

Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia
Grado en Farmacia
Trabajo de fin de Grado



LA CLICK-CHEMISTRY EN EL DESCUBRIMIENTO DE
FÁRMACOS

Revisión Bibliográfica
Departamento de Química Farmacéutica
Tutor: José Ignacio Candela Lena
Autora: María González Vázquez

Sevilla, Septiembre 2016

RESÚMEN

La revisión bibliográfica que se presenta a continuación trata sobre la llamada click-chemistry y su aplicación en el descubrimiento de fármacos.

Para ello se parte de la definición de click-chemistry y sus principales características que la hacen adecuada para el descubrimiento de fármacos.

En segundo lugar, se nombran algunas de sus múltiples aplicaciones además del descubrimiento de fármacos, concretamente de su utilidad en el etiquetado de biomoléculas, la síntesis y modificación de polímeros o la síntesis de ADN y ARN biocompatible.

Posteriormente pasaremos a la aplicación de la click chemistry en el descubrimiento de fármacos, sobre la cual se basa esta revisión bibliográfica.

Primero pasaremos a describir las tres estrategias principales a seguir en la síntesis de nuevos fármacos con click chemistry que son el cribado de alto rendimiento, la estrategia basada en fragmentos y la estrategia basada en fragmentos dinámica en molde.

A continuación pasaremos a detallar múltiples ejemplos de inhibidores enzimáticos sintetizados con estas reacciones click como inhibidores de reductasas o de proteína quinasas entre otros.

También se nombran algunos agonistas y antagonistas de receptores sintetizados con estas reacciones

Por último se presentan las conclusiones sacadas de la revisión bibliográfica respecto a la click chemistry en el descubrimiento de fármacos.

Las palabras claves de esta revisión bibliográfica son:

Click chemistry, descubrimiento de fármacos e inhibidores enzimáticos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	4
2. METODOLOGÍA.....	4-5
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5-35
3.1 CONCEPTO DE CLICK-CHEMISTRY.....	5-7
3.2 PRINCIPALES APLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA CLICK-CHEMISTRY	7-13
3.2.1.CLICK-CHEMISTRY EN EL ETIQUETADO DE BIOMOLÉCULAS.....	7-10
3.2.2.SÍNTESIS DE DNA Y RNA BIOCOMPATIBLE VÍA CLICK-CHEMISTRY.....	10-12
3.2.3. CLICK-CHEMISTRY EN LA FORMACIÓN DE POLÍMEROS.....	12-13
3.3 LA CLICK CHEMISTRY EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS.....	13-35
3.3.1ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS.....	14-16
3.3.1.1. CRIBADO DE ALTO-RENDIMIENTO.....	14-15
3.3.1.2. DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS BASADOS EN FRAGMENTOS.....	15-16
3.3.1.3. DYNAMIC TEMPLATE-ASSISTED STRATEGIES EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS POR FRAGMENTOS.....	16
3.3.2 SÍNTESIS DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS VÍA CLICK-CHEMISTRY.....	16-31
3.3.3. CLICK-CHEMISTRY EN LA SÍNTESIS DE LIGANDOS DE RECEPTORES.....	32-35
4. CONCLUSIÓN	35-36
5. BIBLIOGRAFÍA.....	36-39

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La click-chemistry se trata de un conjunto de reacciones químicas que ha permitido un nuevo enfoque de la química farmacéutica en lo que respecta al descubrimiento de nuevos fármacos.

Con la presente revisión bibliográfica, pretendemos realizar un breve resumen de la importantísima aplicación de estas reacciones en el descubrimiento de nuevos fármacos, además de considerar las perspectivas de futuro de la misma.

A continuación describiremos en qué se fundamenta este conjunto y qué tipo de reacciones incluye, así como hablaremos de algunas otras aplicaciones de la misma además de la investigación sobre nuevos fármacos.

Por último, expondremos cuáles son las diferentes formas de utilizar esta click-chemistry para la formación de diferentes fármacos y algunos ejemplos que han salido a la luz gracias a la misma.

Por consiguiente, el objetivo de este trabajo de investigación es dar a conocer el presente y futuro de la click-chemistry en el mundo farmacéutico y sus posibles aplicaciones en otros campos además de la farmacia.

2. METODOLOGÍA

Para la realización del presente estudio bibliográfico, hemos utilizado principalmente la base de datos *online* SciFinder y la página web de la American Chemical Society, sobre todo la segunda en cuestión, donde encontramos multitud de artículos relacionados con el contenido a estudiar.

Hemos seleccionado un total de 37 artículos, 13 sacados de las bases de datos anteriormente mencionadas y el resto de las referencias de los primeros.

Además, a través de la biblioteca virtual del Servicio Andaluz de Salud hemos tenido acceso a un libro que también hemos encontrado importante para incluir en la revisión.

Las palabras claves utilizadas para la búsqueda de artículos referidos a la aplicación de la click chemistry en el descubrimiento de fármacos fueron:

Click chemistry, click-chemistry in drug discovery, click-chem applications, click-chem concept, click-chemistry labeling, click-chemistry inhibitors.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CONCEPTO DE CLICK-CHEMISTRY

La llamada “click-chemistry” nació como consecuencia de la enorme dificultad para sintetizar moléculas análogas a estructuras tremendamente complejas como metabolitos secundarios producidos por plantas o por cualquier otro organismo vivo.

La dificultad en la formación de estas grandes moléculas no solo a escala industrial sino también a pequeña escala se debe a la creación de multitud de enlaces C-C lo que entrañaba un enorme gasto en tiempo y en recursos y a la larga no era rentable para las empresas investigadoras.

Gracias a K. B. Sharpless se introdujo este concepto de química, la click-chemistry, que se basa simplemente en la unión de pequeños bloques moleculares mediante enlaces carbono-heteroátomo-carbono de forma sencilla y eficiente para lograr formar las macromoléculas deseadas tanto a pequeña escala como a escala industrial. (Sharpless y cols, 2001)

Para ello utilizaremos las llamadas “click reactions” o reacciones click.

Estas reacciones deben cumplir una serie de condiciones sin las cuales no entrarían en esta categoría, entre las cuales destacan:

- Son reacciones modulares.
- Alto rendimiento.
- Producción de subproductos inofensivos o fácilmente eliminables mediante técnicas no-cromatográficas.
- Estereoespecíficas, aunque no necesariamente enantioespecíficas.
- Condiciones de reacción bastante simples, suelen ser insensibles a agua y oxígeno.
- No necesidad de disolvente o, en el caso de requerirlo, uso de disolventes inofensivos y fácilmente eliminables mediante técnicas no-cromatográficas.

- Extracción y purificación de productos sencilla, también con técnicas no cromatográficas. (Sharpless y cols, 2003)

Los sustratos de los que parten estas reacciones suelen ser resultado del craqueo del petróleo, de donde se obtienen esqueletos carbonados a los que se añaden los grupos funcionales necesarios mediante click chemistry

Para cumplir todas estas condiciones, la reacción debe ser exotérmica.

Esta serie de características han dado como resultado las múltiples aplicaciones de este tipo de reacciones en el ámbito farmacéutico, sobre todo para el descubrimiento de nuevos fármacos.

La principal reacción utilizada en este tipo de química es la cicloadición azida-alquino, también llamada cicloadición 1,3-dipolar que fue introducida de K. B. Sharpless y cols. en el 2001 y posteriormente en 2003, tanto Sharpless y cols. como Medal y cols. demostraron independientemente una dramática mejora en la cinética de este reacción gracias al uso de Cu(I) como catalizador. (Sharpless y cols, 2003)

Algunos ejemplos de tipos de reacciones utilizadas en la click-chemistry son:

- Cicloadiciones de especies insaturadas, como la cicloadición 1,3-dipolar descrita anteriormente.(Figura 1)

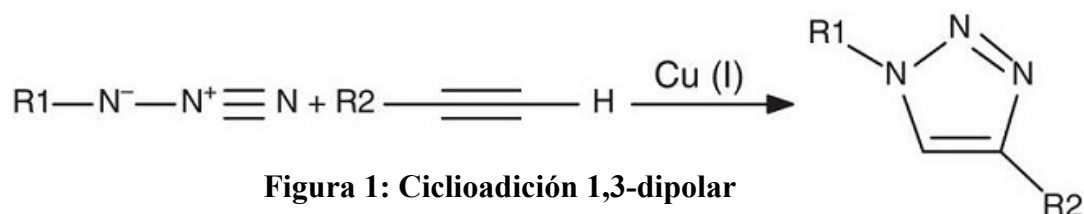


Figura 1: Cicloadición 1,3-dipolar

- Reacciones de sustitución nucleofílica, particularmente aquella de apertura de anillo de heterociclos nucleofílicos. (Figura 2)

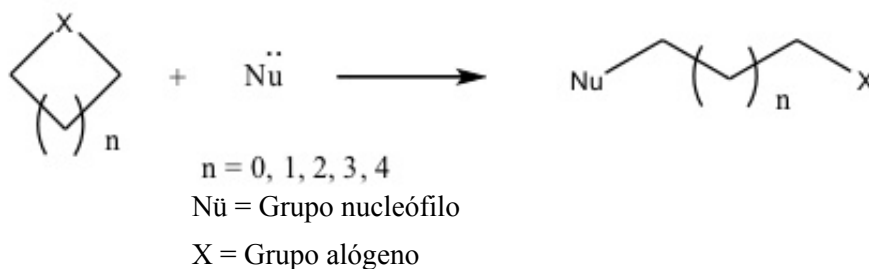


Figura 2: Apertura de anillos nucleofílicos

- Reacciones del grupo carbonilo de tipo no aldólica, tales como la formación de ureas, tioureas, hidrazonas, éteres de oximas... (Figura 3)

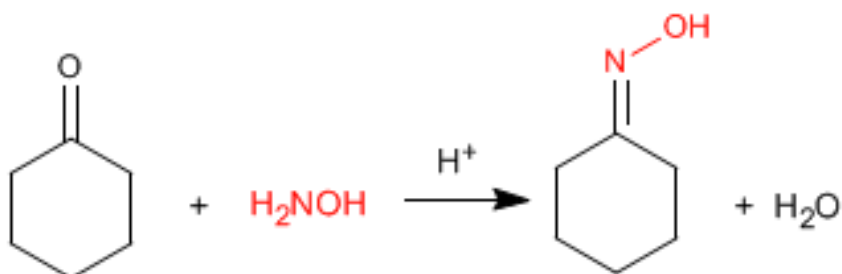


Figura 3: Formación de éteres de oximas

- Adición a enlaces múltiples C-C, especialmente casos como epoxidación, dihidroxilación... (Chatuverdi y cols, 2011) (Figura 4)

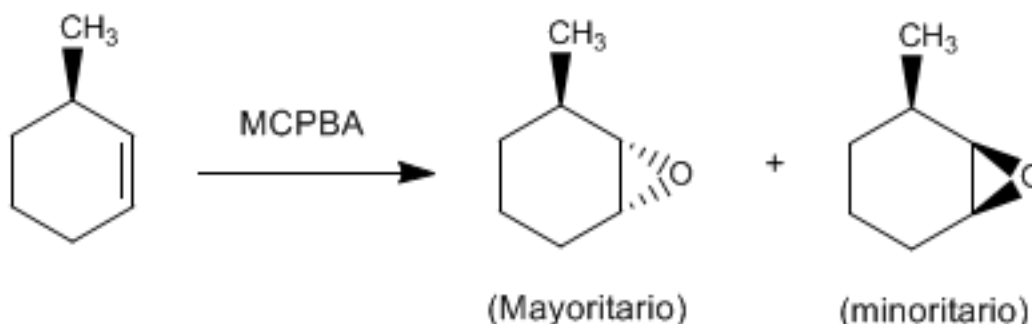


Figura 4: Epoxidación

A continuación detallaremos las aplicaciones principales de este tipo de química para posteriormente centrarnos en la más utilizada y sobre la que se centra este trabajo: la síntesis de nuevos fármacos.

3.2. APLICACIONES PRINCIPALES DE LA “CLICK-CHEMISTRY”

3.2.1. CLICK-CHEMISTRY EN EL ETIQUETADO DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

La naturaleza bioortogonal de los componentes de las reacciones “click” o lo que es lo mismo que no reaccionan con otra biomoléculas presentes, convierten este tipo de reacciones en una herramienta inestimable para el etiquetado y detección de

moléculas biológicas en muestras complejas, tales como muestras celulares e incluso *in vivo*.

Estas técnicas han sido utilizadas en un amplio rango de biomoléculas, tales como DNA, RNA, azúcares, proteínas, lípidos o virus.

A continuación describiremos brevemente algunos ejemplos de etiquetado de biomoléculas con esta técnica:

- Introducción de aminoácidos sintéticos marcados con reactivos en proteínas.

Para ello, primero debemos sintetizar una tRNA transferasa por vía biotecnológica que acepte los aminoácidos modificados, que se incorporarán a la proteína deseada de manera usual conteniendo el resto de azida o alquino, para posteriormente añadirle el marcador con un resto de alquino o azida y mediante la cicloadición 1,3-dipolar unirlo a la proteína de manera que esta quede marcada. (Best, 2009)

- Marcado de superficies víricas.

Tal y como se ha demostrado en un estudio de Finn y cols. en el año 2003, se utilizó la reacción de cicloadición-1,3-dipolar para marcar la superficie celular del virus CPMV o “cowpea mosaico virus”, introduciendo ligandos como azúcares, péptidos, proteínas o polietilenglicoles(PEG). (Finn, 2003)

- Introducción de moléculas marcadas en proteínas tras su modificación post-traducional

Diferentes azúcares modificados con un resto de alquino o azida pueden incorporarse a glicoproteínas para posteriormente añadir un marcador mediante la cicloadición ya descrita anteriormente y obtener así una glicoproteína marcada.(Best, 2009)

Además de glicoproteínas, esta técnica también ha resultado útil para el etiquetado de lipoproteínas.

- Etiquetado de nucleótidos para visualización de DNA y RNA.

El marcado o etiquetado de nucleótidos usando este tipo de técnica ha sido eficazmente realizado y demostrado por numerosos estudios.

Inicialmente, se introdujo de forma sintética un grupo azida en el extremo 5' de una cadena simple de DNA, que posteriormente se marcó con un resto fluorescente para su análisis mediante fragmentación de Sanger. (Ju y cols, 2003).

También Salic y cols. en 2008 estudiaron el etiquetado de DNA (Salic y Mitchison, 2008) y RNA (Salic y Jao, 2008) *en vivo*. En estos estudios se sintetizaron análogos de Desoxiuridina y Uridina conteniendo un grupo propargilo. Estos nucleótidos modificados se incorporaban a una cadena de DNA o RNA de manera usual y posteriormente se unían con un resto fluorescente mediante la cicloadición 1,3-dipolar para su observación. (Figura 5)

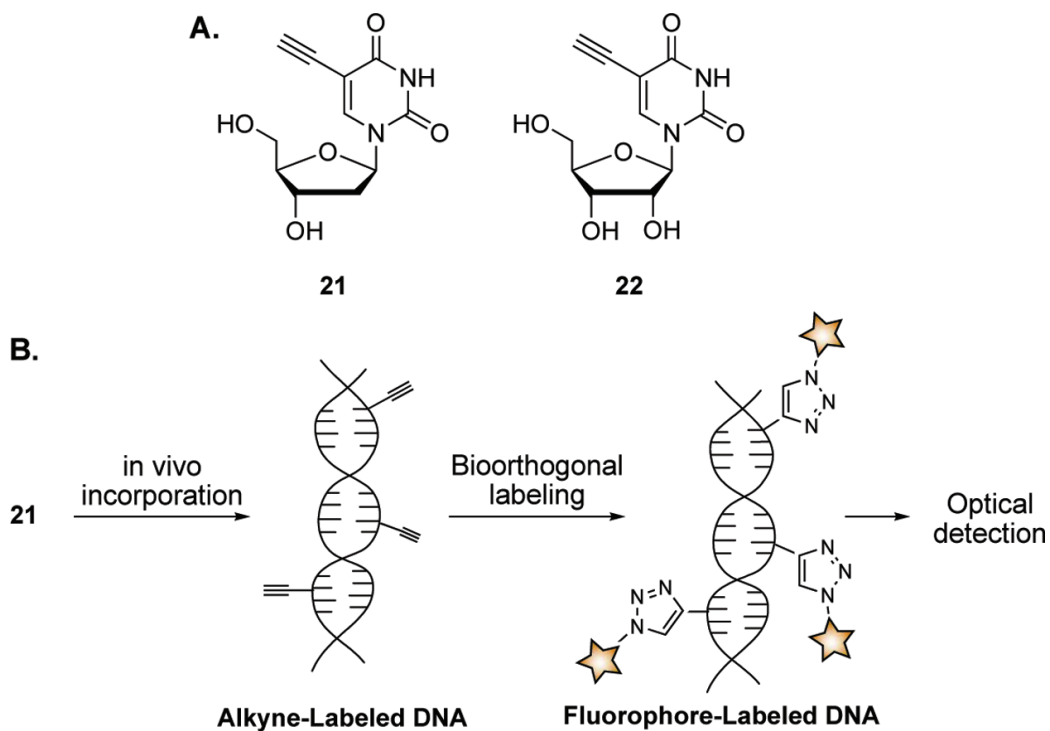


Figura 5: Esquema del marcado *in vivo* de DNA y RNA vía click-chemistry

- Etiquetado de lípidos.

Un estudio realizado por Schultz y Neef utilizó el etiquetado selectivo para la detección del ácido fosfatídico utilizando marcadores fluorescentes. Aunque este ácido tiene una estructura relativamente simple, se trata de un fosfolípido de señalización muy importante que regula la función de muchas proteínas como la Raf-1 quinasa.

En este estudio se une un ciclooctino en el ácido graso mediante una reacción no catalizada por cobre, además este ácido posee un grupo protector S-acetil-2-tioetil (SATE) que realiza la permeabilidad de la membrana plasmática.

Este compuesto se incubaba en macrófagos y se trata con un resto fluorescente con una función azida para su observación óptica. (Figura 6) (Schultz y Neef, 2009)

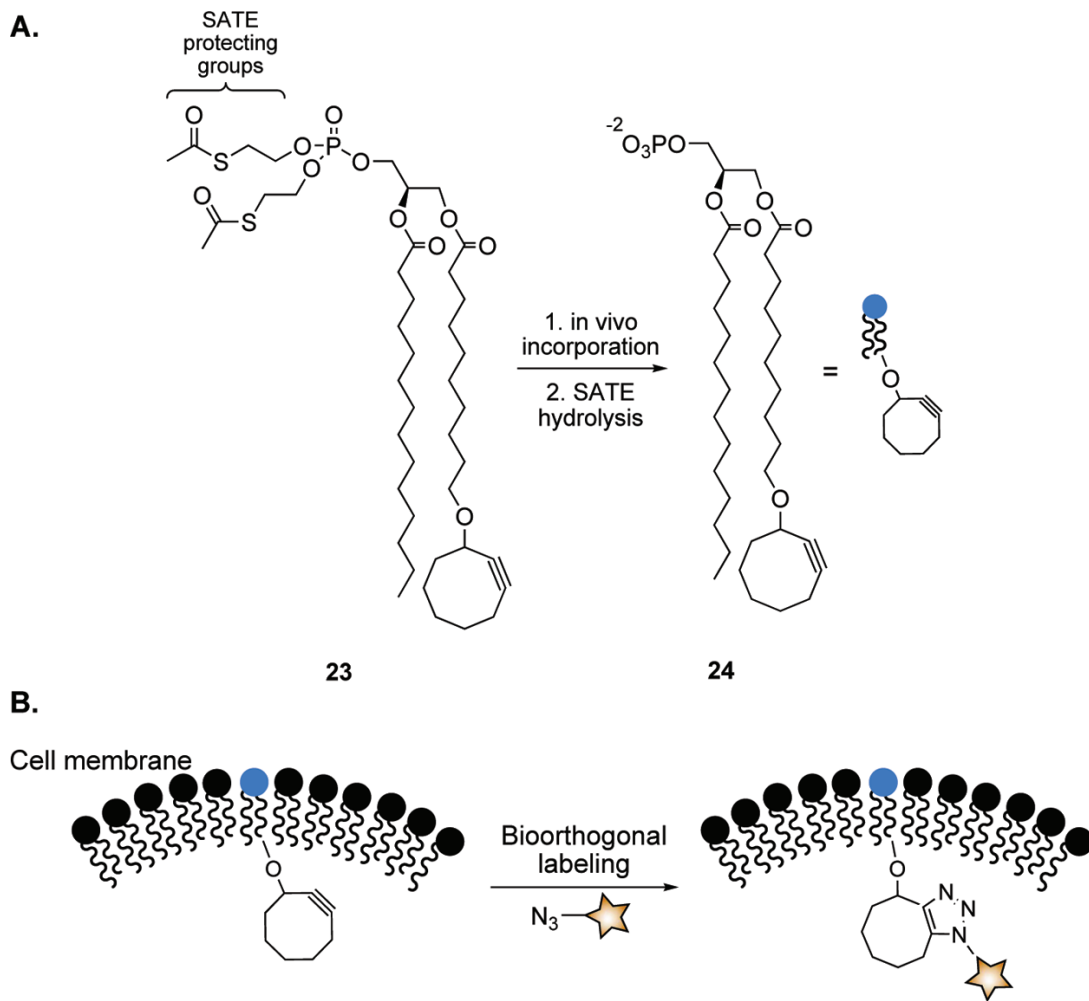


Figura 6: Estrategia de visionado de lípidos en muestras lipídicas.

3.2.2. SINTESIS DE DNA Y RNA BIOCOMPATIBLE MEDIANTE CLICK-CHEMISTRY

En este caso utilizaríamos la click-chemistry para conseguir un enlace biocompatible entre moléculas de DNA o RNA.

Concretamente nos serviremos de nuevo de la cicloadición azido-alquino-1,3-dipolar catalizada por cobre (I) (Reacción CuAAC), una reacción altamente selectiva y eficiente para la unión entre ácidos nucleicos, por motivos como la posibilidad de realizarse en medio acuoso, porque los restos de azida o alquilo se pueden añadir a los ácidos nucleicos de forma simple y porque el triazol resultante de la reacción se trata de un compuesto altamente estable.

Este proceso se realiza como hemos comentado anteriormente en medio acuoso y preferiblemente en presencia de un cebador, ya que así se aumenta la velocidad de la reacción y se requiere menor concentración de los diferentes oligonucleótidos, además de asegurarnos que el sentido de la cadena sintetizada es el correcto. Se utilizan dos oligonucleótidos, uno marcado con un resto azida y otro con un resto propargilo.

Este resto (A) se utiliza de molde en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, o Polymerase Chain Reaction) y tras algunas pequeñas modificaciones (B) se comprobó como el amplicón era exactamente idéntico al resultante de una cadena de DNA natural. (Figura 7)

Además se han realizado diversos estudios *in vivo* en los cuales se han añadido estas cadenas al plásmido de una bacteria y los resultados han sido prácticamente idénticos a los de un plásmido generado por biotecnología convencional. (Brown y El-Sagheer, 2012)

3.2.3 CLICK-CHEMISTRY EN LA FORMACIÓN DE POLÍMEROS

Esta novedosa técnica se ha encontrado de gran utilidad en diversos procesos de formación de polímeros.

Un ejemplo de ello sería la formación de dendrímeros, así como la síntesis de copolímeros en bloque, pero sobre todo se han encontrado grandes aplicaciones utilizando estas novedosas técnicas para la incorporación de grupos funcionales a las diferentes cadenas de polímeros, logrando así diferentes propiedades de los mismos. (Sumerlin y Vogt, 2010)

Es por esto que la click chemistry ha demostrado ser una herramienta sencilla con muchas posibilidades futuras para la fabricación de polímeros.

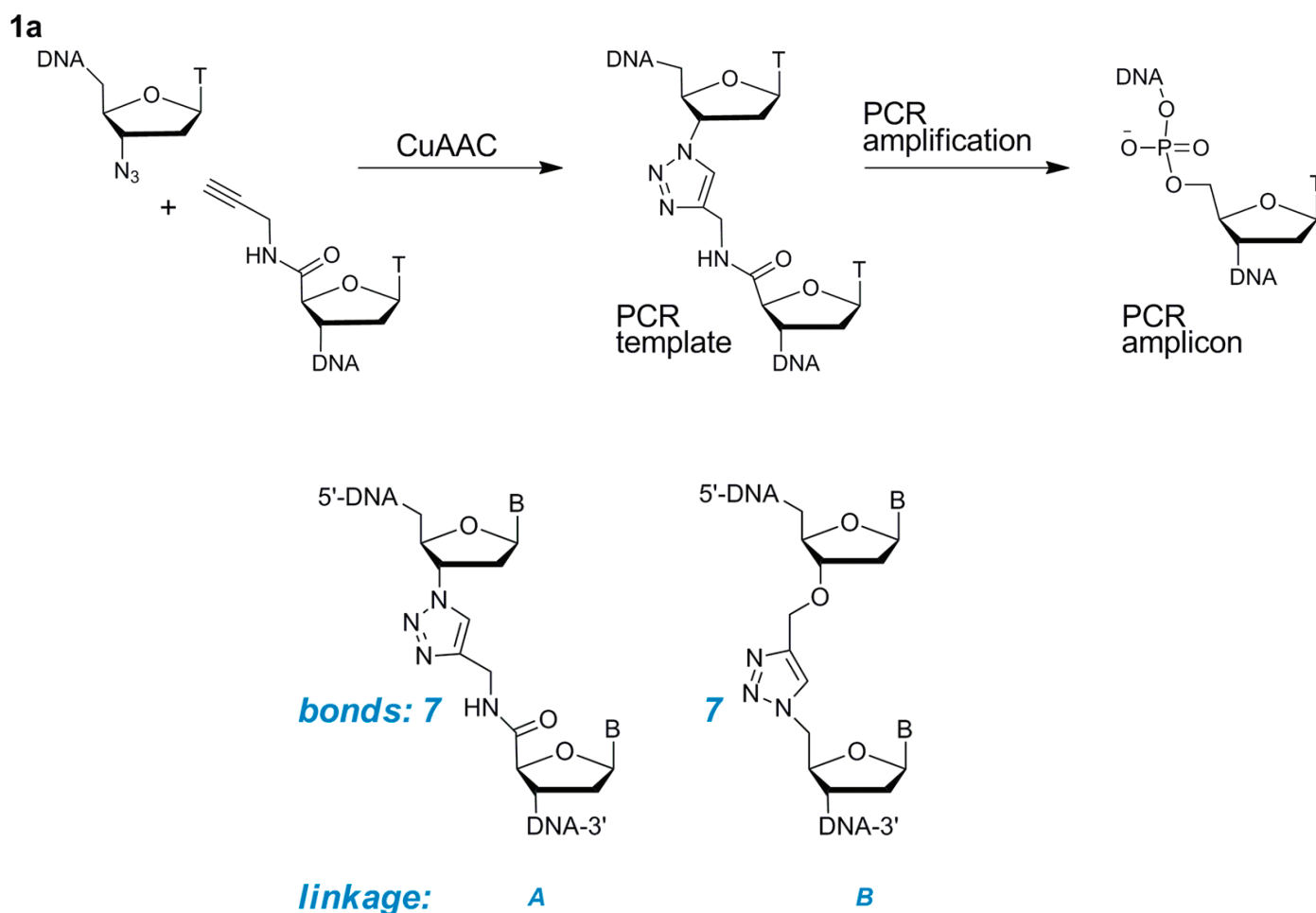


Figura 7: 1a, Esquema de la síntesis y amplificación vía PCR de la primera generación de DNA con union triazólica. (A) Primera generación de dinucleótidos unidos vía click-chemistry (B) Segunda generación de dinucleótidos unidos vía click-chemistry

3.3. LA CLICK-CHEMISTRY EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS.

Actualmente el descubrimiento de nuevos fármacos radica en cribados masivos sobre extensos catálogos frente a moléculas diana intracelulares o extracelulares con el objetivo de encontrar nuevos modelos químicos que posean la actividad buscada.

La disponibilidad de grandes colecciones de compuestos a partir de fuentes comerciales ha aumentado considerablemente en tamaño y diversidad de moléculas, en algunos casos superiores a un millón de compuestos diferentes por catálogo.

Las principales técnicas para el descubrimiento de nuevos fármacos son: el cribado de alto rendimiento, el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos y las técnicas dinámicas basadas en fragmentos usando moldes. (Dynamic Template-Assisted Strategies)

A continuación describiremos brevemente estas tres técnicas y posteriormente pasaremos a revisar algunos de los recientes descubrimientos gracias a la click-chemistry y sus diferentes utilidades.

3.3.1. ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS.

3.3.1.1. CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

El cribado de alto rendimiento, también conocido como high-throughput screening se trata de un proceso bien establecido para dirigir el descubrimiento de fármacos en la industria farmacéutica.

Se trata del análisis de grandes bases de datos de compuestos frente a nuestra diana terapéutica mediante el uso de pequeños ensayos automatizados y un análisis a gran escala de los datos obtenidos.

Para la elaboración de catálogos de moléculas conteniendo restos de azidas, se han utilizado diversas estrategias. Wu y cols en 2009 publicaron un artículo en el que propusieron una nueva estrategia en fase sólida utilizando la resina comercial PL-FML para añadir a diferentes moléculas el resto de azida necesario para su posterior unión con un alquino mediante la cicloadición catalizada por cobre. Esta estrategia nos permite realizar el cribado de alto rendimiento en un tiempo de una semana aproximadamente siguiendo el siguiente esquema. (Figura 8) (Srinivasan et al, 2009)

Estas unidades moleculares son enlazadas usando click-chemistry, pudiendo dar lugar a inhibidores específicos y obteniendo una especie de huella dactilar de importantes enzimas.

Se espera un enorme desarrollo de esta estrategia para la síntesis de nuevos fármacos mediante la click-chemistry y nuevas variantes de la misma en combinación con nuevas tecnologías como el uso de chips de DNA o *microarrays*.

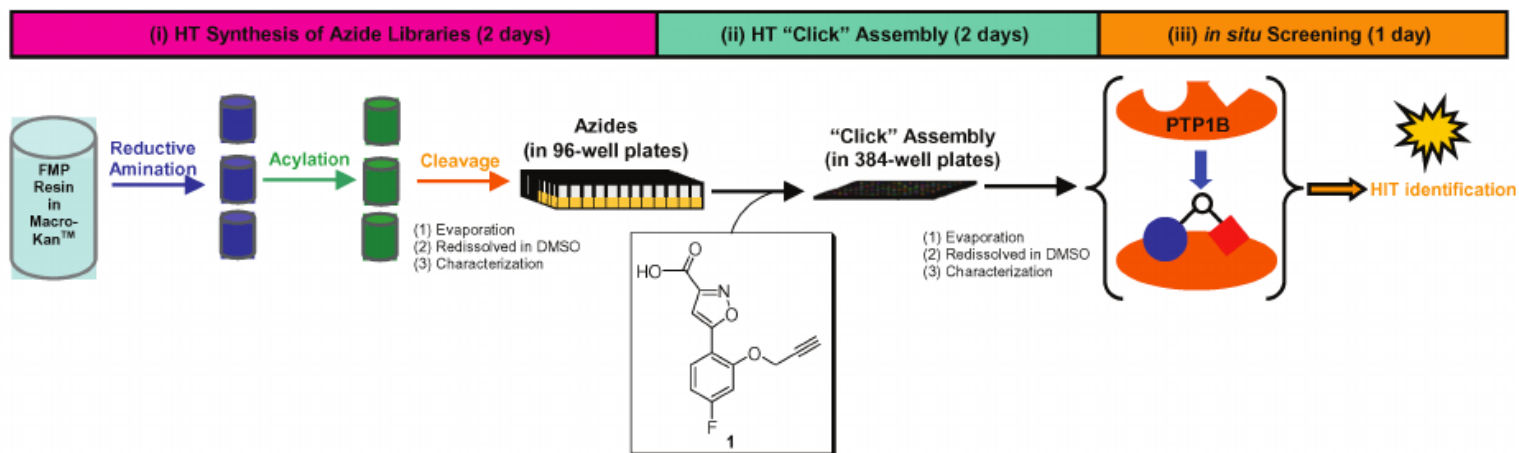


Figura 8: Estrategia para la síntesis de nuevos inhibidores enzimáticos con cribado de alto rendimiento mediante el ejemplo de PTP1B

3.3.1.2. DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS BASADO EN FRAGMENTOS

La búsqueda de nuevos fármacos basada en fragmentos ha pasado a ser la principal alternativa en los últimos años, superando al cribado de alto rendimiento.

Cada vez son más los fármacos que se han descubierto desde este método y existen una gran cantidad de artículos que muestran sus beneficios respecto al cribado descrito anteriormente.

Los fragmentos utilizados son moléculas orgánicas pequeñas de bajo peso molecular (<250 Da), que en realidad tienen baja afinidad (100 M-10 mM) para la unión a la diana. Estos fragmentos son modificados y probados para crear compuestos finales con alta afinidad y selectividad por la molécula diana. (Bienstock, 2010)

Los motivos principales para elegir este enfoque a la hora de sintetizar un nuevo fármaco son los siguientes:

- Las interacciones de los fragmentos son de alta calidad, a pesar de tener una menor potencia.
- Podemos optimizar el proceso conociendo cuál de los diferentes conjugados de fragmentos es más eficiente.
- Los catálogos de fragmentos para un sitio de acción son mucho menos extensos que para buscar los compuestos completos.

Además, esta estrategia se basa en la consideración de que la energía libre de un ligando es la resultante de sus componentes moleculares, por lo que con la unión de pequeñas moléculas podríamos alcanzar una alta afinidad entre proteína y ligando.

Hoy en día conocemos numerosos enzimas que poseen más de un sitio de unión, y antiguamente para sintetizar ligandos la tendencia era centrarse en el sitio de acción; sin embargo, en muchos casos el segundo sitio de unión alostérico confiere un gran aumento en selectividad y potencia, por lo que actualmente se tiene en cuenta en la síntesis de nuevos fármacos. (Thirumurugan y cols, 2013)

Para la detección de la unión de estos fragmentos necesitaremos técnicas más específicas para medir las interacciones con el sitio de unión ya que estas son mucho más débiles como hemos explicado anteriormente.

Para ello se utilizan, entre otras, las técnicas de espectometría RMN, cristalografía, espectrometría de masas, resonancia superficial de plasmones, etc. (Rankovic y Morphy, 2010)

3.3.1.3. DYNAMIC TEMPLATE-ASSISTED STRATEGIES EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS POR FRAGMENTOS

El mayor reto para la de búsqueda de fármacos usando fragmentos es el hecho de que estos fragmentos deben poseer un enlace débil con la proteína a la vez que una actividad biológica elevada y detectarlos es un proceso complejo.

Estos problemas se solucionan gracias al uso de la proteína diana como molde para la selección y/o ensamblaje de los fragmentos adecuados. Todas estas técnicas poseen una reacción química común para la detección de la mejor combinación de fragmentos que posteriormente se unirán por medio de la cicloadición 1,3-dipolar.

Este tipo de técnica puede ser utilizada in vivo para la síntesis del ligando final en proximidad a su diana biológica. (Thirumurugan y cols, 2013)

En la Figura 9 se presenta un esquema con las tres principales estrategias para el descubrimiento de nuevos fármacos vía click chemistry explicadas anteriormente.

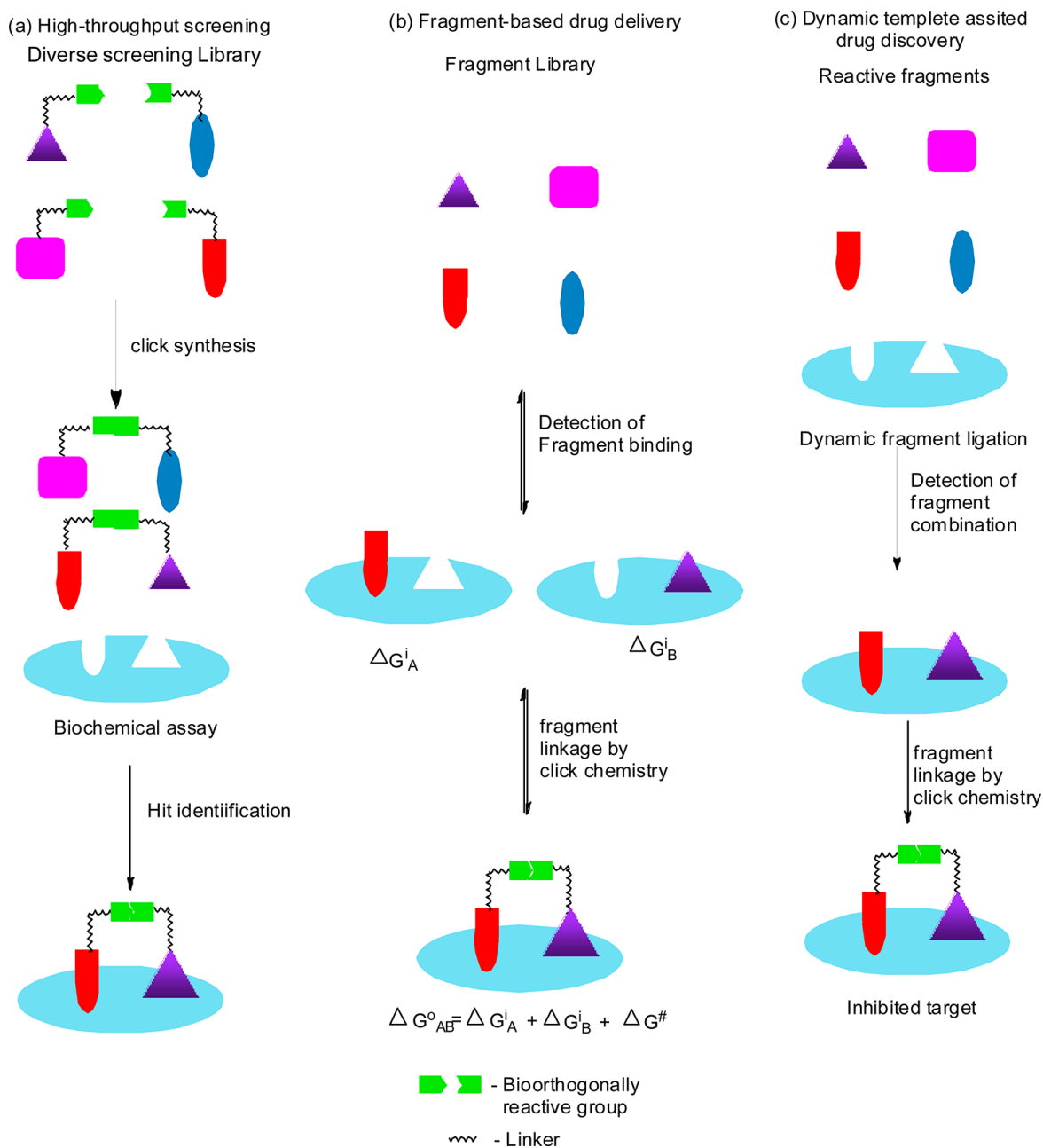


Figura 9: Esquemas de los tres tipos de estrategias a seguir para el descubrimiento de nuevos fármacos vía click-chemistry (Thirumurugan y cols, 2013)

3.3.2. SÍNTESIS DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS VÍA CLICK-CHEMISTRY

Las enzimas constituyen una parte importante del conjunto de todas las proteínas expresadas por el genoma eucariota, llegando a representar hasta un 29% de la totalidad de proteínas.

Están implicadas en diversas enfermedades formando el segundo grupo de moléculas diana para los fármacos solo superado por los receptores. A pesar de ello muy pocas

de ellas están bien caracterizadas por lo que no se conoce del todo bien su papel fisiológico, sustratos específicos, ni su diana final.

Los inhibidores enzimáticos han demostrado ser de gran utilidad en enfermedades como cáncer, tuberculosis y muchas otras enfermedades hasta ahora incurables.

Las reacciones click han demostrado ser de gran utilidad para la síntesis de los mismos debido a su alta eficiencia y su naturaleza modular, sobre todo con la búsqueda basada en fragmentos. Además, gracias a que estas reacciones son compatibles con el agua, no sería necesaria la purificación de los productos en la mayoría de los casos (Thirumurugan y cols, 2013)

• INHIBIDORES DE PROTEIN-TIROSIN FOSFATASAS

La familia de las protein-tirosin fosfatasas constituyen un conjunto importante de enzimas de señalización que canalizan la fosforilación y desfosforilación de residuos de tirosina en un sustrato proteico.

De todas ellas, la llamada PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) ha sido identificada como la mayor reguladora de las hormonas insulina y leptina. Por esto, un mal funcionamiento de la misma puede dar lugar a enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad o inflamación. (Thirumurugan y cols, 2013)

Hay muchos inhibidores sintetizados vía click-chemistry usando la estrategia de cribado de alto rendimiento, algunos de los cuales son:

- Inhibidores de PTP vía click a través de alquino-aminoácidos como la Serina o Treonina junto con azido-azúcares como la glucosa, galactosa o manosa; uno de los cuales con un resto de glucosa se demostró altamente selectivo con la PTP1B(Figura 10) (He y cols, 2001).

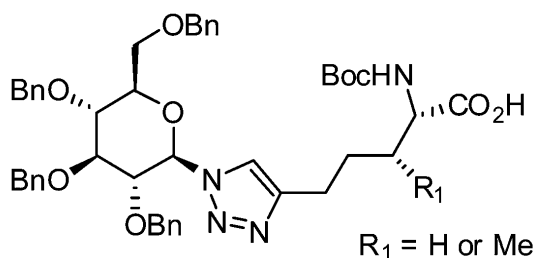


Figura 10: Inhibidor de la PTP1B

- Inhibidores de la *Mycobacterium tuberculosis* tirosin-fosfatasa: descubiertos mediante el cribado de alto rendimiento de 67 restos diferentes con azida unidos a diferentes alquin-isoxazoles, obteniendo 325 posibles inhibidores, entre los cuales dos de ellos demostraron una altísima selectividad y efectividad contra esta proteína. (Figura 11) (Yand y cols, 2009)

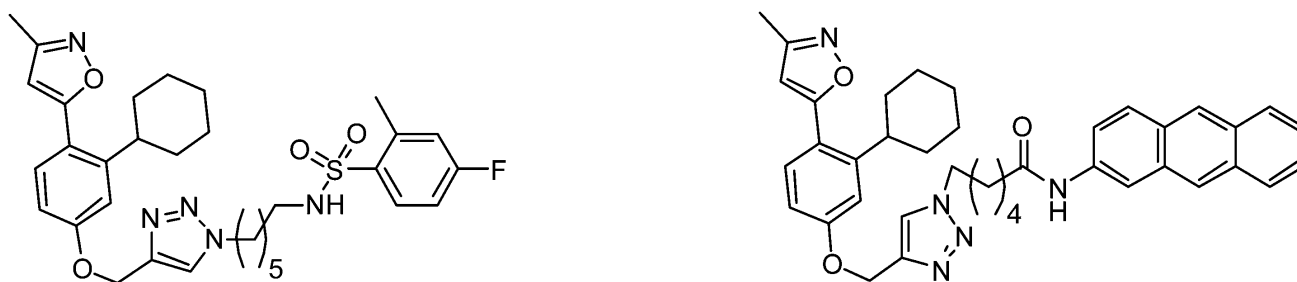


Figura 11: Inhibidores de la *Mycobacterium tuberculosis* tirosin-fosfatasa

- Inhibidores de la YopH (*Yersenia pestis* outer protein phosphatase): La enterobacteria Gram negativa *Yersenia pestis* ha jugado un importante papel en la historia humana ya que es la responsable de la peste y actualmente también se encuentra en el punto de mira debido a que se trata de un arma potencial para el bioterrorismo. Esta bacteria necesita de un factor de virulencia externo en la proteína H, una importante protein-tirosin fosfatasa, por tanto un inhibidor de esta YopH podría suponer una nueva ventana terapéutica frente a esta bacteria. El sustrato de esta enzima se trata de un derivado del nitrofenilfosfato y mediante modificación de este sustituyendo el grupo fosfato por ácido difluorometilfosfónico y uniendo un resto con aminóxido para optimizar la estructura podemos obtener un potente inhibidor de la YopH. Estos dos restos se unen mediante un enlace oxima (reacción click) dando lugar al compuesto que mostramos a continuación (Figura 12) (Bahta y cols, 2011).

• INHIBIDORES DE PROTEIN-QUINASAS (PK)

El grupo de las protein quinasas es clave en la regulación de la función celular y se trata del grupo más importante y más funcional de las enzimas. Es por ello que son

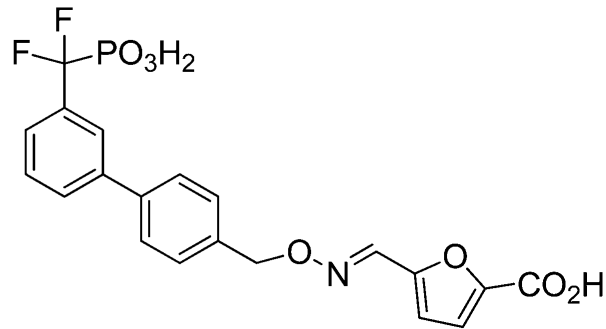


Figura 12: Inhibidor de la YopH

consideradas una de las principales dianas terapéuticas para el tratamiento de multitud de enfermedades importantes como pueden ser cáncer o diabetes.

Esta familia de enzimas juegan un papel clave en la transducción de la señal celular y muchas enfermedades están caracterizadas por alteraciones en estas protein-quinasas o en sus niveles de expresión.

Las protein-quinasas se encargan de controlar la función de otras proteínas mediante la fosforilación de los grupos hidroxilo en los restos de Serina y Treonina de las mismas. Pueden ser activadas por varias señales como un incremento en la concentración de iones Ca o de diacilglicerol.

Por todo esto se han convertido en una de las principales dianas terapéuticas para el futuro desarrollo de nuevos fármacos. (Thirumurugan y cols, 2013)

Estos son algunos ejemplos de inhibidores de las PK obtenidos vía click-chemistry.

- Liskamp y cols. sintetizaron novedosos inhibidores bi-sustrato para el sitio de unión específico del péptido además del sitio de unión de ATP, uniendo los dos componentes vía click chemistry. (Figura 13) (Liskamp y cols, 2009)
- Kumar y cols. han investigado el uso de dos clases de conjugados con 1,2,3-triazol-3-fenilpirazolopirimidina sintetizados vía click-chemistry, que fueron evaluados para la familia de las Src quinazas en relación al adenocarcinoma de ovario, carcinoma mamario y carcinoma de colon. El hexiltiazol-sustituido 3-fenilpirazolopirimidina demostró ser un potente inhibidor de la Src quinasa. (Figura14) (Kumar y cols, 2011).

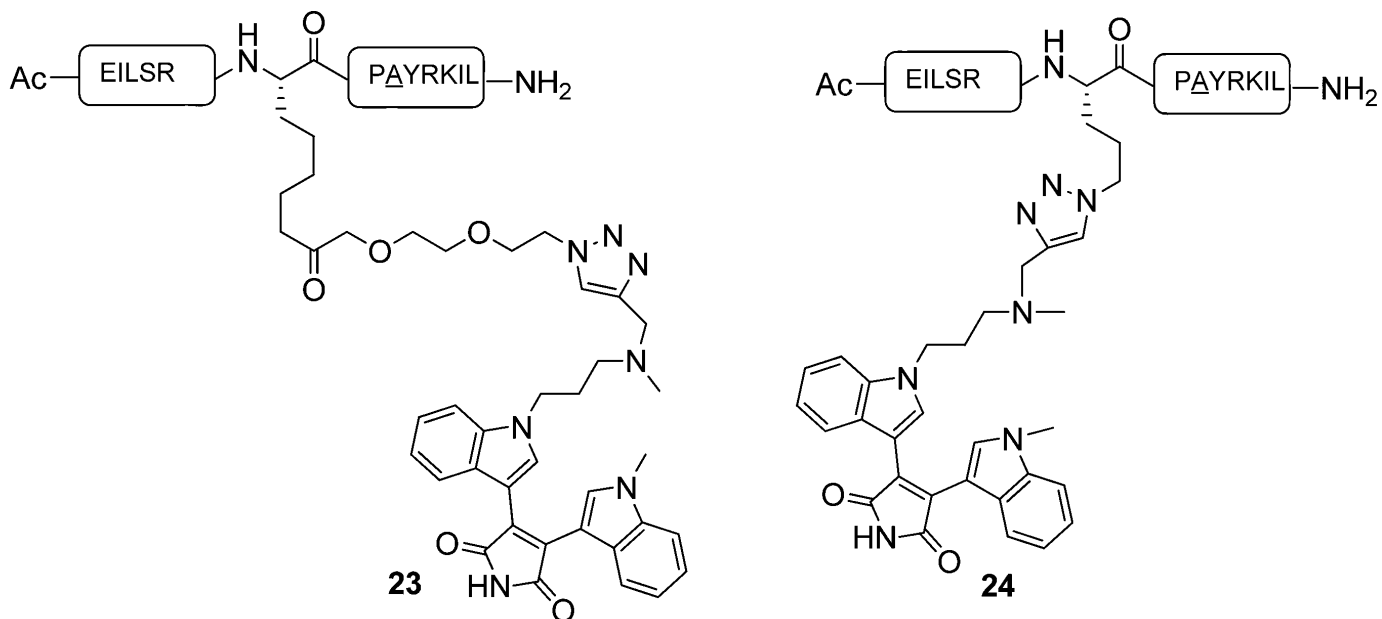


Figura 13: Inhibidores de la protein-kinasa vía click-chemistry

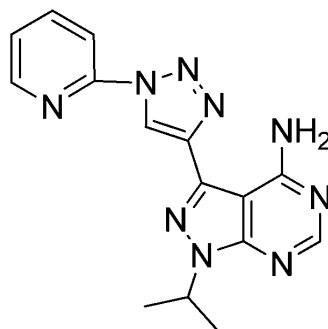


Figura 14: Inhibidor de la Src quinasa

- Grøtli y cols. emplearon análogos de la purina en reacción click con diferentes aromáticos para sintetizar compuestos que demostraron una inhibición moderadamente potente contra la *Plasmodium falciparum* protein-quinasa 7 (PfPK7) (Figura 15) (Grøtli y cols, 2009)

• INHIBIDORES DE TRANSFERASAS

Las transferasas forman un amplio grupo de enzimas con un papel clave en muchos procesos biológicos, por tanto sus inhibidores son fármacos potenciales para tratar

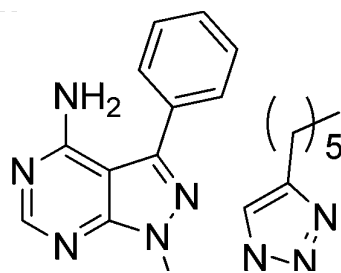


Figura 15: Inhibidor de la PfPK7

enfermedades como el cáncer y muchas patologías infecciosas. (Thirumurugan y cols, 2013)

- Inhibidores de glicosil-transferasa: El proceso de glicosilación realizado por estas enzimas interviene en procesos biológicos importantes en las modificaciones post-traduccionales de las proteínas y los lípidos, que influyen de manera importante en procesos de reconocimiento molecular entre los cuales se encuentran la respuesta inmune, procesos inflamatorios, infecciones virales o bacterianas y otras importantes comunicaciones intercelulares y transducción de señales.

Por otra parte, la biosíntesis de carbohidratos catalizada por fucosiltransferasas implica el traslado de un resto de L-fucosa desde la GDP-fucosa hasta un grupo hidróxilo de la N-acetilglicosamina por lo que inhibidores selectivos de esta enzima bloquearían la síntesis de los productos glico/fucosilados y, por tanto, las patologías que estos desencadenen. (Thirumurugan y cols, 2013)

Nishimura y cols, identificaron inhibidores potentes y selectivos a partir de un screening de alto rendimiento de compuestos unidos por la cicloadición-1,3-dipolar, con azido-azucars-nucleótidos y varios alquinos. Esto dio lugar al

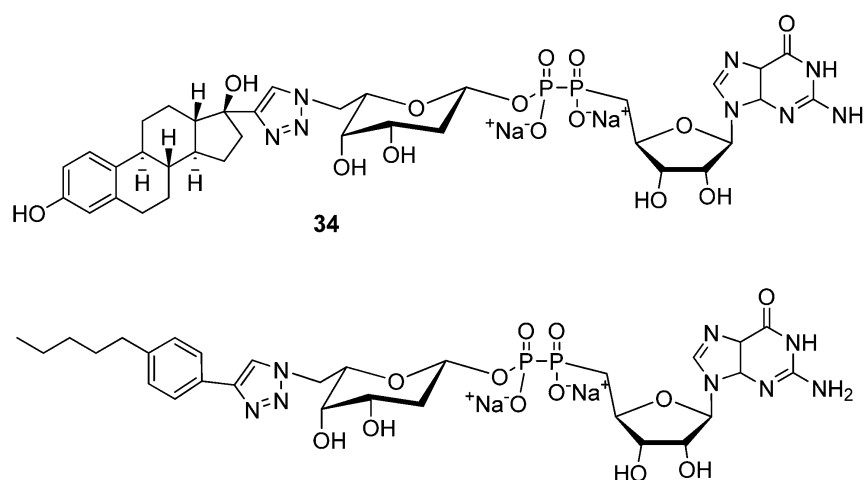


Figura 16: Inhibidores de la α -fucosiltransferasa humana

descubrimiento de dos inhibidores selectivos para la α -fucosiltransferasa humana recombinante V y VIII.(Figura 16) (Hosoguchi y cols, 2010)

- Inhibidores de la nicotinamida fosforibosiltransferasa: Esta enzima está involucrada en el proceso de síntesis del NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido), cuyos altos niveles se han relacionado con células tumorales de alta tasa de división. Por tanto, el uso de inhibidores de la Nicotinamida-fosforibosil transferasa podría ser bastante útil para modificar diferentes señales celulares relacionadas con el cáncer, por lo que se trata de una novedosa diana terapéutica para la investigación de fármacos antitumorales. (Thirumurugan y cols, 2013)

Colombano y cols. estudiaron nuevos análogos usando la cicloadición-1,3-dipolar, dando lugar a un potente inhibidor de esta enzima que presenta un grupo aromático 2-aminobifenilo.(Figura 17) (Colombano y cols, 2010)

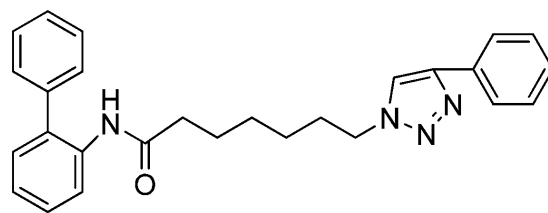


Figura 17: Inhibidor de la nicotinamida fosforibosil-transferasa

- Inhibidores de la O-NAcetilglucosaminasa: Esta enzima elimina un grupo N-acetilglucosamina del oxígeno de los restos de Serina o Treonina de proteínas nucleocitoplasmáticas implicadas en varios procesos de regulación del ciclo celular, traducción de señal, degradación de proteínas y traducción y transcripción de DNA.

Inhibidores de esta enzima son objeto de investigaciones en el desarrollo de fármacos para enfermedades degenerativas. (Thirumurugan y cols, 2013)

Wang y cols, han reportado la síntesis de glicosil-azido o alquinos para generar inhibidores de esta enzima. Estudios de cinética enzimática revelaron el siguiente

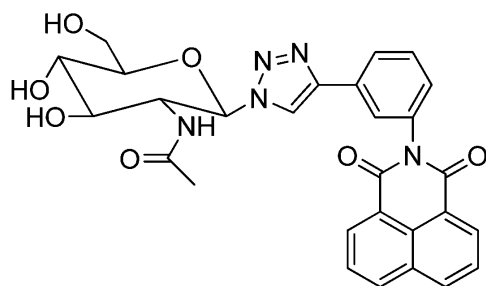


Figura 18: Inhibidor de O-NAGasa humana.

compuesto como un potente inhibidor competitivo de la O-NAGasa humana. (Figura 18) (Wang y cols, 2011)

- **INHIBIDORES DE GLUCÓGENO FOSFORILASA.**

Esta enzima, que se encuentra presente en la mayoría de mamíferos, cataliza la fosforilación de la cadena principal de glucógeno mediante un enlace glicosídico α -1,4, dando lugar a glucosa-1-fosfato que posteriormente pasara a α -D-glucosa.

Desde el punto de vista farmacéutico, la síntesis de inhibidores de esta enzima podría dar lugar a novedosos avances en la terapia de control de la glucemia en Diabetes Mellitus tipo 2. (Thirumurugan y cols, 2013)

Recientemente se ha descrito al ácido oleanólico como un potente análogo de esta enzima y posteriormente Cheng y cols. decidieron utilizar dímeros de éste sintetizados vía click chemistry. Estos compuestos fueron probados en la Glucógeno Fosforilasa Muscular de conejo dando resultados altamente positivos. (Figura 19) (Cheng y cols, 2010)

- **INHIBIDORES DE SERINA-HIDROLASA**

Esta clase de inhibidores es una de las más extensas y diversas en las células eucariotas y procariontas, incluyendo lipasas, proteasas, esterases, tioesterasas, peptidasas y amidasa. Inhibidores de esta clase de enzimas pueden ser utilizados en enfermedades como la obesidad, Alzheimer o diabetes entre otras.

- Cravatt y cols. han desarrollado recientemente derivados de triazolurea vía click-chemistry, que han demostrado ser inhibidores altamente potentes de diversos tipos de Serina Hidrolasas (incluyendo peptidasas, hidrolasas, lipasas, etc) con elevada actividad en células de ratón. (Figura 20).

Esta inhibición conduce a un aumento de N-acetil-proteínas, que promueven la proliferación de células T. (Cravatt y cols, 2011)

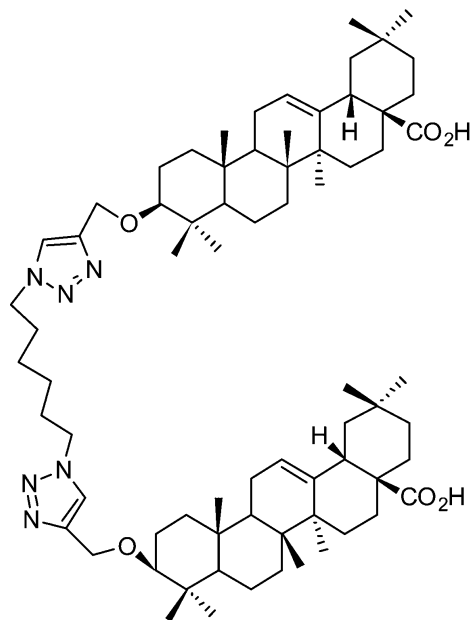


Figura 19: Inhibidor de la glucógeno fosforilasa

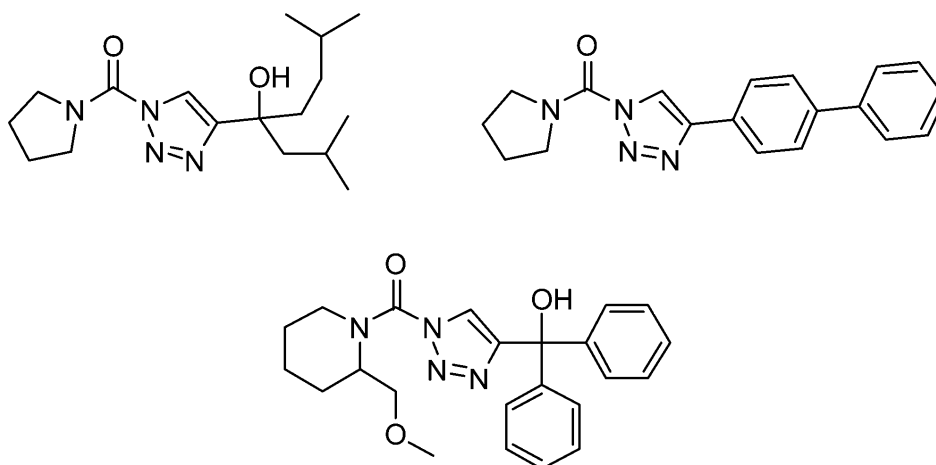


Figura 20: Inhibidores de Serina hidrosilasas

- **INHIBIDORES DE PROTEASAS DE CISTEINA Y SERINA**

Este grupo de enzimas son esenciales en la regulación de diversos procesos fisiológicos y propagación de enfermedades y algunas de estas están involucradas en

el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y oncológicas, osteoporosis y artritis.

En humanos son responsables del proceso de apoptosis, remodelación de la matriz extracelular, la respuesta inmune y procesos hormonales, por lo que el desarrollo de inhibidores de estas enzimas puede dar lugar al descubrimiento de nuevos fármacos para muchas enfermedades.

Un grupo de aproximadamente 450.000 peptidotriazoles fueron preparados para una síntesis en fase sólida de péptidos mediante una cicloadición-1,3-dipolar entre una resina con restos alquilo y un aminoazida protegido.

Posteriormente se realizó un estudio de la actividad enzimática frente a una cistein-proteasa recombinante, en el que 48 compuestos mostraron actividad.

A estos compuestos se les realizó una espectrometría de masas MALDI, la cual reveló la estructura de los mismos y posteriormente se paso a resintetizarlos para evaluarlos en solución. (Thirumurugan y cols, 2013)

- El *Trypanosoma cruzi* es el parásito responsable de la enfermedad de Chagas. El tratamiento de esta enfermedad ha provocado problemas de toxicidad y resistencia, por lo que se han desarrollado inhibidores de cistein-proteasa mayoritaria en este parásito gracias a la click-chemistry,.

El inhibidor irreversible formado de 1,2,3-triazoltetrafluorofeniloximetilcetona ha demostrado propiedades prometedoras en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. (Figura 21) (Thirumurugan y cols, 2013)

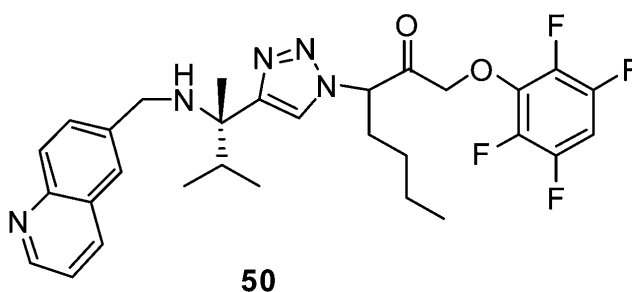


Figura 21: Inhibidor de la cistein-proteasa en *Trypanosoma cruzi*

- Las caspasas son un tipo de cistein-proteasas que actúan específicamente sobre residuos de ácido aspártico en proteínas. Son responsables de la apoptosis celular, por tanto su inhibición podría tener fines terapéuticos para enfermedades degenerativas y neurodegenerativas.

Yao y cols. emplearon la click-chemistry en la búsqueda de inhibidores de caspasas a través de screening de alto rendimiento conteniendo funciones aldehído y vinil sulfona. (Figura 22) (Yao y cols, 2008)

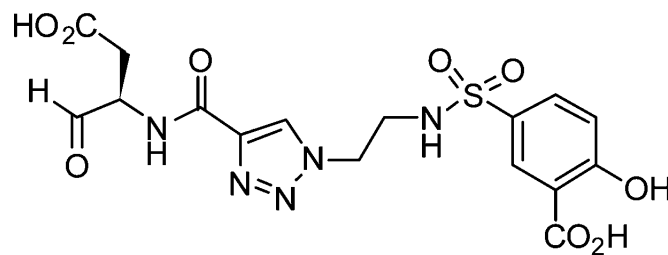


Figura 22: Inhibidor de las caspasas

• INHIBIDORES DE METALOPROTEASAS

Estas metaloproteasas son una clase de enzimas proteolíticas relacionadas con multitud de procesos fisiológicos y patológicos. Su investigación es de gran importancia por las implicaciones que tienen en procesos de degradación de tejidos lo que afecta a diversas enfermedades como la esclerosis múltiple, el crecimiento tumoral, la artritis reumatoide, la osteoartritis, etc. (Thirumurugan y cols, 2013)

- Ramos y cols. han empleado recientemente click-chemistry en la síntesis de inhibidores de metaloproteasas de la matriz 2(MMP2) usando la estrategia basada en fragmentos, concretamente uniendo azidas con alquinos lipofílicosselectivos para interactuar con la subunidad S1' de la enzima. (Figura 23) (Ramos y cols, 2011)
- La anhidrasa carbónica es una enzima que cataliza de forma eficiente y reversible la hidratación de dióxido de carbono a bicarbonato y que, por tanto, juega un papel relevante en numerosos procesos fisiológicos.

Varias de las 16 isoenzimas presentes en el cuerpo humano son consideradas

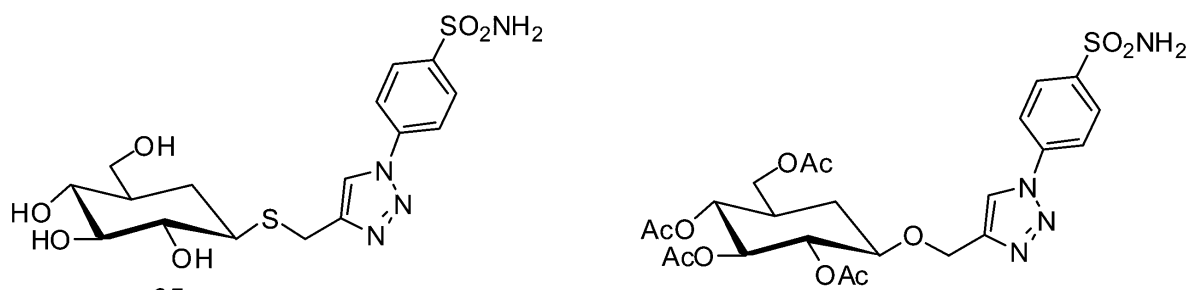


Figura 23: Inhibidores selectivos de las MMP2

dianas terapéuticas y el diseño de inhibidores de las mismas se trata de un reto a largo plazo que ha centrado la atención de numerosos investigadores y ha demostrado su utilidad frente a muchas enfermedades como el glaucoma, la epilepsia y el cáncer.

- La membrana mitocondrial es impermeable al HCO_3^- y la anhidrasa carbonica se lo proporciona para que la piruvato carboxilasa lo utilice como sustrato. Finalmente esta ruta biosintética desemboca en la formación de citrato a partir de piruvato. Este citrato es trasladado al citoplasma para producir lipogénesis a través de otras rutas biosintéticas.

Varios compuestos obtenidos mediante click-chemistry a través de 4-azidobencensulfonamidas y fenilacetilenos demostraron su utilidad como inhibidores de dichas enzimas lo que puede conducir, tras futuros estudios, a su aplicación en el tratamiento de la obesidad. (Figura 24) (Thirumurugan y cols, 2013)



Figura 24: Inhibidores de la anhidrasa carbonica

- **INHIBIDORES DE PROTEASAS ASPÁRTICAS.**

Estas enzimas juegan un papel fundamental en numerosas enfermedades como el SIDA (VIH-proteasas), desórdenes neoplásicos (catepsinas D y E) o en el Alzheimer (β y γ secretasas). (Thirumurugan y cols, 2013)

- Fischer y cols. han publicado recientemente la síntesis y evaluación de ariltriazoles como potentes moduladores de la γ -secretasa, con excelente farmacocinética. (Figura 25) (Fischer y cols, 2011)

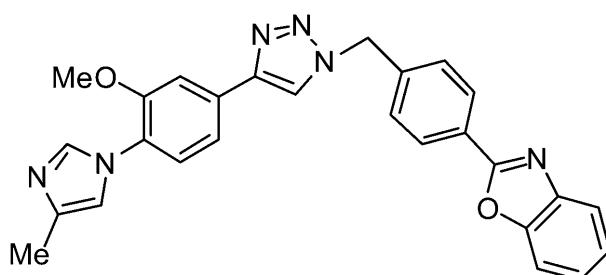


Figura 25: Inhibidor de la γ -secretasa

- Brik y cols utilizaron la click-chemistry para la síntesis de inhibidores de la VIH-proteasa por primera vez. Los siguientes compuestos fueron los más activos. (Figura26) (Brik y cols, 2005)

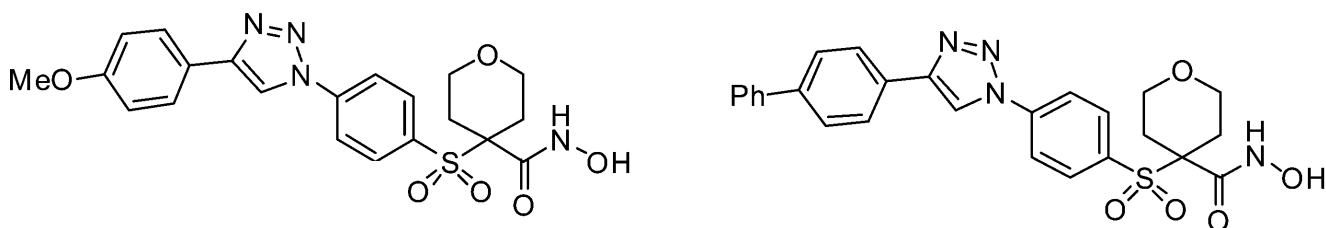


Figura: 26: Inhibidores de la VIH-proteasa

- **INHIBIDORES DE LAS OXIDOREDUCTASAS**

- Zhu y Jia desarrollaron una estrategia vía click-chemistry para la síntesis rápida de 108 compuestos para la inhibición de las monoaminoxidasas A y B.

Tras el screening cuatro compuestos fueron identificados como inhibidores de la

actividad de la enzima MAO-A. El compuesto presentado a continuación fue el que demostró la inhibición más potente. (Figura 27) (Zhu y Jia, 2010)

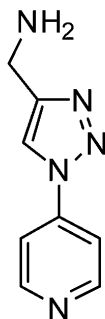


Figura 27: Inhibidor de la MAO-A

- La Lactato deshidrogenasa humana 5 ha resultado ser una diana interesante para la quimioterapia antiglicolítica de cáncer. Moses y cols. estudiaron la síntesis de un pequeño conjunto de compuestos bifuncionales usando la estrategia basada en fragmentos de la click-chemistry, especialmente desarrollada para la inhibición de esta enzima. La siguiente estructura ha demostrado una impresionante selectividad y actividad frente a la lactato deshidrogenasa 5. (Figura 28) (Moses y cols, 2011)
- El parásito *Cryptosporidium parvum* se trata de un importante patógeno humano

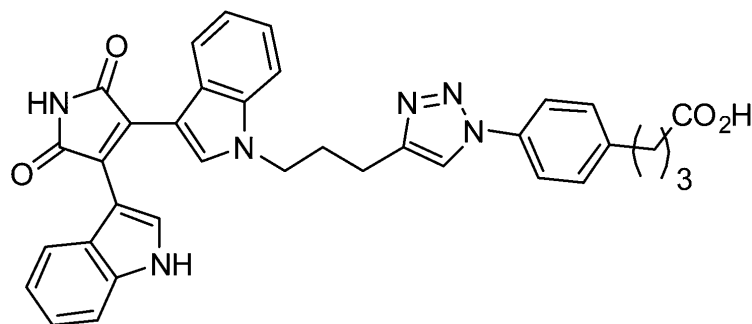


Figura 28: Inhibidor de la Lactato-deshidrogenasa 5

además de un arma potencial para el bioterrorismo.

Este parásito no tiene reservas de guanina o guanosina por lo que necesita de la enzima Inosina-Monofosfato deshidrogenasa para la biosíntesis de nucleótidos de guanina y en consecuencia para su supervivencia. Esta enzima es bastante

diferente de la Inosina Monofosfato deshidrogenasa humana por lo que su inhibición resulta una potencial diana para el tratamiento de la criptosporidiosis con efectos mínimos sobre el hospedador mamífero.

Cuny y cols. sintetizaron una serie de inhibidores para esta enzima conteniendo 1,2,3-triazoles vía click-chemistry, entre los cuales, el siguiente compuesto resultó el más potente (Figura 29) (Cuny y cols, 2009)

- Por otra parte, esta Inosina-Monofosfatodeshidrogenasa humana dependiente de NAD convierte la Inosina monofosfato en Xantina monofosfato durante la síntesis

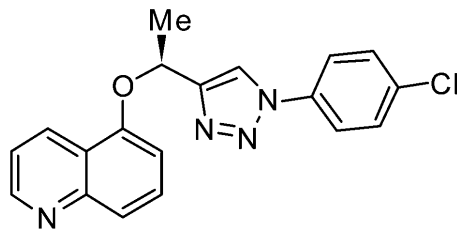


Figura 29: Inhibidor de la *Cryptosporidium parvum* IMPDH

de novo de nucleótidos de guanina. Su inhibición frenaría el suministro de estos nucleótidos, que son necesarios para el crecimiento y proliferación celular, por lo que sería de gran utilidad para posibles tratamientos de cáncer, enfermedades autoinmunes o infecciones en general.

Chen y cols. emplearon la click-chemistry en la elaboración de potentes inhibidores de esta enzima en humanos y en *Mycobacterium tuberculosis*, pruebas sucesivas probaron los siguientes compuestos como inhibidores potentes frente a la IMPDH en *Mycobacterium tuberculosis*.(Figura 30) (Chen y cols, 2010)

3.3.3. SÍNTESIS DE LIGANDOS DE RECEPTORES VÍA CLICK-CHEMISTRY

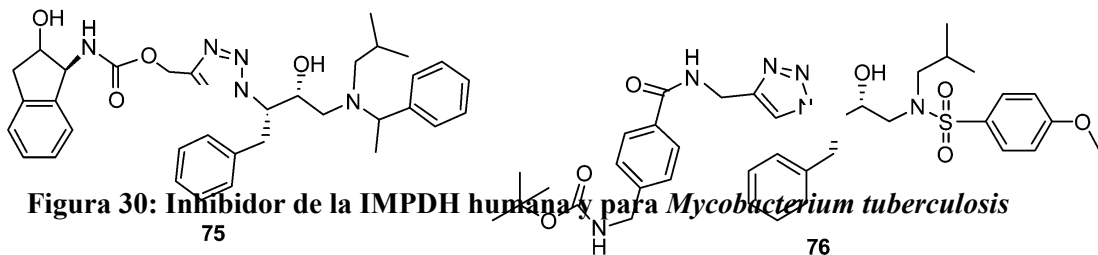


Figura 30: Inhibidor de la IMPDH humana y para *Mycobacterium tuberculosis*

Los receptores acoplados a proteína G se encargan de comunicar señales provenientes de hormonas, neurotransmisores y diversos factores. Regulan importantes componentes celulares como enzimas metabólicas o canales de iones. Su función afecta por tanto a importantes procesos celulares como el crecimiento embrionario, el aprendizaje, la memoria y la homeostasis del organismo.

Estos receptores se tratan por tanto de una potencial diana terapéutica para nuevos fármacos.

Diversos grupos de investigación tratan de desarrollar agonistas, antagonistas selectivos y ligandos vía click-chemistry que resultan muy útiles para el descubrimiento de nuevos fármacos contra enfermedades hasta ahora incurables. (Thirumurugan y cols, 2013)

- **AGONISTAS SELECTIVOS**

Un ejemplo serían los agonistas para el receptor de la adenosina, concretamente el A_3 que podrían ser utilizados en enfermedades como el cáncer o enfermedades inflamatorias.

Jacobson y cols desarrollaron una serie de agonistas selectivos para este receptor A_3 , además del A_1 , conteniendo azido poliamidoaminodendrimeros y alquino-2 octadienil nucleósido. (Figura 31) (Jacobson y cols, 2011)

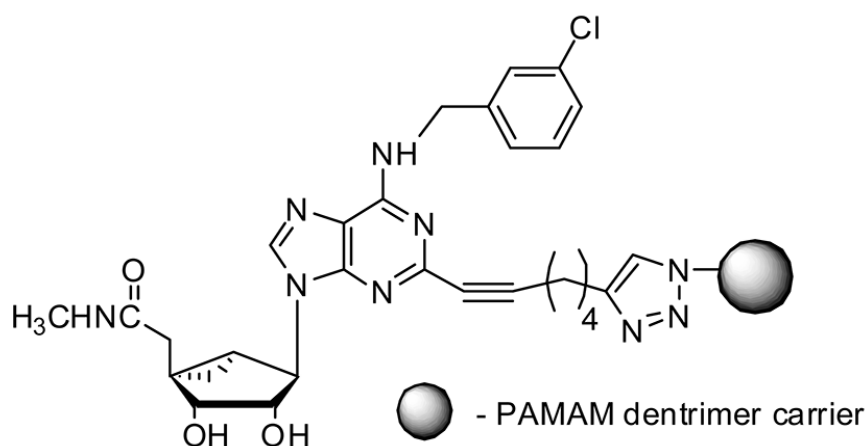


Figura 31: Agonista de receptores de adenosina A_1 y A_3

La citoquina MIF está relacionada con el proceso de inflamación y proliferación celular y su receptor transmembrana es el CD74. Jorgensen y cols. diseñaron y sintetizaron agonistas para estos receptores vía click-chemistry con el máximo efecto posible. (Figura 32) (Jorgensen y cols, 2010)

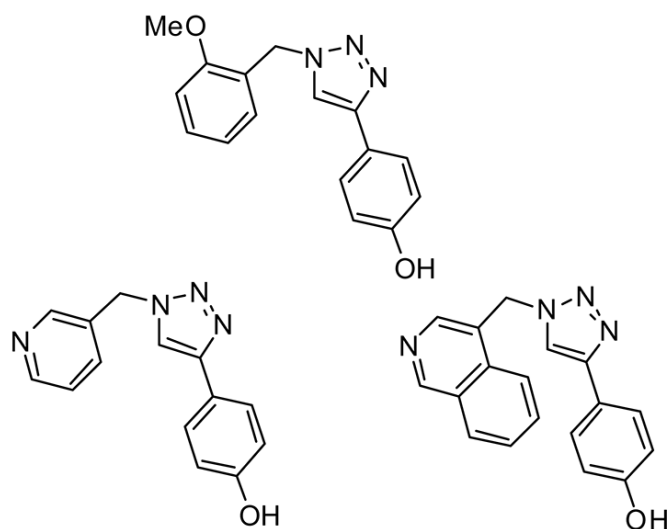


Figura 32: Agonistas para el receptor MIF-CD74

- **ANTAGONISTAS SELECTIVOS.**

Jacobson y cols. también sintetizaron antagonistas del receptor de adenosina para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, asma y otras enfermedades. Estos antagonistas contenían paraamidoamidodendrimeros unidos mediante click chemistry a una aminoxantina dando como resultados antagonistas selectivos del receptor A₂. (Figura 33) (Jacobson y cols, 2011)

- **LIGANDOS DE UNIÓN SELECTIVOS**

- Los receptores de histamina humana H₃ en el sistema nervioso central son auto y heteroreceptores que modulan la síntesis y liberación de Histamina y otros neurotransmisores, que coordinan funciones como la vigilancia, atención y capacidad de aprendizaje. Su modulación vía antagonistas o agonistas inversos puede ser de gran utilidad para el tratamiento de enfermedades neuronales como la epilepsia, el deficit cognitivo, desórdenes del sueño u obesidad. Sander y cols.

elaboraron ligandos usando la click-chemistry que demostraron alta afinidad en un rango de concentración nano-subnanomolar. (Figura 34) (Sander y cols, 2010)

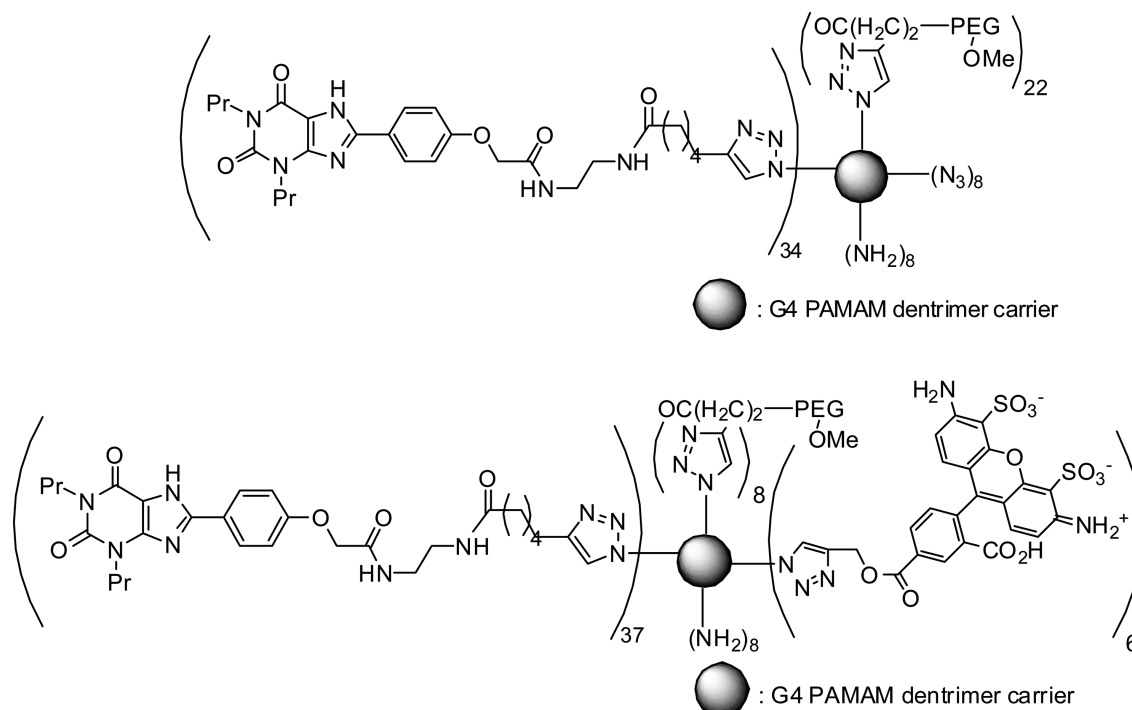


Figura 33: Agonistas selectivos del receptor de adenosina A₂

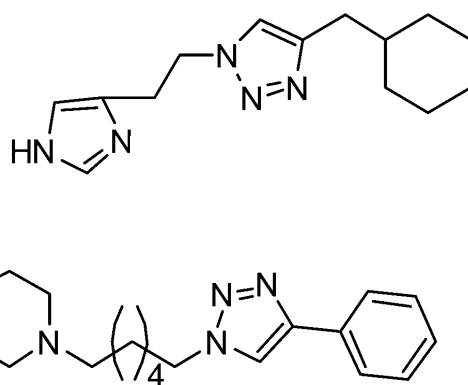


Figura 34: Ligandos de los receptores de la Histamina humana H₃

- Los receptores dopaminérgicos D₃ pertenecen al grupo de receptores D₂-like junto con los D₂ y D₄ cuya función es totalmente diferente de aquella de los receptores D₁-like (D₁ y D₅). Este receptor está implicado en diversas funciones celulares y

se trata de una potencial diana terapéutica para el tratamiento de desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia, la depresión o la enfermedad de Parkinson. Zhang y cols. usaron la click-chemistry en la formación de ligandos a partir de arilpiperazinas y ciertos precursores dando lugar a compuestos altamente selectivos para el receptor D₃(Figura 35) o para los receptores D₁ y D₂ (Figura 36) (Zhang y cols, 2011)

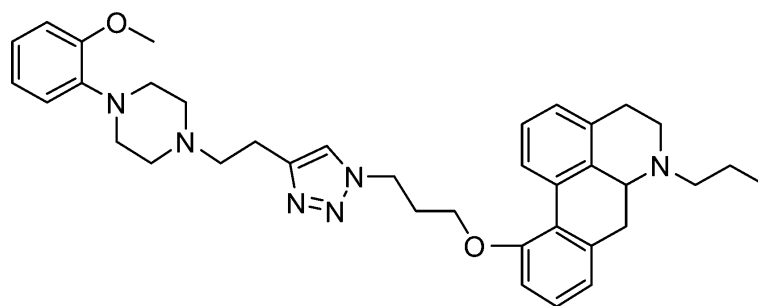


Figura 35: Ligando de los receptores dopaminérgicos D₃

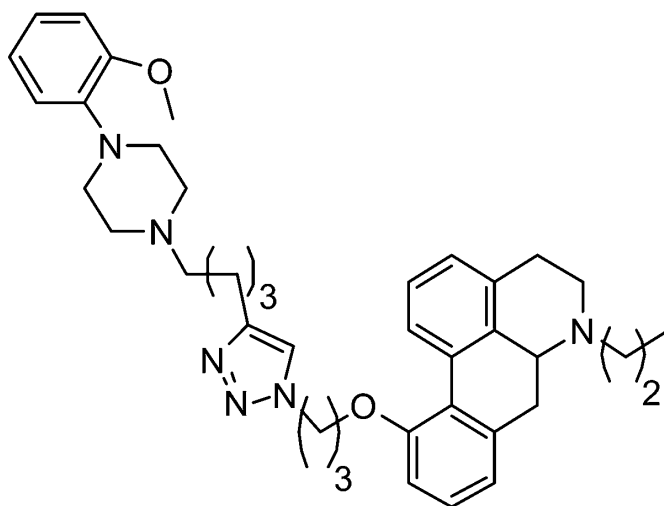


Figura 36: Ligando de los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂

4. CONCLUSIÓN

En conclusión, podríamos afirmar que la click-chemistry ha demostrado ser una herramienta enormemente útil para la investigación biomédica y en lo referente a la síntesis de nuevos fármacos potenciales.

Sin duda la reacción click por excelencia sería la ciclación 1,3-dipolar catalizada por cobre ya que se trata de la más utilizada debido entre otros motivos a la posibilidad de reacción en agua y a la no necesidad de protección de grupos funcionales.

En definitiva, se trata de un modo de emular la síntesis natural de compuestos, pero dejando de lado la gran dificultad de elaboración de enlaces C-C y sustituirlos por enlaces C-heteroátomo-C.

Respecto al desarrollo de inhibidores enzimáticos la click-chemistry ha demostrado su enorme utilidad, especialmente en la estrategia basada en fragmentos, disminuyendo enormemente las dificultades para los diferentes grupos de investigación. A día de hoy, se han realizado con éxito numerosas síntesis de diversos inhibidores enzimáticos con rango de concentraciones de inhibición nano-subnanomolar.

Además también se ha evidenciado su uso en la síntesis de diferentes agonistas y antagonistas de diferentes receptores y de análogos de ligando para el desarrollo de fármacos en la industria farmacéutica.

En general, la investigación usando esta nueva visión de síntesis química se encuentra creciendo de forma exponencial en todas sus diferentes aplicaciones.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bahta M., Lountos G.T., Dyas B., Kim S., Ulrich R.G., Waugh D.S. et al. Utilization of Nitrophenylphosphates and Oxime-Based Ligation for the Development of Nanomolar Affinity Inhibitors of the *Yersinia pestis* Outer Protein H (YopH) Phosphatase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; 54 (8): 2933-2943.
- Best M.D. Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules. *Biochemistry*. 2009; 48 (28): 6571-6584.

- Bienstock R. Library Design, Search Methods, and Applications of Fragment-Based Drug Design. ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society; 2011.
- Brik A., Alexandratos J., Lin Y., Elder J. H., Olson A. J., A. Wlodawer et al. 1,2,3-Triazole as a Peptide Surrogate in the Rapid Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors. *ChemBioChem*. 2005; 6 (7): 1167-1169.
- Brown T., El-Sagheer A.H. Click Nucleic Acid Ligation: Applications in Biology and Nanotechnology. 2012; 45 (8): 1258-1267.
- Chaturvedi P., Chaturvedi N., Gupta S., Mishra A., Singh M., Siddhartha T. Click chemistry: a new approach for drug discovery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2011; 10 (2): 111-117.
- Chen L., Wilson D.J., Xu Y., Aldrich C.C., Felczak K., Sham Y.Y. et al. Triazole-Linked Inhibitors of Inosine Monophosphate Dehydrogenase from Human and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53 (12): 4768–4778
- Cheng K., Liu J., Sun H., Xie J. Synthesis of Oleanolic Acid Dimers as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Chemistry & Biodiversity*. 2010; 7 (3): 690-697.
- Colombano G., Travelli C., Galli U., Caldarelli A., Chini M.G., Canonico P.L. et al. A Novel Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor Synthesized via Click Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53 (2): 616–623.
- Finn M.G., Sharpless K.B., Wang Q., Chan T.R., Hilgraf R., Fokin V.V. Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of American Chemical Society*. 2003; 125: 3192-3193.
- Fischer C., Zultanski S.L., Zhou H., Methot J.L., Brown W.C., Mampreian D.M. et al. Triazoles as γ -secretase modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011; 21 (13): 4083-4087.
- He X., Deng Q., Gao L., Li C., Zhang W., Zhou Y. et al. Facile fabrication of promising protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitor entities based on ‘clicked’ serine/threonine–monosaccharide hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2001; 19 (13): 3892-3900.
- Hosoguchi K., Maeda T, Furukawa J., Shinohara Y., Hinou H., Nishimura S. et al. An Efficient Approach to the Discovery of Potent Inhibitors against Glycosyltransferases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010; 53 (15): 5607–5619
- Jao. C. Y., Salic A. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105: 1498-1500.

- Jia Z. , Zhu Q. ‘Click’ assembly of selective inhibitors for MAO-A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010; 20 (21): 6222-6225.
- Jorgensena W. L., Gandavadia S., Dub X., Harea A.A., Trofimova A., Leng L. et al. Receptor agonists of macrophage migration inhibitory factor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010; 20 (23): 7033-7036.
- Kecskés A., Tosh D.K., Wei Q., Gao Z., Jacobson K.A.. GPCR Ligand Dendrimer (GLiDe) Conjugates: Adenosine Receptor Interactions of a Series of Multivalent Xanthine Antagonists. *Bioconjugate Chemistry*. 2011; 22 (6): 1115–1127
- Kirubakaran S., Zhang M., Johnson C.R., Benjamin N.N., Hedstrom L., Cuny G.D. et al. Triazole Inhibitors of *Cryptosporidium parvum* Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009; 52 (15): 4623–4630
- Klein M., Dinér P., Dorin-Semblat D., Doerig C., Grötli M.. Synthesis of 3-(1,2,3-triazol-1-yl)- and 3-(1,2,3-triazol-4-yl)-substituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4- amines via click chemistry: potential inhibitors of the *Plasmodium falciparum* PfPK7 protein kinase. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2009; 7 (17): 3421-3429.
- Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B.. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie*. 2001; 40 (11): 2004-2021
- 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011; 21 (5): 1342–1346.
- Ling Ng S., Yang P., Chen K.Y.T., Srinivasan R., Yao S.Q. “Click” synthesis of small-molecule inhibitors targeting caspases. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2008; 6 (5): 844-847.
- Moorhouse A.D., Spiteri C., Sharma P., Zloh M., Moses. J.E.. Targeting glycolysis: a fragment based approach towards bifunctional inhibitors of hLDH-5. *Chemical Communications*. 2011; 47 (1): 230-232.
- Poot A. J., Van Ameijde J., Slijper M., van den Berg A., Hilhorst R., Liskamp R.M.J. et al. Development of Selective Bisubstrate-Based Inhibitors Against Protein Kinase C (PKC) Isozymes By Using Dynamic Peptide Microarrays. *ChemBioChem*. 2009; 10 (12): 2042–2051.
- Rankovik Z., Morphy R. *Lead Generation Approaches in Drug Discovery*. Hoboken, EEUU: Wiley; 2010
- Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105: 2415-2420.

- Sander K., Kottke T., Hoffend C., Walter M., Weizel L., Kamelien J. et al. First Metal-Containing Histamine H3 Receptor Ligands. *Organic Letters*. 2010; 12 (11): 2578–2581.
- Schott, A.K., Pineda-Lucena ,A., Martínez, A., Martín-Santamaría, S., de Pascual-Teresa, B., Ramos, A. et al. Potent “Clicked” MMP2 Inhibitors: Synthesis, Molecular Modeling and Biological Exploration. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2011; 9, (12): 4587-4599.
- Schultz C., Neef A.B. Selective fluorescence labeling of lipids in living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009; 48; 1498-1500.
- Sharpless K.B., Kolb H.C. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2003; 8 (24): 1128-1137.
- Srinivasan R., Tan L.P., Wu H., Yang P., Kalesh K.A., Yao S.Q. High-throughput synthesis of azide libraries suitable for direct “click” chemistry and *in situ* screening. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2009; 7: 1821-1828.
- Sumerlin B.S., Vogt A.P.. Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. *Macromolecules*. 2010; 43 (1): 1-13.
- Tan L.P., Wu H., Yang P.Y.,Kalesh K.A., Zhang X.,Hu M. et al. High-throughput discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (MptpB) inhibitors using click chemistry. *Organic Letters*. 2009; 11(22):5102-5105.
- Thirumurugan P., Matosiuk D., Jozwiak K. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical-Biology Applications. 2013;
- Wang C., Hsu K., Bachovchin D.A., Niessen S., Hoover H., Cravatt F. et al. Click-generated triazole ureas as ultrapotent *in vivo*–active serine hydrolase inhibitors. *Nature Chemical Biology*. 2011; 7: 469–478.
- Wub Q., Zhub L., Zheng L., Gaoc B., Zhenb X., Zhang A. et al. Further SAR study on 11-O-substituted aporphine analogues: Identification of highly potent dopamine D3 receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011; 19 (6): 1999-2008.
- Zhang Z., Li L., Lin J., Zhao W., J. Li, Wang P.G. et al. Design and synthesis of O-GlcNAcase inhibitors via ‘click chemistry’ and biological evaluations. *Carbohydrate Research*. 2011; 346 (9): 1083-1092.