



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**TÍTULO: QUÍMICA CLICK EN EL DISEÑO Y**  
**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE LA**  
**PODOFILOTOXINA**

Autor: Claudia Caro Sánchez

Fecha: 31/01/2020

Tutor: Maria Teresa Ramos García

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	3
3. OBJETIVOS .....	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	10
6. CONCLUSIONES .....	17
7. BIBLIOGRAFÍA .....	18

## **1. RESUMEN**

La química click se trata de una estrategia química que se basa en la generación de moléculas a través de la unión de pequeñas unidades mediante enlaces de heteroátomos. Se trata de un concepto introducido por Sharpless en 2001 y que permite llevar a cabo reacciones simples, de forma rápida, fáciles de usar y de purificar, regioespecíficas y que dan altos rendimientos del producto. Se han encontrado diferentes reacciones que cumplen estos requisitos, pero la más efectiva y en la que se piensa cuando se habla de química click es la cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar de azidas y alquinos terminales. En los últimos años, se ha extendido el uso de dicha reacción y se le han encontrado múltiples aplicaciones en una gran variedad de áreas de investigación, sobretodo en el ámbito farmacéutico. En esta revisión bibliográfica se repasarán los aspectos más importantes de la química click, así como sus aplicaciones en el diseño y síntesis de derivados de la podofilotoxina. La podofilotoxina y sus derivados se tratan de unos compuestos que presentan actividad antitumoral mediante diferentes mecanismos de acción. Para la síntesis de estos derivados será necesario la utilización de la química click.

### **ABSTRACT**

Click chemistry is a chemical strategy that is based on generate molecules by joining small units together with heteroatom links. It is a concept introduced by Sharpless in 2001, and it allows simple reactions, quickly, simple to use, easy to purify, regioespecific and that give high product yields. Different reactions have been found with these requirements, but the most effective and the reaction that is thought of when talking about click chemistry is the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of azides and terminal alkynes. In recent years, the use of this reaction has been extended and multiple applications have been found in a wide variety of research areas, especially in the pharmaceutical field. In this bibliographic review, it will be reviewed the most important aspects of click chemistry, as well as its applications in the design and synthesis of podophyllotoxin derivates. Podophyllotoxin and its derivates are compounds with antitumor activity that they have different mechanisms of action. It will be necessary the use of click chemistry for the synthesis of these derivates.

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1. Qué es la química click

La química click es un concepto introducido por el Dr. Barry Sharpless y colaboradores en 2001, que consiste en la generación de sustancias uniendo pequeñas unidades con enlaces de heteroátomos (C-X-C). Además, este mismo doctor añadió que esta química debe tener ciertos requerimientos (1), entre los que se encuentran: ser modular, de amplio alcance, proporcionar rendimientos muy altos, generar subproductos inofensivos y fácilmente eliminables por métodos no cromatográficos, y ser estereoespecíficos.

También deben presentar ciertas características en el proceso como:

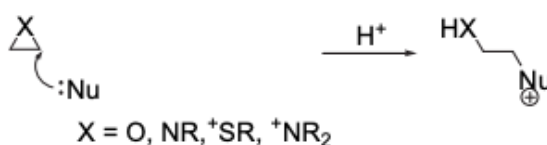
1. Ser reacciones simples,
2. Los materiales de partida y reactivos empleados tienen que estar fácilmente disponibles,
3. No pueden usarse ningún disolvente o en caso de usarlos no deben ser tóxicos, como el agua, o ser fácilmente eliminables,
4. Debe ser fácilmente aislable,
5. Si requiere purificación debe ser por métodos como destilación o cristalización,
6. Debe ser estable en condiciones fisiológicas.

### 2.2. Tipos de reacciones de la química click

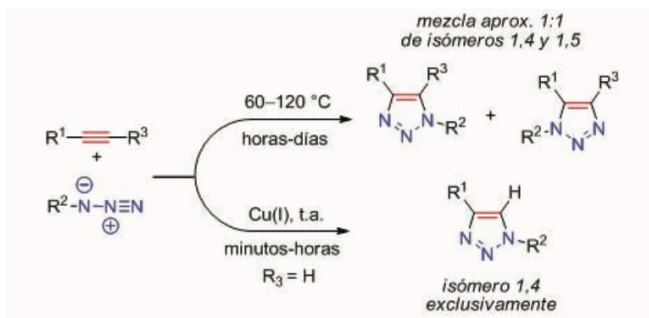
Dentro de la química click existen diferentes reacciones, las cuales son:

- *Reacciones de sustitución nucleofílicas o apertura de anillo* (2)(3). Estas reacciones se basan sobretodo en apertura de heterociclos electrófilos como son los epóxidos, aziridinas, iones de aziridinio o de episulfonio y sulfatos. Estas reacciones son estereoespecíficas, y presentan una gran utilidad.
- *Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares o cicloadiciones [4+2]*. Dentro de este tipo se encuentran las hetero Diels-Alder. Se trata de reacciones de fusión modular (1), y en estas se van a unir dos reactivos insaturados, produciendo heterociclos de 5 y 6 miembros de forma rápida. Además, son reacciones concertadas.
- *Reacciones del grupo carbonilo tipo no aldólica* (2)(3). En este tipo de reacciones se distinguen la formación de éteres de oximas, de heterociclos aromáticos y de hidrazonas.
- *Reacciones de adición a enlaces múltiples carbono-carbono*. Existen varias reacciones dentro de este tipo, en primer lugar estarían las de tipo oxidativo como epoxidación, aziridinación, dihidroxilación y adición de haluros sulfonilo y nitrosilo. En segundo lugar, algunas reacciones de tipo Michael.

- Reaction: ring opening







**Figura 2.** Comparación entre la reacción de cicloadición bajo condiciones térmicas y catalizada por Cu<sup>I</sup>. (2)

Esta reacción admite un amplio rango de temperaturas (0-160°C), de pH (5-12) y amplia variedad de disolventes. Además se trata de una reacción poco reactiva en condiciones estándar (5).

Más adelante, Sharpless y colaboradores descubrieron el uso de sulfato de cobre pentahidratado y ácido ascórbico en agua (2). Esta reacción es muy exotérmica y el hecho de que sea posible realizarla en agua, supuso una ventaja enorme ya que esta actuaba como refrigerante, además de evitar interferencias entre grupos funcionales próticos como son alcoholes, aminas, amidas y ácidos carboxílicos.

Este método de cicloadición debido a su elevado grado de fiabilidad, a la completa selectividad, a la biocompatibilidad de los reactivos, a la baja sensibilidad a efectos estéricos y a que los protocolos de purificación son sencillos (filtración), ha hecho que sea un importante método para la unión irreversible de dos moléculas de distinta naturaleza de forma rápida y eficaz.

### 2.3. Fuentes de obtención del cobre empleado en la reacción:

Dado las óptimas características de la cicloadición 1,3 dipolar, se han descrito varias estrategias para conseguir el catalizador de la reacción (2), estas son:

- **Reducción de sales de Cu<sup>II</sup>:** se trata de una reducción in situ. La ventaja que presenta esta estrategia es que no requiere atmósferas inertes. La elevada velocidad de reacción de conmutación junto al tratamiento final en la reducción favorece la preferencia del cobre en estado reducido (Cu<sup>I</sup>).

- **Oxidación de cobre metálico:** se produce la oxidación de Cu metálico, en forma de alambre, en presencia de sales de Cu<sup>II</sup>. Es un método efectivo para la generación de los suficientes iones de Cu<sup>I</sup> necesarios para la activación de la cicloadición 1,3-dipolar. Este método requiere mayor tiempo de reacción que otros y además mayor cantidad de Cu<sup>II</sup>.

Otra alternativa dentro de esta estrategia es utilizar nanopartículas de Cu<sup>0</sup>. Este método presenta un inconveniente y es que la solvatación de nanopartículas de cobre (0) requiere medios ligeramente ácidos (con pH en torno a 5), por lo que al ser un medio ácido será necesario proteger los grupos funcionales sensibles a dicho medio. Además, las nanopartículas de Cu<sup>0</sup> presenta un precio 7 veces mayor que el de otras fuentes de cobre.

- **Adición de sales de Cu<sup>I</sup>:** consiste en una adición directa de sales solubles de Cu<sup>I</sup> en disolventes orgánicos como por ejemplo CuI, sin la necesidad de emplear agentes reductores (6). Este método requiere atmósferas inertes, por lo que no va a ser necesario la protección de los grupos, pero sí el uso de una base, ya que se están usando disolventes orgánicos.

El uso de un exceso molar de bases de N como trietanolamina, piridina, entre otras, favorecen la cicloadición al disminuir al mínimo la producción de subproductos. Sin embargo, no existen estudios suficientes sobre el funcionamiento de estas bases, pero se cree que el uso de sistemas donadores de nitrógeno (como las bases) previenen la degradación de Cu<sup>I</sup>. Se ha visto que el uso de DIPEA (N,N-Diisopropiletilamina) y 2,6-lutidina dan buenos resultados (7).

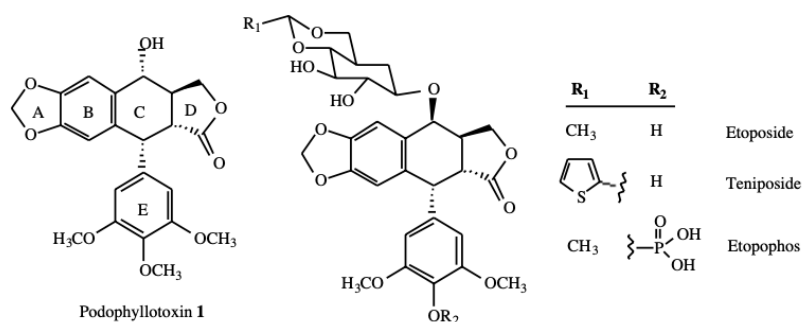
#### 2.4. Qué es la podofilotoxina

La podofilotoxina es el compuesto más abundante aislado de la podofilina, la cual es una resina sacada del extracto alcohólico de los rizomas y las raíces de diferentes especies de plantas, y en especial de las del género *Podophyllum*, principalmente de *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodi* y *Podophyllum hexandrum* (8)(9).

Se trata de un compuesto procedente de la familia de los lignanos (10), unos compuestos fenólicos. Los lignanos se originan como metabolitos secundarios por la vía del ácido sikímico (8), y se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal en un gran número de especies. Estos presentan importantes propiedades antineoplásicas y antivirales. Dichos compuestos están formados por unión de dos unidades de fenilpropano, las cuales dependiendo de la posición de estas dos entidades podemos distinguir diferentes grupos: lignanos simples, ciclolignanos, neolignanos y lignanoides mezclados; pero serán los ciclolignanos los que presentan numerosos estudios enfocados en quimioterapia para el cáncer. (10)

Además de la podofilotoxina, existen tres derivados semisintéticos, que son el etopósido, el tenipósido y el etopofos, que han mejorado la actividad farmacológica y que se encuentran numerosos protocolos de quimioterapia sobre distintos tipos de cáncer.

La principal desventaja de estos compuestos es que presentan una citotoxicidad elevada en células normales, por lo que se producen numerosos efectos secundarios debidos a la falta de selectividad.



**Figura 3.** Podofilotoxina, etopósido, tenipósido and etopofos. (10)

## 2.5. Actividad anticancerígena de la podofilotoxina y sus derivados.

Los lignanos presentan una amplia variedad de actividades biológicas, y su descubrimiento es algo que se remonta a la antigüedad ya que en ella la gente utilizaba diferentes extractos de plantas como remedios para distintas patologías en las diferentes culturas existentes. Entre otras, la podofilotoxina aparece en varias farmacopeas como agente antiviral, en el tratamiento del *Condyloma acuminatu* (10)(11) producido por el virus del Papiloma HPV y otras verrugas venéreas siendo muy eficaz, y muchos otros virus tales como el virus herpes simple tipo I, sarampión, citomegalovirus, etc., además es útil como tratamiento para la psoriasis vulgar, para la artritis reumatoide, y muchas más patologías, pero en este trabajo vamos a centrarnos solo en su actividad anticancerígena, entre las que destacan su aplicación en tumor de Wilms, diferentes tipos de tumores genitales, distintos linfomas (10)(12) (como el no Hodking) y leucemias, cáncer colorrectal, pulmonar (13), entre muchas.

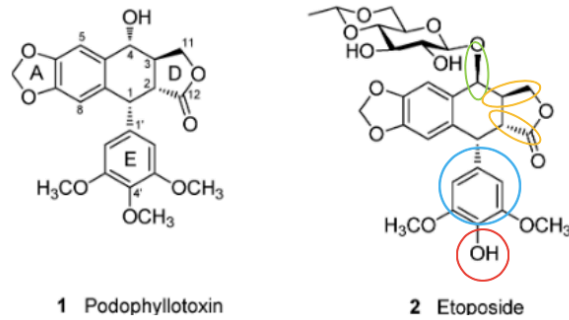
Además, para lograr una eficacia terapéutica mayor, se está llevando a cabo la aplicación de terapias combinadas, un ejemplo de esto es el caso de la combinación de la podofilotoxina con el cis-platino para una eficacia superior sobre el tratamiento de neuroblastomas (10).

En lo que respecta a su uso como antineoplásico en la actualidad, los derivados de podofilotoxina, presentan grandes avances terapéuticos, como es el caso del etopósido que tiene facilidad para administrarse y una actividad frente a un gran número de tumores; este es utilizado en múltiples terapias combinadas, como por ejemplo con prednimustina o ifosfamida para linfoma no Hodgkin; además, muchos oncólogos lo utilizan como complemento al autotransplante de médula. Otro de sus derivados, como es el tenipósido, presenta todavía una actividad más potente.

El mecanismo de acción por el cual la podofilotoxina presenta actividad antitumoral consiste en que produce un bloqueo de la división celular; esta se une a la tubulina interrumpiendo el ensamblaje de microtúbulos (10) y la regeneración del ADN (14) después de su replicación. Mientras que, se comprobó que sus derivados sintéticos presentaban propiedades anticancerígenas a través de diferente mecanismo de acción, en este caso, actúan como inhibidores irreversibles de la topoisomerasa II del ADN, formando un complejo enzimático que induce la ruptura del ADN. El resultado de este proceso es que las células que estaban en división detienen su proceso produciéndose así la muerte celular. (10)

Para que estos compuestos presenten actividad antineoplásica, según estudios de la relación estructura-actividad (SAR), tienen que presentar ciertos requerimientos: 4'-desmetilación, 4-epimerización, anillo trans en la lactona D, con configuración  $2\alpha$  y  $3\beta$ , y libre rotación del anillo E; esto es esencial para que estos compuestos mantengan la actividad de inhibidores de la topoisomerasa II. (15)(16)





**Figura 4.** Requerimientos necesarios para el mantenimiento de la actividad anticancerígena.

Uno de los principales problemas de estos compuestos, como ya se ha comentado anteriormente, es su falta de selectividad, ya que afecta tanto a las células cancerígenas como a las células sanas; atacan a todas las células sin distinciones, especialmente a aquellas que se encuentran en división, esas que presentan una tasa de renovación muy elevada, provocando numerosos efectos adversos, limitando así su utilidad clínica. Debido a esta citotoxicidad, algunos de estos compuestos se suelen administrar junto con factores de crecimiento para prevenir la inducción de apoptosis (10).

Por esto, existen numerosos estudios que buscan mediante la síntesis de nuevos derivados, una mayor selectividad de la actividad citotóxica para evitar este gran inconveniente que presentan estos compuestos.

## 2.6. Metabolismo de las células cancerosas

Para poder desarrollar una buena terapia contra el cáncer es necesario conocer como se comportan las células cancerígenas.

Una de las cosas que se ha visto de estas células es que presentan el metabolismo de la glucosa alterado, por lo que es una buena estrategia a seguir para el estudio de agentes citotóxicos.

La glucosa es la principal fuente de energía metabólica, generando ATP a través de la glucólisis (sobretudo en condiciones de anaerobiosis) y la fosforilación oxidativa. En las células cancerosas, dado que presentan un metabolismo acelerado, la absorción y el consumo de esta es mayor que en células normales(17)(18)(19); esto es porque a medida que tienen lugar la división y crecimiento celular, aumenta la demanda de glucosa, y en las células cancerígenas no es diferente, pero hay que tener en cuenta que en estas se produce un crecimiento descontrolado. Además, se ha visto que su metabolismo en lugar de realizarlo por el ciclo ATC y fosforilación oxidativa lo realiza mediante vía fermentativa. Uno de los motivos por los que las células cancerosas utilizan estas vías es porque las rutas de señalización celular que son importantes para el crecimiento de estas células, además están implicadas en la regulación de las vías metabólicas; y dicha regulación facilita la incorporación de los diferentes nutrientes esenciales para la proliferación celular.

El transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática hacia el citosol es llevado a cabo por transportadores GLUT, y en general estos transportadores se encargan de regular el movimiento de la glucosa en los compartimentos intra y extracelulares. Los cuales se ha observado que, en células cancerígenas al presentar un mayor consumo de glucosa, estos transportadores también aumentan.

Se ha visto que el GLUT1 se encuentra sobreexpresado en numerosas neoplasias malignas sólidas y hematológicas (18), como linfoma de células B grandes, carcinomas colorrectales, cáncer de pulmón, sarcomas, etc.

Referente a esto, una buena terapia contra el cáncer sería la unión covalente de residuos de glucosa a la podofilotoxina, creando agentes citotóxicos que van a ser absorbidos en mayor parte por células cancerosas a través de GLUT, evitando así la actuación sobre células normales y sus consecuentes efectos secundarios indeseables. Para la síntesis o unión covalente de estos compuestos citotóxicos se va a utilizar la química click.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo final de este trabajo es ver como mediante el uso de la Química “click”, a través de reacciones de cicloadición 1,3-dipolar, se diseñan y sintetizan diferentes derivados de la podofilotoxina, los cuales van a presentar actividad anticancerígena.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Dado que este trabajo se trata de una revisión bibliográfica, para la realización del presente se han consultado diversas fuentes, se ha realizado una búsqueda en diferentes bases de datos con artículos científicos. Dichas bases de datos empleadas son “PubMed”, “SciELO”, “ScienceDirect”, “SpringerLink”, “ACS publications”, así como el buscador de internet “Google Scholar”. También se ha consultado la red social “ResearchGate”.

Para realizar las búsquedas, he empleado ciertas palabras clave o keywords, que son: química click (click chemistry), podofilotoxina (podophillotoxin), actividad anticancerígena (anticancer activity), cicloadición (cycloaddition), descubrimiento de fármacos (drug discovery).

La búsqueda bibliográfica se realizó a través de las fuentes nombradas anteriormente durante los meses de noviembre y diciembre de 2019.

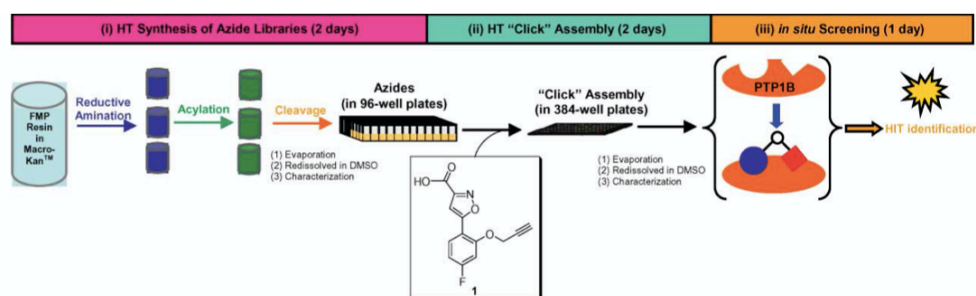
### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La química click es una herramienta que desde que se produjo su descubrimiento se ha ido utilizando para una amplia variedad de aplicaciones, la mayoría de ellas para el ámbito farmacéutico. Pero en este trabajo sobre todo nos centraremos en el uso de la química click para el diseño de fármacos derivados de la podofilotoxina, unos compuestos con actividad anticancerígena.

En primer lugar, para el diseño de estos derivados o de cualquier fármaco, es necesario su previo descubrimiento. Para ello se lleva a cabo un gran cribado en el que se expone todo un abanico de moléculas dianas intra y extracelulares, en el cual se conseguirá buscar nuevas estructuras químicas que presenten analogías con la molécula endógena que interacciona con la diana escogida previamente. Existen tres estrategias para el descubrimiento de “leads”, los cuales pueden o no ser sintetizados mediante química click:

- *El cribado de alto rendimiento o High-Throughput Screening (HTS)* es una técnica muy conocida para el descubrimiento de fármacos, la cual se basa en hacer un cribado o análisis de grandes bases de datos de compuestos químicos frente a una diana terapéutica seleccionada mediante el uso de automatización, ensayos en miniatura y análisis de datos a gran escala.

Cada vez existen más herramientas que hacen llevar a cabo un mejor cribado como son: cribado enfocado en dianas bien conectadas, cribado virtual y acceso a grandes fuentes químicas externas, diseños basados en estructuras y ensayos celulares (20). Mediante el empleo de la química click, se pueden elaborar dichos catálogos de moléculas. Para ello solo se necesita un resto azida y un alquino terminal y por cicloadición de Huisgen van a formarse diferentes tipos de moléculas. Para añadir los restos de azida se encontró una estrategia en fase sólida muy eficiente en la que usando una resina PL-FMP y mediante una reacción de aminación y posterior acilación, se obtenían gran número de azidas de elevada calidad y en tan solo 2 o 3 días (21).



**Figura 4.** Estrategia de síntesis de alto rendimiento de una colección de azidas mediante el uso de la resina PL-FMP a través del ejemplo del PTP1B y su uso en química click

Después de tener la diana elegida y las moléculas que deseamos para actuar sobre ella, la química click también podrá ser utilizada para unirlos y crear así diferentes inhibidores o "huellas dactilares" únicas de enzimas, teniendo de esta forma una estrategia magnífica para el descubrimiento de nuevos fármacos. (20)

- *Descubrimiento de fármacos basado en fragmentos (FBDD).* En los últimos años, se ha convertido en la principal alternativa al cribado de alto rendimiento, llegando a desplazarla (22)(23), ya que se espera que la selección inicial de las bibliotecas de fragmentos muestree de forma más eficiente que los enfoques tradicionales. (20)

Una reciente revisión sobre FBDD se destacan ciertos conceptos:

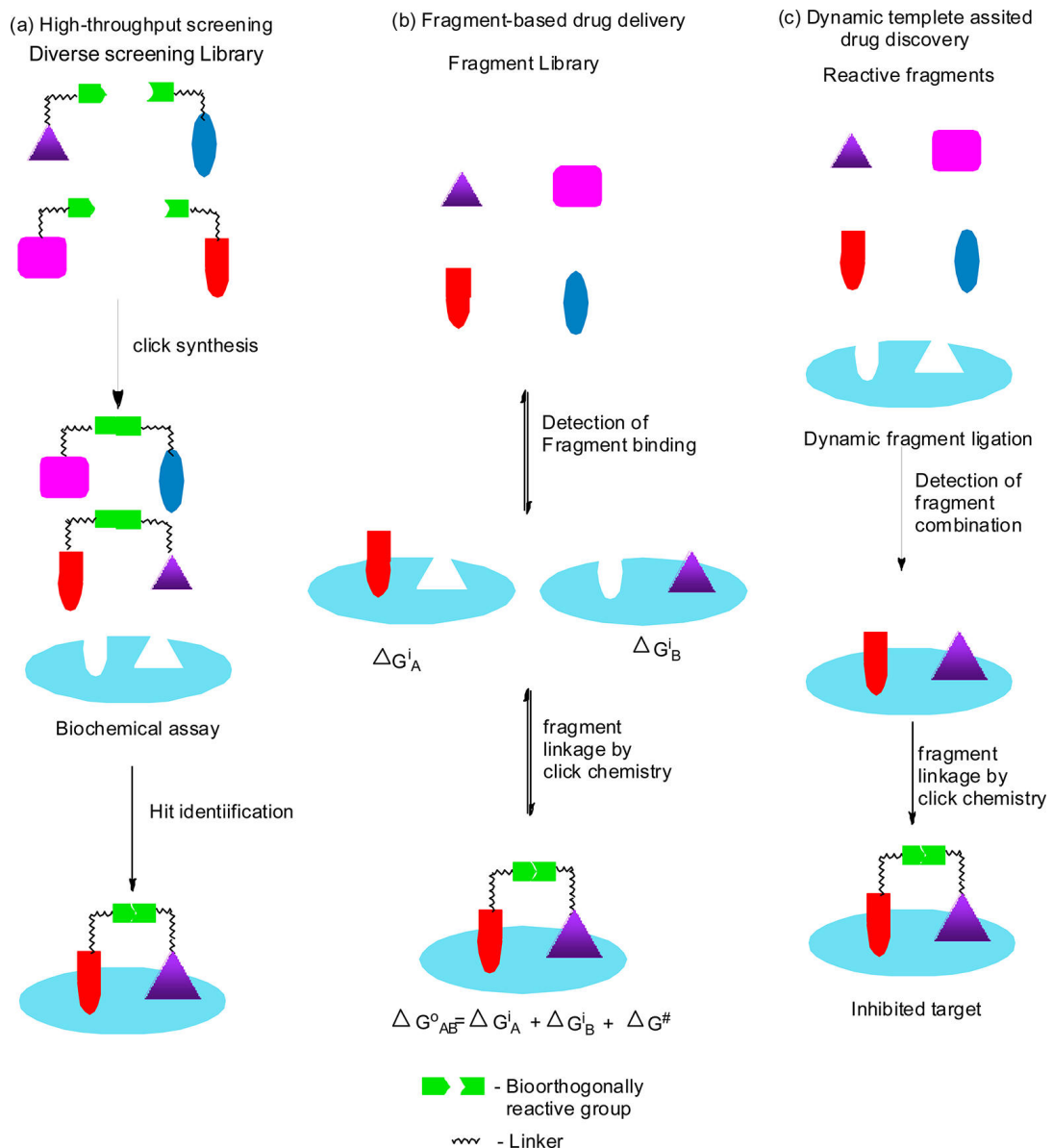
- Las propiedades físicas inapropiadas son el principal problema para fármacos de moléculas de pequeño tamaño.
- Los fragmentos forman interacciones de alta calidad, aunque de potencia débil.
- La eficiencia del ligando es una forma de juzgar si los diferentes tamaños de moléculas son óptimos.
- Los catálogos de fragmentos que se requieren para muestrear compuestos son relativamente pequeños en comparación con la búsqueda de moléculas completas.

Esta estrategia se basa en que la energía libre de la unión de un ligando a su receptor resulta de la unión de sus componentes moleculares, es decir que pequeños fragmentos moleculares pueden sumarse para producir un ligando de alta afinidad. Para la unión de estos fragmentos, que como se ha comentado forman interacciones de alta calidad, pero de baja potencia de unión con las proteínas, se va a usar la química click, añadiendo a una parte de los fragmentos el alquino terminal, y en la otra parte restos azida.

- **Técnicas dinámicas de fragmentos asistidas por plantillas.** Los principales retos cuando se buscan fármacos mediante el uso de fragmentos son la identificación de fragmentos de baja afinidad y la unión eficiente de los fragmentos identificados y que el resultado sea biológicamente activo. (24)

La solución para esto pasa por usar una técnica dinámica y asistida por una plantilla (o modelo), una proteína diana utilizada para seleccionar y/o ensamblar los fragmentos óptimos. Esta técnica presenta una reacción química común, reversible o irreversible, enzimática o no enzimática, que va a detectar la mejor combinación de fragmentos; los cuales pueden terminar uniéndose mediante química click, gracias a la cicloadición 1,3-dipolar o mediante otras estrategias químicas. (20)

Los últimos dos métodos presentan características comunes, y es que reúnen ciertos patrones de reconocimiento molecular utilizados para una mejor selección de los fragmentos adecuados "ex vivo", que más tarde formaran ligandos gracias al autoensamblaje *in situ*. Además, estos ligandos pueden volver a sintetizarse y ampliarse para estudios biológicos posteriores.



**Figura 5.** Esquema de los tres métodos basados en la química click a seguir para el descubrimiento de fármacos. (20)

En los últimos años, se han producido ciertos avances, y considerando también las ideas de Rideout, se está intentando crear un ligando final, ya sea *in vivo* o *in situ*, cercano a su diana biológica; esto es que los distintos fragmentos se van a unir en el sitio de acción dentro de la enzima, y ya una vez se encuentren unidos a ella se va a producir el ligando final. Con esto lo que se pretende es conservar las propiedades farmacológicas, y también puede ser un beneficio potencial de evasión de mecanismos de resistencia, o incluso en antineoplásicos ampliar la selectividad entre células cancerosas y células normales.

Una vez tenemos el diseño de las moléculas que queremos obtener llega la hora de sintetizarlas. La síntesis de fármacos muchas veces es un proceso muy largo y costoso, además de no ser muy rentable ya que siempre se anda buscando distintas maneras de síntesis para llegar de una forma rápida y eficiente; para esto, la química click es un avance enorme en la síntesis de ciertos fármacos, sobre todo cuando se trata de moléculas grandes, como es por ejemplo el caso de los derivados glucosilados de la podofilotoxina.

Dado que la podofilotoxina, y los otros derivados semisintéticos mencionados anteriormente (como el etopósido) presentan potente actividad antitumoral, pero también diversos inconvenientes como los numerosos efectos secundarios, la posible resistencia a medicamentos, la supresión mieloide (15), etc., los investigadores se han centrado en el diseño de derivados de estos compuestos que sean capaces de mejorar estos problemas. Existen diferentes compuestos derivados de la podofilotoxina que presentan actividad antineoplásica. El primer paso para la síntesis de estos derivados es conseguir la podofilotoxina. A continuación, dependiendo del mecanismo de acción que se le quiera dar a nuestro compuesto, seguiremos un esquema u otro. Si queremos conservar el mecanismo de inhibición de la polimerización de la tubulina, será importante conservar la estereoquímica ( $\alpha$ ) del carbono en posición 4 y el grupo metoxilo del carbono 4'; en cambio, si se quiere cambiar a una inhibición de la topoisomerasa II, hay que realizar una estereotransformación de  $\alpha$  a  $\beta$  del C4, y una 4'-O-desmetilación.

a) Obtención de la podofilotoxina:

Para sintetizar estos nuevos fármacos, se toma como punto de partida la podofilotoxina, y a partir de esta, mediante sucesivas reacciones se va a llegar a los compuestos que deseamos.

Como el primer compuesto que se requiere es la podofilotoxina, es necesario realizar su extracción.

La podofilotoxina como ya se ha mencionado antes es un compuesto aislado de la podofilina, una resina que se saca del extracto alcohólico de los rizomas y raíces de varias especies del género *Podophyllum* (8). Para la obtención de la podofilotoxina se parte de la podofilina comercial, la cual se disuelve en acetato de etilo ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ ) a  $75^\circ\text{C}$ , y una vez disuelto se filtra por gravedad en caliente, y a continuación se hace una extracción ácido-base con una disolución de bicarbonato sódico al 1%, cuyo disolvente se evapora en un rotavapor, obteniéndose un sólido impuro que se va a recrystalizar en benceno caliente obteniéndose la podofilotoxina. (8)(25)



Esquema 1. Ruta de obtención de la podofilotoxina. (8)

b) Obtención de azidas derivadas de la podofilotoxina:

Si se van a formar compuestos con actividad antimicrotubular, una vez obtenida la podofilotoxina, se procede a una inversión del grupo hidroxilo en posición 4, y a una simultánea desmetilación de 4' mediante adición de  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{NaI}$  en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 5h, obteniéndose la 4'-O-desmetil-epipodofilotoxina. (26)(27) A continuación, mediante TFA y  $\text{NaN}_3$  se obtiene 4 $\beta$ -azido-4'-O-desmetil-epipodofilotoxina.

En cambio, los compuestos inhibitorios de la topoisomerasa II, partiendo directamente de esta se les añadirá TFA y  $\text{NaN}_3$  para obtener la azida.

Con estas azidas, mediante la cicloadición de Huisgen con la presencia de alquinos terminales, y utilizando  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y ácido ascórbico, en  $\text{tBuOH} : \text{H}_2\text{O} (1:2)$ , se puede formar compuestos derivados de la podofilotoxina con mayor potencia y actividad citotóxica, que esta, y menos efectos adversos. (28)

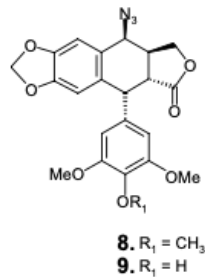
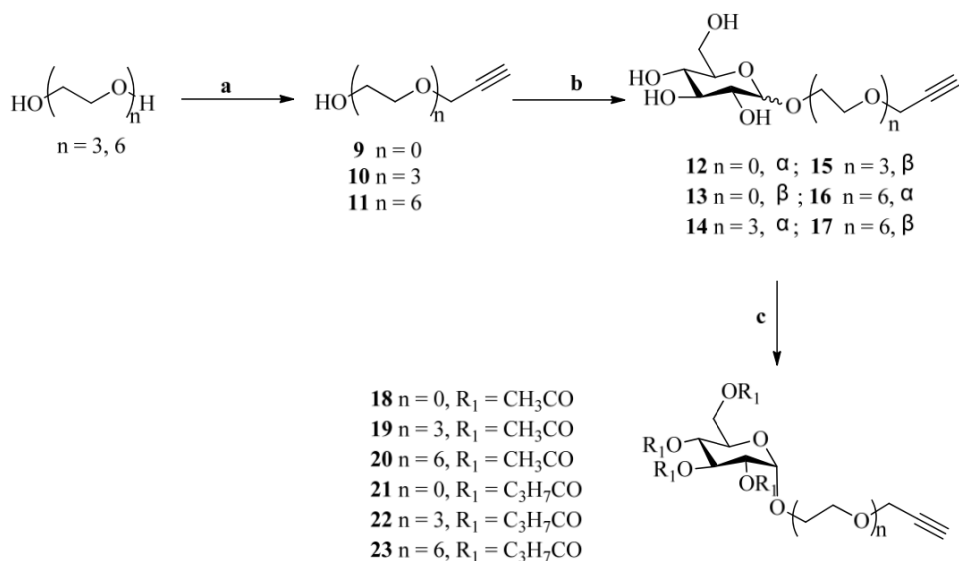


Figura 6. Molécula obtenida a partir de la podofilotoxina tras la adición de TFA y  $\text{NaN}_3$ .

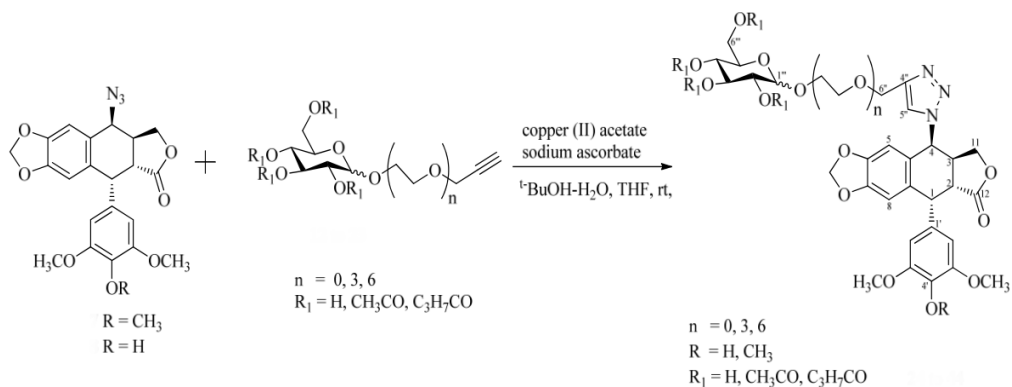
c) Obtención de los alquinos terminales:

Por otro lado, para la formación de moléculas unidas a alquinos terminales, existen ciertos reactivos con los que podemos ser capaces de obtener estos compuestos. El bromuro de propargilo en reacción con dioles, forma excelentes alquinos terminales. Un ejemplo de ello es la formación de alquinos terminales glucosilados, los cuales mediante dicha reacción y una glucosilación de Fisher se formarían estos compuestos.



**Esquema 2.** Esquema de formación de alquinos terminales glucosilados. Reactivos y condiciones de la reacción: **(a)** bromuro de propargilo, hidruro de sodio, THF y reflujo; **(b)** cat. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sílice, D-glucosa; **(c)** anhídrido acético o anhídrido n-butírico, piridina, 0°C-rt. (9)

- d) Reacción click para la síntesis de los distintos derivados y su actividad biológica:  
 Algunos ejemplos de los diferentes compuestos derivados de la podofilotoxina sintetizados mediante química click son:
- **1,2,3-triazol-glucoderivados:** para la formación de estos compuestos, se parte del compuesto **8** o **9** (figura 6), el cual presenta una azida que, mediante química click, y gracias a la presencia de un azúcar (D-glucosa, pentaacetato de β-D-glucopiranos, pentaacetato de β-D-galactosa, etc.) unido a un alquino terminal, va a formar los diferentes derivados glucosilados.

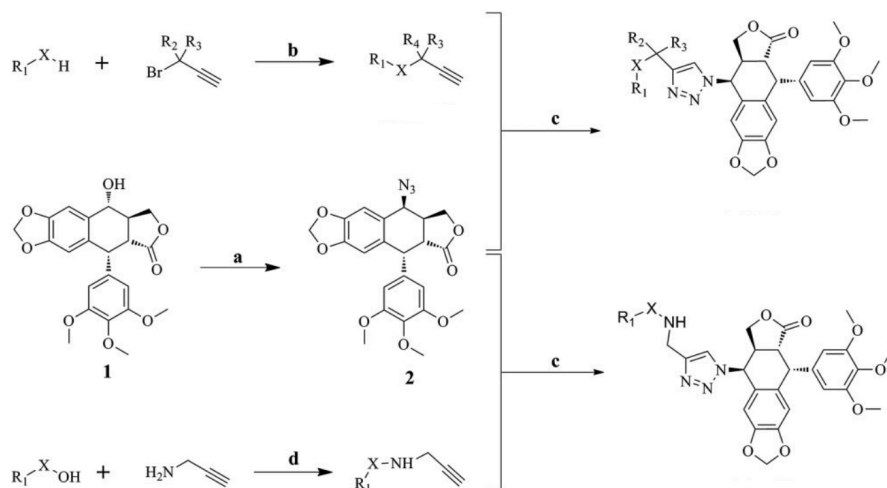


**Esquema 3.** Estrategia de química click para la síntesis de conjugados de glucosa 4β-triazoles-podofilotoxina. (9)

La introducción de una fracción glucosídica en β en el carbono de la posición 4, convierte a los compuestos en inhibidores de la topoisomerasa II, cambiando así el mecanismo de acción de la podofilotoxina. Estos forman un complejo ternario ácido nucleico-fármaco-enzima que bloquea la religación de la cadena de ADN, genera roturas y bloquea la progresión del ciclo celular en las fases S y G2. (25)(29)

GLUT1 está sobreexpresado en gran variedad de neoplasias malignas, como linfoma de células B grandes, carcinomas colorrectales, cáncer de pulmón o de páncreas, entre muchos, por lo que estos derivados glucosilados podrían resultar útiles a la hora de generar agentes citotóxicos preferentemente absorbidos por las células cancerosas a través de los transportadores GLUT, disminuyendo los efectos adversos derivados de la falta de selectividad de la podofilotoxina. (9)

- **4β-[(4-aryl)-1,2,3-triazol-1-il] podofilotoxina:** la síntesis de estos compuestos pasa también por una cicloadición 1,3-dipolar, pero en este caso, los alquinos terminales presentan unidos sustituyentes aromáticos.



**Esquema 4.** Estrategia química de la síntesis de 4β-[(4-aryl)-1,2,3-triazol-1-il] podofilotoxina. Reactivos y condiciones de reacción: **(a)** NaN<sub>3</sub>, TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24h; **(b)** KOH, NaI, acetona, 25°C, 8 h; **(c)** CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y ácido ascórbico, tBuOH: H<sub>2</sub>O(1:2); **(d)** 2-propinilamina, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 12h. (30)

Se ha visto que estos compuestos presentan una actividad antiproliferativa superior a la del Etopósido. Algunos de los compuestos más representativos dentro de estos derivados son los compuestos **10**, **11**, **12** y **13** (tabla 1), los cuales se ha visto que estimulan la parada del ciclo celular de las células HepG2 en fase G2/M dependientes de la concentración, potenciándose así la actividad antineoplásica debido a la apoptosis que se produce en dichas células.

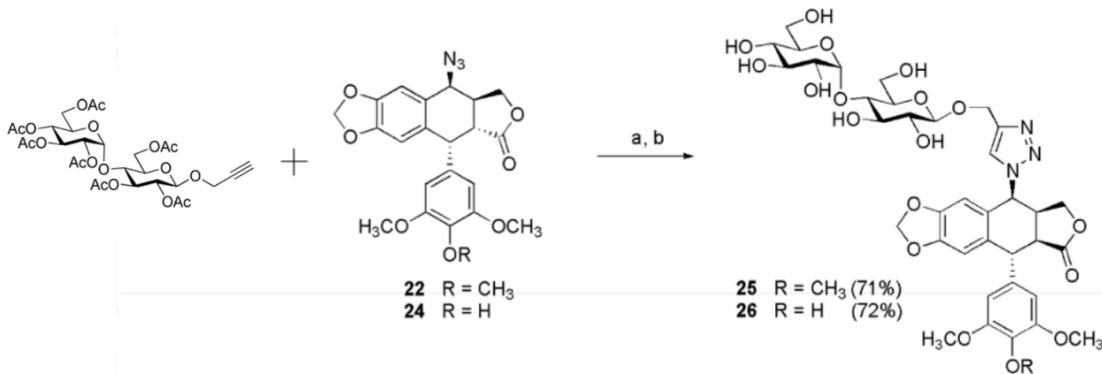
Compounds	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
10	O		H	H
11	O		H	H
12	S		H	H
13	S		H	H

**Tabla 1.** Ejemplos de compuestos 4β-[(4-aryl)-1,2,3-triazol-1-il] podofilotoxina.



- **Picropodofilotoxina y derivados:** estos compuestos parten de una podofilotoxina modificada, ya que presenta una estereotransformación en la lactona, pasando a ser una *cis*- $\gamma$ -lactona. Esta modificación hace que se bloquee la actividad del receptor de IGF-1R, el cual presenta un papel fundamental en la transformación, crecimiento y supervivencia de las células malignas. Además, se ha visto que disminuye la pAkt y la pErk1/2, induce la apoptosis en células tumorales cultivadas positivas para IGF-1R y produce una regresión tumoral completa en ratones xenoinjertados y aloinjertados. (31)

Estos compuestos pueden incorporar residuos glucídicos, disminuyendo así los efectos secundarios y mejorando su eficacia, ya que como ya se ha mencionado anteriormente las células cancerosas absorben más glucosa que las normales. Además, estos compuestos presentan una LD50 > 500mg/kg en roedores, por lo que son unos prometedores compuestos con actividad antitumoral. El método para la incorporación de estos residuos es exactamente igual, mediante la cicloadición de Huisgen con alquinos terminales glucosilados.



**Esquema 5.** Síntesis de derivados de picropodofilotoxina. Reactivos y condiciones de la reacción: (a) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y ácido ascórbico, tBuOH: H<sub>2</sub>O(1:2); (b) CH<sub>3</sub>ONa, CH<sub>3</sub>OH, rt, 24h.

## 6. CONCLUSIONES

- ⇒ La química click es una herramienta excelente, dado que permite obtener una gran cantidad de moléculas mediante la unión de pequeños fragmentos químicos y de fácil obtención, consiguiendo resultados muy eficaces.
- ⇒ La cicloadición 1,3-dipolar o de Huisgen, catalizada por Cu<sup>I</sup> es la reacción mas representativa dentro de la química click, ya que se le ha encontrado uso en muchos campos dentro de la ciencia, especialmente en el ámbito farmacéutico.
- ⇒ En el ámbito farmacéutico, puede utilizarse en diversas etapas dentro del desarrollo de un nuevo fármaco, ya que sus aplicaciones van desde el propio diseño de nuevas moléculas hasta su síntesis química.
- ⇒ Cuando se trata de la síntesis de fármacos, se busca disminuir el tiempo de reacción, así como reducir costes, y la química click es una excelente herramienta para conseguirlo.

- ⇒ La podofilotoxina y sus diferentes derivados presentan una potente actividad antitumoral, la cual está cobrando mucha importancia en los últimos tiempos ya que estos compuestos presentan prometedoras características.
- ⇒ La química click es una herramienta muy útil en el desarrollo de los diferentes derivados de la podofilotoxina, los cuales van a presentar modificaciones con respecto a la original mejorando así los efectos secundarios y demás inconvenientes que presenta.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed*. 2001;40(11):2004–21.
2. Díaz DD, Finn MG, Sharpless KB, Fokin VV, Hawker CJ. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos: I: Principales aspectos sintéticos. *An Real Soc Esp Quím*. 2008;(3):173–80.
3. Kolb HC, Sharpless KB. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today*. 2003 Dec;8(24):1128–37.
4. Aragão-Leoneti V, Campo VL, Gomes AS, Field RA, Carvalho I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. *Tetrahedron*. 2010 Dec;66(49):9475–92.
5. Hein CD, Liu X-M, Wang D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm Res*. 2008 Oct;25(10):2216–30.
6. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002 Jul 15;41(14):2596–9.
7. Bock VD, Hiemstra H, van Maarseveen JH. CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur J Org Chem*. 2006 Jan;2006(1):51–68.
8. Carolina S-D, Andrés A-R, Alí B, Pablo C-M. Síntesis de derivados nitrogenados de la podofilotoxina. :5.
9. Zi C-T, Xu F-Q, Li G-T, Li Y, Ding Z-T, Zhou J, et al. Synthesis and Anticancer Activity of Glucosylated Podophyllotoxin Derivatives Linked via 4 $\beta$ -Triazole Rings. *Molecules*. 2013 Nov 13;18(11):13992–4012.
10. Gordaliza M, Castro M, Miguel del Corral J, San Feliciano A. Antitumor Properties of Podophyllotoxin and Related Compounds. *Curr Pharm Des*. 2000 Dec 1;6(18):1811–39.
11. Xu H, Lv M, Tian X. A Review on Hemisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure-Activity Relationship of Podophyllotoxins: 2003- 2007. *Curr Med Chem*. 2009 Jan 1;16(3):327–49.
12. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents<sup>†</sup>. *Chem Rev*. 2009 Jul 8;109(7):3012–43.
13. Castro M. Synthesis, cytotoxicity and antiviral activity of podophyllotoxin analogues modified in the E-ring. *Eur J Med Chem*. 2003 Oct;38(10):899–911.

14. Muñoz Cendales DR, Cuca Suárez LE. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Rev Colomb Cancerol*. 2016 Jul;20(3):124–34.
15. Zi C-T, Liu Z-H, Li G-T, Li Y, Zhou J, Ding Z-T, et al. Design, Synthesis, and Cytotoxicity of Perbutyrylated Glycosides of 4 $\beta$ -Triazolopodophyllotoxin Derivatives. *Molecules*. 2015 Feb 16;20(2):3255–80.
16. Lv M, Xu H. Recent Advances in Semisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure-Activity Relationship of Podophyllotoxins: An Update (2008-2010). *Mini-Rev Med Chem*. 2011 Sep 1;11(10):901–9.
17. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 2005 Mar;202(3):654–62.
18. Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism: *Curr Opin Oncol*. 2012 Nov;24(6):650–4.
19. Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res*. 2002;35(1):9–26.
20. Thirumurugan P, Matosiuk D, Jozwiak K. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical–Biology Applications. *Chem Rev*. 2013 Jul 10;113(7):4905–79.
21. Srinivasan R, Tan LP, Wu H, Yang P-Y, Kalesh KA, Yao SQ. High-throughput synthesis of azide libraries suitable for direct “click” chemistry and in situ screening. *Org Biomol Chem*. 2009;7(9):1821.
22. Congreve M, Chessari G, Tisi D, Woodhead AJ. Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery. *J Med Chem*. 2008 Jul 1;51(13):3661–80.
23. Mondal M, Unver MY, Pal A, Bakker M, Berrier SP, Hirsch AKH. Fragment-Based Drug Design Facilitated by Protein-Templated Click Chemistry: Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin. *Chem - Eur J*. 2016 Oct 10;22(42):14826–30.
24. Schmidt MF, Rademann J. Dynamic template-assisted strategies in fragment-based drug discovery. *Trends Biotechnol*. 2009 Sep;27(9):512–21.
25. Liu Y-Q, Tian J, Qian K, Zhao X-B, Morris-Natschke SL, Yang L, et al. Recent Progress on C-4-Modified Podophyllotoxin Analogs as Potent Antitumor Agents. *Med Res Rev*. 2015 Jan;35(1):1–62.
26. Reddy PB, Paul DV, Agrawal SK, Saxena AK, Kumar HMS, Qazi GN. Design, Synthesis, and Biological Testing of 4 $\beta$ -[(4-Substituted)-1,2,3-triazol-1-yl]podophyllotoxin Analogues as Antitumor Agents. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2008 Feb;341(2):126–31.
27. Kamal A, Laxman N, Ramesh G. Facile and efficient one-pot synthesis of 4 $\beta$ -arylamino-podophyllotoxins: synthesis of DNA topoisomerase II inhibitors (NPF and W-68). *Bioorg Med Chem Lett*. 2000 Sep;10(18):2059–62.
28. Bhat BA, Reddy PB, Agrawal SK, Saxena AK, Kumar HMS, Qazi GN. Studies on novel 4 $\beta$ -[(4-substituted)-1,2,3-triazol-1-yl] podophyllotoxins as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem*. 2008 Oct;43(10):2067–72.

29. Gordaliza M, García PA, Miguel del Corral JM, Castro MA, Gómez-Zurita MA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*. 2004 Sep;44(4):441–59.
30. Chen J, Ma L, Zhang R, Tang J, Lai H, Wang J, et al. Semi-Synthesis and Biological Evaluation of 1,2,3-Triazole-Based Podophyllotoxin Congeners as Potent Antitumor Agents Inducing Apoptosis in HepG2 Cells. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2012;345(12):945–56.
31. Zi C-T, Yang L, Gao W, Li Y, Zhou J, Ding Z-T, et al. Click Glycosylation for the Synthesis of 1,2,3-Triazole-Linked Picropodophyllotoxin Glycoconjugates and Their Anticancer Activity. *ChemistrySelect*. 2017;2(18):5038–44.