



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A  
DISTANCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MÁSTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
MÓDULO QUÍMICA ORGÁNICA**

**REACCIONES CLICK:**

**SÍNTESIS DE FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO  
DEL CÁNCER DE MAMA**



**Autor: Laura Cieza Villafañe**

**Tutora: María de los Ángeles Farrán Morales**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIO-ORGÁNICA  
Septiembre 2015**

### Abreviaturas utilizadas en este trabajo

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
AR	Receptor de la adenosina
ARN	Ácido ribonucleico
Arg	Arginina (aminoácido)
Asn	Asparagina (aminoácido)
Asp	Ácido aspártico (aminoácido)
BRCA1	Breast Cancer 1 (Genes humanos que producen proteínas supresoras de tumores)
BRCA2	Breast Cancer 2 (Genes humanos que producen proteínas supresoras de tumores)
CC	Click Chemistry (Química click)
CuAAC	Cicloadición azida-alqueno catalizada con Cu
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
ER	Estrogen Receptors (Receptores de estrógenos)
FBDD	Fragment Based Drug Discovery (Descubrimiento de fármacos basados en fragmentos)
FDA	Food and Drug Administration (Agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos y los medicamentos)
FdUMP	Fluorodeoxyuridine monophosphate (Monofosfato de 6-Fluorodesoxiuridina)
Gly	Glicina (aminoácido)
GPCR	G Protein Coupled Receptor (Receptor acoplado a la proteína G)

HER2	Human Epidermal growth factor Receptor (Receptores Humanos epidérmicos de crecimiento)
HTS	High Throughput Screening (Cribado de alto rendimiento)
HU	Hidroxiurea
MTIC	5-(-3-metiltriacen-1-il)imidazol-4-carboxamida
MS	Espectrometría de masas
NIPAM	N-isopropilacrilamida
PAMAM	Poli-amidoamina
PDMA	Poli(N,N-dimetilacrilamida)
PEG	Polietilenglicol
PPI	Polipropilenimina
PR	Progesterone Receptors (Receptores de progesterona)
PTM	Post-Traslational Modification (Modificación post-traslacional)
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase (Tirosina fosfatasa)
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Transfer (Cadena de transferencia reversible adición-fragmentación)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TIMP	Ácido tioinosínico
TS	Timidilato sintasa
UTP	Uridine Triphosphate (Trifosfato de uridina)
UV	Ultravioleta
XAC	Xantina Amina Congénere

## Índice

1.	Introducción a los fármacos para el tratamiento de cáncer de mama .....	6
1.1.	Clasificación fármacos .....	9
1.1.1.	Antimetabolitos .....	9
1.1.2.	Antibióticos .....	10
1.1.3.	Agentes alquilantes .....	11
1.1.4.	Inhibidores de la topoisomerasas ii .....	12
1.1.5.	Inhibidores de la mitosis .....	13
1.1.6.	Corticoesteroides .....	14
1.1.7.	Fármacos para terapias dirigidas .....	15
1.2.	Mecanismos de acción .....	19
1.2.1.	Antimetabolitos .....	19
1.2.2.	Antibióticos .....	21
1.2.3.	Agentes alquilantes .....	21
1.2.4.	Inhibidores de la topoisomerasa II .....	22
1.2.5.	Inhibidores de la mitosis .....	22
1.2.6.	Corticoesteroides .....	22
1.2.7.	Fármacos para terapias dirigidas .....	23
2.	Reacciones click: mecanismo y aplicaciones en química terapéutica .....	26
2.1.	Mecanismo .....	26
2.2.	Aplicaciones en química terapéutica .....	30
2.2.1.	Inhibidores de enzimas .....	31
2.2.2.	Química click in situ .....	33
2.2.3.	Otros ejemplos .....	33
3.	Reacciones click: fármacos para el cáncer de mama .....	39
3.1.	Síntesis .....	39

3.1.1. Inhibidores de la tirosina quinasa.....	39
3.1.2. Antimetabolitos.....	40
3.1.3. Agentes antiproliferativos.....	41
3.1.4. Inhibidores de la mitosis.....	42
3.1.5. Agentes intercalantes.....	45
3.2. Sistemas de administración de fármacos (drug delivery) .....	46
3.2.1. Liposomas.....	48
3.2.2. Micelas poliméricas.....	51
3.2.3. Dendrímeros .....	52
3.2.4. Aplicaciones en la terapia del cancer de mama .....	57
Conclusiones .....	62
Referencias bibliográficas.....	63

## 1. INTRODUCCIÓN A LOS FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea, que comprende numerosas entidades, no solo tiene diferentes características biológicas sino también distinto comportamiento clínico. Se trata de la enfermedad mortal más frecuente entre las mujeres, tanto en el mundo desarrollado como en el subdesarrollado. Cada año se detectan 1.4 millones de nuevos casos de los cuales un tercio no son curables. Sin embargo, debido a que las mujeres cada vez toman más precauciones en cuanto a revisiones preventivas, sobre todo en casos con antecedentes familiares, a la mejora de las técnicas de detección temprana y los tratamientos aplicados contra la enfermedad, esta tasa de mortalidad ha disminuido en los últimos años. [1]

Entre el 5-10% de todos los cánceres de mama femeninos están relacionados con alteraciones hereditarias. La mayoría de ellos están vinculados con dos genes: BRCA1 y BRCA2, representando el 10% de todos los casos heredados y según el Instituto Nacional del Cáncer las mujeres que poseen estas anomalías tienen un 25-28% de riesgo de padecer cáncer de mama. BRCA1 y BRCA2 son genes supresores de distintos tumores y que juegan un papel fundamental en la respuesta celular a través de la activación de procesos de reparación del ADN. [2]

La clasificación tradicional de la enfermedad se hace en base a las características biológicas: como tamaño del tumor, la implicación de los ganglios linfáticos, el grado histológico, la edad del paciente, los receptores de estrógenos (ER), los receptores de progesterona (PR), los receptores epidérmicos de crecimiento 2 (HER2) y la tolerancia del paciente al tratamiento. Sin embargo, la apariencia histológica no es suficiente ya que, tumores que presentan similares características clínicas y patológicas pueden tener diferente comportamiento. [3]

Estudios recientes se han centrado en la definición de las características biológicas de la enfermedad en función de la supervivencia del paciente basándose en patrones de la expresión genética [3], para hacer una clasificación más adecuada a la hora de poder aplicar el mejor tratamiento terapéutico a cada paciente. Estudios sobre la expresión genética que aplican análisis por microarray [4,5] han identificado distintas clases de tumores a nivel molecular basados en el análisis de

expresiones simultáneas de los genes. En función de este análisis a nivel molecular se distinguen dos grupos: ER-positivo y ER-negativo. Otro grupo de tumores son aquellos caracterizados por la expresión del oncogén HER2, los cuales también muestran niveles bajos de expresión ER y otros genes asociados con la expresión ER.

Aproximadamente el 75% de los cánceres de mama detectados son positivos en ER y/o PR.

- Luminal A: es el subtipo más común y representa entre 50 y 60% de todos los cánceres de mama. Se caracteriza por altos niveles de ER más bajos niveles de proliferación de genes relacionados. Los pacientes con cáncer tipo luminal A tienen un buen pronóstico.
- Luminal B: el porcentaje de tumores que son de este tipo está entre el 15 y el 20%, y tienen un fenotipo más agresivo, grado histológico mayor y peor pronóstico.
- HER2-positivo: HER2 es miembro de la familia de cuatro miembros de tirosina quinasas. El receptor HER2 es codificado por el gen HER2.
- Basal-like: representa del 8 al 37% de los tumores de cáncer de mama. Está asociado con altos grados histológicos, deficiente formación de túbulos y la presencia de zonas necróticas y fibróticas. Los análisis inmunohistoquímicos demuestran que este tipo de cáncer constituye aproximadamente el 75% de los cánceres de mama relacionados con la herencia genética, tipo BRCA1.
- Normal breast-like: no están muy caracterizados todavía y han sido agrupados en los subtipos con fibroadenomas. Expresan genes característicos del tejido adiposo presentando un diagnóstico intermedio entre cánceres tipo luminal y tipo basal-like. Por regla general no responde a tratamiento quimioterapéutico.

Actualmente existen cinco tratamientos estándar para combatir esta enfermedad y las consecuencias que puede acarrear. [6] Estos tratamientos son:

- Cirugía: muchos de los pacientes tienen que someterse a cirugía para eliminar el tumor de la mama.
- Radioterapia: tratamiento que utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que crezcan. La forma en que se administra la radioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando.
- Quimioterapia: se emplean fármacos para interrumpir el crecimiento de células cancerosas, mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación.

- Terapia hormonal: tratamiento que elimina hormonas o bloquea su acción y detiene el crecimiento de las células cancerosas. Algunas hormonas pueden causar que ciertos tipos de cáncer crezcan.
- Terapia dirigida: tipo de tratamiento en el que se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas sin dañar las células normales. Los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de la tirosina quinasa son dos tipos de terapias dirigidas utilizados en el tratamiento de cáncer de mama.

La elección de la terapia elegida o la combinación de dos o más terapias, así como de los fármacos seleccionados para los tratamientos dependen del tipo de cáncer, del estadio en el que se encuentre y de la respuesta clínica de cada paciente.

El método más empleado y por tanto el conocido como estándar, es la quimioterapia. Sin embargo los agentes quimioterapéuticos tienen ciertas limitaciones, como son, la falta de selectividad o especificidad hacia las células cancerosas. Esto provoca que estos fármacos produzcan una serie de efectos secundarios: cardiotoxicidad, neuropatías, neutropenia, fallo renal, náuseas, pérdida del cabello, etc. De ahí la necesidad que ha surgido de encontrar sistemas de administración de fármacos (drug delivery) que disminuyan o eliminen estos efectos secundarios e incrementen la efectividad de los fármacos. [6] Lo que se pretende es aumentar la selectividad de los fármacos hacia las células cancerosas, dejando a las células sanas intactas.



## 1.1. CLASIFICACIÓN FÁRMACOS

Los fármacos destinados a combatir el cáncer de mama se pueden clasificar en función de su:

- Mecanismo de acción.
- Estructura química.
- Relación con otros fármacos.

Atendiendo al mecanismo de acción, el cual es muy importante ya que nos informa de los posibles efectos secundarios, podemos clasificar los fármacos en los siguientes grupos, que serán expuestos a continuación.

### 1.1.1. Antimetabolitos

Los antimetabolitos [7,8.] son aquellas sustancias cuyo mecanismo de acción se basa en interferir con el crecimiento del ADN y del ARN al sustituir los elementos fundamentales de estas moléculas.

Como ejemplos de estos fármacos podemos encontrar (Tabla 1): [9]

- Clorafabina (Evoltra): nucleósido de purina.
- 5-fluorouracilo 5-FU (Carzonal, Efudix, Efurix): antimetabolito antineoplásico. Es análogo de la pirimidina y se trata de un profármaco. Su síntesis parte de una fluoropirimidina denominada, capecitabina [10], la cual, tras la acción de varias enzimas se convierte en 5-fluorouracilo.
- Metotrexato (Altrex, Ebetrex): antimetabolito antineoplásico con propiedades inmunosupresoras. Se trata de un compuesto similar al ácido fólico (Tabla 2).

Tabla 1. Fármacos antimetabolitos.

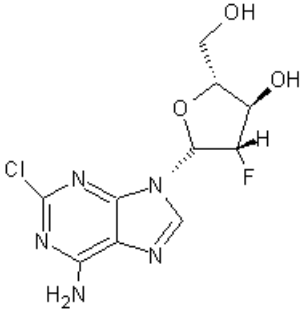
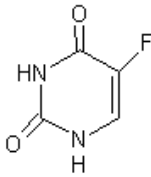
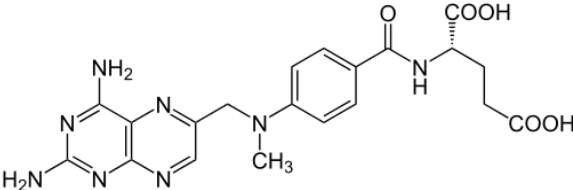
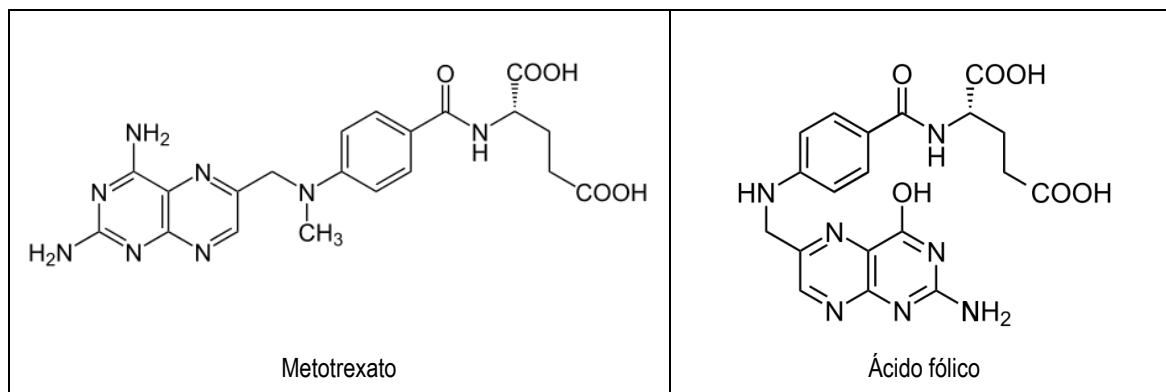
 <p style="text-align: center;">Clorafabina</p>	 <p style="text-align: center;">5-fluorouracilo (5-FU)</p>	 <p style="text-align: center;">Metotrexato</p>
--	---	---

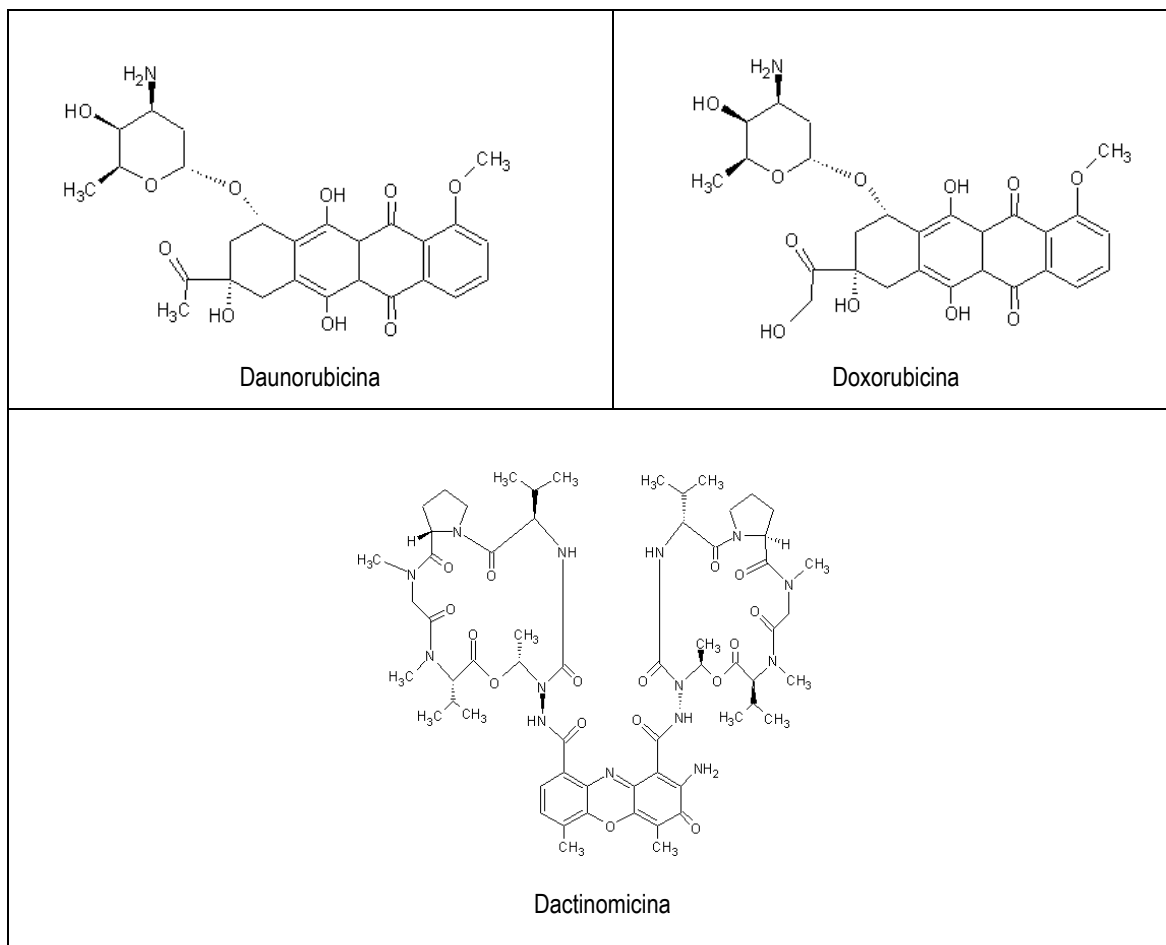
Tabla 2. Comparativo estructural: metotrexato – ácido fólico.



### 1.1.2. Antibióticos

Dentro del grupo de los antibióticos las antraciclinas son las más destacadas. Son antibióticos antineoplásicos producidos por hongos de la familia *Streptomyces*. Su estructura química se caracteriza por poseer un núcleo plano de antraquinona, unido a un aminoazúcar (Tabla 3). Las dos antraciclinas más utilizadas son la Daunorubicina (Cerubidin, Daunoblastin), utilizada casi exclusivamente para el tratamiento de la leucemia; y la Doxorubicina (Adriablastina, Rubex), utilizada en el tratamiento de varios tumores. [11] Uno de los efectos secundarios más acusados por la administración en altas dosis de antraciclinas es el daño cardíaco permanente. Otro fármaco que pertenece al grupo de los antibióticos es la Dactinomicina (Lyovac, Cosmogen). Este compuesto pertenece a la clase conocida como depsipéptidos cíclicos. Se trata de uno de los fármacos contra el cáncer más antiguos, y el primer antibiótico que presentó actividad antitumoral. [11]

Tabla 3. Fármacos antibióticos.



### 1.1.3. Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes se han usado desde los inicios del tratamiento del cáncer. Estos agentes actúan uniéndose covalentemente al ADN, o al N-7 de la guanina, haciendo que las hebras de ADN se rompan y afectando a la división celular con lo que eventualmente se produce la muerte celular. Debido a este daño en el ADN pueden provocar deterioros a largo plazo en la médula ósea. [11] En este tipo de fármacos podemos encontrar el grupo de las mostazas nitrogenadas (derivados de la 2-cloro-N-(2-cloroetil)-N-metiletan-1-amina o gas mostaza) y entre las más importantes se encuentran (Tabla 4):

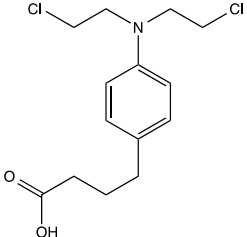
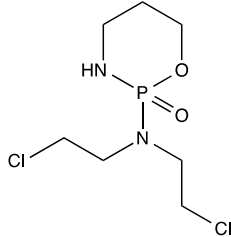
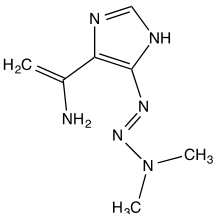
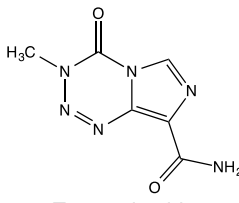
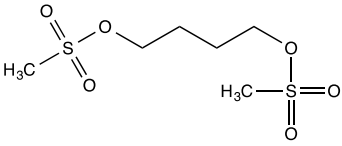
- Clorambucil (Celkeran): tiene dos grupos  $\beta$ -haloalquilo unidos por un átomo de nitrógeno.
- Clofosfamida (Cytosan, Sendoxan)

Otro grupo importante es el de las azinas, los siguientes compuestos son los más utilizados:

- Dicarbazina (DTIC, Dacantic, Detimedic): agente antineoplásico con actividad significativa contra los melanomas.
- Temozolomida: pertenece a los compuestos orgánicos conocidos como imidazotetracinas. Estos compuestos orgánicos contienen un anillo de imidazol unido a un anillo de tetracina. Se trata de un profármaco que no tiene actividad farmacológica hasta que es hidrolizado in vivo a 5-(-3-metilriacén-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC).

Por último, también se utilizan los alquil sulfonatos, como el Busulfán que es un agente alquilante bifuncional con un efecto selectivo inmunodepresivo.

Tabla 4. Fármacos que actúan como agentes alquilantes

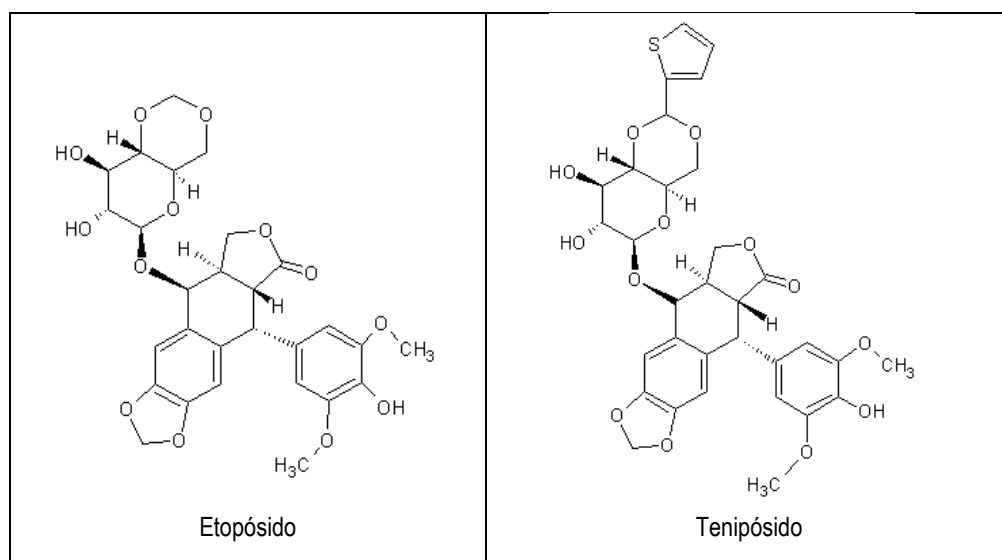
Derivados de las mostazas nitrogenadas	 <p>Cloramubicil</p>	 <p>Ciclofosfamida</p>
Azinas	 <p>Dicarbicina</p>	 <p>Temozolomida</p>
Alquil sulfonatos	 <p>Busulfán</p>	---

#### 1.1.4. Inhibidores de la Topoisomerasas II

Las topoisomerasas son enzimas que catalizan las reacciones de rotura del ADN. Las topoisomerasas II o girasas están implicadas en procesos de rotura de la doble hélice del ADN,

escisión de ADN superenrollado y en general procesos del metabolismo del ADN. [12] Entre los inhibidores de las Topoisomerasas II las más usadas como fármacos antitumorales son las antraciclinas antes mencionadas, como la Doxorubicina (1.1.2.) y el Etopósido (Eposin, Nexvep) [13] y el Tenipósido [14] (Tabla 5).

Tabla 5. Fármacos inhibidores de la topoisomerasa II.

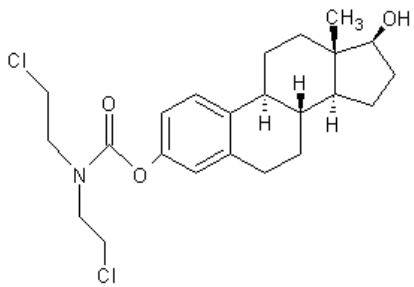
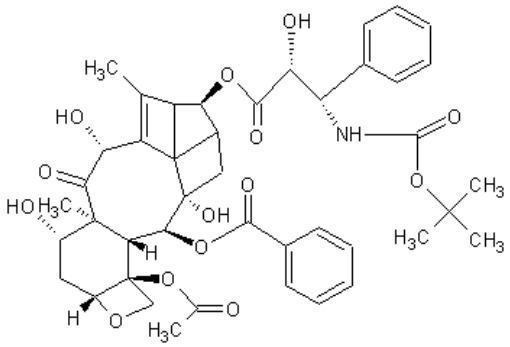
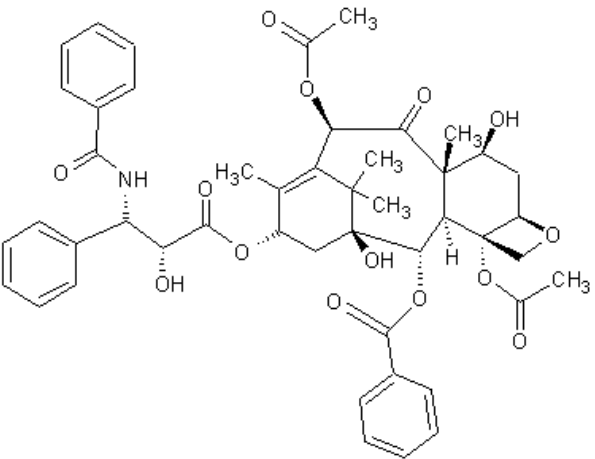


### 1.1.5. Inhibidores de la mitosis

Los inhibidores de la mitosis [15] con frecuencia son alcaloides de origen vegetal y otros compuestos derivados de productos naturales. Causan daños en los nervios periféricos, lo que puede ser un efecto secundario limitante de la dosis. Los más importantes son (Tabla 6):

- Estramustina (Estracyt): antineoplásico indicado para cuidados paliativos. Se trata de una combinación de estradiol con mostazas nitrogenadas.
- Taxanos: diterpenoides con una estructura basada ya sea en el esqueleto de taxano, o un derivado del mismo. El Docetaxel y el Paclitaxel se emplean en pacientes con cáncer de mama avanzado o con metástasis.

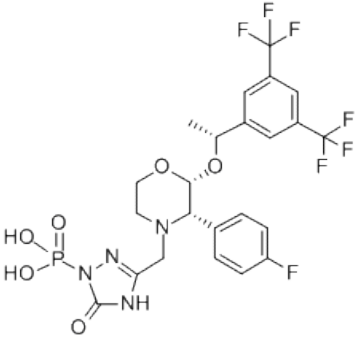
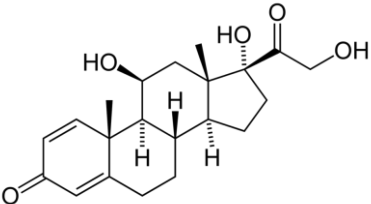
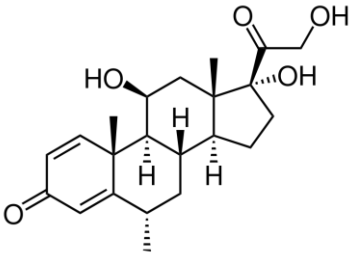
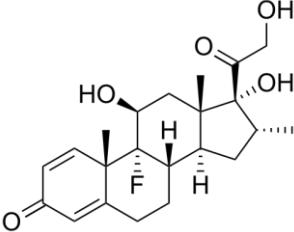
Tabla 6. Fármacos inhibidores de la mitosis.

 <p>The structure of Estramustina consists of a steroid nucleus (estrane) with a hydroxyl group at C-17 and a methyl group at C-13. At C-3, there is an ester linkage to a side chain: -COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>.</p> <p style="text-align: center;">Estramustina</p>	 <p>The structure of Docetaxel is a complex taxane diterpene. It features a tetracyclic core with multiple stereocenters, including methyl groups at C-10, C-13, and C-14, and hydroxyl groups at C-1, C-2, C-4, C-5, C-7, and C-10. It is substituted with a benzoyl group at C-13, a 2-phenylpropanoate ester at C-10, and a tert-butyl ester at C-4.</p> <p style="text-align: center;">Docetaxel</p>
 <p>The structure of Paclitaxel is a taxane diterpene with a tetracyclic core. It has methyl groups at C-10, C-13, and C-14, and hydroxyl groups at C-1, C-2, C-4, C-5, C-7, and C-10. It is substituted with a benzoyl group at C-13, a 2-phenylpropanoate ester at C-10, and two acetate esters at C-4 and C-10.</p> <p style="text-align: center;">Paclitaxel</p>	

### 1.1.6. Corticoesteroides

Los esteroides son hormonas naturales y fármacos similares a las hormonas, [16] se emplean como antieméticos para ayudar a prevenir los efectos secundarios de la quimioterapia como pueden ser las náuseas o vómitos. Dentro de este grupo destacan: Fosaprepitant, Prednisolona, Metilprednisolona y Dexametasona (Tabla 7).

Tabla 7. Fármacos corticoesteroides.

 <p>Fosaprepitant</p>	 <p>Prednisolona</p>
 <p>Metilprednisolona</p>	 <p>Dexametasona</p>

### 1.1.7. Fármacos para terapias dirigidas

Los fármacos quimioterapéuticos aprovechan el hecho de que las células cancerosas se dividen rápidamente. Sin embargo otro tipo de fármacos, considerados no quimioterapéuticos se dirigen hacia otras propiedades que pueden diferenciar las células cancerosas de las normales. Por ello, suelen tener menos efectos secundarios, ya que ejercen su acción principalmente en las células cancerosas no en las sanas normales. Se trata de fármacos que bloquean el crecimiento del cáncer al interferir en moléculas específicas, denominadas blancos, que participan en el crecimiento de la enfermedad. Estos fármacos, se pueden emplear como parte del tratamiento principal, o se pueden utilizar después del tratamiento para mantener la remisión o reducir la probabilidad de recurrencia.

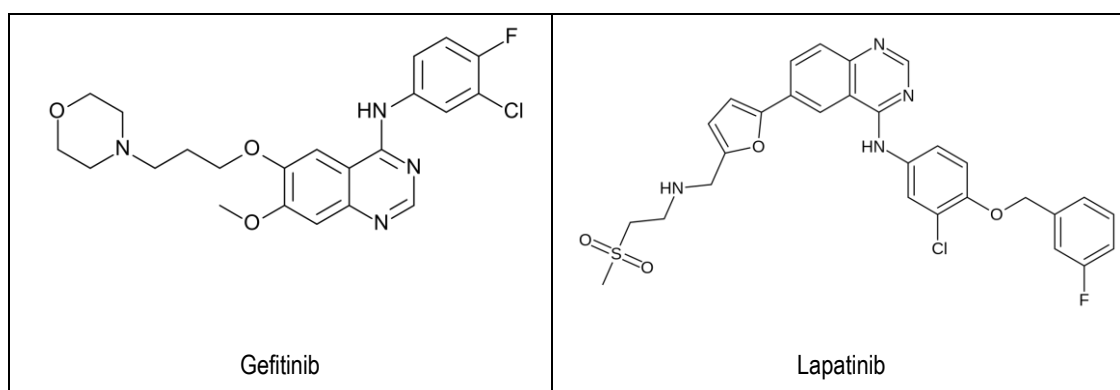
#### 1.1.7.1. Inhibidores de la tirosina quinasa

Las enzimas tirosina quinasa junto a las fosfatasa regulan el estado de fosforilación de proteínas intracelulares. Debido a su implicación en el desarrollo de enfermedades como el cáncer,

recientemente han surgido como dianas en el tratamiento contra esta enfermedad. Las tirosina quinasas se dividen generalmente en dos grupos: tirosina quinasas que funcionan como receptores y tirosina quinasas no-receptores (Tabla 8). [17]

- Gefitinib (Iressa): se dirige selectivamente a las proteínas mutantes en células malas. Este compuesto pertenece al grupo de las quinazolinaminas, compuestos aromáticos heterocíclicos que contienen un resto de quinazolina sustituido por uno o más grupos amina.
- Lapatinib: fármaco aprobado FDA en 2007, para su uso en pacientes con cáncer de mama metastásico avanzado en combinación con el fármaco de quimioterapia capecitabina. Se une al dominio de fosforilación intracelular para evitar la autofosforilación del receptor tras la unión del ligando.

Tabla 8. Fármacos que actúan como inhibidores de la tirosina quinasa.



#### 1.1.7.2. Terapia hormonal

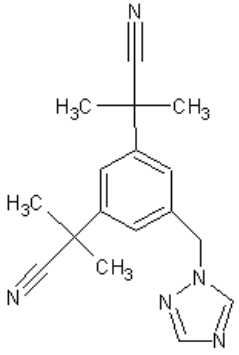
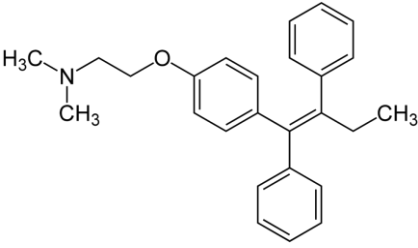
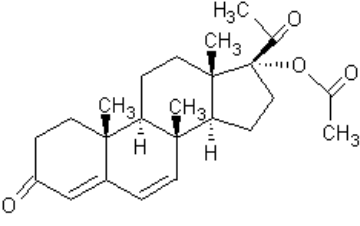
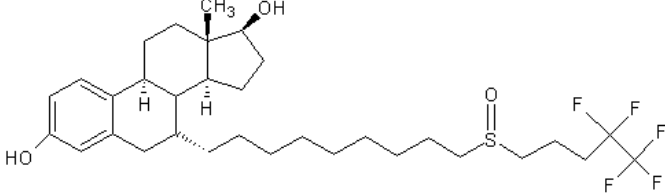
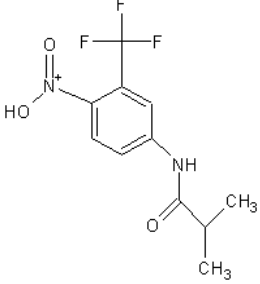
Es una terapia basada en el empleo de fármacos como hormonas sexuales, o medicamentos similares a hormonas, [18] que cambian la acción o la producción de hormonas femeninas o masculinas. Entre los más importantes podemos encontrar (Tabla 9):

- Inhibidores de la aromataza: Anastrozol (Anastrol), indicado concretamente para el cáncer de mama en mujeres post-menopáusicas. Se emplea tanto en la terapia adyuvante como en la etapa metastásica.
- Antiestrogénicos:



- Fulvestant: al igual que el anastrozol está indicado para mujeres con cáncer de mama postmenopáusicas. Sin embargo este fármaco se emplea cuando la enfermedad sigue progresando después de la terapia anti-estrógenos.
- Tamoxifeno (Fenahex): pertenece a una clase de fármacos llamados moduladores selectivos de estrógenos, que tienen ambos efectos, estrogénico y antiestrogénico. Fue la primera causa la pérdida de densidad ósea en mujeres premenopáusicas pero protege a los huesos en mujeres postmenopáusicas terapia de antiestrógenos usada para tratar el cáncer de mama. Afecta a los huesos.
- Progestinas: Acetato de megestrol (Megestil, Maygace): se trata de progestina sintética, pero con los mismos efectos fisiológicos que la progesterona natural.
- Antiandrógenos: Flutamida (Andraxan, Antiprox), antiandrógeno no esteroideo que bloquea la acción de la testosterona endógena y exógena por la unión al receptor de andrógenos. [19,20]
- Antagonistas de la hormona liberadora de la gonadotropina (GNRH)

Tabla 9. Fármacos pertenecientes a la terapia hormonal.

 <p>Anastrozol</p>	 <p>Tamoxifeno</p>	 <p>Acetato de megestrol</p>
 <p>Fulvestrant</p>		 <p>Flutamida</p>

### 1.1.7.3. Inmunoterapia

Algunos fármacos se administran para estimular el sistema inmunitario para que puedan reconocer y atacar las células cancerosas. [21] Aunque no está del todo claro cómo la inmunoterapia trata el cáncer, puede funcionar para detener o retardar el crecimiento de las células cancerosas, y así evitar que el cáncer se propague a otras partes del cuerpo, o bien, ayudar al sistema inmunológico a aumentar su eficacia en la eliminación de las células cancerosas. Existen varios tipos de inmunoterapias, incluidos los anticuerpos monoclonales, los cuales atacan las proteínas específicas que se encuentran en la superficie de las células cancerosas o las células que apoyan el crecimiento de las células cancerosas.

## 1.2. MECANISMOS DE ACCIÓN

Considerando la clasificación anterior, vamos a describir los mecanismos de acción de los fármacos detallados.

### 1.2.1. Antimetabolitos

Los antimetabolitos interfieren con el crecimiento del ADN y del ARN al sustituir los elementos fundamentales de estas moléculas. [7,8] Estos agentes dañan las células durante la fase S, cuando se copian los cromosomas de la célula. Siguiendo estas pautas, la Clofarabina inhibe las síntesis del ADN a través de la acción inhibitoria sobre la ribonucleótido reductasa, por terminación de elongación de la cadena de ADN y la inhibición de la reparación a través de la inhibición competitiva de las polimerasas de ADN. Esto conduce al agotamiento del desoxinucleótido trifosfato intracelular y la auto-potenciación de la incorporación de trifosfato de clofarabina en el ADN, intensificando así, la eficacia de la inhibición de la síntesis de ADN [22]. Con el 5-fluorouracilo el mecanismo de acción principal se cree que es la unión del monofosfato de 6-Fluorodesoxiuridina (FdUMP) y el cofactor, N-5,10-metilentetrahidrofolato, a la timidilato sintasa (TS) para formar un complejo ternario unido covalentemente (Figura 1). Esta complejación induce la inhibición de la formación de timidilato de uracilo que a su vez, conduce a la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, por tanto a la muerte celular. El fluorouracilo también se puede incorporar en el ARN en lugar de UTP (trifosfato de uridino), para la producción de un ARN fraudulento e interfiriendo con el procesamiento del ARN y la síntesis de proteínas. [10]

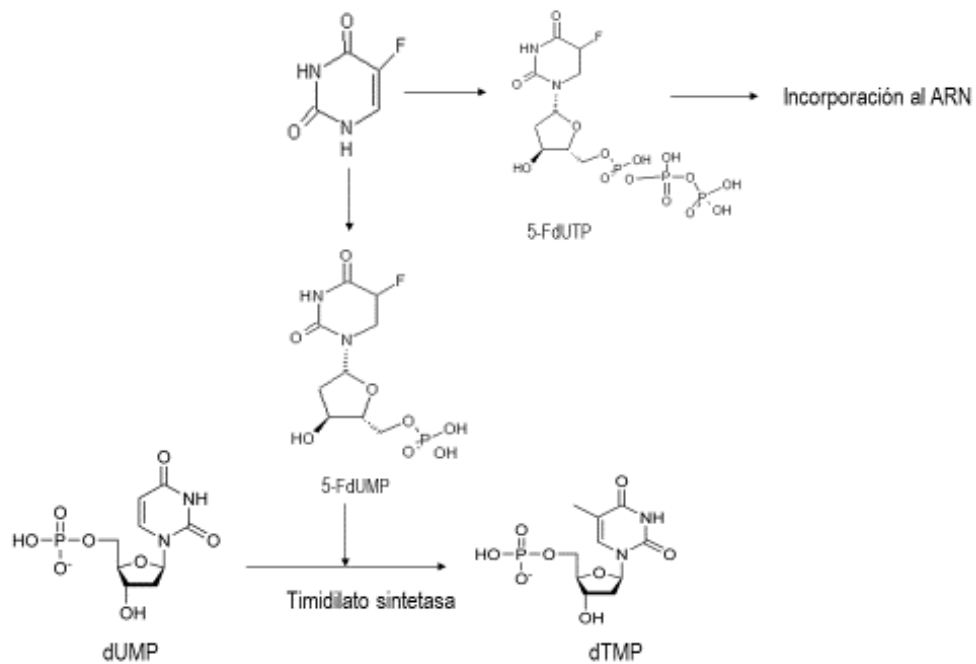


Figura 1. Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo.

Como se observa en la figura 2, el metotrexato inhibe la proliferación de células neoplásicas, bloqueando la síntesis de nuevas purinas y pirimidinas, debido a la inhibición irreversible de la dihidrofolato reductasa, por lo que no se produce la síntesis de ADN ni la replicación celular [23,24,25,26].

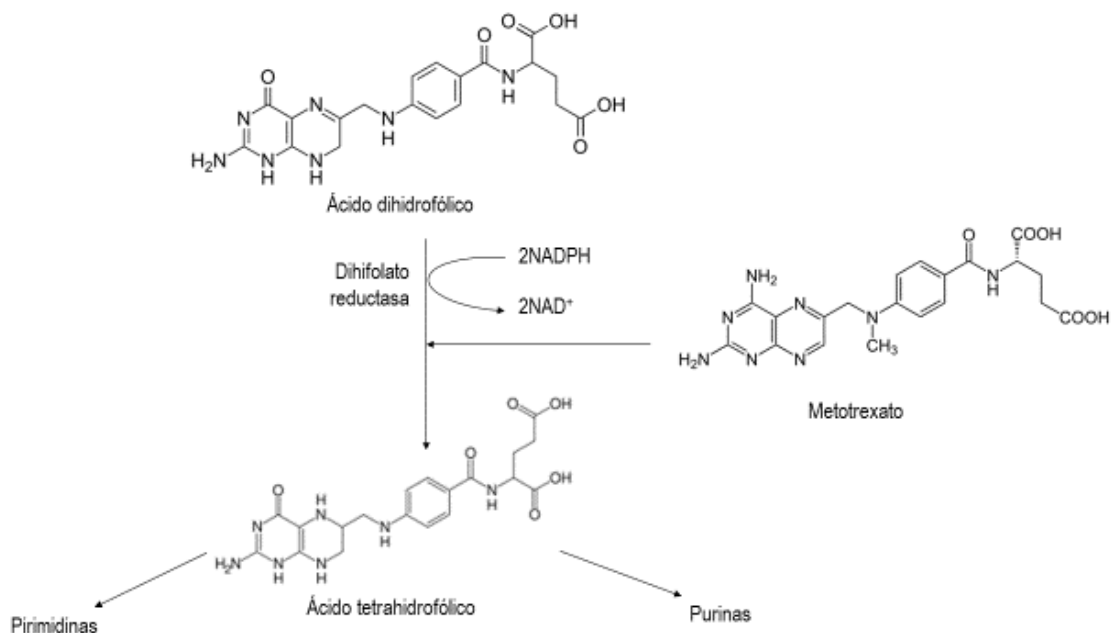


Figura 2. Mecanismo de acción del metotrexato.

### 1.2.2. Antibióticos

Interfieren con las enzimas involucradas en la replicación del ADN, en concreto inhibiendo la topoisomerasa II, produciéndose radicales libres por la rotura del ADN. Estos fármacos ejercen su acción en todas las fases del ciclo celular, al contrario que otros fármacos que solamente actúan en alguna fase específica. La Daunorubicina, tiene actividad antimotítica, es decir, detiene o inhibe la división celular en metafase o anafase, y citotóxica. Forma complejos con el ADN por intercalación entra las pares de bases e inhibe la topoisomerasa II por estabilización del complejo ADN-topoisomerasa II. [27,28,29]

### 1.2.3. Agentes alquilantes

Se trata de fármacos muy reactivos que forman enlaces covalentes entre grupos alquilo y moléculas nucleófilas. Funcionan por tres mecanismos diferentes, pero todos ellos con el mismo resultado final, la interrupción de la función del ADN y la muerte celular:

- a. Unión de grupos alquilo a bases de ADN, por lo que el ADN se fragmenta por las enzimas de reparación al intentar eliminar las bases alquiladas, por lo que no hay síntesis de ADN ni transcripción del ARN.
  - b. Daño directo al ADN a través de la formación de enlaces cruzados, lo que evita que el ADN se separe para la síntesis o transcripción.
  - c. La inducción de “mispairing” de los nucleótidos que conducen a mutaciones.
- Clorambucil: evita el crecimiento del tumor por las bases de guanina de reticulación en hebras de ADN, lo que hace que la doble hebra no pueda desenrollarse. Al ser esto necesario en la replicación del ADN, las células ya no se dividen. [30,31,32]
  - Temozolomida: el 5-(3-metiltriacen-1-il)imidazol-4-carboximida (MTIC) alquila el ADN en las posición N7 de la guanina, posición O3 de la adenosina y posición O6 de la guanosina. Esta metilación de residuos de guanina, conduce a roturas simples de la doble hebra de ADN y posterior muerte celular por apoptosis. Lo que sugiere que N7-metilguanina juega un papel crucial en la actividad anticancerosa del fármaco, ya que hay una correlación entre la sensibilidad de células tumorales a la temozolomida y la actividad de alquiltransferasa O6-alquilguanina que es la proteína de reparación del ADN que elimina específicamente grupos alquilo en la posición O6 de la guanina. [33,34,35]

#### 1.2.4. Inhibidores de la Topoisomerasa II

Como hemos mencionado antes, ciertos antibióticos como la Doxorubicina actúan como inhibidores de la Topoisomerasa II, forma complejos con el ADN por intercalación entre pares de bases, inhibe la actividad de la topoisomerasa II mediante la estabilización del complejo ADN-topoisomerasa II. [36,37,38] Otros fármacos como el Etopóxido o el Tenipósido, al inhibir las topoisomerasas II, inhiben la ligación del ADN, lo que provoca errores en la síntesis de ADN en la etapa premitótica de la división celular lo que puede inducir a la apoptosis de la célula cancerosa. [39,40]

#### 1.2.5. Inhibidores de la mitosis

Mitosis constituye una serie de fases que producen dos nuevos núcleos de células que contienen copias idénticas de ADN. Debido al papel crucial de los microtúbulos en la mitosis, son objetivo de los fármacos para el tratamiento contra el cáncer. Sin fibras del huso funcionales, la célula no puede dividirse y se muere. [41]

- Estramustina: fármaco derivado del estradiol con mostazas nitrogenadas, in vivo, dichas mostazas se activan y pueden alquilar el ADN y otros componentes celulares, por lo que se producen roturas de ADN conduciendo de nuevo a la apoptosis y muerte celular. [42]
- Docetaxel y Paclitaxel: al ser un agente antimotótico interfiere en el crecimiento normal de microtúbulos. Estabiliza la estructura de los microtúbulos por lo que se destruye la capacidad de la célula para utilizar su citoesqueleto de una manera flexible. El complejo docetaxel-microtúbulo afecta negativamente a la función celular. [43]

#### 1.2.6. Corticoesteroides

Los corticosteroides se emplean como tratamiento complementario, ya que su función es evitar las náuseas y vómitos que provoca el tratamiento quimioterapéutico o la radioterapia.

- Fosaprepitant: la forma activa de fosaprepitant es como un antagonista de los receptores de neuroquinina 1, receptores de superficie celular acoplados a proteínas G, y que por tanto bloquea las señales emitidas por los receptores NK1. De esta manera, se disminuye la probabilidad de vómitos en pacientes que los padecen. [44]

- Prednisolona, metilprednisolona, doxometasona: glucocorticoides que inhiben la infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, interfieren con mediadores de la respuesta inflamatoria, y suprimen las respuestas inmunitarias humorales. [45]

### **1.2.7. Fármacos para terapias dirigidas**

#### **1.2.7.1. Inhibidores de la tirosina quinasa**

Los fármacos inhibidores de las tirosina quinasa evitan la unión de ATP o del sustrato o de ambos, por lo que se bloquea su función. Englobado en este grupo se encuentra el fármaco Gefitinib, el cual inhibe el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tirosina quinasa mediante la unión a la adenosina trifosfato (ATP) -sitio de unión de la enzima. Así, la función de la quinasa de tirosina de EGFR en la activación de la cascada de transducción de señales es inhibida; y las células cancerosas son inhibidas. [46,47] Otro ejemplo es el Lapatinib, inhibidor de quinasa 4-anilinoquinazolina de los dominios de tirosina quinasa intracelulares tanto del receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER1 / EGFR / ERBB1) y el tipo de crecimiento epidérmico humano receptor del factor de 2 (HER2 / ErbB2). [48,49]

#### **1.2.7.2. Terapia hormonal**

El mecanismo de acción no es el mismo que el de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, sino que evitan que la célula cancerosa use la hormona que necesita para crecer o evitan que el cuerpo produzca más hormonas.

- Inhibidores de aromatasa. Anastrozol: potente y selectivo no esteroideo inhibidor de la aromatasa. La principal fuente de estrógeno es la conversión de androsterona generada por la aromatasa en los tejidos periféricos. Por lo tanto la inhibición de esta enzima conduce a una disminución de la masa tumoral o retrasa la progresión del crecimiento tumoral en algunas mujeres. [50,51,52]
- Antiestrogénicos: Fulvestrant: se une a los receptores de estrógeno presentes en las células cancerosas y logra sus efectos anti-estrógeno a través de dos mecanismos separados. En primer lugar se une a los receptores y los regula a la baja de manera que el estrógeno ya no es capaz de unirse a estos receptores. En segundo lugar, degrada los receptores de estrógeno a los que está ligado. Por otro lado tenemos el Tamoxifeno, agente no esteroideo que se une a los receptores de estrógeno (ER) induciendo un cambio

conformacional en el receptor. Esto produce un bloqueo o cambio en la expresión de genes dependientes de estrógenos. [53]

- Progestinas: Acetato de megestrol, su actividad antitumoral puede implicar la supresión de la hormona luteinizante por la inhibición de la función pituitaria. [54,55]
- Antiandrógenos: Flutamida, antiandrógeno no esteroideo que bloquea la acción de la testosterona endógena y exógena por la unión al receptor de andrógenos. [56]

### 1.2.7.3. Inmunoterapia

El tratamiento más común es el que utiliza el Trastuzumab: se trata de un anticuerpo monoclonal que actúa frente al receptor HER2. La sinergia entre el trastuzumab y los agentes quimioterapéuticos en las células cancerosas depende tanto de la dosis como del periodo de administración, dicha sinergia es específica de las células que sobreexpresan HER2. [1,57].

La Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) perteneciente al gobierno de los Estados Unidos es responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos. Se encarga por tanto de regular los fármacos de manera tal que asegure la seguridad de los consumidores estadounidenses y la efectividad de los medicamentos comercializados. La FDA exige que cada nuevo medicamento sea evaluado a través de una serie sucesiva de 4 fases de ensayos clínicos, siendo la fase 3 la más extensa, y en la que se realizan pruebas en 1000 a 3000 pacientes, de esta manera tiene aprobados para el tratamiento del cáncer de mama, los fármacos que se enumeran en la Tabla 10.



Tabla 10. Lista de fármacos para el tratamiento del cáncer de mama aprobados para su administración por la FDA.

Abitrexate (Methotrexate)	Faslodex (Fulvestrant)	Mexate (Methotrexate)
Abraxane	Femara (Letrozole)	Mexate-AQ (Methotrexate)
Ado-Trastuzumab Emtansine	Fluoroplex (Fluorouracil)	Neosar (Cyclophosphamide)
Adrucil (Fluorouracil)	Fluorouracil	Nolvadex (Tamoxifen Citrate)
Afinitor (Everolimus)	Folex (Methotrexate)	Paclitaxel
Anastrozole	Fulvestrant	Palbociclib
Aredia (Pamidronate Disodium)	Gemcitabine Hydrochloride	Pamidronate Disodium
Arimidex (Anastrozole)	Gemzar (Gemcitabine Hydrochloride)	Perjeta (Pertuzumab)
Aromasin (Exemestane)	Goserelin Acetate	Pertuzumab
Capecitabine	Halaven (Eribulin Mesylate)	Tamoxifen Citrate
Clafen (Cyclophosphamide)	Herceptin (Trastuzumab)	Taxol (Paclitaxel)
Cyclophosphamide	Ibrance (Palbociclib)	Taxotere (Docetaxel)
Cytosan (Cyclophosphamide)	Ixabepilone	Thiotepa
Docetaxel	Ixempra (Ixabepilone)	Toremifene
Doxorubicin Hydrochloride	Kadcyla (Ado-Trastuzumab)	Trastuzumab
Efudex (Fluorouracil)	Emtansine	Tykerb (Lapatinib Ditosylate)
Ellence (Epirubicin Hydrochloride)	Lapatinib Ditosylate	Velban (Vinblastine Sulfate)
Epirubicin Hydrochloride	Letrozole	Velsar (Vinblastine Sulfate)
Eribulin Mesylate	Megace (Megestrol Acetate)	Vinblastine Sulfate
Everolimus	Megestrol Acetate	Xeloda (Capecitabine)
Exemestane	Methotrexate	Zoladex (Goserelin Acetate)
Fareston (Toremifene)	Methotrexate LPF (Methotrexate)	

## 2. REACCIONES CLICK: MECANISMO Y APLICACIONES EN QUÍMICA TERAPÉUTICA

### 2.1. MECANISMO

En los últimos años ha surgido la necesidad de desarrollar síntesis de compuestos orgánicos que sean eficaces, versátiles y selectivas. Este concepto ha sido desarrollado en paralelo con el interés, sobre todo de la industria farmacéutica, de obtener un amplio espectro de compuestos mediante métodos económicos, rápidos y que sean altamente selectivos.

El término de reacción-click (click chemistry, CC) apareció por primera vez en el año 2.001, para describir reacciones que cumpliesen con los siguientes requisitos:

*“La reacción debe ser modular, con un amplio rango de aplicación y con altos rendimientos, generando únicamente productos inofensivos con el medioambiente y que puedan ser separados mediante métodos no cromatográficos, como la destilación o cristalización, y estereoespecífica. Las características requeridas incluyen condiciones de reacción simples, materiales y reactivos de los que se disponga fácilmente, además del uso de disolventes no nocivos, como por ejemplo el agua, o fácilmente eliminados”* [58]

La reacción click es una variación de la reacción de Huisgen [59] que no es más que una cicloadición 1,3-dipolar, entre acetilenos terminales y azidas para la formación de triazoles (Figura 3). [60] Es uno de los métodos más empleados para la construcción de sistemas heterocíclicos.

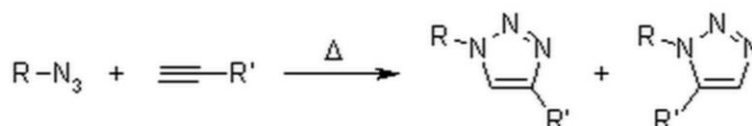


Figura 3. Reacción de Huisgen. Cicloadición 1,3-dipolar entre acetileno y azida.

Un dipolo 1,3 reacciona con un dipolarófilo para formar un anillo de cinco miembros. [60] Los dipolarófilos pueden ser compuestos con enlaces múltiples tales como alquenos, alquinos, carbonilos y nitrilos, los cuales contienen átomos de nitrógeno, carbono, azufre u oxígeno. Por su lado, los

compuestos 1,3-dipolares son aquellos que tienen un dipolo en su estructura de resonancia y que al menos tienen un heteroátomo.

En el año 2.002 se comprobó que el uso de sales de cobre (I) (Figura 4) como catalizador de esta reacción aumentaba su velocidad en diez millones de veces, y lo que era casi más importante, a temperatura ambiente y dirigiendo la reacción hacia uno de los dos regioisómeros. [58]

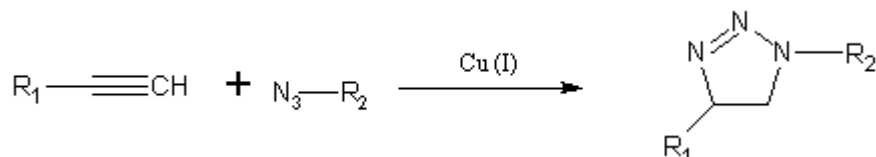


Figura 4. Cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I) para dar un solo regioisómero.

La coordinación del Cu (I) a alquinos en una solución acuosa forma un intermedio de acetiluro de cobre, siendo una reacción exotérmica. La azida se une a este intermedio Cu (I) formando un metalciclo de seis miembros Cu (III). A continuación se produce la formación del anillo de triazol, que es muy rápida (Figura 5). El producto de cicloadición que se genera entonces, es químicamente inerte o estable frente a las reacciones redox, ya que posee un fuerte momento dipolar, enlace de hidrógeno y carácter aromático. [61,62]

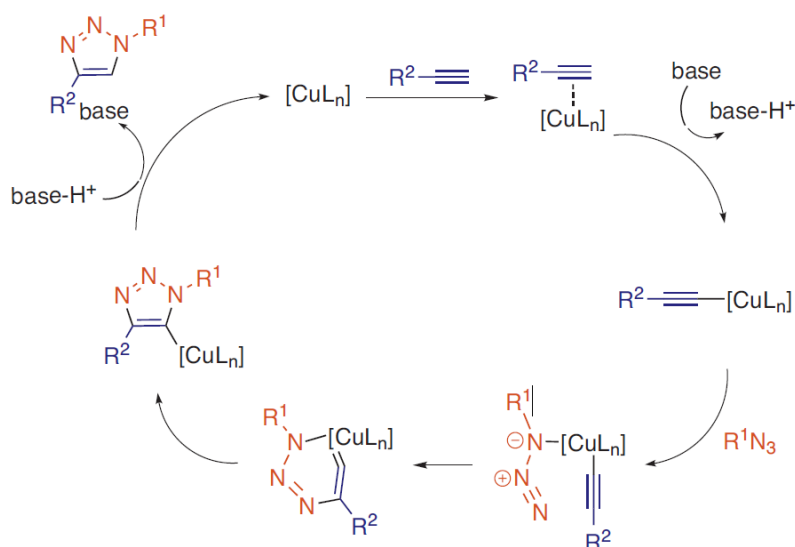


Figura 5. Mecanismo de la cicloadición [3+2] de azidas y alquinos catalizado por cobre.  $[CuL_n]$  hace referencia a una especie mono- o polinuclear de cobre. [62]

Los triazoles han demostrado tener un gran número de características deseables dentro de la química terapéutica. Son estables a la hidrólisis tanto ácida como básica y en condiciones oxidativas y reductoras, esto se debe a la alta estabilidad aromática que poseen. Otra de sus características es que poseen un momento dipolar de valor alto y pueden participar en enlaces de hidrógeno así como en interacciones dipolo-dipolo y electrostáticas.

El sistema estándar emplea sales de cobre (II) en presencia de un agente reductor, como puede ser ascorbato de sodio. Por lo que el cobre (II) se reduce de forma continua a cobre (I) manteniendo en todo momento alto contenido del agente catalítico. Respecto al disolvente empleado en este tipo de reacción, uno de los más frecuentes es una mezcla terc-butanol y agua. Es importante, hacer hincapié, que este disolvente también puede ser usado para compuestos lipofílicos. Cuando las condiciones acuosas no pueden utilizarse, se emplean disolventes orgánicos como: tetrahidrofurano, tolueno, diclorometano o acetonitrilo; en presencia de cantidades estequiométricas de sales de cobre (I), y un exceso de una base, frecuentemente una amina terciaria. A pesar de que las sales de cobre son más usadas como catalizadores para esta reacción, se ha demostrado que la adición de tris-(bencil-triazolmetil)amina o hidrocloreuro de trimetilamina, aumenta la eficacia. [58]

Se puede decir que las reacciones click comparten las siguientes cualidades: [60]

- Reactivos con enlaces múltiples carbono-carbono, que proporcionan tanto energía como el mecanismo adecuado para formar las estructuras click
- En su mayoría, las reacciones click forman enlaces carbono-heteroátomo (O, N, S)
- Son altamente exotérmicas, debido a la energía de los reactivos y a la alta estabilidad de los productos que se forman
- Las reacciones click son normalmente procesos de fusión o condensación
- Muchas reacciones click toleran e incluso se aceleran en presencia de agua

Algunas de las causas por las que el agua es el mejor disolvente en reacciones click son las siguientes: [60]

- Las reacciones click tienen lugar fácilmente en agua caliente, dando un único producto, incluso cuando uno o más de los reactivos o productos son insolubles en este medio. Esto se podría explicar por la energía libre de las moléculas orgánicas, la cual es mayor cuando están solvatadas en agua.

- Adiciones nucleófilas de epóxido (homocarbonilo) y azaridina (homoimina) están favorecidas por disolventes que induzcan a la formación de enlaces de hidrógeno durante el proceso. Y para eso, el agua es el mejor disolvente.
- Reacciones click de olefinas y acetilenos son oxidaciones por reactivos electrofílicos y reacciones de cicloadición. Ambos procesos son electrofílicos o nucleófilos polarizables por lo que el agua es un medio que no interfiere y por tanto ideal.
- El agua es un excelente disipador térmico, debido a su alta capacidad para calentarse, y tiene un adecuado punto de ebullición, por lo que es útil para procesos a gran escala.

La reacción click solo da altos rendimientos cuando el triazol obtenido es el 1,4 disustituido, por lo que se ha expandido la aplicación de esta reacción para desarrollar una cicloadición ortogonal para dar productos 1,5-disustituidos. Esto, haría de la reacción click una verdadera reacción regiocomplementaria, obteniendo el regioisómero deseado en función de las condiciones empleadas.

[59]

Las reacciones click, tal y como se ha visto hasta ahora y con los ejemplos que se verán a continuación tienen un amplio espectro de aplicaciones, dada su versatilidad, los altos rendimientos que produce y que además cumple con las normas de la química verde. Sin embargo también tienen una serie de limitaciones:

- Si el dieno, la azida, es demasiado deficiente en electrones entonces la reacción no se lleva a cabo. La energía de su estado fundamental es demasiado baja para que interactúe con un dienófilo, el alquino terminal.
- Por otro lado, el dienófilo no puede ser demasiado rico en electrones.
- Un problema común es el homoacoplamiento alquino. Esto ocurre cuando dos alquinos reaccionan entre sí, en vez alquino-azida. Este problema se puede solventar con el uso de bases estéricamente voluminosas.
- Un problema menos común es la saturación de CuI. Para que la reacción clic tenga lugar, el complejo CuI-acetiluro tiene que tener contacto físico con la azida. Si el complejo está demasiado rodeado por alquinos terminales existe la posibilidad de que estos alquinos lleguen a formar complejos. [63]

- Limitaciones específicas en química terapéutica: [63]
  - o Requiere un catalizador de cobre. A pesar de que el cuerpo humano requiere de cobre para poder funcionar, el consumo en exceso puede conducir a drásticas consecuencias. Algunos efectos secundarios asociados incluyen hepatitis, trastornos neurológicos, riñón enfermedades, y la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, para aplicar in vivo CC, el catalizador de cobre debe ser eliminado completamente.
  - o Biocompatibilidad de 1,2,3-triazoles, ya que no se conoce aún, sus procesos biológicos.

## 2.2. APLICACIONES EN QUÍMICA TERAPÉUTICA

Las reacciones click han comenzado a ser en el pasado más reciente la herramienta de síntesis más potente en la investigación y desarrollo de fármacos, en la bioquímica y en aplicaciones proteómicas. Dentro de la química terapéutica la aplicación de la química click recae principalmente en tres áreas: [64]

- Cribado de alto rendimiento (High-throughput screening; HTS)
- Descubrimiento de fármacos basado en fragmentos (Fragment-Based Drug Discovery; FBDD)
- Descubrimiento de fármacos, estrategias con modelos dinámicos basado en fragmentos (dynamic template-assisted strategies in fragment-based drug discovery)

El cribado de alto rendimiento (HTS) es una metodología para el desarrollo de un amplio espectro de productos químicos, cuya funcionalidad es combatir moléculas biológicas (fármacos), empleando técnicas automatizadas, ensayos miniaturizados y con un gran análisis de datos. La combinación de CC y tecnologías de ensayo de enzimas ha ayudado a evolucionar el desarrollo de fármacos. El descubrimiento de fármacos, estrategias con modelos dinámicos basados en fragmentos (FBDD) es una tecnología que en los últimos años ha permitido encontrar un gran número de compuestos desarrollados clínicamente, debido principalmente a la detección de fragmentos. Por regla general, las enzimas suelen tener un solo centro activo y por tanto un sustrato específico, sin embargo existen enzimas con más de un centro activo, en este caso la aplicación de CC, dada su efectividad en

condiciones normales y su alta modularidad ha sido la clave para desarrollar sustratos bidentados de alta selectividad por las enzimas. Por ello se han desarrollado estrategias con modelos dinámicos en el descubrimiento de fármacos. Los reactivos de azida y alquino se seleccionan estructuralmente para interactuar parcialmente con el sitio activo de la enzima, llevándose a cabo la reacción click y formándose un único inhibidor final.

### 2.2.1. Inhibidores de enzimas

Los inhibidores de enzimas juegan un papel importante en la cura de enfermedades, y por ello son objeto de fármacos contra el cáncer. Utilizando un amplio espectro de fragmentos pro-inhibidores junto con reacciones click, se han llegado a desarrollar un gran abanico de inhibidores de enzimas muy eficientes. Todo ello se ha podido llevar a cabo debido a la eficiencia en medio acuoso de las reacciones click, ya que en la mayoría de los casos los productos han sido ensamblados directamente para la inhibición sin necesidad de purificarlos. [64]

Un ejemplo son las tirosina fosfatasa que constituyen una clase importante de enzimas que catalizan la defosforilación de residuos de fosfotirosina en sustratos de proteína. Dentro de este grupo, se encuentra la PTP1B (Figura 6), que ha sido identificada como el mayor regulador de las vías de señalización de la insulina y la leptina. Un mal funcionamiento de esta enzima puede ser la causante de enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad o inflamaciones.

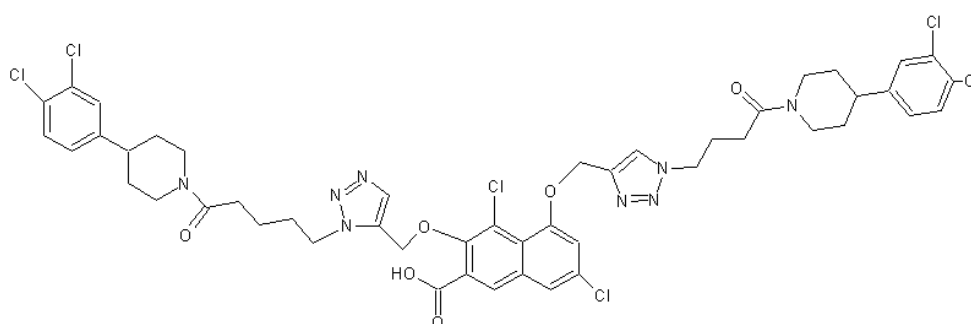


Figura 6. Estructura química de un inhibidor sintético de la tirosina fosfatasa.

Xie y su grupo [64,65] desarrollaron nuevos inhibidores de PTP (tirosina fosfatasa) mediante la reacción de alquil aminoácidos en patrones de azúcar con grupos azido. En primer lugar, con CC introdujeron el grupo azida al ácido cetocarboxílico con 56 alquinos diferentes [65], a continuación el producto que mayor reactividad tuvo, fue modificado con grupo azida para un segundo paso de CC

con 56 alquinos. Obteniéndose finalmente un producto (Figura 7) que destacaba por su capacidad de inhibición frente al resto.

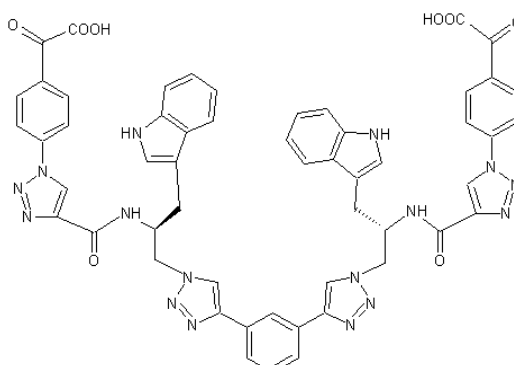


Figura 7. Estructura del inhibidor de PTP más potente sintetizado por el grupo de Xie.

Otro ejemplo de inhibidor importante dentro de la química terapéutica son los inhibidores de la proteína quinasa, ya que esta enzima es reguladora clave de la función de la célula. Las enzimas proteína quinasa fosforilantes juegan un papel fundamental en la señal de transducción de la célula y muchas enfermedades están caracterizadas por anomalías en la quinasa o en su nivel de expresión, entre otras el cáncer. [66] Liskamp y su grupo de trabajo [64,67] utilizaron inhibidores de bisustrato quinasa que se dirigen selectivamente al sitio de unión del péptido además del sitio de unión de la ATP (adenosin trifosfato). Estos péptidos activos se unieron por reacción click quimioselectiva al sitio de unión de la ATP del inhibidor de la quinasa (Figura 8).

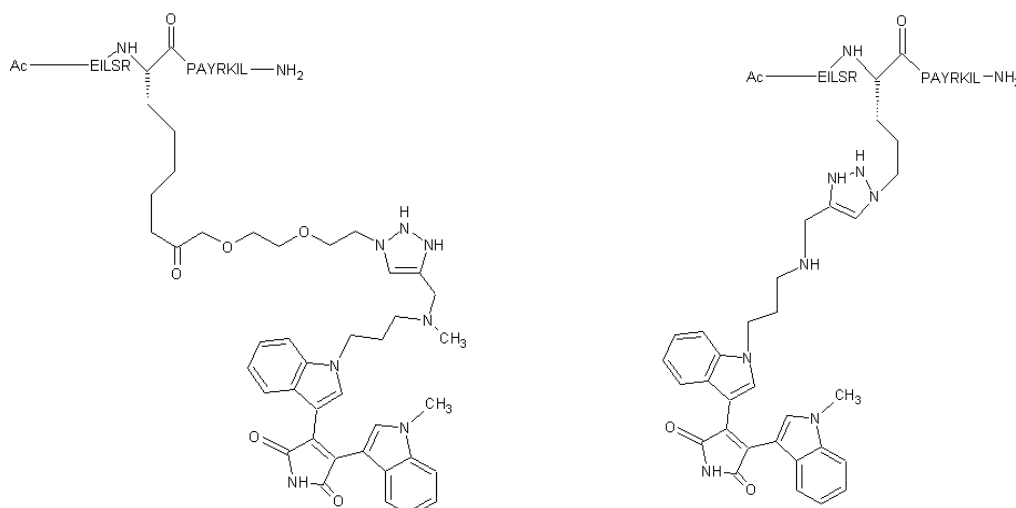


Figura 8. Estructuras químicas de inhibidores de la proteína quinasa.



### 2.2.2. Química click in situ

Las reacciones click no solo se pueden emplear para sintetizar fármacos previamente a su administración sino que también existe la posibilidad de aplicar las reacciones click in situ (Figura 9). En este sentido, para que esto se produzca tiene que, a temperatura ambiente, una enzima llevar moléculas que contengan grupos alquilo y azida a tal proximidad que se supere la barrera energética y puede ocurrir la reacción click, es decir la enzima tiene que ser un buen catalizador a temperatura ambiente (dynamic template-assisted strategies in fragment-based drug discovery). [64]

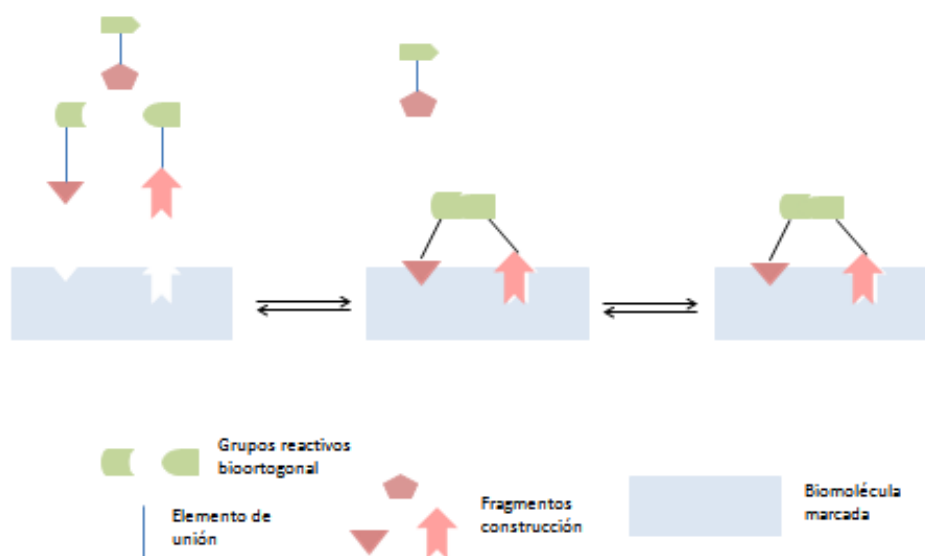


Figura 9. Esquema química click in situ.

### 2.2.3. Otros ejemplos

El Resveratrol (fitoalexina, Figura 10) es un compuesto que posee una gran variedad de actividades biológicas. Dentro de estas actividades destaca el papel que ejerce como agente cardio o neuroprotector, como fármaco antiinflamatorio y quimio protector contra el cáncer. Sin embargo, su uso es limitado ya que ejerce la mayoría de sus efectos biológicos a concentraciones micromolares altas, por lo que es difícil determinar cuáles son los objetivos responsables de los efectos. En este caso se ha sintetizado una serie de análogos del trans-resveratrol sustituyendo el enlace doble con el anillo de triazol. La presencia de sales de cobre (I) a temperatura ambiente genera productos 1,4-regioselectivos, lo que contrasta con la reacción llevada a cabo a altas temperaturas, ya que produce cantidades equimolares de los dos regioisómeros, y que son difíciles de aislar. De la serie sintetizada, 74 reacciones produjeron precipitados, y 72 de ellos fueron confirmados como los productos

esperados. También se ha evaluado la citotoxicidad de estos compuestos, y el análisis biológico preliminar sugiere que este procedimiento es capaz de generar análogos de resveratrol-triazol sustituido activos. [68]

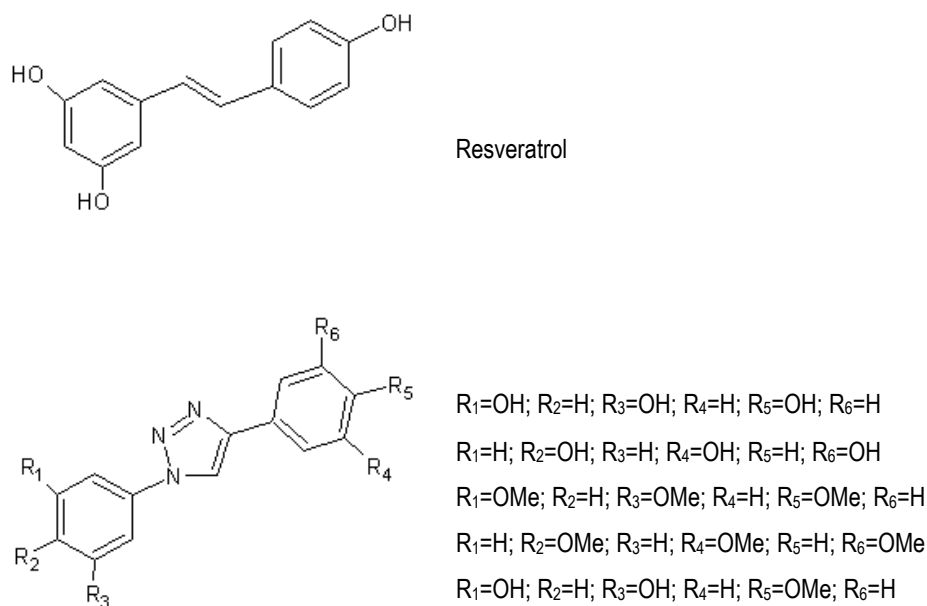


Figura 10. Comparativo estructural del Resveratrol y sus análogos sintetizados por reacción click.

Para determinar si el doble enlace de resveratrol se puede sustituir con el anillo de triazol, la serie se sintetizó mediante cicloadición, y los compuestos fueron sometidos a pruebas de citotoxicidad/proliferación en diferentes series de células entre ellas células mamarias cancerosas. Se empleó un método colorimétrico, que distingue entre disminución de la proliferación y el aumento de la muerte celular. Obteniéndose que, en función de los sustituyentes y el tipo de células el comportamiento es diferente. Se ha detectado que algunos de estos compuestos análogos al resveratrol sintetizados tienen mayor potencial como agentes citotóxico/antiproliferativos. [68]

Los avances tecnológicos y químico-biológicos se han enfocado en el estudio más profundo de la función catalizadora de las enzimas, lo que ha constituido el grupo denominado catalomics, que no es más que una rama emergente de la biología en la cual se engloban los estudios de alto rendimiento de las enzimas empleando proteomas. El proteoma es el conjunto completo de proteínas producidos por un organismo o sistema, y el estudio de las mismas tanto sus estructuras como sus funciones. La

reacción entre alquinos terminales y azidas ha influido mucho dentro del campo de las proteomas. Las reacciones click se han aplicado dentro de este grupo para conocer los perfiles de actividad de las proteínas (ABPP) y la modificación post-traslacional. Se incluye dentro de este grupo los inhibidores de enzimas, que ya se ha comentado anteriormente.

ABPP ha emergido como un método de proteomas dirigido hacia el análisis funcional de las proteínas en los proteomas. Generalmente el diseño de ABPP se divide en tres partes: [66]

- Grupo reactivo en el sitio activo que dirige la sonda a dicho sitio activo y provoca la reacción covalente con la proteína.
- Unidad de lectura, que suele ser un fluoróforo o una biotina para la lectura directa de la actividad de la proteína.
- Molécula de unión o espaciador para minimizar la disrupción de la unidad marcada en la reactividad o reconocimiento de la proteína en la unidad reactiva o en ocasiones sirve como elemento de reconocimiento.

El uso de CC en este campo, se justifica por la alta especificidad que no precisa grupos protectores, y las características estructurales y enlaces de hidrógeno del anillo triazol. El grupo de trabajo de Cravatt empleó las reacciones click como método de unión en la síntesis de rodamina y rodamina-biotina marcada, a partir de productos naturales. Así, pudieron observar la selectividad de la carboxiesterasa-1 en los proteomas de un corazón de ratón. Del mismo modo, el grupo de trabajo de Thompson utilizó CC para unir rodamina marcada mediante enlace covalente al inhibidor de la argina deiminasa 4 (PAD4) a fracciones de fluoro y cloroacetamina (Figura 11). La PAD4 es una enzima implicada en la artritis reumatoide. Con este estudio se ha podido demostrar la especificidad por el calcio ligado de la enzima en su forma activa. [66,69]

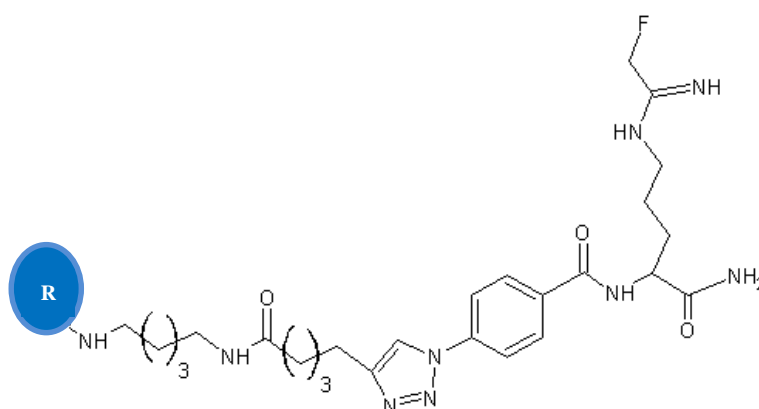


Figura 11. Estructura de la forma activa PAD.

Las modificaciones post-traslacionales (PTM) (Figura 12) incluyen la incorporación de azúcares, lípidos, fosfatos, etc. La comunicación intracelular tiene un papel importante en la metástasis del cáncer. Esta comunicación está controlada por la glicosilación de las proteínas, que a pesar de ser muy frecuente dentro de las células eucarióticas no está muy estudiada debido a la presencia de azúcares en la sangre y la dificultad de marcarlos. Por eso, para solventar el problema de la visualización de la glicosilación se han empleado reacciones bioortogonales. En un principio se empleó la reacción de Staudinger, pero entre otros problemas, la velocidad de reacción es lenta, por ello se emplea CC ya que es veinte veces más rápida. Reutter y su grupo de trabajo introdujeron N-propanoil-D-manosamina (sintetizada previamente) en la membrana y en glicoproteínas del suero, demostrando que la incorporación de un azúcar análogo artificial ligeramente modificado escoge diferentes vías metabólicas. [66,70,71]

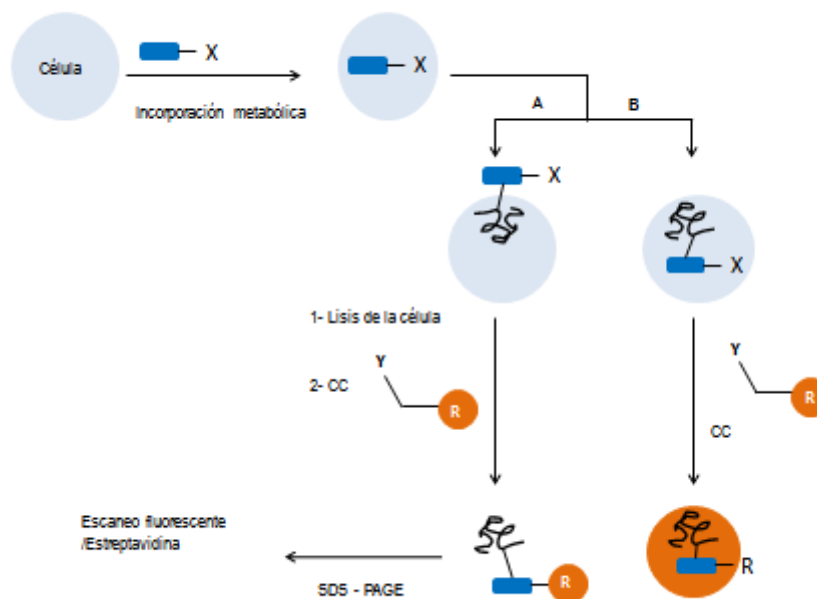


Figura 12. Esquema metabólico, incorporación de azúcares análogos de ácidos grasos seguido por proceso de marcación utilizando química click. A: incorporación a la superficie de la célula; B: incorporación intracelular.

Dímeros de la Daunorubicina (Figura 13) fueron sintetizados empleando CC. [58] La distancia entre los monómeros dependía de las moléculas de unión que se empleasen, siempre conteniendo el grupo triazol. El hecho de generar dímeros, fue debido a la necesidad de encontrar intercaladores de ADN más potentes y de menor toxicidad. [72] Los productos obtenidos se aplicaron en células cancerosas observándose que la distancia entre monómeros era crucial para la actividad del dímero.

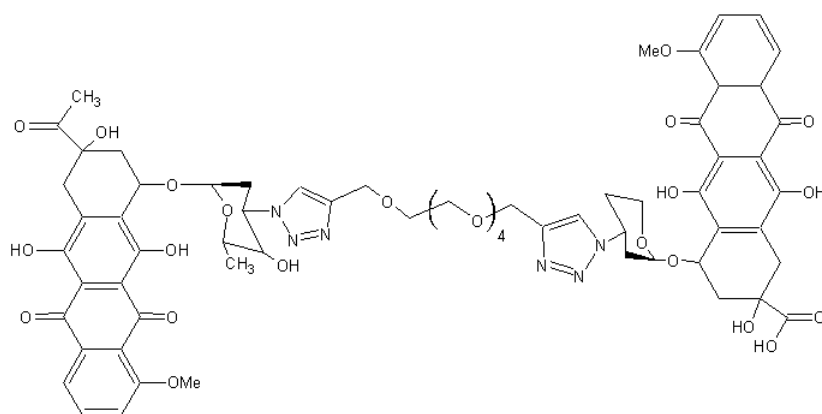


Figura 13. Dímero de daunorubicina sintetizado vía química click.

La reacción de cicloadición de azida y alquino catalizada por cobre, se utilizó para unir varios azúcares, incluidos compuestos antitumorales. Se tuvieron en consideración datos existentes que mostraban que el hexámero  $\beta$ -D-glucosamina tenía una actividad antitumoral leve, para sintetizar una glucosamina C3 simétrica (1,6)-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamida octadecasacárido. La síntesis implicó el uso del triazol, obteniéndose un sacárido trivalente (Figura 14) con mayor capacidad inhibitoria que el monómero.

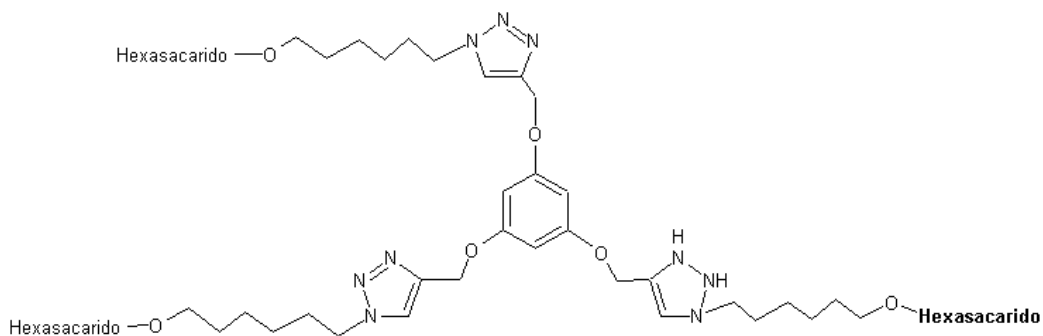


Figura 14. Oligosacárido trivalente con mayor capacidad inhibitoria.

### 3. REACCIONES CLICK: FÁRMACOS PARA EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una de las enfermedades más extendidas sobre todo entre la población femenina, por ello el diseño y síntesis de derivados del triazol para desarrollar nuevos fármacos, menos tóxicos y más efectivos ha sido uno de los campos más estudiados y desarrollados dentro de la investigación farmacológica. La versatilidad de la reacción click ha impulsado y fundamentado muchos de estos nuevos fármacos, como los que se citan a continuación.

#### 3.1. SÍNTESIS

##### 3.1.1. Inhibidores de la tirosina quinasa

Cómo ya hemos visto, los inhibidores de algunas enzimas son agentes terapéuticos contra el cáncer y específicamente contra el cáncer de mama. En concreto, en el año 2011 el grupo de trabajo de Kumar [73,74] se centró en los inhibidores de las tirosina quinasa, sintetizando series de dos clases de 3-fenil-pirazolopirimidina conjugado con 1,2,3-triazol (Figura 15) empleando reacciones click. El objetivo era conocer si influían el tipo de residuos hidrofóbicos de los compuestos de 1,2,3-triazol sustituidos en el N<sub>1</sub> de 3-fenil-pirazolopirimidina. Esta influencia estaba relacionada con la posibilidad de unirse a los aminoácidos de los centros activos y formar cadenas:  $\alpha$ C o  $\alpha$ D, y cómo contribuían a la potencialidad inhibitoria. Los compuestos sintetizados se evaluaron en carcinomas de mama (MDA-MB-361).

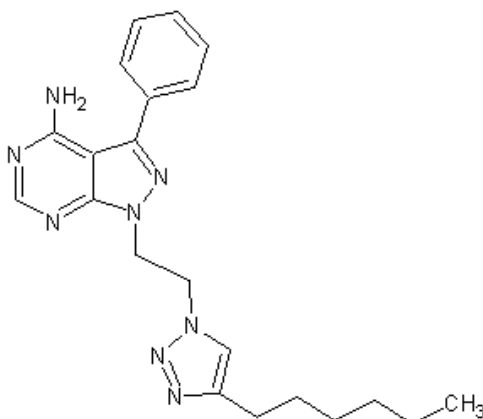


Figura 15. Estructura de un inhibidor de tirosina quinasa.

En el cáncer de mama se puede sobreexpresar el EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico), por lo que es un analito conocido para el desarrollo de fármacos contra esta enfermedad. Como se ha visto un tipo de cáncer de mama está relacionado con HER2, por lo que el grupo de Cheng [73,75] en el año 2.007 se centró en buscar inhibidores de HER2. Sintetizaron mediante reacciones click, una serie de derivados de 4-aryl-5-ciano-2-h-1,2,3-triazol, los cuales llevaban un grupo fenilo en la posición 4. Todos los compuestos presentaron bioactividad frente a HER2 tirosina quinasa. Hubo un compuesto (Figura 16) que presentó un valor  $IC_{50}$  de 6.6  $\mu$ M para la inhibición de la fosforilación de las tirosina quinasa HER2 en células de cáncer mamario y un valor de  $IC_{50}$  30.39  $\mu$ M para inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama MDA-MB-453 (carcinoma).

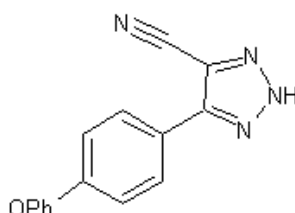


Figura 16. Inhibidor sintético de la tirosina quinasa con alta bioactividad.

### 3.1.2. Antimetabolitos

El ADN juega un papel básico dentro del desarrollo del cáncer de mama, y los nucleósidos son piezas fundamentales en el código genético. Derivados de estos nucleósidos como los azacompuestos (Figura 17), análogos en los cuales un átomo de nitrógeno desplaza al oxígeno del anillo de la furanosa, tienen actividad terapéutica incluida actividad anticancerosa.

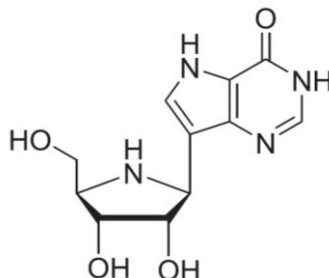


Figura 17. Estructura química de un azacompuesto. Ferodesine (antimetabolito). [76]



La actividad de los azanucleósidos había sido estudiada, sin embargo nadie se había centrado en los compuestos 1'-homo-3'-isoazanucleosidos, por ello se decidió sintetizar derivados de este compuesto, utilizando química click, y estudiar su efecto contra el cáncer frente diversas células cancerosas entre las que se encontraban células mamarias. En este caso se empleó química click con radiación microondas, obteniéndose 11 compuestos con diferente rendimiento. La figura 18 muestra la reacción llevada a cabo, la cual permite una cicloadición que proporciona solo uno de los dos regioisómeros con buen rendimiento.

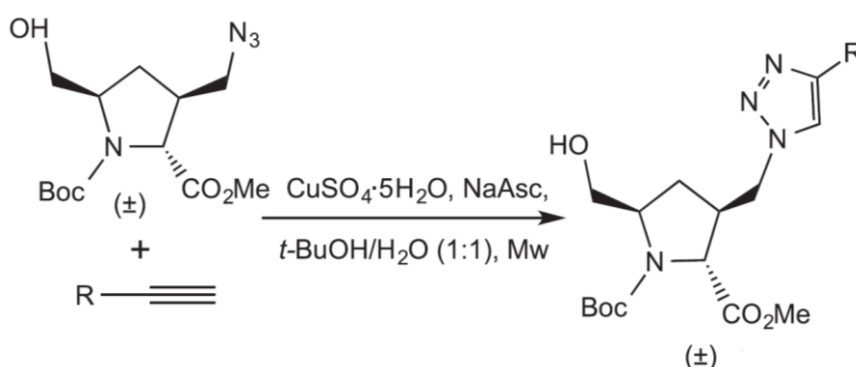


Figura 18. Síntesis de 11 derivados 1'-homo-3'-isoazanucleosidos vía click. R = arilos y alquilo terminales.

Estos compuestos fueron evaluados in vitro frente a células de cáncer de mama (MCF-7), utilizando el cisplatino como elemento de control positivo y como método de ensayo MTT. Solamente hubo dos compuestos (Figura 19) que mostraron unos considerables efectos citotóxicos. [76]



Figura 19. Sustituyentes de los dos compuestos con mayor actividad citotóxica.

### 3.1.3. Agentes antiproliferativos

Se sintetizaron vía click una serie de híbridos de 1,2,3-triazol-1,4-benzoxacina (Figura 20), para estudiar la actividad antiproliferativa que tenían frente a células cancerosas. Los 14 híbridos

sintetizados se obtuvieron con altos rendimientos, empleando RMN para determinación de sus estructuras.

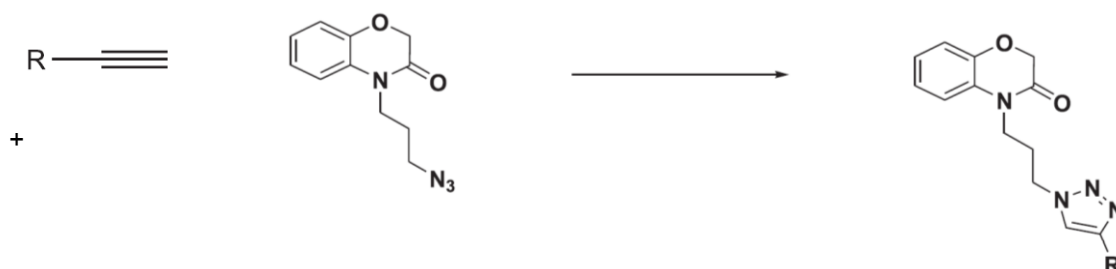


Figura 20. Síntesis click de híbridos de 1,2,3-triazol-1,4-benzoxacina. Condiciones de reacción:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , ascorbato sódico, THF:H<sub>2</sub>O (1:1), 24h.

De nuevo la valoración de actividad antiproliferativa fue estudiada in vitro, frente a células cancerosas entre ellas MDA-MB-231 (mama). Se obtuvo la actividad inhibidora del crecimiento, correspondiendo estos valores a la concentración del compuesto que causa 50% de disminución del crecimiento celular ( $\text{IG}_{50}$ ), comparándolo con fármacos estándar (Doxorubicina y Paclitaxel). Así, para las células mamarias, se determinó un compuesto (Figura 21) con  $\text{IG}_{50}=1.1 \pm 0.04$  (Figura 21). [77]

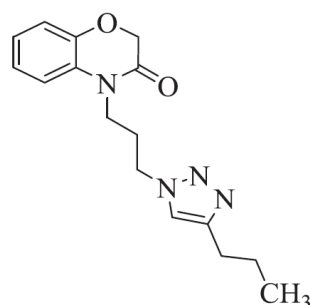


Figura 21. Estructura sintetizada con menor  $\text{IG}_{50}$ .

### 3.1.4. Inhibidores de la mitosis

La tubulina es esencial durante la mitosis, por ello un fallo o interrupción de su función puede llevar a la división y posible apoptosis de las células. Los microtúbulos son heterodímeros formados por  $\beta$  y  $\alpha$ -tubulina, siendo el mayor componente del citoesqueleto. Estos heterodímeros, recientemente han sido objeto de estudio para el desarrollo de fármacos contra el cáncer de mama, siendo el objetivo principal, encontrar nuevos microtúbulos más específicos, con menos toxicidad e insensibles a

mecanismos de resistencia química. Stefely y su grupo de trabajo [73,78] obtuvieron una serie de N-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)arilamidas como matriz para obtener nuevos agentes antimicrotúbulo empleando cicloadición catalizada por cobre. Todos los compuestos tenían cierta actividad contra el crecimiento de células cancerosas. Sin embargo entre todos estos inhibidores, hubo uno (Figura 22) que dio un valor de IC<sub>50</sub> de 46nM contra células de mama cancerosas (MCF-7).

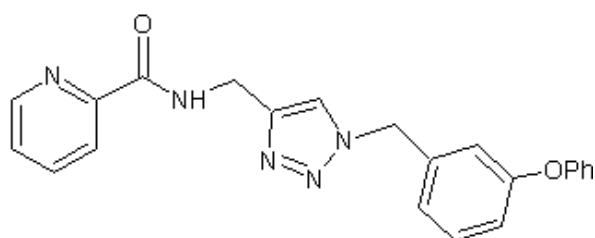


Figura 22. Agente microtúbulo sintetizado mediante reacción click.

En el año 2.011, el grupo de trabajo de Manach [73,79] sintetizó lo que denominaron en un principio, posibles sustitutos del taxol, el cual es un estabilizador de microtúbulos antitubulina. Esta síntesis se llevó a cabo mediante dos reacciones consecutivas, en primer lugar una  $\beta$ -glicosación estereoselectiva y en segundo lugar una cicloadición (CC) de estructuras aromáticas. (podrias haber añadido una figura para mostrarlo)

El uso de CC para la síntesis de fármacos contra el cáncer de mama, lleva a realizar previamente estudios con diferentes productos pertenecientes a la misma familia, como ha ocurrido con la berberina. La berberina (Figura 23) es un fármaco natural que se emplea para diversas enfermedades, entre ellas el cáncer de mama. El problema que presenta es su baja absorción en el intestino.

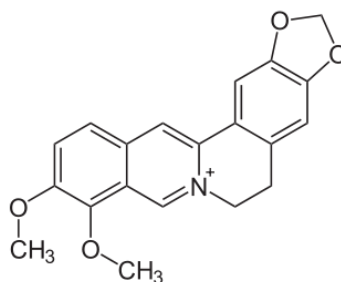


Figura 23. Estructura de la Berberina.

Por ello se planteó un estudio para aumentar dicha absorción, así se sintetizaron diferentes derivados con grupos bencil por medio CuAAC (cicloadición azida-alqueno catalizada con Cu) (Figura

24). En concreto, se sintetizaron 33 compuestos, cuyas estructuras fueron dilucidadas mediante RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) y MS.

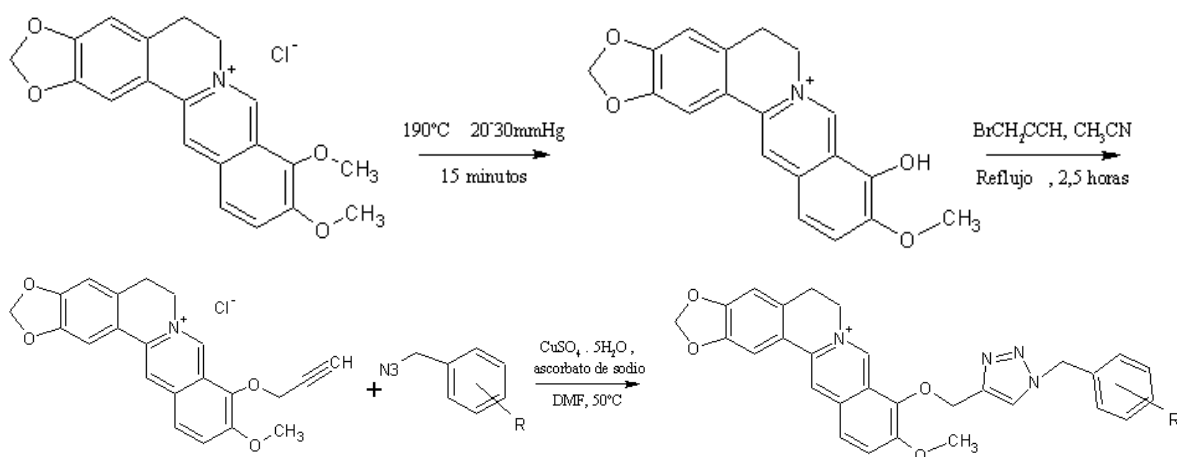


Figura 24. Ruta general de síntesis de derivados de berberina empleando CuAAC.

La actividad citotóxica fue determinada en células cancerosas de mama, MCF-7, obteniéndose que la mayoría de los compuestos sintetizados tenían mejor  $\text{IC}_{50}$  que la berberina natural, la cual tiene un  $\text{IC}_{50}$   $121.91 \pm 11.26 \mu\text{M}$ . Sin embargo destacaron dos compuestos, aquellos que tenían como sustituyentes terc-butilo y 1,3,5-triclorosustituyente en el grupo fenilo. Estos dos compuestos (Figura 25) presentaron mayor actividad anticancerosa y menor citotoxicidad frente a células sanas. [80]

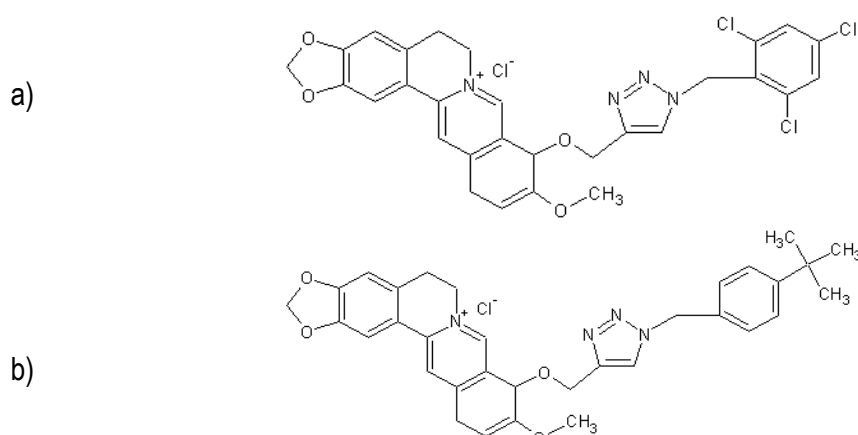


Figura 25. Compuestos sintetizados con menor actividad citotóxica, a)  $\text{IC}_{50}$   $12.57 \pm 1.96$  b)  $\text{IC}_{50}$   $15.80 \pm 2.14$ .

### 3.1.5. Agentes intercalantes

Los agentes intercalantes, sustancias que se encajan entre las bases a lo largo del ADN inhibiendo la transcripción y replicación, son objeto de estudio, ya que es necesario conocer más a fondo su interacción con el ADN y repercusión en su actividad los cambios estructurales. En este caso para el estudio se parte de naftalimida, sintetizando dos series de 3-1,2,3-triazol-1,8-naftalimidias (Figura 26). La síntesis fue llevada a cabo por reacción click uniendo 1,2,3-triazol en vez del grupo amino a la naftalimida.

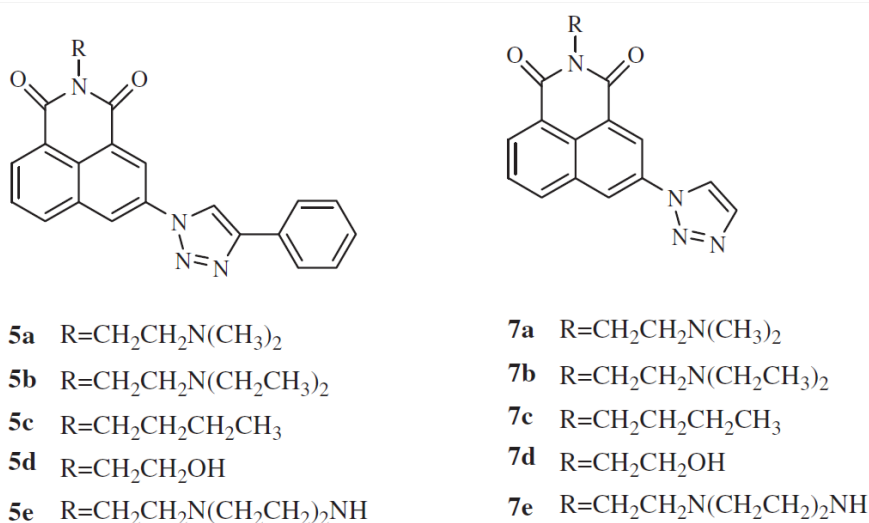


Figura 26. Estructuras de las dos series de derivados 1,2,3-naftalimidias sintetizados. [81]

La actividad antitumoral de las dos series fue evaluada in vitro contra células MCF-7 (células de cáncer mamario humano), Hela (células de carcinoma cervical humano), y 7,721 (célula de cáncer de hígado humano) mediante el ensayo de MTT. Los resultados IC<sub>50</sub> indicaron que citotoxicidad de los compuestos mejoró. Siendo los compuestos 5a-5e los que resultaron ser más citotóxicos contra las células MCF-7, sobre todo el compuesto 5a con un valor IC<sub>50</sub>=0.301. [81]

### 3.2. SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS (Drug Delivery)

Los agentes quimioterapéuticos son la terapia más empleada para el cáncer de mama, sin embargo producen muchos efectos secundarios, lo que a menudo obliga a administrar dosis menores de las necesarias por lo que el tratamiento puede fallar. De ahí la necesidad de estudiar e implantar nuevos sistemas de liberación de estos agentes que puedan discriminar entre células sanas y células cancerosas. [82] Algunos sistemas de liberación han sido utilizados para aumentar la solubilidad acuosa y estabilidad de los agentes y proporcionar un grado de selectividad en sus efectos terapéuticos. [6]

Los sistemas de liberación están formados por tres componentes: un componente que dirige el sistema con ligandos que presentan afinidades por moléculas expresados en las células cancerosas, una carga útil de fármacos y una estructura a nano-escala a la cual la fracción que dirige y la fracción de carga están unidas. Hay un gran número de tipos de administración dirigida de fármacos: conjugados fármaco-diana, polímeros lineales, transportadores basados en lípidos (liposomas y micelas), nanotubos de carbono, nanopartículas inorgánicas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de oro y dendrímeros (Figura 27). [63,82]

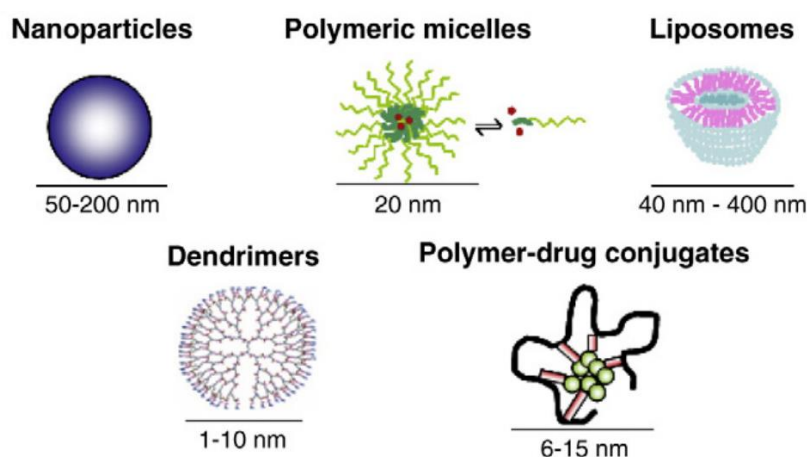


Figura 27. Nanosistemas para la administración de fármacos. [83]

Todos estos nanosistemas marcados pueden suministrar fármacos tanto de forma activa (Figura 28) como de forma pasiva (Figura 29). El sistema pasivo de liberación de fármacos marcado mejora la permeabilidad y el efecto de retención permite aumentar la deposición de los nanovehículos en el tumor. Sin embargo en el sistema activo, la liberación se consigue con conjugación covalente en la

superficie de la nanopartícula, del ligando o del anticuerpo, identificando entonces el receptor específico de la célula cancerosa. [84]

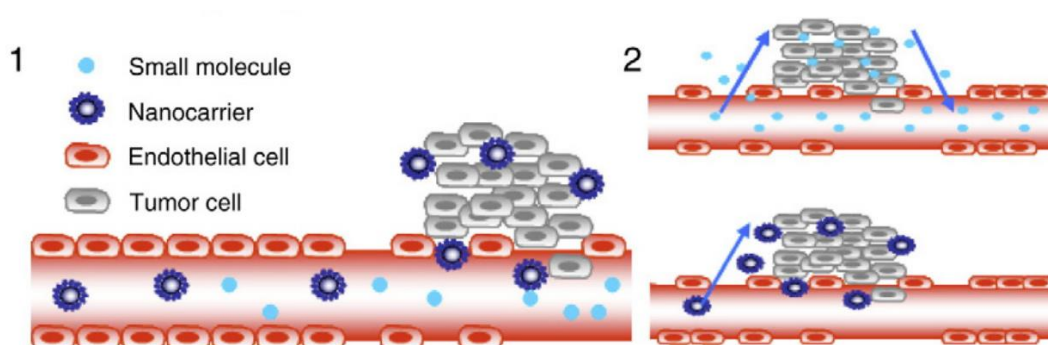


Figura 28. Sistema pasivo e liberación de fármacos. [83]

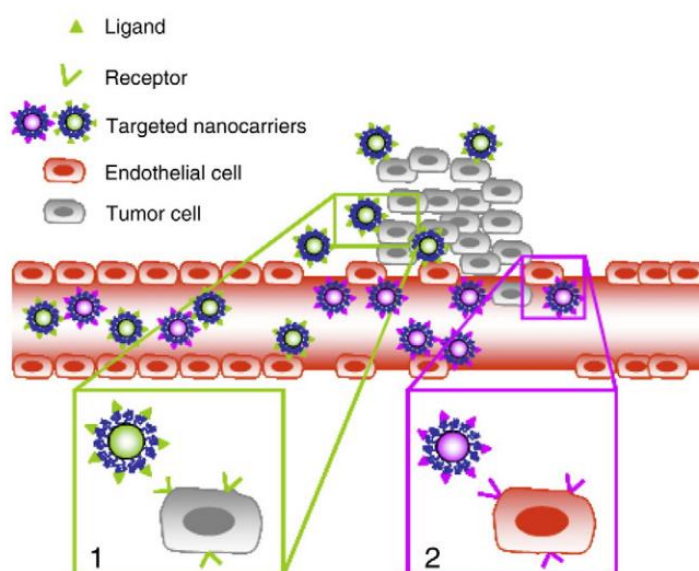


Figura 29. Sistema activo de liberación de fármacos. [83]

En la actualidad los sistemas de administración de fármacos más destacados y desarrollados para el cáncer de mama incluyen: liposomas, micelas poliméricas y dendrímeros. El aumento de la duración de la actividad terapéutica de estos sistemas de administración es debido a que estas macromoléculas tienen mayor retención y acumulación ya que se produce un deterioro del drenaje linfático del fluido intersticial del tejido canceroso. [6]

### 3.2.1. LIPOSOMAS

Los liposomas son macromoléculas formadas por bicapas de fosfolípidos que pueden encapsular un fármaco activo. Los fosfolípidos, son moléculas lineales que por un extremo son polares y por el otro apolares, de ahí que se agrupen para formar los liposomas de forma esférica, confiriendo una gran estabilidad a la vesícula, y encapsulando un medio acuoso. [6] Diferentes tipos de fármacos pueden ser encapsulados por liposomas, aquellos que sean hidrofílicos dentro de la vesícula y los lipofílicos dentro de la bicapa de lípidos. Son empleados para transportar fármacos contra el cáncer ya que aumentan la solubilidad acuosa, minimizan la toxicidad del fármaco, producen un mejor control de liberación y aumentan el tiempo de residencia en el plasma.

En los últimos años varios liposomas han sido aprobados por la FDA para uso clínico. Sin embargo, este transportador de fármacos aún no ha alcanzado todo su potencial; todavía hay algunos aspectos que se deben optimizar. Entre estos aspectos, se encuentran estrategias más eficientes para conjugar fracciones para dirigir los liposomas, como péptidos o anticuerpos. La reacción entre ácidos carboxílicos y aminas primarias para formar enlaces amida, es uno de los métodos más empleados. La ventaja de este método es que el ligando no precisa una modificación previa, sin embargo en ocasiones le falta especificidad. También se han estudiado enlaces de hidrazona para la conjugación, implicando una leve oxidación de grupos hidroxilo a aldehídos.

La baja estabilidad de los liposomas ha llevado a desarrollar los denominados liposomas stealth o estéricamente estabilizados. Para la síntesis de estos liposomas se recurrió al recubrimiento con polímeros hidrofílicos y flexibles, como por ejemplo el polietilenglicol, el cual es completamente biocompatible (Figura 30). La presencia de PEG (polietilenglicol) en la superficie de los liposomas entorpece la adsorción de proteínas, por lo que en vivo su semivida es mayor. Debido al carácter anfipático que presenta el PEG y sus derivados, debe añadirse en bajas proporciones, ya que, cantidades elevadas dan lugar a estructuras micelares. Por otra parte la proporción de éstos derivados va afectar a la eficacia de encapsulación, al tamaño del liposoma y a la liberación del material encapsulado. [85]



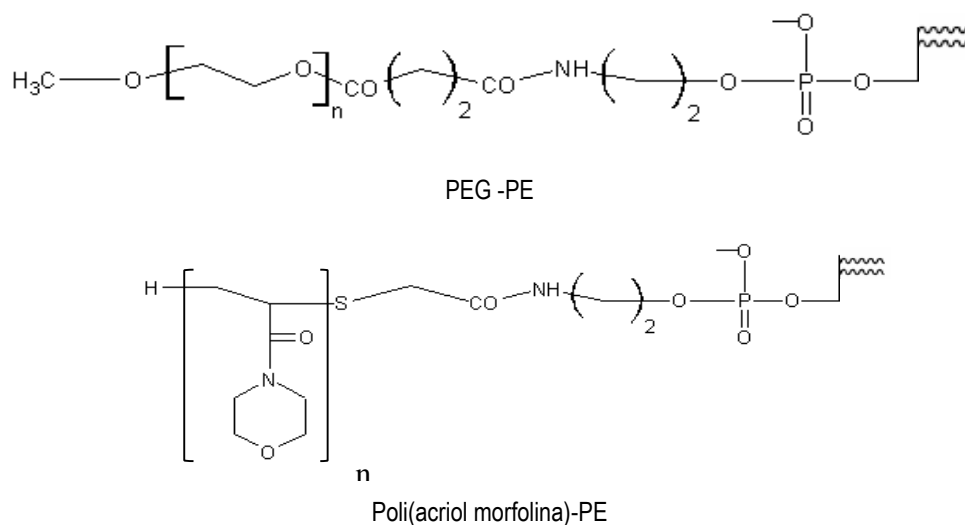


Figura 30. Estructura de algunos polímeros utilizados para la preparación de liposomas estabilizados.

Existen también los polimerosomas [86], se trata de vesículas huecas formadas por una doble membrana formada por copolímeros y bloques de grupos anfífilicos. Presentan ventajas frente a los liposomas, como una mayor estabilidad cuando es baja la concentración micelar crítica, también es menor la permeabilidad. Existen los llamados inmunoliposomas: se trata de sistemas liposomales con anticuerpos funcionales en la bicapa lipídica, los cuales liberan el fármaco cuando se fijan en la célula cancerosa.

Utilizando reacciones click, Schuber y su grupo de trabajo [63,87,88,89] desarrollaron una estrategia para conjugar ligandos de manosa a las superficies de liposomas. Los liposomas conjugados se dirigen de forma específica a las células dañinas. En esta estrategia (Figura 31):

- i. Un lípido con alquino terminal se incorporó al liposoma.
- ii. Un derivado de manosil sin protección fue funcionalizado con un grupo azida y conjugado a la superficie del liposoma en un solo paso.
- iii. Cantidades catalíticas del sistema ascorbato / CuSO<sub>4</sub> no fueron suficientes para impulsar CC. Por ello se tuvo que añadir un agente estabilizador para proteger el Cu en estado de oxidación (I), de esta manera se obtuvo una reacción con un alto rendimiento y un tiempo de reacción de una hora.

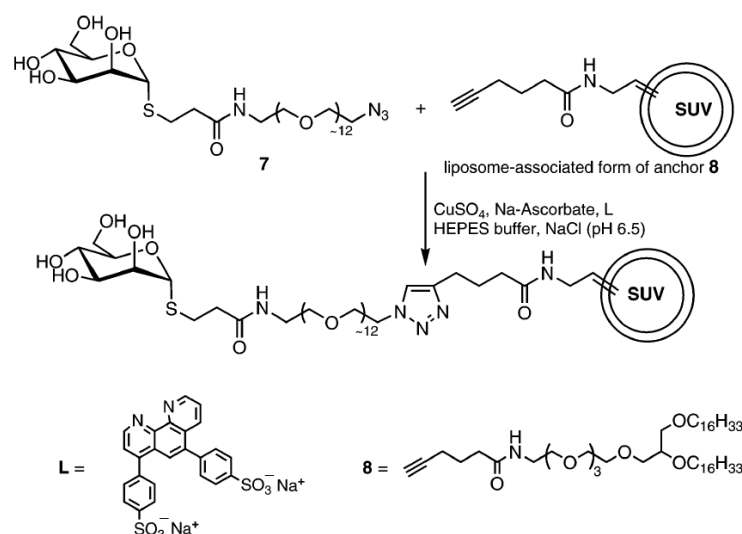


Figura 31. Síntesis vía click para la funcionalización de liposomas con manosa. [87]

El grupo de trabajo de Cavalli [63,90] investigó la modificación in situ superficial de los liposomas con CC (Figura 32).

- i. Una mezcla de alquino-terminal 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3- fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfolina, y una rodamina lisamina derivado de DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) (DOPE-LR) se sometió a ultrasonidos, para preparar liposomas unilamenares que llevan grupos alquino terminal en su superficie.
- ii. A continuación, un derivado de azida funcionalizado con nitro-benzoxadiazol, N3-Lys (NBD) –NH<sub>2</sub>, y CuBr eran añadido a la solución. La reacción se completó en 4 horas, sin cambios importantes en el tamaño de los liposomas.

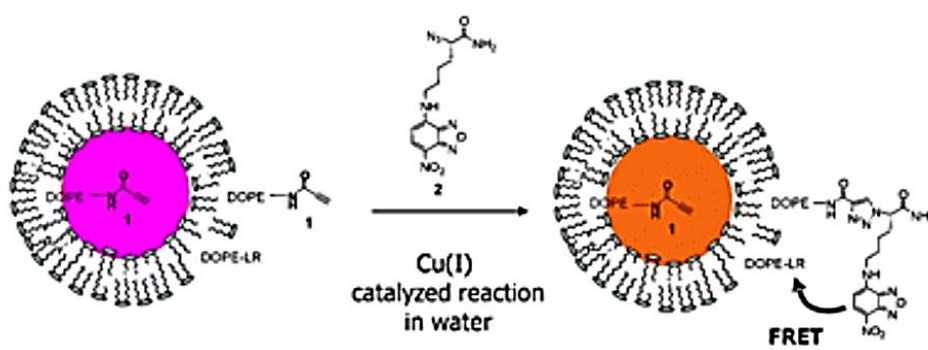


Figura 32. Síntesis de la modificación in situ superficial de los liposomas empleando química click. [90]

### 3.2.2. MICELAS POLIMÉRICAS

Las micelas poliméricas son nanoestructuras esféricas, caracterizadas por un tamaño de 20-100 nm (similar a las lipoproteínas y virus). [86] En medio acuoso, están formadas por copolímeros compuestos de segmentos hidrófilos e hidrófobos. El núcleo es hidrófobo, lo que facilita el transporte de fármacos hidrófobos, ya sea por medio de enlaces covalentes o no covalentes, como interacciones hidrófobas e interacciones iónicas, mientras que la envoltura hidrofílica las estabiliza y las hace solubles en agua. La corona además de conferir el carácter hidrófilo protege la micela. Estas propiedades fisicoquímicas controlan el comportamiento biológico de la micela, incluyendo su biodistribución in vivo y su biocompatibilidad. [6]

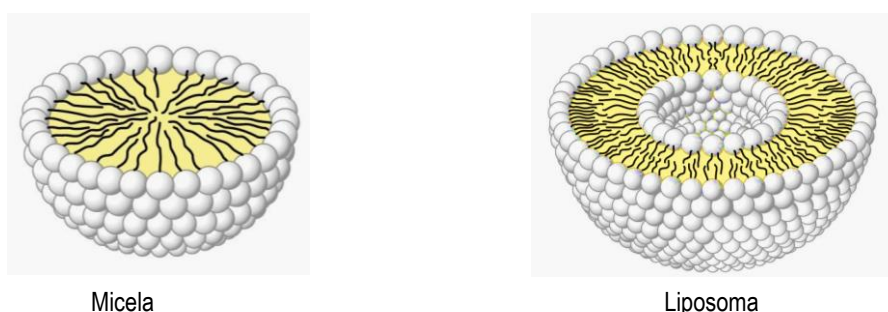


Figura 33. Diferencia estructural entre las micelas y los liposomas.

Las micelas son utilizadas para la liberación de fármacos ya que confieren las siguientes ventajas: poseen un diámetro adecuado para el periodo prolongado de vida media en la sangre, esto es debido a que no son eliminadas vía renal debido precisamente a su tamaño y por tanto la actividad del fármaco continúa después de una única dosis; alta solubilidad en agua; muy buena estabilidad estructural, no producen acumulación a largo plazo. La toxicidad provocada por la acumulación del fármaco es evitada ya que éste circula por la sangre dentro de las micelas.

Los fármacos hidrofóbicos se pueden cargar en la micela por:

- Medios físicos: disolución directa, diálisis, emulsión O/W, conjugación química, complejación y diversos métodos de evaporación del disolvente siendo los dos primeros los más utilizados para fármacos razonadamente hidrosolubles.
- Acoplamiento covalente del fármaco al bloque hidrófobo para lograr un mayor control sobre la velocidad de liberación del fármaco.

Estudios preclínicos mostraron que micelas poliméricas cargadas con adriamicina [6] se acumulan preferentemente en tejido tumoral que en órganos con tejido o células sanas, mostrando por tanto un aumento de la actividad terapéutica y minimizando la toxicidad. Estas micelas poliméricas están dirigidas contra un tejido canceroso específico mediante el acoplamiento covalente de moléculas de azúcar, transferina, y el ácido fólico como agentes dirigentes, provocando la apoptosis de las células cancerosas. Se han funcionalizado micelas empleando la adición de Michael de tioles a olefinas activadas [86]. Los grupos de trabajo de An y Stucky [91] combinando la adición de Michael y CuAAC llevaron a cabo la funcionalización del núcleo y de la capa externa de la micela polimérica. La capa externa de la micela (65-95nm) se preparó por precipitación de NIPAM (N-isopropilacrilamida), utilizando un preformado de polímero PDMA (Poli(N,N-dimetilacrilamida)) RAFT (cadena de transferencia reversible adición-fragmentación) (CTA). Grupos de tritiocarbonato se localizaron en el núcleo junto con NIPAM, mientras que los bloques de PDMA, los cuales tienen grupos azido forman la capa externa. El núcleo de la micela puede ser funcionalizado con una fluoresceína o-acrilato a través de un solo paso de aminólisis/adición de Michael, mientras que la capa externa se marcó con una sonda de dansyl por medio de CuAAC (Figura 34).

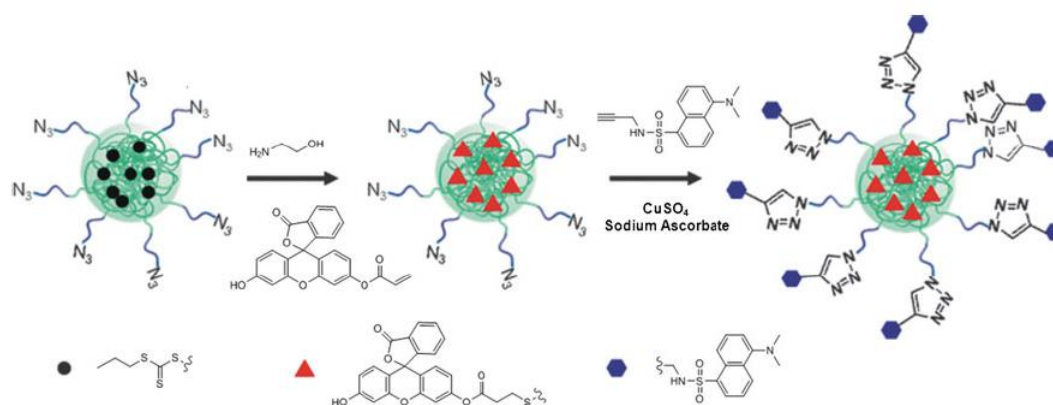


Figura 34. Preparación de micelas funcionalizadas mediante la secuencia aminólisis/adición Michael/CuAAC. [86,91]

### 3.2.3. DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son moléculas poliméricas con formas bien definidas, de tamaño nanoscópico (1-20nm) [92] y propiedades fisicoquímicas que les otorgan las funciones terapéuticas para las que se les utiliza. Representan una clase única de polímeros que se caracteriza por una arquitectura de ramificación de árbol y con una alta densidad de grupos funcionales en su superficie, si lo

comparamos con las proteínas poseen un mayor volumen hidrodinámico. Su estructura se caracteriza por estar compuesta por:

- Superficie multivalente con un alto número de potenciales sitios reactivos.
- Armazón exterior justo por debajo de la superficie, son capas concéntricas o capas de amplificación.
- Un núcleo, que determina el tamaño, forma, dirección y multiplicidad.

Los dendrímeros, en su mayoría, están formados por más de una capa (G1, G2, G3, etc.), es muy importante que la síntesis de cada una de estas capas se finalice correctamente para mantener la pureza y por tanto la monodispersidad del dendrímero [93,94]. Se trata de macromoléculas ideales para ser portadoras de agentes terapéuticos, dada su arquitectura y el gran número de grupos funcionales en su superficie. Dendrímeros PPI (Polipropilenimina) (Figura 35) [95] y PAMAM (poliamidoamina) (Figura 36) [96] contienen aminas primarias en su superficie y muestran conformaciones extendidas a pH ácido debido a las repulsiones electrostáticas entre las aminas terciarias protonadas en el interior y entre las aminas primarias de la superficie. A pH básico se produce un plegamiento como consecuencia de los puentes de hidrógeno entre las aminas terciarias interiores y las aminas primarias de la superficie, resultando un núcleo denso.

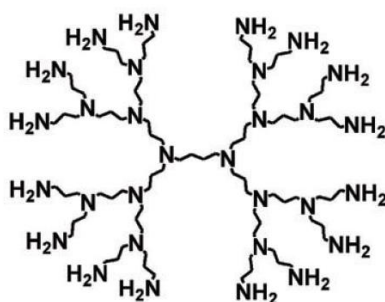


Figura 35. Estructura de un dendrímero PPI. [97]

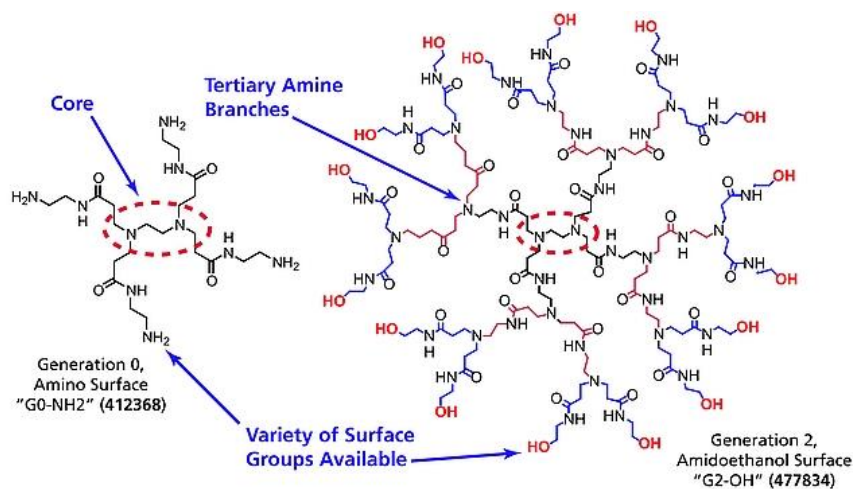


Figura 36. Estructura de un dendrímero PAMAM (fuente [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

La funcionalización de los dendrímeros es de gran interés para el desarrollo de nuevos o mejores métodos de administración de fármacos, ya que influyen en la solubilidad y otras características biológicas. Se puede aplicar por tanto la química CuAAC para la funcionalización de dendrímeros con carbohidratos, péptidos y nucleótidos [98] entre otras moléculas de interés en química farmacéutica.

Aplicando la reacción click se han llegado a preparar dendrímeros a partir de unidades repetidas que llevan funcionalidades ortogonales, evitando pasos de activación de intermedios. Los grupos de Hawker y Malkoch [98,99] han utilizado esta estrategia para la preparación de éter bencílico y dendrímeros bis-MPA (ácido 2,2-bis(metilol)propionico) combinando CuAAC ( $\text{CuSO}_4$ , ascorbato, THF- $\text{H}_2\text{O}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ) y etapas eterificación/esterificación (Figura 37) El grupo de Kakkar [98,100] ha combinado dos reacciones click: CuAAC y Diels-Alder, para la síntesis de dendrímeros (Figura 38, c).

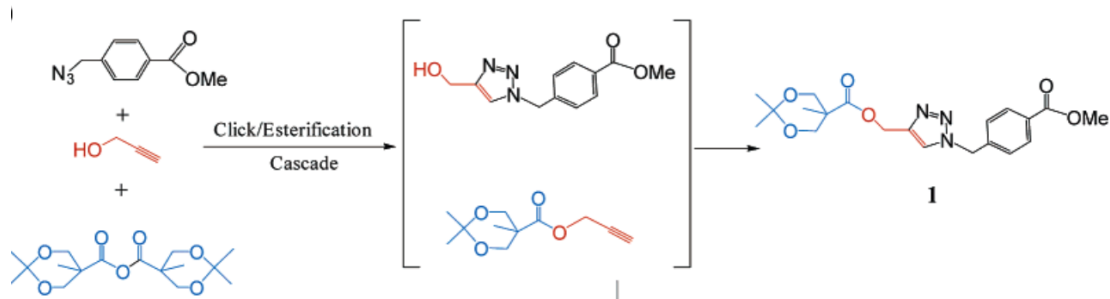


Figura 37. Modelo de cascada de esterificación con aplicando química click. [99]

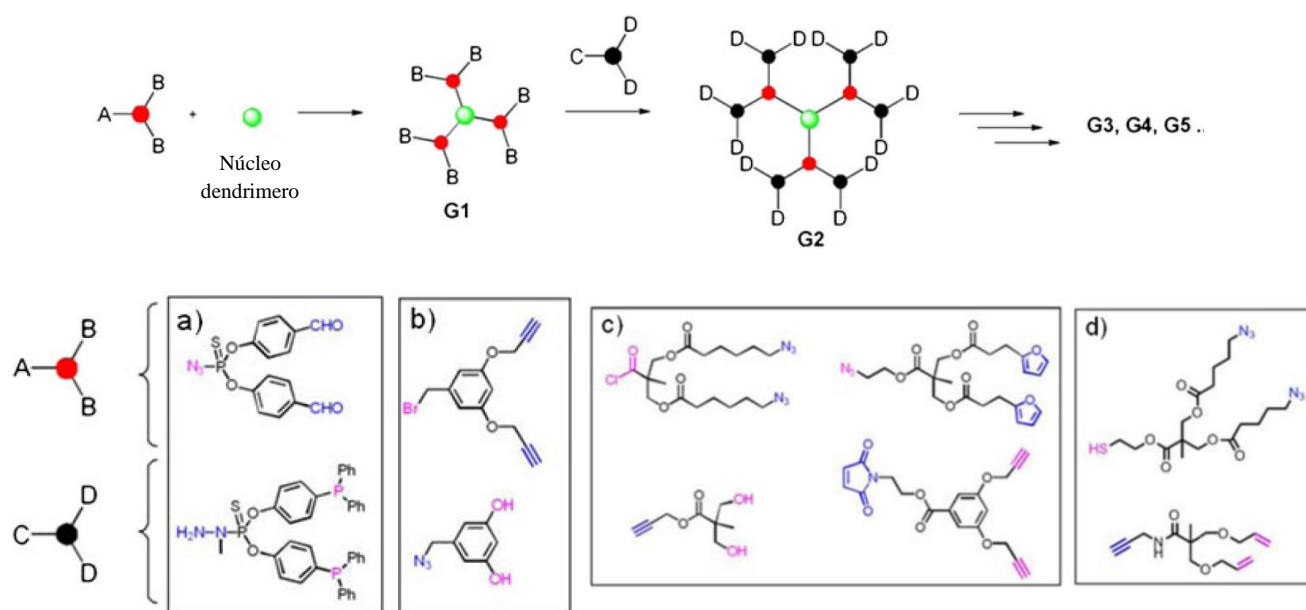


Figura 38. Síntesis de dendrímeros empleando CuAAC y Diels-Alder; a) síntesis de fósforo dendrímeros que implican enlaces de hidrazona [98,101,102], d) síntesis dendrímico de sexta generación por la combinación de TEC (luz ultravioleta, 365 nm, THF) y CuAAC (CuSO<sub>4</sub>, ascorbato, THF-H<sub>2</sub>O). [98,103]

Otro ejemplo es la síntesis de dendrímeros por CC fundamentada en la química tiol-eno. Se basa en la reacción entre un alqueno terminal y un tiol, cuyo mecanismo de reacción puede ser a través de radicales libres o mecanismo nucleofílico. En la mayoría de los casos, es necesario un iniciador de radicales para llevar la reacción hasta su final. En particular, en estudios recientes [93] se utilizó 2,2'-metoxi-2-fenilacetofenona en cantidades subestequiométricas. Se puede llevar a cabo en diferentes disolventes, generalmente en atmósfera inerte para evitar reacciones secundarias que impliquen oxígeno molecular. La reacción click basada en tiol-eno es una de las más recientes herramientas empleadas ya que tiene una gran tolerancia hacia otro tipo de reacciones y se empleado para la síntesis de dendrímeros con varias capas. En concreto se ha empleado química tiol-eno en la modificación de poli-oxazolinas o poli-butadienos con tioles para construir glicodendrones. [70] Síntesis de la cuarta generación de dendrímeros empleando la química tiol-eno, para construir la base y funcionalizar los extremos. A partir del núcleo 2,4,6-trialiloxi-1,3,5-triazina. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente, utilizando radiación UV (365nm) durante 30 min. Las reacciones-tiol-eno en ausencia de disolvente bajo condiciones de reacción benignas y sin el uso de cualquier catalizador de metal permite un proceso respetuoso con el medio ambiente, para la síntesis de macromoléculas. La reacción Diels Alder (reacción de un dieno y un dienófilo) también se ha aplicado

para la síntesis de dendrímeros vía click. Mullen [104] popularizó el uso de ciclopentadienona como el dieno para construir dendrímeros ricos en carbono. La reacción Diels-Alder también se utiliza para sintetizar macromoléculas biocompatibles, a pesar de que las altas temperaturas pueden causar problemas. Para solventar este inconveniente se emplean sustratos altamente activos, siendo furano y antraceno los más empleados. [93]

Los dendrímeros son buenos portadores también, porque no son tóxicos, atraviesan barreras biológicas, como la barrera hematoencefálica, membranas celulares, intestino, pared vascular, etc. Son altamente estables, permaneciendo en circulación el tiempo necesario para tener el efecto clínico deseado. Existen algunos estudios en los que se describe la encapsulación molecular de fármacos como adriamicina y 5-fluoruracilo. [85]

Aunque las micelas poliméricas, los dendrímeros y los liposomas sean los sistemas más estudiados y aplicados, esto no quiere decir que no existan otros sistemas de liberación. Se pueden emplear sistemas gelificados (hidrogeles) aplicados directamente en el tumor (in situ), lo que evita los efectos sistémicos. [105] Estos sistemas sin embargo presentan limitaciones tales como la necesidad de utilizar para su síntesis disolventes orgánicos o iniciadores químicos, además de ser incompatible con algunos fármacos contra el cáncer como doxorubicina, daunorubicina o ciclofosfamida. Para salvar estas limitaciones, se ha estudiado el hecho de ensamblar nanopartículas como péptidos a estos hidrogeles. Un ejemplo es hidrogel peptídico derivado del oxiplatino sintetizado vía CC. Estos péptidos tienen la capacidad de funcionalizarse sin interferir en el autoensamblaje con el hidrogel. Así, las secuencias de péptidos, tales como Arg-Gly-Asp (RGD) y Asn-Gly-Arg (NGR) han hecho importantes contribuciones en la administración dirigida de fármacos. Las secuencias cortas de péptidos son interesantes debido a que se pueden sintetizar a gran escala, pueden ser modificados y no son inmunogénicos. No obstante, los péptidos RGD lineales pueden ser degradados por las proteasas por lo que sus análogos cíclicos son mucho más estables. Han sido sintetizados análogos cíclicos pentapéptidos de NGR y RGD través de resina vía química click. Estos péptidos cíclicos (Figura 39) contienen una unidad de triazol, por lo que están menos predispuestos a ser atacados por enzimas hidrolíticas o esterases. [106]



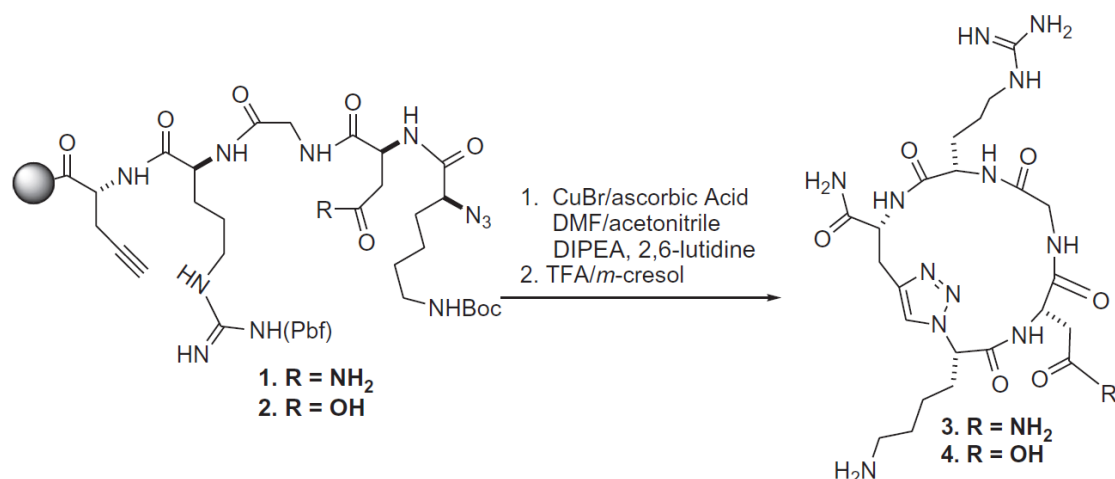


Figura 39. Síntesis vía química click de péptido cíclico. [106]

### 3.2.4. APLICACIONES EN LA TERAPIA DEL CÁNCER DE MAMA

Una vez vistos los sistemas de administración de fármacos, los cuales pueden ser sintetizados vía click y aplicables a fármacos para el tratamiento del cáncer de mama, se detallan ejemplos más concretos.

#### 3.2.4.1. Liposomas

Uno de los ejemplos del uso de liposomas para la administración de un fármaco contra el cáncer de mama es el Doxil<sup>®</sup>. Se trata de una formulación liposomal de doxorubicina (antibiótico). El Doxil<sup>®</sup> combina fosfolípidos para formular un liposoma con PEG, cuyas cadenas se utilizan para recubrir la superficie del liposoma con un polímero hidrófilo. Así se repelen las proteínas plasmáticas y se minimiza su unión a la superficie del liposoma. La ventaja de este sistema es que se minimiza la captura de los liposomas por el sistema reticular endotelial en órganos sanos. Por otro lado, estos liposomas gracias al PEG aumentan su tiempo de residencia en el plasma y por tanto se incrementa la capacidad para acumularse en tejidos tumorales. [98]

La HU (hidroxiurea) (Figura 40) es un fármaco muy empleado como agente quimioterapéutico frente al cáncer de mama. Uno de los métodos para mejorar su efectividad y disminuir los efectos secundarios, es el empleo de liposomas como agente transportador. En el estudio llevado a cabo, se comparó la citotoxicidad de la HU libre y la HU encapsulada en liposomas, observándose que, al



efecto del paclitaxel estándar ( $IC_{50}$   $166.9 \pm 2.9$ ), debido entre otras características que confiere la cobertura de lípidos, a que la liberación del fármaco sea menor que la del fármaco estándar. [108]

#### 3.2.4.2. Micelas

Para la liberación de fármacos de elevada toxicidad como doxorubicina, metotrexato y camptotecina se han utilizado micelas poliméricas basadas en polímeros de aminoácidos L-aspártico. Este tipo de micelas y aquellas constituidas por polímeros de polióxido tienen una amplia aplicación dado a las modificaciones químicas que permiten que se les haga en el núcleo, permitiendo una mejor carga del fármaco a transportar. [85]

El grupo de trabajo de Shoichet [86,109] desarrolló una ruta para la síntesis de micelas utilizando la cicloadición Diels-Alder. Se preparó y ensambló un furano anfífilico como dieno terminal. Los grupos furano reaccionaron con el anticuerpo modificado anti-HER2, que se emplea como fármaco para el cáncer de mama. Con este método se superaban las deficiencias que presentaba hasta entonces la síntesis de micelas como la baja eficacia y la pérdida de actividad. Solo fue necesaria una pequeña cantidad de anticuerpos anti-HER2 en la superficie de las micelas, mientras que existía un número mucho mayor de cadenas de PEG-furano para acoplarse a la doxorubicina. Por tanto se desarrolló un método para la liberación de agentes quimioterapéuticos y anticuerpos. [86]

Otro modelo de sistema de liberación de fármacos es la propuesta y desarrollada por el grupo de Zhang [110] Para ello se utilizaron nanopartículas funcionalizadas con histamina (Figura 42) para que puedan llegar a introducirse en las mitocondrias. Focalizar las mitocondrias como destino de los compuestos quimioterapéuticos ha surgido por la necesidad de superar la resistencia a los fármacos, ya que las células suelen protegerse de sustancias extrañas incluidas moléculas pequeñas de fármacos y sistemas de liberación. Esta técnica de defensa se basa en el encapsulamiento de la molécula extraña (endosomas, lisosomas) y posterior degradación, lo que hace que los fármacos pierdan parte de su efecto terapéutico. Además, las mitocondrias desempeñan un papel vital en la célula, ya que regulan diversas tareas, como la respiración celular (con consumo de oxígeno y

glucosa) y la homeostasis celular. En el cáncer, con el crecimiento progresivo del tumor hay una gran demanda de oxígeno y nutrientes.

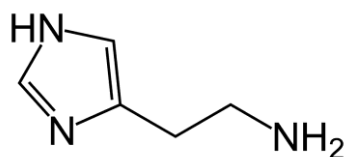


Figura 42. Estructura química de la histamina.

En esta ocasión fueron sintetizados copolímeros anfifílicos funcionalizados con histamina. La ruta sintética comenzó por una apertura de anillo seguida de post-funcionalización vía química click tiol-eno iniciada por UV (Figura 43). La formación de las micelas de estos copolímeros funcionalizados solo tiene lugar en metanol o en disolución acuosa.

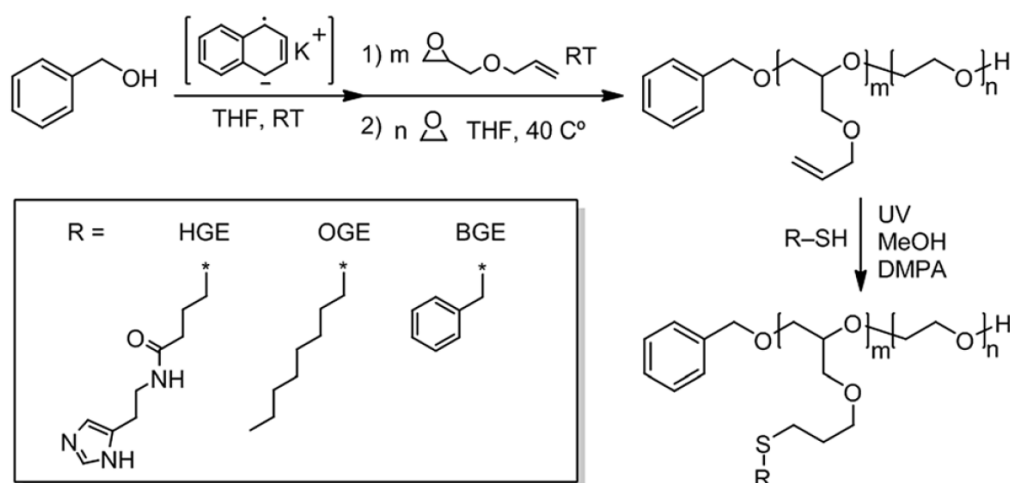


Figura 43. Ruta sintética del co-polímero PAGE-b-PEO (poli(alil glicilil éter)-b-poli(etilenoóxido)) y sus análogos. [110]

El estudio para la efectividad de la administración de fármacos *in vitro*, utilizando el ensayo MTT bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol para evaluar la actividad mitocondrial. Las células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468) fueron tratadas con doxorubicina libre y con doxorubicina cargada en el polímero funcionalizado (DOX-NPs). El resultado obtenido fue que el sistema de liberación del fármaco puede escapar de los lisosomas y endosomas y dejar el

fármaco en el núcleo y la mitocondria en solo 2 horas. Mientras que el fármaco libre tarda 72 horas en ejercer la misma eficacia. [110]

### 3.2.4.3. Dendrimeros

Kono y su grupo de trabajo [6,111] han desarrollado varios dendrímeros conjugados con el Metotrexato que incorporan ácido fólico como agente de dirección. La selección del ácido fólico como agente de dirección es un resultado de la sobreexpresión de los receptores de folato en la superficie de muchos tipos de cánceres, lo que permite la orientación de estos dendrímeros conjugados con el fármaco a las células cancerosas. La investigación demostró que el dendrímero conjugado marcado con ácido fólico, se dirigió selectivamente a las células cancerosas, proporcionando una actividad anticancerígena mayor si se compara con el fármaco solo.

En la Tabla 11, se destacan diferentes sistemas de administración de fármacos ya registrados, comercializados y administrados en personas para el tratamiento del cáncer de mama.

Tabla 11. Sistema de administración de fármacos para el tratamiento de cáncer de mama. [83]

Sistemas administración	Fármaco	Nombre	
Micelas porliméricas	Paclitaxel	Genosol®-PM	Cáncer de mama
Nanopartículas	Albumina-paclitaxel	Abraxane®	Metástasis cáncer de mama
	Paclitaxel	Nanoxel®	Cáncer de mama avanzado
Polímero conjugado	Paclitaxel	Xyotec®	Cáncer de mama
	Doxorubicina	PK1	Cáncer de mama
Liposomas	Doxorubicina	Doxil®	Metástasis cáncer de mama
	Doxorubicina	Myocet®	Cáncer de mama

## CONCLUSIONES

Es una realidad que el cáncer es una de las enfermedades que afecta a un mayor porcentaje de la población mundial llegando a causar la muerte. Dentro de los diversos tipos de cáncer que existen, el de mama, es el más extendido entre la población femenina, y el que ha causado más muertes hasta el día de hoy. No obstante, los avances tecnológicos, médicos, científicos y la evolución del papel de la mujer en la sociedad, han permitido que cada vez se detecte antes esta enfermedad con una mayor probabilidad para ser curada. Por lo que a pesar de seguir siendo una enfermedad que nadie quiere padecer la motivación y esperanzas por superarla cada vez es mayor.

El progreso de los tratamientos frente al cáncer de mama, no se centra en el descubrimiento de nuevos fármacos, sino, más bien, en obtener la máxima efectividad de los existentes evitando los efectos secundarios que puedan producir. Y sobre todo, en una síntesis de fármacos más rápida e inocua. Por ello, en los últimos años ha jugado un papel básico la reacción click dentro del mundo del cáncer de mama.

La reacción click nace como una versión de la reacción de cicloadición Huisgen, para poder ser aplicada en diferentes campos, desde el terapéutico, como se ha visto en el presente trabajo hasta la nanotecnología aplicada a la ingeniería. Una reacción versátil, modular, selectiva, con altos rendimientos y capaz de sintetizar un amplio rango de, en este caso, fármacos para poder estudiar su efectividad. La síntesis de fármacos para el tratamiento del cáncer de mama no es la única pieza del tratamiento de la enfermedad que se ha visto beneficiada por la reacción click, también los sistemas de liberación de fármacos han sabido aprovecharse de esta reacción, y esto se evidencia en los ejemplos expuestos en los diferentes apartados del presente trabajo.

La evolución no se concibe sin investigación, la investigación no se concibe sin personas que creen en lo que hacen y luchan por mejorar la vida o la salud de otros millones de personas. Aquí hemos hablado de la reacción click y su aplicación concreta en el tratamiento del cáncer de mama, pero existen otros muchos avances en química que han mejorado y mejorarán la calidad de vida las personas, y espero que esto nunca se pierda porque si no se habrán perdido las ganas de evolucionar y las ganas de mejorar el mundo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Larsen, M. J.; Mads T.; Gerdes, A.M.; Kruse, T.A. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics *Breast Canc.* **2014**, 8,145 – 155.
- [2] Arindam P.; Soumen P. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front. Biosci.* **2015**, 19, 605–618.
- [3] Yersal, O.; Barutca, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications *World J. Clin. Oncol.* **2014**, 5, 412-424.
- [4] Xiang, Y.J.; Fu, Q.Y.; Ma, Z.B.; Gao, D.Z.; Zhang, Q.; Li Y.Y.; Li, L.; Liu, L.; Ye, C.M.; Yu, Z. G.; Guo, M.M. Screening for candidate genes related to breast cancer with cDNA microarray analysis, 2014, *Chronic Dis. Trans. Med.* **2015**, 1, 65–72.
- [5] Conklin, C.; Huntsman, D.; Yorida, E.; Maktresov, N.; Turbin, D.; Bechberger, J.F.; Sin, W.C.; Naus, C.C. Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer *Cancer Lett.* **2007**, 255, 284–294.
- [6] El Hazzat J.; El-Sayed Jallal, M.E.J. Advances in Targeted Breast Cancer Therapy *Curr. Breast Cancer Rep.* **2010**, 2,146-151.
- [7] Hatse, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Role of Antimetabolites of Purine and Pyrimidine Nucleotide Metabolism in Tumor Cell Differentiation. *Biochemical Pharmacology*, **1999**, 58, 539 – 555.
- [8] Kaye, S.B. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact *J. Br. Cancer.* **1998**, 78, 1–7.
- [9] G.J. Peters, G.J.; Van der Wilt, C.L.; Van Moorsel, C.A.J.; Kroep, J.R.; Bergman, A.M.; Ackland, S.P. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacology & Therapeutics.* **2000**, 87, 227 – 253.
- [10] Walko C.M.; Lindley C. Capecitabine: A Review *Clin. Ther.* **2005**, 27, 1, 23 – 44.
- [11] Avendaño C.; Menéndez J.C. (2008) Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Elsevier, Amsterdam.
- [12] Burde, A.; Oshero, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1400, 139-154.
- [13] Van Maane, J.M.S.; Retel, J.; de Vries, J.; H.M. Pinedo Mechanism of action of antitumor drug Etoposide: a review *J. Natl. Canc. Inst.* **1988**, 80, 1526-33.
- [14] Montecucco, A.; Biamonti, G. Cellular response to Etoposide treatment *Cancer Lett.* **2007**, 252, 9-18.

- [15] Jiang, N.; Wang, X.; Yang, Y.; Dai, W. Advances in Mitotic Inhibitors for Cancer Treatment *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, 6, 885-895.
- [16] Cannon, G.W. (2012) Goldman's Cecil Medicine, vol. 1, 159-165, Elsevier.
- [17] Madhusudan, S.; Ganesan, T.S. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy *Clin. Biochem.* **2004**, 37, 618–635.
- [18] Cahir, C.; Guinan, E.; Dombrowski, S.U.; Sharp, L.; Bennett, K. Identifying the determinants of adjuvant hormonal therapy medication taking behavior in women with stages I–III breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Patient Education and Counseling.* **2015**, Article in press
- [19] Rai, K.R., Peterson, B.L., Appelbaum, F.R., Kolitz, J., Elias, L., Shepherd, L., Hines, J., Threatte, G.A., Larson, R.A., Cheson, B.D., Schiffer, C.A. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* **2000**, 343(24), 1750 – 1757.
- [20] Yang, K., Tan, J., Wu, T. Alkylating agents for Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Cochrane Database Syst Rev.* **2009**; 1.
- [21] American Cancer Society  
<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-toc>  
(23 Septiembre 2015)
- [22] Lubecka-Pietruszwska, K.; Kaufman-Szymczyk, A.; Stefanska, B.; Smolewski, P.; Fabianowska-Majewska, K. Clofarabine, a novel adenosine analogue, reactivates DNA methylation-silenced tumor suppressor genes and inhibits cell growth in breast cancer cells *Eur. J. Pharm.* **2013**, 723, 276–287.
- [23] Hess, J.A., Khasawneh, M.K. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate *BBA Clinical*, **2015**, 3, 152 – 161.
- [24] Piug, L. Methotrexate: New Therapeutic Approaches, *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, 105, 583 – 589.
- [25] Klareskog, L.; Van der Heijde, D.; De Jager, J.P.; Gough, A.; Kalden, J.; Malaise, M.; Martin Mola, E.; Pavelka, K.; Sany, J.; Settas, L.; Wajdula, J.; Pedersen, R.; Fatenejad, S.; Sanda, M. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* **2004**, 363, 675-681.
- [26] Johnston, A.; Gudjonsson, J.E.; Sigmundsdottir, H.; Ludviksson, B.R.; Valdimarsson, H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol.* **2005**, 114, 154-163.



- [27] Aubel-Sadron, G.; Londos-Gagliardi, D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*. **1984**, *66*, 333-352.
- [28] Zunino, F.; Capranico, G. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines *Anticancer Drug Des.* **1990**, *5*, 307-317.
- [29] Mordente, A.; Meucci, E.; Silvestrini, A.; Martorana, G.E.; Giardina, B. New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Curr Med Chem.* **2009**, *16*, 1656 - 1672.
- [30] Bielawski, K.; Bielawska, A.; Muszynska, A.; Popławska, B.; Czarnomysy, R.; Cytotoxic activity of G3 PAMAM-NH<sub>2</sub> dendrimer-chlorambucil conjugate in human breast cancer cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, **2011**, *32*, 364 – 372.
- [31] Foon, K.A., Hallek, M.J. Changing paradigms in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. **2010**, *3*, 500-511.
- [32] Bielawska, A; Bielawski, K; Muszynska, A. Synthesis and biological evaluation of new cyclic amidine analogs of chlorambucil *Farmaco* **2004**, *59*, 111-7.
- [33] Neyns, B., Tosoni, A., Hwu, W.J., Reardon, D.A. Dose-dense temozolomide regimens: antitumor activity, toxicity, and immunomodulatory effects. *Cancer*. **2010**, *116*, 2868-2877.
- [34] Wick, W., Platten, M., Weller, M. New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. *Neuro Oncol.* **2009**, *1*, 69-79.
- [35] Clark, A.S.; Deans, B.; Stevens, M.F.G.; Tisdale, M.J.; Wheelhouse, R.T.; Denny, B.J.; Hartley, J.A. Synthesis of Novel Imidazotetrazinones and Related Bicyclic Heterocycles To Probe the Mode of Action of the Antitumor Drug Temozolomide *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 1493–1504.
- [36] Weiss, R.B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* **1992**, *6*, 670-686.
- [37] Tan, C., Tasaka, H., Yu, K.P., Murphy, M.L., Karnofsky, D.A. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*. **1967**, *3*, 333-353.
- [38] Arcamone, F.; Cassinelli, G.; Fantini, G.; Grein, A.; Orezzi, P.; Pol, C.; Spalla, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* **1969**, *6*, 1101-1110.
- [39] Zhou, Z.; Zwelling, L.A.; Ganapathi, R.; Kleinerman, E.S. Enhanced etoposide sensitivity following adenovirus-mediated human topoisomerase II alpha gene transfer is independent of topoisomerase II beta. *Br J Cancer*. **2001**, *85*, 747 – 751.

- [40] Azarova, A.M.; Lyu, Y.L.; Lin, C.P.; Tsai, Y.C.; Lau, J.Y.; Wang, J.C.; Liu, L.F. Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**, 104(26), 11014 – 11019.
- [41] Adhirikari, N.; Kumar Halder, A.; Sha, A.; Das Saha, K.; Jha, T. Structural findings of phenylindoles as cytotoxic antimetabolic agents in human breast cancer cell lines through multiple validated QSAR studies. *Toxicology in Vitro*, 2015, 29, 1392 – 1404.
- [42] Moraga, D; Rivas-Berrios, A; Farias, G; Wallin, M.L.; Maccioni, R.B-Estramustine-phosphate binds to a tubulin binding domain on microtubule-associated proteins MAP-2 and tau. *Biochim. Biophys. Acta*. **1992**, 1121, 97-103.
- [43] Vriens, B.E.P.J.; Aarts, M.J.B.; Vries, B.; Van Gastel, S.M.; Wals, J.; Smilde, T.J.; Van Warmerdam, L.J.C.; Boer, M.; van Spronsen, D.J.; Born, G.F.; Tjan-Heijnen, V.C.G.; Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. *European Journal of Cancer*, **2013**, 49, 3102 – 3110.
- [44] Wan, W.L.; He, Y.; Guan, M.; Li, X.L.; Cheng, X.; Wu, Y. Synthesis of the Major isomers of Aprepitant and Fosaprepitant. *Chinese Chemical Letters*, **2013**, 24, 1118 – 1122.
- [45] Sloka, J.S.; Stefanelli, M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler*. **2005**, 11, 425 - 432.
- [46] Pao, W.; Miller, V.; Zakowski, M.; Doherty, J.; Politi, K.; Sarkaria, I.; Singh, B.; Heelan, R.; Rusch, V.; Fulton, L.; Mardis, E.; Kupfer, D.; Wilson, R.; Kris, M.; Varmus, H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2004**, 101, 13306-13311.
- [47] Sordella, R.; Bell, D.W.; Haber, D.A.; Settleman, J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*. **2004**, 305, 1163 – 1167.
- [48] Nelson, M.H.; Dolder, C.R. Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors. *Ann Pharmacother*. **2006**, 40, 261 - 269.
- [49] Burris, H.A. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *Oncologist*. **2004**; 9, 10-5.
- [50] Nabholz, J.M. Role of anastrozole across the breast cancer continuum: from advanced to early disease and prevention. *Oncology*. **2006**; 70, 1-12.
- [51] Milani, M., Jha, G., Potter, D.A. Anastrozole Use in Early Stage Breast Cancer of Post-Menopausal Women. *Clin Med Ther*. **2009**, 1, 141-156.

- [52] Gangadhara, S.; Bertelli, G. Long-term efficacy and safety of anastrozole for adjuvant treatment of early breast cancer in postmenopausal women. *Ther Clin Risk Manag.* **2009**, *4*, 291-300.
- [53] Lee, B.L.; Higgins, M.J.; Goss, P.E. Denosumab and the current status of bone-modifying drugs in breast cancer *Acta Oncol.* **2012**, *51*, 157 – 167.
- [54] Rao, G.G.; Miller, D.S. Hormonal therapy in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* **2006**, *1*, 43 – 47.
- [55] Schindler, A.E.; Campagnoli, C.; Druckmann, R.; Huber, J.; Pasqualini, J.R.; Schweppe, K.W.; Thijssen, J.H. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas.* **2008**, *61*, 171 - 180.
- [56] Temerk, Y.; Ibrahim, H. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug flutamide with DNA and its analytical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2015**, *736*, 1 – 7.
- [57] Pegram, M.D; Konecny, G.E.; O'Callaghan, C.; Beryt, M.; Pietras,R.; Slamon,D.J, Rational combination of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer; *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 739 – 749.
- [58] Tron, G.C.; Pirali, T.; Billington, R.A.; Canonico, P.L.; Sorba, G.; Gennazanni, A.A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes *Med. Res. Rev.* **2007**, *28*, 278 – 308.
- [59] Huisgen, R. Centenary Lecture - 1,3-Dipolar Cycloadditions, *Proc. Chem. Soc. London.* **1961**, 357.
- [60] Colb, H. K.; Finn, M. G.; Sharpless, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004 - 2021.
- [61] Suárez, A. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares a alquinos catalizadas por cobre *An. Quim.* **2012**, *108*, 306 – 313.
- [62] Avti, P.K.; Maysinger, D.; Kakkar, A. Alkyne-Azide “Click” Chemistry in Designing Nanocarriers for Applications in Biology *Molecules* **2013**, *18*, 9531-9549.
- [63] Hein, C.D.; Liu, X.M.; Wang D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences; *Pharm Res.* **2008**, *25*, 2216–2230.
- [64] Prakasam T., Dariusz M.; Krzysztof J., Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical Biology Applications *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905 – 4979.
- [65] He X.P.; Deng Q.; Gao, L.X.; Li, C.; Zhang, W.; Zhou, Y.B.; Tang, Y.; Shi, X.X.; Xie, J.; Li, J.; Guo-Rong Chen, G.R.; Chen, K. Facile fabrication of promising protein tyrosine phosphatase (PTP)

inhibitor entities based on 'clicked' serine/threonine–monosaccharide hybrids, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 3892 – 3900.

[66] Kalesh, K.A.; Shi, H.; Ge J.; Yao. S.Q. The use of click chemistry in the emerging field of catalomics *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1749 – 1762.

[67] Poot, A. J.; van Ameijde, J.; Slijper, M.; van den Berg, A.; Hilhorst, R.; Ruijtenbeek, R.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J. Development of Selective Bisubstrate-Based Inhibitors Against Protein Kinase C (PKC) Isozymes By Using Dynamic Peptide Microarrays, *Chem. Bio. Chem.* **2009**, *10*, 2042.

[68] Pagliai, F.; Pirali, T.; Di Grosso, E.; Di Brisco, R.; Tron, G.C.; Sorba, G., Genazzani, A.A., Rapid Synthesis of Triazole-Modified Resveratrol Analogues via Click Chemistry; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 467 – 470.

[69] Adam, G.C.; Vanderwal, C.D.; Sorensen, E.J.; Cravatt, B.F. (-)-FR182877 Is a Potent and Selective Inhibitor of Carboxylesterase, *Angew.Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5480 – 5484.

[70] Kayser, H.; Zeitler, R.; Kannicht, C.; Grunow, D.; Nuck, R.; Reutter, W. Biosynthesis of a Nonphysiological Sialic Acid in Different Rat Organs, Using N-Propanoyl-D-hexosamines as Precursors, *J. Biol. Chem*, **1992**, *267*, 16934 - 16938.

[71] Keppler, O.T.; Stehling, P.; Herrmann, M.; Kayser, H.; Grunow, D.; Reutter, W.; Pawlita, M. Biosynthetic Modulation of Sialic Acid-dependent Virus-Receptor Interactions of Two Primate Polyoma Viruses, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1308 - 1314.

[72] Zhang, G; Fang, L.; Zhu, L.; Sun, D.; Wang, P.G. Syntheses and biological activity of bisdaunorubicins *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 426–434.

[73] Ma, N.; Wang, Y.; Zhao, B.X.; Ye, W.C; Jiang, S. The application of click chemistry in the synthesis of agents with anticancer activity *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 1585 – 1599.

[74] Kumar A; Ahmad, I.; Chhikara, B.S.; Tiwari, R.; Mandal, D.; Parang, K., Synthesis of 3-phenylpyrazolopyrimidine-1,2,3-triazole conjugates and evaluation of their Src kinase inhibitory and anticancer activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1342 – 1346.

[75] Cheng, Z.Y.; Li, W.J.; He, F.; Zhou, J.M.; Zhu, X.F. Synthesis and biological evaluation of 4-aryl-5-cyano-2H-1,2,3-triazoles as inhibitor of HER2 tyrosine kinase. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1533.

[76] Ferreira da Costa, J.; García-Mera, X.; Caamaño, O.; Brea, J.M.; Loza, M.I. Synthesis by microwave-assisted 1,3-dipolar cycloaddition of 1,2,3-triazole 1'-homo-3'-isozanucleosides and evaluation of their anticancer activity *Eur. J. Med. Chemistry*, **2015**, *98*, 212 – 220.

- [77] Bollu, R.; Devi Palem, J.; bantú, R.; Guguloth, V.; Nagarapu, L.; Polepalli, S.; Jain, N. Rational design, synthesis and anti-proliferative evaluation of novel 1,4-benzoxazine-[1,2,3]triazole hybrids *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 138 – 146.
- [78] Stefely, J.A.; Palchadhuri, R.; Miller, P.A.; Peterson, R.J.; Moraski, G.C.; Hergenrother, P.J.; Miller, M.J. N-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)arylamide as a new scaffold that provides rapid access to antimicrotubule agents: synthesis and evaluation of antiproliferative activity against select cancer cell lines *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3389 - 3395.
- [79] Manach, C.; baron, A.; Guillot, R.; Vauzeilles, B.; Beau, J.M.; Design and synthesis by click triazole formation of paclitaxel mimics with simplified core and side-chain structures. *Tet. Lett.* **2001**, *52*, 1462 – 1465.
- [80] Xin, X.; Yan, T.H.; Yan, L.; Li, Q.; Wang, R.L.; Hu, Z.L.; Jiang, Y.Y.; Sun, Q.Y.; Cao, Y.B. Design, synthesis, and anticancer activity of novel berberine derivatives prepared via CuAAC “click” chemistry as potential anticancer agents; *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 1047–1059.
- [81] Li, X.; Lin, Y.; Yuan, Y.; Kai, L.; Qian, X. Novel efficient anticancer agents and DNA-intercalators of 1,2,3-triazol-1,8-naphthalimides: design, synthesis, and biological activity *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 2299 – 2304.
- [82] Majumder, N. Click chemistry in nano drug delivery systems and its applications in biology *Int. J. Res. Phar. Chem.* **2015**, *5*, 95-105.
- [83] Danhier, F.; Feron, O.; Preat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Contr. Release* **2010**, *148*, 135 – 146.
- [84] Ma, P.; Zhang, X.; Ni, L.; Li, J.; Zhang, F.; Wang, Z.; Lian, S.; Sun K. Targeted delivery of polyamidoamine-paclitaxel conjugate functionalized with anti-human epidermal growth factor receptor 2 trastuzumab; *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 2173–2190.
- [85] D. Jose Luis Vila Jato (**2006**) Nanotecnología farmacéutica: Una galénica emergente Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid.
- [86] Lallana, E.; Fernandez-Trillo, F.; Sousa-Herves, A.; Riguera R.; Fernandez-Megia E. Click Chemistry for Drug Delivery Nanosystems *Pharm. Res.*, **2012**, *29*, 1–34.
- [87] Hassane, S.F.; Frisch, B.; Schuber, F. Targeted liposomes: convenient coupling of ligands to preformed vesicles using “click chemistry”. *Bioconjugate Chem* **2006**, *17*, 849 – 854.
- [88] Copland, M.J.; Baird, M.A.; Rades, T.; McKenzie, J.L.; Becker, B.; Reck, F.; Tyler, P.C.; Davies, N.M. Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells *Vaccine* **2003**, *21*, 883 – 890.

- [89] Gal, S.; Pinchuk, I.; Lichtenberg, D. Peroxidation of liposomal palmitoyllinoleoylphosphatidylcholine (PLPC), effects of surface charge on the oxidizability and on the potency of antioxidants. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *126*, 95 – 110.
- [90] Cavalli, S.; Tipton, A.R.; Overhand, M.; Kros, A. The chemical modification of liposome surfaces via a copper-mediated [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition monitored by a colorimetric assay. *Chem. Commun* **2006**, 3193 – 3195.
- [91] An, Z.; Tang, W.; Wu, M.; Jiao, Z.; Stucky, G.D. Heterofunctional polymers and core-shell nanoparticles via cascade aminolysis/Michael addition and alkyne-azide click reaction of RAFT polymers. *Chem Commun*. **2008**, 6501–6503.
- [92] Bosman, H. A.; Janssen, W.M.; and Meijer, E. W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665–1688.
- [93] Arseneault, M.; Wafer, C.; Morin, J.F. Recent Advances in Click Chemistry Applied to Dendrimer Synthesis *Molecules*, **2015**, *20*, 9263-9294.
- [94] Killops, K.L.; Campos, L.M.; Hawker, C.J. Robust, Efficient, and Orthogonal Synthesis of Dendrimers via Thiol-ene “Click” Chemistry *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062–5064.
- [95] Brabander-Van den Berg, E. M.; Meijer, E. W. Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations *Angew.Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1308 - 1311.
- [96] Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules *Polymer J.* **1985**, *17*, 117-132.
- [97] Marcos, M.; Serrano, J.L. Polímeros dendríticos, *An. Quím.* **2009**, *105*, 103 – 110-
- [98] Lallana Ozores, E.; Fernández-Trillo, F.; Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernández- Megía, E. Click Chemistry with Polymers, Dendrimers, and Hydrogels for Drug Delivery *Pharm. Res.*, **2012**, *29*, 902–921.
- [99] Malkoch, M.; Thibault, R.J.; Drockenmuller, E.; Messerschmidt, M; Voit, B.; Russell, T.P.; Hawker, C.J. Orthogonal approaches to the simultaneous and cascade functionalization of macromolecules using click chemistry *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14942 - 14949.
- [100] Vieyres, A.; Lam, T.; Gillet, R.; Franc, G.; Castonguay, A.; Kakkar, A. Combined CuI-catalysed alkyne-azide cycloaddition and furanmaleimide Diels-Alder “click” chemistry approach to thermoresponsive dendrimers *Chem Commun*. **2010**, *46*, 1875–1877.

- [101] Brauge L.; Magro, G.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. First divergent strategy using two AB<sub>2</sub> unprotected monomers for the rapid synthesis of dendrimers *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6698–6699.
- [102] Maraval, V.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P.; Blais, J.C. Dendrimer design: How to circumvent the dilemma of a reduction of steps or an increase of function multiplicity *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1822 – 1826.
- [103] Antoni, P.; Robb, M.J.; Campos, L.; Montanez, M.; Hult, A.; Malmström, E. Pushing the limits for thiol-ene and CuAAC reactions: Synthesis of a 6th generation dendrimer in a single day *Macromolecules* **2010**, *43*, 6625 – 6631.
- [104] Tanja Weil, T.; Wiesler, U.M.; Herrmann, A.; Bauer, R.; Hofkens, J.; De Schryver, F.C.; Müllen, K. Polyphenylene Dendrimers with Different Fluorescent Chromophores Asymmetrically Distributed at the Periphery, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8101 – 8108.
- [105] Reithofer, M.R.; Chan, K.H.; Lakshmanan, A., Hoang Lam, D.; Mishra, A.; Gopalan B.; Joshi, M.; Wang, S.; Hauser, C.A.E. Ligation of anti-cancer drugs to self-assembling ultrashort peptides by click chemistry for localized therapy *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 625-630.
- [106] Metaferia, B.B.; Matthew, R.; Gheeya, J.S.; Lee, A.; Hempel, H.; Plaza, A.; Stetler-Stevenson, W.G.; Bewley, C.A.; Khan, J. Synthesis of novel cyclic NGR/RGD peptide analogs via on resin click chemistry *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7337 – 7340.
- [107] Alavi, S.E.; Esfahani, M.K.; Alavi, F.; Movahedi F.; Akbarzadeh, A. Drug Delivery of Hydroxyurea to Breast Cancer Using Liposomes, *Ind. J. Clin. Biochem*, **2013**, *28*, 299–302.
- [108] Alavi, S.E.; Mansouri, H.; Movahedi, F.; Moftakhari E.; Akbarzadeh, A.; Chiani, M. Archaeosome: As New Drug Carrier for Delivery of Paclitaxel to Breast Cancer; *Ind. J. Clin. Biochem*, **2014**, *29*, 150–153.
- [109] Shi, M.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M.S. Doxorubicin-Conjugated Immuno-Nanoparticles for Intracellular Anticancer Drug Delivery, *Adv. Funct. Mat.* **2009**, *19*, 1689 – 1696
- [110] Zhang, Y.; Lundberg, P.; Maren, D.; Porsch, C.; Janson, C.; Lynd, N.A.; Ducani, C.; Malkoch, M.; Malmström E.; Hawker, C.J.; Nyström, A.M. Histamine-functionalized copolymer micelles as a drug delivery system in 2D and 3D models of breast cancer *J. Mater. Chem. B*, **2015**, *3*, 2472–2486.
- [111] Kono K.; Liu M; Fréchet J.M. Design of dendritic macromolecules containing folate or methotrexate residues *Bioconjug Chem.* **1999**, *10*, 1115-21.

Páginas web

Drug Bank Open data Drug & Drug Target Database

<http://www.drugbank.ca/>

13 Abril de 2.015

PubMED Health

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825/#CDR0000062955\\_\\_246](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825/#CDR0000062955__246)

2, 3 de Marzo de 2.015