

Síntesis y evaluación de compuestos con actividad antitumoral derivados de nuevos activadores de AMPK.

Marta Gargantilla López^{1, a}, Sergio Quesada Sánchez², Ana Castro Morera²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Instituto de Química Médica, IQM-CSIC. Juan de la Cierva, 3. 28006, Madrid, España.

a. marta.gargantilla@hotmail.com

Palabras clave: oxoindol; antitumorales; cáncer; reprogramación metabólica

Resumen

Además del componente genético, el cáncer se entiende como una enfermedad con un componente metabólico clave a tener en cuenta para poder entender su aparición y su progresión. Las células tumorales pueden sufrir una reprogramación metabólica para adaptarse a las condiciones ambientales en las que se encuentren y no ver afectada su proliferación. Incidir en el equilibrio del metabolismo energético de las células tumorales, alterando farmacológicamente esta capacidad de reprogramación, puede suponer una potente vía para ralentizar su proliferación o incluso ocasionar su muerte. En este sentido, existen fármacos antitumorales cuyos mecanismos de acción están contrastados y consisten en alterar la homeostasis energética de las células proliferativas. Partiendo de las estructuras químicas definidas de estos compuestos, y de prototipos derivados de los mismos, en este trabajo se ha llevado a cabo la búsqueda de estructuras novedosas que puedan tener un efecto antitumoral. A partir de este prototipo se han obtenido compuestos derivados del mismo con una estructura basada en el núcleo de 2-oxoindol en tres pasos de síntesis. Los resultados de este estudio exploratorio han permitido optimizar el rendimiento de reacciones de fluoración, que suponen el último paso de la ruta sintética diseñada, llevando a cabo un estudio exhaustivo de las condiciones experimentales. Además, los ensayos de viabilidad celular incubando diferentes líneas celulares tumorales humanas con los nuevos compuestos obtenidos, ha permitido evaluar el efecto antiproliferativo de los compuestos. La estrecha relación estructural de los nuevos prototipos antitumorales con activadores de AMPK podrían aventurar un mecanismo de acción similar.

Cita: Gargantilla López, Marta; Quesada Sánchez, Sergio; Castro Morera, Ana (2016) Síntesis y evaluación de compuestos con actividad antitumoral derivados de nuevos activadores de AMPK. *Dianas* 5 (2): e20160906. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20160906](http://www3.uah.es/dianas?e20160906) <http://www3.uah.es/dianas?e20160906>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Gargantilla-López M, Quesada-Sánchez S, Castro-Morera A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción y objetivos

El cáncer ha sido, hasta hace algunos años, una enfermedad entendida como genética. Estaba íntimamente relacionada con la sobreexpresión de oncogenes o con mutaciones en genes supresores de tumores [1]. A día de hoy se sabe que el componente genético tiene un gran peso en la aparición de esta enfermedad pero que hay otros muchos factores que influyen tanto en dicha aparición como en su desarrollo [2]. Aunque no están aún muy definidos, se sabe que las complejas alteraciones metabólicas que presentan las células tumorales son sin duda uno de ellos [3]. Las condiciones del medio en el que se encuentren, señales externas o la disponibilidad de nutrientes pueden influir lo suficiente en una célula como para provocar en ella una reprogramación metabólica que desencadene una alteración crucial. Por tanto, las características metabólicas de las células tumorales y su desregulación son un importante objeto de estudio para comprender los mecanismos moleculares que dan lugar a esta enfermedad [4].

La disponibilidad de nutrientes es esencial para la regulación de determinadas rutas metabólicas, como la glicolisis y la fosforilación oxidativa. Estos dos procesos metabólicos son los principales mecanismos de provisión de energía de las células, por lo que su relación con el crecimiento de células tumorales está siendo objeto de estudio. De esta manera, se ha puesto de manifiesto que el aumento de la glicolisis en células tumorales está vinculado a la activación o inhibición de algunos oncogenes y genes supresores de tumores y a la influencia de determinadas vías de señalización [5]. Las células proliferativas (incluidas las tumorales) tienen una gran demanda de glucosa debido a la gran cantidad de precursores de macromoléculas que necesitan para conseguir esa proliferación desmesurada. Gracias a la alta captación y consumo de glucosa, son capaces de generar todo el ATP que necesitan para la síntesis de los mencionados precursores a través del proceso de glicolisis [6]. Lo habitual en células no proliferativas es que obtengan la energía necesaria para su supervivencia a través de la fosforilación oxidativa, energéticamente más eficaz que la glicolisis. A pesar de ello, las células proliferativas prefieren obtener ATP a través de glicolisis porque es mucho más rápida que la fosforilación oxidativa, lo que les permite

reproducirse rápidamente. Esta reprogramación metabólica que presentan las células tumorales se denomina efecto Warburg y está demostrado como una de las causas fundamentales de la aparición y progresión del cáncer [7] (**fig. 1**).

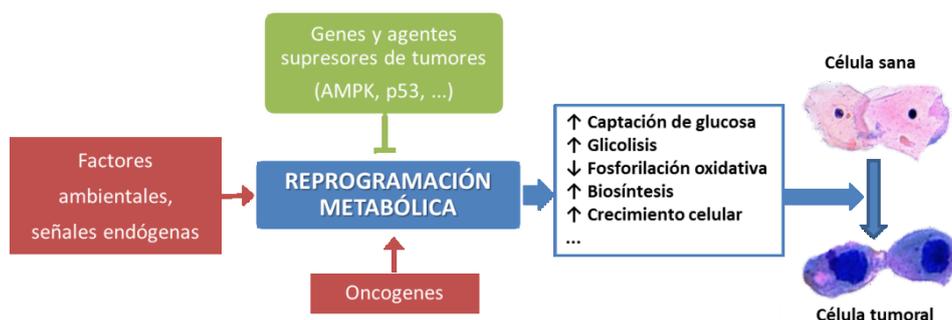


Figura 1.- Factores que causan e interaccionan con la reprogramación metabólica implicada en la carcinogénesis y en el desarrollo y progresión del cáncer.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha descubierto que el prototipo **1** (fig 2) presenta una interesante actividad antiproliferativa, ya que los ensayos de viabilidad celular llevados a cabo empleando un método colorimétrico que consiste en analizar la actividad metabólica de las células valorando su capacidad para reducir la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol) en la línea celular de cáncer de próstata humana (PC-3), uno de los cánceres más relacionados con el factor metabólico [8], han revelado que el prototipo **1** muestra una IC_{50} de 12 μ M.

A la vista de estos resultados, en el presente trabajo se ha seleccionado el prototipo **1** como punto de partida para la búsqueda de nuevos análogos. De manera que, se plantea llevar a cabo la exploración de nuevas modificaciones químicas alrededor de este compuesto (fig. 2). Concretamente, se partirá de una base estructural consistente en un núcleo de 2-oxoindol con un sustituyente biarílico en la posición C3. Se variará la naturaleza de los anillos aromáticos por anillos bioisómeros, lo que arrojará información sobre la especificidad por unos grupos u otros. La influencia del átomo de flúor unido a esta posición C3, que además es un centro estereogénico, también será evaluada. Se plantearán análogos que lleven incorporado dicho átomo de flúor y otros que sustituyan ese flúor por un átomo de cloro, esperando conocer si el halógeno es determinante en la relación estructura-actividad.

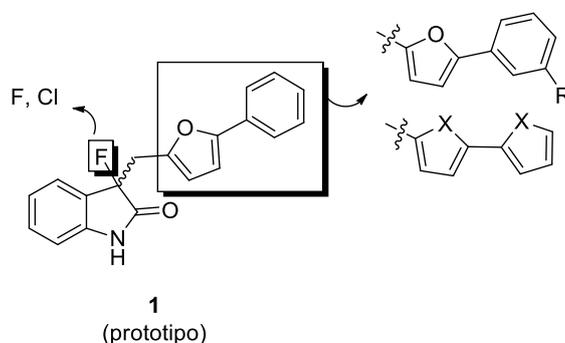


Figura 2.- Estructura del prototipo **1**, y propuesta de modificaciones estructurales para la síntesis de nuevos derivados de 2-oxoindol.

Por otro lado, como parte de los objetivos del trabajo, se planteará la puesta a punto de las condiciones de experimentales de síntesis del prototipo **1**.

Finalmente, se evaluará su efecto antitumoral sobre diferentes tipos de líneas celulares tumorales: pulmón (A549), colon (HT29), mama (MDA-MB-231) y páncreas (PSN1). El resultado de este trabajo pretende ser el punto de partida para el descubrimiento de nuevos prototipos que permitan profundizar en los estudios de relación estructura química actividad biológica de esta familia química.

Métodos

Métodos generales

Los reactivos y disolventes se adquirieron de *Sigma-Aldrich Co.*, *Fluorochem* y *Acros Organics* y *Lab-Scan* y se usaron sin purificación.

La monitorización de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm, y visualización con luz ultravioleta (254 nm).

Las purificaciones mediante cromatografía en columna se realizaron usando sílice Merck 60, 230-400 mesh.

Los experimentos de HPLC-MS se han llevado a cabo empleando un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ. El gradiente de elución estándar es agua:acetonitrilo 85:15 → 5:95 con 0.1% de ácido fórmico durante un tiempo de elución de 5 minutos y un flujo de 1 mL/min.

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron bajo estrictas condiciones anhidras.

Los experimentos de irradiación de microondas han sido realizados en un reactor de microondas monomodo *Emrys Synthesizer* (Biotage AB).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ¹H y ¹³C fueron registrados en un espectrofotómetro Varian UNIT INOVA-300 (a 300 y 75 Hz). Se ha indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuadruplete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; m, multiplete), el valor de las constantes de acoplamiento *J* (Hz) y la asignación estructural.

Los espectros de masas se han registrado en un espectrómetro *Hewlett-Packard* LC/MS HP 1100, mediante las técnicas de Impacto Electrónico o Electrospray.

Métodos de síntesis

Procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles (**2a-c**)

A una disolución del correspondiente 2-oxoindol (1 eq.) en metanol (25 mg/mL) se le añade el correspondiente aldehído (1 eq.), tras lo cual se añade pirrolidina (0.1 eq.) sobre el crudo de reacción. La mezcla se agita a reflujo durante 3h. Una vez terminada la reacción, se deja enfriar el crudo primero hasta temperatura ambiente y después a 0 °C, apareciendo un precipitado que se aísla por filtración a vacío y se lava con varias porciones de metanol a 0 °C.

(*E, Z*)-3-(5-fenilfuran-2-il-metiliden)-2-oxo-indol (**2a**) [9]

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles, se parte de 495 mg (3.72 mmol) de 2-oxoindol y de 640.34 mg (3.72 mmol) de 5-fenil-2-furaldehído y se obtiene 1.06 g (99%) de un sólido naranja. **P. f.** 253-255 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.59 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.57 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H), 7.50-7.23 (m, 6H), 7.12 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H). **HPLC**: *t_R* = 5.32 (99%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 288.0 [M+H]⁺.

(*E, Z*)-3-[(2, 2'-bitiofen)-5-il-metiliden]-2-oxoindol (**2b**) [10]

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles, se partió de 137 mg (1.03 mmol) de 2-oxoindol y de 200 mg (1.03 mmol) de 2-2'-bitiofeno-5-carboxaldehído para dar lugar a 292 mg (92%) de un sólido naranja. **P. f.** 265 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.70-7.62 (m, 2H), 7.56-7.47 (m, 1H), 7.48-7.42 (m, 1H), 7.39 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H), 7.37-7.17 (m, 2H), 7.15-6.97 (m, 2H), 6.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H). **HPLC**: *t_R* = 5.59 (98%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 310.2 [M+H]⁺.

(*E, Z*)-3-(5-bromofuran-2-il-metiliden)-2-oxoindol (**2c**) [11]

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles, a una disolución de 1 g (7.52 mmol) de 2-oxoindol se le añaden 1.31 g (7.52 mmol) de 5-bromo-2-furaldehído, resultando 1.45 g (66%) de un sólido amarillo. **P. f.** 230 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.36 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.68 (s, 1H, NH), 7.36-7.18 (m, 2H, H-Ar), 7.11 (td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-Ar), 6.93-6.79 (m, 2H, H-Ar), 6.57 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, CH). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.56, 153.43, 141.49, 130.16, 127.00, 125.85, 123.30, 122.86, 122.26, 121.86, 119.65, 115.53, 110.06. **HPLC**: *t_R* = 4.70 (94.5%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 292.2 [M-2H]⁺.

Procedimiento general para la síntesis de 3-arilmetil-2-oxoindoles (**3a-c**)

A una disolución del correspondiente 3-metilen-2-oxoindol (1 eq.) en N, N-dimetilformamida anhidra (10 mg/mL) se le añade NaBH₄ (1.2 eq.) lentamente, manteniendo el burbujeo bajo control. La mezcla se agita durante 2 h. a temperatura ambiente. Una vez terminada la reacción, se añade un volumen de agua aproximadamente igual a la mitad del volumen del crudo y la mezcla se extrae tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se concentran a sequedad a

presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla hexano:acetato de etilo (3:2).

(R, S)-3-(5-fenilfuran-2-il-metil)-2-oxoindol (**3a**)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-arilmetil-2-oxoindoles, sobre una disolución de **2a** de 250 mg (0.87 mmol) se añaden 38.7 mg (1.04 mmol) de NaBH₄, dando lugar a 172 mg (68%) de un sólido amarillo pálido. **P. f.** 155 °C. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.43 (s, 1H, NH), 7.53 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-Ar), 7.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-Ar), 7.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-Ar), 7.14 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar), 7.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-Ar), 6.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-Ar), 6.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar), 6.75 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-Ar), 6.54 (m, 1H, H-Ar), 6.11 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-Ar), 3.83 (dd, *J* = 7.3, 4.9 Hz, 1H, CH₂), 3.10 (dd, *J* = 15.4, 7.4 Hz, 1H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 178.58, 140.49, 131.15, 128.12, 127.00, 124.62, 123.51, 117.59, 110.94, 108.44, 103.92, 40.30, 28.19. **HPLC**: *t_R* = 4.92 (98%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 290.0 [M]⁺.

(R, S)-3-[(2, 2'-bitiofen)-5-il-metil]-2-oxoindol (**3b**)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-arilmetil-2-oxoindoles, partiendo de 200 mg (0.65 mmol) de **2b** y de 28.8 mg (0.78 mmol) de NaBH₄ se obtuvieron 54 mg (27%) de un aceite amarillo. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.19 (s, 1H, NH), 7.36-7.11 (m, 3H, H-Ar), 7.11-6.77 (m, 5H, H-Ar), 6.65 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-Ar), 3.75 (dd, *J* = 8.2, 4.6, 1H, CH), 3.57 (dd, *J* = 14.9, 4.4 Hz, 1H, CH₂), 3.30 (dd, *J* = 14.9, 8.0 Hz, 1H, CH₂). **HPLC**: *t_R* = 5.31 (97%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 312.0 [M-H]⁺.

(R, S)-3-(5-bromofuran-2-il-metil)-2-oxoindol (**3c**)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-arilmetil-2-oxoindoles, se partió de 500 mg (1.72 mmol) de **2c** y de 76.6 mg (2.07 mmol) de borohidruro sódico, obteniendo 134 mg (27%) de un sólido blanco. **P. f.** 126 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.22 (s, 1H, NH), 7.29-7.16 (m, 1H, H-Ar), 7.08-6.75 (m, 3H, H-Ar), 6.20 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-Ar), 6.01 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-Ar), 3.77 (dd, *J* = 9.5, 4.7 Hz, 1H, CH), 3.43 (dd, *J* = 15.4, 4.6 Hz, 1H, CH₂), 2.96 (dd, *J* = 15.3, 9.2 Hz, 1H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 178.26, 153.78, 140.92, 128.10, 127.97, 124.37, 122.09, 119.89, 111.67, 109.79, 109.41, 44.49, 28.96. **HPLC**: *t_R* = 4.40 (99.5%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 292.1 [M]⁺.

Procedimiento para la síntesis de *(R, S)* 3-(5-((2-oxoindolin-3-il)metil)furan-2-il)benzoato de metilo (**3d**)

A una disolución de 50 mg (1 eq, 0.17 mmol) de **3c** (1 eq.) en isopropanol (15 mL) en un reactor sellado, se le añaden 4.8 mg (2 %mol, 0.034 mmol) de Pd(PPh₃)₂Cl₂, 36.25 mg (2 eq, 0.34 mmol) de Na₂CO₃ disuelto en 3 mL de agua y 50.1 mg (1.63 eq, 0.28 mmol) de ácido 3-metoxicarbonil-fenil borónico. La mezcla se agita a 90 °C bajo irradiación de microondas durante 70 min. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se disuelve en acetato de etilo y se extrae tres veces con agua. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se concentran a sequedad a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice hexano:acetato de etilo (3:1), obteniéndose 38 mg (72%) de un sólido marrón pálido. **P. f.** 153 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.32 (s, 1H, NH), 8.22 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 7.80 (dd, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-Ar), 7.40 (td, *J* = 7.9, 3.6 Hz, 1H, H-Ar), 7.33-7.10 (m, 2H, H-Ar), 7.04-6.82 (m, 2H, H-Ar), 6.62 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-Ar), 6.15 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-Ar), 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 3.88 (dd, *J* = 9.0, 4.7 Hz, 1H, CH), 3.55 (dd, *J* = 15.0, 4.5 Hz, 1H, CH₂), 3.09 (dd, *J* = 15.1, 9.2 Hz, 1H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177.77, 166.88, 151.09, 150.96, 140.25, 130.11, 129.61, 127.73, 127.68, 127.17, 126.93, 126.57, 123.70, 123.52, 121.34, 108.69, 108.65, 106.67, 51.20, 44.08, 28.23. **HPLC**: *t_R* = 4.78 (97%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 348.4 [M-H]⁺.

Procedimiento general para la síntesis de 3-(arilmetil)-3-cloro-2-oxoindoles (**4a-b**)

A una disolución del correspondiente 3-(arilmetil)-2-oxoindol (1 eq.) en diclorometano (10 mL) se añade trietilamina (0.6 eq.). La mezcla se enfría a 0 °C y sobre ella se adiciona N-clorosuccinimida (1.2 eq.) disuelta en diclorometano (5 mL) lentamente. La mezcla resultante se agita durante 1h a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice hexano:acetato de etilo (3:1).

(R, S)-3-cloro-3-(5-fenilfuran-2-il-metil)-2-oxoindol (**4a**)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis para los 3-(arilmetil)-3-cloro-2-oxoindoles y partiendo de 60 mg (0.21 mmol) de **3a**, de 33.7 mg (0.25 mmol) de N-clorosuccinimida y de 18 µL (0.13 mmol) de trietilamina se obtienen 50 mg (75%) de un sólido marrón pálido. **P. f.** 139-141 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.98 (s, 1H, NH), 7.26 (m, 8H, H-Ar), 6.74 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-Ar), 6.28 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-Ar), 5.99 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-Ar), 3.76-3.39 (m, 2H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176.37, 153.86, 148.15, 140.43, 130.88, 130.79, 129.71, 128.99, 127.64, 125.57, 123.91, 123.85, 123.65, 111.72, 111.13, 64.05, 38.17. **HPLC**: *t_R* = 5.26 (98%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 324.2 [M-

H]⁺. **Análisis elemental:** Calc. para C₁₉H₁₄ClNO₂: C 70.48, H 4.36, N 4.33, Cl 10.95. Medido: C 70.63, H 4.17, N 4.30, Cl 11.21.

(*R, S*)-3-cloro-3-[(2, 2'-bitiofen)-5-il-metil]-2-oxoindol (**4b**)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis para los 3-(arilmetil)-3-cloro-2-oxoindoles, se partió de 30 mg (0.10 mmol) de **3b**, de 15.44 mg (0.12 mmol) de N-clorosuccinimida y de 9 µL (0.62 mmol) de trietilamina para obtener 16 mg (48%) de un aceite marrón. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.18 (s, 1H, NH), 7.36 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-Ar), 7.26 (s, 1H, H-Ar), 7.18-7.06 (m, 2H, H-Ar), 6.99-6.89 (m, 2H, H-Ar), 6.87-6.78 (m, 2H, H-Ar), 6.58 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-Ar), 4.12 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH₂), 3.72 (d, 1H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.31, 140.48, 137.83, 137.44, 134.18, 130.96, 129.45, 129.09, 128.03, 125.39, 124.59, 123.89, 123.73, 123.43, 110.94, 64.53, 39.71. **HPLC:** *t_R* = 5.32 (98%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 346.2 [M-H]⁺. **Análisis elemental:** Calc. para C₁₇H₁₂ClNOS₂: C 59.03, H 3.50, N 4.05, Cl 10.25, S 18.54. Medido: C 59.33, H 3.88, N 4.15, Cl 9.89, S 18.69.

Procedimiento general para la síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles (**4c-e**)

A una disolución del correspondiente 3-(arilmetil)-2-oxoindol (1 eq.) en metanol (5 mg/mL), se añade cinconina (1.5 eq.). La mezcla se agita a t.a. durante 30 min. Tras esto, la mezcla se enfría a 0 °C y se añade *Selectfluor* (1.5 eq.) lentamente y se agita la mezcla resultante durante 48 h más. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se disuelve en acetato de etilo y se extrae tres veces con agua. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se concentran a sequedad a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice hexano:acetato de etilo (2:1).

(*R, S*)-3-fluoro-3-(5-fenilfuran-2-il-metil)-2-oxoindol (**4c**)

Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles, sobre una disolución de 50 mg (0.173 mmol) de **2 a** y 76.2 mg (0.26 mmol) de cinconina en metanol, se añaden 91.75 mg (0.26 mmol) de *Selectfluor*, obteniéndose 16 mg (30%) de un sólido amarillo. **P. f.** 128 °C. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.85 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H, H-Ar), 7.88-7.74 (m, 2H, H-Ar), 7.59 (dt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H-Ar), 7.55-7.39 (m, 4H, H-Ar), 7.27 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H, H-Ar), 7.00 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-Ar), 6.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-Ar), 3.77 (dd, *J* = 25.1, 12.4 Hz, 1H, CH₂), 3.42 (dd, *J* = 25.2, 12.4 Hz, 1H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.15, 149.42, 144.16, 141.65, 129.34, 128.20, 127.84, 126.94, 124.77, 124.75, 122.10, 120.49, 120.23, 110.46, 109.97, 109.29, 93.60, 33.37. **HPLC:** *t_R* = 2.56 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 306.8 [M]⁺. **Análisis elemental:** Calc. para C₁₉H₁₄FNO₂: C 74.26, H 4.59, N 4.56. Medido: C 73.98, H 4.36, N 4.68.

(*R, S*)-3-fluoro-3-[(2, 2'-bitiofen)-5-il-metil]-2-oxoindol (**4d**)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles se partió de 45 mg (0.15 mmol) de **2 b**, de 76.8 mg (0.22 mmol) de *Selectfluor* y de 63.8 mg (0.22 mmol) de cinconina, para dar lugar a 10.4 mg (22%) de un aceite amarillo. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.95 (s, 1H, NH), 7.32 (tt, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H-Ar), 7.17 (m, 2H, H-Ar), 7.10-7.00 (m, 2H, H-Ar), 6.95 (m, 2H, H-Ar), 6.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-Ar), 6.67 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-Ar), 3.71 (dd, *J* = 21.0, 14.5 Hz, 1H, CH₂), 3.48 (dd, *J* = 21.0, 14.6 Hz, 1H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.35, 141.67, 141.60, 137.91, 137.63, 133.22, 133.11, 131.94, 131.90, 129.53, 128.15, 126.16, 124.66, 123.98, 123.64, 111.02, 36.22. **HPLC:** *t_R* = 5.18 (99%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 330.2 [M-H]⁺. **Análisis elemental:** Calc. para C₁₇H₁₂FNOS₂: C 61.98, H 3.67, N 4.25, S 19.47. Medido: C 62.17, H 3.42, N 4.19, S 19.09.

(*R, S*)-3-(5-((3-fluoro-2-oxoindolin-3-il)metil)furan-2-il)benzoato de metilo (**4e**)

Siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles, partiendo de 45 mg (0.13 mmol) de **2 d**, 68.9 mg (0.19 mmol) de *Selectfluor* y de 57.2 mg (0.19 mmol) de cinconina se obtienen 14 mg (31%) de un sólido blanco. **P. f.** 157 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.10 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.97-7.80 (m, 2H, H-Ar), 7.67-7.58 (m, 1H, H-Ar), 7.41-7.22 (m, 2H, H-Ar), 7.07 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-Ar), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-Ar), 6.57 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-Ar), 6.21 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-Ar), 3.93 (s, 3H, -OCH₃), 3.68 (dd, *J* = 18.6, 14.7 Hz, 1H, CH₂), 3.47 (dd, *J* = 18.6, 14.6 Hz, 1H, CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.21, 167.19, 152.81, 147.80, 147.66, 141.43, 141.36, 131.70, 131.23, 130.94, 129.07, 128.45, 128.01, 126.05, 124.96, 123.50, 111.85, 110.81, 107.12, 52.26, 34.56. **HPLC:** *t_R* = 4.98 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 366.3 [M-H]⁺. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₁H₁₆FNO₄: C 69.04, H 4.41, N 3.83. Medido: C 68.97, H 4.22, N 3.74.

Métodos de la evaluación biológica

Los ensayos para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados consistieron en la incubación de dichos compuestos con 4 líneas celulares tumorales humanas: mama, pulmón, páncreas y colon. Dichas líneas fueron proporcionadas por ATCC (American Type Culture Collection): A-549, (carcinoma de pulmón); HT-29 (adenocarcinoma colorrectal); MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama) y PSN1 (adenocarcinoma pancreático). Las líneas celulares se conservaron en medio RPMI (Roswell

Park Memorial Institute) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina y 100 U/mL de penicilina y estreptomycin, a 37°C y un 5% de CO₂. Además de los cultivos con los que se incubaron los compuestos, se utilizaron tres controles: un control de células no tratadas, un control a tiempo cero de la incubación y un control en el que no se han sembrado células (como control de la muerte celular). Los cultivos se incubaron en presencia o ausencia de los compuestos durante 72h a 10 concentraciones que oscilan entre 10 y 0.0026 µg/mL.

Se lleva a cabo un ensayo colorimétrico para determinar el crecimiento y la viabilidad celular de manera cuantitativa tras la incubación con los compuestos. Para ello se utiliza sulforrodamina B (SRB) y se colocan las células en placas de 96 pocillos con una densidad de 5x10³ por pocillo. Una placa de cada tipo de línea celular es usada como referencia T_z (número de células control a tiempo $t = 0$). A continuación, las células son tratadas con un vehículo de control o con los compuestos a las concentraciones indicadas. Después estas células se incuban durante 72h para llevar a cabo después el análisis colorimétrico.

Las células se lavan dos veces con PBS (phosphate buffered saline), fijadas durante 15 minutos en una solución al 1% de glutaraldehído, lavadas dos veces con PBS y tratadas con una solución al 0.4% de SRB durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después las células son lavadas varias veces con una solución al 1% de ácido acético y secadas. A continuación, se extrae el SRB con una solución 10mM trizma base y se mide la absorbancia a 490 nm. La supervivencia celular se expresa a partir de los datos del control del crecimiento celular.

Con los datos obtenidos se elabora una curva dosis-respuesta con un análisis de regresión no lineal utilizando el algoritmo NCI que utiliza como parámetros:

T_z = número de células control a tiempo $t = 0$

C = número de de células control a tiempo t

T = número de células tratadas a tiempo t

Si $T_z < T < C$ (inhibición del crecimiento), entonces: $100 \times [(T - T_z) / (C - T_z)]$

Si $T < T_z$ (muerte celular neta), entonces: $100 \times [(T - T_z) / T_z]$

Tras la generación de la mencionada curva, se obtienen los siguientes parámetros llevando a cabo una interpolación de la misma:

GI₅₀ = concentración de compuesto a la que se causa una inhibición del crecimiento celular del 50%.

TGI = concentración de compuesto que causa una inhibición total del crecimiento.

LC₅₀ = concentración de compuesto que causa la muerte de la mitad de la población celular.

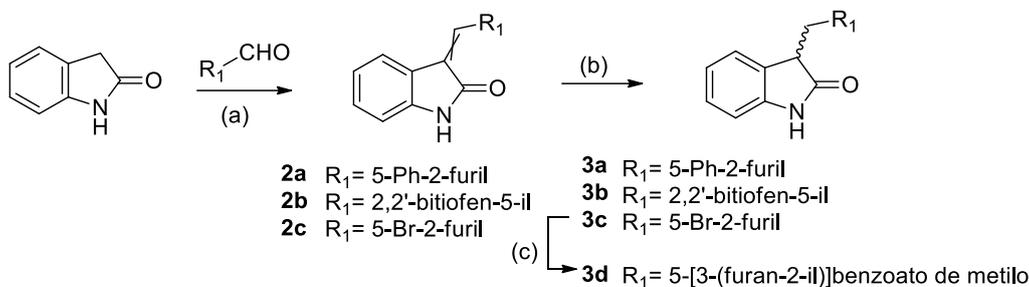
Resultados

Síntesis

La ruta sintética diseñada para conseguir los productos deseados comprende tres etapas generales: la obtención del precursor insaturado de 3-metilen-2-oxoindol, la reducción de este precursor y la halogenación del compuesto reducido.

En el esquema 1 se muestra la ruta sintética llevada a cabo para la obtención de los precursores insaturados y la posterior reducción. La obtención de los precursores **2 a-c** se consigue a partir de la condensación sobre el carbono en posición C3 del 2-oxoindol con aldehídos de naturaleza aromática. Esta reacción se lleva a cabo con calefacción a reflujo y en presencia de pirrolidina. Se forman las mezclas de isómeros geométricos *E-Z* como resultado de la libre disposición del doble enlace, con un rendimiento global que oscila entre el 66 y el 99%. La reducción se consigue con borohidruro de sodio en N, N-dimetilformamida anhidra, obteniendo en este caso los compuestos **3 a-c** con rendimientos entre el 27 y el 68%. En este momento se forma un centro estereogénico en la posición C3 del 2-oxoindol.

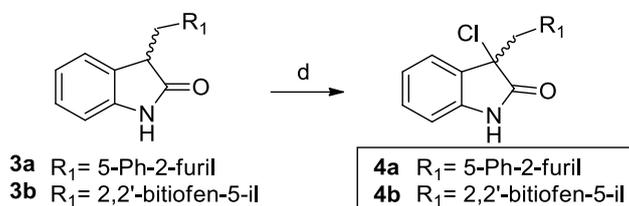
Por otro lado, se lleva a cabo una reacción adicional sobre el compuesto **3 c** para dar lugar al precursor **3 d**. Se trata de una reacción de tipo Suzuki en la que **3 c** reacciona con ácido 3-metoxicarbonil-fenil borónico en presencia de carbonato de sodio y del catalizador Pd(PPh₃)₂Cl₂ en una mezcla de isopropanol y agua [12]. Tras una primera prueba para poner a punto las condiciones experimentales, que consistió en 24h de reacción a 90°C y reflujo, se obtuvo un rendimiento del 17%. A la vista de estos resultados, se consideraron otras alternativas. Así, se hizo una segunda prueba utilizando irradiación de microondas también a 90°C, que finalizó en 70 minutos de reacción y con un rendimiento del 84%, por lo que se seleccionaron estas condiciones como las óptimas para futuros procesos similares.



Esquema 1.- Reactivos y condiciones: a) R₁CHO (1 eq.), pirrolidina (0.1 eq.), metanol, ref., 8 h, 66 - 99 %; b) NaBH₄ (1.2 eq.), N, N-dimetilformamida anh., t.a., 2 h, 27 - 68 %; c) Ácido 3-metoxicarbonil-fenil borónico (1.63 eq.), Na₂CO₃ (2 eq.), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.02 eq.), isopropanol:agua 5:1, m.o., 90 °C, 70 min., 84 %.

Una vez obtenido el precursor reducido se lleva a cabo una etapa de halogenación, que tiene como objeto la introducción de un átomo de flúor o de cloro en la posición C3 del 2-oxoindol, donde se encuentra el mencionado centro estereogénico.

La ruta seguida para la cloración de los sustratos reducidos se contempla en el esquema 2. En esta reacción se emplea N-clorosuccinimida en diclorometano y en presencia de trietilamina, obteniéndose el producto deseado con un rendimiento entre el 48 y el 75% en una hora de reacción a temperatura ambiente.



Esquema 2.- Reactivos y condiciones: d) N-clorosuccinimida (1.2 eq.), trietilamina (0.6 eq.), diclorometano, t.a., 1 h, 48 - 75 %.

Nº	Dvte.	t (h)	T (°C)	eq. <i>Selectfluor</i>	Base	eq. base	r (HPLC), %
1	THF: DMF (1:1)	24	25	1	-	-	3
2	MeCN	48	0	1	-	-	.*
3	MeCN	24	60	1.5	N, N'-diisopropiletilamina	1.5	41**
4	MeCN	24	25	2	N, N'-diisopropiletilamina	1.5	.*
5	MeOH	24	25	2	-	-	.*
6	MeOH	24	25	2	N, N'-diisopropiletilamina	1.5	30
7	MeOH	48	25	1.5	quinina	1.5	38
8	MeOH	48	25	1.5	cinchonina	1.5	72
9	MeOH	48	25	1.5	cinchonidina	1.5	56

Tabla 1.- Condiciones experimentales estudiadas para la reacción de fluoración. *En estos casos no se pudo cuantificar el rendimiento de la reacción, debido a la descomposición que se generaba en el crudo de reacción. **En este caso se obtuvo el 41% de rendimiento, pero no se obtuvo el producto deseado, sino que el precursor reducido incorporó un átomo de flúor en el resto aromático diferente del 2-oxoindol. Abreviaturas: MeCN: acetonitrilo; MeOH: metanol; DMF: N, N-dimetilformamida; THF: tetrahidrofurano.

En el caso de las reacciones de fluoración, en nuestro grupo de investigación se había descrito la síntesis de los compuestos fluorados, empleando *Selectfluor*, como agente de fluoración y metanol como disolvente. Estos procedimientos originaban bajos rendimientos, por lo que se decidió hacer un barrido de condiciones en torno a esta reacción para mejorar los rendimientos obtenidos previamente.

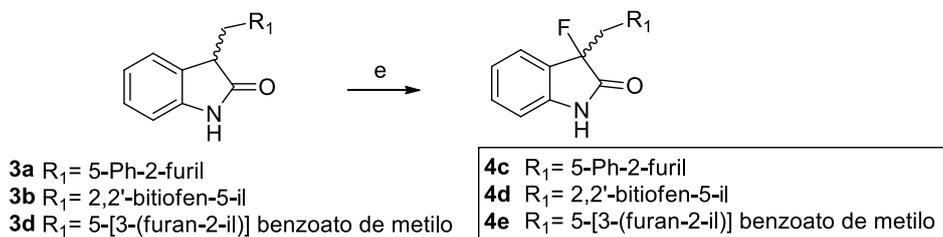
Las diferentes condiciones estudiadas con los respectivos rendimientos que se obtuvieron se recogen en la tabla 1. Se decidió partir de condiciones similares a las mencionadas y sobre ellas ir modificando variables de manera paulatina.

La reacción de fluoración, que suponía el punto de partida, consistía en emplear 1 equivalente de *Selectfluor* empleando metanol como disolvente, a temperatura ambiente y durante 24 h de reacción. Se decidió que la primera variable a modificar fuera el disolvente, por lo que se utilizaron esas mismas condiciones, pero empleando una mezcla de tetrahidrofurano y N, N-dimetilformamida (1:1), esperando

que la gran capacidad de la dimetilformamida como disolvente mejorase los rendimientos (entrada n 1). Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados así que se cambió el disolvente por acetonitrilo y se disminuyó la temperatura de reacción a 0°C [13]. Tras 48 h de reacción, lo que podía observarse al seguir el proceso por cromatografía en capa fina, era la descomposición del crudo de reacción, por lo que se concluyó que una temperatura baja no favorecía en absoluto la formación del producto deseado (entrada n 2). En este momento se decidió incluir una base en la mezcla de reacción que favoreciese la salida del hidrógeno en posición C3 del 2-oxoindol. Así, se hicieron varias pruebas en acetonitrilo y metanol empleando 1.5 equivalentes de N, N'-diisopropiletilamina y variando los equivalentes de *Selectfluor*, que oscilaron entre 1.5 y 2 (entradas n 3-6). En las pruebas de acetonitrilo se observó que, o bien se descomponía el crudo de reacción o si se elevaba la temperatura en torno a 60°C lo que se obtenía era la fluoración del precursor reducido, pero en una posición diferente a la deseada, más favorecida en estas condiciones (entrada n 3). Las pruebas empleando metanol desvelaron que la base jugaba un papel esencial en esta etapa, ya que sin ella se obtenía de nuevo la descomposición del crudo de reacción (entrada n 5) y si en cambio sí se utilizaba se obtenía una conversión por HPLC del 30% (entrada n 6). Este resultado, aunque prometedor, situaba los rendimientos obtenidos en el mismo rango que en el proceso utilizado inicialmente. De manera que, se optó por cambiar la base utilizando en concreto alcaloides de *cinchona*, en concreto se seleccionaron quinina, cinchonina y cinchonidina. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando 1.5 equivalentes de tres alcaloides, 1.5 equivalentes de *Selectfluor* y en metanol, como disolvente que ofrecía mejores resultados (entradas n 7-9). Los datos de progresión de la reacción, cuantificados por HPLC-MS, mostraron conversiones hacia el producto final del 38, 72 y 56%, respectivamente. De manera que, se pudo concluir la importancia de la naturaleza de la base en este tipo de reacciones, encontrándose que las condiciones que empleaban cinchonina como base condujeron a una conversión del 72%.

En base a estos resultados, se seleccionó el metanol como el mejor disolvente y la cinchonina como la base más adecuada para llevar a cabo el proceso (entrada 8 de la tabla 1). Cabe destacar que en los antecedentes bibliográficos aparecen los alcaloides de *cinchona* en este tipo de reacciones como bases que, además, inducen enantioselectividad. En este caso no se está buscando un enantiómero concreto, pero el efecto que puede ejercer sobre el producto puede ser una ventaja interesante para estudios futuros.

La reacción de fluoración sobre los precursores reducidos se muestra en el esquema 3.



Esquema 3.- Reactivos y condiciones: *Selectfluor* (1.5 eq.), cinchonina (1.5 eq.), metanol, t.a., 48 h, 22 – 31 %;

Evaluación biológica

Los cinco compuestos se ensayaron en cuatro líneas tumorales diferentes: pulmón (A549), colon (HT29), mama (MDA-MB-231) y páncreas (PSN1). Tras la incubación de los compuestos con los cultivos celulares se mide el crecimiento celular y se compara con un control de células no tratadas, otro a tiempo cero de la incubación y un tercero en el que no se han sembrado células como control de la muerte celular. Los resultados obtenidos tras la evaluación biológica se muestran en la tabla 2, ofreciendo tres parámetros: GI₅₀, TGI y LC₅₀. GI₅₀ es la concentración de compuesto a la que se inhibe el crecimiento celular al 50%, TGI es la concentración de compuesto a la que se causa inhibición total del crecimiento celular y LC₅₀ es la concentración total de compuesto que causa la muerte de la mitad de la población celular. Por tanto, lo ideal sería esperar valores muy pequeños de estos parámetros, de manera que a concentraciones del orden de 10⁻⁹ M del compuesto se observe una clara disminución del número de células tras la incubación.

Como se puede ver en la tabla, casi todos los compuestos en todas las líneas de células tumorales presentan valores de GI₅₀, TGI y LC₅₀ superiores a la máxima concentración ensayada, 10 µg/mL, y a dicha concentración no causaron efecto alguno: las células han crecido igual que el control no tratado. Únicamente el compuesto **4 a** presenta actividad antiproliferativa para las líneas de células tumorales de mama y páncreas, siendo en la de mama más representativa. Este compuesto presenta un valor de GI₅₀ del orden micromolar para una concentración de 1.3 µg/mL en la línea de mama, mientras que para la línea de páncreas es del orden de 10⁻⁵ M para una concentración de 8.3 µg/mL. Estos valores de GI₅₀ hacen que se fije la atención sobre el compuesto **4 a** que presenta actividad antiproliferativa en cáncer de mama en el rango micromolar.

Comp.	Valor molar (M) · 10 ⁻⁵ del parámetro correspondiente. Concentración ensayada: 10 µg/mL				
	Línea celular	Pulmón (NSCLC) (línea A549)	Colon (línea HT29)	Mama (línea MDA-MB-231)	Páncreas (línea PSN1)
4 a	GI ₅₀	> 3,10	> 3,10	0,402 (*)	2,57 (**)
	TGI	> 3,10	> 3,10	> 3,10	> 3,10
	LC ₅₀	> 3,10	> 3,10	> 3,10	> 3,10
4 b	GI ₅₀	> 2.90	> 2.90	> 2.90	> 2.90
	TGI	> 2.90	> 2.90	> 2.90	> 2.90
	LC ₅₀	> 2.90	> 2.90	> 2.90	> 2.90
4 c	GI ₅₀	> 3,25	> 3,25	> 3,25	> 3,25
	TGI	> 3,25	> 3,25	> 3,25	> 3,25
	LC ₅₀	> 3,25	> 3,25	> 3,25	> 3,25
4 d	GI ₅₀	> 3.04	> 3.04	> 3.04	> 3.04
	TGI	> 3.04	> 3.04	> 3.04	> 3.04
	LC ₅₀	> 3.04	> 3.04	> 3.04	> 3.04
4 e	GI ₅₀	> 2,74	> 2,74	> 2,74	> 2,74
	TGI	> 2,74	> 2,74	> 2,74	> 2,74
	LC ₅₀	> 2,74	> 2,74	> 2,74	> 2,74

Tabla 2.- Resultados de la evaluación biológica de los compuestos estudiados empleando los parámetros GI₅₀, TGI y LC₅₀ en las líneas de células tumorales de pulmón, colon, mama y páncreas. (*) Para concentración ensayada de 1.3 µg/mL en lugar de 10 µg/mL. (**) Para concentración ensayada de 8.3 µg/mL en lugar de 10 µg/mL.

Discusión

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de una nueva colección de derivados de 2-oxoindol para evaluar su efecto como agentes antitumorales, ampliando el estudio de su capacidad antitumoral a otras líneas celulares tumorales como son: mama, páncreas, pulmón y colon.

Los resultados revelan la falta de actividad antiproliferativa en las mencionadas líneas celulares para nuestro prototipo inicial **1** (**4 c**). El resto de los compuestos ensayados no han presentado una actividad antiproliferativa significativa salvo para el caso de **4 a**, en la que se observó una GI₅₀ = 0.402 · 10⁻⁵ M en línea MDA-MB-231 de cáncer de mama y una GI₅₀ = 2.57 · 10⁻⁵ M en línea PSN1 de cáncer de páncreas (tabla 2).

Desde un punto de vista de la estructura química, el compuesto **4 a** tan solo difiere en un átomo de cloro en lugar de un átomo de flúor con respecto al prototipo **1**. El hecho de que, entre los compuestos descubiertos, sólo presente actividad antiproliferativa el que más similitudes guarda con el prototipo **1**, lleva a pensar que la estructura en común de ambos pueda ser la responsable de dicho efecto. Por tanto, se puede plantear que además del núcleo de 2-oxoindol, la presencia de dos anillos aromáticos de tipo furano y benceno unidos a través de un grupo metileno a la posición C3 del 2-oxoindol junto con la presencia de un átomo de halógeno en esa misma posición son esenciales para ejercer una actividad antitumoral.

Como se comentaba en la introducción, el componente metabólico en células tumorales es un factor clave a tener en cuenta como posible causa de la aparición de la enfermedad. En este contexto, el prototipo **1** ha mostrado un interesante perfil como activador de AMPK (proteína kinasa activada por AMP) (*datos no mostrados*).

AMPK es la enzima reguladora del metabolismo energético por excelencia [14]. AMPK mantiene la homeostasis energética en respuesta a un estrés metabólico generado por ausencia de nutrientes, estrés oxidativo o una situación de hipoxia [15]. La activación de AMPK hace que, por ejemplo, se inhiba la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol, ya que AMPK activada fosforila e inhibe ACC (acetil-CoA carboxilasa) y HMG-CoA reductasa, lo que hace que se dificulte la supervivencia de las células tumorales que son muy proliferativas. Además, AMPK es capaz de inhibir la vía de señalización de Akt ya que facilita su desfosforilación, y dado que Akt está muy implicada en la progresión del ciclo celular y la supervivencia, AMPK es capaz así de causar un efecto antiproliferativo [16]. Por otra parte, en estudios de células de osteosarcoma se ha comprobado que AMPK es capaz de activar a p53, provocando alteraciones en el ciclo celular y desencadenando la apoptosis de la célula mediada por este gen supresor de tumores.

En nuestro caso, los ensayos de fosforilación de AMPK en PC-3 llevados a cabo con el prototipo **1**, confirmaron que este compuesto era capaz de inducir la fosforilación específica de AMPK. En estos ensayos, se determinaron los niveles de p-Thr172-AMPK y AMPK total y de p-ACC y ACC total, una proteína sustrato *downstream* de AMPK cuya fosforilación sirve como indicativo de la actividad de esta

kinasa. Las células humanas de cáncer de próstata PC-3 fueron tratadas con el prototipo **1** durante 1 h a 25 μ M. Los resultados mostraban un aumento significativo de los niveles de p-Thr172-AMPK y p-ACC con respecto a los valores control, lo cual es indicativo de la fosforilación de AMPK mediada por el compuesto ensayado.

Por tanto, a la vista del efecto antitumoral del prototipo **1** mediado a través de la activación de AMPK, y conociendo la gran similitud estructural que conserva con la propuesta **4 a** con efecto antiproliferativo en células tumorales de mama y páncreas, se podría plantear un posible mecanismo de acción para **4 a** a través de la activación de AMPK. Será necesario llevar a cabo estudios que permitan evaluar el efecto que tiene este compuesto sobre AMPK y sobre sus sustratos.

Por último, en cuanto a la optimización del proceso de síntesis, las nuevas condiciones de fluoración encontradas implican una doble mejora, por un lado, en cuanto a rendimientos con respecto a las condiciones de obtención iniciales, y, por otro lado, el empleo de alcaloides de *cinchona* y en concreto de cinchonina, permiten, además, introducir la posibilidad de inducir enantioselectividad en los productos finales. Además, las reacciones de cloración que conducen a la obtención del derivado **4 a**, han demostrado ser una alternativa sintética muy eficiente y limpia para la síntesis de nuevos derivados clorados.

Agradecimientos

El trabajo recogido en la presente Memoria ha sido desarrollado en el Instituto de Química Médica (IQM) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo gracias a la colaboración con los laboratorios Pharma Mar. Los experimentos de caracterización se realizaron en los servicios de apoyo a la investigación del IQM y del Centro de Química Orgánica Lora-Tamayo.

Referencias

1. Dang, C. V. 2012. Links between metabolism and cancer. *Genes and development*. 26(9): 877-890.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144(5): 646-674.
3. Brooks Robey, R.; Weisz, J.; Kuemmerle, N.; Salzberg, A. C.; Berg, A.; Brown, D. G.; Kubik, L.; Palorini, R.; Al-Mulla, F.; Al-Temaimi, R.; Colacci, A.; Mondello, C.; Raju, J.; Woodrick, J.; Scovassi, A. I.; Singh, N.; Vaccari, M.; Roy, R.; Forte, S.; Memeo, L.; Salem, H. K.; Amadei, A.; Hamid, R. A.; Williams, G. P.; Lowe, L.; Meyer, J.; Martin, F. L.; Bisson, W. H.; Chiaradonna, F.; Ryan, E. P. 2015. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis*. 36(1): 203-231.
4. Zhou, X.; Chen, J.; Gao, Y.; Deng, M.; Hao, L.; Liang, M.; Shi, B.; Fu, X.; Chen, Y.; Chen, L.; He, Z.; Wang, J.; Liu, J. 2015. Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1 through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 7(1): 873-884.
5. Dandapani, M.; Hardie, D. G. 2013. AMPK: opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells? *Biochem. Soc. Trans.* 41(2): 687-693.
6. Formentini, L.; Martínez-Reyes, I.; Cuezva, J. M. 2010. The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB Life*. 62(7): 554-560.
7. Yan, M.; Gingras, M.; Dunlop, E. A.; Nouët, Y.; Dupuy, F.; Jalali, Z.; Possik, E.; Coull, B. J.; Kharitidi, D.; Dydensborg, A. B.; Faubert, B.; Kamps, M.; Sabourin, S.; Preston, R. S.; Davies, D. M.; Roughead, T.; Chotard, L.; van Steensel, M. A. M.; Jones, R.; Tee, A. R.; Pause, Arnim. 2014. The tumor suppressor folliculin regulates AMPK-dependent metabolic transformation. *The Journal of Clinical Investigation*. 124(6): 2640-2650.
8. Guo, F., Liu, S.-Q., Gao, X.-H., Zhang, L.-Y. 2016, AICAR induces AMPK-independent programmed necrosis in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 474(2): 277-283
9. Bouderat Duvold, L. M. E.; Fensholdt, J.; Nielsen, S. F.; Liang, X.; Havez, S. E.; Andersson, E. C.; Jensen, L.; Hansen, J. R. 2005. Novel therapeutic uses of indolinone derivatives. Patent. WO2005/58309, Leo Pharma A. S.
10. McGovern, S. L.; Caselli, E.; Grigorieff, N.; Shoichet, B. K. 2002. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *Journal of Medicinal Chemistry*. 45(8):1712-1722.

11. Suthar, S. K.; Bansal, S.; Alam, M. M.; Jaiswal, V.; Tiwari, A.; Chaudhary, A.; Alex, A. T.; Joseph, A. 2015. Design, synthesis, and biological evaluation of oxindole derivatives as antidepressive agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 25(22): 5281-5285.
12. Yano, J. K.; Denton, T. T.; Cerny, M. A.; Zhang, X.; Johnson E. F.; Cashman, J. R. 2006. Synthetic Inhibitors of Cytochrome P-450 2A6: Inhibitory Activity, Difference Spectra, Mechanism of Inhibition, and Protein Cocrystallization. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49(24): 6987-7001.
13. Shibata, N.; Suzuki, E.; Asahi, T.; Shiro, M. 2001. Enantioselective Fluorination Mediated by Cinchona Alkaloid Derivatives/Selectfluor Combinations: Reaction Scope and Structural Information for N-Fluorocinchona Alkaloids. *Journal of American Chemical Society*. 123(29): 7001-7009.
14. Chuang, H.; Chou, C.; Kulp, S. K.; Chen, C. 2014. AMPK as a Potential Anticancer Target – Friend or Foe? *Curr. Pharm. Des.* 20(15): 2607-2618.
15. Salminen, A.; Hyttinen, J. M. T.; Kaarniranta, K. 2011. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine*. 89(7): 667-676.
16. Dasgupta, B.; Chhipa, R. R. 2016. Evolving Lessons on the Complex Role of AMPK in Normal Physiology and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 37(3): 192-206.