (Hh) está relacionada con procesos de carcinogénesis, la inhibición de Hh ha surgido como una herramienta para el tratamiento de una amplia gama de cánceres humanos, donde el receptor Smoothened (Smo) ha sido el principal blanco terapéutico. El primer antagonista comercial de Smo vismodegib (GDC0449/Erivedge®), fue aprobado el año 2012 por la FDA para el tratamiento del carcinoma de células basales en etapas avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, en los últimos años, han surgido mutaciones en Smo que confieren resistencia al tratamiento. Por esta razón, el desarrollo de nuevos antagonistas de Smo representa un desafío importante para la terapia del cáncer.

Desde el punto de vista químico, una de las características comunes que presentan los inhibidores de Hh o antagonistas de Smo, es la presencia de un sistema heterocíclico como núcleo. Por ello, a partir de diversas evidencias reportadas en bibliografía y trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en esta tesis se diseñaron, sintetizaron y evaluaron biológicamente un conjunto de nuevas purinas 2,6,9-trisustituidas como potenciales agentes antitumorales.

De un total de 49 compuestos sintetizados, fueron seleccionados aquellos que presentaron el mejor perfil de potencia y selectividad en modelos de cáncer *in vitro*. Así, los compuestos **4r**, **4s**, **11a**, **14g** y **14j** reportaron valores de IC<sub>50</sub> en el rango de 1.2 a 40 µM en ensayos de viabilidad celular en un amplio panel de líneas celulares neoplásicas humanas, donde la apoptosis, fue el principal tipo de muerte celular observada para estos derivados, siendo estadísticamente más significativo el efecto producido por el compuesto **4s** que además fue capaz de reprimir la expresión génica de Hh. Adicionalmente, ensayos de desplazamiento con Bodipy-Ciclopamina, estudios de genes reporteros (Gli-luciferasa) y estudios de la expresión

génica mediante qRT-PCR, lograron identificar **4s** como un nuevo antagonista de Smo. Estudios de acoplamiento molecular confirman que este derivado de purina se une al dominio transmembrana de Smo al igual que los antagonistas Smo aprobados clínicamente.

Finalmente, en estudios *in vivo*, utilizando un modelo animal de ratón C57BL/6, el compuesto **4s** vehiculizado en nanopartículas de fosfolípidos, mostró tener un efecto antitumoral en células B16F10 de melanoma murino (dependiente de Hh) al reducir la reincidencia tumoral y metástasis del tumor primario en única dosis de 1.5 mg de aplicación subcutánea. A partir de todo el trabajo realizado en esta tesis, se concluye que **4s** es un prometedor agente antagonista de Smo, con un perfil citotóxico selectivo por células neoplásicas vs células no neoplásicas y con un notorio efecto antitumoral capaz de afectar específicamente el crecimiento y reincidencia de tumores dependientes de la vía Hh.

**Palabras claves:** síntesis, receptor de Smo, antagonistas de Smo, citotoxicidad, muerte celular, líneas neoplásicas, ensayos de unión, expresión génica, acoplamiento molecular, efecto antitumoral.

## SUMMARY

### **Design, synthesis, docking and biological evaluation of new compound as inhibitors Hedgehog signaling pathway.**

Because the aberrant activation of the Hedgehog signaling pathway (Hh) is related to carcinogenesis processes, Hh inhibition has emerged as a target for the treatment of a wide range of human cancers, where the smoothed (Smo) receptor is the main therapeutic target. The first commercial Smo antagonist, vismodegib (GDC0449/Erivedge®), was approved in 2012 by the FDA for the treatment of basal cell carcinoma in advanced stages of the disease. However, in recent years, Smo mutations have emerged that confer treatment resistance. For this reason, the development of new Smo antagonists is an important challenge for cancer therapy.

From the chemical point of view, one of the commonest characteristics that the Hh inhibitors or Smo antagonists present is a heterocyclic core in their structures, based on evidence reported in the literature and previous work of our research team. The synthesis and biological evaluation of a new series of 2,6,9-trisubstituted purines as potential antitumor agents have been adequately presented in this thesis.

Out of 49 synthesized compounds, we selected those that elicited the highest potency and selectivity in *in vitro* cancer models. Compounds **4r**, **4s**, **11a**, **14g** and **14j**, showed IC<sub>50</sub> values in the range of 1.2 to 40 µM in cell viability assays, in a wide panel of human neoplastic cell lines.

Apoptosis was the main cell death mechanism elicited by them, being statistically most significant the effect showed by **4s**, which also was able of suppress gene expression of Hh. Additionally, Bodipy-Cyclopamine displacement assays, reporter genes (Gli-luciferase) assays and the study of gene expression through qRT-PCR, led us to identify **4s** as a new Smo antagonist. Molecular docking studies confirmed that this purine derivative bond to the transmembrane domain of Smo like the clinically approved Smo antagonist.

Finally, "*in vivo*" studies, using the C57BL/6 mouse model, a nanoformulation of **4s** was found to be highly effective in preventing post-surgery tumour reoccurrence and metastasis in a single 1.5 mg subcutaneous dose. Therefore, **4s** is a promising Smo antagonist, which has a selective cytotoxic profile on neoplastic cells versus non neoplastic ones and with a marked antitumor effect that affects specifically the growth and recurrence of tumors dependent on the Hh pathway.

**KeyWords:** Synthesis, Smo receptor, Smo antagonists, cytotoxicity, cell death, neoplastic lines, binding assays, gene expression, molecular coupling, antitumor effect.

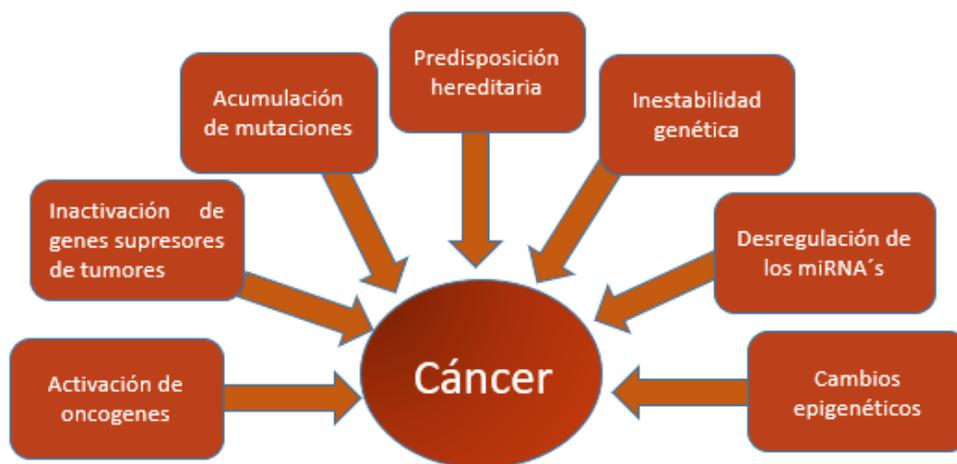
## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Cáncer**

El cáncer es una patología heterogénea que comprende un amplio grupo de enfermedades crónico-degenerativas que pueden afectar cualquier parte del organismo. Su desarrollo es un proceso multifactorial y acumulativo gatillado en una primera instancia por la suma de factores ambientales, tales como el consumo de tabaco, una dieta poco saludable, la exposición a agentes infecciosos, entre otros y factores genéticos inherentes al individuo, entre ellos, mutaciones genéticas, hormonales y alteraciones inmunológicas. Así, con el tiempo, las células se transforman progresivamente en “aberrantes” dando como resultado la activación de los mecanismos celulares y moleculares comunes que presentan todas las células cancerígenas (Figura 1).<sup>1</sup> Estas se relacionan con defectos en los circuitos regulatorios que controlan la homeostasis celular, incluyendo la proliferación, diferenciación, migración y muerte. así, como consecuencia del dinamismo de este sistema es que existe una gran dificultad para obtener tratamientos efectivos en esta patología.<sup>1-2</sup>

Estudios recientes realizados por Tomasetti y Vogelstein,<sup>2</sup> sugieren que sólo un tercio de la probabilidad de riesgo de contraer cáncer en los diferentes tejidos del organismo es atribuible exclusivamente a factores ambientales y/o predisposiciones genéticas, siendo la mayor parte de la probabilidad producida por un tercer componente -denominado factor estocástico- el cual sería el principal contribuyente de esta enfermedad y se produciría por mutaciones aleatorias y acumulativas durante la replicación normal del ADN en células madres no cancerosas propias del tejido donde se generó el tumor lo cual guiaría a la célula a adquirir un fenotipo carcinogénico. Por ejemplo, pacientes con disfunción en la enzima producida por la próstata, fosfatasa ácida prostática (FAP), tienen alrededor

de un 30 % más de probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal que duodenal, probablemente porque hay 150 veces más divisiones de células madres en el colon que en el duodeno.<sup>2</sup> Así, la variación del riesgo de contraer cáncer entre diferentes tejidos es proporcional al total de divisiones de las células madres no cancerosas (factor estocástico) y puede ser cuantificado mediante el Puntaje de Riesgo Adicional (ARS, por sus siglas en inglés) que a su vez, se verá influenciado en mayor o menor magnitud por los factores genéticos y ambientales asociados a cada individuo.



**Figura 1.** Alteraciones moleculares implicadas en el cáncer. La carcinogénesis se produce por diversos mecanismos que se encuentran desregulados en una o múltiples vías de señalización asociadas a factores de crecimiento y que participan controlando el desarrollo durante la embriogénesis y organogénesis y están implicadas en el desarrollo embrionario a la hora de establecer la posición celular, la segmentación-polaridad celular y destinos celulares. Entre estas vías, se encuentran: Hedgehog (Hh), Wnt, Notch, BMP/TGF $\beta$ , PI3K/AKT y JAK/STAT. Un desbalance en alguna de ellas, sumado a la acumulación de mutaciones, predisposiciones genéticas, activación de oncogenes, entre otras, dirigen a las células a la patología del cáncer.<sup>3</sup>

Bajo este contexto, los cánceres de pulmón y colon merecen especial atención ya que están asociados a tejidos con un alto número de divisiones celulares, lo cual aumenta la probabilidad de acumular errores genéticos aleatorios elevando el porcentaje del componente estocástico<sup>4</sup> y, además

presentan un elevado valor de ARS comparado a otros cánceres de alta prevalencia mundial como lo son el de próstata para los hombres y el de mamas para las mujeres.<sup>2</sup>

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) posiciona al cáncer como la principal causa de muerte en el mundo después de las enfermedades cardiovasculares<sup>5</sup> y estima que el año 2012 hubo 14.1 millones de casos nuevos de cáncer, 8.2 millones de muertes por esta enfermedad y 32.4 millones de personas que viven con ella (con aproximadamente cinco años de diagnóstico).

El cáncer de pulmón produce más de 160.000 muertes por año en los EUA y está asociado principalmente al consumo de tabaco. La incidencia de casos nuevos alcanza alrededor de un 14 % y generalmente es detectado en etapas avanzadas de la enfermedad (40 % en etapa IV y 30 % en etapa III) con una tasa de mortalidad que abarca alrededor de un 9 %.<sup>6</sup> El cáncer de colon representa un 9 % de casos nuevos y un 8 % de las muertes en EUA, siendo la segunda causa de muerte. En Chile, la tasa de mortalidad asociada al cáncer de pulmón ha ido en aumento, incrementándose tan sólo en 20 años en un 52 % encontrándose vinculado principalmente al consumo de tabaco, por lo que dentro los próximos 15 años se estima un total de 12.000 muertes anuales por esta causa. Por su parte, el cáncer de colon ocupa el tercer lugar en la causa de muerte entre los cánceres digestivos de Chile, con una tasa de mortalidad de 1116 defunciones anuales y está vinculado principalmente a una alimentación elevada en grasas saturadas y a colitis ulcerosa.<sup>7</sup>

## **1.2 Vía de señalización Hedgehog y su relación con el cáncer**

La transformación progresiva de las células normales en aberrantes no sólo corresponde a una expansión monoclonal de células, sino que a procesos complejos donde el crecimiento anormal aleatorio es impulsado por un

grupo minoritario patológico de células madre, que por un lado han adquirido características relacionadas con el tumor como el crecimiento no controlado, capacidad para formar metástasis y por otro lado, mantienen su capacidad inherente de autorrenovarse y diferenciarse en una progenie fenotípicamente heterogénea, aunque aberrante. Las subpoblaciones de células cancerosas están dotadas de un potencial tumorigénico de células madres cancerosas y se han logrado detectar en tumores sólidos de cánceres humanos. Entre ellos destaca el cáncer de colon, de pulmón, de cerebro, páncreas, cuello y cabeza.<sup>8-9</sup>

Las células madres deben su gran importancia y relevancia a que están estrechamente relacionadas con el modelamiento, crecimiento y desarrollo de organismos multicelulares, los cuales corresponden a procesos finamente regulados por la acción de diferentes vías de transducción de señales involucradas en la comunicación célula-célula cuyas acciones son mediadas por la secreción de un conjunto de factores de crecimiento. En vertebrados, se ha identificado que existe una importante y compleja red de señales secretadas que incluyen la familia de factores de crecimiento llamados Hedgehog (Hh), compuesta por Indian Hedgehog (Ihh), Desert Hedgehog (Dhh) y Sonic Hedgehog (Shh), siendo el último, el ligando más expresado en mamíferos.<sup>10</sup> Esta familia fue descrita por primera vez en 1980 en embriones de la mosca *Drosophila melanogaster* mediante un tamizaje de los genes que controlaban el patrón segmentario en el desarrollo de las larvas en esta especie.<sup>11-12</sup> Hh debe su nombre al aspecto externo de la larva de la mosca mutante que, debido a la disposición de los dentículos, se asemeja a un erizo.<sup>13-14</sup>

La vía de señalización Hh es crucial para el desarrollo embrionario en *Drosophila melanogaster* y dirige la proliferación de células madres progenitoras estableciendo patrones definidos que son interpretados por las células receptoras para adquirir diversos destinos y comportamientos celulares determinando la polaridad segmentaria y su estructura

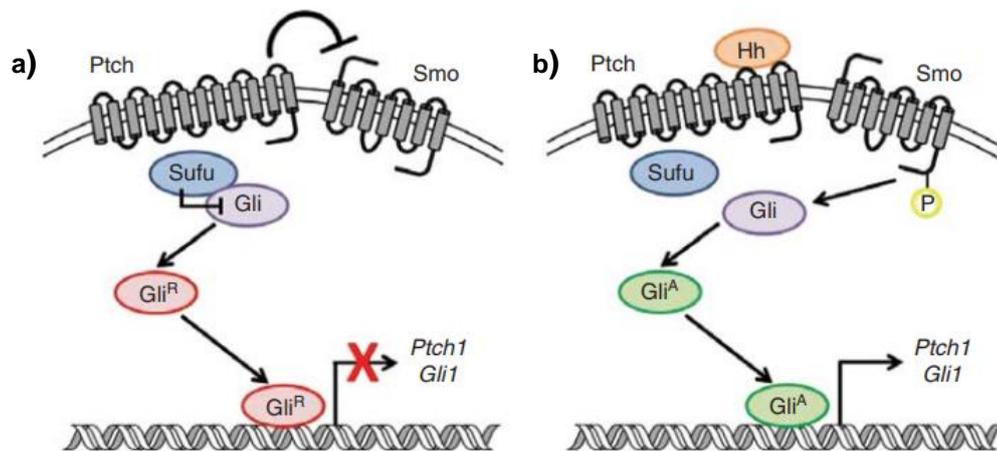
morfológica normal. También, desempeña un papel importante en la organogénesis en múltiples especies, mediando la proliferación y diferenciación celular, la transición epitelio-mesénquima y el reordenamiento celular mediante cambios en la motilidad y adhesión tisular.<sup>12, 15-16</sup> Sin embargo, durante la edad adulta se encuentra activa en el folículo piloso de las células y en células madres, y juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular, la reparación tisular, desarrollo óseo y también se ha sugerido su participación en el desarrollo del sistema hematopoyético.<sup>17-18</sup>

El correcto control de la homeostasis tisular ejercido por SHh se logra regulando el comportamiento y la autorenovación de células madres troncales. Una activación aberrante en esta vía se ha visto implicada en la iniciación de las células madres cancerígenas, las cuales regulan la autorenovación y el potencial tumorigénico<sup>10</sup> contribuyendo a la agresividad del tumor, afectando procesos claves como proliferación, invasión y progresión de células cancerígenas llevando a una amplia variedad de tumores humanos.<sup>19-26</sup> Algunos datos preclínicos sugieren un posible papel regulador de la vía Hh en estas células y en la adquisición de un estado celular más indiferenciado en numerosos tumores como glioblastoma, cáncer de mama, adenocarcinoma de páncreas y colon y diversas neoplasias hematológicas que representan alrededor de un 25 % de todas las muertes por cánceres humanos.<sup>26</sup>

En condiciones normales de embriogénesis y homeostasis, la vía de activación canónica Hh cuenta con un sistema de reconocimiento o recepción de la proteína, el cual está constituido por un receptor proteico de doce dominios transmembrana Ptch que actúa como regulador negativo de la vía, y una proteína de siete dominios transmembrana, Smoothed (Smo), que actúa como regulador positivo de la misma.<sup>27</sup> Por otra lado, Hh se compone de un importante sistema de transducción de la señal, donde destacan los factores transcripcionales Gli en sus isoformas Gli1, Gli2 y

Gli3,<sup>28</sup> la quinasa Fused, el gen supresor tumoral de Fused (Sufu)<sup>29</sup> y diversas proteína quinasas.<sup>29</sup> Todos ellos, se comportan de una forma dinámica en las células donde existen dos posibilidades (Figura 2).

En ausencia de ligando Hh (estado reprimido), Ptch1 reprime la activación del receptor Smo, con el consecuente procesamiento proteolítico de Gli a la isoforma reprimida Gli3 (Gli<sup>R</sup>), que reprime la transcripción de los genes diana de Hh.<sup>28</sup> Por otra parte, en presencia de ligando Hh (estado activado), la unión Hh/Ptch1 produce la activación del co-receptor Smo.<sup>30</sup> Su activación, promueve la disociación del complejo Gli/Sufu lo que resulta en la activación de la proteína Gli1/Gli2 (Gli<sup>A</sup>) la cual se transloca al núcleo y actúa como un activador transcripcional de los genes diana de Hh relacionados con la proliferación celular (Ptch), diferenciación (ciclina D1 y D2, E2F1, N-Myc, Negenin, Hes1, entre otros), la supervivencia celular (BCL-2), la auto-renovación (Bmi1, Nanog, Sox2), angiogénesis (VEGF, Cyr61), la invasividad (Osteopontina) y la apoptosis (Bax, PI3K).<sup>31-33</sup>

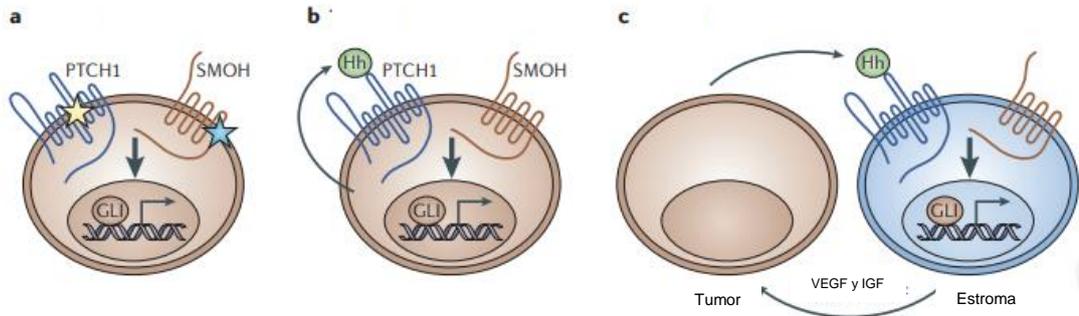


**Figura 2.** Esquema simplificado para la cascada de señalización Hh/Gli. **a)** Represión de la vía en ausencia de ligando Hh donde Ptch reprime a Smo. **b)** Activación de la vía por la presencia del ligando Hh el cual se une a Ptch liberando la represión sobre Smo. Gli: glioma asociado a oncogen; Hh: Hedgehog; Ptch: Patched; Smo: Smoothened. Adaptado de Banrjee U.y col, 2014.<sup>34</sup>

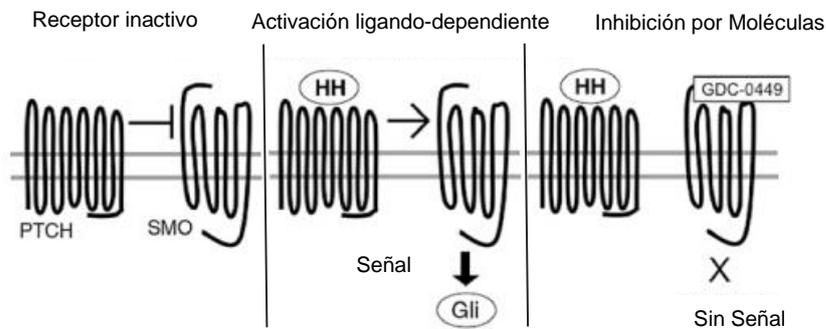
En etapas tempranas del desarrollo como la embriogénesis y en condiciones normales de homeostasis en adultos, existe un balance entre las funciones activadoras y represoras de las proteínas Gli (Gli1, Gli2 y Gli3) las cuales se unen directamente al ADN a través de dominios conocidos como *GBS* (*Gli Binding Sites*, en inglés).<sup>35-36</sup> Este balance se ve influenciado por el gradiente de concentración de la proteína Hh presente en el medio, lo cual parece determinar un programa transcripcional definido de genes que presentan un mecanismo de retroalimentación positiva o negativa de la propia vía.<sup>28, 36</sup> No obstante, una desregulación de la vía Hh en la adultez se ha visto implicada en la generación y promoción de muchos tipos de cánceres. Por ejemplo, el hallazgo de múltiples casos clínicos donde se presenta una mutación de la pérdida de función en el gen del receptor Ptch1 han llevado a una hiperactivación de la vía independiente de su ligando (Figura 3a).<sup>24, 37</sup> Esto ha sido muy bien establecido para el carcinoma de células basales (CCB y CBSN) más conocido como el síndrome de Gorlin (SG)<sup>38-40</sup> que confiere una mutación en Ptch1 o Smo. Otras veces, se presentan mutaciones con ganancia de la función como es el caso del meduloblastoma (MB) por una mutación en Gli y SuFu.<sup>24, 41-42</sup> La gran mayoría de los CCBs y alrededor de un 30 % de los MB, tienen activa la señal Hh ya sea por mutaciones en Ptch1, Smo, Gli o SuFu lo que confiere al tumor propiedades intrínsecas de crecimiento y proliferación.<sup>24, 41</sup>

Si bien el CCB y MB son dos neoplasias en las que las alteraciones en los diferentes componentes de la vía han sido bien establecidas y han generado un mayor conocimiento de la vía de señalización Hh, también han llevado a la idea que moduladores específicos de la vía Hh podrían ser agentes terapéuticos eficaces para algunos tipos de cánceres hereditarios, pero sobre todo, especialmente útiles para aquellos cánceres dependientes de la activación por el ligando Hh<sup>43</sup> y donde no hay mutaciones en ninguno de sus componentes, sino más bien se ha desregulado la comunicación

célula-célula llevando a una activación aberrante de la vía (Figura 3b-c, Figura 4).



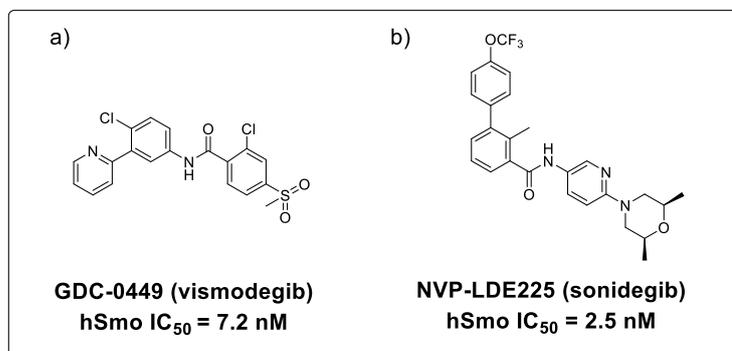
**Figura 3.** Formas de activación aberrantes de la vía Hh en el cáncer. **a)** Activación independiente de ligando Hh, ya sea por pérdidas de la función en Ptch1 o Sufu, por aumento de la función de Smo o por mutaciones en Gli1 y Gli3. La activación dependiente de ligando Hh puede ser del tipo: **b)** Autocrina (activado por la misma célula tumoral). **c)** Paracrina (la célula tumoral activa a una célula cercana normal), asociada a una variedad de cánceres tales como pulmón, colon, mama, estómago y próstata. Paracrina inversa (la célula sana activa a una célula tumoral cercana), presente en la leucemia y linfoma de no Hodgkin. Adaptado de Rubin Lee. y col, 2006.<sup>22</sup>



**Figura 4.** Diagrama de la activación dependiente de ligando de la vía Hh. Los antagonistas de Smo son especialmente útiles en este tipo de activación. Adaptado de Robarge K., 2009.<sup>44</sup>

Es claro que la vía de señalización Hh contribuye a la carcinogénesis en múltiples etapas, tales como la iniciación, crecimiento, mantenimiento, metástasis y recurrencia. Sin embargo, no es la única vía de comunicación célula-célula que puede contribuir al microambiente del tumor.<sup>45</sup> Además, considerando que Smo juega un papel fundamental como andamio central

para la transducción de la señal implicada en la vía Hh y también, es el blanco farmacológico más conocido y abordable para proponer el diseño de nuevos inhibidores sintéticos de la vía de señalización Hh es que diversas compañías farmacéuticas han enfocado su atención en Smo. Es así como vismodegib (GDC-0449, Figura 5a) aparece como el primer inhibidor selectivo de la vía Hh aprobado por la FDA (Erivertex, Genentech, enero 2012) y por la Agencia Europea de Medicamento (EMA) en julio de 2013 para el tratamiento de CCB metastásico.<sup>46</sup> Este fármaco se une y bloquea específicamente a Smo, inhibiendo su translocación a la membrana celular de tal manera que inhibe la proliferación y el crecimiento tumoral en los pacientes expuestos a este tratamiento.<sup>44</sup> Más tarde, en el año 2015 sonidegib (NVP-LDE225, Figura 5b) fue aprobado como alternativa para el BCC en pacientes que presentaron una disminución de la eficacia al tratamiento con vismodegib debido a un mecanismo de resistencia provocado por una mutación de un residuo aminoacídico de ácido aspártico del receptor Smo (D473) por una histidina (D473H) que llevó al rebrote del tumor en estos pacientes.<sup>47-48</sup>



**Figura 5.** Estructuras de antagonistas del receptor Smo aprobados por la FDA el año 2012 y 2015 respectivamente. a) vismodegib, b) sonidegib.

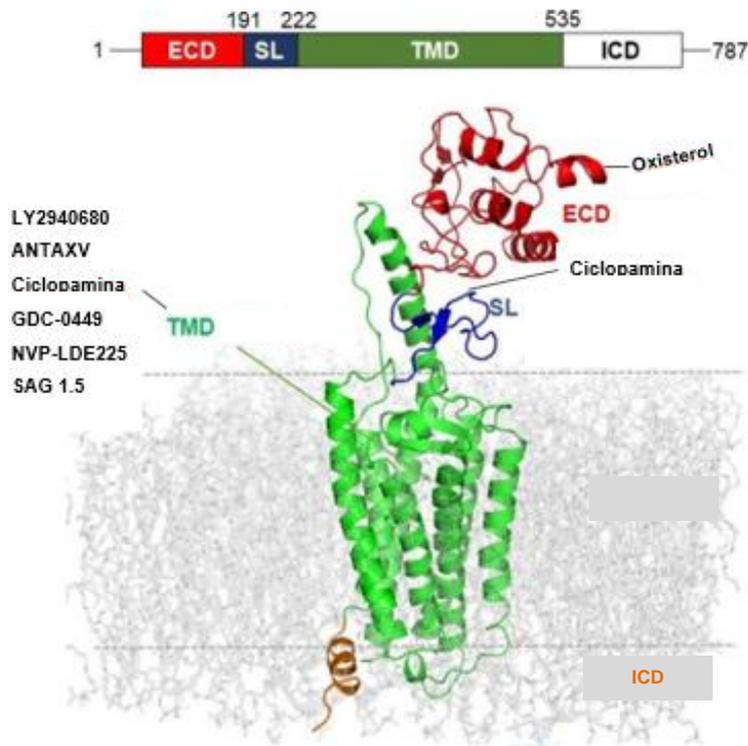
Es por ello, que la búsqueda de nuevos derivados que contemplen diferentes patrones estructurales, con mayor potencia, menores efectos adversos y una mejorada actividad en tumores que presenten ese tipo de mutaciones, podría ser un campo de estudio interesante a modo de

comprender mejor la ruta génica de la vía Hh que aún permanece sin caracterizar en su totalidad y que ha hecho que los esfuerzos por obtener moléculas con alta eficacia y selectividad sean poco exitosos y por tanto, aún permanece como un blanco terapéutico de interés para muchos investigadores.

### 1.3 Receptor Smoothened y características estructurales

Smo se clasifica dentro de la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs).<sup>49</sup> Si bien, sólo presenta un 10 % de identidad de secuencia total con receptores clase A, tales como el receptor de rodopsina o el  $\beta$ 2-adrenérgico ( $\beta$ 2-AR), es en el dominio de siete transmembranas (7TM) donde muestra una alta conservación de las secuencias en las hélices (V, VI Y VII). No obstante, estas hélices carecen de los residuos de prolina P<sup>5.50</sup>, P<sup>6.25</sup> y P<sup>7.50</sup> fundamentales en un GPCR clase A, y en su reemplazo cuenta con residuos de glicina que facilitan la flexibilidad de éstas mismas permitiendo el ensamblaje y los cambios conformacionales durante su activación. Debido a estas diferencias, no es posible clasificarlo en su totalidad como un GPCR clase A, y se ha clasificado como un GPCR clase F, por su alta homología al receptor Frizzled (Fzd) el cual participa en la vía de señalización Wnt.<sup>50-51</sup>

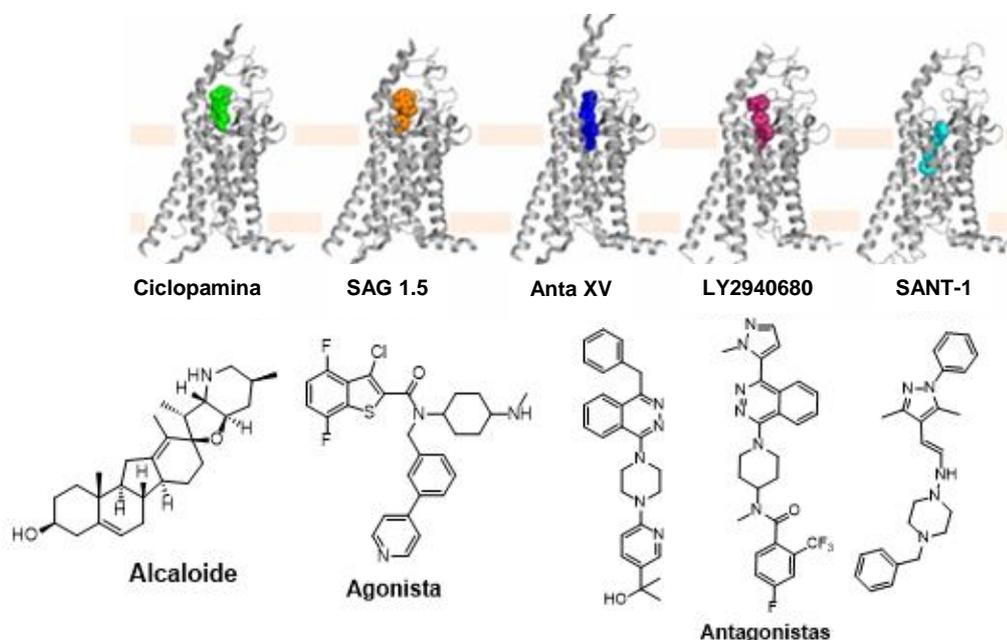
La secuencia completa del receptor hSmo contiene 787 residuos aminoacídicos (*Uniprot Identifier*: Q99835).<sup>52</sup> Sin embargo, las estructuras cristalográficas muestran la mayor parte de estos residuos organizados en cuatro principales dominios que son representados en la Figura 6. (1) Dominio extracelular ECD (residuos 1-191), (2) Dominio de unión pequeño SL (192-222), (3) Dominio siete transmembranas TMD (223-253) y, (4) Dominio intracelular citoplasmático ICD (535-787), siendo TMD el blanco farmacológico más explorado para la mayor parte de moléculas sintéticas reportadas de Hh.



**Figura 6.** Modelo esquemático de Smo. El dominio extracelular ECD, el lazo de unión SL y los dominios TMD e ICD se indican con los colores rojo, azul, verde y naranja respectivamente. Adaptado de Byrne y col.<sup>53</sup>

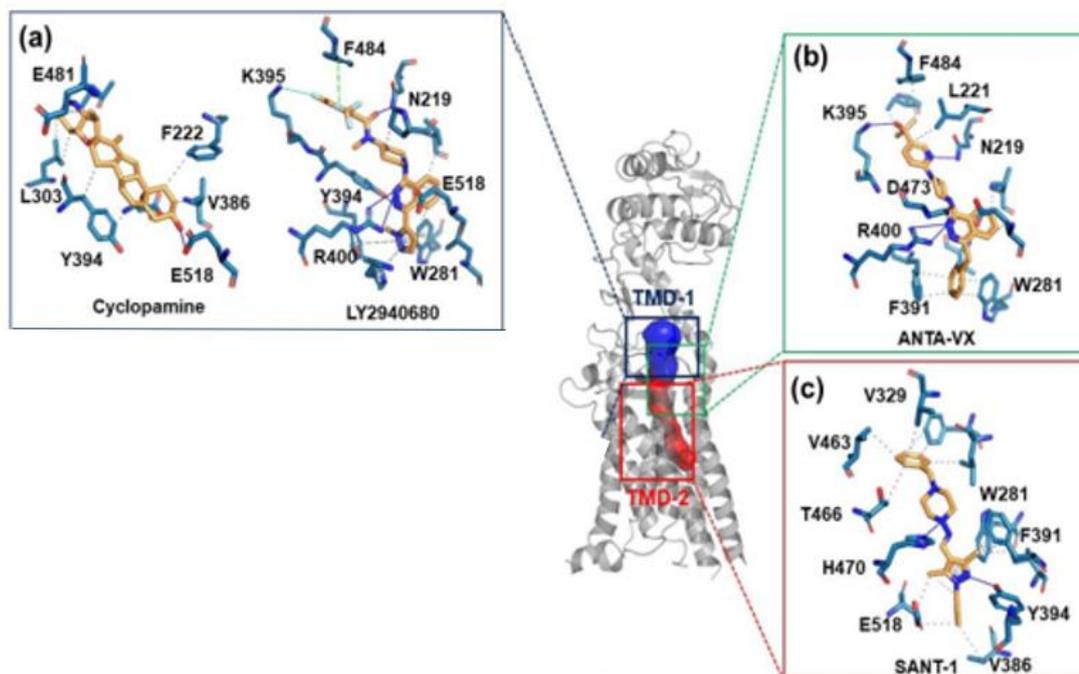
Moléculas sintéticas inhibitoras de Hh que se encuentran en estudios clínicos o bien ya han sido aprobadas como fármacos para el tratamiento de diversas neoplasias, son capaces de unirse a Smo antagonizando su función. Estructuras de rayos X de alta resolución han otorgado información acerca de la estructura cristalográfica de algunos multidominios de hSmo, especialmente de la región transmembrana (7TMD) en complejo con ligandos antagonistas (Figura 7).<sup>51</sup> Esta evidencia cristalográfica permitió conocer que el dominio transmembrana se encuentra subdividido en las porciones denominadas TM1 y TM2. A su vez, TM1 se ubica cercano al dominio extracelular ECD y al ser largo y angosto, facilita que moléculas de baja masa logren unirse y ejercer un efecto antagonista sobre hSmo. En esta cavidad, se alojan la mayoría de los ligandos Smo de importancia clínica reportados hasta el momento, tales como vismodegib, sonidegib, ANTAXV, LY2940680, entre otros.<sup>50</sup> TM2 es el sitio más profundo en el

bolsillo de este receptor, donde se une el antagonista Smo SANT-1.<sup>54</sup> Por su parte, el alcaloide ciclopamina se posiciona entre el dominio extracelular ECD y TM1.<sup>53</sup>



**Figura 7.** Sitios de unión para antagonistas Smo en TM1, ciclopamina, LY2940680 y Anta XV. Sitio de unión del agonista SAG 1.5 en TM1. Sitio de unión del antagonista SANT-1 en TM2. Adaptado de Wang C. 2014.<sup>51</sup>

En la Figura 8 se describen las principales interacciones de los antagonistas Hh con el receptor Smo. LY2940680 fue diseñado para el tratamiento de tumores sólidos.<sup>54</sup> Residuos del dominio TM1 de las hélices I, II V y VII (R400, N219, E518 y F484) interaccionan con LY2940680 mediante interacciones de enlaces de hidrógeno, sin embargo, es la guanidina de R400 presente en la hélice V la que posee una estrecha interacción con el nitrógeno del anillo de ftalazina presente en la estructura de la molécula, sumado a la interacción entre la carboxamida de N219 y el oxígeno del grupo carbonilo de LY2940680 lo que confiere la clave de las uniones de hidrógeno y estabilización de la estructura inactiva de Smo.<sup>51</sup>



**Figura 8.** Representación de los sitios de unión de Smo en TM destacando TM1 y TM2. **a)** Sitios de unión para antagonistas Smo en TM1, ciclopamina, LY2940680. **b)** Sitio de unión del antagonista ANTA XV. **c)** Sitio de unión del antagonista SANT-1. Adaptado de Salas y col.<sup>26</sup>

A pesar de que LY2940680 Y ANTA XV presentan en su estructura un anillo de ftalazina, ambos presentan modos de unión diferentes en el sitio TM1 de Smo. Este hecho se debe principalmente a que el grupo 4-fluoro-2-trifluorometoxifenil de LY2940680 presenta una amplia interacción con el lazo ECL-3 donde participan los aminoácidos K395, W480 y F484 que hacen que el anillo fenilo se posicione en forma apilada para tener una interacción  $\pi$ - $\pi$ . Además, la contribución del enlace de hidrógeno entre el residuo N219 y el grupo carbonilo de LY2940680 permiten que la orientación del anillo de piperidina que es sustituyente del núcleo ftalazina de LY2940680 defina una orientación diferente a ANTA XV en el mismo sitio de unión <sup>51</sup>

Por su parte, el antagonista ciclopamina se une a Smo cerca del dominio extracelular ECD y su amina del grupo 3-metil piperidina se aloja fuera del

bolsillo de unión de los antagonistas, mientras que el grupo 3,  $\beta$ -hidroxilo se aloja más adentro del bolsillo (involucrando los residuos Y394 y E518) y no se han visto implicados aminoácidos que tengan mutaciones que generen alguna resistencia de Smo. Otro antagonista Smo SANT-1, se une inusualmente más profundo en el bolsillo de este receptor (sitio TM2) que LY2940680 ya que el presenta interacciones no polares (residuos H470, F391 y L522) y un enlace de hidrógeno entre Y394 y el anillo fenilo y pirazol de SANT-1 permitiendo un ajuste de la estructura de SANT-1 al bolsillo TM2 de Smo.<sup>51</sup>

La elucidación de 3D-hSmo entrega evidencia de la plasticidad y la habilidad para alojar un amplio rango de moléculas como ligando en sus sitios de unión, permitiendo dilucidar las propiedades estructurales que han sido consideradas en el diseño de nuevas generaciones de antagonistas Smo más seguros y eficaces los cuales están asociados a diversos tipos de cánceres humanos dependientes de la vía Hh.

#### **1.4 Ligandos de Smoothened: del diseño al uso clínico**

El primer indicio de moléculas que podrían bloquear la vía Hh se demostró con el descubrimiento de la ciclopamina,<sup>55</sup> un alcaloide esteroideo aislado de la planta *Veratrum californicum*.<sup>56</sup> Defectos congénitos encontrados en críos de oveja que ingerían la planta durante su periodo de gestación estaban caracterizados por la ausencia de estructuras faciales de la línea media y prosencéfalo no dividido (holoprosencefalia) dejando un aspecto de cíclope en los recién nacidos por lo cual fue atribuido el nombre de ciclopamina.<sup>57</sup> A bajas concentraciones ( $\leq 10$  mmol/L), esta molécula tiene la capacidad de unirse específicamente al receptor Smo con un  $IC_{50}$  de 300 nM<sup>26</sup> y bloquear la expresión de los genes de la vía Hh mientras que a concentraciones mayores conduce directamente a la muerte celular antes de que los genes sean expresados. El hecho de presentar alta complejidad estructural, escasa afinidad a altas concentraciones, reducida estabilidad

química en medio ácido, y baja biodisponibilidad oral<sup>58</sup>, ha llevado a la búsqueda de otros derivados sintéticos y semisintéticos con estructura química diferente y con un potencial de administración por vía oral.<sup>59-60</sup>

El descubrimiento de ciclopamina condujo a iniciar la primera búsqueda de antagonistas de la vía de señalización Hh. El uso de ensayos de genes reporteros específicos de la vía (Gli-luciferasa) fue crítico para permitir la identificación de inhibidores potentes y selectivos a través de la medición óptica de la disminución de la señal de luciferina como función de la concentración del compuesto inhibidor para generar valores de IC<sub>50</sub> y así poder sustentar un estudio de estructura actividad.

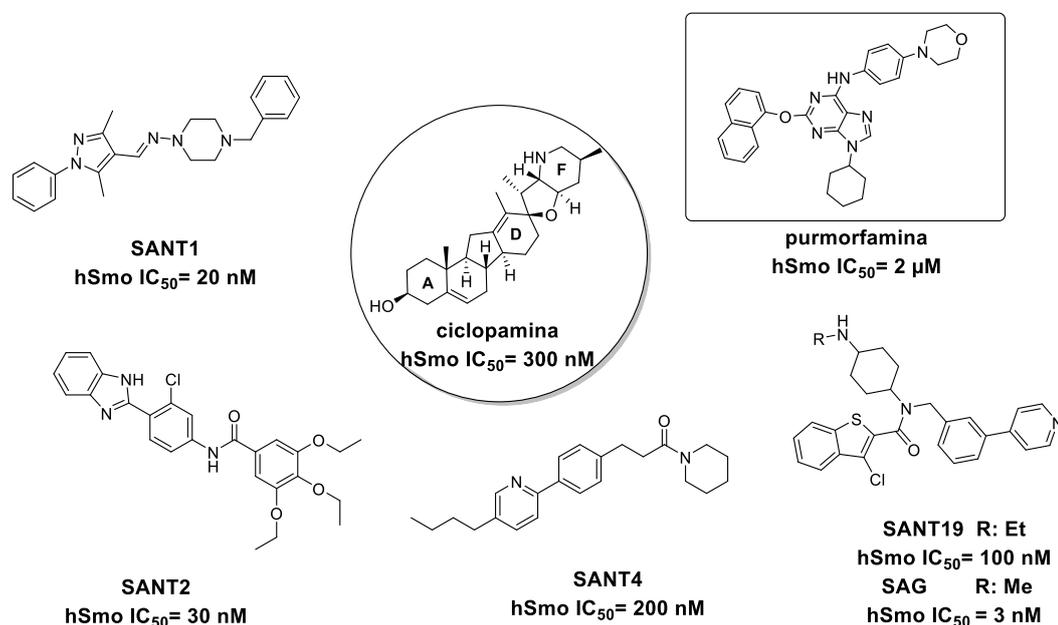
De acuerdo con lo anterior, la primera molécula candidata a inhibir Hh fue un compuesto denominado benzimidazol **I** que a pesar de tener una potencia submicromolar en ensayos de Gli-luciferasa presentó limitaciones como un potencial candidato inhibidor de Hh (Figura 9).<sup>61</sup> De esta manera, reemplazos en el anillo A del benzimidazol **I** por un sustituyente con un aceptor de enlace de hidrógeno como el grupo 2-piridinil presentaron mejor potencia y propiedades de biodisponibilidad que los que no lo tenían (**II**). Modificaciones en el anillo B llevaron a una pérdida de la actividad. El anillo C que contenía la función amida fue ampliamente modificado sugiriendo que la presencia del grupo sulfonilo en la posición 4 del anillo de benceno otorga interacciones de Van der Waals con Smo y que en conjunto con los grupos cloro y metilo fuerzan a la molécula a adoptar una conformación más plana aumentando su potencia y unión con Smo (**IV**). Es así como se obtuvo el candidato líder **V**, GDC-0449 (posteriormente llamado vismodegib, erivedge®) con una potencia submicromolar análoga a su precursor benzimidazol **I**, pero con una mejor biodisponibilidad oral.<sup>61</sup>



Los derivados esteroidales análogos a ciclopamina no han sido un blanco atractivo de estudio debido a la dificultad sintética para obtenerlos y su escasa citotoxicidad en líneas celulares de modelos tumorales. Por este motivo, los esfuerzos se han enfocado en el diseño de nuevas moléculas sintéticas inhibitoras de Smo con una estructura diferente a ciclopamina y que sean capaces de mejorar estas propiedades.<sup>64</sup>

#### 1.4.1 Andamio de compuestos no análogos a ciclopamina

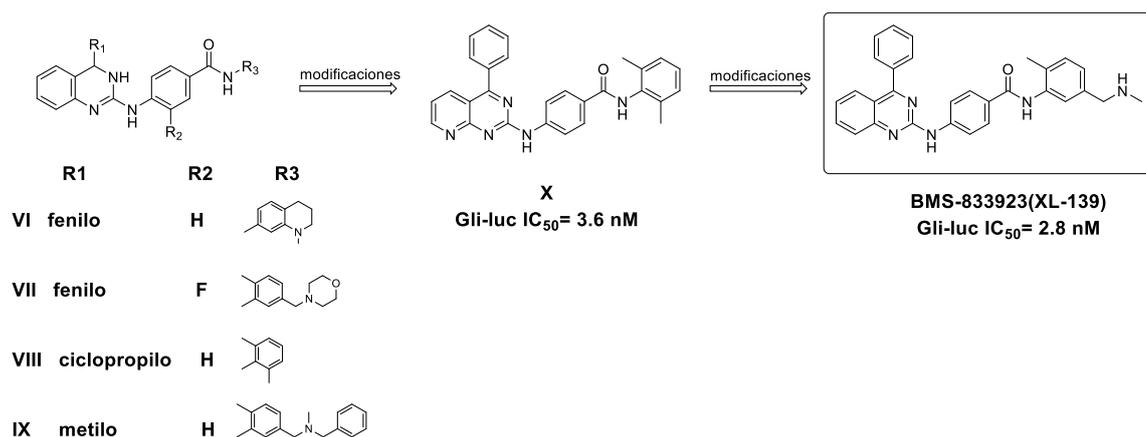
Los compuestos SANT1, SANT2, SANT4 y SANT19 fueron sintetizados en un tamizaje de 10.000 moléculas sintéticas con características de potenciales inhibidores Hh. Dentro de ellas, SANT1 es el que mostró ser más potente con un  $IC_{50}$  de 20 nM. A raíz de estas estructuras se logró reconocer a SAG y purmorfamina (que contiene el heterociclo purina) como agonistas Hh con afinidad por Smo (Figura 10).<sup>34</sup>



**Figura 10.** Estructuras químicas de los primeros ligandos de Smo: ciclopamina y SANT19 (antagonistas) y purmorfamina y SAG (agonistas) descubiertos mediante un tamizaje con un gen reportero Shh. Modificado de Mahindroo N, 2009.<sup>65</sup>

### 1.4.2 Quinazolininas

La compañía de descubrimiento de fármacos Exelixis ha descrito las quinazolininas (**VI-IX**) y la piridopirimidina **X** (Figura 11). El análogo con tetrahydro quinolina **VI** exhibe un  $IC_{50}$  de 5.8 nM en ensayos de genes reporteros utilizando la línea celular Shh LIGHT II.<sup>66</sup> El compuesto **VIII** con un sustituyente ciclopropilo fue más potente ( $IC_{50}$ : 3.6 nM) y el reemplazo de la quinazolinina por piridopirimidina llevó a una actividad similar (compuesto **X**). Es así como investigadores de las compañías Exelixis y de Bristol-Myers Squibb identificaron el compuesto XL139/BMS-833923 que actualmente se encuentra en estudios clínicos fase II para el tratamiento del cáncer de ovario ( $IC_{50}$ : 2.8 nM).<sup>65</sup>



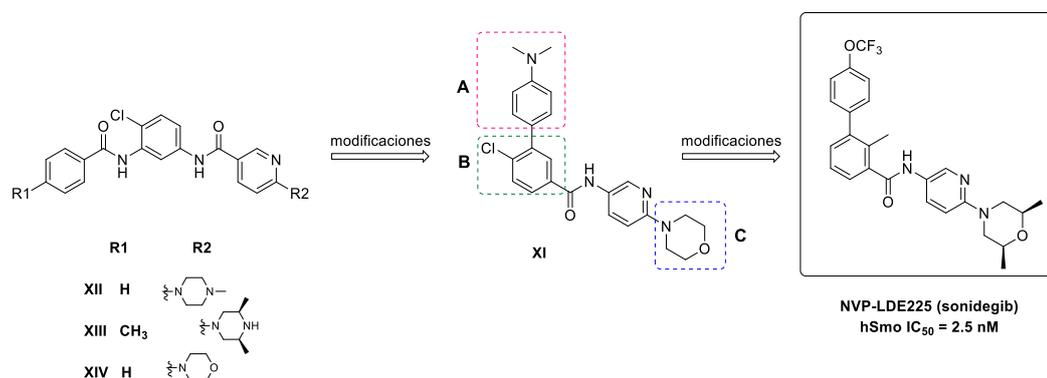
**Figura 11.** Estructuras de quinazolininas. Destaca el compuesto BMS-833923/XL139. Modificado de Mahindroo N, 2009.<sup>65</sup>

### 1.4.3 Biarilcarboxamidas y Bisamidas

Peukert y col. de Novartis a través de un tamizaje de compuestos utilizando ensayos de genes reportero, identificaron una serie de biarilcarboxamidas, tal como **XI**<sup>65</sup> y bisamidas estructuralmente similares **XII-XIV** como compuestos bases para nuevos antagonistas Smo (Figura 12). Para ello,

se realizó un estudio de estructura-actividad donde se observó que grupos como metilpiperazina (**XII**), dimetilpiperazina (**XIII**) y morfolina (**XIV**) aumentaron la potencia antagonista sobre Smo. Además, tomando en cuenta el compuesto líder **XI** se estableció que el grupo *cis*-dimetilo del anillo de morfolina (región C) aumentó la actividad. También, grupos hidrofóbicos pequeños como metilo en la región B, especialmente en la posición 2 del anillo de benceno aumentaron la actividad.

Considerando todos los cambios estructurales de la región B y C y sumado al reemplazo de un OCF<sub>3</sub> en posición 4 de la región A, se logró obtener el compuesto líder NVP-LDE225 (Sonidegib) que inhibe a hSmo con un valor de IC<sub>50</sub> de 2.5 nM en ensayos de unión BODIPY-ciclopamina. Sonidegib fue aprobado por la FDA el año 2015 para el tratamiento local del BCC.

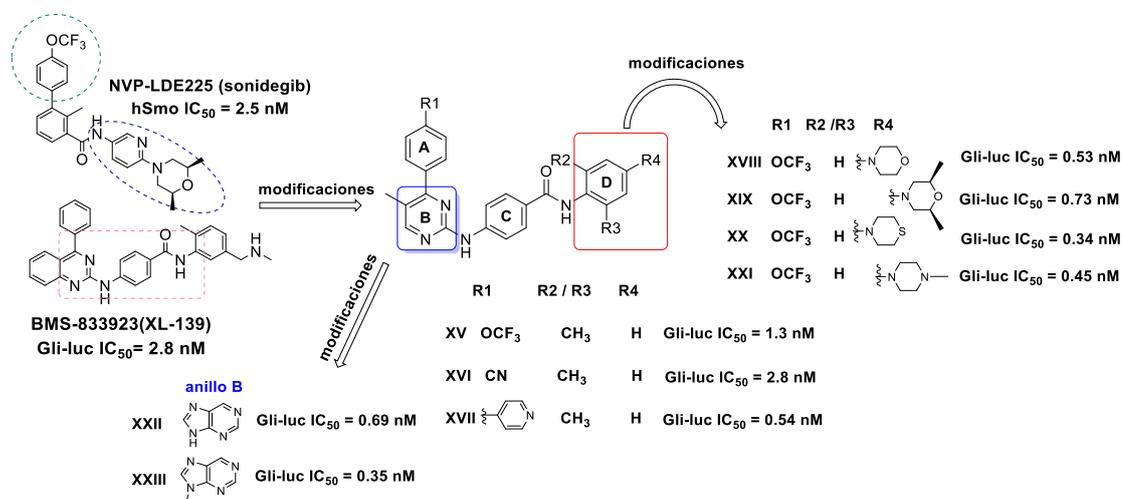


**Figura 12.** Estructuras de biarilcarboxamidas y bisamidas. Destaca el compuesto NVP-LDE225 (Sonidegib). Modificado de Mahindroo N, 2009.<sup>65</sup>

#### 1.4.4 Otras moléculas sintéticas como potentes inhibidores de Hh

A través de la combinación de estrategias que dieron lugar a moléculas sintéticas aprobadas por la FDA tales como NVP-LDE225 y BMS-833923 y mediante estudios de estructura-actividad a través de ensayos de genes

reporteros de luciferasa (Gli-luciferasa), fueron capaces de reportar el compuesto líder **XV** (Figura 13).<sup>67</sup>



**Figura 13.** Moléculas sintéticas que han llevado al desarrollo de potentes inhibidores de la vía Hh. Modificado de Xin M. y col , 2013-2014.<sup>67-68</sup>

Como se muestra en la Figura 13 por modificaciones en R1 del anillo A, se observó que el grupo fenilo tolera bien grupos atractores de electrones en posición 4 tales como trifluorometoxi **XV** (IC<sub>50</sub>:1.3 nM) ciano **XVI** (IC<sub>50</sub>:2.8 nM) y piridinilo **XVII** (IC<sub>50</sub>:0.54 nM). Además, el anillo C que contempla el grupo 4-[N-(2-pirimidilamino)] benzamida mostró ser esencial para la actividad y la eliminación de la función benzamida llevó a la pérdida total de la actividad. Funcionalizar el anillo D con grupos hidrofílicos básicos llevó a compuestos con buena actividad sobre la vía Hh y además con mejores propiedades de solubilidad que **XV** y **XVI**. De esta manera, en un trabajo posterior<sup>68</sup> se sugirió que compuestos que contenían sobre el anillo D aminas cíclicas alifáticas tales como morfolina (**XVIII**), dimetilmorfolina (**XIX**), tiomorfolina (**XX**) y N-metil piperazina (**XXI**) presentaron entre 7 y 20 veces mayor actividad Hh que el compuesto líder **XV**.

El grupo de investigación de Zhang L.<sup>69</sup> exploraron el efecto que tendría la ciclación del anillo B de pirimidina del compuesto **XV** con anillos de 5

miembros fusionados tales como purinas, pirrolopirimidinas, tienopirimidinas y fuopirimidinas. Compuestos que tenían el anillo de purina y que fueron funcionalizadas en D con grupos tales como morfolino (XXII) y metilpiperazina presentaron un aumento de la actividad alrededor de 2 veces con respecto a XV. De la misma manera, al sustituir en N9 del anillo de purina con un grupo metilo (XXIII) llevo a compuestos de 3 a 300 veces más potentes que el mismo anillo sin sustitución, indicando que el heterociclo purina podría ser un buen candidato a la hora de apunta a la obtención de antagonistas Smo. Heterociclos como tienopirimidinas y fuopirimidinas también presentaron buena actividad en estos ensayos.<sup>67-68</sup>

#### 1.4.5 Purinas como heterociclo central y andamiaje privilegiado

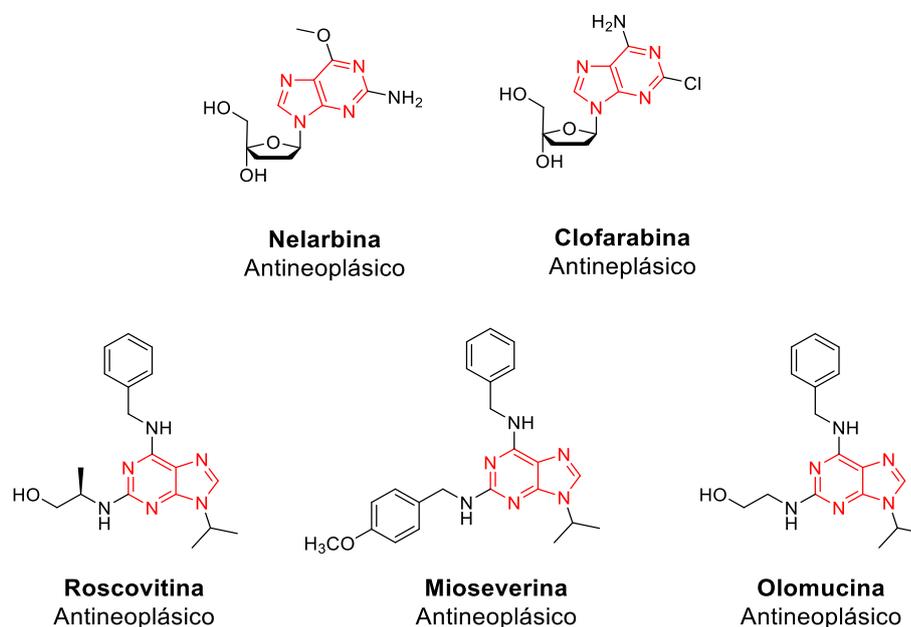
Dentro de la búsqueda de nuevos compuestos con potencia antagonista del receptor Smo y en el ámbito de la Química Medicinal es fundamental explorar y tener una comprensión de la relación estructura-actividad (SAR) y estrategias de diseño basadas en fragmentos de moléculas que han presentado ser antagonistas de Smo,<sup>70</sup> o de aquellas que se encuentran bajo estudios clínicos y preclínicos como inhibidores de esta vía de señalización.

Desde un punto de vista químico, la mayoría de los fármacos anticancerosos sintéticos conocidos son compuestos heterocíclicos en su mayoría nitrogenados<sup>71-73</sup>. Este hecho se observa en las estructuras químicas de algunos medicamentos contra el cáncer aprobados por la FDA el 2017 que comparten un andamio heterocíclico común de purina<sup>74-75</sup> (Figura 14) y ejercen su actividad mediante la inhibición de proteínas quinasas. El anillo de purina que es considerado un “andamio privilegiado”<sup>76-77</sup> en química medicinal por lo que en último tiempo, se han tenido reportes de diversos derivados de purinas con actividad antitumoral<sup>78-79</sup> y de muchos otros compuestos con elevado valor biomédico y terapéutico<sup>80</sup> tales como agentes antibacterianos,

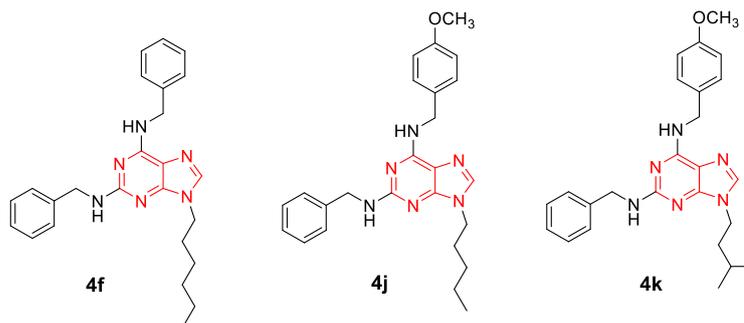
antiparasitarios, antivirales (6-metoxipurina arabinósido) y antitumorales (nelarbina, clofarabina, mioseverina, olomucina y roscovitina).<sup>80-84</sup>

Basados en las estructuras de mioseverina y roscovitina, Salas y col. reportaron una serie de purinas 2,6,9 trisustituidas análogos a estos antineoplásicos como potenciales compuestos que inducen citotoxicidad en líneas celulares neoplásicas de pulmón y colon (Figura 15).<sup>85</sup> Tres de los compuestos sintetizados mostraron tener una alta potencia citotóxica en líneas celulares neoplásicas de pulmón y de colon y fueron selectivos por las líneas neoplásicas versus las células no neoplásicas VERO.

Gracias a esta información, se ha podido indagar y tener un mayor conocimiento tanto en la química de las purinas como en la citotoxicidad de estos compuestos frente a líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas.



**Figura 14.** Principales estructuras químicas de purinas antitumorales y compuestos antineoplásicos aprobados por la FDA.

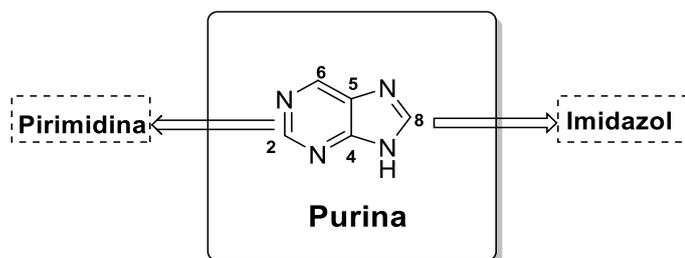


Compuesto	H1975 IC <sub>50</sub> (μM)	IS	HCT116 IC <sub>50</sub> (μM)	IS	VERO IC <sub>50</sub> (μM)
4f	9.9 ± 0.18	2.6	3.0 ± 0.12	8.7	26 ± 0.12
4j	2.3 ± 0.13	11.3	8.0 ± 0.21	3.3	26 ± 0.18
4k	5.6 ± 0.23	6.1	11 ± 0.26	3.1	34 ± 0.13

**Figura 15.** Citotoxicidad *in vitro* realizada mediante el ensayo de MTT para los compuestos **4f**, **4j** y **4k** en dos líneas celulares neoplásicas de pulmón (H1975) y colon (HCT116) y una línea celular no neoplásica (VERO). Los valores de IC<sub>50</sub> e índice de selectividad (IS) fueron determinados en tres experimentos independientes realizados por triplicado.

### 1.5 Características químicas de las purinas

Los aspectos relacionados con la reactividad de las purinas pueden explicarse en términos relativamente simples si existe una comprensión de la naturaleza química de este sistema heterocíclico. El núcleo de purina se compone de dos anillos, uno de pirimidina (1,3-diazina) y otro de imidazol (1*H*-1,3-diazol). Por una parte, el anillo de pirimidina debido al efecto de localización de los electrones por parte de los dos nitrógenos es considerado un sistema π-deficiente. Por su parte, el anillo de imidazol contiene un enlace simple y uno doble en los átomos de nitrógenos conformando un sistema con exceso de electrones. La distribución electrónica total de la purina no sustituida es producida por un intercambio de los electrones π del anillo de imidazol con el anillo de pirimidina<sup>86</sup> (Figura 16).



**Figura 16.** Heterociclo purina generado a partir de la fusión de los anillos de pirimidina e imidazol.

### 1.5.1 Carácter electrofílico de los átomos de carbono 2, 6 y 8 del anillo de purina.

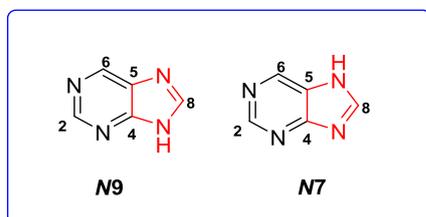
Como consecuencia de la distribución de electrones  $\pi$  alrededor de los átomos de nitrógeno del anillo, los átomos de carbono adyacentes a estos muestran un grado pronunciado de carácter electrofílico. De esta manera, puede ocurrir en ellos una sustitución nucleofílica que estaría gobernada por el estado de ionización de la molécula al momento del ataque.

Con la unión de los anillos de pirimidina e imidazol el C8 se encuentra más deficiente de electrones que los C6 y C2. Debido a esto, el orden creciente de electrofilia contempla al  $C8 > C6 > C2$ . No obstante, la pérdida del protón del imidazol por el tratamiento con una base fuerte lleva a la formación de su anión y al consecuente aumento en el carácter electronegativo del anillo. Como consecuencia de ello el ataque nucleofílico es dirigido hacia el anillo de pirimidina generando un nuevo orden de electrofilia  $C6 > C2 > C8$ .<sup>87</sup>

### 1.5.2 Tautomería del anillo de imidazol.

Por las características ácidas del *NH* libre de anillo de imidazol y el carácter básico del otro nitrógeno de este mismo anillo es que este sistema se encuentra en un equilibrio ácido-base generando la correspondiente

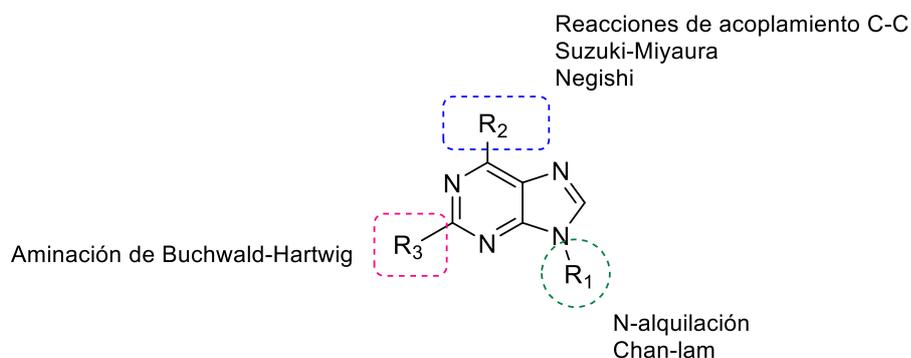
tautomería. De esta manera, el anillo de purina puede sufrir tanto una *N9* como *N7* alquilación (Figura 17).



**Figura 17.** Tautomería del anillo de purina en los nitrógenos *N7* y *N9*.

### 1.5.3 Reacciones químicas sobre el anillo de purina.

Las reacciones más utilizadas al momento del diseño de moléculas inhibitoras de la vía de señalización Hh y que presenten una funcionalización en el anillo de purina son representadas en la Figura 18. Muchas de estas reacciones serán detalladas más adelante en este manuscrito.



**Figura 18.** Principales reacciones sobre el anillo de purinas que han llevado a compuestos bioactivos e inhibidores de Hh. La *N*-alquilación del nitrógeno 7 o 9 podría ocurrir mediante una *N*-alquilación<sup>69</sup> o una reacción de Chan-Lam<sup>88</sup>. El acoplamiento C-C en el carbono 6 del anillo de purina podría ocurrir través de un acoplamiento catalizado por metales como en la reacción de Suzuki-Miyaura<sup>89</sup> y de Negishi.<sup>90</sup> Finalmente, la sustitución en el C2 podría ocurrir mediante una aminación de Buchwald-Hartwig<sup>67</sup>.

## **CAPITULO II: HIPÓTESIS**

El diseño y la síntesis de nuevos derivados de purinas 2,6,9 tri-sustituidas permite obtener compuestos citotóxicos y selectivos en líneas celulares neoplásicas de pulmón y de colon y, que además son capaces de inhibir la vía de transducción Hedgehog al antagonizar al receptor Smoothened.

## INVESTIGACIÓN PROPUESTA

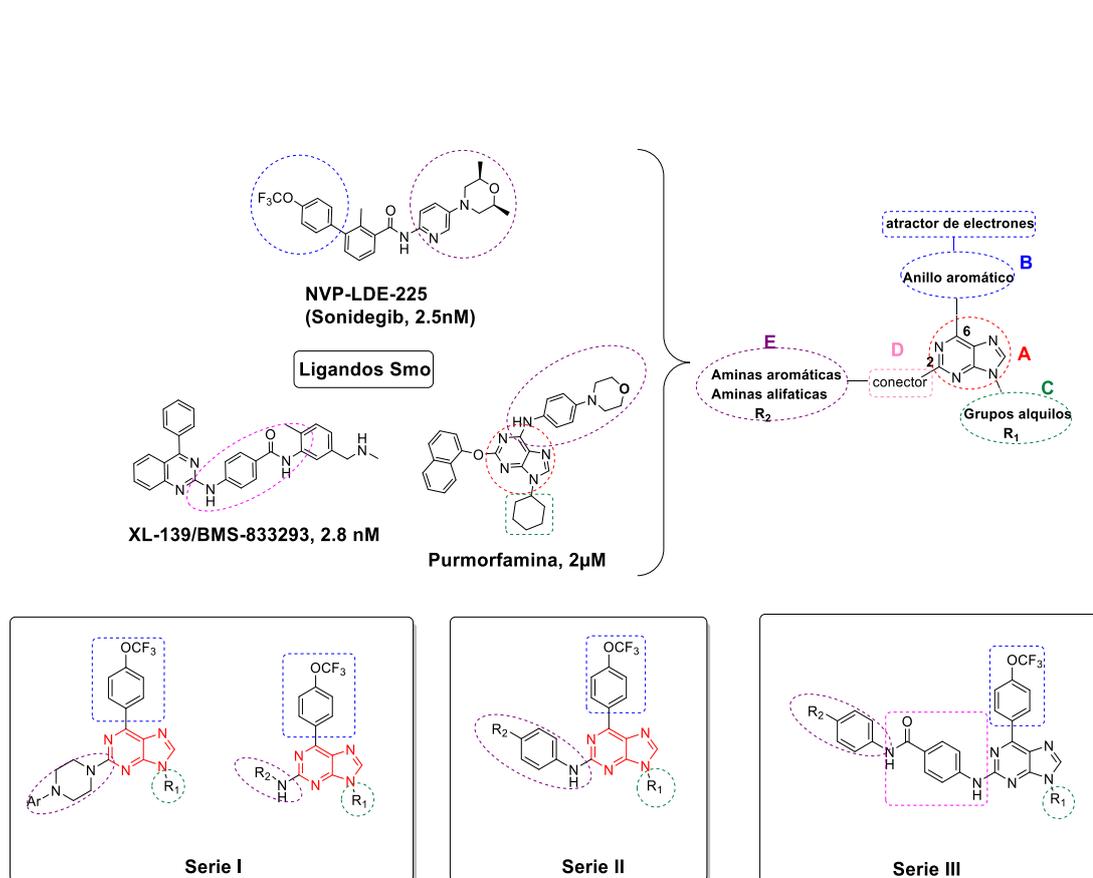
Debido a todos los antecedentes recaudados en el Capítulo I y considerando las estructuras químicas de ligandos de Smo y trabajos previos de nuestro grupo de laboratorio donde se consideran derivados de purinas con propiedades citotóxicas,<sup>85</sup> en esta tesis doctoral se propone el diseño, síntesis, estudios de acoplamiento molecular y evaluación biológica de nuevos antagonistas Smo, derivados de purinas 2,6,9-trisustituidas esquematizados como serie I, serie II y serie III.

El diseño de los compuestos propuestos para cada serie mencionada proviene del análisis estructural de algunos ligandos de Smo, lo cual permitió por medio de la estrategia de diseño basado en estructuras (Esquema 1) desprender lo siguiente:

- i) Para los compuestos de las tres Series. El fragmento A, corresponde al heterociclo de purina, y su elección se basa en el hecho de que derivados de purinas trisustituidas son citotóxicos y selectivos en células neoplásicas de cáncer de pulmón y de colon.
- ii) El fragmento B, presente en las tres series debe contener una porción aromática, la cual se ha visto implicada en ejercer interacciones de Van der Waals, o interacciones  $\pi$  con Smo especialmente cuando esta sustituido por el grupo 4-trifluorometoxifenilo que se encuentra presente en algunas estructuras bajo estudios clínicos como sonidegib.
- iii) El fragmento C (R<sub>1</sub>) se compone de diferentes grupos alquílicos unidos al anillo A. Se pretende estudiar el efecto que tendría la extensión de la cadena alquílica en la N9 sustitución de la purina sobre diversas actividades biológicas de interés.
- iv) El fragmento E (R<sub>2</sub>) será sustituido por diversas aminas alifáticas o alicíclicas en la serie I y aminas aromáticas unidas a una porción análoga a morfolina en las series II y III. Con estos diferentes patrones de unión al C2 del núcleo de purina, se pretende reconocer la mejor funcionalidad del

tipo nitrogenado en términos de extensión y naturaleza que pudiesen determinar un incremento en la actividad biológica.

v) Finalmente el conector D se encuentra ausente en las series I y II y presente a través de una porción benzamida en la serie III (al igual que en XL-139), el cual ejerce una interacción clave de puente de hidrógeno entre la función carbonilo y el residuo N219 de Smo. Se pretende determinar la contribución del conector en la actividad biológica de estos derivados.



**Esquema 1.** Estructuras químicas generales propuestas para los compuestos de las series I-III como nuevos antagonistas de Smo.

## **CAPITULO III: OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

Diseñar, sintetizar, realizar estudios de acoplamiento molecular y ensayos biológicos de algunas purinas 2,6,9 tri-sustituidas para determinar si la inhibición de la vía de señalización Hedhehog sería a través del antagonismo del receptor Smoothened.

### **3.2 Objetivos Específicos**

#### **3.2.1 Objetivos Sintéticos**

1. Sintetizar compuestos correspondientes a las series I, II y III pertenecientes a la familia de derivados de purinas 2,6,9-trisustituidas.
2. Optimizar las reacciones claves de la síntesis de cada familia de compuestos, a través del uso de técnicas convencionales y no convencionales, con el fin de disminuir los tiempos y aumentar el rendimiento de las reacciones.
3. Caracterizar los intermediarios y compuestos finales mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

#### **3.2.2 Objetivos Biológicos**

1. Realizar ensayos de viabilidad celular por reducción de MTT en líneas celulares comerciales neoplásicas de pulmón (H1975), colon (HCT116 y HT29) y meduloblastoma (DAOY), y compararlas con células no neoplásicas HEK293 para evaluar el efecto citotóxico de los compuestos ( $IC_{50}$ ) y obtener sus índices de selectividad (IS).

2. Llevar a cabo estudios mediante citometría de flujo (FC) para determinar:
  - a) Ensayo del tipo de muerte celular (necrosis vs apoptosis) utilizando los marcadores Anexina-V FITC y yoduro de propidio (PI). Este ensayo realizado para los compuestos que presentaron una elevada potencia de citotoxicidad por MTT.
  - b) Efectos sobre la proliferación celular para el (los) mejores candidatos utilizando como marcador la sonda fluorescente CFSE.
3. Evaluar la capacidad de los compuestos sintetizados como inhibidores de la vía Hedgehog mediante un conjunto de ensayos funcionales:
  - a) Evaluación de la capacidad antagonista sobre el receptor Smo mediante ensayos de unión a través del desplazamiento de BODIPY-ciclopamina.
  - b) Ensayo de gen reportero de luciferasa (Gli-luciferasa).
  - c) Determinación de cambios en la expresión de genes a través del ensayo de la transcriptasa reversa a tiempo real (qRT-PCR) para algunos mediadores involucrados en la vía de señalización Hh tales como Gli1, Ptch1 y HHIP.

### **3.2.3 Objetivo Bioinformático**

Estudiar el modo de unión de los mejores candidatos por medio del acoplamiento molecular en la porción transmembrana de un cristal de Smo y compararlo con la droga control vismodegib.

## **CAPÍTULO IV: SECCIÓN EXPERIMENTAL**

### **4.1 Metodología Sintética**

#### **4.1.2 Aspectos generales de la etapa sintética**

Los disolventes utilizados para la obtención de las moléculas finales fueron de grado analítico.

La eliminación de los disolventes se realizó mediante destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio.

El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina (CCF) sobre un soporte de aluminio de 0.2 mm de espesor con gel de sílica 60 254 PF y el análisis se realizó por la visualización con una lámpara de UV con emisión a 254 y 365 nm.

La purificación y separación de los productos de las reacciones se realizó mediante las siguientes técnicas:

- I. Cromatografía en columna por gravedad con gel de sílice tipo 60G de tamaño de partícula 70-230 mallas del proveedor Merck como fase estacionaria y la fase móvil según se especifica en cada caso.
- II. Cromatografía en gel de sílica de yeso de 60 245 PF de 2.5 kg calidad Merck.

Los puntos de fusión (p.f) fueron determinados en un aparato modelo Stuart Scientific SMP3, no se encuentran corregidos y se expresan en grados Celsius (°C).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron obtenidos en un equipo Bruker modelo Avance 400 (400 MHz canal <sup>1</sup>H y 100.1 MHz

$^{13}\text{C}$ , DEPT, bidimensional y  $^{19}\text{F}$ ) con un procesador multinúcleo en cloroformo deuterado salvo que se indique lo contrario.

Los desplazamientos químicos se expresan en  $\delta$  ppm referidos a la señal de  $\text{CDCl}_3$  respecto al tetrametilsilano (TMS) usado como referencia. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresa según alfabeto (s: singulete, sa: singulete ancho, d: doblete, dd: doble doblete, t: triplete, q: cuadruplete, m: multiplete bs.: señal difusa). La región de interés para confirmar la obtención de los productos está definida entre 0.5 -10 ppm en eje  $^1\text{H}$  y 0 - 210 ppm en eje carbono  $^{13}\text{C}$ .

Los espectros de masa se midieron con un espectrómetro de masa de alta resolución Exactive Plus Orbitrap, Thermofisher Scientific (Bremen, Alemania)

Los microanálisis elementales fueron realizados en un analizador FISON EA 1108 CHNS-O.

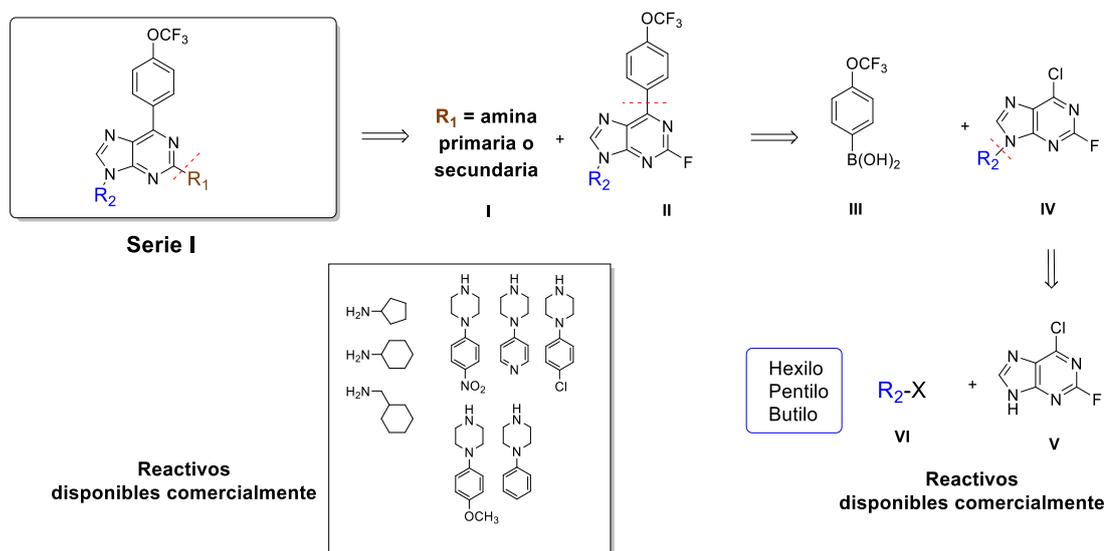
#### 4.1.3 Análisis retrosintético para los derivados de las series I-III

Para acceder a los derivados de las series I-III de purinas 2,6,9-trisustituidas se plantearon los análisis retrosintéticos representados en los Esquemas 2 y 3 para cada una de las series.

- Derivados de la **serie I**

A través del análisis retrosintético del Esquema 2, los derivados de la serie I podrían ser obtenidos mediante una desconexión entre el enlace carbono-nitrógeno a partir de sus equivalentes sintéticos precursores aminas comerciales I ( $\text{R}_1$ ) y la purina 6,9-disustituida II. A su vez, II se formaría por una escisión del enlace carbono-carbono que proviene de la fragmentación

entre el ácido fenil borónico comercial **III** y la purina 9-sustituida **IV**. Esta última podría generarse mediante la desconexión del enlace carbono-nitrógeno provenientes de haluros de alquilo **VI** y la 2-fluoro-6-cloropurina **V**.



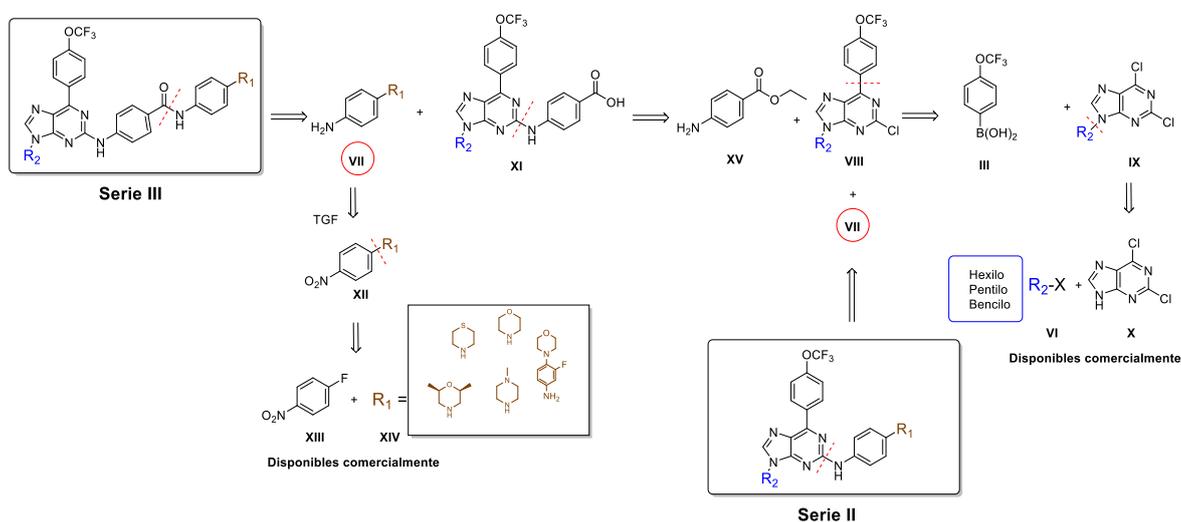
**Esquema 2.** Análisis retrosintético para la obtención de los derivados de purinas de la serie I.

- Derivados de las **series II y III**

A través del análisis retrosintético del Esquema 3, los derivados de la serie **II** podrían ser obtenidos mediante una desconexión entre el enlace carbono-nitrógeno a partir de sus equivalentes sintéticos precursores la purina 6,9-disustituida **VIII** y diferentes anilinas sustituidas **VII**, las cuales son generadas por una transformación de grupo funcional a partir de su precursor nitroderivado **XII**, el cual se obtendría por una desconexión del enlace carbono-nitrógeno a partir de diferentes aminas cíclicas **XIV** y *p*-fluoronitrobenzenceno **XIII**. El fragmento **VIII** se obtiene por una desconexión del enlace-carbono-carbono a partir de sus equivalentes sintéticos ácido trifluorofenilborónico **III** y la correspondiente purina 9-sustituida **IX**. Finalmente, **IX** sería factible de obtener mediante la desconexión del enlace

carbono-nitrógeno provenientes de la 2,6-dicloropurina **X** y los haluros de alquilo **VI**.

Los derivados de la serie **III** podrían ser obtenidos mediante una desconexión de la función amida a partir de sus equivalentes sintéticos precusores la purina 2,6,9-disustituida **XI** y diferentes anilinas sustituidas **VII**, las cuales son obtenidas de la misma manera que en el en la serie **II**. El fragmento **XI** se obtiene por una desconexión del enlace carbono-nitrógeno a partir de sus equivalentes sintéticos *p*-aminobenzoato de etilo **XV** y la correspondiente purina 6,9-disustituida **VIII**. Las desconexiones posteriores son planteadas de la misma manera que en la serie **II**.



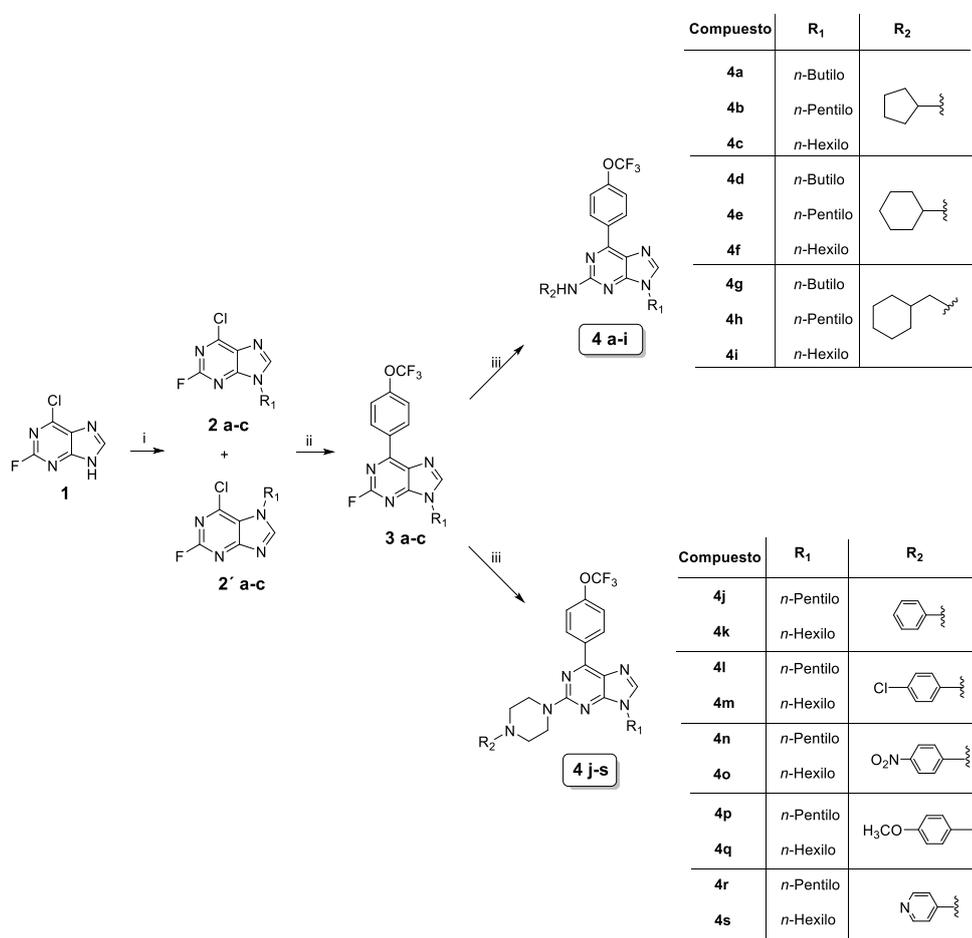
**Esquema 3.** Análisis retrosintético para la obtención de los derivados de purinas de las series **II** y **III**.

#### 4.1.4 Metodología sintética para los derivados de las series I-III.

A partir de la metodología descrita en los análisis retrosintéticos y una vez analizados los equivalentes sintéticos en cada etapa de desconexión de las moléculas objetivo, se propone una ruta sintética a través de reacciones de química orgánica convencional para la obtención de 49 nuevos derivados de purinas 2,6,9-trisustituidas representados en los Esquemas 4 y 5.

- Derivados de la **serie I**

El Esquema 4, correspondiente a la serie **I** de las moléculas objetivo, se inicia con la 2-fluoro-6-cloropurina comercial **1**, la cual fue *N*<sup>9</sup>-alquilada generando los regioisómeros **2a-c** y **2'a-c** en proporción 4/1 respectivamente. Los derivados de interés **2a-c** fueron sometidos a una reacción de acoplamiento carbono-carbono de Suzuki-Miyaura,<sup>91-92</sup> utilizando paladio como catalizador para dar paso a los compuestos **3a-c** que mediante una sustitución nucleofílica aromática con aminas alifáticas y aromáticas sobre C-2 del anillo de purina, dan paso a la obtención de las moléculas finales **4a-s**.

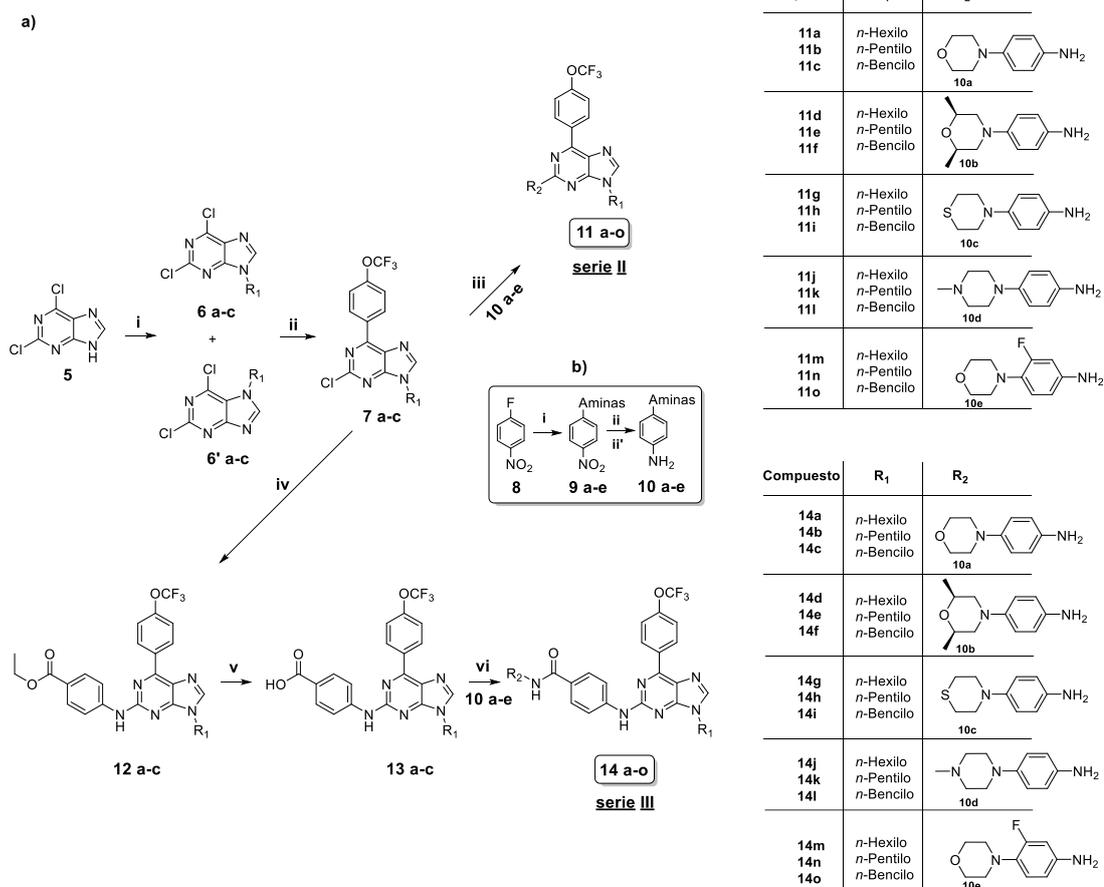


**Esquema 4.** Reactivos y condiciones para la obtención de los derivados de la serie **I**: **i)** Haluros de alquilo (**R**<sub>1</sub>), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, t.a, 12 h (36-60 %); **ii)** ácido 4-trifluorometoxifenilborónico, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M, dioxano, reflujo 3 h (41-57 %); **iii)** Aminas (**R**<sub>2</sub>), DIPEA, *n*-BuOH, 110 °C, 12 h (67-97 %).

- Derivados de las **series II y III**

El Esquema 5a, correspondiente a las series II y III de las moléculas objetivo, comienza con la 2,6-dicloropurina comercial **5**, la cual fue *N*<sup>9</sup>-alquilada para dar los regioisómeros **6a-c** y **6'a-c** en proporción 4/1 respectivamente. Los derivados de interés **6a-c** fueron sometidos a una reacción de acoplamiento carbono-carbono de Suzuki-Miyaura<sup>91-92</sup> utilizando paladio como catalizador para dar paso a los compuestos **7a-c** que mediante una sustitución nucleofílica aromática con las anilinas correspondientes sobre C-2 del anillo de purina, a través de una reacción de acoplamiento C-N de Buchwald-Hartwig<sup>68, 93-94</sup> da paso a las moléculas finales correspondientes a la serie II (**11a-o**). A su vez, los compuestos **7a-c** a través de una sustitución nucleofílica sobre el C2 con *p*-aminobenzoato de etilo dan lugar a los compuestos **12a-c** que al ser sometidos a una hidrólisis en medio básico<sup>95</sup> generan el ácido carboxílico **13a-c** que finalmente en una reacción de condensación con las anilinas correspondientes se obtienen los productos finales de la serie III (**14a-o**).

Para la elaboración de las anilinas (Esquema 5b), en una primera etapa, y mediante una sustitución nucleofílica aromática entre **8** y diferentes aminas cíclicas se obtienen los intermediarios **9a-e** que seguido de una reducción del grupo nitro usando hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C<sup>96</sup> o mediante SnCl<sub>2</sub> o Fe, se obtuvieron las anilinas finales **10a-e**.



**Esquema 5.** Reactivos y condiciones para la obtención de los derivados de las series II y III: **a) i)** Haluros de alquilo (R<sub>1</sub>), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, t.a, 12 h (45-50 %); **ii)** ácido 4-trifluorometoxifenilborónico, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M, dioxano, reflujo 3 h (85-89 %); **iii)** Anilina (R<sub>2</sub>) Pd(OAc)<sub>2</sub>, Xantphos, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxano, MW 90 °C, 30 min (48-65 %); **iv)** Aminobenzoato de etilo, Pd(OAc)<sub>2</sub>, Xantphos, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxano, MW 90 °C, 10 min (66-73 %); **v)** NaOH 0.5 M, acetona, reflujo 12 h (78-88 %); **vi)** Anilina (R<sub>2</sub>), HATU, TEA, DMF, MW 30 min, 90 °C (30-48 %). **b) i)** aminas a, b, c, d y e, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMSO, reflujo 4 h (90 %); **ii)** 10 % Pd/C, H<sub>2</sub>, t.a 24 h (97 %); **ii')** (tiomorfolina) Fe<sup>0</sup>, metanol, reflujo, 24 h t. a. (56 %), 48 h (90 %).

Los detalles de los procedimientos de síntesis y datos espectroscópicos para cada uno de los compuestos de las series I-III se encuentran disponibles en la sección Material Anexo, Capítulo XVIII: 8.1- 8.4.

## 4.2 Metodología Biológica

### 4.2.1 Aspectos generales de la etapa biológica.

#### 4.2.1.1 Líneas celulares

En este estudio, se utilizaron las líneas celulares detalladas a continuación: adenocarcinoma colorrectal humano HT29 (ATCC® HTB-38™), carcinoma colorrectal humano HCT116 (ATCC® CCL-247™), adenocarcinoma: células humanas de cáncer de pulmón no pequeñas H1975 (ATCC® CRL-5908™), meduloblastoma cerebelo dermoplásico DAOY (ATCC® HTB-186™) y células humanas no cancerígenas de riñón en etapa embrionaria HEK293 (ATCC® CRL-1573™).

#### 4.2.1.2 Medios de cultivo y suplementos

RPMI 1640 (Gibco, Cat.No.11875-093), DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, Gibco, Cat.No.12800-058), McCoy's 5A (Gibco, Cat.No 16600108). Solución de 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Biological Ind, Cat.No.03031B). Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco, Cat.No.12070346). Suero bovino fetal inactivado (Biological Ind, Cat.No.041211A).

#### 4.2.1.3 Partidores para qRT-PCR

Los partidores (*primer*) utilizados para el PCR en tiempo real (*Quantitative Polymerase Chain reaction, Real Time*) son detallados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Secuencias de partidores humanos utilizados en qRT-PCR.<sup>97-98</sup>

Genes	Forward	Reverse
Gli1	5'-GGGATGATCCCACATCCTCAGTC-3'	5'-CTGGAGCAGCCCCCCCAGT-3'
Ptch1	5'-CCACAGAAGCGCTCCTACA-3'	5'-CTGTAATTTTCGCCCTTCC-3'
HHIP	5'-CCCACACTTCAACAGCACCA-3'	5'-GCTTTGTACAGGACTTTGC-3'
TBP	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'
HMBS	5'-AAGTGCAGCAAGGACCAG-3'	5'-TTACGAGCATGATGCCTACCAAC-3'

#### **4.2.1.4 Reactivos generales: lista de proveedores y número de catálogo**

La lista detallada de reactivos por proveedor se encuentra disponible en Material Anexo.

#### **4.2.2 Aspectos generales de cultivo celular**

##### **4.2.2.1 Cultivo celular**

La línea celular neoplásica HT29 y la línea celular no cancerígena HEK293, fueron cultivadas en DMEM F12 con 10 % de FBS. Las líneas celulares cancerígenas HCT116, H1975 Y DAOY fueron cultivadas en RPMI 1640 con 10 % FBS. Todas fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. Para los experimentos realizados en este estudio, las células fueron sembradas 12 h antes para asegurar su apropiada adhesión a la placa de cultivo. Posteriormente, se aspiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco para luego tratar compuestos sometidos a estudio considerando la concentración y los tiempos descritos en la metodología correspondiente a cada experimento. Todos los ensayos se realizaron con una confluencia aproximada entre un 70-80 %.

Las células HCT116, H1975 y HEK293 fueron adquiridas directamente de los proveedores. Las células DAOY fueron proporcionadas por la Dra. Verónica Palma (Universidad de Chile). Las células HT29 fueron adquiridas del Dr. Mauricio Cuellar (Universidad de Valparaíso).

##### **4.2.2.2 Almacenamiento de células, crio-preservación y subcultivos**

La crio-preservación de los cultivos celulares se realizó en FBS suplementado con 5 % de DMSO. Las células fueron transferidas a un criovial y rotuladas indicando el número de pasaje celular. Posteriormente,

fueron guardadas en un contenedor de congelamiento con alcohol isopropílico por 24 h que permite un descenso gradual de la temperatura desde -1 °C/min hasta llegar a -80°C. Los crioviales se almacenaron hasta por 12 meses en un congelador a -80 °C.

El descongelamiento de células se llevó a cabo en un baño termostático a 37 °C en un solo paso bajo campana de flujo laminar. A cada criovial se adicionaron 3 mL de medio de cultivo suplementado con 10 % de FBS y se centrifugó por 5 minutos a 170 g; una vez obtenida la pella, se sembró en una placa de cultivo con medio de cultivo completo (FBS al 10 % v/v, antibióticos y aminoácidos no esenciales al 10 % v/v). Las células se mantuvieron en un incubador suplementado con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de O<sub>2</sub>.

Las células descongeladas que alcanzaron una confluencia cercana al 90%, fueron subcultivadas para los futuros experimentos. Primero, se retiró el medio de cultivo; seguidamente se lavaron dos veces con amortiguador fosfato salino (PBS 1X), luego, fueron tripsinizadas por incubación con tripsina-EDTA 1X durante 3-5 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactivó la tripsina con medio de cultivo suplementado con 10 % de FBS y se colectaron en tubos de centrifuga. A continuación, se centrifugaron por 5 minutos a 170 g y la pella obtenida fue resuspendida en 1 mL de medio de cultivo completo y sembrada en las placas de cultivo adecuadas para su mantención.

#### **4.2.2.3      Conteo de células**

El conteo de células se realizó con una cámara de Neubauer utilizando el colorante azoico azul de tripán con el objetivo de diferenciar las células viables (sin tinción) de las no viables (tinción azul). La estimación de la cantidad de células se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio óptico a un aumento de 10X de magnificación. El conteo permitió establecer la concentración celular adecuada para cada experimento.

#### **4.2.2.4 Compuestos utilizados en cultivo celular**

Todos los compuestos sintetizados y utilizados en este estudio fueron disueltos en DMSO. Se aseguró que la concentración de DMSO en el medio de cultivo fuera menor al 1 %, tanto para las condiciones control y vehículo como en las diluciones de los compuestos ensayados. Los compuestos fueron almacenados indefinidamente a -20 °C en viales protegidos de la luz y descongelados según necesidad.

#### **4.2.2.5 Transfección y tratamientos**

HEK293T (células transfectadas) y Smo<sup>-/-</sup> MEFs fueron cultivadas en DMEM puls con 10 % de FBS, 1 % L-glutamina y antibióticos. La transfección transiente fue realizada utilizando el agente de transfección DreamFect<sup>TM</sup> Gold (Oz Biosciences SAS, Marseille, Francia) de acuerdo con los protocolos del proveedor. Las células fueron tratadas con Bodipy-ciclopamina (5 nM, BioVision Inc., San Francisco, CA, USA), con el compuesto **4s** o vismodegib (1µM, Selleckchem, Munich, Alemania). Los experimentos fueron realizados por la Dra. Lucia Di Marcotullio de la Universidad de Roma, Italia.

#### **4.2.3 Estudios de viabilidad celular: ensayo colorimétrico de MTT**

Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados usando bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol<sup>99</sup> (MTT) de acuerdo al método colorimétrico analítico-cuantitativo descrito por Mosmann (1983)<sup>100</sup> basado en la reducción de sales sódicas de tetrazolio a formazán. El MTT es una sal de tetrazolio amarilla que es transformada en las mitocondrias de las células metabólicamente activas a formazán, compuesto azul oscuro que presenta un máximo de absorbancia a 570 nm proporcional al número de células viables.<sup>100-101</sup>

La incubación de las líneas celulares con los diferentes compuestos se llevó a cabo para determinar la concentración necesaria para reducir *in vitro* la viabilidad celular en un 50 % (IC<sub>50</sub>). Para ello, las líneas celulares anteriormente descritas, fueron cultivadas en placas estériles de 96 pocillos a concentraciones de 5.000 y 10.000 células/pocillo. Luego, las células fueron tratadas con los compuestos a las concentraciones adecuadas para obtener una curva dosis-respuesta cuya pendiente representa el IC<sub>50</sub> del compuesto.

Inicialmente, se llevó a cabo un tamizaje (*screening*) de todos los compuestos sintetizados en las series I-III para determinar su citotoxicidad (mediante la determinación de la viabilidad celular) a una concentración fija de 50 µM. Aquellos compuestos que presentaron una disminución de la viabilidad celular, comparados con el vehículo, superior al 50 %, fueron seleccionados para ser analizados en una siguiente fase experimental mediante la construcción de una representación logarítmica de dosis-respuesta cuya pendiente representó el IC<sub>50</sub> reportado de los compuestos.

Para ello, las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos con concentraciones de 0.05, 0.5, 5, 15, 25 y 50 µM en 200 µL de medio suplementado con 10 % de FBS a una concentración celular de 5.000 células/pocillo para las líneas de mayor tasa de crecimiento como HEK293 y HT29 y de 10.000 células por pocillo para las líneas de crecimiento moderado como HCT116, H1975 y DAOY. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h de tratamiento con los compuestos ensayados. Posteriormente se adicionaron 10 µL de MTT (10 mg/ mL) a cada pocillo para obtener una concentración final de (0.5 mg/mL), luego se incubó durante 4 h y se adicionaron 100 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % en 0.1 mM de HCl por 12 h adicionales y se procedió a la lectura de los experimentos.

La formación de formazán en las células metabólicamente activas fue medida a 570 nm en un multilector de placas (Cytation 5, Biotek Instruments, USA). Las curvas dosis-respuesta fueron construidas con el Software GraphPad Prism 6.0. Los resultados fueron expresados como porcentaje de citotoxicidad de los compuestos a la concentración de su IC<sub>50</sub> ± DS (Desviación estándar), considerando tres experimentos independientes realizados cada uno de ellos por triplicado. Se realizó un análisis estadístico *t-test* con un 95 % de confianza expresado como \*  $p < 0.05$ .

#### **4.2.4 Ensayos mediante citometría de flujo**

##### **4.2.4.1 Ensayo de muerte celular mediante marcaje con yoduro de propidio (PI) y doble marcaje con anexina-V FITC/PI**

Para evaluar el tipo de muerte celular (apoptosis o necrosis) inducida por los compuestos en las líneas celulares ensayadas, se realizó un marcaje con yoduro de propidio (PI) en las líneas celulares utilizadas en este trabajo, por un periodo de 24 h de tratamiento con concentraciones de 1.5, 19, 25 y 50  $\mu\text{M}$ . De esta manera, las células HT29 y HEK293 fueron cultivadas en placas estériles de 12 pocillos a una concentración de 50.000 células por pocillo en 600  $\mu\text{L}$  de medio DMEM F12 suplementado con 10 % de FBS. Por su parte, las células HCT116, H1975 y DAOY fueron cultivadas a la misma concentración y en las mismas placas con 600  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 con 10 % de FBS a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 24 h todas las células de cada pocillo fueron colectadas en tubos para citometría, centrifugadas a 170 g y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de PI (20 ng/mL) en PBS 1X y se mantuvieron en hielo protegidas de la luz hasta su lectura mediante citometría de flujo<sup>102</sup> (FACScanto II, Becton Dickinson, CA, USA).

Aquellos compuestos que mostraron un porcentaje significativo de muerte celular del tipo apoptosis, se sometieron a un análisis adicional utilizando el marcador anexina V que se une al residuo fosfatidilserina expuesto en la membrana plasmática a consecuencia de la inducción temprana de la apoptosis por parte de las células.

Para ello, las células HT29 y HEK293 se cultivaron en placas estériles de 12 pocillos a una concentración de 50.000 células por pocillo en 600  $\mu$ L de medio DMEM F12 suplementado con 10 % de FBS a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células fueron evaluadas a una concentración fija de 19  $\mu$ M a 3, 6, 12 y 24 h de tratamiento para detectar el tiempo óptimo de inicio de la apoptosis. Transcurrido el tiempo de incubación, todas las células fueron colectadas en tubos de citometría, centrifugadas a 170 g descartándose el sobrenadante y se procedió al tratamiento con el *Kit Dead Cell Apoptosis with annexin V Alexa Fluor 488 y PI* (ThermoFisher Scientific, CA.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células fueron incubadas en hielo por 10 minutos protegidas de la luz y, posteriormente se procedió a la medición por citometría de flujo<sup>102</sup> (FACScanto II, Becton Dickinson, CA, USA).

El análisis de las poblaciones celulares se realizó mediante un gráfico Dot Plot observando los porcentajes de células de acuerdo a:

Los cuatro cuadrantes representan células que son:

- i) PI (-) y anexina-V FITC (-) representa a una población de células viables pues su integridad celular se mantuvo intacta en porcentajes superiores al 85 %.
- ii) PI (-) y Anexina-V FITC (+) representa a una población de células en apoptosis temprana.
- iii) PI (+) y anexina-V FITC (+) representa a una población de células en apoptosis tardía o necrosis.

- iv) PI (+) y anexina-V FITC (-) representa a una población en apoptosis tardía o necrosis.

Los resultados de citometría de flujo fueron analizados con el programa FCS Express V6. Los análisis estadísticos y gráficos fueron obtenidos mediante el programa GraphadPrism V6. Los experimentos se realizaron por duplicado en tres experimentos independientes. Se realizó un análisis por Anova-Dunnet de una vía con un 95 % de confianza considerando un valor significativo \*  $p < 0.05$ .

#### **4.2.4.2 Ensayo de proliferación celular con sonda fluorescente CFSE**

Para evaluar adicionalmente un efecto de los compuestos sintetizados en estudio sobre la proliferación celular, se realizó un marcaje de las distintas líneas celulares con la sonda fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, por siglas en inglés), la cual fue diluida 1/10 en DMSO. Posteriormente se realizó un conteo con azul de tripán de las líneas celulares HT29 y HEK293 y para una pella de concentración  $10 \times 10^6$  células contenidas en 1 mL de medio sin FBS, se adicionó 1  $\mu$ L de la dilución de la sonda. La mezcla entre pella de células y la sonda, se incubó durante 15 minutos protegida de la luz a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X frío (sin FBS) para asegurar la fijación de la sonda a las células. Luego, las células fueron lavadas 3 veces con medio de cultivo suplementado al 10 % FBS para eliminar el exceso de sonda no incorporada a las células. La pella resultante se resuspendió en 1 mL de medio completo y sembrada en placas estériles de 12 pocillos a una concentración de 100.000 células/pocillo.

Las células incubadas con sonda fueron sembradas y tratadas con los compuestos durante 24, 48 y 72 h a una concentración de 19  $\mu$ M, tripzinizadas y colectada la totalidad del contenido de cada pocillo en tubos

para citometría de flujo. Finalmente se adicionaron 200  $\mu$ L de PBS 1X y se mantuvieron en hielo hasta su análisis en el citómetro de flujo. Los tubos fueron mantenidos como máximo por una semana en 1 mL de PFA al 4 % en PBS 1X protegidos de la luz a 4 °C antes de su lectura definitiva.

Para este tipo de experimento se consideraron como controles experimentales, células sin marcaje con CFSE + PBS, células sin marcaje CFSE + PI y células con marcaje + PBS.

Los resultados derivados de este estudio fueron analizados con el programa FCS express V6. Los gráficos fueron obtenidos a través del software GraphadPrism V6. Se realizó un análisis estadístico Anova-Dunnet una vía con un 95 % de confianza, considerando un valor \*  $p < 0.05$  para diferencias estadísticas.

#### **4.2.5 Tinción nuclear con DAPI y evaluación de la capacidad formadora de colonias**

Se realizó una tinción con DAPI a los núcleos de las células HT29 para evaluar si los compuestos deben su disminución de la viabilidad celular a un mecanismo de muerte celular por apoptosis debido a cambios en su morfología y aumento en la permeabilidad celular. Para ello, Se sembraron 200.000 células/pocillo en placas estériles de 6 pozos y fueron cultivadas a una confluencia entre 75-80 %. Luego del tratamiento con los compuestos a concentraciones de 1.5, 5 y 25  $\mu$ M durante 3, 6, 24 y 72 h, los pocillos fueron lavados con PBS 1X y fijados a temperatura ambiente por 30 minutos con 1 mL de PFA 4 %. Finalmente, cada pocillo fue lavado 2 veces con PBS 1X e incubados durante 5 minutos con DAPI. Las imágenes fueron capturadas en campo claro, en DAPI y con la superposición de ambas con aumentos de 4X, 20X y 60X en el equipo Cytation 5. Corresponde a un experimento cualitativo realizado una vez por triplicado.

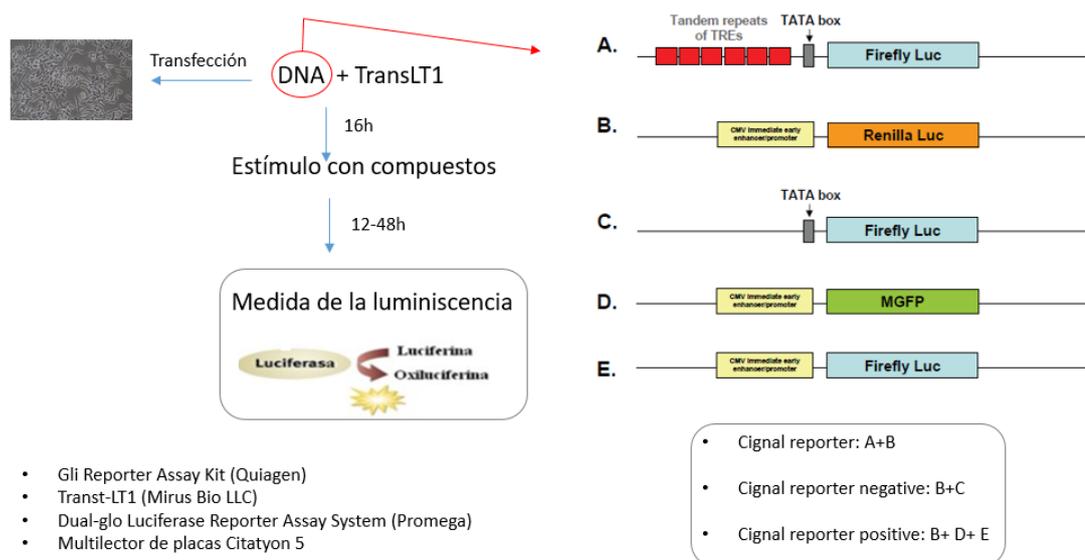
Para evaluar la capacidad formadora de colonias por parte de los compuestos sintetizados, se sembraron 10.000 células por pocillo en placas de 6 pozos estériles con 2 mL de medio de cultivo suplementado con 10 % de FBS y fueron incubadas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Luego, las células fueron lavadas con PBS 1X, tratadas con los compuestos (a la concentración del IC<sub>50</sub> obtenido mediante el ensayo de MTT) e incubadas. Transcurridas 72 h el medio fue reemplazado por medio fresco sin compuestos, y las células fueron incubadas durante 14 días adicionales. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con 500 µL de PFA al 4 % por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X y se mantuvieron durante 30 minutos con 500 µL de cristal violeta 0.5 % a temperatura ambiente. La captura de imágenes se realizó utilizando una lupa de alta resolución. Corresponde a un experimento cualitativo realizado una vez por triplicado.

#### **4.2.6 Evaluación de la capacidad de los compuestos como inhibidores de la vía Hedgehog mediante ensayos funcionales**

##### **4.2.6.1 Ensayo de gen reportero Gli-luciferasa**

Para determinar una posible inhibición de los compuestos en la vía de señalización SHh, se realizó un ensayo de transactivación en donde la línea celular cancerígena de colon HCT116 fue transfectada transcientemente con un gen reportero Gli (Signal Reporter Gli-luciferase, ADN, Quiagen) utilizando lipofectamina 2000 como agente de transfección. La activación de Gli como factor transcripcional es indicativo de la activación de la vía de transducción molecular Hedgehog y puede ser cuantificada por la expresión de genes específicos como HHIP, Gli1, SuFu, Myc, PTCH1, entre otros.

El ADN codificante de Gli contenido en el Kit mostrado en el Esquema 6 (100 ng de cada constructo), fue transfectado en las células HCT116, las cuales se sembraron a una concentración de 40.000 células por pocillo en placas estériles de 96 pocillos especiales para luminiscencia. Las células se mantuvieron en medio RPMI al 5 % de FBS y se incubaron por 16 h a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se reemplazó el medio de cultivo por RPMI 1640 al 0.5 % de FBS y se mantuvieron durante 8 h de incubación adicionales. Luego las células fueron estimuladas con los compuestos y los controles del experimento por un periodo de 24 h adicionales. Para el experimento, se utilizó el antagonista comercial vismodegib (IC<sub>50</sub>: 100 nM) y el agonista comercial purmorfamina (IC<sub>50</sub>: 2 μM) como controles experimentales positivo y negativo respectivamente. La concentración utilizada de los compuestos fue de (1X, 10X, 100X), siendo 10X la concentración correspondiente al valor del IC<sub>50</sub> en la línea celular cancerígena HCT116. Para los casos donde se trató con el agonista purmorfamina en presencia de los compuestos, primero se pre-incubó durante 20 minutos con purmorfamina y a continuación, se adicionaron los compuestos hasta completar las 24 h de incubación con el objetivo de establecer la competencia con purmorfamina.



**Esquema 6.** Procedimiento de trabajo con el Kit Gli luciferasa para estudios de moléculas pequeñas antagonistas de Smo.

La activación o disminución del factor transcripcional Gli1, medida a través de la actividad de la luciferasa y de renilla (control de normalización de células efectivamente transfectadas) se realizó determinando la medida de la luminiscencia a través del kit “*Dual-Glo Luciferase Reporter Assay System*” (Promega) en un equipo Cytation 5 (Biotek) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Los valores de la actividad luciferasa fueron normalizados respecto a los valores de renilla. De esta manera, resultados para cada punto experimental representan la razón luciferasa/renilla, expresadas como unidades relativas de luminiscencia (URL). Los gráficos se obtuvieron utilizando el software GraphadPrism V6. El experimento se realizó por triplicado y los datos muestran el promedio  $\pm$  DS de un único experimento.

#### **4.2.6.2 Ensayo de qRT-PCR**

##### **❖ Extracción del ARN**

La extracción de ARN se realizó utilizando Trizol de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Se sembraron 300.000 células/pocillo de la línea celular HT29 en placas estériles de 6 pozos. Posteriormente, se adicionaron 500  $\mu$ L de Trizol por cada pocillo. La muestra homogeneizada, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionó 100  $\mu$ L de cloroformo. La muestra se agitó en un vórtex y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 4 °C por 15 minutos a 24.515 g La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo de microcentrifuga.

##### **❖ Precipitación, lavado y re-suspensión del ARN**

El ARN fue precipitado con 500  $\mu$ L de isopropanol y luego se incubó durante 15 minutos a una temperatura entre 15-30 °C. Posteriormente, se centrifugó

por 15 minutos a 24.515 g a 4 °C y se descartó el sobrenadante. A continuación, se lavó la pella de ARN con 950 µL de etanol al 75 %, se mezcló mediante vortex y se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 7500 rpm. Posteriormente, el ARN total resultante se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas y se disolvió mediante pipeteos repetidos e incubando las muestras por 10 minutos a 55 °C.

Se estimó la concentración y pureza del ARN mediante la medición de la absorbancia a  $A_{260}/A_{280}$ . El ARN fue tratado con 4 µL de RNase-Free DNase, según las indicaciones del fabricante y se mantuvo a 37°C por 30 minutos. Finalmente, se adicionó a cada tubo 3 µL de DNA de inactivación dando un giro de 681 g y se tomó el sobrenadante para el análisis espectrofotométrico.

#### ❖ **Análisis espectrofotométrico y síntesis de cDNA**

El cálculo de concentración y pureza del ARN total proveniente de las muestras se realizó en el biophotometer (UNGIE, Suiza) mezclando 2 µL de ARN + 98 µL de agua ultrapura y registrando la absorbancia a  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ .

2 µg de ARN total fueron transcritos a ADN complementario (ADNc) utilizando la enzima SuperScript II en presencia de partidores aleatorios, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoFisher). Todas las reacciones se llevaron a cabo con el siguiente protocolo: Iniciación de 2 minutos a 55 °C, seguida de 15 minutos a 95 °C para lograr desnaturalizar el ADNc, seguido de la etapa de amplificación de 45 ciclos de 18 s a 95 °C y 45 s de temperatura de alineamiento con un total de 2:35 horas de duración.

### ❖ qRT-PCR

Las amplificaciones mediante PCR, fueron llevadas a cabo con los partidores descritos en la Tabla IV a una temperatura de 60 °C en un equipo Opticon Machine (MJ Research) mediante el uso de *iQtm SYBR green supermix*. Los resultados de qRT-PCR fueron expresados como la razón de la expresión génica del compuesto/control en los diferentes genes SHh (*signatures*, en inglés) utilizando el análisis de método de curva estándar siguiendo el procedimiento proporcionado por el equipo de trabajo del Dr Ariel i Altaba (UNIGE, Suiza).<sup>97-98</sup>

El procesamiento de los datos contempló el siguiente protocolo:

- 1- Cálculo del valor CT (*cycle threshold*, en inglés) del promedio de dos genes de referencia (TBP y HMBS).
- 2- Cálculo del valor CT del promedio de cada muestra\_ensayada (cada muestra fue realizada por triplicado) y del vehículo (células sin tratamiento y con menos de 1 % DMSO, ensayadas por triplicado).
- 3- La obtención del valor de la expresión normalizada de los valores CT (EN) de cada muestra/referencia tanto para las células tratadas con los compuestos como para el vehículo.
- 4- Para obtener los valores de 0 a 1 en los gráficos de expresión génica se dividió el valor de EN de las células tratadas con los compuestos por el valor EN del vehículo (células sin tratamiento).
- 5- Valores iguales o cercanos a 1 fueron considerados sin cambio en la expresión de genes. Valores inferiores a 0.6 fueron considerados como una disminución de la expresión génica y valores sobre 1.3 fueron considerados como una sobre expresión génica.

### ❖ Análisis de expresión de mRNA para $\text{Smo}^{-/-}$ en MEFs

El siguiente protocolo fue generado gracias a los datos aportados por la Dra. Lucia Di Marcotullio de la Universidad de la Sapienza, Roma quién realizó los ensayos de qRT-PCR para  $\text{Smo}^{-/-}$  en células MEFs.

Se realizó el análisis de la expresión de mARN para las células con Smo<sup>-/-</sup> (delecionado) MEFs. El RNA total fue aislado con Trizol (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las células MEFs Smo<sup>-/-</sup> fueron tratadas por 24 y 48 h con los compuestos seleccionados a diferentes concentraciones y la transcripción reversa se realizó con SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline Reagents Limited, London, UK). El análisis por PCR cuantitativo en tiempo real (Q-PCR) de Gli1 y la expresión de mARN del estándar interno (Housekeeping) HPRT fue realizado a cada muestra de cADN usando el sistema VIIA7 Real Time PCR (Life Technologies). Se amplificó una mezcla de reacción que contenía el molde a través del kit cDNA SensiFAST Probe Lo-ROX (Bioline Reagents Ltda.) y la mezcla de la sonda del partidor utilizando los parámetros del termociclador FAST Q-PCR. Cada reacción de amplificación se realizó por triplicado, el promedio de los tres ciclos se utilizó para calcular la cantidad de cada transcrito en la muestra (utilizando el software SDS versión 2.3). La cuantificación de mARN se expresó, en unidades arbitrarias, como la relación de la cantidad de muestra a la cantidad del calibrador. Todos los valores fueron normalizados con el control endógeno HPRT.

#### 4.2.6.3 Ensayo de radioligando

El siguiente protocolo fue generado gracias a los datos aportados por la Dra. Lucia Di Marcotullio de la Universidad de la Sapienza, Roma quién realizó los ensayos de radioligando.

La línea celular HEK293 transfectada con Smo nativo (*Wild Type*, WT) etiquetado con Myc-DDK humano o mutante Smo D473H etiquetado con Myc-DDK humano. Las células se lavaron con amortiguador fosfato salino (PBS) 1X suplementado con un 0.5 % de suero bovino fetal (FBS). Posteriormente, fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4 % disuelto PBS durante 10 minutos, y se incubaron durante 6 h a 37 °C. Las células fueron permeabilizadas con 0.2 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C durante 3 horas y se trataron con una concentración 5 nM de Bodipy-clícopamina (BC) junto con los compuestos seleccionados a concentraciones de ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$   $\mu$ M). Se utilizó una solución de montaje por fluorescencia Dako (Dako, CA, USA) como medio de montaje y el reactivo Hoechst (azul) para la tinción de los núcleos celulares. Las señales de Bodipy (verde) y Hoechst (azul) fueron analizados en tres campos representativos bajo microscopia de fluorescencia (aumento de 20X, 1000 células/campo). Los datos fueron expresados como el porcentaje de incorporación BC en presencia de los compuestos seleccionados el cual fue comparado con el porcentaje de BC sólo en las células control.

#### 4.2.7 Ensayos “*in vivo*”: evaluación de la respuesta antitumoral

Los siguientes protocolos fueron generados gracias a los datos aportados por el Dr. Andrew Quest y por el Dr. Pablo Lara de la Universidad de Chile, quienes realizaron los ensayos “*in vivo*” y la nanoemulsión de **4s** respectivamente.

#### ❖ **Preparación de 4s en nanoemulsión y cuantificación del contenido del solvente residual**

El método de preparación de la nanoemulsión (NEM), se realizó de acuerdo a autores Quest y col.<sup>103</sup> mediante una mezcla compuesta por una fase orgánica que contiene 125 µL de Miglilol (0.945 gr/cm<sup>3</sup>), 30 mg de Epikuron 145 V (fosfatidil colina enriquecido con una fracción de lecitina), 2.76 mg de 4s, 0.5 mL de etanol y 9.5 mL de acetona; y una fase acuosa que se compuso de 20 mL de agua Milli-Q. La mezcla de solución fue concentrada al vacío mediante un evaporador rotatorio hasta alcanzar un volumen aproximado de 5 mL (considerando la eliminación completa del etanol y acetona de la mezcla de reacción). La formación de la nanoemulsión fue instantánea y espontánea, quedando en evidencia por la apariencia lechosa de la mezcla. El solvente residual fue cuantificado siguiendo la norma 32 de la USP (guía *US Pharmacopeia*) en un equipo GC-FID 5890 utilizando una columna DB-624 (longitud 30 m x 0.32 mm de diámetro interno x 0.25 µm espesor de la pared) aplicando un programa de temperatura que contempló: inicio a 40 °C por 10 minutos, seguido de un gradiente de 10 °C/min sobre 250 °C, con el inyector a 200 °C y el detector a 250 °C.

#### ❖ **Estudio en animales: Tratamiento, detección y análisis**

Ratones C57BL/6 fueron adquiridos en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y mantenidos en el Centro de Estudios Animales en Ejercicio, Metabolismo y Cáncer (Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile). Para todos los experimentos se utilizaron ratones entre 8 y 12 semanas de edad con un peso promedio de 25 g. Todos los procedimientos animales utilizados fueron aprobados por el Comité Local de Bioética (CBA#889). Se utilizaron células de melanoma de piel B16F10 (ATCC CRL-6475) para formar el tumor en los ratones. El crecimiento del tumor subcutáneo y los ensayos de metástasis fueron realizados de acuerdo con lo reportado por Quest y col.<sup>103</sup> Una dosis simple de compuesto-NEM (1500 µg/mL) o del control (NEM en suero fisiológico) fue administrada a dichos

ratones después de la extirpación del tumor y antes de suturar la herida. Los volúmenes empleados fueron calculados mediante una correlación entre el volumen del tumor con aquellos usados para los estudios *in vitro* de viabilidad celular.

La detección de la fluorescencia mediante imágenes se realizó como sigue: Los animales fueron mantenidos durante 15 días luego de la administración de una dosis única de los compuestos seleccionados y los controles. Todo ello, se realizó en diferentes tiempos e intervalos. El primer día a 2, 4, 8 y 24 h una dosis al día y hasta completar 15 días. Antes de la extirpación del tumor, las ratas fueron anestesiadas por 20 minutos (2.5 % de isoflurane en O<sub>2</sub>) y se tomaron imágenes por fluorescencia usando un sistema de imágenes In-Vivo FX-PRO (excitación 430 nm/emisión 540 nm, Bruker, USA). La fluorescencia en las regiones de interés (ROI) para cada experimento fue cuantificada mediante imágenes obtenidas con el software molecular imaging Bruker (USA).

Al inicio de los experimentos se realizaron ensayos toxicológicos de la prueba en animal de 6 semanas de edad y un peso entre 19.9 y 21.2 g. Todos los resultados de análisis microbiológico y de la carga viral de patógenos fueron negativos (Smart Spot, South Africa). En el día de la cirugía, se aplicó al área del tumor un volumen máximo de 300 µL de compuesto-NEM (concentración 0.01 M de los compuestos seleccionados que corresponde a una dosis 22 veces superior a la aplicada a los animales). El día 14 postcirugía los animales fueron eutanasiados. Todos los componentes sanguíneos fueron chequeados por un análisis de sangre por EPOC (BGEM test cards, Epocal, Canada).

Los datos resultantes fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar (SEM) de tres experimentos independientes usando el programa GrapPhad Prism V 5.03 (GraphPad software, Inc). Los resultados fueron analizados mediante un análisis de ANOVA por una vía a través de una prueba de

multi comparación Tukey para ensayos *in vitro* o mediante un análisis de ANOVA no paramétrico usando la prueba Mann-Whitney para ensayos *in vivo*. La significancia estadística fue determinada con un intervalo de confianza de un 95 %.

### **4.3 Metodología Bioinformática**

#### **4.3.1 Parametrización de ligandos y preparación de modelo de hSmo**

La estructura 3D de los compuestos seleccionados se generó a utilizando el programa Spartan'1081.<sup>104</sup>La estructura de mínima energía se obtuvo al nivel B3LYP/6-31G\*\*. La estructura cristalina empleada corresponde a hSMO co-cristalizado con SAG1.5 (Cod. PDB: 4QIN).<sup>105</sup>

#### **4.3.2 Acoplamiento molecular de ligandos**

Con el fin de evaluar los modos de unión de los compuestos seleccionados en la cavidad 7 transmembranas de hSMO se utilizó el programa AutoDock 4.2.<sup>106</sup> Las preparaciones de los archivos necesarios para ejecutar el acoplamiento molecular se llevaron a cabo con el programa AutoDockTools. Considerando los aminoácidos responsables en la interacción con los antagonistas hSmo, se definió el tamaño de grilla correspondiente a 60 x 60 x 60 Å, con un espaciado de 0.375 Å. Se empleó el algoritmo genético Lamarckiano (LGA), estableciendo un total de 50 conformaciones, con un número máximo de 25 x 10<sup>7</sup> de evaluaciones energéticas. Se seleccionó la posición de enlace de energía más bajo para construir los complejos ligando-proteína en el acoplamiento molecular. Los servidores Pymol<sup>107</sup> y Mestro<sup>108</sup> se utilizaron para describir contactos 3D y 2D en los complejos proteína/ligando.

#### **4.3.3 Determinación de parámetros fisicoquímicos teóricos**

Los compuestos seleccionados fueron analizados utilizando el servidor MarvinSketch para calcular valores de pKa de grupos ionizables y átomos de hidrogeno faltantes según el pH específico del medio ambiente.

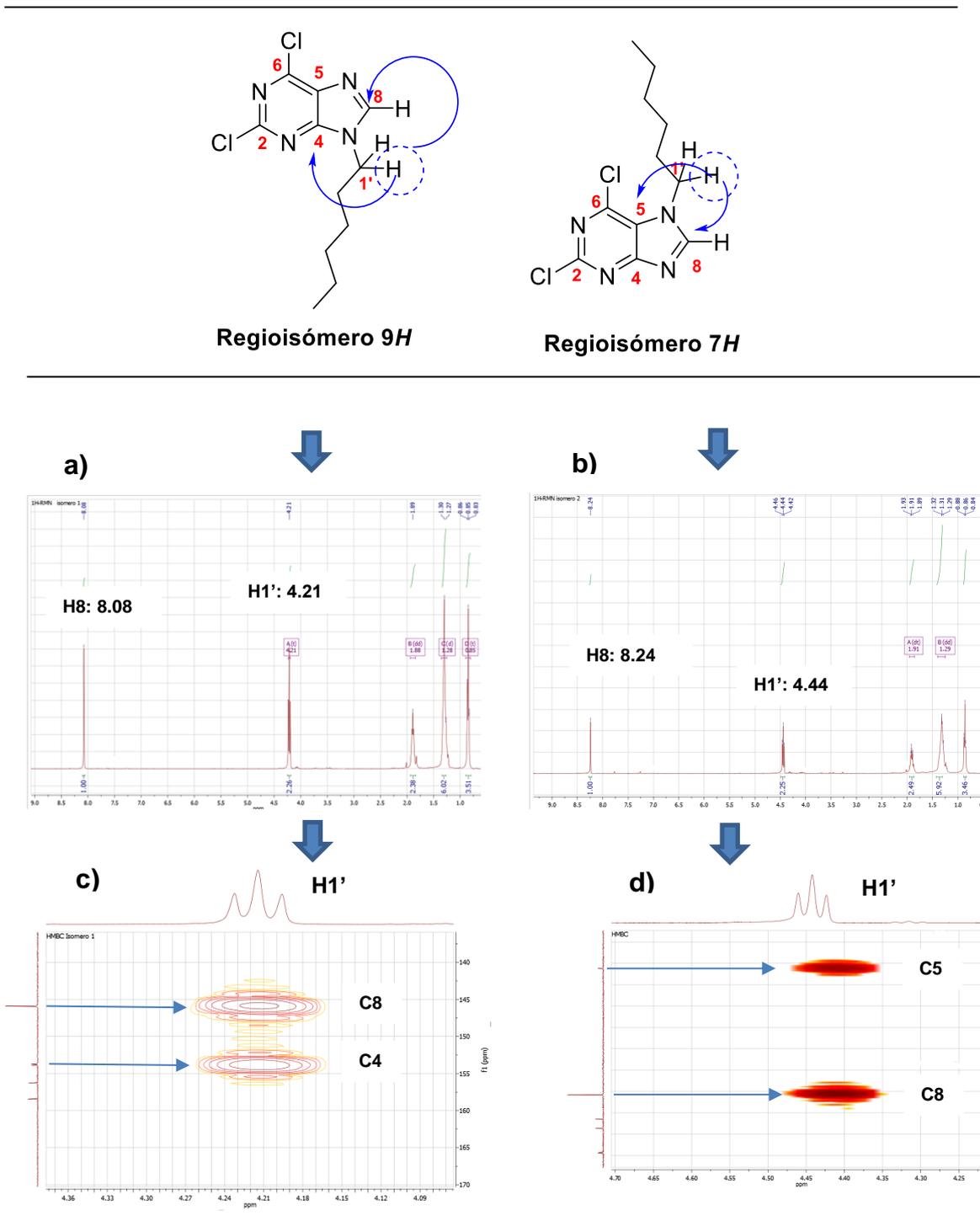
## CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Síntesis de los compuestos

La síntesis de purinas 2,6,9 trisustituidas de las series I-III están descritas en el capítulo IV y caracterizadas en el capítulo XVIII, material anexo.

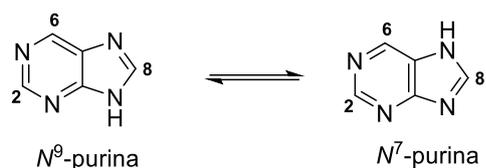
#### 5.1.1 Obtención de los derivados 2a-c y 2'a-c (serie I) y 6a-c + 6'a-c (series II y III): Reacción de *N*-alquilación

El primer paso de reacción para obtener las moléculas propuestas de las series I-III contempló una *N*-alquilación sobre el anillo de purina de los derivados **1** y **5** con diferentes halogenuros de alquilo en condiciones básicas, con dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente para dar los derivados *N*<sup>9</sup>- y *N*<sup>7</sup>- alquilados **2a-c + 2'a-c** (serie I) y **6a-c + 6'a-c** (series II y III) en proporción 4/1 respectivamente. Este hallazgo se logró confirmar mediante el aislamiento de todos los dos compuestos del crudo de reacción. Con la ayuda de un análisis de espectroscopía bidimensional por HMBC, se logró caracterizar cada regioisómero presente en el anillo de purina. El análisis indica que en el regioisómero *N*<sup>7</sup>-alquilado la señal del protón H1' a 4.44 ppm aparece con una señal del C8 a 150.83 ppm y con el C5 a 121.23 ppm; sin embargo, en el regioisómero *N*<sup>9</sup>-alquilado la señal del protón H1' a 4.21 ppm muestra un acoplamiento con la señal del C4 a 153.78 ppm y con la señal del C8 a 145.91 ppm como se representa en la Figura 19.



**Figura 19.** Representación de los regioisómeros *N9*- y *N7*-alquilados. **a** y **b)** muestra el RMN  $^1\text{H}$  para ambos regioisómeros. **c** y **d)** muestra el análisis por HMBC de ambos regioisómeros indicando la diferencia en la correlación  $\text{H1}'$  vs C8, C5 y C4, lo que conlleva a una asignación espectral inequívoca.

La obtención de ambos regioisómeros en la etapa de *N*-alquilación se debe a que el anillo de purina presenta una tautomería en el anillo de imidazol, lo que conlleva a que se formen ambos productos de reacción (Esquema 7). Este comportamiento se observa tanto para la 2-fluoro-6-cloropurina **1** como para las 2,6-dicloropurina **5**.



**Esquema 7.** Equilibrio tautomérico de purinas.

Como muestra el Esquema 7 y como fue mencionado en el capítulo I, en el heterociclo de purina, por la fusión de los anillos de pirimidina e imidazol, los C2 y C6 son los centros más electrofílicos, por lo que son susceptibles a una sustitución nucleofílica aromática ( $S_NAr$ ). De esta manera, considerando las características del heterociclo purina y su disponibilidad comercial con diferentes grupos halógenos como cloro y flúor, se proponen dos sustituciones nucleofílicas aromáticas en el C6 y en el C2 descritas a continuación para acceder a los productos de cada serie propuesta.

### 5.1.2 Obtención de los derivados **3a-c** (serie I) y **7a-c** (series II y III): Reacción de acoplamiento carbono-carbono de Suzuki-Miyaura

Sobre el C6 de las purinas *N*<sup>9</sup>-alquiladas **2a-c** y **6a-c** se realizó una reacción de acoplamiento carbono-carbono con el ácido 4-(trifluorometoxi)fenil borónico mediante la reacción de Suzuki-Miyaura para obtener el esqueleto 6-(4-trifluorometoxifenil)-9*H*-purina. De esta forma, se lograron obtener los derivados de interés **3a-c** y **7a-c**.

En 1979 A. Suzuki y N. Miyaura reportaron la síntesis estereoselectiva de (*E*)-alquenos arilados mediante la reacción de 1-alquenilboronatos con haluros de arilo en presencia de un catalizador de paladio.<sup>109</sup> El

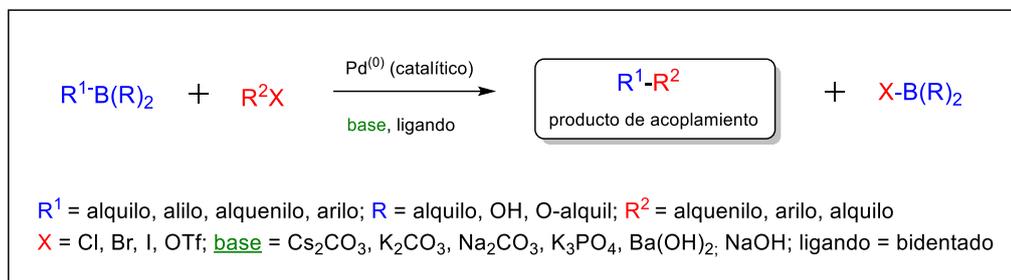
acoplamiento catalizado con paladio entre compuestos organoborados y haluros o triflatos orgánicos, proporciona un método general y potente para la formación de enlaces carbono-carbono conocido como el acoplamiento cruzado de Suzuki.<sup>110-112</sup>

Si bien hay variadas metodologías para la obtención de los acoplamientos carbono-carbono catalizado por paladio, entre ellas, las reacciones de Heck<sup>113</sup>, Negishi<sup>114</sup> y Stille,<sup>115-116</sup> se decidió utilizar la reacción de Suzuki ya que presenta múltiples ventajas:

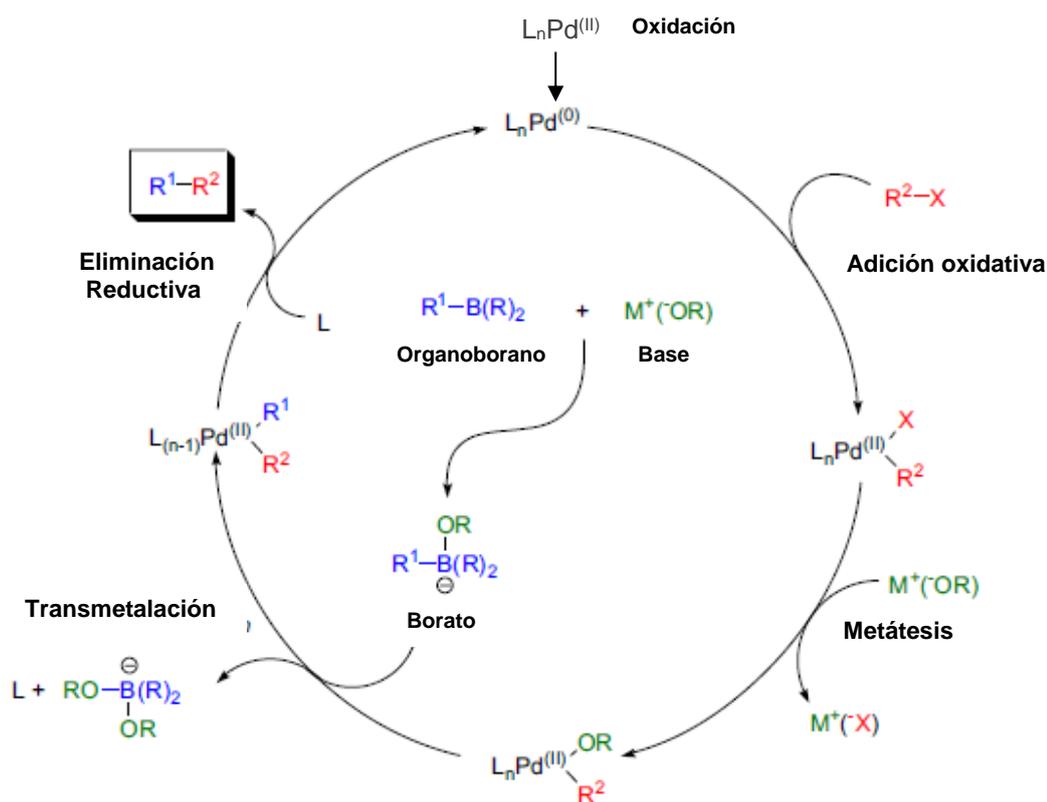
- 1) Requiere condiciones suaves de reacción.
- 2) Existe disponibilidad comercial de variados ácidos borónicos.
- 3) Los subproductos pueden ser fácilmente eliminados de la mezcla de reacción.
- 4) Los ácidos borónicos son ambientalmente más seguros y mucho menos tóxicos que organoestánicos (acoplamiento de Stille) u organozínicos (acoplamiento de Negishi).
- 5) Los materiales de partida toleran una amplia variedad de grupos funcionales y son estables en condiciones ambientales.
- 6) El acoplamiento es estéreo y regioselectivo.

Las condiciones generales de la reacción se muestran en la Figura 20. El ciclo catalítico (representado en la Figura 21) muestra que en una primera etapa ocurre el proceso de adición oxidativa, el cual es la etapa determinante. Durante esta etapa, el catalizador de paladio cambia su estado de oxidación de Pd(0) a Pd(II) y se acopla con el haluro de alquilo para producir un complejo de organopaladio (II). Posteriormente, en la etapa de metátesis la base es extremadamente importante ya que se une al complejo organopaladio (II). En un paso paralelo el organoborano comercial también requiere del anión de la base para activarse y generar el borato que en una etapa de transmetalación transfiere su grupo alquilo a la especie de organopaladio (II) para que finalmente y, mediante una

eliminación reductiva, el complejo de Pd(II) genera el producto deseado (acoplamiento carbono-carbono) y se regenera el catalizador Pd(0).<sup>109</sup>



**Figura 20.** Condiciones generales para el acoplamiento carbono-carbono de Suzuki-Miyaura.



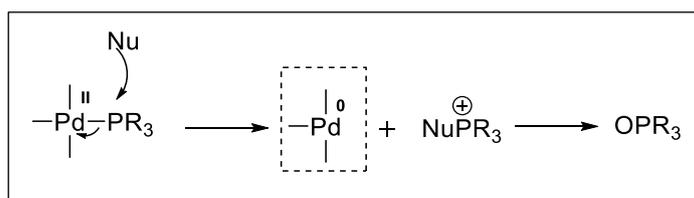
**Figura 21.** Ciclo catalítico de la reacción de Suzuki-Miyaura.

Para la obtención de los derivados **3a-c** a partir de la 2-fluoro-6-cloro-9-alkilpurina (**2a-c**), serie I y para los derivados **7a-c** a partir de la 2,6-dicloro-9-alkilpurina (**6a-c**), series II y III se utilizó el ácido 4-((trifluorometoxi)fenil)borónico y se consideró la utilización de dos bases diferentes con el objetivo de optimizar los rendimientos de la reacción. En una primera instancia se utilizó Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (s) en 1,4-dioxano dando un rendimiento de reacción de 33-41 % lo cual se debe a que esta base no fue completamente soluble en 1,4-dioxano. Posteriormente se utilizó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (s) el cual fue levemente más soluble llevando a un aumento discreto del rendimiento de la reacción entre un 45-51 %. Finalmente, se tomó en consideración que una de las ventajas que presenta la reacción de Suzuki es que no se ve afectada en presencia de cantidades pequeñas de agua y por ello se utilizó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M, esto hace que la base sea completamente soluble y pueda actuar de manera más eficiente en el ciclo catalítico aumentando el rendimiento total de la reacción entre un 70-85 %, Tabla 2.

**Tabla 2.** Porcentaje de rendimiento de la reacción de Suzuki al utilizar diferentes bases.

Compuesto	Base	% Rendimiento
<i>Prueba Inicial</i>		
<b>3b</b>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (s)	41%
<b>3b</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (s)	50%
<b>3b</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2 M	84%
<i>Reacciones estandarizadas con la base seleccionada</i>		
<b>3a</b>	<u>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M</u>	≈ 57%
<b>3b</b>		
<b>3c</b>		
<b>7a</b>	<u>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M</u>	≈ 84%
<b>7b</b>		
<b>7c</b>		

Considerando la disponibilidad de la sal de paladio, acetato de paladio II,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  y el complejo dicloruro de bis(trifenilfosfin)paladio (II),  $(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2)$ , se decidió utilizar este último en base a las características que presenta el ciclo catalítico del acoplamiento carbono-carbono de Suzuki. Si bien el ciclo requiere que el paladio se encuentre como Pd (0) para comenzar la reacción, las sales de Pd (0) que se encuentran disponibles comercialmente como  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  son inestables al aire y sensibles a la luz. Por esta razón, se debe comenzar con el paladio en estado de oxidación II. Como se observa en el Esquema 8. Lo primero que ocurre es la reducción de Pd (II) a Pd (0) y en ese sentido la fosfina es de gran utilidad ya que se oxida en presencia de la base utilizada en la reacción. De esta manera, el Pd (0) puede comenzar el ciclo catalítico.<sup>92</sup>



**Esquema 8.** Reducción de Pd (II) a Pd (0) y formación de óxido de fosfina.

Mediante un análisis de RMN  $^1\text{H}$  se observa que en 8,70 ppm ( $\text{H}2''$ , flecha roja) y 7,22 ppm ( $\text{H}3''$ , flecha azul) aparecen los dos dobletes correspondientes a los carbonos del anillo trifluorometoxifenilo del compuesto **7b**, Figura 22, Además del producto deseado, fue posible aislar el producto diarilado con trifluorometoxifenilo tanto en el C6 como en el C2 del anillo de purina ya que ambos son centros deficientes de electrones (espectro no mostrado).

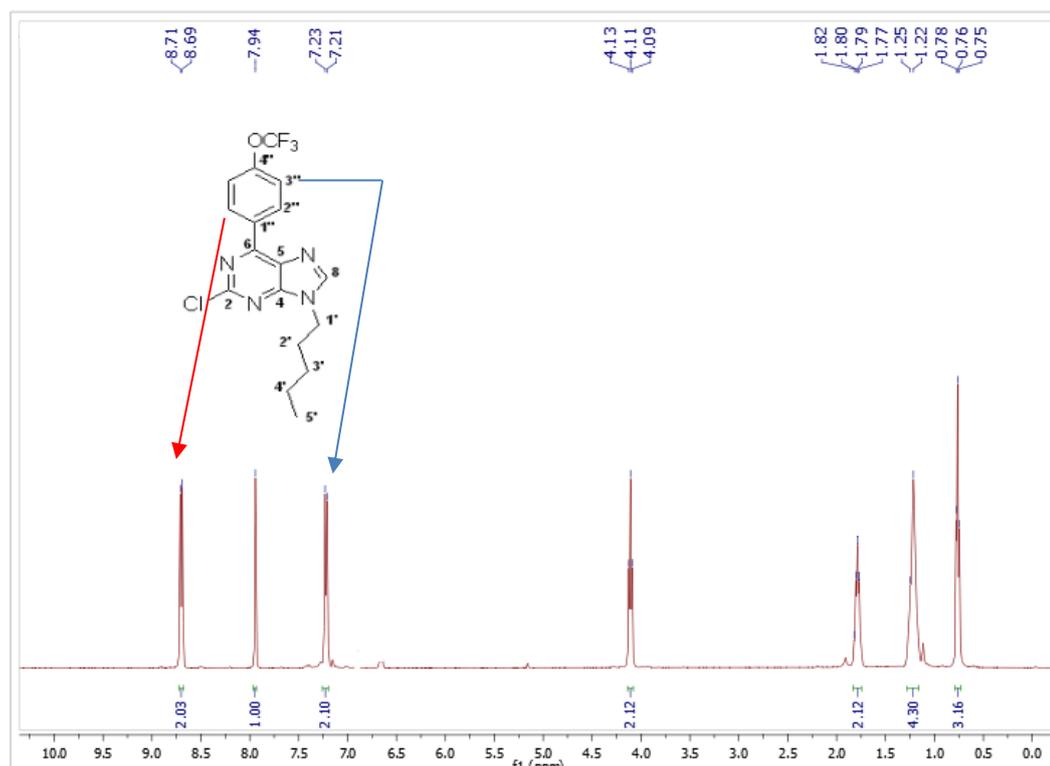


Figura 22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **7b**.

### 5.1.3 Obtención de los derivados finales **4a-s** (serie I): Sustitución Nucleofílica Aromática (S<sub>N</sub>Ar)

El último paso de reacción para acceder a los compuestos finales **4a-s** fue a través de una sustitución nucleofílica aromática sobre el C2 del heterociclo de purina con diferentes aminas alifáticas (derivados **4a-i**) o alicíclicas (derivados **4j-s**). El C2 al estar entre dos heteroátomos de nitrógeno es menos reactivo que el C6, debido a ello, se utilizó como solvente *n*-butanol por 12 h a reflujo y una base no nucleofílica voluminosa como DIPEA para evitar que exista competencia entre la base y las aminas presentes en el medio de reacción. El rendimiento de la reacción global fue entre 67-97 %. Cabe mencionar, que esta etapa de reacción fue posible llevarla a cabo bajo las mismas condiciones utilizando calentamiento a 90 °C en horno de microondas disminuyendo considerablemente el tiempo de reacción de 12 h (por calentamiento a reflujo) a 30 minutos (por

calentamiento con microondas). Se destaca que los rendimientos se mantuvieron inalterados por uno u otro método.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la Figura 23 se observan las señales características para el compuesto **4s**, las cuales contemplan las señales del anillo de piperazina que integra para 4 protones en 3.99 ppm (flecha azul) y en 3.50 ppm (flecha Roja).

Los análisis espectroscópicos, confirman que los 19 compuestos de la serie **I** fueron obtenidos con un rendimiento del último paso de la reacción que varió entre 67-97 %. Las propiedades espectroscópicas son descritas en la sección Material Anexo.

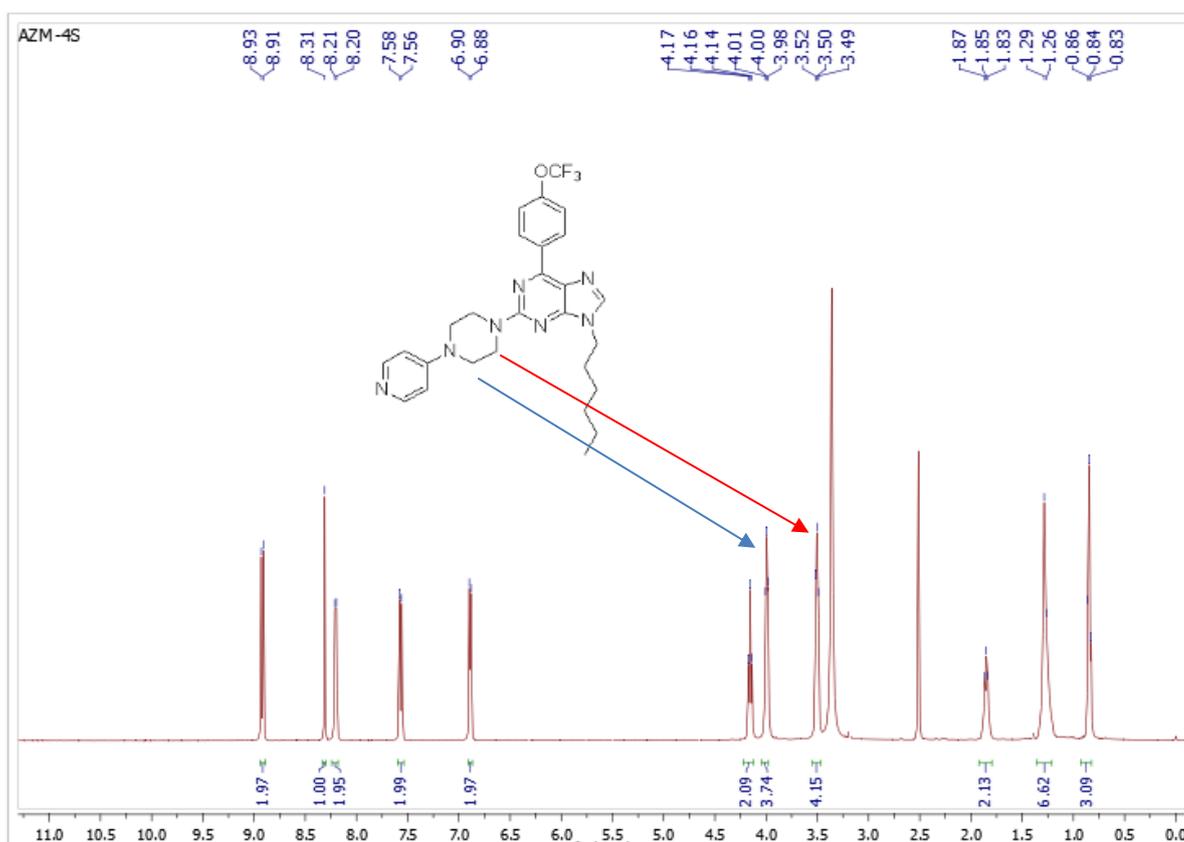
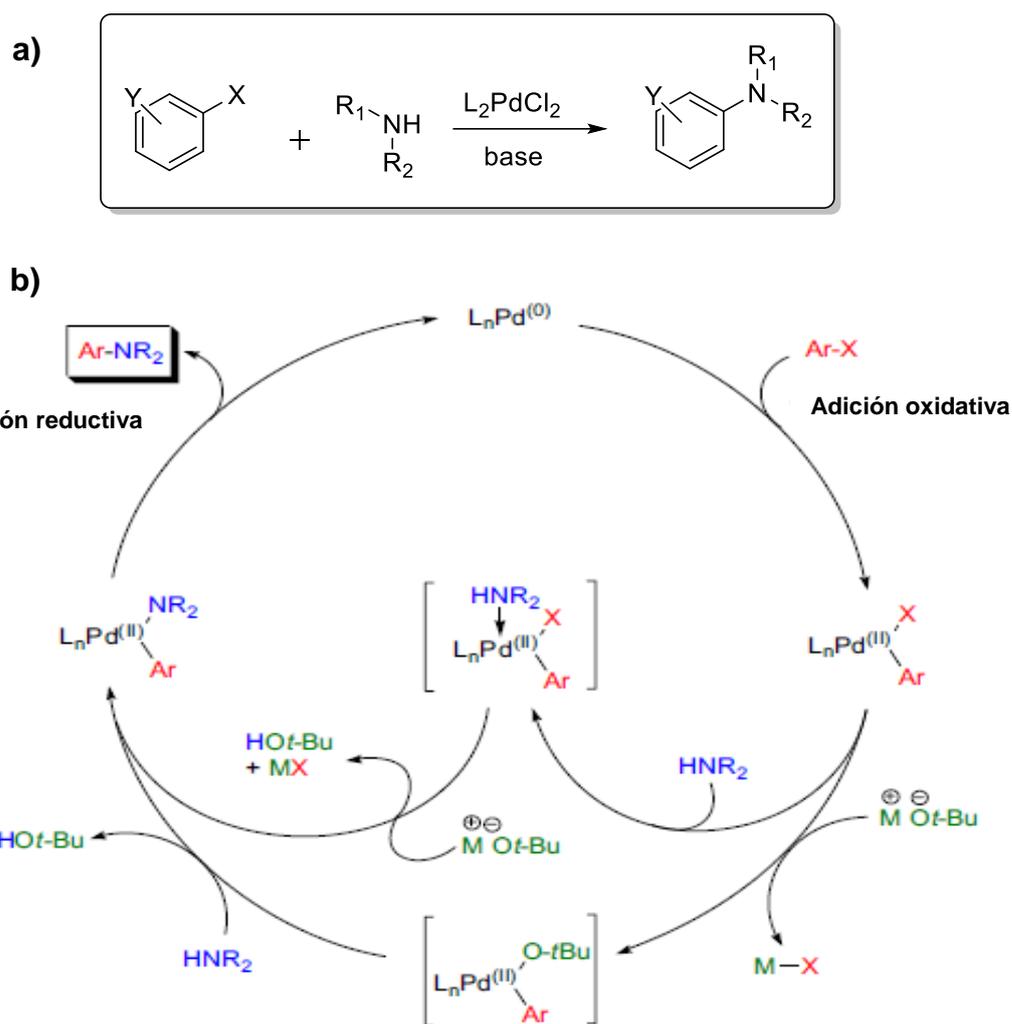


Figura 23. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4s**.

#### 5.1.4 Obtención de los derivados finales 11a-o (serie II): Reacción de acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig

El siguiente paso de la ruta sintética comprendió la formación de un enlace carbono-nitrógeno. Como primera etapa se realizó una reacción de sustitución nucleofílica aromática con 4-aminobenzoato de etilo en presencia de *ter*-butóxido (*t*-BuOK) en dimetilsulfóxido (DMSO). Esta reacción se llevó a cabo a reflujo durante 48 h y no se observó formación del producto. Debido a esto, se utilizaron condiciones más enérgicas mediante calentamiento por microondas a 100 °C durante 30 minutos. De este modo, se logró aislar el producto final con un 20 % de rendimiento. Finalmente, el producto fue purificado por cromatografía en columna utilizando como fase móvil éter de petróleo/acetato de etilo (4:1).

Como una forma de aumentar el rendimiento de los compuestos finales, se procedió a realizar una metodología alternativa para la formación del enlace carbono-nitrógeno a través de la reacción de acoplamiento cruzado C-N de Buchwald-Hartwig.<sup>67, 117-118</sup> Esta alternativa, consiste en la formación directa de enlaces C-N y C-O catalizada por paladio (habitualmente acomplexado con quelantes tipo fosfinas, tales como (BINAP, DPPF, Xantphos y DPBP) entre haluros de arilo y aminas (alifáticas, aromáticas, primarias y secundarias, imidas, amidas y sulfonamidas) o entre haluros de arilo y alcoholes (alifáticos o fenoles) siempre en presencia de una cantidad estequiométrica de una base, Figura 24.



**Figura 24. a)** Ecuación general y **b)** Mecanismo de reacción de Buchwald-Hartwig para la obtención del acoplamiento C-N de las moléculas propuestas.

El primer paso del ciclo catalítico de la reacción de Buchwald-Hartwig es la adición oxidativa del Pd (0) al haluro de arilo, generando la especie de Pd (II). En el segundo paso, la amina de Pd (II) puede formarse ya sea por desplazamiento directo del haluro por la amina o mediante el desplazamiento del haluro por la base con la consecuente adición de la amina. Por último, la eliminación reductiva da como resultado la formación del enlace C-N deseado.

Para llevar a cabo esta reacción se utilizó Pd(OAc)<sub>2</sub> en presencia del agente quelante Xantphos, en presencia de la base Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M en 1,4-dioxano. En una primera etapa se procedió a calentamiento por reflujo por 24 h, generando rendimientos de reacción de alrededor del 57 %. No obstante, con el objetivo de minimizar el tiempo de espera, se procedió a calentamiento a 90 °C mediante energía por microondas, lo cual redujo los tiempos a 30 minutos manteniendo los rendimientos (43-65 %). La purificación de estos productos se realizó por cromatografía en columna usando como fase móvil de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/5 % acetona. De esta manera se logró obtener los quince productos finales de la serie II (**11a-o**).

Las cinco anilinas utilizadas en esta reacción, entre ellas, morfolinanilina, tiomorfolinanilina, dimetilmorfolinanilina, metilpiperazinanilina y 4-fluoromorfolinanilina, fueron preparadas en una primera etapa mediante la amina correspondiente a partir del 4-fluoronitrobenceno en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, con un rendimiento superior al 90 %.

Posteriormente, la reducción del grupo nitro a la anilina correspondiente para las aminas **10a-e**, se realizó mediante un catalizador Pd/C en presencia de hidrógeno por 24 h a temperatura ambiente con un rendimiento superior al 97 %. Sin embargo, tiomorfolinanilina **10c** no se logró obtener bajo estas condiciones, ya que se produjo un envenenamiento del catalizador de Pd(II) por la presencia del átomo de azufre en la tiomorfolina. Por esta razón, esta reducción se realizó con Fe<sup>0</sup> en presencia de HCl por 24 h a temperatura ambiente, con un rendimiento de 54 %; no obstante, a las 48 h de reacción, el rendimiento aumentó a un 90 %.

En la Figura 25, se observa el espectro de <sup>1</sup>H y del compuesto **11b** donde en 7.43 ppm (flecha morada) apareció la señal del protón del grupo NH, en 7.91 ppm (flecha azul) y 7.22 ppm (flecha roja) se observaron los protones (H2''' y H3''' respectivamente) y en 4.15 ppm y 3.41 ppm se observaron las

señales correspondientes a los protones (H2''' y H3''') de la morfolina (flechas verdes) que demuestran la obtención del producto final.

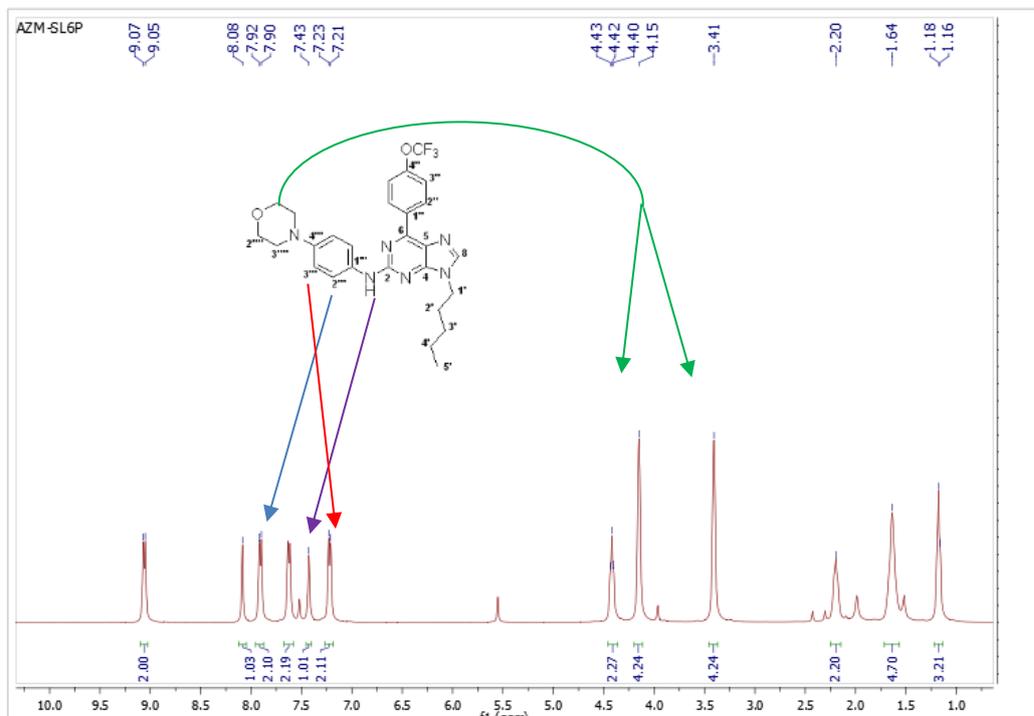
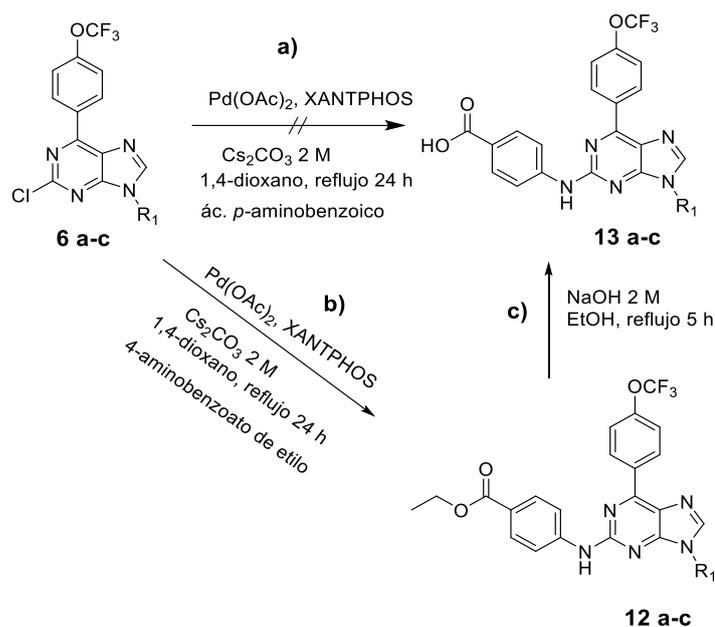


Figura 25. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **11b**.

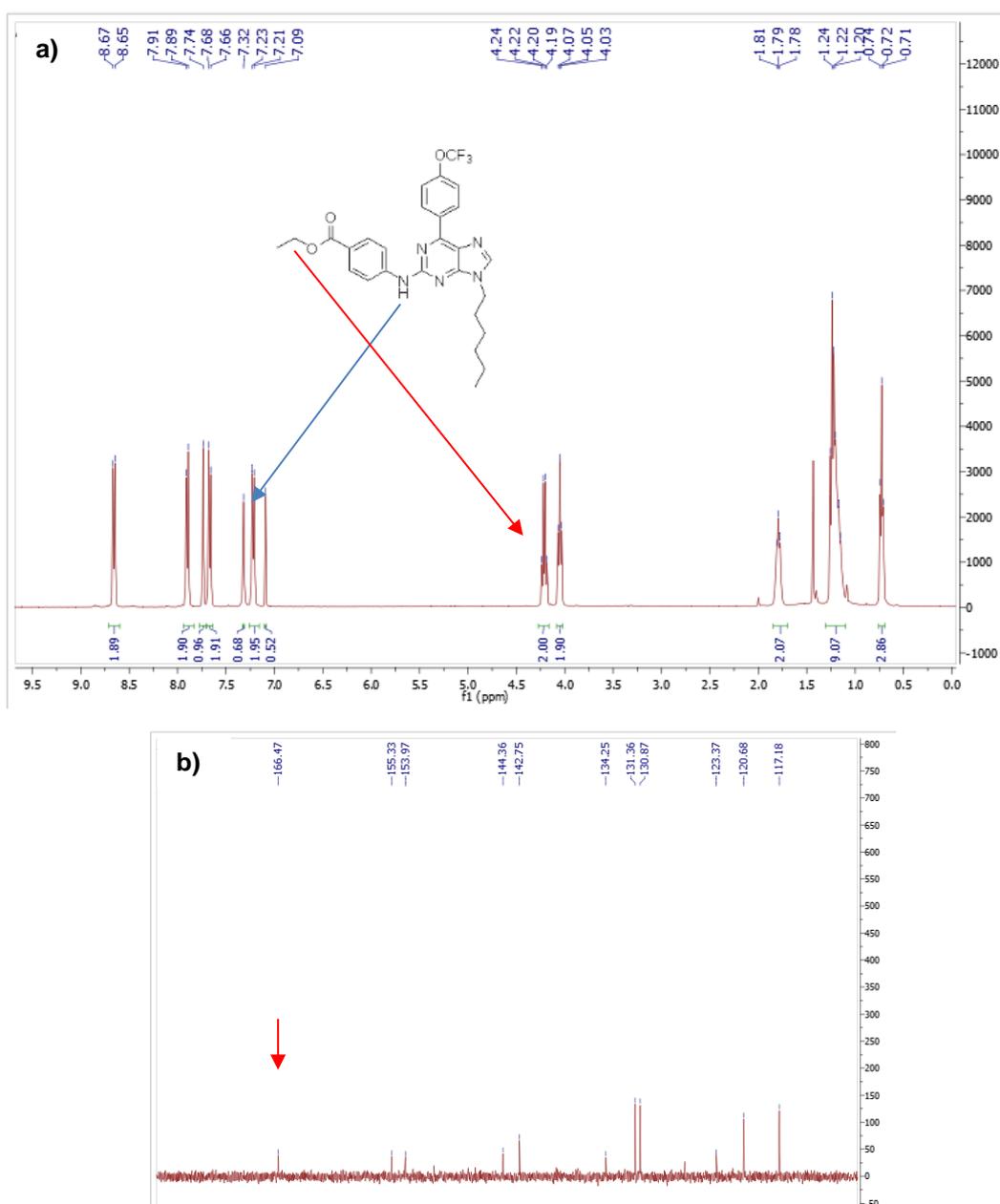
### 5.1.5 Obtención de los derivados finales 14a-o (serie III)

Para la obtención de los derivados de la serie III, al igual que en la **serie II**, también se procedió a la formación del enlace C-N mediante el acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig. Si bien esta reacción de acoplamiento inicialmente se intentó con el ácido *p*-aminobenzoico en las condiciones de reacción descritas en la Figura 26a, no se observó formación del producto debido que el carboxilato interacciona con el catalizador de paladio, interfiriendo en las etapas siguientes del ciclo catalítico. Es por este motivo, que se utilizó 4-aminobenzoato de etilo. Finalmente, se lograron obtener los derivados **12a-c** (Figura 26b) con un rendimiento entre 66-73 %.



**Figura 26.** a) Intento fallido para la obtención del producto **13a-c**. b) Ruta alternativa con la generación de los compuestos **12a-c**. c) Hidrólisis básica de **12a-c** para la obtención de **13a-c**.

En el espectro RMN <sup>1</sup>H de la Figura 27, se observa la formación del enlace C-N a 7.32 ppm (flecha azul) para el compuesto **12a**. También es posible observar que en la zona aromática se encuentran presentes las señales correspondientes a ocho protones de los dos anillos de benceno de la molécula. Finalmente, el grupo CH<sub>2</sub> del grupo etilo resuena a 4.21 ppm (flecha roja) confirmando la formación del producto esperado. Por lo demás en el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observó el carbono correspondiente al grupo carbonilo a 166.47 ppm (flecha roja).



**Figura 27. a)** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **12a**. **b)** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **12a**.

En una siguiente etapa de reacción, **12a-c** fue sometido a una hidrólisis básica para dar el producto deseado **13a-c** con un rendimiento del 96 %. Como se muestra en la Figura 28 en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **13a** se observa la aparición de un singulete a 10.10 ppm (flecha roja), correspondiente al hidrogeno del grupo hidroxilo perteneciente al ácido carboxílico.

Para la obtención de las moléculas finales de la serie **III**, se realizó una condensación entre los derivados de ácido carboxílico **13a-c** y diferentes anilinas (**10a-e**) con el agente acoplante hexafluorofosfato de O-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU), utilizando trietilamina o *N*-diisopropiletilamina (TEA/DIPEA) como base y dimetilformamida (DMF) como disolvente.<sup>69</sup>

En un inicio, se mantuvo la reacción a reflujo por 12 h, observando la aparición de la especie deseada según cromatografía en capa fina (CCF). Este compuesto se logró aislar cromatográficamente utilizando la fase móvil acetato de etilo/éter de petróleo en proporción (1:2). Posteriormente, mediante un análisis mediante RMN <sup>1</sup>H se observó que no correspondía al producto final de condensación del derivado de ácido carboxílico (**13a**) con las anilinas (**10a-e**), sino a un intermediario de reacción del derivado de ácido carboxílico con HATU (**13a-HATU**) que presenta intermediarios estables y por lo tanto aislables.

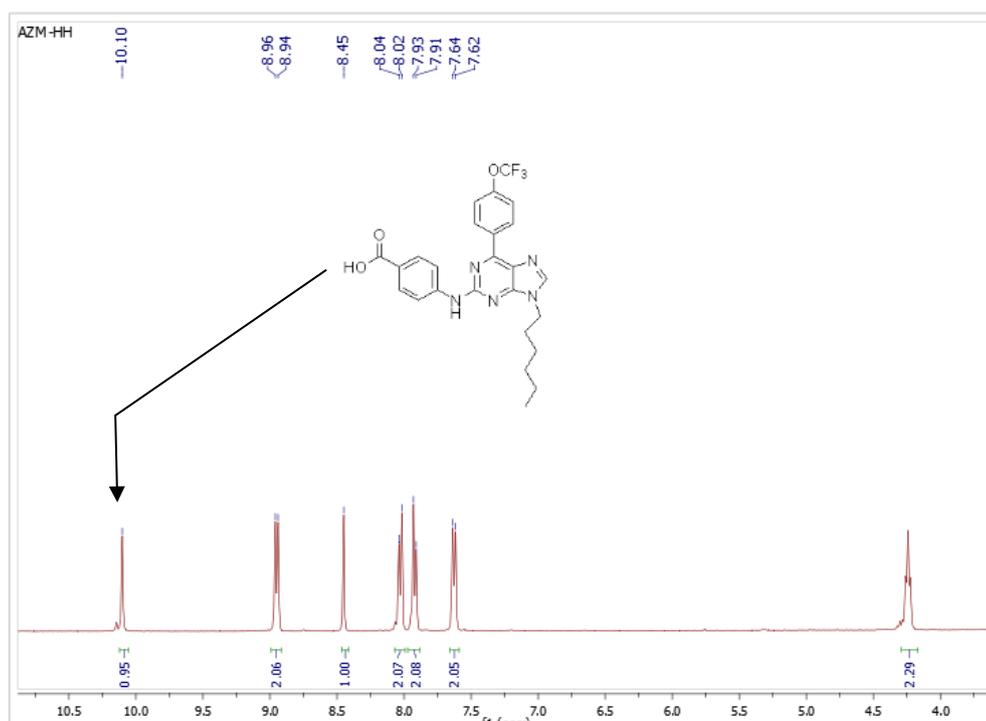
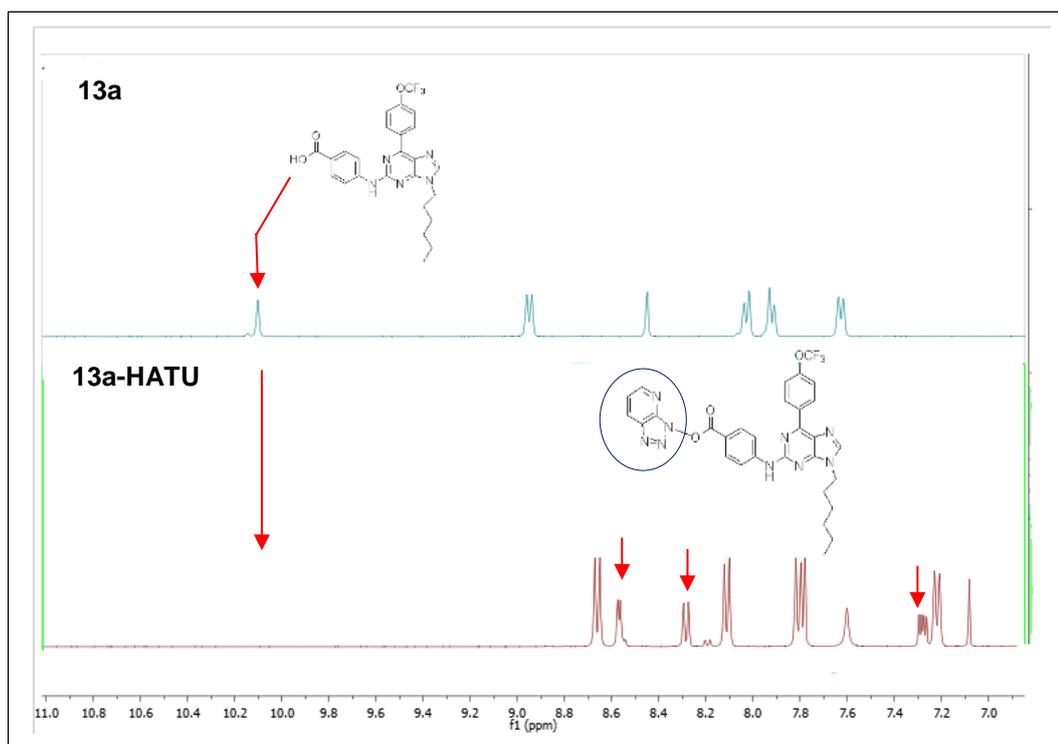


Figura 28. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **13a**.

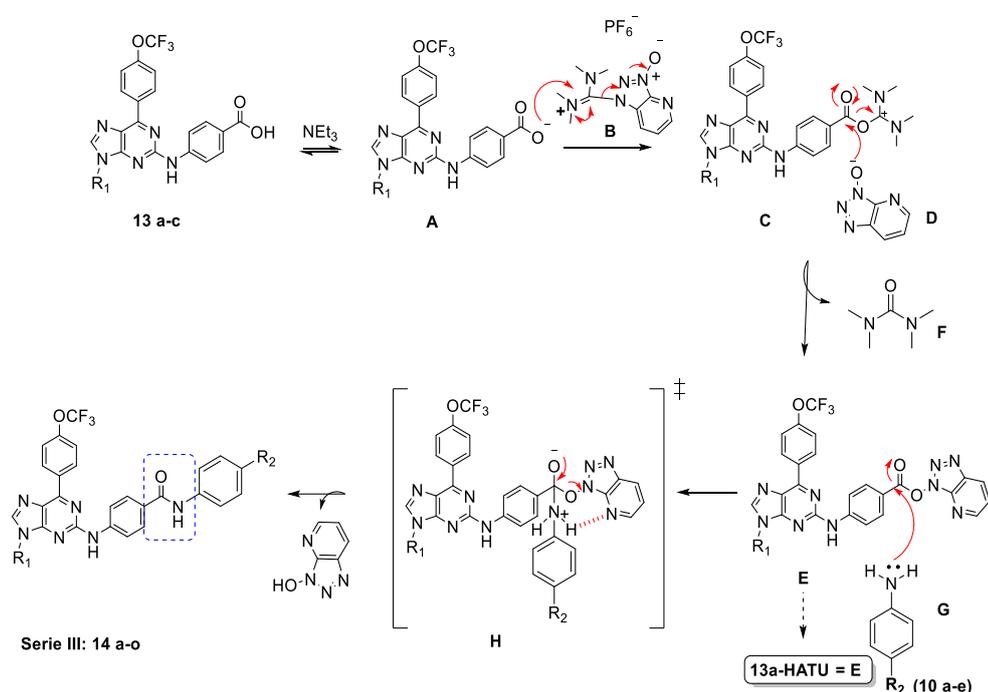
En la Figura 29, se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , donde se observa la desaparición del hidrógeno del grupo hidroxilo perteneciente al ácido carboxílico del compuesto **13a** y la aparición de señales aromáticas correspondientes al 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5]piridina **13a-HATU**.



**Figura 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **13a** en conjunto con el producto aislado de la reacción con el agente acoplante HATU (**13a-HATU**).

Para explicar la formación del producto anterior, es necesario considerar el mecanismo de la reacción de condensación entre el compuesto **13a** y las anilinas correspondientes (**10a-e**), el cual en términos generales se lleva a cabo en dos etapas.<sup>87</sup> Primero, ocurre una reacción entre el derivado de ácido carboxílico con el agente acoplante HATU para dar paso a la formación del éster activo con el desprendimiento de tetrametilurea. Posteriormente, en una segunda etapa ocurre la adición del nucleófilo (anilinas **10a-e**) al éster activo para proporcionar el producto final acilado.

En el mecanismo de reacción detallado, es representado en el Esquema 9. El anión carboxilato (**A**) (formado por la desprotonación con una base) ataca al agente acoplante HATU (**B**) para formar una sal inestable de O-acil-(tetrametil)isouronio (**C**). El anión *O*-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5]piridina (**D**) reacciona rápidamente con la sal isourónica, proporcionando el éster activo (**E**) liberando una cantidad estequiométrica de tetrametilurea (**F**). Posteriormente, la adición de un nucleófilo (**G**) al éster activo por medio de un intermediario (**H**) dio lugar el producto final de acilación.



**Esquema 9.** Mecanismo general de la formación de amidas, usando HATU como agente acoplante para la formación de las purinas 2.6.9 trisustituidas finales de la Serie III.

Con el objetivo de obtener las moléculas finales de la serie III, como se indica en el Esquema 9, se realizó un nuevo intento reacción con calentamiento a reflujo por 24 y 48 h. con HATU. Sin embargo, la CCF reveló la continua aparición del intermediario (**E**) en altas proporciones. Debido a esto se modificó la estrategia de síntesis como sigue.

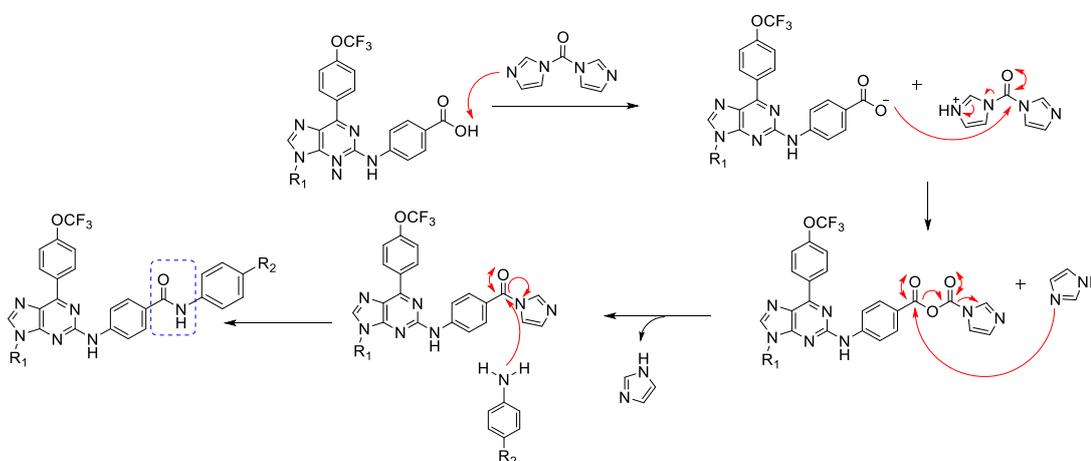
- 1) Cambiar de agente acoplante por CDI.

- 2) Realizar la reacción final con HATU y calentamiento en horno de microondas para aumentar la energía del sistema y desplazar el equilibrio hacia la formación de productos, además de aumentar la cantidad estequiométrica de anilina utilizada en un comienzo (1 equivalente de derivado de ácido (**13a-c**) por 1 equivalente de anilina) a 1.5 equivalentes de anilina.

- Estrategia 1:

El *N-N'* carbonildiimidazol (CDI) es un agente acoplante muy utilizado en la síntesis de enlaces peptídicos. Presenta la ventaja de ser soluble en una gran variedad de disolventes (DMF, THF, DMSO, acetona y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). En el mecanismo de reacción el ion carboxilato (generado por la adición de una base) éste, reacciona con el grupo carbonilo presente en la molécula de CDI generando un intermediario reactivo el cual se hace reaccionar con las anilinas correspondientes para dar paso al producto final, Esquema 10

En esta reacción no fue posible aislar el intermediario, ya que no es estable. La reacción se mantuvo a reflujo por 12, 24 y 48 h. A las 48 h de reacción fue posible aislar una pequeña cantidad de producto final con un 21 % de rendimiento que fue muy similar al obtenido con HATU a las 48 h de reacción a reflujo.

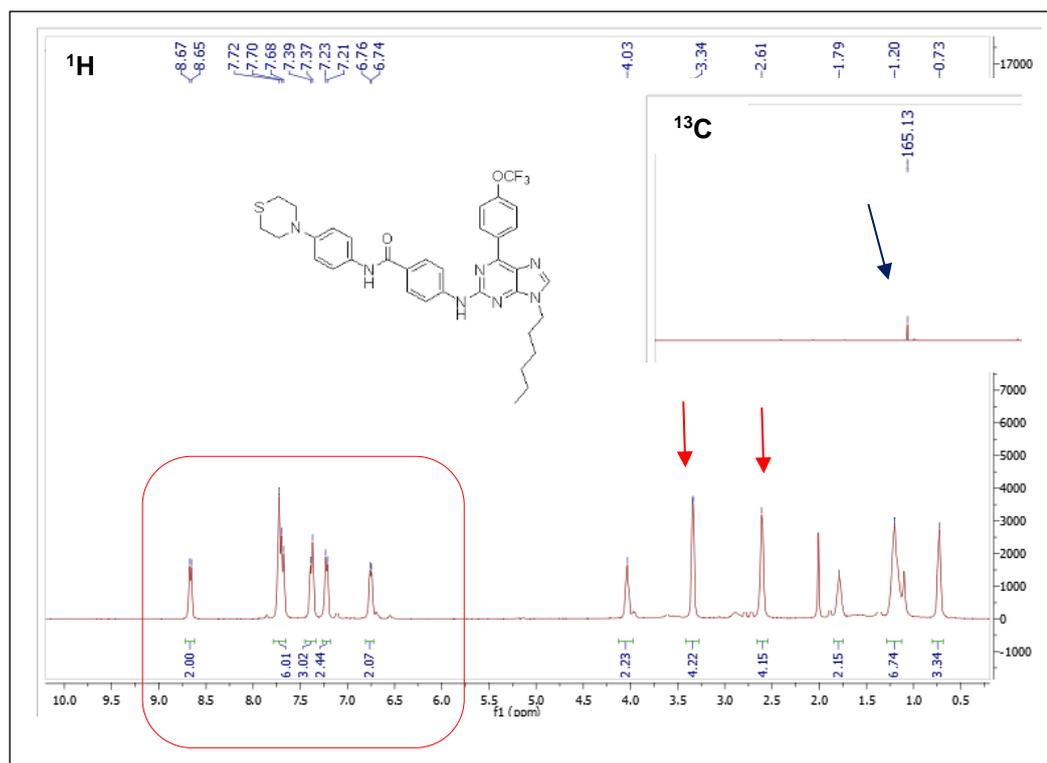


**Esquema 10.** Mecanismo general para la formación de amidas, usando CDI como agente acoplante para la formación de las purinas 2,6,9 trisustituidas.

- Estrategia 2:

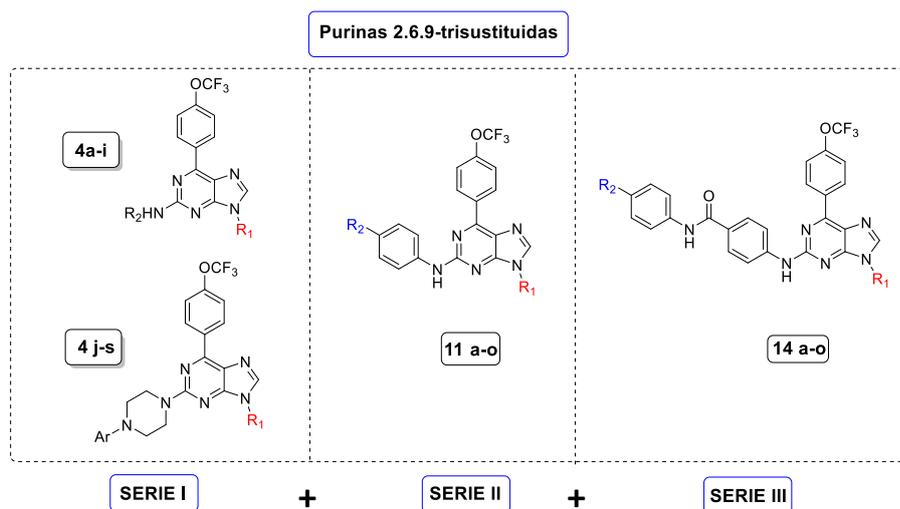
Se realizó la prueba de la reacción de condensación utilizando HATU como agente acoplante, bajo las mismas condiciones anteriores, pero esta vez usando energía de microondas durante 30 minutos a 90 °C. De esta manera se logró desplazar el equilibrio termodinámicamente hacia la formación de productos. Así, se lograron obtener los productos finales con un rendimiento moderado (38-55 %).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **14g**, se observan los 15 protones correspondientes a la zona aromática que comprende los tres anillos de benceno presentes en la molécula, el hidrógeno del C8 del anillo de purina y los hidrógenos de ambos grupos NH. Además, es posible apreciar dos singuletes que integran para cuatro protones en 3.34 y 2.61 correspondientes a los hidrógenos del grupo tiomorfolina. Por su parte, en una ampliación del espectro de  $^{13}\text{C}$  se observa a 165.13 ppm la presencia del carbonilo de la función amida, Figura 30.



**Figura 30.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **14g** y ampliación de la señal del carbonilo del grupo amida en RMN  $^{13}\text{C}$ .

La Figura 31 muestra un breve resumen de las estructuras de las cuarenta y nueve purinas 2,6,9-trisustituidas sintetizadas en esta tesis.



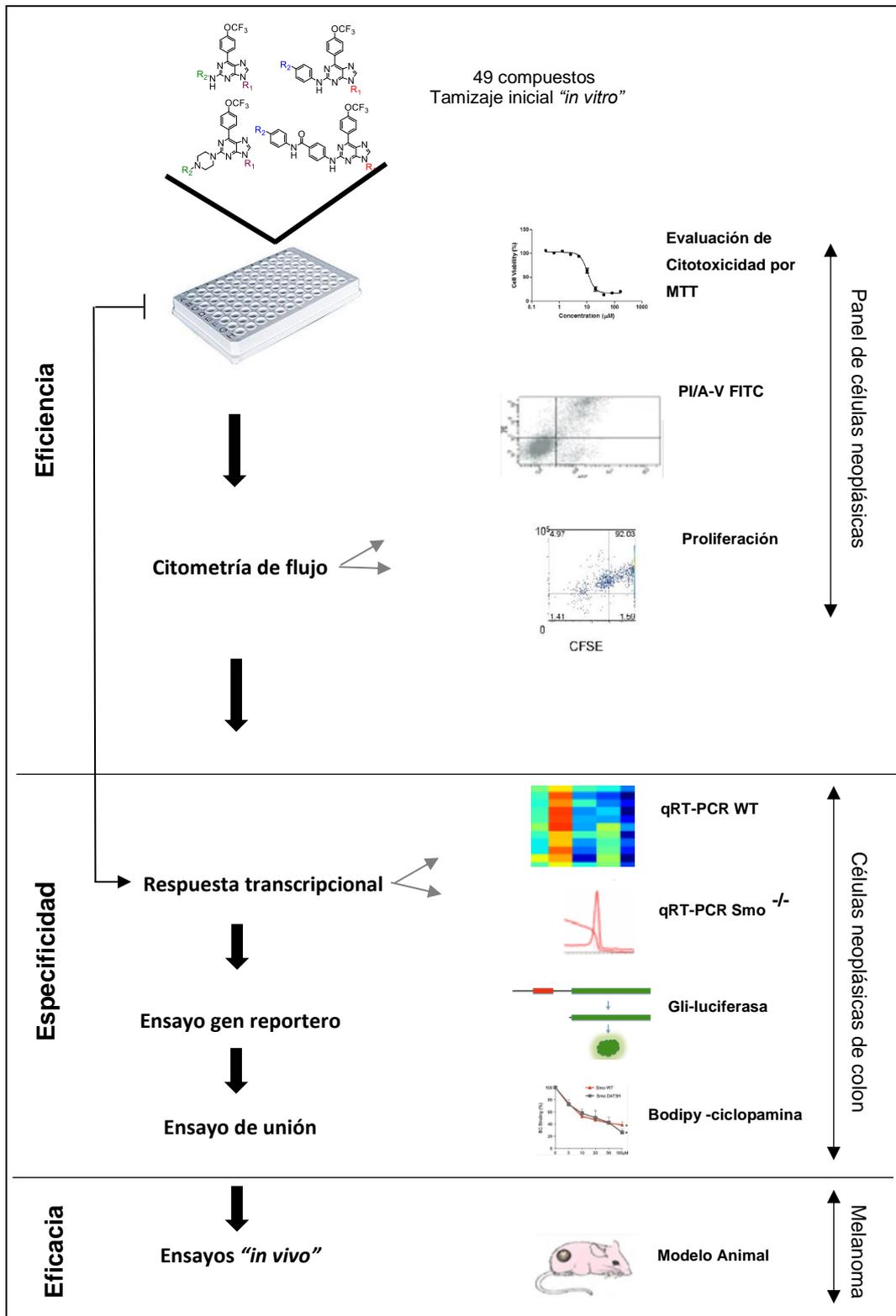
**Figura 31.** Representación de las estructuras bases de las moléculas finales de las series I-III.

## 5.2 Evaluación biológica de los compuestos

En el diagrama de flujo 1, se muestra una representación de la secuencia de ensayos biológicos “*in vitro*” que llevaron a la selección del compuesto líder **4s** por su propiedad como antagonista de la vía de señalización Hedgehog y su actividad antitumoral demostrada en ensayos “*in vivo*”. Cuarenta y nueve purinas 2.6.9-trisustituidas fueron sometidas a una etapa inicial de tamizaje a una concentración de 50  $\mu$ M, basándose en su capacidad de inducir citotoxicidad en un panel de líneas celulares neoplásicas de colon (HCT116, HT29), pulmón (H1975), meduloblastoma (DAOY) y la línea celular no neoplásica (HEK293) utilizando el ensayo colorimétrico de MTT. Como controles se utilizaron compuestos antineoplásicos como etopósido, cisplatino y 5-fluorouracilo, los cuales son tratamientos de primera línea de elección en quimioterapia de colon y pulmón. También se utilizó el antagonista Hh comercial vismodegib.

A los compuestos seleccionados bajo este filtro, se les determinó su concentración IC<sub>50</sub> en todas las líneas celulares ensayadas. El (los) compuestos seleccionados, fueron sometidos a una caracterización adicional como inhibidor(es)/antagonista(s) de Hh para lo cual se recurrió a otras metodologías experimentales que contemplaron los siguientes ensayos: **i)** Evaluación del tipo de muerte celular, mediante los marcadores PI/Anexina-V FITC; **ii)** Inhibición de la proliferación celular mediante la incorporación de la sonda CFSE; **iii)** Inhibición de los genes implicados en la ruta Hh, determinados por qRT-PCR en células nativas de cáncer de colon HT29 (WT, *Wild Type*) y en células MEF Smo<sup>-/-</sup> (*Smo knockout*); **iv)** Ensayo del gen reportero de luciferasa (Gli-luciferasa) en línea celular de cáncer de colon HCT116; **v)** Ensayos de desplazamiento mediante la incorporación de Bodipy-ciclopamina en células HEK293 transfectadas con Smo WT y Smo mutante D473H; **vi)** Evaluación de la eficiencia antitumoral “*in vivo*” mediante un modelo animal de melanoma de ratón.

**Diagrama 1.** Identificación de purinas 2,6,9-trisustituidas como inhibidores Hh.



### **5.2.1 Evaluación del efecto citotóxico de purinas 2,6,9 tri-sustituidas en un panel de líneas celulares neoplásicas y una línea no neoplásica. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT**

Si bien la capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de viabilidad celular, la determinación de esta capacidad después de su exposición a un compuesto permite además obtener información acerca de la toxicidad celular del compuesto en evaluación. Esta técnica se ha utilizado en una variedad de ensayos que incluyen desde citotoxicidad<sup>119</sup> hasta proliferación.<sup>120</sup>

Para acceder a la selección del (los) mejor (es) inhibidor (es)/antagonista (s) del receptor Smo de la vía de señalización Hedgehog a partir de las 49 purinas 2,6,9-trisustituidas sintetizadas en este trabajo, se evaluó como punto de partida, su citotoxicidad en un tamizaje de doble filtro contra un panel de cuatro líneas celulares neoplásicas (HT29, HCT116, H1975 y DAOY) que expresan -en mayor o menor proporción- todos los genes de la vía de señalización Hedgehog, tales como Gli, SuFu, HHIP o Ptch1, lo que se ha reportado ampliamente en literatura especializada.<sup>101, 121</sup> Como control de células no neoplásicas, se utilizó en todos los casos la línea celular humana de riñón HEK293.

Para asegurar la calidad del cultivo celular utilizado, en la sección Material Anexo, Figura Anexo 1 se muestran las Microfotografías de los controles de las líneas celulares utilizadas en esta tesis que fueron capturadas a través de microscopia de contraste de fases.

Cada línea celular mostró la morfología característica reportada en el catálogo ATCC y los ensayos se realizaron respetando una concentración y confluencia adecuada para este estudio. Además, cada línea utilizada en este estudio reportó tener alta expresión de genes pertenecientes a la vía

Hh como Gli1, Ptch1 y HHIP (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>, consultado el 10-08-2019).

La Tabla Anexo 1 y Tabla Anexo 2 (ver material anexo), muestran los datos de porcentaje de citotoxicidad correspondiente al primer filtro de los cuarenta y nueve compuestos sintetizados en esta tesis. Ellas, se generaron a partir de la información de su efecto citotóxico a una concentración fija de 50  $\mu$ M obtenido mediante el ensayo de MTT en las líneas celulares neoplásicas seleccionadas que expresan los genes de la vía Hh y de la línea celular de meduloblastoma DAOY que, además de expresar los genes de la vía Hh, presenta una mutación independiente de ligando en el receptor Ptch1 por lo que la vía Hh se encuentra aberrante y permanentemente activada.<sup>62</sup> Reportes actuales, demuestran que en la línea DAOY, los antagonistas comerciales ciclopamina y sonidegib presentan un efecto citotóxico que también es observado en otras líneas neoplásicas, no así el fármaco vismodegib que por presentar un fenotipo diferente no se ve asociado a generar citotoxicidad en ninguna de las líneas neoplásicas dependientes de la vía Hh.<sup>97</sup>

La Tabla 3, muestra los valores del porcentaje de citotoxicidad para los mejores compuestos de las series **I-III** en las líneas celulares de cáncer de colon (HT29 y HCT116), cáncer de pulmón H1975, meduloblastoma DAOY y la línea celular no neoplásica HEK293. El análisis de estos datos muestra una respuesta diferencial de cada compuesto en las distintas líneas celulares, lo que podría explicarse por lo mencionado anteriormente y que dice relación a la abundancia relativa en cada línea de los componentes de la vía Hedgehog. En los compuestos de la serie **I**, 6 de 19 mostraron una actividad citotóxica mayor al 50 % luego de 72 h de tratamiento, no obstante, los compuestos **4r** y **4s** fueron los que presentaron el mayor grado de citotoxicidad (superior al 80 %) a la concentración de 50  $\mu$ M en la mayoría de las líneas celulares neoplásicas ensayadas. Se demostró, además, que el grado de citotoxicidad en la línea no neoplásica HEK293

(control) fue menor al 50 % para todos los compuestos, lo que sugiere la selectividad de estos compuestos por las líneas neoplásicas versus las líneas celulares no oncogénicas.

La eficiencia citotóxica mostrada por los compuestos **4r** y **4s** demuestra que la sustitución del C2 del anillo de purina con una amina cíclica y un anillo aromático que contenga un nitrógeno como el grupo 1-metil-4-(piridin-4il) piperazina sería esencial para obtener derivados más potentes comparado con los derivados alicíclicos. Se destaca, además que **4r** y **4s** fueron más efectivos que vismodegib, un antagonista comercial de Smo y que se ha reportado que muestra una citotoxicidad en distintas líneas celulares cancerígenas con un IC<sub>50</sub> igual o superior a 100µM.

En el caso de la serie **II**, sólo 5 de 15 compuestos mostraron un grado de citotoxicidad que bordeó o fue superior al 50 % encontrándose diferencias entre los mismos compuestos y entre las distintas líneas celulares ensayadas. Los compuestos más promisorios en esta serie, aunque con un efecto diferencial entre las líneas celulares cancerígenas fueron **11a**, **11d**, **11g**, **11j** y **11m**. Por otra parte, 4 de 15 compuestos de la serie **III** (**14b**, **14g**, **14j** y **14m**), mostraron tener un efecto citotóxico moderado en las líneas neoplásicas.

Del análisis de los compuestos de las series **II** y **III** se desprende que la incorporación del conector benzamida de los derivados de la serie **III**, no tuvo un efecto mayor en la obtención de compuestos más potentes con respecto a los derivados de la serie **II**. Sin embargo, en ambos casos la sustitución con grupos como morfolina o metilpiperazina llevó a derivados más potentes en todas las líneas celulares neoplásicas ensayadas. Para las series **I-III**, fue posible observar que la mayoría de los compuestos que presentaron un porcentaje de citotoxicidad más elevado en el ensayo de MTT poseen un patrón de sustitución en el *N9* de la purina con un grupo

hexilo, sugiriendo que cadenas alquílicas  $\geq 6$  átomos de carbono podrían tener un efecto importante para la actividad de los compuestos.

Ninguno de los compuestos ensayados fue citotóxico para la línea celular no neoplásica HEK293 comparados con las drogas comerciales de uso habitual en las terapias de cáncer de colon, pulmón y meduloblastoma que sí resultaron ser citotóxicos para estas células.

Los compuestos seleccionados a partir de la Tabla 3, aquellos que presentaron un porcentaje de citotoxicidad superior al 60 % en las líneas celulares neoplásicas y la línea de meduloblastoma DAOY y, que además no resultaron ser tóxicos para las células HEK293, fueron sometidos a un segundo filtro de selección en una evaluación dosis-respuesta mediante el ensayo de MTT a concentraciones crecientes de los compuestos (Tabla 4) cuyo valor da cuenta del  $IC_{50}$  de estos. Además, se incorporaron dos líneas de adenocarcinoma pancreático metastásico (ASPC1) y no metastásico (BXPC3) que son altamente resistentes a los tratamientos anticancerígenos actuales y presentan una elevada expresión de todos los componentes de la vía Hh.<sup>122</sup>

**Tabla 3.** Evaluación de la citotoxicidad de los mejores compuestos de las series I-III en un panel de 4 líneas celulares neoplásicas y una línea celular no neoplásica HEK293. Los valores muestran el porcentaje de citotoxicidad (cuantificado por una disminución de la viabilidad celular) a una única concentración de 50  $\mu$ M a 72 h de tratamiento para cada compuesto.

compuesto				HCT116 <sup>a</sup>	HT29 <sup>b</sup>	H1975 <sup>c</sup>	DAOY <sup>d</sup>	HEK293 <sup>e</sup>
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>						
<b>4a</b>	butilo		68±0.3	<50	66±0.9	82±6.2	<50	
<b>4b</b>	pentilo		53±0.9	<50	<50	94±0.4	<50	
<b>4r</b>	pentilo		81±0.8	<50	<50	92±0.4	<50	
<b>4s</b>	hexilo		99±0,4	<50	99±0.2	98±0.3	<50	
<b>11a</b>	hexilo		69±3.2	65±6.2	64±2.3	73±4.9	<50	
<b>11d</b>	hexilo		55±5.2	67±4.6	78±6.2	<50	<50	
<b>11g</b>	hexilo		57±2.4	69±2.8	75±4.2	<50	<50	
<b>11j</b>	hexilo		61±1.8	59±2.8	69±3.2	65±4.7	<50	
<b>11m</b>	hexilo		65±4.7	61±5.8	75±5.2	<50	<50	
<b>14b</b>	pentilo		<50	55±6.8	<50	68±5.3	<50	
<b>14g</b>	hexilo		63±5.1	49±1.6	<50	<50	55±6.3	
<b>14j</b>	hexilo		61±1.8	59±2.8	69±3.2	65±4.7	<50	
<b>14m</b>	hexilo		65±4.7	61±5.8	75±5.2	<50	<50	
<b>vismodegib</b>			<50	<50	<50	<50	<50	
<b>etopósido</b>			90±0.5	----	60±1.1	----	65±0.7	
<b>cisplatino</b>			----	----	----	88±0.7	88±0.7	
<b>5-FU</b>			62±2.8	66±1.7	----	----	66±4.7	

Ensayo de MTT en líneas neoplásicas de <sup>a</sup>HCT116 y <sup>b</sup>HT29 (carcinoma de colon). <sup>c</sup>H1975 (carcinoma de pulmón). <sup>d</sup>DAOY (meduloblastoma). <sup>e</sup>HEK293 (células de riñón humano no neoplásicas). Los compuestos que presentaron citotoxicidad menor al 50 % en todas las líneas cancerígenas no son mostrados en esta tabla y sus valores se encuentran disponibles en Material Anexo, Tabla Anexo 1 y Tabla Anexo 2.

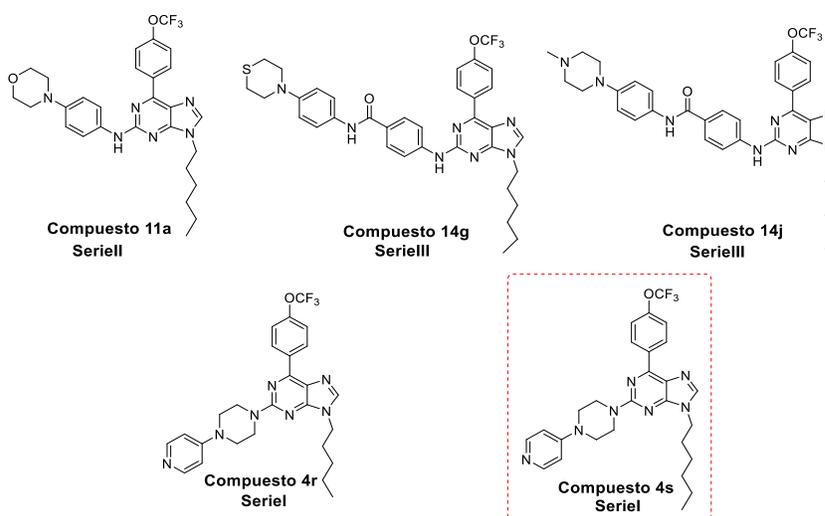
**Tabla 4.** Determinación del IC<sub>50</sub> (μM) e índice de selectividad (IS) para los compuestos **4a**, **4b**, **4r**, **4s**, **11a**, **14g** y **14j** contra un panel de seis líneas celulares neoplásicas que expresan todos los componentes de la vía Hh en altos niveles y una línea no neoplásica HEK293. El valor de IC<sub>50</sub> representa la concentración del compuesto donde la viabilidad celular se reduce en un 50 %.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) HCT116 <sup>a</sup>	IS	IC <sub>50</sub> (μM) HT29 <sup>b</sup>	IS	IC <sub>50</sub> (μM) H1975 <sup>c</sup>	IS	IC <sub>50</sub> (μM) DAOY <sup>d</sup>	IS	IC <sub>50</sub> (μM) AsPC-1 <sup>e</sup>	IS	IC <sub>50</sub> (μM) BxPC-3 <sup>f</sup>	IS	IC <sub>50</sub> (μM) HEK-293 <sup>g</sup>
<b>4a</b>	32 ± 0.3	>1.6	>50	>1.0	34 ± 0.9	>1.5	18 ± 0.2	>2.7	20.1 ± 0.3	>2.5	>50	>1.0	>50
<b>4b</b>	47 ± 0.9	>1.1	>50	>1.0	30 ± 1.0	>1.7	>50	>1.0	23.2 ± 0.2	>2.2	>50	>1.0	>50
<b>4r</b>	19 ± 0.8	>2.6	>50	>1.0	7.7 ± 0.4	>6.5	6.5 ± 0.4	>7.7	>50	>1.0	>50	>1.0	>50
<b>4s</b>	1.3 ± 0.4	>38	15 ± 1.2	>3.3	1.5 ± 0.3	>33	1.4 ± 0.2	>36	1.7 ± 0.05	>29	4.1 ± 0.9	>12	>50
<b>11a</b>	>50	>1.0	-	-	21 ± 1.5	>2.4	>50	>1.0	>50	>1.0	>50	>1.0	>50
<b>14g</b>	46 ± 0.6	>1.1	-	-	>50	>1.0	>50	>1.0	>50	>1.0	>50	>1.0	>50
<b>14j</b>	18 ± 0.1	>2.7	15 ± 0.9	3.3	>50	>1.0	12 ± 0.4	>4.2	>50	>1.0	>50	>1.0	>50
<b>Vismodegib</b>	>50	>1.0	>50	>1.0	>50	>1.0	>50	>1.0	>50	>1.0	>50	>1.0	>50
<b>Etopósido</b>	9.8 ± 0.5	>0.9	-	-	40 ± 0.2	>1.2	-	-	-	-	-	-	8.4 ± 0.7
<b>Cisplatino</b>	-	-	-	-	-	-	12 ± 0.7	>1.0	-	-	-	-	12 ± 1.4
<b>5-FU</b>	31 ± 0.3	>0.03	0.51 ± 0.06	>1.6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83 ± 0.07
<b>Gemcitabina</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3 ± 0.09	>25	0.2 ± 0.07	>38	7.5 ± 0.6

<sup>a</sup>HCT116 y <sup>b</sup>HT29 (carcinoma humano de colon. Expresión mRNA de genes Hh = 8.40 y 7.55 respectivamente). <sup>c</sup>H1975 (carcinoma humano de pulmón. Expresión mRNA de genes Hh = 8.70). <sup>d</sup>DAOY (meduloblastoma humano. Expresión mRNA de genes Hh = 17.05). <sup>e</sup>ASPC1 (Adenocarcinoma pancreático humano metastásico. Expresión mRNA de genes Hh = 6.80), <sup>f</sup>BXPC3 (Adenocarcinoma pancreático humano. Expresión mRNA de genes Hh = 6.80), <sup>g</sup>HEK293 (células de riñón humano no cancerígenas. Expresión mRNA de genes Hh = 6.85). Valores de expresión de mRNA de genes Hh son considerados elevados sobre 4.0 (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=2735>, revisado 1-12-2019). Los valores muestran el promedio ± DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

En la Tabla 4, se observa que los compuestos **4a**, **4b**, **4r**, **11a**, **14g** y **14j** presentaron valores de IC<sub>50</sub> en el rango de 12 a 40 µM y un índice de selectividad cercano a 1 en líneas celulares de pulmón, colon y meduloblastoma. Sólo el compuesto **4s** de la serie I fue citotóxico en todas las líneas celulares neoplásicas ensayadas con un valor de IC<sub>50</sub> que osciló entre 1.3 µM y 15 µM según la línea ensayada, superando en un orden de 40 veces al antagonista comercial vismodegib y 7 veces a agentes antineoplásicos de primera línea, como; etopósido, cisplatino, 5-FU o gemcitabina, según corresponda a cada tipo de cáncer. Además, fue 40 veces más selectivo por células neoplásicas que por células no neoplásicas HEK293, lo cual es deseable al momento de buscar la estructura de un compuesto líder que sea selectivo sobre células neoplásicas.<sup>123</sup>

En la Figura 32 se representan las estructuras de los compuestos **4s**, **4r**, **11a**, **14g** y **14j**, los cuales fueron seleccionados mediante un análisis de sus valores de citotoxicidad (IC<sub>50</sub>) y, su índice de selectividad en células neoplásicas vs células no neoplásicas.



**Figura 32.** Estructura de los compuestos que presentaron mayor potencia citotóxica (IC<sub>50</sub>) e índice de selectividad (IS) de las series I-III.

Una vez seleccionados los mejores compuestos de las series I, II y III, en base a su respuesta de citotoxicidad, se determinó cuál de ellos inhibía la expresión génica de los mediadores intracelulares de la vía Hedgehog (mecanismo clásico en moléculas con actividad antagonista y/o inhibidora) a través de un PCR en tiempo real (Figura 33). Luego de analizar los genes para Gli1, Ptch1 y HHIP, responsables de la activación y transducción de la vía canónica Hh, se observó que a una concentración de 10  $\mu$ M de cada compuesto, utilizando la línea de adenocarcinoma colorrectal HT29, que entre todas las líneas estudiadas posee los más altos niveles de expresión de la vía Hedgehog, sólo el compuesto **4s** reprimió significativamente la respuesta de la expresión de Gli1, Ptch1 y HHIP de manera comparable al control vismodegib luego de 24 h de tratamiento. Los compuestos **4r**, **11a**, **14g** y **14j** no indujeron cambios en la expresión de Gli1 por lo que se sugiere que sólo **4s** estaría involucrado en la inhibición de la vía de señalización Hh.

	Expresión de genes droga/control a 24 h					
	<b>4s</b>	<b>4r</b>	<b>11a</b>	<b>14g</b>	<b>14j</b>	<b>vismodegib</b>
<b>Gli1</b>	0.3	0.8	1.0	0.9	0.8	0.4
<b>Ptch1</b>	0.1	0.8	0.9	0.9	1.2	0.1
<b>HHIP</b>	0.3	1.1	1.1	1.1	0.9	0.6

**Figura 33.** Niveles de expresión de mRNA blanco de genes Hh que son mostrados como la razón de los valores Ct normalizados por los genes TBP y HMBS (*housekeeping*) de las células HT29 bajo diferentes tratamientos con los compuestos a 10  $\mu$ M sobre los valores Ct normalizados con el control DMSO. Color blanco: indica que no hay cambios comparado con el control y es expresado con valores cercanos o igual a 1. Color azul: indica una represión de los genes blanco de Hh con valores bajo 0.6. Los valores muestran el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Al analizar en conjunto los datos aportados por el ensayo de citotoxicidad más el análisis por PCR en tiempo real, se puede inferir que el efecto inhibitorio de la vía de señalización Hh no estaría estrechamente relacionada con la citotoxicidad de los compuestos. Es por ello, que se quiso determinar el tipo de muerte celular (apoptosis/necrosis) que tendrían los compuestos sintetizados en las líneas celulares ensayadas.

### **5.2.2 Evaluación del tipo de muerte celular mediante citometría de flujo**

Para definir el tipo de muerte celular por el cual los cinco compuestos seleccionados indujeron citotoxicidad, se evaluó mediante ensayos por citometría de flujo la inducción de muerte por apoptosis o necrosis en las líneas celulares neoplásicas HCT116, HT29, H1975, DAOY y no neoplásicas HEK293.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso celular que se encuentra genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte frente a determinados estímulos. Lo que diferencia a la apoptosis frente a otros tipos de muerte celular, radica en el control que ejercen las células sobre su propio destino y en condiciones normales constituye un mecanismo fundamental para mantener la homeostasis del organismo.<sup>124</sup> Otro tipo de muerte celular habitual es la necrosis donde, las células están destinadas irrevocablemente a morir sufriendo daño en su estructura celular y no poseen control de su destino como en la apoptosis.

La detección del tipo de muerte celular para los compuestos **4r**, **4s**, **11a**, **14g** y **14j**, se efectuó mediante el estudio de la alteración de membrana de las células seleccionadas por citometría de flujo (FC). Como una aproximación inicial, rápida y poco costosa, se decidió cuantificar la medida de la emisión de

fluorescencia de las células frente a un marcador catiónico como yoduro de propidio (PI) que es un agente intercalante del ADN y presenta como característica principal que no tiene la capacidad para penetrar la membrana de células vivas, por lo que no puede unirse a su ADN. De esta manera, el marcaje de células con PI es útil para diferenciar células apoptóticas de necróticas.<sup>125</sup>

En la Figura 34a se muestra el porcentaje de células vivas y muertas por apoptosis y/o necrosis luego de la incubación con las cuatro líneas neoplásicas (DAOY, H1975, HCT116, HT29) y control (HEK293) con 25  $\mu$ M de cada compuesto por un periodo de 24h. Los resultados mostraron:

La línea DAOY, presentó un 94 % de viabilidad celular al inicio del experimento y sólo un 6 % de muerte por apoptosis (indicativo de un cultivo en buenas condiciones). Luego de 24 horas de tratamiento con los compuestos seleccionados a una dosis de 25  $\mu$ M se observó:

- El compuesto **4s** redujo significativamente la población de células viables a un 2 %, aumentando la población de células muertas por apoptosis en un 84 % y por necrosis en un 14 %.
- Tanto los compuestos **4r**, **11a**, **14g** y **14j** no indujeron una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular, observándose tan sólo un 12 % de muerte por apoptosis.
- Los controles experimentales vismodegib y etopósido, no indujeron una disminución significativa de la viabilidad comparado con las células control (vehículo, DMSO < 1 %).

La línea celular de cáncer de pulmón H1975, presentó un 89 % de viabilidad celular al inicio del experimento y sólo un 8 % de muerte por apoptosis (indicativo de un cultivo en buenas condiciones). Luego de 24 horas de tratamiento con los compuestos seleccionados a una dosis de 25  $\mu$ M se observa:

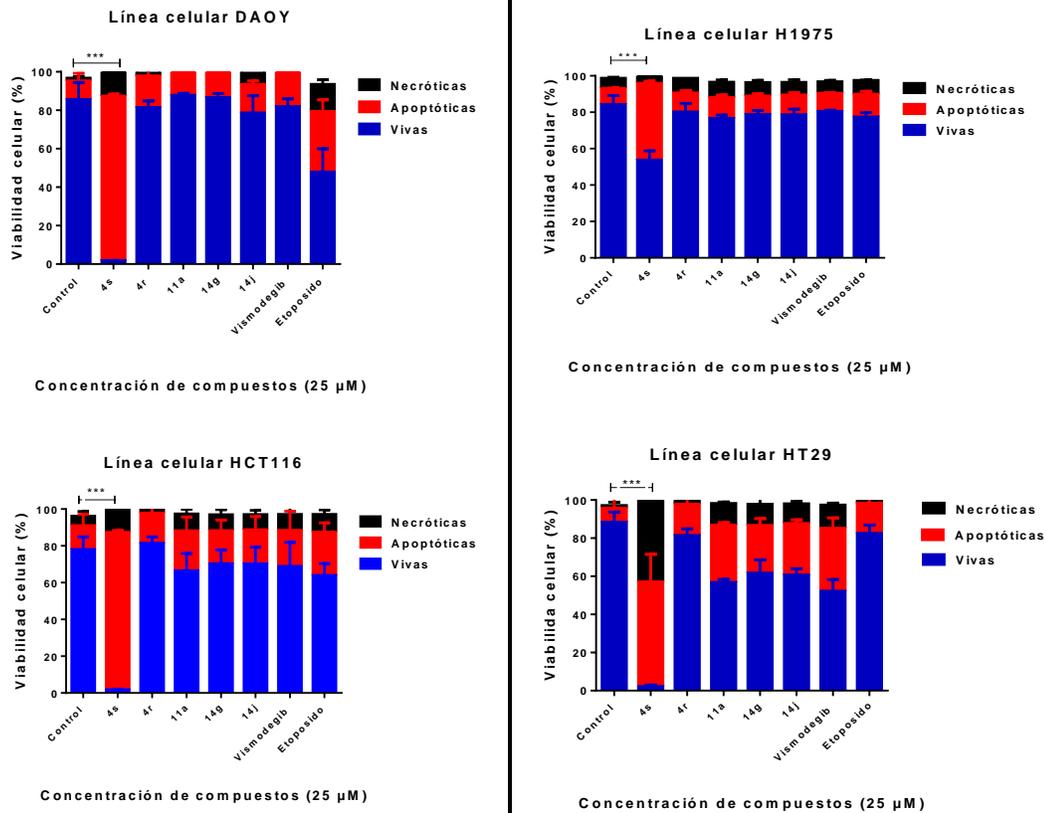
- Los compuestos **4r**, **11a**, **14g** y **14j** no mostraron una reducción significativa de la viabilidad celular comparados con el control en ambas líneas celulares de colon.
- El compuesto **4s** aumentó el porcentaje de muerte por apoptosis de un 9 % observado en las células control a un 43 % posterior al tratamiento. Estos resultados fueron estadísticamente significativos comparados con el control.

Las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal HT29 y HCT116, presentaron un 92 y 86 % de viabilidad celular al inicio del experimento y un 3 y 11 % de muerte por apoptosis respectivamente (indicativo de un cultivo en buenas condiciones). Luego de 24 horas de tratamiento con los compuestos seleccionados a una dosis de 25  $\mu$ M se observó:

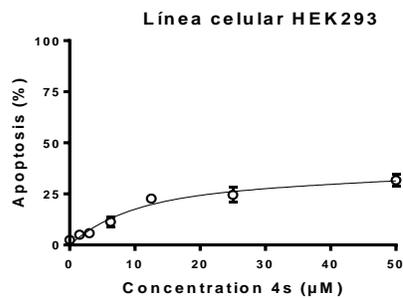
- En ambas líneas de colon el compuesto **4s** redujo su viabilidad celular alrededor de un 2 % y aumentó su muerte en alrededor de un 80%, siendo la principal modalidad de muerte la apoptosis. Estos resultados fueron estadísticamente significativos comparados con las células control.
- Los compuestos **4r**, **11a**, **14g** y **14j** no mostraron una reducción significativa de la viabilidad celular comparados con el control en ambas líneas celulares de colon.

En la Figura 34b se muestra el gráfico de porcentaje de apoptosis vs concentraciones crecientes del compuesto **4s** en la línea celular no neoplásica HEK293 a 24 h de tratamiento. Los resultados mostraron que el máximo valor de apoptosis inducido por el compuesto **4s** a la mayor concentración ensayada de 50  $\mu$ M fue tan sólo de un 33 %, por lo que el compuesto no estaría afectando la viabilidad celular de las células HEK293 por sobre las células neoplásicas. Sólo el compuesto **4s** indujo un porcentaje de apoptosis estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en todas las líneas celulares neoplásicas ensayadas. De esta manera, el efecto observado de muerte por apoptosis se encuentra en concordancia con la citotoxicidad genera por **4s** en todas las líneas celulares ensayadas, sugiriendo que este compuesto es eficiente y selectivo en disminuir la viabilidad celular llevando a una muerte por apoptosis en un amplio panel de líneas celulares neoplásicas.

a)

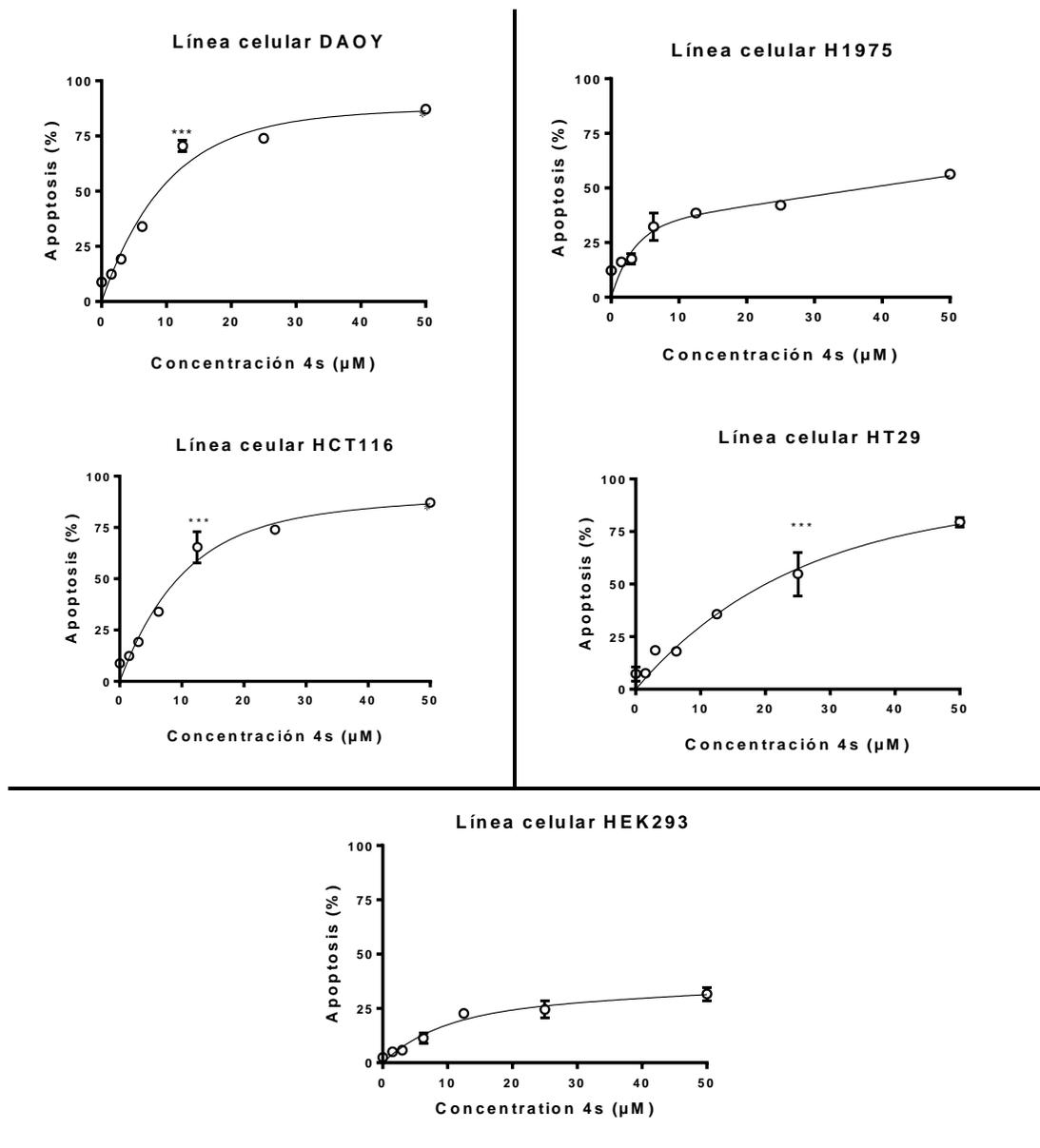


b)



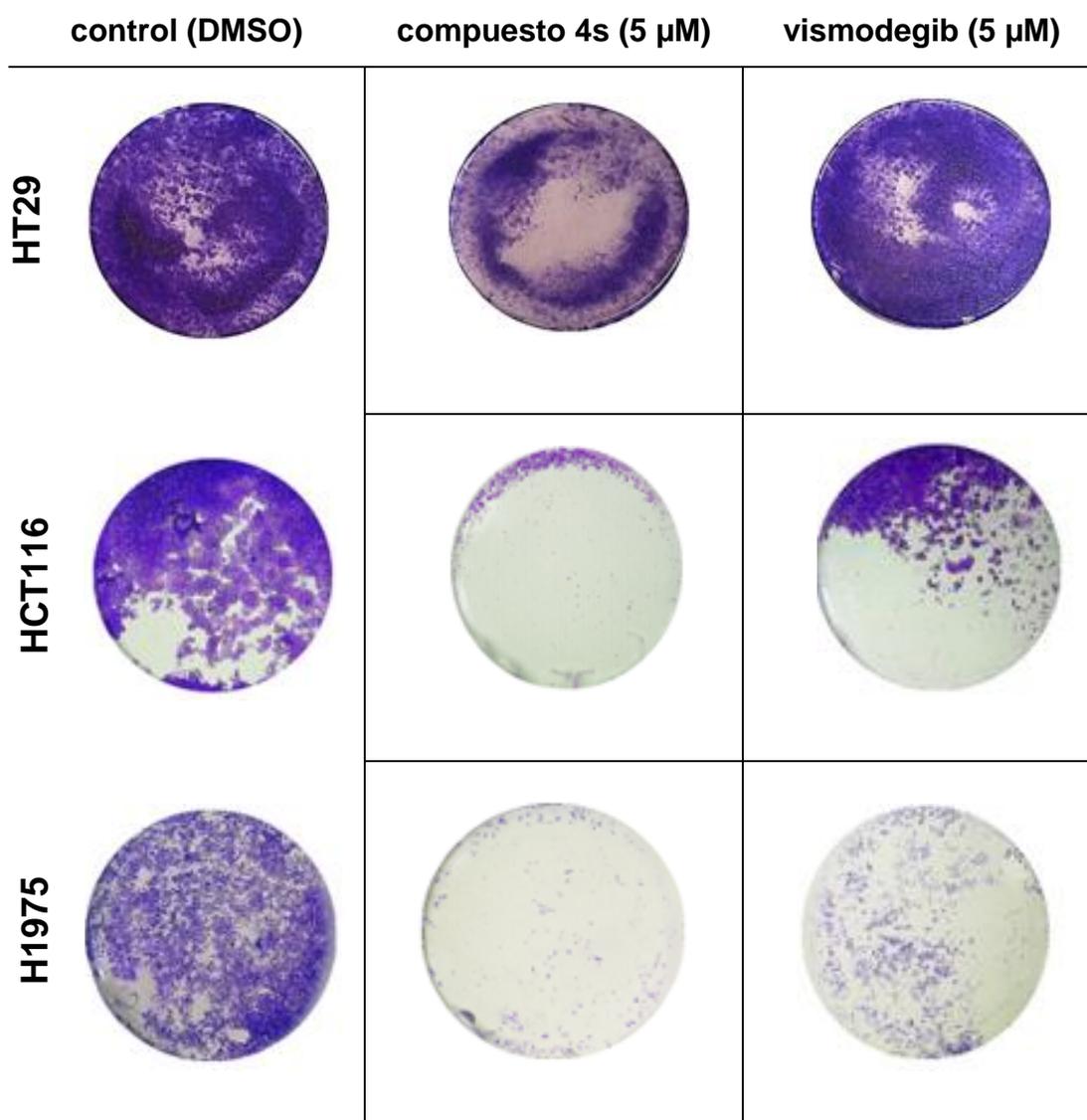
**Figura 34.** Modalidad de muerte celular. **a)** Gráficos de muerte celular mediante citometría de flujo, para los compuestos **4s**, **4r**, **11a**, **14g**, **14j**, los controles positivos vismodegib y etoposido en líneas celulares neoplásicas de meduloblastoma DAOY, cáncer de pulmón H1975 y adenocarcinoma colorrectal HCT116 y HT29. **b)** curva dosis respuesta del porcentaje de apoptosis del compuesto **4s** a diferentes concentraciones en la línea celular no neoplásicas HEK293. Los datos son obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado a 24 h de tratamiento con los compuestos. Análisis estadístico de t-test, con valor  $*p < 0.05$ .

Como una manera de conocer cuán temprana fue la inducción de apoptosis en nuestros cultivos, se realizó una titulación del compuesto **4s** a distintas concentraciones bajo 50  $\mu\text{M}$ . La Figura 35, muestra las curvas dosis respuesta del porcentaje de apoptosis de **4s** en el rango de concentraciones (1.5, 3.0, 6.25, 19, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) en todas líneas celulares ensayadas. Los resultados mostraron que la inducción de apoptosis luego de la adición del compuesto **4s** es dependiente de la dosis utilizada en el cultivo. Se pudo observar, que hasta una concentración de 19  $\mu\text{M}$  se alcanzaron valores de apoptosis por sobre el 50 % (70.46 % para DAOY, 65.46 % para HCT116 y 54.83 % para HT29) y muy cercano al 50 % en H1975, donde todos estos valores fueron estadísticamente significativas respecto al control (vehículo, DMSO < 1 %). Además, la línea celular no neoplásica HEK293 no mostró una muerte significativa por apoptosis.



**Figura 35.** Inducción de apoptosis dosis dependiente utilizando el compuesto **4s** en líneas celulares neoplásicas de meduloblastoma DAOY, cáncer de pulmón H1975 y adenocarcinoma colorrectal HCT116 y HT29 y en la línea celular no neoplásica HEK293. Los datos son obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado a 24 h de tratamiento con los compuestos. Análisis estadístico de t-test, con valor \*p < 0.05.

Con todos estos antecedentes, adicionalmente se quiso evaluar si el efecto diferencial de muerte por apoptosis observado por parte del compuesto **4s** versus los otros compuestos ensayados, poseía alguna relación con la muerte de las células más resistentes que crecen dentro de una colonia. Estas células resistentes remanentes, vuelven a crecer en colonias una vez que se ha administrado el compuesto antineoplásico, llevando muchas veces al fracaso de las terapias.<sup>126</sup> Por este motivo, se realizó un ensayo de la capacidad formadora de colonias en las mismas líneas celulares sometidas a estudios de muerte celular tratadas con 5  $\mu$ M de **4s** y vismodegib durante 14 días (Figura 36). Los datos muestran que el efecto a largo plazo del tratamiento con el compuesto **4s** generó una disminución de las colonias remanentes en todas las líneas celulares neoplásicas -comparadas con el control- sin embargo, en el tratamiento con vismodegib no se observó una disminución de la formación de colonias con respecto a las células control. Así, el compuesto **4s** mostró tener un efecto diferencial a vismodegib y fue capaz de inhibir la capacidad formadora de colonias en todas las líneas celulares neoplásicas ensayadas, lo cual fue consistente con los estudios de apoptosis.



**Figura 36.** Inhibición de la capacidad formadora de colonias en un panel de tres líneas celulares neoplásicas HT29, HCT116 y H1975. Las células, fueron tratadas con una concentración de 5  $\mu$ M de **4s** y vismodegib durante 14 días de tratamiento. Las células fueron marcadas con cristal violeta y fotografiadas bajo una lupa de alta resolución

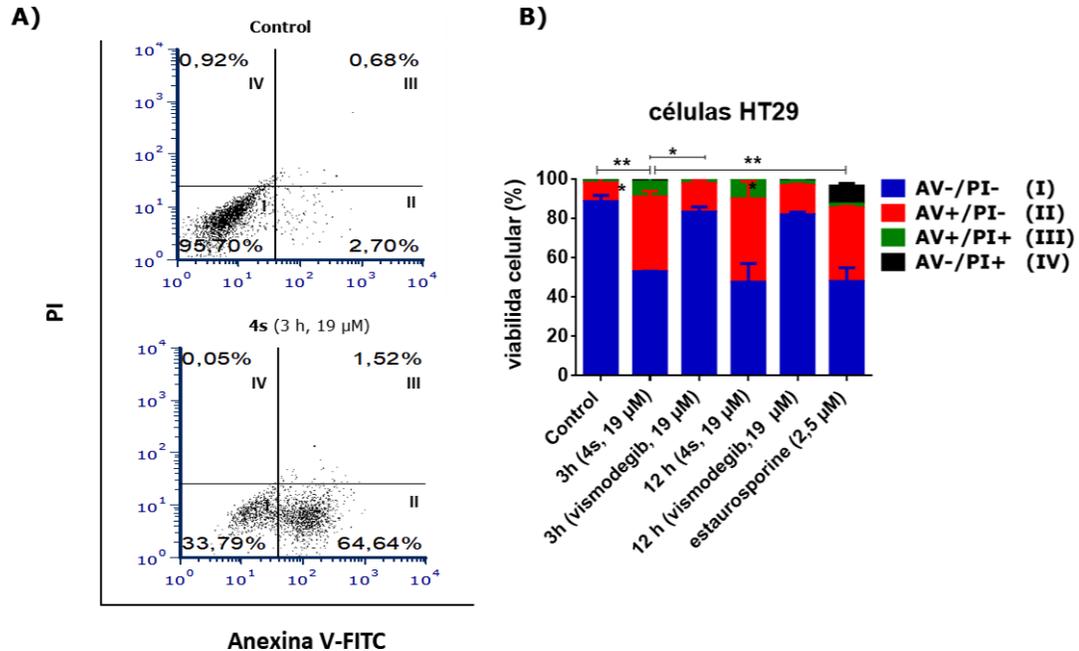
La confirmación inequívoca de la muerte celular por apoptosis por parte de **4s**, fue realizada mediante citometría de flujo a través un ensayo más preciso que contempla los marcadores anexina-VFITC y PI.

La pérdida de la asimetría y morfología de la membrana de la célula al entrar en apoptosis es un fenómeno que parece ser universal en el proceso apoptótico. Una vez que la célula comienza a entrar en apoptosis, expone hacia el exterior restos de fosfatidilserina debido a la pérdida de asimetría y mayor permeabilidad de su membrana.<sup>127</sup> El marcador anexina-V FITC se une a la célula apoptótica detectando la fosfatidilserina de la membrana celular. Para diferenciar la posible muerte mediante un proceso necrótico, las células también son marcadas simultáneamente con PI, el cual es capaz de ingresar sólo en las células que hayan perdido la integridad de su membrana. Cabe destacar, que las células que sufren necrosis secundaria también pueden ser marcadas con PI, esto es, ya que se trata de un monocultivo y una vez que las células en cultivo han sufrido apoptosis y dado que no existen macrófagos capaces de fagocitar dichas células apoptóticas o los cuerpos apoptóticos presenten en éstas, estas necesariamente sufrirán una necrosis que se conoce como necrosis secundaria al proceso apoptótico, aunque no haya sido un proceso de necrosis la primera causa de muerte.<sup>128</sup>

Se cuantificó el porcentaje de apoptosis en el cultivo de la línea celular de colon HT29, tanto a niveles basales como luego de la adición de **4s** al medio de cultivo. Se utilizó una concentración de 19  $\mu\text{M}$  para **4s** y los respectivos controles durante 3 y 12 h de tratamiento. Los resultados de citometría de flujo se representaron en gráficos de *dot plot* y están divididos en cuatro cuadrantes, lo que explica los distintos patrones de tinción de las células en estudio. Es así como células. el eje X representan la fluorescencia de anexina-V FITC y en el eje Y la de PI. De acuerdo con la información entregada por cada cuadrante, es posible interpretar:

- Cuadrante I: células que no unen anexina-V FITC (-) y excluyen PI (-) fueron consideradas células viables.
- Cuadrante II: Células que unen anexina-V FITC (+) y excluyen PI (-) fueron consideradas en apoptosis temprana.

- Cuadrante III: células que unen anexina-V FITC (+) e incorporan PI (+).
- Cuadrante IV: células que no unen anexina-V FITC (-) e incorporan PI.



**Figura 37.** Análisis de muerte celular por citometría de flujo (FC) en células HT29 tratadas con 0.1 % DMSO (control) y 19 μM del compuesto **4s** por 3 o 12 h. **a)** Gráficos de *dot plot* que muestran la distribución de las poblaciones de células que siguieron el tratamiento indicado para **4s** y células control. **b)** Gráfico de barra que muestra la misma distribución de células del *dot plot a)*. En color azul, I: células AV-/PI- (viables), color rojo, II: células AV+/PI- (apoptosis temprana), color verde, III: células AV+/PI+ y color negro, IV: células AV-/PI+. Valores son expresados como el promedio ± DS calculada de tres experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a un Anova dunnet una vía con valor \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

En la Figura 37a-b, Se observaron claramente las poblaciones diferenciadas de células vivas, apoptóticas y de células que incorporan anexina V y yoduro de propidio o sólo incorporan yoduro de propidio. En el control (que corresponde a células en ausencia de **4s**, pero marcadas con anexina-V FITC), se observó sobre de un 84 % de células viables al inicio del experimento. Cuando el cultivo fue tratado con una concentración de 2.5 μM

de estaurosporina durante 3 h de tratamiento, un antineoplásico que se caracteriza por tener propiedades pro-apoptóticas al tiempo y concentración indicados, por lo tanto es utilizado en este estudio como un control de muerte por apoptosis,<sup>129</sup> se observó que la viabilidad celular se reduce de un 89 % a un 48 % y aumentó la población de células en apoptosis temprana desde un 9 % en el cultivo control a un 38 % con el tratamiento con estaurosporina lo cual es estadísticamente significativo.

Al analizar las poblaciones celulares que fueron tratadas con el antagonista comercial vismodegib a una concentración de 19  $\mu$ M durante 3 o 12 h de tratamiento, se encontró que la viabilidad del control (89 %) fue similar a la viabilidad de las células tratadas con vismodegib (81 %) y que la muerte por apoptosis temprana que indujo vismodegib (14 %) no fue estadísticamente significativa comparada con el control (9 %), pero sí al compararla con el marcador de apoptosis estaurosporina (38 %). Estos experimentos demuestran que la inducción de la apoptosis se inicia tempranamente a partir de las 3h con un efecto citotóxico de alrededor un 50 %.

Por otra parte, cuando el cultivo celular fue tratado con 19  $\mu$ M de **4s** a 3 y 12 h. Se observó que el compuesto generó una disminución de la viabilidad celular del cultivo inicial de un 89 % a un 47 % en ambos ciclos de tratamiento y un aumento estadísticamente significativo de la apoptosis temprana de un 9 % del control a un 42 % con el tratamiento con **4s** y superando en un 4 % al control de apoptosis del experimento estaurosporina.

Para apoyar la hipótesis de que **4s** exhibe citotoxicidad en las células de cáncer de colon HT29 a través de un mecanismo de muerte mediado por apoptosis, se realizó una tinción de los núcleos celulares con DAPI. El experimento mostrado en Material Anexo, Figura Anexo 2, confirma que **4s** induce apoptosis, en efecto, las células muestran un fuerte color azul en el

núcleo debido a la mayor permeabilidad de la membrana en el proceso de apoptosis, con márgenes anormales en el contorno celular y un aumento en la condensación de la cromatina en comparación con las células control.<sup>130</sup>

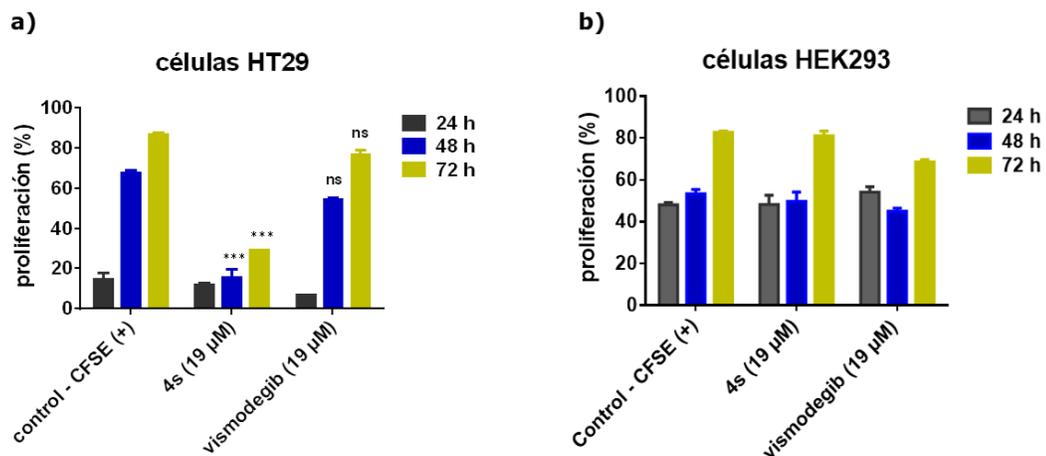
Con el sustento de todos estos experimentos, se logró confirmar que el compuesto **4s** presentó citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer de colon (HCT116 y HT29), pulmón (H1975), meduloblastoma (DAOY), y no fue citotóxico en células no neoplásicas HEK293, siendo el mecanismo principal de muerte la apoptosis en etapas tempranas a una concentración de 19  $\mu$ M y a tiempos menores de 12 h de tratamiento. Además, el compuesto **4s** a diferencia de la droga control vismodegib fue capaz de reducir la formación de colonias remanentes en todas las líneas celulares neoplásicas.

### 5.2.3 Evaluación del efecto anti-proliferativo de 4s mediante citometría de flujo

La vía de señalización Hh juega un rol fundamental en la proliferación celular y en el desarrollo embrionario, bajo ese contexto se quiso explorar adicionalmente, si **4s** podía inducir un efecto anti proliferativo en las líneas neoplásicas contempladas en este estudio. Para ello, se realizó un análisis mediante citometría de flujo en cultivos celulares previamente tratados con la sonda fluorescente CFSE que se incorpora a cada una de las células y cuya concentración se diluye a mediada que las células se replican en las múltiples generaciones. De esta manera, a mayor proliferación menor será la señal emitida por la sonda en cultivo a consecuencia de la distribución en las nuevas generaciones celulares.<sup>131</sup>

La Figura 38 muestra el porcentaje de proliferación en células HT29 y HEK293 (células control), sembradas en una condición subconfluyente, y tratadas con una concentración fija de 19  $\mu$ M de **4s** y vismodegib por 24, 48 y 72 h de tratamiento. Se observó, que las células control proliferaron en el tiempo, y alcanzaron un 80 % de confluencia, tanto en la línea HT29 como en la línea celular no neoplásica HEK293 a las 72h. La incubación con **4s**, sin embargo, sólo afectó la proliferación en las células HT29 tratadas, lo que se evidenció a partir de las 24 h, no afectando la proliferación de las células no neoplásicas. El uso de un antagonista comercial como vismodegib a la misma concentración que **4s** no afectó la proliferación en ninguna de las células contempladas en este estudio.

De este experimento se concluye que el compuesto **4s** fue capaz de inhibir la proliferación celular en las células de cáncer de colon HT29 a partir de las 24 h de tratamiento. Estos hallazgos se ven reforzados en el hecho que la vía de señalización Hh participa activamente de los procesos de proliferación celular y por ello se sugiere que **4s** podría tener un efecto antiproliferativo y además presenta un efecto citotóxico en la célula HT29.



**Figura 38.** Evaluación del efecto antiproliferativo en la línea celular de cáncer de colon HT29 (a) y HEK293 (b) tratadas con el control (CLT, sólo con sonda CFSE), 19 μM de **4s** o vismodegib por un tiempo de 24, 48 y 72 h. Datos muestran el promedio ± DS de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Análisis estadístico corresponde a un t-test con valor \*\*\*p < 0.001, ns: no significativo (valores comparados con el control).

## 5.2.4 Evaluación del efecto del compuesto **4s** en la inhibición de genes propios de la vía de señalización Hh

Previamente se demostró que el compuesto **4s** reprime la expresión génica de proteínas propias del sistema de transducción molecular de la vía Hedgehog. Para complementar estos hallazgos, se realizó un ensayo de PCR en tiempo real en células nativas (WT), con expresión normal del receptor Smo, y en aquellas que eran deficientes de éste ( $Smo^{-/-}$ ).

### 5.2.4.1 Ensayo de qRT-PCR para células nativas (WT) y $Smo^{-/-}$ y ensayo de gen reportero de luciferasa

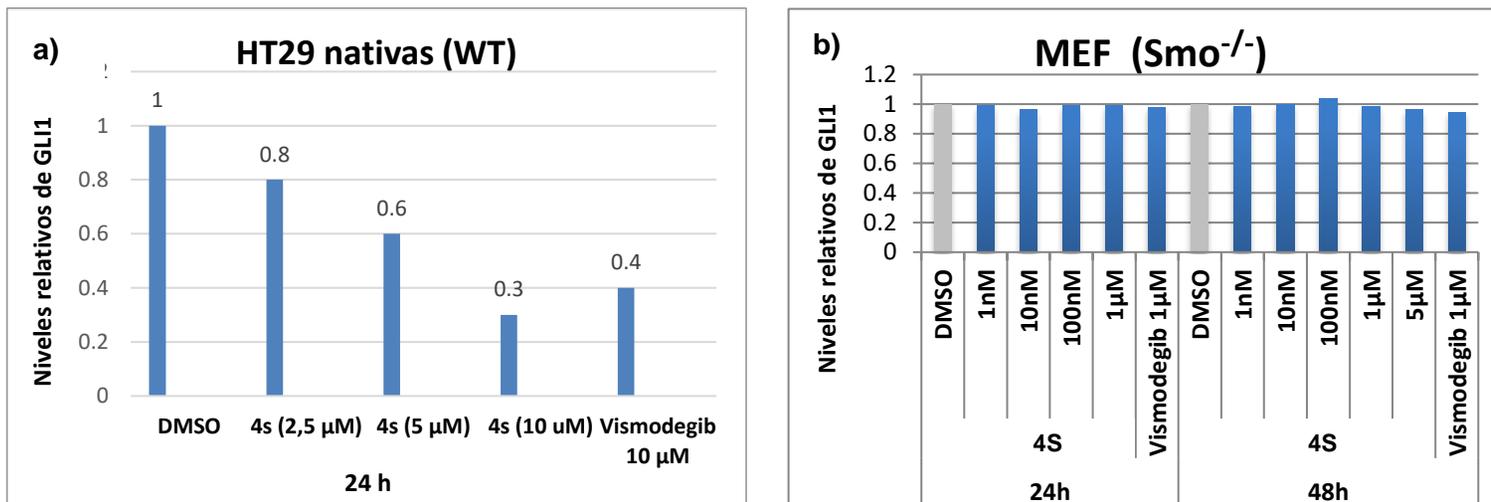
Con el objetivo de investigar el papel de **4s** en la inhibición de los genes blanco de la vía de señalización Hh, se realizó un ensayo de PCR en tiempo real en células de cáncer de colon HT29 nativas (*Wild type*, WT) y en células embrionarias de ratón (MEF) donde el receptor Smo fue deletado (*Knockout*,  $Smo^{-/-}$ ). El análisis de la expresión génica fue realizado a diferentes concentraciones de **4s** y vismodegib a 24 h para las células WT y a las 24 y 48 h para la línea celular mutante  $Smo^{-/-}$ .

Los resultados de PCR en tiempo real para células WT, son mostrados en la Figura 39. Se observó que en el rango de concentración (2.5 -50  $\mu$ M) en la línea de adenocarcinoma colorrectal HT29, **4s** fue capaz de reprimir la respuesta de la expresión de Gli1, Ptch1 y HHIP de manera comparable al control vismodegib a las 24 h de tratamiento. Además, se observó que la inhibición de la expresión de los genes de la vía Hh, fue dependiente de la concentración del compuesto **4s**, encontrándose la concentración óptima para lograr una represión génica en el rango de 2.5 y 10  $\mu$ M dependiendo del gen analizado.

	Expresión de genes droga/control a 24 h				
	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M
<b>Gli1- vismodegib</b>	0.5	0.5	0.4	0.4	0.2
<b>Gli1- 4s</b>	0.8	0.6	0.3	0.2	0.1
<b>Ptch1- vismodegib</b>	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1
<b>Ptch1- 4S</b>	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0
<b>HHIP - vismodegib</b>	0.8	1.0	0.6	0.1	0.0
<b>HHIP- 4s</b>	0.9	0.8	0.3	0.2	0.0

**Figura 39.** Expresión de los niveles de mRNA blanco de Hh mostrados como la razón de los valores Ct normalizados por los genes TBP y HMBS (housekeeping) de células bajo diferentes tratamientos sobre los valores Ct normalizados con el control DMSO en la línea celular HT29. Color blanco: indica que no hay cambios comparado con el control y es expresado con valor 1. Color azul: indica una represión de los genes blanco de Hh con valores bajo 0.6. Los experimentos fueron realizados por triplicado en tres tiempos diferentes.

Los resultados de PCR en tiempo real para la expresión de Gli1 (gen fundamental encargado de la activación de la vía Hh) en ambas células, WT y *Smo*<sup>-/-</sup>, son mostrados en la Figura 40. Los resultados indicaron que en las células nativas HT29 (WT) existió una represión génica dosis dependiente generada por **4s** similar al efecto generado por el antagonista comercial vismodegib (Figura 40a). Al analizar la expresión de Gli1 en células de fibroblastos embrionarios de ratón, deficientes de *Smo* (*Smo*<sup>-/-</sup>), se observó que los niveles de Gli1 tanto para **4s** como para el antagonista vismodegib permanecieron inalterados independiente de la concentración utilizada (Figura 40b) sugiriendo que la unión de **4s** y de vismodegib y los efectos mediados por ellos son dependientes de la expresión funcional del receptor *Smo* en las células neoplásicas HT29 y no estarían asociados a una comunicación cruzada con otras vías de señalización.



**Figura 40.** Inhibición de la vía de señalización celular Hh por parte de **4s**. Determinación de los niveles de Gli1 mediante qRT-PCR. **a)** HT29 WT fueron tratadas por 24 h con **4s**, vehículo o vismodegib como control positivo a concentraciones de 2.5, 5 y 10 μM. Los resultados se expresan como una normalización de los compuestos con la expresión de TBP y HMBS. **b)** Células MEF (Smo<sup>-/-</sup>) fueron tratadas por 24 o 48 h sólo con **4s** o vehículo y con vismodegib como control positivo. Los resultados se expresan como una normalización de los compuestos con la expresión de HPRT.

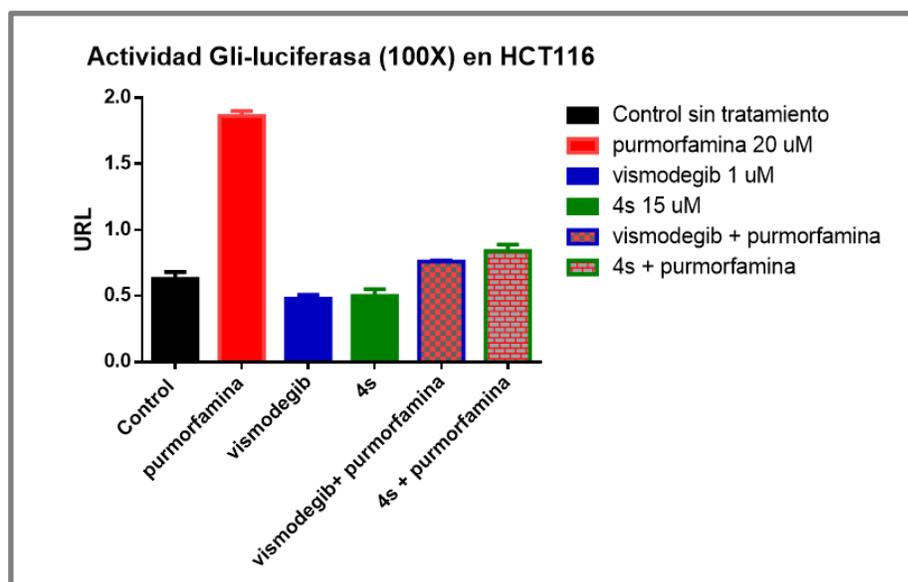
Con el fin de complementar estos resultados, y determinar la naturaleza de acción de **4s** (inhibidor/antagonista) sobre los cultivos contemplados en este estudio, se llevó a cabo un ensayo con un constructo reportero-Gli luciferasa. De esta manera, los resultados obtenidos con anterioridad sugieren que mediante este diseño experimental el compuesto **4s** generaría una inhibición de la vía de señalización Hh mediada por una represión de los niveles de Gli1 intracelular (ver Figura 40a). El ensayo de gen reportero Gli-luciferasa es ampliamente utilizado para caracterizar inhibidores Hh.<sup>44, 97-98</sup> Con este fin se utilizó la línea celular de cáncer de colon HCT116, que fue transfectada en forma transiente con un constructo reportero de luciferasa de luciérnaga sensible a Gli (Gli-RE). El ensayo se llevó a cabo según las especificaciones del proveedor (Signal Reporter Assay, Quiagen).<sup>132</sup> Como un control negativo del experimento, se incubaron células HCT116, con el agonista sintético purmorfamina. Como control positivo, se utilizó el antagonista sintético vismodegib. El compuesto **4s** se ensayó a concentraciones 10 veces mayor al IC<sub>50</sub> obtenido en el ensayo de MTT (1.5 µM) y tratadas sólo o en combinación con el agonista purmorfamina. Lo mismo se hizo con vismodegib. Ambos ensayos de competencia fueron estrategias esenciales para evaluar las propiedades de **4s** como un antagonista de la vía Hedgehog. Los resultados además se normalizaron al nivel de transfección, utilizando para ello, un constructo conocido como renilla. De esta manera, cada valor se representó como un cociente de la relación Gli-Luciferasa/Renilla.

Otros controles internos del ensayo reportero Gli-luciferasa contemplan el uso de un *Signal reporter* sin tratamiento que da cuenta de la medida basal total de la luminiscencia de las células HCT116 (6100 órdenes de magnitud). Además, un valor de *signal reporter* negativo evidencia la actividad de otras vías transduccionales de comunicación cruzada con Hh y que pudieran interferir en la interpretación de los resultados (2600 órdenes de magnitud). Se observó una diferencia aceptable según las recomendaciones del proveedor

de 3500 órdenes de magnitud entre el *Signal reporter* sin tratamiento y el *Signal reporter* negativo de 3500 órdenes de magnitud (Material Anexo, Figura Anexo 3). Con la ayuda de los *Signal reporter* (sin tratamiento y negativo) se pudo tener la certeza de que la presencia de otras vías transduccionales en la línea de cáncer de colon HTC116, no alteró los resultados obtenidos en este experimento.

Los resultados mostrados en la Figura 41 indican que el uso de los compuestos contemplados en este ensayo a una máxima concentración, (10 veces superior a su IC<sub>50</sub>), presentaron una sensibilidad adecuada y cuantificable. El agonista purmorfamina (utilizado como control negativo) aumentó las unidades relativas de luminiscencia (URL) de 0.6 a 1.8, lo cual fue un indicativo de la activación apropiada de Gli1 en las células HCT116 transfectadas. En aquellas células transfectadas con el constructo Gli-Luciferasa y tratadas con vismodegib y/o **4s** no se observó una disminución o un aumento de las URL comparado con las células control (vehículo, DMSO < 1 %), lo cual es indicativo que ambos compuestos no ejercen un efecto en la activación de Gli1.

Por otra parte, los resultados de competencia entre el agonista purmorfamina y **4s** o vismodegib, claramente demuestran un efecto de desplazamiento del agonista por **4s** y/o vismodegib, obteniéndose valores de URL similares a la condición control. Estos resultados demuestran que **4s** al igual que vismodegib tiene un comportamiento como un antagonista en las células de cáncer de colon HCT116 y esto se ve apoyado por los resultados de competencia con purmorfamina.



**Figura 41.** Activación de Gli-luciferasa en células HCT16 transfectadas con los constructos Luciérnaga de luciferasa y renilla. El control del experimento corresponde a células transfectadas transcientemente con Gli1 (utilizando < 1 % DMSO) y en ausencia de **4s** o vismodegib. Los resultados se expresan como URL (Unidades relativas de luminiscencia). Las barras de color indican el compuesto o su combinación a dosis 10 veces mayor que el IC<sub>50</sub> reportado.<sup>26</sup> El experimento se realizó por triplicado de cada condición en un experimento y los resultados son expresados como el promedio ± DS. La actividad luciferasa de luciérnaga fue normalizada con los valores del reportero luciferasa de renilla.

Los ensayos funcionales de qRT-PCR en células nativas (WT) y/o Smo<sup>-/-</sup>, además del ensayo de genes reporteros de luciferasa (Gli-luciferasa) sugieren que el compuesto **4s** se une a Smo antagonizándolo y demuestran de forma inequívoca que a consecuencia de ello induce la represión de genes propios de la vía de señalización Hedgehog.

#### 5.2.4.2 Evaluación del efecto antagonista del compuesto **4s** mediante ensayos de desplazamiento de Bodipy-Ciclopamina (BC)

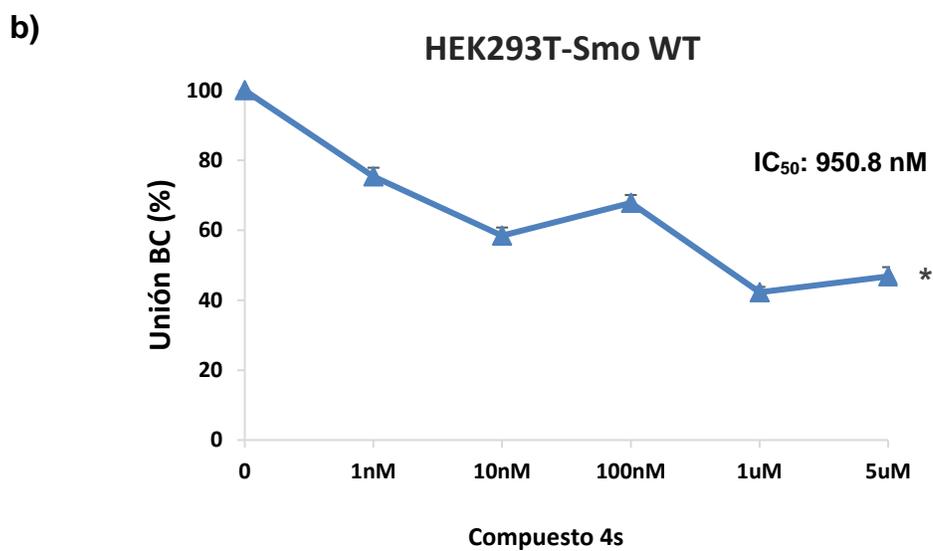
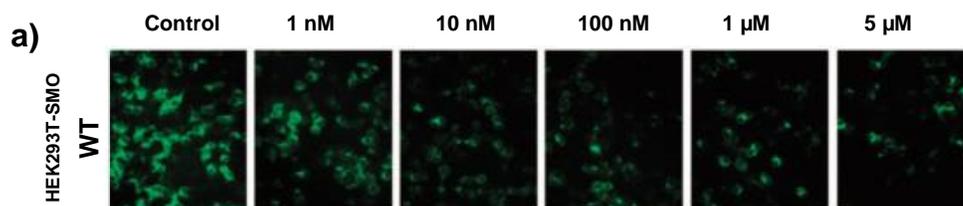
Para complementar los resultados descritos anteriormente, y verificar que **4s** se une a Smo, se realizó un ensayo de desplazamiento basado en el uso de Bodipy-Ciclopamina (BC)<sup>1</sup>, un derivado fluorescente de ciclopamina que actúa sobre Smo al nivel de su haz heptahélico.<sup>66</sup> Como control, se utilizó el antagonista comercial vismodegib.

Este ensayo se utilizó para verificar la habilidad de **4s** para unirse a Smo en células que expresan el receptor nativo (WT). Para tal fin, la unión competitiva de BC en células HEK293T (células transfectadas con el plasmidio de Smo wt), se realizó utilizando varias concentraciones del compuesto **4s**.

Como se muestra en la Figura 42, **4s** mostró un efecto dependiente de la concentración utilizada y fue capaz de desplazar la unión de BC presentando un promisorio valor de IC<sub>50</sub>-SmoWT de 950.8 nM comparado con la droga control vismodegib (IC<sub>50</sub>: 7.62 nm)<sup>97</sup>.

---

<sup>1</sup> Experimento realizado por la Dra. Lucia Di Marcotullio. Universidad de la Sapienza. Roma.



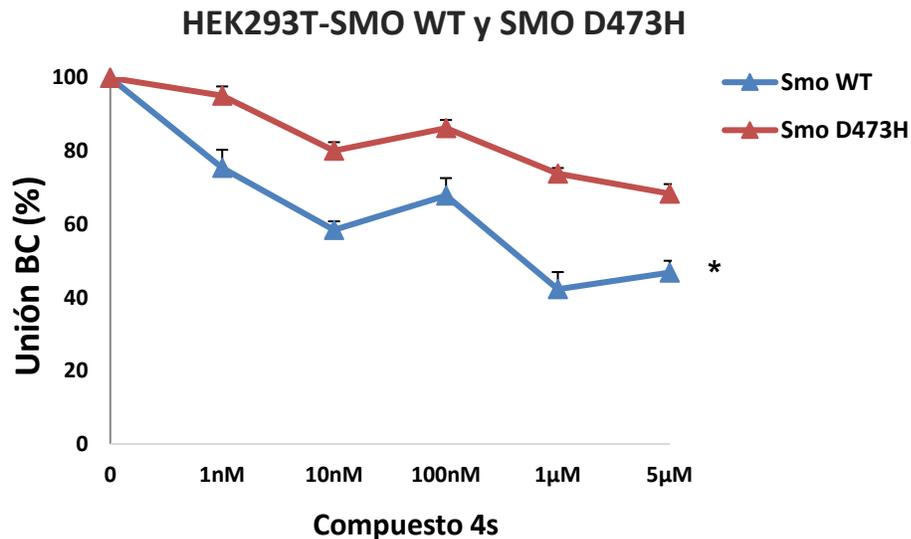
**Figura 42.** Unión de **4s** a células HEK293T incubadas con el compuesto fluorescente Bodipy-Ciclopamina (BC) en un ensayo de unión competitiva. **a)** Fotomicrografías de fluorescencia de la unión competitiva de BC (verde) en HEK293T en ausencia de **4s** (control) y concentraciones crecientes de **4s**. Se observa el desplazamiento de BC en una manera dependiente del compuesto **4s**.<sup>97</sup> **b)** Competencia de la unión entre **4s** y BC por el receptor Smo. Los resultados se expresaron como porcentaje de unión de BC en células HEK293T en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de **4s**.  $IC_{50}$  Smo WT = 950.8 nM. Los datos representan el promedio  $\pm$  DS. de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs control. Datos son el promedio de la intensidad de BC de cinco imágenes de microscopía de fluorescencia.

La resistencia a drogas debido a mutaciones en Smo (principalmente en el residuo aminoacídico D473), ha planteado la necesidad de desarrollar nuevos y efectivos antagonistas Smo que sean capaces de superar esta limitación.<sup>97</sup>

Como una manera de complementar los resultados obtenidos, se quiso evaluar la influencia del residuo aminoacídico D473 en la unión de **4s** en el receptor Smo. Para ello, se realizaron experimentos en idénticas condiciones a las descritas anteriormente, pero utilizando células HEK293T transfectadas con un mutante Smo D473H. La Figura 43, muestra el efecto de **4s** y su unión a las células Smo mutantes en el residuo D473H. La droga control vismodegib presentó una afinidad de unión en Smo WT de 7.62 nM. Sin embargo, cuando el compuesto se incubó con las células Smo-D473H esta afinidad se redujo en alrededor de 1000 órdenes de magnitud (superior a un 100 %) con un IC<sub>50</sub> de 10450 nM, lo que explica el pobre efecto de este fármaco en las terapias de los pacientes con carcinoma de células basales con más de 6 meses de tratamiento con vismodegib.<sup>134</sup>

Por otra parte, cuando se incubó el compuesto **4s** con las células Smo-D473H se observó un efecto dependiente de la concentración en la afinidad de unión a Smo mutante (D473H), sin embargo, el compuesto resultó ser tóxico para estas células a concentraciones superiores a 5 µM por lo que no fue posible obtener un valor de IC<sub>50</sub> que pudiera dar cuenta de la efectividad de **4s** sobre Smo D473H. Sólo es posible sugerir que **4s** disminuyó su afinidad de unión cuando fue incubado en células Smo D4743H en alrededor de un 25 % comparado con la afinidad de unión de Smo WT siendo esta diferencia significativamente menor que la exhibida por la droga comercial vismodegib (Tabla 5).

Estos hallazgos *in vitro*, revelan que **4s** actúa como antagonista de Smo con una afinidad de unión a Smo WT de 950.8 nM y sugiere su potencial uso para el tratamiento de cánceres dependientes de la vía de señalización Hh, incluso en tumores resistentes al tratamiento con vismodegib.



**Figura 43.** Unión de **4s** a células transfectadas con Smo WT y Smo mutante D473H. Las curvas de concentración-respuesta, representan el porcentaje de incorporación de BC observado después de la adición del tratamiento con **4s** en células control (Smo WT) y células mutantes (Smo D473H). Color rojo: Mutante Smo D473H, color azul: Smo WT. IC<sub>50</sub> Smo WT = 950.8 nM (a concentraciones superiores a 5 μM, **4s** fue tóxico para Smo D473H). Los datos representan el promedio ± DS. de tres experimentos independientes. \*p < 0.05 vs control. Datos son el promedio de la intensidad de BC de cinco imágenes de microscopía de fluorescencia.

**Tabla 5.** Unión de **4s** versus vismodegib, ambos en células humanas HEK293T -transfectadas transientemente- con Smo nativas (WT) o Smo mutante D473H (resistente a drogas). Valores son expresados como afinidad de unión en valores de IC<sub>50</sub> (μM). Vismodegib disminuye la afinidad a Smo D473H en 1000 unidades, mientras que **4s** sólo en un 25 % menos que Smo-WT sugiriendo su uso en tumores resistentes al tratamiento con vismodegib.

Compuesto	Humano Smo WT	Humano Smo D473H
4s	0.9508 μM	> 5 μM
Vismodegib	0.00762 μM	10.45 μM

### 5.3 Estudios de acoplamiento molecular entre **4s** y el receptor Smo

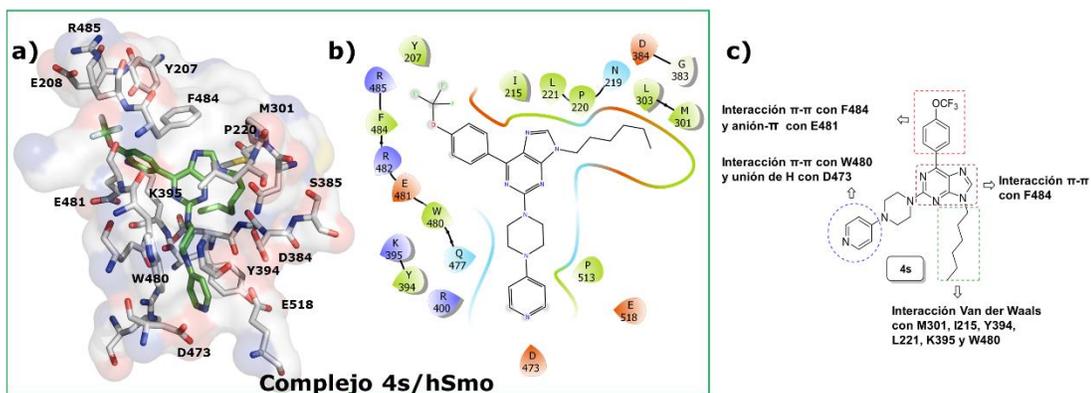
Con el objetivo de identificar el sitio de unión más probable y la conformación más estable con que el antagonista **4s** se une a Smo en su dominio siete transmembranas, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (*Docking*). En la Figura 44a-b se muestra una descripción en 3D y 2D de las interacciones moleculares de **4s**.

Para evaluar la exactitud del protocolo de acoplamiento molecular de la estructura cristalina del complejo SAG 1.5-hSmo (PDB ID: 4QIN; resolución 2.6 Å), se realizó una evaluación de las conformaciones de SAG 1.5 (previa optimización de la estructura mediante Spartan) dentro del sitio de unión de hSmo utilizando el programa Autodock 4. La superposición entre la estructura cristalina y la estructura energéticamente más abundante y probable de SAG 1.5 optimizado da cuenta de una distancia menor a 2.0 Å y es consistente con las interacciones reportadas para el complejo SAG 1.5 cristal-hSmo (Material Anexo, Figura Anexo 4) De esta manera, se desprende que los parámetros seleccionados son adecuados y el modelo validado, dado que tanto las conformaciones del ligando optimizado como las interacciones entre los residuos de la proteína de hSmo se conservan con respecto a SAG 1.5 cristalizado. A partir de este modelo, se determinaron los complejos ligando-proteína para el compuesto **4s** y el antagonista comercial vismodegib.

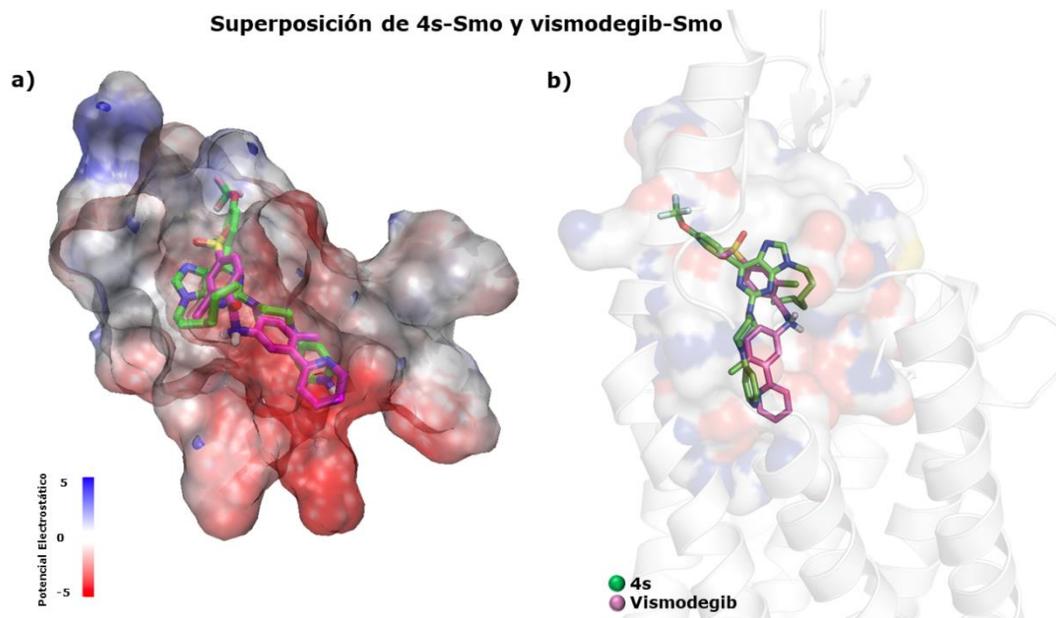
Los datos obtenidos de los ensayos de unión de Bodipy-ciclopamina se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos de la simulación del acoplamiento molecular. Los resultados muestran que tanto el compuesto **4s** como la droga control vismodegib, son capaces de unirse en el sitio de unión siete transmembranal reportado para los antagonistas Smo.

De acuerdo con nuestros estudios de modelado molecular, el compuesto más activo **-4s-** fue capaz de alojarse en la misma cavidad de Smo donde se han descrito otros agonistas / antagonistas que respaldan nuestros resultados estructurales.<sup>26, 105</sup> **4s** se localizó dentro del haz heptahelico y estableció interacciones moleculares con residuos clave como M301, I215, Y394, L221, L303, K395 y W480 (Figura 44). Específicamente, la cavidad de unión proporciona un entorno altamente rico en electrones (color rojo en la Figura 45a) que permite generar interacciones de apilamiento  $\pi$  con el núcleo central del andamio de purina **4s** y también se observó un enlace hidrógeno con D473. Además, F484 establece una interacción  $\pi - \pi$  adicional con el anillo de piridina y con el centro aromático del grupo trifluorometilfenilo. Es importante mencionar que los residuos de aminoácidos descritos anteriormente se han identificado en estudios de difracción de Rx en la estructura cristalina de Smo complejoado con 4QIN, 4O9R, 4JKV y 4N4W. Por lo tanto, para validar la cavidad donde se posicionó **4s**, llevamos a cabo una comparación de vismodegib complejoado con Smo. Nuestros hallazgos muestran que **4s** y vismodegib se une a la parte interna de la Smo genera contactos similares en el haz heptahelico de Smo (ver Figura 45b).

Por lo tanto, la Figura 44c muestra una representación general de las principales interacciones establecidas por **4s** en complejo con Smo.



**Figura 44.** Modo de unión pronosticado de **4s** (verde) dentro del haz heptahelico cristalográfico del receptor hSmo (PDB ID: 4QIN). **a)** La representación 3D de Smo en complejo con **4s**, los residuos (menos de 5.0 Å) se muestran en una representación con barra blanca. **b)** Representación 2D de **4s** en complejo con hSmo. **c)** Representación general de la interacción principal del complejo **4s**-hSmo. Las líneas punteadas en colores representan áreas importantes de interacción entre **4s** y Smo.



**Figura 45.** Superposición gráfica de **4s**-Smo (verde) y vismodegib-Smo (Fucsia). **a)** Potencial electrostático. La cavidad de unión (en rojo) proporciona un entorno altamente rico en electrones. **b)** Representación 3D de **4s** y vismodegib los cuales se une a la parte interna del haz heptahelico del receptor Smo..

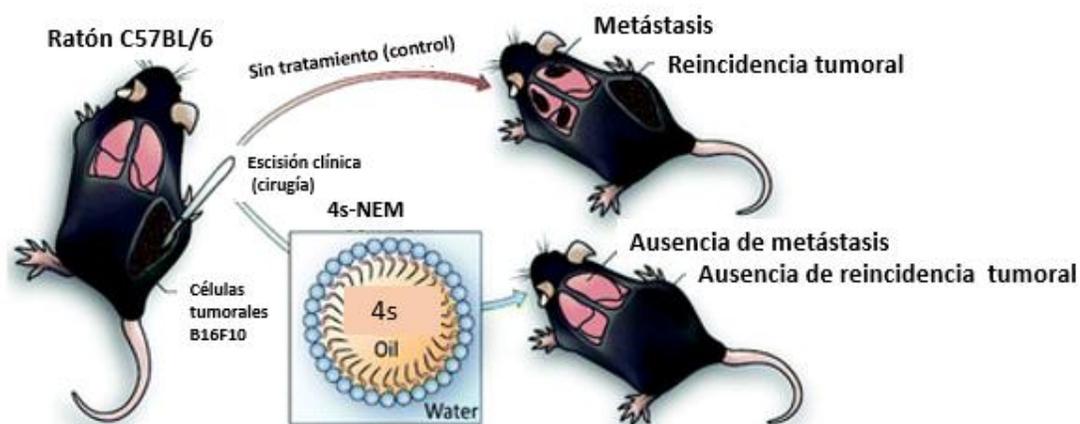
#### **5.4 Evaluación del efecto antitumoral del compuesto 4s en células de melanoma murino B16F10 utilizando un modelo de ratón**

Muchas moléculas que se han diseñado para el tratamiento del cáncer no han logrado llegar a estudios *in vivo*, y menos a avanzar hacia una fase de ensayos clínicos, fracasando, muchas veces debido a que no se encuentra una estrecha correlación entre la ruta génica de la enfermedad y el efecto de la droga bajo el contexto estudiado o bien, debido a las pobres propiedades farmacocinéticas-farmacodinámicas de los compuestos. Esto ha hecho que el diseño de nuevas moléculas efectivas y eficaces frente a una ruta de señalización específica se vuelva más dificultoso, sea altamente costoso y lento.

En las líneas celulares de cáncer humano ensayadas en este estudio, **4s** ayuda a dar un sentido de especificidad génica por el que actúa en el contexto de la vía de señalización Hh en el cáncer humano. El aporte de un estudio a través de un modelo animal proporcionaría además herramientas valiosas al modelo definitivo de cáncer humano.

De esta manera se evaluó el efecto de **4s** *in vivo*, en un modelo de melanoma de ratón desarrollado por el Dr. Andrew Quest de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Para este modelo, se inyectaron en los ratones C57BL/6 células de melanoma murino B16F10 y se determinó la reincidencia del crecimiento del tumor en el sitio inicial como también, la metástasis en el pulmón de las ratas. Se permitió que los tumores se desarrollaran por 14 días previo a la extracción quirúrgica, tal como se describe en la sección Materiales y Métodos.<sup>103</sup> La zona resultante posterior a la cirugía no se trató (control), o bien se trató con una aplicación subcutánea de la nanoemulsión (NEM) o con **4s**-NEM (Figura 46). Finalmente, los ratones fueron sacrificados a los 21 días

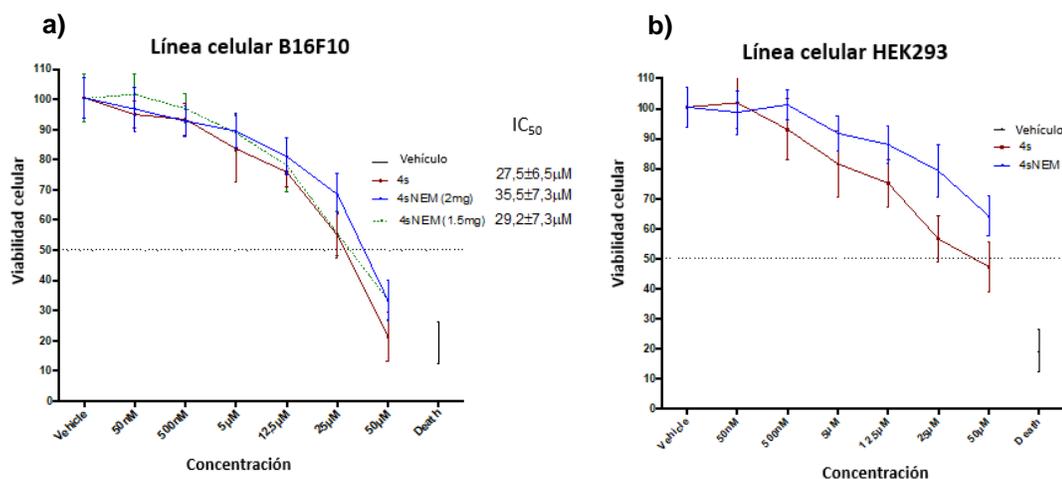
posteriores a la cirugía y se determinó el crecimiento del tumor en el sitio inicial como también, se evaluó la masa tumoral en el pulmón.



**Figura 46.** Diagrama de flujo de la evaluación de la recidiva tumoral y metástasis en pulmón en ratones C57BL/6 sin tratamiento (control) o tratados con una inyección de **4s**-NEM (nano-emulsión agua-aceite (o-w)).

NEM fue preparada siguiendo el método por desplazamiento de solvente.<sup>135</sup> esta estrategia se ha utilizado para crear vehículos cargados con drogas citotóxicas (por ejemplo, docetaxel) y recubiertas con diferentes polímeros (nanocápsulas) para mejorar la eficacia de la droga después de una administración intravenosa.<sup>136</sup> El compuesto **4s** debido a su pobre solubilidad en agua debió ser sometido a una nanoformulación para solubilizar a **4s** en agua y de esta manera poder administrarlo por vía subcutánea a los ratones. Se evaluó la estabilidad de **4s**-NEM encontrando que las dosis de 1.5 y 2 mg fueron las que llevaron a una nanoemulsión más estable. Adicionalmente, fue evaluada la diferencia del potencial Z durante 21 días (Material Anexo, Figura 5). Una vez realizada la nanoformulación, se llevó a cabo un estudio *in vitro* de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en células de melanoma murino B16F10 y células de riñón de embrión humano no neoplásicas HEK293 (Figura 47). Las células B16F10 fueron seleccionadas porque además de poseer los

genes blanco de la vía Hh como Gli1,<sup>137</sup> son altamente resistentes, proliferativas y metastásicas<sup>138</sup> y, son adecuadas para los estudios *in vivo* -en ratones C57BL/6 (con un sistema inmunitario funcional)- para la formación de tumores después de la aplicación subcutánea, así como el crecimiento tumoral y la reincidencia de metástasis, después de la extirpación quirúrgica del tumor primario, objetivo importante en este estudio. Como se observa en la Figura 47 la línea celular B16F10 fue sensible al efecto de **4s**-NEM. Se observó que el IC<sub>50</sub> de **4s**-NEM a las dosis ensayadas de 1.5 y 2 mg fue comparable al de **4s** sin nanoformulación IC<sub>50</sub>: 27.5  $\mu$ M y no indujo una disminución de la viabilidad celular en células sanas HEK293 en más de un 20 %, estos datos fueron concordantes con los estudios realizados *in vitro* en otras líneas neoplásicas. Además, el vehículo de NEM (SDS) no afectó la viabilidad celular sugiriendo la seguridad de la nanoemulsión.



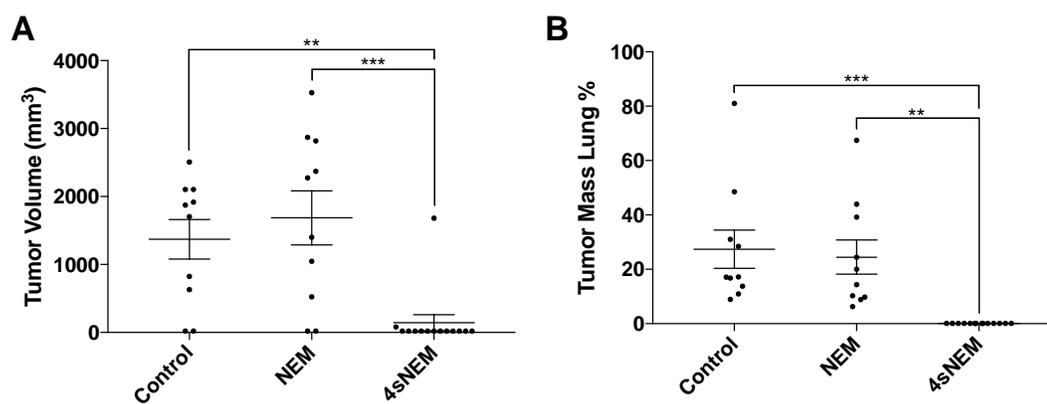
**Figura 47.** Ensayo de viabilidad celular mediante MTT. Se evaluó la viabilidad celular por 24 h de tratamiento con **4s** solo y **4s**-NEM a dosis de 1.5 y 2 mg, y se determinó su IC<sub>50</sub>. **a)** Células de melanoma murino B16F10. **b)** Células de riñón de embrión humano no cancerígenas HEK293. Se realizaron 6 experimentos independientes por triplicado (n=24) para **a)** y 2 experimentos independientes por triplicado (n=6) para **b)**. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  DS.

La extirpación de los tumores primarios representa uno de los principales enfoques clínicos empleados para controlar los tumores malignos. Cuando una célula cancerosa es detectada, el riesgo de reincidencia del tumor en el mismo sitio y metástasis a diferentes tejidos es elevado. Por ello, se decidió aplicar la formulación **4s**-NEM tras la extirpación quirúrgica del tumor primario de células B16F10 en ratones C57BL/6 para prevenir/tratar el crecimiento tumoral por reincidencia y/o metástasis por células cancerosas remanentes.

Los experimentos *in vivo* (modelo animal preclínico) mostraron que la administración de una sola dosis de **4s**-NEM, en la zona de la herida después de la extirpación quirúrgica total del tumor primario, previno casi por completo la reincidencia del tumor (Figura 48a), además esta única dosis de **4s**-NEM, no generó metástasis pulmonar en los ratones (Figura 48b) comparado con el control y con la nanoemulsión (NEM) sola. Sin embargo, en la gráfica se observó que hubo sólo un ratón que se fue capaz de generar un tumor posterior a la aplicación **4s**-NEM, pero no provocó metástasis pulmonar sugiriendo que posiblemente el compuesto **4s** podría estar afectando la migración y/o invasión celular.

Estos resultados son muy prometedores, ya que los tumores de células de melanoma suelen ser muy agresivos y representan uno de los cánceres con una alta tasa de mortalidad.<sup>139-141</sup> Además, este estudio demostró que la aplicación subcutánea de una única dosis de 1.5 mg de la formulación **4s**-NEM en el área del tumor primario extirpado, fue suficiente para prevenir la reincidencia del melanoma y la metástasis pulmonar en los ratones sometidos a ensayos.

De esta manera, el compuesto **4s** antagoniza el receptor Smo y disminuye la expresión de los genes blanco de la vía de señalización Hh, implicados en la proliferación y mantenimiento tumoral, en un modelo *in vitro*, siendo a su vez, más eficiente que la droga comercial vismodegib en inducir un efecto citotóxico en células neoplásicas humanas versus células no neoplásicas y en disminuir las colonias remanentes y, presenta una alta eficacia antitumoral en un modelo animal *in vivo* de ratón en células de melanoma B16F10 previniendo la reincidencia y metástasis tumoral con una única dosis de aplicación subcutánea.



**Figura 48.** Eficiencia del compuesto **4s** nanovehiculizado en nanoemulsiones (**4s-NEM**) de aceite en agua (O / W). Evaluación del volumen de reincidencia del crecimiento del tumor después de la cirugía en el sitio inicial (**A**) y metástasis en la evaluación de los pulmones por porcentaje de masa tumoral (**B**) después de 21 días de la cirugía en un modelo pre-clínico de ratón. Las células B16F10 se inyectaron subcutáneamente en ratones C57BL/6 por la parte posterior lateral y se dejó que los tumores se desarrollaran de manera localizada durante 15 días antes de la extirpación quirúrgica. La zona herida que resultó de dicha extirpación no fue tratada (vehículo, control), se trató con NEM o se trató con **4s**-NEM. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la cirugía y se evaluó **A**) el crecimiento del tumor en el sitio inicial y **B**) la masa tumoral del pulmón por metástasis. (n=10-14, \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.0001).

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

A través de este estudio:

- Se logró el diseño, síntesis y caracterización de nuevas moléculas del tipo purinas 2.6.9-trisustituídas categorizadas en las series **I-III**.
- Se demostró el efecto citotóxico los compuestos **4s, 4r, 11a, 14g y 14j**. Siendo **4s** el que presentó un mejor perfil en citotoxicidad, índice de selectividad y muerte celular por apoptosis temprana en un panel de líneas celulares de cáncer de colon (HT29 y HCT116), cáncer de pulmón H1975, meduloblastoma (DAOY), cáncer de páncreas (BXPC3 y ASPC1) y células no neoplásicas de riñón humano HEK293.
- Se demostró que el mecanismo de muerte principal de **4s** fue la apoptosis en estadios tempranos.
- Se demostró que **4s** es capaz de inhibir la formación de colonias remanentes de las células neoplásicas HT29, HCT116 y H1975.
- Se demostró que **4s** no presentó un efecto significativo en la inhibición de la proliferación en la línea celular de cáncer de colon HT29 y no neoplásica HEK293.
- Se demostró que **4s** es capaz de inhibir la vía de señalización Hh por la represión de genes blanco tales como; Gli1, Ptch1, HHIP, datos comprobados por experimentos de qRT-PCR y ensayos de genes reporteros de luciferasa.
- Se demostró que **4s** es un antagonista de Smo y se une al mismo sitio que vismodegib en la cavidad 7TM del receptor. Además, **4s** es capaz de unirse a Smo mutante D473H con una mayor afinidad que la droga comercial vismodegib lo que sugiere su uso en cánceres resistentes al tratamiento con vismodegib.
- Se demostró en modelos de ratón *in vivo* que **4s** es un potente agente antitumoral en carcinoma de melanoma murino.

En este trabajo, se demuestra que se logró sintetizar y caracterizar cuarenta y nueve purinas 2,6,9-trisustituidas hasta obtener el compuesto líder **4s**, el cual es capaz de inhibir y antagonizar la vía de señalización Hedgehog tan eficazmente como vismodegib y, que además tiene la ventaja de disminuir selectivamente la viabilidad celular de un amplio panel de líneas celulares neoplásicas, que expresan los componentes de la vía de señalización Hh, versus células no neoplásicas humanas, siendo el principal mecanismo de muerte celular la apoptosis en estadios tempranos. Además, el compuesto **4s** tiene la habilidad de inhibir la capacidad formadora de colonias en todas células neoplásicas ensayadas y es un potente agente antitumoral, debido que ha demostrado lograr disminuir la reincidencia tumoral y metástasis en una única dosis de 1.5 mg de aplicación subcutánea en tumores primarios de melanoma de ratones.

## CAPÍTULO VII: REFERENCIAS

1. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2017. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* **2017**, *67* (1), 7-30.
2. Tomasetti, C.; Vogelstein, B., Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **2015**, *347* (6217), 78-81.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57-70.
4. Preston-Martin, S.; Pike, M. C.; Ross, R. K.; Jones, P. A.; Henderson, B. E., Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research* **1990**, *50* (23), 7415-7421.
5. Bach, P. B.; Mirkin, J. N.; Oliver, T. K.; Azzoli, C. G.; Berry, D. A.; Brawley, O. W.; Byers, T.; Colditz, G. A.; Gould, M. K.; Jett, J. R., Benefits and harms of CT screening for lung cancer: a systematic review. *Jama* **2012**, *307* (22), 2418-2429.
6. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2015. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* **2015**, *65* (1), 5-29.
7. DeSantis, C. E.; Lin, C. C.; Mariotto, A. B.; Siegel, R. L.; Stein, K. D.; Kramer, J. L.; Alteri, R.; Robbins, A. S.; Jemal, A., Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* **2014**, *64* (4), 252-271.
8. Dalerba, P.; Dylla, S. J.; Park, I.-K.; Liu, R.; Wang, X.; Cho, R. W.; Hoey, T.; Gurney, A.; Huang, E. H.; Simeone, D. M., Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (24), 10158-10163.
9. Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**, *414* (6859), 105.
10. Carballo, G. B.; Honorato, J. R.; de Lopes, G. P. F., A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling* **2018**, *16* (1), 11.
11. Nüsslein-Volhard, C.; Wieschaus, E.; Kluding, H., Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **1984**, *193* (5), 267-282.
12. Fuccillo, M.; Joyner, A. L.; Fishell, G., Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience* **2006**, *7* (10), 772.
13. Ingham, P. W., Transducing Hedgehog: the story so far. *The EMBO journal* **1998**, *17* (13), 3505-3511.
14. Mohler, J., Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* **1988**, *120* (4), 1061-1072.
15. Varjosalo, M.; Taipale, J., Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & Development* **2008**, *22* (18), 2454-2472.

16. Shigeki, T.; Tatsuo, M.; Shin-ichi, H.; Shuhei, Z.; Satoshi, I.; Fumitaka, T.; Minako, O.; Tetsuya, K.; Kaoru, S., Structure and expression of hedgehog, a *Drosophila* segment-polarity gene required for cell-cell communication. *Gene* **1993**, *124* (2), 183-189.
17. Firestone, A. J.; Chen, J. K., Controlling destiny through chemistry: small-molecule regulators of cell fate. *ACS Chemical Biology* **2009**, *5* (1), 15-34.
18. Hofmann, I.; Stover, E. H.; Cullen, D. E.; Mao, J.; Morgan, K. J.; Lee, B. H.; Kharas, M. G.; Miller, P. G.; Cornejo, M. G.; Okabe, R., Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **2009**, *4* (6), 559-567.
19. Sullivan, J. P.; Minna, J. D.; Shay, J. W., Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* **2010**, *29* (1), 61-72.
20. Velcheti, V.; Govindan, R., Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* **2007**, *2* (1), 7-10.
21. Varnat, F.; Duquet, A.; Malerba, M.; Zbinden, M.; Mas, C.; Gervaz, P.; i Altaba, A. R., Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Molecular Medicine* **2009**, *1* (6-7), 338-351.
22. Rubin, L. L.; de Sauvage, F. J., Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature reviews Drug Discovery* **2006**, *5* (12), 1026.
23. Rubin, A. I.; Chen, E. H.; Ratner, D., Basal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine* **2005**, *353* (21), 2262-2269.
24. Amakye, D.; Jagani, Z.; Dorsch, M., Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature medicine* **2013**, *19* (11), 1410.
25. Clement, V.; Sanchez, P.; De Tribolet, N.; Radovanovic, I.; i Altaba, A. R., HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Current Biology* **2007**, *17* (2), 165-172.
26. Espinosa-Bustos, C.; Mella, J.; Soto-Delgado, J.; Salas, C. O., State of the art of Smo antagonists for cancer therapy: advances in the target receptor and new ligand structures. *Future Medicinal Chemistry* **2019**, (00).
27. Briscoe, J.; Théron, P. P., The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2013**, *14* (7), 416-429.
28. i Altaba, A. R.; Mas, C.; Stecca, B., The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology* **2007**, *17* (9), 438-447.
29. Chen, M.-H.; Wilson, C. W.; Li, Y.-J.; Law, K. K. L.; Lu, C.-S.; Gacayan, R.; Zhang, X.; Hui, C.-c.; Chuang, P.-T., Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes & Development* **2009**, *23* (16), 1910-1928.

30. Taylor, M. D.; Liu, L.; Raffel, C.; Hui, C.-c.; Mainprize, T. G.; Zhang, X.; Agatep, R.; Chiappa, S.; Gao, L.; Lowrance, A., Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature Genetics* **2002**, *31* (3), 306-310.
31. Duman-Scheel, M.; Weng, L.; Xin, S.; Du, W., Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* **2002**, *417* (6886), 299.
32. Kurita, S.; Mott, J. L.; Cazanave, S. C.; Fingas, C. D.; Guicciardi, M. E.; Bronk, S. F.; Roberts, L. R.; Fernandez-Zapico, M. E.; Gores, G. J., Hedgehog inhibition promotes a switch from Type II to Type I cell death receptor signaling in cancer cells. *PloS One* **2011**, *6* (3), e18330.
33. Cochrane, C.; Szczepny, A.; Watkins, D.; Cain, J., Hedgehog signaling in the maintenance of cancer stem cells. *Cancers* **2015**, *7* (3), 1554-1585.
34. Banerjee, U.; Hadden, M. K., Recent advances in the design of Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancies. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2014**, *9* (7), 751-771.
35. Sasaki, H.; Hui, C.-c.; Nakafuku, M.; Kondoh, H., A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* **1997**, *124* (7), 1313-1322.
36. Stecca, B.; Ruiz i Altaba, A., Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *Journal of Molecular Cell Biology* **2010**, *2* (2), 84-95.
37. Oro, A. E.; Higgins, K. M.; Hu, Z.; Bonifas, J. M.; Epstein, E. H.; Scott, M. P., Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science* **1997**, *276* (5313), 817-821.
38. Hahn, H.; Wicking, C.; Zaphiropoulos, P. G.; Gailani, M. R.; Shanley, S.; Chidambaram, A.; Vorechovsky, I.; Holmberg, E.; Unden, A. B.; Gillies, S., Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **1996**, *85* (6), 841-851.
39. Epstein, E., Genetic determinants of basal cell carcinoma risk\*. *Medical and Pediatric Oncology* **2001**, *36* (5), 555-558.
40. Caro, I.; Low, J., The role of the hedgehog signaling pathway in the development of basal cell carcinoma and opportunities for treatment. *Clinical Cancer Research* **2010**, clincanres. 2570. subyr.
41. Echelard, Y.; Epstein, D. J.; St-Jacques, B.; Shen, L.; Mohler, J.; McMahon, J. A.; McMahon, A. P., Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **1993**, *75* (7), 1417-1430.
42. Danhof, R.; Lewis, K.; Brown, M., Small molecule inhibitors of the hedgehog pathway in the treatment of basal cell carcinoma of the skin. *American Journal of Clinical Dermatology* **2018**, *19* (2), 195-207.
43. Marini, K. D.; Payne, B. J.; Watkins, D. N.; Martelotto, L. G., Mechanisms of Hedgehog signalling in cancer. *Growth Factors* **2011**, *29* (6), 221-234.
44. Robarge, K. D.; Brunton, S. A.; Castanedo, G. M.; Cui, Y.; Dina, M. S.; Goldsmith, R.; Gould, S. E.; Guichert, O.; Gunzner, J. L.; Halladay, J., GDC-

- 0449—a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (19), 5576-5581.
45. Jia, Y.; Wang, Y.; Xie, J., The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Archives of Toxicology* **2015**, *89* (2), 179-191.
46. Dlugosz, A.; Agrawal, S.; Kirkpatrick, P., Vismodegib. Nature Publishing Group: 2012.
47. Yauch, R. L.; Dijkgraaf, G. J.; Alicke, B.; Januario, T.; Ahn, C. P.; Holcomb, T.; Pujara, K.; Stinson, J.; Callahan, C. A.; Tang, T., Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* **2009**, *326* (5952), 572-574.
48. Brinkhuizen, T.; Reinders, M. G.; van Geel, M.; Hendriksen, A. J.; Paulussen, A. D.; Winnepenninckx, V. J.; Keymeulen, K. B.; Soetekouw, P. M.; van Steensel, M. A.; Mosterd, K., Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothed mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2014**, *71* (5), 1005-1008.
49. Sharpe, H. J.; de Sauvage, F. J., Grking the Smoothed signal. *Sci. Signal.* **2018**, *11* (516), eaar6377.
50. Wang, C.; Wu, H.; Evron, T.; Vardy, E.; Han, G. W.; Huang, X.-P.; Hufeisen, S. J.; Mangano, T. J.; Urban, D. J.; Katritch, V., Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs. *Nature Communications* **2014**, *5*.
51. Wang, C.; Wu, H.; Katritch, V.; Han, G. W.; Huang, X.-P.; Liu, W.; Siu, F. Y.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C., Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* **2013**, *497* (7449), 338.
52. Zhang, X.; Zhao, F.; Wu, Y.; Yang, J.; Han, G. W.; Zhao, S.; Ishchenko, A.; Ye, L.; Lin, X.; Ding, K., Crystal structure of a multi-domain human smoothed receptor in complex with a super stabilizing ligand. *Nature Communications* **2017**, *8*.
53. Byrne, E. F.; Sircar, R.; Miller, P. S.; Hedger, G.; Luchetti, G.; Nachtergaele, S.; Tully, M. D.; Mydock-McGrane, L.; Covey, D. F.; Rambo, R. P., Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature* **2016**, *535* (7613), 517.
54. Bendell, J.; Andre, V.; Ho, A.; Kudchadkar, R.; Migden, M.; Infante, J.; Tiu, R. V.; Pitou, C.; Tucker, T.; Brail, L., Phase I Study of LY2940680, a Smo antagonist, in patients with advanced cancer including treatment-naive and previously treated basal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **2018**, *24* (9), 2082-2091.
55. Chen, J. K.; Taipale, J.; Young, K. E.; Maiti, T.; Beachy, P. A., Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (22), 14071-14076.
56. Keeler, R. F.; Binns, W., Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of steroidal alkaloids

- from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology* **1968**, *1* (1), 5-10.
57. Keeler, R. F., Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). X. Cyclopia in rabbits produced by cyclopamine. *Teratology* **1970**, *3* (2), 175-180.
58. Gould, A.; Missailidis, S., Targeting the hedgehog pathway: the development of cyclopamine and the development of anti-cancer drugs targeting the hedgehog pathway. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2011**, *11* (3), 200-213.
59. Munchhof, M. J.; Li, Q.; Shavnya, A.; Borzillo, G. V.; Boyden, T. L.; Jones, C. S.; LaGreca, S. D.; Martinez-Alsina, L.; Patel, N.; Pelletier, K., Discovery of PF-04449913, a potent and orally bioavailable inhibitor of smoothened. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *3* (2), 106-111.
60. Feldmann, G.; Fendrich, V.; McGovern, K.; Bedja, D.; Bisht, S.; Alvarez, H.; Koorstra, J.-B. M.; Habbe, N.; Karikari, C.; Mullendore, M., An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* **2008**, *7* (9), 2725-2735.
61. Gould, S. E.; Low, J. A.; Marsters Jr, J. C.; Robarge, K.; Rubin, L. L.; de Sauvage, F. J.; Sutherlin, D. P.; Wong, H.; Yauch, R. L., Discovery and preclinical development of vismodegib. *Expert opinion on Drug Discovery* **2014**, *9* (8), 969-984.
62. Peyrl, A.; Krapfenbauer, K.; Slavic, I.; Yang, J. W.; Strobel, T.; Lubec, G., Protein profiles of medulloblastoma cell lines DAOY and D283: Identification of tumor-related proteins and principles. *Proteomics* **2003**, *3* (9), 1781-1800.
63. Sharpe, H. J.; Pau, G.; Dijkgraaf, G. J.; Basset-Seguín, N.; Modrusan, Z.; Januario, T.; Tsui, V.; Durham, A. B.; Dlugosz, A. A.; Haverty, P. M., Genomic analysis of smoothened inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* **2015**, *27* (3), 327-341.
64. Chang, A. L. S.; Oro, A. E., Initial assessment of tumor regrowth after vismodegib in advanced basal cell carcinoma. *Archives of Dermatology* **2012**, *148* (11), 1324-1325.
65. Mahindroo, N.; Punchihewa, C.; Fujii, N., Hedgehog-Gli signaling pathway inhibitors as anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (13), 3829-3845.
66. Chen, J. K.; Taipale, J.; Cooper, M. K.; Beachy, P. A., Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & Development* **2002**, *16* (21), 2743-2748.
67. Xin, M.; Wen, J.; Tang, F.; Tu, C.; Shen, H.; Zhao, X., The discovery of novel N-(2-pyrimidinylamino) benzamide derivatives as potent hedgehog signaling pathway inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23* (24), 6777-6783.
68. Xin, M.; Wen, J.; Tang, F.; Tu, C.; Huang, W.; Shen, H.; Zhao, X.; Cheng, L.; Wang, M.; Zhang, L., Synthesis and evaluation of 4-(2-pyrimidinylamino)

- benzamides inhibitors of hedgehog signaling pathway. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (3), 983-988.
69. Zhang, L.; Xin, M.; Shen, H.; Wen, J.; Tang, F.; Tu, C.; Zhao, X.; Wei, P., Five-membered heteroaromatic ring fused-pyrimidine derivatives: Design, synthesis, and hedgehog signaling pathway inhibition study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (15), 3486-3492.
70. Sun, C.; Petros, A. M.; Hajduk, P. J., Fragment-based lead discovery: challenges and opportunities. *Journal of computer-aided Molecular Design* **2011**, *25* (7), 607-610.
71. Sherer, C.; Snape, T. J., Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: Exploring the scope of indole and carbazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *97*, 552-560.
72. Dolezal, M.; Zitko, J., Pyrazine derivatives: a patent review (June 2012–present). *Expert opinion on Therapeutic Patents* **2015**, *25* (1), 33-47.
73. Khan, I.; Ibrar, A.; Abbas, N., Oxadiazoles as privileged motifs for promising anticancer leads: Recent advances and future prospects. *Archiv der Pharmazie* **2014**, *347* (1), 1-20.
74. Huang, W.-S.; Liu, S.; Zou, D.; Thomas, M.; Wang, Y.; Zhou, T.; Romero, J.; Kohlmann, A.; Li, F.; Qi, J., Discovery of brigatinib (AP26113), a phosphine oxide-containing, potent, orally active inhibitor of anaplastic lymphoma kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59* (10), 4948-4964.
75. Flick, A. C.; Ding, H. X.; Leverett, C. A.; Kyne Jr, R. E.; Liu, K. K.-C.; Fink, S. J.; O'Donnell, C. J., Synthetic approaches to the new drugs approved during 2015. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (15), 6480-6515.
76. Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R., Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14* (3), 347-361.
77. Legraverend, M.; Grierson, D. S., The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14* (12), 3987-4006.
78. Morales, F.; Ramirez, A.; Conejo-Garcia, A.; Morata, C.; Marchal, J. A.; Campos, J. M., Anti-proliferative activity of 2, 6-dichloro-9-or 7-(ethoxycarbonylmethyl)-9H-or 7H-purines against several human solid tumour cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *76*, 118-124.
79. Sharma, S.; Singh, J.; Ojha, R.; Singh, H.; Kaur, M.; Bedi, P.; Nepali, K., Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *112*, 298-346.
80. Gray, N. S.; Wodicka, L.; Thunnissen, A.-M. W.; Norman, T. C.; Kwon, S.; Espinoza, F. H.; Morgan, D. O.; Barnes, G.; LeClerc, S.; Meijer, L., Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **1998**, *281* (5376), 533-538.
81. Munshi, P. N.; Lubin, M.; Bertino, J. R., 6-thioguanine: a drug with unrealized potential for cancer therapy. *The Oncologist* **2014**, *19* (7), 760-765.

82. Masson, C., Treatment of herpes with acyclovir. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* **1983**, 12 (22), 1399-1400.
83. Gandhi, V.; Keating, M. J.; Bate, G.; Kirkpatrick, P., Nelarabine. Nature Publishing Group: 2006.
84. Bonate, P. L.; Arthaud, L.; Cantrell Jr, W. R.; Stephenson, K.; Secrist III, J. A.; Weitman, S., Discovery and development of clofarabine: a nucleoside analogue for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery* **2006**, 5 (10), 855.
85. Calderón-Arancibia, J.; Espinosa-Bustos, C.; Cañete-Molina, Á.; Tapia, R.; Faúndez, M.; Torres, M.; Aguirre, A.; Paulino, M.; Salas, C., Synthesis and pharmacophore modelling of 2, 6, 9-trisubstituted purine derivatives and their potential role as apoptosis-inducing agents in cancer cell lines. *Molecules* **2015**, 20 (4), 6808-6826.
86. Hurst, D. T., *introduction to the chemistry and biochemistry of pyrimidines, purines, and pteridines*. J. Wiley: 1980.
87. Lister, J. H., *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Fused Pyrimidines: The Purines*. John Wiley & Sons: 2009; Vol. 24.
88. Yue, Y.; Zheng, Z. G.; Wu, B.; Xia, C. Q.; Yu, X. Q., Copper-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Nucleobases with Arylboronic Acids: An Efficient Access to N-Arylnucleobases. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 2005 (24), 5154-5157.
89. Wolfe, J. P.; Singer, R. A.; Yang, B. H.; Buchwald, S. L., Highly active palladium catalysts for Suzuki coupling reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121 (41), 9550-9561.
90. Phapale, V. B.; Cárdenas, D. J., Nickel-catalysed Negishi cross-coupling reactions: scope and mechanisms. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38 (6), 1598-1607.
91. Miyaura, N.; Suzuki, A., Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chemical Reviews* **1995**, 95 (7), 2457-2483.
92. Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V., The Heck reaction as a sharpening stone of palladium catalysis. *Chemical Reviews* **2000**, 100 (8), 3009-3066.
93. Pathak, A. K.; Pathak, V.; Reynolds, R. C., Solution-phase parallel synthesis of acyclic nucleoside libraries of purine, pyrimidine, and triazole acetamides. *ACS Combinatorial Science* **2014**, 16 (9), 485-493.
94. Hartwig, J. F., Approaches to catalyst discovery. New carbon-heteroatom and carbon-carbon bond formation. *Pure and Applied Chemistry* **1999**, 71 (8), 1417-1423.
95. Corma, A.; González-Arellano, C.; Iglesias, M.; Sánchez, F., Gold complexes as catalysts: Chemoselective hydrogenation of nitroarenes. *Applied Catalysis A: General* **2009**, 356 (1), 99-102.
96. Sánchez Mendoza, M.; Vázquez Sánchez, A.; García Manrique, C.; Ávila-Zárraga, J. G., Reducción de nitrocompuestos utilizando el sistema Pd/H<sub>2</sub>N-NH<sub>2</sub>/Mw. *Educación Química* **2013**, 24 (3), 347-350.
97. Infante, P.; Alfonsi, R.; Ingallina, C.; Quaglio, D.; Ghirga, F.; D'acquerica, I.; Bernardi, F.; Di Magno, L.; Canettieri, G.; Screpanti, I., Inhibition of

- Hedgehog-dependent tumors and cancer stem cells by a newly identified naturally occurring chemotype. *Cell Death & Disease* **2016**, 7 (9), e2376.
98. Melotti, A.; Mas, C.; Kuciak, M.; Lorente-Trigos, A.; Borges, I.; Altaba, A. R., The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. *EMBO Molecular Medicine* **2014**, 6 (10), 1263-1278.
99. Gerlier, D.; Thomasset, N., Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods* **1986**, 94 (1-2), 57-63.
100. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65 (1-2), 55-63.
101. Green, L. M.; Reade, J. L.; Ware, C. F., Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *Journal of Immunological Methods* **1984**, 70 (2), 257-268.
102. Dive, C.; Gregory, C. D.; Phipps, D. J.; Evans, D. L.; Milner, A. E.; Wyllie, A. H., Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1992**, 1133 (3), 275-285.
103. Guerrero, S.; Inostroza-Riquelme, M.; Contreras-Orellana, P.; Diaz-Garcia, V.; Lara, P.; Vivanco-Palma, A.; Cárdenas, A.; Miranda, V.; Robert, P.; Leyton, L., Curcumin-loaded nanoemulsion: a new safe and effective formulation to prevent tumor recurrence and metastasis. *Nanoscale* **2018**, 10 (47), 22612-22622.
104. Spartan'10, S., version 1.1.0. Wavefunction, Inc. Irvine. 2010.
105. Wang, C.; Wu, H.; Evron, T.; Vardy, E.; Han, G. W.; Huang, X.-P.; Hufeisen, S. J.; Mangano, T. J.; Urban, D. J.; Katritch, V., Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs. *Nature Communications* **2014**, 5, 4355.
106. 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. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, 30 (16), 2785-2791.
107. Schrodinger, L., The PyMOL molecular graphics system, version 1.8. *Schrodinger LLC, New York, NY* **2015**.
108. Release, S., 1: Maestro. *Schrödinger, LLC: New York, NY, USA* **2018**.
109. Kurti, L.; Czakó, B., *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*. Elsevier: 2005.
110. Miyaura, N.; Suzuki, A., Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1979**, (19), 866-867.
111. Miura, M., Rational ligand design in constructing efficient catalyst systems for Suzuki–Miyaura coupling. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (17), 2201-2203.

112. Yasuda, N., Application of cross-coupling reactions in Merck. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, 653 (1), 279-287.
113. Campo, M. A.; Zhang, H.; Yao, T.; Ibdah, A.; McCulla, R. D.; Huang, Q.; Zhao, J.; Jenks, W. S.; Larock, R. C., Aryl to aryl palladium migration in the Heck and Suzuki coupling of o-halobiaryls. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (19), 6298-6307.
114. Peyrat, J.-F.; Thomas, E.; L'Hermite, N.; Alami, M.; Brion, J.-D., Versatile palladium (II)-catalyzed Negishi coupling reactions with functionalized conjugated alkenyl chlorides. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44 (35), 6703-6707.
115. Gowrisankar, S.; Sergeev, A. G.; Anbarasan, P.; Spannenberg, A.; Neumann, H.; Beller, M., A general and efficient catalyst for palladium-catalyzed C–O coupling reactions of aryl halides with primary alcohols. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (33), 11592-11598.
116. Kosugi, M.; Fugami, K., Overview of the Stille Protocol with Sn. *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis* **2002**, 263-283.
117. Xin, M.; Zhang, L.; Shen, H.; Wen, J.; Tu, C.; Liu, Z.; Cheng, L.; Zhao, X., Design, synthesis, and biological study of 6, 7-dihydro-5H-pyrano [2, 3-d] pyrimidine derivatives as novel hedgehog signaling pathway inhibitors. *Medicinal Chemistry Research* **2014**, 23 (8), 3784-3792.
118. Lakshman, M. K., Palladium-catalyzed C–N and C–C cross-couplings as versatile, new avenues for modifications of purine 2'-deoxynucleosides. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, 653 (1-2), 234-251.
119. Ferrari, M.; Fornasiero, M. C.; Isetta, A. M., MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods* **1990**, 131 (2), 165-172.
120. Wang, Y.-Y.; Zheng, X.-X., A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro. *Journal of Immunological Methods* **2002**, 268 (2), 179-188.
121. Trinh, T. N.; McLaughlin, E. A.; Abdel-Hamid, M. K.; Gordon, C. P.; Bernstein, I. R.; Pye, V.; Cossar, P.; Sakoff, J. A.; McCluskey, A., Quinolone-1-(2 H)-ones as hedgehog signalling pathway inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, 14 (26), 6304-6315.
122. Miller, D. W.; Fontain, M.; Kolar, C.; Lawson, T., The expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Letters* **1996**, 107 (2), 301-306.
123. Frankfurt, O. S.; Krishan, A., Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anti-cancer Drugs* **2003**, 14 (7), 555-561.
124. Aguirre, A.; Shoji, K. F.; Sáez, J. C.; Henríquez, M.; Quest, A. F., FasL-triggered death of Jurkat cells requires caspase 8-induced, ATP-dependent cross-talk between fas and the purinergic receptor P2X7. *Journal of Cellular Physiology* **2013**, 228 (2), 485-493.
125. Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M.; Grignani, F.; Riccardi, C., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium

- iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **1991**, 139 (2), 271-279.
126. Kim, B. R.; Jeong, Y. A.; Na, Y. J.; Park, S. H.; Jo, M. J.; Kim, J. L.; Jeong, S.; Lee, S.-Y.; Kim, H. J.; Oh, S. C., Genipin suppresses colorectal cancer cells by inhibiting the Sonic Hedgehog pathway. *Oncotarget* **2017**, 8 (60), 101952.
127. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **2007**, 35 (4), 495-516.
128. Van Engeland, M.; Nieland, L. J.; Ramaekers, F. C.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. P., Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* **1998**, 31 (1), 1-9.
129. Bertrand, R.; Solary, E.; O'Connor, P.; Kohn, K. W.; Pommier, Y., Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental Cell Research* **1994**, 211 (2), 314-321.
130. Bernardini, G.; Geminiani, M.; Gambassi, S.; Orlandini, M.; Petricci, E.; Marzocchi, B.; Laschi, M.; Taddei, M.; Manetti, F.; Santucci, A., Novel smoothed antagonists as anti-neoplastic agents for the treatment of osteosarcoma. *Journal of Cellular Physiology* **2018**, 233 (6), 4961-4971.
131. Paget, C.; Duret, H.; Ngiow, S. F.; Kansara, M.; Thomas, D. M.; Smyth, M. J., Studying the role of the immune system on the antitumor activity of a Hedgehog inhibitor against murine osteosarcoma. *Oncoimmunology* **2012**, 1 (8), 1313-1322.
132. Yao, H.; Ashihara, E.; Strovel, J.; Nakagawa, Y.; Kuroda, J.; Nagao, R.; Tanaka, R.; Yokota, A.; Takeuchi, M.; Hayashi, Y., AV-65, a novel Wnt/ $\beta$ -catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model. *Blood cancer journal* **2011**, 1 (11), e43.
133. Pricl, S.; Cortelazzi, B.; Dal Col, V.; Marson, D.; Laurini, E.; Fermeglia, M.; Licitra, L.; Pilotti, S.; Bossi, P.; Perrone, F., Smoothed (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Molecular oncology* **2015**, 9 (2), 389-397.
134. Wolfe, C. M.; Green, H. W.; Coggnetta Jr, A. B.; Hatfield, K. H., Basal cell carcinoma rebound after cessation of vismodegib in a nevoid basal cell carcinoma syndrome patient. *Dermatologic Surgery* **2012**, 38 (11), 1863-1866.
135. Ribeiro, H. S.; Chu, B.-S.; Ichikawa, S.; Nakajima, M., Preparation of nanodispersions containing  $\beta$ -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids* **2008**, 22 (1), 12-17.
136. Lozano, M.; Lollo, G.; Alonso-Nocelo, M.; Brea, J.; Vidal, A.; Torres, D.; Alonso, M., Polyarginine nanocapsules: a new platform for intracellular drug delivery. *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, 15 (3), 1515.
137. Gunarta, I. K.; Li, R.; Nakazato, R.; Suzuki, R.; Boldbaatar, J.; Suzuki, T.; Yoshioka, K., Critical role of glioma-associated oncogene homolog 1 in maintaining invasive and mesenchymal-like properties of melanoma cells. *Cancer Science* **2017**, 108 (8), 1602-1611.

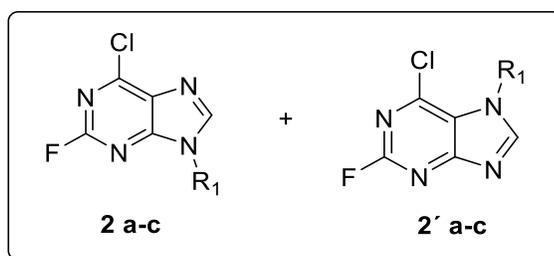
138. Danciu, C.; Falamas, A.; Dehelean, C.; Soica, C.; Radeke, H.; Barbu-Tudoran, L.; Bojin, F.; Pinzaru, S. C.; Munteanu, M. F., A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell International* **2013**, *13* (1), 75.
139. Karimkhani, C.; Gonzalez, R.; Dellavalle, R. P., A review of novel therapies for melanoma. *American Journal of Clinical Dermatology* **2014**, *15* (4), 323-337.
140. Becker, J. C.; Houben, R.; Schrama, D.; Voigt, H.; Ugurel, S.; Reisfeld, R. A., Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Experimental Dermatology* **2010**, *19* (2), 157-164.
141. Overwijk, W. W.; Restifo, N. P., B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology* **2000**, *39* (1), 20.1. 1-20.1. 29.

## CAPÍTULO VIII: MATERIAL ANEXO

### 8.1 Síntesis y datos espectroscópicos para los compuestos de la Serie I

De acuerdo con la metodología sintética representada en el Esquema 4 (capítulo V: resultados y discusión), se logró obtener:

#### 8.1.1 Procedimiento general y síntesis de 9-alkil-6-cloro-2-fluoro-9*H* y 7*H*-purina: 2a-c y 2'a-c



Una mezcla de 6-cloro-2-fluoropurina **1** (1.0 mmol) con el respectivo haluro de alquilo R<sub>1</sub> (1.5 mmol) y carbonato de potasio (3.0 mmol) en dimetilformamida (5 mL) fue agitada por 12 h a temperatura ambiente, luego la mezcla fue filtrada y evaporada en un evaporador rotatorio al vacío. El producto de la reacción fue separado por cromatografía en columna de sílica flash usando como eluyente EtOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:3).

#### 9-Butil-6-cloro-2-fluoro-9*H*-purina (2a)

Sólido blanco, rendimiento 36 %, pf 76-78 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.09 (s, 1H), 4.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.00 – 1.81 (m, 2H), 1.50 – 1.22 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.44 – 155.08 (d, *J*<sub>CF</sub> = 219.6 Hz), 153.87 – 153.50 (d, *J*<sub>CF</sub> = 18.3 Hz), 152.82 – 152.47 (d, *J*<sub>CF</sub> = 17.6

Hz), 145.76 – 145.69 (d,  $J_{CF} = 3.1$  Hz), 130.32 – 130.22 (d,  $J_{CF} = 5.0$  Hz), 44.38, 31.65, 19.78, 13.38.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -49.69. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2959, 1605, 1579, 1511, 1408, 1332, 920. ESI/MS para ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClFN}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 229.1. Encontrado: 229.1

### **6-Cloro-2-fluoro-9-pentil-9H-purina (2b)**

Sólido amarillo, rendimiento 47 %, pf 92-93 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.05 (s, 1H), 4.19 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.93 – 1.83 (m, 2H), 1.39 – 1.22 (m, 4H), 0.85 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.35 – 156.17 (d,  $J_{CF} = 219.6$  Hz), 153.76 – 153.59 (d,  $J_{CF} = 17.0$  Hz), 152.71 – 152.54 (d,  $J_{CF} = 17.6$  Hz), 145.79 – 145.76 (d,  $J_{CF} = 3.2$  Hz), 130.31 – 130.26 (d,  $J_{CF} = 5.0$  Hz), 44.66, 29.37, 28.63, 22.04, 13.79.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -49.71. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2958, 1599, 1578, 1510, 1406, 1338, 920. ESI/MS para ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClFN}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado. 243.0. Encontrado: 243.0

### **6-Cloro-2-fluoro-9-hexil-9H-purina (2c)**

Gel amarillo, rendimiento 60 %.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.08 (s, 1H), 4.21 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.95 – 1.85 (m, 2H), 1.30 (m, 6H), 0.85 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.44 – 156.26 (d,  $J_{CF} = 219.7$  Hz), 153.87 – 153.70 (d,  $J_{CF} = 16.9$  Hz), 152.78 – 152.61 (d,  $J_{CF} = 17.6$  Hz), 145.93 – 145.90 (d,  $J_{CF} = 3.1$  Hz), 130.40 – 130.36 (d,  $J_{CF} = 4.8$  Hz), 44.78, 31.16, 29.74, 26.31, 22.48, 13.98.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -49.73. ESI/MS para ( $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClFN}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 257.0. Encontrado: 257.0

### **7-Butil-6-cloro-2-fluoro-7H-purine (2'a)**

Aceite amarillo claro, rendimiento 13 %.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.21 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 4.42 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.87 (dt,  $J = 15.1, 7.5$  Hz, 2H), 1.41 – 1.32 (m, 2H), 0.94 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.35 – 64.17 (d,  $J_{CF} = 17.3$  Hz), 158.55 – 156.38 (d,  $J_{CF} = 217.5$  Hz), 150.74, 144.62 – 144.44 (d,  $J_{CF} = 18.3$  Hz), 121.14 – 121.09 (d,  $J_{CF} = 5.4$  Hz) 47.45, 33.46,

19.59, 13.44.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -50.30. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2961, 1608, 1485, 1396, 1036. ESI/MS para ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClFN}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 2298.1. Encontrado: 229.0

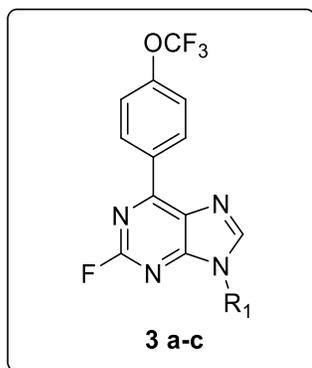
#### **6-Cloro-2-fluoro-7-pentil-7H-purina (2'b)**

Sólido blanco, rendimiento 12 %, pf 42-43 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.21 (s, 1H), 4.41 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.39 – 1.24 (m, 4H), 0.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.37 – 164.20 (d,  $J_{\text{CF}} = 17.2$  Hz), 158.57 – 156.41 (d,  $J_{\text{CF}} = 217.5$  Hz), 150.70, 144.61 – 144.43 (d,  $J_{\text{CF}} = 18.2$  Hz), 121.13 – 121.07 (d,  $J_{\text{CF}} = 6.0$  Hz), 47.71, 31.22, 28.45, 22.08, 13.81.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -50.23. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2953, 1610, 1553, 1490, 1363, 1084, 939. ESI/MS para ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClFN}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 243.1. Encontrado: 243.1

#### **6-Cloro-2-fluoro-9-hexil-7H-purina (2'c)**

Gel amarillo, rendimiento 10 %.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.24 (s, 1H), 4.44 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.91 (t,  $J = 14.9, 7.4$  Hz, 2H), 1.41 – 1.25 (m, 6H), 0.86 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 164.46-164.29 (d,  $J_{\text{CF}} = 17.2$  Hz), 158.66-156.50 58 (d,  $J_{\text{CF}} = 217.4$  Hz), 150.83, 144.71-144.53 (d,  $J_{\text{CF}} = 18.4$  Hz), 121.23-121.17 (d,  $J_{\text{CF}} = 5.9$  Hz), 47.82, 31.58, 31.18, 29.77, 26.12, 22.49, 14.28, 13.96.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -50.18. ESI/MS para ( $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClFN}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 256.0. Encontrado: 256.8

### 8.1.2 Procedimiento general y síntesis de 9-alkil-2-fluoro-6-(4-(trifluorometoxifenil)-9H-purina: 3a-c



Una solución de los derivados **2a-c** (1.0 mmol), ácido (4-(trifluorometoxi)fenil)borónico (1.0 mmol), una solución de carbonato de potasio 2M (1 mL por mmol de **2a-c**), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (0.1 mmol), en dioxano (10 mL), fue sometida a calentamiento a reflujo por 3 horas. A continuación, la solución se enfrió a temperatura ambiente y fue extraída con acetato de etilo. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y concentrada al vacío en un evaporador rotatorio. El crudo de reacción fue purificado en columna de sílica gel utilizando diclorometano como eluyente.

#### 9-Butil-2-fluoro-6-(4-(trifluorometoxifenil)-9H-purina (3a)

Sólido blanco, rendimiento 41 %, pf 67-69 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.89 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.38 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 4.26 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.99 – 1.84 (m, 2H), 1.48 – 1.35 (m, 2H), 0.99 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.77 – 157.66 (d,  $J_{\text{CF}} = 212.9$  Hz), 155.58 – 155.43 (d,  $J_{\text{CF}} = 15.3$  Hz), 155.15 – 154.99 (d,  $J_{\text{CF}} = 16.7$  Hz), 151.71, 145.13 – 145.10 (d,  $J_{\text{CF}} = 3.0$  Hz), 133.02, 131.78 (2C), 129.66 – 129.62 (d,  $J_{\text{CF}} = 4.3$  Hz), 121.70, 120.64 (2C), 43.92, 31.74, 19.86, 13.45.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -50.65, -57.56 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2964, 1597, 1578, 1517, 1359, 1250,

1219,1117. ESI/MS para (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 354.1. Encontrado: 354.9

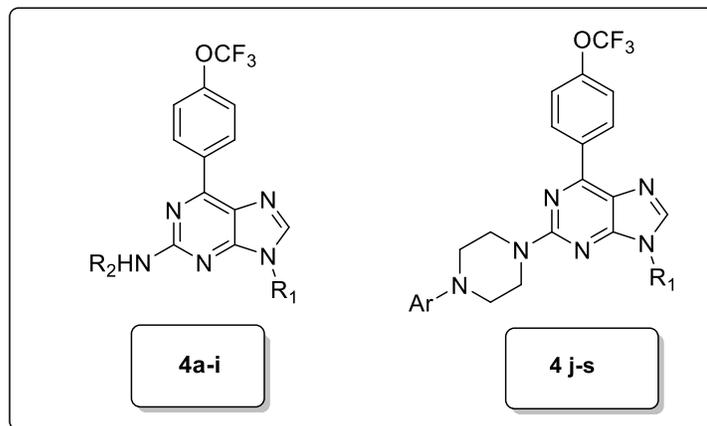
### **2-Fluoro-9-pentil-6-(4-(trifluorometoxifenil)-9H-purina (3b)**

Sólido blanco, rendimiento 57 %, pf 72-73 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.03 – 1.90 (m, 2H), 1.37 (s, 4H), 0.91 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.79 – 157.67 (d, *J*<sub>CF</sub> = 213.0 Hz), 155.61 – 155.46 (d, *J*<sub>CF</sub> = 14.7 Hz), 155.15 – 155.00 (d, *J*<sub>CF</sub> = 15.0 Hz), 151.71, 145.11, 133.02, 131.78 (2C), 131.66, 129.64, 120.65 (2C), 44.18, 29.45, 28.72, 22.10, 13.82. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -50.64, -57.56 (3F). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2964, 1596, 1576, 1514, 1360, 1293, 1095. ESI/MS para (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 368.1. Encontrado: 368.9

### **2-Fluoro-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxifenil)-9H-purina (3c)**

Sólido blanco, rendimiento 51 %, pf 80-82°C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.83 – 1.71 (m, 2H), 1.26 – 1.07 (m, 6H), 0.72 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.78 – 157.67 (d, *J*<sub>CF</sub> = 213.0 Hz), 155.60 – 155.45 (d, *J*<sub>CF</sub> = 15.4 Hz), 155.15 – 154.98 (d, *J*<sub>CF</sub> = 16.8 Hz), 151.70, 145.14 – 145.11 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3.0 Hz), 133.03, 131.79 (2C), 129.67 – 129.63 (d, *J*<sub>CF</sub> = 4.2 Hz), 121.70 – 119.13 (d, *J*<sub>CF</sub> = 259.6 Hz), 120.65 (2C), 44.20, 31.14, 29.72, 26.29, 22.43, 13.90. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -50.66, -57.56 (3F). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2921, 1596, 1573, 1515, 1371, 1305, 1278, 1155. ESI/MS para (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 382.1. Encontrado: 382.8

### 8.1.3 Procedimiento general para la síntesis de purinas 2,6,9-trisustituidas Serie I: (4a-s)



Los compuestos **3a-c**, las aminas respectivas (3.0 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (3.0 mmol) fueron disueltas en *n*-butanol (5 mL). La mezcla fue calentada a reflujo a 110°C por 12 horas. Posteriormente fue enfriada y concentrada en un evaporador rotatorio al vacío. El crudo de reacción fue purificado en columna de sílica gel utilizando cloroformo como fase móvil.

#### **9-Butil-*N*-ciclopentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4a)**

Sólido amarillo, rendimiento 89 %, pf 93-95 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.19 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.45 – 4.33 (m, 1H), 4.11 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.82 – 1.60 (m, 4H), 1.55 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.17, 154.70, 153.59, 150.71 – 150.70 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.7 Hz), 141.22, 135.00, 131.12 (2C), 124.84, 121.77 – 119.21 (d, *J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.52 (2C), 53.51, 42.95, 33.36 (2C), 31.74, 23.85 (2C), 19.83, 13.49. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.61 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 420.2013. Encontrado: 420.1996

***N*-Ciclopentil-9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4b)**

Sólido amarillo, rendimiento 87 %, pf 62-63 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.19 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.44 – 4.32 (m, 1H), 4.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.12 (td, *J* = 12.1, 6.5 Hz, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 2H), 1.82 – 1.60 (m, 4H), 1.60 – 1.48 (m, 2H), 1.42 – 1.27 (m, 4H), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.17, 154.69, 153.58, 150.72 – 150.70 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.7 Hz), 141.23, 135.00, 131.11 (2C), 124.86, 121.77 – 119.21 (d, *J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.52 (2C), 53.51, 43.26, 33.36 (2C), 29.36, 28.77, 23.85 (2C), 22.12, 13.84. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.61 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 434.2169. Encontrado: 434.2154

***N*-Ciclopentil-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4c)**

Sólido amarillo, rendimiento 97 %, pf 58-60 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.64 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.32 – 4.21 (m, 1H), 3.97 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.03 – 1.96 (m, 2H), 1.80 – 1.71 (m, 2H), 1.70 – 1.50 (m, 4H), 1.45 – 1.39 (m, 2H), 1.28 – 1.12 (m, 6H), 0.75 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.16, 154.69, 153.56, 150.72 – 150.70 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.6 Hz), 141.23, 135.00, 131.12 (2C), 124.85, 121.77 – 119.21 (d, *J*<sub>CF</sub> = 257.6 Hz), 120.51 (2C), 53.51, 43.26, 33.36 (2C), 31.19, 29.63, 26.30, 23.85 (2C), 22.44, 13.92. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.61 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 448.2326. Encontrado: 448.2313

**9-Butil-*N*-ciclohexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4d)**

Sólido blanco, rendimiento 90 %, pf 92-94 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.12 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.94 (m, 1H), 2.20 – 2.05 (m, 2H), 1.93 – 1.72 (m, 4H), 1.71 – 1.60 (m, 2H), 1.54 – 1.17 (m, 6H), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.78, 154.76, 153.64, 150.70 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.7 Hz),

141.20, 135.01, 131.10 (2C), 124.81, 121.77 – 119.21 (d,  $J_{CF} = 258.6$  Hz), 120.52 (2C), 50.28, 42.90, 33.19 (2C), 31.74, 25.88, 24.98 (2C), 19.82, 13.47.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.61 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 434.2169. Encontrado: 448.2313

***N*-Ciclohexil-9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4e)**

Sólido blanco, rendimiento 77 %, pf 108-110 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.76 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.35 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 5.10 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 4.09 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 4.01 – 3.87 (m, 1H), 2.19 – 2.08 (m, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.84 – 1.74 (m, 2H), 1.53 – 1.19 (m, 10H), 0.90 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.78, 154.75, 153.66, 150.72-150.70 (d,  $J_{CF} = 1.7$  Hz), 141.21, 135.00, 131.10 (2C), 124.83, 121.77 – 119.21 (d,  $J_{CF} = 258.6$  Hz), 120.53 (2C), 50.28, 43.23, 33.20 (2C), 29.38, 28.76, 25.89, 24.99 (2C), 22.10, 13.84.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.61 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 448.2326. Encontrado: 448.2308

***N*-Ciclohexil-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4f)**

Sólido amarillo, rendimiento 96 %, pf 84-86 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.63 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 5.03 (s, 1H), 3.97 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.87 – 3.78 (m, 1H), 2.00 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 1.81 – 1.61 (m, 2H), 1.40 – 1.07 (m, 12H), 0.81 – 0.68 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.68, 154.79, 153.56, 150.76 – 150.74 (d,  $J_{CF} = 1.6$  Hz), 141.30, 134.85, 131.13 (2C), 124.80, 121.77 – 119.21 (d,  $J_{CF} = 257.6$  Hz), 120.54 (2C), 50.28, 43.27, 33.18 (2C), 31.19, 29.64, 26.31, 25.89, 24.98 (2C), 22.44, 13.94.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.61 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 462.2482. Encontrado: 462.2467

**9-Butil-*N*-(ciclohexilmetil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4g)**

Sólido blanco, rendimiento 94 %, pf 88-89 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.19 (s, 1H), 4.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.29 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.81 - 1.73 (m, 4H), 1.70 - 1.61 (m, 2H), 1.61 - 1.48 (m, 2H), 1.35 - 1.23 (m, 2H), 1.23 - 1.06 (m, 3H), 0.95 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.70, 154.71, 153.58, 150.70 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.7 Hz), 141.19, 135.00, 131.12 (2C), 124.83, 121.77 - 119.21 (d, *J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.52 (2C), 53.40, 48.35, 42.94, 38.22, 31.74, 31.12 (2C), 26.55, 26.01, 19.84, 13.49. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.60 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 448.2326. Encontrado: 448.2303

***N*-(Ciclohexilmetil)-9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4h)**

Sólido blanco, rendimiento 82 %, pf 78-79 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.10 (s, 1H), 3.98 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.26 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.82 - 1.69 (m, 4H), 1.68 - 1.50 (m, 4H), 1.32 - 1.04 (m, 7H), 0.95 - 0.87 (m, 2H), 0.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.71, 154.71, 153.64, 150.74 - 150.72 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.7 Hz), 141.21, 134.98, 131.12 (2C), 124.87, 121.77 - 119.21 (d, *J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.55 (2C), 48.37, 43.27, 38.26, 31.14 (2C), 29.39, 28.78, 26.57, 26.02 (2C), 22.15, 13.89. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.61 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 462.2482. Encontrado: 462.2465

***N*-(Ciclohexilmetil)-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (4i)**

Sólido blanco, rendimiento 93 %, pf 85-86 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.12 (s, 1H), 4.00 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.28 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.83 - 1.53 (m, 7H), 1.31 -

1.04 (m, 10H), 1.01 – 0.85 (m, 2H), 0.78 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.70, 154.70, 153.62, 150.73 – 150.71 (d,  $J_{\text{CF}} = 1.6$  Hz), 141.20, 134.99, 131.11 (2C), 124.87, 121.77 – 119.21 (d,  $J_{\text{CF}} = 257.6$  Hz), 120.54 (2C), 48.36, 43.29, 38.26, 31.22, 31.13 (2C), 29.65, 26.56 (2C), 26.32, 26.02, 22.46, 13.96.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.61 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): Calculado: 476.2639. Encontrado: 476.2622

**9-Pentil-2-(4-fenilpiperazin-1-il)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4j)**

Sólido café, rendimiento 90 %, pf 119-120 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.04 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.66 – 7.41 (m, 4H), 7.22 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.11 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.47 – 4.24 (m, 6H), 3.63 – 3.44 (m, 4H), 2.23 – 2.00 (m, 2H), 1.70 – 1.40 (m, 4H), 1.12 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.70, 154.66, 152.97, 151.46, 150.74, 141.72 (2C), 135.11, 131.15 (2C), 129.15 (2C), 124.65, 120.50 (2C), 120.04, 116.47 (2C), 49.41 (2C), 44.52 (2C), 43.18, 29.32, 28.73, 22.06, 13.85.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.62 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2932, 2856, 1531, 1269, 1229, 1160. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): Calculado: 511.2435. Encontrado: 511.2415

**9-Hexil-2-(4-fenilpiperazin-1-il)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4k)**

Sólido amarillo, rendimiento 81 %, pf 99-101°C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.69 – 8.66 (m, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.17 (t,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.90 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 6.78 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.00 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H), 3.23 – 3.17 (m, 4H), 1.82 – 1.71 (m, 2H), 1.30 – 1.14 (m, 6H), 0.75 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.73, 154.72, 153.07, 150.82 (d,  $J_{\text{CF}} = 1.6$  Hz), 141.80 (2C), 135.13, 131.21 (2C), 129.27 (2C), 124.74, 124.35, 121.78 – 119.22 (d,  $J_{\text{CF}} = 258.6$  Hz), 120.57 (2C), 116.71 (2C), 49.69 (2C), 44.49 (2C), 43.27, 31.19, 29.65, 26.33, 22.49, 13.99.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.60 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 1530, 1266, 1228, 1158. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): Calculado: 525.2591. Encontrado: 525.2581

**9-Pentil-2-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)-6-4-(trifluorometoxifenil)-9H-purina (4l)**

Sólido amarillo, rendimiento 82 %, pf 147-149 °C. <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.73 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H), 4.21 – 3.83 (m, 6H), 3.32 – 3.07 (m, 4H), 1.91 – 1.68 (m, 2H), 1.42 – 1.05 (m, 4H), 0.83 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.63, 154.69, 153.03, 150.82 – 150.78 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.8 Hz), 149.98, 141.82 (2C), 135.08, 131.19 (2C), 129.05 (2C), 125.03, 124.74, 123.04 – 117.90 (d, *J*<sub>CF</sub> = 257.7 Hz), 120.54 (2C), 117.72, 49.49 (2C), 44.38 (2C), 43.25, 29.36, 28.77, 22.10, 13.88. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.61 (3F). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2931, 1521, 1256, 1224, 1166. EMAR *m/z* para (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 545.2045. Encontrado: 545.2031

**2-(4-(4-Clorofenil)piperazin-1-il)-9-hexil--6-4-(trifluorometoxifenil)-9H-purina (4m)**

Sólido blanco, rendimiento 81 %, pf 126-128 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.15 – 4.11 (m, 6H), 3.34 – 3.22 (m, 4H), 1.96 – 1.83 (m, 2H), 1.45 – 1.19 (m, 6H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.64, 154.70, 153.06, 150.82 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.7 Hz), 149.94, 141.84, 135.09, 131.21 (2C), 129.08 (2C), 125.13, 124.75, 121.78 – 119.22 (d, *J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.56 (2C), 117.78 (2C), 49.55 (2C), 44.39 (2C), 43.27, 31.18, 29.64, 26.32, 22.48, 13.99. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.60 (3F). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2931, 1529, 1270, 1224, 1159. EMAR *m/z* para (C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 559.2202. Encontrado: 559.2171

**9-Pentil-2-(4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il)-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4n)**

Sólido amarillo, rendimiento 86 %, pf 180-181 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.15 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.36 (d, *J* =

8.3 Hz, 2H), 6.87 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 4.24 – 4.03 (m, 6H), 3.69 – 3.55 (m, 4H), 2.00 – 1.85 (m, 2H), 1.45 – 1.28 (m, 4H), 0.91 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.34, 154.78, 154.64, 153.07, 150.85 – 150.83 (d,  $J_{\text{CF}} = 2.0$  Hz), 141.96, 138.49, 134.90, 131.17 (2C), 125.98 (2C), 124.85, 121.72 – 119.26 (d,  $J_{\text{CF}} = 256.5$  Hz), 120.53, 112.58 (2C), 46.83 (2C), 43.87 (2C), 43.28, 29.33, 28.74, 22.08, 13.87.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.60 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2925, 2859, 1598, 1316, 1230. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 556.2286. Encontrado: 556.2280

**9-Hexil-2-(4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il)-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H purina (4o)**

Sólido amarillo, rendimiento 90 %, pf 142-144 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.66 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.99 (d,  $J = 9.3$  Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.72 (d,  $J = 9.3$  Hz, 2H), 4.07 – 3.95 (m, 6H), 3.50 – 3.42 (m, 4H), 1.84 – 1.72 (m, 2H), 1.30 – 1.08 (m, 6H), 0.80 – 0.46 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.41, 154.81, 154.59, 153.14, 150.93 (2C), 141.94, 138.57, 134.82, 131.22 (2C), 126.02, 124.48, 120.60 (2C), 112.64 (2C), 46.88 (2C), 43.91 (2C), 43.41, 31.18, 29.63, 26.32, 22.61, 22.48, 13.98.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.60 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2931, 2855, 1597, 1531, 1329, 1266, 1231. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 570.2442. Encontrado: 570.2424

**9-Pentil-2-(4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H purina (4p)**

Sólido café, rendimiento 84 %, pf 118-120 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.83 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.99 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 4.27 – 4.05 (m, 6H), 3.78 (s, 3H), 3.35 – 3.06 (m, 4H), 2.08 – 1.77 (m, 2H), 1.46 – 1.21 (m, 4H), 0.91 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.70, 154.66, 154.09, 152.93, 150.72 – 150.70 (d,  $J_{\text{CF}} = 1.7$  Hz), 145.81, 141.68 (2C), 135.13, 131.14 (2C), 124.61, 121.72 –

119.16 (d,  $J_{CF} = 257.7$  Hz), 120.47 (2C), 118.68 (2C), 114.45 (2C), 55.48, 50.95, 44.64 (2C), 43.16, 29.30, 28.72, 22.05, 13.83.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.59 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2927, 2865, 1600, 1265. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 541.2541. Encontrado: 541.2514

**9-Hexil-2-(4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4q)**

Sólido amarillo, rendimiento 80 %, pf 144-145 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.74 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 4.00 (t,  $J = 6.9$  Hz, 6H), 3.64 (s, 3H), 3.13 – 3.04 (m, 4H), 1.82 – 1.72 (m, 2H), 1.29 – 1.07 (m, 6H), 0.75 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.15, 154.14, 152.48, 150.22 (d,  $J_{CF} = 1.4$  Hz), 141.20 (2C), 134.57, 130.62 (2C), 124.13, 121.73, 121.20-118.64 (d,  $J_{CF} = 258.6$  Hz), 121.17, 119.98 (2C), 118.34 (2C), 113.99 (2C), 50.62 (2C), 44.02 (2C), 42.68, 30.61, 29.07, 25.75, 21.90, 13.40.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.61 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2929, 1510, 1265, 1216, 1124. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 555.2697. Encontrado: 555.2668

**9-Pentil-2-(4-piridin-4-il)piperazin-1-il)-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4r)**

Sólido amarillo, rendimiento 70 %, pf 109-110°C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.66 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.99 (d,  $J = 9.3$  Hz, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.21 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.71 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 4.07 – 3.85 (m, 6H), 3.51 – 3.36 (m, 4H), 1.90 – 1.69 (m, 2H), 1.32 – 1.16 (m, 4H), 0.76 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.51, 158.71, 154.64, 152.93, 150.72, 147.94, 137.48 (2C), 135.08, 124.62, 120.47 (2C), 119.15, 113.40 (2C), 107.16 (2C), 45.11 (2C), 44.25 (2C), 43.16, 29.28, 22.03, 13.81, 13.77.  $^{19}\text{F}$  RMN (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.60 (3F). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2926, 1531, 1265, 1228, 1158. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 512.2387. Encontrado: 512.2369

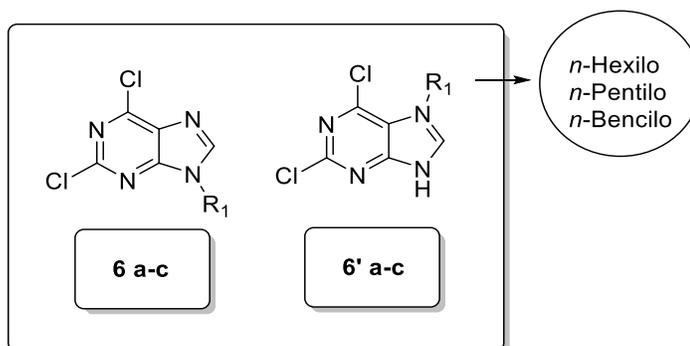
**9-Hexil-2-(4-piridin-4-il)piperazin-1-il)-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4s)**

Sólido amarillo, rendimiento 67 %, pf 153-155 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.30 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.15 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.99 (s, 4H), 3.50 (s, 4H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.28 (m, 6H), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d6) δ 158.36, 155.07, 154.93, 151.61, 150.38 (d, *J*<sub>CF</sub> = 1.2 Hz), 150.27 (2C), 150.21, 144.38, 135.57, 131.65 (2C), 124.64, 121.25 (2C), 108.87 (2C), 45.59 (2C), 44.00 (2C), 43.02, 31.02, 29.29, 26.08, 22.39, 14.29. <sup>19</sup>F RMN (188 MHz, DMSO-d6) δ -57.60 (3F). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2933, 2852, 1482, 1207. EMAR *m/z* para (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 526.2544. Encontrado: 526.2529

**8.2 Síntesis y datos espectroscópicos para los compuestos de la Serie II y Serie III**

De acuerdo con la metodología sintética representada en el Esquema 5 (capítulo V: resultados y discusión), se logró obtener:

**8.2.1 Procedimiento general para la síntesis de 2,6-dicloro-9H-alquil-purina y 2,6-dicloro-7H-alquil-7H-purina : 6a-c y 6'a-c**



Una mezcla de 2,6-dicloropurina **5** (1.0 mmol) con el respectivo haluro de alquilo R<sub>1</sub> (1.5 mmol) y carbonato de potasio (3.0 mmol) en dimetilformamida (5 mL) fue agitada por 12 h a temperatura ambiente, luego la mezcla fue filtrada y evaporada en un evaporador rotatorio al vacío. El producto de la reacción fue separado por cromatografía en columna de sílica flash usando como eluyente EtOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:3).

#### **2,6-Dicloro-9-hexil-9H-purina (6a)**

Sólido blanco, rendimiento 45 %, pf 39.4-40.1 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.06 (s, 1H), 4.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.87 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 1.29 (m, 6H), 0.85 (t, *J* = 6.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.19, 152.92, 151.75, 145.72, 130.77, 44.68, 31.08, 29.74, 26.22, 22.40, 13.80. EMAR *m/z* (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 273.0674. Encontrado: 273.0664

#### **2,6-Dicloro-9-pentil-9H-purina (6b)**

Sólido blanco, rendimiento 50 %, pf 43.3-45.1 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.06 (s, 1H), 4.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.93-1.84 (m, 2H), 1.39-1.24 (m, 4H), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.19, 152.91, 151.74, 145.73, 130.76, 44.67, 29.45, 28.64, 22.05, 13.80. EMAR *m/z* para (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 259.0517. Encontrado: 259.0510

#### **9-Bencil-2,6-dicloro-9H-purina (6c)**

Sólido blanco, rendimiento 46 %, pf 148.4-149.2 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95 (s, 1H), 7.23 (d, 3H), 7.21 – 7.15 (m, 2H), 5.26 (s, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.18, 153.13, 151.78, 145.65, 134.04, 130.65, 129.35 (2C), 129.04, 128.08 (2C), 48.04. EMAR *m/z* para (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 279.0204. Encontrado: 279.0196

**2,6-dicloro-7-hexil-7H-purina (6'a)**

Sólido blanco, rendimiento 18 %, pf 116.2-118.4 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.26 (s, 1H), 4.45 – 4.39 (m, 2H), 1.90 (dt, *J* = 14.7, 7.6 Hz, 3H), 1.30 (dt, *J* = 11.4, 8.1 Hz, 2H), 0.86 (dd, *J* = 9.4, 4.7 Hz, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.68, 150.53, 145.29, 140.23, 137.46, 47.81, 31.48, 31.10, 26.04, 22.41, 13.88. ESI/MS para (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 273.1. Encontrado: 273.3

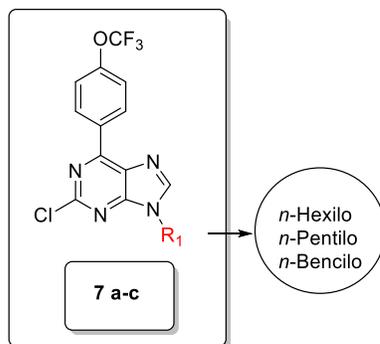
**2,6-dicloro-7-pentil-7H-purina (6'b)**

Sólido blanco, rendimiento 15 %, pf 114.7-116.0 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.21 (s, 1H), 4.47 – 4.37 (m, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 2H), 1.37 – 1.26 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.07, 150.25, 143.70, 121.58, 53.45, 47.72, 31.26, 28.44, 22.08, 13.81. ESI/MS para (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 259.0. Encontrado: 259.0

**7-bencil-2,6-dicloro-7H-purina (6'c)**

Sólido blanco, rendimiento 23 %, pf 144.4 -145.5 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.11 (s, 1H), 7.28 – 7.19 (m, 3H), 7.02 (dd, *J* = 7.3, 2.2 Hz, 2H), 5.52 (s, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.58, 153.38, 150.40, 144.00, 134.14, 129.49 (2C), 129.12, 127.11 (2C), 121.78, 50.95. ESI/MS para (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 279.0. Encontrado: 279.0

### 8.2.2 Procedimiento general para la síntesis de 2-cloro-9-alkil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)9H-purina (7a-c)



Una solución de los derivados **6a-c** (1.0 mmol), ácido (4-(trifluorometoxi)fenil)borónico (1.0 mmol), una solución de carbonato de potasio 2 M (1ml por mmol de **6a-c**), cloruro de bis(trifenilfosfina) paladio(II) (0.1 mmol), en dioxano (10 mL), fue sometida a calentamiento a reflujo por 3 horas. A continuación, la solución se enfrió a temperatura ambiente y fue extraída con acetato de etilo. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y concentrada en un evaporador rotatorio al vacío. El crudo de reacción fue purificado en columna de sílica gel utilizando diclorometano como eluyente.

#### 2-Cloro-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)9H-purina (7a)

Sólido blanco, rendimiento 85 %, pf 67-69 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.71 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.82 – 1.73 (m, 2H), 1.18 (m, 6H), 0.73 (t, *J* = 6.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.74, 154.32, 154.07, 151.60 – 151.59 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1.6 Hz), 145.14, 132.99, 131.78 (2C), 129.98, 124.25 – 119.12 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 259.6 Hz), 120.59 (2C), 44.15, 31.12, 29.74, 26.27, 22.41, 13.87. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.60 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 399.1199. Encontrado: 399.1192

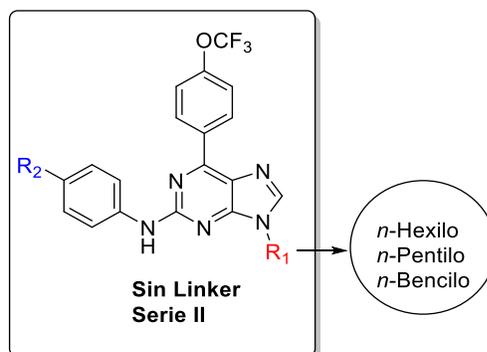
### 2-Cloro-9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)9H-purina (7b)

Sólido blanco, rendimiento 89 %, pf 35-36 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.70 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 4.11 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.80 (d,  $J = 13.6, 6.7$  Hz, 2H), 1.23 (d,  $J = 12.7$  Hz, 4H), 0.76 (t,  $J = 6.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  154.69, 154.28, 154.05, 151.59 – 151.57 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.6$  Hz), 145.13, 132.94, 131.76 (2C), 129.92, 124.24 – 116.54 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 259.6$  Hz), 120.55 (2C), 44.13, 29.44, 28.68, 22.06, 13.76.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.60 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 385.1043. Encontrado: 385.1000

### 9-bencil-2,6-dicloro-9H-purina (7c)

Sólido amarillo, rendimiento 92 %, pf 150-151 °C. 137-140 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.72 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.90 (s, 1H), 7.22 (qd,  $J = 7.5, 3.6$  Hz, 7H), 5.29 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.10, 154.45, 154.36, 151.71 – 151.70 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.7$  Hz), 144.94 (2C), 134.54, 132.91, 131.86 (2C), 129.88, 129.30 (2C), 128.88, 128.05 (2C), 124.27 – 119.13 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 259.6$  Hz), 120.65, 47.53.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.55 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 405.0730. Encontrado: 405.0721

### 8.2.3 Procedimiento general para la síntesis de purinas 2,6,9-trisustituidas Serie II: (11 a-o)



En un vial de reacción de 10 mL, se adicionó Pd(OAc)<sub>2</sub> (6 mg, 0.03 mmol, 0.1 Eqv), XantPhos (33 mg, 0.058 mmol, 0.3 Eqv) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M (0.15 mL, 0.3 mmol, 2.5 Eqv) a una solución de **7a-c** (50 mg, 0.17 mmol, 1 Eqv) y la anilina correspondiente (**10a-e**) (1.5 Eqv) en dioxano (2 mL). La mezcla de reacción se agitó por 5 minutos y se llevó a un reactor microondas a 50 W, 90 °C por 30 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró al vacío con Celita 545. Se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica fue recolectada y secada con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (diclorometano / acetona 5 %) para obtener las purinas de la Serie II.

**9-Hexil-N-(4-morfolinofenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (11a)**

Sólido amarillo, rendimiento 61 %, pf 138-140 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.43 (s, 1H, H-NH), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.83 – 3.68 (m, 4H), 3.14 – 3.03 (m, 4H), 2.27 – 2.13 (m, 2H), 1.62 (s, 6H), 1.16 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.41, 154.19, 153.83, 150.96, 147.23, 142.03, 134.61, 133.52, 131.27 (2C), 125.83, 121.76 – 119.20 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 258.8 Hz), 120.61 (2C), 120.12 (2C), 118.54 (2C), 53.15 (2C), 43.63 (2C), 31.24, 29.66, 27.37, 26.39, 22.49, 13.99. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.56 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 541.2539. Encontrado: 541.2513

**N-(4-Morfolinofenil)-9-pentil-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (11b)**

Sólido amarillo, rendimiento 63 %, pf 143-144 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.06 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.42 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.15 (s, 4H), 3.41 (s, 4H), 2.20 (m, 2H), 1.64 (m, 4H), 1.17 (b.s., 3H). <sup>13</sup>C RMN (101

MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.44, 154.21, 153.81, 150.93 – 150.92 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 1.6 Hz), 146.75, 142.02, 134.63, 133.39, 131.27 (2C), 125.82, 121.76 – 119.20 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.61 (2C), 120.20 (2C), 116.70 (2C), 67.02 (2C), 50.27 (2C), 43.60, 29.38, 28.83, 22.16, 13.91. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.56 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 527.2382. Encontrado: 527.2327

**9-Bencil-*N*-(4-morfolinofenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (11c)**

Sólido amarillo, rendimiento 63 %, pf 187-189 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.24 (m, 6H), 7.10 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.21 (s, 2H), 3.77 (s, 4H), 3.03 (s, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.66, 154.20, 154.04, 150.99 – 150.98 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 1.6 Hz), 146.83, 141.77, 135.67, 134.51, 133.21, 131.30 (2C), 129.06 (2C), 128.42 (2C) 127.86 (2C), 125.62, 124.03 – 114.69 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.61, 120.34 (2C), 116.67 (2C), 67.01 (2C), 50.24 (2C), 47.06. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.54 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 547.2069. Encontrado: 547.2040

***N*-(4-((2*S*,6*R*)-2,6-Dimetilmorfolino)fenil)-9-hexil-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (11d)**

Sólido amarillo opaco, rendimiento 58 %, pf 134-135 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.86 – 3.75 (m, 2H), 3.39 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 2.40 (t, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.97 – 1.86 (m, 2H), 1.32 (d, *J* = 10.6 Hz, 6H), 1.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.47, 154.22, 153.84, 150.95-150.94 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 1.4 Hz), 146.46, 141.99, 134.64, 133.14, 131.26 (2C), 125.81, 120.63 (2C), 120.22 (2C), 121.76 – 119.20 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 116.75 (2C), 71.74 (2C), 55.81 (2C), 43.63, 31.26, 29.67, 26.40, 22.50, 19.11 (2C), 14.00.

$^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.57 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 569.2852. Encontrado: 569.2831

***N*-(4-((2*S*,6*R*)-2,6-Dimetilmorfolino)fenil)-9-pentil-6-(4-trifluorometoxi)fenil-9*H*-purin-2-amina (11e)**

Sólido amarillo opaco, rendimiento 56 %, pf 145-146 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.77 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.61 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.34 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 6.93 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 4.14 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.82 (q, 2H), 3.39 (d,  $J = 11.6$  Hz, 2H), 2.40 (t,  $J = 10.8$  Hz, 2H), 1.92 (m, 6.8 Hz, 2H), 1.37 (m, 4H), 1.24 (d,  $J = 5.9$  Hz, 6H), 0.89 (t,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.48, 154.23, 153.82, 150.94 – 150.92 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.3$  Hz), 146.50, 142.00, 134.63, 133.14, 131.26 (2C), 125.81, 121.76-119.20 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 258.6$  Hz), 120.62 (2C), 120.23 (2C), 116.76 (2C), 71.74 (2C), 55.82 (2C), 43.60, 29.40, 28.83, 22.17, 19.11 (2C), 13.92.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.56 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 555.2695. Encontrado: 555.2670

**9-Bencil-*N*-(4-((2*S*,6*R*)-2,6-dimetilmorfolini)fenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-amina (11f)**

Sólido amarillo, rendimiento 47 %, pf 112-115 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.68 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.47 (t,  $J = 13.4$  Hz, 2H), 7.24 (b.s., 7H), 7.05 (s, 1H), 6.84 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 5.21 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.30 (d,  $J = 11.6$  Hz, 2H), 2.31 (t,  $J = 10.9$  Hz, 2H), 1.15 (d,  $J = 6.3$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.66, 154.22, 154.04, 151.00 – 150.98 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.5$  Hz), 146.50, 141.76, 135.67, 134.48, 131.30 (2C), 129.07 (2C), 128.43 (2C), 127.87 (2C), 126.98, 125.61, 121.76 – 119.20 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 258.6$  Hz), 120.62 (2C), 120.37 (2C), 116.67, 71.70 (2C), 55.82 (2C), 47.05, 19.11 (2C).  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.55 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 575.2382. Encontrado: 575.2338

**9-Hexil-N-(4-tiomorfolinofenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amine (11g)**

Sólido café, rendimiento 56 %, pf 131-133 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.07 (s, 2H), 2.95 (s, 4H), 1.88 – 1.72 (m, 2H), 1.32 – 1.06 (m, 8H), 0.73 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.63, 153.98, 153.85, 151.06 – 150.05 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1.1 Hz), 142.57, 141.57, 138.45, 134.32, 131.34, 128.54 (2C), 122.69 (2C), 121.74 – 119.18 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.64 (2C), 117.57 (2C), 43.77 (2C), 37.40, 31.19, 29.66, 26.38 (2C), 26.49, 22.45, 13.95. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>OS [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 557.2310. Encontrado: 557.2268

**9-Pentil-N-(4-tiomorfolinofenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (11h)**

Sólido café, rendimiento 48 %, pf 136-138 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.14 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.45 (s, 4H), 2.77 (s, 4H), 1.97 – 1.88 (m, 2H), 1.36 (m, 4H), 0.89 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.44, 154.21, 153.85, 150.95 – 150.93 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1.6 Hz), 147.26, 142.03, 134.61, 133.51, 131.26 (2C), 125.85, 121.75 – 119.20 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.63 (2C), 120.14 (2C), 118.55 (2C), 53.16 (2C), 43.61, 30.92, 29.40, 28.84 (2C), 22.17, 13.92. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>OS [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 543.2154. Encontrado: 543.2107

**9-Bencil-N-(4-tiomorfolinifenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (11i)**

Sólido café, rendimiento: 43 %, pf 121-123 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 9.8

Hz, 5H), 7.14 (s, 1H), 6.84 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.36 (s, 4H), 2.67 (s, 4H), 1.44 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.78, 154.67, 154.12, 149.87, 146.69, 141.50, 135.60, 134.05, 133.27, 131.31 (2C), 129.09 (2C), 128.46 (2C), 127.86 (2C), 126.39, 120.64 (2C), 120.29 (2C), 117.82, 116.16, 67.10 (2C), 47.11 (2C), 29.70.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.57 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_6\text{OS}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): Calculado: 563.1841. Encontrado: 563.1818

**9-Hexil-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amine (11j)**

Sólido amarillo, rendimiento 66 %, pf 145-148 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.04 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.60 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 4.40 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.44 (d,  $J = 3.9$  Hz, 4H), 2.87 (d,  $J = 3.6$  Hz, 4H), 2.62 (s, 3H), 2.22 – 2.12 (m, 2H), 1.67 – 1.53 (m, 6H), 1.13 (t,  $J = 6.5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.49, 154.21, 153.80, 150.92 – 150.90 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.6$  Hz), 146.77, 141.97, 134.64, 133.10, 131.26 (2C), 125.77, 121.76 – 119.20 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 258.6$  Hz), 120.60 (2C), 120.16 (2C), 117.05 (2C), 55.21 (2C), 49.97 (2C), 46.12, 43.61, 31.23, 29.66, 26.38, 22.48, 13.99.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.56 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): Calculado: 554.2855. Encontrado: 554.2830

**N-(4-(4-Metilpiperazin-1-il)fenil-9-pentil-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (11k)**

Sólido amarillo, rendimiento 62 %, pf 113-116 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.05 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 4.39 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.45 (s, 4H), 2.86 (s, 4H), 2.62 (s, 3H), 2.22 – 2.13 (m, 2H), 1.63 (d,  $J = 12.6$  Hz, 4H), 1.15 (t,  $J = 6.5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.49, 154.21, 153.72, 150.89 – 150.88 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.5$  Hz), 146.78, 141.97, 134.67, 133.09, 131.27 (2C), 125.76, 121.76 – 119.20 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 258.6$  Hz), 120.57 (2C), 120.17

(2C), 117.00 (2C), 55.22 (2C), 49.97 (2C), 46.13, 43.57, 29.36, 28.81, 22.15, 13.90.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.55 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 540.2698. Encontrado: 540.2677

**9-Bencil-N-(4-(4-metilpiperazin-1il)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (11l)**

Sólido amarillo 62 % pf, 150-152 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.67 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.48 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.24 (d,  $J = 8.6$  Hz, 6H), 7.14 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.85 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 5.22 (s, 2H), 3.11 (s, 4H), 2.54 (s, 4H), 2.28 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.68, 154.21, 154.09, 150.99 – 150.97 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.5$  Hz), 146.75, 141.73, 135.66, 134.52, 133.03, 131.29 (2C), 129.07 (2C), 128.43 (2C), 127.88 (2C), 125.62, 121.76 – 119.07 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 258.6$  Hz), 120.62 (2C), 120.33 (2C), 117.14, 55.11 (2C), 49.81 (2C), 47.09, 45.97.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.57 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 560.2385. Encontrado: 560.2369

**N-(3-Fluoro-4-morfolinofenil)-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (11m)**

Sólido amarillo, rendimiento 65 %, pf 161-162 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.77 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.86 – 7.75 (m, 2H), 7.35 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.22 – 7.14 (m, 2H), 6.92 (t,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 4.17 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.86 (d,  $J = 4.2$  Hz, 4H), 3.09 – 2.95 (m, 4H), 1.99 – 1.89 (m, 2H), 1.31 (m, 6H), 0.86 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.47 – 154.22 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 227.3$  Hz), 154.40, 153.84, 150.95 – 150.94 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 1.4$  Hz), 146.50, 141.99, 134.64, 133.14, 131.26 (2C), 125.81, 121.76 – 119.07 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 271.9$  Hz), 120.63 (2C), 120.22, 116.75 (2C), 71.74 (2C), 55.81, 43.63, 31.26, 29.67, 26.40, 22.50, 22.50, 19.11, 14.00.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.57 (3F), -121.62 (1F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 559.2444. Encontrado: 559.2420

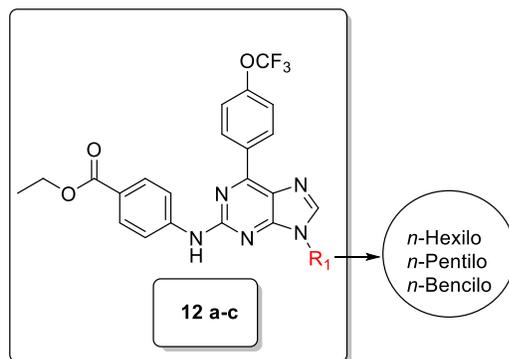
***N*-(3-Fluoro-4-morfolinofenil)-9-pentil-6-(4-trifluorometoxi)fenil)-9*H*-  
purin-2-amina (11n)**

Sólido amarillo, rendimiento 65 %, pf 171-172 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.90 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.15 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.86 (s, 4H), 3.04 (s, 4H), 1.91 (s, 2H), 1.35 (s, 4H), 0.88 (t, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.02 – 154.59 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 245.4 Hz), 155.85, 154.02, 153.91, 151.04 – 151.03 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1.1 Hz), 142.32, 135.94 – 135.83 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 11.1 Hz), 134.44 – 134.35 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 4.7 Hz), 131.29 (2C), 126.07, 121.75-119.19 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 258.6 Hz), 120.63 (2C), 119.06 – 119.02 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 4.2 Hz), 114.17 – 114.14 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2.8 Hz), 107.62 – 107.36 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 26.3 Hz), 67.12 (2C), 51.41 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2.4 Hz, 2C), 43.74, 29.42, 28.84 (2C), 22.14, 13.88. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.56 (3F), -121.66 (1F). EMAR *m/z* para (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>F<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 545.2288. Encontrado: 545.2250

***9*-Bencil-*N*-(3-fluoro-4-morfolinofenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-  
purin-2-amina (11o)**

Sólido amarillo, rendimiento 58 %, pf 171-172 °C. <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.71 (dd, *J* = 14.9, 2.4 Hz, 1H), 7.30 (s, 6H), 7.19 (s, 2H), 7.11 (dd, *J* = 8.7, 1.6 Hz, 1H), 6.87 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 3.90 – 3.77 (m, 4H), 3.10 – 2.96 (m, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.91, 154.02, 153.35, 151.15, 142.18, 135.36, 134.08, 133.40, 131.35 (2C), 129.14 (2C), 128.51 (2C), 128.87 (2C), 125.91, 121.37 – 119.09 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 230.5 Hz), 120.64 (2C), 120.17 (2C), 114.31, 107.42, 67.09 (2C), 51.41 – 51.36 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub>: 2.8 Hz), 47.32, 29.68. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F), -121.61 (1F). EMAR *m/z* para (C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>F<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 563.1819. Encontrado: 563.1827

#### 8.2.4 Procedimiento general para la síntesis etil-4-((9-alkil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)benzoato (12a-c)



En un vial de reacción de 10 mL, se adicionó Pd(OAc)<sub>2</sub> (6 mg, 0.03 mmol), XantPhos (33 mg, 0.058 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M (0.15 mL, 0.3 mmol) a una solución de **7a-c** (50 mg, 0.17 mmol) y p-aminobenzoato de etilo (6.24 mg, 0.144 mmol) en dioxano (2 mL). La mezcla de reacción se agitó por 5 minutos y se llevó a un reactor microondas a 50 W, 100 °C por 2 h. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró al vacío con Celita 545. Se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica fue recolectada y secada con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (éter de petróleo/acetato de etilo, 3:1) para obtener **12a-c**.

#### Benzoato de etil-4-((9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino) (12a)

Sólido blanco, rendimiento 73 %, pf 80-81 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.21 (dd, *J* = 49.6, 41.3 Hz, 2H), 4.21 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.05 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.21 (dt, *J* = 21.6, 7.3 Hz, 9H), 0.73 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.47, 156.51,

155.33, 153.97, 151.23, 144.36, 142.75, 134.25, 131.36 (2C), 130.87 (2C), 121.75 – 117.10 (C-OCF<sub>3</sub>), 126.50, 123.37, 120.68 (2C), 117.18 (2C), 60.63, 43.85, 31.22, 29.68, 26.40, 22.49, 14.42, 13.97. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.56 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 528.22222. Encontrado: 528.2114

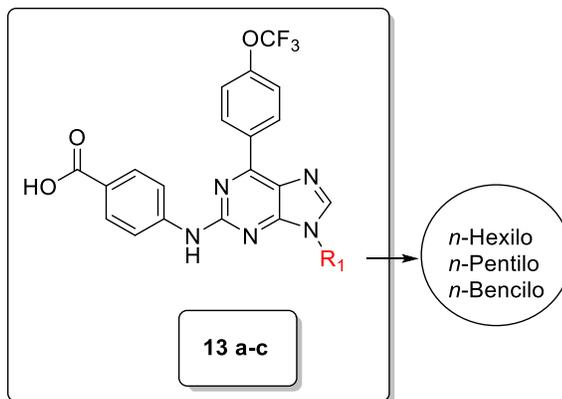
**Benzoato de etil-4-((9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino) (12b)**

Sólido blanco, rendimiento 68 %, pf 98-99 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.35 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.53 (s, 1H), 1.38 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.90 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.06, 155.06, 154.26, 153.74, 151.97, 144.36, 142.75, 134.38, 131.37 (2C), 130.88 (2C), 126.49, 123.75, 120.69 (2C), 117.18 (2C), 60.64, 43.83, 29.43, 28.84, 22.16, 14.43, 13.90. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.56 (3F) EMAR *m/z* para (C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 514.066. Encontrado: 514.2065

**Benzoato de etil-4-((9-bencil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino) (12c)**

Sólido blanco, rendimiento 66 %, pf 175-177 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.29 – 7.19 (m, 6H), 7.12 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.24 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.19, 159.90, 154.50, 153.86, 151.59, 145.20, 143.01, 135.14, 134.41, 133.41, 131.39 (2C), 130.87 (2C), 129.17 (2C), 127.81 (2C), 125.41, 120.69 (2C), 120.15 (2C), 117.26, 60.65, 47.37, 14.43. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.56 (3F) EMAR *m/z* para (C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 534.1753. Encontrado: 534.1752

### 8.2.5 Procedimiento general para la síntesis de ácido 4-((9-alkil-6-(4(trifluorometoxy)fenil)-9H-purin-2-il)amino)benzoico (13a-c)



En un balón de 100 mL se añadió de **12a-c** (250 mg, 0.6 mmol), NaOH 2 M (15 mL, 30 mmol) y 45 mL de acetona. La mezcla se agitó a reflujo por 24 h. El crudo se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó aproximadamente hasta pH: 3 con HCl 10 % v/v. El precipitado sólido se filtró al vacío y se lavó con agua. Se dejó secar en estufa por 24 horas a 70 °C para dar un producto sólido.

#### Ácido 4-((9-hexil-6-(4(trifluorometoxy)fenil)-9H-purin-2-il)amino)benzoico (13a)

Sólido blanco, rendimiento 78%, pf 250-253 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.51 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.45 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.26 (t, *J* = 13.6, 7.0 Hz, 2H), 1.30 (d, *J* = 19.5 Hz, 8H), 0.85 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 167.64, 155.68, 154.96, 151.42 – 151.40 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2.5 Hz), 154.15, 152.26, 149.50, 145.76, 145.27, 136.69, 131.81 (2C), 130.80 (2C), 126.00, 121.37 (2C), 117.12 (2C), 43.54, 31.12, 29.41, 26.19, 22.41, 14.30. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, DMSO) δ -57.56 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 500.1909. Encontrado: 500.1914

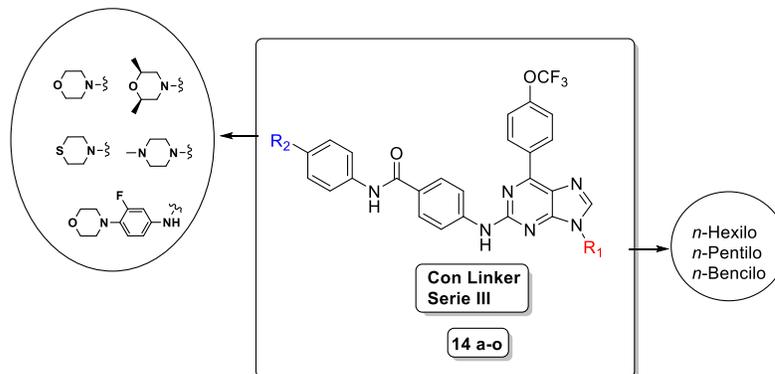
**Ácido 4-((9-pentil-6-(4(trifluorometoxy)fenil)-9H-purin-2-il)amino)benzoico (13b)**

Sólido blanco, rendimiento 88%, pf 280-282 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.49 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.45 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.00 – 1.86 (m, 2H), 1.43 – 1.29 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d6) δ 167.67, 155.69, 154.41, 152.25, 150.56, 145.74, 135.18, 131.82 (2C), 130.80 (2C), 126.13, 123.05, 121.82, 121.38 (2C), 119.26, 117.72 (2C), 43.54, 29.14, 28.72, 22.07, 14.28. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, DMSO-d6) δ -57.56 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 486.1753. Encontrado: 486.1749

**Ácido-4-((9-benzil-6-(4(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-**

**il)amino)benzoico (13c).** Sólido blanco, rendimiento 57 %, pf 252.3-254.9 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.51 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.58 (s, 1H), 7.92 (q, *J* = 8.9 Hz, 4H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.44 – 7.36 (m, 4H), 7.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d6) δ 167.85, 155.82, 154.20, 152.54, 150.06, 145.49, 145.17, 138.76, 137.11, 135.02, 131.84 (2C), 130.77 (2C), 129.21 (2C), 128.34, 128.06 (2C), 126.04, 123.36 (2C), 121.37, 117.73 (2C), 46.99. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, DMSO-d6) δ -56.51 (3F). ESI/MS para (C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 506.1. Encontrado: 506.1

## 8.2.6 Procedimiento general para la síntesis de purinas 2,6,9-trisustituidas Serie III: (14 a-o)



En un balón de 25 mL con una disolución de **13a-c** (100 mg, 0.26 mmol) y **10 a-e** (0.31 mmol) en 10 mL de DMF se adicionó HATU (300 mg, 0.8 mmol) y DIPEA (0.21 mL, 1.3 mmol). La mezcla se agitó y fue sometida a calentamiento por microondas por 30 minutos a 90 °C. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se evaporó el solvente hasta sequedad y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (diclorometano/acetato de etilo, 2:1 para obtener los productos finales de la Serie III.

### 4-((9-Hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(4-morfolinofenil)benzamida (14a)

Sólido amarillo, rendimiento 51 %, pf 76-77 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.65 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.73 (s, 2H), ), 7.69 (bs., 1H), 7.64 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.38 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.00 – 6.91 (m, 1H), 4.04 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.06 (s, 4H), 2.94 (s, 4H), 1.85 – 1.73 (m, 2H), 1.19 (d,  $J = 13.0$  Hz, 6H), 0.72 (t,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.60, 155.65, 153.98-153.93 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 5.2$  Hz), 151.07, 142.56 (2C), 141.58, 138.46, 136.27, 134.35, 131.33 (2C), 129.16, 128.55 (2C), 126.28, 122.70, 121.75-119.18 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 259.8$  Hz), 120.66 (2C), 120.45 (2C), 117.57 (2C), 116.38, 55.28, 43.78 (2C), 37.41 (2C),

31.20, 29.67, 26.38, 22.46, 13.96.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.57 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 658.2754. Encontrado: 658.3951

***N*-(4-Morfolinofenil)-4((9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)amino)benzamida (14b)**

Sólido amarillo, rendimiento 44 %, pf 154-155 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.80 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.87 (s, 2H), 7.77 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.48 – 7.42 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.23 (s, 6H), 6.91 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 4.25 – 4.16 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.10 (d,  $J = 18.4$  Hz, 4H), 2.14 (s, 2H), 1.95 (s, 2H), 1.37 (s, 4H), 0.90 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.60, 155.65, 153.98-153.93 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 5.2$  Hz), 151.07, 142.56 (2C), 141.58, 138.46, 136.27, 134.35, 131.33 (2C), 129.16, 128.55 (2C), 126.28, 122.70, 121.75 – 119.18 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 259.8$  Hz), 120.66 (2C), 120.45 (2C), 117.57 (2C), 116.38, 43.78 (2C), 37.41 (2C), 31.20, 29.67, 26.38, 22.46, 13.96.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.56. EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 646.2753. Encontrado: 646.2732

**4-((9-Bencil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)amino)-*N*-(4-morfolinofenil)benzamida (14c)**

sólido amarillo, rendimiento 34 %, Pf 245-248 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.69 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.77 (s, 2H), 7.61 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.44 – 7.31 (m, 2H), 7.31 – 7.19 (m, 8H), 7.14 (s, 1H), 6.98 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.30 (d,  $J = 25.4$  Hz, 2H), 3.10 (s, 4H), 2.97 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.28, 162.04, 158.48, 155.81, 153.99, 151.17, 142.38, 141.38, 140.98, 138.47, 136.27, 135.41, 134.10, 131.39, 130.51, 129.12 (2C), 128.53 (2C), 127.82 (2C), 127.58 (2C), 122.71, 121.17-119.17 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 202.2$  Hz), 120.66 (2C), 120.45 (2C), 117.89 (2C), 117.70 (2C), 47.32, 37.42, 29.70.  $^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -57.56 (3F). EMAR  $m/z$  para ( $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): Calculado: 666.2440

***N*-(4-((2*S*,6*R*)-2,6-Dimetilmorfolino)fenil)-4-((9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)amino)benzamida (14d)**

Sólido amarillo, rendimiento 55 %, pf 71-72 °C <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.42 – 7.30 (m, 8H), 7.23 (s, 2H), 4.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.44 (s, 2H), 1.97 – 1.90 (m, 2H), 1.55 (s, 4H), 1.40 – 1.26 (m, 6H), 1.18 (bs., 6H), 0.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.30, 155.72, 154.01 – 153.98 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 5.2 Hz), 151.08, 142.52 (2C), 141.15, 138.66, 137.66, 134.37, 131.34 (4C), 129.94, 127.62, 126.28, 123.25, 121.77-119.29 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 250.7 Hz), 120.68 (2C), 117.79 (4C), 71.22, 43.80 (2C), 31.22 (2C), 29.69 (2C), 26.40 (2C), 22.47, 13.97 (2C). <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F) EMAR *m/z* para (C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 688.3223. Encontrado: 688.3171

***N*-(4-((2*S*,6*R*)-2,6-Dimetilmorfolino)fenil)-4-((9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)amino)benzamida (14e)**

Sólido café, rendimiento 45 %, pf 115-116 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.79 – 7.64 (m, 6H), 7.43 – 7.32 (m, 2H), 7.23 (t, *J* = 9.5 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 3.96 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.72 – 3.59 (m, 2H), 3.26 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 2.24 (t, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.84 – 1.75 (m, 2H), 1.09 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.76 (t, *J* = 6.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.13, 165.09, 155.37, 153.92 – 153.82 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 9.5 Hz), 151.10, 147.99, 143.41, 142.71, 134.28, 131.34 (2C), 130.76, 128.16 (2C), 127.69, 127.58, 126.42, 121.66 (2C), 120.63 (2C), 117.58 (2C), 116.35 (2C), 71.63, 60.38 (2C), 55.26, 53.42, 29.39, 21.05 (2C), 19.06 (2C), 14.18. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F) EMAR *m/z* para (C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 674.3066. Encontrado: 674.3047

**4-((9-bencil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(4-((2S,6R)-2,6-dimetilmorfolino)fenil)benzamida (14f)**

Sólido amarillo, rendimiento 45 %, pf 231-236 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.03 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.56 (s, 1H), 8.03 – 7.94 (m, 4H), 7.63 (t, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.41 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 7.32 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.49 (s, 2H), 3.75 – 3.65 (m, 2H), 3.53 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.22 (t, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.16 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.01, 155.98, 154.25, 152.58, 150.60 – 150.58 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1.6 Hz), 147.44, 145.00, 144.29, 137.13, 135.12, 131.91, 131.81 (2C), 129.25 (C), 128.82 (2C), 128.37, 128.07 (2C), 127.42, 125.92, 121.98 (2C), 121.82-119.26 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 258.8 Hz), 121.34 (2C), 117.71 (2C), 115.75 (2C), 71.45 (2C), 54.80(2C), 46.94, 19.33 (2C). <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -56.52 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 694.2753

**4-((9-Hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(4-tiomorfolinofenil)benzamida (14g)**

Sólido café, rendimiento 38 %, pf 74-76 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.76 (dd, *J* = 8.4, 3.4 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 4H), 7.23 (s, 1H), 7.07 (dd, *J* = 7.6, 5.2 Hz, 1H), 4.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.20 (s, 4H), 3.07 (s, 2H), 1.99 – 1.86 (m, 2H), 1.31 (dd, *J* = 13.8, 8.5 Hz, 6H), 0.85 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.59, 158.50, 155.72, 153.99-153.96 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3.4 Hz), 151.07, 142.56, 138.47, 136.28, 134.37, 131.33 (2C), 129.20, 128.56 (2C), 127.61, 126.30, 121.73-119.24 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 251.7 Hz), 122.71 (2C), 121.73, 120.67 (2C), 120.45, 117.78 (2C), 52.60, 43.80, 37.43 (2C), 31.21, 29.69, 26.39 (2C), 22.47, 13.96. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F) EMAR *m/z* para (C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 674.2525. Encontrado: 674.2533

**4-((9-pentil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(4-tiomorfolinofenil)benzamida (14h)**

Sólido amarillo, rendimiento 46 %, pf 132-136 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.02 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.43 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.63 (dd, *J* = 8.4, 5.3 Hz, 4H), 6.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 4.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.15 – 3.06 (m, 4H), 2.48 – 2.39 (m, 4H), 2.01 – 1.87 (m, 2H), 1.33 (tt, *J* = 7.8, 4.7 Hz, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d6) δ 164.98, 155.85, 154.43, 152.26, 150.54-150.52 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1.5 Hz), 147.77, 145.11, 144.44, 135.24, 131.83, 131.77 (2C), 128.84 (2C), 127.37, 126.02, 121.89 (2C), 121.82-119.6 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 258.8 Hz), 121.32 (2C), 117.63 (2C), 115.95 (2C), 55.13 (2C), 49.03 (2C), 43.52, 29.13, 28.75, 22.09, 14.28. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, DMSO-d6) δ -56.54 (3F) EMAR *m/z* para (C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 662.7498

**4-((9-bencil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(4-thiomorfolinofenil)benzamida (14i)**

Sólido amarillo, rendimiento 36 %, pf 221-223 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.14 (s, 1H), 7.90 – 7.76 (m, 4H), 7.67 (d, *J* = 14.9 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 10.8 Hz, 5H), 7.20 – 7.12 (m, 2H), 6.92 – 6.81 (m, 2H), 5.35 (s, 2H), 3.44 (s, 4H), 2.70 (s, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.28, 162.04, 158.48, 155.81, 153.99, 151.17, 142.38, 141.38, 140.98, 138.47, 136.27, 135.41, 134.10, 131.39, 130.51, 129.12 (2C), 128.53 (2C), 127.82 (2C), 127.58 (2C), 122.71, 121.17-119.17 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 202 Hz), 120.66 (2C), 120.45 (2C), 117.89 (2C), 117.70 (2C), 47.32, 37.42, 29.70. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.56 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 682.2212

**4-((9-Hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)benzamida (14j)**

Sólido amarillo, rendimiento 50%, pf 83-86 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (dt, *J* = 16.6, 8.2 Hz, 4H), 7.23 (s, 2H), 7.08 (dd, *J* = 7.4, 5.3 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.20 (s, 2H), 3.07 (s, 4H), 1.92 (dd, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 2H), 1.57 (s, 3H), 1.44 – 1.24 (m, 6H), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.59, 161.20, 155.66, 153.98, 151.08, 142.56, 138.48, 137.64, 134.36, 131.34 (2C), 129.22, 128.57 (2C), 127.62, 126.31, 122.72, 120.66 (2C), 120.45 (2C), 117.78 (2C), 117.58 (2C), 53.14, 43.80 (2C), 37.43, 31.21, 29.69, 26.39, 22.47, 13.97. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 673.3226. Encontrado: 673.3866

**4-((9-bencil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)benzamida (14l)**

Sólido amarillo, rendimiento 43%, pf 295-298 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.04 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.97 – 8.92 (m, 2H), 8.57 (s, 1H), 7.97 (q, *J* = 9.1 Hz, 4H), 7.63 (dd, *J* = 8.7, 3.8 Hz, 4H), 7.46 – 7.37 (m, 4H), 7.36 – 7.32 (m, 1H), 6.93 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 5.50 (s, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 4H), 2.49 – 2.43 (m, 4H), 2.23 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.99, 155.99, 154.27, 152.58, 150.60-150.58 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1.6 Hz), 147.79, 145.04, 144.27, 137.14, 135.13, 131.81 (2C), 129.26 (2C), 128.83, 128.37, 128.07 (2C), 127.45, 125.92, 121.91 (2C), 121.61 – 119.26 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 237.6 Hz), 121.38 (2C), 120.79, 117.70, 115.96 (2C), 114.24, 66.82, 55.13 (2C), 49.02 (2C), 46.25. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -56.51 (3F). EMAR *m/z* para (C<sub>37</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 679.2754

***N*-(3-Fluoro-4-morfolinofenil)-4-(9-hexil-6-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)amino)benzamida (14m)**

Sólido amarillo, rendimiento 67 %, pf 103-105 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.86 (s, 2H), 7.76 (dd, *J* = 8.3, 3.5 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 19.4, 11.2 Hz, 4H), 7.23 (s, 2H), 4.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.93 – 3.79 (m, 1H), 3.44 (s, 2H), 3.07 (s, 2H), 2.02 – 1.84 (m, 2H), 1.58 (s, 2H), 1.47 – 1.26 (m, 6H), 0.85 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.31, 166.69, 156.65, 153.97, 151.10, 142.52, 141.16, 138.49, 137.63, 134.37, 131.24 (2C), 130.40, 128.56, 128.24, 127.27 (2C), 126.27 (2C), 120.68 (2C), 117.78 (2C), 117.58 (2C), 51.11 (2C), 43.80 (2C), 31.20, 29.69, 26.40, 22.47, 13.96. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F), -120.97 (1F). EMAR *m/z* para (C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>F<sub>4</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 678.2816. Encontrado: 678.2790

***N*-(3-Fluoro-4-morfolinofenil)-4-((9-pentil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)amino)benzamida (14n)**

Sólido amarillo, rendimiento 41 %, pf 101-105 °C <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.52 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.98 (s, 2H), 7.42 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 14.8 Hz, 3H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.93 – 6.78 (m, 2H), 4.09 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.83 (s, 4H), 3.02 (s, 4H), 2.01 (s, 2H), 1.60 (s, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 206.99, 162.55, 162.42, 162.06-162.01 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 4.9 Hz), 158.66, 155.89, 153.45, 151.09, 143.65, 131.27 (2C), 128.16 (2C), 128.07, 120.72 (2C), 119.67 – 119.63 (d, *J*<sub>CF</sub> = 4.1 Hz), 118.85-118.81 (d, *J*<sub>CF</sub> = 4.0 Hz), 115.7-115.67 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3.2 Hz), 117.38 (2C), 109.27, 109.01, 108.85, 108.30, 66.97 (2C), 51.01, 36.48 (2C), 30.92 (2C), 21.05, 14.19. <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.57 (3F), -120.64 (1F). EMAR *m/z* para (C<sub>34</sub>H<sub>33</sub>F<sub>4</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 664.2659. Encontrado: 648.2787

**4-((9-Bencil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)amino)-N-(3-fluoro-4-morfolinofenil)benzamida (14o)**

Sólido amarillo opaco, rendimiento 46 %. pf 210-215 °C <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.77 (s, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 15.0, 6.6 Hz, 8H), 6.98 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 6.68 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.29 (t, *J* = 11.4 Hz, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.72 (s, 4H), 2.84 (s, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.30, 158.49, 157.99, 155.86, 1543.96, 151.13, 142.95-142.84 (d, *J*<sub>CF</sub> = 10.4 Hz), 142.33, 138.46, 136.27, 135.44, 134.21, 131.36 (2C), 130.43, 129.11 (2C), 128.52 (2C), 127.81 (2C), 127.57 (2C), 126.09, 122.70 (2C), 120.65, 120.45, 120.33 – 120.28 (d, *J*<sub>CF</sub> = 4.3 Hz), 117.86, 117.64, 110.65 – 110.63 (d, *J*<sub>CF</sub> = 2.9 Hz), 104.02 – 103.79 (d, *J*<sub>CF</sub> = 2.2 Hz), 67.14, 51.79 – 51.76 (d, *J*<sub>CF</sub> = 2.2 Hz, 2C), 37.41 (2C). <sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -57.55 (3F), -122.85 (1F). EMAR *m/z* para (C<sub>36</sub>H<sub>29</sub>F<sub>4</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 684.2346. Encontrado: 684.4182

**8.2.7 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 9a-o**

**4-(4-nitrofenil)morfolina (9a)**

Sólido amarillo, rendimiento 94 %, pf 147.7-149.5 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.13 – 8.11 (m, 1H), 8.11 – 8.09 (m, 1H), 6.82 – 6.81 (m, 1H), 6.80 – 6.78 (m, 1H), 3.84 – 3.82 (m, 4H), 3.35 – 3.33 (m, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.01, 139.07, 125.89 (2C), 112.66 (2C), 66.37 (2C), 47.17 (2C). ESI/MS para (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 209.1. Encontrado: 209.0

**(2S,6R)-2,6-dimetil-4-(4-nitrofenil)morpholina (9b)**

Sólido amarillo, rendimiento 99 %, pf 133.2-134.5 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.13 – 8.11 (m, 1H), 8.11 – 8.09 (m, 1H), 6.85 – 6.84 (m, 1H), 6.83 – 6.81 (m, 1H), 3.76 (m, *J* = 12.5, 6.2, 2.5 Hz, 2H), 3.63 (dd, *J* = 12.9, 2.1 Hz, 2H), 2.60 (dd, *J* = 12.5, 10.7 Hz, 2H), 1.26 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101

MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.35, 139.03, 125.95 (2C), 112.91 (2C), 71.22 (2C), 52.62 (2C), 18.93(2C). ESI/MS para (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 237.1. Encontrado: 236.9

#### **4-(4-nitrofenil)tiomorfolina (9c)**

Sólido amarillo, rendimiento 99 %, pf 115-117 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.12 – 8.07 (m, 2H), 6.77 – 6.72 (m, 2H), 3.86 – 3.78 (m, 4H), 2.69 (dd, *J* = 5.0, 2.5 Hz, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 126.27 (2C), 112.87 (2C), 50.31 (2C), 25.86 (2C). ESI/MS para (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>-</sup>): Calculado: 223.1. Encontrado: 223.8

#### **1-metil-4-(4-nitrofenil)piperazina (9d)**

Sólido naranja, rendimiento 98 %, pf 105-107 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.09 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 3.48 – 3.37 (m, 4H), 2.58 – 2.50 (m, 4H), 2.35 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.91, 138.55, 126.03 (2C), 112.79, 77.16, 54.59, 47.02 (2C), 46.10 (2C). ESI/MS para (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 222.1. Encontrado: 221.4

### **8.2.8 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 10a-o**

#### **4-morfolinoanilina (10a)**

Sólido naranja, rendimiento 99 %, pf 123.5-125.4 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.76 – 6.74 (m, 1H), 6.74 – 6.72 (m, 1H), 6.58 – 6.56 (m, 1H), 6.56 – 6.54 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.77 – 3.73 (m, 4H), 2.93 (dd, *J* = 5.5, 4.0 Hz, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 142.84, 142.78, 118.06 (2C), 115.23 (2C), 66.80 (2C), 51.11 (2C). ESI/MS para (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 179.2. Encontrado: 179.0

#### **4-((2S,6R)-2,6-dimetilmorfolino)anilina (10b)**

Sólido café, rendimiento 96 %, pf 132-136 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.78 (dd, *J* = 8.8, 6.7 Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.23 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 10.8 Hz, 2H), 1.20 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.17, 140.17, 118.32 (2C), 116.27 (2C), 71.79 (2C), 56.79 (2C), 19.09 (2C). ESI/MS para (C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 207.1. Encontrado: 207.1

#### **4-tiomorfolinoanilina (10c)**

Sólido café, rendimiento 98 %, pf 103.6-104.8 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6.77 – 6.75 (m, 1H), 6.74 – 6.72 (m, 1H), 6.57 – 6.55 (m, 1H), 6.55 – 6.53 (m, 1H), 3.45 (s, 2H), 3.23 – 3.19 (m, 4H), 2.76 – 2.72 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 145.32, 140.81, 120.37 (2C), 116.14 (2C), 54.12 (2C), 27.85 (2C). ESI/MS para (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 195.1. Encontrado: 195.2

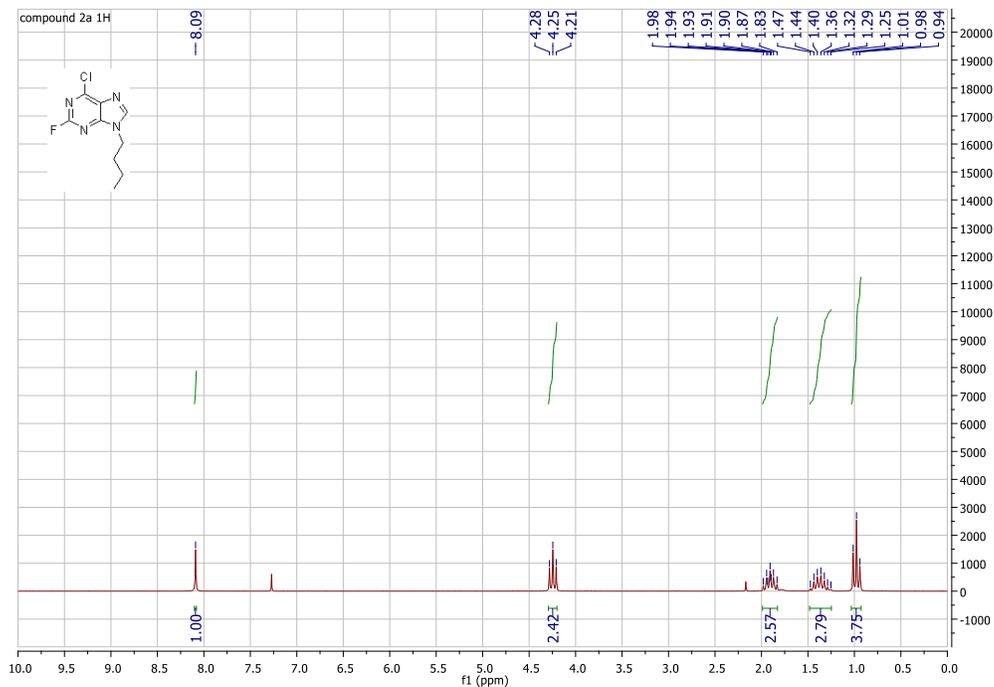
#### **4-(4-metilpiperazin-1-il)anilina (10d)**

Sólido negro, rendimiento 99 %, pf 128-130 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.85 – 6.74 (m, 1H), 6.67 – 6.55 (m, 1H), 3.30 (s, 2H), 3.13 – 2.98 (m, 4H), 2.62 – 2.43 (m, 4H), 2.31 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.55, 140.23, 118.67 (2C), 116.29 (2C), 55.39 (2C), 50.89 (2C), 46.17. ESI/MS para (C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>): Calculado: 192.2. Encontrado: 191.9

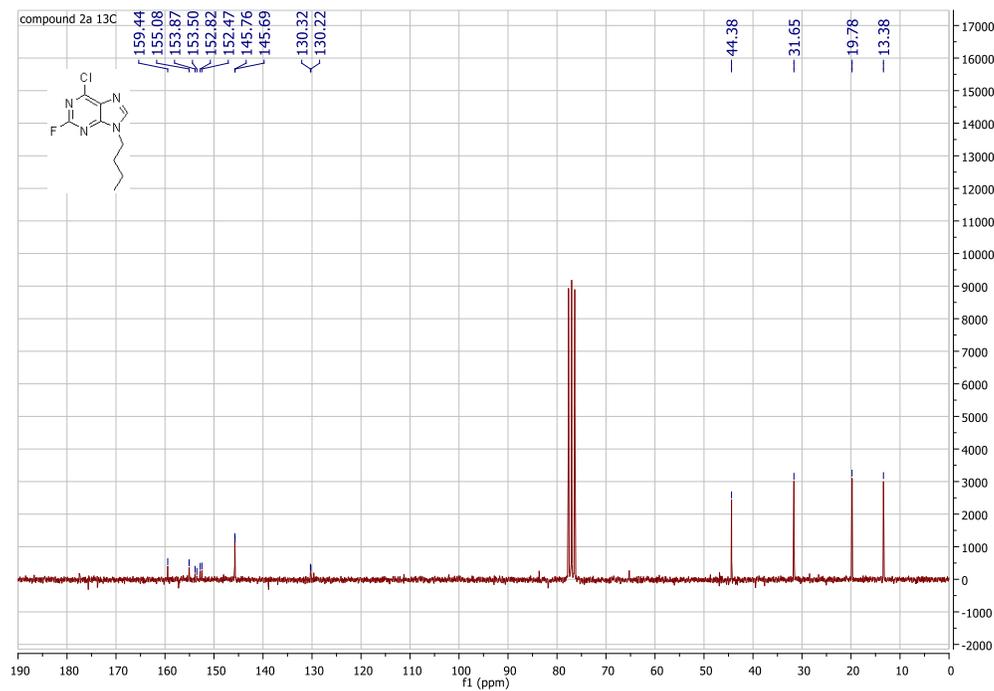
### 8.3 Espectros de RMN para las moléculas sintetizadas

#### 8.3.1 Intermediarios de reacción correspondientes a la serie I

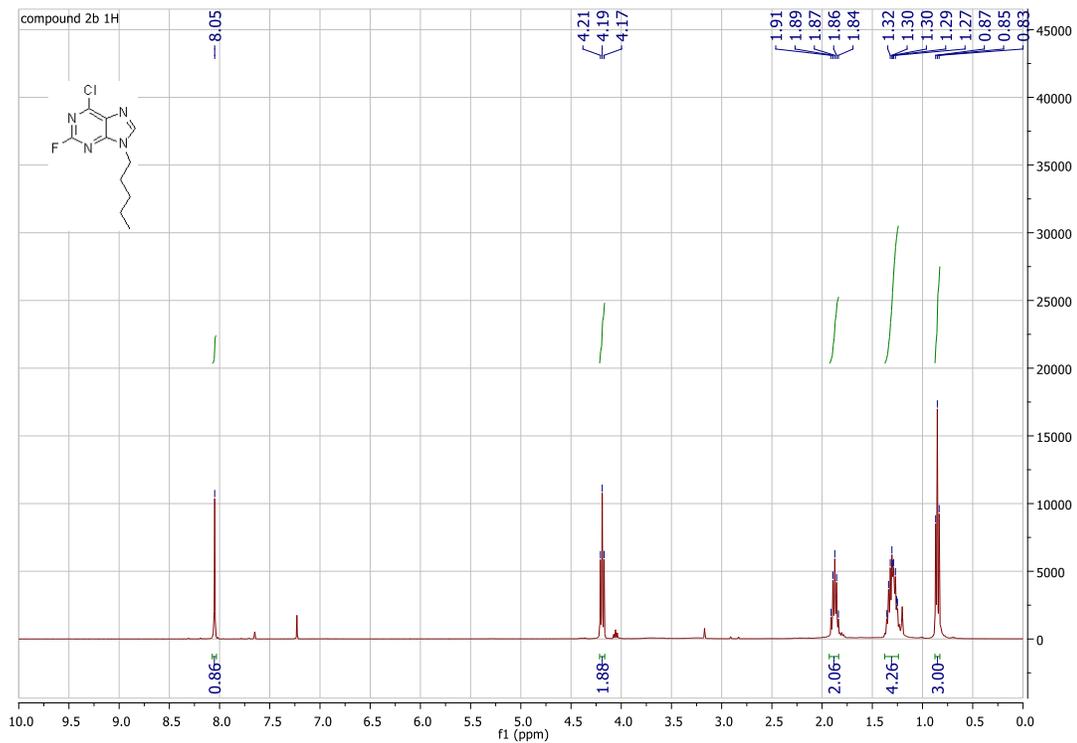
##### RMN $^1\text{H}$ 2a



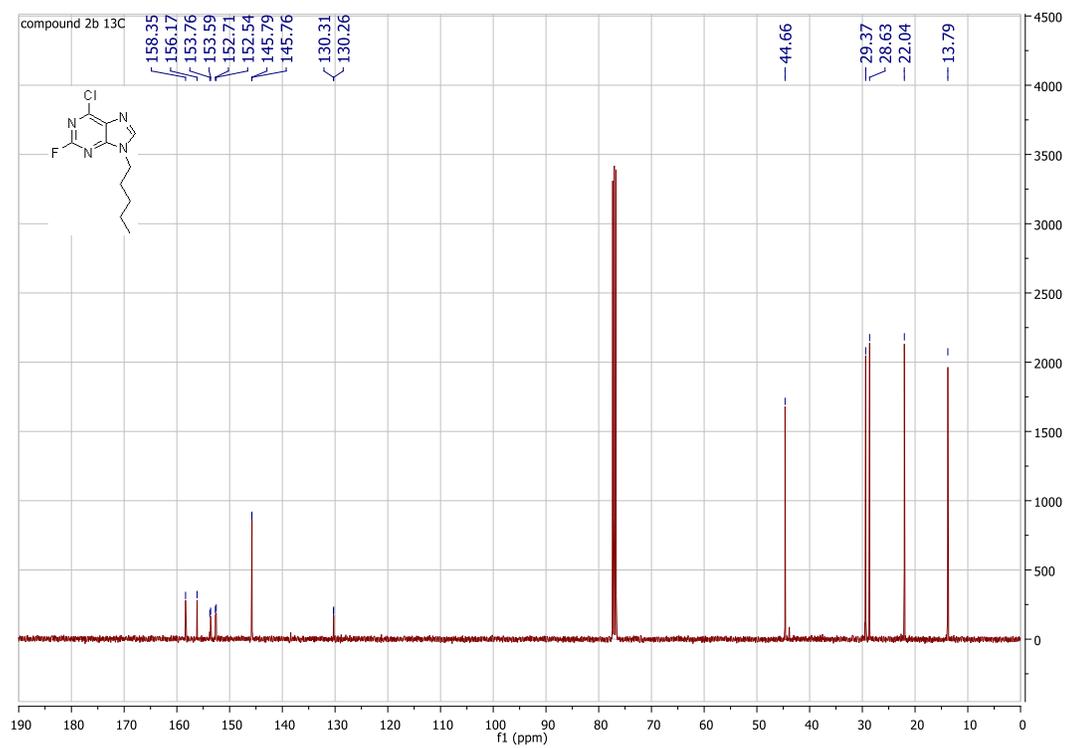
##### RMN $^{13}\text{C}$ 2a



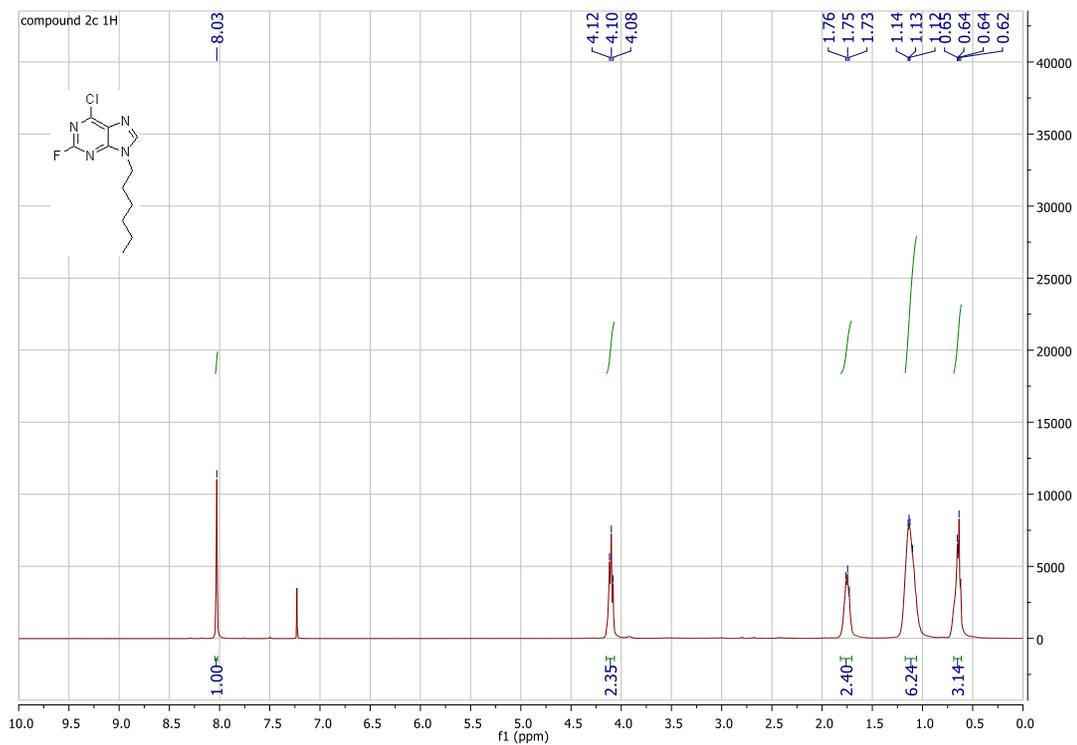
## RMN <sup>1</sup>H 2b



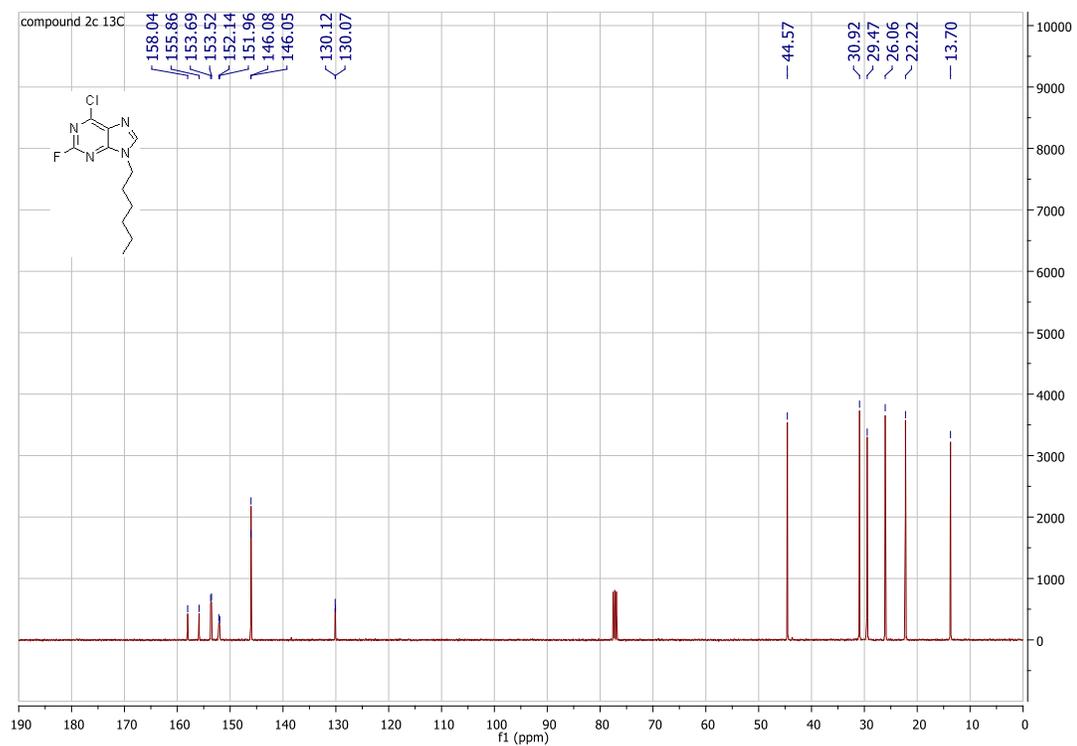
## RMN <sup>13</sup>C 2b



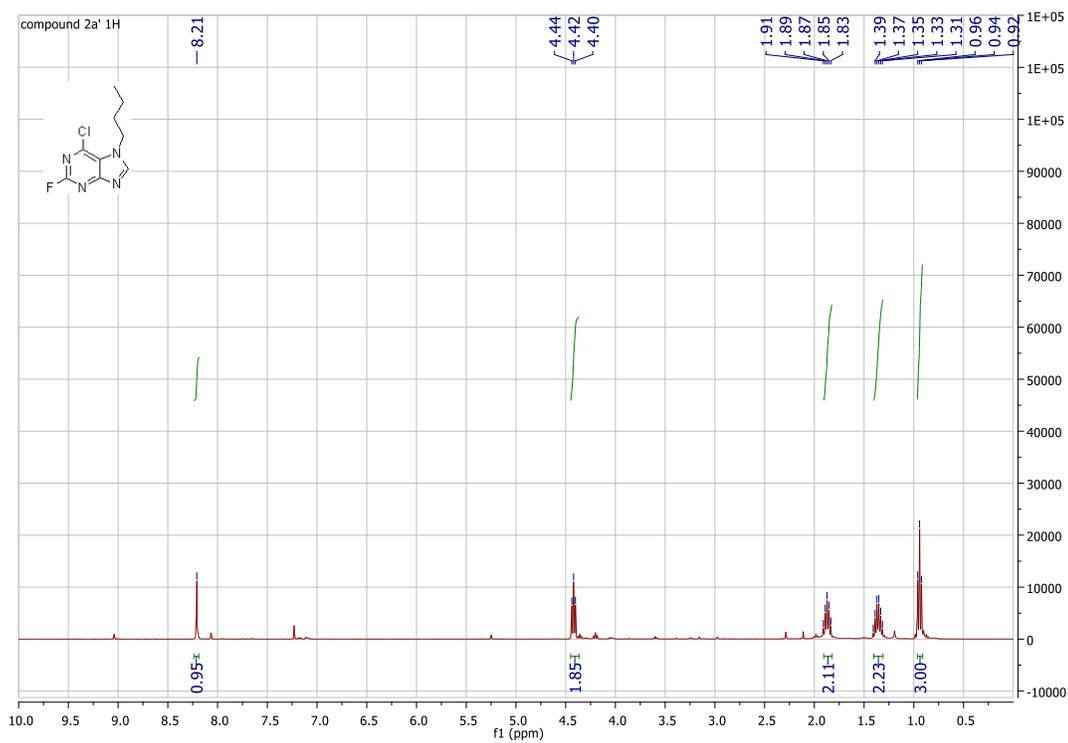
## RMN <sup>1</sup>H 2c



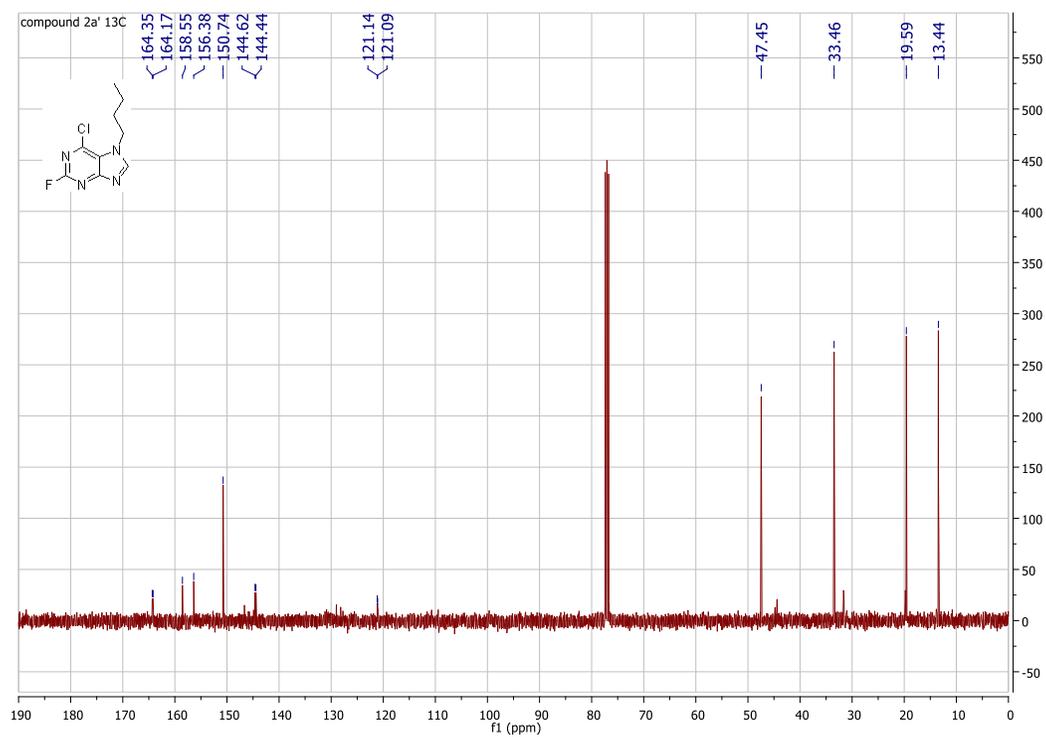
## RMN <sup>13</sup>C 2c



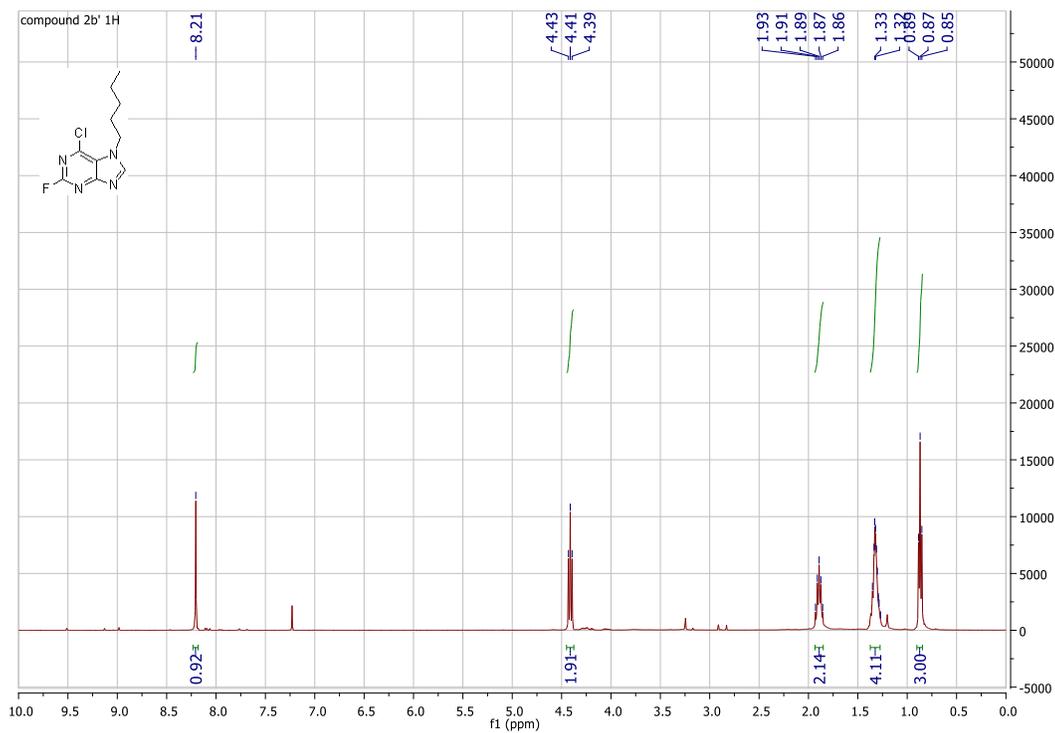
## RMN <sup>1</sup>H 2'a



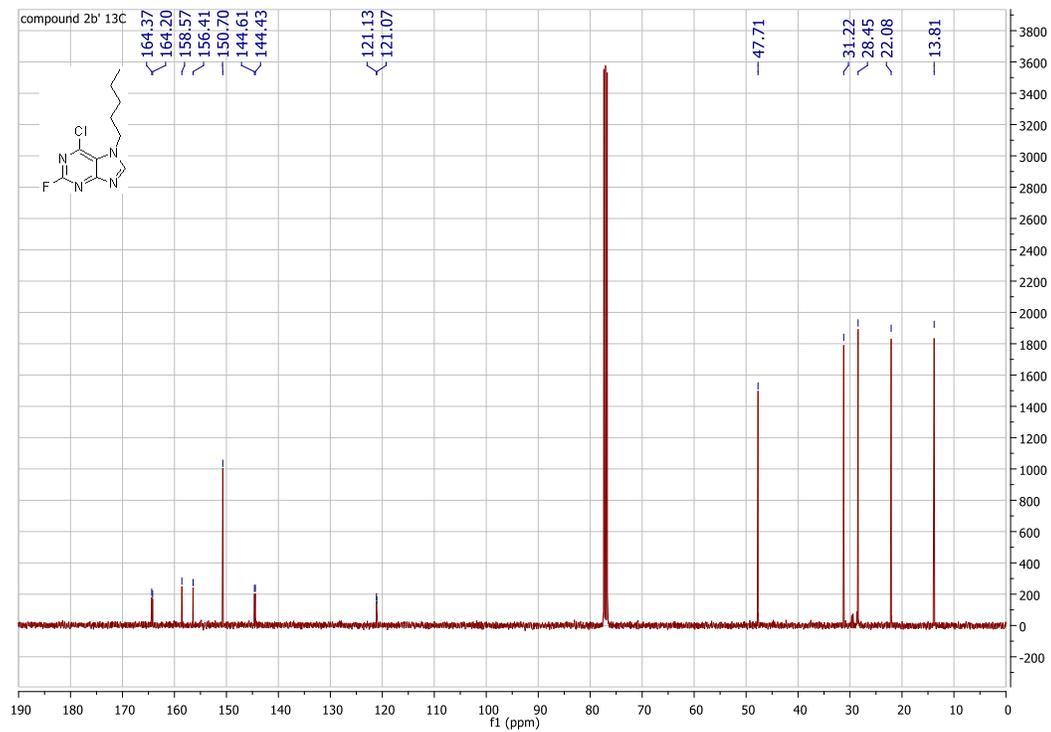
## RMN <sup>13</sup>C 2'a



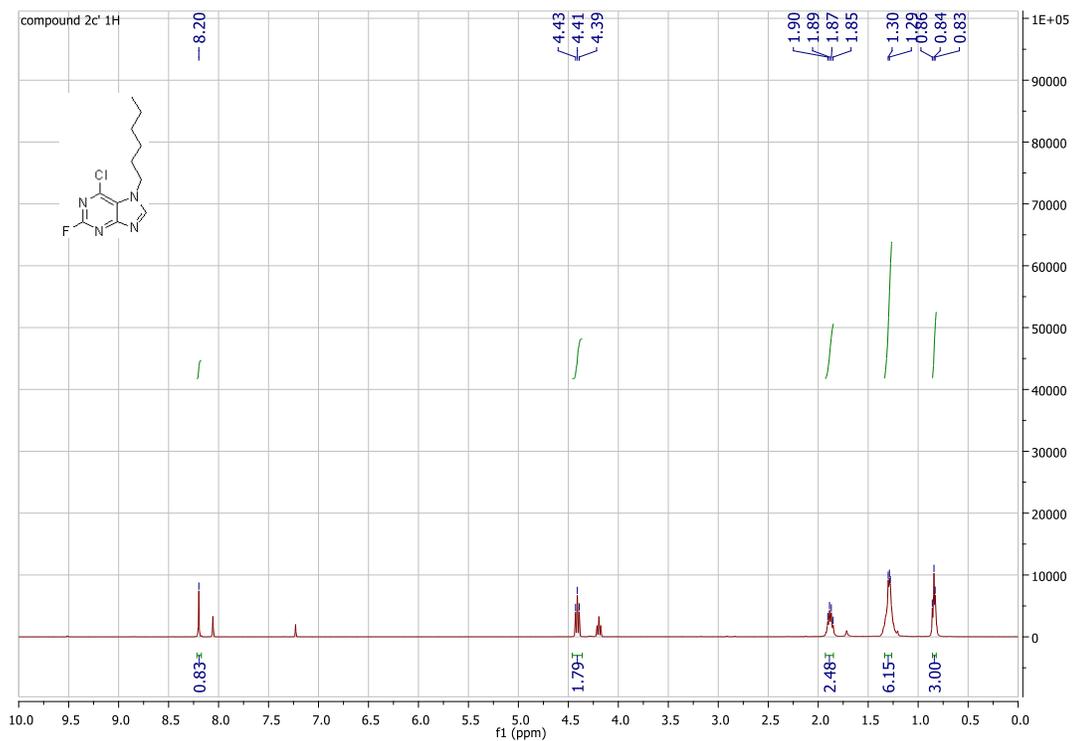
## RMN <sup>1</sup>H 2'b



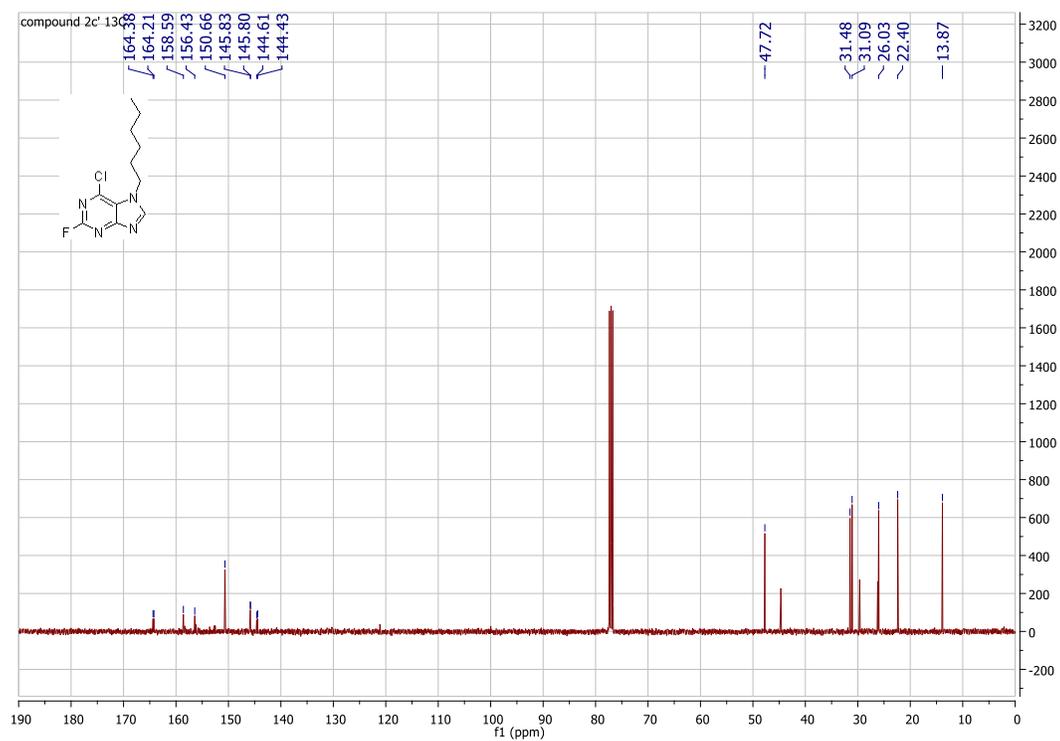
## RMN <sup>13</sup>C 2'b



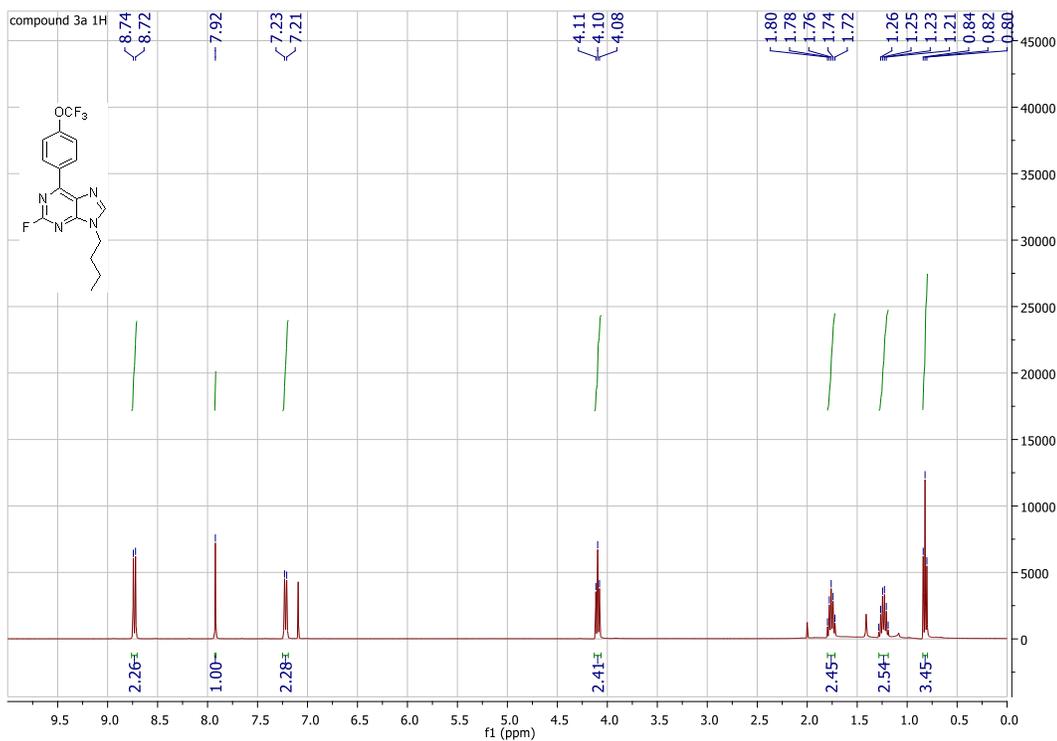
## RMN <sup>1</sup>H 2'c



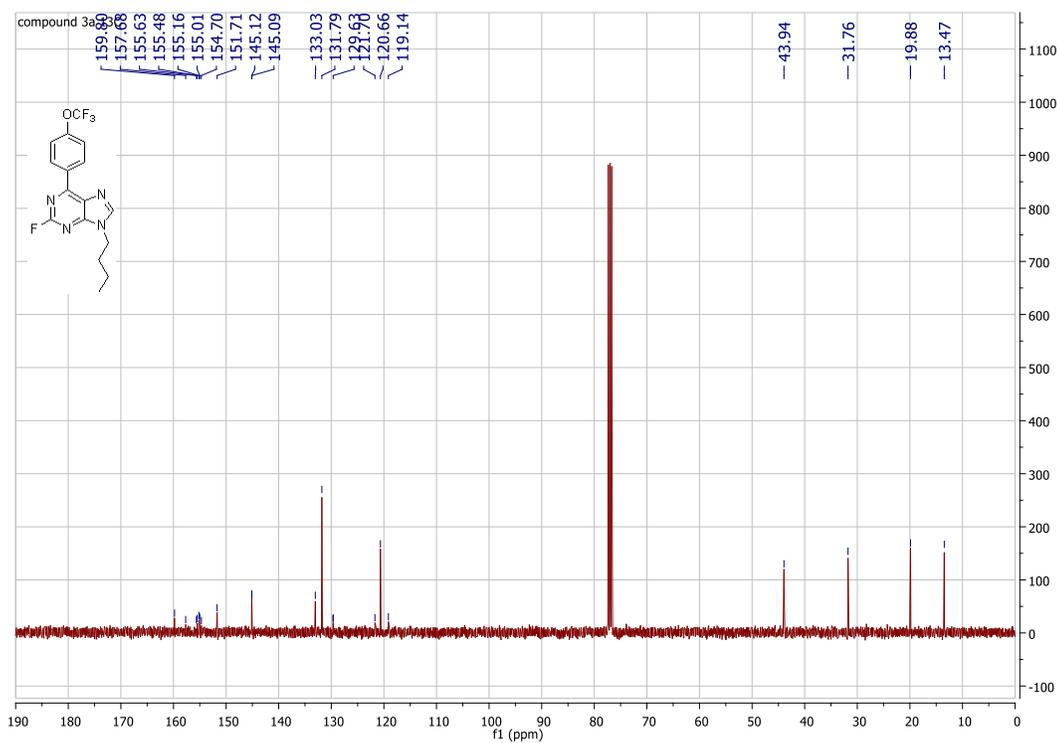
## RMN <sup>13</sup>C 2'c



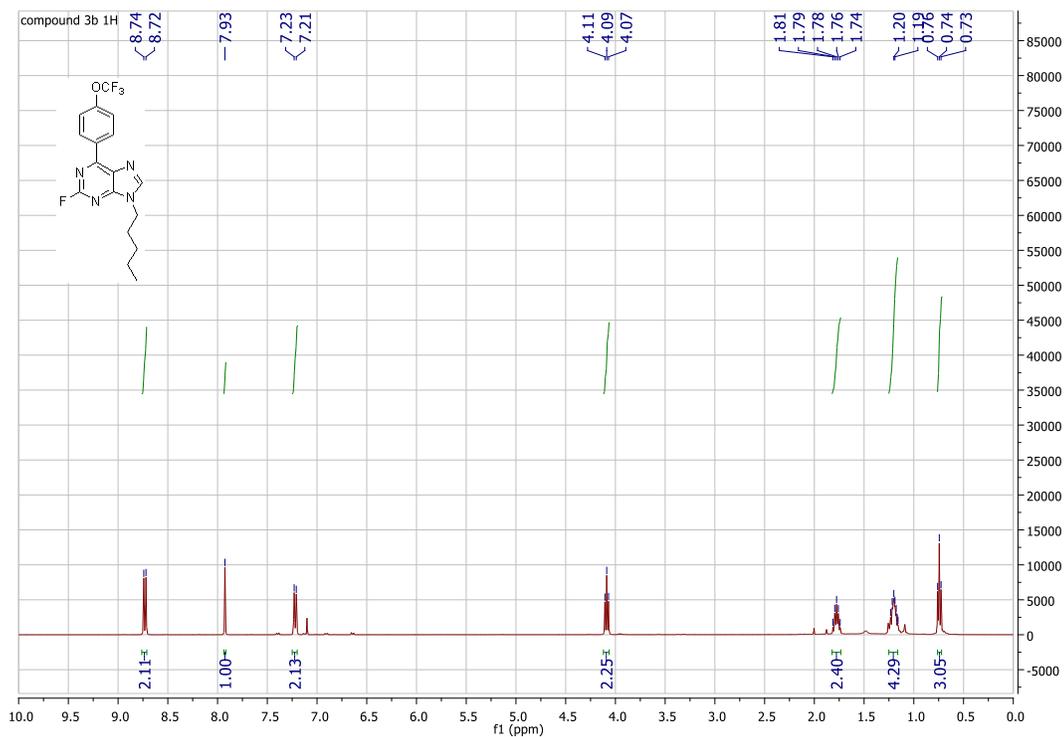
# RMN <sup>1</sup>H 3a



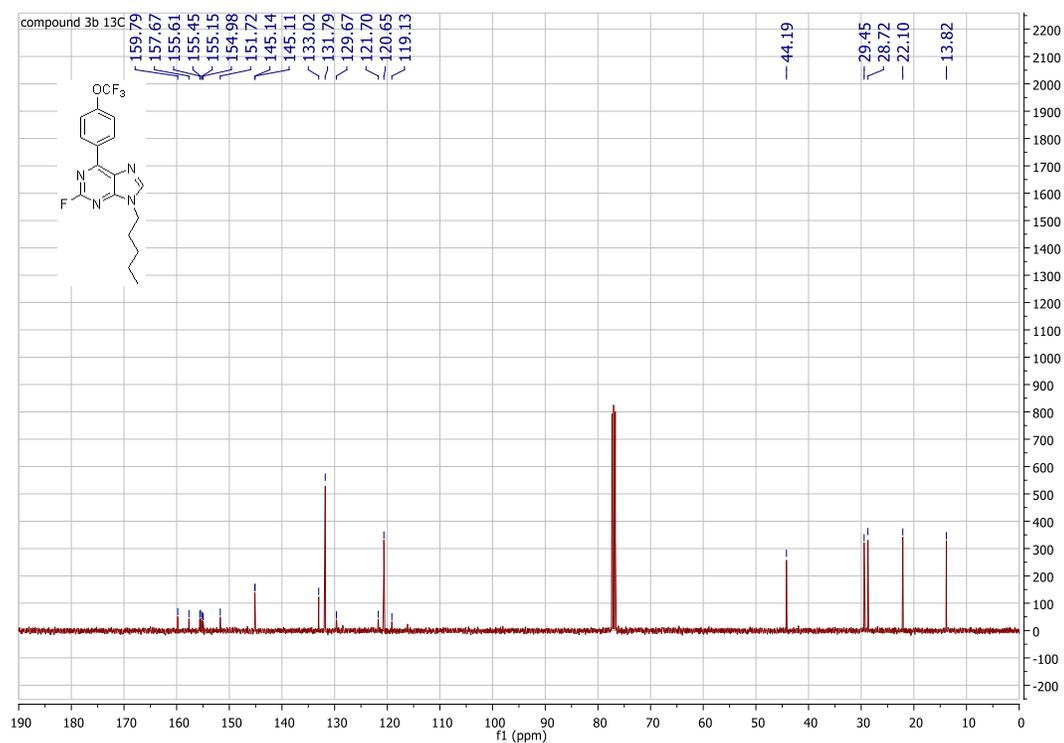
# RMN <sup>13</sup>C 3a



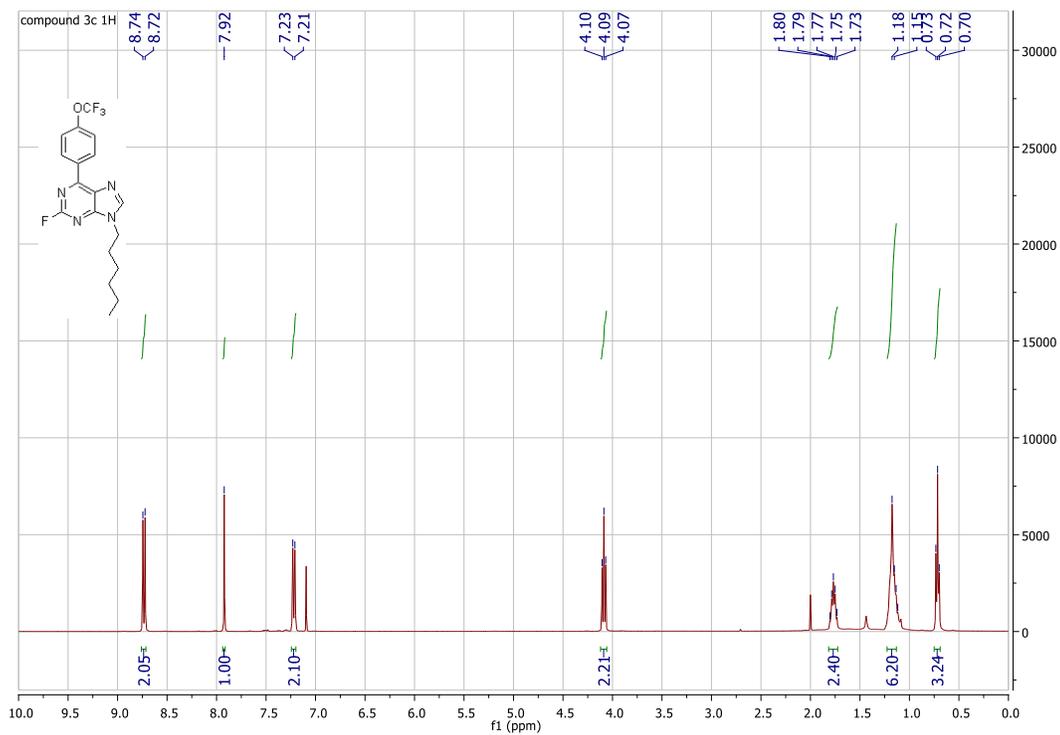
# RMN <sup>1</sup>H 3b



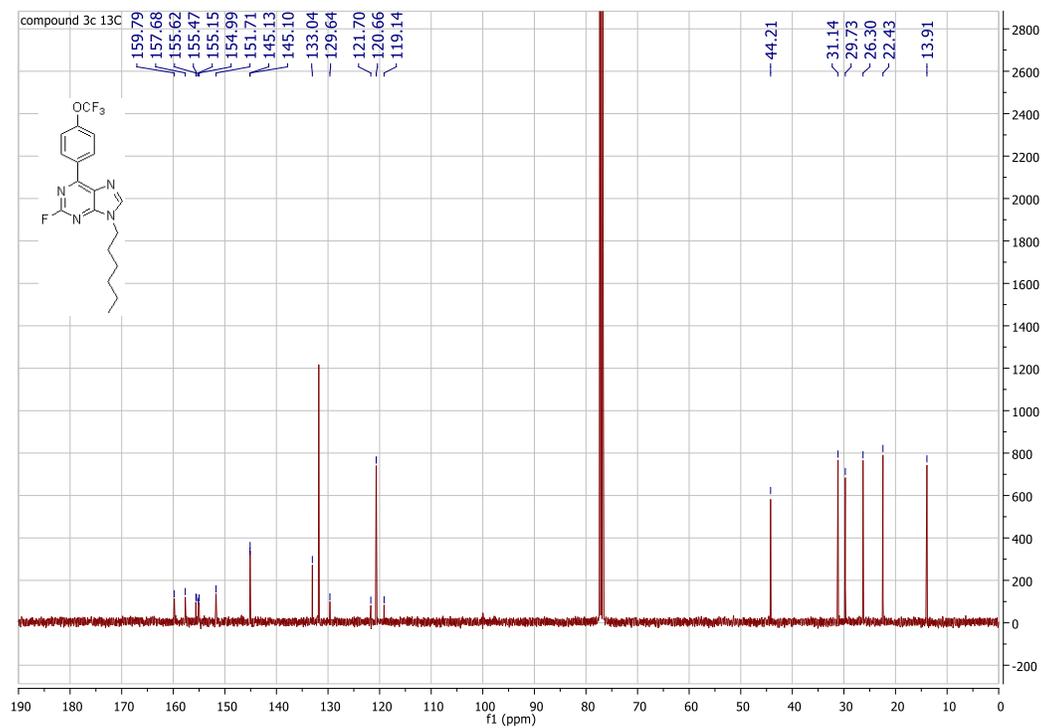
# RMN <sup>13</sup>C 3b



## RMN <sup>1</sup>H 3c

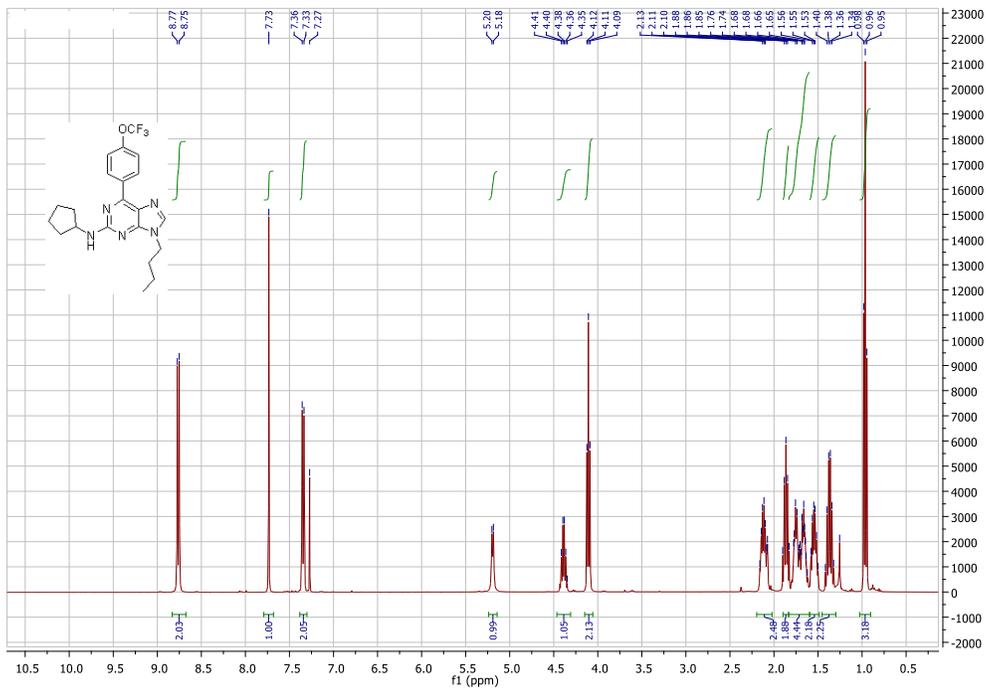


## RMN <sup>13</sup>C 3c

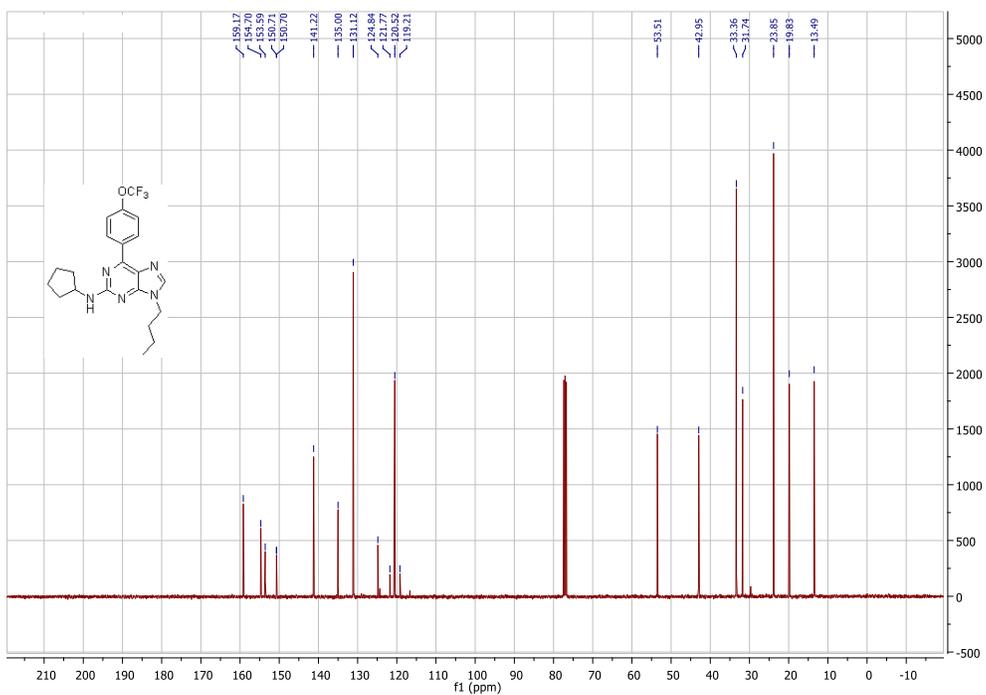


### 8.3. 2 productos finales serie I: 4a-s

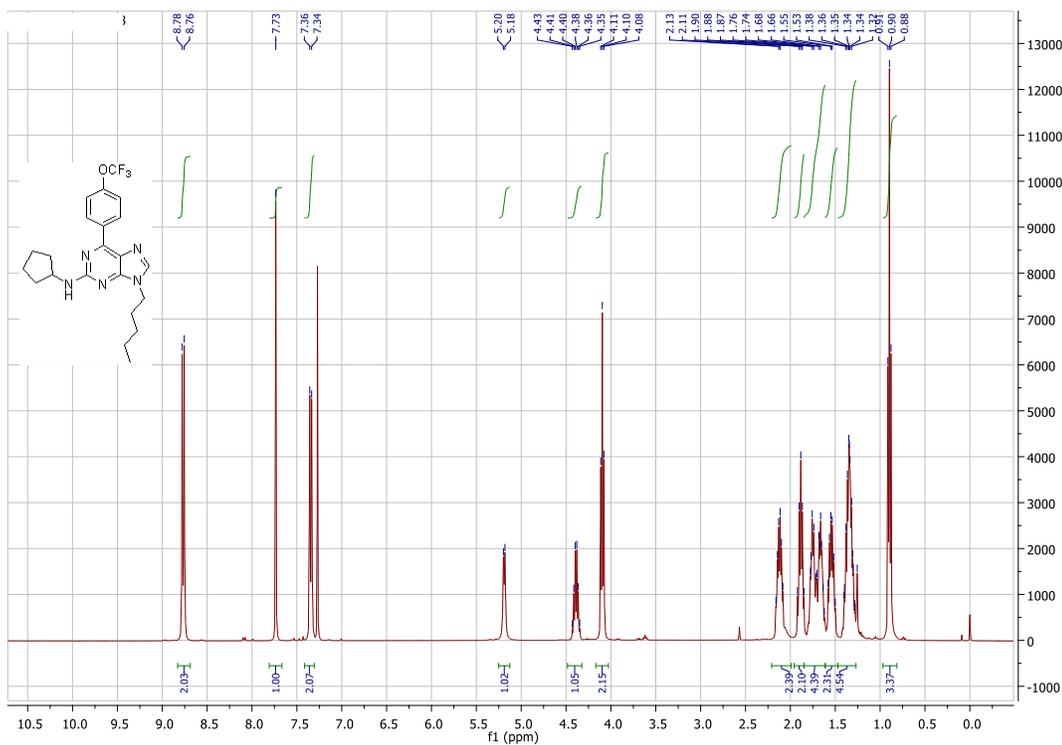
#### RMN <sup>1</sup>H 4a



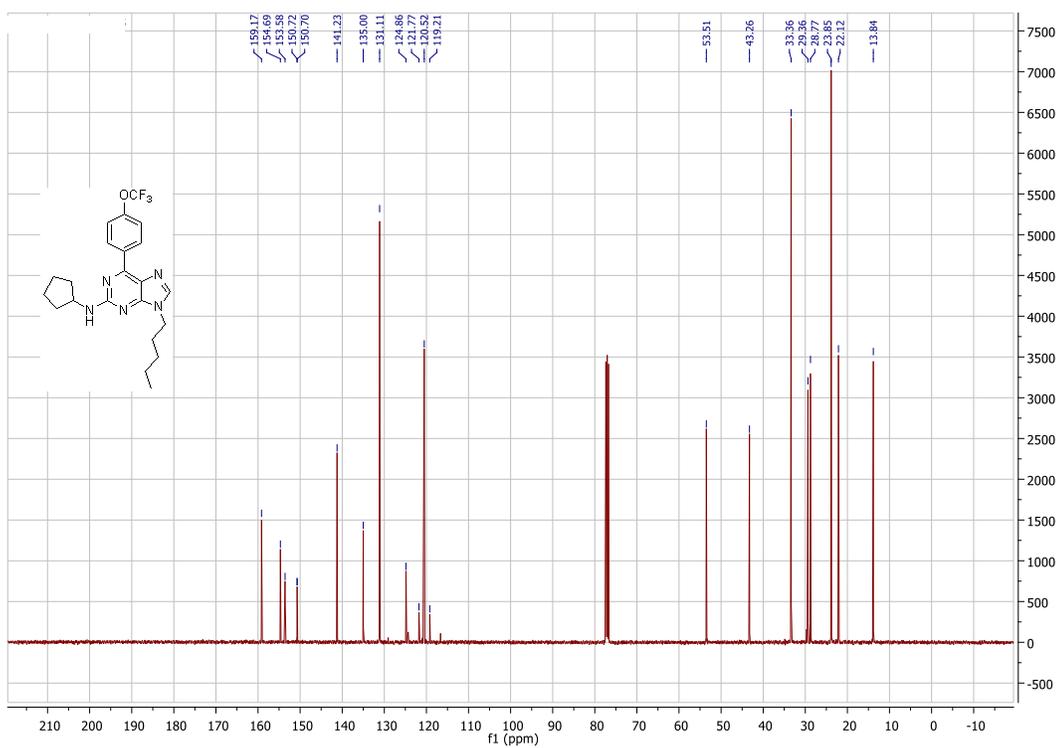
#### RMN <sup>13</sup>C 4a



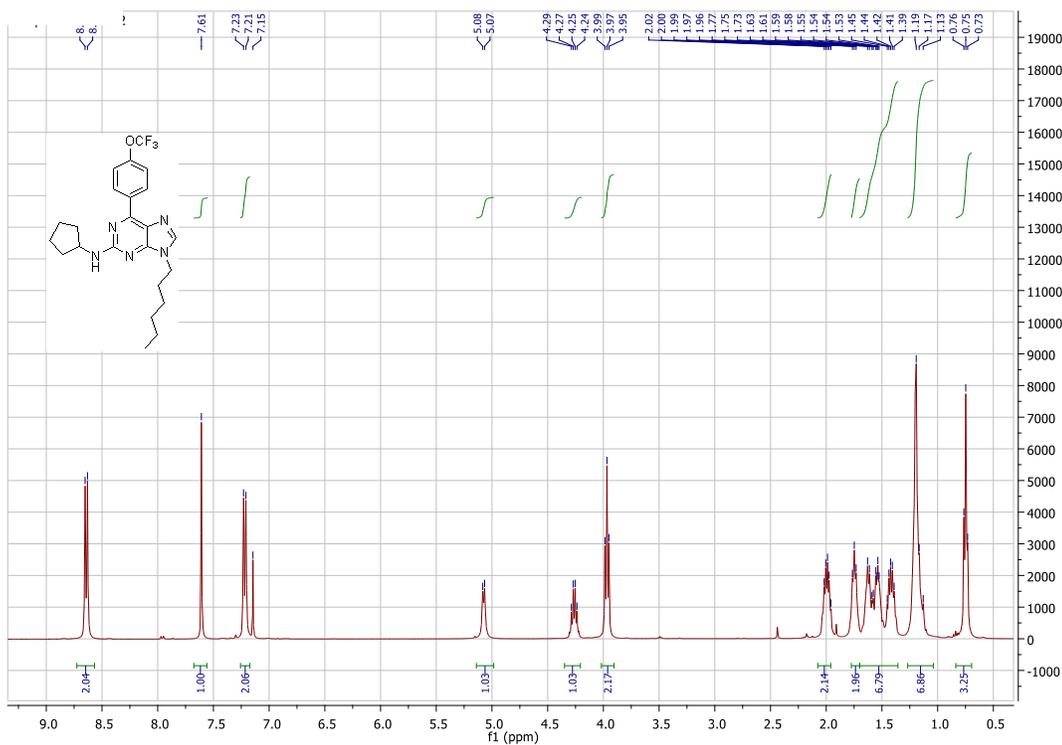
# RMN <sup>1</sup>H 4b



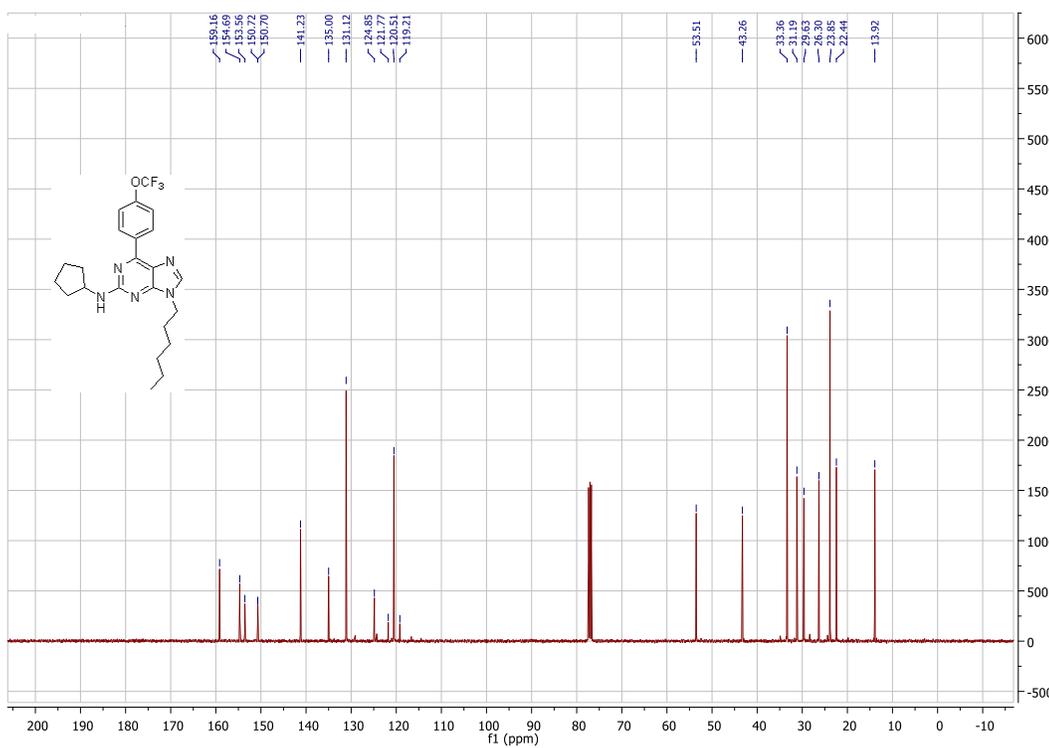
# RMN <sup>13</sup>C 4b



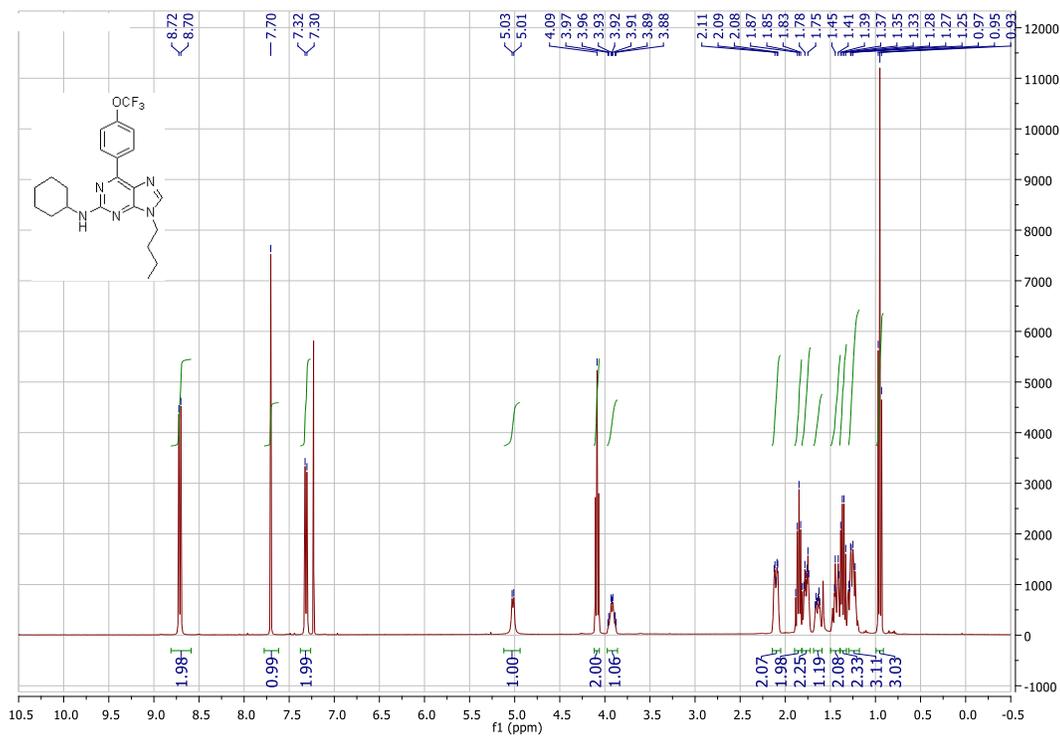
# RMN <sup>1</sup>H 4c



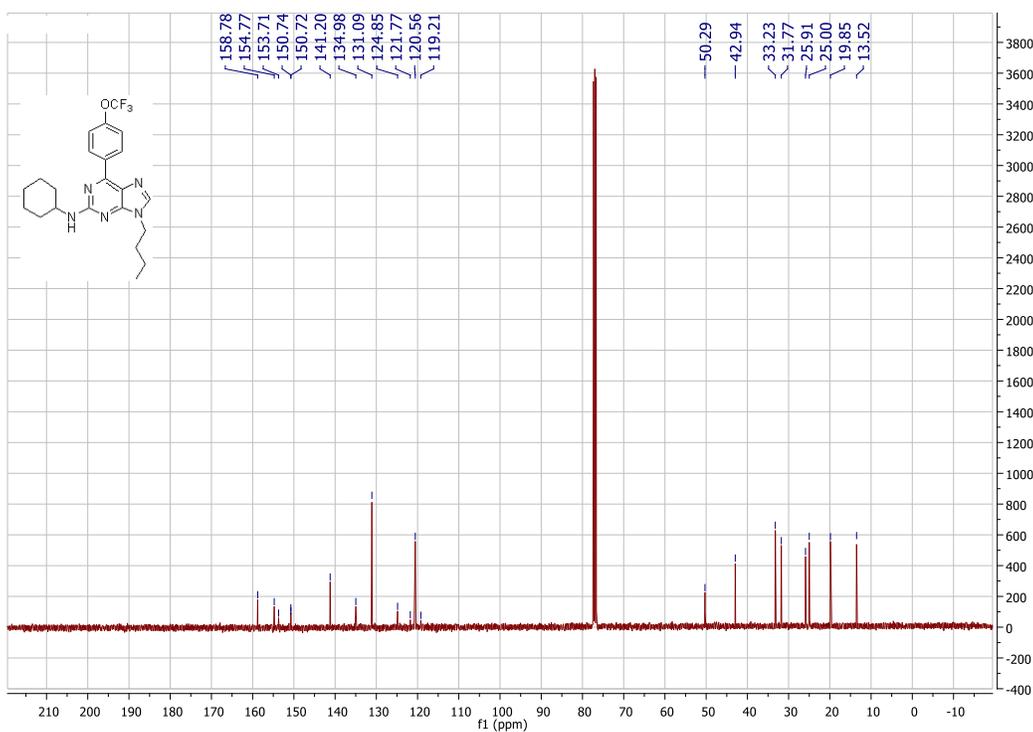
# RMN <sup>13</sup>C 4c



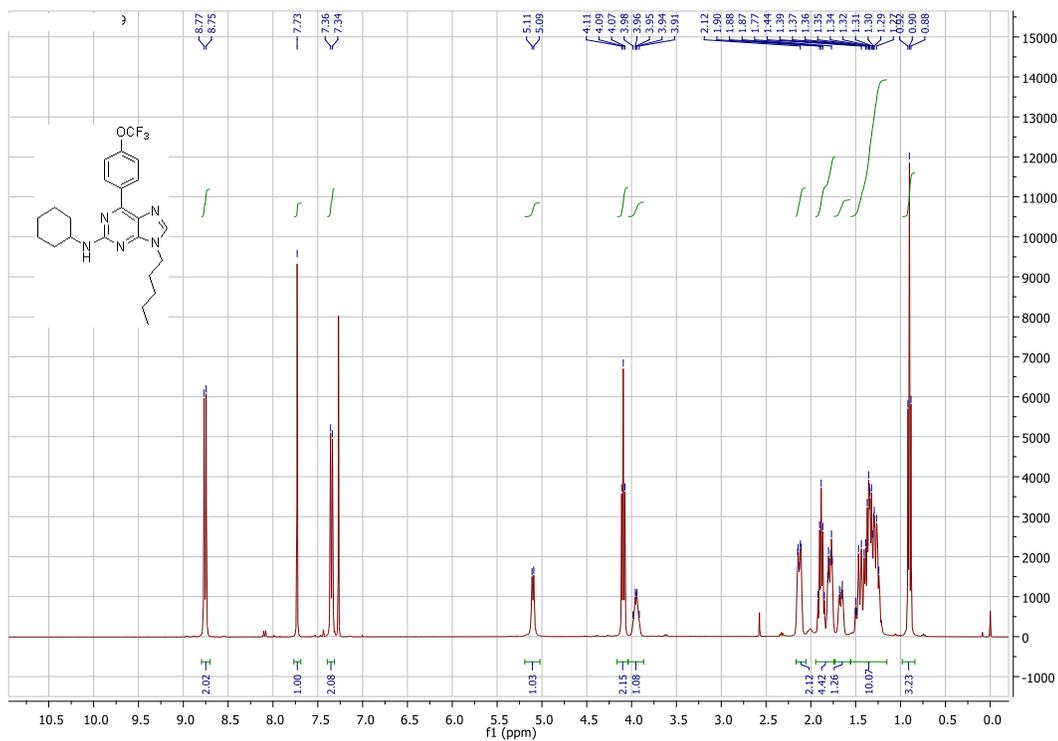
# RMN <sup>1</sup>H 4d



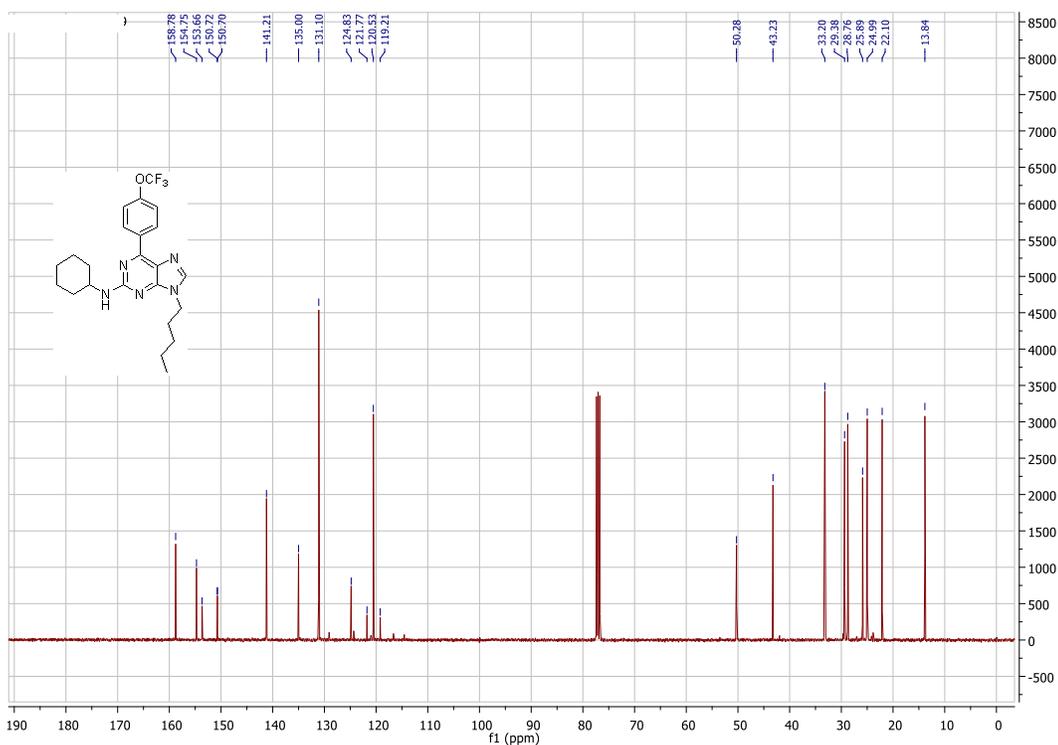
# RMN <sup>13</sup>C 4d



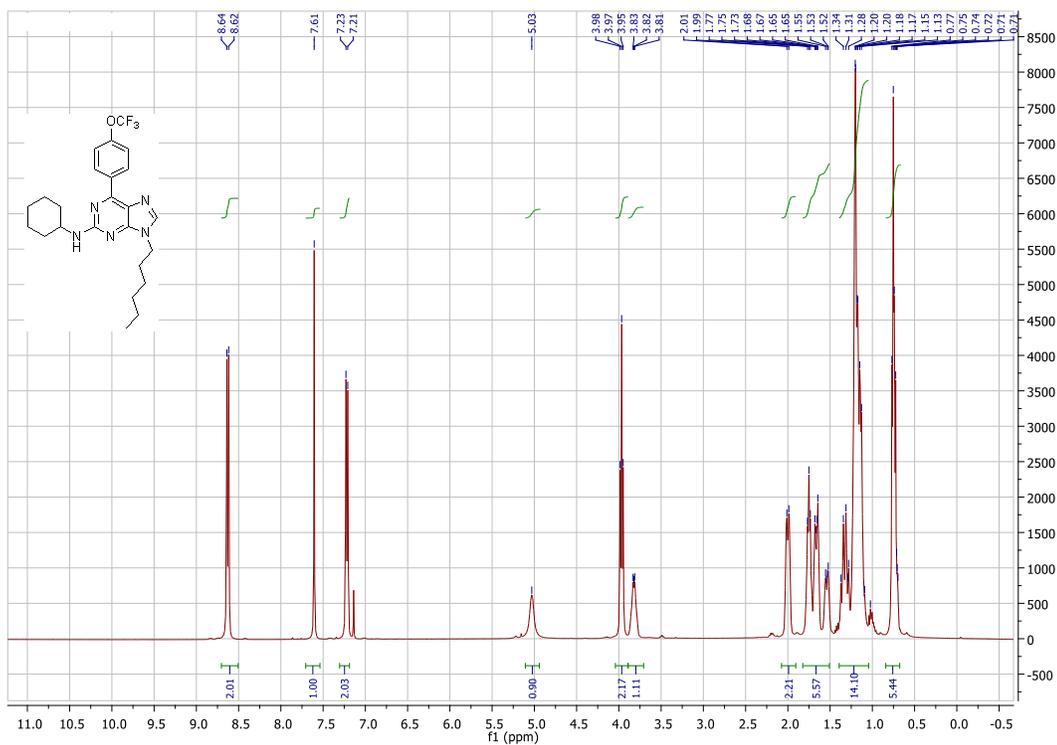
# RMN <sup>1</sup>H 4e



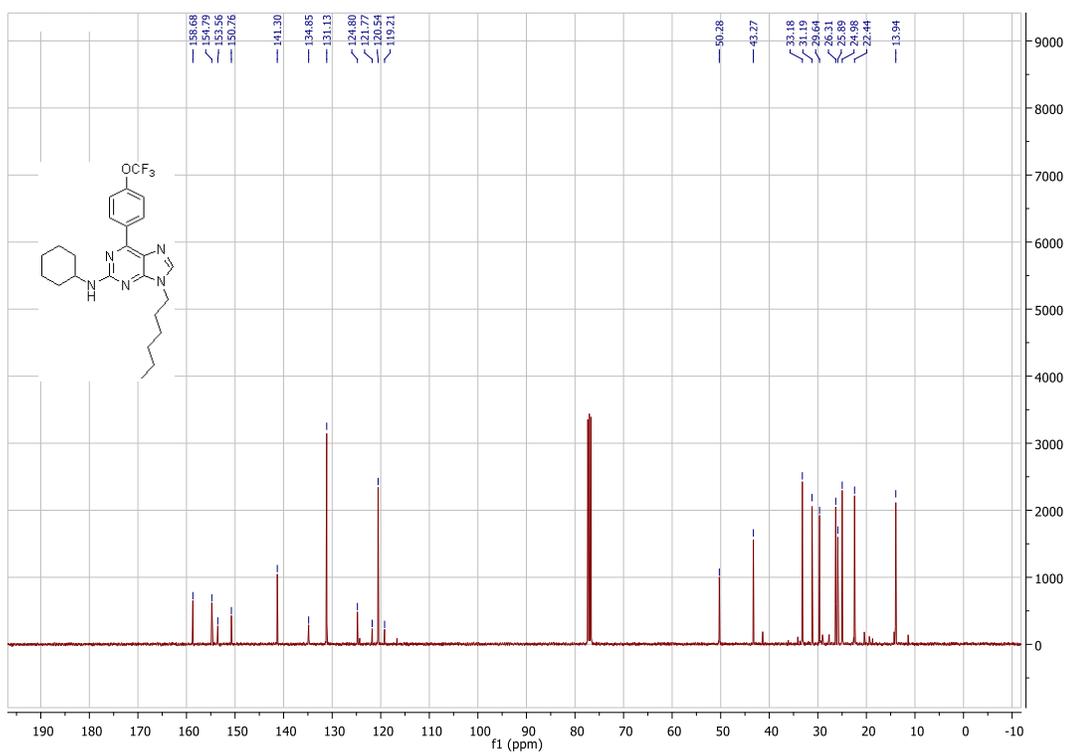
# RMN <sup>13</sup>C 4e



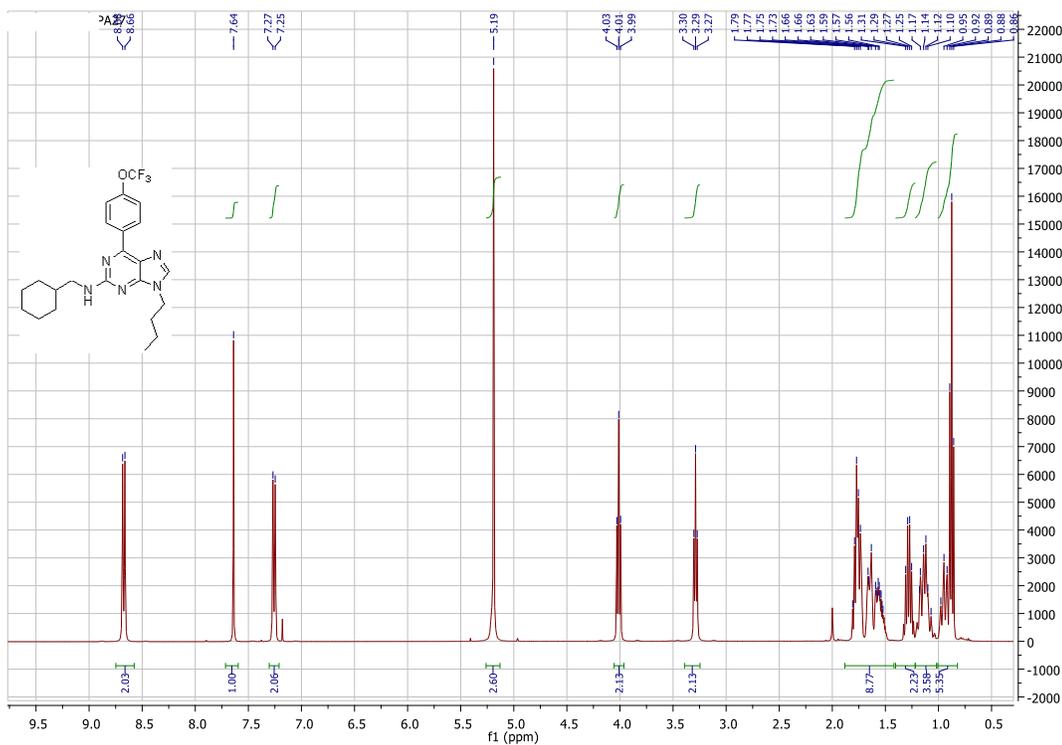
# RMN <sup>1</sup>H 4f



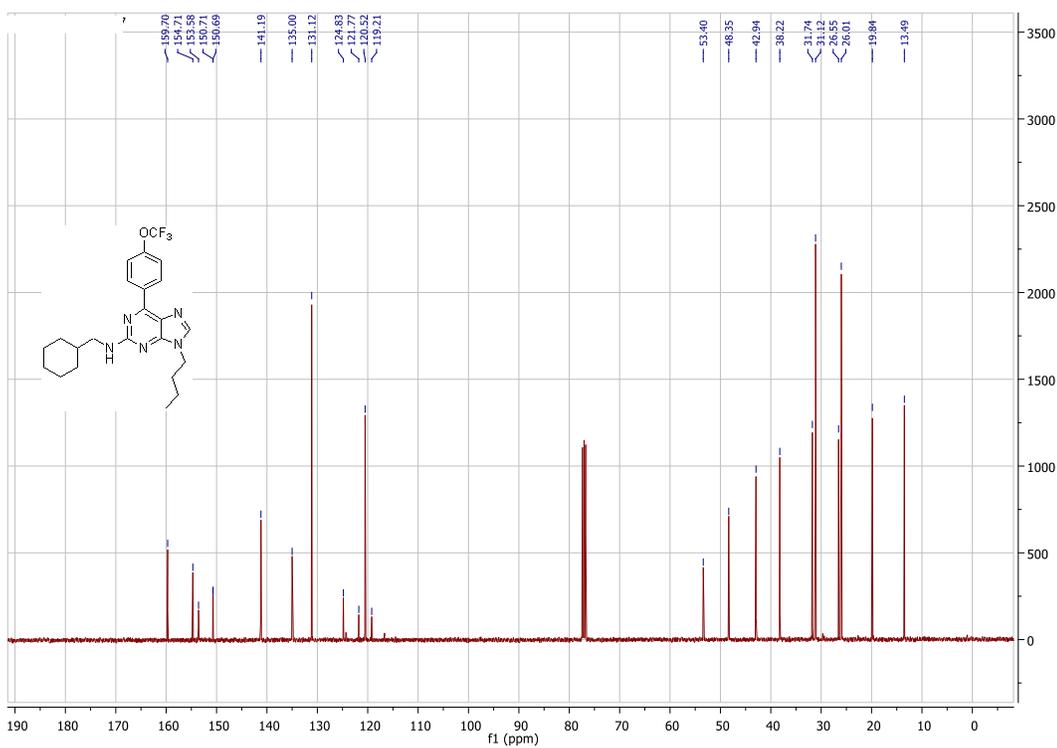
# RMN <sup>13</sup>C 4f



# RMN <sup>1</sup>H 4g

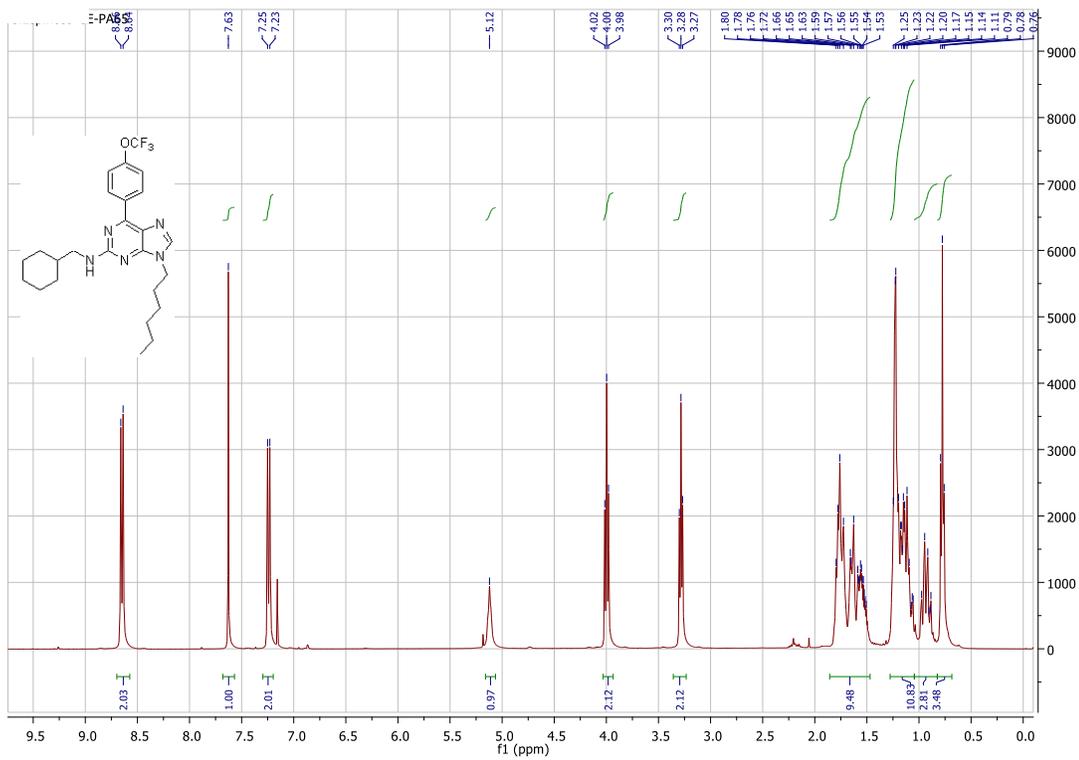


# RMN <sup>13</sup>C 4g

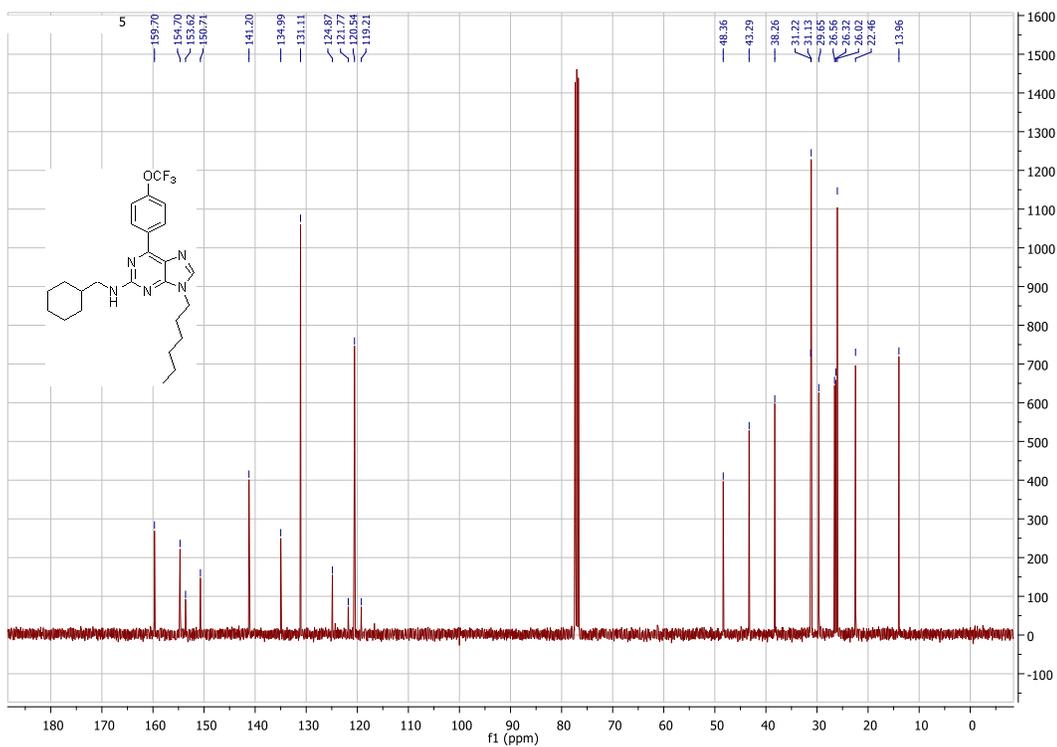




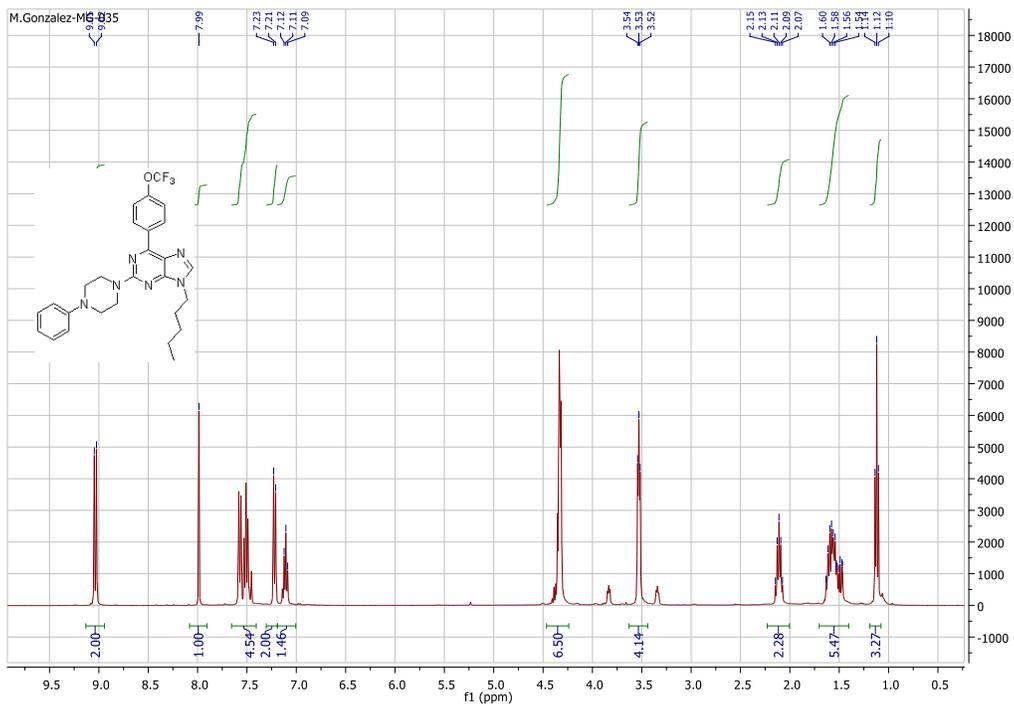
# RMN <sup>1</sup>H 4i



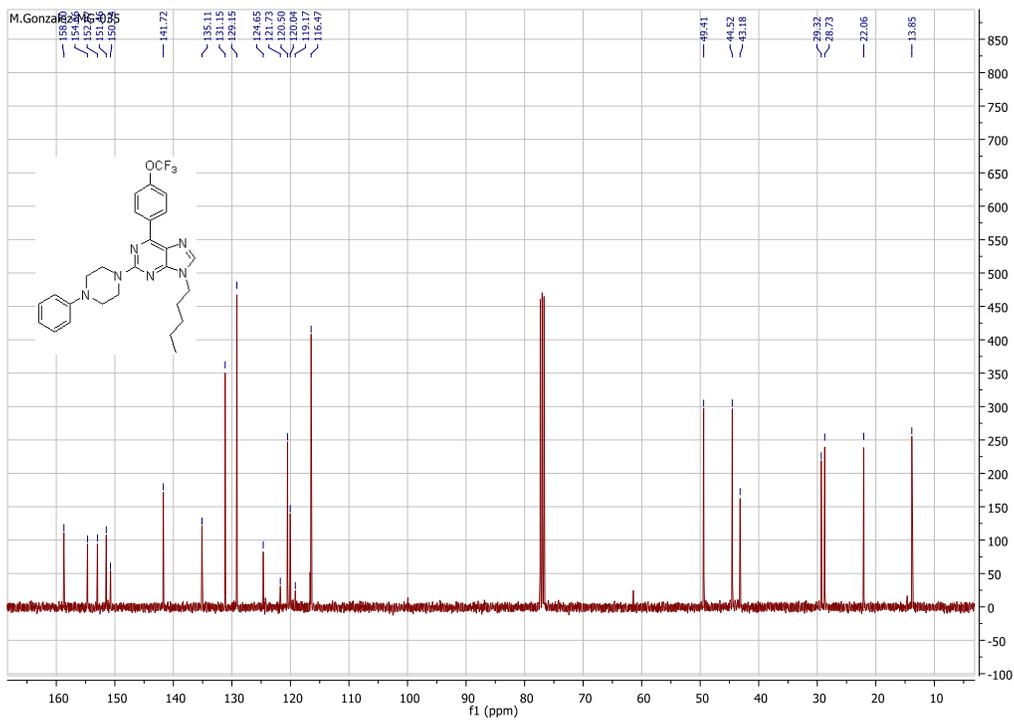
# RMN <sup>13</sup>C 4i



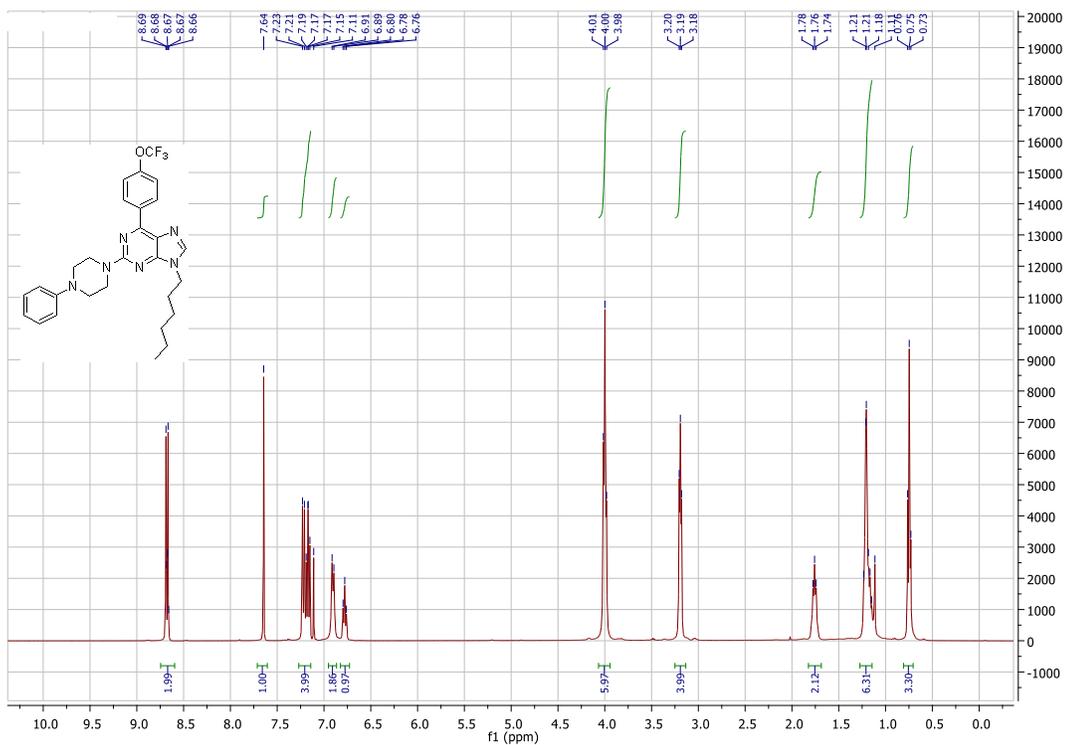
# RMN <sup>1</sup>H 4j



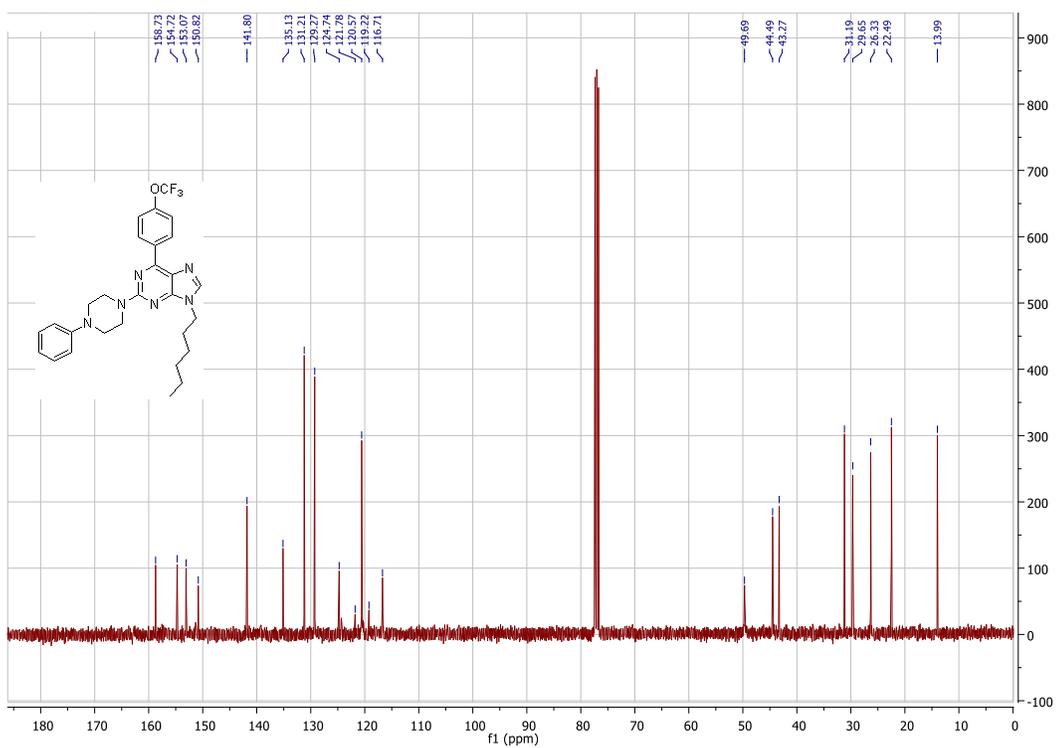
# RMN <sup>13</sup>C 4j



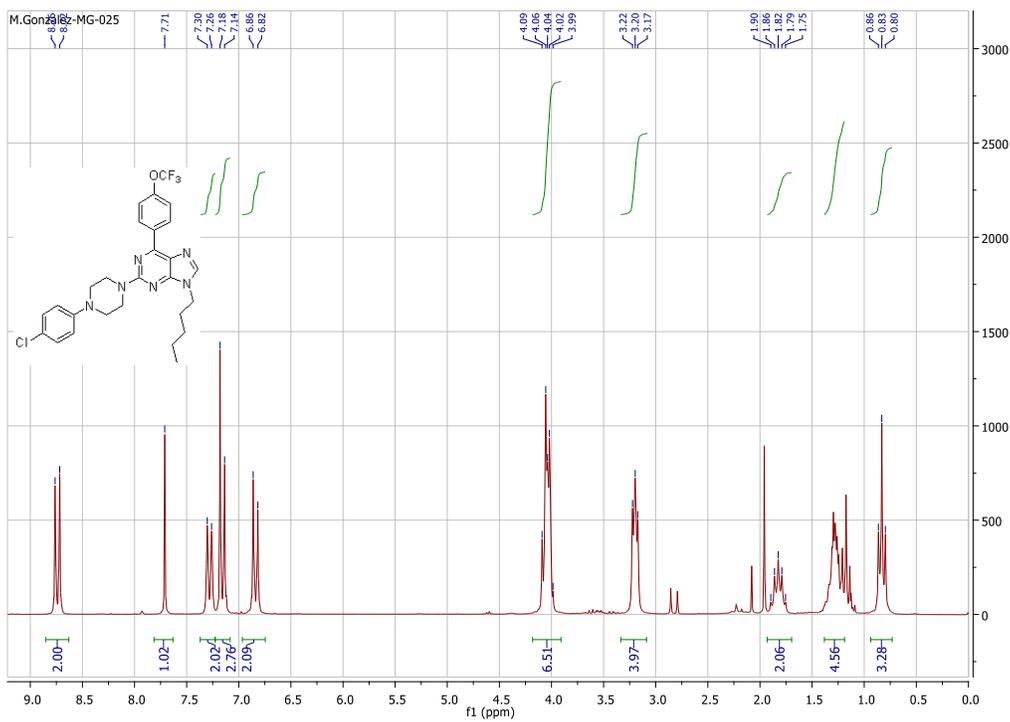
# RMN <sup>1</sup>H 4k



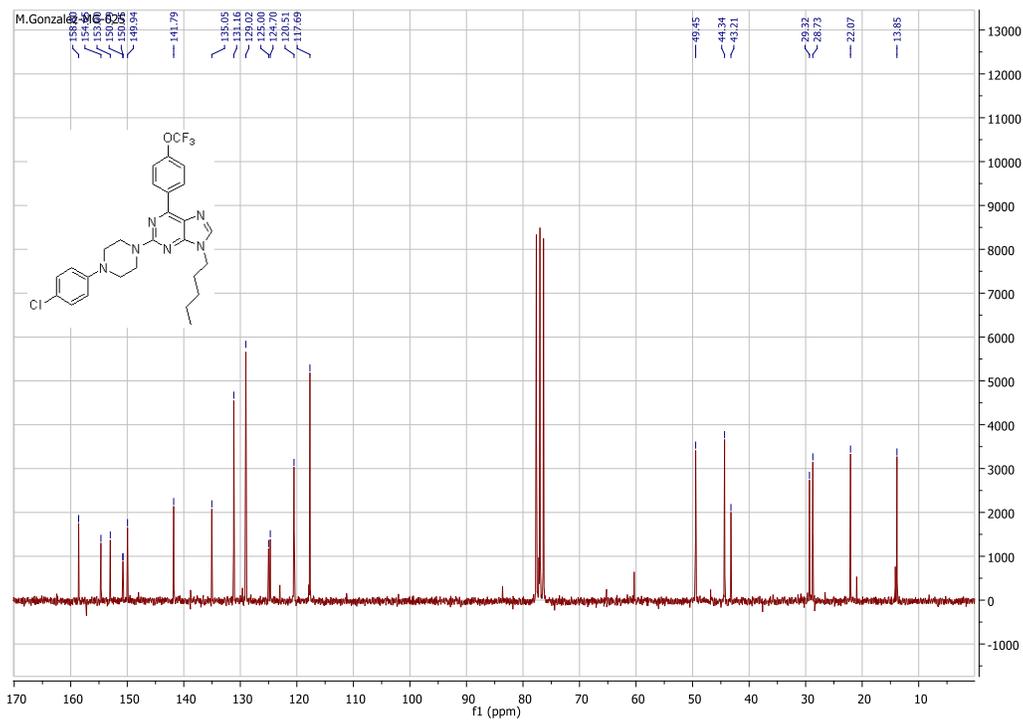
# RMN <sup>13</sup>C 4K



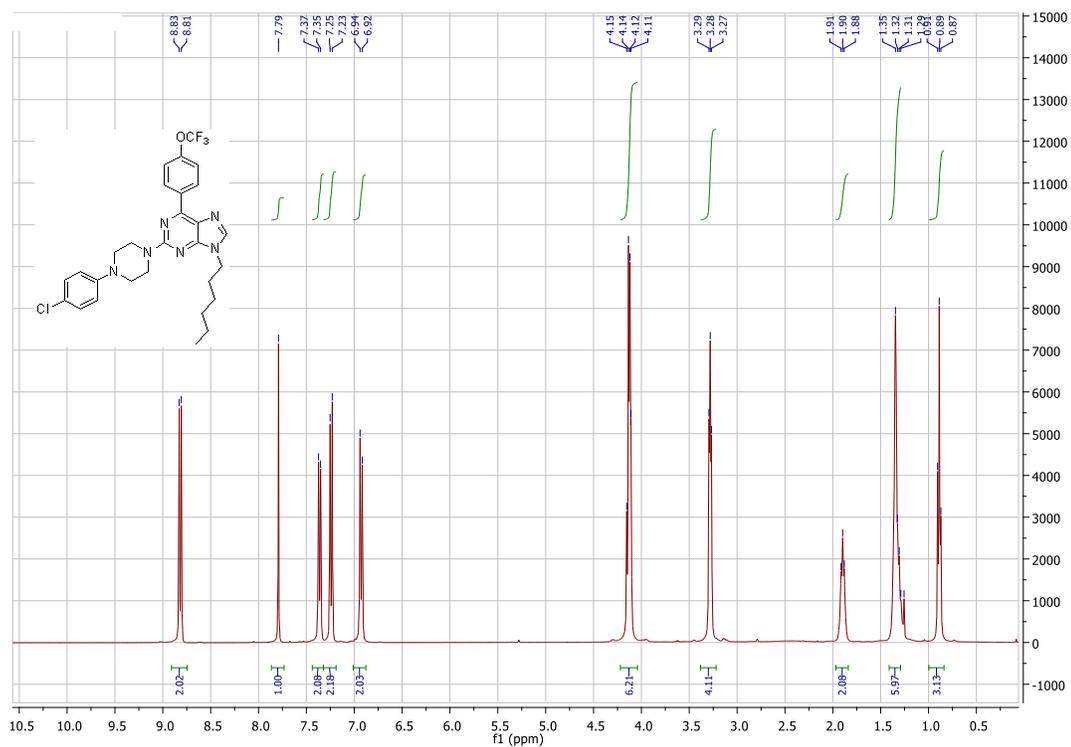
# RMN <sup>1</sup>H 4I



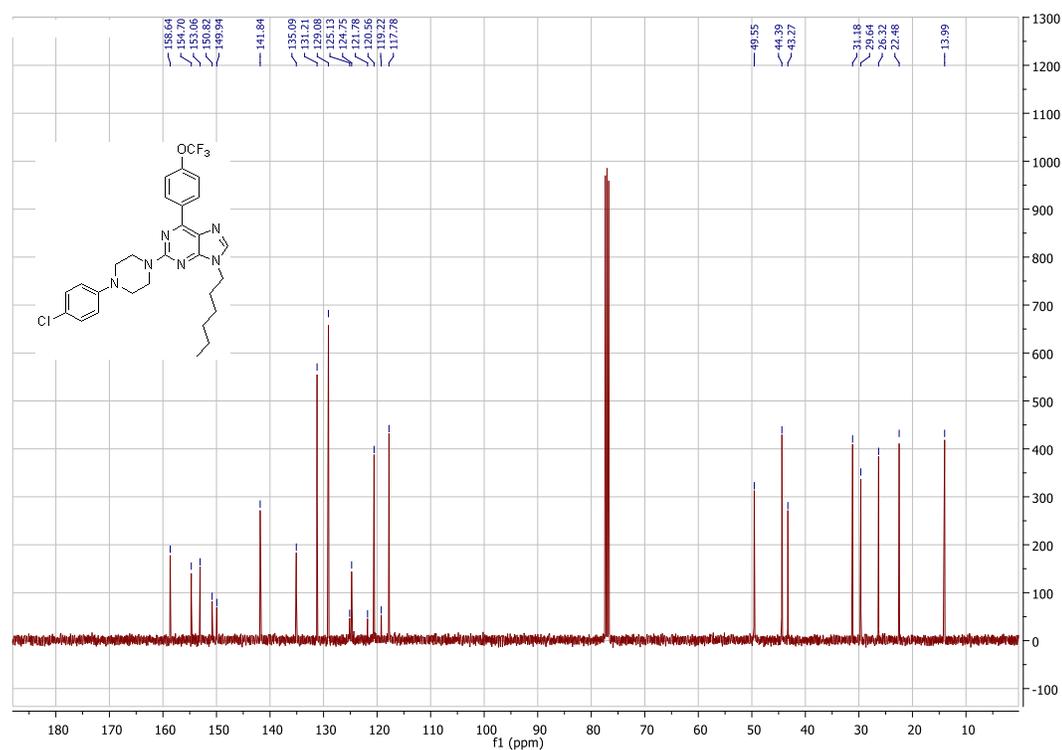
# RMN <sup>13</sup>C 4I



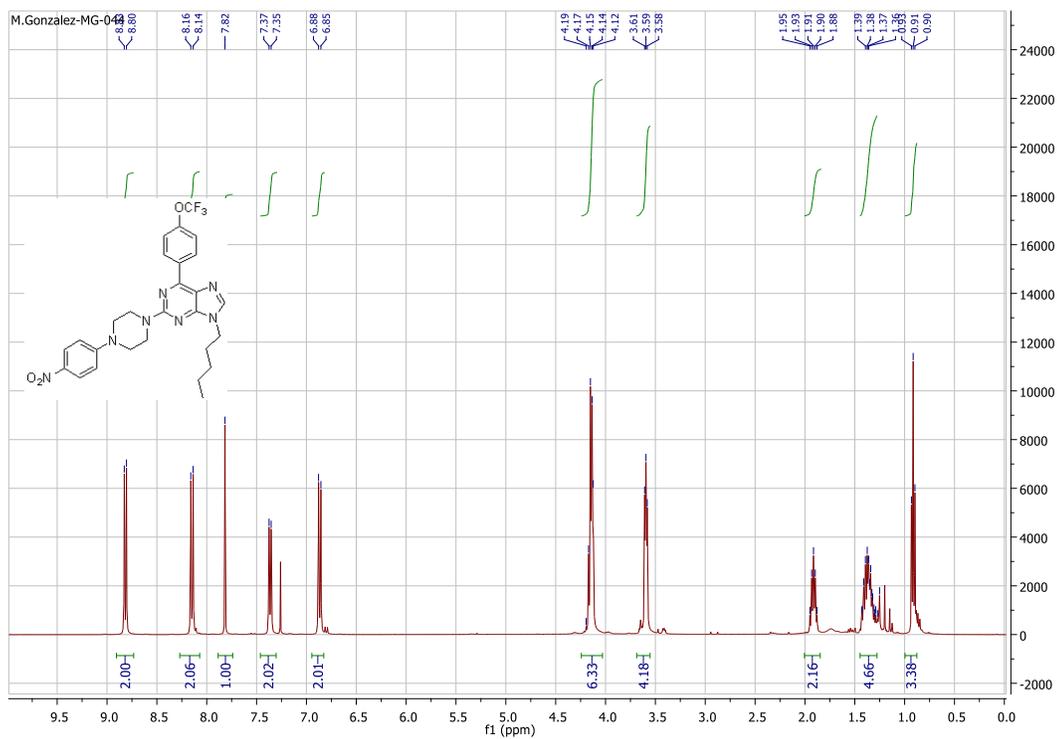
# RMN <sup>1</sup>H 4m



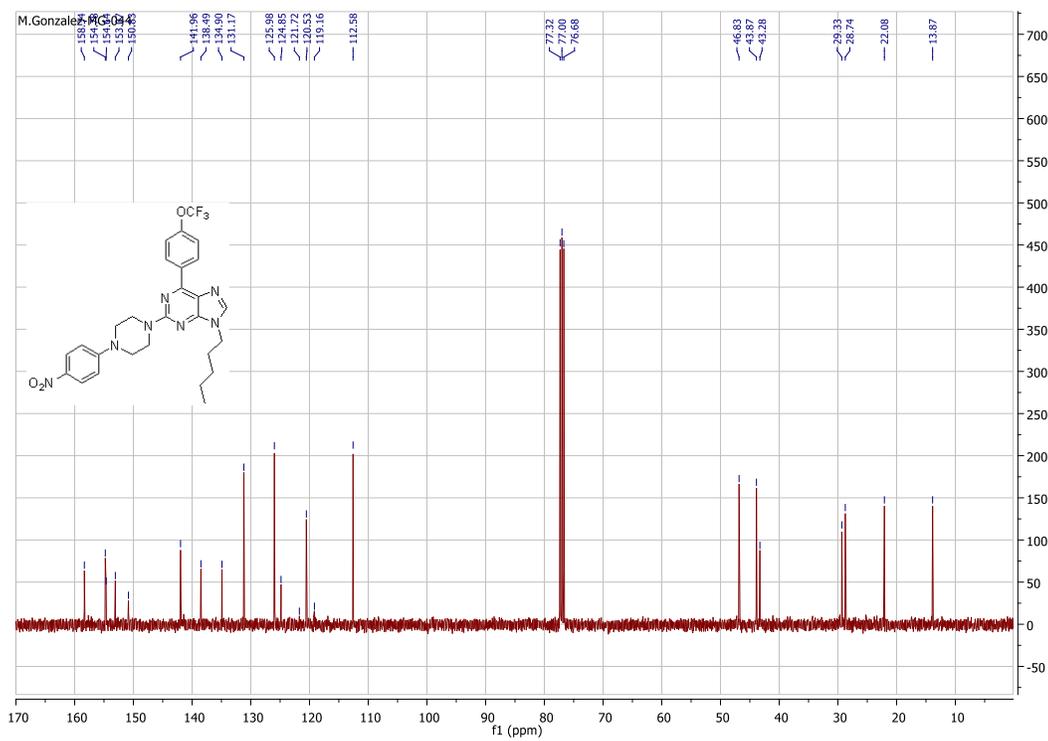
# RMN <sup>13</sup>C 4m



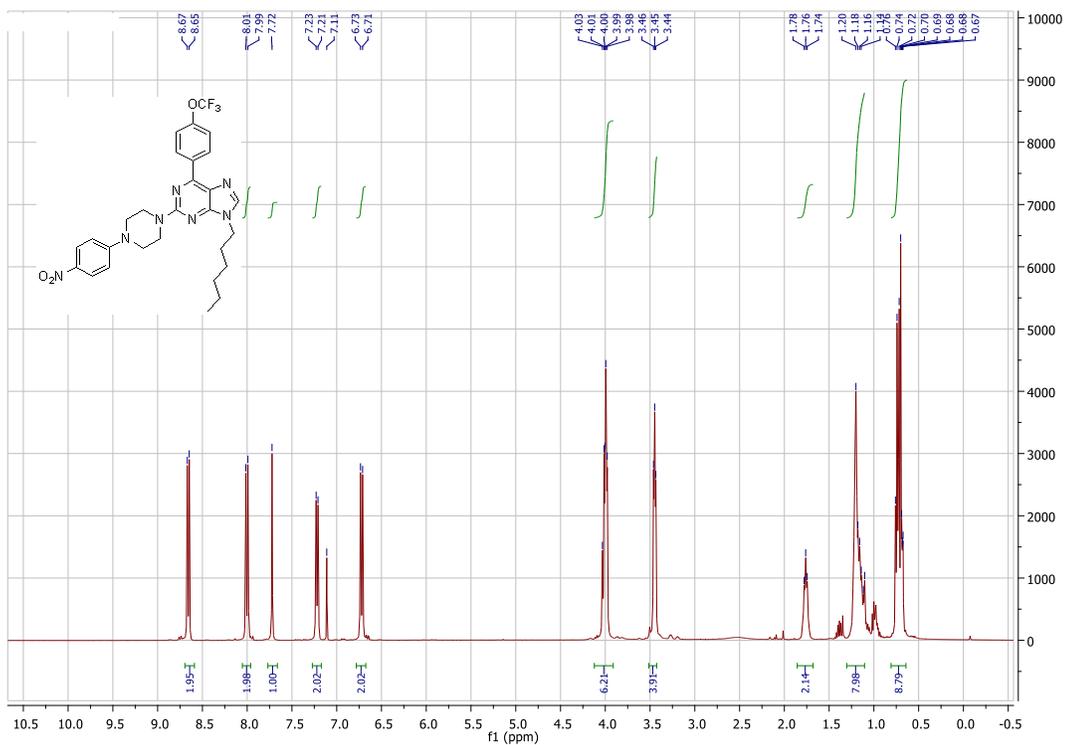
## RMN <sup>1</sup>H 4n



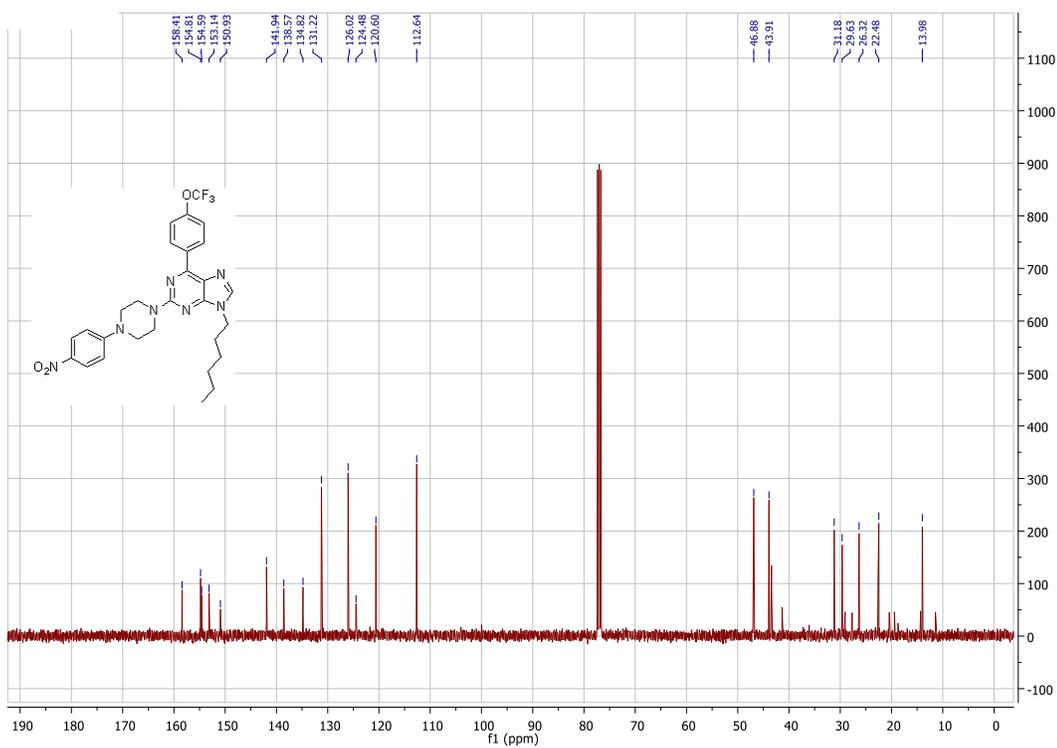
## RMN <sup>13</sup>C 4n



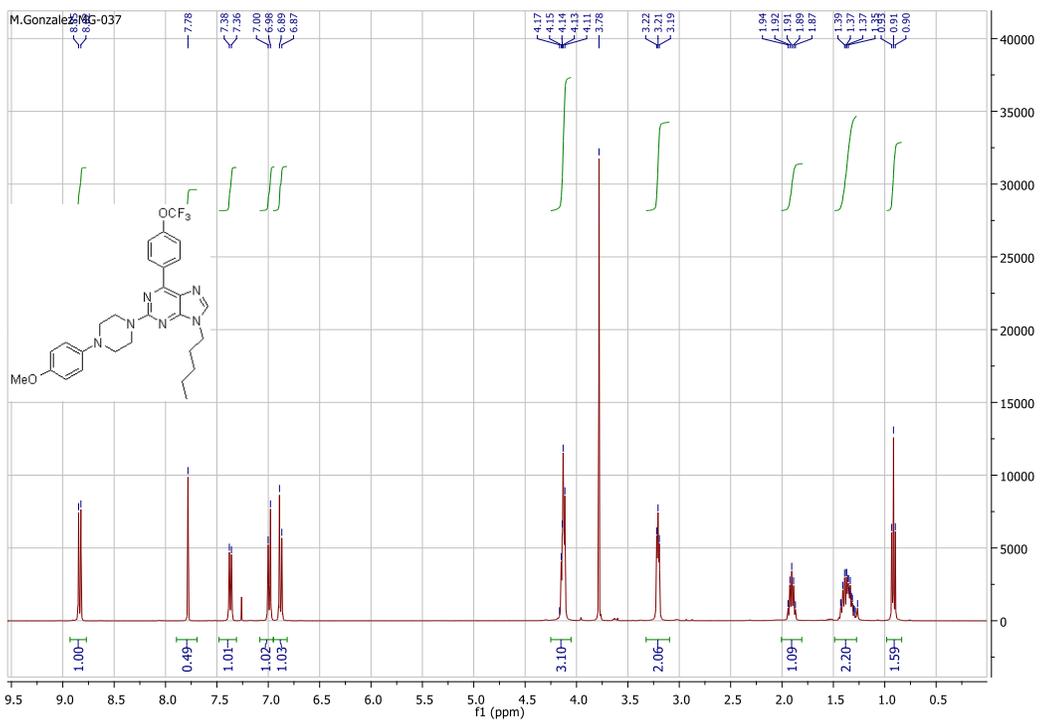
# RMN <sup>1</sup>H 4o



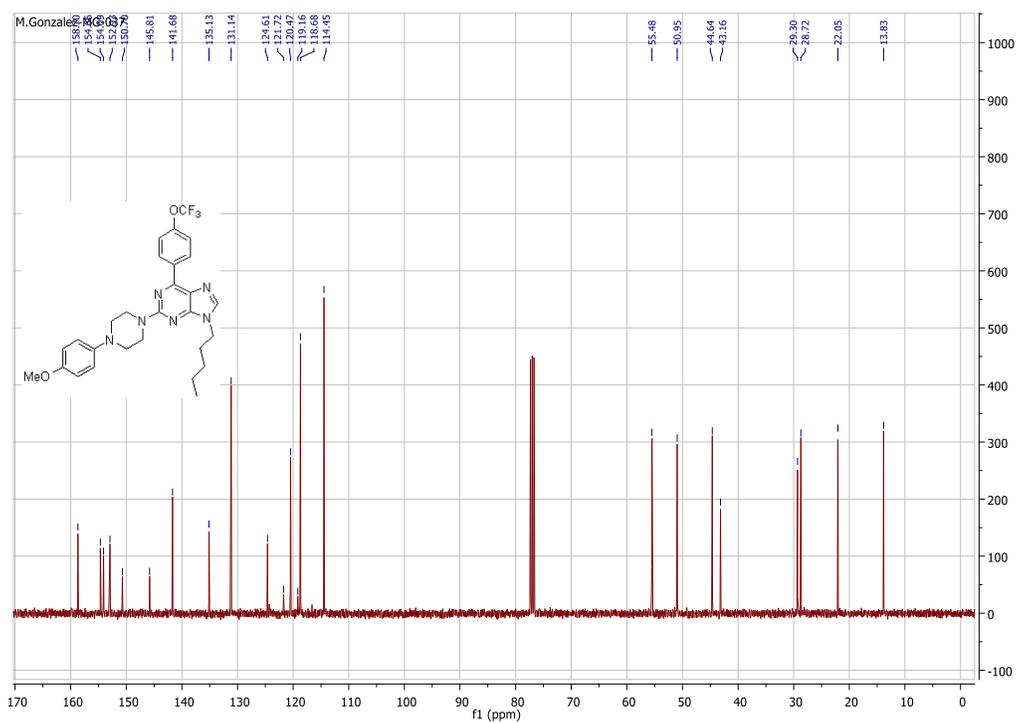
# RMN <sup>13</sup>C 4o



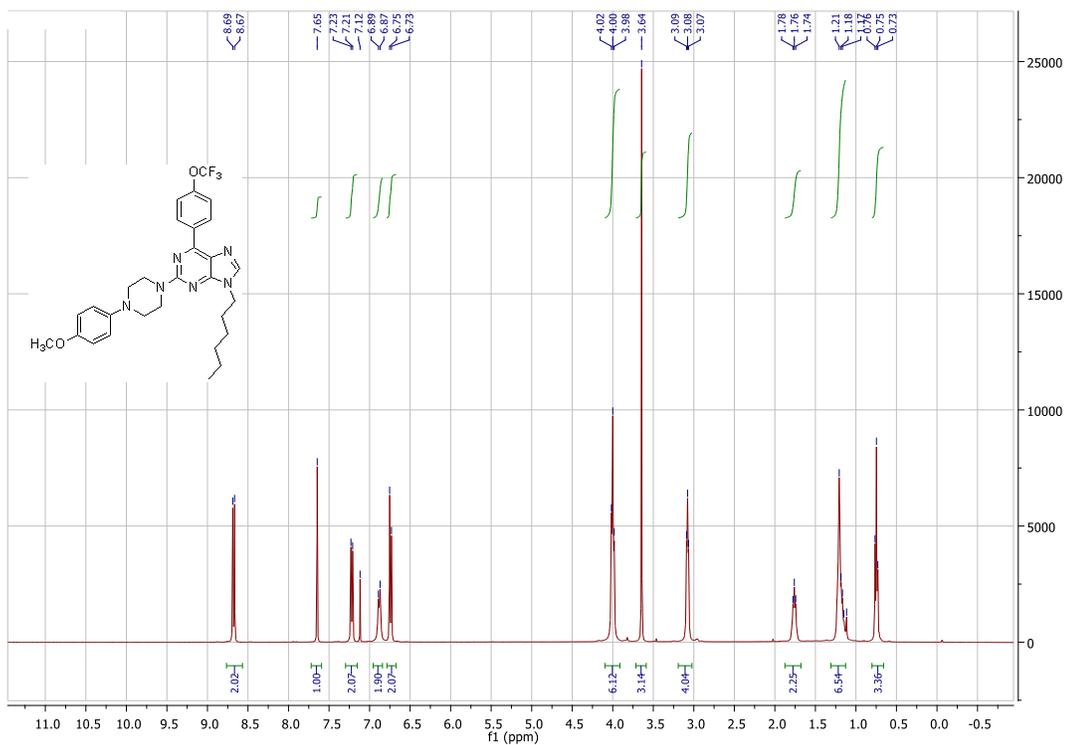
# RMN <sup>1</sup>H 4p



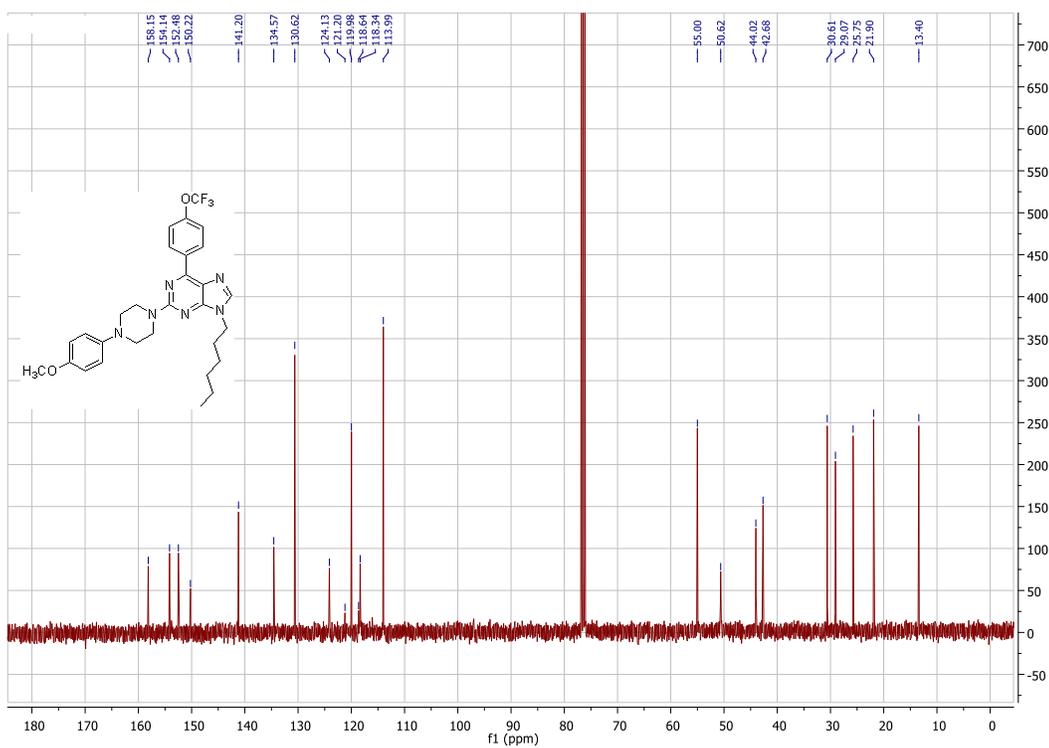
# RMN <sup>13</sup>C 4p



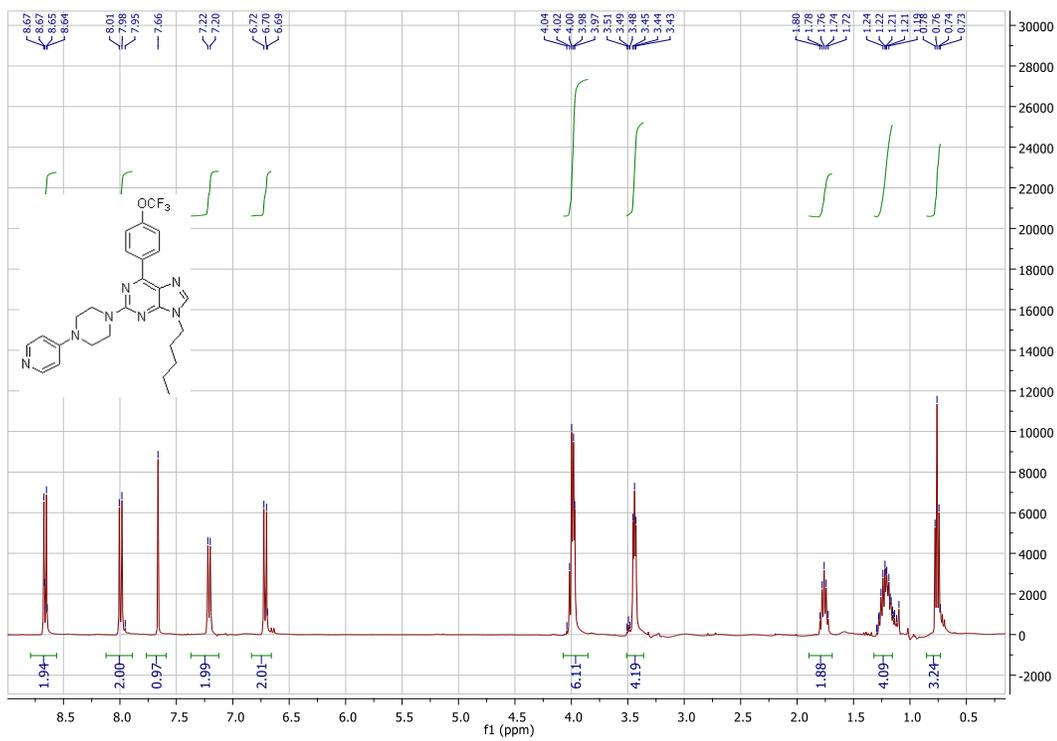
# RMN <sup>1</sup>H 4q



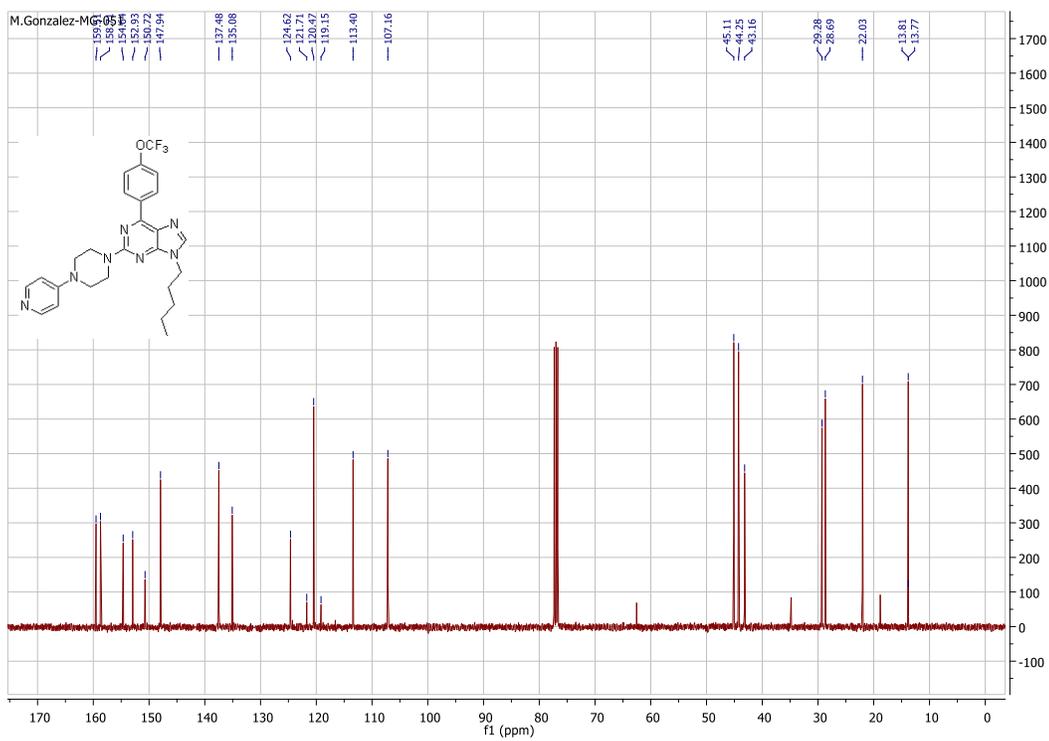
# RMN <sup>13</sup>C 4q



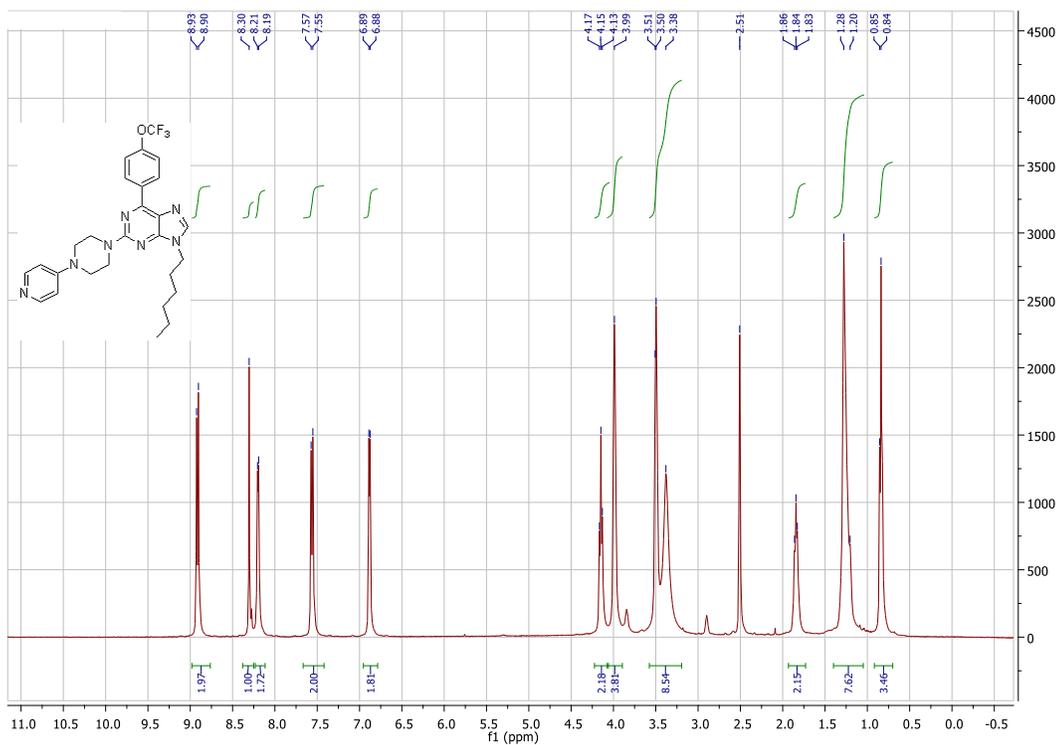
# RMN <sup>1</sup>H 4r



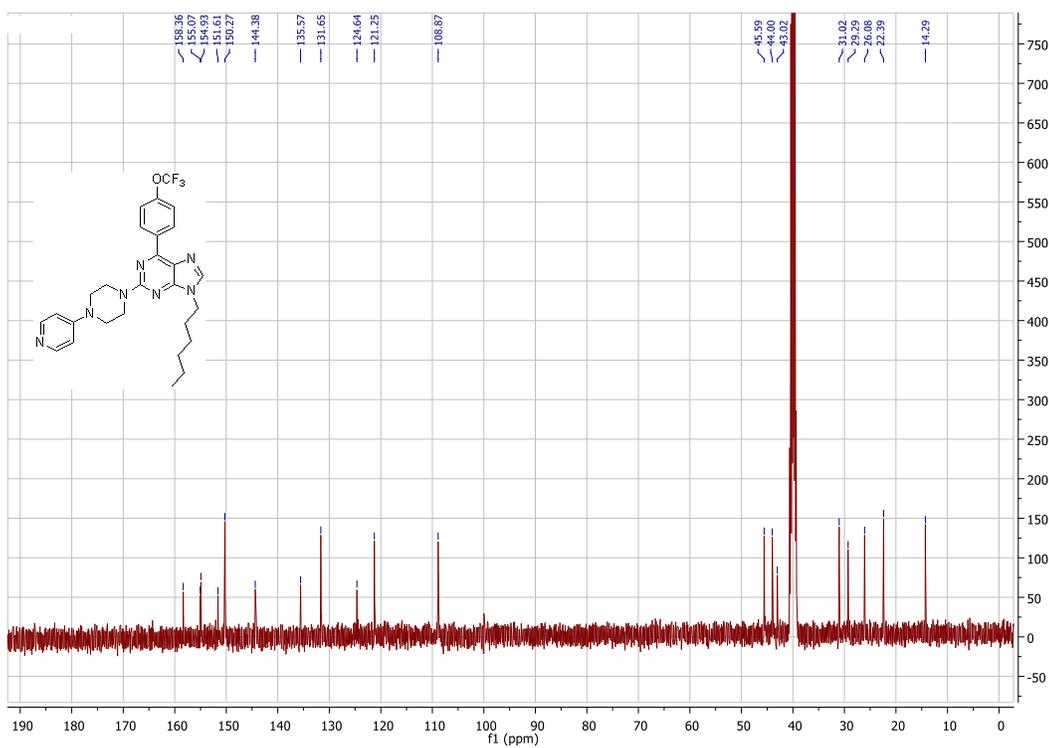
# RMN <sup>13</sup>C 4r



# RMN <sup>1</sup>H 4s

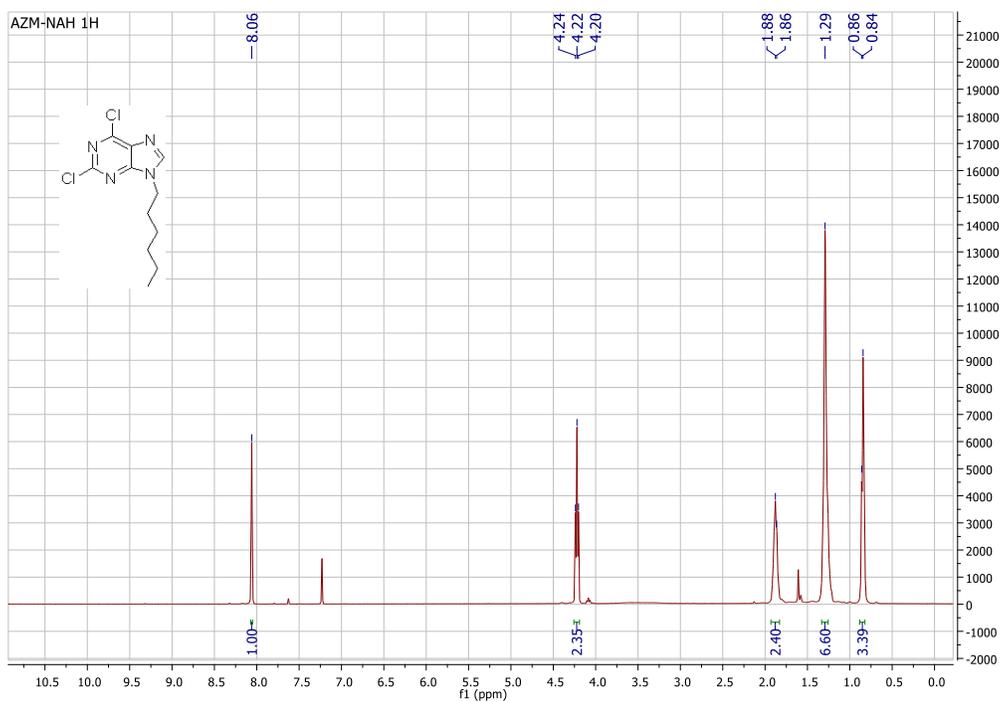


# RMN <sup>13</sup>C 4s

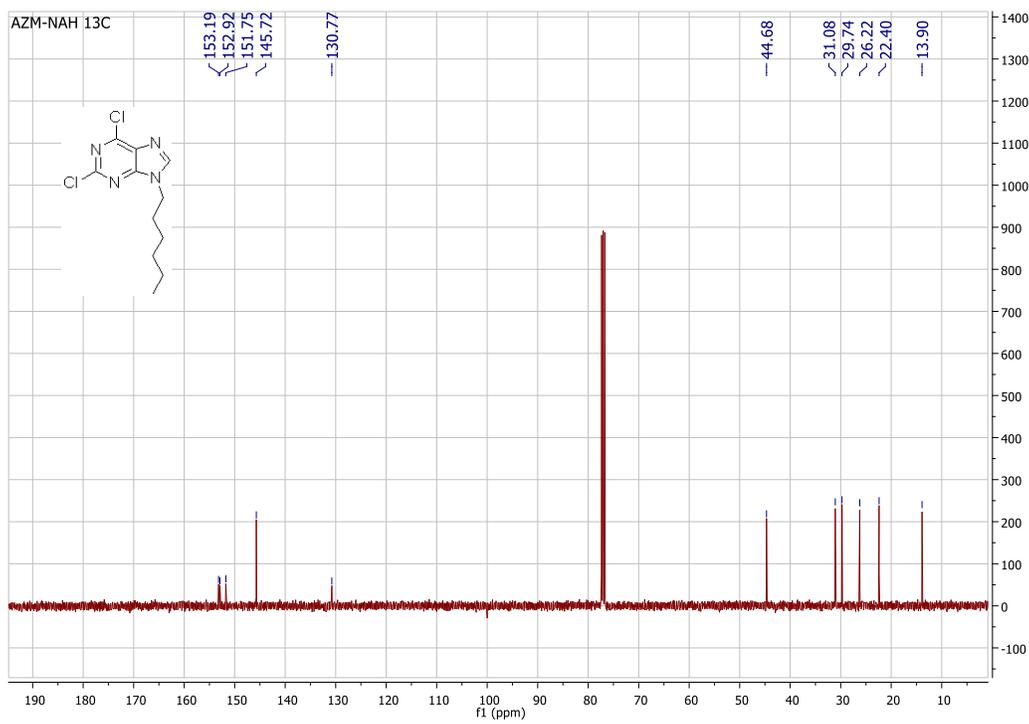


### 8.3.3 Intermediarios de reacción correspondientes a las series II y III

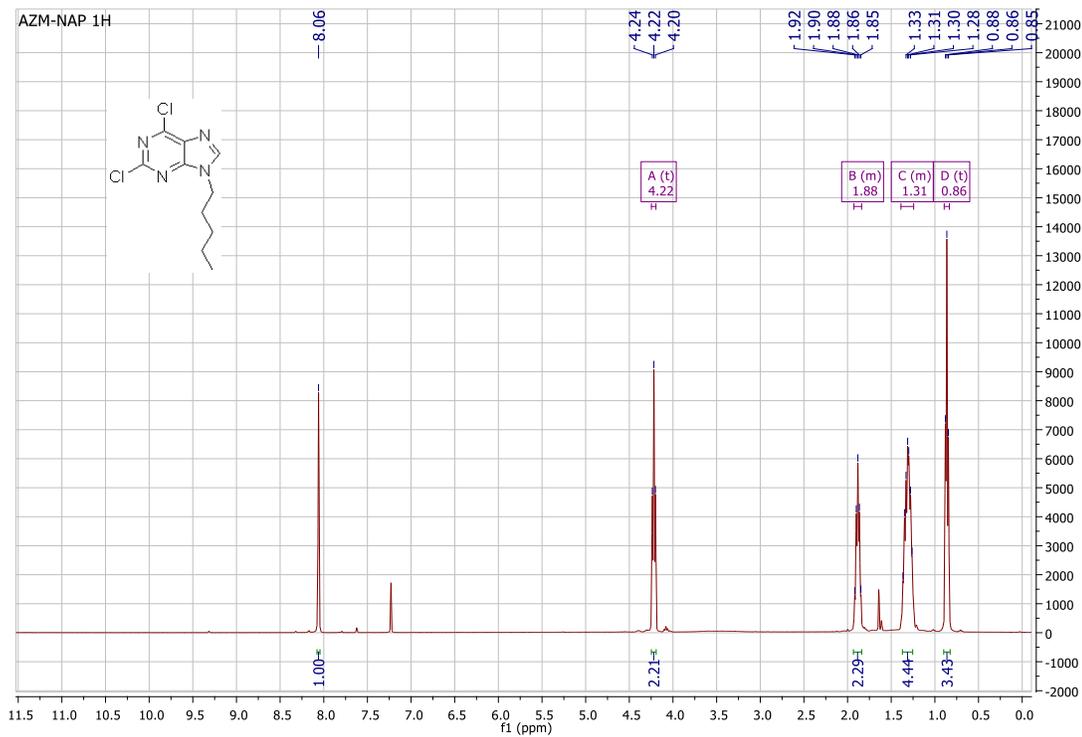
#### RMN $^1\text{H}$ 6a



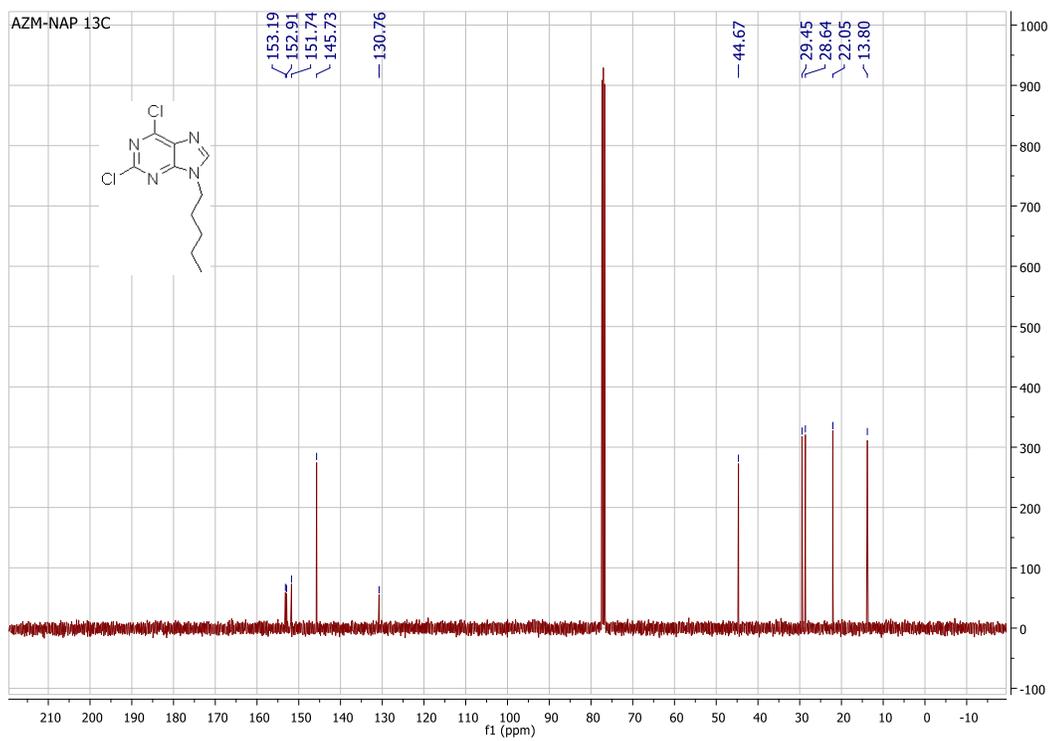
#### RMN $^{13}\text{C}$ 6a



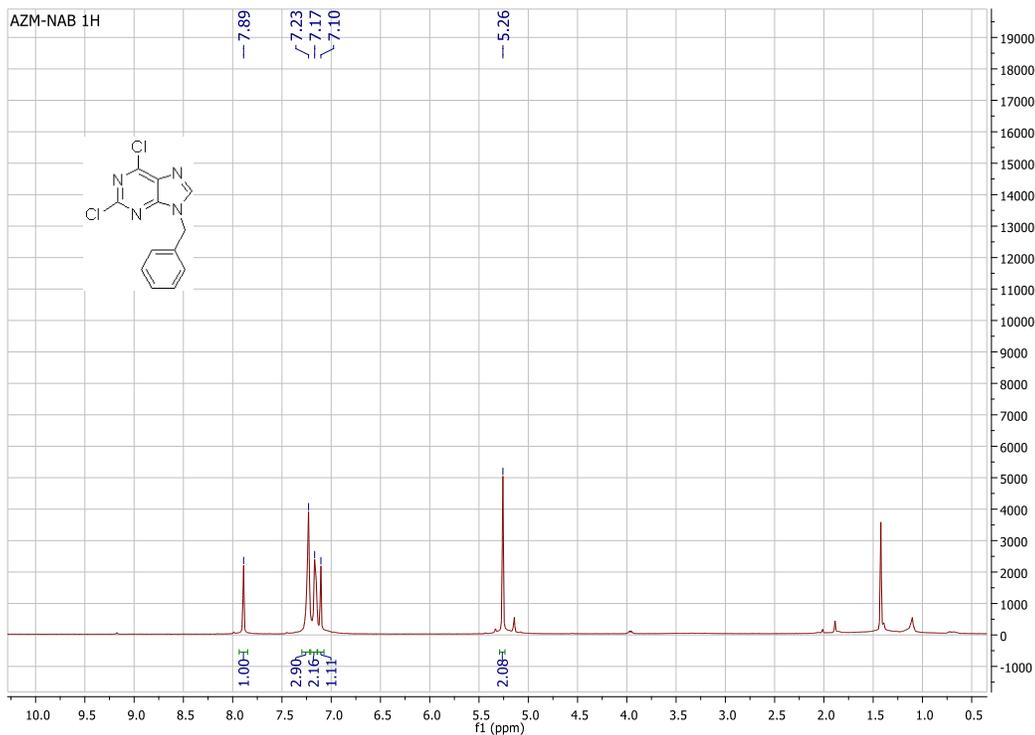
# RMN <sup>1</sup>H 6b



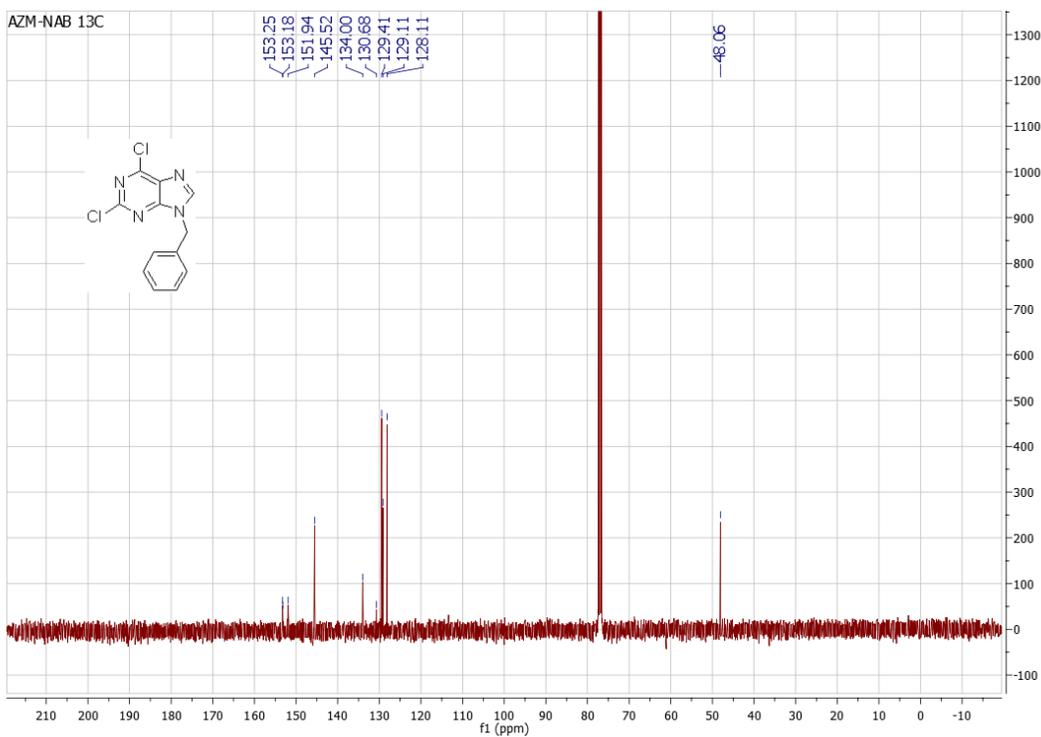
# RMN <sup>13</sup>C 6b



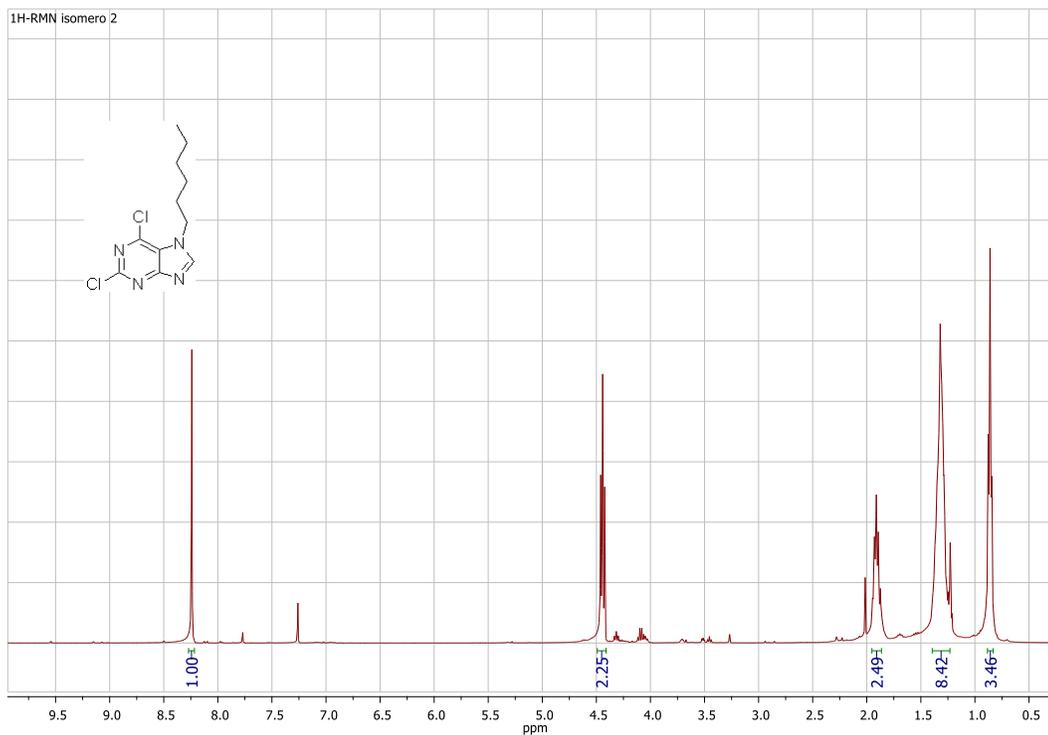
# RMN <sup>1</sup>H 6c



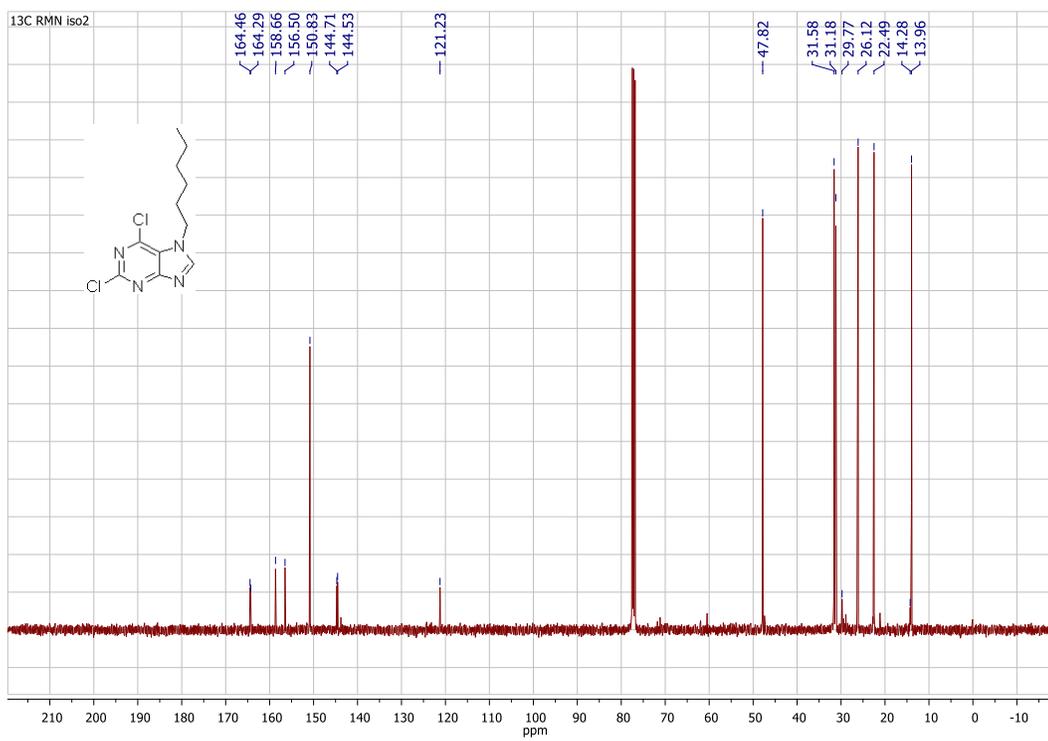
# RMN <sup>13</sup>C 6c



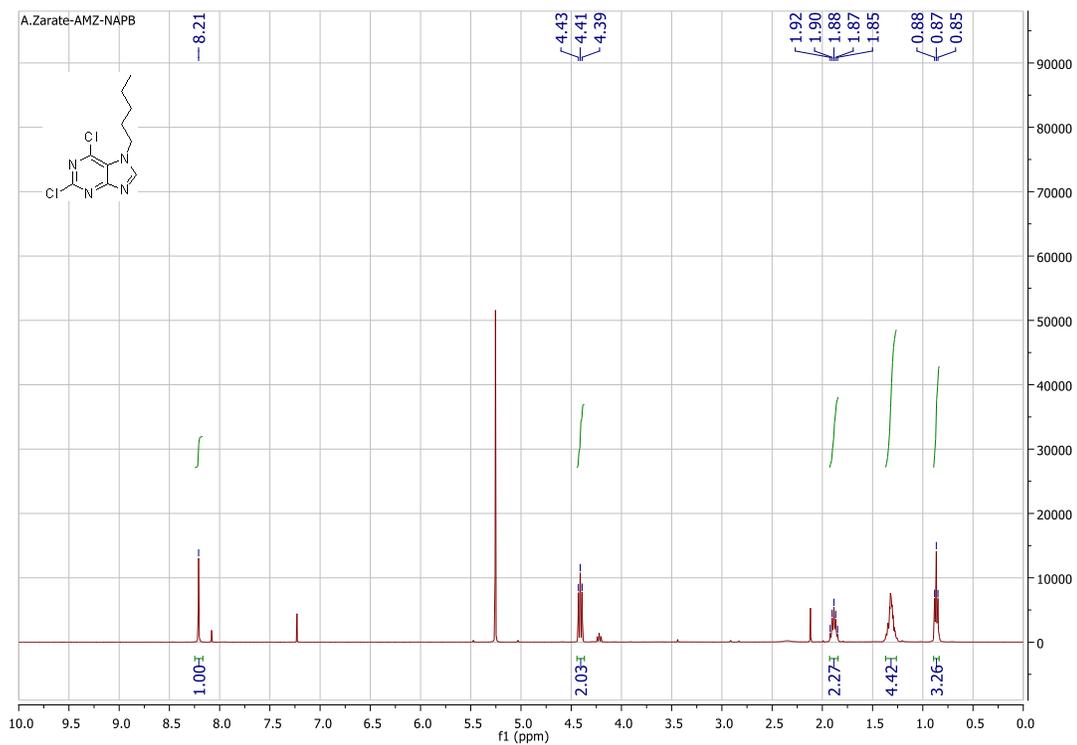
## RMN <sup>1</sup>H 6'a



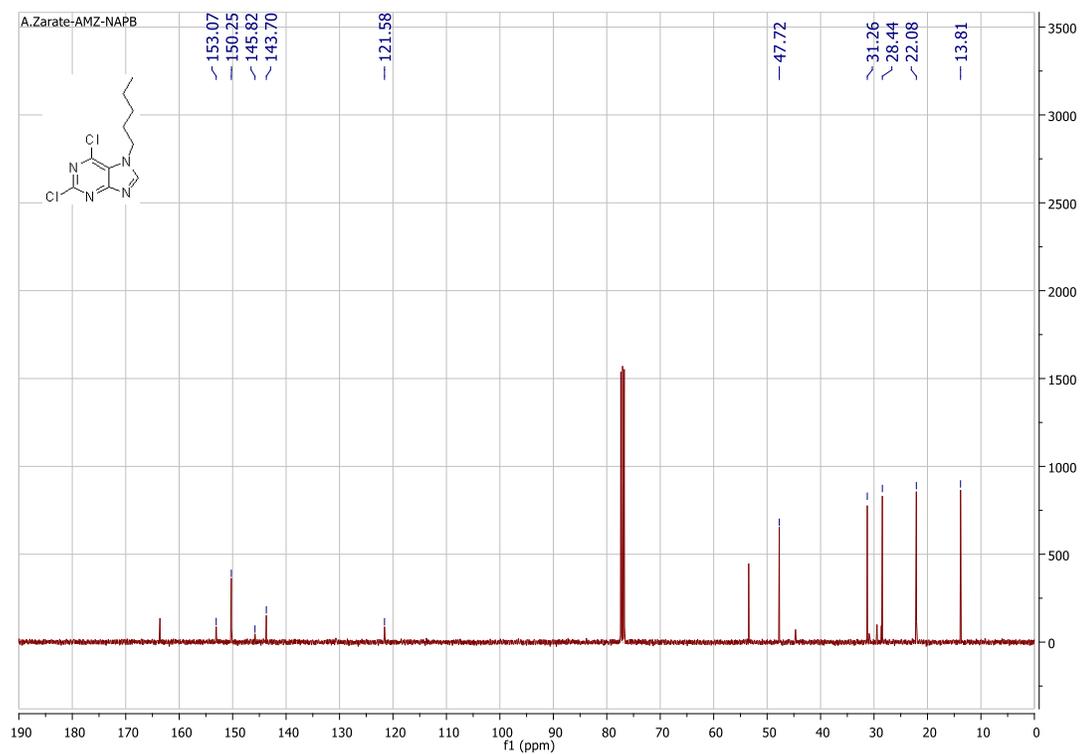
## RMN <sup>13</sup>C 6'a



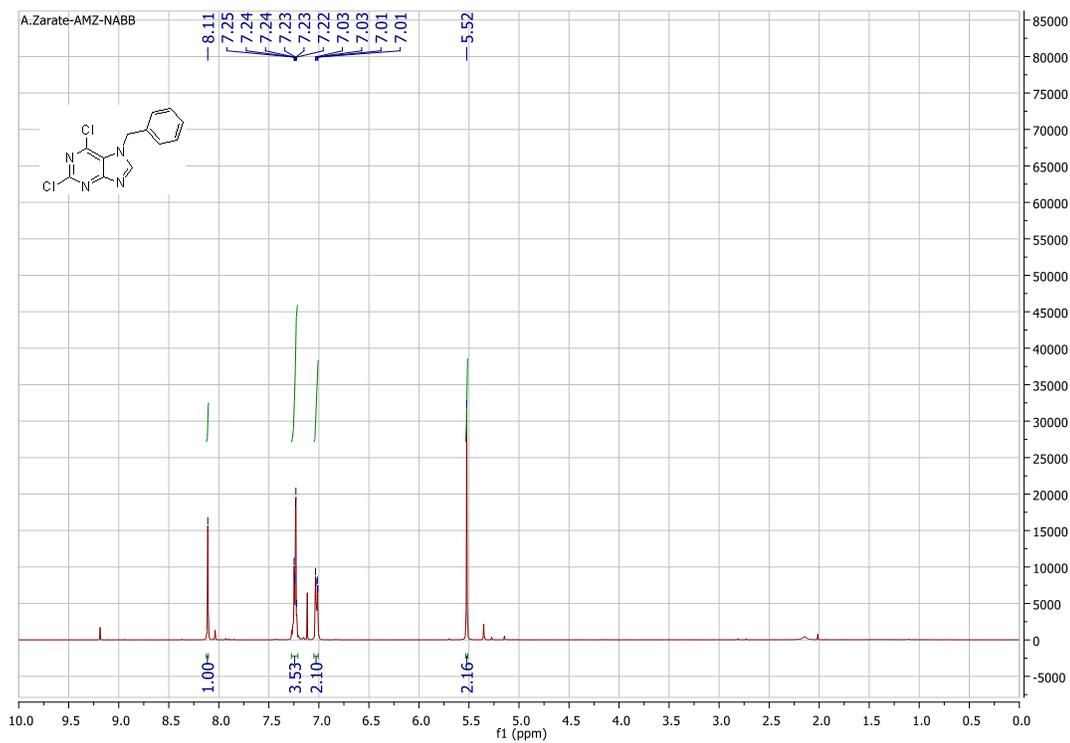
# RMN <sup>1</sup>H 6'b



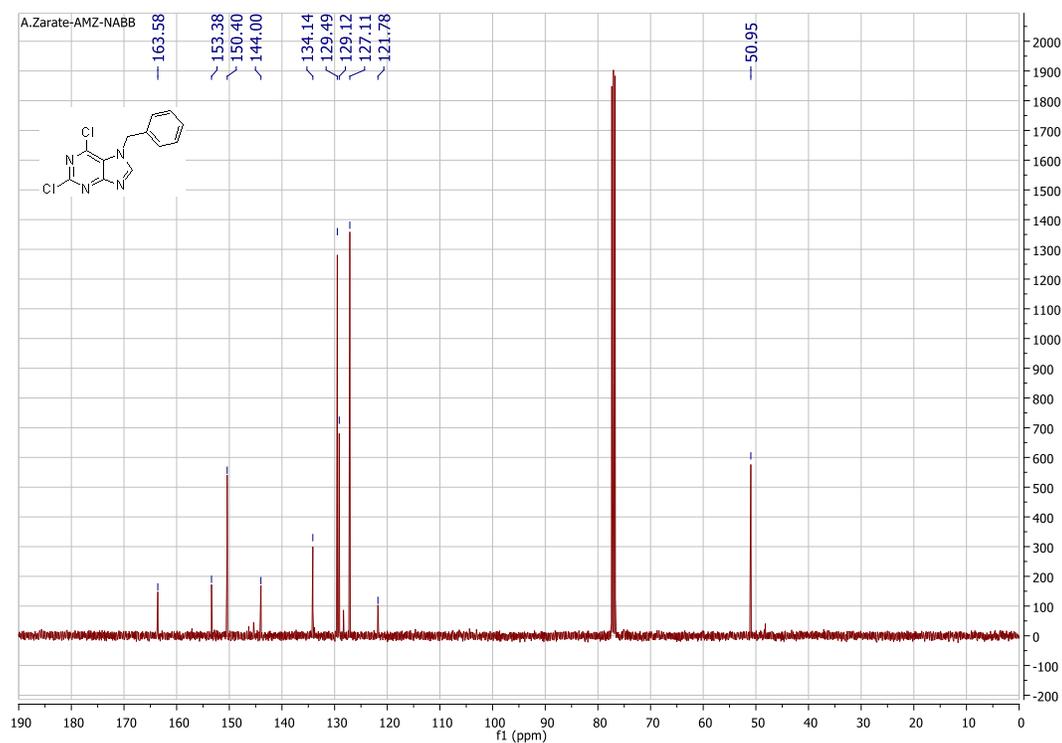
# RMN <sup>13</sup>C 6'b



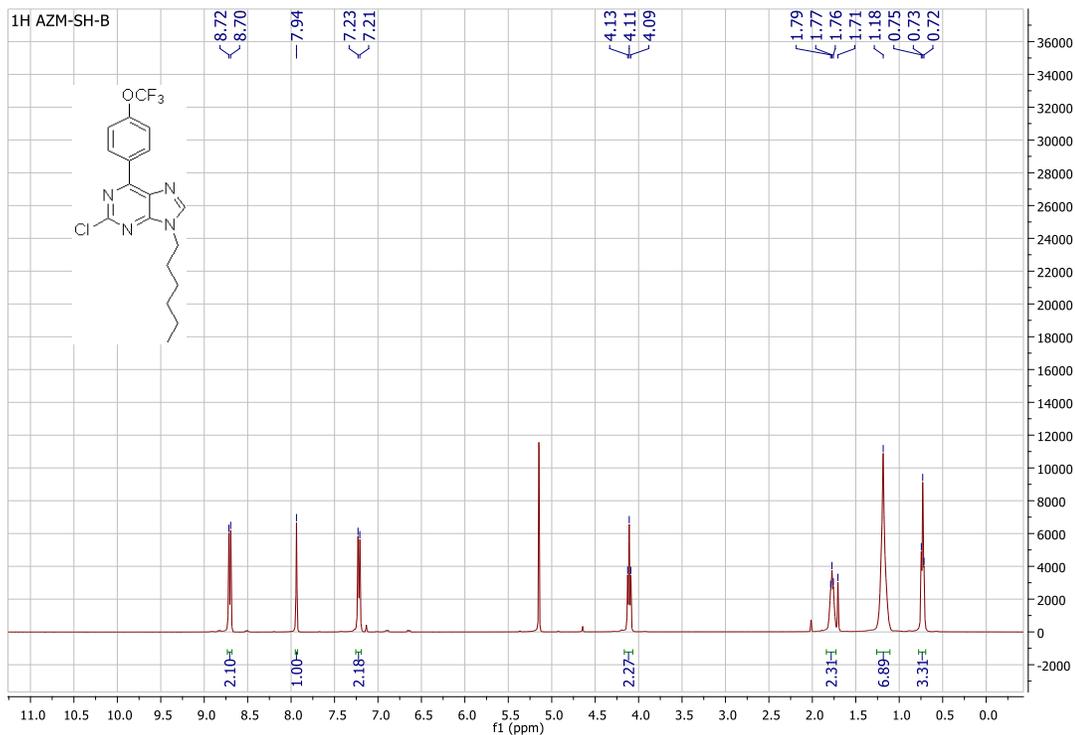
# RMN <sup>1</sup>H 6'c



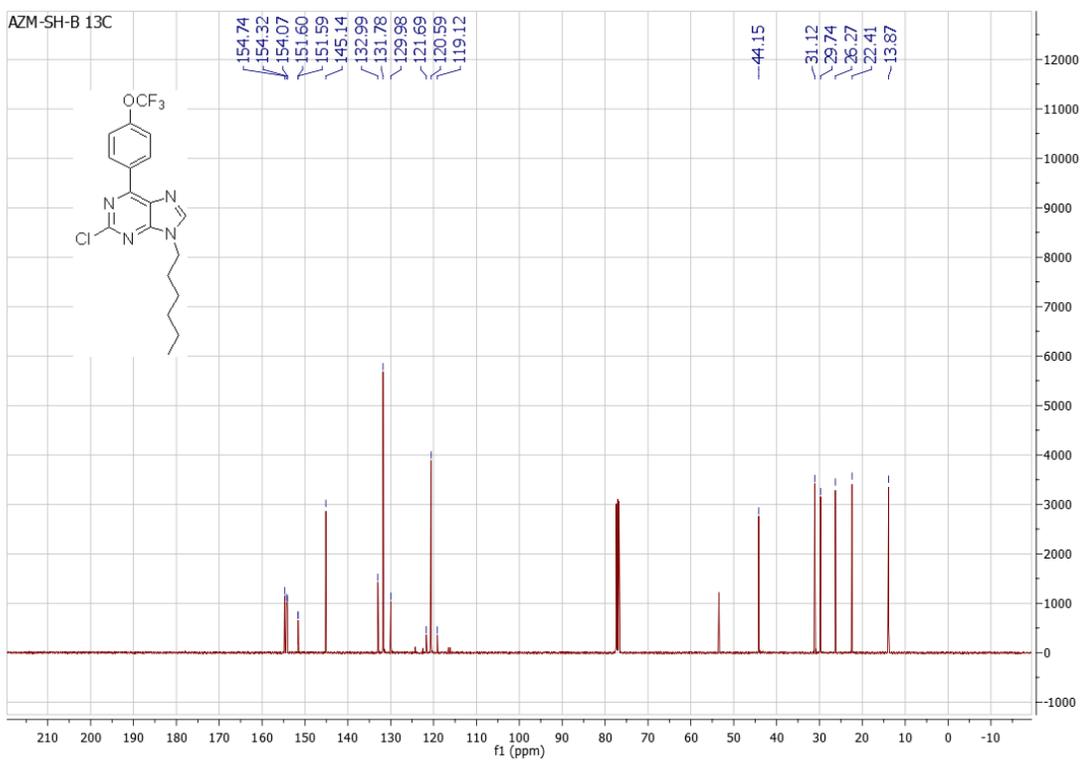
# RMN <sup>13</sup>C 6'c



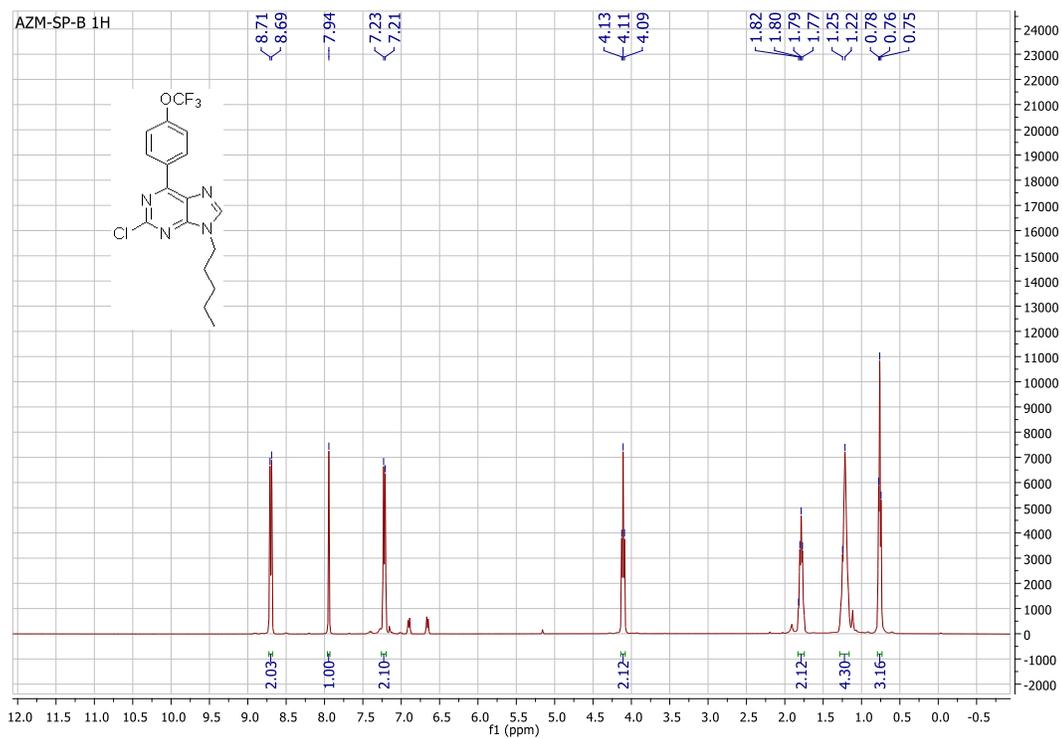
# RMN <sup>1</sup>H 7a



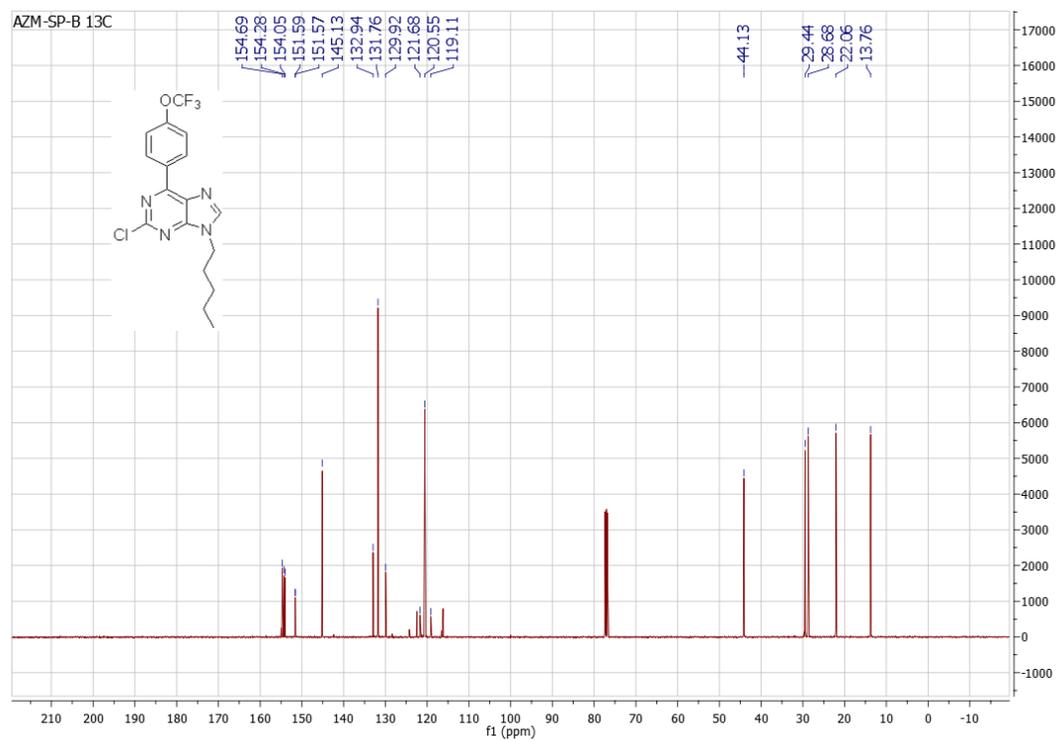
# RMN <sup>13</sup>C 7a



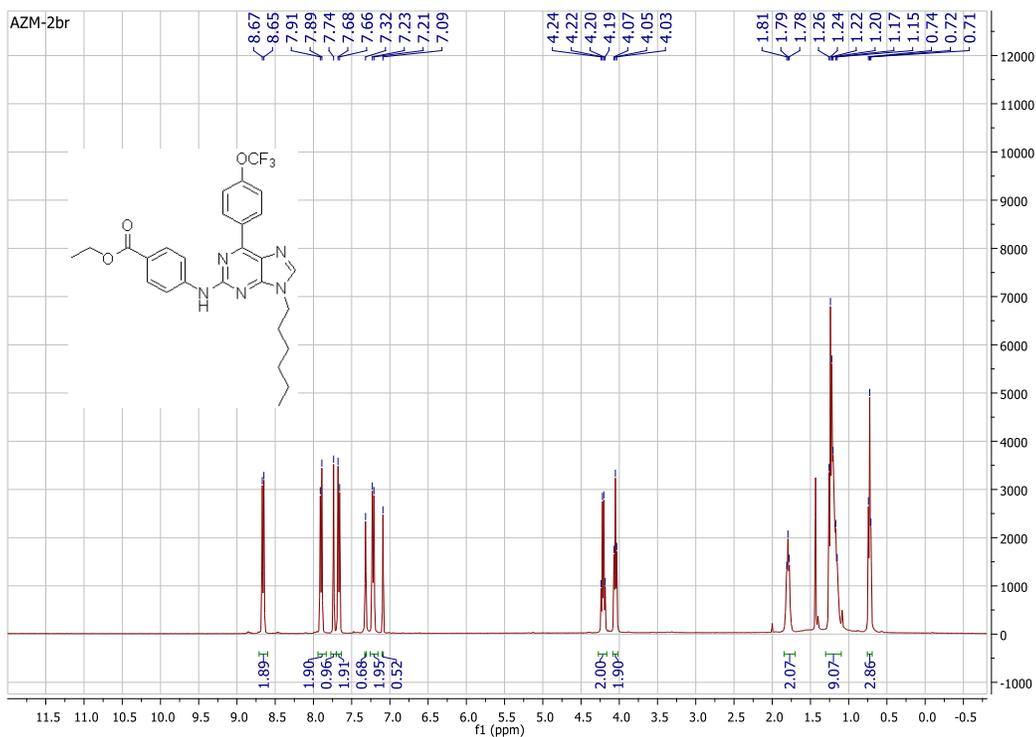
# RMN <sup>1</sup>H 7b



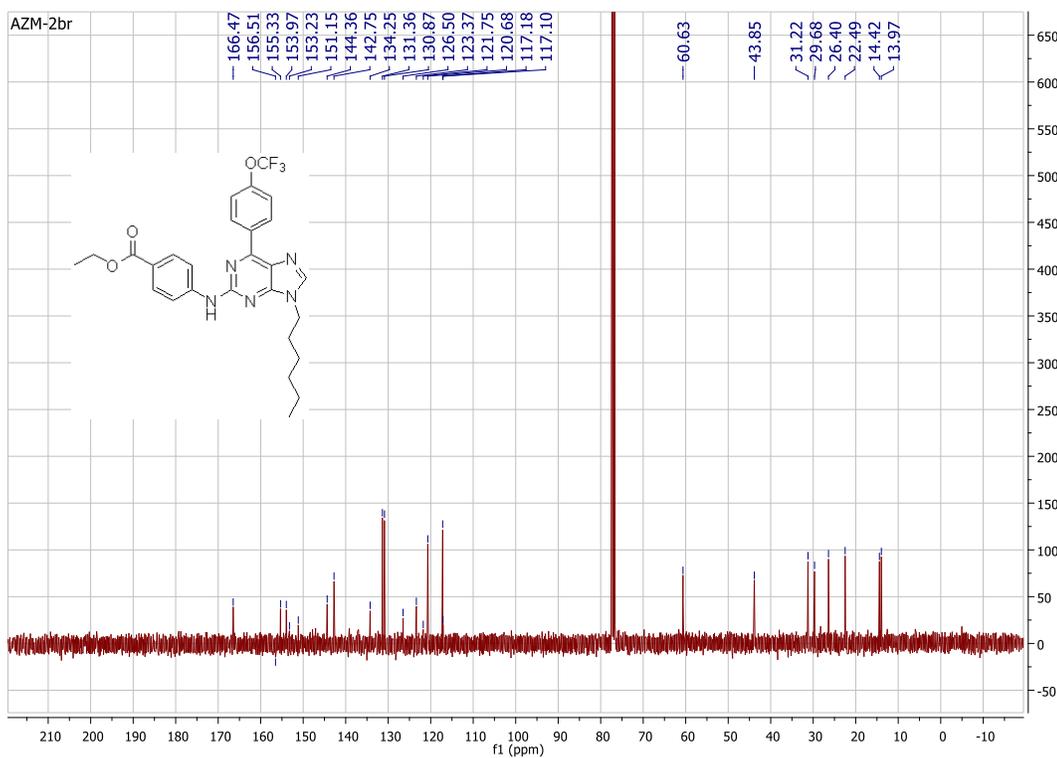
# RMN <sup>13</sup>C 7b



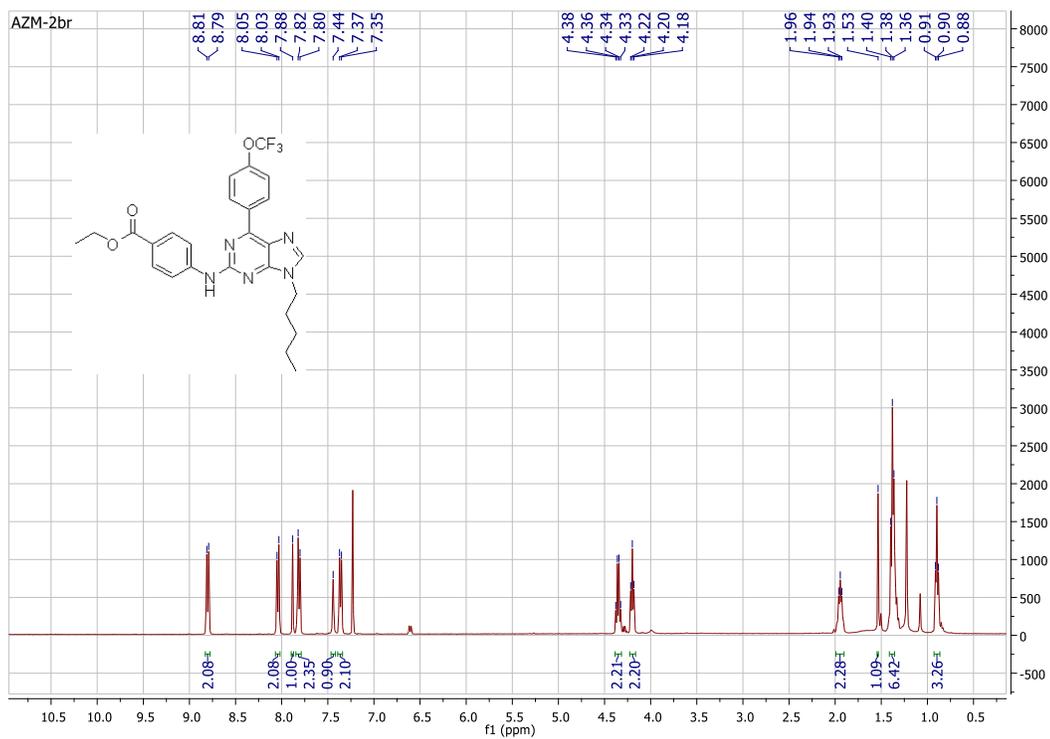
# RMN <sup>1</sup>H 12a



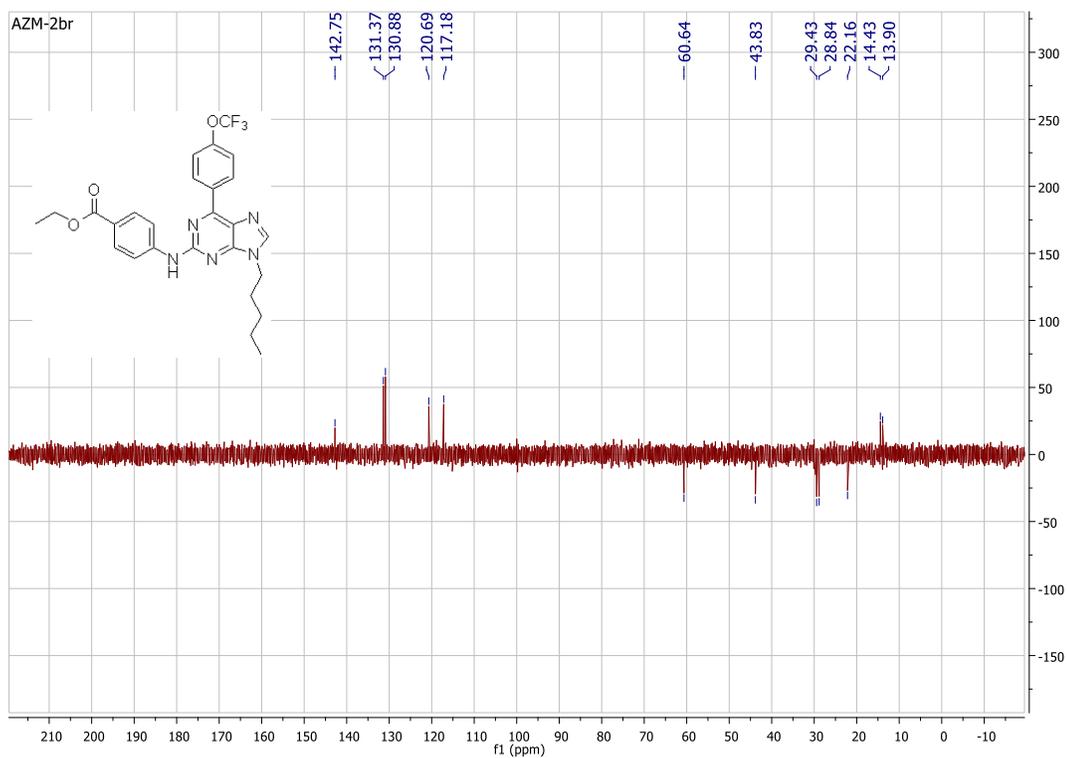
# RMN <sup>13</sup>C 12a



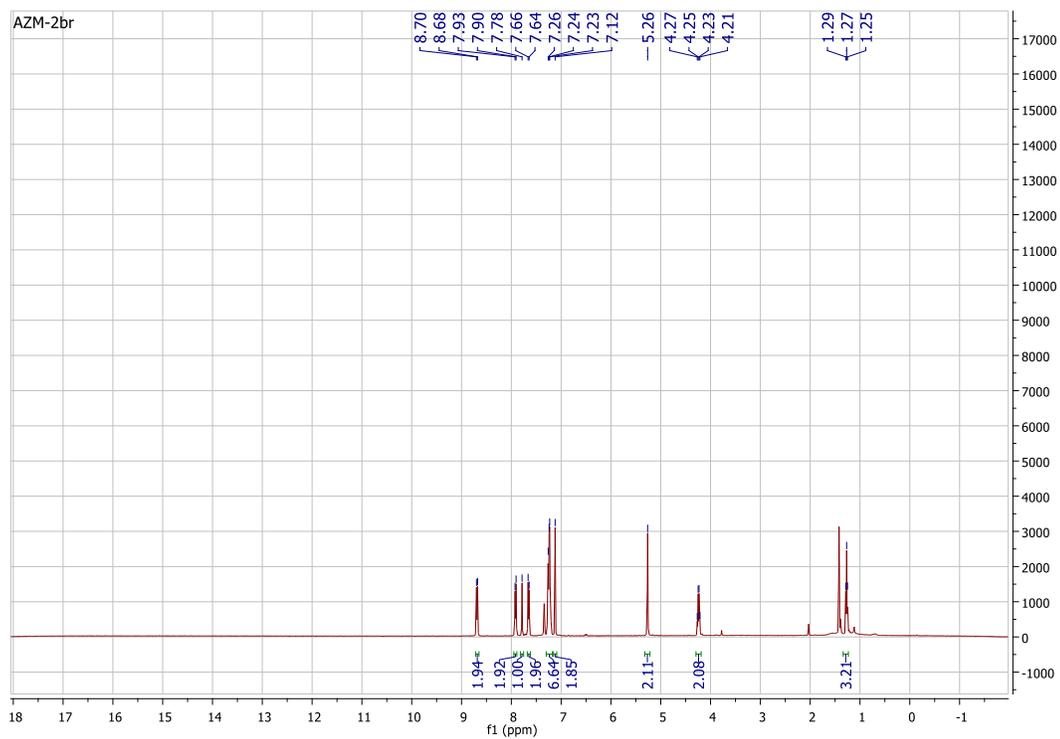
# RMN <sup>1</sup>H 12b



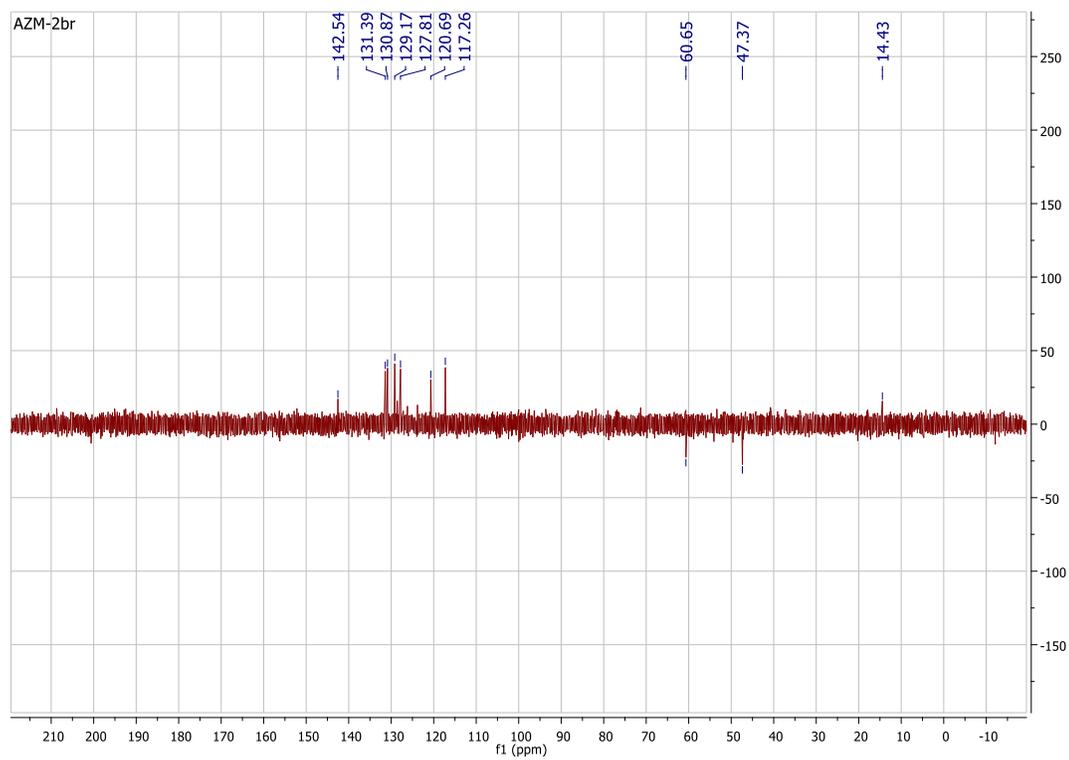
# RMN DEPT 12b



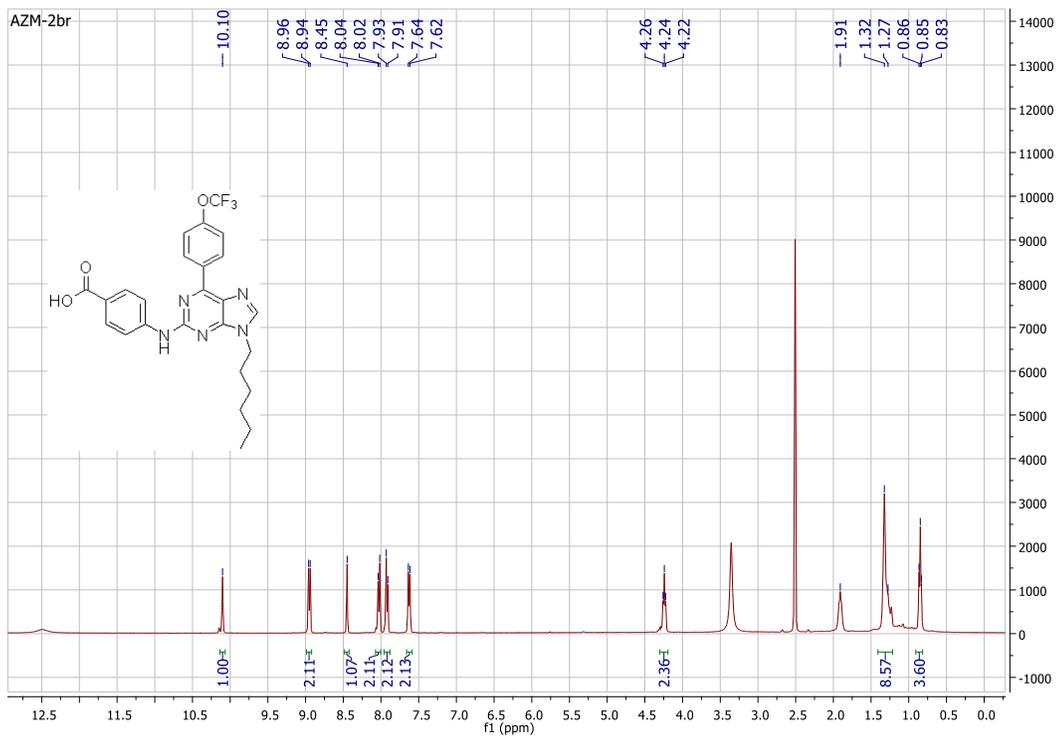
# RMN <sup>1</sup>H 12c



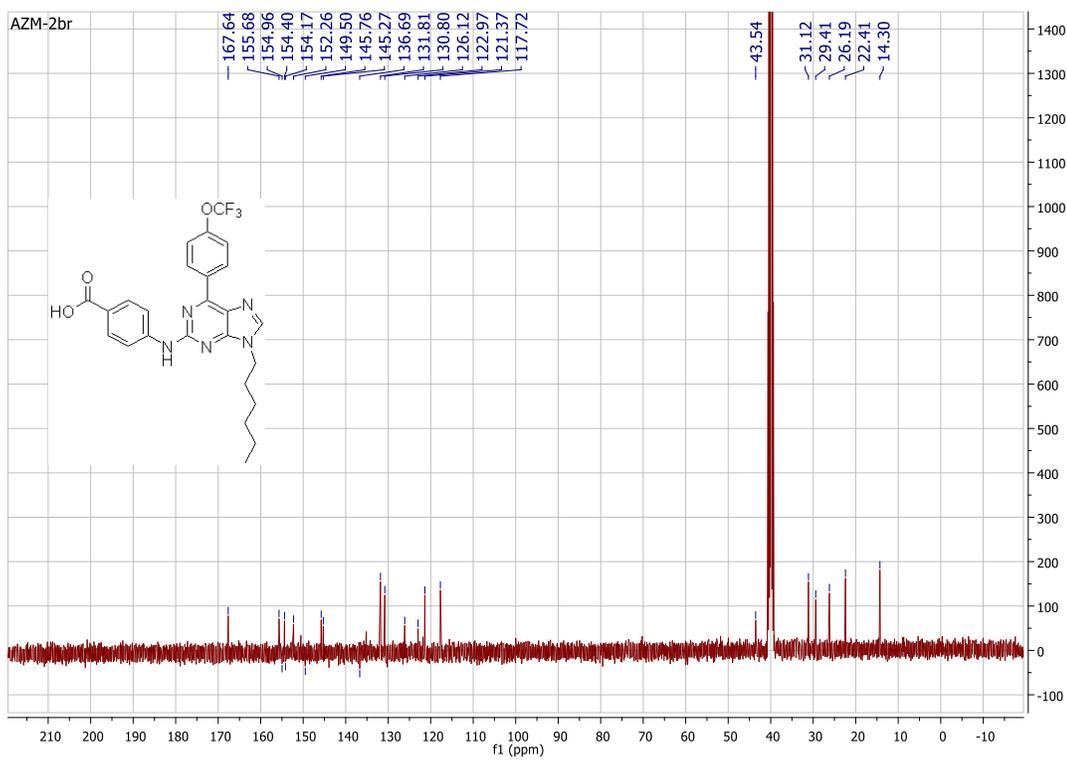
# RMN DEPT 12c



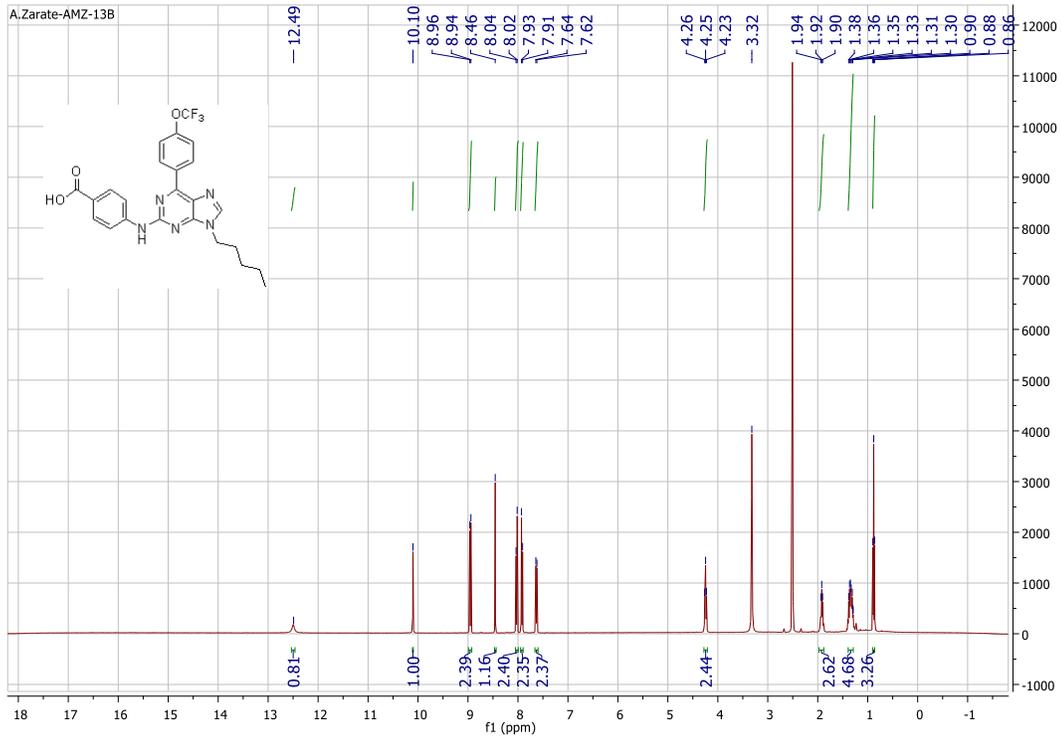
# RMN <sup>1</sup>H 13a



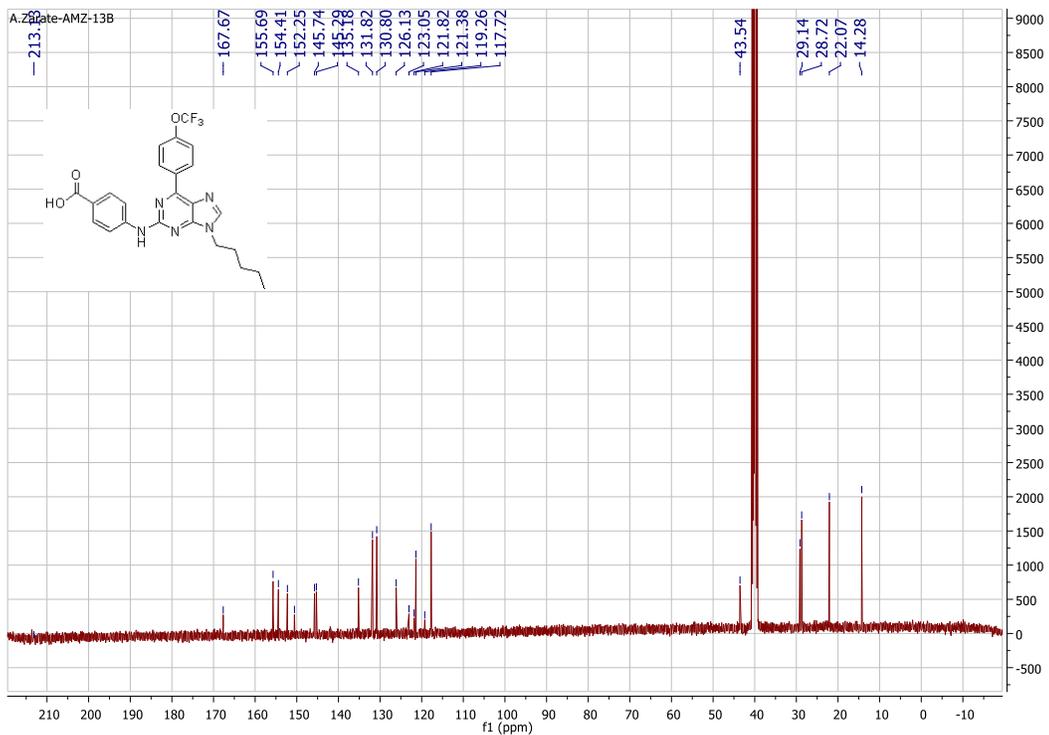
# RMN <sup>13</sup>C 13a



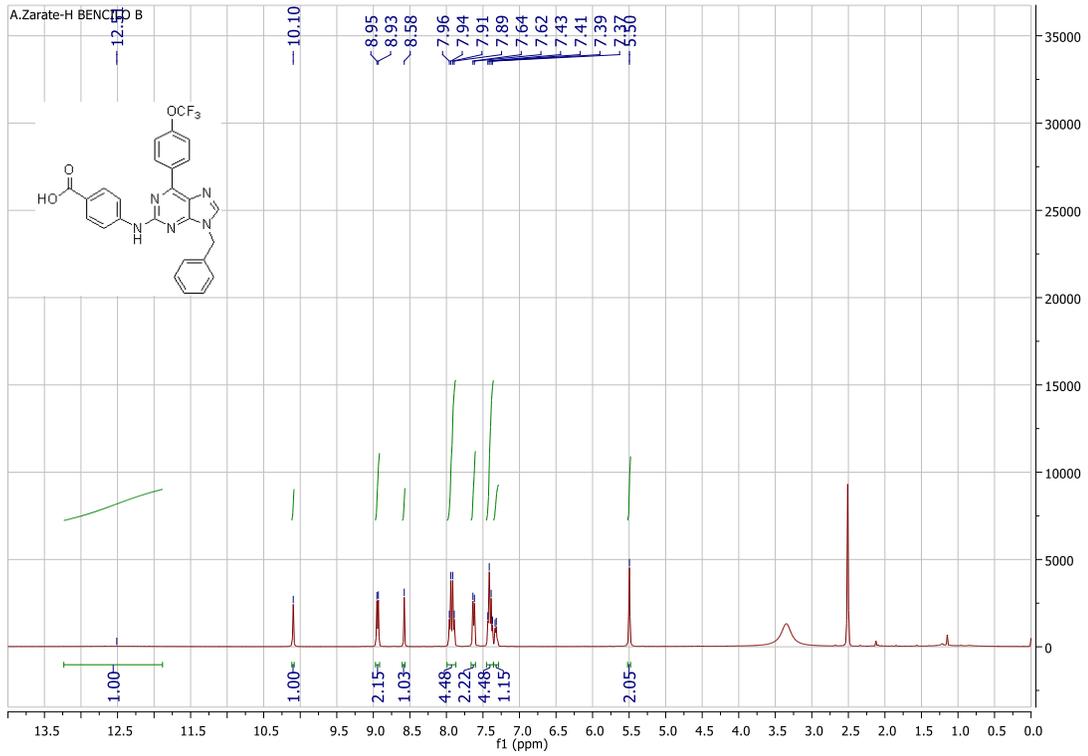
# RMN <sup>1</sup>H 13b



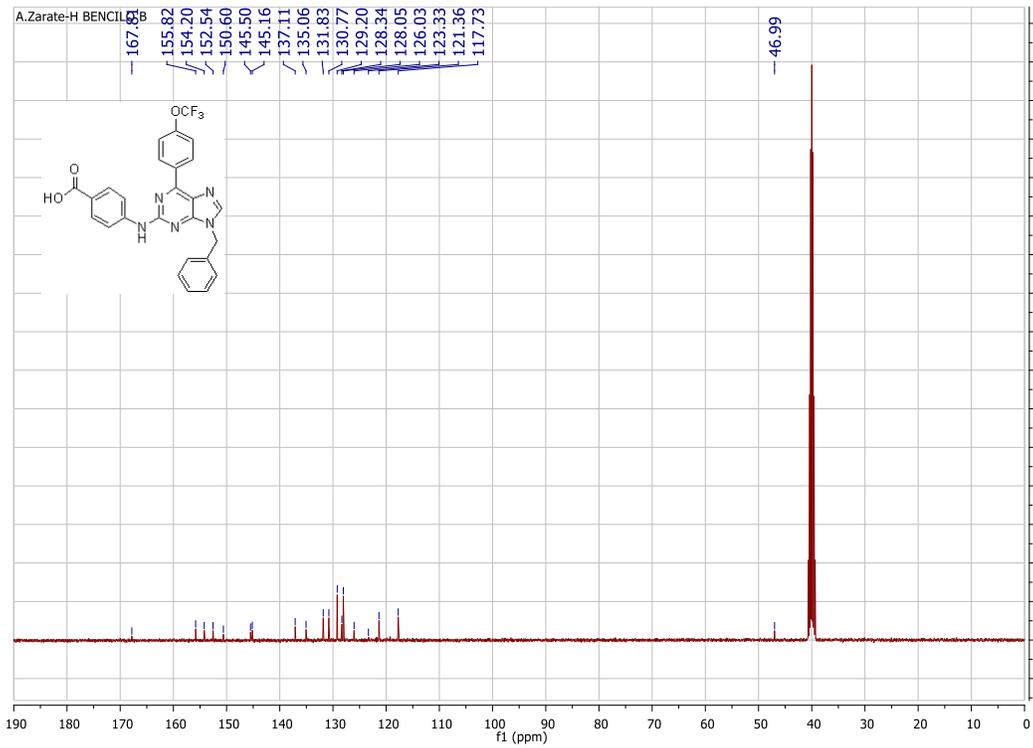
# RMN <sup>13</sup>C 13b



# RMN <sup>1</sup>H 13c

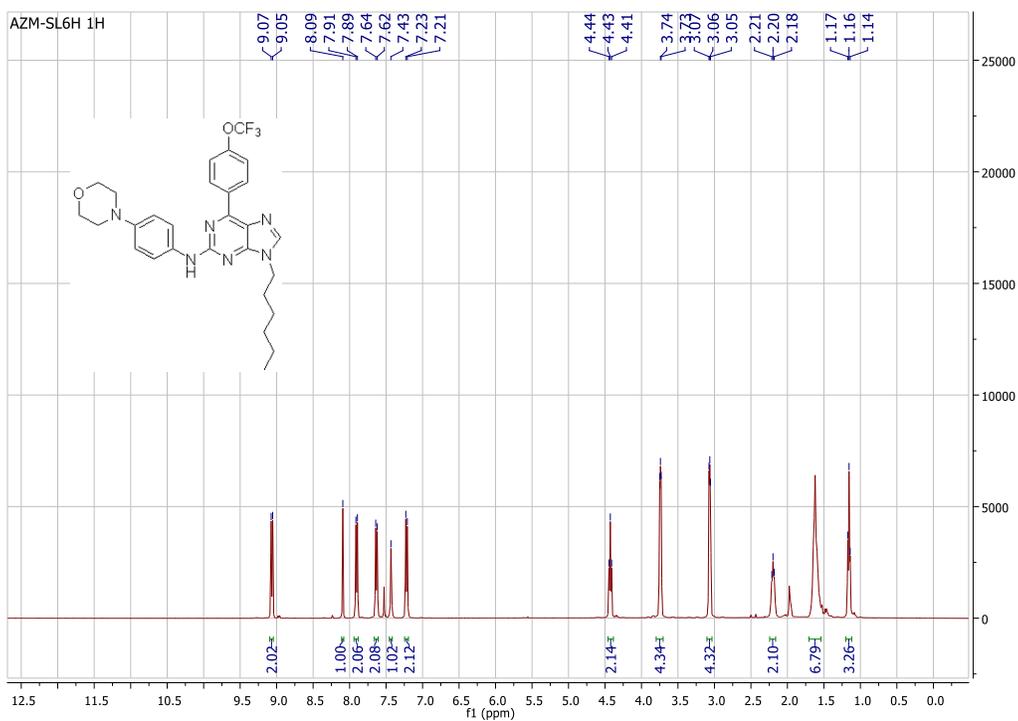


# RMN <sup>13</sup>C 13c

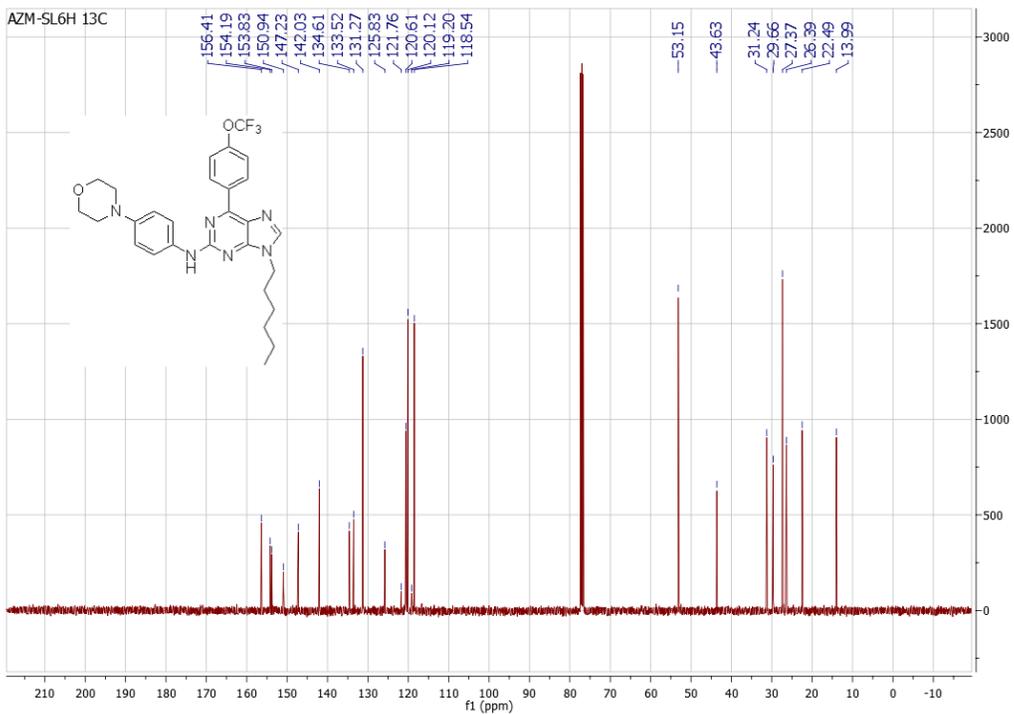


### 8.3.4 productos finales serie II: 11a-0

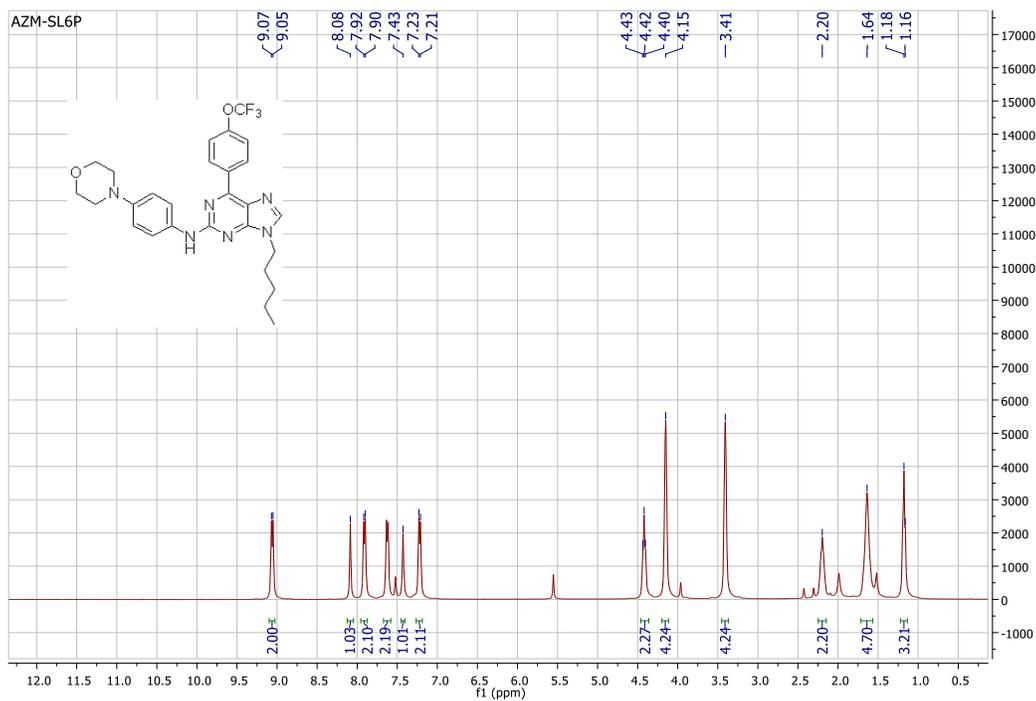
#### RMN <sup>1</sup>H 11a



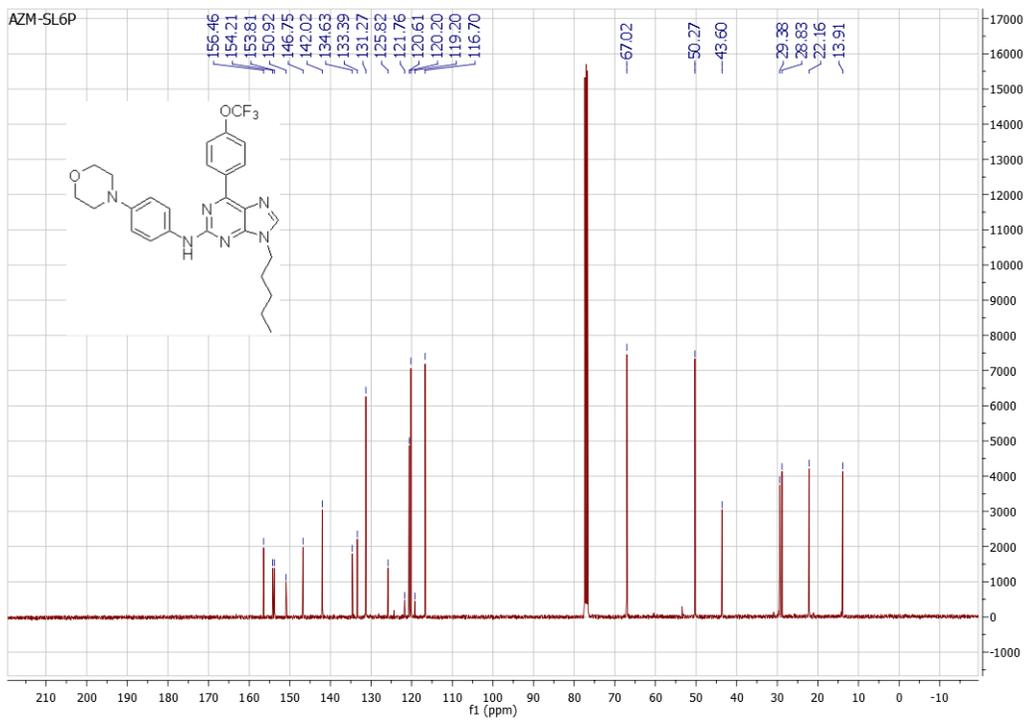
#### RMN <sup>13</sup>C 11a



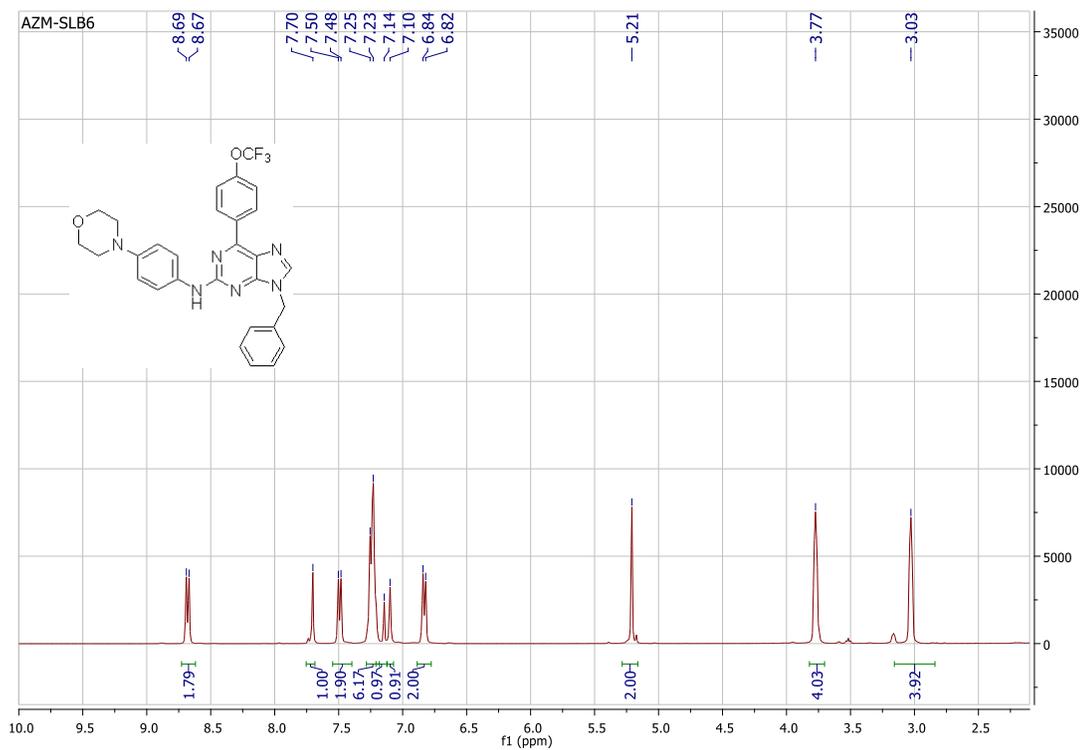
# RMN <sup>1</sup>H 11b



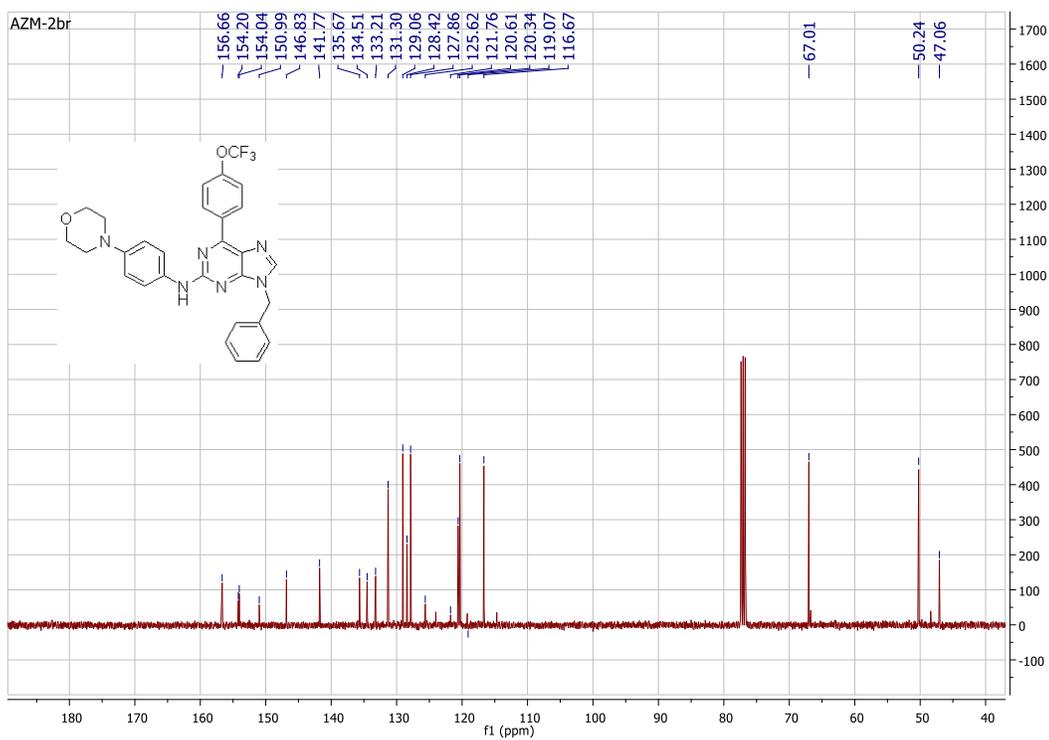
# RMN <sup>13</sup>C 11b



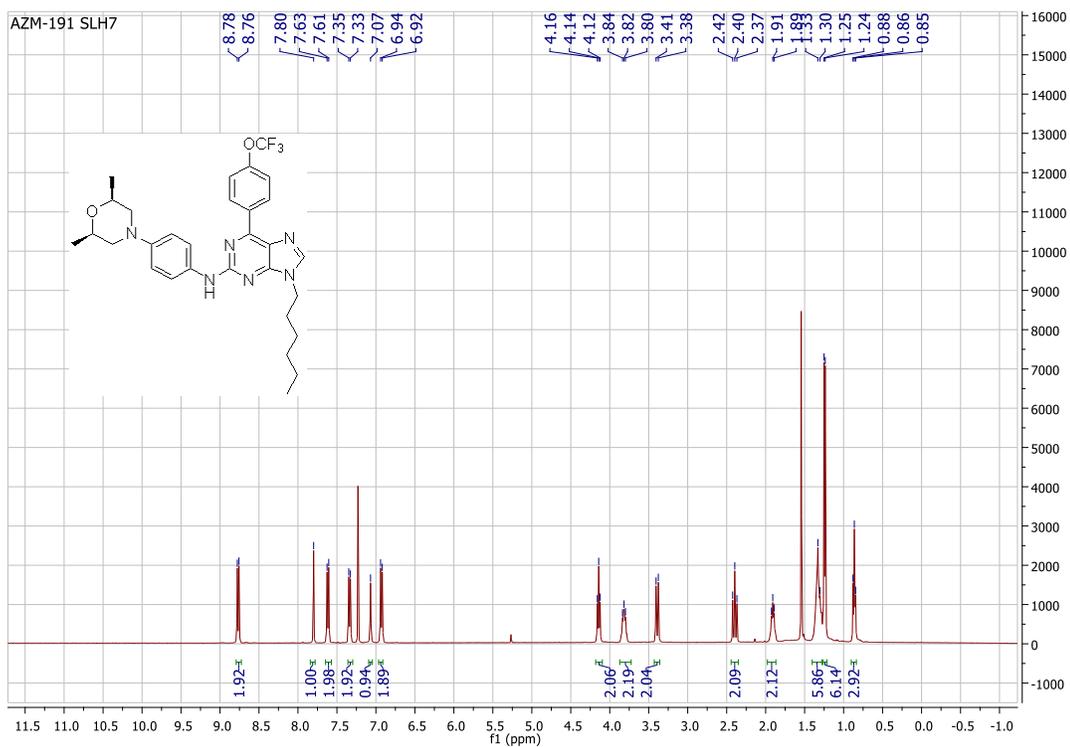
# RMN <sup>1</sup>H 11c



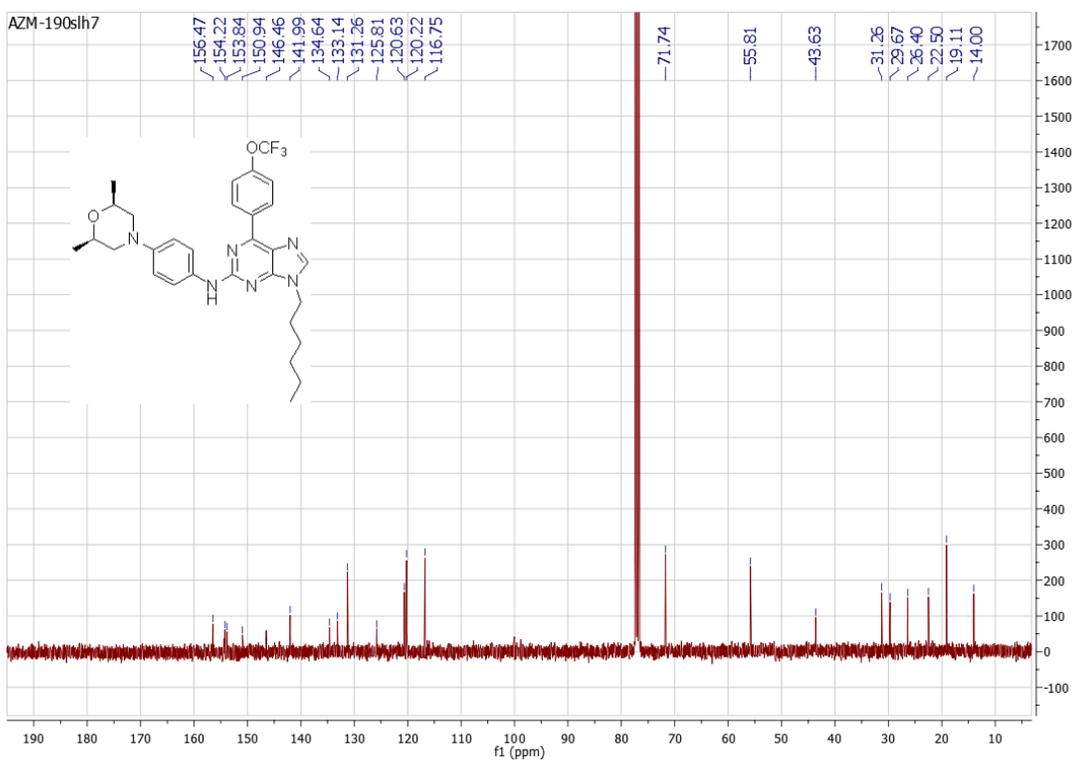
# RMN <sup>13</sup>C 11c



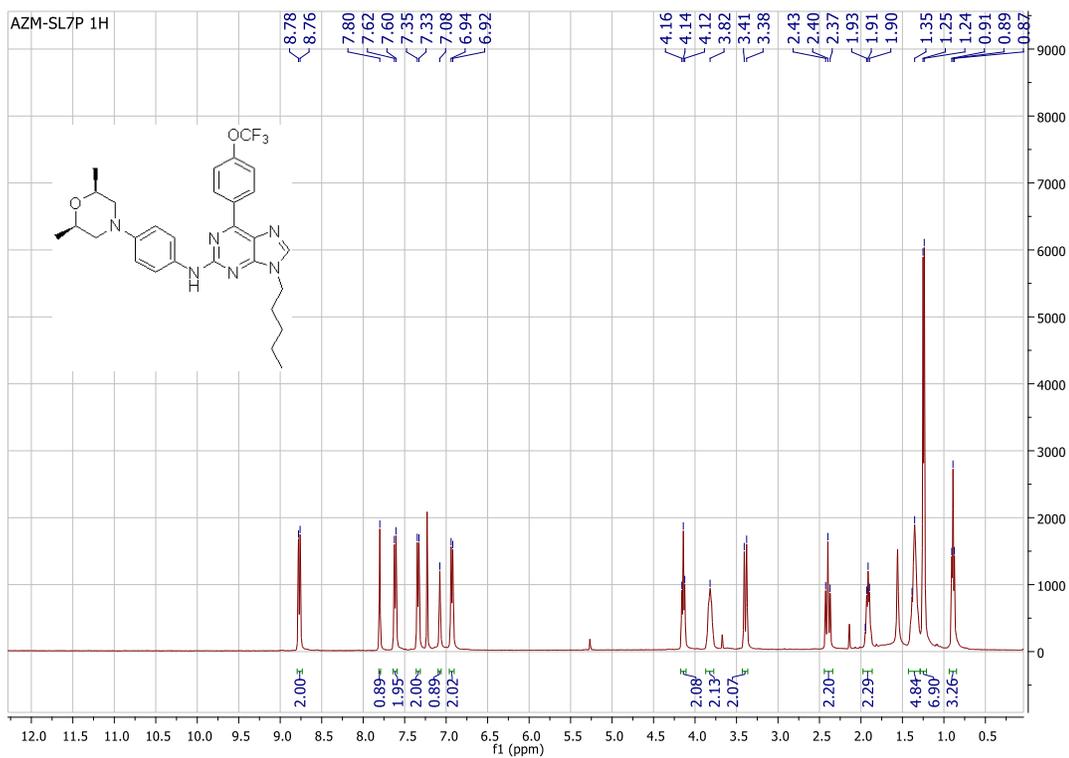
# RMN <sup>1</sup>H 11d



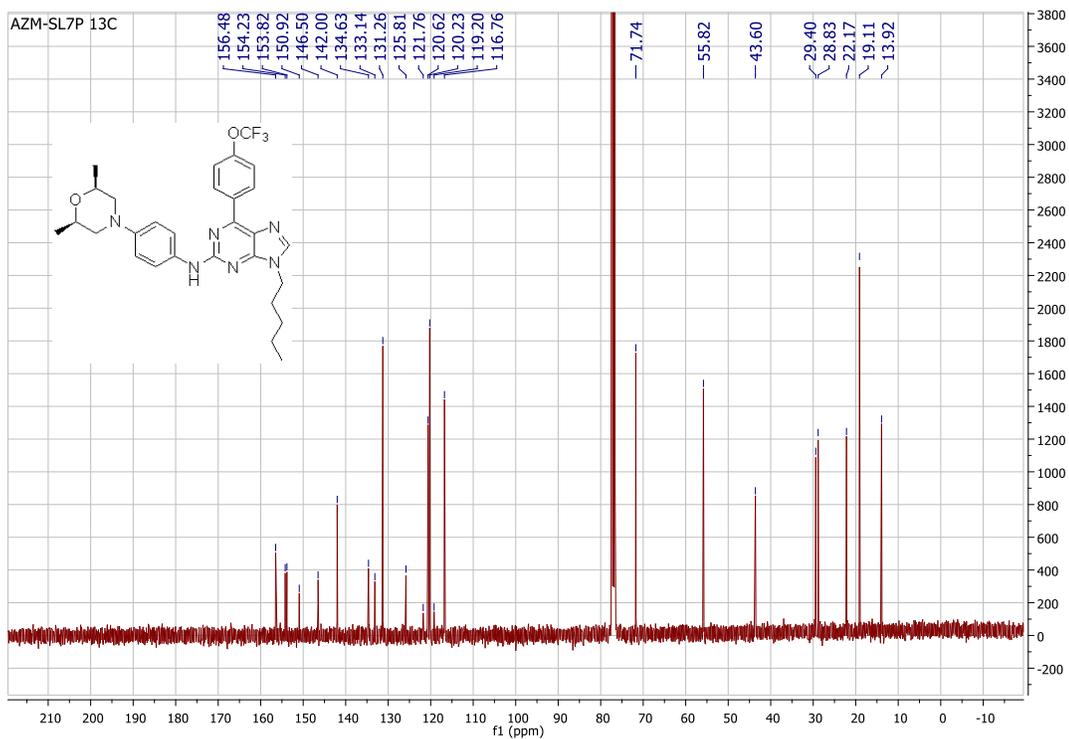
# RMN <sup>13</sup>C 11d



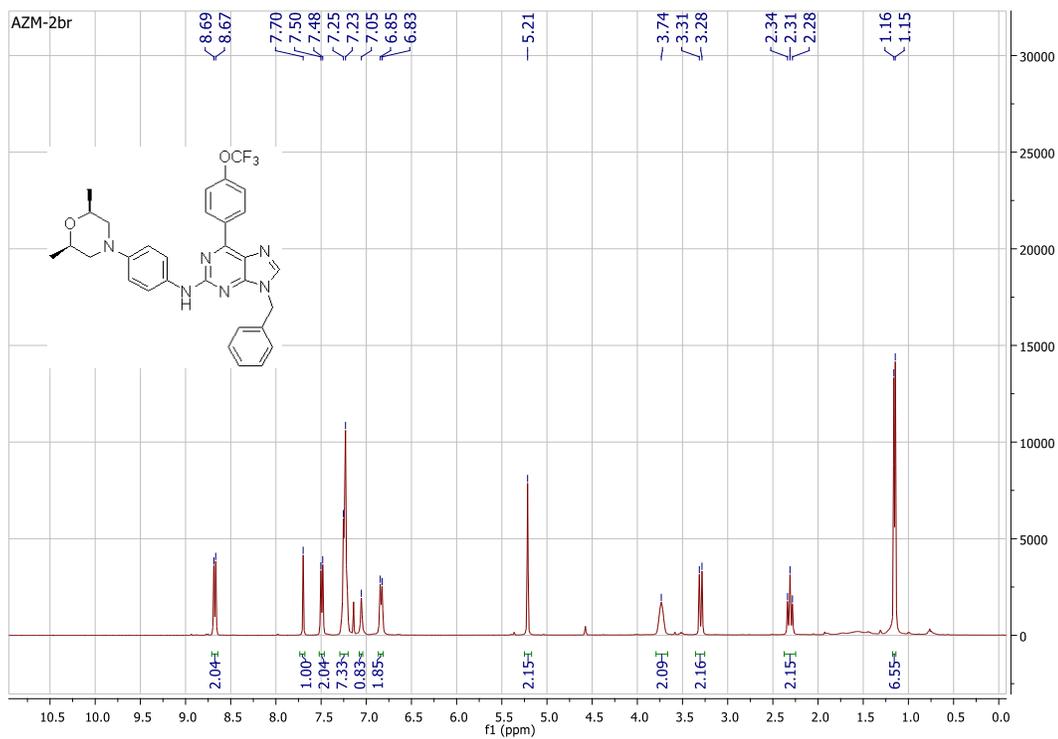
# RMN <sup>1</sup>H 11e



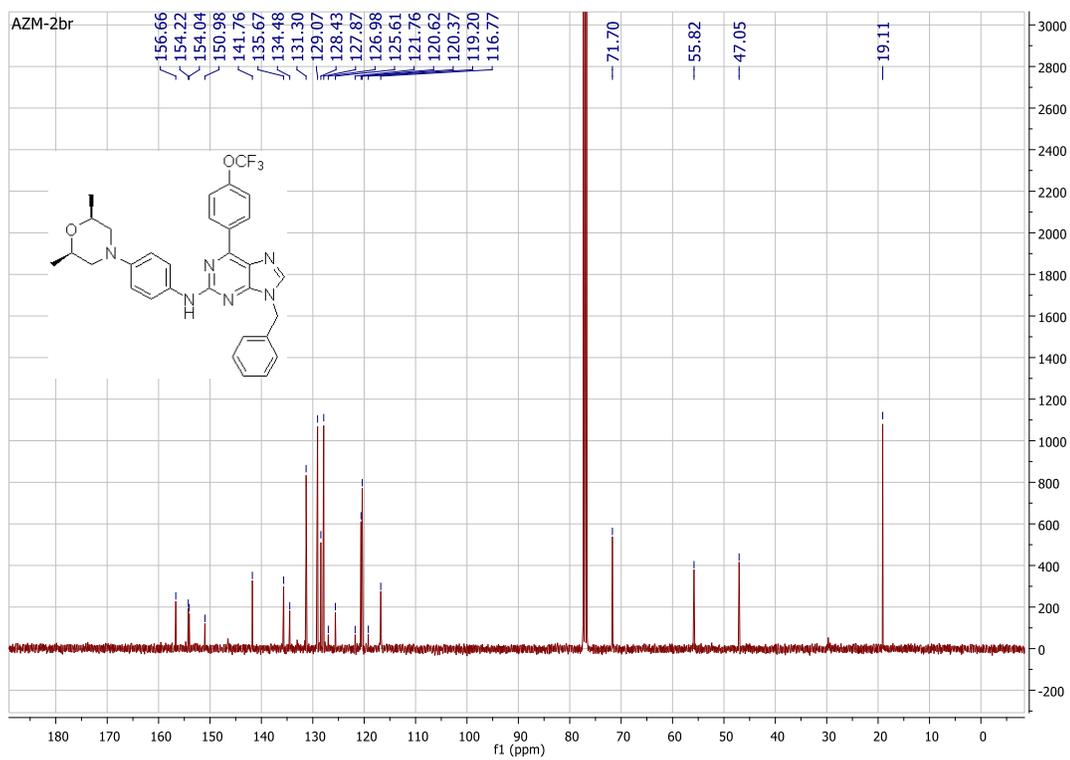
# RMN <sup>13</sup>C 11e



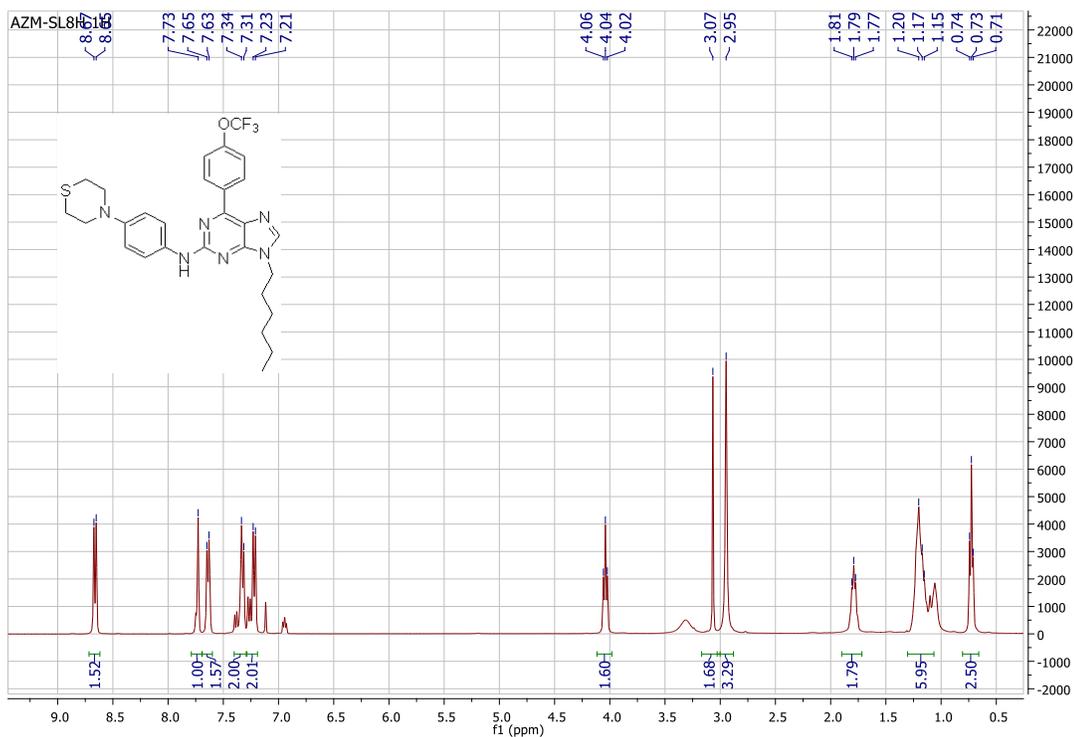
# RMN <sup>1</sup>H 11f



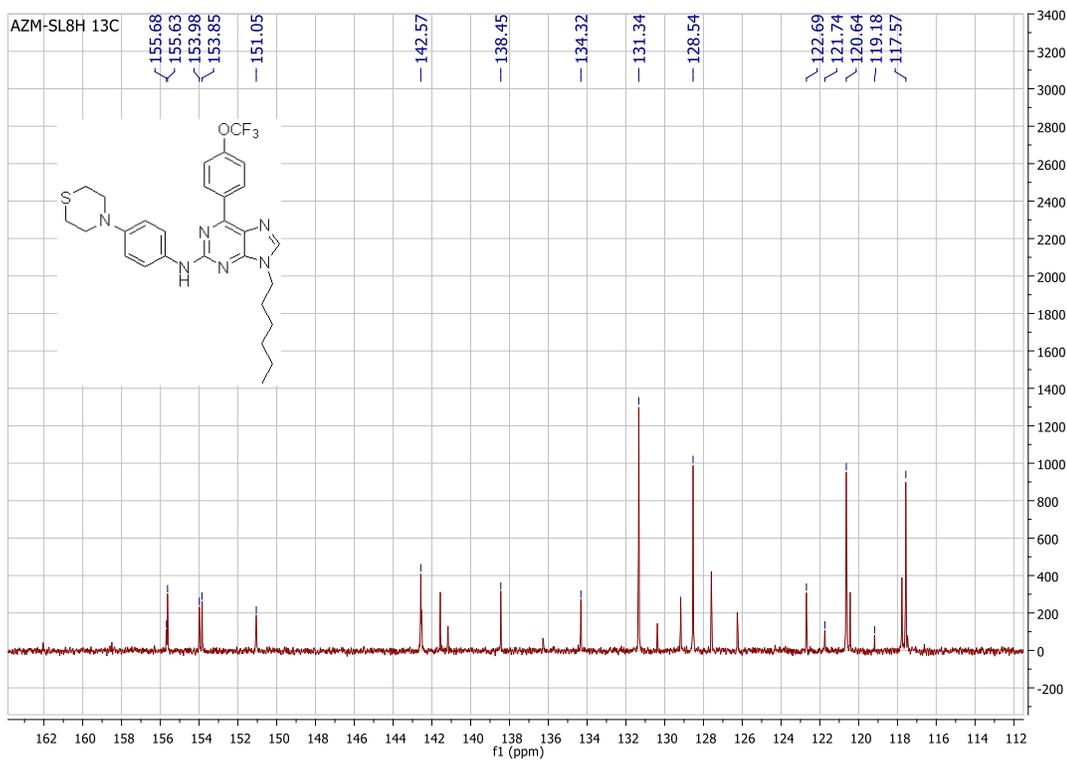
# RMN <sup>13</sup>C 11f



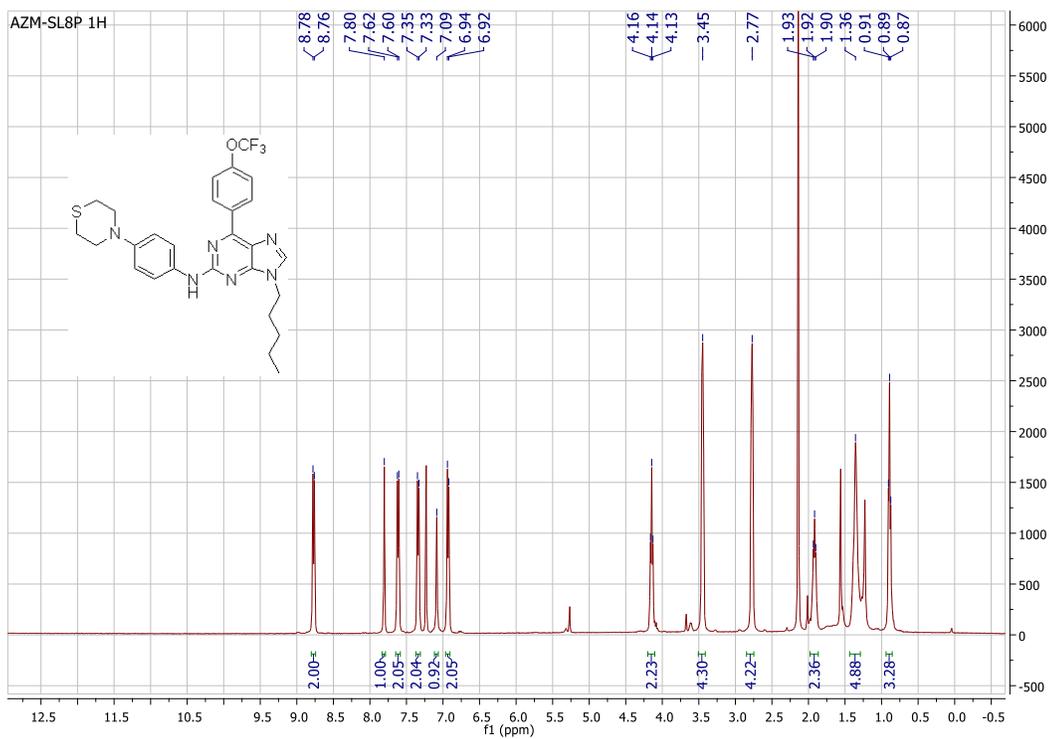
# RMN <sup>1</sup>H 11g



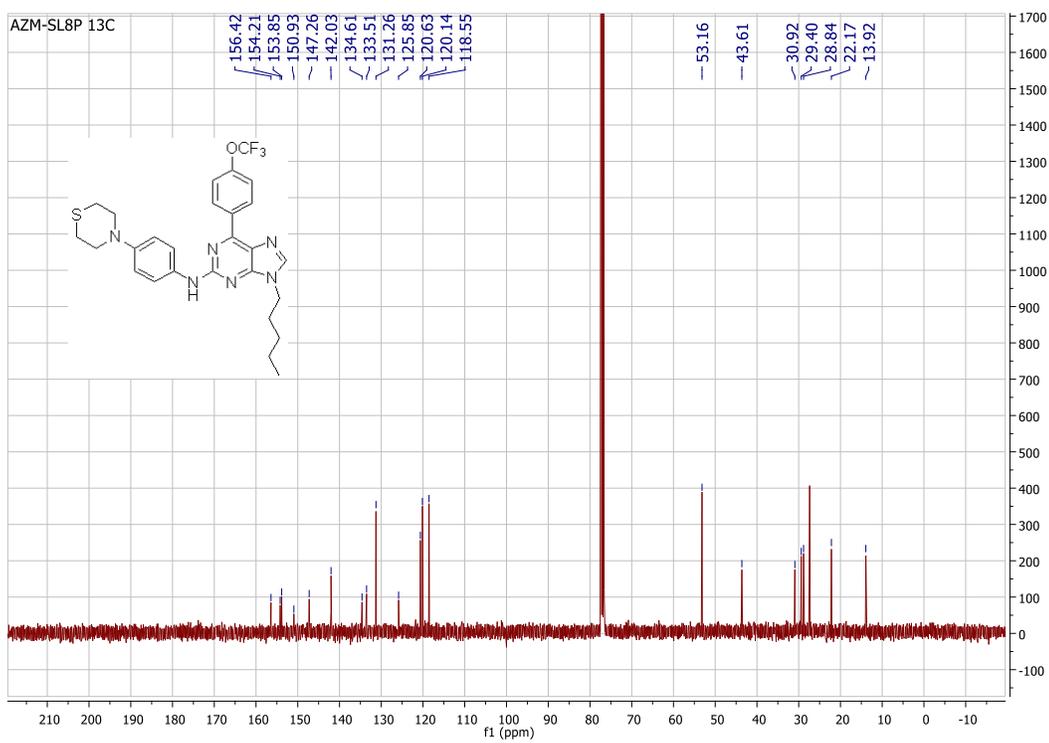
# RMN <sup>13</sup>C 11g



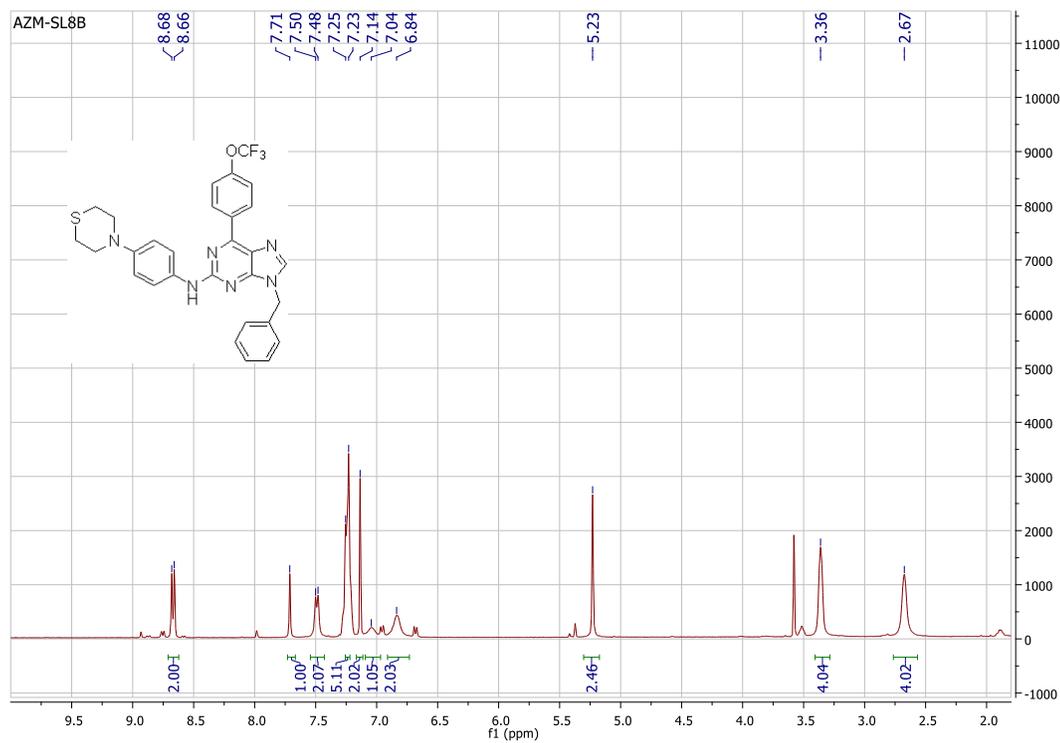
# RMN <sup>1</sup>H 11h



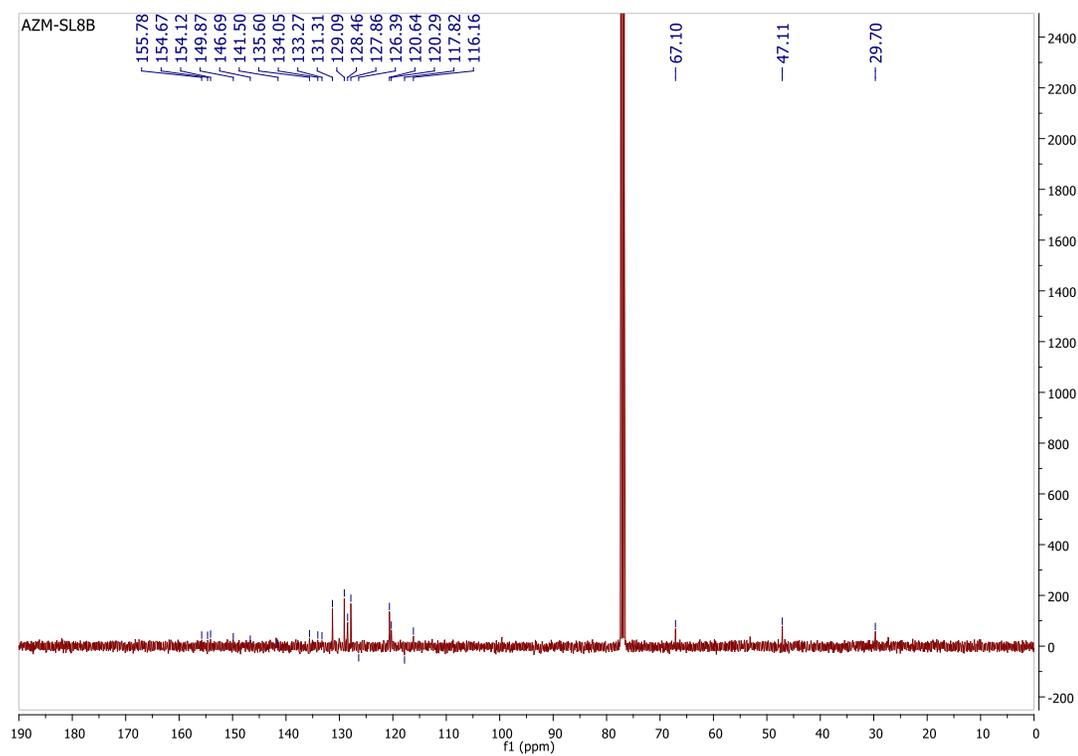
# RMN <sup>13</sup>C 11h



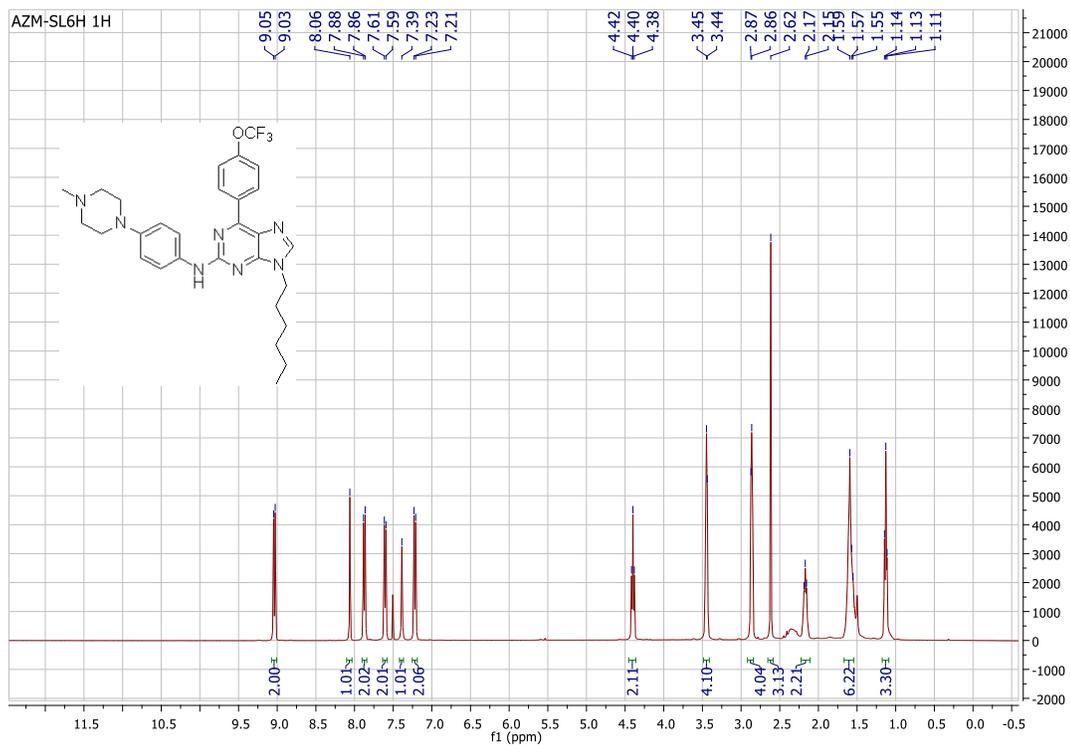
# RMN <sup>1</sup>H 11i



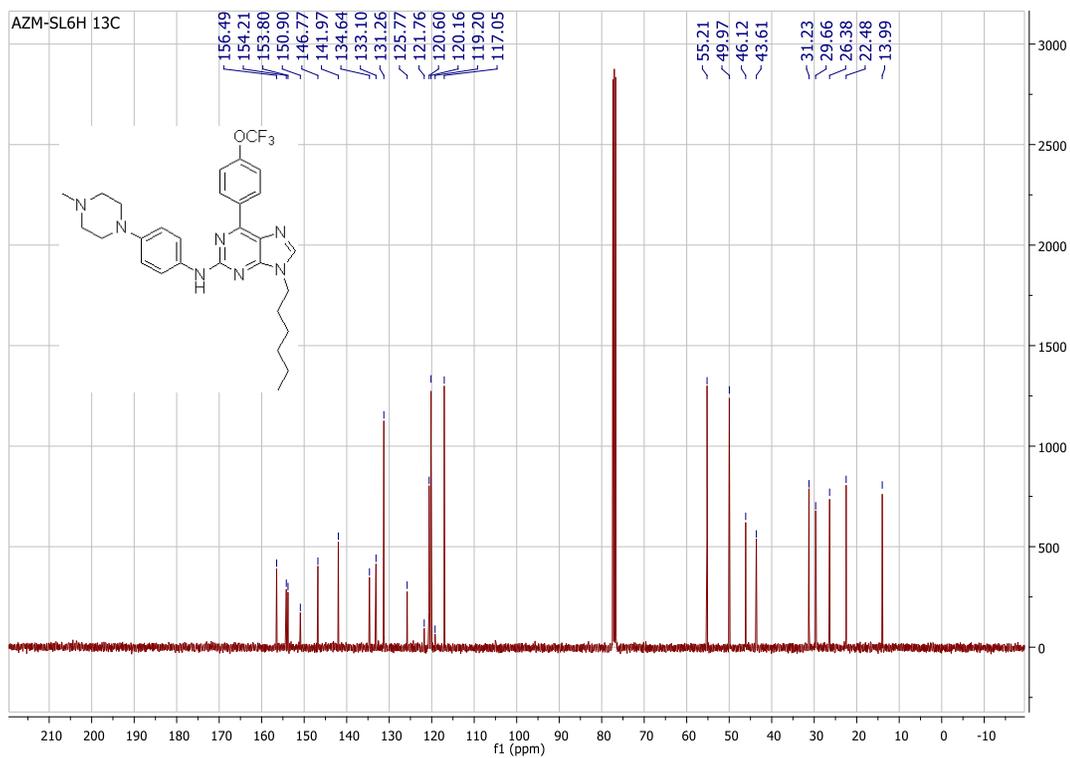
# RMN <sup>13</sup>C 11i



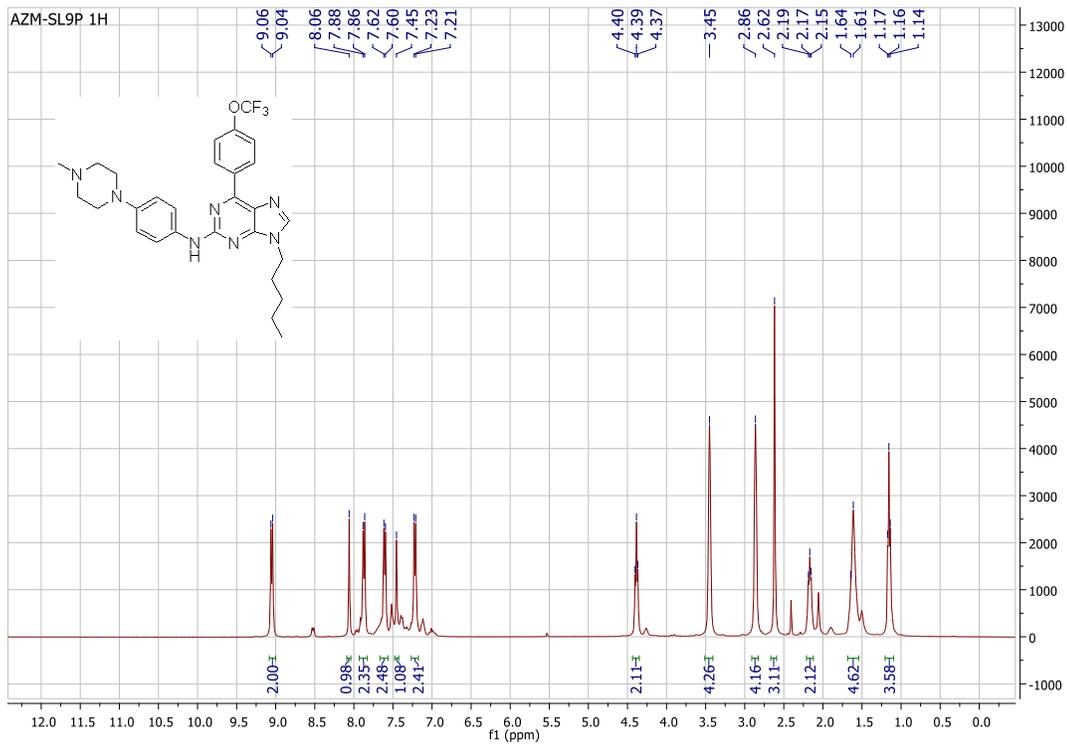
## RMN <sup>1</sup>H 11j



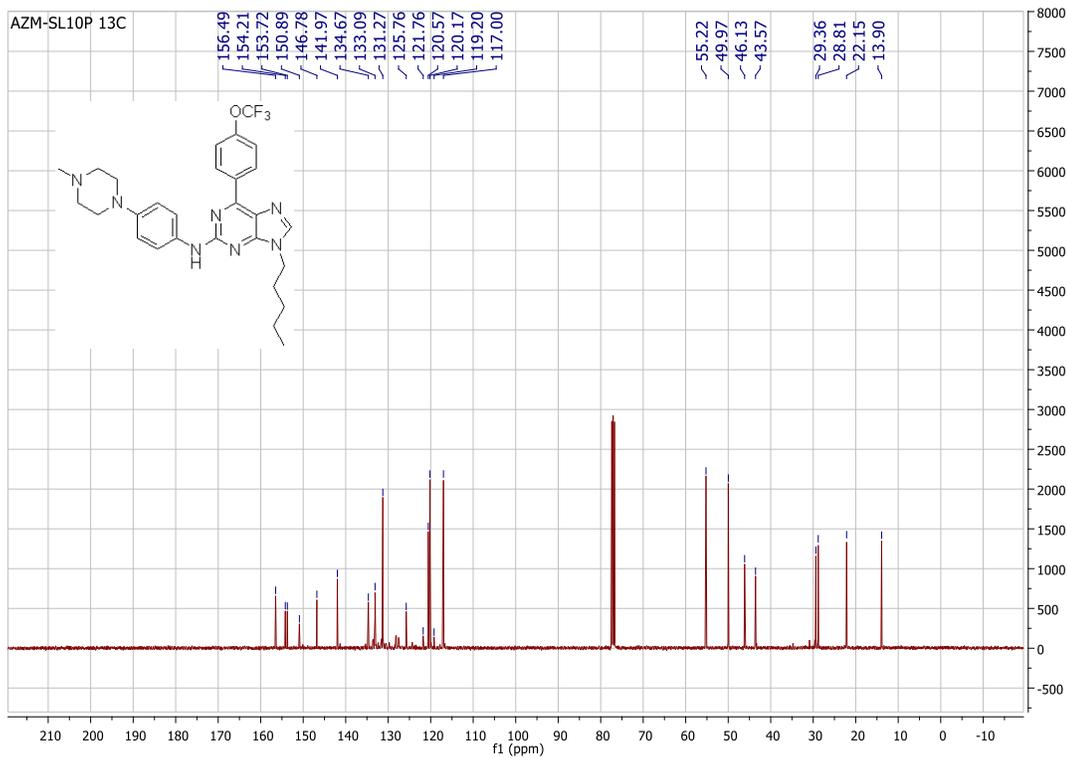
## RMN <sup>13</sup>C 11j



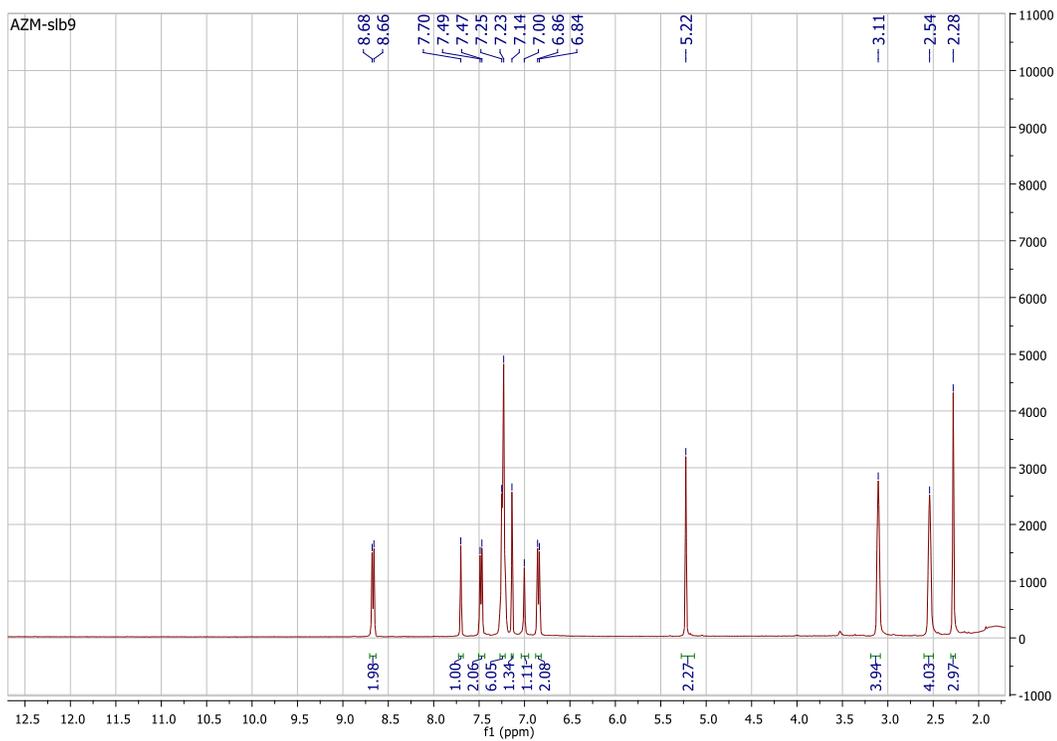
# RMN <sup>1</sup>H 11k



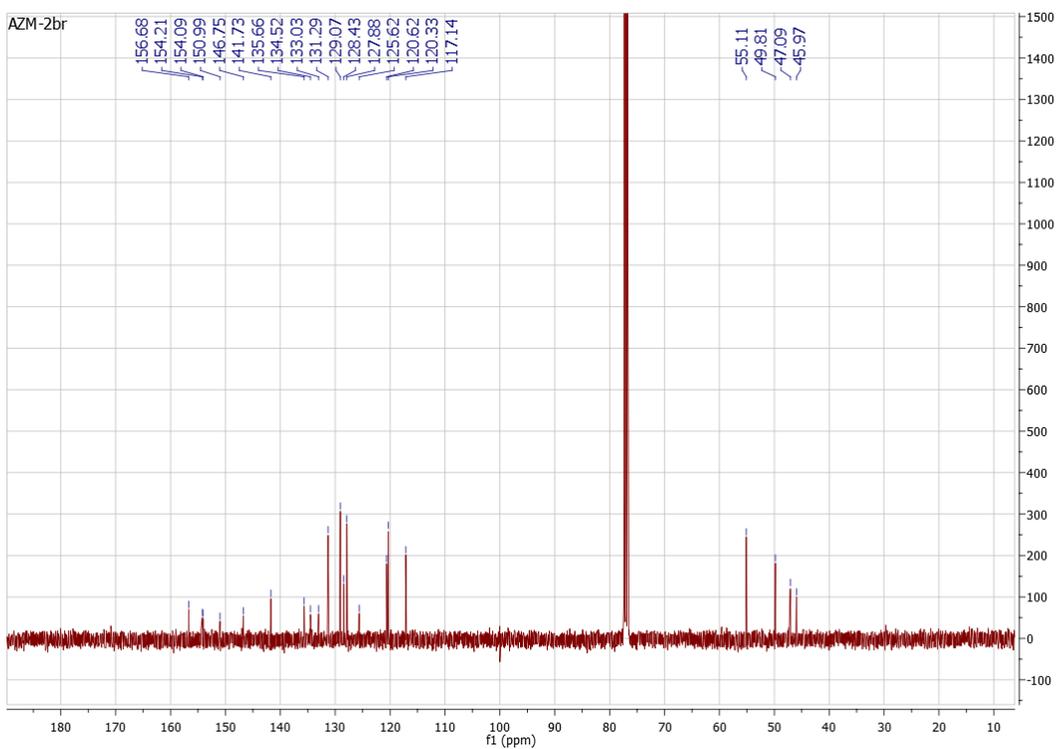
# RMN <sup>13</sup>C 11k



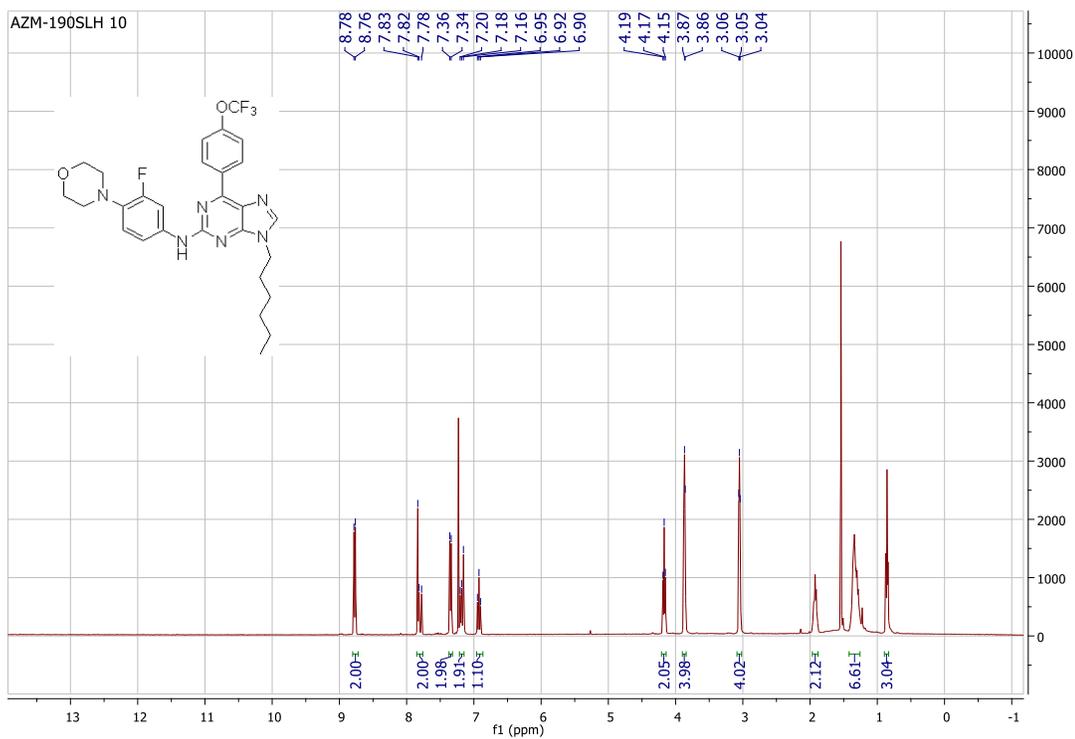
# RMN <sup>1</sup>H 111



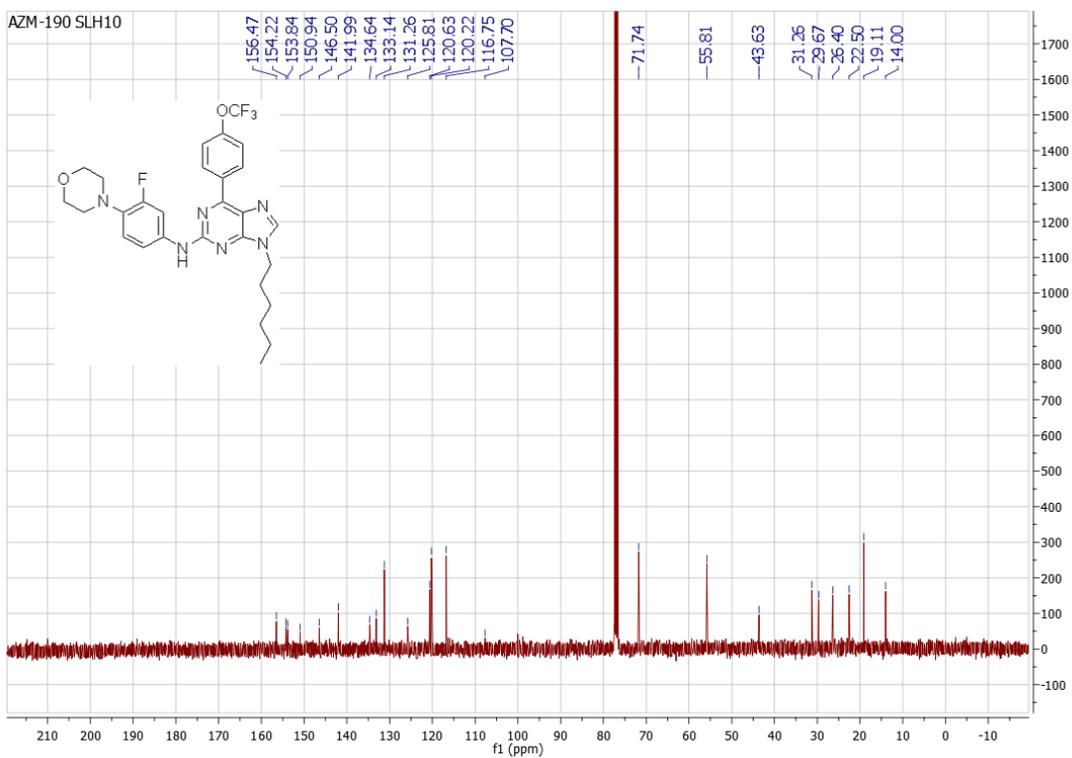
# RMN <sup>13</sup>C 111



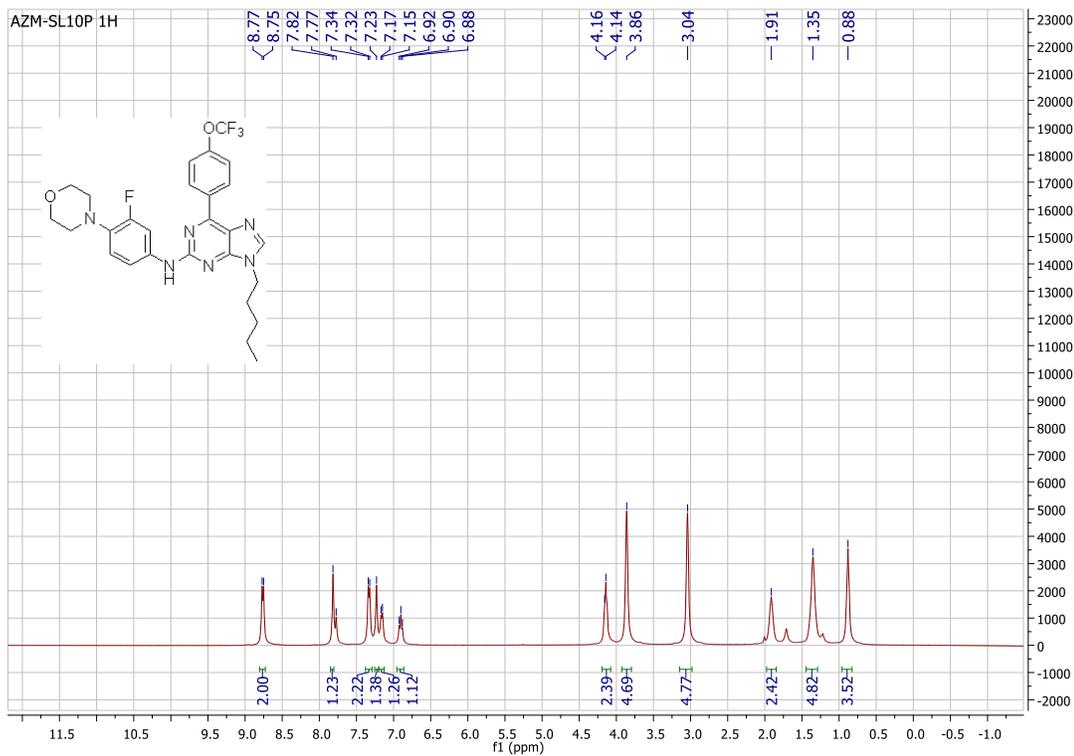
# RMN <sup>1</sup>H 11m



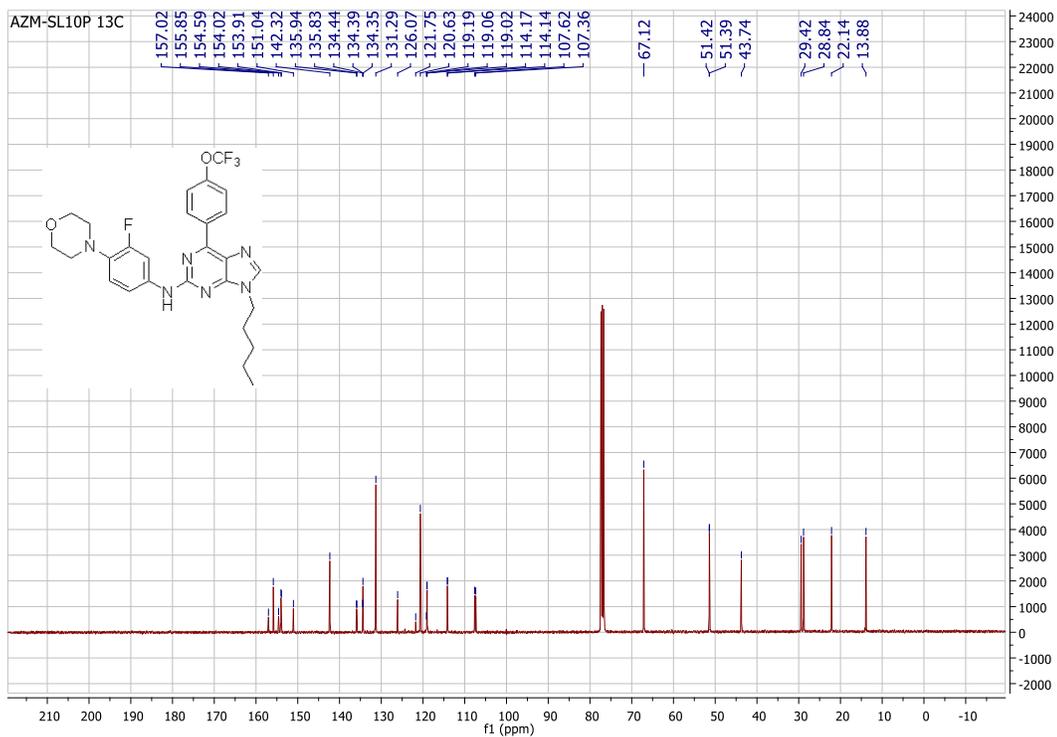
# RMN <sup>13</sup>C 11m



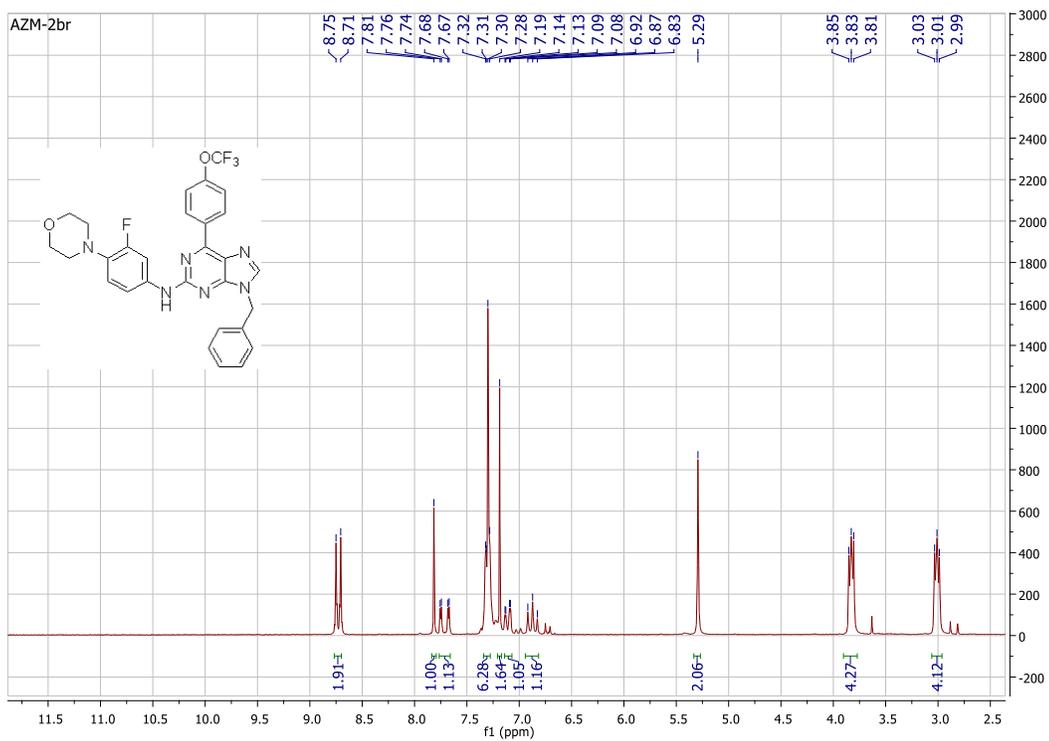
# RMN <sup>1</sup>H 11n



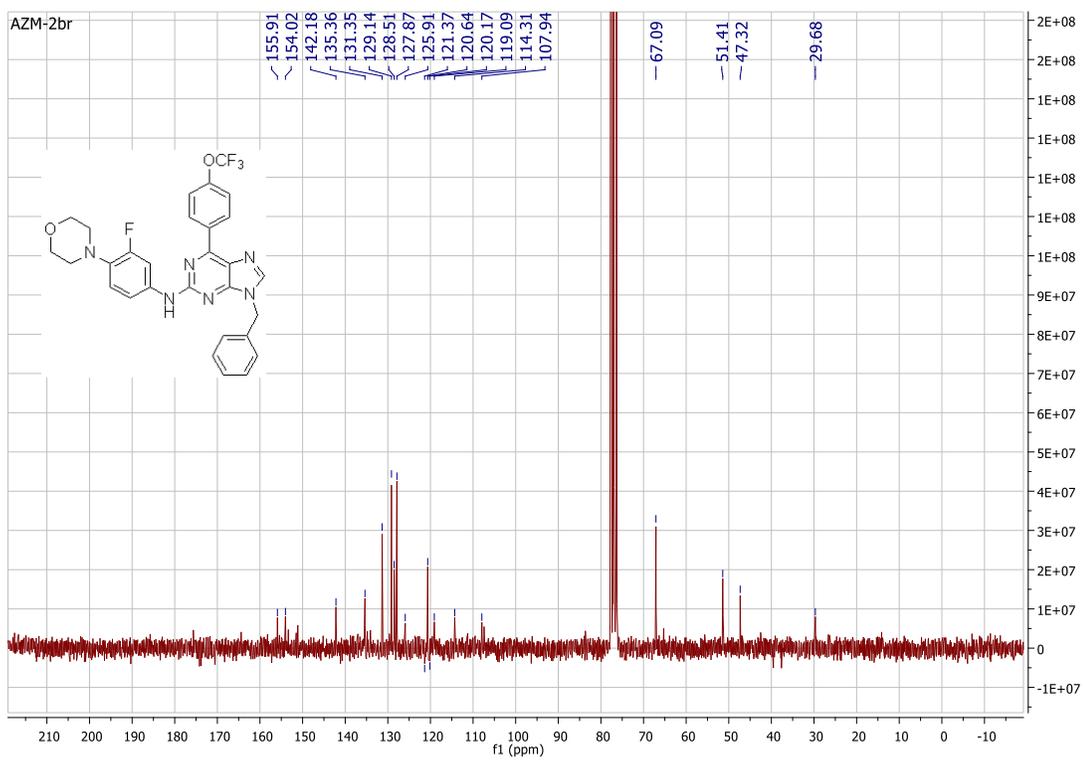
# RMN <sup>13</sup>C 11n



# RMN <sup>1</sup>H 11o

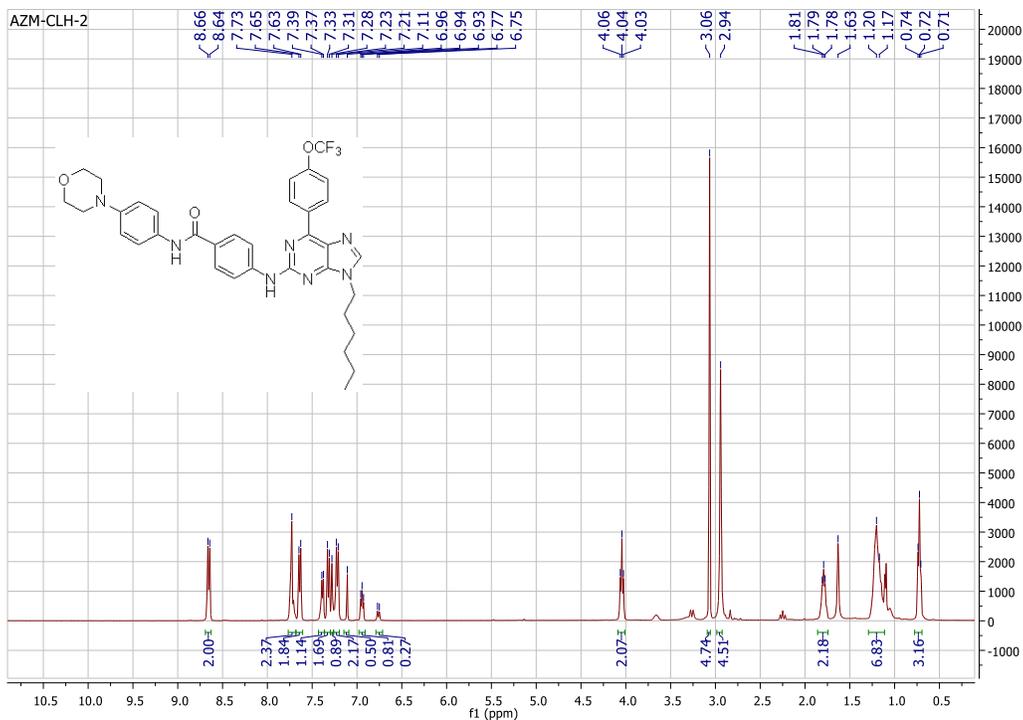


# RMN <sup>13</sup>C 11o

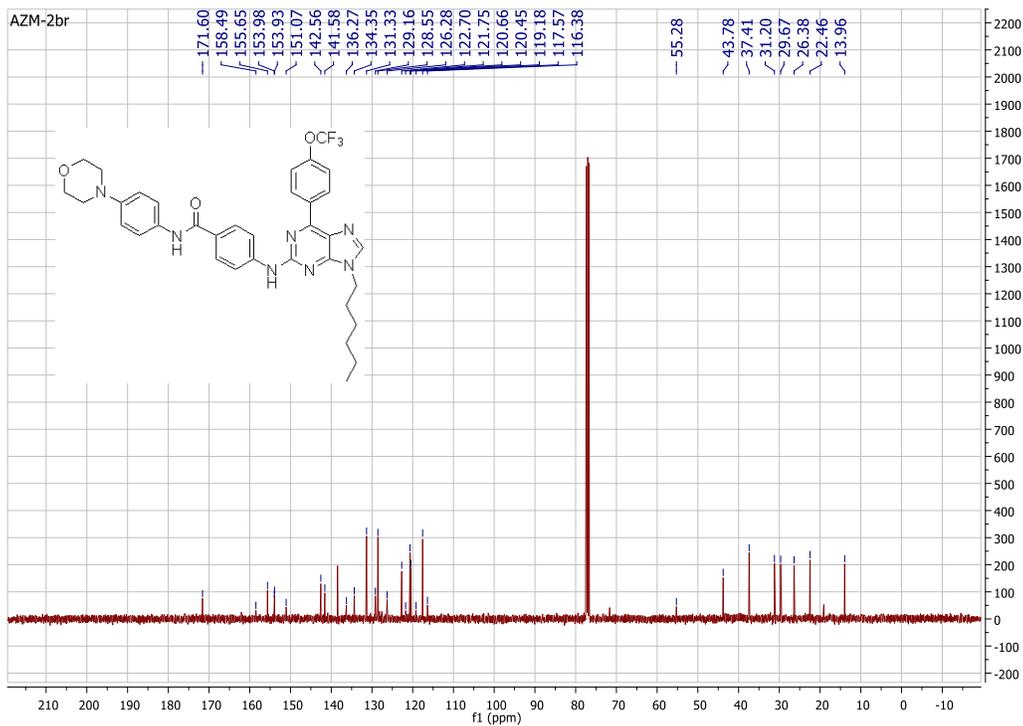


### 8.3.5 productos finales serie III: 14a-0

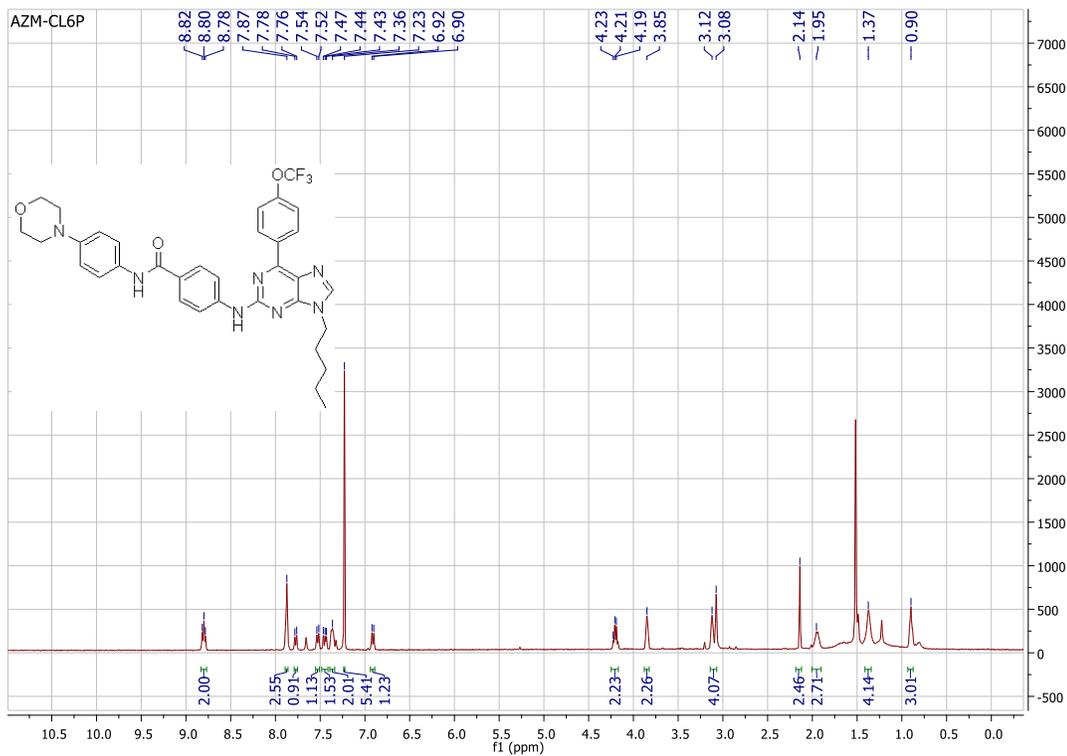
#### RMN <sup>1</sup>H 14a



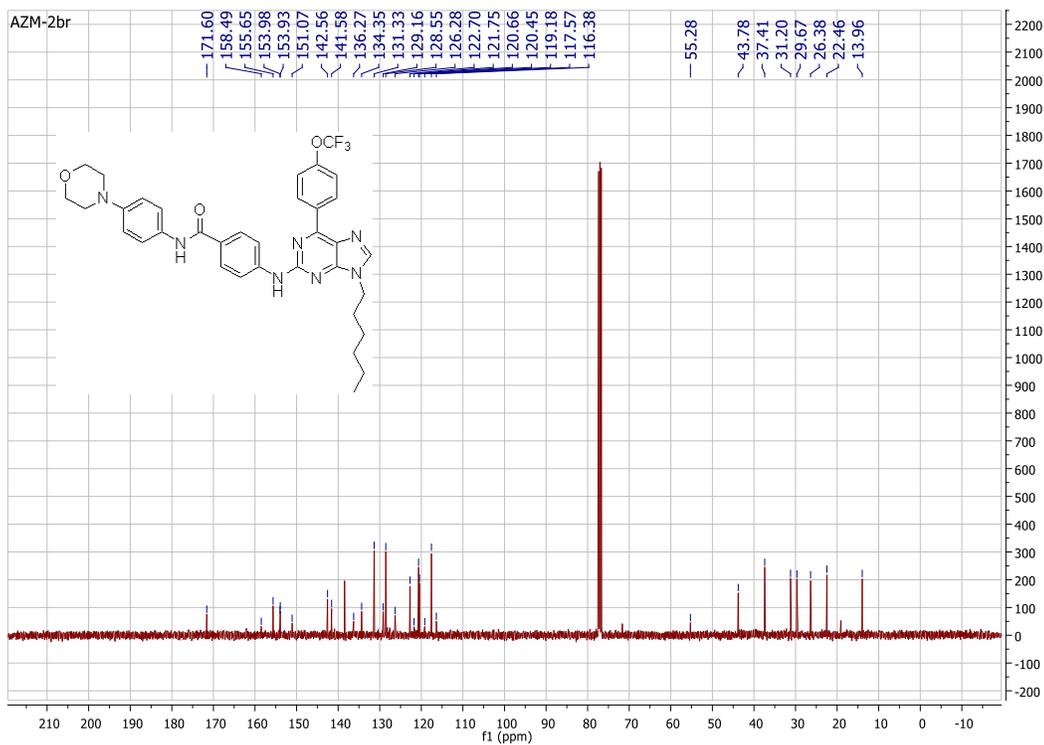
#### RMN <sup>13</sup>C 14a



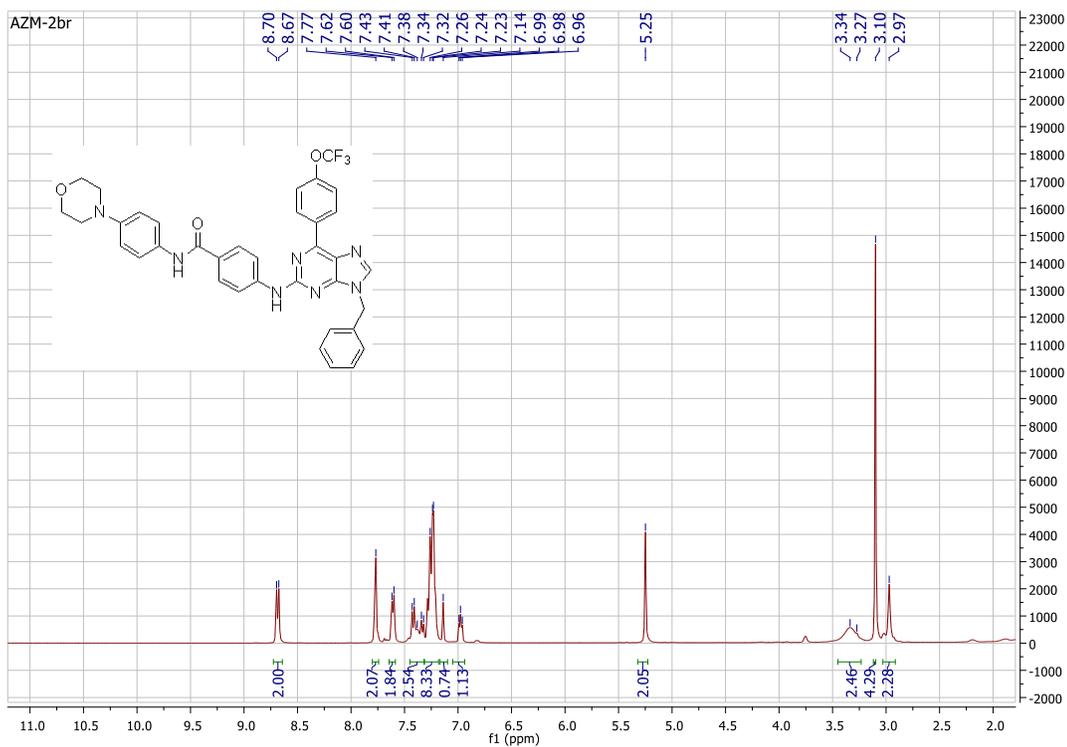
# RMN <sup>1</sup>H 14b



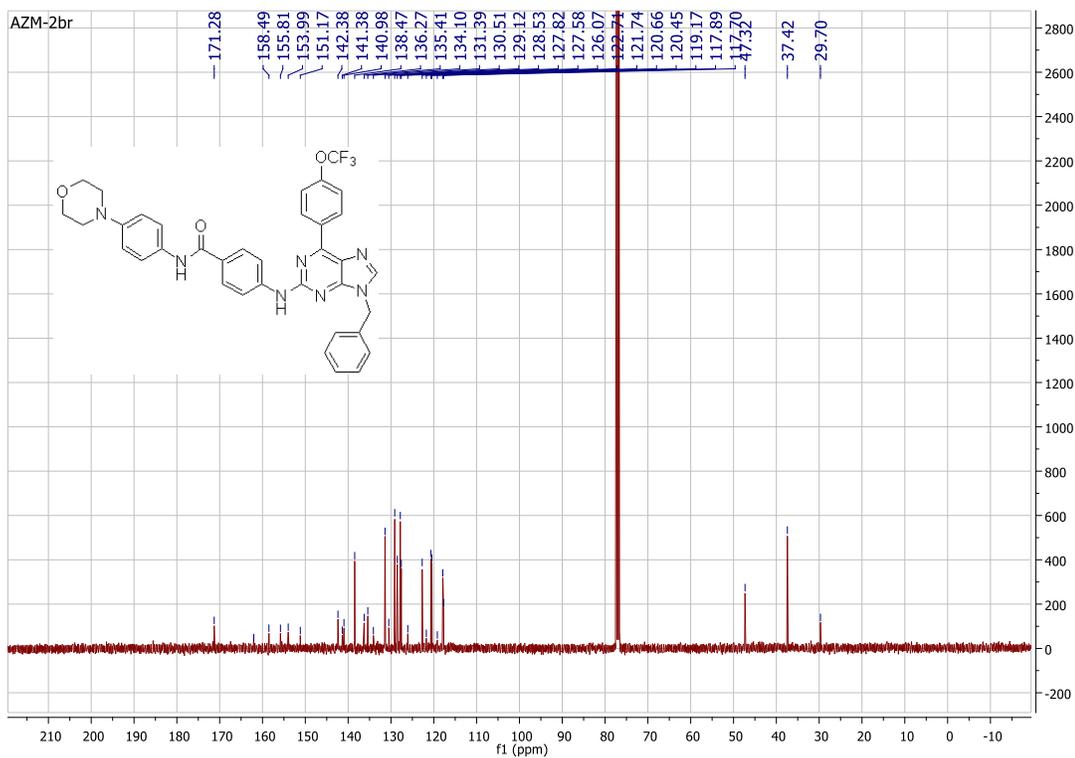
# RMN <sup>13</sup>C 14b



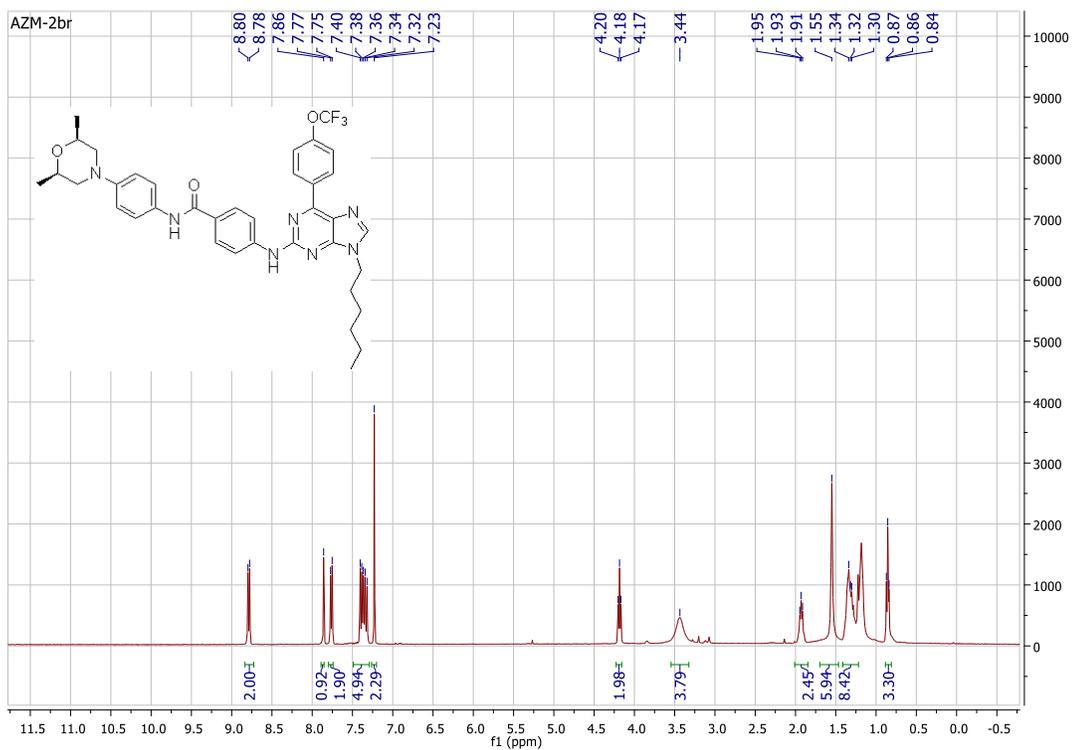
# RMN <sup>1</sup>H 14c



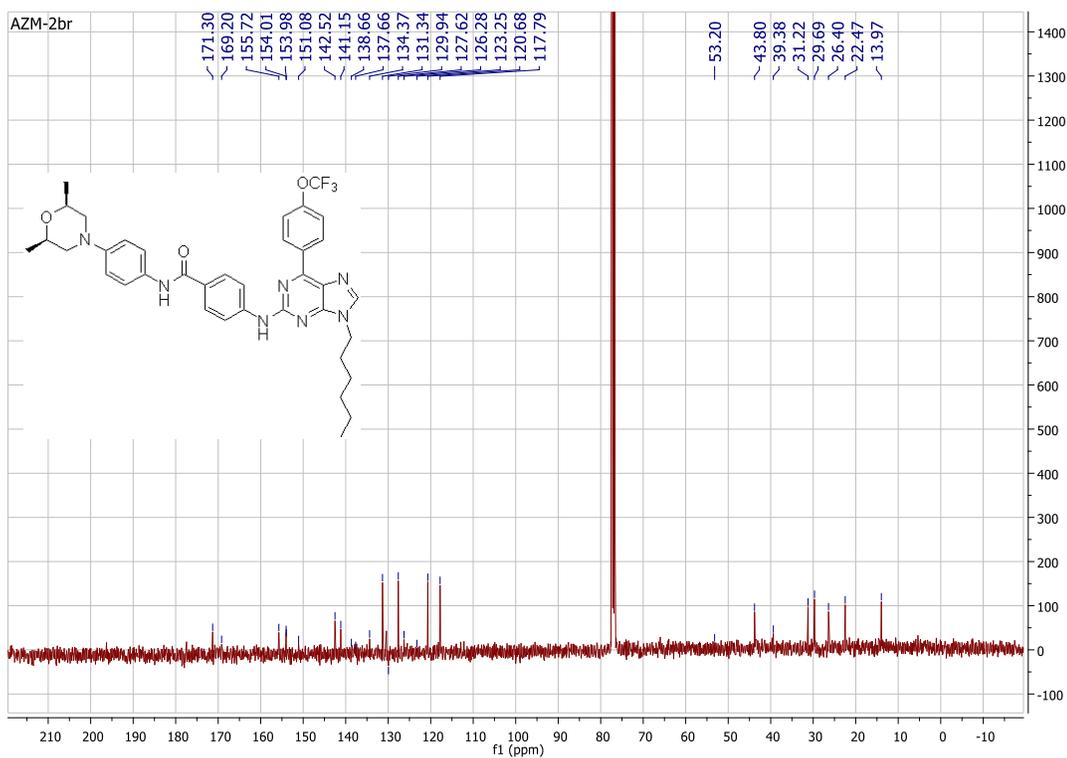
# RMN <sup>13</sup>C 14c



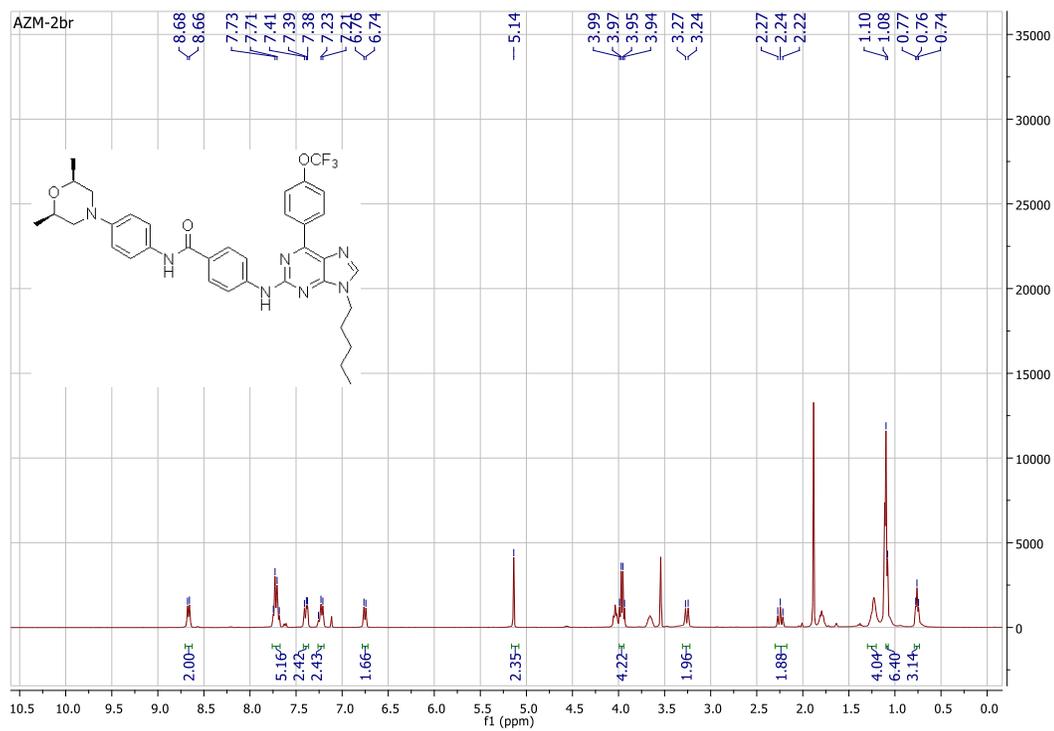
# RMN <sup>1</sup>H 14d



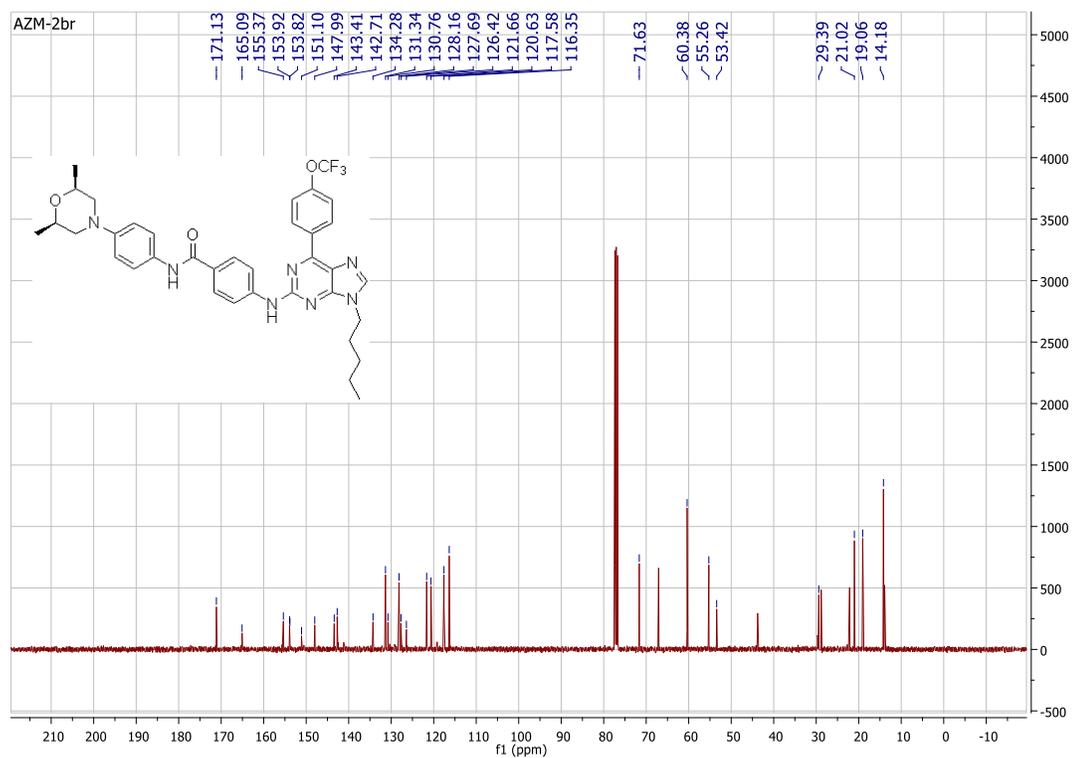
# RMN <sup>13</sup>C 14d



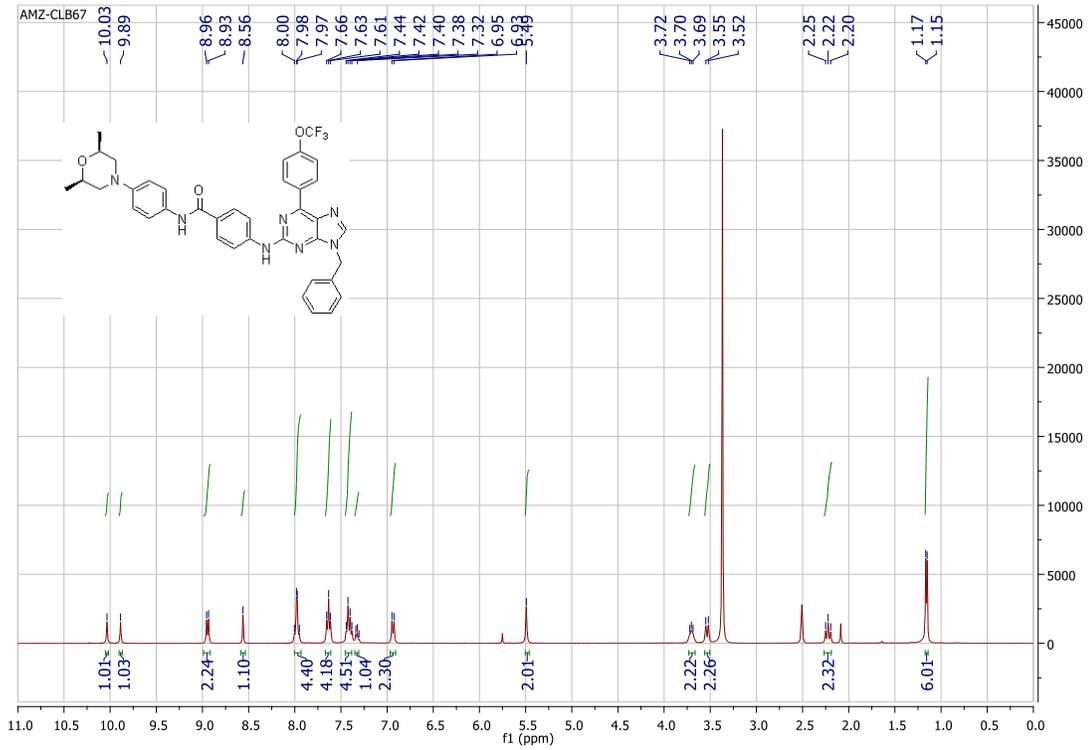
# RMN <sup>1</sup>H 14e



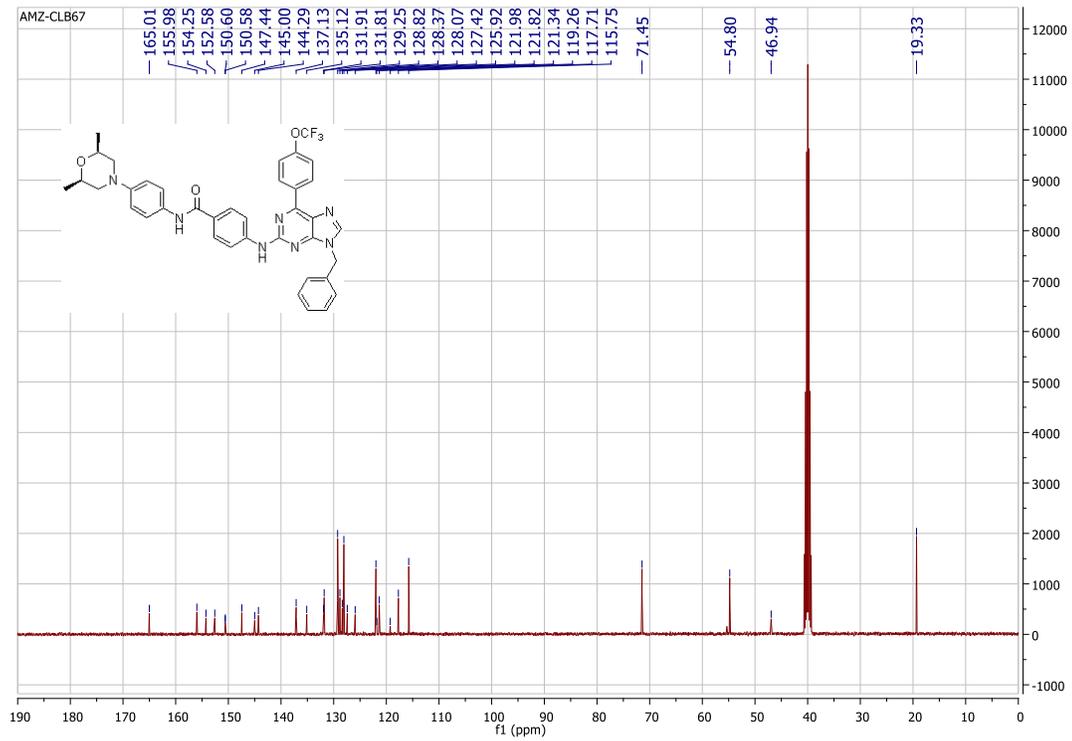
# RMN <sup>13</sup>C 14e



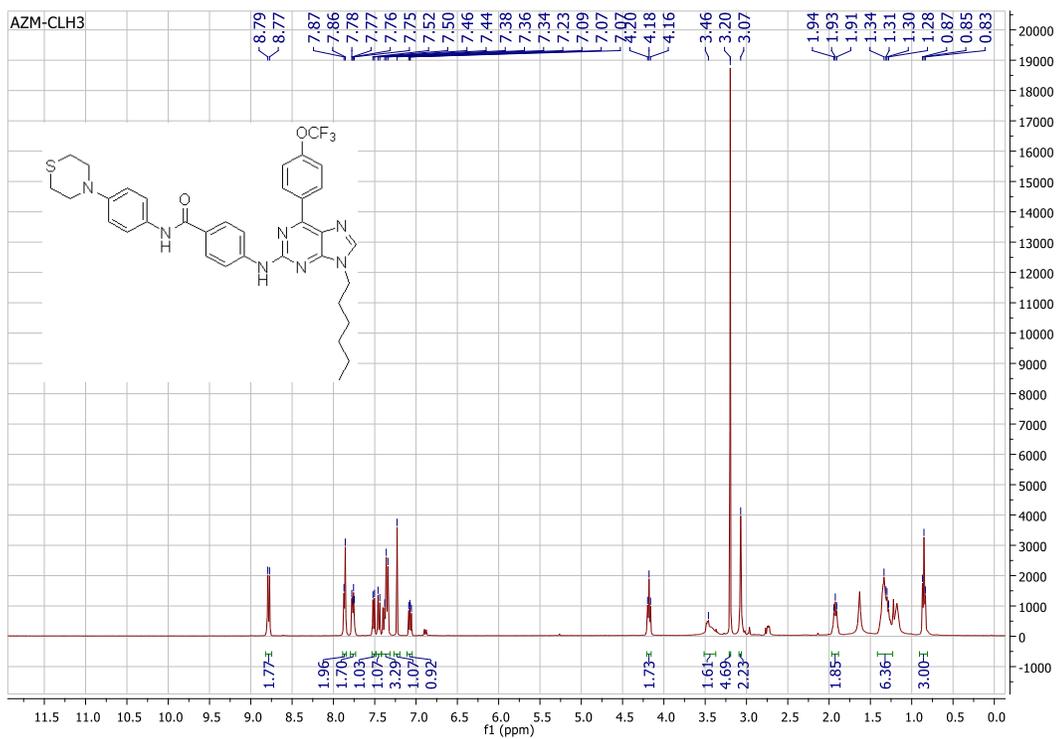
# RMN <sup>1</sup>H 14f



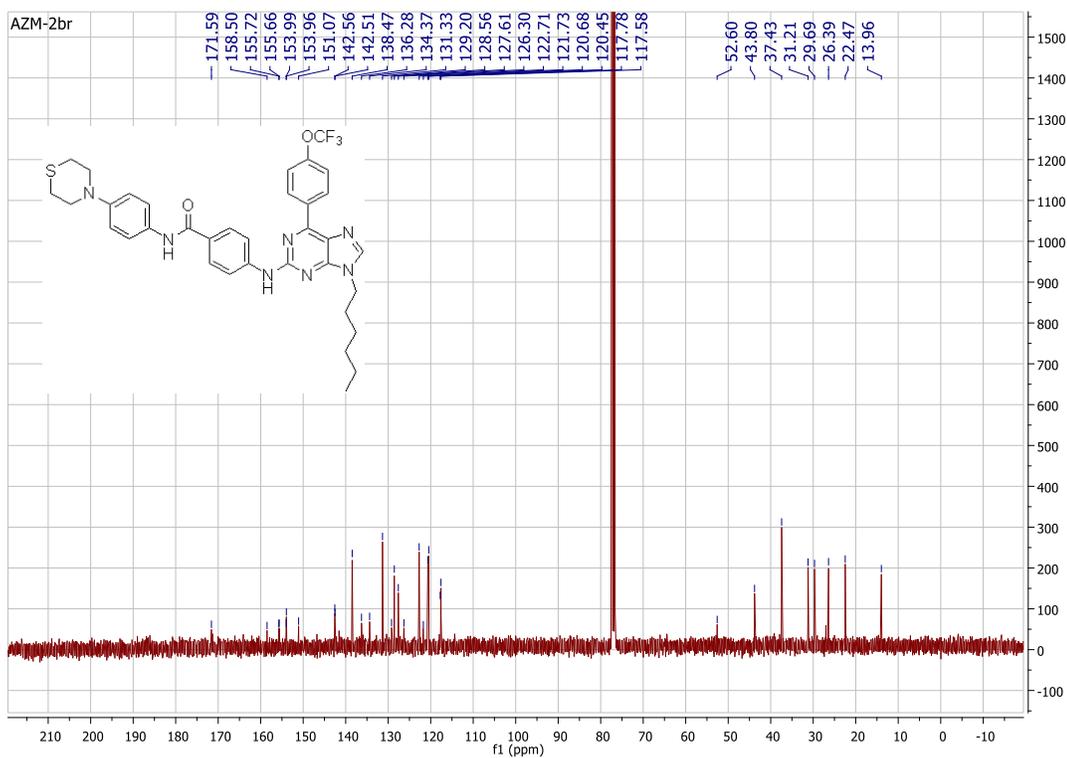
# RMN <sup>13</sup>C 14f



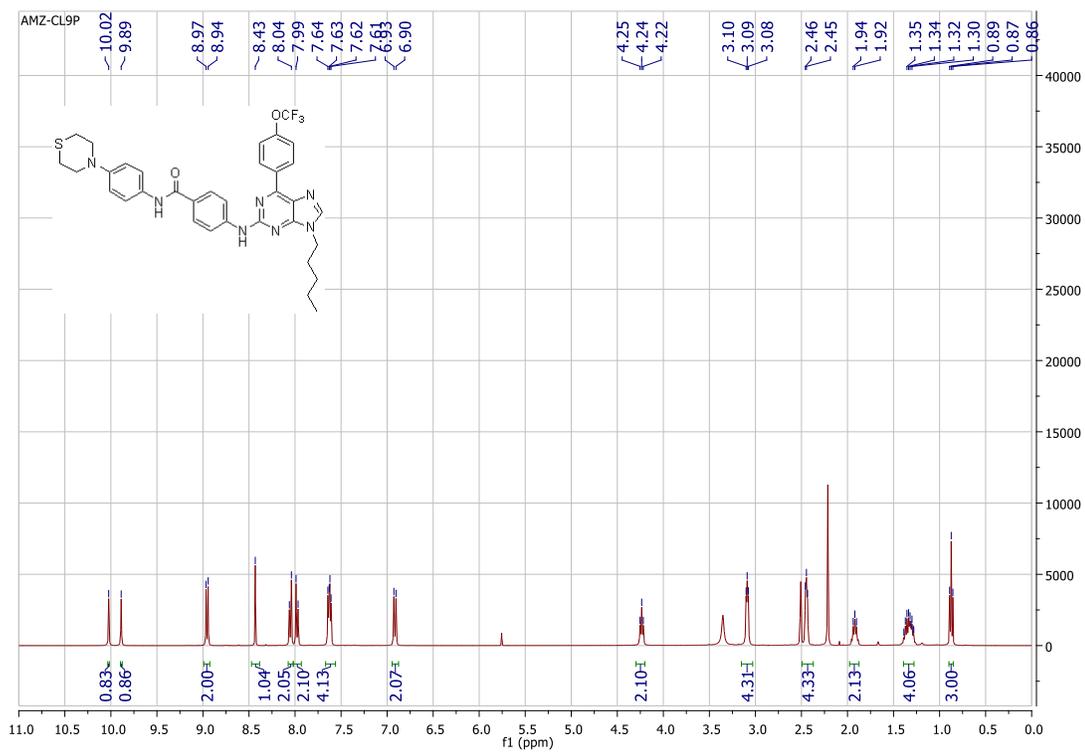
# RMN <sup>1</sup>H 14g



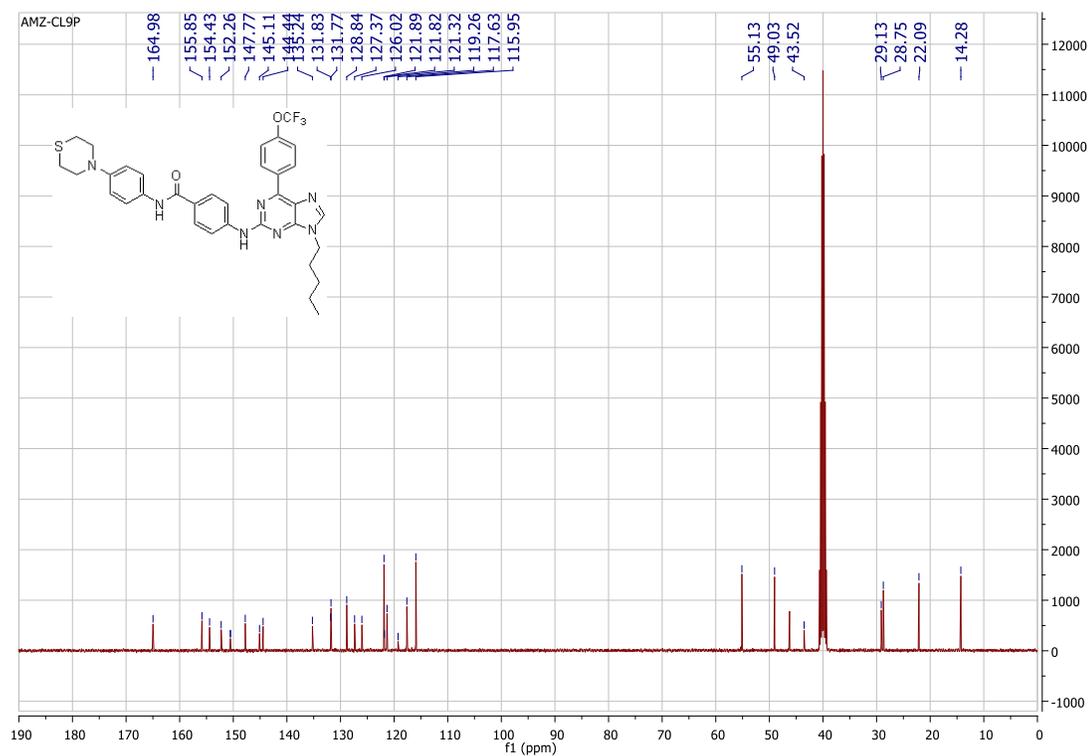
# RMN <sup>13</sup>C 14g



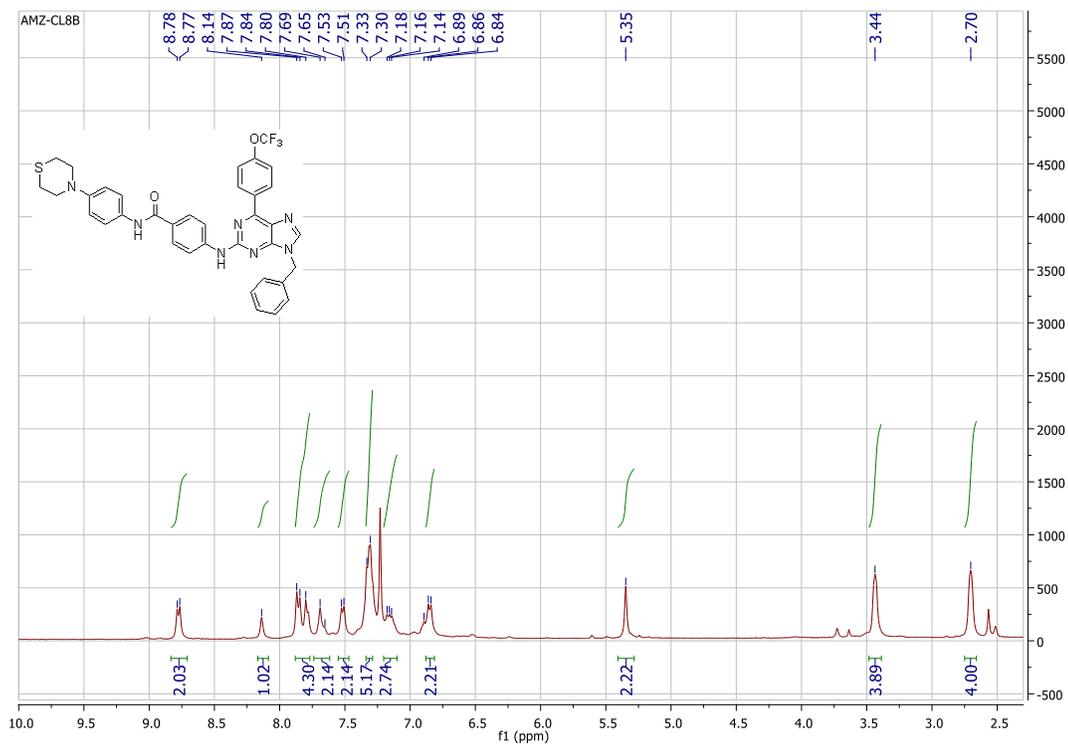
# RMN <sup>1</sup>H 14h



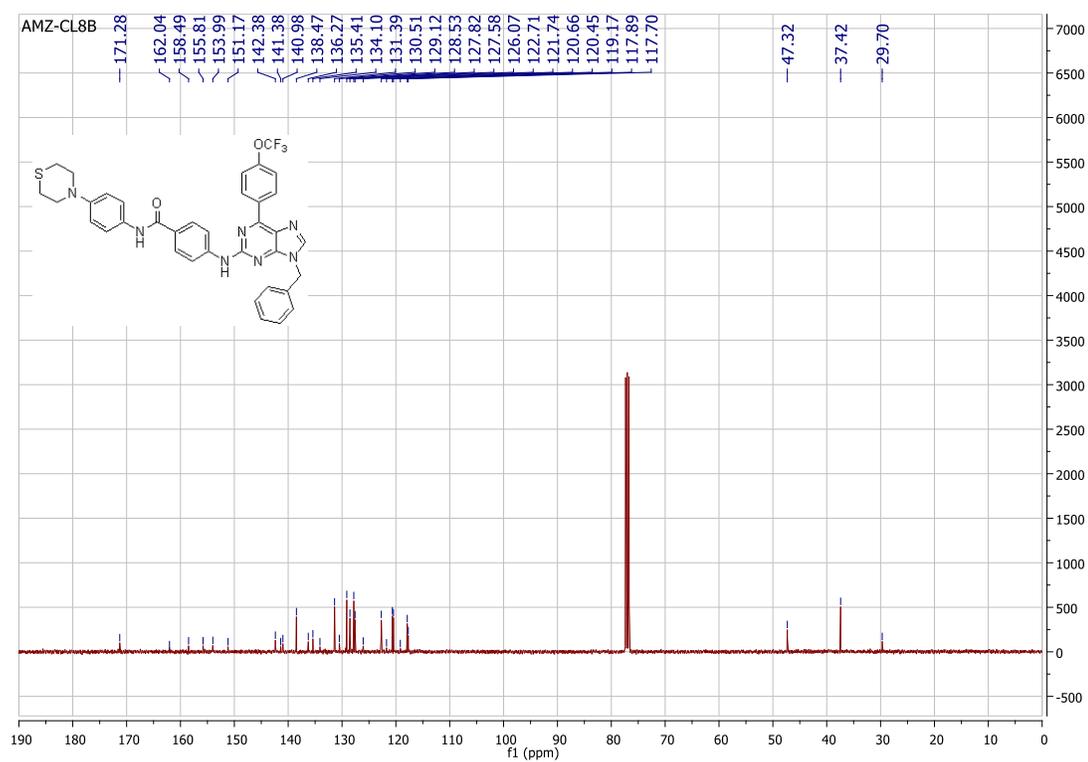
# RMN <sup>13</sup>C 14h



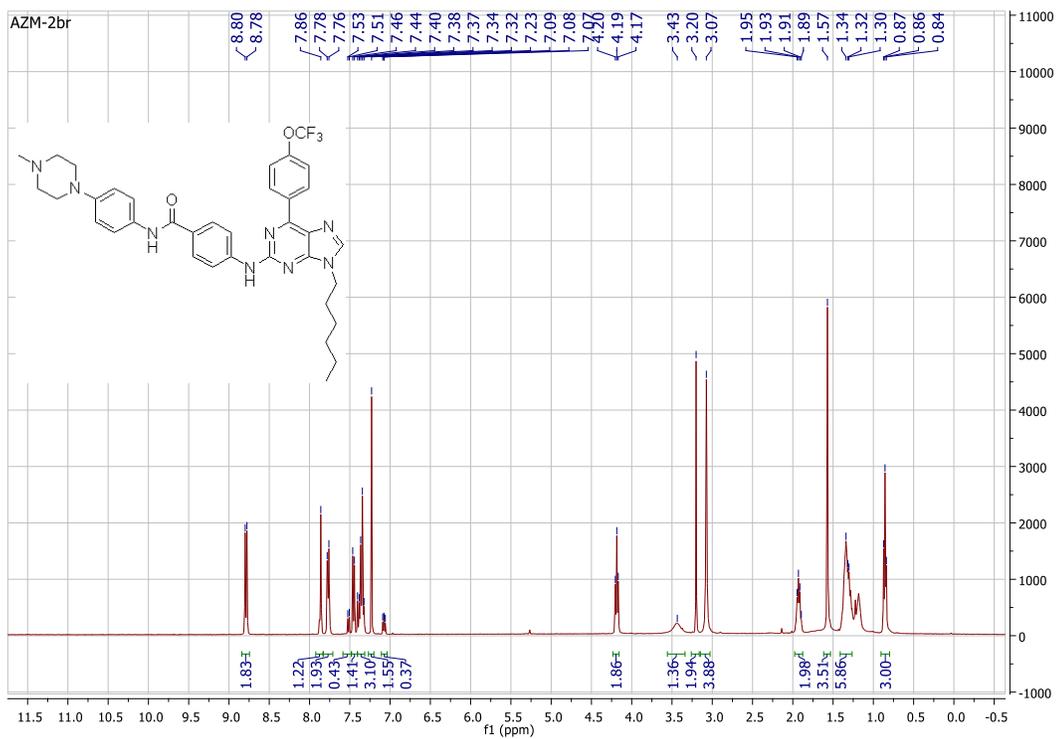
# RMN <sup>1</sup>H 14i



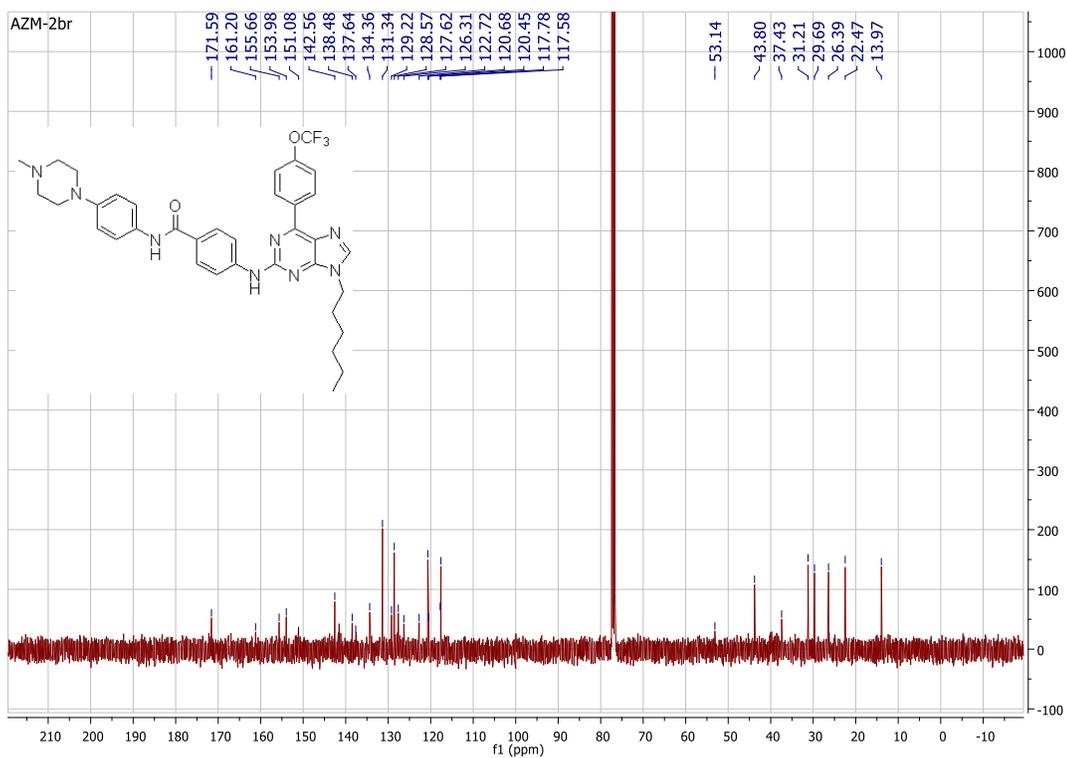
# RMN <sup>13</sup>C 14i



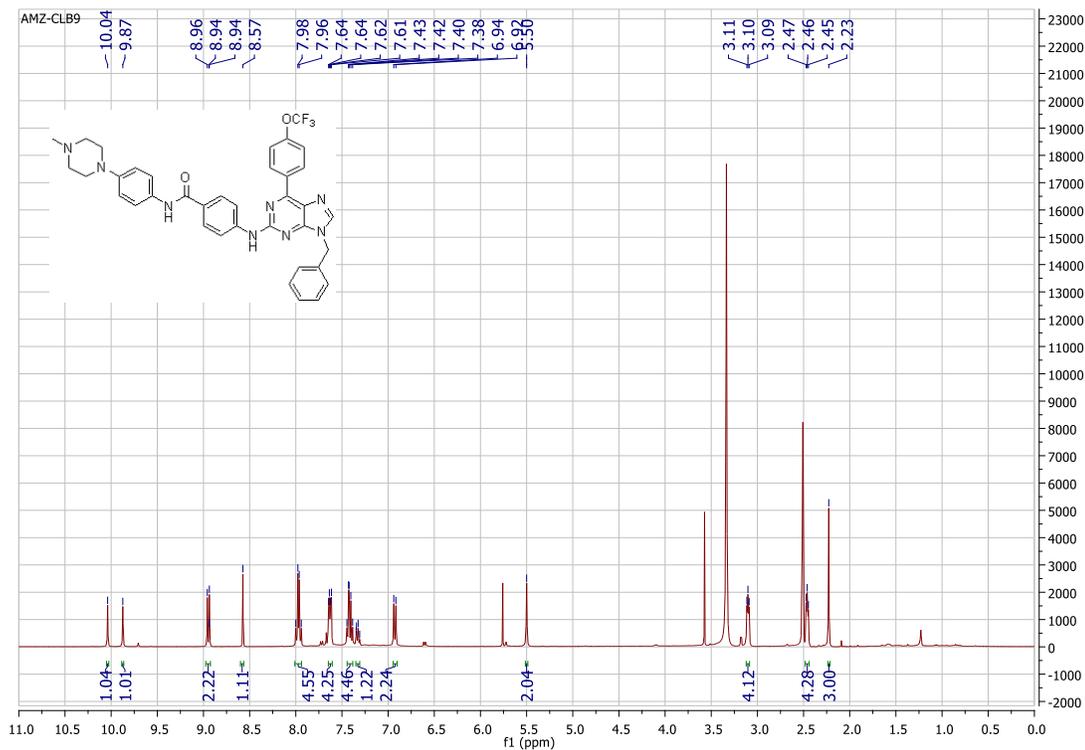
# RMN <sup>1</sup>H 14j



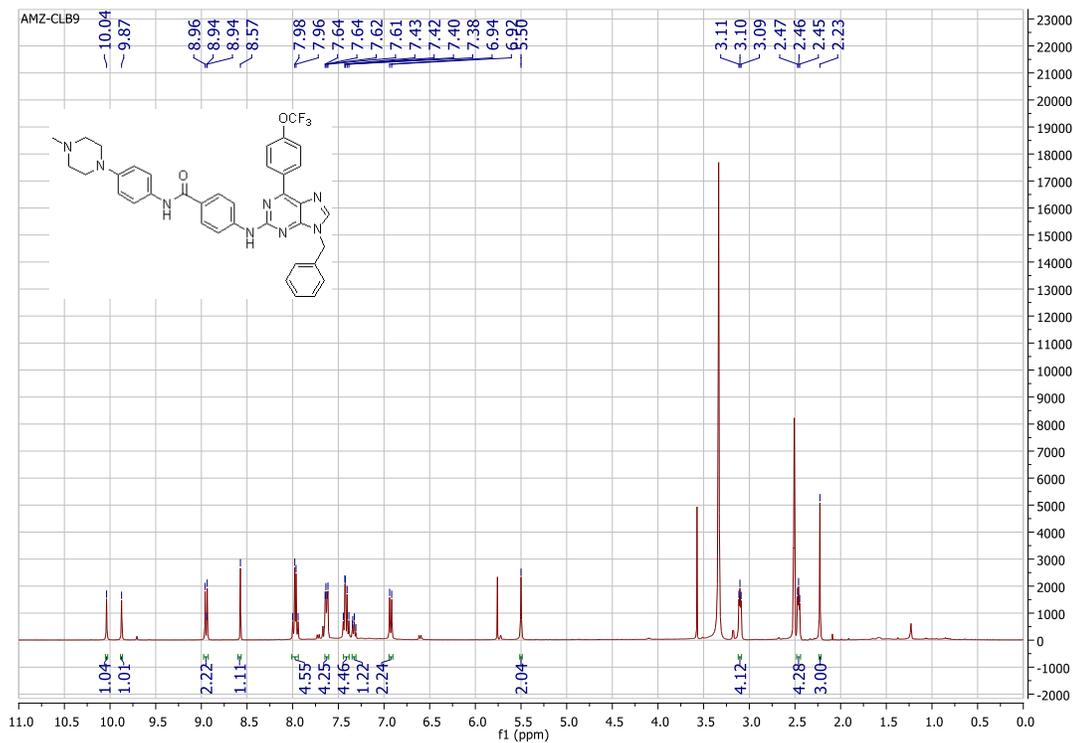
# RMN <sup>13</sup>C 14j



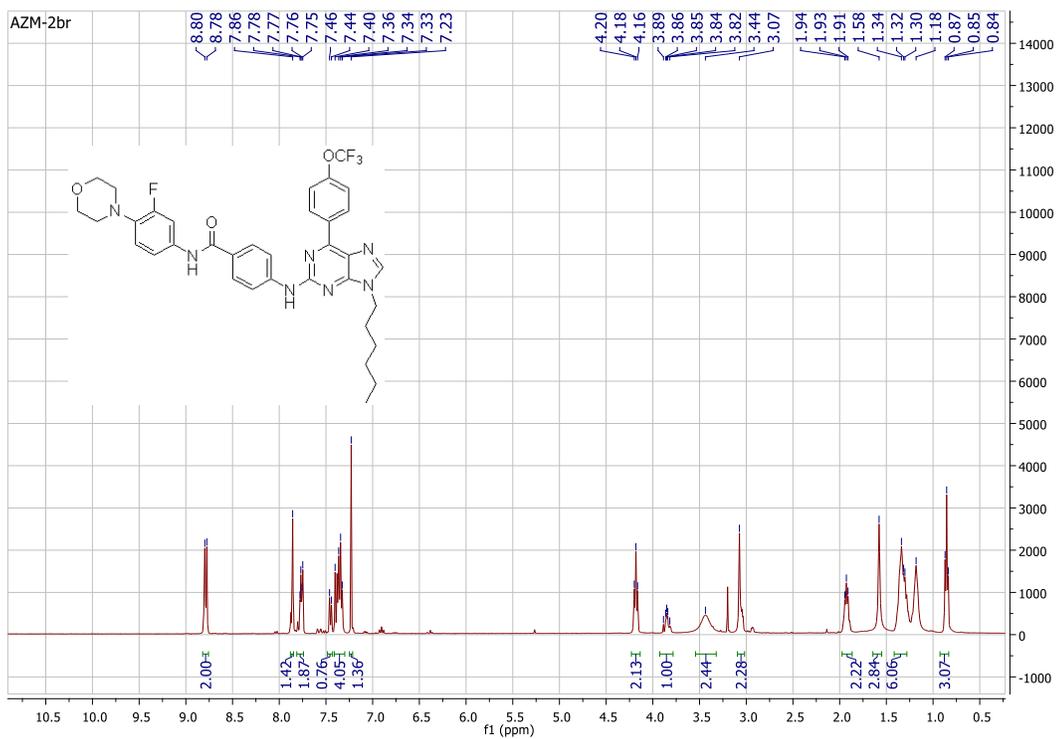
# RMN <sup>1</sup>H 14I



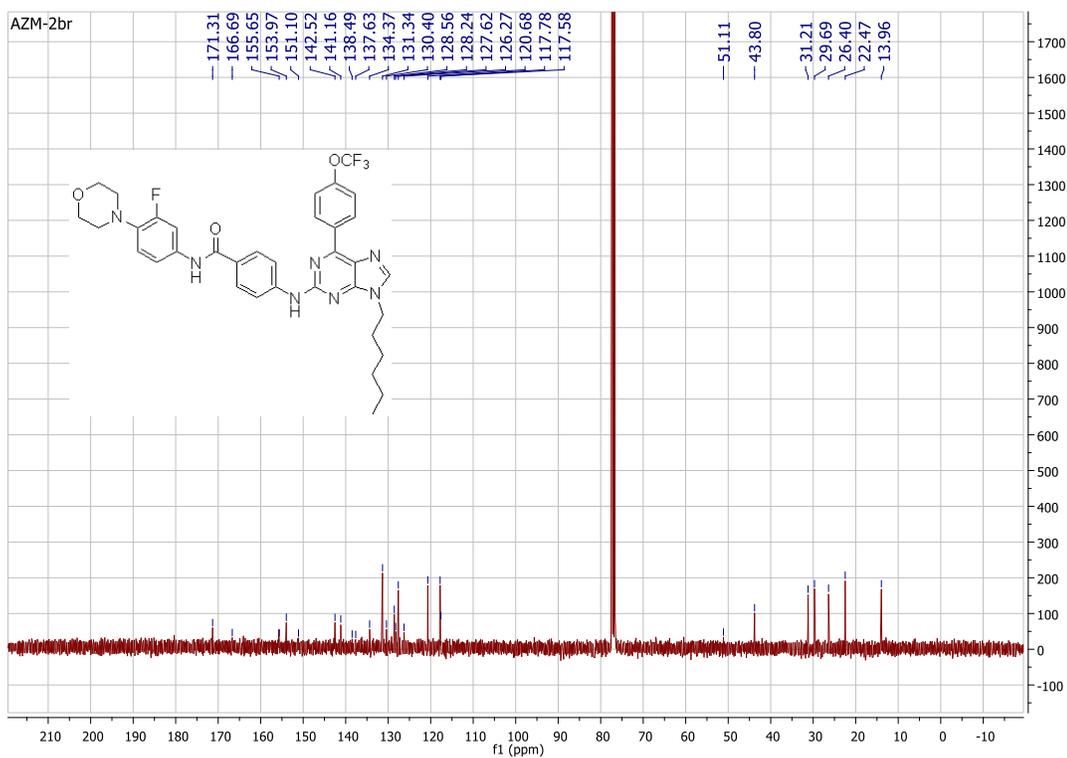
# RMN <sup>13</sup>C 14I



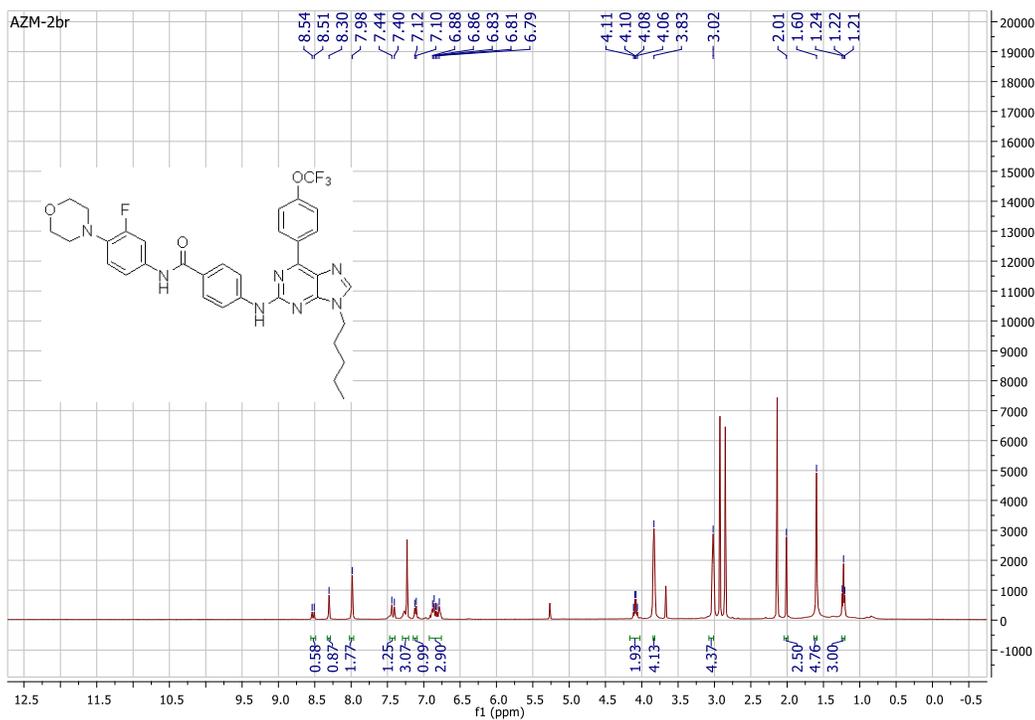
# RMN <sup>1</sup>H 14m



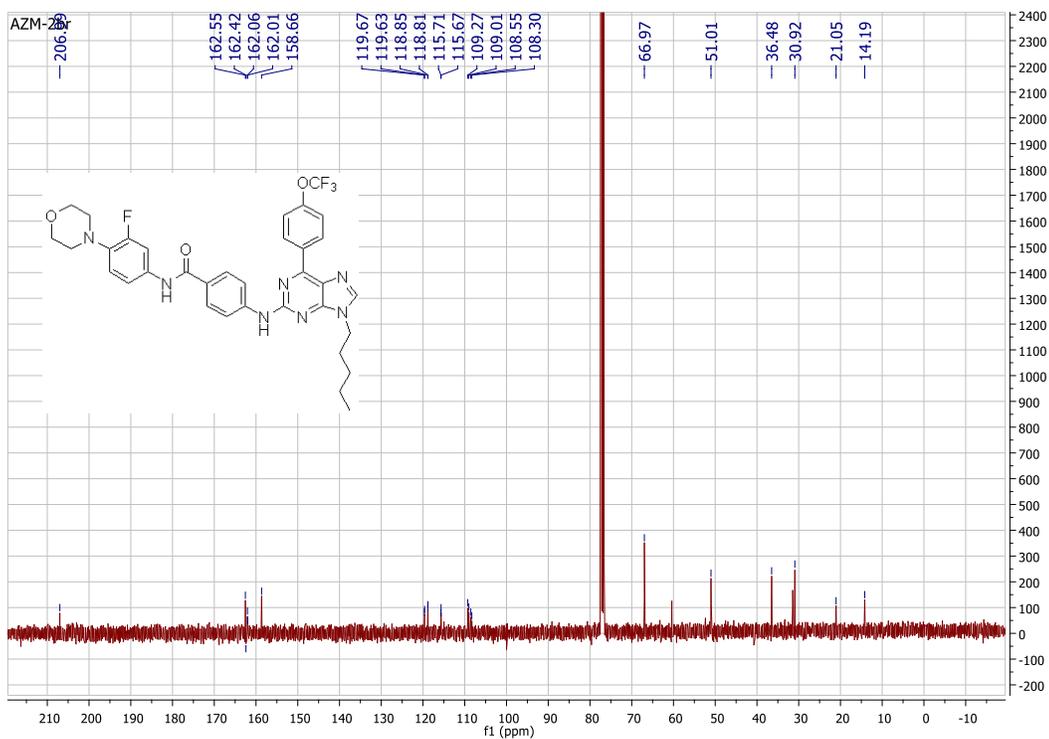
# RMN <sup>13</sup>C 14m



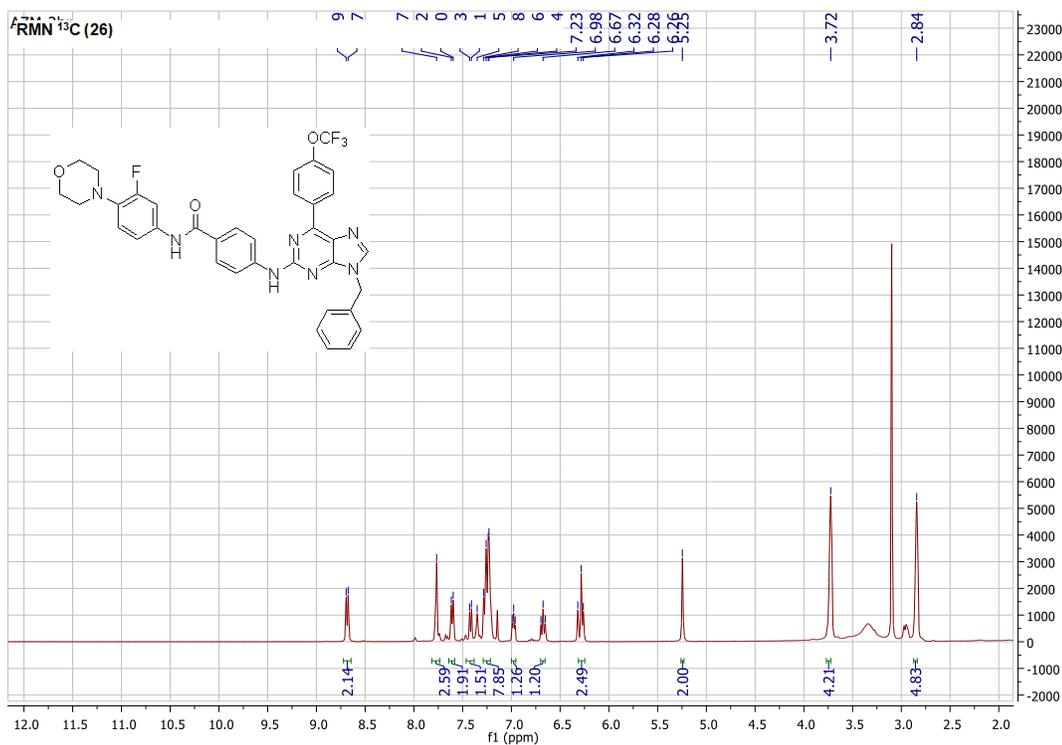
# RMN <sup>1</sup>H 14n



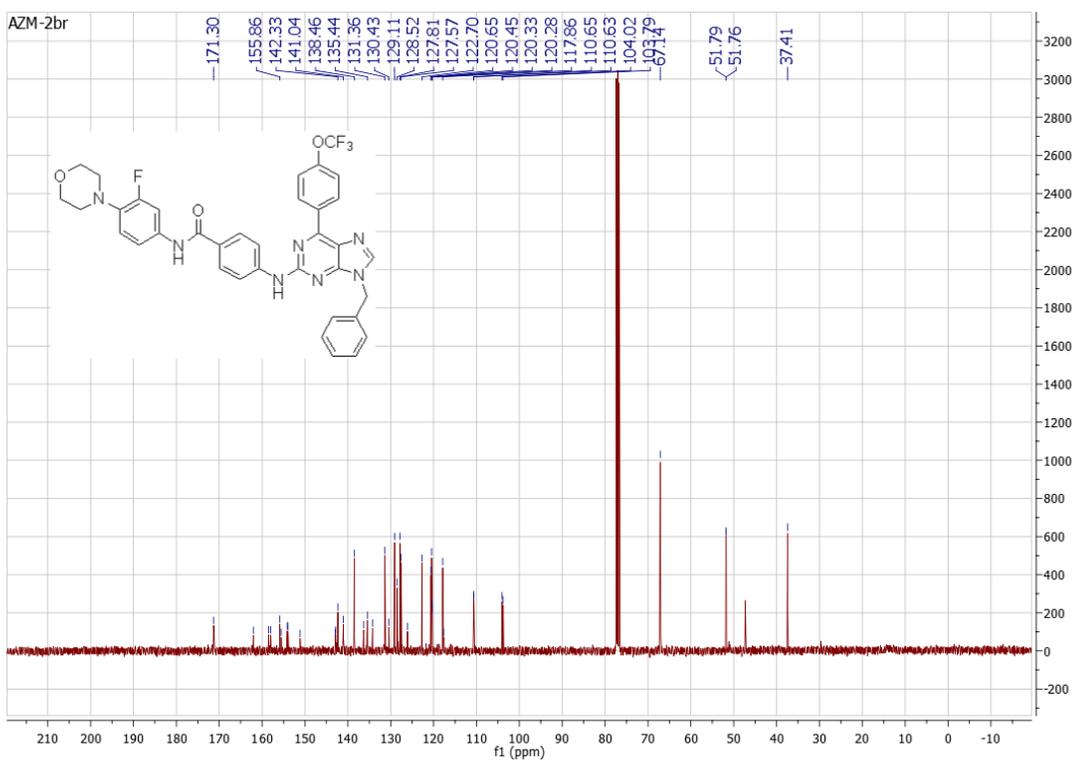
# RMN <sup>13</sup>C 14n



# RMN <sup>1</sup>H 14o



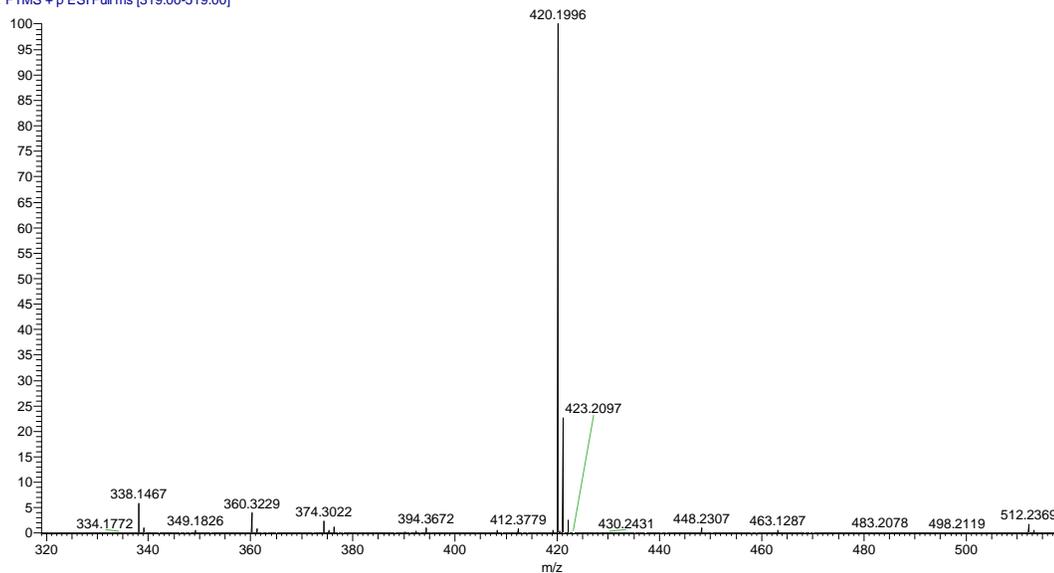
# RMN <sup>13</sup>C 14o



## 8.4 Espectros masa de alta resolución para las moléculas finales correspondientes a las series I, II y III

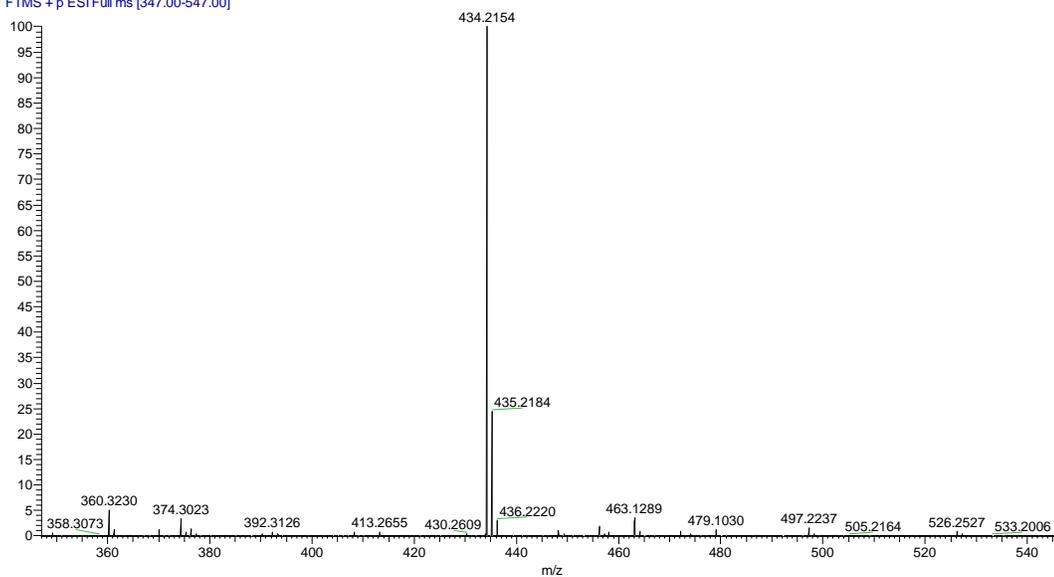
### Espectro de masa del compuesto 4a

5I#26 RT: 0.12 AV: 1 NL: 4.96E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [319.00-519.00]



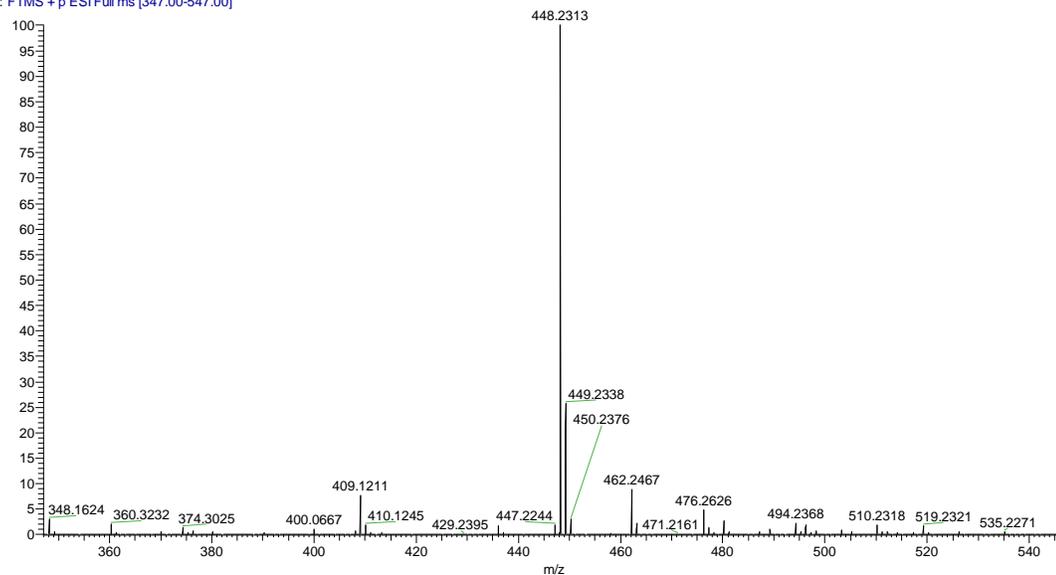
### Espectro de masa del compuesto 4b

5M#1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.67E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [347.00-547.00]



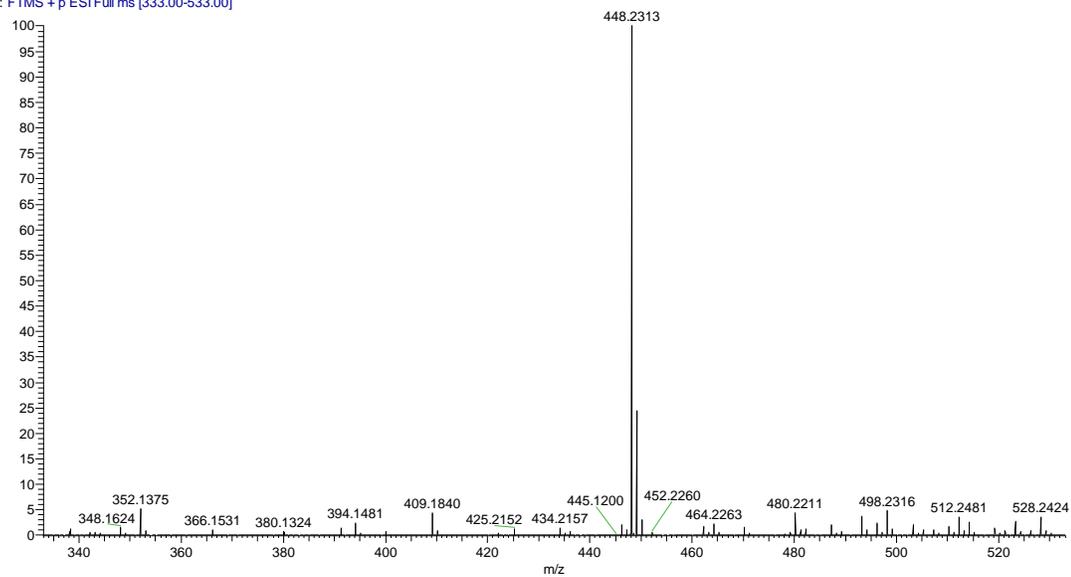
## Espectro de masa del compuesto 4c

CE\_PA62 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 9.24E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [347.00-547.00]



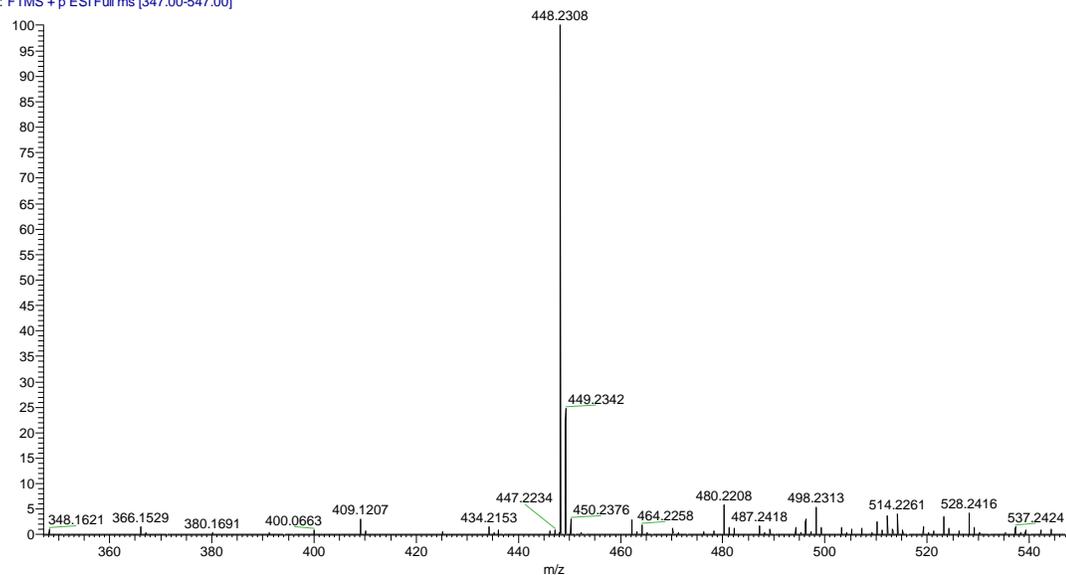
## Espectro de masa del compuesto 4d

5J #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.80E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [333.00-533.00]



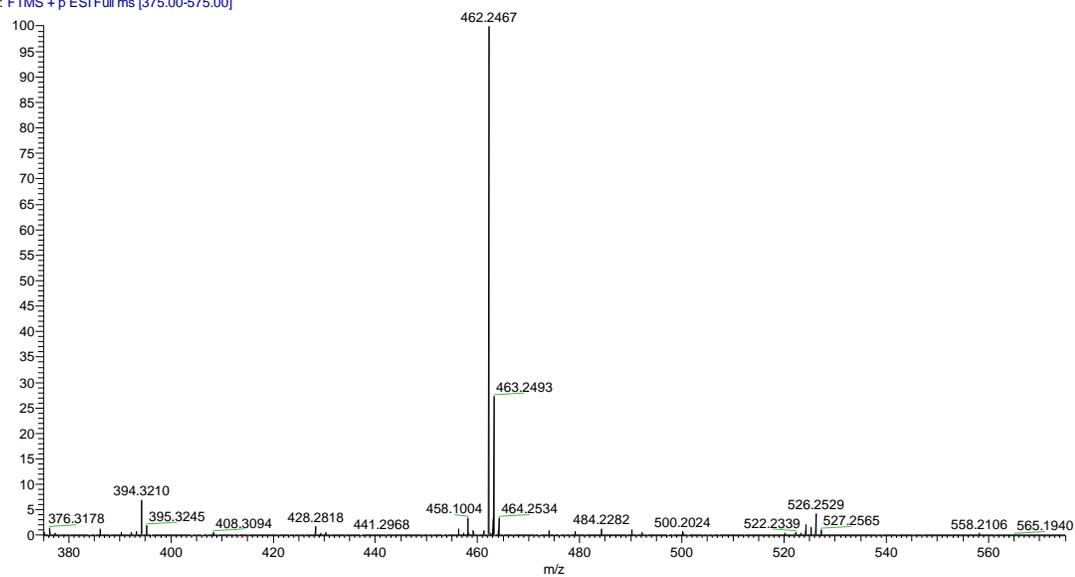
## Espectro de masa del compuesto 4e

CE\_PA29 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.24E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [347.00-547.00]



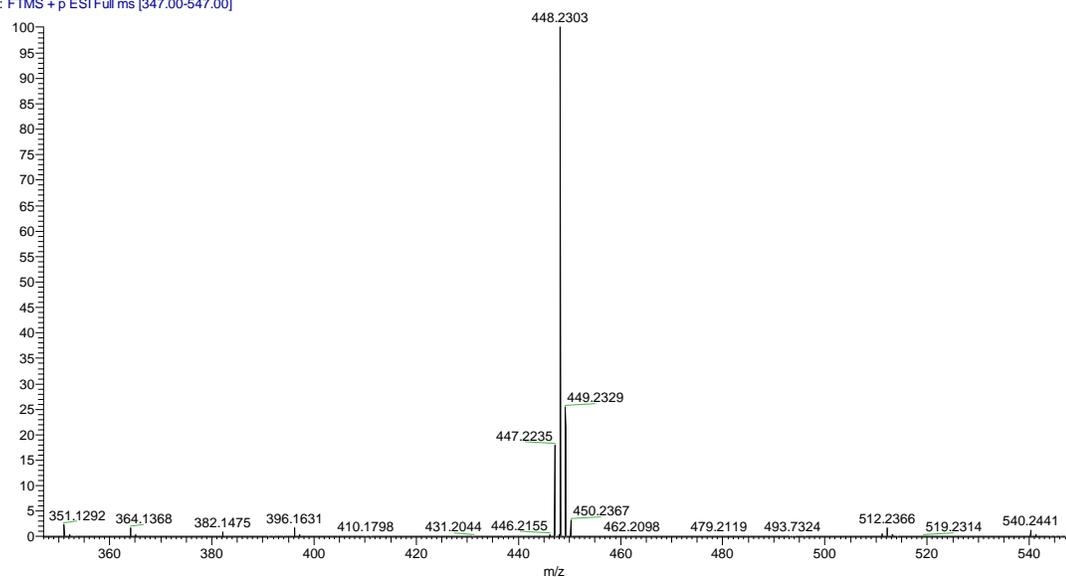
## Espectro de masa del compuesto 4f

CE\_PA64 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.31E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [375.00-575.00]



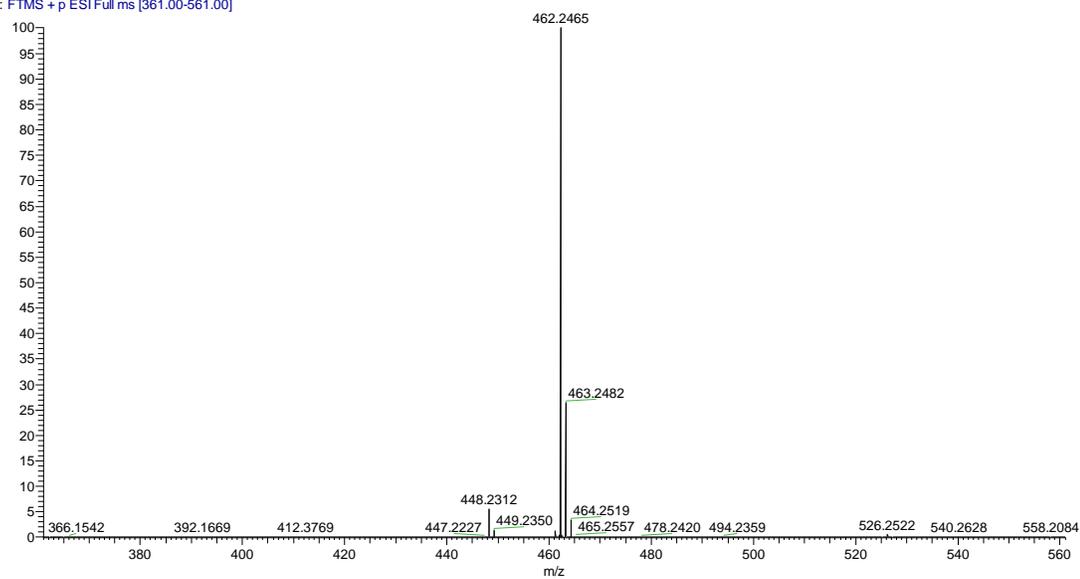
## Espectro de masa del compuesto 4g

5K #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.25E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [347.00-547.00]



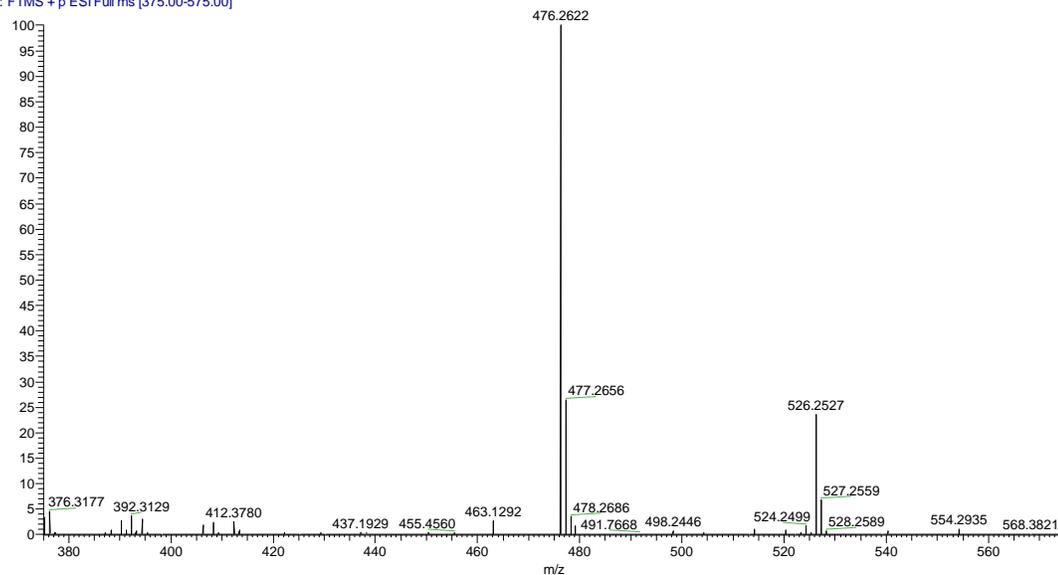
## Espectro de masa del compuesto 4h

CE\_PA48 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.64E9  
T: FTMS + p ESI Full ms [361.00-561.00]



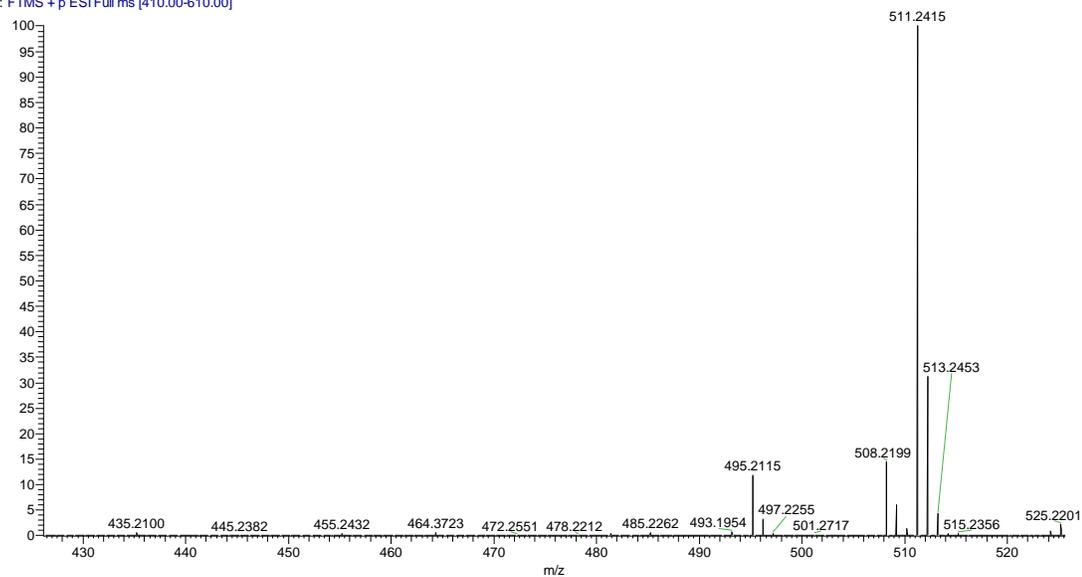
## Espectro de masa del compuesto 4i

CE\_PA65 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.43E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [375.00-575.00]



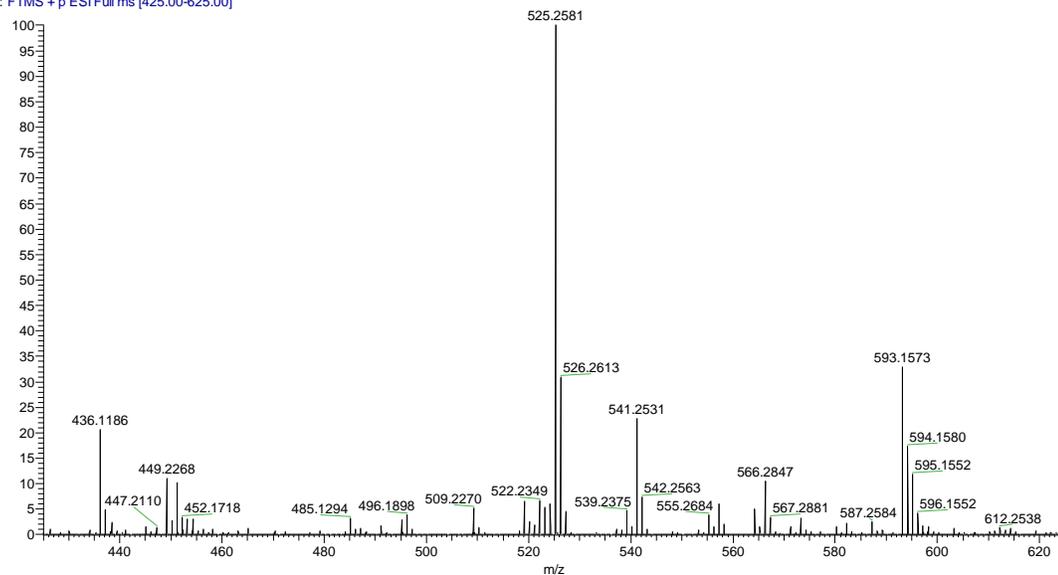
## Espectro de masa del compuesto 4j

035 #8 RT: 0.12 AV: 1 NL: 2.20E9  
T: FTMS + p ESI Full ms [410.00-610.00]



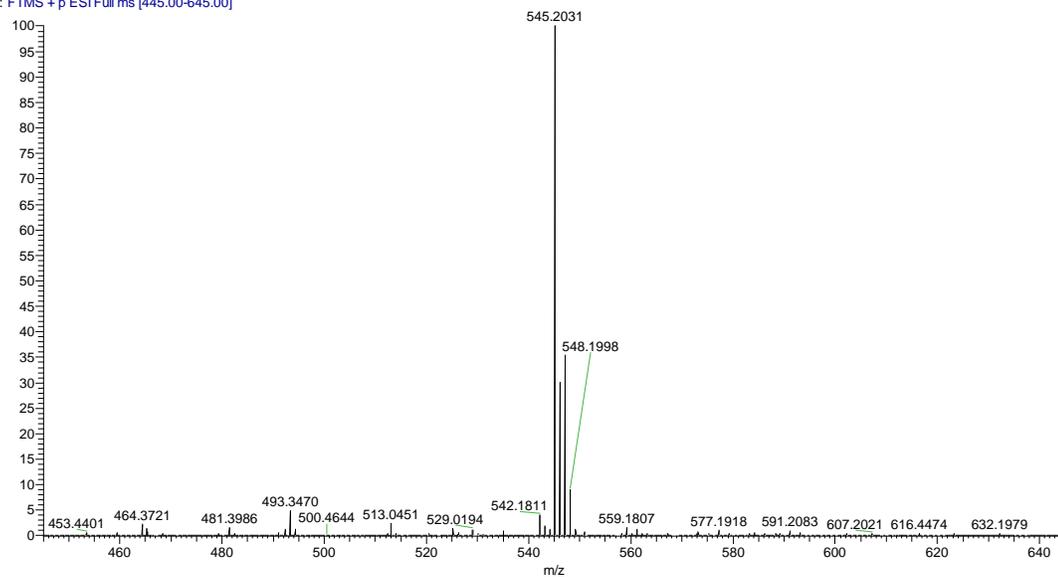
## Espectro de masa del compuesto 4k

CE\_FP5 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 9.21E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [425.00-625.00]



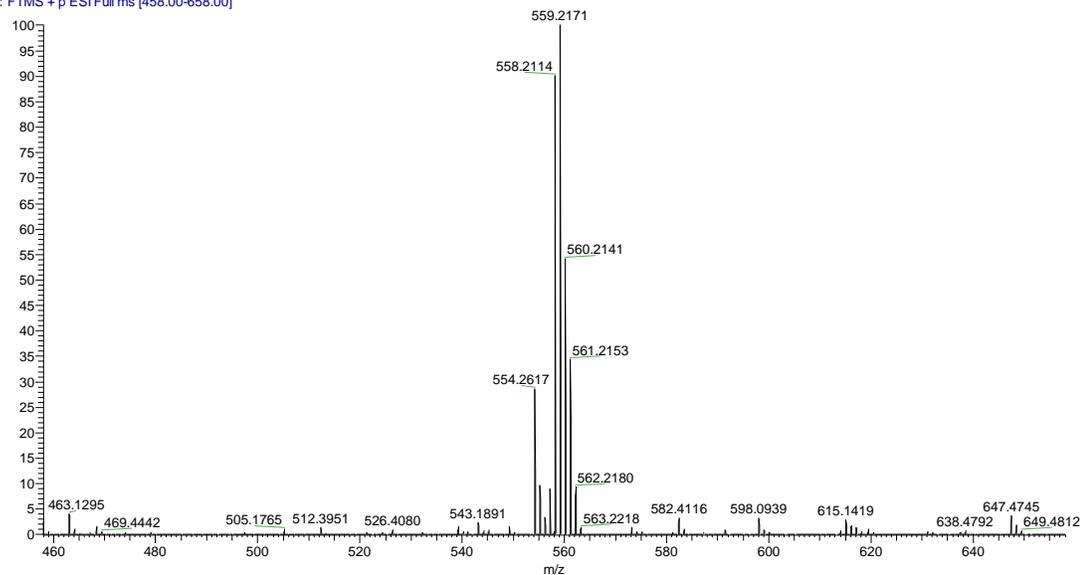
## Espectro de masa del compuesto 4l

025 #8 RT: 0.13 AV: 1 NL: 4.96E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [445.00-645.00]



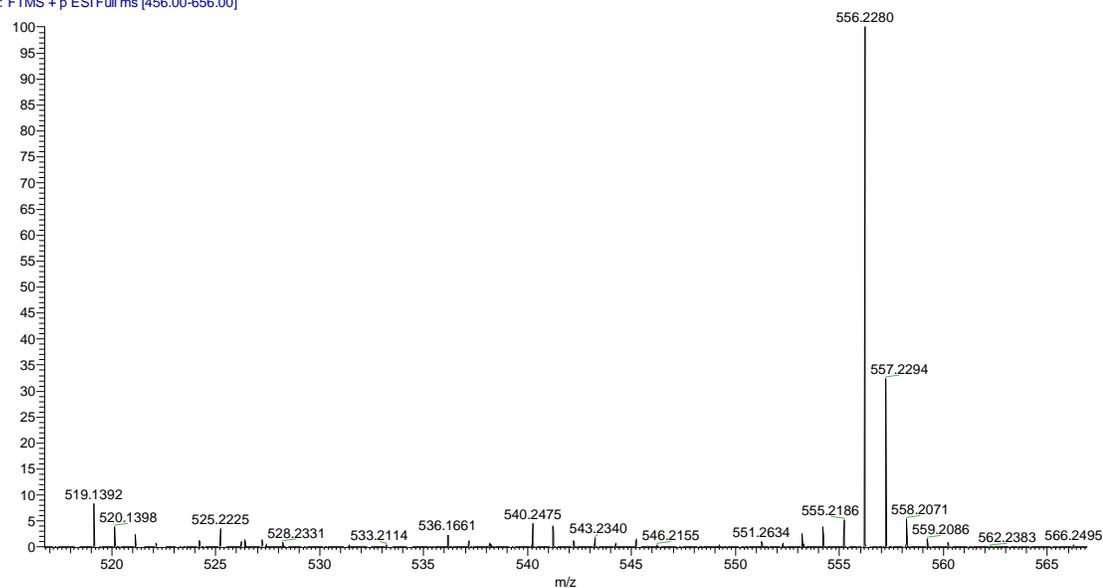
## Espectro de masa del compuesto 4m

CE\_FP3 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.74E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [458.00-658.00]



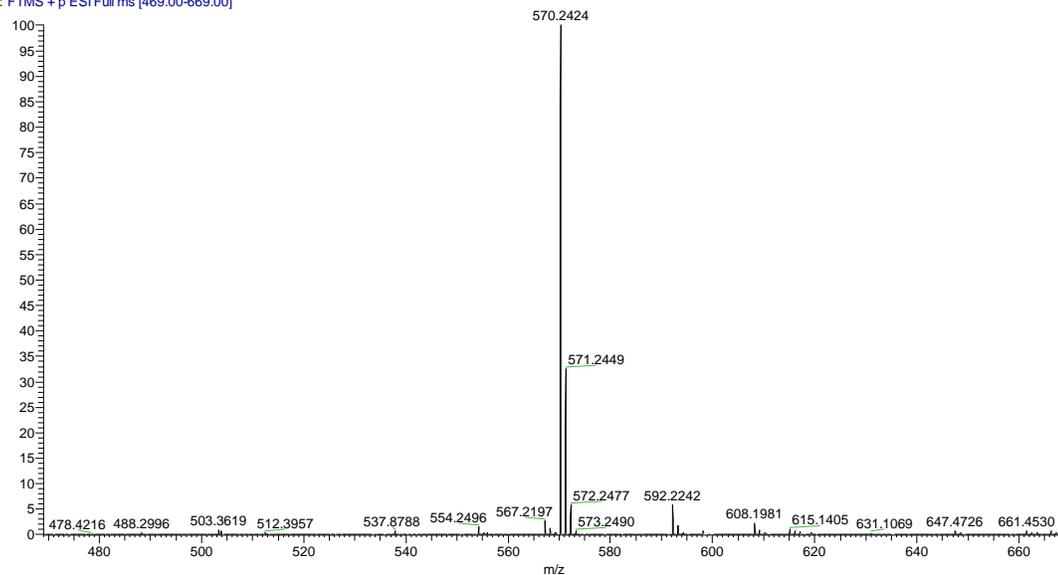
## Espectro de masa del compuesto 4n

044 #10 RT: 0.16 AV: 1 NL: 3.00E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [456.00-656.00]



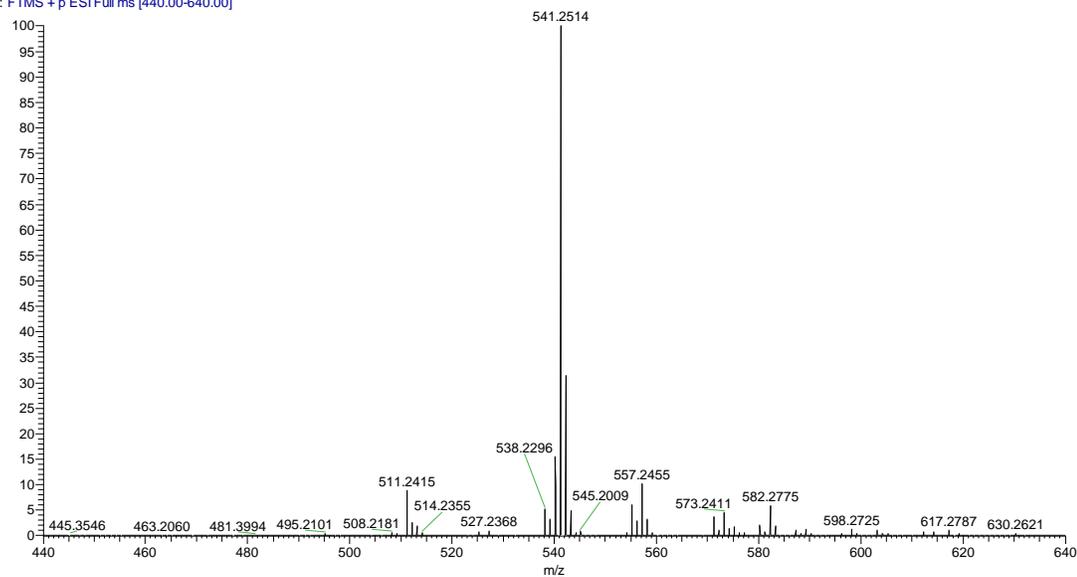
## Espectro de masa del compuesto 4o

CE\_FP1 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.27E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [469.00-669.00]



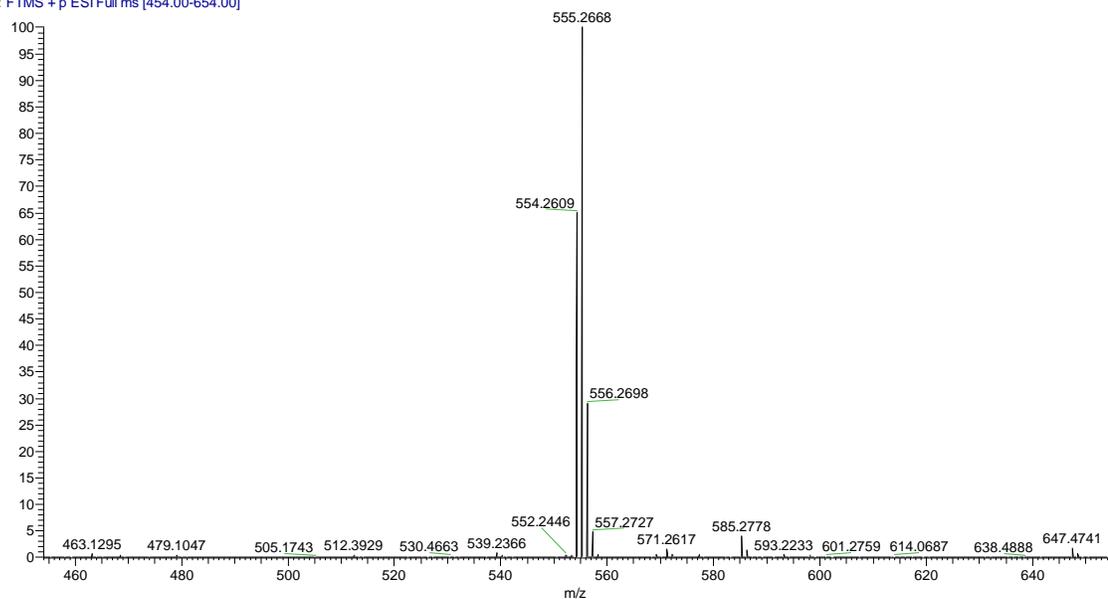
## Espectro de masa del compuesto 4p

037 #9 RT: 0.13 AV: 1 NL: 4.09E9  
T: FTMS + p ESI Full ms [440.00-640.00]



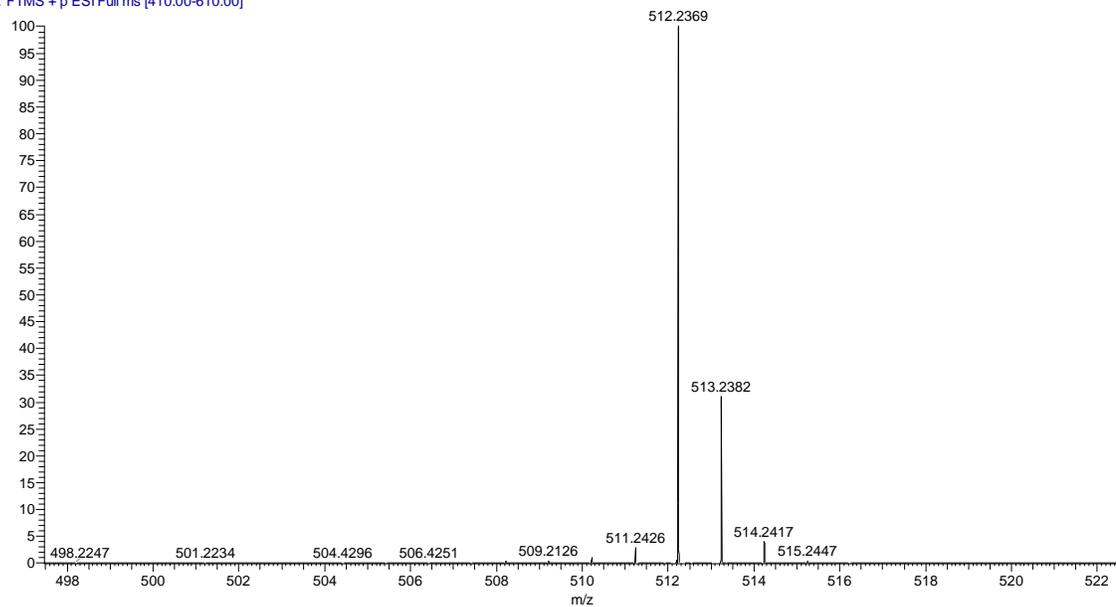
## Espectro de masa del compuesto 4q

CE\_FP4 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.07E7  
T: FTMS +p ESI Full ms [454.00-654.00]



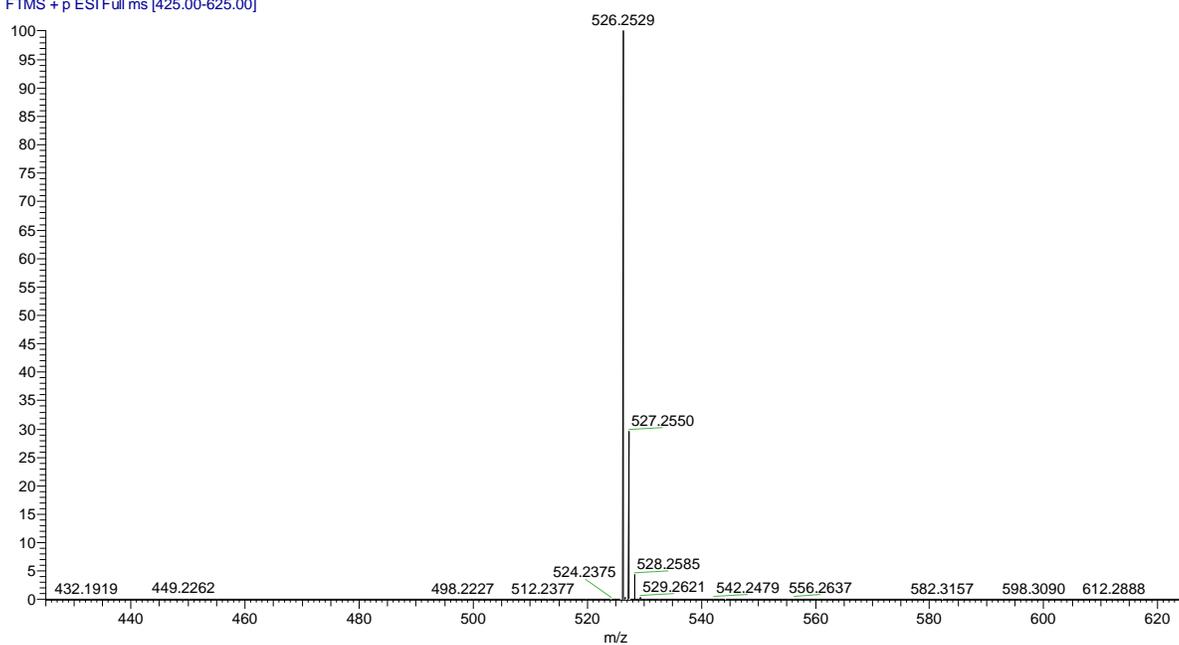
## Espectro de masa del compuesto 4r

051 #12 RT: 0.18 AV: 1 NL: 5.20E9  
T: FTMS +p ESI Full ms [410.00-610.00]



## Espectro de masa del compuesto 4s

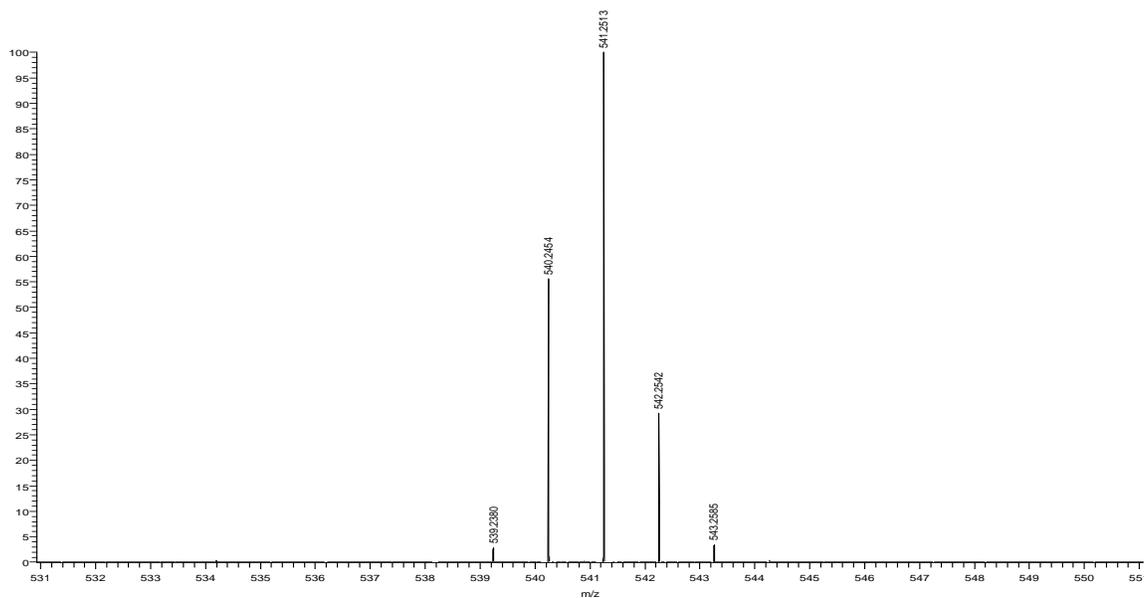
CE\_FP2 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.81E9  
T: FTMS + p ESI Full ms [425.00-625.00]



## Espectro de masa del compuesto 11a

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11a 06/07/19 09:35:20

11a #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.48E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [440.0000-640.0000]

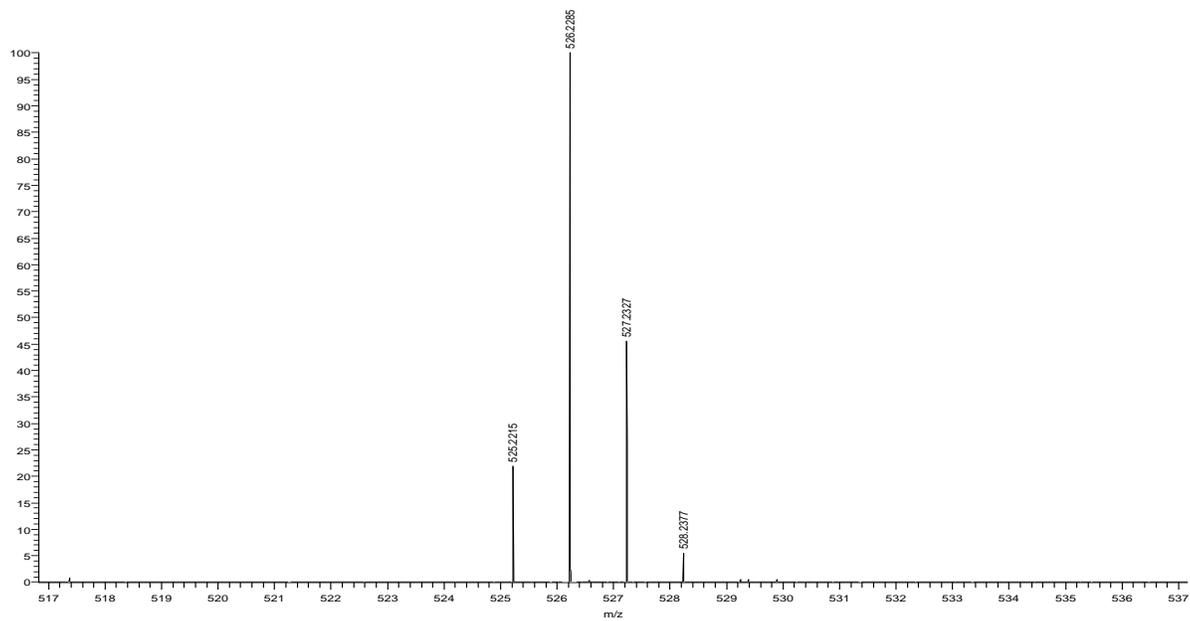


## Espectro de masa del compuesto 11b

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11b

06/07/19 10:19:19

11b #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 5.57E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [426.0000-626.0000]

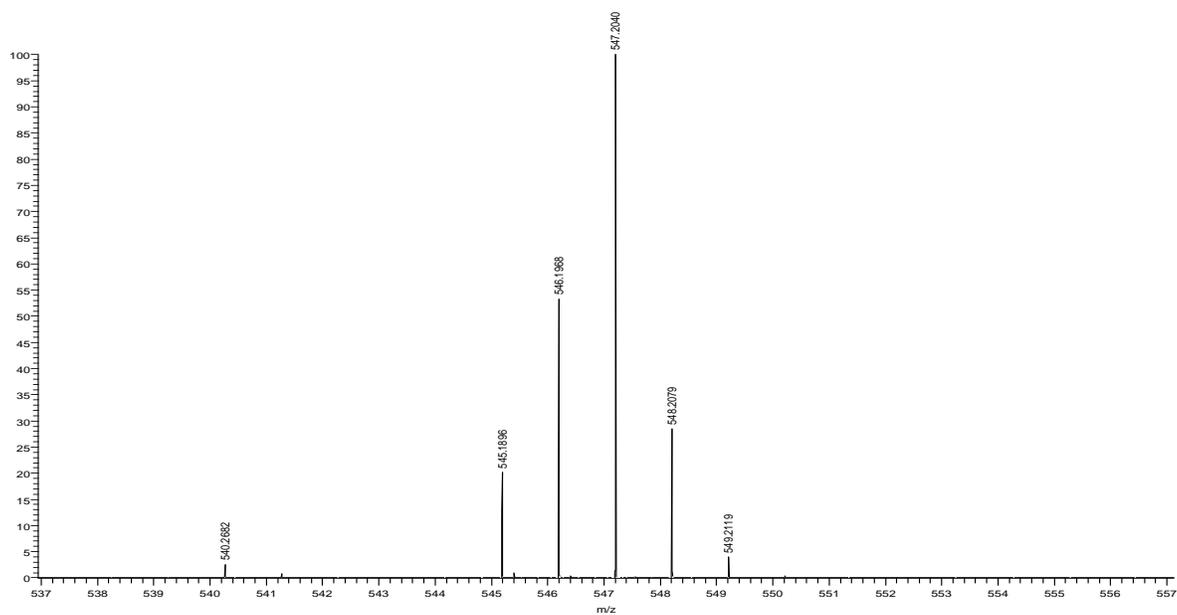


## Espectro de masa del compuesto 11c

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11c

06/07/19 10:47:10

11c #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 5.26E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [445.0000-645.0000]

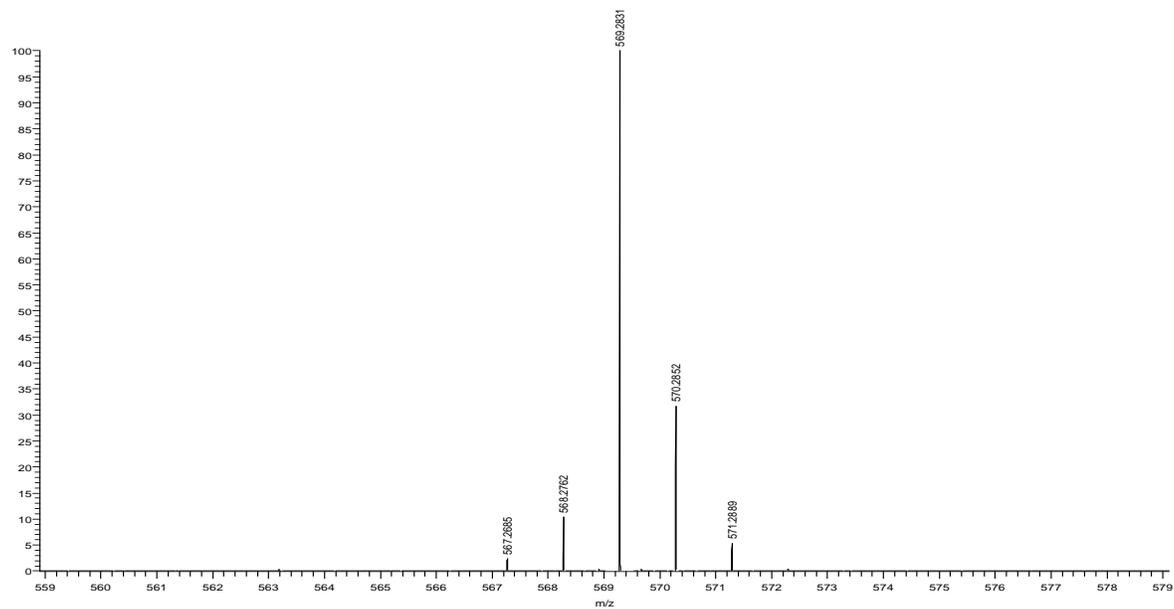


# Espectro de masa del compuesto 11d

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11d

06/07/19 09:57:25

11d #4 RT: 0.03 AV: 1 NL: 3.25E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [469.0000-669.0000]

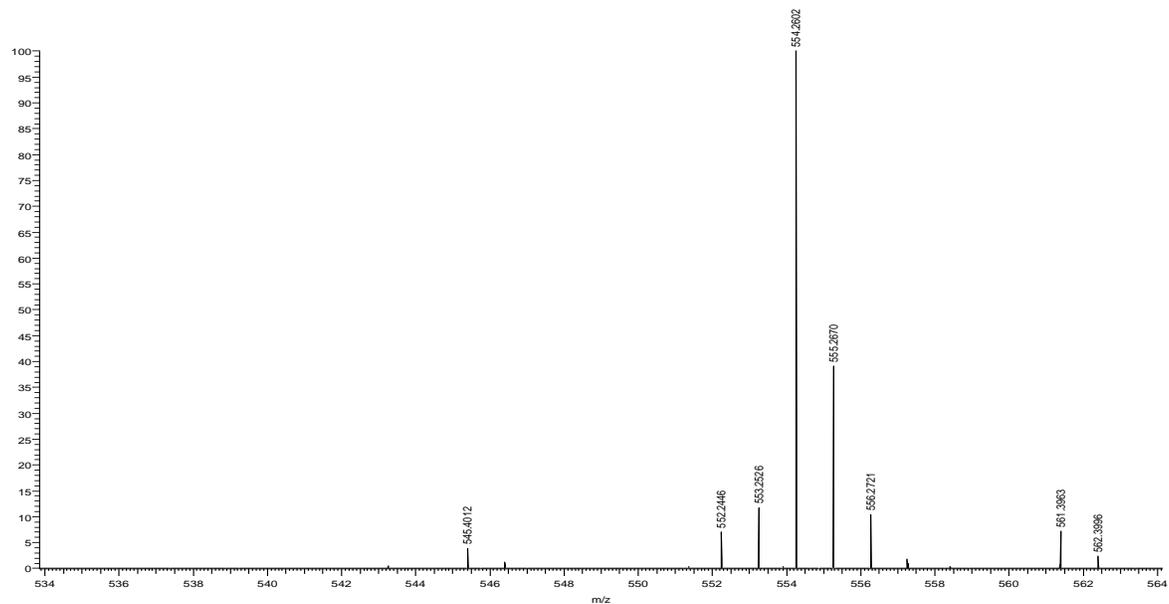


# Espectro de masa del compuesto 11e

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11e

06/07/19 10:25:06

11e #15 RT: 0.13 AV: 1 NL: 3.76E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [454.0000-654.0000]

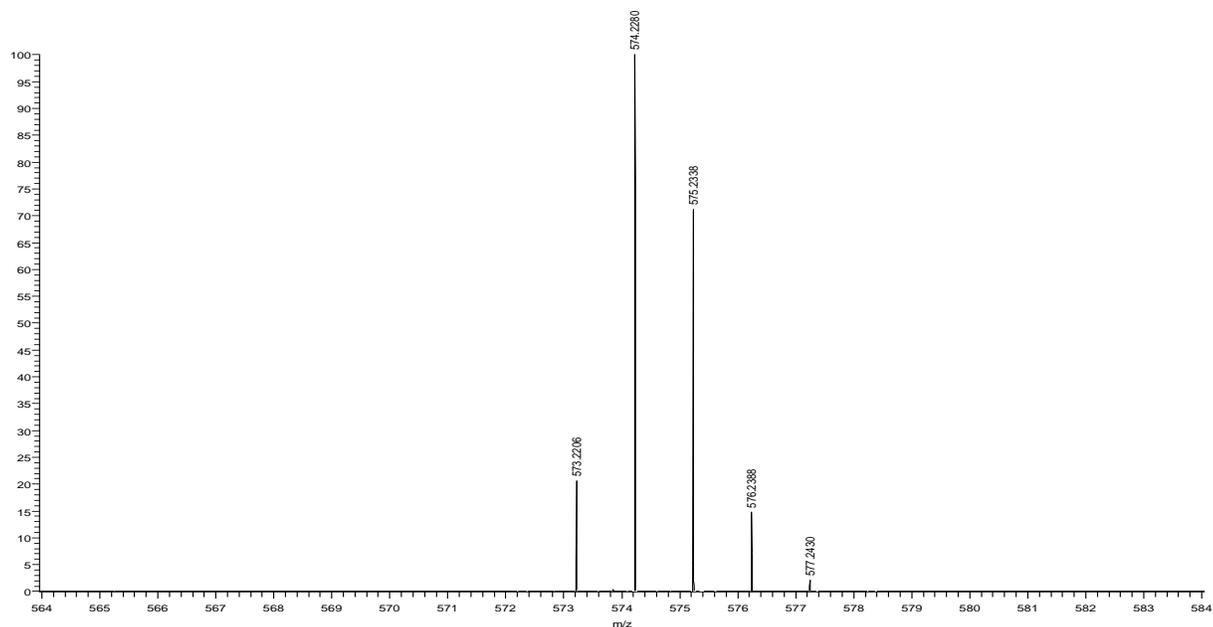


# Espectro de masa del compuesto 11f

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11f

06/07/19 11:15:49

11f #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 6.98E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [474.0000-674.0000]

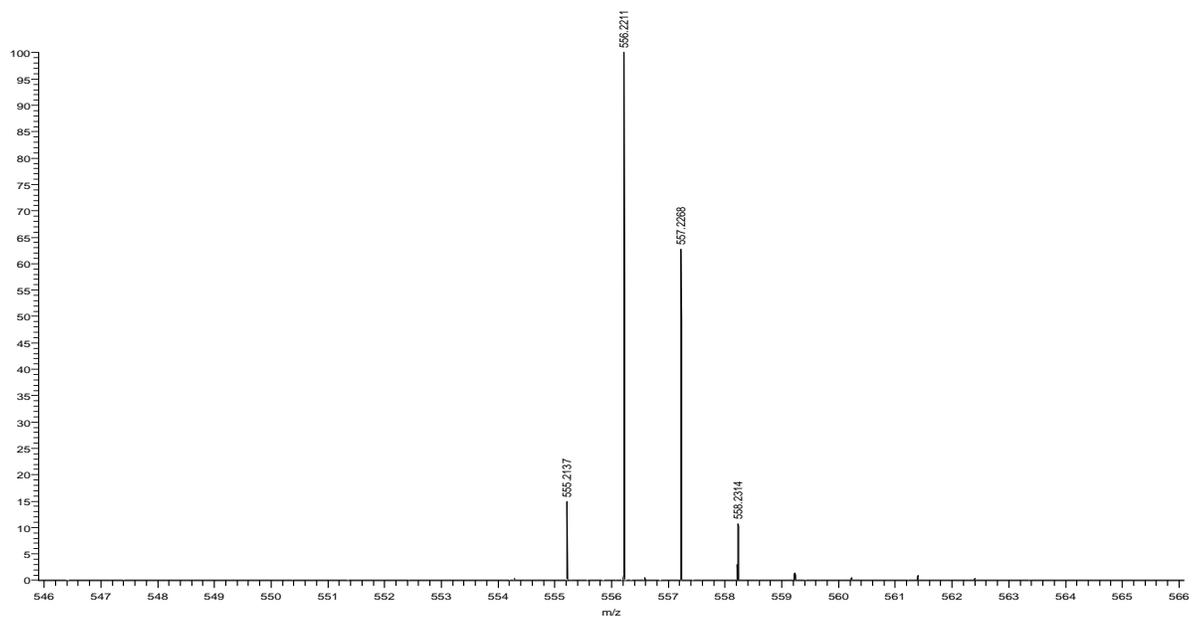


# Espectro de masa del compuesto 11g

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11g

06/07/19 10:04:20

11g #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 4.80E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [466.0000-666.0000]

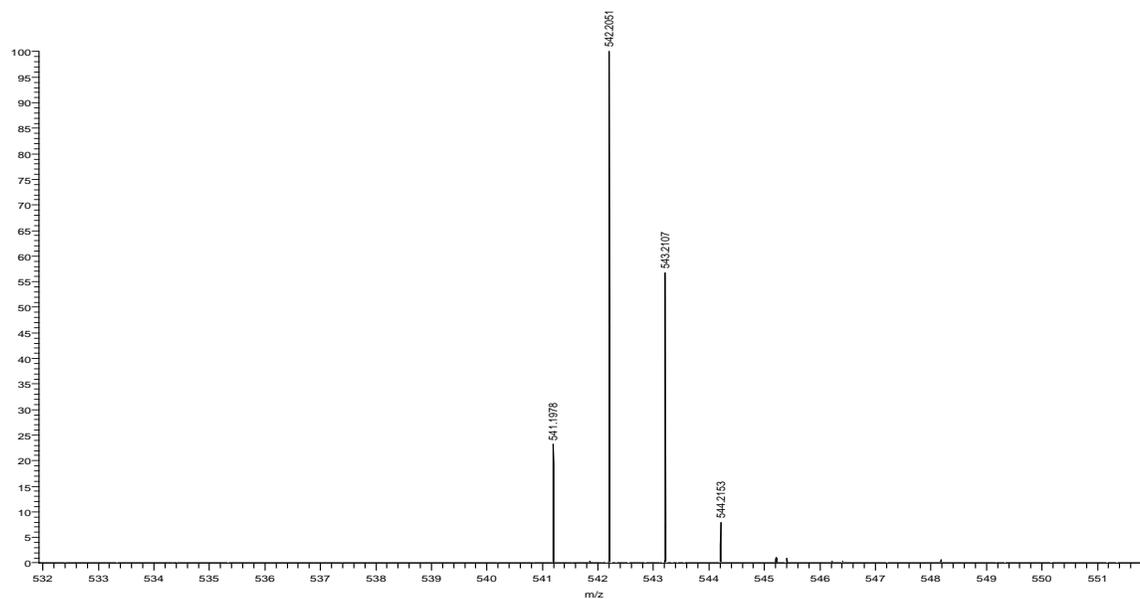


## Espectro de masa del compuesto 11h

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11h

06/07/19 10:30:21

11h #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 6.37E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [442.0000-642.0000]

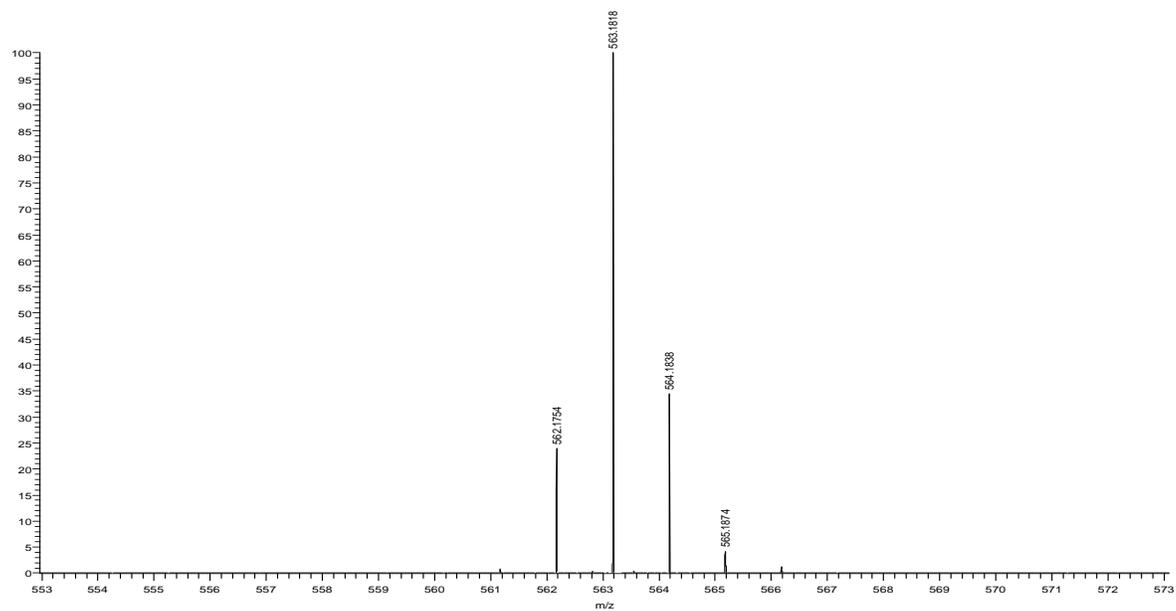


## Espectro de masa del compuesto 11i

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11i

06/07/19 09:42:26

11i #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.56E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [462.0000-662.0000]

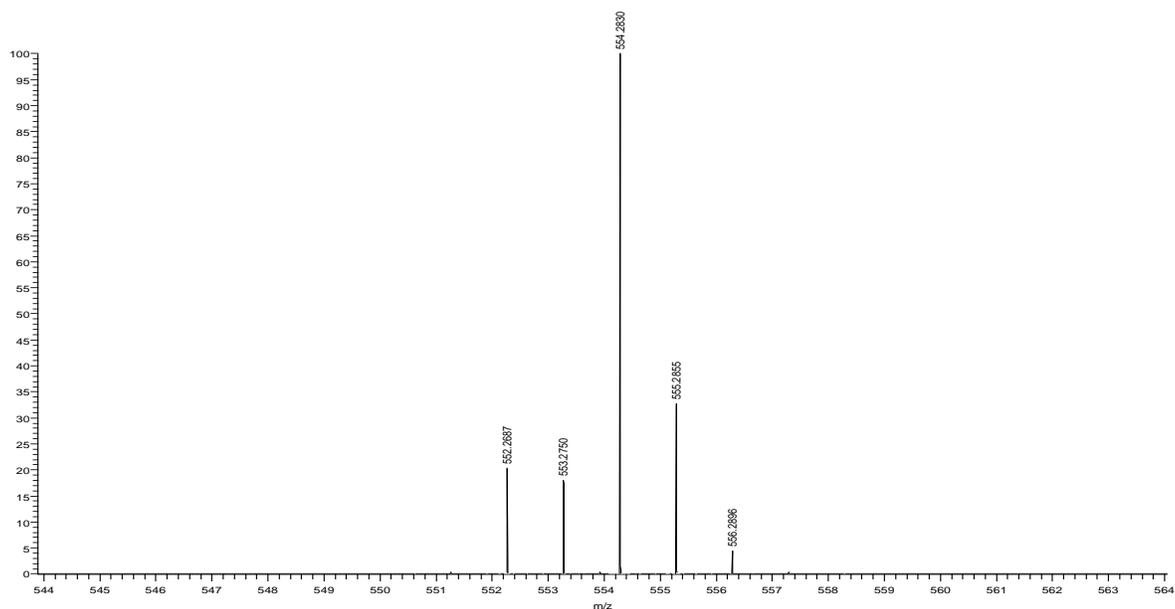


## Espectro de masa del compuesto 11j

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11j

06/07/19 10:09:09

11j #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 6.50E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [454.0000-654.0000]

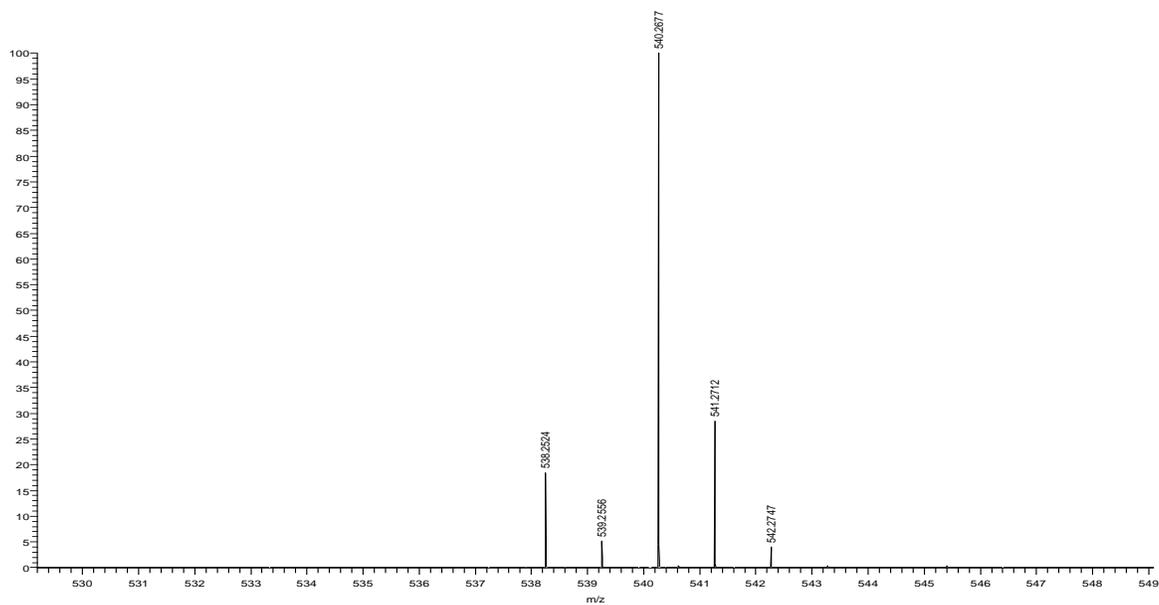


## Espectro de masa del compuesto 11k

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11k

06/07/19 10:35:53

11k #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.46E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [439.0000-639.0000]

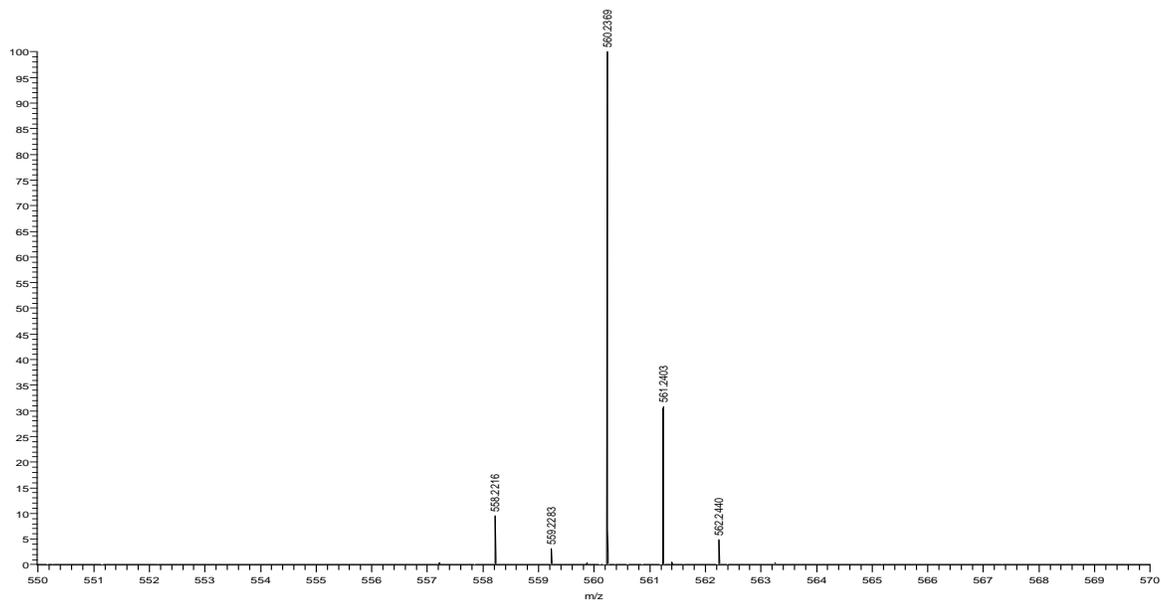


# Espectro de masa del compuesto 11l

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11l

06/07/19 11:23:50

11l #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 4.50E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [459.0000-659.0000]

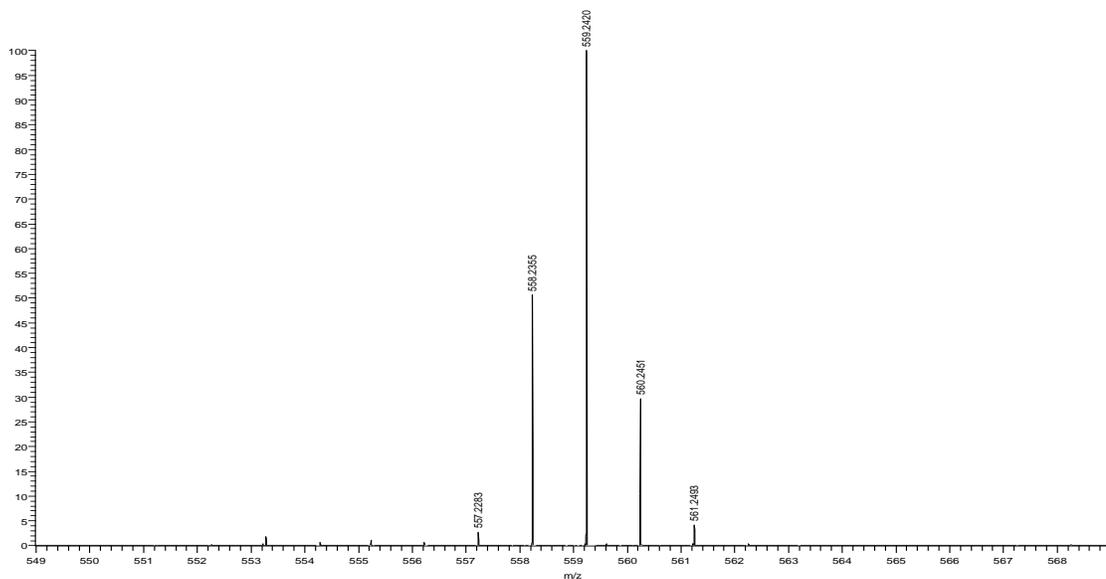


# Espectro de masa del compuesto 11m

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11m

06/07/19 10:14:03

11m #11 RT: 0.10 AV: 1 NL: 6.27E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [454.0000-654.0000]

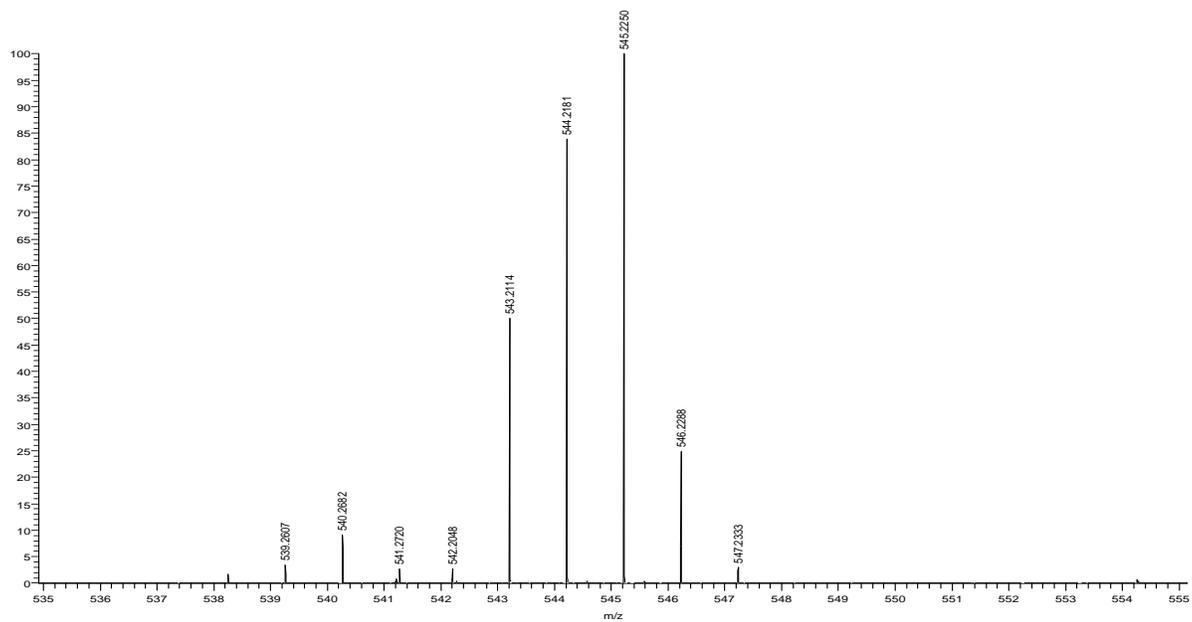


## Espectro de masa del compuesto 11n

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11n

06/07/19 10:42:06

11n #18 RT: 0.16 AV: 1 NL: 9.33E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [445.0000-645.0000]

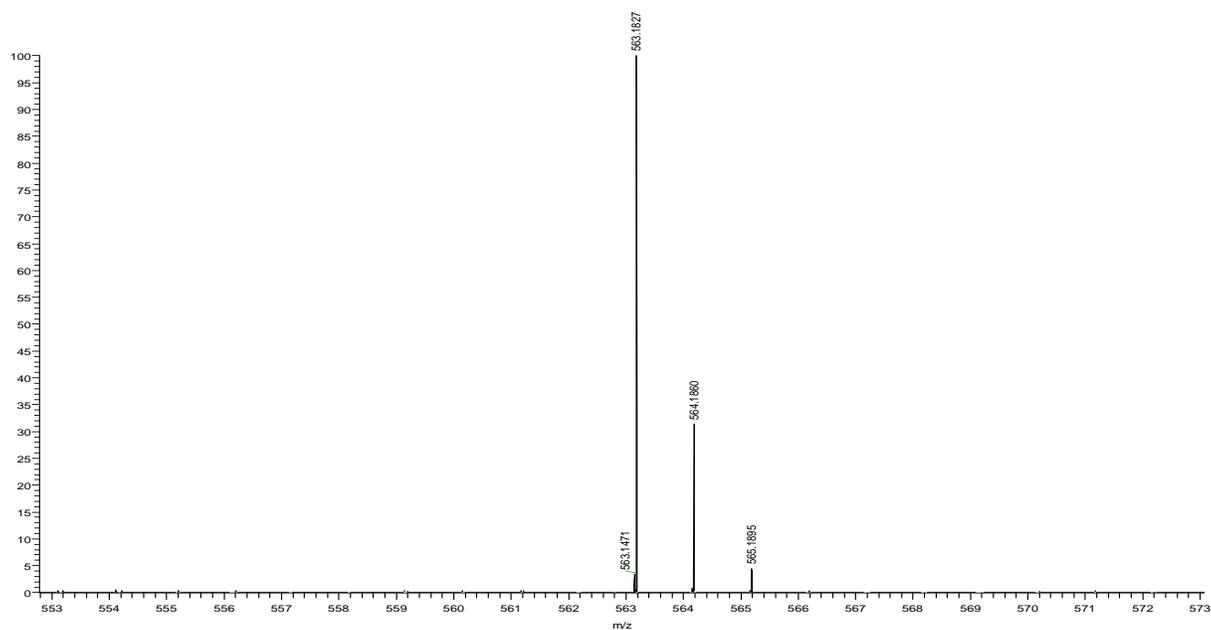


## Espectro de masa del compuesto 11o

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\11o\_2

06/07/19 11:35:04

11o\_2 #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.47E6  
T: FTMS - p ESI Full ms [465.0000-665.0000]

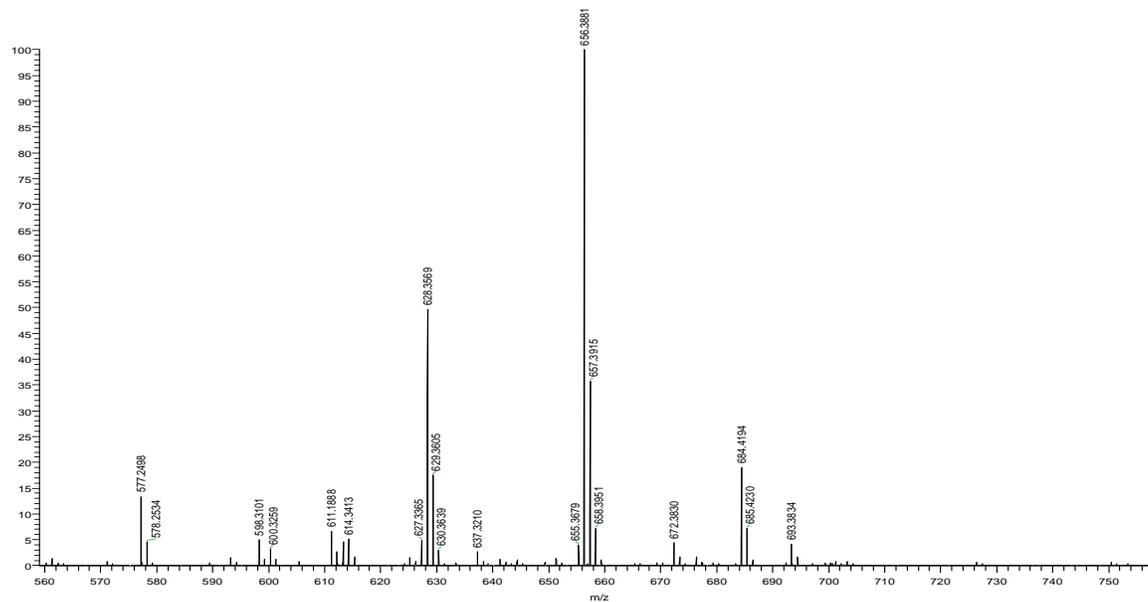


## Espectro de masa del compuesto 14a

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\14a

06/07/19 11:43:30

14a #18 RT: 0.16 AV: 1 NL: 2.94E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [559.0000-759.0000]

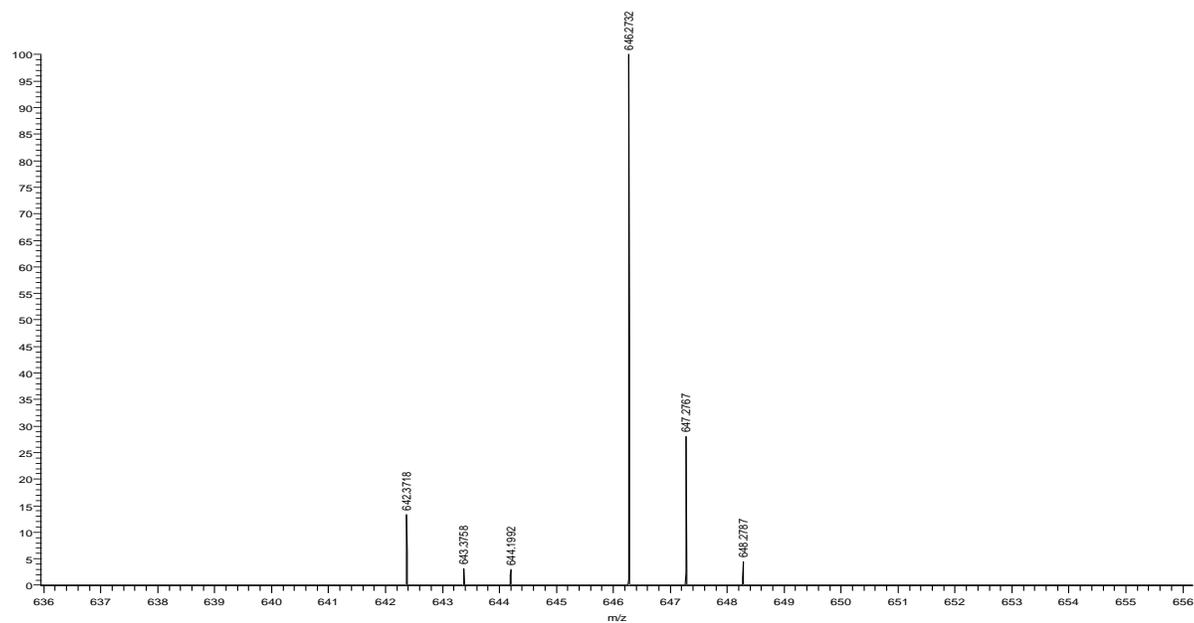


## Espectro de masa del compuesto 14b

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\14b

06/07/19 12:22:19

14b #5 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.73E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [545.0000-745.0000]

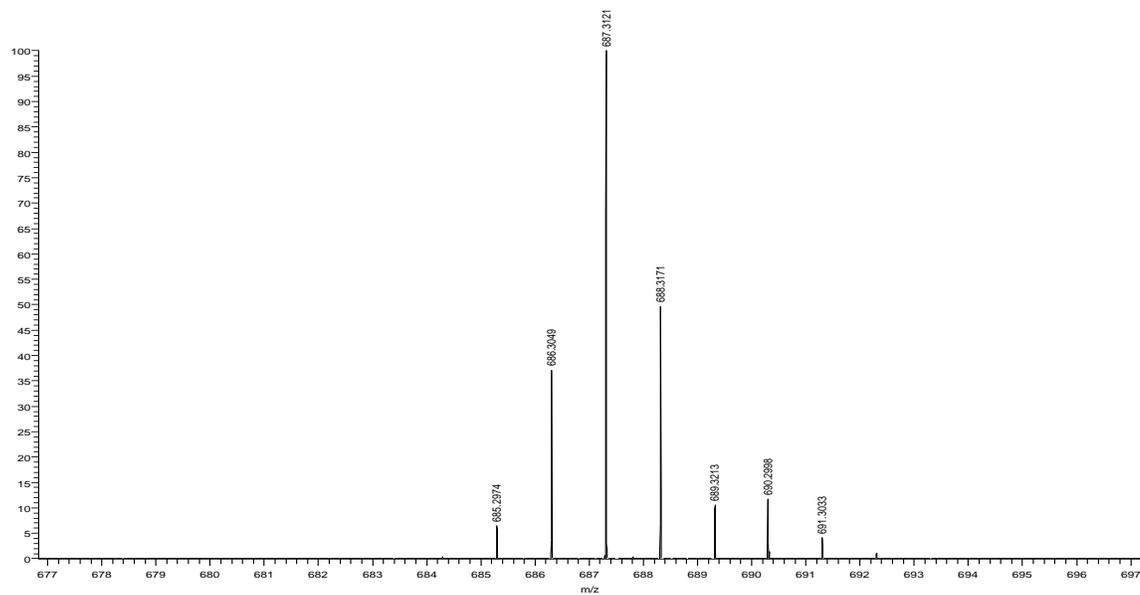


## Espectro de masa del compuesto 14d

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\14d

06/07/19 11:48:49

14d #8 RT: 0.07 AV: 1 NL: 1.22E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [587.0000-787.0000]

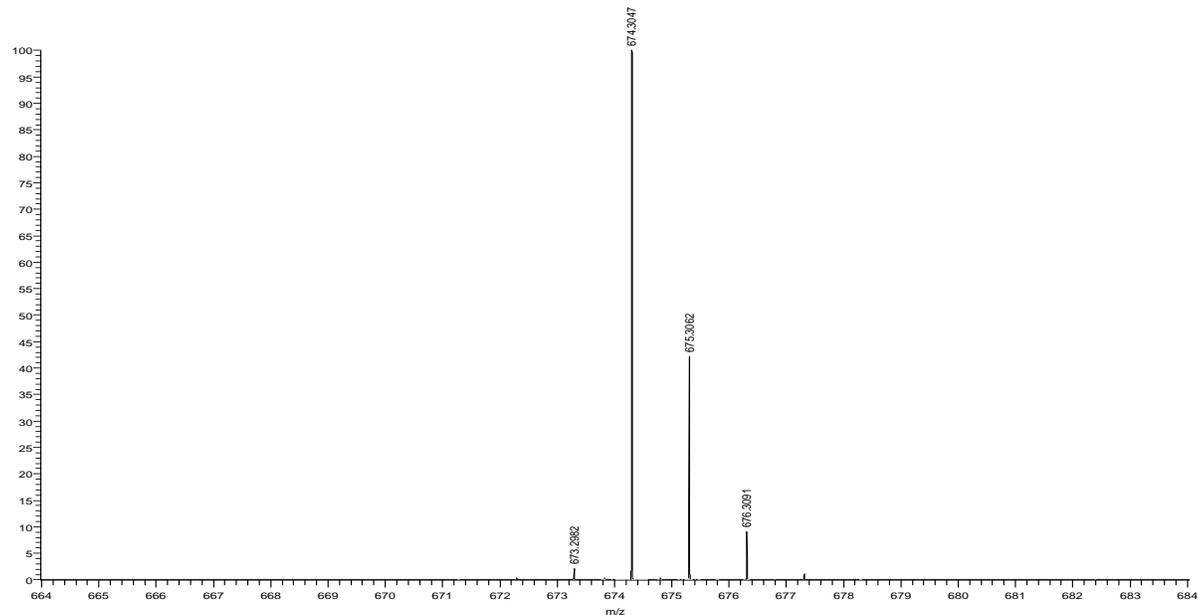


## Espectro de masa del compuesto 14e

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\14e

06/07/19 12:52:17

14e #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 7.53E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [573.0000-773.0000]

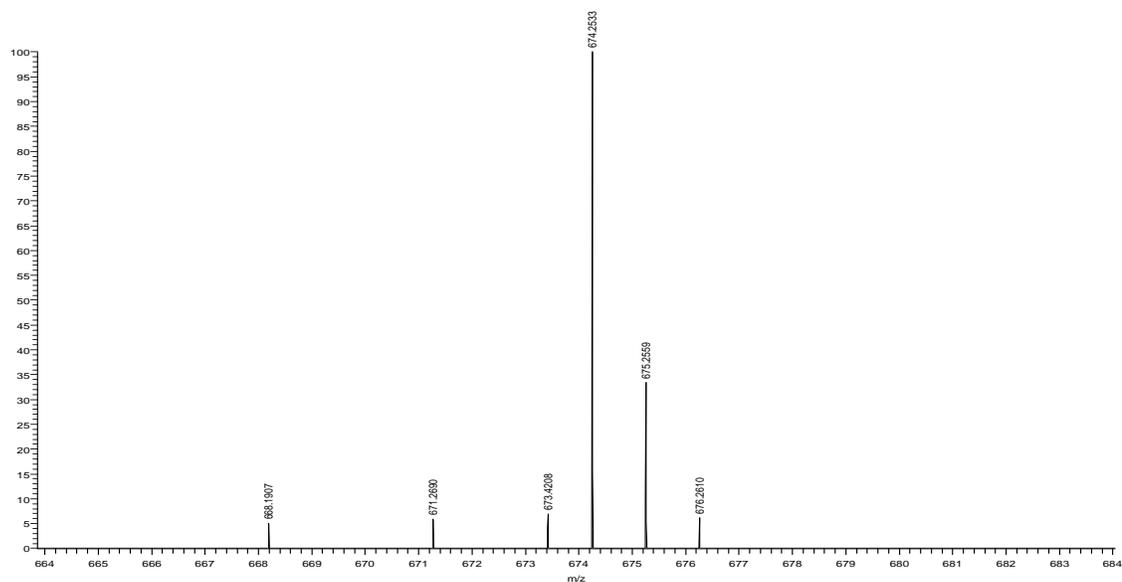


## Espectro de masa del compuesto 14g

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\14g

06/07/19 11:54:38

14g #7 RT: 0.06 AV: 1 NL: 3.84E4  
T: FTMS - p ESI Full ms [575.0000-775.0000]

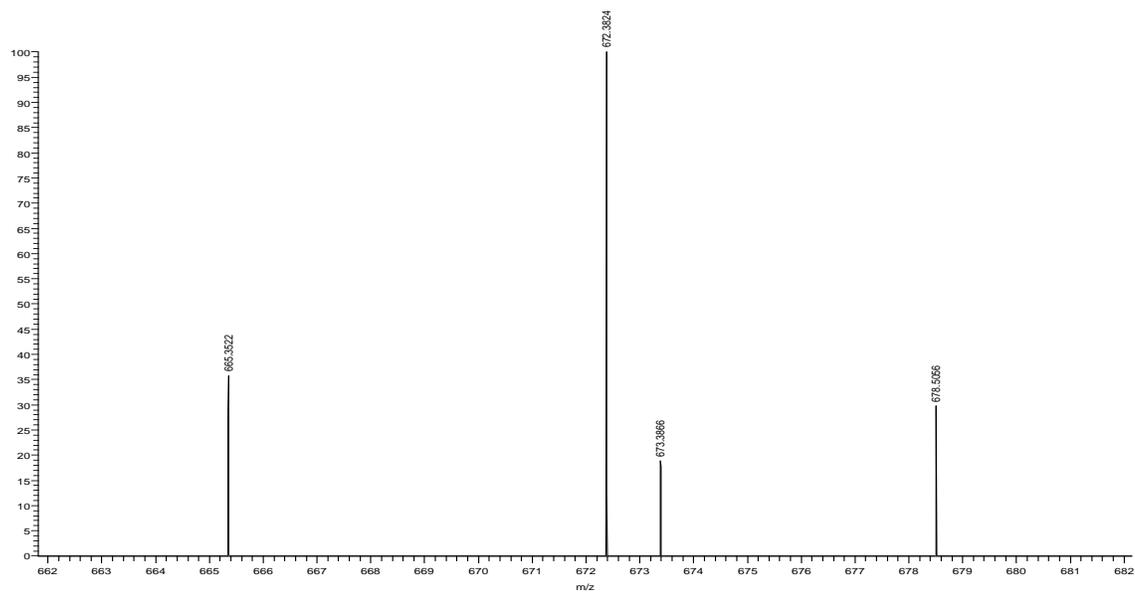


## Espectro de masa del compuesto 14j

D:\Tunes\2019\Junio\07.06.19\14j

06/07/19 12:02:35

14j #16 RT: 0.14 AV: 1 NL: 5.66E2  
T: FTMS + p ESI Full ms [572.0000-772.0000]

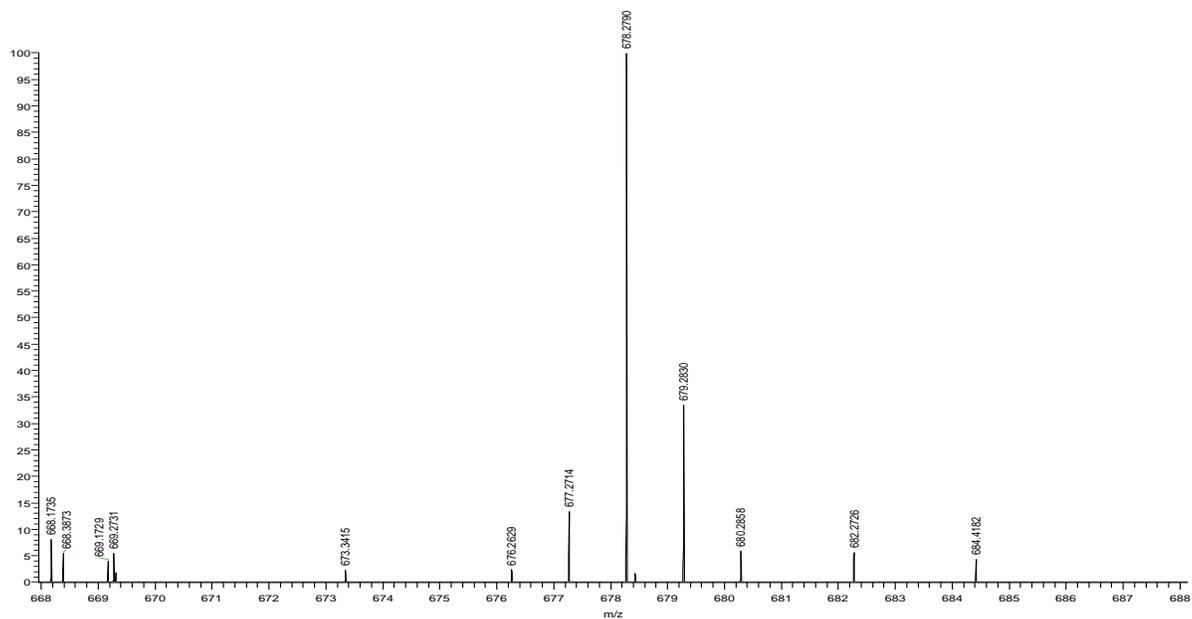


## Espectro de masa del compuesto 14m

D:\Tunes\...07.06.19\14m\_190607121421

06/07/19 12:14:21

14m\_190607121421 #5 RT: 0.04 AV: 1 NL: 5.13E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [577.0000-777.0000]

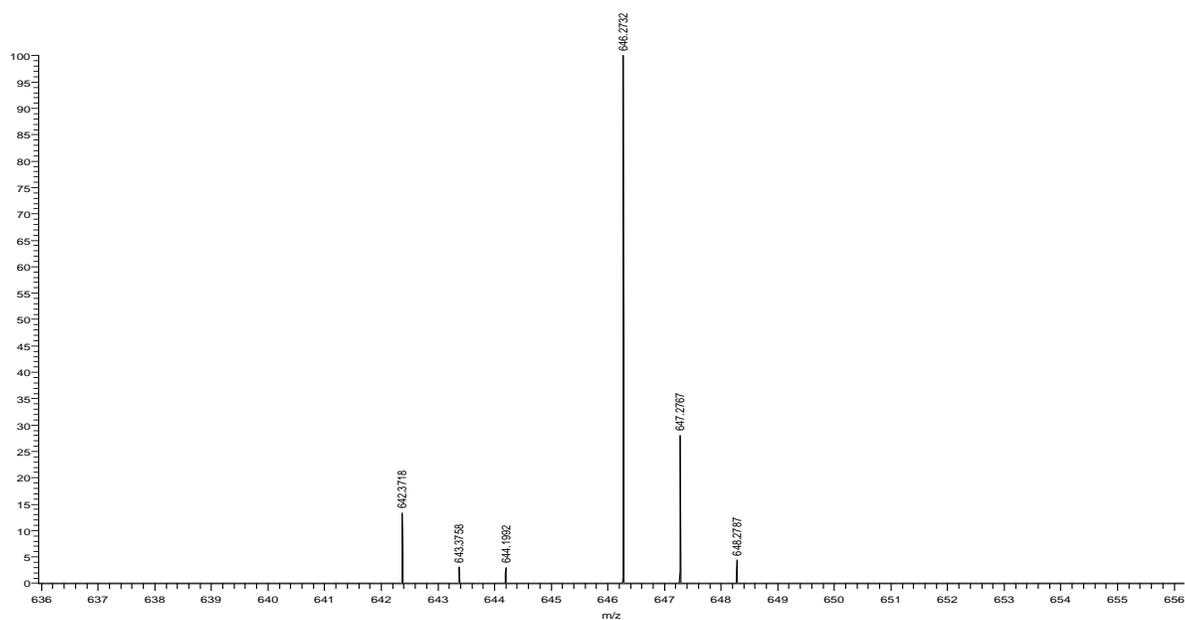


## Espectro de masa del compuesto 14n

D:\Tunes2019\Junio\07.06.19\14b

06/07/19 12:22:19

14b #5 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.73E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [545.0000-745.0000]

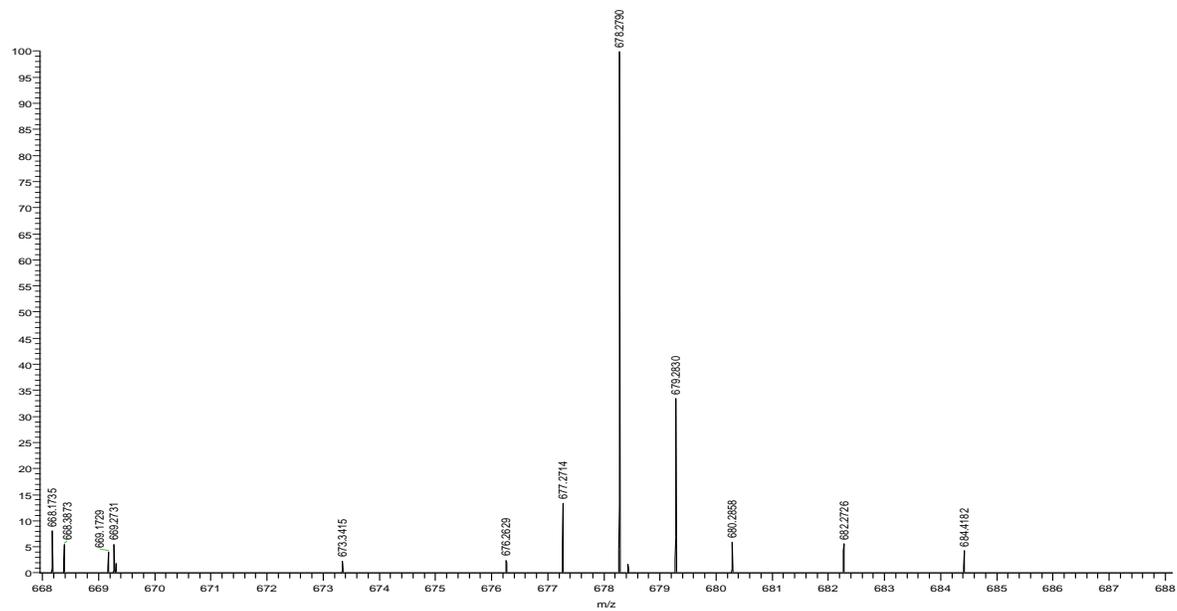


# Espectro de masa del compuesto 14o

D:\Tunes\...07.06.19\14m\_190607121421

06/07/19 12:14:21

14m\_190607121421 #5 RT: 0.04 AV: 1 NL: 5.13E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [577.0000-777.0000]



## 8.5 Ensayos biológicos suplementarios

### Reactivos generales: lista de proveedores y número de catálogo

Los siguientes reactivos se obtuvieron de *Sigma Aldrich*: Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ), Dimetilsulfoxido (DMSO) grado cultivo celular.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de *AK Scientific Inc*: Vismodegib (Cat.No.879085-55-9), Purmorfamina (Cat.No.483367-10-8).

Los siguientes reactivos se obtuvieron de *Santa Cruz Biotechnology*: Estaurosporina (Cat.No.62996-74-1).

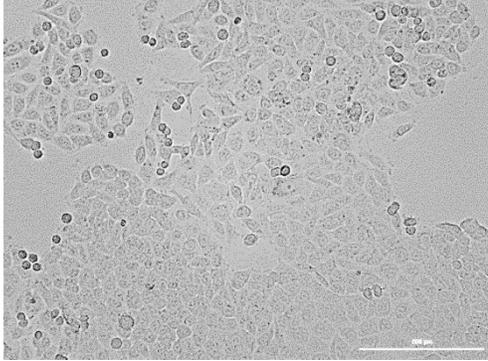
Los siguientes reactivos se obtuvieron de *Merk*: Solventes de grado analítico (etanol, metanol, cloroformo, isopropanol), ácido clorhídrico (HCl), 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT, Cat.No.MFCD0080731).

Los siguientes reactivos se obtuvieron de *ThermoFisher Scientific, CA*: Albumina de Suero Bobino (BSA), acrilamida/Bis-Acrilamida 40 %, Cell Trace CFSE Proliferation Kit (Cat.No.C34570), Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 & Propidium Iodide (PI) (Cat.No.V13245), SuperScript II (Cat.No18064014).

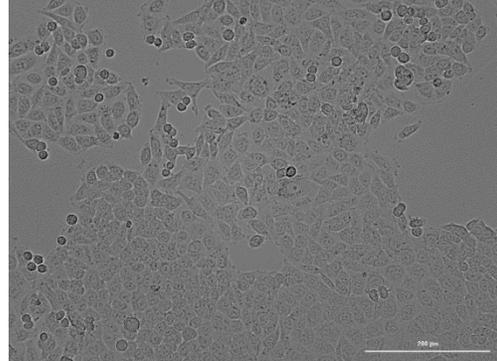
Los siguientes reactivos se obtuvieron de *Invitrogen*: Lipofectamine 2000 transfection Reagent (Cat.No.11668027), Trizol.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de *Fermelo S.A*: Dual-Glo Luciferase Assay System (Cat.No.E2920).

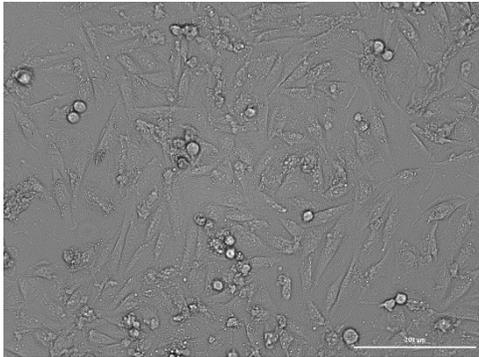
HT29 (adenocarcinoma  
colorrectal)



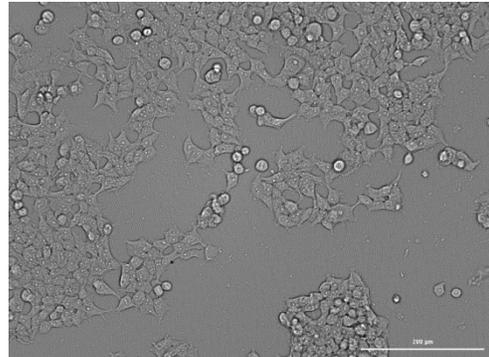
HCT116 (adenocarcinoma  
colorrectal)



H1975 (Cáncer de pulmón)



HEK293 (células no  
cancerígenas de riñón humano)



**Figura Anexo 1.** Microfotografías de contraste de fases a campo claro con un aumento de 4X para líneas celulares neoplásicas HCT116, HT29 y H1975 y no neoplásicas HEK293. Las células control (< 1 % DMSO) fueron fotografiadas luego de 48 h y mantenidas en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

**Tabla Anexo 1.** Screening completo del porcentaje de citotoxicidad para los compuestos finales correspondientes a la serie I (4a-s)

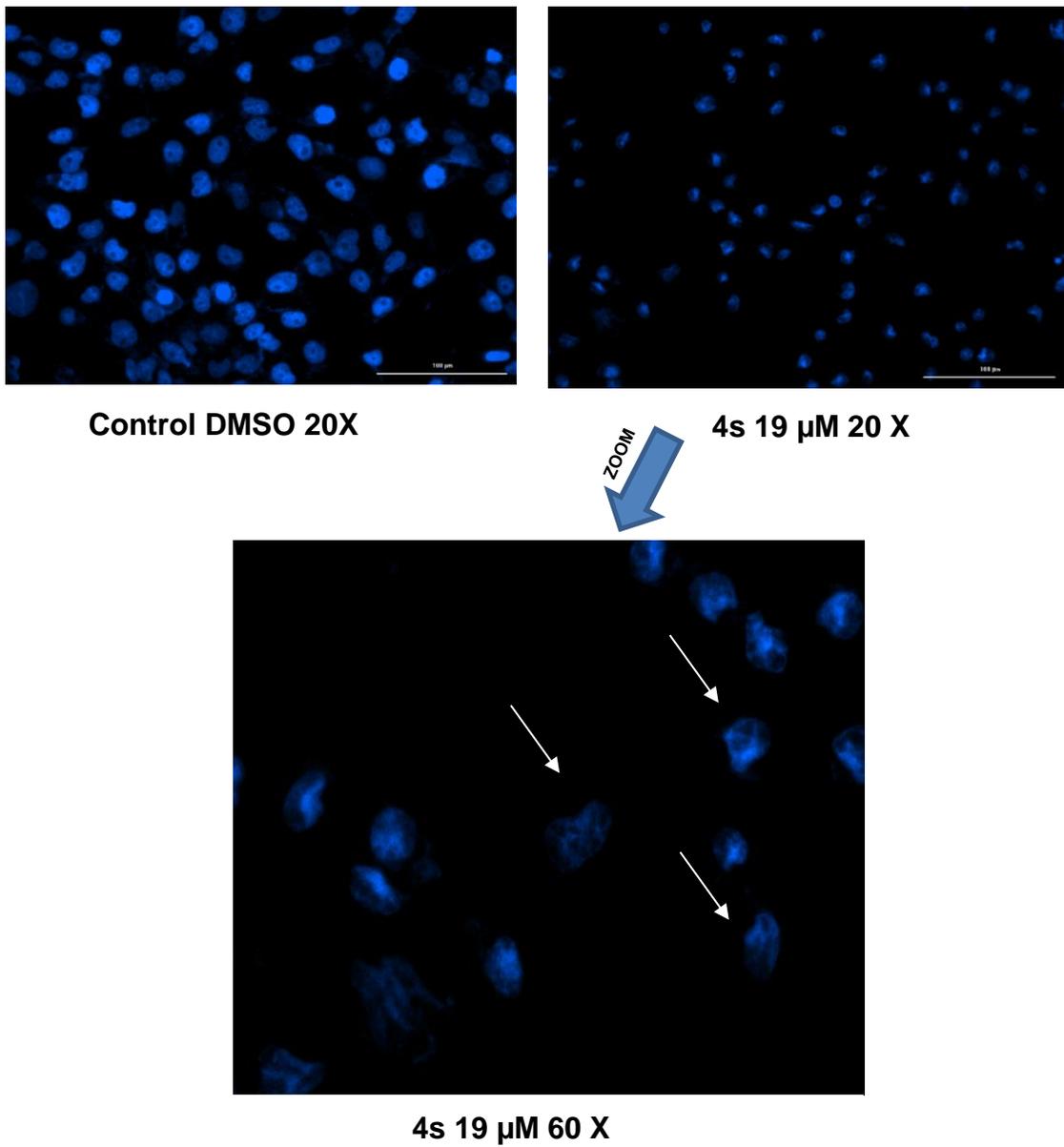
Compuestos	% Citotoxicidad (50 $\mu$ M)				
	HCT116	HT29	H1975	DAOY	HEK293
4a	68 $\pm$ 0.3	<50	66 $\pm$ 0.9	82 $\pm$ 6.2	<50
4b	53 $\pm$ 0.9	<50	<50	94 $\pm$ 0.4	<50
4c	<50	<50	<50	69 $\pm$ 0.9	<50
4d	<50	<50	<50	<50	<50
4e	<50	<50	<50	<50	<50
4f	<50	<50	<50	<50	<50
4g	<50	<50	<50	<50	<50
4h	<50	<50	61 $\pm$ 1.2	81 $\pm$ 1.1	<50
4i	<50	<50	<50	<50	<50
4j	<50	<50	<50	<50	<50
4k	<50	<50	<50	<50	<50
4l	<50	<50	<50	<50	<50
4m	<50	<50	<50	<50	<50
4n	<50	<50	<50	<50	<50
4o	<50	<50	<50	<50	<50
4p	<50	<50	<50	<50	<50
4q	<50	<50	<50	<50	<50
4r	81 $\pm$ 0.8	<50	<50	92 $\pm$ 0.4	<50
4s	99 $\pm$ 0.4	<50	99 $\pm$ 0.2	98 $\pm$ 0.3	<50
Vismodegib	<50	<50	53 $\pm$ 1.2	<50	<50

<b>Etopósido</b>	90±0.5	-	60±1.1	-	65±0.7
<b>Cisplatino</b>	-	-	-	88±0.7	88±0.7
<b>5-FU</b>	62±1.3	66±4.9	-	-	<50

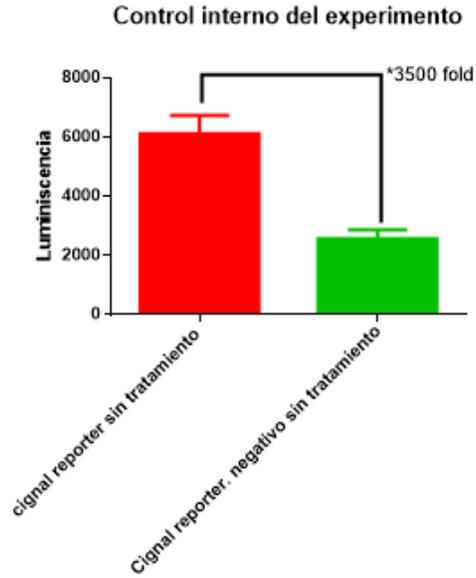
**Tabla Anexo 2.** Screening completo del porcentaje de para los compuestos finales correspondientes a serie II (11a-o) y serie III (14a-o)

<b>Compuestos</b>	<b>% Citotoxicidad (50 µM)</b>				
	<b>HCT116</b>	<b>H1975</b>	<b>DAOY</b>	<b>HT29</b>	<b>HEK293</b>
<b>11a</b>	69±3.2	64±2.5	73±4.9	65±6.2	51±4.4
<b>11b</b>	<50	<50	<50	<50	40±3.6
<b>11c</b>	<50	<50	<50	<50	55±1,7
<b>11d</b>	55±5.2	78±6.2	39±1.2	67±4.6	49±5.9
<b>11e</b>	<50	<50	<50	<50	39±3.1
<b>11f</b>	<50	<50	<50	<50	48±2.2
<b>11g</b>	57±2.4	75±4.2	26±1.1	69±2.8	20±2.4
<b>11h</b>	<50	<50	<50	<50	29±5.7
<b>11i</b>	<50	<50	<50	<50	33±3.4
<b>11j</b>	61±1.8	69±3.2	65±4.7	59±2.8	45±5.9
<b>11k</b>	<50	<50	<50	<50	36±5.4
<b>11l</b>	<50	<50	<50	<50	21±1.4
<b>11m</b>	65±4.7	75±5.2	28±1.2	61±5.8	34±5.9
<b>11n</b>	44±2.8	35±1.9	65±0.7	47±3.2	33±5.8
<b>11o</b>	<50	<50	<50	<50	33±6.3

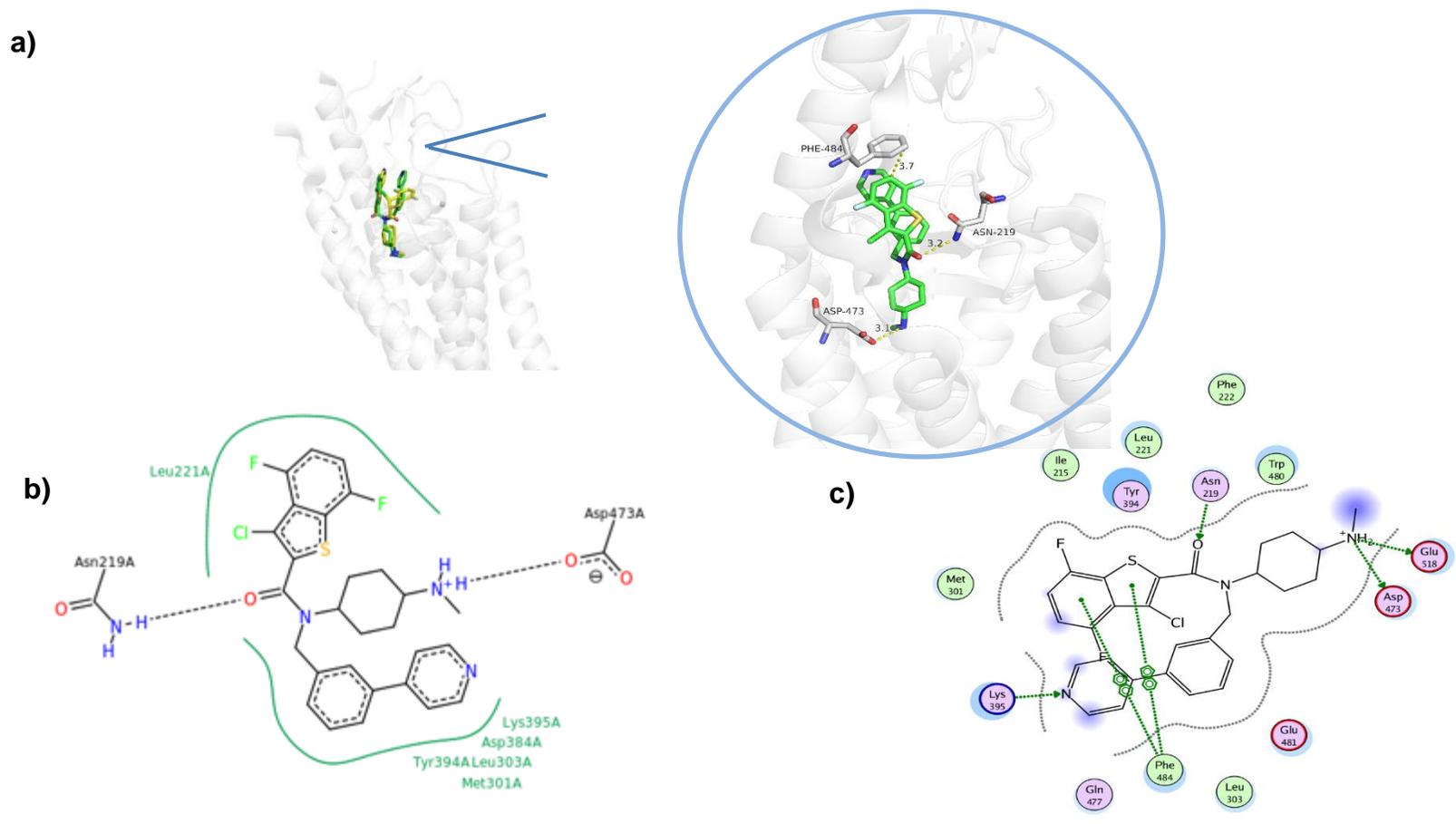
<b>14a</b>	<50	<50	<50	<50	40±1.1
<b>14b</b>	34±1.4	21±3.7	68±5.3	55±6.8	46±6.7
<b>14c</b>	<50	<50	<50	<50	48±2.3
<b>14d</b>	<50	<50	<50	<50	28±5.2
<b>14e</b>	<50	<50	<50	<50	45±4.4
<b>14f</b>	62±5.7	46±2.9	22±1.1	49±4.8	53±0.3
<b>14g</b>	63±5.1	29±1.2	36±5.2	49±1.6	55±6.3
<b>14h</b>	<50	<50	<50	<50	24±1.3
<b>14i</b>	<50	<50	<50	<50	25±1.7
<b>14j</b>	61±1.8	69±3.2	65±4.7	59±2.8	45±5.9
<b>14k</b>	62±1.3	25±2.7	16±0.7	39±0.8	23±4.4
<b>14l</b>	<50	<50	<50	<50	26±4.3
<b>14m</b>	65±4.7	75±5.2	28±1.2	61±5.8	34±5.9
<b>14n</b>	<50	<50	<50	<50	45±4.3
<b>14o</b>	<50	<50	<50	<50	37±4.2
<b>Vismodegib</b>	<50	<50	53±1.2	<50	<50
<b>Etoposido</b>	90±0.5	-	60±1.1	-	65±0.7
<b>Cisplatino</b>	-	-	-	88±0.7	88±0.7
<b>5-FU</b>	62±1.3	66±4.9	-	-	<50



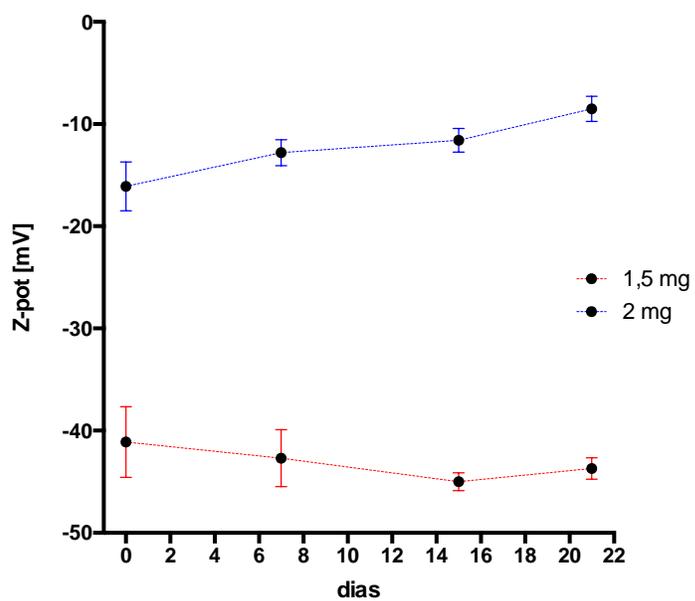
**Figura Anexo 2.** Morfología celular y evaluación del daño al ADN por tinción con DAPI en células HT29 tratadas con control (< 1% DMSO) y 19  $\mu$ M de **4s** a 1 horas de tratamiento. Células son mostradas con un aumento de 20 x y 60 x. Flechas blancas indican pérdida de morfología celular y condensación de la cromatina.



**Figura Anexo 3.** Control interno del experimento de gen reportero Gli-lucifera. El valor de 3500 órdenes de magnitud de diferencia entre el reportero positivo sin tratamiento y el reportero negativo sin tratamiento, indica que no habría la participación de otras vías de señalización cruzadas las cuales pudieran interferir con los resultados.



**Figura Anexo 4.** Superposición de estructuras de SAG 1.5-hSmo y principales interacciones. **a)** Color amarillo: Cristal, Color verde: estructura optimizada. **b)** Principales interacciones entre Sag 1.5 cristal, entre ellas, destacan interacciones de puente de hidrógeno entre el carbonilo y asn 219 y una interacción ion-ión entre el nitrógeno protonado de SAG 1.5 y un residuo de asp 473. **c)** Principales interacciones entre SAG 1.5 optimizado se correlacionan con las descritas en el cristal (**b**).



**Figura Anexo 5.** Variación del potencial Z en el tiempo. Se evaluó por 21 días la estabilidad de dos sistemas con diferente carga de compuesto **4s** (1.5 y 2 mg). Estudios realizados por triplicado