



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Recerca i caracterització de nous *leads* per al tractament del càncer

Patricia Mateo Campins

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**RECERCA I CARACTERITZACIÓ DE NOUS *LEADS* PER AL
TRACTAMENT DEL CÀNCER**

PATRICIA MATEO CAMPINS
2018

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**RECERCA I CARACTERITZACIÓ DE NOUS *LEADS* PER AL
TRACTAMENT DEL CÀNCER**

PROGRAMA DE DOCTORAT DE QUÍMICA ORGÀNICA

Memòria presentada per Patricia Mateo Campins per optar al títol de
doctor per la Universitat de Barcelona

M^a Dolors Pujol Dilmé

Patricia Mateo Campins

PATRICIA MATEO CAMPINS, 2018

AGRAÏMENTS

Aquesta memòria és el resultat de quatre anys de dedicació a un projecte que no tan sols consisteix en l'adquisició de coneixements purament relacionats amb la recerca científica que es duu a terme, sinó també en l'aprenentatge d'habilitats essencials com el treball en equip, la paciència i la constància. Si bé és cert que hi ha hagut obstacles i moments de patiment, aquesta experiència destaca pels bons moments, l'alegria, els ànims i l'afecte de tots aquells que han col·laborat en fer-lo possible.

A la primera persona a la qual voldria agrair tot el seu esforç és a la persona sense la qual no hagués estat possible l'elaboració d'aquesta tesi doctoral: la Dra. Dolors Pujol. Gràcies a ella he gaudit de l'oportunitat d'entrar en contacte amb el món de la recerca química mèdica i he pogut realitzar un projecte molt enriquidor tant a nivell personal com professional. M'agradaria transmetre-li de tot cor, tota la meva admiració per la seva paciència, dedicació i capacitat d'esforç insuperables. També m'agradaria agrair-li la confiança que sempre ha dipositat en mi, així com els consells, l'ajuda, l'atenció i els ànims que m'ha fet arribar tant en els moments bons com en els moments més complicats. Ha estat un privilegi poder comptar amb la tutela.

En segon lloc, m'agradaria agrair-li a la Dra. Annalisa Santucci l'oportunitat d'haver treballat en el seu grup de recerca a la Universitat de Siena i posar al meu abast els mitjans necessaris per dur a terme l'avaluació biològica dels meus compostos. A més a més, m'agradaria esmentar tot el coneixement i l'ajuda desinteressada rebuts per la Dra. Giulia Bernardini i tots els companys de laboratori, els quals han fet possible obtenir no només resultats prometedors sinó també haver fet de la meva estada un record inoblidable. Així mateix, m'agradaria agrair a la Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons el seu ajut econòmic que ha facilitat la realització d'aquesta estada.

Aquests anys de treball no haguessin estat possibles sense tots i cadascun dels que han format part d'aquest grup de recerca. Durant aquests quatre anys, he tingut el plaer de compartir el meu dia a dia al laboratori de Química Farmacèutica amb la Dra. Laura Grau i els doctorands Lorena Navarro, Lucía Acedo, Enric Lizano, Marta Vilapana i Miquel Vinyes. A la Dra. Laura Grau, agrair-li una vegada més tot el que m'ha ensenyat i m'ha transmès amb el seu bon humor i la seva determinació inigualables. A la Lorena, transmetre-li tota l'estima que li tinc per tota l'ajuda que m'ha ofert, per ser un exemple de treball constant i per haver compartit i encoratjat aquesta etapa final del doctorat. A la Lucía, amb la qual he pogut compartir d'inici a final la tesi doctoral, per la seva manera de veure el món i la serenitat amb la qual afronta la vida. A l'Enric i a la Marta, per haver-me fet recordar que amb il·lusió i treball en equip, els resultats sempre són més enriquidors en tots els aspectes. Al Miquel, transmetre-li la motivació i l'energia necessaris per seguir endavant amb la mateixa motivació que ha mostrat fins ara.

De la mateixa manera, m'agradaria recalcar la participació en aquest treball de la Yuliyah Koval, la Leïla Khacef, la Paula Álvarez, l'Helena Río i el Pol Salvans, sense els quals no podria haver obtingut tots els resultats que s'inclouen en aquesta memòria. A més a més, tot i que no han format part d'aquest projecte directament, agrair a la Lidia Terrazas, a la Miren Fernández i a la Yuyu Zhang la seva energia positiva i el seu suport.

Gràcies al Dr. Manel Romero, al Dr. Richard Soucek, al Dr. Arturo Vinuesa i de nou a la Dra. Laura Grau per haver realitzat el valuós treball previ amb el qual s'ha pogut encaminar aquest projecte.

Agraeixo també als membres del tribunal, el Dr. Daniel-Henri Caignard, la Dra. Gemma Triola i la Dra. Olga Abián, la dedicació i el temps que els ha suposat formar-ne part.

Per últim, agrair a la meva família i als meus amics tot el suport i l'amor que m'han donat sempre, per haver estat allà, per seguir aquí i per fer-me tirar endavant.

Gràcies

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ACHN: 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitril)
AcOEt/EtOAc: Acetat d'etil/*Ethyl acetate*
ACN: Acetonitril
ADCC: *Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*
ADN/DNA: Àcid desoxirribonucleic /*Deoxyribonucleic acid*
AEBP2: *Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2*
AIES: Antiinflamatoris esteroides
ALK: quinasa del limfona anaplàstic/*Anaplastic lymphoma kinase*
AML: Leucèmia mieloide aguda/*Acute Myeloid Leukaemia*
Angptl8: *Angiopoietin Like 8*
APOC3: *Apolipoproteina C-III*
APTS: Àcid para-toluensulfònic
ARN/RNA: Àcid ribonucleic /*Ribonucleic acid*
ASCO: Societat Americana d'Oncologia Clínica/*American Society of Clinical Oncology*
AR: Receptor androgènic/*Androgenic Receptor*
CCM: Carcinoma de cèl·lules Merkel
CDI: Carbonildiimidazole
CDK: Ciclina depenent de quinasa
CMT: Carcina medul·lar de tiroides
CPCP: Càncer de pulmó de cèl·lules petites o microcític
CPCNP: Càncer de pulmó de cèl·lules no petites o no microcític
CU: Carcinoma urotelial
CYP: Citocrom
CSC: *Cancer Stem Cells*
DME: 1,2-Dimetoxietà
DMF: Dimetilformamida
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO: Dimetilsulfòxid
EED: *Embryonic Ectoderm Development*
EGCG: Epigallocatequina-3-galat
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
EM/MS: Espectroscòpia de masses/*Mass Spectroscopy*
EMT: transició epiteli-mesènquima
ESI: Ionització per electroesprai
EtOH: Etanol/*Ethanol*
EZH1/EZH2: *Enhancer of Zeste Homolog 1/2*
FDA: *Food and Drug Administration*
FLT3: *FMS-Like Tyrosine Kinase 3*
GCO: *Global Cancer Observatory*
HER2: Receptor del factor de creixement epidèrmic humà 2
HMT: Histona metil transferasa
HRMS: *High Resolution Mass Spectroscopy*
HNSCC: Carcinoma escamocel·lular de cap i coll/*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*
HR: Receptor hormonal
IC₅₀: Concentració inhibidora 50
ICT: *Institute of Cancer Therapeutics*

ILCs: *Innate Lymphoid cells*
IL: *Interleukin*
INE: Instituto Nacional de Estadística
iNKT: *invariant Natural Killer T cells*
IR: *Infrared radiation*
ISCIII: *Spanish National Centre for Epidemiology*
JARID: *Jumonji- and AT-rich Interaction Domain*
KRAS: *Kirsten Rat Sarcoma*
LC/MS: *Cromatografia de líquids amb espectrofotometria de masses/Liquid chromatography–mass spectrometry*
mAbs: *Anticossos monoclonals/Monoclonal antibodies*
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MSC: *Cèl·lules mieloides supressores/Myeloid Suppressor Cells*
MDS: *Síndrome mielodisplàtica/Myelodysplastic Syndrome*
MeOH: *Metanol/methanol*
MHz: *Megahertz*
MIC: *Concentració mínima inhibidora/Minimum inhibitory concentration*
miRNA: *micro-ARN/microRNA*
MNAM: *Metilnicotinamida*
MSRE: *Modulador selectiu dels receptors d'estrogen*
MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
mTORC1: *Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*
MTT: *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*
MW: *Microones/microwave*
ncRNA: *ARN no codificant/non-coding RNA*
NF-YA: *Nuclear transcription factor Y subunit alpha*
NK: *Natural Killer*
NNMT: *Nicotinamida N-Methyl Transferase*
OIDD: *Open Innovation Drug Discovery*
OMS: *Organització Mundial de la Salut*
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCL: *Polycomb Like*
PCSK9: *Pro-protein Convertase Subtilisin Kexin type 9*
PcG: *Grup Polycomb/Polycomb group*
PDGFR: *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*
ppm: *Parts per milió/parts per million*
pRb: *Proteïna del retinoblastoma/Retinoblastoma Protein*
PRC: *Complex Repressiu Polycomb/Polycomb Repressive Complex*
PTM: *Modificació post-traducciona*
RANKL: *Lligand del receptor activador del factor nuclear κ B/Receptor activator of nuclear factor κ B ligand*
RbAp48/46: *Histone-binding protein Retinoblastoma binding protein p48/46*
R_f: *Factor de retenció*
RMN/NMR: *Ressonància Magnètica Nuclear/Nuclear Magnetic Resonance*
RoR α : *Retinoic acid-related orphan nuclear receptor α*
SAT: *S-Adenosilhomocisteïna*
SAM: *S-adenosil-metionina*
SAR: *Relació estructura activitat/Structure-Activity Relationship*

SET: *Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax*
siRNAs: *Small interfering RNAs*
S_NAr: *Substitució Nucleòfila Aromàtica*
STAT-3: *Signal transducer and activator of transcription 3*
SUZ12: *Supressor of Zeste 12*
T-ALL: *Leucèmia limfoblàstica aguda de cèl·lules T/T-cell acute lymphoblastic leukaemia*
t.a./RT: *Temperatura ambient/Room Temperature*
TBK1: *TANK-binding kinase 1*
Th cells: *T helper cells*
TLC: *Thin Layer Chromatography*
TMS: *Tetrametilsilà/tetramethylsilane*
TNEGEP: *Tumors neuroendocrins gastroenteropancreàtics*
TNF: *Factor de necrosis tumoral*
Treg: *Regulatory T cells*
Th: *T helper cells*
THF: *Tetrahidrofuran/Tetrahydrofuran*
TNF: *Tumour Necrosis Factor*
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
VHB: *Virus de la hepatitis B*
VHC: *Virus de la hepatitis C*
VPH: *Virus del papil·loma humà*

RESUM

La present tesi doctoral està enfocada al desenvolupament de noves petites molècules dirigides a diferents dianes del càncer. Els descobriments recents sobre la seqüenciació genòmica del càncer han revelat que molts dels gens involucrats en la regulació de la cromatina que modifiquen histones es troben sovint mutats en múltiples tipus de càncer. Entre aquests modificadors d'histones, els complexos multiproteics anomenats *Polycomb Repressive Complex* (PRC) estan implicats en el silenciament epigenètic, alterant principalment l'estructura de la cromatina, la pluripotència de cèl·lules mare i l'expressió de gens específics involucrats en la diferenciació i el desenvolupament cel·lulars. En particular, el component catalític del PRC2 anomenat *Enhancer of Zeste Homolog 2* (EZH2) destaca per la seva sobreexpressió en diversos tipus de càncer i els seus reguladors semblen ser crítics per a la proliferació cel·lular, la formació tumoral i el manteniment de la funció de cèl·lules mare. A més a més, es pretén desenvolupar compostos multidiana que, inhibint enzims essencials per a la progressió i el desenvolupament del càncer, mostrin selectivitat per les cèl·lules cancerígenes amb l'objectiu de reduir els efectes adversos.

S'han posat a punt tres rutes sintètiques diferents: la preparació de derivats d'1,4-benzodioxà, la preparació d'intermedis de diarilamina i la preparació de diarilèters. Tots els compostos han estat sintetitzats mitjançant reaccions orgàniques clàssiques, han estat purificats utilitzant tècniques de separació comunes (cromatografia) i la seva elucidació estructural ha estat possible gràcies a les tècniques de Resonància Magnètica Nuclear (RMN), Espectroscòpia de masses (EM) i Espectroscòpia d'Infraroig (IR).

Per tal d'avaluar les activitats biològiques dels compostos preparats, els laboratoris Eli Lilly han dut a terme un cribratge d'alt rendiment sobre diferents desordres (càncer, autoimmunitat, neurodegeneració i dolor, malalties endocrines i cardiovasculars, etc.). Addicionalment, s'han realitzat assajos MTT sobre línies cel·lulars d'osteosarcoma, atesa la relació significativa entre l'expressió d'EZH2 i l'augment de l'agressivitat i el mal pronòstic de l'osteosarcoma descrita en diversos estudis. Per tant, una teràpia epigenètica dirigida específicament a l'EZH2 podria constituir una nova aproximació per al tractament de l'osteosarcoma.

ABSTRACT

This doctoral thesis focuses on the development of new small molecules against different cancer targets. Recent findings arisen from human cancer genome sequencing have revealed that many genes involved in the regulation of chromatin that modify histones are often mutated in a wide variety of cancers. Among these histone modifiers, multiproteic complexes named Polycomb Repressive Complex (PRC) are implicated in epigenetic silencing mainly affecting the structure of chromatin, stem cell pluripotency and expression of specific genes involved in cell differentiation and development. In particular, the catalytic component of PRC2 called Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) has drawn special attention since its overexpression has been found in several cancer types and its regulators seem to be critical for cellular proliferation, tumour formation and stem cell function maintenance. Moreover, we are looking for multitarget compounds that inhibit essential enzymes for cancer progression and development that show selectiveness against cancerous cells in order to reduce side effects.

Three different synthetic routes have been set: preparation of 1,4-benzodioxan derivatives, preparation of diarylamine intermediates and preparation of diarylethers. All compounds have been prepared using classic organic reactions, purified using common separation techniques (chromatography) and their structure elucidation has been carried out through Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Mass Spectroscopy (MS) and Infrared Spectroscopy (IS).

In order to assess their biological activities, a high throughput screening has been performed at Eli Lilly laboratories over different disorders (cancer, autoimmunity, neurodegeneration and pain, endocrine and vascular diseases, etc.). In addition, MTT assays have been performed in osteosarcoma cell lines since diverse studies suggest that EZH2 expression is significantly associated with more aggressive osteosarcoma tumour behaviour and poorer patient outcome. Thus, an epigenetic therapy that pharmacologically targets EZH2 via specific inhibitors may constitute a novel approach to the treatment of osteosarcoma.

ÍNDIX

1	INTRODUCCIÓ	1
1.1	Càncer	1
1.2	Tipus de càncer	3
1.3	Epidemiologia.....	4
1.4	Prevenió del càncer	8
1.5	Tractaments	13
1.6	Teràpia dirigida: Dianes farmacològiques	24
1.6.1	EZH2	24
1.6.1.1	Rol de l'EZH2 en càncer	24
1.6.1.2	Rol de l'EZH2 en l'osteosarcoma	32
1.6.2	IL17	34
1.6.3	Autofàgia'	37
1.7	Problemàtica sobre la reproductibilitat de les investigacions científiques.....	40
1.8	Antecedents del treball.....	41
1.8.1	Derivats del benzodioxà	41
1.8.2	Nucli de diarilamines.....	43
1.8.3	Diarilurees	44
2	OBJECTIUS.....	47
2.1	Primer objectiu.....	47
2.2	Segon objectiu.....	49
2.3	Tercer objectiu	50
3	DISCUSSIÓ TEÒRICA	53
3.1	Química	53
3.1.1	Preparació de compostos amb nucli d'1,4-benzodioxà	53
3.1.2	Preparació d'arilamines com a intermediaris sintètics	69
3.1.2.1	Preparació de les diarilamines 1-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)etan-1-ona (10), l'oxima 1-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)etan-1-ona (11), l' <i>N</i> -(4-((4-nitrofenil)amino)fenil) acetamida (12) i <i>N</i> -(4-((4-aminofenil)amino)fenil)acetamida (13)	69
3.1.2.2	Preparació dels compostos 1-(4-((4-acetilfenil)amino)fenil)-3-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)urea (15) i 1-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)-3-(4-((4-(1-hidroxiimino)etil)fenil)amino)fenil)urea (16)	73
3.1.3	Preparació d'arilèters	75
3.1.3.1	Preparació de la 3-(2-cianofenoxi)- <i>N</i> -((2-oxoindolin-7-il)metil)benzamida (17) i de la 3-(2-(aminometil)fenoxi)- <i>N</i> -((2-oxoindolin-7-il)metil)benzamida (18).....	76
3.1.3.2	Preparació de la <i>N</i> -(4-(4-(3-fenilureido)fenoxi)fenil)acetamida (19), la <i>N</i> -(4-(4-(3-(3-nitrofenil)ureido)fenoxi)fenil)acetamida (20) i la <i>N</i> -(4-(4-(3-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)ureido)fenoxi)fenil)acetamida (21) i el 4-(4-(3-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)ureido)fenoxi)benzoat de metil (22)	80
3.1.3.3	Preparació de la 1-(4-(2-(bromometil)fenoxi)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea (23) i 1-(4-((2-(bromometil)fenil)amino)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea (24).....	84
3.1.3.4	Preparació dels compostos (1-(4-(benzofuran-2-ilamino)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea) 25 i <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzofuran-2-amina (26).....	89
3.2	Resultats biològics.....	94
3.2.1	Resultats biològics dels derivats del benzodioxà 7 i 39.....	94

3.2.1.1	Resultats biològics en oncologia	94
3.2.1.2	Resultats biològics en immunologia.....	95
3.2.1.3	Resultats biològics en neurodegeneració i dolor	96
3.2.1.4	Resultats biològics en malalties tropicals i oblidades	98
3.2.2	Resultats biològics de les diarilamines.....	101
3.2.3	Resultats biològics dels diarilèters 20, 19, 21 i 22.....	101
3.2.3.1	Resultats biològics en oncologia	101
3.2.3.2	Resultats biològics en immunologia.....	102
3.2.3.3	Resultats biològics en neurodegeneració i dolor	102
3.2.3.4	Resultats biològics en malalties endocrines i cardiovasculars	103
3.2.3.5	Resultats biològics en malalties tropicals i oblidades	104
3.2.4	Activitat biològica avaluada a la Universitat de Siena (UNISI)	109
3.2.4.1	Activitat biològica sobre cèl·lules canceroses	109
3.2.4.2	Selecció dels compostos més actius.....	134
3.2.4.3	Avaluació biològica sobre cèl·lules sanes.....	136
4	EXPERIMENTAL PART	141
4.1	Organic Chemistry laboratory materials and methods	141
4.2	Biochemical laboratory materials and methods (<i>University of Siena, UNISI</i>)	141
	Preparation of ethyl 4-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-6-yl)-4-oxobutanoate	144
	Preparation of ethyl 4-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-6-yl)-4-oxobutanoic acid	145
	Preparation of 4-(2,3-dihydro-1,4benzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-6-yl)butanoic acid	146
	Preparation of 2,3,8,9-tetrahydronaphtho[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]-6-one	147
	Preparation of (<i>E</i>)-2,3,8,9-tetrahydronaphtho[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]-6-one oxime.....	148
	Preparation of 2,3,7,8,9,10-hexahydro-6 <i>H</i> -benzo[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]azepin-6-one and 2,3,6,8,9,10-hexahydro-7 <i>H</i> -benzo[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]azepin-7-one.....	149
	Preparation of <i>N</i> -2-(7-oxo-7,8,9,10-tetrahydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]azepin-6(3 <i>H</i>)- yl)acetonitrile and <i>N</i> -2-(6-oxo-9,10-dihydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]azepin-7(3 <i>H</i> ,6 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)- yl)acetonitrile	150
	Preparation of <i>N</i> -(2-(7-oxo-2,3,7,8,9,10-hexahydro-6 <i>H</i> -benzo[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]azepin-6- yl)ethyl)acetamide.....	152
	Preparation of 7-(2-aminoethyl)-7,8,9,10-tetrahydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]dioxin[6,7- <i>b</i>]azepin-6(3 <i>H</i>)- one.....	153
	Preparation of 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-carbaldehyde	154
	Preparation of (<i>E</i>)- <i>N</i> -((2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-yl)methylene)-2-phenylethylamine	155
	Preparation of 1-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)-yl)- 2,2,2-trifluoroethanone.....	156
	Preparation of 1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline	157
	Preparation of 2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)- yl)acetonitrile	158
	Preparation of <i>N</i> -(2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)- yl)ethyl)acetamide.....	159
	Preparation of 2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)- yl)ethanamine	160
	Preparation of 1-(2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[<i>b</i>]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)- yl)ethyl)-3-propylurea	161
	Preparation of 1-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)ethanone	162
	Preparation of 1-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)ethanone oxime.....	163

Preparation of <i>N</i> -(4-((4-(3-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenyl)amino)phenyl)acetamide	164
Preparation of <i>N</i> -(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)acetamide	165
Preparation of 1-(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)ethanone	166
Preparation of <i>N</i> -(4-((4-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)phenyl)amino)phenyl)acetamide	167
Preparation of 1-(4-((4-acetylphenyl)amino)phenyl)-3-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl) urea	168
Preparation of 1-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((4-(1-(hydroxyimino)ethyl)-phenyl)amino)phenyl)urea	169
Preparation of methyl 3-(2-cyanophenoxy)benzoate	170
Preparation of methyl 3-(2-cyanophenoxy)benzoate and 3-(2-cyanophenoxy)benzoic acid ..	172
Preparation of methyl 3-(2-cyanophenoxy)benzoate	173
Preparation of 2-bromo- <i>N</i> -(2-cyanophenyl)acetamide.....	173
Preparation of 7-ciano-2-oxoindoline	174
Preparation of 7-ciano-2-oxoindoline	175
Preparation of 7-ciano-2-oxoindoline	175
Preparation of 2-bromo- <i>N</i> -(2-cyanophenyl)- <i>N</i> -methylacetamide	176
Preparation of ethyl 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetate	177
Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid.....	178
Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid.....	178
Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid.....	179
Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid.....	180
Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid.....	180
Preparation of 2,3-dioxindoline-7-carbonitrile	181
Preparation of 2,3-dioxindoline-7-carbonitrile	181
Preparation of methyl 3-(2-(aminomethyl)phenoxy)benzoate	182
Preparation of <i>N</i> -(4-(4-nitrophenoxy)phenyl)acetamide	183
Preparation of <i>N</i> -(4-(4-aminophenoxy)phenyl)acetamide.....	184
Preparation of <i>N</i> -(4-(4-aminophenoxy)phenyl)acetamide.....	185
Preparation of <i>N</i> -(4-(4-(3-phenylureido)phenoxy)phenyl)acetamide	186
Preparation of <i>N</i> -(4-(4-(3-(3-nitrophenyl)ureido)phenoxy)phenyl)acetamide.....	187
Preparation of <i>N</i> -(4-(4-(3-(4-chloro-3 (trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)phenyl)acetamide	188
Preparation of methyl 4-(4-aminophenoxy)benzoate.....	189
Preparation of methyl 4-(4-aminophenoxy)benzoate.....	190
Preparation of methyl 4-(4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy) benzoate	191
Preparation of 1-(bromomethyl)-2-(4-nitrophenoxy)benzene.....	192
Preparation of 2-(bromomethyl)- <i>N</i> -(4-nitrophenyl)aniline	192
Preparation of 4-(2-(bromomethyl)phenoxy)aniline and <i>N</i> -(2-(bromomethyl)phenyl)-benzene-1,4-diamine.....	194
Preparation of 4-(2-(bromomethyl)phenoxy)aniline and <i>N</i> -(2-(bromomethyl)phenyl) benzene-1,4-diamine.....	194
Preparation of 1-(4-(2-(bromomethyl)phenoxy)phenyl)-3-(3-nitrophenyl)urea and 1-(4-((2-(bromomethyl)phenyl)amino)phenyl)-3-(3-nitrophenyl)urea.....	196
Preparation of 2-(4-nitrophenoxy)benzaldehyde.....	198
Preparation of 4-(4-acetylphenoxy)benzoxonitrile	199
Preparation of 2-(2,2-dibromovinyl)phenol	200

Preparation of 2-bromobenzofuran	201
Preparation of <i>N</i> -(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)acetamide	202
Preparation of 2-(4-methoxyphenyl)benzofuran	203
Preparation of 2-(4-methoxyphenyl)benzofuran, 2-(<i>p</i> -tolyl)benzofuran and 2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)benzofuran	204
5 CONCLUSIONS.....	207
6 BIBLIOGRAFIA	213

1 INTRODUCCIÓ

1.1 Càncer

El càncer és un terme utilitzat per designar un conjunt de malalties genètiques caracteritzades principalment per una divisió i proliferació incontrolades d'un determinat grup de cèl·lules que pot estendre's pels teixits circumdants mitjançant el sistema circulatori o limfàtic. Aquest desordre pot tenir lloc a qualsevol part de l'organisme i sovint dona lloc a una acumulació anormal de teixit anomenada tumor. La capacitat de les cèl·lules canceroses per formar nous tumors en altres parts del cos s'anomena metàstasi.¹

Les cèl·lules normals de l'organisme es caracteritzen, entre d'altres, per reproduir-se on i quan és necessari, mantenir-se unides al teixit corresponent, autodestruir-se quan deixen de ser funcionars correctament o quan són massa velles (fenomen conegut com a mort cel·lular programada o apoptosi) i especialitzar-se en tipus de cèl·lules específics per dur a terme funcions concretes dins l'organisme. Les cèl·lules canceroses disten d'aquestes quatre característiques principals formant cèl·lules amb una divisió il·limitada, mancades de les molècules de superfície necessàries per romandre al teixit corresponent, capaces d'ignorar els senyals químics que regulen el seu creixement, mancades de mecanisme d'autoreparació o autoeliminació esdevenint "immortals", capaces d'induir la formació de nous vasos sanguinis al voltant dels tumors (indret conegut com microentorn) permetent el transport d'oxigen i nutrients als tumors i mancades de la capacitat d'especialització normal – fenomen que provoca que no puguin desenvolupar correctament una funció cel·lular normal i a més a més, atesa l'alta velocitat amb la qual es reproduïen és més probable que continguin mutacions genètiques, esdevenint encara menys funcionals.^{2,3}

El procés de transformació de cèl·lules normals en cèl·lules canceroses (carcinogènesi) inclou les següents etapes:

1. Iniciació: ocorre a nivell de genoma, l'ADN de les cèl·lules normals pateix mutacions que els hi confereixen les característiques esmentades anteriorment.
2. Promoció: formació del tumor primari, invasió local, intravasació i extravasació.
3. Progressió: metàstasi.

Cal destacar l'existència de tumors benignes, els quals a diferència dels càncers malignes només segueixen les dues primeres etapes de la carcinogènesi, essent incapaços d'estendre's ni d'envair els teixits del voltant o arribar fins a diferents indrets de l'organisme a través de la sang o del sistema limfàtic i formar nous tumors allunyats de l'original. Els tumors benignes no solen reaparèixer un cop extirpats i tret dels tumors benignes cerebrals, no solen implicar un risc mortal per a l'individu afectat.²

Els canvis genètics que originen el càncer poden ésser heretats dels progenitors o bé poden aparèixer *a posteriori* a causa d'errors genètics conseqüents a la divisió cel·lular o per alteracions de l'ADN

¹ <http://www.who.int> (20/02/2018)

² <https://www.cancer.gov> (12/02/18)

³ <http://www.cancerresearchuk.org> (12/02/18)

originades per exposicions ambientals nocives (algunes substàncies químiques com el fum del tabac o físiques com la radiació ultraviolada del sol). Cal destacar que cada individu té una combinació única d'alteracions genètiques i que a mesura que avança el càncer, n'apareixen de noves com a conseqüència d'aquest mateix.²

Aquests canvis genètics que contribueixen a l'aparició del càncer es poden classificar segons el tipus de gens afectats:²

- Proto-oncògens: implicats en el creixement i divisió cel·lulars. L'alteració d'aquest tipus de gens pot permetre a les cèl·lules créixer i sobreviure quan no ho haurien de fer. Per aquest motiu, es considera que l'alteració d'aquests gens pot convertir-los en gens causants del càncer (oncògens).
- Gens supressors de tumors: implicats en el creixement i divisió cel·lulars. L'alteració d'aquest tipus genètic pot provocar que les cèl·lules es divideixin de forma incontrolada ja que no desenvolupen la seva funció inicial.
- Gens reparadors d'ADN: implicats en la reparació de l'ADN alterat. L'alteració d'aquest tipus de gens permet l'aparició de noves mutacions sobre diferents parts de l'ADN, fet el qual pot provocar la transformació de cèl·lules normals en cèl·lules canceroses.

Teoria de les cèl·lules mare canceroses^{4,5}

Un dels problemes més importants del càncer és la heterogenicitat cel·lular tumoral. El concepte de cèl·lules mare canceroses (CSC, *cancer stem cells*) proposa el càncer com una patologia amb una organització cel·lular jeràrquica dirigida per un petit conjunt de cèl·lules relativament quiescents les quals tenen l'habilitat d'autorenovar-se de forma il·limitada i diferenciar-se en diferents tipus de cèl·lules canceroses, i un ampli subgrup de cèl·lules tumorals que s'han diferenciat del petit conjunt de CSC.

Segons aquest model teòric de la patologia cancerosa, les CSC serien les responsables de la formació del tumor, el creixement, la metastasi, la resistència a la teràpia, la recaiguda i el mal pronòstic. Un dels problemes principals de la quimioteràpia és la resistència de les cèl·lules tumorals al tractament. Aquesta resistència pot ésser intrínseca (les cèl·lules tumorals són resistents a les dosis utilitzades del tractament des de l'inici), adquirida (les cèl·lules tumorals desenvolupen resistència al llarg del tractament) o adaptable (les cèl·lules tumorals desenvolupen nous mecanismes de senyalització immediatament després de rebre el tractament i esdevenen resistents). Tot i que el mecanisme de resistència al tractament no ha estat del tot elucidat, s'ha demostrat que aquestes CSC disposen de diverses línies de defensa per a evitar l'acció del tractament. Els mecanismes de defensa proposats són els següents:

1. Evitar l'exposició cel·lular al fàrmac: el microentorn tumoral forma una barrera física que protegeix les CSC (nínxol) i dins d'aquestes es produeixen substàncies protectores (matriu extracel·lular, fibroblasts associats al càncer, cèl·lules immunitàries i cèl·lules inflamatòries).
2. Evitar l'exposició molecular al fàrmac: utilitzen mecanismes que expulsen el fàrmac de la cèl·lula.

⁴ J. Zhao. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *160*, 145-158

⁵ S. Annett, T. Robson. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *187*, 13-30

3. Evitar condicions essencials per a l'actuació del fàrmac: regulen l'expressió d'enzims que inactiven o activen el fàrmac. A més a més, tant la quimioteràpia com la radioteràpia actuen sobre cèl·lules amb una ràpida proliferació i les CSC presenten un comportament quiescent durant períodes molt llargs essent poc sensibles a aquests tipus de tractament.
4. Reparar el dany produït a l'ADN.
5. Sobreactivar les senyalitzacions de supervivència i anti-apoptosi, així com sobreinhibir la senyalització apoptòtica.
6. Autoregenerar-se: utilitzen el fenomen de transició epíteli-mesènquima (EMT), el qual permet la transformació de cèl·lules epitelials immòbils i polaritzades en cèl·lules mesenquimals apolars amb capacitat de migració i els hi confereix característiques típiques de CSC.
7. Similitud a cèl·lules mare normals: al mantenir característiques molt similars a les cèl·lules mare sanes, la teràpia dirigida sobre CSC resulta molt complexa ja que sovint implica efectes secundaris considerables.

1.2 Tipus de càncer

Existeixen diferents classificacions per al càncer. Normalment, es classifiquen en funció dels òrgans dins dels quals es forma el tumor en primer lloc. No obstant, el càncer també es pot classificar en funció del tipus de cèl·lula en el qual es desenvolupa el càncer. Dins d'aquesta divisió trobem cinc tipus principals de càncers:^{2,3}

- Carcinoma: comença en els teixits epitelials, els quals estan formats per cèl·lules que recobreixen la part externa del cos (la pell), així com els òrgans interns de l'organisme i les cavitats internes.

Els carcinomes són el tipus més comú de càncer. Atès que existeixen diferents tipus de cèl·lules epitelials, es poden desenvolupar diferents subtipus de càncer:

Adenocarcinoma: les cèl·lules implicades són les cèl·lules glandulars anomenades també cèl·lules adenomatoses. Els tipus cel·lular produeix fluids o mucoses per tal de mantenir els teixits humits. La majoria de càncers de mama, colon o pròstata són adenocarcinomes.

Carcinoma de cèl·lules basals: les cèl·lules basals formen part de la capa més profunda de l'epidermis, la capa més externa de la pell.

Carcinoma de cèl·lules escamoses (o carcinomes epidermoids): les cèl·lules escamoses són cèl·lules epitelials primes i planes que es troben just per sota la superfície externa de la pell, en el revestiment d'alguns òrgans interns com la bufeta o els ronyons i cobreix els aparells respiratori i digestiu. La majoria de càncers d'anus, coll uterí i vagina formen part d'aquest tipus de càncers.

Carcinoma de cèl·lules transicionals: aquest tipus de cèl·lules formen els teixits anomenats epitelis transicionals o urotelis. Aquest tipus cel·lular és capaç d'emmotllar-se a l'expansió de l'òrgan al qual recobreix, i es troba en el revestiment de la bufeta, de les uretres i en part del revestiment dels ronyons, entre d'altres.

- Sarcoma: comença en el teixit connectiu com l'os, el cartílag, el teixit adipós, el múscul, els vasos sanguinis o limfàtics, o els teixits fibrosos (com tendons i lligaments).

Constitueixen un tipus poc freqüent de càncer.

Es classifiquen en dos grups principals:

Sarcoma d'ossos: el càncer comença a partir de cèl·lules d'os. El tipus més freqüent de càncer dins d'aquesta classificació és l'osteosarcoma.

Sarcoma de teixits connectius: són càncers rars que comencen en un determinat tipus de teixit connectiu. Els més freqüents són els càncers que afecten al cartílag (condrosarcoma) o al múscul (rabdomyosarcoma o leiomyosarcoma).

- Leucèmia: comença en el teixit que forma la sang de la medul·la òssia. Aquest tipus de càncer no produeix tumors sòlids però produeix un excés de cèl·lules sanguínies blanques anormals que s'acumulen a la sang i a la medul·la òssia. La baixa concentració de cèl·lules normals presents a la sang dificulta l'administració d'oxigen als teixits, el control del sagnat i afavoreix les infeccions. Els quatre tipus més comuns de leucèmia es classifiquen en funció de la velocitat amb la qual la malaltia empitjora (agut o crònic) i el tipus de cèl·lula sanguínia dins al qual es desenvolupa el càncer (limfoblàstica o mieloide).

- Limfoma i mieloma: càncers que afecten al sistema immunitari.
Limfoma: els limfomes s'originen en els limfòcits (cèl·lules T o B) i provoquen una acumulació de limfòcits no funcionals que no poden combatre les infeccions com ho farien normalment. Atès que el sistema limfàtic recorre tot l'organisme, aquest tipus de càncer es pot originar a qualsevol part del cos. Els dos tipus principals són el limfoma de Hodgkin (normalment originat per cèl·lules B) i el limfoma de no-Hodgkin (originat per ambdós tipus cel·lulars, T o B).
Mieloma: també conegut com a mieloma múltiple, es un càncer que afecta a les cèl·lules plasmàtiques, un tipus de cèl·lules blanques de la sang. Aquestes cèl·lules es formen també dins la medul·la òssia i són les responsables de produir anticossos (immunoglobulines) per tal de combatre infeccions. En aquest tipus de càncer, les cèl·lules plasmàtiques anormals s'acumulen a la medul·la òssia i formen tumors ossis.

- Melanoma: aquest tipus de càncer s'origina en precursors dels melanòcits, cèl·lules especialitzades en crear melanina. La majoria de casos ocorren a la pell.

- Cervell i espina dorsal: càncers del sistema nerviós central. El tipus més comú de càncer cerebral s'origina a les cèl·lules glials i s'anomena glioma.
Aquest tipus de tumors poden ser benignes o malignes (cancerosos).

1.3 Epidemiologia

A nivell mundial

El càncer constitueix una de les principals causes de morbiditat i mortalitat arreu del món, amb aproximadament 14 milions de casos nous diagnosticats al 2012 i uns 8,8 milions de morts al 2015 (Figura 1).^{1,6}

⁶ J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359-386.

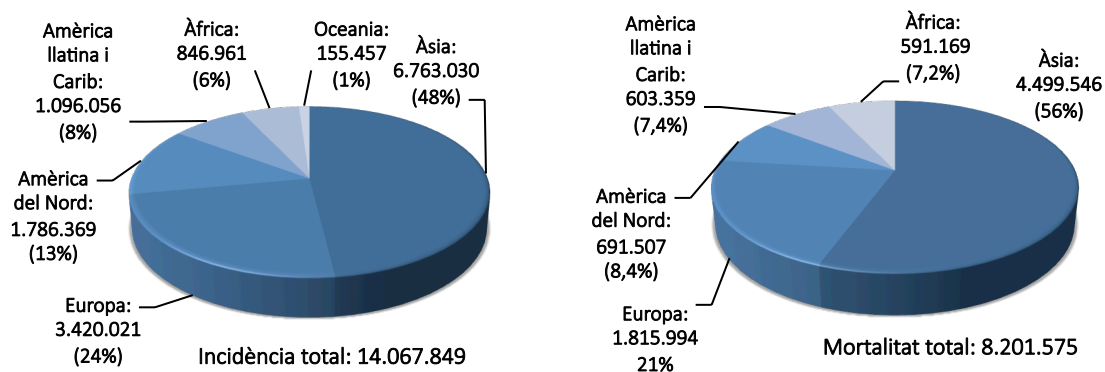


Figura 1. Incidència i mortalitat del càncer a nivell mundial al 2012⁷

Els tipus de càncer que varen provocar més morts a nivell mundial per ambdós sexes al 2015 foren el càncer de pulmó (1.690.000 morts), el càncer de fetge (788.000 morts), el càncer d'estómac (754.000 morts), el càncer colorectal (744.000 morts) i el càncer de mama (571.000 morts).¹ Les dades respecte a la incidència i la mortalitat del càncer separades per sexe al 2012 es presenten a continuació (Taula 1):⁷

Taula 1. Incidència de càncer a nivell mundial l'any 2012⁷

	Homes	Dones
Càncer de pulmó	1.241.601 (16,8%)	Càncer de mama 1.671.149 (25,1%)
Càncer de pròstata	1.094.916 (14,8%)	Càncer colorectal 614.304 (9,2%)
Càncer colorectal	746.298 (10,1%)	Càncer de pulmó 583.200 (8,9%)
Càncer d'estómac	631.293 (8,5%)	Càncer cervical 527.624 (7,9%)
Càncer de fetge	554.369 (7,5%)	Càncer d'estómac 320.301 (4,8%)

Taula 2. Mortalitat de càncer a nivell mundial l'any 2012⁷

	Homes	Dones
Càncer de pulmó	1.098.702 (23,6%)	Càncer de mama 521.907 (14,7%)
Càncer de fetge	521.041 (11,2%)	Càncer de pulmó 491.223 (13,8%)
Càncer d'estómac	468.970 (10,1%)	Càncer colorectal 320.294 (9,0%)
Càncer colorectal	373.639 (8,0%)	Càncer cervical 265.672 (7,5%)
Càncer de pròstata	307.481 (6,6%)	Càncer d'estómac 254.103 (7,2%)

L'impacte econòmic del càncer és significatiu i va en augment. El cost econòmic total anual s'estima que fou de 1,16 trilions de dòlars estatunidencs al 2010.¹

⁷ <https://gco.iarc.fr> (20/02/2018)

A nivell europeu

Pel que fa l'Europa, el càncer provoca un 20% de morts en aquest territori. Amb més de 3 milions de nous casos diagnosticats i més de 1,7 milions de morts l'any, el càncer constitueix la segona causa de mort més important després de les malalties cardiovasculars (Taula 3, Taula 4).⁸

Taula 3. Incidència de càncer a nivell europeu l'any 2012⁸

Homes		Dones	
Càncer de pròstata	400.364 (22%)	Càncer de mama	458.718 (29%)
Càncer de pulmó	290.904 (16%)	Càncer colorectal	205.323 (13%)
Càncer colorectal	241.813 (13%)	Càncer de pulmó	119.316 (7,4%)
Càncer de bufeta	118.365 (6,5%)	Càncer uterí	98.984 (6,2%)
Càncer d'estómac	84.226 (4,6%)	Càncer d'ovari	65.584 (4,1%)

Taula 4. Mortalitat de càncer a nivell europeu l'any 2012⁸

Homes		Dones	
Càncer de pulmó	254.706 (26%)	Càncer de mama	131.347 (17%)
Càncer colorectal	113.246 (12%)	Càncer colorectal	101.620 (13%)
Càncer de pròstata	92.328 (9,5%)	Càncer de pulmó	99.142 (13%)
Càncer d'estómac	63.680 (6,5%)	Càncer de pàncrees	51.923 (6,7%)
Càncer de pàncrees	52.632 (5,4%)	Càncer d'estómac	43.680 (5,6%)

A nivell espanyol

En el cas d'Espanya, el càncer també constitueix una de les principals causes de morbiditat amb 215.535 casos estimats per l'any 2012, 228.482 casos estimats pel 2017 i una previsió de 315.413 casos pel 2035 basada en dades poblacionals. Tot i que en els últims 20 anys el creixement del número de tumors registrats s'ha desenvolupat de forma constant, aquest fet no es pot atribuir únicament a l'augment poblacional, si no també a la implantació de tècniques de detecció precoç i a l'augment de l'esperança de vida (factor de risc fonamental per a l'aparició de tumors atès que implica una major exposició a factors de risc i una tendència elevada a presentar mecanismes de reparació cel·lular ineficients). Per tant, cal contemplar la possibilitat que aquests factors puguin modificar les estimacions anteriors basades únicament en dades poblacionals.⁹

Al 2015, es van diagnosticar a Espanya aproximadament 250.000 casos nous de càncers invasius, uns 149.000 en homes (60%) i uns 99.000 en dones (40%).¹⁰ Els tumors més diagnosticats a Espanya l'any 2017 foren el càncer colorectal (34.311), el càncer de pròstata (30.076), el càncer de pulmó (28.645),

⁸ <http://www.euro.who.int> (20/02/2018)

⁹ <https://www.seom.org> (20/02/2018)

¹⁰ J. Galceran, A. Ameijide, M. Carulla, A. Mateos, J. R. Quirós, D. Rojas, A. Alemán, A. Torrella, M. Chico, M. Vicente, J. M. Díaz, N. Larrañaga, R. Marcos-Gragera, M. J. Sánchez, J. Perucha, P. Franch, C. Navarro, E. Ardanaz, J. Bigorra, P. Rodrigo, R. P. Bonet, REDECAN Working Group. *Clin. Transl. Oncol.* **2017**, *19*, 799-825

el càncer de mama (26.370) i el càncer de bufeta (14.677). No obstant, si desglossem la incidència de tumors en funció del sexe, les estimacions pel 2017 són les següents (Taula 5):

Taula 5. Incidència de càncer a nivell espanyol l'any 2017⁹

Homes		Dones	
Càncer de pròstata	30.076	Càncer de mama	26.370
Càncer de pulmó	23.398	Càncer colorectal	13.711
Càncer colorectal	20.621	Càncer uterí	5.473
Càncer de bufeta	12.364	Càncer de pulmó	5.247
Càncer gàstric	5.195	Càncer d'ovari	3.412

Dades procedents de GLOBOCAN 2012, extrapolades a los dades de la població espanyola per l'any 2017 proporcionada per l'INE.

Pel que fa referència a les dades de mortalitat per l'any 2016, a Espanya es mantenen les malalties cardiovasculars com a primera causa de mortalitat (119.788 morts, 29,2% respecte al total), seguides del càncer (112.939 morts, 27,5% del total) i les malalties respiratòries (46.812, 11% del total).⁹

Si desglossem aquestes dades per sexe, observem que al 2016 la principal causa de mortalitat pels homes a Espanya va ésser el càncer (68.619 morts respecte a les 65.357 morts del 2015, un augment del 4,75%), seguida de les malalties cardiovasculars (55.307 morts respecte a les 55.790 del 2015, una disminució de menys d'un 0,1%) i les malalties respiratòries (26.197 morts respecte a les 28.828 morts del 2015, una disminució del 9% aproximadament). En canvi, pel que fa les dones a Espanya al 2016, la principal causa de mortalitat van ésser les malalties cardiovasculars (64.471 morts respecte a les 67.457 succeïdes al 2015, una disminució del 4,6%), seguides de les morts causades per càncer (44.320 respecte a les 41.632 del 2015, un augment del 6,1%) i de les malalties respiratòries (20.615 morts respecte les 22.857 del 2015, una disminució de quasi l'11%) (Figura 2).⁹

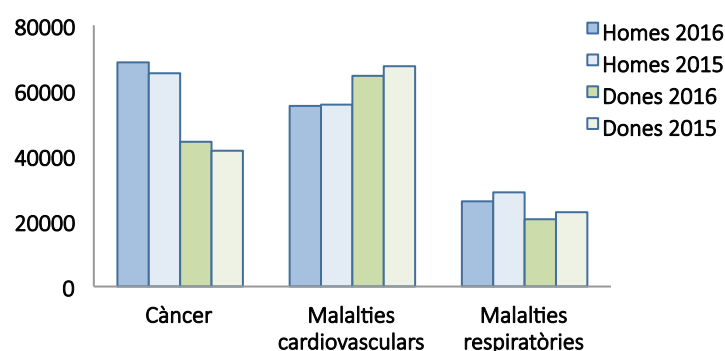


Figura 2. Principals causes de mortalitat a Espanya l'any 2015 i 2016.⁹

Els càncers responsables del major número de morts l'any 2016 a Espanya foren el càncer de pulmó (22.187), el càncer colorectal (15.802), seguits amb una diferència considerable del càncer de pàncrees (6.789), el càncer de mama (6.477) i el càncer de pròstata (5.752).

Si desglossem la mortalitat del càncer en funció del sexe, les estimacions pel 2016 són les següents (Taula 6):¹¹

Taula 6. Mortalitat de càncer a nivell espanyol l'any 2016¹¹

Homes		Dones	
Càncer de tràquea, bronquis i pulmó	17.624	Càncer de mama	6.385
Càncer de colon	6.892	Càncer de colon	4.889
Càncer de pròstata	5.752	Càncer de tràquea, bronquis i pulmó	4.563
Càncer de bufeta	3.918	Càncer de pàncrees	3.355
Càncer de pàncrees	3.434	Càncer del teixit limfàtic, dels òrgans hematopoètics i de teixits afins, excepte leucèmia	2.275

Tot i que Espanya és un dels països europeus en els quals es diagnostiquen més tumors i en els quals moren un major número d'individus per càncer, cal destacar que tenint en compte l'elevada esperança de vida espanyola, si ajustem els valors d'incidència i de mortalitat del càncer per edat, Espanya no formaria part dels 20 països europeus amb una incidència i mortalitat ajustades per edat més elevades d'Europa.

D'altra banda, la supervivència dels pacients amb càncer a Espanya és similar a la resta de països propers amb el mateix nivell de desenvolupament, amb un 53% de supervivència als 5 anys posteriors al diagnòstic de la patologia. Dades recents indiquen que la supervivència dels pacients amb càncer ha augmentat de forma contínua a Europa, especialment per al Limfoma de no Hodgkin, el càncer colorectal (possiblement relacionat amb els avenços sobre el tractament) i el càncer de pròstata (possiblement relacionat amb el diagnòstic precoç).⁹

1.4 Prevenció del càncer

Tot i que el càncer constitueix un grup de malalties relacionades amb la genètica i la fisiopatologia de l'individu, l'estil de vida i els factors ambientals tenen un paper molt important en el desenvolupament d'aquesta patologia.² Aproximadament un terç de les morts ocasionades pel càncer es deuen a 5 principals conductes i dietes de risc: índex elevat de massa corporal, ingesta reduïda de fruita i vegetals, manca d'activitat física, consum de tabac i consum d'alcohol.¹ El factor de risc més important és el consum de tabac, responsable d'aproximadament el 22% de les morts per càncer.¹² Actualment, es disposa d'informació suficient com per prevenir com a mínim un terç de tots els càncers (incloent el càncer de mama, el càncer colorectal i el càncer de cèrvix, inclosos dins els càncers més comuns a Espanya i al món).

¹¹ <http://www.ine.es> (20/02/2018)

¹² GBD 2015 Risk Factors Collaborators. *Lancet* **2016**, 388, 1659-1724

La detecció i el diagnòstic precoç faciliten l'aplicació del tractament en fases poc avançades de la patologia augmentant considerablement la possibilitat de supervivència dels individus, millorant la morbiditat i reduint els costos derivats del tractament.¹ No obstant, al 2015 només un 35% dels països poc desenvolupats disposava d'accessibilitat al diagnòstic i al tractament del càncer a través del servei sanitari públic. A més a més, cal destacar que en aquestes zones les infeccions susceptibles de provocar càncer com el virus de l'hepatitis o el virus del papil·loma humà (VPH) són responsables d'un 25% dels casos de càncer.¹³

De forma global, més del 70% de les morts per càncer es donen països poc o semi desenvolupats, atès que com s'ha esmentat anteriorment, no disposen de les eines necessàries per a la prevenció, el diagnòstic i el tractament d'aquesta patologia.

Prevenció primària

Per poder definir mesures per reduir la incidència del càncer, cal determinar quines són les possibles causes de la transformació de les cèl·lules sanes en cèl·lules canceroses. Aquesta transformació es deu a la interacció de la genètica individual amb 3 categories de factors externs:¹

- Carcinògens físics: radiacions ultraviolada i ionitzant, entre d'altres.

- Carcinògens químics: l'asbest (amiant impur), alguns components del tabac, l'aflatoxina (contaminant alimentari), i l'arsènic, entre d'altres.

- Carcinògens biològics: infeccions per determinants virus, bacteris i paràsits.

A més a més, cal tenir en compte el paper fonamental de l'edat en el risc de desenvolupar el càncer. Aquest fet es deu a l'acumulació de l'exposició als factors de risc esmentats i a la ineficiència dels mecanismes de reparació cel·lular proporcionals a l'increment de l'edat de l'individu.

Pel que fa els principals factors de risc evitables:¹

- Tabac

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, el tabac constitueix el factor de risc més important de mortalitat per càncer a nivell global. Les formes d'exposició a aquest carcinogen inclouen el tabaquisme actiu, el tabaquisme passiu o involuntari i el tabac sense fum. Els càncers que poden derivar d'aquest consum són el càncer de pulmó, esòfag, laringe, oral, bufeta, ronyó, estómac, coll d'úter i colorectal.

- Inactivitat física, factors de la dieta, obesitat i sobrepès

El sobrepès ($\geq 25 \text{ Kg/m}^2$) i la obesitat estan associats causalment a diversos tipus de càncer comuns com el càncer d'esòfag, colorectal, mama en dones post menopàusiques, endometri i ronyó (Figura 3).

¹³ M. Plummer, C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, S. Franceschi. *Lancet Glob. Health* **2016**, 4, e609-616

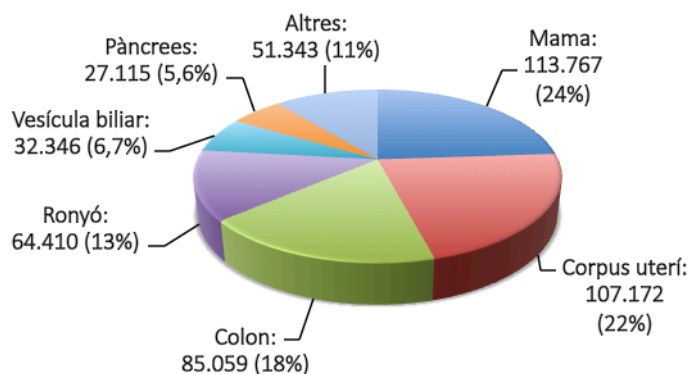


Figura 3. Casos de càncer en ambdós sexes arreu del món al 2012 atribuïbles a l'excés de l'índex de massa corporal, mostrat per percentatges de lloc anatòmic del total de tots els casos atribuïbles a tots els llocs anatòmics de la població⁷

La inactivitat física contribueix de forma significativa a l'augment de la taxa de sobrepès i obesitat, i també pot tenir un efecte directe sobre el desenvolupament d'alguns tipus de càncer. Així mateix, l'activitat física també pot tenir un rol protector en si mateixa sobre alguns tipus de càncer com el càncer de colon. En conjunt, un elevat índex de massa corporal i una inactivitat física varen ésser responsables del 19% de la fracció atribuïble de mortalitat per càncer de mama i un 26% de la mortalitat per càncer colorectal. A més a més, el sobrepès i la obesitat constitueixen per si soles les causes del 40% de càncer d'endometri.

Pel que fa l'alimentació, a part de tenir una relació directa amb els altres tres punts descrits anteriorment, també pot tenir un efecte directe sobre el desenvolupament d'alguns càncers (com el colorectal en el cas d'excés de consum de carns vermelles, com el càncer de cavitat oral, faringe i esòfag per ingesta de begudes i aliments molt calents) i un augment del risc de patir malalties cardiovasculars. A més a més, cal destacar el paper protector que poden tenir els hàbits alimentaris com les dietes riques en verdures i fruites sobre determinats tipus de càncer (com el de cavitat bucal, esòfag, estómac, colorectal) i altres malalties que poden posar en risc la salut de l'individu. ^{!Error! Marcador no definido.}

Atès que aquests quatre factors estan molt relacionats entre si, la implementació d'uns hàbits alimentaris i un ritme de vida saludable pot reduir considerablement el risc de desenvolupar un càncer.

– Consum d'alcohol

El risc de desenvolupar càncer augmenta amb la quantitat d'alcohol que es consumeix. Els càncers associats a un consum excessiu d'alcohol són el càncer de la cavitat bucal, faringe, laringe, esòfag, fetge, colorectal i mama. A més a més, cal destacar que en els casos de càncers de la cavitat oral, faringe, laringe i esòfag, el fet de fumar pot incrementar considerablement el risc de desenvolupar aquestes patologies.

– Infeccions

Existeixen principalment dos virus que tenen un impacte considerable sobre la incidència d'alguns tipus de càncer arreu del món que poden ésser evitables gràcies al desenvolupament de vacunes contra aquests darrers: el virus de la hepatitis B i el virus del papil·loma humà. Aquests dos agents

infecciosos són responsables de fins un 25% de casos de càncer en països mig i subdesenvolupats.¹⁴

Virus de la hepatitis B

La hepatitis B es una infecció hepàtica potencialment mortal causada pel virus de la hepatitis B (VHB) el qual es transmet per contacte amb la sang o amb altres líquids corporals d'una persona infectada.

S'estima que hi ha 527 milions de persones amb infecció crònica pel VHB. Al 2015, la infecció pel virus de la hepatitis B crònica provocà al voltant de 887.000 morts, la gran majoria relacionades amb les complicacions que comporta (cirrosi i carcinoma hepatocel·lular). Es disposa d'una vacuna amb un 95% d'eficàcia en la prevenció de la infecció i l'aparició d'una malaltia crònica i càncer de fetge causat per la hepatitis B.¹ L'OMS recomana vacunar als recent nascuts durant les primeres 24 h abans de néixer per tal de reduir la incidència d'aquesta malaltia i les complicacions que comporta.⁹

No obstant, cal destacar que el virus de la hepatitis C (VHC) és responsable d'una gran part de morts per càncer de fetge i que actualment no es disposa de cap vacuna per prevenir-ne el contagi.

Virus del papil·loma humà

El virus del papil·loma humà (VPH) és una infecció del tracte reproductiu per transmissió sexual més comú del món, el qual provoca càncer de coll d'úter (99% estan relacionats amb la infecció) i ocupa el quart lloc entre els tipus més comuns de càncer que afecten a dones amb unes 266.000 morts i uns 528.000 nous casos al 2012. Pots provocar altres tipus de càncer com el càncer de cavitat oral i orofaringi, així com càncer de cèrvix i vagina en dones, càncer anal en ambdós sexes o càncer de penis en homes.¹

Els genotips d'alt risc més comuns de VPH són els tipus 16 i 18, responsables d'un 70% aproximadament de casos de càncer de coll d'úter en tot el món.⁹

La vacuna enfront aquest virus pot prevenir la infecció d'aquest dos subtipus d'alt risc i és efectiva en aquells individus que encara no han estat infectats pel virus. Per aquets motiu, l'OMS recomana la vacunació per a nenes d'entre 9 i 13 anys. La vacunació en els nens no s'ofereix actualment en programes de salut pública per motius econòmics i per la baixa incidència de càncers en homes relacionats amb aquesta infecció.¹

Es calcula que la implementació de serveis de vacunació generalitzada contra els virus VHB i VPH podrien prevenir 1 milió de càncers cada any.¹³

– Contaminació ambiental

La contaminació de l'aire, l'aigua i el sòl amb substàncies químiques carcinògenes és responsable del 1-4% de tots els càncers. Aproximadament el 6% de càncers de pulmó és atribuïble a la contaminació de l'aire per abocaments de residus industrials, emanacions del tub d'escapament dels vehicles i altres toxines.^{1,15}

¹⁴ <https://communitymedicine4asses.wordpress.com> (20/02/2018)

¹⁵ <https://www.iarc.fr> (13/03/2018)

La exposició a carcinògens també es pot produir a través de la contaminació dels aliments per substàncies químiques com aflatoxines o dioxines.

– Carcinògens ocupacionals

Més de 40 agents o circumstàncies d'exposició en l'entorn laboral són carcinogènics. Actualment s'ha establert una relació causal d'aquests carcinògens laborals amb el càncer de pulmó, bufeta, laringe, pell, leucèmia i nasofaringe. El mesotelioma (càncer de la coberta protectora exterior dels pulmons o de la cavitat toràctica) està provocat en gran mesura per l'exposició a l'asbest.

Cal recalcar que els càncers laborals es concentren en grups específics de la població treballadora; en aquests casos, aproximadament el 20-30% dels homes i el 5-20% de les dones poden haver estat exposats a carcinògens pulmonars durant la seva vida laboral (entre els 15 i els 64 anys), dada la qual implica un 10% dels càncers de pulmó d'arreu del món.

– Radiacions

Les radiacions són un tipus d'energia emesa en forma d'ones o rajos.

Les radiacions ionitzants són un tipus d'energia alliberada pels àtoms en forma d'ones electromagnètiques (rajos gamma o rajos X) o partícules (partícules alfa o beta). Els individus estem exposats a fonts naturals de radiacions ionitzants com el sòl, l'aigua, la vegetació o certs gasos, i a radiacions artificials com els rajos X o alguns dispositius mèdics. L'exposició a la radiació natural és principalment conseqüència del gas radó produït a l'escorça terrestre el qual augmenta el risc de càncer de pulmó.

El potencial nociu de les radiacions sobre òrgans i teixits depèn de la dosi rebuda o absorbida, de la durada de l'exposició i de la sensibilitats dels diferents òrgans i teixits. Aquest tipus de radiació pot provocar quasi qualsevol tipus de càncer, però especialment leucèmia, càncer de pulmó, tiroïdes i mama.

Les radiacions no ionitzants engloben els camps magnètics (com els emesos pels telèfons mòbils) i la radiació ultraviolada (principalment emesa pel sol). L'exposició excessiva a la radiació ultraviolada és una causa reconeguda de càncer de pell. L'OMS recomana reduir l'exposició a les radiacions ultraviolada i utilitzar protector solar de manera freqüent en cas d'exposició.¹

Prevenició secundària

Des del punt de vista de la salut pública, les mesures de prevenició primària són prioritàries ja que poden evitar un alt percentatge d'incidència de càncer. Tot i així, atès que el període de latència dels càncers sol ésser molt llarg, que els resultats de l'aplicació d'aquestes mesures no es podran quantificar a curt termini i que en molts casos l'etiologia del càncer no està del tot elucidada, cal complementar aquestes mesures primàries amb una educació sanitària de qualitat i amb tècniques de detecció precoç adequades (diagnòstic precoç i cribratge).⁹

Aquestes tècniques de detecció precoç poden permetre detectar i tractar de forma precoç el càncer i reduir-la la mortalitat. Aquestes tècniques es divideixen en dos elements:¹

– Diagnòstic precoç

Consisteix en tres passos successius:

1. Conscienciació i accés a assistència sanitària. En aquesta fase és molt important l'educació sanitària per tal de facilitar a la població la possibilitat de detectar els signes precoços del càncer i de la importància de sol·licitar atenció sanitària el més ràpid possible.

2. Avaluació clínica, diagnòstic i classificació.

3. Accés al tractament.

– Cribratge

En aquest cas el que es pretén és identificar anomalies específiques de certs tipus de càncer o precàncer que no han provocat símptomes i detectar-los ràpidament per poder tractar-los. Aquesta mesura és una intervenció de la salut pública més complexa que l'anterior ja que requereix programes i assajos eficients i de qualitat. Exemples d'aquest tipus d'iniciatives serien la detecció de VPH pel càncer cervical o la realització de mamografies per la detecció de càncer de mama.

Per conseqüent, les estratègies necessàries per poder evitar tots els càncers causats per agents evitables, es basen en la reducció de l'exposició a tots els factors i comportaments de risc i en aplicar de manera global sistemes de detecció i diagnòstic precoç, així com tractament accessible a domini públic.

1.5 Tractaments

L'adequada determinació del diagnòstic de càncer és essencial per poder determinar un tractament eficaç. Actualment, disposem de molts tractaments diversos pels diferents tipus i estadis del càncer. De forma general i si és possible, en primer lloc es realitza cirurgia per tal d'extreure el teixit tumoral i a continuació s'apliquen tractaments com la quimioteràpia i/o la radioteràpia. Tot i així, actualment s'han desenvolupat altres tipus de tractaments com la hormonoteràpia (utilitzada en certs tipus de càncers relacionats amb hormones), la immunoteràpia (inicialment no havia mostrat una eficàcia adequada però recentment ha mostrat una millora considerable), els transplaments de cèl·lules mare i la teràpia dirigida (la qual forma part de l'anomenada medicina de precisió).²

Radioteràpia

Aquest tipus de teràpia utilitza altes dosis de radiació per matar cèl·lules canceroses i reduir la mida dels tumors.

Quimioteràpia

La quimioteràpia és la primera opció per molts tipus de càncer i normalment s'utilitza com a tractament sistèmic.¹⁶ Aquest tipus de tractament té com a objectiu destruir les cèl·lules canceroses en diferents etapes del seu cicle cel·lular. El seu mecanisme d'acció consisteix en inhibir o disminuir el seu creixement o la seva divisió atès que aquest tipus de cèl·lules es caracteritzen per créixer i dividir-se més ràpid de l'habitual. No obstant, la quimioteràpia clàssica no ha estat capaç de distingir les cèl·lules sanes de les cèl·lules canceroses, provocant efectes adversos considerables.¹⁷ Per aquest motiu, els teixits amb major recanvi cel·lular com la medul·la òssia o l'epiteli de la mucosa digestiva queden més afectats durant el tractament amb quimioteràpia.

El tractament quimioteràpic es pot dur a terme juntament amb altres tipus de tractament del càncer (com la cirurgia o la radioteràpia), però també es pot dur a terme utilitzant diversos medicaments

¹⁶ <https://www.cancer.org> (15/03/2018)

¹⁷ <https://www.cancer.net> (15/03/2018)

quimioteràpics simultàniament o de forma seqüencial per tal de potenciar el seu efecte individual o per tal d'evitar resistències al tractament. Tot i així, cal destacar que el fet de combinar més d'un medicament quimioteràpic no garanteix una eficàcia superior al tractament amb un sol fàrmac (monoteràpia) i que l'addició de més medicaments (poliquimioteràpia combinada) sol generar una toxicitat més elevada.⁹

Tipus de quimioteràpics.^{2,16,18,19,20}

En funció del tipus de mecanisme d'acció i del moment del cicle cel·lular en el qual actuen, els tractaments quimioteràpics es classifiquen en els següents grups:

– Agents alquilants

Aquets fàrmacs impedeixen la reproducció de les cèl·lules incidint en el seu ADN. Exerceixen la seva acció sobre totes les fases del cicle cel·lular i s'utilitzen per a diferents tipus de càncer com el càncer de pulmó, mama, ovàric, leucèmia, limfoma de Hodgkin, mieloma múltiple i sarcoma.

Aquest tipus de fàrmacs poden afectar considerablement a les cèl·lules de la medul·la òssia - les quals tenen com a funció principal formar cèl·lules sanguínies - podent generar a partir de certes dosis, leucèmia.

Alguns dels fàrmacs més coneguts d'aquest grup són el *cisplatí*, el *carboplatí* i el *melfalan* (Figura 4):²¹

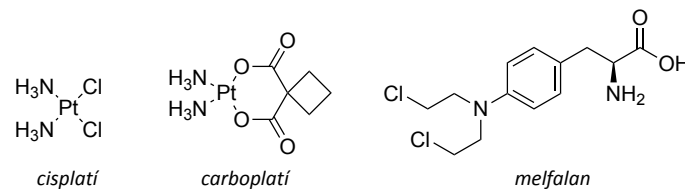


Figura 4. Estructura química del *cisplatí*, el *carboplatí* i el *melfalan*, respectivament

El *cisplatí* (Neoplatin®) fou el primer gran fàrmac quimioteràpic i ha estat utilitzat àmpliament pel càncer de bufeta, ovaris, testicles i càncer de pulmó de cèl·lules petites o microcític (CPCP). Conté el metall platí, el qual forma un complex dins la cèl·lula i interacciona amb l'ADN provocant la mort cel·lular.

El *carboplatí* (Paraplatin®) s'utilitza per a tractar el càncer d'ovari en estadi avançat que mai ha estat sotmès a tractament o que ha reaparegut després d'haver estat tractat amb altres medicaments. Aquest fàrmac presenta menys efectes adversos i menys severos que el *cisplatí*.

El *melfalan* (Melfalan® GSK) és un derivat del gas mostassa i actua inhibint la replicació cel·lular. Aquest fàrmac s'utilitza per tractar el mieloma múltiple i el càncer d'ovari que no s'ha pogut extirpar amb cirurgia.

– Antimetabòlits

¹⁸ <http://www.oncohealth.eu> (13/06/2018)

¹⁹ <http://www.chemocare.com> (13/06/2018)

²⁰ <https://www.vademecum.es> (13/06/2018)

²¹ <http://www.cisplatin.org> (13/06/2018)

Els antimetabòlits interfereixen amb el creixement de l'ADN i de l'ARN mitjançant la substitució d'elements fonamentals d'aquestes molècules durant la fase a la qual es dupliquen els cromosomes de la cèl·lula. S'utilitzen normalment per tractar leucèmies, càncer de mama, ovaris i tracte intestinal.

Dins d'aquest tipus de fàrmacs els més coneguts són el *fluorouracil* (FU) i el *metotrexat* (MTX) (Figura 5):

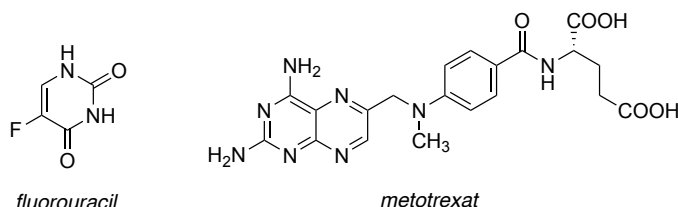


Figura 5. Estructura química del *fluorouracil* i del *metotrexat*, respectivament

El *fluorouracil* o 5-fluorouracil (Fluorouracilo® Accord EFG) és un antagonista de la pirimidina i s'usa per al tractament del càncer de mama, colorectal, estómac i pàncrees. A més a més, s'utilitza en forma de crema per tractar altres afectacions com la queratosi actínica i el càncer de pell de cèl·lules basals superficial. Actualment, es troba en estudi per al tractament d'altres patologies i tipus de càncer.

El *metotrexat* (Metotrexato® Wyeth Oral) és un antagonista de l'àcid fòlic i és un fàrmac àmpliament utilitzat tant en el tractament de diversos tipus de càncer com en patologies autoimmunitàries com l'artritis reumatoide i la psoriasi greu.

– Antibiòtics tumorals

Aquest tipus d'antibiòtics actuen sobre l'ADN de les cèl·lules canceroses per tal d'impedir el seu creixement i la seva divisió. No tenen les mateixes indicacions ni el mateix mecanisme d'acció que els antibiòtics utilitzats per tractar infeccions.

Un tipus d'antibiòtic tumoral és el grup de les antraciclines, les quals interfereixen amb enzims involucrats en la replicació de l'ADN durant el cicle cel·lular. Cal tenir en compte que a altes dosis aquests fàrmacs poden ser nocius pel cor.

Dins del grup de les antraciclines destaquen la *daunorubicina* i la *doxorubicina* (Figura 6):

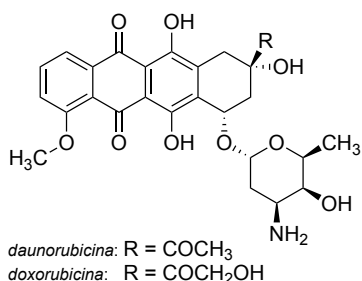


Figura 6. Estructura química de la *daunorubicina* i de la *doxorubicina*

La *daunorubicina* (Daunoblastina®) s'utilitza per al tractament de leucèmies agudes i altres tipus de càncer.

La *doxorubicina* (Farmiblastina®) s'usa per tractar diversos tipus de càncer com la leucèmia, el limfoma, el neuroblastoma o el sarcoma.

– Inhibidors de la topoisomerasa

Aquests fàrmacs interfereixen amb els enzims topoisomerasa, els quals ajuden a separar els brins d'ADN per tal que puguin ésser copiats. Existeixen dos tipus diferents d'inhibidors en funció de l'enzim sobre el qual actuen: inhibidors de la topoisomerasa I i II (Figura 7).

Aquest tipus d'anticancerosos s'utilitzen per tractar certes leucèmies, càncer de pulmó, ovari i gastrointestinal, entre d'altres.

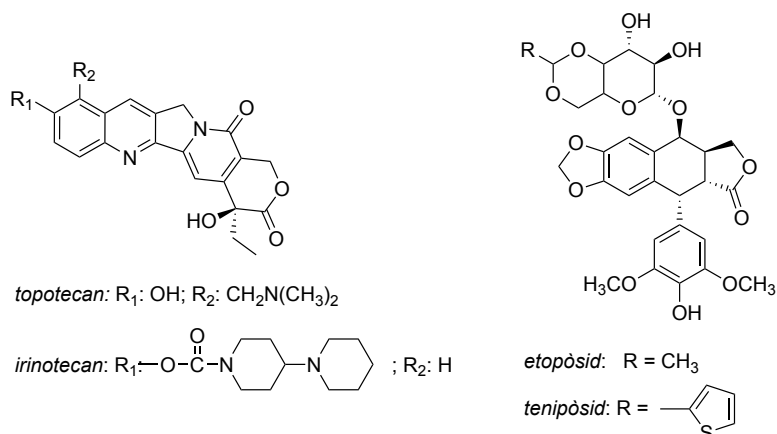


Figura 7. Estructura química del *topotecan* i *irinotecan*, i de *etopòsid* i *tenipòsid*, respectivament

Dins del grup d'inhibidors de la topoisomerasa I destaquen els derivats de la *camptotecina*: el *topotecan* i *irinotecan* (CPT-11). El *topotecan* (Hycamtin®) s'utilitza per tractar certs tipus de càncer d'ovari, de pulmó microcític i de càncer de coll uterí. L'*irinotecan* (Irinotecan®, Campto®) s'utilitza per al tractament del càncer de colon o de recte que s'han disseminat a altres parts del cos o que han reaparegut després del tractament amb *fluorouracil*.

Pel que fa els inhibidors de la topoisomerasa II, destaquen les podofilotoxines *etopòsid* (Vepesid®) i *tenipòsid*, les quals s'utilitzen juntament amb altres medicaments per al tractament del CPCP, limfoma i leucèmies agudes.

– Inhibidors de la mitosi

Els inhibidors de la mitosi són compostos derivats de productes naturals. Exerceixen la seva acció sobre la divisió cel·lular, evitant la formació de noves cèl·lules. Són capaces d'actuar en totes les fases del cicle cel·lular impedit la síntesi de les proteïnes necessàries per a la reproducció cel·lular. Aquest tipus de medicaments poden provocar danys als nervis.

S'utilitzen per tractar càncers com el càncer de mama, pulmó, mielomes, limfomes i leucèmies.

Dins d'aquest tipus de medicaments hi ha els taxans derivats de les plantes del gènere *Taxus* *docetaxel* i *paclitaxel*, i els alcaloides de la vinca (*Catharanthus rosea*) com la *vinblastina* i la *vincristina* (Figura 8):

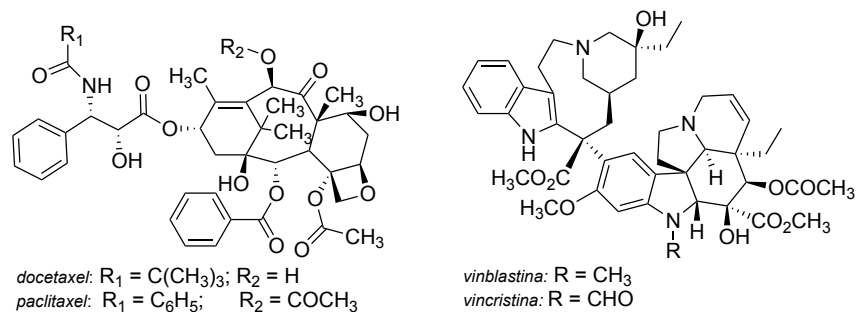


Figura 8. Estructura química del *docetaxel* i el *paclitaxel*, i de la *vinblastina* i la *vincristina*, respectivament

El *docetaxel* (Taxotere®) s'usa per tractar certs tipus de càncer de mama, d'estómac, de pulmó, de pròstata i de cap i coll.

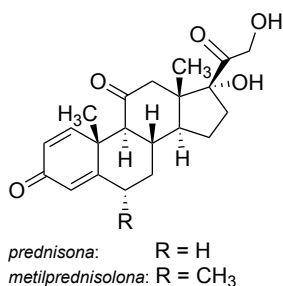
El *paclitaxel* (Taxol®) s'utilitza per tractar el sarcoma de Kaposi relacionat amb la infecció per VIH, el càncer d'ovari avançat i alguns tipus de càncer de mama.

La *vinblastina* (Vinblastina®) s'usa en el càncer de mama, el coriocarcinoma (un tipus de tumor de la gestació), el limfoma de Hodgkin i de no Hodgkin, el sarcoma de Kaposi, la micosis fungoide i el càncer de testicle.

La *vincristina* (Vincrisul®) s'utilitza per tractar la leucèmia aguda, i en combinació amb altres fàrmacs, per al tractament del limfoma de Hodgkin i de no Hodgkin, el rabdomiosarcoma, el neuroblastoma i el tumor de Wills.

– Corticosteroides

Els corticosteroides són els antiinflamatoris esteroides clàssics (AIES) i constitueixen un grup d'hormones naturals similars a les hormones utilitzades en tractament de diversos tipus de càncer, així com d'altres patologies. Els corticosteroides més típics són la *prednisona* i la *metilprednisolona* (Figura 9):



La *prednisona* i la *metilprednisolona* són glucocorticoides que s'utilitzen en combinació amb altres fàrmacs per tractar diversos tipus de càncer com la leucèmia i el limfoma. També s'usen com a tractament de suport per patologies relacionades amb el càncer com l'anèmia, les reaccions al·lèrgiques, les nàusees derivades de la quimioteràpia i la manca de fam.

Figura 9. Estructura química de la *prednisona* i de la *metilprednisolona*

A més a més, es disposa d'altres tipus de medicaments quimioteràpics que tenen un mecanisme d'acció diferent que no pot classificar-se en cap d'aquests grups com la *L-asparaginasa* (enzim) o l'inhibidor del proteosoma *bortezomib* (Velcade®) (Figura 10).

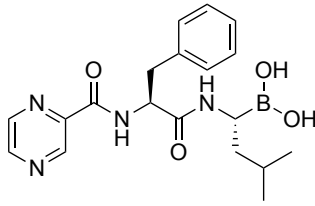


Figura 10. Estructura química del *bortezomib*

Teràpia hormonal⁹

La teràpia hormonal, també anomenada teràpia endocrina, és un tractament que té com objectiu modificar certes hormones evitant la seva síntesi o alterant els seus efectes sobre determinades cèl·lules. El tipus de tumors indicats per aquest tipus de tractament mostren receptors hormonals a la superfície de les cèl·lules els quals permeten que les hormones actuïn com a estimulants del creixement dels tumors. Els tipus de càncer que tenen aquesta característica i que poden ésser tractats amb aquest tipus de teràpia són principalment el càncer de pròstata i el càncer mama, i en menor mesura el càncer d'endometri, d'ovari i els tumors neuroendocrins.

Els tipus de teràpia hormonal actuals són els següents:

- *Tamoxifè* (Nolvadex®)

El *tamoxifè* és un dels fàrmacs més coneguts per al tractament del càncer de mama. És un modulador selectiu dels receptors d'estrògen (MSRE) i és el fàrmac més conegut i utilitzat des de fa temps per tractar el càncer de mama en dones premenopàusiques (Figura 11).

- Inhibidors de l'aromatasa

Aquests tipus de fàrmacs impedeixen la síntesi d'estrògens suprarenals i del teixit adipós. Constitueix la primera línia de tractament per al càncer de mama en dones postmenopàusiques. Els inhibidors de l'aromatasa més utilitzats són l'*anastrozol* (Arimidex®) i l'*exemestà* (Aromasin®) (Figura 11).

- Inhibidors LH-RH

Aquest tractament està indicat en dones premenopàusiques a les quals pot resultar beneficiós interrompre el cicle menstrual.

- *Fulvestrant* (Faslodex®)

El *fulvestrant* és un antiestrogen que impedeix la unió dels estrògens al seu receptor i disminueix la presència dels receptors hormonals a les cèl·lules tumorals, bloquejant amb aquests dos mecanismes el creixement dels tumors. Aquest fàrmac està indicat en el tractament de càncer de mama avançat o metastàtic (Figura 11).

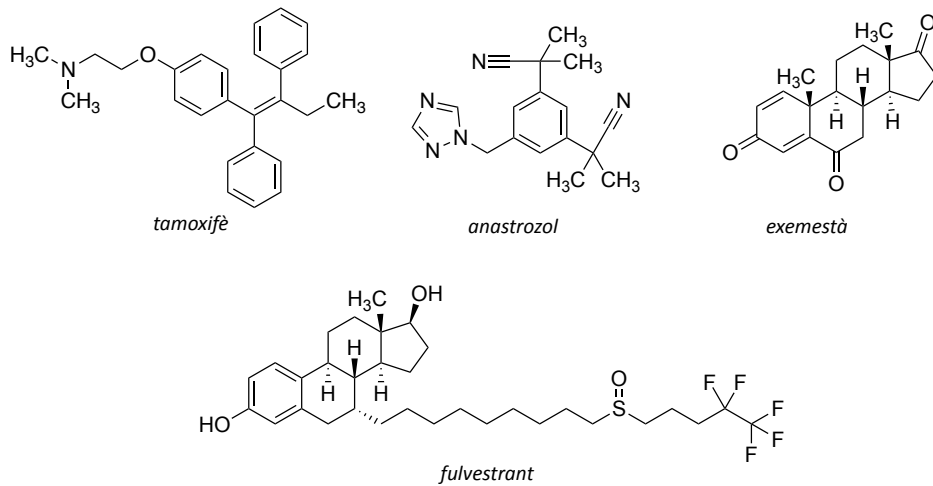


Figura 11. Estructura química del *tamoxifè*, l'*anastrozol*, l'*exemestà* i el *fulvestrant*

A part dels tractaments esmentats anteriorment, actualment s'estan utilitzant alguns tipus de fàrmacs que reverteixen la resistència a les hormones en certs tipus de càncer, com és l'*everolimus* en combinació amb l'*exemestà* en dones postmenopàusiques amb càncer de mama en estat avançat.

A més a més, s'estan començant a utilitzar inhibidors de ciclins com a complement d'alguns tractaments hormonals com el *letrozol* per tractar el càncer de mama.

Immunoteràpia

La immunoteràpia, també anomenada teràpia biològica, utilitza el sistema immunitari per combatre el càncer. L'objectiu d'aquest tractament és ajudar al sistema immunitari a reconèixer i destruir les cèl·lules canceroses. La relació entre el sistema immunitari i el càncer és extremadament complexa. En condicions normals, el sistema immunitari pot detectar i destruir les cèl·lules defectuoses però es poden donar situacions en les quals aquesta funció no es desenvolupi correctament. Aquest fenomen pot ocórrer quan:³

- El sistema immunitari reconegui les cèl·lules canceroses però no sigui capaç de combatre-les
- Les cèl·lules canceroses produeixen senyals immunosupressores que impedeixen l'actuació del sistema immunitari. En aquests casos apareixen els anomenats tumors inflamats
- Les cèl·lules canceroses aconsegueixen evadir el sistema immunitari, donant lloc als tumors no inflamats

Per tant, és lògic que en persones immunodeprimides el càncer pugui desenvolupar-se amb més freqüència i facilitat.

Els avantatges principals d'aquest tipus de teràpia són la baixa toxicitat que presenta (el sistema immunitari és capaç de distingir entre les cèl·lules cancerígenes i les cèl·lules sanes) i la capacitat d'aquest mateix a desenvolupar memòria per poder identificar en llargs períodes de temps les cèl·lules canceroses. Tot i així, cal destacar que el sistema immunitari no sempre és capaç de distingir correctament ambdós tipus de cèl·lules i pot no resultar efectiu o fins i tot confondre cèl·lules sanes per cèl·lules defectuoses i desenvolupar una toxicitat autoimmunitària. A més a més, el sistema immunitari triga un cert temps a poder exercir la seva acció i pot suposar un problema per a alguns pacients que presentin càncers més avançats o més agressius.

Durant tota la història de la oncologia, s'ha intentat potenciar el sistema immunitari per combatre el càncer però no s'havien arribat obtenir fàrmacs amb potència prou satisfactòria. No obstant, actualment s'han dissenyat noves generacions de fàrmacs que presenten resultats prometedors. La Societat Americana d'Oncologia Clínica (ASCO) va anunciar la immunologia com l'avenç més important en el tractament del càncer del 2016 i del 2017.²²

Els tipus de tractaments actuals es classifiquen dins dos grans grups: la immunoteràpia específica, la qual va dirigida a cèl·lules o antígens concrets (vacunes i teràpia cel·lular adoptiva) i la immunoteràpia inespecífica, la qual pretén estimular el sistema immunitari de forma general (citocines i proteïnes de control immunològic). A més a més, existeix un grup de fàrmacs àmpliament utilitzat constituït per anticossos monoclonals (mABs, *Monoclonal antibodies*), els quals es considerarien immunoteràpia específica passiva ja que no es pretén activar el sistema immunitari si no aportar els anticossos des de fora.

– Anticossos monoclonals¹⁷

Anticossos específics sobre algun receptor de la cèl·lula tumoral o d'algun factor que aquesta necessita per créixer. La seva funció és destruir les cèl·lules tumorals o impedir que aquestes disposin de factors essencials per al seu creixement. Aquests anticossos poden tenir principalment dos objectius: marcar les cèl·lules canceroses i facilitar-ne la destrucció per part del sistema immune - anomenada citotoxicitat dependent d'anticossos (ADCC: *Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*) - o bé inhibir l'efecte de les substàncies alliberades per part de les cèl·lules canceroses que impedeixen l'actuació del sistema immunitari - aquest tipus d'anticossos s'anomenen inhibidors dels punts de control immunitaris -. Dins dels inhibidors dels punts de control immunitaris destaquen el *ipilimumab* (Yervoy®), el *nivolumab* (Opdivo®) i el *pembrolizumab* (Keytruda®).

Les desavantatges principals dels anticossos monoclonals són l'elevat cost econòmic que suposa el desenvolupament de l'anticòs i la ràpida tolerància que desenvolupa l'organisme enfront aquests anticossos atesa la seva naturalesa biològica, provocant una disminució de l'activitat terapèutica en una curta durada de tractament. Per aquest motiu, actualment hi ha especial interès en l'estudi de nous quimioteràpics orgànics.

– Vacunes^{3,17}

De la mateixa manera que les vacunes poden ésser d'utilitat amb altres tipus de patologia, s'han desenvolupat vacunes que incorporen proteïnes característiques de les cèl·lules canceroses per tal de facilitar al sistema immunitari el reconeixement d'aquestes. Aquestes vacunes podrien:

- Aturar el creixement del càncer
- Prevenir la recaiguda del càncer
- Destruir les cèl·lules residuals d'altres tractaments

L'inconvenient principal d'aquest tipus de tractament és que el càncer suprimeix el sistema immunitari fent que aquest no sigui capaç de destruir-lo i que en moltes ocasions les cèl·lules canceroses són difícils de distingir de les cèl·lules sanes.

²² D. L. Madden. *Curr. Oncol. Rep.* **2018**, *20*, 8

Actualment aquest tipus de tractament només està disponible a través d'assajos clínics, però existeix una vacuna aprovada per la FDA (*Food and Drug Administration*) contra el càncer de pròstata metastàtic anomenada sipuleucel-T (Provenge®).

– Teràpia cel·lular adoptiva^{2,9}

Aquest tipus de tractament es troba actualment en fase experimental. Consisteix en extreure mitjançant una biòpsia els limfòcits que actuen sobre el tumor per tal de poder replicar-los al laboratori i tornar a injectar-los al pacient en major quantitat. Una vessant d'aquest tipus de tractament, consisteix en extreure del pacient limfòcits de la sang i modificar-los genèticament per tal d'introduir algunes modificacions que permetin reconèixer les cèl·lules canceroses amb més facilitat.

Aquest tipus de teràpia s'està aplicant amb un èxit considerable en leucèmies refractàries.

– Citocines^{9,17}

Aquest tipus de molècules són utilitzades pel sistema immunitari per comunicar-se entre sí. El seu mecanisme d'acció és inespecífic ja que estimula de forma global el sistema immunitari. Els dos de citocines principals en el tractament del càncer són les interleucines pel carcinoma renal - com la interleucina 2 (Proleukin®) - i els interferons per al melanoma - com l'interferó 2a (Roferon-A®).

L'eficàcia d'aquest grup terapèutic encara és moderada i actualment s'estan desenvolupant derivats per millorar-la.

Transplantament de cèl·lules mare²

Els transplantaments de cèl·lules mare ajuden a restaurar les cèl·lules mare que produeixen les cèl·lules de la sang (cèl·lules hematopoètiques) en pacients en els quals aquestes cèl·lules han estat destruïdes a causa del tractament previ amb quimioteràpia o radioteràpia.

Teràpies dirigides²

Les teràpies dirigides van adreçades a les modificacions de les cèl·lules canceroses que fan que aquestes puguin créixer, dividir-se i estendre's a altres teixits de forma anormal. Aquest tipus de modificacions poden ésser genètiques o epigenètiques. Aquesta modalitat de tractament s'inclou dins l'anomenada medicina de precisió. La medicina de precisió consisteix en l'adaptació del tractament a les característiques individuals de cada pacient en funció de la seva genètica, de la informació clínica disponible sobre la seva patologia i dels seus hàbits. Aquest tipus de teràpia ha estat possible gràcies als avenços actuals sobre la genòmica humana, la creació de bases de dades de pacients (dades moleculars, genètiques, clíniques, respostes als tractaments, etc.) i la disposició de tecnologies de gestió d'aquestes grans bases de dades.^{9,23}

El mecanisme d'acció d'aquestes teràpies dirigides sol ésser:³

- Aturar el creixement i divisió cel·lular

²³ K. C. Kurnit, E. E. Ileana Dumbrava, B. B. Litzenburger, Y. B. Khotskaya, A. Johnson, T. A. Yap, J. Rodon, J. Zeng, M. A. Shufean, A. Bailey, N. Sánchez, V. R. Holla, J. Mendelsohn, K. R. M. Shaw, E. V. Bernstam, G. B. Mills, F. Meric-Bernstam. *Clin. Cancer. Res.* **2018**, *24*, 2719-2731

- Localitzar les cèl·lules canceroses i eliminar-les
- Estimular el sistema immunitari per a que ataquí les cèl·lules canceroses
- Aturar l'angiogènesi
- Ajudar a dirigir altres tractaments cap a les cèl·lules canceroses

En comparació amb la quimioteràpia clàssica, aquest tipus de teràpia resolt el problema de la inespecificitat del tractament ja que són teràpies adreçades a una diana en concret, reduint al mateix temps els possibles efectes adversos conseqüents d'aquesta inespecificitat.

Les desavantatges principals d'aquest tipus de tractament són la major probabilitat de desenvolupament de resistències per part de les cèl·lules tumorals ja que únicament es tracta una diana en concret - en aquests casos sol utilitzar-se la politeràpia amb quimioteràpia o radioteràpia - i la dificultat de desenvolupar fàrmacs per certs tipus de dianes atesa la seva complexitat estructural o la seva implicació en la funcionalitat de la cèl·lula.

La majoria d'aquestes teràpies dirigides són molècules petites o anticossos monoclonals. La via d'administració d'aquest tipus de tractament sol ésser la via oral per les molècules petites i la via intravenosa en el cas d'anticossos monoclonals.

A continuació, s'indica el protocol de nous fàrmacs antineoplàsics per al tractament de diversos tipus de càncer aplicable als hospitals espanyols per aquest 2018 (alguns d'ells encara no han estat comercialitzats) (Taula 7):

Taula 7. Llistat de fàrmacs aplicables actualment per al tractament del càncer als hospitals espanyols

Principi actiu	Nom comercial	Indicació terapèutica
<i>abemaciclib</i>	-	Tractament del càncer de mama avançat o metastàtic amb el receptor hormonal (HR) positiu i HER2 negatiu amb <i>fulvestrant</i> amb progressió del càncer posterior al tractament hormonal, o com a monoteràpia amb progressió del càncer posterior al tractament hormonal i previ a la quimioteràpia.
<i>allectinib</i>	Alecensa®	Tractament del càncer de pulmó de cèl·lules no petites o no microcític (CPCNP) positiu per a la quinasa del limfoma anaplàstic (ALK), posterior a la manca de resposta al tractament amb <i>crizotinib</i> . Tractament de primera línia per al càncer de pulmó no microcític (CPCNP) positiu per a ALK.
<i>atezolizumab</i>	Tecentriq®	Com a monoteràpic per al tractament de pacients adults amb CPCNP avançat o metastàtic posterior a quimioteràpia. Els pacients amb mutacions activades pel receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>) o mutacions tumorals positives per ALK haurien de rebre teràpia dirigida prèviament. Com a monoteràpic per al tractament de pacients adults amb carcinoma urotelial (CU) avançat o metastàtic

		posterior a quimioteràpia amb platí o quan el <i>cisplatí</i> no pot utilitzar-se.
<i>avelumab</i>	Bavencio®	Com a monoteràpic per al tractament de pacients adults amb carcinoma de cèl·lules Merkel (CCM) metastàtic.
<i>bevacizumab biosimilar</i>	Avastin®	Tractament del CPCNP avançat i altres tipus de càncer.
<i>cabozantinib</i>	Cometriq®	Tractament de pacients adults amb carcinoma medul·lar de tiroides (CMT) progressiu, irressecables, localment avançats o metastàtics.
<i>ceritinib</i>	Zykadia®	Tractament de pacients adults amb CPCNP avançat positiu per ALK prèviament tractat amb <i>crizotinib</i> . Primera línia per al tractament del CPCNP no escamós positiu per ALK.
<i>ipilimumab</i>	Yervoy®	Tractament de melanoma avançat (irressecable o metastàtic) en pacients adults i en adolescents a partir dels 12 anys.
<i>lutetium oxodotreotide</i>	Lutathera®	Tractament de tumors neuroendocrins gastroenteropancreàtics (TNEGEP) positius pel receptor de somatostatina irressecables o metastàtics, progressius, ben diferenciats (G1 i G2), en pacients adults.
<i>necitumumab</i>	Portrazza®	Tractament de pacients adults amb CPCNP escamós amb expressió del receptor de l'EGFR localment avançat o metastàtic que mai ha rebut tractament quimioteràpic per a aquesta condició.
<i>niraparib</i>	Zejula®	Com a monoteràpic per al tractament de manteniment de pacients adults amb càncer ovàric epitelial serós de grau alt recurrent sensible al platí, de trompes de Falopi o càncer primari peritoneal que responen (parcialment o completament) a la quimioteràpia basada en platí.
<i>osimertinib</i>	Tagrisso®	Tractament de pacients adults amb CPCNP amb expressió del EGFR amb mutació positiva per T790M, localment avançat o metastàtic.
<i>padeliporfin</i>	Tookad®	Com a monoteràpic per a pacients adults amb adenocarcinoma de pròstata de baix risc, unilateral i que mai han estat tractats amb unes característiques clíniques específiques.
<i>palbociclib</i>	Ibrance®	Tractament del càncer de mama localment avançat o metastàtic amb l'HR positiu i l'HER2 negatiu: en combinació amb un inhibidor d'aromatasa; en combinació amb <i>fulvestrant</i> en dones que hagin rebut teràpia hormonal prèviament.
<i>ribociclib</i>	Kisqali®	Tractament de primera línia amb <i>letrozole</i> per càncer de mama avançat amb HR positiu i HER2 negatiu en dones postmenopàusiques.

<i>talimogene laherparepvec</i>	Imlygic®	Tractament de pacients adults amb melanoma irressecable regionalment o allunyadament metastàtic (Estadi IIB, IIC i IVM1a) sense cap patologia òssia, cerebral, pulmonar o de qualsevol altra víscera.
<i>tivozanib</i>	Tivopath®	Tractament de primera línia per al carcinoma de cèl·lules renals avançat.
<i>trastuzumab biosimilar</i>	Ontruzant®)	Tractament de càncer de mama en estadis inicials o metastàtic. Tractament del càncer gàstric metastàtic.

Tractaments pal·liatius¹

A diferència dels altres tipus de tractament, els tractaments pal·liatius no tenen com a objectiu curar la patologia sinó alleujar-ne els símptomes i millorar la qualitat de vida dels pacients i de les seves famílies. Els tractaments pal·liatius poden millorar la qualitat de vida del pacient en diverses malalties cròniques i en estadis avançats de càncer on la cura no és possible.

1.6 Teràpia dirigida: Dianes farmacològiques

1.6.1 EZH2

1.6.1.1 Rol de l'EZH2 en càncer

La regulació de modificacions covalents d'histones a la zona dels promotors i potenciadors juga un paper essencial en la modulació de l'expressió gènica i consegüent diferenciació i determinació del tipus cel·lular. Els darrers avenços en la seqüenciació del genoma humà han permès descobrir que molts dels gens implicats en la regulació de la cromatina que modifiquen les histones solen estar mutats en diversos tipus de càncer.^{24,25}

Les proteïnes del grup Polycomb (PcG) es van identificar en primer lloc en *Drosophila melanogaster* com a silenciadores geniques homeòtiques. Més endavant, es van identificar aquestes mateixes molt ben conservades en cèl·lules de mamífers. Aquestes proteïnes PcG es troben en diversos complexos multiproteics, dins els quals s'inclouen els Complexes Repressius Polycomb (PRC), els quals formen dos complexos relacionats: PRC1 i PRC2. Aquests complexos modulen el silenciament gènic regulant principalment l'estructura de la cromatina a través de la modificació post-traducciona (PTM) d'histones²⁶ i tenen un rol fonamental com a reguladors de la pluripotència de cèl·lules mare i l'expressió de gens específics de teixit implicats en la diferenciació i el desenvolupament cel·lular.^{27,28} El PRC2 està format per les subunitats *enhancer of zeste homolog 1* o *2* (EZH1 o EZH2, els quals són els components catalítics d'aquest complex amb activitat histona metil transferasa (HMT) que catalitzen la trimetilació de la lisina 27 de la histona 3, i les tres proteïnes no catalítiques *Embryonic Ectoderm Development* (EED), *Supressor of Zeste 12* (SUZ12) i *Histone-binding protein Retinoblastoma binding*

²⁴ M. Yamagishi, K. Uchamaru. *Curr Opin Oncol.* **2017**, 29, 375-381

²⁵ K. H. Kim, C. W. M. Roberts. *Nat. Med.* **2016**, 22, 128-134

²⁶ A. Christofides, T. Karantanos, K. Bardhan, V. A. Boussiatis. *Oncotarget* **2016**, 7, 85624-85640

²⁷ H. Wu, H. Zeng, A. Dong, F. Li, H. He, G. Senisterra, A. Seitova, S. Duan, P. J. Brown, M. Vedadi, C. H. Arrowsmith, M. Schapira. *PLoS One* **2013**, 8, e83737

²⁸ H. Yamaguchi, M.-C. Hung. *Cancer Res. Treat.* **2014**, 46, 209-222

protein p48/46 (RbAp48/46). Cal destacar que l'EZH1 i l'EZH2 no tenen funció catalítica *per se*, sinó que necessiten les tres proteïnes addicionals del complex per poder tenir funció metiltransferasa.^{26,29,30} A més a més, aquest complex conté les unitats accessorïes AEBP2 (*Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2*), JARID (*Jumonji- and AT-rich Interaction Domain*) i PCL (*Polycomb Like*), de les quals se'n desconeix la funció específica però podrien estimular l'activitat metiltransferasa (Figura 12). Pel que fa el PRC1, conté les subunitats Bmi1, Ring1b, CBX4 i PHC, s'uneix al residu H3K27me3 i indueix la monoubiquitinació de la lisina 119 de la histona 2A (H2AK119ub1).^{28,30} Tot i que el PRC1 potencia l'acció del PRC2 a través de la interacció amb H3K27me3, ambdós complexes poden reprimir l'expressió gènica de forma independent.²⁸

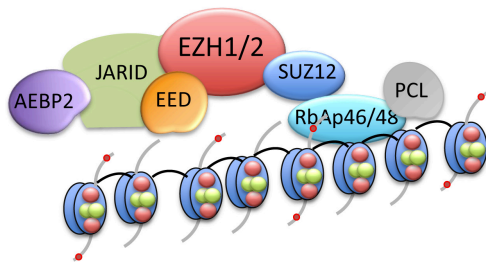


Figura 12. Complex PRC2 amb EZH1/EZH2 amb els quatre components essencials EED, EZH1/2, SUZ12 i RbAp46/48 i els tres components accessoris AEBP2, PCL i JARID²⁶

Pel que fa la diferència entre EZH1 i EZH2, tot i que tots dos s'acomplexen amb el PRC2 per controlar els mateixos grups de gens, actuen de forma diversa sobre l'estat de repressió de la cromatina. L'EZH2 es troba expressat majoritàriament en teixits en creixement, mentre que l'EZH1 es troba sobretot en cèl·lules diferenciades i en divisió. Aquest fet implica que els complexos de PRC2-EZH2 podrien encarregar-se d'establir la repressió mitjançant la trimetilació de la histona (H3K27me3) mentre que els complexos amb PRC2-EZH1 contribuirien a restablir aquesta metilació en cas de canvis en la histona.³⁰

Estructura del domini catalític de l'EZH2²⁷

L'arquitectura lineal de l'EZH2 cristal·litzat adopta el plegament canònic del domini SET (*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax*) de les metiltransferases. Els dominis caracteritzats de l'EZH2 són: l'EID, domini d'interacció amb l'EED; el SANT, domini d'unió de SWI3, ADA2, N-CoR i TFIIB; el ncRBD, domini d'unió a RNA no codificant; el CXC, domini ric en cisteïna; i el domini SET C-terminal, el qual constitueix un element altament conservat de les HMT i en permet la seva activitat (requerint la presència d'almenys l'EED i el SUZ12 al complex PRC2) (Figura 13).



Figura 13. Dominis caracteritzats de l'EZH2: EID, domini d'interacció de l'EED; domini d'unió a l'ADN del SANT, el SWI2, l'ADA2, el N-CoR i el TFIIB; ncRBD, domini d'unió a l'ARN no codificant; CXC, domini ric en cisteïna, domini SET, *Su(var)3-9, enhancer of zeste i trithorax*²⁶

Tot i conservar la majoria de trets distintius d'aquest tipus de domini, presenta algunes alteracions:

- Immediatament després de la N-terminal del domini SET es troba un domini CXC el qual està coordinat per dos grups de tres ions de zinc. L'alteració d'aquest domini a causa de mutacions

²⁹ I. Marchesi, L. Bagella. (2013). Role of Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Protein and Its Significance in Tumor Progression and Cell Differentiation, Chromatin Remodelling, Dr. Danuta Radzioch (Ed.), InTech.

³⁰ P. Völkel, B. Dupret, X. Le Bourhis, P.-O. Angrand. *Am. J. Transl. Res.* 2015, 7, 175-193

missense ha estat associat amb determinats tipus de càncer (leucèmia mieloide aguda (AML, *Acute Myeloid Leukemia*) i síndrome mielodisplàsica (MDS, *Myelodysplastic syndrome*).

- Diferent conformació dels primers cinc residus del domini post-SET, la qual evita la possible unió del cofactor *S*-adenosil-metionina (SAM) provocant inactivitat enzimàtica d'aquest.
- Presència d'una segona butxaca formada al domini I-SET juxtaposada al lloc d'unió del SAM de l'EZH2. Es desconeix si aquest fenomen té lloc en el context del complex PRC2.

Regulació de l'expressió d'EZH2

Les proteïnes del PcG són reguladors epigenètics del desenvolupament embrionari i del manteniment de cèl·lules mare. Diversos estudis suggereixen que la funció dels PRC són específiques de teixit i depenen del context cel·lular. No obstant això, la sobreexpressió d'EZH2 està present en diversos tipus de càncer i és crítica per a la proliferació de cèl·lules canceroses i la seva supervivència. A més a més, els seus reguladors també són crítics per a la proliferació cel·lular, la formació de tumors i el manteniment de les funcions de cèl·lules mare. Hi ha diversos mecanismes que participen en aquesta sobreexpressió (Figura 14):^{26, 28,29,30,31}

- Modulació a nivell transcripcional

Aquesta regulació es pot donar a partir de vies de senyalització que activen l'expressió de l'EZH2 o a través de factors de transcripció que s'uneixen directament al promotor d'EZH2. La senyalització pRb-E2F (proteïna del retinoblastoma-factor de transcripció E2F) està involucrada en diversos tipus de càncer. Mitjançant la fosforilació pRb/E2F, l'E2F es dissocia del complex pRb/E2F i el factor de transcripció E2F activat s'uneix als llocs d'unió E2F del promotor de l'EZH2 per activar-ne la seva transcripció. La sobreexpressió d'E2F o de la via pRb/E2F estan correlacionades amb l'expressió d'EZH2 en càncer de mama, bufeta i càncer de pulmó de cèl·lules petites o microcític (CPCP). En canvi, els factors de transcripció MYC i ETS regulen directament l'expressió d'EZH2 en el càncer de pròstata mentre el NF-YA (*Nuclear transcription factor Y subunit alpha*), STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) i el co-activador del receptor androgènic (AR) ATAD2/ANCCA en regulen l'expressió en càncer ovàric epitelial, càncer colorectal i càncer de mama, respectivament.

Cal destacar que la hipòxia en els tumors sòlids també representa un mecanisme de modulació directa de l'EZH2 a través de l'activació de factors presents al promotor d'EZH2 que s'activen gràcies a aquesta mateixa hipòxia.

- Modulació a nivell post-transcriptional

Aquesta regulació és duu a terme a partir de micro-RNAs (miRNAs), els quals interaccionen amb determinades seqüències de l'EZH2 disminuint directament l'expressió d'aquest. La manca de control sobre aquests miRNAs provoca la sobreexpressió d'aquesta proteïna i està relacionada amb el grau d'agressivitat de diversos tipus de càncer.

- Modulació a nivell post-traducciona

Aquesta modulació també es pot dur a terme per altres agents proteics que mitjançant la fosforilació en diferents punts de l'EZH2 poden augmentar-ne o disminuir-ne l'expressió. Aquesta

³¹ L. Gan, Y. Yang, Q. Li, Yi. Feng, T. Liu, W. Guo. *Biomark. Res.* **2018**, 6, 10

fosforilació pot ésser dependent de senyals dependents del cicle cel·lular (quinases dependents de ciclines 1 i 2, CDK1 i CDK2) o de quinases regulades per senyals extracel·lulars (activació d'AKT).

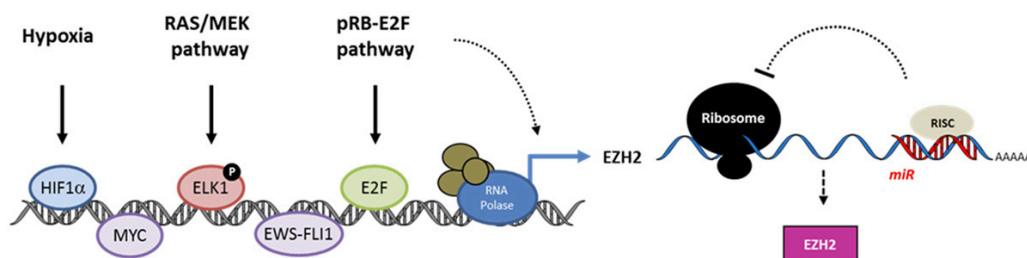


Figura 14. Participació de l'EZH2 en càncer³⁰

– Reclutament al *loci* específic

L'EZH2, l'EED, el SUZ12 i el RbAp48 són proteïnes del *core* de PRC2 però tenen una afinitat baixa per l'ADN. Per aquest motiu, requereixen d'agents externs que les reclutin al *loci* específic. Aquests agents poden ésser proteïnes o ncRNAs (RNA no codificant).

Algunes d'aquestes proteïnes tenen un paper crític en el desenvolupament del càncer ja que poden contribuir a la repressió de supressors de tumors a través de la regulació del silenciament gènic gràcies al reclutament d'EZH2 al *loci* específic; o bé, el PRC2 pot interactuar directament amb proteïnes supressores de tumors i silenciar-les.

En el cas dels ncRNAs, un dels més estudiats és el HOTAIR, el qual es troba sobreexpressat en el càncer de mama i facilita la invasió per part de cèl·lules canceroses i la metastasi, mentre que l'absència d'aquest redueix aquestes capacitats.

– Mutacions

Diversos tipus de mutacions de l'EZH2 han estat associats a la seva sobreexpressió i a la seva implicació en el desenvolupament i progressió del càncer, sobretot en diverses leucèmies. Aquest fet demostraria el seu paper com a mediador oncogènic. Tot i així, altres esdeveniments han mostrat un possible paper de l'EZH2 com a supressor de tumors ja que la pèrdua de la seva activitat també està relacionada amb el desenvolupament d'agressivitat d'alguns càncers. Per tant, l'EZH2 presenta una dualitat com a oncogen i supressor de tumors.

Mecanisme d'acció d'EZH2 en càncer^{30,28,32,33}

L'EZH2 presenta diferents activitats en el desenvolupament de càncer (Figura 15).

³² Y. Wen, J. Cai, Y. Hou, Z. Huang, Z. Wang. *Oncotarget* **2017**, 8, 37974-37990

³³ I. Marchesi, L. Bagella. *World J. Clin. Oncol.* **2016**, 7, 135-148

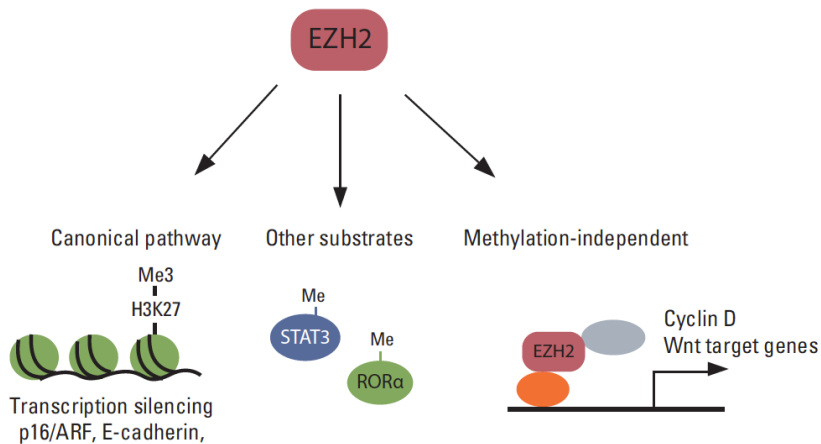


Figura 15. Funcions de l'EZH2 en càncer²⁸

– Via canònica

Com s'ha explicat anteriorment, la funció principal de l'EZH2 és la trimetil·lació de la lisina 27 de la histona 3 donant lloc a un silenciament de gens que pot afavorir el desenvolupament i la progressió de determinats tipus de càncers.

– Altres substrats (modificacions post-traduccionals)

A part de metilar la histona 3, l'EZH2 també metila altres substrats provocant una activació o una desactivació (silenciament) de la seva funció. Per exemple, pot interaccionar i metilar el STAT3 provocant un augment de la fosforilació de la tirosina i l'activació d'aquest STAT3. L'EZH2 també pot monometilar el supressor de tumors *Retinoic acid-related orphan nuclear receptor α* (RORα), el qual en conseqüència d'aquesta metil·lació es degrada i no pot exercir la seva funció.

– Independent de metil·lació

- Activador de la transcripció: estudis recents han demostrat que l'EZH2 pot activar vies oncogèniques de forma independent al complex PRC2 com la senyalització Wnt al càncer colorectal. També pot interactuar amb el receptor estrogènic α i β -catenina, regulant amb aquest complex l'expressió de c-MYC i de la ciclina D1 en el càncer de mama. També pot actuar com a co-activador amb el receptor androgènic en càncer de pròstata resistent a la castració.
- Implicació de PRC2 en la reparació de l'ADN: el mecanisme d'acció d'aquesta activitat no ha estat elucidat però el silenciament de l'EZH2 ha mostrat una reducció de la reparació de l'ADN de doble cadena i un augment de la sensibilitat a radiacions ionitzants.

Desregulació d'EZH2 en càncer^{25,26,31}

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la sobreexpressió de l'EZH2 està relacionada amb diversos tipus de càncer com el càncer de pulmó, l'hepatocel·lular, el colorectal, el de mama, el pancreàtic, etc. Tot i així, en altres tipus de càncer com la MDS i la AML estan implicades tant la sobreexpressió com la pèrdua de funció de l'EZH2. A continuació s'exposen les conseqüències de la desregulació d'EZH2:

– Progressió del cicle i la supervivència cel·lulars i implicació en el manteniment de les CSC

La desregulació de l'EZH2 accelera la proliferació cel·lular i la supervivència. L'EZH2 està implicat en la disminució dels factors especificadors de llinatge i suprimeix programes transcripcionals específics que regulen la diferenciació cel·lular i l'apoptosi. Per aquest motiu, l'expressió d'EZH2 en

CSC és més elevada que en la resta de cèl·lules tumorals i juga un paper molt important en el manteniment i l'expansió de CSC. Aquesta correlació EZH2-CSC ha estat demostrada en el melanoma, el càncer de mama, l'ovàric, el pancreàtic, el de pell, el colorectal i en la leucèmia.^{32,34}

– EMT

Com s'ha explicat anteriorment, l'EMT consisteix en un conjunt de processos cel·lulars que permeten la transformació de cèl·lules epitelials immòbils i polaritzades en cèl·lules mesenquimals apolars amb capacitat de migració. Aquesta conversió ocorre a causa de l'activació i repressió d'alguns gens específics - com la repressió del gen SNAIL-1 el qual codifica per als components de les unions adherents cel·lulars - i de canvis en el citoesquelet de la cèl·lula - com la pèrdua d'E-cadherina - que alteren la polaritat cel·lular.

– Resistència a medicaments intervinguda per EZH2

Diversos estudis mostren que la sobreexpressió d'EZH2 augmenta la quimioresistència en el càncer de pulmó de cèl·lules petites o microcític (CPCP), el carcinoma escamocel·lular de cap i coll (HNSCC) i el glioblastoma. L'ús d'inhibidors d'EZH2 en combinació amb altres fàrmacs quimioteràpics va disminuir la resistència adquirida i augmentà l'eficàcia quimioterapèutica tan en models quimiosensitius com en quimioresistents de glioblastoma.

– Rol com a supressor de tumors

En alguns tipus de càncer, la supressió de l'EZH2 n'afavoreix la progressió. En el cas de la leucèmia limfoblàstica aguda de cèl·lules T (T-ALL), majoritàriament ocasionada per l'activació oncogènica de la senyalització NOTCH1, el 25% d'aquest tipus de càncer mostra la pèrdua de funcionalitat o supressió dels gens d'EZH2 i SUZ12. La via de senyalització NOTCH1 indueix específicament la pèrdua de la trimetilació de la histona 3 antagonitzant l'activitat del PRC2 i augmentant així la progressió del càncer.

– Immunogenicitat del microentorn tumoral

La inhibició de l'enzim EZH2 provoca diferents efectes en funció del tipus de cèl·lula a la qual es duu a terme aquesta inhibició:

- Cèl·lules canceroses: la inhibició de l'enzim EZH2 augmenta el reclutament de cèl·lules T al microentorn tumoral provocant un augment de la immunitat antitumoral.
- Cèl·lules *Natural Killer* (NK): la inhibició d'EZH2 pot inhibir el creixement del tumor de forma directa i indirecta a través de la mobilització d'aquest tipus cel·lular.
- Cèl·lules T: la inhibició de l'EZH2 suprimeix la supervivència i eficiència d'aquest tipus cel·lular disminuint la immunitat antitumoral.
- Cèl·lules T reguladores (Tregs): en aquest cas l'expressió d'EZH2 és essencial per al reclutament de cèl·lules T reguladores al lloc d'inflamació i la inhibició d'aquesta provoca la impossibilitat d'actuar de forma eficient contra l'autoimmunitat o la immunitat antitumoral.

³⁴ F. Crea, E. Paolicchi, V. E. Marquez, R. Danesi. *Crit. rev. Oncol. Hematol.* **2012**, 83, 184-193

Per aquest motiu, l'ús d'inhibidors d'EZH2 per al tractament del càncer suposa una estratègia prometedora però cal tenir en compte que pot dificultar l'actuació del sistema immunitari contra les cèl·lules canceroses.

Inhibició d'EZH2 per al tractament del càncer^{25,33,35,36}

Actualment, s'han desenvolupat diversos inhibidors d'EZH2 i han estat avaluats en assajos preclínic i clínic. A continuació es mostren els mecanismes d'acció dels inhibidors enzimàtics actuals, així com exemples dels compostos més descrits a la literatura:

- Regulació dels nivells d'EZH2

A través de la degradació d'EZH2 a través del proteosoma (DZNep, *sorafenib*) o mitjançant l'augment de l'expressió de miRNA que disminueix l'expressió d'EZH2 i fins i tot pot augmentar la quimiosensibilitat (Figura 16).

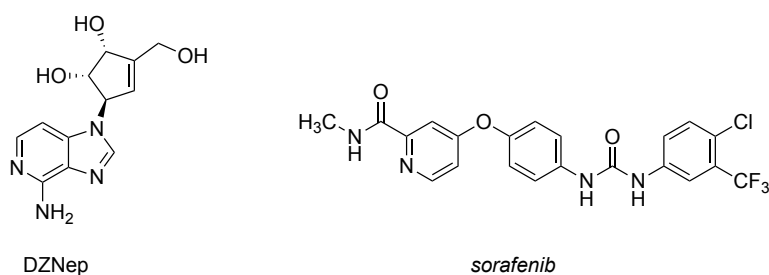


Figura 16. Estructura química de dos reguladors dels nivells d'EZH2 inhibidors d'EZH2

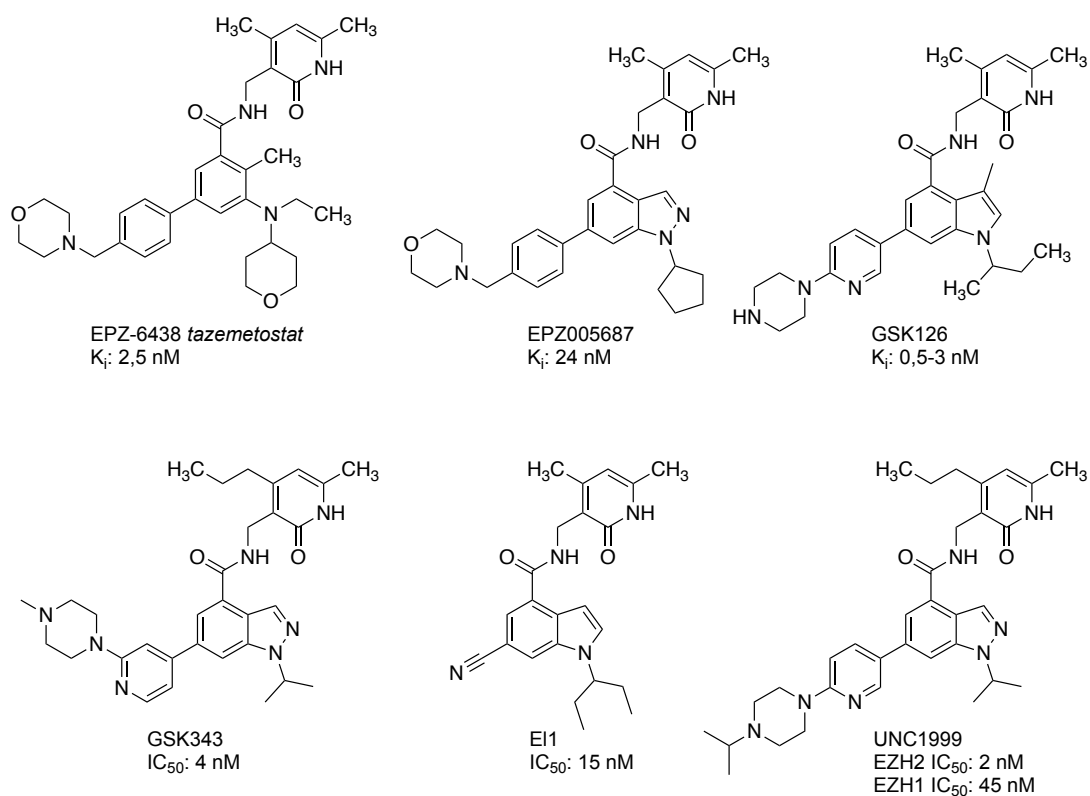
- Anàlegs de SAM

Competidors del SAM pel lloc d'unió a l'EZH2 desenvolupats per inhibir l'activitat metiltransferasa d'EZH2 sense alterar-ne el nivell d'expressió (Figura 17).³⁷

³⁵ G. Stazi, C. Zwergel, A. Mai, S. Valente. *Expert Opin Ther Pat.* **2017**, 27, 797-813

³⁶ N. Gulati, W. Béguelin, L. Giulino-Roth. *Leuk. Lymphoma* **2018**, 1-12

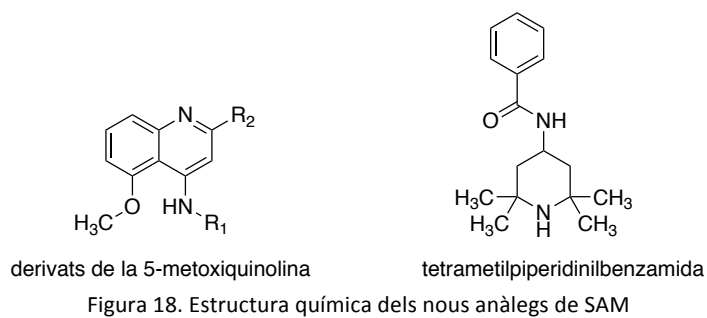
³⁷ C. Hui, T. Ye. *Front. Chem.* **2015**, 3, 44



K_i : constant de dissoció del complex enzim-inhibidor.
 IC_{50} : concentració a la qual s'inhibeix el 50 % del creixement cel·lular.

Figura 17. Estructura química dels anàlegs de SAM més estudiats actualment³⁵

Actualment, s'estan desenvolupant derivats de 5-metoxiquinolina i tetrametilpiperidinil benzamides (Figura 18).^{33,38}



³⁸ P. Xiang, H. Jie, Y. Zhou, B. Yang, H-J. Wang, J. Hu, J. Hu, S.-Y. Yang, Y.-L. Zhao. *Molecules* **2015**, *20*, 7620-7636

- Inhibició de la interacció entre EZH2 i altres subunitats de PRC2

Les interaccions amb altres components del complex PRC2 com l'EED o el SUZ12 són essencials per a l'activitat canònica de l'EZH2. Un exemple d'aquest tipus de compostos és el pèptid SAH-EZH2 el qual és capaç de trencar la unió entre l'EZH2 i l'EED inhibint la H3K27me3 i disminuint els nivells d'EZH2 ja que desestabilitza la seva estabilitat proteica.

- Mecanisme desconegut

En alguns casos el mecanisme d'acció sobre EZH2 es desconeix. Aquest és el cas del compost CP-1205 el qual actualment es troba en assajos clínics per al tractament del limfoma de cèl·lules B (Figura 19).³⁶

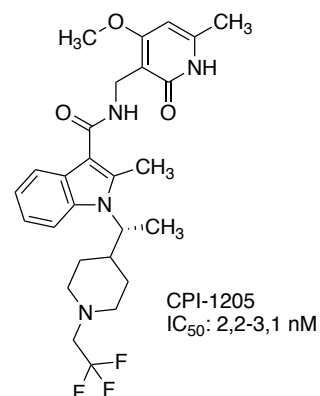


Figura 19. Estructura química del compost CPI-1205

A més a més dels inhibidors sintètics desenvolupats, diversos compostos naturals han mostrat eficàcia com a inhibidors d'EZH2. Entre ells, destaquen els següents:^{33,39}

- *Curcumina*: polifenol present en diferents tipus de plantes, sobretot en els rizomes de *Curcuma longa*. S'utilitza sobretot la curcumina bifluorada.
- Te verd: concretament el polifenol epigallocatequina-3-galat (EGCG).
- Tripòlid: compost bioactiu de la planta xinesa *Trpterygium wilfordii Hook F* (TWHF).
- Àcid ursòlic: triterpè pentacíclic aïllat de la pell de les pomes del pomer comú.
- Sulforafà: isocianat bioactiu abundant al bròquil.
- Resveratrol: polifenol flavonoid present al vi negre i a altres espècies.

1.6.1.2 Rol de l'EZH2 en l'osteosarcoma

L'osteosarcoma és el tumor maligne ossi més comú i la segona causa de mort relacionada amb el càncer en nens i adolescents. Sol presentar una distribució d'edat bimodal, incidint principalment en la segona dècada de vida o a partir dels 60 anys aproximadament.^{40,41} Aquest tipus de càncer sol caracteritzar-se per presentar un mal pronòstic, metàstasi i resistència a la quimioteràpia.

³⁹ F. Shahabipour, M. Caraglia, M. Majeed, G. Derosa, P. Maffioli, A. Shebkar. *Cancer Lett.* **2017**, 400, 325-335

⁴⁰ D. D. Moore, H. H. Luu. *Cancer. Treat. Res.* **2014**, 162, 65-92

⁴¹ M. W. Bishop, K. A. Janeway, R. Gorlick. *Curr. Opin. Pediatr.* **2016**, 28, 26-33

Aquest tipus de sarcoma tendeix a aparèixer en parts de l'os amb creixement elevat com són els extrems ossis de cames i braços, concretament i en ordre decreixent, el fèmur distal, la tibia proximal i l'húmer proximal. Tot i així, cal tenir en compte que pot aparèixer a qualsevol os.^{16,40}

L'etiologia de l'osteosarcoma segueix essent desconeguda actualment. Es considera una patologia multifactorial que compta amb diversos factors genètics i ambientals. Els avenços dels darrers anys en l'àmbit de la genòmica han revelat que aquest tipus de càncer comporta una complexitat genòmica sorprenent i una heterogeneïtat interindividual considerable. Dins les alteracions més documentades freqüentment presents en altres tipus de càncer són les mutacions dels supressors de tumors p53 i RB.^{40,41}

Tractament

Actualment, el tractament dels osteosarcoma severs compta amb cicles de quimioteràpia neoadjuvant combinada, cirurgia i teràpia post-operacional. La radioteràpia només s'indica en tumors primaris irressecables.^{41,42}

Tot i que en els darrers anys s'ha incrementat l'índex de supervivència als 5 anys fins al 60-70% gràcies a la resecció quirúrgica i a la quimioteràpia adjuvant, el progrés del tractament de l'osteosarcoma en pacients amb càncer recurrent o metastasi no ha mostrat una millora satisfactòria.⁴³ Per aquest motiu, és imprescindible el desenvolupament de nous fàrmacs per tractar l'osteosarcoma recurrent i metastàtic.^{44,45}

A continuació es mostra una taula amb els compostos presents en estudis clínics per al tractament de l'osteosarcoma (Taula 8):⁴¹

Taula 8. Candidats per al tractament de malalties relacionades amb l'osteosarcoma⁴¹

Compost	Diana	Assaig clínic
<i>eribulin mesilat</i>	Inhibició microtubular	NCT02097238
<i>cisplatí</i> lípid inhalat	Agent citotòxic	NCT01650090
<i>denosumab</i>	Lligand del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL)	NCT02470091
<i>glembatumumab vedotin</i>	Glicoproteïna NMB (osteoactivina)	NCT02487979
<i>dinutuximab</i>	GD2	NCT02484443
Hu3F8	GD2	NCT02502786
Hu14.18K322A	GD2	NCT00743496
Cèl·lules T activades amb	GD2	NCT02173093

⁴² A. Redondo, J. Cruz, A. Lopez-Pousa, F. Barón. *Clin. Transl. Oncol.* **2013**, *15*, 1037-1043

⁴³ Z.-C. Zhang, C. Tang, Y. Dong, J. Zhang, T. Yuan, X.-L. Li. *J. Cancer* **2018**, *9*, 71-80

⁴⁴ Y.-F. Lv, G.-N. Yan, G. Meng, X. Zhang, Q.-N. Guo. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12999

⁴⁵ R. Sun, J. Shen, Y. Gao, Y. Zhou, Z. Yu, F. Hornicek, Q. Kan, Z. Duan. *Oncotarget* **2016**, *7*, 38333-38346

GD2-biespecífic		
Cèl·lules T amb receptor antigènic quimèric anti-GD2	GD2	NCT02107963
<i>bevacizumab</i>	VEGF	NCT00667342
<i>sorafenib</i>	VEGFR2-3, PDGFR- β , CRAF, BRAF, c-Kit, FLT3	NCT00889057; NCT01804374
<i>regorafenib</i>	VEGFR1-3, TIE2, PDGFR- β , FGFR, KIT, RET, RAF	NCI02048371
<i>pazopanib</i>	VEGFR1-3, PDGFR- α , PDGFR- β , FGFR, c-Kit, CSF-1	NCT01956669; NCT01759303
<i>cabozantinib</i>	MET, VEGFR2, RET, KIT, TIE2	NCT02243605
<i>sirolimus</i>	FKBP12/mTORC1	NCT02517918
<i>everolimus (RAD001)</i>	FKBP12/mTORC1	NCT01804374
Muramil tripèptid fosfaditiletanolamina liposomal (L-MTP-PE)	Agent immunomodulador	NCT00631631; NCT02441309
Interferó pegilat α -2b (INF- α -2b)	Agent immunomodulador	NCT00134030
<i>nivolumab</i> (\pm <i>ipilimumab</i>)	PD-1 (\pm CTLA-4)	NCT02304458
<i>pembrolizumab</i>	PD-1	NCT02301039

Rol d'EZH2 en l'osteosarcoma

Diversos estudis han demostrat que la sobreexpressió d'EZH2 està associada a osteosarcomes més agressius amb mal pronòstic. Una elevada sobreexpressió d'aquest enzim està íntimament relacionada amb un grau histopatològic sever, un estadi clínic avançat i una metastasi distant al tumor primari molt probable. Per tant, l'expressió d'EZH2 consisteix un possible biomarcador per al pronòstic del càncer. Per tal de confirmar el rol d'EZH2 en l'osteosarcoma, s'han dut a terme diversos experiments silenciament aquest enzim mitjançant siRNAs. Els resultats d'aquest *knockdown* mostren el bloqueig del cicle cel·lular en fase G1, una inhibició del creixement i la proliferació tumors *in vitro* i *in vivo*, un increment de l'apoptosi, una inhibició de la invasió i migració tumoral *in vitro* i *in vivo*, una disminució de la metastasi i un augment de la sensibilitat a la quimioteràpia.^{43,44,45}

Tots aquests descobriments fan que els inhibidors d'EZH2 puguin ésser potencials candidats per al tractament de l'osteosarcoma. Actualment, s'han desenvolupat estudis per avaluar el potencial terapèutic del DZNep, el qual ha mostrat resultats prometedors sobre la inhibició del creixement i la proliferació de les cèl·lules tumorals d'osteosarcoma.⁴⁵

1.6.2 IL17

Les IL-17 són una família d'interleucines (citocines) proinflamàtores que engloba sis proteïnes diferents (IL-17A, B, C, D, E i F), les funcions de les quals no estan completament definides. La IL-17A, normalment anomenada IL-17, és la isoforma més estudiada i està formada per dos monòmers d'IL-

17A o per un heterodímer de IL-17A i IL-17F. Aquesta citocina és secretada principalment per un subtipus de cèl·lules T CD4⁺ anomenades cèl·lules Th17,⁴⁶ tot i que també pot ésser secretada per cèl·lules immunitàries innates com les cèl·lules $\gamma\delta$ T, les cèl·lules T Natural Killer invariants (iNKT, *invariant Natural Killer T cells*) i les cèl·lules limfoides innates (ILCs, *Innate Lymphoid cells*) del grup 3. A més a més, en processos infecciosos o inflamatoris també pot ésser secretada per neutròfils i mastòcits.^{47, 48} Els receptors d'IL-17 (IL-17RA i IL-17RC) s'expressen en cèl·lules epitelials, mesenquimals i hematopoètiques. La unió d'IL-17 al receptor indueix el reclutament de la proteïna Act1, la qual interacciona amb les proteïnes del citoesquelet TRAF6 i TAK1 per activar el NF- κ B (factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres *kappa* de les cèl·lules B activades) i la p38/MAPKs (*mitogen activated protein kinases*).⁴⁷

Mecanisme fisiològic de l'IL-17

La funció principal de la IL-17 és produir una resposta immunitària contra patògens en els teixits més exposats a l'exterior com són la pell, els intestins i els pulmons, mitjançant la inducció de la infiltració, l'activació i la supervivència de neutròfils i la inducció d'altres respostes immunitàries innates com l'expressió de quimioquines, del factor estimulant de colònies granulocitari (G-CSF) i de l'IL-22.⁴⁸ S'ha demostrat que la secreció d'IL-17 és essencial per a respostes immunitàries efectives contra certes infeccions com les produïdes per *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Escherichia coli*. La segona funció destacable d'aquesta proteïna és dur a terme la remodelització tissular durant la resposta inflamatòria a través de la inducció de la secreció de metal·loproteïnases (MMPs) o actuant de forma sinèrgica amb IL-1, IL-6 i TNF- α . A més a més, contribueix a la formació d'unions entre cèl·lules de l'epiteli intestinal per garantir-ne la integritat induint la secreció de les claudines 1 i 2.^{47,49}

Mecanisme patològic d'IL-17

La desregulació de la interleucina IL-17 juntament amb altres interleucines proinflamatòries com la IL-22 i la IL-23 estan relacionades amb diverses patologies autoimmunitàries, al·lèrgies i càncers. El rol protector o patològic d'aquestes interleucines està determinat pel microentorn del teixit on actuen, així com per la interacció amb altres components del sistema immunitari (Figura 20).

⁴⁶ A. Wasilewska, M. Winiarska, M. Olszewska, L. Rudnicka. *Adv. Dermatol. Allergol.* **2016**, XXXIII, 247-252

⁴⁷ J. Eyerich, V. Dimartino, A. Cavani. *Eur. J. Immunol.* **2017**, 47, 607-614

⁴⁸ S. J. Blake, M. W. L. Teng. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, 105, 41-50

⁴⁹ J. C. Daniel; M. T. Cristina. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, 10, 479-489

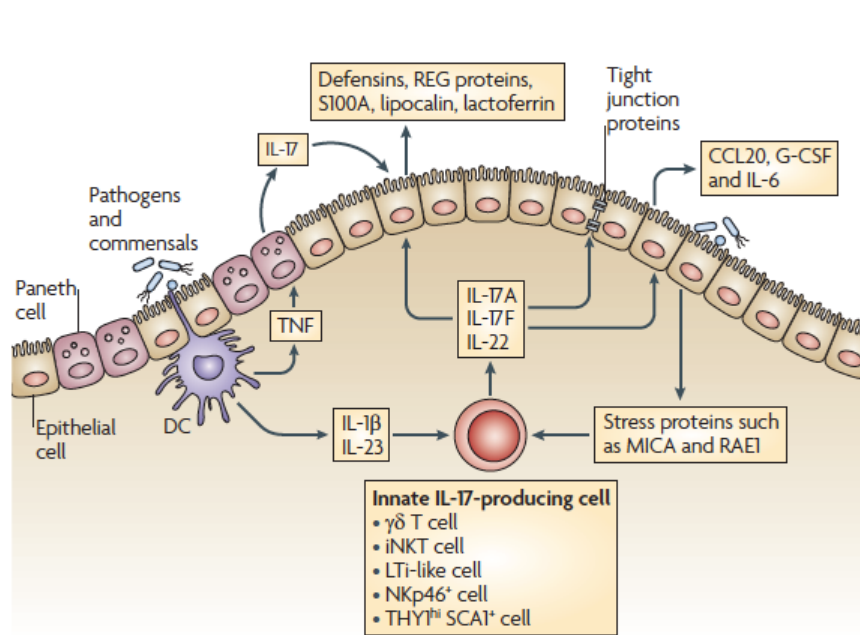


Figura 20. Rol essencial de la IL-17 sobre la barrera mucosa en situacions fisiològiques i patològiques⁴⁹

– Autoimmunitat

La IL-17 ha estat directament vinculada amb diverses patologies autoimmunitàries com la psoriasi, l'artritis reumatoide, les malalties gastrointestinals inflamatòries i l'espondilitis anquilosant i l'esclerosi múltiple.^{50,51}

L'artritis reumatoide, per exemple, és una malaltia autoimmunitària caracteritzada per una inflamació permanent, una hiperplàsia sinovial, la presència de dany ossi i una destrucció del cartílag irreversible. En aquesta patologia s'ha demostrat que els valors de IL-17, IL-22 i IL-23 estan involucrats en la severitat i l'evolució de la patologia.^{47,48}

– Càncer

La presència de cèl·lules Th17 i/o IL-17 ha estat considerada un indicador de bon i mal pronòstic en funció del tipus de càncer al qual es fa referència. A partir d'estudis realitzats en ratolins, s'ha arribat a la conclusió que no es pot equiparar la presència de cèl·lules Th17 amb les citocines IL-17 ja que nombrosos tipus cel·lulars del sistema immunitari innat i adaptatiu són capaços de sintetitzar-la. A més a més, es considera que l'origen cel·lular de la secreció d'IL-17 podria determinar la promoció o la inhibició del caràcter patògen de la IL-17. Altrament, tal i com s'ha comentat anteriorment, la interacció entre les diferents interleucines i la interacció d'aquestes amb altres substàncies com el factor tumoral α (TNF α), també determina l'efecte positiu o negatiu sobre la antiimmunitat tumoral. Cal destacar que recentment s'ha observat que les cèl·lules Th17 i les cèl·lules Tregs mostren plasticitat en funció del microentorn en el qual es troben.^{47,48,52}

⁵⁰ W. B. van der Berg, J. B. McInnes. *Sem. Arth. Rheum.* **2013**, 43, 158-17

⁵¹ C. T. Weaver, C. O. Elson, L. A. Fouser, J. K. Kolls. *Annu. Rev. Pathol.* **2013**, 8, 477-512

⁵² K. Wang, M. Karin. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2015**, 33, s87-90

Inhibició d'IL-17

Actualment, la majoria de candidats inhibidors d'IL-17 són anticossos monoclonals. A causa del cost i la ràpida adaptació de l'organisme a aquest tipus de tractament, s'estan desenvolupant diverses molècules petites que permetrien l'administració oral o tòpica del tractament i una reducció del cost considerable. La majoria de candidats inhibeixen l'IL-17 de forma indirecta. A continuació es mostra una taula amb els compostos en fase preclínica o clínica més destacats (Taula 9):⁵³

Taula 9. Candidats per al tractament de malalties relacionades amb l'IL-17⁵³

Compost	Mecanisme d'acció	Indicació terapèutica	Fase
Domainex TBK1/1Kepsilon	Inhibidor de TBK1 i 1Kepsilon	Malaltia pulmonar obstructiva crònica Psoriasi	Preclínica
Derivats de la digoxina	Inhibidor del factor de transcripció ROR γ t	Esclerosi múltiple	Preclínica
GSK 2981278	Inhibidor del factor de transcripció ROR γ t	Psoriasi	Clínica I, II
ML209	Inhibidor del factor de transcripció ROR γ t	Desconeguda	Preclínica
TMP788	Inhibidor del factor de transcripció ROR γ t	Esclerosi múltiple	Preclínica
Àcid ursòlic	Inhibidor del factor de transcripció ROR γ t	Esclerosi múltiple Artritis reumatoide	Preclínica
VTP-43742	Inhibidor del factor de transcripció ROR γ t	Psoriasi	II

1.6.3 Autofàgia^{54,55}

Mecanisme

L'autofàgia és un procés altament conservat durant l'evolució responsable de la degradació i el reciclatge del contingut intracel·lular a través del sistema lisosomal. Aquest procés és l'únic procés capaç de destruir òrgànuls sencers presents en el citoplasma com els mitocondris, els peroxisomes o el reticle endoplasmàtic. Per tant, aquest mecanisme juga un rol essencial en la homeòstasi cel·lular. En condicions fisiològiques, l'autofàgia es manté a nivells basals mentre que en situacions com la diferenciació cel·lular o la remodelització de molts teixits, augmenta. Així mateix, l'autofàgia s'activa ràpidament en resposta a situacions d'estrès (com la manca de nutrients, la hipòxia o la presència d'estrès oxidatiu) desenvolupant un paper crioprotector i reparador davant el dany cel·lular i en certes patologies com el càncer o el Parkinson.

⁵³ M. Campa, A. Menter. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2016**, *25*, 1337-1344

⁵⁴ J. Zhang, G. Wang, Y. Zhou, Y. Chen, L. Ouyang, B. Liu. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 1803-1826

⁵⁵ <https://www.nobelprize.org> (15/03/2018)

El Premi Nobel de Medicina del 2016 fora atorgat a Yashori Ohsumi pel descobriment dels mecanismes i de la regulació de l'autofàgia, ja que tot i ésser un procés de regulació cel·lular identificat, se'n desconeixia el mecanisme d'acció i la importància d'aquest procés sobre la supervivència cel·lular i el desenvolupament de certs desordres.

Actualment, s'han caracteritzat tres tipus principals d'autofàgia:

- Macroautofàgia: depenent dels autofagosomes, vesícules de doble membrana que ingereixen una gran porció de citoplasma i posteriorment es fusionen amb els lisosomes per digerir-la.
- Microautofàgia: ingesta de quantitats més petites de material citoplasmàtic a través de la invaginació de la membrana del propi lisosoma.
- L'autofàgia regulada per xaperones: translocació de proteïnes amb senyals de reconeixement específiques dins el lisosoma mitjançant la unió al complex de xaperones.

El procés de formació dels lisosomes consta de les següents etapes (Figura 21):

1. Inducció de l'autofàgia: en aquest punt intervenen diversos factors els quals tindran un rol essencial en l'activació o inactivació d'aquest mecanisme. La inhibició del complex mTORC1 (diana de la rapamicina en els mamífers) és necessària per tal d'activar aquest procés i la majoria d'inductors de l'autofàgia l'activaran mitjançant aquesta via. A més a més, els membres del complex ULK també es consideren activadors essencials d'aquest procés.
2. Formació de l'estructura de sobre membrana (fagòfor) i extensió de la mateixa sobre una part del citoplasma.
3. Elongació i tancament de la vesícula formant l'anomenat autofagosoma.
4. Fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma.
5. Degradació i reciclatge.

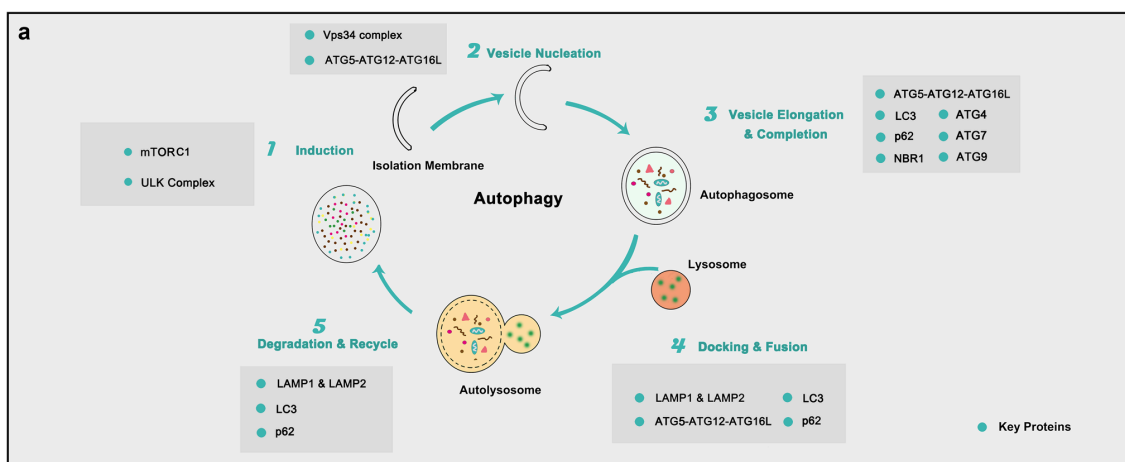


Figura 21. Mecanismes d'autofàgia i petites molècules per a la teràpia dirigida contra el càncer.⁵⁴

Implicació de l'autofàgia en el càncer

Una autofàgia defectuosa sempre comporta l'aparició de patologies com immunodeficiència, senescència o càncer. La primera aproximació sobre la relació entre l'autofàgia i el càncer fora el descobriment de la implicació del producte Beclin-1 en l'autofàgia. Aquest producte està codificat pel gen BECN-1, l'homòleg del gen ATG-1 dels llevats, el qual fou el primer gen identificat com a regulador de l'autofàgia en aquests darrers. El gen BECN-1 sol ésser deficient en el càncer de mama, ovari i pròstata i en conseqüència, el procés d'autofàgia no es pot dur a terme en condicions normals. A més a més, les alteracions d'aquest gen estan relacionades amb l'augment de risc de transformacions malignes.

Tot i que es considera que l'autofàgia prevé el desenvolupament del càncer i elimina la carcinogènesi a través de diversos mecanismes, un cop instaurat el càncer a l'organisme, participa en la seva proliferació, supervivència i resistència al tractament.

Pel que fa la prevenció sobre la iniciació i la progressió del càncer, l'autofàgia permet:

- Provocar la mort cel·lular per autofàgia citostàtica (associades amb inhibició del creixement, reducció de la supervivència o senescència) o citotòxica (mort cel·lular).
- Reduir la inflamació a través de la inhibició de la necrosi, de la inflamació i de l'alliberament d'interleucines, i eliminant els mitocondris defectuosos o deteriorats i les cèl·lules mortes.
- Regular i afavorir la resposta a la immunoteràpia, estimulants la presentació i el processament de l'antigen del tumor. Tot i així, cal destacar que també afavoreix en alguns casos la resistència a la immunoteràpia inhibint certes vies de senyalització cel·lular.

En relació a les propietats protumorals d'aquest procés, afavoreix:

- Resistència a l'estrès (energètic, nutritiu, hipòxia, inhibició de l'eliminació de mitocondris defectuosos).
- Resistència a la necrosi.
- Resistència a l'apoptosi.

Tenint en compte el doble rol de l'autofàgia sobre el càncer, és essencial determinar en quin tipus de càncer seria recomanable induir l'autofàgia i en quins casos seria favorable inhibir-la. En els càncers en els quals les cèl·lules tenen activat el RAS, l'autofàgia és indispensable per a la supervivència de les cèl·lules tumorals, per tant, en aquest cas seria recomanable inhibir aquest procediment. En canvi, en els càncers en els quals la mutació del gen BECN-1 provoca una disminució de Beclin-1, la inducció de l'autofàgia podria ésser beneficiosa.

Una altra aproximació possible més complexa, seria el disseny de fàrmacs que permetessin modular ambdues activitats (protumoral i antitumoral) de forma global per poder regular el procés en tots els casos. No obstant, per poder dur a terme aquest disseny caldria en primer lloc elucidar completament tots els mecanismes implicats en la xarxa de senyalització de l'autofàgia.

1.7 Problemàtica sobre la reproductibilitat de les investigacions científiques

La reproductibilitat dels experiments científics és un dels fonaments essencials de la recerca i és imprescindible per al desenvolupament de nous fàrmacs. Actualment, la validesa dels resultats publicats en diferents àmbits científics s'han posat en dubte.^{56,57}

Al novembre del 2011 es va iniciar un projecte anomenat *Reproducibility Project: Psychology*, el qual tenia com a objectiu repetir 100 estudis psicològics publicats en tres diaris prestigiosos de psicologia per tal de determinar si eren reproduïbles. Els resultats d'aquest projecte varen mostrar que dels 97 articles que deien tenir resultats significatius, només un 36% de les reproduccions va tenir un resultat significatiu i amb una magnitud dels efectes considerablement inferior a les magnituds originals.⁵⁸ Aquests resultats mostren el problema creixent sobre la reproductibilitat dels experiments realitzats en l'àmbit de les ciències socials i s'ha estès la preocupació a la resta d'àmbits científics.

Seguint la iniciativa del projecte de reproductibilitat sobre estudis de psicologia, la col·laboració entre el Center for Open Science i Science Exchange varen permetre desenvolupar un estudi de reproductibilitat sobre una selecció de publicacions més rellevants publicades entre el 2010 i el 2012 sobre la biologia del càncer anomenat *Reproducibility Project: Cancer Biology*. Aquest estudi té dos objectius principals: en primer lloc, donar validesa a la reproductibilitat en la recerca preclínica del càncer i en segon lloc, identificar els factors que afecten a la reproductibilitat en termes més generals. Per tal de garantir que la metodologia utilitzada en la reproducció dels experiments és adequada i segueix el protocol original, es proposa contactar amb els autors de la publicació original per tal de dissenyar conjuntament l'experiment i recopilar tota la informació possible.

Cal destacar que en el cas en que tots els estudis fossin reproduïbles, per qüestió de probabilitat no tots demostrarien ser-ho. Es considera que els experiments d'aquest estudi tenen un 80% de probabilitat de reproduir alguna cosa que és certa, per tant, si es reproduïen tres experiments d'una publicació, la probabilitat que les tres reproduccions aportin resultats significatius és del 50%, tot i considerar que els resultats d'aquella publicació són reproduïbles. Per tant, a l'hora d'analitzar la validesa de les publicacions no cal trobar un valor significatiu a cada experiment sinó aconseguir reproduir alguns dels experiments claus de la publicació i veure efectes similars a la resta d'experiments.

El fet que els investigadors que realitzen les reproduccions dels experiments no estiguin interessats en si l'experiment resulta reproduïble o no, pot ésser positiu ja que descarta qualsevol possible manipulació de resultats o omissió d'informació, però a la vegada pot no haver-hi la mateixa motivació i experiència de l'autor original a l'hora de dur a terme l'experiment.

Actualment no es disposa de dades suficients com per valorar la situació actual sobre la reproductibilitat dels experiments realitzats en la biologia del càncer. Per a confirmar o desmentir la validesa dels resultats aportats a la publicació original caldria reproduir els experiments diverses vegades i per grups de recerca diferents. Tot i així, la realització del projecte ha permès arribar a la

⁵⁶ *Elife*. 2017, 6, e23693

⁵⁷ K. Grens. *TheScientist*. 2014

⁵⁸ <https://osf.io> (25/06/2018)

conclusió que els estudis de reproductibilitat permeten conèixer com de preparades estan les publicacions per a ésser reproduïdes.⁵⁶

1.8 Antecedents del treball

1.8.1 Derivats del benzodioxà

Tal i com s'ha comentat anteriorment, al llarg dels anys s'han caracteritzat múltiples compostos naturals amb activitat antitumoral. L'*el-lipticina* (5,11-dimetil-6H-pirido[4,3-*b*]carbazol) és un compost natural aïllat originàriament d'*Ocrosia elliptica* Labill. (família Apocinaceae), el qual posseeix una elevada activitat antineoplàsica a l'ésser activat pel citocrom P450 (CYP) o per peroxidases.^{59,60} La seva estructura química consisteix en un esquelet tetracíclic format de carbazole fusionat amb una piridina (Figura 22).

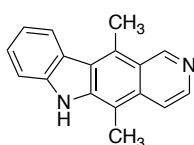


Figura 22. Estructura química de l'*el-lipticina*

L'*el-lipticina* i els seus derivats exerceixen els seus efectes citotòxics i antineoplàstics mitjançant un mecanisme d'acció biològica múltiple: inhibició de l'ADN-topoisomerasa II, intercalació a l'ADN, unió covalent a l'ADN i generació de radicals lliures citotòxics mitjançant reaccions d'oxidació-reducció.⁶¹ La presència de nitrògens protonables als anells de la molècula diferencien el comportament de l'*el-lipticina* d'altres agents intercalants més simples. La càrrega positiva pot establir la unió als àcids nucleics de l'ADN, mentre que la forma neutre més lipofílica li podria permetre travessar més fàcilment les barreres membranoses.⁶² Tot i posseir una àmplia activitat terapèutica en càncer, en VIH⁵⁹ o en patologies autoimmunitàries com l'artritis reumatoide⁶³, també comporta efectes adversos que han fet necessari el desenvolupament de diferents anàlegs d'aquest compost que presentin millor activitat antitumoral i menys reaccions adverses.^{61,64}

Nombrosos estudis sobre l'*el-lipticina* i els seus derivats destaquen la importància de la mida, la forma i la planaritat de l'estructura en el seu mecanisme d'acció antitumoral.^{65,66} Prèviament, en el nostre grup de treball es van dur a terme estudis sobre les 1,4-benzodioxinoisoquinolines dissenyades i sintetitzades com a anàlegs de l'*el-lipticina*, les quals consisteixen en la substitució de l'indole per la subunitat de 2,3-dihidro-1,4-benzodioxina (Figura 23).^{67,68,69}

⁵⁹ M. Stiborová, J. Poljaková, E. Martínková, L. Borek-Dohalská, T. Eckschlager, E. Kizek, E. Frei. *Interdiscip. Toxicol.* **2011**, *4*, 98-105

⁶⁰ M. Stiborová, M. Rupertová, E. Frei. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1814*, 175-85

⁶¹ K. R. Vann, Y. Ergün, S. Zencir, S. Oncuoglu, N. Osherooff, Z. Topcu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1809-1812

⁶² N. C. Garbett, D. E. Graves. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2004**, *4*, 149-172

⁶³ H. L. Wen, G. Yang, Q. R. Dong. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2017**, *39*, 219-224

⁶⁴ M. Stiborová, E. Frei. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 575-591

⁶⁵ C. Auclair, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *259*, 1-14

⁶⁶ M. A. Schwaller, G. Dodin, J. Aubard. *Biopolymers* **1996**, *50*, 510-527

⁶⁷ J. Basset. Disseny i síntesi de compostos policíclics que contenen el nucli indòlic. Avaluació de l'activitat antitumoral. *Tesi Doctoral* **2011**. Universitat de Barcelona

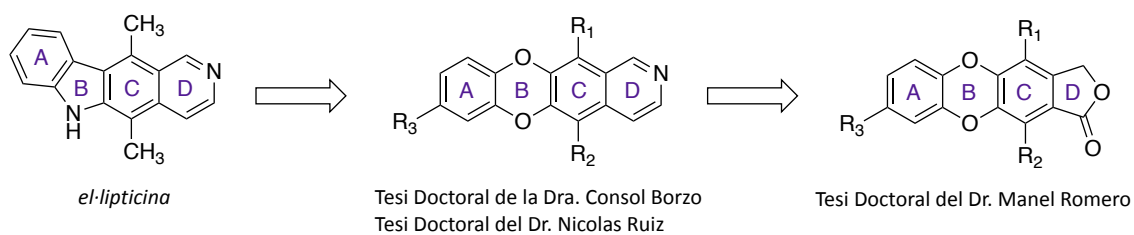


Figura 23. Estructura química dels anàlegs de l'*el-lipticina* desenvolupats al nostre grup de recerca

Aquesta substitució va donar lloc a compostos amb una activitat citotòxica *in vitro* elevada. L'anàlisi de la relació estructura-activitat (SAR, *Structure-Activity Relationship*) va recalcar els següents requeriments estructurals:

- La presència de substituents a l'anell A: un grup metoxil aporta millors resultats que hidrogen.
- La naturalesa dels substituents de l'anell C: $R_1 = \text{CH}_3$ i $R_2 =$ cadenes de 4 i 5 àtoms de carboni.
- La posició dels substituents de l'anell C de la cadena més llarga: s'obtenen millors resultats al situar la cadena més llarga al costat del grup carbonil de la lactona. A més a més, es varen obtenir resultats més satisfactoris utilitzant cadenes funcionalitzades amb funcions no polars ni substituents ramificats.
- La naturalesa de la lactona policíclica: la formació d'una tiolactona provoca la pèrdua de l'activitat biològica.

Entre el compostos preparats a la Tesi Doctoral del Dr. Manel Romero al nostre grup de recerca,⁷⁰ van destacar els compostos **3a** i **3b** per a la seva activitat inhibidora sobre EZH2, mostrant un valor d' IC_{50} de 20 μM i de 10 μM , respectivament (Figura 24).

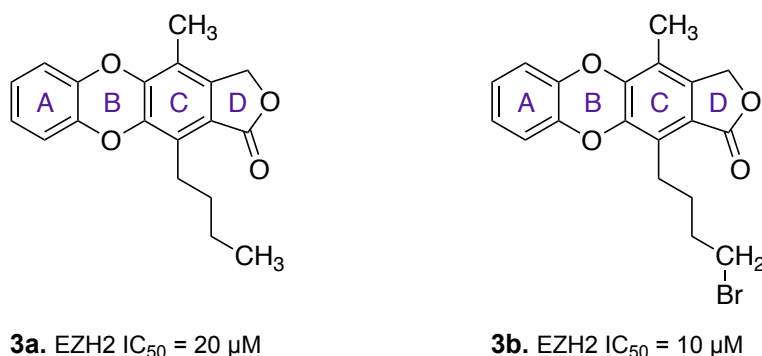


Figura 24. Estructura química dels compostos **3a** i **3b** preparats a la Tesi Doctoral del Dr. Manel Romero⁷⁰

Per altra banda, el nucli de dioxino-isoquinolina ha demostrat també actuar sobre la topoisomerasa II. Aquests tipus de compostos, a diferència dels anteriors, es caracteritzen per la necessitat de posseir un esquelet no planar per tal de posseir propietats no intercalants del DNA. Aquest esquelet de dioxino-isoquinolina és d'especial interès ja que mostra selectivitat sobre cèl·lules pulmonars canceroses amb una activitat inhibidora sobre la topoisomerasa II d'un valor de $\text{IC}_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ per a la

⁶⁸ M. D. Pujol, M. Romero, I. Sánchez. *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2005**, 5, 215-239

⁶⁹ R. Ruiz, P. Bouyssou, J. C. Maurizis, J. C. Maldemont, G. Coudert. *Heterocycl. Commun.* **1997**, 3, 509-514

⁷⁰ M. Romero. Preparació de nous agents antitumorals. Síntesi i avaluació citotòxica de sistemes policíclics que contenen el nucli d'1,4-benzodioxina. *Tesi Doctoral* **2001**. Universitat de Barcelona

tetrahidroisoquinolina **I-1**, de $IC_{50} > 10 \mu M$ per al compost **I-2** i de $IC_{50} = 21,1 \mu M$ per al compost **I-3** sobre la línia cel·lular NCI-H460 a les 72 hores (Figura 25).^{71,72}

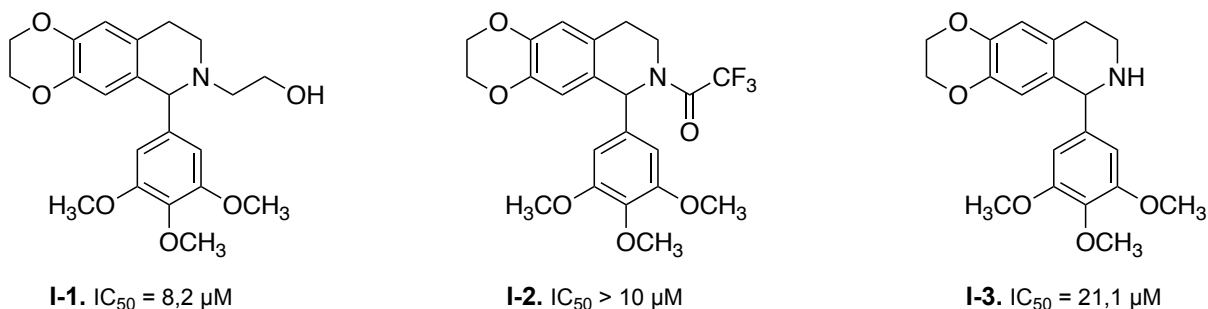


Figura 25. Estructura química dels compostos **I-1**, **I-2** i **I-3**

A la Tesi Doctoral del Dr. Richard Soucek⁷³ es varen preparar diferents compostos amb el nucli de dioxino-isoquinolina d'entre els quals destaquem el compost **4** amb una $IC_{50} = 8,2 \mu M$ sobre l'hexoquinasa-2 (Figura 26).

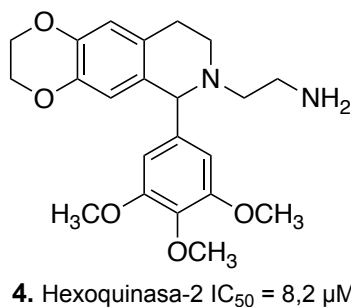


Figura 26. Estructura química del compost 4 preparat a la Tesi Doctoral del Dr. Richard Soucek⁷³

1.8.2 Nucli de diarilamines

Actualment, es disposa de diversos fàrmacs antitumorals amb el nucli de diarilmina amb anells heterocíclics (Figura 27):

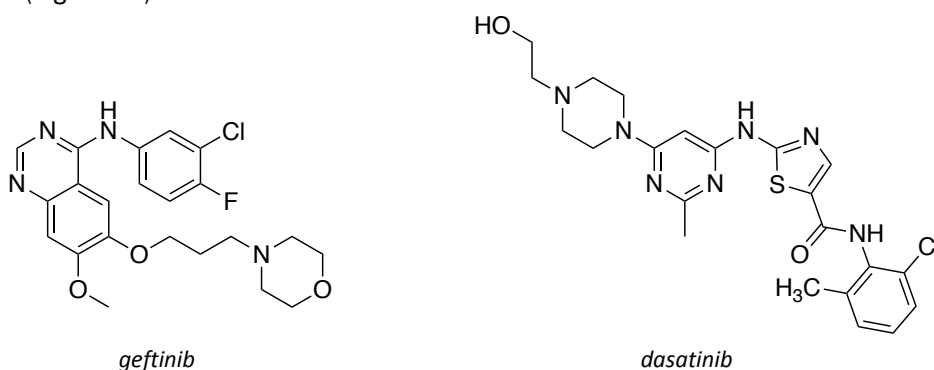


Figura 27. Estructura química dels compostos comercials *gefitinib* (Iressa®) i *dasatinib* (Sprycel®)²

⁷¹ *deaoptcancer.ptt.* presentació del grup de M. D. Pujol **2007**

⁷² A. S. Capilla, M. Romero, M. D. Pujol, D. H. Caignard, P. Renard. *Tetrahedron* **2001**, 57, 8297-8303

⁷³ R. Soucek. Synthesis of new heteropolycyclic compounds with potential antitumor activity. *Tesis Doctoral* **2014**. Universidad de Barcelona

Tot i així, al mercat no es disposa de compostos amb el nucli de diarilamina amb anells homocíclics. Wang i col., varen preparar a partir del compost 6-cloro-2-(4-cianofenil)amino-3-nitropiridina (**I-4**) dissenyat amb una estructura similar a les diarilamines presents als mercat) una sèrie de compostos que varen ésser avaluats biològicament per a determinar la seva activitat inhibidora sobre diferents línies cel·lulars humanes canceroses: l'A549 (càncer de pulmó), el KB (carcinoma nasofaríngi), el KB-vin (carcinoma nasofaríngi resistent a la vincristina) i la DU-145 (càncer de pròstata) (Figura 28).⁷⁴

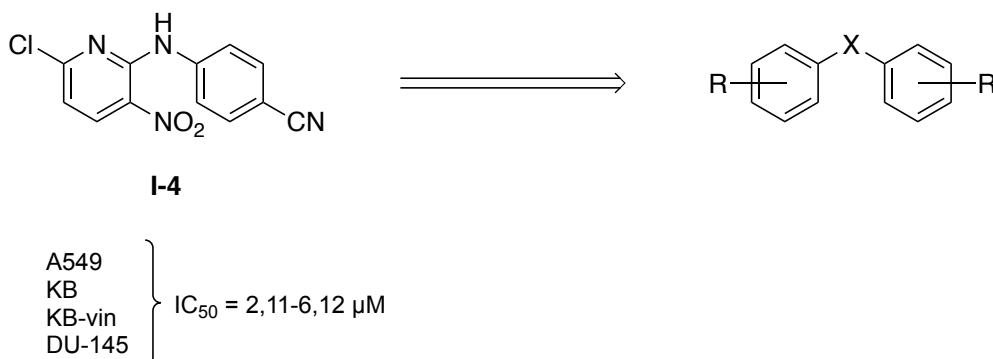


Figura 28. Estructura química del compost **I-4** procedent de la bibliografia⁷⁴

Entre les diarilamines assajades amb aquestes modificacions, cal destacar l'activitat del compost **9** sobre els diferents tipus de línies cel·lulars assajades amb una $IC_{50} = 3,45 \mu M$ en A549, $2,42 \mu M$ en KB, $0,33 \mu M$ en KB-vin i $1,07 \mu M$ en DU-145 (Figura 29).

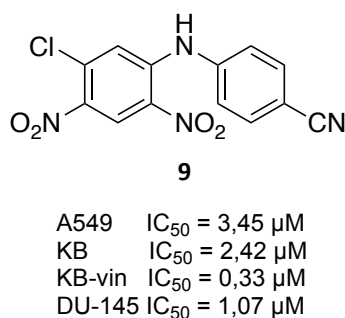


Figura 29. Estructura química del compost **9** procedent de la bibliografia⁷⁴

1.8.3 Diarilurees

El *sorafenib* és una diarilurea antitumoral que exerceix la seva acció sobre diferents dianes farmacològiques, capaç d'inhibir diverses quinases involucrades en la progressió tumoral i l'angiogènesi com Raf, VEGFR, PDGFR i KIT.^{75,76,77,78} Ates l'ampli espectre d'acció d'aquest fàrmac,

⁷⁴ X.-F. Wang, X.-T. Tian, E. Ohkoshi, B. Qin, Y.-N. Liu, P. C. Wub, M.-J. Hour, H.-Y. Hung, K. Qian, R. Huang, K. F. Bastow, W. P. Janzen, J. Jin, S. L. Morris-Natschke, K.-H. Lee, L. Xie. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 6224–6228

⁷⁵ J. Yao, J. Chen, Z. He, W. Sun, W. Xu. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2923-2929

⁷⁶ J. C. Wei, F. D. MENG, K. Qu, Z. X. Wang, Q. F. Wu, L. Q. Zang, Q. Pang, C. Liu. *Acta Pharmacol. Sin.* **2015**, 36, 241–251

⁷⁷ S. M. Wilhelm, L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J. M. Llovet, M. Lynch. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 3129–3140

⁷⁸ S. Sun, Z. He, M. Huang, N. Wang, Z. He, X. Kong, J. Yao. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 2381-2391

actualment s'estan desenvolupant diversos anàlegs per tal d'optimitzar-ne la seva eficàcia.^{78,79,80,81} A la Tesi Doctoral del Dr. Arturo Vinuesa⁸² duta a terme al nostre grup de recerca, es varen desenvolupar diversos anàlegs del *sorafenib* amb esquelets de diarilèter, els quals mostraren activitats antiproliferatives interessants sobre diferents línies cel·lulars humanes: HeLa (càncer cervical), MIA Paca-2 (càncer de pàncrees) i HFF-1 (fibroblasts sans) (Figura 30).

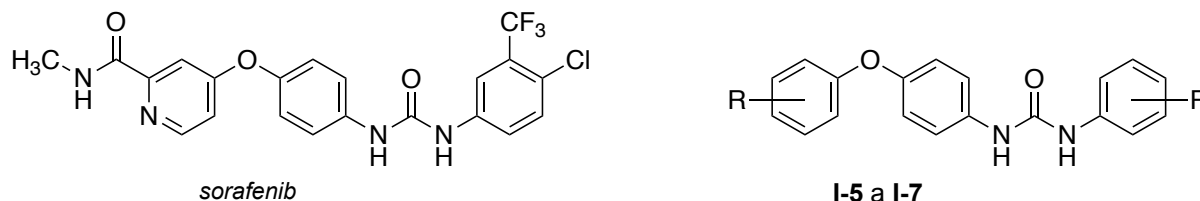


Figura 30. Estructura química del *sorafenib* i dels compostos **I-5**, **I-6** i **I-7** preparats a la Tesi Doctoral del Dr. Arturo Vinuesa⁸²

L'avaluació biològica del compost **I-5** mostrà una elevada inhibició del creixement cel·lular sobre cèl·lules canceroses HeLa i MIA Paca-2 amb un valor d'IC₅₀ de l'ordre micromolar. No obstant, la seva inhibició del creixement sobre les cèl·lules sanes HFF-1 també fou elevada indicant una manca de selectivitat sobre les cèl·lules canceroses. Per aquest motiu, es realitzaren modificacions sobre R obtenint el compost **I-6**, el qual no mostrà inhibició del creixement d'HFF-1, mantingué una bona activitat sobre cèl·lules MIA Paca-2, però la seva capacitat inhibidòria sobre el creixement de cèl·lules HeLa disminuï de forma considerable. Aplicant diferents modificacions de R, s'obtingué el compost **I-7**, el qual mantingué una bona activitat inhibidòria sobre les cèl·lules canceroses HeLa i MIA Paca-2 i reduí de forma notable la inhibició del creixement sobre les cèl·lules sanes HFF-1 (Taula 10).

Taula 10. Valors d'IC₅₀ (μM) per als compostos **I-5**, **I-6** i **I-7** en cèl·lules HeLa, MIA Paca-2 i HFF-1⁸²

	HeLa	MIA Paca-2	HFF-1
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
I-41	17 ± 3	11 ± 1	24 ± 2
I-42	100 ± 10	10 ± 1	-
I-43	13 ± 1	18 ± 2	140 ± 7

⁷⁹ Y. Dai, K. Hartandi, Z. Ji, A. A. Ahmed, D. H. Albert, J. L. Bauch, J. J. Bouska, P. F. Bousquet, G. S. Cunha, K. B. Glaser, C. M. Harris, D. Hickman, J. Guo, J. Li, P. A. Marcotte, K. C. Marsh, M. D. Moskey, R. L. Martin, A. M. Olson, D. J. Osterling, L. J. Pease, N. B. Soni, K. D. Stewart, V. S. Stoll, P. Tapang, D. R. Reuter, S. K. Davidsen, M. R. Michaelides. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1584

⁸⁰ M.-H. Jung, H. Kim, W.-K. Choi, M.I. El-Gamal, J.-H. Park, K.H. Yoo, T.B. Sim, S.H. Lee, D.Baek, J. M. Hah, J.-H. Cho, C.-H. Oh. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6538-6543

⁸¹ M. Sun, X. Wu, J. Chen, J. Cai, M. Cao, M. Ji. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2299-2306

⁸² A. Vinuesa. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos compuestos nitrogenados potencialmente antitumorales. *Tesis Doctoral* **2016**. Universidad de Barcelona y Universidad San Jorge (Zaragoza)

2 OBJECTIUS

Tenint en compte els precedents bibliogràfics descrits a la introducció i la preparació química i avaluació biològica duta a terme pel nostre grup de recerca, a continuació es mostren diferents estructures amb potencial activitat antitumoral multidiana.

2.1 Primer objectiu

Considerant els resultats obtinguts a la Tesi Doctoral del Dr. Manel Romero en l'avaluació biològica dels compostos **3a** i **3b** sobre l'activitat inhibidora d'EZH2, es procedeix a dissenyar noves estructures realitzant múltiples modificacions de tipus farmacomodulació modulativa sobre els compostos esmentats anteriorment (**3a** i **3b**) (Figura 31).⁷⁰

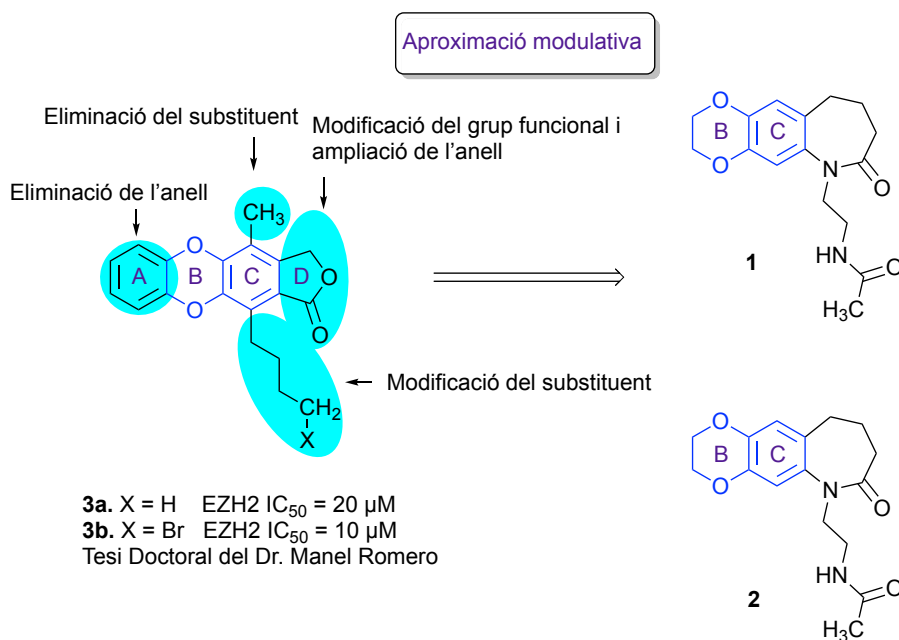


Figura 31. Aproximació modulativa dels compostos **1** i **2**

Els nous compostos **1** i **2** conserven el nucli d'1,4-benzodioxà, perden el nucli benzènic A i la funció lactona de l'anell D es canvia per una funció lactama. Cal dir que els compostos **1** i **2** són isòmers funcionals a causa de la posició de la funció lactama i que tots els canvis plantejats constitueixen modificacions modulatives estructurals.

Segons les dades obtingudes dels assajos duts a terme pels laboratoris Eli Lilly (Indianapolis), els compostos **3a** i **3b** presenten una important activitat inhibidora de l'enzim EZH2 però presenten poca solubilitat en aigua. Tenint en compte aquest fet es proposa la preparació dels compostos **5-8** per aproximació conjuntiva entre els compostos **3a-3b** i **4**. S'espera que aquests canvis permetin augmentar la polaritat i en conseqüència, la solubilitat del compost, mantenint o augmentant les propietats antitumorals demostrades pels dos fragments per separat (Figura 32).

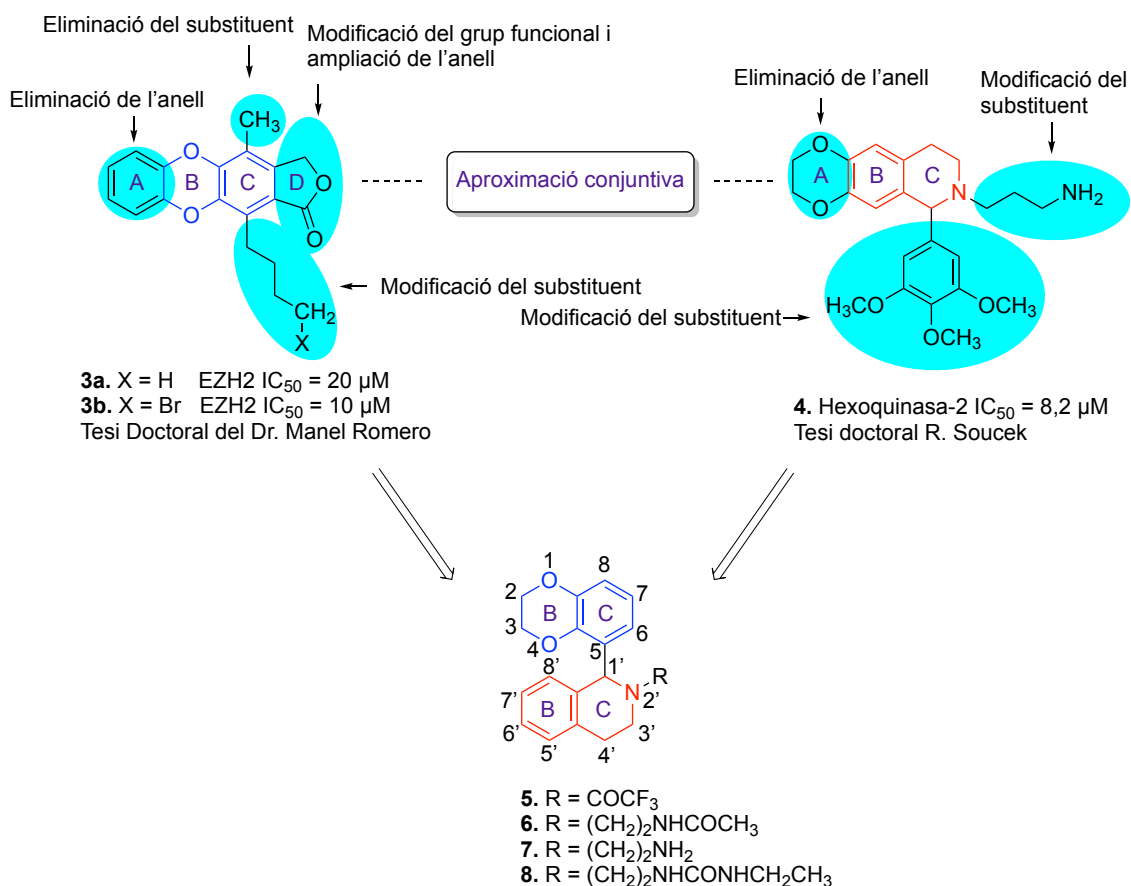


Figura 32. Aproximació modulativa dels compostos **5**, **6**, **7** i **8**

Relacionat amb els compostos **1** i **2**, es proposa mantenir el nucli benzodioxànic i incorporar una 1,2,3,4-tetraisoquinolina a la posició 5, derivada del compost **4** preparat a la Tesi Doctoral del Dr. Richard Soucek amb activitat antitumoral sobre l'hexoquinasa-2.⁷³ Es manté la cadena lateral d'aquest compost **4** però se'n varia la funció per tal d'esbrinar els requisits estructurals que en faciliten l'activitat antitumoral.

La presència del trifluoroacetil en el compost **5** permet mantenir la funció amida i podria considerar-se un profàrmac. En el cas dels derivats **6** i **7** s'hi introdueix una cadena de tipus acetamidoacetil i aminoetil, respectivament, sobre l'àtom de nitrogen de la isoquinolina. En ambdós casos, el nitrogen isoquinolínic és protonable a pH fisiològic i s'esperaria que aquest fet contribuís a un augment de la polaritat de l'estructura. Per últim, la introducció d'un substituent de tipus etilureaetil sobre l'àtom de nitrogen de la isoquinolina permet mantenir el nitrogen protonable i a la vegada incorpora grups polars que haurien de facilitar no només la solubilitat sinó també la interacció amb la diana biològica.

La preparació de compostos que contenen el nucli d'1,4-benzodioxà constitueix el primer objectiu d'aquesta tesi doctoral.

2.2 Segon objectiu

La subestructura de diarilèter forma part de nombrosos compostos amb activitat biològica. No obstant, actualment no es disposa d'estructures que continguin el sistema de diarilamina amb anells homocíclics amb activitat antitumoral. En aquest treball es proposa la preparació de diarilamines a partir del compost **9** procedent de la bibliografia que mostra activitat antitumoral enfront diferents tipus de cèl·lules humanes canceroses com són l'A549 (càncer de pulmó), el KB (carcinoma nasofaríngi), el KB-vin (carcinoma nasofaríngi resistent a la vincristina) i la DU-145 (càncer de pròstata) (Figura 33).⁷⁴

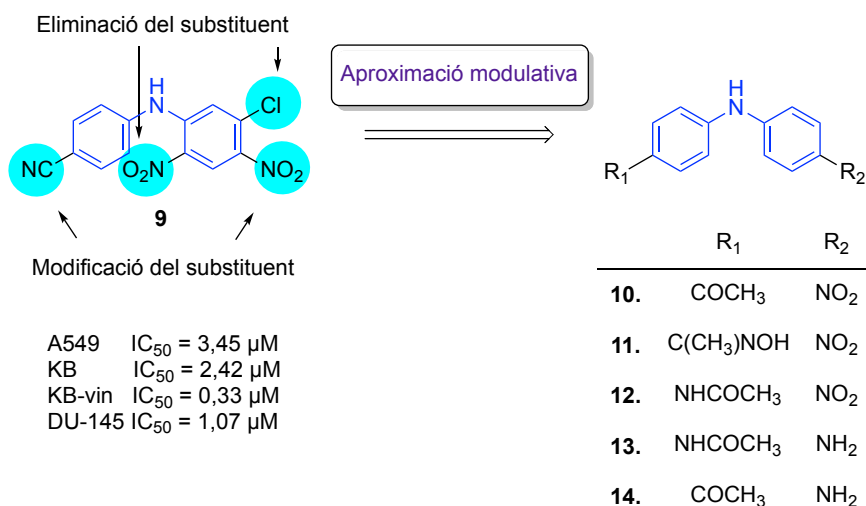


Figura 33. Aproximació modulativa dels compostos **10**, **11**, **12**, **13** i **14**

Els compostos **10-14** constitueixen intermediaris sintètics per a la preparació d'estructures més complexes potencialment antitumorals. Tot i així, l'avaluació biològica d'aquests compostos **10-14** com a antitumorals és de gran interès atès que els resultats que s'obtinguin seran de gran utilitat per a determinar els requisits estructurals d'aquesta família.

En el cas dels compostos **15** i **16** es va introduir una funció urea a causa de la seva àmpliament coneguda activitat biològica i a més a més, es va proposar la modificació del substituent de l'altre anell (Figura 34).

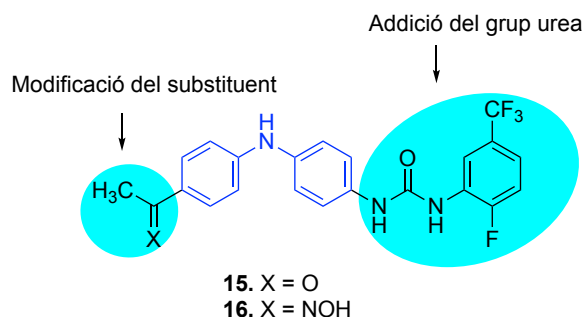


Figura 34. Aproximació modulativa dels compostos **15** i **16**

La preparació i l'avaluació biològica de les diarilamines indicades conforma el segon objectiu d'aquest treball.

2.3 Tercer objectiu

Tal i com s'ha comentat prèviament, el *sorafenib* és un inhibidor de diverses quinases que s'utilitza en el tractament de diversos tipus de càncer^{83,84} i que ha estat utilitzat com a referència per a desenvolupar diversos anàlegs mitjançant farmacomodulació modulativa.

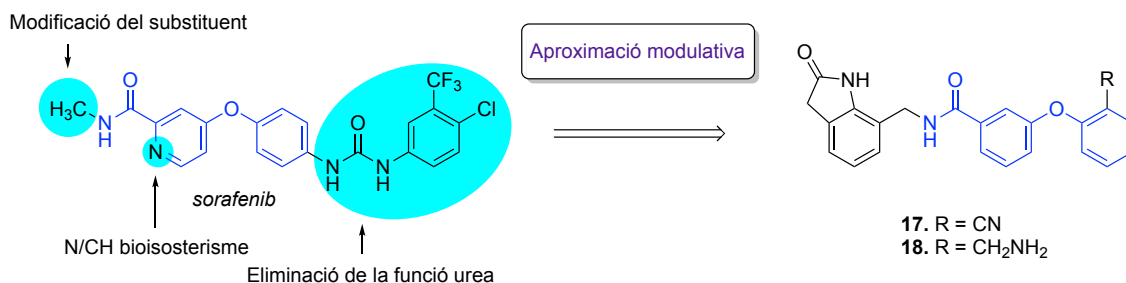


Figura 35. Aproximació modulativa dels compostos **17** i **18**

Els compostos **17** i **18** han estat dissenyats mitjançant modelització computacional per part del Prof. Jaime Rubio de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona. Aquests compostos presenten una eliminació de la funció urea per tal d'avaluar l'esquelet del diarilèter i incorporen un substituent en la posició orto ja que a la bibliografia no es descriuen compostos amb aquesta posició orto substituïda. A més a més, es duu a terme una modificació del grup metil de l'amida per una ftalamida, provocant un canvi en la mida del substituent que podria influir en la interacció amb la diana. Així mateix, s'ha realitzat bioisosterisme clàssic mitjançant la substitució de la pirimidina disubstituïda per un benzè (N = / C =) (Figura 35).

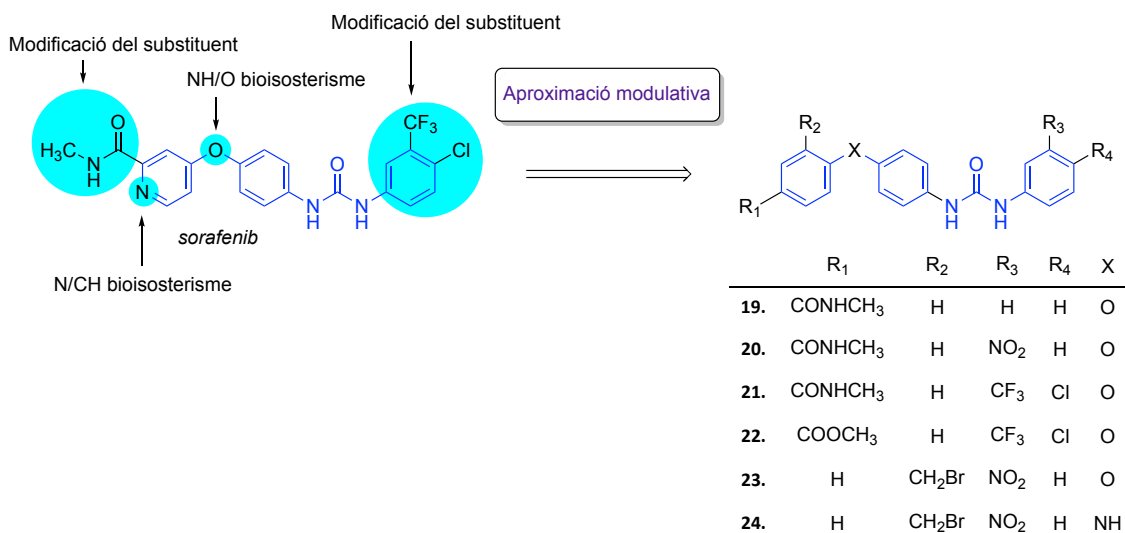


Figura 36. Aproximació modulativa dels compostos **19-24**

Dins d'aquest darrer objectiu, també s'han preparat diferents anàlegs del *sorafenib* (**19-24**) aplicant principalment farmacomodulació modulativa. En aquest cas, el grup funcional urea s'ha mantingut però se n'han modificat els substituents així com la posició d'aquests en *meta* i *para*. Pel que fa la part del diaril, també s'han realitzat canvis de substituents en les posicions *orto* i *para*. De la mateixa

⁸³ L. Garuti; M. Roberti; G. Bottegoni; M. Ferraro. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 1528-1548

⁸⁴ G. M. Keating. *Targ. Oncol.* **2017**, *12*, 243-253

manera que en el cas anterior, s'ha aplicat bioisosterisme clàssic sobre la pirimidina disubstituída transformant-la en un benzè, i sobre l'àtom d'oxigen del diarilèter substituïnt-lo per un àtom de nitrogen, obtenint una diarilamina (-O- / -NH-) (Figura 36).

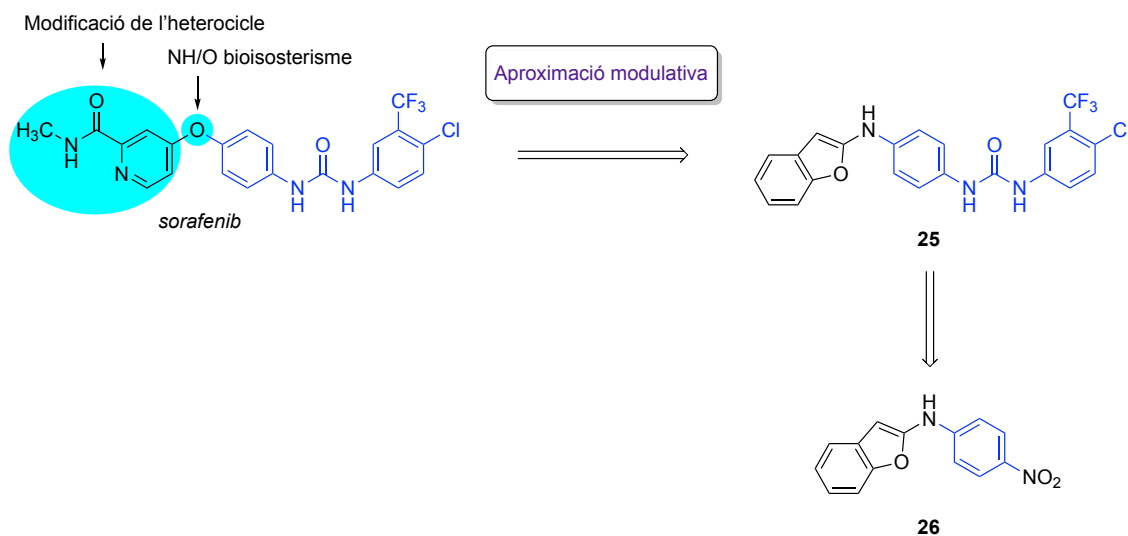


Figura 37. Aproximació modulativa dels compostos **25** i **26**

Per últim, s'ha dissenyat per aproximació modulativa el compost **25** mantenint la funció urea amb els mateixos substituents del *sorafenib*, a partir de l'intermediari **26**. Per a realitzar aquesta aproximació, s'ha aplicat bioisosterisme clàssic sobre l'àtom d'oxigen del diarilèter de la mateixa manera que en el cas anterior (-O- / -NH-), i s'ha dut a terme una modificació de l'heterocicle pirimidínic per un nucli de benzofurà, preparat prèviament mitjançant condicions posades a punt pel nostre grup de recerca (Figura 37).

3 DISCUSSIÓ TEÒRICA

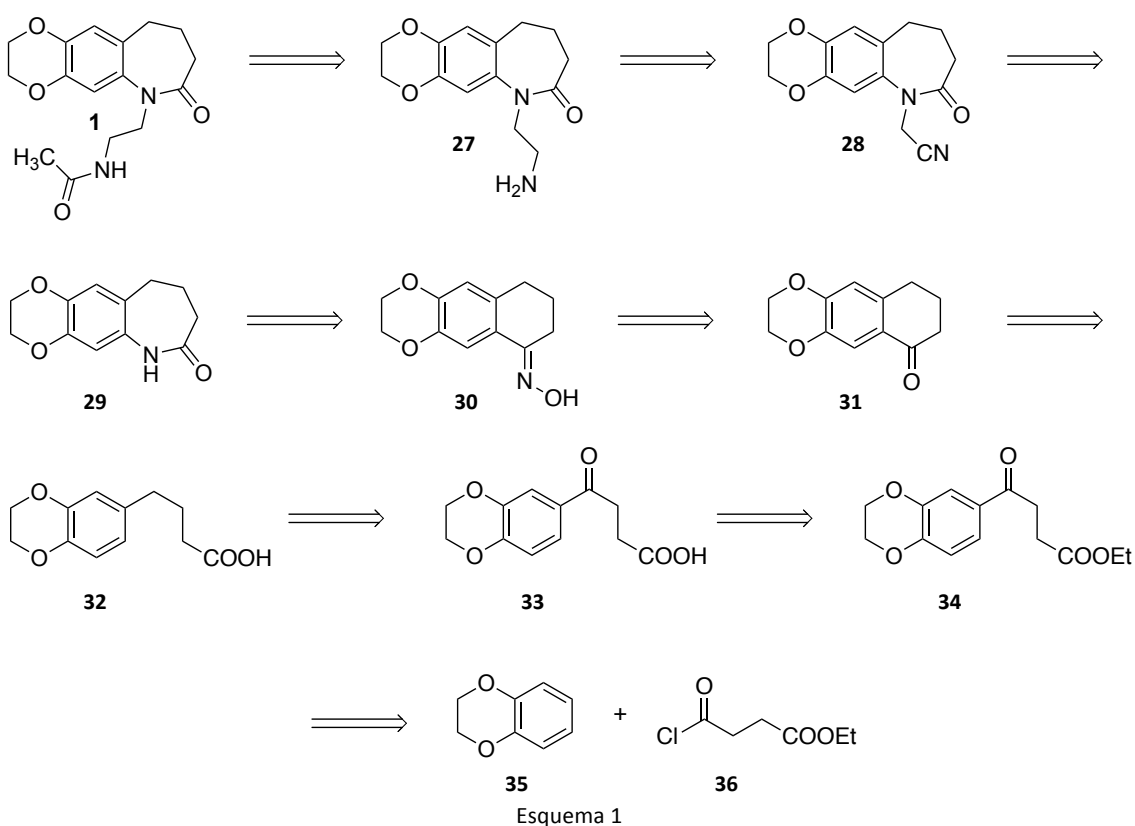
3.1 Química

3.1.1 Preparació de compostos amb nucli d'1,4-benzodioxà

3.1.1.1 Preparació *N*-(2-(7-oxo-2,3,7,8,9,10-hexahidro-6*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-6-il)etil)acetamida (**1**) i *N*-(2-(6-oxo-2,3,7,8,9,10-hexahidro-7*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-7-il)etil)acetamida (**2**)

3.1.1.1.1 Anàlisi retrosintètica dels compost 1

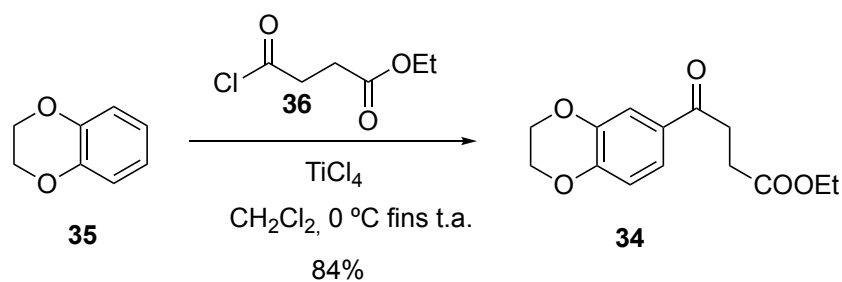
El compost **1** s'obté a partir de l'1,4-benzodioxà (**35**) i el monoclorur de l'èster oxàlic (**36**), ambdós assequibles comercialment (Esquema 1).



3.1.1.1.2 Preparació de la 2,3,8,9-tetrahidronafto[1,4]dioxino[6,7-*b*]-6(7*H*)-ona (**31**)

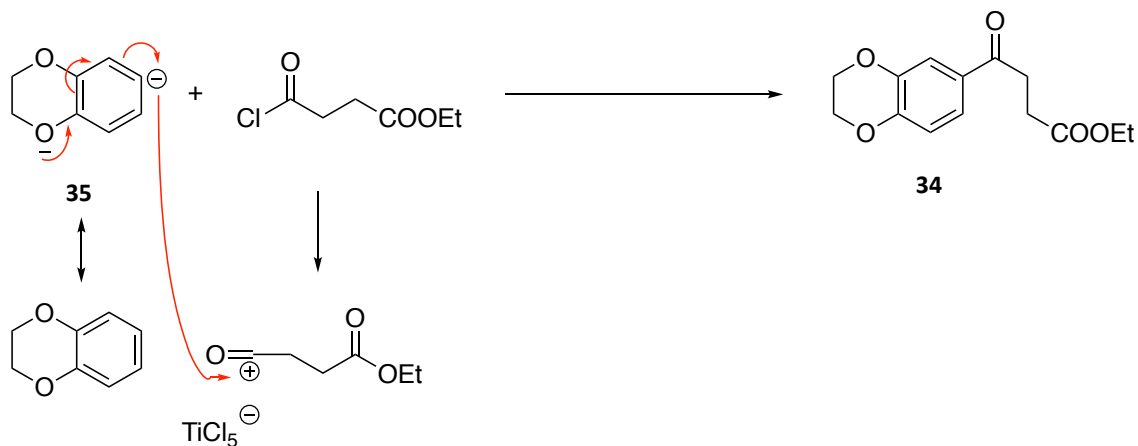
El tractament de l'1,4-benzodioxà (**35**) amb el monoclorur de l'èster oxàlic (**36**) catalitzat amb tetraclorur de titani (TiCl₄), en el si de diclorometà, en condicions d'acilació de Friedel Crafts permet l'obtenció del cetoèster esperat **34** amb un 84% de rendiment (Esquema 2).⁸⁵

⁸⁵ N. M. Guillaume, S. J. Chard, D. M. Leyshon. *J. Chem. Soc.* **1952**, 376-380



Esquema 2

El mecanisme proposat per a aquesta reacció s'indica a continuació (Esquema 3):

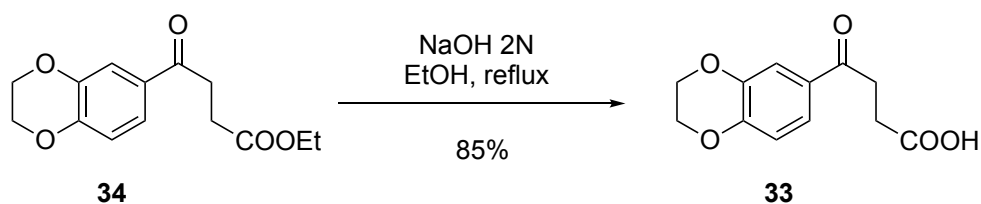


Esquema 3

El catalitzador TiCl_4 exalta el poder electròfil del clorur d'àcid emprat en la reacció d'acilació per formació de la sal corresponent.

Pel que fa referència a l'esquelet de benzodioxà present en totes les estructures preparades en aquest primer objectiu, cal destacar la conformació en forma de semicadira que adopta aquesta subestructura, la qual fa possible la distinció entre els protons axials i equatorials de les posicions 2 i 3.⁸⁶ Aquest fet es fa visible als espectres de RMN de protó però no permet identificar-los explícitament ja que sovint forma un multiplet d'elevada complexitat.

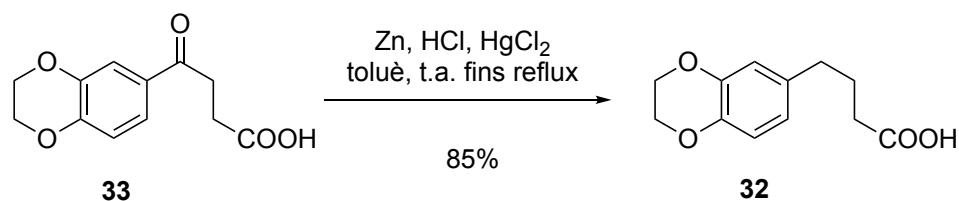
A continuació, es proposa la reducció del grup carbonil cetònic per tal de facilitar la ciclació intramolecular. Per a la reducció es van aplicar les condicions de la reacció de Clemmensen a l'àcid provinent de l'èster **34**. Prèviament, es realitza la hidròlisi de l'èster **34** duta a terme per tractament amb NaOH/etanol en condicions clàssiques obtenint el producte esperat amb un 85% de rendiment (Esquema 4).



Esquema 4

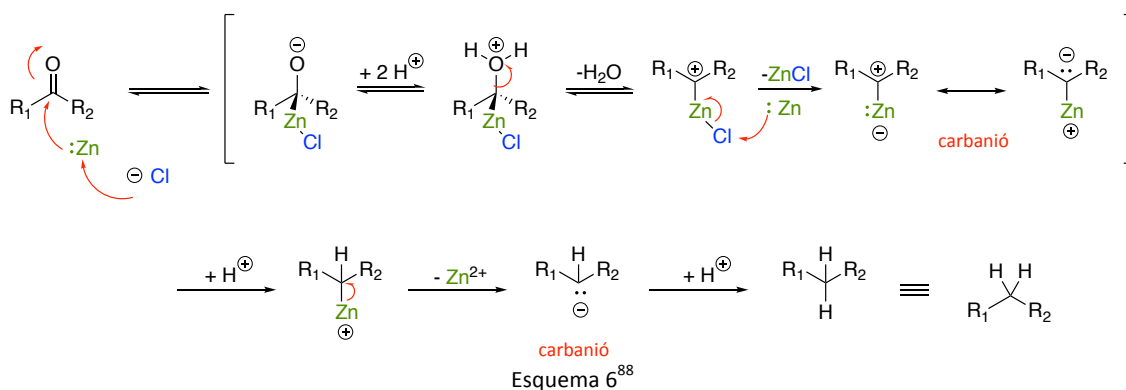
⁸⁶ G. Pfundt, S. Farid. *Tetrahedron*. **1966**, 22, 2237-2247

La reducció del ceto-àcid **33** amb Zn(Hg) en condicions de la reacció de Clemmensen permet accedir a l'àcid **32** amb un 85% de rendiment (Esquema 5).⁸⁷

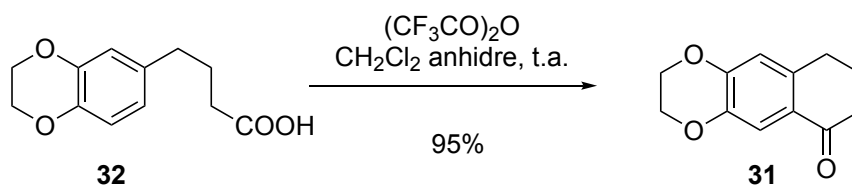


Esquema 5

A continuació s'indica un possible mecanisme que permeti explicar la reducció de Clemmensen (Esquema 6).⁸⁸



Posteriorment, l'àcid carboxílic **32** es converteix en la cetona **31** per tractament amb l'anhídrid trifluoroacètic, en el si de diclorometà, a temperatura ambient (Esquema 7).

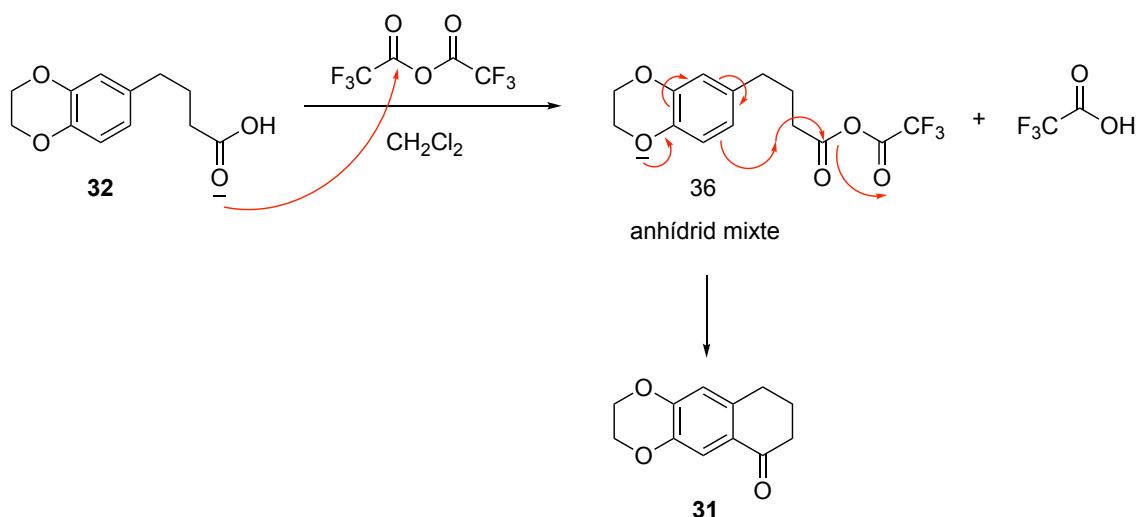


Esquema 7

En aquestes condicions s'obté el producte esperat **31** amb un 95% de rendiment. el mecanisme proposat per a aquesta reacció de ciclació s'indica a continuació (Esquema 8).

⁸⁷ H. J. Brewster. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 6364-6368

⁸⁸ L. Kürtj, B. Czakó. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. Elsevier Amsterdam, **2005**. p 92.

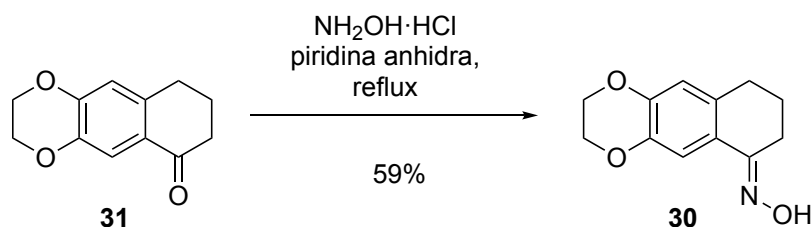


Esquema 8

L'àcid carboxílic **32** reacciona amb l'anhídrid trifluoroacètic per donar lloc a l'anhídrid mixte. L'anell aromàtic actua com a nucleòfil sobre el grup carbonil de l'anhídrid donant lloc a una ciclació intramolecular.

3.1.1.1.3 Preparació de les lactames 2,3,6,8,9,10-hexahidro-7*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-7-ona (**29**) i 2,3,7,8,9,10-hexahidro-6*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-6-ona (**37**)

El tractament de la cetona **31** amb hidroxilamina en medi bàsic (piridina) condueix a la (*E*)-oxima **30** selectivament amb un 59% de rendiment (Esquema 9).



Esquema 9

La presència d'una senyal ampla a 8,58 ppm que integra un protó en l'espectre d'RMN de protó del compost **30** i l'absència d'aquesta senyal en l'espectre de la cetona **31** permet confirmar l'estructura proposada per a l'oxima **30**.

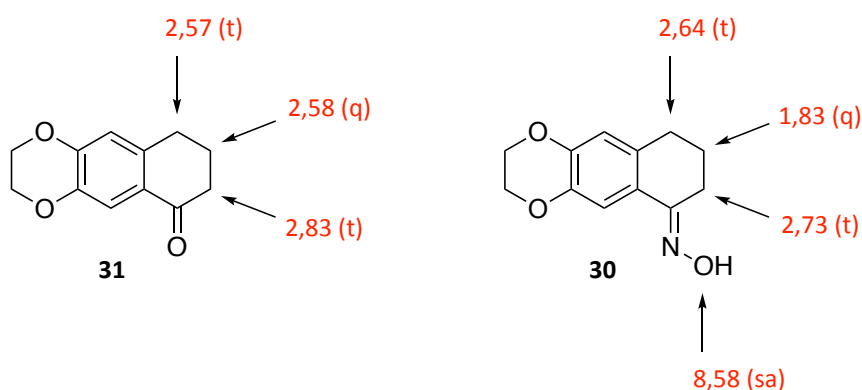
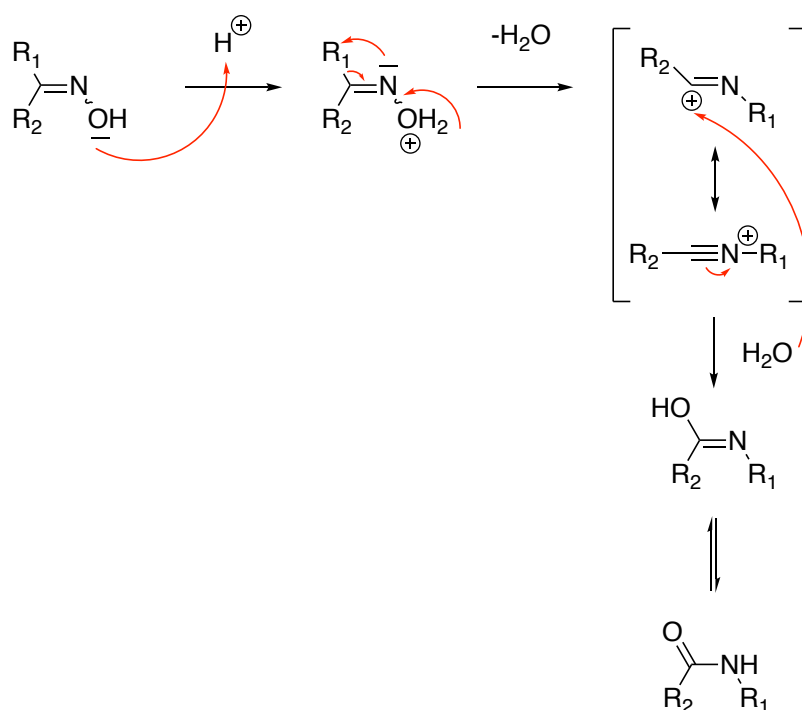


Figura 38. Dades de l'espectre d'RMN-¹H dels compostos **30** i **31**

A més a més, els grups metilens de les posicions α , β i γ de l'oxima **30** són lleugerament diferents dels observats en l'espectre d'RMN per a la cetona **31** (Figura 38).

Respecte a l'estereoquímica de l'oxima **30**, mitjançant experiments NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) es va confirmar l'existència exclusiva de l'isòmer (*E*).

El tractament d'oximes provinent de cetones cícliques, en medi àcid, condueix a la formació de lactames que s'obtenen per transposició segons el mecanisme que s'indica a continuació (Esquema 10).



Esquema 10

Aquest mecanisme consisteix en la protonació del grup hidroxil seguida de la migració del radical alquil i la posterior captació d'una molècula d'aigua per donar lloc a la hidroxilamina que per tautomerisme permet accedir a l'amida (si és cadena oberta) o bé a la lactama corresponent (si prové d'una oxima cíclica).⁸⁹

Per dur a terme aquesta reacció de transposició es poden emprar diferents àcids com l'àcid sulfúric, l'àcid acètic o l'àcid clorhídric.^{90,91} També es poden utilitzar àcids de Lewis⁹² o emprar activadors catalítics com complexes de radi⁹³ o organocatalitzadors.⁹⁴

⁸⁹ E. Beckmann. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, 19, 988-993

⁹⁰ R. E. Gawley. *Org. React.* **1988**, 35, 1-420

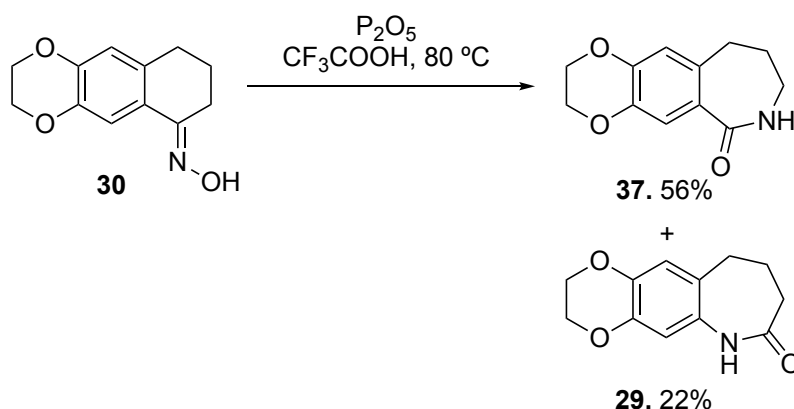
⁹¹ E. C. Homing, V. L. Stromberg, H. A. Lloyd. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 5153-5154

⁹² J. Peng, Y. Deng. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 403-405

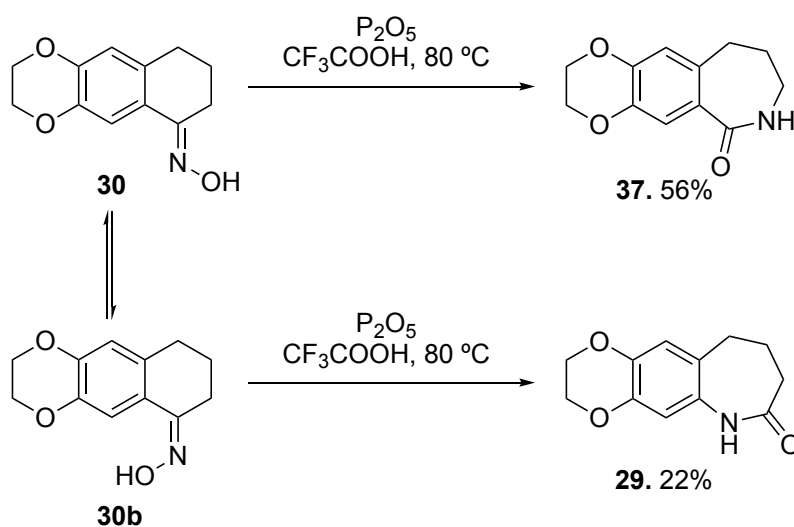
⁹³ M. Arisawa, M. Yamaguchi. *Org. Lett.* **2001**, 3, 311-312

⁹⁴ Y. Furuya, K. Ishihara, H. Yamamoto. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12240-12241

En el nostre cas, es va optar per emprar l'àcid trifluoroacètic⁹⁵ i P₂O₅ com a catalitzador i en aquestes condicions es varen obtenir les dues lactames **29** i **37** amb un 22% i un 56% de rendiment, respectivament (Esquema 11).



Tenint en compte que s'havia partit de l'oxima (*E*) purificada prèviament i sense la presència de l'isòmer (*Z*) (**30b**), el fet d'aïllar finalment una barreja de dues lactames ens fa pensar que s'ha produït un procés d'isomerització en el transcurs de la reacció a causa del medi àcid present en la mateixa (Esquema 12).⁹⁶

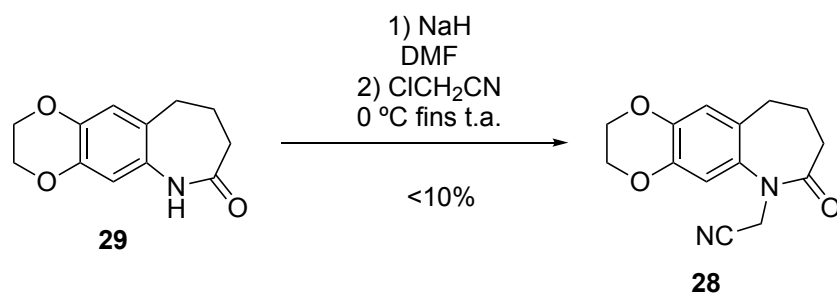


3.1.1.1.4 Preparació de l'amida **1**

A continuació es va realitzar l'alquilació de la lactama **29** per tractament amb l'hidrur de sodi i posterior addició del 2-cloroacetil, en el si de DMF. D'aquesta manera es va obtenir el nitril derivat **28** amb menys d'un 10% de rendiment (Esquema 13).

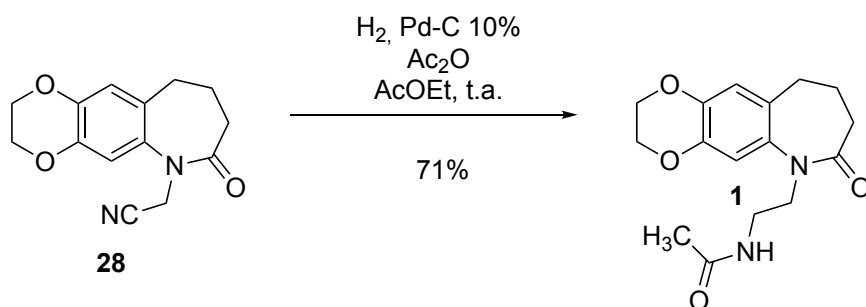
⁹⁵ L. Ronchin, A. Vavasori. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2009**, 313, 22-30

⁹⁶ S. Yamabe, N. Tsuchida, S. Yamazaki. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10638-10644



Esquema 13

Tot seguit, el derivat **28** es va sotmetre a una corrent d'hidrogen sota catalisi de Pd-C 10%, d'anhidrid acètic, en el si d'acetat d'etil. En aquestes condicions es va aïllar l'acetamida esperada **1** amb un rendiment del 71% (Esquema 14).



Esquema 14

Les dades de l'espectre d'RMN de protó mostren un singlet a 1,93 ppm, un triplet a 2,52 ppm (corresponent al metilè CH₂-NH), un triplet a 3,39 ppm (corresponent al metilè CH-N-CO), permetent confirmar l'estructura de la cadena d'acetamidoetil de l'àtom de nitrogen 6 del sistema heterocíclic (Figura 39).

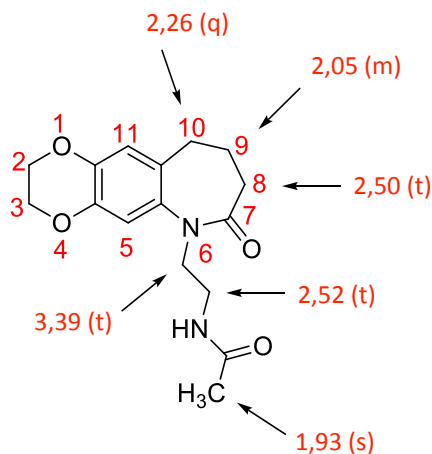
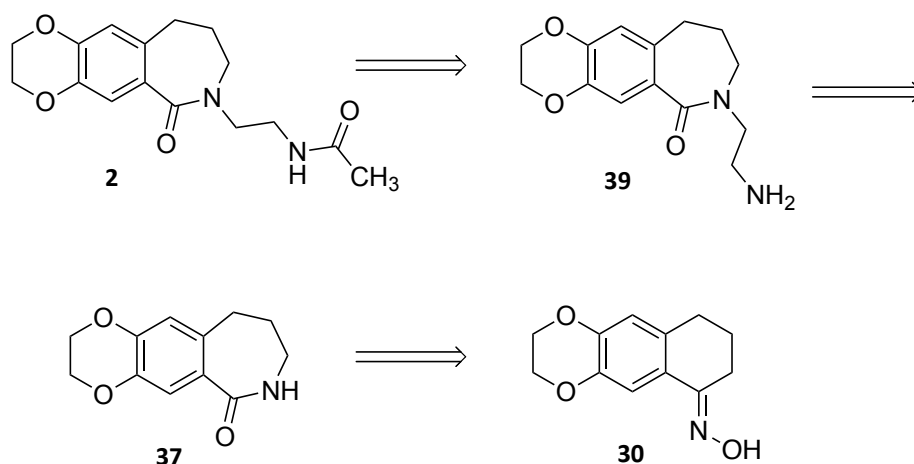


Figura 39. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost **1**

3.1.1.1.5 Anàlisi retrosintètica del compost **2**

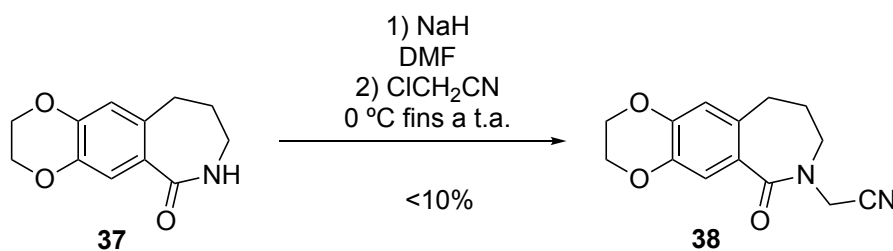
El compost **2** s'obté a partir de la lactama **37** obtinguda a partir de l'oxima **30** sintetitzada anteriorment, seguint l'anàlisi retrosintètica següent (Esquema 15):



Esquema 15

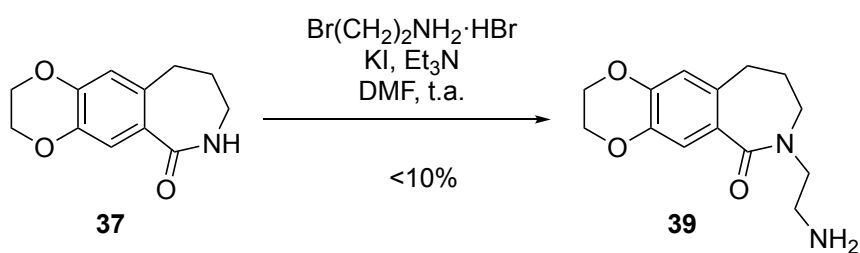
3.1.1.1.6 Preparació del compost **2**

La lactama **37** es va tractar amb el clorur d'acetonitril en presència d'hidrur de sodi i en el si de DMF, per tal d'aconseguir l'alquilació de la lactama. En aquestes condicions es va obtenir el compost **38** amb rendiments baixos que no varen permetre la continuació de la ruta sintètica (Esquema 16).



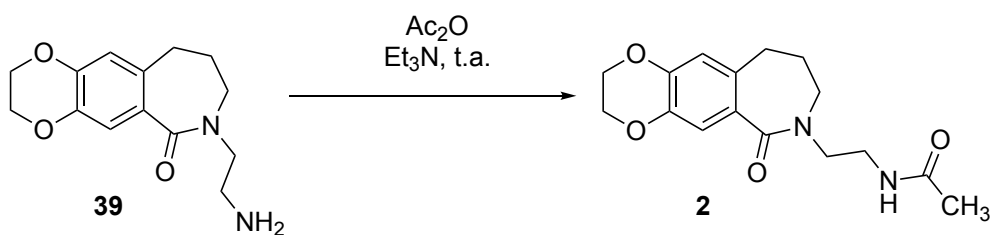
Esquema 16

Una alternativa sintètica per a la preparació del compost **39** consisteix en el tractament del compost **37** amb el bromhidrat de 2-bromoetilamina en medi bàsic (Et₃N), en el si de DMF, a temperatura ambient, amb un rendiment menor al 10% (Esquema 17).



Esquema 17

A partir d'aquest derivat **39** es pot obtenir el producte **2** mitjançant una acetilació amb anhídrid acètic (Esquema 18).

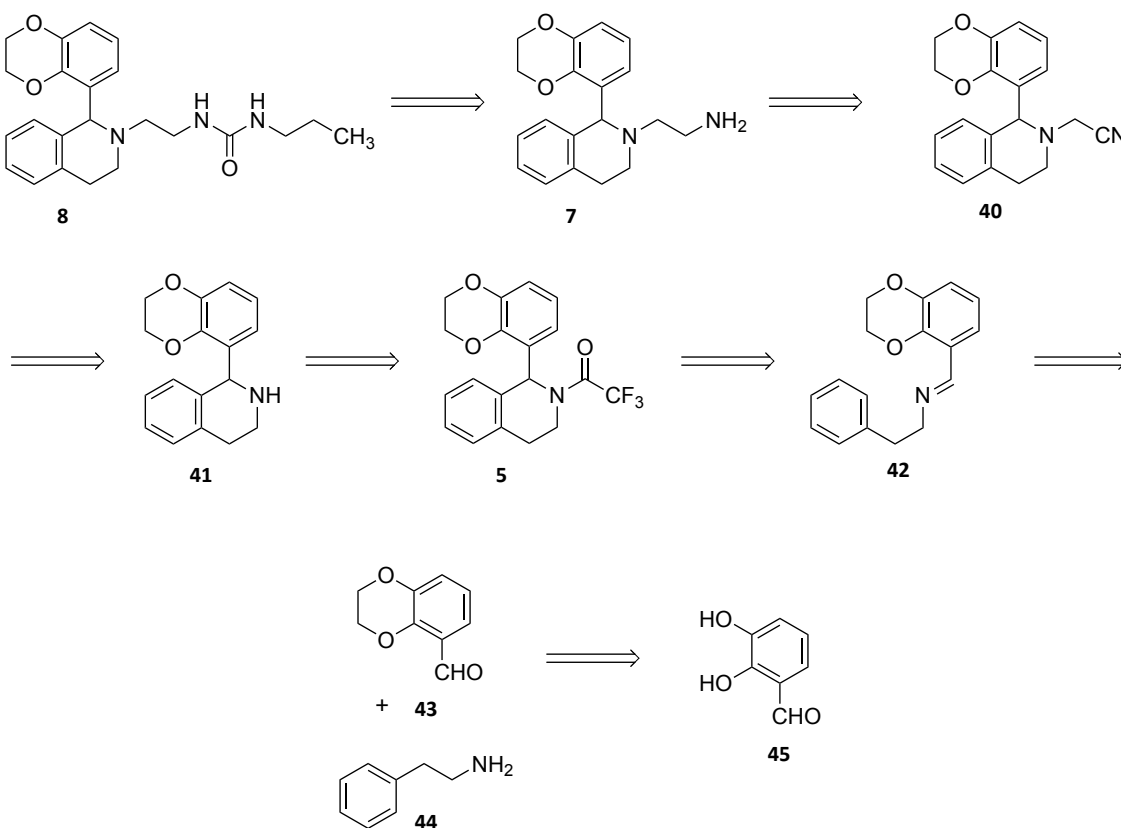


Esquema 18

3.1.1.2 Preparació dels compostos 1-(1-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxino[*b*]-5-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (**5**), *N*-(2-(1-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxino[*b*]-5-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)etil)acetamida (**6**), 2-(1-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxino[*b*]-5-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)etan-1-amina (**7**) i 1-(2-(1-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxino[*b*]-5-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)etil)-3-propilurea (**8**)

3.1.1.2.1 Anàlisi retrosintètica dels composts **5-8**

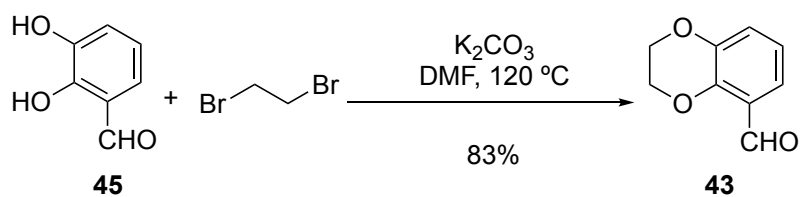
Els compostos **5-8** s'obtenen a partir del 2,3-dihidroxibenzaldehyd (**45**) assequible comercialment (Esquema 19).



Esquema 19

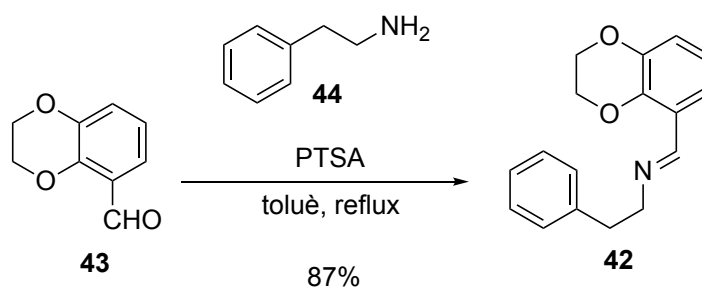
3.1.1.2.2 Preparació del compost **5**

En primer lloc es va dur a terme l'alquilació del 2,3-dihidroxibenzaldehyd (**45**) amb el 1,2-dibromoetà en condicions clàssiques d'alquilació de fenols, emprant K_2CO_3 com a base, en el si de DMF (Esquema 20).



Esquema 20

Es va obtenir l'aldehid esperat **43** amb un 83% de rendiment. Tot seguit, l'aldehid **43** es va tractar amb la fenetilamina **44** en presència d'àcid *p*-toluensulfònic (APTS), en el si de toluè, en un sistema de reflux que incorpora un Dean-Stark. En aquestes condicions es va obtenir la imina **42** amb un 87% de rendiment. Cal remarcar l'elevada estabilitat de la imina obtinguda gràcies a la qual va ésser possible la realització de diferents proves analítiques que en varen permetre la seva identificació (Esquema 21).



Esquema 21

Els senyals de l'espectre d'RMN de protó que apareixen a 3,01 ppm (t), 3,87 ppm (t) i a 8,56 ppm (s) assignables als protons del metilè benzílic, del metilè de la posició α de la imina i de la pròpia imina, respectivament, permeten confirmar l'estructura proposada per a **42** (Figura 40).

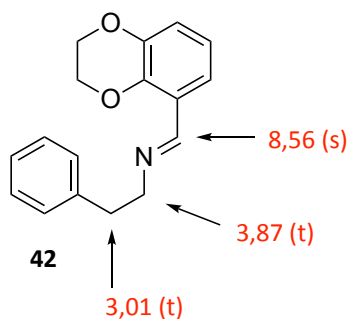
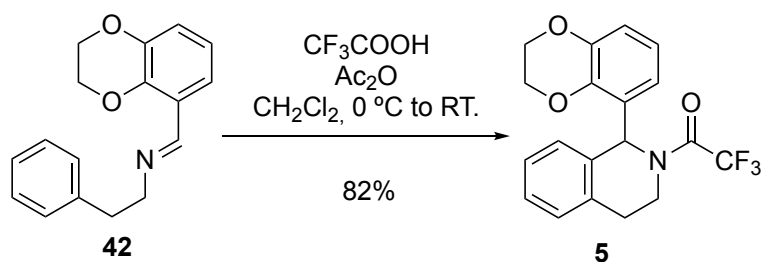


Figura 40. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost **42**

El tractament de la imina **42** amb l'àcid trifluoroacètic aplicant les condicions descrites prèviament pel nostre grup de recerca⁹⁷ condueix a la tetrahydroisoquinolina **5** amb un 82% de rendiment (Esquema 22).

⁹⁷ A. S. Capilla, M. Romero, M. D. Pujol, D. H. Caignard, P. Renard. *Tetrahedron* **2001**, 57, 8297-8303



Esquema 22

Donada la presència del grup trifluoroacetil els senyals de l'espectre d'RMN de protó apareixen desdoblats i permeten distingir entre el rotàmer A i el rotàmer B (Figura 41).

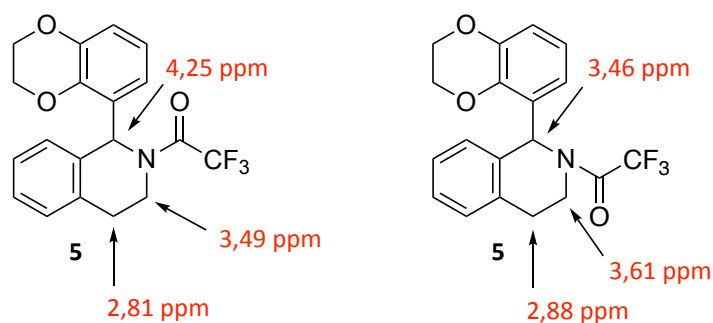


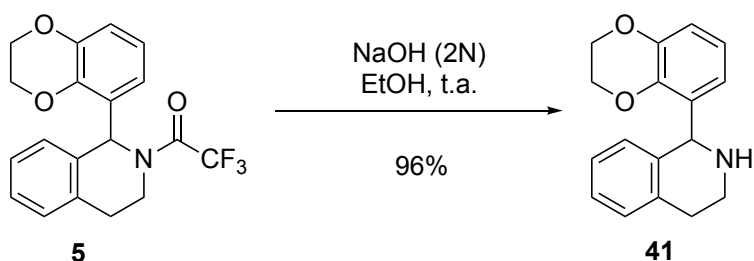
Figura 41. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost 5

La disposició del grup carbonil de la cadena lateral de la isoquinolina fa que els grups metilens de les posicions 3 i 4 ressonin a camps diferents. Així el rotàmer A majoritari presenta el grup carbonil orientat cap a la part superior i els senyals dels grups metilens de les posicions 3 i 4 apareixen a camps més apantallats mentre que la senyal del metí apareix a camps més alts a causa de la proximitat del grup -CO-.

En el cas del rotàmer B, l'efecte és l'oposat: els metilens de les posicions 3 i 4 apareixen més desapantallats i en el canvi el -CH- de la posició 1 de la isoquinolina apareix ara a camps més baixos a causa de la disposició contrària a la del grup carbonil.

3.1.1.2.3 Preparació del compostos 6 i 7

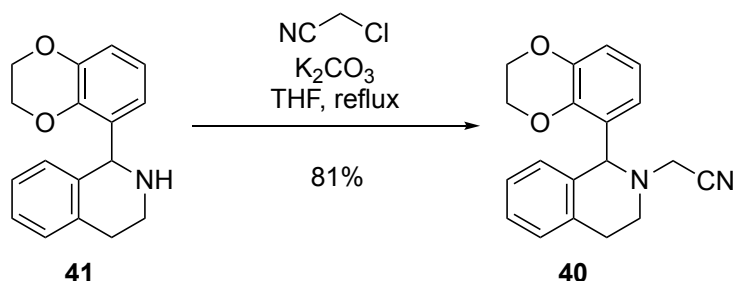
La isoquinolina **41** s'obté per hidròlisi de la corresponent amida **5** tal com s'indica a continuació (Esquema 23).



Esquema 23

Per a la hidròlisi es van seguir les condicions clàssiques d'hidròlisi d'amides⁹⁸ que impliquen el tractament amb medi bàsic, en el si d'etanol, a temperatura ambient, obtenint el compost **41** amb un 96% de rendiment.

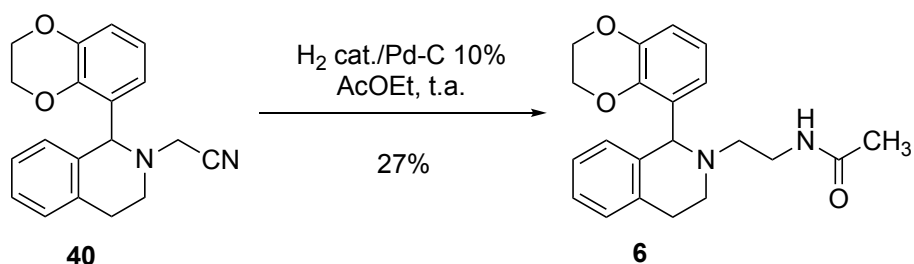
Tot seguit es realitza l'alquilació de l'àtom de nitrogen isoquinolínic tal com s'indica en l'esquema següent (Esquema 24).



Esquema 24

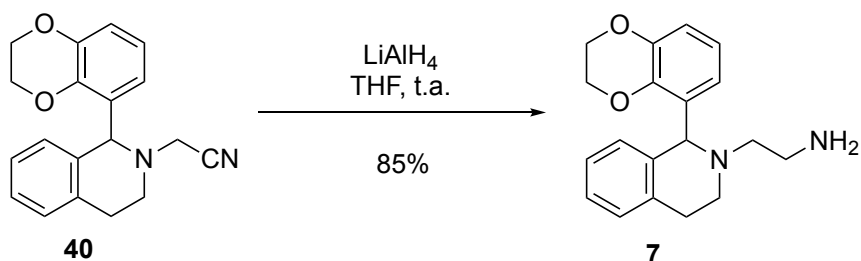
En medi bàsic i en presència de 2-cloroacetronitril, en el si de THF, s'obté el producte esperat **40** amb un 81% de rendiment.

La hidrogenació catalítica del compost **40** amb Pd-C 10%, en el si d'àcid acètic, a temperatura ambient, condueix a l'acetamida **6** amb un 27% de rendiment (Esquema 25).



Esquema 25

El baix rendiment obtingut en la reacció anterior ens va fer plantejar la possibilitat de reduir directament el nitril **40** amb LiAlH_4 . Es va dur a terme aquesta reducció en el si de THF, a temperatura ambient, i es va obtenir l'amina **7** amb un 85% de rendiment (Esquema 26).



Esquema 26

⁹⁸ F. Hibbert, R. J. Sellens. *J. Chem. Soc. Perkins Trans 2* **1988**, 3, 399-402

Els senyals que apareixen a l'espectre d'RMN de protó entre 2,82-3,06 i 3,22-3,26 assignables als grups metilens de la cadena lateral entre la isoquinolina i l'amina primària corresponent permeten confirmar l'estructura proposada per al compost **7** (Figura 42).

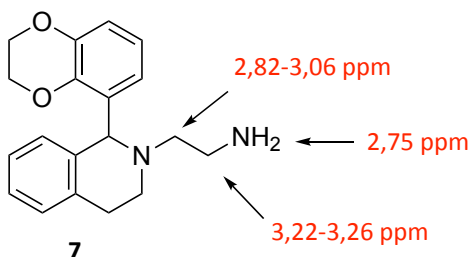


Figura 42. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost **7**

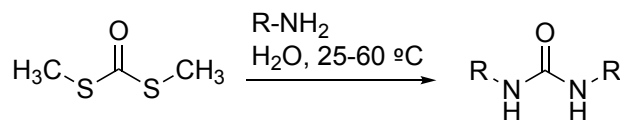
3.1.1.2.4 Preparació de 1-(2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxino[b]-5-yl)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)etil)-3-propilurea (**8**)

Actualment, es coneixen diferents metodologies que permeten la preparació d'urees. Alguns d'aquests mètodes s'indiquen a continuació:

- Urees simètriques⁹⁹

Les urees simètriques s'obtenen principalment per:

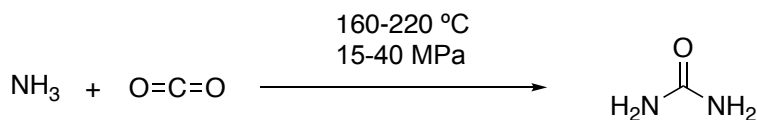
- Per la reacció entre el *S,S*-dimetilditiocarbonat i una amina o anilina, mitjançant una addició al grup carbonil i eliminació de metatiol (Esquema 27).



Esquema 27

- Amb addició d'amoniac o amines a CO₂

Al 1870, A. Bazarov va aconseguir sintetitzar urees mitjançant l'addició d'amoniac a diòxid de carboni (Esquema 28).¹⁰⁰



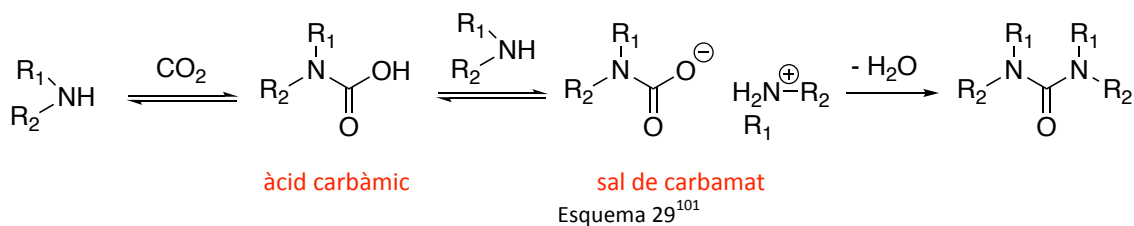
Esquema 28

Consisteix en un bon mètode per a la preparació d'urees emprat a nivell industrial al ser considerat un mètode sostenible amb el medi ambient. Un dels mecanismes proposats consisteix en la formació d'àcid carbàmic, seguida de la formació de la sal corresponent amb amoniac i per últim, la deshidratació que dona lloc a la formació de la urea corresponent. Aquesta síntesi també es pot dur a terme mitjançant una amina primària o secundària amb dos radicals diferents (Esquema 29).¹⁰¹

⁹⁹ E. Artuso, I. Degani, R. Fochi, C. Magistris. *Synthesis* **2007**, 3497-3506

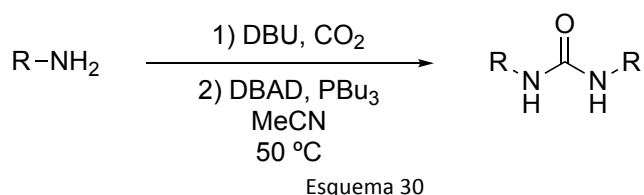
¹⁰⁰ A. I. Bazarov. *J. Prakt. Chem.* **1870**, 2, 283

¹⁰¹ H. Wang, Z. Xim, Y. Li. *Top. Curr. Chem.* **2017**, 375, 49-75



Gràcies a la baixa acidesa del CO₂, la reacció amb amines o amoníac ocorre en condicions suaus (temperatura ambient i baixa pressió) donant lloc a l'àcid carbàmic i a la sal de carbamat. No obstant, la conversió entre la sal de carbamat, l'àcid carbàmic i el CO₂ és reversible, per tant, l'eficiència de la síntesi recau sobre la deshidratació de la sal de carbamat.

En els darrers anys, Li i col.¹⁰² varen proposar modificacions de la metodologia de Bazarov per a facilitar l'etapa de deshidratació que condueix a les urees (Esquema 30). En els seus assajos de marcatge radioactiu, varen utilitzar DBU com a base, en presència d'azodicarboxilat de di-tere-butil, per tal de poder marcar les urees amb una sola etapa.



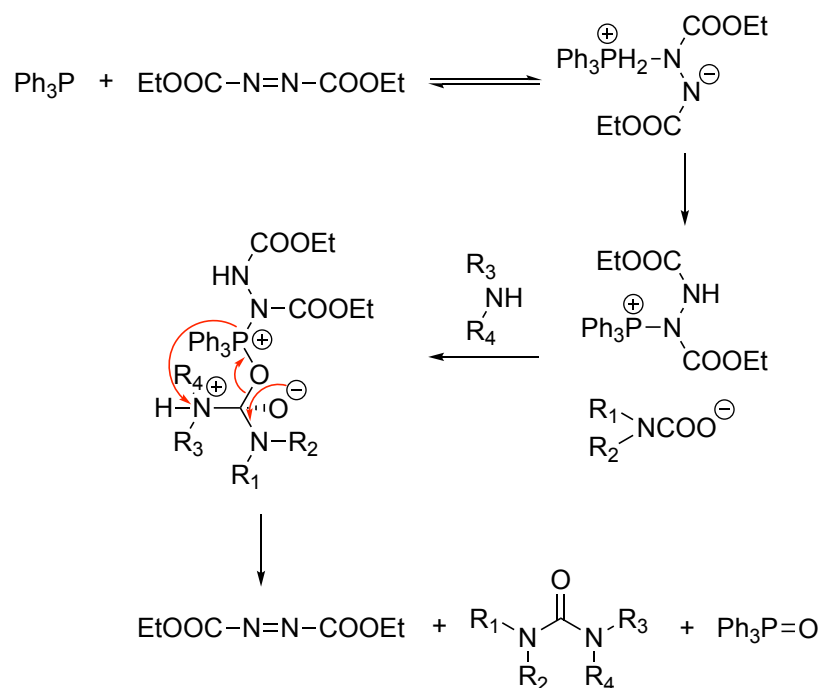
– Urees no simètriques

A continuació es mostren algunes rutes sintètiques possibles per a la formació d'urees no simètriques:

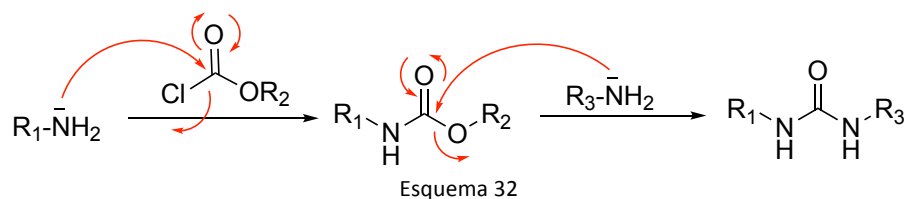
- Reacció de Mitsunobu

En relació al mètode anterior, s'han desenvolupat diferents metodologies que permeten tan l'obtenció d'urees simètriques com l'obtenció d'urees asimètriques. Una d'elles es basa en la reacció de Mitsunobu. Aquest mètode permet obtenir urees amb bons rendiments mitjançant una combinació de PPh₃ i DEAD (azodicarboxilat de dietil) sota condicions suaus (temperatura ambient i corrent de CO₂). L'àcid carbàmic resultant del tractament de l'amina amb el CO₂ reacciona amb el zwitterió derivat de la PPh₃ i forma espècies zwitterió estables, les quals reaccionen amb una altra molècula d'amina donant lloc a un intermediari molt actiu, el qual es "reordena" formant les urees substituïdes desitjades (Esquema 31).¹⁰¹

¹⁰² A. K. H. Dheere, S. Bongarzone, C. Taddei, R. Yan, A. D. Gee. *Synlett* **2015**, 26, 2257-2260



- Amb cloroformiats¹⁰³
Per reacció entre un cloroformiat i una amina o anilina, mitjançant una addició al grup carbonil i eliminació de clorur, seguida d'una reacció amb una segona amina que s'addiciona de nou al carbamat intermediari per generar la urea asimètrica (Esquema 32).

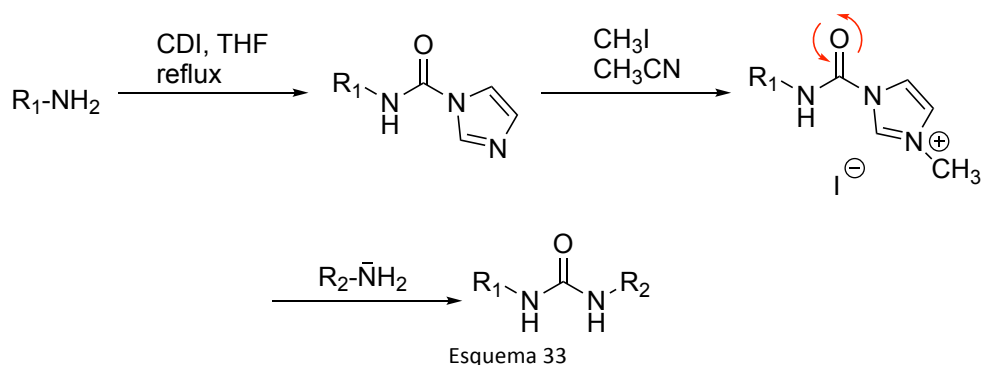


- Amb sals de carbonildiimidazole^{104,105}
L'addició d'una amina o anilina al carbonildiimidazole (CDI) condueix al corresponent *N*-(aminocarbonil)imidazole, el qual per tractament amb iodur de metil es converteix en iodur de carbonilimidazoli. La sal intermèdia pot ésser tractada amb una altra amina per conduir a la urea corresponent (Esquema 33).

¹⁰³ C. Han, J. A. Porco. *Org. Lett.* **2007**, 9, 1517-1520

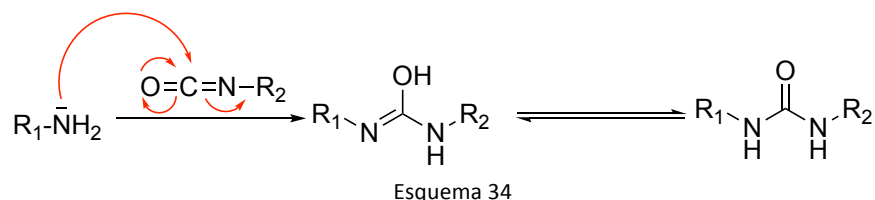
¹⁰⁴ J. A. Grzyb, R. A. Batey. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5279-5282

¹⁰⁵ M. N. Bertrand, J. P. Wolfe. *Tetrahedron* **2005**, 61, 6447-6459



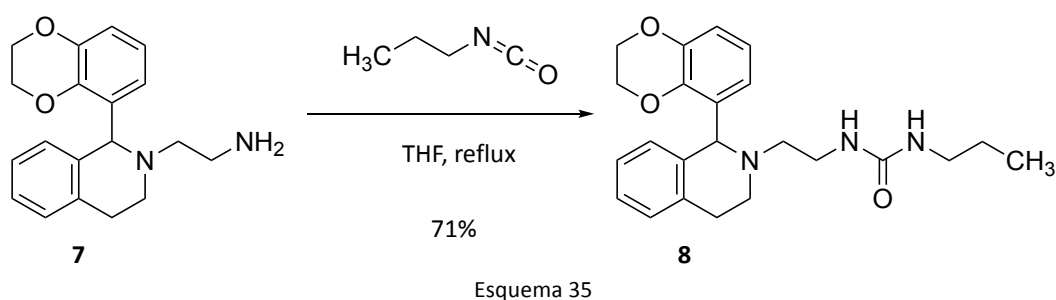
- Amb isocianats^{106,107}

Els isocianats són derivats de l'àcid isociànic (HNCO). L'addició d'amines o anilines a isocianats condueix a les urees asimètriques desitjades tal i com es mostra a continuació (Esquema 34). És d'interès recordar que la transformació de l'isocianat d'amoni a la urea que va dur a terme *Wöhler* al 1824, va constituir la primera síntesi d'un compost orgànic a partir d'un precursor inorgànic.



Aquest constitueix el millor mètode, ja que permet la síntesi d'urees en una sola etapa, en períodes curts de temps i amb agitació a temperatura ambient. Per a dur a terme la reacció s'empren diferents dissolvents com DMSO,¹⁰⁸ èter etílic^{106,107} o THF.^{106,107} L'únic inconvenient radica en la preparació de certs isocianats, tot i que molts d'ells actualment són assequibles comercialment.

En aquest treball l'amina **7** es va tractar amb l'*N*-propilisocianat, en el si de THF, a reflux. En aquestes condicions es va obtenir la urea **8** amb un 71% de rendiment (Esquema 35).



¹⁰⁶ D. P. N. Satchel; R. S. Satchel. *Chem. Soc. Rev.* **1975**, 4, 231-250

¹⁰⁷ E. A. Castro; R. B. Moodle; P. J. Sansom. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, 737-742

¹⁰⁸ Y. Zhang; M. Anderson; J. L. Weisman; M. Lu; C. J. Choy; V. A. Boyd; J. Price; M. Sigal; J. Clark; M. Connelly; F. Zhu; W. A. Guiguemde; C. Jeffries; L. Yang; A. Lemoff; A. P. Liou; T. R. Webb; J. L. DeRisi; R. K. Guy. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, 1, 460-465

La presència dels senyals a 4,64 i 4,68 ppm en l'espectre d'RMN de protó corresponents als protons dels grups NH així com el triplet a 0,87 ppm (CH₃), i els multiplets compresos entre 2,88-2,95; 2,97-3,05; 3,17-3,25 (CH₂-N-) assignables als protons de la cadena del propil de l'agrupació urea i als protons de la cadena lateral del nucli d'isoquinolina, permetent confirmar l'estructura proposada per a la urea **8** (Figura 43).

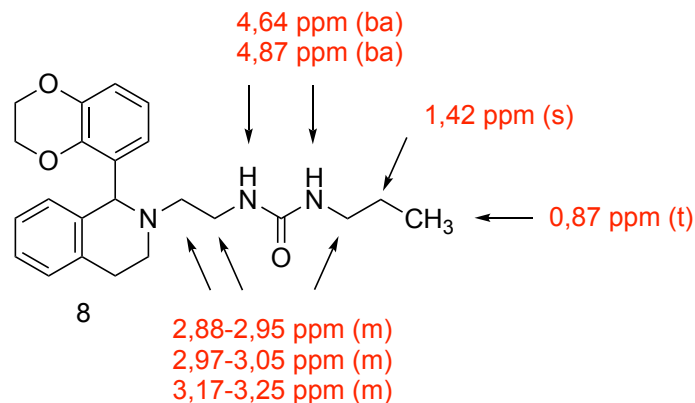


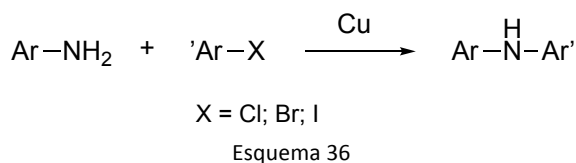
Figura 43. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost **8**

3.1.2 Preparació d'arilamines com a intermediaris sintètics

Les *N*-arilamines són compostos amb una importància notable dins el camp de la recerca farmacèutica i de la síntesi orgànica, en general, essent compostos intermediaris molt utilitzats per a la preparació de múltiples compostos.¹⁰⁹

3.1.2.1 Preparació de les diarilamines 1-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)etan-1-ona (**10**), l'oxima 1-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)etan-1-ona (**11**), l'*N*-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil) acetamida (**12**) i *N*-(4-((4-aminofenil)amino)fenil)acetamida (**13**)

Les arilamines primàries, tot i aparentar ésser compostos de fàcil preparació, en ocasions requereixen d'una síntesi química complexa. La metodologia clàssica de preparació d'arils implica diverses etapes que solen ésser incompatibles amb determinats grups funcionals i compostos aromàtics específics. A les reaccions clàssiques, el protocol de formació d'*N*-arilamines requereix les condicions tipus Ullmann (sals de coure com a catalitzador) i sovint implica la utilització de condicions dràstiques (Esquema 36).^{110,111,112,113,114}



¹⁰⁹ Y. Oshiro, S. Sato, N. Kurahashi, T. Tanaka, T. Kikuchi, K. Tottori, Y. Uwahodo, T. Nishi, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 658–667

¹¹⁰ M. Romero, Y. Harrak, J. Basset, J.A. Orúe, M.D. Pujol. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1951-1956

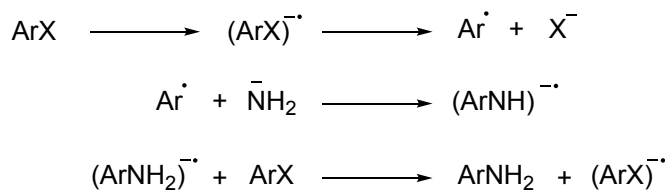
¹¹¹ H. Wiingarten. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 977–978

¹¹² A. J. Paine. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1496–1502

¹¹³ Y. Shirota, T. Kobata, N. Noma. *Chem. Lett.* **1989**, *18*, 1145–1148

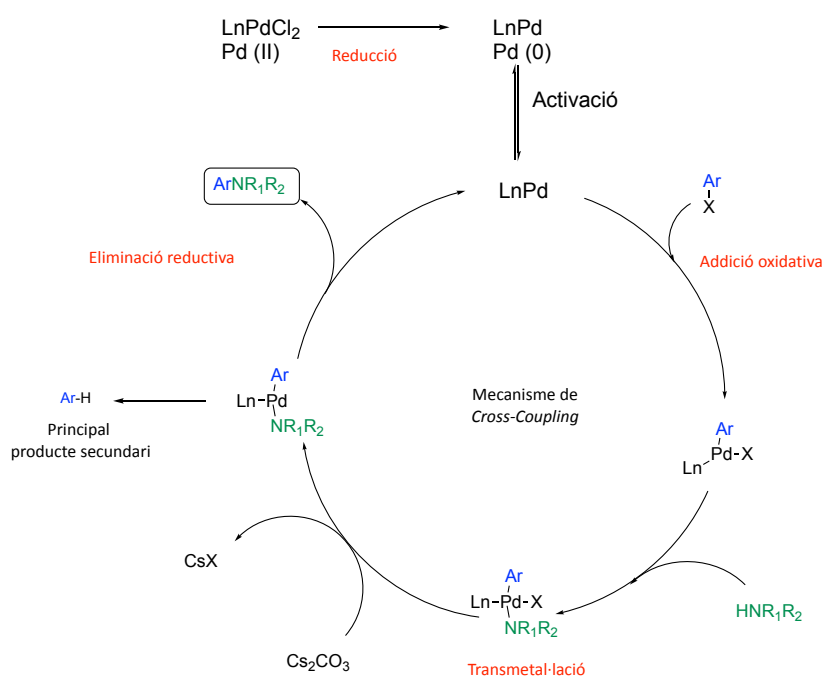
¹¹⁴ C. Sambigiato, S. P. Marsden, A. J. Blacker, P. C. McGowan. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3525-50

El mecanisme proposat per a aquesta reacció és el següent (Esquema 37):¹¹⁴



Esquema 37

Diversos grups de recerca com Buchwald i col.^{115,116,117,118,119,120} i Hartwig i col.^{121,122,123,124} van posar a punt la preparació de diverses *N*-arilamines a partir de reaccions d'acoblament creuat entre halurs d'aril i aminoderivats. El mecanisme proposat per Buchwald i Hartwig és el següent (Esquema 38):¹²⁵



Esquema 38. Mecanisme de formació de diarilamines

En primer lloc, es duu a terme una addició oxidativa d'un halur orgànic al catalitzador de pal·ladi. El pal·ladi divalent actua com a donador d'electrons i juntament amb el lligand formen un intermedi que s'acomplexa amb l'anell aromàtic que conté l'halogen. Aquest complex trenca l'enllaç carboni-halogen i es formen dos nous enllaços amb el metall. En segon lloc, es produeix una transmetal·lació de manera que els dos reactius queden situats sobre el centre metàl·lic, mentre la base reacciona amb

¹¹⁵ J. P. Wolfe, S. Wagaw, S. L. Buchwald. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7215-7216

¹¹⁶ J. P. Wolfe, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1264-1267

¹¹⁷ J. P. Wolfe, R. A. Rennels, S. L. Buchwald. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7525-7546

¹¹⁸ J. P. Wolfe, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1144-1157

¹¹⁹ J. Yin, S. L. Buchwald. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6043-6048

¹²⁰ T. Ikawa, T. E. Barder, M. R. Biscoe, S. J. Buchwald. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13001-13007

¹²¹ G. Mann, J. F. Hartwig, M. S. Driver, C. Fernández-Rivas. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 827-828

¹²² J. F. Hartwig. *Synlett* **1996**, 329-340

¹²³ M. S. Driver, J. F. Hartwig. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7217-7218

¹²⁴ J. F. Hartwig. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2046-2067

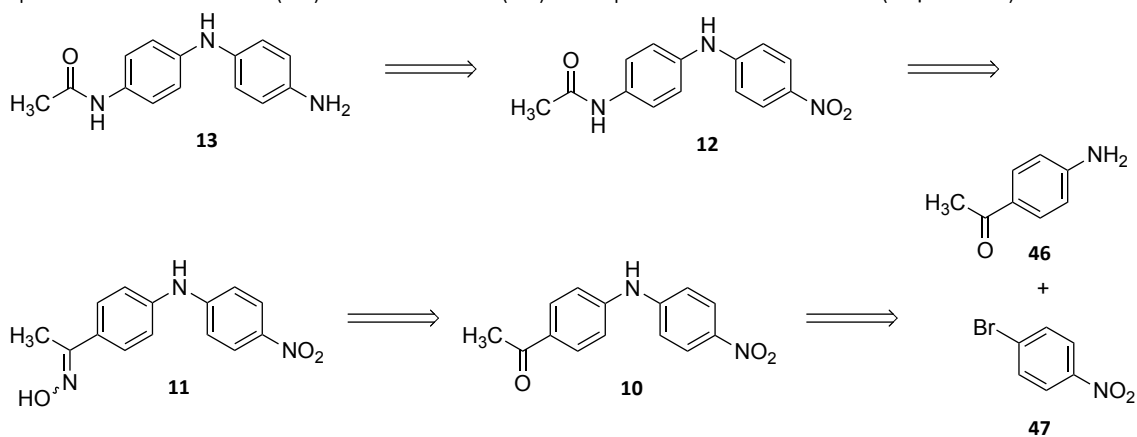
¹²⁵ J. Louie, J. F. Hartwig. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-3612

l'halogen derivat per formar la sal corresponent. D'aquesta manera, l'àtom de nitrogen s'introdueix sobre el derivat aromàtic substituint l'halogen inicial. Finalment té lloc una eliminació reductiva dels dos fragments d'acoblament de manera que es genera el producte final esperat i es regenera el catalitzador.

Cal destacar que els grups de recerca de Buchwald i Hartwig han mostrat un progrés notable sobre les reaccions d'aminació mitjançant el catalitzador de pal·ladi sota bones condicions. En general, les reaccions mostraven una elevada eficiència sota condicions determinades (catalitzador, lligand, base i temperatura) però sovint aquesta eficiència estava limitada a determinats substrats, i en ocasions el catalitzador o el lligand requerits eren excessivament costosos, difícils de manipular o no eren compostos accessibles comercialment.

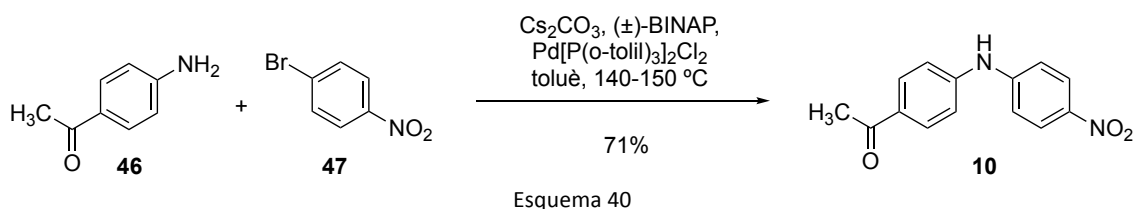
3.1.2.1.1 Anàlisi retrosintètica de les diarilamines 10-13

Les diarilamines **10-13** s'obtenen mitjançant l'anàlisi retrosintètica descrita a continuació a partir dels compostos 4-acetilnilina (**46**) i 4-nitrobenzè (**47**) assequibles comercialment (Esquema 39).



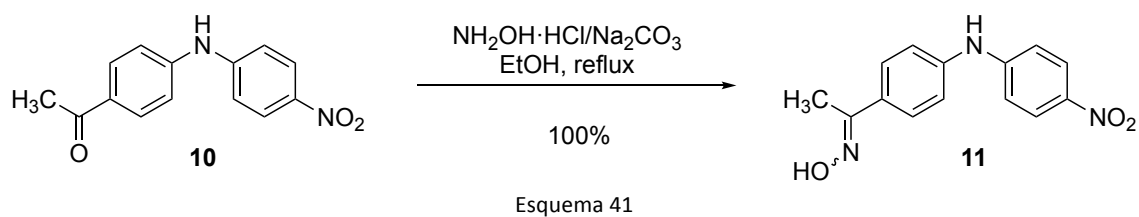
3.1.2.1.2 Preparació de les diarilamines 10-13

En el nostre cas, seguint la metodologia emprada en el nostre grup de recerca per a la preparació de diversos compostos *N*-arilderivats,¹²⁶ per a la preparació de la diarilamina **10** es va condensar la 4-acetilnilina (**46**) amb el 4-nitrobenzè (**47**), en presència de Pd[P(*o*-tolil)₃]₂Cl₂ com a catalitzador, Cs₂CO₃ com a base i (±)-BINAP com a lligand, en el si de toluè, a 140-150 °C. En aquestes condicions d'acoblament creuat s'obté **10** amb un rendiment del 71% (Esquema 40).



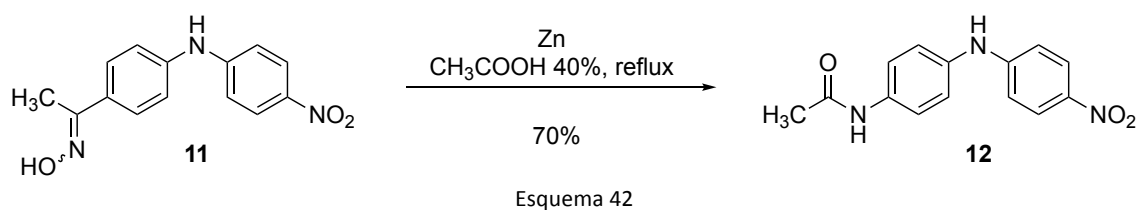
¹²⁶ M. Romero, Y. Harrak, J. Basset, L. Ginet, P. Constans, M. D. Pujol. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9010-9016

A continuació, la diarilamina acetilada **10** per tractament amb hidroxilamina clorhidrat, en el si d'etanol i en presència de carbonat de sodi conduí a l'oxima **11** amb un 100% de rendiment. (Esquema 41).

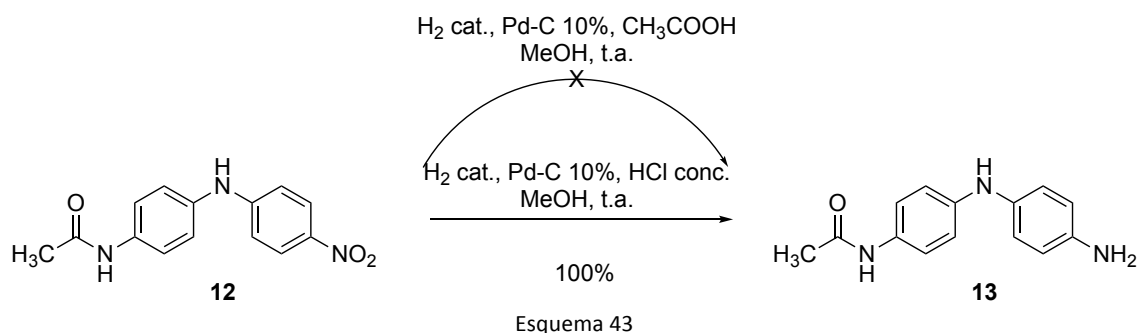


Respecte a l'estereoquímica, indicar que només s'observà la formació d'un sol estereoisòmer. Es va dur a terme un assaig NOE per tal d'elucidar la configuració (*E*) o (*Z*), però els resultats no varen ésser concloents, probablement a causa de la presència de rotació del substituent C(CH₃)NOH que impedeix analitzar la sensibilitat del protó de l'anell aromàtic més pròxim al protó de l'oxima, ni del grup metil del propi substituent. Tot i així, d'acord amb la informació bibliogràfica, la configuració més probable per a aquest compost és la configuració (*E*).¹²⁷

La transposició de Beckmann^{128,129} de l'oxima **11** emprant Zn i àcid acètic a temperatura ambient condueix a l'amida **12** esperada amb un rendiment del 70% (Esquema 42).



La reducció de la nitro-amida **12** es duu a terme quimiosselectivament mitjançant una hidrogenació catalítica en presència de Pd-C 10% com a catalitzador. En aquestes condicions s'obté l'anilina **13** amb rendiments quantitius (Esquema 43).



Un assaig realitzat en condicions molt semblants modificant únicament l'àcid utilitzat, en aquest cas àcid acètic en comptes d'àcid clorhídric, no va permetre obtenir el producte reduït corresponent (Esquema 43).

¹²⁷ S. Conde, C. Corral, J. Lissavetzky. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, 22, 301-304

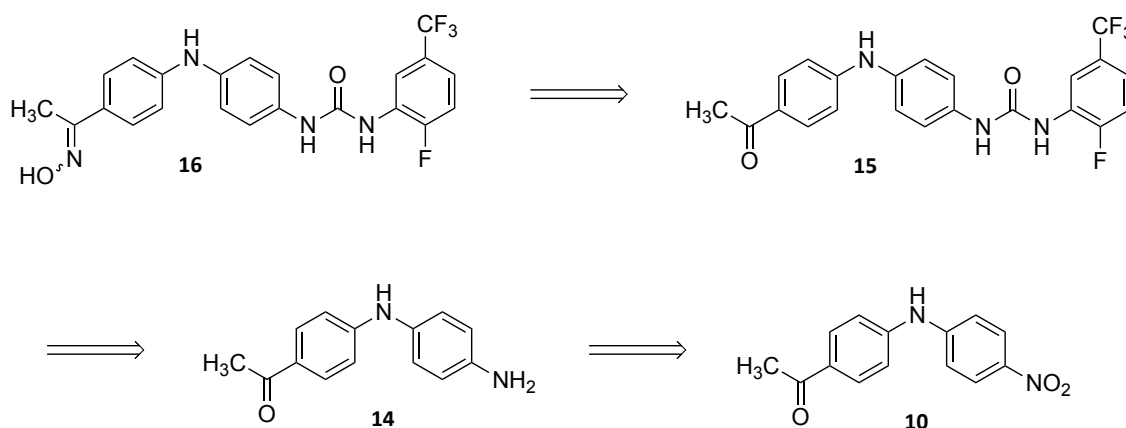
¹²⁸ F. March. *Comptes Rendus Heb.* **1902**, 134, 843-845

¹²⁹ X. Liu, L. Xien, H. Wu, J. Chen, C. Xia *H. Chim. Acta* **2009**, 92, 1014-1021

3.1.2.2 Preparació dels compostos 1-(4-((4-acetilfenil)amino)fenil)-3-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)urea (**15**) i 1-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)-3-(4-((4-(1-(hidroxiimino)etil)fenil)amino)fenil)urea (**16**)

3.1.2.2.1 Anàlisi retrosintètica de les diarilamines **15** i **16**

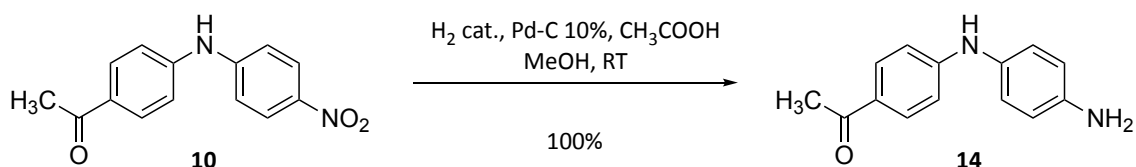
Paral·lelament a la preparació dels compostos **10-13**, es va dur a terme la preparació dels compostos **15** i **16** a partir del compost **10** prèviament descrit seguint la retrosíntesi següent (Esquema 44):



Esquema 44

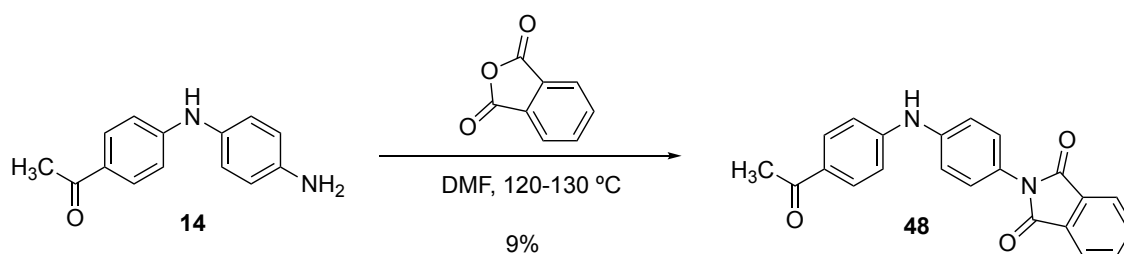
3.1.2.2.2 Preparació de les diarilamines **14**, **15** i **16**

L'obtenció de la diarilamina **14** es va dur a terme mitjançant la reducció del nitroderivat **10** en condicions d'hidrogenació catalítica emprant Pd-C 10% com a catalitzador i metanol com a dissolvent, en presència d'àcid acètic. En aquestes condicions es va obtenir quimiosselectivament el producte de reducció del grup nitro **14** amb un rendiment del 100% (Esquema 45).



Esquema 45

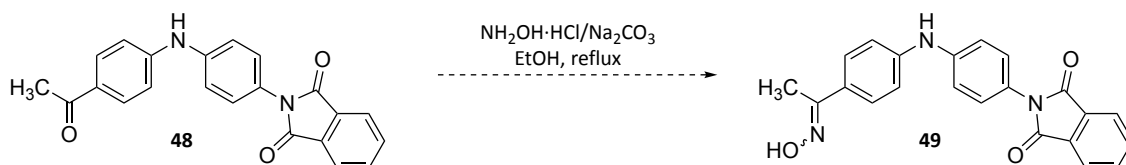
A continuació, la condensació de l'anilina **14** amb l'anhídrid ftàlic va conduir a la imida **48** amb un 9% de rendiment (Esquema 46).



Esquema 46

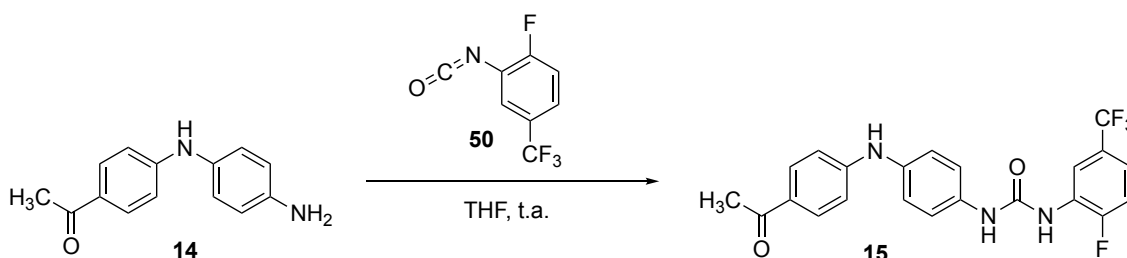
La ftalimida, a més a més d'emprar-se com a grup protector d'amines i anilines, també ha demostrat formar part d'estructures amb destacable activitat terapèutica; s'han descrit derivats amb activitat antioxidant,¹³⁰ antiinflamatòria,¹³¹ hipolipidèmica,¹³² analgèsica,¹³³ entre d'altres.¹³⁴

El nostre objectiu consistia en la preparació de la corresponent oxima de la metilcetona **48**, però el fet que s'obtingués **48** en rendiments baixos no ho va permetre. Aquests resultats ens varen conduir a abandonar aquesta ruta però es va poder avaluar l'activitat citotòxica de la ftalimida **48** (Esquema 47).



Esquema 47

El tractament de l'anilina **14** amb el 2-fluoro-5-trifluorometilfenil isocianat (**50**) en les condicions esmentades anteriorment en aquesta memòria, va conduir a la urea **15** amb un 67% de rendiment (Esquema 48).



Esquema 48

Els senyals de l'espectre d'RMN de carboni a 125,1 ppm ($J = 271$ Hz), a 127,2 ppm ($J_1 = 3$ Hz, $J_2 = 32$ Hz) i a 154,6 ppm ($J = 247$ Hz) corresponents als àtoms de carboni de es posicions CF₃, C-5'' i C-2'' que acoblen amb els àtoms de fluor corresponents, permeten confirmar l'estructura proposada per al compost **15** (Figura 44).

¹³⁰ C. S. Chidan Kumar, W.-S. Loh, S. Chandrāju, Y.-F. Win, W. K. Tan, C. K. Quah, H.-K. Fun. *Plos one* **2015**, 10, e011944011-e0119440/23

¹³¹ A. L. Machado, L.M. Lima, J. X. Araujo, C. A. M. Fraga, V. L. Goncalves Koatz, E. J. Barreiro. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1169–1172

¹³² V. L. M. Sena, R. M. Srivastava, R. O. Silva, V. L. M. Lima. Part V, *Farmaco*. **2003**, 58, 1283-1288

¹³³ R. Antunes, H. Batista, R. M. Srivastava, G. Thomas, C. C. Araujo. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3071–3076

¹³⁴ V. Bailleux, L. Valee, J. P. Nuyts, I. Vameeq. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 1817–1821

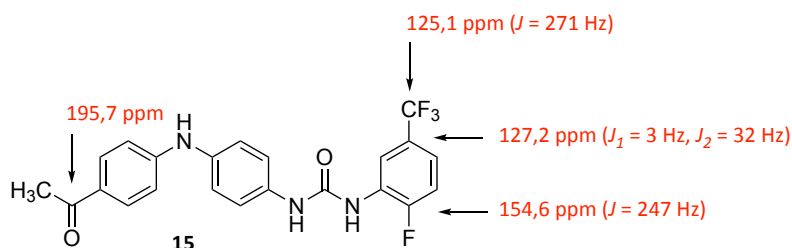
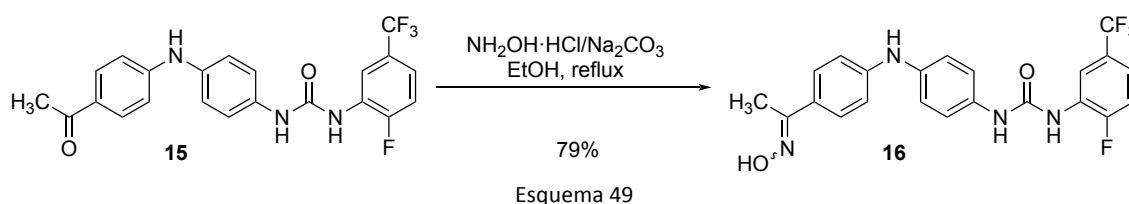


Figura 44. Dades de l'espectre d'RMN-¹³C del compost **15**

A continuació, la urea **15** es va tractar amb hidroxilamina clorhidrat, en el si d'etanol i en presència de carbonat sòdic com a base i es va obtenir l'oxima **16** amb un rendiment del 79% (Esquema 49).



De la mateixa manera que amb el compost **11**, les dades de l'espectre NOE per a l'oxima **16** no permeten confirmar la configuració (*E*) o (*Z*) de l'oxima.¹²⁷ No obstant, tal i com s'ha comentat anteriorment, en base a la informació bibliogràfica, la configuració més probable per a aquesta oxima **16** seria al conformació (*E*).

A continuació es mostren les dades obtingudes a partir de l'RMN de carboni (Figura 45).

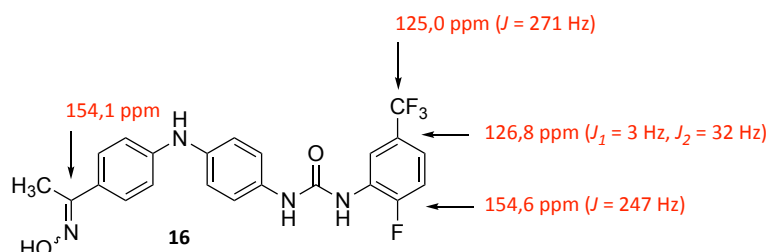


Figura 45. Dades de l'espectre d'RMN-¹³C del compost **16**

3.1.3 Preparació d'arilèters

Els diarilèters funcionalitzats formen part de l'estructura de diversos compostos naturals amb activitat biològica.^{135,136} Per aquest motiu, en els darrers anys han estat àmpliament utilitzats en la síntesi química de compostos orgànics amb activitat terapèutica.¹³⁷ Tal i com s'ha exposat prèviament en aquest treball, dins d'aquests tipus de compostos s'inclou el *sorafenib*, el qual ha demostrat interessants propietats antitumorals^{75,76,77,78}.

Els diarilèters han estat sintetitzats a partir de l'arilació de fenols amb halurs d'aril mitjançant diferents metodologies. Tal i com s'ha comentat anteriorment amb el cas de les diarilamines, inicialment el protocol utilitzat es basava en la reacció d'acoblament de Ullmann (Esquema 36),^{111,114} el qual implicava

¹³⁵ E. S. Tan, M. Miyakawa, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, T. S. Scanlan. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2787-2798

¹³⁶ K. C. Nicolau, C. N. C. Boddy, S. Brase, N. Winssinger. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2097-2152

¹³⁷ F. Bedos-Belval, A. Rouch, C. Vanucci-Bacqué, M. Baltas. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1356-1372

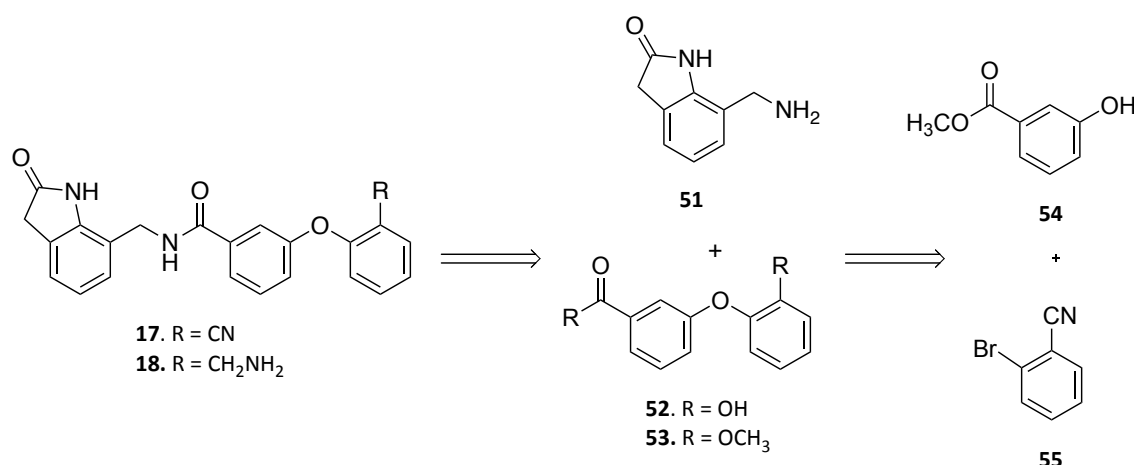
l'ús de quantitats estequiomètriques de coure o salts de coure, temperatures elevades i temps de reacció llargs. Atès l'interès creixent en processos més sostenibles, es va anar substituint aquesta metodologia per l'ús de quantitats catalítiques de metalls de transició en presència de lligands¹³⁸ o per eliminació de l'ús de catalitzadors.¹³⁹

Al nostre grup de recerca s'han dut a terme diferents assajos descrits a la literatura per a la síntesi de compostos amb l'esquelet de diarilèter. El nostre objectiu era sintetitzar diarilèters substituïts en *meta* però la majoria d'articles tracten la síntesi de diarilèters substituïts en *para*. La manca d'èxit en l'obtenció dels compostos desitjats ens va portar a plantejar la necessitat de desenvolupar una nova metodologia. Després de diversos assajos amb diferents derivats fenòlics i halurs d'aril sota diferents condicions, es va posar a punt la síntesi de derivats *O*-arilats mitjançant CuBr com a catalitzador i ACHN com a lligand, Cs₂CO₃ com a base, en el si de DMF.¹⁴⁰

3.1.3.1 Preparació de la 3-(2-cianofenoxi)-*N*-((2-oxoindolin-7-il)metil)benzamida (**17**) i de la 3-(2-(aminometil)fenoxi)-*N*-((2-oxoindolin-7-il)metil)benzamida (**18**)

3.1.3.1.1 Anàlisi retrosintètica dels compostos **17** i **18**

A continuació s'exposa l'anàlisi retrosintètica per als compostos **17** i **18** a partir del 2-bromobenzonitril (**55**) i del 3-hidroxi-benzoat de metil (**54**) assequibles comercialment (Esquema 50).



Esquema 50

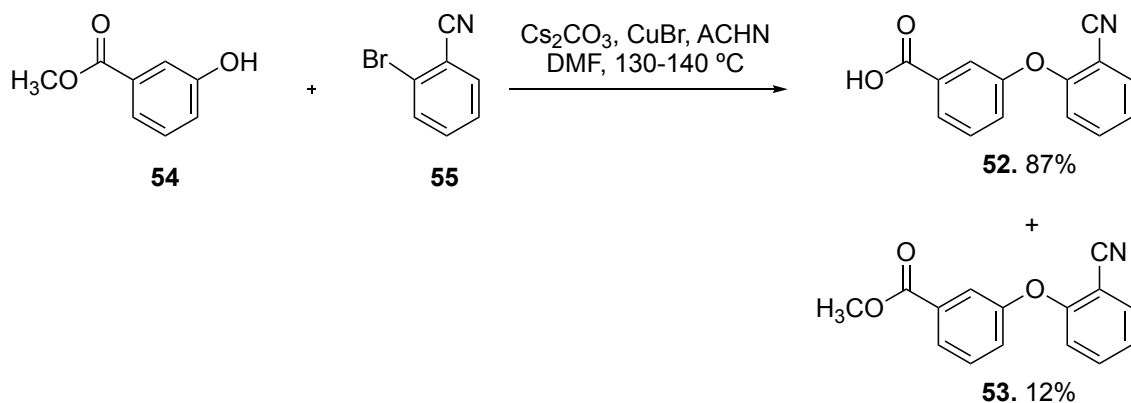
3.1.3.1.2 Preparació dels diarilèters **17** i **18**

El tractament del fenol **54** amb el 2-bromobenzonitril (**55**) seguint les condicions exposades anteriorment per a l'obtenció de diarilèters ens va conduir a una mescla de l'àcid carboxílic **52** i l'èster metílic **53** (Esquema 51).

¹³⁸ D. Maiti, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1791-1794

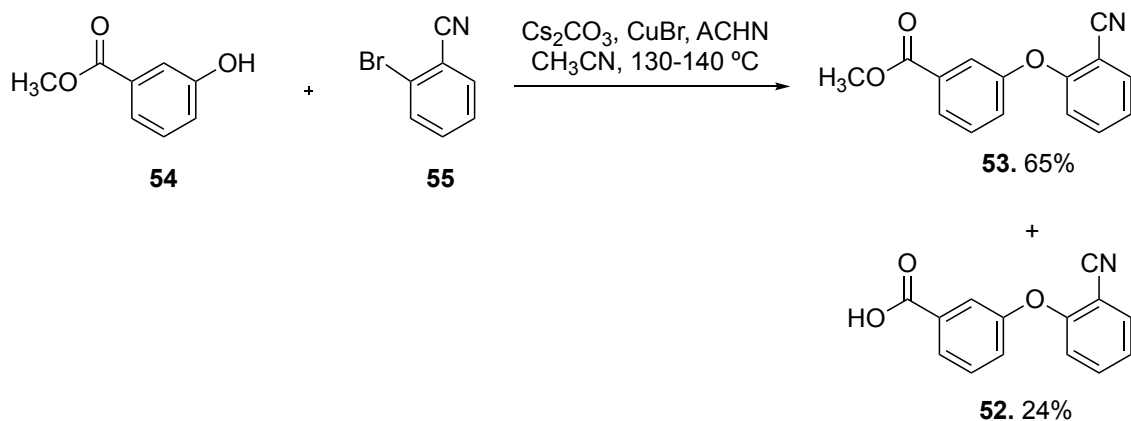
¹³⁹ H. Xu, Y. Chen. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 2411-2420

¹⁴⁰ L. Navarro, M. D. Pujol. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1812-1815



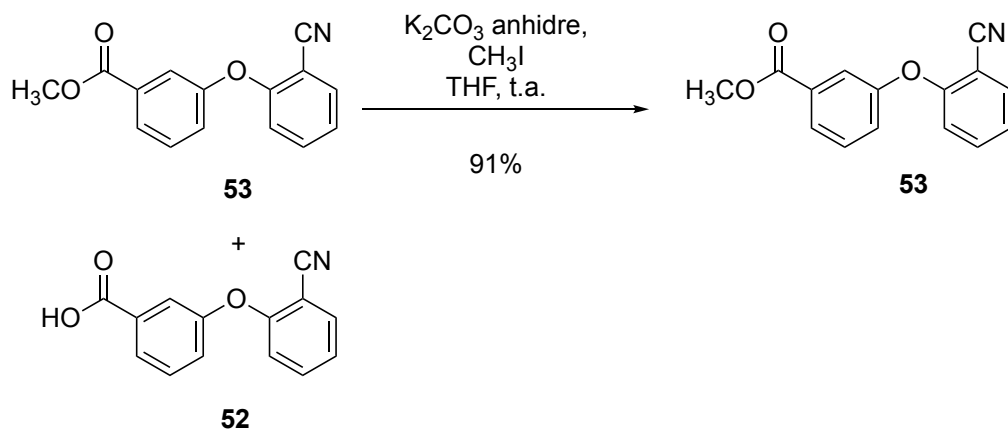
Esquema 51

Es va assajar la reacció d'acoblament anterior en les mateixes condicions variant el dissolvent. Així, en el cas en que es va emprar DMF es va obtenir una mescla d'àcid/èster amb rendiments del 87% i 12%, respectivament, mentre que la utilització d'acetonitril condueix a una barreja on predomina majoritàriament l'èster respecte l'àcid (rendiments del 65% i 24%, respectivament) (Esquema 52).



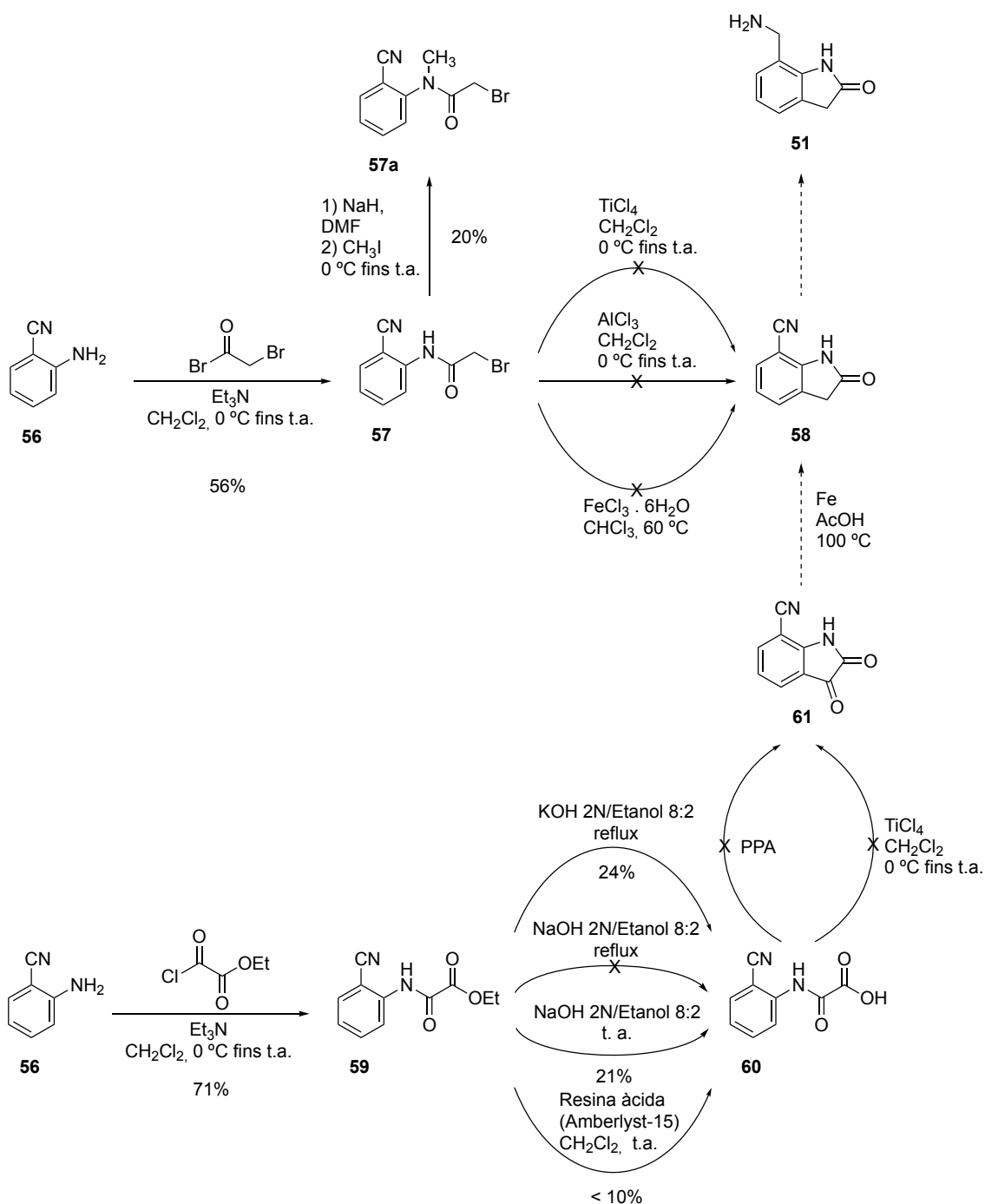
Esquema 52

A continuació, la barreja de l'àcid carboxílic **52** i el corresponent èster metílic **53** es tracta amb K_2CO_3 i iodur de metil per tal d'obtenir exclusivament l'èster **53**, obtenint-se aquest darrer amb un rendiment del 91% (Esquema 53).



Esquema 53

Per altra banda es va considerar la preparació de l'amina **51** (Esquema 54).



Esquema 54

En primer lloc, es va assajar l'acilació de la 2-cianoanilina **56** amb el bromur de 2-bromoacetil, en el si de diclorometà i en presència de trietilamina que va conduir a **57** amb un rendiment del 56%. A continuació, es va dur a terme la ciclació intramolecular emprant diferents condicions d'alquilació de nuclis benzènics i diferents àcids de Lewis (TiCl_4 , AlCl_3 i FeCl_3) però en cap cas es va detectar el compost **58** esperat ja que el producte **57** s'hidrolitzava donant lloc al producte de partida **56**. Per tal d'intentar evitar la hidròlisi del producte **57**, es va dur a terme una *N*-metilació mitjançant hidrur de sodi i iodur de metil, en el si de DMF. La reacció va permetre obtenir el producte **57a** amb un 20% de

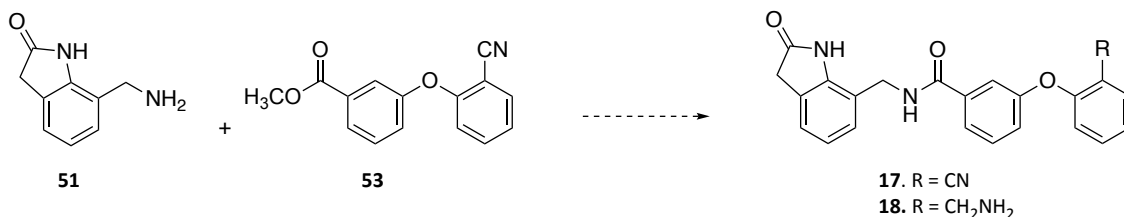
rendiment, però a causa del baix rendiment obtingut en una etapa tan inicial ens va portar a abandonar aquesta via.

En vista dels resultats anteriors i com alternativa es va dur a terme l'acilació de l'anilina **56** amb el monoclòrid de l'èster de l'àcid oxàlic en condicions clàssiques i es va obtenir **59** amb un 71% de rendiment. A continuació, es va realitzar la hidròlisi de l'èster **59**. En un primer moment, es va emprar KOH en medi etanol-aigua, a temperatura de reflux durant 1 hora i es va obtenir l'àcid carboxílic **60** amb un rendiment baix. Posteriorment, es va considerar utilitzar NaOH a les mateixes condicions però reduint a la meitat el temps de reacció i no es va obtenir el producte desitjat ja que s'obtenia majoritàriament el producte de partida **56**. Per tal de suavitzar les condicions, es va realitzar un assaig amb NaOH/etanol a temperatura ambient i s'obtingué el producte desitjat però amb un rendiment baix. Finalment, es va utilitzar la resina iònica àcida (Amberlyst-15) però els resultats foren negatius i no van permetre accedir a l'àcid esperat **60**.

L'àcid obtingut **60** es va tractar amb diferents condicions per tal d'accedir al derivat indòlic **61** però cap d'aquests tractaments (TiCl₄ i PPA (àcid fosfòric)) varen permetre la ciclació intramolecular que conduïa a **61**.

Tant en aquest cas com en l'anterior, la falta de reactivitat es pot deure a la presència del substituent nitril disposat en *orto* de la cadena lateral que desactiva la possible reacció de S_EAr desitjada en aquest cas.

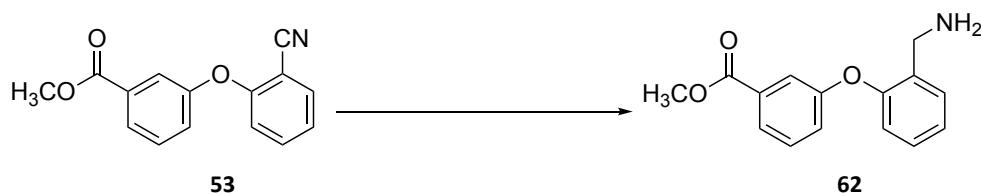
Al no poder accedir a la indolinona **61**, no es va poder realitzar la síntesi de **17** i **18** (Esquema 55).



Esquema 55

La poca o escassa reactivitat d'aquests derivats que presenten substituents nitril en *orto* així com la relativament poca bibliografia existent d'estructures relacionades ens van portar a considerar altres transformacions com la reducció d'aquest grup nitril a l'amina corresponent. Es varen assajar diferents condicions emprant diferents catalitzadors (Pd-C 10%, Ni-Raney, PtO₂) i diferents àcids (àcid clorhídric, àcid acètic). Els resultats obtinguts es recullen a la taula següent (Taula 11):

Taula 11. Resultats de la reactivitat del compost **53** sota diferents condicions



Catalitzador	Àcid/Base	Pressió	Rendiments
Pd-C 10%	HCl conc.	Atmosfèrica	-

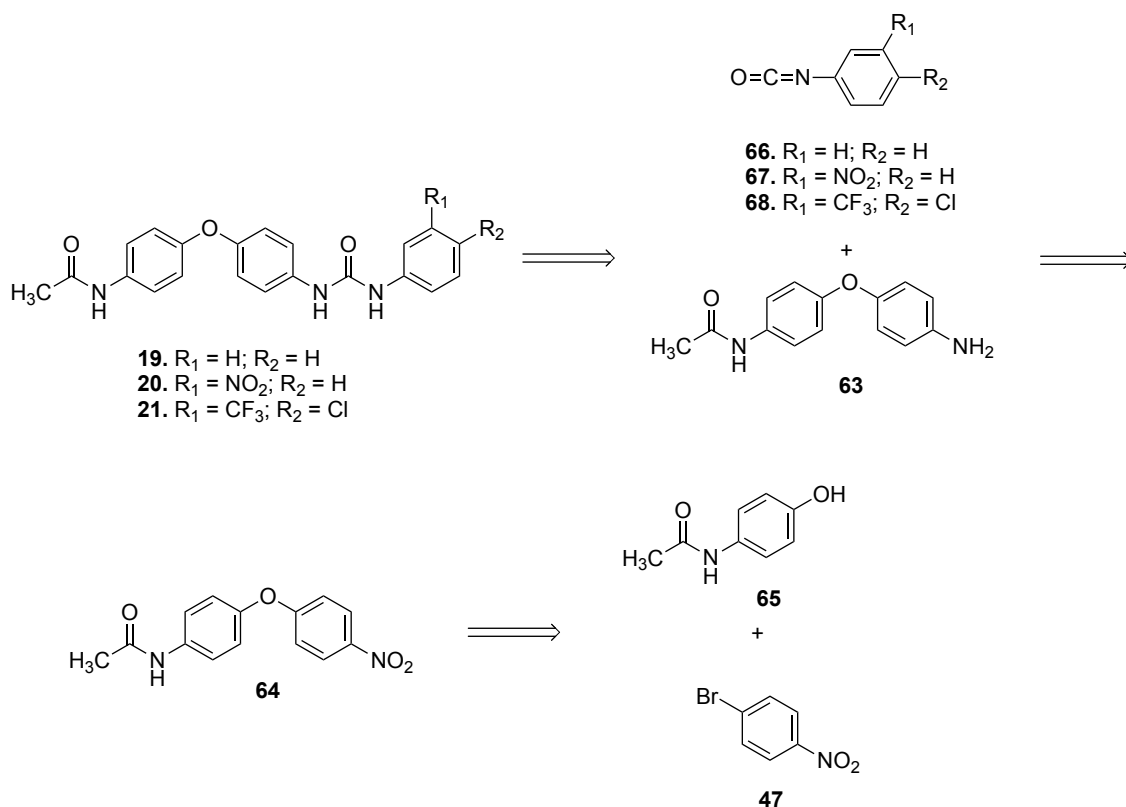
Pd-C 10%	CH ₃ COOH	Atmosfèrica	-
Pd-C 10%	CF ₃ COOH	Atmosfèrica	-
Pd-C 10%	CF ₃ COOH	250 psi	-
Ni-Raney	HCl conc.	Atmosfèrica	-
Ni-Raney	CH ₃ COOH	Atmosfèrica	-
Ni-Raney	NH ₄ OH	Atmosfèrica	-
PtO ₂	HCl conc.	Atmosfèrica	-
PtO ₂	CH ₃ COOH	Atmosfèrica	16%

Els resultats obtinguts confirmen l'escassa reactivitat constatada per aquestes estructures atès que només es va obtenir l'amina **62** desitjada amb un 16% de rendiment a l'emprar PtO₂ com a catalitzador i gotes d'àcid acètic.

3.1.3.2 Preparació de la *N*-(4-(4-(3-fenilureido)fenoxi)fenil)acetamida (**19**), la *N*-(4-(4-(3-(3-nitrofenil)ureido)fenoxi)fenil)acetamida (**20**) i la *N*-(4-(4-(3-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)ureido)fenoxi)fenil)acetamida (**21**) i el 4-(4-(3-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)ureido)fenoxi)benzoat de metil (**22**)

3.1.3.2.1 Anàlisi retrosintètica de les urees **19-21**

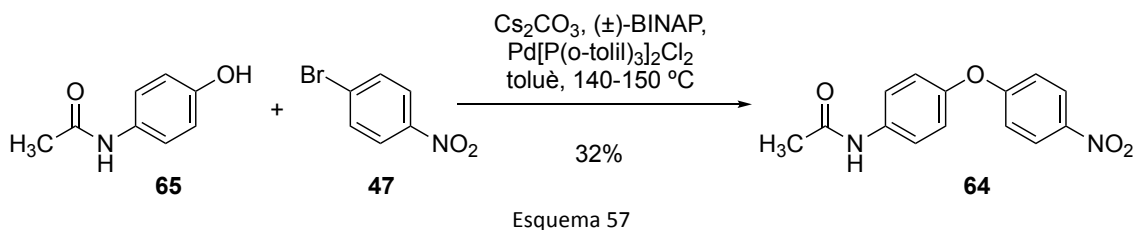
L'anàlisi retrosintètica proposada per a la preparació de les diarilurees **19-21** s'indica a continuació (Esquema 56):



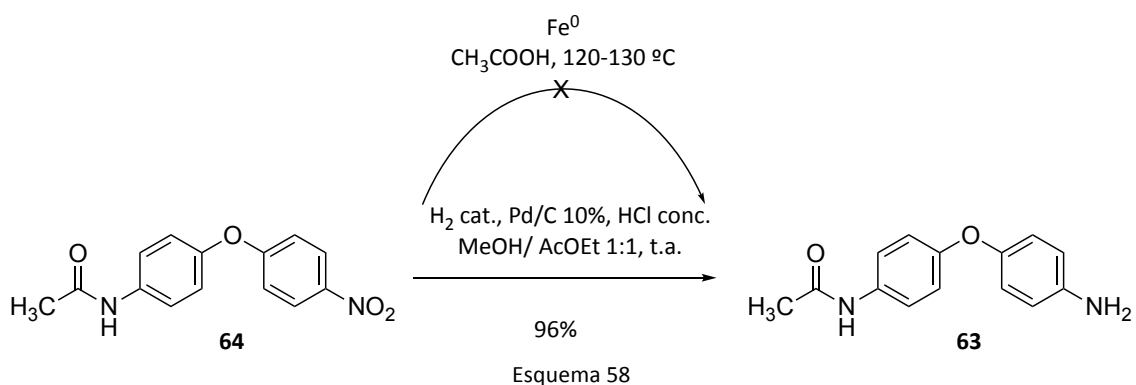
Esquema 56

3.1.3.2.2 Preparació de les urees 19-21

En primer lloc, es va dur a terme la preparació del diarilèter **64** per tractament del 4-bromonitrobenzè (**47**) amb el 4-acetamidofenol (**65**) emprant condicions posades a punt prèviament pel nostre grup de recerca per a la formació de diarilèters substituïts en posició *para* (Esquema 57). Comparant amb treballs anteriors del grup¹⁴¹ s'arriba a la conclusió que la preparació de diarilèters proporciona millors resultats obtenint rendiments més elevats.

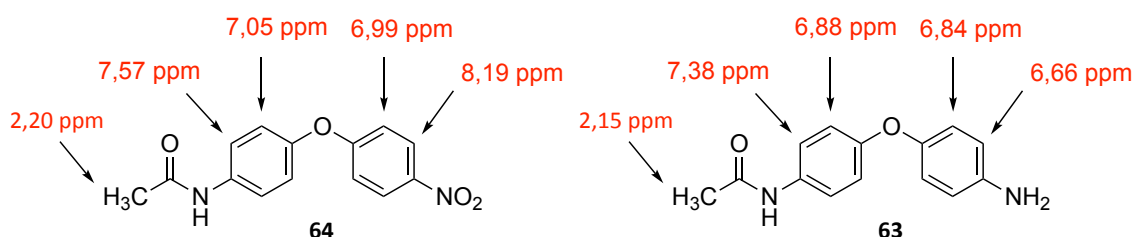


En les condicions esmentades s'obté **64** amb un 32% de rendiment. Tot seguit, es procedeix a la reducció quimiosselectiva del grup nitro a l'amina corresponent **63** (Esquema 58).



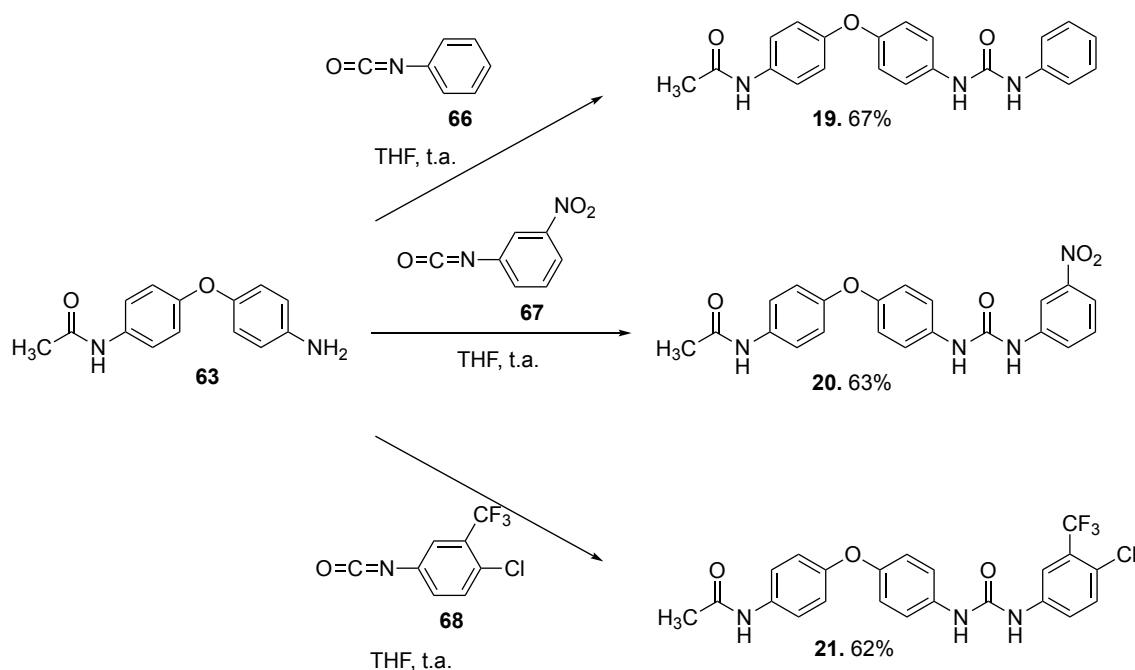
En un primer moment es va assajar la reducció de **64** utilitzant Fe^0 i àcid acètic en diferents condicions però cap d'elles va permetre accedir a l'anilina **63** esperada. Per aquest motiu, posteriorment es va realitzar la reducció de **64** mitjançant hidrogenació catalítica emprant Pd-C 10% com a catalitzador en presència d'àcid clorhídric, obtenint així el producte esperat **63** amb un 96% de rendiment (Esquema 58).

L'assignació dels senyals de l'espectre d'RMN de protó dels diferents protons de l'amida **64** i de l'anilina **63** permeten confirmar les estructures proposades per a aquests compostos (Figura 46).



¹⁴¹ Grup de recerca M. D. Pujol. Resultats no publicats

L'anilina **63** obtinguda anteriorment es va addicionar als isocianats **66**, **67** i **68** seguint les condicions descrites anteriorment en aquesta memòria. Els rendiments obtinguts en la síntesi de **19**, **20** i **21** van ésser del 67%, 63% i 62%, respectivament (Esquema 59).



Esquema 59

L'assignació dels senyals d'RMN dels diferents protons de les urees **19-21** que apareixen en els espectres obtinguts per a aquests compostos es distingeixen clarament en la part dels anells aromàtics provinents dels diferents isocianats, tal i com es mostra en la figura següent (Figura 47).

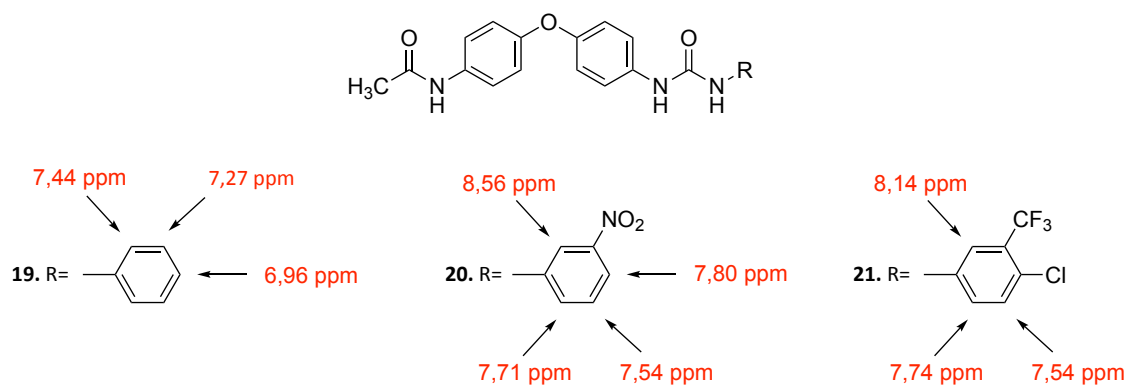
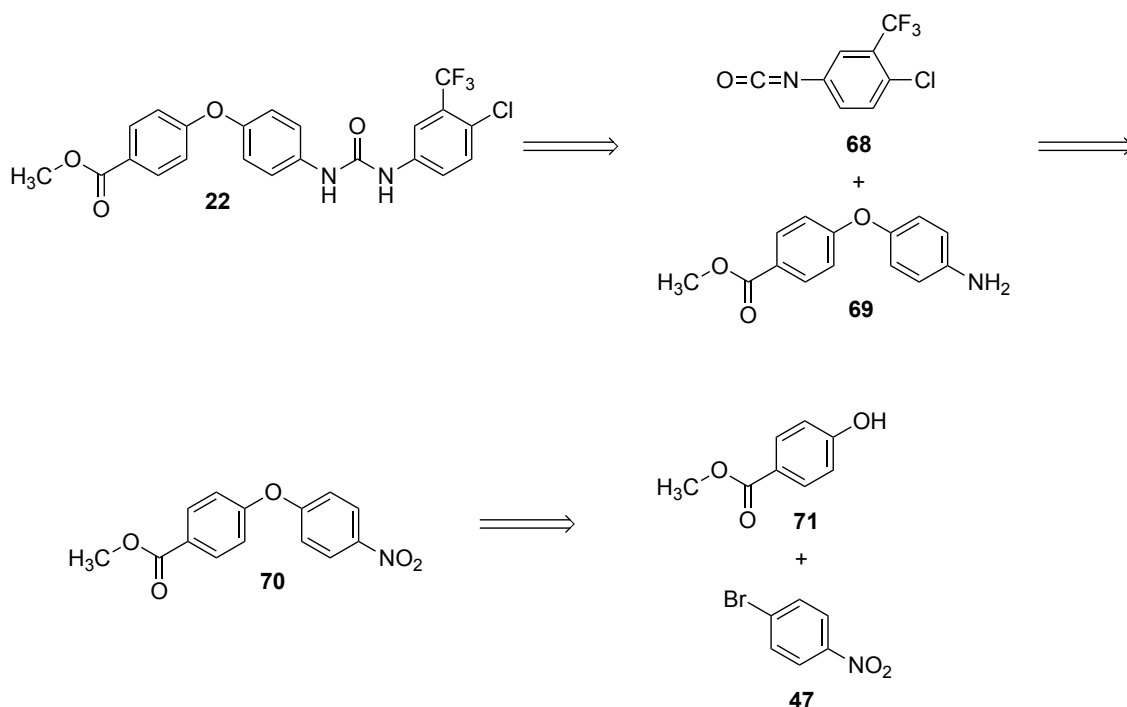


Figura 47. Dades de l'espectre d'RMN-¹H dels compostos **19-21**

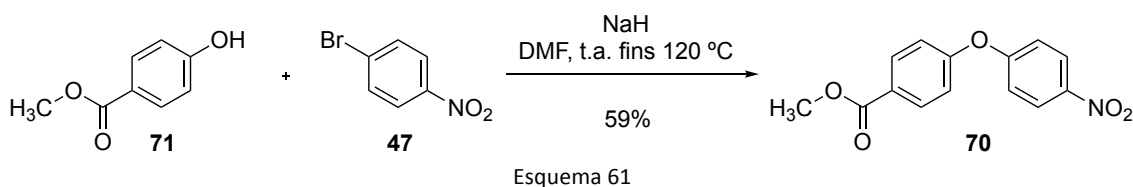
3.1.3.2.3 Anàlisi retrosintètica de la urea **22**

Per a la preparació de la urea **22** es va plantejar la següent ruta de retrosíntesi (Esquema 60).

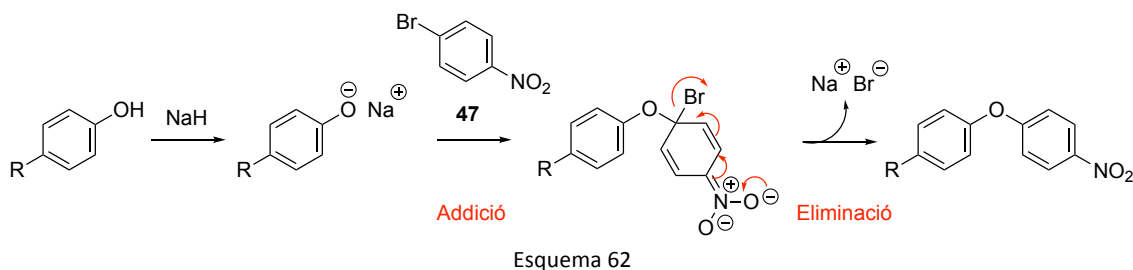


3.1.3.2.4 Preparació de la urea **22**

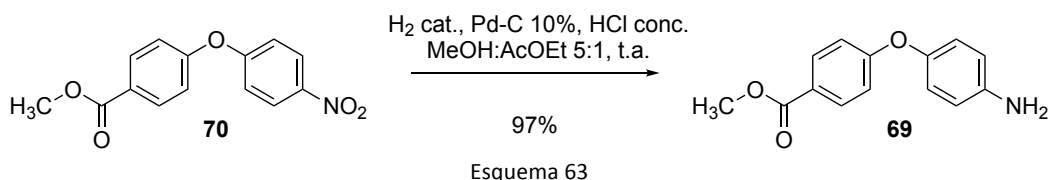
En primer lloc es va realitzar el tractament del fenol **71** amb el 4-bromonitrobenzè (**47**) emprant NaH com a base, en el si de DMF, sota les condicions que van permetre aïllar el nitroderivat **70** amb un rendiment del 59% (Esquema 61).



Un mecanisme possible per a la formació del diarilèter **70** s'indica a continuació (Esquema 62). Es tracta d'una substitució nucleòfila aromàtica (S_NAr) mitjançant dues etapes: addició del nucleòfil a la posició 4 del 4-bromonitrobenzè (**47**) seguida de l'eliminació del brom en aquest cas.



A continuació, es va procedir a la reducció del nitroderivat **70** mitjançant una hidrogenació catalítica emprant Pd-C 10% com a catalitzador en medi àcid. En aquestes condicions es va aïllar l'anilina esperada **69** amb un 97% de rendiment (Esquema 63).



Els senyals de l'espectre d'RMN assignats als diferents protons del nitroderivat **70** i de l'anilina **69** permeten confirmar les estructures proposades per aquests compostos (Figura 48).

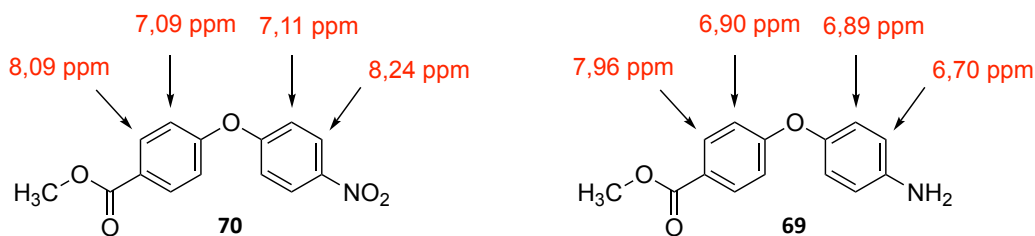
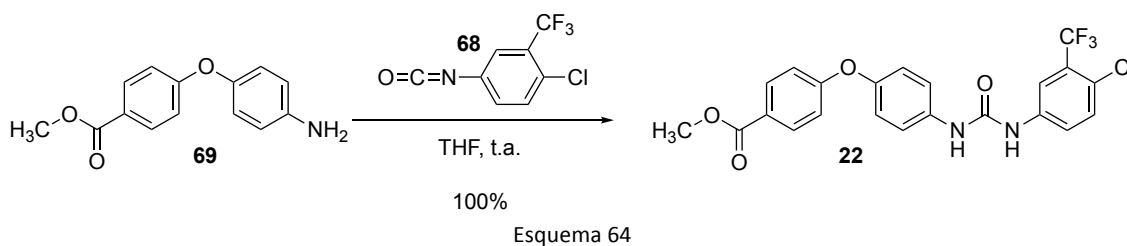


Figura 48. Dades de l'espectre d'RMN-¹H dels compostos **70** i **69**

Per últim, l'anilina **69** es va tractar amb l'isocianat **68** seguint les condicions descrites anteriorment per a la preparació de diarilurees. En aquestes condicions es va obtenir la urea **22** amb un 100% de rendiment (Esquema 64).



Les dades d'RMN de protó permeten confirmar l'estructura proposada per a la urea **22** (Figura 49).

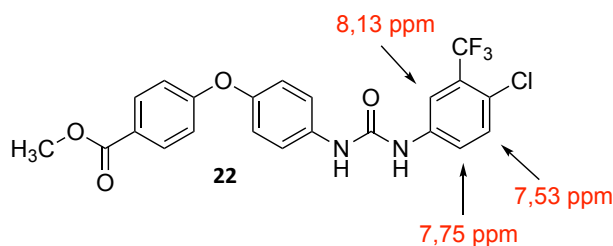
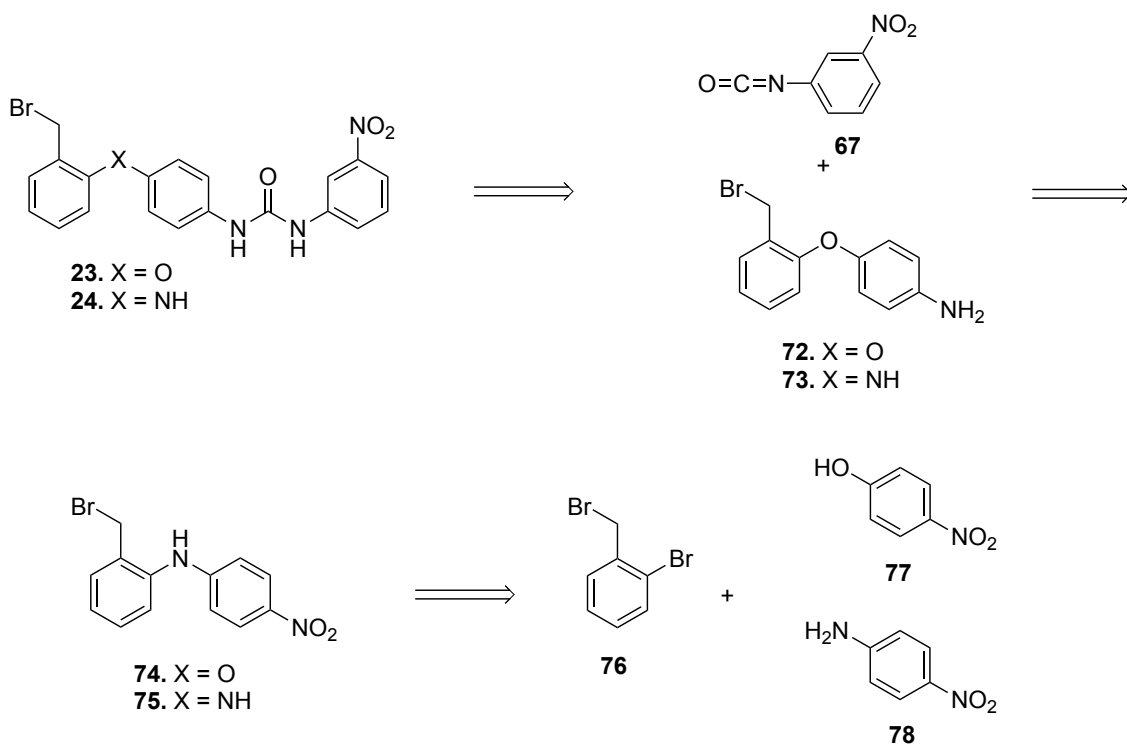


Figura 49. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost **22**

3.1.3.3 Preparació de la 1-(4-(2-(bromometil)fenoxi)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea (**23**) i 1-(4-((2-(bromometil)fenil)amino)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea (**24**)

3.1.3.3.1 Anàlisi retrosintètica dels compostos **23** i **24**

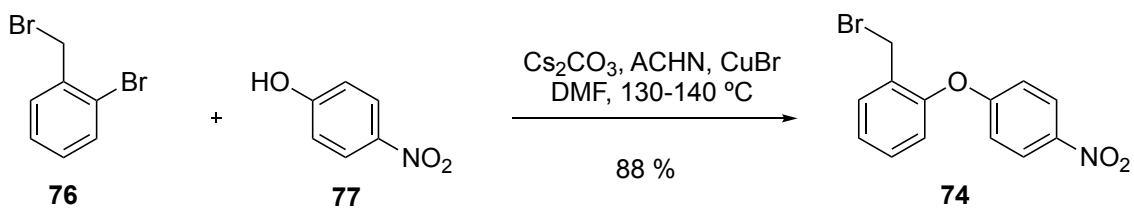
Per a la preparació de les urees **23** i **24** es va plantejar la següent anàlisi retrosintètica (Esquema 65).



Esquema 65

3.1.3.3.2 Preparació dels compostos **23** i **24**

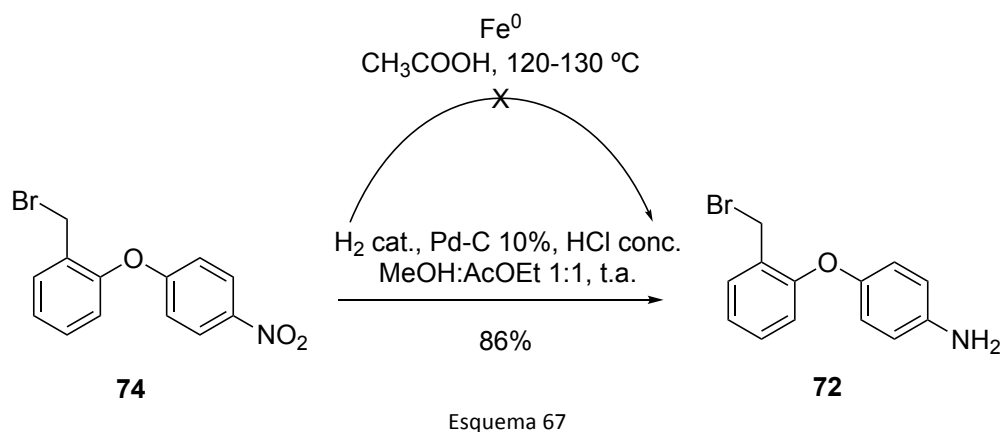
Seguint el procediment de la reacció d'acoblament creuat que s'ha esmentat anteriorment en aquest treball, es va preparar el diarilèter **74** amb un 88% de rendiment (Esquema 66).



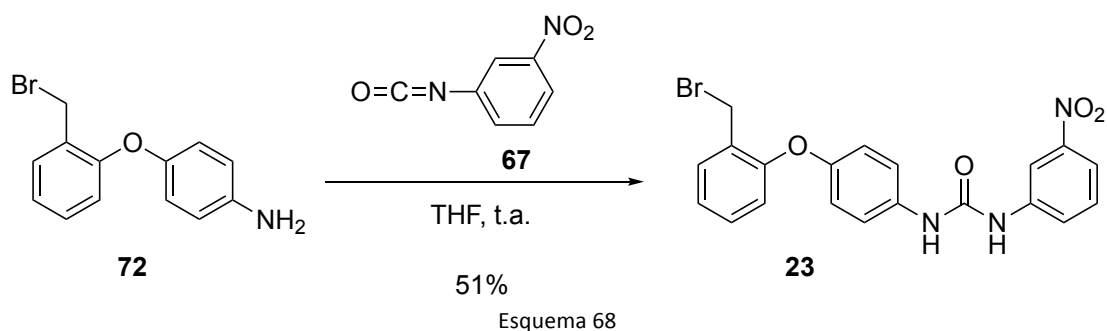
Esquema 66

Cal indicar que en les condicions emprades no es va detectar el producte provinent de l'alquilació, només es va obtenir el diarilèter esperat **74**.

A continuació, es va optar per la reducció del grup nitro amb Fe⁰ i àcid acètic però a les condicions assajades no es va obtenir l'anilina esperada **72**. Per aquest motiu, es va dur a terme una hidrogenació catalítica de **74**, en el si de metanol:acetat d'etil 1:1, emprant Pd-C 10% com a catalitzador, en presència d'àcid clorhídric, la qual va permetre l'obtenció i aïllament de l'anilina **72** amb un 86% de rendiment (Esquema 67).



Per a la preparació de la urea **23** es va optar per seguir la metodologia emprada anteriorment per a la preparació d'altres urees d'aquest treball. Així, el tractament de l'anilina **72** amb el *m*-nitrofenilisocianat **67**, en el si de THF, condueix a la urea **23** amb un 51% de rendiment (Esquema 68).



A l'espectre d'RMN de protó de la urea **23** s'observen els següents senyals que assignats als corresponents protons i conjuntament amb altres proves analítiques, permeten confirmar l'estructura proposada per al compost **23** (Figura 50).

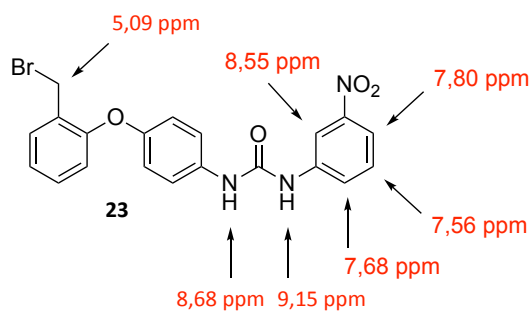
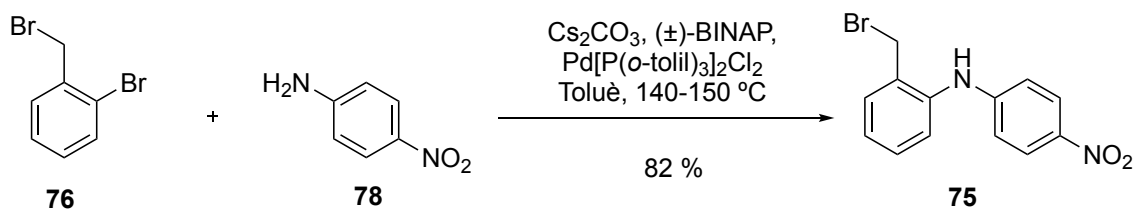


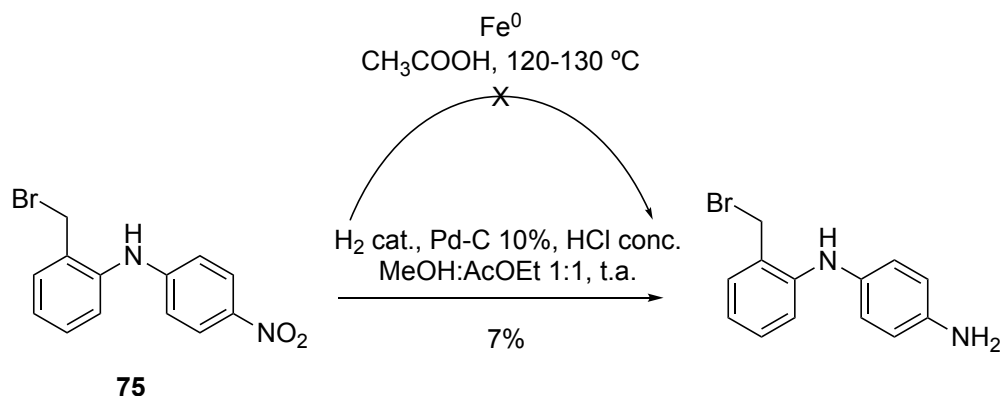
Figura 50. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost **23**

Per una altra banda, es va abordar la preparació de la diarilamina **75** mitjançant el tractament de **76** amb la *p*-nitroanilina (**78**) aplicant les condicions de la reacció d'acoblament creuat esmentades anteriorment, obtenint un 82% de rendiment (Esquema 69).



Esquema 69

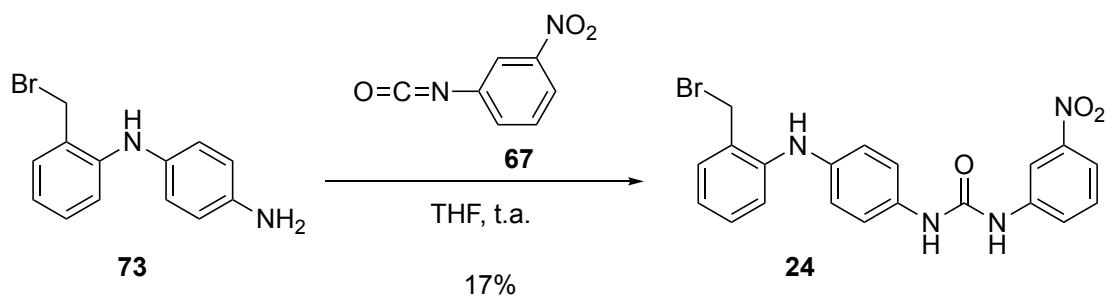
Posteriorment, la reducció del nitroderivat **75** mitjançant hidrogenació catalítica emprant Pd-C 10% com a catalitzador ens permet accedir a l'anilina **73** amb un 7% de rendiment (Esquema 70).



Esquema 70

Cal indicar que en aquest cas tampoc es va aconseguir reduir el grup nitro mitjançant Fe^0 i àcid acètic.

L'anilina **73** es va tractar amb el 3-nitrofenilisocianat (**67**), en el si de THF, a temperatura ambient i així es va obtenir la urea esperada **24** amb un 17% de rendiment (Esquema 71).



Esquema 71

Els senyals que apareixen a l'espectre d'RMN de protó com són el singlet a 4,37 ppm atribuïble al metilè benzílic i els pics a 7,39 ppm (t), 7,57 ppm (d), 7,77 (m) i 8,2 ppm (d) assignables als protons de les posicions 5'', 6'', 4'' i 2'', respectivament, ens permeten confirmar l'estructura proposada per a la urea **24** (Figura 51).

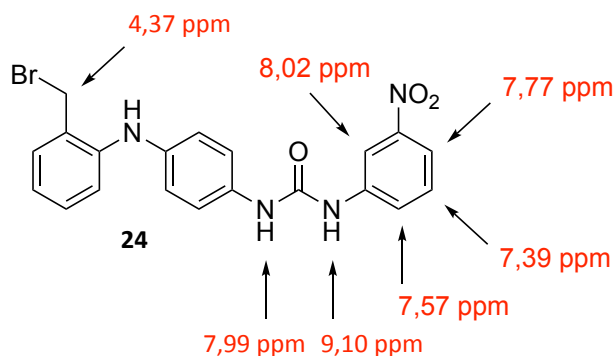
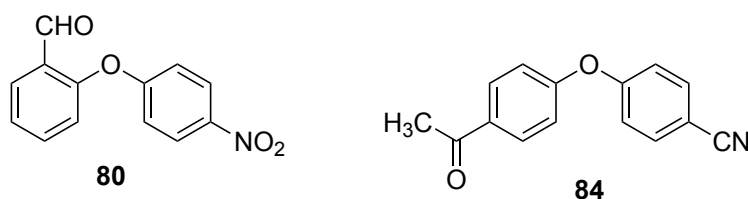


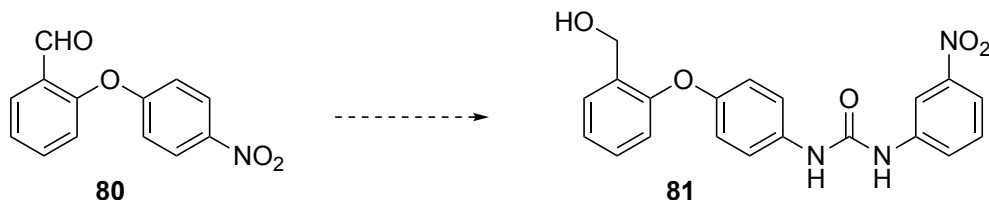
Figura 51. Dades de l'espectre d'RMN-¹H del compost **24**

En un principi es pretenia dur a terme la preparació d'altres urees que continguessin el nucli de diarilèters substituïts en *orto* o bé en *para*. D'aquesta manera, es va realitzar la preparació de dels diarilèters **80** i **84** (Esquema 72).



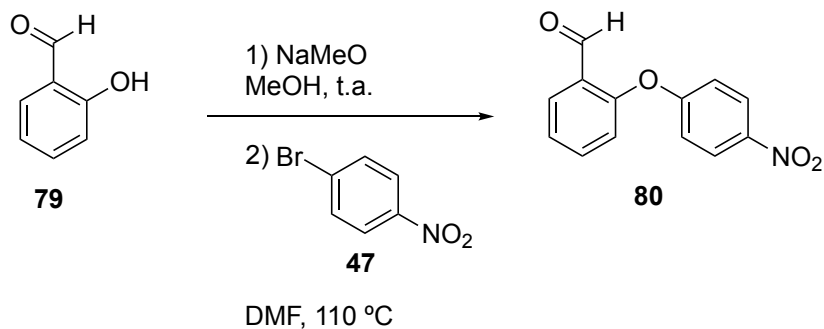
Esquema 72

Per un costat, amb **80** es pretenia arribar a la urea **81** que es pot considerar un anàleg estructural de **23** on el grup de bromometil s'hauria canviat per un grup d'hidroximetil (Esquema 73).



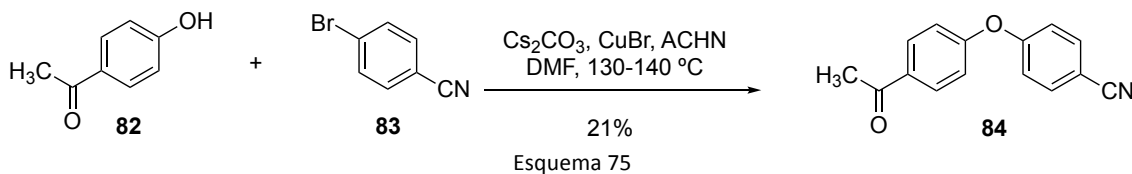
Esquema 73

Per a la síntesi es varen dur a terme diferents assajos en diferents condicions i utilitzant el tractament del 2-hidroxibenzaldehyd (**79**) amb el 4-bromonitrobenzè (**47**) en presència de metòxid sòdic, el qual va permetre obtenir **80** amb només un 11% de rendiment (Esquema 74). El baix rendiment i les dificultats per optimitzar la síntesi varen conduir a abandonar aquesta ruta sintètica.

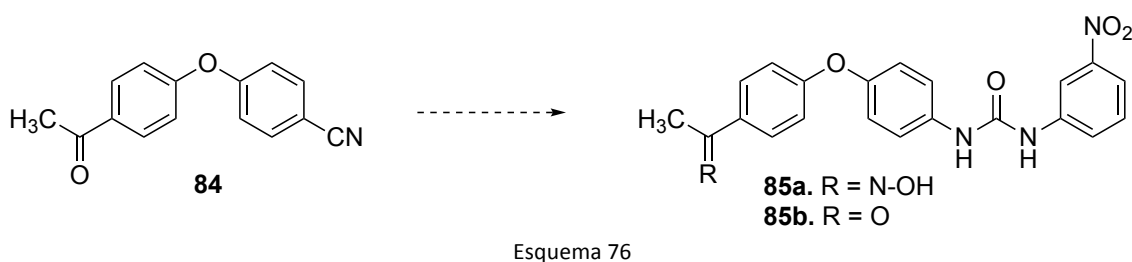


11%
Esquema 74

En paral·lel es varen realitzar diferents assajos per a la preparació del diarilèter **84** a partir del 4-bromobenzonitril (**83**) i de la 4-hidroxiacetofenona (**82**). En aquest cas les condicions que varen permetre la preparació de diarilèters (Cs₂CO₃, CuBr, ACHN, DMF). En totes les condicions assajades el rendiment obtingut no superà el 21% (Esquema 75).



El diarilèter **84** constitueix un intermediari clau per a la preparació de la urea **85** que ens havíem proposat en un principi (Esquema 76). En aquest cas, igual que en el cas anterior, es va abandonar la ruta sintètica, a causa de les dificultats trobades en la seva síntesi.



Les urees **81** i **85** proposades ens havien de proporcionar informació respecte a la importància del substituent en *orto* o en *para* de la funció èter tant respecte a la lipofilia, hidrofília com sobre factors electrònics.

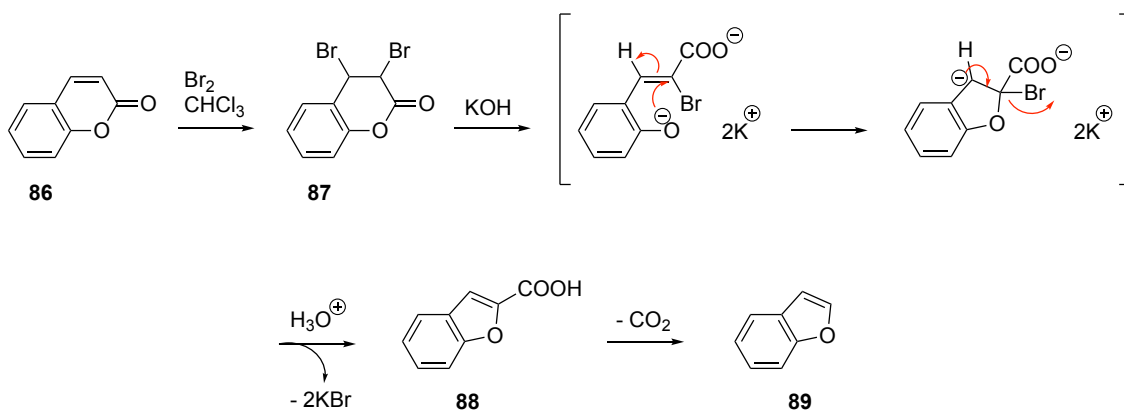
3.1.3.4 Preparació dels compostos (1-(4-(benzofuran-2-ilamino)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea) **25** i *N*-(4-nitrofenil)benzofuran-2-amina (**26**)

El nucli de benzofuran forma part d'un gran nombre d'estructures amb activitat biològica i, a més a més, és de gran interès com a intermediari per a la preparació d'estructures més complexes d'interès industrial.¹⁴²

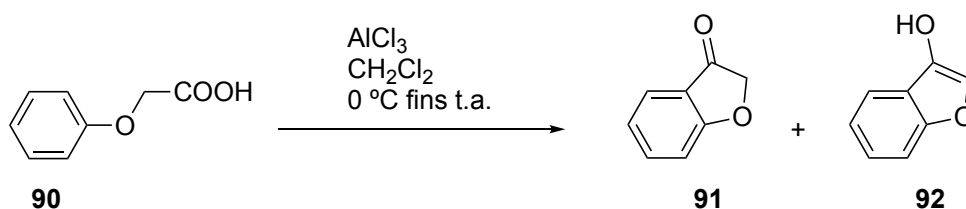
Una síntesi clàssica de benzofurans consisteix en la bromació de la cumarina (**86**) o bé d'un derivat d'aquesta, seguida del tractament del dibromur resultant **87** amb una base i una posterior descarboxilació de l'àcid resultant **88**.¹⁴³ A continuació, es proposa un possible mecanisme per a aquest procés (Esquema 77):

¹⁴² A. R. Katritzky, C. W. Rees. Eds. Pergamon Press: Oxford **1984**, 4, 89-153

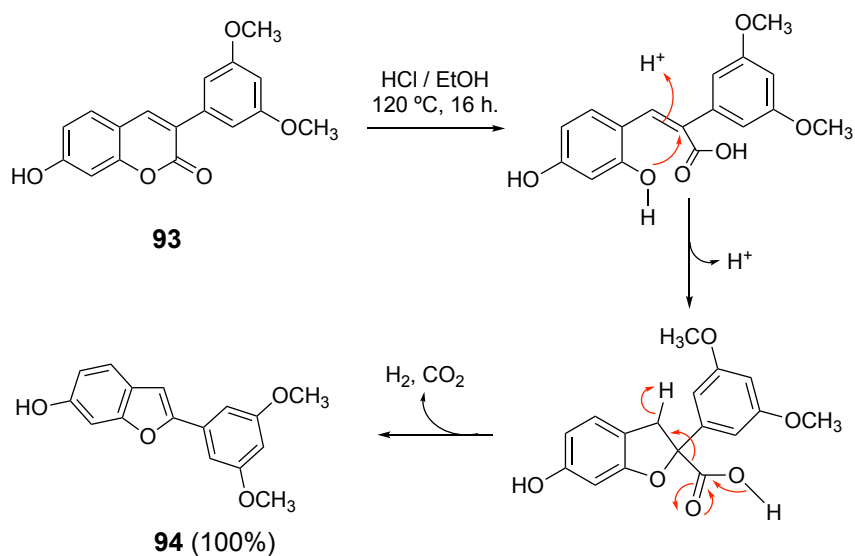
¹⁴³ R. C. Fuson, J. W. Keisley, E. W. Kaiser. *Org. Syn.* **1955**, 3, 209



Una altra alternativa per a la preparació de benzofurans consisteix en la ciclació intramolecular de compostos que presenten una cadena d' α -fenoxicarbonílic en condicions de Friedel-Crafts, tal com s'indica a continuació (Esquema 78):¹⁴⁴



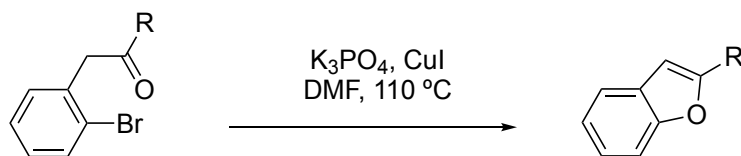
A la tesi de la Dra. Laura Grau es descriu la preparació de benzofurans a partir de la cumarina **93**. En medi àcid, la cumarina s'hidrolitza al corresponent hidroxi-àcid i posteriorment es produeix la ciclació intramolecular per donar lloc al benzofuran esperat **94** (Esquema 79).¹⁴⁵



¹⁴⁴ L. Higginbotham, H. Stephen. *J. Chem. Soc.* **1920**, 117, 1534-1542

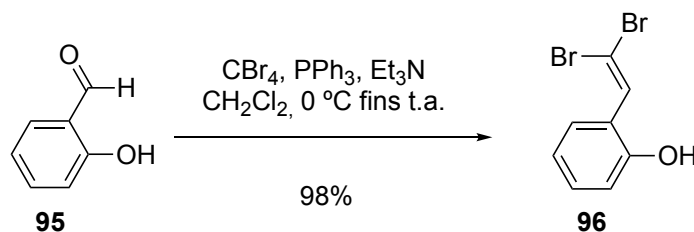
¹⁴⁵ L. Grau. Disseny, síntesi i avaluació biològica de nous compostos potencialment antitumorals per inhibició enzimàtica. *Tesi Doctoral* **2017**. Universitat de Barcelona

Al 2005, Chen i col. van descriure la preparació de benzofurans diferentment substituïts per ciclació intramolecular de 2-bromofenilcetones en presència de CuI, K₃PO₄ i DMF a 110 °C (Esquema 80).¹⁴⁶



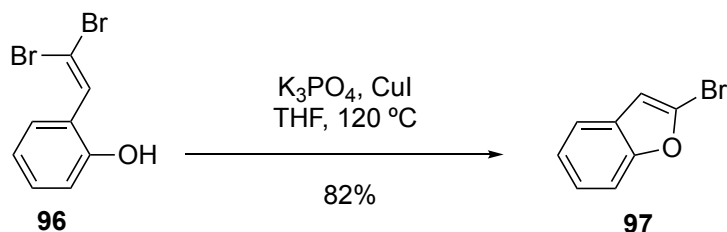
Esquema 80

En el nostre cas es va considerar la possibilitat de preparar el dibromoalquè **96** a partir del 2-hidroxibenzaldehyd (**95**) per tractament amb CBr₄ i PPh₃ en presència de trietilamina i en el si de diclorometà (Esquema 81).¹⁴⁷



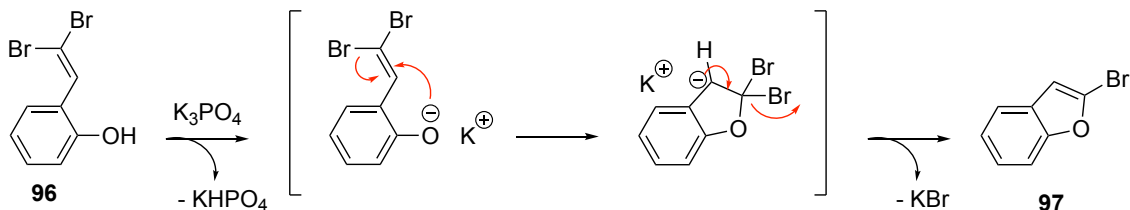
Esquema 81

En aquestes condicions es va obtenir el dibromat **96** amb un 98% de rendiment. Posteriorment, es va dur a terme la ciclació intramolecular de **96** emprant CuI i K₃PO₄, en el si de THF, a 120 °C. En aquestes condicions s'obté el 2-bromobenzofuran **97** amb un 82% de rendiment (Esquema 82).



Esquema 82

A continuació s'indica un possible mecanisme per a la ciclació intramolecular de **96** a **97** s'indica (Esquema 83):



Esquema 83

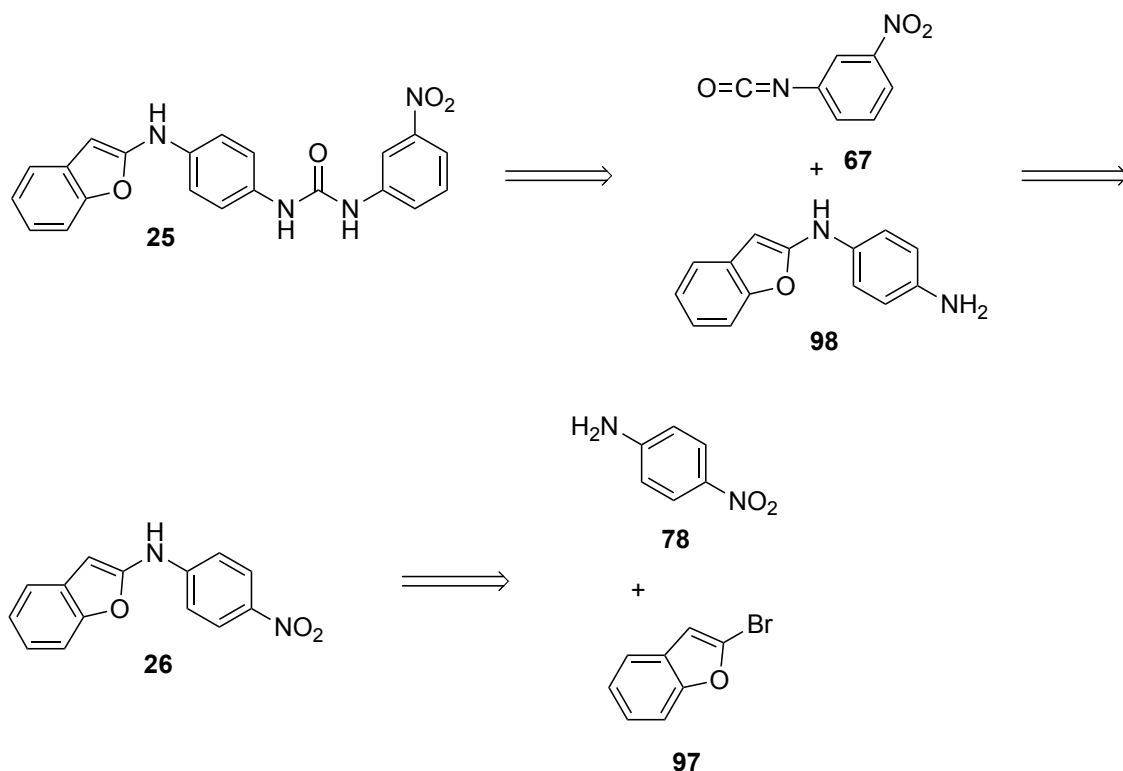
Una vegada posat a punt un procediment per a la preparació del 2-bromobenzofuran **97** es va proposar la preparació de la urea **25** (Esquema 84).

¹⁴⁶ C. Chen, P. G. Dormer. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6964-6967

¹⁴⁷ D. H. Huh, J. S. Jeong, H. B. Lee, H. Ryu, Y. G. Kim. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9925-9932

3.1.3.4.1 Anàlisi retrosintètica de la urea **25** i el nitroderivat **26**

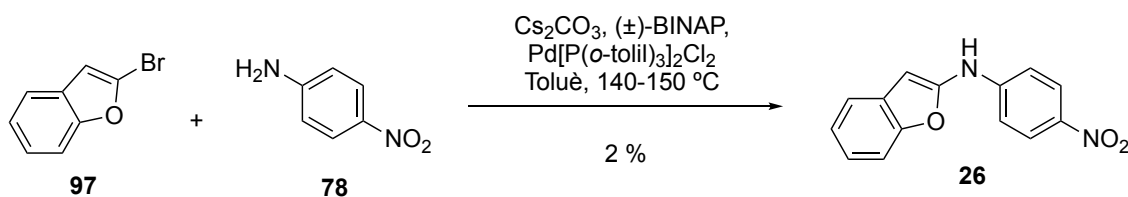
Es pretenia obtenir els compostos **25** i **26** a partir de la 4-nitroanilina (**78**) (assequible comercialment) i el 2-bromobenzofuran **97** (sintetitzat prèviament) (Esquema 84).



Esquema 84

3.1.3.4.2 Preparació de la urea **25** i el nitroderivat **26**

En primer lloc, la reacció entre el bromobenzofuran **97** i la 4-nitroanilina (**78**) en condicions de reacció d'acoblament creuat emprant $[P(o\text{-tolil})_3]_2Cl_2$ com a catalitzador, (\pm) BINAP com a lligand i Cs_2CO_3 com a base, s'obté la diarilamina **99** amb un 2% de rendiment (Esquema 85).



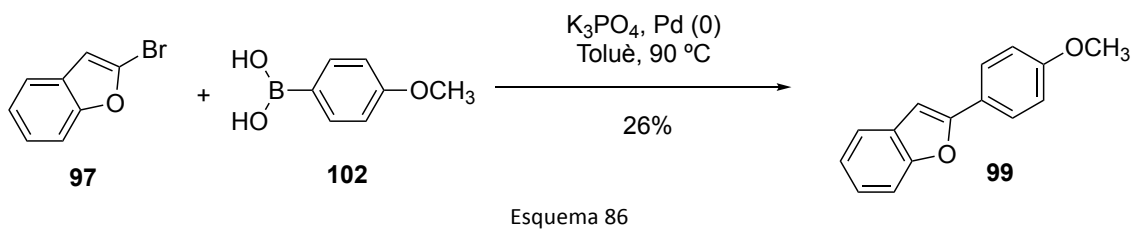
Esquema 85

Cal destacar que a la bibliografia només s'ha trobat una referència que descriu derivats amb el nucli de benzofurà i l'agrupació anilina a la posició 2.¹⁴⁸

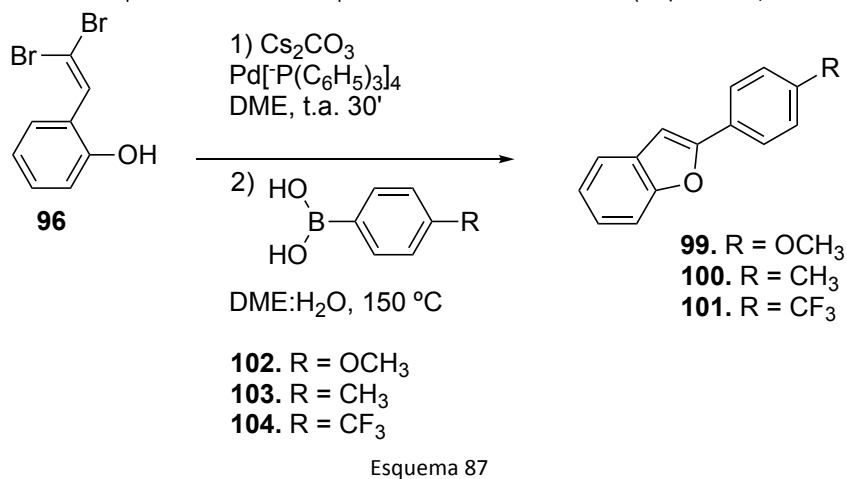
En vistes dels resultats obtinguts i de les conclusions obtingudes de la cerca bibliogràfica es va abandonar aquest ruta. La curiositat per a conèixer la reactivitat dels nuclis benzofurànics halogenats

¹⁴⁸ J. Setsune, T. Ueda, K. Shikata, K. Matsukawa, T. Iida, T. Kitao. *Tetrahedron* **1986**, 42, 2647-2656

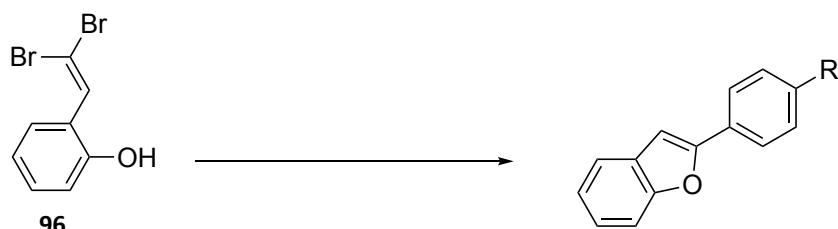
a la posició 2 ens va portar a considerar l'arilació d'aquesta posició emprant les condicions de Suzuki-Miyaura (Esquema 86).¹⁴⁹



També es va dur a terme una reacció multi-component a partir del bromoalquè **96** i Cs_2CO_3 , $\text{Pd}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$ i de la incorporació del corresponent àcid fenilborònic (Esquema 87, Taula 12).



Taula 12. Resultats de la reactivitat de **96** en diferents condicions



Compost	R	Rendiment
99	OCH ₃	33%
99	OCH ₃	18%
	mo*	
100	CH ₃	12%
101	CF ₃	5%

*mo: microones.

Malgrat haver obtingut rendiments baixos o moderats es pot considerar que els substituents donadors per ressonància com el grup -OCH₃ en el cas del compost **99** són millors per aquesta reacció que els

¹⁴⁹ V. Prieur, J. Rubio-Martínez, M. Font-Bardia, G. Guillaumet, M. D. Pujol. *European J. Org. Chem.* **2014**, 1514-1524

substituents atractius com el $-CF_3$ present en el compost **101**. També cal esmentar que la irradiació per microones en aquestes condicions no va aportar cap millora a la reacció.

3.2 Resultats biològics

Els laboratoris Eli Lilly (Indianapolis, USA) han dut a terme una avaluació biològica d'una selecció de compostos preparats durant aquesta tesi doctoral. S'ha realitzat un cribratge d'alt rendiment sobre diferents dianes biològiques atenent els interessos dels laboratoris Eli Lilly. Les diferents dianes assajades estan implicades en patologies com el càncer, malalties autoimmunitàries, neurodegeneració i dolor, patologies endocrines i cardiovasculars i malalties tropicals i oblidades. A continuació es mostren els resultats més rellevants obtinguts al llarg de la tesi doctoral. Per a alguns compostos encara no es disposa de resultats biològics d'Eli Lilly.

Cal destacar que un inici, un dels objectius principals d'aquesta tesi doctoral era avaluar els diferents compostos sintetitzats sobre la diana EZH2, sobre la qual es desenvolupaven diversos assajos en aquest laboratori. No obstant, durant el transcurs d'aquest treball, els Laboratoris Lilly varen interrompre els assajos sobre aquesta diana i no ens va ésser possible obtenir els resultats desitjats sobre aquest enzim.

3.2.1 Resultats biològics dels derivats del benzodioxà 7 i 39

3.2.1.1 Resultats biològics en oncologia

– **Inhibició de NNMT:**

La Nicotinamida *N*-MetilTransferasa (NNMT) és un enzim catabòlic que catalitza la metilació de la nicotinamida a través del donador de grups metil *S*-adenosil-L-metionina (SAM) produint *S*-Adenosilhomocisteïna (SAH) i metilnicotinamida (MNAM). Nivells elevats d'NNMT s'han relacionat amb resistències a la quimioteràpia i a la radioteràpia per part les cèl·lules tumorals, així com a una major agressivitat tumoral. D'acord amb aquest resultat, el silenciament o la disminució de l'expressió de l'enzim NNMT han demostrat augmentar la sensibilitat de les cèl·lules canceroses a la quimioteràpia i a la radioteràpia, i reduir l'agressivitat del tumor.¹⁵⁰

Per tal d'identificar possibles inhibidors d'NNMT, l'Open Innovation Drug Discovery (OIDD) d'Eli Lilly realitza una avaluació de la modulació enzimàtica de l'NNMT humà (hNNMT) per cromatografia de líquids amb espectrofotometria de masses (LC/MS), obtenint el percentatge d'inhibició de l'enzim.

Els resultats preliminars obtinguts dels compostos **7** i **39** a una concentració de 10 μ M no mostren activitat inhibidora.

– **Inhibició de l'arginasa:**

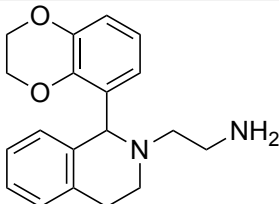
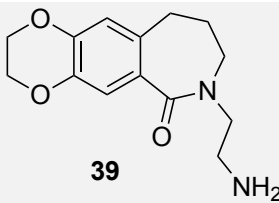
L'arginasa és un enzim intracel·lular que participa en el metabolisme de la L-arginina generant urea i ornitina. Aquest enzim té dos isoenzims diferents: l'ARG1 (citoplasmàtic) i l'ARG2 (mitocondrial). Nivells elevats de l'expressió d'ARG1 s'han vist en macròfags M2 i en cèl·lules mieloides supressores (MSC, *Myeloid Suppressor Cells*), l'augment de l'expressió dels quals s'ha

¹⁵⁰ <https://openinnovation.lilly.com> (25/04/2018)

relacionat amb l'alteració de la resposta immunitària. Per aquest motiu, l'arginina podria ésser de gran interès per estimular el sistema immunitari.

El compost **7** mostra una inhibició de l'ARG1 del 29,55% a una concentració de 100 μM , mentre que el compost **39** potenciarà lleugerament l'efecte d'aquest enzim a la mateixa concentració. Tot i que les estructures no són fàcilment comparables, podríem destacar la diferència entre la llibertat de moviment en el pla del compost **7** respecte a la rigidesa que presenta el compost **39**. La quiralitat del carboni que enllaça amb el benzodioxà que permet el lliure gir sobre el pla podria ser un element imprescindible per a interaccionar amb l'enzim ARG1, mentre que la rigidesa dels anells del compost **39** podrien impedir la unió amb l'enzim ARG1, impeding-ne la interacció i la conseqüent inhibició d'aquest darrer (Taula 13).

Taula 13. Determinació de la inhibició de l'hArginasa

Oncologia - Inhibidor de l'arginasa	
COMPOST	ASSAIG PRIMARI hARG1 MassSpec_No Metal or BSA_384 SP %Inhib @ 100 μM
 <p>7</p>	29,55
 <p>39</p>	-8,03

SP: Single Point.

3.2.1.2 Resultats biològics en immunologia

– Inhibició de la IL-17:

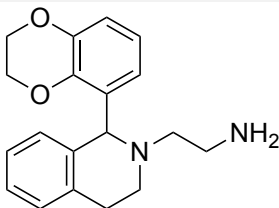
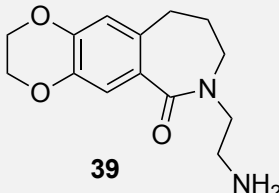
La IL-17A s'expressa en un subgrup de cèl·lules T als llocs d'inflamació i estimula l'alliberament de citocines i quimioquines per a mantenir l'estat proinflamatori al lloc de la lesió. La producció de cèl·lules T patògenes per part de les IL-17A dona lloc a patologies autoimmunitàries com la psoriasi o l'artritis reumatoide. L'ús d'anticossos monoclonals específics contra IL-17A han demostrat alta eficàcia clínica en pacients amb psoriasi en plaques.

L'assaig dut a terme a Eli Lilly mesura la interacció proteïna-proteïna entre la IL-17A i el seu anticòs específic mitjançant una AlphaLisa IL-17A.¹⁵⁰

La inhibició de la IL-17 és més elevada en el cas del compost **7** (24,68%) que en el cas de compost **39** (2,97%) a una concentració de 100 μM . Podríem justificar aquesta diferència de capacitat inhibidora de la mateixa manera que en el cas anterior, és a dir, per la mobilitat en el

pla del compost **7** respecte a la planaritat del compost **39** que limitaria la interacció amb altres proteïnes (Taula 14).

Taula 14. Determinació de la Inhibició de la IL-17A

Autoimmunitat - Interacció proteïna proteïna IL-17	
COMPOST	ASSAIG PRIMARI IL-17A AlphaLisa SP %Inhib @ 100 µM
 <p>7</p>	24,68
 <p>39</p>	2,97

SP: Single Point.

3.2.1.3 Resultats biològics en neurodegeneració i dolor

– Inhibició de la traducció proteica per a la malaltia d'Alzheimer:

La malaltia d'Alzheimer consisteix en l'acumulació de dos tipus de proteïna diferents: la proteïna A β que forma les plaques amiloides a nivell extracel·lular i la proteïna Tau que forma cabdells neurofibril·lars. Les estratègies de tractament actuals inclouen l'impediment de l'acumulació d'ambdues proteïnes, l'eliminació d'aquests un cop acumulades o la regulació de la seva expressió a nivell traduccional.

Per tal d'avaluar la inhibició de la traducció de la proteïna Tau, Eli Lilly realitza un assaig primari sobre cèl·lules Huh7 TT (cèl·lules d'hepatoma) per determinar la inhibició de diferents proteïnes relacionades amb la neurodegeneració i el dolor.¹⁵⁰

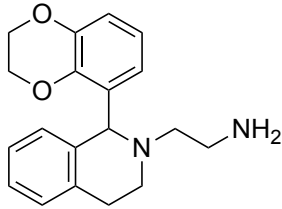
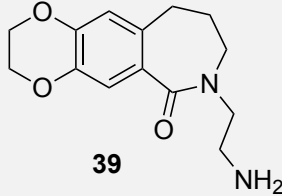
En aquest cas el compost **7** torna a mostrar una capacitat inhibidòria superior al compost **39** en totes les proteïnes assajades sobre cèl·lules Huh7 a una concentració de 40 µM.

En el cas del compost **7**, la inhibició de la proteïna Tau és del 56,97% i de la proteïna Nav1.7 és del 32,29%, mentre que el compost **39** mostra una activitat inhibidòria del 6,71% i del 2,41%, respectivament. Pel que fa les proteïnes també relacionades amb el sistema endocrí Angptl8 (*Angiopoietin Like 8*), APOC3 (*Apolipoproteïna C-III*) i PCSK9 (*Pro-protein Convertase Subtilisin Kexin type 9*), el compost **7** mostra una inhibició del 61,68%, 32,11% i 48,57%, respectivament, i el compost **39** presenta una inhibició del 2,17%, una inhibició negativa del 17,89% i una inhibició del 8,57%, respectivament (Taula 15).

Cal destacar que les proteïnes Angptl8, APOC3 i PCSK9 estan relacionades amb el sistema endocrí i l'alteració de la seva expressió està relacionada amb la hipertrigliceridèmia i la

hipercolesterolèmia (en el cas de la PCSK9). Per tant, el compost **7** podria ésser un possible candidat per al tractament d'aquest tipus de patologies (Taula 15).

Taula 15. Determinació de la inhibició traduccional de la proteïna Tau

Neurodegeneració i dolor - Inhibició de la traducció proteica					
COMPOST	ASSAIG PRIMARI				
	hTau	hAngptl8	hAPOC3	hNav1.7	hPCSK9
	Huh7 TT	Huh7 TT	Huh7 TT	Huh7 TT	Huh7 TT
	Inhib SP				
	%Inhib @ 40 µM				
 <p>7</p>	56,97	61,68	32,11	32,29	48,57
 <p>39</p>	6,71	2,17	-17,89	2,41	8,57

SP: Single Point.

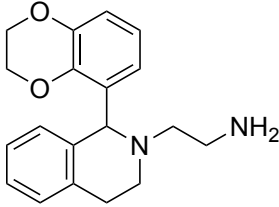
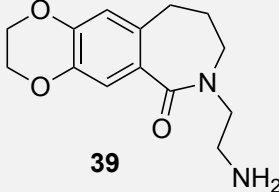
– **Antagonista de Nav1.7:**

El Nav1.7 és un dels canals iònics de sodi dependents de voltatge descrit actualment, el qual està expressat majoritàriament al sistema nerviós perifèric i als ganglis simpàtics. Diversos estudis mostren que la manca de funció d'aquest canal de sodi provoca insensibilitat al dolor, i un augment d'aquesta, implica l'aparició de dolor intermitent i crònic. Aquesta correlació suggereix que els canals de sodi podrien ésser potencials dianes terapèutiques per al tractament del dolor.

Per tal d'avaluar el potencial d'inhibició de Nav1.7, Eli Lilly utilitza una plataforma IWQ ephys amb cèl·lules HEK293 (cèl·lules embrionàries de ronyó humà), en comptes d'utilitzar les cèl·lules Huh7 TT com en el cas anterior.¹⁵⁰

La inhibició de Nav1.7 a una concentració de 3 µM determinada mitjançant la plataforma IWQ, indica que el compost més actiu és el compost **39** amb una inhibició del 15,03%, mentre que la inhibició del compost **7** és de l'11,06%. Tot i que la diferència de la capacitat inhibidora no és gaire elevada, en aquest cas podríem concloure que l'estructura i rigidesa de **39** té més afinitat per bloquejar els canals de sodi dependents de voltatge Nav1.7 (Taula 16).

Taula 16. Determinació de la inhibició de Nav1.7

Neurociència - Antagonista de Nav1.7	
COMPOST	ASSAIG PRIMARI hNav1.7 IWQ %Inhib @ 3 μ M
 <p>7</p>	11,06
 <p>39</p>	15,03

SP: Single Point.

3.2.1.4 Resultats biològics en malalties tropicals i oblidades

– Inhibició de *Mycobacterium tuberculosis*:

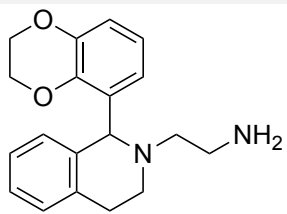
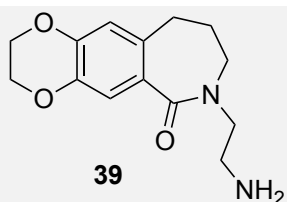
La tuberculosi (TB) és responsable de 1,7 milions de morts anuals a nivell mundial. En humans, aquesta infecció produïda pel bacteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) o bacil de Koch, afecta principalment als pulmons, tot i que pot estendre's a qualsevol part de l'organisme. Normalment té una evolució lenta, però pot presentar-se de manera aguda en individus amb un sistema immunitari feble.

D'una banda, per tal d'intentar reproduir les condicions en les quals es troba el patogen dins l'organisme, Eli Lilly juntament amb la fundació anglesa Tres Cantos Open Lab Foundation utilitzen un protocol desenvolupat en aquest darrer que utilitza monòcits humans THP-1 infectats amb una soca virulenta de MTB (H37RV) expressant luciferasa per tal d'identificar compostos capaços d'inhibir el seu creixement.

Per altra banda, es realitza un assaig per veure la inhibició del creixement d'una soca H37RV, i es realitzen assajos secundaris per determinar la concentració mínima inhibidora (MIC) necessària per inhibir completament la proliferació del bacteri. A més a més, paral·lelament es determina la inhibició del creixement en cèl·lules HeLa (cèl·lules de carcinoma cervical).¹⁵⁰

Pel que fa la inhibició del creixement en monòcits humans infectats per MTB, amb una concentració de 5 μ M el compost **39** mostra una eficàcia de més del doble respecte al compost **7** (12,31% respecte a 4,67% d'inhibició). No obstant, pel que fa la inhibició sobre la soca H37RV modificada genèticament a 20 μ M, els resultats són molt similars i no arriben al 10% en cap d'ambdós casos (Taula 17).

Taula 17. Determinació de l'activitat enfront la tuberculosi

Malalties tropicals i oblidades - Tuberculosi		
COMPOST	ASSAIG PRIMARI	
	hTHP-1 w/ MTB Growth Inhibition SP %Inhib @ 5 μ M	TB MIC SP IDRI OIDD %Inhib @ 20 μ M
 <p>7</p>	4,67	6,5
 <p>39</p>	12,31	5,6

SP: Single Point.

– Inhibició de malària:

El paludisme o malària és una malaltia parasitària provocada per protozous del gènere *Plasmodium* que es caracteritza per la presència de febre alta i anèmia. Uns 300 milions de persones pateixen anualment aquesta patologia a tot el món i, d'aquestes, 3 milions moren per complicacions de la malaltia. La major part de les víctimes són infants que viuen en països en desenvolupament, la majoria dels quals pertanyents al continent africà.

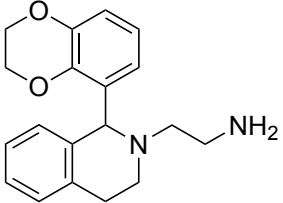
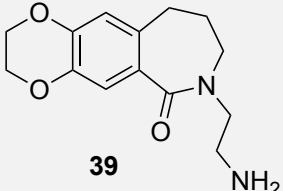
Conjuntament amb la companyia suïssa Medicines for Malaria Venture (MMV), es pretenen trobar compostos que eradiquin la malaltia. Per avaluar la inhibició sobre el creixement parasitari, s'utilitza el *Plasmodium falciparum* en estadi sanguini (asexual) i s'avalua la citotoxicitat no específica en cèl·lules HepG2 (cèl·lules de càncer de fetge). Per avaluar la infecció esporozoítica i la viabilitat dels esquizonts en les cèl·lules del fetge (estadis hepàtics), s'utilitza el *Plasmodium berghei* (Pb).¹⁵⁰

En el cas de la malària, s'obtenen resultats molt prometedors sobre la inhibició de *Plasmodium falciparum* en ambdós casos (superiors al 100%) a una concentració de 2 μ M, mentre que sobre el *Plasmodium berghei* i sobre les cèl·lules HepG2 el grau d'inhibició és molt menor.

El compost **7** presenta una inhibició superior en ambdós paràsits amb uns percentatges de 149,8-144,7% sobre *P. falciparum*, mentre que sobre *P. berghei* no s'obté inhibició o pot arribar a 31,94%. En el cas del compost **39**, la inhibició sobre el creixement de *P. falciparum* és del 132,9-132,5%, mentre que sobre *P. berghei* no s'obté inhibició.

Pel que fa la citotoxicitat en cèl·lules HepG2, el compost **7** presenta una inhibició menor al 10%, mentre que el compost **39** presenta una inhibició d'entre 4,01 i 16,27% (Taula 18).

Taula 18. Determinació de l'activitat enfront la malària

Malalties tropicals i oblidades - Malària			
COMPOST	Plasmodium falciparum DD2 Inh %Inhib @ 2 µM	ASSAIG PRIMARI	
		NV-P.berghei EEf parasite viability HepG2 SP UCSD %Inhib @ 10 µM	HepG2 cytotox SP MMV %Inhib @ 10 µM
 <p>7</p>	149,8*	-0,72	-3,77
	144,7*	31,94	7,08
 <p>39</p>	132,9*	-15,96	4,01
	132,5*	-21,58	16,27

SP: Single Point.

*Resultats experimentals concedits per Eli Lilly; considerar una inhibició del 100%.

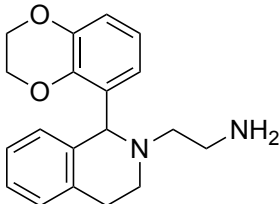
– Inhibició de la Leishmaniosi:

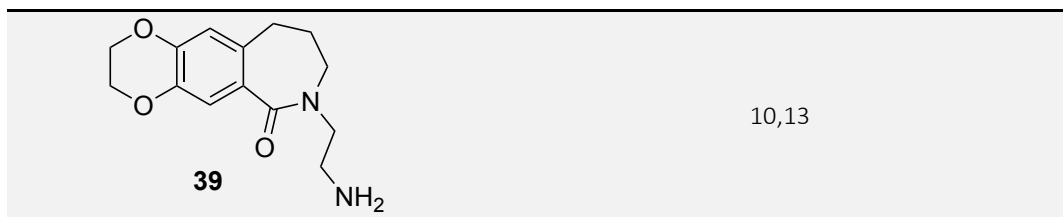
Dins les malalties tropicals oblidades, mig bilió de persones tenen risc de contraure tripanosomiasis africanes com la malaltia del son (*Trypanosoma brucei*), la malaltia del Chagas (*Trypanosoma cruzi*) i diversos tipus de Leishmaniosi (*Leishmania spp*).

Per tal de determinar la inhibició sobre la Leishmaniosi, Eli Lilly realitza assajos de citotoxicitat sobre *Leishmania donovani*.¹⁵⁰

Pel que fa l'efecte sobre la viabilitat de *Leishmania donovani*, el compost **7** no presenta cap inhibició mentre que el compost **39** presenta una inhibició del 10,13% (Taula 19).

Taula 19. Determinació de l'activitat enfront la Leishmaniosi

Malalties tropicals i oblidades - Leishmània	
COMPOST	ASSAIG PRIMARI Viability <i>L. donovani</i> Cytotox SP %Inhib @ 5 µM
 <p>7</p>	-0,93



SP: Single Point.

En termes generals, podríem concloure que el compost **39**, en comparació amb el compost **7**, presenta una afinitat estructural o un mecanisme d'acció més eficient enfront malalties tropicals i oblidades. No obstant, pel que fa l'afinitat sobre les dianes estudiades implicades en càncer, autoimmunologia, neurodegeneració, dolor i sistema endocrí, el compost **7** mostra una eficàcia molt superior.

3.2.2 Resultats biològics de les diarilamines

Eli Lilly no ha dut a terme estudis biològics sobre els compostos inclosos en aquesta família.

3.2.3 Resultats biològics dels diarilèters **20**, **19**, **21** i **22**

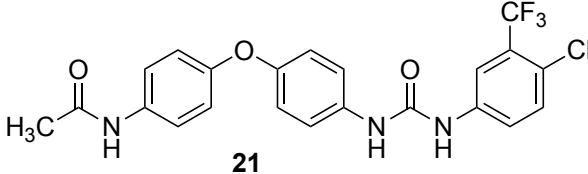
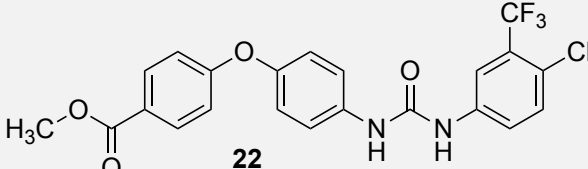
3.2.3.1 Resultats biològics en oncologia

- Inhibició d'NMMT:
Els resultats preliminars dels quatre compostos (**19**, **20**, **21** i **22**) assajats a una concentració de 10 μ M no han mostrat activitat inhibidora.
- Inhibició de l'arginasa:¹⁵¹
Els quatre compostos assajats mostren activitat inhibidora sobre l'enzim ARG1 a una concentració de 100 μ M. La major activitat inhibidora l'exerceix el producte **22** en un 38,04%, seguida del compost **20** amb un 20,56%, del **21** amb un 18,44% d'inhibició i per últim, del compost **19** amb un 10,76% d'inhibició (Taula 20).

Taula 20. Determinació de la inhibició de l'hArginasa

Oncologia - Inhibidor de l'arginasa	
COMPOST	ASSAIG PRIMARI hARG1 MassSpec_No Metal or BSA_384 SP %Inhib @ 100 μ M
<p>19</p>	10,76
<p>20</p>	20,56

¹⁵¹ V. Bronte, P. Zanovello. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, 5, 641-654

 <p style="text-align: center;">21</p>	18,44
 <p style="text-align: center;">22</p>	38,04

SP: Single Point.

3.2.3.2 Resultats biològics en immunologia

– Inhibició de la IL-17:

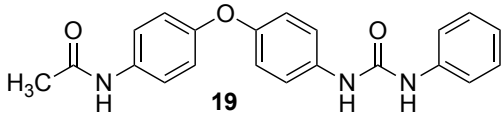
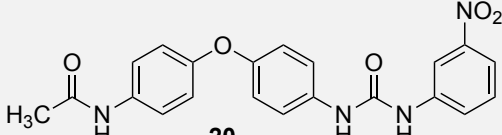
Cap dels quatre compostos assajats mostra aquesta la interacció proteïna-proteïna entre la IL-17A i el seu anticòs específic a una concentració de 100 μ M, exceptuant el compost **19** el qual mostra una lleu inhibició inferior al 5%.

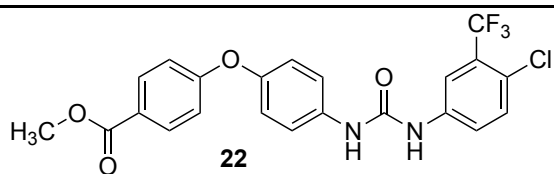
3.2.3.3 Resultats biològics en neurodegeneració i dolor

– Inhibició de la traducció proteica per a la malaltia d'Alzheimer:

Quan comparem els compostos **19**, **20** i **22**, podem veure que ambdós productes **20** i **22** tenen major activitat inhibidora en totes les proteïnes assajades, fenomen el qual suggereix que la presència de grups electró-atraients a l'anell de la urea augmenta la capacitat inhibidora. Entre aquests dos darrers compostos, la diferència entre el seu potencial inhibitori és molt lleu i varia en funció del tipus de proteïna assajada. No disposem dels resultats del compost **21** i no podem determinar la relació directa entre l'efecte de l'èster o l'amida al diarilèter (Taula 21).

Taula 21. Determinació de la inhibició traduccional de la proteïna Tau

Neurodegeneració i dolor - Inhibició de la traducció proteica					
COMPOST	ASSAIG PRIMARI				
	hTau	hAngptl	hAPOC	hNav1.	hPCSK
	Huh7 TT	8	3	7	9
		Huh7 TT	Huh7 TT	Huh7 TT	Huh7 TT
	Inhib SP				
	%Inhib @ 40 μ M				
 <p style="text-align: center;">19</p>	64,20	65,82	62,39	49,63	65,71
 <p style="text-align: center;">20</p>	100,30	103,50*	96,65	97,76	100,00

 22	99,90	98,90	100,90	99,64	98,10
--	-------	-------	--------	-------	-------

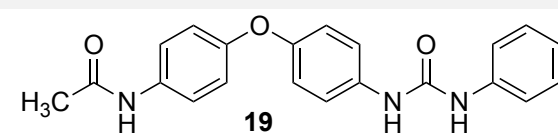
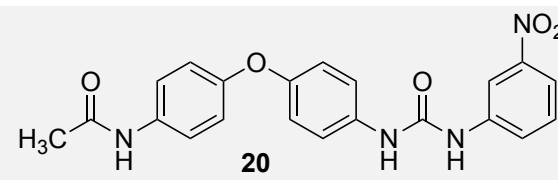
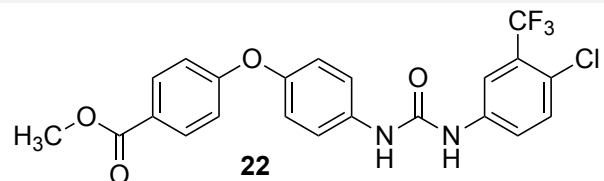
SP: Single Point.

*Resultats experimentals concedits per Eli Lilly; considerar una inhibició del 100%.

– Antagonista de Nav1.7:

La inhibició superior al 20% per part dels compostos **19** i **20** en comparació amb la manca d'inhibició per part del compost **22** (-2.125%) suggereix que el grup amida com a substituent del diarilèter és més efectiu que el grup èster en el bloqueig d'aquest canal de sodi. A més a més, els grups electró-atraients a l'anell de la urea també milloren l'activitat antagonista d'aquests canals (27.19% en front 21.14% del compost **20** i **19**, respectivament) (Taula 22).

Taula 22. Determinació de la inhibició de Nav1.7

Neurociència - Antagonista de Nav1.7	
COMPOST	ASSAIG PRIMARI hNav1.7 IWQ %Inhib @ 3 µM
 19	21,14
 20	27,19
 22	-2,13

SP: Single Point.

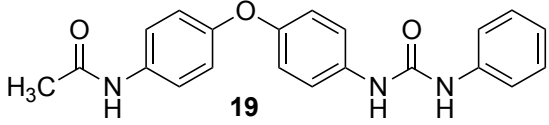
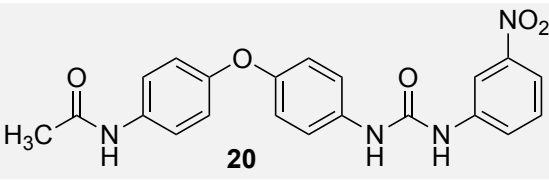
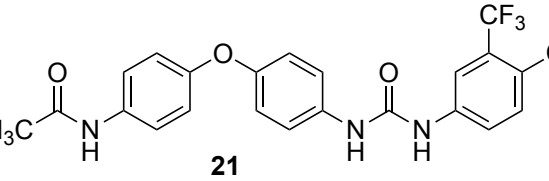
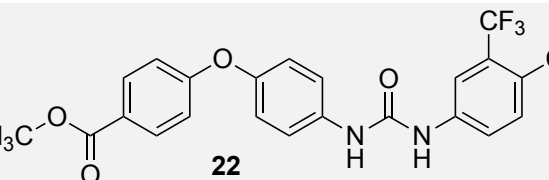
3.2.3.4 Resultats biològics en malalties endocrines i cardiovasculars

– Inhibició de PCSK9 (Effort 2):

La proteïna convertasa subtilisina kexina tipus 9 (PCSK9) és un regulador de la LDL que es troba majoritàriament al fetge i en menor mesura als ronyons i a l'intestí prim. La PCSK9 juga un rol essencial en la homeòstasi del colesterol dirigint el receptor de la LDL (LDLR) a degradació lisosomal, provocant una acumulació de LDL a la circulació per manca d'aclariment plasmàtic. Mutacions de PCSK9 resultants en un augment de la seva activitat promouen l'aparició de hiperlipèemies i malalties d'artèries coronàries, mentre que mutacions associades a una disminució de l'expressió de PCSK9 provoquen una disminució dels nivells de LDL i atorguen protecció enfront les malalties d'artèries coronàries.

Eli Lilly identifica compostos que inhibeixen la expressió de PCSK9 mitjançant Alphalisa o l'assaig CellTiter-Glo amb cèl·lules d'hepatoma humanes com Huh7.¹⁵⁰

Taula 24. Determinació de l'activitat enfront la tuberculosi

Malalties tropicals i oblidades - Tuberculosi				
COMPOST	ASSAIG PRIMARI			ASSAIG SECUNDARI
	hTHP-1 w/ MTB Growth Inhibition SP	TB MIC SP IDRI OIDD	TB MIC CRC IDRI OIDD	HELA Cytotox CellTiter-Glo SP
	%Inhib @ 5 μ M	%Inhib @ 20 μ M	MIC (μ M)	%Inhib @ 20 μ M
	-17,87	12,5	-	-
	7,31	7,2	-	-
	23,32 23,32	7,6 -3,3	-	-
	41,97 41,97	97,9 98,7	16,0 17,0	100,7*

SP: Single Point.

CRC: Concentration Response Curve.

*Resultats experimentals concedits per Eli Lilly; considerar una inhibició del 100%.

- Inhibició de malària:

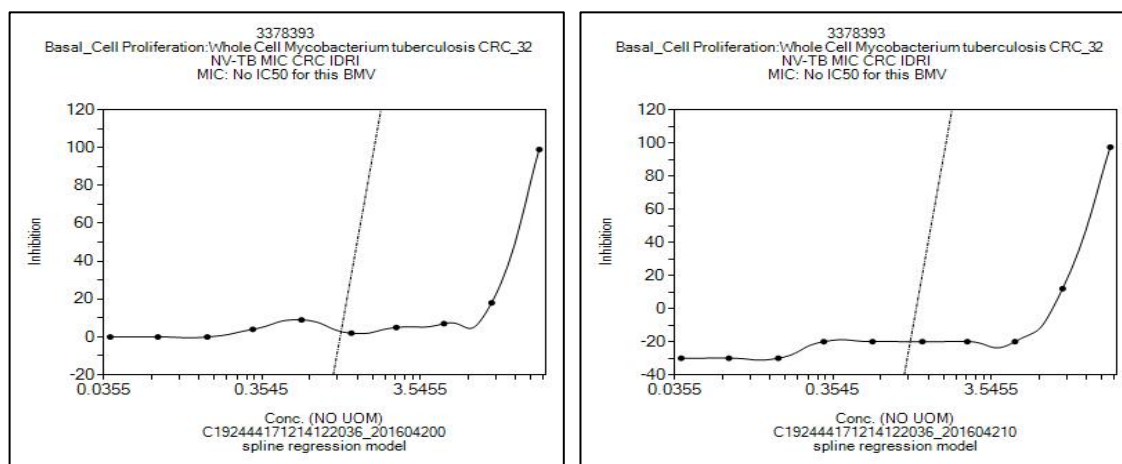


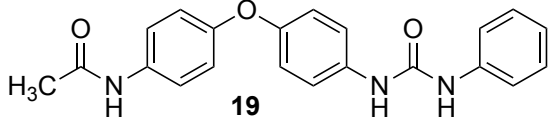
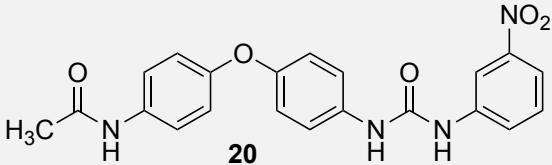
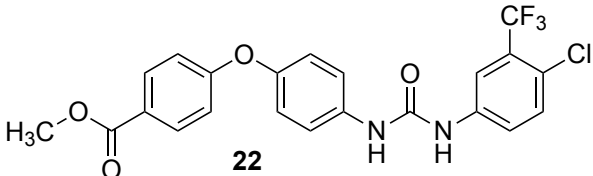
Figura 52. Determinació de la concentració mínima inhibidora (MIC) del compost 22

Pel que fa la inhibició sobre *Plasmodium falciparum*, tots els compostos assajats mostren una inhibició superior al 65% a una concentració de 2 µM. Per ordre creixent, el compost **20** mostra una inhibició del 80,95%-68,68%, seguit del compost **19** amb una activitat inhibidòria del 108,6%-110,2% i del compost **22** amb una capacitat inhibidòria sobre el paràsit del 138,7-144,9%.

Pel que fa la viabilitat del paràsit *Plasmodium berghei* en cèl·lules HepG2 a una concentració de 10 µM, els compostos mostren una efectivitat més baixa: el compost **19** mostra una activitat inhibidòria de 6,805%-3,027%, seguit del producte **20** amb una inhibició del 67,87-43,6% i del compost **22** amb una capacitat d'inhibició del 86,55%-90,99%.

Per últim, la citotoxicitat no específica sobre cèl·lules HepG2 a una concentració de 10 µM resulta inferior al 10% per als dos primers compostos **19** i **20**, mentre que pel compost **22** és superior al 80% (83,55%-84,76%) (Taula 25).

Taula 25. Determinació de l'activitat enfront la malària

Malalties tropicals i oblidades - Malària			
COMPOST	ASSAIG PRIMARI		
	Plasmodium falciparum DD2 Inh %Inhib @ 2 µM	NV-P.berghei EEf parasite viability HepG2 SP UCSD %Inhib @ 10 µM	HepG2 cytotox SP MMV %Inhib @ 10 µM
 19	108,60*	6,81	-3,49
	110,20*	3,03	7,78
 20	80,95	67,87	-4,37
	68,68	43,60	-1,45
 22	138,70*	86,55	83,55
	144,90*	86,55	83,55
		90,99	84,76
		90,99	84,76

SP: Single Point.

*Resultats experimentals concedits per Eli Lilly; considerar una inhibició del 100%.

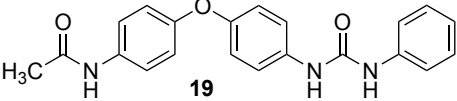
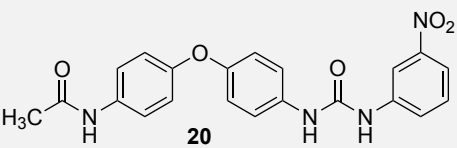
- Inhibició del Chagas:

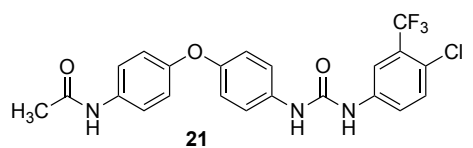
La malaltia de Chagas és una de les principals malalties parasitàries del món que pot afectar el sistema nerviós i provocar lesions importants a l'esòfag, al cor o a l'intestí gros. En la majoria dels casos la persona infectada no presenta símptomes.

Per avaluar la capacitat inhibidòria sobre el creixement del *T. cruzi*, Eli Lilly realitza diferents assajos en diferents estats cel·lulars.

Els assajos que s'han dut a terme mostren que el compost més actiu és novament el compost **22**. En aquest cas disposem dels resultats del compost **21** i per tant podem comparar l'efecte de l'èster o l'amida com a substituent del diarilèter: al substituir l'amida per l'èster, obtenim una inhibició superior al 90% en la majoria d'assajos realitzats a una concentració de 5 µM (95,09-96,81%; 91,16-92,66%; 23,09-26,26%; 99,51-99,83%;97,68-98,07%) mentre que amb l'amida tenim resultats variables en funció de l'assaig realitzat (56,41-68,37%, 33,23-24,73%; -2,55--7,07%; 57,48-59,40%; 9,65-22,86%). D'altra banda, podem recalcar la major eficàcia aportada per la disposició d'un grup electró-atraient a l'anell de la urea comparant el compost **20** (32,8%) i el compost **19** (-3,05%) sobre la inhibició del creixement de *T. cruzi* (Taula 26).

Taula 26. Determinació de l'activitat enfront el Chagas

Malalties tropicals i oblidades - Malaltia de Chagas					
COMPOST	ASSAIG PRIMARI				
	T. cruzi Growth Inhibition SP	NV-Basal_Viability T. cruzi CTG Inhib SP Tres Cantos	NV-T. cruzi myocardiocyte Dead Cells SP Tres Cantos	NV-T. cruzi myocardiocyte Parasites per Cell SP	NV-T. cruzi myocardiocyte Infected Cells SP
	%Inhib @ 5 µM	%Inhib @ 5 µM	%Inhib @ 5 µM	%Inhib @ 5 µM	%Inhib @ 5 µM
 <chem>CC(=O)Nc1ccc(Oc2ccc(NC(=O)C)cc2)cc1</chem> 19	-3,05	-	-	-	-
 <chem>CC(=O)Nc1ccc(Oc2ccc(NC(=O)C)cc2)cc1[N+](=O)[O-]</chem> 20	32,80	-	-	-	-

 21	68,37				
	68,37	33,23	-2,55	57,48	9,65
	64,90	24,73	-7,07	59,40	22,86
	56,41				

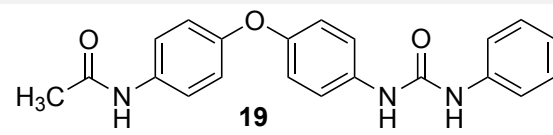
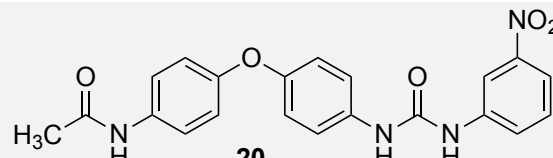
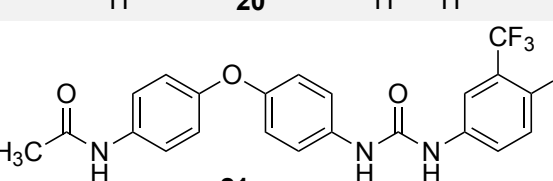
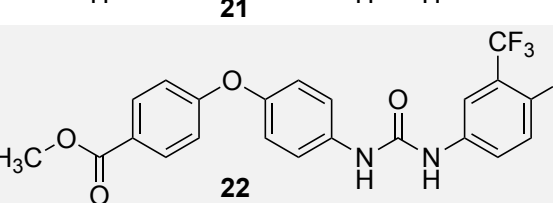
 22	95,09				
	95,09	91,16	23,09	99,51	97,68
	96,81	92,66	26,26	99,83	98,07
	95,52				

SP: Single Point.

– Inhibició de la Leishmaniosi:

En aquest cas, el compost més actiu torna a ser el compost **22** amb una citotoxicitat del 25,14%, seguit del compost **20** amb un percentatge d'inhibició del 18,29%, del compost **19** amb un 10,54% i del compost **21** que no mostra inhibició (Taula 27).

Taula 27. Determinació de l'activitat enfront la Leishmaniosi

Malalties tropicals i oblidades - Leishmanània	
COMPOST	ASSAIG PRIMARI Viability <i>L. donovani</i> Cytotox SP %Inhib @ 5 µM
 19	10,54
 20	18,29
 21	-8,73
 22	25,14

Per últim, aclarir que s'han mostrat resultats que presenten una inhibició sobre certes dianes amb valors inferiors al 50%. Aquests valors s'han discutit per tal de poder establir unes relacions estructura-activitat molt preliminars però de gran importància per a la continuïtat del nostre treball.

3.2.4 Activitat biològica avaluada a la Universitat de Siena (UNISI)

Atesa la manca de resultats favorables obtinguda als laboratoris Eli Lilly sobre la inhibició de determinades dianes relacionades amb el càncer, es va decidir realitzar una avaluació biològica sobre altres cèl·lules tumorals amb una selecció de productes més àmplia (**10, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 48, 99, 100**). Es va escollir utilitzar cèl·lules humanes d'osteosarcoma per a la seva vinculació amb la sobreexpressió d'EZH2, la qual, tal i com s'ha comentat anteriorment, fou la diana a partir de la qual es varen dissenyar la majoria de compostos d'aquesta tesi doctoral i la qual no va poder ésser avaluada als laboratoris Eli Lilly. Per tal de poder determinar si els compostos mostren activitat inhibidora sobre cèl·lules tumorals i no afecten o ho fan en menor mesura a cèl·lules sanes, els compostos més actius sobre cèl·lules tumorals es van assajar sobre osteoblasts humans. El nostre objectiu ha estat trobar compostos que presentin selectivitat per les cèl·lules tumorals i que per tant, tinguin una activitat inhibidora alta sobre cèl·lules tumorals però no mostrin efectes sobre cèl·lules sanes (en el nostre cas, osteoblasts).

L'activitat biològica es mesurà mitjançant l'assaig MTT (bromur de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium)), el qual consisteix en un assaig colorimètric que permet avaluar l'activitat metabòlica de les cèl·lules, i per tant, quantificar la viabilitat cel·lular. Les cèl·lules amb metabolisme actiu transformen el MTT (groc) en un altre producte anomenat formazan (lila); si les cèl·lules no són viables perden l'habilitat de dur a terme aquesta transformació.

Aquest assaig permet determinar la capacitat inhibidora d'un compost sobre el creixement cel·lular i pot donar una lleugera idea sobre el tipus mecanisme d'acció del compost (citotòxic o citostàtic). En aquests assajos es confronta la viabilitat cel·lular en percentatge en funció del control amb les diferents concentracions assajades del compost. Per tal de poder comparar l'eficàcia de diferents compostos, el més habitual és determinar la IC₅₀ (concentració a la qual s'inhibeix el 50% del creixement cel·lular en comparació amb l'assaig del control).

3.2.4.1 Activitat biològica sobre cèl·lules canceroses

Els compostos es varen incubar a concentracions creixents durant 24 i 48 hores en dues línies cel·lulars tumorals humanes diferents: SaOS-2 i MNNG/HOS. Es varen utilitzar aquestes dues línies cel·lulars ja que presenten graus de diferenciació cel·lular diversos: les cèl·lules SaOS-2 són cèl·lules bastant diferenciades que equivaldrien a un tipus cel·lular sa - es consideren un model cel·lular similar als osteoblasts - i les cèl·lules MNNG/HOS mostren un grau de diferenciació més baix similar al perfil típic de les cèl·lules tumorals. A més a més, la velocitat de replicació d'ambdues cèl·lules també divergeix, essent les MNNG/HOS les de creixement més ràpid amb una duplicació del nombre de cèl·lules en 24 hores d'incubació, mentre que les SaOS-2 es dupliquen en 43 hores.^{152,153} El càncer originat en cèl·lules MNNG presenta una agressivitat més elevada.

¹⁵² P. Romano, A. Manniello, O. Aresu, M. Armento, B. Parodi. *Nucl. Acids. Res.* **2009**, *37*, D925-D932

¹⁵³ <https://www.lgcstandards-atcc.org> (23-05-2018)

A continuació es mostren dos tipus de gràfic diferents per a cada línia cel·lular i temps analitzat per cada compost (SaOS-2 24 h, SaOS-2 48 h, MNNG/HOS 24 h, MNNG/HOS 48 h): en primer lloc, un diagrama de barres on es confronta el percentatge de viabilitat cel·lular respecte la concentració molar del compost i en segon lloc, la corba sigmoide del percentatge de la viabilitat cel·lular en funció de la concentració assajada a escala logarítmica (**Taula 28**):

Taula 28. Distribució de figures per compost

COMPOST	Gràfic	COMPOST	Gràfic
10	Figura 53	21	Figura 60
11	Figura 54	22	Figura 61
12	Figura 55	23	Figura 62
15	Figura 56	24	Figura 63
16	Figura 57	48	Figura 64
19	Figura 58	99	Figura 65
20	Figura 59	100	Figura 66

– Compost **10** (Figura 53):

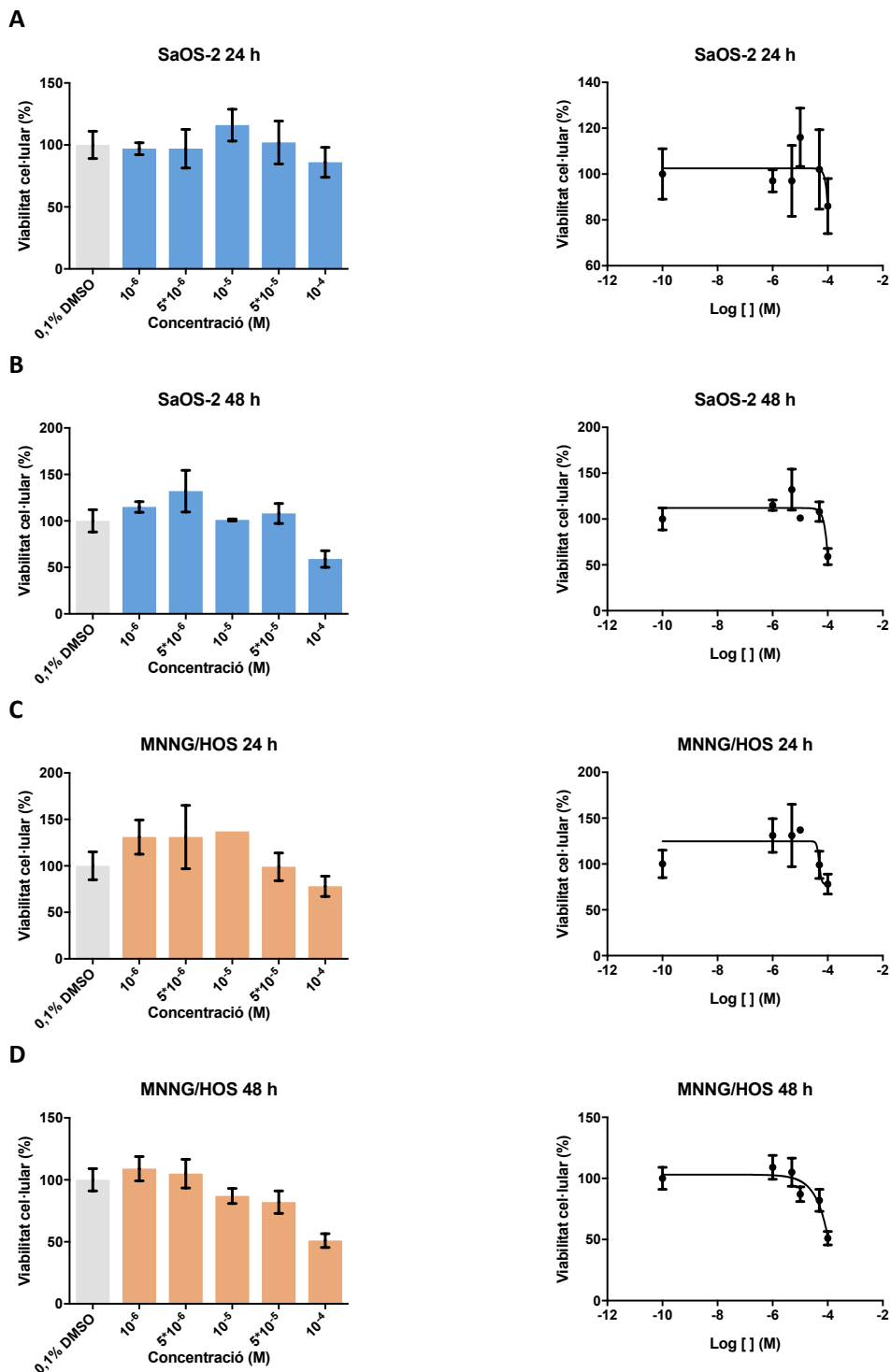


Figura 53. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **10**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **11** (Figura 54):

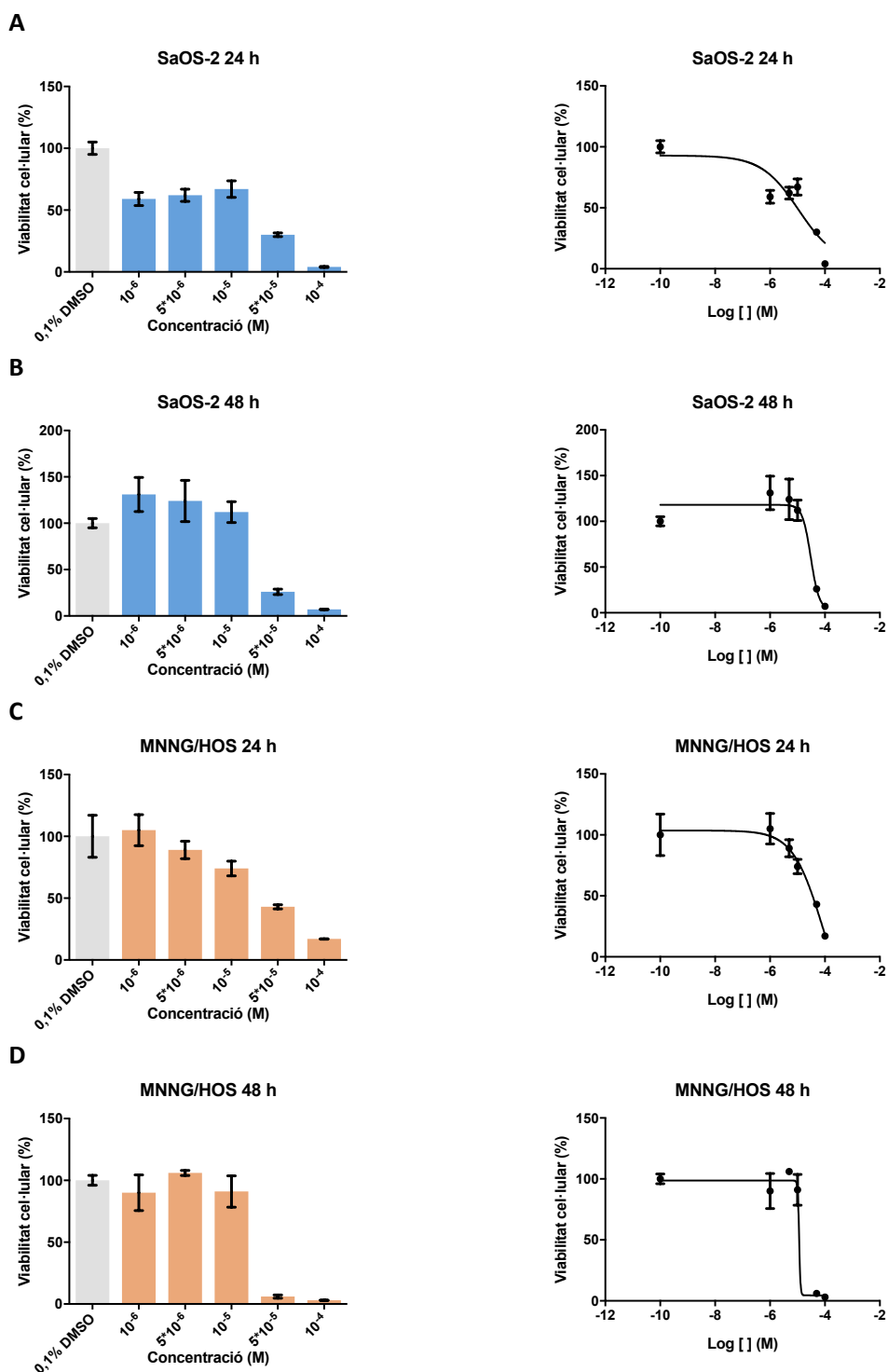


Figura 54. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **11**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **12** (Figura 55):

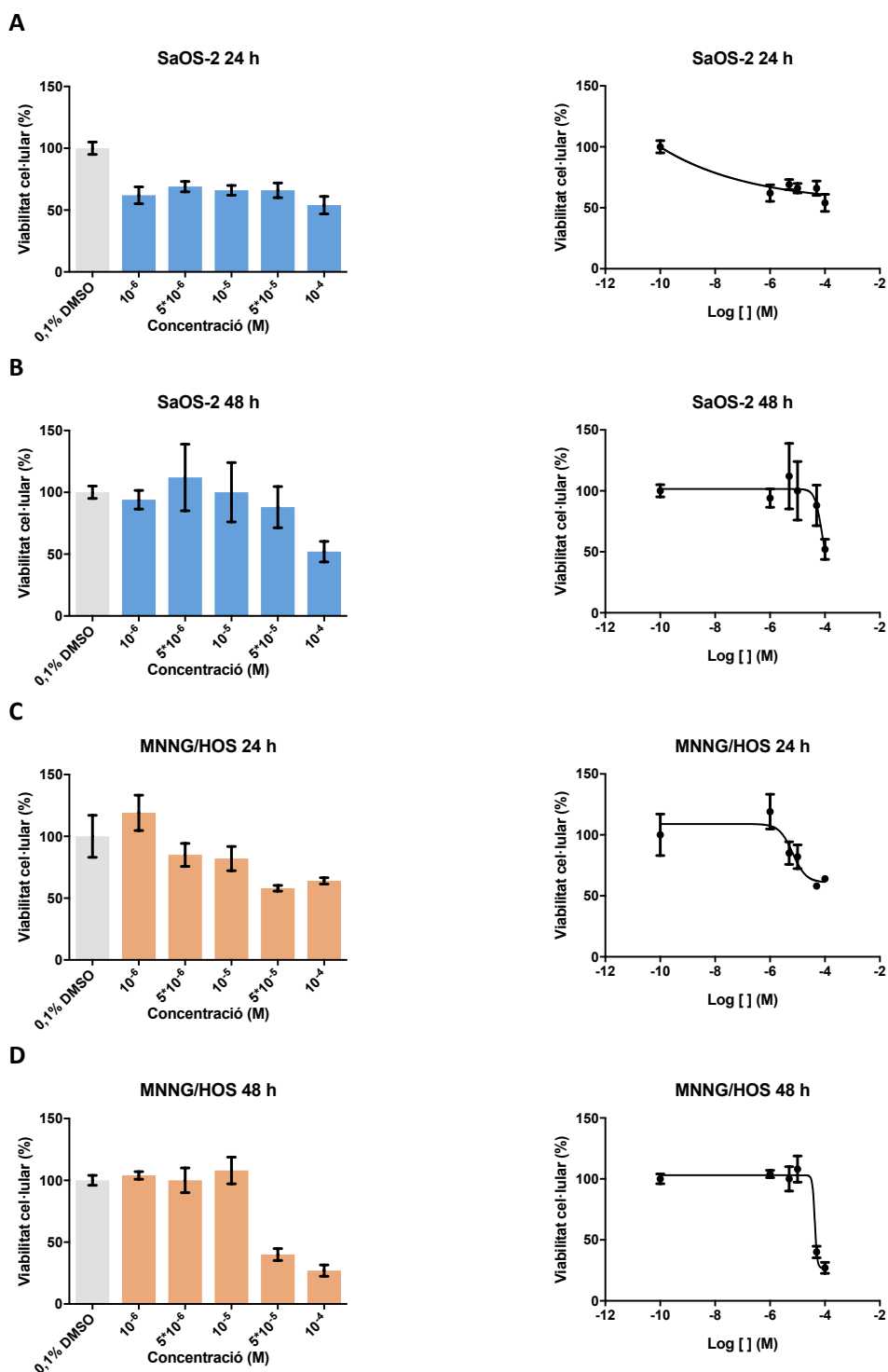


Figura 55. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **12**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **15** (Figura 56):

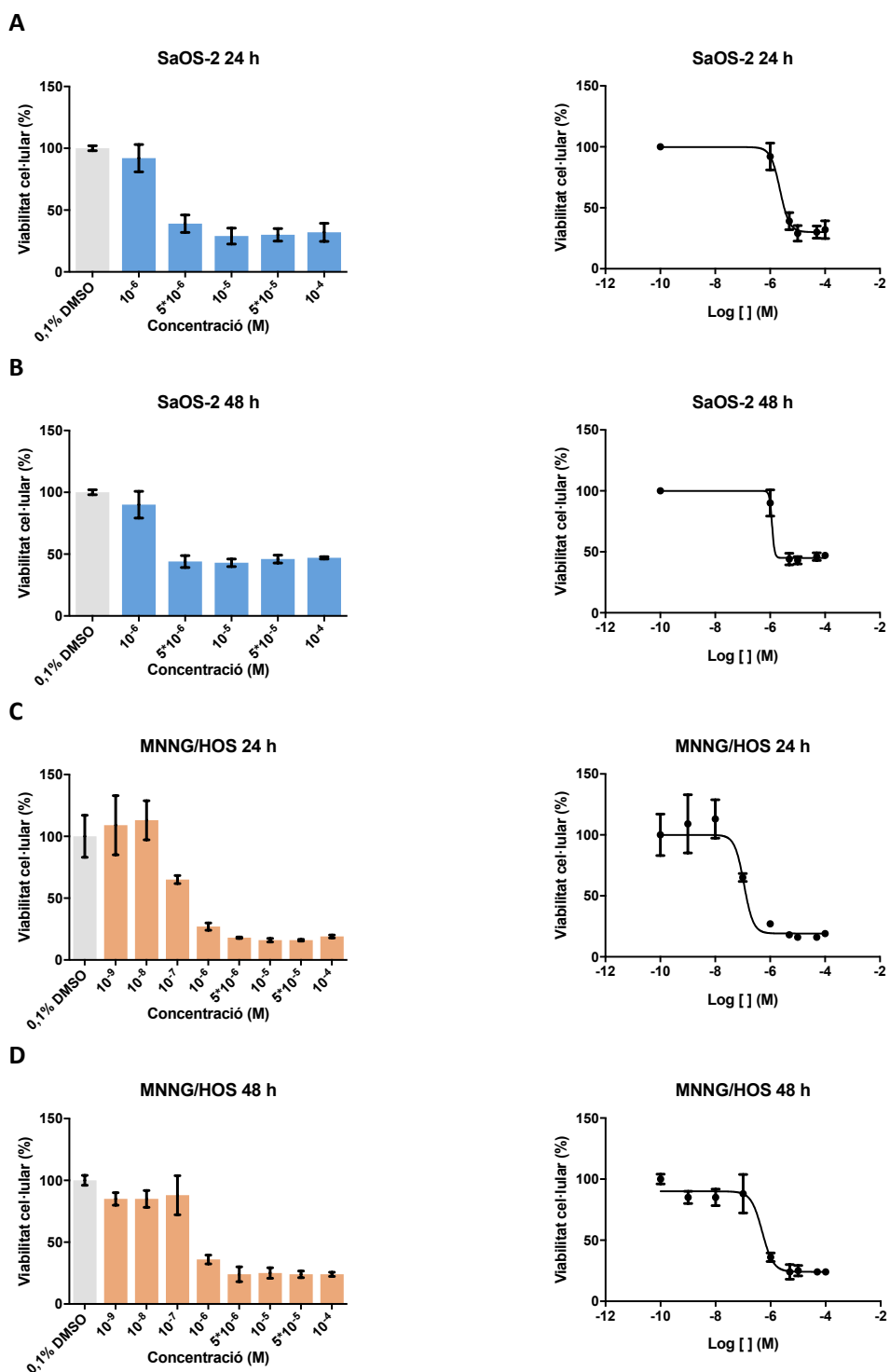


Figura 56. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **15**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **16** (Figura 57):

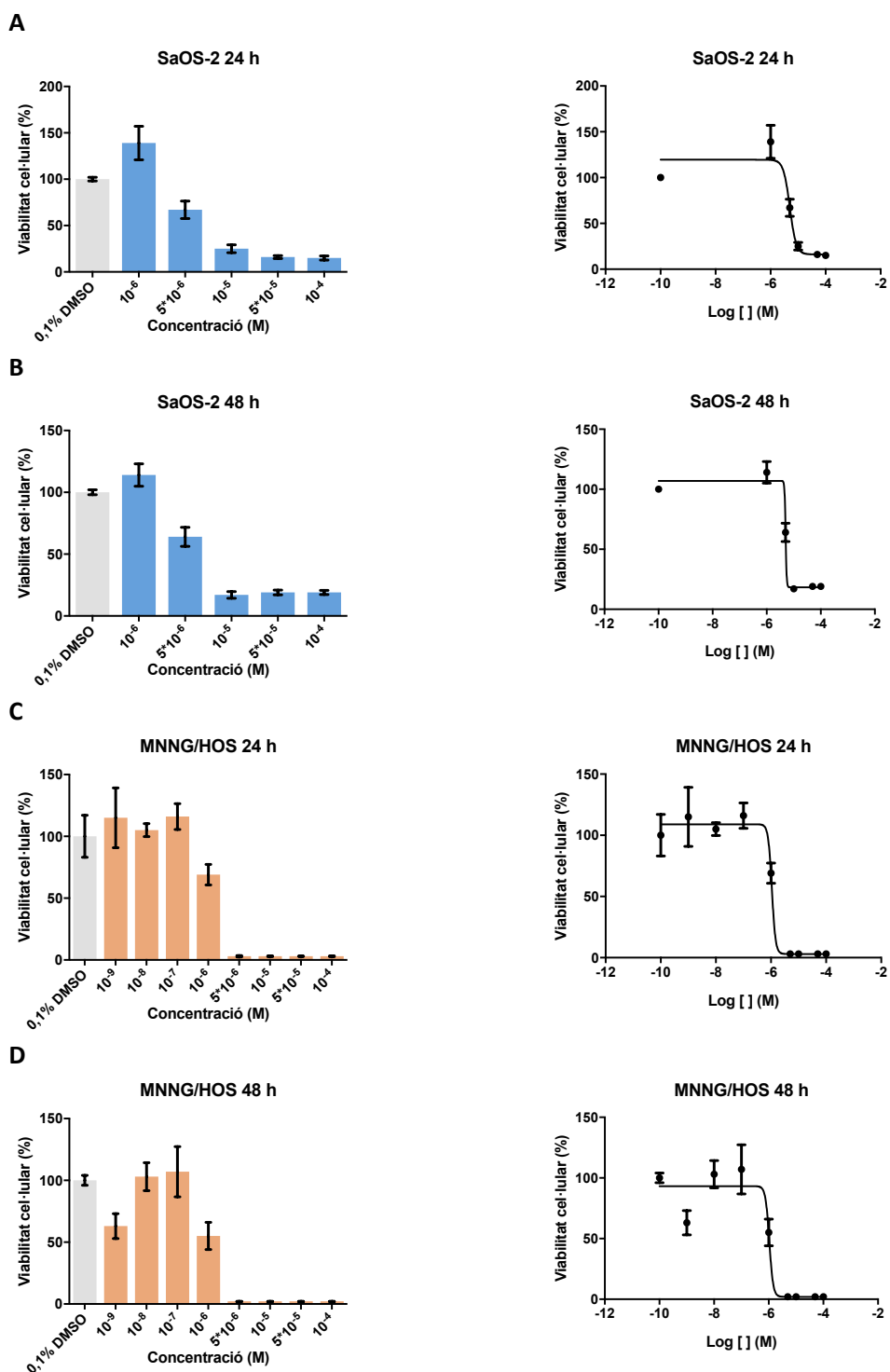


Figura 57. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **16**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **19** (Figura 58):

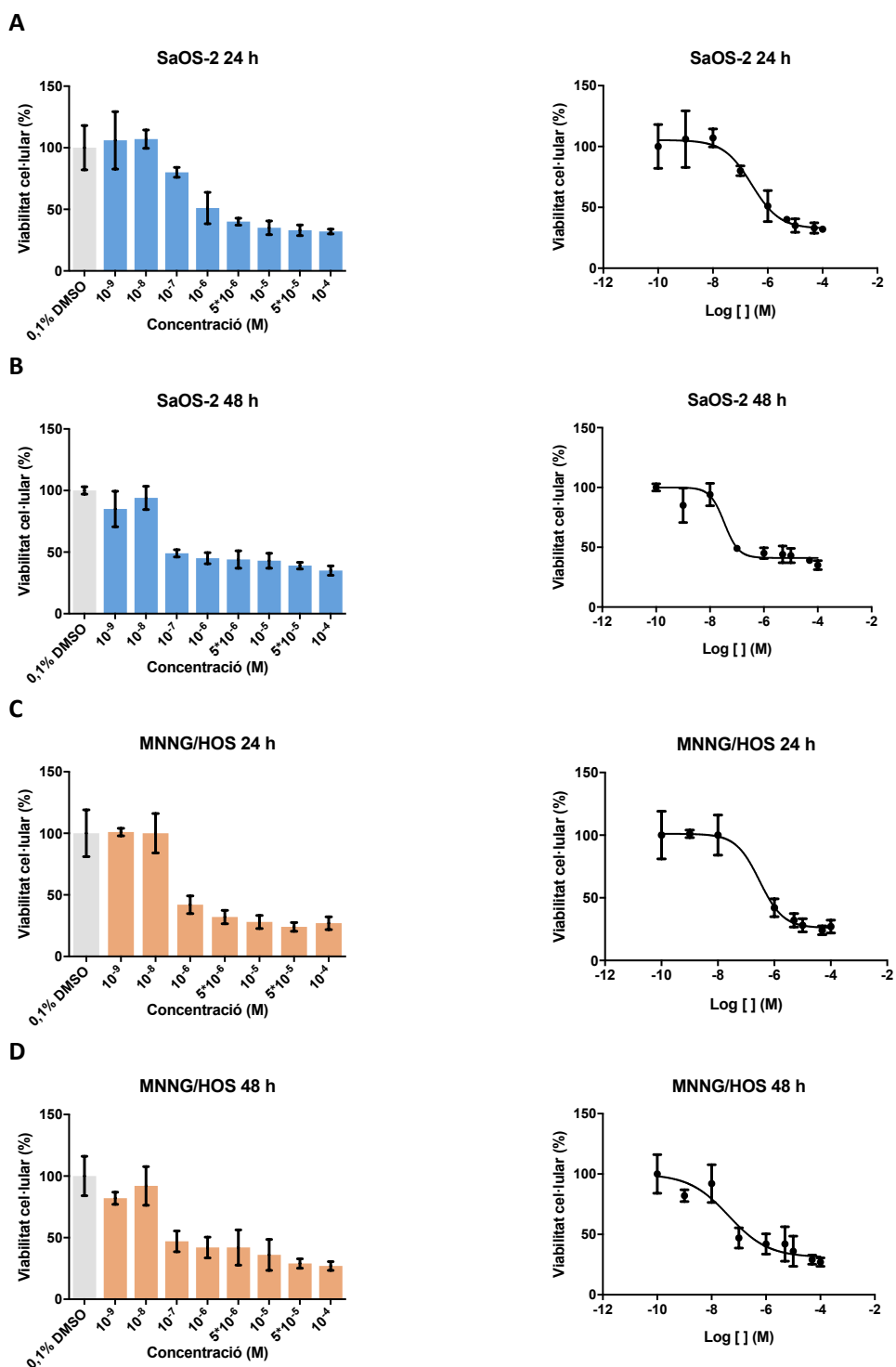


Figura 58. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **19**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **20** (Figura 59):

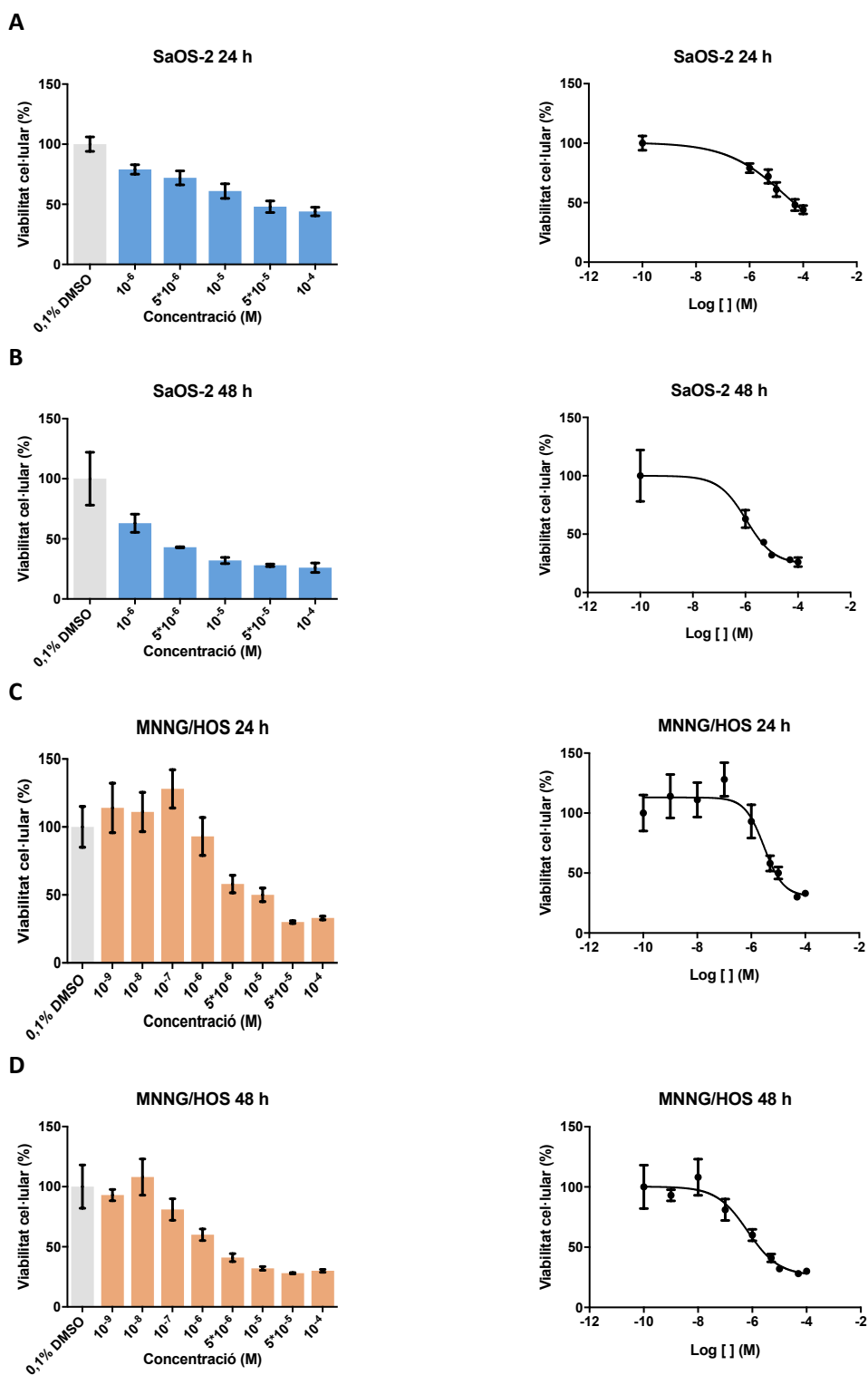


Figura 59. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **20**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **21** (Figura 60):

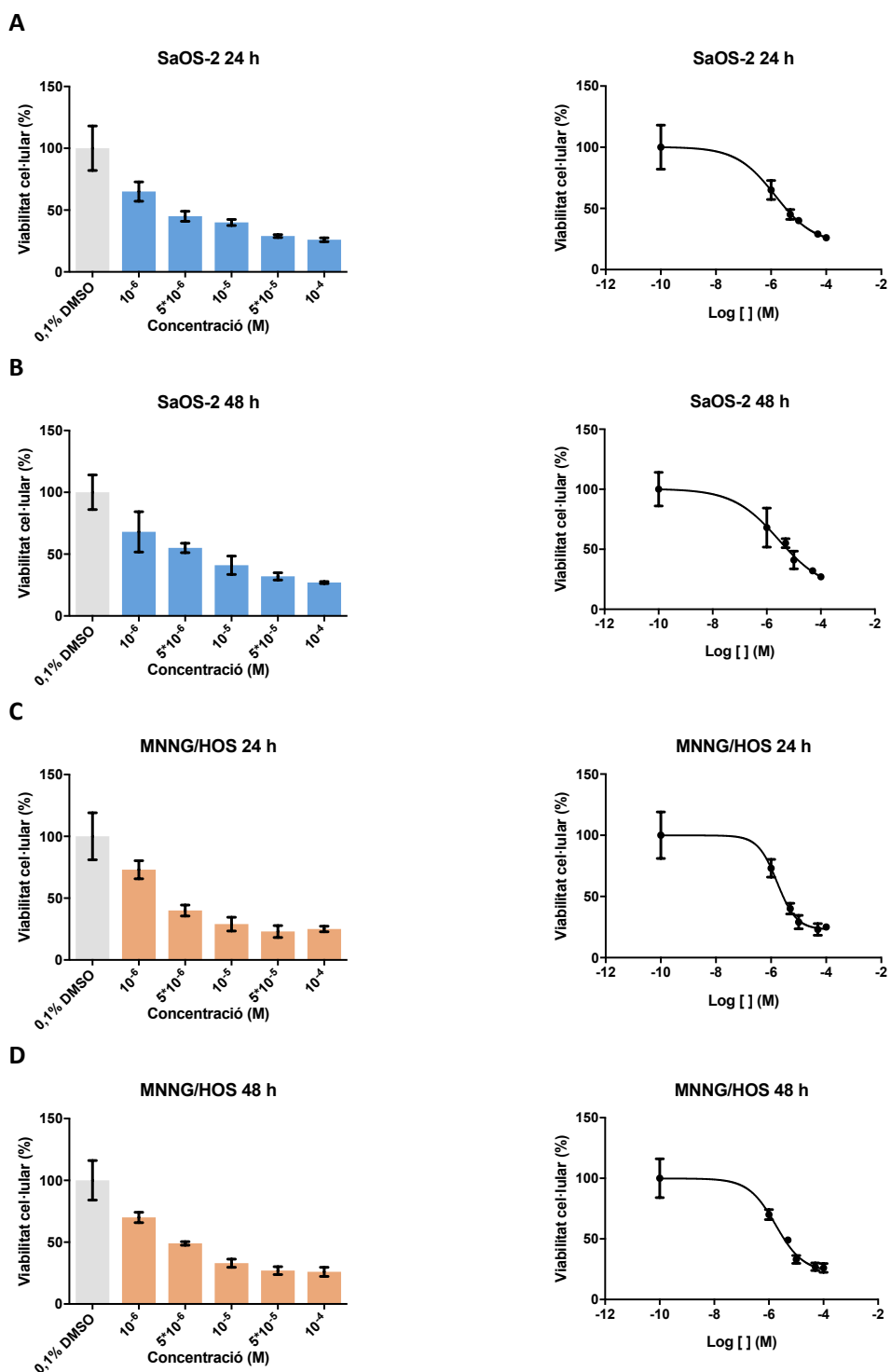


Figura 60. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **21**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **22** (Figura 61):

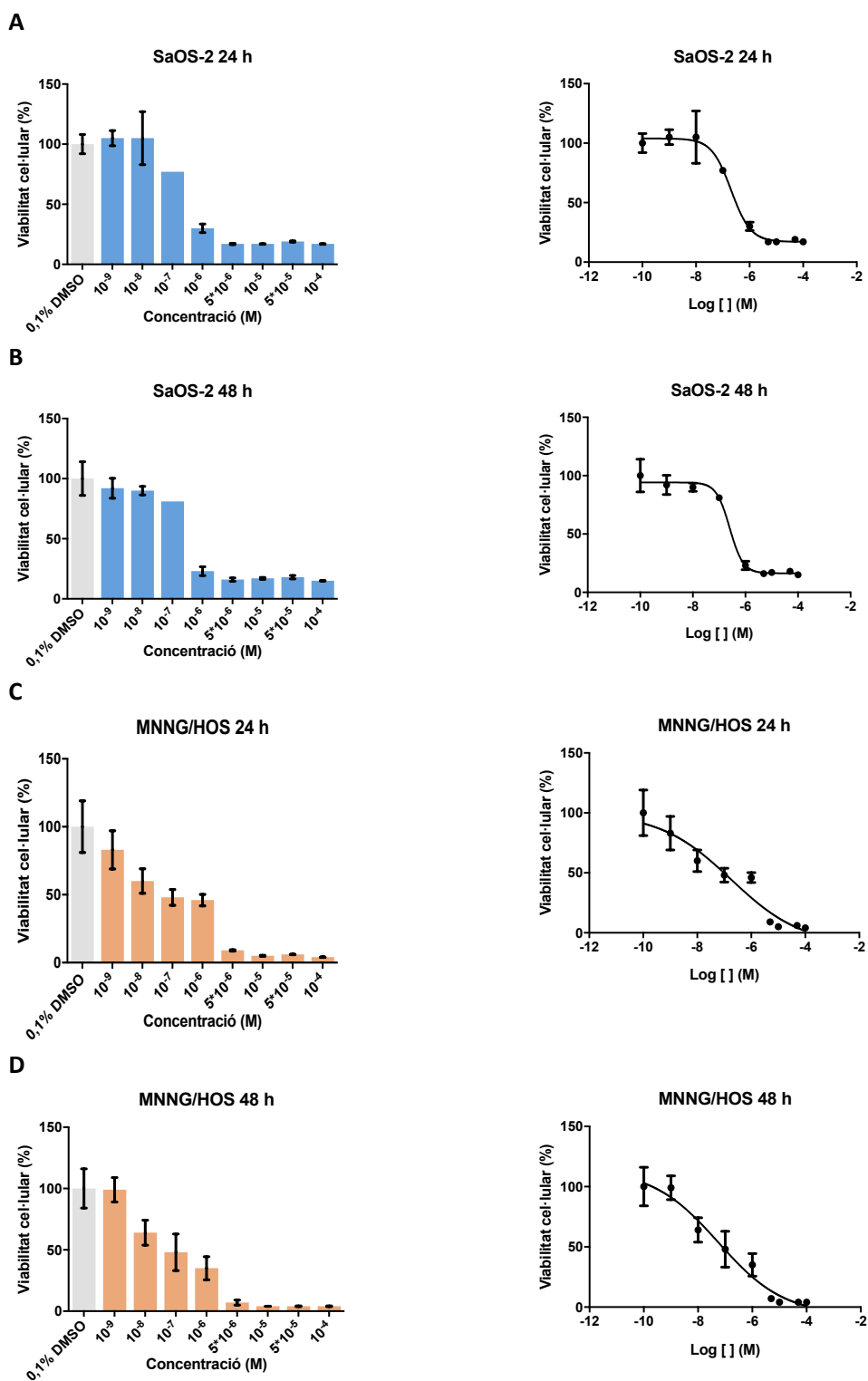


Figura 61. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **22**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **23** (Figura 62):

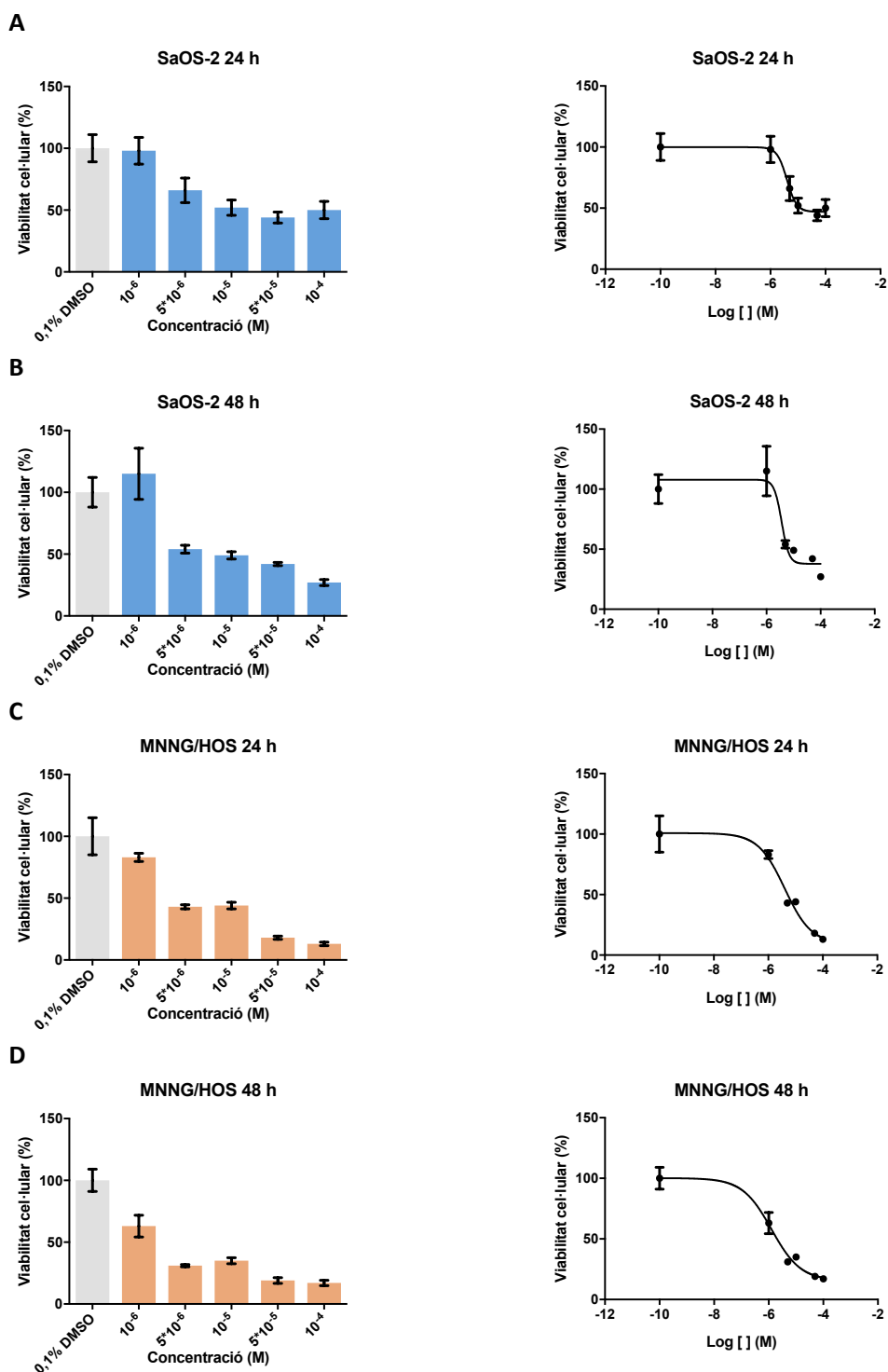


Figura 62. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **23**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **24** (Figura 63):

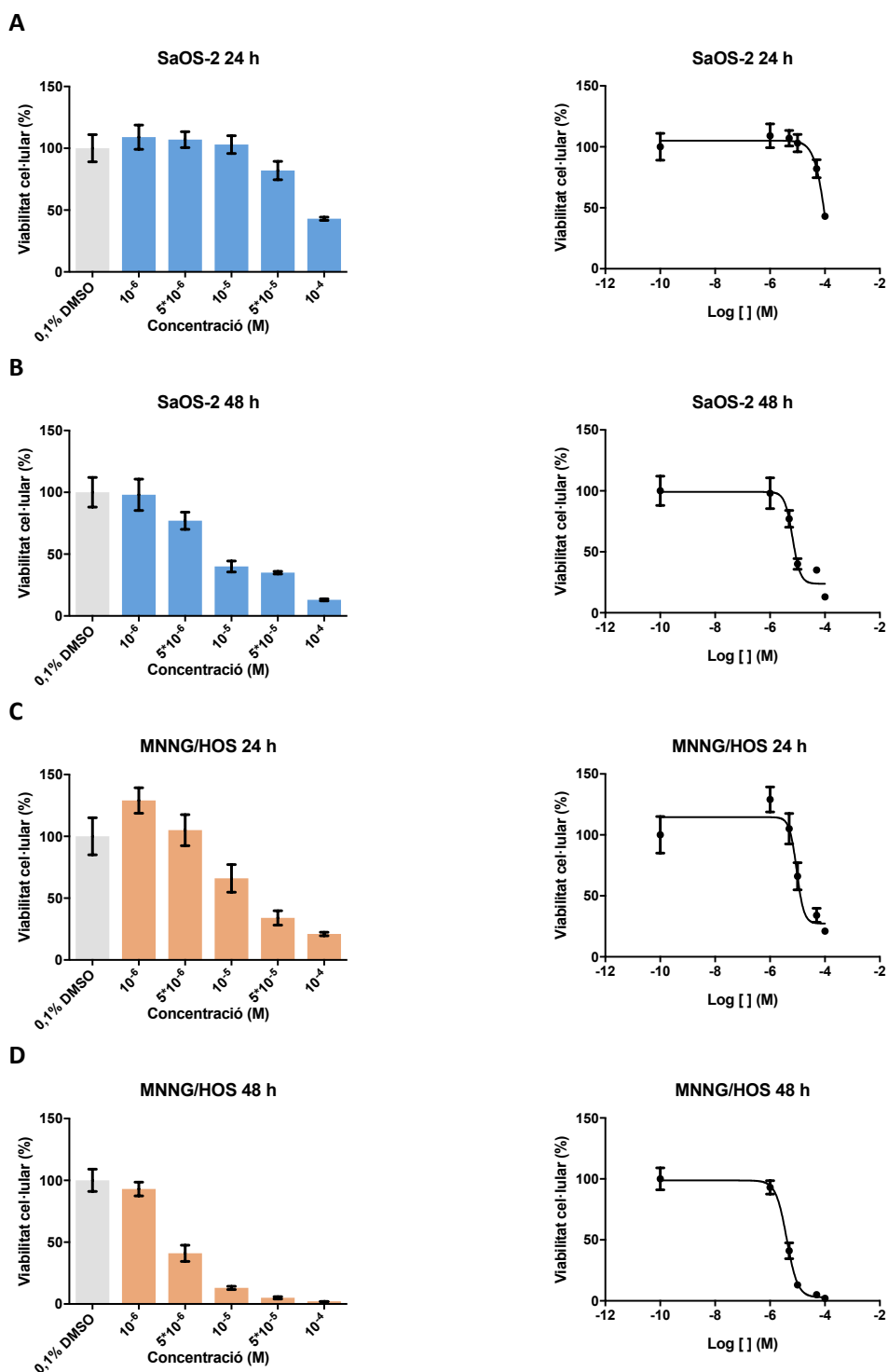


Figura 63. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **24**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **48** (Figura 64):

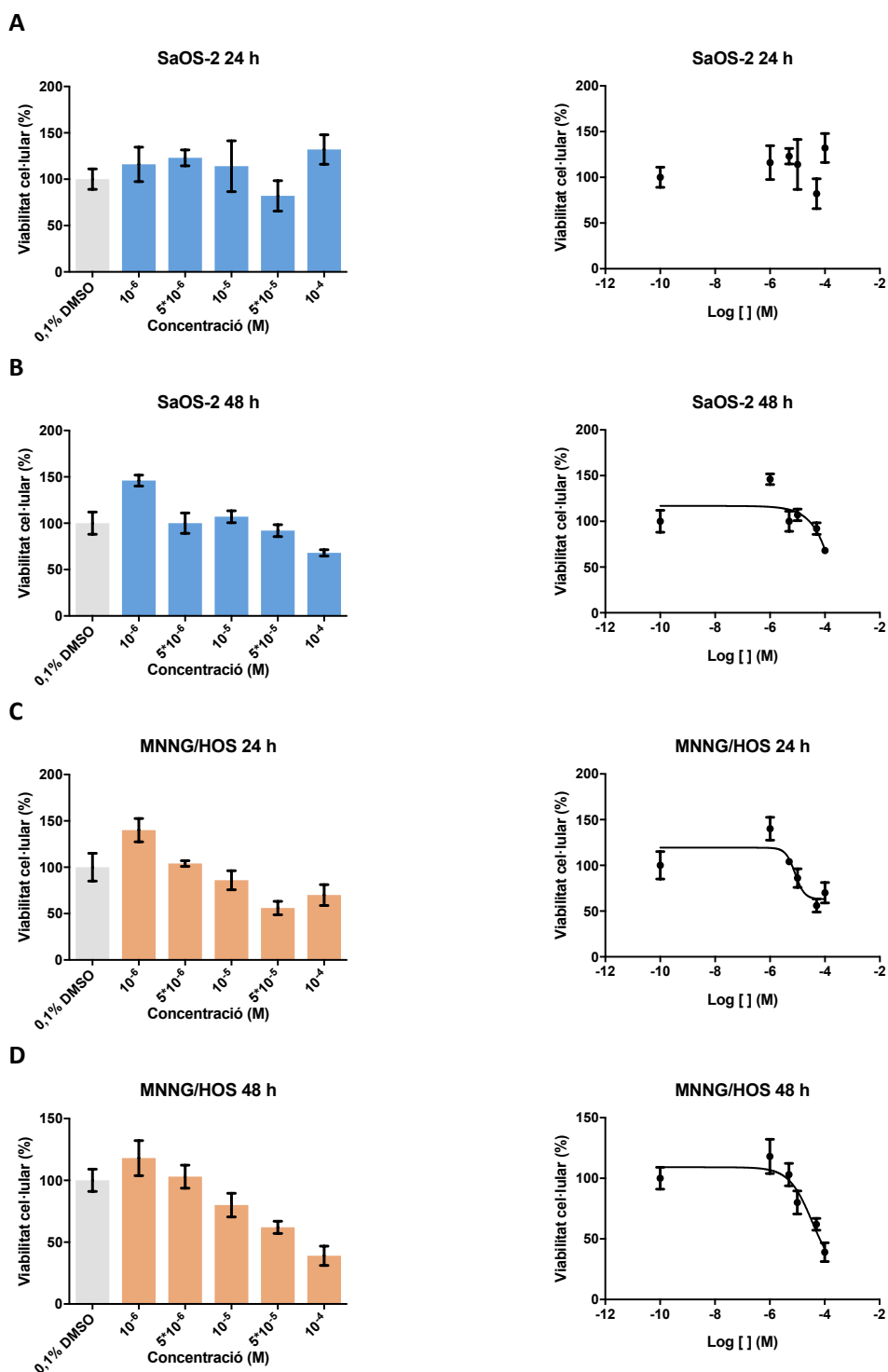


Figura 64. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **48**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **99** (Figura 65):

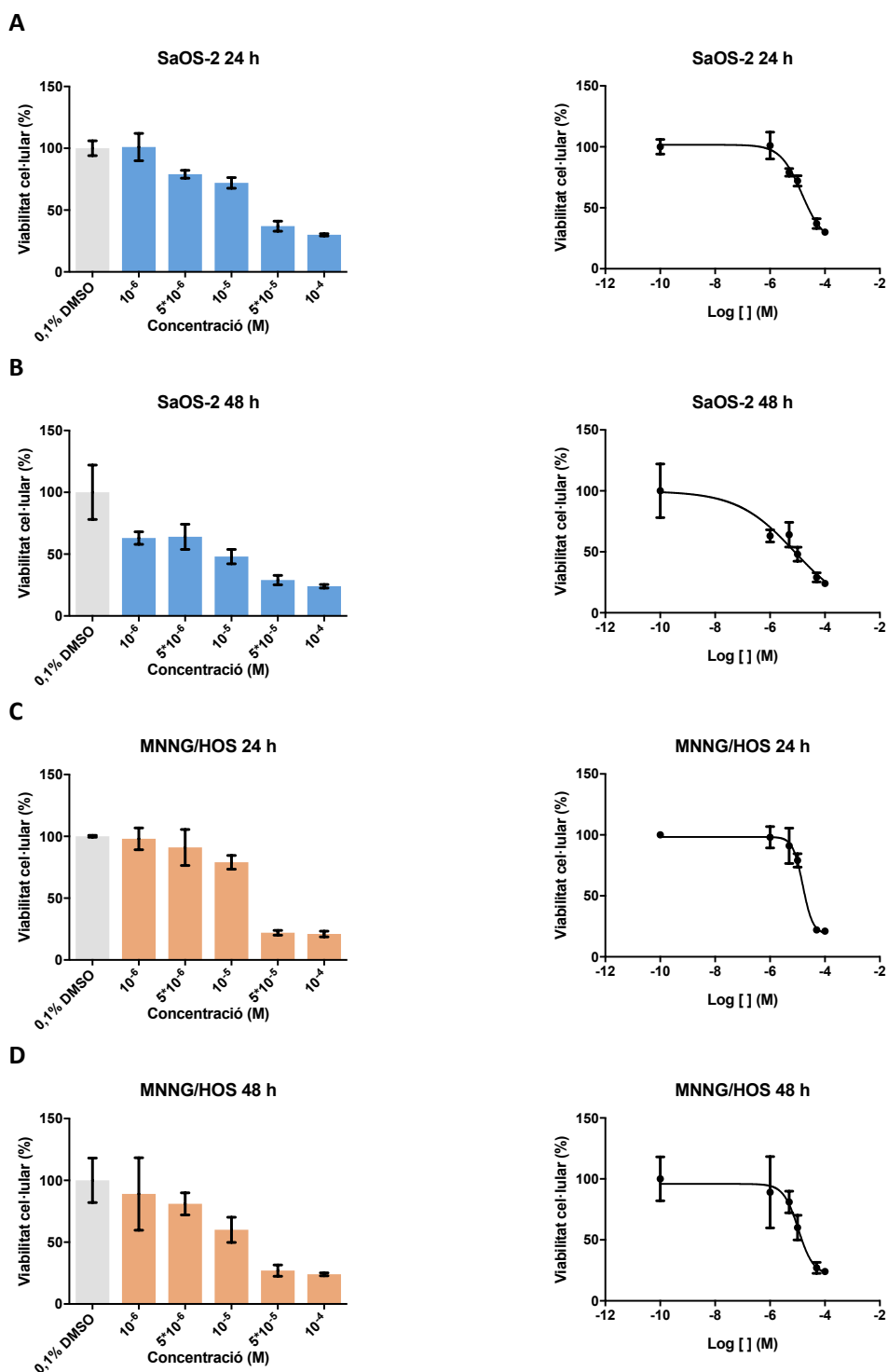


Figura 65. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **99**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

– Compost **100** (Figura 66):

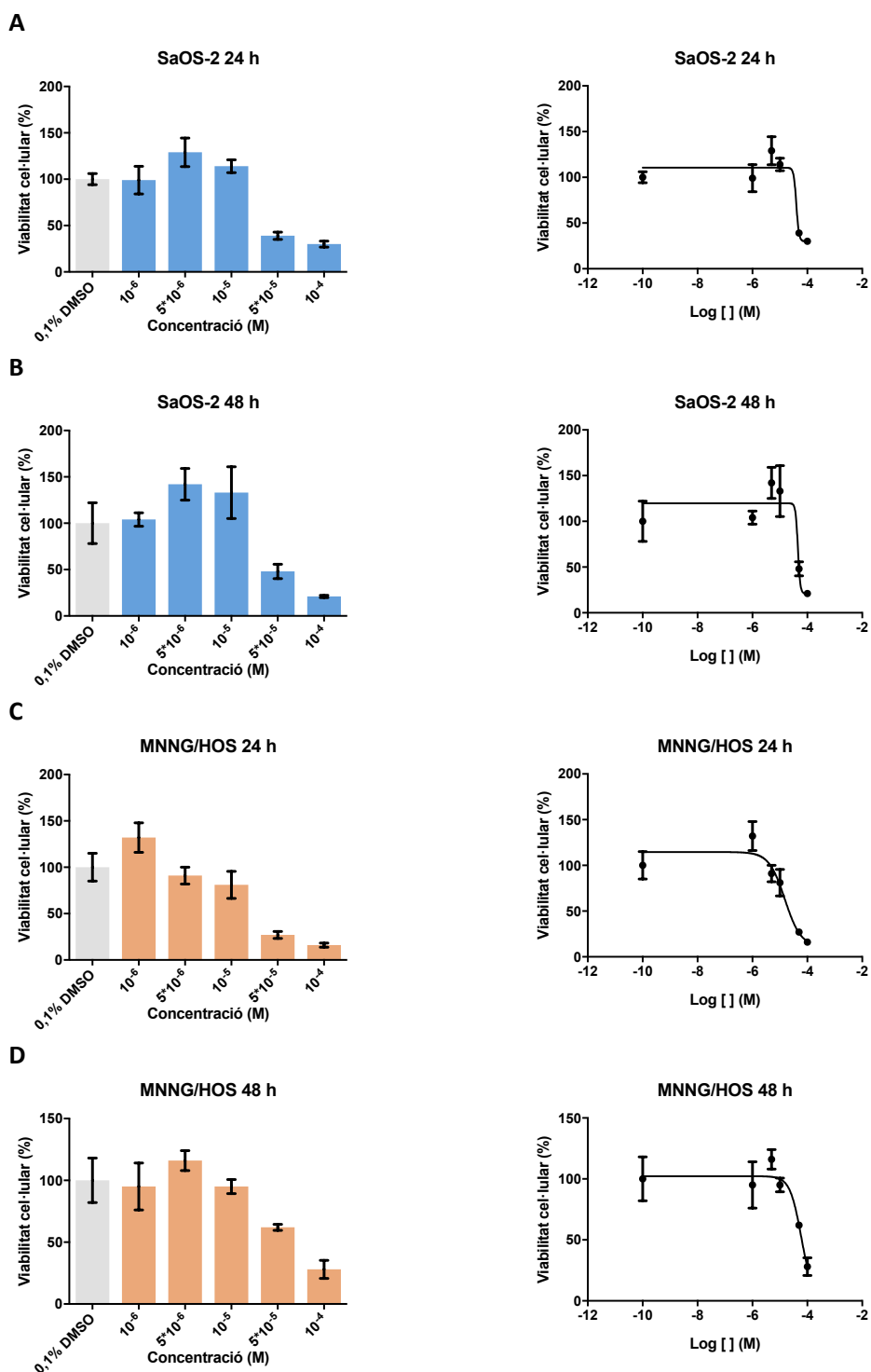


Figura 66. Relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració molar dels compost **100**. (A) Cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació. (B) Cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació. (C) Cèl·lules MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Cèl·lules MNNG/HOS a 48 hores d'incubació.

A la taula següent es mostren els valors de IC₅₀ dels compostos avaluats per a cada línia cel·lular cancerosa i temps analitzat (Taula 29).

Taula 29. Determinació de la IC₅₀ dels compostos **10, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 48, 99, 100**

COMPOST	IC ₅₀ dels 14 compostos assajats en SaOS-2 i MNNG/HOS (µM)							
	SaOS-2				MNNG/HOS			
	IC ₅₀ 24 h	R ²	IC ₅₀ 48 h	R ²	IC ₅₀ 24 h	R ²	IC ₅₀ 48 h	R ²
10	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
11	10,9	0,8188	30,5	0,9618	79,8	0,9863	11,5	0,9883
12	ND	-	ND	-	ND	-	42,8	0,9933
15	2,28	0,9980	1,17	0,9971	0,112	0,9776	0,495	0,9833
16	4,99	0,9407	5,01	0,9895	1,08	0,9920	1,04	0,9306
19	0,257	0,9909	0,0339	0,9460	0,299	0,9985	0,0421	0,9248
20	21,6	0,9919	1,08	0,9971	2,98	0,9570	0,671	0,9755
21	1,42	0,9996	2,76	0,9932	1,67	0,9984	1,79	0,9927
22	0,205	0,9971	0,252	0,9951	0,178	0,9463	0,0559	0,9753
23	3,95	0,9940	3,62	0,9436	3,99	0,9817	1,27	0,9863
24	119	0,9853	6,62	0,9633	9,37	0,9449	4,06	0,9989
48	ND	-	ND	-	ND	-	35,3	0,9146
99	14,5	0,9927	7,87	0,9611	15,6	0,9980	10,8	0,9904
100	39,9	0,9284	45,5	0,8848	15,3	0,9359	59,8	0,9442

ND: no determinat. No es pot extrapolar el valor de la corba.

El fet que en la majoria de casos el valor de IC₅₀ sigui menor en cèl·lules MNNG/HOS que en cèl·lules SaOS-2 resulta prometedor ja que com s'ha explicat anteriorment, les cèl·lules SaOS-2 estan més diferenciades que les MNNG/HOS i sovint es consideren un model similar als osteoblasts. Per tant, tenir resultats més prometedors sobre MNNG/HOS indica que els compostos tenen més afinitat sobre cèl·lules poc diferenciades i per tant, s'espera que tinguin certa selectivitat sobre cèl·lules canceroses.

Gràcies a la similitud estructural d'alguns compostos es poden establir relacions estructura activitat (SAR) tal i com s'indica a continuació:

– Compostos **10**, **11** i **12** (Figura 67):

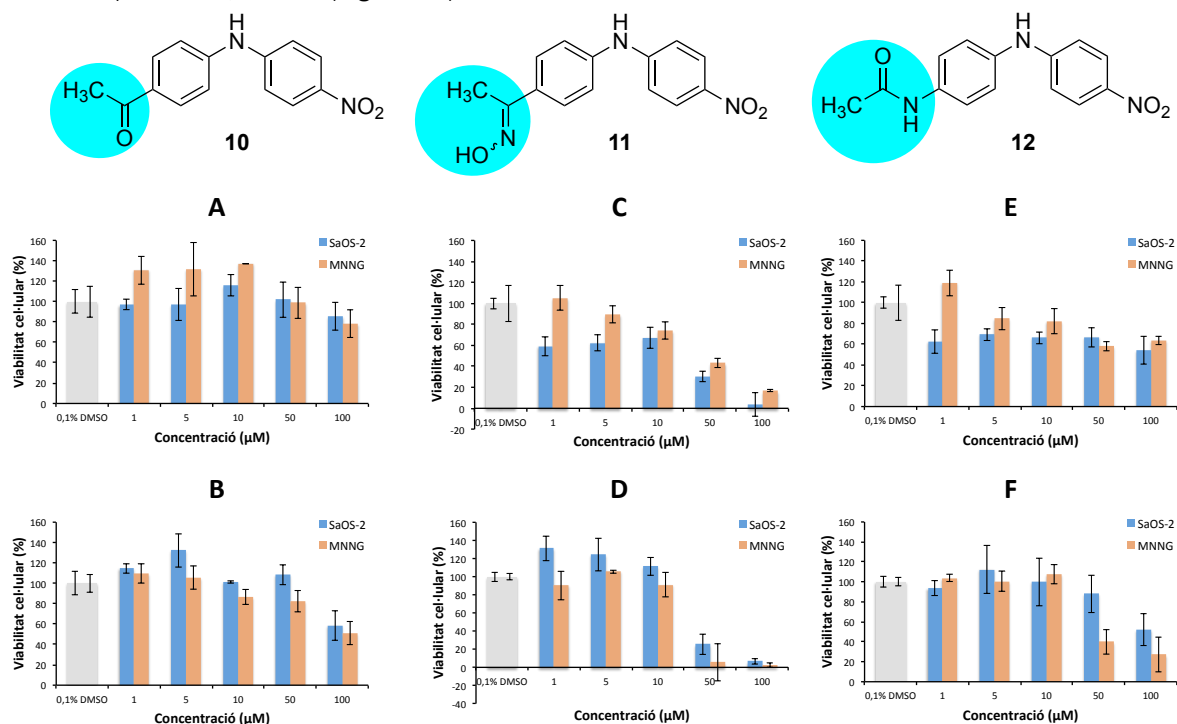


Figura 67. Estructura química dels compostos **10**, **11** i **12** i relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració mil·limolar de cada compost. **(A)** Compost **10** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. **(B)** Compost **10** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. **(C)** Compost **11** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. **(D)** Compost **11** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. **(E)** Compost **12** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. **(F)** Compost **12** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació

Els tres compostos **10**, **11** i **12** mantenen l'estructura de la diarilamina amb el grup nitro en *para* en un dels anells i divergeixen en el substituent en *para* de l'altre anell aromàtic amb un grup acetil, una oxima o una amida, respectivament. Cal destacar que en el cas dels compostos **10** i **12** no es va poder determinar el valor d'IC₅₀ a partir dels valors de viabilitat cel·lular obtinguts, excepte en el cas del compost **12** assajat en MNNG/HOS a les 24 h on es va obtenir un valor de 42,8 µM. Tot i així, a partir dels valors d'IC₅₀ obtinguts per al compost **11** i els gràfics de viabilitat cel·lular dels compostos **10** i **12**, es pot deduir que el producte de major activitat antitumoral és el compost **11** amb el substituent oxima en *para* de la diarilamina, amb unes IC₅₀ de l'ordre de 10 µM. Aquest fet es pot deure a la major polaritat de l'oxima respecte els altres dos substituents que millora la solubilitat del producte. Si comparem el producte **10** i **12** amb un grup acetil i un grup amida, respectivament, el compost **12** mostra una major efectivitat sobre ambdós tipus cel·lulars, tot i que mostrà problemes de solubilitat en DMSO.

Si analitzem cada compost per separat sobre les línies cel·lulars tumorals, es pot veure que el compost **10** mostra un comportament semblant en ambdós tipus cel·lulars i en ambdós temps, però és parcialment més potent a les 48 hores d'incubació. Tal i com s'ha comentat en el cas anterior, aquest fenomen es pot deure a la dificultat que té per accedir a la cèl·lula o interaccionar amb la diana corresponent.

En el cas del compost **11**, pel que fa les cèl·lules SaOS-2 a concentracions baixes (1 µM, 5 µM i 10 µM) veiem com a les 24 hores d'incubació presenta major citotoxicitat que a les 48 hores d'incubació, mentre que a concentracions més elevades (50 µM i 100 µM) l'activitat és molt semblant en ambdós temps. Aquest fet pot deure's a l'activació d'un mecanisme cel·lular per

expulsar el compost de la cèl·lula, per hidrolitzar l'oxima o bé per manca d'afinitat del compost amb la diana corresponent que fa que perdi activitat al llarg del temps. El fet que a concentracions elevades l'activitat sigui molt semblant podria justificar-se per la manca d'eficàcia de la cèl·lula d'expulsar o hidrolitzar dosis altes del compost al temps analitzat. En relació a les cèl·lules MNNG/HOS, a les 24 hores d'incubació la viabilitat cel·lular mostra un perfil quasi lineal, mentre que a les 48 hores d'incubació hi ha un canvi de linealitat entre les concentracions 10 μM i 50 μM . Aquest fet podria explicar-se per la necessitat d'assolir una concentració mínima que permetés bloquejar completament la diana i aquesta fos essencial per a la supervivència.

Pel que fa el compost **12**, sobre SaOS-2 a les 24 hores d'incubació mostra una inhibició del creixement cel·lular molt similar en totes les concentracions assajades. Aquest perfil podria indicar un mecanisme d'acció citostàtic ja que es manté un nivell de creixement constant i per tant les cèl·lules segueix essent viables. No obstant, a les 48 hores d'incubació es pot veure com a concentracions més baixes (1 μM , 5 μM , 10 μM i 50 μM) les cèl·lules poden haver desenvolupat vies alternatives de creixement o de supervivència, o bé poden haver aconseguit expulsar el compost de la cèl·lula o de la diana, mostrant una viabilitat cel·lular superior a la de les 24 hores d'incubació. A la concentració més elevada (100 μM) la viabilitat cel·lular es manté. En relació a les cèl·lules MNNG/HOS, trobem un perfil força semblant al descrit anteriorment, amb una eficàcia superior a concentracions elevades a les 48 hores d'incubació.

- Compostos **10** i **48** (Figura 68):

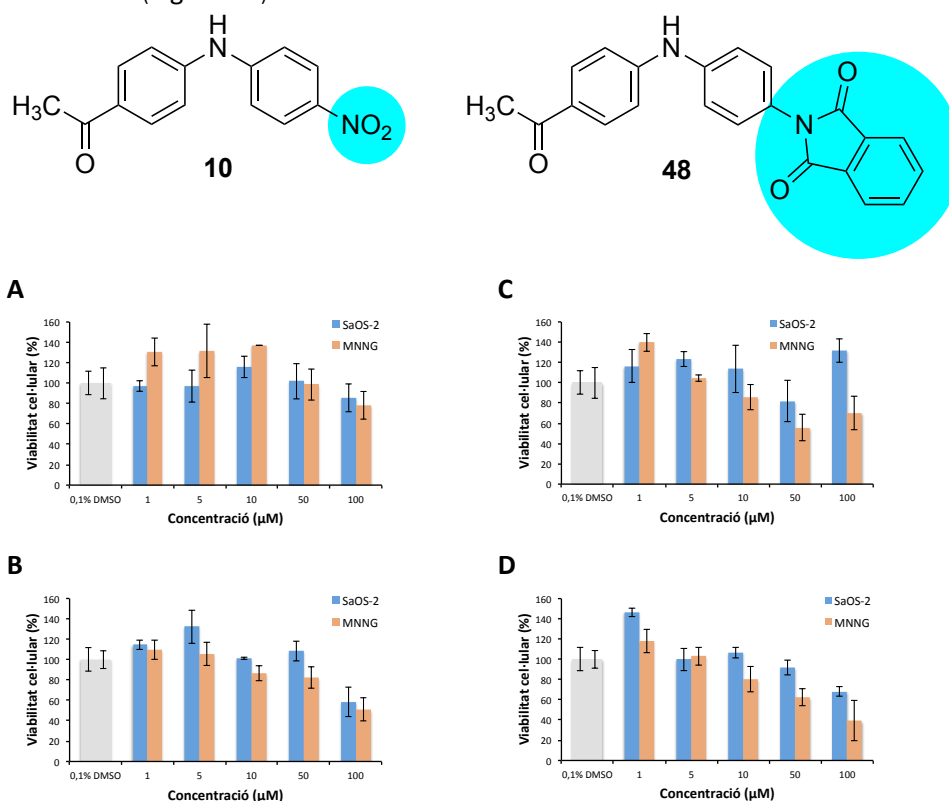


Figura 68. Estructura química dels compostos **10** i **48** i relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració mil·limolar de cada compost. (A) Compost **10** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (B) Compost **10** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. (C) Compost **48** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Compost **48** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació

Ambdós compostos **10** i **48** mostren una corba d'inhibició de creixement a partir de la qual no es pot extrapolar el valor de la IC_{50} , excepte en el cas del compost **48** sobre MNNG/HOS a les 48

hores d'incubació on es determina un valor d'IC₅₀ de 35,3 μM. Ambdós compostos mostren una eficàcia baixa a les concentracions assajades que podria deure's a una alta dificultat per accedir a la cèl·lula o a la manca d'accessibilitat a la diana. El compost **48** mostra més efectivitat sobre MNNG/HOS a les 48 hores d'incubació, fet el qual podria explicar-se per una dificultat inicial per entrar a la cèl·lula o a la diana que disminueix a mesura amb el temps. Cal destacar que aquest compost va presentar problemes de solubilitat en DMSO a causa de la seva lipofília.

– Compostos **15** i **16** (Figura 69):

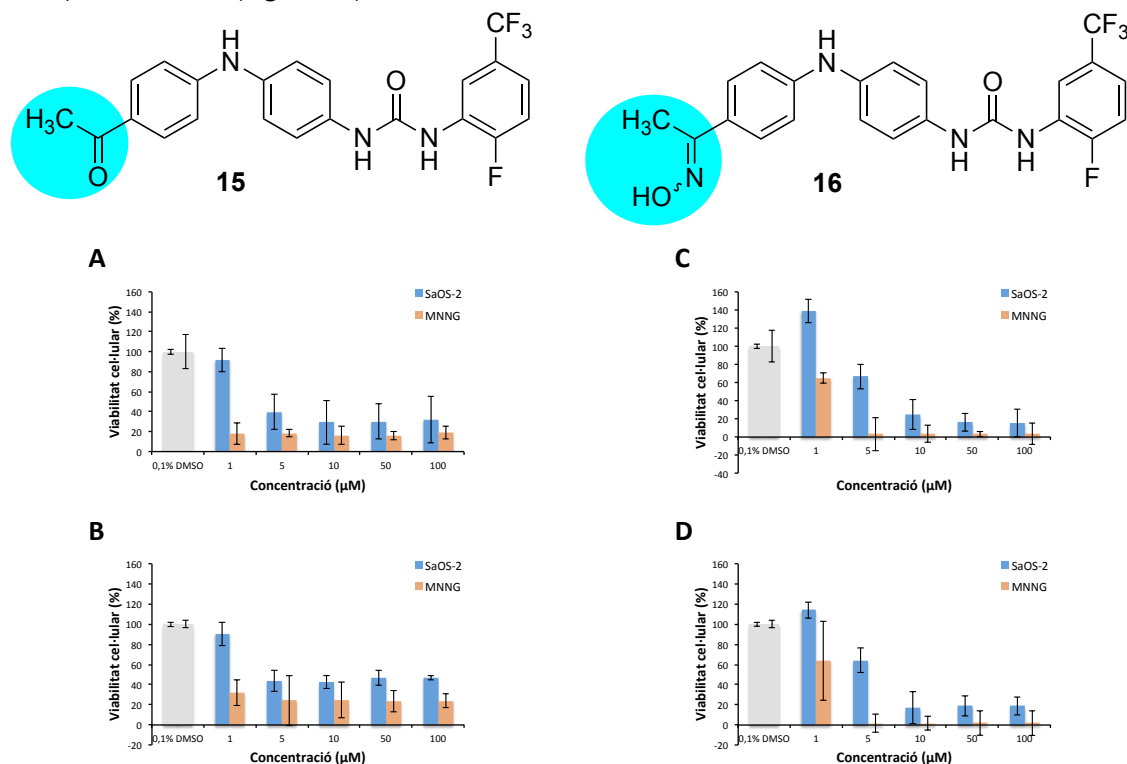


Figura 69. Estructura química dels compostos **15** i **16** i relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració mil·limolar de cada compost. (A) Compost **15** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (B) Compost **15** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. (C) Compost **16** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Compost **16** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació

Ambdós compostos **15** i **16** conserven l'esquelet de diarilamina amb el mateix tipus d'urea i divergeixen en el substituent de l'altre anell de la diarilamina sobre el qual tenen un grup acetil i un grup oxima, respectivament. En tots els casos, el compost **15** mostra un valor d'IC₅₀ més baix i per tant és més efectiu. Tot i així, cal destacar que el compost **16** mostrà problemes de solubilitat que podrien haver afectat a la determinació de la seva activitat inhibidora.

En el cas del compost **15**, per SaOS-2 després de 24 hores d'incubació es troba un valor d'IC₅₀ de 2,28 μM - aproximadament la meitat que en el cas del compost **16** amb un valor d'IC₅₀ de 4,99 μM - mentre que a les 48 hores d'incubació té un valor d'IC₅₀ de 1,17 μM - el compost **16** manté un valor d'IC₅₀ pràcticament idèntic a l'anterior, 5,01 μM -. Els resultats suggereixen que el compost **15** té certa dificultat per accedir a la cèl·lula o interaccionar amb la diana, mentre que el compost **16** no presenta aquesta dificultat i la seva eficàcia es manté constant en el temps.

Pel que fa les cèl·lules MNNG/HOS, el compost **15** a les 24 hores d'incubació mostra un valor d'IC₅₀ de 0,112 μM - quasi 10 vegades inferior a la IC₅₀ corresponent del compost **16** -, mentre que a les 48 hores d'incubació es quadruplica - en el cas del compost **16** es manté com a las 24 hores

d'incubació -. En aquest cas, es pot dir que per al compost **15** la cèl·lula aconsegueix trobar un mecanisme alternatiu per evitar l'efecte inhibitori sobre el creixement, el compost no té prou afinitat per la diana o bé és lleugerament expulsat de la cèl·lula. El compost **16** manté el mateix comportament que en el cas anterior.

Aquests dos compostos poden servir com exemple de la diferència entre un possible mecanisme d'acció citostàtic i un mecanisme d'acció citotòxic. En el cas del compost **15**, es pot veure com a partir d'una certa concentració el percentatge de viabilitat cel·lular es manté a un valor constant però superior a 0, indicant que hi ha un bloqueig del creixement constant però les cèl·lules es mantenen vives. No obstant, el compost **16** mostra el mateix perfil però el percentatge de viabilitat es manté a 0, indicant que no hi ha viabilitat cel·lular i que per tant les cèl·lules estan mortes.

- Compostos **19**, **20** i **21** (Figura 70):

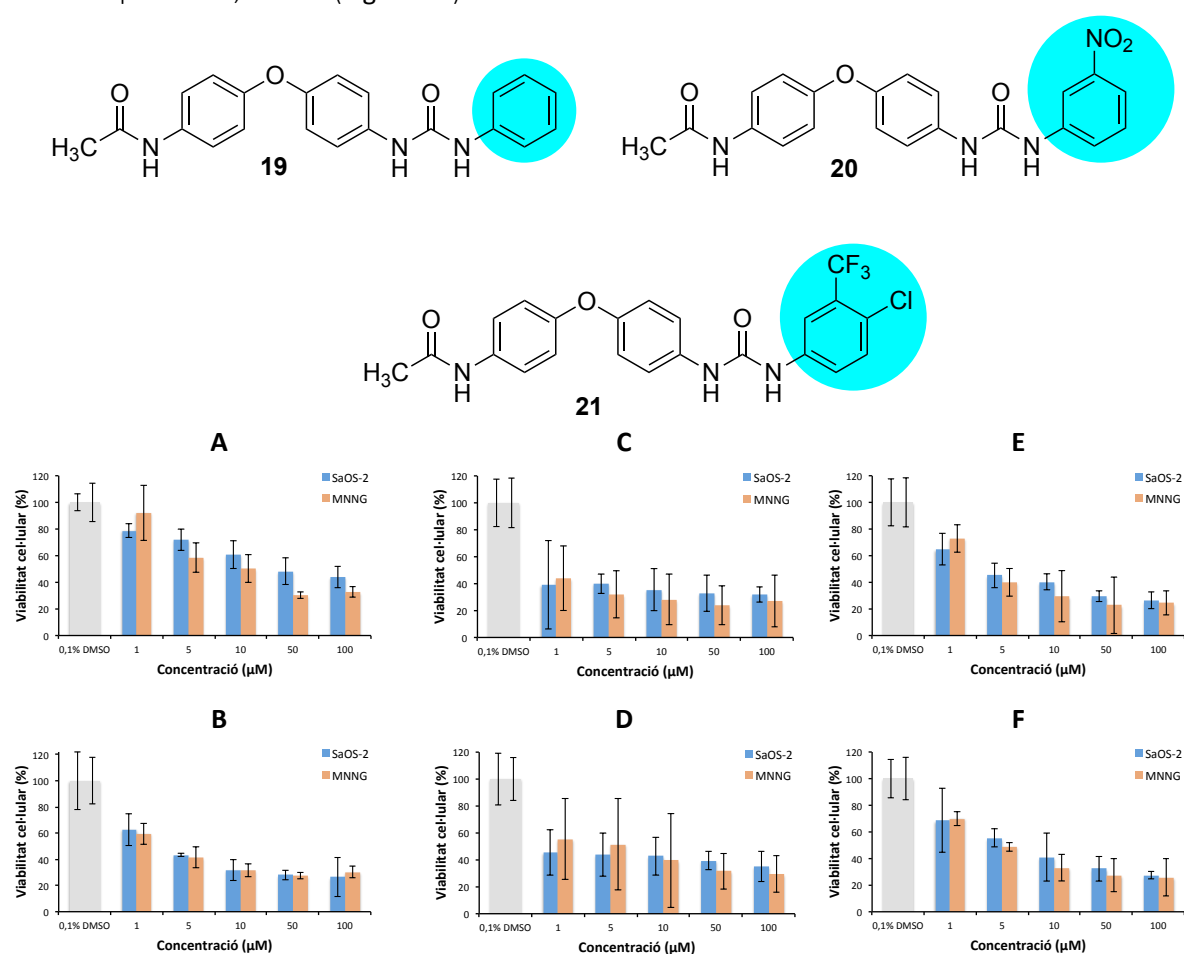


Figura 70. Estructura química dels compostos **19**, **20** i **21** i relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració mil·limolar de cada compost. (A) Compost **19** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (B) Compost **19** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. (C) Compost **20** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Compost **20** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. (E) Compost **22** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (F) Compost **22** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació

Els tres compostos **19**, **20** i **21** tenen el mateix esquelet de diarilèter amb diferents substituents a l'anell aromàtic de la urea; el compost **19** no té substituents, el compost **20** té com a substituent un grup nitro en *meta* i el compost **21** té un trifluorometil en *meta* i un clor en *para*. En les dues línies cel·lulars assajades, el compost **19** és com a mínim 10 vegades més potent que el compost

20 i mínim 5 vegades més actiu que el compost **21**. D'aquesta afirmació es pot extreure que els substituents electró-atraients de l'anell aromàtic de la urea no afavoreixen l'activitat inhibidora ja sigui per dificultat a l'hora d'entrar a la cèl·lula o a l'hora d'interaccionar amb la diana. Pel que fa la potència relativa entre els compostos **20** i **21**, el primer presenta una activitat inhibidora superior als assajos de 48 hores d'incubació - aproximadament 3 vegades més potent -, mentre que el segon presenta una capacitat inhibidora major als assajos de 24 hores d'incubació - aproximadament 2 vegades més actiu -.

A més a més, es pot destacar que en ambdós casos la diferència entre els valor d'IC₅₀ a 24 i 48 hores d'incubació és força elevada - 20 vegades menor a les 48 hores en SaOS-2 i 4 vegades menor a les 48 hores en MNNG per al compost **20**, i unes 7 vegades menor a les 48 hores en ambdós tipus cel·lulars per al compost **19** - i per tant, ambdós compostos inicialment poden tenir dificultat per accedir a la cèl·lula o interaccionar amb la diana. En canvi, en el cas del compost **21**, trobem una diferència de valor d'IC₅₀ a 24 i 48 hores d'incubació del doble en el cas de SaOS-2 i és pràcticament la mateixa en MNNG/HOS. Aquest fenomen implica que aquest compost no té dificultat per entrar a la cèl·lula o interaccionar amb la diana, o bé que aquesta dificultat no es resol en les 48 hores d'incubació.

Pel que fa les cèl·lules SaOS-2, per al compost **19** es determina un valor d'IC₅₀ a les 24 hores d'incubació de 0,257 µM mentre que a les 48 hores d'incubació presenta un valor d'IC₅₀ de 0,0339 µM. El compost **20** té un valor d'IC₅₀ a les 24 hores d'incubació de 21,6 µM, mentre que a les 48 hores d'incubació presenta un valor d'IC₅₀ de 1,08 µM. Com s'ha comentat anteriorment, els valors obtinguts amb el compost **19** són molt menors que els valors obtinguts amb el compost anterior **20**. Si comparem l'activitat del compost **21** en SaOS-2, a les 24 hores d'incubació es troba un valor d'IC₅₀ de 1,42 µM - més de 5 vegades menys eficaç que el compost **19** però més de 10 vegades més potent que el compost **20** - i a les 48 hores un valor d'IC₅₀ de 2,76 µM - més de 80 vegades superior al valor d'IC₅₀ del compost **19** i més de 2 vegades superior al valor d'IC₅₀ del compost **20**, essent menys actiu que ambdós compostos -.

En relació a les cèl·lules MNNG/HOS, la diferència entre la capacitat inhibidora del compost **19** és aproximadament 10 vegades superior a la del compost **20** a ambdós temps d'incubació; per al compost **20** es determina un valor d'IC₅₀ a les 24 hores d'incubació de 2,98 µM i a les 48 hores d'incubació presenta un valor d'IC₅₀ de 0,671 µM, i per al compost **19** es troba un valor d'IC₅₀ a les 24 hores d'incubació de 0,299 µM mentre que a les 48 hores d'incubació presenta un valor d'IC₅₀ de 0,0421 µM. Si comparem l'activitat del compost **21** en MNNG/HOS, a les 24 hores d'incubació es troba un valor d'IC₅₀ de 1,67 µM - més de 5 vegades menys eficaç que el compost **19** però lleugerament més potent que el compost **20** - i a les 48 hores d'incubació una IC₅₀ de 1,79 µM - més de 40 vegades menys eficaç que el compost **19** i més de 2 vegades menys actiu que el compost **20** -.

- Compostos **21** i **22** (Figura 71):

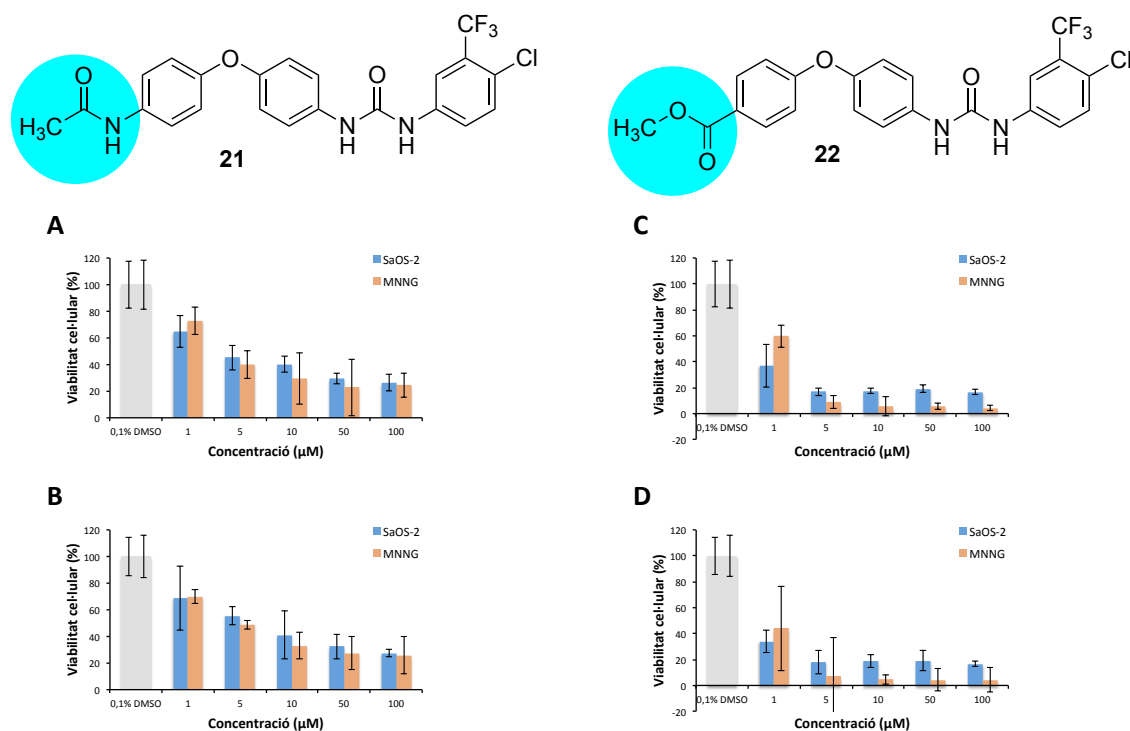


Figura 71. Estructura química dels compostos **21** i **22** i relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració mil·limolar de cada compost. **(A)** Compost **21** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. **(B)** Compost **21** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. **(C)** Compost **22** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. **(D)** Compost **22** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació

En aquest cas, es manté l'estructura del diarilèter amb la urea disubstituïda en *meta* i *para* per un trifluorometil i un clor, respectivament, però es modifica el substituent amida en *para* de l'altre anell del diarilèter per un grup èster en la mateixa posició (**22**). En les dues línies cel·lulars estudiades, el valor d'IC₅₀ del compost **22** ha estat com a mínim 9 vegades menor que el valor d'IC₅₀ del compost **21**. Per tant, en termes generals es pot concloure que sobre SaOS-2 i MNNG/HOS l'èster facilita l'activitat inhibidòria respecte a l'amida, ja sigui facilitant l'entrada a la cèl·lula o la unió a la diana.

Pel que fa la diferència entre les IC₅₀ a 24 i a les 48 hores d'incubació, tal i com s'ha comentat anteriorment, cal dir que tant en el cas del compost **22** - pràcticament igual en SaOS-2 i aproximadament 3 vegades menor a les 48 hores en MNNG/HOS - com en el cas del compost **21** no són gaire elevades, per tant es podria dir que en relació als compostos anteriors **20** i **19** presenten menys dificultats per accedir a la cèl·lula o a la diana.

En relació a l'activitat sobre SaOS-2, pel compost **22** a les 24 hores d'incubació es determina un valor d'IC₅₀ de 0,205 µM - aproximadament 7 vegades més activa a la corresponent IC₅₀ del compost **21** - i a les 48 hores d'incubació presenta una IC₅₀ molt similar (0,252 µM) - més de 10 vegades menor a la IC₅₀ del compost **21** -.

Pel que fa les cèl·lules MNNG/HOS, l'eficàcia relativa del compost **22** en comparació amb el compost **21** és major, amb un valor d'IC₅₀ a les 24 hores d'incubació de 0,178 µM - quasi 10

vegades menor a la IC₅₀ del compost **21** - i un valor d'IC₅₀ a les 48 hores d'incubació de 0,0559 µM - més de 30 vegades més actiu que el compost **21** -.

- Compostos **23** i **24** (Figura 72):

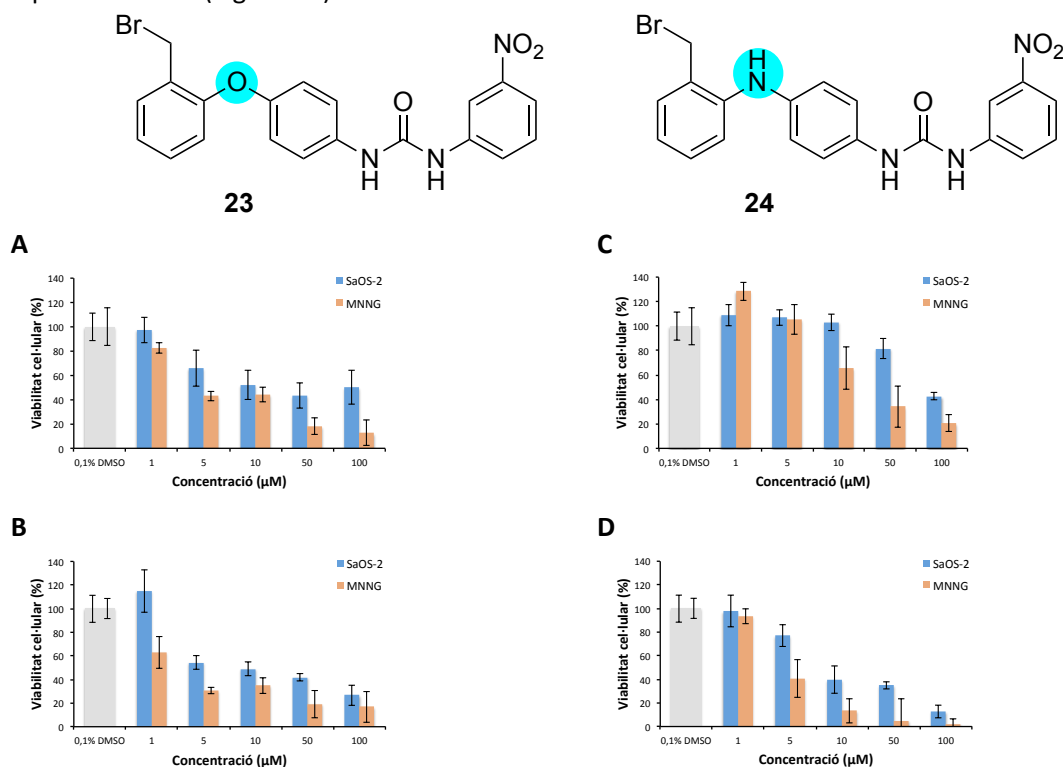


Figura 72. Estructura química dels compostos **23** i **24** i relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració mil·limolar de cada compost. (A) Compost **23** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (B) Compost **23** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. (C) Compost **24** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Compost **24** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació

El compost **23** mostra un valor de IC₅₀ relativament baix en tots els casos, per tant es podria dir que el diarilèter **23** és més efectiu que la respectiva diarilamina **24** en ambdues línies cel·lulars als temps assajats.

Analitzant l'activitat sobre les cèl·lules SaOS-2, el valor d'IC₅₀ del compost **23** és 30 vegades menor a les 24 hores d'incubació i quasi 2 vegades menor a les 48 hores d'incubació que el compost **24**. Amb aquestes resultats i tenint en compte els canvis d'IC₅₀ de cada compost a les 24 i 48 hores d'incubació, es pot concloure que en el cas del compost **23** no hi ha problemes per accedir ni per romandre a la cèl·lula ja que ambdós valors d'IC₅₀ són molt similars. En canvi, en el cas del compost **24**, el temps al qual s'analitza la viabilitat cel·lular és molt important: la diferència d'IC₅₀ és molt elevada, essent 18 vegades superior a la que correspon a 24 hores d'incubació, fet el qual podria justificar-se amb certa dificultat del compost per aconseguir entrar a la cèl·lula o bé per arribar a la diana corresponent.

Pel que fa les cèl·lules MNNG/HOS, en ambdós casos el temps analitzat és important i per tant es podria considerar que ambdós compostos requereixen de cert temps per accedir a la cèl·lula o arribar a la diana corresponent. En el cas del compost **23**, trobem un valor d'IC₅₀ més de 2 vegades més potent a les 24 hores d'incubació i aproximadament 3 vegades més actiu a les 48 hores d'incubació que el compost **24**.

– Compostos **99** i **100** (Figura 73):

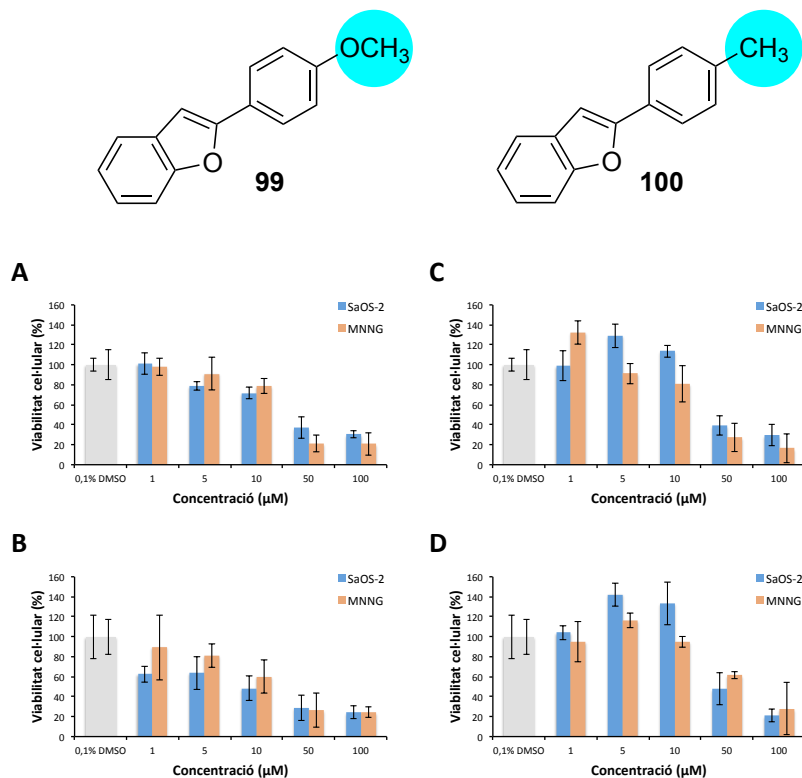


Figura 73. Estructura química dels compostos **99** i **100** i relació entre la viabilitat cel·lular i la concentració mil·limolar de cada compost. (A) Compost **99** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (B) Compost **99** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació. (C) Compost **100** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 24 hores d'incubació. (D) Compost **100** en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS a 48 hores d'incubació

Ambdós compostos **99** i **100** mantenen l'esquelet de benzofuran però el primer té com a substituent un grup metoxil mentre que el darrer té un grup metil. Ambdós grups funcionals són donadors (tot i que el metoxi és atraient per efecte inductiu) però presenten un volum, un pes molecular i una polaritat diversos. En tots els casos el compost **99** és el de major activitat. Aquest esdeveniment pot ocórrer gràcies a la major solubilitat i polaritat del compost.

Pel que fa les cèl·lules SaOS-2, el compost **99** presenta un valor d'IC₅₀ de 14,5 µM a les 24 hores d'incubació que es redueix pràcticament a la meitat a les 48 hores d'incubació (7,87 µM). Tal i com s'ha explicat anteriorment, el fet que a les 48 hores d'incubació el valor d'IC₅₀ sigui menor que a les 24 hores d'incubació pot deure's a una dificultat inicial del compost per entrar a la cèl·lula o interaccionar amb la diana. En el cas del compost **100**, el valor d'IC₅₀ a les 24 hores d'incubació és de 39,9 µM - quasi 3 vegades major que en el cas del compost **99** - i es manté força semblant a les 48 hores d'incubació (45,5 µM).

En relació a les cèl·lules MNNG/HOS, ambdós compostos mostren una inhibició semblant a les 24 hores d'incubació amb un valor d'IC₅₀ de 15,6 µM per al compost **99** i de 15,3 µM per al compost **100**. En el cas del compost **99** aquesta inhibició es veu lleugerament reduïda a les 48 hores d'incubació amb un valor d'IC₅₀ de 10,8 µM, mentre que en el cas del compost **100** es quadruplica fins a un valor de 59,8 µM, indicant una possible neutralització del compost dins la cèl·lula, una baixa afinitat el compost per la diana o l'activació de mecanismes alternatius per a evitar la inhibició del creixement cel·lular.

3.2.4.2 Selecció dels compostos més actius

Per tal de poder comparar els resultats obtinguts sobre cèl·lules d'osteosarcoma s'han seleccionat tres compostos descrits a la introducció d'aquest treball que s'utilitzen per al tractament de l'osteosarcoma o que mostren potencial sobre el tractament de l'osteosarcoma avançat i de mal pronòstic.

Aquests compostos són els següents (Figura 74):

- *cisplati*: tractament del càncer de primera línia en combinació amb *metrotrexat*, *doxorubicina* i *ifosfamida*.⁹
- *sorafenib*: ha demostrat tenir un gran potencial per al tractament d'osteosarcoma avançat i de la pronòstic.¹⁵⁴ El *sorafenib* té una estructura molt similar a les urees assajades en cèl·lules d'osteosarcoma.
- DZNep (3-deazaneplanocina A): inhibidor de l'EZH2 el qual ha demostrat inhibir el creixement tumoral en osteosarcoma.⁴⁵ L'EZH2 és la diana a partir de la qual s'han dissenyat alguns dels compostos assajats en cèl·lules d'osteosarcoma, per tant, aquesta molècula podria ésser el model de mecanisme d'acció sobre la inhibició de l'EZH2.

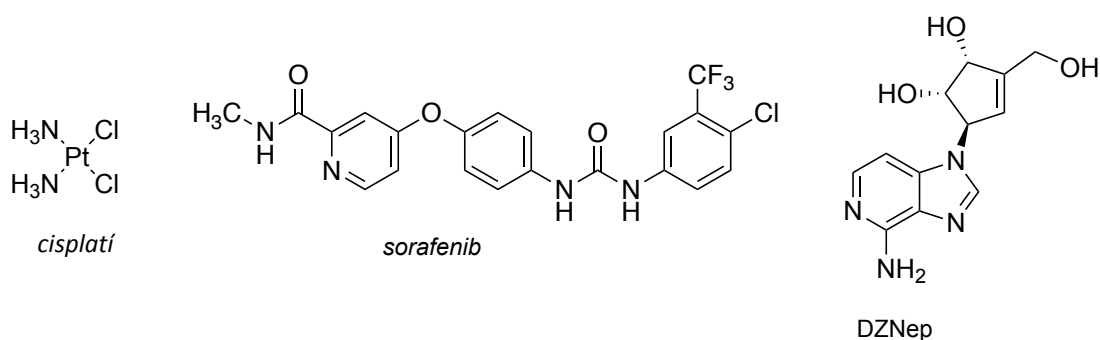


Figura 74. Estructura química del *cisplati*, *sorafenib* i DZNep

S'han escollit diversos resultats d'articles on s'han dut a terme estudis de creixement cel·lular en línies d'osteosarcoma per a determinar el valor d'IC₅₀ d'aquets tres compostos (Taula 30). Tot i que les condicions utilitzades per a determinar aquests valors d'IC₅₀ no són exactament els mateixos que s'han utilitzat per a realitzar els MTT amb els nostres compostos, es poden utilitzar com a valor de referència per avaluar l'eficàcia dels resultats obtinguts i seleccionar els millors candidats dels 14 compostos assajats.

¹⁵⁴ Q. Yang, S. Zhang, M. Kang, R. Dong, J. Zhao. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 2537-2544

Taula 30. IC₅₀ dels compostos de referència *cisplatí*, *sorafenib* i DZNep

IC ₅₀ dels compostos de referència <i>cisplatí</i> , <i>sorafenib</i> i DZNep (µM)			
COMPOSTOS	SaOS-2 48 h	SaOS-2 72 h	MNNG/HOS 72 h
<i>cisplatí</i> ¹	6,5 ± 0,42	-	-
<i>sorafenib</i> ^{154,155,156}	5,5 ± 0,16	3,943 6	4,814
DZNep ⁴⁵	-	0,26	-

El resultat d'IC₅₀ del *cisplatí* en cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació és de 6,5 µM. Pel que fa el *sorafenib*, en cèl·lules SaOS-2 a 48 hores d'incubació presenta un valor d'IC₅₀ de 5,5 µM - mostrant una inhibició del creixement superior a la del *cisplatí* - i a 72 hores d'incubació mostra un valor d'IC₅₀ d'entre 3,9 i 6 µM. En el cas de cèl·lules MNNG/HOS a 72 hores d'incubació, el valor d'IC₅₀ del *sorafenib* és de 4 µM. En el cas del DZNep, l'activitat inhibidòria a 72 hores sobre SaOS-2 és més elevada que en tots els casos anteriors amb un valor d'IC₅₀ de 0,26 µM.

Per tal de mantenir l'ordre de magnitud micromolar, s'han seleccionat els compostos els quals tenen un valor d'IC₅₀ menor a 10 µM. Aquests compostos es presenten a continuació (Taula 31):

Taula 31. IC₅₀ dels compostos més actius **15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24**

IC ₅₀ dels compostos més actius en SaOS-2 i MNNG/HOS (µM)				
COMPOSTOS	SaOS-2 24 h	SaOS-2 48 h	MNNG/HOS 24 h	MNNG/HOS 48 h
15	2,28	1,17	0,112	0,495
16	4,99	5,01	1,08	1,04
19	0,257	0,0339	0,299	0,0421
20	21,6	1,08	2,98	0,671
21	1,42	2,76	1,67	1,79
22	0,205	0,252	0,178	0,0559
23	3,95	3,62	3,99	1,27
24	119	6,62	9,37	4,06

Tal i com s'ha comentat anteriorment, els assajos realitzats per determinar el valor d'IC₅₀ dels productes de referència (*cisplatí*, *sorafenib* i DZNep) no es varen dur a terme sota les mateixes condicions que els MTT realitzats sobre els nostres compostos, per tant la comparació dels valors

¹⁵⁵ Y. Pignochino, G. Grignani, G. Cavalloni, M. Motta, M. Tapparo, S. Bruno, A. Bottos, L. Gammaitoni, G. Migliardi, G. Camussi, M. Alberghini, B. Torchio, S. Ferrari, F. Bussolino, F. Fagioli, P. Picci, M. Aglietta. *Mol. Cancer*. **2009**, *8*, 118

¹⁵⁶ J.P. Plastaras, S.H. Kim, Y.Y. Liu, D.T. Dicker, J.F. Dorsey, J. McDonough, G. Cerniglia, R.R. Rajendran, A. Gupta, A.K. Rustgi, J.A. Diehl, C.D. Smith, K.T. Flaherty, W.S. El-Deiry. *Cancer Res*. **2007**, *67*, 9443-9454

d'IC₅₀ només pot ésser orientativa. A més a més, en alguns casos els valors d'IC₅₀ han estat determinats a temps d'incubació diferents i per tant els resultats obtinguts no són comparables.

– En relació al *cisplatí* i al *sorafenib* en SaOS-2:

Les dades d'IC₅₀ obtingudes de la literatura a 48 hores d'incubació per a ambdós productes de referència són 6,5 i 5,5 µM, respectivament. Si comparem aquests valors amb els obtinguts amb els nostres compostos en SaOS-2 a 48 hores d'incubació, podem comprovar que tots ells mostren un valor d'IC₅₀ menor als dels productes de referència a excepció del compost **24** que és lleugerament menys actiu amb una IC₅₀ de 6,62 µM. Per tant, tots els compostos assajats menys l'esmentat anteriorment són probablement més potents sobre la inhibició del creixement que el *cisplatí* i el *sorafenib* sobre aquest tipus cel·lular. Com a productes més potents es podrien destacar el compost **19** i el compost **22**, els quals mostren una inhibició del creixement cel·lular d'aproximadament 160 i 20 vegades superior als productes de referència, respectivament -.

Pel que fa els valors d'IC₅₀ dels nostres compostos obtinguts sobre SaOS-2 a 24 hores d'incubació, cal dir que també presenten més activitat inhibidora sobre el creixement cel·lular que els resultats d'IC₅₀ del *cisplatí* i el *sorafenib* a 48 hores d'incubació, excepte el compost **24** i **20** els quals presenten un valor d'IC₅₀ de 119 i 21,6 µM.

Si es comparen els resultats de *sorafenib* obtinguts en 72 hores d'incubació, es pot veure que el valor d'IC₅₀ no varia gaire respecte a l'obtingut en 48 hores d'incubació - comprès aproximadament entre 4 i 6 µM -.

– En relació al DZNep en SaOS-2:

Per a aquest producte de referència només disposem del valor d'IC₅₀ per a 72 hores d'incubació i aquest mostra un 50% d'inhibició del creixement a 0,26 µM. Si ho comparem amb els resultats obtinguts amb els nostres compostos en SaOS-2 tant en 24 com en 48 hores d'incubació, els únics compostos que mostren un valor d'IC₅₀ menor són els compostos **24** i **20**, els quals ja destacaven respecte als altres per la seva potència.

– En relació al *sorafenib* en MNNG/HOS:

Si es compara el resultat d'IC₅₀ del *sorafenib* sobre MNNG/HOS a 48 hores d'incubació (4,814 µM) amb els valors d'IC₅₀ dels nostres compostos tant a 24 com a 48 hores d'incubació, es pot veure que tots els nostres compostos mostren una IC₅₀ menor excepte el compost **24** a 24 hores d'incubació que presenta una IC₅₀ de 9,37 µM. Per tant, es podria dir que els nostres compostos probablement tinguin una activitat inhibidora superior a la del *sorafenib* en cèl·lules MNNG/HOS, sobretot els compostos **16**, **19** i **22** amb un valor d'IC₅₀ de l'ordre de 0,1-0,01 µM.

3.2.4.3 Avaluació biològica sobre cèl·lules sanes

Per tal d'avaluar la capacitat inhibidora dels compostos més actius sobre el creixement en cèl·lules sanes, es realitzaren MTT sota les mateixes condicions assajades anteriorment en cèl·lules canceroses utilitzant osteoblasts (hOB). Aquests MTT només es realitzaren a les 24 hores d'incubació posterior al tractament.

L'objectiu d'aquesta avaluació és determinar si els compostos més potents en cèl·lules canceroses mostren toxicitat sobre cèl·lules no canceroses. Per aquest motiu, la concentració de la qual es va partir per avaluar l'efecte sobre hOB es determinà a partir de la IC₅₀ més alta obtinguda en SaOS-2 i

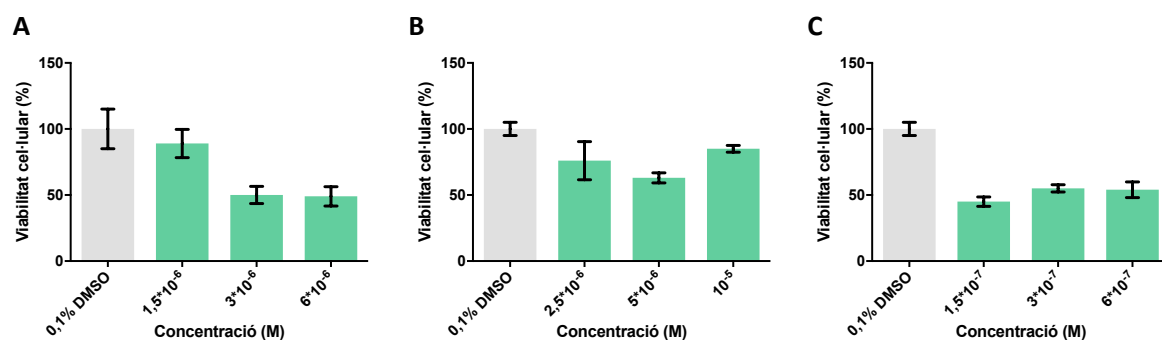
MNNG/HOS. El nostre objectiu és determinar si a la IC₅₀ més alta de cada compost on s'inhibeix el 50% del creixement de cèl·lules SaOS-2 o MNNG s'obté un percentatge de viabilitat cel·lular en osteoblasts proper al 100%. Si fos així, es podria concloure que el compost mostra selectivitat vers les cèl·lules tumorals estudiades i innocuïtat sobre les cèl·lules sanes utilitzades.

Per tal de facilitar la preparació de les dissolucions corresponents de cada compost, la IC₅₀ es va arrodonir en cada cas de manera que per a cada compost s'obtingué un valor de concentració de referència (ref.). Per tal d'obtenir corbes dosi-resposta, per a cada compost es van assajar tres concentracions diferents: ref./2, ref. i ref.*2 (Taula 32).

Taula 32. Concentracions assajades en hOB per als compostos **15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24**

Concentracions assajades en osteoblasts (hOB) (µM)			
	ref./2	ref.	ref.*2
23	2,5	5	10
24	5	10	20
15	1,5	3	6
16	2,5	5	10
20	1,5	3	6
19	0,15	0,3	0,6
21	1,5	3	6
22	0,15	0,3	0,6

A continuació es mostren els resultats obtinguts expressant la viabilitat cel·lular dels osteoblasts respecte la concentració molar de cada compost (Figura 75):



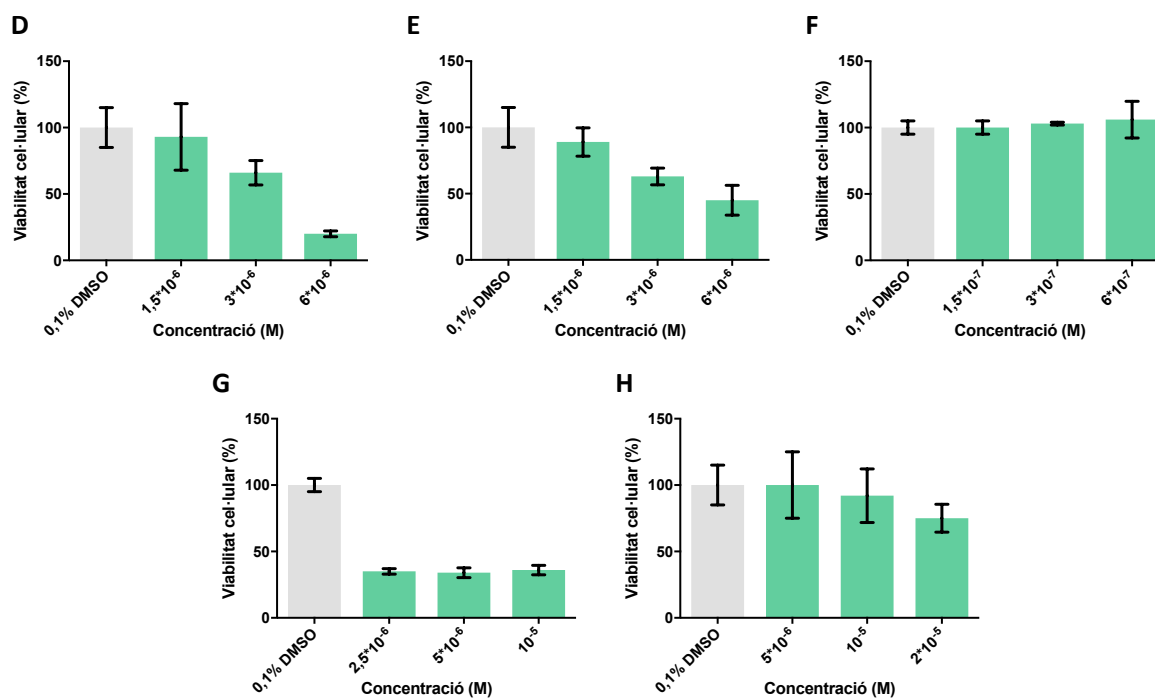


Figura 75. Relació entre la viabilitat cel·lular dels osteoblasts i la concentració molar dels compostos assajats. (A) Compost 15. (B) Compost 16. (C) Compost 19. (D) Compost 20. (E) Compost 21. (F) Compost 22. (G) Compost 23. (H) Compost 24.

A partir de les corbes dosi-resposta obtingudes sobre hOB es poden extreure les següents conclusions:

– Compost **15**:

El compost **15** mostra un creixement cel·lular constant a partir de la concentració de referència 3.00 μ M. Aquest valor de referència es basà en el valor d' IC_{50} de 24 h sobre SaOS-2 (2,28 μ M), i es pot afirmar que en SaOS-2 i en hOB no mostra selectivitat ja que la inhibició del creixement a la mateixa concentració és molt similar en ambdós casos i presenta el mateix mecanisme citostàtic. No obstant, en el cas de les cèl·lules MNNG/HOS, el valor d' IC_{50} a les 24 hores d'incubació és aproximadament 20 vegades menor (0,112 μ M) i caldria valorar la possible innocuïtat sobre hOB a aquestes concentracions.

– Compost **16**:

Aquest compost mostra una corba irregular que no respon a cap perfil esperat. Atès que només s'han avaluat tres concentracions diferents, no es poden extreure conclusions definitives. No obstant, si ens centrem en el valor de viabilitat obtingut a partir de la concentració de referència, es troba un 65% de viabilitat cel·lular enfront un 67% detectat en SaOS-2 a les 24 hores d'incubació i un 3% en MNNG/HOS a les 24 hores d'incubació. Per tant, es podria dir que la inhibició del creixement en SaOS-2 i en hOB és molt similar però caldria avaluar a concentracions més baixes la possible selectivitat del compost entre MNNG/HOS i hOB.

– Compostos **19** i **23**:

Ambdós compostos mostren una inhibició del creixement cel·lular constant a les tres concentracions assajades. Tal i com s'ha comentat amb anterioritat, aquest perfil constant amb una viabilitat cel·lular entorn a 35-55% (en aquest cas) podria ajustar-se a un mecanisme d'acció citostàtic. En el cas del compost **19**, el percentatge de viabilitat cel·lular romà entre un 54-55% i en el cas del compost **23** entre un 34-36%. En ambdós casos els valors de referència utilitzats es basen en valors d' IC_{50} de 24 hores d'incubació tan de SaOS-2 com de MNNG/HOS ja que ambdues

línies cel·lulars presentaren comportaments molt similars. Així doncs, es pot concloure que en ambdós casos la toxicitat sobre les cèl·lules canceroses i cèl·lules sanes assajades és molt similar i per tant, no hi ha selectivitat sobre les cèl·lules canceroses.

– Compostos **20** i **21**:

Ambdós compostos mostren un perfil d'inhibició semblant. En el cas del compost **20**, el valor d'IC₅₀ escollit com a valor de referència és 10 vegades menor al valor d'IC₅₀ de 24 hores d'incubació de SaOS-2 i equival al valor d'IC₅₀ de 24 hores d'incubació de MNNG/HOS. Per tant, tenint en compte que obtenim una inhibició del 66% respecte al 50% d'inhibició en MNNG/HOS i major en SaOS-2 es pot concloure que no mostra selectivitat sobre les cèl·lules tumorals assajades. Pel que fa el compost **21**, el valor de referència equival aproximadament al valor d'IC₅₀ obtingut a les 48 hores d'incubació en SaOS-2 i correspon al doble del valor d'IC₅₀ obtingut a les 24 hores d'incubació en SaOS-2 i MNNG/HOS. Per tant, obtenim un 63% de viabilitat cel·lular en hOB corresponent al 50% a les 48 hores d'incubació en SaOS-2 i un 89% equivalent al 50% a les 24 hores d'incubació en ambdues SaOS-2 i MNNG/HOS. El compost **21** és menys tòxic que l'anterior però tot i així mostra una toxicitat creixent a concentracions molt similars a les corresponents als valors d'IC₅₀ de les cèl·lules tumorals. Per tant, el compost **21** tampoc mostra selectivitat vers SaOS-2 i MNNG/HOS enfront hOB.

– Compost **22**:

En aquest cas, el compost no mostra toxicitat a cap de les concentracions assajades sobre hOB i el percentatge de viabilitat cel·lular es manté constant al 100%. Els valors d'IC₅₀ d'aquest compost a les 24 hores d'incubació en SaOS-2 i MNNG/HOS (0,205 µM i 0,178 µM, respectivament) es troben entre la concentració més baixa (0,15 µM) i el valor de referència (0,3 µM) assajats en hOB, per tant, mentre que en cèl·lules SaOS-2 i MNNG/HOS es troba un 50% d'inhibició del creixement cel·lular, en hOB presenta un 0% d'inhibició. Així doncs, en aquest cas es pot concloure que el compost **22** sí que presenta selectivitat sobre les cèl·lules tumorals assajades (SaOS-2 i MNNG/HOS).

– Compost **24**:

El valor de referència utilitzat per al compost **24** es basà en el valor d'IC₅₀ a les 24 hores d'incubació en MNNG/HOS (9,37 µM) ja que el valor obtingut amb SaOS-2 era molt elevat (119 µM). Per aquest valor de referència 10 µM, es troba un 92% de viabilitat cel·lular en hOB, un 100% de viabilitat en SaOS-2 i un 50% aproximadament en MNNG/HOS a les 24 hores d'incubació. Per tant, es podria dir que el compost **24** presenta selectivitat sobre MNNG/HOS respecte a hOB i SaOS-2, però entre SaOS-2 i hOB sembla actuar de forma similar.

4 EXPERIMENTAL PART

4.1 Organic Chemistry laboratory materials and methods

Proton and carbon nuclear magnetic spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR, respectively) spectrums have been performed with a Mercury-400 spectrophotometer (400 and 100.6 MHz, respectively) using CDCl_3 , acetone, DMSO- d_6 or other deuterated solvents with TMS as a reference. Chemical shifts are expressed as parts per million (ppm).

ESI Mass spectrums have been carried out with Agilent LC/MSD-ToF mass spectrophotometer (Chemical Faculty, University of Barcelona).

IR spectrums have been performed with FT-IR Perkin Elmer model Spectrum RX I and Thermo Nicolet model avatar 320 FT-IR spectrophotometers. It is noteworthy that only relevant frequencies (expressed in cm^{-1}) have been highlighted.

Melting points have been determined with a Gallenkamp model MFB.595.010M device with an internal thermometer and have been adjusted with an external thermometer.

Column chromatography has been performed manually on silica gel Merck 60 (40-60 cm) eluting with mixtures of different solvents or through an automatic CombiFlash[®] Rf system. TLC plate 60 F254 Merck has been used as thin layer chromatography.

Microdistillations have been performed in a Büchi GKR-50 Glass Tube Oven.

All reagents and organic used have recognised analytical grade or have been purified before their use. Commercial products have been obtained from Sigma-Aldrich.

4.2 Biochemical laboratory materials and methods (*University of Siena, UNISI*)

Cell cultures

SaOS-2 and MNNG/HOS cell cultures

SaOS-2 cells (ATCC-HTB-85) and MNNG/HOS cells (ATCC-CRL-1574) are obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured as described by Laschi *et al.*,¹⁵⁷ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (PAN Biotech) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS), Penicillin (100 mg/mL)/Streptomycin (100 mg/mL) (PAN Biotech) (Laschi M., 2015). Cultures are incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 (Thermo Scientific Incubator). Medium is replaced every two days.

hOB cell cultures

Bone samples are obtained from a male who underwent total hip replacement surgery. According to Spreafico's procedure, trabecular bone fragments are extensively washed in PBS (Phosphate-Buffered Saline) to remove blood and bone marrow, and then explanted into culture containing DMEM

¹⁵⁷ M. Laschi, G. Bernardini, M. Geminiani, L. Ghezzi, D. Braconi, L. Millucci, B. Frediani, A. Spreafico, A. Franchi, D. Campanacci, R. Capanna, A. Santucci. *J. Cell. Physiol.* **2015**, 230, 2718-2727

(Dulbecco's Modified Eagle Medium) (PAN Biotech) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS) (Ultra-low endotoxin, Euroclone), Penicillin (100 mg/mL)/Streptomycin (100 mg/mL) (PAN Biotech). Cultures are incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ (Thermo Scientific Incubator). Bone fragments are maintained by replacement of conditioned medium every 2 weeks. After 3–6 weeks in culture, a cellular confluent monolayer of primary osteoblasts has grown out from the bone fragments (E1 culture).¹⁵⁸ At that time, medium is replaced every three days.

All cell cultures are manipulated under a Laminar flow hood (Bluecoltur) and monitored under a Microscope Zeiss Axio.

Cell Viability assay

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay is a cell viability assay developed for a 96-well format suitable for high throughput screening (HTS). Viable cells with active metabolism convert a yellowish solution of MTT into a purple coloured formazan product by dehydrogenase enzymes (NADH-dependent cellular oxidoreductase enzymes) (Figura 76). When cells die, they lose the ability to convert MTT into formazan, thus colour formation serves as a useful and convenient marker for viable cells.¹⁵⁹

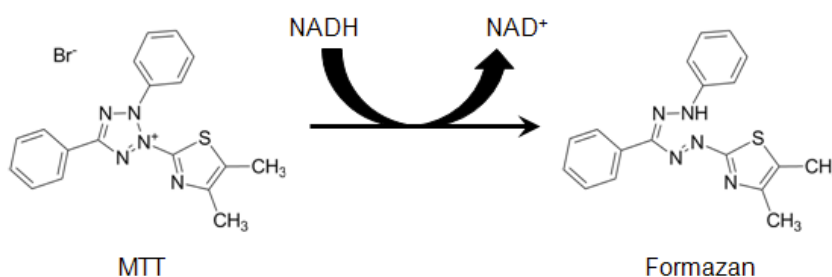


Figura 76. Chemical structures of yellow MTT and purple formazan¹⁵⁹

The formazan product of the MTT tetrazolium accumulates as an insoluble precipitate inside cells, and it is also deposited near the cell surface and in the culture medium. Prior to recording absorbance readings, the formazan product needs to be solubilized with DMSO. Absorbance has been assessed using a microplate reader with a wavelength set at 550 nm.

In order to assess the effect of our compounds in cell viability, each compound is diluted in DMSO to obtain a stock solution of 10⁻¹ M. This stock solution is used to prepare all different concentrations used in each MTT assay:

- For SaOS-2 and MNNG/HOS cells:
The concentrations tested are 10⁻⁶, 5*10⁻⁶, 10⁻⁵, 5*10⁻⁵ and 10⁻⁴ M.

¹⁵⁸ A. Spreafico, B. Frediani, C. Capperucci, F. Chellini, A. Paffetti, C. D'Ambrosio, G. Bernardini, R. Mini, G. Collodel, A. Sacloni, R. Marcolongo, A. Santucci. *Proteomics* **2006**, *6*, 3520-3532

¹⁵⁹ T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor. *Cell Viability Assays*. **2013** May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; **2004**-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>

For those products for which IC_{50} is close or lower than 10^{-6} M, additional lower concentrations are assessed: 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} M.

- For hOB:
The concentrations to be tested on hOB will be determined by the results obtained with SaOS-2 and MNNG/HOS cells for 24 and 48 hours for each compound. The highest IC_{50} of each compound will be rounded to provide a reference concentration (ref).
In order to have a dose response curve, three different points will be tested: ref./2, ref, ref*2.

Once prepared, the 14 selected compounds are tested in SaOS-2 and MNNG/HOS at the previously described concentrations. Then, the most active compounds are tested on osteoblasts at three different concentrations determined by the results obtained in the previous experiments. Each compound is tested in quadruplicate.

Each MTT assay requires 4 or 5 steps depending on the time point assessed (24 or 48 hours):

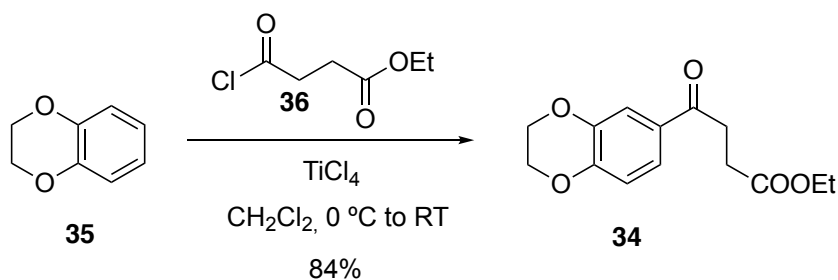
- Day 1: SaOS-2, MNNG/HOS and hOB cells are seeded with a multichannel pipette in a 96-well plate at a density of $9 \cdot 10^3$, $4 \cdot 10^3$ and $7 \cdot 10^3$ cells/well, respectively, using a Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck Millipore). The cells are allowed to attach for 30 hours incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ (Thermo Scientific Incubator).
- Day 2: After that time, complete medium is replaced by 200 µL 0.5% FBS DMEM medium/well for overnight starvation incubated under the same conditions described above.
- Day 3: The next day, the starved medium is replaced by 200 µL of different concentrations of each product. The control cell cultures are treated with the highest concentration of DMSO used for the treatments (0.1% v/v). The cells are incubated for 24 hours under the same conditions.
- Day 4: After 24 hours of treatment addition, culture medium is removed and cells are incubated with 1:5 diluted MTT (final concentration of 1 mg/mL) with white DMEM (without phenol red) for 3 hours and 30 min. After incubation time, the DMEM/MTT solution is carefully removed and formazan salts are dissolved in 100 µg/mL of DMSO. Finally, the absorbance is read at a wavelength of 550 nm using the microplate reader VersaMax™, Molecular Devices.
- Day 5: After 48 hours of treatment addition, the MTT assay described above is repeated. For hOB, this time point will not be evaluated.

Determination of IC_{50}

Cell viability is expressed as percentage of cell growth compared with DMSO control. Cell viability at each concentration is tested in quadruplicate in order to obtain a representative average with its corresponding standard deviation. Average absorbance values and standard deviation were determined by Microsoft® Excel® version 14.7.3.

IC_{50} values are determined using GraphPad Prism software version 6.0.1.298.

Preparation of ethyl 4-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[*b*]-6-yl)-4-oxobutanoate



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the 1,4-benzodioxan **35** (2 g, 14.69 mmol, 1 equiv.) dissolved in dichloromethane (15 mL) and cooled down to $0\text{ }^\circ\text{C}$ with an ice-bath. Ethyl 4-chloro-4-oxobutanoate (3.13 mL, 22 mmol, 1.5 equiv.) was then added dropwise. Finally, titanium tetrachloride (0.8 mL, 7.35 mmol, 0.5 equiv.) was added to the mixture. The mixture was stirred at room temperature for one hour. The reaction was continuously monitored by TLC (ethyl acetate 100%). After this time, more titanium tetrachloride (0.8 mL, 7.35 mmol, 0.5 equiv.) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The system was closed with a CaCl_2 tube.

Work-up

The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate 80:20.

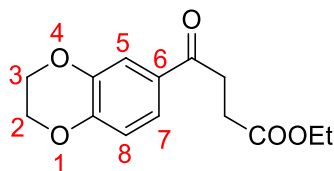
Yield: 84%

Analytical data

Aspect: white solid

R_f: 0.58 (ethyl acetate 100%)

Melting point: 54-55 $^\circ\text{C}$ (hexane/ethyl acetate)



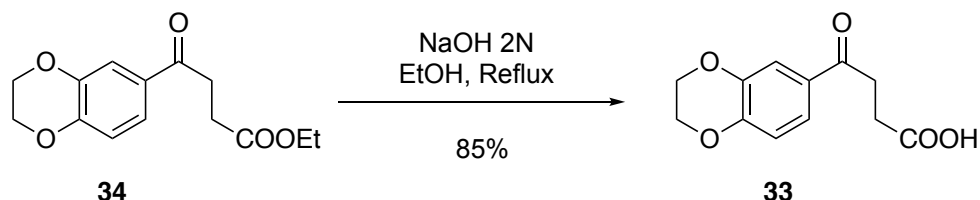
IR (NaCl) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1728 (C=O ester); 1681 (C=O); 1236 (Ar-O); 1068 (C-O).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3); 2.70 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 -); 3.21 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 -); 4.13 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 -O-); 4.22-4.30 (m, 4H, CH_2 -O-(x2)); 6.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-8); 7.49 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-7); 7.50 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50.3 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 14.0 (CH_3); 28.2 (CH_2 , CH_2 - CH_3); 32.8 (CH_2 , CH_2 -CO-); 60.4 (CH_2 , COOCH_2 -); 63.9 (CH_2 , CH_2 -O-, C-2); 64.5 (CH_2 , CH_2 -O-, C-3); 116.9* (CH , C-8); 117.3* (CH , C-5); 121.8

(CH, C-7); 130.2 (C, C-6'); 143.1 (C, C-4'a); 147.9 (C, C-8'a); 172.7 (C, -COOEt); 196.1 (C, C=O).
*interchangeables

Preparation of ethyl 4-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[*b*]-6-yl)-4-oxobutanoic acid



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the keto-ester **34** (3.26 g, 12.36 mmol, 1 equiv.) dissolved in ethanol (20 mL). Then, 40 mL of NaOH 2N were added to the solution. The mixture was stirred and refluxed for 2 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and HCl 2N was then added to the mixture in order to obtain an acid pH (4). Diethyl ether (3 x 20 mL) was used to extract the crude product. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude product was used in the next step without further purification since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

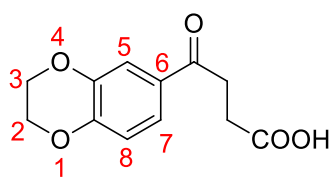
Yield: 85%

Analytical data

Aspect: white solid

R_f: 0.45 (ethyl acetate 100%)

Melting point: 137-139 °C (diethyl ether)

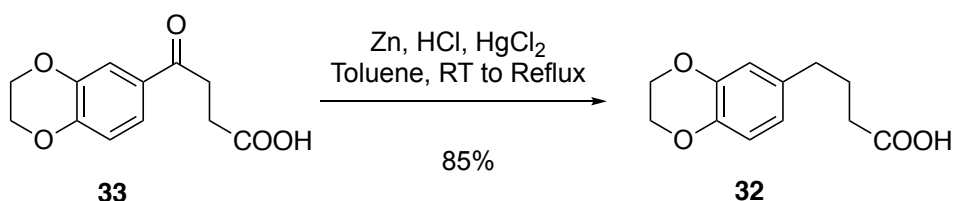


IR (NaCl) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3300 (OH); 1702 (C=O); 1682 (C=O); 1288 (Ar-O); 1194 (C-O).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.79 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH₃); 3.25 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH₂-); 4.27-4.35 (m, 4H, CH₂-O- (x2)); 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, C-8H); 7.52 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-7); 7.53 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-5).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 29.6 (CH₂-COOH); 32.8 (CH₂-CO-); 64.1 (CH₂, CH₂-O-, C-2); 64.6 (CH₂, CH₂-O-, C-3); 117.2* (CH, C-8); 117.6* (CH, C-5); 122.1 (CH, C-7); 130.2 (C, C-6); 143.3 (C, C-4a); 148.1 (C, C-8a); 178.6 (C, COOH); 196.3 (C, CO). *interchangeables

Preparation of 4-(2,3-dihydro-1,4benzo[1,4]dioxin[*b*]-6-yl)butanoic acid



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with Zn (3.6 g, 55.054 mmol, 10.5 equiv.), HgCl₂ (0.36 g, 1.326 mmol, 0.25 equiv.), 6 mL of water and 0.2 mL of concentrated HCl. The mixture was stirred at room temperature for 5 minutes. After this time, the supernatant liquid was carefully decanted (or filtered). Then, 2 mL of water, 5.2 mL of concentrated HCl, 3 mL of toluene and the keto-acid **33** (1.240 g, 5.249 mmol, 1 equiv.) were added to the remaining solid. The resulting mixture was stirred at reflux temperature for 5 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled to room temperature and the crude product was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

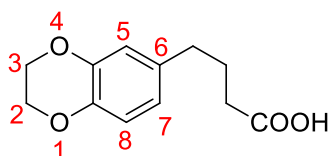
The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate 60:40.

Yield: 85%

Analytical data

Aspect: transparent oil

R_f: 0.38 (ethyl acetate 100%)

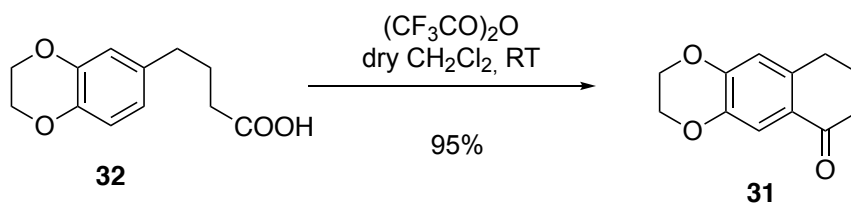


IR (NaCl) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3300 (OH); 1707 (C=O); 1287 (Ar-O); 1069 (C-O). (p.227)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1.92 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$); 2.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 2.57 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO-}$); 4.24 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-O-(x2)}$); 6.64 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-5); 6.68 (dd, $J_1 = 9$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, 1H, H-7); 6.78 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-8).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 26.2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$); 33.2 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$); 34.1 ($\text{CH}_2\text{-C-6}$); 64.2 ($\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{-O-, C-2}$); 64.3 ($\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{-O-, C-3}$); 116.9 (CH, C-5, C-8); 121.3 (CH, C-7); 134.4 (C, C-6); 141.7 (C, C-8a); 143.2 (C, C-4a); 180.0 (C, -COOH).

Preparation of 2,3,8,9-tetrahydronaphtho[1,4]dioxin[6,7-*b*]-6-one



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the carboxylic acid **32** (2.5 g, 11.15 mmol, 1 equiv.) dissolved in dry dichloromethane (15 mL). Then, 2 mL of trifluoroacetic acid were slowly added to the reaction mixture. Then, the solution was stirred at room temperature for 6 hours.

Work-up

The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and the organic phase was separated, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate 90:10.

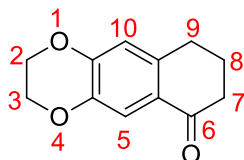
Yield: 95%

Analytical data

Aspect: white oil

R_f: 0.61 (hexane/ethyl acetate 1:1)

Melting point: 105-106 °C (hexane/ethyl acetate)

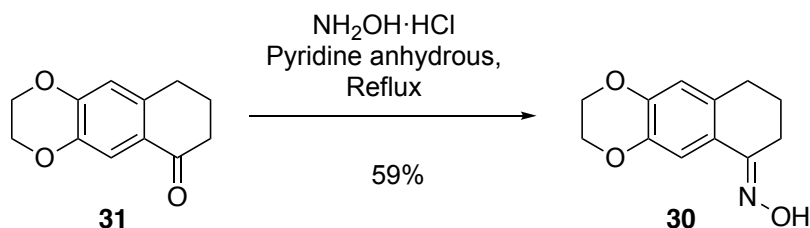


IR (NaCl) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1762 (C=O); 1294 (Ar-O); 1064 (C-O).

¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.08 (quint, $J = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$); 2.57 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 2.83 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO-}$); 4.23-4.31 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O-(x2)}$); 6.70 (s, 1H, H-10); 7.55 (s, 1H, H-5).

¹³C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 23.5 (CH_2 , C-8); 29.0 (CH_2 , C-9); 38.7 (CH_2 , C-7); 63.9 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-O-}$, C-2); 64.7 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-O-}$, C-2); 115.7 (CH, C-5); 116.3 (CH, C-10); 126.6 (C, C-5a); 138.7 (C, C-9a); 142.3 (C-4a); 148.1 (C-10a); 196.9 (C, CO).

Preparation of (*E*)-2,3,8,9-tetrahydronaphtho[1,4]dioxin[6,7-*b*]-6-one oxime



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with the tetralone **31** (0.2 g, 0.979 mmol, 1 equiv.) in anhydrous pyridine (20 mL). Then, hydroxylamine hydrochloride (0.136 g, 1.96 mmol, 2 equiv.) was added to the mixture. The solution was stirred at the reflux temperature of pyridine for 3 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled to room temperature. Once the pyridine was microdistilled, the reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate 75:25. In order to confirm the stereochemistry, a NOE experiment was carried out and *E* configuration was determined for oxime **30**.

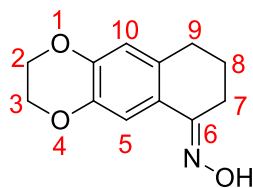
Yield: 59%

Analytical data

Aspect: beige solid

R_f: 0.42 (ethyl acetate 100%)

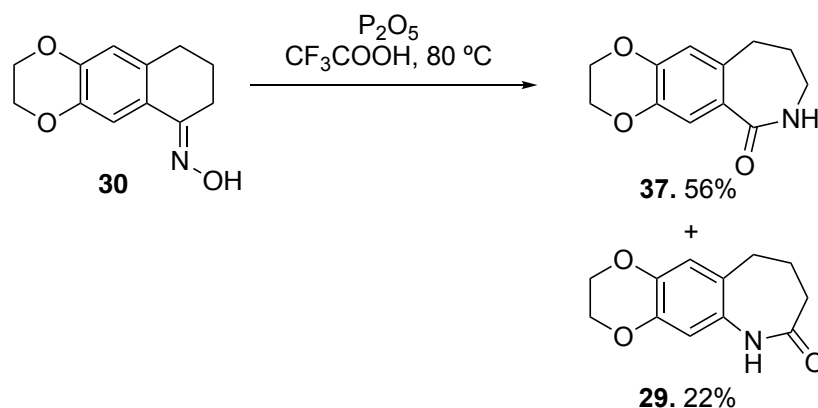
Melting point: 105-106 °C (hexane/ethyl acetate)



IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3201 (OH); 1573 (C=N); 1499 (C=C); 1036 (C-O).

¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1.83 (quint, $J = 6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN-}$); 2.64 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 2.75 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CN-}$); 4.21-4.28 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CO-(x2)}$); 6.64 (s, 1H, H-10); 7.40 (s, 1H, H-5); 8.63 (bs, 1H, OH).

Preparation of 2,3,7,8,9,10-hexahydro-6H-benzo[1,4]dioxin[6,7-b]azepin-6-one and 2,3,6,8,9,10-hexahydro-7H-benzo[1,4]dioxin[6,7-b]azepin-7-one



General procedure

A 25 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with oxime **30** (0.15 g, 0.684 mmol, 1 equiv.) dissolved in trifluoroacetic acid (1 mL). Then, P_2O_5 (0.193 g, 1.368 mmol, 2 equiv.) was slowly added. The mixture was heated at $80 \pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ under stirring for 4 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled to room temperature. Then, the reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. Two lactams were obtained: **29** with a polarity of hexane/ethyl acetate 50:50 and **37** with a polarity of hexane/ethyl acetate 30/70.

Yield: **29**: 22%; **37**: 56%

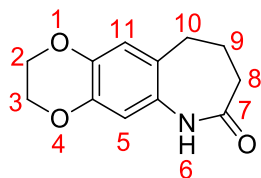
Analytical data

29:

Aspect: beige solid

R_f: 0.53 (ethyl acetate 100%)

Melting point: 176-178 °C (hexane/ethyl acetate)



IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3176 (NH); 1651 (C=O); 1570 (C=C); 1200 (Ar-O); 1064 (C-O).

$^1\text{H NMR}$ ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.14 (quint, $J_1 = 7.0\text{ Hz}$, 2H, $\underline{CH_2}$ - CH_2 -CO-); 2.31 (t, $J = 7.0\text{ Hz}$, 2H, CH_2 -Ar); 2.65 (t, $J = 7.0\text{ Hz}$, 2H, CH_2 -CO-NH-); 4.22 (s, 4H, CH_2 -CO-(x2)); 6.53 (s, 1H, H-11); 6.68 (s, 1H, H-5); 8.07 (bs, 1H, NH).

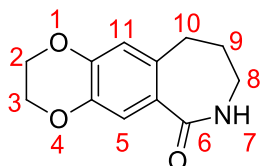
¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 28.4 (CH₂, C-9); 29.5 (CH₂, C-10); 32.6 (CH₂, C-8); 64.3 (CH₂, CH₂-CO(x2)); 111.0 (CH, C-5); 117.6 (CH, C-11); 127.5 (C, C-5a); 131.0 (C, C-10a); 141.0 (C, C-4a); 142.1 (C, C-11a); 175.4 (C, C=O).

37:

Aspect: beige solid

R_f: 0.23 (ethyl acetate 100%)

Melting point: 181-183 °C (hexane/ethyl acetate)

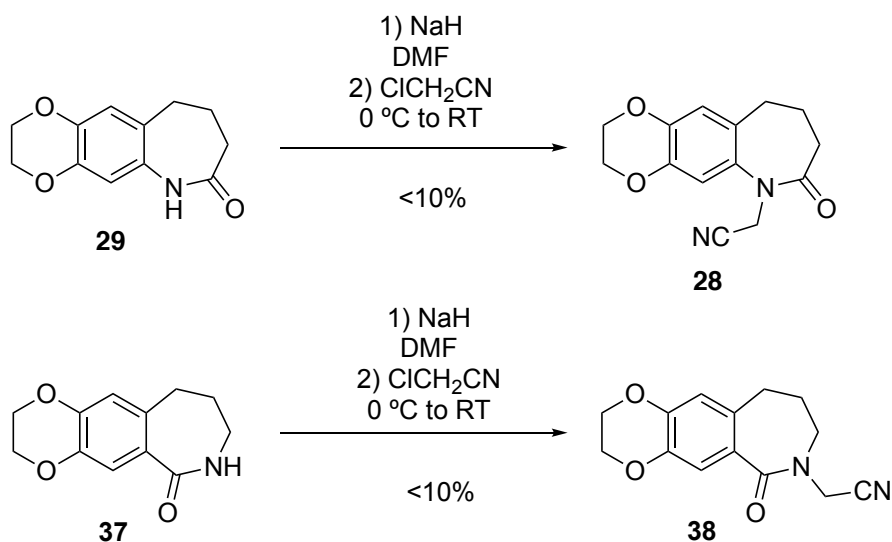


IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3200 (NH); 1666 (C=O); 1505 (C=C); 1180 (Ar-O); 1068 (C-O).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.96 (quint, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH-); 2.75 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Ar); 3.13 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-N-); 4.26 (d, J = 1 Hz, 4H, CH₂-CO-(x2)); 6.67 (s, 1H, H-11); 7.25 (s, 1H, H-5); 7.33 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 29.7 (CH₂, C-9); 30.5 (CH₂, C-10); 39.6 (CH₂, C-8); 64.1 (CH₂, CH₂-O-); 64.5 (CH₂, CH₂-O-); 117.1 (CH, C-5); 118.0 (CH, C-11); 128.0 (C, C-10a); 132.2 (C, C-5a); 142.1 (C, C-4a); 145.5 (C, C-11a); 173.6 (C, C=O).

Preparation of *N*-2-(7-oxo-7,8,9,10-tetrahydro-2*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-6(3*H*)-yl)acetonitrile and *N*-2-(6-oxo-9,10-dihydro-2*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-7(3*H*,6*H*,8*H*)-yl)acetonitrile



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with lactam **29** (0.130 g, 0.59 mmol, 1 equiv.) and **37** (0.089 g, 0.40 mmol, 1 equiv.) dissolved in DMF (10 mL). Then, the mixture was cooled down to 0 °C with an ice-bath and sodium hydride (for **28**: 0.031 g, 0.83 mmol, 1.4 equiv; for

38: 0.022 g, 0.57 mmol, 1.4 equiv.) was added to the mixture. The mixture was stirred at 0 °C for 30 minutes. After this time, chloroacetonitrile (for **28:** 0.049 mL, 0.83 mmol, 1.4 equiv; for **38:** 0.033 mL, 0.57 mmol, 1.4 equiv.) was added and the solution was stirred at room temperature for 16 hours.

Work-up

The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

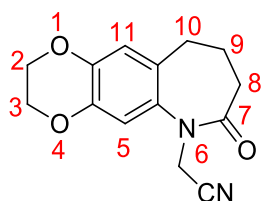
Purification

The crude product was directly used for the next step since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

Yield: **28:** <10%; **38:** <10%

Analytical data

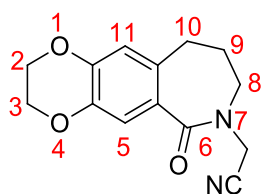
28:



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.82 (quint, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO-); 2.57 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-Ar); 2.79 (t, $J = 7$ Hz, 2H, CH₂-CO-N-); 4.43 (s, 4H, CH₂-CO-(x2)); 4.79 (s, 2H, CH₂-N-); 6.90 (s, 1H, H-5); 6.95 (s, 1H, H-11).

38:

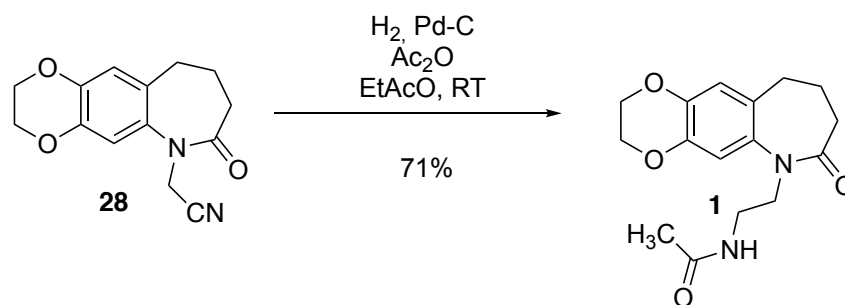
R_f: 0.24



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.98 (quint, $J = 7$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CN-); 2.78 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-Ar); 3.17 (t, $J = 7$ Hz, 2H, CH₂-N-); 3.64 (s, 2H, CH₂-CN-); 4.22 (s, 4H, CH₂-CO-(x2)); 6.63 (s, 1H, H-11); 7.27 (s, 1H, H-5).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 14.1 (CH₂, C-9); 22.7 (CH₂, C-10); 30.5 (CH₂, C-8); 39.8 (CH₂, CH₂-CN); 64.2 (CH₂, CH₂-CO); 64.6 (CH₂, CH₂-CO); 108.6 (C, -CN); 117.2 (CH, C-5); 118.3 (CH, C-11); 127.9 (C, C-5a); 132.3 (C, C-10a); 142.3 (C, C-4a); 145.8 (C, C-11a); 173.3 (C, CO).

Preparation of *N*-(2-(7-oxo-2,3,7,8,9,10-hexahydro-6*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-6-yl)ethyl)acetamide



General procedure

A specific 100 mL round-bottomed flask for catalytic hydrogenations with a magnetic stirring bar was separately charged with compound **28** (0.135 g, 0.615 mmol, 1 equiv.) dissolved in 20 mL of ethyl acetate. The catalyst Pd-C 10% (0.01 g) was then added to the flask. Finally, acetic anhydride (2 mL) was added to the reaction mixture in order to obtain the desired product. The mixture was stirred at room temperature for 4 days, under hydrogen at atmospheric pressure.

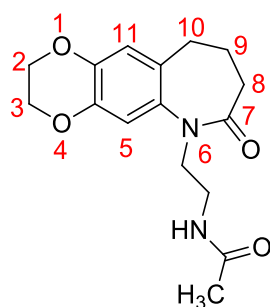
Work-up

The theoretical volume required for the reaction was 23 mL. Given that the hydrogenator was not completely hermetical, the consumed volume was of 62 mL, higher than expected.

The crude product was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of methanol/ethyl acetate and was then collected in a 100 mL round-bottomed flask. Finally, the solvent was removed under vacuum.

Yield: 71%

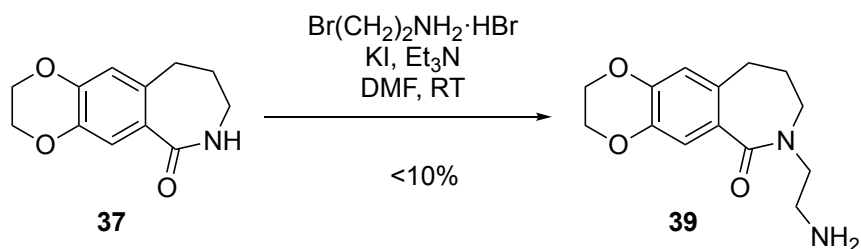
Analytical data



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1.93 (s, 3H, CH_3); 2.05 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$); 2.26 (q, $J = 7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 2.50 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$); 2.54 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH-CO-CH}_3$); 3.39 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N-CO-cycle}$); 4.24 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-CO-(x2)}$); 6.53 (bs, 1H, NH); 6.65 (s, 1H, H-11); 6.72 (s, 1H, H-5).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ (ppm): 14.1 (CH_3), 22.7 (CH_2 , C-9); 29.1 (CH_2 , C-10); 33.1 (CH_2 , C-8); 40.0 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-NH-CO-CH}_3$); 47.1 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-N-CO-cycle}$), 64.3 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-O-(x2)}$); 111.9 (CH, C-5); 117.3 (CH, C-11); 128.9 (C, C-10a); 134.8 (C, C-5a); 141.9 (C, C-4a); 142.5 (C, C-11a); 170.4 (C, C=O lactam); 175.1 (C, C=O amide).

Preparation of 7-(2-aminoethyl)-7,8,9,10-tetrahydro-2H-benzo[1,4]dioxin[6,7-b]azepin-6(3H)-one



General procedure

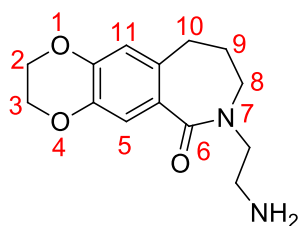
A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with lactam **37** (0.115 g, 0.492 mmol, 1 equiv.) dissolved in DMF (10 mL), triethylamine (0.249 g, 2.460 mmol, 5 equiv.) and 2-bromoethylamine hydrobromide (0.202 g, 0.984 mmol, 2 equiv.). Finally, a catalytic amount of KI was added to the mixture and then was stirred at room temperature for 30 minutes.

Work-up

The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and NaOH 2N in order to ensure a basic pH. The crude product was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

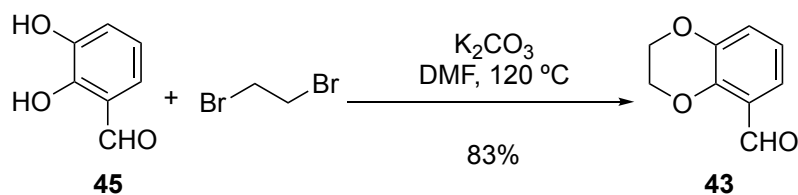
Yield: <math><10\%</math>

Analytical data



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2.13 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN-}$); 2.50 (bs, 2H, NH_2); 2.92 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 3.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CN-}$); 3.79-3.89 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-N-}$); 4.41-4.44 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O-(x2)}$); 6.85 (s, 1H, H-11); 7.43 (s, 1H, H-5).

Preparation of 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[b]-5-carbaldehyde



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux condenser and was charged with 2,3-dihydroxybenzaldehyde (**45**) (2.51 g, 18.2 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) and K_2CO_3 (7.6 g, 55.0 mmol, 3 equiv.). After stirring, 1,2-dibromoethane (1.9 mL, 2.04 mmol, 1.2 equiv.) was added to the flask. The mixture was heated at $120 \pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 hours.

Work-up

The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure. Microdistillation could be considered in case that the DMF was not completely eliminated with the extraction.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ^1H spectrum.

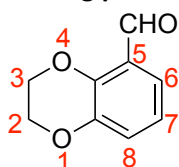
Yield: 83% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: yellow crystals

R_f: 0.65 (hexane/ethyl acetate 1:1)

Melting point: 69-72 $^\circ\text{C}$ (hexane/ethyl acetate)

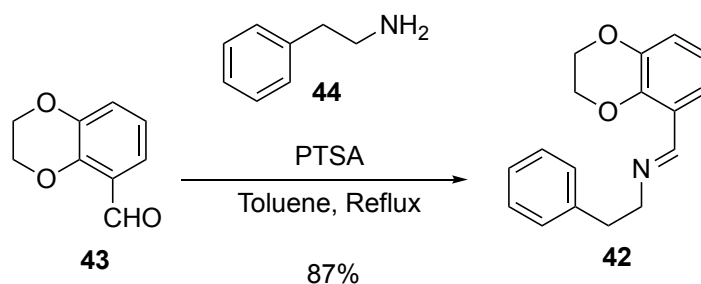


IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1673 (C=O); 1593 (C=C); 1205 (Ar-O); 1074 (C-O).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 4.30-4.40 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O}$ (x2)); 6.90 (td, $J_1 = 8.0\text{ Hz}$, $J_2 = 0.7\text{ Hz}$, 1H, H-7); 7.09 (dd, $J_1 = 8.0\text{ Hz}$, $J_2 = 1.7\text{ Hz}$, 1H, H-8); 7.39 (dd, $J_1 = 8.0\text{ Hz}$, $J_2 = 1.7\text{ Hz}$, 1H, H-6); 10.36 (s, 1H, CHO).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 63.9 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-O}$); 64.6 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-O}$); 120.9 (CH, C-6, C-7); 123.1 (CH, C-8); 125.1 (C, C-5); 144.1 (C, C-4a); 146.4 (C, C-8a); 188.9 (C, CHO).

Preparation of (*E*)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[*b*]-5-yl)methylene)-2-phenylethylamine



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with compound **43** (2g, 12.18 mmol, 1 equiv.) dissolved in toluene (15 mL). Then, phenethylamine (1.53 mL, 12.18 mmol, 1 equiv.) and a catalytic amount of APTS were added to the solution. In order to promote the formation of the imine, a 4 Å sieve (or a Dean-Stark system) was included to ensure the corresponding loss of water. The crude mixture was stirred and heated to reflux of toluene for 24 hours.

Work-up

The reaction mixture was filtered in order to remove the molecular sieves. Then, 20 mL of water were added to the mixture and the crude product was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude product was used in the next step without further purification since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

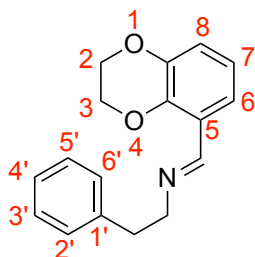
Yield: 87% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown-orange crystals

R_f: 0.68 (hexane/ethyl acetate 1:1)

Melting point: 65-66 °C (hexane/ethyl acetate)

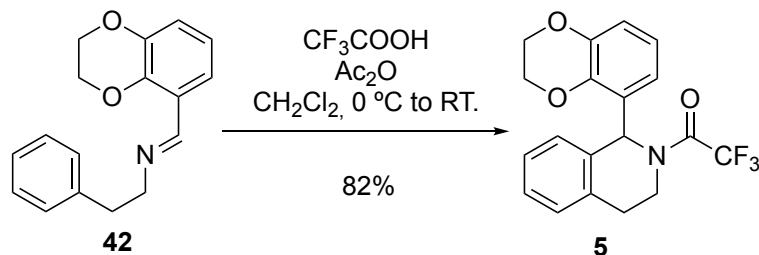


IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1468 (C=N); 1283 (Ar-O); 1088 (C-O).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 3.01 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH₂-CH); 3.87 (td, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 1.3$ Hz, 2H, CH₂-N-); 4.25-4.31 (m, 4H, CH₂-O-()x2); 6.86 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7); 6.92 (dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 1.9$ Hz, 1H, H-8); 7.20-7.30 (m, 5H, Ar); 7.50 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 1H, H-6); 8.56 (s, 1H, CH=N).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ(ppm): 37.7 (CH₂, CH₂-Ar); 63.6 (CH₂, CH₂-N-); 64.0 (CH₂, CH₂-O-); 64.4 (CH₂, CH₂-O-); 119.2 (CH, C-6); 119.4 (CH, C-7); 120.9 (CH, C-8); 124.9 (C, C-5); 126.0 (CH, C-4'); 128.3 (CH, C-2', C-6'); 128.9 (CH, C-3', C-5'); 140.0 (C, C-1'); 143.2 (C, C-4a); 143.6 (C, C-8a); 156.6 (C, CH=N-).

Preparation of 1-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[*b*]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)-2,2,2-trifluoroethanone



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with imine **42** (1g, 3.74 mmol, 1 equiv.) dissolved in dichloromethane (15 mL). Then, the system was cooled down to 0 °C with an ice-bath and 1 mL of trifluoroacetic acid and 1 mL of acetic anhydride were slowly added under stirring. The ice-bath was removed and the mixture was stirred at room temperature for 24 hours.

Work-up

Dichloromethane was removed under reduced pressure. Then, 20 mL of water were added to the reaction mixture and the crude product was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The organic layer was washed with water and NaOH 2N twice in order to remove possible acetic acid residues. Finally, the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

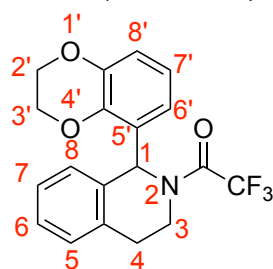
The crude product was used in the next step without further purification since the product was obtained with enough purity as shown by ¹H spectrum. The TLC showed two products that may be conformers.

Yield: 82% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown oil

R_f: 0.78 (hexane/ethyl acetate 1:1)



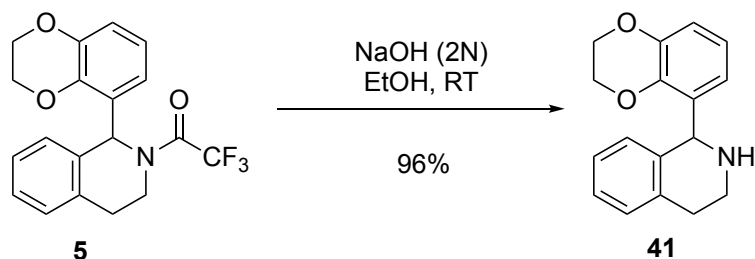
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 2.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Ar conformational isomer A*); 2.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Ar conformational isomer B*); 3.50 (q, *J*₁ = 7.0 Hz, 2H, CH₂-N- conformational isomer

A); 3.61 (q, $J_1 = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-N- conformational isomer B); 4.30-4.38 (m, 4H, CH₂-O-(x2)); 5.58 (bs, 1H, H-1); 6.90 (td, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 0.7$ Hz, 1H, H-7'); 7.09 (dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-8'); 7.19-7.33 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8); 7.38 (dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-6').

conformational isomer A*: majority

conformational isomer B*: minority

Preparation of 1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[b]-5-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with amide **5** (1 g, 2.75 mmol) in a mixture of ethanol (12 mL) and sodium hydroxide 2N (18 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours.

Work-up

Ethanol was removed under reduced pressure. Then, the crude product was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL), the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

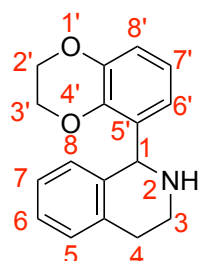
The crude product was used in the next step without further purification since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

Yield: 96% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown oil

R_f: 0.49 (hexane/ethyl acetate 1:1)



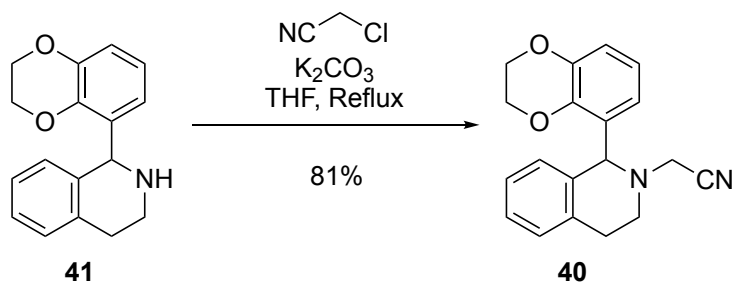
IR (NaCl) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3293 (NH); 1478 (C=C); 1284 (Ar-O); 1083 (C-O).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.82 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-4); 2.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-4); 3.52 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-3); 3.63 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-3); 4.31-4.40 (m, 4H, CH₂-O-); 5.45 (bs, 1H, H-1); 6.91 (td, J_1

= 7.9 Hz, $J_2 = 0.7$ Hz, 1H, H-7'); 7.09 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-8'); 7.18-7.34 (m, 4H, Ar); 7.39 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-6').

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ (ppm): 35.5 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 40.6 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-N-}$); 63.8 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-O-}$); 64.5 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-O-}$, C-1); 120.8 (CH, C-6', C-7'); 123.0 (CH, C-8'); 125.0 (C, C-5'); 126.4 (CH, C-6, C-8); 128.5 (CH, C-7); 128.6 (CH, C-5); 138.8 (C, C-5a); 144.0 (C, C-8a, 4'a); 146.4 (C, C-8'a).

Preparation of 2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[b]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)acetonitrile



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the amine **XX** (0.549 g, 2.05 mmol, 1 equiv.) in THF (10 mL). Then, K_2CO_3 (0.568 g, 4.11 mmol, 2 equiv.) and chloroacetonitrile (0.26 mL, 4.11 mmol, 2 equiv.) were added and the reaction mixture was stirred and heated to reflux of THF for 12 hours. After this time and after TLC, more chloroacetonitrile (0.26 mL, 4.11 mmol, 2 equiv.) was added and the mixture was stirred at reflux for 4 more days.

Work-up

The reaction mixture was cooled to room temperature and THF was removed under reduced pressure. Then, the crude product was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL), the combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

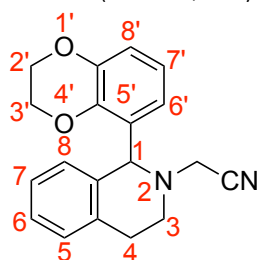
No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ^1H spectrum.

Yield: 81% (non-purified compound)

Analytical data

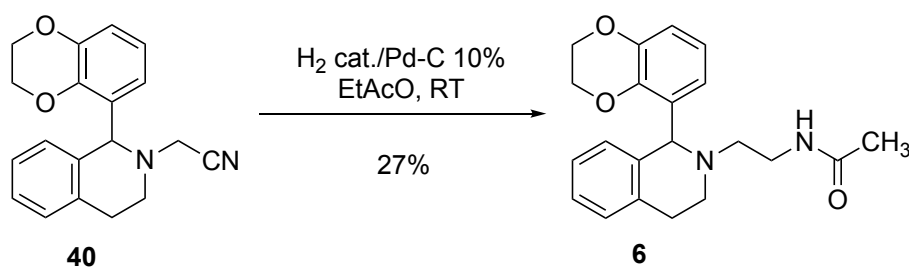
Aspect: orange solid

R_f: 0.29 (hexane/ethyl acetate 1:1)



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 2.87 (td, *J*₁ = 11, *J*₂ = 3 Hz, 1H, H-4 axial); 3.05 (dd, *J*₁ = 11 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz, 1H, H-3 axial); 3.14 (ddd, *J*₁ = 11 Hz, *J*₂ = 5.4 Hz, *J*₃ = 3 Hz, 1H, H-3 equatorial); 3.22-3.33 (m, 1H, H-4 equatorial); 3.51 (s, 1H, CH₂-CN); 3.53 (s, 1H, CH₂-CN); 4.28-4.33 (m, 4H, CH₂-O-(x2)); 5.28 (s, 1H, H-1); 6.70-7.12 (m, 7H, Ar).

Preparation of *N*-(2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[*b*]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)ethyl)acetamide



General procedure

A specific 100 mL round-bottomed flask for catalytic hydrogenations with a magnetic stirring bar was charged with the nitrile derivative **40** (0.105 g, 0.342 mmol, 1 equiv.) in ethyl acetate (10 mL). Then, a catalytic amount of Pd-C 10 % was added in the solution. Finally, 3 drops of HCl were added dropwise to the reaction mixture. The mixture was stirred at room temperature for 2 days, under hydrogen at atmospheric pressure.

Work-up

The theoretical required volume for the reaction was 31 mL. Given that the hydrogenator was not completely hermetical, the consumed volume was of 76 mL, higher than expected.

The crude product was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of ethyl acetate and was then collected in a round-bottomed flask of 100 mL capacity. Finally, THF and ethyl acetate were removed under reduced pressure and the acetic anhydride was microdistilled. The crude product was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL) and washed with a solution of NaOH 2N, the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

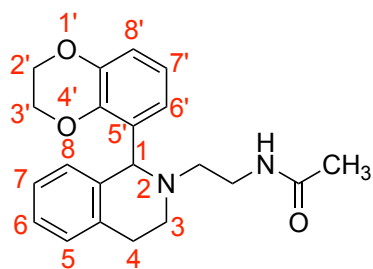
The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluting with first of mixtures of hexane and ethyl acetate and then mixtures of ethyl acetate and methanol. The desired product eluted with a polarity of methanol 100%.

Yield: 27%

Analytical data

Aspect: brown oil

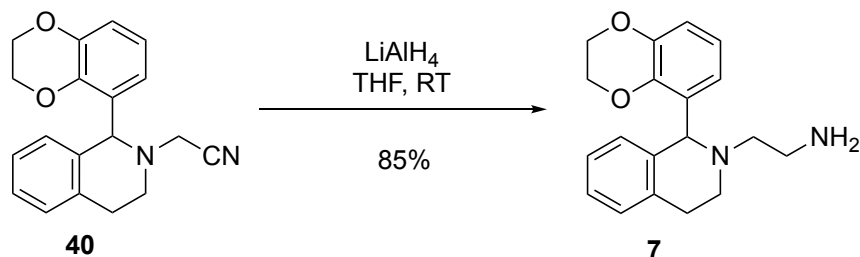
R_f: 0.70 (ethyl acetate 100%)



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.13 (s, 3H, CH₃-); 2.61-2.66 (m, 2H, H-4); 2.81 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H-3); 2.89 (dt, J_1 = 8.0, J_2 = 2 Hz, 2H, CH₂-N-cycle); 3.33 (t, J = 8.0 Hz, 2H, CH₂-NH-CO); 4.28 (s, 4H, CH₂-O-(x2)); 5.17 (s, 1H, H-1); 6.73 (dd, J_1 = 8.0, J_2 = 2.0 Hz, 1H, H-8'); 6.78 (td, J_1 = 8.0, J_2 = 2.0 Hz, 1H, H-6'); 6.83 (td, J_1 = 8.0, J_2 = 2.0 Hz, 1H, H-7'); 7.09-7.13 (m, 2H, H-5, H-7); 7.19-7.22 (m, 1H, H-6); 7.26 (dd, J_1 = 6, J_2 = 2 Hz, 1H, H-8); 7.35 (s, 1H, -NH-).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 22.7 (CH₃); 28.1 (CH₂, C-4); 36.6 (CH₂, CH₂-N-); 46.6 (CH₂, C-3); 50.1 (CH₂, CH₂-N-); 52.5 (CH₂, C-1); 64.1 (CH₂, CH₂-O-); 64.4 (CH₂, CH₂-O-); 115.9 (CH, C-8'); 120.3 (CH, C-5'); 120.8 (CH, C-6'); 122.4 (CH, C-7'); 125.8 (CH, C-8); 125.9 (CH, C-6); 128.3 (CH, C-7); 128.5 (CH, C-5); 133.2 (C, C-4a); 137.7 (C, C-8a); 143.4 (C, C-4'a); 143.5 (C, C-8'a); 170.0 (C, CO).

Preparation of 2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[b]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)ethanamine



General procedure

A 25 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon and cooled down with an ice-bath, was charged with product **40** (0.356 g, 1.16 mmol, 1 equiv.) in distilled THF (10 mL). Then, lithium aluminium hydride (0.88 g, 2.32 mmol, 2 equiv.) was slowly added. After the addition of the reduction agent, the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to 0 °C with an ice-bath and 1 mL of distilled water was added dropwise to quench the reaction mixture. Two hours later, the crude product was filtered by means of a pleated filter under vacuum and the filtered liquid was analysed by TLC (eluent: MeOH) indicating a typical low R_f amine. The product was finally obtained by evaporation under reduced pressure of both solvents (THF and MeOH).

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

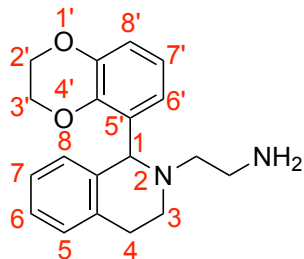
Yield: 85% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown solid

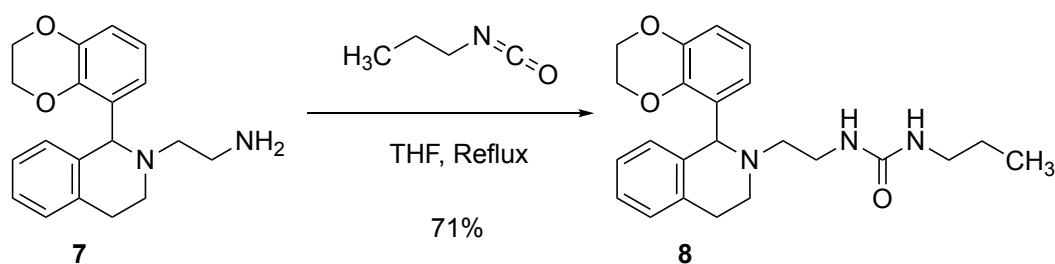
R_f: 0.13 (methanol 100%)

Melting point: 84-86 °C (hexane/ethyl acetate)



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.46 (dt, $J_1 = 12.6$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz, 1H, H-4); 2.57-2.67 (m, 2H, H-4, H-3); 2.74-2.91 (m, 3H, CH₂-N-); 2.96-3.06 (m, 1H, CH₂-N-); 3.24 (dt, $J_1 = 11.9$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, 1H, H-3); 4.32 (s, 4H, CH₂-O-); 5.13 (s, 1H, H-1); 6.59 (dd, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-8'); 6.68 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-7'); 6.75 (dd, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-6'); 6.78 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-5); 7.00-7.04 (m, 1H, H-7); 7.09-7.11 (m, 2H, H-6, H-8).

Preparation of 1-(2-(1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin[b]-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)ethyl)-3-propylurea



General procedure

A 25 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the amine **7** (0.287 g, 0.925 mmol, 1 equiv.) in THF (10 mL). Then, isopropyl isocyanate (0.079 g, 0.925 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred and heated to reflux temperature of THF for 5 hours.

Work-up

THF was removed under vacuum. Then, a solution of HCl 2N was added to the reaction mixture and the crude mixture was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined aqueous layers were treated with a solution of NaOH 2N and the crude product was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude mixture was used in the next step since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

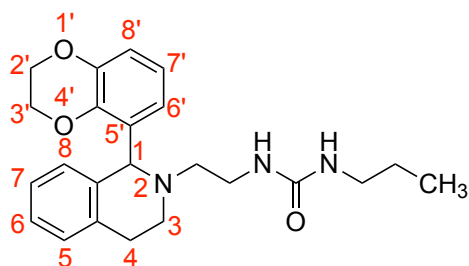
Yield: 71% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: whitish-brown solid

R_f: 0.11 (hexane/ethyl acetate 1:1)

Melting point: 151-153 °C (hexane/ethyl acetate)

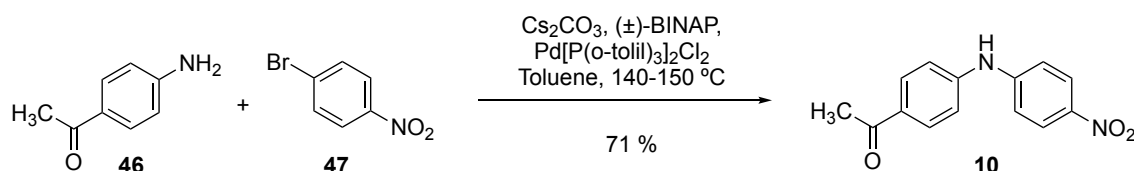


IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3328 (NH); 1469 (C=C); 1283 (Ar-O); 1088 (C-O).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 0.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH₃); 1.42 (sext, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂-CH₃); 2.53-2.61 (m, 2H, CH₂-Ar); 2.63-2.70 (m, 2H, H-3); 2.88-2.94 (m, 2H, CH₂-N-); 2.97-3.05 (m, 2H, CH₂-N-); 3.17-3.25 (m, 2H, CH₂-N-); 4.29-4.33 (m, 4H, CH₂-O-(x2)); 4.64 (bs, 1H, NH-CO-); 4.87 (bs, 1H, NH-CO-); 5.14 (s, 1H, H-1); 6.49 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-8'); 6.69 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-7'); 6.76 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-6'); 6.76-6.78 (m, 1H, H-5); 7.00-7.05 (m, 1H, H-6); 7.10-7.12 (m, 2H, H-7, H-8).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 11.3 (CH₃); 23.3 (CH₂, CH₂-CH₃); 27.7 (CH₂, CH₂-Ar); 38.0 (CH₂, CH₃-CH₂-CH₂-N-); 42.2 (CH₂, CH₂-N-cycle); 46.4 (CH₂, CH₂-N-CO-); 53.6 (CH₂, CH₂-N isoquinoline); 59.1 (CH, C-1); 64.1 (CH₂, CH₂-O-); 64.3 (CH₂, CH₂-O-); 115.9 (CH, C-8'); 120.6 (CH, C-6'); 122.5 (CH, C-7'); 125.7 (CH, C-6); 125.9 (CH, C-8); 128.3 (CH, C-7); 128.5 (CH, C-5); 132.9 (C, C-8a); 134.7 (C, C-5'); 137.6 (C, C-4a); 142.1 (C, C-4'a); 143.4 (C, C-8'a); 158.7 (C, C=O).

Preparation of 1-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)ethanone



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions, previously flame-dried under argon, was charged with 4'-aminoacetophenone (**46**), (0.669 g, 4.95 mmol, 1 equiv.), 1-bromo-4-nitrobenzene (**47**) (1 g, 4.95 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (1.935 g, 5.94 mmol, 1 equiv.) and (±)-BINAP and palladium complex (II) in catalytic quantities in 10 mL of toluene. The reaction mixture was heated at 140 ± 10 °C under stirring for 6 days.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature, 20 mL of water were then added to the reaction mixture and ethyl acetate (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the products were obtained with enough purity.

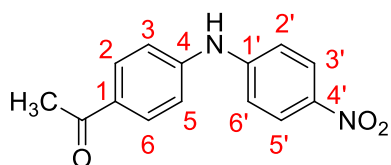
Yield: 71% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: yellow-orange solid

R_f: 0.22 (hexane/ethyl acetate (7:3))

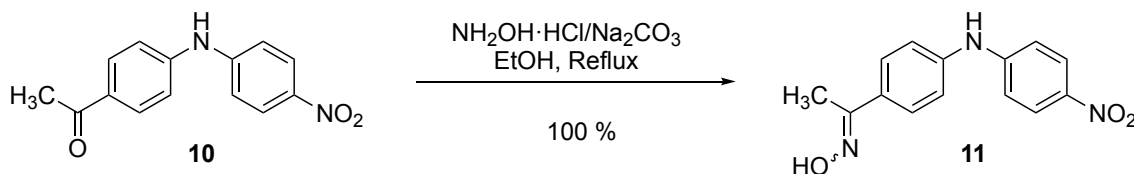
Melting point: 139-141 °C (acetone)



¹H NMR (acetone-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.54 (s, 3H, -CH₃); 7.33 (d, J = 9.2 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.36 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.99 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-2, H-6); 8.18 (d, J = 9.2 Hz, 2H, H-3', H-5'); 8.81 (bs, 1H, -NH-).

¹³C NMR (acetone-d₆, 100.6 MHz) δ (ppm): 26.4 (CH₃); 116.6 (CH, C-3, C-5); 118.9 (CH, C-2', C-6'); 126.6 (CH, C-3', C-5'); 131.0 (CH, C-2, C-6); 132.3 (C, C-1); 141.3 (C, C-4'); 146.2 (C, C-4); 149.7 (C, C-1'); 196.2 (C, CO).

Preparation of 1-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)ethanone oxime



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask equipped with a reflux condenser and a magnetic stirring bar was charged with compound **10** (0.200 g, 0.464 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of ethanol. Then, hydroxylamine hydrochloride (0.039 g, 0.57 mmol, 1.2 equiv.) was added to the solution under argon. After 5 minutes, Na₂CO₃ (0.025 g, 0.232 mmol, 0.5 equiv.) was diluted with water (0.5 equiv./5 mL H₂O) and added to the mixture. The reaction mixture was heated to reflux of ethanol under stirring for 24 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature. Ethanol was evaporated under vacuum and the crude reaction was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum. In order to confirm the stereochemistry, a NOE experiment was carried out but no (*E*) or (*Z*) configuration was successfully determined.

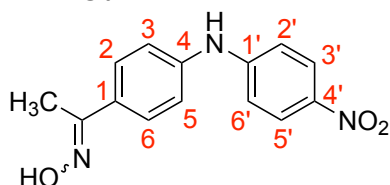
Yield: 100% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: yellow-red crystals

R_f: 0.24 (hexane/ethyl acetate (7:3))

Melting point: 152-154 °C (acetone)

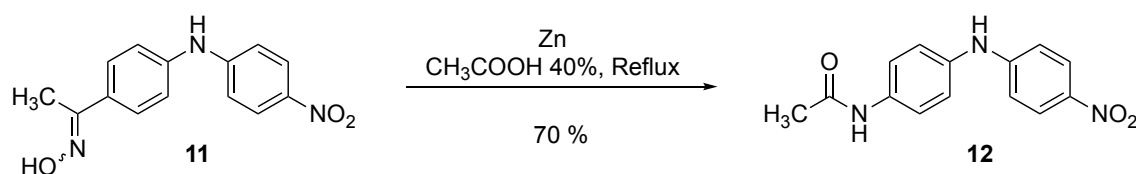


IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3293 (NH); 1606 (C=N); 1533 (NO); 1298 (Ar-N); 1248 (Ar-NH-Ar).

¹H NMR (acetone-*d*₆, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.22 (s, 3H, -CH₃); 7.19 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-2, H-6); 8.13 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, H-3', H-5'); 8.54 (s, 1H, -NH-); 10.19 (bs, 1H, -OH).

¹³C NMR (acetone-*d*₆, 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 11.4 (CH₃); 114.9 (CH, C-3, C-5); 121.0 (CH, C-2', C-6'); 126.7 (CH, C-3', C-5'); 127.7 (CH, C-2, C-6); 133.1 (C, C-1); 140.2 (C, C-4'); 141.8 (C, C-4); 151.2 (C, C-1'); 153.7 (C, -C=N-).

Preparation of *N*-(4-((4-(3-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenyl)amino)phenyl)-acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask was charged with oxime **11** (0.120 g, 0.269 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of acetic acid 40% under stirring. Once the starting product is dissolved, Zn (0.169 g, 2.152 mmol, 8 equiv.) was added to the solution and it was left 5 minutes under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature for 72 hours.

Work-up

The reaction mixture was quenched with ice and an ice-bath was placed to cool it down. Then, a solution of NaOH 5 N was added in order to reach a pH 10. The crude reaction was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

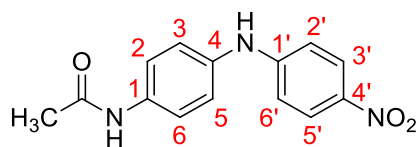
The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (68:32).

Yield: 70% (non-purified compound)

Analytical data

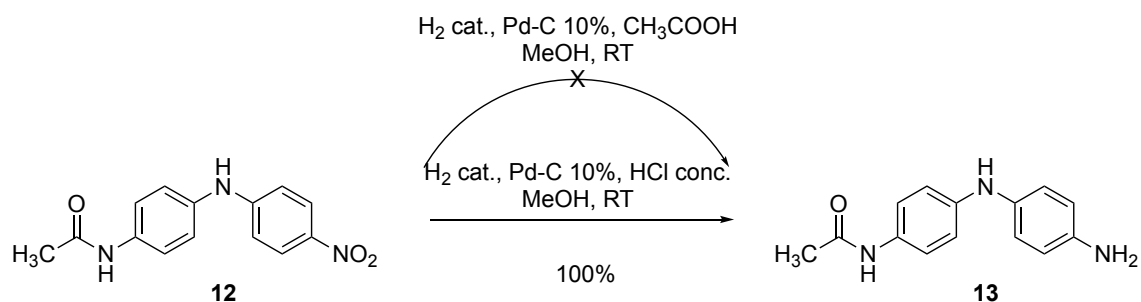
Aspect: yellow oil

R_f: 0.43 (hexane/ethyl acetate (1:1))



¹H NMR (acetone-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.41 (s, 3H, -CH₃); 4.57 (s, 1H, -NH-C-4); 6.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6.82 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 6.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7.51 (s, 1H, -NH-C-1); 7.78 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-3', H-5').

Preparation of *N*-(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)acetamide



General procedure

A specific 100 mL round-bottomed flask for catalytic hydrogenations was charged with compound **12** (0.100 g, 0.369 mmol, 1 equiv.) dissolved in 20 mL of methanol. The catalyst was then added Pd-C 10% (10% p/p). Finally, acetic acid was added to the solution in order to catalyse the reaction (3 drops). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours, under hydrogen at atmospheric pressure.

Since the TLC and ¹H spectrum did not show any formation of a new product, the reaction was released under the same conditions but using hydrochloric acid instead of acetic acid.

Work-up

The theoretical volume required for the reaction was 17 mL. Given that the hydrogenation apparatus was not hermetical and may leak, the consumed volume was of 60 mL, higher than expected.

The crude reaction was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of methanol. Finally, the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

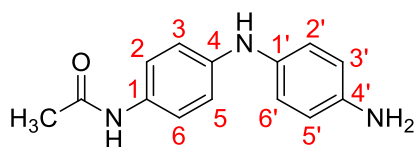
No purification by column chromatography was performed since the products were obtained with enough purity.

Yield: 100% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown-yellow oil

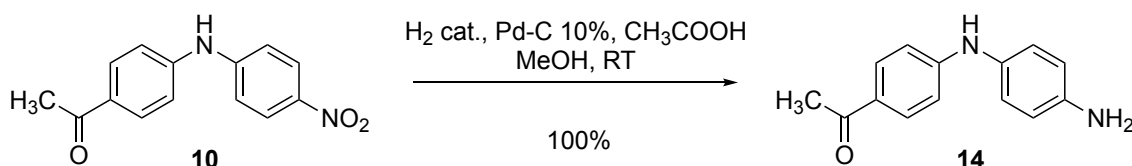
R_f: 0.28 (hexane/ethyl acetate (1:1))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.49 (s, 3H, CH₃); 4.28 (bs, 1H, -NH-C-4); 7.08 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H-3'); 7.11 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H-5'); 7.15 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-2''); 7.17 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-6''); 7.31 (dd, $J_1 = 7.6$ Hz, 1H, H-3); 7.33 (dd, $J_1 = 7.6$ Hz, 1H, H-5); 7.43 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H-2'''); 7.45 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H-6'''); 7.71 (bs, 2H, -NH₂); 7.83 (bs, 1H, -NH-C-1).

*/**/**interchangeables.

Preparation of 1-(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)ethanone



General procedure

A specific 100 mL round-bottomed flask for catalytic hydrogenations was charged with compound **10** (0.305 g, 1.19 mmol, 1 equiv.) dissolved in 20 mL of methanol. The catalyst was then added Pd-C 10% (10% p/p). Finally, acetic acid was added to the solution in order to catalyse the reaction (3 drops). The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours, under hydrogen at atmospheric pressure.

Work-up

The theoretical volume required for the reaction was 53 mL. Given that the hydrogenation apparatus was not hermetical and may leak, the consumed volume was of 100 mL, higher than expected.

The crude reaction was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of methanol. Finally, the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

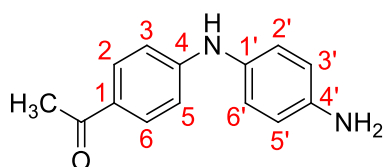
No purification by column chromatography was performed since the products were obtained with enough purity.

Yield: 100% (non-purified compound)

Analytical data

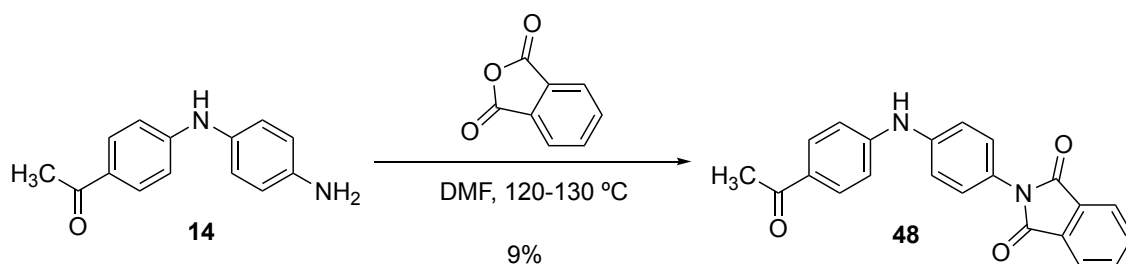
Aspect: yellow-orange oil

R_f: 0.13 (hexane/ethyl acetate (7:3))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.50 (s, 3H, -CH₃); 5.85 (s, 1H, -NH-), 6.70 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.76 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.01 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.81 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-2, H-6).

Preparation of *N*-(4-((4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)phenyl)amino)phenyl)acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon was charged with compound **14** (0.112 g, 0.495 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of DMF. Then, phthalic anhydride (0.069 g, 0.464 mmol, 1 equiv.) was added to the solution and the reaction mixture was heated at 120 ± 10 °C under stirring for 3 days.

Work-up

First, the reaction mixture was cooled down to room temperature, was then diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). Then, the combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

The crude reaction was purified by column chromatography using a *Combi-Flash* R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (63:37).

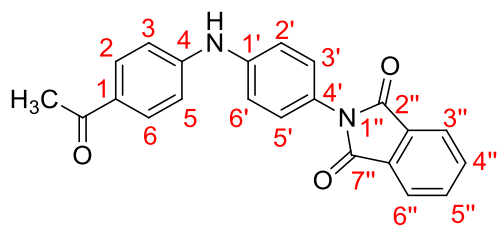
Yield: 9%

Analytical data

Aspect: yellow solid

R_f: 0.45 (hexane/ethyl acetate (1:1))

Melting point: 189-191 °C (dichloromethane)



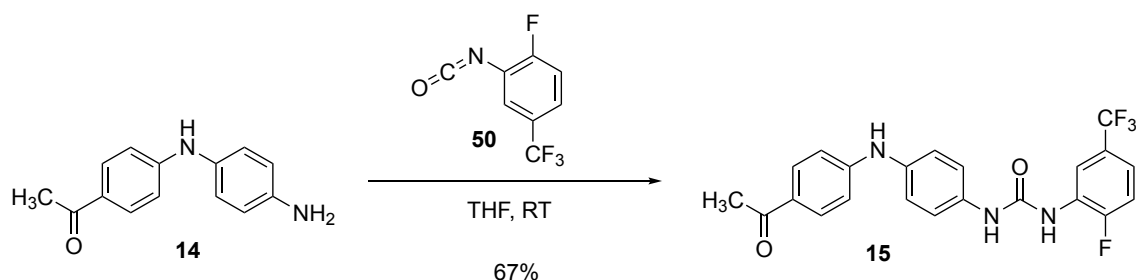
IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3292 (NH); 1710 (C=O); 1594 (NH-C=O); 1278 (Ar-N).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.48 (s, 3H, - CH_3); 6.40 (s, 1H, -NH-C-4); 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3, H-5); 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.80 (dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 2H, H-3'', H-6''); 7.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7.96 (dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 2H, H-4'', H-5'').

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 26.2 (CH_3); 115.1 (CH, C-3, C-5); 120.1 (CH, C-2', C-6'); 123.7 (CH, C-3', C-5'); 126.0 (C, C-4'); 127.8 (CH, C-3'', C-6''); 129.6 (C, C-1); 130.6 (CH, C-2, C-6); 131.9 (C, C-2''a, C-6''a); 134.4 (CH, C-4'', C-5''); 140.8 (C, C-1'); 147.6 (C, C-4); 167.5 (C, -CO-N-(X2)); 196.4 (C, -CO- CH_3).

HRMS (ESI +): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 407.1355, found 407.1342. Calculated for $\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{2M}+\text{Na}]^+$: 735.2214, found 735.2177.

Preparation of 1-(4-((4-acetylphenyl)amino)phenyl)-3-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)urea



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar was charged with compound **14** (0.292 g, 1.29 mmol, 1 equiv.) and 1-fluoro-2-isocyanato-4-(trifluoromethyl)benzene (0.187 mL, 1.292 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h.

Work-up

THF was evaporated under vacuum.

Purification

The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired products eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (53:47).

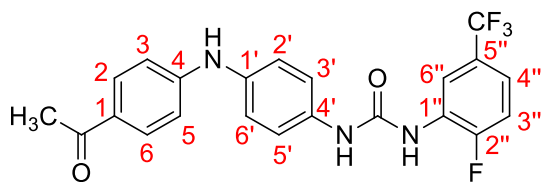
Yield: 67%

Analytical data

Aspect: yellow-brown solid

R_f: 0.44 (hexane/ethyl acetate (1:1))

Melting point: 153-155 °C (acetone)

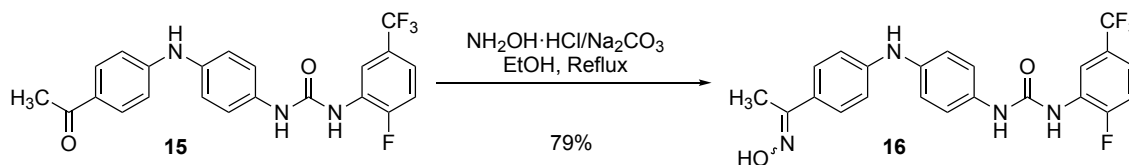


IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3313 (NH); 1710 (C=O); 1642 (C=O); 1610 (NH-C=O); 1292 (Ar-NH); 1180 (CF); 823 (CF₃).

¹H NMR (acetone-d₆, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 2.46 (s, 3H, CH₃); 7.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3, H-5); 7.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-3''); 7.37 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-6''); 7.53 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7.90 (s, 1H, -NH-C-4); 8.33 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, -NH-C-1''); 8.61 (s, 1H, -NH-C-4'); 8.80 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-4'').

¹³C NMR (acetone-d₆, 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 26.1 (CH₃); 114.3 (CH, C-2', C-6'); 116.4 (C, $J = 20$ Hz, C-3''); 118.1 (C, $J_1 = 7$, $J_2 = 4$ Hz, C-6''); 120.0 (C, $J_1 = 8$, $J_2 = 4$ Hz, C-4''); 120.9 (CH, C-3, C-5); 122.4 (CH, C-3', C-5'); 125.1 (C, $J = 271$ Hz, CF₃); 127.2 (C, $J_1 = 32$, $J_2 = 3$ Hz, C-5''); 129.0 (C, C-1); 130.0 (C, $J = 11$ Hz, C-1''); 131.2 (CH, C-2, C-6); 135.4 (C, C-4'); 137.3 (C, C-1'); 150.5 (C, C-4); 153.0 (C, -NH-CO-NH-); 154.6 (C, $J = 247$ Hz, C-2''); 195.6 (C, -CO-CH₃).

Preparation of 1-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((4-(1-(hydroxyimino)ethyl)-phenyl) amino)phenyl)urea



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask equipped with a reflux condenser and a magnetic stirring bar was charged with urea **15** (0.200 g, 0.464 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of ethanol. Then, hydroxylamine hydrochloride (0.039 g, 0.57 mmol, 1.2 equiv.) was added to the solution under argon. After 5 minutes, Na₂CO₃ (0.025 g, 0.232 mmol, 0.5 equiv.) was diluted with water (0.5 equiv./5 mL H₂O) and added to the mixture. The reaction mixture was heated to reflux of ethanol under stirring for 24 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature. Ethanol was evaporated under vacuum and the crude reaction was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-vis detector. The desired compound eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (63:37). In order to confirm the stereochemistry, a NOE experiment was carried out but no (*E*) or (*Z*) configuration was successfully determined.

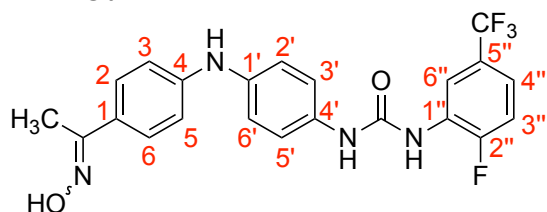
Yield: 79%

Analytical data

Aspect: yellow-orange solid

R_f: 0.53 (hexane/ethyl acetate (1:1))

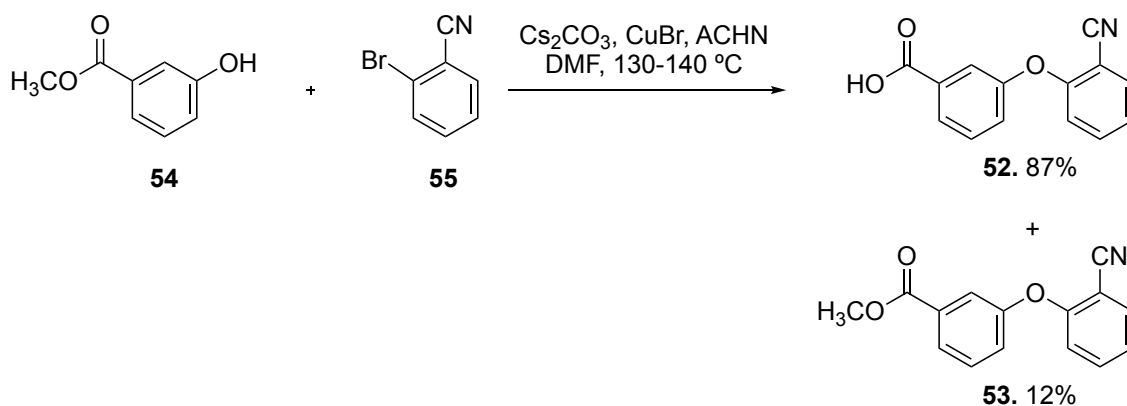
Melting point: 164-166 °C (acetone)



¹H NMR (acetone-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.18 (s, 1H, CH₃); 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.13 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.33 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-3''); 7.34 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-6''); 7.45 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.56 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-2, H-6); 8.31 (d, J = 3.1 Hz, 1H, -NH-C-1''); 8.54 (s, 1H, -NH-C-4'); 8.80 (dd, J_1 = 7.5 Hz; J_2 = 1.7 Hz, 1H, H-4''); 9.99 (s, 1H, -OH).

¹³C NMR (acetone-d₆, 100.6 MHz) δ (ppm): 22.1 (CH₃); 116.0 (CH, C-2', C-6'); 116.3 (CH, J = 21 Hz, C-3''); 118.0 (CH, J_1 = 7, J_2 = 4 Hz, C-6''); 119.9 (CH, J_1 = 9, J_2 = 4 Hz, C-4''); 120.3 (CH, C-3, C-5); 121.2 (CH, C-3', C-5'); 125.0 (C, J = 271 Hz, CF₃); 126.8 (C, J = 12 Hz, C-1''); 127.2 (C, J_1 = 32, J_2 = 3 Hz, C-5''); 127.6 (CH, C-2, C-6); 128.9 (C, C-1); 133.8 (C, C-4'); 139.1 (C, C-1'); 146.1 (C, C-4); 153.1 (C, CO); 154.1 (C, -C=N-); 154.6 (C, J = 247 Hz, C-2'').

Preparation of methyl 3-(2-cyanophenoxy)benzoate



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon was charged with methyl 3-hydroxybenzoate (**54**) (0.418 g, 2.75 mmol, 1 equiv.), 2-bromobenzonitrile (**55**) (0.5 g, 2.75 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (1.075 g, 3.30 mmol, 1 equiv.) and ACHN and CuBr in catalytic quantities in 10 mL of DMF. The reaction was heated at 130 ± 10 °C under stirring for 7 days.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and the TLC analysis showed formation of two new products (hexane/ethyl acetate 7:3). The reaction mixture was diluted with water (20 mL)

and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water and dried over anhydrous Na₂SO₄. After evaporation of the solvent, the crude reaction obtained corresponded to one of the two products expected by TLC. Then, the aqueous layer was acidified and the extraction was performed with ethyl acetate in order to obtain the possible 3-(2-cyanophenoxy)benzoic acid sub-product. The combined organic layers were separated, washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the TLC and the ¹H spectrum showed two pure final products.

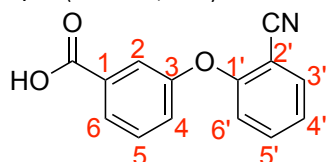
Yield: **52:** 87%; **53:** 12%.

Analytical data

52:

Aspect: brown oil

R_f: 0 (hexane/ethyl acetate (7:3))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 6.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-6'); 7.19 (td, *J*₁ = 8.0, *J*₂ = 0.9 Hz, 1H, H-4'); 7.35 (ddd, *J*₁ = 8.0, *J*₂ = 2.5, *J*₃ = 1 Hz, 1H, H-4); 7.516 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5'); 7.520 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5); 7.69 (dd, *J*₁ = 8.0, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, H-6); 7.77 (dd, *J*₁ = 2.5, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, H-2); 7.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3').

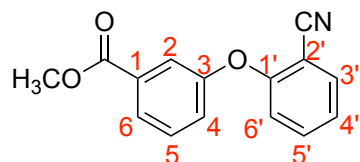
¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ(ppm): 104.3 (C, C-2'); 115.7 (C, -CN); 117.5 (CH, C-6'); 120.9 (CH, C-2); 123.6 (CH, C-4); 125.1 (CH, C-4'); 126.5 (CH, C-6); 130.3 (CH, C-5); 134.1 (CH, C-3'); 134.4 (CH, C-1, C-5'); 155.4 (C, C-3); 158.9 (C, C-1'); 185.9 (C, CO).

HRMS (ESI -): Calculated for C₁₄H₈NO₃ [M-H]⁻: 238.0510, found 238.0444.

53:

Aspect: brown oil

R_f: 0.73 (hexane/ethyl acetate (7:3))

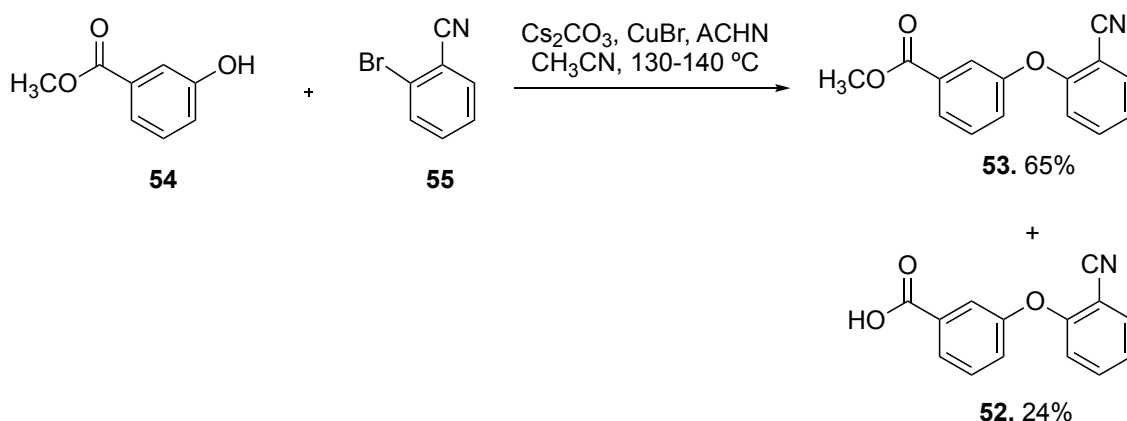


¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 3.90 (s, 3H, CH₃); 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-6'); 7.17 (td, *J*₁ = 8.0, *J*₂ = 0.7 Hz, 1H, H-4'); 7.28 (ddd, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 2.5, *J*₃ = 1.0 Hz, 1H, H-4); 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-5'); 7.49 (td, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 1.6 Hz, H-5); 7.66 (dd, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, H-6); 7.70 (dd, *J*₁ = 2.5, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, H-2); 7.88 (dt, *J*₁ = 8.0, *J*₂ = 1.2 Hz, H-3').

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ(ppm): 52.3 (CH₃); 104.1 (C, C-2'); 115.6 (C, -CN); 117.4 (CH, C-6'); 120.5 (CH, C-2); 123.4 (CH, C-4); 124.3 (CH, C-4'); 126.0 (CH, C-6); 130.2 (CH, C-5); 132.2 (C, C-1); 134.0 (CH, C-3'); 134.3 (CH, C-5'); 155.2 (C, C-3); 158.9 (C, C-1'); 166.0 (C, CO).

HRMS (ESI +): Calculated for C₁₅H₁₂NO₃ [M+H]⁺: 254.0812, found 254.0390.

Preparation of methyl 3-(2-cyanophenoxy)benzoate and 3-(2-cyanophenoxy)benzoic acid



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon was charged with methyl 3-hydroxybenzoate (**54**) (0.418 g, 2.75 mmol, 1 equiv.), 2-bromobenzonitrile (**55**) (0.5 g, 2.75 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (0.895 g, 2.75 mmol, 1 equiv.) and ACHN (1,1'-azobis(cyclohexanecarbonitrile)) and CuBr in catalytic quantities in 10 mL of acetonitrile. The reaction was heated at 130 ± 10 °C under stirring for 7 days.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and the TLC analysis showed formation of two new products (hexane/ethyl acetate 7:3). The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄. After evaporation of the solvent, the crude reaction obtained corresponded to one of the two products expected by TLC. Then, the aqueous layer was acidified and the extraction was performed with ethyl acetate in order to obtain the possible 3-(2-cyanophenoxy)benzoic acid sub-product. The combined organic layers were separated, washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

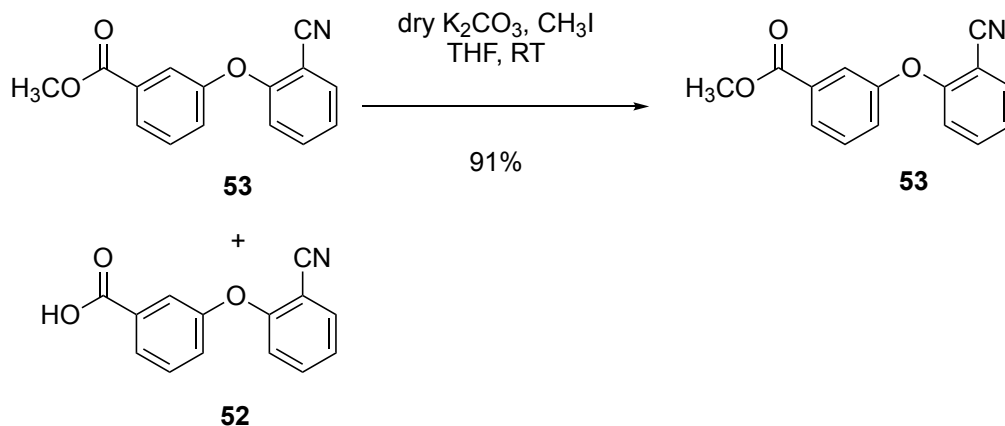
No purification by column chromatography was performed since the products were obtained with enough purity. TLC and ¹H spectrum showed two pure final products and a little amount of other compounds.

Yield: **52:** 24%; **53:** 65%.

Analytical data

Products described previously.

Preparation of methyl 3-(2-cyanophenoxy)benzoate



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with a mixture of **53** and **52** (0.17 g) and K₂CO₃ (0.113 g, 0.805 mmol, 1.2 equiv.) dissolved in 10 mL of THF. An excess of CH₃I (2 mL) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 days. Then, CH₃I (1 mL) was added to the mixture. The reaction was stirred at room temperature for an additional day.

Work-up

TLC analysis showed formation of the expected product (hexane/ethyl acetate 7:3). The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with ethyl acetate and diethyl ether 1:1 (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

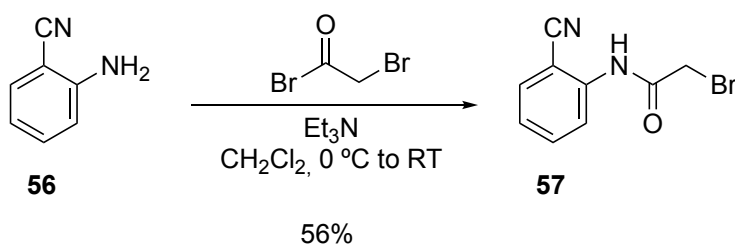
No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

Yield: 91%

Analytical data

Product described previously.

Preparation of 2-bromo-N-(2-cyanophenyl)acetamide



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with 2-aminobenzonitrile (**56**) (0.4 g, 3.4 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of dichloromethane. Then, Et₃N (0.61 mL, 4.4 mmol,

1.3 equiv.) was added to the solution.). The reaction mixture was cooled down to 0 °C with an ice-bath. 2-Bromoacetyl bromide (0.35 mL, 4.8 mmol, 1.2 equiv.) was then added dropwise. Finally, the mixture was stirred at room temperature for 7 days.

Work-up

Dichloromethane (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

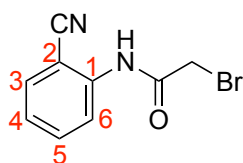
The crude reaction obtained was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-vis detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (40:60).

Yield: 56%

Analytical data

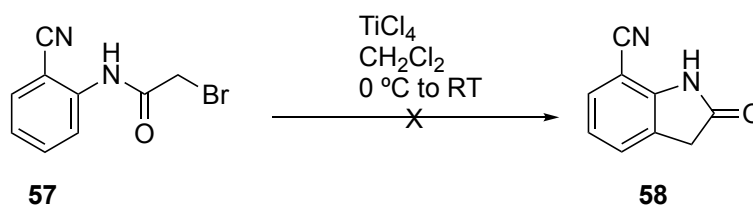
Aspect: brown oil

R_f: 0.21 (hexane/ethyl acetate (7:3))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 3.74 (s, 2H, CH₂-); 6.14 (s, 1H, NH-); 6.85 (td, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 1.2 Hz, 1H, H-4); 7.22 (dt, *J*₁ = 7.1, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, H-5); 7.49 (dd, *J*₁ = 7.9, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, H-6); 8.33 (dd, *J*₁ = 8.4, *J*₂ = 1.1 Hz, 1H, H-3).

Preparation of 7-ciano-2-oxoindoline



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with compound **57** (0.067 g, 0.28 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of dichloromethane and cooled down to 0 °C with an ice-bath. An excess of titanium tetrachloride was then added to the mixture. The mixture was stirred at room temperature for 5 days. The system was closed with a CaCl₂.

Work-up

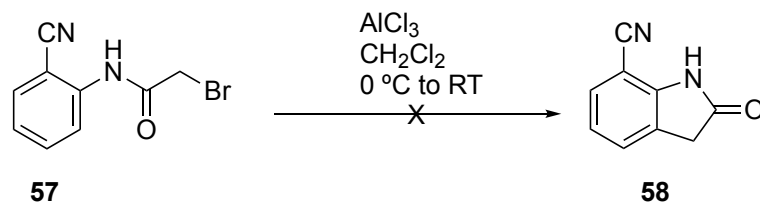
The reaction mixture was cooled down to room temperature and the TLC analysis showed no formation of a new product (hexane/ethyl acetate (7:3)). The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification was performed since no new product was observed by TLC or ¹H-NMR.

Yield: 0%

Preparation of 7-ciano-2-oxoindoline



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with **57** (0.067 g, 0.28 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of dichloromethane and cooled down to $0\text{ }^\circ\text{C}$ with an ice-bath. An excess of aluminium trichloride was then added to the mixture. The mixture was stirred at room temperature for 5 days. The system was closed with a CaCl_2 .

Work-up

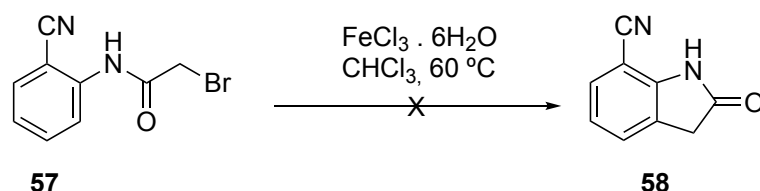
The reaction mixture was cooled down to room temperature and the TLC analysis showed no formation of a new product (hexane/ethyl acetate 7:3). The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification was performed since no new product was observed by TLC or $^1\text{H-NMR}$.

Yield: 0%

Preparation of 7-ciano-2-oxoindoline



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar with a reflux condenser was charged with **57** (0.1 g, 0.4 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of chloroform. Then, FeCl_3 (0.315 mg, 1.2 mmol, 3 equiv.) was added to the mixture. The mixture was stirred at $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 days.

Work-up

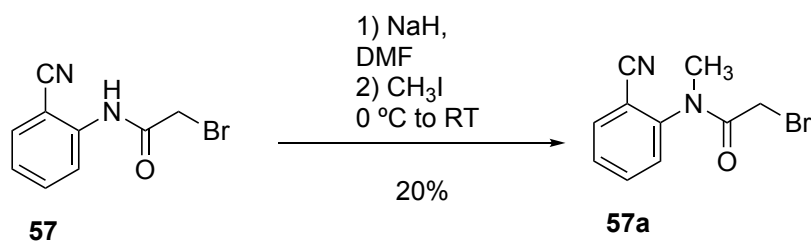
The mixture was cooled down by the addition of crushed ice. Dichloromethane (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure. The TLC analysis showed no formation of a new product.

Purification

No purification was performed since no new product was observed by TLC or $^1\text{H-NMR}$.

Yield: 0%

Preparation of 2-bromo-*N*-(2-cyanophenyl)-*N*-methylacetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the starting product **57** (0.238 g, 1 mmol, 1 equiv.) dissolved in DMF (6 mL). Then, sodium hydride (0.048 g, 1.2 mmol, 1.2 equiv.) was added to the mixture and was stirred for 10 minutes. Then, the mixture was cooled down to 0 °C with an ice-bath and excess of methyl iodide was carefully added (1 mL). The solution was stirred at room temperature for 24 hours. After that time, a TLC analysis showed small formation of a new product, and the same amount of methyl iodide was carefully added (1 mL) under the same conditions. The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 hours.

Work-up

The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

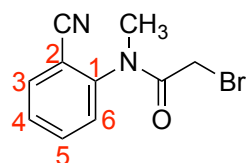
The crude product was directly used for the next step since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

Yield: 20%

Aspect: brown-reddish

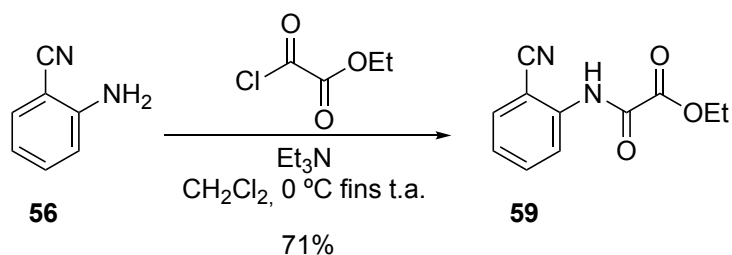
Analytical data

R_f: 0.21 (hexane/ethyl acetate (7:3))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 2.29 (s, 3H, CH₃-N); 4.73 (s, 2H, CH₂-); 7.37 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-6); 7.52 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4); 7.70 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-5); 7.77 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-3).

Preparation of ethyl 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetate



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with 2-aminobenzonitrile (**56**) (1 g, 8.5 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of dichloromethane. Then, Et_3N (0.94 mL, 12.7 mmol, 1.5 equiv.) was added to the solution. The reaction mixture was cooled down to $0\text{ }^\circ\text{C}$ with an ice-bath. Ethyl 2-chloro-2-oxoacetate (0.94 mL, 8.5 mmol, 1 equiv.) was then added dropwise. Finally, the mixture was stirred at room temperature for 7 days. TLC showed small formation of new product and 0.94 mL of ethyl 2-chloro-2-oxoacetate were added. The reaction mixture was stirred for 3 more days.

Work-up

Dichloromethane (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

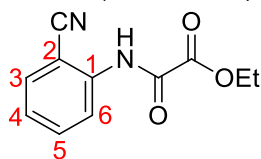
The crude reaction was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (80:20).

Yield: 71%

Analytical data

Aspect: brown oil

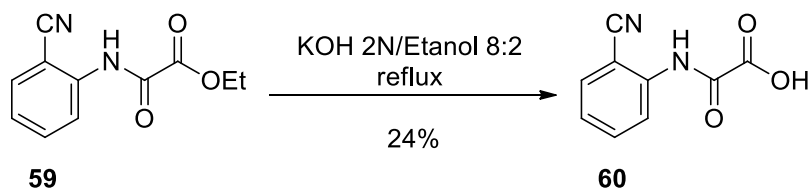
R_f: 0.48 (hexane/ethyl acetate (8:2))



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1.45 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3); 4.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 -); 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-4); 7.65 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6); 7.67 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5); 8.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-3); 9.42 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ (ppm): 13.8 (CH_3); 64.1 (CH_2 -); 103.0 (C, C-2); 115.1 (C, -CN); 120.9 (CH, C-6); 125.4 (CH, C-4); 132.5 (CH, C-3); 134.2 (CH, C-5); 149.6 (C, C-1); 154.1 (C, CO-NH); 159.7 (C, CO-O).

Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with compound **59** (1.299 g, 6.0 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of KOH and 2 mL of ethanol (8:2). The reaction mixture was stirred and heated to 80 ± 10 °C for 1 hour.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and ethanol was removed under vacuum. HCl 2N was then added to the mixture in order to obtain a slightly acid pH (5-6). Ethyl ether (20 mL) was used to do the first extraction and then dichloromethane was used for a second extraction of the crude reaction. The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

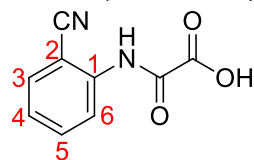
The crude reaction was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (80:20).

Yield: 24%

Analytical data

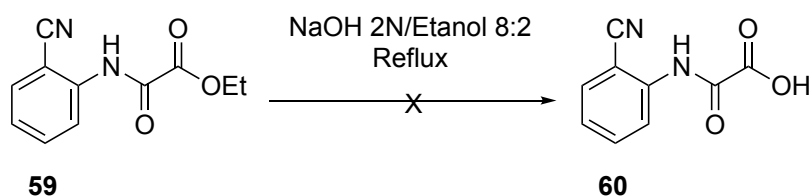
Aspect: brown oil

R_f: 0.03 (hexane/ethyl acetate (7:3))



¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 5.30 (s, 2H, -NH-); 6.67 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-4); 6.68 (dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-3); 7.31 (dt, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-5); 7.92 (dd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H-6).

Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with compound **59** (0.180 g, 0.8 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of NaOH and 2 mL of ethanol (8:2). The reaction mixture was stirred and heated to 80 ± 10 °C for 30 minutes.

Work-up

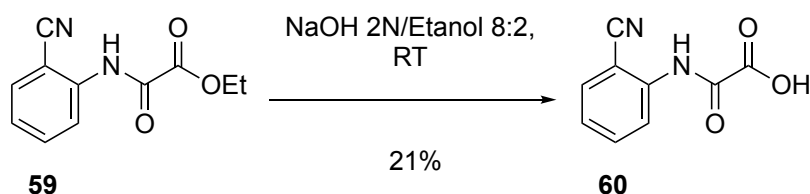
The reaction mixture was cooled down to room temperature and ethanol was removed under vacuum. HCl 2N was then added to the mixture in order to obtain a slightly acid pH (5-6). Dichloromethane (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure. The TLC analysis showed no formation of a new product (hexane/ethyl acetate (8:2)).

Purification

No purification was performed since no new product was observed by TLC or ¹H-NMR.

Yield: 0%

Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with 2-ethyl-2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetate (0.082 g, 0.38 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of NaOH and 2 mL of ethanol (8:2). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and ethanol was removed under vacuum. HCl 2N was then added to the mixture in order to obtain a slightly acid pH (5-6). Dichloromethane (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

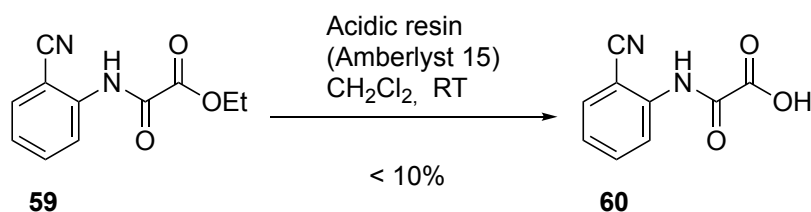
No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

Yield: 21%

Analytical data

Product described previously.

Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with compound **59** (0.113 g, 0.6 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of dichloromethane. Then, acidic resin (0.226 g, 1.2 mmol, 2 equiv.) was added to the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 12 hours.

Work-up

TLC analysis showed the starting product as well as the formation of a new product (hexane/ethyl acetate (8:2)). The reaction mixture was filtered under vacuum to remove the acidic resin and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

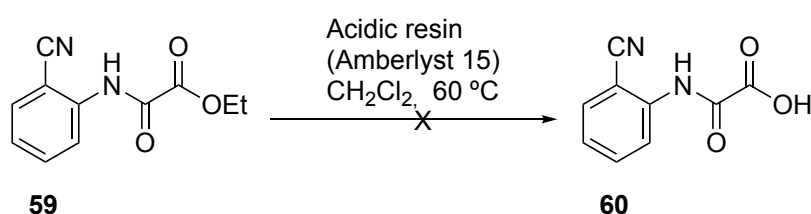
No purification by column chromatography was performed since the product was used to perform another assay at similar conditions.

Yield: <10%

Analytical data

Product described previously.

Preparation of 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with compound **59** (0.071 g, 0.3 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of dichloromethane. Then, acidic resin (0.142 g, 0.6 mmol, 2 equiv.) was added to the reaction mixture and it was stirred and heated to $60 \pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ for 12 hours.

Work-up

TLC analysis showed no formation of a new product (hexane/ethyl acetate (8:2)). The reaction mixture was filtered under vacuum to remove the acidic resin and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

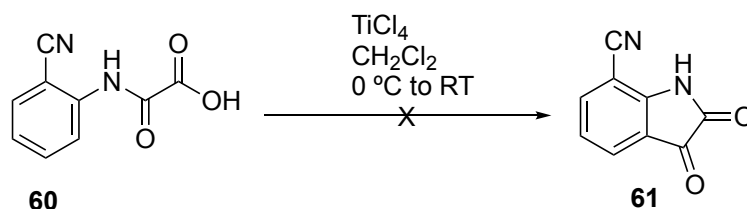
No purification by column chromatography was performed since no new product was observed by TLC or $^1\text{H-NMR}$.

Yield: 10%

Analytical data

Product described previously.

Preparation of 2,3-dioxindoline-7-carbonitrile



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the starting material **60** (0.090 g, 0.47 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of dichloromethane and cooled down to $0\text{ }^\circ\text{C}$ with an ice-bath. Titanium tetrachloride (X mL, XX mmol, X equiv.) was then added to the mixture. The mixture was stirred at room temperature for X days. The system was closed with a CaCl_2 .

Work-up

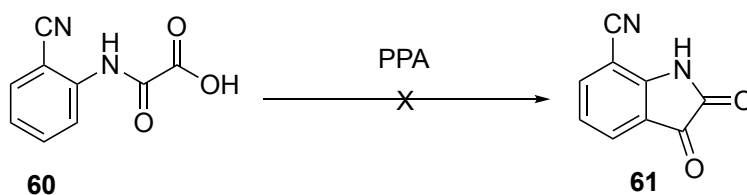
The reaction mixture was cooled down to room temperature and the TLC analysis showed no formation of a new product (hexane/ethyl acetate (8:2)). The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification was performed since no new product was observed by TLC or $^1\text{H-NMR}$.

Yield: 0%

Preparation of 2,3-dioxindoline-7-carbonitrile



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with the starting material **60** (0.100 g, 0.52 mmol, 1 equiv.) dissolved in The mixture was stirred at room temperature for X days. The system was closed with a CaCl_2 .

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and the TLC analysis showed no formation of a new product (hexane/ethyl acetate (8:2)). The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification was performed since no new product was observed by TLC or $^1\text{H-NMR}$.

Yield: 0%

Preparation of methyl 3-(2-(aminomethyl)phenoxy)benzoate

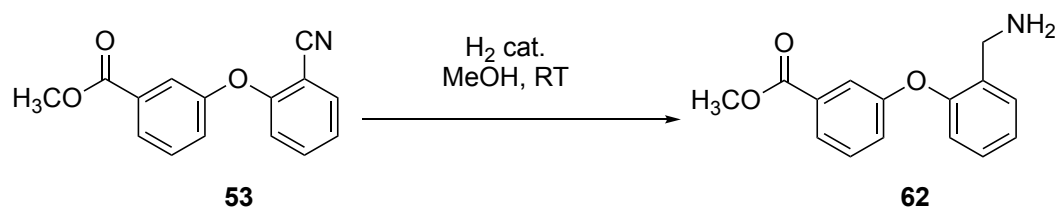


Table 1. Conditions tested with compound **53**

Conditions tested with compound 53					
Compound 53	Hydrogen		Catalyst	Acid/Base	Pressure
0.996 g 4.16 mmol	186 mL	195 mL	Pd-C 10%	HCl conc.	Atmospheric
0.100 g 0.395 mmol	18 mL	36 mL	Pd-C 10%	CH ₃ COOH	Atmospheric
0.144 g 0.569 mmol	26 mL	93 mL	Pd-C 10%	CF ₃ COOH	Atmospheric
0.144 g 0.569 mmol	26 mL	105 mL	Pd-C 10%	CF ₃ COOH	250 psi
0.300 g 1.185 mmol	53 mL	110 mL	Ni-Raney	HCl conc.	Atmospheric
0.084 g 0.332 mmol	15 mL	146 mL	Ni-Raney	CH ₃ COOH	Atmospheric
0.139 g 0.549 mmol	25 mL	150 mL	Ni-Raney	NH ₄ OH	Atmospheric
0.919 g 3.629 mmol	163 mL	225 mL	PtO ₂	HCl conc.	Atmospheric
0.580 g 2.290 mmol	103 mL	128 mL	PtO ₂	CH ₃ COOH	Atmospheric

General procedure

A specific 100 mL round-bottomed flask for catalytic hydrogenations with a magnetic stirring bar was charged with compound **53** (1 equiv.) dissolved in 10 mL of methanol (if solubility issues raised, ethyl acetate was added to the solution.), the catalyst (10% p/p of the starting product in case of Pd-C 10% and PtO₂; catalytic amount for Ni-Raney). Finally, the corresponding acid or base were added to the solution in order to catalyse the reaction (3 drops). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h under hydrogen stream (Table 1). In the case of high-pressure conditions, a PARR apparatus was required.

Work-up

The theoretical required volume for the reaction was 103 mL. Given that the hydrogenation apparatus was not completely hermetical, the consumed volume was of 128 mL, higher than expected.

The crude reaction was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of methanol and was then collected in a 100 mL round-bottomed flask. Finally, the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

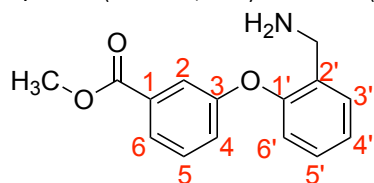
The only product purified by column chromatography was the obtained under PtO₂ conditions as it was the only crude reaction that showed by TLC and ¹H spectra a new compound. The crude reaction obtained was purified by column chromatography using a *Combi-Flash* R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (44:56).

Yield: 16%

Analytical data

Aspect: brown oil

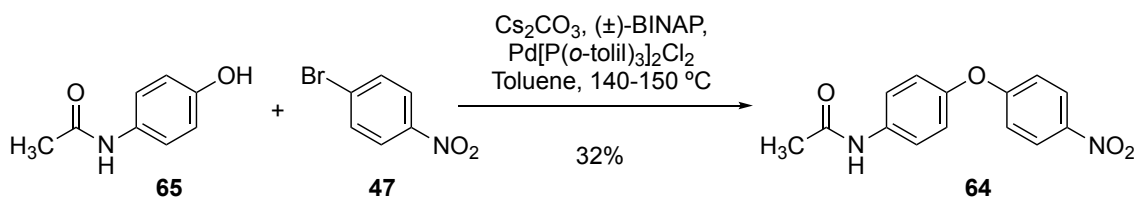
R_f: 0.49 (hexane/ethyl acetate (3:7))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 3.74 (s, 2H, -CH₂-Ar); 3.80 (s, 3H, -CH₃); 6.79 (dd, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 1.1$ Hz, 1H, H-6'); 7.00 (ddd, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 2.5$, $J_3 = 1.0$ Hz, 1H, H-4); 7.03 (td, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 1.1$ Hz, 1H, H-4'); 7.14 (td, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-5); 7.26 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'); 7.35 (dd, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-6); 7.48 (dd, $J_1 = 2.5$, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-2); 7.66 (dt, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H-3').

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 48.0 (CH₃); 52.1 (CH₂-NH₂); 118.5 (CH, C-2); 119.3 (CH, C-4'); 122.2 (CH, C-4); 123.8 (CH, C-6); 124.2 (CH, C-3'); 128.4 (CH, C-5); 129.6 (CH, C-6'); 130.4 (CH, C-5'); 131.6 (C, C-1); 131.8 (C, C-2'); 154.1 (C, C-3); 157.6 (C, C-1'); 166.4 (C, CO).

Preparation of *N*-(4-(4-nitrophenoxy)phenyl)acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon, was charged with *N*-(4-hydroxyphenyl)acetamide (**65**) (0.3 g, 1.98 mmol, 1 equiv.), 1-bromo-4-nitrobenzene (**47**) (0.401 g, 1.98 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (0.647 g, 2.38 mmol, 1.2 equiv.) and (±)-BINAP and palladium complex (II) in catalytic quantities in 10 mL of toluene. The reaction was heated at 140 ± 10 °C under stirring for 24 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and HCl 2N was then added to the mixture in order to obtain a slightly acid pH (5-6). Ethyl acetate (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

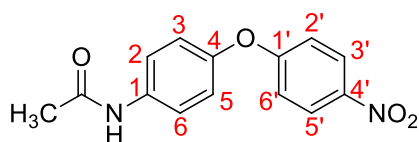
The crude reaction obtained was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-vis detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (54:46).

Yield: 32%

Analytical data

Aspect: brown oil

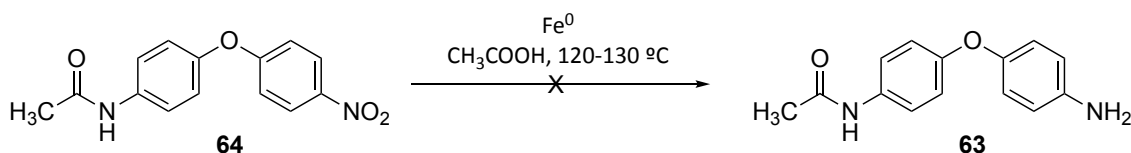
R_f: 0.28 (hexane/ethyl acetate (1:1))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.20 (s, 3H, -CH₃); 6.99 (d, J = 9.3 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.27 (s, 1H, -NH-); 7.57 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2, H-6); 8.19 (d, J = 9.3 Hz, 2H, H-3', H-5').

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 24.3 (CH₃); 116.7 (CH, C-3, C-5); 121.0 (CH, C-2', C-6'); 121.9 (CH, C-2, C-6); 125.9 (CH, C-3', C-5'); 135.4 (C, C-1); 142.4 (C, C-4'); 150.6 (C, C-4); 163.5 (C, C-1'); 168.9 (C, CO).

Preparation of N-(4-(4-aminophenoxy)phenyl)acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with compound **64** (0.146 g, 0.54 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of acetic acid. Then, iron was added to the mixture (0.152 g, 2.68 mmol, 5 equiv.) and it was heated up to 120 ± 10 °C under stirring for 6 hours.

Work-up

The mixture was cooled down by the addition of crushed ice and placing it in an ice-bath. NaOH 5N was then added in order to obtain a basic pH (8-9). Dichloromethane (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

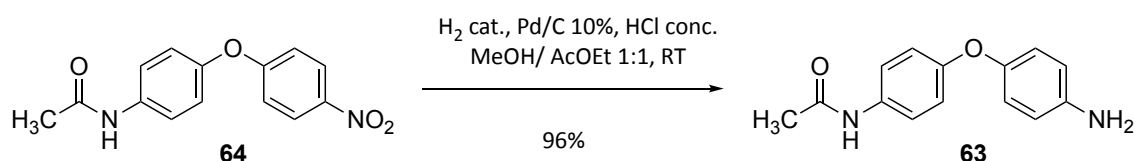
Purification

The crude reaction obtained was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-vis detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity.

TLC of the purified final product as well as ¹H NMR spectra showed starting material and paracetamol, which came from the non-purified starting product.

Yield: 0%

Preparation of *N*-(4-(4-aminophenoxy)phenyl)acetamide



General procedure

A specific 100 mL round-bottomed flask for catalytic hydrogenations with a magnetic stirring bar was charged with compound **64** (0.677 g, 2.49 mmol, 1 equiv.) dissolved in 20 mL of methanol and ethyl acetate (1:1). The catalyst was then added Pd-C 10% (10% p/p). Finally, hydrochloric acid was added to the solution in order to catalyse the reaction (3 drops). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 hours, under hydrogen at atmospheric pressure.

Work-up

The theoretical volume required for the reaction was 111 mL. Given that the hydrogenation apparatus was not hermetical and may leak, the consumed volume was of 200 mL, higher than expected.

The crude reaction was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of methanol. Finally, the solvent was removed under reduced pressure. Then, HCl 2N was added to the reaction mixture and diethyl ether was used to extract impurities. After 3 extractions, NaOH 2N was added in order to obtain a basic pH and the crude reaction was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

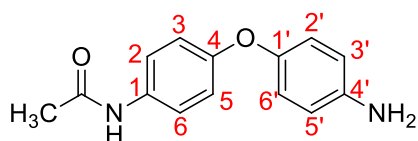
No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

Yield: 96% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown oil

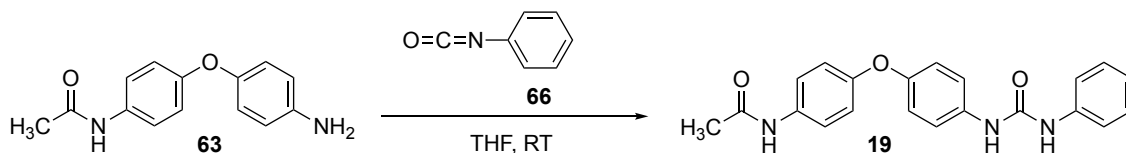
R_f: 0.25 (hexane/ethyl acetate (1:1))



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.15 (s, 3H, -CH₃); 3.58 (bs, 2H, -NH₂); 6.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'); 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.28 (bs, 1H, -NH-); 7.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-2, H-6).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 24.0 (CH₃); 116.2 (CH, C-3', C-5'); 117.6 (CH, C-2', C-6); 120.6 (CH, C-3, C-5); 121.9 (CH, C-2, C-6); 132.4 (C, C-1); 142.5 (C, C-4'); 148.8 (C, C-1'); 155.1 (C, C-4); 168.8 (C, CO).

Preparation of *N*-(4-(4-(3-phenylureido)phenoxy)phenyl)acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask was charged with compound **63** (0.117 g, 0.483 mmol, 1 equiv.) and phenyl isocyanate (0.053 mL, 0.483 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h.

Work-up

First, the solvent was removed under reduced pressure. Dichloromethane was added to the crude reaction and then the supernatant liquid was carefully decanted. Then, the crude reaction was filtered by means of a kitasato and collected in a Büchner flask, but the solid was not properly separated and an additional filtration through a pleated filter with dichloromethane was required.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

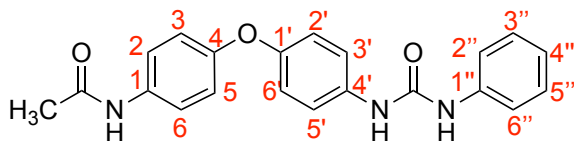
Yield: 67% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: grey solid

R_f: 0.22 (hexane/ethyl acetate (3:7))

Melting point: 155-157 °C (dichloromethane)

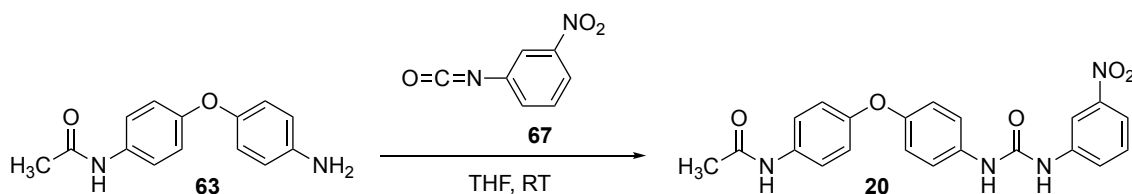


¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.02 (s, 3H, CH₃); 6.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-3, H-5); 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-2', H-6'); 6.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4''); 7.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3'', H-5''); 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-2, H-6); 7.44 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2'', H-6''); 7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-3', H-5'); 8.61 (s, 1H, -NH-C-4'); 8.63 (s, 1H, -NH-C-1''); 9.91 (s, 1H, -NH-C-1).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz) δ (ppm): 23.9 (CH₃); 118.2 (CH, C-2', C-6'); 118.4 (CH, C-3, C-5); 119.0 (CH, C-2, C-6); 119.9 (CH, C-3', C-5'); 120.6 (CH, C-2'', C-6''); 121.8 (CH, C-4''); 128.8 (CH, C-3'', C-5''); 134.7 (C, C-1); 135.3 (C, C-1''); 139.8 (C, C-4'); 151.6 (C, C-4); 152.62 (C, C-1'); 152.63 (C, -NH-CO-NH-); 168.0 (C, CO).

HRMS (ESI +): Calculated for C₂₁H₂₀N₃O₃ [M+H]⁺: 362.1499, found 362.1481. Calculated for C₂₁H₁₈N₃O₃Na [M+Na]⁺: 384.1319, found 384.1297.

Preparation of *N*-(4-(4-(3-(3-nitrophenyl)ureido)phenoxy)phenyl)acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask with a magnetic stirring bar was charged with *N*-(4-(4-aminophenoxy)phenyl)acetamide (0.264 g, 1.09 mmol, 1 equiv.) and 2-nitrophenyl isocyanate (0.179 g, 1.09 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h.

Work-up

The solvent was removed under reduced pressure. Dichloromethane and ethyl acetate were added to the crude reaction and then the supernatant liquid was carefully decanted.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

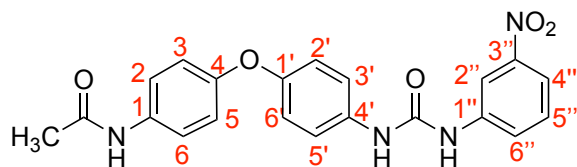
Yield: 63% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: grey solid

Rf: 0.15 (hexane/ethyl acetate (3:7))

Melting point: 159-161 °C (ethyl acetate)



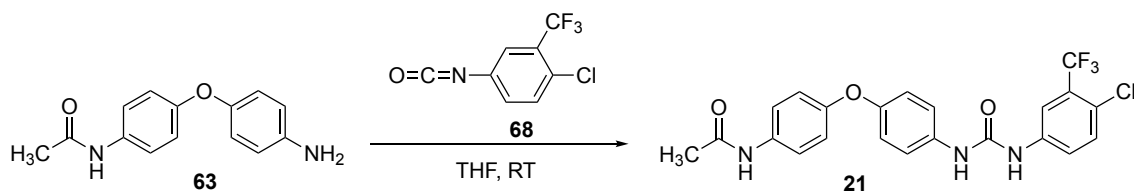
IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3293 (NH); 1698 (C=O); 1650 (C=O); 1611 (NH-C=O); 1562 (NO); 1276 (Ar-NH); 1218 (Ar-O-Ar).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.02 (s, 3H, -CH₃); 6.93 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-3, H-5); 6.94 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.47 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-2, H-6); 7.52-7.56 (m, 1H, H-5''); 7.57 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.71 (dd, J_1 = 8.0, J_2 = 0.6 Hz, 1H, H-6''); 7.80 (dd, J_1 = 8.0, J_2 = 2.1 Hz, 1H, H-4''); 8.56 (s, 1H, H-2''); 8.82 (s, 1H, -NH-C-4'); 9.19 (s, 1H, -NH-C-1''); 9.91 (s, 1H, -NH-C-1).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz) δ (ppm): 23.9 (CH₃); 112.1 (CH, C-2''); 116.2 (CH, C-4''); 118.5 (CH, C-3, C-5); 118.9 (C, C-2', C-6'); 120.4 (CH, C-2, C-6); 120.6 (C, C-3', C-5'); 124.2 (CH, C-6''); 130.0 (CH, C-5''); 134.7 (C, C-1); 134.8 (C, C-1''); 141.1 (C, C-4'); 148.1 (C, C-3''); 152.0 (C, C-4); 152.5 (C, C-1'); 152.5 (C, -NH-CO-NH-); 168.0 (C, CO).

HRMS (ESI +): Calculated for C₂₁H₁₉N₄O₅ [M+H]⁺: 407.1350, found 407.1342. Calculated for C₂₁H₁₈N₄NaO₅ [M+Na]⁺: 429.1169, found 429.1163.

Preparation of *N*-(4-(4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)phenyl)acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask was charged with compound **63** (0.156 g, 0.644 mmol, 1 equiv.) and 4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate (0.143 g, 0.644 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h.

Work-up

The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude reaction obtained was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (28:72).

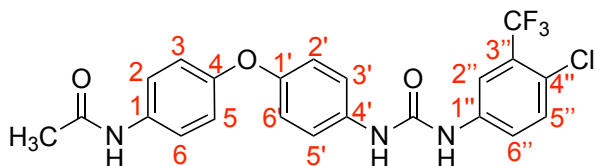
Yield: 62%

Analytical data

Aspect: white crystals

R_f: 0.24 (hexane/ethyl acetate 3:7)

Melting point: 168-170 °C (acetone)



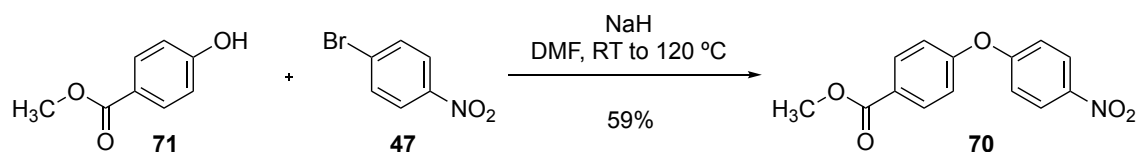
IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3292 (NH); 1697 (C=O); 1650 (C=O); 1601 (NH-C=O); 1281 (Ar-O-Ar); 822 (CF₃).

¹H NMR (acetone-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.87 (s, 3H, CH₃); 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-3, H-5); 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5''); 7.61 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.73 (dd, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, 1H, H-6''), 8.13 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-2''); 8.28 (s, 1H, -NH-C-4'); 8.57 (s, 1H, -NH-C-1''); 9.18 (s, 1H, -NH-C-1).

¹³C NMR (acetone-d₆, 100.6 MHz) δ (ppm): 24.1 (C, CH₃); 118.0 (CH, *J* = 9 Hz, C-2''); 119.5 (CH, C-2', C-6'); 119.8 (CH, C-3, C-5); 121.5 (CH, C-2, C-6); 121.6 (CH, C-3', C-5'); 123.7 (CH, *J* = 9 Hz, C-6''); 124.0 (C, *J* = 272 Hz, CF₃); 124.1 (C, C-4''); 128.5 (C, *J* = 31 Hz, C-3''); 132.7 (C, C-5''); 135.7 (C, C-1); 135.9 (C, C-1''); 140.5 (C, C-4'); 153.3 (C, C-4); 153.7 (C, C-1'); 154.1 (C, NH-CO-NH); 169.0 (C, -NH-CO-CH₃).

HRMS (ESI +): Calculated for C₂₂H₁₈ClF₃N₃O₃ [M+H]⁺: 464.0983, found 464.1002. Calculated for C₂₂H₂₁ClF₃N₄O₃ [M+NH₄]⁺: 481.1249, found 481.1270.

Preparation of methyl 4-(4-aminophenoxy)benzoate



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux condenser was charged with NaH 60 % purity (0.15 g, 3.70 mmol, 1.5 equiv.) and washed out with 10 mL of hexane in order to eliminate the paraffin. Once dry, methyl 4-hydroxybenzoate (**71**) (0.375 g, 2.46 mmol, 1 equiv.) was added in 10 mL of DMF and stirred under argon at room temperature for 30 minutes. After that time, 1-bromo-4-nitrobenzene (**47**) (0.50 g, 2.46 mmol, 1 equiv.) was added. The resulting mixture was heated up to 120 ± 10 °C under stirring for 24 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and was then diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

The crude reaction obtained was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (80:20).

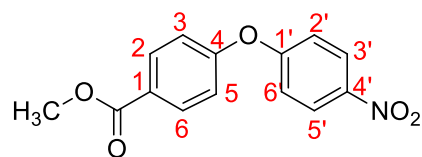
Yield: 59%

Analytical data

Aspect: yellow solid

R_f: 0.45 (hexane/ethyl acetate (8:2))

Melting point: 104-106 °C (ethyl acetate)

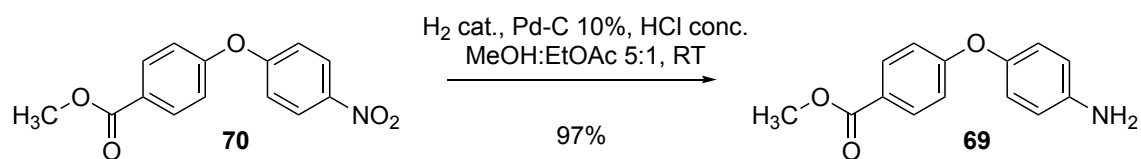


IR (film) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1712 (C=O); 1584 (NO₂); 1526 (C=C); 1344 (NO₂); 1289 (Ar-O); 1239 (Ar-O-Ar); 1160 (C-O).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 3.93 (s, 3H, -OCH₃); 7.09 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-3, H-5); 7.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 8.09 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-2, H-6); 8.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-3', H-5').

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 52.3 (CH₃, OCH₃); 118.4 (CH, C-2', C-6'); 119.5 (CH, C-3, C-5); 126.1 (CH, C-3', C-5'); 126.9 (C, C-1); 132.1 (CH, C-2, C-6); 143.5 (C, C-4'); 159.1 (C, C-4); 161.9 (C, C-1'); 166.2 (C, CO).

Preparation of methyl 4-(4-aminophenoxy)benzoate



General procedure

A specific 100 mL round-bottomed flask for catalytic hydrogenations was charged with compound **70** (0.212 g, 0.776 mmol, 1 equiv.) in 30 mL of methanol and ethyl acetate (5:1). The catalyst Pd-C 10% (10% p/p) was then added. Finally, hydrochloric acid was added to the solution in order to catalyse the reaction (3 drops). The reaction mixture was stirred at room temperature for 36 hours, under hydrogen at atmospheric pressure.

Work-up

The theoretical volume required for the reaction was 35 mL. Given that the hydrogenation apparatus was not hermetical and may leak, the consumed volume was of 70 mL, higher than expected.

The crude reaction was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of methanol. Finally, the solvent was removed under reduced pressure. Then, 20 mL of water with an excess of K_2CO_3 were added to the reaction mixture to reach a pH 7-8. The crude reaction was then extracted with ethyl acetate (3 X 20 mL), the combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ^1H spectrum.

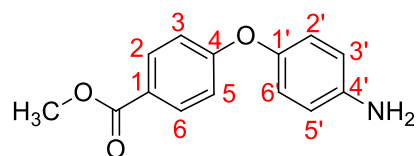
Yield: 97% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown solid

R_f: 0.31 (hexane/ethyl acetate 5:5)

Melting point: 122-124 °C (ethyl acetate)

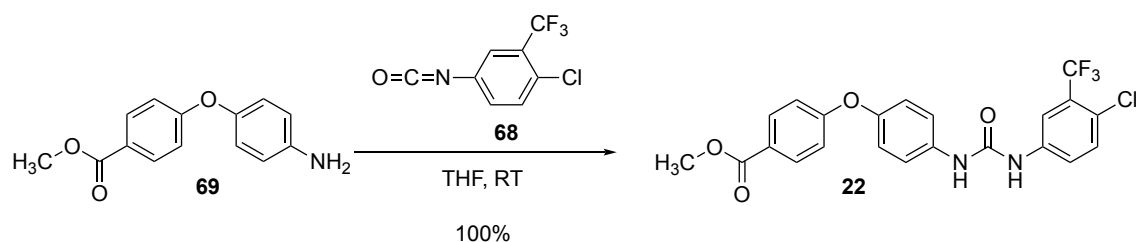


IR (film) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3439 (NH); 3358 (NH); 1706 (C=O); 1498 (C=C); 1279 (Ar-O); 1236 (Ar-O-Ar); 1163 (C-O).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 3.65 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$); 3.88 (s, 3H, CH_3); 6.70 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.89 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 6.91 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-3, H-5); 7.96 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-2, H-6).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 51.9 (CH_3 , OCH_3); 116.1 (CH, C-2', C-6'); 116.3 (CH, C-3, C-5); 121.8 (CH, C-3', C-5'); 123.6 (C, C-1); 131.6 (CH, C-2, C-6); 143.7 (C, C-1'); 147.1 (C, C-4'); 163.2 (C, C-4); 166.7 (C, CO).

Preparation of methyl 4-(4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)benzoate



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask was charged with compound **69** (0.041 g, 0.169 mmol, 1 equiv.) and 4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate (0.037 g, 0.169 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h.

Work-up

The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ^1H spectrum.

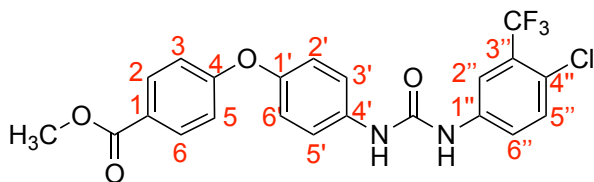
Yield: 100% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect : white crystals

R_f: 0.48 (hexane/ethyl acetate 5:5)

Melting point: 179-181 °C (acetone)

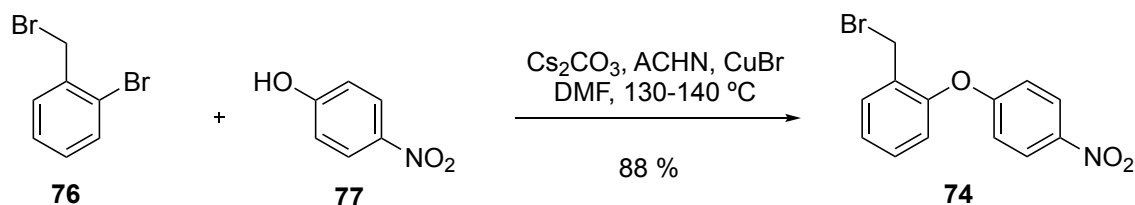


^1H NMR (acetone- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 3.85 (s, 3H, CH_3); 7.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3, H-5); 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-5''); 7.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.75 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-6''); 7.98 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 8.13 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2''); 8.40 (s, 1H, -NH-C-4'); 8.61 (s, 1H, -NH-C-1'').

^{13}C NMR (acetone- d_6 , 100.6 MHz) δ (ppm): 52.2 (CH_3); 117.5 (CH, C-2', C-6'); 118.2 (CH, $J = 11$ Hz, 1H, C-2''); 121.6 (CH, C-3, C-5, C-3', C-5'); 123.85 (CH, C-6''); 123.90 (C, $J = 272$ Hz, CF_3); 124.2 (C, $J = 2$ Hz, C-4''); 125.1 (C, C-1); 128.5 (C, $J = 31$ Hz, C-3''); 132.4 (CH, C-2, C-6); 132.7 (CH, C-5''); 137.2 (C, C-4'); 140.3 (C, C-1''); 151.3 (C, C-1'); 153.3 (C, -NH-CO-NH-); 163.3 (C, C-4); 166.7 (C, -CO-O CH_3).

HRMS (ESI +): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 465.0823, found 465.0824.

Preparation of 1-(bromomethyl)-2-(4-nitrophenoxy)benzene



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon was charged with 1-bromo-2-(bromomethyl)benzene (**76**) (0.270 ml, 2 mmol, 1 equiv.), 4-nitrophenol (**77**) (0.278 g, 2 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (0.717 g, 2.2 mmol, 1 equiv.) and ACHN and CuBr in catalytic quantities in 10 mL of DMF. The reaction was heated at 130 ± 10 °C under stirring for 48 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature. TLC analysis showed formation of a unique new product. The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

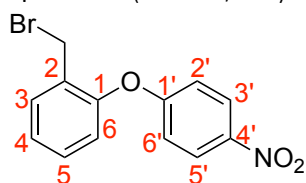
No purification by column chromatography was performed since the TLC and the ^1H spectrum showed two pure final products.

Yield: 88% (non-purified compound)

Analytical data

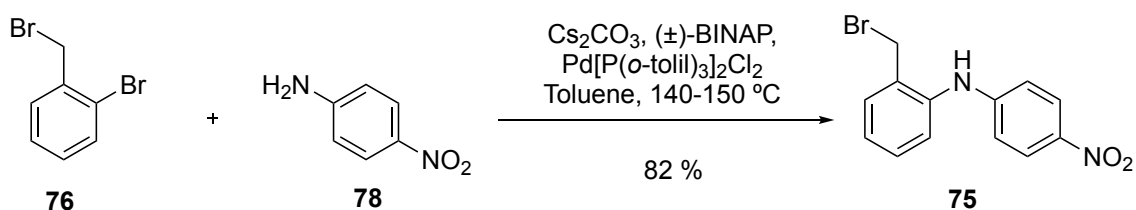
Aspect: brown solid

R_f: A: 0.77 (hexane/ethyl acetate (8:2))



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 5.23 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 7.05 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.22 (t, $J_1 = 7.7$ Hz, 1H, H-4); 7.36 (td, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H, H-5); 7.50 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-6); 7.62 (dd, $J = 7.7$, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H, H-3); 8.23 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, H-3', H-5').

Preparation of 2-(bromomethyl)-N-(4-nitrophenyl)aniline



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon, was charged with 1-bromo-2-(bromomethyl)benzene (**76**) (0.270 ml, 2 mmol, 1 equiv.), *p*-nitroaniline (**78**) (0.276 g, 2 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (0.717 g, 2.2 mmol, 1 equiv.) and (\pm)-BINAP and palladium complex (II) in catalytic quantities in 10 mL of toluene. The reaction was heated at 140 ± 10 °C under stirring for 7 days.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature, 20 mL of water were then added to the mixture and the crude reaction was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

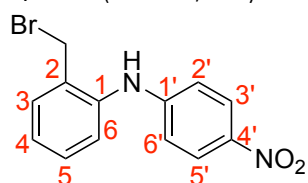
The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (83:17).

Yield: 82%

Analytical data

Aspect: yellow solid

R_f: 0.05 (hexane/ethyl acetate (9:1))



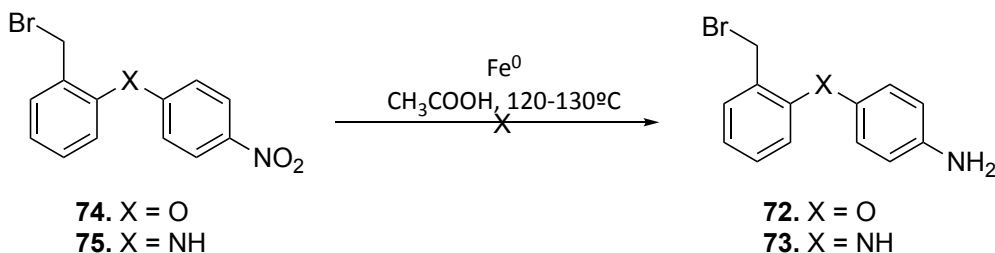
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 4.50 (s, 1H, -CH₂- conformational isomer A*); 4.52 (s, 1H, -CH₂- conformational isomer B*); 4.98 (bs, 1H, -NH-); 6.57 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.19 (td, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-4); 7.29 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5); 7.33 (dd, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 2.2$ Hz, 1H, H-6); 7.61 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3); 8.09 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H-3', H-5').

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 47.8 (CH₂ conformational isomer B*); 47.9 (CH₂ conformational isomer A*); 123.8 (C, C-2); 126.8 (CH, C-2', C-6'); 126.9 (CH, C-6); 128.7 (CH, C-3', C-5'); 129.9 (CH, C-4); 130.1 (CH, C-5); 133.8 (CH, C-3); 138.0 (C, C-4'); 138.5 (C, C-1, C-1').

conformational isomer A*: minority

conformational isomer B*: majority

Preparation of 4-(2-(bromomethyl)phenoxy)aniline and N-(2-(bromomethyl)phenyl)benzene-1,4-diamine



General procedure

50 mL round-bottomed flasks equipped with a reflux condenser and a magnetic stirring bar were separately charged with 1-(bromomethyl)-2-(4-nitrophenoxy)benzene (**74**) (0.304 g, 0.987 mmol, 1 equiv.) and 2-(bromomethyl)-N-(4-nitrophenyl)aniline (**75**) (0.282 g, 0.918 mmol, 1 equiv.) dissolved in 15 mL of acetic acid. Then, iron was added to each mixture (0.276 g, 4.942 mmol, 5 equiv.) and (0.256 g, 4.58 mmol, 5 equiv.) respectively, and both were heated up to 120 ± 10 °C under stirring for 6 hours.

Work-up

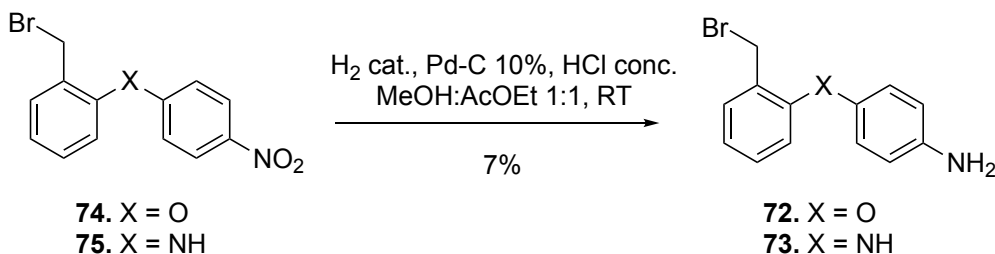
72: The reaction mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

73: The mixture was cooled down by the addition of crushed ice and placing it in an ice-bath. NaOH 5N was then added in order to obtain a basic pH (8-9). Ethyl acetate (3 x 20 mL) was used to extract the crude reaction. The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the TLC and the ^1H spectrum showed only the starting product.

Preparation of 4-(2-(bromomethyl)phenoxy)aniline and N-(2-(bromomethyl)phenyl)benzene-1,4-diamine



General procedure

Specific 100 mL round-bottomed flasks for catalytic hydrogenations were separately charged with 1-(bromomethyl)-2-(4-nitrophenoxy)benzene (**74**) (0.632 g, 2.051 mmol, 1 equiv.) and 2-(bromomethyl)-N-(4-nitrophenyl)aniline (**75**) (0.494 g, 1.608 mmol, 1 equiv.) in 20 mL of methanol and ethyl acetate (1:1). The catalyst was then added Pd-C 10% (10% p/p) in each flask. Finally, hydrochloric acid was

added to both solutions in order to catalyse the reaction (3 drops). The mixtures were stirred at room temperature under hydrogen at atmospheric pressure for 48 hours.

Work-up

72: The theoretical volume required for the reaction was 92 mL. Given that the hydrogenation apparatus was not hermetical and may leak, the consumed volume was of 144 mL, higher than expected.

73: The theoretical volume required for the reaction was 82 mL. Given that the hydrogenation apparatus was not hermetical and may leak, the consumed volume was of 178 mL, higher than expected.

Both crude reactions were separately filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of methanol. Finally, the solvent was removed under reduced pressure. Then, 20 mL of NaOH 2N were added to each reaction mixture to reach a basic pH. The crude reactions were then extracted with ethyl acetate (3 X 20 mL), the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

72: No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity.

73: The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-vis detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (63:37).

Yield: **72:** 86% (non-purified compound); **73:** 7%

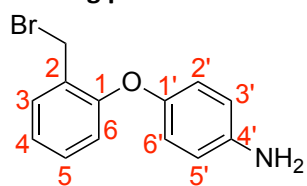
Analytical data

72:

Aspect: brown crystals

R_f: 0.72 (hexane/ethyl acetate (4:6))

Melting point: 126-128 °C (dichloromethane)

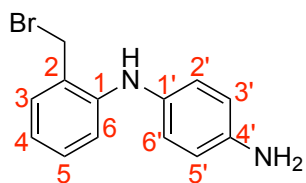


¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 5.06 (s, 2H, -CH₂-); 6.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.09 (bs, 2H, -NH₂); 7.18 (dd, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 1.5 Hz, 1H, H-6); 7.32 (dt, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 1.5 Hz, 1H, H-4); 7.54 (dd, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 1.5 Hz, 1H, H-3); 7.56 (dt, *J*₁ = 7.8, *J*₂ = 1.5 Hz, 1H, H-5).

73:

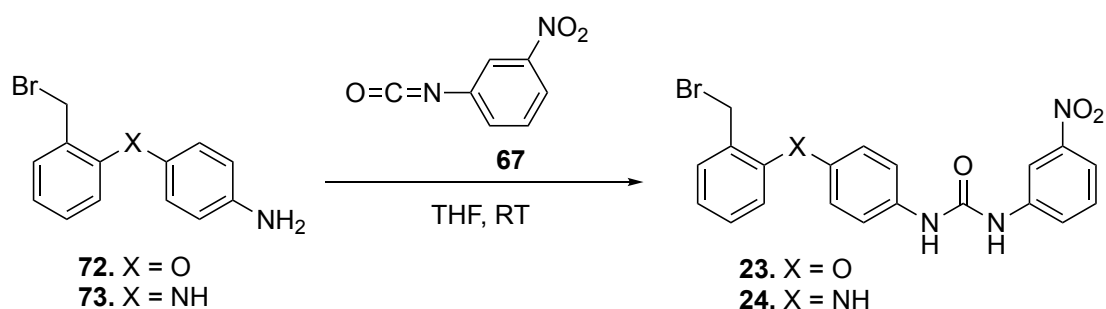
Aspect: brown oil

R_f: 0.38 (hexane/ethyl acetate (1:1))



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 3.47 (bs, 1H, -NH-); 4.34 (s, 1H, -NH₂); 6.51 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.60 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.12 (td, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-4); 7.25 (td, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-5); 7.41 (dd, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-6); 7.56 (dd, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-3).

Preparation of 1-(4-(2-(bromomethyl)phenoxy)phenyl)-3-(3-nitrophenyl)urea and 1-(4-((2-(bromomethyl)phenyl)amino)phenyl)-3-(3-nitrophenyl)urea



General procedure

50 mL round-bottomed flasks were separately charged with compound **72** (0.177 g, 0.64 mmol, 1 equiv.) and 2-nitrophenyl isocyanate (**67**) (0.104 g, 0.64 mmol, 1 equiv.), and compound **73** (0.029 g, 0.104 mmol, 1 equiv.) and 2-nitrophenyl isocyanate (**67**) (0.17 g, 0.104 mmol, 1 equiv.), in 10 mL of THF. The mixtures were stirred at room temperature for 24 h.

Work-up

The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

23: The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (72:28).

24: The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (70:30).

Yield: **23:** 32%; **24:** 28%

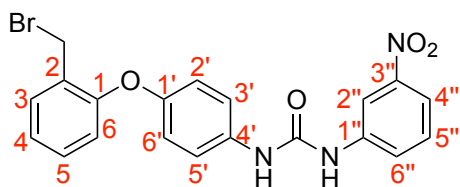
Analytical data

23:

Aspect: yellow solid

R_f: 0.53 (hexane/ethyl acetate (1:1))

Melting point: 205-207 °C (hexane/ethyl acetate)



¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 5.09 (s, 2H, -CH₂-); 6.98 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.31 (td, J_1 = 7.6, J_2 = 1.6 Hz, 1H, H-4); 7.40 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.43 (td, J_1 = 7.6, J_2 = 1.0 Hz, 1H, H-5); 7.56 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-5''); 7.57 (td, J_1 = 7.6, J_2 = 1.6 Hz, 1H, H-6); 7.68 (dd, J_1 = 8.2, J_2 = 1.0 Hz, 1H, H-6''); 7.70 (dd, J_1 = 7.6, J_2 = 1.0 Hz, 1H, H-3); 7.80 (ddd, J_1 = 8.2, J_2 = 2.2 Hz, J_3 = 1.0 Hz, 1H, H-4''); 8.55 (t, J = 2.2 Hz, 1H, H-2''); 8.68 (s, 1H, -NH-C-4'); 9.15 (s, 1H, -NH-C-1'').

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz) δ (ppm): 69.3 (CH₂, -CH₂-Br); 112.0 (CH, C-2''); 115.0 (CH, C-2', C-6'); 116.1 (CH, C-6); 120.5 (CH, C-3', C-5'); 122.7 (C, C-2); 124.2 (CH, C-4''); 127.9 (CH, C-4); 130.01 (CH, C-6''); 130.02 (CH, C-5); 130.1 (CH, C-3); 132.6 (CH, C-5''); 132.7 (C, C-4'); 136.0 (C, C-1''); 141.2 (C, C-3''); 148.1 (C, C-1'); 152.6 (C, C-1); 153.6 (C, CO).

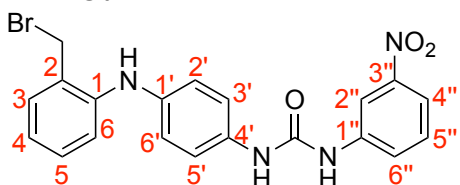
HRMS (ESI +): Calculated for C₂₀H₁₇BrN₃O₄ [M+formic acid]⁺, for isotope ⁷⁹Br: 442.0397, found 442.0413. Calculated for C₂₀H₁₆BrN₃NaO₄ [M+Na]⁺, for isotope ⁷⁹Br: 464.0216, found 464.0226. Calculated for C₂₀H₁₇BrN₃O₄ [M+formic acid]⁺, for isotope ⁸¹Br: 444.0376, found 444.0393. Calculated for C₂₀H₁₆BrN₃NaO₄ [M+Na]⁺, for isotope ⁷⁹Br: 466.0216, found 466.0217.

24:

Aspect: yellow-brown solid

R_f: 0.51 (hexane/ethyl acetate (1:1))

Melting point: 149-151 °C (dichloromethane)

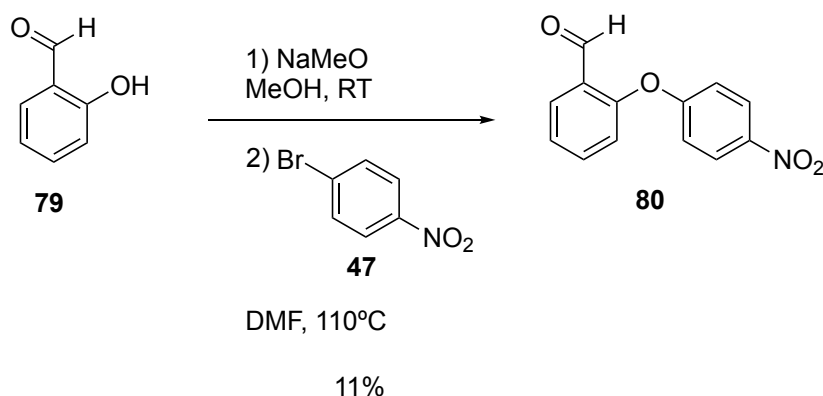


¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 4.37 (s, 2H, -CH₂-Br); 7.09 (dt, J_1 = 7, J_2 = 0.8 Hz, 1H, H-4); 7.16-7.20 (m, 3H, H-3, H-5, H-6); 7.31-7.34 (m, 2H, H-2', H-6'); 7.39 (t, J = 7 Hz, 1H, H-5''); 7.44-7.48 (m, 2H, H-3', H-5'); 7.57 (d, J = 7 Hz, H-6''); 7.75-7.79 (m, 1H, H-4''); 7.95 (bs, 1H, Ar-NH-Ar); 7.99 (bs, 1H, -NH-C-4'); 8.02 (d, J = 1.2 Hz, H-2''); 9.10 (bs, 1H, -NH-C-1'').

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 48.7 (CH₂, -CH₂-Br); 116.5 (CH, C-2''); 118.4 (CH, C-6); 123.3 (CH, C-4); 124.3 (CH, C-4''); 127.6 (CH, C-6''); 127.7 (C, C-4'); 128.7 (CH, C-5, C-5''); 129.2 (C, C-2); 129.4 (C, C-1); 129.5 (C, C-1'); 129.7 (CH, C-2', C-6', C-3); 130.7 (CH, C-3', C-5'); 138.1 (C, C-1''); 148.5 (C, C-3''); 152.2 (C, CO).

HRMS (ESI +): Calculated for C₂₀H₁₈BrN₄O₃ [M+H]⁺, for isotope ⁷⁹Br: 441.0554, found 441.0574; for isotope ⁸¹Br: 443.0534, found 443.0534.

Preparation of 2-(4-nitrophenoxy)benzaldehyde



General procedure

Firstly, a 100 mL round-bottomed flask was charged with Na⁰ (0.170 g, 7.370 mmol, 1.5 equiv.). Then, MeOH was included in the flask in order to obtain MeONa (H₂ release). Once all the H₂ was released, the solvent was evaporated under vacuum. Once completely dry, the starting salicylaldehyde (**79**) (0.514 mL, 4.916 mmol, 1 equiv.) was added dissolved in 15 mL of methanol was added under stirring for 20 minutes. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure. Secondly, 10 mL of DMF were added to the flask, followed by the addition of 1-bromo-4-nitrobenzene (0.993 g, 4.916, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of DMF under stirring. The flask was equipped with a reflux condenser and a magnetic stirring bar and was heated to 110 ± 10 °C for 36 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature. Methanol was firstly evaporated under reduced pressure and then 20 mL of water were added to the mixture and the crude reaction was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-vis detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (90:10).

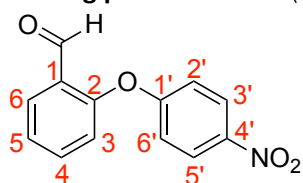
Yield: 11%

Analytical data

Aspect: yellow crystals

R_f: 0.34 (hexane/ethyl acetate (9:1))

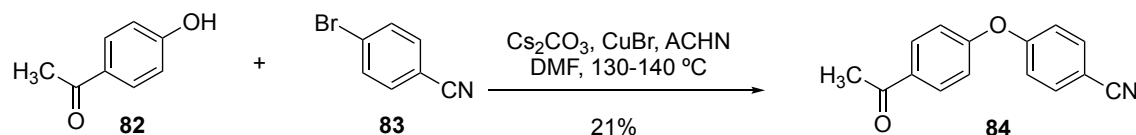
Melting point: 84-86 °C (dichloromethane)



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.08 (dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H, H-3); 7.10 (d, $J_1 = 9.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.38 (tt, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H, H-5); 7.66 (dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-4); 8.00 (dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-6); 8.26 (d, $J_1 = 9.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 10.34 (s, 1H, -CHO).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ (ppm): 117.7 (CH, C-2', C-6'); 120.7 (CH, C-3); 125.6 (CH, C-5); 126.1 (CH, C-3', C-5'); 127.9 (C, C-1); 129.5 (CH, C-6); 136.1 (CH, C-4); 143.3 (C, C-4'); 156.9 (C, C-2); 162.4 (C, C-1'); 188.2 (C, -CHO).

Preparation of 4-(4-acetylphenoxy)benzonitrile



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon was charged with 4-bromobenzonitrile (0.918 g, 5.043 mmol, 1 equiv.), the 4'-hydroxyacetophenone (0.687 g, 5.043 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (1.643 g, 5.043 mmol, 1 equiv.) and ACHN (1,1'-azobis(cyclohexanecarbonitrile)) and CuBr in catalytic quantities in 10 mL of DMF. The reaction was heated at 130 ± 10 °C under stirring for 4 days.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature, 20 mL of water were then added to the mixture and the crude reaction was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (30:70).

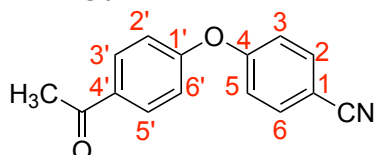
Yield: 21%

Analytical data

Aspect: yellow solid

R_f : 0.31 (hexane/ethyl acetate (1:9))

Melting point: 166-168 °C (ethyl acetate)

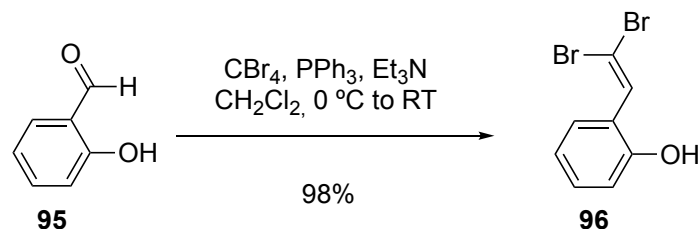


IR (NaCl): 2330 (CN); 1661 (C=O); 1238 (Ar-O); 1165 (C-O).

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 2.55 (s, 3H, CH_3); 7.12 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-3, H-5); 7.14 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 8.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3', H-5').

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz) δ(ppm): 26.6 (CH₃); 118.1 (CH, C-2', C-6'); 118.8 (CH, C-3, C-5); 129.9 (CH, C-3', C-5'); 130.3 (C, CN); 130.8 (CH, C-2, C-6); 132.4 (C, C-1); 157.8 (C, C-4'); 160.3 (C, C-4); 167.1 (C, C-1'); 196.5 (C, CO).

Preparation of 2-(2,2-dibromovinyl)phenol



General procedure

A 100 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar was charged with PPh₃ (6.444 g, 24.577 mmol, 6 equiv.) in dichloromethane (1 mL per mmol PPh₃: 24.56 mL). The vessel was cooled down to 0 °C, after which a solution of CBr₄ (4.073 g, 12.288 mmol, 3 equiv.) in dichloromethane (1 mL per mmol CBr₄: 12.28 mL). After 10 minutes, Net₃ (3.430 mL, 24.577 mmol, 6 equiv.) was added dropwise and stirred for an additional 5 minutes, after which a solution of the salicylaldehyde (**95**) (0.429 mL, 4.096 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (1 mL per mmol salicylaldehyde: 4.1 mL) was added dropwise over 10 minutes. The internal temperature was maintained at 0 °C during the addition of all reagents. The vessel was stirred for an additional 30 minutes at this temperature, after which it was allowed to warm at room temperature for 20 hours.

Work-up

First, 10 mL of NH₄Cl were added to quench the reaction mixture. Then, 20 mL of water diluted were added and extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered under vacuum and the solvent was evaporated under reduced pressure.

Purification

The crude reaction was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (95:5).

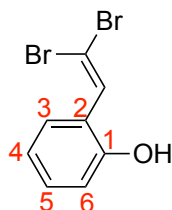
Yield: 100%

Analytical data

Aspect: brown crystals

R_f: 0.54 (hexane/ethyl acetate (8:2))

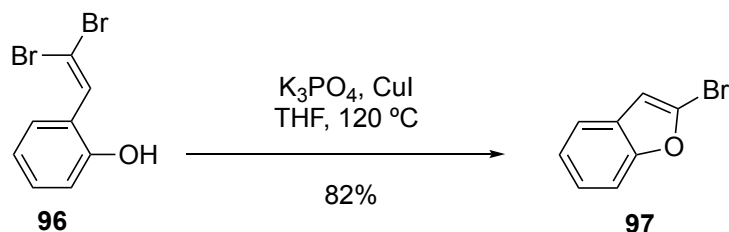
Melting point: 50-52 °C (dichloromethane)



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 5.01 (s, 1H, -OH); 6.83 (dd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H, H-6); 6.95 (tdd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 1.0$, $J_3 = 0.4$ Hz, 1H, H-4); 7.24 (tdd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 1.5$, $J_3 = 0.4$ Hz, 1H, H-5); 7.54 (ddd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 1.5$, $J_3 = 0.4$ Hz, 1H, H-3); 7.56 (s, 1H, -CH=CBr₂).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 91.6 (C, CBr₂); 115.7 (CH, C-6); 120.5 (CH, C-4); 122.8 (CH, C-2); 129.1 (CH, C-3); 130.0 (CH, C-5); 132.4 (CH, CH=CBr₂); 152.6 (C, C-1).

Preparation of 2-bromobenzofuran



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon was charged with compound **96** (0.593 g, 2.134 mmol, 1 equiv.), K_3PO_4 (0.906 g, 4.267 mmol, 2 equiv.) and CuI (catalytic amount) dissolved in 10 mL of THF. The reaction mixture was heated at 120 ± 10 °C under stirring for 36 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and the crude reaction was filtered by means of a pleated filter and washed with 20 mL of dichloromethane. The solvent was removed under reduced pressure.

Purification

No purification by column chromatography was performed since the product was obtained with enough purity as shown by TLC and ¹H spectrum.

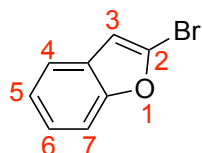
Yield: 82% (non-purified compound)

Analytical data

Aspect: brown crystals

R_f: 0.87 (hexane/ethyl acetate (9:1))

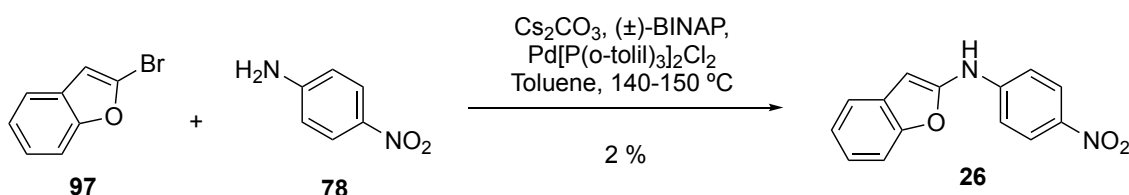
Melting point: 246-248 °C (dichloromethane)



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 6.73 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-3); 7.24 (quint, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.6$ Hz, 1H, H-5); 7.25 (quint, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.6$ Hz, 1H, H-6); 7.45 (ddd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.6$, $J_3 = 1.0$ Hz, 1H, H-7); 7.51 (ddd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.6$, $J_3 = 1.0$ Hz, 1H, H-4).

¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm): 108.2 (CH, C-3); 110.9 (CH, C-7); 120.0 (CH, C-4); 123.3 (CH, C-5); 124.2 (CH, C-6); 128.2 (C, C-3a); 128.7 (C, C-2); 155.8 (C, C-7a).

Preparation of *N*-(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)acetamide



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon, was charged with 1-bromo-2-(bromomethyl)benzene (**97**) (0.208 mg, 1.1 mmol, 1 equiv.), 4-nitroaniline (0.146 g, 1.1 mmol, 1 equiv.), caesium carbonate (**78**) (0.413 g, 1.2 mmol, 1.2 equiv.) and (\pm)-BINAP and palladium complex (II) in catalytic quantities in 10 mL of toluene. The reaction was heated at 140 ± 10 °C under stirring for 4 days. Since the TLC did not show any new product formation, (\pm)-BINAP and palladium complex (II) were added in catalytic quantities and the reaction mixture was stirred and heated at 140 ± 10 °C for 2 more days.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature, 20 mL of saturated aqueous solution of NaCl were then added to the mixture and the crude reaction was extracted with ethyl acetate (3 X 20 mL). The combined organic layers were separated, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under vacuum.

Purification

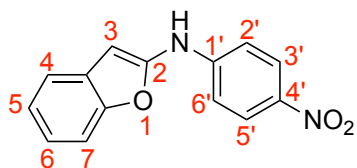
The crude reaction was purified by column chromatography on silica gel eluting with mixtures of hexane and ethyl acetate. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (89:11).

Yield: 4%

Analytical data

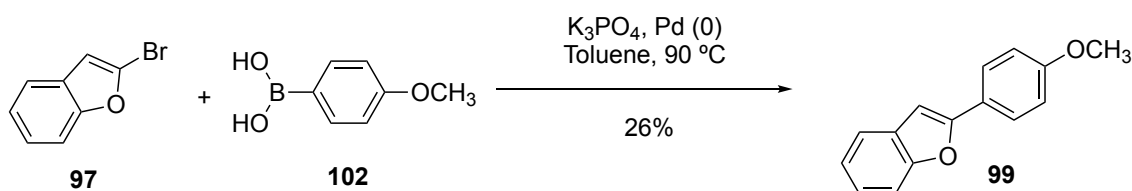
Aspect: yellow solid

R_f: 0.47 (hexane/ethyl acetate (9:1))



¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.22 (dd, $J_1 = 8.4$, $J_2 = 0.7$ Hz, 1H, H-3); 7.32 (t, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.4$ Hz, 1H, H-5); 7.33 (t, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.4$ Hz, 1H, H-6); 7.37 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.65 (dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.4$ Hz, 1H, H-7); 7.93 (dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.4$ Hz, 1H, H-4); 8.26 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-3', H-5').

Preparation of 2-(4-methoxyphenyl)benzofuran



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon was charged with 4-methoxyphenylboronic acid (**102**) (0.120 g, 0.791 mmol, 1 equiv.) dissolved in 10 mL of toluene. Then, 2-bromobenzofuran (**97**) (0.156 g, 0.791 mmol, 1 equiv.), Pd (0) (catalytic amount) and K_3PO_4 (0.219 g, 1.582 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was heated at 90 ± 10 °C under stirring for 3 hours.

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature and the solvent was evaporated under vacuum.

Purification

The crude reaction was purified by column chromatography using a Combi-Flash R_f provided with a UV-*vis* detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The desired product eluted with a polarity of hexane/ethyl acetate (100:0).

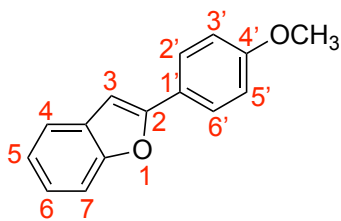
Yield: 26%

Analytical data

Aspect: white solid

R_f: 0.56 (hexane/ethyl acetate (9:1))/0.45 (hexane/ethyl acetate (8:2))

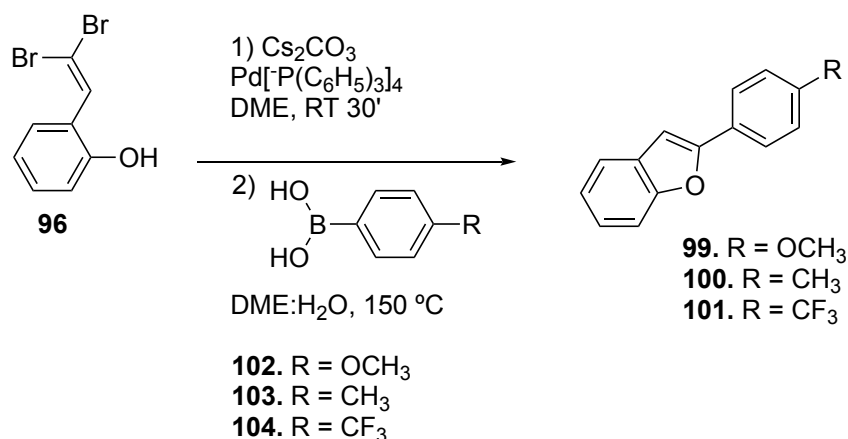
Melting point: 136-138 °C (dichloromethane)



¹H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 3.87 (s, 3H, $-OCH_3$); 6.89 (s, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-3); 6.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.24 (quint, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 1.3$, $J_3 = 0.4$ Hz, 1H, H-5); 7.24 (quint, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 1.3$, $J_3 = 0.4$ Hz, 1H, H-6); 7.51 (ddd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 1.3$, $J_3 = 0.4$ Hz, 1H, H-7); 7.56 (ddd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 1.3$, $J_3 = 0.4$ Hz, 1H, H-4); 7.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2', H-6').

¹³C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz) δ (ppm): 55.3 (CH_3); 99.6 (CH, C-3); 111.0 (CH, C-7); 114.2 (CH, C-3', C-5'); 120.5 (CH, C-4); 122.8 (CH, C-5); 123.3 (C, C-1'); 123.7 (CH, C-6); 126.4 (CH, C-2', C-6'); 129.5 (C, C-4a); 154.7 (C, C-2); 156.0 (C, C-7a); 160.0 (C, C-4').

Preparation of 2-(4-methoxyphenyl)benzofuran, 2-(*p*-tolyl)benzofuran and 2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)benzofuran



General procedure

A 50 mL round-bottomed flask specially equipped with a screw cap for coupling reactions and a magnetic stirring bar, previously flame-dried under argon, was charged with compound **96** (1 equiv.) in outgassed DME (2.8 mL per 1 mmol starting product). Then, Cs_2CO_3 (1 equiv.) and a catalytic amount of palladium (0) were added to the solution and The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 minutes. After this time, boronic acid (1.2 equiv.) was added to the solution in DME:H₂O (1:0.6 per 1 mmol starting product). The reaction mixture was stirred and heated at 150 ± 10 °C for 24-48 hours.

In order to increase the yield, the reaction was introduced into a microwave oven heating at 80 °C for 30 minutes. Nevertheless, the results were not satisfactory.

Table 2. Conditions testes with compounds **99**, **100** and **101**

Conditions tested with compounds 99 , 100 and 101					
Compound	DME	Cs_2CO_3	Boronic acid	DME:H ₂ O	Yield
99 :.118 g (0.425 mmol)	2.00 mL	0.138 g (0.425 mmol)	0.109 g (0.717 mmol)	1.8:0.60 mL	33%
99 :.050 g (0.180 mmol)	0.36 mL	0.138 g (0.180 mmol)	0.109 g (0.717 mmol)	0.46:0.15 mL	18%
100 :.0.146 g (0.525 mmol)	1.05 mL	0.171 g (0.525 mmol)	0.121 g (0.890 mmol)	1.33:0.45 mL	12%
101 :.0.141 g (0.507 mmol)	1.02 mL	0.165 g (0.507 mmol)	0.163 g (0.858 mmol)	1.29:0.43 mL	5%

*mw: microwave oven

Work-up

The reaction mixture was cooled down to room temperature, 20 mL of water were then added to the mixture and the crude reaction was extracted with ethyl acetate (3 X 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered under vacuum and the solvent was removed under reduced pressure.

Purification

The crude reactions were purified by column chromatography using a *Combi-Flash* R_f provided with a UV-vis detector. The eluent used was hexane and ethyl acetate with increasing polarity. The three desired products eluted (separately) with a polarity of hexane/ethyl acetate (100:0).

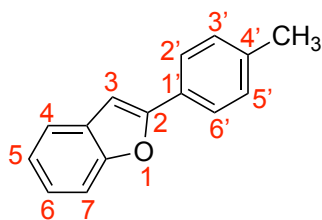
Analytical data

99: Compound already described.

100:

Aspect: white oil

R_f: 0.82 (hexane/ethyl acetate (8:2))



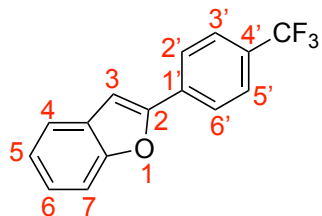
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.42 (s, 3H, CH₃); 6.98 (s, $J = 0.9$ Hz, 1H, H-3); 7.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.260 (t, $J_1 = 8.1$, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-5); 7.262 (t, $J_1 = 8.1$, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-6); 7.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.6 (ddd, $J_1 = 8.1$, $J_2 = 1.3$, $J_3 = 0.9$ Hz, 1H, H-7); 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4).

101:

Aspect: white solid

R_f: 0.79 (hexane/ethyl acetate (8:2))

Melting point: 113-115 °C



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.14 (s, 1H, $J = 0.9$ Hz, H-3); 7.27 (td, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H, H-5); 7.34 (td, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 1.3$ Hz, 1H, H-6); 7.55 (dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H, H-7); 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.97 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-4).

5 CONCLUSIONS

A partir de l'elaboració d'aquesta memòria es desprenen una sèries de conclusions rellevants, com a conseqüència no tan sols de la preparació de diferents rutes sintètiques sinó també de l'avaluació biològica dels compostos obtinguts.

1. La preparació dels compostos *N*-(2-(7-oxo-2,3,7,8,9,10-hexahidro-6*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-6-il)etil)acetamida (**1**) i *N*-(2-(6-oxo-2,3,6,8,9,10-hexahidro-7*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-7-il)etil)acetamida (**2**) ha estat possible mitjançant una ruta sintètica de 8 etapes: a) acilació de Friedel-Crafts, b) hidròlisi, c) reducció de tipus Clemmensen, d) ciclació intramolecular, e) formació d'una oxima, f) transposició de Beckmann, g) alquilació, h) hidrogenació catalítica i acetilació amb rendiments acceptables. No obstant, cal destacar el baix rendiment de l'etapa g) consistent en l'alquilació de les lactames 2,3,7,8,9,10-hexahidro-6*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-6-ona (**37**) i 2,3,6,8,9,10-hexahidro-7*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-7-ona (**29**), el qual va constituir un factor limitant per a l'obtenció d'ambdós productes desitjats **1** i **2**.
2. El tractament de la cetona 2,3,8,9-tetrahidronafto[2,3-*b*][1,4]dioxino-6(7*H*)-ona (**31**) amb hidroxilamina condueix exclusivament a l'obtenció de l'oxima (*E*)-2,3,8,9-tetrahidronafto[1,4]dioxino[6,7-*b*]-6-ona (**30**). A continuació, la transposició de Beckmann permet la formació de les lactames isomèriques **37** i **29**. Aquest fet suggereix que degut al medi àcid present a la reacció s'ha produït una isomerització parcial de l'oxima **30** de configuració (*E*) a (*Z*). Així, l'oxima **30** (*E*) condueix a la lactama **27** amb un 56% de rendiment, i s'obté a més a més la lactama **29** procedent de l'oxima (*Z*) amb un 22% de rendiment.
3. Es va obtenir amb èxit la urea 1-(2-(1-(2,3-dihidrobenczo[*b*][1,4]dioxino-5-il)-3,4-dihidroisoquinolino-2(1*H*)-il)etil)-3-propilurea (**8**) mitjançant una ruta sintètica que comprèn 7 etapes amb un 28% de rendiment global: a) *O*-alquilació, b) aminació de l'aldehid resultant, c) ciclació intramolecular, d) hidròlisi, e) alquilació de la isoquinolina, f) reducció del nitril a l'amina primària corresponent, g) formació de la urea. La preparació de la isoquinolina intermèdia, la qual constitueix l'etapa limitant d'aquesta ruta, es va optimitzar obtenint rendiments superiors al 80% a l'emprar CF₃COOH:CH₃COOH en la proporció 1:1.
4. La diarilamina 1-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)etan-1-ona (**10**) constitueix un intermediari clau per a la síntesi dels següents derivats diarilamínics: l'oxima 1-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)etan-1-ona (**11**), l'*N*-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)acetamida (**12**), l'*N*-(4-((4-aminofenil)amino)fenil)acetamida (**13**), l'1-(4-((4-aminofenil)amino)fenil)etan-1-ona (**14**), la 1-(4-((4-acetilfenil)amino)fenil)-3-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)urea (**15**) i la 1-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)-3-(4-((4-(1-(hidroxiimino)etil)fenil)amino)fenil)urea (**16**). Per a la preparació de la diarilamina **10** es va dur a terme una reacció d'acoblament creuat a partir de la 4-aminofenona (**46**) i el 4-bromonitrobenzè (**47**) en presència de Cs₂CO₃ com a base, catalitzada per Pd[P(*o*-tolil)₃]₂Cl₂ i emprant (±)-BINAP com a lligand en el si de toluè, obtenint el producte desitjat amb un rendiment elevat (71%).
5. A diferència de l'oxima **30**, per les oximes **11** i **16** no va ésser possible determinar la configuració (*E*) o (*Z*) mitjançant un assaig NOE. Aquest fet es deu probablement a la presència de rotació del substituent C(CH₃)NOH que no permet analitzar la sensibilitat del protó de l'anell aromàtic més pròxim al protó de l'oxima ni dels protons del grup metil del propi substituent.

6. Per a la preparació de l'intermediari lactàmic 7-(aminometil)indolin-2-ona (**51**), cal destacar que no ha estat possible arribar a dur a terme la ciclació intramolecular del compost 2-bromo-*N*-(2-cianofenil)acetamida (**57**) ni de l'àcid 2-((2-cianofenil)amino)-2-oxoacètic (**60**). En ambdós casos podríem considerar que aquesta manca de reactivitat es pot deure a la presència del substituent nitril en *orto* de la cadena lateral, el qual a causa del seu caràcter electró-atraient podria desactivar la possible reacció amb electròfils com la requerida per a dur a terme la ciclació intramolecular.
7. La hidrogenació catalítica emprant Pd-C com a catalitzador constitueix un procediment excel·lent per a la reducció dels nitroderivats 1-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)etan-1-ona (**10**), *N*-(4-((4-nitrofenil)amino)fenil)acetamida (**12**), *N*-(4-(4-nitrofenoxi)fenil)acetamida (**64**), 4-(4-nitrofenoxi)benzoat de metil (**70**) i 1-(bromometil)-2-(4-nitrofenoxi)benzè (**74**), a les anilines corresponents amb rendiments del 100, 100, 96, 97 i 86% respectivament. En aquests casos no es varen obtenir bons resultats amb la utilització de Fe/AcOH.
8. La formació de les diferents urees sintetitzades en aquesta memòria 1-(2-(1-(benzo[1,4,*b*]dioxino-5-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)etil)-3-propilurea (**8**), 1-(4-((4-acetilfenil)amino)fenil)-3-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)urea (**15**), *N*-(4-(4-(3-fenilureido)fenoxi)fenil)acetamida (**19**), *N*-(4-(4-(3-(3-nitrofenil)ureido)fenoxi)fenil)acetamida (**20**), *N*-(4-(4-(3-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)ureido)fenoxi)fenil)acetamida (**21**), 4-(4-(3-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)ureido)fenoxi)benzoat de metil (**22**), 1-(4-(2-(bromometil)fenoxi)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea (**23**) i 1-(4-((2-(bromometil)fenil)amino)fenil)-3-(3-nitrofenil)urea (**24**) s'ha aconseguit amb èxit mitjançant l'addició d'amines o anilines (**7**, **14**, **63**, **69**, **72**, **73**) als isocianats corresponents a temperatura ambient, en el si de tetrahidrofuran. Es varen obtenir les urees **8** (71%), **15** (67%), **19** (67%), **20** (63%), **21** (62%) i **22** (100%) amb rendiments elevats; la urea **23** (51%) amb un rendiment moderat; i la urea **24** (7%) amb un rendiment baix. Aquest procediment és de fàcil aplicació, ràpid i respectuós amb el medi ambient.
9. S'ha dut a terme la preparació de derivats benzofurànics 2-(4-metoxifenil)benzofuran (**99**), 2-(*p*-tolil)benzofuran (**100**) i 2-(4-(trifluorometil)fenil)benzofuran (**101**) mitjançant una reacció multicomponent entre el 2-(2,2-dibromovinil)fenol (**96**), emprant Cs₂CO₃, Pd[P(C₆H₅)₃]₄ i la incorporació de l'àcid fenilborònic corresponent. Atesos els baixos rendiments obtinguts, mitjançant l'optimització de les condicions de reacció es podria aconseguir posar a punt aquest procediment per a la preparació, de forma general, de 2-arilbenzofurans d'una manera eficaç, ràpida i econòmica.
10. Els derivats de l'1,4-benzodioxà 2-(1-(benzo[1,4,*b*]dioxino-5-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)etan-1-amina (**7**) i 7-(2-aminoetil)-2,3,7,8,9,10-hexahidro-6*H*-benzo[1,4]dioxino[6,7-*b*]azepin-6-ona (**39**) han mostrat una inhibició total del creixement del paràsit *Plasmodium falciparum* responsable de la malària, a una concentració de 2 μM (les dades obtingudes dels Laboratoris Eli Lilly mostren una inhibició del 149,8-144,7% i 132,9-132,5%, respectivament). A més a més, el compost **7** mostra una inhibició de la proteïna Tau (relacionada amb la neurodegeneració) del 56,97% a una concentració de 40 μM i del 61,68% sobre Angptl8 (*Angiopoietin like 8*, involucrada en l'homeòstasi de la glucosa) a la mateixa concentració.
11. En la majoria dels assajos biològics duts a terme pels laboratoris Eli Lilly sobre neurodegeneració i dolor, i malalties endocrines i cardiovasculars, el compost **22** presenta un millor perfil terapèutic respecte als seus anàlegs **19-21**. Entre els diferents resultats obtinguts, destaquen la inhibició

sobre la traducció proteica de la proteïna Tau, de Nav1.7 (relacionada amb el dolor), de Angptl8, d'APOC3 i de PCSK9 (relacionades amb malalties endocrines) on els compostos **20** i **22** mostren activitats del mateix ordre a una concentració de 40 μM d'entre aproximadament el 98-103% i el 98-101%, respectivament. Si comparem aquests resultats amb els obtinguts per al compost **19** (50-66%) podem concloure que la presència de grups electró-atraients a l'anell de la urea afavoreixen la interacció amb les dianes corresponents. Pel que fa la inhibició de PCSK9 en diferents condicions, obtenim un percentatge d'inhibició del 99,12% a una concentració 10 μM pel compost **22** i del 96,75% a una concentració de 40 μM pel compost **21**.

12. El compost **22** mostra una activitat terapèutica notable sobre la tuberculosi, inhibint el creixement de les soques H37RV (97,9-98,7%) a una concentració de 20 μM amb un valor d' IC_{50} = 16-17 μM , i el creixement de cèl·lules HeLa (100,7%) a la mateixa concentració. En relació a la malària, els tres compostos **19-20** i **22** mostren una elevada inhibició a una concentració de 2 μM sobre el paràsit *P. falciparum* (aproximadament 109-110%, 69-81% i 139-145%, respectivament), mentre que presenten una inhibició més feble sobre el *P. berghei* a una concentració de 10 μM (aproximadament 3-7%, 44-68% i del 87-91%, respectivament). En el cas de la malaltia del Chagas, destaca el compost **22** amb una inhibició dels diferents assajos a una concentració de 5 μM superiors al 90% (excepte en un dels assajos on mostra una inhibició del 23-26%).
13. Els compostos **22** i **24** mostren selectivitat sobre les cèl·lules d'osteosarcoma assajades (SaOS-2 i MNNG/HOS) respecte a les cèl·lules sanes (osteoblasts hOB). El compost **24** mostra un valor d' IC_{50} de l'ordre de 10 μM en ambdues línies cel·lulars cancerígenes (excepte en el cas de les cèl·lules SaOS-2 a 24 hores d'incubació), mentre que presenta una inhibició de només el 8% sobre hOB a la mateixa concentració. Pel que fa el compost **22**, el valor d' IC_{50} és de l'ordre de 0,1-0,01 μM en ambdós tipus cel·lulars cancerosos, mentre que no mostra inhibició del creixement sobre hOB a concentracions superiors. Els resultats de l'activitat biològica avaluada i de la toxicitat sobre cèl·lules sanes porten a considerar el compost **22** com un nou *lead* pel tractament de l'osteosarcoma, el qual mitjançant modificacions estructurals es podria optimitzar per a millorar tant l'activitat anticancerígena com la biodisponibilitat.

5 CONCLUSIONS

From the research in this report a series of relevant conclusions are highlighted, not just regarding the development of synthetic routes, but also the biological assessment of newly synthesised compounds.

1. The preparation of compounds *N*-(2-(7-oxo-2,3,7,8,9,10-hexahydro-6*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-6-yl)ethyl)acetamide (**1**) and *N*-(2-(6-oxo-2,3,6,8,9,10-hexahydro-7*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-7-yl)ethyl)acetamide (**2**) has been successful using an 8-step synthetic route: a) Friedel-Crafts acylation, b) hydrolysis, c) Clemmensen reduction, d) intramolecular cyclisation, e) oxime formation, f) Beckmann transposition, g) alkylation, h) catalytic hydrogenation and acetylation in acceptable yields. Nevertheless, it is noteworthy that the low yield obtained from step g) consisting of lactams 2,3,7,8,9,10-hexahydro-6*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-6-one (**37**) and 2,3,6,8,9,10-hexahydro-7*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-7-one (**29**) alkylation was a limiting factor for obtaining both desired compounds **1** and **2**.
2. Treatment of ketone 2,3,8,9-tetrahydronaphtho[2,3-*b*][1,4]dioxin-6(7*H*)-one (**31**) with hydroxylamine leads exclusively to oxime (*E*)-2,3,8,9-tetrahydronaphtho[1,4]dioxin[6,7-*b*]-6-one oxime (**30**). Then, Beckmann transposition allows isomeric lactam formation **37** and **29**. This fact suggests that under acidic conditions a partial isomerization of oxime **30** takes place from the (*E*) to (*Z*) configuration. Thus, (*E*)-oxime **30** leads to lactam **27** with a yield of 56%, and also to lactam **29** from (*Z*)-oxime with a yield of 22%.
3. Urea 1-(2-(1-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)ethyl)-3-propylurea (**8**) was successfully obtained through a 7-step synthetic route with a global yield of 28%: a) *O*-alkylation, b) aldehyde amination, c) intramolecular cyclisation, d) hydrolysis, e) isoquinolin alkylation, f) nitrile reduction to the corresponding primary amine, g) urea formation. The preparation of isoquinolin intermediate, which constitutes the limiting step of this methodology, was optimized obtaining yields higher than 80% when using a proportion of 1:1 CF₃COOH:CH₃COOH.
4. Diarylamine 1-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)ethan-1-one (**10**) constitutes a key intermediate for the following diarylaminic derivatives: oxime 1-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)ethan-1-one (**11**), *N*-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)acetamide (**12**), *N*-(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)acetamide (**13**), 1-(4-((4-aminophenyl)amino)phenyl)ethan-1-one (**14**), 1-(4-((4-acetylphenyl)amino)phenyl)-3-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**15**) and 1-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((4-(1-(hydroxyimino)ethyl)phenyl)amino)phenyl)urea (**16**). Diarylamine **10** has been prepared through a coupling reaction between 4-aminophenone (**46**) and 4-bromonitrobenzene (**47**) using Cs₂CO₃ as a base, Pd[P(*o*-tolil)₃]₂Cl₂ as catalyst and (±)-BINAP as a ligand in toluene at 140-150 °C, obtaining the desired product in high yields (71%).
5. In contrast to oxime **30**, for oximes **11** and **16** it was not possible to determine their (*E*) or (*Z*) configuration with an NOE assay. This is probably due to the presence of rotation in C(CH₃)NOH substituent that impedes the analysis of proton sensibility from the aromatic ring closer to the oxime proton and protons from the methyl group of the substituent.

6. For the preparation of lactamic intermediate 7-(aminomethyl)indolin-2-one (**51**), it should be highlighted that it has not been possible to carry out the intramolecular cyclisation of compound 2-bromo-*N*-(2-cyanophenyl)acetamide (**57**) and 2-((2-cyanophenyl)amino)-2-oxoacetic acid (**60**). In both cases we could consider that this lack of reactivity is due to the presence of an *ortho* director nitrile substituent, given its electron-withdrawing effect that could inactivate the reaction with electrophiles required for the intramolecular cyclisation.
7. The catalytic hydrogenation using Pd-C as catalyst constitutes an excellent method for nitroderivative reduction of compounds 1-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)ethan-1-one (**10**), *N*-(4-((4-nitrophenyl)amino)phenyl)acetamide (**12**), methyl *N*-(4-(4-nitrophenoxy)phenyl)acetamide (**64**), 4-(4-nitrophenoxy)benzoate (**70**) and 1-(bromomethyl)-2-(4-nitrophenoxy)benzene (**74**), to the corresponding anilines with yields of 100, 100, 96, 97 and 86%, respectively. In these cases, no good results were obtained using Fe/AcOH.
8. The formation of different synthesised ureas 1-(2-(1-(benzo[1,4,*b*]dioxin-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)ethyl)-3-propylurea (**8**), 1-(4-((4-acetylphenyl)amino)phenyl)-3-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**15**), *N*-(4-(4-(3-phenylureido)phenoxy)phenyl)acetamide (**19**), *N*-(4-(4-(3-(3-nitrophenyl)ureido)phenoxy)phenyl)acetamide (**20**), *N*-(4-(4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)phenyl)acetamide (**21**), methyl 4-(4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)benzoate (**22**), 1-(4-(2-(bromomethyl)phenoxy)phenyl)-3-(3-nitrophenyl)urea (**23**) and 1-(4-((2-(bromomethyl)phenyl)amino)phenyl)-3-(3-nitrophenyl)urea (**24**) was successful through the addition of amines or anilines (**7**, **14**, **63**, **69**, **72**, **73**) to the corresponding isocyanates at room temperature in tetrahydrofuran. Ureas **8** (71%), **15** (67%), **19** (67%), **20** (63%), **21** (62%) and **22** (100%) were obtained in high yields; urea **23** (51%) in moderate yields; and urea **24** (7%) in low yields. This procedure is easy to apply, fast and respectful of the environment.
9. The preparation of benzofuran derivatives 2-(4-methoxyphenyl)benzofuran (**99**), 2-(*p*-tolil)benzofuran (**100**) and 2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)benzofuran (**101**) has been carried out through a multicomponent reaction between 2-(2,2-dibromovinyl)phenol (**96**), using Cs₂CO₃, Pd[P(C₆H₅)₃]₄ and the addition of the corresponding phenylboronic acid. Given the low yields obtained, the optimisation of this methodology should lead to a general procedure to prepare 2-arylbenzofurans in an efficient, fast and economic way.
10. The derivatives of 1,4-benzodioxan 2-(1-(benzo[1,4,*b*]dioxin-5-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)ethan-1-amine (**7**) and 7-(2-aminoethyl)-2,3,7,8,9,10-hexahydro-6*H*-benzo[1,4]dioxin[6,7-*b*]azepin-6-one (**39**) have shown total growth inhibition of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* at a concentration of 2 μM (data obtained from Eli Lilly Laboratories provide an inhibition of 149.8-144.7% and 132.9-132.5%, respectively). Moreover, compound **7** exhibits an inhibition of Tau protein (related with neurodegeneration) of 56.97% at a concentration of 40 μM and of 61.68% over Angptl8 (*Angiopoietin like 8*, involved in glucose homeostasis) at the same concentration.

11. Of the biological assays performed at Eli Lilly in the field of neurodegeneration and pain, and endocrine and cardiovascular diseases, compound **22** shows the best therapeutic profile with respect to its analogues **19-21**. Among all results, we should highlight the inhibition of protein translation of Tau protein, of Nav1.7 (related with pain), of Angptl8, APOC3 and PCSK9 (in relation with endocrine diseases) where compounds **20** and **22** show similar activities at a concentration of 40 μM approximately between 98-103% and 98-101%, respectively. When comparing these results with the ones obtained for compound **19** (50-66%), we were able to conclude that the presence of electron-withdrawing groups in the ring of the urea enhances the interaction with the corresponding targets. Concerning PCSK9 inhibition under different conditions, we obtain a percentage inhibition of 99.12% at a concentration of 10 μM for compound **22** and of 96.75% at a concentration of 40 μM for compound **21**.
12. Compound **22** shows an outstanding therapeutic activity against tuberculosis, inhibiting the growth of strains H37RV (97.9-98.7%) at a concentration of 20 μM with an IC_{50} = 16-17 μM , and the growth of HeLa cells (100.7%) at the same concentration. With regards to malaria disease, all three compounds **19-20** and **22** exhibit a high inhibition at a concentration of 2 μM against the parasite *P. falciparum* (approximately 109-110%, 69-81% and 139-145%, respectively), while showing a weaker inhibition against *P. berghei* at a concentration of 10 μM (approximately 3-7%, 44-68% and 87-91%, respectively). In the case of Chagas disease, compound **22** stands out with an inhibition of different assays at a concentration of 5 μM higher than 90% (except for one of the assays where it exhibits an inhibition of 23-26%).
13. Compounds **22** and **24** show selectivity against the osteosarcoma cells tested (SaOS-2 and MNNG/HOS) in relation to normal cells (osteoblasts hOB). Compound **24** shows an IC_{50} of the order of 10 μM in both cancerous cell lines (except for SaOS-2 cells at 24 hours of incubation), while exhibiting an inhibition of only 8% in hOB at the same concentration. Concerning compound **22**, its IC_{50} is of the order of 0,1-0,01 μM for both cancer cell types, while at lower concentrations does not show any inhibition of growth in hOB. These results from the biological testing as well as those from toxicity in normal cells, lead us to consider compound **22** as a new lead for the treatment of osteosarcoma, which through structural modifications should be optimized in order to increase its anticancerous activity and its bioavailability.

6 BIBLIOGRAFIA

- ¹ <http://www.who.int> (20/02/2018)
- ² <https://www.cancer.gov> (12/02/18)
- ³ <http://www.cancerresearchuk.org> (12/02/18)
- ⁴ J. Zhao. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *160*, 145-158
- ⁵ S. Annett, T. Robson. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *187*, 13-30
- ⁶ J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359-386.
- ⁷ <https://gco.iarc.fr> (20/02/2018)
- ⁸ <http://www.euro.who.int> (20/02/2018)
- ⁹ <https://www.seom.org> (20/02/2018)
- ¹⁰ J. Galceran, A. Ameijide, M. Carulla, A. Mateos, J. R. Quirós, D. Rojas, A. Alemán, A. Torrella, M. Chico, M. Vicente, J. M. Díaz, N. Larrañaga, R. Marcos-Gragera, M. J. Sánchez, J. Perucha, P. Franch, C. Navarro, E. Ardanaz, J. Bigorra, P. Rodrigo, R. P. Bonet, REDECAN Working Group. *Clin. Transl. Oncol.* **2017**, *19*, 799-825
- ¹¹ <http://www.ine.es> (20/02/2018)
- ¹² GBD 2015 Risk Factors Collaborators. *Lancet* **2016**, *388*, 1659-1724
- ¹³ M. Plummer, C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, S. Franceschi. *Lancet Glob. Health* **2016**, *4*, e609-616
- ¹⁴ <https://communitymedicine4asses.wordpress.com> (20/02/2018)
- ¹⁵ <https://www.iarc.fr> (13/03/2018)
- ¹⁶ <https://www.cancer.org> (15/03/2018)
- ¹⁷ <https://www.cancer.net> (15/03/2018)
- ¹⁸ <http://www.oncohealth.eu> (13/06/2018)
- ¹⁹ <http://www.chemocare.com> (13/06/2018)
- ²⁰ <https://www.vademecum.es> (13/06/2018)
- ²¹ <http://www.cisplatin.org> (13/06/2018)
- ²² D. L. Madden. *Curr. Oncol. Rep.* **2018**, *20*, 8
- ²³ K. C. Kurnit, E. E. Ileana Dumbrava, B. B. Litzenburger, Y. B. Khotskaya, A. Johnson, T. A. Yap, J. Rodon, J. Zeng, M. A. Shufean, A. Bailey, N. Sánchez, V. R. Holla, J. Mendelsohn, K. R. M. Shaw, E. V. Bernstam, G. B. Mills, F. Meric-Bernstam. *Clin. Cancer. Res.* **2018**, *24*, 2719-2731
- ²⁴ M. Yamagishi, K. Uchamaru. *Curr Opin Oncol.* **2017**, *29*, 375-381
- ²⁵ K. H. Kim, C. W. M. Roberts. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 128-134
- ²⁶ A. Christofides, T. Karantanos, K. Bardhan, V. A. Boussiotis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 85624-85640
- ²⁷ H. Wu, H. Zeng, A. Dong, F. Li, H. He, G. Senisterra, A. Seitova, S. Duan, P. J. Brown, M. Vedadi, C. H. Arrowsmith, M. Schapira. *PLoS One* **2013**, *8*, e83737
- ²⁸ H. Yamaguchi, M.-C. Hung. *Cancer Res. Treat.* **2014**, *46*, 209-222
- ²⁹ I. Marchesi, L. Bagella. (2013). Role of Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Protein and Its Significance in Tumor Progression and Cell Differentiation, Chromatin Remodelling, Dr. Danuta Radzioch (Ed.), InTech.
- ³⁰ P. Völkel, B. Dupret, X. Le Bourhis, P.-O. Angrand. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 175-193
- ³¹ L. Gan, Y. Yang, Q. Li, Yi. Feng, T. Liu, W. Guo. *Biomark. Res.* **2018**, *6*, 10
- ³² Y. Wen, J. Cai, Y. Hou, Z. Huang, Z. Wang. *Oncotarget* **2017**, *8*, 37974-37990
- ³³ I. Marchesi, L. Bagella. *World J. Clin. Oncol.* **2016**, *7*, 135-148
- ³⁴ F. Crea, E. Paolicchi, V. E. Marquez, R. Danesi. *Crit. rev. Oncol. Hematol.* **2012**, *83*, 184-193
- ³⁵ G. Stazi, C. Zwergel, A. Mai, S. Valente. *Expert Opin Ther Pat.* **2017**, *27*, 797-813
- ³⁶ N. Gulati, W. Béguelin, L. Giulino-Roth. *Leuk. Lymphoma* **2018**, 1-12
- ³⁷ C. Hui, T. Ye. *Front. Chem.* **2015**, *3*, 44

- ³⁸ P. Xiang, H. Jie, Y. Zhou, B. Yang, H.-J. Wang, J. Hu, J. Hu, S.-Y. Yang, Y.-L. Zhao. *Molecules* **2015**, *20*, 7620-7636
- ³⁹ F. Shahabipour, M. Caraglia, M. Majeed, G. Derosa, P. Maffioli, A. Shebkar. *Cancer Lett.* **2017**, *400*, 325-335
- ⁴⁰ D. D. Moore, H. H. Luu. *Cancer. Treat. Res.* **2014**, *162*, 65-92
- ⁴¹ M. W. Bishop, K. A. Janeway, R. Gorlick. *Curr. Opin. Pediatr.* **2016**, *28*, 26-33
- ⁴² A. Redondo, J. Cruz, A. Lopez-Pousa, F. Barón. *Clin. Transl. Oncol.* **2013**, *15*, 1037-1043
- ⁴³ Z.-C. Zhang, C. Tang, Y. Dong, J. Zhang, T. Yuan, X.-L. Li. *J. Cancer* **2018**, *9*, 71-80
- ⁴⁴ Y.-F. Lv, G.-N. Yan, G. Meng, X. Zhang, Q.-N. Guo. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12999
- ⁴⁵ R. Sun, J. Shen, Y. Gao, Y. Zhou, Z. Yu, F. Hornicek, Q. Kan, Z. Duan. *Oncotarget* **2016**, *7*, 38333-38346
- ⁴⁶ A. Wasilewska, M. Winiarska, M. Olszewska, L. Rudnicka. *Adv. Dermatol. Allergol.* **2016**, *XXXIII*, 247-252
- ⁴⁷ J. Eyerich, V. Dimartino, A. Cavani. *Eur. J. Immunol.* **2017**, *47*, 607-614
- ⁴⁸ S. J. Blake, M. W. L. Teng. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, *105*, 41-50
- ⁴⁹ J. C. Daniel; M. T. Cristina. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 479-489
- ⁵⁰ W. B. van der Berg, J. B. McInnes. *Sem. Arth. Rheum.* **2013**, *43*, 158-17
- ⁵¹ C. T. Weaver, C. O. Elson, L. A. Fouser, J. K. Kolls. *Annu. Rev. Pathol.* **2013**, *8*, 477-512
- ⁵² K. Wang, M. Karin. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2015**, *33*, s87-90
- ⁵³ M. Campa, A. Menter. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2016**, *25*, 1337-1344
- ⁵⁴ J. Zhang, G. Wang, Y. Zhou, Y. Chen, L. Ouyang, B. Liu. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 1803-1826
- ⁵⁵ <https://www.nobelprize.org> (15/03/2018)
- ⁵⁶ *Elife.* **2017**, *6*, e23693
- ⁵⁷ K. Grens. *TheScientist.* **2014**
- ⁵⁸ <https://osf.io> (25/06/2018)
- ⁵⁹ M. Stiborová, J. Poljaková, E. Martínková, L. Borek-Dohalská, T. Eckschlager, E. Kizek, E. Frei. *Interdiscip. Toxicol.* **2011**, *4*, 98-105
- ⁶⁰ M. Stiborová, M. Rupertová, E. Frei. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1814*, 175-85
- ⁶¹ K. R. Vann, Y. Ergün, S. Zencir, S. Oncuoglu, N. Osheroff, Z. Topcu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1809-1812
- ⁶² N. C. Garbett, D. E. Graves. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2004**, *4*, 149-172
- ⁶³ H. L. Wen, G. Yang, Q. R. Dong. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2017**, *39*, 219-224
- ⁶⁴ M. Stiborová, E. Frei. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 575-591
- ⁶⁵ C. Auclair, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *259*, 1-14
- ⁶⁶ M. A. Schwaller, G. Dodin, J. Aubard. *Biopolymers* **1996**, *50*, 510-527
- ⁶⁷ J. Basset. Disseny i síntesi de compostos policíclics que contenen el nucli indòlic. Avaluació de l'activitat antitumoral. *Tesi Doctoral* **2011**. Universitat de Barcelona
- ⁶⁸ M. D. Pujol, M. Romero, I. Sánchez. *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2005**, *5*, 215-239
- ⁶⁹ R. Ruiz, P. Bouyssou, J. C. Maurizis, J. C. Maldemont, G. Coudert. *Heterocycl. Commun.* **1997**, *3*, 509-514
- ⁷⁰ M. Romero. Preparació de nous agents antitumorals. Síntesi i avaluació citotòxica de sistemes policíclics que contenen el nucli d'1.4-benzodioxina. *Tesi Doctoral* **2001**. Universitat de Barcelona
- ⁷¹ *deaoptcancer.ptt*. presentació del grup de M. D. Pujol **2007**
- ⁷² A. S. Capilla, M. Romero, M. D. Pujol, D. H. Caignard, P. Renard. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8297-8303
- ⁷³ R. Soucek. Synthesis of new heteropolycyclic compounds with potential antitumor activity. *Tesis Doctoral* **2014**. Universidad de Barcelona
- ⁷⁴ X.-F. Wang, X.-T. Tian, E. Ohkoshi, B. Qin, Y.-N. Liu, P. C. Wub, M.-J. Hour, H.-Y. Hung, K. Qian, R. Huang, K. F. Bastow, W. P. Janzen, J. Jin, S. L. Morris-Natschke, K.-H. Lee, L. Xie. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6224-6228

- ⁷⁵ J. Yao, J. Chen, Z. He, W. Sun, W. Xu. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2923-2929
- ⁷⁶ J. C. Wei, F. D. MENG, K. Qu, Z. X. Wang, Q. F. Wu, L. Q. Zang, Q. Pang, C. Liu. *Acta Pharmacol. Sin.* **2015**, *36*, 241-251
- ⁷⁷ S. M. Wilhelm, L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J. M. Llovet, M. Lynch. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 3129-3140
- ⁷⁸ S. Sun, Z. He, M. Huang, N. Wang, Z. He, X. Kong, J. Yao. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2381-2391
- ⁷⁹ Y. Dai, K. Hartandi, Z. Ji, A. A. Ahmed, D. H. Albert, J. L. Bauch, J. J. Bouska, P. F. Bousquet, G. S. Cunha, K. B. Glaser, C. M. Harris, D. Hickman, J. Guo, J. Li, P. A. Marcotte, K. C. Marsh, M. D. Moskey, R. L. Martin, A. M. Olson, D. J. Osterling, L. J. Pease, N. B. Soni, K. D. Stewart, V. S. Stoll, P. Tapang, D. R. Reuter, S. K. Davidsen, M. R. Michaelides. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1584
- ⁸⁰ M.-H. Jung, H. Kim, W.-K. Choi, M.I. El-Gamal, J.-H. Park, K.H. Yoo, T.B. Sim, S.H. Lee, D.Baek, J. M. Hah, J.-H. Cho, C.-H. Oh. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6538-6543
- ⁸¹ M. Sun, X. Wu, J. Chen, J. Cai, M. Cao, M. Ji. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2299-2306
- ⁸² A. Vinuesa. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos compuestos nitrogenados potencialmente antitumorales. *Tesis Doctoral* **2016**. Universidad de Barcelona y Universidad San Jorge (Zaragoza)
- ⁸³ L. Garuti; M. Roberti; G. Bottegoni; M. Ferraro. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 1528-1548
- ⁸⁴ G. M. Keating. *Targ. Oncol.* **2017**, *12*, 243-253
- ⁸⁵ N. M. Guillaume, S. J. Chard, D. M. Leyshon. *J. Chem. Soc.* **1952**, 376-380
- ⁸⁶ G. Pfundt, S. Farid. *Tetrahedron.* **1966**, *22*, 2237-2247
- ⁸⁷ H. J. Brewsler. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 6364-6368
- ⁸⁸ L. Kürti, B. Czakó. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis. Elsevier Amsterdam, **2005**. p 92.
- ⁸⁹ E. Beckmann. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, *19*, 988-993
- ⁹⁰ R. E. Gawley. *Org. React.* **1988**, *35*, 1-420
- ⁹¹ E. C. Hoving, V. L. Stromberg, H. A. Lloyd. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5153-5154
- ⁹² J. Peng, Y. Deng. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 403-405
- ⁹³ M. Arisawa, M. Yamaguchi. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 311-312
- ⁹⁴ Y. Furuya, K. Ishihara, H. Yamamoto. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12240-12241
- ⁹⁵ L. Ronchin, A. Vavasori. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2009**, *313*, 22-30
- ⁹⁶ S. Yamabe, N. Tsuchida, S. Yamazaki. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10638-10644
- ⁹⁷ A. S. Capilla, M. Romero, M. D. Pujol, D. H. Caignard, P. Renard. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8297-8303
- ⁹⁸ F. Hibbert, R. J. Sellens. *J. Chem. Soc. Perkins Trans 2* **1988**, *3*, 399-402
- ⁹⁹ E. Artuso, I. Degani, R. Fochi, C. Magistris. *Synthesis* **2007**, 3497-3506
- ¹⁰⁰ A. I. Bazarov. *J. Prakt. Chem.* **1870**, *2*, 283
- ¹⁰¹ H. Wang, Z. Xim, Y. Li. *Top. Curr. Chem.* **2017**, *375*, 49-75
- ¹⁰² A. K. H. Dheere, S. Bongarzone, C. Taddei, R. Yan, A. D. Gee. *Synlett* **2015**, *26*, 2257-2260
- ¹⁰³ C. Han, J. A. Porco. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1517-1520
- ¹⁰⁴ J. A. Grzyb, R. A. Batey. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5279-5282
- ¹⁰⁵ M. N. Bertrand, J. P. Wolfe. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6447-6459
- ¹⁰⁶ D. P. N. Satchel; R. S. Satchel. *Chem. Soc. Rev.* **1975**, *4*, 231-250
- ¹⁰⁷ E. A. Castro; R. B. Moodle; P. J. Sansom. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, 737-742
- ¹⁰⁸ Y. Zhang; M. Anderson; J. L. Weisman; M. Lu; C. J. Choy; V. A. Boyd; J. Price; M. Sigal; J. Clark; M. Connelly; F. Zhu; W. A. Guiguemde; C. Jeffries; L. Yang; A. Lemoff; A. P. Liou; T. R. Webb; J. L. DeRisi; R. K. Guy. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 460-465
- ¹⁰⁹ Y. Oshiro, S. Sato, N. Kurahashi, T. Tanaka, T. Kikuchi, K. Tottori, Y. Uwahodo, T. Nishi, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 658-667

- ¹¹⁰ M. Romero, Y. Harrak, J. Basset, J.A. Orúe, M.D. Pujol. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1951-1956
- ¹¹¹ H. Wiingarten. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 977-978
- ¹¹² A. J. Paine. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1496-1502
- ¹¹³ Y. Shirota, T. Kobata, N. Noma. *Chem. Lett.* **1989**, *18*, 1145-1148
- ¹¹⁴ C. Sambiagio, S. P. Marsden, A. J. Blacker, P. C. McGowan. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3525-50
- ¹¹⁵ J. P. Wolfe, S. Wagaw, S. L. Buchwald. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7215-7216
- ¹¹⁶ J. P. Wolfe, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1264-1267
- ¹¹⁷ J. P. Wolfe, R. A. Rennels, S. L. Buchwald. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7525-7546
- ¹¹⁸ J. P. Wolfe, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1144-1157
- ¹¹⁹ J. Yin, S. L. Buchwald. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6043-6048
- ¹²⁰ T. Ikawa, T. E. Barder, M. R. Biscoe, S. J. Buchwald. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13001-13007
- ¹²¹ G. Mann, J. F. Hartwig, M. S. Driver, C. Fernández-Rivas. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 827-828
- ¹²² J. F. Hartwig. *Synlett* **1996**, 329-340
- ¹²³ M. S. Driver, J. F. Hartwig. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7217-7218
- ¹²⁴ J. F. Hartwig. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2046-2067
- ¹²⁵ J. Louie, J. F. Hartwig. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-3612
- ¹²⁶ M. Romero, Y. Harrak, J. Basset, L. Ginet, P. Constans, M. D. Pujol. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9010-9016
- ¹²⁷ S. Conde, C. Corral, J. Lissavetzky. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, *22*, 301-304
- ¹²⁸ F. March. *Comptes Rendus Heb.* **1902**, *134*, 843-845
- ¹²⁹ X. Liu, L. Xien, H. Wu, J. Chen, C. Xia. *H. Chim. Acta* **2009**, *92*, 1014-1021
- ¹³⁰ C. S. Chidan Kumar, W.-S. Loh, S. Chandrāju, Y.-F. Win, W. K. Tan, C. K. Quah, H.-K. Fun. *Plos one* **2015**, *10*, e011944011-e0119440/23
- ¹³¹ A. L. Machado, L.M. Lima, J. X. Araujo, C. A. M. Fraga, V. L. Goncalves Koatz, E. J. Barreiro. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1169-1172
- ¹³² V. L. M. Sena, R. M. Srivastava, R. O. Silva, V. L. M. Lima. Part V, *Farmaco.* **2003**, *58*, 1283-1288
- ¹³³ R. Antunes, H. Batista, R. M. Srivastava, G. Thomas, C. C. Araujo. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3071-3076
- ¹³⁴ V. Bailleux, L. Valee, J. P. Nuyts, I. Vameeq. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1817-1821
- ¹³⁵ E.S. Tan, M. Miyakawa, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, T. S. Scanlan. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2787-2798
- ¹³⁶ K. C. Nicolau, C. N. C. Boddy, S. Brase, N. Winssinger. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2097-2152
- ¹³⁷ F. Bedos-Belval, A. Rouch, C. Vanucci-Bacqué, M. Baltas. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1356-1372
- ¹³⁸ D. Maiti, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1791-1794
- ¹³⁹ H. Xu, Y. Chen. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 2411-2420
- ¹⁴⁰ L. Navarro, M. D. Pujol. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1812-1815
- ¹⁴¹ Grup de recerca M. D. Pujol. Resultats no publicats
- ¹⁴² A. R. Katritzky, C. W. Rees. Eds. Pergamon Press: Oxford **1984**, *4*, 89-153
- ¹⁴³ R. C. Fuson, J. W. Keisley, E. W. Kaiser. *Org. Syn.* **1955**, *3*, 209
- ¹⁴⁴ L. Higginbotham, H. Stephen. *J. Chem. Soc.* **1920**, *117*, 1534-1542
- ¹⁴⁵ L. Grau. Disseny, síntesi i avaluació biològica de nous compostos potencialment antitumorals per inhibició enzimàtica. *Tesi Doctoral* **2017**. Universitat de Barcelona
- ¹⁴⁶ C. Chen, P. G. Dormer. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6964-6967
- ¹⁴⁷ D. H. Huh, J. S. Jeong, H. B. Lee, H. Ryu, Y. G. Kim. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9925-9932

- ¹⁴⁸ J. Setsune, T. Ueda, K. Shikata, K. Matsukawa, T. Iida, T. Kitao. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2647-2656
- ¹⁴⁹ V. Prieur, J. Rubio-Martínez, M. Font-Bardia, G. Guillaumet, M. D. Pujol. *European J. Org. Chem.* **2014**, 1514-1524
- ¹⁵⁰ <https://openinnovation.lilly.com> (25/04/2018)
- ¹⁵¹ V. Bronte, P. Zanovello. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 641-654
- ¹⁵² P. Romano, A. Manniello, O. Aresu, M. Armento, B. Parodi. *Nucl. Acids. Res.* **2009**, *37*, D925-D932
- ¹⁵³ <https://www.lgcstandards-atcc.org> (23-05-2018)
- ¹⁵⁴ Q. Yang, S. Zhang, M. Kang, R. Dong, J. Zhao. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 2537-2544
- ¹⁵⁵ Y. Pignochino, G. Grignani, G. Cavalloni, M. Motta, M. Tapparo, S. Bruno, A. Bottos, L. Gammaitoni, G. Migliardi, G. Camussi, M. Alberghini, B. Torchio, S. Ferrari, F. Bussolino, F. Fagioli, P. Picci, M. Aglietta. *Mol. Cancer.* **2009**, *8*, 118
- ¹⁵⁶ J.P. Plataras, S.H. Kim, Y.Y. Liu, D.T. Dicker, J.F. Dorsey, J. McDonough, G. Cerniglia, R.R. Rajendran, A. Gupta, A.K. Rustgi, J.A. Diehl, C.D. Smith, K.T. Flaherty, W.S. El-Deiry. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9443-9454
- ¹⁵⁷ M. Laschi, G. Bernardini, M. Geminiani, L. Ghezzi, D. Braconi, L. Millucci, B. Frediani, A. Spreafico, A. Franchi, D. Campanacci, R. Capanna, A. Santucci. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 2718-2727
- ¹⁵⁸ A. Spreafico, B. Frediani, C. Capperucci, F. Chellini, A. Paffetti, C. D'Ambrosio, G. Bernardini, R. Mini, G. Collodel, A. Sacloni, R. Marcolongo, A. Santucci. *Proteomics* **2006**, *6*, 3520-3532.
- ¹⁵⁹ T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor. *Cell Viability Assays*. **2013** May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; **2004**-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>