



UNIVERSITAT JAUME I

Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals
Departament de Química Inorgànica i Orgànica

**DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO DE LAS
ACTIVIDADES ANTIANGIOGÉNICAS,
ANTITELOMERASA Y ANTIMITÓTICAS DE
DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A-4**

Tesis Doctoral

Sandra Adela Torijano Gutiérrez

Castellón de la Plana, 2013

D. Miguel Carda Usó, Catedrático de Química Orgánica de la Universidad Jaume I y D. Santiago Díaz Oltra, Personal Investigador Contratado Doctor de la Universitat Jaume I, certifican que:

D^a. Sandra Adela Torijano Gutiérrez ha realizado bajo su dirección el trabajo que se recoge en esta memoria para optar al grado de Doctor.

Asimismo, autorizan la presentación del trabajo ante la Universitat Jaume I de Castelló para que se cumplan los trámites correspondientes.

Y para que así conste a los efectos legales presentamos dicha tesis y firmamos este certificado en Castellón de la Plana a 14 de Junio de dos mil trece.

Miguel Carda Usó

Santiago Díaz Oltra

Agradecimientos

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana, bajo la dirección del Dr. D. Miguel Carda Usó y del Dr. D. Santiago Díaz Oltra, a quienes quiero agradecer todos los consejos y el apoyo que me han brindado en estos tres años. Gracias a ustedes hoy estoy más cerca de alcanzar una meta.

Quiero manifestar mi más sentida gratitud a los doctores J. Alberto Marco y Juan Murga Clausell por toda la ayuda prestada. A los doctores Isabel Barasoain, José Fernando Díaz Pereira, y Mariano Redondo Horcajo del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid), por la ayuda y realización de los ensayos biológicos. A la doctora Eva Falomir Ventura, muchas, pero muchas gracias, por la ayuda y paciencia en la realización de los ensayos biológicos llevados a cabo en el grupo de Síntesis Orgánica.

Asimismo quiero expresar mi agradecimiento a la Consellería de Educació, Formació i Ocupació de la Generalitat Valenciana por la concesión de la beca Grisolia que me ha permitido financiar mis estudios de máster y de doctorado.

También quiero agradecer a la Universidad Jaume I y al Ministerio de Economía y Competitividad por los proyectos P1-1B2011-37-UJI y CTQ2011-27560, que han permitido financiar la investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral.

A mis compañeros de laboratorio con los que inicié, con los que han estado de paso y con los que aún permanecen, gracias por compartir su cultura con esta foránea de tierra tropical ;). A los colombianos en esta parte del mundo: Césitar, gracias por mostrarme el camino y facilitarme las cosas, lo mejor para ti siempre, y la adquisición más reciente Steven, gracias por recordarme la tierra, a vos

joven todos los ánimos ¡sí se puede! A los xiquets, gracias por enseñarme a entender el Valencià, por las experiencias vividas, por las risas, los set de fotografía, por las tardes de carajillo en el círculo del café, por los fines de semana de "comelona" comilona de aquí y de allá, por las charlas del momento, por estar pendiente de alguna forma de mi, por brindarme apoyo, por regalarme una sonrisa, un mensaje, por hacer mi estancia en el laboratorio fabulosa, porque con ustedes he aprendido y conocido. A todos y cada uno de ustedes muchas gracias.

A Jairo Sáez y Wilson Cardona, por haberme enviado el correo que cambió mi vida y me abrió las puertas, a ustedes les debo en gran parte el que esté culminando hoy con éxito, esta parte del camino. A mis amigos en Colombia: las niñas y muñecos, gracias por los ánimos, por las palabras, y así no nos hablemos todos los días, el sólo hecho de que en un instante, por más corto que sea, sintiera como si el tiempo y la distancia física no hubiera pasado y no hiciera de las suyas es evidencia de que con ustedes puedo contar.

A Julián *¡El mejor!*, jamás tendré las suficientes palabras para agradecerle cada momento. Gracias por la paciencia que me has tenido, por enseñarme, apoyarme, animarme siempre con la palabra adecuada en el momento adecuado...Gracias porque haces que la vida sea más fácil.

Y por supuesto a mi Familia (Má, Pá, Juancho, tía chava y tío Ramiro, mi binita) ¿qué sería sin ustedes? Gracias por estar aquí, por contestar al teléfono a cualquier hora del día, por los mensajes, las llamadas, por llorar y reír conmigo. Gracias porque aún en la distancia siempre he contado con ustedes *¡Incondicionalmente!* A ustedes mil gracias. ¡Los amo!

Abreviaturas

Ac = acetato	IF = inmunofluorescencia
acac = acetil-acetonato	LLC = leucemia linfocítica crónica
ac. = acuoso	m = multiplete
ABC = <i>ATP-Binding Cassette transporter</i>	MAP = <i>Microtubule Associated Proteins</i>
ADMET = metátesis de dienos acíclicos	m-CPBA = ácido
ADNc = ADN complementario	m-cloroperóxido benzoico
ATP = adenosin trifosfato	MCAK = <i>Mitotic Centromere-Associated Kinesis</i>
ATR = Análogos truncados de resveratol	MDR = resistencia múltiple a fármacos
9-BBN = 9-borabicyclo[3.3.1]nonano	MMLV = transcriptasa inversa del virus De la leucemia murina Moloney
Bu = butilo	MOM = metoximetilo
br = banda o señal ancha	MRP = <i>Multidrug Resistance-associated Protein</i>
CA-4 = combretastatina A-4	MTT = bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolo
CH = colchicina	PBS = tampón de fosfato
CM = metátesis cruzada	PCR = <i>Polymerase Chain Reaction</i>
d = doblete	Ph = fenilo
DCC = dicitclohexilcarbodiimida	POD = podofilotoxina
DIPEA = <i>N,N</i> -diisopropiletilamina	PPTS = <i>p</i> -toluensulfonato de piridinio
DM1A = anticuerpo anti-alfa tubulina	q = cuadruplete
DMAP = 4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina	quint = quintuplete
DME = 1,2-dimetoxietano	QSAR = relación cuantitativa estructura actividad
DMEM = <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	RCM = metátesis con cierre de anillo
DMF = <i>N,N</i> -dimetilformamida	ROMP = metátesis con apertura de anillo
DMSO = dimetilsulfóxido	RTK = receptores tirosina-quinasa
dppf = [1,1'-bis(difenil-fosfina)ferroceno]	s = singulete
EB1 = <i>End-Binding Protein 1</i>	sext = sextuplete
ECs = células endoteliales	SGDD = <i>Structure-Guided Drug Design</i>
EDCI = <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida	t = triplete
EGTA = ácido tetracético de etilenglicol	T = temperatura
ELISA = <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>	temp. amb. = temperatura ambiente
EMA = <i>European Medicines Agency</i>	Tf = triflato
eq = equivalente	TBDMS = TBS = <i>t</i> -butildimetilsililo
Et = etilo	TBAF = fluoruro de tetra- <i>n</i> -butilamonio
FBS = suero fetal bovino	TERT = <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
FDA = <i>Food and Drug Administration</i>	
FMF = fiebre mediterránea familiar	
GAB = tampón de ensamblaje de glicerol	
GTP = guanosin trifosfato	
HTS = cribado de alto rendimiento	

THF = tetrahidrofurano
TMSCHN₂ = trimetilsilildiazometano
TMS = trimetilsililo
TMB = tetrametilbencidina
TLC = cromatografía en capa fina
VEGF = factor de crecimiento del
endotelio vascular
VB = vinblastina

EDER J_B J

Índice

1. Introducción	1
1.1. El cáncer	1
1.2. Estrategias terapéuticas	5
1.2.1. Nuevos agentes antineoplásicos	6
1.2.2. Nuevas modalidades terapéuticas de administración	6
1.2.3. Uso de moduladores bioquímicos	6
1.2.4. Modificación de la intensidad de la dosis	7
1.2.5. Terapia biológica	7
1.2.5.a. Terapia sobre oncogenes	8
1.2.5.b. Terapia con anticuerpos monoclonales	8
1.2.5.c. Terapia antiangiogénica	10
1.2.5.d. Vacunas antitumorales	10
1.2.5.e. Terapia génica	11
1.2.5.f. Inmunoconjugados	11
1.3. Dianas moleculares	12
1.3.1. Descubrimiento de dianas	13
1.3.2. Descubrimiento de fármacos	15
1.3.2.a. Cribado de productos naturales	16
1.3.2.b. Medicina tradicional	18
1.3.2.c. Cribado eficiente	19
1.3.2.d. Diseño racional de fármacos asistido por ordenador	19
1.3.2.e. La síntesis orgánica	20
1.3.3. Desarrollo de fármacos	23
1.3.3.a. Estudios preclínicos	23
1.3.3.b. Ensayos clínicos	24
1.4. Fármacos antineoplásicos	25
1.4.1. Cisplatino y derivados	26

1.4.2. Agentes alquilantes	27
1.4.3. Antimetabolitos	28
1.4.4. Inhibidores de topoisomerasas	32
1.4.5. Antibióticos antitumorales	34
1.4.6. Inhibidores de la mitosis	36
1.4.7. Antagonistas de receptores hormonales	37
1.4.8. Inhibidores enzimáticos de la síntesis de hormonas	38
1.4.9. Modificadores de la respuesta biológica	41
1.5. El ciclo celular y los fármacos antitumorales	42
1.6. Tubulina y microtúbulos	46
1.6.1. Estructura de la tubulina	46
1.6.2. Microtúbulos	47
1.6.2.a. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos	49
1.6.2.b. Proteínas asociadas a los microtúbulos	51
1.7. Inhibidores de la mitosis	55
1.7.1. Agentes estabilizadores de microtúbulos	56
1.7.1.a. Taxanos	56
1.7.2. Agentes desestabilizadores de microtúbulos	61
1.7.2.a. Alcaloides de la vinca	61
1.7.2.b. Colchicina	63
1.7.2.c. Combretastatinas	67
1.7.2.d. Pironetina	72
1.8. Resistencia múltiple a fármacos	75
1.9. Angiogénesis	77
1.9.1. Reguladores de la angiogénesis	79
1.9.2. Inhibidores de la angiogénesis	82
1.9.2.a. Inhibidores de VEGF	82
1.9.2.b. Inhibidores de proteína-quinasa	84
1.10. Telomerasa	87
2. Objetivos	93

2.1. Introducción	93
2.2. Objetivos	96
3. Síntesis de O-alkil derivados de combretastatina A-4	99
3.1. Introducción	99
3.2. Síntesis de combretastatina A-4	101
3.2.1. Síntesis de combretastatina A-4 mediante reacciones de Wittig	101
3.2.2. Síntesis de combretastatina A-4 mediante transposición de Ramberg-Backlund	103
3.2.3. Síntesis de combretastatina A-4 mediante acoplamiento de Suzuki	105
3.2.4. Síntesis de combretastatina A-4 mediante acoplamiento de Kumada-Corriu	109
3.2.5. Síntesis de combretastatina A-4 mediante transposición de Colvin	110
3.2.6. Síntesis de combretastatina A-4 mediante desoxigenación de epóxido	112
3.2.7. Síntesis de combretastatina A-4 mediante reacción de Perkin	114
3.3. Síntesis de derivados bencílicos y alílicos de combretastatina A-4	116
3.4. Síntesis de híbridos CA-4/ATR	117
3.4.1. Síntesis de los derivados estirénicos 3.67	119
3.4.2. Síntesis de análogos truncados de resveratrol 3.62	120
3.4.3. Síntesis de híbridos CA-4/ATR 3.70	127
3.5. Parte experimental	129
3.5.1. Técnicas generales	129
3.5.2. Procedimientos experimentales	130
4. Evaluación biológica de los derivados de combretastatina A-4	159

4.1. Ensayos de citotoxicidad	159
4.2. Inhibición de la producción de VEGF mediante medición con el test ELISA (<i>Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay</i>)	163
4.3. Inhibición de la expresión del gen que codifica VEGF	168
4.4. Actividad inhibidora de la telomerasa	171
4.5. Conclusiones	175
4.6. Parte Experimental	177
4.6.1. Cultivos celulares	177
4.6.2. Ensayos de citotoxicidad	177
4.6.3. Ensayo ELISA para la determinación de la producción de VEGF	178
4.6.4. Determinación de la inhibición de la expresión génica de VEGF, hTERT y c-Myc	178
5. Síntesis de híbridos de CA-4/análogos de pironetina	181
5.1. Introducción	181
5.2. Estructuras objetivo	185
5.3. Síntesis de híbridos de CA-4/análogos de pironetina	187
5.3.1. Síntesis de híbridos de CA-4/análogos de pironetina con 1 estereocentro	188
5.3.2. Síntesis de híbridos de CA-4/análogos de pironetina con 3 estereocentros	190
5.4. Parte experimental	195
5.4.1. Técnicas generales	195
5.4.2. Procedimientos experimentales	195
6. Estudios de citotoxicidad y de interacción con tubulina de los híbridos CA-4/análogos de pironetina	219
6.1. Introducción	219
6.2. Actividad citotóxica	222
6.3. Efecto sobre el ciclo celular	225

6.4. Efecto sobre la red de microtúbulos del citoesqueleto	231
6.5. Efecto sobre el ensamblaje de los microtúbulos	234
6.6. Conclusiones	237
6.7. Parte experimental	239
6.7.1. Cultivos celulares	239
6.7.2. Ensayos de citotoxicidad, inmunofluorescencia indirecta y ciclo celular	239
6.7.3. Ensayo de inhibición del ensamblaje de tubulina	240
7. Resumen y conclusiones	241
8. Espectros seleccionados	245

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

Todas las células de un organismo pluricelular se originan por divisiones sucesivas de una célula germen y, por consiguiente, portan la misma información genética que la célula progenitora. La multiplicación celular provoca el proceso de diferenciación que permite la creación de nuevas estructuras celulares o la transformación de las ya existentes. Las células morfológica y funcionalmente iguales se constituyen en grupos o tejidos.

Cuando el sistema defensivo descubre que una célula está dañada, que ha dejado de actuar correctamente, o que ha sido infectada por un virus o cualquier otro organismo, induce un programa de autodestrucción obligándola a morir reemplazándola por una célula sana.¹

Las células están sometidas a diversos factores ambientales y sustancias tóxicas que pueden dañar el material genético de las mismas afectando a su normal crecimiento y división. Si el organismo es incapaz de mantener bajo control un proceso anormal de multiplicación se produce el crecimiento descontrolado de un tejido que puede desembocar en la formación de un tumor. Entre el 5 y el 7% de las personas presenta una predisposición genética al desarrollo de ciertos cánceres, pero entre el 75 y el 80% de los casos, el cáncer se debe a la acción de diversos agentes externos agrupables en tres categorías:

- *Agentes carcinogénicos*, como la radiación ionizante (rayos X), radiación no ionizante (radiación UV) y las radiaciones naturales que emite la propia corteza terrestre (Radón). Otra fuente de agentes carcinogénicos es la radiación emitida por las fugas que tienen lugar en los accidentes nucleares.

¹ Fidler, I. J. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 453.

- *Procesos químicos procedentes de la industria, del humo del tabaco y de la contaminación en general.* De los 7 millones de compuestos químicos conocidos, unos 2.000 presentan algún tipo de actividad carcinogénica. Independientemente de su composición, la capacidad carcinogénica de una sustancia depende de la cantidad de dosis recibida y del tiempo de exposición. El consumo de tabaco, el consumo nocivo de alcohol, la mala alimentación y la inactividad física son otros importantes factores de riesgo.

- *Agentes infecciosos o biológicos.* Ciertas infecciones crónicas como VHB (virus de la hepatitis B), VHC (virus de la hepatitis C) y algunos tipos de PHV (virus del papiloma humano) causan hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países en vías de desarrollo y un 9% en los países desarrollados. El cáncer cervicouterino, causado por PHV, es una de las principales causas de defunción en mujeres de países del tercer mundo.²

La combinación de agentes carcinogénicos exógenos con los factores genéticos endógenos aumenta la probabilidad de padecer cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En 2008 provocó 7,6 millones de defunciones, aproximadamente el 13% del total. Los principales tipos de cáncer por su índice de mortalidad son:

- Pulmonar (1,4 millones de defunciones).
- Gástrico (740.000 defunciones).
- Hepático (700.000 defunciones).
- Colorrectal (610.000 defunciones).
- Mamario (460.000 defunciones).
- Cervicouterino (275.000 defunciones).

² <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>

Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y superará los 13.1 millones en 2030.²

Si bien los agentes desencadenantes de cáncer pueden ser múltiples, las nuevas técnicas de bioingeniería han permitido analizar los genes implicados en los procesos tumorales y entender los mecanismos moleculares que son comunes a todos los procesos cancerosos.³

Los genes implicados en los procesos tumorales pueden agruparse en dos grupos:

- *Oncogenes*. Un amplio grupo de genes del genoma humano tienen como característica común intervenir en la síntesis de proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares que controlan los procesos de proliferación y diferenciación celular. Estos genes se denominan protooncogenes y son reguladores esenciales de los procesos biológicos, interviniendo en el control del crecimiento celular, proliferación, apoptosis, estabilidad del genoma y diferenciación celular. La transformación de un protooncogén (gen normal) en un oncogén se produce por cambios en su expresión o por cambios en la secuencia de codificación. Una vez transformado, el oncogén exhibe una actividad más intensa de lo normal que desemboca en el aumento de la proliferación celular. Este aumento de la proliferación celular se debe a que los oncogenes originan proteínas con expresión y/o función alterada que favorecen el crecimiento celular y la invasión tumoral. Hasta la fecha se conocen más de 100 protooncogenes diferentes, sin embargo, sólo un grupo limitado de ellos juega un papel esencial en la producción de tumorigénesis. Desde el punto de vista genético los oncogenes son dominantes, ya que basta la presencia de un solo alelo para predisponer a la célula a la transformación maligna.⁴

³ <http://www.cicancer.org>

⁴ (a) Hollstein, M.; Rice, K.; Greenblatt, M. S.; Soussi, T.; Fuchs, R.; Sorlie, T.; Hovig, E.; Smith-Sorensen, B.; Montesano, R.; Harris, C. C. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3551. (b) Spandidos, D.; Anderson, M. L. M. *J. Pathol.* **1989**, *157*, 1. (c) Malumbres, M.; Barbacid, M. *Nature Rev.*

- *Genes supresores de tumores.* Estos genes se encargan de controlar el ciclo celular evitando el crecimiento excesivo, bloqueando el ciclo celular si no les llegan las señales adecuadas o si detectan alteraciones que no hacen aconsejable la proliferación celular. A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores son recesivos, puesto que la presencia de un alelo normal es capaz de mantener los procesos normales de la célula. Para que la célula sana se convierta en cancerígena se deben acumular entre 4 y 6 mutaciones en el gen supresor.¹ El gen más conocido de este grupo es el p53.⁵ Este gen se traduce en proteínas encargadas de regular el ciclo celular ante un eventual daño del ADN, por lo que se le ha denominado *guardián del genoma*. Así, cuando el ADN resulta dañado el p53 se activa deteniendo el ciclo celular en la fase G1 y procediendo a su reparación antes de que se produzca la duplicación del ADN. Si la anomalía del ADN se repara, el ciclo continúa, pero si la reparación no es posible, el gen p53 induce la apoptosis de la célula. La alteración de la proteína codificada por p53 produce inestabilidad genómica.⁶ Las células que contienen esta alteración son incapaces de evitar la proliferación o de activar la muerte programada cuando está comprometida la integridad del ADN, provocándose en última instancia el proceso carcinogénico.

Las alteraciones en los genes que controlan la proliferación y la diferenciación celular han demostrado ser el primer eslabón del proceso de malignización y, por tanto, constituyen dianas terapéuticas del máximo interés en los tratamientos contra el cáncer.

Cancer **2003**, 3, 7. (c) Mascaux, C.; Iannino, N.; Martin, B.; Paesmans, M.; et al. *Br. J. Cancer* **2005**, 17, 13.

⁵ Bai, L.; Zhu, W-G. *J. Cancer Mol.* **2006**, 2, 141.

⁶ (a) Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. C. *Science* **1991**, 253, 49. (b) El-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B., et al. *Cell* **1993**, 75, 817. (c) Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. *Nature* **2000**, 408, 307. (d) Vogelstein, B. *Nat. Edu.* **2010**, 3, 53.

1.2. Estrategias terapéuticas

Muchas de las estrategias usadas actualmente en terapia anticáncer están basadas en observaciones clínicas empíricas, no relacionadas en absoluto con las anomalías genéticas responsables del desarrollo de los tumores en cuestión. Estas estrategias han sido seleccionadas a lo largo de los años por métodos de ensayo y error de entre los tratamientos que han combinado mejor eficacia terapéutica y menores efectos secundarios.

Las tres armas tradicionales contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Estas tres estrategias siguen siendo, básicamente, las únicas armas de elección. La radioterapia y la quimioterapia ofrecen alternativas de tratamiento en aquellos casos en los que no es posible la cirugía y también pueden ser utilizadas en combinación con cualquiera de las otras aproximaciones terapéuticas.

La mejora en el diagnóstico precoz del cáncer, y el refinamiento progresivo de las tres aproximaciones terapéuticas tradicionales, ha permitido conseguir una tasa del 50% de curaciones en el total de cánceres diagnosticados.

El problema de las aproximaciones terapéuticas tradicionales, que hace muy difícil aumentar las tasas de curación actuales, es la falta de especificidad y los efectos secundarios nocivos de la mayoría de los protocolos de tratamiento. Tanto la radiación como los agentes quimioterapéuticos afectan también a las células y tejidos sanos, pudiendo producir importantes efectos tóxicos o nocivos en los pacientes.^{3,7}

Pese a lo complejo de la enfermedad cancerosa, las intervenciones para prevenir y tratar el cáncer han desembocado en el uso de nuevas estrategias de base científica a fin de reducirlo y controlarlo.⁸

⁷ <http://cancer.stanford.edu/information/cancerTreatment/methods/chemotherapy.html>

⁸ (a) Kitano, H. *Nature Rev. Cancer* **2004**, *4*, 227. (b) Seufferlein, T.; Ahn, J.; Krndija, D.; Lothar, U.; Adler, G.; von Wichert, G. *Cell Commun. Sig.* **2009**, *7*, 19.

1.2.1. Nuevos agentes antineoplásicos

Actualmente se está evaluando el efecto de una gran cantidad de nuevos agentes antineoplásicos a fin de mejorar su especificidad, maximizando sus efectos citotóxicos sobre las células tumorales y minimizando sus efectos adversos.⁹ Esta nueva línea de investigación constituye una plataforma para el desarrollo de nuevas moléculas originales o bien moléculas derivadas de las ya existentes.

1.2.2. Nuevas modalidades terapéuticas de administración

El objetivo en estos casos es aumentar la eficacia antitumoral y/o disminuir la toxicidad adecuándose a las características farmacocinéticas del fármaco y la situación clínica del paciente. Estas metodologías buscan la optimización de las terapias (intravenosa, quimioterapia regional) administrando el antineoplásico en el momento que proporcione un mejor índice terapéutico y/o menor toxicidad.¹⁰

1.2.3. Uso de moduladores bioquímicos

Los moduladores bioquímicos son fármacos que no poseen actividad antitumoral propia pero reducen y contrarrestan los mecanismos de resistencia a los antineoplásicos, aumentando el efecto citotóxico de éstos.¹¹

⁹ (a) Quiñones, L.; Rosero, M.; Roco, A.; Moreno, I.; Sasso, J.; Varela, N.; Cáceres, D.; Saavedra, I. *Rev. Med. Chile* **2008**, *136*, 1327. (b) Arrondeau, J.; Gan, H. K.; Razak, A. R.; Paoletti, X.; Le Tourneau C. *Discov. Med.* **2010**, *10*, 355.

¹⁰ Adams, V. R.; Liewer, S. E. A. *Guide to the administration and use of cancer therapeutic agents 2011/12*. Versión on line en:

http://www.clinicaloncology.com/download/PG113_CancerAgents_web_NoPrint.pdf

¹¹ (a) Vokes, E. E. *Semin. Oncol.* **1994**, *21*, 29. (b) Taguchi, T. *Oncology* **1997**, *54*, 12.

1.2.4. Modificación de la intensidad de la dosis

En esta metodología se emplean dosis altas de agentes antineoplásicos combinadas con técnicas que evitan su toxicidad sobre los distintos órganos y sistemas.

1.2.5. Terapia biológica

En estos procesos se utiliza el sistema inmunitario del cuerpo, ya sea directa o indirectamente, para combatir el cáncer o para minimizar los posibles efectos secundarios causados por el tratamiento.¹²

El conocimiento de la biología tumoral, y las diferencias en el control de la proliferación de las células neoplásicas y de las no neoplásicas, ha abierto nuevas perspectivas en el tratamiento del cáncer, que pueden ser usadas en:

a) Detener, controlar o suprimir los procesos que permiten el crecimiento del tumor.

b) Hacer que las células cancerosas se puedan reconocer con más facilidad y, por lo tanto, que el sistema inmunitario las destruya rápidamente.

c) Alterar el patrón de crecimiento de las células cancerosas fomentando su comportamiento como células sanas.

d) Bloquear o revertir el proceso que hace que una célula sana o célula precancerosa se convierta en célula cancerosa.

e) Mejorar la capacidad del cuerpo para reparar o reemplazar las células normales dañadas o destruidas.

f) Impedir que las células cancerosas se diseminen a otras partes del cuerpo.¹³

¹² Sandri, G.; Cestelli, V.; Mascia, M. T. *J. Cancer Ther.* **2013**, *4*, 460.

¹³ Leber, M. F.; Efferth T. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 881.

1.2.5.a. Terapia sobre oncogenes

Las sustancias empleadas en terapias biológicas se llaman también modificadores de la respuesta biológica y pueden ser usadas como terapias por sí solas o en combinación con otros tratamientos, como en el caso de las terapias sobre oncogenes. En estos tratamientos se emplean agentes que actúan sobre los factores implicados en las vías de transducción de señales con el fin de restablecer la regulación normal del ciclo celular.¹⁴

1.2.5.b. Terapia con anticuerpos monoclonales

Esta terapia tiene como objetivo dirigir selectivamente el tratamiento antitumoral hacia antígenos sobreexpresados específicamente en las células tumorales, disminuyendo así la exposición de las células no tumorales al agente citotóxico. Existen actualmente dos anticuerpos monoclonales aprobados para el tratamiento antitumoral, el rituximab¹⁵ y el trastuzumab (véase la figura 1.1),¹⁶ y muchos otros están en fase de investigación.

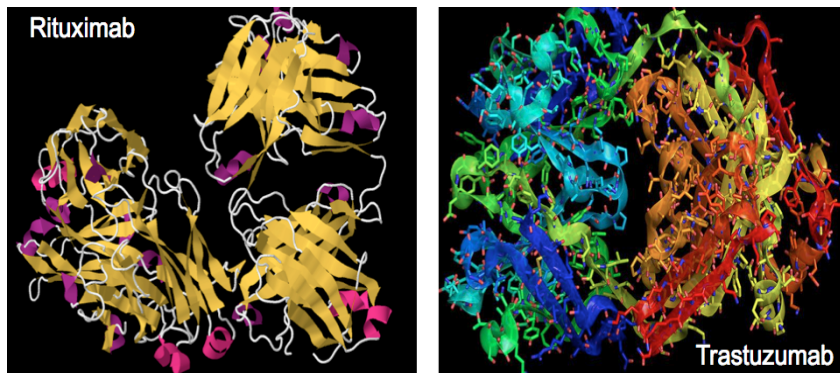


Figura 1.1. Anticuerpos monoclonales

¹⁴ Luo, J.; Solimini, N. L.; Elledge, S. J. *Cell* **2009**, *136*, 823.

¹⁵ Gürcana, H. M.; Keskin, D. B.; Sternb, J. N. H.; Nitzberga, M. A.; Shekhanian, H.; Ahmed, A. R. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 10.

¹⁶ (a) Ménard, S.; Pupa, S. M.; Campiglio, M.; Tagliabue. *Oncogene* **2003**, *22*, 6570. (b) Albanell, J.; Codony, J.; Rovira, A.; Mellado, B.; Gascon, P. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *532*, 253. (c) Hudis, C. A. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 39. (d) Santin, A. D.; Bellone, S.; Roman, J. J.; McKenney, J. K.; Pecorelli, S. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2008**, *102*, 128. (e) Garnock-Jones K. P.; Keating, G. M.; Scott, L. *J. Drugs* **2010**, *70*, 215.

En la figura 1.2 se indica esquemáticamente el mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales que actúan sobre los receptores del EGF, acrónimo del inglés *Epidermal Growth Factor*.¹⁷

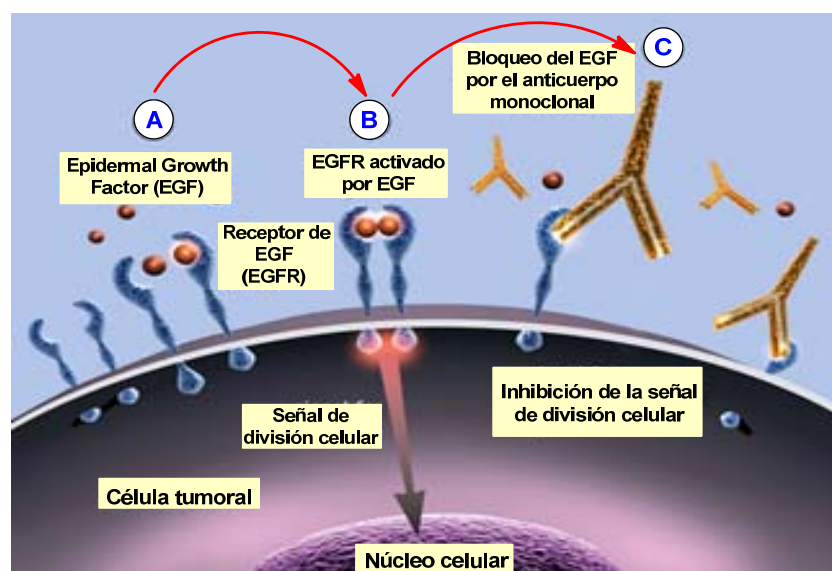


Figura 1.2. Mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales

La unión del EGF a los receptores celulares EGFR desencadena el proceso de transducción de señal que desemboca en la activación génica que conduce a la división celular. El anticuerpo monoclonal se une al receptor bloqueando el proceso de transducción y desactivando el proceso de división celular.

¹⁷ S. Cohen y R. Levi-Montalcini fueron galardonados con el premio Nobel en Fisiología y Medicina del año 1986 por el descubrimiento del EGF. (a) Carpenter, G.; Cohen, S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7709. (b) Voldborg, R. R.; Damstrup, L.; Spang-Thomsen, M.; Poulsen, H. S. *Ann. Oncol.* **1997**, *8*, 1197. (c) Mendelsohn, J.; Baselga, J. *Oncogene* **2000**, *19*, 6550. (d) Mendelsohn, J. *Endocr. Rel. Cancer* **2001**, *8*, 3. (e) Yarden, Y. *Eur. J. Cancer* **2001**, *S3*, 37. (f) Harris, R. C.; Chung, E.; Coffey, R. *J. Exp. Cell. Res.* **2003**, *284*, 2. (g) Scagliotti, G. V.; Selvaggi, G.; Novello, S.; Hirsch, F. R. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4227. (h) Normanno, N.; De Luca, A.; Bianco, C.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Maiello, M. R.; Carotenuto, A.; De Feo, G.; Caponigro, F.; Salomon, D. S. *Gene* **2006**, *366*, 2.

1.2.5.c. Terapia antiangiogénica

La angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Esta modalidad terapéutica está generando grandes expectativas debido a la importancia crucial de la angiogénesis en el crecimiento y la invasión tumoral.¹⁸ El tumor requiere del aporte de sangre para mantener sus necesidades metabólicas y su crecimiento, lo que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos.¹⁹ Además, los nuevos vasos pueden ser utilizados como vía de escape de las células cancerígenas para abandonar el tumor y entrar en el torrente sanguíneo, provocando la intravasación y la subsiguiente metástasis.²⁰

En la actualidad, las terapias antiangiogénicas se fundamentan en dos aspectos: la cuantificación de la angiogénesis con fines de diagnóstico y pronóstico, y la inhibición de la angiogénesis para frenar el crecimiento tumoral.²¹ Más adelante en este capítulo se explicará con más detalle el proceso de angiogénesis así como los factores proteínicos y moléculas receptoras implicados en este proceso.

1.2.5.d. Vacunas antitumorales

En esta terapia se han desarrollado vacunas que permiten aumentar la inmunogenicidad tumoral. Se fundamenta en la existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de los antígenos entre la mayoría

¹⁸ (a) Rajkumar, S. V.; Witzig, T. E. *Cancer Treat. Rev.* **2000**, *26*, 351. (b) Plank, M. J.; Sleeman, B. D. *J. Theor. Med.* **2003**, *5*, 137. (c) Adams, R. H.; Alitalo, K. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2007**, *8*, 464. (d) Bałan, B. J.; Słotwiński, R. *Centr. Eur. J. Immunol.* **2008**, *33*, 232. (e) Kerbel, R. S.; *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2039. (f) Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2011**, *473*, 298.

¹⁹ Li, Q.; Withoff, S.; Verma, I. *Trends Immunol.* **2005**, *26*, 318.

²⁰ (a) Liotta, L. A.; Steeg, P. S.; Stetler-Stevenson, W. G. *Cell* **1991**, *64*, 327. (b) Zetter, B. R. *Annu. Rev. Med.* **1998**, *49*, 407. (c) Fidler, I. J. *Cancer J.* **2000**, *6 Suppl 2*, S134. (d) Folkman J. *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, 15. (e) Stacker, S. A.; Lotta, J.; Baldwin, M. E.; Alitalo, K. *Nature Rev. Cancer* **2002**, *2*, 573. (f) Kirsch, M.; Schackert, G.; Black, P. M. *Cancer Treat Res.* **2004**, *117*, 285. (g) McCarthy, N. *Nature Rev. Cancer* **2008**, *8*, 570.

²¹ (a) Siemann, D. *Int. J. Rad. Onc.* **2002**, *54*, 1472. (b) Hidalgo, M.; Eckhardt, S. *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 285.

de las células cancerosas y no cancerosas.²² Las vacunas tumorales no tienen como objetivo la prevención, sino la estimulación del sistema inmunitario del paciente para que sea capaz de atacar y destruir las células tumorales.

1.2.5.e. Terapia génica

El conocimiento de los mecanismos que regulan el funcionamiento de los genes permite corregir anomalías en el ADN, que son el punto de partida de numerosas enfermedades de origen genético, como el cáncer.²³ La terapia génica se basa en la inserción de un gen funcional capaz de corregir los errores en el ADN, permitiendo la normalización del ciclo celular, inhibiendo los oncogenes y restaurando la actividad de los genes supresores de tumores. La utilidad clínica de esta terapia depende de los avances en la tecnología de los vectores de transferencia génica y del desarrollo de la seguridad, eficiencia y flexibilidad de los actuales sistemas de transporte de genes.²⁴

1.2.5.f. Inmunoconjugados

Otra estrategia terapéutica que permite optimizar el tratamiento antineoplásico consiste en combinar las moléculas de los anticuerpos monoclonales con sustancias que incrementen la eficacia citotóxica frente a las células tumorales, como fármacos, radioisótopos y toxinas.²⁵ Muchos laboratorios están actualmente desarrollando protocolos de manipulación con objeto de potenciar la actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales.

²² (a) Ferriols-Lisart. *Farm. Hosp.* **1997**, *21*, 166. (b) Waldmann, T. A. *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 65. (c) Lollini, P. L.; Cavallo, F.; Nanni, P.; Forni, G. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 204. (d) Schlom, J.; Arlen, P. M.; Gulley, J. L. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3776. (e) Frazer, I. H.; Lowy, D. R.; Schiller, J. T. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, S148. (f) Emens L. A. *Expert Opin. Emerg. Dr.* **2008**, *13*, 295.

²³ (a) Roth, J. A.; Cristiano, R. J. *J. Natl. Cancer I.* **1997**, *89*, 21. (b) Lam, P.; Khan, G.; Stripecke, R.; Hui, K. M.; Kasahara, N.; Peng, K-W.; Guinn, B-A. *Cancer Gene Ther.* **2013**, *20*, 141.

²⁴ (a) Sunji, Y.; Ochiai, T.; Shimada, H.; Matsubara, H. *Surg. Today* **2000**, *30*, 967. (b) Cross, D.; Burmester, J. K. *Clin. Med. Res.* **2006**, *4*, 218. (c) Patil, P. M.; Chaudhari, P. D.; Sahu, M.; Duragkar, N. J. *Int. J. Gen.* **2012**, *4*, 74.

²⁵ Ricart, A. D.; Tolcher, A. W. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2007**, *4*, 245.

Como conclusión a este apartado, en el que se ha abordado el tema de las estrategias terapéuticas frente al cáncer, podemos señalar que en la actualidad, nos encontramos en una situación más que favorable para avanzar en el objetivo de erradicación del cáncer, ya que se dispone de un enorme cuerpo de conocimiento teórico sobre los genes, proteínas y vías de señalización implicados en esta enfermedad. Por otra parte, los nuevos conocimientos en biología molecular, biotecnología e ingeniería genética, están permitiendo la aplicación de nuevas y mejores aproximaciones en los equipos de diagnóstico y tratamiento terapéutico.

La gran cantidad de nuevos conocimientos acumulados en áreas como la química, la biología, la bioquímica, la virología y la medicina permitirá superar la etapa de ensayo-error y contribuirá al diseño y producción de nuevos fármacos, capaces de eliminar específicamente los procesos tumorales sin producir efectos nocivos secundarios en las células y tejidos normales del organismo.⁵

1.3. Dianas moleculares

A mediados del siglo anterior, la bioquímica y la microbiología situaron a la biología como la gran protagonista en el descubrimiento de fármacos. Las posteriores aportaciones de la biología molecular y la biotecnología permitieron comprender las bases moleculares de las enfermedades e identificar las dianas terapéuticas y el mecanismo de actuación de los fármacos.

La investigación a nivel preclínico y el diseño de nuevas estrategias explica la aparición de nuevos agentes terapéuticos cuya actuación se dirige a dianas moleculares específicas. Las dianas terapéuticas son moléculas localizadas en cualquier parte de la célula, generalmente proteínas, que forman parte de una cadena de reacciones (cadenas de transducción) cuya función es adaptar las actividades de cada célula a las necesidades del

organismo. El eslabón inicial se encuentra en la membrana celular donde los receptores captan información de muy distinta naturaleza (hormonas, citoquinas, etc.). El eslabón final de la cadena es el núcleo, donde los factores de transcripción seleccionan los genes encargados de la respuesta celular. Cualquier fallo en la cascada de transducción de la señal puede provocar alteraciones que estimulen la autonomía de la población tumoral, rasgo característico de todos los tumores malignos.²⁶

La caracterización de la actividad biológica de las dianas moleculares depende en gran medida del grado de validación de la diana en cuestión y del avance en el descubrimiento de potenciales compuestos activos.²⁷ No obstante lo anterior, la complejidad de los procesos biológicos implicados en el cáncer puede dificultar la identificación de la diana que permita el eficaz desarrollo del fármaco.²⁸

1.3.1. Descubrimiento de dianas

La falta de nuevas dianas terapéuticas específicas es uno de los problemas que encuentra el desarrollo de nuevos fármacos. La identificación de nuevas dianas se puede llevar a cabo mediante una combinación de técnicas de química médica, química biológica y proteómica, que permitan abordar el estudio de los sistemas biológicos de mayor complejidad.

Tras identificar una patología médica los científicos estudian muy detenidamente los mecanismos moleculares implicados en dicha enfermedad, para determinar dónde pueden intervenir y con qué opciones de intervención cuentan. Dado que el cuerpo humano es un sistema extremadamente complejo, los científicos tienen que elegir cuidadosamente el objetivo, por ejemplo, un gen asociado a una enfermedad genética, proteínas que actúan

²⁶ Druker, B. J. *Oncologist* **2004**, *4*, 357.

²⁷ Whittaker, P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 434.

²⁸ (a) Lindsay, M. A. *Nat. Rev Drug Discov.* **2003**, *2*, 831. (b) Zheng, C. J.; Han, L. Y.; Yap, C. W.; Ji, Z. L.; Cao, Z. W.; Chen, Y. Z. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 259. (c) Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 993.

como receptores de sustancias endógenas, enzimas que catalizan un determinado proceso biológico, o los canales iónicos que controlan el flujo de iones a través de las membranas celulares. De ahí que el conocimiento de las biomoléculas que están implicadas en una determinada patología sea de suma importancia, si se desea diseñar un nuevo fármaco que sea eficaz contra la enfermedad que desencadena dicha patología.

La validación de una diana farmacológica puede realizarse abordando su estudio mediante técnicas de biología celular y molecular y, recientemente, con tecnologías genómicas y proteómicas, que han permitido a la industria farmacéutica descubrir un gran número de fármacos por medio del estudio de las relaciones existentes entre genes y enfermedades.²⁹

La secuenciación del genoma humano ha iniciado la era de la genómica. El conocimiento de la secuencia completa del genoma humano y de los aproximadamente 30.000 genes que lo componen ha llevado al desarrollo de los llamados chips de ADN (microarrays), que permiten el examen completo de un genoma en un solo experimento.³⁰

Como consecuencia de los avances que se acaban de describir, en la actualidad, el número de dianas farmacéuticas se ha incrementado entre 5.000-10.000, en comparación con las conocidas en los años 90.³¹ Este incremento de las dianas terapéuticas se debe, en gran medida, a la puesta a punto de ensayos biológicos *in vitro*, miniaturizados y robotizados, que en pocas horas evalúan la actividad de centenares o millares de compuestos químicos

El nivel más alto de la validación de una diana terapéutica se consigue cuando el fármaco, que se ha diseñado en función de esa diana, consigue revertir los síntomas asociados a una determinada enfermedad. Esto exige la

²⁹ <http://www.instituto-roche.es>

³⁰ Hopkins A. L.; Groom, C. R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727.

³¹ Messeguer, A. *Los químicos y el descubrimiento de fármacos*. Instituto de Química Avanzada de Cataluña. **2010**.

recopilación de una gran cantidad de datos preclínicos y clínicos que permitan determinar la eficacia terapéutica del nuevo fármaco.

1.3.2. Descubrimiento de fármacos

El desarrollo de nuevos fármacos constituye un largo proceso que se puede dividir en una serie de fases, la primera de las cuales consiste en la identificación de nuevas dianas terapéuticas (véase la figura 1.3 y el apartado anterior). Una vez escogida la diana o dianas farmacológicas, se pasa a la siguiente fase que consiste en la selección y optimización de compuestos activos frente a dichas dianas terapéuticas.

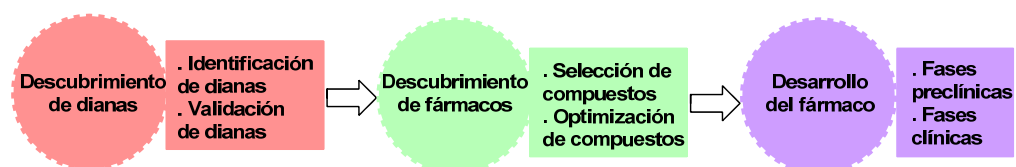


Figura 1.3. Fases del proceso de desarrollo de un fármaco

En esta etapa, el objetivo es encontrar un compuesto que tenga una gran afinidad por la diana escogida y que interactúe de manera específica y selectiva con ella. La unión fármaco-diana se consigue, muy a menudo, mediante la formación de enlaces no covalentes, como los de tipo iónico, enlaces de hidrógeno o de van der Waals. Excepcionalmente, se pueden formar enlaces covalentes que suelen originar interacciones irreversibles.

La selectividad es también un factor crucial en la química médica moderna. Cuanto más selectivo sea un fármaco hacia su diana, menos posibilidad hay de que interactúe con dianas diferentes y tenga efectos secundarios no deseados. A pesar de ello, muy a menudo el tratamiento farmacológico se dirige simultáneamente a varias dianas diferentes mediante la administración de dos o más fármacos (terapia combinada). Esta es una de las opciones más

elegidas en ciertas enfermedades como en el caso del SIDA y el cáncer. La gran desventaja de estas terapias se debe al elevado número de medicamentos y dosis que el paciente debe tomar.

La interacción específica y con alta afinidad de un fármaco no es motivo suficiente para que de dicha interacción surja una acción farmacológica. Para que ello ocurra es preciso que el fármaco tenga el poder de modificar la diana en la forma necesaria a fin de que desencadene un efecto. La capacidad del fármaco para modificar a su diana e iniciar una acción es lo que se define como eficacia. Con frecuencia, pequeños cambios en la estructura de un fármaco modifican su eficacia lo que explica, por ejemplo, el hecho de encontrar agonistas y antagonistas para un mismo receptor celular dentro de una misma familia farmacológica.³²

Una vez se ha elegido la diana y el sistema de ensayo, el siguiente paso es encontrar un compuesto patrón, denominado líder o cabeza de serie, que muestre la actividad farmacológica deseada. Aunque el nivel de actividad del compuesto patrón puede no ser muy elevado, su estructura será el punto de partida que permitirá la preparación de otros compuestos, análogos estructurales del patrón, con mayor actividad y/o menores efectos secundarios.^{32b}

En la actualidad se dispone de muchas fuentes a las que recurrir para encontrar un compuesto patrón o cabeza de serie. A continuación, se describen las principales fuentes de las que se dispone.

1.3.2.a. Cribado de productos naturales

Hacia finales del siglo XIX, los productos naturales extraídos de las plantas y, más raramente, de animales formaban la base de la medicina terapéutica. Una gran parte de la actividad de muchas industrias farmacéuticas se ha

³² (a) Stephenson, R. P. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 106. (b) Negus, S. S. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1663. (c) Swinney, D. C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 801. (d) Wyllie, D. J.; Chen, P. E. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 541.

enfocado a encontrar en la Naturaleza nuevos y mejores fármacos. En la segunda mitad de la década de los 90 se ha producido un declive en el interés por los productos naturales, que han representado hasta esta fecha una fuente prioritaria de nuevos fármacos.³³

La complejidad estructural de muchos productos naturales ha sido, muy a menudo, percibida como un obstáculo, ya que puede imponer un auténtico desafío para la síntesis química y la derivatización durante los procesos de optimización del fármaco y puede tener un impacto negativo cuando se hace necesario el suministro de elevadas cantidades de fármaco. En la figura 1.4 se indican, a modo de ejemplo, las estructuras de algunos productos naturales empleados en el tratamiento de enfermedades bacterianas, del Parkinson o del cáncer.

El enorme avance realizado en los últimos años en la biología molecular y la farmacología ha permitido reinvestigar viejas estructuras de productos naturales y encontrar nuevas aplicaciones farmacológicas como inmunomoduladores, antibióticos, antitumorales, etc. Estos hallazgos han reactivado el estudio del mundo natural, del que sólo alrededor de un 10% de las plantas han sido estudiadas biológicamente.³⁴ Es conveniente indicar que en el transcurso de los últimos veinte años el mar se ha convertido en una importantísima fuente de productos naturales biológicamente activos.³⁵

³³ Para un artículo relacionado con el renacimiento de los productos naturales como candidatos a fármacos véase: Paterson, I.; Anderson, E. A. *Science*. **2005**, *310*, 451.

³⁴ Potier, P. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 113.

³⁵ (a) Jiménez, J. C.; Marfil, M.; Francesch, A. M.; Cuevas, C.; Alvarez, M.; Albericio, F. *Investigación y ciencia* **2007**, 365.

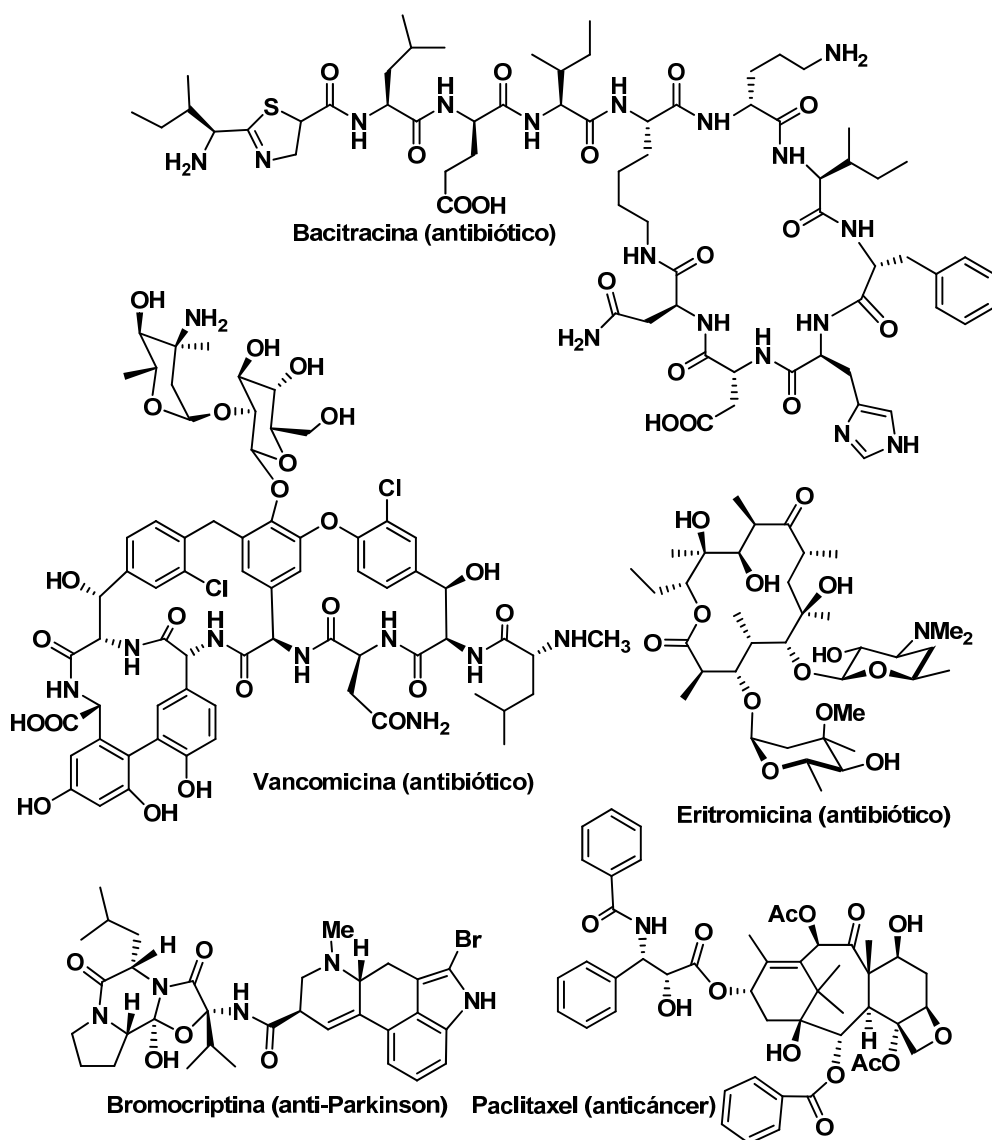


Figura 1.4. Ejemplos de productos naturales de utilidad terapéutica con diversos grados de complejidad estructural

1.3.2.b. Medicina tradicional

Las plantas y sus extractos se han empleado con propósitos medicinales desde los albores de la humanidad. Por diversas razones históricas y

culturales, este tipo de remedios siguen siendo muy populares hoy en día.³⁶ Desde el punto de vista químico los principios activos que explican la actividad farmacológica de los remedios de la medicina tradicional son metabolitos secundarios y por tanto productos naturales.

1.3.2.c. Cribado eficiente

Las técnicas de cribado eficiente, o cribado de alto rendimiento, del inglés *High Throughput Screening* (HTS), han hecho posible la realización simultánea de ensayos masivos *in vitro* en los que se evalúa la interacción de muchas de dianas farmacológicas con un gran número de potenciales fármacos de origen natural o sintético. Actualmente, se ha establecido como un método alternativo, y a la vez complementario, del HTS, el cribado en fragmentos (*fragment screening*). La idea principal de esta aproximación es la de partir de moléculas de un peso molecular más pequeño a las usadas en HTS y evolucionarlas adecuadamente. En este sentido, la aproximación busca establecer las bases para poder llevar a cabo un proceso relativamente estándar e identificar nuevas cabezas de serie, o moléculas pertenecientes a una clase estructural determinada, con potencial en un área terapéutica concreta.³⁷

1.3.2.d. Diseño racional de fármacos asistido por ordenador

A finales de la década de los años 80 se empezó a trabajar sobre la idea del llamado diseño racional de fármacos, o diseño de fármacos guiado por la estructura (SGDD, *Structure-Guided Drug Design*). En sus inicios, la metodología SGDD se dedicó a buscar nuevas cabezas de serie basadas en correlaciones entre la estructura del compuesto y su actividad biológica. De

³⁶ (a) Sáenz, D. *Farmacia* **2003**, *16*, 13. (b) Hu, G.-P.; Yuan, J.; Sun, L.; She, Z.-G.; Wu, J.-H.; Lan, X.-J.; Zhu, X.; Lin, Y.-C.; Chen, S.-P. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 514.

³⁷ (a) Alex, A. A.; Flocco, M. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1544. (b) Peláez, F. *An. Quim.* **2011**, *107*, 36.

ahí surgieron las siglas QSAR acrónimo de *Quantitative Structure-Activity Relationship*. Este método tiene en cuenta ciertos parámetros que representan las propiedades físicas o químicas de una serie de compuestos, los cuales son medidos o calculados al tiempo que se estudia su actividad biológica. Cuando estas propiedades han sido evaluadas en algunos miembros de una serie, se intenta establecer una ecuación que correlacione los parámetros elegidos con la potencia farmacológica de los compuestos.³⁸

De igual forma la estructura tridimensional de una proteína diana, obtenida habitualmente por difracción de rayos X sobre la proteína cristalizada, se emplea como punto de partida para generar *in silico* pequeñas moléculas con capacidad de interactuar con la proteína y que puedan servir de base para el desarrollo de nuevos fármacos. La estructura 3D sirve de base para la aplicación de programas informáticos que permiten predecir la conformación y la orientación de un ligando en el sitio de unión del receptor (*docking*).³⁹

1.3.2.e. La síntesis orgánica

La síntesis orgánica es actualmente indispensable en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. En palabras del profesor K. C. Nicolaou *la síntesis orgánica convierte en realidad una molécula y cuenta con gran potencial ya que el proceso de síntesis puede aplicarse en la investigación y desarrollo de soluciones para todo tipo de patologías, desde las cardiovasculares hasta las oncológicas, el SIDA o el Alzheimer*.⁴⁰

La aproximación sintética conduce en muchas ocasiones al desarrollo de nuevas moléculas con mejores propiedades farmacológicas que el producto natural y abre la vía a fármacos más seguros y eficaces. El estudio de la

³⁸ Dudek, A. Z.; Arodz, T.; Gálvez, J. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2006**, 9, 213. (b) Mittal, R. R.; McKinnon, R. A.; Sorich, M. J. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 1810. (c) Sprous, D. G.; Palmer, R. K.; Swanson, J. T.; Lawless, M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, 10, 619.

³⁹ Liljefors, T.; Petterson, I.; Schneider, G.; Fechner, U. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 649.

⁴⁰ Nicolaou, K. C. *Organic Synthesis in the international year of chemistry*. **2011**, 19 Simposio científico fundación Lilly. Véase también Nicolaou, K.; Montagnon, T. *Molecules that changed the world*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH, **2008**.

química y la biología de los productos naturales, y de las nuevas moléculas de ellos derivadas, implica un largo proceso que incluye la síntesis de compuestos que han sido elegidos por su novedosa estructura molecular, su actividad biológica y su mecanismo de acción.

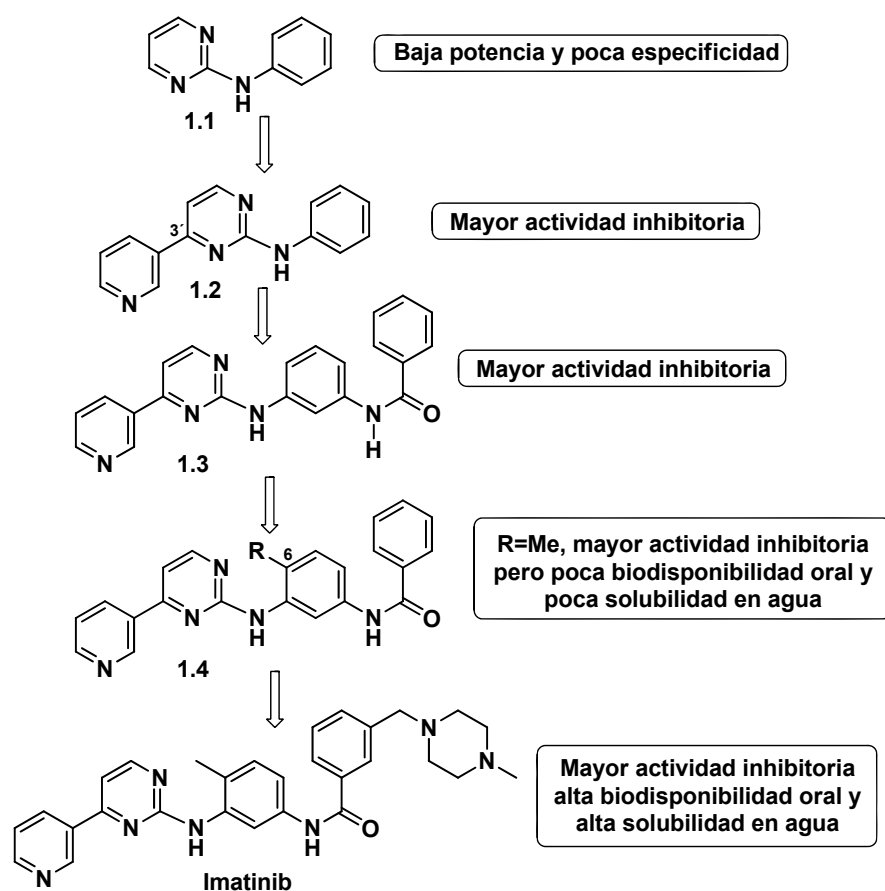
Con el potencial de la síntesis orgánica y con los constante avances en el campo de la biología, se han ido descubriendo nuevas estrategias y procesos, como la *Química Combinatoria*. Este término ha sido aplicado a aquella aproximación que permite sintetizar compuestos orgánicos en paralelo más que secuencial.⁴¹ Aunque inicialmente se ha utilizado esta metodología como una fuente de nuevas moléculas orgánicas, en la actualidad se aplica al descubrimiento de fármacos, incrementando la eficiencia con la que se generan los patrones, aumentando la optimización de patrones previamente identificados y generando moléculas para su validación sobre dianas. En cualquier caso, su aplicación es especialmente valiosa cuando se dispone de información previa de las relaciones estructura-actividad.

Un cabeza de serie obtenido mediante química combinatoria, o mediante cualquier otra metodología, necesita muy a menudo un proceso de optimización, esto es, su conversión en otros derivados que, por ejemplo, tengan restringida su libertad conformacional, lo que disminuye las posibilidades de interacción del compuesto con diferentes dianas. En cada ronda de derivatización las nuevas moléculas son sometidas a un proceso de caracterización biológica y farmacológica, y los mejores derivados son utilizados para una nueva fase de modificación, procediéndose a una mejora en todos los aspectos estudiados.

En el esquema 1.1 se indica el proceso de optimización del imatinib, un fármaco inhibidor de quinasas empleado en terapia antileucémica. El fármaco fue desarrollado en la empresa farmacéutica Ciba-Geigy (hoy Novartis) y el

⁴¹ Pozo-Carrero, M.; Albericio, F. *Revolución combinatoria*. Véase la versión on line en: <http://elfosscoentiae.cigb.edu.cu/PDFs/Muestras/chapter01.pdf>

proceso se inició al comprobar que el compuesto **1.1** mostraba actividad inhibitoria de quinasas.⁴² Un aumento de la actividad se consiguió con la adición de un grupo 3'-piridilo en la posición 3' del anillo pirimidínico (estructura **1.2**).



Esquema 1.1. Optimización de imatinib

La introducción de un grupo benzamido en el anillo fenílico aumentó aun más la actividad inhibitoria (estructura **1.3**). Un paso clave en el desarrollo del

⁴² (a) Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1221. (b) Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 187.

imatinib fue observar que las sustituciones en la posición 6 del anillo fenílico disminuían la actividad inhibidora (estructuras **1.4**). Por el contrario, la introducción de un grupo metilo en esta posición 6 del anillo fenílico retenía o incluso aumentaba la actividad contra tirosina-quinasa (estructura **1.4**, R=Me).

Los primeros compuestos con estructura **1.4** tenían poca biodisponibilidad oral y poca solubilidad en agua. La introducción de una cadena lateral polar, como la de *N*-metilpiperazina, aumentaba la solubilidad y la biodisponibilidad oral y originó el imatinib.

1.3.3. Desarrollo de fármacos

Después del proceso de descubrimiento de un fármaco se debe investigar su seguridad, eficacia, formulación y fabricación. Normalmente, los estudios de seguridad comienzan con diversos experimentos denominados estudios preclínicos. Cuando estos estudios prevén que el candidato a medicamento es seguro, se inicia su evaluación en seres humanos en una serie de ensayos clínicos.

1.3.3.a. Estudios preclínicos

Son pruebas que se llevan a cabo en un contexto científicamente controlado con utilización de cultivos celulares y animales como modelo. La finalidad de estos estudios es determinar las características fisicoquímicas, como solubilidad en agua, biodisponibilidad y características farmacocinéticas del compuesto con potencial farmacológico. Así, el candidato a fármaco debe tener poco efecto *first-pass* (metabolismo tras el primer paso por el hígado), presentar unión moderada a proteínas de plasma (<90%), tener un mínimo potencial para la modificación covalente de proteínas, generar un número limitado de productos metabólicos que, además, no sean farmacológicamente activos (salvo que se trate de un profármaco), ni químicamente reactivos

(potencialmente tóxicos), y que su metabolismo sea catalizado por múltiples isoenzimas de los citocromos CYP450. Cuando estos ensayos aportan las pruebas suficientes de que el candidato a fármaco es seguro, la industria farmacéutica presenta una solicitud de fármaco nuevo en investigación.

1.3.3.b. Ensayos clínicos

Son pruebas diseñadas para determinar la seguridad, la posología adecuada, la eficacia, las reacciones adversas y los efectos del uso a largo plazo de un medicamento nuevo en seres humanos. Una vez que el candidato a fármaco (dispositivo o procedimiento) ingresa en el proceso, debe atravesar varias fases:

Fase I. En esta fase se determina la seguridad de un nuevo tratamiento y la forma de administración, sea por vía oral o intravenosa. El medicamento pasa con éxito la fase I del ensayo si no provoca efectos secundarios graves.

Fase II. En esta fase se determina si la patología diana responde al fármaco. Se evalúa la efectividad del tratamiento y se evalúan los efectos secundarios. Si el nuevo tratamiento parece ser eficaz en un cierto porcentaje, pasa a estudio en fase III.

Fase III. En esta fase se estudia si el nuevo tratamiento es mejor, igual o menos eficaz que el tratamiento estándar o habitual. Estos ensayos son los más costosos y los que requieren más tiempo, de modo que duran un par de años o más, a fin de determinar la seguridad a largo plazo. Una vez finaliza con éxito la fase III, la industria farmacéutica promotora presenta una solicitud de fármaco a las autoridades sanitarias EMA en Europa o FDA en Estados Unidos. Si los correspondientes organismos reguladores aprueban el uso del medicamento, se permite la comercialización y venta del producto en el país o países

Fase IV. En esta fase se obtiene más información sobre el nuevo tratamiento, (ya aprobado en pacientes) para estudiar la inocuidad y eficacia en el curso del tiempo.

En promedio, el desarrollo completo del fármaco puede durar entre 10 y 15 años. La mayoría de los fármacos en investigación no lo consiguen. De cada 1.000 posibles nuevos descubrimientos, tan solo uno alcanzará la autorización.

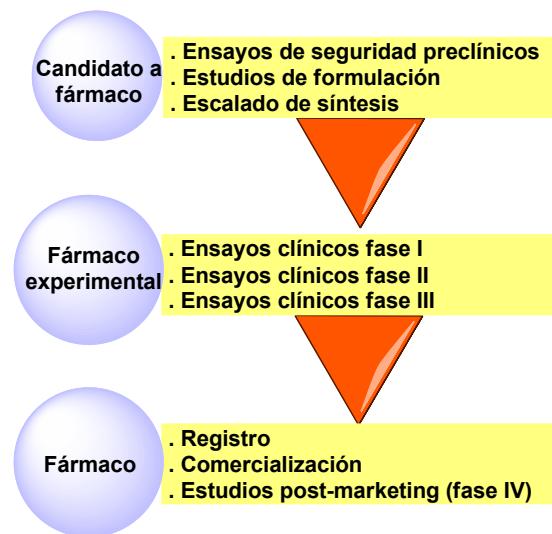


Figura 1.5. Etapas en el desarrollo de un fármaco a partir de un candidato

1.4. Fármacos antineoplásicos

Muchos agentes quimioterapéuticos ejercen su efecto citotóxico actuando en las fases del ciclo celular en las que se produce la replicación del ADN, la transcripción a ARN, la síntesis proteica o la mitosis. Atendiendo a su formación, estructura y componentes, resulta útil clasificar a los fármacos

anticancerígenos en función de su origen y de su principal mecanismo de acción.⁴³

1.4.1. Cisplatino y derivados

El cisplatino y sus derivados forman enlaces covalentes intra o intercatenarios en el ADN, inhibiendo su síntesis. Pueden alterar el transporte de aminoácidos a través de la membrana y alterar los canales de calcio por unión a proteínas citoplasmáticas. El cisplatino y sus derivados no son agentes específicos del ciclo celular aunque son más efectivos en fase G1.⁴⁴

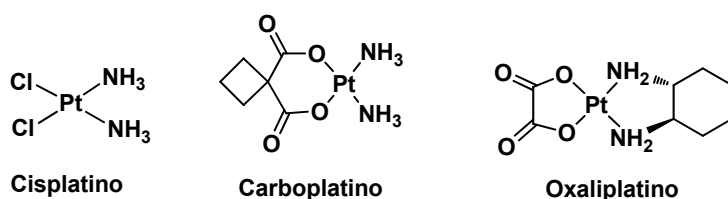


Figura 1.6. Estructuras de complejos de platino antitumorales

El carboplatino presenta menores efectos secundarios que el cisplatino, en especial en lo referente a los efectos neurotóxicos.⁴⁵ El carboplatino es menos efectivo que el cisplatino, pero su efectividad es mucho mayor contra determinados cánceres que no responden ante el cisplatino, tales como cánceres de ovario y las leucemias.⁴⁶

⁴³ (a) Sikic B. I. *Antineoplastic agents: Modern Pharmacology*, Craig R. and Stitzell R. (Eds.), Little, Brown, and Co. 2nd Edition **1986**, 797. (b) Para un listado de fármacos antitumorales del National Cancer Institute (NCI) véase: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/alphalist>

⁴⁴ (a) Fuertes M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Pérez, J. M. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 257. (b) Alderden, R. A.; D. Hall, M. D.; Hambley, T. W. *J. Chem. Ed.* **2006**, *83*, 728.

⁴⁵ Go, R.; Adjel, A. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 409.

⁴⁶ (a) Azzoli, C. G.; Kris, M. G.; Pfister, D. G. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 828. (b) Arriagada, R.; Bergman, B.; Dunant, A.; Le Chevalier, T.; Pignon, J. O. Vansteenkiste, J. *N. Eng. J. Med.* **2004**, *350*, 351. (c) van der Burg, M. E.; de Wit, R.; van Putten, W. L.; Logmans, A.; Kruit, W. H.; Stoter, G.; Verweij, J. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 19. (d) Wadler, S.; Yeap, B.; Vogl, S.; Carbone, P. *Cancer* **1996**, *77*, 733. (e) Knox, RJ et al. *Cancer Res.* **1986**, 1972. (f) Hirota, Y.; Miyamura, K.; Hayata, T.; Miyakawa, I. *Gynecol. Obstet. Invest.* **1997**, *44*, 70.

1.4.2. Agentes alquilantes

Estos fármacos se unen mediante enlaces covalentes a ADN y proteínas, impidiendo el proceso de replicación y transcripción de ARN.⁴⁷ Su acción tiene lugar en cualquier fase del ciclo celular y entre sus principales efectos secundarios destacan trastornos gonadales y carcinogénesis. Las estructuras de algunos fármacos antitumorales alquilantes se indican en la figura 1.7.

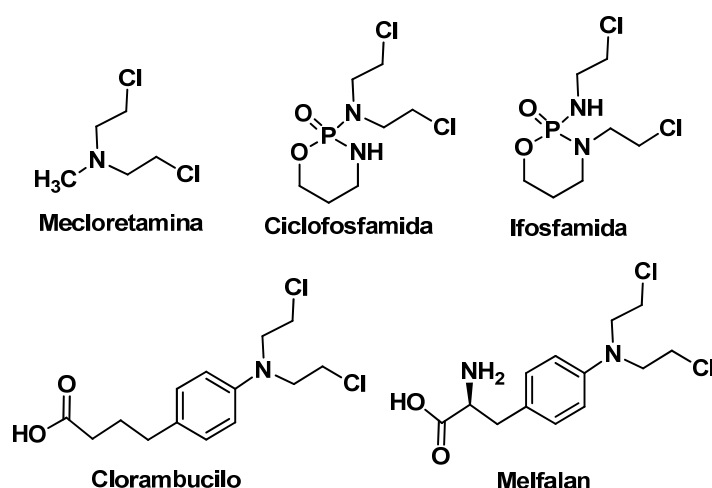


Figura 1.7. Estructuras de agentes alquilantes antitumorales

La ciclofosfamida (Genoxal[®])⁴⁸ y la ifosfamida (Tronoxal[®])⁴⁹ son agentes alquilantes bifuncionales. La ciclofosfamida también se utiliza como agente inmunodepresor por vía oral y se emplea en el tratamiento del linfoma de Hodgkin y no-Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda, linfoma de linfocitos T (micosis fungoides), mieloma múltiple,

⁴⁷ (a) Warwick, G. P. *Cancer Res.* **1963**, 23, 1315. (b) Oronsky, B. T.; Reid, T.; Knox, S. J.; Scicinski, J. J. *Transl. Oncol.* **2012**, 5, 226. (c) Hurley, L. H. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 188.

⁴⁸ Young, S. D.; Whissell, M.; Noble, J. C. et al. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 3092.

⁴⁹ Jahnke, K.; Thiel, E.; Bechrakis, N. E. et al. *J. Neurooncol.* **2008**, 93, 213.

neuroblastoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, cáncer de mama, testicular, endometrial, ovárico y pulmonar.⁵⁰

La ifosfamida se emplea en el tratamiento del cáncer testicular, sarcomas de tejido blando, linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.⁵¹

El clorambucilo se usa en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC), la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no-Hodgkin, el cáncer de mama, ovárico y testicular y el coriocarcinoma.⁵² El melfalan se emplea en el tratamiento del melanoma múltiple, cáncer de ovario, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma y cáncer de mama.⁵³

1.4.3. Antimetabolitos

Estos compuestos actúan en la fase de síntesis del ciclo celular interfiriendo en la síntesis de ADN y ARN. La mayoría son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división, razón por la que se pueden incorporar a las moléculas de ADN y ARN, y desde allí transmitir falsos mensajes. Otros agentes antimetabolitos inhiben enzimas específicos necesarios en la síntesis

⁵⁰ (a) Moschella, F.; Valentini, M.; Aricò, E.; Macchia, I.; Sestili, P.; D'Urso, M. T.; Alessandri, C.; Belardelli, F.; Enrico Proietti, E. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3528. (b) Gor, P. P.; Su, H. I.; Robert, H. I.; Gray, J.; Gimotty, P. A.; Horn, M.M.; Aplenc, T.; Vaughan, W. P.; Tallman, M. S.; Rebbeck, T. T.; DeMichele, A. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, R26. (c) Schiavoni, G.; Mattei, F.; Di Pucchio, T.; Santini, S. M.; Bracci, L.; et al. *Blood* **2000**, *95*, 2024. (d) Awwad, M.; North, R. J. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1649.

⁵¹ F. Boccardo, F.; Guglielmini, O. *Oncology* **2003**, *65*, 67.

⁵² (a) Eichhorst, B. F.; Busch, R.; Stilgenbauer, S.; Stauch, M. *Blood* **2009**, *114*, 3382. (b) Flinn, I. W.; Neuberg, D. S.; Grever, M. R.; et al. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 793.

⁵³ (a) Osher, D. J.; Kushner, Y. B.; Arseneau, J.; Foulkes, W. D. *Clin. Pathol.* **2011**, *64*, 924. (b) Pater, J. L.; Carmichael, J. A.; Krepart, G. V.; Fraser, R. C.; Roy, M.; Kirk, M. E.; Levitt, M.; Brown, L. B.; Wilson, K. S.; Shelley, W. E. *Cancer Treat. Rep.* **1987**, *71*, 277. (c) Davis-Perry, S.; Hernandez, E.; Houck, K. L. Shank. R. A. M. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *26*, 429. (d) Hasan, J.; Jayson, G. C. *British J. Cancer* **2003**, *88*, 1828. (e) Morrison, V. A.; Rai, K. A.; Peterson, B. L.; Kolitz, J. E.; et al. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 3611.

de compuestos esenciales. Su eficacia es máxima cuando la proliferación celular es rápida.⁵⁴

Entre los fármacos antimetabolitos se encuentran los antagonistas del ácido fólico, como el metotrexato y el raltitrexed (Tomudex®).

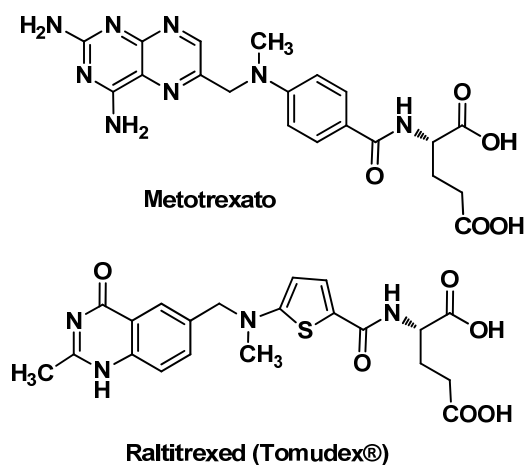


Figura 1.8. Estructuras del metotrexato y del raltitrexed

Los antagonistas del ácido fólico destruyen células durante la fase S del ciclo celular y tienen su mayor eficacia cuando aquéllas inician la fase logarítmica de su proliferación. El más utilizado es el metotrexato o ameopterinina (MTX), que se comporta como un inhibidor de la dihidrofolato-reductasa, enzima limitante de la vía que transforma el ácido fólico en ácido folínico, metabolito activo que actúa como cofactor en reacciones de transferencia de grupos monocarbonados. El MTX, como casi todos los antimetabolitos, muestra selectividad parcial por células tumorales y toxicidad contra las células normales en división rápida, como las de la médula ósea y las del epitelio gastrointestinal. Actualmente el MTX es el medicamento de

⁵⁴ (a) Oronsky, B. T.; Reid, T.; Knox, S. J.; Scicinski, J. J. Bryan T. *Expert Opin. Pharmacotherap.* **2001**, 2, 409. (b) Longley, D. B.; Harlan, D. P.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 330.

primera línea en el tratamiento de algunas enfermedades neoplásicas como la leucemia linfoblástica aguda.⁵⁵

El raltitrexed (Tomudex®) es un análogo del metotrexato. Inhibe la timidilato-sintetasa, enzima que interviene en uno de los pasos clave en la síntesis del nucleótido timidina catalizando la conversión de 2-desoxiuridina-5'-fosfato a timidina-5'-fosfato.⁵⁶ El raltitrexed se emplea en el tratamiento paliativo⁵⁷ del cáncer colorrectal avanzado.⁵⁸

Otros agentes antimetabolitos son los análogos de las bases púricas y pirimidínicas (véase la figura 1.9). El 5-fluorouracilo (5-FU) es un derivado del uracilo que ataca a las células mediante inhibición de la timidilato-sintetasa.⁵⁹ El 5-FU se emplea en la monoterapia o terapia combinada en el tratamiento paliativo, adyuvante⁶⁰ y coadyuvante del cáncer de mama, esófago, estómago, hígado (tumor primario), colon y recto y también en el tratamiento paliativo del cáncer de cabeza y cuello, vejiga, riñón, próstata, cérvix, endometrio, ovario y páncreas.⁶¹

⁵⁵ Murphy, S. B.; Bowman, W. P.; Abramowitch, M.; Mirro, J.; Ochs, J.; Rivera, G.; Pui, C. H.; Fairclough, D.; Berard, C. W. *J. Clin. Oncol.* **1986**, *12*, 1732.

⁵⁶ (a) Widemann, B. C.; Balis, F. M.; Godwin, K. S.; McCully, C.; Adamson, P. C. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *44*, 43. (b) Forastiere, A. A.; Metch, B.; Schuller, D. E.; et al. *J. Clin. Oncol.* **1992**, *10*, 1245. (c) Myron, A. *Am. J. Surg.* **1976**, *4*, 536. (d) Rosenfelt, F. *Yale J. Biol. Med.* **1975**, *48*, 97.

⁵⁷ Administración de quimioterapia para controlar los síntomas sin esperar que reduzca el cáncer de manera significativa.

⁵⁸ Cunningham, D.; Zalberg, J.; Maroun, J.; James, R.; Clarke, S.; Maughan, T. S.; Vincent, M.; Schulz, J.; González Baróni, M.; Facchini, T. *Euro. J. Cancer (Spanish Ed.)* **2002**, *2*, 97.

⁵⁹ Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 330.

⁶⁰ Administración de quimioterapia para destruir las células que pueden haber quedado en el cuerpo una vez extirpado, por vía quirúrgica, el tumor primario. La quimioterapia adyuvante sirve para prevenir una posible reaparición del cáncer.

⁶¹ (a) García M. A.; Carrasco, E.; Aguilera, M.; Alvarez, P.; Rivas, C.; et al. *PLOS ONE* **2011**, *6*(8): e23887. (b) André, T.; Boni, C.; Moudedij-Boudiaf, L. Navarro, M.; Tabernero, J.; Hickish, T.; Topham, C.; Zaninelli, M.; Clingan, P.; Bridgewater, J.; Tabar-Fisch, I.; de Gramont, A. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2343. (c) Dodovi, M. G.; Fredro, K.; Kumbaradzi, E.; Goracinova, K.; Calis, S.; Simonoska, M.; Hincal, A. A. *Acta Pharm.* **2003**, *53*, 241. (d) Cullen, S. I. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1979**, *27*, 529.

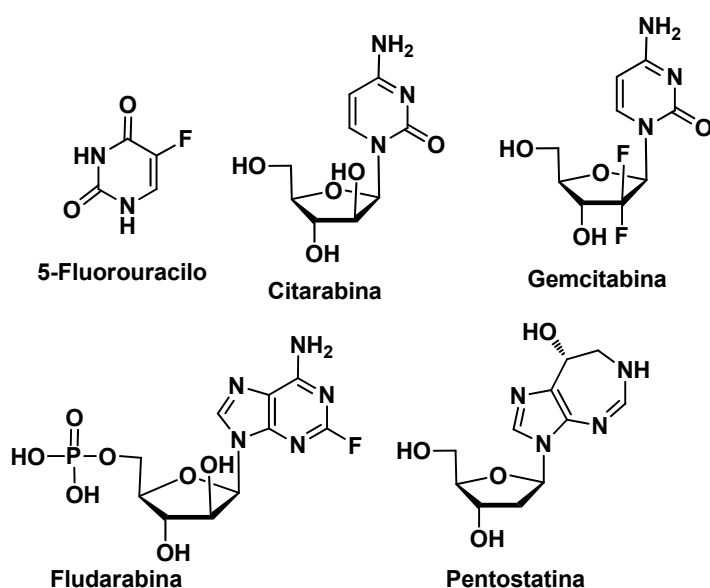


Figura 1.9. Estructuras de fármacos antitumorales antimetabolitos

La citarabina es un análogo de citidina que inhibe competitivamente la ADN-polimerasa y puede inhibir débilmente la actividad de la ADN-ligasa, enzima responsable de los procesos de reparación.⁶² La citarabina se emplea en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y del linfoma no-Hodgkin.

La gemcitabina (Gemzar[®]) se emplea en el tratamiento del cáncer de vejiga localmente avanzado o metastático, cáncer de pulmón no microcítico localmente avanzado o metastático y, en combinación con cisplatino, en el tratamiento del cáncer de mama metastático o localmente avanzado y del carcinoma epitelial de ovario localmente avanzado o metastático.⁶³

⁶² (a) Ogbomo, H.; Michaelis, M.; Klassert, D.; Doerr, H. W.; Cinatl, J. *Neoplasia* **2008**, *10*, 1402. (b) Wang, W. S.; Tzeng, C. H.; Chiou, T. J.; et al. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **1997**, *27*, 154.

⁶³ (a) Komori, S.; Osada, S.; Yoshida, K. *Oncology* **2011**, doi:10.5402/2011/936893. (b) Ashida, R.; Nakata, B.; Shigekawa, M.; Mizuno, N.; Sawaki, A.; Hirakawa, K.; Arakawa, T.; Yamao, K.; *J. Exp. Clin. Canc. Res.* **2009**, *28*, 83. (c) Toschi, L.; Cappuzzo, F. *OncoTarg. Ther.* **2009**, *2*, 209. (d) Oettle, H.; Post, S.; Neuhaus, P. et al. *J. Am. Med. Assoc.* **2007**, *297*, 267. (e) Moore, M. J.; Goldstein, D.; Hamm J.; et al. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 1960. (f) Suzuki, E.; Sun, J.; Kapoor, V.; Jassar, A. S.; Albelda, S. M. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 880. (g) Burris, H. A.; Moore, M. J.; Andersen, J.; et al. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 2403.

La fludarabina (Beneflur[®])⁶⁴ es un análogo de nucleótido que interrumpe la elongación de ADN y ARN e inhibe la actividad de varias enzimas como ADN y ARN-polimerasas, ADN-primasa, ADN-ligasa y ribonucleótido-reductasa. Actúa sobre el tejido maligno linfoproliferativo y se emplea en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica.⁶⁵

La pentostatina (Nipent[®])⁶⁶ es capaz de inhibir la enzima adenosín-desaminasa, incrementando la concentración intra y extracelular de la adenosina, lo que provoca linfotoxicidad e inmunodepresión.⁶⁷

1.4.4. Inhibidores de topoisomerasas

Muchos compuestos anticancerígenos son de origen natural,⁶⁸ como la camptotecina, alcaloide aislado de la planta *Camptotheca acuminata*. La camptotecina y sus derivados, topotecan e irinotecan, inhiben la topoisomerasa I.⁶⁹ Las topoisomerasas son enzimas nucleares que controlan, mantienen y modifican las estructuras y la topología del ADN durante los procesos de replicación y transcripción del ADN.

La topoisomerasa I disminuye la tensión de torsión de la doble hélice de ADN durante la replicación y la transcripción, rompiendo de forma transitoria una de las cadenas de la doble hélice mediante la formación de un complejo ADN-topoisomerasa y volviéndola a soldar. La camptotecina y sus derivados se fijan al complejo ADN-topoisomerasa e impiden que se produzca la soldadura de la doble hélice. La citotoxicidad de estos compuestos es máxima

⁶⁴ Rai, K. R.; et al.. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1750.

⁶⁵ (a) Eichhorst, B. F.; Busch, R.; Hopfinger, G.; Pasold, R.; Hensel, M.; Steinbrecher, C.; Siehl, S.; Jäger, U.; Bergmann, M.; Stilgenbauer, S.; Schweighofer, C.; Wendtner, C. M.; Döhner, H.; Brittinger, G.; Emmerich B.; Hallek., M. *Blood* **2006**, *107*, 885. (b) Gregoire, V.; Van, N. T.; Stephens, L. C.; Brock, W. A.; Milas, L.; Plunkett, W.; Hittelman, W. N. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 6201.

⁶⁶ Sauter, C.; Lamanna, N.; Weiss, M. A. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1217.

⁶⁷ Bryson; H. M.; Sorkin; E. M. *Drugs.* **1993**, *46*, 872.

⁶⁸ Navarro, M. C. *Revista de fitoterapia.* **2005**, *5*, 41.

⁶⁹ Pommier Y. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 789.

cuando se inicia la síntesis del ADN en la fase S del ciclo celular ocasionando una parada del ciclo celular en la fase G2.⁷⁰

El irinotecan presenta una ventana terapéutica más ancha que la camptotecina, mostrando un potente efecto anticancerígeno. La actividad del irinotecan se debe al fármaco nativo y a un metabolito, el SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina, véase la figura 1.10), que es unas 1.000 veces más potente que el irinotecan.

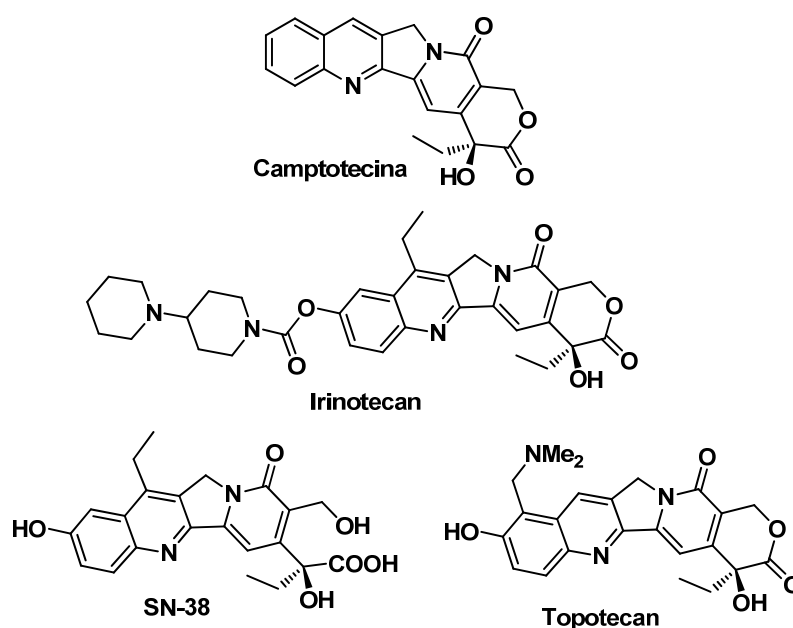


Figura 1.10. Estructuras de inhibidores de la topoisomerasa I

El irinotecan, en combinación con el 5-fluoruracilo y la leucovorina, es considerado como el régimen de elección en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico.⁷¹ La reacción más adversa de este fármaco es la leucopenia.

⁷⁰ Staker, B. L. et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15387.

⁷¹ Saltz, L. B.; Cox, J. V.; Blanke, C.; Rosen, L. S. et al. *N. Eng. J. Med.* **2000**, *343*, 905.

El etopósido (VP-16, Vepesid[®], Eposin[®], Etonco[®]) y el tenipósido (VM-26, Vumon[®]) son glucósidos semisintéticos de la podofilotoxina, producto natural extraído del *Podophyllum peltatum*.⁷² Estos compuestos ejercen su acción antitumoral formando un complejo con la topoisomerasa II y el ADN que provoca rupturas en la doble hélice del ADN, impidiendo la entrada de la célula en la fase G2.⁷³

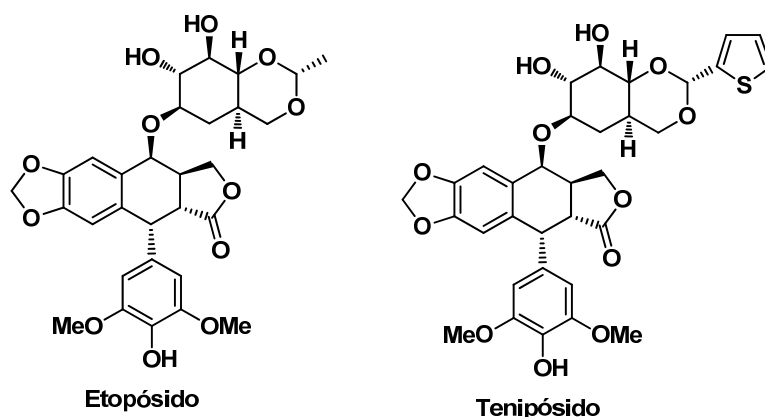


Figura 1.11. Estructuras de inhibidores de la topoisomerasa II

El etopósido se emplea en el tratamiento del cáncer pulmonar microcítico, en la leucemia monocítica y mielomonocítica aguda y en el tratamiento del linfoma no-Hodgkin.⁷⁴

1.4.5. Antibióticos antitumorales

Son de origen y estructura muy diversos pudiendo actuar como intercalantes de ADN, inhibidores de topoisomerasa, etc. La mayoría no son

⁷² Gordaliza, M.; García, P. A.; del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gómez-Zurita, M. A. *Toxicol* **2004**, *44*, 441.

⁷³ Markovits, J.; Pommier, Y.; Kerrigan, D.; Covey, J. M.; Tilchen, E. J.; Kohn, K. W. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2050.

⁷⁴ (a) van Maanen, J. M. S.; Retel, J.; de Vries, J.; Pinedo, H. M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *80*, 1526. (b) Hande, K. R. *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1514. (c) Hainsworth, J. D.; Greco, F. A. *Annals. Oncol.* **1995**, *6*, 325.

específicos del ciclo celular.⁷⁵ Las antraciclinas, como la daunorrubicina, la doxorubicina, la epirubicina y la idarrubicina forman parte de este grupo de fármacos (véase la figura 1.12).

La daunorrubicina, obtenida de *Streptomyces peucetius* y su derivado 14-hidroxilado, la doxorubicina (adriamicina), se emplean en el tratamiento de algunos tipos específicos de leucemia, tales como la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfocítica aguda.⁷⁶

La epirubicina (Farmorubicina®) se emplea como tratamiento adyuvante en mujeres con cáncer de mama que se han sometido a cirugía con afectación de los nódulos linfáticos.⁷⁷ La idarrubicina (Zavedos®) se emplea en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoblástica aguda.⁷⁸

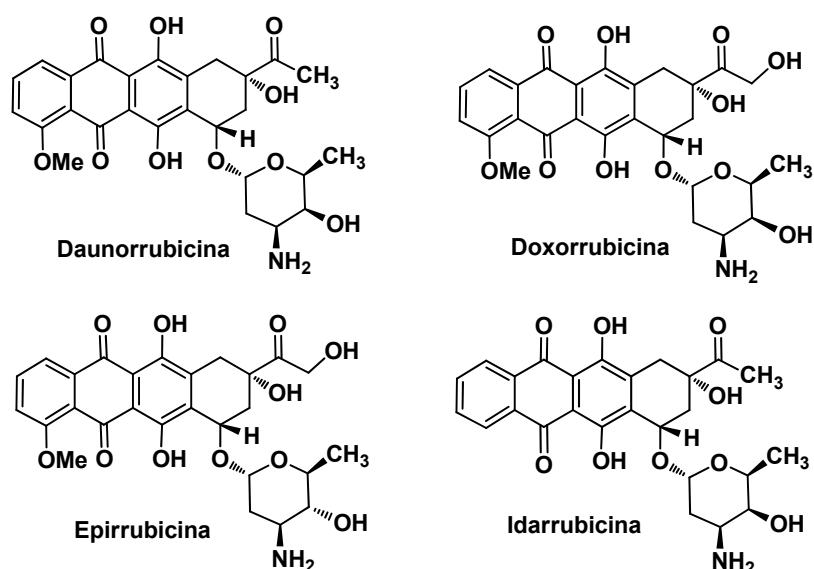


Figura 1.12. Estructuras de antibióticos antitumorales

⁷⁵ Galm, U.; Hager, M. H.; Van Lanen, S. G.; Ju, J.; Thorson, J. S.; Shen, B. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739.

⁷⁶ Tan, C.; Tasaka, H.; Yu, K. P.; Murphy, M. L.; Karnofsky, D. A. *Cancer* **1967**, *20*, 333.

⁷⁷ (a) Poole, C. J., Earl, H. M.; Hiller, L.; et al. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1851. (b) Crump, M.; Tu, D. S.; Shepherd, L.; Levine, M.; Bramwell, V.; Pritchard, K.; *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 3066.

⁷⁸ (a) Borchmann, P.; Hubel, K.; Schnell, R.; et al. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1997**, *35*, 80. (b) Boccardo, F.; Cannata, D.; Cussotto M, et al. *Cancer Chemother. Pharmacol* **1996**, *38*, 102.

Las bleomicinas son una familia de glicopéptidos biosintetizados por la actinobacteria *Streptomyces verticillis*. Estos compuestos actúan produciendo rupturas en las hebras del ADN. La susceptibilidad a la bleomicina es máxima en fase G2, pero también actúa en la fase G1.

La bleomicina (véase la figura 1.13) se emplea en el tratamiento de cánceres de células escamosas, melanoma, sarcoma, cáncer testicular, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin.⁷⁹

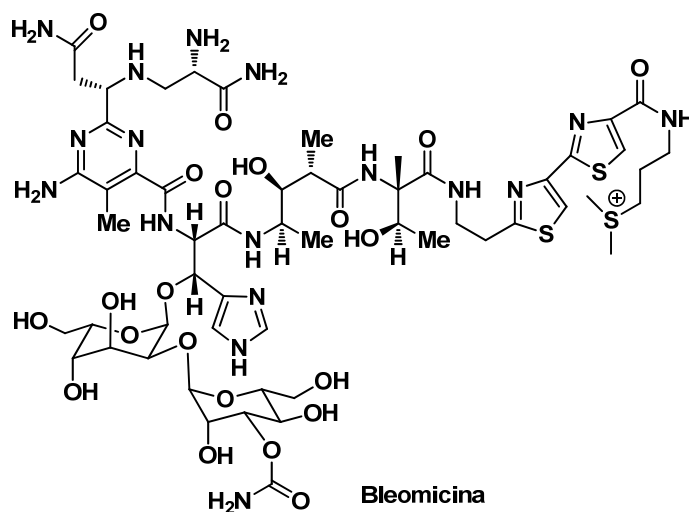


Figura 1.13. Estructura de la bleomicina

1.4.6. Inhibidores de la mitosis

Estos compuestos ejercen su acción citotóxica mediante unión a la tubulina, inhibiendo la formación de microtúbulos (alcaloides de la Vinca) o,

⁷⁹ (a) Harada, T.; Nishikawa, Y.; Suzuki, T.; Ito, K.; Shozo, B. *Am. J. Surg.* **1971**, *122*, 53. (b) Bonadonna, G.; Zucali, R.; Monfardini, S.; De Lena, M.; Uslenghi, C. *Cancer* **1975**, *36*, 252. (c) Shapshay, S. M.; Hong, W. K.; Incze, J. S.; Sismanis, A.; Bhutani, R.; Vaughn, C. W.; Strong, M. *S. Am. J. Surg.* **1980**, *140*, 543. (d) Wu, X.; Gu, J.; Hong, W. K.; Lee, J. J.; Amos, C. I.; Jiang, H.; et al. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1393. (e) Tesch, H.; Diehl, V.; Lathan, B.; Hasenclever, D.; Sieber, M.; Rüffer, U.; Engert, A.; Franklin, J.; Pfreundschuh, M.; Schalk, K. P.; Schwieder, G.; Wulf, G.; Dölken, G.; Worst, P.; Koch, P.; Schmitz, N.; Brunsch, U.; Tirier, C.; Müller, U.; Loeffler M. *Blood* **1998**, *92*, 4560. (f) Linge, A.; Morishima, N.; Kasper, M.; Barth, K. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 1343.

por el contrario, estabilizándolos (taxanos). Son activos en la fase de mitosis del ciclo celular, provocando su cese en metafase.⁸⁰ De estos compuestos se hablará con más detalle en la sección 1.7.

1.4.7. Antagonistas de receptores hormonales

En estas terapias se emplean fármacos, entre los que se incluyen estrógenos, antiestrógenos, inhibidores de la aromatasa, progesteronas, andrógenos y antiandrógenos, que ejercen su acción antitumoral interfiriendo la producción de hormonas. Este tipo de terapias se asocia con menos efectos secundarios que las quimioterapias, lo que la hace apropiada como tratamiento preventivo.⁸¹

Entre los antiestrógenos cabe destacar el tamoxifeno (véase la figura 1.14), que se emplea como terapia complementaria en el tratamiento del cáncer de mama, actuando como modulador selectivo de los receptores estrogénicos. Su mecanismo de acción se basa en su efecto antiestrogénico, uniéndose al sitio receptor del estrógeno en las células cancerosas y bloqueando la entrada del estrógeno en la célula tumoral. Esta acción interfiere en el crecimiento celular, provocando con ello la muerte de la célula. El tamoxifeno no es útil en todos los cánceres de mama, sino únicamente en aquellos cuyas células presentan receptores específicos para estrógenos.⁸²

La medroxiprogesterona (Progevera®) y el megestrol (Megestrol®, Borea®, Maygace®) son progestágenos y exhiben efectos antiestrogénicos mediante unión al sitio receptor de estrógenos. Se emplean en el tratamiento del cáncer de mama y en el de endometrio.

⁸⁰ Jiang, N.; Wang, X.; Yang, Y.; Dai, W. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 885.

⁸¹ Denmeade S. R.; Isaacs, J. T. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 389.

⁸² (a) Jordan, V. C. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, S269. (b) Howell, A.; Cuzick, J.; Baum, M.; Buzdar, A.; Dowsett, M.; Forbes, J. F.; Hoctin-Boes, G.; Houghton, J.; Locker, G. Y.; Tobias, J. S. *Lancet* **2005**, *365*, 60. (c) Blackwell, K. L.; Haroon, Z. A.; Shan, S.; Saito, W.; Broadwater, G.; Greenberg, C. S.; Dewhirst, M. W. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4359. (d) Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. *Cell* **1998**, *95*, 927. (e) Anelli, T. F.; Anelli, A.; Tran, K. N. et al. *Cancer* **1994**, *74*, 74. (f) Ribeiro, G.; Swindell, R. *Br. J. Cancer* **1992**, *65*, 252.

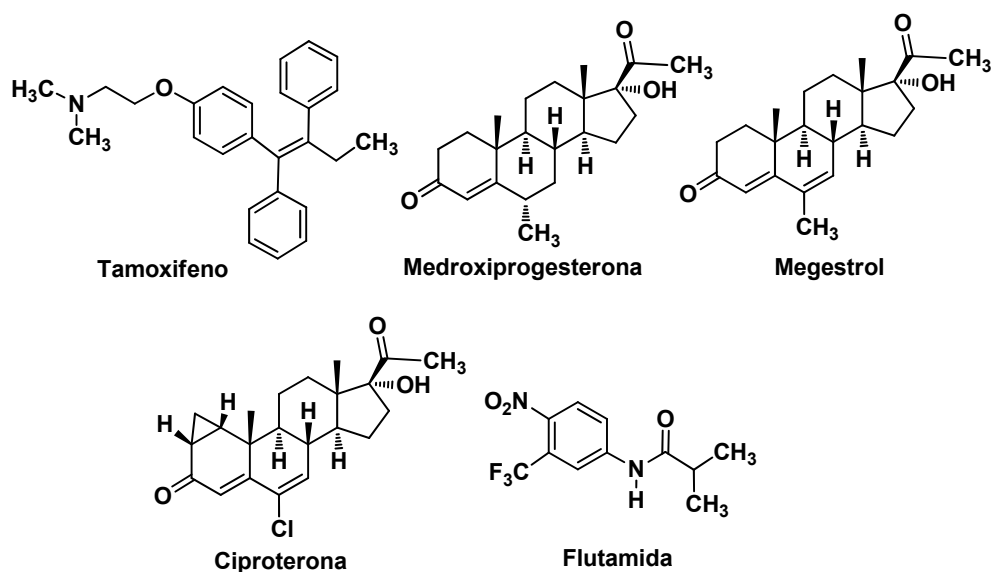


Figura 1.14. Estructuras de compuestos empleados en terapias hormonales anticancerígenas

Los antiandrógenos bloquean la acción de la hormona testosterona, cuya acción descontrolada se manifiesta en el cáncer de próstata. La ciproterona (Androcur[®])⁸³ y la flutamida (Eulexin[®], Prostacur[®])⁸⁴ son antagonistas androgénicos que se emplean en el tratamiento del cáncer de próstata asociados a agonistas de la GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropina).

1.4.8. Inhibidores enzimáticos de la síntesis de hormonas

La finasterida (Proscar[®]) es un fármaco antiandrogénico no hormonal derivado de los esteroides que se emplea en el tratamiento de la hiperplasia benigna del cáncer de próstata.⁸⁵ No es un antagonista androgénico, como la flutamida, ya que no bloquea los receptores androgénicos en el citoplasma ni en el núcleo celular. Su modo de acción se basa en la inhibición competitiva

⁸³ Lopez, M.; Natali, M.; Di Lauro, L. et al. *Cancer* **1993**, 72, 502.

⁸⁴ Labrie, F.; Dupont, A.; Belanger, A. et al. *Clin. Invest. Med.* **1990**, 13, 275. (b) Doberauer, C.; Niederle, N.; Schmidt, C. G. *Cancer* **1988**, 62, 474.

⁸⁵ Vickers, A. J.; Savage, C. J.; Lilja, H. *J. Clin. Oncol.* **2010**, 28, 1112.

de la enzima 5-alfa-reductasa de tipo II, que transforma la testosterona en dihidrotestosterona.

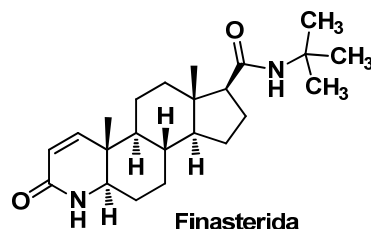


Figura 1.15. Estructura de la finasterida

El anastrozol (Arimidex[®]) y la aminoglutetimida bloquean la conversión de andrógenos en estrógenos al inhibir la acción de la aromatasa. Estos fármacos se emplean en el tratamiento del cáncer de mama estrógeno-dependiente.⁸⁶

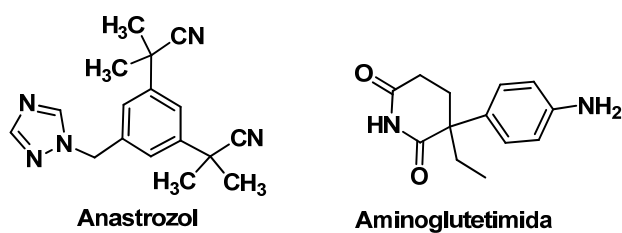


Figura 1.16. Estructuras de inhibidores de la aromatasa

El mitotano (Lysodren[®]) es un inhibidor funcional de las glándulas corticosuprarrenales y modifica además el metabolismo periférico de los corticosteroides endógenos. El fármaco es capaz de inducir un estado de

⁸⁶ Giordano, S. H.; Valero, V.; Buzdar, A. U.; Hortobagvi, G. N. *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**, *25*, 235.

insuficiencia suprarrenal, con el fin de contrarrestar los síntomas del síndrome de Cushing asociados al adenocarcinoma suprarrenal.⁸⁷

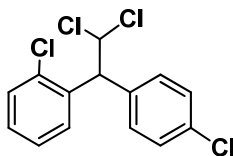


Figura 1.17. Estructura del mitotano

El efecto citotóxico del mitotano se debe a la unión covalente de ciertos metabolitos del fármaco (acil-cloruro), con proteínas mitocondriales de las células corticosuprarrenales que actúan como agentes nucleófilos. El mitotano modifica el metabolismo periférico de los corticosteroides complementando el efecto sobre las células corticosuprarrenales. El efecto final es una reducción drástica de los niveles sanguíneos de los 17-hidroxicorticosteroides fisiológicos.

La prednisona es un fármaco corticoesteroide que se administra a los pacientes como parte del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, sobre todo durante la fase de inducción.⁸⁸

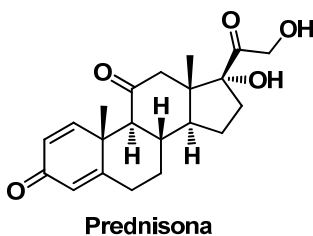


Figura 1.18. Estructura de la prednisona

⁸⁷ (a) Cerquetti, L.; Bucci, B.; Marchese, R.; Misiti, S., et al. *Endocr. Relat. Cancer* **2008**, *15*, 623. (b) Cai, W.; Counsell, D. E.; Schteingart, D. E.; Sinsheimer, J. E.; Vaz, A. D.; Wotring L. L. *Cancer Chemoth. Pharm.* **1997**, *39*, 537.

⁸⁸ (a) Shamson, E.; Miller, S. *N Engl. J. Med.* **1962**, *266*, 1354. (b) Ryalls, M. R.; Pinkerton C. R.; Meller, S. T.; Talbot, D.; McElwain, T. *J. Med. Pediatr. Oncol.* **1992**, *20*, 119. (c) S Yetgin S.; Tuncer M. A.; Çetin M.; Gümrük F.; Yenicesu I.; Tunç, B.; Öner A. F.; Toksoy, H.; Koç, A.; Aslan, D.; Özyürek, E.; Olcay, L.; Atahan, L.; Tunçbilek, E.; Gürgey, A. *Leukemia* **2003**, *17*, 328.

1.4.9. Modificadores de la respuesta biológica

Los modificadores de la respuesta biológica existen de forma natural en el organismo. Su función es la de alterar la interacción entre las defensas inmunes del cuerpo y las células cancerosas para reforzar, dirigir o restaurar la capacidad del cuerpo de combatir la enfermedad.

El levamisol, conocido también por su nombre comercial Ergamisol[®], fue descubierto por la compañía Janssen Pharmaceutica en 1966 y, aunque se ha usado en humanos fundamentalmente para el tratamiento de parásitos, se ha estudiado también en combinación con otras formas de quimioterapia para el cáncer de colon, melanoma y cáncer de cabeza y cuello, ya que normaliza la función de linfocitos T, fagocitos mononucleares y leucocitos polimorfonucleares. El fármaco fue retirado de los EE.UU. y los mercados de Canadá en 2000 y 2003, respectivamente, debido al riesgo de efectos secundarios graves y la disponibilidad de otros medicamentos sustitutivos más eficaces.

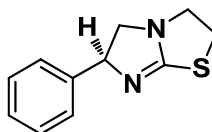


Figura 1.19. Estructura del levamisol

Los interferones son otro tipo de fármacos anticancerígenos que actúan modificando la respuesta biológica. Estos compuestos son producidos de forma natural por el sistema inmunitario de la mayoría de los animales como respuesta a células cancerígenas y agentes externos como los virus. De los tres tipos principales de interferones, el alfa es el más ampliamente usado en el tratamiento del cáncer, siendo empleado en el tratamiento del melanoma, de la leucemia de células pilosas, de la leucemia mieloide crónica y del sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA. Se ha demostrado que el

interferón alfa también puede ser efectivo en el tratamiento de otros cánceres como el cáncer de riñón y el linfoma no-Hodgkin.⁸⁹

Otras terapias biológicas, como las que emplean anticuerpos monoclonales, vacunas antitumorales o inmunoconjugados, ya han sido explicadas en otros apartados de esta memoria.

1.5. El ciclo celular y los fármacos antitumorales

En la figura 1.20 se muestra la relación entre las distintas fases del ciclo celular y el punto de actuación de algunos de los fármacos antineoplásicos más utilizados en los tratamientos anticáncer. La fase G1, indicada en verde, es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN.

En la fase G1 la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas. En un cierto momento de G1 se llega al *punto de no retorno* o *punto R* (*punto de Restricción*), en el que la célula se ve obligada a seguir con el ciclo, es decir, debe completar el resto del proceso. La llegada al *punto R* está determinada por factores de crecimiento. Una vez sobrepasado este punto actúan otras moléculas que conducen a la célula a la etapa S. Si no se alcanza el *punto R* el ciclo celular se detiene. Cerca del final de G1 se sintetizan muchas proteínas, entre ellas las histonas, que se dirigen al núcleo. También se sintetizan los microtúbulos, las enzimas de la replicación (ADN Pol, las del replisoma, etc) y se aumenta el tamaño de los centríolos. La fase G1 tiene una duración de entre 6-12 horas.

⁸⁹ (a) Smalley, R. V.; Andersen, J. W.; Hawkins, M. J.; Bhide, V.; et al. *N. Engl. J. Med.* **1992**, 327, 1336. (b) Foon, K. A.; Sherwin, S. A.; M. D., Abrams, P. G.; Longo, D. L.; et al. *N. Engl. J. Med.* **1984**, 311, 1148. (c) Louie, A. C.; Gallagher, J. G.; Sikora, K.; Levy, R.; Rosenberg, S. A.; Merigan T. C. *Blood*, **1981**, 58, 712. (d) Merigan, T. C.; Sikora, K.; Breeden, J. H.; Levy, R.; Rosenberg, S. A. *N. Engl. J. Med.* **1978**, 299, 1449.

La segunda fase del ciclo celular es la fase S, indicada en rojo en la figura 1.20. En esta fase se produce la replicación o síntesis del ADN, se ensamblan las proteínas del nucleosoma, se forman las fibras de cromatina y se duplican los centriolos. El resultado final es la duplicación de los cromosomas, que quedan formados por dos cromátidas idénticas. La fase S dura entre 10-12 horas en una célula de mamífero y ocupa alrededor de la mitad del tiempo del ciclo celular.

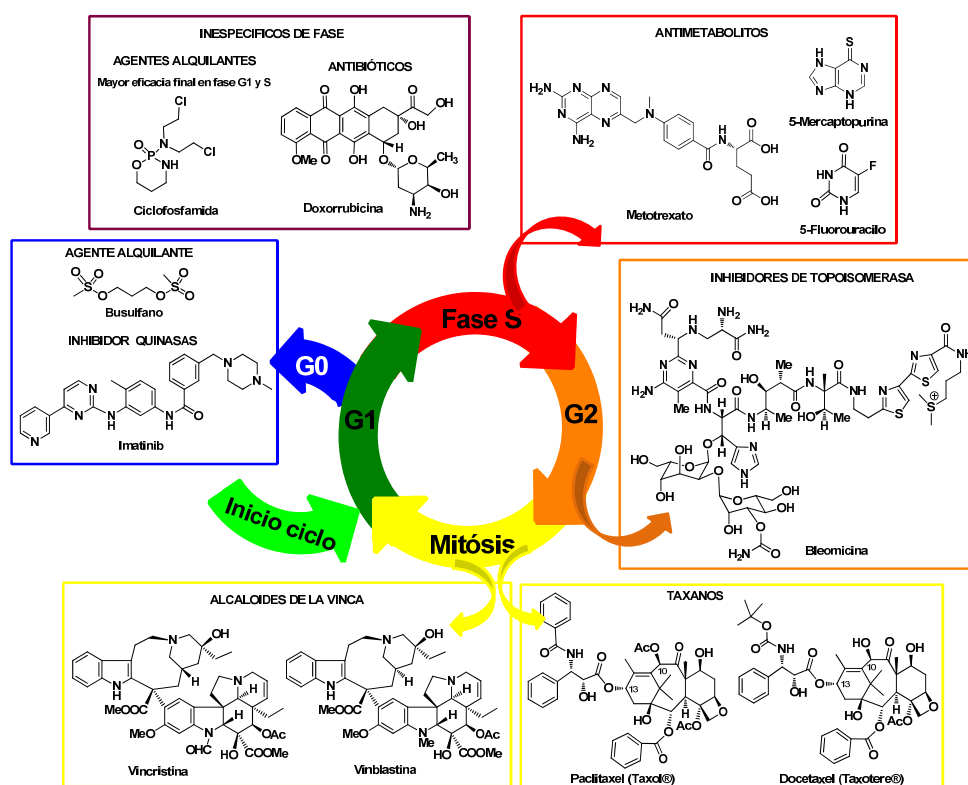


Figura 1.20. Relación entre el ciclo celular y los fármacos antineoplásicos

La tercera fase es la G2, coloreada en naranja en la figura 1.20. En esta fase se continúa la síntesis de proteínas y ARN. Tiene una duración entre 3 y 4 horas y termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis.

La cuarta fase es la de mitosis, coloreada en amarillo en la figura 1.20. En esta fase la célula progenitora se divide en dos células hijas idénticas. Esta fase comprende la profase, metafase, anafase, telofase y la citocinesis, que se inicia ya en la telofase mitótica.

La profase es la fase más larga de la mitosis y en ella se produce la condensación del material genético (ADN, que en interfase existe en forma de cromatina) formando unas estructuras altamente organizadas: los cromosomas. Los centriolos se mueven para ocupar los polos opuestos de la célula. Empiezan a desarrollarse los microtúbulos, que irradian desde los centriolos, denominados en este punto ásteres. La membrana nuclear se desintegra y las fibras del huso mitótico aparecen en el citoplasma.

En la metafase los centrómeros de los cromosomas se congregan en la "placa metafásica" o "plano ecuatorial" y los microtúbulos encuentran y se anclan a los cinetocoros, estructuras protéicas situadas sobre los cromosomas.

Cuando todos los cromosomas están correctamente anclados a los microtúbulos del huso y alineados en la placa metafásica, la célula procede a entrar en anafase. Es la fase crucial de la mitosis, porque en ella se realiza la distribución de las dos copias de la información genética original dividiéndose cada centrómero en dos. Los microtúbulos tiran de los centrómeros hijos y dividen en dos a los cromosomas, dirigiendo cada mitad a polos opuestos.

En la telofase, los microtúbulos no unidos a cinetocoros continúan alargándose, estirando aún más la célula. Los cromosomas hermanos se encuentran cada uno asociado a uno de los polos. La membrana nuclear se reforma alrededor de ambos grupos cromosómicos, utilizando fragmentos de la membrana nuclear de la célula original. Ambos juegos de cromosomas, ahora formando dos nuevos núcleos, se descondensan de nuevo en cromatina.

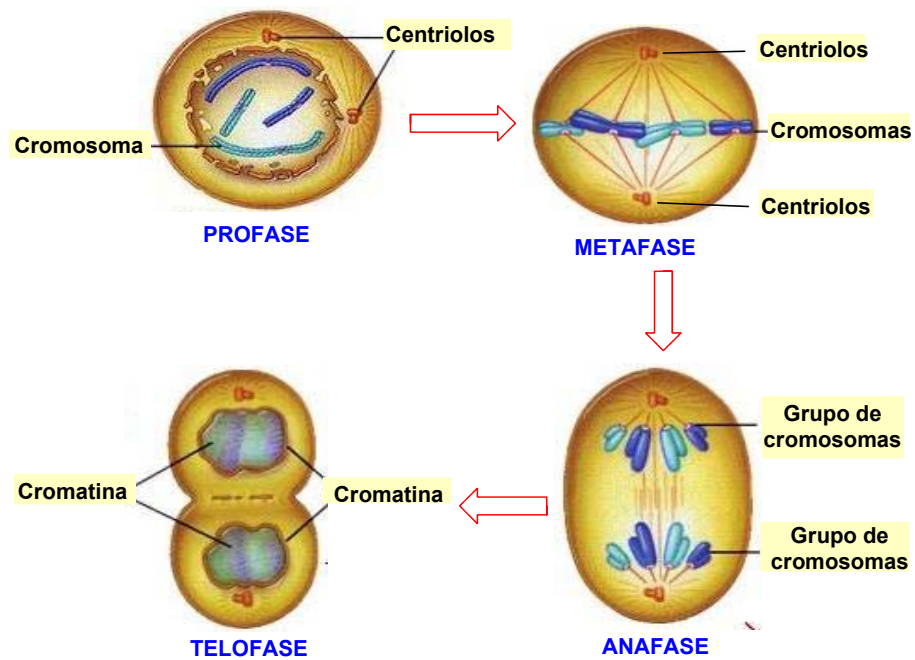


Figura 1.21. Fases de la mitosis

La fase de mitosis es relativamente rápida ya que sólo ocupa alrededor del 2% del tiempo que tarda en completarse el ciclo celular. En la figura 1.21 se muestran las diferentes fases de la mitosis.

A la fase de mitosis le sigue la citocinesis en la que se produce la división del citoplasma. En las células animales se forma un surco en mitad de la célula que se va profundizando y acaba por dividir a la célula en dos células hijas.

Cuando ha terminado el ciclo, la célula entra en la fase G₀ o fase de reposo, coloreada en azul en la figura 1.20. La duración de esta fase depende de numerosos factores (nutrientes, temperatura, iluminación, etc). Algunos tipos celulares están diferenciados de forma terminal y no pueden volver a proliferar permaneciendo en fase G₀ a lo largo de toda su vida, como las células del músculo esquelético y cardíaco, los adipocitos y las neuronas.

Muchos agentes terapéuticos citostáticos transforman las células cancerosas en células diferenciadas no proliferativas, en células diferenciadas terminales que acaban en apoptosis o en células en estado dormido.

1.6. Tubulina y microtúbulos

1.6.1. Estructura de la tubulina

La tubulina, proteína constituyente del citoesqueleto, está involucrada en la formación del huso mitótico cuando la célula entra en mitosis. La tubulina es una proteína heterodimérica formada por dos subunidades polipeptídicas diferentes denominadas α -tubulina y β -tubulina, cada una de ellas con un peso molecular de aproximadamente 55 kDA. La secuencia aminoacídica de la tubulina se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariotas.⁹⁰ Cada monómero contiene alrededor de 450 aminoácidos y una molécula de GTP. Los monómeros alfa y beta comparten aproximadamente el 40% de identidad de secuencia y sus estructuras tridimensionales son muy similares.⁹¹ La α -tubulina se diferencia de la β -tubulina por la presencia de un bucle, denominado bucle S9-S10, algo más largo (8 aminoácidos más) que en la β -tubulina. Ambas subunidades constituyen el protómero, la unidad estructural básica de los microtúbulos.

En la figura 1.22 se indica la estructura tridimensional del dímero de tubulina formada por la agrupación de α - y β -tubulina. La subunidad alfa se encuentra en la parte inferior de la figura y la subunidad beta en la parte superior. El GTP que contienen ambas subunidades se encuentra coloreado en rojo.

⁹⁰ (a) Burns, R. G.; SurrIDGE, C. *FEBS Lett*, **1990**, 271, 1. (b) Ducki, S.; Mackenzie, G.; Greedy, B.; Armitage, S.; Fournier Dit Chabert, J.; Bennett E.; Nettles, J.; Snyder, J.; Lawrence, Nicholas J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 17, 7711.

⁹¹ Nogales, E.; Whittaker, M.; Milligan, R. A.; Downing, K. H. *Cell* **1999**, 96, 79.

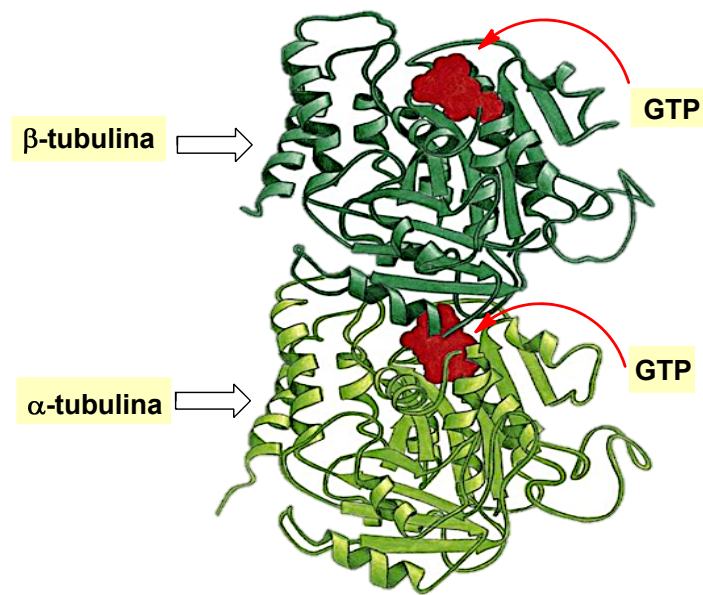


Figura 1.22. Estructura tridimensional del dímero de tubulina

1.6.2. Microtúbulos

La polimerización de los heterodímeros de tubulina conduce progresivamente a la formación de unos protofilamentos, la unión de los cuales genera finalmente los microtúbulos, que son tubos cilíndricos huecos contruidos con 13 protofilamentos con un diámetro de 25 nm y una longitud variable de 25-200 micras.

Un rasgo muy importante de los microtúbulos es su comportamiento dinámico, ya que son capaces de crecer aumentando su longitud añadiendo nuevos protómeros en los extremos del tubo. En uno de los extremos la polimerización es más rápida, por lo que es llamado polo positivo, o terminal (+) del microtúbulo, mientras que el otro extremo es denominado polo negativo, o terminal (-). El extremo (+) termina con subunidades de β -tubulina y el extremo (-) con subunidades de α -tubulina (véase la figura 1.23). Esta polaridad del microtúbulo tiene además su reflejo a nivel molecular y celular:

los polos positivos apuntan y terminan en la periferia de la célula y los polos negativos hacia el centrosoma, que constituye el principal centro de organización de los microtúbulos en la célula.⁹²

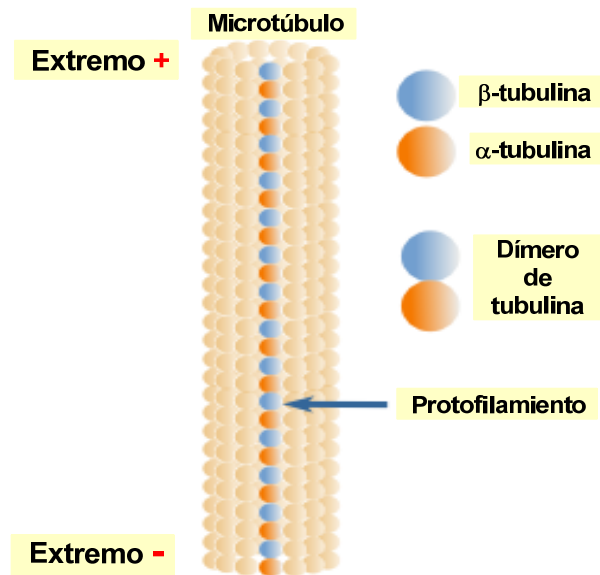


Figura 1.23. Estructura del microtúbulo

Los contactos longitudinales a lo largo de los protofilamentos se basan en interacciones polares hidrofóbicas. La polaridad de los filamentos microtubulares da origen a una superficie polarizada (direccional), repetida y regular en los heterodímeros de la tubulina, lo que proporciona un andamiaje que determina la forma celular, y constituye un conjunto de vías con una dirección definida por donde se pueden mover distintos organelos celulares (mitocondrias, vesículas de secreción, lisosomas) portados por diferentes

⁹² <http://www.educared.org>

proteínas motoras que caminan a lo largo de la superficie de las vías marcadas por el microtúbulo.⁹³

1.6.2.a. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos

Los microtúbulos están sometidos a un proceso continuo de ensamblaje y desensamblaje que encuentra su explicación en dos fenómenos dinámicos intrínsecos:

a) *El recambio rotatorio*, denominado en inglés *treadmilling*, en el que tiene lugar la adición de dímeros de tubulina en el terminal positivo mientras que al mismo tiempo se van liberando en el terminal negativo, permaneciendo constante la longitud del microtúbulo.⁹⁴ Este proceso, parecido a una cinta de transporte sin fin, tiene lugar durante la metafase y la anafase, en las que es esencial la transmisión de señales intracelulares desde el cinetocoro a los polos.⁹⁵

b) *La inestabilidad dinámica*, fenómeno que provoca oscilaciones rápidas de alargamientos y acortamientos de los microtúbulos. El balance entre alargamiento y acortamiento depende de la hidrólisis de GTP a GDP y de la velocidad de adición de nuevos dímeros de tubulina al extremo terminal (+).⁹⁶ Así, la unión de dímeros de tubulina (polimerización) induce la actividad GTPasa de la β -tubulina produciéndose la hidrólisis del GTP a GDP en esta unidad. El GTP enlazado a la α -tubulina no se hidroliza a GDP, permaneciendo atrapado entre los dos monómeros alfa y beta.

La hidrólisis del GTP curva y desestabiliza el microtúbulo debido al cambio conformacional que experimenta la β -tubulina-GDP. Aunque en el proceso de polimerización prácticamente todo el GTP de la β -tubulina se ha hidrolizado a

⁹³ Chaudhuri, A.; Seetharamalu, P.; Schwarz, P.; Hausheer, F. H.; Ludueña, R. *J. Mol. Bio.* **2000**, *303*, 679.

⁹⁴ (a) Margolis, R. L.; Wilson, L. *Cell* **1978**, *13*, 1. (b) Margolis R. L.; Wilson, L. *Bioessays* **1998**, *20*, 830.

⁹⁵ McIntosh, J. R.; Grishchuk, E. L.; West, R. R. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **2002**, *18*, 193.

⁹⁶ Mitchison, T.; Kirschner, M. *Nature* **1984**, *312*, 237.

GDP, existe un tapón (*cap*) en el extremo del microtúbulo que está creciendo y que no ha hidrolizado el GTP.

A medida que crece, el microtúbulo almacena energía y adquiere un estado meta-estable. La pérdida del tapón de β -tubulina-GTP provoca la despolimerización inmediata del microtúbulo, liberándose así la energía almacenada tras la hidrólisis del GTP (véase la figura 1.23).⁹⁷ Por tanto, la hidrólisis de GTP modula la adición de nuevos dímeros y está implicada directamente en el proceso de mitosis.⁹⁸

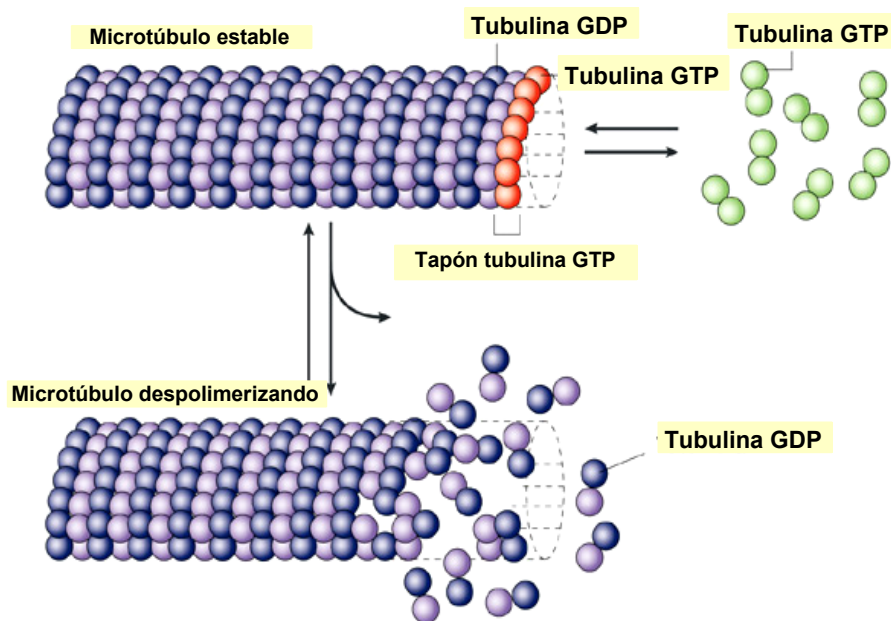


Figura 1.24. Dinámica de la polimerización de la tubulina y modelo del tapón de tubulina-GTP

El *treadmilling* y la inestabilidad dinámica no son mutuamente excluyentes y a menudo tienen lugar de manera simultánea. El grado en el cual una

⁹⁷ Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer*. **2004**, *4*, 253.

⁹⁸ Amos, L. A. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 745.

población de microtúbulos exhibe más o menos comportamiento de uno u otro tipo depende de las condiciones celulares.⁹⁹

1.6.2.b. Proteínas asociadas a los microtúbulos

La velocidad de crecimiento y contracción de los microtúbulos y la frecuencia de los procesos de despolimerización (catástrofe) y crecimiento (rescate) son las cuatro variables que describen la dinámica de los microtúbulos.¹⁰⁰ Estos parámetros están regulados por factores estabilizantes, usualmente proteínas, que previenen la catástrofe, rescatan al microtúbulo que se está despolimerizando o disminuyen la velocidad de contracción de los mismos. Al mismo tiempo existen factores desestabilizantes que inducen la catástrofe, impiden el rescate o incrementan la contracción de los microtúbulos.

Las MAP, del inglés *Microtubule Associated Proteins*, son proteínas que se unen a la tubulina sin afectar al proceso de hidrólisis del GTP. Las MAP son proteínas reguladas por fosforilación, siendo la forma más fosforilada la que presenta menor capacidad de estabilización de los microtúbulos.¹⁰¹ De entre las MAP destacan la MAP1, MAP2, MAP4, tau, y DCX (doublecortina).¹⁰² Otro tipo de MAP es la denominada +TIPS, que se une al terminal positivo del microtúbulo en crecimiento y puede influenciar de manera muy acusada el proceso de mitosis.¹⁰³ Una de las proteínas +TIPS es la EB1, del inglés *End-Binding Protein 1*. La sobreexpresión de EB1 está relacionada con cáncer gástrico, con cáncer de células escamosas esofágicas y con cáncer

⁹⁹ Farrell, K. W.; Jordan, M. A.; Miller, H. P.; Wilson, L. J. *Cell. Biol.* **1987**, *104*, 1035.

¹⁰⁰ Hyman, A. A.; Karsenti, E. *Cell* **1996**, *84*, 401.

¹⁰¹ (a) Drechsel, D. N.; Hyman, A. A.; Cobb, M. H.; Kirschner, M. W. *Mol. Biol. Cell* **1992**, *3*, 1141. (b) Trinczek, B.; Biernat, J.; Baumann, K.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 1887.

¹⁰² Mandelkow, E.; Mandelkow, E. M. *Cell Biol.* **1995**, *7*, 72.

¹⁰³ (a) Schuyler, S. C.; Pellman, D. *Cell* **2001**, *105*, 421. (b) Gundersen, G. G.; Gomes, E. R.; Wen, Y. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2004**, *16*, 106.

hepatocelular.¹⁰⁴ Se ha demostrado que la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes que interaccionan con tubulina es dependiente de las MAP, lo que pone de manifiesto el papel que juegan las MAP en la resistencia de las células tumorales a los agentes citostáticos.¹⁰⁵

Las proteínas desestabilizantes de los microtúbulos son kinesinas que cumplen un papel dual. Por un lado promueven el proceso de catástrofe, que es dependiente de ATP, y por otro participan en el secuestro de tubulina independiente de ATP.¹⁰⁶ Las MCAK, del inglés *Mitotic Centromere-Associated Kinesin*, se unen a ambos terminales del microtubulo, el positivo y el negativo, y muestran máxima afinidad por el microtúbulo curvado que está experimentando el proceso de acortamiento. Las MCAK promueven la disociación de los dímeros de tubulina del microtúbulo en el cinetocoro, de esta forma el microtúbulo se acorta y arrastra a los cromosomas durante la anafase (véase la figura 1.25).¹⁰⁷

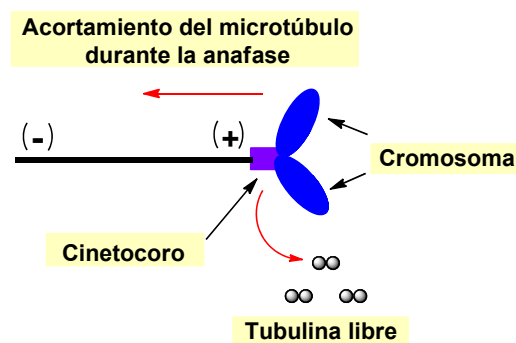


Figura 1.25. Acortamiento de los microtúbulos durante la anafase

¹⁰⁴ (a) Fujii, K.; Kondo, T.; Yokoo, H.; Yamada, T.; Iwatsuki, K.; Hirohashi, S. *Proteomics* **2005**, 5, 1411. (b) Nishigaki, R.; Osaki, M.; Hiratsuka, M.; Toda, T.; Murakami, K.; Jeang, K. T.; Ito, H.; Inoue, T.; Oshimura, M. *Proteomics* **2005**, 5, 3205. (c) Wang, Y.; Zhou, X.; Zhu, H.; Liu, S.; Zhou, C.; Zhang, G.; Xue, L.; Lu, N.; Quan, L.; Bai, J.; Zhan, Q.; Xu, N. *Oncogene* **2005**, 24, 6637.

¹⁰⁵ Bhat, K. M.; Setaluri, V. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 2849.

¹⁰⁶ Newton, C. N.; Wagenbach, M.; Ovechkina, Y.; Wordeman, L.; Wilson, L. *FEBS Lett.* **2004**, 572, 80.

¹⁰⁷ Moores, C. A.; Yu, M.; Guo, J.; Beraud, C.; Sakowicz, R.; Milligan, R. A. *Mol. Cell* **2002**, 9, 903.

Otra proteína reguladora de la estabilidad de los microtúbulos es la estatmina. Esta pequeña proteína, de tan solo 19KDa de peso molecular, está muy expresada en las células leucémicas e interacciona con los dímeros de la tubulina incrementando la velocidad del proceso de catástrofe.¹⁰⁸

La estatmina se une a dos moléculas de tubulina dimérica y forma un complejo ternario denominado complejo T2S.¹⁰⁸ La tubulina unida a estatmina no es polimerizable y no se puede ensamblar en los microtúbulos.¹⁰⁹ Mediante este mecanismo, la estatmina estimula el desensamblaje de los microtúbulos y regula indirectamente el ciclo celular. La regulación del ciclo celular está controlada por quinasas. Así, la fosforilación de cuatro residuos de serina en la estatmina provoca una unión más débil con los dímeros de tubulina, incrementándose la concentración de tubulina disponible en el citoplasma para el ensamblaje de los microtúbulos. Para que la célula pueda ensamblar el huso mitótico es necesaria la fosforilación de la estatmina, de lo contrario se produce la detención del ciclo celular. En citocinesis, la última fase del ciclo celular, tiene lugar la desfosforilación de la estatmina. La estatmina desfosforilada secuestra tubulina e impide que la célula vuelva entrar en el ciclo celular hasta que esté preparada para ello.¹¹⁰

La estatmina se clasifica como oncoproteína. Algunas mutaciones de estatmina impiden su unión a la tubulina favoreciéndose el ensamblaje continuo de microtúbulos y la formación constante del huso mitótico. La célula se replica sin control produciéndose el característico crecimiento celular desregulado de las células cancerosas.¹¹¹

¹⁰⁸ Jourdain, L.; Curmi, P.; Sobel, A.; Pantaloni, D.; Carlier, M. F. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10817.

¹⁰⁹ Steinmetz, M. O.; Kammerer, R. A.; Jahnke, W.; Goldie, K. N.; Lustig, A.; van Oostrum, J. *EMBO J.* **2000**, *19*, 572.

¹¹⁰ (a) Manna, T.; Thrower, D.; Miller, H. P.; Curmi, P.; Wilson, L. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2071. (b) Howell, B.; Deacon, H.; Cassimeris, L. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112*, 3713.

¹¹¹ Cassimeris, L. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 18.

En la figura 1.26 se da la estructura del complejo tubulina-estatmina y de los sitios de unión de algunos fármacos desestabilizantes de microtúbulos.¹¹² Los dominios de tubulina GTPasa se indican en color rosa, los dominios de activación en color azul, las espirales centrales (H7) en color verde claro y las hélices C-terminales en azul más claro. La estatmina, que se muestra en verde, induce curvatura en este corto segmento del protofilamento de la tubulina. El dominio N-terminal de la estatmina cubre el extremo (-) del tetrámero.

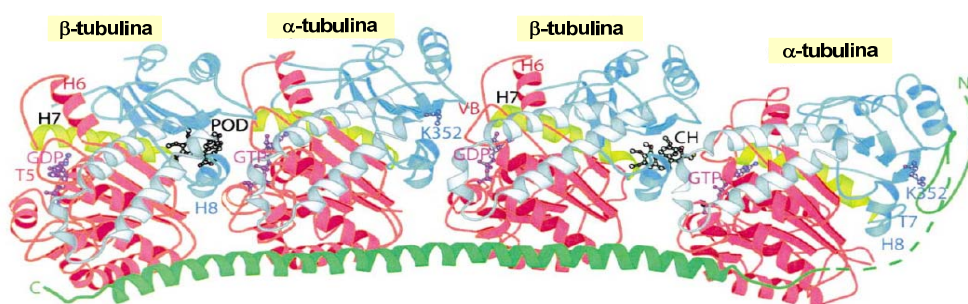


Figura 1.26. Diagrama de cintas de la estructura cristalina del complejo tubulina-estatmina mostrando el sitio de unión para fármacos desestabilizantes de microtúbulos

El GTP se intercala entre las subunidades de α - y β -tubulina de cada heterodímero. El GTP unido a β -tubulina es hidrolizado a GDP mediante el contacto con la hélice H8 y el loop T7 de la subunidad de α -tubulina. Los fármacos desestabilizadores de microtúbulos, como la colchicina (CH) y la podofilotoxina (POD), se enlazan a sitios similares en la β -tubulina. La vinblastina (VB) se une al dominio GTPasa de la β -tubulina, probablemente en

¹¹² La estatmina RB3 ha sido empleada para estabilizar a la tubulina en su conformación doblada y estudiar así los sitios de unión de los compuestos desestabilizantes de los microtúbulos, véase: Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. *Nature* **2004**, *428*, 198.

el loop T5 entre H6 y H7. La pironetina se enlaza a la lisina K352 de la α -tubulina, muy cerca del sitio de unión de la vinblastina.¹¹³

1.7. Inhibidores de la mitosis

Los inhibidores de la mitosis incluyen varios medicamentos quimioterapéuticos distintos. A diferencia de otros compuestos, como los agentes alquilantes, los antimetabolitos, los antibióticos antitumorales o los inhibidores de topoisomerasas, los inhibidores de la mitosis interfieren el mecanismo de división celular sin alterar la estructura ni la función del ADN. Muchos inhibidores de la mitosis son productos naturales o derivados de ellos. En la actualidad, cerca de la mitad de los fármacos disponibles son compuestos naturales o están relacionados con ellos y en el caso de enfermedades como el cáncer la proporción supera el 60%.¹¹⁴

Los inhibidores de la mitosis pueden actuar deteniendo o bloqueando enzimas implicadas en la división celular. Aunque estos fármacos ejercen su acción durante la fase mitótica del ciclo, pueden afectar a las células en todas las fases del ciclo celular.¹¹⁵

Tradicionalmente la diana de los inhibidores de la mitosis han sido los microtúbulos que forman el huso mitótico, aunque su acción sobre la estabilidad y la dinámica de los microtúbulos varía bastante entre unos y otros.¹¹⁶

Los inhibidores de la mitosis continúan siendo los fármacos más prescritos en quimioterapia anticancerígena.¹¹⁷ Como se explicará en el siguiente

¹¹³ Usui, T.; Watanabe, H.; Nakayama, H.; Tada, Y.; Kanoh, N.; Kondoh, M.; Asao, T.; Takio, K.; Watanabe, H.; Nishikawa K.; Kitahara, T.; Osada, H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 799.

¹¹⁴ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat Prod.* **2012**, *75*, 311.

¹¹⁵ *Principios de la quimioterapia: análisis exhaustivo de las técnicas y su papel en el tratamiento del cáncer. American Cancer Society.* **2012**.

¹¹⁶ (a) Zhou, J.; Giannakakou, P. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *5*, 65. (b) Matesanz, R. *Optimización de la interacción microtúbulo-taxol: diseño de taxanos de alta afinidad.* Tesis Doctoral. **2008**. Universidad Complutense de Madrid.

¹¹⁷ Checchi, P. M.; Nettles, J. H.; Zhou, J.; Snyder, J. P.; Joshi, H. C. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 361.

apartado, se conoce la zona de unión a la tubulina de algunos agentes antitumorales, aunque otros antimitóticos se unen a tubulina en sitios no definidos o intervienen sobre los microtúbulos indirectamente alterando su modificación post-translacional.

Los fármacos antitumorales que intervienen sobre la tubulina se suelen dividir en dos categorías: estabilizantes de microtúbulos y destabilizantes de microtúbulos. A pesar de esta clasificación, los fármacos que actúan sobre la tubulina en realidad atenúan la dinámica de los microtúbulos, en lugar de alterar la masa neta del polímero.¹¹⁶ Si nos basamos en este concepto, las diferencias entre las dos clases de fármacos se difuminan por lo que deberían ser denominadas como compuestos supresores de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos. No obstante lo anterior, la clasificación que se seguirá a continuación es la de su división en *agentes destabilizadores de microtúbulos*, del que forman parte, entre otros, los alcaloides de vinca (vinblastina, vincristina) y la colchicina, y *agentes estabilizadores de microtúbulos*, entre los que se encuentran los taxanos (paclitaxel y docetaxel).

1.7.1. Agentes estabilizadores de microtúbulos

1.7.1.a. Taxanos

La mitad de los fármacos con valor terapéutico son productos naturales o derivados de los mismos y los antitumorales que interfieren en la dinámica de los microtúbulos no son una excepción. El Taxol® (paclitaxel), es un diterpeno que inicialmente se aisló de la corteza de *Taxus brevifolia*, recolectado en 1962 en el estado de Washington por el botánico Arthur Barclay, del Departamento de Agricultura de EUA, como parte de un programa de recolecta al azar del Departamento de Agricultura del NCI.¹¹⁸

¹¹⁸ (a) Cragg, C.; Boyd, M.; Cardelina II, J.; Newman, D.; Snader, K.; McCloud, T., *Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer institute. Ethnobotany and search for new drugs*. Wiley & Sons. **1994**, p. 178. (b) Vega-Ávila, E.; Velasco-Lezama, R.; Jiménez-Estrada, M. *Bioquímica* **2006**, *31*, 97. Véase la versión on line en:

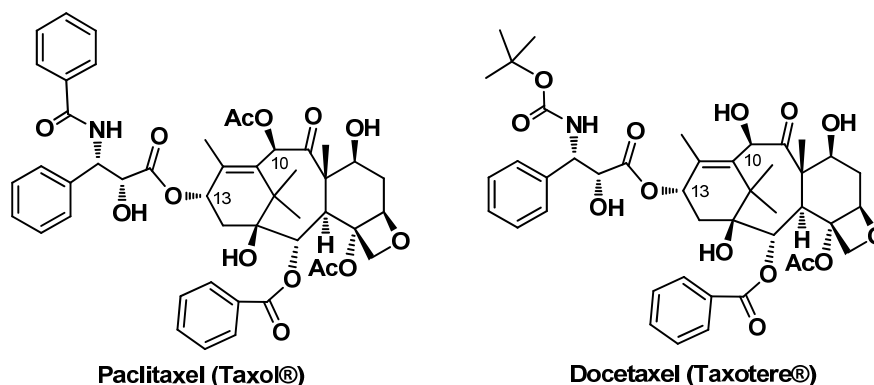


Figura 1.27. Estructuras del paclitaxel y del docetaxel

Aunque el interés por el paclitaxel se inició en la década de 1960, las propiedades médicas del tejo se conocían desde hacía varios siglos. Al árbol de tejo se le denominaba como *árbol de la muerte*, por sus características venenosas que están documentadas en registros griegos y latinos. Las tribus nativas del noreste de Norteamérica utilizaban la corteza del tejo como desinfectante, como inductor del aborto y en el tratamiento de enfermedades de la piel.¹¹⁹

El paclitaxel se obtenía del *T. brevifolia* y para conseguir 1 kg de taxol se requerían 10 toneladas de corteza del árbol, lo que equivalía a talar unos 3.000 árboles. Las presiones medioambientales tendentes a preservar los bosques de *T. brevifolia* llevaron al *Forest Service Bureau of Land Management* (EUA) a prohibir la tala de estos árboles, lo que obligó a la búsqueda de fuentes alternativas de taxol. La solución se encontró en otras especies de *Taxus*. Así, de las hojas del *Taxus baccata* se extrajo la 10-desacetil-bacatina III (10-DAB, véase la figura 1.28).

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57631304>. (c) Nirmala, M. J.; Samundeeswari, A.; Sankar, P. D. *Res. Plant Biol.* **2011**, *13*, 1.

¹¹⁹ Nicolaou, K.; Guy, R.; Potier, P. *Sci. Am.* **1996**, *274*, 84.



Figura 1.28. Tejo común (*Taxus baccata*) (izquierda) y 10-desacetilbaccatina III (10-DAB) (derecha)

El rendimiento en el aislamiento de este producto natural era 5 veces superior al de extracción del taxol y además no era necesario talar los árboles para conseguir su aislamiento. La baccatina se convierte mediante síntesis química en taxol y taxotere.¹²⁰ Ambas estructuras comparten el esqueleto tricíclico de los taxanos pero presentan diferentes sustituyentes en C-10 y en C-13 (véase la figura 1.27). La cadena lateral en C-13 juega un importante papel en la actividad antineoplásica de los taxanos.¹²¹

El paclitaxel y el docetaxel comparten el mismo mecanismo de acción. Ambos se unen a la β -tubulina estabilizando los microtúbulos e impidiendo su despolimerización.¹²² En la figura 1.29 se indica la unión del taxol (en color verde) a un protofilamento de un microtúbulo. En esta visión desde el lumen del microtúbulo, se puede observar que el taxol está completamente embebido en la subunidad β de la tubulina.¹²³

¹²⁰ Denis, J-N.; Greene, A. E.; Guénard, D.; Guerite-Voegelein, F.; Mangatal, L.; Potier, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5917.

¹²¹ Francis, P.; Kris, M.; Rigas, J.; Grant, S.; Miller, V. *Lung Cancer* **1995**, *12*, 163.

¹²² Gibbs, J. *Science* **2000**, *287*, 1969.

¹²³ (a) Lowe, J.; Li, H.; Downing, K. H.; Nogales, E. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045. (b) Para un trabajo de revisión de la dinámica de los microtúbulos y del efecto que ejercen los antimetabólicos

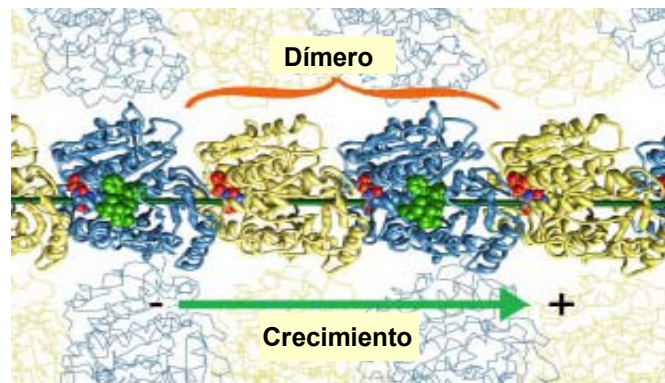


Figura 1.29. Unión del taxol a un protofilamento de microtubulo

En la figura 1.30 se observa la colocación el taxol desde la perspectiva del lumen del microtúbulo.

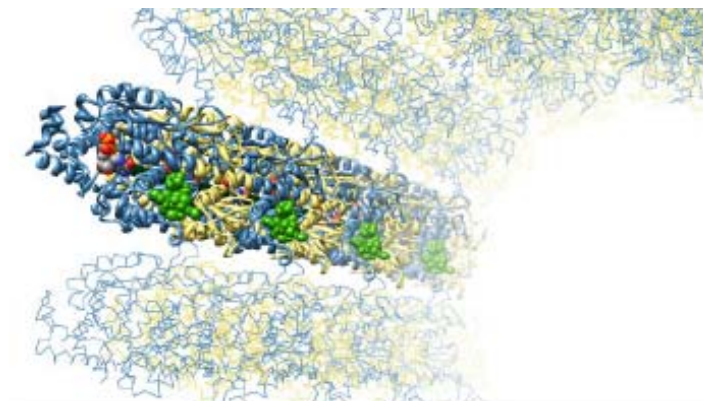


Figura 1.30. Visión del taxol desde el lumen del microtúbulo

El uso del paclitaxel y del docetaxel como fármacos antineoplásicos ha sido aprobado en el tratamiento de cáncer de pecho y cáncer no microcítico de pulmón. El paclitaxel está indicado también en el tratamiento de carcinoma avanzado de ovario, mientras que el docetaxel se emplea también contra el

cáncer de próstata metastático independiente de andrógenos, el adenocarcinoma gástrico y el carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza localmente avanzado. Cabe destacar que, unido a las ventajas que le aporta la mayor solubilidad en agua con respecto al paclitaxel, aunque ambos son bastante insolubles, el docetaxel se muestra más activo que su predecesor natural en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.¹²⁴

Otros productos naturales estabilizantes de los microtúbulos son las epotilonas, la laulimalida, el pelorusido A, el discodermólido y la dictioestatina (véase la figura 1.31). Las epotilonas se unen a un sitio muy próximo al de unión del taxol a los microtúbulos, aunque el mecanismo de acción mediante el cual ejercen su acción estabilizante de los microtúbulos es diferente al del taxol.¹²⁵

La laulimalida se une a un sitio diferente del sitio taxol en el exterior del microtúbulo en la subunidad β de la tubulina.¹²⁶ El pelorusido A tampoco se une al sitio taxano, pero compite con la laulimalida por el mismo sitio de unión.¹²⁷

El discodermólido y la dictioestatina también son agentes estabilizantes de los microtúbulos aunque su sitio de unión es diferente del sitio taxano.¹²⁸

¹²⁴ Jones, S. E.; Erban, J.; Overmoyer, B.; Budd, G. T.; Hutchins, L.; Lower, E.; Laufman, L.; Sundaram, S.; Urban, W. J.; Pritchard, K. I.; Mennel, R.; Richards, D.; Olsen, S.; Meyers, M. L.; Ravdin, P. M. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 5542.

¹²⁵ Kowalski, R. J.; Giannakakou, P.; Hamel, E. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2534.

¹²⁶ (a) Pryor, D. E.; O'Brate, A.; Bilcer, G.; Díaz, J. F.; et al. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9109. (b) Bennett, M. J.; Barakat, K.; Huzil, J. T.; Tuszynski, J.; Schriemer, D. C. *Chem. Biol.* **2010**, *30*, 725.

¹²⁷ Gaitanos, T. N.; Buey, R. M.; Díaz, J. F.; Northcote, P. T.; Teesdale-Spittle, P.; Andreu, J. M.; Miller, J. H. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5063.

¹²⁸ Madiraju, C.; Edler, M. C.; Hamel, E.; Raccor, B. S.; et al. *Biochemistry* **2005**, *44*, 15053.

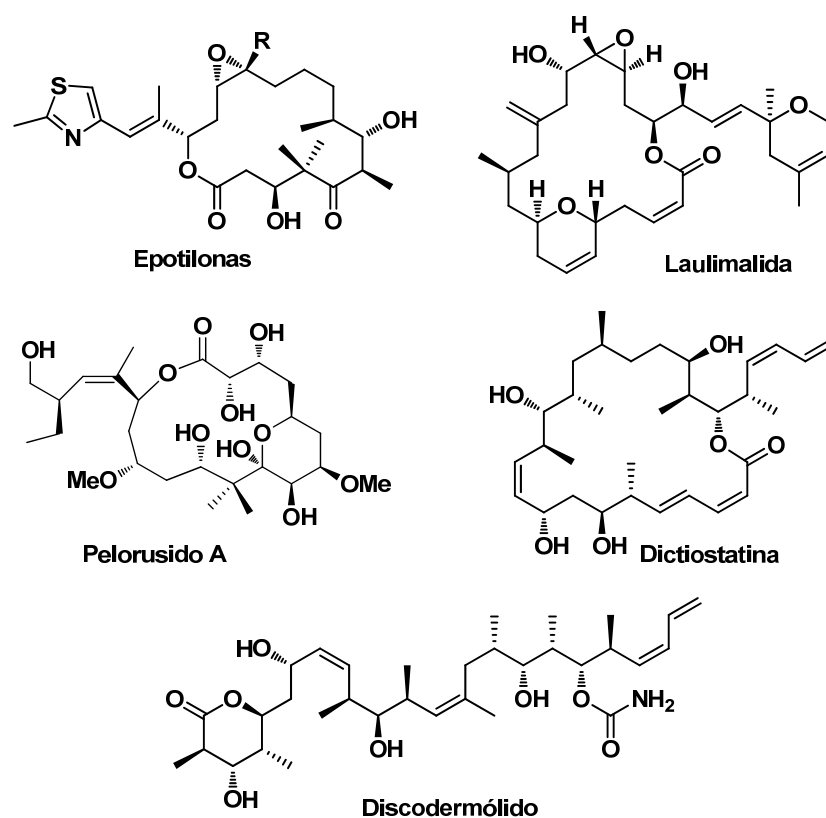


Figura 1.31. Estructuras de compuestos estabilizantes de los microtúbulos

1.7.2. Agentes desestabilizadores de microtúbulos

1.7.2.a. Alcaloides de la vinca

Los primeros compuestos obtenidos de plantas, aprobados para el tratamiento anticancerígeno, fueron la vincristina (Oncovin®) y la vinblastina (Velban®). Estos compuestos se aislaron de *Catharanthus roseus* (vinca de Madagascar), planta empleada en medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes. La utilidad terapéutica de las hojas de la vinca ya era conocida

desde el siglo XVII. A finales de la década de los 50 se descubrieron sus efectos antimitóticos y su potencial como agentes anticancerígenos.¹²⁹

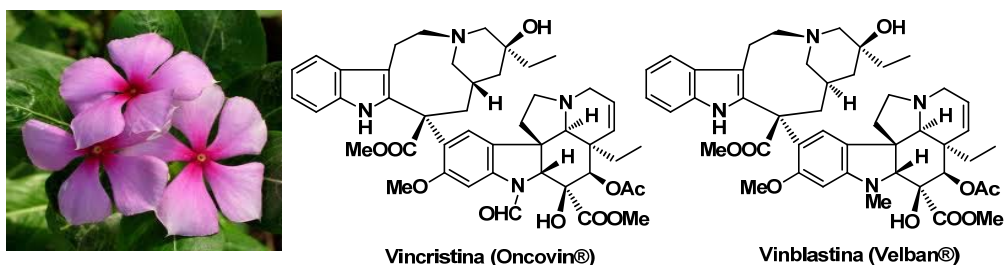


Figura 1.32. *Vinca rosea* (izquierda) y estructura de los alcaloides de la vinca (derecha)

La vincristina y la vinblastina se unen a la tubulina impidiendo la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico.¹³⁰ Se ha determinado mediante cristalografía de rayos X que la unión de estos alcaloides a la tubulina tiene lugar en la interfase entre la α - y la β -tubulina.¹³¹

En la figura 1.33 se indica la unión de la vinblastina (en azul oscuro) en la interfase entre la α - y la β -tubulina en un protofilamento en el momento de la despolimerización.^{123b} El eje en color verde muestra la dirección de crecimiento del protofilamento recto, mientras que el eje en color azul conecta los nucleótidos del protofilamento curvado que está despolimerizándose.

¹²⁹ (a) Noble, R. L. *Biochem. Cell Biol.* **1990**, *68*, 1344 (b) Newmann, D.; Cragg, G.; Snader, K. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215. (c) Coderch, C.; Morreale, A.; Gago, F. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 219.

¹³⁰ Warber, S. *Models of action at target sites. In: Natural products from plants.* Edts. Kaudman, P.; Cseke, L.; Warber, S.; Duke, J.; Brielmann H. L. **1999**, 158.

¹³¹ Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli R. B.; Roussi, F.; Steinmetz, M. O.; Curmi, P. A. *Nature* **2005**, *435*, 519.

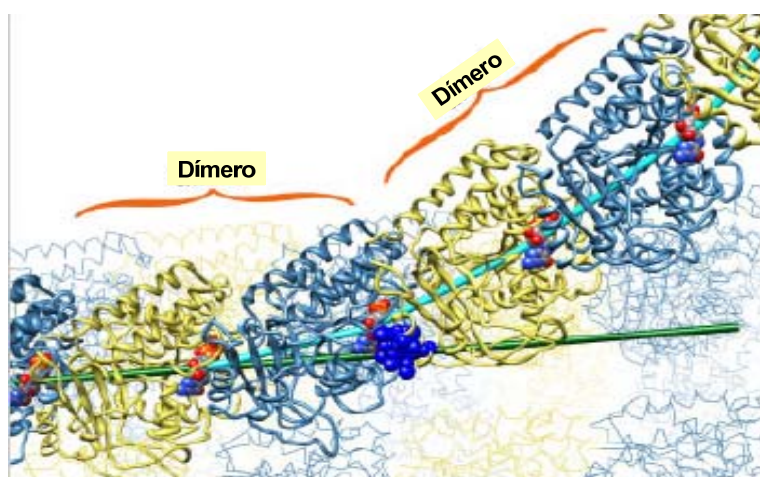


Figura 1.33. Unión de la vinblastina, en azul, a un protofilamento de microtúbulo despolimerizándose

La vinblastina se administra en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no-Hodgkin, el cáncer testicular, de mama, pulmonar, de cabeza y cuello, de vejiga y en el coriocarcinoma.¹³²

La vincristina se emplea en el tratamiento de la leucemia aguda, sarcoma de Ewing, mieloma múltiple, cáncer de tiroides y tumores cerebrales.¹³³

1.7.2.b. Colchicina

El alcaloide colchicina se aisló de *Colchicum autumnale*, planta nativa de Europa. Se utiliza principalmente en el tratamiento de la gota, enfermedad metabólica producida por una acumulación de ácido úrico en las articulaciones¹³⁴ y en otras enfermedades inflamatorias como la fiebre mediterránea familiar (FMF). Sus propiedades antimitóticas están asociadas a

¹³² (a) Bates, D. J. P.; Salemi, B. L.; Lowrey C. H.; Eastman, A. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *12*, 314. (b) Klement, G.; Baruchel, S.; Rak, J.; Man, S.; Clark, K.; Hicklin, D. J.; Bohlen, P.; Kerbel, R. S. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 15.

¹³³ (a) Groth-Pedersen, L.; Stampe Ostenfeld, M. S.; Høyer-Hansen, M.; Nylandsted, J.; Jäättelä, M. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2217. (b) Gidding, C. E.; Kellie, S. J.; Kamps, W. A.; et al. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1999**, *29*, 267.

¹³⁴ <http://www.idph.state.il.us/>

su capacidad de unión a la tubulina y al bloqueo de la formación de los microtúbulos.¹³⁵

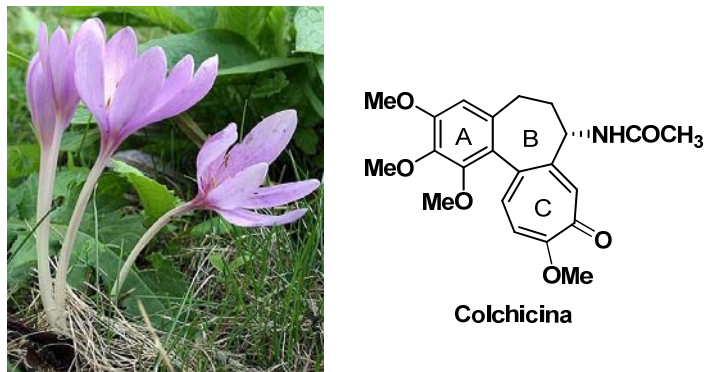


Figura 1.34. *Colchicum autumnale* (izquierda) y estructura de la colchicina (derecha)

En 1998, Downing y Nogales propusieron la colocación de la colchicina en la interfase entre las subunidades de α - y de β -tubulina.¹³⁶ En 2004 Ravelli y colaboradores consiguieron determinar la ubicación de la colchicina mediante cristalografía de rayos X. Según estos autores la colchicina se sitúa en el dominio intermedio de la β -tubulina, al lado del dominio GTP de la subunidad de α -tubulina.¹³⁷

La colchicina se une a la tubulina no polimerizada en un proceso en dos etapas que se inicia con la formación de un complejo, que se genera con baja afinidad y de manera reversible. En la segunda etapa se produce un lento cambio conformacional en el complejo inicial tubulina-colchicina que desemboca en la formación de un complejo tubulina-colchicina mucho más estable y, por tanto, poco reversible. El cambio conformacional en el heterodímero de tubulina-colchicina va seguido de la adición de tubulina

¹³⁵ Cocco, G.; Chu, D.; Pandolfi, S. *Eur. J. Intern. Med.* **2010**, *21*, 503.

¹³⁶ Nogales, E.; Wolf, S.; Downing, K. *Nature* **1998**, *19*, 1639.

¹³⁷ Ravelli, R.; Gigant, B.; Curmi, P.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A. *Nature* **2004**, *428*, 198.

soluble pero el protofilamento anómalo que va formándose experimenta fácilmente la despolimerización.

En la figura 1.35 se indica la colocación de la colchicina en un protofilamento que está despolimerizándose. La colchicina se dibuja en color morado y su posición se indica con una flecha roja. El eje en color verde muestra la dirección de crecimiento del protofilamento recto, mientras que el eje en color azul conecta los nucleótidos del protofilamento curvado que está despolimerizándose.^{123b}

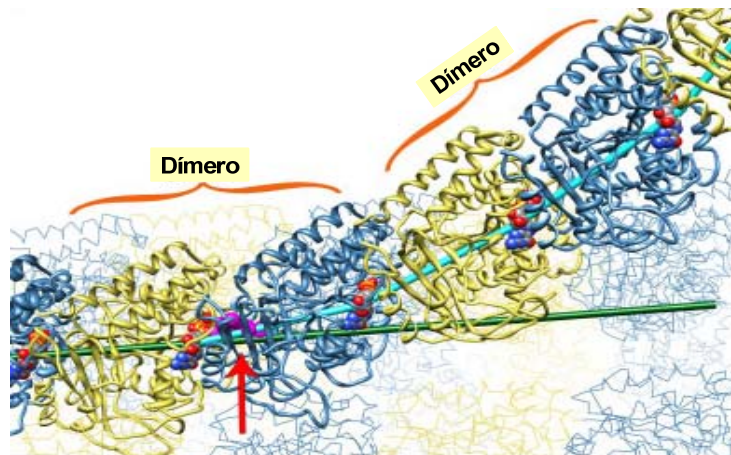


Figura 1.35. Colchicina unida a un protofilamento de microtúbulo despolimerizándose

El anillo B de la colchicina es vital para su acción antimitótica ya que los análogos que carecen de este anillo se unen inmediatamente a la tubulina (primera etapa del proceso) pero el complejo tubulina-análogo de colchicina es muy reversible, al contrario de lo que ocurre con el complejo tubulina-colchicina.¹³⁸

¹³⁸ (a) Banerjee, A.; Barnes, L. D.; Luduena, R. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *913*, 138. (b) Ray, K.; Bhattacharyya, B.; Biswas, B. B. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6241.

Mediante simulaciones computacionales se ha propuesto que el anillo B de la colchicina afecta a la conformación de la α -tubulina y es un factor determinante en los efectos inhibitorios sobre la polimerización de ésta.¹³⁹

En la figura 1.36 se aprecia con más detalle la unión de la colchicina en la interfase entre la α - y la β -tubulina.

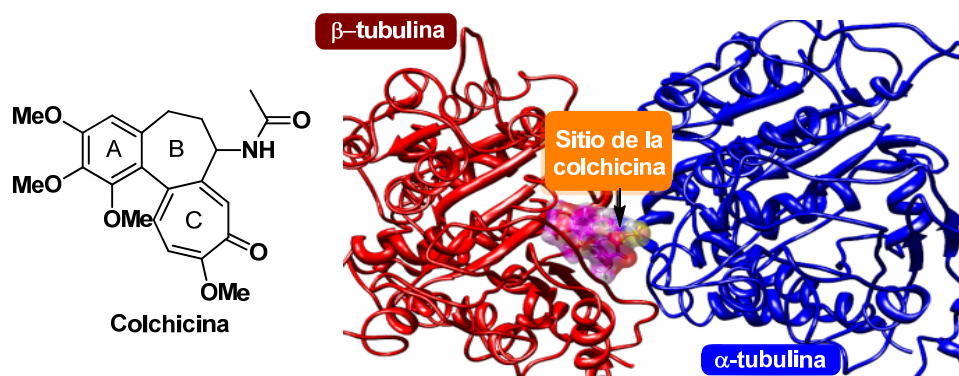


Figura 1.36. Unión de la colchicina en la interfase entre las subunidades de α y β -tubulina

Hasta la fecha se han encontrado en mamíferos seis isoformas de α -tubulina y siete de β -tubulina que se expresan de manera diferente según el tipo de tejido en el que se encuentra la célula.¹⁴⁰ Las isoformas de tubulina se unen de manera diferente a la colchicina y a la *N*-desacetilcolchicina. Así, las denominadas isoformas $\alpha\beta_{II}$ y $\alpha\beta_{IV}$ interaccionan mucho más rápidamente con la colchicina y la *N*-desacetilcolchicina que la isoforma $\alpha\beta_{III}$.¹⁴¹

¹³⁹ Chaudhuri, A. R.; Seetharamalu, P.; Schwarz, P. M.; Hausheer, F. H.; Ludueña, R. F. *J. Mol. Biol.* **2000**, 303, 679.

¹⁴⁰ Sullivan, K. F. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1988**, 4, 687.

¹⁴¹ (a) Banerjee, A.; Ludueña, R. F. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 1689. (b) Banerjee, A.; D'Hoore, A.; Engelborghs Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10324.

1.7.2.c. Combretastatinas

Las combretastatinas son productos naturales que exhiben propiedades antiangiogénicas y antimitóticas. Las combretastatinas A-1, A-2 y A-3 fueron aisladas de la corteza del árbol *Combretum caffrum* en el Sur de África e India por Pettit y colaboradores en 1987.¹⁴² La combretastatina A-4 fue aislada por estos mismos autores en 1989.¹⁴³ Las estructuras de la combretastatinas A-1, A-2, A-3 y A-4 se indican en la figura 1.37.

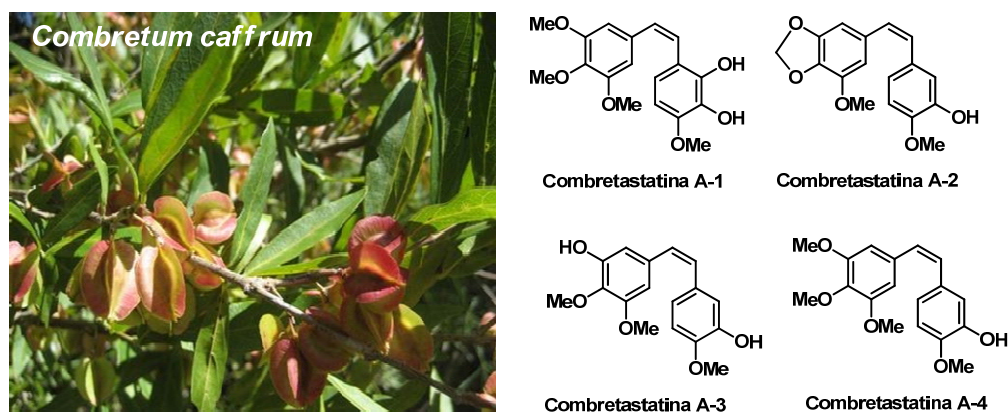


Figura 1.37. *Combretum caffrum* (izquierda) y estructuras de combretastatinas (derecha)

Las combretastatinas inducen muerte celular al enlazarse selectivamente a la tubulina deteniendo el ciclo celular en los estados de transición de meta a anafase.¹⁴⁴ La combretastatina A-4 (CA-4) es el agente antitumoral más potente de la familia de las combretastatinas. Además de su acción antimitótica, la combretastatina A-4 provoca cambios en el citoesqueleto y por lo tanto en la morfología de las células endoteliales. Estos cambios aumentan

¹⁴² (a) Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 386. (b) Pettit, G. R.; Singh, S. B. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2390.

¹⁴³ Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D. *Experientia* **1989**, *45*, 209.

¹⁴⁴ Fürst, R.; Zupkó, I.; Berényi, A.; Ecker, G.; Rinner, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6948.

la permeabilidad vascular y provocan la interrupción del flujo sanguíneo del tumor, lo que lleva a su necrosis isquémica.¹⁴⁵

La combretastatina A-4 muestra *in vivo* una baja o ninguna actividad antitumoral, debido a su baja solubilidad en agua. Para mejorar esta propiedad se ha sintetizado el éster de fosfato denominado CA4P que se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase II en Estados Unidos y Reino Unido para el tratamiento del cáncer en pacientes con tumores sólidos.¹⁴⁶

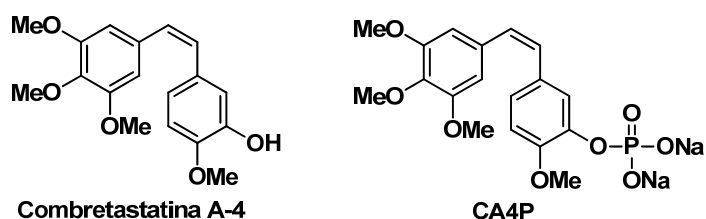


Figura 1.38. Estructuras de la combretastatina A-4 y de CA4P

Recientemente los laboratorios farmacéuticos Bristol-Myers-Squibb (BMS) y Oxigene han presentado la solicitud del fármaco CA4P.¹⁴⁷ Este compuesto incrementa la permeabilidad e inhibe la migración de las células endoteliales bloqueando la formación de tubos capilares al romperse el ciclo de señalización, lo que conduce al colapso vascular y a la necrosis del tumor.¹⁴⁸ CA4P ha despertado un gran interés por sus efectos citotóxicos frente a una

¹⁴⁵ West, C. M. L.; Price, P. *Anti-Cancer Drugs* **2004**, 3, 179.

¹⁴⁶ (a) Srivastava, V.; Singh, N.A.; Kumar, J. K.; Gupta M. M.; Khanuja, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5892. (b) <http://www.cancer.gov/drugdictionary/?Cdrid=43316>.

¹⁴⁷ (a) Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B. *J. Nat. Prod.* **1987**, 50, 386. (b) Pettit, G. R.; Singh, S. B. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 2390.

¹⁴⁸ (a) Vincent, L.; Kermani, P.; Young L.M.; Cheng, J.; Zhang, F.; Shido, K. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 2992. (b) Rustin J.S.; Galbraith, S.; Anderson, H.; Stratford, M.; Folkes, L.; Sena, L.; Gumbrell, L.; Price, P. *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21, 2815.

variedad de células cancerígenas, entre las que cabe incluir a las multirresistentes.¹⁴⁹

La combretastatina A-4 es, de todas las combretastatinas, la que muestra mayor inhibición del ensamblaje de los microtúbulos. Se une al sitio colchicina favoreciendo de manera notable la hidrólisis del GTP.¹⁵⁰

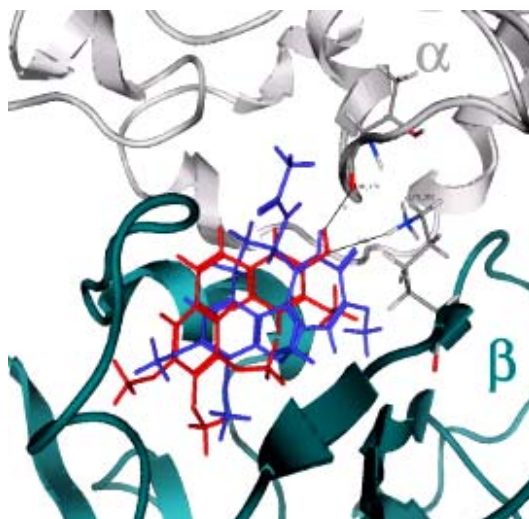


Figura 1.39. Comparación de CA-4 (rojo) y colchicina (azul) en el sitio de unión de la tubulina

Estudios de relación estructura-actividad han demostrado que el sistema de *cis*-estilbeno de las combretastatinas coloca a los dos anillos aromáticos con una inclinación entre ellos de 50°-60° y que esta inclinación juega un papel clave en la unión al sitio de la colchicina en la tubulina.¹⁵¹

¹⁴⁹ (a) Hamel, E.; Lin, C. M. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 3863. (b) McGown, A. T.; Fox, B.W., *Anti-Cancer Drug Des.* **1989**, *3*, 249. (c) Lin, C. M.; Shing, S. B.; Chu, P. S.; Dempsy, R. O.; Schimdt, J. M.; Pettit, G. R.; Hamel, E. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 200.

¹⁵⁰ Lin, C. M.; Ho, H. H.; Pettit, G. R.; Hamel, E. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6984.

¹⁵¹ (a) <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4508364.html>. (b) Woods, J. A.; Hadfield, J. A.; Pettit, G. R.; Fox, B. W.; McGown, A. T. *Br. J. Cancer*, **1995**, *71*, 705.

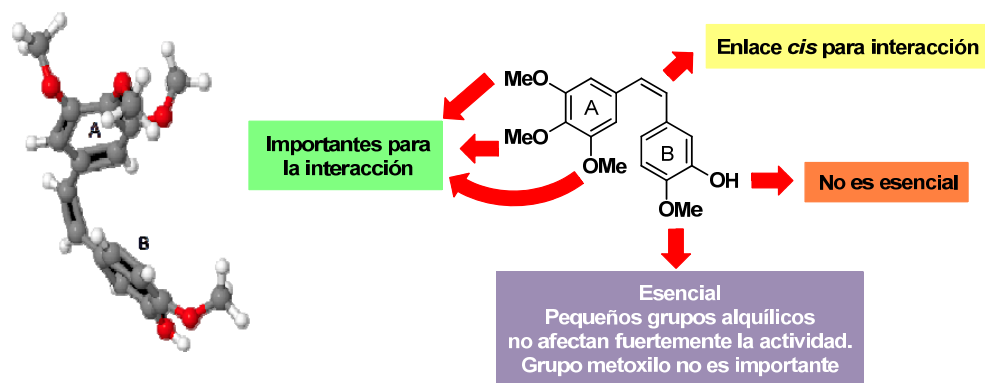


Figura 1.40. Estructura idealizada (izquierda) y relación estructura actividad de análogos de CA-4.

El anillo trimetoxifenílico (anillo A) de la combretastatina A-4 es clave en su capacidad citotóxica y su actividad inhibidora de polimerización de tubulina. Se ha demostrado que las sustituciones en este anillo dan lugar a compuestos con menor actividad.¹⁵²

Las modificaciones funcionales en el anillo B de la combretastatina A-4 alteran menos la actividad biológica de las combretastatinas. Por ejemplo, el cambio del grupo metoxilo en *para* no genera compuestos más activos. La sustitución del grupo hidroxilo por un bromo mantiene la potencia antimetabólica y la introducción de grupos amino la aumenta, a la vez que se mejora la solubilidad en agua.¹⁵³ La sustitución del anillo B por anillos de menos de 6 miembros conlleva una pérdida de actividad. Sin embargo, su reemplazo por sistemas bicíclicos no provoca disminución de la actividad.¹⁵⁴

¹⁵² (a) Gaukroger, K.; Hadfield, J.; Lawrence, N.J.; Nolan, S.; McGown, A. T. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3033. (b) Álvarez-Lozano. *Antimitóticos relacionados con combretastatinas y fenstatinas*. Tesis Doctoral. **2009**. Universidad de Salamanca.

¹⁵³ (a) Tron, G.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033.

¹⁵⁴ Maya, A. B.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollin, F.; Pélaez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 556.

La configuración *cis* del doble enlace es clave en la actividad de las combretastatinas. Se ha demostrado que los isómeros *trans* no causan inhibición de la polimerización de la tubulina en ensayos *in vitro*. La menor capacidad antimetabólica de los isómeros *trans* se explica por su débil interacción con el sitio de unión a tubulina.¹⁵¹ Es conveniente indicar la fácil isomerización que experimentan las combretastatinas al más estable isómero *trans* durante su almacenamiento, su administración o su disolución en disolventes próticos.¹⁵⁵

La actividad biológica de CA-4, unida a su inestabilidad configuracional, explican el desarrollo de estrategias sintéticas conducentes a la preparación de análogos más estables. En la figura 1.41 se representan las estructuras de algunos análogos de CA-4.¹⁵⁶ La transformación de CA-4 al compuesto *iso* CA-4 ha permitido encontrar actividades biológicas del mismo orden de magnitud en relación a la actividad inhibitoria de la polimerización de tubulina ($IC_{50} = 2.2 \mu M$ para *iso* CA-4 y $1.0 \mu M$ para la CA-4).¹⁵⁷

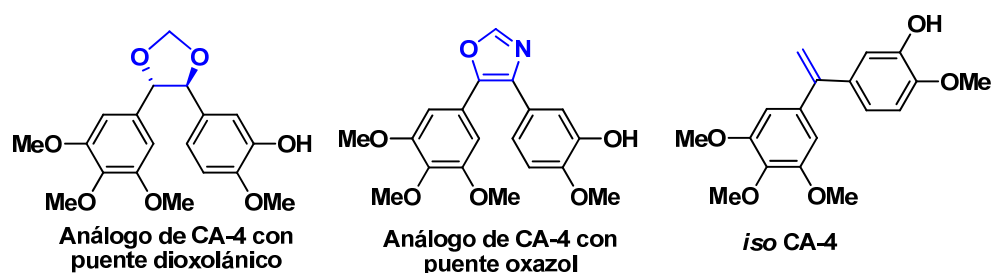


Figura. 1.41. Estructuras de análogos de combretastatina A-4

¹⁵⁵ Schobert, R.; Effenberg-Neidnicht, K.; Biersack, B. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *49*, 71.

¹⁵⁶ Messaoudi, S.; Tréguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J. F.; De Losada, J.; Liu, J. M.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; Brion, J. D.; Alami, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *14*, 4538. Para otros derivados oxazólicos de combretastatina A-4 véase: Mahal, K.; Biersack, B.; Schobert, R. *Int. J. Clin. Phar. Th.* **2013**, *51*, 41.

¹⁵⁷ Rasolofonjatovo, E.; Provot, O.; Hamze, A.; Rodrigo, J.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Desravines, D.; Dubois, J.; Brion, J. D.; Alami, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 32.

1.7.2.d. Pironetina

La mayoría de los agentes disruptores de la polimerización de la tubulina ejercen su modo de acción mediante unión a la β -tubulina. El grupo de sustancias que se unen de manera específica a la α -tubulina es mucho más reducido, siendo las más destacables la pironetina y la hemiasterlina.¹⁵⁸

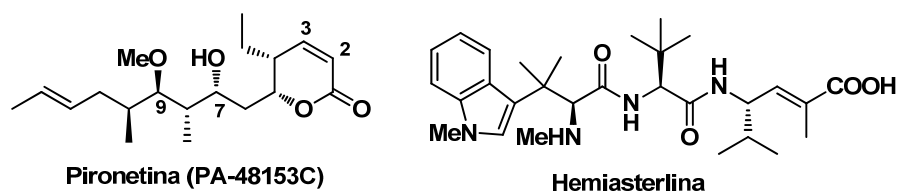


Figura 1.42. Productos naturales con capacidad de unión a α -tubulina

La pironetina fue aislada casi a la vez de dos microorganismos diferentes del género *Streptomyces*, en uno de ellos como un producto regulador de crecimiento vegetal (*Streptomyces* sp. NK10958) y en el otro como un producto con capacidad inmunosupresora (*Streptomyces prunicolor* PA48153), dándosele el nombre de PA-48153C.¹⁵⁹

La pironetina es un potente inhibidor del ensamblaje de microtúbulos y detiene el ciclo celular en la fase G2/M.^{160,113}

Los estudios de estructura-actividad de la pironetina han determinado que ésta ejerce su acción mediante unión covalente con el residuo Lis352 del segmento de α -tubulina, situado a la entrada de un pequeño hueco frente a la unidad de β -tubulina (véase la figura 1.43). Aunque su conformación de unión

¹⁵⁸ Sarabia, F.; García-Castro, M.; Sánchez-Ruiz, A. *Curr. Bioact. Compd.* **2006**, *2*, 269.

¹⁵⁹ (a) Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Harada, T.; Nishide, M.; Kurokawa, T.; Nakagawa, T.; Shimada, N.; Kobayashi, K. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 697. (b) Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Kurokawa, T.; Nakagawa, T.; Shimada, N.; Iitaka, Y. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 703.

¹⁶⁰ (a) Anderson, H. J.; Coleman, J. E.; Andersen, R. J.; Roberge, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *39*, 223. (b) Kondoh, M.; Usui, T.; Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Nishikawa, K.; Nishikiori, T.; Mayumi, T.; Osada, H. *Cancer Lett.* **1998**, *126*, 29. (c) Kondoh, M.; Usui, T.; Nishikiori, T.; Mayumi, T.; Osada, H. *Biochem. J.* **1999**, *340*, 411. (d) Watanabe, H.; Usui, T.; Kondoh, M.; Osada, H.; Kitahara, T. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 540.

no se ha observado directamente, el sitio propuesto ha sido computacionalmente modelado.¹⁶⁰

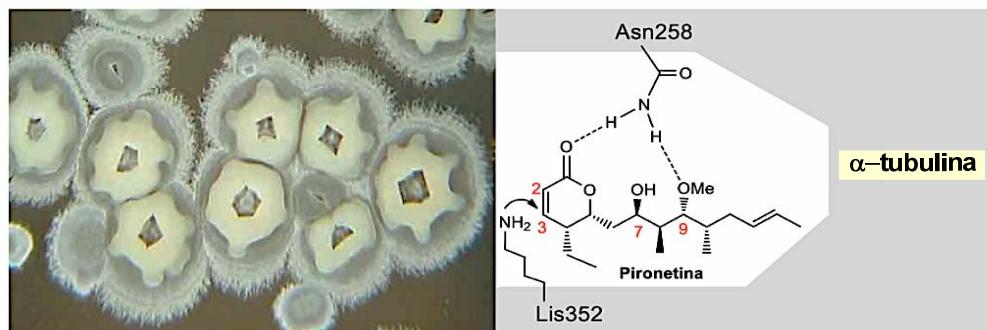


Figura 1.43. *Streptomyces* sp (izquierda) y modelo esquemático de unión covalente de la pironetina a α -tubulina (derecha)

La adición nucleofílica Michael al doble enlace conjugado del anillo de pirona de la pironetina, podría estar apoyada por la fijación de la molécula de pironetina mediante la intervención de sendos enlaces de hidrógeno entre el residuo de Asn258 con el carbonilo de la pirona y con el grupo metoxilo. Esta suposición está apoyada por la ineficiente unión de la pironetina a α -tubulinas mutantes en las que se han sustituido los residuos de Asn258 o la Lis352 por alanina.¹¹³

En la figura 1.44 se muestra el sitio de unión de la pironetina, marcado con un círculo de color naranja, situado en un pequeño hueco de la α -tubulina frente al sitio de unión de los alcaloides de la vinca en la β -tubulina (marcado con un círculo amarillo). De hecho, la unión de la pironetina a la tubulina inhibe la unión de la vinblastina en experimentos competitivos.^{160b}

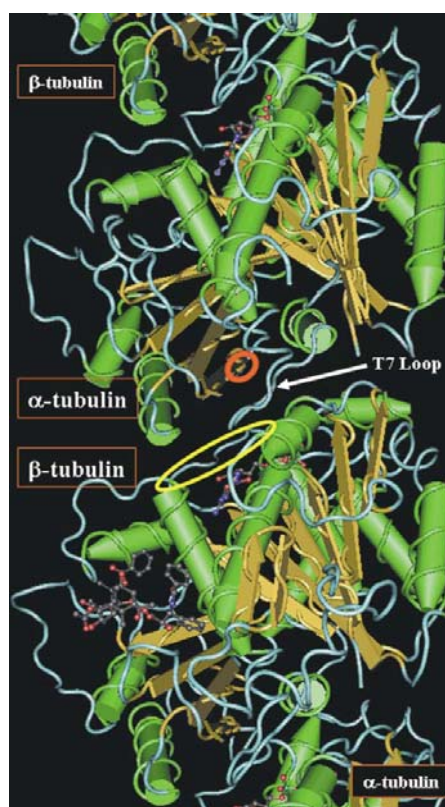


Figura 1.44. Interfase entre dos dímeros de α,β -tubulina. Círculo naranja: sitio de unión de la pironetina en la α -tubulina. Círculo amarillo: sitio de unión de los alcaloides de la vinca en la β -tubulina

Kitahara y colaboradores prepararon una pequeña serie de derivados de pironetina y demostraron el papel clave que juega el doble enlace conjugado entre C-2 y C-3 en la actividad de la pironetina.^{160d} Este y otros estudios establecieron que también era importante la presencia de un oxígeno unido al carbono C-9, sin importar que estuviera metilado o libre. También se ha observado que el grupo hidroxilo unido al carbono C-7 juega un papel relevante en la actividad de la pironetina.^{160c} La pironetina y sus derivados, como el análogo desmetilado NK10958P, detienen la progresión del ciclo celular en la fase G2/M a concentraciones por debajo de 20 ng/ml, mientras

que el análogo epoxipironetina, aunque menos activo, también es capaz de parar el ciclo celular en la fase G2/M.¹¹³

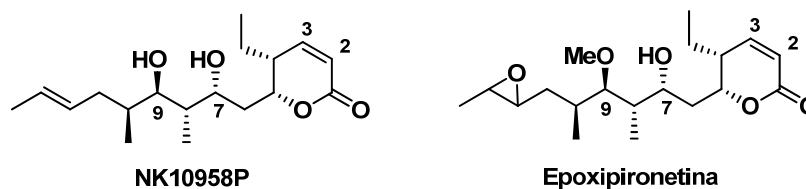


Figura 1.45. Estructuras de análogos de pironetina

1.8. Resistencia múltiple a fármacos

Las primeras evidencias de resistencia a fármacos se detectaron en el caso de los antibióticos,¹⁶¹ aunque más tarde se descubrió que también se veían afectados por estos mecanismos celulares los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer, incluidas las moléculas que interaccionan con tubulina.¹⁶²

Uno de los mecanismos de resistencia más comunes identificados en estudios preclínicos está relacionado con la glicoproteína P. Las células cancerosas expuestas a la quimioterapia pueden sobreexpresar la proteína transportadora ABC, del inglés *ATP-Binding Cassette transporter*, codificada por el gen MDR1,¹⁶³ u otras como la proteína MRP, del inglés *Multidrug Resistance-associated Protein*.¹⁶⁴

La ABC o la MRP son fosfoglicoproteínas que funcionan como bombas expulsoras de fármacos del interior al exterior celular, disminuyendo los niveles de fármaco en la célula y, por consiguiente, limitando la citotoxicidad

¹⁶¹ (a) Rossi, L. M.; Rangasamy, P.; Zhang, J.; Qiu, X.-Q.; Wu, G. Y. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *97*, 1060. (b) Courvalin, P. *J. Intern. Med.* **2008**, *264*, 4. (c) Gualtieri, M.; Baneres-Roquet, F.; Villain-Guillot, P.; Pugniere, M.; Leonetti, J.-P. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 390.

¹⁶² Kavallaris, M. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 194.

¹⁶³ Gottesman, M. M. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615.

¹⁶⁴ *Nat. Biotechnology* **2000**, *18*, 18 (suplemento). <http://biotech.nature.com>.

de aquél. Este mecanismo de autodefensa de las células se conoce como MDR, del inglés *MultiDrug Resistance* (resistencia múltiple a fármacos).¹⁶⁵

Fármacos muy empleados en quimioterapia, como el paclitaxel, se unen a su diana mediante interacciones débiles (Van der Waals, enlaces de hidrógeno, etc.), lo que los hace lábiles frente al mecanismo de expulsión.

Una forma de evadir los sistemas de defensa de las células cancerosas consiste en diseñar fármacos que no actúen como sustratos de la glicoproteína P. Por ejemplo, una molécula será poco susceptible de interactuar con dicha proteína si se logra que la interacción con su receptor sea irreversible, es decir, de tipo covalente. De este modo, se consigue un equilibrio de unión fármaco-diana muy desplazado y, por consiguiente, una baja concentración de fármaco libre susceptible de interactuar con la bomba transmembrana. Como se ha explicado anteriormente, este sería el caso de la pironetina, que forma un enlace covalente con la tubulina gracias a una adición de tipo Michael con el residuo lisina 352.

Como resultado de este comportamiento inerte frente a la glicoproteína P, los fármacos que poseen un modo de acción de tipo covalente presentan una actividad citotóxica similar tanto en células cancerosas sensibles a la quimioterapia como en células que expresan el fenotipo MDR.¹⁶⁶ Así, por ejemplo, la pironetina evidenció capacidad antiproliferativa en el caso de células de la línea tumoral pulmonar humana H69 que exhiben resistencia frente a la vindesina y al paclitaxel, dos productos que interactúan con β -tubulina. Asimismo, la pironetina mostró capacidad para inhibir el crecimiento

¹⁶⁵ (a) Perez, E. A. *Breast Cancer Res. Tr.* **2009**, *114*, 195. (b) Hopper-Borge, E.; Xu, X.; Shen, T.; Shi, Z.; Chen, Z. S.; Kruh, G. D. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 178. (c) Liu, F. S. *Taiwan J. Obstet. Gyne.* **2009**, *48*, 239. (d) Zhou, S. F.; Wang, L. L.; Di Y. M. et al. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1981. (e) Hembruff, S. L.; Laberge, M. L.; Villeneuve D. J.; et al. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 318. (f) Rottenberg, S.; Nygren, A. O. H.; Pajic M.; et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12117. (g) Sharma, S.; Piwnica-Worms, D. *Chem. Rew.* **1999**, *99*, 2545. (h) Zaman, G. J. R.; Flens, M. J.; van Leusden M. R.; et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8882.

¹⁶⁶ Buey, R. M.; Calvo, E.; Barasoain, I.; Pineda, O.; Edler, M. C.; Matesanz, R.; Cerezo, G.; Vanderwal, C. D.; Day, B. W.; Sorensen, E. J.; López, J. A.; Andreu, J. M.; Hamel, E.; Díaz, J. F. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 117.

de células leucémicas humanas K562 con capacidad de resistencia múltiple a fármacos (K562/ADM), causando bloqueo mitótico total y apoptosis a concentraciones en el rango nanomolar bajo.¹⁶⁷

Otro tipo de resistencia observada sobre algunas de las moléculas que se unen a la β -tubulina (paclitaxel, alcaloides de la *vinca*, epotilonas) está producida por una mutación en dicha subunidad de la tubulina, lo que conlleva alteraciones en la conformación del sitio de unión del fármaco y en la dinámica de los microtúbulos, disminuyendo así la actividad biológica. Un ejemplo de este tipo de resistencias puede observarse en la línea celular 1A9, correspondiente a células de carcinoma humano de ovario, al ser tratadas con paclitaxel.¹⁶⁸

1.9. Angiogénesis

La angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos vasculares ya existentes. La angiogénesis comprende la migración, crecimiento y diferenciación de las células endoteliales (ECs) que forman el revestimiento interno de los vasos sanguíneos. El proceso angiogénico está controlado por un delicado balance entre reguladores estimulantes e inhibidores. Los primeros activan la reparación de vasos sanguíneos dañados y la formación de vasos sanguíneos nuevos. Los segundos bloquean el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Normalmente, los efectos estimulantes e inhibidores están equilibrados, de modo que los vasos sanguíneos se forman solamente cuando y donde sean necesarios. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis:¹⁶⁹

¹⁶⁷ Yoshida, M.; Matsui, Y.; Ikarashi, Y.; Usui, T.; Osada, H.; Wakasugi, H. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 729.

¹⁶⁸ (a) Giannakakou, P.; Sackett, D. L.; Kang, Y. K.; Zhan, Z.; Buters, J. T.; Fojo, T.; Poruchynsky, M. S. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17118. (b) Giannakakou, P.; Gussio, R.; Nogales, E.; Downing, K. H.; Zaharevitz, D.; Bollbuck, B.; Poy, G.; Sackett, D.; Nicolaou, K. C.; Fojo, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 2904.

¹⁶⁹ Martínez-Ezquerro, J. D.; Herrera, L. A. *Cancerología* **2006**, *1*, 83.

a) *La angiogénesis fisiológica/normal*. Este proceso tiene lugar durante la embriogénesis y continúa después del nacimiento en el desarrollo temprano post-natal, aportando el oxígeno y los nutrientes requeridos por los órganos en crecimiento, proporcionando señales promotoras morfológicas y siendo fundamental para la formación del hueso endocondral¹⁷⁰ y en el crecimiento del esqueleto.

b) *La angiogénesis patológica/anormal*. Este proceso se produce cuando se alcanza y se sobrepasa el umbral entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos.

La angiogénesis patológica se puede clasificar en dos tipos:

b1) *La angiogénesis activada*, en la que dominan los niveles de moléculas proangiogénicas. Este tipo de angiogénesis está asociada, muy frecuentemente a enfermedades malignas, además de estar implicada en la obesidad, el asma, la diabetes, la cirrosis, la esclerosis múltiple, la endometriosis, el SIDA, las infecciones bacterianas y las enfermedades auto-inmunes.

b2) *La angiogénesis inhibida*, en la que dominan los niveles de moléculas antiangiogénicas. Este proceso está asociado al mal funcionamiento de células endoteliales (ECs) e impide la revascularización, la cicatrización y la regeneración de los vasos sanguíneos.

La mayoría de los tumores persisten durante largos periodos de tiempo, meses e incluso años, en un estado avascular aquiescente. En esta fase el tumor está formado por unos millones de células. Cuando un subgrupo de éstas cambia a fenotipo angiogénico, por alteración del equilibrio entre reguladores positivos y negativos de la angiogénesis, el tumor comienza a crecer rápidamente.¹⁷¹ Los nuevos vasos sanguíneos tumorales aportan los

¹⁷⁰ El hueso endocondral es el que se forma en los fetos a partir de tejido cartilaginoso. El término endocondral significa que la osificación se realiza desde el interior del cartílago hacia el exterior.

¹⁷¹ Madhusudan, S.; Harris, A. L. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, 2, 403.

nutrientes necesarios a las células malignas favoreciendo el crecimiento del tumor. Por otro lado, el proceso de angiogénesis tumoral facilita la diseminación de las células cancerígenas en el torrente sanguíneo, lo que promueve la diseminación del tumor y la aparición de metástasis (véase la figura 1.45).

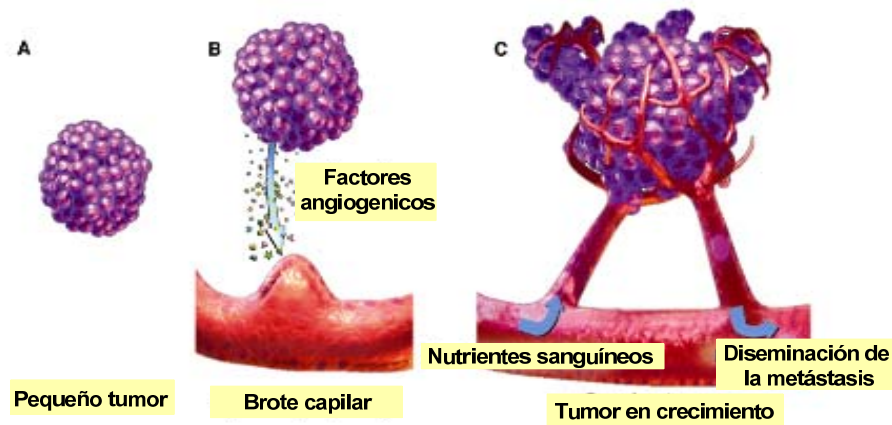


Figura 1.46. Representación del proceso de angiogénesis

1.9.1. Reguladores de la angiogénesis

El proceso de angiogénesis está regulado por citoquinas y por factores de crecimiento, siendo uno de los más importantes el denominado factor de crecimiento del endotelio vascular, conocido con el acrónimo VEGF por su denominación en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*. Este regulador fue identificado en 1989 por Ferrara y Henzel como el principal factor involucrado en la angiogénesis.¹⁷²

El VEGF es una proteína homodimérica unida mediante puentes disulfuro. La familia del VEGF incluye al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF (del inglés *Placental Growth Factor*). De esta familia, el más estudiado es el VEGF-A, que es referido simplemente como VEGF.

¹⁷² (a) Ferrara, N.; Henzel, W. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 851. (b) Kim, K. J.; Li, B.; Winer, J.; Armanini, M.; Gillet, N.; Phillips, H. S.; Ferrara, N. *Nature* **1993**, *362*, 841.

Las distintas isoformas del VEGF-A incrementan la permeabilidad vascular, estimulan la proliferación y la migración de las células endoteliales, proveen a dichas células con señales de supervivencia y anti-senescencia, y fomentan la neuroprotección en los desórdenes isquémicos. Se han descrito seis isoformas humanas de VEGF-A con un número diferente de aminoácidos (VEGF 121, 145, 165, 183, 189 y 206) generados como resultado del procesamiento alternativo del RNAm.¹⁷²

El VEGF-121 es responsable del aumento de la permeabilidad vascular mientras que el VEGF-165 es un importante estimulador de la proliferación de células endoteliales. Estas dos isoformas de VEGF son las más abundantes.

La expresión de VEGF está mediada por receptores de tipo tirosina-quinasa denominados VEGFR que se localizan en la superficie de las células endoteliales vasculares y en la superficie de células derivadas de la médula ósea.

En la figura 1.47 se esquematizan los diferentes VEGF y su relación con los receptores a ellos asociados (VEGFR). Así, el VEGF-A emplea sitios de unión simétricos en cada polo del dímero para unirse tanto al VEGFR-1 como al VEGFR-2.¹⁷³

El VEGF-B se une al receptor VEGFR-1 modulando la actividad de VEGF-A en células endoteliales durante el desarrollo embrionario y durante la angiogénesis patológica. El VEGF-B se expresa en tumores humanos benignos y malignos.¹⁷⁴

El VEGF-C y el VEGF-D se unen a VEGFR-2 en células endoteliales de vasos sanguíneos. Estos miembros de la familia VEGF se unen a su receptor VEGFR-3 en los tejidos linfáticos promoviendo el desarrollo de vasos linfáticos.

¹⁷³ Dvorak H. F. *Thromb Haemost.* **2005**, 3, 1835.

¹⁷⁴ Partanen, T. A.; Paavonen, K. *Microsc. Res. Tech.* **2001**, 55, 108.

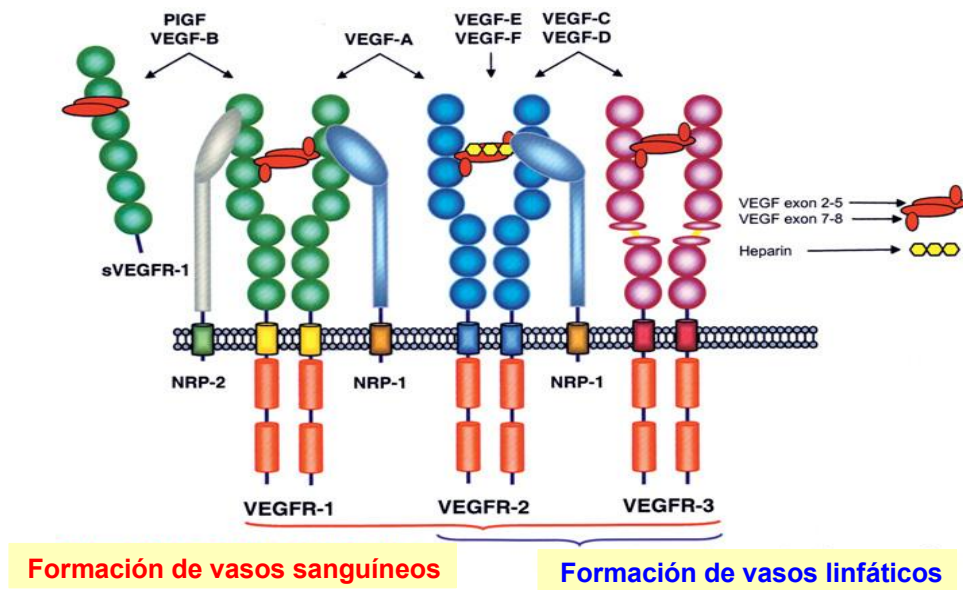


Figura 1.47. Familia de proteínas del VEGF y receptores asociados

El VEGF-C se expresa significativamente en tumores como los de mama, cervix, colon, próstata, pulmón y estómago, siendo una potente diana anticancerígena.¹⁷⁵

La expresión de VEGF-D se correlaciona con metástasis de ganglios linfáticos en el cáncer colorrectal, en el cáncer de pulmón y en los carcinomas de ovario.¹⁷⁶

El VEGF-E fue descubierto en el genoma del parapoxivirus Orf (cepa NZ-7), un virus de cadena lineal doble de ADN que causa dermatitis pustular contagiosa en ovejas, cabras y ocasionalmente en seres humanos. El VEGF-E se une y activa específicamente al VEGFR-2 resultando en un efecto

¹⁷⁵ (a) Siegfried, G.; Basak, A.; Cromlish, J. A. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 1723. (b) Su, J. L.; Yang, P. C.; Shih, J. Y. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 209. (c) Shida, A.; Fujioka, S.; Kobayashi, K. *J. Clin. Onc.* **2006**, *11*, 38.

¹⁷⁶ (a) Achen, M. G.; Williams, R. A.; Minekus, M. P. *J. Pathol.* **2001**, *193*, 147. (b) Funaki, H.; Nishimura, G.; Harada, S. *Oncology* **2003**, *64*, 416. (c) Niki, T.; Iba, S.; Tokunou, M.; Yamada, T.; Matsuno, Y.; Hirohashi, S. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2431.

mitogénico y en actividad de permeabilidad vascular similar al producido por el VEGF-A.¹⁷⁷ Para el VEGF-F no se ha caracterizado del todo su función.

La interacción del VEGF con sus receptores induce una cascada de señalización intracelular que favorece la supervivencia de las células endoteliales activando su proliferación, migración, diferenciación, y transformación, aportando oxígeno e incrementando la permeabilidad vascular. La unión del VEGF a sus receptores también regula la expresión de otras proteínas implicadas en la angiogénesis.¹⁷⁸

La expresión del VEGF se aumenta mediante estímulos tales como hipoxia/isquemia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia 1.¹⁷⁹ Por otro lado, el gen supresor del ciclo celular p53 juega un papel importante en la inhibición de la angiogénesis y en la expresión del VEGF. La proteína producida por el gen p53 es la principal inductora de la apoptosis y participa en la secreción de la trombospondina-1, una glicoproteína endógena que inhibe la angiogénesis. Las mutaciones que inactivan al gen p53 estimulan la proliferación celular y ocasionan un incremento en la expresión de VEGF.¹⁸⁰

1.9.2. Inhibidores de la angiogénesis

1.9.2.a. Inhibidores de VEGF

El efecto de los VEGF está mediado por los receptores VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 todos con actividad tirosina-quinasa. El bevacizumab (Avastrin®) es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF que se emplea en el tratamiento del cáncer de colon, mama y cáncer de pulmón no microcítico. El

¹⁷⁷ Shibuya, M. *Cell Struct. Funct.* **2001**, 26, 25.

¹⁷⁸ Garrel, D.; *A natural liquid cartilage extract brings new hope for patients with metastatic renal cell carcinoma*. Tomado: <http://www.angioworld.com/DominiqueGarrel.html>

¹⁷⁹ La hipoxia se define como el estado de deficiencia de oxígeno en sangre, células y tejidos del organismo con compromiso de la función de éstos.

¹⁸⁰ (a) Lee, M.; Hwang, J.T.; Lee, H.J.; Jung, S.N.; Kang, I.; Chi, S.G.; Kim S.S.; Ha, J., *Biol Chem* **2003**, 278, 39653. (b) Dameron, K.M.; Volpert, O.V.; Tainsky M. A.; Bouck, N. *Science* **1994**, 265, 1582.

bevacizumab se une al VEGF evitando la unión de éste a los receptores endoteliales VEGFR-1 y VEGFR-2 (véase la figura 1.48).¹⁸¹

En la actualidad se está investigando la acción del bevacizumab en el tratamiento del cáncer colorrectal, como tratamiento adyuvante del cáncer de colon de alto riesgo tras cirugía radical y en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de recto. También se está estudiando su aplicación en otros tipos de tumores, como el carcinoma de pulmón y el cáncer de mama metastáticos.¹⁸²

Otras estrategias antitumorales, que también dirigen su foco de acción a la inhibición de la angiogénesis, se centran en la administración de pequeñas moléculas que bloquean la actividad tirosina-quinasa de los receptores VEGFR, como el sorafenib, el sunitinib, etc. En la figura 1.48 se indican esquemáticamente los puntos de actuación de los fármacos antiangiogénicos.

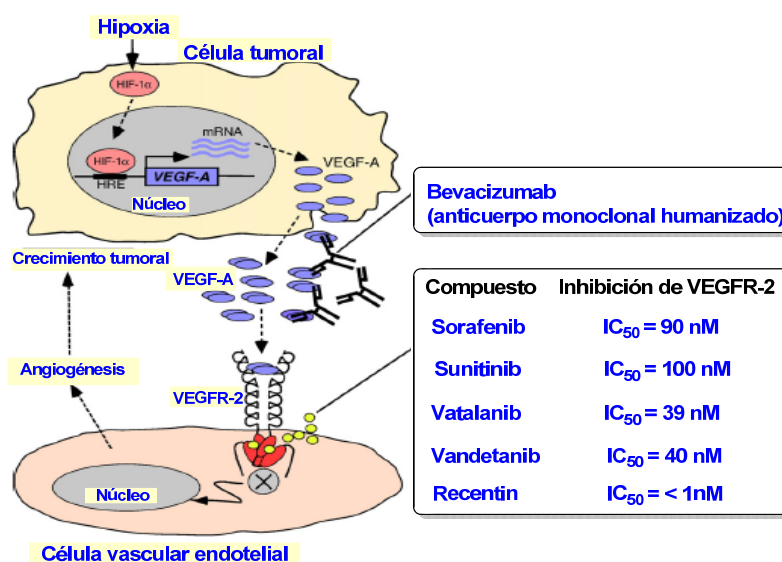


Figura 1.48. Puntos de actuación de los fármacos antiangiogénicos

¹⁸¹ (a) Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; Ferrara, N.; Fyfe, G.; Rogers, B.; Ross, R.; Kabbinavar, F. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335. (b) Cao, Y. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1304.

¹⁸² Tabernero, J. *Inhibidores de VEGF y VEGFR*. Servicio de Oncología. Hospitales Vall de Hebrón. <http://webcasts.prous.com/cnio2005/contents/articles/tabernero2.pdf>

En la figura 1.49 se representan las estructuras de algunos de los compuestos empleados en terapia antiangiogénica.

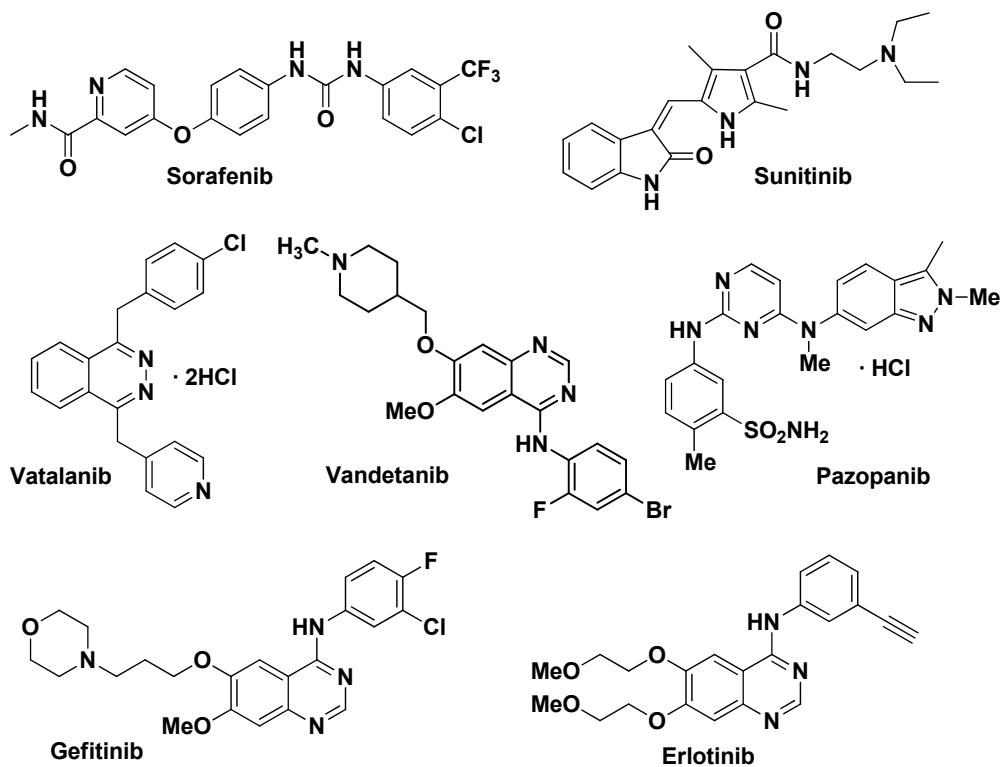


Figura 1.49. Estructuras de inhibidores de tirosina-quinasas recpetoras de VEGF

Otras estrategias se enfocan a impedir el proceso de transducción de señal de los receptores tirosina-quinasa (RTK).¹⁸³

1.9.2.b. Inhibidores de proteína-quinasas

Las quinasas, junto con las fosfatasas, son enzimas que regulan el estado de fosforilación de las proteínas intracelulares y juegan un papel importante en la transducción de señales en células normales, regulando una variedad de

¹⁸³ (a) Lin, P.; Sankar, S.; Shan, S. *Cell Growth Differ*, **1998**, 9, 49. (b) McMahon, G. *The Oncologist*, **2000**, 5, 3.

procesos celulares como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la supervivencia, la migración o la angiogénesis.¹⁸⁴

Las tirosina-quinasas se dividen en dos grupos:¹⁸⁵

1. *Tirosina-quinasas que funcionan como receptoras (RTKs)*. Las RTKs son proteínas transmembrana que contienen un dominio extracelular al que se unen diferentes ligandos, y un dominio intracelular, con actividad tirosina-quinasa.¹⁸⁶
2. *Tirosina-quinasas citoplasmáticas no receptoras (no-RTKs)*. Estas enzimas son proteínas intracelulares que funcionan por debajo de las RTKs en rutas de transducción de señal.

Las quinastas anómalas se caracterizan por su hiperactividad, lo que provoca procesos de fosforilación descontrolada que pueden desembocar en un proceso cancerígeno. La inhibición de este tipo de quinastas aberrantes es una de las nuevas dianas farmacológicas en los tratamientos anticancerígenos.

Los fármacos inhibidores de quinastas, como el sunitinib, el gefitinib, el erlotinib, el lapatinib, y el sorafenib se emplean en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Además de estos fármacos, muchos otros están en distintas fases de desarrollo.¹⁸⁷ En la figura 1.50 se muestran las estructuras de algunos fármacos inhibidores de quinastas.

La principal diferencia entre los fármacos anteriores y los anticuerpos monoclonales es que aquéllos presentan disponibilidad oral mientras que éstos sólo pueden utilizarse por vía intravenosa.¹⁸⁸

¹⁸⁴ Pawson, T. *Cell* **2004**, *116*, 191.

¹⁸⁵ Robinson, D. R.; Wu, Y. M.; Lin, S. F. *Oncogene* **2000**, *19*, 5548.

¹⁸⁶ Hubbard, S. R.; Till, J. H. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 373

¹⁸⁷ Atkins, M.; Jones, C.A.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 279.

¹⁸⁸ Véase: <https://www.lilly.es/PRENSA/medical/cancer/archivos/13.%20TRATAMIENTO.pdf>

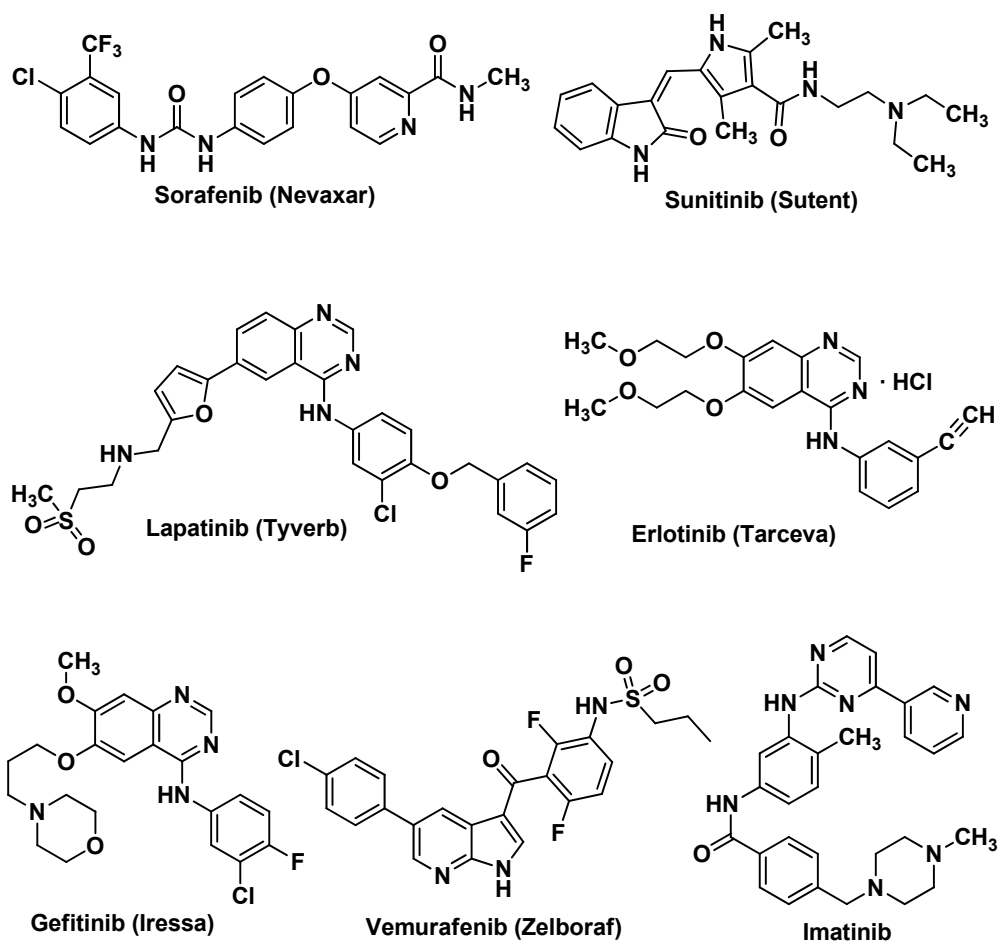


Figura 1.50. Estructuras de fármacos inhibidores de tirosina-quinasas

Los tratamientos antiangiogénicos deben resolver algunas importantes cuestiones, como la diferente respuesta de los pacientes a la misma terapia antiangiogénica,¹⁸⁹ la relación respuesta-coste del fármaco,¹⁹⁰ la resistencia

¹⁸⁹ (a) Garassino, M.C.; Hollander, L.; Torri. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 1373. (b) Haines, I.E.; Miklos, G. L. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1637. (c) Plotkin, S.R.; Stemmer-Rachamimov, A.O.; Barker, F. G.; Halpin, C.; Padera, T. P.; Tyrell, A.; Sorensen, A.G.; Jain, R. K.; di Tomaso, E. *Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 358. (d) Kerbel, R. S. *Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2039.

¹⁹⁰ (a) Jain, R. K.; Duda, D. G.; Willet, C. G.; Sahani, D. V.; Zhu, A. X.; Loeffler, J. S.; Batchelor, T. T.; Sorensen, A. G. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, *6*, 327. (b) Cao, Y.; Zhong, W.; Sun, Y. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 338.

evasiva que ofrecen algunos fármacos antiangiogénicos, que son a menudo muy efectivos en el primer estadio del tratamiento, pero provocan resistencia cuando se prolonga el tratamiento,¹⁹¹ y los efectos secundarios entre las que destacan las incidencias cardiovasculares.¹⁹²

Las terapias antiangiogénicas se administran en combinación con quimioterapia. De acuerdo con el mecanismo de angiogénesis del tumor, los inhibidores angiogénicos deben ser suministrados a los pacientes con cáncer por el resto de su vida, debido a que una discontinuación en el tratamiento puede acelerar la revascularización y la recidiva del tumor.¹⁹³

Algunos agentes antimitóticos son también antiangiogénicos. Esta particularidad, que se ha encontrado tanto en compuestos que se unen al dominio vinca como a los que se unen a los sitios de taxol o colchicina, es muy interesante desde el punto de vista oncológico ya que la formación de tumores va asociada al fenómeno de metástasis, el cual está directamente relacionado con la capacidad del tumor para formar nuevos vasos sanguíneos.¹⁹⁴

1.10. Telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína que se encarga de la adición de desoxirribonucleótidos en los extremos de los telómeros, manteniendo así una longitud telomérica estable a lo largo de la historia replicativa de determinados tipos celulares.¹⁹⁵

¹⁹¹ Cao Y. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 338.

¹⁹² Verheul, H. M. W.; Pinedo, H. M. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 475.

¹⁹³ (a) Folkman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273. (b) Ebos, J. M.; Lee, C. R.; Christensen, J. G.; Mutsaers, A. J.; Kerbel, R.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17069. (c) Mancuso, M. R.; Davis, R.; Norberg, S. M.; O'Brien, S.; Sennino, B.; Nakahara, T.; Yao, V. J.; Inai, T.; Brooks, P.; Freimark, B.; Shalinsky, D. R.; Hu-Lowe, D. D.; McDonald, D. M. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2610.

¹⁹⁴ Schwartz, L. S. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 2594.

¹⁹⁵ Collins, K.; Mitchell, J. R. *Oncogene* **2002**, *21*, 564.

Los telómeros son regiones de ADN no codificante, altamente repetitivas, situadas en los extremos de los cromosomas y cuya función principal es la de proteger a éstos frente a la degradación que tiene lugar, de forma natural, después de cada ciclo de replicación.¹⁹⁶

El mantenimiento de la longitud telomérica, en consecuencia, requiere un delicado equilibrio entre acortamiento y alargamiento. Si el acortamiento es excesivo el sujeto empieza padecer síntomas asociados al envejecimiento prematuro. Si la actividad de la telomerasa es aberrante se puede favorecer la inmortalidad de las células malignas.

En la parte izquierda de figura 1.51 se presenta la zona telomérica de los cromosomas mediante una región brillante.

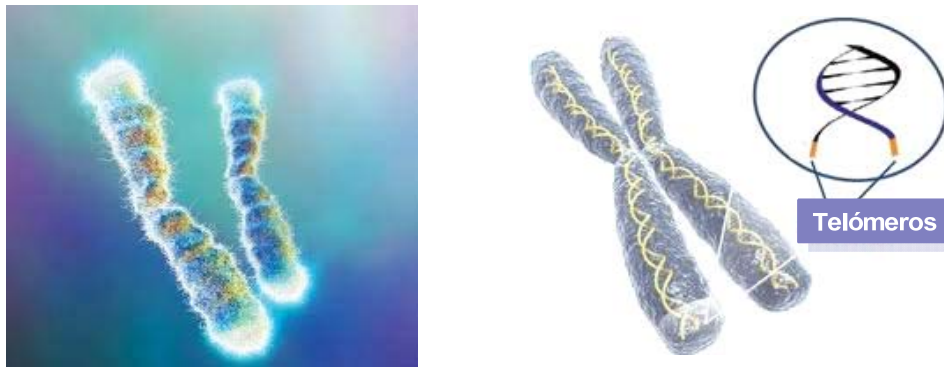


Figura 1.51. Representaciones de ADN y telómeros asociados

En la parte derecha de la figura 1.51 se puede ver, rodeado por un círculo, una representación de la parte final de un cromosoma con sus telómeros (en amarillo), situados en los extremos de ambas hebras de ADN.

¹⁹⁶ (a) Blackburn, E.H. *Nature* **1991**, 350, 569. (b) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell*, **1985**, 43, 405. (c) Kirkpatrick, K. L.; Mokbel, K. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2001**, 27, 754.

La telomerasa fue descubierta por E. Blackburn y C. Greider en 1985 en el protozoo *Tetrahymena*.¹⁹⁷ En la figura 1.52 se indica una representación de la enzima telomerasa de *Tetrahymena* reconstruyendo un telómero mediante adición de la secuencia TTGGGG. En los vertebrados la secuencia que añaden las telomerasas es TTAGGG.

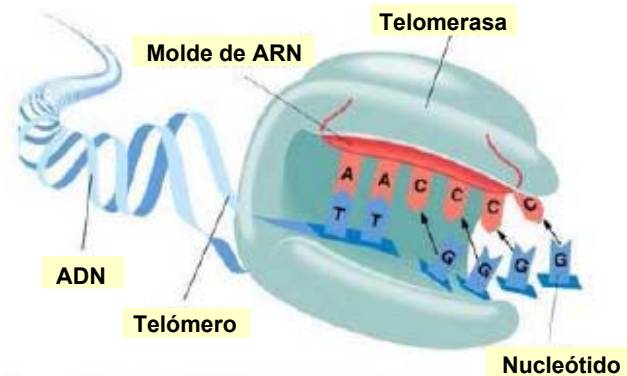


Figura 1.52. Representación de la enzima telomerasa reconstruyendo un telómero

La telomerasa está formada por tres componentes:

a) Componente ribonucleotídico, denominado TER, de *Telomerase RNA*, que contiene la porción de ARN de la telomerasa. La longitud del componente TER depende de las especies, y puede contener entre 146 a 1.544 nucleótidos. La secuencia molde del telómero suele tener una longitud de entre 9 y 28 nucleótidos y también es característica de cada especie.

b) Componente proteico, denominado TERT, de *Telomerase Reverse Transcriptase*, que es la parte de la enzima que contiene la capacidad transcriptasa inversa encargada de la transcripción de la parte TER en ADN.

c) La proteína diskarina (Dkc1) que se encarga del ensamblaje entre TERT y TER.

¹⁹⁷ Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1985**, *43*, 405. Los científicos Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, junto con Jack W. Szostak, fueron galardonados con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina, del año 2009, por descubrir cómo los cromosomas están protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa.

La telomerasa es reprimida en las células somáticas maduras después del nacimiento. En cada ciclo replicativo los telómeros se acortan a causa del problema intrínseco de la replicación de los extremos de las secuencias de ADN lineales.¹⁹⁸

La expresión de la telomerasa en los mamíferos está restringida a ciertas etapas tempranas del desarrollo embrionario y, en adultos, a determinados compartimentos de las células madre adultas y algunos linajes celulares altamente proliferativos, como los linfocitos, los queratinocitos o las células germinales. Como las células sanas no expresan la enzima telomerasa, es decir no llevan a cabo la síntesis de dicho enzima, los telómeros se van acortando después de cada proceso de división celular. Debido a que los telómeros son secuencias no codificantes de nucleótidos, su acortamiento inicial no produce daños en el código genético. Sin embargo, después de muchas divisiones celulares el telómero ha desaparecido y las nuevas divisiones celulares provocan el acortamiento de regiones codificantes, lo que conlleva pérdida de información genética. Cuando se llega a este punto se produce la muerte de la célula por senescencia. En las células cancerosas la telomerasa está sobreexpresada, lo que explica que este tipo de células no alcancen nunca la senescencia, por lo que se dice que las células cancerosas se han convertido en células *inmortales*.¹⁹⁹

La actividad telomerasa constituye el principal mecanismo regulador de la longitud telomérica, si bien existen unos mecanismos alternativos para el alargamiento de la longitud telomérica que funcionan en ausencia de la telomerasa en ciertos tipos de cáncer como el osteosarcoma o el glioma multiforme.²⁰⁰

El acortamiento telomérico hace que la mayor parte de las células de nuestro organismo tengan una vida limitada. La longitud telomérica es una de

¹⁹⁸ de Lange, T. *Science* **2009**, 326, 948.

¹⁹⁹ Blasco, M. A. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6, 611.

²⁰⁰ Lundblad, V.; Blackburn, E. H. *Cell* **1993**, 73, 347.

las principales barreras contra la proliferación incontrolada. De hecho, el 90% de los procesos tumorales cursan en algún momento con una reactivación anómala de la actividad telomerasa. Estos datos ponen de manifiesto la estrecha dependencia entre la adquisición de un potencial replicativo ilimitado y la capacidad tumorigénica de las células.²⁰¹

La actividad aberrante de la telomerasa explica la necesidad de buscar inhibidores químicos de estas enzimas que puedan actuar de forma localizada y controlada para poder así prevenir la aparición y el progreso de manifestaciones tumorales, sin perjudicar la longevidad ni la homeostasis tisular. Se ha demostrado que los ratones deficientes en telomerasa muestran resistencia al cáncer, validando a la telomerasa como una prometedor diana en terapias antitumorales.²⁰²

La actividad telomérica detectada en ciertas células humanas aparece ligada a la sobreexpresión de la proteína hTERT, por lo que se puede afirmar que esta proteína es el factor limitante para el ensamblaje del complejo enzimático activo que forma la telomerasa. La expresión de hTERT tiene lugar, básicamente, a nivel transcripcional aunque, recientemente, se ha observado que también existe un control post-traducciona l de la misma. La regulación transcripcional de hTERT está controlada esencialmente por los factores de transcripción c-Myc y sp1.²⁰³

El factor de transcripción c-Myc es una proteína, codificada por el oncogen que recibe el mismo nombre,²⁰⁴ que está implicado en una amplia red de vías celulares, y por esta razón tiene múltiples funciones como son la progresión

²⁰¹ La mera reactivación de la telomerasa no constituye un evento transformante *per se*, véase: Hahn, W. C.; Counter C. M.; Lundberg, A. S.; Beijersbergen, R. L.; Brooks M. V.; Weinberg R. A. *Nature* **1999**, *400*, 464.

²⁰² (a) Blasco, M. A.; Funk, W.; Villaponteau, B.; Greider, C. W. *Science* **1995**, *269*, 1267. (b) Blasco, M. A.; Lee, H.-W.; Hande, P.; Samper, E.; Lansdorp, P.; DePinho, R. A.; Greider, C. W. *Cell* **1997**, *91*, 25. (c) González-Suárez, E.; Samper, E.; Flores, J. M.; Blasco, M. A. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 114.

²⁰³ Wang, J.; Xie, L. Y.; Allan, S.; Beach, D.; Hannon, G. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1769.

²⁰⁴ El gen regulador c-Myc fue descubierto mediante su homología con el gen transformante del virus de la mielocitomatosis aviar MC29 (v-Myc), véase: Vennstrom, B.; Sheiness, D.; Zabielski, J.; Bishop, J. M. *J. Virol.* **1982**, *42*, 773.

del ciclo celular, el metabolismo celular, la angiogénesis, la adherencia celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la diferenciación celular (véase la figura 1.53).²⁰⁵

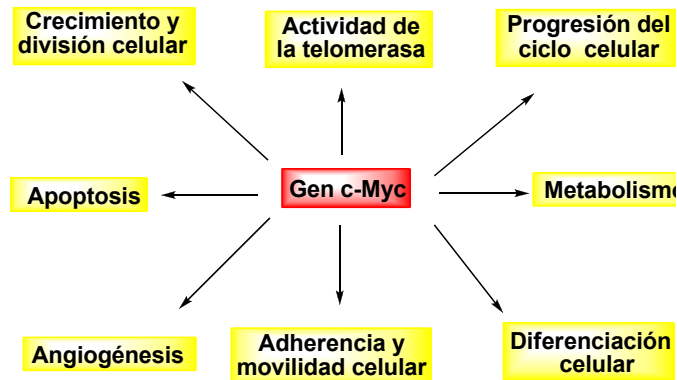


Figura 1.53. Funciones celulares en las que participa el gen c-Myc

El gen c-Myc se encuentra alterado en un gran número de tumores sólidos, leucemias y linfomas. Las alteraciones de c-Myc encontradas con mayor frecuencia en células cancerosas son las amplificaciones, translocaciones, mutaciones y reordenamientos cromosómicos que involucran el locus de este gen y conducen a que se desregule su expresión en diversas neoplasias humanas. La amplificación de c-Myc es una alteración común en los cánceres de mama, pulmón, ovario y próstata, así como en leucemias y linfomas, mientras que la pérdida de su regulación es común en el cáncer de colon, en tumores ginecológicos y en el melanoma.²⁰⁶

²⁰⁵ Eilers, M.; Eisenman, R. N. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2755.

²⁰⁶ Wang, J.; Xie, L. Y.; Allan, S.; Beach, D.; Hannon, G. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1769.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Introducción

Uno de los principales objetivos de la síntesis orgánica es la preparación de compuestos que exhiban nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas. La Naturaleza sintetiza una gran diversidad de productos naturales, con elevados grados de complejidad estructural y funcional, mediante la intervención de rutas biosintéticas específicas. Los productos naturales también pueden ser sintetizados por la mano del hombre mediante el uso de las metodologías de la síntesis orgánica. Esta área de la química orgánica es capaz de conseguir, mediante estrategias y métodos sintéticos debidos al ingenio humano, muchos de los productos que la Naturaleza origina mediante sus particulares rutas biosintéticas.²⁰⁷

La síntesis orgánica no se limita a preparar los compuestos que ya sintetiza la Naturaleza, sino que permite la creación de un número ilimitado de estructuras artificiales que pueden llegar a mejorar las propiedades de las moléculas naturales. Una estrategia para la obtención de moléculas no naturales es la que combina fragmentos estructurales de dos o más productos naturales, originándose de esta forma moléculas híbridas, o quimeras, que no pueden ser obtenidas de fuentes naturales. Con la síntesis de este tipo de compuestos se pretenden conseguir propiedades biológicas inusuales, aumentando o modulando las características individuales de cada uno de sus componentes.²⁰⁸

²⁰⁷ (a) Nicolaou, K. C.; Sorensen, E. J. *Classics in Total Synthesis*. Wiley-VCH, **1996**. (b) Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A. *Classics in Total Synthesis II*. Wiley-VCH, **2003**. (c) Nicolaou, K. C.; Chen, J. S. *Classics in Total Synthesis III*, Wiley-VCH, **2011**.

²⁰⁸ Para ensayos y revisiones sobre diseño y síntesis de diversos tipos de estructuras híbridas concebidas a partir de estructuras de productos naturales, véase: (a) Bajorath, J. *Mol. Divers.* **2000**, *5*, 305. (b) Mehta, G.; Singh, V. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 324. (c) Tietze, L.F.; Bell, H.P.; Chandrasekhar, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3996. (d) Gademann, K. *Chimia* **2006**, *60*, 841. (e) Álvaro, E.; de la Torre, M. C.; Sierra, M. A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6403. (f) Kouznetsov, V. V.; Gómez-Barrio, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3091. (g) Müller-Schiffmann, A.; März-Berberich, J.; Andreyeva, A.; Röncke, R.; Bartnik, D.; Brener, O.; Kutzsche, J.; Horn,

Ejemplos representativos de estas estructuras híbridas sintéticas, se pueden ver en la figura 2.1.

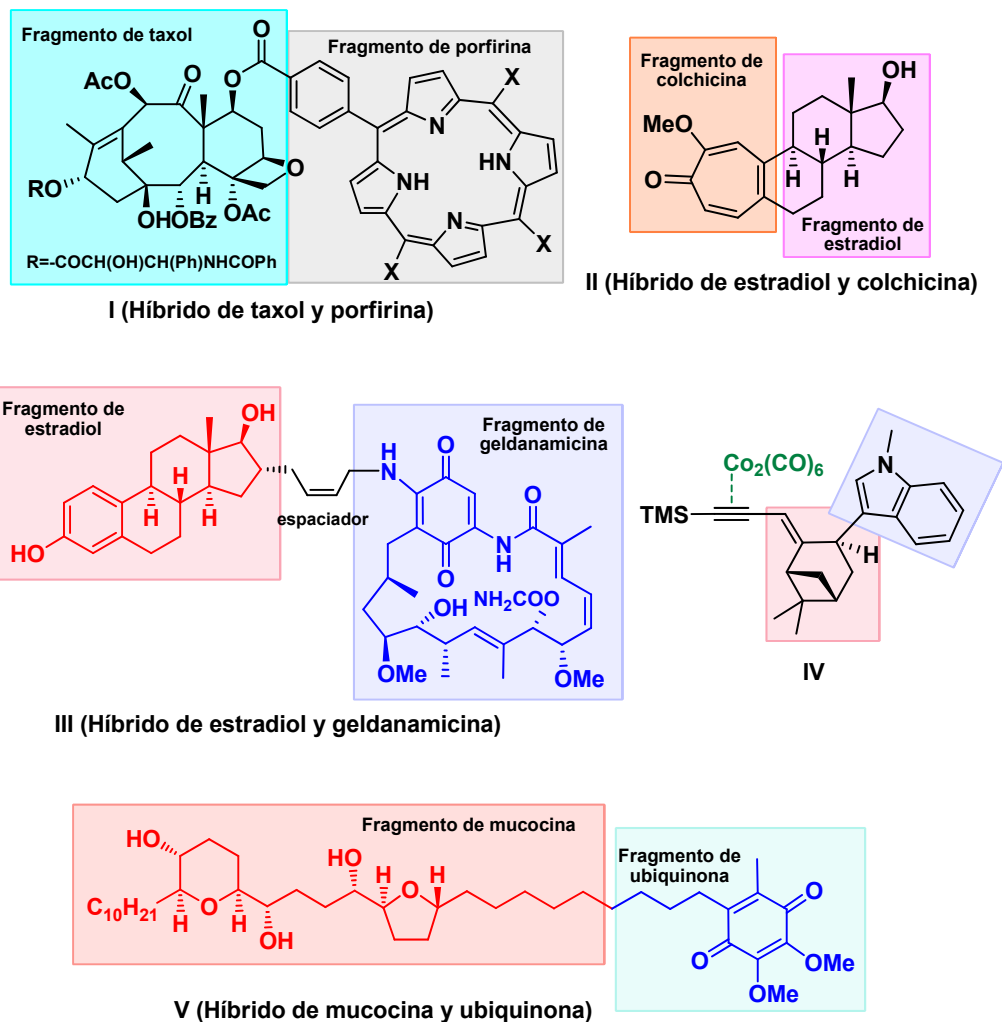


Figura 2.1. Estructuras híbridas resultantes de la unión de fragmentos parciales de productos naturales

El compuesto **I** es un híbrido de taxol-porfirina y el **III** es un híbrido de estradiol-geldanamicina. Ambos compuestos pertenecen al concepto de estructuras híbridas que contienen fragmentos *completos* de dos productos naturales diferentes. En el caso del compuesto **I**, el taxol y la porfirina se mantienen unidos mediante un enlace de tipo éster. En este híbrido se pretende complementar la actividad citotóxica del taxol junto con la acción fotodinámica de la porfirina, a través de la activación con luz, un tipo de terapia de luz y oscuridad que permite un doble ataque letal contra tumores.²⁰⁹

El híbrido **III** contiene la macrolactama geldanamicina, una sustancia de origen microbiano que se une a la llamada proteína “acompañante” (*chaperona*) Hsp90, causando con ello la degradación de varias proteínas señalizadoras importantes.²¹⁰ Su unión al estradiol pretende conseguir un compuesto con mayor capacidad selectiva de degradación del receptor de estrógenos, presente en elevadas concentraciones en cánceres de ovario y próstata.

Otro modo alternativo de hibridación implica la fusión de fragmentos *parciales* de estructuras de productos naturales conservando los elementos funcionales (farmacofóricos) esenciales. Este es el caso del híbrido **II** de la figura 2.1, formado por fusión de una parte de estradiol y de colchicina, sustancia que interacciona con la β -tubulina desestabilizando los microtúbulos.

El híbrido **IV** contiene un fragmento de tipo terpénico y otro indólico coordinado el primero de ellos con un complejo de cobalto.²¹¹

²⁰⁹ Mehta, G.; Maiya, B. G.; Muthusamy, S.; Chanon, M.; Julliard, M. French Patent application (demand No.9807228).

²¹⁰ (a) Rinehart, K. L., Jr.; Sasaki, K.; Slomp, G.; Grostic, M. F.; Olson, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 7591. (b) Miyata, Y. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 1131.

²¹¹ Para otros ejemplos de estructuras análogas, híbridas o miméticas de productos naturales, véase: (a) Scherlitz-Hofmann, I.; Dubs, M.; Krieg, R.; Schönecker, B.; Kluge, M.; Sicker, D. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2345. (b) Myles, D.C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 627. (c) Almqvist, F.; Manner, S.; Thornqvist, V.; Berg, U.; Wallin, M.; Frejd, T. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3085. (d) Clevenger, R.C.; Blagg, B.S.J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4459. (e) Smith, A.B., III; Freeze, B.S.; LaMarche, M.J.; Hirose, T.; Brouard, I.; Rucker, P.V.; Xian, M.; Sundermann, K.F.; Shaw, S.J.; Burlingame, M.A.; Horwitz, S.B.; Myles, D.C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 311. (f) Smith,

Finalmente, el híbrido **V** contiene un fragmento de mucocina y uno de ubiquinona, poliprenilquinona presente en todas las células y sustrato natural del denominado complejo mitocondrial I. La mucocina es un producto aislado de especies vegetales de la familia de las Annonáceas, caracterizado por bloquear dicho complejo mitocondrial, lo que constituye la base de su acción biológica.²¹² El híbrido **V** mostró exhibir una actividad 10 veces superior a la propia mucocina.

2.2. Objetivos

Como se ha explicado en el apartado de introducción, la combretastatina A-4 exhibe propiedades antiangiogénicas y antimetástáticas. Su acción biológica se debe a su unión al sitio de la colchicina en la tubulina.

Las interesantes propiedades de este compuesto nos han llevado a proponer como primer objetivo de esta tesis:

1) Síntesis de derivados de combretastatina A-4 cuyas estructuras generales se indican en la figura 2.2.

A.B., III; Freeze, B.S.; LaMarche, M.J.; Hirose, T.; Brouard, I.; Xian, M.; Sundermann, K.F.; Shaw, S.J.; Burlingame, M.A.; Horwitz, S.B.; Myles, D.C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 315. (g) Shen, G.; Blagg, B.S.J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2157. (h) Barun, O.; Kumar, K.; Sommer, S.; Langerak, A.; Mayer, T.U.; Mueller, O.; Waldmann, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4773. (i) Kaliappan, K.P.; Ravikumar, V. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 848. (j) Mazitschek, R.; Huwe, A.; Giannis, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1250. (k) Zask, A.; Kaplan, J.; Musto, S.; Loganzo, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17667. (l) Paterson, I.; Anderson, E.A. *Science* **2005**, *310*, 451. (m) Zinzalla, G.; Milroy, L.-G.; Ley, S.V. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1977. (n) White, J.D.; Smits, H.; Hamel, E. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3947. (o) Marshall, J.A.; Mikowski, A.M.; Bourbeau, M.P.; Schaaf, G.M.; Valeriote, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 320. (p) Fürstner, A.; Kirk, D.; Fenster, M.D.B.; Aïssa, C.; De Souza, D.; Nevado, C.; Tuttle, T.; Thiel, W.; Müller, O. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 135. (q) Joncour, A.; Décor, A.; Liu, J.-M.; Dau, M.-E. T. H.; Baudoin, O. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5450-5465. (r) Baraldi, P.G.; Preti, D.; Fruttarolo, F.; Tabrizi, M.A.; Romagnoli, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 17. (s) Benoît-Vical, F.; Lelievre, J.; Berry, A.; Deymier, C.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J.; Loup, C.; Robert, A.; Magnaval, J.-F.; Meunier, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1463. (t) Rizzo, S.; Riviere, C.; Piazzzi, L.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Morroni, F.; Tarozzi, A.; Monti, J.-P.; Rampa, A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2883. (u) Adsule, S.; Banerjee, S.; Ahmed, F.; Padhye, S.; Sarkar, F.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1247.

²¹² (a) Shi, G.; Alfonso, D.; Fatope, M.O.; Zeng, L.; Gu, Z.-M.; Zhao, G.-X.; He, K.; MacDougall, J.M.; McLaughlin, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10409. (b) Arndt, S.; Emde, U.; Baurle, S.; Friedrich, T.; Grubert, L.; Koert, U. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 993.

2) Evaluación citotóxica, antiangiogénica y antitelomerasa de dichos derivados.

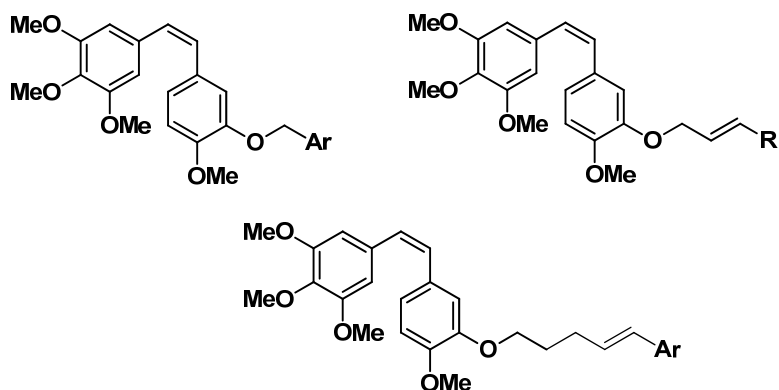


Figura 2.2. Estructuras de O-alkilderivados de combretastatina A4

Las propiedades citotóxicas de la combretastatina A-4 y de la pironetina, explicadas en el capítulo de introducción, nos han llevado a proponer los siguientes objetivos de esta tesis:

3) Síntesis de compuestos híbridos de combretastatina A-4/análogos de pironetina indicados en la figura 2.3.

4) Evaluación citotóxica y de la interacción con tubulina de dichos derivados.

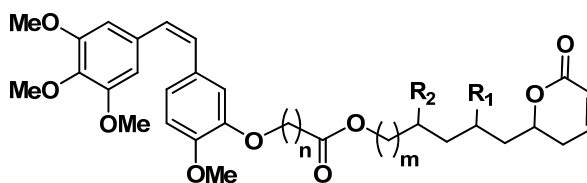


Figura 2.3. Estructuras de híbridos combretastatina A-4/análogos de pironetina

**3. SINTESIS DE *O*-ALQUIL
DERIVADOS DE
COMBRETASTATINA A-4**

3. SÍNTESIS DE O-ALQUIL DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A-4

3.1. Introducción

Las estructuras generales que nos hemos propuesto como objetivos sintéticos en este capítulo de la Tesis se representan en la figura 3.1. Estas estructuras contienen una parte de combretastatina A-4 unida a un fragmento bencílico (estructura **3-I**), a un fragmento alílico (estructura **3-II**), o a una parte truncada de resveratrol (estructura **3-III**).

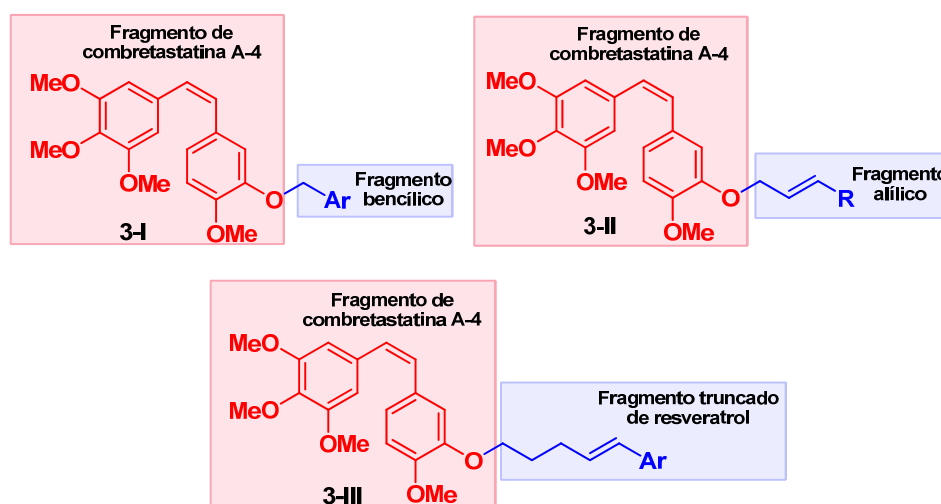


Figura 3.1. Estructuras generales de O-alkil derivados de CA-4

La publicación de la estructura de la CA-4 y de sus propiedades antitumorales ha generado entre la comunidad científica una intensa actividad relacionada con la síntesis y la evaluación biológica de análogos de esta molécula.²¹³

²¹³ Para síntesis y evaluación biológica de derivados de combretastatina A-4 véase: (a) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A. K.; Lin, C. M.; Hamel, E. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2579. (b) Andres, C. J.; Bernardo, J. E.; Yan, Q.; Hastie, S. B.; Macdonald, T. L. *Bioorg.*

Med. Chem. Lett. **1993**, *3*, 565. (c) Brown, R. T.; Fox, B. W.; Hadfield, J. A.; et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1995**, 577 (d) Ohsumi, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; et al. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3022 (e) Shirai, R.; Takayama, H.; Nishikawa, A.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1997 (f) Banwell, M. G.; Flynn, B. L.; Willis, A. C.; et al. *Aust. J. Chem.* **1999**, *52*, 767. (g) Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Nakagawa, R.; et al. *Anticancer Drug Design* **1999**, *14*, 539. (h) Maya, A. B. S.; del Rey, B.; de Clairac, R. P. L.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2549. (i) Flynn, B. L.; Flynn, G. P.; Hamel, E.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2341. (j) Lawrence, N. J.; Rennison, D.; Woo, M.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *11*, 51. (k) Janik, M. E.; Bane, S. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1895. (l) Wang, L.; Woods, K. W.; Li, Q.; et al. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1697. (m) Bailly, C.; Bal, C.; Barbier, P.; et al. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5437. (n) Lawrence, N. J.; Hepworth, L. A.; Rennison, D.; et al. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *123*, 101. (o) Hadimani, M. B.; Hua, J. Y.; Jonklaas, M. D.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *13*, 1505. (p) Liou, J. P.; Chang, Y. L.; Kuo, et al. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4247. (q) Liou, J. P.; Chang, Y. L.; Kuo, F. M.; et al. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4247. (r) Perez-Melero, C.; Maya, A. B. S.; del Rey, B.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *14*, 3771. (s) Sun, L.; Vasilevich, N. I.; Fuselier, J. A.; et al. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 179. (t) Coggiola, B.; Pagliai, F.; Allegrone, G.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *15*, 3551. (u) Pettit, G. R.; Rhodes, M. R.; Herald, D. L.; et al. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4087. (v) LeBlanc, R.; Dickson, J.; Brown, T.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6025. (w) Kaffy, J.; Pontikis, R. E.; Florent, J. C.; et al. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2657. (x) Borrel, C.; Thoret, S.; Cachet, X.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3853. (y) Hadfield, J. A.; Gaukroger, K.; Hirst, N.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 529. (z) Tron, G. C.; Pagliai, F.; Del Grosso, E.; et al. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3260. (ia) Maya, A. B. S.; Perez-Melero, C.; Mateo, C.; et al. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 556. (ib) Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033. (ic) Chang, J.-Y.; Yang, M.-F.; Chang, C.-Y.; et al. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6412. (id) Nam, N. H.; Byung-Zun, A. *Med. Chem.* **2007**, *3*, 373. (ie) Johnson, M.; Younglove, B.; Lee, L.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 5897. (if) Arthuis, M.; Pontikis, R.; Florent, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6397. (ig) Kerr, D. J.; Hamel, E.; Jung, M. K.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3290. (ih) Gurjar, M. K.; Wakharkar, R. D.; Singh, A. T.; et al. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1744. (ii) Wu, M.; Sun, Q.; Yang, C.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 869. (ij) Simoni, D.; Romagnoli, R.; Baruchello, R.; et al. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6211. (ik) Hall, J. J.; Sriram, M.; Strecker, T. E.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18*, 5146. (il) Sriram, M.; Hall, J. J.; Grohmann, N. C.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8161. (im) Mousset, C.; Giraud, A.; Provot, O.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18*, 3266. (in) Alloatti, D.; Giannini, G.; Cabri, W.; et al. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2708. (io) Odlo, K.; Hentzen, J.; Chabert, J. F.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4829. (ip) Siles, R.; Ackley, J. F.; Hadimani, M. B.; et al. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 313. (iq) Pinney, K. G.; Mejia, M. P.; Villalobos, V. M.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2417. (ir) Chaudhary, A.; Pandeya, S. N.; Kumar, P.; Sharma, P.; Gupta, S.; Soni, N.; Verma, K. K.; Bhardwaj, G. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1186. (is) Ty, N.; Kaffy, J.; Arrault, A.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *19*, 1318. (it) Shen, L.; Yang, X.; Yang, B.; He, Q.; Hu, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 11. (iu) Rasolofoniatovo, E.; Provot, O.; Hamze, A.; Bignon, J.; Thoret, S.; Brion, J. D.; Alami, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3617. (iv) O'Boyle, N. M.; Carr, M.; Greene, L. M.; et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8569. (iw) Lorion, M.; Agouridas, V.; Axel Couture, A.; Deniau, E.; Grandclaude, P. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5146. (ix) Odlo, K.; Fournier-Dit-Chabert, J.; Ducki, S.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6874. (iy) Ty, N.; Dupeyre, G.; Chabot, G. G.; et al. *Eur. J. Chem.* **2010**, *45*, 3726. (iz) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Cruz-Lopez, O.; et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4248. (iia) Coccetti, P.; Montano, G.; Lombardo, A.; et al. *Bior. Med. Chem.* **2010**, *20*, 2780. (iib) Kong, Y.; Wang, K.; Edler, M. C.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 971. (iic) Lee, L.; Robb, L. M.; Lee, M.; et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 325. (iid) Zhang, M.; Guo, R.; Wang, Y.; Cao, X.; Shen, M.; Shi, X. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 2337. (iie) Shan, Y.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, M.; Dong, Y. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 523. (iif) Theeramunkong, S.; Caldarelli, A.; Massarotti, A.; Aprile, S.; et al. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4977. (iig) Lee, M.; Brockway, O.; Dandavati, A.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3099. (iih) Li, Y.-W.; Liu, J.; Liu, N.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*,

3.2. Síntesis de combretastatina A-4

La combretastatina A-4 es un producto natural que se encuentra comercialmente accesible, aunque a un precio muy elevado. Por ejemplo, la compañía Aldrich la vende en presentación de 5 mg por un importe de 75 € o en presentación de 25 mg por un importe de 300.5 €. El elevado precio de este compuesto nos decidió a obtenerla mediante síntesis química.

La combretastatina A-4 ha sido sintetizada mediante el empleo de diversas metodologías que se comentan brevemente a continuación.²¹⁴

3.2.1. Síntesis de combretastatina A-4 mediante reacciones de Wittig

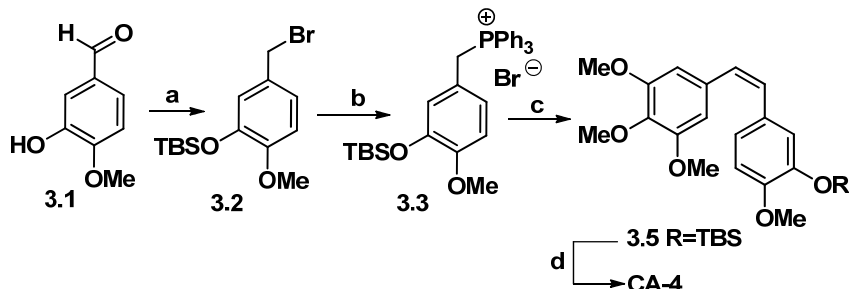
La primera síntesis de CA-4 se debe a Pettit y colaboradores quienes construyeron el doble enlace de esta molécula mediante la reacción Wittig entre el iluro derivado de la sal de fosfonio **3.3** con el 3,4,5-trimetoxibenzaldehído (véase el esquema 3.1).²¹⁵ La estereoselectividad de la reacción Wittig fue muy baja ya que esta reacción proporcionó una mezcla de estilbenos *Z/E*, en relación 1:1.5, de la que se obtuvo puro el isómero *Z*,

3579. (iii) Combes, S.; Barbier, P.; Douillard, S.; et al. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3153. (ijj) Babu, B.; Lee, M.; Lee, L.; Strobel, R.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2359. (iik) González, M. A.; Pérez-Guaita, D.; Agudelo-Gómez, L. S.; Tangarife-Castaño, V.; Zapata, B.; Betancur-Galvis, L. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 1051. (iil) Pettit, R. R.; Rosenberg, H. J.; Dixon, R.; Knight, J. C.; Hamel, E.; Chapuis, J.-C.; Pettit, R. K.; Hogan, F.; Sumner, B.; Ain, K. B.; Trickey-Platt, B. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 385. (iim) Kumar, S.; Sameer, S.; Raj, K.; et al. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 3720. (iin) Kamal, A.; Mallareddy, A.; Ramaiah, M. J.; Pushpavalli, S.N.C.V.L.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *56*, 166. (iio) Blanch, N. Mur.; Chabot, G. G.; Quentin, L.; Scherman, D.; Bourge, S.; Dauzonne, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 22. (iip) Hu, Y.; Lu, X.; Chen, K.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 903. (iiq) Malysheva, Y. B.; A. Combes, S.; Fedorov, A. Y.; Knochel, P.; Gavryushin, A. E. *Synlett* **2012**, 1205. (iir) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Giovanni; Salvador, M. K.; Preti, D.; et al. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 475. (iis) Thi Thanh Binh Nguyen, T. T. B.; Lomberget, T.; Tran, N. C.; Barret, R. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2336. (iit) O'Boyle, N. M.; Greene, L. M.; Keely, N. O.; Wang, S.; Cotter, T. S.; Zisterer, D. M.; Meegan, M. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 705. (iiu) Liu, T.-Q.; Li, X.-J.; Zhao, C.-Y.; Nan, X.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1248. (iiv) Ty, N.; Pontikis, R.; Chabot, G. C.; Devillers, E.; Quentin, L.; Bourg, S.; Florent, J.-C. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1357. (iiw) Aziz, J.; Brachet, E.; Hamze, A.; Peyrat, J.-F.; et al. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 430.

²¹⁴ Para una revisión de métodos de síntesis de CA-4 véase: Singh, R.; Kaur, H. *Synthesis* **2009**, 2471.

²¹⁵ Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Schmidt, J. M.; Hogan, F. J. *Med. Chem.* **1995**, *38*, 1666.

compuesto **3.5**, mediante cromatografía flash. La desililación de **3.5** proporcionó la combretastatina A-4.

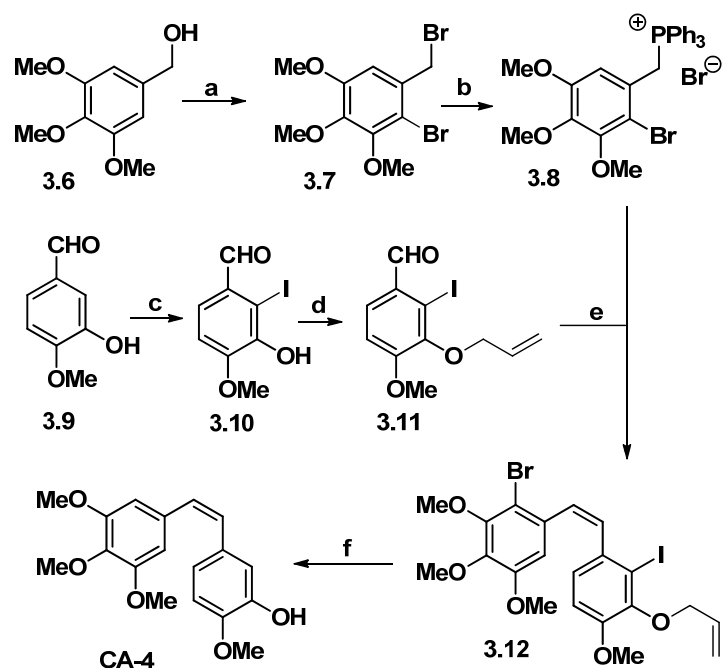


Esquema 3.1

Reactivos y condiciones: (a) (i) TBSCl, DIPEA, DMF, temp. amb. 1h (95%). (ii) NaBH₄, EtOH, temp. amb. 30 min (85%). (iii) TMSCl, LiBr, CH₃CN, temp. amb. 1h (65%). (b) PPh₃, benceno, temp. amb. (95%). (c) BuLi, THF, -20C luego adición de 3,4,5-trimetoxibenzaldehído **3.4** (93%, *Z/E* 1:1.5); separación mediante cromatografía flash. (d) TBAF, THF, 20 min (93%).

El grupo de Harrowven demostró que la estereoselectividad de la reacción de Wittig estaba influenciada por la presencia de átomos de halógeno en la posición *orto* de los anillos aromáticos y aplicaron este hallazgo en la preparación de CA-4.²¹⁶ La síntesis se inició con la conversión del (3,4,5-trimetoxifenil)metanol **3.6** en el dibromocompuesto **3.7** (esquema 3.2). La reacción de **3.7** con trifetilfosfina proporcionó la sal de fosfonio **3.8**. Por otro lado, la halogenación de la isovainillina **3.9** con ICl condujo al yododerivado **3.10** que se convirtió en el yodoaldehído **3.11** mediante alilación. La reacción Wittig entre el iluro derivado de **3.8** y el yodoaldehído **3.11** proporcionó una mezcla de estilbenos *Z/E* en relación 15:1, de la que se obtuvo puro el compuesto **3.12** mediante cromatografía. La eliminación del grupo alilo seguida de un proceso de intercambio litio-halógeno y de protonación, proporcionó la combretastatina A-4.

²¹⁶ Harrowven, D. C.; Guy, I. L.; Howell, M.; Packham, G. *Synlett* **2006**, 2977.



Esquema 3.2

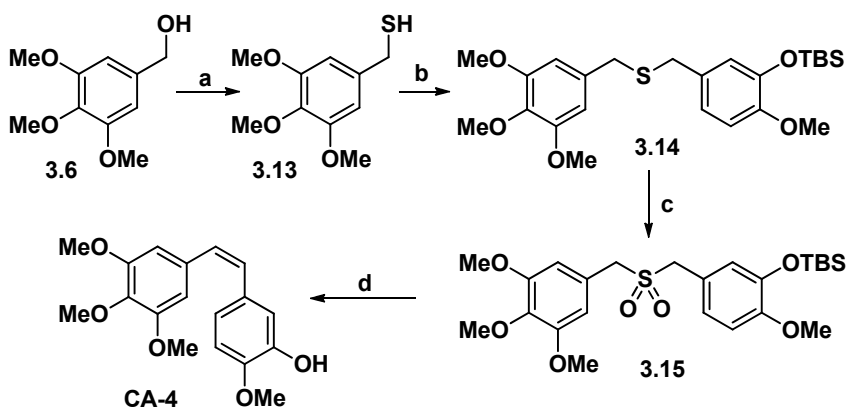
Reactivos y condiciones: (a) Br₂, CHCl₃ (71%). (b) PPh₃, tolueno, 80°C (94%). (c) ICl, piridina, dioxano (44%). (d) bromuro de alilo, K₂CO₃, CH₃CN (68%). (e) *t*BuOK, THF (85%, *Z/E* 15:1). (f) (i) 5 mol% Pd(PPh₃)₄, morfolina, THF (87%). (ii) BuLi, THF, 0°C, luego H₂O (90%).

3.2.2. Síntesis de combretastatina A-4 mediante transposición de Ramberg-Backlund

Taylor y Robinson consiguieron sintetizar la combretastatina A-4 empleando como paso clave una reacción de transposición de Ramberg-Backlund.²¹⁷ Así, el alcohol **3.6** se convirtió en el tiol **3.13** mediante reacción con el reactivo de Lawesson (2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditafosfetano-2,4-disulfuro). La *S*-alquilación de **3.13** con el bromuro **3.2** proporcionó el tioéter **3.14** que se convirtió en la sulfona **3.15** mediante oxidación con ácido *m*-cloroperoxibenzoico (véase el esquema 3.3). El tratamiento de **3.15** con

²¹⁷ Robinson, J. E.; Taylor, R. J. K. *Chem. Commun.* **2007**, 1617.

tetracloruro de carbono en presencia de KOH provocó la halogenación *in situ* de la sulfona y la subsiguiente transposición de Ramberg-Backlund.²¹⁸ En esta reacción se obtuvo una mezcla formada por combretastatina A-4 y su isómero *E* en relación 53:47 (en las condiciones de la reacción de Ramberg-Backlund se provocó la desililación).



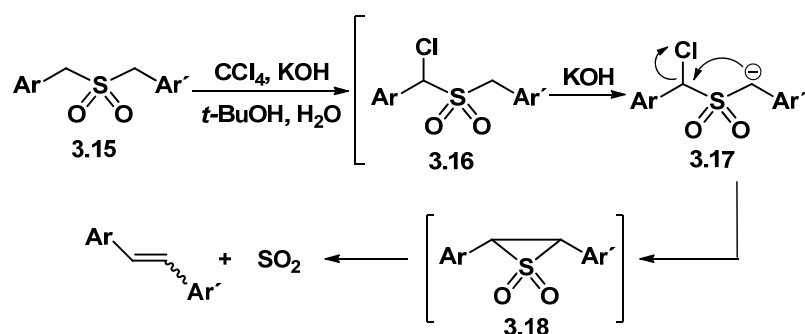
Esquema 3.3

Reactivos y condiciones: (a) Reactivo de Lawesson. (b) KOH, EtOH luego **3.2**. (c) *m*-CPBA, NaHCO₃, CH₂Cl₂ (49% 3 pasos). (d) CCl₄, *t*BuOH, KOH, H₂O (69%, *Z/E* 53:47).

El mecanismo que explica la conversión de la sulfona **3.15** en la mezcla de estilbenos *E/Z* se indica en el esquema 3.4. En las condiciones de la reacción la sulfona **3.15** se halogena por reacción con el CCl₄ y forma la α -clorosulfona **3.16**. La ionización de este compuesto forma el anión **3.17** que por desplazamiento intramolecular de cloro se convierte en el dióxido de ditirano **3.18**.²¹⁹ La extrusión de SO₂ en el compuesto **3.18** forma la mezcla de estilbenos.

²¹⁸ Meyers, C. Y.; Malte, A. M.; Matthews, W. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7510.

²¹⁹ F. G. Bordwell, F. G.; M. Williams, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *90*, 435.



Esquema 3.4

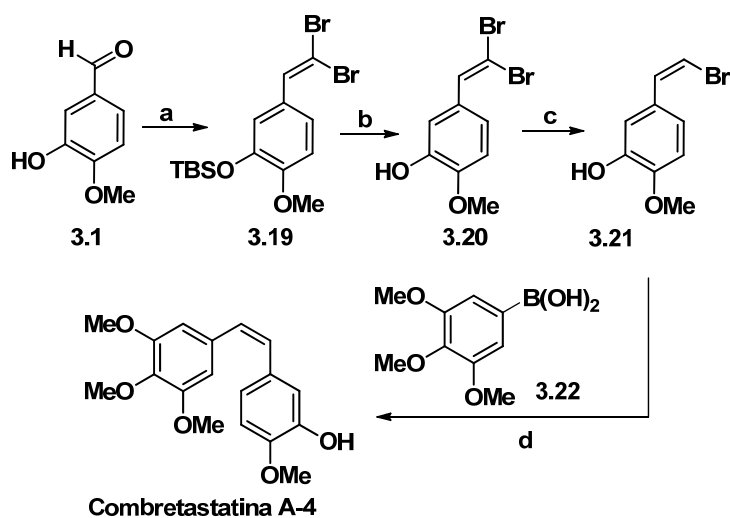
3.2.3. Síntesis de combretastatina A-4 mediante acoplamiento de Suzuki

Gaukroger y colaboradores crearon el doble enlace de la combretastatina A-4 utilizando un acoplamiento de Suzuki.²²⁰ El componente electrofílico de la reacción de Suzuki se obtuvo a partir de la isovainillina **3.1** (esquema 3.5). Así, la sililación de **3.1** seguida de reacción Corey-Fuchs condujo al *gem*-dibromoderivado **3.19**, que se convirtió en **3.20** mediante desililación. La desbromación reductiva de **3.19** con Bu₃SnH y Pd(PPh₃)₄ proporcionó el (*Z*)-bromoalqueno **3.21**.

El acoplamiento de Suzuki se llevó a cabo entre **3.21** y el ácido 3,4,5-trimetoxifenilborónico **3.22**. Esta reacción se efectuó en presencia de cantidades catalíticas de Pd(PPh₃)₄ y de carbonato potásico, en dimetoxietano acuoso como disolvente, y proporcionó directamente la combretastatina A-4 con un 71% de rendimiento.²²¹

²²⁰ Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Hepworth, L. A.; Lawrence, N. L.; McGown, A. T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8135.

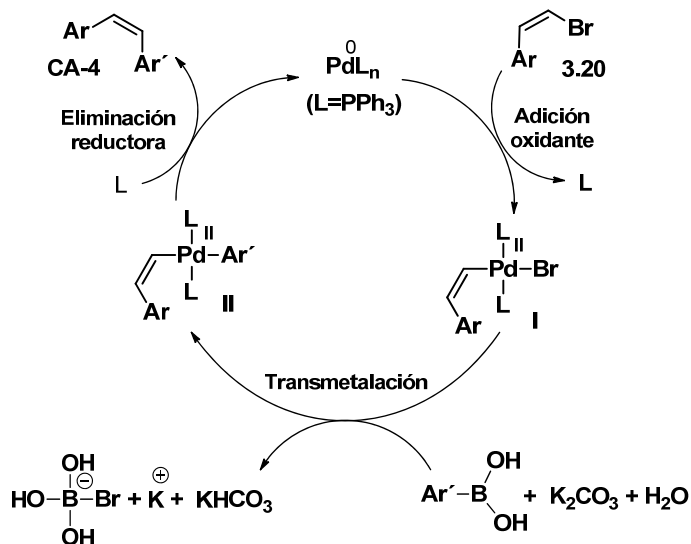
²²¹ Para una revisión de la aplicación de la reacción de Suzuki en síntesis de productos naturales véase: Chemler, S. R.; Trauner, D.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4544.



Esquema 3.5

Reactivos y condiciones: (a) (i) TBSCl, DIPEA, DMF, 1h (95%). (ii) CBr_4 , PPh_3 (60%). (b) TBAF, THF (90%). (c) Bu_3SnH , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (60%). (d) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , DME- H_2O , reflujo, 18 h (71%).

En el esquema 3.6 se indica el ciclo catalítico que opera en la reacción de Suzuki anterior.



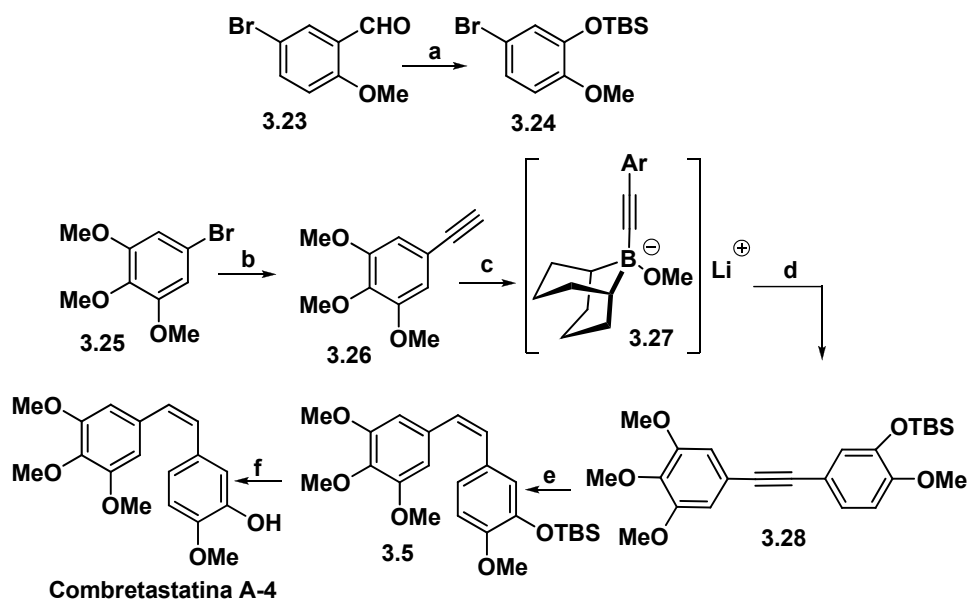
El ciclo catalítico de la reacción de Suzuki se inicia con la etapa de inserción oxidante en la cual el complejo de paladio, en estado de oxidación 0, reacciona con el bromuro vinílico y genera el complejo I con el paladio en estado de oxidación +2. Este proceso es estereoespecífico y el complejo de paladio retiene la configuración Z del bromuro de alqueno. A continuación, el ácido arilborónico, en presencia de carbonato potásico, experimenta un proceso de transmetalación y forma el complejo II. Finalmente, la etapa de eliminación reductora, que se produce también con retención de la configuración del doble enlace, forma el producto de acoplamiento y regenera el catalizador.

Fürstner y Nikolakis también emplearon la reacción de Suzuki para unir los dos fragmentos arílicos de la combretastatina A-4. A diferencia de la estrategia utilizada en la síntesis de Gaukroger y colaboradores, en la síntesis de Fürstner se lleva a cabo un acoplamiento de Suzuki entre un haluro de arilo (componente electrofílico) y un alquínilboronato (componente nucleofílico), lo que produce un diarilacetileno cuya transformación en CA-4 exige su semi-hidrogenación estereoselectiva. La síntesis de Fürstner se indica en el esquema 3.7 y se inició con la conversión del 5-bromo-2-metoxibenzaldehído **3.23** en el compuesto **3.24**, lo que se consiguió mediante transposición de Baeyer-Villiger seguida de silylación.²²²

Por otro lado, el 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno **3.25** se convirtió en el arilacetileno **3.26** mediante acoplamiento con acetiluro sódico catalizado por PdCl₂(dppf). La litación de **3.26** con BuLi, seguida de reacción con 9-MeO-9-BBN, formó el borato **3.27** que experimentó el acoplamiento de Suzuki con el bromuro de arilo **3.24** en presencia de PdCl₂(dppf). La reacción proporcionó el diarilacetileno **3.28** que se sometió a hidrogenación con hidrógeno molecular en presencia de Pd/C al 5% y de etilendiamina. En esta reacción se obtuvo, con un 74% de rendimiento, el Z-estilbena **3.5**. En la reacción de

²²² Fürstner A.; Nikolakis. K. *Liebigs Ann.* **1996**, 2108.

hidrogenación se formó también un 14% de producto de sobre-reducción, que se separó del *Z*-estilbena **3.5** mediante cromatografía de columna. La desililación de **3.5** proporcionó la combretastatina A-4.



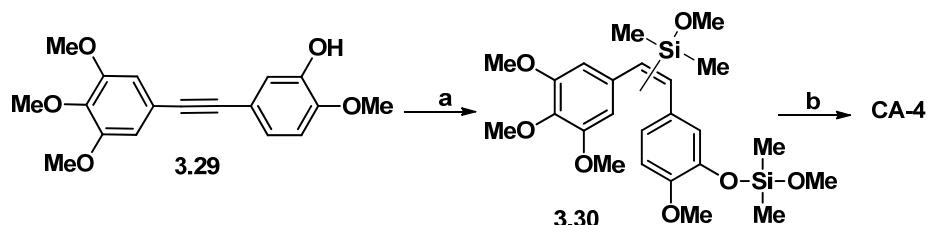
Esquema 3.7

Reactivos y condiciones: (a) (i) *m*-CPBA, CH₂Cl₂ (86%). (ii) TBSCl, imidazol, THF (83%). (b) Acetiluro sódico, B(OMe)₃, PdCl₂(dppf), THF, reflujo (77%). (c) litiación de **3.26** con BuLi en THF, luego 9-MeO-9-BBN. (d) PdCl₂(dppf), **3.24**. (e) H₂ (1 atm), Pd/C 5%, etilendiamina, MeOH. (f) TBAF ac., AcOEt (70% 2 pasos).

La semihidrogenación de diarilacetilenos con el catalizador de Lindlar suele transcurrir, como se pone de manifiesto en la síntesis anterior, con formación del producto de sobre-reducción. En un esfuerzo por eliminar este inconveniente, Alami y colaboradores estudiaron la semihidrogenación de diarilacetilenos mediante una estrategia de hidrosililación-protodesililación.²²³ Esta metodología se aplicó en la síntesis de combretastatina A-4 (esquema 3.8). Así, el calentamiento del diarilacetileno **3.29** con PtO₂ en HSiOEt(Me)₂ proporcionó una mezcla de vinilsilanos regioisoméricos **3.30** que por

²²³ Giraud, A.; Provot, O.; Hamze, A.; Brion, J.-D.; Alami, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1107.

desililación con TBAF en THF, seguida de cromatografía, condujo a la combretastatina A-4.



Esquema 3.8

Reactivos y condiciones: (a) PtO_2 , $\text{HSiOMe}(\text{Me})_2$, 60°C (70%). (b) TBAF, THF, 60°C (69%, Z/E 100:0).

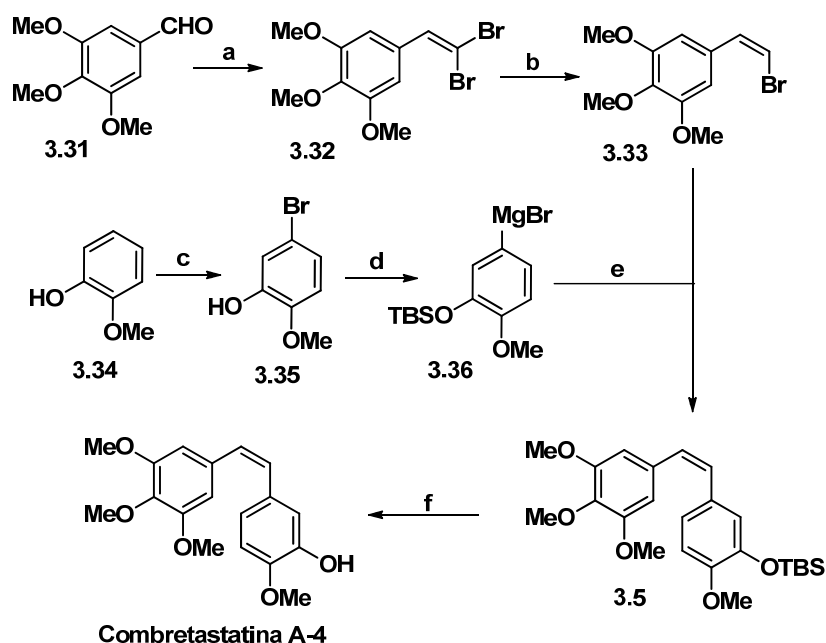
3.2.4. Síntesis de combretastatina A-4 mediante acoplamiento de Kumada-Corriu

Se conoce como acoplamiento de Kumada-Corriu a la reacción entre reactivos de Grignard y haluros orgánicos. La reacción se lleva a cabo en presencia de catalizadores metálicos de paladio, níquel o hierro. Camacho-Davila consiguió una síntesis de combretastatina A-4 mediante aplicación, como paso clave, de un acoplamiento de Kumada-Corriu.²²⁴ El componente electrofílico del proceso fue el haluro **3.33**, que se sintetizó a partir de 2-metoxifenol **3.31** tal y como se indica en el esquema 3.9.

El componente nucleofílico para la reacción de acoplamiento, reactivo de Grignard **3.36**, se preparó a partir del 2-metoxifenol **3.34**. El acoplamiento de Kumada-Corriu se llevó a cabo en presencia de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en THF y proporcionó el estilbeno **3.5**, cuya desililación condujo a la combretastatina A-4.²²⁵

²²⁴ Camacho-Davila, A. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 3823.

²²⁵ Al contrario que en los acoplamientos catalizados por paladio, en los que el complejo de $\text{Pd}(0)$ reacciona con los haluros de arilo mediante un mecanismo asociativo de adición oxidante, los acoplamientos catalizados por hierro pueden implicar etapas de transferencia



Esquema 3.9

Reactivos y condiciones: (a) CBr_4 , PPh_3 . (b) Bu_3SnH , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (76% 2 pasos). (c) (i) Ac_2O , Et_3N . (ii) Br_2 . (iii) KOH , MeOH (78% 3 pasos). (d) (i) TBSCl , imidazol (96%). (ii) Mg , THF . (e) $\text{Fe}(\text{acac})_3$, THF , 0°C (61%). (f) $\text{KF}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, THF (95%).

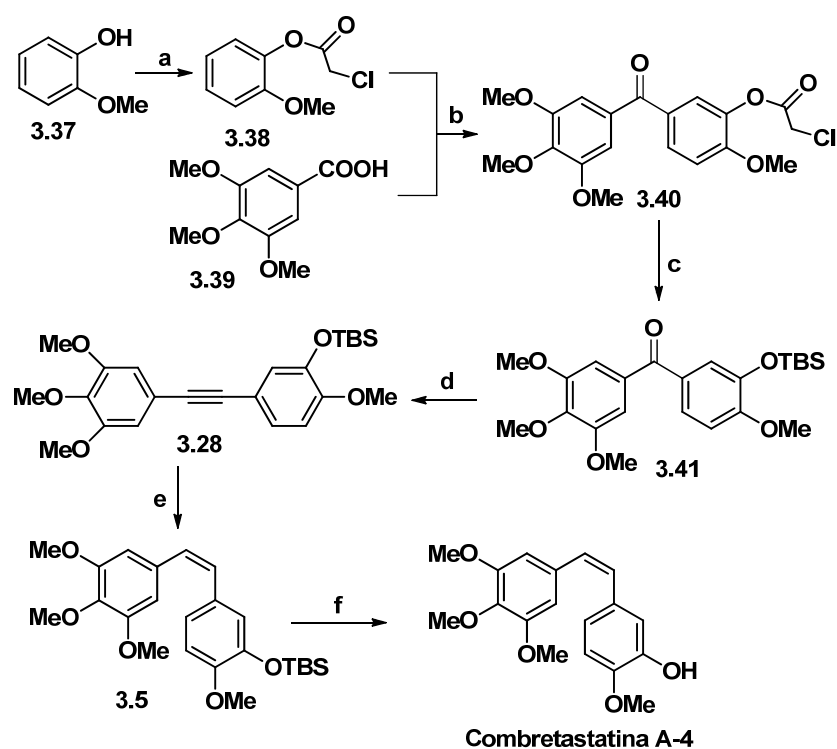
3.2.5. Síntesis de combretastatina A-4 mediante transposición de Colvin

El grupo de O. I. Petrov consiguió sintetizar la combretastatina A-4 empleando como paso clave una reacción de transposición de Colvin.²²⁶ La síntesis se inició con la conversión del 2-metoxifenol **3.37** en el cloroacetato **3.38** por reacción con cloruro de cloroacetilo (esquema 3.10). La reacción $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ del cloroacetato **3.38** con el ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico **3.39** proporcionó la diarilcetona **3.40**, la cual mediante saponificación y sililación se transformó en la cetona **3.41**. La reacción de este compuesto con trimetilsilildiazometano y *n*-BuLi desencadenó el proceso de transposición de

monoelectrónica, véase: Cahiez, G.; Habiak, V.; Duplais, C.; Moyeux, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4364.

²²⁶ Petrov, O. I.; Gerova, M. S.; Chanev, C. D.; Petrov, K. V. *Synthesis* **2011**, 3711.

Colvin, lo que permitió la obtención del diarilcetileno **3.28**. Este compuesto ya había sido obtenido por Fürstner y colaboradores, quienes lo convirtieron en CA-4 mediante semi-hidrogenación (véase el esquema 3.7). Sin embargo, cuando Petrov y colaboradores hidrogenaron el compuesto **3.28**, en las condiciones descritas previamente por Fürstner, obtuvieron el compuesto de hidrogenación total del triple enlace.



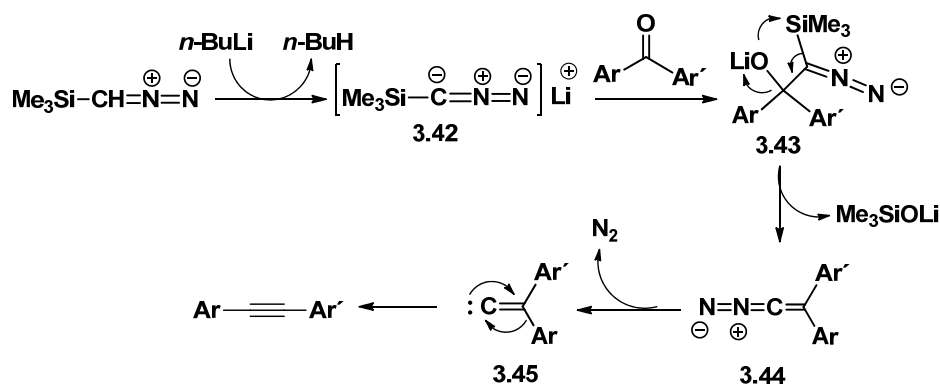
Esquema 3.10

Reactivos y condiciones: (a) ClCH_2COCl , 135°C (90%). (b) $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{P}_2\text{O}_5$, 40°C , (86%). (c) (i) KOAc , MeOH , reflux (96%). (ii) TBSCl , DMAP , Et_3N , CH_2Cl_2 (87%). (d) TMSCHN_2 , $n\text{-BuLi}$, THF , de -78°C a r.t. (89%). (e) H_2 , catalizador de Lindlar, quinolina, hexano-tolueno. (f) TBAF , EtOAc (79% 2 pasos).

Cuando Petrov y colaboradores hidrogenaron el compuesto **3.28** en presencia del catalizador de Lindlar (Pd/CaCO_3 envenenado con plomo), en

una mezcla de hexano-tolueno que contenía quinolina, se obtuvo el compuesto **3.5** acompañado de una ligera proporción de producto de sobre-reducción (96:4). La desililación de la mezcla de hidrogenación seguida de purificación mediante cromatografía de columna proporcionó la combretastatina A-4.

El mecanismo de la transposición de Colvin se indica en el esquema 3.11. Así, la reacción del trimetilsilildiazometano con *n*-BuLi genera el anión lítico **3.42** que se adiciona a la cetona para formar el intermedio **3.43**. Esta especie elimina trimetilsilanolato de litio y se convierte en el diazocompuesto **3.44** que mediante eliminación de nitrógeno molecular se transforma en el carbeno **3.45**. La transposición de arilo en este intermedio forma el diarilacetileno.



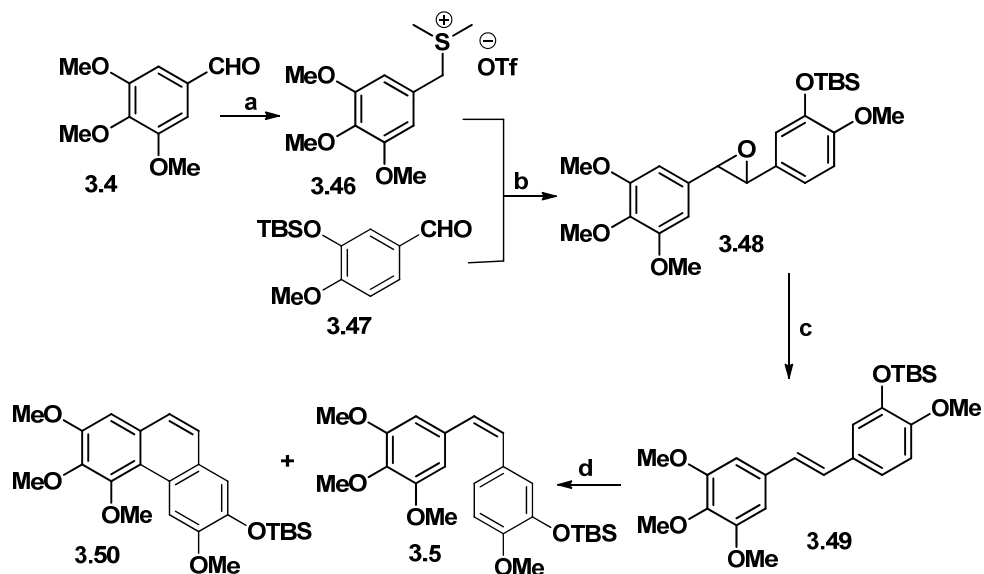
Esquema 3.11

3.2.6. Síntesis de combretastatina A-4 mediante desoxigenación de epóxido

Lupattelli y colaboradores llevaron a cabo una síntesis formal de CA-4 empleando como paso clave la desoxigenación de un compuesto oxiránico.²²⁷ La síntesis se inició con la conversión del 3,4,5-trimetoxibenzaldehído **3.4** en el triflato de sulfonio **3.46** (esquema 3.12). La conversión de este compuesto

²²⁷ Lupattelli, P.; D'Auria, M.; Di Blasio, N.; Lenti, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 141.

en el correspondiente iluro, mediante reacción con NaH, y la subsiguiente reacción con el aldehído **3.47** proporcionó el *trans*-epóxido **3.48**.



Esquema 3.12

Reactivos y condiciones: (a) (i) NaBH₄. (ii) PBr₃. (iii) SMe₂, AgOTf (75% 3 pasos). (b) NaH, CH₂Cl₂ (65%). (c) ZrCl₄, NaI, CH₃CN (57%). (d) irradiación con lámpara de Hg de 15W de baja presión (λ_{\max} = 254 nm).

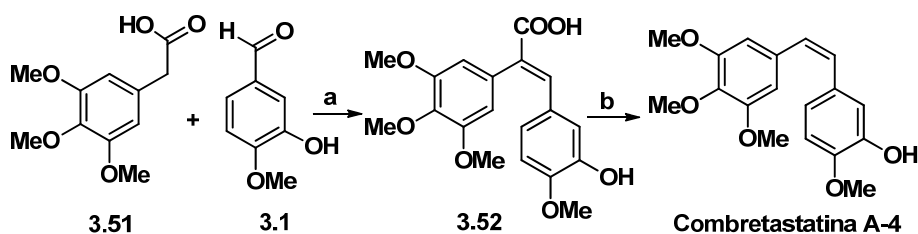
Cuando el epóxido **3.48** se trató con ZrCl₄, en acetonitrilo en presencia de NaI, se provocó la reacción de desoxigenación y la formación del *E*-stilbeno **3.49**. Este compuesto se isomerizó al *Z*-stilbeno **3.5** mediante irradiación de una disolución acetónica de **3.49**, durante 44 horas, con una luz de 254 nm de longitud de onda. En estas condiciones se formó una mezcla de **3.5/3.49** en relación 80:20. Cuando la reacción se llevó a cabo en MeOH el equilibrio fotoestacionario se consiguió a las 8 horas y la relación **3.5/3.49** fue de 89:11. Sin embargo en MeOH como disolvente se formó también el compuesto fenantrénico **3.50** (relación **3.5+3.49/3.50** 87:13).

El compuesto **3.5** ya había sido convertido previamente en combretastatina A-4 (véase el esquema 3.1)

3.2.7. Síntesis de combretastatina A-4 mediante reacción de Perkin

Las anteriores síntesis de CA-4 no están exentas de inconvenientes. Algunas de ellas sufren de bajo control estereoquímico en la formación del doble enlace y/o secuencias sintéticas relativamente largas que requieren el uso de grupos protectores.

En el esquema 3.13 se indica la síntesis de combretastatina A-4, que llevaron a cabo Gaukroger y colaboradores, y que transcurre con excelente estereocontrol *Z/E*, sin el empleo de grupos protectores y con tan solo dos pasos sintéticos.²²⁰ Esta fue la secuencia que empleamos en esta Tesis para la preparación de la combretastatina A-4. La síntesis se inició con la condensación de Perkin entre el ácido 2-(3,4,5-trimetoxifenil)acético **3.51** y la isovainillina **3.1**. La reacción se llevó a cabo mediante calentamiento a reflujo de anhídrido acético, durante 3 horas, en presencia de trietilamina. La adición de HCl y el procesamiento de la reacción proporcionó, después de la cristalización de etanol, el ácido **3.52** de configuración *E*.²²⁸



Esquema 3.13

Reactivos y condiciones: (a) Ac_2O , Et_3N , reflujo, 3 h, después HCl conc. 56%; (b) Cu, quinolina, reflujo, 3 h, 83% (*Z/E* 98:2).

²²⁸ Para una síntesis de CA-4 mediante reacción de Perkin entre el ácido 2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acético y 3,4,5-trimetoxibenzaldehído véase: Chen, Y.; Zou Y.; Sun, H-K.; Liu, X-K.; Xiao, C-F.; Sun, J.; He, S-J.; Li, J. *Synthesis* **2011**, 217.

El ácido **3.52** se convirtió en combrestatina A-4 mediante descarboxilación con cobre. La descarboxilación de ácidos carboxílicos aromáticos catalizados por Cu(0) y sales de Cu(I)²²⁹ se ha investigado extensamente por Sheppard,²³⁰ Cohen,²³¹ Nilsson²³² y otros.²³³ Sheppard y colaboradores reportaron que las descarboxilaciones arílicas con Cu ocurrían fácilmente en quinolina, empleada como disolvente o co-disolvente.

La purificación del producto de descarboxilación mediante cromatografía de columna proporcionó la combretastatina A-4 con una relación Z/E, medida mediante espectroscopia de RMN de protón, de 98:2.

En el esquema 3.14 se indican los pasos mecanísticos del proceso de condensación de Perkin que se inicia con la acetilación del ácido **3.51** (Ar = 3,4,5-trimetoxifenilo). En este proceso se forma el intermedio **3.53** el cual, mediante enolización se transforma en el enolato **3.54**. La reacción con el aldehído **3.1** (Ar' = 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído) forma el intermedio **3.55**, que experimenta *trans*-acilación y forma el compuesto **3.56**. La eliminación de ácido acético conduce al intermedio **3.57** cuya protonación forma el ácido **3.52**.

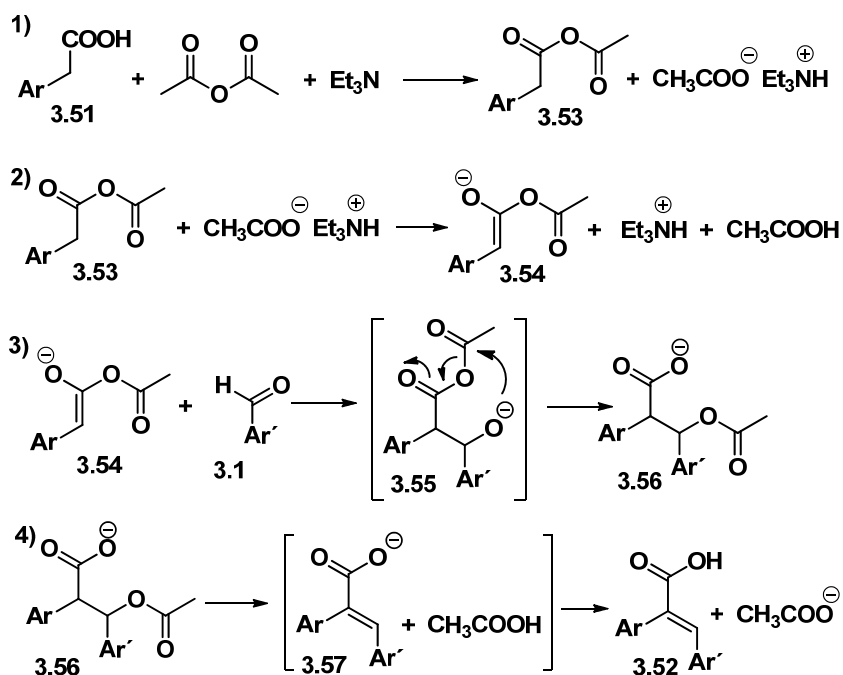
²²⁹ (a) Fager, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 2217. (b) S. G. Turnbull Jr, U. S. Patent **2,1948**, 453, 103.

²³⁰ Cairncross, A.; Roland, J. R.; Henderson, R. M.; Sheppard W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3187.

²³¹ (a) Cohen, T.; Schambach, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3189. (b) Cohen, T.; Berninger, R. W.; Wood, J. T. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 837.

²³² (a) Nilsson, M. *Acta Chem. Scand.* **1966**, *20*, 423. (b) Björklung, C.; Nilsson, M. *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 2585. (c) Chodowska-Palicka, J.; Nilsson, M. *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 3353. (d) Nilsson, M.; Ullenius, C. *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 2428. (e) Chodowska-Palicka, J.; Nilsson, M. *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 3451.

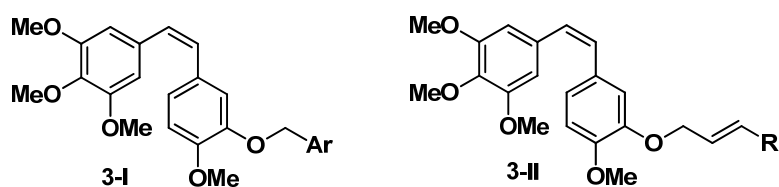
²³³ (a) Gooßen, L. J.; Rodriguez, N.; Gooßen, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3100. (b) Gooßen, L. J.; Gooßen, K.; Rodriguez, N.; Blanchot, M.; Linder, C.; Zimmermann, B. *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 1725. (c) Shang, R.; Liu, L. *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 1670 (d) Cahiez, G.; Moyeux, A.; Gager, O.; Poizat, M. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 790.



Esquema 3.14. Pasos mecanísticos de la condensación de Perkin de 3.11 con 3.1

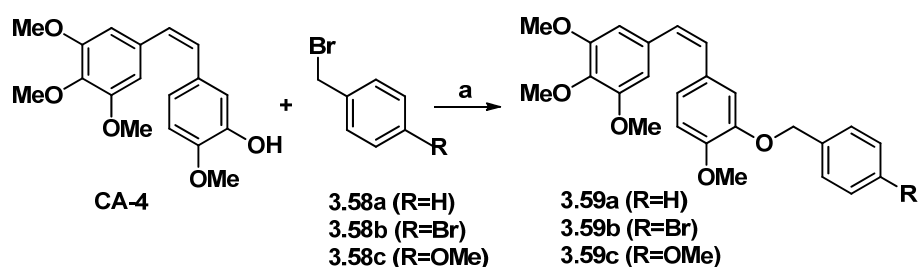
3.3. Síntesis de derivados bencílicos y alílicos de combrestatina A4

En el esquema 3.15 se indican las estructuras generales de los derivados bencílicos y alílicos de combrestatina A-4 que preparamos en esta Tesis.



Esquema 3.15. Estructuras generales de derivados bencílicos y alílicos de CA-4

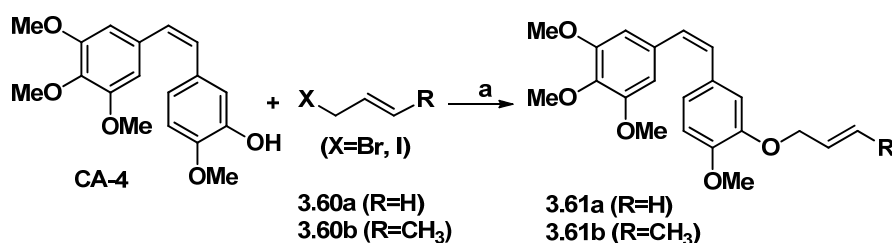
Los derivados bencílicos de combretastatina A-4 se sintetizaron mediante ionización de la combretastatina A-4 con carbonato potásico y reacción con los bromuros de bencilo indicados en el esquema 3.16.



Esquema 3.16. Estructuras de derivados bencílicos de CA-4

Reactivos y condiciones: (a) K_2CO_3 , DMF, temp. amb., 24 h: **3.59a** (73%); **3.59b** (78%); **3.59c** (69%).

Los derivados alílicos se sintetizaron de forma similar (esquema 3.17).



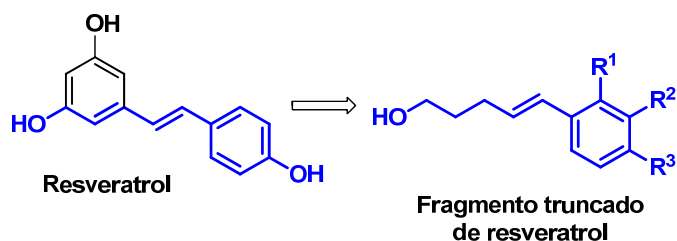
Esquema 3.17. Estructuras de derivados bencílicos de CA-4

Reactivos y condiciones: (a) K_2CO_3 , DMF, temp. amb., 24 h: **3.61a** (con X=I, 22%, con X=Br, 70%); **3.61b** (X=Br, 70%).

3.4. Síntesis de híbridos CA-4/ATR

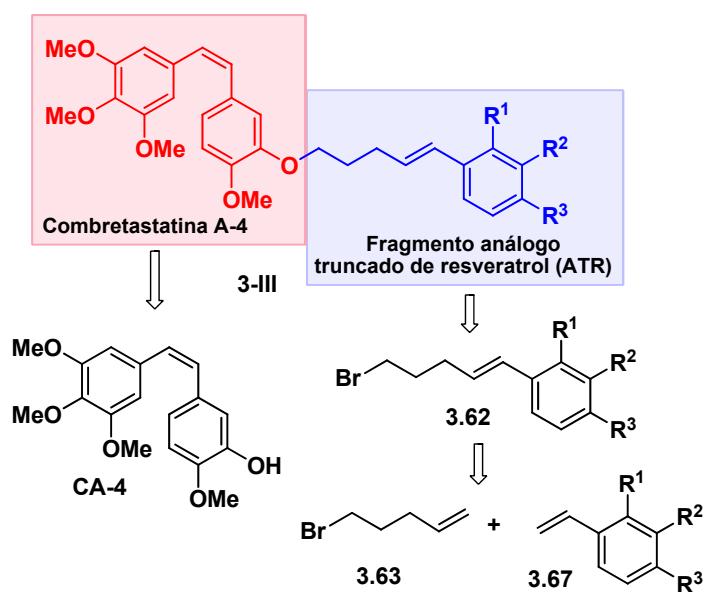
En esta parte de la tesis se prepararon compuestos híbridos que contenían un fragmento estructural completo de combretastatina A-4 y el fragmento truncado de resveratrol que se indica en el esquema 3.18. El resveratrol es un producto natural que exhibe propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cardioprotectoras y antitumorales.²³⁴

²³⁴ (a) Brakenhielm, E.; C. R.; C. Y. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1798. (b) Kundu, J. K.; Surh, Y. J. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 243. Para un estudio sobre los efectos antiangiogénicos del resveratrol véase: Trapp, V.; Parmakhtiar, B.; Papazian, V.; Willmott, L.; Fruehauf, J. P. *Angiogenesis* **2010**, *13*, 305. Para el mecanismo de inhibición de la angiogénesis mediante resveratrol véase: Lin, M-T.; Yen, M-L.; Lin, C-Y.; Kuo, M-L.; *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1029. También se ha demostrado que el resveratrol puede tener efecto proangiogénico en células endoteliales



Esquema 3.18. Estructuras de resveratrol y del fragmento truncado

En el esquema 3.19 se dibuja la estructura general **3-III** de los compuestos híbridos CA-4/análogos truncados de resveratrol (ATR) que sintetizamos en este apartado. Los fragmentos estructurales que empleamos para la síntesis de estas moléculas híbridas se indican en el esquema 3.19 y fueron la combretastatina A-4, el 5-bromo1-penteno **3.63** y los derivados estirénicos **3.67**.



Esquema 3.19. Estructura general de híbridos CA-4/ATR y bloques de construcción empleados

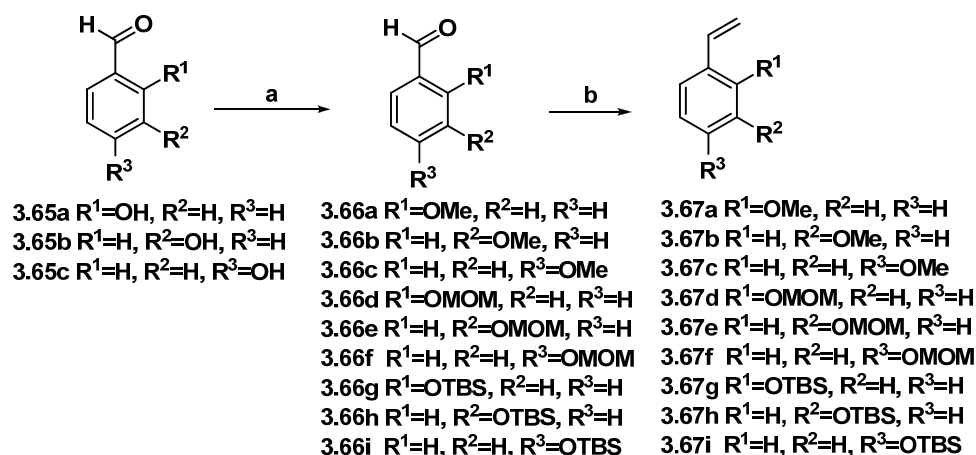
3.4.1. Síntesis de los derivados estirénicos 3.67

A partir de hidroxibenzaldehídos **3.65** mediante O-metilación con yoduro de metilo en acetona, en presencia de carbonato sódico, se obtuvieron los derivados **3.66a**, **3.66b** y **3.66c** (véase el esquema 3.20).

Mediante reacción de **3.65** con cloruro de metoximetilo, en diclorometano en presencia de diisopropil etil amina se obtuvieron los MOM derivados **3.66d**, **3.66e** y **3.66f**.

Mediante reacción de **3.65** con cloruro de *t*-butildimetilsililo, en diclorometano en presencia de trietilamina, se obtuvieron Los *t*-butildimetilsililderivados **3.66g**, **3.66h** y **3.66i**.

Los compuestos obtenidos en las reacciones de protección se convirtieron en derivados estirénicos mediante reacción de Wittig con $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$.

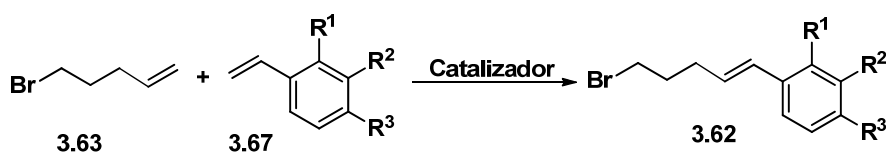


Esquema 3.20

Reactivos y condiciones: (a) O-metilación: CH_3I , K_2CO_3 , acetona, temp. amb., 24 h (**3.66a** 90%; **3.66b** 97%; **3.66c** 97%); MOM-protección: MOMCl, DIPEA, CH_2Cl_2 , reflujo, 18 h (**3.66d** 99%; **3.66e** 98%, **3.66f** 99%); OTBS-protección: TBSCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , temp. amb., 18 h (**3.66g** 75%; **3.66h** 80%, **3.66i** 92%) (b) $\text{BrP}(\text{Ph})_3\text{CH}_3$, *t*-BuOK, THF, temp. amb., 24 h, (**3.67a** 79%; **3.67b** 89%; **3.67c** 71%; **3.67d** 75%; **3.67e** 68%; **3.67f** 61%); $\text{BrP}(\text{Ph})_3\text{CH}_3$, *n*-BuLi, THF, temp. amb., 3 h (**3.67g** 70%; **3.67h** 85%, **3.67i** 87%).

3.4.2. Síntesis de análogos truncados de resveratrol 3.62

Como equivalentes sintéticos de los análogos truncados de resveratrol (ATR) empleamos los compuestos **3.62**. Estos compuestos se obtuvieron mediante reacciones de metátesis cruzada (CM, del acrónimo inglés *cross metathesis*) entre el 5-bromo-1-penteno **3.63** y los estirenos **3.67** (véase el esquema 3.21).



Esquema 3.21. Síntesis de ATR mediante reacciones de CM

Las reacciones de metátesis de olefinas mediante los denominados catalizadores de Grubbs y Schrock han tenido un impacto enorme en el campo de la síntesis orgánica. Baste decir que estos dos autores, junto con el químico francés Y. Chauvin, fueron galardonados con el premio Nobel de Química en el año 2005 por el desarrollo de catalizadores para metátesis de olefinas y por los estudios mecanísticos relacionados con este tipo de reacciones.²³⁵

Las estructuras de los catalizadores más empleados en las reacciones de metátesis de olefinas se indican en la figura 3.2.

²³⁵ Para revisiones sobre las reacciones de metátesis véase: (a) Grubbs, R. H.; Miller, S. J.; Fu, G. F. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 446. (b) Grubbs, R. H.; Chang, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413. (c) Armstrong, S. K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1998**, 371. (d) Maier, M. E.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2073. (e) Yet, L. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2963. (f) Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18. (g) Prunet, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2826. (h) Grubbs, R. H. *Handbook of Metathesis*. Wiley-VCH, **2003**, Germany. (i) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. C.; Sarlah, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4490. (j) Vougioukalakis, G. C.; Grubbs, R. H. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1746.

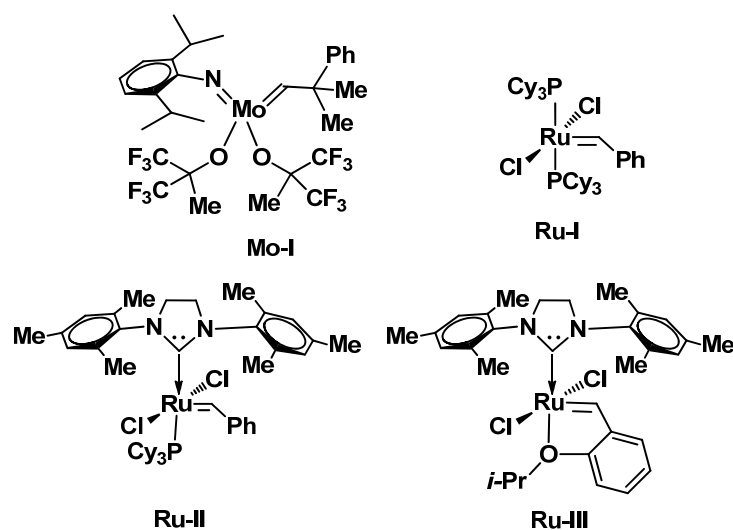


Figura 3.2. Catalizadores más empleados en metátesis de olefinas

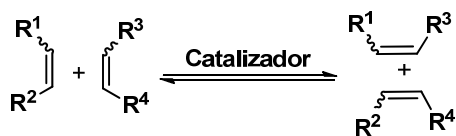
Las reacciones de metátesis de olefinas se pueden clasificar en los siguientes tipos:

1) ROMP, del acrónimo inglés *Ring Opening Metathesis Polymerization*, metátesis con apertura de anillo y polimerización. En este proceso, de interés predominantemente industrial, una olefina cíclica, usualmente tensa, se abre y a continuación se polimeriza.



Esquema 3.22. Reacción ROMP

2) CM, metátesis cruzadas. En estas reacciones se produce la *trans*-alquilidación entre dos olefinas (esquema 3.23). Puede tener interés tanto a nivel industrial como en el laboratorio de investigación básica.



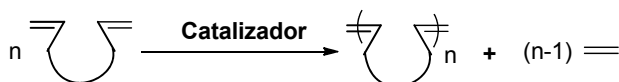
Esquema 3.23. Reacción CM

3) RCM, del acrónimo inglés *Ring Closing Metathesis*, metátesis con cierre de anillo. En estas reacciones un sustrato diolefínico se cierra dando lugar a un cicloalqueno expulsando una olefina de bajo peso molecular (usualmente etileno, véase el esquema 3.24).



Esquema 3.24. Reacción RCM

4) ADMET, del acrónimo inglés *Acyclic Diene Metathesis*, metátesis de dienos acíclicos. Este es un proceso de interés industrial, en el cual una diolefina acíclica se polimeriza con expulsión de una olefina de bajo peso molecular (esquema 3.25).



Esquema 3.25. Reacción ADMET

El catalizador **Mo-I** se denomina de Schrock. Es un catalizador muy activo, pero tiene en su contra su elevado precio y su extrema sensibilidad al aire y a la humedad, lo que obliga a su manipulación en caja seca.²³⁶

El catalizador **Ru-I**, denominado a menudo catalizador de Grubbs de 1ª generación, es muy útil en las reacciones de metátesis ciclante (RCM) de

²³⁶ Schrock, R. R. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 342.

diolefinas terminales, así como también en las metátesis cruzadas (CM) y en las reacciones de polimerización mediante apertura de anillos por metátesis (ROMP).²³⁷

El catalizador **Ru-II**, denominado catalizador de Grubbs de 2^a generación,²³⁸ es más activo que el de 1^a generación, y ha sido muy empleado en las reacciones de metátesis cruzada de olefinas estéricamente impedidas o electrónicamente desactivadas. En las reacciones de metátesis cruzada que pueden dar lugar a la formación de mezclas de olefinas *E/Z*, el catalizador **Ru-II** favorece además la formación del alqueno termodinámicamente más estable, que normalmente es el de configuración *E*.²³⁹

El catalizador **Ru-III** se denomina de Hoveyda-Grubbs de 2^a y tiene una reactividad similar al catalizador de Grubbs de 2^a generación **Ru-II**, si bien es capaz de iniciar el ciclo de metátesis a temperaturas inferiores de las que necesita este último. El catalizador **Ru-III** es muy efectivo en la metátesis de sustratos electrónicamente deficientes.²⁴⁰

El ciclo catalítico de la reacción de metátesis cruzada se indica en el esquema 3.26 y se inicia con la cicloadición del carbeno metálico, simbolizado como $[M]=CH_2$, a una de las olefinas. La reacción de cicloadición forma un metalaciclobutano, intermedio **I** del esquema 3.26, que experimenta un proceso de ciclorreversión y forma el carbeno metálico **II**. Este compuesto se cicloadiciona a la otra olefina y forma el metalaciclobutano **III**, que por ciclorreversión proporciona el producto de metátesis cruzada y regenera el catalizador.²⁴¹

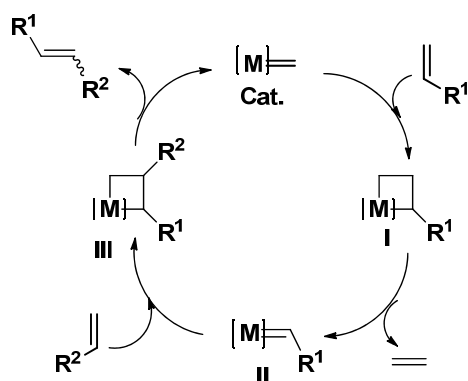
²³⁷ (a) Schwab, P.; France, M. B.; Ziller, J. W.; Grubbs, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *34*, 2039. (b) Schwab, P.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 100.

²³⁸ Morgan, J. P.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3153.

²³⁹ Chatterjee, A.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1751.

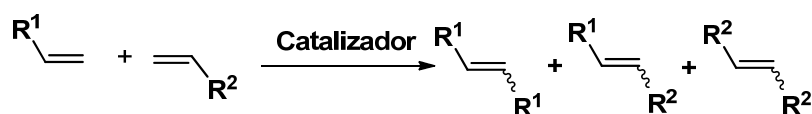
²⁴⁰ (a) Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168. (b) Chatterjee, A. K.; Choi, T.-L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11360. (c) Stewart, I. C.; Benitez, D.; O'Leary, D. O.; Tkatchouk, E.; Day, M. W.; Goddard, W. A. III; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1931.

²⁴¹ Chatterjee, A. K.; Morgan, J. P.; Scholl, M.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3783.



Esquema 3.26. Ciclo catalítico de la reacción de metátesis cruzada

Cuando se lleva a cabo la reacción de metátesis cruzada entre dos olefinas $R^1CH=CH_2$ y $R^2CH=CH_2$ se pueden formar tres productos: los dos de homodimerización ($R^1CH=CHR^1$ y $R^2CH=CHR^2$) y el de metátesis cruzada $R^1CH=CHR^2$, pudiéndose formar cada uno de ellos como mezclas isoméricas *E/Z* (véase el esquema 3.27).



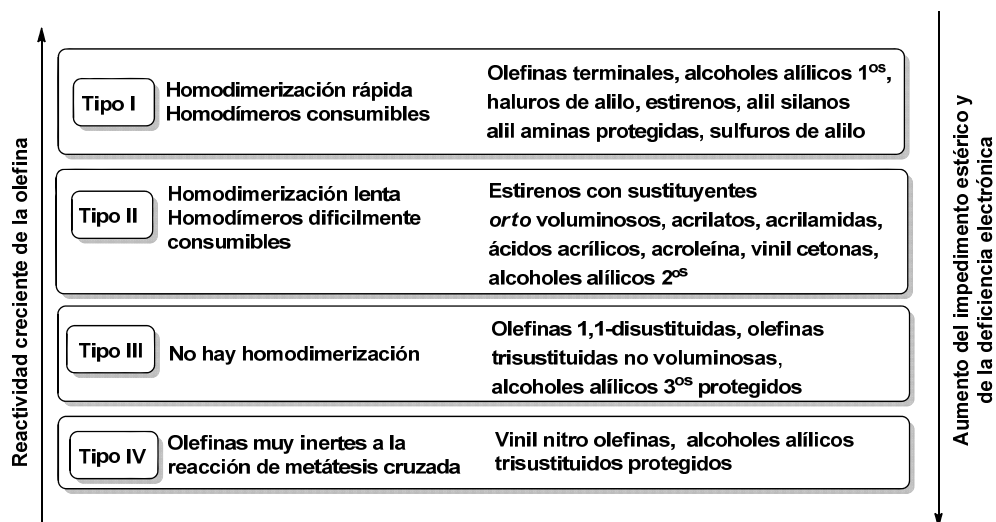
Esquema 3.27. Productos de metátesis cruzada

El grupo de Grubbs publicó en el año 2003 un estudio en el que se determinaban las condiciones estéricas y/o electrónicas que debían cumplir las olefinas a fin de suprimir la formación de productos de homodimerización y conseguir buenos rendimientos en el producto de metátesis cruzada.²⁴²

En el modelo propuesto por Grubbs y colaboradores, las olefinas se dividen en los cuatro grupos que se indican en el esquema 3.28. Para el

²⁴² Chatterjee A, K.; Choi, T. L.; Sanders, D.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360.

catalizador **Ru-II** se indican una serie de compuestos olefínicos agrupados en los cuatro tipos diferentes.



Esquema 3.28. Modelo propuesto por Grubbs sobre los tipos de olefinas

En base a las anteriores categorías de olefinas se pueden distinguir los tres subtipos de reacciones de metátesis cruzada que se indican en la tabla 3.1.

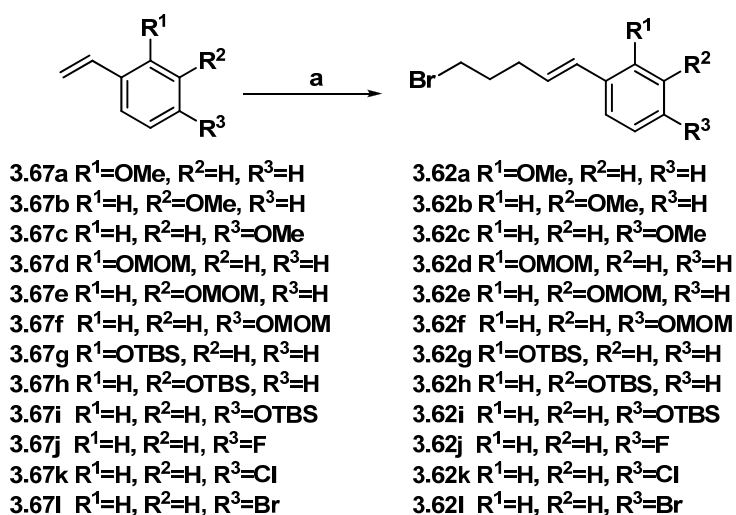
Tabla 3.1

Tipos de olefinas	Tipo de reacción	Comentarios
Tipo I + Tipo I	= CM estadística	Dos olefinas del tipo I
Tipo X + Tipo X	= CM no selectiva	X = Olefinas de tipo II, III o IV
Tipo Y + Tipo Z	= CM selectiva	Y, Z = Olefinas de dos tipos diferentes

Las reacciones de metátesis cruzada entre el 5-bromo-1-penteno **3.63** y los estirenos **3.67**, entre los que se han incluido los haloestirenos comercialmente accesibles **3.67j**, **3.67k** y **3.67l**, se pueden agrupar bajo la categoría de reacciones Tipo I + Tipo I. Cuando se utilizan dos olefinas Tipo I las

velocidades de homodimerización y de metátesis cruzada son similares. Además, las reactividades de los homodímeros y del producto de metátesis cruzada hacia la metátesis secundaria son altas, equilibrándose el producto de metátesis cruzada con los homodímeros, lo que origina una mezcla estadística de productos. Para que estas reacciones sean útiles se hace necesario emplear un exceso de una de las olefinas de partida.

Las reacciones de metátesis cruzada se llevaron a cabo a reflujo de diclorometano en presencia del catalizador **Ru-II** empleando 3 equivalentes del estireno **3.67** por cada equivalente de 5-bromo-1-penteno **3.63**.²⁴³ Los resultados obtenidos se reúnen en el esquema 3.29.



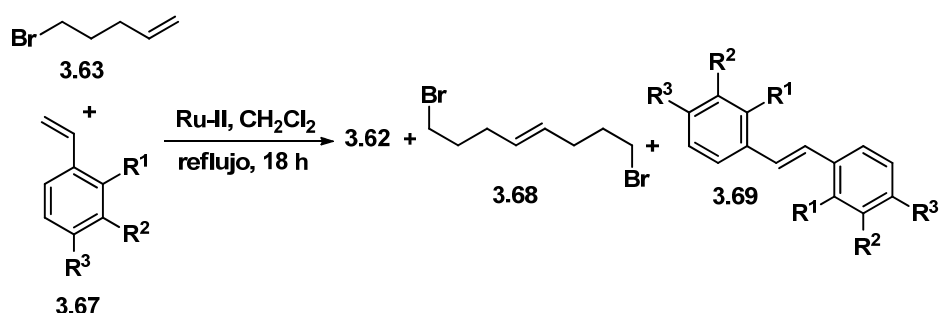
Esquema 3.29

Reactivos y condiciones: (a) catalizador **Ru-II**, estireno **3.67** (3.3 eq), 5-bromo-1-penteno **3.63** (1 eq), CH₂Cl₂, reflujo, 18 h (**3.62a** 40%; **3.62b** 97%; **3.62c** 99%; **3.62d** 91%; **3.62e** 97%; **3.62f** 99%; **3.62g** 97%; **3.62h** 98%; **3.62i** 98%; **3.62j**, **3.62k** y **3.62l** no se pudieron separar de los productos de homodimerización).

²⁴³ Para revisiones sobre síntesis de compuestos farmacológicamente activos mediante reacciones de metátesis cruzadas véase: (a) Prunet, J. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2005**, *5*, 1559. (b) Netscher, T. *Curr. T. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1579. (c) Binder, J. B.; Raines, R. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 767. (d) Morzycki, J. W. *Steroids* **2011**, *76*, 949.

La reacción de metátesis cruzada también se intentó en presencia del catalizador **Ru-I**, pero en este caso el producto mayoritario era el alqueno de configuración *Z* (**3.62i**, *Z/E* 80:20).

En las reacciones de metátesis cruzada en presencia del catalizador **Ru-II** el alqueno era mayoritariamente de configuración *E* (*Z/E* 5:95). En estas reacciones se formaban también los productos de homodimerización **3.68** y **3.69** (véase el esquema 3.30).

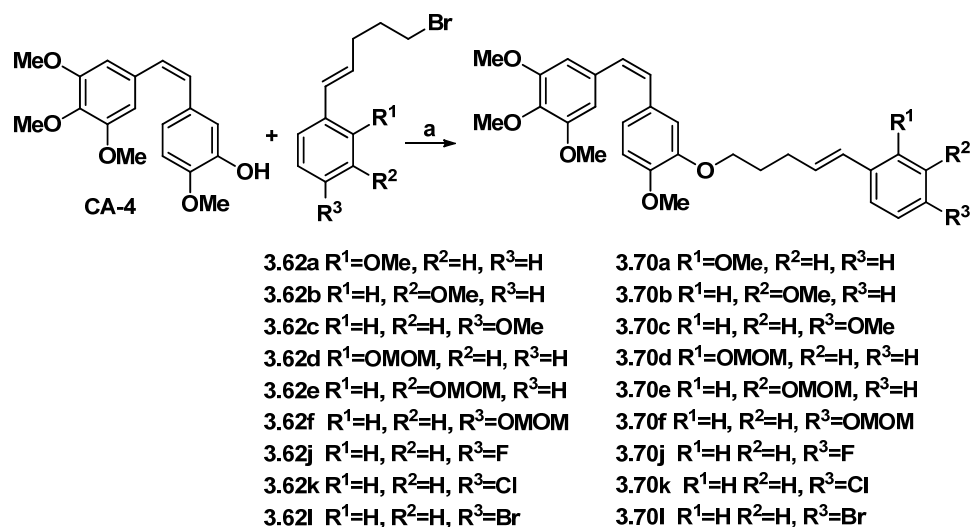


Esquema 3.30. Productos de homodimerización en la reacción CM

Los productos de homodimerización eran fácilmente separables mediante cromatografía de columna, excepto en el caso de los provenientes de la homodimerización de los 4-haloestirenos. En este caso la mezcla que contenía los compuestos **3.62** y los de homodimerización se sometió tal cual a la siguiente reacción.

3.4.3. Síntesis de híbridos CA-4/ATR 3.70

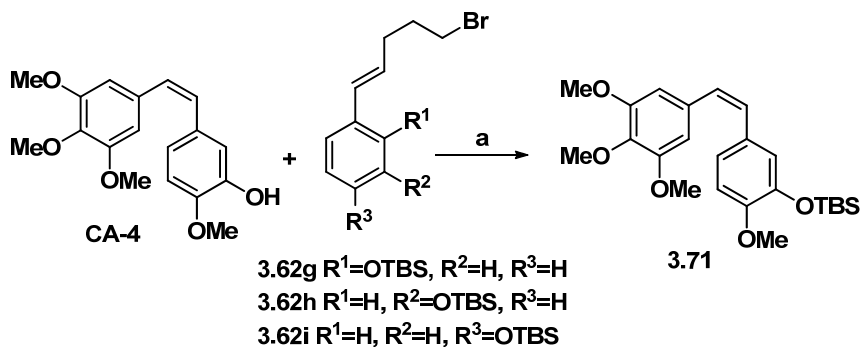
La síntesis de los híbridos CA-4/ATR se llevó a cabo mediante ionización de la combretastatina A-4 con carbonato potásico en DMF seguida de reacción con el correspondiente bromoderivado **3.62**. En el esquema 3.31 se reúnen los resultados obtenidos en estas reacciones de *O*-alquilación.



Esquema 3.31. Síntesis de híbridos CA-4/ATR

Reactivos y condiciones: (a) K₂CO₃, DMF, temp. amb., 1 hora, luego adición de **3.62** y agitación a temp. amb. 18 h (**3.70a** 64%; **3.70b** 37%; **3.70c** 36%; **3.70d** 58%; **3.70e** 68%; **3.70f** 49%; **3.70j** 44%; **3.70k** 41%; **3.70l** 23%).

La reacción de O-alkilación también se llevó a cabo sobre los compuestos sililados **3.62g**, **3.62h** y **3.62i** pero en estos casos no se formaron los correspondientes compuestos **3.70**, obteniéndose en su lugar el producto de O-sililación de la combretastatina A-4 **3.71** (véase el esquema 3.32).



Esquema 3.32

Reactivos y condiciones: (a) K₂CO₃, DMF, temp. amb., 1 hora, luego adición de **3.62** y agitación a temp. amb. 2 h (formación de **3.71**: a partir de **3.62g** 85%; a partir de **3.62h** 91%; a partir de **3.62i** 93%).

3.5. Parte experimental

3.5.1. Técnicas generales

Los espectros de IR se obtuvieron mediante el uso de pastillas de KBr en un espectrómetro Jasco FT/IR-6200, abarcando la región 4000-600 cm^{-1} . Solo se indican las bandas de funciones relevantes (C=O, OH).

Los espectros de masas se midieron en un espectrómetro de masas Q-TOF (Waters, Manchester, UK) con fuente de ionización combinada de tipo electrospray y APCI con diseño Z-spray; la tensión capilar de 3,5 KV se utilizó en el sentido positivo y la tensión de cono se estableció en 20 V.

Los espectros de RMN fueron registrados en espectrómetros Varian Unity de 300 y 500 (frecuencias aproximadas de operación, 300 y 500 MHz para ^1H ; 75 y 125 MHz para ^{13}C). La naturaleza de las señales de carbono (C, CH, CH_2 , CH_3) se determinó utilizando las técnicas APT o DEPT. Las asignaciones de las señales se han llevado a cabo mediante correlaciones heteronucleares bidimensionales (COSY y HMQC/HMBC). Salvo indicación en contra, los espectros se midieron en disolución de CDCl_3 . Los desplazamientos químicos (δ) están indicados en ppm usando como referencia las señales residuales del disolvente (δ 7.27 ppm para el ^1H y 77.0 ppm para el ^{13}C). En el caso de las multiplicidades en el ^1H -RMN se han usado s cuando se trata de un singulete, d para doblete, t para triplete, q para cuadruplete, quint para quintuplete, sext para sextuplete, hept para heptuplete, m para multiplete, br cuando se trata de una señal ancha y app cuando se trate de una señal con una multiplicidad aparente.

Para la cromatografía de capa fina se utilizaron cromatofolios de gel de sílice de Merck 5554.

Los disolventes tetrahidrofurano, diclorometano y éter, se secaron antes de su uso cuando fue necesario por medio de un sistema de purificación de

solventes MBRAUN modelo MB-SPS-800 series. La trietilamina se destiló sobre hidróxido potásico. La DMF se destiló y se guardó sobre tamices de 3Å.

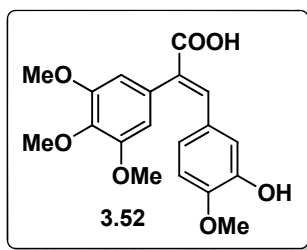
Los reactivos disponibles comercialmente se utilizaron sin tratamiento previo, directamente de Aldrich, Fluka, Acros o Strem.

Los reactivos sensibles al aire se utilizaron bajo atmósfera de nitrógeno evitando en todo momento el contacto con el aire y humedad.

Los reactivos sensibles a la luz se utilizaron cubiertos con papel de aluminio.

3.5.2. Procedimientos experimentales

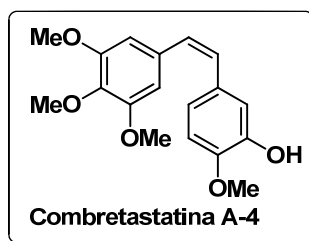
Síntesis del ácido 3.52



A una mezcla de **3.51** (1.65 g, 10.88 mmol) y **3.1** (5.22 g, 23.07 mmol, 2.0 eq.) en Ac_2O (12 mL) se le añadió Et_3N (5 mL) y se calentó a reflujo durante 3 h. Acabado este tiempo, se acidificó la mezcla de reacción con HCl concentrado (6 mL) formándose un precipitado que se filtró a vacío. El sólido obtenido se recristalizó con EtOH, obteniéndose 2.2 g (56%) del ácido **3.52**, como sólido amarillo.²²⁰

RMN ^1H (500 MHz): δ = 7.58 (1H, s), 6.80 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.61 (1H, dd, J = 8.3, 1.9 Hz), 6.54 (1H, d, J = 1.9 Hz), 6.44 (2H, s), 3.74 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.68 (6H, s).

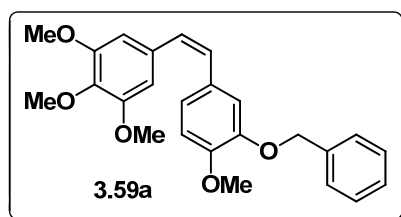
RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 169.0, 153.5, 149.2, 146.2, 139.5, 137.3, 132.5, 130.7 (C), 127.4, 123.4, 117.5, 111.8, 107.0 (CH), 60.5, 56.3, 55.8 (CH_3).

Síntesis de la combretastatina A-4

A una suspensión de Cu (2.0 g, 31.62 mmol, 5.2 eq.) en quinolina (23.5 mL) se le adicionó el ácido **3.52** (2.2 g, 6.08 mmol) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 3 h. A continuación se enfrió la reacción, se adicionó Et₂O (100 mL) y el Cu se filtró a través de celite. El filtrado se lavó con HCl 1M y la fase acuosa se extrajo con Et₂O. Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y luego se secaron con Na₂SO₄. Después de filtrar, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-EtOAc (7:3), obteniéndose 1.6 g (83%) de combretastatina A-4 como sólido rosado y como mezcla de isómeros *Z/E* 98:2.²²⁰

RMN ¹H (500 MHz): δ = 6.93 (1H, d, J = 1.9 Hz), 6.82 (1H, dd, J = 8.3, 1.9 Hz), 6.74 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.54 (2H, s), 6.46 (1H, d, J = 12.4 Hz), 6.42 (1H, d, J = 12.4 Hz), (5.52 (1H, br s, OH), 3.86 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.70 (6H, s).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 152.8 (x 2), 145.7, 145.2, 137.2, 132.6, 130.6 (C), 129.4, 128.9, 121.0, 115.0, 110.3, 106.1 x 2 (CH), 60.8, 55.8 (x 3) (CH₃).

Síntesis del compuesto 3.59a

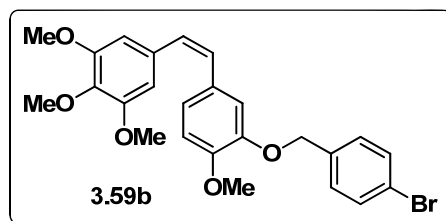
A una disolución de combretastatina A-4 (60 mg, 0.19 mmol) en DMF (3.6 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N₂, K₂CO₃ (2.2 mg, 0.38 mmol, 2.0 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se le adicionó el bromuro de bencilo (67.4 μ L, 0.57 mmol, 3.0 eq.) y se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 24 h protegiendo la reacción de la luz. A continuación, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con Et₂O (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 56 mg (73%) de **3.59a** como único isómero.

Sólido p.f 83-84 °C.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.35-7.25 (5H, br m), 6.90-6.85 (2H, m), 6.80 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.51 (2H, s), 6.47 (1H, d, J = 12.2 Hz), 6.43 (1H, d, J = 12.2 Hz), 4.94 (2H, s), 3.87 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.71 (6H, s).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 153.0 (x 2), 148.9, 147.7, 137.2, 136.9, 133.0, 129.8 (C), 133.1, 129.6, 128.4 (x 2), 127.7, 127.2 (x 2), 122.4, 114.5, 111.5, 106.0 (x 2) (CH), 70.9 (CH₂), 60.9, 56.0, 55.9 (x 2) (CH₃).

HR ESMS m/z 429.1674 (M+Na⁺). Calcd.para C₂₅H₂₆NaO₅, 429.1678.

Síntesis del compuesto 3.59b

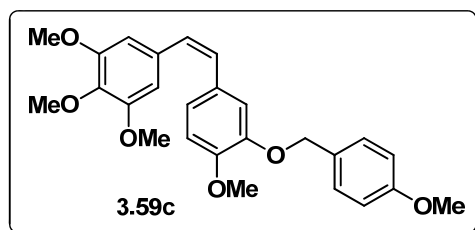
Una disolución de combretastatina A-4 (150 mg, 0.47 mmol), K_2CO_3 (131.2 mg, 0.95 mmol, 2.0 eq.) y bromuro de *p*-bromobencilo (356 mg, 1.42 mmol, 3.0 eq.) en DMF (9 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.59a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 180 mg (78%) de **3.59b** como un único isómero.

Aceite incoloro.

RMN 1H (500 MHz): δ = 7.44 (2H, br d, $J \sim 8.4$ Hz), 7.18 (2H, br d, $J = 8.4$ Hz), 6.88 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz), 6.83 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 6.80 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.50 (2H, s), 6.44 (2H, s), 4.87 (2H, s), 3.86 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.71 (6H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 153.0 (x 2), 149.0, 147.4, 137.2, 136.0, 133.0, 129.8, 121.6 (C), 131.5 (x 2), 129.5, 128.8, 128.7 (x 2), 122.8, 114.6, 111.5, 106.0 (x 2) (CH), 70.2 (CH₂), 60.9, 56.0 (x 3) (CH₃).

HR ESMS m/z 507.0782 (M+Na⁺). Calcd. para C₂₅H₂₅⁷⁹BrNaO₅, 507.0783.

Síntesis del compuesto 3.59c

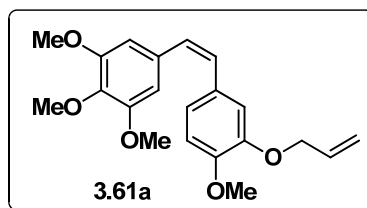
Una disolución de combretastatina A-4 (150 mg, 0.47 mmol), K_2CO_3 (131.2 mg, 0.95 mmol, 2.0 eq.) y cloruro de *p*-metoxibencilo (0.19 mL, 1.42 mmol, 3.0 eq.) en DMF (9 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la esterificación de **3.59a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatógrafió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 142 mg (69%) de **3.59c** como mezcla de isómeros *Z/E* en relación 82:12.

Sólido, p.f 62-63 °C

RMN 1H (500 MHz): δ = 7.24 (2H, br d, J ~ 8.7 Hz), 6.95-6.85 (3H, m), 6.78 (2H, br d, J = 8.7 Hz), 6.52 (2H, s), 6.47 (1H, d, J = 12.2 Hz), 6.43 (1H, d, J = 12.2 Hz), 4.87 (2H, s), 3.85 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.71 (6H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 159.4, 153.0 (x 2), 149.0, 147.8, 137.2, 133.0, 129.9, 129.1 (C), 129.7, 129.0 (x 2), 128.8, 122.4, 114.7, 113.9 (x 2), 111.5, 106.0 (x 2) (CH), 70.7 (CH₂), 60.9, 55.9 (x 3), 55.3 (CH₃).

HR ESMS m/z 459.1783 (M+Na⁺). Calcd. para C₂₆H₂₆NaO₆, 459.1784.

Síntesis del compuesto 3.61a

a) Una mezcla de combretastatina A-4 (60 mg, 0.19 mmol), K_2CO_3 (52.2 mg, 0.38 mmol, 2.0 eq.) y 3-yodo-propeno (51.8 μ L, 0.57 mmol, 3.0 eq.) en DMF (3.6 mL), se sometió a las mismas condiciones empleadas en la eterificación de **3.59a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 15 mg (22%) de **3.61a** como aceite de mezcla de isómeros *Z/E* de 56:44.

b) Una mezcla de combretastatina A-4 (60 mg, 0.19 mmol), K_2CO_3 (52.2 mg, 0.38 mmol, 2.0 eq.) y 3-bromo-propeno (49 μ L, 0.57 mmol, 3.0 eq.) en DMF (3.6 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.59a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 47 mg (70%) de **3.61a** y como mezcla de isómeros *Z/E* en relación 94:6.

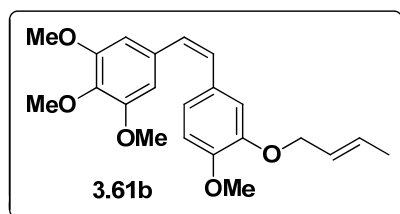
Sólido, p.f 107-108 °C

RMN 1H (500 MHz): δ = 6.86 (1H, dd, J = 8.3, 1.7 Hz), 6.84 (1H, d, J = 1.7 Hz), 6.79 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12.2 Hz), 6.46 (1H, d, J = 12.2 Hz), 5.95 (1H, ddt, J = 17.2, 11.4, 5.5 Hz), 5.27 (1H, dq, J = 17.2, 1.5 Hz), 5.20 (1H, dq, J = 11.4, 1.5 Hz), 4.40 (2H, dt, J = 5.5, 1.5 Hz), 3.86 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.71 (6H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 153.0 (x 2), 148.7, 147.5, 137.2, 133.0, 129.8 (C), 133.1, 129.7, 128.8, 122.3, 113.9, 111.3, 106.0 (x 2) (CH), 117.9, 69.7 (CH₂), 60.9, 56.0 (x 3) (CH₃).

HR ESMS m/z 379.1518 ($M+Na^+$). Calcd. for $C_{21}H_{24}NaO_5$, 379.1521.

Síntesis del compuesto 3.61b



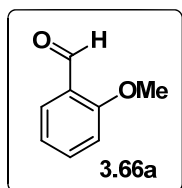
Una mezcla de combretastatina A-4 (150 mg, 0.47 mmol), K_2CO_3 (131.2 mg, 0.95 mmol, 2.0 eq.) y 4-bromo-2-buteno (0.15 mL, 1.42 mmol, 3.0 eq.) en DMF (9 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.59a**. Después del procesamiento de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 123 mg (70%) de **3.61b** como una mezcla de isómeros *Z/E* en relación 83:17.

Aceite incoloro.

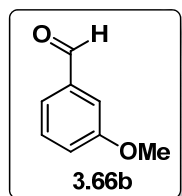
RMN 1H (500 MHz): δ = 6.86 (2H, m), 6.74 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12.1 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12.1 Hz), 5.75-5.60 (2H, m), 4.30 (2H, br d, J ~ 5.8 Hz), 3.85 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.72 (6H, s), 1.70 (3H, br dd, J ~ 6.5, 1.5 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 153.0 (x 2), 148.7, 147.6, 137.2, 133.0, 129.8 (C), 130.8, 129.7, 128.7, 125.9, 122.0, 113.6, 111.1, 106.0 (x 2) (CH), 69.5 (CH_2), 60.9, 56.0 (x 3), 17.7 (CH_3).

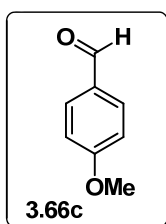
HR ESMS m/z 393.1677 ($M+Na^+$). Calcd. para $C_{22}H_{26}NaO_5$, 393.1678.

Síntesis del compuesto 3.66a

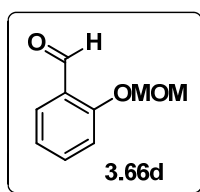
A una disolución de 2-hidroxibenzaldehído **3.65a** (0.34 mL, 3.27 mmol) en acetona seca (62 mL) se le añadió, bajo N₂, K₂CO₃ (904 mg, 6.55 mmol, 2.0 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se adicionó yoduro de metilo (0.6 mL, 9.6 mmol, 3.0 eq.) y se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (95:5), obteniéndose 400 mg (90%) del aldehído **3.66a** como aceite incoloro. Este compuesto fue utilizado directamente en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.66b

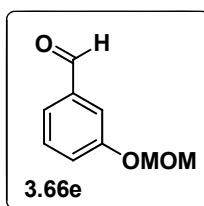
El 3-hidroxibenzaldehído **3.65b** (400 mg, 3.27 mmol) se sometió a las mismas condiciones de reacción que **3.65a** obteniéndose 430 mg (97%) del aldehído **3.66b** como aceite incoloro, el cual fue utilizado directamente en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.66c

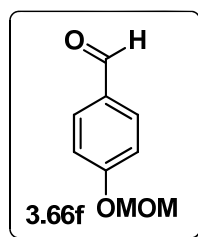
El 4-hidroxibenzaldehído **3.65c** (400 mg, 3.27 mmol) se sometió a las mismas condiciones de reacción que **3.65a** obteniéndose 430 mg (97%) del aldehído **3.66c** como aceite incoloro, el cual fue utilizado directamente en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.66d

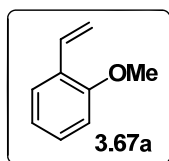
A una disolución de 2-hidroxibenzaldehído **3.65a** (300 mg, 2.45 mmol) en CH_2Cl_2 seco (62 mL) se le adicionó, bajo atmósfera de N_2 , DIPEA (5.19 mL, 31.85 mmol, 13 eq.) y MOMCl (1.86 mL, 24.5 mmol, 10 eq.). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 18 h. Acabado este tiempo, se adicionó CH_2Cl_2 y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se cromatógrafió sobre gel de sílice con hexano-EtOAc (95:5), obteniéndose el compuesto **3.66d** 406 mg (99%) como aceite incoloro, el cual fue utilizado directamente en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.66e

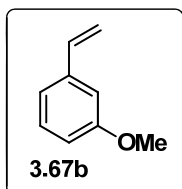
El 3-hidroxibenzaldehído **3.65c** (300 mg, 2.45 mmol) se sometió a las mismas condiciones de MOM protección empleadas en la síntesis de **3.66d**, obteniéndose 400 mg (98%) del aldehído **3.66e** como aceite incoloro, el cual fue utilizado directamente en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.66f

El 4-hidroxibenzaldehído **3.65c** (300 mg, 2.45 mmol) se sometió a las mismas condiciones de MOM protección empleadas en la síntesis de **3.66d**, obteniéndose 402 mg (99%) del aldehído **3.66f** como aceite incoloro, el cual fue utilizado directamente en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.67a

A una disolución de $\text{BrP}(\text{Ph})_3\text{CH}_3$ (2.93 g, 8.23 mmol, 2.8 eq.) en THF seco (18 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N_2 , $t\text{-BuOK}$ (0.89 g, 7.94 mmol, 2.7 eq.). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se adicionó el aldehído **3.66a** (400 mg, 2.94 mmol) disuelto en THF seco (4.3 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. A continuación, la mezcla se vertió sobre CH_2Cl_2 y se extrajo con H_2O (2 x 20 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con salmuera (2 x 20 mL), se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (98:2), obteniéndose 310 mg (79%) del estireno **3.25a** como aceite incoloro. Los datos espectrales obtenidos están de acuerdo con los descritos en la literatura.²⁴⁴

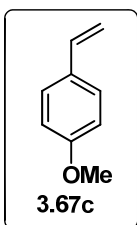
Síntesis del compuesto 3.67b

El aldehído **3.66b** (430 mg, 3.16 mmol) se sometió a las mismas condiciones de reacción de Wittig que el compuesto **3.66a**. Después del procesamiento de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano, obteniéndose 377 mg (89%) del estireno **3.67b** como aceite

²⁴⁴ Denmark, S. E.; Butler, C. R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 63.

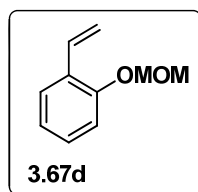
incolore. Los datos espectrales obtenidos están de acuerdo con los descritos en la literatura.²⁴⁵

Síntesis del compuesto 3.67c



El aldehído **3.66c** (430 mg, 3.16 mmol) se sometió a las mismas condiciones de reacción de Wittig que el compuesto **3.66a** lo que proporcionó 300 mg (71%), del estireno **3.67c** como aceite incoloro. Los datos espectrales obtenidos están de acuerdo con los descritos en la literatura.²⁴⁶

Síntesis del compuesto 3.67d



A una disolución de $\text{BrP}(\text{Ph})_3\text{CH}_3$ (2.70 g, 7.58 mmol, 3.15 eq.) en THF seco (9 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N_2 , *t*-BuOK (0.82 g, 7.32 mmol, 3.0 eq.) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Seguidamente, se adicionó el aldehído **3.66d** (406 mg, 2.44 mmol) en THF seco (4.3 mL) y la agitación se mantuvo a temperatura ambiente durante 18 h. A continuación, la mezcla se vertió sobre CH_2Cl_2 y se extrajo con H_2O (2 x 15 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con salmuera (2 x 15 mL),

²⁴⁵ Yamamoto, T.; Yamakawa, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3603.

²⁴⁶ Wang, C. H.; White, A. R.; Schwartz, S. N.; Alluri, S.; et al. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9750.

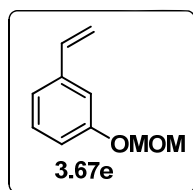
se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente a presión reducida, el residuo se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (95:5), obteniéndose 300 mg (75%) del estireno **3.67d**.

Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz): δ = 7.53 (1H, dd, J = 7.7, 1.5 Hz), 7.23 (1H, td, J = 7.7, 1.5 Hz), 7.14-7.09 (2H, m), 7.02 (1H, td, J = 7.5, 1 Hz), 5.79 (1H, dd, J = 17.8, 1.4 Hz), 5.31 (1H, dd, J = 11, 1.4 Hz), 5.22 (2H, s), 3.51 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 154.4, 127.6 (C), 131.5, 128.8, 126.4, 121.9, 114.8 (CH), 114.5, 94.7 (CH_2), 56.0 (CH_3).

Síntesis del compuesto **3.67e**

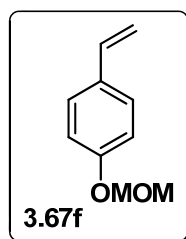


El aldehído **3.66e** (400 mg, 2.41 mmol) se sometió a las mismas condiciones de reacción de Wittig empleadas en la síntesis de **3.67d**, obteniéndose 270 mg (68%) del estireno **3.65e**.

Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz): δ = 7.26 (1H, t, J = 7.9 Hz), 7.12 (1H, br t, J ~ 2 Hz), 7.08 (1H, br d, J ~ 7.6), 6.97 (1H, ddd, J = 7.9, 2.4, 1 Hz), 6.71 (1H, dd, J = 17.5, 10.8 Hz), 5.77 (1H, dd, J = 17.5, 1 Hz), 5.27 (1H, dd, J = 10.8, 1 Hz), 5.21 (2H, s), 3.51 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 157.6, 139.2 (C), 136.7, 129.5, 120.1, 115.7, 114.0 (CH), 114.3, 94.5 (CH_2), 56.0 (CH_3).

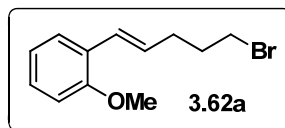
Síntesis del compuesto 3.67f

El aldehído **3.66f** (402 mg, 2.42 mmol) se sometió a las mismas condiciones de reacción de Wittig empleadas en la síntesis de **3.67d**, obteniéndose 242 mg (61%) de **3.67f**.

Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.38 (2H, br d, J ~ 8.5 Hz), 7.05 (2H, br d, J ~ 8.5 Hz), 6.71 (1H, dd, J = 17.6, 11 Hz), 5.77 (1H, d, J = 17.6 Hz), 5.21 (2H, s), 5.20 (1H, d, J = 11 Hz), 3.52 (3H, s).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 157.0, 131.6 (C), 136.2, 127.3 (x 2), 116.3 (x 2) (CH), 112.0, 94.4 (CH₂), 55.9 (CH₃).

Síntesis del compuesto 3.62a

A una disolución del catalizador de Grubbs-II (100 mg, 0.11 mmol, 0.35 eq, 2 Mm) en CH₂Cl₂ seco (59 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N₂, el compuesto **3.67a** (150 mg, 0.91 mmol, 3.3 eq.) y 5-bromo-1-penteno (39.7 μ L, 0.33 mmol, 0.3 eq.) La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 h. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar y se añadió DMSO (390 μ L, 5.6 mmol, 50 eq.). Después del procesado de la reacción el residuo resultante se

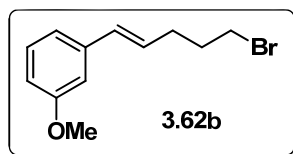
concentró y se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-Et₂O (400:1), obteniéndose 34 mg (40%) del producto de metátesis **3.62a**.

Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.43 (1H, br d, J ~ 7.8 Hz), 7.22 (1H, br t, J ~ 7.8 Hz), 6.94 (1H, t, J = 7.8 Hz), 6.88 (1H, br d, J ~ 7.8 Hz), 6.79 (1H, d, J = 16 Hz), 6.20 (1H, dt, J = 16, 7 Hz), 3.87 (3H, s), 3.48 (2H, t, J = 7 Hz), 2.42 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 2.07 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 156.4, 126.4 (C), 129.2, 128.1, 126.5, 126.0, 120.6, 110.9 (CH), 33.2, 32.4, 31.8 (CH₂), 55.5 (CH₃).

Síntesis del compuesto **3.62b**



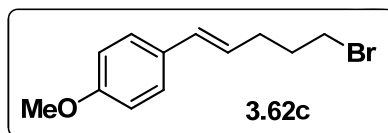
A una disolución del catalizador de Grubbs-II (100 mg, 0.11 mmol, 0.35 eq, 2Mm) en CH₂Cl₂ seco (55 mL), se le añadió, bajo atmósfera de N₂, el compuesto **3.67b** (150 mg, 1.119 mmol, 3.3 eq.) y el 5-bromo-1-penteno (39.7 μ L, 0.335 mmol, 0.3 eq.). La mezcla resultante se sometió a las mismas condiciones empleadas en la síntesis de **3.67a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se concentró y cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-Et₂O (400:1), obteniéndose 83 mg (97%) de **3.62b**.

Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.23 (1H, t, J = 7.8 Hz), 6.96 (1H, br d, J ~ 7.8 Hz), 6.91 (1H, br t, J ~ 2 Hz), 6.79 (1H, dd, J = 7.8, 2.5 Hz), 6.44 (1H, d, J = 16 Hz), 6.18 (1H, dt, J = 16, 7 Hz), 3.83 (3H, s), 3.47 (2H, t, J = 7 Hz), 2.40 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 2.05 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 159.8, 138.9 (C), 131.2, 129.5, 128.8, 118.7, 112.8, 111.4 (CH), 33.1, 32.2, 31.2 (CH_2), 55.2 (CH_3).

Síntesis del compuesto 3.62c



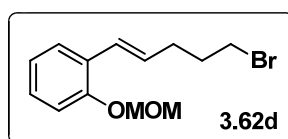
A una disolución del catalizador de Grubbs-II (100 mg, 0.11 mmol, 0.35 eq, 2Mm), en CH_2Cl_2 seco (59 mL), se le añadió, bajo atmósfera de N_2 , el compuesto **3.67c** (150 mg, 0.914 mmol, 3.3 eq.) y 5-bromo-1-penteno (39.7 μL , 0.335 mmol, 0.3 eq). La mezcla resultante se sometió a las mismas condiciones empleadas en la síntesis de **3.67a** obteniéndose 85 mg (99%) de **3.62c**.

Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz): δ = 7.30 (2H, br d, $J \sim 8.5$ Hz), 6.86 (2H, br d, $J \sim 8.5$ Hz), 6.41 (1H, d, $J = 16$ Hz), 6.04 (1H, dt, $J = 16, 7$ Hz), 3.82 (3H, s), 3.46 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.38 (2H, br q, $J \sim 7$ Hz), 2.05 (2H, br quint, $J \sim 7$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 158.9, 128.6 (C), 130.7 (x 2), 127.1 (x 2), 126.3, 114.0 (CH), 33.2, 32.4, 31.3 (CH_2), 55.3 (CH_3).

Síntesis del compuesto 3.62d



A una disolución del catalizador de Grubbs-II (33.3 mg, 0.037 mmol, 0.33 eq, 2 Mm) en CH_2Cl_2 seco (46 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N_2 , el compuesto **3.67d** (150 mg, 0.91 mmol, 3.3 eq.) y 5-bromo-1-penteno (32 μL ,

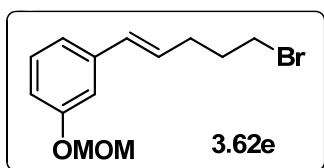
0.27 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 h. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la reacción y se añadió DMSO (325 μL , 4.57 mmol, 50 eq.). Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se concentró y cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-Et₂O (400:1), obteniéndose 71 mg (91%) de **3.62d**.

Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.45 (1H, br d, J ~ 7.8 Hz), 7.19 (1H, br t, J ~ 7.8 Hz), 7.10 (1H, br d, J ~ 7.8 Hz), 6.98 (1H, br t, J ~ 7.8 Hz), 6.81 (1H, d, J = 16 Hz), 6.18 (1H, dt, J = 16, 7 Hz), 5.23 (2H, s), 3.52 (3H, s), 3.49 (2H, t, J = 7 Hz), 2.42 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 2.07 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 154.1, 127.4 (C), 129.2, 128.1, 126.4, 125.8, 122.0, 115.0 (CH), 94.8, 33.2, 32.4, 31.7 (CH₂), 56.1 (CH₃).

Síntesis del compuesto 3.62e



A una disolución del catalizador de Grubbs-II (82.16 mg, 0.09 mmol, 0.33 eq, 2Mm) en CH₂Cl₂ seco (46 mL), se le añadió, bajo atmósfera de N₂, el compuesto **3.67e** (150 mg, 0.914 mmol, 3.3 eq.) y 5-bromo-1-penteno (32 μL , 0.27 mmol, 0.3 eq.). La mezcla resultante se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la síntesis de **3.62d** obteniéndose 76 mg (97%) de **3.62e**.

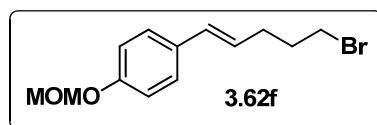
Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.23 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.05 (1H, br t, J ~ 2 Hz), 7.01 (1H, br d, J ~ 7.8 Hz), 6.92 (1H, br dd, J ~ 7.8, 2.2 Hz), 6.43 (1H, d, J =

15.8 Hz), 6.18 (1H, dt, $J = 15.8, 6.8$ Hz), 5.20 (2H, s), 3.50 (3H, s), 3.47 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.39 (2H, br q, $J \sim 6.8$ Hz), 2.05 (2H, br quint, $J \sim 6.8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 157.5, 139.0$ (C), 131.1, 129.5, 128.9, 119.8, 115.1, 113.7 (CH), 94.4, 33.0, 32.2, 31.2 (CH_2), 55.9 (CH_3).

Síntesis del compuesto 3.62f

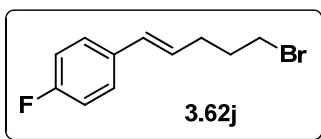


A una disolución del catalizador de Grubbs-II (82.16 mg, 0.09 mmol, 0.33 eq, 2 Mm) en CH_2Cl_2 seco (46 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N_2 , el compuesto **3.67f** (150 mg, 0.91 mmol, 3.3 eq.) y 5-bromo-1-penteno (32 μL , 0.27 mmol). La mezcla de reacción se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la síntesis de **3.62d**, obteniéndose 78 mg (99%) de **3.62f**.

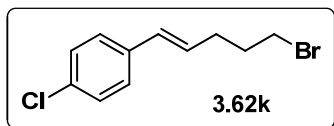
Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz): $\delta = 7.29$ (2H, br d, $J \sim 8.5$ Hz), 6.99 (2H, br d, $J \sim 8.5$ Hz), 6.41 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 6.05 (1H, dt, $J = 15.9, 6.8$ Hz), 5.18 (2H, s), 3.49 (3H, s), 3.46 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.37 (2H, br q, $J \sim 6.8$ Hz), 2.04 (2H, br quint, $J \sim 6.8$ Hz).

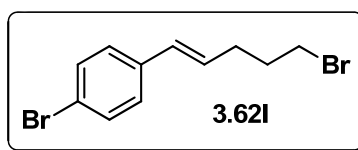
RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 156.5, 131.5$ (C), 130.6, 127.1 (x 2), 126.8, 116.3 (x 2) (CH), 94.5, 33.1, 32.3, 31.2 (CH_2), 55.9 (CH_3).

Síntesis del compuesto 3.62j

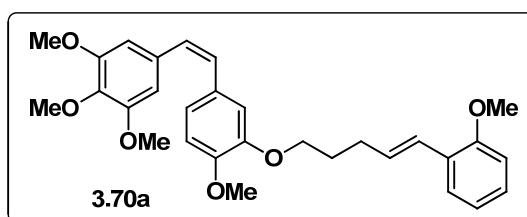
A una disolución del catalizador de Grubbs-II (208 mg, 0.25 mmol 0.1 eq, 2 Mm) en CH_2Cl_2 seco (120 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N_2 , el 4-fluoroestireno **3.67j** (292 μL , 2.46 mmol, 1.1 eq.) y el 5-bromo-1-penteno (320 μL , 2.71 mmol, 1.1 eq.). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 h. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la reacción y luego se añadió DMSO (430 μL , 6.14 mmol, 50 eq.) y la mezcla se agitó durante 24 h. El residuo se concentró y se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano- Et_2O (400:1), obteniéndose 487mg de una mezcla de isómeros y otros subproductos (homometátesis), que fueron imposibles de separar y se utilizaron en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.62k

Una mezcla del catalizador de Grubbs-II (92 mg, 0.11 mmol, 0.2 eq, 2Mm), 4-cloroestireno **3.67k** (96 μL , 1.08 mmol, 2.0 eq.) y 5-bromo-1-penteno (65 μL , 0.54 mmol) en CH_2Cl_2 seco (50 mL), se sometió a las mismas condiciones de reacción empleadas en la síntesis del compuesto **3.62j**, obteniéndose 300 mg de un mezcla de isómeros y otros subproductos (homometátesis), que fueron imposibles de separar y que se utilizaron en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.62l

Una disolución del catalizador de Grubbs-II (70 mg, 0.08 mmol, 0.2 eq, 2 Mm), 4-bromoestireno **3.67l** (75 μ L, 0.82 mmol, 2.0 eq.) y 5-bromo-1-penteno (48 μ L, 0.41 mmol) en CH_2Cl_2 seco (40 mL) se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la síntesis de **3.62j**, obteniéndose 321 mg mezcla de isómeros y otros subproductos (homometátesis), que fueron imposibles de separar y se utilizaron en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del compuesto 3.70a

A una disolución de combretastatina A-4 (15.05 mg, 0.05 mmol) en DMF (2 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N_2 , con K_2CO_3 (13.17 mg, 0.09 mmol, 2.0 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se adicionó el compuesto **3.62a** (34 mg, 0.13 mmol, 3.0 eq.) y la agitación se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h protegiendo la reacción de la luz. A continuación, la mezcla de reacción se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH_4Cl y se extrajo con Et_2O (3 x 6 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente bajo presión reducida, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 15 mg (64%) del híbrido **3.70a**.

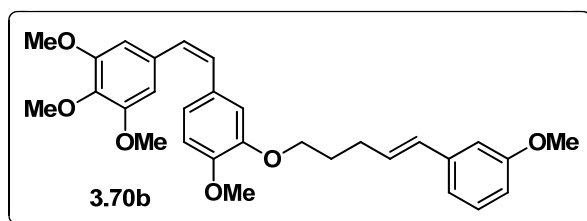
Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz): δ = 7.41 (1H, dd, J = 7.7, 1.5 Hz), 7.19 (1H, td, J = 7.7, 1.5 Hz), 6.91 (1H, td, J = 7.7, 1 Hz), 6.90-6.85 (3H, m), 6.78 (1H, d, J = 8 Hz), 6.74 (1H, br d, J ~ 15.8 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12.2 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12.2 Hz), 6.22 (1H, dt, J = 15.8, 6.8 Hz), 3.90 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.86 (3H, s), 3.84 (6H, s), 3.70 (6H, s), 2.36 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 1.94 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 156.3, 153.0 (x 2), 148.8, 148.1, 137.2, 133.0, 130.0, 126.8 (C), 130.4, 129.8, 128.8, 127.9, 126.5, 125.2, 122.0, 120.7, 113.9, 111.5, 110.8, 106.0 (x 2) (CH), 68.4, 29.8, 28.8 (CH_2), 60.9, 56.1, 56.0 (x 2), 55.5 (CH_3).

HR ESMS m/z 513.2247 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{NaO}_6$, 513.2253.

Síntesis del compuesto 3.70b



Una mezcla de combretastatina A-4 (38.74 mg, 0.123 mmol), K_2CO_3 (34 mg, 0.245 mmol, 2.0 eq.) y el compuesto **3.62b** (83 mg, 0.326 mmol, 2.6 eq.) en DMF (2 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.70a**, obteniéndose 22 mg (37%) del híbrido **3.70b**.

Aceite incoloro.

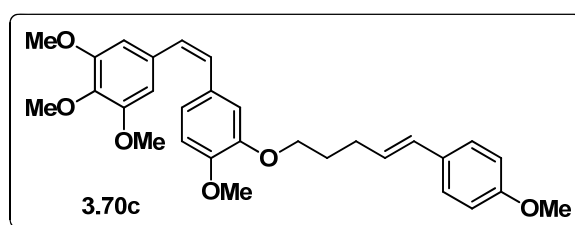
RMN ^1H (500 MHz): δ = 7.21 (1H, t, J = 7.9 Hz), 6.94 (1H, br d, J ~ 7.7 Hz), 6.90-6.85 (3H, m), 6.78 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.76 (1H, dd, J = 8.3, 2.5 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12 Hz), 6.38 (1H, br d, J ~ 15.8 Hz), 6.23 (1H, dt, J = 15.8, 6.8 Hz), 3.88 (2H, t, J = 6.7 Hz), 3.86 (3H, s),

3.84 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.70 (6H, s), 2.34 (2H, br q, $J \sim 7$ Hz), 1.92 (2H, br quint, $J \sim 7$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 160.0, 153.0$ (x 2), 148.8, 148.0, 139.2, 137.2, 133.0, 130.0 (C), 130.4, 130.1, 129.7, 129.4, 128.8, 122.1, 118.7, 113.8, 112.5, 111.5 (x 2), 106.0 (x 2) (CH), 68.2, 29.4, 28.7 (CH₂), 60.9, 56.0 (x 3), 55.2 (CH₃).

HR ESMS m/z 513.2255 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₀H₃₄NaO₆, 513.2253.

Síntesis del compuesto 3.70c



Una disolución de combretastatina A-4 (41.00 mg, 0.13 mmol), K₂CO₃ (35.86 mg, 0.2595 mmol, 2.0 eq.) y el compuesto **3.62c** (85 mg, 0.335 mmol, 3.5 eq.) en DMF (2.5 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.70a**, obteniéndose 23 mg (36%) del híbrido **3.70c** mezcla de isómeros *Z/E* en relación 95:5.

Aceite incoloro.

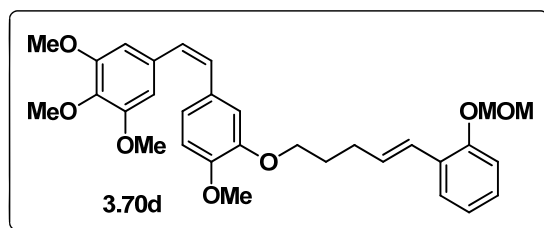
RMN ^1H (500 MHz): $\delta = 7.28$ (2H, br d, $J \sim 8.5$ Hz), 6.90-6.85 (4H, m), 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.54 (2H, s), 6.50 (1H, d, $J = 12$ Hz), 6.46 (1H, d, $J = 12$ Hz), 6.36 (1H, br d, $J \sim 15.8$ Hz), 6.09 (1H, dt, $J = 15.8, 6.8$ Hz), 3.89 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.86 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.71 (6H, s), 2.33 (2H, br q, $J \sim 7$ Hz), 1.92 (2H, br quint, $J \sim 7$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 158.7, 153.0$ (x 2), 148.8, 148.0, 137.2, 133.0, 130.6, 130.0 (C), 129.8, 129.7, 128.7, 127.5, 127.1 (x 2), 122.0, 113.9 (x 2),

113.7, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 68.2, 29.4, 28.8 (CH₂), 60.9, 56.0 (x 3), 55.2 (CH₃).

HR ESMS *m/z* 513.2256 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₀H₃₄NaO₆, 513.2253.

Síntesis del compuesto 3.70d



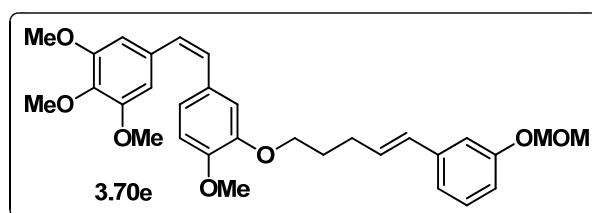
A una disolución de combretastatina A-4 (26.3 mg, 0.083 mmol) en DMF (3 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N₂, K₂CO₃ (23 mg, 0.16 mmol, 2.0 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se adicionó el compuesto **3.62d** (71 mg, 0.25 mmol, 3.0 eq.) y la agitación se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h, protegiendo la reacción de la luz. A continuación, la mezcla de reacción se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con Et₂O (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 25 mg (58%) del híbrido **3.70d** como aceite incoloro y como mezcla de isómeros *Z/E* en relación 93:7.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.44 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.8 Hz), 7.16 (1H, td, *J* = 7.9, 1.8 Hz), 7.07 (1H, dd, *J* = 8, 1 Hz), 6.97 (1H, td, *J* = 7.6, 1 Hz), 6.90-6.85 (2H, m), 6.78 (1H, d, *J* = 8 Hz), 6.75 (1H, br d, *J* ~ 15.8 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, *J* = 12 Hz), 6.45 (1H, d, *J* = 12 Hz), 6.22 (1H, dt, *J* = 15.8, 6.8 Hz), 5.20 (2H, s), 3.90 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.86 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.70 (6H, s), 3.48 (3H, s), 2.38 (2H, br q, *J* ~ 7 Hz), 1.94 (2H, br quint, *J* ~ 7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 154.0, 153.0 (x 2), 148.8, 148.1, 137.2, 133.0, 130.0, 127.7 (C), 130.5, 129.8, 128.8, 127.9, 126.4, 125.0, 122.0, 121.9, 114.9, 113.8, 111.5, 106.0 (x 2) (CH), 94.8, 68.3, 29.8, 28.8 (CH₂), 60.9, 56.1, 56.0, 55.9 (x 2) (CH₃).

HR ESMS m/z 543.2362 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₁H₃₆NaO₇, 543.2359.

Síntesis del compuesto 3.70e



Una mezcla de combretastatina A-4 (28 mg, 0.08 mmol), K₂CO₃ (25 mg, 0.18 mmol, 2.0 eq.) y el compuesto **3.62e** (76 mg, 0.27 mmol, 3.3 eq.) en DMF (3 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.70d** obteniéndose 31 mg (68%) del híbrido **3.70e** como único isómero.

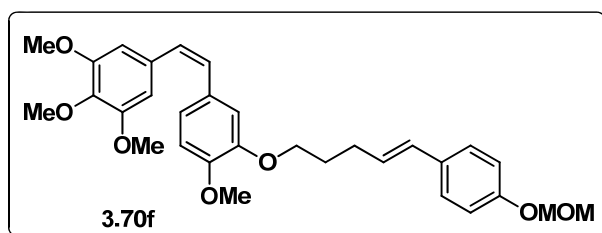
Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz): δ = 7.21 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.02 (1H, br s), 7.00 (1H, br d, J ~ 8 Hz), 6.90-6.85 (3H, m), 6.78 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.54 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.46 (1H, d, J = 12 Hz), 6.38 (1H, br d, J ~ 15.7 Hz), 6.23 (1H, dt, J = 15.7, 6.8 Hz), 5.19 (2H, s), 3.88 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.86 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.70 (6H, s), 3.49 (3H, s), 2.34 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 1.91 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 157.5, 153.0 (x 2), 148.8, 148.0, 139.2, 137.2, 133.0, 129.9 (C), 130.3, 130.2, 129.7, 129.4, 128.8, 122.0, 119.8, 114.8, 113.8, 113.7, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 94.4, 68.2, 29.4, 28.7 (CH₂), 60.8, 55.9 (x 4) (CH₃).

HR ESMS m/z 543.2359 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₁H₃₆NaO₇, 543.2359.

Síntesis del compuesto 3.70f



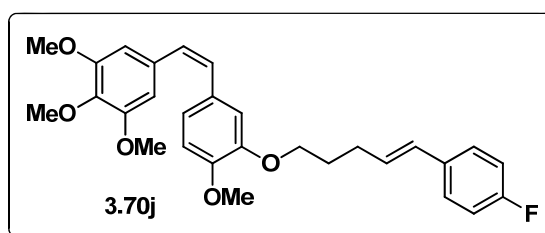
Una mezcla de combretastatina A-4 (35 mg, 0.11 mmol), K_2CO_3 (31 mg, 0.23 mmol, 2.0 eq.) y el compuesto **3.62f** (78 mg, 0.27 mmol, 2.5 eq.) en DMF (2.1 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.70d**, obteniéndose 28 mg (49%) del compuesto **3.70f** como único isómero.

Aceite incoloro.

RMN 1H (500 MHz): δ = 7.26 (2H, br d, J ~ 8.5 Hz), 6.97 (2H, br d, J ~ 8.5 Hz), 6.90-6.85 (2H, m), 6.78 (1H, d, J = 8.2 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12.3 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12.3 Hz), 6.36 (1H, br d, J ~ 15.7 Hz), 6.10 (1H, dt, J = 15.7, 6.8 Hz), 5.17 (2H, s), 3.88 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.86 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.70 (6H, s), 3.48 (3H, s), 2.32 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 1.91 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 156.4, 153.0 (x 2), 148.8, 148.0, 137.2, 133.0, 131.8, 130.0 (C), 129.8, 129.7, 128.8, 128.1, 127.1 (x 2), 122.0, 116.3 (x 2), 113.8, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 94.5, 68.3, 29.4, 28.8 (CH_2), 60.9, 56.0 (x 4) (CH_3).

HR ESMS m/z 543.2360 ($M+Na^+$). Calcd. para $C_{31}H_{36}NaO_7$, 543.2359.

Síntesis del compuesto 3.70j

A una disolución de combretastatina A-4 (62 mg, 0.19 mmol) en DMF (4 mL) se le añadió, bajo atmósfera de N₂, K₂CO₃ (54.2 mg, 0.39 mmol, 2.0 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se adicionó el compuesto **3.62j** (139 mg) y se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 24 h, protegiendo la reacción de la luz. A continuación, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con Et₂O (3 x 15 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 42 mg (44%) del compuesto **3.70j** como mezcla de isómeros *Z/E* en relación 93:7.

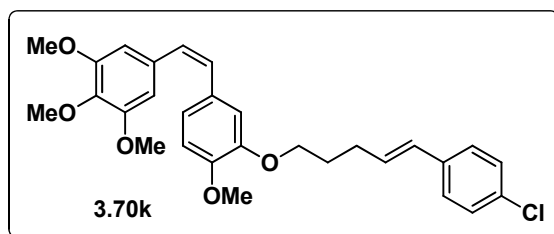
Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz): δ = 7.30 (2H, m), 6.98 (2H, m), 6.90-6.85 (2H, m), 6.79 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12.1 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12.1 Hz), 6.37 (1H, br d, J ~ 15.8 Hz), 6.14 (1H, dt, J = 15.8, 6.8 Hz), 3.88 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.86 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.70 (6H, s), 2.33 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 1.91 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 162.9/161.0 [d, $^1J_{C-F}$ ~ 244 Hz], 153.0 (x 2), 148.8, 148.0, 137.2, ~133.9 [d, $^4J_{C-F}$ ~ 3 Hz], 133.0, 129.9 (C), 129.7, 129.5, 129.3, 128.8, ~127.4 [d, $^3J_{C-F}$ ~ 8 Hz] (x 2), 122.1, 115.3/115.2 [d, $^2J_{C-F}$ ~ 21 Hz], (x 2), 113.7, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 68.2, 29.3, 28.7 (CH₂), 60.9, 56.1, 56.0 (x 2) (CH₃).

HR ESMS m/z 501.2052 ($M+Na^+$). Calcd. Para $C_{29}H_{31}FNaO_5$, 501.2053.

Síntesis del compuesto 3.70k



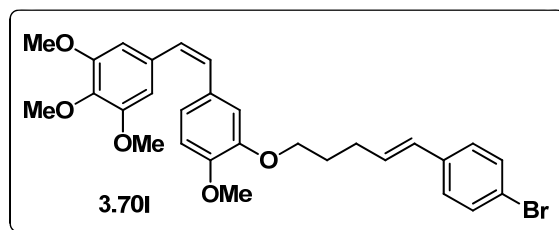
Una mezcla de combretastatina A-4 (65 mg, 0.21 mmol), K_2CO_3 (57 mg, 0.41 mmol, 2.0 eq.) y el compuesto **3.62k** (300 mg) en DMF (4 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.70j**, obteniéndose 42 mg (41%) del compuesto **3.70k** como mezcla de isómeros *Z/E* en relación 95:5.

Aceite incoloro.

RMN 1H (500 MHz): δ = 7.26 (4H, m), 6.88 (1H, dd, J = 8.2, 1.7 Hz), 6.85 (1H, d, J = 1.7 Hz), 6.79 (1H, d, J = 8.2 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12 Hz), 6.36 (1H, br d, J ~ 15.8 Hz), 6.21 (1H, dt, J = 15.8, 6.8 Hz), 3.87 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.85 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.70 (6H, s), 2.34 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 1.91 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 153.0 (x 2), 148.8, 147.9, 137.2, 136.2, 133.0, 132.5, 129.9 (C), 130.5, 129.7, 129.3, 128.8, 128.5 (x 2), 127.2 (x 2), 122.1, 113.7, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 68.2, 29.4, 28.6 (CH_2), 60.9, 56.0 (x 3) (CH_3).

HR ESMS m/z 517.1761 ($M+Na^+$). Calcd. for $C_{29}H_{31}^{35}ClNaO_5$, 517.1758.

Síntesis del compuesto 3.70i

Una disolución de combretastatina A-4 (89.70 mg, 0.2838 mmol), K_2CO_3 (78.44 mg, 0.567 mmol, 2.0 eq.) y el compuesto **3.62i** (321 mg) en DMF (6 mL), se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la eterificación de **3.70j**, obteniéndose 35 mg (23%) del compuesto **3.70i** como mezcla de isómeros *Z/E* en relación 89:11.

Aceite incoloro.

RMN 1H (500 MHz): δ = 7.41 (2H, br d, J = 8.5 Hz), 7.20 (2H, br d, J = 8.5 Hz), 6.87 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz), 6.85 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.79 (1H, d, J = 8.2 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12 Hz), 6.35 (1H, br d, J ~ 15.8 Hz), 6.22 (1H, dt, J = 15.8, 6.8 Hz), 3.87 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.85 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.70 (6H, s), 2.33 (2H, br q, J ~ 7 Hz), 1.90 (2H, br quint, J ~ 7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 153.0 (x 2), 148.8, 147.9, 137.2, 136.6, 133.0, 131.5, 129.9 (C), 131.4 (x 2), 130.7, 129.7, 129.4, 128.8, 127.5 (x 2), 122.1, 113.7, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 68.2, 29.4, 28.6 (CH₂), 60.9, 56.1, 56.0 (x 2) (CH₃).

HR ESMS m/z 561.1248 ($M+Na^+$). Calcd. for $C_{29}H_{31}^{79}BrNaO_5$, 561.1253.

**4. EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DE LOS
DERIVADOS DE
COMBRETASTATINA A-4**

4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A-4

4.1. Ensayos de citotoxicidad

En la figura 4.1 se indican las estructuras de los derivados de combretastatina A-4 cuya síntesis se describe en el capítulo anterior. La capacidad antiproliferativa y citotóxica de estos compuestos se investigó sobre dos líneas tumorales: adenocarcinoma de colon (HT-29) y adenocarcinoma de pecho (MCF7) y una línea celular sana: células embrionarias de riñón (HEK293).

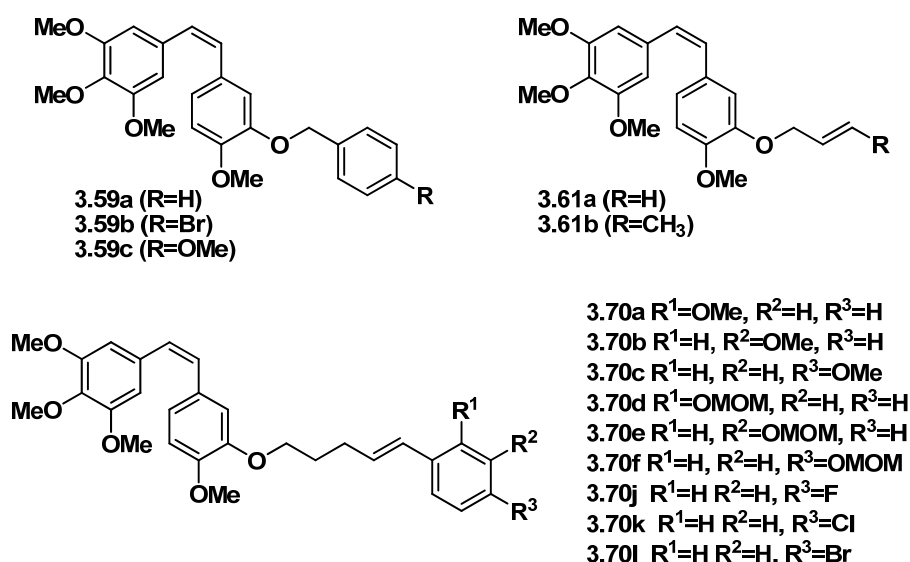
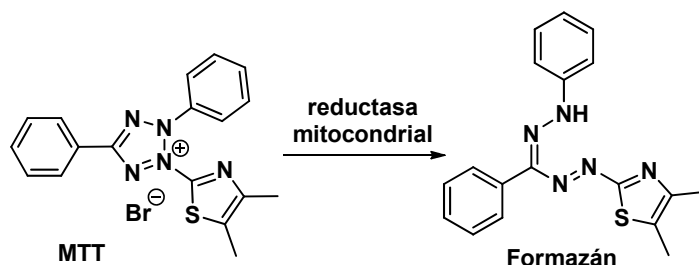


Figura 4.1. Derivados de combretastatina A-4

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT (MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo se basa en la conversión del MTT (incolore) en formazán (azul) mediante reducción metabólica realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. (véase el esquema 4.1). El formazán absorbe radiación entre 450-530 nm por

lo que se puede medir la cantidad de formazán formado mediante un colorímetro o lector de microplacas. Las células muertas no pueden llevar a cabo la reducción del MTT por lo que la cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas.



Esquema 4.1. Metabolización celular del MTT

Los resultados obtenidos se expresan mediante el valor de la concentración de compuesto capaz de inhibir la proliferación del 50% de las células (IC_{50}).

En la tabla 4.1 se muestran los valores de IC_{50} obtenidos para cada compuesto y para cada línea celular. Las citotoxicidades encontradas para todos los análogos diseñados y sintetizados fueron del orden micromolar y siempre ligeramente superiores a las mostradas por la propia combretastatina A-4.

También se puede observar que algunos compuestos, en concreto **3.61b**, **3.70a**, **3.70c**, **3.70d**, **3.70j**, **3.70k** y **3.70l** exhiben valores de IC_{50} mucho más altos en la línea celular embrionaria en comparación con alguna de las dos líneas tumorales. Este hecho se puede apreciar mejor observando los coeficientes α y β , obtenidos al dividir el valor de IC_{50} en células tumorales entre el IC_{50} de las células embrionarias.

Estos coeficientes permiten establecer que el compuesto **3.70d** presenta un mayor margen de seguridad que la propia combretastatina A-4, puesto que es más de diez veces más tóxico para las células tumorales HT-29 que para

las sanas, mejorando en su valor α ($\alpha=0.09$) el valor observado para la combretastatina natural ($\alpha=0.2$).

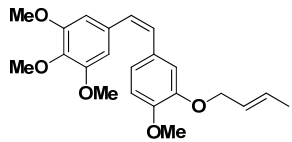
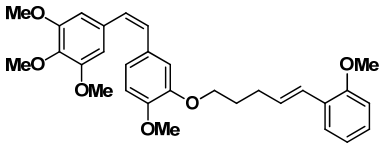
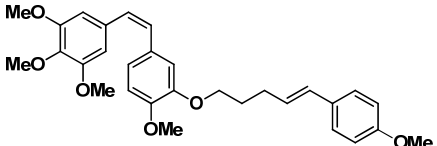
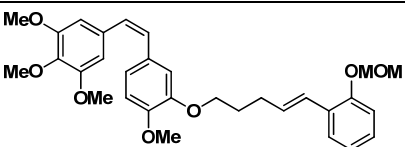
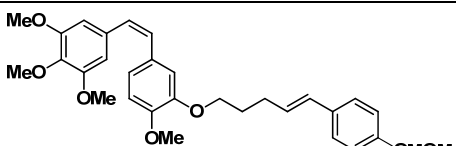
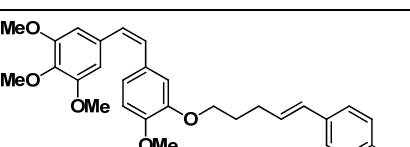
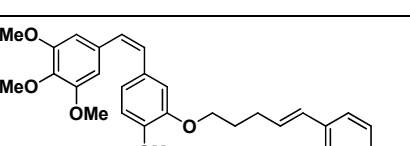
Tabla 4.1. Valores de IC₅₀

Compuesto	IC ₅₀ (μM)			Coeficientes	
	HT-29	MCF7	HEK293	α^a	β^b
CA-4	4.2 \pm 0.5	1.0 \pm 0.2	25 \pm 3	0.2	0.04
3.59a	39 \pm 6	59 \pm 2	15 \pm 3	2.6	3.9
3.59b	108 \pm 1	29 \pm 1	45 \pm 4	2.4	0.64
3.59c	47 \pm 5	48 \pm 1	64 \pm 7	0.7	0.7
3.61a	29 \pm 3	12.0 \pm 0.4	43.5 \pm 0.8	0.7	0.3
3.61b	161 \pm 5	5.4 \pm 0.4	135 \pm 13	1.2	0.04
3.70a	86 \pm 6	21 \pm 2	>400	0.2	0.05
3.70b	25 \pm 3	41 \pm 3	39 \pm 2	0.6	1.0
3.70c	47 \pm 7	16 \pm 3	88 \pm 6	0.5	0.2
3.70d	9.6 \pm 0.2	4.4 \pm 0.8	106 \pm 9	0.09	0.04
3.70e	59 \pm 7	8 \pm 3	30 \pm 2	2.9	0.3
3.70f	7 \pm 0.4	42 \pm 7	25 \pm 4	0.3	1.7
3.70j	98 \pm 8	16 \pm 2	115 \pm 5	0.8	0.1
3.70k	18 \pm 3	40 \pm 5	111 \pm 3	0.2	0.4
3.70l	11 \pm 2	37 \pm 8	55 \pm 5	0.2	0.7

$$^a \alpha = \text{IC}_{50} (\text{HT-29}) / \text{IC}_{50} (\text{HEK293}); \quad ^b \beta = \text{IC}_{50} (\text{MCF7}) / \text{IC}_{50} (\text{HEK293})$$

En la Tabla 4.2 se indican las estructuras de los compuestos con mejores coeficientes α y/o β .

Tabla 4.2. Compuestos con mejores coeficientes α y/o β

Código	Compuesto	α	β
3.61b		1.2	0.04
3.70a		0.2	0.05
3.70c		0.5	0.2
3.70d		0.09	0.04
3.70j		0.8	0.1
3.70k		0.2	0.4
3.70l		0.2	0.7

4.2. Inhibición de la producción de VEGF mediante medición con el test ELISA (*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*)

El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) es un importante regulador de la angiogénesis y de la vasculogénesis. La angiogénesis ocurre normalmente en el ciclo reproductivo femenino y también en procesos patológicos como la retinopatía diabética, la artritis reumatoide, la isquemia tisular, en el crecimiento tumoral y en la metástasis. La vasculogénesis implica la formación de vasos sanguíneos mediante la diferenciación de células endoteliales. La vasculogénesis está restringida a la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario, pero la angiogénesis está operativa durante toda la vida y se activa cuando se requiere nueva vascularización.

El término VEGF engloba a seis isoformas de 121, 145, 165, 183, 189, y 206 aminoácidos, que son el resultado del corte y empalme (*splicing*) alternativo del ARN mensajero proveniente de un único gen de VEGF que contiene 8 exones (véase la figura 4.2).

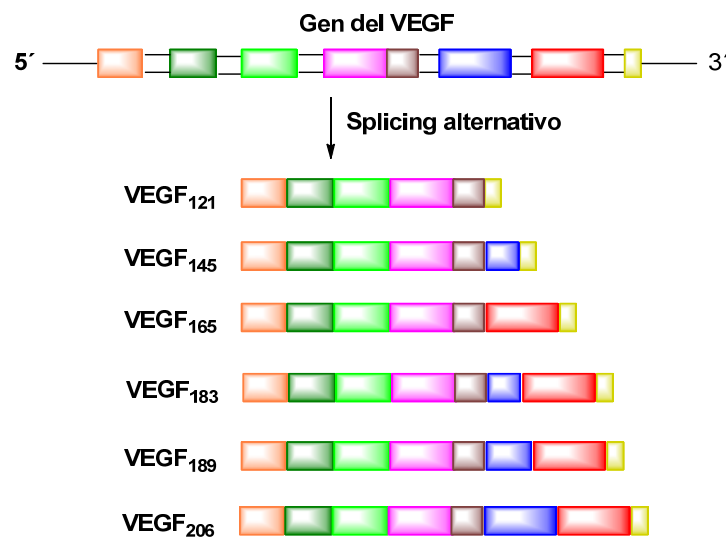


Figura 4.2. Isoformas del VEGF mediante *splicing* alternativo

La isoforma que contiene 165 aminoácidos es la más abundante y es producida por numerosos tipos de células entre las que se encuentran las tumorales.

Los receptores de VEGF son de tipo tirosina-quinasa y están expresados únicamente en las células endoteliales. La unión del VEGF a estos receptores activa la cascada de señalización celular que provoca la activación de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) y la tirosina-fosforilación de la fosfolipasa PLC γ , lo que permite el incremento de los niveles intracelulares de calcio y de inositol 1,4,5-trifosfato. El incremento del calcio activa a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) encargada de la producción de NO. La actividad del NOS es necesaria para que el VEGF pueda estimular la angiogénesis y para que pueda incrementar la permeabilidad vascular.

La capacidad inhibitoria de VEGF de los derivados de combretastatina A-4 se midió sobre células de adenocarcinoma de colon (HT-29).

En primer lugar se procedió a determinar la cantidad de VEGF que las células segregaban al medio de cultivo después de ser tratadas con el correspondiente compuesto durante 3 días, a una concentración inferior a la del IC₅₀ (véase la tabla 4.1). La determinación se llevó a cabo mediante el ensayo ELISA (*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*). En este ensayo se utiliza un anticuerpo policlonal insolubilizado mediante anclaje a un soporte sólido. La interacción con el antígeno forma un conjugado antígeno-anticuerpo inmovilizado. El antígeno es reconocido por un anticuerpo monoclonal secundario que lleva enlazado una enzima, cuya reacción con un sustrato específico produce un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

El test ELISA para la determinación de VEGF se lleva a cabo del siguiente modo:

- 1) Una alícuota del medio de cultivo en que se han incubado las células, tratadas previamente con el correspondiente compuesto, se añade al

anticuerpo policlonal inmovilizado sobre un soporte sólido (paso 1 de la figura 4.3). El anticuerpo reconoce el VEGF humano que pudiera estar presente en el medio de cultivo, formándose un complejo anticuerpo-antígeno que queda inmovilizado en el soporte sólido (véase la figura 4.3).

2) El complejo anticuerpo-antígeno se trata con un anticuerpo monoclonal biotinilado, que se une al VEGF inmovilizado en el soporte sólido (paso 2 de la figura 4.3).

3) Se añade una enzima de tipo peroxidasa conjugada con la estreptavidina (paso 3 de la figura 4.3). La estreptavidina es una proteína, aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii*, que presenta una elevada afinidad por la biotina. Esta elevada afinidad es la que permite anclar la enzima peroxidasa al anticuerpo biotinilado del conjugado formado por los dos anticuerpos y el VEGF.

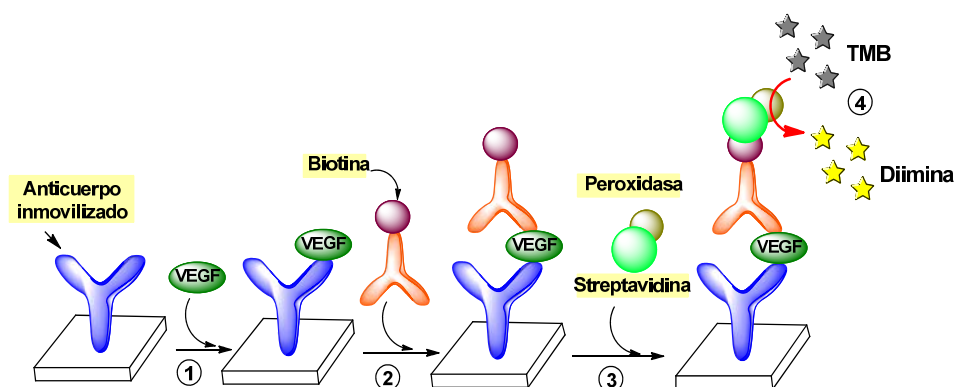
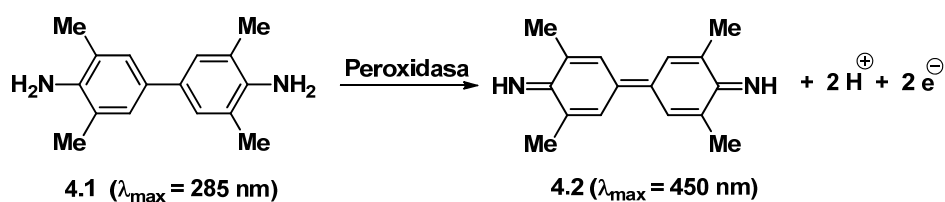


Figura 4.3. Fases del ensayo ELISA

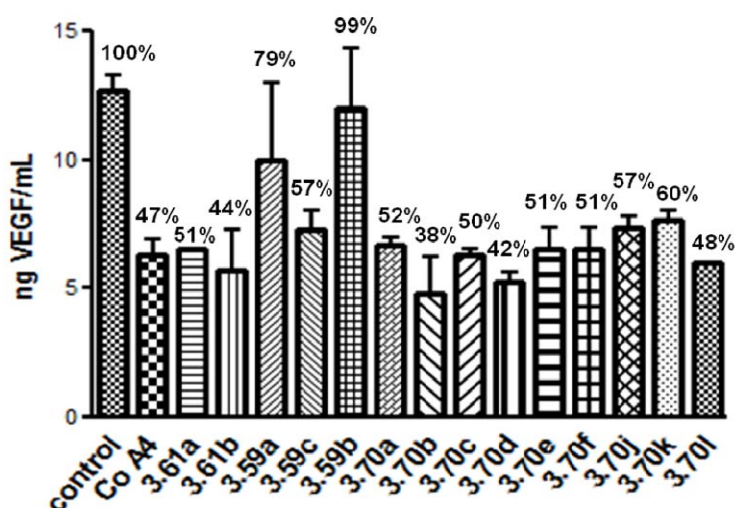
4) Se añade una disolución acuosa de tetrametilbencidina (TMB incolora, compuesto 4.1 del esquema 4.2) que es oxidada por la enzima peroxidasa a la diimina 4.2 (amarilla, paso 4 de la figura 4.3).²⁴⁷ La medida de la absorbancia de la disolución coloreada es directamente proporcional a la concentración del VEGF presente en la muestra.

²⁴⁷ Josephy, P. D.; Elin, T.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3669.



Esquema 4.2. Oxidación de la tetrametilbencidina

En la gráfica 4.1 se representan los valores de VEGF (ng/mL), medidos mediante el test ELISA. Estos valores miden el VEGF secretado por cada 100.000 células tumorales después de ser incubadas durante tres días con los diferentes compuestos. Se consideró como control aquellas células que se incubaron durante tres días en presencia de DMSO.



Gráfica 4.1. Porcentaje de producción de VEGF medido por ELISA

Como se observa en la gráfica 4.1, en todos los casos la producción de VEGF por parte de las células tumorales fue inferior a la del control. En la mayoría de los casos la producción del VEGF descendió más del 50%. Los compuestos con mayor capacidad inhibidora de la producción del VEGF

fueron el **3.70b** (38% de producción de VEGF) y **3.70d** (42% de producción) siendo incluso más activos que la combretastatina A-4.

En la tabla 4.3 se muestra el porcentaje de inhibición de VEGF respecto del control y la concentración de los compuestos que permite tal reducción, cuando las células de la línea HT-29 se trataron con cada uno de los compuestos a una concentración inferior a la del IC₅₀.

Tabla 4.3. Inhibición de VEGF

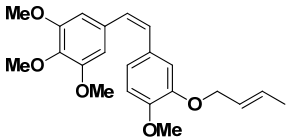
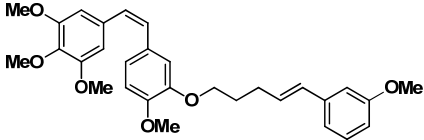
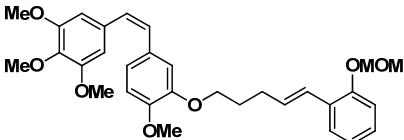
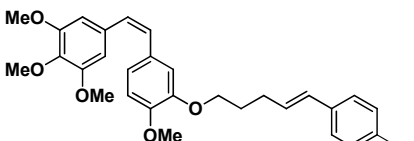
Compuesto	Concentración	% Inhibición ^a
CA-4	5 µg/mL	53
3.59a	15 µg/mL	21
3.59b	50 µg/mL	43
3.59c	15 µg/mL	1
3.61a	50 µg/mL	49
3.61b	50 µg/mL	56
3.70a	40 µg/mL	48
3.70b	15 µg/mL	62
3.70c	10 µg/mL	50
3.70d	15 µg/mL	58
3.70e	25 µg/mL	49
3.70f	25 µg/mL	49
3.70j	40 µg/mL	43
3.70k	15 µg/mL	40
3.70l	50 µg/mL	52

$$^a \% \text{ Inhibición} = \% \text{ Expresión VEGF}_{\text{control}} - \% \text{ Expresión VEGF}_{\text{compuesto}}$$

Los compuestos que provocaron una inhibición de VEGF mayor del 50% fueron el **3.61b**, **3.70b**, **3.70d** y **3.70l** (véase la tabla 4.4). De estos compuestos el que provocó una mayor inhibición de VEGF fue el **3.70b**,

seguido de **3.70d**. Como se ha visto anteriormente, el compuesto **3.70d** era el que mostraba un mejor perfil citotóxico (coeficiente $\alpha=0.09$, coeficiente $\beta=0.04$).

Tabla 4.4. Compuestos con mayor porcentaje de inhibición de VEGF

Código	Compuesto	% inhibición
3.61b		56
3.70b		62
3.70d		58
3.70l		52

4.3. Inhibición de la expresión del gen que codifica VEGF

Para medir la inhibición de la expresión del gen que codifica la proteína VEGF escogimos los compuestos **3.61b**, **3.70b**, **3.70d**, y **3.70l**, que habían demostrado provocar la mayor inhibición de la producción de VEGF. Además, también se escogió para este ensayo el compuesto **3.70e**, que era, después de **3.70d** y **3.61b**, el más citotóxico en la línea celular MCF7 ($IC_{50} = 8 \mu\text{M}$) y el compuesto **3.70f**, que era el más citotóxico en la línea celular HT-29 ($IC_{50} = 7 \mu\text{M}$).

Las células de la línea celular HT-29 se trataron, durante 48 horas, con los compuestos anteriores en las concentraciones indicadas en la tabla 4.3. A continuación se recogieron las células, se extrajo su ARN y éste se retrotranscribió a ADN-complementario. El ADN procedente de cada muestra se amplificó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando como cebadores secuencias comercialmente accesibles para la amplificación del gen que codifica VEGF (véase la parte experimental).

Como referencia se escogió la β -actina por lo que ésta también se amplificó. Los fragmentos de ADN amplificado se purificaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. El gel se trató con bromuro de etidio y se observó bajo radiación ultravioleta. En la figura 4.4 se muestra la fotografía de los geles de agarosa que muestran la amplificación del VEGF y de la actina para cada muestra.

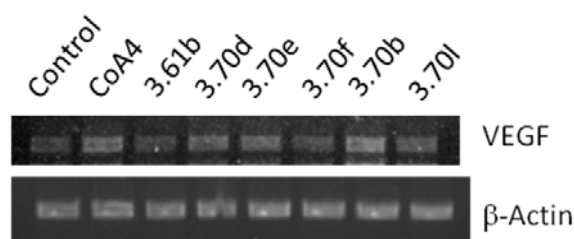
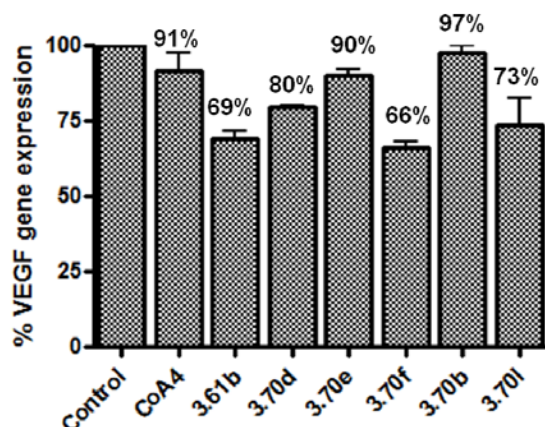


Figura 4.4. Imagen del gel de agarosa de los productos obtenidos en la amplificación RT-PCR

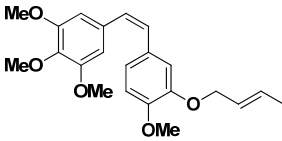
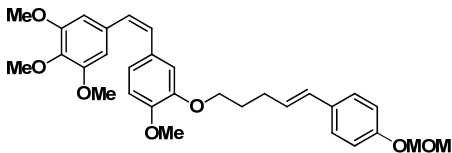
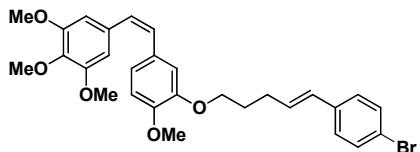
La expresión del gen que codifica el VEGF se cuantificó usando el programa Image J y se normalizó al gen de la actina. En la gráfica 4.2 se muestran los porcentajes de expresión del gen de VEGF respecto del control.



Gráfica 4.2. Porcentaje de la expresión del gen de VEGF

Los compuestos **3.61b**, **3.70f** y **3.70i** fueron los que mostraron un mayor porcentaje de inhibición de la expresión del gen que codifica la proteína VEGF (véase la tabla 4.5).

Tabla 4.5. Compuestos con mayor porcentaje de inhibición del gen de VEGF

Código	Compuesto	% inhibición del gen de VEGF
3.61b		31
3.70f		34
3.70i		27

En la tabla 4.6 se comparan los valores de inhibición de VEGF y de gen de VEGF.

Tabla 4.6. Comparación de Inhibición de VEGF y gen de VEGF

Compuesto	% Inhibición de VEGF	% Inhibición del gen de VEGF
CA-4	53	9
3.61b	56	31
3.70b	62	3
3.70d	58	20
3.70e	49	10
3.70f	49	34
3.70I	52	27

En la tabla 4.6 se puede observar que no hay correlación entre los niveles de inhibición de la expresión del gen VEGF y los niveles de VEGF secretados al medio de cultivo. De hecho, la combretastatina A-4 inhibe la producción de VEGF en un 53%, pero la inhibición del gen que codifica la proteína VEGF es sólo del 9%. Lo mismo ocurre con los compuestos **3.70b** y **3.70e**, los cuales inhiben de forma importante la producción de VEGF (62% y 49% respectivamente), pero inhiben muy débilmente la expresión del gen que codifica VEGF (3% y 10% respectivamente), lo que parece indicar que estos compuestos provocan una disminución en la producción de VEGF interfiriendo en una fase diferente a la transcripcional.

4.4. Actividad inhibidora de la telomerasa

Sobre los derivados de combretastatina más activos como agentes inhibidores de VEGF, compuestos **3.61b**, **3.70b**, **3.70d**, **3.70e**, **3.70f** y **3.70I**, se midió también la inhibición de la telomerasa. Para ello estudiamos la influencia que estos compuestos ejercen sobre la expresión del gen que codifica la parte

proteica de la telomerasa, hTERT y sobre la expresión del gen que codifica el factor de transcripción c-Myc que, a su vez, controla la activación de hTERT.

Los ensayos de expresión de hTERT y c-Myc se realizaron con la línea tumoral HT-29.

Al igual que en el estudio de inhibición del gen del VEGF, las células se trataron, durante 48 horas, con las concentraciones de compuestos indicadas en la tabla 4.3. A continuación, se recogieron las células, se extrajo su ARN y éste se retrotranscribió a ADN-complementario. El ADN procedente de cada muestra se amplificó mediante PCR utilizando como cebadores secuencias comercialmente accesibles para la amplificación de los genes que codifican hTERT y c-Myc (véase la parte experimental).

Como referencia se escogió la β -actina por lo que ésta también se amplificó.

Los fragmentos de ADN amplificado se purificaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. El gel se trató con bromuro de etidio y se observó bajo radiación ultravioleta. En la figura 4.5 se muestra la fotografía de los geles de agarosa que muestran la amplificación, para cada muestra, del hTERT, del c-Myc y de la actina.

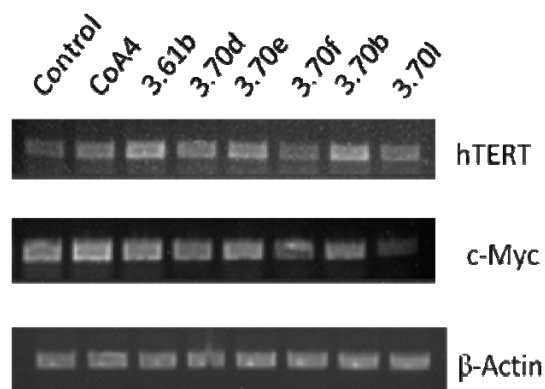
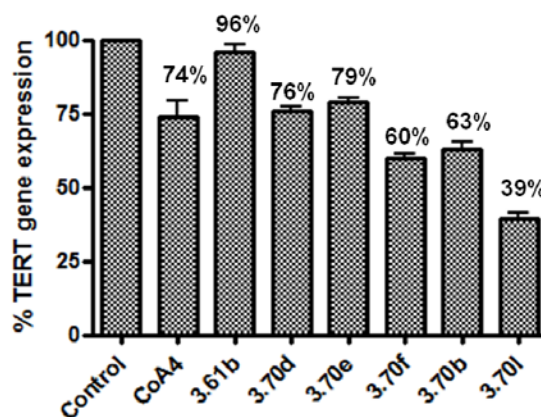
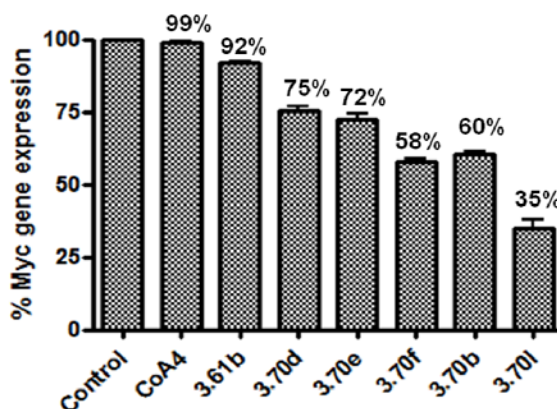


Figura 4.5. Imagen del gel de agarosa de los productos obtenidos en la amplificación RT-PCR

La expresión de cada uno de los genes amplificados se cuantificó usando el programa Image J y se normalizó al gen de la actina. En las gráficas 4.3 y 4.4 se muestran los porcentajes de expresión del gen hTERT y c-Myc, respectivamente, respecto del control.



Gráfica 4.3. Porcentaje de expresión del gen de hTERT



Gráfica 4.4. Porcentaje de expresión del gen de c-Myc

Se puede observar una buena correlación entre los resultados de la expresión de los genes hTERT y c-Myc, al comparar las gráficas 4.3 y 4.4, por

lo que se podría concluir que los compuestos estudiados reducen la expresión del gen hTERT mediante la inhibición de la transcripción del gen c-Myc.

En la tabla 4.7 se comparan los valores de inhibición de VEGF, del gen de VEGF, del gen de hTERT y del gen de c-Myc

Tabla 4.7. Comparación de Inhibición de VEGF, gen de VEGF, gen de h-TERT y gen de c-Myc

Compuesto	% Inhibición de VEGF	% Inhibición del gen de VEGF	% Inhibición del gen de hTERT	% Inhibición del gen de c-Myc
CA-4	53	9	26	1
3.61b	56	31	4	8
3.70b	62	3	37	40
3.70d	58	20	24	25
3.70e	49	10	21	28
3.70f	49	34	40	42
3.70I	52	27	61	65

Como se observa en la tabla anterior, el compuesto más activo es el **3.70I**, que disminuye un 61% la expresión del gen que codifica la proteína de la telomerasa. Además la expresión del factor de transcripción c-Myc también se ve disminuída en un 65%. Aunque el compuesto **3.70I** no es el que provoca la mayor inhibición de VEGF ni de su gen asociado, es el compuesto que conjuga altos valores en los cuatro parámetros indicados en la tabla 4.7.

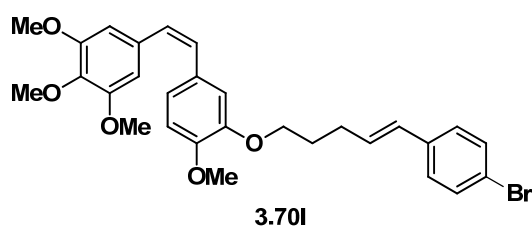


Figura 4.6. Compuesto con altos valores de inhibición de VEGF, gen de VEGF, gen de hTERT y gen de c-Myc

4.5. Conclusiones

a) Las actividades citotóxicas de los O-alkil derivados de combretastatina A-4 están en el rango micromolar. El compuesto **3.70d** es el que presenta un mayor margen de seguridad, ya que es mucho más tóxico para las células tumorales que para las células embrionarias sanas ($\alpha=0.09$, $\beta=0.04$).

b) Los compuestos **3.70b** (62% de inhibición) y **3.70d** (58% de inhibición) son los que provocan una mayor inhibición en la producción de VEGF (test ELISA).

c) La disminución en la producción de VEGF no se correlaciona con la inhibición de la transcripción del gen de VEGF (**3.70b** 3% de inhibición, **3.70d** 20% de inhibición), por lo que probablemente estos compuestos interfieran la producción de VEGF en una fase diferente de la transcripcional.

d) El compuesto **3.70I** es el más activo en cuanto a inhibición del gen hTERT (61% de inhibición) y del gen c-Myc (65% de inhibición) y es el que conjuga altos valores en los cuatro parámetros estudiados.

4.6. Parte experimental

4.6.1. Cultivos celulares

Las células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, de adenocarcinoma de pecho MCF7 y las células embrionarias de riñón humano HEK293 se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FBS, 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina tal como se describe en la bibliografía.²⁴⁸

Todos los compuestos sintetizados se disolvieron en DMSO hasta una concentración de 10 mg/mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.6.2. Ensayos de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad se realizó con células HT-29, MCF7 y HEK293 mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).²⁴⁹ Se sembraron 5×10^3 células por pocillo (HT-29, o MCF7, o HEK293) en placas de 96 pocillos con un volumen de 80 μL de medio de cultivo y se dejaron incubando durante 24 h. Después de este periodo se añadió a cada pocillo 20 μL de cada una de las diluciones de los distintos compuestos a ensayar y se dejaron incubar durante 3 días (37°C , 5% CO_2 en una atmósfera húmeda).

Posteriormente, se añadió a cada pocillo 10 μl de MTT (5 mg/ml en PBS) y se incubaron durante 3 h a 37°C . A continuación se eliminó el medio de cultivo, el formazán formado se disolvió en 100 μL de DMSO y se midió la absorbancia a 492 nm. Todas las medidas se efectuaron al menos por triplicado.

²⁴⁸ Buey, R. M.; Calvo, E.; Barasoain, I.; Pineda, O.; Edler, M. C.; Matesanz, R.; Cerezo, G.; Vanderwal, C. D.; Day, B. W.; Sorensen, E. J.; López, J. A.; Andreu, J. M.; Hamel, E.; Díaz, J. F. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 117.

²⁴⁹ Yang, C.; Barasoain, I.; Li, X.; Matesanz, R.; Liu, R.; Sharom, F. J.; Yin, D. L.; Díaz, J. F.; Fang, W. S. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 691.

4.6.3. Ensayo *ELISA* para la determinación de la producción de VEGF

La medida de la producción de la proteína VEGF se efectuó sobre células HT-29. Para ello, se sembraron unas 100.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar 24 h con 1.5 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se añadió a cada uno de los pocillos cada uno de los compuestos a ensayar en la concentración que se detalla en la tabla 4.3. A la muestra correspondiente al control se le añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos. Las células se incubaron durante 72 h en presencia de los compuestos. A continuación, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y éstos se emplearon para medir el VEGF secretado por las células HT-29 siguiendo las instrucciones del kit *ELISA* de detección de VEGF humano de Invitrogen.

4.6.4. Determinación de la inhibición de la expresión génica de VEGF, hTERT y c-Myc

Para la determinación de la expresión del gen que codifica VEGF, del gen que codifica hTERT y gen que codifica c-Myc, se sembraron unas 100.000 células HT-29 por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar 24 h con 1.5 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se añadió a cada uno de los pocillos cada uno de los compuestos a ensayar en la concentración que se detalla en la tabla 4.3. A la muestra que correspondía al control se le añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos. Las células se incubaron durante 48 h en presencia de los compuestos. A continuación, las células se recogieron y el ARN se aisló usando el kit de extracción de Ambion. Luego se sintetizó el ADN complementario mediante el empleo de la retrotranscriptasa MMLV, 1-21 μg del ARN extraído y oligo(dT)15 siguiendo el manual de instrucciones.

En la tabla 4.8 se muestran los cebadores para la reacción de polimerización en cadena (PCR) específicos para cada gen. Además, de los

genes que codifican VEGF, hTERT y c-Myc, se amplificó también el gen que codifica la β -actina como sistema de control para monitorizar la integridad del ARN y la eficacia en la carga de las muestras.

Los productos obtenidos en la PCR se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % y se revelaron con bromuro de etidio bajo transiluminación ultravioleta. Las condiciones que se emplearon en la PCR fueron las siguientes:

VEGF: 94°C durante 30 s, 58°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min 50 s 30 ciclos

hTERT: 94°C durante 1 min, 57°C durante 1 min y 72°C durante 1 min 30 s 30 ciclos

c-Myc: 94°C durante 30 s, 58°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min 50 s 30 ciclos

β -actina: 94°C durante 30 s, 58°C durante 50 s y 72°C durante 50 s 30 ciclos

Tabla 4.8. Cebadores usados y tamaño de los productos de la PCR
(número de pares de bases)

VEGF	directo: 5'-CCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3' inverso: 5'-ACCGCCTCGGCTTGTCAC-3'	379
hTERT	directo: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' inverso: 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'	145
c-Myc	directo: 5'-AAGTCCTGCGCCTCGCAA-3' inverso: 5'-GCTGTGGCCTCCAGCAGA-3'	249
β -actina	directo: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATC CGT-3' inverso: 5'-CGTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG-3	287

5. SÍNTESIS DE HÍBRIDOS DE CA-4/ANÁLOGOS DE PIRONETINA

5. SÍNTESIS DE HIBRIDOS DE CA-4/ANÁLOGOS DE PIRONETINA

5.1. Introducción

La pironetina es un compuesto con actividad antiangiogénica que también inhibe la polimerización de la tubulina deteniendo el proceso de división mitótico.²⁵⁰ La pironetina interacciona con la α -tubulina uniéndose covalentemente al residuo Lis352 del segmento de α -tubulina (figura 5.1). Este aminoácido se encuentra situado en la entrada de un pequeño hueco que contiene la α -tubulina, que se encuentra ubicado frente al segmento de β -tubulina del dímero siguiente.¹¹³

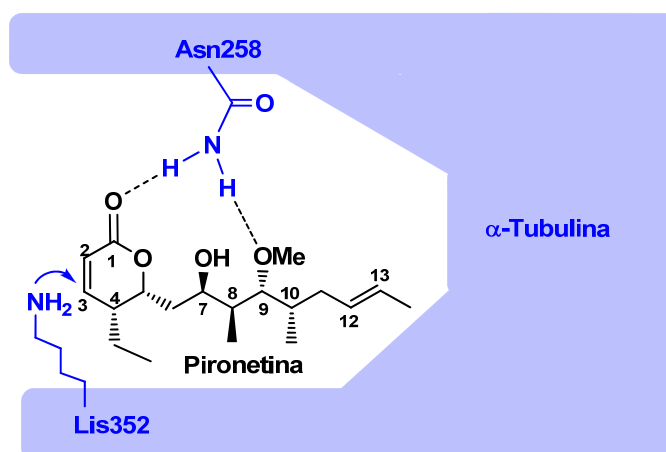


Figura 5.1. Modelo esquemático propuesto de las posibles interacciones en el centro de unión entre pironetina y α -tubulina

La mayoría de los compuestos antimitóticos que deben su capacidad de acción a su unión a la tubulina lo hacen mediante unión a la β -tubulina. El

²⁵⁰ Vogt, A.; Mc. Pherson, P.A.; Shen, X.; Balachandran, R.; Zhu, G.; Raccor, B.S.; Nelson, S.G.; Tsang, M.; Day, B.W. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 358.

desarrollo de nuevos compuestos capaces de interactuar con la α -tubulina puede resultar de extraordinaria utilidad al suponer la apertura de una nueva diana biológica que, hasta la fecha, aún no ha sido empleada terapéuticamente.

La estructura del producto natural pironetina no es extremadamente compleja pero, con sus seis carbonos estereogénicos, cualquier síntesis debe requerir necesariamente de un apreciable número de pasos, lo cual hace que su síntesis sea poco práctica incluso a una escala mediana. Por dicho motivo, en nuestro grupo de investigación se ha iniciado una línea de investigación dirigida a la síntesis de análogos simplificados de la estructura natural, a fin de evaluar los elementos realmente esenciales para la actividad biológica de la pironetina. Los primeros análogos sintetizados fueron los indicados en la figura 5.2.

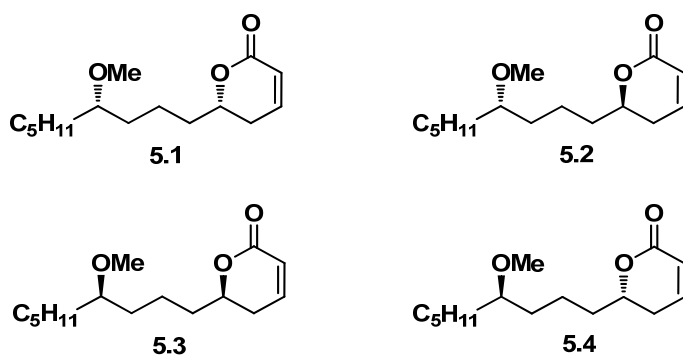


Figura 5.2. Análogos de pironetina simplificados con dos estereocentros

Después de esta primera generación de análogos se sintetizaron las estructuras dibujadas en la figura 5.3, que se caracterizan por contener todas ellas tres centros estereogénicos.

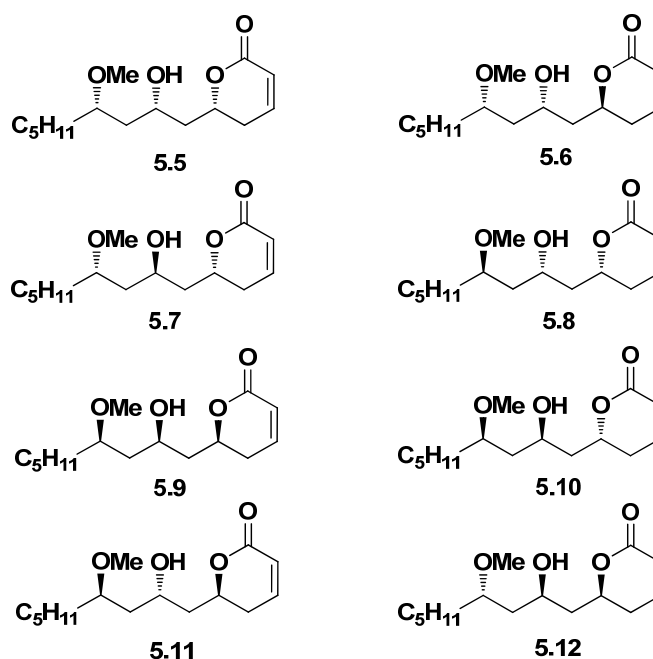


Figura 5.3. Análogos de pironetina simplificados con tres estereocentros

Una vez sintetizados estos compuestos, se llevó a cabo una evaluación completa de sus perfiles biológicos. Dichas investigaciones biológicas incluían la determinación del grado de citotoxicidad de los mismos, el efecto sobre el ciclo celular y la determinación de su interacción con α -tubulina.

En términos generales, el resultado observado fue que estos compuestos mostraban citotoxicidades en el rango micromolar, es decir, unos tres órdenes de magnitud menos activos que el producto natural, cosa nada sorprendente dada la importante simplificación estructural llevada a cabo. Un rasgo característico de todos los análogos simplificados es que, no solamente provocaban disrupción de los microtúbulos, al igual que la pironetina, sino que también competían con el producto natural por el mismo sitio de unión en la α -tubulina, lo cual indicaba que la simplificación estructural no cambiaba el

mecanismo de acción.²⁵¹ Probablemente, el papel de los tres restos alquilo suprimidos en la simplificación consiste en mantener más tiempo la molécula en una situación conformacionalmente apropiada para la interacción con la α -tubulina.

Después de esta primera generación de análogos de pironetina se sintetizaron también los análogos con lipofilia aumentada **5.13-5.16**. Estos compuestos tienen el mismo patrón estereoquímico que el que presenta la estructura **5.11** que es, además, coincidente con el de la pironetina. Difieren entre sí en la parte final de la cadena lateral, excepto **5.13** y **5.16**, que se diferencian por la presencia en C7 de un grupo hidroxilo en aquél y de un grupo metoxilo en éste (figura 4.4).

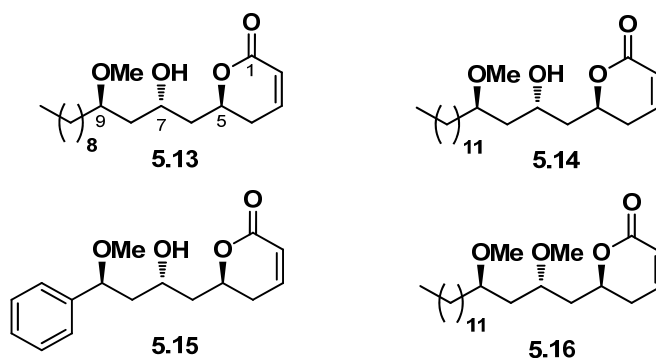


Figura 5.4. Análogos de pironetina simplificados con mayor lipofilia

La sustitución de la cadena lateral del producto natural por un anillo bencénico (compuesto **5.15**), o la introducción de cadenas alquílicas más alargadas (compuestos **5.13**, **5.14** y **5.16**), no influyó excesivamente en la actividad citotóxica de estos compuestos, ni en su capacidad para inhibir el ensamblaje de los microtúbulos tanto *in vitro* como en cultivos celulares, compartiendo de esta forma el mecanismo general tanto de la pironetina como

²⁵¹ Marco, J. A.; García-Pla, J.; Carda, M.; Murga, J.; Falomir, E.; Trigili, C.; Notararigo, S.; Díaz, J. F.; Barasoain, I. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1630.

del resto de análogos simplificados. Sin embargo, los compuestos **5.13**, **5.14** y **5.16**, con cadenas alquílicas más alargadas, difieren del resto de análogos y de la propia pironetina en que no acumulan células en la fase G2/M del ciclo celular. Esto indica que la actividad citotóxica que conduce a la muerte celular, cuando se emplean estos tres compuestos, podría deberse a un mecanismo alternativo al de la pironetina y al del resto de análogos.²⁵²

En cualquier caso, estos resultados referentes al mecanismo de unión a la tubulina de los análogos de pironetina resultan animadores y han estimulado a continuar el desarrollo de nuevos análogos de pironetina con actividad mejorada.²⁵³

5.2. Estructuras objetivo

La combretastatina A-4 ejerce su acción antimitótica mediante unión a β -tubulina mientras que la actividad antimitótica de la pironetina se debe a su unión a α -tubulina. Por esta razón se diseñó una familia de híbridos formados por CA-4 con análogos estructurales de pironetina. El diseño de esta clase de híbridos se basa en su potencial capacidad de unión simultánea a α -tubulina (parte de pironetina) y a β -tubulina (parte de combretastatina A-4). En la figura 5.5 se indica la estructura general de esta clase de moléculas híbridas.

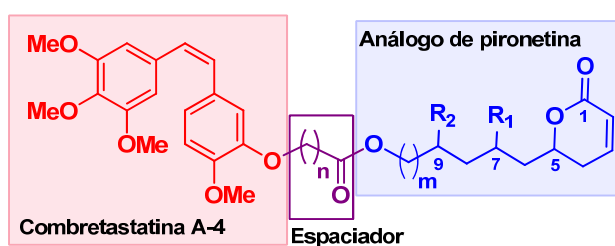


Figura 5.5. Estructura general de híbridos de CA-4/análogos de pironetina

²⁵² Carda, M.; Murga, J.; Díaz-Oltra, S.; García-Pla, J.; Paños, J.; Falomir, E.; Trigili, C.; Díaz, J. F.; Barasoain, I.; Marco, J. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1116.

²⁵³ Paños, J. Resultados no publicados.

La unión entre el fragmento de CA-4 y el análogo de pironetina se lleva a cabo mediante un espaciador de tipo éster. Esta familia de híbridos de CA-4 con análogos de pironetina se dividió en dos subfamilias, la primera de las cuales se indica en la figura 5.6.

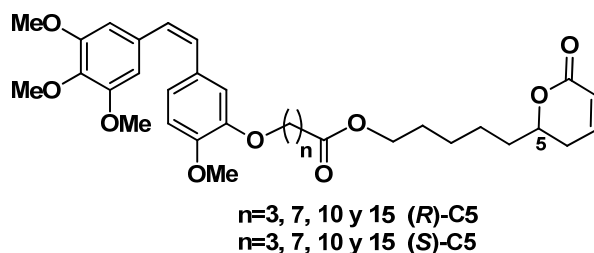


Figura 5.6. Estructuras de híbridos de CA-4/análogos de pironetina con 1 estereocentro

Las estructuras de esta primera subfamilia de compuestos contienen un fragmento de tipo 6-(5-hidroxipentil)-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona con un único estereocentro. La presencia del anillo de dihidropiranona es vital para que el compuesto pueda actuar como aceptor de tipo Michael frente a los restos nucleofílicos de los residuos de los aminoácidos de la tubulina.

El fragmento de CA-4 y el de análogo de pironetina se unen mediante un espaciador éster con cuatro longitudes diferentes, a fin de estudiar el papel que ejerce la diferente longitud de los espaciadores en la capacidad de interacción de estos híbridos con la tubulina.

La segunda subfamilia está compuesta por híbridos de CA-4 con análogos simplificados de pironetina que contienen tres centros estereogénicos con la misma configuración que los de la pironetina. La unión de los fragmentos también se lleva a cabo mediante espaciadores de tipo éster con cuatro longitudes diferentes (véase la figura 5.7).

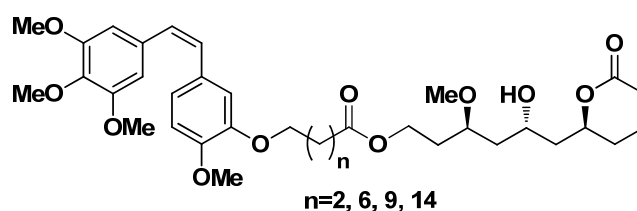


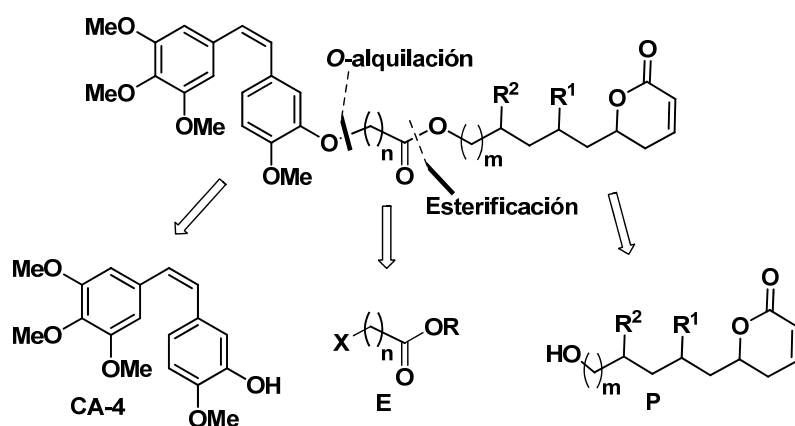
Figura 5.7. Estructuras de la híbridos de CA-4/análogos de pironetina con tres estereocentros

Estas estructuras híbridas se han diseñado con la intención de conseguir la interacción simultánea del híbrido con los sitios de unión de la CA-4 (β -tubulina) y de la pironetina (α -tubulina).

5.3. Síntesis de híbridos de CA-4/análogos de pironetina

La preparación de los híbridos de CA-4/análogos de pironetina se abordó mediante el concepto retrosintético general que se muestra en el esquema 5.1, en el cual la molécula objetivo se desconecta en tres fragmentos: la propia combretastatina A-4, el espaciador **E**, que será un éster funcionalizado (X= grupo saliente) y el análogo de pironetina **P**.²⁵⁴

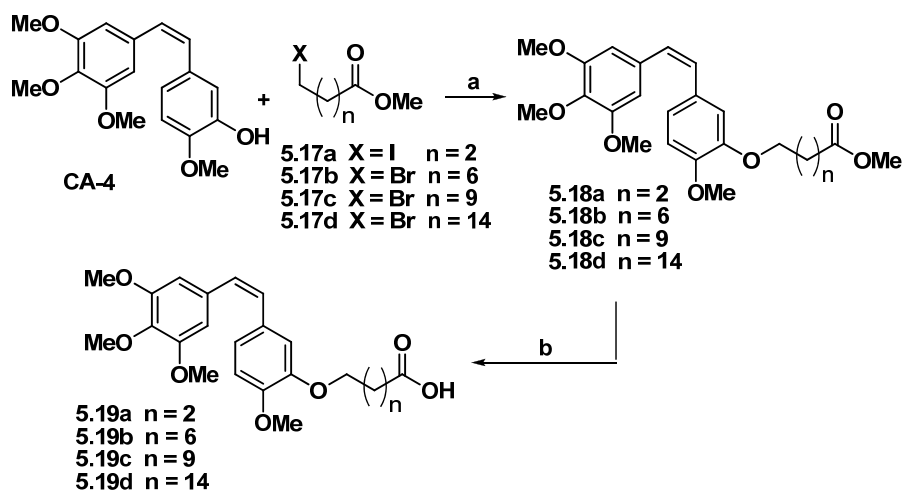
²⁵⁴ Para la síntesis de otros híbridos de combretastatina A-4 véase: (a) Andres, C. J.; Bernardo, J. E.; Yan, Q.; Hastie, S. B.; Macdonald, T. L. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 565. (b) Coggiola, B.; Pagliai, F.; Allegrone, G.; Genazzani A. A.; Tron, G. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3551. (c) Nam, N. H.; Byung-Zun, A. *Med. Chem.* **2007**, *3*, 373. (d) Shen, L.; Yang, X.; Yang, B.; He, Q.; Hu, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 11. (e) Rasolofoniatovo, E.; Provot, O.; Hamze, A.; Bignon, J.; Thoret, S.; Brion, J. D.; Alami, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3617. (f) Zhang, M.; Guo, R.; Wang, Y.; Cao, X.; Shen, M.; Shi, X. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 2337. (g) González, M. A.; Pérez-Guaita, D.; Agudelo-Gómez, L. S.; Tangarife-Castaño, V.; Zapata, B.; Betancur-Galvis, L. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 1051.



Esquema 5.1. Retrosíntesis general de los híbridos CA-4/análogos de pironetina

5.3.1. Síntesis de híbridos de CA-4/análogos de pironetina con 1 estereocentro

Para la síntesis de estos híbridos se prepararon en primer lugar los ácidos **5.19** (véase el esquema 5.2).

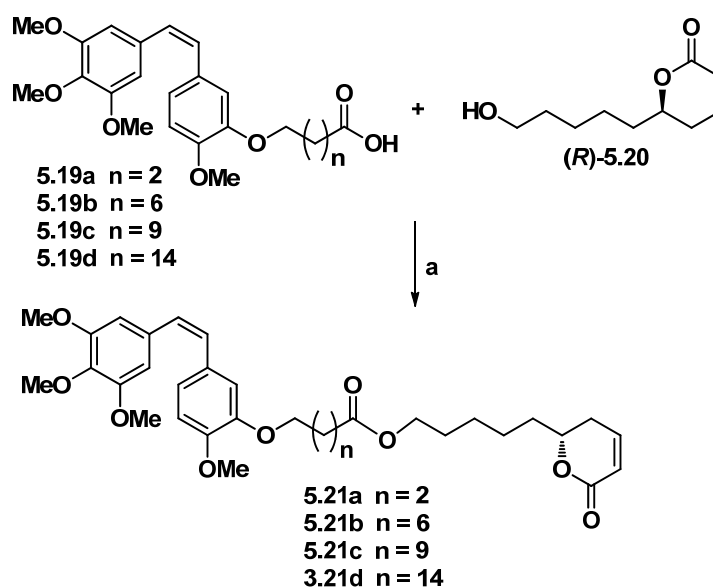


Esquema 5.2

Reactivos y condiciones: (a) DMF, K_2CO_3 , temp. amb., 24-48 h (**5.18a**, 92%; **5.18b**, 99%; **5.18c**, 99%; **5.18d**, 92%). (b) NaOH, MeOH, temp. amb., 18 h. (**5.19a**, 90%; **5.19b**, 71%; **5.19c**, 73%; **5.19d**, 75%).

La combretastatina A-4 se alquiló en el hidroxilo fenólico mediante reacción con los halogenoésteres **5.17** indicados en el esquema 5.2. Los correspondientes ésteres, con estructuras **5.18**, se convirtieron en los ácidos **5.19** mediante saponificación.

Los ácidos **5.19** se esterificaron con (*R*)-6-(5-hidroxipentil)-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona²⁵⁵ mediante aplicación del método de Yamaguchi,²⁵⁶ lo que permitió la obtención de los híbridos **5.21** indicados en el esquema 5.3.



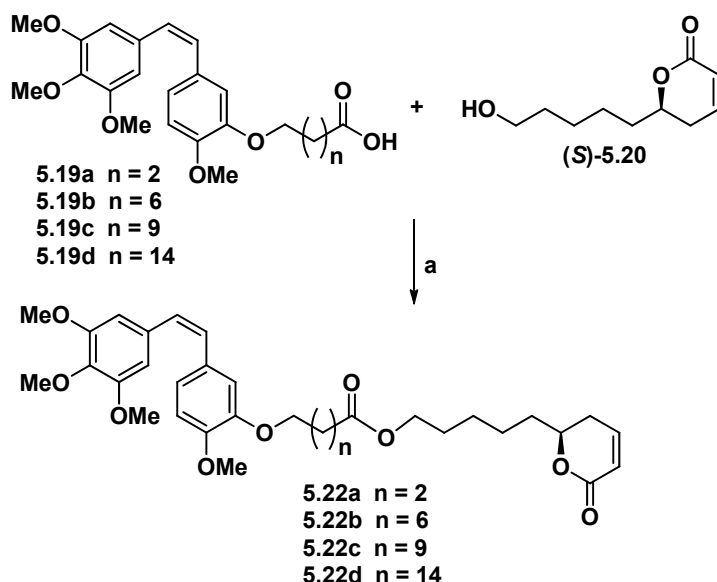
Esquema 5.3

Reactivos y condiciones: (a) Cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo, Et₃N, THF, temp. amb., 3 h, luego adición de (*R*)-**5.20**, DMAP, temp. amb., 2 h. (**5.21a**, 34%; **5.21b**, 47%; **5.21c**, 37%; **5.21d**, 25%).

²⁵⁵ Las lactonas (*R*)-**5.20** y (*S*)-**5.20** han sido preparadas en el contexto de otra tesis doctoral de nuestro grupo actualmente en fase de finalización: C. Vilanova, resultados no publicados.

²⁵⁶ Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; M. Yamaguchi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989. Para una modificación del método de esterificación de Yamaguchi véase: Dhimitruka, I.; Santa Lucia, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 47.

La esterificación de los ácidos **5.19** con (S)-6-(5-hidroxipentil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona también se llevó a cabo mediante el método de Yamaguchi y proporcionó los compuestos **5.22** indicados en el esquema 5.4.



Esquema 5.4

Reactivos y condiciones: (a) Cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo, Et₃N, THF, temp. amb., 3 h, luego adición de (S)-**5.20**, DMAP, temp. amb., 2 h. (**5.22a**, 42%; **5.22b**, 55%; **5.22c**, 37%; **5.22d**, 49%).

5.3.2. Síntesis de híbridos de CA-4/análogos de pironetina con 3 estereocentros

Los siguientes híbridos que sintetizamos fueron obtenidos mediante esterificación de los ácidos **5.19** con la dihidropiranona **5.23**.²⁵⁷ Este compuesto contiene tres centros estereogénicos oxigenados con la misma

²⁵⁷ La dihidropiranona **5.23** han sido preparada en el contexto de otra tesis doctoral de nuestro grupo actualmente en fase de finalización: C. Vilanova, resultados no publicados.

configuración que los que presenta la pironetina en C5, C7 y C9 (véase la figura 5.8).

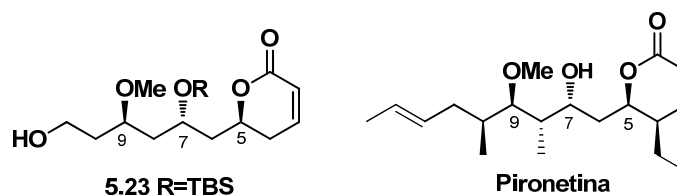
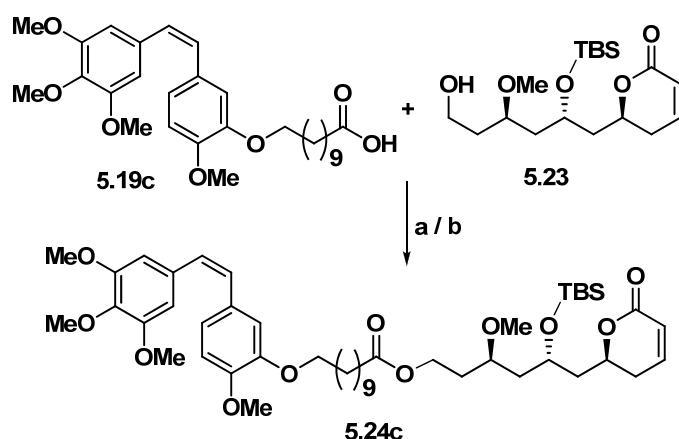


Figura 5.8. Estructuras de **5.23** y de la pironetina

La unión de la pironetina **5.23** a los ácidos **5.19** se ensayó en primer lugar mediante el método de acoplamiento que utiliza diciclohexilcarbodiimida (DCC).²⁵⁸ Decidimos probar este método en un intento por mejorar los rendimientos obtenidos en las esterificaciones de los ácidos **5.19** con (**R**)-**5.20** y (**S**)-**5.20** con el método de Yamaguchi. La reacción de esterificación se probó con el ácido **5.19c**, del cual disponíamos de mayor cantidad. La reacción se llevó a cabo tratando una mezcla del ácido **5.19c** y de la **5.23** en diclorometano en presencia de DCC y DMAP a temperatura ambiente. Sin embargo, los rendimientos de la esterificación eran inferiores al 35% y la *N,N'*-diciclohexilurea, subproducto del proceso de acoplamiento, era difícil de separar del producto de reacción mediante cromatografía de columna (véase el esquema 5.5).

²⁵⁸ (a) Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522. (b) Hassner, A; Alexanian, V. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4475.



Esquema 5.5

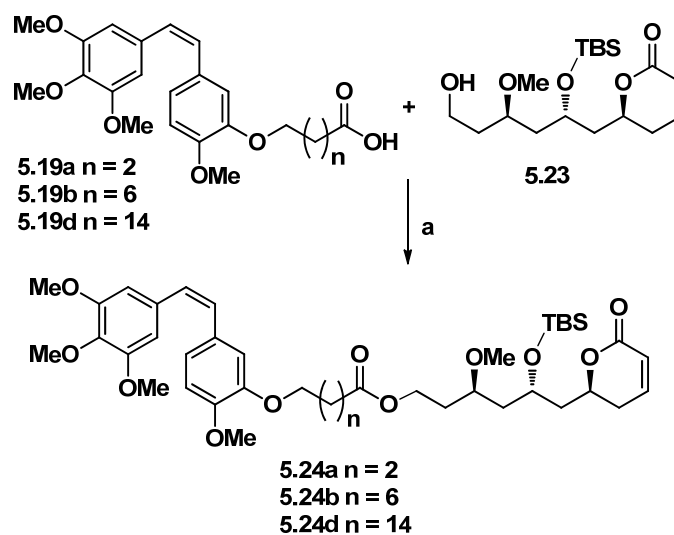
Reactivos y condiciones: (a) DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , temp. amb. 18h (35%). (b) EDCI, DMAP, CH_2Cl_2 , temp. amb. 18h (44%).

Una variante del método anterior emplea *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDCI) en lugar de DCC. En este caso, la urea resultante del producto de acoplamiento es soluble en agua, lo que permite su fácil separación del producto de esterificación mediante extracción con agua.²⁵⁹ Sin embargo, la formación del éster **5.24c** no fue satisfactoria cuando se empleó EDCI y DMAP, debido a que parte del ácido **5.19c** no reaccionó y su separación por cromatografía fue difícil debido a su co-elución con el éster **5.24c**. La única forma de separar el ácido **5.19c** fue mediante columna cromatográfica utilizando alúmina básica como fase estacionaria (véase el esquema 5.5).

Las dificultades experimentadas en la esterificación en presencia de DDC/DMAP y EDCI/DMAP nos llevaron a preparar el resto de los ésteres mediante el método de Yamaguchi. Aunque los rendimientos que se

²⁵⁹ (a) Sheehan, J.; Cruickshank, P.; Boshart, G. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525. (b) Dhaon, M. K.; Olsen, R. K.; Ramasamy, K. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 1962.

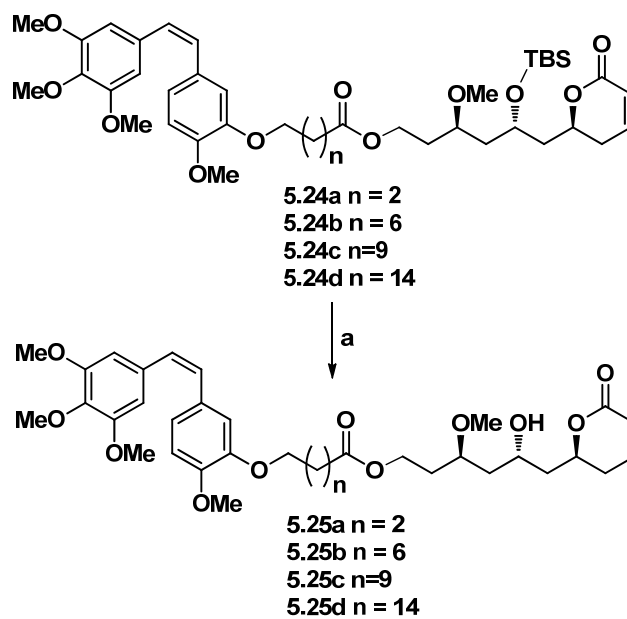
obtuvieron no eran mejores que con los métodos anteriores, la purificación de los productos resultó mucho más sencilla.



Esquema 5.6

Reactivos y condiciones: (a) THF, cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo, Et_3N , temp. amb., 3 h, luego adición de **5.23**, DMAP, temp. amb., 2 h. (**5.24a**, 25%; **5.24b**, 40%; **5.24d**, 21%).

Los ésteres **5.24** se convirtieron en los híbridos **5.25** mediante desililación con PPTS en metanol. La desprotección se llevó a cabo mediante calentamiento a reflujo de MeOH, lo que condujo a los híbridos finales **5.25a-d** con buenos rendimientos. Sin embargo, era inevitable en estas desprotecciones la isomerización parcial del doble enlace de la combretastatina, formándose mezclas de isómeros *Z/E* en proporciones variables (véase el esquema 5.7).



Esquema 5.7

Reactivos y condiciones: (a) MeOH, PPTS, H₂O, reflujo, 18 h. (**5.25a**, 85%, Z/E 87:13; **5.25b**, 95%, Z/E 90:10; **5.25c**, 80%, Z/E 80:20; **5.25d**, 85%, Z/E 93:7).

Cuando se empleó HF acuoso al 48% se observó, tras una hora de reacción a temperatura ambiente, la isomerización completa del doble enlace de la combretastatina A-4.

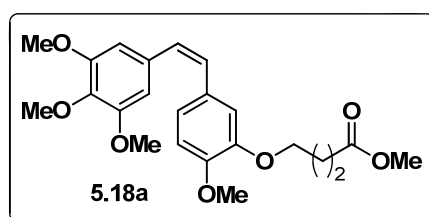
5.4. Parte experimental

5.4.1. Técnicas generales

Véase la sección 3.5.1.

5.4.2. Procedimientos experimentales

Síntesis del compuesto 5.18a



Una disolución de **CA-4** (200 mg, 0.63 mmol) en DMF (15 mL) se trató en atmósfera inerte con K_2CO_3 (174.14 mg, 1.26 mmol, 2.0 eq.) y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se le adicionó el 4-yodo-butanoato de metilo (0.128 mL, 0.95 mmol, 1.5 eq.) y se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 24 h protegiendo la mezcla de reacción de la luz. A continuación, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH_4Cl y se extrajo con Et_2O (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó en el rotavapor. El residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 241 mg (92%) del éster **5.18a** como una mezcla de isómeros *Z/E* 96:4

Aceite incoloro.

IR ν_{max} 1737 (C=O) cm^{-1}

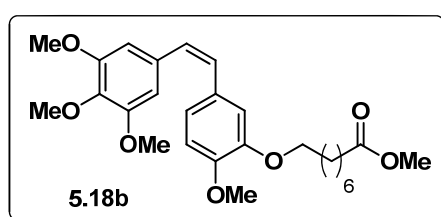
RMN 1H (500 MHz): δ = 6.84 (1H, dd, J = 8.3, 1.8 Hz), 6.81 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.75 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.50 (2H, s), 6.47 (1H, d, J = 12 Hz), 6.42 (1H, d,

$J = 12$ Hz), 3.84 (2H, t, $J = 6.2$ Hz), 3.82 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.68 (6H, s), 3.65 (3H, s), 2.46 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.03 (2H, br quint, $J \sim 6.7$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 173.4, 152.8$ (x 2), 148.7, 147.7, 137.1, 132.8, 129.8 (C), 129.6, 128.8, 122.1, 113.9, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 67.7, 30.4, 24.4 (CH₂), 60.7, 55.9 (x 3), 51.4 (CH₃).

HR ESMS m/z 439.1733 (M+Na⁺). Calcd. para C₂₃H₂₈NaO₇, 439.1728.

Síntesis del compuesto 5.18b



Una disolución mezcla de **CA-4** (200 mg, 0.63 mmol) en DMF (15 mL) se trató en atmósfera inerte con K₂CO₃ (174.14 mg, 1.26 mmol, 2.0 eq.) y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se le adicionó sobre esta mezcla el 8-bromo-octanoato de metilo (570 mg, 2.40 mmol, 3.8 eq.) y se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 48 h y protegido de la luz. A continuación, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con Et₂O (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 267 mg (99%) del éster **5.18b** como único isómero.

Aceite incoloro.

IR ν_{max} 1737 (C=O) cm⁻¹

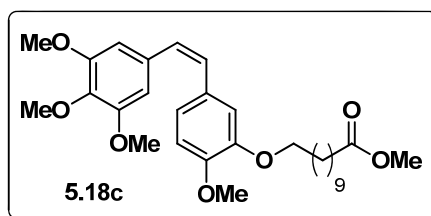
RMN ^1H (500 MHz): $\delta = 6.83$ (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.51 (2H, s), 6.48 (1H, d, $J = 12$ Hz), 6.42 (1H, d,

$J = 12$ Hz), 3.82 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.78 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.69 (6H, s), 3.65 (3H, s), 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.70 (2H, br quint, $J \sim 7$ Hz), 1.62 (2H, m), 1.40-1.30 (6H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 174.1, 152.8$ (x 2), 148.7, 148.0, 137.1, 132.9, 129.8 (C), 129.6, 128.7, 121.8, 113.5, 111.3, 106.0 (x 2) (CH), 68.7, 34.0, 29.0 (x 2), 28.9, 25.7, 24.8 (CH_2), 60.7, 55.9 (x 3), 51.3 (CH_3).

HR ESMS m/z 495.2359 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{NaO}_7$, 495.2360.

Síntesis del compuesto 5.18c



La **CA-4** (200 mg, 0.63 mmol), K_2CO_3 (174.14 mg, 1.26 mmol, 2.0 eq) y el 11-bromo-undecanoato de metilo (670 mg, 2.4 mmol, 3.8 eq.) se sometió a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la eterificación de **5.18b**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 320 mg (99%) del éster **5.18c** como único isómero.

Sólido, p.f: 38 - 40°C

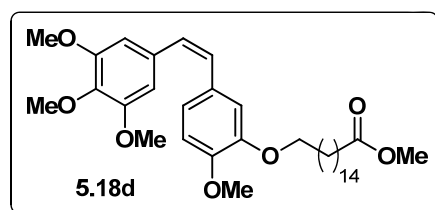
IR ν_{max} 1737 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): $\delta = 6.85$ -6.80 (2H, m), 6.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.51 (2H, s), 6.48 (1H, d, $J = 12$ Hz), 6.42 (1H, d, $J = 12$ Hz), 3.82 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.78 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.69 (6H, s), 3.65 (3H, s), 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.71 (2H, br quint, $J \sim 7$ Hz), 1.60 (2H, m), 1.40-1.25 (12H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 174.1, 152.8$ (x 2), 148.7, 148.0, 137.1, 132.9, 129.8 (C), 129.7, 128.6, 121.8, 113.5, 111.3, 106.0 (x 2) (CH), 68.7, 34.0, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 25.8, 24.8 (CH₂), 60.7, 55.9 (x 3), 51.3 (CH₃).

HR ESMS m/z 537.2826 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₀H₄₂NaO₇, 537.2828.

Síntesis del compuesto 5.18d



La **CA-4** (200 mg, 0.63 mmol), K₂CO₃ (174.14 mg, 1.26 mmol, 2.0 eq) y el 16-bromo-hexadecanoato de metilo (1.1 g, 3.15 mmol, 5.0 eq.) se sometió a las mismas condiciones de eterificación de **5.18b**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 338 mg (92%) del éster **5.18d** como único isómero.

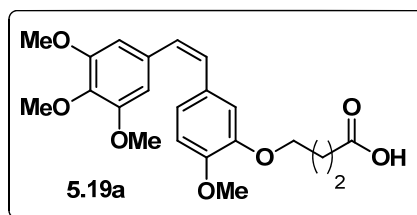
Sólido, p.f: 59 - 61°C

IR ν_{max} 1739 (C=O) cm⁻¹

RMN ^1H (500 MHz): $\delta = 6.80\text{-}6.75$ (2H, m), 6.70 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.47 (2H, s), 6.43 (1H, d, $J = 12$ Hz), 6.37 (1H, d, $J = 12$ Hz), 3.77 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.73 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.64 (6H, s), 3.60 (3H, s), 2.24 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.68 (2H, br quint, $J \sim 7$ Hz), 1.56 (2H, m), 1.35-1.20 (22H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 173.9, 152.7$ (x 2), 148.5, 147.8, 137.0, 132.7, 129.6 (C), 129.5, 128.4, 121.6, 113.3, 111.1, 105.8 (x 2) (CH), 68.6, 33.8, 29.4-28.8 (once picos parcialmente superpuestos), 25.7, 24.7 (CH₂), 60.5, 55.7 (x 3), 51.0 (CH₃).

HR ESMS m/z 607.3625 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₅H₅₂NaO₇, 607.3610.

Síntesis del compuesto 5.19a

A una disolución del éster **5.18a** (178 mg, 0.42 mmol) en MeOH (214 mL) se le adicionó otra disolución de NaOH (3.4 g, 84 mmol, 200 eq.) en H₂O (22 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente manteniéndola protegida de la luz.

Una vez transcurrido éste tiempo se eliminó el MeOH a vacío, el crudo obtenido se acidificó con HCl concentrado y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó en el rotavapor. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), obteniéndose 152 mg (90%) del ácido **5.19a** como una mezcla de isómeros *Z/E* 98:2.

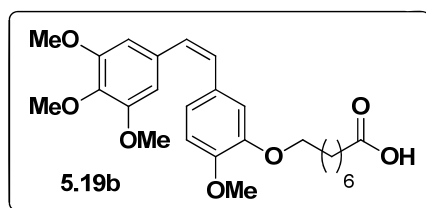
Aceite incoloro.

IR ν_{\max} 3500-2500 (br, OH), 1710 (C=O) cm⁻¹

RMN ¹H (500 MHz): δ = 6.87 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 6.77 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.52 (2H, s), 6.49 (1H, d, *J* = 12 Hz), 6.45 (1H, d, *J* = 12 Hz), 3.86 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 3.84 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.70 (6H, s), 2.54 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.06 (2H, br quint, *J* ~ 6.7 Hz) (señal de OH no detectada).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 178.0, 153.0 (x 2), 148.8, 147.7, 137.1, 133.0, 129.9 (C), 129.7, 128.8, 122.4, 114.0, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 67.7, 30.4, 24.3 (CH₂), 60.9, 55.9 (x 3) (CH₃).

HR ESMS *m/z* 401.1600 (M-H)⁻. Calcd. para C₂₂H₂₆NaO₇-H, 401.1606.

Síntesis del compuesto 5.19b

El compuesto **5.18b** (267 mg, 0.56 mmol) se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la transformación del éster **5.18a** en el ácido **5.19a**. Después del procesamiento de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), lo que permitió obtener 202 mg (71%) del ácido **5.19b** como único isómero.

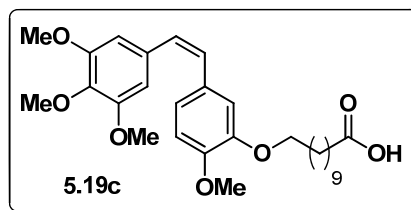
Aceite incoloro.

IR ν_{\max} 3500-2500 (br, OH), 1711 (C=O) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.87 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz), 6.86 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.79 (1H, d, J = 8.2 Hz), 6.55 (2H, s), 6.52 (1H, d, J = 12 Hz), 6.47 (1H, d, J = 12 Hz), 3.87 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.82 (2H, t, J = 6.7 Hz), 3.73 (6H, s), 2.38 (2H, t, J = 7.5 Hz), 1.75 (2H, br quint, J ~ 7 Hz), 1.66 (2H, m), 1.45-1.35 (6H, br m) (señal de OH no detectada).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 179.5, 152.9 (x 2), 148.7, 148.0, 137.1, 132.9, 129.9 (C), 129.7, 128.7, 121.9, 113.5, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 68.7, 34.0, 29.0, 28.9 (x 2), 25.7, 24.6 (CH₂), 60.8, 55.9 (x 3) (CH₃).

HR ESMS m/z 457.2231 (M-H)⁻. Calcd. para C₂₆H₃₄NaO₇-H, 457.2226.

Síntesis del compuesto 5.19c

El compuesto **5.18c** (320 mg, 0.62 mmol) se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la transformación del éster **5.18a** en el ácido **5.19a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), lo que permitió obtener 226 mg (73%) del ácido **5.19c** como único isómero.

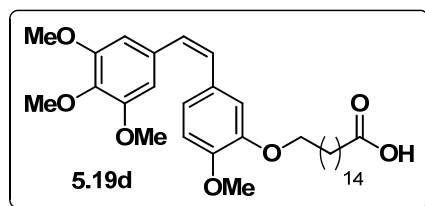
Aceite incoloro.

IR ν_{\max} 3500-2500 (br, OH), 1709 (C=O) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.85 (1H, dd, J = 8.1, 1.8 Hz), 6.84 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.77 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12 Hz), 3.84 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.80 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.70 (6H, s), 2.35 (2H, t, J = 7.5 Hz), 1.73 (2H, br quint, J ~ 7 Hz), 1.64 (2H, m), 1.40-1.25 (12H, br m) (señal de OH no detectada).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 179.5, 152.9 (x 2), 148.7, 148.0, 137.1, 132.9, 129.9 (C), 129.8, 128.7, 121.9, 113.5, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 68.8, 34.0, 29.4, 29.3 (x 2), 29.2, 29.0 (x 2), 25.8, 24.7 (CH₂), 60.8, 55.9 (x 3) (CH₃).

HR ESMS m/z 499.2696 (M-H)⁻. Calcd. para C₂₉H₄₀NaO₇-H, 499.2696.

Síntesis del compuesto 5.19d

El compuesto **5.18d** (250 mg, 0.48 mmol) se sometió a las mismas condiciones utilizadas en la transformación del éster **5.18a** en el ácido **5.19a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), lo que permitió obtener 205 mg (75%) del ácido **5.19d** como único isómero.

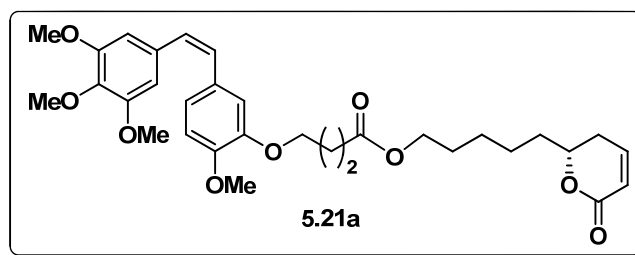
Sólido, p.f: 88 - 89°C

IR ν_{\max} 3500-2500 (br, OH), 1710 (C=O) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.85 (2H, m), 6.77 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.53 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12 Hz), 3.85 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.81 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.71 (6H, s), 2.36 (2H, t, J = 7.5 Hz), 1.74 (2H, br quint, J ~ 7 Hz), 1.64 (2H, m), 1.40-1.25 (22H, br m) (señal de OH no detectada).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 179.2, 152.9 (x 2), 148.7, 148.1, 137.2, 132.9, 129.9 (C), 129.8, 128.7, 121.9, 113.5, 111.4, 106.0 (x 2) (CH), 68.9, 34.0, 29.6-29.0 (eleven partially overlapped peaks), 25.9, 24.7 (CH₂), 60.8, 55.9 (x 3) (CH₃).

HR ESMS m/z 569.3478 (M-H)⁻. Calcd. para C₃₄H₅₀NaO₇-H, 569.3478.

Síntesis del compuesto 5.21a

A una disolución del compuesto **5.19a** (60.3 mg, 0.15 mmol, 1.1 eq.) en THF (3 mL) se le añadió cloruro 2,4,6-triclorobenzoilo (43 μ L, 0.272 mmol, 2 eq.) y Et_3N (57 μ L, 0.408 mmol, 3 eq.) bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h manteniéndola protegida de la luz. A continuación se añadió lentamente el alcohol (*R*)-**5.20** (25 mg, 0.136 mmol) disuelto en THF (1.4 mL), y seguidamente DMAP (42 mg, 0.34 mmol, 2.5 eq.) en THF (1.7 mL). La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH_4Cl y se extrajo con Et_2O (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó en el rotavapor. El residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano- Et_2O (6:4), obteniéndose 26 mg (34%) del híbrido **5.21a** como una mezcla de isómeros *Z/E* 95:5.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_{\text{D}} +30.9$ (c 1.88, CHCl_3)

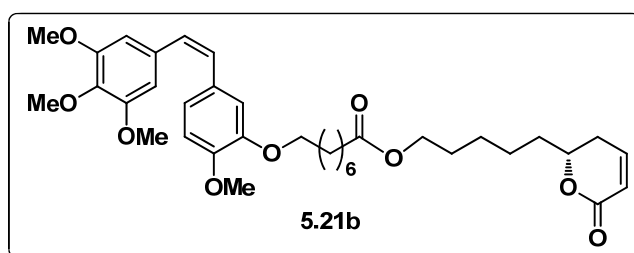
IR ν_{max} 1726 (C=O) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.76 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.52 (2H, s), 6.49 (1H, d, J = 12 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12 Hz), 6.01 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.40 (1H, m), 4.07 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.86 (2H, t, J = 6.4 Hz), 3.83 (6H, s), 3.70 (6H, s), 2.48 (2H, t, J = 7.3 Hz), 2.32 (2H, m), 2.05 (2H, br quint, J ~ 7 Hz), 1.80 (1H, m), 1.70-1.35 (7H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.1, 164.4, 152.9 (x 2), 148.7, 147.8, 137.2, 132.9, 129.9 (C), 144.9, 129.6, 128.9, 122.2, 121.5, 114.0, 111.5, 106.0 (x 2), 77.8 (CH), 67.8, 64.3, 34.7, 30.7, 29.4, 28.5, 25.7, 24.5 (x 2) (CH_2), 60.8, 55.9 (x 3) (CH_3).

HR ESMS m/z 591.2567 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{NaO}_9$, 591.2570

Síntesis del compuesto 5.21b



El compuesto **5.19b** (70.2 mg, 0.148 mmol, 1.1 eq.) y el alcohol (*R*)-**5.20** (24.8 mg, 0.135 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.21a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), obteniéndose 40 mg (47%) del híbrido **5.21b** como una mezcla de isómeros *Z/E* 98:2.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D$ +24.9 (*c* 2.0, CHCl_3)

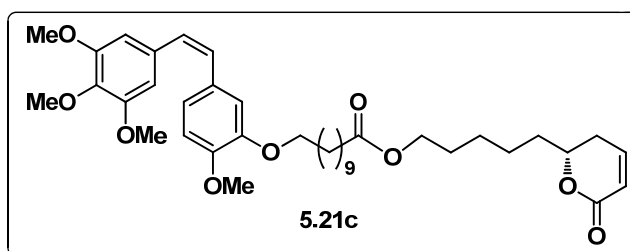
IR ν_{max} 1726 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.85-6.80 (3H, m), 6.75 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.51 (2H, s), 6.48 (1H, d, J = 12 Hz), 6.42 (1H, d, J = 12 Hz), 6.00 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.40 (1H, m), 4.05 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.82 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.78 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.69 (6H, s), 2.35-2.25 (4H, m), 1.80 (1H, m), 1.75-1.30 (17H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.7, 164.3, 152.9 (x 2), 148.6, 147.9, 137.2, 132.9, 129.9 (C), 144.9, 129.7, 128.7, 121.8, 121.4, 113.5, 111.3, 106.0 (x 2), 77.7 (CH), 68.7, 64.0, 34.7, 34.2, 29.3 (x 2), 29.0 (x 2), 28.5, 25.7, 25.6, 24.8, 24.4 (CH₂), 60.8, 55.9 (x 3) (CH₃).

HR ESMS m/z 647.3193 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₆H₄₈NaO₉, 647.3196

Síntesis del compuesto 5.21c



El compuesto **5.19c** (61.7 mg, 0.12 mmol, 1.1 eq.) y el alcohol (*R*)-**5.20** (20 mg, 0.108 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.21a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (7:3), obteniéndose 27 mg (37%) del híbrido **5.21c** como una mezcla de isómeros *Z/E* 78:22

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{20}$ +21.1 (c 1.3, CHCl₃)

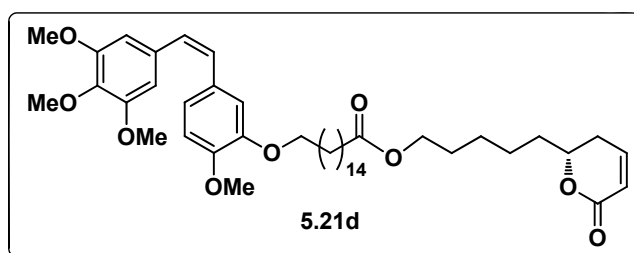
IR ν_{max} 1718 (C=O) cm⁻¹

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.74 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12 Hz), 6.02 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.41 (1H, m), 4.07 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.84 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.80 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.70 (6H, s), 2.35-2.25 (4H, m), 1.80 (1H, m), 1.75-1.55 (9H, br m), 1.50-1.25 (14H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.9, 164.4, 152.9 (x 2), 148.7, 148.0, 137.2, 132.9, 129.9 (C), 144.9, 129.7, 128.7, 121.8, 121.5, 113.5, 111.4, 106.0 (x 2), 77.7 (CH), 68.8, 64.0, 34.7, 34.3, 29.4-29.0 (siete señales parcialmente superpuestas), 28.5, 25.9, 25.7, 24.9, 24.5 (CH_2), 60.8, 55.9 (x 3) (CH_3).

HR ESMS m/z 689.3671 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{NaO}_9$, 689.3666.

Síntesis del compuesto 5.21d



El compuesto **5.19d** (85.5 mg, 0.15 mmol, 1.1 eq.) y el alcohol (*R*)-**5.20** (25 mg, 0.136 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.21a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (7:3), obteniéndose 25 mg (25%) del híbrido **5.21d** como único isómero.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_{\text{D}} +17.4$ (c 2.0, CHCl_3)

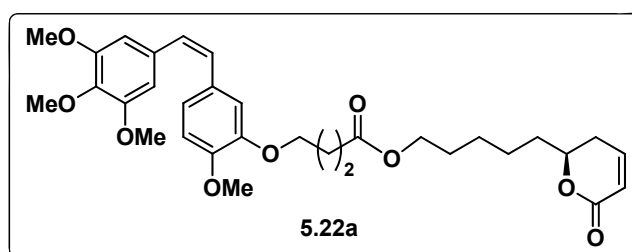
IR ν_{max} 1726 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.85-6.80 (3H, m), 6.74 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.50 (2H, s), 6.47 (1H, d, J = 12 Hz), 6.41 (1H, d, J = 12 Hz), 6.00 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.39 (1H, m), 4.04 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.81 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.77 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.68 (6H, s), 2.35-2.25 (4H, m), 1.80-1.50 (10H, br m), 1.45-1.20 (24H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.9, 164.4, 152.9 (x 2), 148.7, 148.0, 137.1, 132.9, 129.9 (C), 144.9, 129.7, 128.7, 121.8, 121.5, 113.5, 111.3, 106.0 (x 2), 77.7 (CH), 68.8, 64.0, 34.7, 34.3, 29.6-29.0 (doce señales parcialmente superpuestas), 28.5, 25.9, 25.7, 24.9, 24.5 (CH_2), 60.8, 55.9 (x 3) (CH_3).

HR EIMS m/z 759.4456 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. for $\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{NaO}_9$, 759.4448.

Síntesis del compuesto 5.22a



El compuesto **5.19a** (48 mg, 0.119 mmol, 1.1 eq.) y el alcohol (S)-**5.20** (20 mg, 0.108 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.21a** pero utilizando la lactona (S)-**5.20** en este caso. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), obteniéndose 26 mg (42%) del híbrido **5.22a** como único isómero.

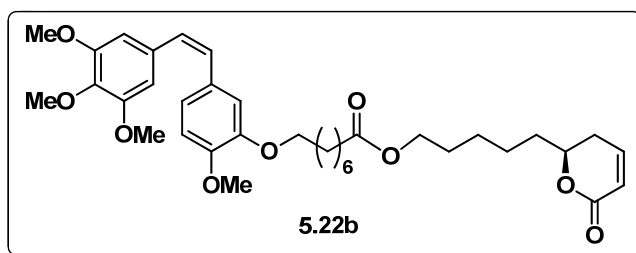
Aceite incoloro.

$[\alpha]_D$ -25 (c 1.74, CHCl_3)

IR ν_{max} 1731 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1}

Los datos espectroscópicos son idénticos a los del compuesto **5.21a**

HR ESMS m/z 591.2570 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{NaO}_9$, 591.2570.

Síntesis del compuesto 5.22b

El compuesto **5.19b** (56.7 mg, 0.12 mmol, 1.1 eq.) y el alcohol (*S*)-**5.20** (20 mg, 0.108 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.21a** pero utilizando la lactona **5.20** de configuración *S* en este caso. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), obteniéndose 37 mg (55%) del híbrido **5.22b** como único isómero.

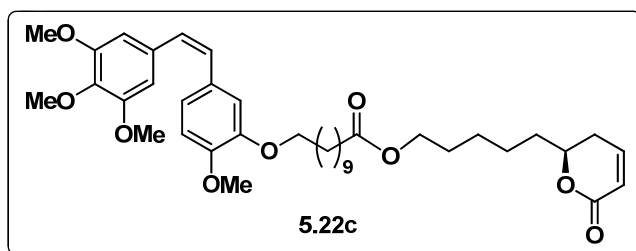
Aceite incoloro.

$[\alpha]_D -25.4$ (c 1.81, CHCl_3)

IR ν_{max} 1726 (C=O) cm^{-1}

Los datos espectroscópicos son idénticos a los del compuesto **5.21b**

HR ESMS m/z 647.3196 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{NaO}_9$, 647.3196

Síntesis del compuesto 5.22c

El compuesto **5.19c** (46.3 mg, 0.09 mmol, 1.1 eq.) y el alcohol (*S*)-**5.20** (15 mg, 0.108 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.21a** pero utilizando la lactona **5.20** de

configuración *S* en este caso. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatógrafo sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (7:3), obteniéndose 20 mg (37%) del híbrido **5.22c** como una mezcla de isómeros *Z/E* 98:2.

Aceite incoloro.

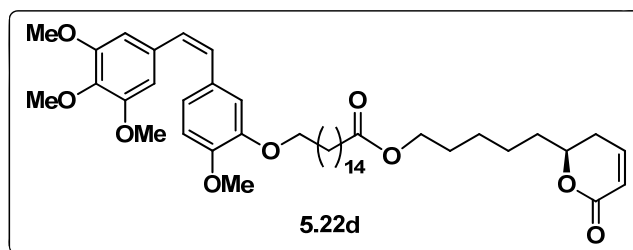
$[\alpha]_D -20.3$ (*c* 1.86, CHCl₃)

IR ν_{\max} 1721 (C=O) cm⁻¹

Los datos espectroscópicos son idénticos a los del compuesto **5.21c**

HR ESMS *m/z* 689.3665 (M+Na⁺). Calcd. para C₃₉H₅₄NaO₉, 689.3666.

Síntesis del compuesto 5.22d



El compuesto **5.19d** (58 mg, 0.102 mmol, 1.1 eq.) y el alcohol (*S*)-**5.20** (17 mg, 0.092 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.21b** pero utilizando la lactona **5.20** de configuración *S* en este caso. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatógrafo sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (7:3), obteniéndose 33 mg (49%) del híbrido **5.22d** como único isómero.

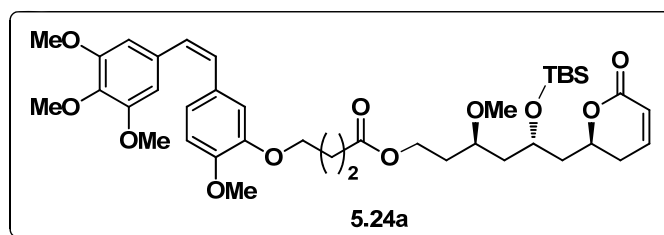
$[\alpha]_D -21.2$ (*c* 1.68, CHCl₃)

IR ν_{\max} 1726 (C=O) cm⁻¹

Los datos espectroscópicos son idénticos a los del compuesto **5.21d**

HR EIMS *m/z* 759.4456 (M+Na⁺). Calcd. for C₄₄H₆₄NaO₉, 759.4448.

Síntesis del compuesto 5.24a



A una disolución del compuesto **5.19a** (124 mg, 0.308 mmol, 1.1 eq.) en THF (6.2 mL) se le añadió cloruro 2,4,6-triclorobenzoilo (88 μ L, 0.56 mmol, 2 eq.) y Et₃N (117 μ L, 0.84 mmol, 3 eq.) bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h manteniéndola protegida de la luz. A continuación se añadió lentamente la lactona **5.23** (100.4 mg, 0.280 mmol) disuelta en THF (2.8 mL), y seguidamente DMAP (85.5 mg, 0.70 mmol, 2.5 eq.) en THF (3.5 mL). La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó en el rotavapor. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-Et₂O (6:4), obteniéndose 52 mg (25%) del híbrido **5.24a** como una mezcla de isómeros *Z/E* 83:17.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D -24.5$ (c 0.2, CHCl₃)

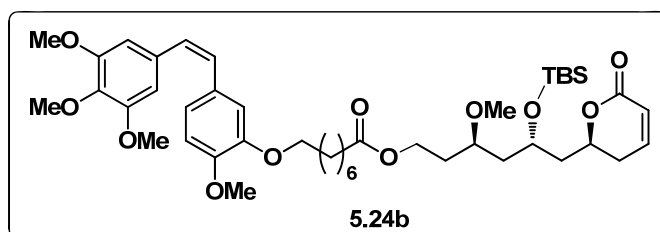
IR ν_{\max} 1729 (C=O) cm⁻¹

RMN ¹H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.76 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.50 (2H, s), 6.48 (1H, d, *J* = 12 Hz), 6.43 (1H, d, *J* = 12 Hz), 6.00 (1H, br d, *J* ~ 9.8 Hz), 4.58 (1H, m), 4.20-4.10 (3H, m), 3.87 (2H, t, *J* = 6 Hz), 3.83 (6H, s), 3.70 (6H, s), 3.39 (1H, m), 3.30 (3H, s), 2.48 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.32 (2H, m), 2.10-1.95 (3H, br m), 1.82 (2H, m), 1.75-1.55 (3H, br m), 0.88 (9H, s), 0.10 (3H, s), 0.08 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.0, 164.2, 152.9 (x 2), 148.8, 148.0, 137.2, 132.9, 130.0, 18.0 (C), 145.1, 129.6, 128.9, 122.2, 121.5, 114.1, 111.5, 106.0 (x 2), 74.8, 74.4, 65.9 (CH), 67.8, 61.1, 43.3, 43.2, 32.7, 30.7, 30.0, 24.5 (CH_2), 60.8, 56.1, 55.9 (x 3), 25.9 (x 3), -4.4, -4.5 (CH_3).

HR EIMS m/z 765.3639 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{NaO}_{11}\text{Si}$, 765.3646.

Síntesis del compuesto 5.24b



El compuesto **5.19b** (50.0 mg, 0.109 mmol, 1.1 eq.) y la lactona **5.23** (35.5 mg, 0.099 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.24a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (7:3), obteniéndose 32 mg (40%) del híbrido **5.24b** como una mezcla de isómeros *Z/E* 95:5.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_{\text{D}}$ -7.2 (c 0.8, CHCl_3)

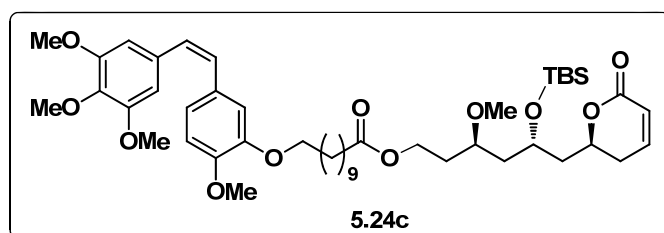
IR ν_{max} 1728 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.76 (1H, d, J = 8 Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12 Hz), 6.02 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.58 (1H, m), 4.20-4.10 (3H, m), 3.84 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.78 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.70 (6H, s), 3.40 (1H, m), 3.31 (3H, s), 2.35-2.25 (4H, br m), 2.00 (1H, ddd, J = 14, 9.3, 3.5 Hz), 1.85-1.55 (9H, br m), 1.45-1.30 (6H, br m), 0.89 (9H, s), 0.10 (3H, s), 0.08 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.7, 164.2, 152.9 (x 2), 148.6, 148.0, 137.0, 132.9, 129.8, 18.0 (C), 145.1, 129.7, 128.7, 121.8, 121.4, 113.4, 111.2, 105.9 (x 2), 74.8, 74.4, 65.8 (CH), 68.7, 60.7, 43.3, 43.2, 34.3, 32.7, 30.0, 29.0 (x 3), 25.8, 24.8 (CH_2), 60.8, 56.1, 55.9 (x 3), 25.9 (x 3), -4.4, -4.5 (CH_3).

HR EIMS m/z 821.4277 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{NaO}_{11}\text{Si}$, 821.4272.

Síntesis del compuesto 5.24c



Una mezcla del compuesto **5.19c** (75.8 mg, 0.147 mmol, 1.6 eq.), la lactona **5.23** (33 mg, 0.092 mmol) y DMAP (7.86 mg, 0.064 mmol, 0.7 eq.) en CH_2Cl_2 (10 mL) se agitó en atmósfera inerte y protegida de la luz, durante 5 min. a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió sobre esta mezcla EDCI (28.22 mg, 0.147 mmol, 1.6 eq.) disuelto en CH_2Cl_2 (2.0 mL) y se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 18 h. A continuación, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NH_4Cl y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con salmuera, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó en el rotavapor. El residuo resultante se cromatografió primero sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (7:3), y más tarde sobre alúmina básica²⁶⁰ con Hexano-AcOEt (9:1), obteniéndose 33.8 mg (44%) del híbrido **5.24c** como aceite y una mezcla de isómeros *Z/E* 98:2.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_{\text{D}} -8.3$ (c 1.23, CHCl_3)

²⁶⁰ Alumina básica 90Å (SDS), 0.05-0.2 mm, pH 9.5 ± 0.3.

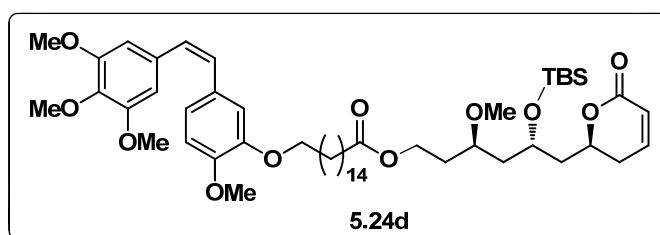
IR ν_{\max} 1732 (C=O) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.76 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12 Hz), 6.02 (1H, dt, J = 9.8, 1.5 Hz), 4.58 (1H, m), 4.20-4.10 (3H, m), 3.84 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.79 (2H, t, J = 6.7 Hz), 3.70 (6H, s), 3.40 (1H, m), 3.31 (3H, s), 2.35-2.25 (4H, br m), 2.00 (1H, ddd, J = 14, 9.3, 3.5 Hz), 1.82 (2H, m), 1.75-1.60 (7H, br m), 1.40-1.25 (12H, br m), 0.88 (9H, s), 0.10 (3H, s), 0.08 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.7, 164.2, 152.9 (x 2), 148.7, 148.0, 137.0, 132.9, 129.8, 18.0 (C), 145.1, 129.7, 128.7, 121.8, 121.4, 113.5, 111.4, 105.9 (x 2), 74.9, 74.4, 65.9 (CH), 68.8, 60.8, 43.3, 43.2, 34.3, 32.7, 30.0, 29.5-29.0 (seis señales parcialmente superpuestas), 25.9, 24.8 (CH_2), 60.7, 56.1, 56.0 (x 3), 25.8 (x 3), -4.4, -4.5 (CH_3).

HR EIMS m/z 863.4744 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{47}\text{H}_{72}\text{NaO}_{11}\text{Si}$, 863.4742.

Síntesis del compuesto 5.24d



El compuesto **5.19d** (100 mg, 0.175 mmol, 1.1 eq.) y la lactona **5.23** (57 mg, 0.159 mmol) se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del híbrido **5.24a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (8:2), obteniéndose 31 mg (21%) del híbrido **5.24d** como una mezcla de isómeros *Z/E* 98:2.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_{\text{D}}$ -2.2 (c 0.62, CHCl_3)

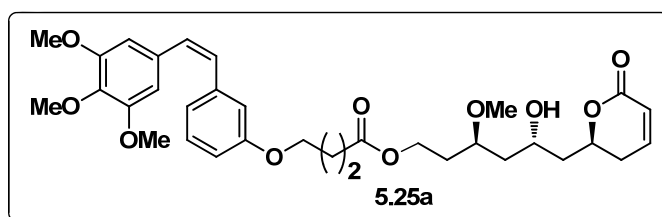
IR ν_{\max} 1733 (C=O) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.77 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12 Hz), 6.02 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.58 (1H, m), 4.20-4.10 (3H, m), 3.84 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.80 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.70 (6H, s), 3.40 (1H, m), 3.32 (3H, s), 2.35-2.25 (4H, br m), 2.00 (1H, ddd, J = 14, 9.5, 3.7 Hz), 1.85 (2H, m), 1.75-1.55 (7H, br m), 1.40-1.25 (22H, br m), 0.89 (9H, s), 0.10 (3H, s), 0.08 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.7, 164.2, 152.9 (x 2), 148.7, 148.1, 137.1, 132.9, 129.9, 18.0 (C), 145.1, 129.8, 128.7, 121.8, 121.5, 113.5, 111.4, 106.0 (x 2), 74.9, 74.5, 65.9 (CH), 68.8, 60.7, 43.3, 43.2, 34.3, 32.7, 30.0, 29.7-29.0 (once señales parcialmente superpuestas), 25.9, 24.9 (CH_2), 60.8, 56.1, 56.0 (x 3), 25.8 (x 3), -4.4, -4.5 (CH_3).

HR EIMS m/z 933.5533 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{52}\text{H}_{82}\text{NaO}_{11}\text{Si}$, 933.5524.

Síntesis del compuesto **5.25a**



A una disolución del compuesto **5.24a** (32 mg, 0.043 mmol) en MeOH (2 mL) se le añadió PPTS (2.2 mg, 0.008 mmol, 0.2 eq.) y agua (0.02 mL). La mezcla se agitó a reflujo durante 18 horas protegida de la luz. A continuación se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó con NaHCO_3 sólido (3.0 mg). Después de filtrar a vacío, el disolvente se eliminó en el rotavaporador y el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (1:1), obteniéndose 23 mg (85%) del híbrido **5.25a** como una mezcla de isómeros *Z/E* 87:13.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D -19$ (c 0.79, CHCl_3)

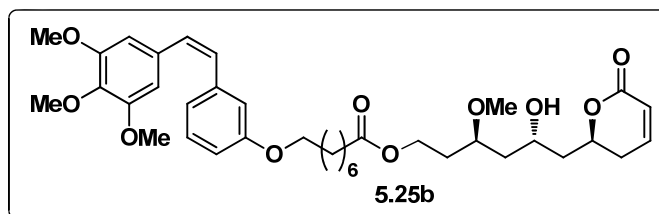
IR ν_{max} 3470 (br, OH), 1726 (C=O), cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.77 (1H, d, J = 8.2 Hz), 6.52 (2H, s), 6.49 (1H, d, J = 12 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12 Hz), 6.02 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.74 (1H, m), 4.26 (1H, m), 4.18 (2H, m), 3.88 (2H, t, J = 6 Hz), 3.83 (6H, s), 3.71 (6H, s), 3.60 (1H, m), 3.37 (3H, s), 3.10 (1H, br s, OH), 2.50 (2H, t, J = 7.5 Hz), 2.37 (2H, m), 2.10-1.95 (2H, br m), 1.90-1.65 (3H, br m), 1.65-1.45 (3H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.1, 164.3, 152.9 (x 2), 148.8, 147.8, 137.2, 132.9, 130.0 (C), 145.1, 129.6, 128.9, 122.2, 121.5, 114.1, 111.5, 106.0 (x 2), 76.5, 74.9, 64.5 (CH), 67.8, 61.2, 43.0, 39.6, 32.3, 30.7, 30.1, 24.5 (CH_2), 60.8, 57.1, 55.9 (x 3) (CH_3).

HR EIMS m/z 651.2781 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{NaO}_{11}$, 651.2781.

Síntesis del compuesto 5.25b



La desprotección del grupo sililéter bajo catálisis ácida del compuesto **5.25b** (32 mg, 0.040 mmol) se llevó a cabo en las mismas condiciones utilizadas en la síntesis de **5.25a**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (1:1), obteniéndose 26 mg (95%) del híbrido **5.25b** como una mezcla de isómeros *Z/E* 90:10.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D -6.3$ (c 0.54, CHCl_3)

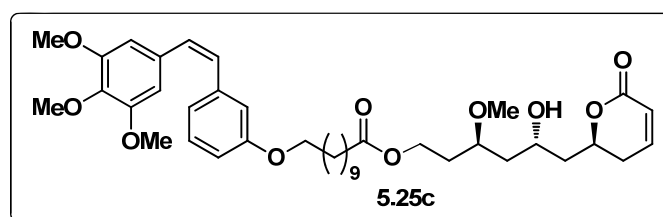
IR ν_{max} 3500 (br, OH), 1726 (C=O) cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.77 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.44 (1H, d, J = 12 Hz), 6.02 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.74 (1H, m), 4.28 (1H, br t, J ~ 9 Hz), 4.17 (2H, t, J = 6.5 Hz), 3.84 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.80 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.71 (6H, s), 3.60 (1H, m), 3.37 (3H, s), 3.20 (1H, br s, OH), 2.38 (2H, m), 2.30 (2H, t, J = 7.5 Hz), 2.00 (1H, m), 1.90-1.50 (7H, br m), 1.45-1.20 (8H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): δ = 173.7, 164.3, 152.9 (x 2), 148.7, 148.0, 137.2, 132.9, 129.9 (C), 145.1, 129.7, 128.7, 121.9, 121.4, 113.6, 111.4, 106.0 (x 2), 76.5, 74.9, 64.5 (CH), 68.8, 61.0, 43.0, 39.7, 34.3, 32.4, 30.0, 29.7, 29.1, 29.0, 25.8, 24.8 (CH_2), 60.9, 57.1, 55.9 (x 3) (CH_3).

HR EIMS m/z 707.3408 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{NaO}_{11}$, 707.3407.

Síntesis del compuesto 5.25c



A una disolución del compuesto **5.25c** (26 mg, 0.031 mmol) se disolvió en MeOH (2 mL) se le añadió PPTS (3.0 mg, 0.012 mmol, 0.4 eq.) y agua (0.02 mL). La mezcla se agitó a reflujo durante 40 horas protegida de la luz. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó con NaHCO_3 sólido (5.0 mg). Después de filtrar a vacío, el disolvente se eliminó en el rotavaporador y el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (1:1), obteniéndose 18 mg (80%) del híbrido **5.25c** como una mezcla de isómeros *Z/E* 80:20.

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D -4.2$ (c 1.1, CHCl_3)

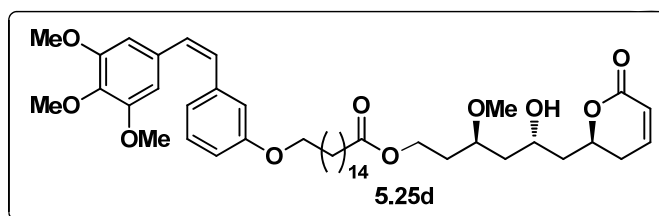
IR ν_{max} 3476 (br, OH), 1726 (C=O), cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz): $\delta = 6.90\text{-}6.80$ (3H, m), 6.77 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, $J = 12$ Hz), 6.44 (1H, d, $J = 12$ Hz), 6.02 (1H, br d, $J \sim 9.8$ Hz), 4.75 (1H, m), 4.28 (1H, br t, $J = 9.5$ Hz), 4.17 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.85 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.80 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.71 (6H, s), 3.60 (1H, m), 3.38 (3H, s), 3.10 (1H, br s, OH), 2.38 (2H, m), 2.30 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.00 (1H, m), 1.90-1.55 (9H, br m), 1.40-1.20 (12H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz): $\delta = 173.8, 164.3, 152.9$ (x 2), 148.7, 148.0, 137.2, 132.9, 129.9 (C), 145.1, 129.7, 128.7, 121.9, 121.4, 113.6, 111.4, 106.0 (x 2), 76.6, 74.9, 64.5 (CH), 68.8, 61.0, 43.0, 39.6, 34.3, 32.4, 30.0, 29.5-29.0 (seis señales parcialmente superpuestas), 25.9, 25.0 (CH_2), 60.9, 57.1, 56.0 (x 3) (CH_3).

HR EIMS m/z 749.3871 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calcd. para $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{NaO}_{11}$, 749.3877.

Síntesis del compuesto 5.25d



La desprotección del grupo sililéter bajo catálisis ácida del compuesto **5.25d** (31 mg, 0.034 mmol, 1.0 eq) se llevó a cabo en las mismas condiciones utilizadas en la síntesis de **5.25c**. Después del procesado de la reacción, el residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano-AcOEt (6:4), obteniéndose 23 mg (85%) del híbrido **5.25d** como una mezcla de isómeros *Z/E* 93:7.

Aceite incoloro.

[α]_D -2 (c 0.88, CHCl₃)

IR ν_{\max} 3470 (br, OH), 1726 (C=O), cm⁻¹

RMN ¹H (500 MHz): δ = 6.90-6.80 (3H, m), 6.77 (1H, d, J = 8 Hz), 6.52 (2H, s), 6.50 (1H, d, J = 12 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12 Hz), 6.02 (1H, br d, J ~ 9.8 Hz), 4.75 (1H, m), 4.28 (1H, br t, J ~ 9 Hz), 4.17 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.85 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.81 (2H, t, J = 6.8 Hz), 3.71 (6H, s), 3.60 (1H, m), 3.38 (3H, s), 3.10 (1H, br s, OH), 2.38 (2H, m), 2.30 (2H, t, J = 7.5 Hz), 2.00 (1H, m), 1.90-1.50 (11H, br m), 1.40-1.20 (20H, br m).

RMN ¹³C (125 MHz): δ = 173.9, 164.3, 152.9 (x 2), 148.7, 148.1, 137.2, 133.0, 129.9 (C), 145.1, 129.8, 128.8, 121.9, 121.4, 113.6, 111.4, 106.0 (x 2), 76.6, 74.9, 64.5 (CH), 68.9, 61.0, 43.0, 39.6, 34.3, 32.4, 30.0, 29.7-29.0 (once señales parcialmente superpuestas), 25.9, 25.0 (CH₂), 60.9, 57.1, 55.9 (x 3) (CH₃).

HR EIMS m/z 819.4679 (M+Na⁺). Calcd. para C₄₆H₆₈NaO₁₁, 819.4659.

**6. ESTUDIOS DE
CITOTOXICIDAD Y DE
INTERACCIÓN CON
TUBULINA DE LOS
HÍBRIDOS CA-4/
ANÁLOGOS DE
PIRONETINA**

6. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD Y DE INTERACCIÓN CON TUBULINA DE LOS HÍBRIDOS DE CA-4/ANÁLOGOS DE PIRONETINA

6.1. Introducción

Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, la pironetina inhibe el ensamblaje de la tubulina *in vitro* al unirse covalentemente con el residuo de Lis352 de dicha proteína.²⁶¹ Su actividad antitumoral, tanto en cultivos celulares como en ratones, se debe a la despolimerización que provoca en la red de microtúbulos de la célula en interfase, lo que inhibe el progreso del ciclo celular y provoca la acumulación células en la fase G2/M.^{261,262}

La combretastatina A-4 (CA-4) inhibe el ensamblaje de los microtúbulos lo que confiere a este compuesto una potente citotoxicidad frente a una amplia gama de líneas tumorales, incluyendo líneas celulares multirresistentes a fármacos.²⁶³

En el contexto de esta Tesis se han estudiado las interacciones de 20 nuevos derivados sintéticos de combretastatina A-4 con la tubulina. En la figura 6.1 se muestran las estructuras de los derivados de CA-4 con cadenas de tipo éster metílico y ácido carboxílico (**5.18a-d**, **5.19a-d**) y de los híbridos de CA-4 con análogos de pironetina (**5.21a-d**, **5.22a-d** y **5.25a-d**).

²⁶¹ Kondoh, M.; Usui, T.; Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Nishikawa, K.; Nishikiori, T.; Mayumi, T.; Osada, H. *Cancer Lett.* **1998**, *126*, 29.

²⁶² Kondoh, M.; Usui, T.; Nishikiori, T.; Mayumi, T.; Osada, H. *Biochem. J.* **1999**, *340*, 411.

²⁶³ Rajak, H.; Dewangan, P. K.; Patel, V.; Jain, D. K.; Singh, A.; Veerasamy, R.; Sharma, P. C.; Dixit, A. *Curr. Pharm. Design.* **2013**, *19*, 1923.

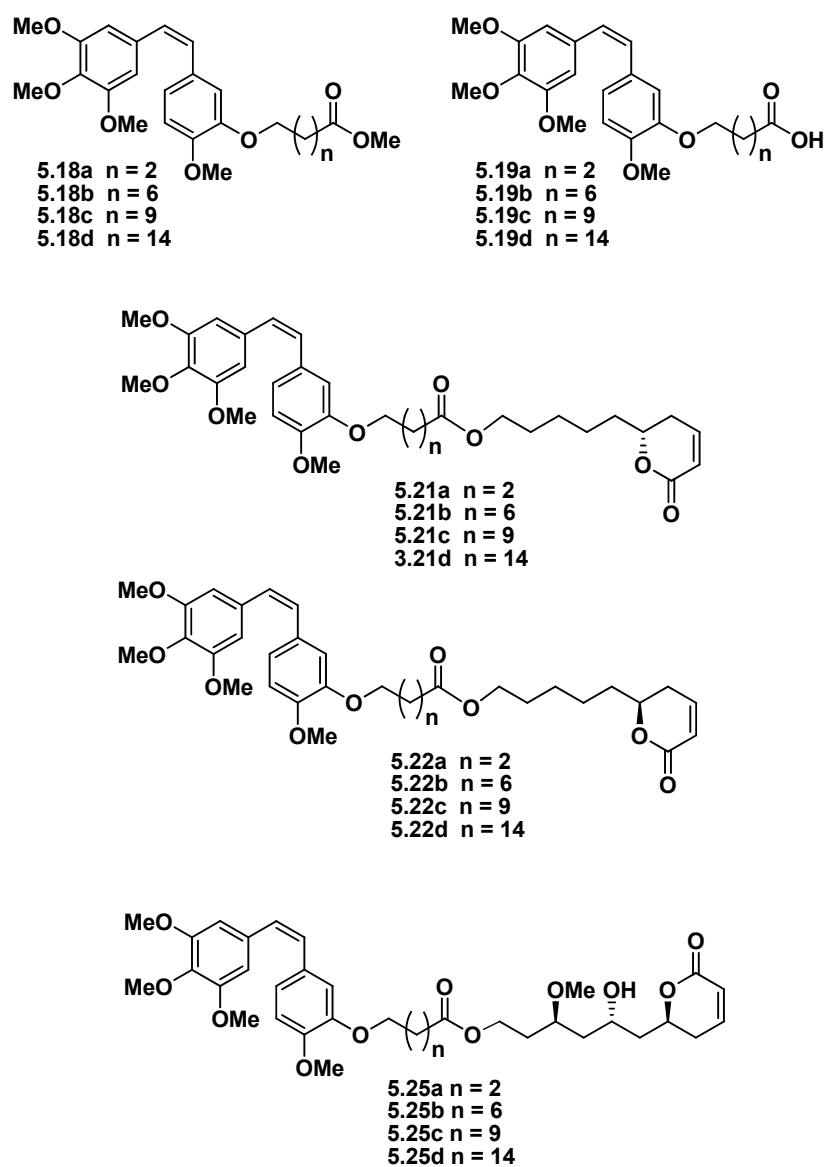


Figura 6.1. Estructuras de derivados de CA-4 e híbridos CA-4/análogos de pironetina

Los estudios de citotoxicidad de nuestros compuestos se llevaron a cabo sobre las líneas celulares de carcinoma de ovario humano A2780 y su variante A2780AD, caracterizada por ser resistente a quimioterapia debido a la sobreexpresión del gen de la glicoproteína P, que actúa como bomba de

expulsión de moléculas hidrofóbicas de la célula (incluyendo fármacos). Estos dos tipos de células provienen de un tumor que se forma en el epitelio que recubre el ovario (figura 6.2).

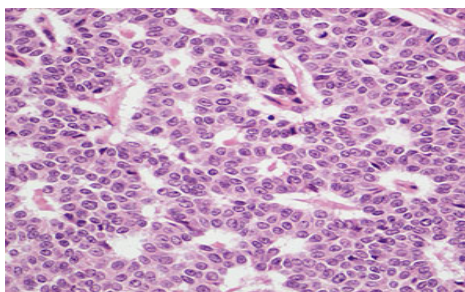


Figura 6.2. Carcinoma de ovario humano

Las actividades biológicas de los derivados de combretastatina A-4 se iniciaron con la medida de sus actividades citotóxicas y con la observación de los cambios morfológicos que experimentan las células en mitosis, que se distinguen fácilmente por su apariencia redondeada y por no estar adheridas al fondo de la placa de cultivo, como ocurre con las células en interfase. Para los compuestos **5.18d**, **5.21c-d** y **5.22b-d** no se observó una mayor población de células en mitosis, en comparación con el control (células con DMSO), por lo que se descartaron para el resto de estudios biológicos. El resto de compuestos sintéticos se sometieron a estudios de citotoxicidad, ciclo celular e inmunofluorescencia.

Los estudios de ciclo celular permiten cuantificar la parada en la fase G2/M, mientras que la técnica de inmunofluorescencia indirecta se utilizó para estudiar el efecto de los compuestos sobre la red de microtúbulos citoplásmicos y del huso mitótico.

Estas dos últimas técnicas se llevaron a cabo sobre cultivos de adenocarcinoma de pulmón humano de células no pequeñas A549. Estas células pertenecen a un subtipo de carcinoma no microcítico de pulmón que,

por lo general, se localiza en la región externa del pulmón.²⁶⁴ Alrededor del 40% de los cánceres de pulmón son adenocarcinomas, un tipo de cáncer que se origina en las células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de secreción, que se encargan de verter los productos que generan en la luz glandular. El adenocarcinoma de pulmón es la forma más común de cáncer, y la más frecuente en fumadores (figura 6.3).²⁶¹

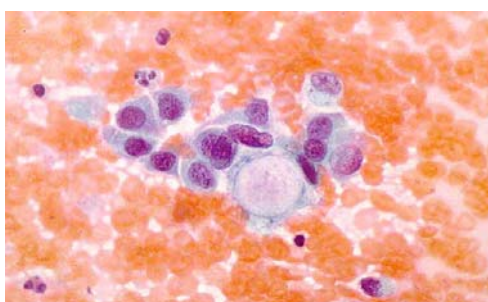


Figura 6.3. Adenocarcinoma pulmonar

6.2. Actividad citotóxica

En la tabla 6.1 se muestran los valores de IC_{50} de derivados de CA-4 en células de carcinoma de ovario humano A2780 (sensibles) y A2780AD (resistentes). Los valores se compararon con los de los compuestos de origen natural combretastatina A-4, pironetina y taxol.

En la tabla 6.1 se ha calculado también el índice de resistencia relativa (R/S) de la línea celular A2780AD para cada uno de los compuestos. Este valor se obtiene dividiendo el valor de IC_{50} observados para la línea resistente por el de la línea sensible. Cuanto mayor sea la relación R/S, tanto más resistente se muestra la línea celular tumoral frente al compuesto en cuestión, como ocurre en el caso del taxol. Por el contrario, la pironetina y la combretastatina A-4 exhiben valores muy similares de actividad citotóxica en

²⁶⁴ <http://www.cancer.org>

ambas líneas celulares siendo su relación R/S no muy diferente de la unidad.

Tabla 6.1. Valores de IC₅₀ de los compuestos en las líneas A2780 y A2780AD.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) ^a		R/S ^b
	A2780	A2780AD	
Taxol	0.0013 ± 0.0002	0.51 ± 0.18	391
Pironetina	0.0077 ± 0.0001	0.0061 ± 0.00024	0.79
CA-4	0.0022 ± 0.00011	0.0022 ± 0.00028	1
5.18a	5.8 ± 0.4	5.45 ± 0.05	0.95
5.18b	21 ± 1	15 ± 2	0.73
5.18c	12.8 ± 0.7	9 ± 1	0.68
5.19a	18 ± 1	14 ± 2	0.77
5.19b	31 ± 2	48 ± 11	1.54
5.19c	8.4 ± 0.4	8.9 ± 0.5	1.07
5.19d	20.5 ± 0.3	25 ± 7	1.21
5.21a	15 ± 1	21.9 ± 0.5	1.46
5.21b	46 ± 2	38 ± 1	0.82
5.22a	2.8 ± 0.1	11 ± 1	4.11
5.25a	10.6 ± 0.5	19 ± 13	1.82
5.25b	78 ± 3	79 ± 2	1
5.25c	>50	55 ± 1	1
5.25d	17 ± 3	35 ± 6	2.00

^aLos valores de IC₅₀ se acompañan del error derivado de tres experimentos independientes.

^bR/S = Índice de resistencia relativa de la línea celular A2780AD, obtenido dividiendo el IC₅₀ de la línea resistente entre el IC₅₀ de la línea parental A2780.

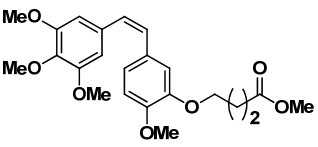
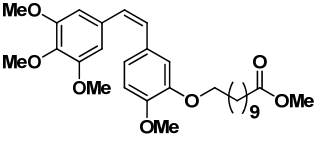
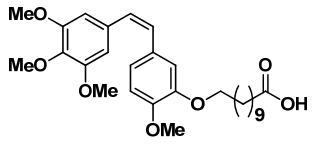
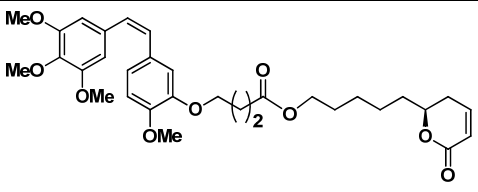
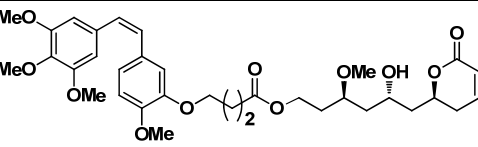
En general, todos los compuestos sintéticos mostraron actividades citotóxicas en el rango micromolar, siendo por tanto unos tres órdenes de magnitud menos activos que el producto natural CA-4. Con todo, y al igual que la combretastatina A-4 y la pironetina, la mayoría exhibía actividades citotóxicas similares en las células sensibles (A2780) y resistentes (A2780AD), exhibiendo en muchos casos valores R/S cercanos a la unidad. Estos valores podrían deberse, en el caso de los compuestos que contienen el anillo de 5,6-dihidropirano, a una baja afinidad por la glicoproteína P y/o a la intervención de un mecanismo de interacción de tipo covalente entre el compuesto y la tubulina, tal como se ha propuesto para el caso de la propia pironetina.

Los compuestos **5.18a-c** y **5.19a-d** no contienen el sistema aceptor Michael de dihidropirano pero sus valores R/S también son cercanos a la unidad, lo que indica que sus actividades citotóxicas frente a las líneas sensible y resistente son similares. Esto podría deberse a una baja afinidad de éstos compuestos por la glicoproteína P. Como se ha indicado anteriormente, esta similitud de actividad citotóxica se observa también en la combretastatina A-4, cuyo valor R/S es prácticamente igual a la unidad.²⁶⁵

Los compuestos que presentaron mayor actividad citotóxica se indican en la tabla 6.2.

²⁶⁵ Darzinkiewics, Z.; Huang, X.; Okafuji, M. *Methods Mol. Biol.* **2006**, 314, 81.

Tabla 6.2. Compuestos con menores IC₅₀ en la línea A2780

Código	Compuesto	IC ₅₀	R/S
5.18a		5.8 μM	0.95
5.18c		12.8 μM	0.68
5.19c		8.4 μM	1.07
5.22a		2.8 μM	4.11
5.25a		10.6 μM	1.82

6.3. Efecto sobre el ciclo celular

El ciclo celular implica una secuencia ordenada de eventos que incluyen la duplicación del material genético y la división celular. La determinación del grado de ploidía del ADN y del ciclo celular mediante citometría de flujo se inició hace más de dos décadas. Constituye una herramienta muy útil para el análisis del curso del ciclo celular y aporta evidencia del efecto de ciertos compuestos que inducen parada de la proliferación celular en alguna de sus etapas y subsiguiente apoptosis y muerte celular.²⁶⁵

El ciclo celular se refleja en una curva que muestra las variaciones del contenido de ADN frente al número de células analizadas. La fluorescencia medida en las células en fase de reposo (G0) y en fase de presíntesis de ADN (G1), produce un pico de distribución normal (véase la figura 6.4).²⁶⁶

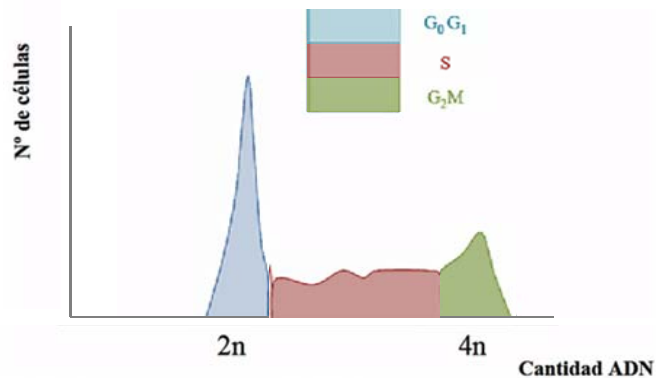


Figura 6.4. Imagen de tipo histograma en un tejido normal.

Los mismos factores que afectan a la amplitud de los picos G0/G1 y G2/M, también afectan a la amplitud de la fase S, por lo que en un histograma de ADN, las células que inician la fase S se superponen con las células G1, como también lo hacen las células al final de la fase S con las células G2.²⁶⁷

En un histograma representativo de una población celular habrá tres regiones bien definidas (figura 6.4). En la región que se muestra en azul en la figura 6.4, llamada G0/G1, la célula tiene un contenido diploide (2n) de ADN, correspondiente a 23 pares de cromosomas.

La fase S o de síntesis se representa por una meseta en la cual la célula duplica su contenido en ADN, convirtiéndose en tetraploide (paso de 2n a 4n).

²⁶⁶ Rabitnovich, P. *Practical Considerations for DNA Content Cell Cycle Analysis*. 1993, ed. Bauer, 117.

²⁶⁷ Shankey, T. V.; Rabitnovich, P.; Bagwell, B.; Bauer, K.; Duque, R.; Hedley, D. *Cytometry* 1993, 14, 472.

Después de la fase de meseta (síntesis) aparece un pico menor correspondiente a las células en fase G2/M que mantiene el doble contenido de ADN (4n).

En células tratadas con algunos compuestos aparece una región, llamada sub G0/G1, que corresponde a células con menor contenido de ADN, lo cual puede correlacionarse con células en apoptosis.

En este apartado se ha estudiado el efecto sobre el ciclo celular de las células A549 de los compuestos **5.18a-c**, **5.19a-d**, **5.21a-b**, **5.22a** y **5.25a-d** comparándolos con el de los compuestos parentales CA-4 y pironetina después de 20 horas de incubación. Para cada compuesto se midió la acumulación de células en G2/M a diferentes concentraciones. En la figura 6.5 se muestra para cada compuesto la máxima acumulación de células en G2/M que éste era capaz de provocar a la concentración indicada en la figura 6.5.

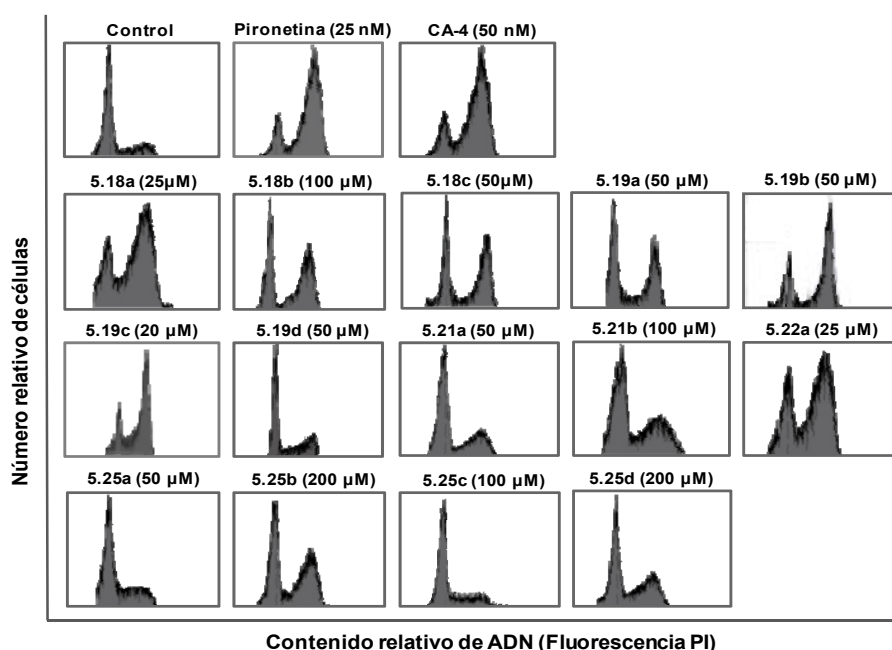


Figura 6.5. Histograma del ciclo celular de células de carcinoma de pulmón A549 tratadas con **5.18a-c**, **5.19a-d**, **5.21a-b**, **5.22a** y **5.25a-d**. Se indica la concentración mínima de ligando que induce el mayor bloqueo en la fase G2/M.

Los resultados observados para cada uno de los compuestos fueron los siguientes:

Se puede apreciar que concentraciones muy bajas de las moléculas parentales, pironetina 25 nM y la combretastatina A-4 50 nM detienen las células en la fase G2/M.

1) Compuestos **5.18**

El compuesto **5.18a** mostró una parada casi completa de células en la fase G2/M a una concentración 25 μ M, y se mantenía a 50 μ M. A 100 μ M ejercía un efecto citotóxico con una gran muerte celular.

El compuesto **5.18b** acumulaba más de la mitad de células en la fase G2/M a concentraciones de 50 y 100 μ M.

El compuesto **5.18c** acumuló células en la fase G2/M a partir de 50 μ M. Esta acumulación se mantenía al aumentar la concentración a 100 y 200 μ M.

2) Compuestos **5.19**

El compuesto **5.19a** provocó una importante acumulación de células en G2/M a una concentración 50 μ M. Esta acumulación se mantuvo a 100 μ M y a una concentración mayor (200 μ M) mostró efecto citotóxico.

El compuesto **5.19b** a 50 μ M indujo una gran acumulación de células en la fase G2/M que se mantuvo a 100 μ M.

El compuesto **5.19c** provocó acumulación de células en fase G2/M a partir de 20 μ M, aumentando ligeramente a 50 μ M.

El compuesto **5.19d**, a una concentración 50 μ M no mostró una acumulación significativa de células en la fase G2/M ni al aumentar la concentración.

3) Compuestos **5.21**

El compuesto **5.21a** a 50 μM produjo un ligero aumento de células en la fase G2/M que se mantuvo a 100 μM y a concentraciones mayores mostró una gran citotoxicidad.

El compuesto **5.21b** a 100 μM provocó una pequeña acumulación de células en la fase G2/M. Sin embargo, la actividad cesaba a la máxima concentración ensayada (200 μM), probablemente por problemas de solubilidad del compuesto.

4) Compuestos **5.22**

El híbrido **5.22a**, a una concentración 25 μM , mostró una acumulación importante de células en la fase G2/M, pero este efecto disminuyó a 50 μM y desapareció al aumentar la concentración (100 μM), posiblemente por problemas de solubilidad del compuesto.

5) Compuestos **5.25**

Para el compuesto **5.25a** se observó un ligero incremento en la fase G2/M a una concentración 50 μM , pero principalmente se observó un aumento de células en la fase sub G0/G1 a concentraciones mayores (no mostrado en la figura 6.5), debido probablemente a células que progresaban a apoptosis.

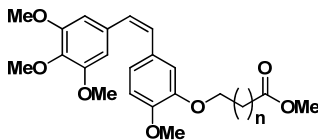
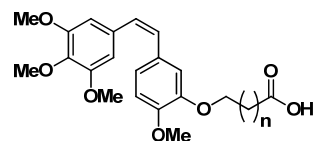
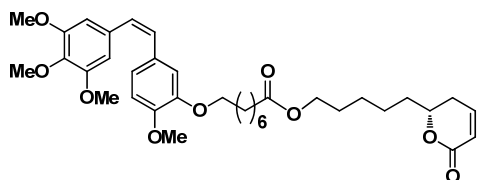
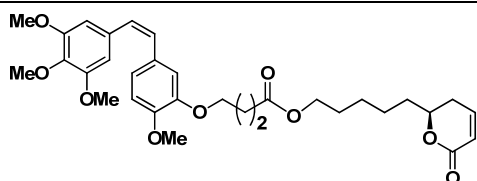
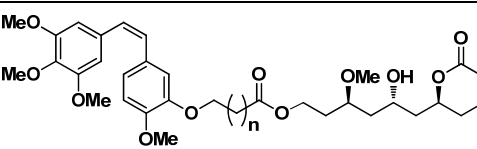
El híbrido **5.25c** mostró ser igual al control en todos los rangos de concentración ensayados (10 μM , 25 μM y 50 μM).

Los compuestos **5.25b** y **5.25d** indujeron un incremento pequeño en el número de células en la fase G2/M a concentraciones de 200 μM , pero a esa concentración también se detectaron problemas de solubilidad. Los pequeños aumentos en G2/M observados son poco relevantes en todos los casos.

Se puede concluir que, aunque los compuestos sintéticos son menos citotóxicos que la combretastatina A-4 y la pironetina, muestran actividades

interesantes al acumular células en la fase G2/M, especialmente los derivados de combretastatina A-4 de tipo éster metílico **5.18a-c**, los derivados de CA-4 de tipo ácido carboxílico **5.19a-c**, y los híbridos **5.21b**, **5.22a**, **5.25b** y **5.25d** (véase la figura 6.5).

Tabla 6.3. Compuestos que provocan mayor acumulación de células en fase G2/M

Código	Compuesto
5.18a (n=2) 5.18b (n=6) 5.18c (n=9)	
5.19a (n=2) 5.19b (n=6) 5.19c (n=9)	
5.21b	
5.22a	
5.25a (n=2) 5.25b (n=6) 5.25d (n=14)	

6.4. Efecto sobre la red de microtúbulos del citoesqueleto

Para visualizar el efecto de los compuestos en la morfología de la red de microtúbulos citoplásmicos o del huso mitótico, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia.

En dicha técnica se emplean anticuerpos marcados con moléculas fluorescentes. La técnica de inmunofluorescencia se diferencia de otras técnicas inmunoquímicas en que aquí el anticuerpo lleva unida una molécula fluorescente (inmunofluorescencia directa) o bien es reconocido por un segundo anticuerpo con marca fluorescente (inmunofluorescencia indirecta) (véase la figura 6.6).

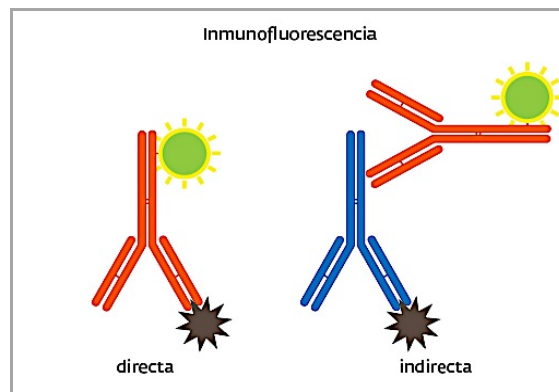


Figura 6.6. Tipos de inmunofluorescencia.

Esta técnica permite visualizar el efecto del fármaco en la morfología de la red de microtúbulos citoplásmicos o del ADN según la longitud de onda seleccionada con el monocromador del microscopio, como se puede ver en el ejemplo de la figura 6.7.

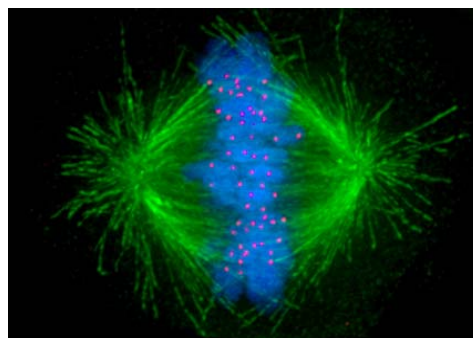


Figura 6.7. Célula en mitosis con el ADN en azul, el citoesqueleto en verde y los cinetocoros en rojo

Las células de la línea A549 se incubaron en presencia de los compuestos sintéticos durante 24 horas (figuras 6.8 y 6.9). Se estudiaron los compuestos **5.18a-c**, **5.19a-c**, **5.21a-b**, **5.22a**, **5.25a-d** y los controles CA-4 y pironetina.

Estos resultados muestran los efectos que causan los diferentes compuestos sobre la red de microtúbulos. Así, por ejemplo, la combretastatina A-4 despolimeriza completamente los microtúbulos de la célula en interfase a una concentración 50 nM (figura 6.8 B). Los husos mitóticos de la misma preparación (recuadro de la parte superior derecha) son de tipo IV,²⁶⁸ los cromosomas forman una bola de ADN condensado y no hay microtúbulos.

²⁶⁸ Jordan, M. A.; Thrower, D.; Wilson, L. J. *Cell Sci.* **1992**. 102, 401.

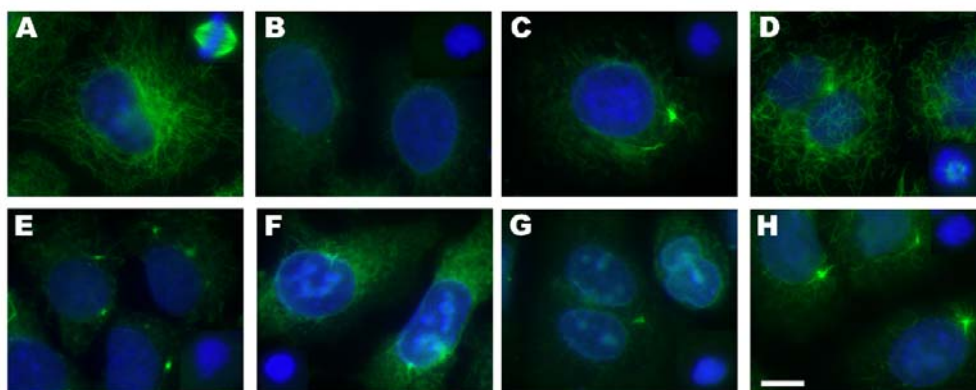


Figura 6.8. Efecto de los compuestos **5.18a-c**, **5.19a-c**, en comparación con la molécula natural CA-4, en la red de microtúbulos de células en interfase y en la morfología del huso mitótico (mostrado en los recuadros de las esquinas). Las células A549 fueron incubadas durante 24 horas con el vehículo DMSO (A), 50 nM de CA-4 (B), 25 μ M de **5.18a** (C), 25 μ M de **5.18b** (D), 100 μ M de **5.18c** (E), 100 μ M de **5.19a** (F), 200 μ M de **5.19b** (G), 50 μ M de **5.19c** (H). Los microtúbulos fueron teñidos con anticuerpos anti α -tubulina (verde) y el ADN se teñió con Hoechst 33342 (azul). La barra en H es de 10 μ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento. Los husos mitóticos que aparecen en los paneles son de la misma preparación.

En esta misma figura se observa que los derivados de combretastatina A-4 de tipo éster **5.18a** a 25 μ M (C), **5.18c** a 100 μ M (E) y de tipo ácido **5.19a** a 100 μ M (F), **5.19b** a 200 μ M (G), **5.19c** a 50 μ M (H) despolimerizan la red de microtúbulos de células en interfase e inducen husos mitóticos de tipo IV. El **5.18b** a 25 μ M muestra una depolimerización parcial y husos de tipo III, el ADN condensado forma una bola y los microtúbulos en forma de estrella. El **5.19d** a 50 μ M es semejante a las células control y a concentraciones mayores ocurre un efecto citotóxico, donde las células muestran núcleos pequeños (resultados no mostrados en la figura 6.8).

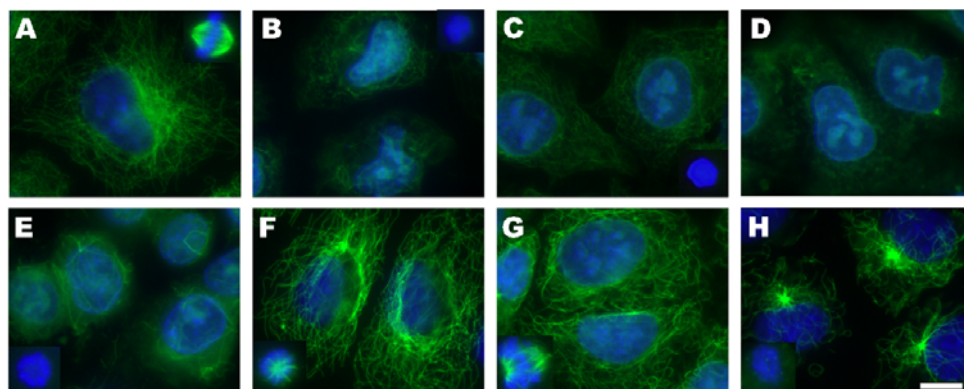


Figura 6.9 Efecto de los compuestos **5.21a-b**, **5.22a**, **5.25a-d**, en comparación con la molécula natural CA-4, en la red de microtúbulos de células en interfase y en la morfología del huso mitótico (mostrado en los recuadros de las esquinas). Las células A549 fueron incubadas durante 24 horas con el vehículo DMSO (A), 100 μM de **5.21a** (B), 100 μM de **5.21b** (C), 25 μM de **5.22a** (D), 50 μM de **5.25a** (E), 100 μM de **5.25b** (F), 100 μM de **5.25c** (G), 200 μM de **5.25d** (H). Los microtúbulos fueron teñidos con anticuerpos anti α -tubulina (verde) y el ADN se teñió con Hoechst 33342 (azul). La barra en H es de 10 μm . Todos los paneles tienen el mismo aumento. Los husos mitóticos que aparecen en los paneles son de la misma preparación

En la Figura 6.9 se observa que los compuestos **5.21a** a 100 μM (B), **5.22a** a 25 μM (D), **5.25a** a 50 μM (E) y **5.25d** a 200 μM (H) y en menor medida **5.21b** a 100 μM (C), despolimerizan el citoesqueleto de las células en interfase. La preparación **5.25a** a 50 μM sin embargo presentaba ya células con núcleos pequeños, estando redondeadas y no extendidas. Los compuestos **5.25b** a 100 μM (F) y **5.25c** a 100 μM (G) no despolimerizan la red de microtubulos en interfase.

6.5. Efecto sobre el ensamblaje de los microtúbulos

En este apartado se estudió la actividad inhibidora de los híbridos y los derivados de combretastatina A-4 sobre el ensamblaje de los microtúbulos *in vitro* utilizando tubulina aislada, con el objetivo de relacionar dicha capacidad con su actividad citotóxica.

La polimerización de tubulina en microtúbulos presenta, por lo general, dos fases: una fase de nucleación, en la cual la tubulina se asocia en forma lineal para formar núcleos de polimerización, y una fase de elongación o crecimiento del polímero, en la que las subunidades se asocian a los microtúbulos crecientes en forma cooperativa.²⁶⁹

En el ensamblaje de tubulina se presenta una polimerización no covalente por condensación nucleada, caracterizada por un comportamiento cooperativo y por la presencia de una concentración crítica de proteína, por debajo de la cual no existe formación significativa de polímeros. El equilibrio de polimerización es muy parecido al equilibrio de solubilidad de un determinado compuesto en disolución; la concentración crítica de tubulina se correspondería a la concentración saturante de compuesto, y el exceso de moléculas del compuesto que están precipitadas, se correspondería con los dímeros de tubulina que forman parte de los microtúbulos.²⁷⁰

El número de moléculas del compuesto que coexisten con el precipitado es independiente de la cantidad total de precipitado, pero depende de las condiciones de la disolución en que se encuentre la proteína.²⁶⁹

La concentración crítica requerida para el ensamblaje de la tubulina se determinó en el tampón GAB (véase parte experimental) en presencia de un gran exceso (100 μM) de los compuestos **5.18a-c**, **5.19a-d**, **5.21a-b**, **5.22a** y **5.25a-d**.

Como se muestra en la tabla 6.4, la concentración de tubulina necesaria para producir el ensamblaje (concentración crítica) asciende de 3.30 μM en ausencia de los compuestos (control de DMSO), hasta 4.3 μM en el caso del compuesto más activo **5.18a**.

²⁶⁹ Evangelio, J. A., Tesis doctoral, Universidad Complutense, **1999**.

²⁷⁰ Martínez Buey, R., Tesis doctoral, Universidad Complutense, **2005**.

Tabla 6.4. Concentración crítica (C_R) de tubulina

Compuesto ^a	C_R (μM) ^b
DMSO	3.30 ± 0.01
Docetaxel	0.7 ± 0.3
CA-4	6 ± 1
5.18a	4.3 ± 0.2
5.18b	4.2 ± 0.5
5.18c	3.8 ± 0.3
5.19a	3.4 ± 0.2
5.19b	3.8 ± 0.5
5.19c	4.0 ± 0.1
5.19d	3.9 ± 0.2
5.21a	3.6 ± 0.2
5.21b	3.4 ± 0.1
5.22a	3.67 ± 0.03
5.25a	3.3 ± 0.4
5.25b	3.2 ± 0.3
5.25c	3.7 ± 0.2
5.25d	3.3 ± 0.3

^a 20 μM para docetaxel, 100 μM para los compuestos **CA-4**, **5.18a-c**, **5.19a-d**, **5.21a-b**, **5.22a** y **5.25a-d**.

^b Los datos son la media de tres medidas y se acompañan de la desviación estándar.

Las actividades más altas se midieron en los derivados de combretastatina A-4 de tipo éster metílico **5.18a-c**, y los derivados de CA-4 de tipo ácido carboxílico **5.19b-d**, seguidas de los híbridos de CA-4/análogos de pironetina

de 1 estereocentro **5.21a**, y **5.22a**. Sorprende que el compuesto **5.22a** no mostrase un efecto considerable sobre tubulina *in vitro*, al contrario de lo observado *in vivo* en los ensayos de citotoxicidad, ciclo celular e inmunofluorescencia.

Para los híbridos **5.25a-d**, la actividad *in vitro* no fue significativa, en desacuerdo con algunos de los datos obtenidos *in vivo* en los ensayos de citotoxicidad, ciclo celular o inmunofluorescencia. El compuesto **5.25a** sí que presentó actividad citotóxica y despolimerización de la red de microtúbulos (a 50 μM) en inmunofluorescencia. Con el compuesto **5.25b** había una acumulación de células en fase G2/M pero no se observó despolimerización de la red de microtúbulos en células. Con el compuesto **5.25c** no se observó actividad en células. Con el compuesto **5.25d** se observó una acumulación no significativa de células en G2/M a la concentración más alta (200 μM) en los ensayos de ciclo celular, y despolimerización a ésta concentración en los ensayos de inmunofluorescencia.

6.6. Conclusiones

A modo de conclusión general, cabe destacar lo siguiente:

a) Al medir las actividades citotóxicas de los compuestos sintéticos, los valores de IC_{50} obtenidos se sitúan en el rango micromolar, tres órdenes de magnitud más altos en comparación con sus respectivos productos naturales de partida.

b) De los compuestos estudiados, los que mostraron tener actividades biológicas más importantes fueron el derivado de combretastatina A-4 de tipo éster metílico **5.18a**, el derivado de CA-4 de tipo ácido carboxílico **5.19c** y los híbridos de CA-4/análogos de pironetina **5.21a**, **5.22a**, y **5.25a**. De estos cinco compuestos, cuatro contienen el espaciador alquílico más corto, pudiendo estar este hecho relacionado con su mejor solubilidad en agua.

c) Los compuestos más activos en células que mostraron resultados relevantes tanto en ciclo celular, como en actividad despolimerizante de la red de microtúbulos de células en interfase, son los derivados de combretastatina A-4 de tipo éster metílico **5.18a**, **5.18b**, **5.18c**, y los derivados de CA-4 de tipo ácido carboxílico **5.19a**, **5.19b** y **5.19c**. El compuesto **5.19d** muestra resultados contradictorios ya que en ciclo celular e inmunofluorescencia no muestra actividad, pero en los ensayos sobre el ensamblaje de tubulina *in vitro* muestra una actividad significativa.

d) De los híbridos de CA-4/análogos de pironetina el más activo es el **5.22a**. Los compuestos **5.21a**, **5.21b** y **5.25a** no afectan al ciclo celular pero si que despolimerizan la red de microtúbulos citoplásmicos a las concentraciones ensayadas. Los compuestos **5.25a** y **5.25d** tienen efecto citotóxico, pero en las preparaciones de inmunofluorescencia se observa que el primero despega las células del fondo de la placa de cultivo, y el segundo despolimeriza los microtúbulos a una concentración alta (200 μM), pero ambos compuestos no afectan al ciclo celular.

6.7. Parte experimental

6.7.1. Cultivos celulares

Las células de carcinoma no microcítico de pulmón humano A549 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con un 10% de FCS, glutamina y antibióticos tal como se describe en la bibliografía.²⁷¹ Los carcinomas de ovario humano A2780 y A2780AD (con resistencia múltiple a fármacos MDR por sobreexpresión de P-glicoproteína)²⁷² fueron cultivados como se cita arriba y añadiendo 0.25 unidades/mL de insulina bovina.

6.7.2. Ensayos de citotoxicidad, inmunofluorescencia indirecta y ciclo celular

La evaluación de la citotoxicidad se realizó con células A2780 y A2780AD mediante el ensayo MTT modificado.²⁷³ La inmunofluorescencia indirecta se efectuó en células A549 que fueron cultivadas a lo largo de la noche en cubreobjetos redondos de 12 mm e incubadas 24 horas más en presencia del vehículo DMSO o en presencia de diferentes concentraciones de ligandos. Las células se permeabilizaron con Tritón X100 y se fijaron con formaldehído al 3.7%. Los microtúbulos se tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra α -tubulina (DM1A) y el ADN con Hoechst 33342 como se describe en la bibliografía.²⁷⁴ Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan y las imágenes fueron registradas con una cámara CCD refrigerada Hamamatsu 4742-95. La progresión de los ciclos celulares fue analizada mediante determinación del ADN por citometría de flujo con yoduro de propidio. Las células fueron fijadas,

²⁷¹ Buey, R. M.; Calvo, E.; Barasoain, I.; Pineda, O.; Edler, M. C.; Matesanz, R.; Cerezo, G.; Vanderwal, C. D.; Day, B. W.; Sorensen, E. J.; López, J. A.; Andreu, J. M.; Hamel, E.; Díaz, J. F. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 117.

²⁷² Gottesman, M. M. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615.

²⁷³ Yang, C.; Barasoain, I.; Li, X.; Matesanz, R.; Liu, R.; Sharom, F. J.; Yin, D. L.; Díaz, J. F.; Fang, W. S. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 691.

²⁷⁴ De Ines, C.; Leynadier, D.; Barasoain, I.; Peyrot, V.; García, P.; Briand, C.; Renner, G. A.; Temple, C. Jr. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 75.

tratadas con RNasa y teñidas con yoduro de propidio como se describe en la bibliografía.²⁷⁵ El análisis se realizó con un citómetro de flujo Coulter Epics XL.

6.7.3. Ensayo de inhibición del ensamblaje de tubulina

El efecto de los compuestos en el ensamblaje de tubulina aislada se determinó incubando tubulina purificada en concentración 20 μM a 37°C durante 30 min. en GAB (tampón de ensamblaje de glicerol, glicerol 3.4 M, fosfato sódico 10 mM, EGTA 1 mM, GTP 1 mM a pH 6.9) en presencia de docetaxel 20 μM , 100 μM de uno de los ligandos **5.18a-c**, **5.19a-d**, **5.21a-b**, **5.22a**, **5.25a-d** y 2 μL de DMSO (vehículo). Las muestras fueron procesadas y se calculó la concentración crítica para producir el ensamblaje de tubulina en presencia de los ligandos tal y como se describe en la bibliografía.²⁷⁶

²⁷⁵ Andreu, J. M.; Barasoain, I. *Biochemistry* **2001**, *40*, 11975.

²⁷⁶ Oosawa, F.; Asakura, S. *Thermodynamics of the Polymerisation of Protein*, Academic Press, London, **1975**.

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) Se ha llevado a cabo el diseño y la síntesis de los 14 compuestos de tipo O-alkil derivados de combretastatina A-4 que se muestran en la figura 7.1.

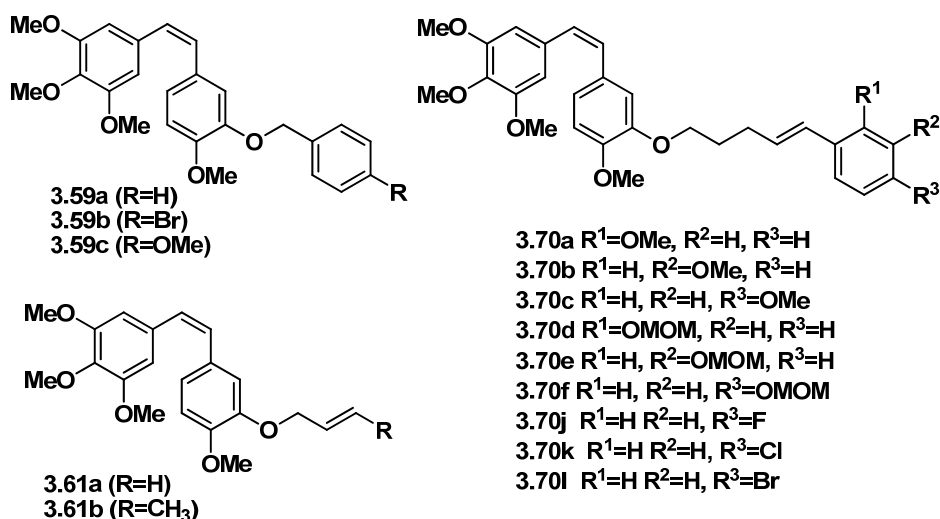


Figura 7.1. O-Alquil derivados de combretastatina A-4

2) Se han medido las actividades citotóxicas de los O-alkil derivados de combretastatina A-4 en las líneas celulares HT-29, MCF7 y HEK293, siendo el compuesto **3.70d** el que ha dado los mejores resultados.

3) Se ha medido la inhibición de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en células HT-29. Los compuestos más activos han sido el **3.70b** y el **3.70d**.

4) Se ha medido la actividad antitelomerasa mediante el análisis de la expresión de los genes hTER y c-Myc en células HT-29. El compuesto que presenta mejor actividad es el **3.70l**.

5) De los compuestos **3.70b**, **3.70d** y **3.70I**, el que presenta una actividad tanto a nivel antiangiogénico como antitelomerasa comparable con el producto natural es el **3.70I** (véase la tabla 7.1).

Tabla 7.1. Compuestos con mejores actividades biológicas

Compuesto	Actividad citotóxica	Inhibición de la producción de VEGF	Inhibición del gen de hTERT
CA-4	$\alpha = 0.2$	53%	26%
3.70d	$\alpha = 0.09$	58%	24%
3.70b	$\alpha = 0.6$	62%	37%
3.70I	$\alpha = 0.2$	52%	61%

6) Se han diseñado y sintetizado los 12 compuestos híbridos CA-4/análogos de pironetina, cuyas estructuras, junto con las de sus precursores, se indican en la figura 7.2.

7) Se han medido las actividades citotóxicas de los híbridos de combretastatina A-4/análogos de pironetina y de sus precursores, en las líneas celulares A2780 y su variante resistente A2780AD, obteniéndose actividades en el rango micromolar.

8) Se ha estudiado, mediante citometría de flujo, la influencia que determinados compuestos indicados en la figura 7.2 ejercen sobre el ciclo celular en células A549.

9) Se ha estudiado, mediante inmunofluorescencia, el efecto que determinados compuestos indicados en la figura 7.2, ejercen sobre la red de microtúbulos del citoesqueleto en la línea celular A549.

10) Se ha estudiado el efecto de determinados compuestos indicados en la figura 7.2 sobre el ensamblaje de los microtúbulos *in vitro* con tubulina aislada.

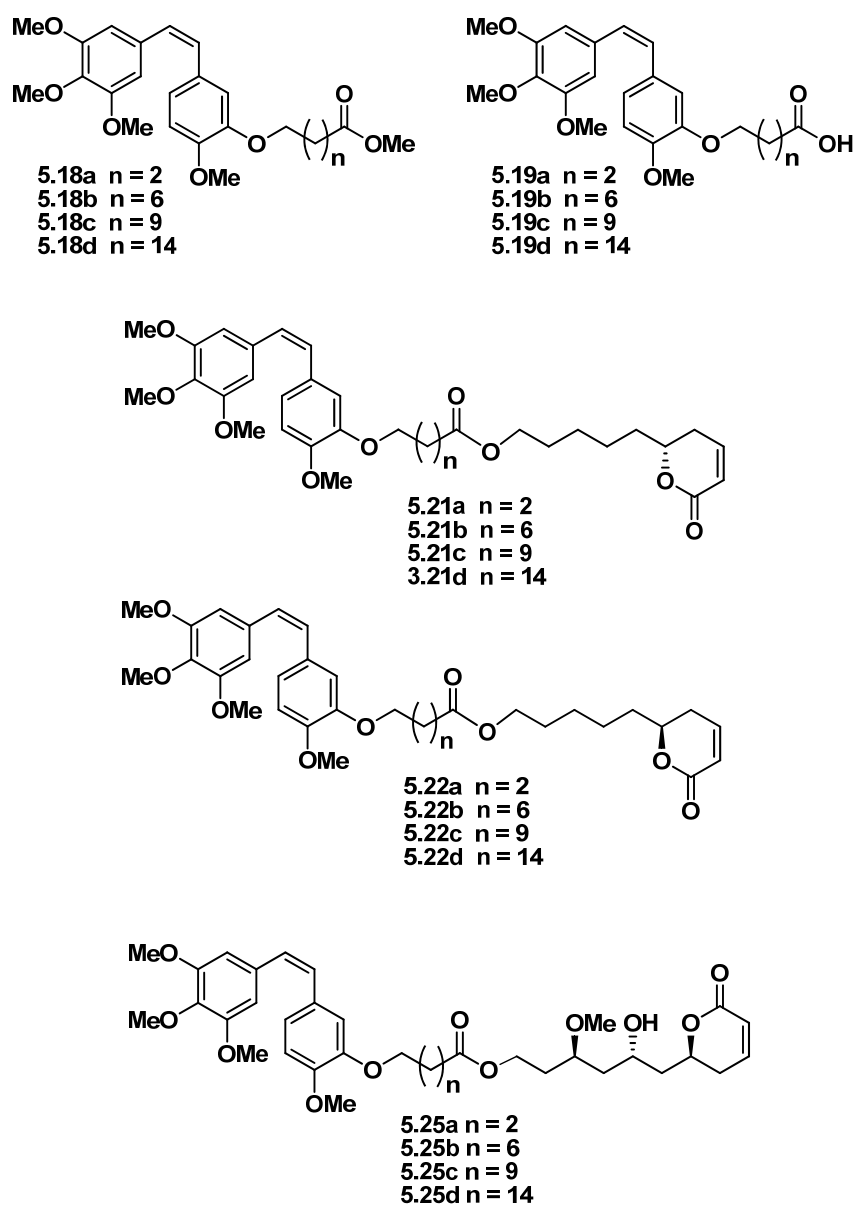


Figura 7.2. Híbridos de CA-4/análogos de pironetina y precursores

11) Los derivados de combretastatina A-4 que mostraron mayores actividades biológicas han sido el **5.18a** y el **5.19c**. De entre los híbridos CA-

4/análogos de pironetina los compuestos con el espaciador más corto, **5.21a**, **5.22a**, y **5.25a**, fueron los más activos (véase la tabla 7.2).

Tabla 7.2. Compuestos con mejores actividades biológicas

Compuesto	Actividad citotóxica (μM)		Ciclo celular (μM)	IF (μM)	C_R (μM)
	A2780	A2780AD			
CA-4	0.0022	0.0022	0.050	0.050	6
5.18a	5.8	5.45	25	25	4.3
5.19c	8.4	8.9	20	50	4
5.21a	15	21.9	50	100	3.6
5.22a	2.8	11	25	25	3.67
5.25a	10.6	19	50	50	3.3