UNIVERSITAT JAUME I

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

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE HONOKIOL Y DEL ÁCIDO 3-METILGLUTÁMICO

Tesis Doctoral

María Sánchez Peris

Castellón de la Plana, 2015

Dña. Eva Falomir Ventura, Profesora Titular de Química Orgánica de la Universidad Jaume I y D. Juan Murga Clausell, Profesor Titular de Química Orgánica de la Universidad Jaume I, certifican que:

Dña. María Sánchez Peris ha realizado bajo su dirección el trabajo que se recoge en esta memoria para optar al grado de Doctora.

Asimismo, autorizan la presentación del trabajo ante la Universidad Jaume I de Castellón 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 2 de noviembre de dos mil quince.

Eva Falomir Ventura

Juan Murga Clausell

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, bajo la dirección de la Dra. Dña. Eva Falomir Ventura y del Dr. D. Juan Murga Clausell. A ellos me gustaría agradecerles todo el apoyo, paciencia y dedicación mostradas tanto en el ámbito profesional como en el personal y sobre todo por haberme iniciado en el mundo de la investigación.

Al Dr. Miguel Carda Usó, muchísimas gracias por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por sus consejos y aportaciones durante mis años de doctoranda, por la pasión mostrada al compartir su sabiduría, por sus lecciones de historia a la hora del café y, por algo que yo considero de suma importancia, su capacidad de mantener al equipo unido.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. J. Alberto Marco Ventura toda la ayuda proporcionada, su experiencia y su exigencia en el trabajo realizado.

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento al Dr. Andrew Westwell y el Dr. Jun Cai de la Universidad de Cardiff por aceptarme en sus respectivos grupos y por hacerme sentir como una más. A los compañeros del laboratorio de Cardiff por su cálida bienvenida y cariño mostrados.

También quiero expresar mi agradecimiento al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión del proyecto CTQ2011-27560, a la Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència de la Generalitat Valenciana por los proyectos PROMETEO 2013/027 y ACOMP 2013/208 y a la Universitat Jaume I por la concesión de la beca predoctoral PREDOC/2011/10, la ayuda para la estancia E-2014-05 y la concesión del proyecto con código PI-1B-2011-37, mediante los cuales ha sido posible financiar el contenido de esta Tesis Doctoral.

Por supuesto, no pueden faltar mis compañeros de laboratorio junto a los cuales he compartido momentos de "sufrimiento" pero también de bromas y risas

durante todos estos años de tesis. A los que ya se han ido César, Jorge, Carme, Sandra y Julián todos habéis dejado una huella importante en mí. A Santi, uno de mis más importantes mentores, por su inestimable ayuda y motivación. A Rocío, por su gran energía y vitalidad, gracias por facilitarme el camino. A Conxín, por ser amiga, compi del laboratorio grande y por su gran corazón. A Ana M., por su sana locura y capacidad de transmitir su entusiasmo incluso en un mal día. A Raül, corrector ortográfico del grupo, por su humor y su disposición a ayudar. A Steven, por sus alocadas ideas y su peculiar perspectiva de ver la vida. A Laura, por su alegría, sus ganas de aprender y saber escuchar. A Ana T., por su simpatía y ganas de compartir siempre una sonrisa. A Rosa, con ella he compartido la tesis de principio a fin, amiga y confidente, gracias por compartir frustraciones, bromas, emociones... A todos los que han pasado por el grupo y a los compañeros de la planta 0, gracias por todos los momentos compartidos.

También quiero agradecer a mis amigos, Pau, Víctor, Tania y Alexis, su apoyo e interés por algo que, aunque no tengan muy claro de qué va, saben que es muy importante para mí y siempre puedo contar con ellos.

Me gustaría expresar un agradecimiento muy especial a mi familia, sobre todo a mis padres Esteban e Isabel, porque también habéis tenido que soportar mis neuras y mal humor cuando los experimentos no salían, por animarme y confiar en mí.

A Jordi, no tengo palabras para expresar lo mucho que me has ayudado y lo importante que eres para mí. A ti, quiero agradecerte tu apoyo, tu paciencia, tus agradables sorpresas para evadirme de la rutina, tu compostura al soportar todos mis males de cabeza, y que, a pesar de todo, sigues aquí. Mil gracias por estar siempre a mi lado.

Abreviaturas y acrónimos

ABC: <i>ATP-binding cassette.</i>	HTS: <i>High throughput screening.</i>
ACD: <i>alpha B-crystallin domain.</i>	IFN: Interferon.
Ac: Acetato.	IL: Interleucina.
ADMET: Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad.	IR: Infrarojo.
ADNc: ADN complementario.	lit.: Literatura.
Ang: Angiopietina.	m: Multiplete.
APC: <i>Antigen-presenting cells.</i>	Me: Metilo.
app: Señal con multiplicidad aparente.	MDR: <i>Multiple drug resistance.</i>
ARNm: ARN mensajero.	MEBM: <i>Mammary epithelial basal medium.</i>
ATP: Trifosfato de adenosina.	Met.: Método.
ATR: <i>Attenuated total reflection.</i>	MGA: <i>3-Methylglutamic acid.</i>
Bn: Bencilo.	MIC: <i>Minimum inhibitory concentration.</i>
Boc: <i>tert</i> -Butiloxicarbonilo.	M-MLV: <i>Moloney Murine Leukemia Virus.</i>
br: Banda o señal ancha.	MMPs: <i>Matrix metalloproteinases.</i>
Bz: Benzoílo.	MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
c: Cuadrupte.	MW: Microondas.
CDK: <i>Cyclin-dependent kinase.</i>	NRP: Neuropilina.
Comerc.: Comercialmente.	PBS: <i>Phosphate-buffered saline.</i>
Comp.: Compuesto.	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction.</i>
CRYAB: <i>alpha-crystallin B.</i>	PD-ECGF: <i>Platelet-derived endothelial cell growth factor.</i>
d: Doblete.	PDGFR: <i>Platelet-derived growth factor receptor.</i>
DBU: 1,8-Diazabicycloundeco-7-eno.	Ph: Fenilo.
DCC: Diciclohexilcarbodiimida.	PIGF: <i>Placental growth factor.</i>
DMAP: 4- <i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina.	pf: Punto de fusión.
DME: 1,2-Dimetoxietano.	QSAR: <i>Quantitative structure-activity relationship.</i>
DMEM: <i>Dulbecco's modified eagle's medium.</i>	Q-TOF: <i>Quadrupole-time of flight.</i>
DMSO: Dimetilsulfóxido.	RMN: Resonancia magnética nuclear.
dNTP: <i>Deoxyribonucleotide triphosphate.</i>	Rto.: Rendimiento.
dppf: [1,1'-bis(difenil-fosfina)ferroceno].	s: Singulete.
EGFR: <i>Epidermal growth factor receptor.</i>	S _N Ar: Sustitución nucleofílica aromática.
ELISA: <i>Enzyme linked-immuno-sorbent assay.</i>	t: Triplete.
eq: Equivalente.	<i>t</i> -Bu: <i>tert</i> -Butilo.
Et: Etilo.	TGF: <i>Transforming growth factor.</i>
FBS: <i>Fetal bovine serum.</i>	THF: Tetrahidrofurano.
FDA: <i>Food and drug administration.</i>	TLC: <i>Thin layer chromatography.</i>
FGF: <i>Fibroblast growth factor.</i>	TMB: Tetrametilbencidina.
GM-CSF: <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor.</i>	TMS: Tetrametilsilano.
HER-2: Receptor 2 del EGF humano.	TNBC: <i>Triple negative breast cancer.</i>
HIF-1: <i>Hypoxia-inducible factor-1.</i>	TNF: <i>Tumour necrosis factor.</i>
HR ESMS: <i>High resolution electrospray mass spectrometry.</i>	VEGF: <i>Vascular endothelial growth factor.</i>
hTERT: <i>Human telomeric end reverse transcriptase.</i>	VEGFR: <i>Vascular endothelial growth factor receptor.</i>
hTR: <i>Human telomerase RNA.</i>	

*“El aprendizaje es experiencia,
todo lo demás es información”*

Albert Einstein

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. QUÍMICA MÉDICA	1
1.2. CÁNCER	5
1.2.1. Definición y origen	5
1.2.2. Patogenia del cáncer	6
1.2.3. Ciclo celular y cáncer	10
1.2.4. Tratamiento	14
1.2.5. Resistencia a fármacos	15
1.3. FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	18
1.3.1. Agentes que actúan sobre el ADN	18
1.3.1.1. Alquilantes de ADN	19
1.3.1.2. Antimetabolitos	22
1.3.1.3. Antibióticos antitumorales	25
1.3.1.4. Inhibidores de topoisomerasas	28
1.3.2. Agentes que actúan sobre la mitosis celular	30
1.3.3. Terapia hormonal	32
1.3.4. Inhibidores de quinasas	34
1.3.5. Inmunoterapia	38
1.4. ANGIOGÉNESIS	40
1.4.1. Angiogénesis tumoral	41
1.4.2. Activación de la angiogénesis	42
1.4.3. VEGF	44
1.4.4. Inhibidores de la angiogénesis	47
1.5. TELOMERASA	50
1.5.1. Telomerasa y cáncer	53
1.5.2. Inhibidores de la telomerasa	54

1.6. HONOKIOL Y OTROS PRODUCTOS NATURALES	59
2. OBJETIVOS	65
2.1. DERIVADOS DE HONOKIOL	65
2.2. DERIVADOS DEL ÁCIDO 3-METILGLUTÁMICO	66
3. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE HONOKIOL.....	69
3.1. SÍNTESIS DE BIFENILOS	69
3.1.1. Síntesis de aliloxi- e (hidroxi)alil-bifenilos	69
3.1.2. Síntesis de dihidroxi- e (hidroxi)metoxi-bifenilos	71
3.1.3. Síntesis de dimetoxi-, trimetoxi- y (dimetoxi)hidroxi-bifenilos	75
3.1.4. Síntesis de dialiloxi- y (metoxi)aliloxi-bifenilos	76
3.1.5. Reacciones de tranposición de Claisen sobre aliloxi-bifenilos	78
3.1.6. Síntesis de amino- e (hidroxi)amino-bifenilos	81
3.1.7. Síntesis de (dimetoxi)amino-bifenilos	83
3.2. SÍNTESIS DE ARILPIRIDINAS Y ARILPYRIMIDINAS	85
3.3. SÍNTESIS DE <i>N</i> -ARILMORFOLINAS, <i>N</i> -ARILPIPERIDINAS Y <i>N</i> -ARILPIRROLIDINAS.....	87
3.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	92
3.4.1. Técnicas generales	92
3.4.2. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método A	93
3.4.3. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método B	94
3.4.4. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método C	95
3.4.5. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método D	111
3.4.6. Procedimiento general para la reacción de alilación	113
3.4.7. Procedimiento general de transposición Claisen con Et ₂ AlCl.....	123
3.4.8. Procedimiento general de aminación en MW.....	132
3.4.9. Procedimiento general de amidación.....	134
4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE HONOKIOL	137
4.1. INTRODUCCIÓN	137

4.1.1. Cálculo del IC ₅₀ : citotoxicidad	138
4.1.2. Ensayo ELISA: medición de la secreción de VEGFA-165	139
4.1.3. Ensayo de la PCR: medición de la expresión génica de <i>VEGF</i> , <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	141
4.1.4. Ensayo de tubulogénesis: capacidad de inhibición de la diferenciación celular endotelial	146
4.1.5. Ensayo de la herida: medición del grado de migración celular	147
4.2. FAMILIA 1: DERIVADOS MONOOXIGENADOS	149
4.2.1. Actividad citotóxica	149
4.2.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen <i>VEGF</i>	151
4.2.3. Ensayo de tubulogénesis	152
4.2.4. Inhibición de la expresión de los genes <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	156
4.3. FAMILIA 2: DERIVADOS DIHIDROXILADOS, (METOXI)- HIDROXILADOS, DIMETOXILADOS, TRIMETOXILADOS Y (DIMETOXI)HIDROXILADOS	157
4.3.1. Actividad citotóxica	157
4.3.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen <i>VEGF</i>	161
4.3.3. Inhibición de la expresión de los genes <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	165
4.4. FAMILIA 3: DERIVADOS ALILADOS Y TRANSPUESTOS	169
4.4.1. Actividad citotóxica	169
4.4.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen <i>VEGF</i>	174
4.4.3. Inhibición de la expresión de los genes <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	178
4.5. FAMILIA 4: DERIVADOS AMINADOS	182
4.5.1. Actividad citotóxica	182
4.5.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen <i>VEGF</i>	185
4.5.3. Inhibición de la expresión de los genes <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	188
4.6. FAMILIA 5: DERIVADOS DE ARILPIRIDINAS Y ARILPIRIMIDINAS	191

4.6.1. Actividad citotóxica	191
4.6.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen <i>VEGF</i>	194
4.6.3. Ensayo de la herida.....	197
4.6.4. Inhibición de la expresión de los genes <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	201
4.7. FAMILIA 6: DERIVADOS DE <i>N</i> -ARILMORFOLINAS, <i>N</i> -ARILPIPERIDINAS Y <i>N</i> -ARILPIRROLIDINAS	204
4.7.1. Actividad citotóxica	204
4.7.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen <i>VEGF</i>	206
4.7.3. Inhibición de la expresión de los genes <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	210
4.8. CONCLUSIONES	213
4.9. PARTE EXPERIMENTAL	218
4.9.1. Cultivos celulares	218
4.9.2. Ensayos de citotoxicidad	218
4.9.3. Ensayo ELISA para determinar la producción de VEGFA-165	219
4.9.4. Ensayo de tubulogénesis.....	220
4.9.5. Determinación de la expresión génica de <i>VEGF</i> , <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i> mediante qPCR.....	220
4.9.6. Ensayo de la herida.....	221
5. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DEL ÁCIDO 3-METILGLUTÁMICO	223
5.1. INTRODUCCIÓN.....	223
5.1.1. Cáncer de mama triple negativo (TNBC)	223
5.1.2. Diana biológica: Interacción α B-crystallin-VEGF-165	224
5.1.3. Antecedentes	225
5.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL MGA.....	227
5.2.1. Síntesis de intermedios	228
5.2.2. Síntesis de productos finales.....	229
5.3. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y PROLIFERACIÓN CELULAR.....	231

5.4. CONCLUSIONES	236
5.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	237
5.5.1. Técnicas generales	237
5.5.2. Procedimientos sintéticos.....	237
5.5.3. Ensayos biológicos.....	252
6. SUMMARY OF THE THESIS	257
6.1. INTRODUCTION	257
6.1.1. Cancer	257
6.1.2. Angiogenesis.....	258
6.1.3. Telomerase	260
6.1.4. Honokiol	262
6.1.5. Triple negative breast cancer (TNBC)	263
6.2. OBJECTIVES	265
6.3. SYNTHESIS	266
6.3.1. Honokiol analogues.....	266
6.3.2. 3-Methylglutamic acid analogues	270
6.4. BIOLOGICAL EVALUATION.....	273
6.4.1. Cytotoxicity, VEGF protein secretion and <i>VEGF</i> , <i>hTERT</i> and <i>c-Myc</i> gene expressions of honokiol analogues.....	273
6.4.2. Cytotoxicity of MGA analogues.....	281
6.5. DISCUSSION	283
6.5.1. Honokiol analogues.....	283
6.5.2. MGA analogues	286
7. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL	287
7.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS	287
7.2. PUBLICACIONES EN REVISTAS	288
8. ESPECTROS SELECCIONADOS.....	289

1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. QUÍMICA MÉDICA

El origen de la química médica se encuentra en la obtención de productos medicinales a partir de fuentes de origen natural, mayoritariamente plantas. El desarrollo de la química orgánica sintética y de la farmacología sentó las bases científicas de la química médica, que en la actualidad es una rama de la química encargada del descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos a nivel molecular.¹

Un fármaco, o principio activo, se define como una sustancia pura, químicamente definida, extraída de fuentes naturales o sintetizada en el laboratorio y dotada de una respuesta biológica que puede ser aprovechada por sus efectos terapéuticos.² Cuando un fármaco produce un efecto en el organismo se debe a la unión que tiene dicho fármaco con su diana terapéutica.³ Existen diferentes tipos de dianas pero las más comunes son los ácidos nucleicos (ADN o ARN) y sobre todo las de tipo proteico, tales como enzimas, receptores, proteínas transportadoras, canales iónicos, etc.

El área de la diana donde se produce la interacción con el fármaco se conoce como sitio de unión. El fármaco se enlaza al sitio de unión mediante formación de enlaces covalentes⁴ y/o mediante enlaces intermoleculares más débiles que aquéllos, como son los enlaces de hidrógeno o las fuerzas de van der Waals. La interacción fármaco-diana que se establece mediante este segundo tipo de fuerzas los mantiene unidos el tiempo necesario para que se

¹ Timmerman, H. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier. **2013**.

² Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. McGraw - Hill - Interamericana de España. **1993**.

³ Graham, L. P. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th ed. Oxford University Press. **2009**.

⁴ Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. *Nature Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 307-317.

produzca el efecto biológico del fármaco. Al mismo tiempo, la unión mediante este tipo de enlaces no covalentes es lo suficientemente débil como para permitir la liberación del fármaco una vez realizada su función.

Hay dos factores que deben ser considerados al diseñar un nuevo fármaco. Por un lado, hay que determinar el curso temporal de las concentraciones del fármaco en el organismo (farmacocinética) y por otro, hay que tener en cuenta el mecanismo de acción del fármaco y los efectos bioquímicos y fisiológicos que aquél produce (farmacodinamia).

Muy a menudo, a partir de la estructura de un principio activo, o compuesto patrón, se preparan un gran número de análogos con el fin de investigar su actividad farmacológica o biológica.⁵ El proceso de optimización del compuesto patrón mediante la preparación de análogos está basado en una serie de parámetros que se pueden englobar dentro de “la regla del cinco” de Lipinski.⁶ Esta regla, descrita en 1997, trata de predecir la biodisponibilidad de un candidato a fármaco basándose en los siguientes criterios:

- El compuesto debe poseer un peso molecular menor de 500.
- El coeficiente de reparto log P (logaritmo del coeficiente de partición entre el agua y el 1-octanol) debe ser menor de 5.
- El número de grupos donadores de enlaces de hidrógeno del compuesto tiene que ser menor de 5.
- El compuesto debe presentar menos de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno.

En la actualidad también se predicen las características biológicas de un compuesto o farmacóforo mediante las propiedades ADMET.⁷ Los parámetros que definen este concepto son: absorción, distribución, metabolismo,

⁵ Wess, G.; Urmann, M.; Sickenberger, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3341-3350.

⁶ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 23, 3-25.

⁷ Norinder, U.; Bergstroem, C. A. S. *Chem. Med. Chem.* **2006**, 1, 920-937.

eliminación/excreción y toxicidad, los cuales están directamente relacionados con la selectividad y la actividad biológica. La optimización farmacológica de un compuesto, o de sus análogos, mediante el uso de técnicas *in silico* como la Química Computacional, técnicas de estructura-actividad (QSAR) o escaneado de alto rendimiento (HTS o *High Throughput Screening*), ha adquirido un notable auge en los últimos años debido a su alta capacidad de predicción y al ahorro económico que supone su utilización.

Un modelo a seguir para el descubrimiento de un fármaco sería el que se muestra en la figura 1.1. Así, a partir de una diana biológica y a través de programas HTS se descubren *hits* o compuestos patrón, los cuales son optimizados para dar lugar a posibles candidatos. Estos candidatos son ensayados *in vitro* e *in vivo* para determinar su actividad biológica en la diana estudiada.

Figura 1.1. Etapas del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos.

Una de las fases necesarias para el desarrollo de un fármaco es el desarrollo preclínico y clínico. En el desarrollo preclínico se realizan ensayos *in vitro* e *in vivo* tales como pruebas de toxicidad, análisis farmacocinético y formulación.

Los ensayos clínicos tienen la función de examinar la eficacia y la seguridad de un fármaco experimental antes de su comercialización a través de tres fases.

En la fase I se administra el fármaco a un grupo reducido de voluntarios sanos para evaluar su toxicidad.

En la fase II se valora la eficacia del compuesto sobre un grupo reducido de pacientes y se determina la dosis adecuada que disminuya los efectos secundarios y mantenga la eficacia.

Finalmente, en la fase III se llevan a cabo estudios similares a los de la fase II aunque en poblaciones numerosas.

En algunos casos se pueden detectar efectos adversos después de la aprobación del medicamento. Por ello, existe una fase IV de vigilancia que puede implicar desde un reajuste de la dosis del medicamento hasta incluso su retirada del mercado, en caso necesario.^{8,9}

⁸ Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. *Pharmacology*, 7th ed. Elsevier. **2012**.

⁹ Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, 6th ed. Editorial Reverté. **2007**.

1.2. CÁNCER

1.2.1. Definición y origen

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados y la tercera en países en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2012 se produjeron 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer y se detectaron 14 millones de nuevos casos.¹⁰

El cáncer no es una única enfermedad sino un término amplio que abarca a más de 200 enfermedades diferentes que se caracterizan por el crecimiento y la proliferación incontrolada de células mutadas que pueden colonizar tejidos u órganos alejados del foco de origen.¹¹

En la figura 1.2 se muestra el porcentaje de incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en el año 2012 de la población mundial. Entre los distintos tipos de cáncer destacan, por su elevado nivel de incidencia, el de colon, pulmón, mama y próstata.

Figura 1.2. Epidemiología mundial del cáncer en 2012.¹²

¹⁰ World Health Organization (WHO). <http://www.who.int>

¹¹ Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. *GLOBOCAN, 2012*, v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

¹² Sociedad Española de Oncología Médica. <http://www.seom.org>

Según la teoría monoclonal del cáncer, esta enfermedad se origina a partir de una célula que sufre una serie de mutaciones que la convierten en cancerosa.¹³ Las causas del cáncer son muy variadas y dependen de diversos factores de riesgo tales como el tabaquismo, las dietas poco saludables, las radiaciones (rayos X, rayos UV...), los virus y las bacterias, la inmunodeficiencia, los agentes carcinogénicos, etc.^{3,14}

Existen dos categorías de modificación genética que pueden iniciar el cáncer:⁸

- **Inactivación de los genes supresores de tumores.** Las células no tumorales contienen genes con la capacidad de suprimir posibles mutaciones. Un ejemplo de este tipo de gen es el *p53*, encargado de reparar el ADN y restaurar el ciclo celular o inducir la apoptosis de la célula en caso de su imposible reparación.¹⁵ La pérdida de función de los genes supresores de tumores puede dar lugar a la aparición de la enfermedad cancerosa.
- **Activación de protooncogenes a oncogenes.** Los protooncogenes son genes que normalmente controlan la división celular, la apoptosis y la diferenciación. Esta clase de genes se pueden convertir en oncogenes debido a un cambio en su expresión o en la secuencia de codificación, induciendo así la transformación maligna de las células.

1.2.2. Patogenia del cáncer

El desarrollo del cáncer se inicia con la aparición de una alteración genética en una célula que provoca la anormal proliferación de células mutadas cuyo resultado es la formación de un tumor o neoplasia. Existen dos tipos de tumores: benignos (adenoma o pólipo) o malignos (neoplasia

¹³ Nowell, P. C. *Science* **1976**, *194*, 23-28.

¹⁴ a) American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures*, 3rd ed. **2015**. b) Cancer Research UK. <http://www.cancerresearchuk.org>

¹⁵ Wiesmueller, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, X1768-X1770.

maligna). El tumor benigno permanece confinado en su posición original sin invadir los tejidos adyacentes. El tumor maligno o cáncer, que se define como invasivo, penetra en los tejidos del contorno y se propaga a través del sistema circulatorio o linfático a otras zonas del organismo. A este proceso se le conoce con el término de metástasis.¹⁶ En la figura 1.3 se representan las diferentes fases mediante las cuales el tumor maligno experimenta el proceso de metástasis.

Figura 1.3. Progresión del tumor y proceso de metástasis.¹⁷

La metástasis a través de los vasos sanguíneos se produce generalmente en zonas del organismo fuertemente vascularizadas, tales como pulmón, hígado o cerebro. No todas las células que traspasan la membrana basal sobreviven para formar metástasis ya que algunas son eliminadas por el

¹⁶ Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates. **2000**.

¹⁷ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York, NY, USA: Garland Sciences. **2002**.

sistema inmunológico. Las células cancerosas que logran superar las barreras inmunitarias viajan por el torrente sanguíneo a través de los capilares, se adhieren a la pared del vaso sanguíneo, la penetran (extravasación) e invaden el nuevo órgano formando un tumor secundario. La metástasis es la principal causa de mortalidad en la mayoría de los cánceres y constituye un grave problema en el tratamiento antineoplásico.

Según el tamaño del tumor y la diseminación del cáncer se pueden diferenciar diferentes grados o estadios, los cuales describen la gravedad de la enfermedad y ayudan a calcular el pronóstico de un paciente.¹⁸ Los distintos estadios se muestran en la siguiente figura:

Figura 1.4. Estadios del desarrollo de un tumor.

Las células tumorales presentan un conjunto de características que las diferencian de las células no tumorales.⁸ En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron en un artículo titulado *The hallmarks of cancer* seis características comunes a todos los procesos cancerosos, las cuales se indican a continuación.¹⁹

¹⁸ National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov>.

¹⁹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, 100, 57-70.

- 1) Inducción de señales estimuladoras del crecimiento mediante la activación de oncogenes como *Ras* o *Myc* y de factores de crecimiento.
- 2) Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, muchas de las cuales son dependientes de la acción de genes supresores de tumores.
- 3) Resistencia a la apoptosis a través de la inactivación de factores proapoptóticos o de la activación de factores antiapoptóticos.
- 4) Potencial replicativo ilimitado o inmortalidad celular, que es consecuencia de la sobreexpresión de la telomerasa, enzima que mantiene y estabiliza los telómeros.
- 5) Activación de la angiogénesis con el fin de conseguir los nutrientes y el oxígeno necesarios para el crecimiento del tumor.
- 6) Elevada capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis.

En una revisión posterior, publicada en el año 2011, Hanahan y Weinberg añadieron otras cuatro nuevas características a las seis anteriores, las cuales se indican a continuación:²⁰

- 7) Evasión del sistema inmunológico por el ataque de linfocitos T, linfocitos B, macrófagos o células NK (*Natural Killer*).
- 8) Desarrollo de inestabilidad genómica que conduce a la generación de mutaciones en células tumorales.
- 9) Modificación o reprogramación del metabolismo energético tumoral para mantener el crecimiento y la proliferación celular.
- 10) Inflamación para estimular la progresión del tumor.

²⁰ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.

Las diez señales de identidad del cáncer se representan de forma esquemática en la siguiente figura.

Figura 1.5. Señales de identidad del cáncer.

1.2.3. Ciclo celular y cáncer

El ciclo celular es un proceso ordenado y altamente regulado que permite a las células su crecimiento y división para formar dos células hijas. Dentro de este proceso se encuentran cuatro fases diferentes con múltiples controles internos (*checkpoints*) encargados de evaluar las señales de crecimiento extracelular, el tamaño de la célula y la integridad del ADN.²¹

Existen dos periodos bien diferenciados en el ciclo celular eucariota, la interfase que engloba las fases G₁, S y G₂, en las cuales la célula crece y replica su ADN, y la división celular que tiene lugar en la fase M, la cual a su vez comprende la fase de mitosis y la de citocinesis.

²¹ Park, M.-T.; Lee, S.-J. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, 36, 60-65.

Figura 1.6. Esquema del ciclo celular eucariota.²²

El ciclo celular comienza en la etapa G_1 (*gap 1*) en la cual se produce la síntesis de proteínas y ARN, lo que conlleva un incremento del tamaño celular.

La siguiente etapa es la S (síntesis) en la que se forman dos cromátidas idénticas por duplicación del ADN.

La fase G_2 (*gap 2*) es la última etapa de la interfase. Transcurre entre la duplicación del ADN y el inicio de la mitosis y se caracteriza por el crecimiento celular y la adquisición de ATP que se empleará en el proceso de mitosis.

El ciclo termina con la fase M, dónde se produce la mitosis o reparto del material genético nuclear (separación de las cromátidas) y la citocinesis o división del citoplasma.²³

La mitosis a su vez se divide en cinco etapas: profase, prometáfase, metafase, anafase y telófase, tal y como se muestra en la figura 1.7:

²² <http://www.bdbiosciences.com/br/research/apoptosis/analysis/index.jsp>

²³ http://www.biologia.edu.ar/cel_euca/ciclo.htm

Figura 1.7. Fases de la mitosis de una célula eucariota.²⁴

En la profase la cromatina sufre una progresiva condensación mediante la cual los cromosomas van individualizándose y diferenciándose dentro del núcleo celular. Al mismo tiempo, en el citoplasma se van organizando los centrosomas, llamados áster en esta etapa, que se sitúan en polos opuestos y son los puntos de crecimiento de los microtúbulos.

En la prometafase los microtúbulos se unen a los cinetocoros de las regiones centroméricas de los cromosomas y forman el huso mitótico. La membrana nuclear desaparece.

En la metafase se produce el desplazamiento de los cromosomas debido a fuerzas de tensión que experimentan los microtúbulos. Al final de esta fase, las cromátidas hermanas se sitúan en el plano ecuatorial de la célula orientadas hacia polos opuestos.

²⁴ <http://fhs-bio-wiki.pbworks.com/w/page/12145788/Mitosis>

En la anafase cada cinetocoro hermano es arrastrado hacia un polo distinto de la célula, produciéndose la división del cromosoma y la migración de cada cromátida hacia polos opuestos.

En la telofase la cromatina empieza a descondensarse y la membrana nuclear vuelve a reconstruirse para dar lugar a dos núcleos hijos.

La ausencia de factores de señalización mitogénicos provoca el cese de la proliferación celular y las células entran en un estado de reposo que se conoce como G_0 . Las neuronas son una clase de células que se encuentran permanentemente en este periodo de no proliferación.

Dentro del ciclo celular existen unos puntos o mecanismos de control que pueden detenerlo si las condiciones para la división no son las adecuadas. Existen tres controles internos en el ciclo, el primero se encuentra en la etapa G_1 y se conoce como punto de restricción o de inicio, el segundo es un control intermedio situado al final de la etapa G_2 y el tercero es el punto de chequeo de la metafase o del huso mitótico.

La regulación del ciclo celular a través de los puntos de control se lleva a cabo mediante proteínas reguladoras que monitorizan la progresión del ciclo. Estas proteínas, denominadas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*), son capaces de reconocer los defectos surgidos en la replicación del ADN o en la escisión del cromosoma provocando la detención del ciclo celular hasta la reparación de los fallos. Las CDKs pertenecen a una familia de serina/treonina quinasas que se unen a las ciclinas activando el complejo CDK-ciclina en diferentes fases del ciclo. Estos complejos activan distintas cascadas de señalización promoviendo la progresión del ciclo celular. La inhibición de las CDKs provoca la parálisis del ciclo y, por tanto, impide la división de la célula.²⁵

²⁵ a) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell*, 5th ed. New York: Garland Science **2007**. b) Malumbres, M.; Barbacid, M. *Nature Rev. Cancer* **2009**, 9, 153-166. c) Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. *Cell Prolif.* **2003**, 36, 131-149.

El cáncer ha sido considerado como una enfermedad dependiente del ciclo celular, ya que la desregulación del ciclo es una de las alteraciones más frecuentes durante el desarrollo del tumor. La sobreexpresión o activación de factores reguladores que activan el ciclo o la supresión de reguladores negativos es uno de los elementos que originan el cáncer.²¹

1.2.4. Tratamiento

Los tratamientos más habituales y extendidos contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, que pueden utilizarse tanto por separado como combinados.¹⁸

La falta de selectividad y especificidad hacia las células cancerosas, la aparición de resistencias a los fármacos y la incapacidad de los compuestos de penetrar tumores sólidos agresivos son los mayores problemas de la quimioterapia. Estos inconvenientes explican la constante búsqueda de nuevos fármacos antitumorales que sean capaces de evitar las deficiencias arriba mencionadas.²⁶

La combinación de fármacos antitumorales con mecanismos de acción diferentes permite aumentar la eficiencia de dichos fármacos usados por separado.³ En los tratamientos de quimioterapia se pueden distinguir dos tipos de fármacos antineoplásicos:

- Los **tradicionales**, que son generalmente citotóxicos y funcionan interaccionando con el ADN, ya sea directamente sobre éste o indirectamente por inhibición de enzimas presentes en la síntesis del ácido nucleico.
- Los **selectivos**, que se pueden clasificar como tratamientos dirigidos a dianas moleculares específicas que son anómalas o se encuentran sobreexpresadas en células tumorales. Dentro de este grupo se

²⁶ Panchal, R. G. *Biochem. Pharm.* **1998**, 55, 247-252.

engloba la terapia hormonal, la terapia dirigida (vías de señalización o proteínas estructurales) y la inmunoterapia o terapia biológica.

1.2.5. Resistencia a fármacos

La aparición de resistencia celular a fármacos es una cuestión esencial en la quimioterapia del cáncer. Existen diversas vías por las que el organismo puede crear resistencia a un fármaco antitumoral.⁸

- La **resistencia intrínseca** se produce cuando, desde el inicio del tratamiento, el tumor muestra poca respuesta al agente antineoplásico. Este tipo de resistencia está ligada con la inestabilidad genómica y puede venir dada por la mutación del gen supresor de tumores *p53*. La pérdida de la función de este gen genera resistencia a una amplia gama de fármacos antineoplásicos y también a la radioterapia.
- La **resistencia adquirida** es aquella en la que un tumor, inicialmente susceptible a un fármaco, se vuelve resistente tras su exposición a dicho fármaco. Esta resistencia suele venir provocada por una mutación en las células cancerosas que las transforma en células resistentes. Existen diversos mecanismos que explican este tipo de resistencias. Por ejemplo, una elevada expresión y actividad de las proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*), de las enzimas reparadoras de ADN o de los elementos de señalización del factor de crecimiento. Otros mecanismos de resistencia son la sobreexpresión de la diana, la inactivación del fármaco o la reducción de la cantidad de fármaco que capta la célula.²⁷ La mutación que confiere resistencia puede ser específica para un sólo fármaco mediante un cambio genético en una determinada célula tumoral impidiendo la activación o unión del fármaco a su diana, pero también puede producirse una

²⁷ a) Mimeault, M.; Hauke, R.; Batra, S. K. *Clin Pharmacol Ther.* **2008**, 83, 673-691. b) Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 275-284.

resistencia múltiple a fármacos (MDR) debida a una elevada expresión del gen *MDR1*, que codifica la glicoproteína P. Este último es uno de los mecanismos de resistencia más utilizados por las células y que genera más problemas en el tratamiento de tumores.²⁸

La glicoproteína P es una proteína transportadora que forma parte del complejo ABC y está presente en la superficie celular. Normalmente, se encarga de la expulsión de toxinas en células no tumorales. Sin embargo, en células mutadas está sobreexpresada y se encarga de la expulsión de una gran variedad de moléculas. Así, tras la exposición a un fármaco, las células resistentes por sobreexpresión de la glicoproteína P adquieren resistencia cruzada a otros fármacos con estructura y función diferente al fármaco original, poniendo en grave peligro el éxito del tratamiento oncológico.³

Se han desarrollado diferentes estrategias a fin de evitar el fenómeno de la resistencia a fármacos. Una de ellas es la inhibición de la glicoproteína P. Como inhibidores de primera y segunda generación destacan el verapamilo y la ciclosporina A. Estos compuestos interaccionan con la glicoproteína P actuando como inhibidores competitivos, aunque no son suficientemente selectivos y potentes. Actualmente se han desarrollado inhibidores de tercera generación como el tariquidar, biricodar o elacridar.²⁹

En la figura 1.8 se representa esquemáticamente el modo de acción de la glicoproteína P y la estrategia para su inhibición. La glicoproteína P es una bomba de extrusión dependiente de ATP. El consumo de energía suministrada por el ATP provoca un cambio conformacional que conduce a la expulsión del fármaco. Los inhibidores de la glicoproteína P evitan dicha expulsión bloqueando la salida de la proteína transportadora.

²⁸ Katzung, B. G.; Masters, S. B.; Trevor, A. J. Farmacología básica y clínica. *McGraw-Hill Interamericana Editores* **2009**.

²⁹ a) Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 48-58. b) Ozben, T. *FEBS Lett.* **2006**, 580, 2903-2909.

Figura 1.8. Mecanismo de acción de la glicoproteína P y estrategia de inhibición.³⁰

³⁰ <http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/Antineoplastics/GeneralConcepts/MDR.html>.

1.3. FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Los medicamentos antineoplásicos se pueden agrupar según su mecanismo de acción o su diana biológica. A continuación se muestra una clasificación de los fármacos más destacados en este campo en función de su mecanismo de acción.^{3,31}

Figura 1.9. Mecanismo de acción de fármacos antineoplásicos.³²

1.3.1. Agentes que actúan sobre el ADN

Las células tumorales suelen presentar dos características que las hacen vulnerables a los agentes que actúan sobre el ADN. Una de ellas es su capacidad de replicación ilimitada y la otra la inhibición de los sistemas de reparación del ácido nucleico.⁹ A continuación, se indican los agentes antitumorales que tienen el ADN como diana terapéutica.

³¹ a) Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. Academic Press (Elsevier), 3rd edition. **2008**. b) Espinosa, E.; Zamora, P.; Feliu, J.; González, M. *Cancer Treat. Rev.* **2003**, 29, 515-523.

³² <http://es.slideshare.net/slayerail/tema-27-anticancerososbis>.

1.3.1.1. Alquilantes de ADN

Los agentes alquilantes del ADN son compuestos altamente electrofílicos que atacan a esta biomolécula impidiendo su replicación y provocando, en consecuencia, la muerte celular. Son compuestos altamente citotóxicos pero poseen baja selectividad. Así, actúan sobre las células tumorales que se dividen a mayor velocidad que las no tumorales, pero también son capaces de alquilar el ADN de estas últimas, o incluso atacar a grupos nucleofílicos de proteínas, provocando graves efectos secundarios.³³

- **Mostazas nitrogenadas.** Surgieron de la sustitución de un átomo de azufre por uno de nitrógeno en el letal gas mostaza. Algunas de las mostazas más relevantes utilizadas aún como terapia contra el cáncer se indican en la figura 1.10.

Figura 1.10. Estructuras de mostazas nitrogenadas antitumorales.

Entre estos compuestos destaca la ciclofosfamida, profármaco que se metaboliza en el hígado mediante oxigenasas dependientes del citocromo P450 para formar una fosforamida, que es el agente alquilante del ADN.

³³ Warwick, J. P. *Cancer Res.* **1963**, 23, 1315-1333.

Esquema 1.1. Generación de la mostaza fosforamida a partir de la ciclofosfamida.

La ciclofosfamida se utiliza, en combinación con otros agentes, en el tratamiento de linfomas de Burkitt, enfermedad de Hodgkin, leucemias agudas y crónicas linfoblásticas, leucemias no linfoblásticas, mieloma múltiple, carcinoma de mama, ovario, pulmón y sarcoma.³⁴

- **Nitrosoureas.** Son capaces de traspasar la membrana hematoencefálica por ser compuestos lipofílicos, por lo que son usados en el tratamiento de tumores cerebrales. Los compuestos a destacar en esta familia son la carmustina y la lomustina.³⁵

Figura 1.11. Ejemplos de nitrosoureas antineoplásicas.

- **Platinos.** Son complejos de platino con ligandos que pueden ser desplazados por nucleófilos formando enlaces covalentes, generalmente con ácidos nucleicos. El primer antitumoral derivado del platino fue el cisplatino que presenta una actividad importante contra el cáncer testicular, linfoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello,

³⁴ Kufe, D. W.; Pollock, R. E.; Weichselbaum, R. R. et al. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th ed. Hamilton (ON): BC Decker. **2003**.

³⁵ a) Levin, V.A.; Hoffman, W.; Weinkam, R. J. *Cancer Treat Rep.* **1978**, 62, 1305-1312. b) Johnston, T. P.; McCaleb, G. S.; Clayton, S. D.; Frye, J. L.; Krauth, C. A.; Montgomery, J. A. *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 279-290.

cáncer de ovario y cáncer de vejiga.³⁶ Otros derivados menos tóxicos y con menores efectos secundarios son el carboplatino y el oxaliplatino, este último utilizado cuando aparece resistencia al cisplatino y al carboplatino.³⁷

Figura 1.12. Complejos de platino con actividad antitumoral.

- **Otros tipos estructurales.** El busulfán se utiliza en la leucemia granulocítica crónica. La dacarbacina se emplea en el tratamiento del linfoma de Hodgkin y del melanoma y en el sarcoma de tejidos blancos. La procarbacina inhibe la síntesis de ADN y ARN y se utiliza, principalmente, para tratar la enfermedad de Hodgkin. La temozolomida presenta gran aplicación en el cáncer cerebral.³⁸

³⁶ a) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature* **1969**, 222, 385-386. b) Higby, D. J.; Wallace, H. J. Jr.; Albert, D. J.; Holland, J. F. *Cancer* **1974**, 33, 1219-1225. c) Forastiere, A. A. *Semin. Oncol.* **1994**, 21, 20-27.

³⁷ a) Fujiwara, K.; Markman, M.; Morgan, M.; Coleman, R. L. *Gynecol. Oncol.* **2005**, 97, 10-15. b) Stewart, D.J. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2007**, 63, 12-31. c) Noordhuis, P.; Laan, A. C.; van de Born, K.; Losekoot, N.; Kathmann, I.; Peters, G. *J. Biochem. Pharmacol.* **2008**, 76, 53-61.

³⁸ a) Ehrsson, H.; Hassan, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1984**, 36, 694-696. b) Chand, V. K.; Link, B. K.; Ritchie, J. M.; Shannon, M.; Wooldridge, J. E. *Leuk. Lymphoma* **2006**, 47, 657-663. c) Chaar, B. T.; Salem, P.; Petruska, P. J. *Leuk. Lymphoma* **2006**, 47, 637-640. d) Larkin, J. M. G.; Hughes, S. A.; Beirne, D. A.; Patel, P. M.; Gibbens, I. M.; Bate, S. C.; Thomas, K.; Eisen, T. G.; Gore, M. E. *Brit. J. Cancer* **2007**, 96, 44-48.

Figura 1.13. Estructuras de otros agentes alquilantes de ADN.

1.3.1.2. Antimetabolitos

La mayoría de los antimetabolitos son específicos del ciclo celular y actúan en la fase S (síntesis ADN). Generalmente, presentan una estructura similar a un nucleósido, por lo que se incorporan al ADN produciendo errores en los procesos de duplicación y transcripción que acaban provocando la apoptosis. Otros antimetabolitos actúan inhibiendo las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos nucleicos. Los principales antimetabolitos empleados en tratamientos oncológicos se indican a continuación.

- **Antagonistas del ácido fólico.** Son compuestos que inhiben la acción enzimática en la vía del ácido fólico. El metotrexato es el antimetabolito más extendido en quimioterapia e inhibe la enzima dihidrofolato-reductasa. Esta enzima interviene en la transformación de la forma inactiva del ácido fólico a la activa, necesaria para la producción de nucleótidos. El metotrexato se emplea en el tratamiento del linfoma no-Hodking, leucemia linfoblástica aguda, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de pulmón.³⁹ Un análogo del

³⁹ a) Berd, D.; Cornog, J.; DeConti, R. C.; Levitt, M.; Bertino, J. R. *Cancer* **1975**, 35, 1050-1054. b) Harris, R.E.; McCallister, J. A.; Provisor, D. S.; Weetman, R. M.; Baehner, R. L. *Cancer* **1980**, 46, 2004-2008. c) Colleoni, M.; Rocca, A.; Sandri, M. T.; Zorzino, L.; Masci, G.; Nolè, F.;

metotrexato es el raltitrexed, que inhibibe la timidilato-sintetasa, otra enzima fundamental para la síntesis de ADN. Se usa mayoritariamente en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado.⁴⁰

Figura 1.14. Antagonistas del ácido fólico.

- **Análogos de las bases púricas.** Las purinas son sustancias químicas utilizadas por las células para fabricar ADN y ARN. La 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina son moléculas cuya estructura es similar a la de las purinas naturales. Sustituyen a las verdaderas purinas, inhibiendo una o más enzimas necesarias en la síntesis de los ácidos nucleicos e interrumpiendo la división celular. Se emplean en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda infantil.⁴¹ Otros derivados de las purinas son la fludarabina, la cladribina y la clofarabina, utilizadas para combatir ciertas leucemias.⁴²

Peruzzotti, G.; Robertson, C.; Orlando, L.; Cinieri, S.; Viale, G.; Goldhirsch, A. *Ann Oncol.* **2002**, *13*, 73-80. d) Cadman, E.; Heimer, R.; Davis, L. *Science* **1979**, *205*, 1135-1137. e) Browman, G. P.; Levine, M. N.; Goodyear, M. D.; Russell, R.; Archibald, S. D.; Jackson, B. S.; Young, J. E. M.; Basrur, V.; Johanson, C. *J. Clin. Oncol.* **1988**, *6*, 963-968. f) Sorensen, J. B.; Hansen, H. H. *Cancer Surv.* **1989**, *8*, 671-679.

⁴⁰ a) Cocconi, G.; Cunningham, D.; Van Cutsem, E.; Francois, E.; Gustavsson, B.; van Hazel, G.; Kerr, D.; Possinger, K.; Hietschold, S. M. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 2943-2952. b) Hind, D.; Tappenden, P. Tumor, I.; Egginton, S.; Sutcliffe, P.; *Health Technol. Assess.* **2008**, *12*, 1-182.

⁴¹ a) Elion, G. B. *Science* **1989**, *244*, 41-47. b) Parker, W. B. *Chem Rev.* **2009**, *109*, 2880-2893. c) Stone, T.; Darlington, G. *Pills, Potions and Poisons: How drugs work*. Oxford University Press. **2000**.

⁴² a) Gandhi, V.; Plunkett, W. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41*, 93-103. b) Parker, W. B.; Shaddix, S. C.; Chang, C. H.; White, E. L.; Rose, L. M.; Brockman, R. W.; Shortnacy, A. T.; Montgomery, J. A.; Secrist, J. A.; Bennett, L. L. Jr. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2386-2394. c) Bonate, P. L.; Arthaud, L.; Cantrell, W. R. Jr.; Stephenson, K.; Secrist, J. A.; Weitman, S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 855-863.

Figura 1.15. Análogos de purinas.

- **Análogos de las bases pirimidínicas.** El 5-fluorouracilo actúa inhibiendo la acción de la timidilato-sintetasa y es usado en el tratamiento del cáncer de colon avanzado y en el de mama.⁴³ La gemcitabina es un análogo de citidina que se utiliza en el tratamiento de cáncer de páncreas y de otros tumores sólidos.⁴⁴

Figura 1.16. Estructuras de análogos de pirimidina.

⁴³ Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 330-338.

⁴⁴ a) Burris, H. A.; Moore, M. J.; Andersen, J.; Green, M. R.; Rothenberg, M. L.; Modiano, M. R.; Cripps, R. M.; Portenoy, C. K.; Storniolo, A. M.; Tarassoff, P.; Nelson, R.; Dorr, F. A.; Stephens, C. D.; Von Hoff, D. D. *J. Clin. Oncol.* **1997**, 15, 2403-2413. b) Scagliotti, G. V.; Parikh, P.; von Pawel, J.; Biesma, B.; Vansteenkiste, J.; et al. *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 3543-3551.

1.3.1.3. Antibióticos antitumorales

Los antibióticos se comportan como agentes intercalantes que se insertan y unen a la doble hélice de ADN interfiriendo con su replicación, transcripción y reparación.

- **Antraciclinas.** Con este nombre se designa a un conjunto de antibióticos aislados de bacterias del género *Streptomyces*. Las primeras antraciclinas en ser descubiertas fueron la daunorrubicina y la doxorrubicina, esta última es una de las más efectivas en los tratamiento antitumorales. Ambas antraciclinas se utilizan en el tratamiento de la leucemia mieloide y de la leucemia linfóide aguda.⁴⁵ La doxorrubicina también está indicada en el tratamiento de diversos tumores sólidos, como el cáncer de mama, de tiroides, de ovario, de vejiga y de pulmón, y en el tratamiento del linfoma de Hodgkin y no-Hodgkin.⁴⁶ La epirubicina y la idarrubicina son antraciclinas de origen semisintético que se emplean en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda.⁴⁷ La epirubicina también se utiliza en el cáncer de mama, ovario, colon y en melanomas.⁴⁸

⁴⁵ Arlin, Z.; Case, D. C. Jr.; Moore, J.; Wiernik, P.; Feldman, E.; Saletan, S.; Desai, P.; Sia, L.; Cartwright, K. *Leukemia* **1990**, *4*, 177-183.

⁴⁶ a) Burke, P. J.; Koch, T. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1193-1206. b) Kwang, I. K.; Joo, H. K.; Chung, J. K.; Yong, J. L.; Jae, M. J.; Dong, S. L.; Myung, C. L. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1553-1561. c) Weiss, R. B. *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 670-686.

⁴⁷ Willmore, E.; Errington, F.; Tilby, M.J.; Austin, C.A. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 1807-1815.

⁴⁸ a) Ceruti, M.; Tagini, V.; Recalenda, V.; Arpicco, S.; Cattell, L.; Airolidi, M.; Bumma, C. *Farmaco* **1999**, *54*, 733-739. b) Rothermundt, C.; Hubner, R.; Ahmad, T.; Gibbens, I.; Keyzor, C.; Habeshaw, T.; Kaye, S.; Gore, M. *Bri. J. Cancer* **2006**, *94*, 74-78. c) Lopez, M.; Perno, C. F.; Papaldo, P.; Lauro, L.; Ganzina, F.; Barduagni, A. *Invest. New Drug.* **1984**, *2*, 315-317.

Figura 1.17. Estructuras de antraciclinas antitumorales.

- **Bleomicinas.** Con este nombre se designa a un grupo de antibióticos producidos por la bacteria *Streptomyces verticillus*. Las bleomicinas se intercalan en el ADN y son responsables de la producción de radicales libres que causan la oxidación de las hebras de ADN. En quimioterapia se utiliza una mezcla de bleomicina A₂ y B₂ que se usa en terapias combinatorias en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer de piel, testicular y linfomas.⁴⁹

⁴⁹ a) Noordijk, E. M.; Carde, P.; Hagenbeek, A.; Mandard, A. M.; Kluin-Nelemans, J.; Thomas, J.; Tirelli, U.; Monconduit, M.; Eghbali, H.; Burgers, J. M. V.; Dupouy, N.; Henryamar, M. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1997**, 39, 173-173. b) 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, 4560-4567.

Bleomicina A₂ R=NH(CH₂)₃S⁺(CH₃)₂
 Bleomicina B₂ R=NH(CH₂)₄NHC(NH₂)=NH

Figura 1.18. Estructuras de las bleomicinas A₂ y B₂.

- **Dactinomicina (actinomicina D).** Se intercala en el surco menor del ADN entre pares adyacentes de guanina-citosina, interfiriendo en el movimiento de la ARN polimerasa a lo largo del gen e impidiendo la transcripción. Se utiliza con mayor frecuencia en los tratamientos de tumores pediátricos.⁵⁰

Figura 1.19. Estructura de la dactinomicina (actinomicina D).

⁵⁰ Veal, G. J.; Cole, M.; Errington, J.; Parry, A.; Hale, J.; Pearson, A. D. J.; Howe, K.; Chisholm, J. C.; Beane, C.; Brennan, B.; Waters, F.; Glaser, A.; Hemsworth, S.; McDowell, H.; Wright, Y.; Pritchard-Jones, K.; Pinkerton, R.; Jenner, G.; Nicholson, J.; Elsworth, A. M.; Boddy, A. V. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 5893-5899.

- **Mitoxantrona.** Es un agente intercalante de ADN, preferiblemente en los pares de bases guanina-citosina. También interacciona con la enzima topoisomerasa II. Se emplea en el tratamiento de ciertas leucemias y linfomas y en el cáncer metastásico de mama.⁵¹

Figura 1.20. Estructura de la mitoxantrona.

1.3.1.4. Inhibidores de topoisomerasas

Las topoisomerasas son enzimas que controlan los cambios estructurales de ADN en la replicación y la transcripción, por lo que son necesarias para la reparación y el mantenimiento del ADN cromosómico. La inhibición de las topoisomerasas provoca un daño irreparable en la maquinaria genética de la célula.⁵²

- **Podofilotoxinas.** El etopósido y tenipósido son potentes agentes anticancerosos, derivados de la podofilotoxina, que estabilizan el complejo ADN-topoisomerasa II y provocan la rotura de las hebras de ADN.

⁵¹ a) Parker, C.; Waters, R.; Leighton, C.; Hancock, J.; Sutton, R.; Moorman, A. V.; Ancliff, P.; Morgan, M.; Masurekar, A.; Goulden, N.; Green, N.; Révész, T.; Darbyshire, P.; Love, S.; Saha, V. *Lancet*. **2010**, 376, 2009-2017. b) Sora, F.; Piccirillo, N.; Chiusolo, P.; Laurenti, L.; Marra, R.; Bartolozzi, F.; Leone, G.; Sica, S. *Cancer* **2006**, 106, 859-866. c) Onyenadum, A.; Gogas, H.; Kosmidis, P.; Aravantinos, G.; Bafaloukos, D.; Bacoyiannis, H.; Markopoulos, C.; Koutras, A.; Tzorakoelefterakis, E.; Makatsoris, T.; Fountzilas, G.; Kalofonos H. P. *J. Chemother.* **2006**, 18, 192-198.

⁵² Topcu, Z. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2001**, 26, 405-416.

Figura 1.21. Estructuras del etopósido y del tenipósido.

El etopósido se ha utilizado en el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer testicular y linfomas.⁵³

- **Camptotecinas.** La camptotecina es un alcaloide natural, estabilizador del complejo ADN-topoisomerasa I. A partir de este producto natural se sintetizaron dos fármacos con propiedades antitumorales, el topotecan y el irinotecan. La principal aplicación del irinotecan se encuentra en el cáncer de colon avanzado.⁵⁴

Figura 1.22. Inhibidores de la topoisomerasa I.

⁵³ a) Hande, K. R. *Eur. J. Cancer* **1998**, 34, 1514-1521. b) El-Yazigi, A.; Ezzat, A.; Berry, J.; Raines, D. A.; Yusuf, A.; Al-Rawithi, S.; Legayada, E. S. *J. Clin. Pharma.* **2000**, 40, 153-160.

⁵⁴ Maroun, J. A.; Jonker, D.; Seymour, L.; Goel, R.; Vincent, M.; Kocha, W.; Cripps, C.; Fisher, B.; Lister, D.; Malpage, A.; Chiritescu, G. *Eur. J. Cancer* **2006**, 42, 193-199.

1.3.2. Agentes que actúan sobre la mitosis celular

En esta sección se engloban aquellos compuestos capaces de detener el proceso de mitosis o inhibir enzimas implicadas en la división celular. La mitosis es el proceso de división celular por el cual una célula se divide en dos células hijas, conservando cada una la información genética de la célula origen. La diana terapéutica de estos compuestos es la tubulina, proteína estructural que forma los microtúbulos. Los microtúbulos intervienen en la formación del huso mitótico, mediante la polimerización y despolimerización de la tubulina.⁵⁵

- **Alcaloides de la Vinca.** Estos compuestos actúan inhibiendo el proceso de polimerización de los microtúbulos. La vinblastina y la vincristina se obtienen de la planta *Catharanthus roseus*. La vinorelbina se obtiene por semi-síntesis a partir de los anteriores. La vinblastina ha sido aprobada para el tratamiento de cáncer de mama, linfomas, sarcoma de Kaposi, coriocarcinoma y cáncer testicular.⁵⁶ El principal uso de la vincristina es el tratamiento de la leucemia aguda.⁵⁷

⁵⁵ Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev.* **2004**, *4*, 253-265.

⁵⁶ a) Urruticoechea, A.; Archer, C. D.; Assersohn, L. A.; Gregory, R. K.; Verrill, R.; Mendes, M.; Walsh, G.; Smith, I. E.; Johnston, S. R. D. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 475-479. b) Kuruvilla, J.; Song, K.; Mollee, P.; Panzarella, T.; McCrae, J.; Nagy, T.; Crump, M.; Keating, A. *Hematology* **2006**, *11*, 25-29. c) Brambilla, L.; Miedico, A.; Ferrucci, S.; Romanelli, A.; Brambati, M.; Vinci, M.; Tedeschi, L.; Boneschi, V. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2006**, *20*, 1090-1094. d) Kardinal; Jacobs; Bull; Bateman; Pajak. *Cancer Treat. Rep.* **1976**, *60*, 953-954.

⁵⁷ Thomas, D. A.; Sarris, A. H.; Cortes, J.; Faderl, S.; O'Brien, S.; Giles, F. J.; Garcia-Manero, G.; Rodriguez, M. A.; Cabanillas, F.; Kantarjian, H. *Cancer* **2006**, *106*, 120-127.

Figura 1.23. Alcaloides de la Vinca.

- **Taxanos.** El paclitaxel (Taxol®) y el docetaxel (Taxotere®) son fármacos estabilizadores de microtúbulos. El paclitaxel se extrae del tejo *Taxus brevifolia* y se utiliza en el cáncer de ovario, mama, pulmón y sarcoma de Kaposi.⁵⁸ El docetaxel es un análogo semi-sintético del paclitaxel y presenta mayor solubilidad en agua que éste.⁵⁹ Se emplea en el tratamiento de cáncer de mama, estómago, cabeza y cuello, pulmón y próstata.⁶⁰

Figura 1.24. Estructuras del paclitaxel y docetaxel.

⁵⁸ a) Safavy, A.; Raisch, K. P.; Khazaeli; Buchsbaum, D. J.; Bonner, J. A. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4919-4924. b) Millenbaugh, N. J.; Gan, Y.; Au, J. L. *Pharm. Res.* **1998**, 15, 122-127. c) Baskan, E. B.; Tunali, S.; Adim, S. B.; Kiyici, M.; Ali, R. *Int. J. Dermatol.* **2006**, 45, 1441-1443. d) Zhang, W.; Shi, Y.; Chen, Y.; Yu, S.; Hao, J.; Luo, J.; Sha, X.; Fang, X. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, 75, 341-353.

⁵⁹ Rowinsky, E. K. *Annu. Rev. Med.* **1997**, 48, 353-374.

⁶⁰ a) Kolfschoten, G. M.; Hulscher, T. M.; Duyndam, M. C. A.; Pinedo, H. M.; Boven, E. *Bio. Pharm.* **2002**, 63, 733-743. b) Soon, T. L.; Tupule, A.; Espina, B. M.; Levine, A. M. *Cancer*, **2005**, 103, 417-421. c) Cattel, L.; Recalenda, V.; Airolidi, M.; Tagini, V.; Delprino, L.; Rocco, F.; Bumma, C. *Farmaco* **2001**, 56, 695-699.

1.3.3. Terapia hormonal

Esta terapia se utiliza en cánceres dependientes de hormonas, tales como el cáncer de mama, próstata o útero. El crecimiento de estos tumores puede inhibirse por las hormonas que tienen acciones opuestas, por antagonistas hormonales o por inhibición de la síntesis de hormonas endógenas.⁸

- **Hormonas.** La prednisolona es un glucocorticoide con efectos inhibidores sobre la proliferación de los linfocitos y se emplea en leucemias y linfomas.⁶¹ El etinilestradiol y dietilestilbestrol son estrógenos utilizados en el tratamiento de tumores prostáticos.⁶² El megestrol y la medroxiprogesterona son progestágenos y se utilizan en tumores de endometrio.⁶³

Figura 1.25. Compuestos empleados en tratamientos hormonales antitumorales.

- **Antiestrógenos.** Dentro del tejido, el tamoxifeno compite con los estrógenos endógenos por sus receptores e inhibe la transcripción de

⁶¹ Mueller-Beissenhertz, H.; Kasper, C.; Nueckel, H.; Duehrsen, U. *Ann. Hematol.* **2005**, *84*, 796-801.

⁶² Azuma, H.; Inamoto, T.; Takahara, K.; Ibuki, N.; Koyama, K.; Utimoto, S.; Fujisue, Y.; Uehara, H.; Komura, K.; Nomi, H.; Ubai, T.; Katsuoka, Y. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 3737-3746.

⁶³ Lim, M. C.; Lee, S.; Seo, S.-S. *Onkologie* **2010**, *33*, 260-262.

genes que responden a estrógenos. Es muy efectivo en algunos casos de cáncer de mama.⁶⁴ Otros antagonistas más recientes de los receptores de estrógeno son el toremifeno y el fulvestrant.

Figura 1.26. Estructura del tamoxifeno.

- **Antiandrógenos.** La flutamida y la ciproterona bloquean la acción del andrógeno testosterona con su receptor. Se utilizan solos o combinados con otros fármacos en el tratamiento de tumores de próstata.⁶⁵

Figura 1.27. Estructuras de antiandrógenos.

- **Inhibidores de aromatasa.** El anastrozol, el letrozol y el exemestano suprimen la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos y resultan eficaces en el tratamiento de cáncer de mama.⁶⁶

⁶⁴ Smith, L. L.; White, I. N. H. *Toxicol. Lett.* **1995**, 82, 181-186.

⁶⁵ Kai, L.; Levenson, A. S. *Anticancer Res.* **2011**, 31, 3323-3330.

⁶⁶ a) Arnheim, K. *Onkologie* **2007**, 30, 146-147. b) Melichar, B.; Plisek, J.; Hyspler, R.; Kalabova, H.; Kasparova, M.; Krcmova, L.; Studentova, H.; Solichova, D. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2010**, 56, 98-103.

Figura 1.28. Estructuras del anastrozol y del letrozol.

1.3.4. Inhibidores de quinasas

Las quinasas son enzimas clave en los procesos de señalización celular, incluyendo aquellos que controlan el crecimiento y la división celular. Su principal función es la de fosforilar mediante ATP un aminoácido de la cadena peptídica de la proteína. La adición del grupo fosfato produce un cambio conformacional en la proteína que pone en funcionamiento la señalización celular. En las células cancerosas algunas quinasas se encuentran sobreexpresadas, por lo que son una emergente diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.⁶⁷

Los inhibidores de quinasas pueden actuar sobre la propia enzima o en receptores asociados a ellas, impidiendo la transducción de señales desencadenadas por los factores de crecimiento.

- **Inhibición de quinasas aberrantes.** En 2001 se aprobó el empleo del imatinib. El imatinib ocupa el bolsillo de unión a ATP de la tirosina-quinasa Bcr-Abl, impidiendo de esta forma su acción fosforilante. Se emplea en el tratamiento de la leucemia mielógena crónica y en los tumores del estroma digestivo.⁶⁸

⁶⁷ Krause, D. S.; Van Etten, R. A. *New Engl. J. Med.* **2005**, 353, 172-187.

⁶⁸ a) Deininger, M.; Buchdunger, E.; Druker, B. J. *Blood* **2005**, 105, 2640-2653. b) Duffaud, F.; Blay, J. Y. *Oncology* **2003**, 65, 187-197.

Figura 1.29. Estructura del Imatinib.

La aparición de resistencia a este fármaco condujo al diseño de una segunda generación de inhibidores de la quinasa. Entre estos destaca el dasatinib, compuesto más potente que el imatinib debido a su capacidad de interactuar con diferentes estados conformacionales de Bcr-Abl, aumentando así su afinidad. El dasatinib está aprobado como alternativa al imatinib en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y la leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia.⁶⁹

Figura 1.30. Estructura del dasatinib.

- **Inhibidores de receptores del factor de crecimiento.** Dentro de esta clasificación se encuentran aquellos agentes que inhiben los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y los del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR). La terapia anti-EGFR incluye análogos de ATP y anticuerpos monoclonales. Los más destacados son el gefitinib, aprobado para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico, el erlotinib, usado contra el cáncer de páncreas avanzado combinado con gencitabina y los anticuerpos monoclonales trastuzumab y

⁶⁹ Hantschel, O.; Rix, U.; Schmidt, U.; Burckstummer, T.; Kneidinger, M.; Schutze, G.; Colinge, J.; Bennett, K. L.; Ellmeier, W.; Valent, P.; Superti-Furga, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2007**, *104*, 13283-13288.

cetuximab.⁷⁰ El cetuximab posee además un efecto antiangiogénico indirecto debido a la represión de factores angiogénicos como VEGF, IL-8 y bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y es utilizado en el tratamiento de cáncer de colon y cáncer de células escamosas que afectan a cabeza y cuello.⁷¹ El trastuzumab inhibe la actividad de HER-2, receptor de EGF humano, que se encuentra sobreexpresado en el 30% de los cánceres invasivos. Se ha aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico.⁷²

Figura 1.31. Estructuras de inhibidores del EGFR.

Muy a menudo, la terapia dirigida contra la familia de EGFRs debe ser complementada con quimioterapia. La inhibición de EGFR en cambio, resulta ser muy eficaz en la prevención del cáncer.⁷³

Dentro de los inhibidores del VEGFR, también llamados agentes antiangiogénicos, destaca el anticuerpo monoclonal humanizado bevacizumab (Avastin®), que bloquea el VEGF-A y previene la angiogénesis. La FDA aprobó el uso de este fármaco en 2004 para el tratamiento de cáncer de colon y en combinación con paclitaxel e interferón para el tratamiento de cáncer de mama metastásico y

⁷⁰ Tibes, R.; Trent, J.; Kurzrock, R. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 357-384.

⁷¹ Li, S.; Schmitz, K. R.; Jeffrey, P. D.; Wiltzius, J. J.; Kussie, P.; Ferguson, K. M. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 301-311.

⁷² Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.M.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 783-792.

⁷³ Grandis, J. R.; Sok, J. C. *Pharmacol. Ther.* **2004**, *102*, 37-46.

carcinoma de células renales avanzado.⁷⁴ En la figura 1.32 se indica el modo de acción del bevacizumab que se une al VEGF-A extracitosólico e impide la interacción de éste con su receptor.

Figura 1.32. Modo de acción del bevacizumab.⁷⁵

El sorafenib y sunitinib son moléculas pequeñas que inhiben a múltiples receptores tirosina-quinasa, entre los que se encuentra el VEGFR.

El sorafenib se emplea en el tratamiento de cáncer renal avanzado y de adenocarcinoma hepatocelular avanzado y el sunitinib se utiliza en el tratamiento de cáncer gastrointestinal y de carcinoma renal.⁷⁶

⁷⁴ a) Marx, J. *Science* **2005**, 308, 1248-1249. b) Ferrara, N.; Hill, K. J.; Gerber, H. P.; Novotny, W. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 391-400.

⁷⁵ <http://www.avastin-hcp.com/about-avastin/proposed-moa>.

⁷⁶ a) Zhu, A. X. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2010**, 19, 663-672. b) Mendel, D. B.; Laird, A. D.; Xin, X.; Louie, S. G.; Christensen, J. G.; Li, G.; Schreck, R. E.; Abrams, T. J.; Ngai, T. J.; Lee, L. B.; Murray, L. J.; Carver, J.; Chan, E.; Moss, K. G.; Haznedar, J. O.; Sukbuntherng, J.; Blake, R. A.; Sun, L.; Tang, C.; Miller, T.; Shirazian, S.; McMahon, G.; Cherrington, J. M. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 327-337.

Figura 1.33. Inhibidores del VEGFR.

1.3.5. Inmunoterapia

La inmunoterapia, también llamada terapia biológica o bioterapia, es un tipo de tratamiento antitumoral que ayuda a combatir la enfermedad estimulando las defensas naturales del organismo.

- **Citocinas.** Son proteínas de señalización celular que regulan la comunicación intercelular en respuestas inmunes y estimulan el movimiento de las células hacia sitios de inflamación o infección. Existen diversos tipos de citocinas entre las cuales destacan los interferones (IFN) y las interleucinas (IL). En varios modelos tumorales se ha determinado que las citocinas pueden favorecer la regresión del tumor al activar la respuesta inmune mediada por células. El IFN- α , su derivado pegilado⁷⁷, la aldesleucina (IL-2 recombinante) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos recombinantes (GM-CSF) se han utilizado preferentemente como inmunoterapia contra el cáncer. Estas citocinas promueven la activación de linfocitos T contra antígenos tumorales, activan la respuesta inmune no específica e inducen la expresión de otras citocinas activadoras.⁷⁸
- **Anticuerpos monoclonales.** Cuando el sistema inmunológico del cuerpo detecta antígenos (sustancias nocivas, como bacterias, virus, hongos o

⁷⁷ La pegilación es la unión covalente de PEG (polietilenglicol) a otra molécula, usualmente un fármaco o una proteína.

⁷⁸ a) Dranoff, G. *Nature Rev.* **2004**, *4*, 11-22. b) Tayal, V.; Kalra, B. S. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *579*, 1-12. c) Jonasch, E.; Haluska, F.G. *Oncologist* **2001**, *6*, 34-55.

parásitos) produce anticuerpos (proteínas que combaten la infección). El rituximab es un anticuerpo monoclonal que ha sido aprobado para el tratamiento de linfoma no-Hodgkin difuso a grandes células B y de linfoma folicular.⁷⁹

- **Vacunas.** Las vacunas terapéuticas en cáncer constituyen una novedosa estrategia inmunoterapéutica y tienen como objetivo estimular o potenciar en el huésped una respuesta inmunitaria contra los antígenos del tumor. En la actualidad existen dos vacunas preventivas, una contra el virus del papiloma humano causante del 70% de los cánceres de cuello uterino y una vacuna terapéutica aprobada para combatir el cáncer metastásico de próstata.⁸⁰
- **Terapia génica.** Está basada en la introducción de genes dentro de la célula tumoral. Se puede utilizar para la restauración de genes supresores de tumores (gen *p53*), inactivar la expresión de oncogenes, transportar un gen al interior de la célula neoplásica haciéndola sensible a algunos fármacos, transportar un gen al interior de una célula no tumoral para protegerlas de la quimioterapia o marcar células cancerosas con genes para hacerlas más visibles al sistema inmunitario del huésped.⁸

⁷⁹ Keating, G. M. *Drugs* **2010**, 70, 1445-1476.

⁸⁰ a) Doorbar, J. *Clinical Science* **2006**, 110, 525-541. b) Kantoff, P. W.; Higano, C.S.; Shore, N. D.; Berger, E. R.; Small, E. J.; Penson, D. F.; Redfern, C. H.; Ferrari, A. C.; Dreicer, R.; Sims, R. B.; Xu, Y.; Frohlich, M. W.; Schellhammer, P. F. *New Engl. J. Med.* **2010**, 363, 411-422.

1.4. ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la proliferación de células endoteliales de vasos preexistentes. Este mecanismo es esencial para el crecimiento y reparación de órganos y la cicatrización de heridas. Otro mecanismo para el desarrollo de la red vascular es la vasculogénesis, proceso de formación *de novo* de vasos sanguíneos a partir de células endoteliales progenitoras (angioblastos) que tiene lugar en el desarrollo embrionario.⁸¹

El proceso de formación y crecimiento de los capilares está altamente regulado por una serie de estímulos angiogénicos y antiangiogénicos. Generalmente, la angiogénesis se encuentra desactivada aunque las células endoteliales pueden experimentar una rápida proliferación si el organismo así lo necesita. En la edad adulta, la angiogénesis fisiológica tiene lugar durante el ciclo reproductivo menstrual de la mujer, durante el embarazo y también en la reparación o cicatrización de heridas.⁸²

La angiogénesis patológica está impulsada por una irregular persistencia de las señales activadoras de la misma. Por ejemplo, en la artritis reumatoide, la invasión de nuevos capilares en la articulación es la causante de destruir el cartílago. La neovascularización ocular provocada por la activación de la angiogénesis es una de las principales causas de ceguera. Otras patologías dependientes de la angiogénesis son la psoriasis, la retinopatía diabética, la endometriosis o el crecimiento tumoral.⁸³ Por otra parte, la deficiencia de vasos capilares está relacionada con la isquemia y la aparición de úlceras, cuyos efectos pueden atenuarse promoviendo el crecimiento vascular.⁸⁴

⁸¹ Alba, E.; Rodríguez-Quesada, A. *Angiogénesis y Cáncer*. TACTICS MD, S.L. **2009**.

⁸² Carmeliet, P. *Nature* **2005**, 438, 932-936.

⁸³ Folkman, J.; Shing, Y. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 10931-10934.

⁸⁴ Marti, H. M.; Risau, W. *Thromb. Haemost.* **1999**, 82, 44-52.

1.4.1. Angiogénesis tumoral

Las células tumorales necesitan un constante suministro de nutrientes y oxígeno con el fin de desarrollarse y dividirse.⁸⁵ Este aporte se realiza a través de una buena irrigación sanguínea, lo que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ello, se considera que el crecimiento del tumor es un proceso dependiente de la angiogénesis. Además, los nuevos capilares incrustados en un tumor proporcionan una puerta de entrada para las células tumorales en la circulación sanguínea, donde pueden desplazarse a otros tejidos del organismo y provocar la metástasis.⁸⁶

Figura 1.34. Representación del proceso de angiogénesis tumoral.

La dependencia entre tumor y angiogénesis fue descrita en los años 70 por el Dr. Judah Folkman, conocido como el padre de la angiogénesis.⁸⁷ La hipótesis propuesta por Folkman defiende que la inhibición de la angiogénesis detendría el crecimiento del tumor, reduciendo su tamaño hasta alcanzar un estado de inactividad.

Una característica de la angiogénesis tumoral es la creación de una vasculatura aberrante a causa de una expresión caótica y mal regulada de los

⁸⁵ Crivellato, E.; Ribatti, D. *Recent Advances in Angiogenesis and Antiangiogenesis*. Chapter 4: Cross-Linked Between Inflammation and Angiogenesis. **2009**, 30-39.

⁸⁶ Siemann, D. W. *Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside* **2002**, 3, 4-15.

⁸⁷ Folkman, J.; Bach, M.; Rowe, J.W.; Davidoff, F.; Lambert, P.; Hirsch, C.; Goldberg, A.; Hiatt, H. H.; Glass, J.; Henshaw, E. *N. Engl. J. Med.* **1971**; 285, 1182-1186.

factores proangiogénicos. Como consecuencia de esto, los vasos tumorales suelen estar desorganizados e incluso inacabados.⁸⁸

El tratamiento del cáncer basado en terapias antiangiogénicas presenta algunas ventajas teóricas respecto a las terapias convencionales de quimioterapia o radioterapia, que se describen a continuación:⁸⁹

- a) La angiogénesis está activada en todos los cánceres producidos por tumores sólidos, por lo que los tratamientos antiangiogénicos poseen una extensa aplicación terapéutica.
- b) Los fármacos antiangiogénicos ejercen su función en células endoteliales activadas, por lo que no afecta a células endoteliales quiescentes, pudiéndose evitar muchos de los efectos secundarios de la quimioterapia estándar.
- c) Los tratamientos antiangiogénicos pueden actuar en situaciones en las cuales el cáncer está en proceso de metástasis, fase en la que no actúan la mayoría de fármacos quimioterapéuticos.
- d) Las células endoteliales presentan estabilidad genómica, por lo que no desarrollan mutaciones que dan lugar a resistencia a fármacos.

Por todos estos motivos, la inhibición de la angiogénesis se ha convertido en una prometedora diana en el desarrollo de nuevas terapias que ayuden a combatir el cáncer.

1.4.2. Activación de la angiogénesis

El proceso angiogénico se encuentra altamente regulado por los activadores e inhibidores de la angiogénesis. Este mecanismo se conoce con el nombre de interruptor angiogénico (véase la figura 1.35) y puede ser

⁸⁸ Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2000**, *407*, 249-257.

⁸⁹ Mauriz, J. L.; Linares, P.; González, P.; Culebras, J. M. *Cir. Esp.* **2005**, *78*, 3-11.

activado tanto por reducción de la concentración de los inhibidores como mediante el aumento de niveles de los activadores.⁸¹

Los niveles de factores activadores pueden verse aumentados por diversas señales, siendo la hipoxia una de las más importantes. Este estímulo activa factores de transcripción, como HIF-1, que activan la transcripción de genes que intervienen en la angiogénesis, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).⁹⁰

Figura 1.35. Interruptor angiogénico.⁹¹

Los más destacados factores activadores e inhibidores de la angiogénesis se indican en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Factores activadores e inhibidores de la angiogénesis.^{88,92}

Activadores	Inhibidores
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Angiostatina
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	Trombospondina-1
Factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF)	Interferon $\alpha/\beta/\gamma$
Angiopoietina (Ang-1)	Factor plaquetario-4
Factor de crecimiento transformante (TGF)	Endostatina
Metaloproteinasa de la matriz (MMP)	Prolactina 16-kd
Factor de necrosis tumoral (TNF- α)	Interleucinas 4, 12 y 18

⁹⁰ Semenza, G. L. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 721-732.

⁹¹ Folkman, J.; Hanahan, D. *Cell* **1996**, 86, 353-364.

⁹² Zetter B. R. *Annu. Rev. Med.* **1998**, 49, 407-24.

Una vez se ha activado el estímulo angiogénico comienza la degradación enzimática de la membrana basal de los vasos mediante las metaloproteinasas de la matriz. A continuación, se produce la migración y proliferación de las células endoteliales, reclutando a células circundantes en dirección al estímulo mitogénico (tumor). El proceso finaliza con la organización y estabilización de las estructuras tridimensionales mediante células musculares lisas (pericitos), dando lugar a vasos sanguíneos.⁹³

1.4.3. VEGF

El factor angiogénico de mayor relevancia es el VEGF, que promueve la proliferación y diferenciación de las células endoteliales y está compuesto por glicoproteínas homodiméricas.^{94,95} La familia del VEGF incluye diversos factores tales como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y también el factor de crecimiento placentario (PlGF).

Los VEGF actúan sobre las células endoteliales vasculares a través de receptores de membrana tirosina-quinasa específicos (VEGFR), regulando de esta manera funciones celulares como la proliferación de células endoteliales y la migración y expresión de quimocinas, citocinas y metaloproteinasas de la matriz (MMP). En la figura 1.36 se representan los diferentes VEGF y la unión de éstos a los distintos receptores, así como la función que modulan.

Los VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 son receptores transmembrana de tipo tirosina-quinasa. Los receptores de VEGF tienen una porción extracelular que consta de 7 dominios de tipo inmunoglobulina, una única región transmembrana y una región intracelular que contiene un dominio tirosina-quinasa escindido. Al igual que otros receptores tirosina-quinasa, los VEGFRs se dimerizan, pudiendo formar homodímeros o heterodímeros, y experimentan

⁹³ a) Pandya, N. M.; Dhalla, N. S.; Santani, D. D. *Vasc. Pharmacol.* **2006**, *44*, 265-274. b) Nishida, N.; Yano, H.; Nishida, T.; Kamura, T.; Kojiro, M. *Vasc. Health Risk Manag.* **2006**, *2*, 213-219.

⁹⁴ Ferrara, N. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 2413-2422.

⁹⁵ Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4-25.

transfosforilación después de la unión al ligando, desencadenando una cascada de señalización que regula mecanismos involucrados en la angiogénesis.⁹⁶

El VEGFR-1 y el VEGFR-2 también pueden existir en formas solubles denominadas sVEGFR-1 y sVEGFR-2. Además de los VEGFR, algunos factores de la familia VEGF pueden unirse a co-receptores como las neuropilinas (NRP), NRP-1 y NRP-2.⁸¹

Figura 1.36. Familia de ligandos VEGF y sus receptores.⁹⁷

Los VEGFR-1 y VEGFR-2 son expresados predominantemente por células endoteliales vasculares; ambos se unen al VEGF-A y se encuentran activados durante la angiogénesis. El VEGFR-1 también juega un papel importante en la migración celular y presenta afinidad por VEGF-B. El VEGFR-3 se une únicamente al VEGF-C y VEGF-D. Este receptor es expresado en

⁹⁶ Cross, M. J.; Dixelius, J.; Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 488-494.

⁹⁷ Pavlakovic, H.; Becker, J.; Albuquerque, R.; Wiltig, J.; Ambati, J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, 1207, E7-E15.

altos niveles por las células endoteliales linfáticas y su activación estimula la mitosis, migración, diferenciación y supervivencia de dichas células.⁹⁸

El factor más estudiado y mejor caracterizado es el VEGF-A o VEGF, el cuál es secretado por el tumor y posee un papel importante en la angiogénesis. El gen del VEGF codifica diversas isoformas de entre 121 y 206 aminoácidos mediante corte y empalme alternativo que codifica de un modo diferente los exones 6 y 7. De entre las distintas isoformas (véase la figura 1.37) las más abundantes son VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 y VEGF-206. La isoforma predominante es el VEGF-165 y es el transductor de señales más fuerte entre los distintos tipos de VEGF.⁹⁹

Figura 1.37. Isoformas del VEGF.

El receptor VEGFR-2 es el más importante en la activación de la angiogénesis, ya que interviene en la mayoría de los efectos angiogénicos producidos por el VEGF-A, incluyendo la proliferación, invasión, migración, supervivencia y permeabilidad vascular de las células endoteliales.¹⁰⁰ En la

⁹⁸ Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A. T.; De Bruijn, E. A. *Pharmacol. Rev.* **2004**, 56, 549-580.

⁹⁹ Martínez-Ezquerro, J. D.; Herrera, L. A. *Cancerología* **2006**, 1, 83-96.

¹⁰⁰ Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 1011-1027.

siguiente figura se muestran esquemáticamente las funciones reguladas por el receptor VEGFR-2.

Figura 1.38. Funciones reguladas por la interacción VEGF/VEGFR-2.¹⁰¹

1.4.4. Inhibidores de la angiogénesis

En la tabla 1.1 se han indicado las biomoléculas inhibidoras de la angiogénesis. La trombospondina fue la primera en ser descubierta en 1989 por el Dr. Noel Bouck.¹⁰² Más tarde, se identificaron dos nuevos inhibidores en el laboratorio del Dr. Judah Folkman: la angiostatina (en 1994) y la endostatina (en 1997).¹⁰³ Estos dos inhibidores proceden de proteínas estructurales preexistentes en fragmentos específicos tales como el colágeno o el plasminógeno.

Los inhibidores de las MMP también son importantes factores antiangiogénicos. Las MMP son enzimas capaces de degradar tanto los componentes proteicos de la matriz extracelular como los de la membrana

¹⁰¹ Rini, B. I.; Small, E. J. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 1028-1043.

¹⁰² Rastinejad, F.; Polverini, P.J.; Bouck, N.P. *Cell* **1989**, 56, 345-355.

¹⁰³ a) O'Reilly, M.S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R.A.; Moses, M.; Lane, W.S.; Cao, Y.H.; Sage, E.H.; Folkman, J. *Cell* **1994**, 79, 315-328. b) O'Reilly, M.S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W.S.; Flynn, E.; Birkhead, J.R.; Olsen, B.R.; Folkman, J. *Cell* **1997**, 88, 277-285.

basal y están asociadas a la formación de metástasis.¹⁰⁴ Los inhibidores de las MMP contienen grupos funcionales que se unen al zinc del dominio catalítico de estas enzimas, como en la estructura del marimastat y del batimastat, aunque ninguno de estos dos inhibidores ha superado la fase clínica III.¹⁰⁵

En la terapia antiangiogénica dirigida al VEGF destaca el anticuerpo monoclonal bevacizumab (Avastin®), ya comentado en el apartado 1.3.4, el pegaptanib (Macugen®), un oligonucleótido con gran afinidad por el VEGF-165 que impide la unión con el receptor, y el ranibizumab (Lucentis®), un fragmento de anticuerpo monoclonal derivado del bevacizumab.¹⁰⁶

Otros compuestos antiangiogénicos se dirigen hacia el receptor del VEGF, como el sunitinib (Sutent®) y el sorafenib (Nexavar®), cuyas estructuras se han indicado en la figura 1.33.

El axitinib (Inlyta®), el pazopanib (Votrient®) y el vatalanib son también inhibidores de los VEGFR, pero además también son capaces de bloquear otros receptores tirosina-quinasa como los PDGFR.¹⁰⁷

¹⁰⁴ Zucker, S. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, 8, 2371-2373.

¹⁰⁵ a) Sparano, J. A. *J. Clin. Oncol.* **2004**, 22, 4683-4690. b) Rothenberg, M. L.; Nelson, A. R.; Hande, K. R. *Stem Cells* **1999**, 17, 237-240.

¹⁰⁶ a) Ng, E. W.; Shima, D. T.; Calias, P.; Cunningham, E. T. Jr.; Guyer, D. R.; Adamis, A. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 123-132. b) Wolf, S.; Balciuniene, V. J.; Laganovska, G.; Menchini, U.; Ohno-Matsui, K.; Sharma, T.; Wong, T. Y.; Silva, R.; Pilz, S.; Gekkieva, M. *Ophthalmology* **2014**, 121, 682-692.

¹⁰⁷ a) Hutson, T. E.; Lesovoy, V.; Al-Shukri, S.; Stus, V. P.; Lipatov, O. N.; Bair, A. H.; Rosbrook, B.; Chen, C.; Kim, S.; Vogelzang, N. J. *Lancet. Oncol.* **2013**, 14, 1287-1294. b) Sternberg, C. N.; Hawkins, R. E.; Wagstaff, J.; Salman, P.; Mardiak, J.; Barrios, C. H.; Zarba, J. J.; Gladkov, O. A.; Lee, E.; Szczyluk, C.; McCann, L.; Rubin, S. D.; Chen, M.; Davis, I. D. *Eur. J. Cancer* **2013**, 49, 1287-1296. c) Paesler, J.; Gehrke, I.; Gandhirajan, R. K.; Filipovich, A.; Hertweck, M.; Erdfelder, F.; Uhrmacher, S.; Poll-Wolbeck, S. J.; Hallek, M.; Kreuzer, K. A. *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 3390-3398.

Figura 1.39. Inhibidores de VEGFR y PDGFR.

En la figura 1.40 se muestran las dianas biológicas de algunos inhibidores de la angiogénesis.

Figura 1.40. Dianas biológicas de inhibidores de la angiogénesis.¹⁰⁸

¹⁰⁸ Modificado del artículo: Capdevila, J.; Argilés, G.; Mulet-Margalef, N.; Tabernero, J. *Endocrinol. Nutr.* **2012**, 59, 438-451.

1.5. TELOMERASA

Una de las señas de identidad del cáncer es su capacidad proliferativa ilimitada, ya mencionada en el apartado 1.2.2. Esta propiedad se debe en gran medida a la acción de la telomerasa, enzima que se encuentra activada en más del 90% de los distintos tipos de cánceres.¹⁰⁹ La telomerasa se encarga de alargar los telómeros, nombre que reciben las secuencias repetitivas de ADN no codificante situadas en los extremos de los cromosomas lineales. La principal función del telómero es la de proteger el ADN cromosómico de la degradación que tiene lugar, de forma natural, durante la replicación de las moléculas lineales de ADN. Además de esta función, los telómeros se encargan de mantener la estabilidad cromosómica evitando la fusión de sus extremos y juegan un papel importante en la meiosis ya que facilitan el reconocimiento de cromosomas homólogos.¹¹⁰

Figura 1.41. Representación de los telómeros y del ADN telomérico humano.¹¹¹

¹⁰⁹ Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. C.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science* **1994**, 266, 2011-2015.

¹¹⁰ a) Arvelo, F.; Morales, A. *Acta Cien. Venez.* **2004**, 55, 288-303. b) Nugent, C. I.; Lundblad, V. *Genes Dev.* **1998**, 12, 1073-1085.

¹¹¹ Ramunas, J.; Yakubov, E.; Brady, J. J.; Corbel, S. Y.; Holbrook, C.; Brandt, M.; Stein, J.; Santiago, J. G.; Cooke, J. P.; Blau, H. M. *FASEB J.* **2015**, 29, 1930-1939.

Durante el proceso de replicación del ADN las polimerasas replican completamente la hebra molde en sentido 3'→5' pero son incapaces de copiar la hebra en sentido 5'→3'. Como consecuencia, el extremo 3' no se puede copiar por completo y los telómeros se acortan en cada replicación hasta que la división celular se detiene (senescencia). Este acortamiento actúa como un reloj interno que determina el número de divisiones que la célula puede experimentar a lo largo de su existencia.^{9,112}

La telomerasa fue descubierta por Elizabeth Blackburn y Carol Greider en 1985. En humanos, esta enzima se encarga de alargar los telómeros sintetizando fragmentos en el extremo 3' de ADN que contienen seis nucleótidos con la secuencia TTAGGG.¹¹³ La telomerasa humana está compuesta por un componente catalítico proteico hTERT (*human Telomeric End Reverse Transcriptase*), con actividad transcriptasa inversa y por un componente ribonucleotídico de ARN (hTR o TERC, *Telomerase RNA Component*) de secuencia complementaria a las repeticiones teloméricas y que sirve como molde para la síntesis de ADN telomérico.¹¹⁴

Figura 1.42. Estructura de la subunidad catalítica de la telomerasa, hTERT; del componente ribonucleotídico de ARN, hTR (rojo); y de ADN telomérico (verde).

¹¹² a) Rhyu, M. S. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1995**, 87, 884-894. b) Blackburn, E. H. *Nature* **1991**, 350, 569-573.

¹¹³ a) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1985**, 43, 405-413. b) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1987**, 51, 887-898.

¹¹⁴ Shay, J. W.; Wright, W. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 577-584.

1.5.1. Telomerasa y cáncer

Como se ha indicado anteriormente, la telomerasa se encuentra activada en más del 90% de los tumores malignos, por lo que la inhibición de esta enzima se ha revelado como una nueva y prometedora diana biológica en los tratamientos antitumorales.¹¹⁷

El empleo de agentes antitelomerasa presenta ciertas ventajas en los tratamientos oncológicos. Una de ellas es que los tumores son menos propensos a desarrollar resistencia en terapias dirigidas a telomerasa que en la quimioterapia estándar. Otra ventaja es que la falta de expresión de la telomerasa y la mayor longitud de los telómeros en células no tumorales frente a células tumorales proporciona una alta especificidad de los fármacos antitelomerasa, reduciéndose la eventual toxicidad en el tejido no tumoral.¹¹⁷

A pesar de las ventajas comentadas, conviene señalar que los agentes antitelomerasa no destruyen inmediatamente a las células tumorales, sino que causan un progresivo acortamiento de los telómeros, que es el causante indirecto de la muerte celular. Por ello, los inhibidores de telomerasa no son útiles en la supresión de tumores primarios, ya que el tratamiento oncológico basado únicamente en fármacos antitelomerasa permitiría el crecimiento del tumor antes de que éstos ejercieran su acción farmacológica. Por este motivo, se ha propuesto el empleo de los agentes antitelomerasa en el tratamiento de tumores secundarios y en combinación con otros agentes antineoplásicos.¹¹⁸

Existen dos genes principales que regulan la actividad de la telomerasa, el gen *hTR*, que codifica el componente ARN, y el gen *hTERT*, que codifica la

¹¹⁷ a) Harley, C. B. *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, 8, 167-179. b) Shay, J. W.; Keith, W. N. *Br. J. Cancer* **2008**, 98, 677-683.

¹¹⁸ Corey, D. R. *Chemistry & Biology* **2009**, 16, 1219-1223.

proteína hTERT. La regulación transcripcional de hTERT está controlada, entre otros, por los factores de transcripción c-Myc y sp1.¹¹⁹

El protooncogen *c-Myc* es el encargado de codificar la proteína c-Myc que juega un papel importante en numerosos procesos celulares como, por ejemplo, la progresión del ciclo celular, el crecimiento celular, la diferenciación, la transformación, la angiogénesis o la apoptosis.¹²⁰ Este gen puede verse alterado por amplificación, translocación cromosomal o mutaciones, provocando una desregulación en su expresión que está asociada con el desarrollo de diversas neoplasias humanas.¹²¹ Debido a estos motivos, el control de la expresión del gen *c-Myc* puede utilizarse como estrategia terapéutica contra el cáncer tanto por sus múltiples funciones como por su función reguladora de la telomerasa.

1.5.2. Inhibidores de la telomerasa

Existen numerosas estrategias terapéuticas que actúan sobre el telómero o la telomerasa. En la figura 1.44 se representan algunas de las estrategias antitelomerasa clasificadas según su modo de acción.

¹¹⁹ Kyo, S.; Takakura, M.; Taira, T.; Kanaya, T.; Itoh, H.; Yutsudo, M.; Ariga, H.; Inoue, M. *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, 669-677.

¹²⁰ Gonzalez, V.; Hurley, L. H. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 111-129.

¹²¹ a) Nesbit, C. E.; Tersak, J. M.; Prochownik, E. V. *Oncogene* **1999**, *18*, 3004-3016. b) Dang, C. V.; O'Donnell, K. A.; Zeller, K. I.; Nguyen, T.; Osthus, R. C.; Li, F. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 253-264. c) Ospina, M.; Muñeton, C. M. *Iatreia* **2011**, *24*, 389-401.

Figura 1.44. Estrategias terapéuticas antitelomerasa.¹²²

Entre las diferentes terapias anti-telomerasa se encuentran:¹¹⁷

- 1) **Agentes perturbadores de telómeros.** Estos compuestos modifican la estructura del telómero haciendo difícil su unión con la telomerasa. Generalmente, actúan estabilizando la estructura G cuádruplex de los telómeros. Los G-cuádruplex son pliegues formados por la interacción de varias guaninas de la hebra 3' y se encargan de proteger al telómero. La estabilización de estas estructuras inhibe la actividad de la telomerasa ya que impide la apertura del telómero para su replicación. El producto natural telomestatina es un ejemplo de agente estabilizador de G-cuádruplex.¹²³

¹²² Lü, M-H.; Liao, Z-L.; Zhao, X-Y.; Fan, Y-H.; Lin, X-L.; Fang, D-C.; Guo, H.; Yang, S-M. *Oncol. Rep.* **2012**, 28, 1945-1952.

¹²³ a) Kim, M. Y.; Vankayalapati, H.; Shin-Ya, K.; Wierzba, K.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2098-2099. b) Tauchi, T.; Shin-ya, K.; Sashida, G.; Sumi, M.; Nakajima, A.; Shimamoto, T.; Ohyashiki, J. H.; Ohyashiki, K. *Oncogene* **2003**, 22, 5338-5347.

Telomestatina

Figura 1.45. Estructura de la telomestatina.

- 2) **Inhibidores de telomerasa.** Pueden ser tanto inhibidores del sitio activo con una estructura similar a los telómeros, como inhibidores alostéricos dirigidos al componente hTERT o al hTR. Entre estos inhibidores destaca el oligonucleótido antisentido Imetelstat (GRN163L), agente antagonista del componente hTR, que se encuentra en fase clínica II.¹²⁴

Figura 1.46. Inhibición de la telomerasa mediante el oligonucleótido GRN163L.¹²⁵

- 3) **Inmunoterapia TERT.** En esta terapia se emplean compuestos diseñados para estimular el sistema inmune del paciente contra células tumorales que expresan la proteína TERT. Así, las células que presentan antígeno (APC, *Antigen-presenting cells*) son expuestas a altos niveles de fragmentos peptídicos, ARNm o vectores de ADN hTERT. Los antígenos hTERT suscitan la activación de células T específicas de TERT (CD8 y

¹²⁴ Burchett, K. M.; Yan, Y.; Ouellette, M. M.; *PLOS ONE* **2014**, 9, e85155.

¹²⁵ Ruden, M.; Puri, N. *Cancer Treat. Rev.* **2013**, 39, 444-456.

CD4) que cooperan para provocar la muerte de células tumorales que presentan péptidos TERT en su superficie. Dentro de este grupo destacan los compuestos GV1001 y GRNVAC1. GV1001 es un péptido hTERT formado por 16 aminoácidos que se encuentra en fase III en el tratamiento del cáncer pancreático y del cáncer de pulmón no microcítico.¹²⁶

- 4) **Terapia génica suicida.** Esta terapia está basada en la infección de células tumorales a partir de la cual se induce la expresión de genes suicidas controlados por el promotor hTERT. La infección de las células se lleva a cabo a través de sistemas de vectores que pueden ser no virales, tales como ácidos nucleicos libres o liposomas, o bien virales, como los adenovirus. Los genes suicidas que se expresan en las células codifican proteínas que controlan la replicación de enzimas microbiales o virus oncolíticos que convierten un profármaco no tóxico en una sustancia tóxica.¹²⁷
- 5) **Bloqueo de la expresión de la telomerasa.** Este tipo de terapias se centran en la regulación de la proteína hTERT, ya sea su transcripción, su translocación, ensamblaje o transporte, y su función es la de reducir la expresión de hTERT en diversos pasos de la biogénesis. La geldanamicina es un producto natural inhibidor de Hsp90 que bloquea el ensamblaje de la telomerasa.¹²⁸ Recientemente se ha demostrado que la curcumina, compuesto natural con propiedades antiinflamatorias, es

¹²⁶ a) Kyte, J. A. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, 18, 687-694. b) Shaw, V. E.; Naisbitt, D. J.; Costello, E.; Greenhalf, W.; Park, B. K.; Neoptolemos, J. P.; Middleton, G. W. *Expert Rev. Vaccines* **2010**, 9, 1007-1016.

¹²⁷ a) Murofushi, Y.; Nagano, S.; Kamizono, J.; Takahashi, T.; Fujiwara, H.; Komiya, S.; Matsuishi, T.; Kosai, K. *Int. J. Oncol.* **2006**, 29, 681-688. b) Kyo, S.; Takakura, M.; Fujiwara, T.; Inoue, M. *Cancer Sci.* **2008**, 99, 1528-1538.

¹²⁸ Holt, S. E.; Aisner, D. L.; Baur, J.; Tesmer, V. M.; Dy, M.; Ouellette, M.; Trager, J. B.; Morin, G. B.; Toft, D. O.; Shay J. W.; Wright, W. E.; White, M. A. *Genes Dev.* **1999**, 13, 817-826.

capaz de inhibir la actividad de la telomerasa por disociación de una co-chaperona Hsp90, p23, del complejo hTERT.¹²⁹

Figura 1.47. Inhibidores de la expresión de telomerasa.

¹²⁹ a) Lee, J. H.; Chung, I. K. *Cancer Lett.* **2010**, 290, 76-86. b) Ramachandran, C.; Fonseca, H. B.; Jhabvala, P.; Escalon, E. A.; Melnick, S. J. *Cancer Lett.* **2002**, 184, 1-6.

1.6. HONOKIOL Y OTROS PRODUCTOS NATURALES

En la última década ha surgido un gran interés por los productos naturales como extractos activos obtenidos de plantas medicinales en el tratamiento contra el cáncer. Este interés es debido a la actividad sinérgica de los compuestos presentes en los extractos, que pueden actuar simultáneamente sobre diferentes dianas.¹³⁰ Algunos de estos compuestos son el galato de epigallocatequina del té y la genisteína de la soja, cuyas estructuras se indican en la figura 1.48.

Figura 1.48. Estructuras del galato de epigallocatequina y de la genisteína.

La curcumina es otro producto natural que ha demostrado poseer numerosas actividades farmacológicas. Es un colorante natural que proviene de la planta *Curcuma longa*, cultivada principalmente en la India y China, y es uno de los componentes más activos de la cúrcuma, condimento utilizado en el curry. La curcumina ha demostrado presentar efectos antioxidantes,¹³¹ antiinflamatorios,¹³² antiangiogénicos,¹³³ anticoagulantes,¹³⁴ antimicrobianos,

¹³⁰ a) Sagar, S. M.; Yance, D.; Wong, R. K. *Current Oncology* **2006**, 13, 14-26. b) Sagar, S. M.; Yance, D.; Wong, R. K. *Current Oncology*, **2006**, 13, 99-107.

¹³¹ Menon, V. P.; Sudheer, A. R. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, 595, 105-125.

¹³² Jurenka, J. S. *Altern. Med. Rev.* **2009**, 14, 141-153.

¹³³ a) Yoysungnoen, P.; Wirachwong, P.; Changtam, C.; Suksamrarn, A.; Patumraj, S. *World J. Gastroenterol.* **2008**, 14, 2003-2009. b) Gururaj, A. E.; Belakavadi, M.; Venkatesh, D. A.; Marmé, D.; Salimath, B. P. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2002**, 297, 934-942.

¹³⁴ Kim, D-C.; Ku, S-K.; Bae, J-S. *BMB Reports* **2012**, 45, 221-226.

antivíricos,¹³⁵ antitumorales¹³⁶ y recientemente efectos antiteloméricos,¹³⁷ entre otros.¹³⁸ Sin embargo, su utilidad terapéutica presenta varias limitaciones tales como su intenso color amarillo, su baja biodisponibilidad *in vivo* y su baja solubilidad en agua debido a sus polifenoles hidrofóbicos (véase la estructura en la figura 1.47), siendo poco absorbida y rápidamente excretada.¹³⁹

El resveratrol es otro compuesto fenólico que se encuentra presente en numerosas plantas y frutos tales como cacahuetes, moras, arándanos y, sobre todo, en la uva y el vino tinto.¹⁴⁰ Presenta numerosas propiedades biológicas entre las que destacan su acción antioxidante,¹⁴¹ antiinflamatoria,¹⁴² antiproliferativa¹⁴³ y antiangiogénica,¹⁴⁴ por lo que puede actuar a través de numerosas vías de señalización, siendo beneficioso en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer.¹⁴⁵

¹³⁵ Moghadamtousi, S. Z.; Kadir, H. A.; Hassandarvish, P.; Tajik, H.; Abubakar, S.; Zandi, K. *BioMed. Res. Int.* **2014**, ID 186864. doi: 10.1155/2014/186864.

¹³⁶ a) Bachmeier, B. E.; Killian, P.; Pfeffer, U.; Nerlich, A. G. *Front. Biosci.* **2010**, *2*, 697-717. b) Bar-Sela, G.; Epelbaum, R.; Schaffer, M. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 190-197.

¹³⁷ Khaw, A. K.; Hande, M. P.; Kalthur, G.; Hande, M. P. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 1257-1270.

¹³⁸ a) Anand, P.; Sundaram, C.; Jhurani, S.; Kunnumakkara, A. B.; Aggarwal, B. B. *Cancer Lett.* **2008**, *18*, 133-164. b) Maheshwari, R. K.; Singh, A. K.; Gaddipati, J.; Srimal R. C. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2081-2087.

¹³⁹ a) Anand, P.; Thomas, S. G.; Kunnumakkara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Sung, B.; Tharakan, S. T.; Misra, K.; Priyadarsini, I. K.; Rajasekharan, K. N.; Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590-1611. b) Chattopadhyay, I.; Biswas, K.; Bandyopadhyay, U.; Banerjee, R. K. *Current Sci.* **2004**, *87*, 44-53.

¹⁴⁰ Soleas, G. J.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. *Clin. Biochem.* **1997**, *30*, 91-113.

¹⁴¹ Sanchez-Moreno, C.; Jimenez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F. *Nutr. Res.* **2000**, *20*, 941-953.

¹⁴² Alarcón de la Lastra, C.; Isabel Villegas, I. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 405-430.

¹⁴³ Schneider, Y.; Vincent, F.; Duranton, B.; Badolo, L.; Gossé, F.; Bergmann, C.; Seiler, N.; Raul, F. *Cancer Lett.* **2000**, *158*, 85-91.

¹⁴⁴ Chen, Y.; Tseng, S. H. *In Vivo* **2007**, *21*, 365-370.

¹⁴⁵ a) Catalgol, B.; Batirel, S.; Taga, Y.; Ozer, B. K. *Frontiers in Pharmacol.* **2012**, *3*, 1-18. b) Takada, Y. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2783-2840. c) Baur, J. A.; Sinclair, D. A. *Nature Rev.* **2006**, *5*, 493-506. d) Bradamante, S.; Barenghi, L.; Villa, A. *Cardiovasc. Drug Rev.* **2004**, *22*, 169-188.

Figura 1.49. Estructura del resveratrol.

Otro producto natural con un amplio conjunto de propiedades biológicas es la pteroginidina, una guanidina natural extraída de la planta brasileña *Alchornea glandulosa*. Este compuesto ha demostrado tener actividad antiinflamatoria, antiangiogénica y antitumoral.¹⁴⁶

Figura 1.50. Estructura de la pteroginidina.

El honokiol es un producto natural bifenílico extraído de la corteza y raíz de ciertas especies arbóreas de la familia de las Magnoliáceas (*Magnolia officinalis*, *Magnolia obovata* y *Magnolia grandiflora*). La corteza de estos árboles ha sido usada ampliamente en la medicina tradicional china y japonesa para el tratamiento de la depresión, la ansiedad y los desórdenes gastrointestinales. Las propiedades curativas de este compuesto fueron descubiertas debido a un antiguo remedio natural chino conocido como *Saiboku-to*, que contiene como principal ingrediente el honokiol. Este remedio

¹⁴⁶ a) Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, 28, 1726-1730. b) Lopes, F. C. M.; Rocha, A.; Pirraco, A.; Regasini, L.O.; Sulva, D.; Bolzani, V.S.; Azevedo, I.; Carlos, I.Z.; Soares, R. *BMC Complement. Altern. Med.* **2009**, 9, 15-26. c) Regasini, L. O.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D. H. S.; Furlan, M.; Barreiro, E. J.; Ferreira, P. M. P.; Pessoa, C.; Lotufo, L. V. C.; Moraes, M. O.; Young, M. C. M.; Bolzani, V. S. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 473-476. d) Duarte, R. A.; Mello, E. R.; Araki, C.; Bolzani, V. S.; Silva, D. H. S.; Regasini, L. O.; Silva, T. G. A.; Morais, M. C. C.; Ximenes, V. F.; Soares, C. P. *Tumor Biol.* **2010**, 31, 513-522.

fue aprobado por las autoridades japonesas como tratamiento para el asma y la bronquitis.¹⁴⁷ Como componentes activos de la corteza, además del propio honokiol, se ha identificado un isómero estructural de éste, el magnolol.¹⁴⁸

Figura 1.51. Flor y compuestos activos de la familia de las Magnoliáceas.

Entre los dos productos el honokiol es el compuesto más activo, ya que posee propiedades antiinflamatorias,¹⁴⁹ antitrombóticas,¹⁵⁰ antivirales,¹⁵¹ antifúngicas,¹⁵² antioxidantes,¹⁵³ ansiolíticas,¹⁵⁴ neuroprotectoras¹⁵⁵ y, recientemente en estudios preclínicos, se han observado también propiedades

¹⁴⁷ Lin, J. M.; Gowda, A. S. P.; Sharma, A. K.; Amin, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3202-3211.

¹⁴⁸ Amblard, F.; Govindarajan, B.; Lefkove, B.; Rapp, K. L.; Detorio, M.; Arbiser, J. L.; Schinazi, R.F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4428-4431.

¹⁴⁹ a) Zhao, C.; Liu, Z. Q. *Biochimie*. **2011**, *93*, 1755-1760. b) Munroe, M. E.; Arbiser, J. L.; Bishop, G. A. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 753-763. c) Liou, K. T.; Shen, Y. C.; Chen, C. F.; Tsao, C. M.; Tsai, S. K. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *475*, 19-27.

¹⁵⁰ Hu, H.; Zhang, X. X.; Wang, Y. Y.; Chen, S. Z. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 1063-1068.

¹⁵¹ Lan, K-H.; Wang, Y-W.; Lee, W-P.; Keng-Li Lan, K-L.; Tseng, S-H.; et al. *Liver Int.* **2012**, *32*, 989-997.

¹⁵² Bang, K. K.; Kim, Y. K.; Min, B. S.; Na, M. K.; Rhee, Y. H.; Lee, J. P.; Bae, K. H. *Arch. Pharm. Res.* **2000**, *23*, 46-49.

¹⁵³ Ogata, M.; Hoshia, M.; Shimotohno, K.; Urano, S.; Endo, T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 557-562.

¹⁵⁴ Kuribara, H.; Kishi, E.; Hattori, N.; Okada, M.; Maruyama, Y. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 1425-1429.

¹⁵⁵ Woodbury, A.; Yu, S. P.; Ling, Wei.; García, P. *Front. Neurol.* **2013**, *4*, doi:10.3389/fneur.2013.00130.

antiangiogénicas¹⁵⁶ y antitumorales.¹⁵⁷ Además, a diferencia de otros productos naturales presenta una alta biodisponibilidad.¹⁵⁸

El honokiol ejerce su acción antiangiogénica mediante la regulación del factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), la regulación del factor de crecimiento transformante beta (TGFb) y la inhibición del factor inductor de hipoxia (HIF-1).¹⁵⁹

Otra acción antiangiogénica del honokiol es la inhibición de la fosforilación del receptor VEGFR-2 en células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC).¹⁶⁰ De este modo no puede activarse la cascada de señalización del receptor, disminuyendo la permeabilidad vascular de los capilares e impidiendo la proliferación, migración y sobreexpresión de células endoteliales.^{148,156} Además, en ensayos *in vitro* se ha observado que el honokiol suprime la proliferación de células endoteliales de vasos sanguíneos.¹⁶¹ Todas estas propiedades hacen del honokiol un atractivo candidato como agente antineoplásico.¹⁶²

¹⁵⁶ Bai, X.; Cerimele, F.; Ushio-Fukai, M.; Waqas, M.; Campbell, P.M.; Govindarajan, B.; Der, C.J.; Battle, T.; Frank, D.A.; Ye, K.; Murad, E.; Dubiel, W.; Soff, G.; Arbiser, J.L. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35501-35507.

¹⁵⁷ Wen, J.; Fu, A-F.; Chen, L-J.; Xie, X-J.; Yang, G-L.; Chen, X-C.; Wang, Y-S.; Li, J.; Chen, P.; Tang, M-H.; Shao, X-M.; Lu, Y.; Zhao, X.; Wei, Y-Q. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2709-2718.

¹⁵⁸ a) Lee, Y-J.; Lee, Y. M.; Lee, C-K.; Jung, J. K.; Han, S. B.; Hong, J. T. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *130*, 157-176. b) Fried, L. E.; Arbiser, J. L. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 1139-1148. c) Kumar, V. P.; Reddy, R. G.; Vo, D-D.; Chakravarty, S.; Chandrasekhar, S.; Grée, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1439-1444. d) Arora, S.; Singh, S.; Piazza, G. A.; Contreras, C. M.; Panyam, J.; Singh, A. P. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 1244-1252.

¹⁵⁹ a) Lee, B. C.; Doo, H. K.; Lee, H. J.; Jin, S. Y.; Jung, J. H.; Hong, S. J.; Lee, S. H.; Kim, S. D.; Park, J. K.; Leem, K. H.; Ahn, S. Y. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *94*, 81-85. b) Lan, K-L.; Lan, K-H.; Sheu, M-L.; Chen, M-Y.; Shih, Y-S.; Hsu, F-C.; Wang, H-M.; Liu, R-S.; Yen, S-H. *Int. J. Radiat. Biol.* **2011**, *87*, 579-590.

¹⁶⁰ a) Jeong, J. J.; Lee, J. H.; Chang, K. C.; Kim, H. J. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 1358-1364. b) Leeman-Neill, R. J.; Cai, Q.; Joyce, S. C.; Thomas, S. M.; et al. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2571-2579.

¹⁶¹ Kim, G. D.; Bae, S. Y.; Park, H-J.; Bae, K.; Lee, S. K. *Cell. Physiol. Biochem.* **2012**, *30*, 758-770.

¹⁶² a) Ishitsuka, K.; Hideshima, T.; Makoto Hamasaki, M.; Raje, N.; et al. *Blood* **2005**, *106*, 1794-1800. b) Chen, F.; Wang, T.; Wu, Y. F.; Gu, Y.; Xu, X. L.; Zheng, S.; Hu, X. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 3459-3463. c) Maruyama, Y.; Kuribara, H. *CNS Drug Reviews* **2000**, *6*, 35-44.

2. OBJETIVOS

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis se dividen en dos apartados. En el primero de ellos se abordará la síntesis y evaluación biológica de compuestos derivados del producto natural honokiol. El segundo se enfocará a la síntesis y evaluación biológica de derivados del ácido 3-metilglutámico. Estos objetivos se describen con más detalle a continuación.

2.1. DERIVADOS DE HONOKIOL

- a) El primer objetivo se centrará en la síntesis de derivados de honokiol. La elección de este compuesto se basa, además de en sus múltiples propiedades biológicas y su alta biodisponibilidad comentadas en la introducción, en su simplicidad estructural.

Figura 2.1. Estructura del honokiol.

Su estructura bifenílica convierte la síntesis de sus derivados en un objetivo muy interesante, ya que con un plan de síntesis adecuado se pueden preparar, de forma rápida y eficiente, numerosos análogos. Las estructuras generales de los compuestos que se pretenden sintetizar se indican en la figura 2.2. Estas estructuras se han agrupado en cinco series. Las dos primeras engloban compuestos bifenílicos con sustituyentes de tipo hidroxilo, metoxilo, alilo y amino. La tercera serie contiene compuestos de tipo arilpiridínico y arilpirimidínico. La serie cuatro consta de compuestos de tipo *N*-arilmorfolina, *N*-arilpiperidina y *N*-arilpirrolidina. La última serie de compuestos contiene compuestos de tipo

amida que resultan de la inserción formal del grupo carbonilo en los compuestos de la serie anterior.

Figura 2.2. Estructuras generales de los objetivos sintéticos del apartado 2.1.

- b) En el segundo objetivo de este apartado se procederá a la evaluación de la actividad biológica de los compuestos indicados en la figura anterior. Se determinará la citotoxicidad de cada producto y, sobre una serie de compuestos seleccionados en función de su actividad citotóxica, se evaluará su acción antiangiogénica y antitelomerasa.

2.2. DERIVADOS DEL ÁCIDO 3-METILGLUTÁMICO

Se ha demostrado que el ácido 3-metilglutámico (véase la figura 2.3) presenta propiedades antitumorales y antiangiogénicas.¹⁶³ El principal inconveniente de este compuesto es su bajo valor del coeficiente log P (-3.41),

¹⁶³ Chen, Z.; Ruan, Q.; Han, S.; Xi, L.; Jiang, W.; Jiang, H.; Ostrov, D. A.; Cai, J. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *145*, 45-59.

lo que explica su incapacidad para traspasar la membrana celular y llegar a su diana farmacológica.

Figura 2.3. Estructura del ácido 3-metilglutámico.

- a) El primer objetivo de esta segunda parte del proyecto se enfocará a la síntesis de derivados del ácido 3-metilglutámico (MGA) que sean capaces de actuar como profármacos de éste. Las estructuras generales de estos derivados se indican en la figura 2.4.

Figura 2.4. Estructuras generales de derivados del MGA.

- b) El segundo objetivo se dirigirá a la evaluación de la actividad biológica de los derivados sintéticos del MGA. Se medirá su citotoxicidad en diferentes líneas celulares, con especial interés en aquellas relacionadas con el cáncer de mama triple negativo (TNBC). También se estudiará la proliferación celular en determinados tipos de células, a fin de seleccionar los compuestos con vistas a ulteriores análisis biológicos relacionados con el cáncer de mama triple negativo.

3. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE HONOKIOL

CAPÍTULO 3: SÍNTESIS DE DERIVADOS DE HONOKIOL

3.1. SÍNTESIS DE BIFENILOS

3.1.1. Síntesis de aliloxi- e (hidroxi)alil-bifenilos

La estructura del honokiol (3',5'-dialil-[1,1'-bifenil]-2,4'-diol) se dibuja en la figura 3.1. En este esquema también se dibujan las estructuras de los primeros compuestos bifenílicos sintetizados en esta tesis y que corresponden a compuestos del tipo aliloxi e (hidroxi)alil-bifenilos.

Figura 3.1. Estructura del honokiol y estructura general de aliloxi e (hidroxi)alil-bifenilos.

A partir de los hidroxi-bifenilos **1-3**, compuestos comercialmente disponibles, se obtuvieron los aliloxi-bifenilos **7-9** mediante reacción de O-alilación con bromuro de alilo en acetona en presencia de carbonato potásico (véase el esquema 3.1 y la tabla 3.1).¹⁶⁴ La transposición de Claisen de los compuestos **7** y **9** en presencia del ácido de Lewis Et_2AlCl condujo a los (hidroxi)alil-bifenilos **10** y **11** (véase el esquema 3.1 y la tabla 3.1).¹⁶⁵

¹⁶⁴ Ma, L.; Chen, J.; Wang, X.; Liang, X.; Luo, Y.; Zhu, W.; Wang, T.; Peng, M.; Li, S.; Jie, S.; Peng, A.; Wei, Y.; Chen, L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6469-6481.

¹⁶⁵ Tripathi, S.; Chan, M-H.; Chen, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 216-221.

Esquema 3.1. (a) Bromuro de alilo, K_2CO_3 , acetona, reflujo, 5 h. (b) Et_2AlCl , hexano, $25^\circ C$, 2 h.

La estructura de los compuestos de O-alilación y de transposición, los rendimientos obtenidos y el valor estimado de $\log P^{166}$ se indican en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Aliloxi e (hidroxi)alil-bifenilos.

Compuesto de partida	O-aliloxi-bifenilo	(Hidroxi)alil-bifenilo
 1 Log P: 3,32	 7 (78%) Log P: 4,28	 10 (70%) Log P: 4,37
 2 Log P: 3,32	 8 (56%) Log P: 4,28	Mezclas de productos
 3 Log P: 3,32	 9 (81%) Log P: 4,28	 11 (40%) Log P: 4,37

La evaluación biológica de todos los compuestos mostrados en la tabla 3.1, junto con la de los productos comercialmente disponibles 2-metoxi-1,1'-bifenilo (compuesto **4**), 3-metoxi-1,1'-bifenilo (compuesto **5**) y 4-metoxi-1,1'-bifenilo (compuesto **6**), se explicará en el capítulo 4.

Todos los compuestos de la tabla anterior cumplen con lo establecido en "la regla del cinco" de Lipinski para ser un buen candidato a fármaco, ya que presentan un valor de $\log P$ inferior a 5.

¹⁶⁶ El valor de $\log P$ se ha calculado mediante el programa ChemBioDraw Ultra 14.0.

3.1.2. Síntesis de dihidroxi- e (hidroxi)metoxi-bifenilos

En este apartado se describe la síntesis de dihidroxi- e (hidroxi)metoxi-bifenilos. La preparación de estos compuestos se llevó a cabo mediante reacción de Suzuki entre bromuros de arilo y organoboranos. La reacción de Suzuki es una de las más empleadas en la formación de enlaces C-C y en particular en la formación de enlaces Csp^2-Csp^2 como los que presentan los compuestos bifenílicos. La reacción fue descrita en 1979 y permite el acoplamiento de organoboranos con haluros de arilo o vinilo en presencia de una base y un catalizador de paladio.¹⁶⁷ El éxito de la reacción de Suzuki reside en la baja toxicidad de los organoboranos empleados como componentes nucleofílicos del proceso, en la utilización de agua y otros disolventes hidroxílicos, en la tolerancia a una amplia variedad de grupos funcionales y en su regio- y estereoselectividad.¹⁶⁸ El ciclo catalítico de dicha reacción se indica en el siguiente esquema:

Esquema 3.2. Ciclo catalítico de la reacción de Suzuki.

¹⁶⁷ Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440.

¹⁶⁸ a) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483. b) Suzuki, A. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 576, 147-168.

Para la síntesis de los dihidroxi- e (hidroxi)metoxi-bifenilos se emplearon tres métodos experimentales, denominados A, B y C.

En el método A (véase el esquema 3.3) se emplearon como componentes nucleofílicos ácidos arilborónicos, como componentes electrofílicos bromuros de arilo y como catalizador el diacetato de paladio. Como activador del ácido borónico se empleó el carbonato de sodio.¹⁶⁹ La reacción se llevó a cabo en una mezcla de agua/acetona a 35°C durante aproximadamente 1 hora.¹⁷⁰

En el método B se empleó también carbonato sódico y diacetato de paladio, pero el disolvente de la reacción era una mezcla de agua/etanol y la temperatura aplicada fue de 70°C durante 4 horas (véase el esquema 3.3).¹⁷¹

En el método C se empleó carbonato sódico como base y PdCl₂(dppf) como catalizador en una mezcla de agua y 1,2-dimetoxietano (DME) bajo calentamiento a 85°C durante 24 horas.^{165,171,172} En este método se emplearon como componentes nucleofílicos ácidos arilborónicos y también arilpinacol boronatos.

Esquema 3.3. Método A: Pd(AcO)₂, Na₂CO₃, H₂O/acetona, 35°C, 1 h. Método B: Pd(AcO)₂, Na₂CO₃, H₂O/EtOH, 70°C, 4 h. Método C: PdCl₂(dppf), Na₂CO₃, H₂O/DME, 85°C, 24 h.

En la tabla 3.2 se indican las estructuras de los bifenilos obtenidos, las estructuras de los organoboranos empleados así como el valor de log P, el

¹⁶⁹ a) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, 58, 9633-9695. b) Bellina, F.; Carpita, A.; Rossi, R. *Synthesis* **2004**, 15, 2419-2440.

¹⁷⁰ a) Liu, L.; Zhang, Y.; Xin, B. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3994-3997. b) Liu, L.; Zhang, Y.; Wang, Y. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 6122-6125.

¹⁷¹ a) Lee, D.; Choi, M.; Yu, B.; Ryoo, R.; Taher, A.; Hossain, S.; Jin, M. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 2912-2920. b) Badone, D.; Baroni, M.; Cardamone, R.; Ielmini, A.; Guzzi, U. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7170-7173.

¹⁷² Asano, S.; Kamioka, S.; Isobe, Y. *Tetrahedron* **2012**, 68, 272-279.

método aplicado y el rendimiento obtenido. También se indican las estructuras de otros derivados adquiridos en el comercio (compuestos **12**, **15**, **17** y **18**), que junto con el resto de compuestos de la tabla 3.2 fueron evaluados biológicamente, tal y como se explicará en el capítulo 4.

Tabla 3.2. Dihidroxi- e (hidroxi)metoxi-bifenilos (continúa).

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Met.	Rto.
12	-		2,93	-	Comerc. disponible
13			2,93	A	71%
14			2,93	B	50%
15	-		2,93	-	Comerc. disponible
16			2,93	B	95%
17	-		2,93	-	Comerc. disponible
18	-		2,93	-	Comerc. disponible
19			3,19	C	60%

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Met.	Rto.
20			3,19	C	95%
21			3,19	C	95%
22			3,19	B	57%
23			3,19	C	90%
24			3,19	C	70%
25			3,19	C	43%
26			3,19	C	80%
27			3,19	C	95%

Los valores calculados de log P de los productos de la tabla anterior son inferiores a cinco.

3.1.3. Síntesis de dimetoxi-, trimetoxi- y (dimetoxi)hidroxi-bifenilos

Los dimetoxi-, trimetoxi- y (dimetoxi)hidroxi-bifenilos indicados en la tabla 3.3 se obtuvieron mediante aplicación del método C (véase el esquema 3.3). En esta tabla se indican las estructuras de los bifenilos obtenidos, sus rendimientos y su coeficiente de partición, así como las estructuras de los organoboranos empleados en las reacciones de acoplamiento.

Tabla 3.3. Dimetoxi-, trimetoxi- y (dimetoxi)hidroxi-bifenilos (método C) (continúa).

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Rto.
28			3,46	84%
29			3,46	95%
30			3,33	95%
31			3,07	77%
32			3,07	95%
33			3,07	43%
34			3,07	61%

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Rto.
35			3,07	84%
36			3,07	45%

3.1.4. Síntesis de dialiloxi- y (metoxi)aliloxi-bifenilos

Los dialiloxi- y (metoxi)aliloxi-bifenilos que se indican en la tabla 3.4 se obtuvieron mediante O-alilación de los correspondientes hidroxi-bifenilos con bromuro de alilo y carbonato potásico a reflujo de acetona durante 5 horas, tal y como se muestra en el esquema 3.4.¹⁶⁴

Esquema 3.4. (a) Bromuro de alilo, K₂CO₃, acetona, reflujo, 5 h.

Tabla 3.4. Dialiloxi- y (metoxi)aliloxi-bifenilos (continúa).

Comp.	Compuesto de partida	Producto	Log P	Rto.
37			4,84	81%
38			4,84	56%
39			4,84	40%

Comp.	Compuesto de partida	Producto	Log P	Rto.
40			4,84	95%
41			4,84	78%
42			4,84	47%
43			4,84	40%
44			4,15	74%
45			4,15	82%
46			4,15	94%
47			4,15	85%
48			4,15	64%

Comp.	Compuesto de partida	Producto	Log P	Rto.
49			4,15	94%
50			4,15	38%
51			4,02	61%
52			4,02	47%
53			4,02	60%

Como antes, en ninguno de los compuestos anteriores el valor de log P sobrepasa el recomendado por Lipinski para ser un buen candidato a fármaco.

3.1.5. Reacciones de transposición de Claisen sobre aliloxi-bifenilos

Sobre una gran mayoría de los compuestos indicados en la tabla anterior se llevaron a cabo reacciones de transposición de Claisen a fin de obtener los correspondientes (hidroxi)alil-bifenilos. La transposición de Claisen se efectuó en presencia del ácido de Lewis Et_2AlCl , utilizando la metodología del apartado 3.1.1 (véase el esquema 3.5).^{165,173}

¹⁷³ Palmer, F. N.; Lach, F.; Poriel, C.; Pepper, A. G.; Bagley, M. C.; Slawin, A. M. Z.; Moody, C. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3805-3811.

Esquema 3.5. (a) Et_2AlCl , hexano, 25°C , 2-3 h.

El compuesto de partida, los productos de reacción, el valor de log P y los rendimientos obtenidos en las reacciones de transposición se indican en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Productos de transposición de Claisen (continúa).

Comp.	Compuesto de partida	Producto	Log P	Rto.
54			5,03	51%
55			5,03	30%
56			5,03	13% (56)
57				32% (57)
58			5,03	15% (58)
59				24% (59)

Comp.	Compuesto de partida	Producto	Log P	Rto.
60			5,03	13%
61			4,25	32%
62			4,25	62%
63			4,25	51%
64			4,25	57%
65			4,25	35%
66			4,12	35%
67			4,12	48% (67)
68			4,12	34% (68)

En algunas reacciones se obtenían mezclas de productos difíciles de aislar y purificar por lo que en la tabla anterior únicamente se muestran los compuestos que se pudieron obtener en forma pura.

En este caso únicamente los compuestos con similitud estructural al honokiol presentan un valor de log P ligeramente superior a 5.

3.1.6. Síntesis de amino- e (hidroxi)amino-bifenilos

Los bifenilos indicados en la tabla 3.6 se obtuvieron mediante acoplamiento de Suzuki de organoboranos con las correspondientes bromoanilinas bajo las condiciones de reacción de los métodos C (descrito anteriormente) y D (véase el esquema 3.6).^{171,174}

Esquema 3.6. Método C: $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$, Na_2CO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{DME}$, 85°C , 24 h. Método D: $\text{Pd}(\text{AcO})_2$, Na_2CO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, MW (150°C), 30-70 min.

La síntesis de los (hidroxi)amino-bifenilos con los grupos hidroxilo en posiciones 2 y 4, en las condiciones del método D, proporcionó mezclas difíciles de separar de compuestos de partida y productos de reacción. Por ello, la síntesis de este tipo de bifenilos se llevó a cabo en las condiciones del método C.¹⁶⁵ En la tabla 3.6 se indican los organoboranos empleados en las reacciones de acoplamiento, las estructuras de los compuestos bifenílicos obtenidos, así como el método empleado y el rendimiento obtenido.

En la tabla 3.6 se indican también las estructuras de los compuestos **69**, **70** y **71**, comercialmente disponibles, que fueron evaluados biológicamente junto con el resto de los compuestos de la tabla 3.6, tal y como se explicará en el siguiente capítulo de esta tesis.

¹⁷⁴ Leadbeater, N. E.; Marco, M. *Org. Lett.* **2002**, 4, 2973-2976.

Tabla 3.6. Amino- e (hidroxi)amino-bifenilos (continúa).

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Método	Rto.
69	-		2,91	-	Comerc. disponible
70	-		2,91	-	Comerc. disponible
71	-		2,91	-	Comerc. disponible
72			2,52	C	36%
73			2,52	C	70%
74			2,52	C	47%
75			2,52	D	61%
76			2,52	D	65%
77			2,52	D	68%

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Método	Rto.
78			2,52	C	77%
79			2,52	C	44%
80			2,52	C	70%

Todos los valores de log P de los compuestos anteriores se encuentran en el rango de entre 2 y 3.

3.1.7. Síntesis de (dimetoxi)amino-bifenilos

Los (dimetoxi)amino-bifenilos indicados en la tabla 3.7 se obtuvieron en las condiciones de acoplamiento del método C (véase el esquema 3.7).

Esquema 3.7. Método C: $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$, Na_2CO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{DME}$, 85°C , 24 h.

En la tabla 3.7 se muestran los organoboranos utilizados en cada reacción junto con las estructuras de los productos y los rendimientos obtenidos. Se indica también el valor de log P, que es inferior a 5 en todos los casos.

Tabla 3.7. (Dimetoxi)amino-bifenilos (método C).

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Rto.
81			2,65	32%
82			2,65	42%
83			2,65	38%
84			2,65	63%
85			2,65	79%
86			2,65	31%

3.2. SÍNTESIS DE ARILPIRIDINAS Y ARILPYRIMIDINAS

La síntesis de arilpiridinas y arilpirimidinas se llevó a cabo empleando las condiciones del método C (véase el esquema 3.8).¹⁶⁵

Esquema 3.8. Método C: $PdCl_2(dppf)$, Na_2CO_3 , H_2O/DME , $85^\circ C$, 24 h.

Las estructuras de las arilpiridinas y arilpirimidinas sintetizadas, los organoboranos empleados, así como el valor de log P y los rendimientos obtenidos se indican en la tabla 3.8. Los valores estimados de log P son inferiores a 5. En dicha tabla se indican también las estructuras de los compuestos **87** y **91**, comercialmente accesibles, que fueron evaluados biológicamente junto con el resto de compuestos de la tabla 3.8, tal y como se explicará en el capítulo 4 de esta tesis.

Tabla 3.8. Arilpiridinas y arilpirimidinas (método C) (continúa).

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Rto.
87	-		2,8	Comerc. disponible
88			2,41	95%
89			2,54	76%
90			2,54	71%

Comp.	Organoborano	Producto	Log P	Rto.
91	-		2,8	Comerc. disponible
92			2,41	64%
93			2,54	87%
94			2,54	80%
95			2,28	43%
96			2,41	49%
97			2,41	47%
98			1,77	72%
99			2,28	32%
100			2,41	41%
101			2,41	46%

3.3. SÍNTESIS DE *N*-ARILMORFOLINAS, *N*-ARILPIPERIDINAS Y *N*-ARILPIRROLIDINAS

Otro tipo de compuestos sintetizados en esta tesis fueron las *N*-arilmorfolinas, *N*-arilpiperidinas y *N*-arilpirrolidinas que se obtuvieron mediante acoplamiento de bromuros de arilo con morfolina, piperidina o pirrolidina.

Las reacciones de aminación mediante sustituciones nucleofílicas sobre haluros de arilo que contienen sustituyentes electrón-donantes se pueden llevar a cabo mediante diferentes metodologías, tales como la de Ullmann, que emplea sales de Cu(I),¹⁷⁵ la de Goldberg,¹⁷⁶ en la que se acopla el haluro de arilo y la amina en presencia de CuO y KOH a elevada temperatura, o el método de Buchwald-Hartwig,¹⁷⁷ en el que se lleva a cabo el acoplamiento entre el haluro de arilo y la amina en presencia de un catalizador de paladio y una base. Todos estos métodos requieren de un catalizador metálico basado en sales de cobre o en complejos de paladio. Sin embargo, para la obtención de las *N*-arilmorfolinas, *N*-arilpiperidinas y *N*-arilpirrolidinas se empleó, por su mayor simplicidad experimental, un método de reacción consistente en el calentamiento, bajo irradiación con microondas,¹⁷⁸ de los correspondientes haluros de arilo y las *N*-arilaminas en presencia de *tert*-butóxido de potasio y sin el uso de ningún catalizador (véase el esquema 3.9).¹⁷⁹

Esquema 3.9. (a) *t*-BuOK, DMSO, MW (190°C), 20-35 min.

¹⁷⁵ Ullmann, F; *Chem. Ber.* **1903**, 36, 2382-2384.

¹⁷⁶ Goldberg, I. *Chem. Ber.* **1906**, 39, 1691-1692.

¹⁷⁷ a) Louie, J.; Hartwig, J. F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3609-3612. b) Guram, A. S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1348-1350.

¹⁷⁸ a) Narayan, S.; Seelhammer, T.; Gawley, R. E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 757-759. b) Cano, R.; Ramón, D. J.; Yus, M. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 654-660. c) Fang, Y.; Zheng, Y.; Wang, Z. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1495-1498.

¹⁷⁹ Shi, L.; Wang, M.; Fan, C. A.; Zhang, F. M.; Tu, Y. Q. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3515-3517.

Las estructuras de las *N*-arilmorfolinas, *N*-arilpiperidinas y *N*-arilpirrolidinas sintetizadas se indican en la tabla 3.9. También se indican las estructuras de la 4-fenilmorfolina (producto **102**) y 1-fenilpirrolidina (producto **108**), ambos comercialmente disponibles, que fueron evaluados biológicamente junto con el resto de compuestos de la tabla 3.9, tal y como se explicará en el siguiente capítulo de esta tesis.

Tabla 3.9. *N*-Arilmorfolinas, *N*-arilpiperidinas y *N*-arilpirrolidinas (continúa).

Comp.	Bromuro de arilo	Amina	Producto	Log P	Rto.
102	-	-		1,92	Comerc. disponible
103		Morfolina		1,79	46%
103		Morfolina		1,79	39% (103)
104					42% (104)
105		Piperidina		3,05	53%
106		Piperidina		2,93	40%

Comp.	Bromuro de arilo	Amina	Producto	Log P	Rto.
106		Piperidina		2,93	41% (106)
107					56% (107)
108	-	-		2,63	Comerc. disponible
109		Pirrolidina		2,51	55% (109)
110					38% (110)

De los resultados mostrados en la tabla anterior se puede deducir que el mecanismo de la reacción no sigue el de una reacción de sustitución nucleofílica aromática. Este hecho se evidencia en los productos **103/104**, **106/107** y **109/110** generados a partir del 1-bromo-4-metoxibenceno, dónde se obtiene mezclas de productos. La formación de dichas mezclas se puede explicar por la intervención del mecanismo con un intermedio de tipo bencínico, favorecido por la presencia del sustituyente electrón-donante metoxilo en posición *para*.¹⁸⁰ El mecanismo bencínico consta de dos etapas. En la primera de ellas se produce la eliminación de HBr con la subsiguiente formación de la especie bencínica. En la segunda etapa tiene lugar la adición del nucleófilo a dicha especie.¹⁸¹ En el esquema 3.10 se explica la formación

¹⁸⁰ Chapman, O. L.; Mattes, K.; McIntosh, C. L.; Packansky, J.; Calder, G. V.; Orr, G. J. *Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 6134-6135.

¹⁸¹ March, J.; Smith, M. B. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structures*, 6th ed. John Wiley & Sons, Inc. **2007**, 859.

de las mezclas de productos anteriormente indicados mediante la aplicación de esta pauta mecanística.

1) Eliminación

2) Adición

Esquema 3.10. Mecanismo con participación de una especie bencínica.

Cuando se emplea 1-bromo-3-metoxibenceno se obtiene únicamente el producto en *meta* debido, muy probablemente, tanto a impedimentos electrónicos como estéricos. Además, la reacción del bromuro de arilo con sustituyente en posición *orto* y su correspondiente amina conduce a un producto final con sustituyente en posición *meta*, sin llegar a obtenerse el producto en *orto*.

Las amidas indicadas en la tabla 3.10 se pueden considerar como análogos de los compuestos anteriores que contienen una función carbonilo entre los dos anillos. Las amidas se obtuvieron mediante reacción de cloruros de ácido con aminas, tal y como se muestra en el esquema 3.11.¹⁸²

Esquema 3.11. (a) Et₃N, CH₂Cl₂, 25°C, 30-60 min.

¹⁸² Das, S.; Addis, D.; Zhou, S.; Junge, K.; Beller, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1770-1771.

En la tabla 3.10 se indican las estructuras de los compuestos de partida, de las correspondientes amidas y sus rendimientos. El compuesto **112**, comercialmente accesible, ha sido evaluado biológicamente junto con los demás compuestos de la tabla 3.10, tal y como se verá en el capítulo 4.

Tabla 3.10. *N*-Arilmorfolinas, *N*-arilpiperidinas y *N*-arilpirrolidinas con grupos carbonilo.

Comp.	Cloruro de acilo	Amina	Producto	Log P	Rto.
111		Morfolina		1,01	95%
112	-	-		2,14	Comerc. disponible
113		Pirrolidina		1,73	93%
114		Morfolina		0,8	56%
115		Piperidina		2,25	79%
116		Pirrolidina		1,79	54%

El valor de log P de las *N*-arilaminas es en todos los casos menor que 5.

3.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.4.1. Técnicas generales

Los espectros de RMN fueron registrados en espectrómetro Varian Unity 500 (frecuencias aproximadas de operación, 500 MHz para ^1H ; 125 MHz para ^{13}C). Las asignaciones de las señales se han llevado a cabo mediante correlaciones heteronucleares bidimensionales (COSY y HSQC). Los espectros se midieron en disolución de CDCl_3/TMS , CD_3OD y $\text{DMSO}-d_6$. Los desplazamientos químicos (δ) están indicados en ppm usando como referencia las señales residuales de los disolventes. Para el ^1H , se referencia $\delta=7,27$ ppm para el CDCl_3 o si estuviera solapada con otra señal de la muestra $\delta=0,00$ ppm para el TMS, $\delta=3,31$ ppm para el CD_3OD y $\delta=2,50$ ppm para el $\text{DMSO}-d_6$. Para el ^{13}C , se referencia $\delta=77,0$ ppm para el CDCl_3 , $\delta=49,0$ ppm para el CD_3OD y $\delta=39,5$ ppm para el $\text{DMSO}-d_6$. En el caso de las multiplicidades en el ^1H -RMN se ha usado *s* cuando se trata de un singulete, *d* para doblete, *t* para triplete, *c* para cuadruplete, *m* para multiplete, *br* cuando se trata de una señal ancha y *app* cuando se trata de una señal con multiplicidad aparente.

Los espectros de IR se obtuvieron mediante el uso de pastillas de KBr para muestras líquidas o mediante el uso de ATR para muestras sólidas en un espectrómetro Jasco FT/IR-6200, abarcando la región $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.

Los espectros de masas se midieron en un espectrómetro de masas Q-TOF (Waters, Manchester, UK) con fuente de ionización combinada 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 puntos de fusión fueron medidos en un aparato de punto de fusión digital SMP10 (Stuart Scientific) y no fueron corregidos.

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

El uso de la radiación microondas se llevo a cabo en un equipo MW Discover Labmate (CEM corp.).

Los reactivos disponibles comercialmente se emplearon sin tratamiento previo, directamente de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Fluka, Scharlab o Acros.

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

3.4.2. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método A

A una mezcla de Na_2CO_3 (0,212 g, 2 mmol, 2 eq) y $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,001 g, 0,5% mmol, 0,5% eq) se le añadió 2-bromofenol (0,11 mL, 1 mmol, 1 eq), ácido 3-(hidroxifenil)borónico (0,21 g, 1,5 mmol, 1,5 eq), agua destilada (3,5 mL) y acetona (3,5 mL). Esta mezcla se agitó y se calentó a 35°C durante 1 hora, hasta desaparición del producto de partida. Seguidamente, se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con Et_2O (4 x 5 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con salmuera, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice usando como fase móvil hexano/ AcOEt (8:2). El producto final se recristalizó con una mezcla de disolventes hexano/ CH_2Cl_2 .

[1,1'-Bifenil]-2,3'-diol

Rto. = 71%. Sólido blanquecino, pf 92-93°C (pf lit. 96°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

¹⁸³ Schmidt, B.; Riemer, M. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 4104-4118.

3.4.3. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método B

En un matraz de fondo redondo se disolvió el haluro de arilo (1 mmol, 1 eq), el ácido fenilborónico correspondiente (0,18 g, 1,3 mmol, 1,3 eq), el $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,001 g, 0,5% mmol, 0,5% eq) y el Na_2CO_3 (0,414g, 4 mmol, 4 eq) en $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a 70°C durante 4 horas. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con Et_2O (4 x 5 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/ AcOEt (8:2) para los dioles y hexano/ AcOEt (95:5) para el compuesto **22**. Los productos sólidos fueron recristalizados con CH_3OH .

[1,1'-Bifenil]-2,4'-diol

Rto. = 50%. Sólido incoloro, pf 152-154°C (pf lit. 158°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

[1,1'-Bifenil]-3,4'-diol

Rto. = 95%. Sólido incoloro, pf 190-192°C (pf lit. 200°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁶⁵

2'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-3-ol

Rto. = 57%. Aceite incoloro. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

3.4.4. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método C

A una disolución del bromuro de arilo (1 mmol, 1 eq) y el organoborano correspondiente (1,3 mmol, 1,3 eq) en DME (7 mL), se le añadió $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (0,037g, 0,05 mmol, 0,05 eq) en atmósfera inerte y, seguidamente, una disolución de Na_2CO_3 acuoso 2M (3 mL). La mezcla resultante se calentó a 85°C durante 15-18 horas, hasta la desaparición del producto de partida. Seguidamente, la mezcla se filtró, se separó la fase orgánica y se extrajo con Et_2O (4 x 5 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatógrafió sobre gel de sílice con hexano/ AcOEt (95:5) para fenolanisoles, hexano/ AcOEt (9:1) para los derivados piridínicos y pirimidínicos con metoxilo y con hexano/ AcOEt (8:2) para los bifenildioles, aminofenilfenoles y piridinas o pirimidinas hidroxiladas. Los productos sólidos fueron recrystalizados con CH_3OH .

2'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 60%. Sólido blanquecino, pf 60-62°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

3'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 95%. Sólido blanquecino, pf 88-90°C (pf lit. 92°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

4'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 95%. Sólido incoloro, pf 68-70°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

3'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-3-ol

Rto. = 90%. Aceite incoloro. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

4'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-3-ol

Rto. = 70%. Sólido incoloro, pf 119-121°C (pf lit. 117°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

2'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 43%. Sólido incoloro, pf 115-117°C (pf lit. 117-119°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

3'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 80%. Sólido incoloro, pf 93-95°C (pf lit. 91°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

4'-Metoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 95%. Sólido incoloro, pf 182-184°C (pf lit. 181-182°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸³

2,4-Dimetoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 84%. Aceite incoloro. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸⁴

¹⁸⁴ Li, J.-H.; Zhu, Q.-M.; Xie, Y.-X. *Tetrahedron* **2006**, 62, 10888-10895.

3,4-Dimetoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 95%. Sólido incoloro, pf 70-72°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸⁵

3,4,5-Trimetoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 95%. Sólido incoloro, pf 84-88°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁸⁶

2',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 77%. Sólido incoloro, pf 121-123°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.25-7.20 (3H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.96 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 6.61 (1H, dd, *J* = 8, 1.5 Hz), 6.58 (1H, d, *J* = 2 Hz), 6.10 (1H, br s, OH), 3.80 (6H, s).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 160.8, 156.5, 153.6, 125.8, 119.3 (C); 132.8, 131.2, 128.8, 120.7, 117.0, 106.1, 99.1 (CH); 56.0, 55.4 (CH₃).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) 3450 (br, OH).

¹⁸⁵ Storr, T.E.; Greaney, M. F. *Org. Lett.* **2013**, 15, 1410-1413.

¹⁸⁶ Hüttner C.; Beuerle, T.; Scharnhop, H.; Ernst, L.; Beerhues, L. *J. Agr. Food Chem.* **2010**, 58, 11977-11984.

HR ESMS m/z 231.1023 ($M+H^+$). Calculado para $C_{14}H_{15}O_3$ 231.1021.

2',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3-ol

Rto. = 95%. Aceite marrón claro.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$, TMS) δ 7.25-7.20 (2H, m), 7.04 (1H, dd, $J = 7.8$, 1 Hz), 6.99 (1H, br s), 6.76 (1H, br d, $J \approx 8$ Hz), 6.55-6.53 (2H, m), 5.40 (1H, br s, OH), 3.84 (3H, s), 3.77 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 160.2, 157.3, 155.3, 139.8, 123.2 (C); 132.1, 129.1, 121.7, 116.5, 113.5, 104.7, 99.1 (CH); 55.5, 55.4 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3420 (br, OH).

HR ESMS m/z 231.1018 ($M+H^+$). Calculado para $C_{14}H_{15}O_3$ 231.1021.

2',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 43%. Sólido incoloro, pf 78-80°C (pf lit. 48.2°C).¹⁸⁷

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$, TMS) δ 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.18 (1H, br d, $J \approx 8$ Hz), 6.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.55-6.53 (2H, m), 5.70 (1H, br s, OH), 3.82 (3H, s), 3.75 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 159.8, 157.3, 154.4, 130.7, 123.3 (C); 130.9, 130.6 (x2), 115.0 (x2), 104.7, 99.1 (CH); 55.5, 55.4 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3420 (br, OH).

¹⁸⁷ Petronzi, C.; Filosa, R.; Peduto, A.; Monti, M. C.; Margarucci, L.; Massa, A.; Ercolino, S. F.; Bizzarro, V.; Parente, L.; Riccio, R.; de Caprariis, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 488-496.

HR ESMS m/z 231.1017 ($M+H^+$). Calculado para $C_{14}H_{15}O_3$ 231.1021.

3',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 61%. Sólido incoloro, pf 126-128°C.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$, TMS) δ 7.25-7.20 (2H, m), 7.00 (1H, dd, J = 8.3, 2 Hz), 6.98-6.92 (4H, br m), 5.50 (1H, br s, OH), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 152.5, 149.4, 148.6, 129.6, 127.9 (C); 130.0, 128.7, 121.1, 120.6, 115.7, 112.3, 111.7 (CH); 55.8 (x2) (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3460, 3420 (OH).

HR ESMS m/z 231.1017 ($M+H^+$). Calculado para $C_{14}H_{15}O_3$ 231.1021.

3',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3-ol

Rto. = 84%. Sólido incoloro, pf 118-120°C.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$, TMS) δ 7.24 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.10-7.05 (4H, m), 6.86 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.81 (1H, ddd, J = 7.8, 2.5, 1 Hz), 6.45 (1H, br s, OH), 3.84 (6H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 156.1, 148.8, 148.4, 142.4, 133.8 (C); 129.8, 119.3, 118.9, 113.8, 113.7, 111.5, 110.4 (CH); 55.8 (x2) (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3450 (br, OH).

HR ESMS m/z 231.1018 ($M+H^+$). Calculado para $C_{14}H_{15}O_3$ 231.1021.

3',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 45%. Sólido blanco, pf 163-165°C. El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.¹⁸⁸

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.44 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.09 (1H, d, $J = 8$, Hz), 7.07 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6.90 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.95 (1H, br s, OH), 3.95 (3H, s), 3.92 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 155.0, 149.1, 148.2, 134.1, 133.7 (C); 128.1 (x2), 119.0, 115.6 (x2), 111.6, 110.3 (CH); 55.9 (x2) (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3430 (br, OH).

HR ESMS m/z 231.1020 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_3$ 231.1021.

2'-Amino-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 36%. Sólido marrón claro, pf 80-82°C (pf lit. 91-92°C). El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.¹⁸⁹

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.30-7.25 (2H, m), 7.25-7.20 (2H, m), 7.00-6.95 (2H, m), 6.92 (1H, br t, $J \approx 7.6$ Hz), 6.80 (1H, br d, $J \approx 7.7$ Hz), 5.00 (3H, br s, OH/ NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 153.5, 141.8, 126.1, 121.3 (C); 131.7, 131.1, 129.4, 128.9, 121.1, 120.9, 118.0, 117.2 (CH).

¹⁸⁸ Dahlgren, M. K.; Garcia, A. B.; Hare, A. A.; Tirado-Rives, J.; Leng, L.; Bucala, R.; Jorgensen, W. L. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10148-10159.

¹⁸⁹ Mori, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 911-913.

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3380, 3310 (OH, NH_2).

HR ESMS m/z 186.0919 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}$ 186.0914.

3'-Amino-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 70%. Sólido blanquecino, pf 163-165°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.20 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), 7.15-7.10 (2H, m), 6.94 (1H, br s), 6.90-6.85 (3H, m), 6.68 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), (las señales OH/ NH_2 están solapadas con la señal de disolvente).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 155.2, 148.2, 141.0, 130.3 (C); 131.6, 129.7, 129.3, 120.8, 120.7, 117.9, 116.9, 115.3 (CH).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3525, 3365, 3290 (OH, NH_2).

HR ESMS m/z 186.0920 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}$ 186.0914.

4'-Amino-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 47%. Sólido incoloro, pf 186-188°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.33 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.18 (1H, dd, $J = 7.8$, 1.5 Hz), 7.07 (1H, td, $J = 7.8$, 1.5 Hz), 6.86-6.83 (2H, m), 6.77 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), (las señales OH/ NH_2 están solapadas con la señal de disolvente).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 155.1, 147.4, 130.3, 130.1 (C); 131.3, 131.0 (x2), 128.5, 121.0, 116.8, 116.3 (x2) (CH).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3380, 3315 (NH_2 , OH).

HR ESMS m/z 186.0919 ($M+H^+$). Calculado para $C_{12}H_{12}NO$ 186.0914.

2'-Amino-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 77%. Sólido marrón claro, pf 157.5-158.5°C (pf lit. 163.5-165.5°C).¹⁹⁰

RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.22 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.05 (1H, td, J = 7.8, 1.5 Hz), 7.00 (1H, dd, J = 7.5, 1.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.79 (1H, br d, J $\approx$ 7.8 Hz), 6.73 (1H, br t, J $\approx$ 7.5 Hz), (las señales OH/ NH_2 están solapadas con la señal de disolvente).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 157.7, 145.2, 132.2, 129.5 (C); 131.3 (x2), 131.2, 128.8, 119.6, 117.1, 116.6 (x2) (CH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3380, 3310 (NH_2 , OH).

HR ESMS m/z 186.0917 ($M+H^+$). Calculado para $C_{12}H_{12}NO$ 186.0914.

3'-Amino-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 44%. Sólido amarillento, pf 220-221°C (pf lit. 183°C).¹⁹¹

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$, TMS) δ 7.40 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.11 (1H, t, J = 7.8 Hz), 6.92 (1H, br s), 6.87 (1H, br d, J $\approx$ 7.8 Hz), 6.81 (2H, d, J = 8.7 Hz), 6.64 (1H, br d, J $\approx$ 7.8 Hz), (las señales OH/ NH_2 están solapadas con la señal de disolvente).

¹⁹⁰ Smith, P.A.S.; Clegg, J. M.; Hall, J. H. *J. Org. Chem.* **1958**, 23, 524-529.

¹⁹¹ Vangala, V. R.; Bhogala, B. R.; Dey, A.; Desiraju, G. R.; Broder, C. K.; Smith, P. S.; Mondal, R.; Howard, J. A. K.; Wilson, C. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14495-14509.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 158.0, 148.8, 143.3, 134.3 (C); 130.3, 128.9 (x2), 117.7, 116.4 (x2), 115.0, 114.8 (CH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3360, 3290 (NH_2 , OH).

HR ESMS m/z 186.0918 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}$ 186.0914.

4'-Amino-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 70%. Sólido marrón claro, pf 170-172°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁹²

2',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-amina

Rto. = 32%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.20-7.15 (2H, m), 7.10 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 6.84 (1H, td, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 6.78 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), 6.64-6.60 (2H, m), 3.87 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.70 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 160.5, 157.7, 144.6, 124.7, 120.9 (C); 132.1, 131.3, 128.2, 118.3, 115.5, 105.0, 99.1 (CH); 55.7, 55.4 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3450, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z 230.1179 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ 230.1175.

¹⁹² Dickerson, T. J.; Tremblay, M. R.; Hoffman, T. Z.; Ruiz, D. I.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15395-15401.

2',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3-amina

Rto. = 42%. Aceite marrón claro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.20 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.15 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.87 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 6.80 (1H, t, $J = 1.5$ Hz), 6.59 (1H, ddd, $J = 7.8, 2.5, 1$ Hz), 6.54-6.50 (2H, m), 3.81 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.50 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 160.1, 157.4, 146.0, 139.4, 123.7 (C); 131.1, 128.7, 120.0, 116.4, 113.4, 104.5, 99.0 (CH); 55.5, 55.3 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3460, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z 230.1182 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ 230.1175.

2',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-4-amina

Rto. = 38%. Sólido marrón claro, pf 84-86°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.29 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.69 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.54-6.50 (2H, m), 3.81 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.50 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 159.7, 157.4, 145.0, 128.6, 123.7 (C); 130.7, 130.3 (x2), 114.8 (x2), 104.5, 99.0 (CH); 55.5, 55.3 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3450, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z 230.1184 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ 230.1175.

3',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-amina

Rto. = 63%. Sólido blanquecino, pf 108-110°C (pf lit. 114-116°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁹³

3',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-4-amina

Rto. = 79%. Sólido marrón claro, pf 110-112°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.22 (1H, t, *J* = 8 Hz), 7.13 (2H, dd, *J* = 8, 2 Hz), 7.10 (1H, d, *J* = 2 Hz), 6.96 (1H, dd, *J* = 8, 2 Hz), 6.94 (1H, d, *J* = 8 Hz), 6.88 (1H, t, *J* = 2 Hz), 6.66 (1H, dd, *J* = 8, 2 Hz), 3.96 (3H, s), 3.93 (3H, s), 3.75 (2H, br s, NH₂).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 148.9, 148.4, 146.7, 142.0, 134.3 (C); 129.4, 119.2, 117.0, 113.5, 113.4, 111.3, 110.4 (CH); 55.7 (x2) (CH₃).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3430, 3350 (NH₂).

HR ESMS *m/z* 230.1181 (M+H⁺). Calculado para C₁₄H₁₆NO₂ 230.1175.

3',4'-Dimetoxi-[1,1'-bifenil]-4-amina

¹⁹³ Mandadapu, A. K.; Saifuddin, M.; Agarwal, P. K.; Kundu, B. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2796-2803.

Rto. = 31%. Sólido marrón claro, pf 156-158°C. El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.¹⁹⁴

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.38 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.09 (1H, dd, J = 7.8, 2 Hz), 7.07 (1H, d, J = 2 Hz), 6.92 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.75 (2H, d, J = 8.5 Hz) 3.95 (3H, s), 3.92 (3H, s), 3.80 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 149.1, 147.9, 145.4, 134.4, 131.5 (C); 127.7 (x2), 118.5, 115.4 (x2), 111.6, 110.0 (CH); 56.0, 55.9 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3470, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z 230.1180 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ 230.1175.

2-(piridin-2-il)fenol

Rto. = 95%. Sólido amarillo, pf 56-57°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁹⁵

2-(2,4-Dimetoxifenil)piridina

Rto. = 76%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁹⁶

¹⁹⁴ Venkatraj, M.; Messagie, J.; Joossens, J.; Lambeir, A.-M.; Haemers, A.; Van Der Veken, P.; Augustyns, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1557-1568.

¹⁹⁵ Shaibu, B. S.; Kawade, R. K.; Liu, R.-S. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6834-6839.

¹⁹⁶ Dick, G. R.; Woerly, E. M.; Burke, M. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2667-2672.

2-(3,4-Dimetoxifenil)piridina

Rendimiento = 71%. Sólido blanco, pf 70-74°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁹⁷

2-(Piridin-3-il)fenol

Rto. = 64%. Sólido blanco, pf 70-74°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁹⁸

3-(2,4-Dimetoxifenil)piridina

Rto. = 87%. Aceite amarillo.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 8.73 (1H, app s), 8.49 (1H, dd, *J* = 4.9, 1.5 Hz), 7.80 (1H, app d, *J* = 7.8 Hz), 7.28 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz), 7.22 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.59-6.56 (2H, m), 3.84 (3H, s), 3.78 (3H, s).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 160.6, 157.2, 133.7, 119.2 (C); 149.6, 146.8, 136.2, 130.6, 122.4, 104.6, 98.6 (CH); 55.0, 54.9 (CH₃).

HR ESMS *m/z* 216.1026 (M+H⁺). Calculado para C₁₃H₁₄NO₂ 216.1025.

¹⁹⁷ Xu, C.; Shen, Q. *Org. Lett.* **2014**, 16, 2046-2049.

¹⁹⁸ Raminelli, C.; Liu, Z.; Larock, R. C. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 4689-4691.

3-(3,4-Dimetoxifenil)piridina

Rto. = 80%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁹⁹

2-(Pirimidin-2-il)fenol

Rto. = 43%. Sólido incoloro, pf 157-159°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁰⁰

2-(2,4-Dimetoxifenil)pirimidina

Rto. = 49%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁰¹

2-(3,4-Dimetoxifenil)pirimidina

Rto. = 47%. Sólido blanco, pf 66-69°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁰¹

¹⁹⁹ Hiraoka, S.; Sakata, Y.; Shionoya, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10058-10059.

²⁰⁰ Noda, H.; Bode, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3958-3966.

²⁰¹ Zheng, X.; Song, B.; Xu, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *23*, 4376-4380.

5-Fenilpirimidina

Rto. = 72%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁰²

2-(Pirimidin-5-il)fenol

Rto. = 32%. Sólido blanco, pf 172-175°C.

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 9.04 (1H, s), 9.00 (2H, s), 7.36 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.27 (1H, t, *J* = 8.3 Hz), 6.99-6.95 (2H, m), 4.83 (1H, br s, OH).

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ 156.1, 134.5, 122.0 (C); 157.8 (x2), 154.8, 131.7, 131.0, 121.4, 117.1 (CH).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3584 (OH).

HR ESMS *m/z* 173.0716 (M+H⁺). Calculado para C₁₀H₉N₂O 173.0715.

5-(2,4-Dimetoxifenil)pirimidina

Rto. = 41%. Sólido amarillo, pf 92-96°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 9.09 (1H, s), 8.86 (2H, s), 7.23 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.6 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz), 6.57 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.85 (3H, s), 3.81 (3H, s).

²⁰² Bratt, E.; Verho, O.; Johansson, M. J.; Baekvall, J.-E. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 3946-3954.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 161.7, 157.7, 132.0, 116.0 (C); 156.5 (x2), 156.3, 130.7, 105.2, 99.1 (CH); 55.5, 55.4 (CH_3).

HR ESMS m/z 217.0979 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ 217.0977.

5-(3,4-Dimetoxifenil)pirimidina

Rto. = 46%. Sólido blanco, pf 106-108°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 9.17 (1H, s), 8.92 (2H, s), 7.15 (1H, dd, J = 8.3, 2.0 Hz), 7.06 (1H, d, J = 2.4 Hz), 7.01 (1H, d, J = 8.3 Hz), 3.97 (3H, s), 3.95 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 149.8, 149.6, 133.9, 126.7 (C); 156.8, 154.3 (x2), 119.4, 111.8, 109.8 (CH); 55.9, 55.8 (CH_3).

HR ESMS m/z 217.0977 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ 217.0977.

3.4.5. Procedimiento general para la reacción de Suzuki: método D

En un tubo de microondas de 10 mL, que contenía una mezcla de $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (2 mL), se adicionó el correspondiente ácido fenilborónico (1,3 mmol, 1,3 eq), el bromuro de anilina (1 mmol, 1 eq), el $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,0012 g, 0,5% mmol, 0,5% eq), el Na_2CO_3 (0,414g, 4 mmol, 4 eq). Se introdujo un imán, se selló y se realizó el siguiente programa en el MW:

Potencia = 210W	Tiempo = 30-70 min
Presión = 250 Psi	Temperatura = 150°C

Una vez finalizada la reacción, se separó la fase orgánica y la fase acuosa fue extraída con Et_2O (3 x 5 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó bajo

presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (9:1) para las fenilaminas y hexano/AcOEt (8:2) para las fenolanilinas. Los productos se recrystalizaron con CH₃OH.

2'-Amino-[1,1'-Bifenil]-3-ol

Rto. = 61%. Sólido incoloro, pf 149.5-150.5°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁰³

3'-Amino-[1,1'-Bifenil]-3-ol

Rto = 65%. Sólido blanquecino, pf 161-163°C (pf lit. 156-159°C). El espectro de RMN ¹H ha sido descrito en la literatura.²⁰⁴

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.20 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.13 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.05-7.00 (2H, m), 6.94 (1H, d, *J* = 2 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.75 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.68 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), (las señales OH/NH₂ están solapadas con la señal de disolvente).

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ 158.6, 148.8, 144.4, 143.4 (C); 130.6, 130.4, 119.4, 118.1, 115.7, 115.2, 115.1, 114.8 (CH).

IR *v*_{max} (cm⁻¹) 3380, 3310 (NH₂).

HR ESMS *m/z* 186.0918 (M+H⁺). Calculado para C₁₂H₁₂NO 186.0914.

²⁰³ Liang, Z.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, K.; Zhang, Y. *Tetrahedron* **2013**, 69, 6519-6526.

²⁰⁴ Mor, M.; Rivara, S.; Lodola, A.; Plazzi, P. V.; Tarzia, G.; Duranti, A.; Tontini, A.; Piersanti, G.; Kathuria, S.; Piomelli, D. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4998-5008.

4'-Amino-[1,1'-Bifenil]-3-ol

Rto. = 68%. Sólido marrón claro, pf 165-167°C (pf lit. 163-165°C). El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.²⁰⁴

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.35 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.17 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.00-6.95 (2H, m), 6.75 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.69 (1H, ddd, $J = 7.8, 2.5, 1$ Hz), (las señales OH/ NH_2 están solapadas con la señal de disolvente).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ 158.6, 148.1, 144.1, 132.2 (C); 130.6, 128.6 (x2), 118.6, 116.8 (x2), 114.0, 113.9 (CH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3380 (NH_2 , OH).

HR ESMS m/z 186.0918 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}$ 186.0914.

3.4.6. Procedimiento general para la reacción de alilación

A una mezcla del bifenol (1 mmol, 1 eq) y K_2CO_3 anhidro (0,18 g, 1,3 mmol, 1,3 eq) en acetona (1,3 mL), se le adicionó, gota a gota, bromuro de alilo (0,10 mL, 1,1 mmol, 1,1 eq). La mezcla se calentó a 60°C durante 5 horas. Después se filtró y se concentró hasta sequedad. Seguidamente, al filtrado se le añadió una disolución de NaOH 10% (5 mL) y se extrajo con Et_2O (3 x 5 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron con MgSO_4 anhidro y se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (9:1). Los productos se recrystalizaron con CH_3OH . Para los compuestos en los que se han alilado dos hidroxilos, se utilizaron el doble de las cantidades detalladas para el K_2CO_3 y el bromuro de alilo.

2-(Aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 78%. Aceite incoloro. Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁰⁵

3-(Aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 78%. Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.60 (2H, br d, *J* ≈ 8 Hz), 7.45 (2H, br t, *J* ≈ 7.8 Hz), 7.36 (2H, br t, *J* ≈ 7.8 Hz), 7.20 (1H, dt, *J* = 8.3, 1.5 Hz), 7.17 (1H, t, *J* = 1.5 Hz), 6.93 (1H, br dd, *J* ≈ 8.3, 2.5 Hz), 6.15-6.05 (1H, br m), 5.46 (1H, dq, *J* ≈ 17.5, 1.5 Hz), 5.32 (1H, dq, *J* ≈ 10.7, 1.5 Hz), 4.62 (2H, dt, *J* = 5.5, 1.5 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 159.0, 142.7, 141.1 (C); 133.3, 129.7, 128.7 (x2), 127.4, 127.1 (x2), 119.8, 113.7, 113.5 (CH); 117.7, 68.8 (CH₂).

HR ESMS *m/z* 211.1125 (M+H⁺). Calculado para C₁₅H₁₅O 211.1123.

4-(Aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 81%. Sólido blanco, pf 84-86°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁰⁶

²⁰⁵ Bujok, R.; Bieniek, M.; Masnyk, M.; Michrowska, A.; Sarosiek, A.; Stepowska, H.; Arlt, D.; Grela, K. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6894-6896.

²⁰⁶ Parrish, J. P.; Sudaesan, B.; Jung, K. W.; *Synth. Comm.* **1999**, 29, 4423-4431.

2,2'-Bis(aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 81%. Aceite incoloro.²⁰⁷

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.35-7.30 (4H, m), 7.03 (2H, br t, *J* ≈ 7.8 Hz), 6.97 (2H, br d, *J* ≈ 8 Hz), 6.00-5.90 (2H, br m), 5.24 (2H, dm, *J* ≈ 17.5 Hz), 5.15 (2H, dm, *J* ≈ 10.7 Hz), 4.52 (4H, m).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 156.2 (x2), 128.5 (x2) (C); 133.7 (x2), 131.5 (x2), 128.3 (x2), 120.5 (x2), 112.5 (x2) (CH); 116.3 (x2), 69.0 (x2) (CH₂).

HR ESMS *m/z* 267.1389 (M+H⁺). Calculado para C₁₈H₁₉O₂ 267.1385.

2,3'-Bis(aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 56%. Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.42 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.40-7.32 (2H, m), 7.23 (1H, br s), 7.22 (1H, dd, *J* = 7.7, 1 Hz), 7.10 (1H, br t, *J* ≈ 7.6 Hz), 7.03 (1H, br d, *J* ≈ 8.3 Hz), 6.96 (1H, dt, *J* = 7.5, 2 Hz), 6.20-6.10 (1H, br m), 6.10-6.00 (1H, br m), 5.49 (1H, dm, *J* ≈ 17.5 Hz), 5.40 (1H, dm, *J* ≈ 17.5 Hz), 5.35 (1H, dm, *J* ≈ 10.7 Hz), 5.27 (1H, dm, *J* ≈ 10.7 Hz), 4.63 (2H, dt, *J* = 5.5, 1.5 Hz), 4.59 (2H, dt, *J* = 5.5, 1.5 Hz).

²⁰⁷ Li, C.-Y.; Wang, Y.; Hu, M.-K. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3665-3671.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 158.3, 155.5, 139.9, 131.0 (C); 133.5, 133.4, 130.9, 128.7, 128.5, 122.2, 121.1, 116.1, 113.5, 113.2 (CH); 117.4, 116.8, 69.2, 68.8 (CH_2).

HR ESMS m/z 267.1382 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2$ 267.1385.

2,4'-Bis(aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 40%. Aceite incoloro.²⁰⁸

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.48 (2H, br d, $J \approx 8.8$ Hz), 7.32 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.25 (1H, td, $J = 7.8, 2$ Hz), 7.00 (1H, br t, $J \approx 7.8$ Hz), 6.95-6.90 (3H, m), 6.10-6.05 (1H, m), 6.00-5.95 (1H, m), 5.43 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.33 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.29 (1H, dm, $J \approx 10.7$ Hz), 5.20 (1H, dm, $J \approx 10.7$ Hz), 4.57 (2H, m), 4.52 (2H, m).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 157.5, 155.5, 131.1, 130.8 (C); 133.4, 133.3, 130.7, 130.6 (x2), 128.0, 121.1, 114.2 (x2), 113.0 (CH); 117.5, 116.8, 69.2, 68.8 (CH_2).

HR ESMS m/z 267.1385 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2$ 267.1385.

3,3'-Bis(aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 95%. Aceite incoloro.

²⁰⁸ Reddy, B. V. S.; Rao, R. N.; Reddy, N. S. S.; Somaiah, R.; Yadav, J. S.; Subramanyam, R. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 1049-1051.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.35 (2H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.19 (2H, dt, $J = 8.3, 1.5$ Hz), 7.14 (2H, t, $J = 2$ Hz), 6.93 (2H, dt, $J = 8, 2$ Hz), 6.10-6.00 (2H, br m), 5.46 (2H, dq, $J = 17.5, 1.5$ Hz), 5.33 (2H, dq, $J = 10.5, 1.5$ Hz), 4.62 (4H, dt, $J = 5.5, 1.5$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 158.9 (x2), 142.5 (x2) (C); 133.3 (x2), 129.6 (x2), 119.8 (x2), 113.7 (x2), 113.6 (x2) (CH); 117.6 (x2), 68.8 (x2) (CH_2).

HR ESMS m/z 267.1382 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2$ 267.1385.

3,4'-Bis(aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 78%. Sólido blanquecino, pf 44-45°C (pf lit. 120-122°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁶⁵

4,4'-Bis(aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 47%. Sólido blanquecino, pf 146-148°C. El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.²⁰⁹

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 157.8 (x2), 133.6 (x2) (C); 133.3 (x2), 127.7 (x4), 115.0 (x4), (CH); 117.6 (x2), 68.9 (x2) (CH_2).

HR ESMS m/z 267.13182 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2$ 267.1385.

²⁰⁹ Schlosser, M.; Michel, D.; Croft, S. L. *Synthesis* **1996**, 591-593.

2,5-Bis(aliloxi)-1,1'-bifenilo

Rto. = 40%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.58 (2H, br d, $J \approx 8$ Hz), 7.41 (2H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.33 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 3$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.86 (1H, dd, $J = 8.8, 3$ Hz), 6.10-6.05 (1H, br m), 6.00-5.95 (1H, br m), 5.43 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.32-5.28 (2H, m), 5.18 (1H, dm, $J \approx 10.7$ Hz), 4.55 (2H, m), 4.45 (2H, m).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 153.1, 150.0, 138.4, 132.4 (C); 133.7, 133.6, 129.5 (x2), 127.9 (x2), 127.0, 116.7, 115.0, 114.2 (CH); 117.6, 117.5, 70.2, 69.5 (CH_2).

HR ESMS m/z 267.1380 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2$ 267.1385.

2-(Aliloxi)-3'-metoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 74%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.33 (1H, br d, $J \approx 8$ Hz), 7.28 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.24 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.14 (2H, m), 6.99 (1H, br t, $J \approx 7.7$ Hz), 6.92 (1H, br d, $J \approx 8.3$ Hz), 6.86 (1H, dm, $J \approx 8$ Hz), 6.00-5.90 (1H, br m), 5.30 (1H, ddt, $J = 17.5, 1.5, 1.5$ Hz), 5.26 (1H, ddt, $J = 10.5, 1.5, 1.5$ Hz), 4.48 (2H, br dd, $J \approx 5.5, 1.5$ Hz), 3.80 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 159.1, 155.4, 139.8, 130.8 (C); 133.2, 130.8, 128.7, 128.5, 122.0, 121.0, 115.1, 113.0, 112.6 (CH); 116.8, 69.0 (CH_2); 55.1 (CH_3).

HR ESMS m/z 241.1229 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 241.1229.

2-(Aliloxi)-4'-metoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 82%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.60 (2H, br d, $J \approx 8.6$ Hz), 7.40 (1H, br d, $J \approx 7.5$ Hz), 7.33 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.10 (1H, br t, $J \approx 7.7$ Hz), 7.03 (3H, m), 6.10-6.00 (1H, br m), 5.41 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.28 (1H, dm, $J \approx 10.6$ Hz), 4.60 (2H, br dd, $J \approx 5.5, 1.5$ Hz), 3.90 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 158.6, 155.4, 130.9, 130.6 (C); 133.4, 130.7 (x3), 128.0, 121.1, 113.4 (x2), 113.0 (CH); 116.8, 69.1 (CH_2); 55.1 (CH_3).

HR ESMS m/z 241.1225 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 241.1229.

3-(Aliloxi)-3'-metoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 94%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.40-7.35 (2H, m), 7.25-7.15 (4H, br m), 6.95-6.90 (2H, m), 6.15-6.10 (1H, br m), 5.48 (1H, ddt, $J = 17.5, 1.5, 1.5$ Hz), 5.34 (1H, ddt, $J = 10.5, 1.5, 1.5$ Hz), 4.63 (2H, br dd, $J \approx 5.5, 1.5$ Hz), 3.89 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 159.9, 158.9, 142.6 (x2) (C); 133.3, 129.7 (x2), 119.8, 119.6, 113.8, 113.6, 112.9, 112.8 (CH); 117.6, 68.8 (CH_2); 55.3 (CH_3).

HR ESMS m/z 241.1233 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 241.1229.

3-(Aliloxi)-4'-metoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 85%. Sólido incoloro, pf 39-41°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.53 (2H, d, $J \approx 8.6$ Hz), 7.33 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.16 (1H, br d, $J \approx 8$ Hz), 7.13 (1H, br s), 6.98 (2H, d, $J \approx 8.6$ Hz), 6.88 (1H, br dd, $J \approx 8$, 2 Hz), 6.13-6.08 (1H, br m), 5.46 (1H, ddt, $J = 17.1$, 1.5, 1.5 Hz), 5.32 (1H, ddt, $J = 10.5$, 1.5, 1.5 Hz), 4.60 (2H, br dd, $J \approx 5.5$, 1.5 Hz), 3.86 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 159.2, 159.0, 142.3, 133.5 (C); 133.4, 129.6, 128.2 (x2), 119.4, 114.2 (x2), 113.4, 112.8 (CH); 117.6, 68.8 (CH_2); 55.3 (CH_3).

HR ESMS m/z 241.1225 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 241.1229.

4-(Aliloxi)-2'-metoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 64%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.53 (2H, br d, $J \approx 8.6$ Hz), 7.30 (2H, m), 7.08 (1H, br t, $J \approx 7.5$ Hz), 7.00-6.95 (3H, m), 6.20-6.10 (1H, br m), 5.46 (1H, ddt, $J = 17.5$, 1.5, 1.5 Hz), 5.32 (1H, br d, $J \approx 10.5$ Hz), 4.64 (2H, br d, $J \approx 5.5$ Hz), 3.86 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 157.7, 156.5, 131.1, 130.3 (C); 133.4, 130.6, 130.5 (x2), 128.1, 120.8, 114.3 (x2), 111.2 (CH); 117.5, 68.8 (CH_2); 55.4 (CH_3).
HR ESMS m/z 241.1228 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 241.1229.

4-(Aliloxi)-3'-metoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 94%. Sólido blanquecino, pf 59-61°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.54 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.35 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.16 (1H, br d, $J \approx 8$ Hz), 7.11 (1H, br s), 7.00 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.88 (1H, dd, $J = 8, 2.5$ Hz), 6.15-6.05 (1H, br m), 5.46 (1H, ddt, $J = 17.5, 1.5, 1.5$ Hz), 5.32 (1H, br d, $J \approx 10.5$ Hz), 4.61 (2H, br d, $J \approx 5.5$ Hz), 3.88 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 160.0, 158.3, 142.3, 133.7 (C); 133.3, 129.6, 128.1 (x2), 119.2, 115.0 (x2), 112.5, 112.0 (CH); 117.5, 68.8 (CH_2); 55.2 (CH_3).

HR ESMS m/z 241.1230 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 241.1229.

4-(Aliloxi)-4'-metoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 38%. Sólido blanco, pf 136-137°C (pf lit. 136-137°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹⁰

²¹⁰ Chang, M.-Y.; Lin, S.-Y.; Chan, C.-K. *Tetrahedron* **2013**, 69, 2933-2940.

3'-(Aliloxi)-2,4-dimetoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 61%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.28 (1H, t, $J = 8.3$ Hz), 7.25-7.23 (1H, m), 7.09-7.07 (2H, m), 6.85 (1H, br dd, $J = 8.3$, 2 Hz), 6.56-6.55 (2H, m), 6.12-6.04 (1H, m), 5.42 (1H, ddt, $J = 17.5$, 1.5, 1.5 Hz), 5.28 (1H, ddt, $J = 10.5$, 1.5, 1.5 Hz), 4.56 (2H, br d, $J \approx 5.5$ Hz), 3.84 (3H, s), 3.79 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 160.4, 158.3, 157.5, 139.7, 123.4 (C); 133.6, 131.2, 128.8, 122.1, 116.1, 112.9, 104.6, 99.1 (CH); 117.5, 68.8 (CH_2); 55.6, 55.4 (CH_3).

HR ESMS m/z 271.1333 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 271.1334.

2'-(Aliloxi)-3,4-dimetoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 47%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.33 (1H, dd, $J = 7.8$, 1.5 Hz), 7.25 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.17 (1H, d, $J = 2$ Hz), 7.09 (1H, dd, $J = 8.3$, 2 Hz), 7.01 (1H, br t, $J \approx 7.5$ Hz), 6.95 (1H, br d, $J \approx 8.3$ Hz), 6.90 (1H, br d, $J \approx 8.3$ Hz), 6.05-5.95 (1H, br m), 5.34 (1H, ddt, $J = 17.5$, 1.5, 1.5 Hz), 5.20 (1H, br d, $J \approx 10.5$ Hz), 4.51 (2H, br d, $J \approx 5.5$ Hz), 3.90 (3H, s), 3.88 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 155.5, 148.2, 148.1, 131.2, 130.8 (C); 133.3, 130.7, 128.1, 121.7, 121.1, 113.2, 113.0, 110.8 (CH); 116.9, 69.1 (CH_2); 55.8, 55.7 (CH_3).

HR ESMS m/z 271.1334 ($M+H^+$). Calculado para $C_{17}H_{18}O_3$ 271.1334.

3'-(Aliloxi)-3,4-dimetoxi-1,1'-bifenilo

Rto. = 60%. Aceite incoloro.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$, TMS) δ 7.34 (1H, br t, $J \approx 7.8$ Hz), 7.20-7.10 (4H, br m), 6.95 (1H, br d, $J \approx 8.3$ Hz), 6.90 (1H, br dd, $J \approx 8.3$, 2.5 Hz), 6.15-6.05 (1H, br m), 5.46 (1H, ddt, $J = 17.5$, 1.5, 1.5 Hz), 5.33 (1H, ddt, $J = 10.5$, 1.5, 1.5 Hz), 4.61 (2H, dt, $J = 5.5$, 1.5 Hz), 3.96 (3H, s), 3.93 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 158.9, 149.1, 148.7, 134.0, 133.3 (C); 142.5, 129.6, 119.5, 119.4, 113.6, 112.8, 111.5, 110.5 (CH); 117.6, 68.8 (CH_2); 55.9, 55.8 (CH_3).

HR ESMS m/z 271.1331 ($M+H^+$). Calculado para $C_{17}H_{18}O_3$ 271.1334.

3.4.7. Procedimiento general de transposición Claisen con Et_2AlCl

A una disolución del correspondiente bifenilalil éter (1 mmol, 1 eq) en hexano seco (4 mL), se le adicionó, bajo atmósfera de nitrógeno y gota a gota, una disolución de Et_2AlCl (1M en hexano seco, 2,0 mL, 2 mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, hasta que se observó mediante TLC la completa desaparición del compuesto de partida. Luego, la reacción se enfrió a $0^\circ C$, se añadió lentamente una disolución de HCl 2M (4 mL) y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (4 x 5 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera (2 x 5 mL), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (9:1) Los productos se recrystalizaron

con CH_3OH . (Nota: Cuando el compuesto de partida contenía dos grupos aliloxi se utilizaron cuatro equivalentes de la disolución de Et_2AlCl).

3-Alil-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 18%. Aceite amarillo.²⁰⁵

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.55-7.50 (4H, m), 7.46-7.42 (1H, m), 7.40-7.25-7.20 (2H, m), 7.02 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 6.20-6.10 (1H, br m), 5.40 (1H, s, OH), 5.25 (1H, ddt, $J = 17.5, 1.5, 1.5$ Hz), 5.20 (1H, ddt, $J = 10.5, 1.5, 1.5$ Hz), 3.56 (2H, br d, $J \approx 6.5$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 150.4, 137.3, 128.2, 126.4 (C); 136.6, 129.7, 129.2 (x4), 128.3, 127.7, 120.4 (CH); 115.8, 34.8 (CH_2).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3550 (OH).

HR ESMS m/z 209.0967 (M-H^+). Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}$ 209.0966.

3-Alil-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 31%. Sólido incoloro, pf 71-73°C. El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.¹⁷⁴

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.57 (2H, m), 7.42 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 7.40-7.35 (2H, m), 7.31 (1H, br t, $J \approx 8.5$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.15-6.05 (1H, br m), 5.23 (1H, ddt, $J = 17.5, 1.5, 1.5$ Hz), 5.20 (1H, ddt, $J = 10.5, 1.5, 1.5$ Hz), 5.10 (1H, s, OH), 3.50 (2H, br d, $J \approx 6.5$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 153.7, 140.9, 134.2, 125.6 (C); 136.3, 129.2, 128.7 (x2), 126.7 (x2), 126.6, 126.5, 116.2 (CH); 116.7, 35.3 (CH_2).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) 3550 (OH).

HR ESMS m/z 209.0967 (M-H⁻). Calculado para C₁₅H₁₃O 209.0966.

3,3'-Dialil-[1,1'-bifenil]-2,2'-diol

Rto. = 51%. Aceite incoloro. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹¹

3,3'-Dialil-[1,1'-bifenil]-2,4'-diol

Rto. = 30%. Aceite incoloro viscoso (pf lit. 65-68°C).²⁰⁸

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.25-7.20 (2H, m), 7.14-7.07 (2H, m), 6.95-6.90 (2H, m), 6.10-6.00 (2H, m), 5.30 (2H, s 2 OH), 5.25-5.00 (4H, br m), 3.47 (4H, d, J = 6.5 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 154.0, 150.5, 128.8, 127.9, 126.3 (C); 136.7, 136.0, 131.3, 129.4, 128.7, 128.3, 120.4, 116.6 (CH); 116.9, 115.8, 35.2, 34.8 (CH₂).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) 3500-3300 (br, OH).

HR ESMS m/z 265.1230 (M-H⁻). Calculado para C₁₈H₁₇O₂ 265.1229.

²¹¹ Alexakis, A.; Polet, D.; Rosset, S.; March, S. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 5660-5667.

2,2'-Dialil-[1,1'-bifenil]-3,3'-diol

Rto. = 13% Sólido blanco, pf 125-127°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.15 (2H, br t, $J \approx 7.8$ Hz), 6.86 (2H, br d, $J \approx 8$ Hz), 6.75 (2H, br d, $J \approx 7.5$ Hz), 5.90-5.80 (2H, m), 5.10 (2H, br s, 2 OH), 5.09 (2H, dq, $J \approx 10.5, 1.5$ Hz), 5.03 (2H, dq, $J \approx 17.5, 1.5$ Hz), 3.24 (2H, br dd, $J \approx 16.6$ Hz), 3.13 (2H, br dd, $J \approx 16.6$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 154.8 (x2), 142.3 (x2), 123.3 (x2) (C); 136.1 (x2), 127.0 (x2), 122.5 (x2), 115.1 (x2) (CH); 116.3 (x2), 32.2 (x2) (CH_2).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3500-3300 (br, OH).

HR ESMS m/z 265.1225 (M-H^+). Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 265.1229.

2,4'-Dialil-[1,1'-bifenil]-3,3'-diol

Rto. = 32% Aceite amarillo viscoso.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.18 (1H, br t, $J \approx 7.8$ Hz), 7.13 (1H, br d, $J \approx 7.4$ Hz), 6.90-6.80 (3H, m), 6.78 (1H, br s), 6.10-6.00 (2H, br m), 5.25-5.05 (4H, br m), 5.00 (2H, br s, 2 OH), 3.45 (2H, br d, $J \approx 6.5$ Hz), 3.37 (2H, br d, $J \approx 6$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 154.8, 153.6, 143.3, 141.3, 124.1, 122.6 (C); 136.7, 136.3, 130.0, 127.3, 122.7, 121.8, 116.3, 115.1 (CH); 116.6, 116.5, 34.9, 32.1 (CH_2).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3500-3300 (br, OH).

HR ESMS m/z 265.1233 (M-H⁻). Calculado para C₁₈H₁₇O₂ 265.1229.

2,3'-Dialil-[1,1'-bifenil]-3,4'-diol

Rto. = 15% (total 39%). Sólido blanquecino, pf 73-75°C (pf lit. 78-79°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁶⁵

4,3'-Diallil-[1,1'-bifenil]-3,4'-diol

Rto. = 24% (total 39%). Aceite amarillo viscoso. Datos espectrales consistentes con la literatura.¹⁶⁵

3,3'-Diallil-[1,1'-bifenil]-4,4'-diol

Rto. = 13%. Sólido incoloro, pf 71-73°C (pf lit. 81-82°C). Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹⁰

3-Alil-3'-metoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 32%. Aceite amarillo.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.40 (1H, br t, $J \approx 8.3$ Hz), 7.15 (2H, br t, $J \approx 8.3$ Hz), 7.05 (1H, br d, $J \approx 7.6$ Hz), 7.00 (1H, br s), 6.96-6.93 (2H, m), 6.10-6.00 (1H, br m), 5.40 (1H, br s, OH), 5.16 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.12 (1H, dm, $J \approx 10.5$ Hz), 3.86 (3H, s), 3.48 (2H, br d, $J \approx 6.4$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 160.3, 150.4, 138.7, 128.0, 126.5 (C); 136.7, 130.3, 129.7, 128.2, 121.3, 120.4, 114.6, 113.6 (CH); 115.8, 34.7 (CH_2); 55.3 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3530 (br, OH).

HR ESMS m/z 239.1073 (M-H^+). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2$ 239.1072.

3-Alil-4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 62%. Aceite amarillo.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.40 (2H, br d, $J \approx 8.5$ Hz), 7.15-7.10 (2H, m), 7.03 (2H, br d, $J \approx 8.5$ Hz), 6.94 (1H, br t, $J \approx 7.6$ Hz), 6.10-6.00 (1H, br m), 5.30 (1H, br s, OH), 5.17 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.13 (1H, dm, $J \approx 10.5$ Hz), 3.87 (3H, s), 3.49 (2H, br d, $J \approx 6.4$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 159.3, 150.5, 129.4, 127.9, 126.3 (C); 136.7, 130.4 (x2), 129.4, 128.4, 120.4, 114.7 (x2) (CH); 115.8, 34.8 (CH_2); 55.3 (CH_3).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3540 (br, OH).

HR ESMS m/z 239.1070 (M-H⁻). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2$ 239.1072.

3-Alil-2'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 51%. Aceite amarillo.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.35-7.30 (4H, m), 7.03 (1H, br t, $J \approx 7.5$ Hz), 6.99 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), 6.86 (1H, br d, $J \approx 8.3$ Hz), 6.15-6.05 (1H, br m), 5.23 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.19 (1H, dm, $J \approx 10.5$ Hz), 5.10 (1H, br s, OH), 3.83 (3H, s), 3.48 (2H, br d, $J \approx 6.5$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 156.4, 153.3, 131.2, 130.4, 124.8 (C); 136.5, 131.5, 130.7, 129.0, 128.1, 120.8, 115.4, 111.3 (CH); 116.5, 35.2 (CH_2); 55.6 (CH_3).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3440 (br, OH).

HR ESMS m/z 239.1070 (M-H⁻). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2$ 239.1072.

3-Alil-3'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 57%. Aceite incoloro. El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.¹⁶⁴

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 159.9, 153.8, 142.4, 134.0, 125.6 (C); 136.3, 129.6, 129.3, 126.5, 119.4, 116.2, 112.6, 112.0 (CH); 116.7, 35.2 (CH_2); 55.3 (CH_3).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3400 (br, OH).

HR ESMS m/z 239.1069 (M-H^+). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2$ 239.1072.

3-Alil-4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-ol

Rto. = 35%. Sólido blanco, pf 64-66°C. El espectro de RMN ^1H ha sido descrito en la literatura.¹⁶⁴

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 158.7, 153.2, 133.8, 133.6, 125.5 (C); 136.3, 128.8, 127.7 (x2), 126.1, 116.1, 114.1 (x2) (CH); 116.7, 35.3 (CH_2); 55.3 (CH_3).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3420 (br, OH).

HR ESMS m/z 239.1075 (M-H^+). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2$ 239.1072.

3-Alil-3',4'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-ol

Rto. = 35%. Sólido blanquecino, pf 96-98°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7.14 (2H, br t, $J \approx 7.3$ Hz), 7.03 (1H, dd, $J = 8.3, 2$ Hz), 7.00-6.92 (3H, m), 6.15-6.05 (1H, br m), 5.40 (1H, br s, OH), 5.17 (1H, dm, $J \approx 17.5$ Hz), 5.12 (1H, dm, $J \approx 10.5$ Hz), 3.94 (3H, s), 3.91 (3H, s), 3.49 (2H, br d, $J \approx 6.4$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 150.4, 149.6, 148.7, 129.7, 127.9, 126.4 (C); 136.6, 129.4, 128.2, 121.2, 120.3, 112.5, 111.8 (CH); 115.8, 34.7 (CH_2); 56.0, 55.9 (CH_3).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3450 (br, OH).

HR ESMS m/z 269.1174 (M-H⁻). Calculado para C₁₇H₁₇O₃ 269.1178.

2-Alil-3',4'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3-ol

Rto. = 48%. Sólido blanquecino, pf 142-144°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.19 (1H, br t, $J \approx 7.8$ Hz), 6.95-6.85 (5H, br m), 6.10-6.00 (1H, br m), 5.19 (1H, br d, $J \approx 10.5$ Hz), 5.10 (1H, br d, $J \approx 17.5$ Hz), 5.10 (1H, br s, OH), 3.93 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.38 (2H, br d, $J \approx 5$ Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 154.8, 148.4, 148.2, 143.6, 134.2, 122.7 (C); 136.8, 127.3, 122.8, 121.2, 114.8, 112.6, 110.9 (CH); 116.1, 32.1 (CH₂); 55.9, 55.8 (CH₃).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) 3430 (br, OH).

HR ESMS m/z 269.1177 (M-H⁻). Calculado para C₁₇H₁₇O₃ 269.1178.

4-Alil-3',4'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3-ol

Rto. = 34%. Sólido blanquecino, pf 103-105°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 7.17 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.13 (1H, dd, $J \approx 8.3, 2$ Hz), 7.10 (2H, app dd, $J = 7.8, 2$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.10-6.00 (1H, br m), 5.21 (1H, dq, $J = 17.5, 1.5$ Hz), 5.19 (1H, dq, $J = 10.5, 1.5$ Hz), 5.10 (1H, br s, OH), 3.94 (3H, s), 3.92 (3H, s), 3.46 (2H, br d, $J \approx 6.4$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 154.4, 149.1, 148.6, 141.1, 133.7, 123.8 (C); 136.4, 130.7, 119.4, 119.2, 114.2, 111.5, 110.4 (CH); 116.6, 34.8 (CH_2); 56.0, 55.9 (CH_3).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3440 (br, OH).

HR ESMS m/z 269.1179 (M-H^+). Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_3$ 269.1178.

3.4.8. Procedimiento general de aminación en MW

A un tubo de microondas de 10 mL se adicionó el correspondiente bromuro de arilo (1 mmol, 1 eq), la amina (1,5 mmol, 1,5 eq), *t*-BuOK (0,174g, 1,5 mmol, 1,5 eq) y DMSO (5 mL). Se introdujo un imán, se selló y se realizó el siguiente programa en el MW:

Potencia = 140W	Tiempo = 20-35 min
Presión = 160 Psi	Temperatura = 190°C

Una vez finalizada la reacción se enfrió a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se vertió sobre hielo agitando durante 5 min hasta la precipitación. A continuación, se añadió Et_2O (5 mL) y una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (5 mL). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con Et_2O (3 x 5mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice con hexano/ AcOEt (95:5). Los productos se recrystalizaron con CH_3OH .

4-(3-metoxifenil)morfolina

Rto. = 46%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹²

4-(4-metoxifenil)morfolina

Rto. = 42%. Sólido incoloro, pf 64-66°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹²

1-fenilpiperidina

Rto. = 53%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹²

1-(3-metoxifenil)piperidina

Rto. = 41%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹²

1-(4-metoxifenil)piperidina

Rto. = 56%. Aceite amarillo. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹²

²¹² Zhu, L.; Gao, T.-T.; Shao, L.-X. *Tetrahedron* **2011**, 67, 5150-5155.

1-(3-metoxifenil)pirrolidina

Rto. = 55%. Aceite incoloro. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹²

1-(4-metoxifenil)pirrolidina

Rto. = 38%. Sólido blanco, pf 36-38°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹³

3.4.9. Procedimiento general de amidación

A una disolución de la correspondiente amina (1,1 mmol, 1,1 eq) en diclorometano (2 mL), a temperatura ambiente, se le adicionó Et₃N (0,17 mL, 1,25 mmol, 1,25 eq) y el correspondiente cloruro de acilo (1 mmol, 1 eq). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 30-60 minutos hasta la desaparición de los compuestos de partida. A continuación, se diluyó con CH₂Cl₂ (3 mL), se traspasó a un embudo de extracción y se lavó con una disolución de HCl 1M (5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice utilizando como fase móvil hexano/AcOEt (7:3). Los productos se recrystalizaron con CH₃OH.

²¹³ Manolikakes, G.; Gavryushin, A.; Knochel, P. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1429-1434.

Morfolin(fenil)metanona

Rto. = 95%. Sólido incoloro, pf 59-67°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹⁴

Fenil(pirrolidin-1-il)metanona

Rto. = 93%. Aceite incoloro. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹⁵

(3,5-dinitrofenil)(morfolin)metanona

Rto. = 56%. Sólido blanco, pf 177-179°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ 8.86 (1H, t, J = 2.1 Hz), 8.64 (2H, d, J = 2.0 Hz), 3.70 (2H, br s), 3.66 (2H, br s), 3.56 (2H, br s), 3.34 (2H, br s).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 164.8, 148.2 (x2), 138.6 (C); 127.6 (x2), 119.1 (CH); 65.7 (x2), 47.5, 42.1 (CH₂).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 1644.02 (C=O).

HR ESMS m/z 282.0727 (M+H⁺). Calculado para C₁₁H₁₂N₃O₆ 282.0726.

²¹⁴ Bantreil, X.; Kanfar, N.; Gehin, N.; Golliard, E.; Ohlmann, P.; Martinez, J.; Lamaty, F. *Tetrahedron* **2014**, 70, 5093-5099.

²¹⁵ Li, J.; Xu, F.; Zhang, Y.; Shen, Q. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 2575-2577.

(3,5-dinitrofenil)(piperidin)metanona

Rto. = 79%. Sólido blanco, pf 146-148°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 8.46 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 8.59 (2H, d, $J = 2.4$ Hz), 3.62 (2H, br s), 3.28 (2H, br s), 1.62 (4H, br s), 1.48 (2H, br s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 164.6, 148.2 (x2), 139.4 (C); 127.2 (x2), 118.9 (CH); 48.0, 42.6, 25.7, 24.9, 23.8 (CH_2).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 1643.05 (C=O).

HR ESMS m/z 280.0933 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5$ 280.0933.

(3,5-dinitrofenil)(pirrolidin)metanona

Rto. = 54%. Sólido blanco, pf 138-139°C. Datos espectrales consistentes con la literatura.²¹⁶

²¹⁶ Kumar, A.; Akula, H. K.; Lakshman, M. K. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2709-2715.

4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE HONOKIOL

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE HONOKIOL

4.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen en detalle las evaluaciones biológicas siguientes:

- 1) Citotoxicidad.
- 2) Capacidad para inhibir la secreción de la proteína VEGFA-165.
- 3) Capacidad de inhibición de la diferenciación celular endotelial.
- 4) Medición del grado de migración celular.
- 5) Medición de la expresión de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*.

Para facilitar la evaluación de una batería de productos tan amplia se han dividido los compuestos en 6 familias, tal y como se indica en la figura 4.1.

Figura 4.1. Compuestos a evaluar distribuidos según familias.

A continuación se explican los ensayos biológicos llevados a cabo.

4.1.1. Cálculo del IC₅₀: citotoxicidad

La capacidad de inhibición del crecimiento celular se determina a través del valor de IC₅₀, que se define como la concentración de un compuesto a la cual es capaz de inhibir la proliferación celular al 50%.

La determinación del IC₅₀ se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico de MTT, abreviación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. El fundamento de este ensayo es la reducción del MTT, de color amarillo, a formazán, sólido de color morado insoluble en disolución acuosa, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas (véase el esquema 4.1).²¹⁷ La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, por lo que este método permite medir la proliferación celular en presencia de los compuestos a evaluar.

Esquema 4.1. Reducción del MTT a formazán.

El formazán absorbe radiación entre 450-600 nm por lo que se puede medir su absorbancia mediante un colorímetro o lector de microplacas. Una vez obtenidas las absorbancias de cada pocillo, se calcula el valor de IC₅₀ con el programa *GraphPad Prism 4*, que ajusta los resultados de las distintas concentraciones de un compuesto a una representación sinusoidal, cuyo punto de inflexión corresponde al valor de IC₅₀.

²¹⁷ a) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63. b) Denizot, F.; Lang, R. *J. Immunol. Methods* **1986**, 89, 271-277.

El IC_{50} de los compuestos se midió en las líneas celulares humanas MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y HEK-293 (células embrionarias de riñón). Además, el IC_{50} de los productos de la familia 1 y familia 5 también se determinó en BAEC (células endoteliales de aorta de bovino).

A partir de los valores de IC_{50} se calcularon los coeficientes de selectividad, que se emplearon en la selección de compuestos para los subsiguientes ensayos biológicos. Así, el coeficiente de selectividad α se obtiene al dividir los valores de IC_{50} de la línea no tumoral HEK-293 entre los de la línea tumoral HT-29. En cada familia se seleccionaron los compuestos que presentaban valores α superiores a 1 y/o un bajo valor de IC_{50} en la línea HT-29. Además del coeficiente α , también se calculó el coeficiente β mediante la relación de los valores de IC_{50} de la línea no tumoral HEK-293 entre los de la línea tumoral MCF-7. Todos los valores de citotoxicidad vienen expresados por el valor medio de $IC_{50} \pm SD$ (tres valores experimentales como mínimo).

4.1.2. Ensayo ELISA: medición de la secreción de VEGFA-165

El ensayo ELISA (*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*) mide la cantidad de VEGFA-165 (isoforma más abundante y una de las más ligeras) secretada al medio de cultivo durante un cierto tiempo.

Los ensayos ELISA llevados a cabo en esta tesis se realizaron sobre células HT-29 que fueron incubadas durante 72 horas con los compuestos elegidos de cada familia, a concentraciones ligeramente inferiores a sus valores de IC_{50} con el fin de disminuir al máximo el efecto citotóxico. A las 72 horas se recoge el medio de cultivo y se procede a efectuar el ensayo ELISA.

El ensayo ELISA se basa en el uso de un anticuerpo policlonal, insolubilizado sobre un soporte. En la figura 4.2 se indican las fases de este ensayo. Así, el anticuerpo reconoce el VEGFA-165 del medio de cultivo y forma un complejo anticuerpo-antígeno (paso 1). A continuación, se añade un

anticuerpo monoclonal biotinilado que se une al VEGFA-165, formando un complejo tipo sándwich (anticuerpo-antígeno-anticuerpo, paso 2). En el tercer paso se adiciona una enzima peroxidasa conjugada con estreptavidina. La estreptavidina es una proteína con elevada afinidad por la biotina, por lo cual se ancla al anticuerpo biotinilado quedando libre el extremo peroxidasa. En el último paso se añade una disolución de tetrametilbencidina (TMB, incolora) que es oxidada por la enzima peroxidasa a la diimina (amarilla). La concentración de VEGF de la muestra es proporcional a la medida de absorbancia de la disolución coloreada.²¹⁸

Figura 4.2. Fases del ensayo ELISA.

La reacción de oxidación de la TMB a la diimina, por acción de la peroxidasa, se muestra en el esquema 4.2.

Esquema 4.2. Reacción de oxidación de TMB a diimina.

²¹⁸ Josephy, P. D.; Elin, T.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3669-3675.

4.1.3. Ensayo de la PCR: Medición de la expresión génica de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*

Existen dos tipos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la PCR convencional, en la cual se evalúa la expresión de genes de forma cualitativa y la qPCR (*real-time Polymerase Chain Reaction* o *quantitative Polymerase Chain Reaction*), que determina la expresión de genes de manera cuantitativa. En esta tesis se ha utilizado la técnica qPCR para la determinación de la expresión génica. Las células utilizadas en este ensayo fueron las HT-29 y como cebadores se usaron secuencias comercialmente accesibles para la amplificación de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*. Como gen endógeno se utilizó el gen de la β -actina.

La técnica PCR o reacción en cadena de la polimerasa está basada en la amplificación de una región específica de cualquier tipo de ADN, mediante el uso de cebadores o *primers*, generando de miles a millones de copias de dicha secuencia. Presenta numerosas aplicaciones dentro del campo de la biología molecular, entre ellas se encuentra la amplificación de determinados genes para evaluar su grado de expresión.²¹⁹

Los componentes básicos para llevar a cabo la amplificación son:²²⁰

- El ADN de muestra o molde que contiene la región de ADN a amplificar.
- La ADN polimerasa, enzima encargada de sintetizar nuevas hebras de ADN complementario de la secuencia específica.
- Cebadores, pequeños fragmentos de una sola hebra de ADN que contienen la secuencia complementaria a las regiones iniciales y finales que se quiere amplificar. Se necesitan 2 cebadores, uno con el oligonucleótido complementario al inicio de la secuencia

²¹⁹ Mullis, K. B.; Faloona, F. A. *Methods Enzymol.* **1987**, 155, 335-350.

²²⁰ a) Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Essential Cell Biology*. Garland Science, Taylor & Francis Group. **2009**. b) Müller-Sterl, W. *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Editorial Reverté, S. A. **2008**.

(*forward*) y otro con el oligonucleótido complementario a la secuencia de bases final (*reverse*), que actúan como límites de la región de ADN que va a ser amplificada.

- Oligonucleótidos conocidos como dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*) que son los bloques de construcción a partir de los cuales la ADN polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN.

Para realizar la PCR se utiliza un termociclador que se encarga de realizar repeticiones de ciclos de calentamiento y enfriamiento. Un ciclo de replicación se compone de tres etapas:

- 1) Desnaturalización del ADN. Calentamiento alrededor de los 95°C para poder separar las hebras del ADN.
- 2) Hibridación de los cebadores con la hebra sencilla de ADN. Enfriamiento a 40-68°C.
- 3) Elongación de la cadena. Calentamiento a 72°C (temperatura óptima para que actúe la ADN polimerasa).

Una vez alcanzada esta temperatura, la polimerasa empieza a sintetizar la cadena complementaria de ADN, partiendo del cebador y añadiendo los dNTPs complementarios de forma secuencial en sentido 5'→3', obteniendo un amplicón. A continuación, el ciclo vuelve a comenzar (véase la figura 4.3). Normalmente se necesita entre 20 y 40 ciclos para que el ADN pueda ser detectado y cuantificado.²²¹

²²¹ White, B.A. *PCR protocols: current methods and applications*. In: *Methods in molecular biology*. Humana Press. **1993**.

Figura 4.3. Reacción de la PCR.

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variación de la PCR estándar en la que, simultáneamente, se amplifica y cuantifica de forma absoluta el ADN de la muestra. Para ello, además de los componentes mencionados anteriormente, también se necesita la adición de una sonda fluorescente compuesta por un oligonucleótido de unión específica al ADN diana. En los ensayos se ha empleado la sonda TaqMan, marcada con un fluoróforo donador (*reporter*, FAM o VIC) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (*quencher*, TAMRA) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Durante cada amplificación el fluoróforo es liberado y el termociclador es capaz de medir la fluorescencia que se corresponde con el nivel de amplificación del gen (véase la figura 4.4).²²²

²²² a) Lie, Y.S.; Petropoulos, C. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 43-48. b) Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. *Genome Res.* **1996**, 6, 986-994.

Figura 4.4. Fundamentos de la sonda TaqMan.

Los datos de fluorescencia se representan en una curva similar a la de la figura 4.5, en dónde se puede distinguir varias fases. La primera es una línea base debido a que el equipo no es capaz de detectar la fluorescencia emitida. La segunda es una fase exponencial en la cual el equipo ya es capaz de detectar la fluorescencia. Por último, el equipo llega a su máximo de saturación que se conoce como fase meseta o *plateau*.²²³

Para el análisis de esta curva, se traza un umbral de fluorescencia límite. La interpolación entre la línea umbral y la curva de fluorescencia se denomina C_T (*threshold cycle*) y es el valor que se utiliza para cuantificar la expresión génica. El valor de C_T es inversamente proporcional a la cantidad de ADN presente en una muestra.²²⁴

²²³ Walker, N. J. J. *Biochem. Molecular Toxicology* **2001**, 15, 121-127.

²²⁴ Larionov, A.; Krause, A.; Miller, W. *BMC bioinformatics* **2005**, 6, 62-78.

Figura 4.5. Curva de amplificación obtenida mediante PCR cuantitativa.

Para realizar los cálculos de la cantidad obtenida de cada gen, es necesario calcular la eficiencia (E) de los cebadores de cada gen mediante una curva de calibración del logaritmo de distintas concentraciones de ADN frente a sus valores de C_T . La eficiencia se determina a partir de la pendiente de la curva de calibrado siguiendo la ecuación:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$$

Si la eficiencia alcanza su máximo teórico 1 (100%) significa que la cantidad de amplicón se dobla en cada ciclo.

El cálculo de los valores de expresión de los genes se realiza por cuantificación relativa, comparando una muestra tratada con producto con respecto a una muestra control (sin tratar) para un mismo gen y relacionando la cantidad de ADN del gen diana con respecto a la cantidad de ADN del gen constitutivo (control endógeno) para la misma muestra. Para ello, se emplea la diferencia en valores de C_T .²²⁵

²²⁵ Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W. Shipley, G. L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C. T., MIQE guideless for QPCR. *Clinical Chem.* **2009**, 611-622.

- 1) Normalización del gen específico al gen endógeno:

$$\Delta C_T = C_T (\text{gen diana}) - C_T (\text{gen endógeno})$$

- 2) Normalización de la muestra tratada a la muestra control:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{muestra tratada}) - \Delta C_T (\text{control})$$

Asumiendo que los dos genes tienen eficiencias similares y cercanas al 100%, se calcula las veces que se expresa el gen específico cuando las células son tratadas respecto al control (RQ), mediante la siguiente ecuación:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Sin embargo, si la eficiencia del gen diana y la del gen endógeno no es la misma, el valor de RQ se calcula según la siguiente ecuación matemática:²²⁶

$$RQ = \frac{\text{muestra normalizada}}{\text{control normalizado}} = \frac{\frac{\text{ADN}(\text{gen diana})_{\text{muestra}}}{\text{ADN}(\text{gen endógeno})_{\text{muestra}}}}{\frac{\text{ADN}(\text{gen diana})_{\text{control}}}{\text{ADN}(\text{gen endógeno})_{\text{control}}}}$$

La cantidad de ADN se obtiene de extrapolar el valor de C_T en la recta de calibrado realizada para el cálculo de la eficiencia del gen diana:

$$C_T = a \times \text{Log}(\text{ADN}) + b$$

$$\text{ADN} = 10^{\frac{C_T - b}{a}}$$

4.1.4. Ensayo de tubulogénesis: capacidad de inhibición de la diferenciación celular endotelial

Uno de los ensayos *in vitro* más utilizado en la evaluación de la actividad angiogénica es el ensayo de diferenciación celular. Este ensayo mide la capacidad de las células endoteliales para formar un entramado tubular en

²²⁶ StepOne Plus Real Time PCR System User Training. Applied Biosystems by Life Technologies.

respuesta a un estímulo angiogénico o antiangiogénico y se ha empleado en esta tesis para determinar la capacidad de inhibición de los compuestos en los procesos de formación de capilares.

El ensayo se realiza sobre un soporte de matriz extracelular constituido por una mezcla de proteínas con aspecto gelatinoso, conocido por su nombre comercial Matrigel®. La Matrigel® mimetiza las condiciones del entorno extracelular y proporciona una superficie tridimensional adecuada que permite la adhesión de las células endoteliales y la subsiguiente formación de una estructura tubular.

Figura 4.6. Ensayo de la tubulogénesis en Matrigel®.

Un ejemplo de la formación de tubos se muestra en la parte izquierda de la figura 4.6 (control). La adición de un compuesto antiangiogénico impide la formación de estructuras tubulares, como se muestra en la imagen de la derecha de la figura 4.6. Los ensayos de tubulogénesis llevados a cabo en esta tesis se efectuaron sobre células BAEC durante un tiempo de incubación de 7 horas.

4.1.5. Ensayo de la herida: medición del grado de migración celular

El ensayo de la cicatrización de heridas estudia la migración y/o invasión de células endoteliales para determinar la posible capacidad inhibitoria del compuesto en cuestión. Para ello, en el cultivo de células adherentes que

contiene el compuesto a estudiar se efectúa una *herida*, es decir, se despegan células de una zona de la placa. A continuación, se observa durante las siguientes 24 horas la evolución de la *herida* con respecto al control. Así, en el control se observará el cierre de la herida después de transcurrido un cierto tiempo (véase la figura 4.7). Por el contrario, si el cultivo celular ha sido *herido* en presencia de un compuesto antiangiogénico la migración celular se ve impedida y el surco tardará mucho más en cerrarse.

Figura 4.7. Ensayo de la cicatrización de heridas.

4.2. FAMILIA 1: DERIVADOS MONOOXIGENADOS

4.2.1. Actividad citotóxica

Los valores de citotoxicidad de los compuestos sintéticos se midieron en las líneas celulares HT-29 (adenocarcinoma de colon), HEK-293 (células embrionarias de riñón) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama), después de 48 horas de incubación. Los valores obtenidos en los compuestos de la familia 1 se muestran a continuación.

Tabla 4.1. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad (familia 1) (continúa).

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
1	31,4±1,6	55±11	51±5	0,6	0,6
2	25±5	28,0±0,6	27,4±2,0	0,9	0,9
3	45±6	25±3	47±3	1,86	1,0
4	52±3	51±12	1,56±0,06	1,0	33,3
5	5,5±1,3	1,1±0,5	47±3	5,1	0,1
6	17±6	45±8	>100	0,4	<0,2
7	67±7	48±5	52±5	1,4	1,3

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
8	54,1±1,0	5,6±2,4	50,8±0,9	9,7	1,1
9	29±6	>100	49±10	<0,3	0,6
10	50,4±2,2	60±9	48±10	0,8	1,0
11	29±3	25±6	25,8±1,0	1,2	1,1
Honokiol	9,3±1,6	6,1±0,5	5,0±0,7	1,5	1,9

* α = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (HT-29). ** β = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (MCF-7).

De la tabla anterior destacan los compuestos **5** y **8** en HT-29 y el compuesto **4** en MCF-7, ya que poseen mayor citotoxicidad que el propio honokiol, además de presentar un valor α superior a 1.

Para la medición de la secreción de la proteína VEGF y la inhibición de la expresión génica se seleccionaron los compuestos honokiol, **3**, **5**, **8** y **11**. La línea celular empleada fue HT-29 y las concentraciones utilizadas en los distintos ensayos fueron en todos los casos inferiores al valor de IC₅₀ en dicha línea celular. Cabe destacar que en la bibliografía no se han encontrado estudios sobre las actividades biológicas del honokiol evaluadas en esta tesis, por lo que, además de utilizar el honokiol como producto de referencia también se evalúan dichas actividades, no conocidas hasta el momento. En

la tabla 4.2 se reúnen las estructuras de los compuestos seleccionados junto a las concentraciones empleadas en los ensayos de medición de la secreción proteica de VEGF e inhibición de la expresión génica.

Tabla 4.2. Productos seleccionados con sus respectivas concentraciones (familia 1).

<p>Honokiol C=5 µg/mL</p>	<p>3 C=20 µg/mL</p>	<p>5 C=5 µg/mL</p>
<p>8 C=5 µg/mL</p>	<p>11 C=20 µg/mL</p>	

4.2.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen *VEGF*

La medición de la secreción de la proteína VEGF se llevó a cabo en células HT-29, después de 72 horas de incubación, empleando el test ELISA según el protocolo descrito en el apartado 4.1.2. Los porcentajes de VEGF secretados al medio de cultivo se indican en la siguiente gráfica.

Gráfica 4.1. Niveles de VEGF presentes en el medio de cultivo (familia 1).

De la gráfica anterior se extrae que el honokiol presenta un porcentaje de inhibición del 45%, por lo que puede ser un buen agente antiangiogénico, tal y como se indica en la bibliografía. El compuesto **3** presenta un valor de inhibición algo superior al del honokiol. El resto de compuestos ensayados no mejoran la capacidad inhibitoria de la secreción de VEGF que muestra el honokiol.

Los niveles de expresión del gen *VEGF* se determinaron en células HT-29 después de 48 horas de incubación, utilizando la técnica qPCR. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica.

Gráfica 4.2. Porcentaje de la expresión del gen *VEGF* (familia 1).

Los resultados de la tabla anterior ponen de manifiesto que el producto con mayor capacidad de inhibición de la expresión del gen *VEGF* es el honokiol.

4.2.3. Ensayo de tubulogénesis

La etapa final de la angiogénesis es la organización de células endoteliales en una red de tubos tridimensional (tubulogénesis). *In vitro*, las células endoteliales de aorta de bovino (BAEC) sembradas en la Matrigel® se alinean entre ellas formando microtúbulos, que se pueden apreciar pocas horas después del inicio del ensayo.

En primer lugar, se determinó la citotoxicidad de los compuestos de la familia 1 en células BAEC después de 72 horas de incubación. Los valores de IC_{50} se muestran en la tabla 4.3. A continuación, se realizó el ensayo de tubulogénesis para cada compuesto de la familia 1. En la tabla 4.3 se muestra la concentración mínima inhibitoria (MIC) de formación de tubos junto con su correspondiente imagen tomada a las 7 horas de la adición del producto.

Tabla 4.3. Ensayo de formación de tubos (familia 1) (continúa).

Producto	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Tubulogénesis
Control	-	-

Honokiol	$7,7 \pm 0,6$	3,1

1	37 ± 3	25*

2	25 ± 3	12,5

Producto	IC ₅₀ (µg/mL)	MIC (µg/mL)	Tubulogénesis
3	28,0±1,0	25*

4	>100	25

5	>100	25

6	81,0±2,0	25**

7	50±3	25

Producto	IC ₅₀ (µg/mL)	MIC (µg/mL)	Tubulogénesis
8	>100	12,5

9	85±6	25 ^{*,**}

10	29,0±2,0	50

11	>100	>100 ^{**}

* Inhibición parcial a 12,5 µg/mL. **Parcialmente insoluble a esta concentración.

Los valores de IC₅₀ de los compuestos de la familia 1 son superiores a los del honokiol, lo cual indica que estos compuestos son menos citotóxicos que el producto natural en la línea no tumoral BAEC.

Por otro lado, el honokiol es el compuesto que presenta mayor capacidad inhibitoria en la formación de capilares en BAEC (3,1 µg/mL). Los valores MIC del resto de compuestos de la familia 1 son, en todos los casos, superiores al del honokiol, por lo que no son capaces de mejorar la actividad inhibitoria del producto natural.

4.2.4. Inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

La inhibición del gen *hTERT*, que codifica la parte proteica de la telomerasa, y la del gen *c-Myc*, que es uno de los principales factores reguladores del gen *hTERT*, se determinó con la técnica qPCR en células HT-29 después de 48 horas de incubación. Los resultados se muestran en la gráfica 4.3.

Gráfica 4.3. Porcentaje de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 1).

De la gráfica anterior se concluye que, de nuevo, el honokiol es capaz de inhibir la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* en un 55% en ambos casos. Ninguno de los compuestos estudiados en la familia 1 es capaz de mejorar dicha capacidad de inhibición.

4.3. FAMILIA 2: DERIVADOS DIHIDROXILADOS, (METOXI)-HIDROXILADOS, DIMETOXILADOS, TRIMETOXILADOS Y (DIMETOXI)HIDROXILADOS

4.3.1. Actividad citotóxica

Los valores de citotoxicidad de los compuestos de la familia 2 se midieron en las líneas celulares HT-29, HEK-293 y MCF-7 después de 48 horas de incubación. Los valores de IC₅₀ se indican en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad (familia 2) (continúa).

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
12	57±8	2,52±0,05	60±6	22,6	1,0
13	>100	5,24±0,18	>100	>19,1	1,0
14	54±4	1,42±0,16	>100	37,8	<0,5
15	68±11	2,5±1,2	51,6±0,4	27,6	1,3
16	31±6	3,4±1,2	>100	9,0	<0,31

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
17	5,1±2,2	13,9±2,3	17,800±0,014	0,4	0,3
18	23±6	29±8	13±3	0,8	1,8
19	54±6	2,7±1,1	>100	20,2	<0,5
20	39±4	35±7	43±3	1,1	0,9
21	44±8	47±8	42±5	0,9	1,0
22	50±8	22±4	44±5	2,3	1,1
23	34±10	16,0±1,9	33±6	2,1	1,0
24	14,6±2,4	72±8	48±5	0,2	0,3
25	44±5	49±6	55±6	0,9	0,8

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
26	35±10	24±6	41±4	1,5	0,9
27	2,0±0,7	>100	53±5	<0,02	0,04
28	27±3	55,2±1,6	>100	0,5	<0,3
29	26±8	41±3	45±10	0,6	0,6
30	>100	54±9	57±5	>1,8	>1,8
31	>100	33,7±1,5	>100	>3,0	1,0
32	28±5	54±7	50,2±1,6	0,5	0,6
33	>100	21±4	47±5	>4,7	>2,1
34	23±10	>100	55±5	<0,2	0,4

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
35	23,1±0,6	29±8	48±3	0,8	0,5
36	>100	26±8	34±9	>3,9	>2,9
Honokiol	12±3	6,5±0,6	5,9±2,0	1,8	2,0

* α = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (HT-29). ** β = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (MCF-7).

Para determinar los porcentajes de inhibición de secreción de la proteína VEGF y de la expresión de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* se seleccionaron los compuestos con coeficiente de selectividad α superior a 1 y valores de IC₅₀ inferiores a 35 µg/mL. Las concentraciones empleadas para llevar a cabo los ensayos fueron, para cada compuesto, inferiores a las de su valor de IC₅₀ en la línea HT-29, tal y como se indica en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Productos seleccionados y concentraciones (familia 2).

Honokiol C=3 µg/mL	12 C=3 µg/mL	13 C=3 µg/mL
14 C=3 µg/mL	15 C=3 µg/mL	16 C=3 µg/mL

4.3.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen *VEGF*

En primer lugar, se determinó la cantidad de VEGF secretado al medio de cultivo en células HT-29 después de 72 horas de incubación. Los porcentajes de VEGF secretado respecto al VEGF secretado por las células sin tratar (control) se indican en la gráfica 4.4.

Gráfica 4.4. Niveles de VEGF presentes en el medio de cultivo (familia 2).

Los porcentajes de secreción de VEGF de los compuestos **12**, **13**, **14**, **15**, **16** y **19**, empleados en concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$, son inferiores a los del honokiol, que se ensayó a la misma concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$. En este grupo de compuestos destaca el **19** que inhibe la producción de VEGF un 67%. El resto de compuestos ensayados (**22**, **23**, **26**, **31**, **33** y **36**) también presentan un porcentaje de inhibición superior al del honokiol, aunque las concentraciones utilizadas para estos compuestos han sido superiores a las del producto natural.

La medición de la expresión del gen *VEGF* se llevó a cabo sobre células HT-29 después de 48 horas de incubación utilizando la técnica qPCR. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 4.5.

Gráfica 4.5. Porcentajes de la expresión del gen *VEGF* (familia 2).

En la gráfica anterior se puede apreciar que los compuestos **12**, **13**, **14**, **15** y **19**, medidos a igual concentración (3 $\mu\text{g/mL}$), inhiben la expresión del gen *VEGF* entre un 76-95% respecto al control, mientras que el honokiol es capaz de inhibir un 35% dicha expresión a la misma concentración. También destaca el compuesto **23** que a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ inhibe la expresión del gen *VEGF* tres veces más que el honokiol.

En la tabla 4.6 y en la gráfica 4.6 se comparan los porcentajes de inhibición del gen *VEGF* y de la secreción de la proteína VEGF.

Tabla 4.6. Porcentajes de inhibición del gen *VEGF* y la proteína VEGF secretada(familia 2).

Compuesto	% inhibición gen <i>VEGF</i>	% inhibición VEGF secretado
Honokiol	35	25
12	76	43
13	90	43
14	84	38
15	95	50
16	65	48
19	83	67
22	24	69
23	79	69
26	49	52
31	44	71
33	63	65
36	59	45

Gráfica 4.6. Comparación entre los % de inhibición de la secreción de la proteína VEGF y del gen que la codifica (familia 2).

Los compuestos **16, 19, 23, 26, 33 y 36**, junto con el honokiol, se ajustan a una distribución lineal ($R^2 = 0,759$), con porcentajes de inhibición similares

entre gen y proteína, lo cual indica que dichos compuestos son capaces de regular la producción de la proteína VEGF a nivel transcripcional, es decir, mediante el control de la expresión del gen asociado.

Para el resto de compuestos la regulación de la expresión de la proteína VEGF se lleva a cabo a nivel post-transcripcional.

Los compuestos **22** y **31** inhiben en mucha menor proporción la expresión del gen *VEGF* que la secreción de la proteína asociada.

Los compuestos **12**, **13**, **14** y **15** inhiben la expresión génica en mayor medida que la secreción de la proteína al medio de cultivo. Esto podría ser debido a una activación de la proteólisis de las isoformas más pesadas VEGF-189 y VEGF-206, que se encuentran en el interior de la célula. Esta degradación de las proteínas genera otras isoformas más ligeras como VEGF-165, que es secretado al medio de cultivo, aumentando los niveles de VEGF por encima de lo esperado.

En la figura 4.8 se muestran los compuestos que muestran mejor actividad en la inhibición de la secreción de la proteína VEGF y en la inhibición de la expresión del gen *VEGF* (actividad que a partir de ahora se denominará anti-VEGF).

A modo de conclusión, se puede decir que los productos con mayor actividad anti-VEGF son **19** y **23**. Ambos compuestos presentan un sustituyente hidroxilo en un anillo y un metoxilo en el otro y los patrones de sustitución son *orto-orto* (patrón de sustitución del magnolol) y *meta-meta*, respectivamente. Además, los compuestos **22**, **31** y **33** inhiben la secreción de la proteína con porcentajes superiores al 60%. Estos compuestos presentan un grupo hidroxilo y un grupo metoxilo en diferentes anillos y el modelo de sustitución preferido es *orto-meta* u *orto-para* (patrón de sustitución del honokiol).

Respecto a los compuestos inhibidores de la expresión del gen *VEGF* presentan, mayoritariamente, un grupo hidroxilo en cada anillo.

a) Inhibidores de la secreción de la proteína VEGF y del gen asociado

b) Inhibidores de la secreción de la proteína VEGF

c) Inhibidores de la expresión del gen VEGF

Figura 4.8. Inhibidores de la secreción de VEGF y de la expresión del gen VEGF (familia 2).

4.3.3. Inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

La medición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*, relacionados con la telomerasa, se llevó a cabo mediante qPCR en células HT-29 después de 48 horas de incubación. En la gráfica 4.7 se indican los porcentajes de expresión del gen *hTERT* de los compuestos seleccionados de la familia 2.

Gráfica 4.7. Porcentajes de la expresión del gen *hTERT* (familia 2).

La gráfica anterior muestra que los compuestos **12** y **19**, son capaces de inhibir la expresión del gen *hTERT* en un 97%. Los compuestos **13**, **14**, **15** y **16** inhiben el gen *hTERT* con porcentajes entre el 70-90%. Estos valores de inhibición son muy superiores a los del honokiol que, a igual concentración (3 $\mu\text{g/mL}$), inhibe este gen un 33%.

Los compuestos **26**, **31** y **36** también superan el porcentaje de inhibición del honokiol, aunque en estos casos las concentraciones de los compuestos fueron mayores a las del producto natural.

Gráfica 4.8. Porcentajes de la expresión del gen *c-Myc* (familia 2).

En la gráfica 4.8 se indican los porcentajes de expresión del gen *c-Myc*. Los compuestos que destacan por mostrar elevados porcentajes de inhibición son **12**, **14**, **15** y **19**, con porcentajes de entre 82-94%, cuando se emplean a una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores son muy superiores a los del honokiol que inhibe la expresión de este gen un 20%.

Otros compuestos destacables son **16** (61% de inhibición a 3 $\mu\text{g/mL}$) y **26** (66% de inhibición a 15 $\mu\text{g/mL}$).

En la tabla 4.7 y en la gráfica 4.9 se comparan los porcentajes de inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc*.

Tabla 4.7. Porcentajes de inhibición de los genes *c-Myc* y *hTERT* (familia 2).

Compuesto	% inhibición gen <i>c-Myc</i>	% inhibición gen <i>hTERT</i>
Honokiol	20	33
12	82	97
13	13	82
14	89	89
15	84	71
16	61	70
19	94	97
22	50	38
23	29	12
26	66	65
31	46	71
33	13	44
36	13	78

Gráfica 4.9. Comparación entre los % de inhibición de la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* (familia 2).

La mayoría de los compuestos, con excepción de **13**, **33** y **36**, se ajustan a una distribución lineal ($R^2 = 0,856$), lo cual sugiere que dichos compuestos son capaces de controlar la expresión del gen *hTERT* a través del control de la expresión de su factor de transcripción asociado, *c-Myc*.

Los compuestos con mayor actividad anti-hTERT y anti-c-Myc de esta familia son **12** y **19**. Ambos son capaces de inhibir casi por completo la expresión de los genes estudiados en la gráfica 4.9 y presentan un patrón de sustitución *orto-orto* en su estructura. Además, los compuestos **14**, **15**, **16** y **26** muestran porcentajes de inhibición de la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* por encima del 60%.

En conclusión, los compuestos que presentan mayor inhibición en la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en cada anillo aromático o también un grupo hidroxilo y un grupo metoxilo en anillos diferentes (véase la figura 4.9). Los patrones de sustitución preferidos son *orto-orto* (patrón de sustitución del magnolol), *meta-meta*, *orto-para* (patrón de sustitución del honokiol) o *meta-para*.

a) Inhibidores de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc*

b) Inhibidores de la expresión del gen *hTERT*

Figura 4.9. Inhibidores de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 2).

Los mejores compuestos de esta familia son **12** y **19** por combinar las mejores actividades de los aspectos estudiados en este apartado.

4.4. FAMILIA 3: DERIVADOS ALILADOS Y TRANSPUESTOS

4.4.1. Actividad citotóxica

Los valores de IC_{50} de los derivados alílicos y sus correspondientes productos de transposición se midieron en las líneas celulares HEK-293, HT-29 y MCF-7, después de 48 horas de incubación.

En la tabla 4.8 se indican los valores de IC_{50} para estas tres líneas celulares y también los valores de los coeficientes de selectividad α y β .

Tabla 4.8. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad (familia 3) (continúa).

Producto	$IC_{50} \pm SD$ ($\mu g/mL$)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α^*	β^{**}
37	17,7 $\pm$ 1,5	27 $\pm$ 3	21,28 $\pm$ 0,23	0,7	0,8
38	13,0 $\pm$ 1,3	55 $\pm$ 4	3,6 $\pm$ 0,9	0,2	3,6
39	5,6 $\pm$ 1,4	18,49 $\pm$ 0,20	4,8 $\pm$ 1,1	0,3	1,2
40	>100	2,8 $\pm$ 0,8	29 $\pm$ 4	>35,5	>3,4
41	>100	18 $\pm$ 10	25,8 $\pm$ 1,4	>5,5	>3,9

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
42	6,8±1,2	10±3	0,78±0,04	0,7	8,7
43	35±7	4,9±2,3	49±7	7,1	0,7
44	18±7	51±7	26±4	0,3	0,7
45	7,5±1,6	43,3±2,4	51,2±2,4	0,2	0,1
46	25±3	56±5	54±6	0,4	0,5
47	28±10	18±8	50,4±0,6	1,6	0,6
48	26,4±2,3	13,49±0,17	55±3	2,0	0,5
49	15±6	53±3	12,7±0,5	0,3	1,2

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
50	1,1±0,6	7,6±2,3	1,0±0,8	0,1	1,1
51	>100	16±4	38±6	>6,2	>2,6
52	14±3	11,8±1,6	34±11	1,2	0,4
53	13,1±0,8	>100	51±4	<0,1	0,3
54	6,2±1,0	44,2±0,6	12,0±0,9	0,1	0,5
55	35±4	46±5	34±3	0,7	1,0
56	24,8±1,0	21±6	15±3	1,2	1,7
57	50,4±2,3	>100	48,3±1,8	<0,5	1,1

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
58	23±3	7,6±2,3	17,7±1,7	0,8	1,3
59	15±5	16±7	12,35±0,16	0,9	1,2
60	21,5±0,7	>100	47±6	<0,2	0,5
61	17,1±2,2	43±4	24±5	0,4	0,7
62	16±3	30,7±1,2	22±3	0,5	0,7
63	13±3	23±3	18±3	0,6	0,7
64	29±5	16,6±2,0	26±3	1,7	1,1
65	4,6±1,2	14±3	16±3	0,3	0,3

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
66	28±6	33±3	50±9	0,9	0,6
67	3,2±1,1	26±4	20±3	0,1	0,2
68	2,1±0,4	12,3±1,1	12±4	0,2	0,2
Honokiol	9,3±1,6	6,1±0,5	5,0±0,7	1,5	1,9

* α = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (HT-29). ** β = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (MCF-7).

Los compuestos seleccionados para los posteriores estudios biológicos fueron aquellos con coeficiente de selectividad α superior a la unidad o valores de IC₅₀ en HT-29 inferiores a 12,5 µg/mL. En la tabla 4.9 se indican las estructuras de los compuestos que cumplen los criterios de selección anteriores. Las concentraciones empleadas para llevar a cabo los ensayos biológicos fueron inferiores a las de su valor de IC₅₀ en la línea HT-29, tal y como se indica en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Productos seleccionados y concentraciones (familia 3).

<p>Honokiol C=5 µg/mL</p>	<p>40 C=3 µg/mL</p>	<p>41 C=10 µg/mL</p>
<p>42 C=10 µg/mL</p>	<p>43 C=3 µg/mL</p>	<p>47 C=10 µg/mL</p>
<p>48 C=10 µg/mL</p>	<p>50 C=5 µg/mL</p>	<p>51 C=10 µg/mL</p>
<p>52 C=5 µg/mL</p>	<p>56 C=10 µg/mL</p>	<p>59 C=10 µg/mL</p>
<p>64 C=15 µg/mL</p>		

4.4.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen *VEGF*

Los niveles de secreción de la proteína VEGF se midieron con el método ELISA después de incubar las células HT-29 durante 72 horas. Los resultados obtenidos se indican en la gráfica 4.10. Los compuestos de la familia 3 se caracterizan por poseer porcentajes de secreción de la proteína VEGF superiores al del honokiol. Únicamente destacan los compuestos **56** y **64**, que

inhiben la secreción de VEGF con porcentajes similares al del producto natural a concentraciones de 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Gráfica 4.10. Niveles de VEGF presentes en el medio de cultivo (familia 3).

La expresión del gen *VEGF* se determinó con la técnica qPCR en células HT-29 después de 48 horas de incubación. Los resultados obtenidos se indican en la gráfica 4.11.

Gráfica 4.11. Porcentajes de la expresión del gen *VEGF* (familia 3).

En la inhibición del gen *VEGF* destacan los compuestos **40**, **41** y **42**, que presentan un porcentaje de inhibición mayor que el del honokiol. El más

relevante de los tres compuestos es el **40**, ya que inhibe un 84% la expresión del gen *VEGF* a una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$ frente al 64% del honokiol medido a concentración 5 $\mu\text{g/mL}$.

En la tabla 4.10 y en la gráfica 4.12 se comparan los porcentajes de inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de inhibición de la expresión del gen *VEGF*.

Tabla 4.10. Porcentajes de inhibición del gen *VEGF* y la proteína VEGF secretada (familia 3).

Compuesto	% inhibición gen <i>VEGF</i>	% inhibición VEGF secretado
Honokiol	64	45
40	84	24
41	77	6
42	76	42
43	45	37
47	48	1
48	49	38
50	67	41
51	22	0
52	62	0
56	58	60
59	65	19
64	28	53

Gráfica 4.12. Comparación entre los % de inhibición de la secreción de la proteína VEGF y del gen que la codifica (familia 3).

Los compuestos que presentan una correlación lineal ($R^2 = 0,695$) entre gen *VEGF* y proteína asociada son el honokiol, **43**, **48** y **50**, lo cual indica que dichos compuestos son capaces de regular la producción de la proteína VEGF a nivel transcripcional mediante inhibición de su gen asociado. Para el resto de compuestos la regulación de la producción de la proteína se establece a nivel post-transcripcional.

Los compuestos **56** y **64** presentan un mayor valor de inhibición de la proteína con respecto al valor de inhibición de la expresión génica de *VEGF*.

El resto de compuestos son capaces de inhibir la expresión génica en mayor medida que la secreción de la proteína, lo que podría explicarse mediante la activación de la proteólisis de las isoformas más pesadas del VEGF intracrino.

El compuesto **56** muestra una actividad anti-VEGF con porcentajes de inhibición superiores al 50%.

Observando las estructuras de la figura 4.10 se concluye que la presencia de grupos hidroxilo y alilo en al menos uno de los anillos aromáticos, favorece la inhibición de la secreción de la proteína VEGF. Sin embargo, la presencia de un grupo aliloxi en cada uno de los anillos aromáticos favorece la inhibición génica del *VEGF*. Los patrones de sustitución anti-VEGF que favorecen dichas actividades son *meta-meta*, *meta-para* o *para-para*.

a) Inhibidores de la secreción de la proteína VEGF

b) Inhibidores de la expresión del gen *VEGF*

Figura 4.10. Inhibidores de la secreción de VEGF y de la expresión del gen *VEGF* (familia 3).

4.4.3. Inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

Los valores de expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* se midieron con la técnica qPCR sobre células HT-29 después de 48 horas de incubación. En la gráfica 4.13 se indican los porcentajes de expresión del gen *hTERT* para los compuestos seleccionados de la familia 3.

Gráfica 4.13. Porcentaje de la expresión del gen *hTERT* (familia 3).

Comparando los compuestos de la gráfica con el honokiol, los más destacados son **40**, **41**, **43**, **51** y **56**. Los compuestos **40** y **43** presentan una inhibición de la expresión del gen *hTERT*, a concentración 3 µg/mL, del 66% y 58%, respectivamente, valores ligeramente superiores a los del honokiol que inhibe el gen *hTERT* un 55% pero a una concentración de 5 µg/mL.

En la gráfica 4.14 se indican los porcentajes de inhibición del gen *c-Myc* de los compuestos seleccionados de la familia 3. Los compuestos más activos son, además del honokiol, **42**, **43**, **47**, **50**, **56** y **59**. Los compuestos **43** y **50**, evaluados a concentración de 3 µg/mL y 5 µg/mL respectivamente, muestran un porcentaje de inhibición del 64% y 77%, respectivamente, frente al porcentaje de inhibición del 53% mostrado por el honokiol a 5 µg/mL. También destacan los compuestos **42** y **56** por su alta inhibición (87% y 93% respectivamente) que fueron ensayados a concentración 10 µg/mL, ligeramente superior a la del honokiol.

Gráfica 4.14. Porcentaje de la expresión del gen *c-Myc* (familia 3).

En la tabla 4.11 y en la gráfica 4.15 se comparan los porcentajes de inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc*.

Tabla 4.11. Porcentajes de inhibición de los genes *c-Myc* y *hTERT* (familia 3).

Compuesto	% inhibición gen <i>c-Myc</i>	% inhibición gen <i>hTERT</i>
Honokiol	55	55
40	42	66
41	37	75
42	87	55
43	64	58
47	74	22
48	55	54
50	77	15
51	16	69
52	36	44
56	93	75
59	68	49
64	51	28

Gráfica 4.15. Comparación entre los % de inhibición de la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* (familia 3).

Los compuestos que se ajustan a una distribución lineal ($R^2 = 0,957$) son, además del honokiol, **43**, **48**, **52** y **56** por lo que la inhibición de la expresión del gen *hTERT* podría estar controlada por la inhibición del factor de transcripción codificado por el gen *c-Myc*.

El compuesto con mayor actividad dual en su capacidad de inhibir la expresión génica de *hTERT* (75%) y *c-Myc* (93%) es el **56**.

De nuevo, a la hora de inhibir la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* se muestran más activos los compuestos con al menos un sustituyente aliloxi en uno de los anillos aromáticos. El patrón de sustitución más favorable vuelve a ser *meta-meta*, *meta-para* o *para-para* (véase la figura 4.11).

El compuesto **56** es un isómero estructural del honokiol que es capaz de mejorar la actividad del producto natural, siendo el compuesto más destacado en la familia 3. Además, el compuesto **40**, precursor del compuesto **56**, muestra también actividad inhibitoria en la expresión génica de *hTERT*.

a) Inhibidor de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc*

b) Inhibidores de la expresión del gen *hTERT*

c) Inhibidores de la expresión del gen *c-Myc*

Figura 4.11. Inhibidores de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 3).

4.5. FAMILIA 4: DERIVADOS AMINADOS

4.5.1. Actividad citotóxica

Los valores de citotoxicidad de los compuestos de la familia 4 se midieron en las líneas celulares HT-29, HEK-293 y MCF-7, después de 48 horas de incubación, obteniendo los siguientes valores de IC₅₀.

Tabla 4.12. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad (familia 4) (continúa).

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
69	54,9±2,4	16±5	2,9±0,5	3,3	18,9
70	54±12	42±7	60±5	1,3	0,9
71	>100	>100	1,45±0,16	1,0	>69,0
72	54,1±1,8	44±8	56,0±1,6	1,2	1,0
73	47±5	49±5	28±7	1,0	1,7
74	31±8	27,3±0,4	52±4	1,2	0,6
75	10,5±0,5	9,2±1,8	16±3	1,1	0,7

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
76	50,1±1,6	54±6	99±8	0,9	0,5
77	55±7	49,35±0,08	>100	1,1	<0,6
78	50±6	51±8	44,3±1,0	1,0	1,1
79	>100	5,4±1,4	6,5±0,6	>18,4	>15,4
80	62±11	56±4	49,9±0,8	1,1	1,2
81	>100	56±4	56±4	>1,8	>1,8
82	29,2±1,4	49±4	>100	0,6	<0,3
83	22±5	2,25±0,18	>100	9,7	<0,2
84	49,9±1,2	15±5	18±9	3,3	2,8

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficientes de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
85	20±3	4,0±1,6	>100	4,9	<0,2
86	23±4	2,0±0,7	5,5±0,8	12,0	4,2
Honokiol	9,3±1,6	6,1±0,5	5,0±0,7	1,5	1,9

* α = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (HT-29). ** β = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (MCF-7).

Para los siguientes estudios biológicos se seleccionaron los compuestos con coeficiente de selectividad α mayor que 1 o con valores de IC₅₀ en HT-29 inferiores a 25 µg/mL (véase la tabla 4.13), empleándose para cada compuesto concentraciones inferiores a las de su IC₅₀ en la línea HT-29. Las estructuras de tales compuestos y sus concentraciones se indican en la siguiente tabla.

Tabla 4.13. Productos seleccionados y concentraciones (familia 4).

Honokiol C=5 µg/mL	69 C=15 µg/mL	75 C=3 µg/mL
79 C=3 µg/mL	83 C=3 µg/mL	84 C=15 µg/mL

4.5.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen *VEGF*

Los porcentajes de secreción de la proteína VEGF, para los compuestos seleccionados de la familia 4, se indican en la gráfica 4.16. La medición de la secreción se llevó a cabo con el ensayo ELISA en células HT-29 después de 72 horas de incubación.

Gráfica 4.16. Niveles de VEGF presentes en el medio de cultivo (familia 4).

Los compuestos **75**, **79**, **83**, **85** y **86**, empleados en concentraciones de 3 µg/mL, exhiben valores de inhibición de la proteína VEGF similares a los del honokiol, que se empleó a una concentración de 5 µg/mL.

La inhibición de la expresión del gen *VEGF* se midió en células HT-29 después de 48 horas de incubación, utilizando la técnica qPCR. Los porcentajes de expresión se indican en la gráfica 4.17.

Los compuestos más destacables en la inhibición del gen *VEGF* son **79** y **83** que, a una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$, muestran un porcentaje de inhibición ligeramente superior al del honokiol a concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ (42% y 41%, respectivamente vs 36%).

Gráfica 4.17. Porcentaje de la expresión del gen *VEGF* (familia 4).

En la tabla 4.14 y en la gráfica 4.18 se comparan los porcentajes de inhibición de la secreción de la proteína *VEGF* y de inhibición de la expresión del gen *VEGF*.

Tabla 4.14. Porcentajes de inhibición del gen *VEGF* y la proteína *VEGF* secretada (familia 4).

Compuesto	% inhibición gen <i>VEGF</i>	% inhibición <i>VEGF</i> secretado
Honokiol	64	45
69	35	9
75	46	52
79	58	45
83	59	49
84	39	44
85	43	58
86	52	52

Gráfica 4.18. Comparación entre los % de inhibición de la secreción de la proteína VEGF y del gen que la codifica (familia 4).

La mayoría de los compuestos, excepto el **69**, muestran una correlación lineal entre la inhibición de la secreción de la proteína VEGF y del gen que la codifica, lo que indica una regulación transcripcional de la proteína mediante el gen *VEGF*.

El compuesto **69** es capaz de inhibir la expresión génica de VEGF en mayor medida que la secreción de la proteína, lo que se podría explicar mediante la proteólisis de las isoformas más pesadas de VEGF que originan VEGF-165 y que es liberado al medio de cultivo.

Los compuestos con mayor actividad anti-VEGF son **83** y **86**, los cuales se caracterizan por poseer el grupo amino en posición *para* y dos grupos metoxilos en el otro anillo aromático.

Inhibidores de la secreción de VEGF y su gen asociado

Figura 4.12. Inhibidores de la secreción de VEGF y de la expresión del gen *VEGF* (familia 4).

4.5.3. Inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

La medición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* se llevó a cabo en células HT-29 después de 48 horas de incubación. Los resultados obtenidos se indican en la gráfica 4.19.

Gráfica 4.19. Porcentaje de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 4).

El compuesto **83** ($C = 3 \mu\text{g/mL}$) inhibe un 60% la expresión del gen *hTERT* y es el único capaz de superar la capacidad de inhibición del honokiol ($C = 5 \mu\text{g/mL}$), que es de un 55%.

En relación al gen *c-Myc*, los compuestos más destacables son el **75**, **79**, **83** y **85** que, a una concentración de 3 µg/mL, son capaces de inhibir la expresión génica alrededor de un 60% con respecto al control, frente al 55% de inhibición del honokiol, empleado a concentración 5 µg/mL.

En la tabla 4.15 y en la gráfica 4.20 se comparan los porcentajes de inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc*.

Tabla 4.15. Porcentajes de inhibición de los genes *c-Myc* y *hTERT* (familia 4).

Compuesto	% inhibición gen <i>c-Myc</i>	% inhibición gen <i>hTERT</i>
Honokiol	45	45
69	47	44
75	62	23
79	61	22
83	61	60
84	50	14
85	60	10
86	8	0

Gráfica 4.20. Comparación entre los % de inhibición de la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* (familia 4).

Los compuestos que se ajustan a una distribución lineal ($R^2 = 0,996$) son el honokiol, **69**, **83** y **86**. Este resultado sugiere que estos compuestos son

capaces de controlar la expresión del gen *hTERT* mediante el control de la expresión del gen *c-Myc*. Además, el compuesto **83** destaca por sus elevados porcentajes de inhibición en ambas expresiones génicas (véase la figura 4.13).

a) Inhibidores de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc*

b) Inhibidores de la expresión del gen *c-Myc*

Figura 4.13. Inhibidores de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 4).

En conclusión, los compuestos con mayor número de sustituyentes en el anillo en el que no hay grupo amino presentan mayores actividades en los campos estudiados que los compuestos con menor número de sustituyentes.

4.6. FAMILIA 5: DERIVADOS DE ARILPIRIDINAS Y ARILPIRIMIDINAS

4.6.1. Actividad citotóxica

Los valores de citotoxicidad de los compuestos arilpiridínicos y arilpirimidínicos se midieron en las líneas celulares HT-29, HEK-293, MCF-7 y BAEC, después de 72 horas de incubación. Los valores de IC_{50} se muestran en la tabla 4.16.

Tabla 4.16. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad (familia 5) (continúa).

Producto	$IC_{50} \pm SD$ ($\mu g/mL$)				Coeficiente de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	BAEC	α^*	β^{**}
87	>100	>100	0,26 $\pm$ 0,12	13 $\pm$ 5	1,0	>385
88	69 $\pm$ 13	33,7 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 0,7	48 $\pm$ 6	2,0	57,5
89	50 $\pm$ 5	>100	>100	52 $\pm$ 7	<0,5	<0,5
90	36 $\pm$ 15	12,0 $\pm$ 1,6	44 $\pm$ 8	27 $\pm$ 4	3,0	0,8
91	>100	49,86 $\pm$ 0,21	>100	26 $\pm$ 6	>2,0	1,0
92	50 $\pm$ 3	19,7 $\pm$ 1,2	7 $\pm$ 4	14 $\pm$ 6	2,5	7,1

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)				Coeficiente de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	BAEC	α*	β**
93	21±8	12,7±1,0	45±8	45±9	1,7	0,5
94	>100	>100	47,9±2,0	37±4	1,0	>2,1
95	>100	>100	7±4	63±18	1,0	14,3
96	4,0±1,9	6,4±1,5	29±10	14,9±2,0	0,6	0,1
97	>100	>100	10,3±1,2	0,18±0,09	1,0	>9,7
98	>100	>100	1,1±0,4	21,0±2,1	1,0	>90,9
99	16±8	65±16	10,6±0,7	20±6	0,2	1,5
100	>100	>100	>100	60±14	1,0	1,0
101	>100	>100	43±6	41,8±1,7	1,0	2,3

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)				Coeficiente de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	BAEC	α*	β**
Honokiol	9,3±1,6	6,1±0,5	5,0±0,7	10,8±1,3	1,5	1,9

* α = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (HT-29). ** β = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (MCF-7).

Los compuestos seleccionados para los posteriores estudios biológicos fueron aquellos que presentan un coeficiente de selectividad α superior a la unidad o valores de IC₅₀ en HT-29 inferiores a 10 µg/mL (véase la tabla 4.17), empleándose para cada compuesto concentraciones inferiores a las de su IC₅₀ en la línea HT-29. Las estructuras de tales compuestos y concentraciones se indican en la tabla 4.17.

Tabla 4.17. Productos seleccionados y concentraciones (familia 5).

Honokiol C=5 µg/mL	88 C=20 µg/mL	90 C=10 µg/mL
91 C=40 µg/mL	92 C=25 µg/mL	93 C=10 µg/mL
96 C=5 µg/mL		

4.6.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen *VEGF*

La medición de la secreción de la proteína VEGF se llevó a cabo con el método ELISA sobre células HT-29 después de 72 horas de incubación. Los resultados obtenidos se indican en la gráfica 4.21.

Gráfica 4.21. Niveles de VEGF presentes en el medio de cultivo (familia 5).

Los compuestos **88**, **90**, **91**, **93** y **96** son capaces de inhibir la producción de la proteína VEGF a un nivel similar al del honokiol. De los compuestos anteriores destaca el **96** por emplearse a igual concentración que el honokiol (5 µg/mL).

El porcentaje de expresión del gen *VEGF* se midió mediante la técnica qPCR en células HT-29 después de 48 horas de incubación. Los resultados obtenidos se indican en la gráfica 4.22.

Gráfica 4.22. Porcentaje de la expresión del gen *VEGF* (familia 5).

Todos los compuestos presentan valores de inhibición más elevados que el del honokiol, aunque hay que señalar que las concentraciones empleadas fueron superiores a la del producto natural (5 µg/mL), excepto para el compuesto **96**, cuya acción inhibitoria se midió también a una concentración de 5 µg/mL.

En la tabla 4.18 y en la gráfica 4.23 se representan los porcentajes de inhibición de la proteína VEGF secretada y de su gen asociado.

Tabla 4.18. Porcentajes de inhibición del gen *VEGF* y la proteína VEGF secretada (familia 5).

Compuesto	% inhibición gen <i>VEGF</i>	% inhibición VEGF secretado
Honokiol	64	45
88	69	35
90	92	52
91	66	58
92	82	4
93	68	48
96	67	52

Gráfica 4.23. Comparación entre los % de inhibición de la secreción de la proteína VEGF y del gen que la codifica (familia 5).

El honokiol y los compuestos **91**, **93** y **96** ajustan sus valores de secreción de la proteína VEGF y de expresión del gen *VEGF* a una distribución lineal ($R^2 = 0,637$), por lo que es probable que dichos compuestos regulen la producción de la proteína VEGF a nivel transcripcional mediante el control de la expresión de su gen asociado.

El resto de compuestos regulan la expresión de la proteína a nivel post-transcripcional. Estos compuestos presentan mayor inhibición del gen que de la proteína, lo que podría explicarse mediante la formación de VEGF-165 por proteólisis de las isoformas más pesadas.

Los compuestos **90**, **91** y **96** son capaces de inhibir las actividades estudiadas en este apartado con porcentajes superiores al 50%.

Inhibidores de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen *VEGF*

Figura 4.14. Inhibidores de la secreción de VEGF y de la expresión del gen *VEGF* (familia 5).

Todos los compuestos piridínicos y pirimidínicos estudiados son capaces de inhibir la expresión génica de *VEGF* con porcentajes superiores al 60%,.

4.6.3. Ensayo de la herida

En esta familia también se estudió la migración celular de BAEC mediante el ensayo de la herida. Para realizar este ensayo se eligieron los compuestos **88**, **90**, **92**, **93** y **96** debido a su baja citotoxicidad en BAEC y por presentar un margen de seguridad terapéutico aceptable (véase la tabla 4.19).

Tabla 4.19. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad de arilpiridinas y arilpirimidinas.

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficiente de selectividad	
	HT-29	MCF-7	BAEC	γ*	δ**
88	33,7±1,2	1,2±0,7	48±6	1,4	40,0
90	12,0±1,6	44±8	27±4	2,3	0,6
92	19,7±1,2	7±4	14±6	0,7	2,0
93	12,7±1,0	45±8	45±9	3,8	1,0
96	6,4±1,5	29±10	14,9±2,0	2,3	0,5
Honokiol	6,1±0,5	5,0±0,7	10,8±1,3	1,8	2,2

* γ = IC₅₀ (BAEC)/ IC₅₀ (HT-29). ** δ = IC₅₀ (BAEC)/ IC₅₀ (MCF-7).

En la figura 4.15 se muestran las imágenes de las células BAEC control (sin tratar con ningún compuesto). A tiempo 0 se observa la *herida* en diagonal, que se cierra completamente después de 24 horas.

Figura 4.15. Imágenes de células BAEC control.

En la figura 4.16 se muestra la evolución de la herida en células BAEC tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de honokiol. A tiempo 24 horas la herida no está completamente cerrada, lo que indica que este compuesto tiene una ligera actividad antimigratoria de células BAEC.

Figura 4.16. Imágenes de células BAEC tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de honokiol.

En la figura 4.17 se muestra la evolución de la herida en células BAEC tratadas con 15 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **88**. A tiempo 24 horas la herida no está

completamente cerrada, por lo que se concluye que este compuesto presenta una actividad antimigratoria de células BAEC similar a la del honokiol.

Figura 4.17. Imágenes de células BAEC tratadas con 15 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **88**.

En la figura 4.18 se muestra la evolución de la herida en células BAEC tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **90**. A tiempo 20 y 24 horas la herida se asemeja a sus homólogas para el honokiol, por lo que presenta una actividad antimigratoria similar a éste.

Figura 4.18. Imágenes de células BAEC tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **90**.

En la figura 4.19 se muestra la evolución de la herida en células BAEC tratadas con 5 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **92**. A tiempo 20 horas la herida se muestra en toda su amplitud. La actividad antimigratoria de este compuesto es, por tanto, mucho mayor que la del honokiol, puesto que la concentración empleada fue la mitad que la empleada con el honokiol.

Figura 4.19. Imágenes de células BAEC tratadas con 5 µg/mL del compuesto **92**.

En la figura 4.20 se muestra la evolución de la herida en células BAEC tratadas con 25 µg/mL del compuesto **93**. A tiempo 20 horas la *herida* está completamente cerrada, por lo que este compuesto no presenta capacidad antimigratoria.

Figura 4.20. Imágenes de células BAEC tratadas con 25 µg/mL del compuesto **93**.

En la figura 4.21 se muestra la evolución de la herida en células BAEC tratadas con 10 µg/mL del compuesto **96**. A tiempo 20 horas la *herida* no está completamente cerrada, por lo que se concluye que este compuesto tiene actividad inhibidora de la migración en células BAEC similar a la del honokiol.

Figura 4.21. Imágenes de células BAEC tratadas con 10 µg/mL del compuesto **96**.

De las imágenes anteriores se puede extraer que el compuesto **92**, a concentración 5 µg/mL, es el que podría poseer mayor capacidad antiangiogénica, pues inhibe la capacidad migratoria de las células endoteliales de aorta de bovino en mayor medida que el producto natural, haciéndolo además a menor concentración que éste último.

4.6.4. Inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

La expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* se determinó mediante la técnica qPCR sobre células HT-29 después de 48 horas de incubación. Los resultados obtenidos se indican en la gráfica 4.24.

En dicha gráfica se aprecia que los compuestos **88**, **90**, **92** y **93** inhiben la expresión del gen *hTERT* en mayor porcentaje que el honokiol. De entre los compuestos anteriores destacan el **90** y el **93**, que inhiben la expresión del gen *hTERT* un 80% y 72%, respectivamente.

Gráfica 4.24. Porcentaje de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 5).

Con respecto al gen *c-Myc*, cabe señalar que todos los compuestos son capaces de inhibir la expresión génica en mayor medida que el honokiol. Es importante mencionar el porcentaje de inhibición de los compuestos **88** y **96**, los cuales logran reducir la expresión del gen un 83% y 82%, respectivamente.

La relación que se establece entre la inhibición de la expresión del gen *hTERT* y del gen *c-Myc* se puede observar en la gráfica 4.25.

Tabla 4.20. Porcentajes de inhibición de los genes *c-Myc* y *hTERT* (familia 5).

Compuesto	% inhibición gen <i>c-Myc</i>	% inhibición gen <i>hTERT</i>
Honokiol	55	55
88	83	64
90	62	80
91	65	44
92	61	56
93	61	72
96	82	15

Gráfica 4.25. Comparación entre los % de inhibición de la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* (familia 5).

Aquellos compuestos que se ajustan a una distribución lineal ($R^2 = 0,989$) son **88**, **92** y el propio honokiol, por lo que, probablemente, su reducción en la expresión del gen *hTERT* es debida a una reducción en la expresión del protooncogen *c-Myc*.

Los compuestos **88**, **90** y **93** son capaces de inhibir la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* con porcentajes superiores al 60%.

Figura 4.22. Inhibidores de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 5).

De nuevo, los compuestos piridínicos y pirimidínicos son capaces de inhibir altamente la expresión de los genes, en este caso *hTERT* y *c-Myc*.

En esta familia destacan los derivados **90** y **96**, ya que presentan una alta actividad anti-VEGF y anti-*hTERT* o anti-*c-Myc*, respectivamente.

4.7. FAMILIA 6: DERIVADOS DE *N*-ARILMORFOLINAS, *N*-ARILPIPERIDINAS Y *N*-ARILPIRROLIDINAS

4.7.1. Actividad citotóxica

Los valores de citotoxicidad de los compuestos de la familia 6 se midieron en las líneas celulares HT-29, HEK-293 y MCF-7, después de 48 horas de incubación, obteniendo los siguientes valores de IC₅₀.

Tabla 4.21. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad (familia 6) (continúa).

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficiente de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
102	>100	39±13	19±6	>2,6	>5,3
103	>100	30±11	19±8	>3,3	>5,3
104	>100	36±15	14,1±1,3	>2,8	>7,1
105	>100	19±11	25±4	>5,3	>4,0
106	>100	5±3	31±9	>20,1	>3,2
107	19±7	23±6	13±4	0,8	1,5
108	>100	>100	>100	1,0	1,0

Producto	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Coeficiente de selectividad	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
109	37±5	55±5	9±4	0,7	4,1
110	62±16	37±6	>100	1,7	<0,6
111	51,7±0,6	31±9	19±8	1,7	2,7
112	6,3±1,0	47±4	19,8±0,9	0,1	0,3
113	8±4	43±7	>100	0,2	<0,1
114	>100	31±6	36±9	>3,2	>2,8
115	>100	13±7	>100	>7,7	1,0
116	>100	31,6±0,4	20±11	>3,2	>5,0
Honokiol	9,3±1,6	6,1±0,5	5,0±0,7	1,5	1,9

* α = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (HT-29). ** β = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (MCF-7).

Los compuestos seleccionados para los posteriores estudios biológicos son aquellos con coeficiente de selectividad α superior a 1 (véase la tabla 4.22). Los compuestos se utilizaron con concentraciones por debajo del valor de IC₅₀ en células HT-29, tal y como se indica en la tabla 4.22.

Tabla 4.22. Productos seleccionados y concentraciones (familia 6).

Honokiol C=5 µg/mL	102 C=30 µg/mL	103 C=30 µg/mL	104 C=30 µg/mL
105 C=14 µg/mL	106 C=2 µg/mL	110 C=20 µg/mL	111 C=20 µg/mL
114 C=20 µg/mL	115 C=10 µg/mL	116 C=20 µg/mL	

4.7.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF y de la expresión del gen *VEGF*

La medición de la secreción de la proteína VEGF se llevó a cabo con el método ELISA sobre células HT-29 después de 72 horas de incubación. Los resultados obtenidos se indican en la gráfica 4.26.

Gráfica 4.26. Niveles de VEGF presentes en el medio de cultivo (familia 6).

Los compuestos **103**, **106** y **111** son capaces de inhibir con un porcentaje superior al del honokiol la secreción de VEGF. Además, el compuesto **106** se ha estudiado a menor concentración (2 $\mu\text{g/mL}$) que el producto natural (5 $\mu\text{g/mL}$).

La medición de la expresión del gen *VEGF* se llevó a cabo sobre células HT-29 después de 48 horas de incubación, utilizando la técnica qPCR. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 4.27.

Gráfica 4.27. Porcentaje de la expresión del gen *VEGF* (familia 6).

El compuesto más destacable de la gráfica anterior es el **115** por mostrar un nivel de inhibición de la expresión del gen *VEGF* similar al del honokiol. Aunque, el compuesto **106** es capaz de inhibir más de la mitad la expresión del gen.

En la tabla 4.23 y en la gráfica 4.28 se comparan los porcentajes de inhibición del gen *VEGF* y de secreción de la proteína VEGF.

Tabla 4.23. Porcentajes de inhibición del gen *VEGF* y la proteína VEGF secretada (familia 6).

Compuesto	% inhibición gen <i>VEGF</i>	% inhibición VEGF secretado
Honokiol	64	45
102	22	21
103	46	50
104	34	36
105	11	25
106	56	58
110	45	21
111	22	56
114	47	20
115	64	23
116	44	0

Gráfica 4.28. Comparación entre los % de inhibición de la secreción de la proteína VEGF y del gen que la codifica (familia 6).

Los compuestos honokiol, **102**, **103**, **104**, **105** y **106** se ajustan a una distribución lineal ($R^2 = 0,815$), con porcentajes de inhibición similares entre gen y proteína, lo que indica que dichos compuestos son capaces de regular la producción de la proteína VEGF a nivel transcripcional mediante el control de la expresión de su gen asociado.

Para el resto de compuestos la regulación de la expresión de la proteína VEGF se lleva a cabo a nivel post-transcripcional.

Los compuestos **110**, **114**, **115** y **116** presentan porcentajes de inhibición superiores en la expresión del gen que en la secreción de la proteína. Esto podría ser debido a una activación de la proteólisis de las isoformas más pesadas del VEGF que libera VEGF-165 al medio de cultivo.

El compuesto **111** inhibe en mucha menor proporción la expresión del gen *VEGF* que la secreción de la proteína asociada.

Los compuestos **103** y **106** son los que mejor combinan el efecto inhibitor de la secreción de VEGF y el de la expresión de su gen asociado. Ambos compuestos presentan el mismo patrón de sustitución (*meta*), un único metoxilo en el anillo aromático y un anillo de 6 eslabones no aromático. (figura 4.23).

a) Inhibidores de la secreción de la proteína VEGF y de su gen asociado

b) Inhibidor de la secreción de VEGF

c) Inhibidor de la expresión del gen *VEGF*

Figura 4.23. Inhibidores de la secreción de VEGF y de la expresión del gen *VEGF* (familia 6).

Todas las estructuras de la figura anterior tiene en común el anillo de seis eslabones no aromático, que al parecer es un elemento esencial para su actividad. Además, la posición *meta* en el anillo aromático está favorecida.

4.7.3. Inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

La medición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*, relacionados con la telomerasa, se llevó a cabo sobre células HT-29 después de 48 horas de incubación mediante la técnica qPCR. En la gráfica 4.29 se indican los porcentajes de expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* para los compuestos seleccionados en la familia 6.

Gráfica 4.29. Porcentaje de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 6).

Para el gen *hTERT* los compuestos **105**, **106**, **110**, **114** y **116** presentan porcentajes de inhibición superiores al del honokiol. De nuevo destaca el compuesto **106** por su actividad a concentración inferior a la del honokiol.

Respecto al gen *c-Myc*, destacan los compuestos **115** y **116** estudiados a una concentración de 20 µg/mL y que son capaces de inhibir alrededor de un 90% la expresión génica con respecto al control.

En la tabla 4.24 y en la gráfica 4.30 se comparan los porcentajes de inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc*.

Tabla 4.24. Porcentajes de inhibición de los genes *c-Myc* y *hTERT* (familia 6).

Compuesto	% inhibición gen <i>c-Myc</i>	% inhibición gen <i>hTERT</i>
Honokiol	55	55
102	33	42
103	38	28
104	4	37
105	48	59
106	37	70
110	21	65
111	0	0
114	30	62
115	90	37
116	86	79

Gráfica 4.30. Comparación entre los % de inhibición de la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* (familia 6).

Los compuestos que se ajustan a una distribución lineal ($R^2 = 0,946$) son el honokiol, **102**, **103**, **105**, **111** y **116**, lo cual sugiere que dichos compuestos son capaces de controlar la expresión del gen *hTERT* a través de *c-Myc*.

El compuesto **116** destaca por presentar porcentajes de inhibición por encima del 70% en la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*.

Las estructuras de los compuestos más activos se muestran en la siguiente figura.

Figura 4.24. Inhibidores de la expresión del gen *hTERT* y *c-Myc* (familia 6).

En conclusión, en los derivados de tipo arilcetona, el grupo nitro mejora la capacidad de inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*. En estos casos la presencia de un anillo de piperidina o pirrolidina potencia la acción anti-*hTERT* o anti-*c-Myc* frente al de morfolina.

4.8. CONCLUSIONES

En este apartado se destacan todos aquellos compuestos que han mostrado poseer mayor actividad biológica que el honokiol en los ensayos realizados para las distintas familias.

Los valores obtenidos para el honokiol se muestran a continuación y son los valores de referencia con los que comparamos el resto de derivados.

Tabla 4.25. Porcentajes de inhibición medios del honokiol según su concentración.

Concentración del honokiol	Inhibición secreción VEGF	Inhibición gen VEGF	Inhibición gen <i>hTERT</i>	Inhibición gen <i>c-Myc</i>
5 µg/mL	45%	64%	55%	55%
3 µg/mL	25%	35%	33%	20%

Fijándonos en los resultados de la tabla anterior se puede afirmar que el honokiol presenta importantes actividades biológicas, con porcentajes de inhibición de alrededor del 50% en todos los aspectos evaluados en esta tesis. La concentración idónea para su estudio es de 5 µg/mL.

Los compuestos más activos y sus porcentajes de inhibición se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4.26. Compuestos más activos, concentraciones y % de inhibición (continúa).

Compuesto	% inhibición secreción de VEGF	% inhibición gen VEGF	% inhibición gen <i>hTERT</i>	% inhibición gen <i>c-Myc</i>
12 (3 µg/mL)	44	76	97	82
14 (3 µg/mL)	38	84	89	89
15 (3 µg/mL)	50	95	71	84
16 (3 µg/mL)	48	65	70	61
19 (3 µg/mL)	67	83	97	94
23 (10 µg/mL)	69	79	12	29
26 (15 µg/mL)	52	49	65	66
31 (30 µg/mL)	71	44	71	46
33 (15 µg/mL)	65	63	44	13
36 (3 µg/mL)	45	59	78	13
40 (3 µg/mL)	24	84	66	42
41 (10 µg/mL)	6	77	75	37

Compuesto	% inhibición secreción de VEGF	% inhibición gen VEGF	% inhibición gen <i>hTERT</i>	% inhibición gen <i>c-Myc</i>
42 (10 µg/mL)	42	76	55	87
56 (10 µg/mL)	60	58	75	93
83 (3 µg/mL)	49	59	60	61
90 (10 µg/mL)	52	92	80	62
93 (10 µg/mL)	48	68	72	61
96 (5 µg/mL)	52	67	15	82
106 (2 µg/mL)	58	56	70	37

Con el fin de determinar cuáles de los compuestos más activos presentan actividad dual inhibitoria respecto a la secreción de la proteína VEGF y a la expresión génica de *hTERT* se representan dichas actividades en la siguiente gráfica.

Gráfica 4.31. Comparación entre los % de inhibición de la secreción de VEGF y de la expresión del gen *hTERT*.

De los compuestos seleccionados por ser potentes inhibidores en algunos de los campos estudiados, la mayoría presenta actividad dual tanto de la secreción de la proteína VEGF como de la expresión del gen *hTERT*.

Únicamente, cuatro compuestos (**14**, **23**, **40** y **41**) se encuentran fuera de este rango. Claramente, el compuesto **19** es el máximo inhibidor tanto para la expresión génica de *hTERT* como para la secreción de la proteína VEGF.

Algo similar sucede al estudiar la actividad dual inhibitoria respecto a la secreción de la proteína VEGF y a la expresión génica de *c-Myc* (véase la gráfica 4.32).

Gráfica 4.32. Relación entre los niveles de inhibición de la secreción de VEGF y de la expresión del gen *c-Myc*.

Los compuestos que presentan actividad dual en la gráfica anterior son el honokiol, **12**, **15**, **16**, **19**, **26**, **31**, **42**, **56**, **83**, **90** y **93**.

En conjunto los compuestos más activos en la inhibición tanto de la secreción de VEGF como de la expresión de los genes *hTERT* y/o *c-Myc* se encuentran agrupados en la figura 4.25.

Figura 4.25. Derivados de honokiol y porcentajes de inhibición con mayor actividad biológica.

Como conclusiones finales se puede establecer que:

- El compuesto con mejores propiedades biológicas es el **19**, que muestra elevada inhibición en todos los aspectos evaluados y su actividad citotóxica se encuentra en el rango nanomolar.
- La presencia de un grupo hidroxilo en posición *orto* o *meta* favorece la inhibición de la expresión de los genes estudiados.
- Los patrones de sustitución que favorecen más las actividades biológicas medidas en esta tesis son el *orto-orto* (patrón de sustitución del magnolol), *meta-meta* y *orto-para* (patrón de sustitución del honokiol).

- La presencia de un sustituyente hidroxilo en cada anillo aromático mejora, sobre todo, la actividad inhibitoria de la expresión de los genes estudiados. Mientras que, la presencia de un grupo hidroxilo en un anillo y un metoxilo en el otro anillo favorece más la inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- Se ha descubierto un isómero estructural del honokiol, compuesto **56**, el cual supera las actividades biológicas del honokiol tanto en el grado de secreción de la proteína como en la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* y presenta altos márgenes de seguridad terapéuticos.
- La presencia de grupos alilo no muestra una mejora significativa en la inhibición de la secreción de VEGF respecto a los compuestos sin grupos alilos de la familia 2. Los compuestos con grupos aliloxi son capaces de aumentar la inhibición de la expresión de los genes estudiados respecto a sus homólogos transpuestos. Mientras que, la presencia de grupos alilo provoca un aumento en la inhibición de la secreción de VEGF respecto a sus precursores. Ninguno de estos sustituyentes favorecen la actividad biológica cuando se encuentran en posición *orto*.
- La introducción de un grupo amino en la estructura bifenílica no favorece las actividades inhibitorias estudiadas tanto como los compuestos con grupos hidroxilo y/o metoxilo en los dos anillos aromáticos. Los derivados con grupos amino no favorecen la actividad anti-*hTERT*, aunque sí la actividad anti-*c-Myc*.
- La presencia de un mayor número de sustituyentes en compuestos piridínicos y pirimidínicos favorece la inhibición de las propiedades biológicas estudiadas en la tesis.
- La pérdida de aromaticidad en uno de los anillos no mejora la capacidad inhibitoria del honokiol en las propiedades estudiadas.

4.9. PARTE EXPERIMENTAL

4.9.1. Cultivos celulares

Las células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, de adenocarcinoma de mama MCF-7 y las células embrionarias de riñón humano HEK-293 se cultivaron en un medio de cultivo compuesto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con un 10% de FBS, 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina, tal y como se describe en la bibliografía.²²⁷

Las células endoteliales de aorta de bovino BAEC se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FBS, 1% de glutamina, 1% de anfotericina B y 1% de penicilina/estreptomicina.

Todos los derivados del honokiol que han sido evaluados se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mg/mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.9.2. Ensayos de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad se realizó con células HT-29, MCF-7, HEK-293 y BAEC mediante el ensayo MTT.²²⁸ Se sembraron 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos con un volumen de 80 μ L de medio de cultivo y se dejaron incubando durante 24 horas.

Por otra parte, a partir de la disolución inicial de 10 mg/mL se realizaron diferentes diluciones seriadas desde concentración 100 a 0 μ g/mL de cada producto, usando medio de cultivo para realizar las diluciones y conservándolas a 4°C hasta su uso.

²²⁷ 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, 117-125.

²²⁸ a) Yang, C.; Barasoain, I.; Li, X.; Matesanz, R.; Liu, R.; Sharom, F. J.; Yin, D. L.; Díaz, J. F.; Fang, W. S. *Chem. Med. Chem.* **2007**, 2, 691-701. b) Rodríguez-Nieto, S.; Medina, M. A.; Quesada, A. R. *Anticancer Res.* **2001**, 21, 3457-3460.

Pasadas las 24 horas de incubación de las células, se añadió a cada pocillo 20 μ L de cada una de las diluciones de los distintos compuestos a ensayar y se dejaron incubar durante 2 o 3 días a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

Posteriormente, se añadió a cada pocillo 10 μ L de MTT (5 mg/ml en PBS) y se incubaron durante 3 horas a 37°C. A continuación, se eliminó el medio de cultivo, el formazán formado se disolvió en 100 μ L de DMSO y se midió la absorbancia a 492 nm. Todas las medidas se efectuaron como mínimo por triplicado.

4.9.3. Ensayo ELISA para determinar la producción de VEGFA-165

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 horas con 1,5 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo y se añadió a cada uno de los pocillos los compuestos a ensayar a las concentraciones indicadas para cada compuesto. 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 horas 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 (tipo sandwich) de detección de VEGF humano de Invitrogen. El ensayo se realizó por triplicado.

4.9.4. Ensayo de tubulogénesis

Para la realización de este ensayo se adicionó 50 μ L de 10,5 mg/mL de Matrigel® a cada pocillo de una placa de 96 pocillos a temperatura 4°C y se dejó polimerizar a 37°C durante un mínimo de 30 minutos. Seguidamente, se sembraron en cada pocillo 5×10^4 células BAEC con un volumen de 200 μ L de DMEM. Finalmente, se adicionó diferentes cantidades de producto, para obtener distintas concentraciones, y se incubó (37°C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda) durante 7 horas.²²⁹ Pasado este tiempo, se observaron los cultivos y se fotografiaron con un microscopio invertido NIKON DIAPHOT-TMD (NIKON Corp. Tokio, Japón). La evaluación de los resultados se realizó con dos observadores distintos.

4.9.5. Determinación de la expresión génica de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* mediante qPCR

Para determinar la expresión de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*, se sembraron unas 100.000 células HT-29 por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar 24 horas con 1,5 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo y se añadió a cada uno de los pocillos los distintos compuestos a ensayar a las concentraciones especificadas en cada caso. 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 horas en presencia de los compuestos. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron y el ARN se aisló usando el kit de extracción de ARN Ambion, de acuerdo a sus instrucciones de uso. En siguiente lugar, el ARN se retrotranscribió a ADN complementario mediante el empleo de la retrotranscriptasa M-MLV, 1-21 μ g de ARN extraído y oligo(dT)15 siguiendo el protocolo.

²²⁹ Rodríguez-Nieto, S.; González-Iriarte, M.; Carmona, R.; Muñoz-Chapuli, R.; Medina, M. A.; Quesada, A. R. *FASEB J.* **2002**, *16*, 261-263.

La amplificación de los genes mediante la técnica qPCR se efectuó a partir del ADN procedente de cada muestra y mediante el empleo de un termociclador StepOnePlus™ y sondas Taqman®. Se utilizó TaqMan® Gene Expression Fast Master Mix, que contiene el tampón adecuado para las condiciones de amplificación, dNTPs, la enzima ADN polimerasa termoestable y una sonda de referencia pasiva.

Para amplificar cada uno de los genes se utilizaron los cebadores prediseñados y comercializados por Life Technologies TaqMan® Gene Expression Assays, Hs99999903-m1 (β -actina), Hs00900055-m1 (*VEGF*), Hs00972646-m1 (*hTERT*) y Hs00153408-m1 (*c-Myc*).

4.9.6. Ensayo de la herida

Para determinar la capacidad migratoria de las células endoteliales de aorta de bovino se sembraron unas 200.000 células BAEC por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar con 1,5 mL de medio de cultivo hasta observar confluencia de las células. El siguiente paso fue realizar una herida en forma de cruz con la punta de una pipeta. Seguidamente, se cambió el medio de cultivo y se añadió a cada uno de los pocillos los distintos compuestos a ensayar a diversas concentraciones. A la muestra correspondiente al control se le añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos. Se tomaron fotos de la herida a tiempo 0, 3,5, 20 y 24 horas.

**5. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DE DERIVADOS
DEL ÁCIDO
3-METILGLUTÁMICO**

CAPÍTULO 5: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DEL ÁCIDO 3-METILGLUTÁMICO

La síntesis y parte de los estudios biológicos de este capítulo de la tesis fue realizado en los laboratorios de *Cardiff University*, Reino Unido, gracias a una estancia de investigación financiada por la Universitat Jaume I, que se llevó a cabo desde septiembre de 2014 a febrero de 2015. El proyecto de investigación de dicha estancia fue dirigido por el Dr. Andrew Westwell (*School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*) y el Dr. Jun Cai (*Cardiff China Medical Research Collaborative*).

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. Cáncer de mama triple negativo (TNBC)

El cáncer de mama es uno de los cánceres invasivos más diagnosticados en mujeres de países desarrollados y es el responsable de casi medio millón de muertes de mujeres de todo el mundo.²³⁰ Los cánceres de mama representan un grupo heterogéneo de tumores que son diferentes en progresión y respuesta a la terapia. Aunque los indicios de clínica tradicional, tales como el tamaño del tumor y el grado de metástasis, son necesarios para el pronóstico del cáncer, recientes perfiles genéticos han revelado 5 subtipos moleculares de cáncer de mama que se denominan como cáncer de mama normal, cáncer de mama tipo luminal A, tipo luminal B, cáncer de tipo *basal like* y cáncer HER-2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) positivo.²³¹ Estos subtipos se diferencian entre sí por su respuesta, positiva o negativa, a diferentes receptores hormonales, principalmente de estrógeno.

²³⁰ "World Cancer Report". International Agency for Research on Cancer. **2008**.

²³¹ Espinosa, E.; Vara, J. A.; Navarro, I. S.; Gámez-Pozo, A.; Pinto, A.; Zamora, P.; Redondo, A.; Feliu, J. *Cancer Treat. Rev.* **2011**, 37, 416-421.

El cáncer de mama de tipo *basal like* expresa genes característicos de células epiteliales basales y un 85% de estos cánceres se clasifican dentro de los cánceres de mama triple negativo (TNBC, *Triple Negative Breast Cancer*). El TNBC se caracteriza por la falta de genes que expresan los receptores de estrógeno, progesterona y HER-2 y ocurren mayoritariamente en mujeres jóvenes. Aproximadamente el 15% de todos los cánceres de mama son de tipo triple negativo.²³²

Debido a que el crecimiento del tumor no es dependiente de estrógeno, progesterona y receptores HER-2, el TNBC no responde ni a las terapias hormonales, como las que emplean tamoxifeno o inhibidores de aromatasa, ni a las terapias que inhiben receptores HER-2, en las que se emplea trastuzumab. Tampoco es efectivo el uso de terapias antiangiogénicas en las que se administra bevacizumab.²³³ El difícil tratamiento de los cánceres TNBC explica la necesidad de investigar nuevas dianas biológicas que permitan avanzar en la lucha contra esta enfermedad.

5.1.2. Diana biológica: Interacción α B-crystallin-VEGF-165

Estudios recientes han demostrado la presencia de la proteína α B-crystallin (CRYAB) en varios tipos de tumores sólidos, principalmente en los de tipo TNBC, por lo que esta proteína podría constituir una prometedora diana biológica en el tratamiento de estos cánceres.^{234,235}

La proteína CRYAB tiene función de chaperona por lo que se une a proteínas desplegadas a fin de conferirles estabilidad e impedir su agregación

²³² a) Cheang, M. C.; Voduc, D.; Bajdik, C.; Leung, S.; McKinney, S.; Chia, S. K.; Perou, C. M.; Nielsen, T. O. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1368-1376. b) Pogoda, K.; Niwinska, A.; Murawska, M.; Pienkowski, T. *Med. Oncol.* **2013**, *30*, 388-395.

²³³ Reis-Filho, J. S.; Tutt, A. N. *Histopathology* **2008**, *52*, 108-118.

²³⁴ Stegh, A. H.; Kesari, S.; Mahoney, J. E.; Jenq, H. T.; Forloney, K. L.; Protopopov, A.; Louis, D. N.; Chin, L.; DePinho, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 10703-10708.

²³⁵ Moyano, J. V.; Evans, J. R.; Chen, F.; Lu, M.; Werner, M. E.; Yehiely, F.; Diaz, L. K.; Turbin, D.; Karaca, G.; Wiley, E.; Nielsen, T. O.; Perou, C. M.; Cryns, V. L. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 261-270.

con otras proteínas. Además, CRYAB también juega un papel importante en la inhibición apoptótica en respuesta a diversos estímulos.²³⁶ Debido a sus importantes funciones implicadas en el correcto funcionamiento celular, la inhibición directa de CRYAB podría conllevar efectos secundarios no deseados.

En estudios previos se ha demostrado que CRYAB se une al VEGF que se encuentra en el interior de la célula (VEGF intracrino), ayudando a su correcto plegamiento en presencia de tumores, razón por la cual CRYAB podría ser un componente clave en la activación de la cascada de señalización del VEGF.²³⁷ La cascada de señalización del VEGF puede verse activada por dos mecanismos, bien mediante el VEGF secretado al exterior de la célula, que es el proceso de activación más común, o bien mediante el VEGF intracrino, lo que no implica la secreción de VEGF. Debido a este mecanismo interno, las células cancerosas son capaces de resistir a tratamientos que bloquean el VEGF exógeno, como por ejemplo, el bevacizumab. Una estrategia alternativa a este tipo de resistencias podría ser bloquear la unión entre CRYAB y VEGF-165, lo que constituiría una nueva y potencial diana terapéutica para el tratamiento contra el TNBC.

5.1.3. Antecedentes

El dominio α B-crystallin (ACD) está compuesto por una región N-terminal que contiene hebras β y secuencias helicoidales. Diversos estudios han revelado que las hebras β 7 y β 9 juegan un papel crucial en la interacción proteína-proteína entre CRYAB y VEGF-165.²³⁸ Investigaciones llevadas a cabo por el Dr. Jun Cai y colaboradores, en las que se ha hecho uso de docking molecular y ensayos *in vitro* en MDA-MB-231 (línea celular de TNBC),

²³⁶ Acunzo, J.; Katsogiannou, M.; Rocchi, P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1622-1631.

²³⁷ Ruan, Q.; Han, S.; Jiang, W. G.; Boulton, M. E.; Chen, Z. J.; Law, B. K.; Cai, J. *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 1632-1643.

²³⁸ White, A. W.; Westwell, A. D.; Brahemi, G. *Exp. Rev. Mol. Med.* **2008**, *10*, 1-14.

han puesto de manifiesto que el ácido 3-metilglutámico es capaz de bloquear la interacción entre las dos proteínas.²³⁹

En la figura 5.1 se muestra la superficie molecular de CRYAB indicando el centro activo, los residuos esenciales para la interacción CRYAB-VEGF-165 y el ácido 3-metilglutámico (MGA) en el sitio de unión.

Figura 5.1. Docking molecular de CRYAB.

Aunque aparentemente el ácido 3-metilglutámico cumple todas las reglas de Lipinski, tal y como se indica en la figura 5.2, su elevada hidrofiliía obliga a realizar ciertos cambios estructurales para poder mejorar su permeabilidad celular.

Ácido 3-metilglutámico

MW =161
 Dadores H = 3
 Aceptores H = 5
 Log P = -3.41

Figura 5.2. Estructura y características del MGA.²⁴⁰

²³⁹ Chen, Z.; Ruan, Q.; Han, S.; Xi, L.; Jiang, W.; Jiang, H.; Ostrov, D. A.; Cai, J. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *145*, 45-59.

5.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL MGA

Los derivados del ácido 3-metilglutámico que fueron sintetizados durante la estancia en la universidad de Cardiff se indican en la figura 5.3. En esta figura también se indica el valor de log P de estos análogos que, como se puede apreciar es mucho mayor que el valor de log P del ácido 3-metilglutámico. Los compuestos sintetizados contienen funciones de tipo éster metílico, etílico, *t*-butílico y bencílico y la función amina aparece protegida en forma de amida o carbamato.

Figura 5.3. Análogos del MGA sintetizados.

²⁴⁰ El valor de log P se ha calculado mediante el programa ChemBioDraw Ultra 14.0.

La estrategia general empleada en la síntesis de los análogos se indica en el esquema 5.1 y se basa en la adición Michael de ésteres del ácido nitroacético a crotonatos, seguida de reducción de la función nitro a amino y subsiguiente protección.

Esquema 5.1. Esquema general para la síntesis de los análogos.

5.2.1. Síntesis de intermedios

- Síntesis del 2-nitroacetato de bencilo (**GA15**) y del 2 nitroacetato de *t*-butilo (**GA16**)²⁴¹

El calentamiento del nitrometano **GA12** con una disolución de hidróxido potásico proporcionó el nitroacetato dipotásico **GA13**, el cual se convirtió en el ácido α -nitroacético **GA14** por acidificación con ácido L-tartárico. La esterificación de este ácido con alcohol bencílico o con alcohol *t*-butílico en presencia de DCC permitió la obtención del 2-nitroacetato de bencilo **GA15** y del 2-nitroacetato de *t*-butilo **GA16**, respectivamente (véase el esquema 5.2).

Esquema 5.2. (a) KOH, H₂O, 70-160°C, 1 h, **GA13** (91%). (b) Ácido L-tartárico, hielo-H₂O, -10°C, 15 min, **GA14** (81%). (c) R-OH, DCC, THF, 0°C, 5 h, **GA15** (67%), **GA16** (67%).

²⁴¹ Vanier, S. F.; Larouche, G.; Wurcz, R. P.; Charette, A. B. *Org. Lett.* **2010**, 12, 672-675.

• **Síntesis de crotonato de bencilo (GA18) y crotonato de *t*-butilo (GA19)**²⁴²

Estos dos compuestos se obtuvieron mediante reacción del cloruro de crotilo con los correspondientes alcoholes en diclorometano en presencia de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina y de carbonato potásico (esquema 5.3).

Esquema 5.3. (a) R-OH, 4-DMAP, K₂CO₃, CH₂Cl₂, 25°C, 15 h, **GA18** (68%), **GA19** (20%).

5.2.2. Síntesis de productos finales

• **Adición Michael**²⁴³

En el proceso de adición Michael se hicieron reacciones los crotonatos correspondientes (**GA18** y **GA19** previamente sintetizados y **GA22** y **GA23** comercialmente disponibles) con los respectivos nitroacetatos (**GA15** y **GA16** previamente sintetizados y los 2-nitroacetatos de metilo y de etilo, **GA20** y **GA21**, ambos comercialmente accesibles). La reacción se llevó a cabo en THF en presencia de la base DBU y manteniendo el matraz de reacción en la oscuridad (véase el esquema 5.4).

Esquema 5.4. (a) DBU, THF, 25°C, 72 h, oscuridad, **GA24** (91%), **GA25** (98%), **GA26** (89%), **GA27** (46%).

²⁴² Smaltz, D. J.; Myers, A. G. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 8554-8559.

²⁴³ Milne, C.; Powell, A.; Jim, J.; Nakeeb, M. A.; Smith, C. P.; Micklefield, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11250-11259.

• Reducción de la función nitro²⁴⁴ y protección de la función amino^{243,245}

Los últimos pasos en la síntesis de los análogos fueron la reducción de la función nitro, que se llevó a cabo con zinc en metanol en presencia de ácido clorhídrico, y la protección de la función amino, bien en forma de carbamato o bien en forma de amida (véase el esquema 5.5). Para la obtención de los carbamatos se empleó dicarbonato de di-*t*-butilo (Boc₂O) en diclorometano en presencia de trietilamina y 4-DMAP. Para la preparación de las amidas se empleó anhídrido acético en diclorometano en presencia de trietilamina y 4-DMAP, y cloruro de benzoílo en diclorometano en presencia de trietilamina.

Esquema 5.5. (a). Zn, HCl concentrado, CH₃OH, 25°C, 15 min. (b) Boc₂O, Et₃N, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0-25°C., 18 h, **GA1** (20%), **GA2** (35%), **GA3** (28%), **GA4** (46%). (c) Ac₂O, Et₃N, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0-25°C., 18 h, **GA5** (26%), **GA6** (13%), **GA7** (72%). (d) BzCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 25°C, 2 h, **GA8** (49%), **GA9** (72%), **GA10** (50%), **GA11** (66%).

²⁴⁴ So, S. S.; Auvil, T. J.; Garza, V. J.; Mattson, A. E. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 444-447.

²⁴⁵ Liang, X.; Lee, C. J.; Chen, X.; Chung, H. S.; Zeng, D.; Raetz, C. R. H.; Li, Y.; Zhou, P.; Toone, E. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 852-860.

5.3. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y PROLIFERACIÓN CELULAR

La citotoxicidad de los derivados del MGA y del propio compuesto patrón (disponible comercialmente) se evaluó en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-436, HMVECd, MCF-10A, HT-29, MCF-7 y HEK-293, mediante el ensayo MTT, el fundamento del cual ha sido explicado en el apartado 4.1.1.

En primer lugar, se determinó el IC_{50} para las líneas celulares de cáncer de mama metastásico humano (MDA-MB-231 y MDA-MB-436), las cuales sirven como principal modelo de líneas celulares de TNBC y han sido extensamente usadas previamente en este contexto.²³⁸ Los valores de IC_{50} de dichas líneas se compararon con los obtenidos para el modelo no canceroso de mama epitelial humano (MCF-10A) mediante el cálculo de los coeficientes γ y δ . En la tabla 5.1 también se muestran los valores de IC_{50} para la línea celular no tumoral correspondiente a células endoteliales microvasculares dermales humanas (HMVECd).

Tabla 5.1. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad de derivados del MGA (estudio de TNBC).

Producto	$IC_{50} \pm SD$ (μM)				Coeficientes de selectividad	
	MDA-MB-231	MDA-MB-436	MCF-10A	HMVECd	γ^*	δ^{**}
GA1	>100	20 $\pm$ 10	>100	>100	1,0	>5,0
GA2	>100	>100	10 $\pm$ 7	56 $\pm$ 8	0,1	0,1
GA3	38 $\pm$ 13	24 $\pm$ 3	45 $\pm$ 8	24 $\pm$ 8	1,2	1,9
GA4	37 $\pm$ 11	47 $\pm$ 7	18 $\pm$ 7	51,4 $\pm$ 1,1	0,5	0,4
GA5	36 $\pm$ 15	19 $\pm$ 22	>100	>100	>2,8	>5,3
GA6	66 $\pm$ 9	>100	12,7 $\pm$ 0,3	>100	0,2	<0,1
GA7	57 $\pm$ 23	19 $\pm$ 7	4 $\pm$ 13	60,2 $\pm$ 2,3	0,07	0,2
GA8	19 $\pm$ 4	25 $\pm$ 9	4 $\pm$ 3	28 $\pm$ 12	0,2	0,2
GA9	34 $\pm$ 16	31 $\pm$ 9	23,6 $\pm$ 1,4	30 $\pm$ 30	0,7	0,8
GA10	53 $\pm$ 4	45 $\pm$ 5	2,3 $\pm$ 1,2	37,9 $\pm$ 2,1	0,04	0,05
GA11	>100	47 $\pm$ 10	43 $\pm$ 10	92 $\pm$ 6	<0,4	0,9
MGA	42 $\pm$ 11	2,5 $\pm$ 1,9	0,15 $\pm$ 0,09	56 $\pm$ 8	0,004	0,06

* $\gamma = IC_{50}$ (MCF-10A) / IC_{50} (MDA-MB-231). ** $\delta = IC_{50}$ (MCF-10A) / IC_{50} (MDA-MB-436).

Gráfica 5.1. Nº células inhibidas y/o muertas en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-436, MCF-10A y HMVECd.

Los compuestos más destacables en las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-436 son **GA5** y **GA8**, respectivamente. Ambos compuestos presentan curvas de inhibición con mayor número de células inhibidas y/o muertas con respecto al resto de productos estudiados.

Los compuestos con mejores propiedades biológicas para las líneas celulares no tumorales serán aquellos que presenten una curva de inhibición baja. Así, en la línea celular HMVECd destacan los compuestos **GA5** y **GA6**. Para la línea MCF-10A, todos los compuestos presentan una tendencia general similar, por lo que no cabe destacar ninguno.

Finalmente, se determinó la citotoxicidad en las líneas celulares HEK-293, HT-29 y MCF-7 y los coeficientes de selectividad α y β , tal y como se muestra en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Citotoxicidad y coeficientes de selectividad de derivados del MGA.

Producto	IC ₅₀ ±SD (μM)			Coeficientes de selectividad	
	HEK293	HT-29	MCF-7	α*	β**
GA1	5±3	51,9±2,0	12,1±0,4	0,1	0,4
GA2	39±13	94,6±2,3	>100	0,4	<0,4
GA3	26±3	48,5±0,8	>100	0,5	<0,3
GA4	56,6±1,0	53,49±0,03	46±11	1,1	1,2
GA5	29±15	3,7±2,2	48±3	7,8	0,6
GA6	15±6	41±10	55±4	0,4	0,3
GA7	46±9	0,6±0,3	52,6±0,7	76,7	0,9
GA8	46±11	3,8±1,6	53,7±1,6	12,1	0,9
GA9	>100	5,5±0,6	51,5±1,1	>18,2	>1,9
GA10	28±5	38±3	27±4	0,7	1,0
GA11	54±9	53,24±0,15	19±10	1,0	2,8
MGA	0,12±0,04	45±4	48±13	0,003	0,003

*α = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (HT-29). **β = IC₅₀ (HEK293)/ IC₅₀ (MCF-7).

Teniendo en cuenta los valores de la tabla anterior, los compuestos que destacan en la línea celular HT-29 son **GA5**, **GA7**, **GA8** y **GA9**, pues tienen citotoxicidad en el rango micromolar bajo y presentan un coeficiente α muy superior a la unidad. En el caso de las células MCF-7, únicamente destaca el compuesto **GA11**.

5.4. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los valores de IC_{50} de los análogos del ácido 3-metilglutámico, se puede concluir que el compuesto más prometedor en la mayoría de líneas tumorales estudiadas es **GA5**. Además, para las líneas celulares modelo del TNBC también resulta interesante el compuesto **GA3** por ser más citotóxico en ambas líneas celulares de cáncer metastásico que en la línea celular no tumoral MCF-10A. Sin embargo, ambos compuestos son menos citotóxicos en la línea MDA-MB-436 que el propio compuesto patrón.

Figura 5.4. Estructuras químicas de **GA3** y **GA5**.

Con respecto al ensayo de proliferación celular, que indica el número de células muertas o inhibidas en función de la concentración del compuesto, hay que destacar nuevamente al compuesto **GA5** en la línea celular MDA-MB-231 y también el compuesto **GA8** en la MDA-MB-436, por presentar un elevado valor de células inhibidas en la mayor parte de las concentraciones estudiadas.

En la línea celular HT-29, además del compuesto **GA5**, también destacan los compuestos **GA7**, **GA8** y **GA9**, aunque sería necesario realizar más ensayos para determinar su capacidad biológica.

5.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

5.5.1. Técnicas generales

Los espectros de RMN fueron registrados en espectrómetro Bruker AVANCE 500 MHz. Las asignaciones de las señales se han llevado a cabo mediante correlaciones heteronucleares bidimensionales (COSY y HSQC). Los espectros se midieron en disolución de CDCl_3 . Los desplazamientos químicos (δ) están indicados en ppm usando como referencia la señal residual del CDCl_3 . 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, *c* para cuádruplete y *m* para multiplete.

La espectrometría de masas (modo ESI +ve o -ve) se llevó a cabo en las instalaciones de *School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University*. La espectrometría de masas de alta resolución se realizó en *EPSRC UK National Mass Spectrometry Facility, Swansea University*.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Griffin y no fueron corregidos.

Los reactivos disponibles comercialmente se emplearon sin tratamiento previo, directamente de la casa comercial Sigma-Aldrich.

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

5.5.2. Procedimientos sintéticos

Síntesis del nitroacetato dipotásico (GA13)

En un matraz de dos bocas de fondo redondo equipado con un condensador de reflujo se introdujo KOH (44,8 g, 0,8 mol, 8 eq) y agua (22,5 mL) y se calentó a 70°C. Seguidamente, se adicionó, gota a gota y con

agitación magnética, nitrometano (10,8 mL, 0,2 mol, 2 eq). Una vez finalizada la adición, se detuvo la agitación y se aumentó la temperatura a 160°C, calentando a esta temperatura durante 1 hora. El sólido resultante, de color naranja, se enfrió hasta temperatura ambiente, se filtró, se lavó con CH₃OH (3 x 75 mL) y se dejó secando en estufa toda la noche. Se obtuvieron 16,6 g (91%) de dinitroacetato potásico (**GA13**) en forma de polvo anaranjado (pf > 250°C).

Síntesis del ácido α -nitroacético (**GA14**)

A una mezcla de nitroacetato dipotásico (3,0 g, 16,6 mmol, 1 eq) en hielo y H₂O fría (10 mL) se le añadió una disolución de ácido L-tartárico (21,4 g, 142,8 mmol, 8,6 eq) en agua (40 mL). La mezcla de reacción se dejó durante 15 minutos, manteniendo la temperatura entre -5°C y -15°C (hielo seco en CH₃OH). A continuación, se filtró y se extrajo con Et₂O frío (5 x 30 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, obteniéndose 1,4 g (81%) del ácido α -nitroacético (**GA14**) en forma de sólido cristalino amarillento (pf = 68-71°C) y cuyos datos espectrales son consistentes con los de la literatura.²⁴¹

Procedimiento general para la esterificación del ácido α -nitroacético

En un matraz de fondo redondo que contenía ácido α -nitroacético (10 mmol, 1 eq, preparado en el mismo día) se le añadió, bajo atmósfera de nitrógeno, una disolución del correspondiente alcohol (10 mmol, 1 eq) en THF anhidro (8,6 mL). La disolución se enfrió a 0°C y se añadió lentamente una disolución de DCC (11 mmol, 1,1 eq) en THF (8,6 mL). La temperatura de la reacción se mantuvo a 0°C durante 5 horas hasta desaparición de los reactivos de partida. Seguidamente, la mezcla de la reacción se filtró sobre gel de sílice, se lavó con Et₂O y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió con hexano/AcOEt (90:10).

2-Nitroacetato de bencilo (GA15)

Rto. = 67%. Líquido viscoso blanco.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.39 (5H, m), 5.31 (2H, s), 5.21 (2H, s).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 161.8, 134.1 (C); 129.4, 129.1 (x2) 128.7 (x2) (CH); 76.3, 68.8 (CH₂).

Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁴⁶

2-Nitroacetato de t-butilo (GA16)

Rto. = 67%. Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5.09 (2H, s), 1.55 (9H, s).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 160.7, 85.2 (C); 76.8 (CH₂); 27.8 (x3) (CH₃).

Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁴⁷

Procedimiento general para la esterificación del cloruro de crotilo

A una suspensión de cloruro de crotilo (60 mmol, 1,2 eq), el correspondiente alcohol (50 mmol, 1 eq) y K₂CO₃ (100 mmol, 2 eq) en CH₂Cl₂ (100 mL) se le añadió 4-DMAP (5 mmol, 0,1 eq). La mezcla resultante se agitó a 23°C durante 6 horas y luego se añadió una segunda porción de cloruro de crotilo (55 mmol, 1,1 eq). Después de 15 horas se añadió agua (100 mL) y las fases se separaron en un embudo de extracción. La fase acuosa se extrajo

²⁴⁶ Sylvain, C.; Wagner, A.; Mioskowski, C. *Tet. Lett.* **1999**, 40, 875-878.

²⁴⁷ Scardovi, N.; Casalini, A.; Peri, F.; Righi, P. *Org. Lett.* **2002**, 4, 965-968.

con CH_2Cl_2 (3 x 100 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavaron secuencialmente con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 , una disolución acuosa 1 M de HCl , agua y una disolución acuosa saturada de NaCl . La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/ AcOEt (95:5).

(E)-But-2-enoato de bencilo (GA18)

Rto. = 68%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.29-7.22 (5H, m), 6.97-6.90 (1H, m), 5.83-5.79 (1H, m), 5.09 (2H, s), 1.79 (3H, dd, $J = 1.7, 6.9$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 136.2 (C); 145.1, 128.9, 128.5 (x2) 128.1 (x2), 122.2 (CH); 66.0 (CH_2); 18.0 (CH_3).

Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁴⁸

(E)-but-2-enoato de *t*-butilo (GA19)

Rto. = 20%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.82-6.77 (1H, m), 5.71-5.68 (1H, m), 1.78-1.76 (3H, m), 1.41 (9H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 166.0, 79.9 (C); 143.0, 126.4 (CH); 28.2 (x3), 17.7 (CH_3).

²⁴⁸ Kim, K-Y.; Kim, B. C.; Lee, H. B.; Shin, H. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 8106-8108.

Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁴⁹

Procedimiento general para la reacción de adición Michael

A una mezcla del correspondiente crotonato (70 mmol, 7 eq) y éster de nitroacetato (10 mmol, 1 eq) en THF anhidro (12 mL) se añadió DBU (10 mmol, 1 eq) bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se agitó, protegida de la luz, durante 72 horas. Pasado este tiempo se añadió una disolución acuosa 1,2 M de HCl y se extrajo con Et₂O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (90:10).

3-Metil-2-nitropentanodioato de dimetilo (GA24)

Rto. = 91%. Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 5.26 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 5.24 (1H, dd, *J* = 6.6 Hz), 3.77 (6H, s), 3.63 (6H, s), 2.95-2.91 (2H, m), 2.54-2.50 (2H, m), 2.40-2.34 (2H, m), 1.08 (6H, d, *J* = 6.8 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 171.6, 164.1, 164.0 (C); 90.6, 90.5, 31.4 (x2) (CH); 36.7, 36.6 (CH₂); 53.5 (x2), 52.0, 51.9, 16.1, 16.0 (CH₃).

Datos espectrales consistentes con la literatura.²⁴³

²⁴⁹ Lombardo, L. *Tet. Lett.* **1985**, 26, 381-384.

3-Metil-2-nitropentanodioato de dietilo (GA25)

Rto. = 98%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 5.33 (1H, d, J = 6.6 Hz), 5.27 (1H, d, J = 6.6 Hz), 4.36-4.29 (4H, m), 4.20-4.16 (4H, m), 3.05-2.99 (2H, m), 2.61-2.56 (2H, m), 2.46-2.41 (2H, m), 1.36-1.27 (12H, dt, J = 7.1, 1.6 Hz), 1.18 (3H, d, J = 2.8 Hz), 1.17 (3H, d, J = 2.8 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 171.2, 163.6 (C); 90.8, 90.7, 31.4 (x2) (CH); 63.3, 63.0, 60.9 (x2), 37.0, 36.9 (CH_2); 16.0, 15.9, 14.2 (x2), 13.9 (x2) (CH_3).

ESMS m/z 270.1 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ 270.11.

3-Metil-2-nitropentanodioato de dibencilo (GA26)

Rto. = 89%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 7.41-7.35 (20H, m), 5.37 (1H, d, J = 6.5 Hz), 5.31 (1H, d, J = 6.5 Hz), 5.24 (4H, s), 5.15 (4H, s), 3.06-3.02 (2H, m), 2.65-2.59 (2H, m), 2.50-2.45 (2H, m), 1.15 (3H, d, J = 6.7 Hz), 1.12 (3H, d, J = 6.7 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 170.9, 163.5, 135.5 (x2), 135.2 (x2) (C); 128.9 (x2), 128.7 (x2), 128.6 (x4), 128.5 (x4), 128.4

(x4), 128.3 (x4), 90.7, 31.6, 31.5 (CH); 68.5 (x2), 66.7 (x2), 36.9, 36.8 (CH₂); 16.0, 15.9 (CH₃).

ESI-MS m/z 394.1 (M+Na⁺). Calculado para C₂₀H₂₁NO₆ 394.14.

3-Metil-2-nitropentanodioato de di-*t*-butilo (GA27)

Rto. = 46%. Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 5.22 (1H, d, J = 6.6 Hz), 5.14 (1H, d, J = 6.6 Hz), 2.92-2.91 (2H, m), 2.51-2.46 (2H, m), 2.36-2.31 (2H, m), 1.53 (18H, s), 1.48 (18H, s), 1.17 (6H, d, J = 6.9 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:1) δ 170.5 (x2), 162.6 (x2), 84.7 (x2), 81.2 (x2) (C); 91.7, 91.6, 31.6 (x2) (CH); 38.4, 38.2 (CH₂); 28.1 (x6), 27.8 (x6), 15.8, 15.7 (CH₃).

ESMS m/z 316.2 (M+Na⁺). Calculado para C₁₄H₂₅NO₆ 326.17.

Procedimiento general para la reducción del grupo nitro

A un matraz de fondo redondo que contenía el correspondiente nitroderivado (3 mmol, 1 eq) disuelto en CH₃OH 0,1 M se le añadió HCl concentrado (60 mmol, 20 eq) y luego se añadió lentamente, a 23°C y con agitación vigorosa, zinc en polvo (120 mmol, 40 eq). Después de 15 minutos, la mezcla de reacción se neutralizó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se filtró sobre celite. La disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida, obteniéndose las correspondientes aminas crudas que se emplearon directamente en la siguiente reacción.

Procedimiento general para la síntesis de los carbamatos

La amina cruda resultante de la reacción anterior (1 mmol, 1 eq, preparada en el mismo día) se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (1,46 mL) y luego, bajo atmósfera de nitrógeno y a 0°C , se añadió dicarbonato de di-*t*-butilo (1,58 mmol, 1,58 eq), trietilamina (1,05 mmol, 1,05 eq) y 4-DMAP (1,05 mmol, 1,05 eq). La mezcla de la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Pasado este tiempo, se añadió agua (30 mL) y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (95:5). Los productos sólidos se recrystalizaron con CH_2Cl_2 .

2-((*t*-Butoxicarbonil)amino)-3-metilpentanodioato de dimetilo (GA1)

Rto. = 20%. Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.4) δ 5.05 (1H, d, J = 8.7 Hz), 4.41-4.39 (1H, m), 3.72 (3H, s), 3.68 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.60 (3H, s), 2.73-2.70 (1H, m), 2.45-2.40 (3H, m), 2.13-2.10 (2H, m), 1.42 (9H, s), 1.37 (9H, s), 0.83-0.80 (6H, m).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.4) δ 172.7, 172.6, 172.3, 171.4, 155.7, 152.2, 83.6, 83.2 (C); 65.9, 56.7, 35.9, 20.4 (CH); 32.9, 22.6 (CH_2); 52.5 (x2), 51.5 (x2), 29.7 (x3), 29.3 (x3), 15.5, 14.5 (CH_3).

HR ESMS m/z 290.1602 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ 290.1598.

2-((*t*-Butoxicarbonil)amino)-3-metilpentanodioato de dietilo (GA2)

Rto. = 35%. Aceite incoloro.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.9) δ 5.19 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 5.12 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 4.45-4.43 (1H, m), 4.27-4.11 (8H, m), 3.75-3.74 (1H, m), 2.81-2.76 (1H, m), 2.62-2.57 (1H, m), 2.50-2.37 (2H, m), 2.19-2.14 (2H, m), 1.49 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.30-1.24 (12H, m), 0.99 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.88 (3H, d, *J* = 6.9 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.9) δ 172.9, 172.3, 171.8, 170.9, 155.7, 155.5, 83.6, 79.9 (C); 57.6, 56.7, 33.4, 32.9 (CH); 61.9, 61.8, 60.5, 60.4, 38.2, 37.5, (CH₂); 28.3 (x3), 27.9 (x3), 17.8, 16.6, 14.3 (x2), 14.1 (x2) (CH₃).

HR ESMS *m/z* 318.1915 (M+H⁺). Calculado para C₁₅H₂₇NO₆ 318.1911.

2-((*t*-Butoxicarbonil)amino)-3-metilpentanodioato de dibencilo (GA3)

Rto. = 28%. Aceite amarillento.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.35) δ 7.28-7.24 (20H, m), 5.12-5.02 (10H, m), 4.46-4.44 (1H, m), 4.27-4.25 (1H, m), 2.58-2.54

(4H, m), 2.16-2.10 (2H, m), 1.37 (9H, s), 1.36 (9H, s), 0.89 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.75 (3H, d, $J = 6.8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.35) δ 172.0, 171.7, 135.9, 135.8, 135.2 (x2), 69.0, 65.4 (C); 128.6 (x2), 128.5 (x2), 128.1, 128.0, 127.9 (x2), 127.0 (x2), 56.8, 52.3, 33.5, 33.0 (CH); 67.2, 67.1, 66.8, 66.7, 38.0, 37.4 (CH_2); 28.0 (x3), 27.7 (x3), 16.7, 14.6 (CH_3).

HR ESMS m/z 442.2218 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NO}_6$ 442.2224.

2-((*t*-Butoxicarbonil)amino)-3-metilpentanodioato de di-*t*-butilo (GA4)

Rto. = 43%. Sólido blanco, pf 41-46°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.7) δ 5.03-5.02 (2H, m), 4.24-4.22 (1H, m), 4.07-4.04 (1H, m), 2.47-2.44 (1H, m), 2.35-2.31 (3H, m), 2.00-1.97 (2H, m), 1.40 (9H, s), 1.38 (9H, s), 1.22 (18H, s), 1.20 (18H, s), 0.92 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.81 (3H, m).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.7) δ 171.7, 171.1, 155.7, 155.5, 82.1, 82.0, 80.5, 79.6 (C); 58.2, 57.2, 33.7, 33.2 (CH); 39.4, 38.9 (CH_2); 28.7 (x3), 28.3 (x3), 28.1 (x6), 28.0 (x6), 16.3, 14.4 (CH_3).

ESMS m/z 374.3 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}_6$ 374.25.

Análisis elemental % Teórico 61.10(C), 9.45(H), 3.75(N). % Experimental 60.23(C), 9.71(H), 3.65(N).

Procedimiento general para la síntesis de las acetamidas

La amina cruda resultante de la reacción anterior (1 mmol, 1 eq) (preparada en el mismo día) se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (1,46 mL) y luego, bajo atmósfera de nitrógeno y a 0°C , se le añadió anhídrido acético (1,58 mmol, 1,58 eq), trietilamina (1,05 mmol, 1,05 eq) y 4-DMAP (1,05 mmol, 1,05 eq). La mezcla de la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Pasado este tiempo, se añadió agua (30 mL) y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (95:5). Los productos sólidos se recrystalizaron con CH_2Cl_2 .

2-Acetamido-3-metilpentanodioato de dimetilo (GA5)

Rto. = 26%. Sólido blanco, pf > 250°C .

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.7) δ 4.54 (1H, d, J = 4.8 Hz), 4.34 (1H, d, J = 5.7 Hz), 3.65 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.56 (3H, s), 2.50-2.47 (1H, m), 2.38-2.28 (3H, m), 2.15-2.09 (2H, m), 1.91 (3H, s), 1.89 (3H, s), 0.88 (3H, d, J = 6.9 Hz), 0.84 (3H, d, J = 7.0 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.7) δ 174.3, 174.2, 173.7, 173.5, 173.1, 173.0 (C); 57.8, 56.7, 33.8, 33.4 (CH); 38.5, 38.1 (CH_2); 52.8, 52.6, 52.2, 52.1, 22.2, 20.2, 17.0, 15.5 (CH_3).

HR ESMS m/z 232.1182 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ 232.1179.

2-Acetamido-3-metilpentanodioato de dietilo (GA6)

Rto. = 13%. Aceite amarillento.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.55) δ 6.45 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.33 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 4.75 (1H, dd, *J* = 8.6, 3.8 Hz), 4.56 (1H, dd, *J* = 8.6, 5.6 Hz), 4.22-4.18 (4H, m), 4.16-4.10 (4H, m), 2.63-2.40 (4H, m), 2.24-2.09 (2H, m), 2.03 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.28 (6H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.28 (6H, t, *J* = 7.1 Hz), 0.99 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 0.90 (3H, d, *J* = 6.9 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.55) δ 172.4, 172.2, 171.7, 171.6, 167.6, 167.4 (C); 56.3, 55.4, 35.8, 35.5 (CH); 61.7, 61.4, 60.7, 60.5, 38.1, 37.7 (CH₂); 23.1, 23.0, 16.6, 14.9, 14.1 (x2), 14.0 (x2) (CH₃).

HR ESMS *m/z* 260.1494 (M+H⁺). Calculado para C₁₂H₂₁NO₅ 260.1492.

2-Acetamido-3-metilpentanodioato de di-*t*-butilo (GA7)

Rto. = 72%. Aceite amarillento.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.7) δ 6.18 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.07 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 4.58 (1H, dd, *J* = 8.6, 3.5 Hz), 4.39 (1H, dd, *J* = 8.5, 5.4 Hz), 2.50-2.47 (2H, m), 2.37-2.03 (3H, m), 2.05-2.00 (1H, m), 1.96 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.41 (18H, s), 1.38 (18H, s), 0.91 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.82 (3H, d, *J* = 6.9 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.7) δ 171.8, 171.7, 170.9, 170.8, 170.1, 169.9, 82.4, 82.3, 80.7, 80.5 (C); 56.7, 55.8, 33.5, 33.1 (CH); 39.3, 39.1 (CH_2); 28.6 (x6), 28.1 (x6), 23.3, 23.2, 16.25, 14.6 (CH_3).

HR ESMS m/z 316.2118 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ 216.2120.

Procedimiento general para la síntesis de las benzamidas

La amina cruda resultante de la reacción anterior (1 mmol, 1 eq, preparada en el mismo día) se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL), bajo atmosfera de nitrógeno, y luego se añadió Et_3N (4 mmol, 4 eq) y cloruro de benzoílo (1,05 mmol, 1,05 eq) gota a gota. Una vez terminada la adición, la reacción se agitó a 25°C durante 2 horas. La mezcla de la reacción se diluyó en CH_2Cl_2 y se lavó secuencialmente con una disolución acuosa de HCl 1 M, una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y una disolución acuosa saturada de NaCl . Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con hexano/ AcOEt (95:5). Los productos sólidos se recrystalizaron con CH_2Cl_2 .

2-Benzamido-3-metilpentanodioato de dimetilo (GA8)

Rto. = 49%. Sólido blanco, pf $61-66^\circ\text{C}$.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.5) δ 7.81-7.78 (4H, m), 7.48-7.45 (2H, m), 7.41-7.38 (4H, m), 7.23 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.02 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 4.94 (1H, dd, $J = 8.2, 3.8$ Hz), 4.39 (1H, dd, $J = 8.2, 6.0$

Hz), 3.74 (3H, s), 3.73 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.61 (3H, s), 2.72-2.48 (4H, m), 2.32-2.18 (2H, m), 1.03 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.97 (3H, d, $J = 6.9$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.5) δ 173.2, 172.9, 172.1, 167.4, 167.2, 133.9, 133.8 (C); 131.8, 128.6 (x4), 127.1 (x4), 56.8, 55.9, 33.2, 33.1 (CH); 38.0, 37.7 (CH_2); 52.5, 52.4, 51.8, 51.7, 17.0, 15.5 (CH_3).

ESMS m/z 294.1 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ 294.13.

Análisis elemental % Teórico 61.42(C), 6.53(H), 4.77(N). % Experimental 61.59(C), 6.76(H), 4.71(N).

2-Benzamido-3-metilpentanodioato de dietilo (GA9)

Rto. = 72%. Sólido blanco, pf 58-60°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.6) δ 7.87-7.84 (4H, m), 7.55-7.53 (2H, m), 7.49-7.46 (4H, m), 7.12 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.97 (1H, dd, $J = 8.2, 3.6$ Hz), 4.79 (1H, dd, $J = 8.3, 5.7$ Hz), 4.30-4.24 (4H, m), 4.20-4.12 (4H, m), 2.79-2.64 (4H, m), 2.36-2.21 (2H, m), 1.36-1.32 (6H, m), 1.29-1.24 (6H, m), 1.12 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.04 (3H, d, $J = 6.9$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros 1:0.6) δ 172.7, 172.5, 171.6, 167.4, 167.1, 134.0, 133.9 (C); 131.8, 131.7, 128.6 (x4), 127.1 (x4), 56.9, 56.0, 33.2, 33.1 (CH); 61.7, 61.6, 60.8, 60.6, 38.3, 38.0 (CH_2); 16.9, 15.3, 14.2 (x2), 14.1 (x2) (CH_3).

ESMS m/z 322.2 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ 322.16.

Análisis elemental % Teórico 63.54(C), 7.21(H), 4.36(N). % Experimental 63.57(C), 7.21(H), 4.23(N).

2-Benzamido-3-metilpentanodioato de dibencilo (GA10)

Rto. = 50%. Sólido blanco, pf 67-75°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.4) δ 7.73-7.72 (10H, m), 7.45-7.21 (20H, m), 7.03 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 5.20-5.04 (8H, m), 4.96-4.94 (1H, m), 4.79-1.76 (1H, m), 2.70-2.41 (4H, m), 2.27-2.14 (2H, m), 0.99 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.89 (3H, d, *J* = 6.9 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.4) δ 172.5, 172.2, 171.6, 171.5, 167.5, 167.2, 135.8, 135.2, 133.9, 133.7 (x2) (C); 131.9 (x2), 131.8 (x2), 130.9 (x4), 128.8 (x4), 128.7 (x4), 128.6 (x4), 128.3, 128.2, 127.1 (x2), 127.0 (x2), 56.8, 55.9, 33.2 (x2) (CH); 67.5, 67.4, 66.6, 66.5, 38.2, 37.7 (CH₂); 17.0, 15.3 (CH₃).

ESMS *m/z* 446.2 (M+H⁺). Calculado para C₂₇H₂₇NO₅ 446.19.

Análisis elemental % Teórico 72.79(C), 6.11(H), 3.41(N). % Experimental 71.61(C), 6.36(H), 2.92(N).

2-Benzamido-3-metilpentanodioato de di-*t*-butilo (GA11)

Rto. = 66%. Sólido blanco, pf 57-61°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.8) δ 7.87-7.84 (4H, m), 7.54-7.52 (2H, m), 7.49-7.47 (4H, m), 5.81-5.77 (2H, m), 4.85 (1H, dd, *J* = 8.2, 3.2 Hz), 4.69 (1H, dd, *J* = 8.1, 5.5 Hz), 2.72-2.43 (4H, m), 2.25-2.11 (2H, m), 1.56 (9H, s), 1.54 (9H, s), 1.48 (9H, s), 1.47 (9H, s), 1.10 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.99 (3H, d, *J* = 6.9 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, mezcla de diastereoisómeros 1:0.8) δ 172.0, 171.9, 170.9, 167.3, 134.2, 134.1, 82.5, 80.6 (C); 131.7, 131.6, 128.6 (x2), 1285 (x2), 127.1 (x2), 127.0 (x2), 57.3, 56.3, 33.5 (CH); 39.6, 39.1 (CH₂); 28.2 (x3), 28.1 (x3), 16.5, 14.9 (CH₃).

ESMS *m/z* 378.2 (M+H⁺). Calculado para C₂₁H₃₁NO₅ 378.22.

Análisis elemental % Teórico 66.82(C), 8.28(H), 3.71(N). % Experimental 66.77(C), 8.57(H), 3.56(N).

5.5.3. Ensayos biológicos**Cultivos celulares**

Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-436 se cultivaron en un medio de cultivo compuesto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con un 10% de FBS y 1% de glutamina, penicilina y estreptomycin.

Las células endoteliales microvasculares dermales humanas (HMVECd) se cultivaron en medio basal de células endoteliales microvascular suplementado con un 10% de factores de crecimiento (*Life Technologies*).

Las células MCF-10A se cultivaron en MEBM (*Mammary Epithelial Basal Medium*) suplementado con factores de crecimiento y toxina del cólera.

Para las células HEK-293, MCF-7 y HT-29 véase el apartado 4.9.1.

Todos los derivados del ácido 3-metilglutámico **GA1-GA11** se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Ensayos de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad se realizó con células MDA-MB-231, MDA-MB-436, HMVECd, MCF-10A, HT-29, MCF-7 y HEK-293 mediante el ensayo MTT.

Los ensayos de citotoxicidad de las células HT-29, MCF-7 y HEK-293 se realizaron a 48 horas utilizando los métodos descritos en el apartado 4.9.2.

La citotoxicidad de las células MDA-MB-231, MDA-MB-436, HMVECd y MCF-10A, se realizó en las instalaciones Dr. Jun Cai, *Cardiff China Medical Research Collaborative*. Para ello, se sembraron $1,5 \times 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos con un volumen de 120 μ L de medio de cultivo y se dejaron incubando durante 24 horas.²⁵⁰

Por otra parte, a partir de la disolución inicial de 10 mM se realizaron diferentes diluciones seriadas desde concentración 100 a 0,195 μ M de cada producto, usando medio de cultivo para realizar las diluciones y conservándolas a 4°C hasta su uso.

Pasadas las 24 horas de incubación de las células, se añadió a cada pocillo 30 μ L de cada una de las diluciones de los distintos compuestos a

²⁵⁰ van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 731, 237-245.

ensayar (3 réplicas por compuesto y concentración) y se dejaron incubar durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

Además, también se realizó una placa de 96 pocillos sin células, sólo con 120 µL de los distintos medios de cultivo de cada tipo de línea celular y a la cual se añadió los compuesto a estudiar a las distintas concentraciones. De igual modo, se dejaron incubando durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Esta placa se realizó con el fin de determinar si los compuestos de por sí poseen coloración que puede ser detectada por el colorímetro y sea capaz de inducir un error en las mediciones del IC₅₀.

Posteriormente, se añadió a cada pocillo 15 µL de MTT (5 mg/ml en PBS) y se incubaron durante 4 horas más. A continuación, se eliminó el medio de cultivo, el formazán formado se disolvió en 100 µL de una disolución 0,04M de HCl en isopropanol, se dejó unos 10 minutos para asegurar la completa disolución del formazán y se midió la absorbancia a 540 nm. Todas las medidas se efectuaron como mínimo por triplicado.

En aquellos casos en los que la absorbancia del compuesto de las placas sin células era notable, dicho valor se restó a la absorbancia obtenida de las placas con células para rectificar el posible error debido a la coloración que posee el propio compuesto.

Estudio de la proliferación celular

Se realizó una curva de calibrado para las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-436, HMVECd y MCF-10A. Para ello, se sembraron 25600 células en los primeros pocillos y se hicieron diluciones a la mitad hasta llegar a sembrar 100 células por pocillo. También se incluyeron algunos pocillos sin células. Para cada número de células se realizaron 3 réplicas. Se dejaron incubando el tiempo suficiente hasta su adhesión al pocillo (18-20 horas). A continuación, se siguió el procedimiento del ensayo MTT descrito

anteriormente y se determinó la absorbancia. Cada curva de calibrado se obtuvo de al menos tres ensayos.

Mediante la curva de calibrado se obtiene una relación entre la absorbancia y el número de células vivas, por lo que se puede determinar el número de células que queda en cada pocillo para los ensayos de citotoxicidad. Restando dicho valor al número de células finales que quedan en los pocillos de control (tratados únicamente con DMSO) tras finalizar el ensayo de citotoxicidad, se tiene una idea del número de células que han sido matadas o se ha inhibido su proliferación en cada compuesto a las distintas concentraciones.

6. SUMMARY OF THE THESIS

CAPÍTULO 6: SUMMARY OF THE THESIS

6.1. INTRODUCTION

6.1.1. Cancer

Cancer is an ample group of diseases characterized by uncontrolled proliferation of mutated cells, which have the potential to invade or spread to other parts of the body. Cancer is one of the main mortality causes in developed countries, and is showing a countinuing increase of cases in undeveloped countries. For this reason, novel anticancer drugs are urgently required.²⁵¹

The uncontrolled proliferation of cells results in a primary tumour. If the tumour becomes malignant, cells can penetrate the walls of lymphatic and/or blood vessels and then circulate through the bloodstream to other organs and tissues in the body. Cells that avoid the immune system can penetrate an organ and then continue their multiplication, with eventual formation of a secondary tumour. This process is known as metastasis and is most often frequenting highly vascularized areas such as lung or brain.²⁵²

The main problems of antitumour drugs already in the market are the lack of selectivity and specificity for cancer cells, the emergence of drug resistance and the inability of compounds to penetrate aggressive solid tumours.²⁵³

Tumour cells present several features in common than make them different from non-tumour cells. These common features were reported by Hanahan and Weinberg in two seminal papers published in 2000 and 2011,

²⁵¹ a) Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. *GLOBOCAN*, **2012**, v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.b) <http://www.cancer.gov>. *National Cancer Institute*.

²⁵² a) Nowell, P. C. *Science* **1976**, *194*, 23-28. b) Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates. **2000**.

²⁵³ Panchal, R. G. *Biochem. Pharm.* **1998**, *55*, 247-252.

entitled *Hallmarks of Cancer* and *Hallmarks of cancer: the next generation*, respectively (see figure 1.5, p. 10).²⁵⁴ In order to find more efficient anticancer drugs, it is advisable to focus with more detail on some of these features.

6.1.2. Angiogenesis

Angiogenesis is one of the hallmarks of cancer. This term refers to a biological process through which new blood vessels grow from pre-existing ones. Angiogenesis plays an essential role in the growth and spread of cancer as the development and division of cancer cells depends on an adequate supply of oxygen and nutrients. In order to reach these nutrients, tumours can stimulate endothelial cells of blood vessels making new capillaries and allowing cancer cells to move through the body and to invade nearby tissues.

Cancer cells without blood supply can grow until 1-2 mm³ in diameter, but they can grow beyond 2 mm³ when placed in an area where angiogenesis is possible. In the absence of vascular support, tumours may become necrotic or even apoptotic. Tumour growth and metastasis are angiogenesis-dependent, and therefore, the inhibition of angiogenesis could be a way to inhibit cell reproduction on cancer disease.²⁵⁵

The angiogenic process is highly regulated by angiogenic and antiangiogenic factors that are in a tightly controlled equilibrium. Angiogenesis can be activated when tumour cells start segregating angiogenic factors. Subsequently, the extracellular matrix is degraded, followed by proliferation and migration of endothelial cells towards the tumour. Finally, support cells

²⁵⁴ a) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, 100, 57-70. b) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, 144, 646-674.

²⁵⁵ a) Ferrara, N. *Endocr. Rev.* **2004**, 25, 581-611. b) Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 1011-1027. c) Crivellato, E.; Ribatti, D. *Recent Advances in Angiogenesis and Antiangiogenesis*. Chapter 4: Cross-Linked Between Inflammation and Angiogenesis. **2009**, 30-39.

such as pericytes are recruited to organize and stabilize new blood vessels formation.²⁵⁶

Figure 6.1. Angiogenic process.

More than a dozen different proteins have been identified as angiogenic activators. The VEGF family and their receptors (VEGFR) are receiving increasing attention in the field of neoplastic vascularization. VEGF is a powerful angiogenic agent in neoplastic tissues, as well as in normal tissues, so that VEGF proteins have become a key target in cancer therapy.²⁵⁷ There are different members in the VEGF family, but the best characterized factor and the most relevant in angiogenesis is VEGF-A (named VEGF hereafter), which is encoded by *VEGF* gene.

VEGF binds to different tyrosine kinase membrane receptors (VEGFR) to carry out its function. The receptor that interferes in most of the angiogenic effects is VEGFR-2. The joint of VEGF with VEGFR-2 promotes endothelial cell proliferation, invasion, migration, survival and vascular permeability.²⁵⁸

²⁵⁶ a) Sturk, C.; Dumont, D. In: *Basic Science of Oncology*. Tannock, I. F.; Hill, R. P.; Bristow, R. G.; Harrington, L. editors. McGraw-Hill, Medical Pub. 4th ed. New York. **2005**, 231-248. b) Ferrara, N.; Hillan, K. J.; Gerber, H. P.; Novotny, W. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 391-400.

²⁵⁷ Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, 4th edition, **2009**.

²⁵⁸ Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 1011-1027.

Cancer treatment based on antiangiogenic therapy exhibits some theoretical advantages over the traditional chemotherapy or radiotherapy.²⁵⁹

- It has an extensive therapeutic application because angiogenesis activation occurs in all types of solid tumours.
- Antiangiogenic drugs will affect only activated endothelial cells but not quiescent endothelial cells, thus causing less side-effects than standard chemotherapy.
- It is able to act in metastatic tumours, phase in which chemotherapeutic drugs cannot operate.
- Endothelial cells present genomic stability, so they do not develop mutations leading to drug resistance.

For all these reasons, angiogenesis inhibition has become a promising target in the development of new therapies which could help in the fight against cancer.

6.1.3. Telomerase

Another hallmark of cancer is the limitless replicative potential of cancer cells. Non-tumour cells are only able to divide a limited number of times, and this number of divisions is regulated by telomere length. Telomeres are repetitions of a DNA sequence located at the end of eukaryotic chromosomes, which confers stability and integrity to genetic material.

Telomerase is a ribonucleoprotein polymerase which synthesizes telomeric DNA and stabilizes telomeres, essentials for the replication of DNA and cell survival. Telomerase is also an attractive cancer target as it is involved in the immortalization process that characterizes the majority of tumour cells. Telomerase repression and tight regulation in humans appears to be a tumour

²⁵⁹ Mauriz, J. L.; Linares, P.; González, P.; Culebras, J. M. *Cir. Esp.* **2005**, 78, 3-11.

suppression mechanism because it may limit the proliferative capacity of malignant cells.²⁶⁰

Telomerase consists of a RNA template (hTR) that binds to the telomere and a catalytic subunit with reverse transcriptase activity, encoded by the gen *hTERT*, which adds a specific DNA sequence to the chromosome ends.²⁶¹

Figure 6.2. Telomerase components and telomeric DNA.

The signalling pathways of hTERT can be controlled by many different transcription factors such as c-Myc, which is encoded by the *c-Myc* protooncogen. The c-Myc factor plays an important role in a variety of cellular processes like cell cycle progression, cell growth, differentiation, angiogenesis and apoptosis.²⁶² The ability of c-Myc to activate telomerase may contribute to its ability to promote tumour formation.

Furthermore, antitelomerase drugs show some advantages in front of other oncologic treatments:²⁶³

²⁶⁰ a) Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. C.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science* **1994**, 266, 2011-2015. b) Harley, C. B. *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, 8, 167-179. c) Shay, J. W.; Keith, W. N. *Br. J. Cancer* **2008**, 98, 677-683.

²⁶¹ a) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1985**, 43, 405-413. b) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1987**, 51, 887-898. c) Shay, J. W.; Wright, W. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 577-584.

²⁶² Gonzalez, V.; Hurley, L. H. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, 50, 111-129.

²⁶³ Kyo, S.; Takakura, M.; Kohama, T.; Inoue, M. *Cancer Res.* **1997**, 57, 610-614.

- Tumours are less likely to develop resistance against telomerase target therapies than standard chemotherapy.
- Lack of telomerase expression in non-tumour cells in front of tumour cells provides high specificity of antitelomerase drugs, making them less cytotoxic in non-tumour cells.

6.1.4. Honokiol

Honokiol is a biphenolic lignan derived from the bark, seed cones and leaves of trees belonging to the genus *Magnolia*, of the family Magnoliaceae. In the past decades this compound has been used in the traditional Chinese and Japanese medicine for the treatment of depression, flu, anxiety and allergy.²⁶⁴ Honokiol has a structural isomer, magnolol, which can be extracted from the same bark and leaves as honokiol and it also presents similar biological properties.

Figure 6.3. Chemical structure of honokiol and magnolol.

Early research on honokiol showed the compound to have diverse biological functions such as anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, antifungal, antibacterial, anxiolytic and recently, antiangiogenic and antitumour properties, without appreciable toxicity.²⁶⁵ Moreover, unlike other natural products,

²⁶⁴ a) Lin, J. M.; Gowda, A. S. P.; Sharma, A. K.; Amin, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3202-3211. b) Kumar, V. P.; Reddy, R. G.; Vo, D-D.; Chakravarty, S.; Chandrasekhar, S.; Grée, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1439-1444.

²⁶⁵ a) Bai, X.; Cerimele, F.; Ushio-Fukai, M.; Waqas, M.; Campbell, P.M.; Govindarajan, B.; Der, C.J.; Battle, T.; Frank, D. A.; Ye, K.; Murad, E.; Dubiel, W.; Soff, G.; Arbiser, J. L. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35501-35507. b) Amblard, F.; Govindarajan, B.; Lefkove, B.; Rapp, K. L.; Deterio, M.; Arbiser, J. L.; Schinazi, R. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4428-4431. c) Fried, E. M.; Arbiser, J. L. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 1139-1148. d) Wen, J.; Fu, A-F.; Chen, L-J;

honokiol shows a high bioavailability. In addition, its structural simplicity provides an attractive target for the development of new derivatives.²⁶⁶ These biological properties make honokiol an attractive candidate drug as an antineoplastic agent.

Another natural product similar in structure to honokiol and with potential pharmacological activity is curcumin (see picture 1.47, p. 58). This product is a natural colorant derived from the *Curcuma longa* herb. Curcumin has been shown to exhibit antioxidant, anti-inflammatory, antiangiogenic, antibacterial, antitumour and in recently studies, antitelomerase activities.²⁶⁷ However, curcumin presents some therapeutic limitations like its poor aqueous solubility, relatively low bioavailability and yellow intense colour.²⁶⁸

6.1.5. Triple negative breast cancer (TNBC)

Triple negative breast cancer (TNBC) is characterized by lack of estrogen receptors, progesterone receptors and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2). Thus, common treatments like hormone therapy and chemotherapeutic drugs that target estrogen, progesterone, and HER-2 are ineffective.

Xie, X.-J.; Yang, G.-L.; Chen, X.-C.; Wang, Y.-S.; Li, J.; Chen, P.; Tang, M.-H.; Shao, X.-M.; Lu, Y.; Zhao, X.; Wei, Y.-Q. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2709-2718.

²⁶⁶ a) Lee, Y.-J.; Lee, Y. M.; Lee, C.-K.; Jung, J. K.; Han, S. B.; Hong, J. T. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *130*, 157-176. b) Fried, L. E.; Arbiser, J. L. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 1139-1148. c) Kumar, V. P.; Reddy, R. G.; Vo, D. D.; Chakravarty, S.; Chandrasekhar, S.; Grée, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1439-1444. d) Arora, S.; Singh, S.; Piazza, G. A.; Contreras, C. M.; Panyam, J.; Singh, A. P. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 1244-1252.

²⁶⁷ a) Menon, V. P.; Sudheer, A. R. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *595*, 105-125. b) Gururaj, A. E.; Belakavadi, M.; Venkatesh, D. A.; Marmé, D.; Salimath, B. P. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2002**, *297*, 934-942. c) Jurenka, J. S. *Altern. Med. Rev.* **2009**, *14*, 141-153. d) Bachmeier, B. E.; Killian, P.; Pfeffer, U.; Nerlich, A. G. *Front. Biosci.* **2010**, *2*, 697-717. e) Bar-Sela, G.; Epelbaum, R.; Schaffer, M. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 190-197. f) Khaw, A. K.; Hande, M. P.; Kalthur, G.; Hande, M. P. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 1257-1270.

²⁶⁸ a) Anand, P.; Thomas, S. G.; Kunnumakkara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Sung, B.; Tharakan, S. T.; Misra, K.; Priyadarsini, I. K.; Rajasekharan, K. N.; Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590-1611. b) Chattopadhyay, I.; Biswas, K.; Bandyopadhyay, U.; Banerjee, R. K. *Current Sci.* **2004**, *87*, 44-53.

Recent studies reported the high presence of α B-crystallin (CRYAB) in TNBC tumours.²⁶⁹ It has been found that CRYAB binds to and corrects the unfolded/misfolded VEGF under conditions of cellular stress of tumour microenvironment. Thus, CRYAB may be a key component in the activation of the intracrine VEGF pathway by protecting VEGF from intracellular degradation in tumour endothelial cells.²⁷⁰ Therefore, focusing on the disruption of these two proteins (CRYAB and VEGF) could be a potential new therapeutic target for TNBC and also for inhibiting angiogenesis.

Dr. Jun Cai and collaborators have used structure-based molecular docking of CRYAB and they have found that 3-methylglutamic acid (MGA) can block the interaction between CRYAB and VEGF-165. The disruption of this interaction causes *in vitro* antitumour cell proliferation and invasion effects through the downregulation of VEGF signalling.²⁷¹

Figure 6.4. Structure of MGA.

Although MGA satisfies Lipinski "rule of five", it is highly hydrophilic²⁷² so that it becomes necessary to make some structural changes with the purpose to enhance its cell permeability.

²⁶⁹ Moyano, J. V.; Evans, J. R.; Chen, F.; Lu, M.; Werner, M. E.; Yehiely, F. et al. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 261-70.

²⁷⁰ Ruan, Q.; Han S.; Jiang W.G.; Boulton M.E.; Chen Z.J.; Law B.K.; Cai J. *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 1632-1643.

²⁷¹ Chen, Z.; Ruan, Q.; Han, S.; Xi, L.; Jiang, W.; Jiang, H.; Ostrov, D. A.; Cai, J. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *145*, 45-59.

²⁷² Log P value has been calculated by ChemBioDraw Ultra 14.0 programme.

6.2. OBJECTIVES

The two main goals of this thesis are the following:

- The synthesis of a library of biaryl compounds (see figure 6.5) based on honokiol structure with the purpose of enhancing its biological activity and evaluating their cytotoxicity in several tumour and non-tumour cell lines, as well as their ability to inhibit secreted VEGF protein and several gene expressions. Finally, depending on the results eventually achieved, it is also intended to establish a relationship between the synthetic compounds and their different activities as compared with honokiol.

Figure 6.5. General structures of honokiol analogues.

- The synthesis of MGA analogues, in order to enhance cell permeation of this molecule, the evaluation of their cytotoxicity in several tumour and non-tumour cell lines and the evaluation of their effects over cell proliferation.

Figure 6.6. MGA analogues.

6.3. SYNTHESIS

6.3.1. Honokiol analogues

Synthetic honokiol analogues have been divided in six families. The creation of carbon-carbon biaryllic bond has been performed by means of Suzuki couplings whereas the C-allyl side chain attached has been installed through O-allylation followed by Claisen rearrangement.

The synthetic sequences carried out in this thesis are shown in the following schemes:

Family 1 (O-allylation²⁷³ and Claisen rearrangement²⁷⁴)

Scheme 6.1. (a) Allyl bromide, K_2CO_3 , acetone, reflux, 5 h. (b) Et_2AlCl , hexane, $25^\circ C$, 2 h.

Aside from the compounds shown above, family 1 also comprises the commercially available compounds **4**, **5** and **6**, which contains one methoxyl group in the three different positions of the aromatic ring.

²⁷³ Ma, L.; Chen, J.; Wang, X.; Liang, X.; Luo, Y.; Zhu, W.; Wang, T.; Peng, M.; Li, S.; Jie, S.; Peng, A.; Wei, Y.; Chen, L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6469-6481.

²⁷⁴ Tripathi, S.; Chan, M-H.; Chen, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 216-221.

Family 2 (Suzuki coupling: methods A²⁷⁵, B²⁷⁶ and C²⁷⁴)

Scheme 6.2. Method A: Pd(AcO)₂, Na₂CO₃, H₂O/acetone, 35°C, 1 h. Method B: Pd(AcO)₂, Na₂CO₃, H₂O/EtOH, 70°C, 4 h. Method C: PdCl₂(dppf), Na₂CO₃, H₂O/DME, 85°C, 24 h.

Scheme 6.3. Method C: PdCl₂(dppf), Na₂CO₃, H₂O/DME, 85°C, 24 h.

In this family it has also been included compounds **12**, **15**, **17** and **18**, which are commercially available, shown in table 3.2 (p. 73) for further biological evaluation.

²⁷⁵ a) Liu, L.; Zhang, Y.; Xin, B. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3994-3997. b) Liu, L.; Zhang, Y.; Wang, Y. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6122-6125.

²⁷⁶ a) Lee, D.; Choi, M.; Yu, B.; Ryoo, R.; Taher, A.; Hossain, S.; Jin, M. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2912-2920. b) Badone, D.; Baroni, M.; Cardamone, R.; Ielmini, A.; Guzzi, U. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7170-7173.

Family 3 (O-allylation²⁷³ and Claisen rearrangement²⁷⁴)

Scheme 6.4. (a) Allyl bromide, K₂CO₃, acetone, reflux, 5 h. (b) Et₂AlCl, hexane, 25°C, 2-3 h.

Family 4 (Suzuki coupling: methods C²⁷⁴ and D²⁷⁷)

Scheme 6.5. Method C: PdCl₂(dppf), Na₂CO₃, H₂O/DME, 85°C, 24 h. Method D: Pd(AcO)₂, Na₂CO₃, H₂O/EtOH, MW (150°C), 30-70 min.

²⁷⁷ Leadbeater, N. E.; Marco, M. *Org. Lett.* **2002**, 4, 2973-2976.

Scheme 6.6. Method C: PdCl₂(dppf), Na₂CO₃, H₂O/DME, 85°C, 24 h.

Family 4 is constituted by all the compounds shown in schemes 6.5 and 6.6 but also by compounds **69**, **70** and **71** acquired directly from the market. Their structures are shown in table 3.6 (p. 82).

Family 5 (Suzuki coupling: method C²⁷⁴)

Scheme 6.7. Method C: PdCl₂(dppf), Na₂CO₃, H₂O/DME, 85°C, 24 h.

Family 5 is constituted by all the compounds shown in scheme 6.7 but also by compounds **87** and **91**. These compounds are commercially available and their structures are shown in table 3.8 (pp. 85-86).

Family 6 (Amination²⁷⁸ and amidation²⁷⁹)

Scheme 6.8. (a) $t\text{-BuOK}$, DMSO, MW (190°C), 20-35 min.

Scheme 6.9. (a) Et_3N , CH_2Cl_2 , 25°C, 30-60 min.

Appart from compounds shown above, family 5 is also comprised by compounds **102**, **108** and **112**, which are commercially available and their structures are shown in tables 3.9 (pp. 88-89) and 3.10 (p. 91).

6.3.2. 3-Methylglutamic acid analogues

MGA analogues have been prepared by means of Michael addition of nitroacetates to crotonates followed by reduction of nitro group and amine protection.

²⁷⁸ Shi, L.; Wang, M.; Fan, C. A.; Zhang, F. M.; Tu, Y. Q. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3515-3517.

²⁷⁹ Das, S.; Addis, D.; Zhou, S.; Junge, K.; Beller, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1770-1771.

The synthetic sequences carried out in order to prepare MGA analogues are the following:

1) Synthesis of benzyl 2-nitroacetate and *t*-butyl 2-nitroacetate²⁸⁰

Scheme 6.10. (a) KOH, H₂O, 70-160°C, 1 h, **GA13** (91%). (b) L-tartaric acid, ice-H₂O, -10°C, 15 min, **GA14** (81%). (c) R-OH, DCC, THF, 0°C, 5 h, **GA15** (67%), **GA16** (67%).

2) Synthesis of crotonates²⁸¹

Scheme 6.11. (a) R-OH, 4-DMAP, K₂CO₃, CH₂Cl₂, 25°C, 15 h, **GA18** (68%), **GA19** (20%).

3) Michael addition²⁸²

Scheme 6.12. (a) DBU, THF, 25°C, 72 h, absence of light, **GA24** (91%), **GA25** (98%), **GA26** (89%), **GA27** (46%).

²⁸⁰ Vanier, S. F.; Larouche, G.; Wurz, R. P.; Charette, A. B. *Org. Lett.* **2010**, 12, 672–675.

²⁸¹ Smaltz, D. J.; Myers, A. G. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 8554–8559.

²⁸² Milne, C.; Powell, A.; Jim, J.; Nakeeb, M. A.; Smith, C. P.; Micklefield, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11250–11259.

4) Nitro group reduction²⁸³ and amine protection^{282,284}

Scheme 6.13. (a). Zn, conc. HCl, CH_3OH , 25°C, 15 min. (b) Boc_2O , Et_3N , 4-DMAP, CH_2Cl_2 , 0-25°C, 18 h, **GA1** (20%), **GA2** (35%), **GA3** (28%), **GA4** (46%). (c) Ac_2O , Et_3N , 4-DMAP, CH_2Cl_2 , 0-25°C, 18 h, **GA5** (26%), **GA6** (13%), **GA7** (72%). (d) BzCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , 25°C, 2 h, **GA8** (49%), **GA9** (72%), **GA10** (50%), **GA11** (66%).

²⁸³ So, S. S.; Auvil, T. J.; Garza, V. J.; Mattson, A. E. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 444-447.

²⁸⁴ Liang, X.; Lee, C. J.; Chen, X.; Chung, H. S.; Zeng, D.; Raetz, C. R. H.; Li, Y.; Zhou, P.; Toone, E. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 852-860.

6.4. BIOLOGICAL EVALUATION

6.4.1. Cytotoxicity, VEGF protein secretion and *VEGF*, *hTERT* and *c-Myc* gene expressions of honokiol analogues

The cytotoxic ability of compounds **1-116** and honokiol was measured by means of their IC_{50} values towards the tumour cell lines HT-29 and MCF-7 and non-tumour cell line HEK-293 after 48 or 72 hours of incubation, depending on the family. The therapeutic safety margin of each compound was also evaluated and expressed by means of the α and β coefficients which were obtained by dividing the IC_{50} value of each compound in non-tumour HEK-293 cell line by those for the HT-29 (α) and the MCF-7 (β) tumour cell lines, respectively. The higher the value of either coefficient, the greater the therapeutic safety margin for the corresponding compound.

The majority of the IC_{50} values are in the low to medium micromolar range. In the following table are shown the IC_{50} values of the most important compounds eligible to continue with further biological assays (see structures in chapter 4).

Table 6.1. Cytotoxicity and selectivity coefficients for honokiol analogues. (continue)

Compound	$IC_{50} \pm SD$ ($\mu g/mL$)			Selectivity coefficients	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α^*	β^{**}
Honokiol	9.3 $\pm$ 1.6	6.1 $\pm$ 0.5	5.0 $\pm$ 0.7	1.5	1.9
3	45 $\pm$ 6	25 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3	1.86	1.0
5	5.5 $\pm$ 1.3	1.1 $\pm$ 0.5	47 $\pm$ 3	5.1	0.1
8	54.1 $\pm$ 1.0	5.6 $\pm$ 2.4	50.8 $\pm$ 0.9	9.7	1.1
11	29 $\pm$ 3	25 $\pm$ 6	25.8 $\pm$ 1.0	1.2	1.1
12	57 $\pm$ 8	2.52 $\pm$ 0.05	60 $\pm$ 6	22.6	1.0
13	>100	5.24 $\pm$ 0.18	>100	>19.1	1.0
14	54 $\pm$ 4	1.42 $\pm$ 0.16	>100	37.8	<0.5
15	68 $\pm$ 11	2.5 $\pm$ 1.2	51.6 $\pm$ 0.4	27.6	1.3
16	31 $\pm$ 6	3.4 $\pm$ 1.2	>100	9.0	<0.31
19	54 $\pm$ 6	2.7 $\pm$ 1.1	>100	20.2	<0.5
22	50 $\pm$ 8	22 $\pm$ 4	44 $\pm$ 5	2.3	1.1
23	34 $\pm$ 10	16.0 $\pm$ 1.9	33 $\pm$ 6	2.1	1.0

Compound	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Selectivity coefficients	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α*	β**
26	35±10	24±6	41±4	1.5	0.9
31	>100	33.7±1.5	>100	>3.0	1.0
33	>100	21±4	47±5	>4.7	>2.1
36	>100	26±8	34±9	>3.9	>2.9
40	>100	2.8±0.8	29±4	>35.5	>3.4
41	>100	18±10	25.8±1.4	>5.5	>3.9
42	6.8±1.2	10±3	0.78±0.04	0.7	8.7
43	35±7	4.9±2.3	49±7	7.1	0.7
47	28±10	18±8	50.4±0.6	1.6	0.6
48	26.4±2.3	13.49±0.17	55±3	2.0	0.5
50	1.1±0.6	7.6±2.3	1.0±0.8	0.1	1.1
51	>100	16±4	38±6	>6.2	>2.6
52	14±3	11.8±1.6	34±11	1.2	0.4
56	24.8±1.0	21±6	15±3	1.2	1.7
59	15±5	16±7	12.35±0.16	0.9	1.2
64	29±5	16.6±2.0	26±3	1.7	1.1
69	54.9±2.4	16±5	2.9±0.5	3.3	18.9
75	10.5±0.5	9.2±1.8	16±3	1.1	0.7
79	>100	5.4±1.4	6.5±0.6	>18.4	>15.4
83	22±5	2.25±0.18	>100	9.7	<0.2
84	49.9±1.2	15±5	18±9	3.3	2.8
85	20±3	4.0±1.6	>100	4.9	<0.2
86	23±4	2.0±0.7	5.5±0.8	12.0	4.2
88	69±13	33.7±1.2	1.2±0.7	2.0	57.5
90	36±15	12.0±1.6	44±8	3.0	0.8
91	>100	49.86±0.21	>100	>2.0	1.0
92	50±3	19.7±1.2	7±4	2.5	7.1
93	21±8	12.7±1.0	45±8	1.7	0.5
96	4.0±1.9	6.4±1.5	29±10	0.6	0.1
102	>100	39±13	19±6	>2.6	>5.3
103	>100	30±11	19±8	>3.3	>5.3
104	>100	36±15	14.1±1.3	>2.8	>7.1
105	>100	19±11	25±4	>5.3	>4.0
106	>100	5±3	31±9	>20.1	>3.2
110	62±16	37±6	>100	1.7	<0.6
111	51.7±0.6	31±9	19±8	1.7	2.7
114	>100	31±6	36±9	>3.2	>2.8
115	>100	13±7	>100	>7.7	1.0
116	>100	31.6±0.4	20±11	>3.2	>5.0

*α = IC₅₀ (HEK-293)/ IC₅₀ (HT-29). **β = IC₅₀ (HEK-293)/ IC₅₀ (MCF-7).

Some of the selected compounds exhibit better IC_{50} values than honokiol in the tumour cell lines. Others have also been selected according to their acceptable therapeutic safety margin.

The next activity to be measured was the influence of honokiol derivatives on the expression of the VEGFA-165 protein secretion. The selected compounds were tested at concentrations below their IC_{50} values (indicated on chapter 4) in HT-29 cells. The amount of secreted VEGFA-165 was determined by means of the ELISA procedure after 72 hours of incubation in the presence of each of the selected compounds. The values achieved were compared to control value, which measures the amount of VEGFA-165 secreted when cells were treated only with DMSO (standardized to 100%).

In order to find out whether the selected biphenyl derivatives were able to downregulate the secretion of VEGFA-165 protein by means of interference at the transcriptional level, the ability of the compounds to inhibit the expression of the *VEGF* gene has been tested. In this case, HT-29 cells were incubated for 48 hours with the selected derivatives at concentrations below their IC_{50} values, as well as with DMSO as the control test. The real time quantitative PCR (qPCR) methodology was then used to determine the percentage of *VEGF* gene expression related to control test.

Furthermore, in order to determine whether the studied compounds were able to downregulate the expression of the *hTERT* and *c-Myc* genes, a qPCR analysis on HT-29 tumour cells was undertaken. The cells were incubated for 48 hours in the presence of DMSO (control) and in the presence of the selected compounds.

In this thesis, several previously untested biological activities of honokiol have been measured. Therefore the results achieved by honokiol it will be a good marker to verify the angiogenic properties of this compound (see table 6.2).

Table 6.2. Biological results from honokiol at different concentrations.

Honokiol concentration	Secreted VEGF inhibition	VEGF gene inhibition	<i>hTERT</i> gene inhibition	<i>c-Myc</i> gene inhibition
5 µg/mL	45%	64%	55%	55%
3 µg/mL	25%	35%	33%	20%

Family 1 - Monooxygenated derivatives

The most remarkable product from family 1 (see graphic 4.1, p. 151) is compound **3**, which lowers VEGF secretion to 48% whilst honokiol lowers to 55%. In the qPCR assays, however, none of the studied compounds exhibit a higher inhibition of gene expression than honokiol (see table 6.2).

The final event during angiogenesis is the organisation of endothelial cells in a three-dimensional network of tubes (see figure 4.6, left, p. 147). In this family it has been tested the endothelial cell differentiation assay, where endothelial cells plated on Matrigel® align themselves forming cords, already evident a few hours after plating. First it has been measured the cytotoxicity of family 1 compounds in BAEC (bovine aortic endothelial cells) showing a lower growth inhibitory activity by honokiol derivatives than that of honokiol itself, suggesting lower toxicity of these compounds (see table 4.3, p. 153). Looking at the tube formation assay, honokiol was able to completely inhibit cell alignment and cord formation of BAEC at 3.1 µg/mL, which is the best result.

Family 2 - Dihydroxylated, (methoxy)hydroxylated, dimethoxylated, trimethoxylated and (dimethoxy)hydroxylated derivatives

All the compounds tested from family 2 (see table 4.5, p. 160), inhibit the VEGF segregation more than honokiol (see graphic 4.4, p. 161). The most outstanding derivative is compound **19** which inhibits 67% protein secretion at a very low concentration (3 µg/mL). Compounds **12**, **13**, **14**, **15** and **16** also downregulate the secretion of VEGF around 50% with the same concentration as compound **19**. Compounds **22**, **23**, **31** and **33** inhibit around 70% secreted VEGF protein at higher concentrations than honokiol.

Compounds **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **19** and **23** are able to inhibit *VEGF* gene expression at higher values than honokiol, in a range of 65-95% compared to control values (see graphic 4.5, p. 162).

As regards *hTERT* gene expression, compounds **12** and **19** show inhibition values at 97% (see graphic 4.7, p. 165). Compounds **13**, **14**, **15** and **16** are able to inhibit *hTERT* gene expression around 70-90%. Other compounds as **26**, **31** and **36** present similar effect but at higher concentrations than honokiol.

Regarding *c-Myc* gene expression (see graphic 4.8, p. 166), compounds **12**, **14**, **15** and **19** inhibit around 82-94% this activity at the same concentration. Compounds **16** and **26** also present higher inhibition (40%) values than honokiol.

The most important compounds of this family and their concentrations are shown in the following figure.

Figure 6.7. Compounds with the highest biological activities (family 2).

In conclusion the common substitution patterns are *ortho-ortho* (magnolol substitution pattern), *meta-meta*, *ortho-para* (honokiol substitution pattern) and *meta-para*. It seems important for the biological activity to have one hydroxyl group in one of the rings and one substituent in the other which can be a hydroxyl or methoxyl group.

Family 3 - Allylated and rearranged derivatives

The most remarkable members of family 3 as regards secreted VEGF protein inhibition are compounds **56** and **64**, which inhibit secreted VEGF protein around 60% (see graphic 4.10, p. 175).

Compounds **40**, **41** and **42** show higher levels of *VEGF* gene expression inhibition than honokiol (see graphic 4.11, p. 175).

Compounds **40**, **41**, **43**, **51** and **56** present low values of *hTERT* gene expression compared to lead compound (see graphic 4.13, p. 178).

As regards *c-Myc* gene expression, compounds **42**, **43**, **47**, **50**, **56** and **59** show the best values in graphic 4.14 (p. 179).

The most active products of family 3 are the following ones.

Figure 6.8. Compounds with the highest biological activities (family 3).

Looking at the previous structures, it can be conclude that the preferred substitution patterns are *meta-meta*, *meta-para* and *para-para*. Moreover, the presence of allyloxy groups stimulates gene inhibition whereas compounds with allyl and hydroxyl groups are effective in the inhibition of secreted VEGF protein.

The most active product in this family is **56**, a structural isomer of honokiol. This compound proved superior to honokiol in all biological properties studied in this thesis (see graphic 4.12, p. 176, and 4.15, p. 180).

Family 4 - Aminated derivatives

Compounds **75**, **79**, **83**, **85** and **86** show higher levels of VEGF secreted inhibition at 3 $\mu\text{g/mL}$ than honokiol (see graphic 4.16, p. 185).

As regards *hTERT* gene expression inhibition, compound **83** is the only one that deserves to be highlighted with a 60% inhibition of *hTERT* gene expression (see graphic 4.19, p. 188).

Compounds **75**, **79**, **83** and **85**, studied at 3 $\mu\text{g/mL}$, show a slightly higher inhibition of *c-Myc* gene as compared with honokiol (see graphic 4.19, p. 188).

The only compound in this family with high biological activity is **83**, which presents two methoxyl groups in one of the aromatic rings and the amino group is placed in *para* position in the other ring.

Figure 6.9. Compound with the highest biological activity (family 4).

Family 5 - Arylpyridine and arylpyrimidine derivatives

Compounds **88**, **90**, **91**, **93** and **96** show levels of secreted VEGF protein inhibition similar to those of honokiol (see graphic 4.21, p. 194).

As regards *VEGF* and *c-Myc* gene expression (see graphic 4.22, p. 195, and 4.24, p. 202, respectively) all the compounds studied in this family show higher inhibition levels than honokiol.

For the *hTERT* gene inhibition, compounds **88**, **90**, **92** and **93** show higher inhibition levels than honokiol (see graphic 4.24, p. 201).

Compounds with the best biological activities are shown in figure 6.10.

Figure 6.10. Compounds with the highest biological activities (family 5).

In conclusion, biphenyl derivatives containing pyridine and pyrimidine are able to inhibit gene expression levels more than honokiol. The compounds with the highest gene inhibition ability in this family present two methoxyl groups in their structures.

Family 6 - *N*-arylmorpholine, *N*-arylpiperidine and *N*-arylpyrrolidine derivatives

As regards VEGF protein inhibition the most remarkable compounds of family 6 are **103**, **106** and **111**, which are able to lower VEGF protein secretion to 50% (see graphic 4.26, p. 207).

The most remarkable compounds in *hTERT* gene expression are **105**, **106**, **110**, **114** and **116** which exhibit gene inhibition ability higher than honokiol (see graphic 4.29, p. 210).

As regards *c-Myc* gene expression inhibition, only compounds **115** and **116** show 90% inhibition compared to control (see graphic 4.29, p. 210).

In conclusion, the best biological activity in this family is shown by compound **106**, which has a cytotoxicity value in the nanomolar range.

Figure 6.11. Compound with the highest biological activity (family 6).

6.4.2. Cytotoxicity of MGA analogues

The cytotoxicity of compounds **GA1-GA11** was measured by means of their IC_{50} values towards the TNBC model cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-436, non-tumourigenic human breast cells MCF-10A and human dermal microvascular endothelial cells HMVECd at 72 hours. The therapeutic safety margin of each compound as expressed by means of the γ and δ coefficients has also been evaluated. These coefficients are obtained by dividing the IC_{50} value of each compound for the non-tumour MCF-10A line by those for the MDA-MB-231 (γ) and the MDA-MB-436 (δ) tumour cell lines, respectively.

Table 6.3. Cytotoxicity and selectivity coefficients for MGA analogues (TNBC study).

Compound	$IC_{50} \pm SD$ (μM)				Selectivity coefficients	
	MDA-MB-231	MDA-MB-436	MCF-10A	HMVECd	γ^*	δ^{**}
MGA	42 $\pm$ 11	2.5 $\pm$ 1.9	0.15 $\pm$ 0.09	56 $\pm$ 8	0.004	0.06
GA1	>100	20 $\pm$ 10	>100	>100	1.0	>5.0
GA2	>100	>100	10 $\pm$ 7	56 $\pm$ 8	0.1	0.1
GA3	38 $\pm$ 13	24 $\pm$ 3	45 $\pm$ 8	24 $\pm$ 8	1.2	1.9
GA4	37 $\pm$ 11	47 $\pm$ 7	18 $\pm$ 7	51.4 $\pm$ 1.1	0.5	0.4
GA5	36 $\pm$ 15	19 $\pm$ 22	>100	>100	>2.8	>5.3
GA6	66 $\pm$ 9	>100	12.7 $\pm$ 0.3	>100	0.2	<0.1
GA7	57 $\pm$ 23	19 $\pm$ 7	4 $\pm$ 13	60.2 $\pm$ 2.3	0.07	0.2
GA8	19 $\pm$ 4	25 $\pm$ 9	4 $\pm$ 3	28 $\pm$ 12	0.2	0.2
GA9	34 $\pm$ 16	31 $\pm$ 9	23.6 $\pm$ 1.4	30 $\pm$ 30	0.7	0.8
GA10	53 $\pm$ 4	45 $\pm$ 5	2.3 $\pm$ 1.2	37.9 $\pm$ 2.1	0.04	0.05
GA11	>100	47 $\pm$ 10	43 $\pm$ 10	92 $\pm$ 6	<0.4	0.9

* $\gamma = IC_{50}$ (MCF-10A) / IC_{50} (MDA-MB-231). ** $\delta = IC_{50}$ (MCF-10A) / IC_{50} (MDA-MB-436).

Most IC_{50} values are in the medium micromolar range. None of the synthesized compounds can improve the IC_{50} value of MGA in MDA-MB-436 cell line. However, compounds **GA3**, **GA4**, **GA5**, **GA8** and **GA9** exhibit higher cytotoxicity than MGA for MDA-MB-231 cell line.

Furthermore, all the studied products show lower cytotoxicity in non-tumour cell line MCF-10A than natural product, thus there is an improvement in selectivity coefficients γ and δ .

The most promising compounds are **GA3** and **GA5** because of their high therapeutic safety margin in both tumour cell lines.

The cytotoxicity of MGA derivatives in the tumour cell lines HT-29 and MCF-7 and non-tumour cell line HEK-293 has also been measured. The selectivity coefficients are mentioned in section 6.4.1.

Table 6.4. Cytotoxicity and selectivity coefficients for MGA analogues.

Compound	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)			Selectivity coefficients	
	HEK-293	HT-29	MCF-7	α^*	β^{**}
MGA	0.12±0.04	45±4	48±13	0.003	0.003
GA1	5±3	51.9±2.0	12.1±0.4	0.1	0.4
GA2	39±13	94.6±2.3	>100	0.4	<0.4
GA3	26±3	48.5±0.8	>100	0.5	<0.3
GA4	56.6±1.0	53.49±0.03	46±11	1.1	1.2
GA5	29±15	3.7±2.2	48±3	7.8	0.6
GA6	15±6	41±10	55±4	0.4	0.3
GA7	46±9	0.6±0.3	52.6±0.7	76.7	0.9
GA8	46±11	3.8±1.6	53.7±1.6	12.1	0.9
GA9	>100	5.5±0.6	51.5±1.1	>18.2	>1.9
GA10	28±5	38±3	27±4	0.7	1.0
GA11	54±9	53.24±0.15	19±10	1.0	2.8

* α = IC₅₀ (HEK-293)/ IC₅₀ (HT-29). ** β = IC₅₀ (HEK-293)/ IC₅₀ (MCF-7).

The most remarkable compounds in HT-29 cell line are **GA5**, **GA7**, **GA8** and **GA9**. These compounds exhibit a cytotoxicity levels in the low micromolar range and show α coefficients much higher than unity. For MCF-7 cells, only compound **GA11** is worth mentioning.

6.5. DISCUSSION

6.5.1. Honokiol analogues

The compounds of this thesis with the highest biological activity, the concentrations used for the assays and their corresponding percentages of inhibition are shown in the following table:

Table 6.5. Most active compounds, tested concentrations and % of inhibition.

Compound	% secreted VEGF inhibition	% VEGF gene inhib.	% <i>hTERT</i> gene inhib.	% <i>c-Myc</i> gene inhib.
12 (3 µg/mL)	44	76	97	82
14 (3 µg/mL)	38	84	89	89
15 (3 µg/mL)	50	95	71	84
16 (3 µg/mL)	48	65	70	61
19 (3 µg/mL)	67	83	97	94
23 (10 µg/mL)	69	79	12	29
26 (15 µg/mL)	52	49	65	66
31 (30 µg/mL)	71	44	71	46
33 (15 µg/mL)	65	63	44	13
36 (3 µg/mL)	45	59	78	13
40 (3 µg/mL)	24	84	66	42
41 (10 µg/mL)	6	77	75	37
42 (10 µg/mL)	42	76	55	87
56 (10 µg/mL)	60	58	75	93
83 (3 µg/mL)	49	59	60	61
90 (10 µg/mL)	52	92	80	62
93 (10 µg/mL)	48	68	72	61
96 (5 µg/mL)	52	67	15	82
106 (2 µg/mL)	58	56	70	37

In order to establish which of the previous compounds show dual inhibitory activity of secreted VEGF protein and *hTERT* or *c-Myc* gene expressions, it has been represented the corresponding activities of the compounds in two graphics (see graphics 4.31, p. 214, and 4.32, p. 215). Taking into account the tested biological properties, the most active compounds are shown in figure

6.12, along with their corresponding inhibition values towards VEGF protein secretion and *VEGF*, *hTERT* and *c-Myc* gene expressions.

Figure 6.12. The most active honokiol analogues.

The final conclusions are summarized in the following statements:

- Compound **19** presents the best biological properties, as it shows the highest percentages of inhibition in all the tested assays and cytotoxicity in the nanomolar range.
- The presence of one hydroxyl group in *ortho* or *meta* position stimulates the inhibitory ability of the studied gene expressions.

- The preferred substitution patterns for an improvement of the biological activities measured in this thesis are *ortho-ortho* (magnolol pattern substitution), *meta-meta* and *ortho-meta* (honokiol pattern substitution).
- The presence of one hydroxyl group in each aromatic ring gives rise to a marked increase in the inhibitory ability of the studied gene expressions. In contrast, the presence of a hydroxyl group in one ring and a methoxyl group in the other encourages the inhibition of secreted VEGF protein.
- Compound **56** is a structural isomer of honokiol which proved superior in most of the biological activities assayed in this thesis.
- The introduction of allyl residues in the biphenyl system does not cause a significant improvement in the inhibition of VEGF secretion respect compounds without allyl groups (family 2). The introduction of allyloxy groups in the structure encourages gene expression inhibition, while the presence of allyl and hydroxyl groups stimulates the inhibition of secreted VEGF protein.
- The introduction of an amine group in the biphenyl system does not stimulate the studied inhibitory activities to a higher degree than compounds with hydroxyl and methoxyl groups in both aromatic rings.
- The higher the number of substituents in pyridine- and pyrimidine-containing biaryl derivatives, the higher inhibition levels of the studied biological properties.
- Loss of aromaticity in one of the rings does not show an improvement of the inhibition biological activity in comparison with honokiol.

6.5.2. MGA analogues

Concerning cytotoxicity, the most promising analogue for further biological evaluation is compound **GA5**. Furthermore, focusing only on the TNBC model cell lines compound **GA3** can also be of interest for further biological analysis.

Figure 6.13. Chemical structures of **GA3** and **GA5**.

Looking at the above chemical structures it is difficult to find a pattern as none of them have any protecting groups in common.

**7. PUBLICACIONES Y
COMUNICACIONES A
CONGRESOS DERIVADAS
DE LA TESIS DOCTORAL**

CAPÍTULO 7: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

7.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **Discovery Chemistry Congress**, Munich, Alemania. Marzo-2013.
Póster. "*Synthesis of honokiol analogues and biological evaluation of the antiangiogenic activity.*" Sánchez-Peris, M.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A.
- **RICT 2013** - 49th International Conference on Medicinal Chemistry, Niza, Francia. Julio-2013.
Póster. "*New antiangiogenic and antitelomeric drug candidates based on honokiol natural products.*" Sánchez-Peris, M.; Conesa-Milián, L.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A.
- **Discovery Chemistry Congress**, Barcelona. Febrero-2014.
Póster. "*Study of compounds based on biphenyl systems as a therapeutic strategy against cancer.*" Sánchez-Peris, M.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A.
- **Drug Design & Medicinal Chemistry Conference Europe**, Berlin, Alemania. Mayo-2014.
Póster. "*Synthesis of honokiol analogues and study of their antiangiogenic and antitelomerase activity.*" Sánchez-Peris, M.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A.
- **China - United Kingdom Cancer (CUKC) Conference**, Cardiff, Reino Unido. Julio-2015.
Póster. "*Synthesis and biological evaluation of 3-methylglutamic acid analogues acting as inhibitors of the interaction between*

CRYAB/VEGF₁₆₅ for TNBC treatment." Sánchez-Peris, M.; Weeks, H. P.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A.; Cai, J.; Westwell, A. D.

7.2. PUBLICACIONES EN REVISTAS

Una parte de los resultados de esta tesis ha sido objeto de publicación en el siguiente artículo.

- Título. *"Advances in Small Molecule Drug Discovery for Triple-Negative Breast Cancer"*
Autores. Fosu-Mensah, N.; Sánchez-Peris, M.; Weeks, H. P.; Cai, J.; Westwell, A. D.
Future Medicinal Chemistry **2015**, doi:10.4155/fmc.15.129.

Otra parte ha sido enviada recientemente para su publicación:

- Título. *"Inhibitory effect of functionalized biphenyl derivatives related to honokiol on the VEGF protein secretion and on the expression of the VEGF, hTERT and c-Myc genes"*
Autores. Sánchez-Peris, M.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A.
Revista (enviado a publicar). *European Journal of Organic Chemistry*.

En la actualidad se encuentran en proceso de ser próximamente enviados a publicar dos artículos más relacionados con los derivados del honokiol.

8. ESPECTROS SELECCIONADOS

CAPÍTULO 8: ESPECTROS SELECCIONADOS